

# 主 論 文

## Gene expression analysis of hypersensitivity to mosquito bite, chronic active EBV infection and NK/T-lymphoma/leukemia

(蚊アレルギー、慢性活動性 EB ウイルス感染症ならびに NK/T リンパ腫/白血病の遺伝子発現解析)

### 【緒言】

EBV は、1970 年代後半から、蚊アレルギー (HMB)、慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV)、NK/T リンパ腫/白血病などの致命的となりうる T/NK 細胞増殖症 (T/NK-LPD) の発症と関連していると考えられてきた。

T/NK-LPD はしばしば血球貪食症候群を合併し致命的となる。また、HMB や CAEBV の経過観察中に悪性リンパ腫を発症し命を落とす患者も高頻度でみられ T/NK-LPD が段階的に悪化していく疾患であることを示唆している。

EBV 関連 T/NK-LPD の研究における問題点は下記のとおりである：

a. 発症機序が不明である b. 難治である c. 希少疾患であり、かつ発症率に地域差がある  
ヒト NK 細胞は、細胞表面の CD16 および CD56 の発現型によって、異なるサブタイプに分類される。主なものは CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> と CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>である。CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>はリンパ節・扁桃・脾臓などの二次リンパ組織に存在する。

今回我々は、NK-LPD に注目し、EBV 関連 CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>NK-LPD の細胞株を用いて研究を行った。健常人の扁桃から採取した CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>NK 細胞および健常ドナー由来の末梢血有核細胞 (PBMC) をコントロールとし、EBV 関連 CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>NK-LPD 細胞株を用いて、DNA マイクロアレイ法で遺伝子発現解析を行った。HMB、CAEBV、NK リンパ腫および NK 白血病を一連の疾患として、CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>NK 細胞に注目しマイクロアレイ法を用いて発現プロファイルを解析したのは、我々の研究がおそらく初めてである。

我々は、この遺伝子発現プロファイル解析から、これらの疾患の段階的な悪化・進行に関与している可能性のある候補遺伝子をいくつか抽出した。

### 【材料・方法】

#### 患者サンプル

岡山大学医歯薬学総合研究科 病理学教室、名古屋大学病院 病理検査学、その他の関連病院からリンパ腫検体のパラフィンブロックを提供していただいた。反応性腫大リンパ節 (RLH) と扁桃を正常コントロールとして使用した。組織を解析したすべての患者からインフォームド・コンセントを得た。この研究はヘルシンキ宣言に基づき、岡山大学医歯薬総合研究科大学院および関連病院の倫理審査で承認を得たものである。

#### 細胞培養

5 つの EBV 陽性 NK 腫瘍細胞株を使用した (Table S1)。KAI3、SNK10 および NK-YS はそれぞれ HMB、CAEBV および白血化した鼻腔 NK/T リンパ腫患者の末梢血から、SNK6 および HANK1 は鼻腔 NK/T リンパ腫の原発巣から樹立された。

#### マイクロアレイ

RNeasy Mini/Micro Kit を用いて RNA を抽出し、規定の方法でハイブリダイゼーションを行った。プローブ・データセットは Subio Platform software (Subio, Nagoya, Japan) を用いて、主成分分析 (PCA)、階層的クラスタ分析、遺伝子オントロジー分析 (DAVID を利用)、pathway 解析 (KEGG を利用) を行った。

## 免疫染色

CAEBV および NK リンパ腫のパラフィンブロックから切片を切り出して免疫染色を行った。CD56、CD3、CD16、survivin、SHP1 に対する抗体を用いて実験を行った。陽性腫瘍細胞の染色強度と染色率は、10 倍強拡大視野にて、3 名の判定者が行った。

## ウェスタンブロット

SHP1、SHP2、survivin、Cyclin D1、Cyclin A2、Cyclin E2、Fas、 $\beta$ -actin に対する抗体と、HRP ラベル抗ウサギおよび抗マウス抗体を用いて、既存の方法を利用して行った。

