

厚生労働省科学研究費補助金  
(難治性疾患等政策研究事業(難治性疾患政策研究事業))  
分担研究報告書

EBV-positive T/NK lymphoproliferative diseases の病態解明と新規治療法の開発

研究分担者 新井文子(東京医科歯科大学大学院血液内科学 講師)

研究要旨

Epstein-Barr virus (EBV) は B 細胞のみならず、T 細胞や NK 細胞腫瘍にもそのゲノムを認め、腫瘍発症に関与すると考えられるが、その分子機序は明らかになっていない。私たちは EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症(いわゆる慢性活動性 EB ウイルス感染症、EBV-positive T/NK lymphoproliferative diseases; EBV-T/NK-LPDs) の病態解明と新規治療法の開発を目的に以下の 2 項目について研究を行った。

**EBV-T/NK-LPDs と P-glycoprotein (P-gp) 発現:** EBV-T/NK-LPDs の EBV 感染腫瘍細胞では薬剤耐性に関与する分子 P-gp が強く発現し、薬剤排出機能を示すことを見出した。さらに P-gp の阻害剤 Cyclosporin A 処理により Etoposide による apoptosis 誘導は亢進することが示された。以上から P-gp は EBV-T/NK-LPDs の化学療法耐性の原因のひとつであることが示された。

**EBV-T/NK-LPDs 成人例に対する L-asparaginase (L-aspar) 単剤療法の検討:** 至適治療法開発のため、5 人の EBV-T/NK-LPDs 成人例に対し、L-aspar の効果を検討する前向き探索的研究を施行した。末梢血中 EBV 量は 1 例で 0.08 倍の減少を見たが、1 例で 22 倍に増加、2 例は不変であった。1 例は投与中鼻粘膜病変が増悪したため途中で中止した。ウイルス量の低下を見た症例では、発症から治療開始までの期間は 8 か月と他の患者より短かった。EBV 感染腫瘍細胞の Asparagine synthetase (AS) の発現は治療効果と関連しなかった。以上から EBV-T/NK-LPDs は早期に治療を導入することが良い治療反応性につながる可能性が示唆された。

A. 研究目的

慢性活動性 Epstein-Barr ウイルス (EBV) ウイルス感染症 (CAEBV) は、近年 EBV 感染 T もしくは NK 細胞のクローン性増殖を伴う事が明らかになり、腫瘍であるとの位置づけがなされ、2008 年度版 WHO 造血器腫瘍分類にリンパ腫のひとつ、EBV-positive T/NK lymphoproliferative diseases (EBV-T/NK-LPDs) として記載された。疾患の周知に従い、近年症例報告は増加している

が、その発症メカニズム、特に EBV が本当に腫瘍発症に寄与しているのかは証明されていない。また 2009 年度の研究で私達が明らかにしたとおり(業績、論文 1)、CHOP 療法、大量 Cytarabine 療法をはじめとする化学療法に抵抗性の症例が多く、予後は極めて不良である。

本研究では、それらの問題点を解析、解決するために、以下の 2 つの解析を行った。

### **EBV-T/NK-LPDs と MDR1 発現 :**

EBV-T/NK-LPDs V の化学療法抵抗性の原因について、薬剤耐性に関与する分子のひとつ、P-glycoprotein (P-gp)に注目し、その発現量、機能を患者の細胞を用いて解析した。

### **EBV-T/NK-LPDs 成人例に対する L-asparaginase (L-asp) 単剤療法の検討 :**

EBV-T/NK-LPDs 治療法確立のため L-asp 単剤の有効性を前向きに検討した。L-asp は EBV-T/NK-LPDs 同様 EBV 陽性 T/NK 腫瘍である extranodal NK/T-cell lymphoma nasal type (ENKL) 治療の中心的薬剤であり、同疾患に対しても単剤で有効であるとの報告がある。よって効果が期待された。

### **B . 研究方法**

解析には EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症細胞株 (SNT8,15,16, SNK6: 清水則夫博士より供与) および EBV-T/NK-LPDs 患者の末梢血から磁気ビーズを用いて分離した EBV 感染細胞を用いた。対照には EBV 陰性 T および NK 細胞腫瘍株を用いた。

それらにおける P-gp の発現を RNA(RT-PCR) および蛋白 (Western blotting) レベルで確認した。また P-gp の薬剤排出機能を Rhodamine efflux assay で検討した。対照には、EBV 陽性 B 細胞リンパ腫細胞株、EBV 陰性 T および NK 細胞腫瘍株を用いた。また、これらの細胞に対し P-gp 阻害剤 Cyclosporin A (CsA) を用いて Etoposide に対する apoptosis の変化を検討した。

治療法開発のため EBV 感染症研究会診断指針に基づいて診断され、十分な肝腎機能を持つ患者に対し L-asp を一日一回、6000 U/m<sup>2</sup> を隔日で 7 回投与した。主評価項目は一ヵ月後の末梢血 EBV-DNA 量の減少率、副評価項

