

L-アスパラギナーゼに対して感受性を示す急性骨髄性白血病の細胞遺伝学的・分子生物学的サブグループの同定

研修医1年目 佐藤 登夢

Abstract

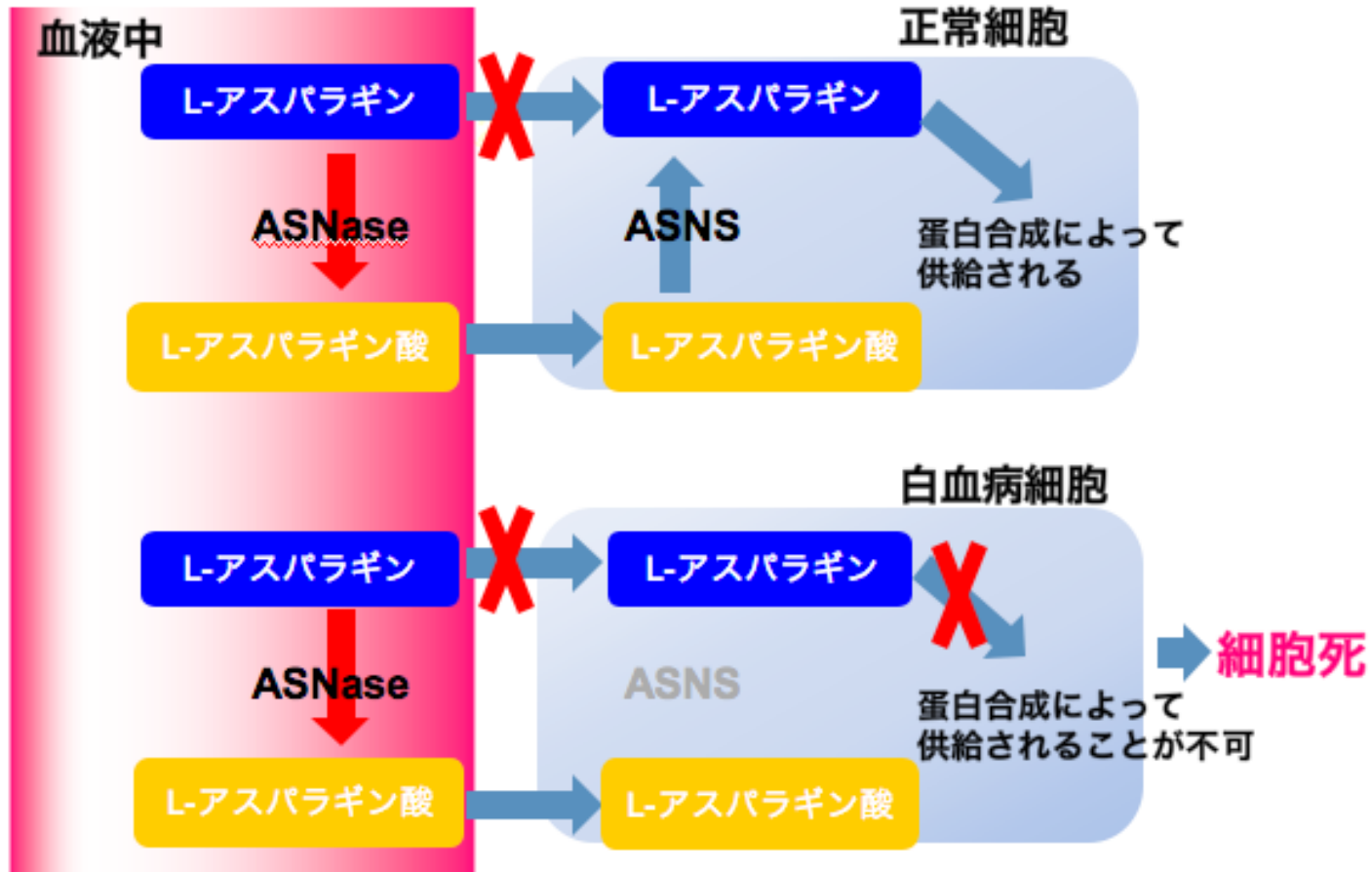
- L-アスパラギナーゼはL-アスパラギンを加水分解し、白血病細胞死を誘導する。
- L-アスパラギナーゼに対する感受性はL-アスパラギン合成酵素 (ASNS) が存在しないことに起因する。
- ASNSは 7q21.3に位置し、7番染色体欠失はAML患者のL-アスパラギナーゼ感受性に影響する。
- →7番染色体欠失AMLにL-アスパラギナーゼは治療効果あり？

7番染色体モノソミー

- 7番染色体モノソミーは急性骨髄性白血病（AML）、骨髄異形成症候群（MDS）に高頻度に認められる。
- 本異常を示す症例は、好中球機能障害による重度の感染症を併発しやすく、また抗がん剤に治療抵抗性があり、一般的に予後不良とされている。

Wang ML, Bailey NG. Acute Myeloid Leukemia Genetics: Risk Stratification and Implications for Therapy. Arch Pathol Lab Med. 2015; 139:1215–23.

L-Asp (ASNase)の作用機序



L-アスパラギナーゼ

L-アスパラギナーゼ（商品名：ロイナーゼ）

副作用

- － ショック、アナフィラキシー様症状→代替薬として、エルウィニアL-アスパラギナーゼ（商品名：エルウィナーゼ）が多く
の国で臨床使用されてきた
- － 脳出血、脳梗塞、肺出血等の重篤な凝固異常
- － 重篤な急性膵炎、膵内分泌機能障害（膵ランゲルハンス島炎）による糖尿病

