

ファミリーの発現解析と血清抗 TRIM68 抗体値の関係を解析する必要があると考えられた。

#### F. 健康危機情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Suzuki K, Terui Y, Nakano K, Nara E, Nasu K, Ueda K, Nishimura N, Mishima Y, Sakajiri S, Yokoyama M, Takahashi S, Hatake K. High thymidine kinase activity is a strong predictive factor for poor prognosis in PTCLs treated by CHOP. Leuk Lymphoma. 2011 Oct 31. [Epub ahead of print]
- 2) 照井康仁 副作用対策におけるチーム医療の意義 分子標的治療薬の副作用のマネジメント 弦間昭彦編集 南江堂 15- 22、2011
- 3) 照井康仁 2. ホジキンリンパ腫治療の最近の進歩 Annual Review 血液2011 中外医学社 129-136、2011
- 4) 照井康仁 血液腫瘍治療薬 新薬展望 2011 医薬ジャーナル 197-202、2011
- 5) 照井康仁 リツキシマブはB細胞受容体シグナルを抑制する 血液内科 62(2) 226-230、2011
- 6) 照井康仁 CHAPTER6 悪性リンパ腫 —悪性リンパ腫 化学療法選択の原則— 外来癌化学療法クリニカルパス実例集 メディカルレビュー社180-184、2011
- 7) 照井康仁 CHAPTER7 白血病 —白血病 化学療法選択の原則— 外来癌化学療法クリニカルパス実例集 メディカルレビュー社204-205、2011

8) 照井康仁 CHAPTER8 多発性骨髄腫 —多発性骨髄腫 化学療法選択の原則— 外来癌化学療法クリニカルパス実例集 メディカルレビュー社221-222、2011

9) 照井康仁 2. 治療関連合併症・悪性腫瘍 IV. 予後と病診連携 日本内科学会雑誌 第100巻 第7号1909-1916、2011

10) 照井康仁 外来化学療法の運営 第73回日本血液学会学術集会 教育講演 S-4 基本シリーズ 臨床血液 第52巻 第10号 56-61、2011

#### 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

## エイズリンパ腫における miRNA の発現異常と シグナル伝達系の解析

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： 山岸誠（東京大学大学院新領域科学研究科  
メディカルゲノム専攻病態医療科学分野）  
片野晴隆（国立感染症研究所感染病理部）  
大田泰徳（虎の門病院病理部）

**研究要旨** エイズリンパ腫の分子病態と発症危険因子の決定に最も有効な方法は、実際の臨床検体を用いた系統的な解析である。エイズ合併リンパ腫検体由来 RNA と正常扁桃 RNA について、miRNA の網羅的な発現解析を行った結果、エイズリンパ腫に特異的な miRNA の異常を明らかにすることができた。さらに、前年度までに明らかにした miR-31 の発現低下の他に、固形癌で重要な癌抑制性 miRNA である miR-200 ファミリーがリンパ腫において著しく減少していることがわかった。エイズ合併の症例ではその低下度が顕著であり、新規分子マーカーとしての可能性と、機能的な重要性が示唆された。

機能的解析は、miR-200 ファミリーの発現を誘導するレンチウイルスベクターを作成し、B 細胞リンパ腫細胞株において発現を誘導させることにより解析を行った。その結果、エピジェネティック調節因子やシグナル調節因子を始めとする B 細胞の生存、分化、増殖に関わる遺伝子群の発現が制御されることがわかった。従って本研究で明らかにした異常な miRNA の発現パターンは B 細胞リンパ腫の生物学的特徴に寄与することが示唆された。

### A. 研究目的

エイズ合併 B 細胞リンパ腫は一般に進行が早く予後が不良である。HAART の導入後エイズリンパ腫の発症は減少しているが、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、分子基盤の理解と治療法の開発、また発症危険因子の探索は急務である。

我々はこれまでに、成人 T 細胞白血病を始めとするリンパ腫細胞における重要な miRNA の異常として、miR-31 の発現異常機構とその生物学的意義を報告してきた (Yamagishi et al., Cancer Cell, 2012)。miR-31 の異常な発現低下は

NIK の発現誘導を介して NF- $\kappa$ B シグナル経路の恒常的活性化に寄与することを明らかにした。また NIK 以外にも様々な遺伝子発現調節に関わり、細胞の生存や運動能に強く影響することもわかった。エイズリンパ腫を含む悪性リンパ腫、特にびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) では NF- $\kappa$ B の恒常的活性化が腫瘍細胞の生存能の獲得に重要であり、その分子機構の解明が重要な課題であった。我々はエイズリンパ腫の臨床検体を詳細に解析することにより、miR-31 の発現低下が B 細胞リンパ腫でも起こっており、NF- $\kappa$ B を始めとする異常なシグ

ナル伝達系の獲得に寄与することを明らかにした。

以上の昨年度までの研究成果から、以下の2点が推察された。①エイズリンパ腫を含むB細胞リンパ腫でもmiRNAの発現異常が腫瘍細胞の悪性度、生存能に重要な役割を持っていること。②miR-31の発現を低下させるエピジェネティック調節因子、特にPolycombファミリーは、DLBCLやBurkittリンパ腫などの高悪性度の腫瘍細胞で活性化していること。これらの予測は、これまでの研究報告からも十分にサポートされており、エイズリンパ腫の分子病態と新規危険因子の探索を行う上で重要な基盤になると考えられた。

エイズリンパ腫の発症危険因子の同定は、実際の臨床検体から貴重な情報を取り出す事が必須である。平成23年度は、B細胞におけるmiR-31の機能的解析と、実際のエイズリンパ腫検体を用いたmiRNAの網羅的発現解析を行い、その詳細を検討した。また、明らかとなったmiRNA発現異常の生物学的意義の解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 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表現型の解析

目的のmiRNAやshRNAを発現するレンチウイルスベクターは、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の高発現系やPolycombファミリーのノックダウン系の作成を行った。樹立した細胞の遺伝子発現レベルはReal-time PCRとWestern blottingにより解析した。アポトーシスの検出はAnnexin V/7-AAD染色を行い、FACS Caliburを用いてレンチウイルス感染細胞をVenusでgatingした上で解析を行った。

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

エイズ及び非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。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の網羅的解析は、Human miRNA microarray kit v2 (Agilent Technologies)を用いてデータを取得し、GeneSpring GX(トミーデジタルバイオ)によってクラスター解析を行った。

### 3. miR-200 ファミリーの機能解析

miR-200ファミリーのmiR-200a, b, cを発現するレンチウイルスベクターを作成し、B細胞リンパ腫細胞株に導入することによって機能解析を行った。またmiRNAの阻害実験には、一種類のレンチウイルスで3種のmiR-200ファミリーを同時に阻害できるRNAを発現するウイルスを設計し、miR-200ファミリーの発現減少の意味を検討した。

## C. 研究結果

### 1. B細胞リンパ腫におけるmiR-31の機能的な解析

miR-31の発現レベルは様々な遺伝子制御を介して細胞の運命決定に強く影響する(Valastyan et al., Cell, 2009; Yamagishi et al., Cancer Cell, 2012)。まずB細胞リンパ腫を含む様々なリンパ球系細胞株及び正常T、Bリンパ球細胞を用いてmiR-31の発現レベルの比較を行った。その結果、miR-31の発現はT細胞に比べてB細胞では定常状態で発現量が低く、さらに不死化、腫瘍化したB細胞株ではさらに低値を示した。特にNF- $\kappa$ B経路の恒常的活性化が見られるActivated B cell like (ABC)-DLBCLやPrimary effusion lymphoma (PEL)細胞ではmiR-31レベルが低く、NIKを介したNF- $\kappa$ B経路の活性化やRhoAシグナルの存在が示唆された。

実際にエイズリンパ腫検体を用いたReal-time PCR解析でも、正常扁桃と比較して、エイズリンパ腫ではmiR-31の発現が著しい低値を示すことがわかった。以上より、T細胞リンパ腫だけでなく、B細胞リンパ腫においてもmiR-31の発現が低下することがわかった。

次にmiR-31のB細胞における機能を調べるために、miR-31の発現の誘導、もしくはmiR-31の発現に対して負に寄与するEZH2のノックダ

ウンするレンチウイルスを用いた実験を行った。その結果、Burkitt リンパ腫由来細胞株、DLBCL 由来細胞株、PEL 由来細胞株のいずれもアポトーシスが誘導されることがわかった。特に PEL は Polycomb のノックダウンによるアポトーシスが顕著であった。

また我々は、B 細胞において、CD40L や BAFF といったサイトカインによる NF- $\kappa$ B の非定型的経路の活性化において、miR-31 は負に働くことも明らかにしている(Yamagishi et al., Cancer Cell, 2012)。

