

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590433

研究課題名(和文) LMP-1によるCD30誘導の解析にもとづくホジキンリンパ腫発症の分子機構の解明

研究課題名(英文) Analyses of molecular bases by LMP-1 and CD30, which mediate transformation of lymphocytes to Hodgkin lymphoma cells

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Hodgkinリンパ腫(HL)はほとんどがB細胞、一部T細胞に由来する腫瘍であるが、正常リンパ球がどのような機序で腫瘍化し、HL特有の分子基盤を獲得するかは明らかではない。約50%の症例ではEpstein-Barrウイルス(EBウイルス)の感染が報告されており、HL発生に至る重要な原因と考えられている。本研究では正常リンパ球がEBVによりトランスフォームする過程で、LMP-1を介してHL細胞の増殖の分子基盤であるCD30-ERK1/2-Ets-1-JunB-CD30に加えCD30-NF- $\kappa$ B-CD40-NF- $\kappa$ Bループを獲得することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recent studies indicated that Hodgkin lymphoma (HL) cells derive mostly from B cells and very rarely from T cells. However it is unclear how normal lymphocytes transform and acquire molecular bases characteristic for HL. Epstein-Barr virus (EBV) infection is found in about half of HL cases, thereby thought to be an important mediator of the transformation. In this study, we indicated EBV infection triggers expression of LMP-1, which mediates activation of CD30-ERK1/2-Ets-1-JunB-CD30 and CD30-NF- $\kappa$ B-CD40-NF- $\kappa$ B. The results indicate important roles of EBV for acquisition of biological bases of HL.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：ホジキンリンパ腫 EBウイルス LMP-1 JunB CD30

## 1. 研究開始当初の背景

我々は tumor necrosis factor receptor (TNFR) ファミリーに属する CD30 の過剰発現が転写因子 NF- $\kappa$ B と AP-1 の恒常的活性化を介して Hodgkin リンパ腫 (HL) の増殖や HL における CD30 自身の過剰発現に関わっている事を明らかにしてきた。しかしながら、正常リンパ球が HL という腫瘍に至る過程で、どのようなステップを経て図 1 に示す HL の分子基盤を獲得するのかという疑問を持つに至った。上記の疑問に答えるためには、正常リンパ球が何らかの因子により HL にトランスフォームしていく過程を、段階を追って「各分子の活性化とそれによる脱制御の連鎖」として分子病理学的に解明することが必要であると考えた。我々はこの「何らかの因子」を想定する際に、正常リンパ球をトランスフォームし、HL 発症に深く関わる事が知られる Epstein-Barr ウイルス (EBV) に着目した。EBV は HL の 40-60% で検出され HL 発症に関わると考えられている。

## 2. 研究の目的

HBV ウイルス感染による B 細胞の EB ウイルス陽性リンパ芽球様細胞株 (LCL) へのトランスフォーメーションの過程で誘導された latent membrane protein (LMP)-1 と CD30、CD40、NF- $\kappa$ B、AP-1 (JunB) の分子クロストークを、「各分子の活性化とそれによる脱制御の連鎖」として解析する事により HL の発症に至る分子機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

末梢血リンパ球に EBV 産生細胞株 B95.8 の上清を用いて EBV を感染させ、シクロスポリンによる免疫抑制下において LCL にトランスフォームさせる。予備実験では約 1 月で LCL へとトランスフォームすることが確認できている。

LCL へとトランスフォームしていく過程での LMP-1、CD30、CD40、JunB の誘導と NF- $\kappa$ B、extracellular signal regulated kinase 1/2 mitogen activated kinase (ERK1/2MAPK) 活性化を検討する。感染細胞の同定は蛍光免疫染色による LMP-1 の発現により、これと CD30、CD40、JunB、活性化型 NF- $\kappa$ B (RelA)、活性化型 ERK1/2MAPK (リン酸化型) に対する抗体を用いた 2 重染色を行い、蛍光顕微鏡により発現の検討を行う。感染前、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間のポイントにおいて解析を行うと同時に、DAPI による核染色も同時に行い、細胞や核の大きさの変化も検討する。

さらに HL への分子基盤へシフトしていく

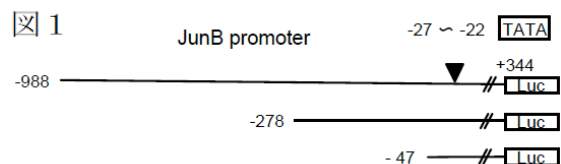
引き金となると考えられる、EBV により誘導される LMP-1 による JunB の誘導メカニズムを解析する。CD30 による JunB 誘導機構についてもあわせて解析を行う。

