

鼻性 T/NK 細胞リンパ腫における  
腫瘍分子生物学的, 免疫遺伝子学的,  
EBウイルス学的解析

(研究課題番号 11470353)

平成11年度～平成13年度 科学研究費補助金

(基盤研究B(2))

研究成果報告書

平成14年3月

研究代表者 原 洸 保 明

旭川医科大学耳鼻咽喉科学講座

## 目次

はじめに	2
研究組織	3
研究経費	3
研究発表	
学会誌発表	4
口頭発表	6
出版物	8
研究成果	9

## はじめに

研究代表者 原 洸 保 明

(旭川医科大学耳鼻咽喉科学講座)

鼻性 T/NK 細胞リンパ腫 nasal T/NK-cell lymphoma 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の壊死性肉芽腫性病変を主体とする予後の不良な悪性疾患に対する新しい疾患概念である。歴史的には、その臨床的特徴から進行性鼻壊疽 rhinitis gangrenosa progressiva、致死性正中肉芽腫症 lethal midline granuloma、悪性肉芽腫 malignant granuloma などの名称で呼ばれていた。一方、病理組織学的見地からは多形細網症 polymorphic reticulosis と呼ばれるなど、多種多様の名称がつけられ、混乱を招いていた。したがって、その本態や病因については不明な点が多く、免疫組織学的解析から研究分担者の青笹らは組織球由来の悪性組織球症であることを唱え (J Pathol 138:241-9, 1982; Cancer 58:1281-5, 1986)、一方、研究代表者の原洸らは単クローン抗体を用いた免疫組織学的に T 細胞リンパ腫であることを報告した (Cancer 56:768-76, 1985; Cancer 70:835-9, 1992; 日耳鼻 95:1834-9, 1992)。しかし、その後、原洸らおよび青笹らが各自で行った研究 (Cancer 75:894-901, 1995; Cancer 77:2137-49, 1996; Int J Cancer 70:9-13, 1997) により、本症の本態は T 細胞または NK 細胞が腫瘍化したリンパ腫であることが認められ、鼻性 T/NK 細胞リンパ腫の名称が汎用されるに至った。

病因的には、原洸らが 1990 年に本疾患に EB ウイルスの DNA と発癌蛋白を検出されたことを報告 (Lancet 335:128-30, 1990) した後、青笹らも本疾患と EB ウイルスの密接な関連性を報告し (Cancer 73:3041-6, 1994; Lab Invest 73:190-6, 1995)、現在では EB ウイルス関連悪性腫瘍の代表的疾患のひとつとして認識されるに至った。

さらに疫学的には青笹、古謝らは本疾患の発生頻度が中国、韓国および日本などの東アジアに多く、さらに本邦では沖縄に多いなど地域性と人種に偏りがあることを報告した (Int J Cancer 44:63-6, 1989; Int J Cancer 52:673-4, 1992; Jpn J Cancer Res 85:384-8, 1994; Cancer 73:3041-6, 1994)。

本研究はこれまでの研究をさらに進めて、本疾患を腫瘍分子生物学的、免疫遺伝子学的、EB ウイルス学的に解析し、その発症病態を探ると共に、臨床像との関連性を検討し、遺伝子療法や特異的免疫療法など本疾患に対する効果的治療法の開発へ結びつけることを目的とした。

## 研究組織

### 研究代表者

原淵保明（旭川医科大学教授・耳鼻咽喉科学）

### 研究分担者

青笹克之（大阪大学医学部大学院教授・病理病態学）	平成 11-13年度
古謝静男（琉球大学医学部講師・耳鼻咽喉科学）	平成 11-13年度
萩野 武（旭川医科大学助手・耳鼻咽喉科学）	平成 11 年度
小林吉史（旭川医科大学講師・耳鼻咽喉科学）	平成 11-12年度
坂東伸幸（旭川医科大学助手・耳鼻咽喉科学）	平成 12-13年度
高原 幹（旭川医科大学助手・耳鼻咽喉科学）	平成 12-13年度
野中 聡（旭川医科大学助教授・耳鼻咽喉科学）	平成 13 年度