## 2. エイズリンパ腫検体を用いた miRNA の網羅的発現解析

これまでの知見から、B 細胞由来リンパ腫は、エピジェネティックな異常があることがわかっている。とくに EZH2 や BMI1 などの Polycomb ファミリーの発現異常に伴うエピジェネティック異常は腫瘍細胞の生存や増殖にとって重要である。また Polycomb 因子の遺伝子変異も報告されており、エイズリンパ腫においても重要な発症危険因子の候補として期待される。上記の miR-31 は Polycomb によって抑制される miRNA であること、また PEL 細胞が Polycomb のノックダウンによって非常に強いアポトーシスが誘導されることから、B 細胞リンパ腫において Polycomb 依存的な miRNA の脱制御があると考えられた。

以上のことを踏まえて、miRNA の発現レベルを網羅的に解析することによって、エイズリンパ腫における分子病態を明らかにすることにした。特にエイズに合併するリンパ腫の特徴をつかむために、エイズと非エイズにおける比較も行った。

エイズリンパ腫 8 例、EBV 陰性 DLBCL5 例、正常扁桃 8 例、正常末梢血 B 細胞 3 例について、Bioanalyzer によって small RNA fraction の質をチェックした後、miRNA microarray を行った。その結果エイズリンパ腫細胞では正常扁桃と比較して 115 種類の miRNA の発現が増加しており、そのうち 99 種類が非エイズと重複、16 種類がユニークな miRNA 発現上昇であった。逆に、108 種類の miRNA が発現減少しており、そのうち 18 種類がユニークな発現減少であっ

た。

エイズリンパ腫においてのみ見つかった異常 miRNA は、機能を検討されていないものが多く、悪性度の高いエイズリンパ腫の特性を説明できる可能性があると考えられた。

一方でエイズと非エイズで共通して見つかった異常は、そのほとんどがエイズリンパ腫の方がその異常度が顕著であり、エイズリンパ腫において miRNA の発現異常が重要な因子であることも推察された。

発現異常のある miRNA(p<0.01)でクラスター解析を行うと、エイズリンパ腫と非エイズリンパ腫が別のクラスターに属することがわかり、エイズの合併によりユニークな miRNA の発現を示す事もエイズリンパ腫の特徴であると考えられた。

## 3. B 細胞リンパ腫における miR-200 ファミリーの発現低下

上記のクラスターについて詳細に解析を進めた結果、リンパ腫において miR-200 ファミリーの発現が顕著に低下していることがわかった。miR-200 ファミリーはシード配列の類似性によって、miR-200b, miR-200c, miR-429 と miR-200a, miR-141 の二つのサブファミリーに分けられ、標的遺伝子も共通していることが多い。これらは特に固形癌で研究が進んでいる癌抑制性 miRNA で、標的遺伝子としては、ZEB1, ZEB2, SUZ12, BMI1, JAG1,  $\beta$ -catenin などがある。特に ZEB1, ZEB2 は自身の 3'UTR に非常に多くの miR-200 結合配列を保持しているため、miR-200 の発現レベルと強い逆相関を示す。上皮系の細胞における miR-200 の発現低下は、ZEB1, ZEB2 の発現上昇を誘導し、その結果、E-cadherin の発現が低下することによって間葉系にシフトする(上皮間葉転換, Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT)。がん細胞の転移や浸潤、幹細胞性において EMT は非常に重要なプロセスであり、miR-200 はその master regulator として注目を集めている。

また miR-200 ファミリーと同様の挙動を示した miR-203 と miR-205 もやはりリンパ腫細胞で低下していた。miR-203 は Ph+の慢性骨髄性白血病(CML)及び急性リンパ球性白血病(B-ALL)で

発現が低下し、その結果 *BCR-ABL* および *ABL1* の発現を上昇させる、癌抑制性 miRNA である。リンパ腫研究において、それぞれ単独の発現異常がアレイ解析の結果として示されることもあるが、本研究の様にファミリーで共通して減少しているという発見は未だに無い。ファミリーで著しく減少している事実は、結果の確かさを示すと共に、リンパ腫における生物学的意義についても示唆された。

#### 4. B 細胞における miR-200 ファミリーの機能的意義

すでに同定されている miR-200 ファミリーの標的遺伝子群は、エピジェネティック調節やシグナル伝達系の調節因子であり、リンパ腫細胞の悪性度に対しても重要であると考えられた。そこで複数の B 細胞株においてレンチウイルスベクターを用いて miR-200a,b,c のそれぞれを発現させたところ、標的遺伝子群の発現抑制が見られた。標的遺伝子の 1 つである *JAG1* は、リンパ球細胞の細胞周期や生存に関わる Notch 経路の活性化因子である。レポーターアッセイによって細胞の Notch 経路の活性レベルを検討したところ、miR-200 を発現させると活性レベルが低下することがわかった。

リンパ腫細胞では miR-200 ファミリーが共通して激減している。そこでこの状況を模倣するために、miR-200 ファミリーの個々のアンチセンス鎖を発現する inhibitory RNA を発現するレンチウイルスを新たに設計し、miR-200 の発現が比較的高い B 細胞株に発現させた。その結果、標的遺伝子の発現が上昇することがわかった。現在これらの細胞の表現型とエピジェネティクスについて詳細な解析を進めている。

#### 5. miR-200 ファミリーの発現低下の分子メカニズムと意義

miR-200 研究が専攻している固形癌の研究から、miR-200b-a-429 と miR-200c-141 の二つの Polycistronic RNA として転写されること、それぞれの転写開始点近傍には多重の CpG アイランドがあり、DNA のメチル化とクロマチン制御によって転写レベルで制御されることが明らかとなっている。また miR-203 についても CML

や Ph(+)-B-ALL では DNA のメチル化によって miR-203 の発現が抑制されている。また別の報告では、miR-200 の標的遺伝子である *ZEB1*, *ZEB2* が miR-200 自身の転写抑制に関わることも明らかにされており、B 細胞及び B 細胞リンパ腫においても非常に複雑な制御系で miR-200 の存在量が規定されると考えられた。実際に複数の B 細胞株についてバイサルファイト解析によって miR-200 の転写開始点近傍の DNA のメチル化状態を調べた結果、正常末梢血 B 細胞と比較してメチル化の度合いが強いことがわかった。現在実際のエイズリンパ腫検体についての解析を行うための準備を行っている。

#### D. 考察

これまでの多くの報告から、miRNA の発現は細胞種や組織によって固有のパターンを示し、各細胞の正常な機能、分化、恒常性にとって非常に重要な役割をもつことがわかっている。裏を返せば miRNA の発現異常は細胞運命に重大な影響を与え、正常からの逸脱が予測される。現にほぼすべてののがんで miRNA の発現異常が見つかっている。B 細胞リンパ腫においても網羅的解析やいくつかの miRNA に焦点を当てた研究が盛んに進められているが、DLBCL や Burkitt リンパ腫をなどの高悪性度の腫瘍細胞の分子病態を説明するに至っていない。またエイズを合併したケースでもいくつかの miRNA 異常が示唆されているが、発症危険因子としての観点からの研究はなされていない。

我々はこれまでに T 細胞性リンパ腫における miRNA 異常の詳細な解析から、エピジェネティックとゲノムの異常に依存した miR-31 の発現欠失が腫瘍細胞の NF- $\kappa$ B の恒常的活性化の正体であることを明らかにしてきた。miRNA による遺伝子制御機構にはある程度の一般性があり、B 細胞リンパ腫でも同様の異常があることがわかった(昨年度研究報告書)。

miR-31 に加えて、マイクロアレイを用いた網羅的解析の結果から、miR-200 ファミリーが正常扁桃や正常抹消血 B 細胞と比較して激減していることを発見した。これは、エイズリンパ腫と非エイズリンパ腫を積極的に比較する実験から明らかになったことであり、B 細胞リンパ腫

の研究において非常に重要な発見であった。またクラスター解析の結果では、miR-31 と miR-200 ファミリーが同じクラスターに属し、類似の制御下にある miRNA であることも示唆された。miR-200 ファミリーをコードする mRNA は 2 カ所あり、そのいずれも DNA のメチル化と Polycomb 依存的なエピジェネティックな異常の両側面から制御されることが固形癌の研究から明らかとなっており、上述した仮説とも一致する。