EBV 感染細胞 Raji より RNA を抽出し、cDNA を合成、LMP-1 全長領域を PCR 法を用いて増幅、サブクローニング、発現ベクター pME18S に組み込む。JunB プロモーターは HL 細胞株より PCR よりクローニングを行いルシフェラーゼベクターに組み込んだ。CD30、CD40、JunB の発現ベクターも LMP-1 と同様に pME18S に組み込んで作製する。CD30 および CD40 プロモーターは既に作製してあるものを用いた。LMP-1 による JunB 誘導、JunB 誘導機構および CD30-JunB-CD30 活性化ループとのクロストークの解析はレポータージーンアッセイや阻害剤、siRNA などを用いた系により行う。

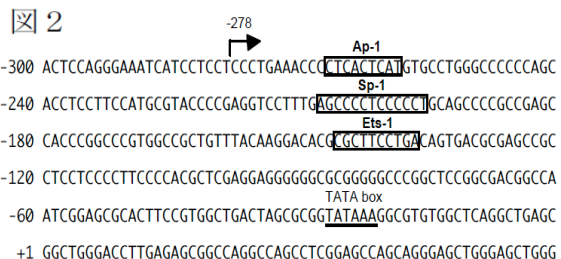
## 4. 研究成果

B 細胞が EBV によりトランスフォーメーションする過程で、LMP-1 が ERK1/2 を介して JunB を誘導し、HL 細胞の増殖の分子基盤である CD30-ERK1/2-JunB-CD30 が誘導されることを見いだした。

一方 HL 細胞株を使用した実験で、(1) JunB プロモーター活性維持に必要な領域に Ets-1 結合配列があることが明らかとなった。図に示す JunB プロモーターの deletion コンストラクトを作製して HL 細胞株に導入して活性の変化を検討すると -278 と -47 の間に有為な減少を認め、この領域が JunB 誘導に関与していることが示唆された (図 1)。



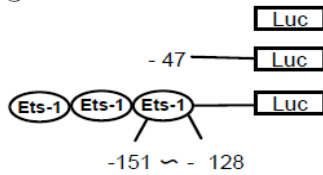
この領域の塩基配列を以下に示す。配列のコンピューター検索にて AP-1、Sp-1、Ets-1 の転写因子結合領域が存在していることが明らかとなった (図 2)。



おのおのに変異を導入して検討した結果

Ets-1 結合部位が JunB プロモーター誘導に重要であることが示唆された。そこで Ets-1 結合部位をコアプロモーターに直接結合させたコンストラクト (図 3) を用いて検討した。

図 3

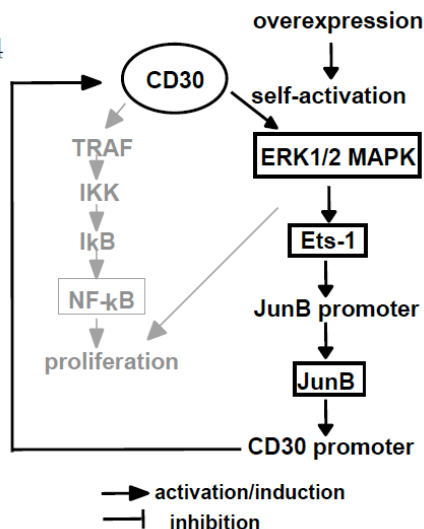


Ets-1 をタンデムにコアプロモーターに結合させたものは HL 細胞株において他のコンストラクトより高いプロモーター活性を示した。これらのことから JunB プロモーター活性維持に必要な領域に Ets-1 結合配列があることが明らかとなった。

さらに(2)CD30 を介した JunB 誘導は ERK1/2 の阻害剤あるいは Ets-1 の siRNA によるノックダウンにより抑制されること、(3) Ets-1 結合配列には Ets-1 が結合していること、(4) HL 細胞株および臨床検体において核に Ets-1 が発現していること、(5) Ets-1 を siRNA を用いてノックダウンすると JunB および CD30 の発現が低下すること、が明らかとなった。活性化ループは CD30 により活性化された ERK1/2 を介した転写因子 Ets-1 活性化による JunB プロモーター誘導を介して形成されることを示唆する。

CD30 はこのように ERK1/2 を介した転写因子 Ets-1 誘導による JunB プロモーターの活性化による CD30-ERK1/2-JunB-CD30 ループの形成による過剰発現の安定化に加えて、TRAF を介した NF- $\kappa$ B の活性化や ERK1/2 そのものの誘導が細胞の増殖や不死化、腫瘍化を支えている物と考えられた (図 4)。

