

＝総説＝

アスパラギン合成酵素をめぐる研究の現状

- L-アスパラギナーゼ発見から65年間の歩み -

Current research status on asparagine synthetase

- history of 65 years since discovery of L-asparaginase -

鬼頭敏幸

Toshiyuki Kitoh, M.D., Ph.D.

愛知学院大学薬学部 医療薬学科 疾患病態学講座

Laboratory of Pediatric Pharmacology, Aichi Gakuin University, School of Pharmacy

Summary

L-asparaginase has long been used as an anti-tumor enzyme preparation of *Escherichia coli*-derived "Leunase" for acute lymphoblastic leukemia since 1971 in Japan. L-Asparaginase exerts an antineoplastic effect by degrading L-asparagine in the blood and tumor cells making asparagine-requiring tumor cells nutritional deficient. Although it was assumed that its effectiveness depends on the loss of asparagine synthetase activity in cancer cells from the beginning of discovery. This hypothesis was verified by a new molecular biology method including our study merely within 20 years. Involvement of apoptosis, ER-stress or autophagy was found to be closely related with respect to the mechanism of cell death by L-asparaginase. The contaminating glutaminase activity also plays a role as a mechanism of cell death. Efforts to explore the precise anti-tumor mechanism made clear that glutamine deficiency is also involved by L-asparaginase treatment. Glutamine plays an important role as an energy fuel not only in cancer cells but also in normal cells. Subsequently it became clear that asparagine and glutamine plays an important role in mammalian cell phenomena. As a recent new clinical aspect, L-asparaginase preparation "Erwinase" derived from *Erwinia chrysanthemi* has been approved and started to be used as a substitute for patients who have allergic reactions to *Escherichia coli*-derived preparations. Clinical trials are also proceeding with a new L-asparaginase preparations encapsulated in erythrocytes. Research success in new preparation enabled a new era of new indication of asparaginase to new target of tumor chemotherapy.

Keywords: L-asparaginase, asparagine synthetase, asparagine, glutamine, acute lymphoblastic leukemia, amino acid response element, amino acid transport, apoptosis, autophagy, DNA methylation, endoplasmic reticulum stress, signal transduction, unfolded protein response

Corresponding author:

Toshiyuki Kitoh, M.D., Ph.D

Tel: +81 52 757 6794, Fax: +81 52 757 6799.

*E-mail address: tkitoh@dpc.agu.ac.jp

はじめに

L-アスパラギナーゼ L-asparaginase(ASNase)は、当初、モルモットの血清中に殺リンパ腫細胞成分があることが発見され(1)、後に、その有効成分が、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酵素であることが発見された(2,3)。ASNase は体内に投与されると血液、組織液中の ASN を加水分解し 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。同時に混入しているグルタミナーゼ glutaminase 活性により、グルタミン GLN をグルタミン酸 GLU と NH₄ に分解し GLN の部分枯渇をきたす。

一方、細胞内ではアスパラギン合成酵素 (ASNS) の作用で ATP1 分子を消費し GLN のアミノ基がアスパラギン酸に転移し ASN に変換する(4)。一部のがん細胞では ASNS が欠損していて ASNase による ASN 枯渇状況に適応できず細胞死に至ると考えられる(Fig.1)。

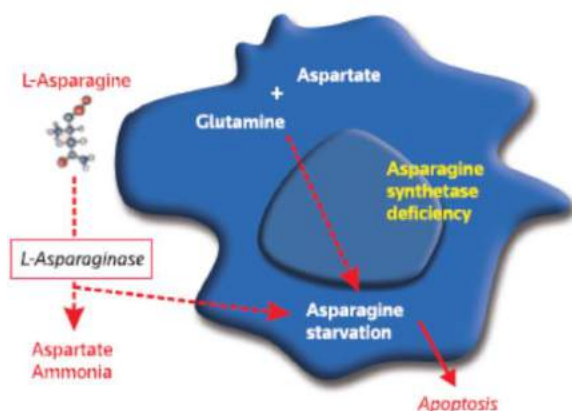


Fig.1. Schematic diagram of asparagine / ASNase / ASNS

L-Asparaginase hydrolyses asparagine, which is essential growth factor for tumor cells deficient in asparagine synthetase.

その後、大腸菌由来の ASNase が実用化され、最も有効ながんとして小児の急性リンパ性白血病、悪性リンパ腫に臨床応用され不可欠な key drug となっている。(5)。L-アスパラギナーゼ発見から 65 年になるが、今も、有効な薬剤として使用され続けている。

当初から ASNase の有効性は、がん細胞の ASNS 活性の欠損の有無によっていることが考えられていたが、新しい分子生物学の手法で、ASNase の作用とがん細胞の

ASNS 活性との関係を解明し、明確に説明がされるようになったのは、この 20 年来のことである。

ASNS 活性の有無が抗がん剤のターゲットであるという側面だけでなく、ASN 枯渇からの細胞内変化の探索は、種々の生命現象の中での ASNS の役割、アスパラギン、グルタミンというアミノ酸の様々な役割を解く手がかりとなる研究となり続けられてきた。このような経過も含めて解説していく。

L-アスパラギナーゼについて

L-アスパラギナーゼ製剤:L-アミノ酸の加水分解酵素であるので L-アスパラギナーゼ製剤と呼ばれる。大腸菌 *E. coli* 由来製剤か、ジャガイモ黒あし病を農作物に引き起こす *Erwinia chrysanthemi* という細菌に由来する L-アスパラギナーゼ (*Erwinia* L-asparaginase) により半減期と混入グルタミナーゼ活性の違いがある。日本では、未承認であるが半減期の延長、免疫原性の低下目的でポリエチレングリコール化された *E. coli* 製剤もある。Table 1. に稲葉より(6)改変したものを示す。

異種蛋白製剤としての副作用 : ASNase 投与は、そもそも、異種タンパク質の侵入であり、一部の患者では抗 ASNase 抗体が産生されることがある。抗 ASNase 抗体産生はアナフィラキシーなどのアレルギー症状による投薬の中断や、中和抗体産生による ASNase 酵素活性の不活性化を引き起こし、治療効果を減弱させる結果となる。

国内の ALL 患者の 15-20% は、大腸菌由来の「Leunase」(協和発酵キリン) 治療を受けている間に、過敏症を示すようになる。代替製剤がなく、その後の使用は中断されていた。新たに、2017 年代替製剤として承認された *Erwinia* 由来製剤「Erwinase」(大原薬品工業) に変更され週 3 回で筋注投与される。

その他の有害事象では、重篤なアレルギー反応 (アナフィラキシー)、膵炎、肝酵素値の上昇、血栓形成、出血、悪心、嘔吐、血糖値の上昇などがある。タンパク合成障害のために、肝障害、膵炎、凝固異常を生じうる。高アンモニア血症を起こし、神経症状も呈することがある。これらは、混入するグルタミナーゼ活性が高いほど、高度になると考えられている。

グルタミナーゼ活性のない製剤の開発もされているが、抗腫瘍作用の減弱も見られたりして完璧な製剤は得られていない。

name	origin	company	Half life	Activity (U)*
Elspar	<i>E. coli</i>	Merck	1.28±0.35 d	10,000
Leunase	<i>E. coli</i>	Medac, 協和発酵キリン	1.16±0.28 d	5,000
Erwinase	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Jazz, 大原	0.65±0.13 d	20,000
Pegaspargase	<i>E. coli</i> -Pegylated	Shire	5.73±3.24 d	500

Table 1. L-asparaginase preparation formula for Acute lymphoblastic leukemia in childhood

