

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	森合重誉
<p>学位論文題目</p> <p>Production of interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) and its role as an autocrine invasion factor in nasal natural killer (NK)/T-cell lymphoma cells (鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるIP-10の産生とそのオートクライン機序による浸潤因子としての役割)</p> <p>共著者名</p> <p>高原 幹、荻野 武、長門 利純、岸辺 幹、石井 秀幸、 片山 昭公、清水 則夫、原渕 保明</p> <p>掲載雑誌</p> <p>CLINICAL CANCER RESEARCH 15(22):6771-6779 (2009)</p> <p>研究目的</p> <p>鼻性NK/T細胞リンパ腫は鼻腔や硬口蓋といった頭頸部領域正中部に壊死性肉芽腫性病変を形成するNKまたは<math>\gamma\delta</math>T細胞由来の悪性リンパ腫である。局所浸潤や遠隔転移を急速にきたす予後不良の疾患であり、治療を念頭に置いた腫瘍特性の理解が早急に求められている。我々は、腫瘍細胞に Epstein-Barr virus (EBV) が感染していることを証明し(1)、さらにIL-9やIL-10などのサイトカインを通して直接、あるいは間接的に本疾患の発症や増殖に寄与することを明らかにしてきた(2)。最近、いくつかの悪性腫瘍において、種々のケモカインが腫瘍増殖、アポトーシス抑制、細胞浸潤能の亢進に関与することが報告されている(3)。しかし、本疾患におけるケモカインの検討は行われていない。</p> <p>本研究では本疾患の局所病変から樹立されたEBV陽性NK細胞株、NK細胞白血病などから樹立されたEBV陰性NK細胞株を用いてケモカインタンパクアレイを行い、発現に差の見られたinterferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10)に着目した。同様の細胞株を用いて培養上清におけるIP-10の発現を検討し、その受容体であるCXCR3の発現をフローサイトメーターにて検討した。さらに本腫瘍細胞におけるIP-10の機能を調べるため、腫瘍細胞増殖能をMTSアッセイにて、浸潤転移能をマトリゲルチャンバーによるinvasion assayにて検討した。さらに臨床検体におけるIP-10およびCXCR3の発現を検討するため、腫瘍組織標本で免疫組織化学染色を、治療前後の患者血清を用いELISAを施行した。</p>			

## 対 象・方 法

### 1. 細胞株と検体

細胞株においては、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫由来の EBV 陽性 NK 細胞株 SNK-1、SNK-6、SNK-8、NK 細胞白血病由来の EBV 陰性 NK 細胞株の KHYG-1 と NK-92、バーキットリンパ腫由来の EBV 陽性 B 細胞株 Raji を用いた。臨床検体は 2003 年から 2008 年にかけて旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科において鼻性 NK/T 細胞リンパ腫と診断された 10 症例（年齢 21 歳から 70 歳、中央値 53 歳）、男性 8 例、女性 2 例における鼻腔生検組織を用いた。臨床進行期分類は Ann Arbor 分類に基づいて行われ、全例が stage I であった。

### 2. ケモカインアレイ

SNK-6、SNT-8、KHYG-1 細胞株の培養上清を用いて、RayBio Human Chemokine Antibody Array 1 (RayBiotech) によるプロテインアレイを施行した。

### 3. ELISA 法

上記細胞株を培養し、24、48、72 時間後の培養上清において IP-10 の発現をサンドイッチ ELISA にて検討した。上述した対象患者において、治療前後の血清においても同様に IP-10 のサンドイッチ ELISA を行った。

### 4. フローサイトメリー

上記細胞株における細胞株表面の CXCR3 の発現を検討するため、同様の細胞株において FITC 標識抗 CXCR3 抗体を用いてフローサイトメリーを施行した。

### 5. MTS アッセイ

IP-10 の腫瘍細胞増殖への影響を調べるため、SNK-6 と KHYG1 における MTS アッセイを行った。外因性 IP-10、または IP-10 中和抗体存在下で 48 時間培養後、MTS 溶液を添加し吸光度を測定した。

### 6. Invasion アッセイ

IP-10 の腫瘍細胞浸潤への影響を調べるため、SNK-1、SNK6、KHYG1 におけるマトリゲルチャンバーを用いた Invasion アッセイを行った。外因性 IP-10 と細胞株をトップチャンバーに入れ、マトリゲルに浸潤した細胞数をカウントした。さらに IP-10 中和抗体や抗 CXCR3 抗体を同様に添加し、細胞浸潤に抑制が認められるか検討した。続いて SNK-6、KHYG-1 培養上清をトップチャンバーに入れ同様の実験を施行した。さらに SNK-6 上清に IP-10 中和抗体や抗 CXCR3 抗体を添加し、細胞浸潤に抑制が認められるか検討した。

