

機関番号：32607
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008-2010
 課題番号：20590374
 研究課題名（和文）CD30 誘導と P80 によるホジキン病と未分化大細胞型リンパ腫発症の分子機構の解析
 研究課題名（英文）Molecular mechanisms of Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma triggered by CD30 induction and P80
 研究代表者
 堀江 良一 (HORIE RYOUICHI)
 北里大学・医学部・准教授
 研究者番号：80229228

研究成果の概要（和文）：がん細胞におけるシグナルの異常とそのメカニズムを明らかにすることは新規治療法の開発につながる。本研究はホジキン病と未分化大細胞型リンパ腫の増殖に関わる分子 CD30 の過剰発現のメカニズムが、低メチル化遺伝子の Ets-1 による JunB 誘導を介していることを明らかにした。Ets-1 は CD30 や P80 (NPM-ALK) により ERK1/2MAPK を介して誘導され、CD30 過剰発現が安定していると考えられた。すなわち ERK1/2MAPK は複数の分子群を抑制するがん細胞治療の分子標的であると考えられた。

研究成果の概要（英文）： Overexpression of CD30 and JunB is a hallmark of tumor cells in Hodgkin lymphoma (HL) and anaplastic large cell lymphoma (ALCL). We report that CD30-ERK-MAPK signaling induces JunB, which maintains constitutive activation of the hypomethylated CD30 promoter. We also localize a cis-acting enhancer in the JunB promoter by Ets-1. We show that Ets-1 enhances JunB promoter activation dependent on CD30 or the NPM-ALK-ERK 1/2 MAPK pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：血液腫瘍学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理

キーワード：CD30、JunB、Ets-1、NPM-ALK、ホジキンリンパ腫、未分化大細胞型リンパ腫

1. 研究開始当初の背景

これまでに CD30 過剰発現の分子機構につき

解析を行い、Hodgkin リンパ腫(HL)や未分化大細胞型リンパ腫(ALCL)で認められる CD30 プロモーターの強い活性には Ap-1 領域に結

合した JunB による JunB-CD30-JunB という自己活性化ループによる CD30 過剰発現の安定化が重要であることを明らかにした。我々は CD30 過剰発現誘導にはその過程で JunB が誘導され、CD30 プロモーター活性を高めることが重要であり、この機構は HL と ALCL に共通の基盤であることを明らかにした。しかしながら CD30 プロモーターのエピジェネティックな制御や JunB プロモーターの制御機構については全く報告がない。

2. 研究の目的

CD30 プロモーターのメチル化によるエピジェネティックな制御や JunB プロモーターの制御機構の解析を通じて HL や ALCL における CD30 過剰発現の分子機構と分子基盤への関わりを明らかにすることを目的とした。さらにこの分子機構に対する全身性 ALCL の約 50% において認められるキメラ蛋白質 nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK) の寄与についても合わせて検討を行った。以上を通じて CD30 過剰発現リンパ腫である HL や ALCL 発症の分子基盤をさらに解明し新規治療に寄与することを目的とした。

3. 研究の方法

細胞株は HL (L428, KM2, L540, HDLM2, HDMYZ)、ALCL (Karpas299, SUDHL1)、それらとは関連しないもので血液系 (Jurkat, K562, ML1, ML2)、非血液系 (FL, HEK293, HeLa, A549) を用いた。適量の FCS を添加した RPMI1640 もしくは DMEM にてこれらの細胞の培養を行った。

CpG island の同定は、CD30 プロモーター領域のコンピューター解析により、この領域に存在する 2 つの CpG アイランドを同定した。これらの細胞株の CD30 遺伝子プロモーター

領域のメチル化の状態は bisulfite genomic sequencing 法にて解析した。CD30 の発現はノーザンブロット法にて mRNA を、ウエスタンブロット法にて蛋白質を解析した。メチル化の状態 (割合) と CD30 の発現の有無の関係を相関係数の算出により解析した。

メチル化と CD30 発現誘導の関係を検討する為に脱メチル化剤である 5-AzaC を用い、CD30 mRNA の発現誘導を RT-PCR 法により解析した。コントロールとしては β -actin を用いた。5-AzaC による脱メチル化は bisulfite genomic sequencing 法および制限酵素による restriction 解析によって確認した。さらにメチレース処理にて CD30 プロモーターをメチル化した際の CD30 誘導活性の抑制については dual luciferase 法を用いたレポータージーンアッセイ法を用いた解析を行った。

