

ウイルス量。

(倫理面への配慮) 本試験に関係する全ての研究者はヘルシンキ宣言(2008年ソウル改訂)および臨床研究に関する倫理指針(平成20年7月31日全部改正)に従って本試験を実施する。患者登録に先立って、担当医は患者本人に施設の倫理委員会の承認が得られた説明文書により同意を得る。

## 2. HIV 関連血液悪性腫瘍についての全国調査

非ホジキンリンパ腫以外の非 AIDS 指標疾患としての血液腫瘍について全国調査を実施した。

対象: 日本血液学会認定研修施設およびエイズ拠点病院

調査疾患: HIV 感染が先行あるいは同時に診断された急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、ホジキン病などとする。

方法: 調査は2段階で行う。1段階目は対象施設に対して HIV 関連血液悪性腫瘍の診療経験の有無について調査。診療経験有と回答した施設に対して調査票を用いた後ろ向き調査を実施する。

解析: 各疾患の発症頻度、発症背景、治療法、寛解率、生存期間について統計解析を行う。

(倫理面への配慮) 多施設共同の疫学研究であるため、患者個人情報保護の対策を十分に行う必要がある。そのため、疫学研究に関する倫理指針(平成19年8月改正)に則り、個人情報は連結不可

能な匿名化を行う。よって患者特定が可能になる固有の番号・符号、照合表は作成しない。本研究は、多施設の協力を得て、HIV 関連血液悪性腫瘍について調査するものである。解析結果は参加施設へ開示するが、個々の患者に対しては開示しない。また研究の成果は日本血液学会およびエイズ学会等、また学術雑誌に公表する。その際には、患者および個人名を匿名とし、その他のプライバシーに関する事項すべてに対して最大限の配慮をする。

## B. 研究結果

### 1. 難治性および再発性 HIV 関連悪性リンパ腫

### に対する MEAM 療法を前処置とする HAART 併用自己末梢血幹細胞移植に関する多施設共同第 II 相臨床試験

本試験は2009年度厚生労働省科学研究費 HAART の長期的副作用対策・長期的予後に関する研究班(田邊班)より引き継いでいる。2011年2月時点での IRB 承認施設は以下の7施設である。

国立病院機構 名古屋医療センター

国立病院機構 大阪医療センター

国立国際医療研究センター戸山病院

北海道大学病院

東京大学医科学研究所附属病院

国立病院機構九州医療センター

がん・感染症センター 都立駒込病院

症例登録の状況は、仮登録症例4例、本登録2例である。現時点では HIV 関連悪性リンパ腫はまだ症例数が少ないが今後、増加が見込まれるため、できるだけ多くの症例を捕捉し、本プロトコルに組み入れられるように周知を図ってゆく必要がある。

2. HIV 関連血液悪性腫瘍についての全国調査 全国のエイズ拠点病院、日本血液学会認定研修施設、合計923施設に対して一次調査票を郵送した。また、医学中央雑誌を用いた検索により医学雑誌・学会等で報告された症例を抽出し、調査票未回収の症例がないか確認をおこなった。各症例に対して二次調査票を送付し回答を得た。

一次調査票回収率55%、二次調査票は21施設から回答を得た。

1991年から2010年までに47例の非 AIDS 指標血液悪性腫瘍がスクリーニングされた。

ホジキン病19例、AML13、ALL7、CML4、Multiple myeloma2、CLL1、MDS-RAEB1であった。

男性93.6%、発症時 CD4 平均値  $303.7 \pm 255.5/\mu\text{L}$ 、HIV ウイルス感染から発症までの期間  $45.0 \pm 46.3$  か月、HAART 歴有 68.1%、以前の AIDS 発症歴 51.1%であった。

AML13 例の治療については2例が支持療法のみ、AML-M3 の1例に対して ATRA、AraC-Idarubicin5 例、AraC-Daunorubicin4 例、その他1例であり、寛解率は61.5%であった。ALL7 例では、HyperCVAD3、JALSG93、202 などが用いられていた。これらを用いた化学療法の寛解率は85.7%であった。

## C. 考察

### 1. 難治性・再発性～

初回治療不応性あるいは再発性の非 HIV 関連リンパ腫の予後は自己幹細胞移植を用いた大量化学療法により改善されている。HIV 関連悪性リンパ腫の再発例および初回治療不応例は、免疫不全に伴う易感染状態のため治療困難とされ、極めて予後不良であった。しかし、2003 年イタリアの Reらは難治性再発性 HIV 関連悪性リンパ腫に対して BEAM レジメンを移植前処置にもちいた自己末梢血幹細胞移植を行い Intent to treat の解析で 2 年生存約 40% を報告し、HIV 感染例でも自家移植をもちいた大量化学療法が可能であることを示した。その後、AIDS malignancy consortium 020 study では busulfan- cyclophosphamide を用いて 2 年生存 65%、EBMT では BEAM を用いて 3 年生存 61% をそれぞれ報告している。再発・難治性 HIV 関連悪性リンパ腫に対する自己末梢血幹細胞移植は、長期生存を可能にする有効な治療法として妥当と考えられつつある。

国立国際医療研究センターでは、2006 年から難治性・再発性 HIV 関連悪性リンパ腫に対して、MEAM を前処置に用いた自己末梢血幹細胞移植を実施してきた。MEAM レジメンは自己末梢血幹細胞移植の前処置として最もよく用いられている BCNU を含んだ BEAM をもとに BCNU を MCNU に置換したものである。国立国際医療センターでの非 HIV 関連悪性リンパ腫と対象とした後方視的解析では MEAM の治療効果と治療関連毒性についてほぼ BEAM 療法と同等であった(川畑、萩原、第 28 回日本造血細胞移植学会総会)。単一施設での難治性再発性 HIV 関連リンパ腫に対するサルベージ療法と引き続く、自己末梢血幹細胞移植を目標に治療を行った症例の平均生存期間は 30.6 か月であり、移植を用いない標準的化学療法の平均生存期間 8.5 か月を有意に上回っていた。今回、多施設共同臨床第 II 相試験を実施することにより、日本における難治性再発性 HIV 関連リンパ腫に対する HAART 併用自己末梢血幹細胞移植の安全性および有効性を評価する。

### 2. HIV 関連白血病

今回、全国のエイズ拠点病院と日本血液学会

認定研修施設すべてに調査票を送付し、過半数の施設から回答を得ることができた。また PubMed および医学中央雑誌を用いて既報告の症例を検索し、日本における HIV 合併血液悪性腫瘍をほぼ網羅することができた。これら疾患の発症は HIV 感染が判明してから平均約 4 年を経ていた。約 70% の症例で HAART を施行されていた。日本における白血病の罹患率は 5.1 人/10 万人/年と報告されている。今回の調査では、1991 年から 2010 年までに急性白血病は 20 例 (AML 13 例、ALL 7 例) 確認されたため、エイズ動向委員会の統計を用いた HIV 感染者数から算出した粗罹患率は約 13 人/10 万人/年となる。統計上に捕捉されていない HIV 感染者の実数は未知であるため、正確な罹患率を算出することは現時点では不可能であるが、HIV 非感染者に比して、白血病発症リスクは高いものと考えられる。

## D. 結論

### 1. 難治性・再発性 HIV 関連悪性リンパ腫

日本では、HIV 感染者の増加が問題となっており、他の先進国に比して十分な対策が奏功しているとは言い難い。悪性リンパ腫の発症は 20 人に 1 人とされており、その対策は急務である。今後、研究参加施設を増やし、目標症例数への到達を急ぐ必要がある。

目標症例到達後の解析により、安全性・有効性の確認が得られれば、治療の標準化に向けた新たな臨床研究を予定している。

### 2. HIV 関連血液疾患

今回、全国調査により HIV 感染者における血液悪性腫瘍発症の実態を示すことができた。とくに急性白血病の発症リスクは非 HIV 感染者に比して高い可能性が示唆され、HIV 感染そのものあるいは HAART による薬剤性発がんの可能性も否定できない。

