

第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2014 年 9 月 25 日（2014 年 9 月 25 日～27 日）（ポスター）

- 6) 藤川大、山岸誠、黒川直也、副島あい、中川翔太、石田尚臣、田中勇悦、中野和民、渡邊俊樹、「ATL 細胞における EZH2 依存のエピジェネティック異常の包括的解析」、第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京大学医科学研究所、2014 年 8 月 24 日（2014 年 8 月 22 日-8 月 24 日）（口演）
- 7) 西田亜季、長門石曉、中野和民、山岸誠、矢持忠徳、田中勇悦、津本浩平、渡邊俊樹、

「単鎖抗体(scFv)を用いた HTLV-1 感染細胞特異的 miRNA 輸送システムの構築」、第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京大学医科学研究所、2014 年 8 月 23 日（2014 年 8 月 22 日-8 月 24 日）（ポスター）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

エイズ関連リンパ腫の病理診断と病態

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 峰宗太郎、福本 瞳、佐藤由子、長谷川秀樹（国立感染症研究所感染病理部）、比島恒和（がん・感染症センター都立駒込病院）、大田泰徳（東京大学医科学研究所）

研究要旨 WHO 分類第 4 版に基づいた日本のエイズ関連リンパ腫の病理組織分類を英文誌へ発表すると共に、診断チャートの掲載を行い、正確な病理診断に寄与した。病理診断窓口を東京大学医科学研究所病院にて継続している。さらに HIV 感染者に発症した腹腔内・腸管原発の形質芽細胞リンパ腫 *Plasmablastic lymphoma* (PBL) の症例から、新たな細胞株 PBL-1 を樹立した。樹立した細胞株は IL-6 依存的増殖が認められ、CD20 (-)、CD38 (+)、CD138 (+) であり、PBL の免疫学的表現型を保っていた。EBV が持続感染しており、潜伏感染様式は *latency I* であった。これまで、PBL の細胞株樹立の報告はなく、PBL-1 は世界で初めての PBL の細胞株である。PBL-1 を詳細に解析することで、PBL における発癌機構とウイルスの動態を解明するだけでなく、新しい治療法の開発に繋がる知見が得られることが期待される。

A. 研究目的

昨年までの本研究班の調査で、日本のエイズ関連リンパ腫の組織学的分類が明らかになってきた。WHO分類第4版に基づく分類では、最も頻度の高いエイズ関連リンパ腫の組織型は、びまん性大細胞性B細胞リンパ腫 (*diffuse large B cell lymphoma*, DLBCL) であり、バーキットリンパ腫 (*Burkitt lymphoma*, BL)、*plasmablastic lymphoma* (PBL)、*primary effusion lymphoma* (PEL)、ホジキンリンパ腫 (*Hodgkin lymphoma*, HL)の順に頻度が高い。年代別に見ると近年はBLの増加が著しく、さらにはPBLの増加も目立つ。ART導入の有無ではART導入患者にHLの頻度が有意に高いことも明らかになった。

エイズ関連リンパ腫では、それぞれの病型としては病理組織学的に非典型例が多いため、その病理診断に苦慮する例も見られる。しかし、昨年来、当研究班で提唱する病理診断フローチャートが日本語、英語で公刊されたことで、多くの病理医の目に触れ、浸透し、その結果、当班にコンサルテーションされる例も減少している。本年度はエイズ関連リンパ腫の診断フローチャートをさらに普及させることと、病理診断のコンサルテーション窓口を開設することで、日本におけるエイズ関連リンパ腫の病理診断精度の向上を目指した。

エイズ関連リンパ腫の組織型の中にはほとんどエイズ患者にしか見られない、まれなリンパ腫も存在する。*Human herpesvirus*

8 (HHV-8/KSHV) が関連する PEL や HHV-8 関連多巣性キャスルマン病に合併する大型 B 細胞リンパ腫とともに EB ウイルス (EBV) が関連する PBL も、HIV 感染者以外ではほとんど見られない、まれなリンパ腫とされる。こうした、特殊なリンパ腫の発症機構は、現在でも多くの点が不明である。本年度、本分担研究では PBL の発症機構の解明に取り組んだ。PBL は B 細胞系のリンパ腫で、形質芽細胞 *plasmablast* が起源とされる。現在では日本のエイズ関連リンパ腫の約 10% に見られ、主に、同性間性的接触を持つ男性 HIV 感染者に発症する。口腔に発症するとされるが、食道などの上部消化管、肛門部、直腸、大腸などに発症するケースも報告されている。通常 EBV 陽性であり、EBV の潜伏感染様式は *latency I* とされる。Myc の転座はしばしば認められる。しかし、これまで、細胞株の樹立に成功した報告はなく、細胞そのものの生物学的な解析はなされていない。本年度は PBL 症例の一例から細胞株を樹立することに成功したことから、この細胞株を詳細に解析することで、PBL の発症機構の解明と新規治療法の検討を行うことを目指した。

B. 研究方法

1. 細胞培養

患者腹水を遠心し、リンパ腫細胞を RPMI1640 / 10%FBS で培養を行った。初代培養ではさまざまな増殖因子やサイトカインを添加し、定期的に生細胞数を計測した。また、細胞の限界希釈を行い、単一クローンを樹立した。

2. 表面抗原の検索

細胞の表面抗原の検索はフローサイトメトリーと蛍光免疫染色により行った。

3. EBV の解析

EBV の潜伏感染タンパク、および、遺伝子を免疫組織化学、及び、*in situ hybridization* で検索した。

(倫理面に対する配慮)

ヒト検体を用いた研究は国立感染症研究所 ヒトを対象とする医学倫理委員会の承認を得た (承認番号 512)。

C. 研究結果

1. 日本におけるエイズ関連リンパ腫の病理診断

日本のエイズ関連リンパ腫症例を WHO 分類第 4 版に基づき、病理組織分類を行った結果を、調査研究の過程で作成した病理診断フローチャートと共に国際英文誌へ掲載した (Ota et al. *Cancer Med* 2014)。また、国内のエイズ関連リンパ腫のための病理診断窓口を東京大学医科学研究所病院 (研究協力者: 大田泰徳) にて継続している。今年度のコンサルテーション症例はなく、病理診断フローチャートが浸透していることが推察された。

2. PBL 細胞株の樹立と解析

(1) 患者

50 歳代の HIV 患者の腹水からリンパ腫細胞が検出された。腫瘍細胞は形質芽細胞類似の大型細胞であり、免疫組織化学的に腫瘍細胞は CD20 (-), CD3 (-), CD38 (+), CD138 (+), HHV-8-LANA-1 (-), LMP1(-), EBNA2(-) で、EBER-*ish* は陽性であった。以上の所見から、PBL と診断された。EBV は *real-time PCR* で約 1.2 *copies/cell* が検出された。

(2) 細胞株の樹立

リンパ腫細胞を含む腹水から細胞株を樹立した。得られた細胞株 PBL-1 はギムザ染色で、比較的大型で、明瞭な核小体とクロマチンの核膜周辺への集積、細胞質には明らかな核周明庭が見られた (図 1)。フローサイトメトリーによる表面マーカーの検索では PBL-1 は CD20 (-)、CD38 (+)、CD138 (+) であり、PBL の免疫学的表現型を保っていた (表 1)。EBV が持続感染しており、定量的 PCR によるコピー数の検索では EBV は細胞 1 個当たり、約 1.2 コピーのウイルス量が存在