*equivalent activity with Elspar 10,000 U

稲葉寛人. (6)より転載

アスパラギン合成酵素蛋白

ASNase の作用機序を理解するためには、正常、がん細胞内での ASNS の働きの理解と ASN 欠乏に引き続く signal transduction の理解が必要なのでこれについて述べる。また、ASNS の生体内での役割を理解するためにも、ASNS タンパク質の発現の機序を理解しておく必要がある。アスパラギン合成酵素 (ASNS) は細胞質内に存在し ATP1 分子を消費し GLN のアミノ基がアスパラギン酸に転移し ASN に変換する。ASNS は殆どの哺乳類の器官に存在し、組織、細胞により ASNS 基底発現は幅広く変化する。標準的なヒト ASNS 酵素は、およそ 65kDa の分子量を有する 561 個のアミノ酸残基からなる。

アスパラギン合成酵素遺伝子

ヒト ASNS 活性は、主に第 7 染色体上 7q21.3 に位置する単一の遺伝子からの転写の増加により細胞ストレスに対して高度に応答する。ヒト ASNS の遺伝子構造を Fig.2A に示す。哺乳動物において ASNS 遺伝子は 35kb にまたがり 13 エクソンを含み 5-prime 上流には、他の housekeeping genes と同様に TATA と CAAT boxes を欠いている。5-prime 側に high G+C content 領域をもち methylation による遺伝子発現調整が想定され、実際、3つの GC-box があり、ここに結合する蛋白も明らかになっている(7) (Fig.3.)。

アスパラギン合成酵素遺伝子のメチル化による発現調節

ASNS 遺伝子は-313 から +336 にまたがって CpG island が存在し 50 個の CpG site を含んでいる。ASNS promoter 中の合計 50 個の CpG island の Methylation

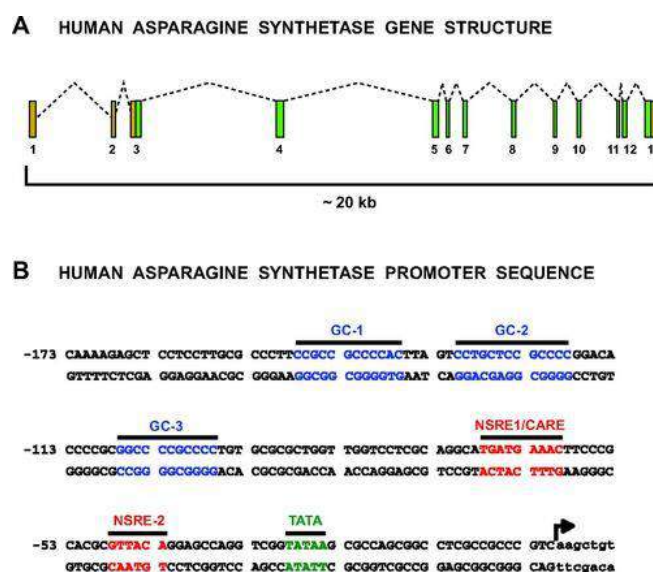


Fig.2 Gene structure and proximal promoter sequence for human ASNS.

A: exon-intron structure and size of the human ASNS gene.
B: sequence of the proximal 173 bp for the human ASNS promoter. Designated are a number of transcription factor binding sites that have been identified by in vivo footprinting and single nucleotide mutagenesis to contribute to either basal or stress-induced transcription. Transferred from Balasubramanian(20).

による遺伝子発現調整が ASNS の基礎的な発現量を調整していることより、多くの研究が ASNase 感受性と ASNS 遺伝子の DNA メチル化状態との間の相関に焦点を当てている (Fig.2B)。

Sugiyama らは(8,9)、アスパラギン栄養要求性 Jensen ラット肉腫細胞においてゲノムの低メチル化をもたらす 5-アザシチジン (5-Aza-C) 処理後に ASNS 発現が検出可能であったため、ASNS 遺伝子が DNA 超メチル

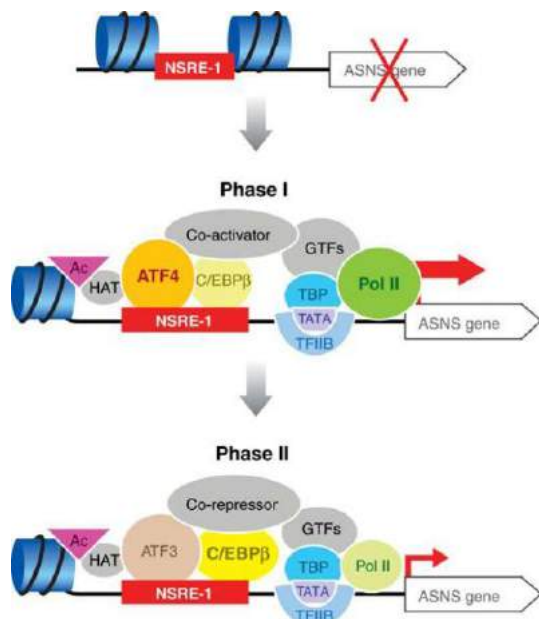


Fig. 3. A working model for control of the asparagine synthetase (ASNS) gene by the AAR or UPR pathways.

Transcription factors shown in color have been localized to the ASNS promoter by chromatin immunoprecipitation analysis. Unidentified or putative components are shown in gray. Transcription from the ASNS gene reaches its highest rate at 1–4 h (phase I) following nutrient stress. ASNS transcription is still elevated relative to the “fed” state between 4–24 h (phase II) following nutrient stress, but the rate is reduced. Transferred from Richards(7).

化によってサイレンシングされることを提案した。Renらは(10)また、ヒト白血病細胞株で高度の ASNS プロモーターのメチル化が ASNS 発現の欠如と相関し、5-Aza-dC処理が ASNS 発現を増強することも観察した。Akagi らは(11)、ASNS プロモーターのメチル化を検討した結果、すべての骨髄サンプルにおいては、B細胞の74%およびT細胞の83%が ASNS プロモーターのメチル化を示したとした。これらの研究に基づいて、ASNS メチル化が ASNase 化学療法に対する ALL 細胞の感受性の根底にあると仮定した。ASNS プロモーターのメチル化のスクリーニングが、ASNase 化学療法に対する ALL 細胞の感受性の予測に有用であることが示唆される。

このような ASNS promoter 中の CpG island のメチル化による遺伝子発現調節はおもに、ASNS の基礎的な発現量を調節し、最大発現量を規定していると考えられ

る。一方、アスパラギン枯渇のような急速な短期的なストレスに対しては、promotor 部分に結合する蛋白の変化や signal transduction により、以下のアミノ酸応答 (AAR) や小胞体ストレス応答で応答することが分かっている (Fig.3.) (7)。

アミノ酸応答 (AAR) アスパラギン欠乏に対する反応

哺乳動物は食物タンパク質またはアミノ酸不均衡を含む食事の変動を感知し、それに応答するのに役立つ広範な適応プロセスを示す。アスパラギン、ヒスチジン、グルタミンなどのアミノ酸欠乏や(12)、glucose 欠乏は後述する小胞体ストレス (ER-stress ; endoplasmic reticulum stress)を引き起こすが、同時に ASNS が誘導される(13)。このような刺激によっては3つの GC boxes への結合蛋白の変化はない(Fig.2B)。アスパラギン枯渇から ASNS の発現に結びつくプロセスの研究によりアミノ酸応答要素 (AARE) と総称される複数のシグナル伝達経路が同定された (Fig.4.)。ASNS の短期的な発現調節にはプロモーター領域に存在している NSRE (nutrient sensing response element)-1,2 といわれる配列が関係している。Barbosa-Tessmann らによる(14)、ASNS プロモーター解析により、2つの異なる領域が AAR 感受性の両方に必要であることを見出された。1 つは nt-68 から-60 で以前から言われている NSRE1 で、第 2 の配列は部位 nt-48 から-43 までの NSRE2 である。ASNS NSRE1 配列は、その後明らかになった signal transduction に関連して、CCAAT/エンハンサー結合タンパク質 (C / EBP) -ATF 応答エレメント (CARE: C / EBP-ATF response element) と呼ばれている(Fig.2B)(14-16)。

