

主論文の要旨

**The heat shock protein 90 inhibitor BIIB021 suppresses
the growth of T and natural killer cell lymphomas**

〔 Heat shock protein 90 阻害剤の BIIB021 は
T/NK 細胞リンパ腫を抑制する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻
発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：小島 勢二 教授)

鈴木 道雄

【緒言】

Epstein-Barr virus (EBV)は主に B 細胞に感染するが、T 細胞や natural killer (NK)細胞にも感染する。節外性リンパ腫鼻型、種痘様水疱症、慢性活動性 EBV 感染症などの T 細胞や NK 細胞に関連した悪性疾患との関連が知られており、これらの EBV 関連 T/NK リンパ腫は難治性のため新たな治療法の開発が求められている。

EBV のコードする latent membrane protein 1 (LMP1) は NF- κ B、c-Jun N-terminal kinase (JNK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 経路を活性化し形質転換に関わるため腫瘍遺伝子として知られている。LMP1 の発現を抑制する薬剤をスクリーニングしたところ heat shock protein 90 (Hsp90)阻害剤が特定された。Hsp90 は細胞内で分子シャペロンとして蛋白合成を補助する蛋白であり、腫瘍細胞での発現増加やその標的蛋白が細胞増殖に関わるものが多いと報告されている。Hsp90 阻害剤の1つである BIIB021 は経口投与可能であり、胃粘膜下腫瘍に対する臨床試験も行われている薬剤であるため、本研究では EBV 関連 T/NK 細胞腫瘍に対する効果を検討した。

【対象および方法】

EBV 陽性または陰性の T 細胞株および NK 細胞株を用いた。各細胞株の詳細を表 1 に示す。各細胞を DMSO または BIIB021 で治療した後に回収し、real-time RT-PCR 法により EBV 関連遺伝子の mRNA 相対発現定量を行った。LMP1 および EBNA1、細胞増殖、細胞周期に関連する蛋白発現をウエスタンブロッティング法で確認した。細胞増殖をトリパンブルー染色により細胞数を計測した。アポトーシスについて annexin V および 7-aminoactinomycin D (7-AAD) 染色を用い、細胞周期について、propidium iodide 染色を用いてフローサイトメトリーで解析した。免疫不全マウスである NOD/Shi-scid/IL-2R γ null (NOG) マウスに対し EBV 陽性の NK 細胞株である SNK6 を皮下接種した腫瘍マウスモデルに BIIB021 を経口投与し腫瘍のサイズを計測した。

【結果】

ウイルス関連遺伝子の発現

EBV 陽性の細胞株に対し BIIB021 5 μ M 投与し 24 および 48 時間に EBV 関連遺伝子の mRNA 発現を real-time RT-PCR で確認した。コントロールに比べ LMP1 および EBNA1 の mRNA 発現が低下し (図 1A)、蛋白の発現も低下した (図 1B)。

細胞増殖

EBV 陽性の T または NK 細胞株に対し BIIB021 を様々な濃度で投与し、コントロール群に対する細胞数を比較したところ、BIIB021 は時間依存性的および濃度依存的に細胞増殖を抑制した (図 2A, B)。しかし、EBV 陰性の T または NK 細胞株でも同様に細胞増殖を抑制した (図 2A, B)。EBV の影響を直接比較するために EBV 感染および非感染の MT-2 細胞株 (図 2C)、TL1 および NKL 細胞株 (図 2D) にも

同様に BIIB021 を投与したが、EBV 感染の有無に関わらず細胞増殖を抑制した。また、細胞への毒性を確認するためヒト末梢血単核球 (PBMC) に対し BIIB021 を投与したが、96 時間後も 80% 以上の生細胞率を維持していた (図 2E)。

