

学内グラント 報告書

平成26年度 学内グラント終了時報告書

リツキシマブ細胞傷害における LR11 の分子機構の解明

研究代表者 東 守洋 (医学部 病理部)

緒 言

びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫 (Diffuse large B-cell lymphoma; DLBCL) は悪性リンパ腫で最も頻度が高い亜型である。DLBCLはheterogeneousな病変であることが知られており、網羅的遺伝子発現解析から胚中心B細胞型 (Germinal center B-cell type; GCB type)、活性型B細胞型 (Activated B-cell type; ABC type) に大別され、その腫瘍起源を反映していると考えられている。GCB typeはABC typeに比べてCHOP療法下で予後が良い。現在の標準治療である抗CD20抗体 (リツキシマブ) 併用CHOP療法下では主にABC typeの予後が改善されてきた。一方、GCB typeではリツキシマブ導入後もその予後の改善はみられていない。その結果、両者の予後に差が見出されなくなっている。DLBCLはリツキシマブ療法導入により予後が改善したとはいえ、依然3割程度の症例が治療抵抗性であり、DLBCLの分子メカニズム解明に伴う新たな治療法開発が必要と考えられる。LR11はlow density lipoprotein (LDL) レセプターとして同定されたI型膜貫通分子であり、LDLの他、アミロイドβタンパクの細胞内取り込み、分子輸送に関与している。われわれはこれまでに免疫組織化学的解析により、濾胞性リンパ腫の一部とDLBCLの約半数、特にGCB typeにおいてLR11の発現が見られることを見出した。LR11発現症例ではその古典的化学療法であるCHOP療法下でのoverall survivalが高かったが、リツキシマブ併用CHOP療法下ではその予後に差を見いだせなかった (第3回日本血液学会国際シンポジウムにて発表)。さらにin vitroでの研究において、LR11発現B細胞株 (Raji細胞) でLR11発現をshRNAにより抑制したところ、リツキシマブによる補体依存性細胞障害 (Complement dependent cytotoxicity; CDC) が増強していることを見出した。このことはLR11がリツキシマブによるCDCを負に制御している可能性を示唆している。本研究では、LR11によるリツキシマブCDCに対する抑制効果をin vitroで検討し、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

材料と方法

1) リツキシマブCDCアッセイ

B細胞リンパ腫細胞株Raji細胞から樹立したLR11ノックダウン細胞株を用いてCDCアッセイを行った。細胞培養液中にリツキシマブ (中外製薬, 東京) と補体ソースとしてウサギ血清を加え 37 °C 1 時間インキュベーションのち、CCK-8 kit (同仁化学研究所, 熊本) を用いプレートリーダで生存細胞数を検討した。

2) プラスミド, 抗体, 試薬:

LR11のcDNAは新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター遺伝子機能解析学分野 池内健博士より供与いただいた。pmCherry-C1 vector (Invitrogen) にin-frameで組み換えLR11-mCherryを融合タンパクとして発現するベクターを作製した。Raji細胞への遺伝子導入はNucleofector (Lonza Japan) を用いて導入した。GST-LR11-C1/3はLR11 cDNAを制限酵素で消化し、pGEM vectorとin-frameでGST-LR11が融合タンパクをつくるように組み換えた。抗LR11抗体は東邦大学医療センター佐倉病院検査部・研究開発部の武城英明先生に供与頂いた。抗CD20抗体はDako社クローンL26を用いた。

3) タイムラプスイメージング:

細胞は35 mmガラスボトムディッシュに血清1%の条件でplatingし翌日観察した。観察には倒立顕微鏡 (TE2000-S Eclipse, Nikon), CCDカメラ (CoolSNAP HQTM; Roper Scientific) とImagePro Plus Software (Mediacybernetics, Roper Scientific), 光源はPrecentered Fiber illuminator (Intensilight C-HGFI, Nikon) を使用した。GFPを観察するために、FF01-485/20-25 excitation filter, FF-436/514/604-25x36 dichroic mirror, FF01-536-40-25 emission filterを使用し、mCherryを観察するためにFF01-586/20-25 excitation filter, FF-436/514/604-25x36 dichroic mirror, FF01-628/32-25 (すべてSemrock社製, New York, USA) を使用した。対物レンズは×100を使用した。intensity correlation analysis (ICA) はimagej Softwareを用いて解析した。ICAによりProduct of Difference from Mean (PDM) 値が求められる。蛍光タンパクAとBについてそれらの蛍光強度をAi, Bi, ROIにおける平均蛍光強度

