

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790071

研究課題名（和文）Bリンパ腫細胞膜上の分子間相互作用により制御されるシグナル伝達経路の解析

研究課題名（英文）Characterization of signaling pathways that are regulated through cell surface molecular interaction in B cell lymphoma.

研究代表者

小谷 典弘（KOTANI NORIHIRO）

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：90342782

研究成果の概要（和文）：増殖因子受容体等の膜貫通タンパク質は細胞膜上をダイナミックに動き回り、その結果分子同士が特異的に会合する現象（細胞膜上分子間相互作用）が観察される。本研究では、抗体医薬リツキシマブ処理時に B リンパ腫細胞膜上の CD20 分子と相互作用する細胞膜上分子の同定を試み、FGFR3 や HLA class II、HSP-90 などの相互作用タンパク質候補を同定した。その内、FGFR3 に関しては細胞周期関連シグナルを介してリツキシマブの効能を制御している可能性を示唆できた。

研究成果の概要（英文）：Many plasma membrane-resident proteins collaborate with other molecules by molecular interactions in a variety of biological events. Herein, we have studied interacted molecules associated with CD20-rituximab complex on B cell lymphoma cells. We found some cell surface molecules, such as FGFR3, HLA class II, and HSP-90 are interacted with CD20-rituximab complex. Above all, FGFR3 possibly plays important role for efficacy of rituximab-dependent cytotoxic effect through cell cycle signaling pathways.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：膜タンパク質、分子間相互作用、Bリンパ腫細胞

1. 研究開始当初の背景

1972 年、Singer と Nicolson は動物細胞膜が脂質二重層から成り、その上には各種受容体など細胞機能にとって重要な役割を果たしている細胞膜上分子が多数存在すること、同時にこれら細胞膜上分子は脂質二重層の

流動に伴って膜上で常にダイナミックに運動していることを提唱した（Singer, S.J., Nicolson, G.L.: *Science* 175: 720-731 (1972)）。1990 年代に入って細胞膜上分子の運動についての研究が進められるようになり、特定の細胞膜上分子同士が非常に

短い一定時間内に膜上で会合する「細胞膜上分子間相互作用」が確認され、細胞内シグナル伝達に極めて重要であることが明らかとなってきた。このような学術的な背景の中、研究代表者らは全く新規で実用的な細胞膜上分子間相互作用解析法の開発に成功した

(Kotani N. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2008) 105:7405-9、特許出願済 特願2007-017667)。本法は細胞膜上分子間相互作用生化学的可視化法と呼ばれ、

Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS) と名付けた反応を利用して行われる。研究代表者らは実際に生化学的可視化法を用いて CD20 抗原などの機能分子の細胞膜上分子間相互作用について解析してきた。本解析法は特別な装置を必要とせず、簡便に生理的条件下において相互作用した細胞膜上分子を生化学的解析により網羅的に同定できるため、今後細胞生物学を中心とした様々な分野の発展に寄与することが見込まれている。

CD20 抗原は B 細胞、特に B リンパ腫細胞膜上に高発現している分子で、B リンパ腫細胞に抗 CD20 抗体を作用させるとアポトーシスや細胞増殖阻害、補体結合細胞障害が誘導されることが知られている (Deans JP. et al. *Immunology*, 107:176-182 (2002))。これらの現象を利用し、B リンパ腫治療抗体が開発され広く用いられているが、その作用メカニズムについてはほとんど分かっていない。これに対し、以前から一部の細胞膜上分子に対する抗体処理が分子間相互作用に影響を与えることが示唆されていることから、研究代表者らは B リンパ腫治療用抗体医薬品として用いられている抗 CD20 モノクローナル抗体 リツキシマブを HRP 標識し生化学的可視化法を実施することで (前頁図参照)、抗体結合時の CD20 抗原の分子間相互作用解析を試みた。その結果、リツキシマブ結合時には CD20

抗原が主に ROR1、FGFR3 などの受容体型チロシンキナーゼと相互作用していることが分かった (第 8 2 回日本生化学会大会で学会発表)。これらの結果や報告から、研究代表者らは 1) 抗 CD20 抗体を細胞に処理すると特定の細胞膜上分子が CD20 抗原と特異的に相互作用する、2) これらの相互作用により何らかのシグナル経路が活性化する、3) 結果、アポトーシスなどの表現型が誘導される、という仮説を立て、これを基に本研究を遂行することとした。

