

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 5 月 15 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009 ~ 2011

課題番号：21590621

研究課題名（和文） 蛍光標識糖鎖ホルモンを利用した機能的受容体の定量法の確立と補充療法の有効性予測

研究課題名（英文） A functional quantitative receptor assay using fluorescein labeled hormones with a carbohydrate chain for the evaluation of the hormonal replacement therapy

研究代表者

小野孝明 (ONO TAKAAKI)

浜松医科大学・がん教育研究センター・特任助教

研究者番号：40402276

研究成果の概要（和文）：Non-isotopic ligand binding assay 法は ligand に蛍光色素を効率よく結合させ、biotin-avidine 結合と energy transfer を利用して赤色蛍光を発光させ、その蛍光量から細胞上の受容体数を定量しようとするものである。測定は flow cytometry を使用し、被爆等の問題が少なく、多くの施設で測定しうる方法である。私たちはこれまで ligand を中心に本方法を成功させてきた。今回の研究では Non-isotopic ligand binding assay 法をホルモン受容体量の検出に広げ、これまで、RIA が抱える諸問題（被爆、施設の限定、臨床検体では得られにくい一定量以上の細胞数が必要なこと、アイソトープの使用期限など）を解決し、高感度かつ定量的に検出できることを試みた。TSH は標識に重要な糖鎖を保有し、遺伝子組み換え TSH が開発されたため、これを今回のモデルとした。rhTSH は臨床用に発売されている Thyrogen を使用した。Kolmogorov-Smirnov 解析中に利用される D value は蛍光標識 TSH が特異的にその受容体に結合していた場合、有意に高値を示す。今回の実験では D value の最大値は 0.12 と特異的に蛍光標識 TSH が受容体に結合していた。臨床検体由来細胞の TSH 受容体を高感度かつ定量的に測定するためには D value を 0.50 以上にまで高める必要があり、今後さらに蛍光標識方法をはじめアッセイ法の改善をしていく必要がある。

研究成果の概要（英文）：We have studied a non-isotopic ligand binding assay with the flow cytometry using biotinylated cytokines and fluorescent dye labeled streptavidin. Also, we have enabled to analyze a very small amount of receptors quantitatively according to the cell surface antigen by multicolor flow cytometry even in the heterogeneous cell population. In this study, we examined the possibility of applying the non-isotopic ligand binding assay with the flow cytometry into the hormone receptor assay. We examined the possibility of analysis of the thyrotropin (TSH) receptor expression by using recombinant human TSH (rhTSH) and FRTL-5 cell line which expresses TSH receptors. We biotinylated the rhTSH according to the previous studies in cytokines. D value, which is one of the components of Kolmogorov-Smirnov statistics in flow cytometry, is useful for quantitative analysis of hormone receptor. If the assay system has enough sensitivity and specificity, D value is significantly high ($p < 0.01$). In clinical usage including the analyses using human serum, maximum D value should be needed more than 0.50. We improved the efficacy of biotinylation to rhTSH and incubation methods. In this study, we tried to label the fluorescent dye to the rhTSH directly. Maximum D value improved to 0.12, which meant specific binding. However, it should be considered about the more effective intensification of biotinylation or fluorescent labeling of the rhTSH.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：ホルモン、TSH、ビオチン化、フローサイトメトリー、糖鎖

1. 研究開始当初の背景

体内の多くの反応は ligand や hormon が細胞表面および内部の当該受容体に結合することにより開始され、これにより細胞内にシグナルの伝達が行われる。これまでの医学研究において、これらの受容体を測定するいくつかの方法が考案されてきた。①ラジオアイソトープにより標識されたリガンドを使用した RI 法、②蛍光色素を標識した抗体を使用し抗原抗体反応を行った後にフローサイトメトリーにて測定する方法、③mRNA を定量的 PCR 法にて測定する方法 (RQ-PCR 法) が存在した。これらの測定にはそれぞれ、長所とともに短所が存在する。現在は、その目的に応じて、これらの測定方法を使い分けている。

①ラジオアイソトープ標識の ligand を使用した RI 法は放射能を扱うための施設が必要であり、人員教育の手間、危険性を回避するための手段を講じる必要があること、コストと手間のかかること、RI の使用期限があることなどの問題がある。②蛍光色素標識抗体を使用し抗原抗体反応を行った後にフローサイトメトリーにて測定する方法では、その特異性は抗原・抗体反応によるため、リガンドを使用した assay 法に劣る。また、1 抗原に反応する抗体が複数であり、その数を同定することは困難である。このように特異性・定量性の面でやや劣る。③mRNA 等を定量的 PCR 法にて測定する方法は高感度で、特異性も高い。しかし、手間がかかること、細胞表面の蛋白構造物を直接測定しているものではないことに問題があった。

