

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 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 抗体投与群にわけて観察したところ、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)。

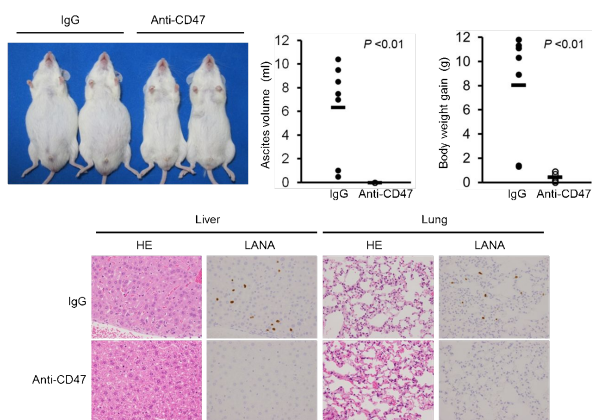


図 1 . 抗 CD47 抗体の抗腫瘍効果 . PEL マウスモデルにおいて、抗 CD47 抗体投与により腹水生成は阻害された。肝臓及び肺への転移も抑制された。

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

体投与群にわけて観察したところ、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。

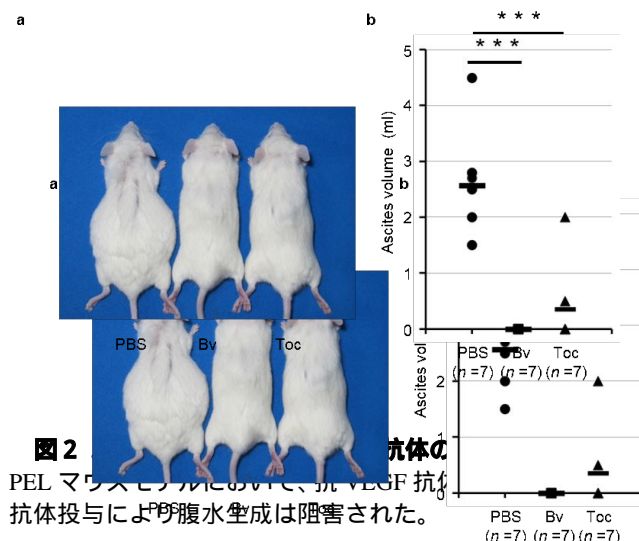


図 2 抗 VEGF 抗体の抗腫瘍効果 . PEL マウスモデルにおいて、抗 VEGF 抗体投与により腹水生成は阻害された。

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パーキッ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-SIRPα 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 IκB-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 methyl-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-κB 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 malignant effusion 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、鯉淵智彦、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 I κ B- 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

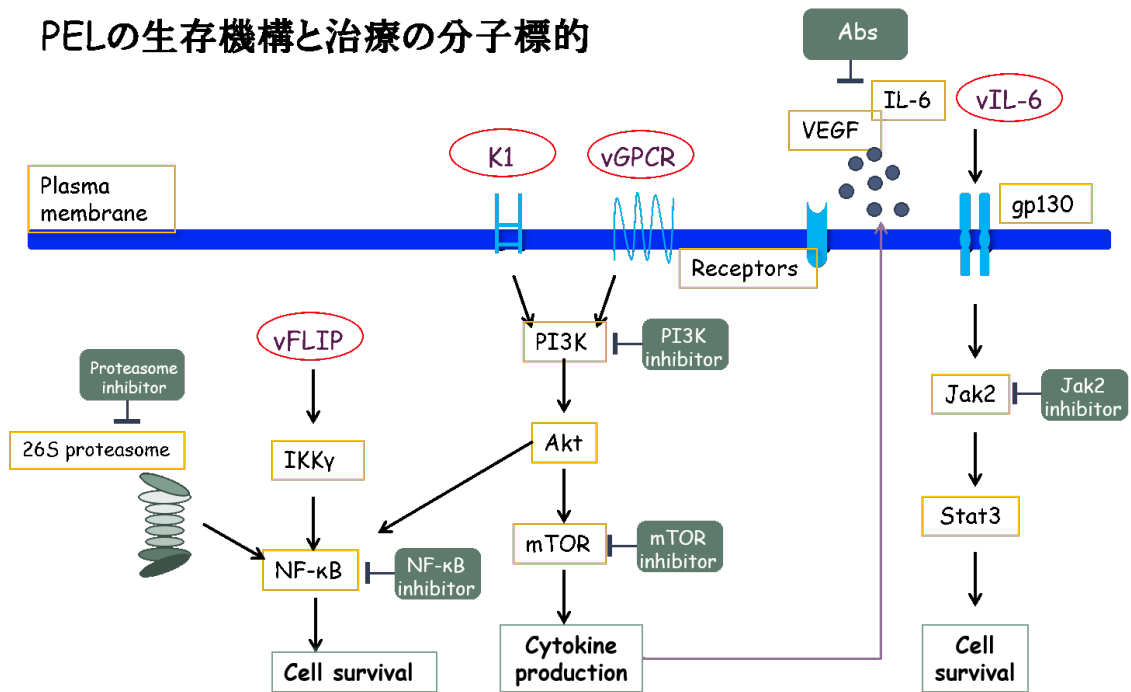
10. Ryusho Kariya, Kouki Matsuda, Takashi Nakamura, Motoshi Suzuki, Kunihiko Kuwajima, and Seiji Okada. HAMLET and BAMLET induce cell death of Primary Effusion Lymphoma. The 5th International Symposium on Carcinogenic Viral Infection, Immunity, and Cancer. 26-27 Feb., 2015
11. Kumiko Gotoh, Ryusho Kariya,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