臨床検体を用いた網羅的解析によってエイズリンパ腫の miRNA 発現パターンが明らかとなった。その特徴として、①検体間でのばらつきが少なく、リンパ腫に固有の miRNA 発現パターンであると考えられる。②異常は発現上昇と減少が同程度の割合であり、そのほとんどが非エイズリンパ腫と一致した。③エイズと非エイズに共通して見られた異常には、リンパ球の生存やシグナルに関わる miRNA が多く、リンパ腫細胞の生存や悪性化に関わっていると考えられる。④異常のレベルはエイズ合併リンパ腫の方が大きく、悪性度と相関する可能性がある。特に今回注目した miR-200 ファミリーの発現低下は著しいものであり、他のがんやリンパ腫研究でも類を見ないレベルであった。また特にエイズに合併した例でその低下が顕著であり、本研究を進める上で重要な候補であると考えられた。

miR-200 ファミリーは研究結果の項目で記載した様に、固形癌においてはすでに癌抑制性 miRNA として非常に注目されている。一方でリンパ腫研究を始めとするリンパ球に関する研究ではほとんど触れられておらず、この異常を明らかにしたことが今年度の大きな成果であった。

リンパ腫における miR-200 の機能については、miR-200 が非常に多機能性の miRNA であることから、今年度得られたデータにとどまらず、さらに発展すると期待される。現在までに遺伝子発現異常の上流のヒットであることが示唆されているし、また Notch 経路とのリンクも見いだされた。リンパ腫細胞の様々な特性と miR-200 の減少の関係についてより詳細な研究を行うことにより発症や悪性化の分子機構の

一端を明らかにすることができると考えられる。

また miR-200 の発現制御機構についても興味深い。エイズリンパ腫におけるエピジェネティックな異常は重要な発症危険因子の候補であり、詳細な解析を通じて十分に理解を深めることで、臨床への橋渡しにもなると期待される。最後に重要な発見として、パラフィン包埋サンプルから miRNA の発現解析が十分に可能であった。複数のサンプルについて網羅的解析を行ったが、ばらつきが少なく、統計的な解析も可能であった。サンプルの品質については十分チェックする必要があるが、これをクリアすれば過去の貴重なサンプルを用いてより発展的な臨床研究が進められると期待される。

## E. 結論

エイズリンパ腫は特徴的な miRNA の発現パターンを示しており、miR-200 ファミリーなどの異常により腫瘍細胞の遺伝子発現異常に関わっていると考えられる。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Watanabe M, Nakano K, Togano T, Nakashima M, Higashihara M, Kadin M-E, Watanabe T, Horie R. Targeted repression of overexpressed CD30 downregulates NF- $\kappa$ B and ERK1/2 pathway in Hodgkin lymphoma cell lines. **Oncol Res**, in press
- 2) Watanabe M, Itoh K, Togano T, Kadin M-E., Watanabe T, Higashihara M, Horie R. Ets-1 Activates Overexpression of JunB and CD30 in Hodgkin Lymphoma and Anaplastic Large-Cell Lymphoma. **Am J Pathol**, 180(2):831-838, Feb. 2012
- 3) Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami Y, Tsutsumi A, Matsuda Y, Sato-Otsubo

- 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**, 21(1):121-135, Jan. 2012
- 4) Uota S, Dewan MZ, Saitoh Y, Muto S, Itai A, Utsunomiya A, Watanabe T, Yamamoto N, Yamaoka S. An I $\kappa$ B kinase 2 inhibitor IMD-0354 suppresses the survival of adult T-cell leukemia cells. **Cancer Sci**, 103(1):100-106, Jan. 2012
- 5) Suzuki K, Ishida T, Yamagishi M, Ahlenstiel C, Swaminathan S, Marks K, Murray D, McCartney EM, Beard MR, Alexander M, Purcell DF, Cooper DA, Watanabe T, Kelleher AD. Transcriptional gene silencing of HIV-1 through promoter targeted RNA is highly specific. **RNA Biol**. 8, 2011
- 6) Takamori A, Hasegawa A, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Masuda M, Shimizu Y, Tamai Y, Sasada A, Zeng N, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Masuda T, Kannagi M. Functional impairment of Tax-specific but not cytomegalovirus-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes in a minor population of asymptomatic human T-cell leukemia virus type 1-carriers. **Retrovirology**, 8:100, 15pp, Dec. 2011(doi:10.1186/1742-4690-8-100) [Epub]
- 開]、血液内科、62 (4) : 455-462、2011 年 4 月
- 2) 渡邊俊樹、特集 感染に由来するヒトの腫瘍—その現状と対策:「成人 T 細胞白血病ウイルスと白血病/リンパ腫」、臨床と微生物、38 (3) : 241-248、2011 年 5 月
- 3) 渡邊俊樹、特集(1):HTLV-1 感染の検査と臨床「成人 T 細胞白血病(ATL)と HTLV-1 研究の現状」、医療と検査機器・試薬/別冊 機器・試薬、34(4) : 437-446、2011 年 8 月
- 4) 渡邊俊樹、教育講演特集号「HTLV-1 特命チームと HTLV-1/ATL 研究」、臨床血液、52(10) : 27-35、2011 年 10 月
- 5) 山岸誠、渡邊俊樹、「成人 T 細胞白血病から明らかになったクロストーク異常とがん」、ライフサイエンス新着論文レビュー、<http://first.lifesciencedb.jp/archives/4367>、2012 年 2 月

(著書)

- 1) 渡邊俊樹 (分担執筆)、「第 1 章 3 腫瘍ウイルス (HTLV, HPV, EBV など)」、がん生物学イラストレイテッド (411 ページ)、43-49、羊土社、2011 年 7 月
2. 学会発表  
(国際学会)
- 1) Nakano K, Ando T, Ishida T, Ohsugi T, Tanaka Y, Watanabe T, “A Novel Function of HTLV-1 Rex in Inhibition of the Host mRNA Surveillance Mechanism (NMD) for Protection of the Viral Genomic mRNA“, the 15<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, Lueven, Belgium, June 5-8, 2011
- 2) Yamagishi M, Kazumi Nakano, Tadanori Yamochi, Ariko Miyake, Yayoi Kagami, Akihisa Tsutsumi, Aiko Otsubo, Seishi Ogawa, Atae Utsunomiya, Kazunari Yamaguchi, Kaoru Uchimaru, Watanabe T, “Genetic and Epigenetic Loss of miR-31 Activates NIK-dependent NF- $\kappa$ B Pathway in Adult T-cell Leukemia“, the 15<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, Lueven, Belgium, June 5-8, 2011
- 3) Asanuma S, Kawanami K, Nakano K, Yamagishi M, Yamaguchi K, Utsunomiya A,

**(Review)**

- 1) Watanabe T. Current status of HTLV-1 infection. **Int J Hematol**. 94(5):430-434, Oct. 2011

