

AMCoR

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

耳鼻咽喉科免疫アレルギー (2003.06) 21巻2号:168~169.

鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるIL-9の発現

長門利純, 岸部 幹, 高原 幹, 原渕保明

76. 鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるIL-9の発現

○長門利純, 岸部 幹, 高原 幹, 原湊保明

旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座

Expression of IL-9 in nasal NK/T-cell lymphoma

Nagato T, Kishibe K, Takahara M, Harabuchi Y

Dept. of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Asahikawa Medical College

1. はじめに

鼻性NK/T細胞リンパ腫は鼻腔、咽頭に初発する破壊性の壊死性肉芽腫が特徴で、多臓器浸潤により予後は極めて不良である。腫瘍の由来として、NK細胞、 $\gamma\delta$ T細胞の2種があることが知られており、その発症にはEBウイルスが関与していることが報告されている。この疾患では症例数が少ないこと、組織における正常細胞の混在の問題から、遺伝子学的検討はあまり進んではおらず、なかでも遺伝子発現解析に関する報告はまだほとんどないのが現状である。遺伝子発現解析を行うためには組織量、細胞量がかなり必要であり、細胞株の分離が待たれていた。最近、永田らは原発巣である鼻腔腫瘍病変部よりSNK6、SNT8の2株の分離に成功した。その性状は、SNK6がCD56陽性で、T細胞レセプターの再構成を認めないNK細胞由来であり、SNT8はCD3陽性、T細胞レセプターの再構成を認め、 $\gamma\delta$ 型のT細胞レセプターを発現しており、 $\gamma\delta$ T細胞由来であった。

そこで今回我々は、由来の違う2種類の鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株SNK6、SNT8、NK細胞リンパ腫細胞株NK92および健常人より分離した正常末梢血リンパ球(PBMC)を用いてcDNA arrayを行い、PBMC、NK92とSNK6、SNT8間で発現差のある遺伝子をスクリーニングし、SNK6、SNT8両細胞株間で共通して発現上昇の見られた遺伝子を検出した。発現上昇を認めた遺伝子の1つにIL-9が存在した。SNK6、SNT8、PBMCおよび他のリンパ腫・白血病細胞株間でIL-9およびIL-9RのmRNAレベルでの発現の差を比較検討し、さらに臨床検体におけるIL-9の免疫染色を行ったところ、興味深い結果が得られたので報告する。

2. 方法

cDNA array: SNK6、SNT8、PBMC、NK92よりtotal RNAを抽出し、それらをDNase処理後、mRNAを単離し、逆転写反応時に ^{32}P で標識しcDNAプローブを作製した。得られたcDNAプローブを1176種の遺伝子が載っているAtlas Human Cancer 1.2 Array (Clontech社)を使用しハイブリダイズさせ、洗浄後にフォスフォイメージャーにて各遺伝子スポットを数値化した。数値化後、house keeping geneにて得られた各遺伝子シグナル値をメンブラン間で標準化し、SNK6、SNT8での遺伝子シグナル値が5.0以上でかつ、SNK6、SNT8遺伝子シグナル値/PBMC、NK92遺伝子シグナル値が3.0以上のものを腫瘍細胞株における有意な発現上昇遺伝子とした。

RT-PCR: 有意な発現上昇を認めた遺伝子としてIL-9が検出されたため、IL-9およびIL-9R (IL-9R/IL-2R γ 複合体)のmRNAレベルの発現についてSNK6、SNT8、PBMCおよび他のリンパ腫・白血病細胞株間(表1)でRT-PCRにて比較検討した。PBMCおよび細胞株よりtotal RNAを抽出後、逆転写反応にてcDNAを作製し、hot start法によるRT-PCRを施行した。IL-9、IL-9R、IL-2R γ 、内部標準として用いた $\beta 2$ ミクログロブリンのプライマー配列、プロダクトサイズ、サイクル数を表2に示した。

免疫染色: 1980年1月~2002年12月までに当科にて病理組織学および免疫組織学的に鼻性NK/T細胞リンパ腫と診断された13例のパラフィン包埋切片を用い、DAKO ENVISION法によるIL-9の免疫染色を施行した。一次抗体としてRabbit anti human IL-9 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology)を用い、濃度は100倍とした。腫瘍細胞の50%以上が染まっている症例を陽性とした。

