

令和元年6月20日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07158

研究課題名(和文) 抗癌剤イブルチニブの感受性を予測するB細胞受容体リン酸化の部位特異抗体による検出

研究課題名(英文) Detection of tyrosin phosphorylation in B cell receptor by site-specific monoclonal antibodies for prediction of sensitivity to Ibrutinib

研究代表者

伊勢 知子 (ISE, Tomoko)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・プロジェクト研究員

研究者番号：20771900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞受容体の活性化は、そのチロシンリン酸化に端を発し、B細胞腫瘍の悪性化とその性質の維持に重要な役割を果たしている。B細胞悪性腫瘍の治療には、B細胞受容体シグナル伝達の下流分子に対する複数のリン酸化酵素阻害剤が用いられているが、B細胞受容体の各チロシンリン酸化との関連は不明であった。本研究では、治療に用いられているリン酸化酵素阻害剤の作用機作解明と感受性予測を目的として、我々が作製した新規抗体を用いてB細胞受容体の二つの異なる部位のチロシンリン酸化を調べた。その結果、イブルチニブ耐性細胞では、感受性細胞では見られないCD79BY196におけるリン酸化が恒常的に起こっていることを初めて示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B細胞悪性腫瘍の治療薬としてB細胞受容体シグナル伝達に關与する多くのリン酸化酵素に対して様々な阻害剤が開発されているが、その治療効果は、標的リン酸化酵素の発現やリン酸化状態とは必ずしも相関せず、適切な治療薬選択は難しい現状である。我々の新規抗体によってもたらされた本研究結果は、薬剤の標的リン酸化酵素の上流に位置するB細胞受容体自身の特定のチロシンリン酸化の検出が、治療効果の予測に有用である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Activation of B cell Receptor (BCR), initiated by phosphorylation of the multiple tyrosin residues, plays important roles for tumorigenesis and proliferation of B cell malignancies. Many kinase inhibitor drugs involving the B cell signaling have been developed to treat B cell malignancies. In order to predict the efficacy of these kinase inhibitors and analyze the mechanisms of the therapeutic effects, we produced novel monoclonal antibodies specific to two different phosphorylated tyrosines in BCR and evaluated the site-specific phosphorylation in B cell lines. We revealed constitutive phosphorylation of CD79BY196 in the BCR in an Ibrutinib-resistant cell line by flow cytometry.