## E. 健康危機情報

1. 難治性・再発性 HIV 関連悪性リンパ腫  
現時点での予期せぬ有害事象報告はない。

2. HIV 関連血液疾患  
該当なし

## G. 研究発表

1. 論文発表

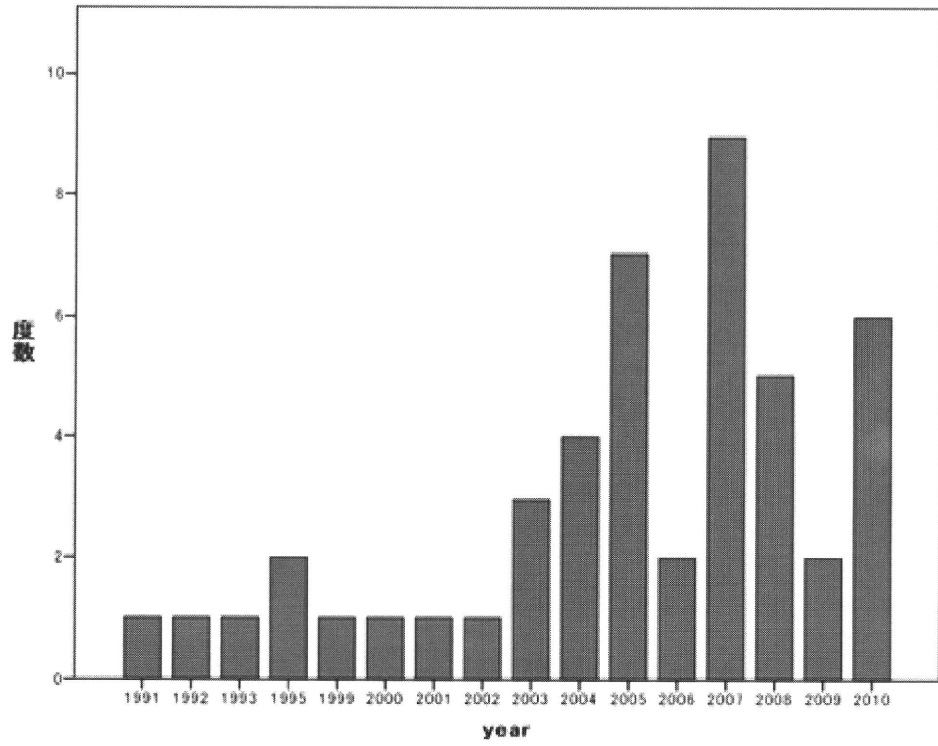
2. 学会発表  
(国際学会)

(国内学会)

- 1) HagiwaraShotaro, TakanoJunichiro,  
KitaharaHideaki, KimuraYuko, TukamotoAyato,  
MiyamaTakahiko, HiraiRisen, TanimuraAkira,  
TakeshitaMasataka, MiwaAkiyoshi,  
TeruyaKatsuji, KikuchiYoshimi, OkaShinichi.  
Acute leukemia in HIV infected patients.第72回  
日本血液学会、2010年9月24-26日、横浜
- 2) GotoHiroki, KitaharaHideaki, TsukamotoAyato,  
KimuraYuko, MiyamaTakahiko, HiraiRisen,  
TanimuraAkira, TakeshitaMasataka,  
HagiwaraShotaro, MiwaAkiyoshi, AokiTakahiro,  
TsukadaKunihisa, TeruyaKatsuji,  
KikuchiYoshimi, OkaShiniti. A case of refractory  
AIDS-related Burkitt lymphoma treated with  
autologous stem cell transplantation. 第72回日  
本血液学会、2010年9月24-26日、横浜

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)  
なし

HIV関連非AIDS指標血液腫瘍年次推移



## エイズ関連リンパ腫の予後マーカーに関する研究

分担研究者 上平 朝子 国立病院機構大阪医療センター 感染症内科

**研究要旨** HIV 関連リンパ腫はエイズ指標疾患のうちでも予後不良の疾患の一つである。また、その発症要因や予後因子も不明である。そこで、これまで当院で加療した HIV 関連リンパ腫について後方視的に調査した。その結果、HIV 関連リンパ腫の生命予後は、節外病変の数、血清 LDH、臨床病期（CS）、日常生活活動性（PS）と関連していた。また、従来の病理組織診断とは異なる病像を呈している症例が存在していることが判った。病理組織により治療方法が異なる場合もあることから、重要な予後因子であると考えられ、さらに検討を続ける。

用いた。有意水準は 5%未満とした。

### A. 研究目的

HIV 患者の予後は、抗 HIV 療法により著明に改善した。しかし、HIV 関連リンパ腫の発生頻度は、非 HIV 合併例の 100 倍以上とされ、抗 HIV 療法後の発症例もある。病理組織診断の難しい例や節外病変が多彩な例も多く、診断に苦慮する場合が少なくない。エイズ関連リンパ腫の病態を詳細に解明し、より有効な治療法の開発や発症予防につなげるため、リンパ腫発症例で retrospective にその発症リスクや予後因子を同定し、発症予防や早期発見につなげる。

そこで、これまで当院で加療した HIV 関連リンパ腫の所見や経過、病理組織について調査し、生命予後と関連する要因について検討した。

### B. 研究方法

2002 年 4 月から 2010 年 4 月まで、当院で HIV 関連リンパ腫と診断された症例（脳原発を除く）について診療録より病歴、発症時の検査所見、臨床経過、転帰を調査した。

病理組織所見および免疫染色は、主に Diffuse large B cell lymphoma（以下 DLBCL）および Burkitt's lymphoma（以下 BL）について調査した。

また DLBCL 15 例において、生存群と死亡群の 2 群間で発症時の所見を比較検討した。統計解析は Fisher 正確検定、Wilcoxon 順位和検定を

### （倫理面への配慮）

調査当院の倫理審査を受け、承認された。個人が特定されないように、氏名・住所・生年月日・カルテ番号といった項目は調査項目から除外した。臨床情報の取り扱いについては注意を行った。

### C. 研究結果

1) 2002 年 4 月から 2010 年 4 月まで、当院で HIV 関連リンパ腫と診断された症例は 23 例であった。DLBCL が 69.5%（16 例）と最も頻度が高く、BL は 17.9%（4 例）、Hodgkin Disease (HD) は 8.6%（2 例）、Plasmablastic Lymphoma (PBL) は 4.3%（1 例）であった。

2) HIV 関連リンパ腫の半数は発症前に抗 HIV 療法が実施されていたが、DLBCL の 76%が CD4 値 200 未満で発症していた。一方、BL は全例で抗 HIV 療法後の発症で CD4 値も DLBCL よりもやや高め、生命予後も比較的良好であった

3) 節外病変として胃・十二指腸病変は最も頻度が高かった。中枢神経系浸潤を認めていた例や節外病変の数が多い例では予後不良の傾向がみられた。

4) DLBCL 症例では、Rituximab を併用した CHOP 療法で寛解導入療法を行った。観察期間での 5 年生存率は 64.2%であった（図 1）。再発・難治例ではサルベージ療法を実施したが予後不良

であった。

5) DLBCL 症例を生存群と死亡群にわけて、2 群間で比較検討したところ、LDH、PS、CS、節外病変数が生命予後との関連性が高い傾向がみられた(表 1、図 2)。年齢、発症時の ART の有無、AIDS 発症の既往と予後との関連はなかった(表 2、3)。

#### 6) 病理組織診断のレビュー

平成 23 年 1 月 7 日に大阪医療センターでエイズリンパ腫の会合を実施し、これまで当院で経験した DLBCL 15 症例、BL 3 例、ホジキンリンパ腫 2 例の全例について病理組織のレビューを行った。