使用禁忌

- ・ 本剤の成分に対し重篤な過敏症の既往歴のある患者



Result

FISH法による7番染色体モノソミーをもつ AML細胞株の同定

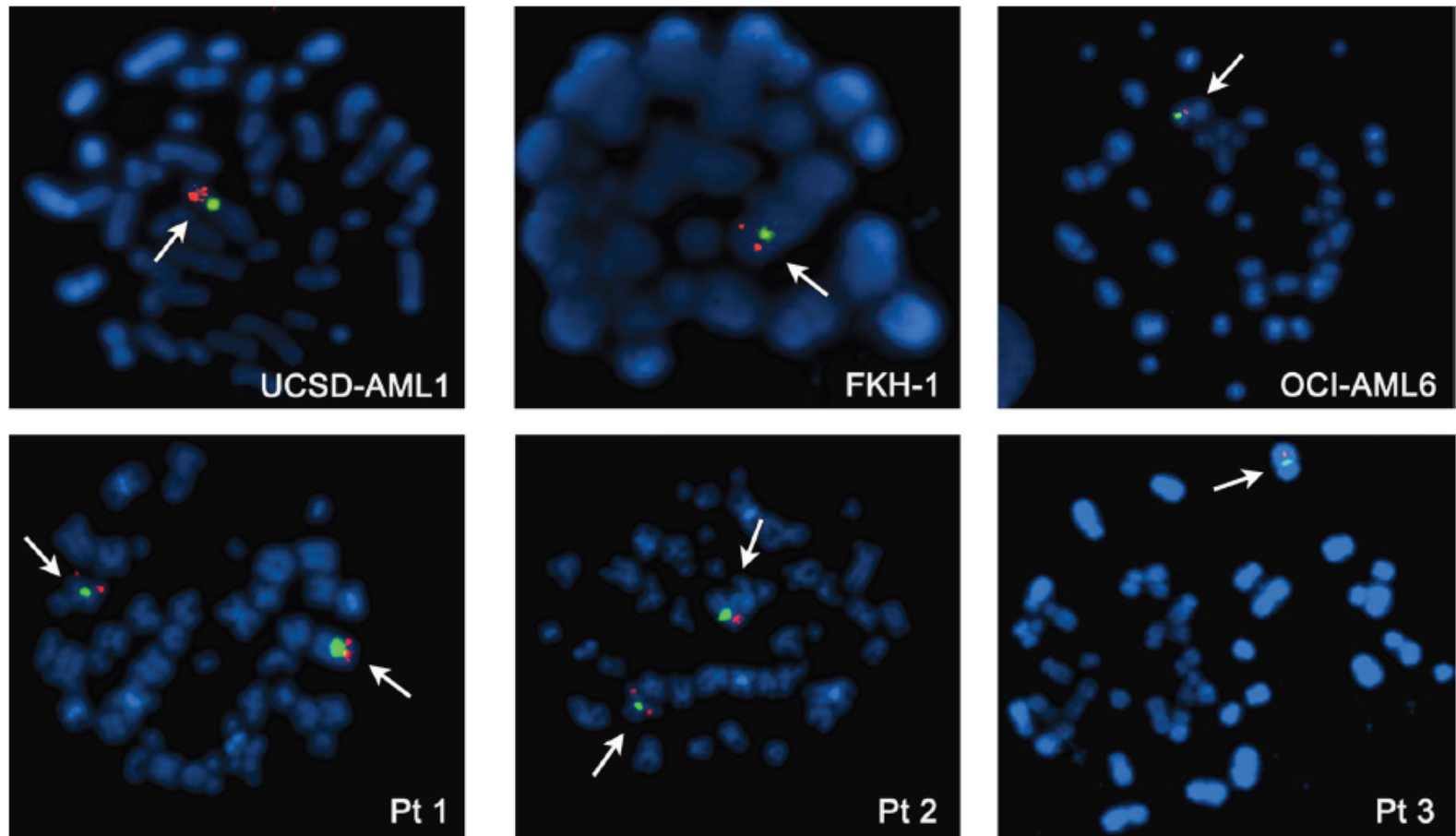
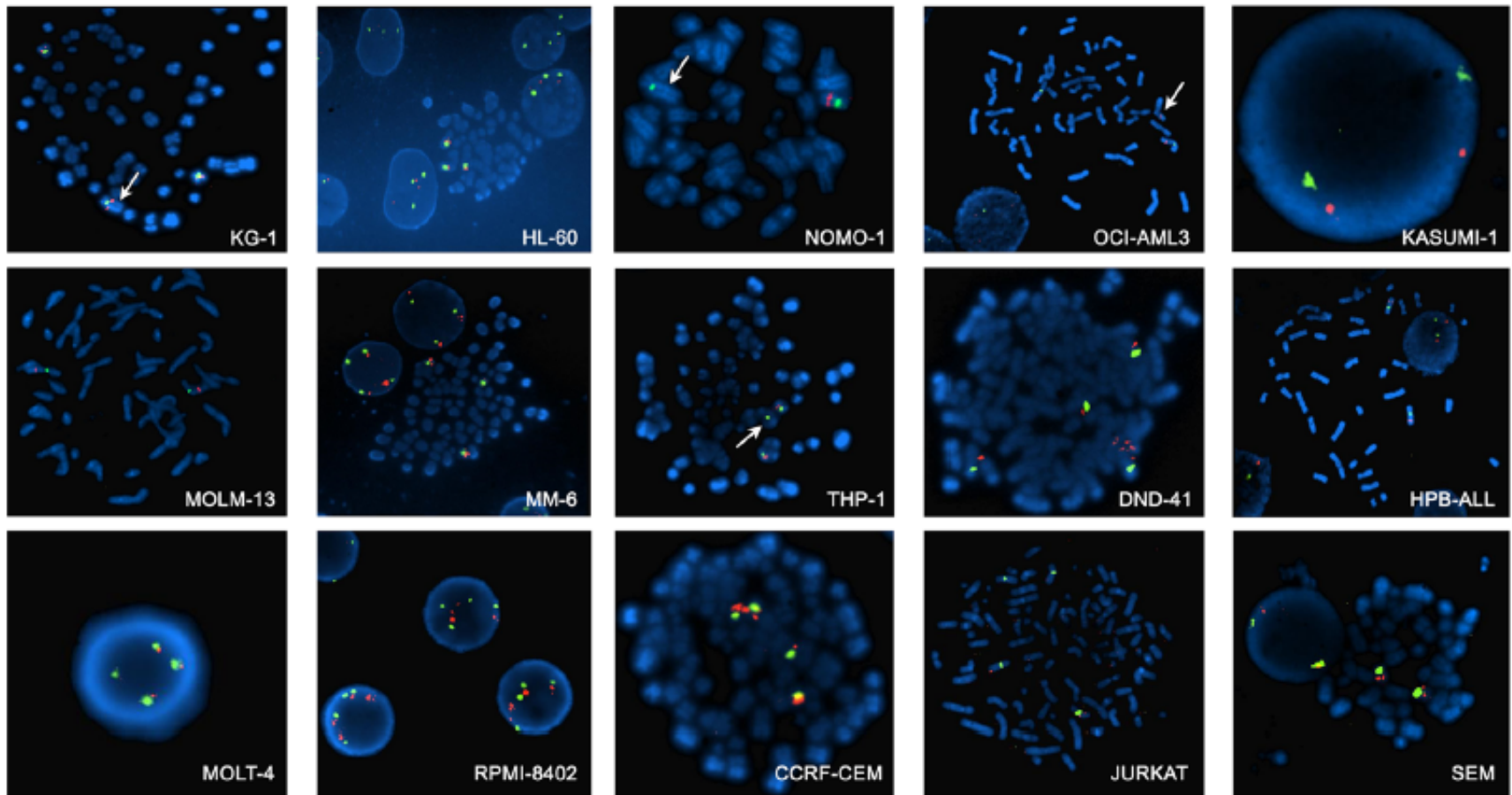