**(総説)**

- 1) 渡邊俊樹、特集 分子病態からみた血液疾患診療の進歩:「ATL の分子病態と治療の新展

- Watanabe T, “Over-expression of dominant-negative Helios isoforms in adult T-cell leukemia (ATL) cells”, the 15<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, Lueven, Belgium, June 5-8, 2011
- 4) Matsuda Y, Yamagishi M, Kobayashi M, Hara T, Ishida T, Watanabe T, “Host Polycomb Family Acts as an Epigenetic Repressor for HIV-1 Transcription”, the XV International Congress of Virology, Sapporo, Sep. 13, 2011 (Sep. 11-16, 2011)
- 5) Kobayashi-ishihara M, Yamagishi M, Hara T, Matsuda Y, Miyake A, Nakano K, Ishida T, Watanabe T, “A Novel Antisense RNA of HIV-1, Ale, Functions as a Self-limiting Factor for the HIV-1 Infection”, the XV International Congress of Virology, Sapporo, Sep. 13, 2011 (Sep. 11-16, 2011)
- 6) Nakano K, Ando T, Ishida T, Ohsugi T, Tanaka Y, Watanabe T, “A Novel Function of HTLV-1 REX in Inhibition of the Host mRNA Surveillance Mechanism (NMD) for Protection of the Viral Genomic mRNA”, the XV International Congress of Virology, Sapporo, Sep. 13, 2011 (Sep. 11-16, 2011)
- 7) Firouzi S, Aoki S, Suzuki Y, Yamochi T, Nakano k, Sugano S, Watanabe T, “Development of a New High-throughput Method to Investigate T-cell Clonality in the HTLV-1 Infected Individuals by Enrichment of the HTLV-1 Integration Site”, the XV International Congress of Virology, Sapporo, Sep. 13, 2011 (Sep. 11-16, 2011)
- 8) Takamori A, Hasegawa A, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Shimizu Y, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Kannagi M, “Functional Impairment of Tax-Specific but not CMV-Specific CD8<sup>+</sup> T-cells in a Minor Population of Asymptomatic HTLV-1-carriers”, the XV International Congress of Virology, Sapporo, Sep. 15, 2011 (Sep. 11-16, 2011)
- 9) Yamagishi M, Nakano K, Yamochi T, Miyake A, Kagami Y, Tsutsumi A, Matsubara A, Ogawa S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimarui K, Watanabe T, “Genetic and Epigenetic Loss of miR-31 Activates NIK-dependent NF-κB Pathway in Adult T-cell Leukemia”, The XXV Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases, Tokyo, Sep. 15-17, 2011
- 10) Nakano K, Ando T, Yamagishi M, Ishida T, Ohsugi T, Tanaka Y, Brighty D, Watanabe T, “A Novel Function of HTLV-1 Rex in Inhibition of the Host mRNA Surveillance Mechanism (NMD) for Protection of the Viral Genomic mRNA”, The XXV Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases, Tokyo, Sep. 15-17, 2011
- 11) Chi HT, Ly BTK, Nagamura F, Tojo A, Kano Y, Watanabe T, Sato Y, “PKC412 (midostaurin) - a potential inhibitor of ETV6-NTRK3”, The XXV Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases, Tokyo, Sep. 15-17, 2011
- 12) Asanuma S, Kawanami K, Yamagishi M, Nakano K, Yamaguchi K, Utsunomiya A, Watanabe T, “Novel Helios variants found in ATL cells hamper functions of Ikaros family proteins and induce T cell proliferation.”, The XXV Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases, Tokyo, Sep. 15-17, 2011
- 13) Watanabe T, “Risk factors for developing ATL in HTLV-1 carriers”, The Fourth Annual T-CELL Lymphoma Forum, San Francisco, USA, Jan. 27, 2012 (Invited Talk)
- (国内学会)
- 1) 井上智裕、石川陽介、小林（石原）美栄、戸村友宣、吉田エリカ、山岸誠、矢持忠徳、石田 尚臣、中野和民、渡邊俊樹、「HTLV-1由来新規アンチセンスRNAの構造及び機能解析」、第4回HTLV-1研究会・合同班会議、2011年9月18日～19日
- 2) 矢持忠徳、守田陽平、矢持淑子、佐々木陽介、Firouzi Sanaz、中島誠、渡辺信和、渡邊俊樹、「成人性T細胞性白血病におけるがん幹細胞の同定への試み」、第4回HTLV-1研究会・合同班会議、2011年9月18日～19日



- 日
- 3) Firouzi Sanaz, 青木桜、鈴木穰、矢持忠徳、中野和民、中井謙太、菅野純夫、渡邊俊樹、  
“Development of a new high-throughput method to investigate T-cell-clonality and integration site preference among HTLV-1 infected individuals”、第4回 HTLV-1 研究会・合同班会議、2011年9月18日～19日
  - 4) Nakano K, Ando T, Yamagishi M, Ishida T, Ohsugi T, Tanaka Y, Brighty D, Watanabe T、  
“A Novel Function of HTLV-1 Rex in Inhibition of the Host mRNA Surveillance Mechanism(NMD) for Protection of the Viral Genomic mRNA”、第4回 HTLV-1 研究会・合同班会議、2011年9月18日～19日
  - 5) Saitoh Y, Hagiwara G, Uota, Uno M, Ogawa S, Utsunomiya A, Watanabe T, Yamaoka S,   
“A20 enhances constitutive activation of NF- $\kappa$ B in adult T-cell Leukemia cells”、第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月3日(2011年10月3日～5日)
  - 6) 山岸誠、中野和民、矢持忠徳、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「Polycomb 依存的なエピジェネティック異常による miR-31 の発現低下と NF- $\kappa$ B 活性化機構」、第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月3日(2011年10月3日～5日)
  - 7) 渡邊俊樹、「我が国における HTLV-1 感染の疫学研究の現状」、第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月3日(2011年10月3日～5日)(シンポジウム/招待講演)
  - 8) 高森絢子、長谷川温彦、宇都宮與、前田裕弘、山野嘉久、清水由起子、玉井洋太郎、笹田亜麻子、崔日承、鶴池直邦、岡村純、渡邊俊樹、神奈木真理、「HTLV-1 感染キャリアに観察された Tax 特異的 CTL の機能不全」、第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月4日(2011年10月3日～5日)
  - 9) 浅沼里実、川波克明、山岸誠、中野和民、山口一成、宇都宮與、渡邊俊樹、「新規 ATL 型 Helios は Ikaros 転写因子ファミリーの機能を阻害し、T 細胞の増殖を促進する。」、第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月4日(2011年10月3日～5日)
  - 10) 矢持忠徳、守田洋平、矢持淑子、佐々木陽介、Sanaz Firouzi、中島誠、渡辺信和、宇都宮與、中内啓光、渡邊俊樹、「成人性 T 細胞白血病におけるがん幹細胞の同定への試み」、第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月4日(2011年10月3日～5日)
  - 11) 中野和民、松原亜以子、矢持忠徳、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「cMyb 変異体発現パターンの変化が細胞の恒常性と腫瘍化に及ぼす影響の解析」、第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月5日(2011年10月3日～5日)
  - 12) 渡邊俊樹、「HTLV-1 特命チームと HTLV-1/ATL 研究」、第73回日本血液学会学術集会、名古屋、2011年10月14日(2011年10月14日～16日)
  - 13) Yamagishi M, Nakano K, Yamochi T, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaruru K, Watanabe T, “Polycomb-Mediated Epigenetic Silencing of miR-31 Activates NF- $\kappa$ B Signaling in Adult T-cell Leukemia”、第73回日本血液学会学術集会、名古屋、2011年10月14日(2011年10月14日～16日)
  - 14) Inoue M, Nakamura N, Abe K, Toyoshima T, Horie R, Watanabe T, “Secreted EBV coding miRNAs in the microenvironment of EBV positive lymphoma”、第73回日本血液学会学術集会、名古屋、2011年10月14日(2011年10月14日～16日)
  - 15) Uchimaruru K, Yamano Y, Tsukasaki K, Uike N, Utsunomiya A, Iwanaga M, Hamada T, Iwatsuki K, Watanabe T, “Nation-wide survey of the management of adult T-cell leukemia and HTLV-1 carrier”、第73回日本血液学会学術集会、名古屋、2011年10月14日(2011年10月14日～16日)
  - 16) Chi HT, Ly BTK, Naganuma F, Tojo A, Watanabe T, Sato Y, “Dasatinib and dDPKC412 Inhibited ETV6-NTRK3 Activity in AML Cell Lines with ETV6-NTRK3 fusion gene”、第73回日本血液学会学術集会、名古屋、2011年10月14日(2011年10月14日～16日)
  - 17) Horie R, Nakashima M, Watanabe M, Togano T, Umezawa K, Watanabe T, “The side population, as a precursor of Hodgkin and Reed-Stemberg cells in Hodgkin lymphoma”、第73回日本血液学会学術集会、名古屋、2011年10月15日(2011年10月14日～16日)
  - 18) Yuki H, Ueno S, Tatetsu H, Niiro H, Hata H,

Watanabe T, “PU.1-induced growth arrest and apoptosis in classical Hodgkin lymphoma cell lines”, 第 73 回日本血液学会学術集会、名古屋、2011 年 10 月 15 日 (2011 年 10 月 14 日～16 日)

- 19) 松田有加、山岸誠、小林美栄、原拓馬、石田尚臣、渡邊俊樹、「潜伏感染細胞における Polycomb group による HIV-1 転写抑制機構の解明」第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日)
- 20) 藤川 大、山岸 誠、黒川直也、副島あい、石田尚臣、中野和民、渡邊俊樹、”HTLV-1 viral protein Tax mediates epigenetic deregulation by interaction with a Polycomb group protein, EZH2”, 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011 年 12 月 14 日 (2011 年 12 月 13 日～16 日)
- 21) 井上智裕、石川陽介、小林 (石原) 美栄、山岸誠、矢持忠徳、石田尚臣、中野和民、渡邊俊樹、”Structural analysis of AS-1, a novel form of antisense RNA encoded by HTLV-1”, 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011 年 12 月 14 日 (2011 年 12 月 13 日～16 日)
- 22) 浅沼里実、川波克明、山岸 誠、中野和民、山口一成、宇都宮 與、渡邊俊樹、「新規 ATL 型 Helios は Ikaros 転写因子ファミリーの機能を阻害し、T 細胞の増殖を促進する」、第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011 年 12 月 14 日 (2011 年 12 月 13 日～16 日)
- 23) 青木 桜、ふいるじ さな一ず、矢持忠徳、中野和民、鈴木 穰、中井謙太、菅野純夫、渡邊俊樹、「次世代シーケンサーを用いた HTLV-1 感染細胞 clonality 解析システムの構築」、第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011 年 12 月 13 日 (2011 年 12 月 13 日～16 日)

