

の、いずれの LCL でも発現していた。Raji では EBER の発現のみが見られ、latency I の潜伏感染様式が示唆された。以上の結果は EBV の miRNA でも EBV の潜伏感染様式に依存し

た発現パターンを取ることが示唆された。また、BCBL-1, TY-1 の EBV 陰性株では EBV miRNA の発現は見られなかった。

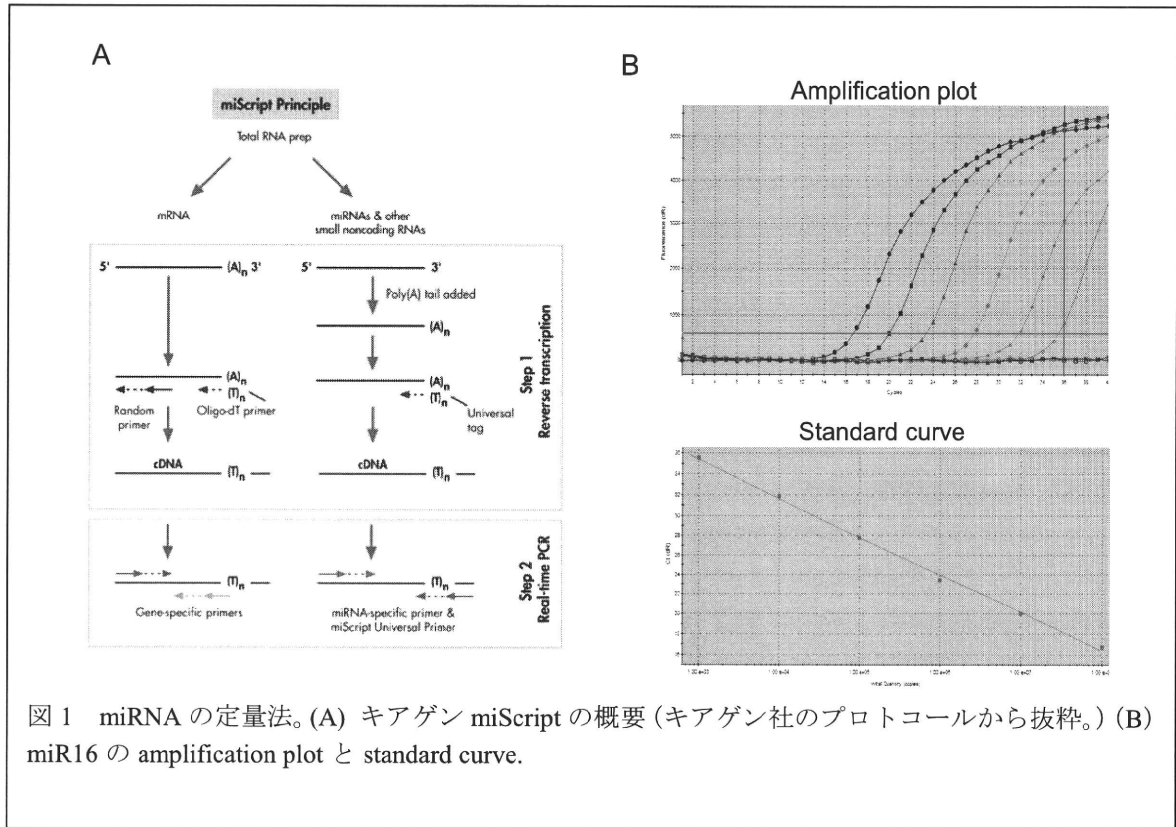


図1 miRNA の定量法。(A) キアゲン miScript の概要(キアゲン社のプロトコールから抜粋。) (B) miR16 の amplification plot と standard curve.

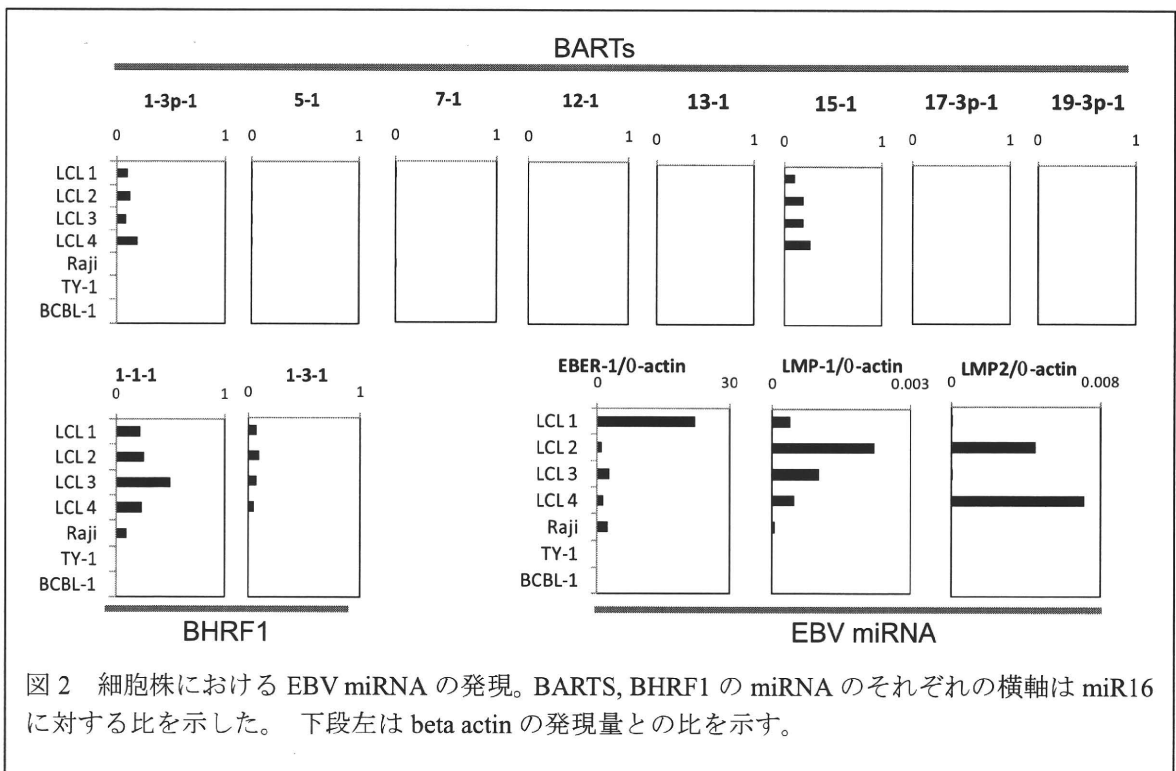


図2 細胞株における EBV miRNA の発現。BARTs, BHRF1 の miRNA のそれぞれの横軸は miR16 に対する比を示した。下段左は beta actin の発現量との比を示す。

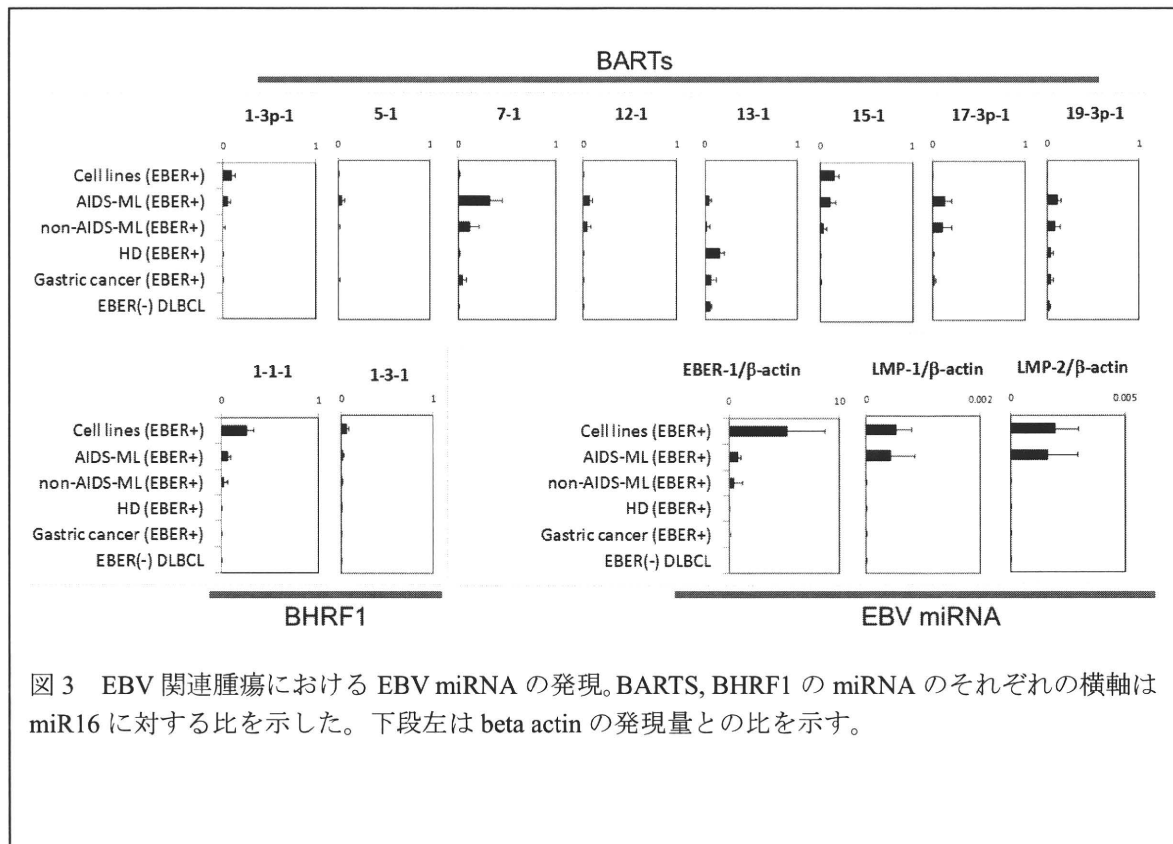


図3 EBV 関連腫瘍における EBV miRNA の発現。BARTs, BHRF1 の miRNA のそれぞれの横軸は miR16 に対する比を示した。下段左は beta actin の発現量との比を示す。