### 研究協力者

長峯正泰（旭川医科大学附属病院医員・耳鼻咽喉科）	平成 12 年度
岸部 幹（旭川医科大学附属病院医員・耳鼻咽喉科）	平成 12-13年度

## 研究経費

平成 11 年度	11,000 千円
平成 12 年度	1,700 千円
<u>平成 13 年度</u>	<u>2,200 千円</u>
計	14,900 千円

## 研究発表

### 1) 学会誌

1. Ohsawa M, Nakatsuka S, Kanno H, Miwa H, Kojya S, Harabuchi Y, Yang WI, Aozasa K. Immunophenotypic and genotypic characterization of nasal lymphoma with polymorphic reticulosis morphology. *Int J Cancer* 81: 865-870, 1999.
2. Ohsawa M, Shingu N, Inohara H, Kubo T, Yang WI, Yoon JH, Aozasa K. Chronological changes in incidences of polymorphic reticulosis in Korea and Japan. *Oncology* 56: 202-207, 1999.
3. Takakuwa T, Li T, Kanno H, Nakatsuka S, Aozasa K. No evidence of replication error phenotype in nasal NK/T cell lymphoma. *Int J Cancer* 84: 623, 1999.
4. 山口治浩, 平尾元康, 原渕保明, 形浦昭克, 王鉄, 張玉富. 中国東北部と北海道の頭頸部悪性腫瘍におけるEBウイルス学的研究 —上咽頭癌における癌関連蛋白質の発現—. *耳喉頭頸* 71: 440-444, 1999.
5. Kanno H, Nakatsuka S, Iuchi K, Aozasa K. Sequences of cytotoxic T-lymphocyte epitopes in the Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen-3B gene in a Japanese population with or without EBV-positive lymphoid malignancies. *Int J Cancer* 88: 626-632, 2000.
6. Li T, Hongyo T, Syaifudin M, Nomura T, Dong Z, Shingu N, Kojya S, Nakatsuka S, Aozasa K. Mutations of the p53 gene in nasal NK/T-cell lymphoma. *Lab Invest* 80: 493-499, 2000.
7. 小林吉史, 荻野武, 林達哉, 野中聡, 原渕保明. 頭頸部非ホジキン悪性リンパ腫の予後因子の検討. *日耳鼻* 103: 761-769, 2000.

8. Hongyo T, Li T, Syaifudin M, Baskar R, Ikeda H, Kanakura Y, Aozasa K, Nomura T. Specific c-kit mutations in sinonasal natural killer/T-cell lymphoma in China and Japan. *Cancer Res* 60: 2345-2347, 2000.
9. Kanno H, Kojya S, Li T, Ohsawa M, Nakatsuka S, Miyaguchi M, Harabuchi Y, Aozasa K. Low frequency of HLA-A\*0201 allele in patients with Epstein-Barr virus-positive nasal lymphomas with polymorphic reticulosis morphology. *Int J Cancer* 87: 195-199, 2000.
10. 原渕保明. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の病態と臨床. *耳鼻臨床* 93: 341-352, 2000.
11. 原渕保明. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の臨床的・EBウイルス的解析. *血液・腫瘍科* 40: 576-583, 2000.
12. 原渕保明. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の臨床像とEBウイルスとの関連性. *血液・腫瘍科* 41: 297-298, 2000.
13. 坂東伸幸, 小林吉史, 荻野武, 高原幹, 野中聡, 原渕保明, 三代川齊之. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の臨床的検討. *耳喉頭頸* 72: 880-886, 2000.
14. 原渕保明. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫. *JOHNS* 16: 1408-1409, 2000.
15. Kojya S, Matsumura J, Ting L, Hongyo T, Inazawa J, Kirihata M, Aozasa K. Familial nasal NK/T-cell lymphoma and pesticide use. *Am J Hematol* 66: 145-147, 2001.

