

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590713

研究課題名(和文)モノクローナル抗体をもちいたアスパラギナーゼ感受性腫瘍の検索

研究課題名(英文)Development of a predictive system of the sensitivity for L-asparaginase in tumor by monoclonal antibody

研究代表者

鬼頭 敏幸 (Kitoh, Toshiyuki)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50243027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：新たなFlow cytometry法によるアスパラギン合成酵素ASNS測定系のためのモノクローナル抗体を作成し(Hybridoma (Larchmt). 2012 1(5):325-32.) 2011年10月3日に特許出願した。この抗体を用いて、白血病臨床検体でASNS発現とL-asparaginase感受性を同時に測定し解析システムの有用性を検討し確認した。臨床検体においてもASNS 低発現とASNase 感受性の関連を認める結果を得た。FCMによるASNS蛋白量の測定は、L - アスパラキナーゼの感受性について予測するための有力な情報をあたえるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Due to the lack of rapid upregulation of asparagine synthetase (ASNS) in ALL cells, they are preferentially killed by ASNase-induced asparagine depletion. The purpose of this study was to examine the usefulness of a rapid flow cytometric assay that measure ASNS protein in whole cells to predict sensitivity and resistance to ASNase. ASNS expression evaluated by cytosolic flow cytometry with the Z5808 monoclonal antibody (McAb) (Hybridoma, 2012) significantly correlated with ASNS activity in leukaemia cell lines. The ASNS protein level was inversely correlated with sensitivity to ASNase in both leukaemia cell lines and primary leukaemia cells. We have shown that ASNS protein expression measured by flow cytometry assay strongly predicts ASNase activity in leukaemia cells and that lower levels of ASNS protein found in AML-M1, M5 and M7 subtypes. The utility of using flow cytometry to measure ASNS levels in clinical samples and the future potential of this methodology is promising.

研究分野：がん化学療法

キーワード：分子標的療法 アミノ酸要求性 選択毒性 抗がん剤 細胞死 酵素製剤 感受性予測 アミノ酸代謝

### 1. 研究開始当初の背景

アスパラギン合成酵素(ASNS)は生体内で L-グルタミンを窒素源とした ATP 依存性の反応により L-アスパラギン酸から L-アスパラギンの生合成を触媒する。そのため、L-アスパラギンは体外から取り入れる必須アミノ酸ではない。正常細胞では L-アスパラギンの供給量が減少すると L-アスパラギンの合成により補うことができる。しかしながらリンパ芽球は ASNS の活性が十分でないために外部から L-アスパラギンを取り入れなければならない。L-アスパラギナーゼ(ASNase)は L-アスパラギンを L-アスパラギン酸とアンモニアへと加水分解する酵素であるが、多くの急性リンパ性白血病(ALL)治療において重要な薬物である。ASNase の投与は血液、髄液、骨髄の L-アスパラギンを枯渇させ、細胞内の L-アスパラギンまで枯渇させる。ASNS レベルが非常に低いリンパ芽球細胞は細胞死を起こしやすい。リンパ芽球細胞の ASNase への暴露で G1 期を停止しアポトーシスを引き起こす。ヒト ASNS の過剰発現で ASNase 耐性を誘導するのに十分であることが示されている。ASNS 発現量と ASNase 感受性の関係は白血病細胞だけでなく卵巣癌細胞でも認められている。これらの所見は ASNase 治療を決定する診断マーカーとしての ASNS 活性モニタリングの重要性を示唆している。ASNase 抵抗性と ASNS mRNA 発現量との関係は広く報告されてきているが、ヒト白血病での ASNS タンパク質量を決定した研究は少ない。ASNase 感受性は ALL 細胞株に含まれるアスパラギン合成酵素(ASNS)のタンパク質量と関係していることが報告されている。しかしながら、定量分析に適したモノクローナル抗体がないために、ASNS タンパク質量を報告した例は少ない。