## **【結果】**

### 主成分分析 (PCA) および階層的クラスタ分析：

PCA では、解析した正常細胞および腫瘍群が下記の 3 群に分類された (Figure1 (A))；

(a) 正常 PBMC (b) 正常 CD16(-)NK 細胞、HMB、CAEBV および NK リンパ腫 (c) NK 白血病

また、NK 系細胞のみを解析したところ、正常 NK 細胞と NK-LPD には距離があった。

NK-LPD のみの解析では、下記の 3 群に分類された；

(a) HMB (b) CAEBV および NK リンパ腫 (c) NK 白血病

CAEBV と NK リンパ腫はスキッタープロットで比較的近傍に位置しており、発現プロファイル上は類似していると推測された。

階層的クラスタ分析では、特徴的な発現パターンから、遺伝子は 7 群のクラスタに分類された (発現低下を↓、発現増強を↑で示す Figure 1 (C))；

A-1 正常 NK↑、NK-LPD↓

A-2 正常 NK↓、NK-LPD↑

B-1 正常 NK・HMB↑、CAEBV・NK リンパ腫・NK 白血病↓

B-2 正常 NK・HMB↓、CAEBV・NK リンパ腫・NK 白血病↑

C 正常 NK・HMB・CAEBV↑、NK リンパ腫・NK 白血病↓

D-1 正常 NK・HMB・CAEBV・NK リンパ腫↑、NK 白血病↓

D-2 正常 NK・HMB・CAEBV・NK リンパ腫↓、NK 白血病↑

## 遺伝子オントロジー分析

発現クラスタごとに上位 7 位の GO term を抽出した (Table 1)

## Pathway 解析

### 《細胞周期》

クラスタ A-2 に所属する遺伝子の多くが、細胞周期経路に存在し、(Figure2 (A,B)) 疾患が進行するにつれて発現が増強していた。

### 《アポトーシス》

アポトーシス惹起遺伝子および回避遺伝子のいずれもが EBV 陽性 NK-LPD で発現増強していた (FigureS1)。前アポトーシス遺伝子の発現は HMB・CAEBV で最も強く、EBV 陽性 NK 白血病では減弱していた。アポトーシス回避遺伝子は正常 NK 細胞と比べて EBV 陽性 NK-LPD で強力に発現し、疾患の進行に伴って増強していた。

### 《JAK/STAT 経路》

JAK/STAT 経路では、正常 NK 細胞と比べ、EBV 陽性 NK-LPD で、JAK3 と STAT3 の発現が増強していた。(Figure 2(C,D)) JAK/STAT 経路の上流・下流の分子をコードする遺伝子も同じ発現パターンを示しており、この経路の伝達増幅が細胞増殖に寄与していることが示唆された。EBV 陽性 NK-LPD では、JAK/STAT 経路の抑制因子である PTPN6 (SHP1) の発現が減少しており、促進因子である PTPN11 (SHP2) は発現増強していた。

## ウェスタンブロット解析

5種の細胞株で行ったウェスタンブロット解析では、疾患の進行に従って、Cyclin-D1、-E2、-A2、SHP2の発現が漸増し、SHP1発現が漸減していることが証明された。Fas発現はCAEBV細胞株(SNK10)で最強であった。Survivin発現はNKリンパ腫細胞株(HANK1、SNK6)で最強であった。(Figure 3(A))

## 免疫染色

NK/Tリンパ腫、CAEBV、RLHの患者検体を用いて、SHP1、SHP2、survivin、Fas発現に対し免疫染色を行った。(Figure 3(B), Table 2) SHP-1染色は、RLH検体では正常であったが、強度・頻度ともNK/Tリンパ腫検体、あるいはNKおよびT細胞型CAEBVでは低値であった。一方で、SHP-2染色は、RLH検体では低値であったが、NKおよびT細胞型CAEBVとNK/Tリンパ腫検体では次第に増強した。Survivin染色は、RLH検体では低値であったが、NKおよびT細胞型CAEBVとNK/Tリンパ腫検体ではいずれも増強していた。Fas染色は、RLH検体では低値であり、NK細胞型CAEBVで高値であった。NK/Tリンパ腫検体では、染色強度はCAEBVと比較して弱かった。