CD30 は JunB により発現が誘導されることが明らかとなっている。CD30 プロモーターのメチル化と JunB の関係を検討しうる為に CD30 と JunB を発現しておらず、かつ CD30 プロモーターが中等度にメチル化されている細胞株 HDMYZ を用いて検討を行った。JunB を恒常的に過剰発現する HDMYZ は JunB の発現ベクターと puromycin 耐性ベクターを lipofectamin により transfection し、puromycin によりセレクションすることにより得た。コントロールとして空ベクターを transfection した HDMYZ を準備した。これらの 2 種類の HDMYZ における CD30 と JunB の発現を免疫染色法により確認し、さらに脱メチル化剤である 5-AzaC を用い、CD30 mRNA の発現誘導を RT-PCR 法により解析した。コントロールとしては β -actin を用いた。さらにメチレース処理にて CD30 プロモーターをメチル化した際の CD30 誘導活性の抑制について、何も導入していない HDMYZ を用い dual luciferase 法を用いたレポータージーンアッセイ法を用いた解析を行った。

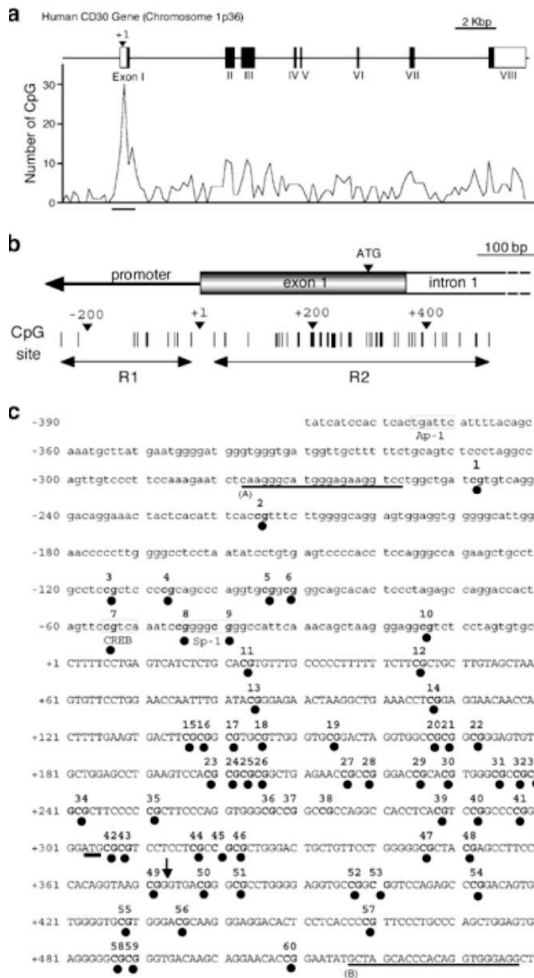
検体を用いたメチル化の検討は HL、ALCL

のホルマリン固定パラフィン包埋検体を用い、レーザーマイクロダイセクション法により腫瘍細胞を切除し、これから DNA を抽出、CD30 遺伝子プロモーター領域のメチル化の状態は bisulfite genomic sequencing 法にて解析した。コントロールとしては正常扁桃を用いた。HL、ALCL、正常扁桃における CD30、JunB の発現は免疫染色法により返答した。

JunB プロモーターの CD30 シグナルあるいは NPM-ALK による誘導機構の解析には、JunB プロモーターの各種 deletion mutant を作製し、dual luciferase 法を用いたレポータージーンアッセイ法を用いた解析を行った。

