

NOG マウスを用いたメソトレキサート関連リンパ腫の 発症におけるEBVの関与の解明

北村 登¹⁾, 長澤洋介¹⁾, 都築 広¹⁾, 渡邊美遙¹⁾, 長塚靖子¹⁾, 岩田光浩¹⁾, 武井正美¹⁾

The relation of EBV in development of methotrexate associated lymphoproliferative disease using hNOG mice

Noboru KITAMURA¹⁾, Yosuke NAGASAWA¹⁾, Hiroshi TSUZUKI¹⁾, Miharuru WATANABE¹⁾,
Yasuko NAGATSUKA¹⁾, Mitsuhiro IWATA¹⁾, Masami TAKEI¹⁾

要旨

メソトレキサート（以下MTX）は関節リウマチ（以下RA）の第一選択薬として知られているが、MTX投与でリンパ増殖性疾患（以下LPD）が発症する事が報告されている。発症にEpstein-Barr virus (EBV) が関与していると言われていたが、直接証明したものは無い。今回EBV感染ヒト化免疫不全マウス（hNOGマウス）にMTXを投与しLPDが発症するか否かを検討した。MTXを投与したマウス3頭中2頭で脾腫を認め、うち1頭で組織学的にEBER（+）のLPDの発症を認めた。今後EBV感染hNOGマウスのLPD発症にMTXがどの様に関与するかを検討したい。

1. はじめに

免疫不全マウスであるNOD/SCID/IL2R γ nullマウス（NOGマウス）は、ヒト骨髄由来細胞移植によりヒト化免疫系を再構築することが可能である。我々はヒト臍帯血由来幹細胞をNOGマウスに移植し、ヒト免疫化マウス（hNOGマウス）を作成、そこにEpstein-Barr virus (EBV) を感染させる事でびらん性関節炎の発症を証明し、EBVと関節リウマチの関連性を証明した。また、EBV感染hNOGマウスはさらに高濃度のEBVを感染させるとリンパ腫を発症することが証明されている。

一方メソトレキサート（MTX）はRAの治療として世界中で最も使用されているが、MTX治療中にリンパ増殖性疾患（LPD）を発症する事が報告され、今ではMTX関連LPD（MTX-LPD）と言う概念が提唱されている。臨床的にはMTX-LPDの発症にEBVが関与していると言う報告がみられるが、MTX-LPD発症にEBVがどの様に関与しているかを直接

証明したものは存在しない。

本研究はEBVを感染させたhNOGマウスにMTXを投与し、LPDの発症の有無を確認し、MTXにLPDがどの様なメカニズムで発症するかをヒトの免疫系で検討する。

2. 対象および方法

2-1 hNOGマウスの作成

NOGマウスは、公益財団法人実験動物中央研究所（神奈川）より購入した。7週齢の雌NOGマウスに、市販されているヒト臍帯血由来CD34陽性造血幹細胞（Lonza, Basel, Switzerland）を 8.0×10^4 から 1.0×10^5 cell/頭で尾静脈から移植し、hNOGマウスを作製した。ヒト造血幹細胞移植マウスにおけるヒト免疫細胞再構築の確認は、末梢血全リンパ球におけるCD45（anti-human CD45 monoclonal antibody (BioLegend, San Diego, CA, USA)）陽性細胞の比率をflow cytometry（FC500, Beckman Coulter, Brea, CA, USA）で経時的に測定し、骨髄に生着したか否

1) 日本大学医学部
北村 登: kitamura.noboru@nihon-u.ac.jp

かを確かめる事でhNOGマウスが作成されたか否かを確かめた。

2-2 EBVおよびEBVの感染

EBVは、B95-8細胞を10% fetal bovine serum (FBS, Gibco/Thermo Fisher, grand Island, NY, USA), ペニシリンG, ストレプトマイシン (Invitrogen/Thermo Fisher, grand Island, NY, USA) を添加した Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用い培養し、培養上清を遠心濃縮し、0.45 μm membrane filter (Millipore/Thermo Fisher, grand Island, NY, USA) を通して精製した。精製ウイルスの力価測定は、臍帯血から単核球を分離し、精製したEBVウイルス液の10倍段階希釈で添加し、培養した。6週間後、リンパ球がtransformation (細胞塊の形成で判定) を起こしたwell数の割合から、50% transforming dose (TD₅₀) を算出した¹⁾。このウイルス液を、ヒト造血幹細胞移植後約12週経過したhNOGマウスの尾静脈から、ウイルス量として20 TD₅₀/100 μl/頭以上で投与しEBVを感染させた。

2-3 MTX投与

EBV感染と動時に、MTX (富士フィルム和光純薬 (株)) 20 μgを1mlのphosphate-buffered saline (PBS) に溶解し毎週腹腔内投与した。またコントロールとしてMTXを投与しないマウスには1mlのPBSを毎週投与した。

2-4 組織学的検討

EBV感染hNOGマウスを、末梢血リンパ球中のヒトCD8陽性細胞が増加し、比率がCD4陽性細胞を上回るEBV感染後8から10週間経過した後に解剖を行い、肝臓、脾臓、唾液腺、リンパ節等の各臓

