

学内グラント 終了時報告書

平成21年度 学内グラント報告書

ホジキンリンパ腫における転写因子 NF- κ B 分子の細胞質—核内振動の役割

研究代表者 豊住 康夫(埼玉医科大学 総合医療センター 病理部)

 研究分担者 田丸 淳一¹⁾, 東 守洋¹⁾, 木崎 昌弘²⁾

【緒言】

NF- κ Bは炎症, 細胞増殖, アポトーシスなど生命のさまざまな機能を担う転写因子であり, その異常は悪性腫瘍, とりわけリンパ球系細胞においてその腫瘍化をひきおこす. NF- κ B阻害剤はリンパ球系腫瘍の分子標的治療薬として注目されている¹⁾. ホジキンリンパ腫はB細胞由来の悪性腫瘍であり²⁾, ホジキンリンパ腫において知られている遺伝子異常のほとんどはNF- κ Bの異常活性化に帰結される³⁻⁵⁾(図1). これらの細胞内シグナルは他のリンパ球系悪性腫瘍とも共通しており何がホジキンリンパ腫を特徴付けるもっとも重要な異常なのかは未だ解明されていない. またNF- κ Bは約300種の分子発現を調節しており, このなかには細胞の増殖をひきおこすシグナルとアポトーシスを誘導するシグナルという相反した機能も有する⁶⁾. この多面的な機能がいかに調節されているかも明らかとなっていない. NF- κ Bの活性は, おもにその抑制因子であるI κ Bにより調節されている⁷⁾. I κ BはIKKによりリン酸化され, リン酸化されたI κ Bはユビキチン—プロテアソーム系で分解される. この結果, NF- κ Bは核へ移行しDNAと結合可能となる. I κ Bはまた, NF- κ Bにより転写調節されている. すなわちI κ BはNF- κ Bのネガティブフィードバック経路として働く⁸⁾. このためNF- κ B-I κ B複合体は図2のように細胞質—核内移動を繰り返す“oscillation”(振動)という現象がみられることが明らかになってきた⁹⁾. 近年, この現象はシステム生物学的研究によるシミュレーションを含めて詳細に検討され, oscillationのパターンの違いにより転写される遺伝子群に違いがあることが示されてきた. 本研究ではホジキンリンパ腫におけるNF- κ Bシグナル伝達機構の重要性について検討するため, シグナル

経路構成分子の発現と活性化について検討し, さらにNF- κ Bのoscillationについて検討することを目的とした.

【材料と方法】

①ホジキンリンパ腫培養細胞株におけるNF- κ Bシグナル伝達経路構成分子の発現

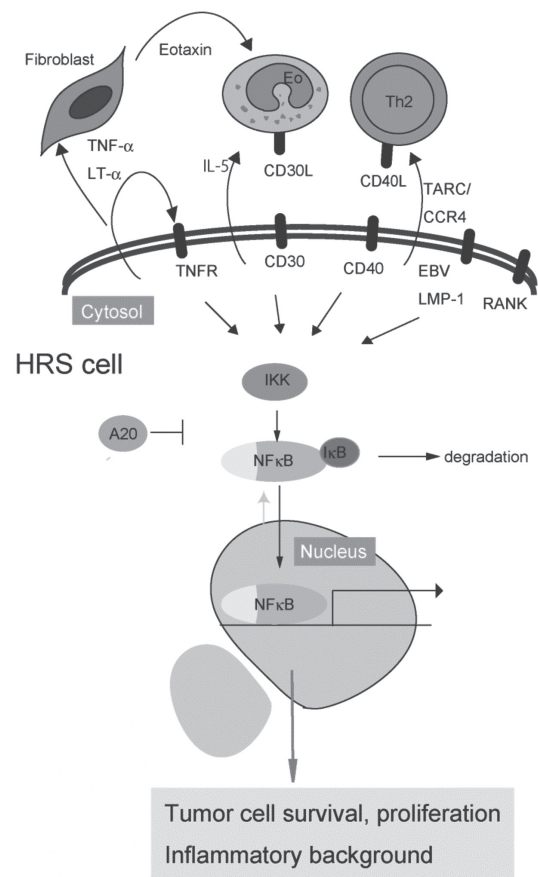


図1. ホジキンリンパ腫とNF- κ Bシグナリング. 種々のシグナルがNF- κ B活性化に帰結する.

