

モノクローナル抗体をもちいた悪性中皮腫のアスパラギン合成酵素の網羅的検索アスパラギナーゼ感受性腫瘍の同定

愛知学院大学薬学部医療薬学科疾患病態学講座	教授	鬼頭 敏幸
愛知学院大学薬学部医療薬学科薬学総合教育講座	准教授	茂木眞希雄
愛知県がんセンター研究所 分子腫瘍学部 部長		関戸 好孝
名古屋大学医学部・大学院医学系研究科病理病態学講座	教授	豊國 伸哉
東京大学 先端科学技術研究センター 計量生物医学	教授	浜窪 隆雄

1. 研究の背景・目的

L-アスパラギナーゼ L-asparaginase (ASNase) は小児の急性リンパ性白血病 (ALL) の治療の key drug であり、ALL 治療の不可欠の薬剤であり、寛解導入だけでなく、維持・強化療法として、治療期間を通じて投与される。ASNase の作用機序とアスパラギン合成酵素・Asparagine synthetase (ASNS) 発現との関係は以下のように考えられている。体内に投与された ASNase は血液、組織液中のアスパラギン (Asn) を加水分解しアスパラギン酸 Asp とアンモニアに分解することで細胞内 Asn を低下、枯渇させる。本来、Asn は非必須アミノ酸であり、正常細胞内では、ASNS の存在により充分産生され、ASNase 処理によって生じた Asn 枯渇状態であっても ASNS の作用で Asn を合成することができ、細胞内欠乏状態が克服され細胞死を免れる。一方、小児急性リンパ性白血病 ALL のような一部のがん細胞では、ASNase の作用による Asn 枯渇状態に際して ASNS 活性の欠損のため、細胞内で Asn が産生できず細胞の増殖が抑制され、apoptosis, autophagy, 小胞体ストレス応答などの機序により細胞死にいたる。ASNS が高い正常組織、骨髄中の正常前駆細胞には障害性がないと考えられ、ASNS 低発現、低活性のがん細胞のみが細胞死にいたると考えられている。特異的に ASNS の欠損したがん細胞は ASNase に感受性があり、ASNase 治療のよい適応であると考えられる。ASNS 発現の解析の手段として、研究者らは抗ヒト ASNS モノクローナル抗体 (3G6 clone) を作成・利用してきた。急性骨髄性白血病 (AML) 患者にも ASNS 低発現例があり ASNase 高感受性であることを明らかにした [1]。また、世界に先駆けて NK/T 腫瘍の ASNS 発現低下と ASNase 有効性を報告し ASNase 使用 regimen の確立に寄与した [2]。欧米においても、抗体をもちいた ASNS 低発現例の検討の結果、成人 AML に対する Phase IIb study だけでなく、成人すい臓がんに対しての ASNase の臨床投与は、phase I が終了し [3]、phase II study が始まっている。高齢患者への投与も視野にいれて、すい臓がん・卵巣がんの ASNase の臨

床投与試験も準備されている[4]。研究者らの抗体を用いた方法で ASNase 感受性例が多く見出される腫瘍の ASNase 適応について、先んじて動物実験・臨床前試験を推進すべき時期であると考えられる。ASNS 発現欠乏・予後不良例への ASNase 使用は、治療標的が明確な治療法の確立につながる確実な方法であり、疾患全体の予後を改善し治療成績向上につながる明確な治療法となりうるものである。