2. 研究の目的

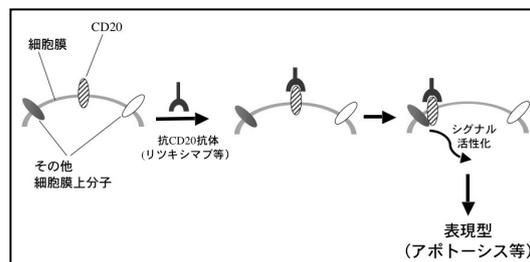
細胞膜上分子間相互作用という細胞膜運動に伴う物理現象が、実際にどのようなシグナル経路の制御、ひいては細胞、生物機能に寄与しているのかについてはほとんど分かっていない。従って、本研究では上述の B リンパ腫細胞上 CD20 抗原の細胞膜上分子間相互作用を題材として、細胞膜上分子間相互作用が、実際にどのようなシグナル経路を制御しているのか、そして細胞にどのような影響 (表現型) を与えるのかについて解明することを目的とする。

3. 研究の方法

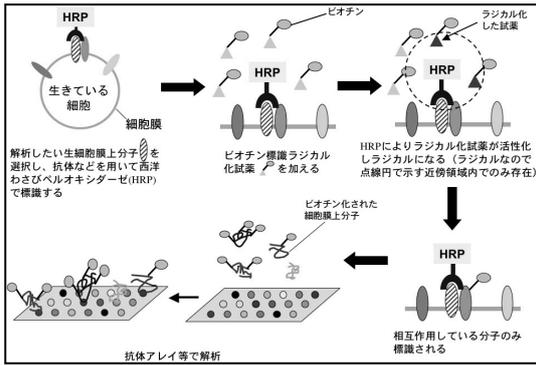
(1) <平成 22 年度>

【CD20 抗原と相互作用する分子の同定】

前述の B リンパ腫細胞及び抗 CD20 抗体処



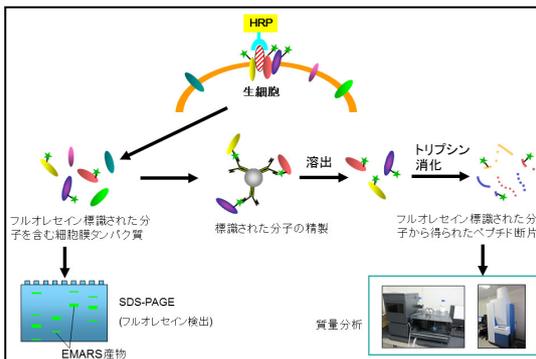
理の実験系 (下図参照) を用い、研究代表者らが開発した EMARS 反応 (下図参照) により以下の手順で実験を遂行した。



リツキシマブ—CD20 複合体と相互作用する細胞膜上分子の同定

まず、EMARS 反応を行うために、抗体医薬品リツキシマブに NHS を介して Horse radish peroxidase を結合させた（細胞膜上分子生化学的可視化法に用いるプローブ）。次に、それを B リンパ腫細胞株として用いられている Raji 細胞に 37°C で 20 分間反応させ結合させた後、最近開発した細胞膜上分子生化学的可視化法の反応試薬である

arylazide-fluorescein を 37°C で 15 分間反応させた。反応後の細胞を lysis buffer にて溶解後、arylazide-Fluorescein により標識された CD20 分子と相互作用する様々な細胞膜上分子を免疫沈降法により精製・濃縮した。これら精製物を研究代表者らが最近開発



した生化学的可視化法の新規プロテオーム解析法により、相互作用分子の候補の同定を行った。これらを還元アルキル化し、トリプシン消化によりペプチド化し、C18 カラムを装着した nano-LC により分画した後、MALDI-TOF/TOF MS によりショットガン解析した（下図参照）。

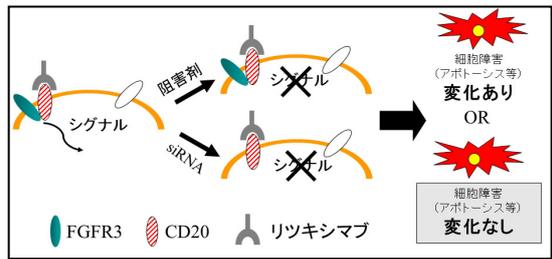
(2) <平成23年度>

【リツキシマブ誘導細胞障害を制御する FGFR3 依存的シグナル経路の解明】

同定された相互作用分子の一つである FGFR3 の機能を阻害剤等により抑制し、表現型であるリツキシマブ誘導細胞障害との関連を確認した（下図参照）。

①FGFR3 自己リン酸化阻害剤 PD173074 を用いてリツキシマブ誘導細胞障害（細胞増殖抑制）が実際に影響を受けるか否か解析した。また、その際に FGFR3 が関与していると考えられる細胞障害誘導経路（アポトーシスもしくは細胞周期等）を決定するために、研究代表者らが以前から使用しているアネキシン V を用いた抗 CD20 抗体依存的アポトーシスの検出系を用いた。