アミノ酸応答と小胞体ストレス / unfolded protein response (UPR)

小胞体 (ER) は、分泌タンパク質および膜貫通タンパク質の適切な折りたたみおよび組み立てに重要な多機能オルガネラである。タンパク質の制限またはアスパラギン枯渇のような不均衡な食事アミノ酸組成は、上記のアミノ酸応答 (AAR) 介して、細胞内アミノ酸の枯渇を感知し ASNS 遺伝子転写の活性化を導く(17)。同時に小胞体ストレス (Endoplasmic reticulum (ER) stress) を引き起こす。ASNase 感受性ガン細胞の細胞

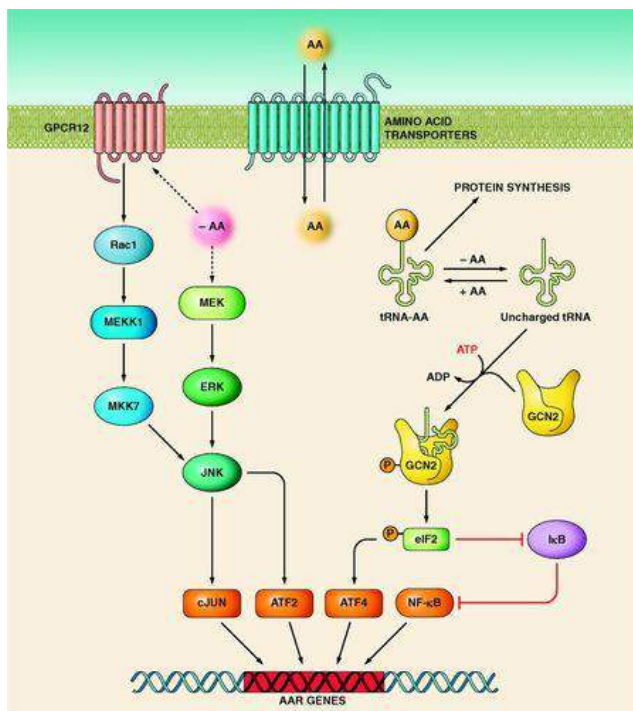


Fig.4. Multiple signal pathways that make up the amino acid response (AAR) in mammals.

The AAR is a collection of signaling pathways that result in an integrated transcriptional program. Whereas uncharged tRNA activation of the GCN2 kinase has been documented to be the AA sensor for the pathways leading to increased NF-κB activity and ATF4 synthesis, the sensor that leads to MEK and GPCR12 activation has not been identified (indicated by dashed lines). AA transporters have been proposed as possible sensor molecules. Transferred from Balasubramanian(20).

死においては、ASN 枯渇後の細胞死には小胞体ストレス(ER-stress ; endoplasmic reticulum stress)も関与している。小胞体ストレスとは、小胞体内腔に立体構造の異常なタンパク質や正常な修飾を受けていないタンパク質が蓄積することで細胞に生じるストレスである。ASNase による ASN 枯渇とは異常タンパク質が合成される可能性が高い状況であり、細胞にはこの小胞体ストレスを回避する機構、小胞体ストレス応答 (Unfolded protein response; UPR) が備わっており、細胞全体における翻訳量を低下させたり、異常タンパク質を分解したりして小胞体にかかる負荷を軽減している。小胞体ストレスはまた、PERK、ATF4 を介して ASNS 転写を増加させる(18)。

ER ストレスに続いて UPR への転写応答後に ASNS 転

写の誘導を導くが(13,19)、プロモーターの分析により、アミノ酸 AA 制限に対する応答(AAR)を担う同じ2つの要素 NSRE1 および NSRE2 が、UPR への転写にもアミノ酸応答(AAR)にも必要である(14)。これらの細胞ストレス経路は、AAR においては GCN2 を介して eIF2 キナーゼ (eukaryotic initiation factor 2alpha kinase) および PERK (PKR 様小胞体キナーゼ) の活性化をもたらす。UPR 応答においては PERK (PKR-like ER kinase)、PERK (PKR-like ER kinase)-ATF4 (activating transcription factor 4) 経路の活性化をもたらす。AAR と UPR はリン酸化-eIF2 以降の経路は共通している。AAR および UPR の両方が、ATF4 の合成の増加をもたらす ASNS の転写を誘導する(20)。小胞体ストレスがこのような細胞の修復機能を越えてしまった場合、アポトーシス誘導因子が活性化され (Fig.5.)、細胞はアポトーシスを実行する。ASNS 誘導が ER-stress だけでなくオートファジー-Autophagy にも関与していることが示された。

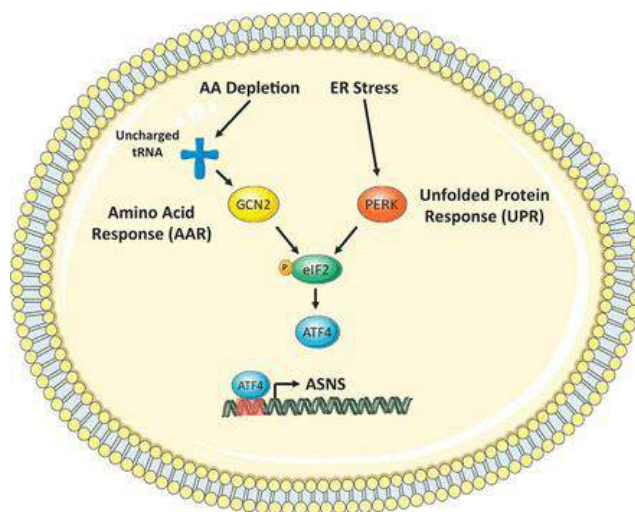


Fig.5. Regulation of ASNS expression.

Asparagine depletion activates the AAR, whereas endoplasmic reticulum stress (ER Stress) activates the UPR. Each stress condition increases the activity of an eIF2 kinase. Phosphorylation of eIF2 slows global protein synthesis, but paradoxically increases translation of a subset of mRNAs, including that for the transcription factor ATF4. Binding of ATF4 to an enhancer element within the promoter of the ASNS gene induces expression of the enzyme. Transferred from Lomelino(63).