その結果、細胞形態としては古典的な DLBCL と診断できる症例でも、臨床経過から BL と診断してもよいのではないと思われる例のあることが判った。

まず DLBCL と診断されていた 4 症例では、HE 染色で細胞膜と核小体が明瞭な比較的大型のリンパ腫細胞がみられ、細胞の形態としては DLBCL と診断される所見であった。しかし、密集したリンパ腫細胞像がみられており、Ki-67(MIB-1index)陽性がほぼ 100%近い点、リンパ腫細胞の間に混在する小型の T リンパ球(CD3 陽性細胞)が非常に少ない傾向がある、といった BL の病理組織像としても矛盾しない所見がみられた。一方、典型的な DLBCL と診断されていた症例ではその傾向がみられなかった。従って、非 HIV の BL では Mib-1 強陽性(99%以上)としているが、HIV 患者ではその基準は当てはまらないのではないかと考えられた。また、DLBCL や BL とは違う分類のリンパ腫でもよいのではないかという症例もみられたが、一定の見解は得られなかった。

次に BL と診断されていた例では、抗 HIV 療法が導入され、数年が経過していた免疫の状態が安定していた場合では、BL に特徴的な Starry-sky の像がみられ、典型的な BL の病理組織所見を呈していた。しかし、高度の免疫不全状態から別の AIDS 指標疾患を発症し、抗 HIV 療法の導入後、新たにリンパ腫を発症した別の BL 症例では、Starry-sky の像がはっきりせず、細胞の形態は DLBCL に特徴的な所見を呈していた。そして、免疫染色と遺伝子の検索では、CD10

陽性、Ki-67(MIB-1index)陽性 100%、bcl-2 陰性、c-myc 陽性であったことから、intermediate DLBCL/Burkitt lymphoma との診断に至っていた。

ホジキンリンパ腫(2 例)では、免疫不全が高度の例は、Reed-Sternberg 細胞(RS 細胞)はみられるものの、ホジキンリンパ腫と違う病理所見がみられた。一方、抗 HIV 療法を導入され数年が経過した後、ホジキンリンパ腫に典型的な所見を示していた。

#### D. 結論

HIV 関連リンパ腫は節外病変が多く、症状も非特異的である。抗 HIV 療法を実施し数年経過して発症する例もあった。抗 HIV 療法が進歩し、HIV 関連のリンパ腫においても予後は改善されている。CS や PS が進行する前に早期に診断することが重要であると考えられた。

HIV 関連の DLBCL では、年齢、節外病変の数、血清 LDH、臨床病期(CS)、日常生活活動性(PS)を用いた国際予後因子(IPI)と予後との関連が報告されている。今回の検討でも年齢以外は同様の傾向がみられたことから、HIV 患者では青壮年においても発症に注意する必要があると考えられる。

HIV 関連の DLBCL では、BL との鑑別に苦慮する例を経験することから、より適切な診断と治療のために病理組織診断は非常に重要である。今回の当院症例における病理組織のレビューの結果でも、HIV 陽性例のリンパ腫は非 HIV 例と一部病像が異なるのではないかと考えられた。従って、HIV 関連のリンパ腫の病理組織診断においては、細胞形態の他、免疫染色(CD3, CD4, CD8, CD10, CD20)、遺伝子検索(c-myc, bcl-2, bcl-6)、EBV 関連マーカー(EBER, LMP, EBNA)などを含めた総合的な診断が重要であることが示唆された。

今後、難治症例や予後不良症例を中心に免疫染色を追加し、病理組織診断についてさらに検討を続ける。また、新規発症の症例について Prospective に予後因子を検索していきたいと考えている。

## E. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hirokazu Nagai, Takashi Odawara, Atsushi Ajisawa, Shotaro Hagiwara, Tomoyuki Watanabe, Tomoko Uehira, Hideki Uchiumi, Mihoko Yotsumoto, Toshikazu Miyakawa, Akira Watanabe, Toshiyuki Kambe, Mitsuru Konishi, Seiji Saito, Soichiro Takahama, Masao Tateyama, Seiji Okada : Whole brain radiation alone produces favourable outcomes for AIDS-related primary central nervous systems lymphoma in the HAART era, European Journal of Haematology 84:499-505, 2010

### 2. 学会発表

- 1) 上平朝子、矢嶋敬史郎、小川吉彦、谷口智宏、笠井大介、坂東裕基、米本仁史、渡邊大、西田恭治、児玉良典、眞能正幸、白阪琢磨. 当院におけるHIV関連リンパ腫についての検討. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会、2010年11月26日、東京

## H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録
3. その他

表1. DLBCLの患者背景

|                         |                 |                     |
|-------------------------|-----------------|---------------------|
| 症例数                     | 15              |                     |
| 年齢 median(IQR)          | 44 (35 – 58)    |                     |
| CD4 median(IQR)         | 80 (53 – 202)   | (/mm <sup>3</sup> ) |
| VL median(IQR)          | 4.4 (2.7 – 5.8) | (logcp/ml)          |
| n (%)                   |                 |                     |
| Ann Arbor 病期分類 (CS)     | I / II 期        | 6 (40.0)            |
|                         | III / IV 期      | 9 (60.0)            |
| Performance status (PS) | 0 – 1           | 6 (40.0)            |
|                         | ≥ 2             | 9 (60.0)            |
| AIDSの既往                 | 有り              | 8 (53.3)            |
|                         | 無し              | 7 (46.6)            |
| 発症時のART                 | 有り              | 6 (40.0)            |
|                         | 無し              | 9 (60.0)            |
| 節外病変の数                  | 0 – 1           | 7 (46.6)            |
|                         | ≥ 2             | 8 (53.3)            |
| 予後                      | 生存              | 9 (60.0)            |
|                         | 死亡              | 6 (40.0)            |

表2. DLBCL発症時の所見と予後との関連

|                         | p*     |
|-------------------------|--------|
| 年齢                      | 0.1113 |
| CD4 (/mm <sup>3</sup> ) | 0.8597 |
| VL (logcp/ml)           | 1.0    |
| LDH (IU/L)              | 0.0039 |
| sL-2R(U/ml)             | 0.1407 |
| CS                      | 0.0185 |
| PS                      | 0.0035 |
| 節外病変の数                  | 0.0468 |

\* Wilcoxon順位和検定

表3. 発症時のARTの有無、AIDSの既往と予後との関連

|         | 例数       | 生存       | 死亡       | p   |
|---------|----------|----------|----------|-----|
| 症例数     | 15       | 9        | 6        |     |
| AIDSの既往 | 8 (53.3) | 5 (55.5) | 3 (50.0) | 1.0 |
| ARTの有無  | 6 (40.0) | 4 (44.4) | 2 (33.3) | 1.0 |

\*Fisherの正確検定

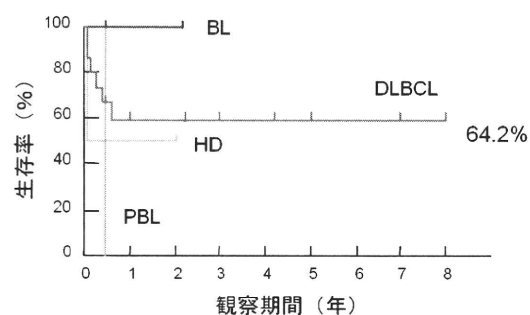


図1. HIV関連リンパ腫の生存曲線

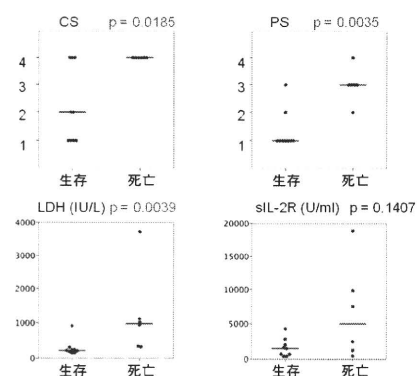


図2 DLBCL症例の生存群と死亡群の発症時所見の比較



## リンパ腫発症検出に関する血清学的検査法に関する研究

分担研究者 照井 康仁 がん研究会癌化学療法センター臨床部 血液腫瘍担当部長

**研究要旨** AIDS 患者のリンパ腫発症を早期に発見することは、診断後の治療効果を大きく改善することが可能であると考えられる。我々はチロシンキナーゼ阻害剤 imatinib により誘導される遺伝子をクローニングし、HIV-suppressive modulator(Murabutide)処理により CD8-depleted PBMNC で発現低下する遺伝子、TRIM68 を同定した。血清中抗 TRIM68 抗体は HIV 患者やシェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスで存在するといわれている。血清中抗 TRIM68 抗体検出 ELISA 法を確立し、各血液がん患者血清にて測定を施行した。この結果、リンパ系腫瘍で高い抗体価を示すことが判明した。