をAm, Bmとした場合, (Ai-Am) x (Bi-Bm)として求められる。共局在した場合正の値をとり, 共局在が見られない場合負の値をとる。

4) プルダウンアッセイおよび共免疫沈降:

300 µgのGST-LR11-C1/3 タンパクとは補体ソースとしてのRabbit serumあるいはHuman serum(いずれもSigma), グルタチオンセファロースを4℃で2時間混和し, 遠心後, 沈降物をWestern blotで検出した。共免疫沈降はCD20抗体で沈降しSDS-PAGE後, LR11抗体でプロットした。

結 果

1) LR11 ノックダウン細胞株におけるリツキシマブCDC効果の増強

LR11をノックダウンしたRaji細胞において, リツキシマブCDCが増強することを確認した(図1)。CDCはリツキシマブおよび補体の量依存的に増強することも確認された。

2) LR11の細胞内局在

リツキシマブの添加によりCD20はlipid raftに移動することが知られている。そこでわれわれはLR11がlipid raftへ移動するかどうかについて検討した。まず, 生細胞において, lipid raftのマーカーとしてGFP-Caveolin-1αとのLR11-mCherryとの局在を蛍光顕微鏡を用いてタイムラプスイメージングを行った(図2A)。共局在については両者

のIntensity correlation analysis (ICA)を行った。Rituximab添加後, PDM値は徐々に上昇した(図2B)。これはGFP-Caveolin-1αとLR11-mCherryが, リツキシマブ刺激により共局在することを意味していると考えられる。次に実際にLR11がlipid raftへ移動するか, 培養細胞のタンパクをTriton-X 100可溶性分画と不溶性分画にわけWestern blotで検討したところ, LR11はリツキシマブ添加によりTriton-X 100不溶分画に移動することが見出された。これらのことからLR11は, リツキシマブ添加によりCD20と同様にlipid raftに移動していると考えられる。

3) LR11とCD20, 補体との会合

LR11とCD20がタンパク-タンパク会合している可能性を考え, 共免疫沈降を行った。Raji細胞のタンパク抽出物をLR11抗体で免疫沈降後, CD20抗体でプロットしたところ, LR11とCD20との会合が確認された。さらにLR11と補体との会合をGST-pulldown assayで検討した。LR11の細胞外ドメインC末端側1/3とGSTを融合したタンパクとヒト血清とをインキュベーションしたのち, GSTでプルダウンしたタンパクをSDS-PAGEし, 各種補体に対する抗体でプロットした。C8, C9に対する抗体でバンドを認め, LR11とC8, C9が会合しうることが示された(図3)。これらの結果から, LR11-CD20-補体がタンパク複合体を形成している可能性が考えられた。

