

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

耳鼻咽喉科免疫アレルギー (2007.09) 25巻2号:83～84.

鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株におけるIP-10の関与

森合重誉, 長門利純, 岸部 幹, 高原 幹, 荻野 武, 原湊
保明

16. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株における IP-10 の関与

森合重誉, 長門利純, 岸部 幹, 高原 幹, 荻野 武, 原渕保明

旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科

Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck

Moriai, S., Nagato, T., Kishibe, K., Takahara, M., Ogino, T., Harabuchi, Y.

Dept. of Otolaryngology, Asahikawa Medical College

1. はじめに

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫は頭頸部中心部における壊死性肉芽腫性病変を伴うリンパ増殖性の疾患である。多臓器への浸潤、破壊性の壊死病変を特徴とし、血球貪食症候群も高頻度に出現するため、その予後は極めて不良である¹⁾。本疾患の腫瘍細胞には Epstein-Barr Virus (EBV) DNA とその特異的発癌蛋白が同定されており²⁾、これに注目した診断や治療法の開発が期待されている。また最近、細胞遊走活性以外のケモカインの作用として血管新生促進や抑制作用が指摘されているものもあり、こうした腫瘍活性を特異的に制御できれば、疾患の治療に結びつけられることが期待される。そこで今回本疾患を含む複数の細胞株を用い、スクリーニングとしてケモカインアレイを行った。細胞株間で、EBV の存在の有無により発現に差の見られたケモカイン IP-10 (CXCL10) に着目し、その腫瘍活性について考察を試みたので報告する。

2. 対象と方法

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫株をはじめとして表 1 に示した 8 種の細胞株を対象とした。ケモカインアレイ; RayBio Human Chemokine Antibody Array I を用いた。ケモカイン抗体がプリントされたメンブレンをブロッキング処理し、サンプルを overnight で反応させた。ビオチン接合し

た一次抗体抗を反応させ、HRP 接合ストレプトアヴィジンでラベルし、同定バッファでフィルムに感光させた。RT-PCR: total RNA の抽出には Promega the SV total RNA Isolation Solution を用いた。cDNA ライブラリの合成には Gene-Hunter MMLV-RT, dNTP, および Perkin elmer Oligod (T) を用いた。RT-PCR には表 2 に示した primer を用い、以下のプロトコルで行った。①熱変性 94°C 10 分②熱変性 94°C 1 分③アニーリング Tm°C 1 分④伸長反応 72°C 1 分、②～④を cycle 数反復、⑤最終伸長反応 72°C 10 分 ELISA: R&D Quantikine Human CXCL10/IP-10 を用いた。各細胞株を 1 ウェルあたり 5×10⁴ の 4 乗個ずつ培養し、0, 24, 48, 72 時間後に回収した上清を試料とした。

3. 結果

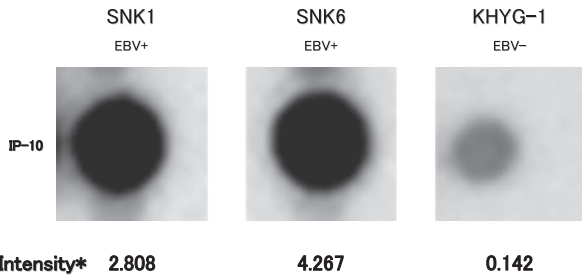
ケモカインアレイ結果に於いて、EBV 陽性株で発現、陰性株で発現していないケモカインとして、IP-10 に着目した。なおメンブレン間のシグナル標準化を Image J にて行った (図 1)。RT-PCR の泳動結果を図 2 に示す。EBV 陽性細胞株で IP-10 が陽性となった。IP-10 の主要なレセプタである CXCR3 については、Raji 以外の細胞株でバンドが得られ、ほかに IP-10 が接合するとされる CCR3 についてはどの細胞株でも陽性所見は得られなかった。図 3 に培養上清中の IP-10 を時系列に ELISA 法にて定量した結果を示す。EBV 陽性株は経時的に IP-10 を産生していることが明かとなった。なお陰性株では産生は見られなかった。

