
鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の
EB ウイルスを標的とした
新たな診断法・治療法の開発

(研究課題番号 17390455)

平成 17 年度～平成 19 年度 科学研究費補助金
基盤研究 (B)

研究成果報告書

平成 20 年 3 月

研究代表者 原 湊 保 明

旭川医科大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座

目次

はじめに	1
研究組織	2
研究経費	2
研究発表	3
学会誌	
口頭発表	
研究成果	6

はじめに

研究代表者 原 洸 保 明
(旭川医科大学教授 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座)

鼻性NK/T細胞リンパ腫は、顔面正中部である鼻腔や咽頭に初発し、急速に進行する壊死性肉芽腫性病変を主体とするリンパ増殖性疾患である。病理組織上、そのほとんどが壊死組織や炎症細胞浸潤という所見で、腫瘍細胞が確認しにくく診断は極めて困難である。そのことから確定診断が得られ治療を開始までに時間がかかり、その間に病状は悪化することがしばしばであった。また、既存の治療法に抵抗性を示すということもあり、予後が極めて不良な疾患である。そのような状況を克服するべく、新たな診断法、治療効果判定や治療後の経過観察のための腫瘍マーカー、効果的な治療法の開発が求められていた。しかしながら、本疾患の本態が不明であったことや診断の困難さなどにより、これまで研究は進んでいなかった。

研究代表者の原洸らは、本疾患の本態はTまたはNK細胞が腫瘍化したリンパ腫であること、本疾患の発症にEBウイルスが深く関連していることを報告してきた。そこで、これまでの研究成果を基盤として、本疾患の特徴であるEBウイルスに着目しその特性を多面的に解析し、本疾患の特性に基づいた新たな診断法・治療法を開発することを本プロジェクトの目的とした。

平成17～19年度科学研究費補助金の助成のもとに行われた「鼻性NK/T細胞リンパ腫のEBウイルスを標的とした新たな診断法・治療法の開発」は研究期間を終了し、研究成果をまとめる運びとなった。研究期間中に計画のすべてが達成されたわけではないが、いくつかの新しい知見が得られ、臨床に応用されているものも存在する。EBウイルス学的特性の解析として、鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株を用いて解析した結果、IL9やIL10などのサイトカインが本腫瘍細胞の増殖に深く関与していることが示された。また、患者組織中に感染しているEBウイルス遺伝子を解析した結果、LMP1遺伝子やLMP2A遺伝子に変異が認められ、それらが宿主の免疫系からの回避や癌原性に関与している可能性が示された。新たな診断法の開発としては、血清EBVDNA量が特異的な腫瘍マーカーとして極めて有用であることが示され、本疾患の早期診断、治療効果判定、さらに再燃の診断に臨床的に応用されるようになった。新たな治療法の開発としては、放射線療法と同時に感受性の高い抗癌剤を栄養血管から選択的に動注する放射線併用動注化学療法が治療選択肢に加えられ、極めて良好な治療成績が得られるようになった。加えて、本研究で示されたLMP1 promiscuous epitopeを臨床応用し、新たな免疫療法も確立される日は近いものと考えられる。

最後に、本研究には多くの諸先生方のご協力をいただいた。この場を借りて厚くお礼を申し上げます。

(平成20年3月)

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・頭頸部外科学講座）

研究分担者

荻野 武（旭川医科大学講師 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座） 平成 17~19 年度

坂東伸幸（旭川医科大学助教 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座） 平成 17~19 年度

小林博也（旭川医科大学助教 病理学第二講座） 平成 17~19 年度

高原 幹（旭川医科大学助教 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座） 平成 18~19 年度

岸部 幹（旭川医科大学病院医員 耳鼻咽喉科・頭頸部外科） 平成 19 年度

森合重誉（旭川医科大学病院医員 耳鼻咽喉科・頭頸部外科） 平成 19 年度

研究協力者

石井秀幸（旭川医科大学病院医員 耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

長峯正泰（旭川医科大学病院医員 耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

長門利純（旭川医科大学病院医員 耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

研究経費

	直接経費	間接経費	合計
平成 17 年度	4,000,000 円	0 円	4,000,000 円
平成 18 年度	3,000,000 円	0 円	3,000,000 円
平成 19 年度	2,900,000 円	870,000 円	3,770,000 円
総計	9,900,000 円	870,000 円	10,770,000 円