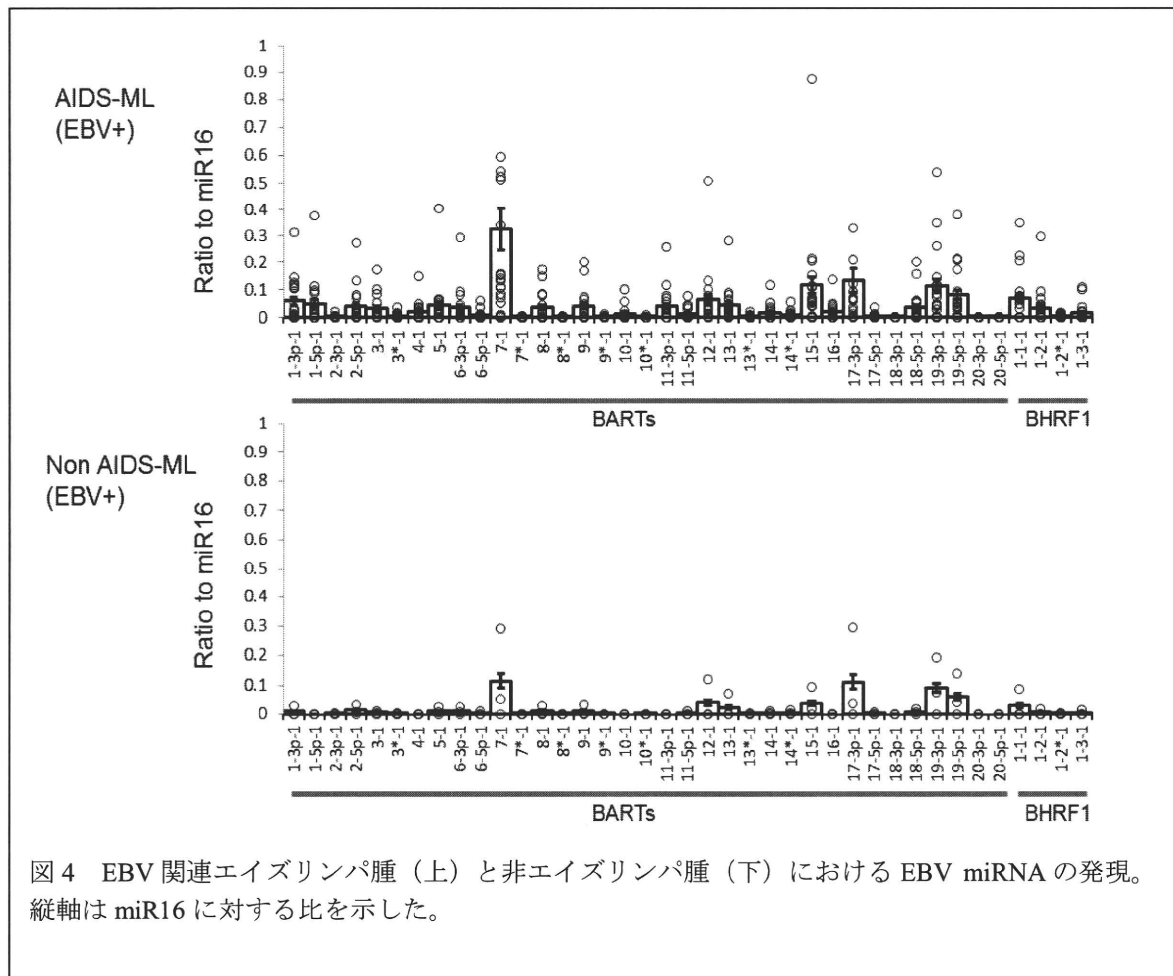


図4 EBV 関連エイズリンパ腫（上）と非エイズリンパ腫（下）における EBV miRNA の発現。縦軸は miR16 に対する比を示した。

2. エイズリンパ腫および他のリンパ腫症例、および EBV 関連胃癌症例における EBV がコードする miRNA の発現

つぎに、臨床病理検体を使い、エイズリンパ腫の EBV miRNA の発現を他の EBV 関連疾患と比較した (図 3)。EBV 陽性エイズリンパ腫では miR-BART7-1 や miR-BART13 などが高発現しており、これらの発現は EBER、LMP1、LMP2 の発現と相関した。エイズリンパ腫では EBER のみならず、LMP1、LMP2 の mRNA の発現も見られ、使用した検体が EBV の latency III 型の感染様式を持つ EBV 関連の日和見リンパ腫であることが確認できた。胃癌やホジキンリンパ腫のサンプルでは miR-BART13 が高発現するなど、エイズリンパ腫とは異なる発現パターンを呈した。エイズリンパ腫と非エイズリンパ腫で EBV miRNA の発現量を比較すると、多くの EBV miRNA で、エイズリンパ腫の方が高コピーを示しており、宿主の免疫不全状態がウイルスの miRNA の発現に影響している可能性が示唆された (図 4)。

#### D. 考察

臨床サンプルを使った EBV の miRNA の発現に関してはこれまで鼻咽頭癌に関する報告が数報あるが (Imig et al. *Nuc Acid Res* 2010)、エイズリンパ腫を含めた、リンパ腫の臨床サンプルの報告はほとんど見当たらない。EBV 関連の鼻咽頭癌サンプルでは EBV miRNA は特異な発現パターンを示し、LCL とは異なり、BHRF1 にコードされる miRNA がほとんど発現しない。EBV 関連リンパ腫における EBV miRNA の検索は LCL 以外、ほとんどなされていないが、LCL や EBV 陽性の細胞株の検索では BHRF-1 miRNA の発現は latency III の感染様式を持つ細胞に限られ、BART の miRNA は latency I の細胞でも比較的高発現が見られるといった報告がなされている。(J Virol 85; 996-1010, 2011) 今回我々の結果は、EBV 関連エイズリンパ腫でも LCL の EBV miRNA の発現様式がほぼ再現されていることが明らかに

なった。LMP-1 や LMP-2 の発現様式とよく似ることから、いくつかの種類の EBV miRNA は、latency III の潜伏感染様式の新たなマーカーにもなりうる。一方で、胃癌やホジキンリンパ腫などの他の EBV 関連悪性腫瘍ではウイルス miRNA の発現は限定され、miR-BART13 などの限られた EBV miRNA のみが発現することから、miRNA の発現機構に細胞側の因子や EBV の潜伏感染様式が関係していることが示唆される。

また、EBV 陽性非エイズ関連リンパ腫との比較ではエイズリンパ腫の方が EBV miRNA の発現量が多いことが示された。これらの 2 つのリンパ腫の違いのひとつは宿主の免疫状態であり、ウイルスの miRNA の発現が宿主の免疫により制御されていることが示唆された。このデータは外来性の miRNA の発現が免疫によって制御されていることを臨床検体で示した初めてのデータであり、どのような細胞側の因子が免疫によりウイルスの miRNA の発現を抑制しているかは今後の研究の成果を待ちたい。miRNA が腫瘍化や細胞周期の促進と関連していることが明らかにされてきている現在、免疫や細胞側因子が miRNA の発現を制御しているという知見は、miRNA 研究がリンパ腫の新たな発症機構の解明や新たな治療法の開発につながる可能性を示唆するものであり、興味深い。

#### E. 結論

エイズリンパ腫における EBV の miRNA 発現プロファイルを明らかにし、その発現には細胞側、宿主側の因子が関係していることを示唆するデータを得た。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

論文発表

1. Yamamoto K, Ishikawa C, Katano H,

Yasumoto T, Mori N: Fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, induce apoptosis of primary effusion lymphomas. *Cancer Lett* 2011 300:225-234.