4. 考察

IP-10 は CXC ケモカインに分類され、外来病原体の侵入の際に、単球、マクロファージ、B 細胞、線維芽細胞などから産生され、T 細胞、NK 細胞の走化性を増大させる³⁾。Th1 疾患に於いては標的臓器へ Th1 を遊走、集積し生体防御に寄与し (Narumi, S., Yoneyama, H. 2002), また血管新生抑制 (Angiolillo, 1995) により腫瘍組織の壊死誘導を計るとされる。細胞株にとって、その生存上、都合が悪いケ

表 1

cell line	origin	phenotype	EBV
SNK1	nasal NK/T cell lymphoma	NK	+
SNK6	nasal NK/T cell lymphoma	NK	+
SNT8	nasal NK/T cell lymphoma	γδT	+
KAI3	severe chronic active EBV infection	NK	+
Raji	Burkitt's lymphoma	B	+
KHYG-1	aggressive NK cell leukemia	NK	-
NK-92	non Hodgkin's lymphoma	NK	-



*: ImageJによる解析. ポジティブ・コントロールに対する濃度比.

図1 RayBio Human Chemokine Antibody Array I 結果 (抜粋)

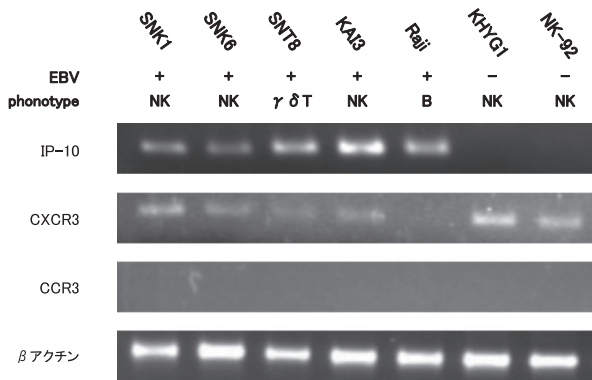


図2 RT-PCR 結果

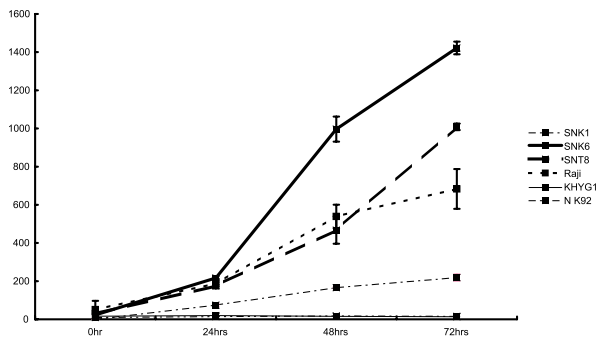


図3

モカインを何故細胞株自身が産生しているのか、リンパ腫細胞株に発現していることの意義が不明といえる。すなわち疾患細胞株に於いては、IP-10が本来の抗腫瘍効果と相容れない働きをしている可能性があることが予想される。鼻性NK/T細胞リンパ腫では、多彩なリンパ球浸潤、壊死組織像の形成に関与している可能性も考えられる。

参考文献

- 1) 原測保明, 高原 幹: 鼻性NK/T細胞リンパ腫のEBウイルス学的, 分子腫瘍学的解析. 耳鼻免疫アレルギー 24: 1-9, 2006.
- 2) Harabuchi, Y., Yamanaka, N., et al.: Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma. Lancet 335: 128-130, 1990.
- 3) Loetscher, M., Gerber, M., et al.: Chemokine receptor specific for IP10 and Mig: Structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. J. Exp. Med. 184: 963-969, 1996.
- 4) Furukawa, M.: Detection of Epstein-Barr virus gene production, p53 and bcl-2 protein in non-endemic nasopharyngeal carcinoma.: Epstein-Barr virus and human cancer, ed by Osato, T., Takada, K., et al. Japan Scientific Societies Press: pp 109-116, 1997.