図 4



さらに、LMP-1 が CD30 および CD40 プロモーター活性化にそれぞれ nuclear factor  $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B)、extra cellular signal regulated kinase (ERK)1/2 を介して関与することを示唆する結果を得た。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① 堀江良一. ホジキンリンパ腫と未分化大細胞型リンパ腫における CD30 過剰発現機構 血液内科 査読無 2014 印刷中
- ② Watanabe M, Umezawa K, Higashihara M, Horie R. Combined inhibition of NF- $\kappa$ B and Bcl-2 triggers synergistic reduction of viability and induces apoptosis in melanoma cells. *Oncol Res.* 査読有 2014;21(4):173-80. doi: 10.3727/096504014X13887748696707
- ③ Togano T, Watanabe M, Itoh K, Umezawa K, Masuda N, Higashihara M, Horie R. Activation of Akt involves resistance to NF- $\kappa$ B inhibition and abrogation of both triggers synergistic apoptosis in lung adenocarcinoma cells. *Lung Cancer.* 査読有 83: 139-145. 2014 doi: 10.1016/j.lungcan.2013.10.018.
- ④ 堀江良一. Hodgkin リンパ腫の発症・維持における炎症の役割 査読無 血液内科 67: 460-466. 2013 <http://www.kahyo.com/item/KS201310-674>
- ⑤ Horie R. Molecularly-targeted strategy and NF- $\kappa$ B in lymphoid malignancies. *J Clin ExpHematop.* 査読有 53(3):185-95. 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24369220>
- ⑥ Horie R. Current Molecular Targets of Lymphomas. *Forum Immun Dis Ther.* 査読無 4(1): 11-23. 2013. doi: 10.1615/ForumImmunDisTher.2013008322
- ⑦ Suzuki Y, Yoshida T, Wang G, Aoki T, Katayama T, Miyamoto S, Miyazaki K, Iwabuchi K, Danbara M, Nakayama M, Horie R, Nakamine H, Sato Y, Nakamura N, Niitsu N. Incidence and Clinical Significance of Aberrant T-Cell Marker Expression on Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cells. *Acta Haematol.* 査読有 130: 230-237. 2013. doi: 10.1159/000348550.
- ⑧ Togano T, Nakashima M, Watanabe M, Umezawa K, Watanabe T, Higashihara M, Horie R. Synergistic effect of 5-azacytidine and NF- $\kappa$ B inhibitor DHMEQ on apoptosis induction in myeloid leukemia cells. *Oncol Res.* 査読有 20(12):571-7. 2012 doi:

10.3727/096504013X13775486749371.