2. Katano H, Kano M, Nakamura T, Kanno T, Asanuma H, Sata T: A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses. *J Med Virol* 2011 83: 322-30.
3. Sakamoto K, Asanuma H, Nakamura T, Kanno T, Sata T, Katano H: Immune response to intranasal and intraperitoneal immunization with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in mice. *Vaccine* 2010 28:3325-3332.
4. Kanno T, Sato Y, Nakamura T, Sakamoto K, Sata T, Katano H: Genotypic and clinicopathological characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection in Japan. *J Med Virol* 2010 82:400-406.
5. Hatano B, Kojima A, Sata T, Katano H: Virus detection using viro-adembeads, a rapid capture system for viruses, and plaque assay in intentionally virus-contaminated beverages. *Jpn J Infect Dis* 2010 63:52-54.

#### 和文

1. 片野晴隆、佐多徹太郎 「Primary effusion lymphoma 原発性滲出液リンパ腫」 癌診療指針のための病理診断プラクティス リンパ球増殖疾患 中山書店、大阪 2010. 11
2. 岡本尚, 木村宏, 片野晴隆, 塚田訓久, 今井健一, 高折晃史 「エイズ発症の危険因子としての微生物間相互作用」日本エイズ学会誌 12:59-66, 2010
3. 岡田誠治, 片野晴隆, 萩原将太郎, 永田安伸, 安岡彰 「HIV-1 感染と悪性腫瘍」日本エイズ学会誌 12:81-88, 2010
4. 片野晴隆 「Epstein-Barr ウイルス(EBV)とカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV, HHV-8)」 特集 ヘルペスウイルスのウイルス学 ウイルス 60: 237-246, 2010

#### 口頭発表

#### 海外

1. Katano H, Sakamoto K, Asanuma H, Nakamura T, Kanno T, Sata T.: Immune response to intranasal and intraperitoneal immunization with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in mice 35th International Herpesvirus Workshop. (Salt Lake City, U.S.A.) 2010.7.

#### 国内

1. 坂本康太、福本 瞳、佐藤由子、水谷隆太、佐多徹太郎、片野晴隆 ヒトヘルペスウイルス8関連疾患におけるウイルス micro RNA の発現 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月 徳島
2. 菅野隆行、佐多徹太郎、片野晴隆 自発的再活性化が亢進した KSHV 感染細胞株の解析 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月 徳島
3. 片野晴隆、坂本康太、武内恵梨香、菅野隆行、福本 瞳、佐多徹太郎 HHV-8 がコードするマイクロRNA miRK12-3 は RapGef2 の発現を抑制し潜伏感染維持に貢献する 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月 徳島
4. 福本 瞳、坂本康太、佐多徹太郎、片野晴隆 ヒトヘルペスウイルス8 がコードする miRNA の血清診断への応用 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月 徳島
5. 片野晴隆、坂本康太、福本 瞳、菅野隆行、佐藤由子、佐多徹太郎 HHV-8 がコードする miRNA の発現とその診断への応用 第7回 EB ウイルス研究会 2010年7月 札幌
6. 片野晴隆、坂本康太、福本 瞳、菅野隆行、佐藤由子、佐多徹太郎 HHV-8 がコードする miRNA の発現とその診断への応用 第25回 ヘルペスウイルス研究会 2010年6月 浜松
7. 菅野 隆行、佐多徹太郎、片野晴隆 日本に

おけるKSHV関連疾患の臨床病理とKSHV  
遺伝子型解析 第99回日本病理学会総会  
2010年4月 東京

**H.** 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## EB ウイルスによるリンパ腫発症モデル

分担研究者 藤原成悦 国立成育医療研究センター研究所母児感染研究部 部長

**研究要旨** エイズリンパ腫をはじめとする EB ウイルス (EBV) 関連リンパ腫のマウスモデルを作成し、それらの腫瘍に対する治療薬や免疫療法の開発に応用することを目的として研究を行った。今年度はヒト化マウスを用いた EBV 感染モデルにおける自然免疫応答を解析し、EBV 感染によりマウス脾臓においてインターフェロン- $\gamma$ の産生が誘導されることを示唆する結果を得た。また、EBV 感染ヒト化マウスモデル及び慢性活動性 EBV 感染症モデルマウスを用いて、NF- $\kappa$ B 阻害薬 Ritonavir 及び抗ヘルペスウイルス薬 YMS95145 の有効性検証実験を開始した。

### A. 研究目的

エイズリンパ腫の約半数は EB ウイルス (EBV) 陽性であり、EBV 感染により不死化したリンパ球が HIV-1 感染による T 細胞機能不全のため無制限に増殖することが原因となる。EBV 陽性エイズリンパ腫のほとんどが B 細胞起源であるが、わずかながら T 細胞起源のものも存在する。EBV はヒトおよび一部の霊長類にのみ感染するため、優れた感染モデル動物に乏しく、特に治療法の評価に適した小動物モデルは皆無であった。私たちは、これまでに免疫不全マウスの一系統である NOD/Shi-*scid*/IL-2R $\gamma$  c<sup>null</sup> マウス (NOG マウス) にヒト造血幹細胞を移植して得られるヒト化マウスに EBV を感染させることにより、エイズリンパ腫モデルを作成することに成功した。また、EBV 感染 T 細胞が増殖する疾患である慢性活動性 EBV 感染症 (CAEBV) の患者末梢血単核細胞を NOG マウスに移植することにより、EBV 感染 T 細胞が増殖する CAEBV モデルマウスの作成にも成功している。

EBV 感染モデルマウスを用いてエイズリンパ腫に対する免疫療法の基礎実験を行うためには、EBV 感染に対するモデルマウスの免疫応答を解析する必要がある。これまでにこのモデルマウスにおいては EBV 特異的 T 細胞応答が誘導され、防御因子として機能することが示さ

れているが、自然免疫応答については解析されていなかった。EBV の初感染は通常不顕性であること、初感染により伝染性単核症を発症した場合も、発症は 3~5 週間という長い潜伏期を経た後であるため、感染直後の自然免疫応答が働く時期は過ぎている。このため EBV に対する自然免疫応答はほとんど全く調べられてこなかった。私たちが開発した感染モデルマウスでは、EBV を接種した直後から観察が可能であるため、これまで不可能であった自然免疫応答の解析が可能である。そこで今年度は EBV 感染直後のマウスにおけるインターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 産生を解析した。

モデルマウスを利用したリンパ腫治療薬候補の評価については、NF- $\kappa$ B 阻害薬 Ritonavir と抗ヘルペスウイルス薬 YMS95145 の効果を検討した。EBV により不死化した細胞の生存は細胞の転写因子 NF- $\kappa$ B の活性に依存することがすでに示されており、幾つかの NF- $\kappa$ B 阻害薬が EBV 感染細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている。私たちは HIV-1 プロテアーゼ阻害薬であると同時に NF- $\kappa$ B を阻害することも知られている Ritonavir の効果をエイズリンパ腫モデルにより検証した。また、ヘルペスウイルスはウイルス固有のチミジンキナーゼをコードするため、このチミジンキナーゼにより特異的にリン酸化されて初めて効果をもつ

幾つかの抗ヘルペスウイルス薬が開発されている。ヤマサが開発した YMS95145 もそのような薬剤の一つであり、EBV 感染細胞の増殖を *in vitro* で阻害することを私たちは確認している。今年度は CAEBV モデルマウスを用いて、この YMS95145 の作用を *in vivo* で解析した。

## B. 研究方法

### 1. ヒト化マウスの作成

NOG マウスは実験動物中央研究所より購入し、国立感染症研究所動物実験施設の SPF 環境のもとで飼育・実験を行った。臍帯血は東京臍帯血バンクより供給を受けた。臍帯血から Ficoll 比重遠心法により単核細胞を分離し、MACS CD34+ アイソレーションキット (Miltenyi Biotec) を用いて CD34+造血幹細胞を分離した。1×10<sup>4</sup>~1.2×10<sup>5</sup> 個の CD34+細胞を、尾静脈内投与により移植した。

### 2. CAEBV モデルマウスの作成

CAEBV 患者末梢血より上記の方法で単核細胞を分離し、1~4×10<sup>6</sup> 個を NOG マウス (ヒト化していないもの) の尾静脈内あるいは腹腔内に接種した。

### 3. EBV 感染後のヒト化マウス脾臓における IFN- $\gamma$ 産生の解析

EBV は Akata 細胞の培養上清を用いた。対照として EBV 陰性 Akata 細胞の培養上清を用いた。ヒト化マウスに 10<sup>3</sup> TD<sub>50</sub> の EBV を尾静脈より接種し 48 時間後に安楽死させ、脾臓を摘出し単核細胞を分離した。10%牛胎児血清と 100 U/ml IL-2 を添加した RPMI1640 培養液を用い、5×10<sup>5</sup> cells/200 $\mu$ l/well で 48 時間培養し、上清中に含まれる IFN- $\gamma$ をヒト IFN- $\gamma$ 特異的 ELISA キットにより測定した。