目は有害事象発現率とした。また、EBV 感染腫瘍細胞の Asparagine synthetase(AS)の発現を RT-PCR 法で解析し、L-asp の効果との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

以上の研究は東京医科歯科大学倫理委員会で承認され(臨床試験は東京医科歯科大学医学部附属病院施設内審査委員会の承認、患者の文書による同意を患者の同意を得て施行した。 は UMIN-CTR へ登録し、施行した (UMIN 試験 ID : UMIN000003498)。

### **C . 研究結果**

EBV 陽性 T/NK 細胞株および 12 例の EBV-T/NK-LPDs 患者細胞で P-gp が強く発現し、薬剤排出機能を示すことを見出した。以上はコントロール細胞では認められなかった。さらに P-gp の阻害因子 CsA によりこれらの細胞で Etoposide による apoptosis 誘導は亢進することが示された。以上から P-gp は EBV-T/NK-LPDs の化学療法耐性に寄与することが示された。

対象患者は女性 5 名。年齢は 20 ~ 62 歳の成人。感染細胞は CD8 陽性 T 細胞 1 例、CD4 陽性細胞 2 例、CD56 陽性細胞 2 例であった。治療開始後一ヵ月後の末梢血中 EBV 量は、1 例で治療前の 0.08 倍へ減少を見たが、1 例で 22 倍に増加、2 例は不変であった。1 例は投与中鼻粘膜病変が増悪したため途中で投与を中止した。有害事象として、全例でフィブリノゲン、AT の低下を認め、新鮮凍結血漿および AT 製剤の投与を必要とした。Grade3 の肝障害を 1 例に、同 2 を 2 例に認めた。Grade3 の好中球減少を 1 例に認めた。ウイルス量の低下を見た症例では、発症から治療開始までの期間は 8 か月と他の患者より短かった。EBV 感染腫瘍細胞における AS

の発現は治療効果と関連しなかった。有害事象として grade2、3 の肝障害が、が 2 例 (2/5 40%) grade3 の好中球減少が 1 例 (1/5 10%)に認められた。いずれも ALL 治療時と比較し高いと考えられた。

#### D . 考察

今まで私たちは EBV-T/NK-LPDs に対し CHOP 療法をはじめとした化学療法が抵抗性を示すことを明らかにしてきた。今回の結果から P-gp による薬剤の細胞外への排出がその原因のひとつであることがしめされた。今後は P-gp に影響を受けない薬剤の検討が望まれる。しかし、多くの化学療法剤は、P-gp により細胞外へくみ出されることが知られている。今回の結果では P-gp 阻害剤である CsA と Doxorubicin の併用の有効性も示唆されている。これらの結果をもとに今後多剤併用療法の開発を行っていく予定である。

L-asp は、EBV-T/NK-LPDs と同じく EBV 感染腫瘍で P-gp の発現が高く CHOP 抵抗性をしめす ENKL で効果を認めることは周知であり、さらに P-gp の影響を受けない。よって効果が期待された薬剤であったが治療効果は明らかにはならなかった。その原因のひとつは EBV-T/NK-LPDs の病態の複雑さにあると考える。今回の検討では、L-asp の効果に影響を与えるとの報告もある AS の発現が患者ごとに大きく異なった。AS 発現のみならず、EBV-T/NK-LPDs は感染細胞、臨床像など、非常に多様性がある。今後は多くの症例を引き続き解析することで、それらの因子の詳細な検討を重ね、因子別の治療効果の検討が必要と考える。

#### E . 結論

EBV は LMP1 を介して NF-kB を活性化し EBV 陽性 T・NK 細胞腫瘍発症の原因にな

る事が示された。また EBV-T/NK-LPDs の治療抵抗性の原因のひとつは P-gp であることも示された。

L-asp の EBV-T/NK-LPDs に対する有効性は示せなかったが、今回の検討結果を元に今後、Bortezomib、CsA などを含めた新規治療法を検討する予定である。

#### F . 研究危険情報

なし。

#### G . 研究発表

##### 原著論文

- 1) Wang L, Sato-Otsubo A, Sugita S, Takase H, Mochizuki M, Usui Y, Goto H, Koyama T, Akiyama H, Miura O, Ogawa S, Arai A. High-resolution genomic copy number profiling of primary intraocular lymphoma by single nucleotide polymorphism microarrays. *Cancer Sci.* 105:592-9, 2014
- 2) Arai A, Yamaguchi T, Komatsu H, Imadome K, Kurata M, Nagata K, Miura O. Infectious mononucleosis accompanied by clonal proliferation of EBV-infected cells and by the infection on CD8-positive cells. *Int J Hematol*, 99:671-52, 2014
- 3) Hattori T, Arai A, Yokota T, Imadome K, Tomimitu H, Miura O, Mizusawa H. Immune-mediated neuropathy with Epstein-Barr virus-positive T-cell lymphoproliferative diseases. *Internal Medicine*, 2014 in press
- 4) Nakatani K, Imai K, Shigeno M, Sato H, Tezuka M, Okawa T, Mitsui N, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Nagasawa M, Kajiwara M, Yamamoto M, Arai A, Miura O, Kamae C, Nakagawa N, Honma K, Nonoyama S, Mizutani S, Morio T. Cord blood transplantation is associated with rapid B cell neogenesis compared with bone marrow

transplantation. Bone Marrow Transplant. 2014 Sep;49(9):1155-61.