表1 本実験で用いた細胞株

Cell line	Origin	EBV	CD3	CD16	CD56	TCR
SNK6	Nasal NK/T cell lymphoma	+	-	-	+	-
SNT8	Nasal NK/T cell lymphoma	+	+	-	+	+
NK-92	Large granular lymphocytes non Hodgkin's lymphoma	-	-	-	+	-
KHYG-1	Aggressive NK cell leukemia	-	-	+	+	-
TALL-1	Acute lymphoblastic leukemia T cell type	-	+	-	-	+
PEER	Acute lymphocytic leukemia T cell type	-	+	-	-	+
Molt-4	Acute lymphoblastic leukemia T cell type	-	+	-	-	+
Jurkat	T cell leukemia	-	+	-	-	+
KAI 3	Severe chronic active EB virus infection hypersensitivity to mosquito bite	+	-	+	+	-
K562	Chronic myelogenous leukemia from blast crisis	-	-	-	-	-

表2 プライマーおよびPCR サイクル数

primer	sequence	size	cycle
IL-9-f	5'-ATGCTTCTGGCCATGGTCCT-3'	432bp	32
IL-9-r	5'-TATCTTGCCTCATCCCTC-3'		
IL-9R-f	5'-ATGTGGTAGAGGAGGAGCGT-3'	174bp	40
IL-9R-r	5'-TGAACAGGAGGTAGGTCGG-3'		
IL-2R γ -f	5'-CCTCACTCTGCATTATTGGTACAAG-3'	655bp	35
IL-2R γ -r	5'-TTCAGTAACAAGATCCTCTAGGT-3'		
β 2M-f	5'-TGTCTTTCAGCAAGGACTGG-3'	652bp	30
β 2M-r	5'-CCAGATTAACCACAACCATG-3'		

3. 結果

cDNA array : SNK6, SNT8 で PBMC, NK92 より有意な発現上昇をきたした遺伝子の1つに IL-9 があった (図1)。IL-9 は PBMC と比較すると SNK6 で3.88倍、SNT8 で19.3倍の発現上昇を認め、NK92 との比較では SNK6 で3.57倍、SNT8 で29.6倍の発現上昇を認めた。

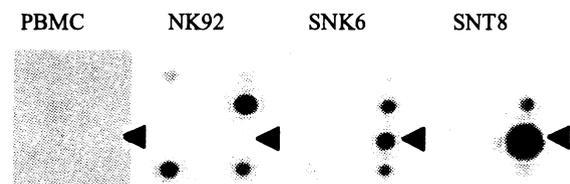


図1 cDNA arrayによる IL-9 の発現

RT-PCR : IL-9 は SNK6 および SNT8 のみに発現が認められた (図2)。IL-9R は PBMC 以外の全細胞株において発現が認められた。IL-2R γ は PBMC および全細胞株において発現が認められた。

免疫染色 : 13例中 8 例で陽性であった。

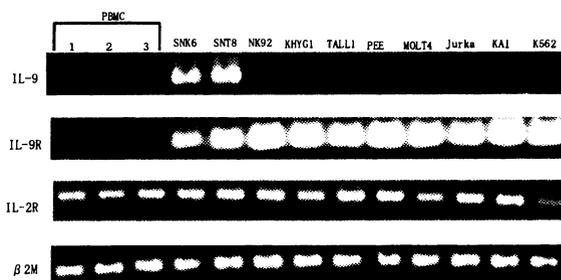


図2 RT-PCR

4. 考察

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株である SNK6, SNT8 両細胞株間で PBMC および NK92 より発現上昇を認めた遺伝子の1つとして IL-9 が検出された。IL-9 は正常では CD4⁺T 細胞が産生しており、その標的細胞は T 細胞、B 細胞、肥満細胞、好酸球などで、T 細胞では細胞増殖に向かうことが報告されている。レセプターは IL-9R と IL-2R γ のヘテロダイマーで形成されており、細胞内のシグナル伝達として Jak-Stat 系を介するとされる。また、ホジキン病ではオートクライン作用により腫瘍細胞の増殖に関与しているとの報告もある。

RT-PCR にて SNK6 と SNT8 のみに IL-9 の発現がみとめられ、両細胞株において IL-9R の発現も認められたことから、IL-9 がオートクライン作用による本腫瘍形成に関与している可能性が考えられた。

また、免疫染色により臨床検体においても IL-9 の発現が認められた。