### 2. 研究の目的

本研究は、細胞内のアスパラギン合成酵素の定量分析に適したフローサイトメトリーや酵素結合免疫吸着法(ELISA)による検査法の確立を課題とする。細胞内のアスパラギン合成酵素の定量分析の結果が、腫瘍細胞の ASNase 感受性の予測に有用であるかを確認するために、同時に腫瘍細胞の ASNase 感受性を確認する。アスパラギン合成酵素の低発現と腫瘍細胞の ASNase 感受性との相関関係を確認する。

### 3. 研究の方法

1) バキュロウイルス提示系を用いて、細胞内に存在するアスパラギン合成酵素に特異的に認識するモノクローナル抗体を作製することに成功した。このモノクローナル抗体は、フローサイトメトリーや酵素結合免疫吸着法(ELISA)に適応できる。このモノクローナル抗体により白血病リンパ芽球の ASNS タンパク質量を定量し、ASNase 抵抗性を予測することが可能となる。本発明のモノクロー

ナル抗体はウェスタンブロッティング、免疫蛍光染色、酵素結合免疫吸着法(ELISA)においてヒトアスパラギン合成酵素を認識することができる。本発明のモノクローナル抗体を用いることにより、リンパ芽球細胞内のアスパラギン合成酵素タンパク質を定量測定し、白血病の ASNase 感受性を臨床評価することが可能である[1]。

2) 浮遊細胞内 ASNS 蛋白質量の定量の方法は、細胞の固定処理と膜透過処理は IntraStain, Fixation and Permeabilization Kit (Dako) を用いて行い、一次抗体としてモノクローナル抗体を 3 µg/ml となるように添加する。その細胞を dilution buffer(1% BSA/0.1 mM EDTA/PBS) で洗浄した後、R-Phycoerythrin (R-PE)標識抗マウス IgG (Jackson Immuno Research Laboratories)を dilution buffer で百倍希釈したものを反応させる。最後に、細胞を dilution buffer で 2 回洗浄し検体を用意する。

3) FCM での測定・解析 BD 社製の FACS Caribur を用いて測定し、CELL Quest にて解析する。陰性コントロールが前方散乱光(FSC)と側方散乱光(SSC)で表したドットグラム上で 10 内になるように設定し、細胞 10,000 個を取り込み蛍光強度を測定する。

4) ASNS 発現量は、モノクローナル抗体による平均蛍光強度(MFI)と isotypic control による MFI との差  $\Delta$ MFI あるいは、モノクローナル抗体による平均蛍光強度(MFI)と isotypic control による MFI との比 MFI ratio で比較定量する。

5) ASNase 感受性のチェック：種々の濃度の ASNase 処理による殺細胞効果を ALL, 急性骨髄性白血病(AML)の臨床検体あるいは白血病細胞株の胞浮遊液において MTT/WST-1 assay で測定する。臨床検体では骨髄または末梢血、細胞浮遊液から、Ficoll-Paque を用いて比重遠心法により単核球を分離する。分離後、細胞は単核球の 80% 以上を占め、生細胞率は 95% 以上であることを確認する。96 穴プレートを用いて、薬剤を含まないあるいは段階希釈した ASNase を含む培養液 (10% 胎児ウシ血清入り RPMI1640) 中に 5% CO<sub>2</sub>、37 °C で単核球を 3 日間培養する。ASNase の最終濃度は 0.016-10.00U/ml とする。1 ウェル (培養液 100µl) あたりの単核球数は、ALL では  $3 \times 10^5$  個、AML では  $1 \times 10^5$  個とする。3 日間培養 methyl-thiazol-tetrazolium (MTT) /WST-1 アッセイにより、薬剤無添加ウェルをコントロールとして ASNase 添加ウェルの殺細胞率を算定する。用量反応曲線から 50% の殺細胞率を示す ASNase の濃度 (LD<sub>50</sub>asp) を求める。