開発中している non-isotopic ligand binding assay 法は ligand の糖鎖にビオチ

ンを結合させ、そのビオチンにストレプトアビジンを標識した赤蛍光色素を結合させ、その蛍光量から、細胞上の受容体数を定量しようとするものである。ligand と受容体の結合は特異的であり、かつ 1 対 1 であることから蛍光量は受容体数を反映したものとなる。赤色系蛍光は、緑色や黄色蛍光に比較して、蛍光量が多く、微量な表面抗原の検出には適する。またストレプトアビジン標識赤色蛍光色素は energy transfer にて蛍光量を増幅することができる。私たちの研究では、flow cytometry の解析に使用される Kormogonov-Smirnov test 内で使用される D value と D/S value は受容体数と極めて良好な相関関係を持つことを発見した (特許を取得)。そしてこの相関直線そのものを標準曲線として flow cytometry から得られた D value を受容体数に変換しうることを開発した。ligand や hormon 治療の標的となる細胞上の受容体数が検査室レベルで簡単に測定可能となれば、これを標的とした分子標的療法の確立や、治療効果を評価する上で有効な手段となる。

本研究においては、糖鎖を有する cytokine と hormon 受容体の非放射性定量法の確立に向けた検討を行う。

2. 研究の目的

Non-isotopic ligand binding assay 法は ligand に蛍光色素を効率よく結合させ、biotin-avidine 結合と energy transfer を利用して赤色蛍光を発光させ、その蛍光量から細胞上の受容体数を定量しようとするものである。本方法をホルモン受容体数の検出に広げ、これまで、RIA が抱える諸問題 (被爆、施設の限定、臨床検体では得られにくい一定量

以上の細胞数が必要なこと、アイソトープの使用期限など)を解決し、高感度かつ定量的に検出できるようにしたい。TSHは糖鎖を保有し、最近、遺伝子組み換えTSHが臨床をtargetに開発されてきたため、これをモデルとする。しかし、TSHにとどまらず、基本的に糖鎖を保有する全てのhormone受容体量の測定のbreakthroughとしたい。

今回のシリーズではTSHとその受容体に本方法を適用し、受容体や以後の転写活性の異常に起因する疾患、受容体への競合物質や自己抗体に起因する疾患そして腫瘍性疾患などで、TSH受容体の数的定量を実現しようとした。甲状腺疾患の領域においては受容体競合物質や自己抗体、そしてシグナル伝達に関して研究が進んできているが、TSHとその受容体に関し研究はあまり進んでいない。そのような中、新たに遺伝子組み換え型TSH (Thyrogen®)が海外ベンチャーで開発され、TSH受容体とその異常が再び注目され、その解析は重要視されつつある。Non-isotopic ligand binding assay法を発展させることで、TSHの結合性や受容体数の研究に応用可能となれば、その臨床面での有用性は高いと考えられる。まずは単離細胞において、本法が応用できる感度と特異性を検討する。

3. 研究の方法

下図はその方法論の概略を示したものである。Aは蛍光標識 hormone に高濃度(x1,000)の非標識 hormone を加え、同時に incubate する。その後 flow cytometer にて測定し、ヒストグラム A を得る。また蛍光標識 hormone のみにて incubate したのち、同様に測定後ヒストグラム B を得る。ヒストグラム A と B を累積したものが図 C である。2つの累積曲線の間の最大乖離幅が Kolmogorov-Smirnov 解析中に利用される D value である。この D value と Scatchard 法にて求めた受容体数の間には正の相関があり、 $r \geq 0.95$ で相関直線を引くことができる。この相関直線を標準直線として、D value から受容体数を逆算できる(特許番号 2585973 号、3262473 号)。

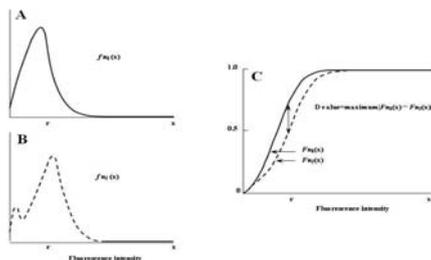


図1 非放射線受容体定量法の概略
Aはbiotin標識ligandに高濃度の非標識ligandを加え、同時にincubateしたのち、SA-RED670にて後染色を施行し、得られたヒストグラムである。Bはbiotin標識ligandのみでincubateしたのち、SA-RED670にて後染色し得られた。CはAとBのヒストグラムを累積したものである。

