

## 学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	吉野和美
-------	-----	-----	------

### 学 位 論 文 題 目

Expression of CD70 in nasal natural killer (NK)/T-cell lymphoma cell lines and patients; its role for cell proliferation through binding to soluble CD27

(邦題：鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるCD70の発現；  
可溶性CD27結合を介した細胞増殖への関与)

#### 共著者名

岸部 幹、長門 利純、上田 征吾、駒林 優樹、高原 幹、原渕 保明

#### 掲載雑誌名

(British Journal of Haematology ; February 2013, Volume 160, Issue 3, 331-342 掲載)

#### I. 研究目的

鼻性NK/T細胞リンパ腫は、鼻腔や咽頭に初発し、顔面正中部に沿って進行する破壊性、壊死性の肉芽腫性病変が特徴で腫瘍の起源として、NK細胞あるいは $\gamma\delta$ T細胞由来があり、その発症にはEpstein-Barr virus (EBV) が関与するとされている。また、本疾患に対する治療については、分子特異的な治療もまだ開発されてはおらず、未だに従来の化学療法と照射が治療の中心である。さらに本腫瘍は、化学療法に対して多剤耐性であるため、その効果が十分ではなく、多臓器不全も併発し予後は極めて不良である。よって、治療を念頭に置いた腫瘍特性の解明が早急に求められている。また、CD70は上咽頭癌、ホジキン病といったEBウイルス関連腫瘍における発現が報告されている。また、CD70陽性腫瘍であるホジキン病を含む悪性リンパ腫や腎細胞癌などではCD70を標的とする抗体療法の可能性が示されている。しかし、本疾患におけるCD70の検討は行われていない。

本研究では、はじめに、本腫瘍で特異的に発現亢進を認める遺伝子を同定するため、本疾患患者の鼻腔病

変部より樹立されたSNK6とSNT8の2細胞株(1)を用いてcDNA array解析を行った。その結果、SNK6とSNT8で特異的にCD70mRNAの発現が亢進していることを見いだした。本研究では、さらに鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株におけるCD70の役割および患者検体での発現、CD70の抗体療法の可能性に関して検討した。

## 1. 患者検体

2003年から2011年までに旭川医大耳鼻咽喉科・頭頸部外科で鼻性NK/T細胞リンパ腫と診断された21名の患者検体(組織、血清)を使用した。および健康人7名より得られた検体を用いた。全検体はインフォームドコンセントを得た後、治療前に採取された。

## 2. 細胞株

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SNK1、SNK6、 $\gamma\delta$ T細胞株SNT8、慢性活動性EBV感染由来のEBV陽性NK細胞株KAI3、NK細胞白血病由来のEBV陽性NK細胞株YT、NK細胞白血病由来のEBV陰性NK細胞株NK92、T細胞性白血病由来のEBV陰性T細胞株Jurkat、MOLT4およびPEER、バーキットリンパ腫由来のEBV陽性B細胞株Rajiを用いた。

## 3. cDNA array

SNK6、SNT8、健康人より分離した末梢血単核球(PBMC)、NK92よりtotal RNAを抽出後、逆転写反応時にランダムプライム法にて<sup>32</sup>P標識を行いcDNAプローブを作製した。それらをAtlas Human Cancer 1.2 Array(Clontech社製)にハイブリダイズさせ、BAS2000システム(富士写真フィルム社製)にて各遺伝子スポットを数値化し、各細胞株間での遺伝子発現を比較した。

## 4. Reverse transcription (RT)-PCR

各細胞株と末梢血単核球(PBMC)においてCD70、CD27の発現を検討した。内部標準として $\beta$ -2ミクログロブリンを用いた。

## 5. Western blot analysis

ウイルス抗原であるLMP-1についてS12抗体(抗LMP-1モノクローナル抗体)を用いて解析した。コントロールとして $\beta$ アクチンを使用した。

## 6. Flow cytometry

上記細胞株における細胞株表面のCD70、CD27の発現を検討するため、同様の細胞株においてPE標識抗CD70抗体、FITC標識抗CD27抗体を用いてFlow cytometryを施行した。

## 7. MTS assay

CD27の腫瘍細胞増殖への影響を調べるため、SNK6、SNK1、NK92、Rajiに対してrecombinant CD27で刺激しMTS assayを行った。次にCD27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。