1) 埼玉医科大学 総合医療センター 病理部
 2) 埼玉医科大学 総合医療センター 血液内科

ホジキンリンパ腫培養細胞株4種(HDLM-2, L540, KM-H2, L428細胞)と対照として4種の非ホジキンリンパ腫細胞株を用いWestern Blotで検討した. 用いた抗体はI κ B α , p65, phospho-p65, c-Rel, p105, hMAML-1, hMAML-2, hMAML-3. それぞれ培養細胞をLaemli's bufferでタンパク抽出後, 30 ugをアプライしSDS-PAGE, PVDF膜に転写後行った.

②ホジキンリンパ腫培養細胞株におけるNF-kBの細胞内局在の検討1

c-Relに対する抗体を用い, 各種培養細胞株のセルブロックを作成し, 免疫染色で検討した.

③ホジキンリンパ腫培養細胞株におけるNF-kBの細胞内局在の検討2

ホジキンリンパ腫培養細胞株からのタンパクを核画分, 細胞質画分にわけWestern blotで検討した.

④ホジキンリンパ腫培養細胞株におけるNF-kB活性の検討

NF-kB binding siteの合成オリゴDNAをprobeとし, electromobility shift assay (EMSA) でNF-kBの活性状態を検討した.

【結果】

①ホジキンリンパ腫培養細胞株4種のうちHDLM-2, KM-H2, L428にはI κ B α の発現が見られなかった. その他のNF-kBシグナル経路構成分子(p65, phospho-p65, c-Rel, p105, hMAML-1, hMAML-2, hMAML-3)はいずれも発現が見られた.

②ホジキンリンパ腫培養細胞株におけるNF-kBの細胞内局在の検討1

c-Relに対する抗体を用い, 各種培養細胞株のセル

ブロックを作成し, 免疫染色で検討した(図2). いずれの細胞株でもWestern blotと同様, c-Relの発現がみられたが, 細胞内局在としては細胞質内, 核細胞質内, 核内の3種のパターンが見出された. また細胞株間によりその局在パターンに差がみられた. 現在定量的な解析を試みている.

③ホジキンリンパ腫培養細胞株におけるNF-kBの細胞内局在の検討2

ホジキンリンパ腫培養細胞株からのタンパクを核画分, 細胞質画分にわけWestern blotで検討した. 対象となるHeLa細胞ではTNF- α 刺激で経時的にNF-kB核移行がみられたが, ホジキンリンパ腫細胞株KM-H2では恒常的に核に存在していた(図3).

④ホジキンリンパ腫培養細胞株におけるNF-kB活性の検討

対象となるHeLa細胞ではTNF- α 刺激で経時的にNF-kB活性化がみられたが, ホジキンリンパ腫細胞株KM-H2では恒常的に活性化していた. またKM-H2ではc-Rel抗体でsupershiftがみられ, DNA結合NF-kB複合体にはc-Relが存在することが見出された(図4).

【考察】

ホジキンリンパ腫細胞株でNF-kBシグナル伝達経路の発現, 細胞内局在, 活性化を検出可能となり, 今後のホジキンリンパ腫におけるNF-kBシグナル経路の役割について解析しうる準備ができたことは意義深い成果と考えられる. 本研究は単年度研究として許可を受けたため, 現時点での研究成果をもって終了時報告とするが, 現在ホジキンリンパ腫におけるNF-kB活性化