### A. 研究目的

HAART 治療によるエイズ患者の延命により、エイズ関連リンパ腫は、年々増加傾向にある。HIV 関連リンパ腫の治療の問題点は、標準療法が存在せず、治療抵抗性であり、抗がん剤治療によって免疫能がさらに低下する可能性がありリンパ腫治療が成功しても感染死のリスクが高くなることで、予後の改善がみられないことである。

この問題点を解決するためには、リンパ腫診断を早期の段階で行い、より早い段階で治療を開始すれば、免疫能低下も回避できる。さらに、R-CHOP 療法などのリンパ腫治療の免疫系への影響を解析し、免疫系の干渉のより少ない治療法を開発することも必要である。すなわち、早期診断法の確立、予後を延長する治療法を開発は急務な課題である。

我々は、いままで、CD5 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫(DLBCL)の難治性、CD20 遺伝子変異が関与したリツキシマブ抵抗性、HCV 感染リンパ腫患者のリツキシマブ投与後の HCV-RNA 量増加と IgG レベル低下、可溶性 IL-2 受容体レベルの R-CHOP 療法施行後の DLBCL の予後への影響、を報告してきた。チロシンキナーゼ阻害剤イマチニブは EBV

関連リンパ腫に対するリツキシマブの抗腫瘍効果を減弱することが知られ、補体阻害系を可逆化し、補体依存性細胞障害作用を阻害することによってイマチニブはリツキシマブの抗腫瘍効果を減弱するが、NK 細胞への影響はないとされている。

このことより、イマチニブにより発現増強する遺伝子群の解析は意義があり、最近、我々はイマチニブ処理により誘導される TRIM68 遺伝子を同定した。

### 研究方法

TRIM68 遺伝子をクローニングし、無細胞系タンパク合成系ベクターに組み換え、TRIM68 タンパクを合成する。そのタンパクを 96 穴プレートに固相化し、同意取得した患者血清を添加する。96 穴プレートから血清を除去後、洗浄し、ヤギ抗ヒト抗体を添加しする。TMB/E 液による発色を OD450nm にて吸光度測定をした。

### (倫理面への配慮)

ヒト由来試料（血清等）を用いた研究はがん研究会倫理委員会の承認を受け、規則に従い実施している。

1)研究対象者に対する人権擁護上の配慮

研究に用いる血清等は、他の研究目的には使

用しない。血清等は匿名処理を行うため、個人情報流出することはない。また、同意書に署名後も試料採取・使用までの期間に同意を撤回することを可能としている。

## 2) 研究方法による研究対象者に対する利益・不利益

本研究により、直接提供者が医学上の利益・不利益を得ることはない。

## 3) 危険性の排除

採血は、医師が問診した上で健康に問題ないと判断した場合に限り、検査技師が採血している。採血に伴う身体への危険性はありうるが、これは通常の診療行為を越えるものではない。一回の採取量は約 10ml であり、採血量は、本人の了解のもとに決定している。

## 4) インフォームドコンセントに係わる状況

血液採取に関しては、がん研究会有明病院のスタッフ（医師）が本研究の趣旨を説明し、血液提供の同意を得られた方のみ同意書に署名していただいている。この際、説明を行った医師名を明記し、同意書はがん研究会において厳重に保管している。

## B. 研究結果

### 1) TRIM68 遺伝子の同定と特徴

TRIM68 は RING finger タンパク 137 で、RING finger ドメインを N 末端に有し、SS-56 ともいわれる。分子量 56kDa で主に細胞質、核膜周辺に局在する。多くの組織で発現しているが、特に脾臓や肝臓で強発現している。RING finger タンパクは ubiquitin あるいは sumo E3 リガーゼ活性を有するが、我々の解析で、ubiquitinE3 リガーゼであることが判明した。現在、その基質の探索と結合タンパクの解析を行っている。

### 2) 抗 TRIM68 抗体検出 ELISA 法の確立

無細胞系タンパク合成系ベクターに組み換え、TRIM68 タンパクを合成した。TRIM68 タンパクを 96 穴プレートに固相化し、既存の抗 TRIM68 抗体を各濃度で添加した。96 穴プレートから血清を除去後、洗浄し、ウサギ抗マウス抗体を添加しする。TMB/E 液による発色を OD450nm にて吸光度測定をし、検量線を作製した。

### 3) 各種血液がんにおける血清抗 TRIM68 抗体

## の測定

同意を得られた血液がん患者 254 名から血液を採取し、血清分離を行った。疾患の内訳は DLBCL 104 例、MALT 9 例、FL57 例、MCL 8 例、BL4 例、CLL/SLL2 例、B-LBL1 例、SMCL2 例、HL15 例、AITL4 例、MM 21 例、ALCL3 例、NK/T3 例、PTCL10 例、ATLL3 例、AML6 例、CML1 例、その他のがん 3 例であった。血清抗 TRIM68 抗体の吸光度平均値はそれぞれ、DLBCL0.45、MALT0.16、FL0.32、MCL0.46、BL0.28、CLL/SLL1.10、B-LBL1.06、SMCL0.87、HL0.34、AITL0.77、MM0.22、ALCL0.45、NK/T0.82、PTCL0.30、ATLL0.52、AML0.17、CML0.31、その他のがん 0.33 であった。DLBCL では病期に関係なく平均値が同等であったが、抗 TRIM68 抗体 0.4 未満と 0.4 以上で層別化すると 0.4 以上で病期 III/IV の割合が高かった。しかしながら、生存期間中央値には有意差はなかった。また、FL に関しては病期が進行するにつれて、抗 TRIM68 抗体平均値が高くなった。

## C. 考察

血清抗 TRIM68 抗体はリンパ系腫瘍で検出される可能性が高く、リンパ系腫瘍の早期発見に応用できる可能性が示唆された。

また、Indolent リンパ腫に比較し、Aggressive リンパ腫で高く検出される傾向があり、HIV 関連リンパ腫では DLBCL がほとんどであり、DLBCL は病期に関係なく血清抗 TRIM68 抗体が高いことから、HIV 患者のリンパ腫早期診断に応用できる可能性がある。

また、FL では病期が進行すると高い傾向があった。

しかしながら、白血球数、ヘモグロビン値、血小板数、LDH、sIL-2R、β2MG とは関連しないことはわかっており、リンパ系腫瘍の特異性が示唆された。

## D. 結論

TRIM68 の同定により、リンパ系腫瘍における血清抗 TRIM68 抗体の検出が早期診断に応用できる可能性が示唆された。今後、症例数を増やし、治療における推移、再発の早期検出への応用、免疫系との関連（リンパ球、CD4/CD8 など）を解析していきたいと考えている。