## 8. CDC活性

鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株でのCDC活性を調べるため、SNK6、SNK1、SNT8、NK92、Rajiに活性化補体、

不活化補体をいれMTS assayを行った。

## 9. ELISA

細胞株培養上清と患者血清中のCD27蛋白を定量した。可溶性CD27 ELISA Kit (Sanquin社製) を用いて測定した。

## 10. 免疫組織染色

生検材料のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いてCD70およびCD56の二重免疫染色を行った。抗CD70抗体 (R&D 社製) を一次抗体として用い、ENVISION+ ポリマー試薬とDAB基質キット (共にDAKO社製) を使用して一次染色を行った。次に、抗CD56抗体 (Novocastra社製) を一次抗体として用い、ENVISION/AP ポリマー試薬とFast Red (共にDAKO社製) を使用して二次染色を行った。CD70とCD56共陽性の細胞が25%以上を占める症例をCD70 陽性症例とした。

### 11. 統計学的解析

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

## III. 結果

### 1. 鼻性NK/T 細胞リンパ腫細胞株におけるCD70の発現解析

cDNA array 解析の結果、CD70がSNK6、SNT8でPBMC、NK92より有意に発現が上昇している遺伝子のひとつとして認められた。CD70はPBMCと比較するとSNK6で6.43倍、SNT8で2.12倍の発現上昇を認め、NK92と比較するとSNK6で8.71倍、SNT8で2.87倍の発現上昇を認めた。CD70が鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株に特異的に発現しているかどうかを確かめるために、SNK6、SNT8、PBMCおよび他の細胞株におけるCD70の発現をRT-PCRを用いて解析した。その結果、鼻性NK/T細胞株であるSNK6、SNT8、SNK1、他のNK細胞株であるKAI3、B細胞株であるRajiでCD70 mRNAの発現を認めたが、PBMCとNK細胞株であるYT、NK92、T細胞株Jurkat、MOLT4、PEERでは発現を認めなかった。Flow cytometryにて細胞表面上の発現を検討した。その結果、RT-PCRと同様の結果であった。Western blotにてLMP-1についても解析したところ、EBER-1陽性細胞株であるSNK6、SNT8、SNK1、KAI3、Rajiで発現を認めた。

### 2. 鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株におけるCD27の発現解析

RT-PCR、Flow cytometry共にSNK6、SNT8、SNK1、KAI3、YT、NK92では発現を認めず、Rajiでは発現を認めた。

### 3. 鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株におけるCD27刺激に対する細胞増殖能の解析

鼻性NK/T細胞株であるSNK6、SNK1、positive controlであるRaji、negative controlであるNK92について recombinant CD27刺激で細胞が増殖するかアポトーシスをおこすか検討した。結果SNK6、SNK1、Rajiで濃度依存性に増殖し、CD27 1.0  $\mu\text{g/ml}$  で有意差を認めた。CD70が発現していないNK92では増殖は認めなかった。次にCD27中和抗体を添加しMTS assayにて生細胞数を測定した。その結果、SNK6、SNK1でCD27中和抗体の濃

度依存性に減少した。Raji、NK92では減少は見られなかった。

#### 4. 鼻性NK/T細胞リンパ腫患者におけるCD70の発現解析

鼻性NK/T細胞リンパ腫患者21名からの生検材料を用いてCD70とCD56の二重免疫染色を行った。その結果、21名中7名（33%）で発現を認めた。次に、鼻性NK/T細胞リンパ腫患者血清中のCD27を測定した。その結果、鼻性NK/T細胞リンパ腫患者8名より採取した血清と健常人7名より採取した血清ではリンパ腫患者の方が有意に血清CD27値の上昇を認めた。

#### 5. 鼻性NK/T細胞リンパ腫患者における抗CD70抗体によるCDC活性の測定

鼻性NK/T細胞株であるSNK6、SNK1、SNT8、positive controlであるRaji、negative controlであるNK92に、抗CD70抗体、活性化補体、不活化補体を添加しMTS液を用いて吸光度計で測定した。結果SNK6、SNK1、SNT8、Rajiで抗CD70抗体と活性化補体を添加したもので有意差をもって減少し、CD70が発現していないNK92では変化を認めなかった。