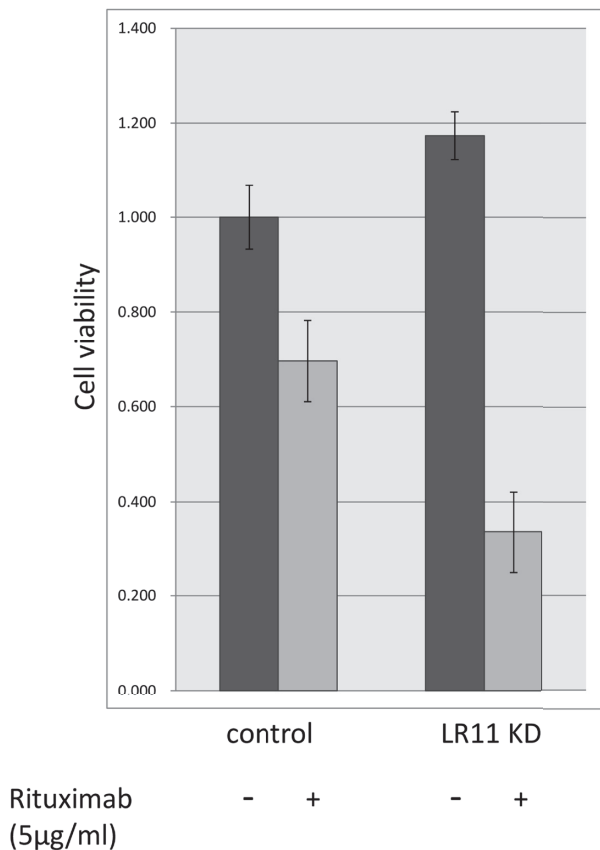


図 1.

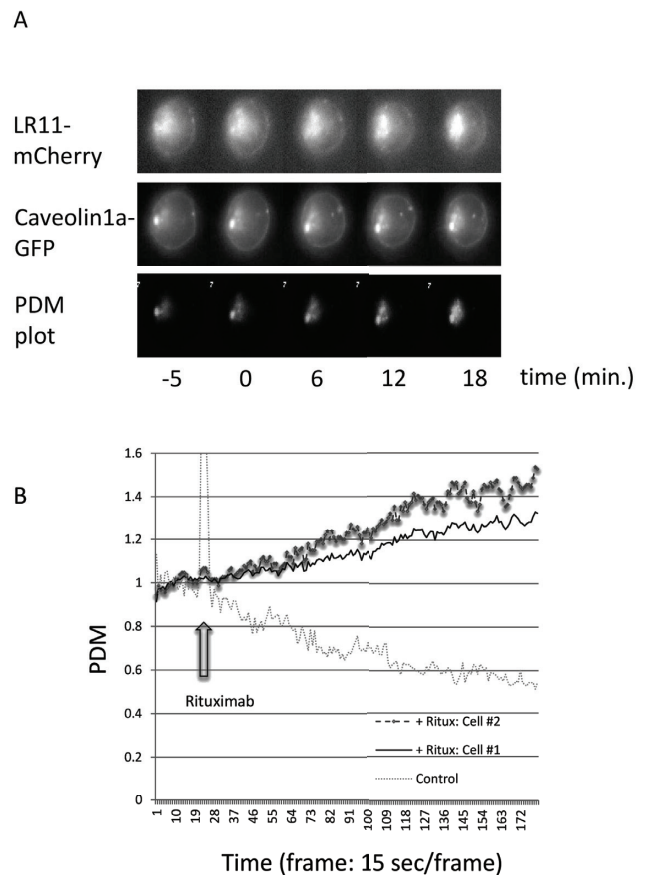


図 2.

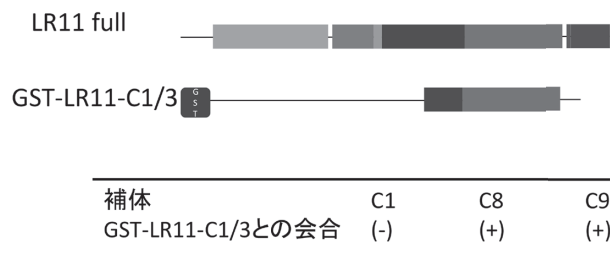


図 3.

