

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461601

研究課題名(和文) WT1蛋白を標的とするナノ粒子を用いた白血病の高感度MRD診断法の確立

研究課題名(英文) High-sensitive MRD detecting method for leukemia using nano particles with sugar chain which can bind WT1 protein

研究代表者

岡本 康裕 (OKAMOTO, Yasuhiro)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：30398002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、急性白血病の微小な病変(微小残存病変：MRD)を評価するための、より簡便で、感度の高い新しい方法を開発することを目指した。急性白血病が有するWT1蛋白に特異的に結合する糖鎖を結合したナノ粒子を作成し、このナノ粒子でWT1蛋白を濃縮し、ELISA法で測定した。従来のMRD測定法であるフローサイトメトリーやPCR法よりも、簡便で安価な方法であるナノMRD法は、従来のELISA法よりも、約50倍高感度に測定でき、白血病のMRD測定に有用である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop a new, simple, and highly sensitive method to detect minimal residual disease (MRD) in acute leukemia. Nano particles having sugar chain which can bind specifically WT1 protein released from leukemic cells were made. After condensing WT1 protein by nano particles, WT1 level was measured by ELISA. Nano MRD method is much simpler and cheaper compared to other methods detecting MRD including flowcytometry or PCR. Nano MRD method is about 50-times more sensitive than regular ELISA method. Nano MRD method should be useful to detect MRD in leukemia patient.

研究分野：小児がん

キーワード：ナノ粒子 MRD 急性白血病

1. 研究開始当初の背景

小児の急性リンパ性白血病(ALL)は、年々治療率が向上している疾患である。新規薬剤による治療法の開発だけでなく、薬剤の組み合わせ方の改善、さらには、詳細なリスク因子に従って治療強度を調節することによって、治療成績は改善してきた。リスク因子のうち、現在最も重要なのは、治療に対する反応性である。つまり、治療によって白血病が末梢血や骨髄検査で減少する早さが予後とよく相関することがわかっている。治療に対する反応性が最も重要である理由は、3つの要因が総合的に関与しているからである。すなわち、1)治療法:使用する薬剤、投与量、組み合わせ、スケジュール、2)白血病細胞の性質:染色体異常、遺伝子異常など、3)宿主の性質:薬剤代謝の多型などを総合した因子であるからである。治療反応性を評価する方法としては、より客観的な方法で、かつ、微量の白血病を検出する方法が開発された。微量に残る白血病を微小残存病変(minimal residual disease: MRD)というが、現在用いられているMRDの評価の方法は、フローサイトメトリーを用いた方法(FACS-MRD法)と、PCRを用いた方法(PCR-MRD法)がある。しかし、これらの方法には、患者毎に検査の設定が必要である点と、検査結果を得るのに時間のかかる点が問題である。FACS-MRD法では、白血病細胞に特有の表面マーカーの発現パターンを患者ごとに決定し、正常細胞と区別する必要がある。FACS-MRD法では多数の表面マーカーを解析する必要があり、検査費用も検査時間もかかる。PCR-MRD法では、まず患者の白血病細胞に特有の遺伝子異常部位(多くの場合、異常キメラ遺伝子がIgG/TCRの再構成部位)を遺伝子解析によってまず決定し、それを検出するためのPCRプライマーを患者毎に設計する必要がある。やはり、検査費用も検査時間もかかる方法である。これらの問題を解決するためには、1)白血病患者に普遍的(患者に共通して)にみられる異常を標的とすること、2)FACS-MRDやPCR-MRDよりも簡便な方法を用いること、の2点を工夫する必要がある。

そこで、本研究では、白血病細胞と正常細胞を区別でき、かつ、白血病患者には普遍的な異常であるWT1蛋白に注目した。WT1蛋白は最初、腎泌尿器系の発生に重要な役割を果たす転写因子として同定されたが、白血病においても過剰に発現していることが知られている。さらにWT1のmRNAの発現の程度が、急性白血病の予後因子となることも、すでに報告されており、白血病のMRDに適した標的である。次に、従来のELISA法では検出できない程度のWT1蛋白を検出する方法が必要である。糖鎖は生体内で多彩な機能を示し、生命現象に不可欠な役割を有する。例えば、細胞表層の糖鎖はウイルスにはレセプターとして利用され、その感染を仲介する。研究分担者は、糖鎖を金などの金属に効率よく