### IV. 考案

本研究では、cDNA array 解析により鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株であるSNK6とSNT8でCD70の発現が上昇していた。CD70は、tumor necrosis factor super family member 7であり、CD27のリガンドである。CD27は、正常細胞では静止期のT細胞とNK細胞、memory B細胞に発現を認め、CD70は活性化T・B細胞等限られた細胞にのみ発現する。CD70の発現についてRT-PCRとFlow cytometryにより解析すると、鼻性NK/T細胞株であるSNK6、SNT8、SNK1でCD70mRNAの発現を認めた。これらはいずれもEBV陽性でありLMP-1陽性細胞株であった。CD70は上咽頭癌、ホジキン病といったEBウイルス関連腫瘍における発現が報告されており、LMP-1による発現誘導が示唆されており、本腫瘍でも同様にLMP-1がCD70の発現に関与している可能性が示唆された。またCD27の発現解析では、RT-PCR、Flow cytometry共に鼻性NK/T細胞株であるSNK6、SNT8、SNK1では発現を認めなかった。

従来CD70はリガンドであり、CD27に作用を及ぼすと考えられていたが、Lensらは慢性リンパ球性白血病細胞株においてCD70にはreverse signalingが存在し、レセプターのようにも働くことを報告している(2)。CD70とCD27が結合し、CD70陽性の腫瘍細胞が増殖するとしている。鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株でもこのようなことが起こるのかどうかMTS assayにより検討を行った。その結果、鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株である、SNK6、SNK1において、有意差をもって濃度依存性に増殖を示した。更に中和抗体を添加するとその増殖が抑制された。よって鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株にもreverse signalingが存在すると考えられる。

鼻性NK/T細胞リンパ腫と診断された21症例の臨床組織検体を用いてCD70とNK細胞のマーカーであるCD56とで2重免疫染色にて検討した。21例中7例(33.3%)において発現を認めた。また血清を用いたELISA法による血清CD27の検討では、CD27が健常人より鼻性NK/T細胞リンパ腫で有意差をもって高かった。鼻性NK/T細胞リンパ腫で可溶性CD27が血清に高値である理由は、今後の検討が必要であるが、患者血清中の

可溶性 CD27 が本腫瘍の腫瘍増殖に関与している可能性が考えられた。

2005 年の Israel らは、バーキットリンパ腫において、抗 CD70 抗体による補体依存性細胞障害活性について検討を行った。その結果、EBV 陽性 CD70 陽性の細胞株の減少を認め、抗体療法の可能性を示した。鼻性 NK/T 細胞リンパ腫においても、抗 CD70 抗体による補体依存性細胞障害活性を認めた。CD70 の発現は活性化 T 細胞 B 細胞と限られた細胞にしか発現しておらず、抗体療法としては有利な分子と考えられ、今後の治療への発展が期待される結果であった。

## V. 結論

1. cDNA array により、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株で CD70 の遺伝子発現が上昇していることを見いだした。
2. CD70 は鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株を含む EB ウイルス陽性 LMP-1 陽性細胞株において発現が認められた。
3. CD70 のリガンドである CD27 の発現は鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株では認められなかった。
4. 臨床組織検体を用いた免疫染色においても CD70 の腫瘍細胞での発現を確認した。
5. 正常人と比べ鼻性 NK/T 細胞リンパ腫患者血清において、可溶性 CD27 の有意な上昇を認めた。
6. CD27 刺激では、CD70 陽性鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株において増殖を示した。
7. 抗 CD70 抗体刺激における CDC 活性では鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株では、減少傾向を示した。
8. 以上の結果から、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫では、CD70 の発現を認め、CD70 は腫瘍細胞の増殖に関与していると考えられた。また、本腫瘍では抗 CD70 抗体による補体依存性細胞障害活性を認め、抗体療法の可能性が示唆された。