研究発表

1) 学会誌

1. Nagato T, Kobayashi H, Kishibe K, Takahara M, Ogino T, Ishii H, Oikawa K, Aoki N, Sato K, Kimura S, Simizu 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.
2. Hongyo T, Hoshida Y, Nakatsuka S, Syaifudin M, Kojya S, Yang WI, Min YH, Chan H, Kim CH, Harabuchi Y, Himi T, Inuyama M, Aozasa K, Nomura T:p53, K-ras, c-kit and beta-catenin gene mutations in sinonasal NK/T-cell lymphoma in Korea and Japan.*Oncol Rep*13:265-71, 2005.
3. Takahara M, Kis LL, Nagy N, Liu A, Harabuchi Y, Klein G, Klein E: Concomitant increase of LMP1 and CD25 (IL-2-receptor alpha) expression induced by IL-10 in the EBV-positive NK lines SNK6 and KAI3. *Int J Cancer* 119: 2775-2783, 2006.
4. Xu JX, Hoshida Y, Yang WI, Inohara H, Kubo T, Kim GE, Yoon JH, Kojya S, Bandoh N, Harabuchi Y, Tsutsumi K, Koizuka I, Jia XS, Kirihata M, Tsukuma H, Aozasa K:Life-style and environmental factors in the development of nasal NK/T-cell lymphoma: a case-control study in East Asia.*Int J Cancer* 15:406-10, 2006.
5. Nagamine M, Takahara M, Kishibe K, Nagato T, Ishii H,Bandoh N, Ogino T, Harabuchi Y: Sequence variations of Epstein-Barr virus LMP1 gene in nasal NK/T-cell lymphoma. *Virus Genes*34:47-54, 2007.
6. Ishii H, Ogino T, Berger C, Köchli-Schmitz N, Nagato T, Takahara M, Nadal D, Harabuchi Y: Clinical usefulness of serum EBV DNA levels of BamHI W and LMP1 for Nasal NK/T-cell lymphoma. *J Med Virol* 79:562-572, 2007.
7. Nagamine M, Kishibe K, Takahara M, Nagato T, Ishii H, Bandoh N, Ogino T, Harabuchi Y: Selected amino acid change encoding Epstein-Barr virus-specific T cell epitope of the LMP2A gene in Japanese nasal NK/T cell lymphoma patients. *Intervirology* 50:319-322, 2007.
8. Kobayashi H, Nagato T, Takahara M, Sato K, Kimura S, Aoki N, Azumi M, Tateno M, Harabuchi Y, Celis E. Induction of EBV-latent membrane protein 1-specific MHC class II-restricted T-cell responses against natural killer lymphoma cells.*Cancer Res*68: 901-8,2008.
9. 原渕保明, 荻野 武 : 特集 ステロイド薬の正しい使い方 悪性リンパ腫 一耳 鼻科医の立場からー. *ENTONI* 48: 90-96, 2005.
10. 原渕保明, 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.
11. 荻野 武, 原渕保明 : 鼻性NK/T細胞リンパ腫の疫学と診断. 日鼻誌 45: 125-7, 2006.
 12. 荻野 武, 原渕保明 : 【ここまでわかった遺伝子異常】 頭頸部領域 悪性リンパ腫. JOHNS 22: 1780-1784, 2006.
 13. 原渕保明, 荻野 武: 鼻性NK/T細胞リンパ腫 症例で学ぶ鼻科診療の実際. 鼻アレルギーフロンティア 6: 41-46, 2006.
 14. 長峯正泰, 坂東伸幸, 高原 幹, 荻野 武, 原渕保明 : EBウイルス関連疾患患者由来EBウイルス遺伝子におけるCTLエピトープ配列の検討. 日耳鼻感染症研究会誌 23 : 159-162, 2005.
 15. 高原 幹, 荻野 武, 原渕保明 : 鼻性NK/T細胞リンパ腫に対する浅側頭動脈動注化学放射線同時併用療法. 耳鼻と臨床 53: S57-S63, 2007
 16. 原渕保明, 高原 幹 : 潜伏感染ウイルスによる血液疾患 EBウイルスとT/NK細胞増殖症 : (6) 鼻性NK/T細胞リンパ腫-発見の契機. 河敬世. 新しい診断と治療のABC 46巻, 最新医学社: 89-98, 2007.