②FGFR3 を直接 siRNA により発現抑制するために FGFR3 knockdown ウイルスベクター（TAKARA）を作製した。その後、Raji 細胞に処理し、FGFR3 knockdown 細胞を作製した。それにリツキシマブを処理し表現型が変化するか観察した。



細胞に処理し、FGFR3 knockdown 細胞を作製した。それにリツキシマブを処理し表現型が変化するか観察した。

4. 研究成果

(1) <平成22年度>

リツキシマブ—CD20 複合体と相互作用する細胞膜上分子の同定

上記の方法により精製した EMARS 産物を MALDI-TOF/TOF MS で分析した結果、HLA class II や HSP-90 など、約 40 個の相互作用タンパク質候補が同定された。HLA class II に関しては、既に CD20 と相互作用しているという報告があり、本研究の手法の有効性があらためて確認された（下記表参照）。

Name
ADP/ATP translocase 2
ADP/ATP translocase 3
Antigen KI-67
ATP-dependent DNA helicase Q4
Breakpoint cluster region protein
BTB/POZ domain-containing protein 17
Calpain-15
Cardiomyopathy-associated protein 5
Cellular nucleic acid-binding protein
Complement C3
Complement component C8 alpha chain
Complement component C8 beta chain
DC-STAMP domain-containing protein 2
Dynein heavy chain 10, axonemal
Heat shock protein HSP 90-alpha
Hepatocyte growth factor
Hephaestin-like protein 1
HLA class I histocompatibility antigen, B-57 alpha chain
HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain
HLA class II histocompatibility antigen, DR-1 beta chain
HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-11 beta chain
Homeobox protein Meis3
Ig gamma-1 chain C region
Ig gamma-2 chain C region
Ig gamma-4 chain C region
Ig kappa chain C region
Ig mu chain C region
Immunoglobulin J chain
Inversin
Laminin subunit alpha-3
Macrophage migration inhibitory factor
Melanoma-associated antigen B1
Polycystin-1
Probable ATP-dependent RNA helicase DHX37
Protein CASP
Protein FAM71A
Protein WWCI
Ras-related protein Rap-1b
Rootletin
Roundabout homolog 3
Serotransferrin

(2) <平成23年度>

【リツキシマブ誘導細胞障害を制御する FGFR3 依存的シグナル経路の同定】

Raji 細胞に FGFR3 自己リン酸化阻害剤 PD173074 を処理した細胞群と処理しない細胞群でリツキシマブ誘導細胞障害（細胞増殖抑制）を比較した。その結果、PD173074 を処理しない細胞群では、約 40% の細胞増殖抑制を見出したが、PD173074 を処理した細胞群では、10nM で約 30%、30nM で約 20% に減少した。これは FGFR3 のリン酸化がリツキシマブの効能に関与していることを示している。また、アポトーシスに関しては PD173074 の濃度が上がるにつれ、early および late apoptosis が観察される細胞群の割合が減少した。さらにリツキシマブと同様の

効能を持つ Bly-1 についても PD173074 に関して同じ効果が見られた。

次に、Raji 細胞において FGFR3 knockdown 細胞を作製し、リツキシマブ及び Bly-1 を処理した結果、PD173074 処理と同様に細胞増殖抑制効果が減弱した。しかし、アポトーシスに関しては PD173074 処理と異なり、コントロール siRNA 細胞と比較して変化は認められなかった。

PD173074 処理と同様の実験を Raji 細胞と同じ B リンパ腫細胞である BJAB 細胞に対して行なった。その結果、興味深いことに BJAB 細胞では PD173074 処理により細胞増殖抑制効果が増強された。しかし、アポトーシスに関しては PD173074 処理をしても変化は見られなかった。

Raji 細胞ではリツキシマブ誘導細胞増殖抑制効果にアポトーシスが関与しているデータが示されたが BJAB 細胞ではそれらの関与が否定されたことから、リツキシマブ処理時に Raji 細胞でアポトーシス関連シグナルが変化するか否か調べるため、アポトーシス関連因子抗体アレイ解析を行った。その結果、アポトーシス関連因子はリツキシマブ処理によって、有意な変化がないことが分かった。そこで、DMSO 処理することにより細胞周期を G0 に拘束した Raji 細胞を使用してリツキシマブを処理すると、処理しない場合と比較してリツキシマブの効能が低下したことから、リツキシマブは G0 期以外の細胞において細胞増殖抑制効果を発揮すること、その経路に FGFR3 が関与している事が示唆された。