ASNS 発現とオートファジー細胞死

オートファジーAutophagy 自食作用とは細胞内の成分を分解するシステムの一つであり、主な役割として (1) アミノ酸欠乏時にオートファジーが活性化してアミノ酸を供給すること (アミノ酸供給)、(2) 傷害を受けたミトコンドリアなどの細胞内小器官を分解し正常な状態を保つこと (恒常性維持) の二つが知られている。オートファジーは総じて、正常細胞および早期の発がん性形質転換では腫瘍抑制性のようであるが、確立された腫瘍に対しては重要な生存経路として働くと考えられている(21-23)。これが抗がん剤への耐性につながることも報告されている。ASNase を用いた治療はまた、ヒトの癌において細胞保護性の自食作用を誘導することができる。ASNase による治療が、解糖および酸化リン酸化の低下により代謝のシャットダウンをきたし、ミトコンドリア損傷およびオートファジーの活性化を伴うことが示された。がん細胞はこのようなストレス下においてもアポトーシスを起こさず、自身の恒常性を保つことが可能で、オートファジーにより損傷したミトコンドリアを排除し、反応性酸素種 (ROS) レベルを低下させ、ASNase による細胞死を逃れがん細胞は生存を図る (Fig.6)(24)。

アスパラギナーゼ治療とアスパラギン合成酵素発現の臨床的妥当性

ASNase 小児の急性リンパ性白血病 ALL をはじめ、多くの白血病、悪性リンパ腫に対して有効な薬剤として使用されている。ALL 細胞は、検出可能な ASNS をほとんど示さず ASN 欠乏に感受性である(25)。体内のほとんどの正常細胞における ASN 枯渇に応答する ASNS 発現の増加とは対照的に、ALL 細胞における ASNS タンパク質含量の上方調節はほとんどなく ASNase に対して優先的に感受性となる(26,27)。

ALL 細胞の薬物療法への抵抗性と細胞内 ASNS 活性との関係が最初に記述されたのは約 40 年前のことである(28)。当時は、大量のがん細胞を用いて酵素活性が測定された。

その後、分子生物学の進歩により、DNA, RNA レベルでの検討が行われた。ASNS の mRNA の発現を検討していくつかの臨床研究では、mRNA レベルと患者における ASNase 感受性が逆相関しない結果であった(29)。これらの研究の問題点は、ASNS タンパク質の含有量

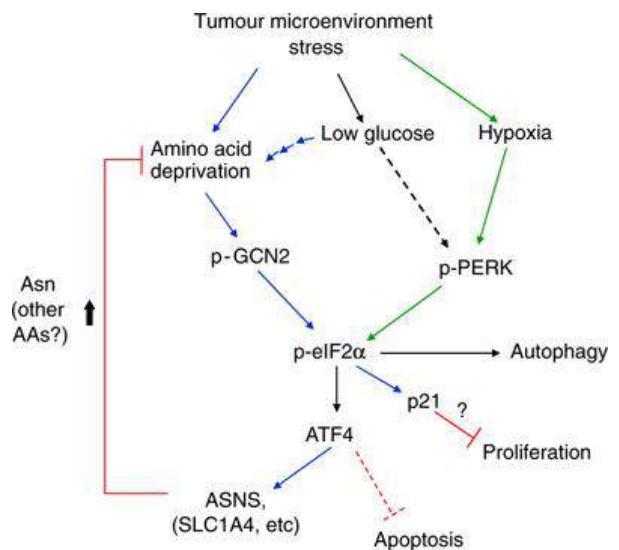


Figure 6. Role of extensive protein response (UPR) in cancer

Tumors frequently encounter exogenous stress that impairs protein folding in the endoplasmic reticulum (ER), including inappropriate amino acid supply. In addition, in response to the accumulation of ER misfolded proteins, UPR is composed of three transmembrane ER proteins: inositol requiring enzyme 1 α (also known as IRE1 α ; ERN1), PRK-like ER kinase (PERK; also known as EIF2AK3) Transcription factor (ATF) 6 α hyperactivity increases the transcription of the target which increases protein folding ability and that of the ER-related degradation (ERAD) pathway. UPR combined output can affect tumor growth at many levels, including cell survival, angiogenesis, inflammation, antigen presentation, invasion and metastasis. Transferred from Oakes(21).

または酵素的な量ではなく ASNS の mRNA が分析されたことである。ここで重要なことは、関連する ASNS の発現は mRNA レベルではなく、蛋白レベルの発現量であることである。Su らは mRNA 含量ではなく ASNS タンパク質レベルが ASNase の感受性予後指標となることが示した(27)。同じ抗体を用いた我々の検討により、造血器腫瘍における ASNase 感受性の増加が mRNA 含量よりも ASNS タンパク質発現の低下と相関することを示された(30)。この観察の分子的基盤は、ASNase 後の ASNS mRNA の上方調節と mRNA の ASNS タンパク質への翻訳との間の有意な遅延時間によるものと考えられた(27)。同じ抗体による我々の検討により急性骨髄芽球性白血病 (AML) (31-33)、悪性 NK 細胞腫瘍 (34-39)も蛋白レベルでの ASNS 欠損があり、ASNase

感受性があることが明らかになった。これらにより、ASNase 感受性造血器腫瘍の範囲が広がった。

固形腫瘍におけるアスパラギナーゼの作用機序

固形腫瘍増殖における ASNS 発現の重要性および ASNase に対する感受性に関しては、それほど広範に研究されていない。Dufour らによると、98 人のヒト膵管癌のスクリーニングにより約 70% で ASNS タンパク質が検出されず、膵臓腫瘍に ASNase 治療の可能性があることが示唆された (14)。Lorenzi らは(40)、卵巣がん細胞における ASNS mRNA レベルと ASNase に対する感受性との間に負の相関関係、ASNS 発現の siRNA ノックダウン後の ASNase 感受性の増加を指摘した。多数の卵巣がん細胞株を用いた第 2 の研究では、ASNase 効力と ASNS タンパク質レベルとの間に逆相関が観察された(41)。ASNS の発現および ASNase に対する感受性もまたは、白血病だけでなく、卵巣がん細胞においても相関していた(40,41)。これらの結果は、以前のヒト白血病細胞における観察と一致し、ASNase 感受性の増加が mRNA 含量よりも ASNS タンパク質発現の低下と相関することを示した。

アスパラギナーゼ耐性化の機序

ASNS タンパク質の発現上昇は小児 ALL におけるアスパラギナーゼ治療に対する耐性に関連することは、モノクローナル抗体の細胞内転送(42)、Hybridoma 作成(43)、siRNA などの手法により(26)証明されている。同じように、ASNS タンパク質の発現上昇の証明は卵巣がん(41)、膵臓癌などの(44)特定の固形腫瘍の薬剤感受性の予測因子となりうる。

アスパラギン合成酵素 ASNS とガン細胞増殖・腫瘍転移

多くのガン細胞において、ASNS が細胞周期を進めたり、ASNS の上方調節によるグルタミン枯渇への細胞適応に寄与したり、ASNS のノックダウンは、癌細胞における細胞増殖を抑制し、腫瘍増殖を抑制することが知られるようになった。

胃癌組織では、正常結腸組織と比較して ASNS は上方調節されることが見出され、ヒト胃癌細胞における ASNS のノックダウンは細胞増殖を抑制し腫瘍増殖を抑制する。また、ASNS の低発現は、胃癌患者におけ

るより良好な生存と有意に関連していた(45)。

肺癌組織での ASNS 遺伝子の発現が正常組織よりも高いことも報告され、ヒト肺癌における ASNS の消失は、G0 / G1 期の細胞周期を停止させることによってヒト肺癌細胞の増殖を抑制するとの報告がある(46)。ヒトメラノーマ細胞および類表皮癌細胞では、RNAi による ASNS のノックダウンによって細胞増殖が抑制された(69)。

結腸直腸癌における KRAS 突然変異によって引き起こされる代謝変化は、ASNS の上方調節によるグルタミン枯渇への細胞適応に寄与する(47)等々の結果が報告されている。

