

主論文の要旨

**Tofacitinib induces G1 cell-cycle arrest and inhibits
tumor growth in Epstein-Barr virus-associated
T and natural killer cell lymphoma cells**

トファシチニブは EB ウイルス関連 T および NK 細胞リンパ腫
において G1 期細胞周期停止を誘導し腫瘍増殖を抑制する

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

(指導：高橋 義行 教授)

安藤 将太郎

【背景】

EB ウイルス (EBV) は初感染後に潜伏感染することを特徴とし、世界中で成人の約 95% が感染していると考えられている。通常は B 細胞に潜伏感染するが、T および NK 細胞リンパ腫や慢性活動性 EBV 感染症などの疾患では、T および NK 細胞にも感染することが確認されている。これらの EBV 関連腫瘍には、従来の化学療法に抵抗性であるものが少なくなく、新規治療法の開発が望まれている。

JAK/STAT 経路は、サイトカインなどの細胞外シグナルを細胞内へと伝える伝達経路で、細胞増殖、細胞分化、免疫制御などの様々な生命活動を調節しており、その異常が悪性腫瘍や免疫疾患を引き起こすことが知られている。JAK ファミリーには JAK1,2,3 と Tyk2 の 4 種類が確認されているが、そのうち JAK3 は、主に血液細胞に限定的に発現するという特徴を有し、T および NK 細胞リンパ腫を含む血液腫瘍におけるその異常活性化が報告されている。

トファシチニブは選択的 JAK3 阻害剤の一つで、当初は免疫抑制剤として開発された薬剤であり、すでに国内においても関節リウマチの経口治療薬として承認されている。一方で、近年は抗腫瘍薬としても注目されるようになり、様々な腫瘍におけるトファシチニブの効果が報告されている。

本研究では、EBV 関連 T および NK リンパ腫における JAK3/STAT5 経路の活性化とトファシチニブによる抗腫瘍効果について検討した。

【方法】

Table1 に示した EBV 陽性および陰性の B、T、NK 細胞株において、JAK3/STAT5 経路の活性化とトファシチニブによる抗腫瘍効果を検討し、それら細胞株におけるアポトーシス、細胞周期、EBV 関連遺伝子の発現について、ウエスタンブロット法、フローサイトメトリー法、PCR 法を用いて解析した。また、EBV 陽性細胞株による NOG マウスの皮下腫瘍モデルを作成し、同薬による抗腫瘍効果を検討した。さらに、EBV 関連 T 細胞リンパ腫患者の単核球を用いて、JAK3/STAT5 経路の活性化と同薬による抗腫瘍効果について検討した。

【結果】

Table1 で示す細胞株における JAK3/STAT5 経路の活性化について検討した所、B 細胞系では EBV 陽性、陰性に関わらず、JAK3 の発現は認めるが、STAT5 のリン酸化は認めなかった。一方で T、NK 細胞系では EBV 陽性細胞株において STAT5 のリン酸化を認め、JAK3/STAT5 が活性化していると考えられた。またトファシチニブによりその活性化が抑制された (Figure 1A)。

トファシチニブによる細胞増殖抑制効果については、T 細胞系では EBV 陰性株に比べて EBV 陽性株においてより強く細胞増殖が抑制された。B 細胞系では EBV 陽性、陰性にかかわらず、細胞増殖抑制は軽度であった。一方で、NK 細胞系では、EBV 陽性、陰性にかかわらず、強く細胞増殖が抑制された (Figure 1B, C)。IL-2 非依存性 T

細胞株 SNT16 においても、IL-2 依存性 T 細胞株 SNT16 とほぼ同様の結果であった (Figure 2A, B, C)。また EBV 陰性 NK 細胞株 NKL と、それを親株として得られた EBV 陽性 NK 細胞株 TL1 を用いて比較した所、トファシチニブによるリン酸化 STAT5 の減少、細胞増殖抑制の両方において、TL1 でより強い効果が確認された (Figure 3A, B, C)。