Figure 1: Metaphase FISH analysis of AML cell lines with -7 (upper panel) and AML patients (lower panel). Normal diploid chromosome 7 has two signals for both centromeric (green) and telomeric (orange) probes. Patients 1 and 2 are disomic, whereas Patient 3, UCSD-AML1, FKH-1 and OCI-AML6 cell lines have -7.

FISH法による7番染色体モノソミーをもつ AML細胞株の同定

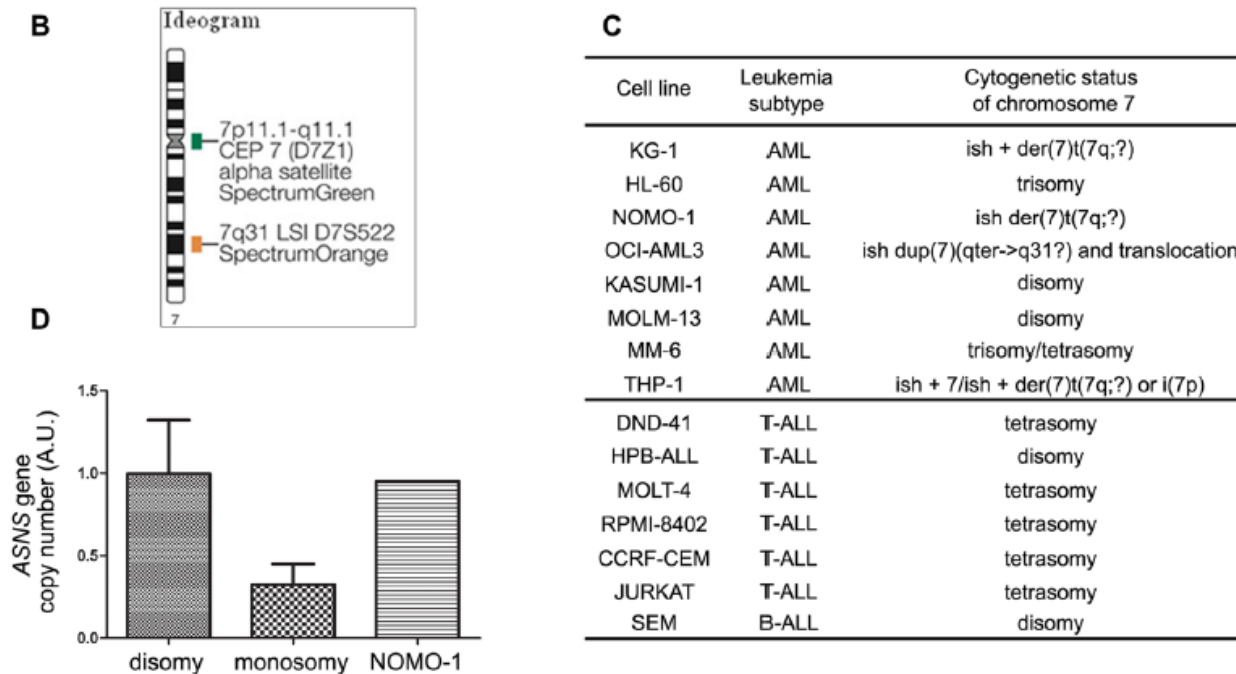
A



8AML (KG-1、HL-60、NOMO-1、OCI-AML3、KASUMI-1、MOLM-13、THP-1)

7ALL (DND-41、HPB-ALL、MOLT-4、RPMI-8402、CCRF-CEM、JURKAT、SEM)

FISH法による7番染色体モノソミーをもつ AML細胞株の同定



Supplementary Figure 1: FISH analysis of AML and ALL cell lines without -7, using LSI D7S522/CEP 7 probe, a mixture of Spectrum Orange (7q31) and Spectrum Green (7p11.1-q11.1) probes. Normal diploid chromosome 7 have two signals for both centromeric (green) and telomeric (orange) probes. (A) Interphase or metaphase FISH results of 8 AML (KG-1, HL-60, NOMO-1, OCI-AML3, KASUMI-1, MOLM-13, MM-6, THP-1) and 7 ALL (DND-41, HPB-ALL, MOLT-4, RPMI-8402, CCRF-CEM, JURKAT, SEM) cell lines. Arrows indicates complex aberrations involving chromosome 7. (B) Ideogram of LSI D7S522/CEP 7 probe. (C) Summary of cytogenetic status of chromosome 7 in both AML and ALL cell lines. (D) Copy number analysis by qPCR of ASNS locus in NOMO-1 cells, compared with disomic (SEM, KASUMI-1, MOLM-13) and monosomic (UCSD-AML1, FKH-1) cell lines.