## E. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kobayashi T, Kuroda J, Ashihara E, Oomizu S, Terui Y, Taniyama A, Adachi S, Takagi T, Yamamoto M, Sasaki N, Horiike S, Hatake K, Yamauchi A, Hirashima M, Taniwaki M. Galectin-9 exhibits anti-myeloma activity through JNK and p38 MAP kinase pathways. *Leukemia* 24(4):843-50, 2010.
- 2) Matsusaka S, Chin K, Ogura M, Suenaga M, Shinozaki E, Mishima Y, Terui Y, Mizunuma N, Hatake K. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. *Cancer Sci* 101(4):1067-71, 2010.
- 3) Ogura M, Tobinai K, Hatake K, Uchida T, Kasai M, Oyama T, Suzuki T, Kobayashi Y, Watanabe T, Azuma T, Mori M, Terui Y, Yokoyama M, Mishima Y, Takahashi S, Ono C, Ohata J. Phase I study of inotuzumab ozogamicin (CMC-544) in Japanese patients with follicular lymphoma pretreated with rituximab-based therapy. *Cancer Sci.* 101(8):1840-1845, 2010.
- 4) Ueda K, Yokoyama M, Asai H, Koudaira M, Yamada S, Katsube A, Mishima Y, Sakajiri S, Takeuchi K, Saotome T, Terui Y, Takahashi S, Hatake K. Efficacy of CHOP+/-Rituximab-like therapy plus radiation therapy for patients with diffuse large B-cell lymphoma stage I. *Gan To Kagaku Ryoho* 37(5):853-7, 2010.
- 5) Asai H, Yokoyama M, Terui Y, Ennishi D, Takeuchi K, Hatake K. Is statin use really associated with efficacy of rituximab? *J Clin Oncol* 20;28(24):e424-5; author reply e427-8, 2010.
- 6) Ohmachi K, Ando K, Ogura M, Uchida T, Itoh K, Kubota N, Ishizawa K, Yamamoto J, Watanabe T, Uike N, Choi I, Terui Y, Usuki K, Nagai H, Uoshima N, Tobinai K; The Japanese Bendamustine Lymphoma Study Group. Multicenter phase II study of bendamustine for relapsed or refractory indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma. *Cancer Sci.* 2010, in press.
- 7) Takeuchi K, Yokoyama M, Ishizawa S, Terui Y, Nomura K, Marutsuka K, Nunomura M, Fukushima N, Yagyuu T, Nakamine H, Akiyama F, Hoshi K, Matsue K, Hatake K, Oshimi K. Lymphomatoid Gastropathy: A Distinct Clinicopathological Entity of Self-limited Pseudomalignant NK-cell Proliferation. *Blood* 116 (25): 5631-5637, 2010.

## H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## エイズリンパ腫発症危険因子の探索

分担研究者 渡邊 俊樹 東京大学大学院新領域創成科学研究科  
メディカルゲノム専攻病態医療科学分野 教授

研究協力者： 片野晴隆（国立感染症研究所感染病理部）  
中野和民、山岸誠（東京大学大学院新領域創成科学研究科  
メディカルゲノム専攻病態医療科学分野）

**研究要旨** エイズ合併リンパ腫検体由来RNAと正常扁桃RNAの解析を行った結果、リンパ球細胞で重要な機能を持つ miR-31 は異常に低下していることがわかった。miR-31 は NF- $\kappa$ B 経路の非定型的経路の上流に位置する NIK を標的にする。miR-31 の発現減少は NIK の発現亢進を介した NF- $\kappa$ B 経路の恒常的活性化を誘導し、その結果、細胞の増殖性、アポトーシス抵抗性に大きく関与することがわかった。ゲノムおよびエピゲノムの解析の結果、miR-31 の発現は転写レベルで制御されており、ヒストンメチル化酵素複合体の活性化による抑制的クロマチン構造が原因であることがわかった。このように miR-31 の低下は腫瘍細胞の特徴に大きく寄与しており、発症危険因子の候補としても有用であることが示唆された。

### A. 研究目的

HIV 感染者はエイズ発症期に、ニューモシスチス肺炎やサイトメガロウイルスなどの日和見感染症の他にカポジ肉腫、リンパ腫などの悪性腫瘍を合併する。近年の Highly Active Anti-Retroviral Therapy (HAART) の導入により、多くの日和見感染症は減少する傾向にあるが、カポジ肉腫、リンパ腫は逆に発症率としては増加傾向にある。エイズ合併リンパ腫 (AIDS-related lymphoma, ARL) は一般に進行が早く、コントロールが困難で致死率も高い。HIV 感染者の 5~20% の例でエイズ合併リンパ腫を発症するとされ、3-4% においてはその発症が AIDS の診断につながっている (Little et al., JAMA 2001;285,1880)。HAART の導入後 ARL の発症は減少しているが、最も減少したのは中枢神経原発のリンパ腫である。ARL は依然とし

てエイズ患者の予後を左右する重大な合併症であり、その治療法の開発、及び発症危険因子の探索は急務である。

我々は前年度までに、NF- $\kappa$ B の特異的阻害剤である DHMEQ を用いて、LCL および PEL 細胞株における NF- $\kappa$ B 活性抑制効果および細胞死誘導能を報告してきた。また種々の PKC 阻害剤を用いた実験を行い、NF- $\kappa$ B pathway の重要性を見いだした。さらに、癌細胞で発現異常を示し、発癌および悪性化に深く関わっている microRNA について特に注目し、エイズリンパ腫検体を用いてその特徴についてアプローチしてきた。

miRNA は 21-23mer の小さな RNA で、様々な遺伝子の 3'UTR に結合し、遺伝子発現を負に制御する機能性 RNA であるが、標的配列の揺らぎが存在するため、一つの miRNA が様々な遺伝子の発現を制御する非常にインパクトの大き

い細胞性因子として研究が急速に進んでいる。microRNA の発現異常は、細胞内の遺伝子発現の攪乱を引き起こし、腫瘍化あるいは悪性化と強く結びついている。これらの背景からもエイズリンパ腫における microRNA の解析は必須であると考えられた。

今年度は、都立駒込病院及び国立感染症研究所で凍結保存されているエイズ合併リンパ腫検体を用いて、実際のエイズリンパ腫細胞における NF- $\kappa$ B 活性化の分子メカニズムを解析することを目的とした。網羅的解析と統計処理が可能な検体の利用を考慮し、ヒトゲノム倫理審査の申請を行った。

さらにこれまでに発見した、NF- $\kappa$ B の活性化に関わる microRNA について特に注目し、エイズリンパ腫検体及びモデル細胞株での発現挙動とその生物学的意義について詳細に検討を行うこととした。

## B. 研究方法

### (1) エイズリンパ腫サンプルを用いた microRNA (miRNA) の発現解析

エイズリンパ腫検体、及び正常リンパ節標本は、東京大学医科学研究所及び国立感染症研究所のヒトゲノム倫理審査委員会に申請し、承認を得た後に解析を行った。エイズリンパ腫検体、及び正常リンパ節より抽出した total RNA を用いて、注目する miRNA に特異的な定量的 RT-PCR を行った (miRNA Assays, Applied Biosystems)。miRNA の網羅的解析には、Human miRNA microarray kit v2 (Agilent Technologies) を用いて解析を行った。

### (2) NF- $\kappa$ B 経路を活性化する miR-31 の減少についての解析

miR-31 の減少が細胞にどのような影響を与えるのかを検討するために、miR-31 を恒常的に発現誘導するレトロウイルスベクターを作成し、さまざまなリンパ球由来細胞株に導入することにより、miR-31 の機能解析を行った。NF- $\kappa$ B 経路の解析には Western blotting、EMSA、NF- $\kappa$ B-reporter assay により解析を行った。

### (4) miR-31 発現減少の分子メカニズムの解析

エイズリンパ腫で減少している miR-31 の発現量を規定する因子を同定するために、ゲノム中の miR-31 をコードする領域について、ChIP assay を用いてヒストンのメチル化の解析を行った。各メチル化特異的ヒストン抗体を用いて免疫沈降したのち、miR-31 領域、MYT1 遺伝子領域、GAPDH 領域について real-time PCR を用いて定量を行った。さらに、miR-31 の発現を制御する因子についてノックダウン等の実験を行い、その影響を検討した。

### (5) miR-31 及び関連遺伝子を制御するレンチウイルスベクターの作成とその利用についての検討

エイズリンパ腫のモデルとして LCL を利用するため、LCL に高効率に遺伝子を導入できるレンチウイルスベクターの作成とその条件検討を行った。レンチウイルスベクターシステムは理化学研究所バイオリソースセンター三好浩之教授が開発した系を利用し、miR-31 の高発現を誘導する系の作成を行った。