## VI. 引用文献

1. Nagata H, Konno A, Kimura N, Zhang Y, Kimura M, Demachi A, Sekine T, Yamamoto K, and Shimizu N. Characterization of novel natural killer (NK)-cell and gammadelta T-cell lines established from primary lesions of nasal T/NK-cell lymphomas associated with the Epstein-Barr virus. *Blood* 97: 708-713, 2001.
2. Lens S.M, Drillenburg P, den Drijver B.F, van Schijndel G, Pals S.T, van Lier R.A. and van Oers M.H. Aberrant expression and reverse signalling of CD70 on malignant B cells. *Br J Haematol*, 106, 491-503, 1999.
3. Israel B.F, Gulley M, Elmore S, Ferrini S, Feng W.H. and Kenney S.C. Anti-CD70 antibodies: a potential treatment for EBV+ CD70-expressing lymphomas. *Mol Cancer Ther*, 4, 2037-2044, 2005.




## VII. 参考文献

1. 吉野和美、片田彰博、片山昭公、高原 幹、國部 勇、林 達哉、畑山尚生、金谷健史、原洵保明. 当

科における鼻副鼻腔内反性乳頭腫35症例の治療成績. 日鼻誌 49, 132-137, 2010.

2. 吉野和美、原淵保明. 【耳鼻咽喉科・頭頸部外科の看護技術2011】救急外来での看護 3)急性扁桃炎、扁桃周囲膿瘍. JOHNS 27, 437-440, 2011.

## 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	吉野 和美
審査委員長 小林 博也 			
審査委員 鳥本 悦宏 			
審査委員 東 寛 			
学 位 論 文 題 目			
<p style="text-align: center;">                     Expression of CD70 in nasal natural killer (NK)/T-cell lymphoma cell lines and patients; its role for cell proliferation through binding to soluble CD27                      (鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における CD70 の発現；                      可溶性 CD27 結合を介した細胞増殖への関与)                 </p> <p style="text-align: center;">                     British Journal of Haematology 160: 331-342(2013)に掲載済                 </p>			
<p> <b>[目的]</b> 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫は、多臓器不全も併発し予後は極めて不良である。治療を念頭に置いた腫瘍特性の解明が早急に求められている。本研究では、本腫瘍で特異的に発現亢進を認める遺伝子を同定するため、本疾患患者の鼻腔病変部より樹立された細胞株を用いて cDNA array 解析を行った。その結果、特異的に CD70mRNA の発現が亢進していることを見いだした。さらに鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株における CD70 の役割および患者検体での発現、CD70 の抗体療法の可能性に関して検討した。                 </p> <p> <b>[方法]</b> cDNA array にて各細胞株間での遺伝子発現を比較した。RT-PCR で CD70、CD27 の発現を検討した。細胞株表面の CD70、CD27 の発現を検討するため、Flow cytometry を施行した。LMP-1 の解析については Western Blot を用いた。CD27 の腫瘍細胞増殖への影響を調べるため MTS assay を行った。CDC 活性を調べるため、MTS assay を施行した。細胞株培養上清と患者血清中の CD27 蛋白を ELISA にて定量した。CD70 および CD56 の二重免疫染色を行った。                 </p>			

[結果] 1. cDNA array により、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株で CD70 の遺伝子発現が上昇していることを見いだした。2. CD70 は鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株を含む EB ウイルス陽性 LMP-1 陽性細胞株において発現が認められた。3. CD70 のリガンドである CD27 の発現は鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株では認められなかった。4. 臨床組織検体を用いた免疫染色においても CD70 の腫瘍細胞での発現を確認した。5. 正常人と比べ鼻性 NK/T 細胞リンパ腫患者血清において、可溶性 CD27 の有意な上昇を認めた。6. CD27 刺激では、CD70 陽性鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株において増殖を示した。7. 抗 CD70 抗体刺激における CDC 活性では鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株では、減少傾向を示した。

[要約] 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫では、CD70 の発現を認め、CD70 は腫瘍細胞の増殖に関与していると考えられた。また、本腫瘍では抗 CD70 抗体による補体依存性細胞障害活性を認め、抗体療法の可能性が示唆された。

論文提出者は、各審査委員からの当該論文に対する質問に的確に答え、また関連領域に関する知識も十分に有することが確認された。内容も独創的でデータ解析も十分なされていた。更に、本論文は、国際的な英文雑誌、**British Journal of Hematology** 誌 160: 331-342 (2013) に掲載済みである。

以上より当審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位に値するものと判断した。