する。ウイルス遺伝子の発現は EBV(+), LMP1(-), LMP2A (-), EBNA2 (-) であることから、PBL-1 の EBV 潜伏感染様式は latency I であった。染色体数は 70 本程度に増加しており、多くの染色体異常があることが推定された。染色体検査では c-Myc の遺伝子再構成が認められ、BCL-2, BCL-6 などの遺伝子再構成は認められなかった。

(3) 細胞株の増殖とサイトカイン

患者腹水、及び、培養上清中のサイトカイン量を測定したところ、IL-6 が高値を示したほか、IL-8, MIP-1a, IP-10 などが高値であった。PBL-1 は IL-6 依存的増殖が認められ、conditioned medium の状態で培養上清中に高濃度の IL-6 を保つか、培養上清中に IL-6 を添加することが増殖には必要であった。培養上清への IL-6 の添加を中止すると細胞の生存率は急激に低下した。他のサイトカイン (IL-8, MIP-1a, IP-10 など) の添加は細胞の生存率に影響を与えず、z-VAD-FMK などのアポトーシス阻害剤も生存率に影響しなかった。

D. 考察

PBL は EBV 関連腫瘍でありながら、その発症と EBV との関連、特異な発症部位、染色体転座との関連などについて、多くの点が不明である。PBL は B 細胞性リンパ腫でありながら、CD20 陰性であり、CD138, CD38 以外のマーカーはほとんど陽性にならない。PBL の起源とされる plasmablast が CD20 陰性、CD38 陽性、CD138 陽性の表現型であり、こうした特殊な表現型と細胞の形態的特徴から plasmablast が起源とされている (図 2)。しかし、このような特殊な表面抗原の発現パターンが、これまでの PBL の診断を困難にしており、過去の症例では DLBCL に分類されているものも少なくない。PBL が明確に定義付けされたのは WHO 第 4 版からであるが、過去の症例

をたどると明らかに PBL に該当する症例が存在することから、昔からエイズ関連リンパ腫の一部を占めていたリンパ腫亜型と考えられる。免疫グロブリンの産生が行われていることが想像されるが、ある特定のイムノグロブリンが産生されるかどうか、特定の抗原を認識するものであるかなどの情報はない。われわれの樹立した PBL-1 はクローンとして Ig 遺伝子のクローニングが可能である。さらに、細胞株の樹立は治療法の選択にも有用であり、さまざまな治療薬の試験管内実験に活用することができる。PBL 以外の EBV latency I のリンパ腫には BL があるが、BL とは c-Myc の転座を伴う点など、共通点も多い。さらにはウイルスの存在形態についても episomal な状態で存在するか、integration しているかも、今後の調査で明らかにすべき点である。

これまで、PBL の細胞株樹立の報告はなく、今回、樹立した細胞株 PBL-1 を用いて PBL における発癌とウイルスの動態の詳細な解析を進める予定である。

E. 結論

WHO 分類第 4 版に基づいた日本のエイズ関連リンパ腫の病理組織分類を英文誌へ発表した。病理診断窓口を東京大学医科学研究所病院にて継続した。さらに世界で初めての PBL の細胞株 PBL-1 を樹立し、現在解析中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Katano H, Hishima T, Mochizuki M, Kodama Y, Oyaizu N, Ota Y, Mine S, Igari T, Ajisawa A, Teruya K, Tanuma J, Kikuchi Y, Uehira T, Shirasaka T, Koibuchi T, Iwamoto A, Oka S, Hasegawa H, Okada S, Yasuoka A: The prevalence of opportunistic infections and malignancies in autopsied patients with human immunodeficiency virus

infection in Japan. **BMC Infect Dis** 2014. 14:229.

- (2) Yamada M, Katano H, Yotsumoto M, Hashimoto H, Muramatsu T, Shiotsuka M, Fukutake K, Kuroda M: Unique expression pattern of viral proteins in human herpesvirus 8-positive plasmablastic lymphoma: a case report. **Int J Clin Exp Pathol** 2014. 7:6415-6418.
- (3) Goto H, Kudo E, Kariya R, Taura M, Katano H, Okada S: Targeting VEGF and interleukin-6 for controlling malignant effusion of primary effusion lymphoma. **J Cancer Res Clin Oncol** 2015. 141:465-474.

2. 学会発表

- (1) 片野晴隆、比島恒和、望月 眞、児玉良典、小柳津直樹、大田泰徳、峰宗太郎、猪狩 亨、味澤 篤、照屋勝治、田沼順子、菊池 嘉、岡 慎一、上平朝子、白阪琢磨、鯉渕智彦、岩本愛吉、長谷川秀樹、岡田誠治、安岡 彰. HIV 感染者の剖検例における日和見感染症と腫瘍の頻度. 第 28 回 日本エイズ学会学術集会総会 大阪 2014.12.3.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