### 4. エイズリンパ腫モデルにおける Ritonavir の効果の検証

10<sup>3</sup> TD<sub>50</sub> の EBV を静脈内接種した 24 時間後から Ritonavir (1.5 mg/mouse/day) を週 5 回、継続して腹腔内投与した。

### 5. CAEBV モデルマウスにおける YMS95145 の効果の解析

NOG マウスに CAEBV 患者末梢血単核細胞を接種した後、末梢血 EBV DNA 量が 10<sup>5</sup> copies/ $\mu$ g DNA に達した段階で、YMS95145 (80

mg/kg/day) を 7 日間連続投与した。

### (倫理面への配慮)

本研究は国立成育医療研究センター、国立感染症研究所、および東京臍帯血バンク倫理委員会の承認を得て行った。臍帯血バンクに提供された臍帯血には、血液量の不足などの理由で移植に用いることができないものが一定の割合で含まれ、多くは廃棄されている。本研究はこのような臍帯血を利用するものであり、提供者およびバンク利用者に不利益は生じない。バンクへの臍帯血提供の際には、移植に使用できない場合は研究に利用する旨を説明し同意を得ている。また、臍帯血バンクより提供を受ける際には、連結不可能匿名化を行い、個人情報の保護を徹底した。CAEBV モデル作成については、患者本人あるいは保護者に対して、本研究に関する十分な説明を文書と口頭で行い、自由意思による同意書への署名を得ることによりインフォームドコンセントを取得した。試料および臨床情報は匿名化され、患者の個人情報は厳重に管理された。

動物実験は、国立感染症研究所動物実験管理委員会の承認を受けたプロトコルに従い、動物実験指針を遵守しつつ行い、動物愛護の観点から十分な配慮をした。

## C. 研究結果

### 1. EBV 感染ヒト化マウスにおける自然免疫応答の解析

EBV 感染後 1, 2, 5 日目においてマウス末梢血中の CD16 或いは CD56 陽性で CD3 陰性の NK 細胞数を計測したが、EBV 感染マウスと対照マウスの間で明確な差は認められなかった。また、感染後 2 日目に、ヒト IFN- $\alpha$ および IFN- $\gamma$ の末梢血中濃度を測定したが、明確な差は認められなかった。そこで、感染後 2 日目のマウス脾臓から回収した単核細胞を短期間培養し、培養上清中の IFN- $\gamma$ 濃度を測定した (図 1)。EBV 感染マウス 5 頭の結果は平均 24.1 pg/ml、範囲 16.0~34.5、標準偏差 6.7、対照マウス 5 頭では、平均 17.1、範囲 7.5~27.0、標準偏差 8.6 であった。P>0.5 で有意性は認められなかったが、EBV 感染マウスで高い傾向が認められた。

次に、脾臓単核細胞のうちどの細胞が主に IFN- $\gamma$  を産生しているかを調べた (図 2)。脾臓単核細胞から磁気ビーズ結合抗体により CD56 陽性細胞を除去した場合、ほぼ全てのマウスにおいて IFN- $\gamma$  産生は検出感度以下に低下した。一方同じ方法により CD8 陽性細胞を除去した場合には、IFN- $\gamma$  産生の低下は認められなかった。CD4 陽性細胞除去の実験は現在進行中である。

## 2. エイズリンパ腫モデルにおける Ritonavir の効果の検証

これまでに 2 回の実験を行った (図 3)。1 回目の実験 (4 頭に Ritonavir 投与、4 頭に対照として生食投与) では、Ritonavir 投与による生存期間への影響は認められなかった。一方 2 回目の実験 (4 頭に Ritonavir 投与、3 頭に生食投与) では、対照マウスが全て死亡したのに対し、Ritonavir 投与群は全てが生存し、有効性が示唆された。今後実験を継続し効果の確認を行う計画である。

## 3. CAEBV モデルマウスにおける YMS95145 の効果の解析

CAEBV は、持続あるいは再発を繰り返す伝染性単核症様の症状と末梢血中 EBV DNA 量の上昇、さらに EBV 感染 T 或いは NK 細胞の増殖を特徴とする疾患であり、予後は不良である。これまで CAEBV を含めて EBV が T 或いは NK 細胞に感染する疾患の動物モデルは存在しなかったため、我々は、CAEBV 患者末梢血単核細胞を NOG マウスに接種することにより、異種移植モデルの作成を試みた。その結果、CD4<sup>+</sup> 細胞、CD8<sup>+</sup> 細胞、 $\gamma\delta$  T 細胞、NK 細胞に感染するそれぞれのタイプの CAEBV のモデル作成に成功した (難治性疾患克服研究事業 H22-難治一般-080 及び成育医療研究開発事業 22 指-9 による助成を受けた)。エイズリンパ腫の一部においても EBV が T 細胞に感染している例が認められるため、私たちはこのモデルを利用して EBV 感染 T リンパ球の増殖を抑える薬剤の評価を進めた。

YMS95145 は EBV などヘルペスウイルスがコードするチミジンキナーゼにより最初のリン酸が付加され、その後細胞のチミジンキナーゼによりさらに二つのリン酸が付加され三リン酸となつてはじめて細胞増殖抑制作用を発

揮する。チミジンキナーゼはウイルス複製サイクルに属する蛋白質であるが、EBV が潜伏感染する細胞株でも発現されていることがこれまでに分かっている。また、T 細胞株では B 細胞よりも高いレベルの発現が認められてきた。そこで、NOG マウスに CAEBV 患者末梢血単核細胞を接種し、末梢血に EBV DNA が出現した段階で YMS95145 を投与し、EBV DNA レベルの変化を検討した (図 4)。その結果、YMS95145 を 1 週間連続投与することにより一時的に末梢血 EBV DNA 量が低下することが示唆された。アシクロピルの投与によっては EBV DNA 量は低下しなかった。

## D. 考察

ヒトの EBV 初感染時における自然免疫応答の解析はこれまで困難であったが、感染モデルマウスの開発により、このような解析が可能になったと考えられる。EBV 感染直後の末梢血中 NK 細胞やインターフェロンの動態に関しては、明確な結果が出なかったが、感染直後に脾臓細胞の IFN- $\gamma$  産生が誘導されることが示唆された。今回の実験では有意差を認めるまでには至らなかったが、今後実験を繰り返し、主な IFN- $\gamma$  産生の同定を含め、明確な結果を得たいと考えている。

Ritonavir は HIV-1 プロテアーゼ阻害薬としてすでに実用化されているが、最近 NF- $\kappa$ B 阻害作用をもつことが示された。また、EBV により不活化された細胞を接種した NOG マウスに対する効果も報告されている。私たちの結果は、EBV 感染後モデルマウスに *de novo* に発症するリンパ腫に対しても有効であるか否かを検証するものである。これまでの実験では明確な結果が得られていないが、今後投与条件の検討を含め実験を繰り返し、最終的な結果を示したい。

エイズリンパ腫には僅かながら EBV 感染 T 細胞が増殖するタイプが存在するが、これまで EBV 感染 T 細胞が *in vivo* で増殖する動物モデルは存在しなかった。私たちが作成した CAEBV モデルマウスは EBV 感染 T 或いは NK 細胞が増殖する初めてのモデルマウスであり、EBV 感染 T 細胞の *in vivo* における増殖に対する薬剤の効果を検証する場として有用と考え



られた。今回の実験はマウスの個体数も少なく preliminary なものであるが、YMS95145 の投与期間中は一時的ながら末梢血 EBV DNA 量の低下が認められたため、さらに実験を続け効果を確認したい。現在 CAEBV モデルマウスは患者末梢血単核細胞を直接移植した場合のみ生着し、マウスからの二次移植ができないため、十分な個体数を用いての実験が困難である。今後、二次移植あるいは EBV 感染 T 或いは NK 細胞株を用いてのモデル作成を試みる予定である。

## E. 結論

EBV 感染直後のヒト化マウスの脾臓において IFN- $\gamma$  産生が誘導されることが示唆された。どの細胞が産生するかについては現在検討中である。

ヒト化マウスを用いたエイズリンパ腫モデル及び CAEBV モデルマウスにおいて NF- $\kappa$ B 阻害薬 Ritonavir 及び抗ヘルペスウイルス薬 YMS95145 の有効性を検証する実験を開始した。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Arai, A., Imadome, K., Fujiwara, S. and Miura O. Autoimmune hemolytic anemia accompanied by reactivation of an Epstein-Barr virus infection with suppressed CTL response to EBV-infected cells in an elderly man. *Inter Med* 49: 325-329, 2010.
- 2) Iwata S, Yano S, Ito Y, Ushijima Y, Gotoh K, Kawada J, Fujiwara S, Sugimoto K, Isobe Y, Nishiyama Y, Kimura H. Bortezomib Induces Apoptosis in T Lymphoma Cells and Natural Killer Lymphoma Cells Independent of Epstein-Barr Virus Infection. *Int J Cancer* in press

### 2. 学会発表

(国際学会)

- 1) Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakagawa A, Kawano F, Ichikawa S, Nakamura H, Miura O, Shimizu N, Ito M, Yamamoto N, and Fujiwara

S. A xenotransplant model of chronic active Epstein-Barr virus (EBV) infection by use of NOG mice. 14<sup>th</sup> Biennial Conference of the International Association for Research on EBV & Associated Diseases. Birmingham, UK. Sep. 4-7, 2010.