7番染色体モノミーはASNSの発現に影響を与え、 L-Aspに対する高い感受性と相関する

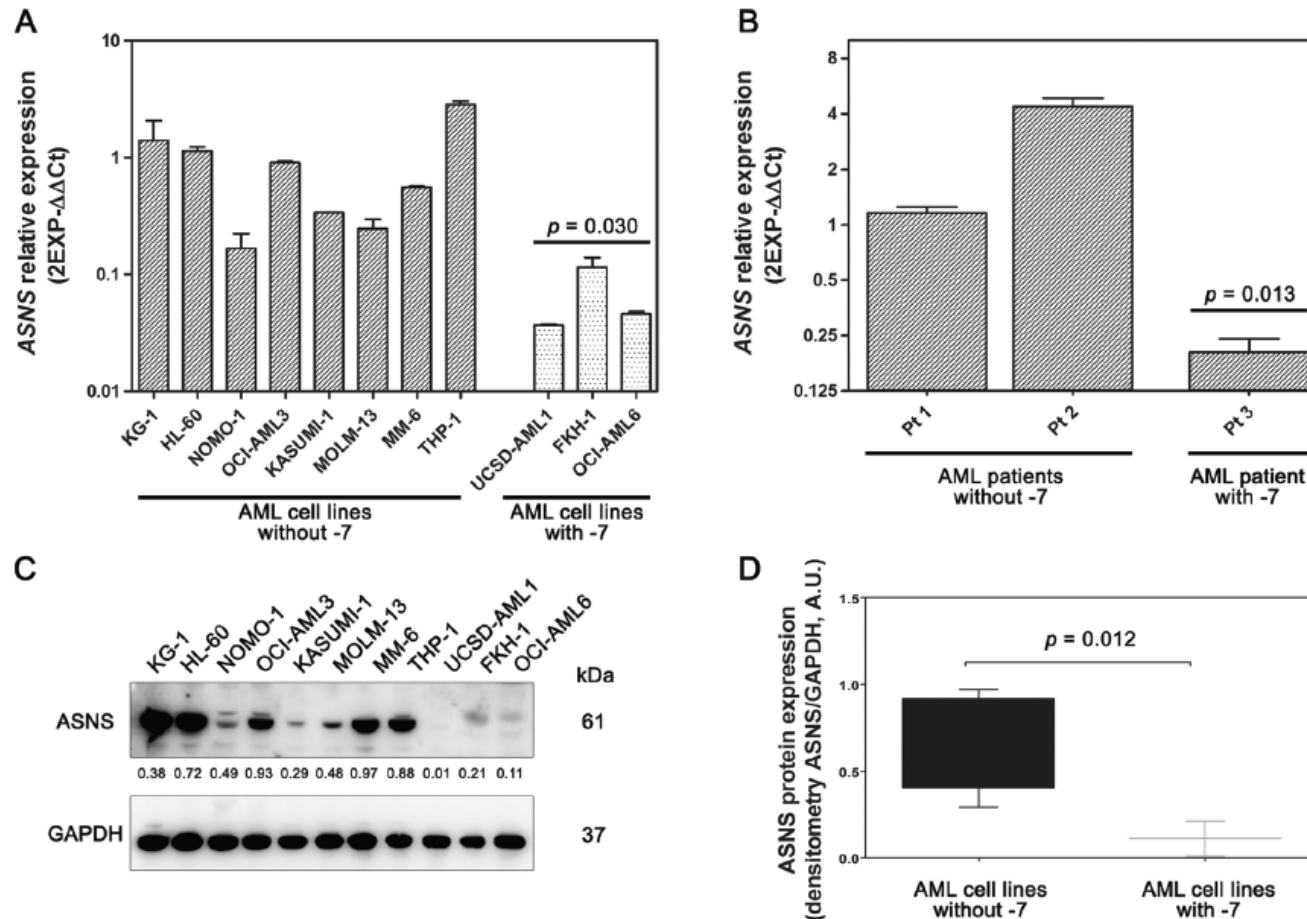
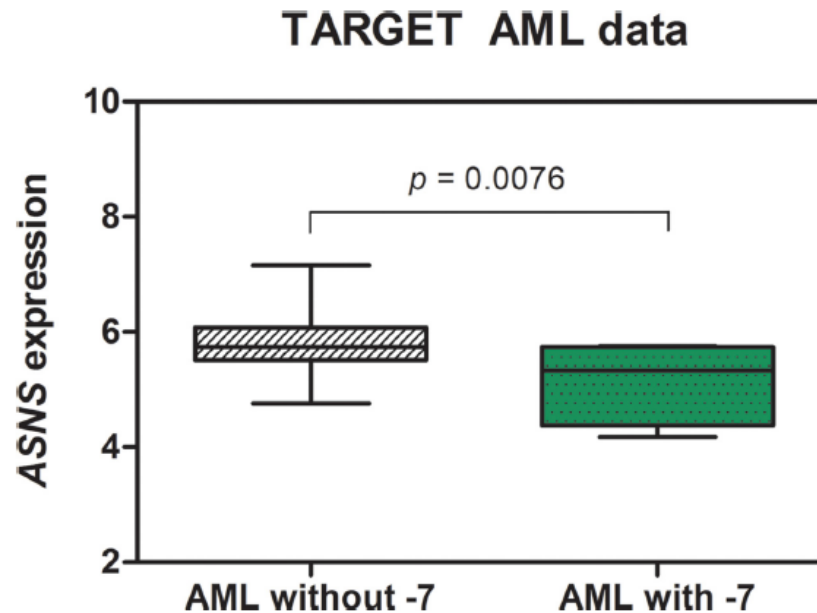


Figure 2: Gene and protein expression of ASNS in AML samples. AML cell lines (A) and AML primary cells (B) with -7 displayed low amount of *ASNS* transcript. Bars represent 2^{-ΔΔCt} value. Gene expression was normalized to *GAPDH* and *ATP5B* housekeeping genes. Data are expressed as mean ± SD of three independent experiments. Statistical analysis (Unpaired *t* test) was performed to compare mean relative mRNA abundance between AML cells, with or without -7. (C) Western blot analysis showing low amount of ASNS protein in AML cell lines with -7. Thirty micrograms of protein were blotted to each lane. Antibody to GAPDH served as a loading control. (D) The amount of ASNS protein, determined by densitometric analysis and normalized to GAPDH density, was significantly lower in AML cells with -7 ($p = 0.012$, Mann Whitney test).