## C. 研究結果

### 1) miRNA 発現解析

まずエイズリンパ腫のモデルとなる細胞株および EBV 感染リンパ芽球様細胞 (LCL) を用いて、real-time PCR 法により miRNA の発現レベルの検討を行った。LCL は EB ウイルス感染によって不死化した B 細胞であり、エイズリンパ腫の細胞レベルでの検討に有用なモデルである。定量実験の結果、我々がこれまでに発見した、T 細胞の増殖やアポトーシスに重要な miR-31 の発現が、リンパ腫モデル細胞株においても異常に低下していることが明らかとなった。エイズ関連リンパ腫は B 細胞性リンパ腫でも悪性度が高く、NF- $\kappa$ B シグナルの活性化レベルも高いと考えられる。また EBV 感染によって発現するウイルス遺伝子 LMP1 によっても NF- $\kappa$ B が活性化されることが多数報告されており、NF- $\kappa$ B シグナルに重要な miR-31 のレベルが低下している事実は、エイズリンパ腫の特徴を示すものであると考えられた。そこで B 細胞における miR-31 の発現低下の生物学的意義と、その原因について以下の検討を行った。

まず、エイズリンパ腫細胞における miR-31 の発現動態を正確に得るために、実際の患者由来細胞を用いて解析することで、細胞株で得られた情報と比較を行った。東京大学と国立感染症研究所のヒトゲノム研究倫理審査申請を行い、エイズリンパ腫検体の研究利用の手続きを進めたのち、解析を行った。パラフィン標本から全 RNA を抽出した後、miR-31 及び内在性コントロールの RNU48 について、特異的 RT-PCR 法により検出及び定量を行った。エイズリンパ腫に対する正常コントロールとして扁桃由来 RNA を用いた。その結果、エイズリンパ腫由来細胞では正常扁桃と比較し、miR-31 の発現が 1/10～1/100 程度まで減少していることがわかった。これまでに癌研究において miRNA の発現異常が多数報告されているが、その多くは 2～5 倍程度の差であり、2 桁の違いを示す miRNA は他に例がない。そこでこの miR-31 の異常な発現減少についてさらに検討を行った。

## 2)miR-31 の機能解析

我々はこれまでに、miR-31 の新規標的遺伝子として、NF- $\kappa$ B シグナルの上流に位置する Kinase である NF- $\kappa$ B inducing kinase (NIK)を同定した。そこで実際に miR-31 の細胞内レベルが NIK の発現レベルに影響するか否かを検討するために、miR-31 を過剰に発現するレトロウイルスベクターを作成し、様々な細胞株に導入した後、NIK の RNA およびタンパク質レベルを検討した。その結果、様々な細胞種において miR-31 のレベルと NIK の RNA およびタンパク質レベルが逆相関を示すことが明らかになった。また 3' UTR の seed 配列に変異を導入したレポーターアッセイにより、miR-31 が結合する重要な配列を決定することができた。

NIK は NF- $\kappa$ B シグナルの非定型的経路の上流で働くリン酸化酵素であるが、これまでの複数の報告により定型的経路に対しても重要な役割を持つ事が報告されている。レトロウイルスベクターによって過剰に発現させた miR-31 は、NIK のレベルを低下させることにより、下流の p52 の成熟化の低下を経て非定型的経路を抑制するだけでなく、I $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化レベルを低下させることにより定型的経路に対しても影響

することがわかった。

NF- $\kappa$ B の恒常的活性化は本研究で対象とする B 細胞性リンパ腫だけでなく、他のリンパ腫や白血病細胞、また多くの固形癌細胞で見られ、腫瘍細胞の特徴である増殖性およびアポトーシス抵抗性に寄与する。実際に NF- $\kappa$ B を標的として様々な抗腫瘍性の薬剤が開発されており、NF- $\kappa$ B シグナルの活性化に寄与する新たな因子は重要な知見であると考えられる。本研究において miR-31 を腫瘍細胞に発現させることにより、細胞増殖能を低下させ、さらにアポトーシスの感受性を高めることがわかった。したがって、エイズリンパ腫細胞における miR-31 の低下は NF- $\kappa$ B シグナルの活性化を介して細胞の増殖や抗アポトーシスに寄与することが示唆された。さらに、miRNA は標的配列のゆらぎがあり、複数の遺伝子を同時に負に制御することが知られている。miR-31 についても RhoA や Radixin などの細胞運動に関わる遺伝子群が制御されることが報告されており、エイズリンパ腫における役割についても今後の重要な検討課題であると考えられた。

## 3)miR-31 発現制御機構の検討

一般的に miRNA の研究は、標的遺伝子の同定とその生物学的意義を求めることが主であるが、個々の miRNA の発現を制御する分子機構は発現異常の原因を示す重要な情報であり、新たな発症危険因子及び分子標的としても有用であると期待される。エイズリンパ腫で大幅な発現減少が見られた miR-31 について、コードする DNA 領域を検索した結果、多くの種類の腫瘍細胞でゲノムの欠損が蓄積する、細胞周期調節因子である INK4 family もコードする 9p21.3 の領域に位置することがわかった。エイズリンパ腫の多くがびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫(DLBCL)であるが、DLBCL の 20%以上の症例で 9p21.3 の領域に欠損があり、miR-31 の領域も付随的に欠損することが報告されていることから、ゲノム異常が miR-31 の低下に寄与することが考えられた。また本研究においてさらに miR-31 の領域を詳しく調べた結果、hsa-miR-31 の転写開始点近傍に YY1 という DNA 結合因子の認識配列が非常に強く蓄積し

ていることを発見した。この YY1 は Polycomb family に属する因子で、クロマチン構造を制御するヒストンメチル化酵素複合体のリクルーターとして働くことで近年注目されている。そこで YY1 依存的に Polycomb グループがリクルートされ、エピジェネティックな制御がされるかを検討するために、YY1 をノックダウンする shRNA を発現するレトロウイルスベクターを作成し、その影響を検討した。その結果 YY1 によってリクルートされる PRC2 構成因子である EZH2 などのタンパク質群が miR-31 の領域から離れ、さらにヒストンのメチル化が減少することがわかった。さらに同様に、PRC2 構成因子である EZH2 及び SUZ12 を shRNA によってノックダウンした結果、ヒストンの脱メチル化を経て、miR-31 の発現が回復することことが明らかとなった。以上の観察から、miR-31 は腫瘍細胞にとって重要な miRNA であり、ゲノムの不安定性とエピジェネティックな異常によって引き起こされることがわかった。

続いて、これらの異常が起こるメカニズムをさらに検討した。miR-31 を負に制御する EZH2 及び SUZ12 は多くの腫瘍細胞で過剰発現しており、エピジェネティックな異常を引き起こして腫瘍細胞の特徴に寄与していることが多数報告されている。Polycomb のノックダウンにより、miR-31 の発現回復を介して、活性化していた NF- $\kappa$ B シグナルが抑制されることがわかった。このことから、これまでに別々の機能的イベントとして考えられてきた Polycomb によるエピジェネティックな制御と NF- $\kappa$ B シグナルの制御が、miR-31 の発現制御を介してつながる可能性が示唆された。この概念はリンパ球系腫瘍だけでなく、乳がん細胞株でも同様の結果を得たことから、miR-31 の発現調節機構は一般的な分子機構であることが示唆された。

#### 4) エイズリンパ腫検体を用いた miRNA の網羅的発現解析の準備

エイズリンパ腫における発症危険因子の同定を試みるために、エイズリンパ腫検体を用いた miRNA の網羅的発現解析の準備を進めている。現在検体の収集を終え、今後クオリティーチェックの後、microarray を用いて解析する予定で

ある。

#### 5) miRNA の発現を誘導するレンチウイルスベクターの作成と応用

エイズリンパ腫の研究モデルとなる LCL や B 細胞株、あるいは末梢血由来リンパ球などの、より生理的条件に近い環境で miRNA の研究を行う上で、高効率に遺伝子を導入する系が必要となる。そこで、リンパ球細胞に効率よく導入できるレンチウイルスベクターの作成に取りかかっている。リンパ球細胞でより高い発現を維持する EF-1 プロモーターを採用し、293T 細胞を用いて高い感染力を持つウイルスを作成した。このベクターは Venus 遺伝子(GFP の改変型)を搭載しているため、導入した細胞を FACS や顕微鏡でモニターすることができる。現在この系を用いて miR-31 を正常リンパ球および LCL に導入し、その効果を検討している。