- 2) Nakamura H, Liao H, Henmi C, Imadome K, Yajima M, Fujiwara S, Koyano S, Yoshikawa T, Moriuchi H, Suzutani T, Asano K, Oh-ishi T, Itoh Y, Taiji H, Inoue N, Fujieda K, for the Japanese Congenital Cytomegalovirus Study Group. Cellular immunological responses to CMV in congenitally CMV-infected infants identified by a pilot newborn CMV screening study in Japan. 3rd Congenital Cytomegalovirus Conference, Paris, France, Sep. 23-25, 2010.

(国内学会)

- 1) 今留謙一、矢島美彩子、川野布由子、市川紗弓、清水則夫、中村浩幸、松田剛、駒野淳、山本直樹、藤原成悦. EB ウイルス関連血球貪食症候群モデルマウスの作製と解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 7~9 日、徳島.
- 2) 田中久美子、今留謙一、川野布由子、市川紗弓、松田剛、藤原成悦. NOG マウスを利用した EB ウイルス感染細胞の同定. 第 7 回 EB ウイルス研究会、2010 年 7 月 9 日、札幌.
- 3) 今留謙一、矢島美彩子、川野布由子、市川紗弓、清水則夫、中村浩幸、松田剛、駒野淳、山本直樹、藤原成悦. EB ウイルス関連血球貪食症候群モデルマウスの作製と解析. 第 7 回 EB ウイルス研究会、2010 年 7 月 9 日、札幌.

## H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

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

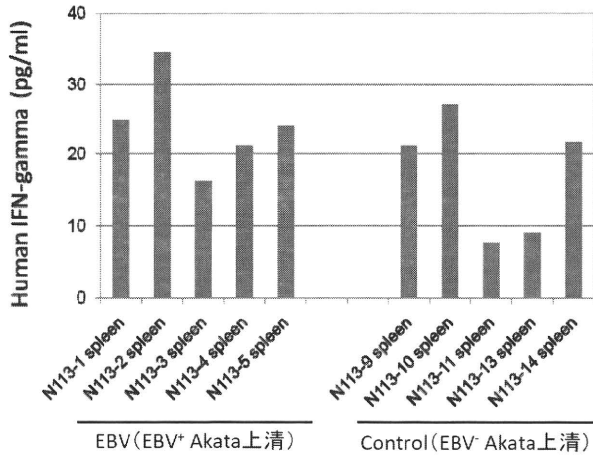


図 1. EBV 感染マウス脾臓細胞による IFN- $\gamma$  産生. EBV 感染マウス及び対照マウスの各 5 頭から、感染後 48 時間に脾臓単核細胞を分離し、48 時間培養後の上清中ヒト IFN- $\gamma$  を ELISA 法により測定した。

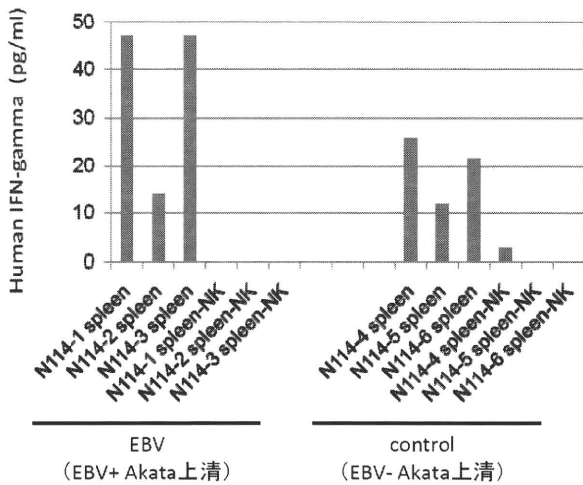
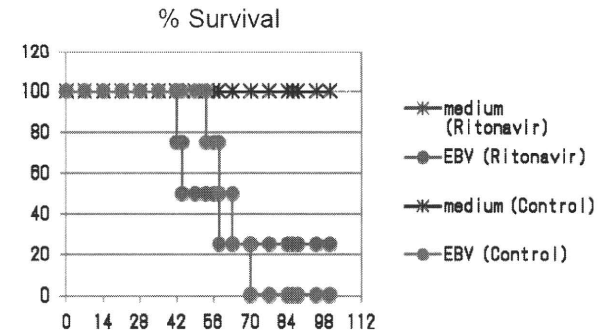


図 2. CD56 陽性細胞による IFN- $\gamma$  産生. EBV 感染マウス及び対照マウスの各 3 頭から、感染後 48 時間に脾臓単核細胞を分離し、磁気ビーズ結合抗体により CD56 陽性細胞を除去したもの（各群の右側 3 個体）としなかったもの（左側 3 個体）を 48 時間培養後、上清中ヒト IFN- $\gamma$  を ELISA 法により測定した。

実験 1



実験 2

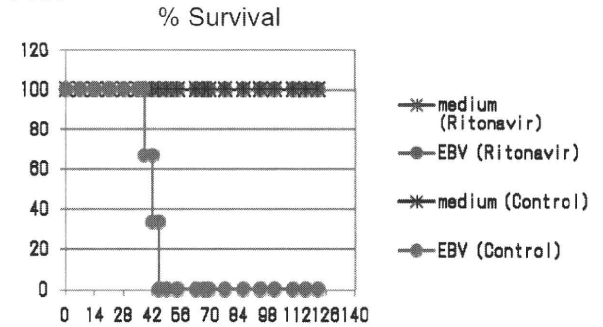


図 3. EBV 感染マウスの生存に対する NF- $\kappa$ B 阻害薬 Ritonavir の効果.

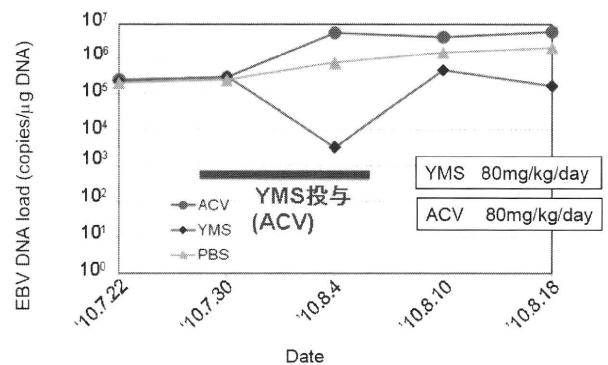


図 4. CAEBV モデルマウスにおける抗ヘルペスウイルス薬 YMS95145 の効果. EBV 感染マウスに 1 週間継続して YMS95145 を投与し、末梢血 EBV DNA 量の変化を調べた。

## エイズ関連悪性リンパ腫マウスモデルを用いた HIV-1 プロテアーゼ 阻害剤の抗腫瘍効果の検討

分担研究者 岡田 誠治 熊本大学エイズ学研究センター 教授

**研究要旨** エイズリンパ腫の病態解析と新規治療法の開発に供するために、エイズ関連悪性リンパ腫のマウスモデルを用いた新たな治療法の開発を進めている。新規高度免疫不全マウス(NOD/Scid/Jak3 欠損マウス)腹腔内にヒト Primary effusion lymphoma (PEL)細胞株を移植することにより、PEL マウスモデルを樹立した。HIV-1 プロテアーゼ阻害剤(PI)のうち RTV と LPV は in vitro 及びマウスモデルにおいて PEL 細胞の増殖を阻害した。RTV と LPV は、NF-kappaB 経路の阻害を介して PEL の増殖阻害作用を示したことから、PI が PEL ばかりでなく他の NF-kappaB 活性が亢進しているエイズ関連悪性リンパ腫の予防と治療に有効である可能性が示唆された。

### A. 研究目的

本研究の目的は、エイズ関連悪性リンパ腫のマウスモデルを作成し、エイズ関連リンパ腫の標準的な治療法、新規治療法の開発に供することである。本年度は、特に HIV-1 感染者にかなり特異的に発症し予後不良の Primary effusion lymphoma (PEL) の治療モデルを用いて、HIV-1 プロテアーゼ阻害薬(Protease inhibitor: PI)の抗腫瘍効果について検討を行った。

### B. 研究方法

ヒト Primary effusion lymphoma (PEL)細胞株 (BCBL-1, TY-1, BC-1, BC-3) に HIV-1 protease inhibitor(PI)を添加し、MTT 法によりその効果を調べた。