アスパラギン合成酵素 ASNS とガン細胞増殖・疾患予後

上記の実験的証拠に加えて、例えば、胃癌患者における ASNS の低発現はより良好な生存と有意に関連していた(45)。乳がん患者の原発腫瘍における ASNS 発現は後の転移性再発と最も強く相関していた(48)。臨床的に、ASNS の発現は、疾患の進行および神経膠腫(49)および神経芽細胞腫患者の不良予後と相関する(50)ことが知られている。ASNS 発現と後の転移性再発、疾患予後との関係も多く知られている。これらの所見は、ASNS が直腸癌を治療するための治療可能性を有する予後因子であることを示している(51)。

ASNase 治療におけるグルタミンの意義

ASNase 耐性ヒト白血病細胞も、混入グルタミンナーゼ活性に対応して Glutamine synthetase 活性も上昇していることが(43)、我々の研究でも示されている (Table 2)。しかしながら、ASNase 依存的枯渇は細胞内アスパラギンの流出も要因として考慮されなければならない。ASNase による細胞外液アスパラギンの減少により合成されたアスパラギンが細胞外に流出される。以前、我々が ASNase 耐性、アスパラギン欠乏培地に適応した MOLT-4 細胞 mutant を作成した際にも、適応的な ASNS 増加にもかかわらず、細胞内アスパラギンの含有量は低いままであったこと(12)、と相応している (Table 3)。ER ストレス、Autophagy、グルタミンの作用を考慮にいたした asparaginase の作用機序をまともると Fig.7. のようになる(52)。

Cells	Asparagine Synthetase Activity ^a (nM/min/mg protein)	Glutamine Synthetase Activity ^a (pM/min/mg protein)
U937	25.3 ± 15.0	6.05 ± 1.08
U937/Asn(-)	165.1 ± 42.2	6.13 ± 1.14
U937/L-Asp 1.0R	2112.6 ± 424.8	9.64 ± 0.33

Table 2. Asparagine synthetase and Glutamine synthetase activities in wild type U937, U937/Asn(-) and U937/L-Asp 1.0R resistant mutant cells

^a Mean ± SD of more than five experiments.

Transferred from Kiriyama(43).

Leukemia Cells	Asparagine Content (nmol/mg protein)	Asparagine Synthetase		
		mRNA	Protein	Activity
MOLT-4	13.8 ± 1.6	1.00	1.00	1.00
NALL-1	12.8 ± 0.2	2.10	2.00	1.38
MOLT-4/R(asn)	4.25±0.67	4.36	4.36	4.32
BALI-1	7.50 ± 2.2	3.53	5.28	4.65
MOLT-4/R(ase)	1.63 ± 0.29	7.05	7.00	6.92

Table 3. Comparison of cellular asparagine concentration and level of ASNS mRNA, protein, and enzymatic activity

Values are means ±SD of at least 4 determinations. Cellular asparagine concentration was measured as described in text. Relative amounts of AS mRNA, protein, and activity were determined by quantification of mRNA and protein content (and enzyme activity) are expressed relative to an arbitrary value of 1.0 assigned to the results from MOLT-4 parental cell line.

Transferred from Hutson RG, Kitoh T(12).

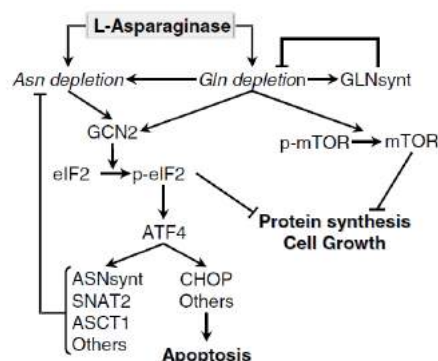


Fig.7. A simplified schema of metabolic pathways triggered by ASNase.

アスパラギンはアミノ酸交換因子として使用されがん細胞の増殖を促進する

Krall らによって(53)、アスパラギンは、細胞内 ASN と細胞外アミノ酸取り込みとの交換因子として使用されがん細胞の増殖を促進することが示された(Fig.8)。ASN 流出に共役したセリン取り込みの調節がセリン代謝およびヌクレオチド合成に影響を与え、ASN がタンパク質およびヌクレオチド合成を調整することに関与することを示唆している。細胞内アスパラギンだけが細胞外アミノ酸、特にセリン、アルギニンおよびヒスチジンと交換して、タンパク質およびヌクレオチド合成および細胞増殖を促進する。そのためには、細胞内に一定の濃度の ASN を維持しておかなければならない。アミノ酸の制限に応答して ASNS 発現は上方調節される(54,55)。低 ASNS 発現癌における ASNase の臨床効果を説明し、なぜアスパラギンなのかという疑問に答える回答の1つとなりうるものである。

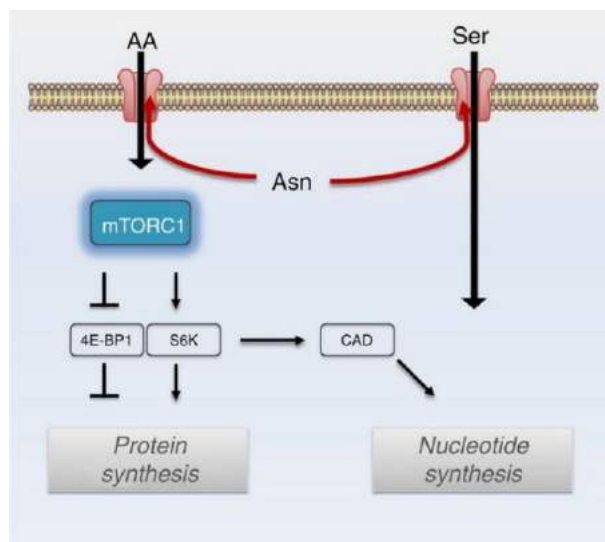


Fig.8 Intracellular asparagine is involved in the exchange with extracellular amino acids including serine (Ser) and regulates protein and nucleotide synthesis. Asparagine rather than extracellular aspartic acid can be transferred inside and outside the cell.

Model showing the contribution of asparagine to protein synthesis and nucleotide synthesis. Intracellular asparagine exchanges with extracellular amino acids (AA) containing serine (Ser) to regulate protein and nucleotide synthesis.

Transferred from Sullivan(64).

アスパラギナーゼ作用の本体

ASNase の作用としては、アミノ酸応答要素、ER-stress、Autophagy などが複雑に絡み合っていることが明らかになってきている。ASNase 投与時における細胞死の理解は、さきほど述べた ASNS 発現に関連のプロセスの裏返しで、特に、活性化する小胞体ストレス(ER-stress ; endoplasmic reticulum stress)と細胞保護性の自食作用 Autophagy を誘導することとの関わりに焦点が当てられている。1) ER ストレス : ASNase 投与時にはアミノ酸供給の観点からミスフォールドタンパク質の蓄積が生じる、これらのタンパク質毒性に対処するために、UPR と呼ばれる転写および翻訳制御の協調システムを活性化する ER ストレスを引き起こす。ER ホメオスタシスは回復するか、または apoptosis をきたし細胞死をもたらす。2) オートファジー活性 : ASNase 投与による ASN 欠乏は、Autophagy 活性が亢進するトリガーとなりうる。実際に Autophagy 活性が亢進していることが確認されている。さらに ASNase 治療が、ミトコンドリアの損傷およびオートファジーの活性化を伴う解糖および酸化的リン酸化の両方の減少を介した代謝停止をもたらすことが確認されている。オートファジーは、損傷したミトコンドリアを排除することによって活性酸素種 (ROS) レベルを低下させ、細胞を rescue しようとする(24)。一方、リソソーム阻害剤である Chloroquine 投与によりオートファジー経路の阻害でがんの細胞死に導けることが報告さ、ASNase との併用により殺細胞効果の増強が期待されている(65)。アスパラギン欠乏から ASNS 発現がされるも、アミノ酸交換因子として機能するのに十分な量の ASN を用意できずに、セリン取り込み不良、タンパク質およびヌクレオチド合成を調整できないことと、ER ストレスと Autophagy が複雑に絡み合っ細胞死にいたると考えられている。