7番染色体モソミーはASNSの発現に影響を与え、 L-Aspに対する高い感受性と相関する



Supplementary Figure 2: ASNS expression in pediatric TARGET AML database. Boxplots show ASNS normalized expression of samples from the NCI-COG TARGET AML project (<https://ocg.cancer.gov/programs/target/acute-myeloid-leukemia>), classified by chromosome 7 status.

7番染色体モノソミーはASNSの発現に影響を与え、 L-Aspに対する高い感受性と相関する

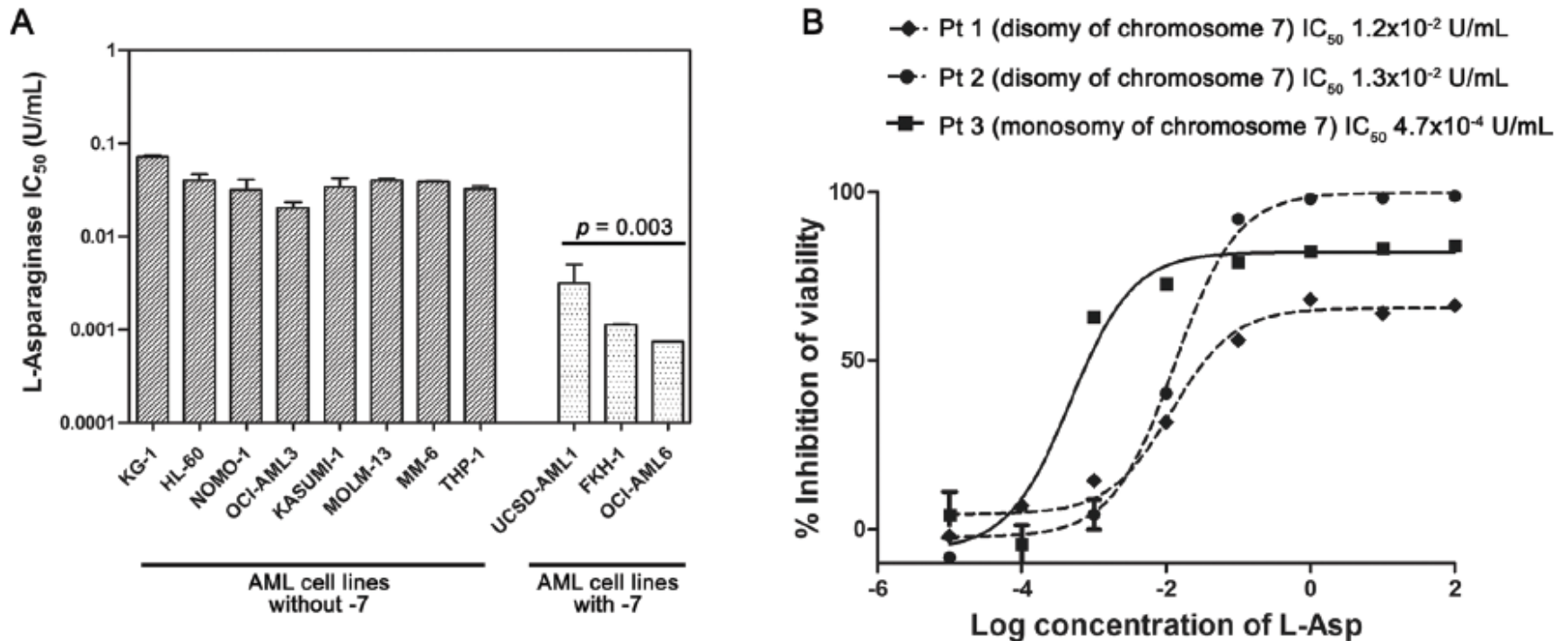
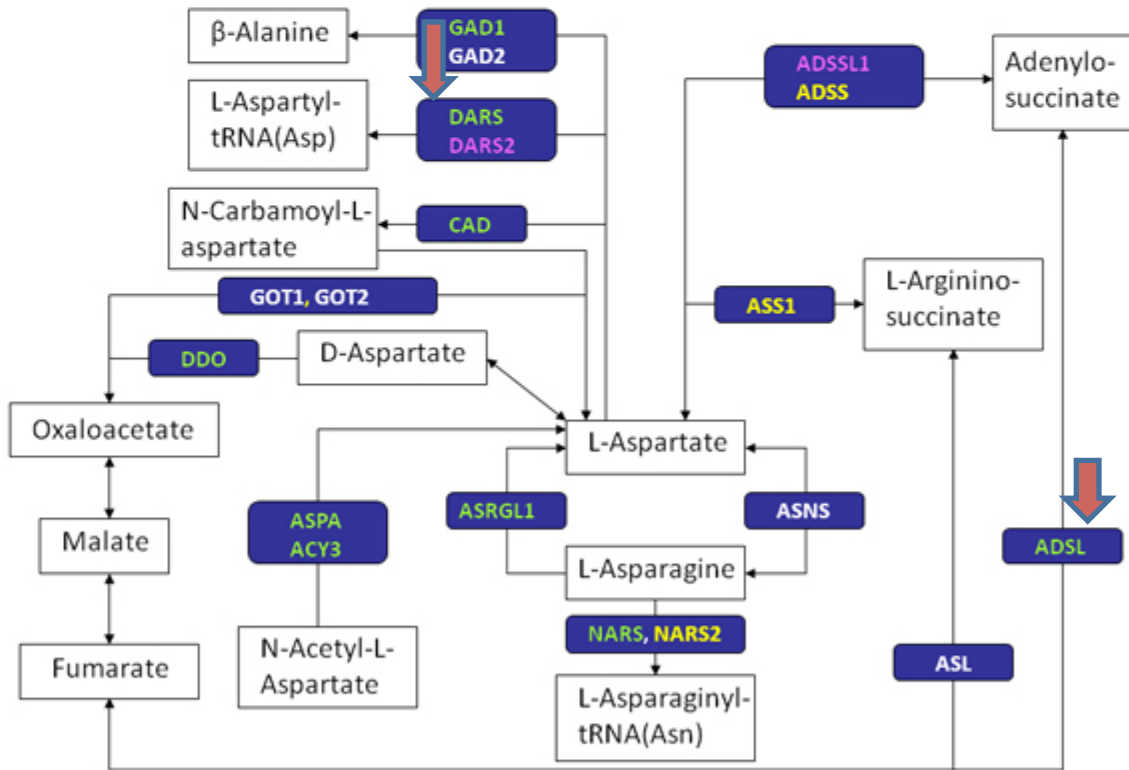