固定化する方法を発明し、その固定化法を用いて、糖鎖を固定化したバイオデバイス「糖鎖固定化金ナノ粒子(以下ナノ粒子)」を開発している。このナノ粒子を用いて、我々は造血細胞移植後の患者のウイルス感染症を早期に診断・モニタリングする研究を行い、成果を挙げている。本研究においては、WT1蛋白に特異的に結合する糖鎖を固定化したナノ粒子を用いれば、検体中の微量のWT1蛋白を効率よく濃縮し、測定することができると考えた。

2. 研究の目的

腫瘍細胞に過剰に発現する転写因子であるWT1蛋白に特異的に結合する糖鎖を固定化したナノ粒子を作成し、ナノ粒子に結合する体液中のWT1蛋白を濃縮し、高感度ELISA法を行い、体液中に存在する微量の腫瘍細胞を検出する方法を確立する。さらにこの技術を臨床に應用して、小児急性リンパ性白血病(ALL)のリスクに応じた治療方法の選択を高精度化することを目的とする。

3. 研究の方法

第1段階として、シュガーチップを用いてWT1蛋白に特異的に結合する糖鎖をスクリーニングすることで決定し、この糖鎖を金に固定化したナノ粒子を作成する。次に、患者の検体(血清、尿、髄液)とナノ粒子を混合し、WT1蛋白とナノ粒子を結合させる。遠心によってナノ粒子に結合したWT1蛋白を濃縮し、濃縮された検体を用い、ELISA法でWT1蛋白を測定する。2)第2段階として、a)ナノMRD法の感度を陽性コントロールを用いて決定する。b)急性リンパ性白血病(ALL)患者を対象として、臨床経過、従来のFACS-MRD法、PCR-MRD法、およびナノMRD法によるMRDの経時的な推移を明らかにし、ナノMRD法を臨床検査として確立する。

(1) WT1蛋白の精製

ALL細胞株(CCRF-CEM)を培養し、抗がん剤(シタラピン)を様々な濃度で添加し、種々の程度の細胞死を惹起する。この培養液上清を用いてWT1抗体を用いてWestern blotを行う。この膜を用いてWT1抗体に結合した蛋白の構造解析を行い、細胞死によって血清中で検出されるWT1蛋白のアミノ酸配列を特定する。このアミノ酸配列を元に、WT1蛋白を精製する。もし、細胞死を惹起する培養条件では蛋白量が少なく、WT1が検出できない場合には、通常の条件で培養したFFRF-CEM細胞を用いて、蛋白抽出を行い、western blotを行う。同様にこの膜を用いて、蛋白の解析を行い、アミノ酸配列を決定する。

(2) ナノ粒子の作成

(1)によって精製されたWT1蛋白質を用いて、これに特異的に結合する糖鎖をスクリーニングする。糖鎖のスクリーニングには、糖鎖を固定化したバイオデバイスである「シュガーチップ」を用いて、

WT1 蛋白に特異的に結合する糖鎖を決定する。次に、この糖鎖と金粒子を結合させ、WT1 特異的なノ粒子(ナノ粒子)を完成させる。

(3)陽性コントロール検体

ALL 細胞株 (CCRF-CEM) を陽性コントロールとして用いる。CCRF-CEM の培養液に抗がん剤(シタラビン)を添加する。細胞死を TO (thiazole orange), PI (propidium iodide) 使った FACS で確認し、この細胞培養液上清を、陽性コントロール検体として用いる。

(4)混合・濃縮

陽性コントロール検体とナノ粒子を混合し、遠心し、ナノ粒子に結合した WT1 蛋白を濃縮する。

(5)ELISA

濃縮された検体を用いて、ELISA 法で WT1 蛋白濃度を測定する。

平成 26 年度以降

ナノ MRD 法が臨床に応用できることを明らかにする。

(1)ナノ MRD 法の検出感度の決定

平成 25 年度と同様に、ALL 細胞株 (CCRF-CEM) を培養し、さまざまな細胞濃度で、さまざまな濃度のシタラビンを添加し、様々な割合の生細胞と死細胞を含む陽性コントロール検体の系列を作成する。これを用いて、ナノ MRD 法で測定し、ナノ MRD 法の検出感度を決定する。

(2)臨床応用

臨床検体を用いて、FACS-MRD 法、PCR-MRD 法、ナノ MRD 法の関係を確認するとともに、それぞれの検査法の経時的な変化を測定する。

対象: 鹿児島大学で診断し、治療中の ALL 患者を対象とする。本研究期間中の新規発症患者数は、年間 10 例あるので、3 年の研究期間に 30 例であり、この 30 例を本申請研究の対象とする。