5) 細胞株で上記の ASNS 発現量 ( $\Delta$ MFI あ

るいは MFI ratio) を比較定量と既報の方法で測定した ASNS 酵素活性[2]との相関を検討する。

#### 4. 研究成果

##### 1) フローサイトメトリーの検討

細胞株の検討で、2 種のモノクローナル抗体 Z5808、Z5801 を比較して前者の方が、よりフローサイトメトリーに適していることが、判明していた。その後の検討では、細胞株、臨床検体ともに Z5808 での検討を行った。

表 1 に示すように、 $\Delta$ MFI、MFI ratio ともに ASNS 発現量を表現し、ASNS 活性との相関も、線形回帰分析  $R^2$  値 はそれぞれ 0.91、0.86 と極めて良好な相関を示した。

表 1 ASNS 発現量と L-ASNase 感受性の関係

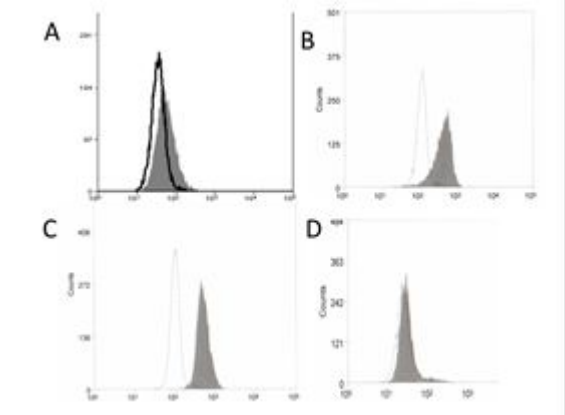
Cell lines	$\Delta$ MFI	MFI ratio
K562	351.7±48.6	5.39±0.34
KG-1	135.7±5.66	2.48±0.09
HL-60	48±8.01	1.77±0.03
RS4;11	22±2.83	1.29±0.02
MOLT4	22±1.89	1.19±0.03
U937	16.7±0.47	1.19±0.02

Cell lines	ASNS activity (pmol/min/mg protein)	ID <sub>50</sub> for L-asp (U/ml)
K562	558±56	>10
KG-1	374.3±139	>10
HL-60	161±24.2	0.27
RS4;11	40.2±6.1	0.16
MOLT4	32.4±3.5	0.15
U937	25.3±15	0.02

図 1 .に FAB 分類に従った AML 臨床検体での代表的なフローサイトメトリーのヒストグラムを示す。

(A)Case 4; MFI=11.65 低発現の AML M1, IC<sub>50</sub> は 0.15 IU/L で ASNS 感受性あり (B) Case 5; MFI=322.9 高発現の FABM2 例では IC<sub>50</sub> は 10 IU/L 以上で耐性であった。  
(C) (C)Case 10 では慢性期の ID<sub>50</sub> >5.0 U/ml ASNase 抵抗性、であったが、急性転化期 MFI=164.99 から 12.12 への低下に伴い ID<sub>50</sub> 0.01 U/ml と感受性ありとなっている。

図 1 . 臨床検体での代表的なヒストグラム



影なしのヒストグラムは isotype 適合コントロールを、影付きヒストグラムは Z5808 によるものを示す。

(A)Case 4; AML M1, MFI=11.65, (B) Case 5; AML M2, MFI=322.9 (C)Case 10;慢性骨髄性白血病慢性期 MFI=164.99 (D) Case 10 の急性転化; MFI=12.12.

