

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

ヘルペスウイルス関連 B 細胞性リンパ腫由来新規細胞株の樹立とその病理学的解析

氏名 峰 宗太郎

### 要旨

【背景】 ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (human immunodeficiency virus-1; HIV-1) 感染者においては悪性リンパ腫の発症率は健常人の 60~200 倍であると報告されており、これらをエイズ関連リンパ腫と総称している。近年、本邦においても HIV-1 感染者は増加しており、エイズ関連リンパ腫は公衆衛生学的にも重要となっている。日本におけるエイズ関連リンパ腫の組織型は diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) が最も多い (50%) が、それに次いで、Burkitt リンパ腫 (28%)、第 3 位が 形質芽細胞リンパ腫 (plasmablastic lymphoma; PBL, 8%)、第 4 位が primary effusion lymphoma (PEL, 4%) である。PBL と PEL、および、DLBCL の一部は Epstein-Barr virus (EBV) やカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/ KSHV、または、ヒトヘルペスウイルス 8/ human herpesvirus 8/ HHV-8) のようなヘルペスウイルスが関連する B 細胞性リンパ腫であり、とくに、PBL と PEL は、ほとんど HIV 患者にしか見られない組織型である。このうち PEL は、患者体腔液中に浮遊細胞として増殖する B 細胞性リンパ腫であり、100%の症例から KSHV が検出されることから、KSHV により発症するリンパ腫であることが明らかになっている。本邦でもすでに複数の細胞株が樹立され、病態の解析やウイルスの遺伝子解析、ウイルス学的解析が進んでいる。一方、PBL は、HIV 感染者の主に口腔に発症し、CD138 陽性、CD38 陽性、CD20 陰性の免疫学的表現型を持つ、形質芽細胞を由来とする B 細胞性リンパ腫であり、2008 年の WHO のリンパ腫国際分類から独立した疾患単位として扱われるようになった新しい疾患概念である。PBL のエイズ関連リンパ腫に占める割合は世界的にも 2~8%であり、本邦では PBL 発症者は増加傾向にある。PBL の予後は不良であり、標準療法も未確立である。疾患概念の確立から間もないことから、その病態・病理学的特性に関する報告は少なく、病態の解明と治療法の開発が待たれている。PBL 症例の 7 割から 8 割に Epstein-Barr virus (EBV) が検出され、EBV 関連リンパ腫と考えられているが、PBL における EBV の詳細な解析はなされておらず、その感染様式や病原性との関連は不明な点が多い。研究が進んでいない大きな理由の一つに、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が樹立されていないことが挙げられる。

【本研究の目的】 本研究では PBL、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、その解析を行なうことで、PBL、PEL の病態の解明と新規治療法の開発を目的とした。特に、これまで細胞株が樹立されていないPBLに関しては、細胞株樹立とともに、その免疫学的表現型や細胞学的特性、ウイルス学的特徴など、その細胞株の詳細な解析を行うことで、由来細胞、増殖因子、ウイルスの関与などを明らかにし、PBL の病態解明と治療薬の候補の選定に役立つ結果を得ることを目的とした。

**【PEL 細胞株の樹立】**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リンパ腫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、KSHV が持続感染していることが免疫染色、遺伝子検索等により証明された。フォルボルエステルの添加によりウイルスが産生され、上清中のウイルスを精製し、ウイルスの全塩基配列を決定することができた。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。KSHV 単独感染 PEL 細胞株の樹立は世界で 10 例目であり、KSHV 関連腫瘍の発症機構の解明のためのモデルとして有用と思われる。

**【PBL 細胞株の樹立】**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た。通常の仔ウシ血清を含む RPMI1640 培地では良好な増殖が見られず、培地に患者腹水の上清を添加することで良好な増殖が観察された。患者腹水の上清中に含まれるサイトカインを検索したところ、多量のインターロイキン 6 (interleukin 6 ; IL-6) が含まれていることが明らかとなり、患者腹水の代わりに IL-6 を添加することで自律的増殖が得られた。その後、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。核型は複雑核型を示し、FISH による解析では IgH/c-myc 転座が認められた。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。

**【PBL 細胞株における EBV 感染】**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。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 は発現していなかった。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。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ことから、PBL-1 では EBV の活性化が起こることはないと考えられた。

【IL-6 依存性の解析】IL-6 は B 細胞、特に形質細胞の分化・増殖及び活性化に関連するサイトカインで、関節リウマチや多中心性キャッスルマン病の病態にも関連する。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。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。

【新規治療法の検討】PBL-1 に対して、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、免疫調整薬のボマリドミド、化学療法薬のメルファラン、ヒストン脱アセチル化酵素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。薬剤の併用効果の検討は、治療法開発につながる可能性がある。

【結論、考察】本研究では PBL と PEL 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。これら樹立された細胞株は、由来となる腫瘍の病理学的特性の解析や治療薬の探索、効果の評価を行う有用なツールとなる。EBV に関しては BART 領域の大きな欠損が本細胞株に特徴的であり、この欠損は PBL-1 の維持に EBV のマイクロ RNA は必須ではないこと、ウイルスが複製不能な状態であることを示唆する。latency I のウイルス遺伝子発現がみられることから、EBNA1 などの因子が腫瘍の形成、維持に関与している可能性がある。IL-6 のシグナルは、gp130/Jak/STAT3 シグナル経路に依存することが、樹立された骨髄腫細胞株では報告されているが、PBL-1 においては STAT3 以外に PI3K/Akt/mTOR 経路がその伝達に深く関わっていることが判明した。PBL-1 に対して、トシリズマブが用量依存性に細胞増殖活性を阻害したことは、IL-6 シグナルを阻害することが PBL の治療法として有用である可能性を示す。PBL とおなじ形質芽細胞由来である PEL では、感染した KSHV がコードするヒト IL-6 アナログである viral IL-6 が発現しており、autocrine 機構により細胞増殖が起こっていると考えられている。IL-6 依存性とその形態学的免疫学的特性を合わせ、PBL は生物学的に PEL の類似の腫瘍であることが考えられる。