#### D. 考察

近年の報告から、悪性度の高い DLBCL では特に NF- $\kappa$ B の恒常的な活性化が報告されている。NF- $\kappa$ B の Noncanonical pathway は最近になり注目を集めているシグナル伝達経路で、B 細胞の増殖や分化に特に重要な役割を果たし、B 細胞性の悪性リンパ腫の分子標的を考える上で重要である。さらに EB ウイルス遺伝子の LMP-1 は Noncanonical pathway の上流に位置し、NIK を介して恒常的に NF- $\kappa$ B のシグナルを伝える。このようにエイズリンパ腫の分子メカニズムの理解と、そこから得られる新しい治療法の開発、そして危険因子の同定を考える上で NF- $\kappa$ B の研究は非常に重要だと考えられる。本年度に明らかにした miR-31 の発現減少とその意義、そして発現制御機構は、エピジェネティックな変化と NF- $\kappa$ B の制御機構をつなぐ新たな概念であり、エイズリンパ腫に留まらず、他の悪性リンパ腫、種々の白血病、NF- $\kappa$ B の活性化を伴う乳がんなどの固形癌に対しても新たな知見を与えるものであると考えられる(概念図参照)。また NF- $\kappa$ B は炎症、細胞増殖、分化、細胞運動など、種々の生物学的意義を持つものであり、本研究の成果は基礎と臨床の両面に寄与すると期待される。

悪性腫瘍の特徴の一つが、アポトーシスに対する抵抗性である。異常な細胞が淘汰されず生存し続ける結果、悪性化が増大する。また治療抵抗性に対しても寄与しており、エイズリンパ腫を考える上でも重要な課題である。NF- $\kappa$ B 経路の活性化はアポトーシス抵抗性に対して大きく寄与する。その多くは Bcl-x1 や FLIP などのアポトーシス抑制因子の発現亢進が作用点であり、近年リンパ球細胞においては、NF- $\kappa$ B の noncanonical pathway が特に重要であると報告された。miR-31 の発現低下がこれらの遺伝子発現に対してどのように寄与するか、より生理的条件に近いモデルで検討する必要があると考えられる。現在準備を進めているレンチウイルスベクターは、アポトーシスや細胞周期、増殖解析などに非常に有用であると考えられる。HIV-1 や EB ウイルスといった感染症と合併するエイズリンパ腫は、他の悪性リンパ腫に比べて悪性度も高く、ユニークな分子病態を持つと考えられる。miRNA の発現解析はこれまでに報告がなく、エイズリンパ腫における miRNA の網羅的発現解析は、発症危険因子の同定に大きく役立つと期待される。

## E. 結論

エイズリンパ腫などの悪性リンパ球細胞において、miR-31 の発現が異常に低下しており、NF- $\kappa$ B の活性化に寄与する。ゲノムおよびエピゲノムでの変化が新たな危険因子となる可能性がある。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Kagami Y, Tsutsumi A, Matsuda Y, Matsubara A, Muto S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T; Polycomb-Mediated Loss of miR-31 Activates NIK-dependent NF- $\kappa$ B Pathway in Adult T-cell Leukemia and Other Cancers. *Cancer Cell* (投稿中)

(総説)

- 1) 渡邊俊樹、「特集細胞死と造血器腫瘍 ウ

イルスによる細胞死抑制と造血器腫瘍」、血液内科、62 (2) : 200-207、2011

### 2. 学会発表

(国際学会)

- 1) Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Kagami Y, Tsutsumi A, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Watanabe T, “Loss of miR-31 links NF- $\kappa$ B activation in Adult T-cell leukemia”, Viruses, Genes ad Cancer-2010, Venezia, Italy, Sep. 30, 2010 (Sep. 29 – Oct.1, 2010) (Poster)

(国内学会)

- 1) 山岸誠、三宅在子、中野和民、片野晴隆、岡田誠治、渡邊俊樹、「エイズ関連悪性リンパ腫における miRNA の発現異常とシグナル伝達系に与える影響」、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月 24 日 (2010 年 11 月 24 日～26 日) (ポスター発表)
- 2) 山岸誠、中野和民、三宅在子、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「ATL 細胞における Polycomb 依存的 miR-31 の発現制御機構と NF- $\kappa$ B 経路に与える影響の解析」、日本エピジェネティクス研究会第 4 回年会、鳥取、2010 年 5 月 28 日(2010 年 5 月 28 日～29 日) (ポスター発表)
- 3) 山岸誠、中野和民、三宅在子、加賀美弥生、包明久、宇都宮與、山口一成、内丸薫、小川誠司、渡邊俊樹、「ATL 細胞におけるエピジェネティックな異常は、miR-31 発現低下を介して NF- $\kappa$ B の恒常的活性化に寄与する」、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 8 日(2010 年 11 月 7 日～9 日) (口頭発表)
- 4) Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Kagami Y, Tsutsumi A, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Watanabe T, “Loss of miR-31 links NF- $\kappa$ B activation in adult T-cell leukemia”, 第 72 回日本血液学会学術集会、横浜、2010 年 9 月 25 日 (2010 年 9 月 24 日～26 日) (口演発表)
- 5) 山岸誠、中野和民、三宅在子、加賀美弥生、

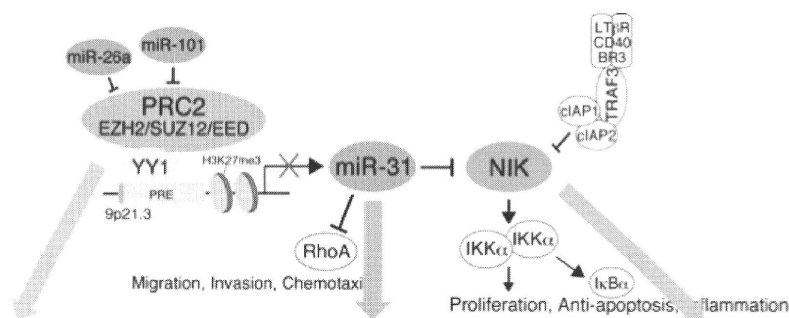


- 包明久、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「ATL 細胞におけるエピジェネティックな異常による miR-31 の発現低下と NF-κB 活性化機構」、第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22 日 (2010 年 9 月 22 日～24 日) (口演発表) なし
- 6) 山岸 誠、中野和民、三宅在子、矢持忠徳、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸 薫、渡邊俊樹、「ATL細胞におけるmiR-31発現低下によるNF-κBの恒常的活性化機構」、第50回日本リンパ網内系学会総会、2010年6月19日 (2010年6月18日～19日) (ポスター発表) 3. その他  
なし
- 7) 中野和民、山岸 誠、三宅在子、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病 (ATL) 患者でのmicroRNA発現異常の実態」、第50回日本リンパ網内系学会総会、2010年6月18日 (2010年6月18日～19日) (口頭発表／ポスター発表)
- 8) 小林美栄、山岸誠、原拓馬、松田有加、三宅在子、中野和民、石田尚臣、渡邊俊樹、「HIV-1由来新規antisense RNA, ALeの同定と機能解析」、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月7日(2010年11月7日～9日) (口頭発表)
- 9) 小林美栄、山岸誠、原拓馬、松田有加、三宅在子、中野和民、石田尚臣、渡邊俊樹、「HIV-1由来新規anisense RNA, Aleはウイルス増殖を抑制する」、第24回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010年11月24日 (2010年11月24日～26日) (ワークショップ)
- 10) Matsuda Y, Yamagishi M, Kobayashi M, Hara T, Ishida T, Watanabe T, “Polycomb repressive complex2 suppresses HIV-1 transcription”, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010年12月8日 (2010年12月7日～10日) (ポスター発表)