本方法を応用し、これまで煩雑な Scatchard 法に頼ってきた TSH の受容体を hormone 受容体の定量的測定を試みた。遺伝子組換え型ヒト TSH (Thyrogen®) を購入し、これに従来より私たちが使用してきた方法で、ビオチン標識した。TSH 依存性に増殖する TSH 受容体発現細胞株である FRTL-5 細胞を用いて発現解析を施行した。

4. 研究成果

数週間のTSHを含んだ培地での培養の後、細胞の生存率等を検討したのち、TSHを除去した培地を変更し、2-5日間、培養後、ビオチン標識遺伝子組換え型ヒトTSHと反応させた。その後、ストレプトアビジン標識PC5と反応させ、フローサイトメーターにて蛍光量を測定した。初年度の検討では、D valueの最大値は0.02で、蛍光標識が不十分であることが判明した。そのため、蛍光ラベルの効率を上げ、インキュベーション時間等の条件を変えて特異性と感度を検討したところ、D valueとして、最大値が0.12と増加した。臨床検体を使用する場合には、D valueとして、0.50以上必要とされ、ビオチン標識方法をさらに変更する必要があると考え、ビオチン標識方法の再検討を行っている。組み換えTSHであるThyrogenに関しては非常に高価であり、量的に限られた資料を使用したこともビオチン標識効率を低下させている可能性がある。遺伝子組み換え型以外のTSHを純化し、必要TSH量を得ることも考慮していく。

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 15 件)

(平成 21 年度)

1. Takeshita A, Ono T, et al
CMC-544 (inotuzumab ozogamicin) shows less effect on multidrug resistant cells: analyses in cell lines and cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia and lymphoma.
Br J Haematol 2009; 136 p34-43. (査読あり)

2. Takeshita A, Ono T, et al
CMC-544 (inotuzumab ozogamicin), an anti-CD22 immuno-conjugate of calicheamicin, alters the levels of target molecules of malignant B-cells. Leukemia 2009; 23 p1329-1336. (査読あり)

3. Kobayashi Y, Takeshita A, et al
Phase I/II study of humanized anti-CD33

antibody conjugated with calicheamicin, gemtuzumab ozogamicin, in relapsed or refractory acute myeloid leukemia: final results of Japanese multicenter cooperative study. *Int J Hematol* 2009; 89 p460-469. (査読あり)

(平成 22 年度)

4. Ono T et al.
BCR-ABL1 mutations in patients with imatinib-resistant Philadelphia chromosome positive leukemia by use of the PCR-Invader assay. *Leukemia Research* 2011; 35(5) p598-603.
(査読あり)

5. Ono T, Takeshita A, et al
Impact of additional chromosomal abnormalities in patients with acute promyelocytic leukemia: 10-year results of the Japan Adult Leukemia Study Group APL97 study.
Haematologica 2011; 96(1) p174-176 (査読あり)

6. Nakamura S, Ono T, et al.
The FOXM1 transcriptional factor promotes the proliferation of leukemia cells through modulation of cell cycle progression in acute myeloid leukemia. *Carcinogenesis* 2010; 31(11) p2012-2021 (査読あり)

7. Takemura T, Ono T, et al.
Reduction of Raf kinase inhibitor protein expression by Bcr-Abl contributes to chronic myelogenous leukemia proliferation.
The Journal of Biological Chemistry 2010; 285(9) p6585-6594 (査読あり)

8. Nakamura S, Ono T, et al.
Development and pharmacologic characterization of deoxybromophospho sugar derivatives with antileukemic activity.
Investigational New Drugs 2010; 28(4) p381-391 (査読あり)

(平成 23 年度)

9. Ohnishi K. et al.
Long-term outcome of imatinib therapy, with assessment of its dosage and blood levels, for chronic myelogenous leukemia. *Cancer Science* 2012 in press. (査読あり)

10. Nakamura S, Ohnishi K. et al.

Transcriptional repression of Cdc25B by IER5 inhibits the proliferation of leukemic progenitor cells through NF-YB and p300 in acute myeloid leukemia. *PLoS One* 2011; 6(11) e28011-28018 (査読あり)

11. Nakamura S, Ohnishi K. et al.
Small GTPase RAB45-mediated p38 activation in apoptosis of chronic myeloid leukemia progenitor cells. *Carcinogenesis* 2011; 32(12) p1758-72 (査読あり)