Figure 3: L-Asp sensitivity of AML cell lines and primary AML cells with or without -7. (A) AML cell lines with -7 (UCSD-AML1, FKH-1 and OCI-AML6) were more sensitive to L-Asp than AML cell lines without -7 ($p = 0.003$). (B) Dose-response growth curves of primary AML cells treated with L-Asp showed that AML -7 are more sensitive than other AML primary cells. Pt1: AML M4 with disomy of chromosome 7; Pt2: AML M2 with disomy of chromosome 7; Pt3: AML M2 with monosomy of chromosome 7.

アスパラギン酸代謝経路

Aspartate metabolism pathway (Adapted from KEGG)

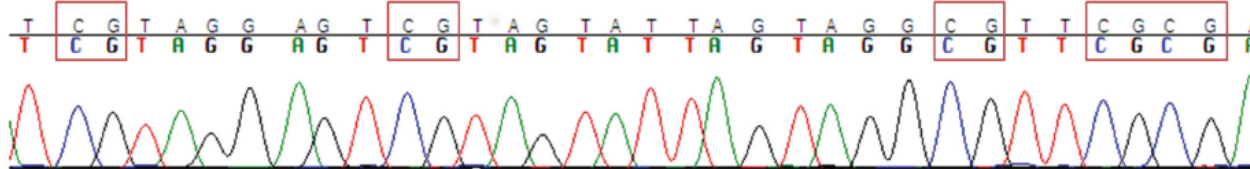


Chen SH. A genome-wide approach identifies that the aspartate metabolism pathway contributes to asparaginase sensitivity. *Leukemia*. 2011; 25:66–74.