## 【考察】

主成分分析では、CD56陽性CAEBVとNKリンパ腫が近似した遺伝子発現プロファイルを有することが推測された。(Figure 1) 一方、階層的クラスター分析と遺伝子オントロジー解析では、これらの細胞間で発現差がある遺伝子群があることが示された。(Table1、S4、S6)

NKリンパ腫/白血病では細胞周期に関わる遺伝子の発現が疾患の進行とともに増強していた。(Figure 2 (A,B)) 抗アポトーシス遺伝子であるBIRC5 (survivin) およびBCL-XLは特にNKリンパ腫/白血病で強力に発現しており、他の細胞株に比べこれらの細胞株がより悪性であることを示していた。一方、EBV陽性HMBおよび/またはCAEBVにおける遺伝子発現のパターンは、感染細胞の特徴と悪性腫瘍の特徴の両方を兼ね備えていた。細胞死シグナル伝達経路における前アポトーシス遺伝子はHMBおよび/またはCAEBVでもっとも高く、これらの疾患が前悪性腫瘍と悪性腫瘍の中間に位置することを示していた。(Figure S1、3(A)) これらの結果は、末梢血中のウイルスゲノムの増加や段階的な疾患の進行といったEBV陽性NK-LPDの臨床的特徴と一致する。

SHP1はJAK/STAT経路の抑制性制御因子である。SHP1をコードするPTPN6発現低下はしばしば多くのリンパ腫/白血病で観察される。PTPN11は、その体細胞変異によってSHP2発現が増強し、小児における若年性骨髄単球性白血病や骨髄異形成症候群、骨髄性白血病を惹起したり、H.ピロリ感染に伴う胃癌を惹起したりする。SHP2は多様な細胞シグナル経路に関与している。我々の研究では、EBV陽性NK-LPD細胞株における遺伝子発現プロファイルによって、HMBのような早期病変の細胞株であっても、PTPN6発現が抑制されている一方でPTPN11発現が増強していることが示された。これらの結果は、SHP1発現抑制とSHP2発現増強がEBV陽性NK-LPDの腫瘍発生の鍵となっていることを示唆している。

我々はここで、EBV陽性NK-LPDの発症機序を仮定した図を提案する。(Figure4)

EBVが感染したのち、SHP1およびSHP2発現が劇的に変容し、JAK/STAT経路やRas/MAPK経路に影響を及ぼし、異常な増殖を惹起する。LMP1やZEBRAなどのウイルス遺伝子も細胞周期に影響を及ぼし、ウイルス複製のためにDNAチェックポイント遺伝子の発現を増強させる。HMBおよびCAEBVでは、前アポトーシス遺伝子の発現が増強している。NKリンパ腫/白血病へと進行していくにつれ、前アポトーシス遺伝子の発現は減弱し、抗アポトーシス遺伝子の発現が増強する。これらのパターンは、時にHMBとして発症し、CAEBV、NKリンパ腫から白血病へと進展していくNK-LPDの臨床像に合致する。

## 【結論】

我々の研究では、EBV陽性NK-LPDにおけるいくつかの重要な遺伝子群、分子群、腫瘍発生や疾患の進行に関わるシグナル経路が明らかとなった。これらの知見により、EBV関連NK-LPDにおいて、EBV感染によって生じる継時的な変異を引き起こす分子生物学的機序を理解する上で重要な情報が得

られ、また将来的にはこれらの致命的な疾患における新たな治療戦略の開発にも寄与するものと思われる。