

# AMCoR

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

耳鼻咽喉科免疫アレルギー (2011.09) 29巻3号:209～213.

鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるケモカインの発現とその役割

長門利純、原淵保明

## 鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるケモカインの発現とその役割

長門 利純<sup>1</sup>, 原 潤 保明<sup>1</sup>

<sup>1</sup>旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科

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壊死性の肉芽腫性病変を主体とするNK細胞あるいは $\gamma\delta$ T細胞由来のEBウイルス陽性悪性リンパ腫であり、病理組織学的には腫瘍細胞と炎症細胞浸潤が混在するという特徴を有する。本疾患におけるケモカインの発現とその役割に関する検討はほとんどなされておらず、腫瘍組織内に浸潤している炎症細胞が腫瘍細胞に与える影響や、腫瘍細胞が産生するケモカインと炎症細胞の関連についても報告されていない。我々の研究結果より、本疾患において特異的に発現しているケモカインが数種類同定され、一部のケモカインはオートクライン作用で腫瘍細胞の浸潤能亢進に関与していることが明らかとなった。また、これらのケモカインのバラクライン作用が、高度の炎症細胞浸潤に寄与している可能性が高い。さらに、生検組織を用いた検討で腫瘍細胞周囲に単球の集積を認めると共に、腫瘍細胞と単球を共培養すると腫瘍細胞の増殖が認められ、その作用はEBウイルス蛋白であるLMP-1を介していると考えられた。以上より、炎症細胞の中でも単球が腫瘍の増殖や進展に対して重要な役割を果たしており、腫瘍細胞から産生される一部のケモカインが単球の遊走を誘導していると考えられる。

キーワード：鼻性NK/T細胞リンパ腫，EBウイルス，ケモカイン，単球

### はじめに

鼻性NK/T細胞リンパ腫は鼻腔や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 $\gamma\delta$ 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<sup>1)</sup>、さらに腫瘍細胞が産生するIL-9やIL-10などのサイトカインが直接、あるいは間接的に腫瘍増殖に寄与することを明らかにしてきた<sup>2,3)</sup>。最近、いくつかの悪性腫瘍において、細胞遊走を主要な作用とする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<sup>4)</sup>。さらに、EBV感染によって発現が誘導されるケモカインも報告されている<sup>5-8)</sup>。しかし、本疾患におけるケモカイン発現の検討はほとんど行われていない。

また、近年の研究結果より、悪性腫瘍の増殖・進展に

周囲の炎症細胞が大きな役割を担うことが報告されている<sup>9,10)</sup>。本リンパ腫は病巣への腫瘍細胞浸潤の他に著しい炎症細胞浸潤を特徴としており、腫瘍組織中の炎症細胞が腫瘍の増殖・進展に深く関連している可能性がある。もし腫瘍細胞が種々のケモカインを産生するならば、それらにより炎症細胞が腫瘍組織中へと遊走・浸潤していることが考えられる。

本稿では、鼻性NK/T細胞リンパ腫で発現が認められるケモカインとその作用に関して我々の研究結果を紹介するとともに、腫瘍細胞と炎症細胞、特に単球との関係について、考えられるケモカインの役割も含め概説する。

### 鼻性NK/T細胞リンパ腫で 発現が認められるケモカイン

鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるケモカイン発現を網羅的に調べるために、本リンパ腫細胞株の培養上清を用いてケモカインアレイを施行した。鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株として、EBV陽性かつウイルス蛋白であるLMP-1陽性であるSNK6、SNT8、SNK1を用いた。対照として鼻性NK/T細胞リンパ腫以外のNK細胞株であり、EBV陰性であるKHYG1を用いた。ケモカインアレイの結果、鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株においてKHYG1より有意に発現が上昇しているケモカインとしてIP-10<sup>11)</sup>、TARC、MDC、

2011年7月15日受稿  
別冊請求先：長門利純  
〒078-8510 北海道旭川市緑が丘東2条1丁目1番1号  
旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科  
TEL: 0166-68-2554, FAX: 0166-68-2559  
E-mail: rijun@asahikawa-med.ac.jp

