

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460440

研究課題名(和文) ホジキンリンパ腫におけるCD30によるHSP90誘導を介したシグナル伝達制御

研究課題名(英文) Signal integration by CD30 through HSP90 in classical Hodgkin lymphoma

研究代表者

堀江 良一 (Horie, Ryouichi)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：80229228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：CD30によるheat shock protein (HSP)90の誘導機構の解析を通し、ホジキンリンパ腫(HL)細胞で病態と関わるシグナル伝達経路との関係を検討、anaplastic lymphoma kinase(ALK)陽性未分化大細胞型リンパ腫(ALCL)と比較した。CD30はHSP90の誘導を通してHL細胞において恒常的に活性化し、病態と関わりとされるNF- $\kappa$ B、ERK、AKT、JAK-STAT経路のシグナルを増強して横断的に統合する機能を果たし、HLの病態への関与が示唆された。一方、ALK陽性ALCLではこの機能はALKによるHSP90誘導により代替されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although classical Hodgkin lymphoma (cHL) cells bear deregulation of multiple signaling pathways, the mechanisms of how these pathways are integrated are not fully understood. We show involvement of CD30 in this process. CD30 facilitates phosphorylation of heat shock protein factor (HSF)1 and induces heat shock protein (HSP) 90 via JNK. CD30 repression and subsequent inhibition of HSP90 suppresses NF- $\kappa$ B, ERK/MAPK, AKT, and STAT pathways in cHL cell lines. Thus CD30 mediated induction of HSP90 appears to serve as a central hub for integration of intracellular signaling in cHL cells. Although anaplastic large cell lymphoma (ALCL) is associated with CD30 overexpression, our experiments reveal that HSP90 induction in ALCL bearing NPM-ALK does not depend on CD30 but instead on ALK via JNK. Together these results highlight a novel role for CD30 in mediating integration of signaling pathways of cHL cells while being replaced in this function by ALK in ALCL cells.

研究分野：がん、細胞生物学、分子標的療法

キーワード：ホジキンリンパ腫 HSP90 CD30 未分化大細胞型リンパ腫 ALK シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

我々は CD30 過剰発現とリガンド非依存的自己活性化による恒常的シグナルが NF- $\kappa$ B 活性化や ERK 活性化を通してホジキンリンパ腫 (HL) 細胞の増殖や生存の分子基盤に重要な役割を果たしていることを報告してきた。一方、HL 細胞は NF- $\kappa$ B や ERK 以外のシグナル伝達系、例えば AKT や JAK-STAT など複数のシグナル伝達系の活性化を通して生存、増殖していることも報告されている。我々はこれまでの報告が単一シグナル経路の重要性を強調するあまり、HL 細胞においてこのような複数のシグナル伝達経路がどのような形で増殖や生存に関与しているかという視点からの研究はなされていないことに注目した。腫瘍細胞の増殖や生存の分子基盤は、重要と考えられる単一シグナル伝達経路の報告の積み上げのみにより理解できるのではなく、実際に腫瘍細胞の中で恒常的に活性化しているシグナル伝達系のクロストークを明らかにすることで俯瞰的に理解していくことが重要であると考えた。

その過程で、恒常的な CD30 シグナルは直下にある NF- $\kappa$ B 活性化や ERK 活性化以外の、HL においてこれまで重要と報告されている AKT や JAK-STAT などのシグナル伝達系とクロストークしうるのか？するとすればどのようなメカニズムによるものなのか？という疑問に直面した。我々はランダムな漠然としたクロストークというよりは、鍵となる分子が CD30 の恒常的なシグナルにより誘導され、この鍵となる分子を介して複数のシグナル伝達系がクロストークするというモデルを考えた。もしこのようなモデルが明らかになれば、これまで我々が報告してきた HL 細胞における CD30 過剰発現とリガンド非依存的自己活性化による恒常的シグナル伝達の重要性が大きく展開し、NF- $\kappa$ B 活性化や ERK 活性化のみならずクロストークを介して、これまで HL において重要と報告されている AKT や JAK-STAT などのシグナル伝達系にも影響し、HL の増殖や生存の分子基盤が「CD30-恒常的シグナル-鍵分子の誘導-HL 細胞における重要なシグナル伝達経路の統括的制御」という全く新しいモデルにより理解される可能性があると考えた。

## 2. 研究の目的

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 (JunB) の恒常的活性化を介して 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。heat shock protein 90 (HSP90) は分子シャペロンとしての機能を有し、種々のシグナル伝達系の鍵となる分子やそのリン

酸化を保護し、腫瘍細胞の増殖シグナルの恒常的な維持に重要な役割を果たしていることが報告されている。我々は予備実験で CD30 シグナルが HSP90 の発現を誘導することを発見した。このことは CD30 が HSP90 の誘導を介して様々なシグナル伝達経路のクロストークを維持し、HL 特有の分子基盤を維持している可能性を示唆する。本研究は CD30 シグナルによる HSP90 を介した「HL における重要なシグナル伝達経路：NF- $\kappa$ B, ERK, AKT, JAK-STAT 等のクロストークを明らかにする」ことにより、HL におけるシグナル伝達の脱制御を「従来のような単一経路の積み上げによる説明ではなく、クロストーク機構により俯瞰的に明らかにする」ことを目標とする新たな試みである。