アスパラギナーゼ治療の新たな展望

1) 新たなアスパラギナーゼ製剤の開発 (Fig.9) : フランス、リヨンの会社、Erytech 社は、ASNase そのものの改良ではなく、赤血球内に蛋白を包入する技術を応用し、*E. coli* ASNase の赤血球内包入製剤を開発した(56)。これによれば、アスパラギンは血液内で分解されるのではなく、transporter により積極的に赤血球の内部に送られ、L-アスパラギナーゼは内部で分解し、アスパラ

ギン酸およびアンモニアを産生する。赤血球内への流入が律速段階になり、過度のアスパラギン分解が起こらず、ASNase が血中にさらされず、免疫原性も低下し、半減期も格段に延長するために、ゆっくりとした分解、アスパラギン枯渇の持続により、抗腫瘍効果を高め、副作用を軽減しようという試みである。膀胱がんへのセカンドラインでの投与(44)が始まっている。

2) 最近、既存薬を別な疾患に用いるドラッグ・リポジショニング(DR)が注目されている。多くの卵巣がんの Glutamine Synthetase GS 発現の検討で、GS 低下の卵巣がんでは、細胞外グルタミン枯渇による卵巣がんの個別化治療可能とされ、グルタミナーゼ活性を有する既存の ASNase に効果があると期待される(57)。

3) 抗ヒト ASNS モノクローナル抗体による ASNase 適応解析

ASNS の欠損を見極める方法があれば、有効症例を選択できる。我々の開発したモノクローナル抗体による免疫染色法は、ASNS タンパク質の発現を半定量し白血球、固形腫瘍いずれにも応用可能な、アスパラギナーゼ治療に対する耐性を予測しうる有効な方法である(30)。新たに作成されたモノクローナル抗体は flow cytometry による白血球細胞内の ASNS 定量も可能なもので(58)、胸水、腹水などの浮遊細胞の L-asparaginase 適応を解析するのに有用なもので、今後の活用がきたされる(59)。米国特許取得: Patent No.: US 9,638,697 B2 Date of Patent: May 2, 2017 これらの抗体を用いた免疫染色法により、種々のがん腫に対して L-asparaginase 適応の可能性を探ってきた(60)。

4)悪性中皮腫は、極めて予後不良の疾患であり、アスベスト被曝後に発症することが多く、今後の患者増が予想される(61)。悪性中皮腫細胞株4種において ASNS の免疫染色法により MESO-9, MESO-12 2株での陰性が観察されており、*in vitro* 有効性を確認した結果、同2株において ASNase の有効性が示唆された。ASNS 免疫染色陰性が ASNase 有効性と相関し、今後の ASNase 感受性予測に応用できることが期待される(62)。

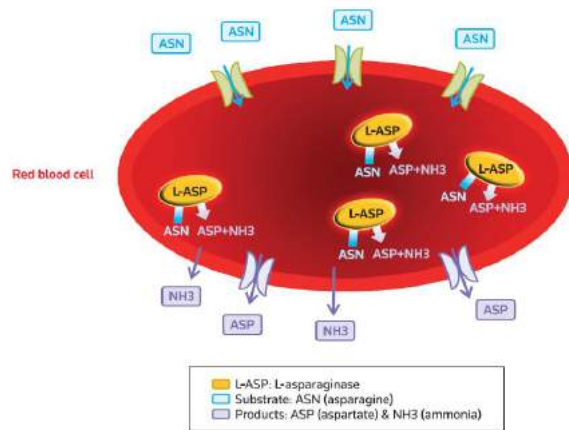


Figure 9. Mechanism of action of Eryaspase (GRASPA®)

Asparagine is actively taken up into erythrocytes. It is decomposed into aspartic acid and ammonia internally by asparaginase.

Transferred from Godfrin(56).

謝辞 :

ともにモノクローナル抗体作成をすすめてきた日本医科大学先端医学研究所教授 浜窪隆雄先生、また、悪性中皮腫の研究を共同で進めている名古屋大学医学部・大学院医学系研究科病理病態学講座教授 豊國伸哉、愛知県がんセンター研究所分子腫瘍学部部长 関戸好孝両先生方に深謝いたします。

参考文献

- 1) Kidd, J. G. (1953) Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. II. Studies on the nature of the active serum constituent: histological mechanism of the regression: tests for effects of guinea pig serum on lymphoma cells in vitro: discussion. *J Exp Med* 98, 583-606
- 2) Broome, J. D. (1963) Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. *J Exp Med* 118, 99-120
- 3) Broome, J. D. (1963) Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. II. Lymphoma 6C3HED cells cultured in a medium devoid of L-asparagine lose their susceptibility to the

- effects of guinea pig serum in vivo. *J Exp Med* 118, 121-148
- 4) Zhang, Y. P., Lambert, M. A., Cairney, A. E. L., Wills, D., Ray, P. N., and Andrulis, I. L. (1989) Molecular structure of the human asparagine synthetase gene. *Genomics* 4, 259-265
 - 5) Tallal, L., Tan, C., Oettgen, H., Wollner, N., McCarthy, M., Helson, L., Burchenal, J., Karnofsky, D., and Murphy, M. L. (1970) E. coli L-asparaginase in the treatment of leukemia and solid tumors in 131 children. *Cancer* 25, 306-320
 - 6) 稲葉寛人. (2018) Symposium of ALL, Optimal use of Asparaginase 小児急性リンパ性白血病におけるアスパラギナーゼ治療の最適化. *日本小児血液・がん学会雑誌* 54, 306-312
 - 7) Richards, N. G., and Kilberg, M. S. (2006) Asparagine synthetase chemotherapy. *Annu Rev Biochem* 75, 629-654
 - 8) Sugiyama, R. H., Arfin, S. M., and Harris, M. (1983) Properties of asparagine synthetase in asparagine-independent variants of Jensen rat sarcoma cells induced by 5-azacytidine. *Molecular and cellular biology* 3, 1937-1942
 - 9) Andrulis, I. L., and Barrett, M. T. (1989) DNA methylation patterns associated with asparagine synthetase expression in asparagine-overproducing and -auxotrophic cells. *Molecular and cellular biology* 9, 2922-2927
 - 10) Ren, Y., Roy, S., Ding, Y., Iqbal, J., and Broome, J. D. (2004) Methylation of the asparagine synthetase promoter in human leukemic cell lines is associated with a specific methyl binding protein. *Oncogene* 23, 3953-3961
 - 11) Akagi, T., Yin, D., Kawamata, N., Bartram, C. R., Hofmann, W. K., Wolf, I., Miller, C. W., and Koeffler, H. P. (2006) Methylation analysis of asparagine synthetase gene in acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* 20, 1303
 - 12) Hutson, R. G., Kitoh, T., Moraga Amador, D. A., Cosic, S., Schuster, S. M., and Kilberg, M. S. (1997) Amino acid control of asparagine synthetase: relation to asparaginase resistance in human leukemia cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 272, C1691-C1699
 - 13) Barbosa-Tessmann, I. P., Pineda, V. L., Nick, H. S., Schuster, S. M., and Kilberg, M. S. (1999) Transcriptional regulation of the human asparagine synthetase gene by carbohydrate availability. *Biochem J* 339 (Pt 1), 151-158
 - 14) Barbosa-Tessmann, I. P., Chen, C., Zhong, C., Siu, F., Schuster, S. M., Nick, H. S., and Kilberg, M. S. (2000) Activation of the human asparagine synthetase gene by the amino acid response and the endoplasmic reticulum stress response pathways occurs by common genomic elements. *J Biol Chem* 275, 26976-26985
 - 15) Leung-Pineda, V., and Kilberg, M. S. (2002) Role of Sp1 and Sp3 in the nutrient-regulated expression of the human asparagine synthetase gene. *J Biol Chem* 277, 16585-16591
 - 16) Zhong, C., Chen, C., and Kilberg, M. S. (2003) Characterization of the nutrient-sensing response unit in the human asparagine synthetase promoter. *Biochem J* 372, 603-609
 - 17) Kilberg, M. S., Balasubramanian, M., Fu, L., and Shan, J. (2012) The transcription factor network associated with the amino acid response in mammalian cells. *Adv Nutr* 3, 295-306
 - 18) Kilberg, M. S., Shan, J., and Su, N. (2009) ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol Metab* 20, 436-443
 - 19) Barbosa-Tessmann, I. P., Chen, C., Zhong, C., Schuster, S. M., Nick, H. S., and Kilberg, M. S. (1999) Activation of the unfolded protein response pathway induces human asparagine synthetase gene expression. *J Biol Chem* 274, 31139-31144
 - 20) Balasubramanian, M. N., Butterworth, E. A., and Kilberg, M. S. (2013) Asparagine synthetase: regulation by cell stress and involvement in tumor biology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304, E789-799
 - 21) Oakes, S. A. (2017) Endoplasmic reticulum proteostasis: a key checkpoint in cancer. *Am J*