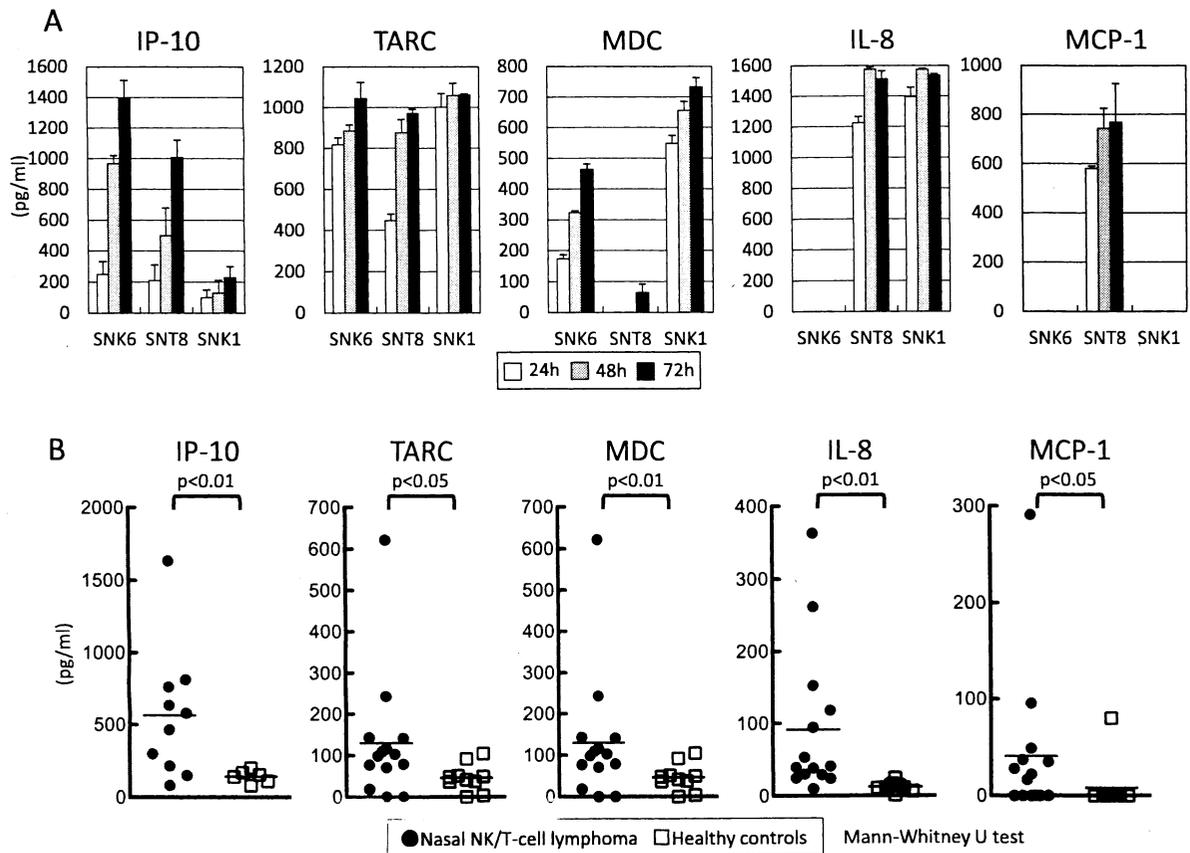


図1 鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるケモカインの発現 (IP-10のデータは文献11より引用改変)。A. 鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株培養上清におけるケモカインの発現解析 (ELISA法)。IP-10とTARCはSNK6, SNT8, SNK1の3種類の細胞株において発現を認める。MDCはSNK6とSNK1において、IL-8はSNT8とSNK1において、MCP-1はSNT8においてそれぞれ発現を認める。B. 患者血清におけるケモカインの発現解析 (ELISA法)。患者血清において健康人血清と比較しIP-10, TARC, MDC, IL-8, MCP-1の有意な発現上昇を認める。