	CD20	CD38	CD138
初発 PBL	-	+	+
株化細胞 PBL1	-	+	+
LCL (Control)	+	+	-

表 1. 初発腫瘍細胞と株化細胞の細胞表面マーカーの比較。PBL-1 の表現型は初発 PBL と同様であり、LCL の表現型とは明らかに異なる。

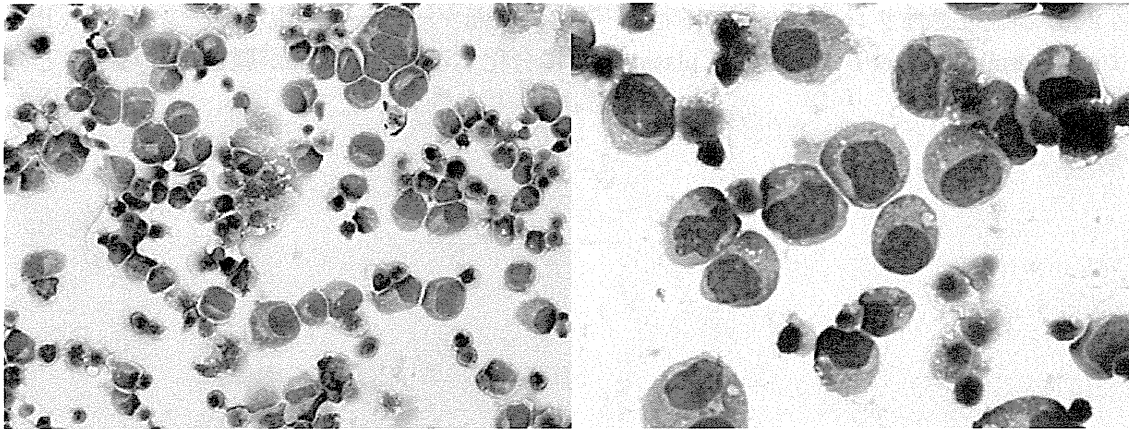


図 1. PBL-1 のギムザ染色。弱拵（左）と強拵（右）。偏在した核には明瞭な核小体がみられ、細胞質には核周明庭がみられる。

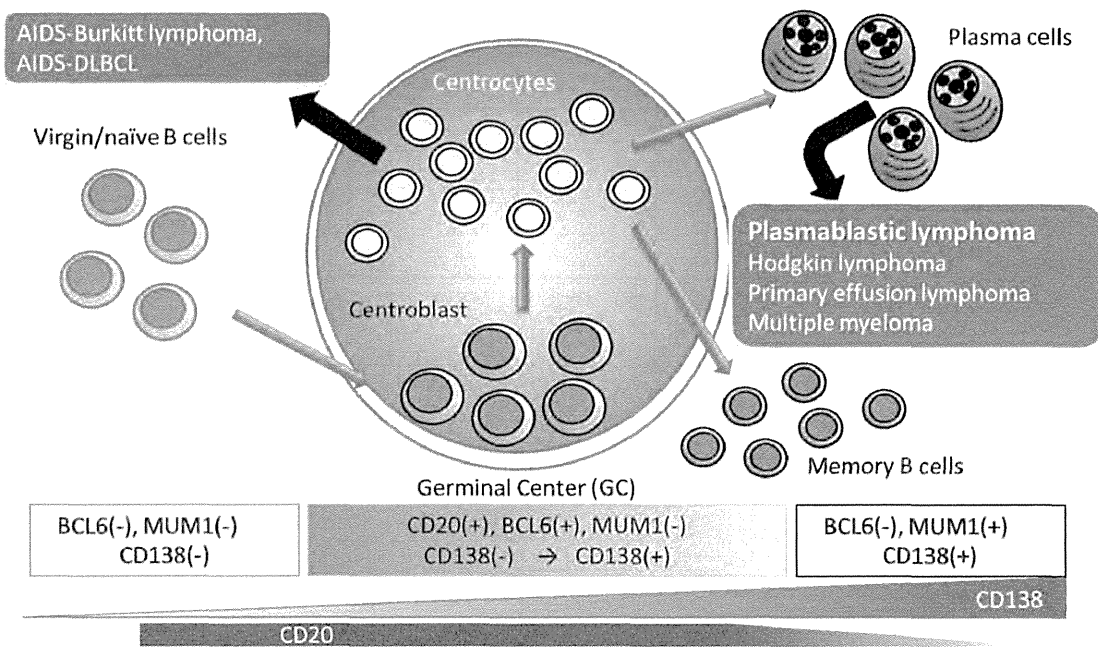


図2. B細胞性悪性リンパ腫の由来細胞。下部には表面マーカーの発現パターンを示す。PBLは post-germinal center B cell のうち plasma cell に分化する細胞の一部が腫瘍化したものと考えられる。

EBV 陽性リンパ腫モデルを用いた細胞免疫治療の研究

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：ヒト化マウスによる EB ウイルス（EBV）陽性リンパ腫モデルを用いて、*ex vivo* で活性化・増幅した T 細胞を輸注する細胞免疫治療の効果を検証した。23 頭のモデルマウスのうち 11 頭には T 細胞輸注、12 頭には対照として PBS を輸注したところ、T 細胞輸注群では生存期間が有意に延長された（ $P=0.036$, Logrank テスト）。これにより、活性化 T 細胞輸注の EBV 陽性リンパ腫モデルマウスに対する治療効果が実証されたと考えられる。

A. 研究目的

エイズリンパ腫は主に抗がん剤により治療されているが、一部のリンパ腫は薬剤耐性を示し治療に難渋することも少なくない。エイズリンパ腫の約 50% は EB ウイルス（EBV）陽性であり抗原となるウイルス蛋白質を発現している。従って、細胞免疫療法は選択肢の一つとして考えられる。私たちは免疫不全マウスにヒト免疫系細胞を再構築したヒト化マウスに EBV を感染させるモデル感染系を確立し、びまん性大型 B 細胞リンパ腫（DLBCL）タイプの EBV 陽性エイズリンパ腫を再現することに成功している。今年度は、このモデルを用いて、*ex vivo* で活性化・増幅した T リンパ球を輸注する治療法の効果を検証した。

B. 研究方法

1. EBV 陽性リンパ腫モデルの作成

NOD/Shi-*scid*/IL2R γ ^{null} マウス（以下 NOG マウス）は、6～8 週齢の雌マウスを実験動物中央研究所より購入し、SPF 環境で飼育した。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）あるいは Stemsep キット（ステムセルテクノロジー社）を用いて CD34 陽性造血幹細胞を分離した。1×10⁴～1.2×10⁵ 個の CD34 陽性細胞を尾静脈より移植した。末梢血ヒト CD45, CD19, CD3 陽性細胞数を測定しヒト化を確認したのち、10² 50% transforming dose

(TD₅₀)の B95-8 株 EBV を静脈内接種した。

2. 臍帯血由来 T 細胞の活性化培養とマウスへの輸注

ヒト化マウス作製にもちいたのと同じ臍帯血サンプルから Lymphosepar I による比重遠心法により単核細胞を分離し、AIM-V 培養液（Life technologies）にヒト血清アルブミン、抗生物質、L-グルタミン、ヒト IL-2（Proleukin, Novartis; 700 U/ml）を添加し、抗 CD3 抗体（OKT-3, Janssen Pharmaceuticals）を固相化したフラスコで 10-14 日間培養した。細胞は一旦凍結保存したのち 2×10⁷ cells/kg の用量で輸注された。マウスの生存期間および末梢血中 EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞数を対照マウスと比較して、T 細胞輸注の効果を検証した。EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞数は、EBV 蛋白質 LMP2, BFLF1, BMLF1, EBNA3A, EBNA3B に由来するエピトープを提示する MHC クラス I テトラマーを用いた。

（倫理面への配慮）

本研究は直接ヒトを対象とする医療行為を含まないが、ヒト臍帯血細胞を利用するため、ヘルシンキ宣言に則った倫理的配慮を必要とする。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により移植に用いられ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。一部の臍帯血は日本大学医学部付属病院で出生した新生児から、母親の同意を得て提供された。これらの臍帯血は連結不可能匿名化され、個人情報の保護を徹底した。動物実験については、動物実験指針を遵守し、動物愛護の観点から十分な配慮をした。本研究は国立成育医療研究センター、東京臍帯血バンク、および日本大学医学部倫理委員会の承認を得て行った。また、国立成育医療研究センター動物実験委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1. 臍帯血由来活性化 T 細胞の性状

10-14 日間の活性化培養を行った後の臍帯血由来 T 細胞の典型的な性状を図 1 に示す。ほぼ全て (98%) の細胞が CD3 陽性の T 細胞であり、そのうち 88.8% が CD4⁺、11.8% が CD8⁺であった。CD4⁺HLA-DR⁺は 26.8%、CD8⁺HLA-DR⁺は 8.4%であった。CD16⁺CD56⁺ の NK 細胞は 0.1%以下であった。

2. 臍帯血由来活性化 T 細胞輸注による生存期間の延長

EBV 感染後 8 週間或いは末梢血に EBV DNA が検出された時点で T 細胞輸注を開始した。輸注は 2 週間のインターバルを置いて 3 回行った。計 23 頭の EBV 感染マウスのうち 11 頭に活性化 T 細胞、12 頭に対照として PBS (phosphate-buffered saline) を輸注した。生存曲線 (図 2) を比較したところ、活性化 T 細胞輸注群は有意に生存期間が長かった (P=0.036、Logrank テスト)。

3. 臍帯血由来活性化 T 細胞輸注による EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞の変化

活性化 T 細胞輸注群と PBS 輸注群の脾臓および肝臓における EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞数をテトラマーにより測定したところ、T 細胞輸注群に高い個体が認められたが、有意差には達していなかった。