#### H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録



|   |  |  |
|---|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>・ PRC2の活性中心である EZH2はDLBCL,FL,BLなどの多くの腫瘍細胞で高発現</li> <li>・ Polycomb familyの異常な活性化は、多くの遺伝子発現異常を引き起こし、腫瘍化、悪性化へ寄与</li> <li>・ 治療標的として注目</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 乳がんの転移能と関連</li> <li>・ 異常な低下は標的遺伝子 (RhoA, RDX, NIK)などの発現を誘導する。</li> <li>・ ATLにおける異常な減少</li> <li>・ リンパ球の活性化によって変動する。</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ NF-κBシグナルの上流に位置し、発現量の上昇は下流への恒常的な活性化を誘導する。</li> <li>・ DLBCLMMなどで発現量が上昇、非定型的経路の活性化が腫瘍化に重要。</li> <li>・ EBVIによるNF-κBIに重要</li> </ul> |
|---|--|--|

概念図

エイズリンパ腫で大きく発現低下を示す miR-31 はエピジェネティックな変化によって抑制される。miR-31 の発現低下は NIK を介した恒常的 NF-κB の活性化に寄与する。これらの因子は多くのガン細胞で重要な機能を持つ因子群であり、新しい関係性を見出すことに成功した。

## エイズリンパ腫の新たな病型分類法と新規病因の探索

研究分担者：片野晴隆（国立感染症研究所感染病理部）

研究協力者：渡邊俊樹（研究分担者、東京大学新領域）

比島恒和（駒込病院病理診断科）

坂本康太、佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）

研究要旨：エイズ患者におけるリンパ腫の発症率は増加傾向にあり、いわゆる「いきなりエイズ」の患者発症するリンパ腫には Epstein-Barr virus (EBV)陽性日和見リンパ腫が多い。近年、様々な悪性腫瘍の発症にマイクロ RNA(microRNA, miRNA)が関与することが報告されており、EBV もそのゲノム中に miRNA がコードされている。本研究では日本人エイズリンパ腫症例における miRNA の発現プロファイルを明らかにし、エイズリンパ腫発症における EBV miRNA の関与を検討した。エイズリンパ腫 18 例を含む病理組織標本から抽出した RNA を用いて、EBV がコードする 39 種類の miRNA とコントロールとしてヒト miR16 の発現を定量的 PCR で解析したところエイズリンパ腫では miR-BART7-1 や miR-BART13 などの発現の亢進が見られた。一方で BHRF1 にコードされる miRNA の発現はどの EBV 関連疾患においても発現が限定されていた。エイズリンパ腫では他の EBV 関連腫瘍よりも高コピー数の EBV miRNA が検出されており、宿主の免疫不全状態が EBV miRNA の発現に関与している可能性が示唆された。これらのデータは EBV 関連エイズリンパ腫の発症機構と EBV miRNA の関連を考える上で重要な基礎資料となる。

### A. 研究目的

近年、エイズ患者におけるリンパ腫の発症率は増加傾向にある。平成21年度厚生労働科学研究費エイズ対策研究の報告書（日和見感染症の診断・治療およびそれを端緒とするHIV感染者の早期発見に関する研究、研究代表者：長崎大学 安岡彰）によるとリンパ腫はエイズ患者の約5%に発症し、カポジ肉腫と並んで、エイズ合併悪性腫瘍として重要な疾患である。しかも、エイズリンパ腫は死亡率が0.4と、他の日和見感染症と比べても高い。エイズ患者においてリンパ腫が発症する機序は未だに不明な点が多い。かつて、HAARTが導入される前は、エイズリンパ腫のほとんどの症例から Epstein-Barr virus (EBV)が検出され、エイズリンパ腫はEBV

関連の日和見リンパ腫と考えられていた。しかし、HAART導入以降、エイズリンパ腫の病型は変化しつつあり、様々な種類のリンパ腫が混在してあらわれるようになった。すなわち、エイズリンパ腫のうち、EBV関連の日和見リンパ腫は5割程度に減少し、残りはEBV陰性のリンパ腫である。いわゆる「いきなりエイズ」の患者に合併するリンパ腫ではEBV陽性日和見リンパ腫が多く、一方で、長期に渡りHAARTが施行されている患者では EBV陰性のリンパ腫が多い傾向がある。EBV陰性エイズリンパ腫ではウイルス以外の因子や未同定の病原体が関与していることも否定できない。いずれにせよ、これらのHAART時代のエイズリンパ腫の抑制には、発症機構ごとにリンパ腫症例を分類し、

発症機構に基づいた的確な治療法を選択することが理想であるが、現状では発症機構が不明な症例が多く、分類は難しい。

とはいえ、現在でもエイズリンパ腫の約半数はEBV陽性の日和見リンパ腫と考えられ、エイズ患者におけるEBV関連リンパ腫の発症機構の解明は特に重要である。近年、様々な悪性腫瘍の発症にマイクロRNA(microRNA, miRNA)が関与することが報告されている。miRNAは20塩基ほどの短いRNAで、ヒト細胞でも1,000種類以上がコードされ、miRNAの種類によっては細胞内に大量に発現していることが明らかになっている。miRNAの機能は特定の messenger RNA(mRNA)の発現や機能を抑制することであり、多くの遺伝子発現の制御に関わっていると考えられている。miRNAは短いだけに細胞内外できわめて安定で、各臓器のみならず、血清中などにも存在する。また、ホルマリン固定パラフィン包埋標本でも保たれており、病理組織標本においても検出可能である。miRNAは細胞のみならず、多くのDNAウイルスにコードされていることが報告されており、EBVと同じガンマヘルペスウイルスであるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV, human herpesvirus 8, HHV-8) では、ウイルスがコードするいくつかのmiRNAが細胞周期の促進やウイルスの潜伏感染の成立に関与している可能性が示されている。そこで、本研究ではEBV陽性のエイズリンパ腫症例について、EBVのmiRNAの発現プロファイルを明らかにし、他のEBV関連腫瘍と比較することで、EBV陽性エイズリンパ腫の特徴を把握し、発症機構の解明につながる知見を得ることを目的とする

## B. 研究方法

### 1. 検体

細胞はEBVで形質転換したヒトB細胞株 lymphoblastoid cell line (LCL)を4株、EBV陽性バーキットリンパ腫細胞株 Raji、EBV陰性KSHV陽性 primary effusion lymphoma 株 BCBL-1 および TY-1 を用いた。さらに国立感染症研究所感染病理部に保管されているホルマ

リン固定パラフィン包埋標本、または、凍結組織の病理検体のうち、EBV陽性のエイズリンパ腫 (diffuse large B cell lymphoma, DLBCL) 15例、EBV陰性非エイズ関連リンパ腫 (DLBCL) 3例、EBV陽性ホジキンリンパ腫 (非エイズ) 6例、EBV陽性胃癌4例を使用した。

### 2. RNA抽出

細胞、および組織からの miRNA を含む total RNA の抽出は PureLink FFPE RNA extraction kit (Invitrogen) を使用した。

### 3. miRNA の定量

miRNA の定量は miScript PCR system (Qiagen) の miScript Reverse Transcription Kit を用いて逆転写反応を行い、miScript Primer Assays および miScript SYBR Green PCR Kit を用いて行った (図1)。EBV の miRNA を検出する primer は miScript Primer Assays (Qiagen) を用いた。また、定量値を標準化するためにヒト miRNA である miR16 を同様の方法で検出した。

### 4. EBV RNA の定量

EBV がコードする RNA である EBV-encoded small RNA (EBER) と LMP1, LMP2 の mRNA, およびヒト beta-actin の mRNA を Taqman real time RT-PCR で検出した。

(倫理面への配慮)

本研究は国立感染症研究所 ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の審査、承認を得て行った。(承認番号 157 および 271)

## C. 研究結果

### 1. 細胞株における EBV miRNA の発現

EBV 感染細胞株における EBV miRNA の発現の検討を行った (図2)。LCL 4 株においては miR-BART1-3p-1 や miR-BART1-15-1、BHRF-1 にコードされる miRNA など、いくつかのウイルス miRNA の発現が共通して見られた。一方で、Raji ではウイルス miRNA の発現は限定されており、その発現は BHRF-1-1-1 などに限られた。同時に検出した EBV の EBER, LMP1,2 の発現は、beta-actin との比で見ると LCL でも株間で大きな違いがあるもの