- ⑨ Aoki T, Miyazaki K, Katayama T, Watanabe M, Horie R, Danbara M, Higashihara M. Surface CD3 expression proceeds through both myosin regulatory light chain 9 (MYL9)-dependent and MYL9-independent pathways in Jurkat cells. *J Smooth Muscle Res.* 査読有 48(5-6):137-47. 2012 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23538510>
- ⑩ Takeiri M, Horie K, Takahashi D, Watanabe M, Horie R, Simizu S, Umezawa K. Involvement of DNA binding domain in the cellular stability and importin affinity of NF- $\kappa$ B component RelB. *Org Biomol Chem.* 査読有 10(15):3053-9. 2012 doi: 10.1039/c2ob07104e.
- ⑪ Watanabe M, Nakano K, Togano T, Nakashima M, Higashihara M, Kadin M. E., Watanabe T, Horie R. Targeted Repression of Overexpressed CD30 Downregulates NF- $\kappa$ B and ERK1/2 Pathway in Hodgkin Lymphoma Cell Lines. *Oncol Res.* 査読有 19(10-11):463-9. 2012 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22715589>
- ⑫ Suzuki Y, Yoshida T, Wang G, Togano T, Miyamoto S, Miyazaki K, Iwabuchi K, Nakayama M, Horie R, Niitsu N, Sato Y, Nakamura N. Association of CD20 levels with clinicopathological parameters and its prognostic significance for patients with DLBCL. *Ann Hematol.* 査読有 91(7):997-1005. 2012 doi: 10.1007/s00277-012-1407-4.
- ⑬ Watanabe M, Itoh K, Togano T, Kadin ME, Watanabe T, Higashihara M, Horie R. Ets-1 activates overexpression of JunB and CD30 in Hodgkin's lymphoma and anaplastic large-cell lymphoma. *Am J Pathol.* 査読有 180(2):831-8. 2012 doi: 10.1016/j.ajpath. 2011. 10. 007.
- ⑭ Suzuki Y, Shichishima T, Yamashiro Y, Kimura H, Ishii R, Miyazaki K, Horie R, Moriya T, Hattori Y. A patient with acute lymphoblastic leukaemia presenting with an extremely high level (21.0%) of HbA(1c). *Ann Clin Biochem.* 査読有 48(Pt 5):474-7. 2011. doi: 10.1258/acb.2011.010121.
- ⑮ Watanabe M, Shibuya A, Tsunoda Y, Danbara M, Ishii R, Ohsaka M, Takada J, Tanaka Y, Okuwaki Y, Minamino T, Hidaka H, Nakazawa T, Horie R, Higashihara M, Koizumi W. Re-appearance of hepatitis B virus following therapy with rituximab for lymphoma is not rare in Japanese patients with past hepatitis B virus infection. *Liver Int.* 査読有 31(3):340-7. 2011. doi:10.1111/j.1478-3231.2010.02417.x.
- ⑯ Nakashima M, Ishii Y, Watanabe M, Togano T, Umezawa K, Higashihara M, Watanabe T, Horie R. The side population, as a precursor of Hodgkin and Reed-Sternberg cells and a target for nuclear factor- $\kappa$ B inhibitors in Hodgkin's lymphoma. *Cancer Sci.* 査読有 101(11):2490-6. 2011. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01693.x.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 堀江良一、渡邊真理子、伊藤金次、梶野富輝、KADIN Marshall E、渡邊俊樹、東原正明: Hodgkin リンパ腫と未分化大細胞型リンパ腫における CD30 過剰発現機構の解析. 第 53 回日本リンパ網内系学会総会 2013. 5. 17-18 京都
- ② 堀江良一、渡邊真理子、中野和民、梶野富輝、Marshall E. Kadin、渡邊俊樹、東原正明: CD30 repression triggers global gene responses and anti-proliferative effects in Hodgkin lymphoma. 第 75 回日本血液学会学術集会、2013. 10. 12 札幌
- ③ 山川奈津子、横山和明、Jun Lu、今留謙一、渡辺俊樹、堀江良一、穂積勝人、八幡崇、安藤潔、中村直哉、幸谷愛: The regulation of 'inflammatory niche' with tumor derived small RNAs. 第 75 回日本血液学会学術集会、2013. 10. 11 札幌
- ④ 堀江良一、渡邊真理子、伊藤金次、梶野富輝、Kadin E Marshall、渡邊俊樹、東原正明: Hodgkin リンパ腫と未分化大細胞性リンパ腫における CD30 過剰発現機構の解析. 第 74 回日本血液学会学術集会 2012. 10. 21 京都
- ⑤ Ai Kotani, Jun Lu, Toshiki Watanabe, Ryoichi Horie, Kiyoshi Ando, Naoya Nakamura. The function of small RNAs conjugated in exosome in inflammatory niche of EBV positive lymphoma. 第 74 回日本血液学会学術集会 2012. 10. 20 京都
- ⑥ 堀江良一、中島誠、渡邊真理子、梶野富輝、梅澤一夫、渡邊俊樹、東原正明: Hodgkin リンパ腫の前駆細胞における分子基盤の解析と分子標的療法の基礎的検討. 第 73 回日本血液学会学術集会、2011. 10. 15 名古屋

- ⑦堀江良一, 中島誠, 石井有実子, 渡邊真理子, 梅野富輝, 渡邊俊樹, 梅澤一夫, 東原正明: Side population は Hodgkin, Reed - Sternberg 細胞の前駆細胞集団で NF -  $\kappa$  B 阻害薬 DHMEQ の標的となる。第 51 回日本リンパ網内系学会総会 2011. 7. 1-2 福岡
- ⑧井上優希, 中村直哉, 阿部幸一郎, 豊嶋孝恵, 堀江良一, 渡邊俊樹, 安藤潔, 幸谷愛: EBV 陽性リンパ腫微小環境における分泌性 EBV コード miRNA. 第 73 回日本血液学会学術集会, 2011. 10. 15 名古屋

[図書] (計 2 件)

- ① 堀江良一 他. 羊土社 実験医学増刊 Vol. 30 No. 5 2012 224(212-218)
- ② 堀江良一 他. 文光社 病理と臨床 Vol. 29 2011 年臨時増刊号 2011 545 (138-141)

## 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