D. 考察

エイズリンパ腫の約半数は EBV 陽性であり、ヒト化マウスによる EBV 陽性リンパ腫モデルは、このような EBV 陽性エイズリンパ腫の病態解明や治療法開発に有用と考えられる。本研

究で検証した活性化 T 細胞輸注療法は、はじめ悪性腫瘍に対する治療法として開発されたが、その後難治性感染症に対する効果も実証されている。抗がん剤抵抗性のエイズリンパ腫にはこのような免疫細胞治療も選択肢の 1 つと考えられる。

MHC クラス I テトラマーによる測定では、T 細胞輸注群でやや EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞が多かったものの有意差には達していなかった。従って現時点で活性化 T 細胞輸注の作用機序は不明である。しかし、今回用いたテトラマーが提示する EBV エピトープの種類は限られており、より多くのエピトープを提示するテトラマーを用いてさらに解析する必要があると考えられる。初感染直後のヒトではウイルス複製サイクルの蛋白質を認識する T 細胞が大部分を占めることが知られているため、今後このような複製サイクル蛋白質のエピトープを提示するテトラマーを多数用いて計測すれば、活性化 T 細胞輸注による効果が認められる可能性があると考えられる。また、今回の実験では臍帯血から活性化増幅した T 細胞を用いているが、臍帯血はナイーブリンパ球が大部分を占めるため、EBV 特異的な成分をほとんど含まないと考えられる。輸注した T 細胞の大部分は CD4 陽性細胞であることから、マウス体内でプライムされた EBV 特異的細胞の機能を促進した可能性がある。

E. 結論

移植後 EBV 陽性 B 細胞リンパ腫のモデルマウスを用いて臍帯血由来活性化 T 細胞輸注の効果を検証した。輸注を受けたマウスは対照と比較して有意に生存期間が延長し、その効果が自称された。輸注群マウスでは EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞が増加している傾向が認められたが有意差には達していなかった。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fujiwara S, Imadome K, and Takei M. Modeling EBV infection and pathogenesis in new-

- generation humanized mice. *Exp Mol Med* (2015) 47, e136; doi:10.1038/emm.2014.102
Published online 23 January 2015.
- 2) Matsuda G, Imadome K-I, Kawano F, Mochizuki M, Ochiai N, Morio T, Shimizu N, and Fujiwara S. Cellular immunotherapy with ex vivo expanded cord blood T cells in a humanized mouse model of EBV-associated lymphoproliferative disease. *Immunotherapy*, in press.
 - 3) Yoshimori M, Imadome KI, Komatsu H, Wang L, Saitoh Y, Yamaoka S, Fukuda T, 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.
 - 4) Siddiquey MN, Nakagawa H, Iwata S, Kanazawa T, Suzuki M, Imadome KI, Fujiwara S, Goshima F, Murata T, Kimura H. Anti-tumor effects of suberoylanilide hydroxamic acid on Epstein-Barr virus-associated T- and natural killer- cell lymphoma. *Cancer Sci.* 2014; 105(6):713-22.
2. 学会発表
(国際学会)
- 1) Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S. Applications of mouse models of EBV-associated diseases for the evaluation of novel therapies. 16th International Symposium on EBV and Associated Diseases. Brisbane, 16-19 July, 2014.
 - 2) Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S. Preclinical studies of novel therapies for Epstein-Barr virus-associated diseases in humanized mouse models. 39th Annual International Herpesvirus Workshop. Kobe, 20-23 July, 2014.
 - 3) Liao H, Lee J-H, Kondo R, Katata M, Imadome K, Miyado K, Inoue N, Fujiwara S, Nakamura H. The highly conserved human cytomegalovirus UL136 ORF generates multiple Golgi-likalizing protein isoforms through differential translation initiation. 39th Annual International Herpesvirus Workshop. Kobe, 20-23 July, 2014.
 - 4) Siddiquey M, Nakagawa H, Iwata S, Kanazawa T, Suzuki M, Imadome K, Fujiwara S, Goshima F, Murata T, Kimura H. Anti-tumor effects of suberoylanilide hydroxamic acid on Epstein-Barr virus-associated T- and natural killer-cell lymphoma. 39th Annual International Herpesvirus Workshop. Kobe, 20-23 July, 2014.
 - 5) Nagasawa Y, Natsumi I, Nozaki T, Inomata H, Imadome K-I, Iwata M, Kitamura N, Fujiwara S, Takei M. Human Osteoclasts are Mobilized in Erosive Arthritis of Epstein-Barr Virus-infected Humanized NOD/Shi-scid/IL-2R γ null Mice. American College of Rheumatology Annual meeting, Boston, November 14-19, 2014.
 - 6) Komatsu H, Imadome K-I, Shibayama H, Yada T, Yamada M, Yamamoto K, Koyama T, Fujiwara S, Miura O, Arai A. STAT3 is activated by EBV in EBV-T/NK-LPDs leading to development of the disorders. December 6, 2014, American Society of Hematology Annual Meeting, San Francisco, CA, USA.
- H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
該当なし。

図 表

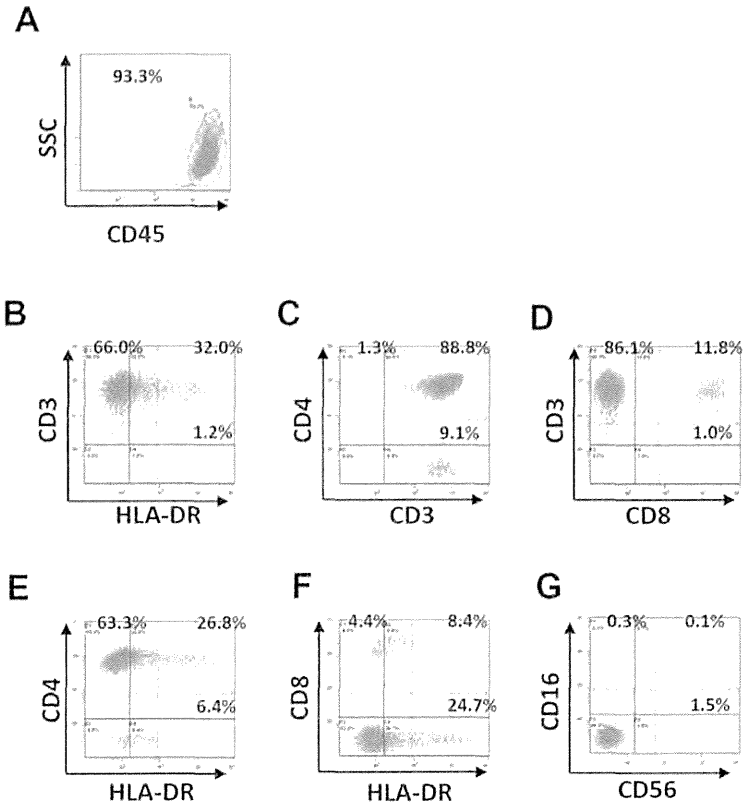


図 1. 臍帯血より増幅した T 細胞の典型的フローサイトメトリーパターン. 98%の細胞が CD3 陽性で、そのうち 88.8%が CD4⁺、11.8%が CD8⁺だった。CD4⁺HLA-DR⁺は 26.8%、CD8⁺HLA-DR⁺は 8.4%。CD16⁺CD56⁺ の NK 細胞は 0.1%以下であった。