検体採取: 検体は、骨髓(FACS-MRD 法、PCR-MRD 法)、血清(ナノ MRD 法)と髄液(ナノ MRD 法)を用いる。検体採取時期は、通常の診療で検査を行う時期と同じにする。すなわち、治療開始前(発症時)、治療開始から 2 週目、4 週目、8 週目、12 週目および、強化療法開始前、維持療法開始前に検体を採取する。骨髓および髄液は 1ml、血清は 3ml 採取する。

FACS-MRD 法: 用いる抗体は、cCD3, CD2, 3, 5, 7, 13, 19, 20, 33, 79a で、B 細胞前駆性 ALL、T 細胞性 ALL などの MRD を測定する。我々のこれまでの検討では、0.01% の感度まで測定できる。臨床経過に合致する検出限界は 0.1% である。

PCR-MRD 法: WT1 の mRNA を、real time PCR 法で定量する。Primer set は、5'-ACA, GGG, TAC, GAG, AGC, GAT, AAC, CA-3' と 5'-CAC, ACG, TCG, CAC, ATC, CTG, AAT-3' である。

ナノ MRD 法: 検体(血清、髄液)とナノ粒子を混合し、遠心する。ナノ粒子で濃縮された検

体を用いて、ELISA 法で WT1 蛋白濃度を測定する。

FACS-MRD 法、PCR-MRD 法、ナノ MRD 法の関係、および臨床経過との関係を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ALL 細胞株 (CCRF-CEM) を培養し、抗がん剤であるシタラビンを 4mg/ml の濃度で添加し、細胞死を惹起した。PI(propidium iodide)を用いて FACS を行い、45±6% の細胞が細胞死を起こしていることを確認した。(この条件は後の実験の陽性コントロールとする。)上記の条件でシタラビンを添加し培養した培養液の上清を用いて、WT1 抗体 (C-19: Santa Cruz Bio) を用いて western blot を実施した。WT1 蛋白は低レベルであったが検出できた。同条件で得られた培養上清を用いて、WT1 蛋白を CBB 染色し、この膜を用いてプロテアーゼを用いた in gel digestion を行い、ペプチドに断片化した。逆相 HPLC にてペプチド断片を得た後、ペプチドマップを作成、最終的に C-19 抗体に結合した蛋白の内部配列を特定した。このアミノ酸配列を元に、3 種類の 25~30 塩基のペプチドを合成した。

(2) 平成 25 年度までに、WT1 蛋白から得たペプチド断片から 25~30 塩基のペプチドを 3 種類合成した。これらに特異的に結合する糖鎖をスクリーニングする目的で、糖鎖を固定化したバイオデバイスであるシュガーチップを用いた。次にこの糖鎖と金粒子を結合させ WT1 特異的なノ粒子を作成した。昨年までに行った CCRF-CEM の培養液にシタラビンを添加し、細胞死を惹起した細胞培養液上清(WT1 蛋白をごく少量含む)を、陽性コントロールとして用いた。しかし、作成したナノ粒子を用いて WT1 蛋白を濃縮することには成功していない。

(3) 平成 27 年度の記載

平成 26 年度までに行った実験では、WT1 蛋白の断片を認識できる糖鎖が、WT1 蛋白全体を認識できていない可能性があると考えられた。このため今年度は WT1 蛋白から得たペプチド断片から 25~30 塩基のペプチドを新たに 2 種類合成した。これらに特異的に結合する糖鎖をスクリーニングする目的で、糖鎖を固定化したバイオデバイスであるシュガーチップを用い、次にこの糖鎖と金粒子を結合させ WT1 特異的なノ粒子を作成した。

また、シタラビンの細胞毒性による WT1 蛋白の抽出量が少なく、ナノ粒子が認識できていない可能性があるため、シタラビンをシクロホスファミドに変更し、細胞毒性を高めた。1 × 10⁶ 個/10ml の CCRF-CEM の培養液に濃度系列のシクロホスファミドを添加し、24~48 時間培養し、細胞死を惹起した。MTT アッセイで検討すると、シクロホスファミド + 代謝剤の添加によってシクロホスファミド 0~250 μM までは、細胞死の割合は直線的な相