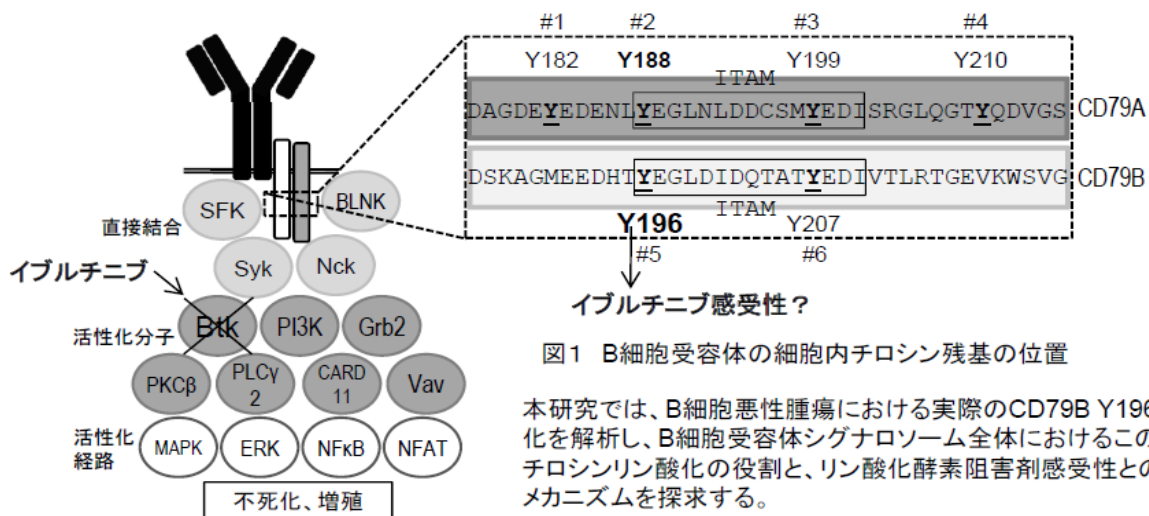
研究分野：免疫学

キーワード：B細胞受容体 リン酸化酵素阻害剤 部位特異的抗リン酸化抗体 薬剤感受性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) B 細胞受容体の活性化は B 細胞の生理学的働きのみならず、B 細胞腫瘍の悪性化とその性質の維持に重要な役割を果たす。B 細胞受容体自身のチロシンリン酸化の後の下流のシグナルカスケードの活性化の研究は進んでおり、B 細胞悪性腫瘍の治療薬として B 細胞受容体シグナル伝達に關与する多くのリン酸化酵素に対して様々な阻害剤が開発されている。しかし、その治療効果は、標的リン酸化酵素の発現やリン酸化状態とは必ずしも相関せず、適切な治療薬選択は難しい現状である。

(2) B 細胞受容体は、特異抗原への結合を担う膜型抗体と B 細胞シグナル伝達を担う CD79A、CD79B の複合体であり、計 6 個の細胞内チロシン残基が存在する (図 1)。これら 6 個のチロシン残基のリン酸化は、その下流のシグナル伝達において異なる働きを持つことがアミノ酸変異導入実験などによって示唆されている。その後の研究から、B 細胞悪性腫瘍の患者サンプルの遺伝子解析に基づき、CD79B のチロシン (Y) 196 のアミノ酸変異を伴う遺伝子変異がびまん性大細胞リンパ腫の活性化 B 細胞型で高頻度に検出され、さらに、この遺伝子変異を持つ培養細胞株ではブルトン型チロシンキナーゼ (BTK) 阻害剤イブルチニブの感受性が高いことが判明した。この知見が意味するところは、標的リン酸化酵素の上流の分子のチロシンリン酸化が起こらないことで、その下流のリン酸化酵素阻害の効果が増えることがあるという一見相反するものであるが、これまでは特異抗体がなかったために行われてこなかった B 細胞受容体の個々のチロシンリン酸化の B 細胞受容体シグナルソーム全体における役割の解明の、リン酸化酵素阻害剤の効果予測における重要性を示している。



(3) 我々は最近 B 細胞受容体のチロシン残基のリン酸化を区別できる配列特異的抗リン酸化抗体の作製を進めており、これらの抗体を使えば、これまでの遺伝子解析ではわからなかった実際のリン酸化の状態を解析することが可能になる。

## 2. 研究の目的

B 細胞受容体 CD79B の Y196 の B 細胞シグナル伝達における役割と、その下流のシグナル伝達分子のリン酸化酵素阻害剤感受性相関のメカニズムを、B 細胞受容体の異なるチロシンリン酸化を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いて解析する。最終的には B 細胞悪性腫瘍の治療に用いられるイブルチニブなどの様々な B 細胞受容体シグナル伝達に關与するリン酸化酵素群阻害剤の治療効果の予測と、それに基づく適切な治療薬選択を可能にすることを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) フローサイトメトリーを用いた B 細胞受容体およびその下流のシグナル伝達分子のリン酸化の解析

各標的リン酸化チロシンとその近傍配列を含むリン酸化ポリペプチド抗原を抗原に用い、部位特異的リン酸化を検出できる抗体の作製を行った。リン酸化ペプチドビーズ複合体を用いたフローサイトメトリーにより確認し、唯一の市販抗体との比較を行った。抗体産生細胞を大量培養し、その培養上清から抗体分子を精製した。さらに、これら

の精製抗体の蛍光標識を行った。これらの標識抗体を用いた多色フローサイトメトリーの実験系の確立を試みた。

(2) 我々の抗体を用いた免疫組織染色

悪性リンパ腫の患者サンプルにおいてこの B 細胞受容体の部位特異的チロシンリン酸化を調べるために、我々の抗体を用いて免疫組織染色を試みた。

(3) いくつかのヒト B 細胞株で、イブルチニブ耐性細胞の樹立と、この細胞における B 細胞受容体の異なるチロシンのリン酸化の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 我々が作製した、B 細胞受容体の 2 つの異なるリン酸化チロシンに対する抗体 A と B は、それぞれ Y188 と Y196 に対して完全な配列特異性およびリン酸化チロシン特異性を示した (図 2)。これに対し、B 細胞受容体のリン酸化チロシンに対して現在市販されている唯一の抗体は、リン酸化された Y188 を特異的に認識するとされているにもかかわらず、B 細胞受容体の他のリン酸化チロシンにも、非リン酸化ペプチドにも結合した。