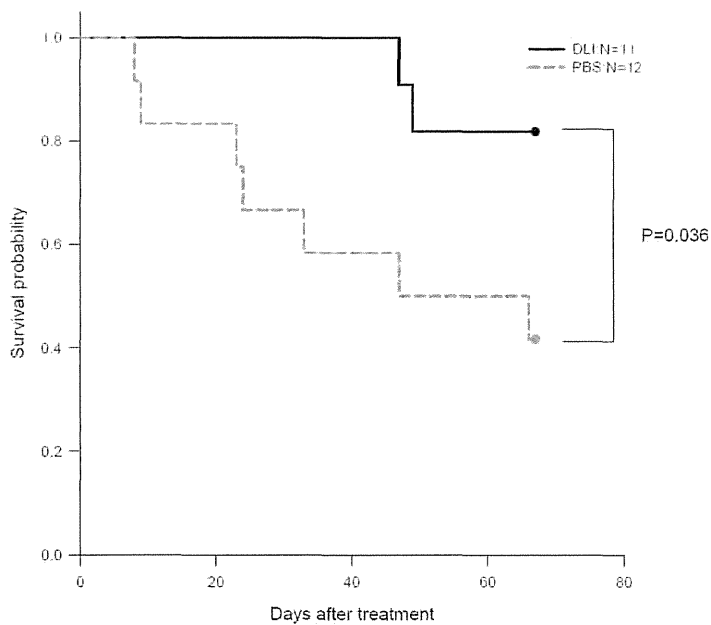


図 2. 活性化 T 細胞輸注による延命効果. Logrank 法による P 値を示す。T 細胞輸注群を実線、対照の PBS 輸注群を破線で示す。

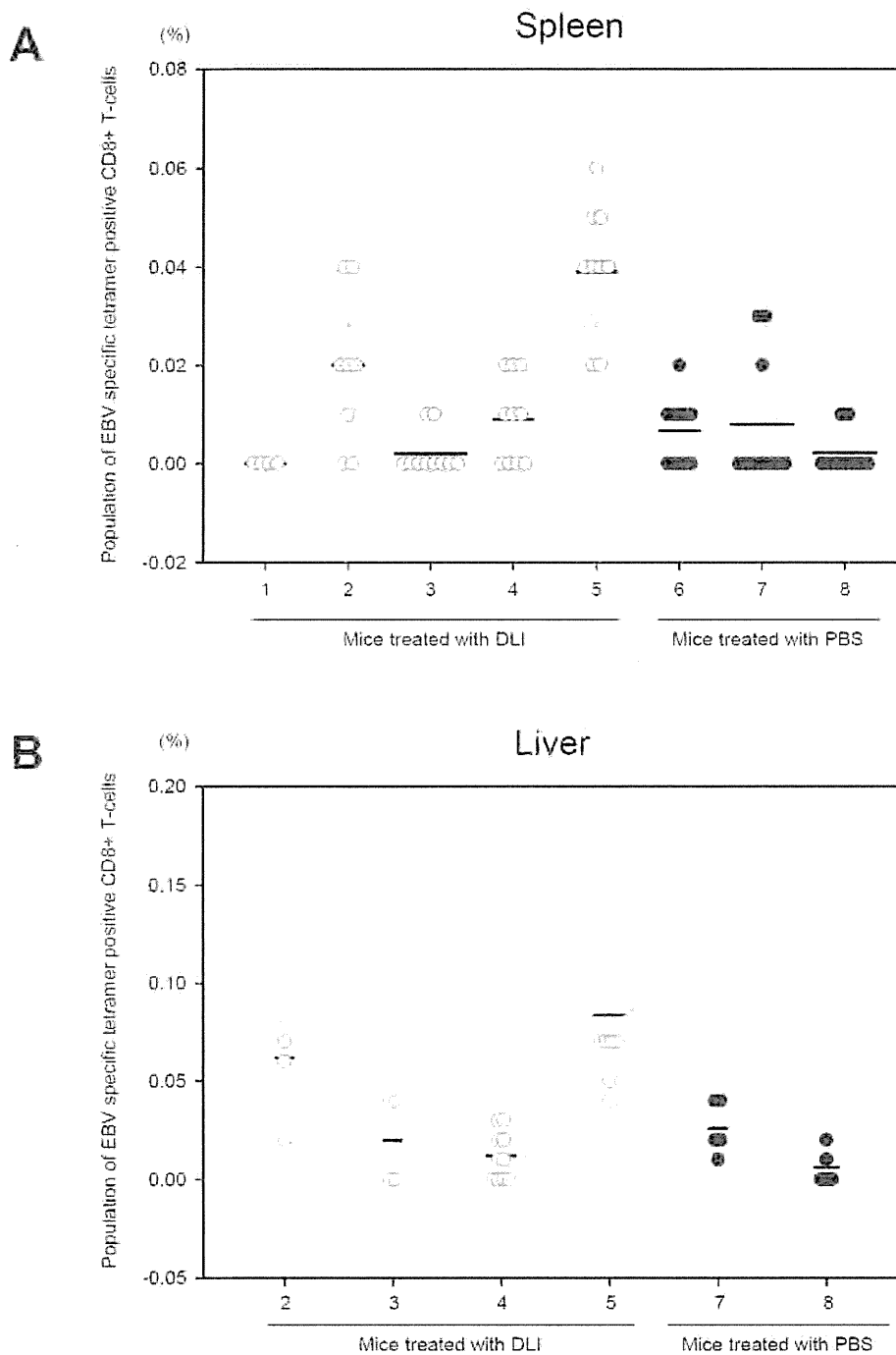


図 3. T 細胞輸注と EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞. 活性化 T 細胞輸注を受けたマウス (○) と対照マウス (●) の脾臓と肝臓における Tetramer⁺CD8⁺細胞の%を示す。

高度免疫不全マウスを用いた抗エイズ関連悪性リンパ腫療法の 評価系の樹立と抗体療法の評価

研究分担者者 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の樹立を試みている。高度免疫不全マウス(NOD/Rag-2/Jak3 欠損マウスまたは 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。これらマウスを用いて抗 VEGF 抗体・抗 IL-6R 抗体及び抗 CD47 抗体に抗リンパ腫作用があることを証明した。

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、エイズ関連悪性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、HIV-1 感染者にかなり特異的に発症し予後不良のエイズリンパ腫である Primary effusion lymphoma (PEL)のマウスモデルを用いて、抗 VEGF 抗体・抗 IL-6R 抗体及び抗 CD47 抗体の抗腫瘍効果について検討を行った。

B. 研究方法

様々なヒト Primary effusion lymphoma (PEL)細胞株(BCBL-1, TY-1, BC-1, BC-3)に抗 CD47 抗体、抗 VEGF 抗体、抗 IL-6R 抗体などを添加し、MTT 法によりその効果を調べた。マクロファージによる PEL 細胞貪食作用は共培養系を用い、PEL によるサイトカイン産生は、ELISA 法及び RT-PCR 法により解析した。Western blot 法、ChIP 法などによりその機能解析を行った。

高度免疫不全マウス NOD/Rag-2/Jak3 欠損マウス (NRJ マウス) は、NOD マウスに Rag-2

欠損マウス (熊本大学生命資源研究・支援センターから供与) または 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、更に NOD Rag-2 マウスと NOD Jak3 欠損マウスを交配して作成した。

