

審査の結果の要旨

氏名 峰 宗太郎

本研究は plasmablastic lymphoma(PBL)、primary effusion lymphoma(PEL)といったヘルペスウイルス関連 B 細胞性リンパ腫の症例から新規細胞株を樹立し、その解析を行うことで、PBL、PEL の病態の解明と新規治療法の開発を目的としたものであり、下記の結果を得ている。

1. 40 歳台後半の男性エイズ患者の胸水に発症したリンパ腫細胞から細胞株の樹立に成功し、SPEL と命名した。SPEL の免疫学的表現型は CD138 陽性、CD38 陽性、CD20 陰性であり、Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) が持続感染していることを免疫染色、遺伝子検索等により証明した。
2. PCR・real-time PCR を用いた検索では、SPEL には KSHV 感染があり、Epstein-Barr virus(EBV)、human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)を含む他のウイルスの感染は認められなかった。
3. SPEL に対してフォルボルエステルである TPA を添加することによりウイルスが産生された。上清中のウイルスを精製し、次世代シーケンサー解析を行うことでウイルスの全塩基配列を決定し、感染する KSHV は genotype A に属することを明らかにした。
4. 重度複合性免疫不全マウスに SPEL を移植すると、約 1 か月で腫瘍が形成され、病理組織学的解析の結果、形成された腫瘍は KSHV 陽性リンパ腫であった。
5. ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬(HDAC 阻害薬)である SBHA が SPEL の細胞死と、感染する KSHV の再活性化を誘導することを明らかにした。
6. 60 歳代男性エイズ患者の腹水中の腫瘍細胞からの細胞株樹立を試み、interleukin-6 (IL-6) 添加培地を用い、限界希釈法により単クローン細胞株を樹立した。樹立した細胞株 (PBL-1 と命名) は、形態学的に好塩基性の豊富な細胞質と車軸様の偏在核を有する形質細胞分化を示し、免疫学的には CD38 陽性、CD138 陽性、CD20 陰性であった。
7. 核型分析では PBL-1 は複雑核型を示した。FISH による解析では IgH/c-myc 転座が認められた。PCR・シーケンスで解析を行ったところ、IgH/c-myc 転座は c-myc 遺伝子の exon1 上流と IgH の調節領域との間で生じており、sporadic type のバーキットリ

ンパ腫にしばしばみられる転座形式であった。

8. PCR・real-time PCR を用いた検索では、PBL-1 には EBV 感染があり、KSHV、HIV-1 を含む他のウイルスの感染は認められなかった。
9. EBV の遺伝子発現は EBERs、EBNA-1、Qp プロモーターのみが認められ、latency I であった。EBV のマイクロ RNA である miR-BART をコードする BART 領域に 52.7kbp に及ぶ欠損領域があり、miR-BART は発現していないことを示した。
10. EBV に対するプローブを用いた FISH 解析およびサザンブロット解析では EBV が宿主染色体内に integration している可能性が示唆された。
11. Real-time PCR 及びドロップレットデジタル PCR 法において、化学的刺激または IgM 添加による刺激によっても PBL-1 に含まれる EBV-DNA のコピー数に変動はみられなかった。PBL-1 では EBV の活性化が起こることはないと考えられた。
12. PBL-1 の増殖には培地に IL-6 の添加が必須であり、IL-6 の添加を中止すると細胞死が誘導されることを示した。Western blot では IL-6 除去により STAT3 経路及び PI3/Akt/mTOR 経路の不活性化が認められた。IL-6 受容体抗体であるトシリズマブにより PBL-1 の細胞増殖活性が抑制された。一方、PBL-1 に IL-6 遺伝子をレンチウイルスにより導入することで IL-6 無添加条件においても細胞は自律的に増殖した。これらのことから PBL-1 が IL-6 依存的な増殖・生存を示すことが明らかになった。
13. PBL-1 に対して、XTT アッセイを用いて幅広く薬物スクリーニングを行ったところ、PI3/Akt/mTOR 経路阻害薬を含む薬剤の増殖抑制効果が認められ、特に mTOR 阻害薬であるエベロリムス及びラパマイシンでは低濃度での効果が認められた。多発性骨髄腫の治療薬であるプロテアソーム阻害薬のボルテゾミブ、免疫調整薬のポマリドミド、化学療法薬のメルファラン、HDAC 阻害薬等にも増殖抑制効果が認められた。これらの結果から mTOR 阻害薬や多発性骨髄腫の治療薬が PBL の治療薬候補となる可能性が示唆された。PBL-1 に対する薬物の併用効果についての検討では、ボルテゾミブとトシリズマブの組み合わせの他いくつかの薬剤の併用により相乗効果が得られることが判明した。

以上、本論文では PEL と PBL について、それぞれ、新規細胞株の樹立に成功し、その細胞株の解析を行った。特に PBL については、これまでに PBL 由来であることが明らかで、詳細な解析が可能な細胞株の報告はなく、本研究が初の報告となる。本研究は PEL と PBL の、病態と治療法開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。