IL-8, MCP-1が同定された。それぞれのケモカインに関して概説すると、IP-10は単球, T細胞, NK細胞などの遊走活性に関与しており, 受容体はCXCR3である。TARCとMDCはT細胞, 胸腺細胞, NK細胞, 単球などの遊走活性に関与しており, 受容体はCCR4である。IL-8は好中球, 好塩基球, T細胞などの遊走活性や血管新生に関与しており, 受容体はCXCR1とCXCR2である。MCP-1は単球, T細胞, 好塩基球などの遊走活性に関与しており, 受容体はCCR2である。また, いずれのケモカインもEBVのLMP-1蛋白によって発現が誘導されるとの報告がある<sup>5-8)</sup>。これらのケモカイン産生はELISAによって確かめられ, ケモカインアレイの結果に一致して, 本腫瘍細胞株培養上清中にそれぞれ十分量の産生を認め, 時間の経過と共にその産生量は増加していた (図1A)。

臨床検体におけるこれらのケモカインの発現を調べるために, 患者血清中のケモカイン量をELISAにて測定した。その結果, 患者血清において健康人血清と比較しIP-10<sup>11)</sup>, TARC, MDC, IL-8, MCP-1の有意な発現上昇を認めた (図1B)。また, 腫瘍組織標本のパラフィン包埋切片を用い,

腫瘍細胞におけるIP-10の発現を検討するため, 抗IP-10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<sup>11)</sup>。その結果, 10症例中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も陽性であった。

TARC, MDC, IL-8, MCP-1の腫瘍組織標本における発現は現在検討中であるが, これらの結果から鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞がIP-10, TARC, MDC, IL-8, MCP-1を産生し, 患者血清中にもそれらが検出されることが考えられる。

#### ケモカインレセプターの発現

IP-10の受容体であるCXCR3, TARCとMDCの受容体であるCCR4, IL-8の受容体であるCXCR1とCXCR2, MCP-1の受容体であるCCR2の鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株における発現をフローサイトメトリーにて検討した。CXCR3<sup>11)</sup>とCCR4は3つの鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株すべてで発現を認めたが, CXCR1, CXCR2, CCR2は発現を認めなかった。

腫瘍組織標本のパラフィン包埋切片を用い, 腫瘍細胞に

おける CXCR3 の発現を検討するため、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<sup>11)</sup>。その結果、10 症例中 7 症例が陽性であった。

### ケモカインのオートクラインによる役割

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫において IP-10 とその受容体である CXCR3 の発現が認められたため、オートクラインによる役割に関して検討した<sup>11)</sup>。Invasion アッセイを用いた検討では、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株において添加した外因性 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、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株の細胞浸潤は抑制された。以上の結果より、IP-10 は鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株において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。TARC と MDC に関しても、細胞株にその受容体である CCR4 の発現が認められるため、IP-10 と同様にオートクラインで浸潤能の亢進に関与している可能性があり、現在検討中である。

### ケモカインのパラクラインによる役割

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫組織には炎症細胞浸潤が著名であり、腫瘍細胞と炎症細胞の相互作用が腫瘍の増殖・進展に関与している可能性がある。本リンパ腫で発現が上昇していたケモカインである IP-10、MDC および MCP-1 は単球を遊走させるケモカインであり、近年、正常 NK 細胞と単球との共培養により、正常 NK 細胞の増殖能が亢進することが報告されている<sup>12)</sup>。また、単球の膜上には膜結合型 IL-15 が、NK 細胞上には IL-15 レセプターが発現しており、我々は、IL-15 で本リンパ腫細胞株を刺激すると、細胞株の LMP-1 発現が亢進することを報告してきた<sup>3)</sup>。以上より、炎症細胞の中でも本リンパ腫における単球の役割を検討した<sup>13)</sup>。

まず、臨床検体を用いて腫瘍周囲の単球の浸潤について 2 重免疫染色にて検討したところ、CD14 陽性である単球の近傍に CD56 陽性リンパ腫細胞を認めた。次に単球と SNK6 を 1:3 で混合し共培養を行なった。SNK6 単培養と比べ、共培養における SNK6 の生細胞数は経時的に増加した (図 2A)。続いて SNK6 と混合する単球の比率を変えて