NOJ マウスまたは NRJ マウス腹腔に患者由来の PEL 細胞もしくは PEL 細胞株 BCBL-1 を移植して PEL モデルマウスを作成し、更に抗 VEGF 抗体・抗 IL-6R 抗体及び抗 CD47 抗体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。

ヒト腫瘍細胞を用いた研究は、熊本大学大学院生命科学研究部等疫学・一般倫理委員会及びヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承認のもと、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して行われた。

C. 研究結果

1) 抗 CD47 抗体の抗 PEL 効果の検討

ヒトマクロファージと PEL 細胞株 BCBL-1 を抗 CD47 抗体の非存在下、存在下で培養したところ、抗 CD47 抗体存在下ではマクロファージによる貪食の増加が認められた。

患者由来 PEL 細胞を NRJ マウス腹腔内に移植し、無治療群、抗 CD47 抗体投与群において観察したところ、無治療群では、マウスへの腫瘍細胞の生着と腹水の貯留を認めた。一方、抗 CD47 抗体投与群では、腹水量の減少、遠隔臓器への浸潤抑制を認めた (Eur J Cancer, 2014 図 1)。

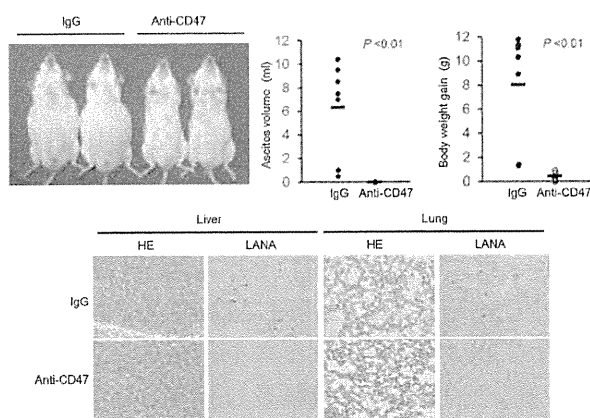


図 1. 抗 CD47 抗体の抗腫瘍効果. PEL マウスモデルにおいて、抗 CD47 抗体投与により腹水生成は阻害された。肝臓及び肺への転移も抑制された。

1) 抗 VEGF 抗体と抗 IL-6 受容体抗体の抗 PEL 効果の検討

PEL 細胞株は IL-6 受容体を発現し、VEGF と IL-6 を分泌していることが判明した。培養系においては抗 VEGF 抗体(Bebacizumab)と抗 IL-6 受容体抗体(Tocilizumab)は PEL 増殖には影響を及ぼさなかった。ところが、PEL 細胞株 BCBL-1 を NRJ マウス腹腔内に移植し、無治療群、抗 VEGF 抗体または抗 IL-6 受容体抗

体投与群において観察したところ、無治療群では、マウスへの腫瘍細胞の生着と腹水の貯留を認めた。一方、抗 VEGF 抗体及び抗 IL-6 受容体抗体投与群では、腹水量の減少、遠隔臓器への浸潤抑制を認めた。

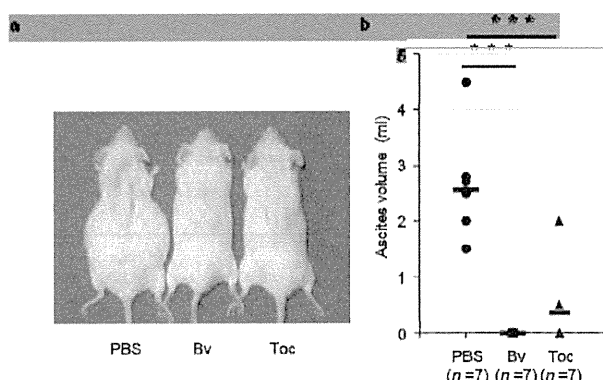


図 2. 抗 VEGF 抗体及び抗 IL-6R 抗体の抗腫瘍効果. PEL マウスモデルにおいて、抗 VEGF 抗体及び抗 IL-6R 抗体投与により腹水生成は阻害された。

D. 考察

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。Primary effusion lymphoma(PEL)は、HHV-8 感染により B 細胞が悪性化したものであり、従来の化学療法に不応なため、様々な分子標的療法が試みられている。抗体療法は、副作用の比較的少ない分子標的療法として期待されている。

CD47-SIRP α シグナルは、マクロファージの貪食作用抑制に重要である。多くの腫瘍細胞は CD47 を高発現しているため、マクロファージによる貪食から免れており、"Don't eat me" シグナルと呼ばれている。最近、抗 CD47 抗体により、この"Don't eat me" シグナルをブロックすることにより、マクロファージが抗

腫瘍作用を発揮することが判明し、臨床応用が期待されている。本研究において、PELにおける抗 CD47 抗体の有用性が証明された。また、本研究で用いた PEL マウスモデルは、抗体療法の有用性の検証に有用なモデル系である。

PEL においては、VEGF を産生することで宿主の血管透過性が増して滲出液が生じる。抗 VEGF 抗体或いは抗 IL-6R 抗体投与により、滲出液はほぼ完全に抑制されることが示された。腫瘍性滲出液の抑制は、PEL 患者の病態改善に有用であると考えられる。しかしながら、腫瘍そのものの抑制作用は低いいため、他の抗腫瘍薬との併用療法が必要なことが示唆された。

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、抗 CD47 抗体、抗 VEGF 抗体と抗 IL-6 受容体抗体による抗体療法の有用性を示した。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。

F. 健康危機情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Terahara K, Ishige M, Ikeno S, Okada S, Kobayashi-Ishihara M, Ato M, and Tsunetsugu-Yokota Y. Humanized mice dually challenged with R5 and X4 HIV-1 show preferential R5 viremia and restricted X4 infection of CCR5⁺CD4⁺ T cells. *Microbes Infect* in press
2. Matsuda K, Hattori S, Kariya R, Komizu Y, Kudo R, Goto H, Taura M, Ueoka R, Kimura S, and *Okada S. Inhibition of HIV-1 entry by the tricyclic coumarin GUT-70 through the modification of membrane fluidity. *Biochem Biophys Res Comm* 475:288-294, 2015
3. Taura M, Kudo E, Kariya R, Goto H, Matsuda K, Hattori S, Vaeteewoottacharn K, McDonald F,

Suico MA, Shuto T, Kai H, and *Okada S. COMMD1/Murr1 reinforces HIV-1 latent infection through I κ B- α stabilization. *J Virol* 89(5):2643-2658, 2015

4. Goto H, Kudo E, Taura M, Kariya R, Katano H, and *Okada S. Targeting VEGF and interleukin-6 for controlling malignant effusion of primary effusion lymphoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 141(3):465-474, 2015
5. Sueoka-Aragane N, Sato A, Kobayashi N, Ide M, Yokoo M, Nagano Y, Sueoka E, Okada S, and Kimura S. Correlation between plasma DNA and tumor status in an animal model. *PLoS One* 9(12):e111881, 2014
6. Gotoh K, Kariya R, Alam MM, Matsuda K, Hattori S, Maeda Y, Motoyama K, Kojima A, Arima H and *Okada S. The antitumor effects of methy- β -cyclodextrin against primary effusion lymphoma via the depletion of cholesterol from lipid rafts. *Biochem Biophys Res Comm* 455(3-4):285-289, 2014
7. Gotoh K, Kariya R, Matsuda K, Hattori S, Vaeteewoottacharn K, and *Okada S. A novel EGFP-expressing Nude mice with complete loss of lymphocytes and NK cells to study tumor-host interactions. *BioSci Trends* 8(4):202-205, 2014
8. Seubwai W, Wongkham C, Puapairoj A, Khuntikeo N, Pugkhem A, Hahnvajjanawong C, Chaiyagool J, Umezawa K, *Okada S, and *Wongkham S. Aberrant expression of NF- κ B in liver fluke associated cholangiocarcinoma: implications for targeted therapy. *PLOS One* 9(8):e106056, 2014
9. Janeklang S, Nakaew A, Vaeteewoottacharn K, Seubwai W, Boonsiri P, Kismale G, Suksamrarn A, Okada S, and *Wongkham S. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of tiliacorinine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, in human cholangiocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 15(17):7473-7478, 2014
10. Michai M, Leeratanapetch N, Lulitanond V, Srikoon P, Hattori S, Vaeteewoottacharn K, Wongkham S, and *Okada S. Phenotypic