AML細胞においてASNS半数不全は 7番染色体欠失に起因する

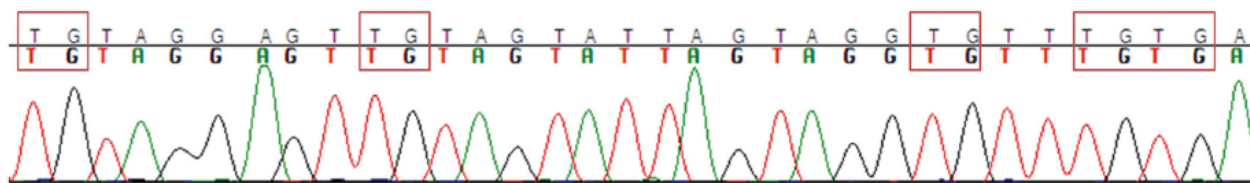
ALL細胞株

A



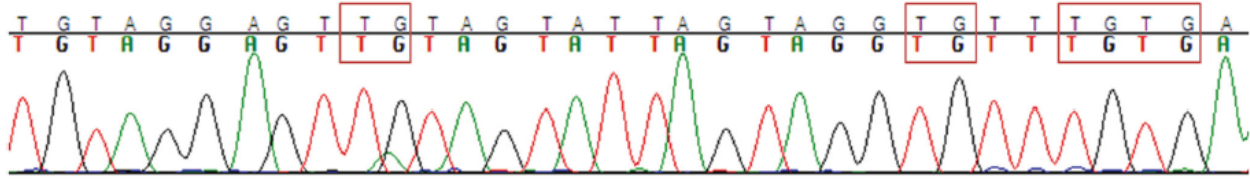
hypermethylated

B



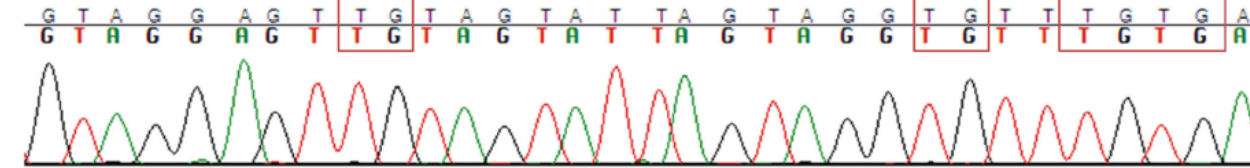
hypomethylated

C



hypomethylated

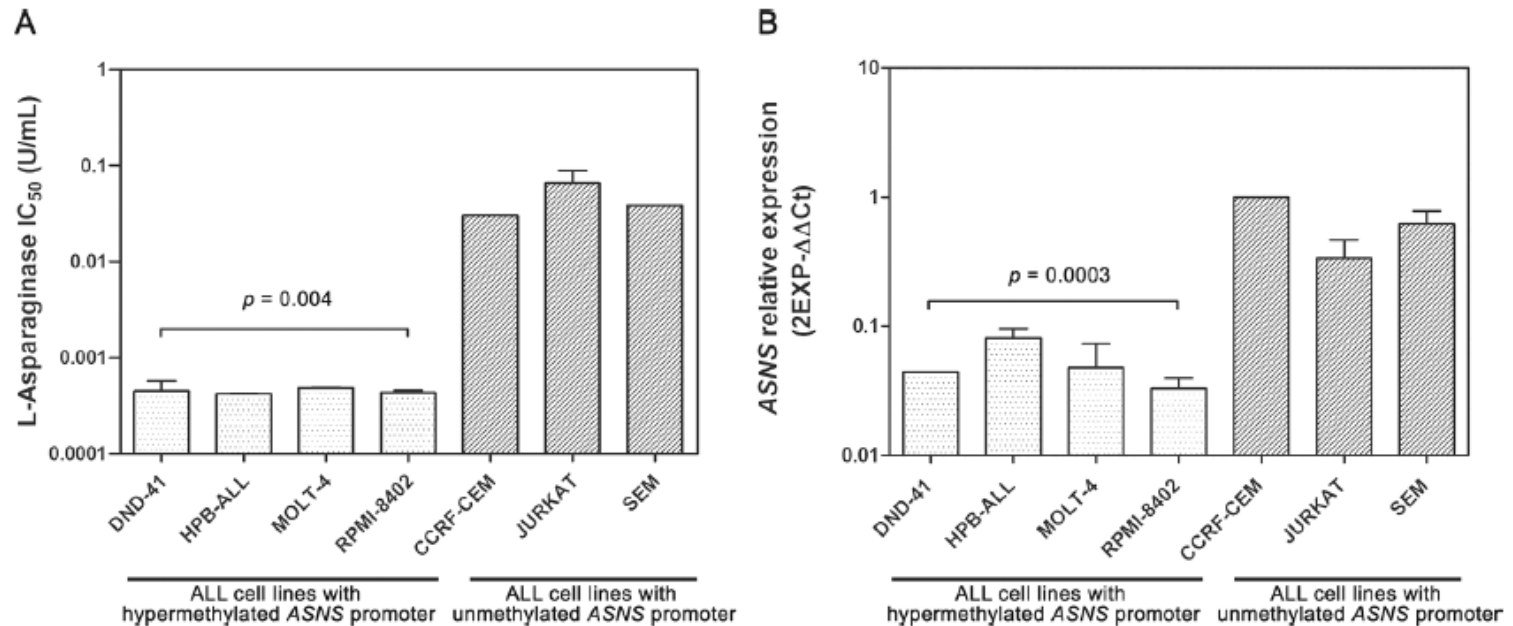
D



hypomethylated

Figure 4: Methylation analysis of *ASNS* CpG. (A) Example of ALL cell lines with *ASNS* promoter hypermethylated (DND-41). (B) Example of ALL cell line with *ASNS* promoter hypomethylated (CCRF-CEM). (C) Example of AML cell line with -7 and with *ASNS* promoter hypomethylated (UCSD-AML1). (D) Example of other AML cell line without -7 and with *ASNS* promoter hypomethylated (MOLM-13).

ALL細胞株においてL-Asp感受性はASNS promoter のメチル化に起因している



Supplementary Figure 3: (A) IC₅₀ of ALL cell lines after 48 h of treatment with increasing concentrations of L-Asp. DND41, HPB-ALL, MOLT-4 and RPMI-8402, which have ASNS promoter methylation, were more sensitive than other ALL cell lines (Unpaired *t* test, $p = 0.004$). (B) ALL cell lines sensitive to L-Asp treatment showed lower amount of ASNS transcript (Unpaired *t* test, $p = 0.0004$). ASNS relative expression is calculated as $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Gene expression was normalized to GAPDH and ATP5B housekeeping genes. Data are expressed as mean $\pm$ SD of three independent experiments.

ALL細胞のASNS promotorのmethylationと AML細胞の7番染色体モノソミーは ASNS発現量を低下させる

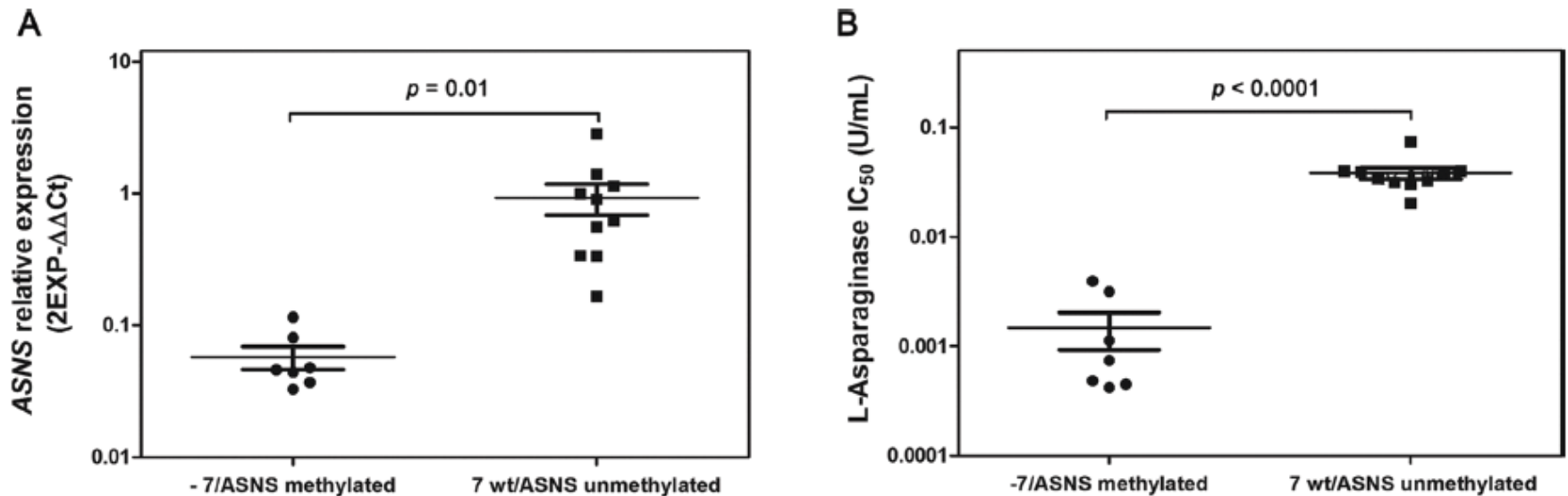


Figure 5: (A) Low expression of *ASNS* gene correlated with *ASNS* promoter methylation (in ALL cells) or -7 (in AML cells). Cell lines with -7 or methylation of *ASNS* promoter (●) have lower *ASNS* expression than cell lines without these genetic aberrations (■). (B) Cell lines with -7 or methylation of *ASNS* promoter (●) displayed higher sensitivity to L-Asp treatment than other cell lines without these genetic aberrations (■).