考 察

DLBCLにおいてはGCB type, ABC typeといったサブグループ分類が日常診断でも行われているものの、その生物学的意義については分子発現レベルおよび腫瘍起源推定といったレベルを越えた理解は未だなされていない。GCB typeにおいてLR11の発現が高い、LR11ノックダウンによりリツキシマブのCDC効果が増強するというわれわれのこれまでの結果を考え合わせると、GCBにおいてはLR11の関与によりリツキシマブが有効に作用していないことが推定される。この意味において、本研究はこれらサブグループ分類の分子レベルでの生物学的意義の一端を明らかにするものであると考える。さらにリツキシマブ開発以降、著明な予後改善がなされていないDLBCLの治療法を進展させる研究であると考えられる。LR11はこれまでLDL、アミロイドβのレセプターとしての動脈硬化、糖尿病などの生活習慣病やアルツハイマー病での役割が解析されてきた。細胞外でプロセッシングを受けた可溶性LR11はこれら疾患群のバイオマーカーとして有望視されている。われわれはこれまで千葉大学血液内科中世古知明らとの共同研究から可溶性LR11がリンパ腫を含めた血液腫瘍においても有用なバイオマーカーであることを見出し、さらに腫瘍細胞自体がその発現ソースであることを見出した。しかしながら腫瘍におけるその分子機構についてはほとんど解明されていない。本研究は悪性リンパ腫のみならず、悪性腫瘍におけるLR11の分子メカニズムを解明する初の研究であると考えられる。

研究成果リスト

論文

- 1) Higashi M, Tokuhira M, Fujino S, Yamashita T, Abe K, Arai E, Kizaki M, Tamaru J I. Loss of HLA-DR expression is related to tumor microenvironment and predicts adverse outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma* (in print 2015).
- 2) Ohwada C, Yamazaki A, Kawaguchi T, Sugita Y, Takeuchi M, Shimizu N, Sakaida E, Takeda Y,

Tsukamoto S, Muto T, Jiang M, Higashi M, Yokote K, Tamaru J I, Bujo H, Nakaseko C. Serum soluble LR11, a novel tumor derived biomarker associated with the outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma* 2015;1-4.

- 3) Tomikawa T, Tabayashi T, Tokuhira M, Watanabe R, Sagawa M, Nemoto T, Kimura Y, Takahashi Y, Mori S, Higashi M, Tamaru J, Kizaki M. Cardiac and breast diffuse large B-cell lymphoma with pericardial effusion and AV-block. [*Rinsho ketsueki*] *The Japanese journal of clinical hematology* 2015;56(1):9-15.
- 4) Kawaguchi T, Ohwada C, Takeuchi M, Shimizu N, Sakaida E, Takeda Y, Sakai S, Tsukamoto S, Yamazaki A, Sugita Y, Higashi M, Fujikawa K, Matsue K, Yokote K, Tamaru J, Bujo H, Nakaseko C. Potential utility of serum soluble LR11 as a diagnostic biomarker for intravascular large B-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma* 2014;55(10):2391-4.
- 5) Shimizu N, Nakaseko C, Jiang M, Nishii K, Yokote K, Iseki T, Higashi M, Tamaru J, Schneider W J, Bujo H. G-CSF induces the release of the soluble form of LR11, a regulator of myeloid cell mobilization in bone marrow. *Annals of hematology* 2014;93(7):1111-22.
- 6) Tokuhira M, Kimura Y, Nemoto T, Sagawa M, Tomikawa T, Sakai R, Okuyama A, Amano K, Higashi M, Tamaru J, Mori S, Tabayashi T, Watanabe R, Kizaki M. Therapy-related myeloid neoplasm in methotrexate-associated lymphoproliferative disease in a rheumatoid arthritis patient. *Journal of clinical and experimental hematopathology* 2014;54(2):137-41.

学会発表

- 1) 東 守洋, 得平道英, 木崎昌弘, 田丸淳一. びまん性大細胞型B細胞リンパ腫におけるHLA-DR発現ロスはT細胞環境と関連し予後不良因子である. 第104回日本病理学会総会, 平成27年, 名古屋
- 2) 東 守洋, 得平道英, 川口岳晴, 武内正博, 大和田千佳子, 中世古知昭, 武城英明, Michael Hummel, 木崎昌弘, 田丸淳一. LR11は細胞膜上のLipid raftでCD20と複合体を形成しRituximab CDCを阻害する. 第30回悪性リンパ腫治療研究会, 平成27年4月, 千葉.
- 3) 東 守洋. 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. Hodgkinリンパ腫におけるNF-κB細胞内シグナル伝達系. 第54回日本リンパ網内系学会総会, 平成26年6月, 山形.

特許出願等

なし