表 2 . FCM 実施 AML 症例

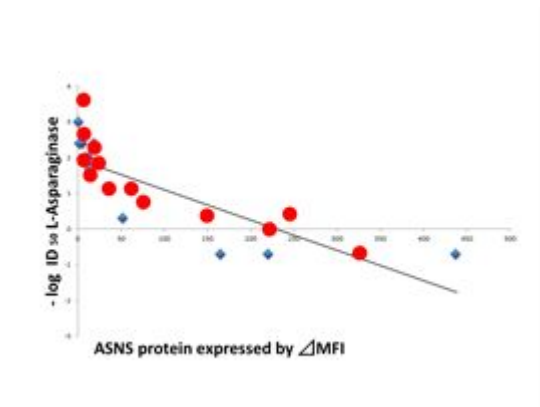
UPN	gender	age	Sample	Blas%	FAB	$\Delta$ MFI	MFI ratio	IC <sub>50</sub> (U/ml)
Case1	F	3y	BM	24.50%	AML M1	12.36	1.6	na
Case2	F	84y	FB	24.50%	TAM M1	8.28	1.22	na
Case3	M	75m	BM	8%	ALL L1	8.28	1.08	<0.01
Case4	M	79y	FB	7%	AML M1	11.48	1.29	0.01
Case5	M	80y	FB	96%	AMLM2	322.9	3.71	>5.0
Case6	M	8y	BM	22.15	ALL L1	8.57	1.65	<0.01
Case7	F	19y	BM	20.21	ALL L1	0.16	1.00	<0.01
Case8	M	20/3m	BM	22.45	ALL L1	7.65	1.20	0.006
Case9	F	20/7m	BM	22.64	ALL L1	18.5	1.25	0.006
Case10	F	3y	FB	7%	CMLCP	165	4.84	>5.0
Case10	F	3y	BM	9%	Ph1-ALL	1.94	1.21	>0.004
Case11	F	10y	BM	7%	AML M1	12.36	1.07	na
Case12	F	8y	BM	96%	AMLM4	51.6	1.61	1
Case13	F	2y	BM	96%	AMLM1	1.26	1.12	>0.004
Case14	F	8y	FB	96%	AMLM1	0.81	1.01	>0.004
Case15	F	5/8m	BM	96%	AMLM0	22	1.16	0.24
Case19	M	11/8m	BM	8%	AML M2	0.28	1.02	0.006
Case20	F	5/7m	BM	7%	ALL L1	1.02	1.24	>0.004
Case21	M	1/5m	BM	8%	AML M1	1.79	1.23	0.07
Case28	M	11y	BM	7%	B-ALL	16.17	1.09	0.3
Case29	M	15y	BM	96%	B-ALL	26.28	1.02	0.6
Case31	F	13y	BM	96%	AMLM4	151	1.85	>5.0
Case32	M	13y	BM	96%	AMLM1	1.01	1.12	0.06

If any characteristics of the AML patients listed in this study, L-ASP activity was registered by: BM (bone marrow), FB (peripheral blood), WBC (white blood cell), nd (not done), na (not available)

2) FCM 結果と L-ASNase 感受性との相関  
主な AML 患者特性は表 2 に示す。Flow cytometry 23 例で実施された; 8 例の ALLs: 1 例 Ph1 陽性 ALL, 2 例 B-ALLs, 13 例の AMLs (M0, 1; M1, 3; M2, 2; M4, 2; M5, 1; M7, 4), 1 例 acute mixed lineage leukemia (AMML) と 1 例の慢性期 CML。IC<sub>50</sub> は 18 例中 15 例で測定できた。

臨床 FCM 実施症例と ID<sub>50</sub> の相関の検討 (図 2) では、MFI として表現した ASNS 発現量レベルが、ALL8 例を参照として、ASNS 蛋白の log<sub>2</sub> としてプロットされている。+2 は参照レベルの ASNS 発現の 4 倍高いことになる。赤丸は AML 症例を示す。線形回帰曲線 (相関指数=-0.90; P 値<0.01) と高い相関を示した。