アポトーシス

各細胞株に対し BIIB021 を投与し 48 時間後にフローサイトメトリーによりアポトーシスの誘導を確認した。2 種の T 細胞株 (SNT16, Jurkat) と 2 種の NK 細胞株 (SNK6, KHYG1) で早期アポトーシスを示す annexin V 陽性かつ 7-AAD 陰性細胞の割合が増加した (図 3)。また、ウエスタンブロッティングにより cleaved PARP を確認したところすべての細胞株で増加した (図 4)。

LMP1 下流のシグナル経路の蛋白発現

NF- κ B、JNK、PI3K 経路は LMP1 の下流に位置する細胞増殖に関わる経路であり、EBV 陽性細胞株において、BIIB021 投与により蛋白発現が低下した (図 4)。しかし、EBV 陰性の細胞株でも同様にこれらの蛋白発現は低下した。また、BIIB021 投与により、LMP1 の発現調整に関連する JAK/STAT 経路に関わる蛋白発現も低下した (図 4)。

細胞周期

BIIB021 による細胞増殖抑制の機序の解析のため、フローサイトメトリーにより細胞周期を解析した (図 5A)。BIIB021 投与により T 細胞株では G1 期および G2 期の細胞の割合が増加し、NK 細胞株では G1 期の細胞の割合が増加した。BIIB021 投与により細胞周期に関連する蛋白発現が低下した (図 5B)。

マウスモデル

免疫不全マウスである NOG マウスに EBV 陽性 NK 細胞株である SNK6 を皮下接種し、BIIB021 を経口投与したところ、腫瘍の増殖が抑制された (図 6)。

【考察】

本研究では、癌遺伝子として知られる LMP1 に注目し、Hsp90 阻害剤である BIIB021 が LMP1 の発現を抑制し、細胞増殖を抑制することを確認した。しかし、LMP1 の発現抑制機序は明確になっていない。EBV 関連 T/NK 腫瘍を含む潜伏感染 II 型の細胞では、様々なサイトカインにより刺激された JAK/STAT 経路、JNK や NF- κ B 経路を介して LMP1 の発現が調整されるという報告がある。本研究ではこれらの蛋白発現は BIIB021 により抑制されたことを示しており LMP1 発現抑制に関与したと考えられる。

細胞増殖における LMP1 の影響を確認するため、siRNA を用いて LMP1 の発現抑制を試みたが、導入効率が低く評価できなかった。また、BIIB021 により治療した T/NK 細胞に LMP1 を導入し過剰発現することも試みたが、細胞へのストレスが強く細胞増殖を評価できなかった。我々は以前、EBV 陰性の T 細胞株に Tet-on システムを利用して LMP1 を導入することに成功したが、LMP1 のみの導入では細胞増殖は亢進しなかった。以上のように、Hsp90 阻害剤による LMP1 と細胞増殖の関連

を示すことはできなかった。

本研究では、BIIB021 は EBV 陰性の細胞株でも細胞増殖を抑制した。Hsp90 は 200 以上の蛋白を標的にする事が知られており、BIIB021 は細胞周期に関連する蛋白である CDK1、CDK2 発現を抑制することにより細胞増殖を阻害したと考えられた。

BIIB021 は LMP1 だけでなく EBNA1 発現も抑制した。EBNA1 は EBV 感染細胞において恒常的に発現しており、EBV 遺伝子を宿主細胞に繋ぎ止める役割や、アポトーシス抑制による腫瘍化に関わるとされる。EBNA1 の発現抑制により EBV 遺伝子の脱落に関与し、リンパ腫細胞を治療する効果があるかもしれない。

BIIB021 を PBMC に投与したが生細胞率は高く維持された。またマウスへの投与によっても重大な有害事象は観察されなかった。胃粘膜下腫瘍に対する臨床試験で認められた有害事象は概ね軽度から中等度であり許容範囲であった。以上より BIIB021 は臨床的に治療薬となり得ると考える。

【結論】

Hsp90 阻害剤である BIIB021 は EBV 関連 T/NK 腫瘍において、EBV 関連遺伝子の LMP1 を抑制するとともに、細胞増殖を抑制した。これら疾患に対する治療薬になるうことが示された。