2) 口頭発表

1. 荻野 武, 原渕保明 : 教育パネル7「鼻副鼻腔悪性リンパ腫の診断と治療」鼻性NK/T細胞リンパ腫の疫学. 第44回日本鼻科学会 : 9.29-10.1, 2005, 大阪.
2. 長峯正泰, 長門利純, 岸部 幹, 原渕保明 : 鼻性NK/T細胞リンパ腫由来細胞株におけるHeat Shock Protein 75発現に関する検討. 第29回日本頭頸部癌学会 : 6.16-17, 2005, 東京.
3. 荻野 武, 石井秀幸, 森合重誉, 長門利純, 原渕保明 : 鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるNKレセプターの発現異常とその意義. 第24回日耳鼻免疫アレルギー学会 : 3.2-4, 2006, 鳥羽.
4. 高原 幹, 長門利純, 坂東伸幸, 野中 聡, 原渕保明 : 鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株SNK6におけるIL-10の作用. 第24回日耳鼻免疫アレルギー学会 : 3.2-4, 2006, 鳥羽.
5. 長門利純 : 鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株および患者におけるインターロイキン9の発現. 第20回北北海道耳鼻咽喉科懇話会 : 5.20, 2006, 旭川.
6. 原渕保明, 荻野 武, 石井秀幸, 森合重誉, 長門利純, 高原 幹, 今田正信, 林 達哉, 野中 聡 : 鼻性NK/T細胞リンパ腫における放射線同時併用動注化学療法. 第30回日本頭頸部癌学会 : 6.15-16, 2006, 大阪.
7. 荻野 武, 森合重誉, 石井秀幸, 長門利純, 高原 幹, 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予後予測因子の解析. 第 30 回日本頭頸部癌学会 : 6.15-16, 2006, 大阪.
8. 長門利純, 小林博也, 岸部 幹, 高原 幹, 荻野 武, 立野正敏, 原渕保明 : 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫におけるインターロイキン 9 の発現. 第 89 回北海道癌談話会 : 9.17, 2006, 札幌.
 9. 荻野 武, 森合重誉, 長門利純, 原渕保明 : 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における NK レセプターの発現異常. 第 45 回日本鼻科学会 : 9.21-23, 2006, 四日市.
 10. 高原 幹, 荻野 武, 石井秀幸, 森合重誉, 長門利純, 今田正信, 林 達也, 原渕保明 : 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫に対する浅側頭動脈動注化学放射線同時併用療法. 第 12 回頭頸部化学療法研究会 : 3.10, 2007, 神戸.
 11. 荻野 武, 長門利純, 吉崎智貴, 石井秀幸, 森合重誉, 岸部 幹, 高原 幹, 原渕保明 : 血清 EBV DNA 量を詳細に観察しえた鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の 1 例. 第 25 回日耳鼻免疫アレルギー学会 : 3.29-31, 2007, 甲府.
 12. 高原 幹, 長門利純, 岸部 幹, 森合重誉, 荻野 武, 林 達也, 原渕保明 : 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株 SNK6 における LFA-1 と ICAM1 の発現. 第 25 回日耳鼻免疫アレルギー学会 : 3.29-31, 2007, 甲府.
 13. 岸部 幹, 長門利純, 森合重誉, 高原 幹, 荻野 武, 原渕保明 : 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における metalloelastase の解析. 第 25 回日耳鼻免疫アレルギー学会 : 3.29-31, 2007, 甲府.
 14. 森合重誉, 高原 幹, 長門利純, 岸部 幹, 荻野 武, 原渕保明 : 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株における IP-10 の関与. 第 25 回日耳鼻免疫アレルギー学会 : 3.29-31, 2007, 甲府.
 15. 長門利純, 岸部 幹, 森合重誉, 高原 幹, 荻野 武, 原渕保明 : 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における CD70 の発現. 第 25 回日耳鼻免疫アレルギー学会 : 3.29-31, 2007, 甲府.
 16. 荻野 武, 森合重誉, 石井秀幸, 高原 幹, 安倍裕介, 原渕保明 : 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の予後因子. 第 108 回日本耳鼻咽喉科学会総会 : 5.17-19, 2007, 金沢.
 17. 高原 幹, 長門利純, 岸部 幹, 森合重誉, 片山昭公, 原渕保明 : 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株 SNK6 における IL-10 による LMP1 を介した CD25 の発現上昇. 第 66 回日本癌学会 : 10.3-5, 2007, 横浜.
 18. 森合重誉, 高原 幹, 長門利純, 岸部 幹, 荻野 武, 原渕保明 : 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株における IP-10 の発現と機能. 第 26 回日耳鼻免疫アレルギー学会: 2.21-23, 2008, 大阪.
 19. 高原 幹, 岸部 幹, 森合重誉, 坂東伸幸, 原渕保明: 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株 SNK6 における LFA-1 と ICAM1 の機能解析. 第 26 回日耳鼻免疫アレルギー学会: 2.21-23, 2008, 大阪.