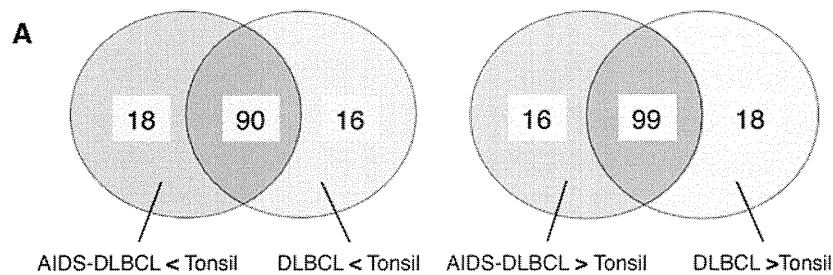
## H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

なし

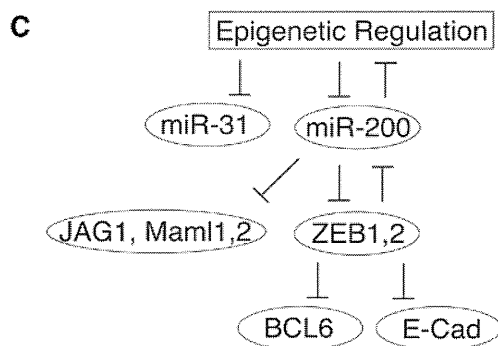
### 2. 実用新案登録

なし



**B**

	AIDS-DLBCL / Tonsil	DLBCL / Tonsil
hsa-miR-31	-16.311848	-9.63479
hsa-miR-200a	-311.43417	-113.90712
hsa-miR-200b	-1218.1031	-738.97595
hsa-miR-200c	-1187.8469	-773.30994
hsa-miR-203	-694.1227	-253.87569
hsa-miR-205	-5388.208	-3141.785
hsa-miR-141	-1344.1993	-432.0043
hsa-miR-429	-216.57397	-79.212006



### エイズリンパ腫における miRNA の解析

(A) エイズ及び非エイズにおける DLBCL の miRNA 発現パターンの比較。正常扁桃と比較して減少していた miRNA 群(左)と増加していた miRNA 群(右)。miRNA 異常の多くはエイズと非エイズで共通しており、エイズ合併 DLBCL の方がより顕著な異常を示す傾向があった。

(B) DLBCL における miR-200 ファミリーの発現異常。正常扁桃と比較した fold change として示した。

(C) miR-200 ファミリーに関連する分子モデル。miR-200 ファミリーはエピジェネティックな制御を中心に複雑に制御される。一方発現した miR-200 は ZEB1, ZEB2, JAG1, また Polycomb ファミリーである SUZ12, BMI1 を抑制する。リンパ腫における miR-200 の発現低下は、これらの平衡を崩し、悪性化に寄与すると考えられる。

## エイズリンパ腫の新たな病型分類法と新規病因の探索 ーエイズ関連リンパ腫の病理診断ー

研究分担者：片野晴隆国立感染症研究所感染病理部 室長

研究協力者：大田泰徳（虎の門病院病理部）

比島恒和（がん・感染症センター都立駒込病院病理科）

望月 眞（国立国際医療研究センター病院病理診断科）

児玉良典（国立病院機構大阪医療センター臨床検査科）

研究要旨：HAART 導入後のエイズ関連リンパ腫にはびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫に加え、バーキットリンパ腫やホジキンリンパ腫など、さまざまな組織型が見られる。Primary effusion lymphoma のようにほとんどエイズ患者にしか見られない組織型もある。いずれの組織型にしてもエイズ関連リンパ腫では非典型像を示すことが多く、病理診断に苦慮する例が多い。施設間において異なる診断がされる可能性もあり、病理診断の標準化が求められる。そこで、本研究では東京および大阪のエイズ拠点病院の難症例を集め、複数の病理医で供覧、検討した。検討の結果、日本のエイズ患者に合併するバーキットリンパ腫では組織像が非典型像を示すものが多いこと、CD20 陰性のリンパ腫がしばしば発症し、EBV や KSHV の検索が重要であることなど、診断上、重要な知見が得られた。これらの結果を踏まえ、日本のエイズ関連リンパ腫の病理診断の手引きとなるものを作成し、専門誌に掲載した。この病理診断の手引きは今後エイズ関連リンパ腫診断の重要な参考資料となり、エイズ関連リンパ腫の病理診断の標準化が期待される。

### A. 研究目的

エイズ関連リンパ腫は宿主の免疫不全状態がベースにあるため、一般に進行が早い。それゆえに、正確な診断の基に、なるべく早く、個々の症例に応じた、適切な治療を開始する必要がある。そうした意味で迅速で正確な病理診断はエイズ関連リンパ腫の診療上、きわめて重要な意味を持つ。エイズ関連リンパ腫にはさまざまな組織型のリンパ腫が見られる。2008年にWHOが提唱したリンパ腫の新しい組織分類（WHO分類第4版、新WHO分類）ではエイズ関連リンパ腫に、びまん性大

細胞性B細胞リンパ腫（diffuse large B cell lymphoma, DLBCL）やバーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、primary effusion lymphoma などを含めている。

エイズ関連リンパ腫の病理組織診断には、非エイズ患者に発症するリンパ腫と比べると、いくつかの特殊な点がある。第1点は、エイズ関連リンパ腫では、それぞれの組織型で非典型像を示す例が多いことが挙げられる。形態の似通ったDLBCLとバーキットリンパ腫の鑑別は常に問題で、バーキットリンパ腫の定義が、WHO分類改訂のたびに変更され

たために、病理医の間でも意見が異なる場合がある。

エイズ関連リンパ腫の特徴の第2点は、ほとんどエイズ患者にしか見られないリンパ腫が発症することである。例えば、**primary effusion lymphoma**はカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV, HHV-8)感染により発症するリンパ腫であり、同性愛男性エイズ患者以外では非常にまれである。口腔などに発症する**plasmablastic lymphoma**も、ほとんど、エイズ患者でしか見られない疾患である。**Primary effusion lymphoma**も**plasmablastic lymphoma**もB細胞のマーカーである**CD20**を発現しておらず、B細胞リンパ腫の診断すら、容易ではない。

こうした、エイズ関連リンパ腫の特殊性から、エイズ拠点病院の病理医は診断に苦慮する例を数多く経験してきている。日本ではエイズ関連リンパ腫症例は東京、大阪などの数施設に集中し、他の施設で経験することはまれである。また、一部の施設では**DLBCL**の診断がされたものの、臨床的な経過はバーキットリンパ腫を疑う症例も提示され、多数例を経験する施設間でも、画一的な診断がされているかどうかは不明である。そこで、本研究では、多数のエイズ関連リンパ腫症例を擁するエイズ拠点病院の症例を持ち寄り、リンパ腫病理の専門家を含む、複数施設の病理医が供覧する検討会を開催することで、いわゆる「目合わせ」を行い、施設間での診断の違いを最小のものにすること、および、そこで得られた知見をまとめ、発表することで、日本におけるエイズ関連リンパ腫の病理診断の標準化を図ることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 症例

東京および大阪のエイズ拠点病院から、各病理担当医の判断で、診断に苦慮した症例、珍しい症例など約40例を選択した。検討した症例の内訳は、**BL**と**DLBCL**の鑑別が問題となった24例、**human herpesvirus 8 (HHV-8)**

関連リンパ腫5例、**plasmablastic lymphoma**4例、**ホジキンリンパ腫**、**多発性骨髄腫**、**PTCL**が1例などで、生検と剖検例を含んでいる。

### 2. 病理学的検索

症例ごとにヘマトキシリンエオジン染色、免疫染色、**in situ hybridization**を供覧した。免疫染色では**CD3**、**CD10**、**CD15**、**CD20**、**CD30**、**CD38**、**CD79a**、**CD138**、**Bcl2**、**Bcl6**、**EBV LMP1**、**HHV8 LANA1**、**lambda**、**kappa**、**cIgM**、**MIB1**などを検出した。**EBV**の感染は**EBER**の**In situ hybridization**で検索した。そのほか、必要に応じて、**myc**遺伝子の再構成の有無を検査した。

### 3. 検討方法

各症例につき、複数施設の病理医がディスカッション顕微鏡、および大型画面モニタにより供覧した。必要に応じ、臨床情報を追加した。

(倫理面への配慮)