## 2) 口頭発表

1. 小林吉史, 林達哉, 野中聡, 高橋光明, 川堀慎一, 原渕保明, 吉田弘, 油野民雄. 当科における悪性リンパ腫の臨床統計. 第23回日本頭頸部腫瘍学会. 千葉. 1999, 6.17.
2. 後藤孝, 小林吉史, 野中聡, 高橋光明, 川堀眞一, 原渕保明. 当科におけるリンパ組織外初発悪性リンパ腫の臨床統計. 第61回耳鼻咽喉科臨床学会. 別府. 1999, 6.25-26.
3. 原渕保明. 鼻性NK/T細胞リンパ腫の臨床的・EBウイルス的解析. 第58回日本癌学会. ワークショップ1「頭頸部悪性腫瘍における基礎と臨床の接点を探る」. 広島. 1999, 9月29日-10月1日.
4. 坂東伸幸, 荻野武, 半谷公彦, 小林吉史, 原渕保明. 進行性鼻壊疽症例の再検討. 第38回日本鼻科学会. 千葉. 1999, 10.2.
5. 原渕保明. 鼻腔原発悪性リンパ腫の臨床像とEBウイルス. 第2回北海道ウイルス感染症セミナー. 札幌. 1999, 11月20日.
6. 長峯正泰, 高原幹, 坂東伸幸, 岸部幹, 原渕保明. 鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるEBウイルス遺伝子塩基配列の検討. 第18回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 金沢. 2000, 3.24-25.
7. 原渕保明. 鼻性NK/T細胞リンパ腫の病態と臨床. 第5回NK腫瘍研究会. 東京. 2000, 4月1日.
8. Harabuchi Y. Nasal NK/T-cell lymphomas - Clinical, molecular pathologic features and association with Epstein-Barr virus .-.Research lecture in Cildren's Hospital of Buffalo. Buffalo, USA. 2000, September, 19.

9. Nagamine M, Bandoh N, Takahara M, Harabuchi Y. Sequence analysis of EBV genes in nasal NK/T cell lymphoma. The Nose 2000 And Beyond. Washington DC, USA. 2000, September 20-23.
10. Harabuchi Y, Bandoh N, Yamaguchi H, Takahara M, Nagamine M, Kobayashi Y, Kataura A. Epstein-Barr virus detection and prognostic factors of nasal NK/T-cell lymphomas. The Nose 2000 And Beyond. Washington DC, USA. 2000, September 20-23.
11. 高原幹, 坂東伸幸, 岸部幹, 長峯正泰, 今田正信, 林達哉, 小林吉史, 野中聡, 原渕保明. 鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるp53遺伝子の解析. 第39回日本鼻科学会. 金沢. 2000, 9.28-30.
12. 原渕保明. 鼻腔悪性リンパ腫とEBウイルス. 第4回愛媛ヘルペス研究会. 松山市. 2001, 2月3日.
13. 原渕保明. 鼻性NK/T細胞リンパ腫の病態と臨床像. 第5回釧路血液病セミナー. 釧路市. 2001, 2月16日.
14. 高原幹, 坂東伸幸, 岸部幹, 今田正信, 林達哉, 小林吉史, 野中聡, 原渕保明. 鼻性NK/T細胞リンパ腫における $\beta$ -カテニン遺伝子の解析. 第19回日耳鼻免疫アレルギー学会. 大阪. 2001, 2.22-24.
15. 原渕保明. 鼻性NK/T細胞リンパ腫とEBウイルス. 第16回東海ヘルペス研究会. 名古屋. 2001, 3月31日.
16. Nagamine M, Bandoh N, Takahara M, Harabuchi Y. Sequence analysis of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 in nasal NK/T-cell lymphoma. Epstein-Barr virus and human cancer. The 21st International Symposium of the Sapporo Cancer Seminar Foundation. Sapporo. 2001, July 4-6.
17. Nagamine M, Bandoh N, Takahara M, Harabuchi Y. Sequence analysis of

Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-2a in nasal NK/T-cell lymphoma. Epstein-Barr virus and human cancer. The 21st International Symposium of the Sapporo Cancer Seminar Foundation. Sapporo. 2001, July 4-6.

18. 高原幹, 岸部幹, 坂東伸幸, 今田正信, 林達哉, 野中聡, 原渕保明. 鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるras遺伝子の解析. 第40回日本鼻科学会. 宇都宮. 2001, 9.27-29.
19. 高原幹, 坂東伸幸, 今田正信, 林達哉, 小林吉史, 野中聡, 原渕保明. 鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるp53蛋白過剰発現とp53遺伝子の解析. 第102回日本耳鼻咽喉科学会. 福岡. 2001, 5.17-19.