### 7. *In Situ* hybridization と免疫組織化学染色

上記 10 症例の腫瘍組織標本のパラフィン包埋切片を用い、*In Situ* hybridization により EBV-encoded small nuclear early region type I (EBER1) の発現を、免疫組織化学染色にて EBV latent membrane protein 1 (LMP1) の発現を検討した。IP-10 およびそのレセプター CXCR3 の発現を検討するため、抗 IP-10、抗 CXCR3 抗体と抗 CD56 抗体における免疫組織化学二重染色を施行した。

### 8. 統計学的解析

2 因子間の検討には Mann-Whitney U 検定または Wilcoxon 検定を行った。いずれも  $p < 0.05$  を有意とした。

## 結 果

### 1. ケモカインアレイ

KHYG-1 の細胞培養上清と比較して、SNK-6、SNT-8 の細胞培養上清では IP-10 の発現強度がより強く認められた。Image J によって信号強度の定量を行ったところ、陽性コントロール信号と比べ SNK-6 は 2.808 倍、SNT-8 は 4.267 倍の信号強度を呈した。これに対し KHYG-1 のそれは陽性コントロールの 0.143 倍であった。

### 2. ELISA 法

SNK-6、SNT-8 および SNK-1 の細胞培養上清中に IP-10 が同定された。24時間、48時間、72時間後と経時的に濃度が増加していることから、それらの細胞株が IP-10 を産生していると考えられた。これに対し KHYG-1 および NK-92 の細胞培養上清中に IP-10 は同定されなかった。

### 3. フローサイトメトリー

SNK-1、SNK-6、SNT-8 に加え KHYG-1、NK-92 においても IP-10 の受容体である CXCR3 の発現を認めた。しかし Raji ではその発現を認めなかった。

### 4. MTS アッセイ

SNK-6、KHYG-1 のいずれも外因性 IP-10 添加による細胞増殖の亢進は見られなかった。同様に IP-10 中和抗体添加による増殖抑制も見られなかった。

### 5. Invasion アッセイ

SNK-1、SNK-6 および KHYG-1 のいずれも、添加した外因性 IP-10 の濃度に依存し浸潤細胞数が増加した。IP-10 中和抗体や抗 CXCR3 抗体存在下では、SNK-1、SNK-6 の細胞浸潤は抑制された。SNK-6 細胞培養上清を用いても、SNK-1、SNK-6 および KHYG-1 の浸潤細胞数は増加したが、KHYG-1 細胞培養上清では変化は見られなかった。さらに SNK-6 細胞培養上清に IP-10 中和抗体や抗 CXCR3 抗体を添加すると細胞浸潤は抑制された。

### 6. 臨床検体での解析

10 症例中 EBER1 の発現は全例で、LMP1 は 6 症例で陽性となった。また、CXCR3 または IP-10 と CD56 の二重染色では両者ともに 7 症例が陽性であった。IP-10 陽性 7 症例のうち 6 症例は LMP1 陽性であった。また、10 症例全例の治療前血清に IP-10 が同定され(81-1635pg/mL、中央値 521pg/mL)、その濃度は健常者と比べ(41-175pg/mL、中央値 83pg/mL)、有意に高値を示した( $p=0.01$ )。さらに治療後有意にその値は低下した( $P=0.01$ ; 84-278pg/mL、中央値 154pg/mL)。なお、LMP1 陽性 6 症例の血清 IP-10 値(150-1635pg/mL、中央値 698 pg/mL)は、陰性 4 症例(81-579pg/mL、中央値 258pg/mL)と比べ、有意に高値を示した( $P<0.05$ )。

## 考 案

IP-10 の主な生物学的役割はその主たる受容体である CXCR3 を発現している単球、活性化 T 細胞、NK 細胞を引き寄せることである。悪性腫瘍、特に造血器腫瘍ではホジキン病細胞や多発性骨髄腫細胞に IP-10 の発現が報告され、その機能としては骨髄腫細胞株で抗アポトーシス効果を持つこと、直腸癌細胞株で浸潤亢進に関与することが報告されている。今回の検討結果から IP-10 は鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株の増殖能には関与しなかったが、オートクラインにより浸潤能を亢進していることが示された。組織検体でも、IP-10 と CXCR3 は CD56 陽性腫瘍細胞で発現を認め、患者血清 IP-10 値は健常者より有意に高値であり、さらに治療後、劇的に低下した。この結果から、IP-10 は *in vitro* だけでなく *in vivo* でも浸潤因子として働いていることが示唆された。

本検討では EBV 陽性株のみから IP-10 が産生されており、EBV が IP-10 の産生に関与している可能性が高い。中でも EBV 由来癌原蛋白である LMP1 は IP-10 を誘導することが報告されている。今回直接的な検討は行ってないが、IP-10 を強く発現していた SNK-6、SNK-1、SNT-8 では LMP-1 も強発現しており、臨床検体においても IP-10 と LMP1 の発現に正の相関を認めた。従って本リンパ腫においても LMP1 が IP-10 の発現を亢進している可能性が考えられた。