ASNS遺伝子をsiRNAでknockdown すると7番染色体欠失のないAML細胞の L-アスパラギナーゼ感受性を引き起こす

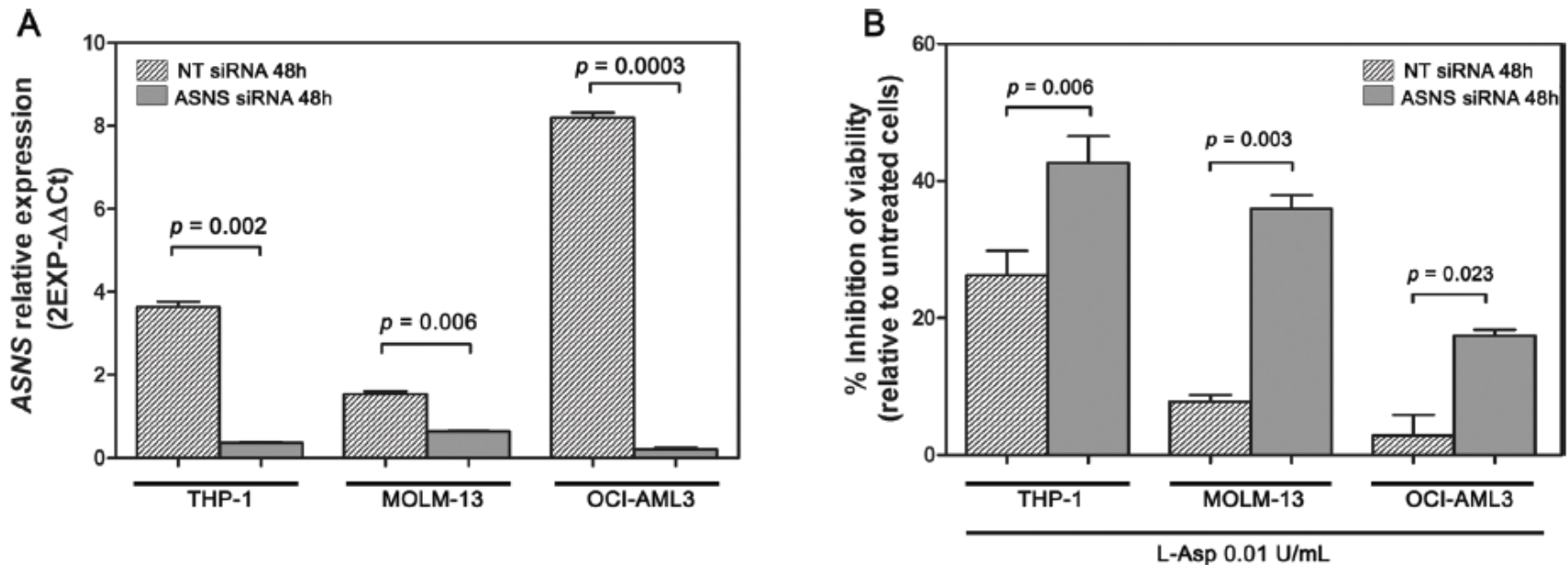


Figure 6: Knockdown of *ASNS* gene with specific siRNA followed by L-Asp treatment. (A) Expression of *ASNS* gene after 48 hours from siRNA transfection. (B) Inhibition of cell viability following 48 hours treatment with 0.01 U/mL of L-Asp. AML cell lines transfected with *ASNS* siRNA showed a higher mortality than AML cell lines transfected with NT siRNA.

まとめ

- 7番染色体モノソミーは、小児AMLの予後不良に関連した細胞遺伝学的異常である。
- ASNSの発現量がL-アスパラギナーゼ治療に対する抵抗性に関連している。
- 7番染色体モノソミーではASNSの発現量が少なく、L-アスパラギナーゼ感受性が高まる。

Discussion

- AML細胞に対してL-Aspを投与したところM1、M4、M5に対して高い感受性を示した。これらはいずれもASNSの発現量が低かった。

Okada S. *In vitro* efficacy of l-asparaginase in childhood acute myeloid leukaemia. Br J Haematol. 2003; 123:802–09.

Discussion

- L-Aspは、予後も悪く従来の化学療法に感受性の低かった7番染色体欠損のある小児AMLへの治療に有益である可能性がある。
- 7番染色体上の他の遺伝子もL-Asp感受性に寄与しているか調べる必要あり。

Materials and methods

- 細胞株
- ALL cell lines (DND41, HPB-ALL, MOLT-4, RPMI-8402, CCRF-CEM, JURKAT)
- AML cell lines (KG-1, HL-60, NOMO-1, KASUMI-1, MOLM-13, THP-1, FKH-1)

Abstract

- L-アスパラギナーゼはL-アスパラギンを加水分解しL-アスパラギン酸にする反応を触媒する酵素である。L-アスパラギナーゼの枯渇は白血病細胞死を誘導する。
- L-アスパラギナーゼへの感受性はL-アスパラギン合成酵素 (ASNS) が存在しないことに起因する。
- ASNSはL-アスパラギンの生合成を触媒する酵素である。
- ASNSは7番染色体上に位置する