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 6 件)

- ① Jiang S[#], Kotani N^{#*}, Ohnishi T, Miyagawa-Yamguchi A, Tsuda M, Yamashita R, Ishiura Y, Honke K: A proteomics approach to the cell surface interactome using the enzyme-mediated activation of radical sources reaction. *Proteomics*,

12:54-62, 2012. #These authors contributed equally to this work.
*corresponding author

- ② Yamashita R, Kotani N*, Ishiura Y, Higashiyama S, Honke K: Spatiotemporally-regulated interaction between beta1 integrin and ErbB4 that is involved in Fibronectin-dependent cell migration. *J Biochem*, 149(3):347-355, 2011. *corresponding author
- ③ Ishiura Y#, Kotani N#, Yamashita R, Yamamoto H, Kozutsumi Y, Honke K: Anomalous expression of Thyl (CD90) in B-cell lymphoma cells and proliferation inhibition by anti-Thyl antibody treatment. *Biochem Biophys Res Commun*, 396(2):329-334, 2010. #These authors contributed equally to this work.
*corresponding author
- ④ Honke K, Kotani N: The EMARS reaction: A new approach to identify partners of a given molecule in membrane microdomains (review) *J Neurochem*, 116(5):690-695, 2011.
- ⑤ 小谷典弘, 本家孝一: 「新規ラジカル反応を用いた細胞膜上分子間相互作用の解析」生化学 (日本生化学会学会誌), 83(8):754-758, 2011.
- ⑥ 本家孝一, 小谷典弘: 「生きている細胞の細胞表面で会合している分子を見つける」口腔組織培養学会誌, 20(2):1-8, 2011.

[学会発表] (計 10 件)

- ① Honke K, Miyagawa-Yamguchi A and Kotani N: Analysis of molecular clustering on the living cell membrane. Glycobiology Japan-Netherland Joint Seminar 2011, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan, October, 2011
- ② Kotani N, Ishiura Y, Yamashita R, Yamamoto H, Kozutsumi Y, Honke K: Anomalous expression of Thyl (CD90) in B-cell Lymphoma cells and proliferation inhibition by anti-Thyl antibody treatment. *GlycoT2010 Tokyo*, Tokyo, Japan, July, 2010
- ③ Honke K, Kotani N: A new approach to identify partners of a given molecule in membrane domains. *4th ISN Special Neurochemistry Conference*, Sicily, Italy, May, 2010
- ④ Yamaguchi A, Kotani N, Honke K: A new EMARS system using HRP expressed by gene manipulation technology. *The 31th NAITO CONFERENCE* Hokkaido, Japan, September, 2011

- ⑤ Kotani N, Ishiura Y, Yamashita R, Honke K: Divergence of cell surface molecular interactions in treatment of B-cell lymphoma cells with different anti-CD20 antibody clones. *The 25th International Carbohydrate Symposium* Tokyo, Japan, Aug, 2010
- ⑥ Kotani N, Ishiura Y, Yamashita R, Yamamoto H, Kozutsumi Y, Honke K: Anomalous expression of Thyl (CD90) in B-cell lymphoma cells and proliferation inhibition by anti-Thyl antibody treatment. *The 28th NAITO CONFERENCE* Kanagawa, Japan, July, 2010
- ⑦ 本家孝一、小谷典弘: EMARS 反応一生きている細胞の表面で任意の分子と会合する分子を同定する—第 61 回日本電気泳動学会 (JES) シンポジウム, 第 7 回日本臨床プロテオーム研究会 (JSCP) 2011 連合大会, 山口, 2011.
- ⑧ 小谷典弘, 石浦 嘉人, 大西 知子, 山下 竜右, 本家 孝一: 抗体医薬の効能や安全性を向上させる分子標的治療の標的分子探索, 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011.
- ⑨ 山口 亜利沙、小谷典弘、本家孝一: HRP 遺伝子発現系を用いた新規 EMARS 法の開発, 日本糖質学会, 新潟, 2011
- ⑩ 小谷典弘、山下 竜右、石浦嘉人、本家孝一: Fluorescence-labeled arylazide is suitable for proteomic approaches of EMARS-based cell surface interactome, BMB2010, 神戸, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷 典弘 (KOTANI NORIHIRO)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号: 90342782

(2) 研究協力者

本家 孝一 (HONKE KOICHI)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号: 80190263