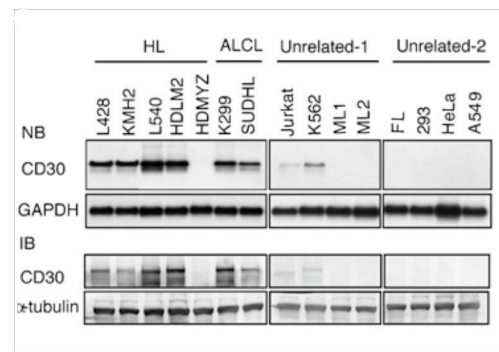
4. 研究成果

(1) CD30 プロモーター領域のコンピューター解析により、この領域に存在する 2 つの CpG island を同定した (a, b)。



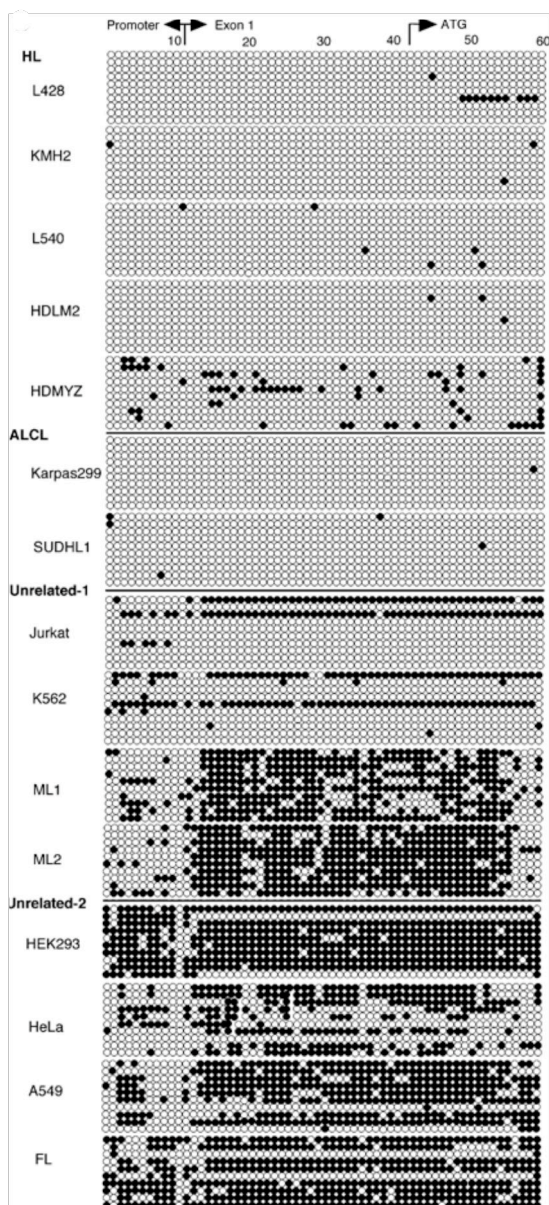
(2) HL および ALCL のほか各種血液および非血液系細胞における CD30 の発現を検討した。

HL (4 種 : L428、KMH2、L540、HDLM2) と ALCL 細胞株 (2 種 : Karpas299、SUDHL1) では高発現、Jurkat と K562 では中等度、HDMYZ のほか他の骨髄系および非血液系細胞では発現を認めなかった。