2. 研究の対象ならびに方法

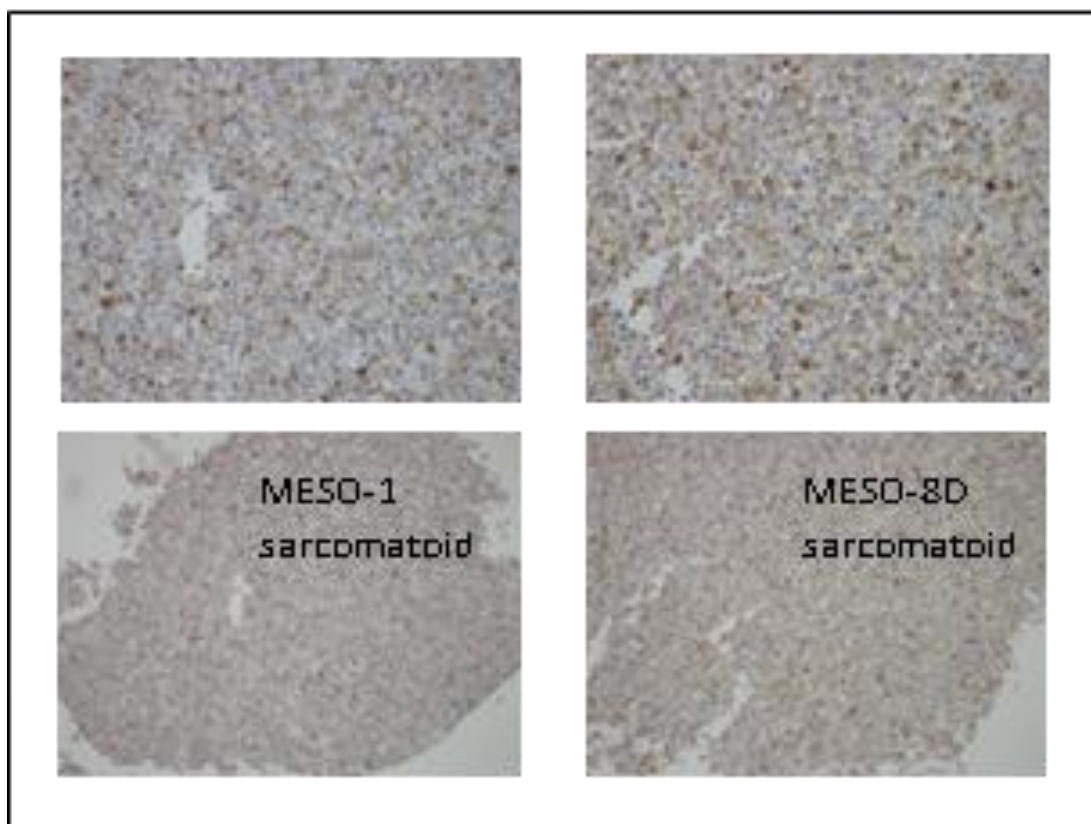
【対象】 関戸らが樹立した悪性中皮腫(MPM malignant pleural mesothelioma)細胞株 4 株 MESO-1, MESO-8D, MESO-9 : sarcomatoid 腫瘍 3 種、MESO-12A epithelioid 腫瘍 1 種[5] および、愛知医科大学病院病院病理部/呼吸器・アレルギー科から提供された臨床例 4 例

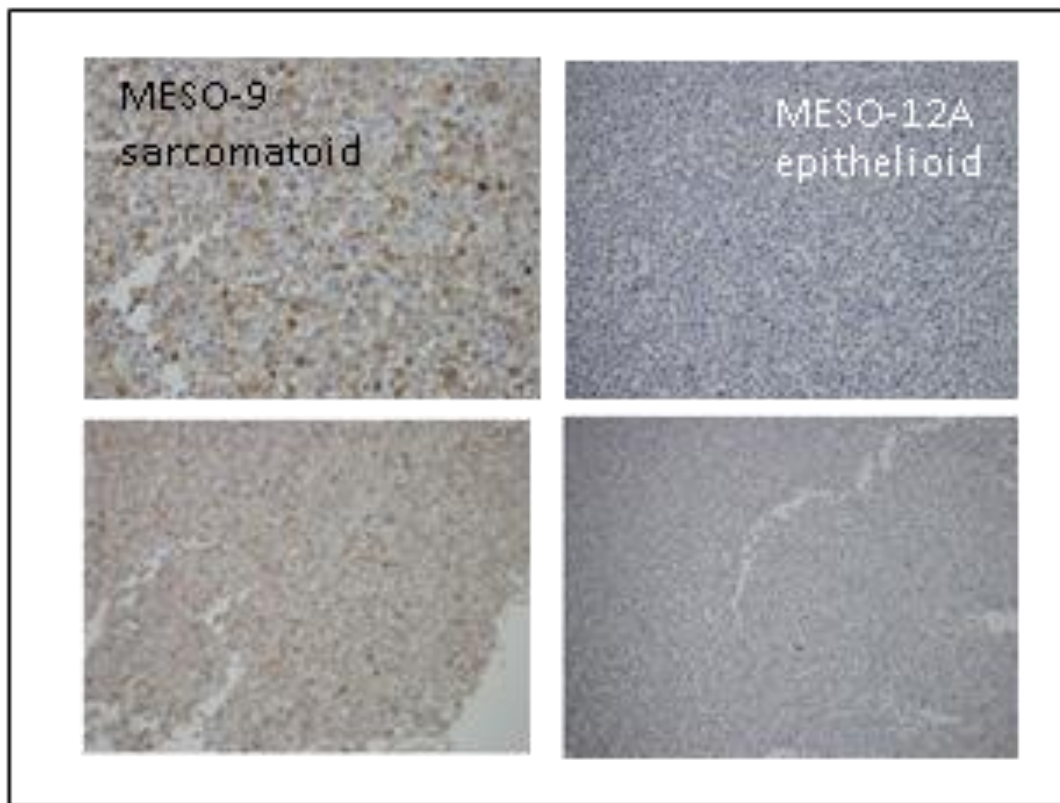
【方法】 抗ヒト Asparagine synthetase 抗体を用いた免疫染色