- characteristics and function of NK cell subsets in cART-treated HIV-1-infected individuals. *World JAIDS* 4(3):293-240, 2014
11. Kariya R, Matsuda K, Gotoh K, Vaeteewoottacharn K, Hattori S, and *Okada S. Establishment of Nude mice with complete loss of lymphocytes and NK cells and Application for in vivo bio-imaging. *In vivo* 28(5):779-784, 2014
 12. *Katano H, Hishima T, Mochizuki M, Kodama Y, Oyaizu N, Ota Y, Mine S, Igari T, Ajisawa A, Teruya K, Tanuma J, Kikuchi Y, Uehira T, Shirasaka T, Koibuchi T, Iwamoto A, Oka S, Hasegawa H, Okada S, and Yasuoka A. The prevalence of opportunistic infections and malignancies in autopsied patients with human immunodeficiency virus infection in Japan. *BMC infect Dis* 14:229, 2014
 13. Onodera R, Motoyama K, Tanaka N, Ohyama A, Okamatsu A, Higashi T, Kariya R, Okada S, and *Arima H. Involvement of Autophagy in Antitumor Activity of Folate-appended Methyl- β -cyclodextrin. *Sci Rep* 4:4417, 2014
 14. Matsuda K, Hattori S, Komizu Y, Kariya R, Ueoka R, and *Okada S. Cepharanthine inhibited HIV-1 cell-cell transmission and cell-free infection via modification of cell membrane fluidity. *Bioorg Med Chem Lett* 24(9):2115-2117, 2014
 15. Nagai K, Nakahata S, Shimosaka S, Tamura T, Kondo Y, Baba T, Taki T, Taniwaki M, Kurosawa G, Sudo Y, Okada S, Sakoda S, and *Morishita K. Development of a complete human anti-human transferrin receptor C antibody as a marker for oral dysplasia and oral cancer. *Cancer Med* 3(4):1085-1099, 2014
 16. Goto H, Kojima Y, Matsuda K, Kariya R, Taura M, Kuwahara K, Nagai H, Katano H, and *Okada S. Efficacy of anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis with macrophages against primary effusion lymphoma. *Eur J Cancer* 50(10):1836-1846, 2014
 17. Endo M, Yamamoto Y, Nakano M, Matsuda T, Odagiri H, Horiguchi H, Miyata K, Kadomatsu T, Motokawa I, Okada S, Iwase H, *Oike Y. Serum ANGPTL2 Levels Reflect Clinical Features of Breast Cancer Patients: Implications for The Pathogenesis of Breast Cancer Metastasis. *Int J Biol Markers* 29(3):e239-245, 2014
 18. Kojima Y, Hagiwara S, Uehira T, Ajisawa A, Kitanaka A, Tanuma J, Okada S, *Nagai H. Clinical Outcomes of AIDS-related Burkitt Lymphoma: A Multi-Institution in Japan. *Jpn J Clin Oncol* 44(4):318-323. 2014
(総説等)
 1. Okada S, Goto H, and Yotsumoto M. Current status of treatment for primary effusion lymphoma. *Intractable Rare Dis Res* 3(3):65-74, 2014
 2. 岡田誠治. HIV 感染症・AIDS における悪性腫瘍. 最新医学別冊 新しい診断と治療の ABC 65 HIV 感染症と AIDS. 改訂第 2 版 満屋裕明編 最新医学社、大阪、pp82-90, 2014 年
- 2.学会発表
(国際学会)
1. Hiroki Goto, Ryusho Kariya, Kouki Matsuda, Eriko Kudo, Seiji Okada. Targeting CD47-SIRPA for the controlling malignanteffusion in primary effusion lymphoma. International Society for Hematology and Stem Cells 42nd Annual Scientific Meeting, The Imperial Riding School Renaissance Hotel, Vienna, Austria, 22-25 August 2013.
 2. Hiroki Goto, Eriko Kudo, Kouki Matsuda, Ryusho Kariya, Manabu Taura, Seiji Okada. Evaluation of Targeting CD47-SIRPa using primary effusion lymphoma xenograft mouse model. 2013 ASH Annual Meeting and Exposition Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, U.S., December 7-10 2013
 3. Manabu Taura, Eriko Kudo, Hiroki Goto, Seiji Okada. The role of HIV-1 restriction

factor Murr1 in HIV-1 latently infected cells. 2013 ASCB Annual Meeting Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, U.S., December 14-18 2013

4. Kulthida Vaeteewoottacharn, Ryusho Kariya, Sawako Fujikawa, Sopit Wongkham, Seiji Okada. Inhibition of CD47 signaling alleviates tumor growth and metastasis of cholangiocarcinoma. The 4th International Symposium on Carcinogenic Viral Infection, Immunity, and Cancer. Keio Plaza Hotel Sapporo, Sapporo, February 10-11 2014
5. Kouki Matsuda, Shinihiro Hattori, Ryusho Kariya, Eriko Kudo, Hiroki Goto, Manabu Taura, Seiji Okada. Inhibition of HIV-1 entry by a tricyclic coumarin GUT-70. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. HIV Pathogenesis Virus vs. Host (X4), Fairmont Banff Springs, Banff, Alberta, Canada March 9-14 2014

(国内学会)