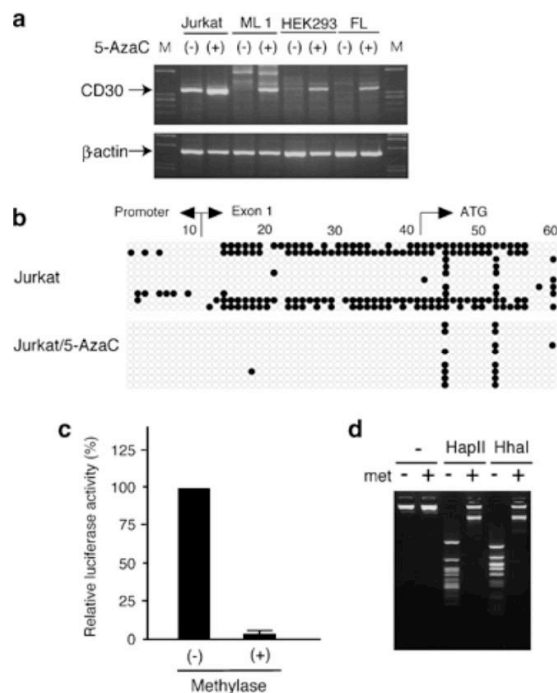


(3) 2 つの CD30 プロモーター CpG island (R1, R2) のメチル化の状態の検討

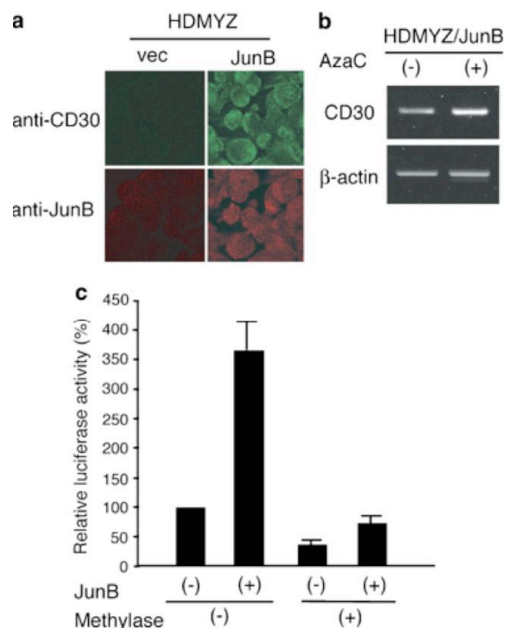
CD30 コアプロモーター領域に存在する 2 つの CpG island (R1, R2) のメチル化の状態を検討した。CD30 を過剰発現している HL (4 種 : L428、KMH2、L540、HDLM2) と ALCL 細胞株 (2 種 : Karpas299、SUDHL1) では低メチル化 (0.8%)、CD30 陽性である細胞株 (2 種 : Jurkat と K562) では中等度メチル化 (18.7%)、CD30 陰性細胞株 (計 7 種 : HDMYZ、ML1、ML2、FL、HEK293、HeLa、A549) では高メチル化 (55.1%) を示した。これらのことから CD30 の発現はメチル化によって抑制されていると考えられた。R1, R2 のメチル化の状態は CD30 陽性細胞株 (8 種 : L428、KMH2、L540、HDLM2、Karpas299、SUDHL1、Jurkat、K562) で 4.9% と 5.3%、CD30 陰性細胞株 (計 7 種 : HDMYZ、ML1、ML2、FL、HEK293、HeLa、A549) で 35.6% と 59.0% といずれにおいても有意な差は無かった。



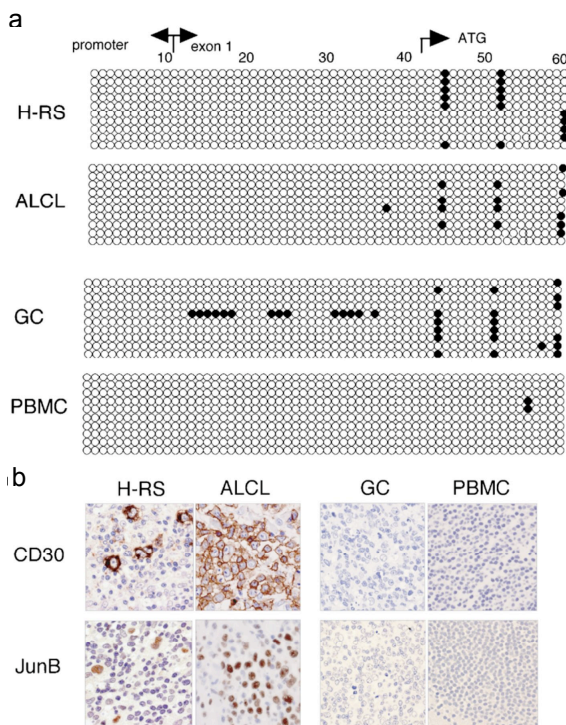
(4) CD30 陰性細胞株を含む 4 種類の細胞株を 5-AzaC 処理したところ PCR 法により CD30 の発現レベルは上昇した (a, b)。さらに CD30 プロモーターのメチル化と CD30 発現について検討するために、ルシフェラーゼベクターにクローニングした CD30 プロモーター (2 つの CpG island を含む CD30 コアプロモーター領域) をメチレースによりメチル化、レポータージーンアッセイによる CD30 プロモーター活性の変化を検討したところ、メチル化により CD30 の誘導は抑制された (c, d)。



(5) 我々はこれまでの検討で HL、ALCL では JunB が過剰発現し、CD30 プロモーターの AP-1 領域を介して CD30 を誘導していることを明らかにしている (a, b)。AP-1 領域は 2 つの CpG island の上流にある。JunB による AP-1 を介した CD30 プロモーター誘導に対する 2 つの CpG island メチル化の影響をレポータージーンアッセイにより検討したところ、メチル化した CD30 プロモーターは JunB による CD30 の誘導を抑制した (c)。