一次抗体 3G6-2G8 抗体 [5] 1mg/ml 1:800 希釈,

二次抗体 avidin-biotin peroxidase complex-conjugated goat anti-mouse IgG

EX-IHC, Ventana, DAB Detection Kits (Ventana Medical Systems)にて染色実施した[1]。





3. 研究結果

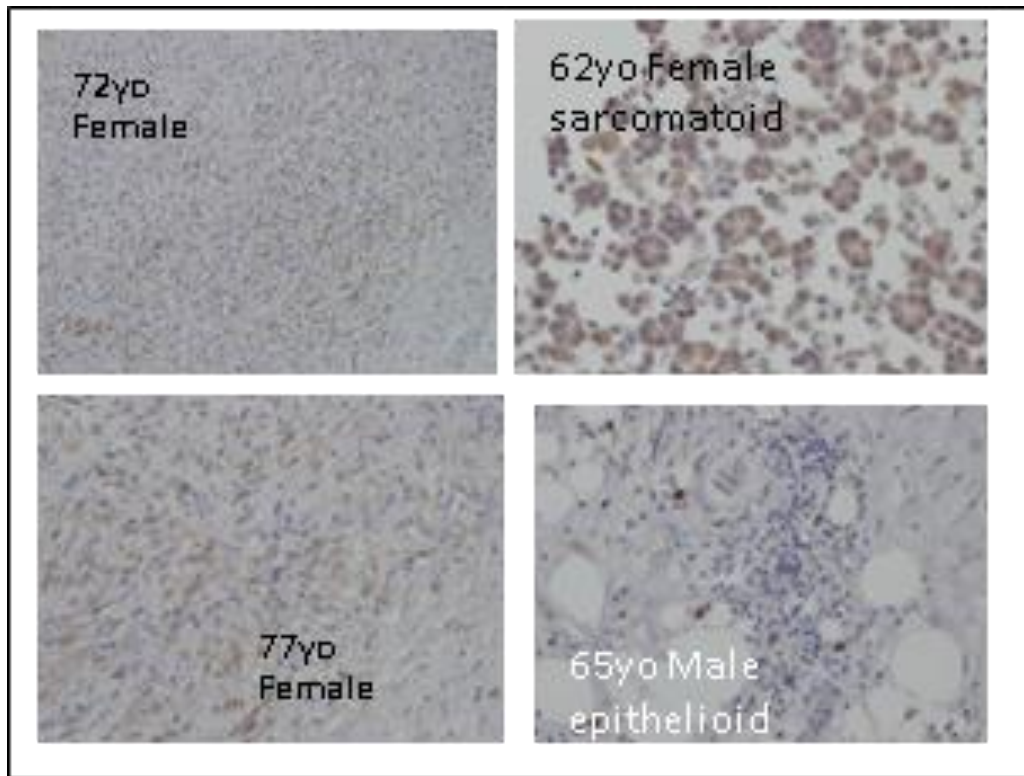
(1) ASNS 発現の低下があり ASNase 有効性を予測させる悪性中皮腫細胞が存在するかを細胞株 4 株で、免疫染色法で検討した。epithelioid 腫瘍 MESO-12A 1 株が ASNS 免疫染色陰性と判定され、ASNase 有効性が期待された。

(2) 臨床例 4 例での免疫染色による同様の検討を行った。

【病理標本】

年齢	性別	部位	組織型
72	Female	胸膜	sarcomatoid
62	Female	胸膜	sarcomatoid
65	Male	胸膜	epithelioid
77	Female	腹膜	sarcomatoid