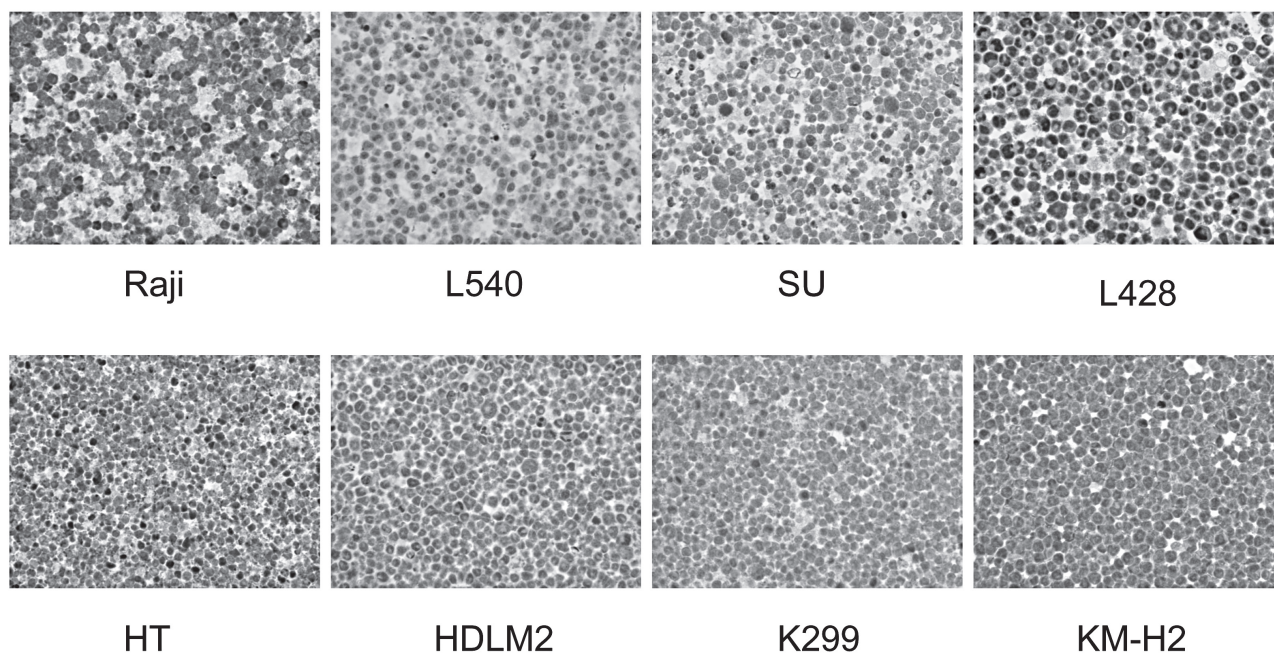


図2. 各種リンパ腫培養細胞株におけるc-Relの発現. セルブロック作成後, 免疫染色を行った.

機構について、その調節分子の関わりと細胞質-核内 oscillation を研究中であるため、これらの成果を含めて改めて終了後報告で説明したい。現時点での論文、学会発表、特許出願などはない。

【文献】

- 1) Pavan A, Spina M, Canzonieri V, Sansonno S, Toffoli G, De Re V. Recent prognostic factors in diffuse large B-cell lymphoma indicate NF-kappaB pathway as a target for new therapeutic strategies. *Leuk Lymphoma*. 2008;49:2048-58.
- 2) 田丸淳一 木崎昌弘編. WHO 分類第4版による白血病・リンパ系腫瘍の病態学: 中外医学社; 2009.
- 3) Felberbaum RS. The molecular mechanisms of classic Hodgkin's lymphoma. *Yale J Biol Med*. 2005;78:203-10.
- 4) Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MZ, et al. Overexpressed NF-kappaB-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood*. 2008;111:5118-29.
- 5) Mathas S, Johrens K, Joos S, et al. Elevated