(6)HL および ALCL 検体, 正常リンパ節, 末梢血単核球における CD30 プロモーターのメチル化の検討をしたところ、いずれの検体においても CD30 プロモーターは低メチル化状態であった。このことは正常リンパ球において CD30 プロモーターは低メチル化状態にあり (a)、HL および ALCL に至る過程においても低メチル化状態が維持される、すなわち CD30 プロモーターの転写が維持されていることを示唆している (b)。このことは転写活性が高いプロモーターはメチル化に抵抗性であるのに対し、転写活性が低いプロモーターはメチル化が誘導されやすいという一般的な報告に合致した結果である。



(7)CD30 過剰発現リンパ種における JunB プロモーター活性誘導に重要な上流シグナルの同定をおこなった。JunB のプロモーター領域をクローニングし、5' 端より deletion mutant を作製し、HL 細胞株 L428 と ALCL 細胞株 SUDHL1 における活性誘導について検討を行った。JunB のプロモーターの-146 から -137 に活性に関わるエレメントの存在が示唆され、さらにこの領域に見いだされた 3 つの転写因子結合配列、SP-1、AP-1、Ets-1 の部分に変異を導入して検討した結果、Ets-1 の領域が重要であることが明らかとなった。

JunB プロモーターはこれまでの我々の研究により ERK1/2-MAPK 経路を介して誘導されることが明らかとなっている。Jurkat 細胞を用いて CD30 および NPM-ALK を介した JunB プロモーター活性誘導における ERK1/2-MAPK 経路と Ets-1 の関与を検討した。JunB プロモーター活性誘導は MEK 阻害剤の U01236 によって Ets-1 の存在に依存的に抑制されることが明らかとなった。

さらに HL 細胞株と ALCL 細胞株に発現する CD30 を siRNA によりノックダウンすると JunB プロモーター活性の低下を認め、JunB の発現も抑制された。一方 NPM-ALK を発現する ALCL 細胞株において NPM-ALK を siRNA によりノックダウンすると同様に JunB プロモーター活性の低下と JunB の発現が抑制された。

以上より HL、ALCL における CD30 過剰発現は低メチル化 CD30 プロモーターと Ets-1 を介した JunB の強発現によることが示唆され、正常リンパ球に何らかの原因で CD30 が誘導され恒常的に活性化することが発症に関与していると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① The side population, as a precursor of Hodgkin and Reed-Sternberg cells and a target for nuclear factor-kappaB inhibitors in Hodgkin's lymphoma. Nakashima M, Ishii Y, Watanabe M, Togano T, Umezawa K, Higashihara M, Watanabe T, Horie R. **Cancer Sci.** 101: 2490-6, 2010 (査読有)
- ② Inhibition of active HIV-1 replication by NF-kappaB inhibitor DHMEQ. Miyake A, Ishida T, Yamagishi M, Hara T, Umezawa K, Watanabe T, Horie R. **Microbes Infect.** 12:400-8, 2010 (査読有)
- ③ CD3- and CD4-positive plasmablastic lymphoma: a literature review of Japanese Plasmablastic lymphoma cases. Suzuki Y, Yoshida T, Nakamura N, Kamata H, Kotani S, Ohsaka M, Kajita S, Miyazaki K, Ohtani S, Nakayama M, Horie R, Hayakawa K, Niitsu N, Higashihara M. **Intern Med.** 49:1801-5, 2010 (査読有)
- ④ A case of giardiasis expressing severe