- Physiol Cell Physiol 312, C93-C102
- 22) White, E. (2012) Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nature reviews. Cancer* 12, 401-410
 - 23) Choi, K. S. (2012) Autophagy and cancer. *Experimental & molecular medicine* 44, 109-120
 - 24) Takahashi, H., Inoue, J., Sakaguchi, K., Takagi, M., Mizutani, S., and Inazawa, J. (2017) Autophagy is required for cell survival under L-asparaginase-induced metabolic stress in acute lymphoblastic leukemia cells. *Oncogene* 36, 4267-4276
 - 25) Broome, J. D. (1968) Studies on the mechanism of tumor inhibition by L-asparaginase. Effects of the enzyme on asparagine levels in the blood, normal tissues, and 6C3HED lymphomas of mice: differences in asparagine formation and utilization in asparaginase-sensitive and -resistant lymphoma cells. *J Exp Med* 127, 1055-1072
 - 26) Aslanian, A. M., Fletcher, B. S., and Kilberg, M. S. (2001) Asparagine synthetase expression alone is sufficient to induce l-asparaginase resistance in MOLT-4 human leukaemia cells. *Biochem J* 357, 321-328
 - 27) Su, N., Pan, Y.-X., Zhou, M., Harvey, R. C., Hunger, S. P., and Kilberg, M. S. (2008) Correlation between asparaginase sensitivity and asparagine synthetase protein content, but not mRNA, in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Pediatric Blood & Cancer* 50, 274-279
 - 28) Cooney, D. A., and Handschumacher, R. E. (1970) L-asparaginase and L-asparagine metabolism. *Annu Rev Pharmacol* 10, 421-440
 - 29) Stams, W. A. G., den Boer, M. L., Holleman, A., Appel, I. M., Beverloo, H. B., van Wering, E. R., Janka-Schaub, G. E., Evans, W. E., and Pieters, R. (2005) Asparagine synthetase expression is linked with l-asparaginase resistance in TEL-AML1-negative but not TEL-AML1-positive pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 105, 4223-4225
 - 30) Irino, T., Kitoh, T., Koami, K., Kashima, T., Mukai, K., Takeuchi, E., Hongo, T., Nakahata, T., Schuster, S. M., and Osaka, M. (2004) Establishment of Real-Time Polymerase Chain Reaction Method for Quantitative Analysis of Asparagine Synthetase Expression. *The Journal of Molecular Diagnostics* 6, 217-224
 - 31) Horikoshi, A., Takei, K., Iriyama, N., Uenogawa, K., Ishizuka, H., Shiraiwa, H., Hosokawa, Y., Sawada, S., and Kitoh, T. (2009) Effect of L-asparaginase combined with vincristine and prednisolone on acute myeloblastic leukemia (M0) associated with non-Hodgkin lymphoma. *Acta Haematol* 122, 54-57
 - 32) Kitoh, T., Sawada, M., Shirahase, H., Hamahata, K., Usami, I., Ying-Wei, L., Akiyama, Y., Kubota, M., and Schuster, M. S. (1998) Asparagine synthetase protein expression in leukemia cells: application of L-asparaginase treatment for leukemia. . *ASH Annual Meeting Abstracts* 92, 400a
 - 33) Takahashi, H., Koh, K., Kato, M., Kishimoto, H., Oguma, E., and Hanada, R. (2012) Acute myeloid leukemia with mediastinal myeloid sarcoma refractory to acute myeloid leukemia therapy but responsive to l-asparaginase. *International Journal of Hematology* 96, 136-140
 - 34) Tezuka, K., Nakayama, H., Honda, K., Suzumiya, J., Oshima, K., Kitoh, T., and Ishii, E. (2002) Treatment of a child with myeloid/NK cell precursor acute leukemia with L-asparaginase and unrelated cord blood transplantation. *Int J Hematol* 75, 201-206
 - 35) Takahashi, H., Sakai, R., Hattori, Y., Ohshima, R., Kuwabara, H., Hagihara, M., Enaka, M., Nozawa, A., Tomita, N., Ishigatsubo, Y., and Fujisawa, S. (2013) Successful disease control with l-asparaginase monotherapy for aggressive natural killer cell leukemia with severe hepatic failure. *Leukemia & Lymphoma* 54, 662-664
 - 36) Shiba, N., Kanazawa, T., Park, M. J., Okuno, H., Tamura, K., Tsukada, S., Hayashi, Y., and