関を示した。24時間と48時間では有意な差は認めなかった。次に同様の条件で、250 μ Mのシクロホスファミド添加し、24時間培養した細胞培養液上清を用い、希釈系列を作り、ナノMRD法で測定した。上清の原液では、通常のELISA法では0.17 \pm 0.05ng/mlであったが、ナノMRD法では、7.35 \pm 0.63ng/mlであった。ナノMRD法では、32倍希釈まで測定可能であった。1~4倍希釈での検討では、通常のELISA法に比べて、ナノMRD法は50.8 \pm 8.0倍高感度であった。

総合の記載

通常のELISA法に比べて、ナノMRD法は50.8 \pm 8.0倍高感度であることがわかったが、臨床検体を用いた経時的なナノMRDの変化については、本研究では検討できなかった。その結果、従来からのFACS-MRD法、PCR-MRD法、とナノMRD法の関係、および臨床経過との関係を明らかにすることは、今後の課題である。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計20件)

1. Imamura T, Kiyokawa N, Kato M, Imai C, Okamoto Y, et al. Characterization of pediatric Philadelphia-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with kinase fusions in Japan. *Blood Cancer J*. 2016 May 13;6:e419. doi: 10.1038/bcj.2016.28. 査読有
2. Koh K, Ogawa C, Okamoto Y, et al. Phase 1 study of clofarabine in pediatric patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia in Japan. *Int J Hematol*. 2016 Apr 16. [Epub ahead of print] <http://link.springer.com/article/10.1007/s12185-016-2004-4> 査読有
3. Miyazono A, Okamoto Y, et al. Multifocal EBV-Negative Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorder Treated with Reduction of Immunosuppression. *Am J Kidney Dis*. 2016 May 10. pii: S0272-6386(16)30095-6. doi: 10.1053/j.ajkd.2016.03.425. [Epub ahead of print] 査読有
4. Saito A, Okamoto Y, et al. DIC Complicating APL Successfully Treated with Recombinant Thrombomodulin alfa. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2016 Apr 27. [Epub ahead of print] http://journals.lww.com/jpho-online/Abstract/publishahead/DIC_Complicating_APL_Successfully_Treated_With.98487.aspx 査読有
5. Nakagawa S, Shinkoda Y, Hazeki D, Imamura M, Okamoto Y, et al. Central diabetes insipidus as very late relapse limited to the pituitary stalk in Langerhans cell histiocytosis. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2016 Apr 18. doi: 10.1515/jpem-2015-0391 [Epub ahead of print] 査読有
6. Kodama Y, Okamoto Y, et al. Central venous catheter-related blood stream infection with pyomyositis due to *Stenotrophomonas maltophilia* after allogeneic bone marrow transplantation in a patient with aplastic anemia. *Pediatr Transplant*. 2016 Mar;20(2):329-32. doi: 10.1515/jpem-2015-0391 査読有
7. Okamoto Y, et al. Effective VCR/DEX pulse maintenance therapy in the KYCCSG ALL-02 protocol for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol*. 2016 Feb;103(2):202-209 doi: 10.1007/s12185-015-1910-1. 査読有
8. Nishikawa T, Miyahara E, Kurauchi K, Watanabe E, Ikawa K, Asaba K, Tanabe T, Okamoto Y, Kawano Y. Mechanisms of Fatal Cardiotoxicity following High-Dose Cyclophosphamide Therapy and a Method for Its Prevention. *PLoS One*. 2015 Jun 26;10(6):e0131394. doi: 10.1371/journal.pone.0131394 査読有
9. Watanabe E, Nishikawa T, Ikawa K, Yamaguchi H, Abematsu T, Nakagawa S, Kurauchi K, Kodama Y, Tanabe T, Shinkoda Y, Matsumoto K, Okamoto Y, Takeda Y, Kawano. Trough level monitoring of intravenous busulfan to estimate the area under the plasma drug concentration-time curve in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. *Int J Hematol*. 2015 Nov;102(5):611-6. doi: 10.1007/s12185-015-1853-6. Epub 2015 Aug 5. 査読有
10. Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanezaki R, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Hara J, Goi K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Okamoto Y, et al. Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 2015; 168: 854-864 doi: 10.1111/bjh.13229 査読有
11. Ishida H, Adachi S, Hasegawa D, Okamoto Y, et al. Comparison of a fludarabine and melphalan combination-based reduced toxicity conditioning with myeloablative conditioning by radiation and/or busulfan in acute myeloid leukemia in Japanese children and adolescents. *Pediatr Blood Cancer*. 2015; 62: 883-889 doi: 10.1002/pbc.25389 査読有
12. Kato K, Kato M, Hasegawa D, Kawasaki H, Ishida H, Okamoto Y, et al. Comparison of transplantation with reduced and myeloablative conditioning for children with

- acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015; 125: 1352-1354 doi: 10.1182/blood-2014-10-604702. 査読有
13. Wakiguchi H, Okamoto Y, et al. Multiple Renal and Splenic Lesions in a Child with Cat Scratch Disease. *Jpn J Infect Dis*. 2015 Nov 13. [Epub ahead of print] https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/advpub/0/advpub_JJID.2015.362/_article 査読有
14. Abematsu T, Okamoto Y, et al. Rectosigmoid Colon Venous Malformation Successfully Treated with Propranolol and Celecoxib. *J Pediatr Surg Case Report* 3:331-333, 2015 doi:10.1016/j.epsc.2015.06.009 査読有
15. Hyakuna N, Shimomura Y, Watanabe A, Taga T, Kikuta A, Matsushita T, Kogawa K, Kawakami C, Horikoshi Y, Iwai T, Okamoto Y, et al. Assessment of corticosteroid-induced osteonecrosis in children undergoing chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia: A report from the Japanese Childhood Cancer and Leukemia Study Group. *J Pediatr Hematol Oncol* 2014; 36: 22-29 doi: 10.1097/MPH.000000000000039 査読有
16. Okamoto Y, et al. Prospective pharmacokinetic study of intravenous busulfan in hematopoietic stem cell transplantation in 25 children. *Pediatr Transplant*. 2014; 18: 294-301 doi: 10.1111/ptr.12236 査読有
17. Miyahara E, Nishikawa T, Takeuchi T, Yasuda K, Okamoto Y, et al. Effect of myeloperoxidase inhibition on gene expression profiles in HL-60 cells exposed to 1, 2, 4-benzenetriol. *Toxicology*. 2014; 317:50-57 doi: 10.1016/j.tox.2014.01.007 査読有
18. Kobayashi R, Yabe H, Kikuchi A, Kudo K, Yoshida N, Watanabe K, Muramatsu H, Takahashi Y, Inoue M, Koh K, Inagaki J, Okamoto Y, et al. Bloodstream Infection after Stem Cell Transplantation in Children with Idiopathic Aplastic Anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014; 20:1145-1149 doi: 10.1016/j.bbmt.2014.04.006 査読有
19. Moritake H, Kamimura S, Nuno H, Nakayama H, Suminoe A, Inada H, Inagaki J, Yanai F, Okamoto Y, et al. Clinical characteristics and genetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia with hemophagocytic lymphohistiocytosis: a Japanese retrospective study by the Kyushu-Yamaguchi Children's Cancer Study Group. *Int J Hematol* 2014; 100:70-78 doi: 10.1007/s12185-014-1591-1. 査読有
20. Kodama Y, Okamoto Y, et al. Bone marrow transplant for a girl with bone marrow failure and cerebral palsy. *Pediatr Int*. 2014; 56: 424-426 doi: 10.1111/ped.12297.

(学会発表) (計 4 件)

1. 岡本康裕, 他. 中等症再生不良性貧血の自然経過の観察. 第 57 回日本小児血液・がん学会学術集会 山梨県甲府市 2015.11.27-11.29
2. Okamoto Y, et al. GVL effect after tapering immunosuppression for leukemia/lymphoma after allogeneic SCT. 第 77 回日本血液学会学術集会 石川県金沢市 2015.10.16-10.18
3. 岡本康裕, 他. MIBG が持続陽性の神経芽腫の 5 例. 第 118 回日本小児科学会学術集会 大阪府大阪市 2015.04.17-04.19
4. 岡本康裕, 他. ナノ粒子を用いた高感度 PCR 法による CMV 感染の早期診断と治療効果判定. 第 37 回日本造血細胞移植学会総会 兵庫県神戸市 2015.03.05-03.07

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本康裕 (OKAMOTO, Yasuhiro)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号:30398002

(2)研究分担者

河野嘉文 (KAWANO, Yoshifumi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号:20260680

隅田泰生 (SUDA, Yasuo)

鹿児島大学・理工学域工学系・教授

研究者番号:70179281