器を摘出した。組織切片は、ホルマリン固定の後にパラフィンブロックとし、連続切片を作製した。各臓器の切片に対し、hematoxylin-eosin (HE) 染色を施行し、顕微鏡下で観察し、LPDの発症の有無について病理組織学的検討を行った。

2-5 EBVの検討

末梢血中のEBVDNAの定量はTaqmanシステム (Applied Biosystems) によるreal-time polymerase chain reaction (PCR) を用いて測定した²⁾。また組織中のEBVの証明にはEBV-encoded small RNA (EBER) のprobes (DAKO, Y5200) を用いたin-situ hybridizationを行った。

3. 結果

3-1 EBV感染hNOGマウスのリンパ球の推移

TD₅₀のEBVを感染と動時にMTXを投与した3頭と投与しない3頭の末梢血のリンパ球の推移を経時的に追跡した。MTXを投与した3頭のうちの2頭が経時的にCD3が上昇した。またCD4/8比はばらつきがあるがCD4が優位に推移した。MTXを投与しない3頭中2頭はCD3の上昇はわずかだった。

MTX投与hNOGマウスの摘出臓器の肉眼的所見 (図-1)

MTXを投与したhNOGマウス3頭のうちの2頭 (2-3, 2-4) で脾臓の増大を認めた。その他、肝、腎、胃、リンパ節には肉眼的に大きな差は認めなかった。

3-2 MTX投与hNOGマウスの摘出臓器の組織学所見 (図-2)

脾臓が増大していたマウス (2-4) のHE染色では異型性のある細胞のほとんどが大型~中型で、孤立



図1 MTX投与hNOGマウスの解剖臓器の肉眼像

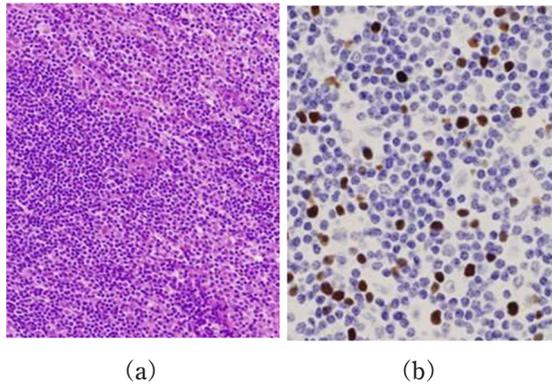


図2 LPDを発症したhNKG2Aマウスの脾臓の病理組織像
(a) HE染色, (b) EBER in situ hybridization

散在性に出現し、小型の成熟リンパ球も散見され、核のクロマチンは粗く、不規則な凝集を示し、LPDを疑わせる所見を認めた。EBERのISHを施行したところ異型性のある細胞の一部でEBERが染色された。

3-3 LPD発症マウスの末梢血のEBV-DNA定量

MTXを投与し、LPDを発症した24のマウスの解剖時のEBV-DNA量は $1 \times 10^3 / \mu\text{DNA}$ と上昇していたが、他の2頭、MTXを投与しなかった3頭からはEBV-DNAは検出出来なかった。

4. 考 察

MTXは現在のRA患者の第一選択薬と認識されている³⁾。しかし、MTXの投与中にLPDを発症した症例について報告され⁴⁾、それ以来、報告が徐々に増加し、2001年に造血腫瘍のWHO分類でMTX-LPDと言う概念が認識された⁵⁾。その後、MTX-LPDの臨床的な報告は数多く見られているが、LPDの発症にMTXがどの様に関与しているかを直接証明した報告はまだない。また臨床的にはIchikawaら⁶⁾が、

RA-LPDの病理組織のEBER陽性率を検討し、non-MTX-LPD (7/15, 46.7%)と比較しMTX-LPD (49/78, 62.8%)の方が、有意にEBER陽性率が高いことを報告しており、MTX-LPDの発症にEBVが関与している事が示唆されている。今回我々はhNKG2AマウスにEBVを感染させ、さらにMTXを投与する事で、一部だが、LPDを発症させ、組織内にEBVが存在する事を証明し、さらに末梢血のEBV-DNAの上昇を確認した。

5. 結 語

本モデルは今後MTX-LPD発症の免疫学的機序を解明する可能性があることが示唆された。

文 献

- 1) Condit RC. Principles of Virology. Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology. 5th ed. 2006, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- 2) Kimura H, Morita M, Yabuta Y, et al. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. J Clin Microbiol 1999; 37:132-136.
- 3) Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, B, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. Ann Rheum Dis 2017; 76:960-977.
- 4) Ellman MH, Hurwitz H, Thomas C, et al. Lymphoma developing in a patient with rheumatoid arthritis taking low dose weekly methotrexate. J Rheumatol 1991; 18: 1741-1743.
- 5) Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. World Health Organization classification of tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research of Cancer, 2017, p462-464.
- 6) Ichikawa A, Arakawa F, Kiyasu J, et al. Methotrexate/iatrogenic lymphoproliferative disorders in rheumatoid arthritis: histology, Epstein-Barr virus, and clonality are important predictors of disease progression and regression. Eur J Haematol 2013; 91: 20-28.