各症例に対する標本の作製、染色は診断の過程で行われた。すべての症例は連結可能匿名化検体として扱った。

## C. 研究結果

### 1. **DLBCL**とバーキットリンパ腫の鑑別

24例の**DLBCL**と**BL**の鑑別が問題となる症例の解析を行った。**DLBCL**の中でも**CD10**、**CD20**、**CD79a**、**Bcl6**が陽性の症例は多く、**germinal center**由来の**DLBCL**か、バーキットリンパ腫か、形態からは鑑別が不可能な症例が多かった。**Myc**の遺伝子再構成の結果と合わせると、バーキットリンパ腫の免疫学的特徴と**myc**の遺伝子再構成がありながら、**starry sky**が明らかでない、大型の細胞が混ざるなど、バーキットリンパ腫の形態としては非典型的な症例が数多く見られた。

**WHO**分類の旧版(第3版)では**atypical Burkitt**というvariantがバーキットリンパ腫に分類されていたが、新**WHO**分類では**atypical Burkitt**の項目はなくなっている。

したがって、これらの症例の取り扱いについて、新 WHO 分類には記載が無い。一方、新 WHO 分類では intermediate BL/DLBCL (正式名称は B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma) の亜型の記載があり、この亜型は BL と DLBCL の中間的な腫瘍と読めることから、intermediate BL/DLBCL への分類を検討した。しかし、新 WHO 分類ではエイズ関連リンパ腫の項目に intermediate BL/DLBCL は定義されておらず、また、エイズ関連リンパ腫の項目には大型細胞が混ざるバーキットリンパ腫が紹介されている。以上のように、新 WHO 分類に記載されている内容からは、形態的にはバーキットリンパ腫として合わないものの、免疫学的表現型や myc の遺伝子再構成が認められる症例の取り扱いが明らかでない。そこで、新 WHO 分類の著者らに直接この件について、問い合わせを行った。今回の検討結果の一部は新 WHO 分類の著者らにも回覧され、著者間でさまざまな意見が交わされた。新 WHO 分類の著者らの意見を要約すると下記のものであった。

- (1) intermediate BL/DLBCL の概念は著者間でも一致せず、問題なのだが、現在では double hit, triple hit のリンパ腫についてのみ適応する傾向にある。
- (2) エイズ関連リンパ腫には double hit, triple hit のリンパ腫はまれで、上記の定義では intermediate BL/DLBCL に当たる症例はほとんどない。
- (3) エイズ関連リンパ腫では旧分類で言う atypical BL が多いが atypical BL も BL であり、BL の範疇に入れている。
- (4) 免疫染色と myc の再構成が BL と一致すれば、形態は非典型的でも BL としている。ただし、典型的な DLBCL の形態を示すものは DLBCL とする。

これらの意見を踏まえ、改めて、日本のエイズ関連リンパ腫についての検討結果を

再検討した。そして、最終的に、WHO 分類第 4 版の著者らの考え方に合わせ、エイズ関連リンパ腫に intermediate BL/DLBCL を適応せず、免疫染色と myc の再構成が BL と一致すれば、形態は非典型的でも BL にする、との結論に至った。

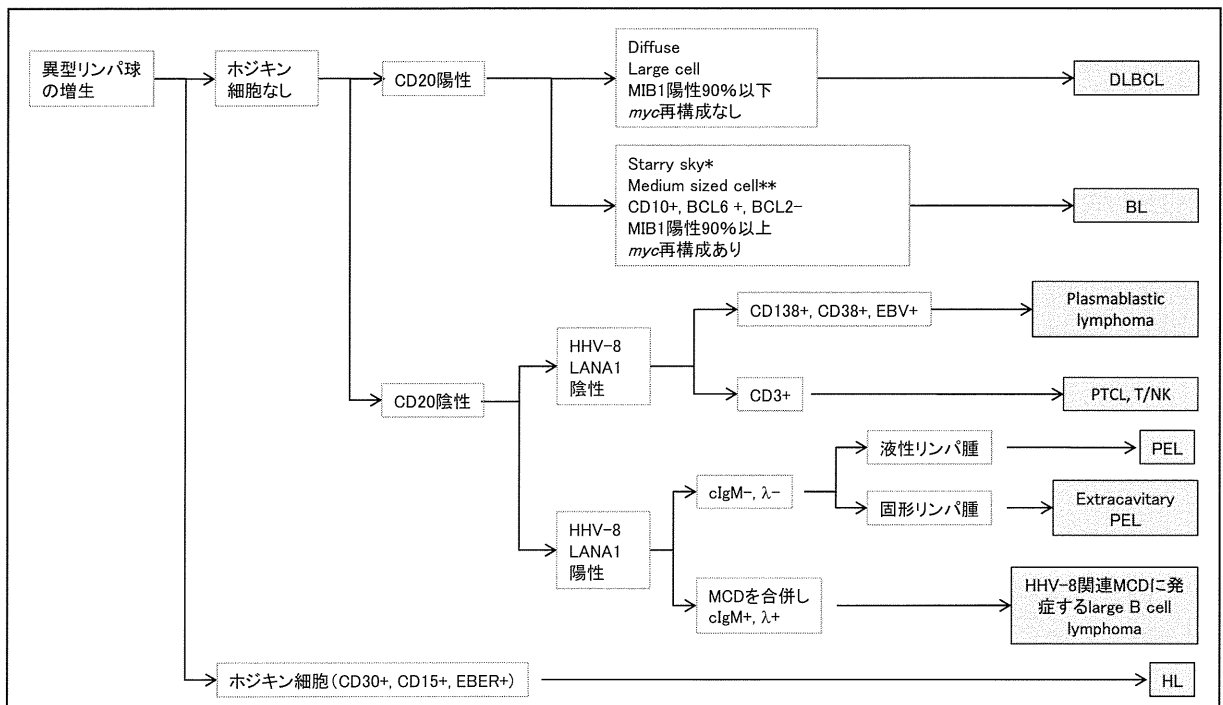
2. CD20 陰性のエイズ関連リンパ腫の診断  
エイズ関連リンパ腫のほとんどは B 細胞リンパ腫であるが、B 細胞の一般的なマーカーである CD20 陰性の症例がしばしば見られる。今回検討した HHV-8 関連リンパ腫 8 例、plasmablastic lymphoma 4 例が CD20 陰性リンパ腫に該当した。HHV-8 関連リンパ腫は primary effusion lymphoma と large B cell lymphoma arising HHV-8 associated multicentric Castleman disease に分けられるが、primary effusion lymphoma でも固形腫瘍を形成しない液性腫瘍のみの場合と固形腫瘍が合併する extracavitary primary effusion lymphoma の 2 種類があり、組織標本で鑑別が問題となるのは後者の extracavitary primary effusion lymphoma と large B cell lymphoma arising HHV-8 associated multicentric Castleman disease であった。これには large B cell lymphoma arising HHV-8 associated multicentric Castleman disease に cIgM と lambda 鎖の発現があることで鑑別される。

Plasmablastic lymphoma では plasmablastic な形態が維持されていない症例も多く認められ、形態だけからは DLBCL との鑑別が困難であった。CD38, CD138 などの免疫染色と EBER の in situ hybridization が重要な鑑別点となった。

以上のことから、エイズ関連リンパ腫では CD20 陰性の B 細胞性リンパ腫が一定の頻度で存在し、CD20 陰性のリンパ腫に対しては HHV-8、EBV の検索が重要であることが改めて認識された。

3. 病理診断標準化のための手引きの作成

以上の検討から、エイズ関連リンパ腫の診断では形態観察のみならず、免疫染色や



図：エイズ関連リンパ腫診断のためのフローチャート

CD20 陽性の場合、BL、DLBCL の鑑別が必要である。エイズ関連 BL では *starry sky* は必ずしも明瞭ではなく (\*)、細胞の大きさも大型細胞が混ざることが多い (\*\*)。形態的に BL として典型的でなくても、CD10, BCL6, BCL2, MIB1 の免疫染色と *myc* の再構成の結果が BL として矛盾しなければ、BL に分類する。CD20 陰性の症例では HHV-8, EBV の検索を行い、HHV-8 陽性であれば PEL か Large B-cell lymphoma arising in HHV-8-associated MCD のどちらかに分類される。後者は HHV-8 関連 MCD に合併し、cIgM, λ 陽性である点が PEL との鑑別点である。PEL と同じ免疫学的表現型を持ち、体腔以外に固形腫瘍を形成する HHV-8 陽性リンパ腫は extracavitary PEL に分類する。CD20 陰性、CD138 ないし CD38 陽性、EBV 陽性、HHV-8 陰性で plasmablastic な形態を持つリンパ腫は plasmablastic lymphoma に分類する。HL は CD30 陽性、CD15 陽性、EBV 陽性のホジキン細胞が診断の決め手となる。

*myc* などの遺伝子検査を加える必要性が認識された。本検討会での結論を広く日本の病理医に周知し、エイズ関連リンパ腫診断の標準化を図るため、エイズ関連リンパ腫診断のための手引きとなるものを作成した。この手引きを多くの病理医が購読している「病理と臨床」誌に投稿し、査読、審査を経て、2012年2月号に掲載された。手引きにはエイズ関連リンパ腫診断のためのフローチャートも掲載した(図)。