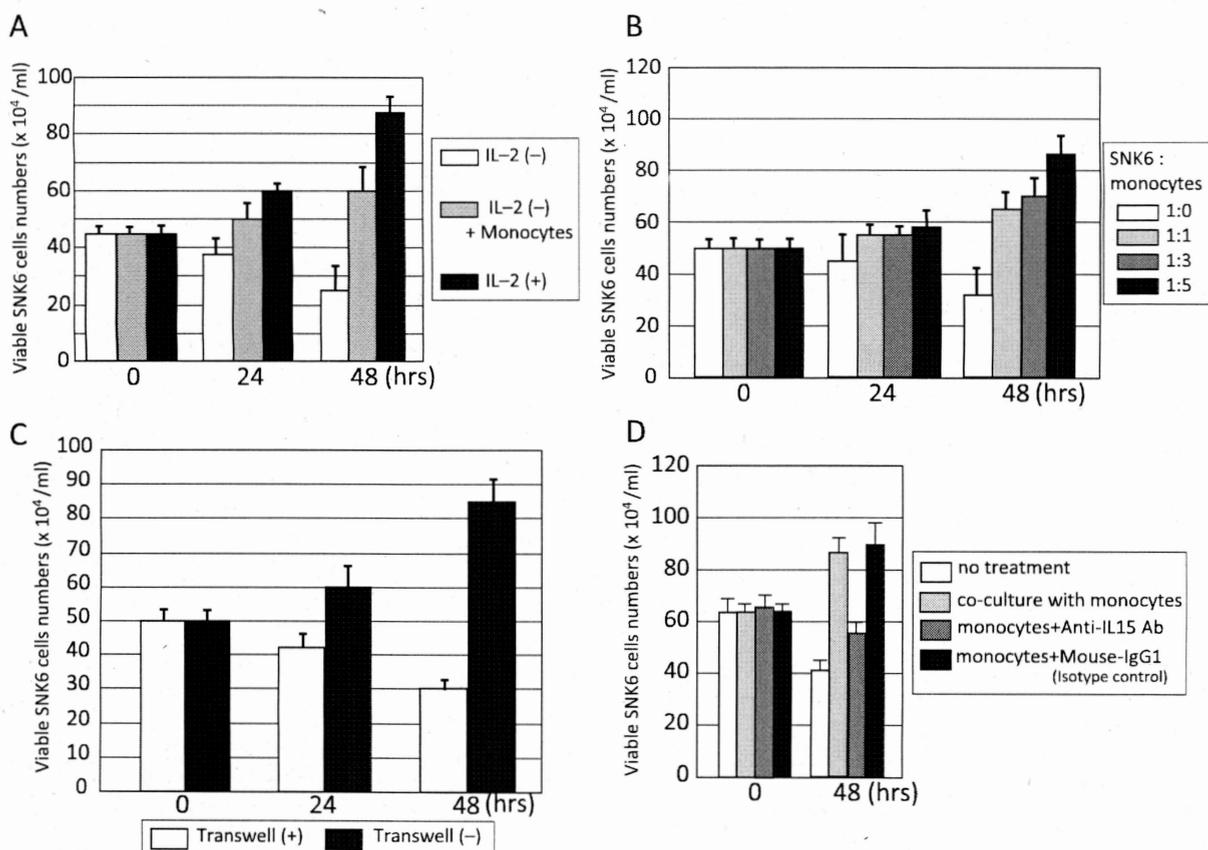


図 2 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株と単球の共培養 (文献 13 より引用改変)。A. 経時変化による SNK6 生細胞数の変化。単球との共培養により SNK6 の生細胞数は経時的に増加している。B. 単球の比率変化による SNK6 生細胞数の変化。混合する単球の比率が増えるほど、SNK6 の生細胞数が増加している。C. トランスウェルを用いた SNK6 生細胞数の変化。トランスウェル無しの培養で SNK6 生細胞数の増加が認められる。D. IL-15 中和抗体を用いた SNK6 生細胞数の変化。IL-15 中和抗体を加えることにより SNK6 生細胞数が減少している。