65 歳、男性、胸膜発症、組織型 epithelioid の症例が ASNS 免疫染色陰性と判定され、ASNase 有効性が期待された。



4. 考察

我々の開発した L-asparaginase 有効例を検出する ASNS 免疫染色を実施したところ、悪性中皮腫細胞株 4 株中 1 株 epithelioid type で ASNS 免疫染色陰性 (L-asparaginase 有効) という結果であった。臨床検体 4 例中 1 例にも、ASNS 免疫染色陰性例が存在した。悪性中皮腫症の細胞株、臨床症例どちらにも L-asparaginase の有効性を示唆する例が存在する可能性が証明できた。

今後は、上記の細胞株 4 例+1 例において、L-asparaginase による *in vitro* での細胞毒性のチェックをしていく予定である。今後は ASNase 感受性のチェックを計画している。悪性中皮腫細胞株を用い、種々の濃度の ASNase 処理による殺細胞効果を WST1 assay で測定する。3 日間培養で、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% の殺細胞率を示す濃度を算出し、L-asparaginase 感受性の指標とする。

前立腺は、正常でも、がん細胞でも ASNS mRNA 発現がありながら、ASNS 蛋白の発現が低いという特徴をもち、L-asparaginase 治療のよい標的となる可能性がある。前立腺がん細胞では、ASNS gene の copy number 数の変化も報告され、ASNS の高発現は、腫瘍進展度、治療抵抗性に関連しているという報告もされている。前立腺がんでの ASNS の発現の度合い

と悪性度との間の関連が考えられ、本研究での悪性時中皮腫での結果に基づき、並行して ASNS の発現レベルと増殖能や転移能との関係を検討することとした。この実験系で、ASNS 活性の比較のために、既存の抗体を用いた免疫染色法に加えて、RT-PCR 法に基づいた ASNS mRNA 定量も行っていくこととした。今年度は、primer を設定し ASNS mRNA PCR 法を確立し、前立腺がんを用いた系で免疫染色に加えて、ASNS mRNA の定量系を確立した。この系を悪性時中皮腫細胞株にも応用していける準備ができたと考える。

従来の大腸菌由来の ASNase に加えて、従来 ASNase に対する抗体の出現、アナフィラキシーの出現が見られた小児白血病に対する新規 ASNase の Erwinase が市販させるようになった。検討に使用する L-asparaginase は、glutaminase 活性も併せ持ち、asparagine 枯渇だけでなく、glutamine 枯渇によりより強力な殺腫瘍効果をもつと考えられ、単剤だけでもより効果的で、他のがん種にも適応となりうる。大腸菌由来の ASNase に加えて Erwinase での悪性中皮腫、前立腺がんの細胞株の細胞毒性を検討していく。

5. 文献

1. Irino T, Kitoh T et al: J Mol Diagn 2004, 6(3):217-224.
2. Ando M, Sugimoto K, Kitoh T et al: Br J Haematol 2005, 130(6):860-868.
3. Bachet, J. B., et al. Pancreas 44(7): 1141-1147, 2015.
4. Dufour E, Lorenzi PL, Godfrin Y, et al: Pancreas 2012, 41(6):940-948.
5. Usami, N., Dr. Sekido et al. Cancer Science 2006;97(5): 387-394.

関連する研究業績

1. 鬼頭敏幸 化学療法薬・その他（ステロイド、アスパラギナーゼ等）堀部敬三、越永従動、大賀正一、米田光宏編 小児血液・腫瘍学. 東京：2015年11月 診断と治療社 2015 ; pp142-146
2. 鬼頭敏幸, 豊國伸哉, 関戸好孝, 山口悦郎, 浜窪隆雄, Sheldon M. Schuster. 悪性中皮腫腫瘍内タンパク発現による抗がん剤感受性予測について-Asparagine synthetase 免疫染色に基づく Malignant mesothelioma の治療選択-第62回日本薬学会東海支部大会 2016年7月9日、名古屋市
3. 鬼頭敏幸、森田あやみ、武井佳史 前立腺がん細胞におけるアスパラギン合成酵素の発現制御を基盤とした増殖能や転移能の抑制効果について 第5回サイエンスフォーラム平成29年3月8日(水) 愛知学院大学楠元キャンパス薬学部棟 203 講義室