#### D. 考察

HAART導入前後ではエイズ関連リンパ腫の組織型が異なることが知られている(Hishima T et al. Microbe Infect 2006)。HAART導入前ではエイズ関連リンパ腫のほとんど

はEBV陽性の日和見リンパ腫としてのDLBCLであった。しかし、HAART導入後ではDLBCLに加え、バーキットリンパ腫やホジキンリンパ腫など、他の組織型のリンパ腫が増加している。とくに近年のリンパ腫に見られる傾向はEBV陽性のリンパ腫が減少したことと、バーキットリンパ腫が増加傾向にあることである。EBV陽性のリンパ腫が減少したことはHAARTによる免疫能の改善と無関係ではない。宿主の免疫能が改善したことで、EBVに対する免疫が維持され、EBV関連リンパ腫の減少につながったものと推察される。一方で、バーキットリンパ腫の増加についてはその原因を推定するのは難しい。バーキットリンパ腫は、もともとは、アフリカの小児の顔面などに発症する、EBVが関連するリン

パ腫と理解されていた。しかし、現在では、バーキットリンパ腫はmycの転座が主な原因となるリンパ腫であり、必ずしもEBVが関連するものだけではないことが、コンセンサスとなっている。形態的にはstarry skyと呼ばれる、特徴的な組織像を取ることが知られているが、エイズ関連リンパ腫に合併するバーキットリンパ腫はこうした典型的な組織像を採る症例は少なく、DLBCLとの鑑別が難しい。今回の検討症例でも形態からは判別がつかず、免疫染色とmycの遺伝子再構成の結果が重視される症例が多かった。同様のことはplasmablastic lymphomaにも言え、形態的には判別のつかない症例がエイズ関連リンパ腫では多い。このようにエイズ関連リンパ腫のどの病型においても非典型的な組織学的形態を示す点は、細胞形態と免疫の関連を示唆するものであり、学術的には興味深い。つまり、バーキットリンパ腫やplasmablastic lymphomaなど、エイズ患者以外では比較的一定の形態を示す腫瘍が、免疫不全状態のエイズ患者では非典型的で多彩な形態を示すことは、腫瘍細胞の形態が免疫によってある程度制御されていることを示唆する。腫瘍細胞の形態と免疫との関連は、さらに多くの解析が必要であるが、いずれにせよ、エイズ関連リンパ腫の診断には形態のみならず、免疫染色や遺伝子検索の情報が極めて重要である点が改めて認識された。

バーキットリンパ腫の診断はWHO分類の旧版から診断基準が異なっており、病理医の間でもDLBCLとの異同について、さまざまな意見がある。臨床的にはバーキットリンパ腫は進行の早いリンパ腫であり、早めに適切な治療を導入する必要がある。今回の検討ではWHO分類第4版の著者である米国等の病理医にいわゆるatypical Burkittの取り扱いについて、意見交換し、貴重なコメントを頂いた。結論は結果に記載した通りであるが、われわれが感じたことはWHO分類第4版も完全なものではなく、今後の改訂で、さらにバーキットリンパ腫の定義が変更になる可能性があ

ることである。現在のWHO分類は形態的な分類というよりも、形態のみならず、免疫学的表現型や遺伝子異常など、あらゆる細胞生物学的情報を総合し、リンパ腫を生物学的に分類する方向にある。こうした生物学的分類は臨床像とよく合致する。形態のみならず、免疫染色、遺伝子検査などの結果を総合して判断することは、リンパ腫の生物学的特徴を正確に把握することであり、エイズ関連リンパ腫の場合はそのプロセスを厳密に踏み、診断する必要がある症例が多いことを理解しなければならない。

本研究で作成したエイズ関連リンパ腫の病理診断の手引きになるものは「病理と臨床」に掲載され、日本の病理医の広く目にするとところとなった。掲載したフローチャートはエイズ関連リンパ腫の理解と診断の一助となるはずであり、これにより、日本のエイズ関連リンパ腫の診断が標準化され、多くの施設で、標準化された診断がなされることを期待したい。また、本基準は上記のごとく国際的にも通用するものであり、この基準に基づいて、これまでの日本のエイズ関連リンパ腫を再分類し、その実態を正確に把握する必要もあろう。

## E. 結論

エイズ関連リンパ腫の病理診断の標準化を目指し、判断に迷う症例を複数の病理医で供覧、検討した。その結果、エイズ患者のバーキットリンパ腫では組織像が非典型像を示すものが多いこと、CD20陰性のリンパ腫がしばしば発症し、EBVやKSHVの検索が重要であることなど、診断上、重要な知見を得た。これらの結果をまとめ、日本のエイズ関連リンパ腫の診断の手引きとなるものを作成し、専門誌へ掲載した。

## F. 健康危険情報

なし。



## G. 研究発表

### 論文発表

1. Nakano K, Katano H, Tadagaki K, Sato Y, Ohsaki E, Mori Y, Yamanishi K, Ueda K: Novel monoclonal antibodies for identification of multicentric Castleman's disease; Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded vMIP-I and vMIP-II, *Virology* 2012, in press
2. Goto H, Kariya R, Shimamoto M, Kudo E, Taura M, Katano H, Okada S: Antitumor effect of berberine against primary effusion lymphoma via inhibition of NF-kappaB pathway, *Cancer Sci* 2012,
3. Nakai H, Sugata K, Usui C, Asano Y, Yamakita T, Matsunaga K, Mizokuchi Y, Katano H, Iwatsuki K, Yoshikawa T: A case of erythema multiforme associated with primary epstein-barr virus infection, *Pediatr Dermatol* 2011, 28:23-25
4. Fukumoto H, Kanno T, Hasegawa H, Katano H: Pathology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection, *Front Microbiol* 2011, 2:175
5. 大田泰徳、比島恒和、望月 眞、児玉良典、

片野晴隆: カレントトピックス エイズ関連リンパ腫の病理診断. *病理と臨床* 2012, 30: 195-203.

### 学会発表

1. 片野晴隆: KSHV 関連疾患の病理とウイルスがコードする miRNA. 第 100 回 日本病理学会総会. 横浜。(2011.4)
2. 片野晴隆、横幕能行、菅野隆行、福本 瞳、中山智之、新ヶ江 章友、杉浦 互、市川誠一、安岡 彰: 日本人 MSM におけるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV/HHV-8) 抗体保有率について. 第 25 回 日本エイズ学会学術集会総会 東京 (2011.11)
3. 片野晴隆、坂本康太、関塚剛史、黒田 誠: KSHV がコードしている 16 base の unusual small RNA の発現. 第 8 回 EB ウイルス研究会. 大阪(2011.7)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## EBV によるリンパ腫発症モデル

分担研究者 藤原成悦 （独）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** エイズリンパ腫の EBV 陽性率は近年低下しつつあるが、依然として約半数が EBV 陽性である。EBV 陽性エイズリンパ腫の大半は diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) の組織型を示すが、最近ではバーキットリンパ腫やホジキンリンパ腫の組織型を示すものが増えている。私たちは、免疫不全マウスにヒト造血幹細胞を移植しヒト免疫系細胞を再構築させたマウス（ヒト化マウス）に EBV を感染させるモデル実験系において、EBV 陽性の DLBCL 型リンパ腫が発症することを示し、エイズリンパ腫モデルとして治療薬候補の評価などに往々してきた。今年度は、ヒト免疫系細胞再構築の程度や感染 EBV 量を変化させ、DLBCL 以外のエイズリンパ腫の再現の可能性を検討したところ、数少ないながらホジキン様リンパ腫と伝染性単核症様リンパ増殖が生じることが明らかになった。

### A. 研究目的

EB ウイルス (EBV) はヒト B リンパ球を不死化し、持続増殖能をもつリンパ芽球様細胞株にトランスフォームする特徴的な生物活性をもつ。このような不死化細胞は EBV 感染健常者にも出現するが、主に EBV 特異的細胞傷害性 T 細胞の働きにより除去されるため、潜伏感染状態が保たれる。しかし免疫不全状態にある HIV 感染者では、不死化細胞が除去されず増殖を続け EBV 関連エイズリンパ腫を発症する。エイズリンパ腫の約半数は EBV 陽性であり、組織型としては diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) が多い。しかし近年はエイズリンパ腫における EBV 陽性率が低下しつつあり、それと同時に DLBCL の割合が低下し、バーキットリンパ腫とホジキンリンパ腫の割合が増加している。