12. Usui N, Ohnishi K. et al.
Phase I trial of gemtuzumab ozogamicin in intensive combination chemotherapy for relapsed or refractory adult acute myeloid leukemia (AML): Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG)-AML206 study. *Cancer Science* 2011 102(7) p1358-65 (査読あり)

13. Uchida T, Ohnishi K. et al.
Phase I and II study of azacitidine in Japanese patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer Science* 2011; 102(9) p1680-6 (査読あり)

14. Nakamura S, Ohnishi K. et al.
JmjC-domain containing histone demethylase 1B-mediated p15(Ink4b) suppression promotes the proliferation of leukemic progenitor cells through modulation of cell cycle progression in acute myeloid leukemia. *Molecular Carcinogenesis* 2011 in press (査読あり)

15. Nakamae H, Ohnishi K. et al.
Nilotinib as frontline therapy for patients with newly diagnosed Ph⁺ chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from the Japanese subgroup of ENESTnd
International journal of hematology 2011; 93(5) p624-632 (査読あり)

[学会発表] (計 11 件)

1. Takeshita A, et al.
Internalization may be important in the efficacy of CMC-544, a new calicheamicin-conjugated anti-CD22 antibody
68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2009.10.2., Yokohama, Japan

2. Ohnishi K, et al.
Hematological malignancies: recent advances and future directions Treatment

of CML in the era of molecular targeted therapy.

68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2009.10.3., Yokohama, Japan

3. Nakamura S, Ohnishi K, et al.
Depletion of PHLPP1,2 by Bcr-Abl promotes CML cell proliferation through the continuous phosphorylation of Akt isoforms

68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 2009.10.2., Yokohama, Japan

4. Yokota D, Ono T, Ohnishi K et al
Downregulation of THAP11 by Bcr-Abl Promotes c-Myc-Mediated CML Cell Proliferation.

51st ASH Annual Meeting and Exposition 2009.12.7., New Orleans, U.S.A.

5. Hirano I, Ono T, Ohnishi K et al
Depletion of PHLPP1 and 2 by Bcr-Abl Promotes CML Cell Proliferation through the Continuous Phosphorylation of Akt
51st ASH Annual Meeting and Exposition 2009.12.6., New Orleans, U.S.A.

(平成 22 年度)

6. Ono T, Takeshita A, et al
Impact of additional chromosomal abnormalities (ACAs) in patients of acute promyelocytic leukemia 10 years follow up results of the Japan Adult Leukemia Study Group APL97 study.

15th Congress of the European Hematology Association 2010.6.12., Fira Barcelona Gran Via Conference Center, Barcelona, Spain,

7. Ono T, Takeshita A, et al
Clinical features and outcomes in elderly patients with acute promyelocytic leukemia - the Japan Adult Leukemia Study Group APL97 study -.

52nd ASH Annual Meeting and Exposition 2010.12.4., Orange County Convention Center, Orlando, USA

8. Ono T, Ohnishi K, et al
The analysis of BCR-ABL1 mutations in imatinib-resistant Philadelphia Chromosome-positive leukemia.
72nd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. 2010.9.26., Yokohama, Japan

9. Ono T, Ohnishi K, et al

BCR-ABL1 mutations in Japanese patients with Ph-positive leukemia resistant to imatinib . 8th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology.
2010.3.20., Tokyo, Japan

(平成 23 年度)

10. Ono T, Takeshita A, et al
Clinical features and prognostic impact of CD56 expression in acute promyelocytic leukemia: Long term follow up data from the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) APL97.

53rd ASH Annual Meeting and Exposition 2011.12.12., San Diego Convention Center, San Diego, U.S.A

11. Ono T, Takeshita A, et al
Clinical impact of CD56 expression in APL; Results from the Japan Adult Leukemia Study Group APL97
73rd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. 2011.10.14., Nagoya, Japan

[図書] (計 3 件)

(平成 23 年度)

1. 小野孝明
専門医のための薬物療法 血液
中外医学社 2011年 12 ページ

2. 大西一功
癌と化学療法 高齢者のがん薬物療法—血液—癌と化学療法社 2011年 5 ページ

3. 大西一功
癌と化学療法 癌と化学療法 慢性骨髄性白血病に対するイマチニブ治療—10 年を振り返り— 癌と化学療法社 2011年 3 ページ

6. 研究組織
(1) 研究代表者

小野 孝明 (ONO TAKA AKI)
浜松医科大学・がん教育研究センター・特任助教
研究者番号: 40402778

(2) 研究分担者

竹下 明裕 (TAKESHITA AKIHIRO)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 00242769

大西 一功 (OHNISHI KAZUNORI)
浜松医科大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80252170

(3)連携研究者

該当なし