- Arakawa, H. (2010) NOTCH1 mutation in a female with myeloid/NK cell precursor acute leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 55, 1406-1409
- 37) Morimoto, M., Kondoh, K., Keino, D., Ohyama, R., Ban, S., Kinoshita, A., and Kitoh, T. (2010) A child with myeloid/natural killer cell precursor acute leukemia treated successfully with acute myeloid leukemia-oriented chemotherapy incorporating L-asparaginase. *Leuk Res* 34, 1677-1679
- 38) Matsumoto, Y., Nomura, K., Kanda-Akano, Y., Fujita, Y., Nakao, M., Ueda, K., Horiike, S., Yokota, S., Kusuzaki, K., Kitoh, T., Watanabe, A., and Taniwaki, M. (2003) Successful treatment with Erwinia L-asparaginase for recurrent natural killer/T cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 44, 879-882
- 39) Hyakuna, N., Toguchi, S., Higa, T., Okudaira, T., Taira, N., Masuda, M., Kitoh, T., and Ohta, T. (2004) Childhood blastic NK cell leukemia successfully treated with L-asparaginase and allogeneic bone marrow transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 42, 631-634
- 40) Lorenzi, P. L., Reinhold, W. C., Rudelius, M., Gunsior, M., Shankavaram, U., Bussey, K. J., Scherf, U., Eichler, G. S., Martin, S. E., Chin, K., Gray, J. W., Kohn, E. C., Horak, I. D., Von Hoff, D. D., Raffeld, M., Goldsmith, P. K., Caplen, N. J., and Weinstein, J. N. (2006) Asparagine synthetase as a causal, predictive biomarker for l-asparaginase activity in ovarian cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 5, 2613-2623
- 41) Lorenzi, P. L., Llamas, J., Gunsior, M., Ozbun, L., Reinhold, W. C., Varma, S., Ji, H., Kim, H., Hutchinson, A. A., Kohn, E. C., Goldsmith, P. K., Birrer, M. J., and Weinstein, J. N. (2008) Asparagine synthetase is a predictive biomarker of l-asparaginase activity in ovarian cancer cell lines. *Molecular Cancer Therapeutics* 7, 3123-3128
- 42) Chakrabarti, R., Wylie, D. E., and Schuster, S. M. (1989) Transfer of monoclonal antibodies into mammalian cells by electroporation. *Journal of Biological Chemistry* 264, 15494-15500
- 43) Kiriya, Y., Kubota, M., Takimoto, T., Kitoh, T., Tanizawa, A., Akiyama, Y., and Mikawa, H. (1989) Biochemical characterization of U937 cells resistant to L-asparaginase: the role of asparagine synthetase. *Leukemia* 3, 294-297
- 44) Dufour, E., Gay, F., Aguera, K., Scoazec, J. Y., Horand, F., Lorenzi, P. L., and Godfrin, Y. (2012) Pancreatic tumor sensitivity to plasma L-asparagine starvation. *Pancreas* 41, 940-948
- 45) Yu, Q., Wang, X., Wang, L., Zheng, J., Wang, J., and Wang, B. (2016) Knockdown of asparagine synthetase (ASNS) suppresses cell proliferation and inhibits tumor growth in gastric cancer cells. *Scandinavian journal of gastroenterology* 51, 1220-1226
- 46) Xu, Y., Lv, F., Zhu, X., Wu, Y., and Shen, X. (2016) Loss of asparagine synthetase suppresses the growth of human lung cancer cells by arresting cell cycle at G0/G1 phase. *Cancer Gene Therapy* 23, 287
- 47) Toda, K., Kawada, K., Iwamoto, M., Inamoto, S., Sasazuki, T., Shirasawa, S., Hasegawa, S., and Sakai, Y. (2016) Metabolic Alterations Caused by KRAS Mutations in Colorectal Cancer Contribute to Cell Adaptation to Glutamine Depletion by Upregulation of Asparagine Synthetase. *Neoplasia* 18, 654-665
- 48) Knott, S. R. V., Wagenblast, E., Khan, S., Kim, S. Y., Soto, M., Wagner, M., Turgeon, M.-O., Fish, L., Erard, N., Gable, A. L., Maceli, A. R., Dickopf, S., Papachristou, E. K., D'Santos, C. S., Carey, L. A., Wilkinson, J. E., Harrell, J. C., Perou, C. M., Goodarzi, H., Poulogiannis, G., and Hannon, G. J. (2018) Asparagine bioavailability governs metastasis in a model of breast cancer. *Nature* 554, 378
- 49) Panosyan, E. H., Lin, H. J., Koster, J., and Lasky, J. L., 3rd. (2017) In search of druggable targets for GBM amino acid metabolism. *BMC Cancer* 17, 162
- 50) Zamarbide, M., Martinez-Pinilla, E., Ricobaraza,

- A., Aragon, T., Franco, R., and Perez-Mediavilla, A. (2013) Phenyl acyl acids attenuate the unfolded protein response in tunicamycin-treated neuroblastoma cells. *PLoS One* 8, e71082
- 51) Lin, C. Y., Sheu, M. J., Li, C. F., Lee, S. W., Lin, L. C., Wang, Y. F., and Chen, S. H. (2014) Deficiency in asparagine synthetase expression in rectal cancers receiving concurrent chemoradiotherapy: negative prognostic impact and therapeutic relevance. *Tumour Biol* 35, 6823-6830
- 52) Daniele, C., Saverio, T., Ovidio, B., Laurent, R. C., Maria, V. P., Rita, D., Giovanna, V., and Claudia, S. (2012) Expanding Targets for a Metabolic Therapy of Cancer: L-Asparaginase. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 7, 4-13
- 53) Krall, A. S., Xu, S., Graeber, T. G., Braas, D., and Christofk, H. R. (2016) Asparagine promotes cancer cell proliferation through use as an amino acid exchange factor. *Nat Commun* 7, 11457
- 54) Gong, S. S., Guerrini, L., and Basilico, C. (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. *Molecular and cellular biology* 11, 6059-6066
- 55) Hutson, R. G., and Kilberg, M. S. (1994) Cloning of rat asparagine synthetase and specificity of the amino acid-dependent control of its mRNA content. *Biochemical Journal* 304, 745-750
- 56) Godfrin, Y., Horand, F., Franco, R., Dufour, E., Kosenko, E., Bax, B. E., Banz, A., Skorokhod, O. A., Lanao, J. M., Vitvitsky, V., Sinauridze, E., Bourgeaux, V., and Gunter, K. C. (2012) International seminar on the red blood cells as vehicles for drugs. *Expert Opinion on Biological Therapy* 12, 127-133
- 57) Furusawa, A., Miyamoto, M., Takano, M., Tsuda, H., Song, Y. S., Aoki, D., Miyasaka, N., Inazawa, J., and Inoue, J. (2018) Ovarian cancer therapeutic potential of glutamine depletion based on GS expression. *Carcinogenesis* 39, 758-766
- 58) Kusano-Arai, O., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Nakata, H., Kodama, T., Kitoh, T., and Hamakubo, T. (2012) Evaluation of the asparagine synthetase level in leukemia cells by monoclonal antibodies. *Hybridoma (Larchmt)* 31, 325-332
- 59) Kitoh, T., Gao Siqiang, K. S., Kato, H., Miyata, K., Shimomura, Y., Hori, T., Sakaguchi, K., Horikoshi, Y., Ohki, K., Koh, K., and Hamakubo, T. (2014) Flow Cytometric Detection of Asparagine Synthetase Protein in Leukemia Cells: Indication for L-Asparaginase Therapy. *Blood* 124, 2233-2233
- 60) 鬼頭敏幸, 豊國伸哉, 関戸好孝, 山口悦郎, 浜窪隆雄, and Schuster, S. M. (2016) 悪性中皮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. 第 62 回日本薬学会東海支部大会, 名古屋市
- 61) McCambridge, A. J., Napolitano, A., Mansfield, A. S., Fennell, D. A., Sekido, Y., Nowak, A. K., Reungwetwattana, T., Mao, W., Pass, H. I., Carbone, M., Yang, H., and Peikert, T. (2018) Progress in the Management of Malignant Pleural Mesothelioma in 2017. *J Thorac Oncol* 13, 606-623
- 62) 桑原雅史, 西尾和茂, and 鬼頭敏幸. (2018) L-アスパラギナーゼ感受性悪性中皮腫の Asparagine synthetase 発現を用いた探索. 第 64 回日本薬学会東海支部大会, 名古屋市
- 63) Lomelino, C. L., Andring, J. T., McKenna, R., and Kilberg, M. S. (2017) Asparagine synthetase: Function, structure, and role in disease. *J Biol Chem* 292, 19952-19958
- 64) Sullivan, L. B., Luengo, A., Danai, L. V., Bush, L. N., Diehl, F. F., Hosios, A. M., Lau, A. N., Elmiligy, S., Malstrom, S., Lewis, C. A., and Vander Heiden, M. G. (2018) Aspartate is an endogenous metabolic limitation for tumour growth. *Nature Cell Biology*