(2) これらの精製抗体の蛍光標識を DyLight シリーズで行ったところ、抗体 A は標識後も変わらぬ抗原結合能を維持したが、抗体 B は標識後に抗原結合能が消失した。このため、抗体 A による pY188 の解析は標識抗体を用いた多色フローサイトメトリーが可能であったが、抗体 B による pY196 の解析は多色フローサイトメトリーが困難となった。この原因としては、抗体 B の抗原結合部位にリジンが含まれていて蛍光色素のラベルが入ることで結合能が失われた可能性が示唆されるが、詳細は不明である。そこで、抗体 B の結合解析は、蛍光標識した二次抗体を用いたフローサイトメトリーで行うことにした。

(3) 抗体 A と抗体 B を用いた免疫組織染色の条件を検討したが、組織切片上の変性下抗原では、染色できる条件を見つかることはできなかった。このため、悪性リンパ腫の患者サンプルにおいて B 細胞受容体の部位特異的チロシンリン酸化を調べることは断念した。

(4) 二つの B 細胞株において、抗 IgM 刺激前後のリン酸化を我々の抗体と市販抗体で調べたところ、我々の抗体は抗体 A, B とともにリン酸化を検出できたが、市販抗体は非常にバックグラウンドが高く、特に SU-DHL-6 細胞ではリン酸化の評価は不可能であった。

(5) CD79B Y196 のリン酸化と B 細胞受容体の下流シグナルの動きと、各種阻害剤感受性の関係を探るためのモデルとして、様々な B 細胞株について、イブルチニブを含む様々なリン酸化酵素阻害剤存在下での長期培養により、薬剤耐性細胞の樹立を目指したところ、びまん性大細胞リンパ腫の細胞株である SU-DHL-6 細胞において、イブルチニブ耐性細胞を樹立することができた。

(6) イブルチニブ感受性 SU-DHL-6 細胞とイブルチニブ耐性 SU-DHL-6 細胞について B 細胞受容体のチロシンリン酸化を調べたところ、CD79AY188 のリン酸化レベルに差は無かったが、CD79BY196 もリン酸化レベルは耐性細胞

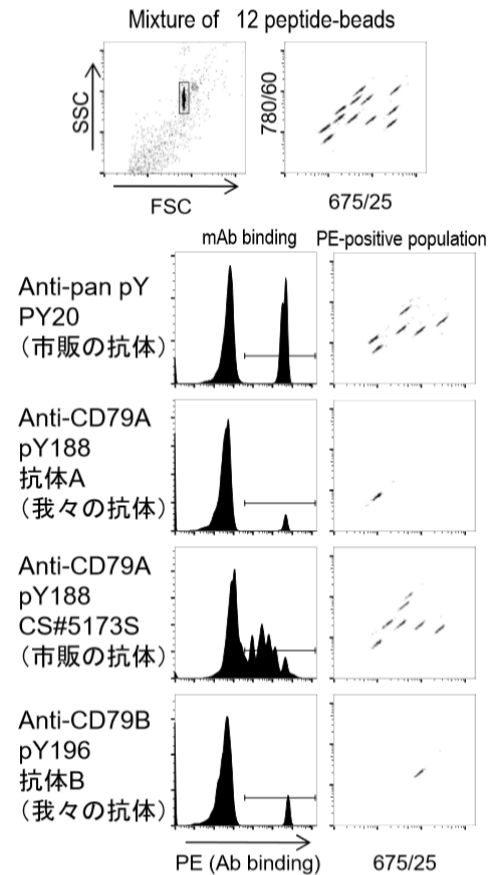


図2 抗体の配列特異性。B細胞受容体の細胞内チロシンを含む6個の特異配列のペプチド(それぞれ非リン酸化、リン酸化したもののペアで計12個)を、異なる12色のビーズにコンジュゲートし、混合し、抗体の結合性を検討した。

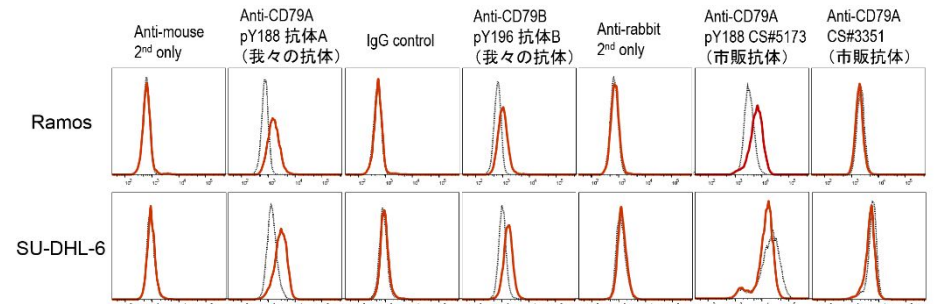


図3 B細胞受容体の配列特異的リン酸化 (破線: 刺激なし、実線: 抗IgM刺激)