高度免疫不全マウス NOD/Scid/Jak3 欠損マ

ウス(NOJ マウス)は、NOD/Scid マウスに Jak-3 欠損マウス (理化学研究所 RCAI 斉藤隆博士から供与) を 10 世代交配して作成した。NOJ マウス腹腔に PEL 細胞株 BCBL-1 を移植して PEL モデルマウスを作成し、更に薬剤投与の有効性を検証した。

#### (倫理面への配慮)

免疫不全マウスの作成及び移植実験等の動物実験は、熊本大学動物実験委員会の承認を得た上で「熊本大学動物実験指針」に従い実施した。動物実験は、「熊本大学動物実験指針」を遵守し、極力動物の苦痛軽減に配慮して行っている。動物実験における実験処置に対する倫理基準では、カテゴリー B (動物に対してほとんど不快感を与えないと思われる実験) レベルの実験であり、解析時には「動物の処分方法に関

する指針」を遵守して、頸椎脱臼により安楽死させた。

### C. 研究結果

#### 1) PI の抗 PEL 効果の検討

近年 PI に抗腫瘍効果があるという報告がなされているので、3種類の PI (RTV, LPV, DRV) を用いて MTT 法により抗腫瘍効果を検討した

(図 1)。その結果、RTV, LPV に強い抗 PEL 効果が認められてが、DRV には抗腫瘍活性は認められなかった。RTV, LPV 添加により

Annexin V 陽性細胞の増加と caspase 3 活性の増加が認められたことから、これらの薬剤は、PEL にアポトーシスを誘導する事が判明した。

#### 2) PI の作用機序

PEL 細胞株に LPV を投与後、ウエスタンブロット法にて NF-κB p65 の発現を検討した。その結果 IκB のリン酸化の抑制と核内の p65 量減少が認められた。従って、PI は NF-κB 阻害作用を呈することで抗腫瘍効果を発揮する事が証明された(図 2)。

#### 3) PEL 発症マウスモデルの樹立

NOJ マウス腹腔に PEL 細胞株 BCBL-1 を移植して PEL 発症マウスモデルを作成した。BCBL-1 1×10<sup>7</sup> 個を腹腔内に移植したところ 3 週間後には腹水の増加と肺・肝・脾臓に転移が認められた。

#### 4) PI による PEL マウスモデルの治療

NOJ マウス腹腔に PEL 細胞株 BCBL-1 を移植し、5 日目より LPV または DRV を連日腹腔内投与した。その結果、LPV 投与群では、明らかな腹水量の低下と転移の抑制が認められたが、DRV では抗腫瘍作用は認められなかった。(図 3)。

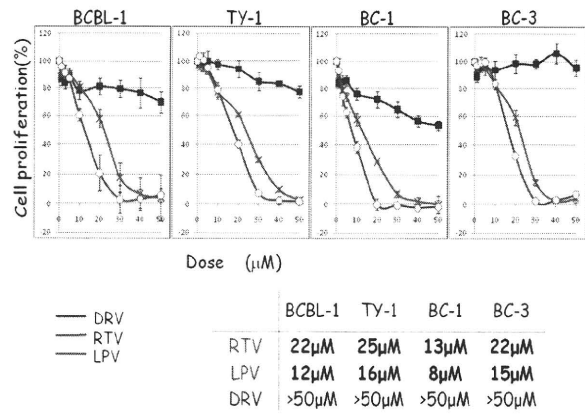


図 1. PI の抗 PEL 作用. MTT 法により PEL 細胞株に対する PI の効果を検討した。

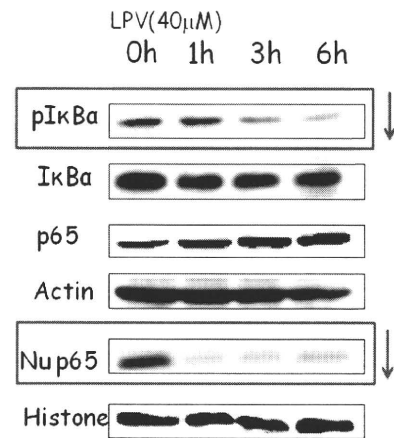
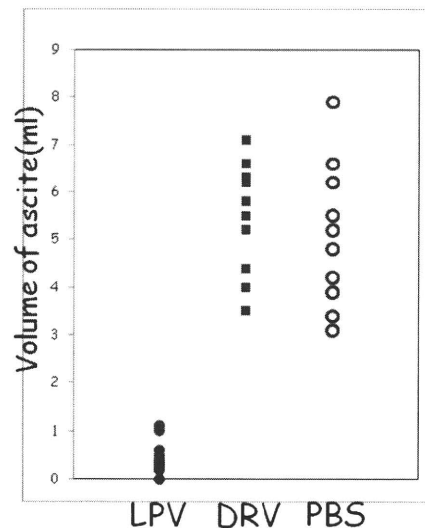


図 2. CEP による NF-κB p65 活性化抑制. LPV 投与により IκB のリン酸化の抑制と核内 p65 の減少が認められた。



### 図3. PI投与による腹水貯留の抑制

#### 5) PIによる小胞体ストレス

HEK293 細胞株に RTV, LPV, DRV を添加して、小胞体ストレスに関与するタンパクの発現を解析したところ、RTV, LPV により BiP, PERK 等の小胞体ストレスタンパクの上昇が認められた。PI のうち、RTV と LPV は細胞に小胞体ストレスを起こすが DRV にはそのような効果（副作用）がないことが判明した。

表1. PI の様々な作用

|                      | RTV | LPV | DRV |
|----------------------|-----|-----|-----|
| 抗 HIV-1 効果           | ++  | ++  | +++ |
| 抗 NF-κB 効果 (抗リンパ種効果) | ++  | +++ | -   |
| 小胞体ストレス誘導効果          | ++  | +++ | -   |

#### D. 考察

エイズ関連悪性リンパ腫のマウスモデルを用いて PI が PEL の治療に有効である可能性を示した。PI は、HIV-1 のプロテアーゼのみを阻害するようにデザインされているが、実際にはホストのプロテアーゼ等の阻害作用も有しており、その結果として様々な副作用を呈する。PI には RTV, LPV のように強い NF-κB 阻害作用を有するものと DRV のように NF-κB 阻害作用を示さないものがあることが示された。また、RTV, LPV は小胞体ストレスを起こすことが判明した。このように RTV, LPV にはホストの細胞に対する様々な副作用もあるが、NF-κB 阻害作用により、NF-κB が活性化している悪性リンパ腫の予防及び治療に有用である可能性が示唆された。

HIV-1 感染者では高頻度に悪性リンパ腫が

発症し、HIV-1 感染者の長期予後を規定する重要な合併症となっている。以前は、HIV-1 のコントロールがされていない免疫不全の状態での脳原発悪性リンパ腫やびまん性大細胞性リンパ腫の合併が多かった。最近では、HIV-1 感染がコントロールされている症例においてバーキットリンパ腫やホジキンリンパ腫が発症する例が増えており注意が必要である。これらの悪性リンパ腫の半数以上が EB ウイルス (Epstein-Barr virus: EBV) 感染が原因とされている。HHV-8 や EBV 感染による NF-κB 活性化が悪性リンパ腫発症の主因のひとつとされており、NF-κB はこれらの悪性リンパ腫治療の分子標的として注目を浴びている。本研究では、HIV-1 治療薬である RTV, LPV に抗 NF-κB 活性があることを証明した。これらの PI は、エイズ関連悪性リンパ腫の治療のみならず、予防にも有効である可能性が示唆された。

#### E. 結論

エイズ関連悪性リンパ腫のマウスモデルを用いて、HIV-1 プロテアーゼ阻害薬である LPV と RTV に抗 Primary Effusion Lymphoma 効果があることを示した。本マウスモデルは、今後エイズ関連悪性リンパ腫の新たな治療法の開発に役立つことが期待される。また、これらのプロテアーゼ阻害薬は抗 NF-κB 効果を示すことから、PEL のみでなく NF-κB が活性化している他の悪性リンパ腫（ホジキン病や EBV を起因とする非ホジキンリンパ腫など）の予防と治療に有効である可能性が示された。