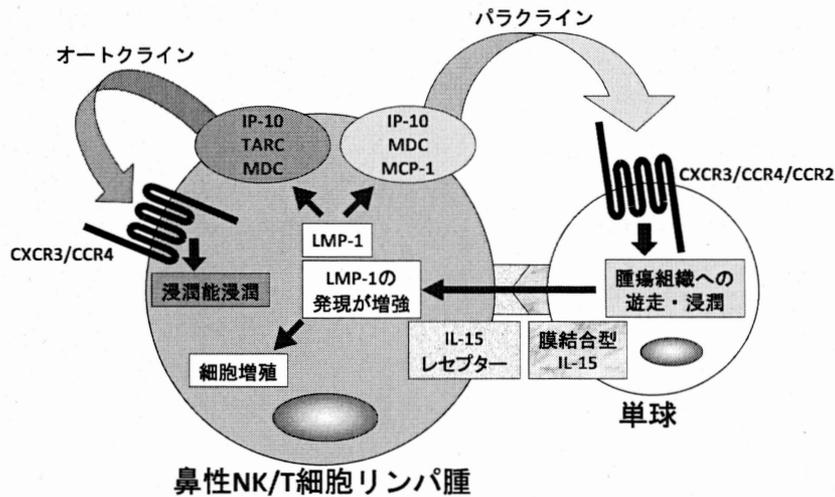


図3 鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるケモカインと単球の役割 (仮説を含む)

共培養を行った。混合する単球の比率が増えるほど、SNK6の増殖能が亢進した(図2B)。また、共培養したSNK6のLMP-1の発現をウェスタンブロットングにて検討したところ、発現の亢進が認められた。次に、SNK6と単球の作用が細胞間接触にて起こることを証明するため、トランスウェルを用いて細胞間接触を阻害しながら共培養を行いSNK6の増殖能を検討した。トランスウェル有りの培養では、SNK6の生細胞数が時間の経過とともに低下することが認められた。一方、トランスウェル無しの培養では生細胞数の増加が認められた(図2C)。このことから、単球との共培養により誘導されたSNK6の増殖能には細胞間接触が大きく関与していることが示唆された。最後に、IL-15中和抗体を用いて単球と共培養されたSNK6の増殖能について検討した。IL-15中和抗体を加えることによりSNK6の生細胞数が減少し増殖能が抑制されていることが示された(図2D)。また、共培養したSNK6のLMP-1の発現をウェスタンブロットングにて検討したところ、IL-15中和抗体にてLMP-1の発現が低下していた。以上より、本リンパ腫における単球の役割については、IP-10やMDC、MCP-1がLMP-1によって誘導されるという過去の報告を考えると、LMP-1により単球遊走能のあるこれらのケモカイン発現が亢進し、パラクラインにより単球を腫瘍組織へ遊走させ、単球上の膜結合型IL-15とリンパ腫細胞のIL-15レセプターが結合することによりLMP-1の発現がさらに亢進し、細胞増殖に関与することが示唆された(図3)。

#### まとめ

我々の研究結果より、鼻性NK/T細胞リンパ腫においてIP-10、TARC、MDC、IL-8、MCP-1といったケモカインの発現が上昇していることがわかった。IP-10はオートクライン作用により腫瘍細胞の浸潤能亢進に関与しており、

TARCとMDCもオートクライン作用により何らかの役割を担っている可能性がある。また、これらのケモカイン発現はEBVのウイルス蛋白であるLMP-1によって誘導されると考えられる。さらに、これらのケモカインのパラクライン作用が、本リンパ腫組織像の特徴である高度の炎症細胞浸潤に寄与している可能性が高い。臨床検体の検討で本リンパ腫細胞周囲に単球の集積を認め、単球と腫瘍細胞との結合によりLMP-1を介した腫瘍増殖への関与が示唆されたことから、炎症細胞の中でも単球が腫瘍の増殖や進展に対して重要な役割を果たしており、腫瘍細胞から産生されるIP-10、MDC、MCP-1といったケモカインが単球の遊走を誘導していると考えられる。