続いてトファシチニブによる細胞増殖抑制のメカニズムについて調べた所、EBV 陰性 NK 細胞株 KHYG1 では、トファシチニブにより Annexin V 陽性、7-AAD 陰性の細胞分画が著増しており、Caspase3 や PARP の断片化も確認され、アポトーシスが誘導されていた。EBV 陽性 T 細胞株 SNT15 においてもアポトーシス誘導が示唆されたが、他の細胞株ではほとんど誘導を認めなかった (Figure 4A, B, C)。一方で、トファシチニブによる細胞増殖の抑制を示した全ての T および NK 細胞株において、トファシチニブによる G1 期割合の増加と G2 期割合の減少を認め、G1 期での細胞周期停止が誘導されていると考えられた。また細胞周期関連蛋白のトファシチニブによる発現変化についても、G1 期細胞周期停止によると考えられる P27 の増加や、CDK2 および cyclin D3 の低下を認めた (Figure 4D, E)。

またトファシチニブによる EBV 関連遺伝子発現への影響を PCR 法、ウエスタンブロット法にて確認した所、EBV 陽性 T 細胞株 (SNT13, SNT15) と EBV 陽性 NK 細胞株 (KAI3, SNK6) において、LMP1、EBNA1 の発現が mRNA レベル、蛋白レベルの両方で低下していた (Figure 5A, B)。

次に *in vivo* でのトファシチニブの抗腫瘍効果を調べるため、NOG マウスにおいて EBV 陽性 T 細胞株 SNT15 の皮下腫瘍モデルを作成し、トファシチニブ投与群 (30mg/kg/day) とコントロール群での皮下腫瘍容積を測定した所、有意差 ($P < 0.05$) をもって治療群において腫瘍増殖の抑制を認めた (Figure 6A)。またコントロール群では EBV 感染を示す EBER 染色陽性の腫瘍細胞が浸潤していることが確認され、治療群ではそれが抑制されていた (Figure 6B)。

最後に、EBV 関連 T リンパ腫患者由来の末梢血単核球 (PBMC) を用いて、EBV 感染細胞である $\gamma \delta$ T 細胞を分離し、JAK3/STAT5 経路の活性化を調べた所、患者由来 $\gamma \delta$ T 細胞ではリン酸化 STAT5 の発現を認めたが、健常者由来ではほとんど発現を認めなかった (Figure 7A)。また、患者由来の PBMC ではトファシチニブによる細胞増殖抑制を認めたが、健常者由来の PBMC では影響を認めなかった (Figure 7B)。

【考察】

本研究では、EBV 関連 T および NK 細胞リンパ腫由来の細胞株において、JAK3/STAT5 経路が活性化しており、トファシチニブはその活性化を阻害することでその増殖を抑制することが示された。T 細胞系では EBV 陽性株においてのみ増殖抑制効果が見られたが、NK 細胞株では EBV 陰性株においても効果が見られた。トファシチニブが効果を示した細胞株の多くが IL-2 依存性であり、IL-2 が JAK3/STAT5 経路を活性化させる主要なサイトカインであることを考慮すると、その効果は十分予想

できるものであるが、本研究では IL-2 非依存性 T 細胞株の SNT16 においてもほぼ同様の結果が得られている。また、NK 細胞株では EBV 陽性株 TL1 において、その親株である EBV 陰性株 NKL よりトファシチニブの効果が増加していた。さらに EBV 陽性株においては、EBV の主要ながん遺伝子として知られる LMP1 と、潜伏感染において重要な役割を果たす EBNA1 の発現が、トファシチニブによって抑制されていた。JAK3 が LMP1 に結合することで STAT 経路を活性化させる可能性や、逆に JAK/STAT 経路の活性化が LMP1 の発現を高めることでポジティブループが形成される可能性の報告もあり、EBV 感染がトファシチニブの抗腫瘍メカニズムに関与することが示唆される。トファシチニブの効果は NOG マウスによる皮下腫瘍モデルでも確認され、また EBV 関連 T 細胞リンパ腫の患者における EBV 感染細胞でも JAK3/STAT5 経路が活性化していることが確認されており、JAK3/STAT5 経路の阻害が、EBV 関連 T リンパ腫における治療戦略において重要であることが示された。

また本研究では、トファシチニブが効果を示した細胞株においては全て G1 期細胞周期停止が確認されたが、一方でアポトーシスは一部の細胞においてのみ誘導された。またマウスモデルにおいても腫瘍増殖を完全に抑えることはできておらず、トファシチニブ単剤による治療の限界も示唆された。

【結論】

EBV 関連 T および NK リンパ腫では JAK3/STAT5 経路の活性化がその細胞増殖において重要であり、トファシチニブはその活性化を抑え、G1 期での細胞周期停止を誘導することで抗腫瘍効果を示すことが確認された。同薬は EBV 関連 T および NK リンパ腫における新規治療薬となる可能性が示された。