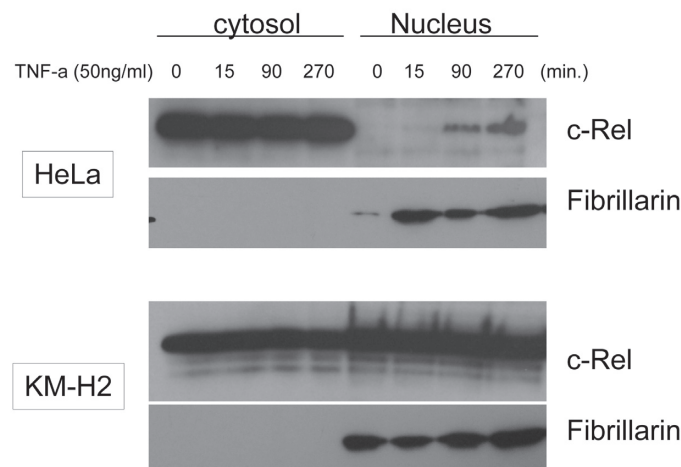


図3. HeLa細胞, KM-H2細胞におけるTNF- α 刺激後のc-Rel核内移行. TNF- α で刺激後、図に示したタイムポイントで核、細胞質画分にわけてタンパクを回収し、c-Rel抗体でプロットした。HeLa細胞では時間依存性に核内c-Relタンパクが増加しているが、KM-H2細胞では恒常的に核内c-Relタンパクがみられる。Fibrillarinは核画分マーカー。

NF- κ B gel shift assay

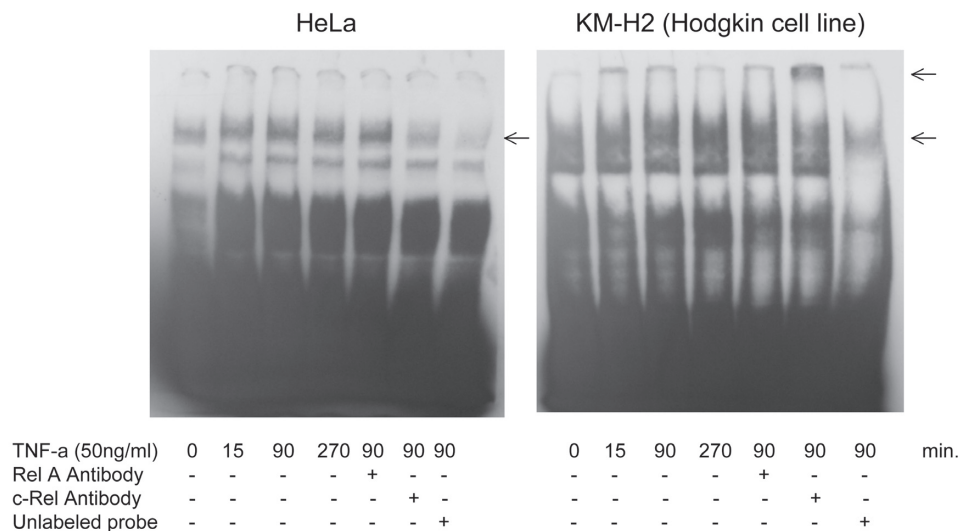


図4. NF- κ B electromobility shift assay. HeLaではTNF- α 刺激下でNF- κ B活性化がみられるが、KM-H2では刺激の有無に関わらず、NF- κ Bが活性化している。KM-H2ではc-Rel抗体をインキュベーションすることにより supershift bandがみられる。

- NF-kappaB p50 complex formation and Bcl-3 expression in classical Hodgkin, anaplastic large-cell, and other peripheral T-cell lymphomas. *Blood*. 2005;106:4287-93.
- 6) Zheng B, Georgakis GV, Li Y, et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by the proteasome inhibitor PS-341 in Hodgkin disease cell lines is independent of inhibitor of nuclear factor-kappaB mutations or activation of the CD30, CD40, and RANK receptors. *Clin Cancer Res*. 2004;10:3207-15.
- 7) Ghosh S, Baltimore D. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature*. 1990;344:678-82.
- 8) Hacker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE*. 2006;2006:re13.
- 9) Nelson DE, Ihekweba AE, Elliott M, et al. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science*. 2004;306:704-8.