- systemic symptoms and marked hypereosinophilia. Suzuki Y, Nakamura T, Tokoro M, Togano T, Ohsaka M, Kohri M, Hirata Y, Miyazaki K, Danbara M, Horie R, Miura I, Sunakawa K, Higashihara M. **Parasitol Int.** 59:487-9. 2010 (査読有)
- ⑤ Constitutive activity of nuclear transcription factor kappaB is observed in follicular lymphoma. Suzuki Y, Yoshida T, Horie R, Tsuruta T, Togano T, Ohsaka M, Miyazaki K, Danbara M, Ohtani S, Okayasu I, Higashihara M. **J Clin Exp Hematop.** 50:45-50, 2010 (査読有)
- ⑥ Induction of oncogene addiction shift to NF-kB by camptothecin in solid tumor cells. Togano T, Sasaki M, Watanabe M, Makoto Nakashima M, Tsuruo T, Umezawa K, Higashihara M, Toshiki Watanabe T, Horie R. **Biochem Biophys Res Commun.** 390:60-4. 2009 (査読有)
- ⑦ Transient inhibition of NF-kappaB by DHMEQ induces cell death of primary effusion lymphoma without HHV-8 reactivation. Dabaghmanesh N, Matsubara A, Miyake A, Nakano K, Ishida T, Katano H, Horie R, Umezawa K, Watanabe T. **Cancer Sci.** 100:737-46, 2009 (査読有)
- ⑧ CD20-positive T-cell large granular lymphocyte leukemia: case report and review of the literature. Miyazaki K, Ohsaka M, Suzuki Y, Danbara M, Horie R, Higashihara M. **Intern Med.** 48:1443-7, 2009 (査読有)
- ⑨ Lymphoproliferative disorders after immunosuppressive therapy for aplastic anemia: a case report and literature review. Suzuki Y, Niitsu N, Hayama M, Katayama T, Ishii R, Osaka M, Miyazaki K, Danbara M, Horie R, Yoshida T, Nakamura N, Higashihara M. **Acta Haematol.** 121:21-6, 2009 (査読有)
- ⑩ Watanabe M, Ogawa Y, Itoh K, Koiwa T, Kadin ME, Watanabe T, Okayasu I, Higashihara M, Horie R.: Hypomethylation of CD30 CpG islands with aberrant JunB expression drives CD30 induction in Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma. **Lab Invest.** 88 : 48-57, 2008 (査読有)
- ⑪ Watanabe M, Nakashima M, Togano T, Higashihara M, Watanabe T, Umezawa K, Horie R. Identification of the RelA domain responsible for action of a new NF-kappaB inhibitor DHMEQ. **Biochem Biophys Res Commun.** 376:310-314, 2008 (査読有)
- ⑫ Miyake A, Dewan MZ, Ishida T, Watanabe M, Honda M, Sata T, Yamamoto N, Umezawa K, Watanabe T, Horie R.: Induction of apoptosis in Epstein-Barr virus-infected B-lymphocytes by the NF- κ B inhibitor DHMEQ. **Microbes Infect.** 10:748-56. 2008 (査読有)
- ⑬ Yamamoto M, Horie R, Takeiri M, Kozawa I, Umezawa K. Inactivation of NF-kappaB components by covalent binding of (-)-dehydroxymethylepoxyquinomicin to specific cysteine residues. **J Med Chem.** 51:5780-5788. 2008 (査読有)
- [学会発表] (計 4 件)
- ① Affect of aberrant T cell antigen expression on DLBCL patients' background and prognosis. Suzuki, Y., (13 名) Horie R, Higashihara M. 第 72 回日本血液学会総会 2010 09 25 横浜
- ② Identification of the RelA domain responsible for the action of a new NF-kB inhibitor DHMEQ. Ryouichi Horie, (3 名) Masaaki Higashihara, Toshiki Watanabe, Kazuo Umezawa 第 71 回日本血液学会学術総会 2009 10 23 京都
- ③ CD30 プロモーターメチル化と JunB を介した CD30 誘導機構の解析 堀江良一, (7 名) 東原正明 第 6 7 回日本癌学会学術総会 2008 10 30 名古屋
- ④ 難治性リンパ系悪性腫瘍における NF- κ B シグナル伝達への阻害剤の応用 堀江良一 第 1 2 回がん分子標的治療学会 シンポジウム招待講演 2008 06 28 東京
- [図書] (計 2 件)
- ① 堀江良一 みんなに役立つ悪性リンパ腫の基礎と臨床 押味和夫 編 リンパ腫微小環境 68-69 医薬ジャーナル社
- ② 堀江良一 病理診断に役立つ分子生物学 金井弥栄、石川俊平、池田栄一 編 病理と臨床 臨時増刊号 29 138-141 文光堂
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
堀江良一 (HORIE RYOUICHI)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号 : 80229228
- (2) 研究分担者
東原正明 (HIGASHIHARA MASA AKI)
北里大学・医学部・教授
研究者番号 : 80165084