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 $\gamma$ <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、DLBCL 型のエイズリンパ腫モデルを作成することに成功しているが、今年度はヒト免疫系細胞再構築の程度や感染 EBV 量を変化させることにより、DLBCL 型以外のエイズリンパ腫をヒト化マウ

スモデルに発症させられるかどうかを検討した。

### 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. ヒト化マウスへの EBV 感染とマウス組織の病理学的解析

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> 50% transforming dose (TD<sub>50</sub>) の EBV を尾静脈より接種し 4-12 週後に安楽死させ、骨髄、胸腺、脾臓、リンパ節、肝臓、腎臓、肺、小腸、脳などに病理組織学的検討を加えた。病理学的検討は共同研究者の中澤温子博士 (国立成育医療研究センター病理診断部) に

より行われた。

### 3. ヒト免疫系細胞再構築の程度および感染 EBV 量を変動させる実験

造血幹細胞移植後の NOG マウス末梢血中ヒト CD45 陽性細胞における CD19 陽性 B 細胞及び CD3 陽性 T 細胞の割合の経時変化を図 1 に示す。移植後 40 日前後から B 細胞の分化が認められたが、T 細胞の分化はやや遅れ、移植後 80 日前後から出現し、150 日以降は末梢血中リンパ球の大半を T 細胞が占めるようになった。これまでの研究から、EBV 感染ヒト化マウスの T 細胞は EBV による B 細胞不死化を抑制する作用を持ち、生体防御機構として機能することが示されている。これらの点を考慮し、今回は、①主に B 細胞が存在し T 細胞分化が不十分な時期（移植後約 3 ヶ月）における大量 ( $10^3$  TD<sub>50</sub>) の EBV 感染、②同じ時期における少量 ( $<10^1$  TD<sub>50</sub>) の感染、③T 細胞が十分分化した時期（移植後約 6 ヶ月）における大量の感染、④同じ時期における少量の感染、以上の 4 グループに分けて感染実験を行った。

#### (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、および東京脐帯血バンク倫理委員会の承認を得て行った。脐帯血バンクに提供された脐帯血には、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。本研究ではこのような脐帯血を実験に利用したため、脐帯血提供者およびバンク利用者に不利益は生じない。バンクへの脐帯血提供の際には、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、脐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。

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ールに従い、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. 造血幹細胞移植後約 3 ヶ月に大量の EBV を感染させる実験

この条件で感染させたマウスは 6 頭すべてがリンパ腫を発症し、短期間に一般状態が悪化したため安楽死させた。リンパ腫の組織は全て DLBCL 型であった (図 2)。肺、肝、脾、腎、リンパ節にリンパ腫が認められ、増殖していた細胞は CD20+、CD23+、Mum1+、LMP1+、EBNA2+、EBER+であった。

#### 2. 造血幹細胞移植後約 3 ヶ月に少量の EBV を感染させる実験

この条件で感染させた 3 頭のうち 1 頭が、CD20+、CD23-、CD30+のマーカー発現を示し、顕著な核小体をもつホジキン様細胞や多核の Reed-Sternberg 様細胞を含むホジキン様リンパ腫を発症した (図 3)。EBV 遺伝子発現は、EBNA1+、LMP-1+、EBNA2-、EBER+の latency II 型であった。ホジキン様細胞の周囲に浸潤する細胞は、典型的なホジキンリンパ腫のように CD4+細胞ではなく、CD8+細胞であった。他の 2 頭のうち 1 頭では、比較的少数の大型芽球様細胞 (CD20+、CD23(+), CD30+/-、LMP-1+、EBNA2+、EBER+)が存在し、その周囲に多数の CD8+ T 細胞が浸潤する伝染性単核症様のリンパ球増殖が認められた (図 4)。残る 1 頭は DLBCL 型であった。

#### 3. 幹細胞移植後約 6 ヶ月に大量の EBV を感染させる実験

この条件で感染させた 5 頭のマウスのうち 2 頭は DLBCL を発症し、1 頭は伝染性単核症様リンパ球増殖を示したが、他の 2 頭では EBV 感染リンパ球の明らかな増殖を認めなかった。

#### 4. 幹細胞移植後約 6 ヶ月に少量の EBV を感染させる実験

この条件で感染させた 7 頭のマウスについては、1 頭のみで DLBCL が認められたが、残る 6 頭ではリンパ増殖が認められなかった。

### D. 考察

EBV は、DLBCL、バーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、primary effusion lymphoma、膵胸後リンパ腫など様々な B 細胞リンパ腫細胞中に検出され、それぞれの腫瘍に特徴的なウイルス遺伝子発現を示す。これらの B 細胞リンパ腫の大部分がエイズリンパ腫としても発症する。私たちはこれまで EBV 感染ヒト化マウスにお

ける DLBCL について報告してきたが、ヒト免疫系細胞再構築の程度や感染ウイルス量を変化させると、DLBCL 以外にも少数ながらホジキン様リンパ腫、伝染性単核症様のリンパ増殖の組織像が認められることが、今回の解析により明らかとなった。ヒト化マウスに生じたホジキン様リンパ腫は、顕著な核小体をもつ Hodgkin 様細胞と多核の Reed-Sternberg 様細胞の存在、CD30 陽性、latency II 型の EBV 遺伝子発現などにおいてホジキンリンパ腫に類似しているが、CD20+である点、腫瘍細胞に浸潤している細胞が主に CD8+細胞である点において異なっている。ホジキンリンパ腫は胚中心細胞のフェノタイプを有しているが、現在私たちが用いているヒト化マウスではヒトの濾胞樹状細胞が分化しないため胚中心の形成が不十分であり、クラススイッチ、体細胞超変異など胚中心で起きる現象が十分再現されていない。今後、ヒト濾胞樹状細胞の分化を実現したヒト化マウスにおいては、実際のホジキンリンパ腫と同様なフェノタイプをもつ疾患モデルを作成することができる可能性が考えられる。

EBV に対する免疫応答の主役となる T 細胞がほとんど存在しない時期のマウスに大量の EBV を感染させると、短期間にリンパ腫を発症し、全てが DLBCL 型であった。一方、T 細胞が十分分化した時期の感染、或いは感染量が少ない場合は、リンパ腫発症までの期間が延長され、ホジキン様リンパ腫や伝染性単核症様リンパ増殖が一部のマウスで認められた。これらのことから、免疫能が極度に低下し短期間にリンパ腫を発症する場合は DLBCL 型になりやすく、比較的免疫能が保たれた状態で発症するか或いはゆっくりと発症する場合には DLBCL 以外のリンパ腫も発症する、という解釈が可能と考えられる。実際のエイズリンパ腫においても、極度の免疫不全状態では EBV 陽性の DLBCL が主に発症し、ホジキンリンパ腫やバーキットリンパ腫は CD4+細胞数が比較的保たれた状態で発症することが多いという知見に一致しているかもしれない。

今後、造血幹細胞移植時のマウスの週齢、造血幹細胞のソース、免疫不全マウスの種類、移植後の日数、感染させる EBV の株と量などを

変動させ、DLBCL 以外のリンパ腫を発症させやすい条件を設定し、ホジキンリンパ腫やバーキットリンパ腫のモデルを作成していきたい。

## E. 結論

ヒト免疫系細胞再構築の程度と感染 EBV 量を変動させ、生じるリンパ腫の組織を検討したところ、主体となる DLBCL 型以外にも、ホジキン様リンパ腫や伝染性単核症様リンパ増殖が再現されることが分かった。このことから、DLBCL 型以外のエイズリンパ腫のモデルも、EBV 感染ヒト化マウスを用いて作成できることが示唆された。

## 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, Watanabe Y, Takahashi M, Kawaguchi T, Nakaseko C, Fujiwara S, Miura O. Clinical features of adult-onset chronic active Epstein-Barr virus infection: a retrospective analysis. *Int J Hematol* 93(5):602-9, 2011.
- 2) Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, and Fujiwara S. Novel Mouse Xenograft Models Reveal a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK Cells. *PLoS Pathogens*, 7(10): e1002326, 2011.
- 3) Kuwana Y, Takei M, Yajima M, Imadome K, Inomata H, Shiozaki M, Ikumi N, Nozaki T, Shiraiwa H, Kitamura N, Takeuchi J, Sawada S, Yamamoto N, Shimizu N, Ito M, and Fujiwara S. Epstein-Barr Virus Induces Erosive Arthritis in Humanized Mice. *PLoS ONE*, 6(10): e26630, 2011.
- 4) Arai A, Imadome K, Wang L, Nan W, Kurosu T, Wake A, Ohta Y, Harigai M, Fujiwara S, and Miura O. Recurrence of chronic active Epstein-Barr virus infection from donor cells after achieving complete response through allogeneic bone marrow transplantation. *Inter*