#### F. 健康危機情報

該当なし。

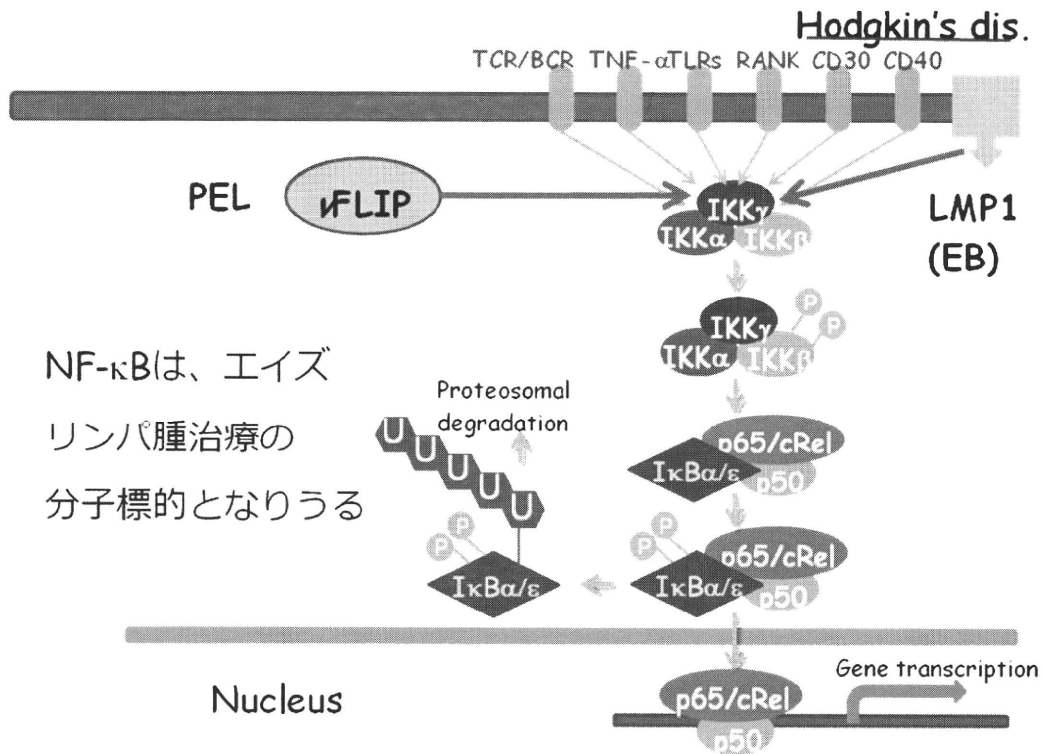
#### G. 研究発表

1. 論文発表
2. Ono A, Hattori S, Kariya R, Iwanaga S, Taura M, Harada H, Suzu S, and \*Okada S. Comparative study of human hematopoietic cell engraftment into Balb/c and C57BL/6 strain of Rag-2/Jak3 double-deficient mice. *J Biomed Biotechnol* in press
3. Ohtsuka H, Sakamoto A, Pan J, Inage S, Horigome S, Ichii H, Arima M, Hatano M, Okada S and \*Tokuhisa T. Bcl6 is required for the development of mouse CD4<sup>+</sup> and CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells. *J Immunol* in press
4. Shimasaki S, Koga T, Shuto T, Suico M A, Sato T, Watanabe K, Morino-Koga S, Taura M, Okada S, Mori K, and \*Kai H; Endoplasmic reticulum stress increases the expression and function of toll-like receptor-2 in epithelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 402(2):235-240, 2010
5. Taura M, Suico MA, Koga R, Shuto T, Sato T, Morino-Koga S, Okada S and \*Kai H; MEF/ELF4 transactivation by E2F1 is inhibited by p53. *Nucleic Acid Res* in press
6. Shimizu T, Ishikawa T, Sugihara E, Kuninaka S, Miyamoto T, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Tsunoda T, Miya F, Morioka H, Nakayama R, Kobayashi E, Toyama Y, Kawai A, Ichikawa H, Hasegawa T, Okada S, Ito T, Ikeda S, Suda T, and \*Saya H. c-MYC overexpression with loss of *Ink4a / Arf* transforms bone marrow stromal cells into osteosarcoma accompanied by loss of adipogenesis. *Oncogene* 29(42):5687-5699, 2010
7. Seubwai W, Wongkham C, Puapairoj A, \*Okada S and \*Wongkham S. 22-oxa-1,25-dihydroxyvitamin D3 efficiently inhibits tumor growth in inoculated mice and primary histoculture of Cholangiocarcinoma. *Cancer* 116(23):5535-5543, 2010
8. Subimerb C, Lulitanond V, Pinlaor S, Khuntikeo N, Okada S, \*McGrath M, \*Wongkham S. Circulating CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocyte levels predict tissue invasive character of cholangiocarcinoma. *Clin Exp Immunol* 161(3):471-479, 2010
9. Towata T, Komizu Y, Kariya R, Suzu S, Matsumoto Y, Kobayashi N, Wongkham C, Wongkham S, \*Ueoka R, and \*Okada S ; Hybrid liposomes inhibit the growth of Cholangiocarcinoma by induction of cell cycle arrest in G<sub>1</sub> phase. *Bioorg Med Chem Lett* 20(12):3680-3682, 2010
10. Chihara T, \*Suzu S, Hassan R, Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Motoyoshi K, Kimura F, and \*Okada S. IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. *Cell Death Differ* 17(12):1917-1927, 2010
11. Seubwai W, Vaeteewoottacharn K, Hiyoshi M, Suzu S, Puapairoj A, Wongkham C, \*Okada S and \*Wongkham S. Cepharanthine exerts anti-tumor activity on cholangiocarcinoma by inhibiting NF- $\kappa$ B. *Cancer Sci* 101(7):1590-1595, 2010
12. Satoh M, Saito M, Tanaka K, Iwanaga S, Nagla S, Seki T, Okada S, Kohara M, Harada S, Kai C, and \*Tsukiyama-Kohara K. Evaluation of a recombinant measles virus expressing hepatitis C virus envelope proteins by infection of human PBMC-NOD/Scid/Jak3<sup>null</sup> mouse. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 33(6):e81-88

13. Towata T, Komizu Y, Suzu S, \*Ueoka R, and \*Okada S ; Highly selective fusion and accumulation of Hybrid Liposomes into Primary Effusion Lymphoma Cells along with induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res Comm* 393(3):445-448, 2010
14. Dessouki O, Kamiya Y, Nagahama H, Tanaka M, Suzu S, Sasaki Y, and \*Okada S.; Chronic hepatitis C viral infection reduces NK cell frequency and suppresses cytokine secretion: Reversion by antiviral treatment. *Biochem Biophys Res Comm* 393(2):331-337, 2010
15. \*Nagai H, Odawara T, Ajisawa A, Hagiwara S, Watanebe T, Uehira T, Uchiumi H, Yotsumoto M, Miyakawa T, Watanabe A, Kanbe T, Konishi M, Saito S, Takahama S, Tateyama M, and Okada S; Whole Brain radiation alone produces favorable outcomes for AIDS-related primary central nervous system lymphoma in the HAART era. *Eur J Haematol* 84(6):499-505, 2010
16. Towata T, Komizu Y, Suzu S, Matsumoto Y, \*Ueoka R, and \*Okada S ; Hybrid liposomes inhibit the growth of primary effusion lymphoma in vitro and in vivo. *Leukemia Res* 34(7):906-911,2010
- (総説等)
1. 後藤裕樹、岡田誠治. AIDS 関連悪性リンパ腫の現状と治療戦略. 血液内科 (印刷中)
  2. 岡田誠治. エイズ関連悪性リンパ腫—その現状と治療戦略—. 医学の歩み 235(5):431-437, 2010
  3. 岡田誠治. 血液悪性腫瘍における細胞膜の揺らぎと膜標的療法. 揺らぎと生体機能. Medical Bio 10月別冊、pp. 91-95 寺嶋正秀 (監修)
4. 岡田誠治、片野晴隆、萩原将太郎、永田安伸、安岡彰. 第23回日本エイズ学会シンポジウム記録. HIV-1 感染と悪性腫瘍. 日本エイズ学会誌 12(2):81-88, 2010.
  5. 岡田誠治. HIV/AIDS-最新の治療研究の進歩悪性リンパ腫. 日本臨牀 68(3):491-496, 2010
  6. 岡田誠治. HIV-1 感染症と悪性腫瘍. 最新医学別冊 新しい診断と治療の ABC 65 HIV 感染症と AIDS. pp78-87
2. 学会発表 (国際学会)
1. Seiji Okada, Takashi Odawara, Atsushi Ajisawa, and Hirokazu Nagai. Whole brain radiation alone produces favourable outcomes for AIDS-related primary central nervous system lymphoma in the HAART era. XVII International AIDS Conference, 18-23 July, 2010. Vienna Austria.
  2. Seiji Okada. Application of novel immunodeficient NOD/SCID/JAK3null (NOJ) mice for Biomedical Research. 6th International Forum on Oxidative Stress and Aging. 6-7 Sep., 2010. Noyori Conference Hall, Nagoya University, Nagoya.
  3. Seiji Okada. Establishment of novel severe immunodeficient NOD/Scid/Jak3<sup>null</sup> mice and application for translational research and nanomedicine. (Special Lecture) 4<sup>th</sup> International Symposium on Nanomedicine (ISNM2010). Okazaki Conference Center, Okazaki. (国内学会)
1. Ryusho Kariya, Manabu Taura, Shinya Suzu,