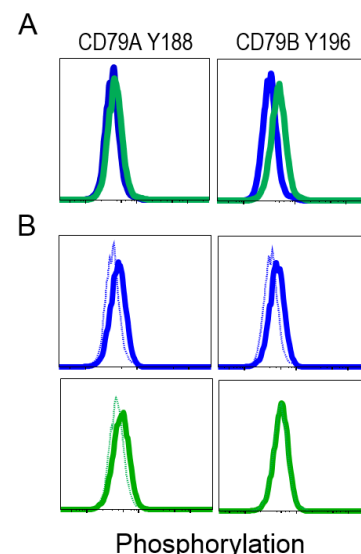
の方が高かった(図4A)。抗 IgM 抗体によって刺激すると、感受性細胞では CD79AY188 も CD79BY196 もリン酸化の上昇が見られたのに対し、耐性細胞では CD79AY188 のみで上昇が見られ、CD79BY196 は刺激前後でリン酸化レベルに差が無かった(図4B)。つまり、イブルチニブ耐性 SU-DHL-6 細胞においては、感受性細胞では見られない CD79BY196 の恒常的なリン酸化が起こっていると考えられる。これは、文献情報で、CD79BY196 に遺伝子変異を持つ培養細胞株ではイブルチニブの感受性が高い傾向があったという所見とも矛盾しない。従って、今回の結果は、抗体 B のイブルチニブ感受性診断薬としての有用性を示唆している。下流のシグナル伝達分子のリン酸化を含む、より詳細な解析のためには、抗原結合能を失わない方法での抗体 B の蛍光標識が必要であり、今後はその方法を追求したい。

(7)本研究は、B細胞受容体の異なるチロシン残基においてリン酸化レベルが異なっていることを初めて実証したものであり、これまでは一塊の B 細胞受容体のリン酸化として語られていたものが、実は異なるチロシン残基が独立して働くことを示した研究となった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕計 5 件

- (1) Shancer Z, Williams M, Igelman A, Nagata S, Ise T, Pastan I, Bera TK. (2018) Preclinical development of anti-BCMA immunotoxins targeting multiple myeloma. *Antib Ther*, Jun;1(1):19-25, (査読有)
- (2) Khan S, Zafar N, Khan SS, Setua S, Behrman SW, Stiles ZE, Yallapu MM, Sahay P, Ghimire H, Ise T, Nagata S, Wang L, Wan JY, Pradhan P, Jaggi M, Chauhan SC. (2018) Clinical significance of MUC13 in pancreatic ductal adenocarcinoma, *HPB (Oxford)*, Jun;20(6):563-572, (査読有)
- (3) Bera TK, Abe Y, Ise T, Oberle A, Gallardo D, Liu XF, Nagata S, Binder M, Pastan I. (2018) Recombinant immunotoxins targeting B-cell maturation antigen are cytotoxic to myeloma cell lines and myeloma cells from patients, *Leukemia* 32, 569-572, (査読有)
- (4) 永田諭志, 伊勢知子, 鎌田春彦. (2018) 標的に抗体が結合できる部位はいくつあるか? 次世代抗体医薬の衝撃, *実験医学* 36, 1867-1874, (査読無)
- (5) Khan S, Sikander M, Ebeling MC, Ganju A, Kumari S, Yallapu MM, Hafeez BB, Ise T, Nagata S, Zafar N, Behrman SW, Wan JY, Ghimire HM, Sahay P, Pradhan P, Chauhan SC, Jaggi M. (2017) MUC13 interaction with receptor tyrosine kinase HER2 drives pancreatic ductal adenocarcinoma progression, *Oncogene* 36,491-500, (査読有)



Phosphorylation  
 図4 B細胞受容体の配列特異的リン酸化。抗IgM抗体刺激のない状態でのリン酸化(A、緑:感受性細胞、青:耐性細胞)と刺激後のリン酸化の比較(B、破線:刺激なし、実線:抗IgM刺激)。