図 2 . 臨床 FCM 実施症例と ID50 の相関の検討



### 3) 考察

モノクローナル抗体 Z5808 を用いたフローサイトメトリー (FCM) を実施し、腫瘍細胞内アスパラギン合成酵素 ASNS の発現を蛍光的に検出した。FCM における MFI (= Z5808 の MFI - アイソタイプ対照の MFI) は、ASNS 蛋白量を反映し、ALL 症例、AML 症例の多くが低 ASNS 蛋白量の白血病であった。AML 症例の一部では、高 ASNS 蛋白量であった。MTT/WST1 assay による L-asparaginase の感受性の検討では、高 ASNS 蛋白量の AML 症例の ID50 は >5 U/ml で L-asparaginase 抵抗性、低 ASNS 蛋白量の ALL 例とも、<0.01 U/ml での感受性であった。臨床検体においても ASNS 低発現と ASNase 感受性の関連を認める結果を得た。FCM による ASNS 蛋白量の測定は、L-アスパラギナーゼの感受性について予測するための有力な情報をあたえるものと考えられた。

ASNS 解析システムを利用し、小児特有の腫瘍性疾患の解析を開始し、小児特有の腫瘍性疾患 Langerhans cell histiocytosis LCH 症例の低 ASNS 発現を見いだした。

新たに、悪性中皮腫の検討で、細胞株 4 例中 1 例、臨床検体 4 例中 1 例に L-asparaginase 感受性例を見出し更なる検討を進めるところである。

### 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 5 件)

- Goto H, Kaneko T, Shioda Y, Kajiwara M, Sakashita K, Kitoh T, Hayakawa A, Miki M, Kato K, Ogawa A, et al: Hematopoietic stem cell transplantation for patients with acute lymphoblastic leukemia and Down syndrome. *Pediatric blood & cancer* 査読有、2015, 62:148-152. DOI: 10.1002/psc.25245

- Muramatsu H, Sakaguchi H, Taga T, Tabuchi K, Adachi S, Inoue M, Kitoh T, Suminoe A, Yabe H, Azuma E, et al: Reduced intensity conditioning in allogeneic stem cell transplantation for AML with Down syndrome. *Pediatric Blood & Cancer* 査読有、2014, 61:925-927. DOI: 10.1002/pbc.2488
- Wada T, Muraoka M, Toma T, Imai T, Shigemura T, Agematsu K, Haraguchi K, Moriuchi H, Oh-Ishi T, Kitoh T, et al: Rapid detection of intracellular p47phox and p67phox by flow cytometry; useful screening tests for chronic granulomatous disease. *J Clin Immunol* 査読有、2013, 33:857-864. DOI: 10.1007/s10875-012-9859-9
- Shinzato A, Tabuchi K, Atsuta Y, Inoue M, Inagaki J, Yabe H, Koh K, Kato K, Ohta H, Kigasawa H, Kitoh T, et al: PBSCT is associated with poorer survival and increased chronic GvHD than BMT in Japanese paediatric patients with acute leukaemia and an HLA-matched sibling donor. *Pediatric Blood & Cancer* 査読有、2013, 60:1513-1519. DOI: 10.1002/pbc.24524
- Kitoh T, Shimomura Y, Hori T, Terashima T, Yokoi T, Tsurusawa M: THE THERAPEUTIC VALUE OF ASPARAGINE SYNTHETASE DEFICIENCY IN LANGERHANS CELL HISTIOCYTOSIS. *Pediatric Blood & Cancer* 査読有、2013, 60:E78. DOI: 10.1002/pbc.24544

〔学会発表〕(計 5 件)

- Toshiyuki Kitoh, Kou Suchan Gao Siqiang, Hidefumi Kato, Kenji Miyata, Yasuto Shimomura, Toshinori Hori, Kimiyoshi Sakaguchi, Yasuo Horikoshi, Kentarou Ohki, Katsuyoshi Koh, and Takao Hamakubo. Flow Cytometric Detection of Asparagine Synthetase Protein in Leukemia Cells; Indication for L-Asparaginase Therapy 56th ASH Annual Meeting and Exposition (December 6-9, 2014) December 7, 2014, San Francisco, CA, USA
- 鬼頭敏幸, 高四強, 坂口公祥, 下村保人, 堀壽成, 三輪啓志, 加藤栄史, 鶴澤正仁, 浜窪隆雄 L-アスパラギナーゼ適応となりうる急性骨髄性白血病症例のフローサイトメトリー法による検索 Flow Cytometric Detection of Asparagine Synthetase Protein in Leukemia Cells;