### 3) 出版物

1. 原渕保明, 坂東伸幸, 荻野武, 山口治浩. 鼻腔原発悪性リンパ腫の臨床像とEBウイルス. ウイルス感染症セミナー, 2000:25-31. vol 2).
2. 原渕保明. 頸部リンパ節原発悪性リンパ腫. 村上泰編. CLIENT21, 16巻 気管・食道・頸部. 中山書店, 東京, 2001: 349-353.
3. 原渕保明. EBウイルスとの関連が考えられる鼻性NK/T細胞リンパ腫. HERPES MANAGEMENT 5, 2001:5..
4. 原渕保明. 頭頸部腫瘍 鼻性NK/T細胞リンパ腫. 古川仨編. 新図説耳鼻咽喉科・頭頸部外科講座. 第5巻. メディカルビュー社, 東京, 2001: 146-151.

## 研究成果

### 1. 臨床的解析

原測は、札幌医大耳鼻咽喉科および旭川医大耳鼻咽喉科でこれまで経験した鼻腔原発の悪性リンパ腫 43 例について、EBV の検出頻度、細胞型、病理組織型および臨床像を検討した。免疫組織学的に表面形質を検索したところ、35 例（80%）は CD56 陽性で NK/T 細胞リンパ腫であることが判明した。しかし、MT1 陽性で CD 56 陰性の T 細胞型リンパ腫や B 細胞リンパ腫（L 26 陽性）もそれぞれ 10% 程度存在することが示された。NK/T 細胞リンパ腫では 90% 以上の症例に EBER1 が同定され、60% 以上の症例が病理組織学的に多形性の炎症性細胞浸潤を示した。肉眼的に浸潤破壊性病変を有する症例が 74% を占めていたが、9 例（26%）は腫瘤形成型の増殖様式を示した。浸潤破壊性病変を有する症例の全例に EBER1 が同定されたのに対して、腫瘤形成型では 67% の症例にしか認めなかった。腫瘤形成型では 5 年生存率が 90% であったのに対し、著明な浸潤破壊性病変を有する症例では極めて予後不良であった。以上の結果から、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫は、その発育増殖形成の違いから浸潤破壊型と腫瘤形成型の 2 型に分類される可能性が考えられた（第 58 回日本癌学会ワークショップ 1, 広島, 1999 ; The Nose 2000 And Beyond. Washington DC, USA. 2000, September 20-23）。

### 2. 免疫遺伝子学的・疫学的解析

青笹は、17 例について表面形質と免疫遺伝子型の解析を行った。その結果、全例が CD56 または CD16 陽性で、TIA 抗原も検索した 12 例全てが陽性であった。また、EBER1 は検索した 15 例中 13 例に同定された。T 細胞レセプター  $\gamma$  鎖遺伝子の再構成を DGGE 法にて解析したところ、全ての症例で再構成は認めなかったことから、本疾患は NK 細胞由来である可能性が強いことを報告した（Int J Cancer 81: 865-70, 1999）。

EB ウイルス関連腫瘍に対する細胞障害性 T 細胞（CTL）の標的抗原のひとつに膜表面に発現している latent membrane protein があり、この抗原に対する CTL は HLA-A 拘束性であることが云われている。青笹は本疾患患者 25 例の HLA-A alleles を RCR 法にて解析した。その結果、本疾患患者では健康日本人に比較して HLA-A\*0201 の発現頻度が有意に低かったことから、本腫瘍

では HLA-A\*0201 拘束性の CTL からの逸脱が行っている可能性を示した (Int J Cancer 87:195-9,2000)。

古謝は、家族内発症 (父 71 才、息子 39 才) した鼻性 NK/T 細胞リンパ腫を報告した。いずれも農夫で農薬を大量に使用していたことから、本疾患の発症に遺伝的因子と環境因子の両者が関与している可能性を報告した (Am J Hematology 60:145-7,2001)。

### 3. 癌抑制遺伝子 (p53), 癌遺伝子 (c-kit, $\beta$ -カテニン, Ras) の解析

青笹は 42 例 (中国症例 19 例、沖縄 14 例、大阪 9 例) の p53 蛋白発現と p53 遺伝変異を SSCP 法にて解析した。その結果 42 例中 19 例 (45%) に p53 蛋白過剰発現、20 例 (47,6%) に p53 遺伝変異子を認めた。p53 遺伝子変異は中国症例に高頻度に認め、大阪の症例では少なかったことから、本腫瘍の p53 遺伝子変異発症には人種や地域性の違いがある可能性が示唆された (Int J Cancer 87:195-9,2000)。