## 3. 研究の方法

HL 細胞株：KMH2、L428、HDLM2、L540、anaplastic lymphoma kinase (ALK) 陽性未分化大細胞型リンパ腫 (ALCL) 細胞株：Karpas299、SUDHL1 はいずれも German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) より入手した。ヒト羊膜由来 FL (Fogh and Lund) および Jurkat 細胞は JCRB 細胞バンクより入手した。CD30 による HSP90 誘導および NF- $\kappa$ B, ERK, AKT, JAK-STAT 活性化への関与の実験は (1) FL 細胞にリポフェクション法により CD30 発現ベクターを導入して作製した、恒常的に CD30 を過剰発現した細胞株 FL-CD30、(2) HL および ALCL 細胞株の CD30 などの標的分子に対する siRNA を nucleofector (AMAXA) を使用して導入、ノックダウンした細胞を用いて各種リン酸化タンパク質を検出する抗体を用いたウエスタン法により検討した。

CD30 や ALK による HSP90 誘導機構の解析には HSP90 プロモーター内の heat shock promoter element (HSE) を pGL3 basic ベクターにつなげて作製したレポーターを用いた。

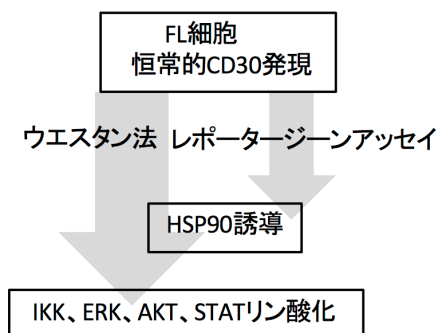
CD30 による HSP90 誘導に関与する分子の解析では CD30 下流に位置するシグナルなる伝達系の阻害剤を用いて、ウエスタン法やレポーター遺伝子アッセイ法を用いた。必要に応じて各種抗体を使用した免疫蛍光染色法、免疫組織染色法をあわせて用いた。

## 4. 研究成果

FL-CD30 およびコントロールである空ベクターが入っている FL-vec において HSP90 および IKK, ERK, AKT, STAT のリン酸化を検出するウエスタン法を施行した。FL-CD30 ではこれらの分子の発現が増強し、一方、レポーター遺伝子アッセイ法では CD30 は HSP90 のプロモーター活性を誘導することが示された (図 1)。以上から CD30 は HSP90 を誘導すると同時に NF- $\kappa$ B, ERK, AKT, JAK-STAT の活性化を

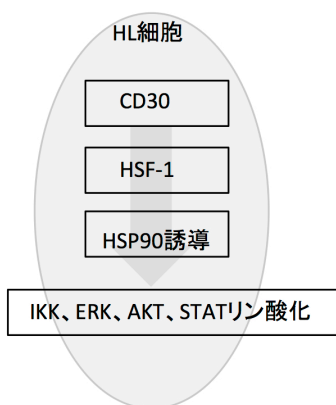
増強することが示唆された。

図 1



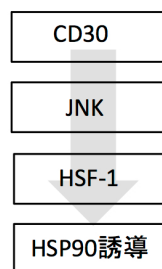
HL 細胞株において CD30 をノックダウンして HSP90 およびリン酸化した IKK、ERK、AKT、STAT を検出するウエスタン法を行ったところ、これらの分子の発現が抑制された。さらに HSP90 の阻害剤であるゲルダナマイシンを用いてもリン酸化した IKK、ERK、AKT、STAT は抑制された。さらにウエスタン法で解析すると FL-CD30 では HSP90 の HSE に結合して発現を誘導する heat shock factor (HSF)-1 のリン酸化の増強を認め、HL 細胞株において CD30 をノックダウンするとリン酸化 HSF-1 の発現は抑制された (図 2)。以上の事から HL 細胞において CD30 は HSF-1 の活性化を介して HSP90 を誘導して NF- $\kappa$ B、ERK、AKT、JAK-STAT の活性化を増強していることが示唆された。

図 2



FL-CD30 を CD30 の下流と考えられる IKK、ERK/MAPK、AKT、JNK、p38/MAPK の阻害剤で処理して HSP90 の発現をレポーター遺伝子アッセイ法により解析したところ、JNK の阻害剤が HSP90 の発現を有意に抑制した。JNK の阻害によりリン酸化 HSF-1 および HSP90 の発現は FL-CD30、HL 細胞株いずれにおいても抑制された。以上のことから CD30 による HSP90 の誘導は JNK-HSF-1 を介していることが示唆された (図 3)。