- L-Asparaginase : Indication for Acute Myeloid Leukemia 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会 2013.12.3 福岡市
3. Kitoh Toshiyuki, Akiyama Masaharu, Taki Tomohiko, Shimomura Yasuto, Hori Toshinari, Terashima Tsuyoshi, Yokoi Toyoharu, Tsurusawa Masahito. AGGRESSIVE LANGERHANS CELL HISTIOCYTOSIS FOLLOWING T-ALL: CLONALLY RELATED NEOPLASMS WITHOUT BRAF V600E MUTATION AND SUFFICIENT EXPRESSION OF ASPARAGINE SYNTHETASE 29th Histiocyte Society Annual Meeting 2013.10.22 Washington, DC. USA
  4. Toshiyuki Kitoh, Kou Suchan Gao Siquang, Hidefumi Kato, Yasuto Shimomura, Toshinori Hori, Kimiyoshi Sakaguchi, Hiroshi Miwa, Masahito Tsurusawa, Takao Hamakubo Flow Cytometric Detection of Asparagine Synthetase Protein in Leukemia Cells; Indication for L-Asparaginase Therapy EAP 2013-European Academy of Paediatrics Educational Congress & MasterCourse 2013.9.19. Lyon, France
  5. Kitoh T, Shimomura Y, Hori T, Terashima T, Yokoi T, Tsurusawa M THE THERAPEUTIC VALUE OF ASPARAGINE SYNTHETASE DEFICIENCY IN LANGERHANS CELL HISTIOCYTOSIS 28th Annual Meeting of the Histiocyte Society 2012. 10.12 London, UK

〔図書〕(計 1 件)

鬼頭敏幸 化学療法薬・その他(ステロイド等)堀部敬三、越永従動、大賀正一、米田光宏編小児血液・腫瘍学。診断と治療社 2015 ; pp142-146 東京 : 2015 年 11 月

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称 : アスパラギン合成酵素に特異的に認識するモノクローナル抗体  
 発明者 : 浜窪隆雄, 望月康弘, 岩成宏子, 鬼頭敏幸, 鶴澤正仁, 新井 修  
 権利者 : 同上  
 出願人 : 国立大学法人東京大学, 学校法人愛知医科大学, 株式会社特殊免疫研究所  
 種類 : 特願 2011 - 218966  
 番号 : 20149073  
 出願年月日 : 2011 年 10 月 3 日  
 国内外の別 : 国内、海外とも  
 国際特許 2012 年 10 月 1 日出願  
 国際予備審査請求申請 2012 年 12 月 17 日

〔その他〕  
 ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鬼頭敏幸 (KITOH TOSHIYUKI)

愛知医科大学・医学部・准教授(移行)

研究者番号 : 50243027

(2)研究分担者

横井豊治 (YOKOI TOYOHARU)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 40200886

鶴澤正仁 (TSURUSAWA MASAHITO)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 90172064

加藤 栄史 (KATO HIDEFUMI)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 40298584

(3)連携研究者

浜窪隆雄 (HAMAKUBO TAKAO)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号 : 90198797

科学研究費助成事業 基盤研究(C)24590713  
 モノクローナル抗体をもちいたアスパラギナーゼ感受性腫瘍の検索

引用文献

1. Kusano-Arai O, Iwanari H, Mochizuki Y, Nakata H, Kodama T, Kitoh T, Hamakubo T: **Evaluation of the asparagine synthetase level in leukemia cells by monoclonal antibodies.** *Hybridoma (Larchmt)* 2012, **31**:325-332.
2. Irino T, Kitoh T, Koami K, Kashima T, Mukai K, Takeuchi E, Hongo T, Nakahata T, Schuster SM, Osaka M: **Establishment of real-time polymerase chain reaction method for quantitative analysis of asparagine synthetase expression.** *J Mol Diagn* 2004, **6**:217-224.