- and Seiji Okada. HIV protease inhibitor inhibits the growth of primary effusion lymphoma and induces apoptosis. 第 72 回日本血液学会、パシフィコ横浜、横浜、2010 年 9 月 24-26 日.
2. 石下真行、寺原和孝、光木裕也、渋沢謙太郎、小林和夫、岡田誠治、横田（恒次）京子. HIV-1 感染モデルとしてのヒト化マウスの妥当性と X4 及び R5 HIV-1 感染. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、あわぎんホール、徳島、2010 年 11 月 7-9 日
  3. 鎌田伸好、青木宏美、服部真一郎、中村太平、青木学、前田賢次、岡田誠治、満屋裕明. mCherry 可視化 HIV-1 を用いた HIV-1 体内播種早期ダイナミクスの検討：1. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、グランドプリンスホテル高輪、東京、2010 年 11 月 24-26 日
  4. 青木宏美、鎌田伸好、服部真一郎、中村太平、青木学、前田賢次、岡田誠治、満屋裕明. mCherry 可視化 HIV-1 を用いた HIV-1 体内播種早期ダイナミクスの検討：2. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、グランドプリンスホテル高輪、東京、2010 年 11 月 24-26 日
  5. 山岸誠、三宅在子、中野和民、片野晴隆、岡田誠治、渡邊敏樹. 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、グランドプリンスホテル高輪、東京、2010 年 11 月 24-26 日
  6. 服部真一郎、淵上典子、鈴伸也、岡田誠治. HIV-1 感染における制御性 T 細胞の動態解析. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、グランドプリンスホテル高輪、東京、2010 年 11 月 24-26 日
  7. 岡田誠治. 本邦における悪性リンパ腫の現状と課題. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、グランドプリンスホテル高輪、東京、2010 年 11 月 24-26 日
  8. Ryusho Kariya, Manabu Taura, Masako Shimamoto, Shinya Suzu, Hiroumi Kai, Harutaka Katano and Seiji Okada. Fluctuation in the mechanism of HIV protease inhibitors between HIV protease and proteasome. The 4th International Symposium. Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions. 30 Nov.- 1 Dec. 2010. Plaza Omi, Shiga, Japan
- H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
1. 特許取得：
    - 抗 HIV-1 薬剤のスクリーニング系及びスクリーニング方法 特許第 4528963 号  
登録日 2010 年 6 月 18 日
    - 特許申請：
      - 生体イメージングに最適化された高度免疫不全マウス 特願 2010-118452
  2. 実用新案登録：なし
  3. その他：なし





### エイズ関連悪性リンパ腫における NF- $\kappa$ B の活性化

HIV-1 感染者においては、Epstein-Barr ウィルスや HHV-8 感染を起因とする悪性リンパ腫に罹患しやすい。これらのウィルス感染を起因とする悪性リンパ腫においては、NF- $\kappa$ B 経路が活性化していることから、NF- $\kappa$ B 経路の阻害薬が治療と予防に有効であることが示唆される。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

| 書籍    |  |                        |  |          |     |      |         |
|-------|--|------------------------|--|----------|-----|------|---------|
| 著者氏名  | 論文タイトル名  | 書籍全体の編集者名              | 書籍名  | 出版社名     | 出版地 | 出版年  | ページ     |
| 永井宏和  | Hodgkin リンパ腫の治療  | 金倉謙                    | 血液診療エキスパート<br>悪性リンパ腫                                     | 中外医学社    | 東京  | 2010 | 217-230 |
| 永井宏和  | ホジキンリンパ腫   | 直江知樹、<br>小澤敬也、<br>中尾眞二 | 血液疾患最新の治療<br>2011-2013                                   | 南江堂      | 東京  | 2010 | 224-227 |
| 永井宏和  | 54歳女性、IPI high-intermediate のびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫がある。移植を行うのはいいか。さてどうしよう？                         | 押味和夫                   | 造血器腫瘍治療 これ<br>は困ったぞ、どうしよう！2版                             | 中外医学社    | 東京  | 2010 | 171-174 |
| 永井宏和  | Stage III の濾胞性リンパ腫で、R-CHOP 療法後に再発した。さてどうしよう？   | 押味和夫                   | 造血器腫瘍治療 これ<br>は困ったぞ、どうしよう！2版                             | 中外医学社    | 東京  | 2010 | 184-188 |
| 永井宏和  | PNP 阻害剤（フォロデシン）による T 細胞性リンパ腫の治療と開発状況   | 堀田知光                   | 血液疾患における分子標的治療<br>ドラッグラッグ解消に向けて<br>血液フロンティア別冊<br>20(S-1) | 医薬ジャーナル社 | 大阪  | 2010 | 179-182 |
| 永井宏和  | Follicular lymphoma, Grade 1, 2 に対するリツキサ単独を用いた治療のエビデンス。Advanced stage におけるリツキサ（リツキシマブ）は単独か併用か？ | 西條長宏                   | EBM がん化学療法・分子標的療法<br>2011-2012                           | 中外医学社    | 東京  | 2010 | 497-502 |
| 萩原将太郎 | AIDS HIV 感染と栄養障害   | 山東勤弥                   | NSTのための臨床栄養ブックレット  | 文光堂      | 東京  | 2010 | 74-79   |

|            |                                      |      |                             |       |    |      |         |
|------------|--------------------------------------|------|-----------------------------|-------|----|------|---------|
| 片野晴隆、佐多徹太郎 | Primary effusion lymphoma 原発性滲出液リンパ腫 | 青笹克之 | 癌診療指針のための病理診断プラクティスリンパ球増殖疾患 | 中山書店  | 大阪 | 2010 | 125-130 |
| 味澤篤        | AIDS関連悪性リンパ腫、                        |      | 血液診療エキスパート悪性リンパ腫            | 中外医学社 | 東京 | 2010 | 297-300 |

雑誌

| 発表者氏名  | 論文タイトル名   | 発表誌名                   | 巻号        | ページ     | 出版年  |
|--|---|------------------------|-----------|---------|------|
| Nagai H, Odawara T, Ajisawa A, Hagiwara S, Watanabe T, Uehira T, Uchiumi H, Yotsumoto M, Miyakawa T, Watanabe A, Kambe T, Konishi M, Saito S, Takahama S, Tateyama M, Okada S. | Whole brain radiation alone produces favourable outcomes for AIDS-related primary central nervous system lymphoma in the HAART era.                 | <i>Eur J Haematol.</i> | 84巻<br>6号 | 499-505 | 2010 |
| Nagai H, Ogura M, Kusumoto S, Takahashi N, Yamaguchi M, Takayama N, Kinoshita T, Motoji T, Ohyashiki K, Kosugi H, Matsuda S, Ohnishi K, Omachi K, Hotta T                      | Cladribine combined with rituximab (R-2-CdA) therapy is an effective salvage therapy in relapsed or refractory indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma | <i>Eur J Haematol.</i> | 86巻<br>2号 | 117-123 | 2011 |
| Iida S, Chou T, Okamoto S, Nagai H, Hatake K, Murakami H, Takagi T, Shimizu K, Lau H, Takeshita K, Takatoku M, Hotta T.  | Lenalidomide plus dexamethasone treatment in Japanese patients with relapsed/refractory multiple myeloma.   | <i>Int J Hematol.</i>  | 92巻<br>1号 | 118-126 | 2010 |

|  |  |                               |            |           |      |
|--|--|-------------------------------|------------|-----------|------|
| 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, <u>Nagai H</u> , 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. | <i>Cancer Sci.</i>            | 101巻<br>9号 | 2059-2064 | 2010 |
| Kubota T, Moritani S, Yoshino T, <u>Nagai H</u> , Terasaki H.  | Ocular adnexal marginal zone B cell lymphoma infiltrated by IgG4-positive plasma cells.  | <i>J Clin Pathol.</i>         | 63巻<br>12号 | 1059-1065 | 2010 |
| 永井宏和   | マントル細胞リンパ腫の分子病態と治療戦略   | 血液腫瘍科                         | 60巻<br>4号  | 506-513   | 2010 |
| 永井宏和   | 臨床医から見る分子標的治療薬のメディカルニーズ～悪性リンパ腫～  | <i>PHARMSTAGE</i>             | 10巻<br>2号  | 48-50     | 2010 |
| 永井宏和   | 濾胞性リンパ腫—治療戦略のポイント  | 臨床血液                          | 51巻<br>10号 | 37-46     | 2010 |
| 永井宏和   | 悪性リンパ腫における分子病態解明の進歩  | <i>Myeloma &amp; Lymphoma</i> | 2巻         | 12-15     | 2010 |
| Kobayashi T, Kuroda J, Ashihara E, Oomizu S, <u>Terui Y</u> , 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.   | <i>Leukemia</i>               | 24巻<br>4号  | 843-850   | 2010 |
| Matsusaka S, Chin K, Ogura M, Suenaga M, Shinozaki E, Mishima Y, <u>Terui Y</u> , Mizunuma N, Hatake K.  | Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in patients with advanced gastric cancer.     | <i>Cancer Sci</i>             | 101巻<br>4号 | 1067-1071 | 2010 |