#### 文 献

- 1) Harabuchi Y, Yamanaka N, et al. Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma. *Lancet*. 1990; 335(8682): 128-30.
- 2) Nagato T, Kobayashi H, et al. Expression of interleukin-9 in nasal natural killer/T-cell lymphoma cell lines and patients. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(23): 8250-7.
- 3) Takahara M, Kis LL, et al. 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*. 2006; 119(12): 2775-83.
- 4) Laurence AD. Location, movement and survival: the role of chemokines in haematopoiesis and malignancy. *Br J Haematol*. 2006; 132(3): 255-67.
- 5) Vockerodt M, Pinkert D, et al. The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 induces expression of the chemokine IP-10: importance of mRNA half-life regulation. *Int J Cancer*. 2005; 114(4): 598-605.
- 6) Nakayama T, Hieshima K, et al. Selective induction of Th2-attracting chemokines CCL17 and CCL22 in human B cells by latent mem-

- brane protein 1 of Epstein-Barr virus. *J Virol.* 2004; 78(4): 1665–74.
- 7) Yoshizaki T, Horikawa T, et al. Induction of interleukin-8 by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 and its correlation to angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2001; 7(7): 1946–51.
- 8) Buettner M, Meyer B, et al. Expression of RANTES and MCP-1 in epithelial cells is regulated via LMP1 and CD40. *Int J Cancer.* 2007; 121(12): 2703–10.
- 9) Balkwill F, Charles KA, et al. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell.* 2005; 7(3): 211–7.
- 10) Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002; 420(6917): 860–7.
- 11) Moriai S, Takahara M, et al. Production of interferon- $\gamma$ -inducible protein-10 and its role as an autocrine invasion factor in nasal natural killer/T-cell lymphoma cells. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(22): 6771–9.
- 12) Miller JS, Oelkers S, et al. Role of monocytes in the expansion of human activated natural killer cells. *Blood.* 1992; 80(9): 2221–9.
- 13) Ishii H, Takahara M, et al. Monocytes enhance cell proliferation and LMP1 expression of nasal natural killer/T-cell lymphoma cells by cell contact-dependent interaction through membrane-bound IL-15. *Int J Cancer.* in press.

## Expression and functional role of chemokines in nasal natural killer/T-cell lymphoma

Toshihiro Nagato<sup>1</sup>, Yasuaki Harabuchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Asahikawa Medical University

### ABSTRACT

Nasal natural killer (NK)/T-cell lymphoma is an Epstein-Barr virus (EBV)-related malignancy with poor prognosis and has distinct histological features characterized by angiocentric and polymorphous lymphoreticular infiltrates including inflammatory cells such as granulocytes, monocytes, macrophages and lymphocytes. Recently, the role of chemokines in tumor proliferation and invasion has been shown. Furthermore, chemokines are likely to play important roles in the pathophysiology of diseases associated with EBV. We examined the chemokines expressed by nasal NK/T-cell lymphoma. Nasal NK/T-cell lymphoma cell lines produced IP-10, TARC, MDC, IL-8, and MCP-1. IP-10 enhanced lymphoma cell invasion through an autocrine mechanism. Next, we examined whether inflammatory cells influence the biological activities of nasal NK/T-cell lymphoma cell lines. We cocultured nasal NK/T-cell lymphoma cell lines with monocytes. Cocultured monocytes enhanced the proliferation of cell lines. Immunohistological studies showed confirmation that a number of infiltrating CD14-positive monocytes were in contact with CD56-positive lymphoma cells in the nasal NK/T-cell lymphoma tissues. These results suggest that chemokines such as IP-10, MDC, and MCP-1 produced by nasal NK/T-cell lymphoma cells attract monocytes through a paracrine mechanism and the attracted monocytes enhance proliferation of lymphoma cells.

**Key words:** nasal NK/T-cell lymphoma, Epstein-Barr virus, chemokine, monocyte