研究成果

1) EB ウイルス学的特性の解析

EB ウイルス学的特性の解析として、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株 SNK6、SNT8 と EBV 陰性のリンパ腫細胞株を用いて、cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い IL-9 が EB ウイルス陽性鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株に特異的に発現していることをみいだした。そして発現した IL-9 は autocrine の機序にて本疾患の細胞増殖能に影響している可能性を示した (Clinical Cancer Research 11:8250-7, 2005)。

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株 SNK6 は IL-10 を分泌しており、その IL-10 が EB ウイルス由来蛋白の中で一番癌原性が高いとされる LMP1(latent membrm protein1)の発現を上昇させ、その LMP1 を介して IL-2 の感受性を亢進させる CD25 の発現を亢進させることをみいだした。このことから、SNK6 において IL-10 は LMP1 や CD25 を介して間接的に細胞増殖に関わっている可能性が示唆された (International Journal of Cancer 119, 2775-2783, 2006)。

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫組織 7 例より DNA を抽出し、EB ウイルス遺伝子である LMP1 遺伝子の変異を解析したところ、全てにおいて上咽頭癌での報告と類似する LMP1 遺伝子 C 末端 30 塩基の欠失を認めた。その欠失が本疾患の発症に寄与している可能性を示した。また、LMP1 の抗原エピトープと考えられている部分にも点変異を認め、宿主の免疫系からの回避に寄与している可能性を示した (Virus Genes 34, 47-54, 2007)。さらに、LMP2A 遺伝子変異を解析した結果、LMP2A のアミノ酸配列において細胞障害性 T 細胞の抗原認識部位である codon348 番の多型に関して、本邦例では全例 threonine となっており、発癌性と関連している可能性を示した (Intervirolgy 50, 319-322, 2007)。

cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果から、CD70 と metalloelastase が鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株において発現上昇していることを示した。(第 25 回耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2007、甲府)。また、EB ウイルス陽性鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株において NK レセプターの構成分子である DAP12 の発現が低下しており、それは本疾患の組織浸潤破壊性という病理組織学的な特徴と関連がある可能性を報告した (第 24 回耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2006、鳥羽)。

ケモカイン抗体アレイを用いて鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株において発現が亢進しているケモカインとして IP-10 をみいだした。IP-10 は EBV 陽性 NK/T 細胞リンパ腫で発現が亢進し、そのリガンドである CXCR3 の発現も確認された。IP-10 は CXCR3 陽性 T、NK 細胞の走化性を亢進させることが知られている。鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞においては IP-10 を産生し、自らの CXCR3 に結合させ、autocrine の機序によって浸潤能を亢進させている可能性が示唆された。また、IP-10 は免疫染色にて鼻性

NK/T 細胞リンパ腫細胞に、ELISA 法にて患者血清中に確認され、治療によって血清 IP-10 濃度は低下することが確認された。これらの結果は、IP-10 を対象とした新たな診断法、治療法の開発への基礎となるものと考えられる。(第 26 回日耳鼻免疫アレルギー学会 : 2.21-23, 2008, 大阪.論文作成中)

2) 新たな診断法の開発

real time PCR 法を用いて本疾患 20 例の血清 EBV DNA 量を測定した。その結果、血清 EBV DNA 量が本疾患における治療前診断、再発徴候さらに予後因子として極めて有用であることを証明した。さらに、測定法として BamHI W fragment と LMP1 に対するプライマーの 2 種を用いることで、より臨床上有用な情報が得られることを示した。組織上の EBV 再活性化遺伝子産物である ZEBRA 蛋白の発現を免疫染色にて検討し、患者の不良な臨床経過と相関することを見いだした (Journal Medical Virology 79, 562-572, 2007)。

3) 新たな治療法の開発

浅側頭動脈動注・放射線同時併用療法の臨床的有用性を検討した。MDR 非関連性薬剤である ifosfamide、carboplatin、methotrexate、peplomycin と etoposide を組み合わせた MPVIC-P 療法を開発した。7 症例に本治療法を適用し、従来の放射線化学療法同時併用療法と比較してより有用であり、しかもその毒性には差がないことが確認された (日本鼻科学会誌 45,125-7,2006,耳鼻と臨床 53,S57-63,2007)。

EBV 関連悪性腫瘍細胞の多くに発現が認められる LMP1 の CTL に認識される epitope 解析は多数報告されているが、ヘルパー T 細胞に認識される epitope の解析は皆無である。HLA class II 結合ペプチドアルゴリズムを用いて、多くの class II 分子に結合することが予測される LMP1 の promiscuous epitope を検索し、この epitope を有するペプチドを合成し、HLA class II に拘束された LMP1 promiscuous epitope を認識するヘルパー T 細胞を誘導した。誘導されたヘルパー T 細胞は HLA-DR9、HLA-DR53 または HLA-DR15 に拘束され、ペプチド LMP1(159-175)を認識した。また、これらのヘルパー T 細胞は EBV 陽性の NK/T 細胞リンパ腫細胞株を直接認識し、しかも細胞傷害能を示した。加えて、このペプチド LMP1(159-175)には HLA-A2 結合モチーフが存在し、CTL にも認識される可能性がある。これらの結果によって、今後鼻性 NK/T 細胞リンパ腫に対するペプチド LMP1(159-175)を用いた免疫療法の可能性が期待された (Cancer Research 68, 901-8, 2008.)。