1. 松田幸樹、服部真一朗、刈谷龍昇、岡田誠治 フローサイトメトリーを用いたウイルス侵入阻害薬スクリーニング法の樹立 第 24 回日本サイトメトリー学会、関西医科大学、大阪、2014 年 6 月 28-29 日
2. Ryusho Kariya, Kouki Matsuda, Takashi Nakamura, Yuji Komizu, Motoshi Suzuki, Ryuichi Ueoka, and Seiji Okada. HAMLET and BAMLET induce cell death of Primary Effusion Lymphoma. 第 76 回日本血液学会学術集会 大阪国際会議場 大阪 2014 年 10 月 31 日～11 月 2 日
3. Yusuke Koizumi, yasunori Ota, Yoshihiko Ogawa, Keishiro Yajama, Tomoko Uehira, Mihoko Yotsumoto, Junko Tanuma, Shotaro Hagiwara, Atsushi Ajisawa, Hirokazu Nagai, Harutaka Katano, and Seiji Okada. Clinical & pathological aspects of Plasmablastic lymphoma in AIDS –Analysis of 24 cases in Japan. 第 76 回日本血液学会学術集会 大阪国際会議場 大阪 2014 年 10 月 31 日～11 月 2 日
4. Shinya Endo, Hiromichi Yuki, Yoshihiro Komohara, Shikiko Ueno, Nao Nishimura, Niina Ueno, Hiro Tatetsu, Shiho Fujiwara, Naoko Wada, Shinya Hirata, Motohiro Takeya, Hiroyuki Hata, Seiji Okada, Hiroaki Mitsuya, and Yutaka Okuno. Deletion of Sfp1 in the lineages from post GC B cells to plasma cells induces B cell malignancies. 第 76 回日本血液学会学術集会 大阪国際会議場 大阪 2014 年 10 月 31 日～11 月 2 日
5. 小川吉彦、廣田和之、伊熊素子、矢島敬史郎、笹井大介、渡邊大、西田恭治、上平朝子、岡田誠治、白阪琢磨. HIV 陽性者における PET(positron emission tomography)検査に関する後方視的検討. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 大阪国際会議場 大阪 2014 年 12 月 3-5 日
6. 片野晴隆、比島恒和、望月眞、児玉良典、小柳津直樹、大田泰徳、峰宗太郎、猪狩亨、味澤篤、照屋勝治、田沼順子、菊池 嘉、岡 慎一、上平朝子、白阪琢磨、鯉渕智彦、岩本愛吉、長谷川秀樹、岡田誠治、安岡彰. HIV 感染者の剖検例における日和見感染症と腫瘍の頻度. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 大阪国際会議場 大阪 2014 年 12 月 3-5 日
7. 矢永由里子、小島勇貴、永井宏和、岩崎奈美、加藤真樹子、味澤篤、田沼順子、萩原將太郎、上平朝子、岡田誠治. HIV 感染悪性腫瘍患者の終末期医療での心理職の関わりについて：現状と課題. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 大阪国際会議場 大阪 2014 年 12 月 3-5 日
8. 小島勇貴、岩崎奈美、矢永由里子、田沼順子、小泉祐介、上平朝子、四本美保子、味澤篤、萩原將太郎、岡田誠治、永井宏和. HIV 感染悪性腫瘍患者の終末期医療についての国内アンケート調査. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 大阪国際会議場 大阪 2014 年 12 月 3-5 日
9. 工藤恵理子、田浦学、岡田誠治 宿主制御因子 COMMD1 による IκB-α の安定化を介した HIV-1 の潜伏感染の制御 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜、

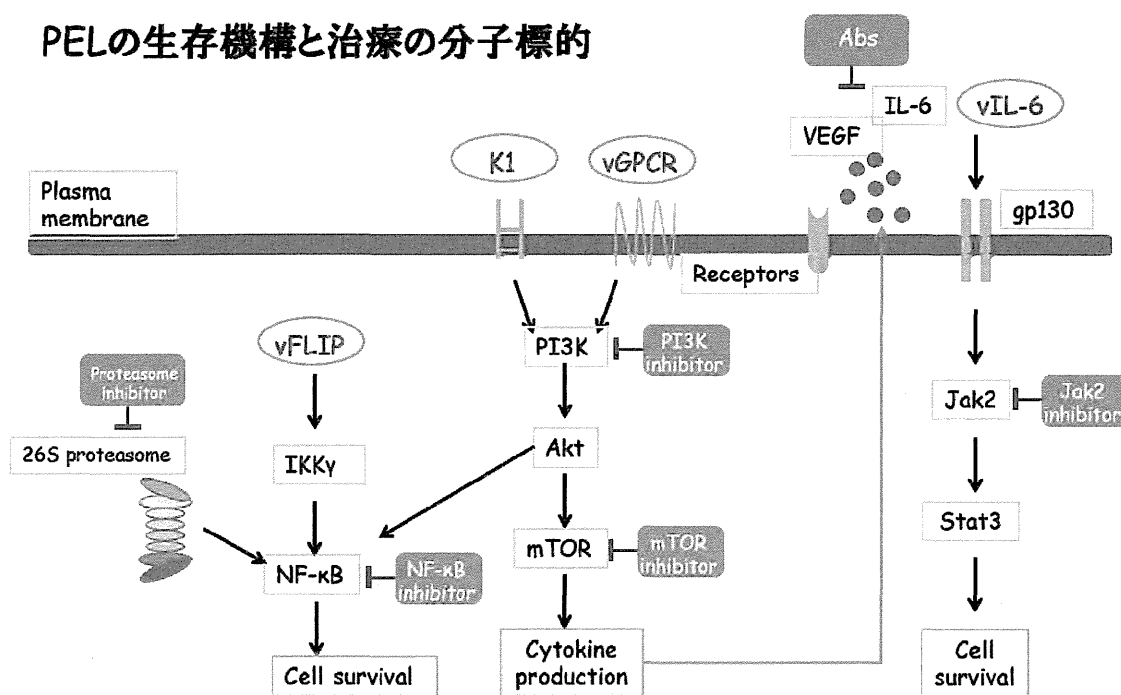
神奈川、2014年11月10-12日

10. Ryusho Kariya, Kouki Matsuda, Takashi Nakamura, Motoshi Suzuki, Kunihiro Kuwajima, and Seiji Okada. HAMLET and BAMLET induce cell death of Primary Effusion Lymphoma. The 5th International Symposium on Carcinogenic Viral Infection, Immunity, and Cancer. 26-27 Feb., 2015
11. Kumiko Gotoh, Ryusho Kariya, Kouki Matsuda, Kulthida Vaeteewoottacharn,

Shinichiro Hattori, and Seiji Okada. Establishment of EGFP expressing highly immunodeficient nude mice optimized for *in vivo* bio-imaging. The 5th International Symposium on Carcinogenic Viral Infection, Immunity, and Cancer. 26-27 Feb., 2015

- H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
- なし

PELの生存機構と治療の分子標的



Okada S et al. *Intractable Rare Dis Res*, 2014

Host factor

Therapy target

KSHV protein

Primary Effusion Lymphoma においては、HHV-8/KSVHHIV-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-κB 経路が活性化していることから、NF-κB 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
味澤篤	AIDS関連悪性リンパ腫	味澤篤編	長期療養時代のHIV感染症/AIDSマニュアル	日本医事新報社	東京	2014	215-221
永井宏和	ホジキンリンパ腫	日本リンパ網内系学会教育委員会編	レベルアップのためのリンパ腫セミナー	南江堂	東京	2014	116-122
永井宏和	バーキットリンパ腫	日本リンパ網内系学会教育委員会編	レベルアップのためのリンパ腫セミナー	南江堂	東京	2014	164-169
永井宏和	永井宏和, 限局期ホジキンリンパ腫の治療方針	金倉譲 木崎昌弘 鈴木律朗 神田善伸編	EBM血液疾患の治療2015-2016	中外医学社	東京	2014	319-323
岡田誠治	HIV感染症・AIDSにおける悪性腫瘍	満屋裕明編	最新医学別冊 新しい診断と治療のABC 65 HIV感染症とAIDS.	最新医学社	大阪	2014	82-90
萩原将太郎	HIV関連リンパ腫	佐藤隆美、藤原康弘、大山優編	What's new in Oncology	南山堂	東京	2015	In press
片野晴隆	HHV8関連多中心性Castleman病に発生する大細胞型B細胞性リンパ腫	森 茂郎 監修 大島孝一、竹内賢吾、田丸淳一、中村栄男、中村直哉、吉野正 編集	リンパ腫アトラス 改訂改題第4版	文光堂	東京	2014	152-153