5) Yoshimori M, Imadome K, Komatsu H, Wang L, Saitoh Y, Yamaoka S, Fukuda F, Kurata M, Koyama T, Shimizu N, Fujiwara S, Miura O, Arai A.

CD137 expression is induced by Epstein-Barr virus infection through LMP1 in T or NK cells and mediates survival promoting signals. PLoS One. 2014 Nov 19;9(11):e112564

6) Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai A, Kodama, E, Morio T, Shimizu N, and Wakiguchi H. Current studies on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan. Pediatrics International, 56:159-66, 2014.

## 著作

- 1) 自己免疫性疾患に合併する悪性リンパ腫 リウマチ科 51 p415-420, 2014 科学評論社
- 2) Epstein-Barr ウイルス陽性腫瘍における制御性 T 細胞 臨床免疫・アレルギー科 62 p524-527, 2014 科学評論社
- 3) 看護病態 発熱 改訂 第 2 版 2014 年 11 月 1 日 (第一版 2011 年 11 月 1 日) 井上 智子 稲瀬直彦 編 p2-6 医学書院
- 4) 今日の臨床サポート 改訂第 2 版 血球貪食症候群 エルゼビア

## 2. 学会発表

### 学会発表

- 1) 小松穂菜実、今留謙一、王路丹、倉田盛人、小山高敏、藤原成悦、三浦修、新井文子  
EBV 陽性 T/NK 細胞リンパ増殖症の EBV 陽性 T, NK 細胞は FOXP-3 を発現し T 細胞の増殖を抑制する  
EB ウイルス感染症研究会 2014 年 3 月 20 日 東京
- 2) Arai A. Treatment for EBV-positive lymphoproliferative diseases NK 腫瘍研究会 2014 年 3 月 16 日 東京

3) 小松穂菜実、今留謙一、小山高敏、藤原成悦、三浦修、新井文子

EB ウイルスは T 細胞に感染後 LMPL1 を介して STAT3 を活性化し T 細胞リンパ腫発症に寄与しうる

第 76 回 日本血液学会 2014 年 10 月 31 日 大阪

4) 秋山弘樹、高瀬博、久保文人、三木徹、山本正英、富田誠、望月學、三浦修、新井文子  
硝子体内投与に続く全身 MTX 投与は原発性眼内リンパ腫の中樞神経への進展を予防する

第 76 回 日本血液学会 2014 年 11 月 1 日 大阪

5) Ken-Ichi Imadome, Go Matsuda, Fuyuko Kawano, Eiichi Kodama, Ayako Arai, Norio Shimizu, and Shigeyoshi Fujiwara ; Preclinical studies of novel therapies for Epstein-Barr virus-associated diseases in humanized mouse models. 39<sup>th</sup> International Herpesvirus Workshop, Kobe July

6) Ken-Ichi Imadome, Go Matsuda, Fuyuko Kawano, Eiichi Kodama, Ayako Arai, Norio Shimizu, and Shigeyoshi Fujiwara ; Applications of mouse models of EBV-associated diseases for the evaluation of novel therapies. 16<sup>th</sup> International Symposium on EBV and Associated Diseases. Brisbane, Australia – 2014

7) Makoto Arai, Ayako Arai, Shun-ichiro Izumi; Postgraduate education in Kampo (traditional Japanese) medicine: A current survey of clinical training hospitals. AMEE 2014 Milan

8) Hiroki Akiyama, Hiroshi Takase, Fumito Kubo, Tohru Miki, Masahide Yamamoto, Makoto Tomita, Manabu Mochizuki, Osamu Miura, Ayako Arai; Systemic following intravitreal MTX administration prevents CNS infiltration of Primary intraocular lymphoma. 56th ASH Annual Meeting and Exposition San Francisco

9) Komatsu H, Imadome K, Shibayama H. Yada T,

Yamada M, Yamamoto K, Koyama T, Fujiwara S, Miura O, Arai A; STAT3 is activated by EBV in T or NK cells leading to development of EBV-T/NK-lymphoproliferative disorders. 56th ASH Annual Meeting and Exposition *San Francisco*

H. 知的財産権の出願・取得状況  
なし