一方、高原、原淵は北海道の本疾患 32 例における p53 蛋白の過剰発現を免疫組織学的に、p53 遺伝子の点変異を PCR 法にて得られた増幅産物を鋳型にした direct sequence 法にて検討した。その結果、p53 蛋白過剰発現は 15 例 (48%) に、p53 遺伝子変異は 6 例 (19%) に認められた。この頻度は青笹の大阪症例と同様であった。さらに、臨床像との関連性を比較したところ、p53 遺伝子変異群では有意に進行期例が多く、予後が不良であり、多変量解析の結果、p53 遺伝子変異は独立した予後不良因子であることが確認された (第 102 回日本耳鼻咽喉科学会、福岡、2001、5.17-19)。

また青笹は 23 例 (中国 14 例、大阪 9 例) について c-kit 遺伝子を SSCP 法にて解析した。その結果、12 例に c-kit 遺伝子変異を認め、その頻度は中国症例に多かった。また、遺伝子変異はエクソン 17 のコドン 825 とエクソン 11 のコドン 561 に多く、本疾患に特異的な変異である可能性が示唆された (Cancer Res 60:2345-7,2000)。

高原、原淵は北海道の 31 例における  $\beta$ -カテニン蛋白の発現と  $\beta$ -カテニン遺伝子変異について検討した。 $\beta$ -カテニン蛋白の発現は生検組織からパラフィン切片を作成し抗  $\beta$ -カテニンモノクローナル抗体 (Transduction labo) を用いて免疫組織学的に検討した。 $\beta$ -カテニン遺伝子変異はパラフィン切片から得られた DNA を用いて  $\beta$ -カテニン遺伝子の Exon3 を PCR 法にて増幅

した後、ダイレクトシーケンス法にて検討した。その結果、 $\beta$ -カテニンの免疫染色では31例中4例が陽性であり、遺伝子変異は5例に認められた。変異が同定された5例中3例はサイレント変異であった。他の2例はアミノ酸の変化を伴うミスセンス変異であり、複数以上の変異を認めた。また両者とも免疫染色にて $\beta$ -カテニンの核、細胞質内蓄積を認めた。また、 $\beta$ -カテニンのミスセンス変異と臨床病期との相関が認められ、変異がある症例は有意に病期が進行していた。(第19回日耳鼻免疫アレルギー学会、大阪、2001、2.22-24)

さらに、高原、原渕は北海道の31例におけるRas遺伝子変異(N-ras、K-ras遺伝子のExon 1、2)について検討した。その結果、N-ras、K-rasの遺伝子変異は同一症例の1例のみに認められたが、この1例は31例中もっとも予後不良な症例であった(第40回日本鼻科学会、宇都宮、2001、9.27-29)

#### 4. EBウイルス遺伝子の解析

本腫瘍に潜伏感染しているEBウイルスの特徴を探るために、本疾患7例についてEBウイルスの発癌遺伝子であるlatent membrane protein (LMP)-1、-2Aの遺伝子配列を解析した。方法はPCRおよびnested PCRにて得られた増幅産物を鋳型にして塩基配列をオートシーケンサーにて決定、塩基多型、変異の有無およびアミノ酸の変化を検討した。その結果、LMP-1遺伝子では7例全てにC末端中30塩基、10個のアミノ酸欠失を認めた。また、B95-8株とは異なる1塩基変異を生じた部位は43ヶ所で、それにより22ヶ所のアミノ酸変異がみられた。塩基多型を認めた部位は11ヶ所存在し、その内アミノ酸多型は10ヶ所であった。これらの変異は過去の報告された上咽頭癌や鼻性NK/T細胞リンパ腫のものと極めて類似しており、癌原性に関与している可能性が示唆された。

LMP-2Aについては7症例全てに細胞傷害性T細胞のエピトープをコードしているエキソン6中グアニンがシトシンとなる塩基置換があり、セリンがスレオニンとなるアミノ酸変異を認めた。したがって、本腫瘍細胞では細胞傷害性T細胞エピトープの一部に変異があり、その結果、宿主の細胞障害性監視機構から逸脱する可能性が示された(第18回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、金沢、2000、3.24-25; The Nose 2000 And Beyond. Washington DC, USA, 2000, September 20-23)。