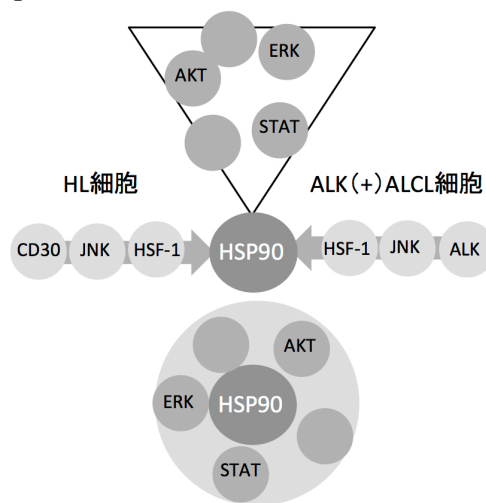
図 3



一方、ALK 陽性 ALCL 細胞株で CD30 をノックダウンして HSP90 の発現への影響をウエスタン法で検討したが、影響は明らかではなかった。一方、ALK の阻害剤は HSP90 の発現を抑制し、リン酸化 HSF-1 の低下を伴っていた。

以上のことから CD30 は HSP90 の誘導を通して、HL 細胞において恒常的に活性化し、増殖や生存の分子基盤に関わる NF- $\kappa$ B、ERK、AKT、JAK-STAT シグナルを横断的に統合する機能を果たし、HL の病態に関与していることが示唆された。一方 ALK 陽性 ALCL では、この機能は ALK により代替されていることが示唆された (図 4)。

図 4



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Watanabe M, Nakano K, Kadin ME, Higashihara M, Watanabe T, Horie R. CD30 induces heat shock protein 90 and signal integration in classic Hodgkin lymphoma cells. 査読有 Am J Pathol. 187(1):163-175. 2017. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.09.007.
- ② Ishida T, Yokoyama M, Danbara M, Michisita Y, Horie R, Higashihara M, Miyazaki K. Successful treatment with ibrutinib of intractable thrombocytopenia associated with recurrent chronic

lymphocytic leukemia. 査読有 The Kitasato Medical Journal 47(1):81-86. 2017.

③ Toda T, Watanabe M, Kawato J, Kadin ME, Higashihara M, Kunisada T, Umezawa K, Horie R. Brefeldin A exerts differential effects on anaplastic lymphoma kinase positive anaplastic large cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma cell lines. 査読有 Br J Haematol. 170(6): 837-846. 2015. doi:10.1111/bjh.13508.

④ Miyazaki K, Koike Y, Kunishima S, Ishii R, Danbara M, Horie R, Yatomi Y, Higashihara M. Immature platelet fraction measurement is influenced by platelet size and is a useful parameter for discrimination of macrothrombocytopenia. 査読有 Hematology. 20(10):587-592. 2015. doi:10.1179/1607845415Y.0000000021.

〔学会発表〕(計6件)

① Makoto Nakashima, Tadanori Yamochi, Mariko Watanabe, Atae Utsunomia, Masaaki Higashihara, Kaoru Uchimar, Toshiki Watanabe, Ryouichi Horie. The emergence of hyperploid cells in CD30+ subpopulation of adult T-cell leukemia. 第78回日本血液学会、2016.10.13 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

② 堀江良一、渡邊真理子、内丸薫、中野和民、Marshall E. Kadin、渡邊俊樹、東原正明. 古典的Hodgkinリンパ腫におけるCD30を介したHSP90誘導とシグナル統合機構の解析第56回日本リンパ網内系学会、2016.9.1-3(誌上发表) ホテル日航熊本(熊本県熊本市)

③ 中島誠、矢持忠徳、渡邊真理子、内丸薫、宇都宮與、東原正明、渡邊俊樹、堀江良一. 成人T細胞性白血病におけるCD30陽性集団に高倍数体細胞は出現する 第3回日本HTLV-1学会学術集会、2016.8.27 鹿児島県市町村自治会館(鹿児島県鹿児島市)

④ Ryouichi Horie, Takashi Toda, Mariko Watanabe, Junji Kawato, Marshall E. Kadin, Kazuo Umezawa, Masaaki Higashihara: Differential effects of Brefeldin A on ALK positive anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. 第77回日本血液学会、2015.10.16 石川県立音楽堂(石川県金沢市)

⑤ 堀江良一、戸田崇史、渡邊真理子、河戸淳仁、梅澤一夫、東原正明: ALK陽性未分化大細胞型リンパ腫と古典的Hodgkinリンパ腫細胞株に対して異なる感受性を示す薬剤の探索とBrefeldin Aの同定 第55回日本リンパ網内系学会総会、2015.6.20 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

⑥ 堀江良一: Hodgkinリンパ腫細胞の分化と

癌幹細胞. シンポジウム III 「Hodgkinリンパ腫の分子機構の解明と新たな治療戦略」第54回日本リンパ網内系学会総会、2014.6.20 山形国際ホテル(山形県山形市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀江 良一 (HORIE RYOUICHI)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号: 80229228