我々は以前から局所における浸潤破壊性病変の程度が本リンパ腫の予後に影響を与えていることを報告している。従って IP-10 を分子生物学的、あるいは免疫学的に抑制し腫瘍浸潤を予防することは予後の改善に繋がると思われる。

## 結 論

1. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株に特異的に発現するケモカイン IP-10 をケモカインプロテインアレイにて同定した。
2. IP-10 の産生と、その受容体 CXCR3 の発現を ELISA、フローサイトメトリーにて確認した。
3. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株を IP-10、または抗 IP-10 中和抗体存在下で培養し、MTS assay により細胞増殖能を検討したが、変化は認められなかった。
4. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株を IP-10、培養上清、抗 IP-10 中和抗体存在下で培養し、Invasion assay により細胞浸潤能を検討したところ、IP-10 は浸潤能を亢進させ、その中和によりその亢進は抑制された。
5. 生検組織における免疫組学的検討にて、腫瘍細胞に IP-10 と CXCR3 の発現が認められた。
6. 患者血清における IP-10 の発現を ELISA 法にて検討したところ、高値を示し、治療後有意にその値は低下した。
7. 従って、IP-10 と CXCR3 によるオートクライン機構にて鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞は自らの浸潤能を亢進させている可能性が示唆された。

## 引用文献

1. Harabuchi Y, Yamanaka N, Kataura A, Imai S, Kinoshita T, Osato T. Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma. *Lancet* 335: 128–30. (1990)
2. Nagato, T. Kobayashi, H. Kishibe, K. Takahara, M. Ogino, T. Ishii, H. Oikawa, K. Aoki, N. Sato, K. Kimura, S. Shimizu, N. Tateno, M. Harabuchi, Y. Expression of interleukin-9 in nasal natural killer/T-cell lymphoma cell lines and patients. *Clin Cancer Res* 11: 8250-8257(2005)
3. Laurence AD. Location, movement and survival: the role of chemokines in haematopoiesis and malignancy. *Br J Haematol* 132: 255–67. (2006)

## 参考文献

1. Harabuchi Y, Takahara M, Kishibe K, Moriai S, Nagato T, Ishii. Nasal natural killer (NK)/T-cell lymphoma: clinical, histological, virological, and genetic features. *Int J Clin Oncol* 14:181-90. (2009)
2. Ogino T, Moriai S, Ishida Y, Ishii H, Katayama A, Miyokawa N, Harabuchi Y, Ferrone S. Association of immunoescape mechanisms with Epstein-Barr virus infection in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 120: 2401-10. (2007)

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	森合 重誉
<p>審査委員長 <u>立野 正敏</u> (印)</p> <p>審査委員 <u>張川 希之</u> (印)</p> <p>審査委員 <u>鳥本 悦宏</u> (印)</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Production of interferon-gamma-inducible protein-10(IP-10) and its role as an autocrine invasion factor in nasal natural killer (NK)/T-cell lymphoma cells</p> <p>(邦題：鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるIP-10の産生とそのオートクライン機序による浸潤因子としての役割)</p>			
<p>鼻性NK/T細胞リンパ腫はEBVの病因的関与が示唆される予後不良のリンパ腫であり、その増殖や浸潤には各種ケモカイン・ケモカイン受容体の関与が示唆される。論文提出者らは鼻性NK/T細胞リンパ腫培養株の検討からinterferon-gamma-inducible protein-10(IP-10)とIP-10の受容体であるCXCR3の発現亢進を見いだした。そこで細胞増殖、細胞浸潤にオートクライン機序が関与するかを検討した。まず、中和抗体を用いた検討で、当初考えられたIP-10とCXCR3を介したオートクライン機序による増殖は否定された。一方、マトリゲルを用いた遊走能の実験からIP-10添加で遊走能増加し、両者の中和抗体添加で抑制されたことから、IP-10とCXCR3は腫瘍の浸潤に関与していることが示された。さらに生検材料を用いた免疫染色で浸潤増殖を示す腫瘍細胞にIP-10とCXCR3が両者とも発現していた。患者血清をELISA法で調べるとIP-10の高値があり、治療に伴って低下がみられた。これらの結果から有効な治療法が少ない鼻性NK/T細胞リンパ腫に対し、IP-10とCXCR3を標的とした治療により血管親和性の強いリンパ腫の進展を抑制したり、リンパ管への浸潤を抑制することにより腫瘍の進展を押さえうる可能性が示され、臨床応用が期待される。</p> <p>論文の構成・手法も適切であり、また、論文提出者に対する試問審査においても、適切か</p>			

つ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。尚、本論文は既に2009年のClinical Cancer reserch誌(2009; 15: 6771-6779)に掲載済みである。