

12. Kumpel BM, Rademacher TW, Rook GA, Williams PJ, Wilson IB. Galactosylation of human IgG monoclonal anti-D produced by EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines is dependent on culture method and affects Fc receptor-mediated functional activity. *Hum Antib Hybrid* 1994;5:143–51.
13. Kumpel BM, Wang Y, Griffiths HL, Hadley AG, Rook GA. The biological activity of human monoclonal IgG anti-D is reduced by β -galactosidase treatment. *Hum Antib Hybrid* 1995;6:82–8.
14. Umana P, Jean-Mairet J, Moudry R, Amstutz H, Bailey JE. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat Biotechnol* 1999;17:176–80.
15. Davies J, Jiang L, Pan LZ, LaBarre MJ, Anderson D, Reff M. Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for Fc γ RIII. *Biotechnol Bioeng* 2001;74:288–94.
16. Shields RL, Lai J, Keck R. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc γ RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 2002;277:26733–40.
17. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting *N*-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* 2003;278:3466–73.
18. Niwa R, Shoji-Hosaka E, Sakurada M, et al. Defucosylated anti-CC chemokine receptor 4 IgG1 with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity shows potent therapeutic activity to T cell leukemia and lymphoma. *Cancer Res* 2004;64:2127–33.
19. Yamane-Ohnuki N, Kinoshita S, Inoue-Urakubo M, et al. Establishment of FUT8 knock-out CHO cells; an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced ADCC. *Biotechnol Bioeng* 2004;87:614–22.
20. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells* 1998;16:413–28.
21. Davis TA, Czerwinski DK, Levy R. Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. *Clin Cancer Res* 1999;5:611–5.
22. Kennedy AD, Beum PV, Solga MD, et al. Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol* 2004;172:3280–8.
23. Lustig HJ, Bianco C. Antibody-mediated cell cytotoxicity in a defined system: regulation by antigen, antibody, and complement. *J Immunol* 1976;116:253–60.
24. Nakamura K, Tanaka Y, Fujino I, Hirayama N, Shitara K, Hanai N. Dissection and optimization of immune effector functions of humanized anti-ganglioside GM2 monoclonal antibody. *Mol Immunol* 2000;37:1035–46.
25. Brockhoff G, Hofstaedter F, Knuechel R. Flow cytometric detection and quantitation of the epidermal growth factor receptor in comparison to Scatchard analysis in human bladder carcinoma cell lines. *Cytometry* 1994;17:75–83.
26. Peeters JM, Hazendonk TG, Beuvery EC, Tesser GI. Comparison of four bifunctional reagents for coupling peptides to proteins and the effect of the three moieties on the immunogenicity of the conjugates. *J Immunol Meth* 1989;120:133–43.
27. Okazaki A, Shoji-Hosaka E, Nakamura K, et al. Fucose depletion from human IgG1 oligosaccharide enhances binding enthalpy and association rate between IgG1 and Fc γ RIIIa. *J Mol Biol* 2004;336:1239–49.
28. Vervoordeldonk SF, Merle PA, van Leeuwen EF, von dem Borne AE, Slaper-Cortenbach IC. Preclinical studies with radiolabeled monoclonal antibodies for treatment of patients with B-cell malignancies. *Cancer* 1994;73:1006–11.
29. Ginardi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky D. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol* 1998;51:364–69.
30. Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guillermo A, et al. Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated *in vitro* by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. *Blood* 2001;98:2771–7.
31. Niwa R, Hatanaka S, Shoji-Hosaka E, et al. Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 is independent of Fc γ RIIIa functional polymorphism. *Clin Cancer Res* 2004;10:6248–55.
32. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1986;136:4480–6.
33. Carter P, Presta L, Gorman CM, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:4285–9.
34. Pauletti G, Dandekar S, Rong H, et al. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2000;18:3651–64.
35. Lewis GD, Figari I, Fendly B, et al. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 1993;37:255–63.
36. Sarup JC, Johnson RM, King KL, et al. Characterization of an anti-p185HER2 monoclonal antibody that stimulates receptor function and inhibits tumor cell growth. *Growth Regulation* 1991;1:72–82.
37. Power CA, Meyer A, Nemeth K, et al. Molecular cloning and functional expression of a novel CC chemokine receptor cDNA from a human basophilic cell line. *J Biol Chem* 1995;270:19495–500.
38. Deans JP, Robbins SM, Polyak MJ, Savage JA. Rapid redistribution of CD20 to a low density detergent-insoluble membrane compartment. *J Biol Chem* 1998;273:344–8.
39. Polyak MJ, Tailor SH, Deans JP. Identification of a cytoplasmic region of CD20 required for its redistribution to a detergent-insoluble membrane compartment. *J Immunol* 1998;161:3242–8.
40. Buben JK, Zhou LJ, Bell PD, Frizzell RA, Tedder TF. Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes. *J Cell Biol* 1993;121:1121–32.
41. Cragg MS, Morgan SM, Chan HT, et al. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood* 2003;101:1045–52.
42. Caron PC, Laird W, Co MS, Avdalovic NM, Queen C, Scheinberg DA. Engineered humanized dimeric forms of IgG are more effective antibodies. *J Exp Med* 1992;176:1191–5.
43. Nielsen SU, Routledge EG. Human T cells resistant to complement lysis by bivalent antibody can be efficiently lysed by dimers of monovalent antibody. *Blood* 2002;100:4067–73.
44. Caligiuri MA, Zmuidzinas A, Manley TJ, Levine H, Smith KA, Ritz J. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med* 1990;171:1509–26.
45. Baume DM, Robertson MJ, Levine H, Manley TJ, Schow PW, Ritz J. Differential responses to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells. *Eur J Immunol* 1992;22:1–6.
46. Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human Fc γ RIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 1989;143:3183–91.

フローサイトメトリーによる白血病細胞内アスパラギン合成酵素 蛋白量定量解析法の確立

八田 小百合¹⁾ 鬼頭 敏幸^{1) 2)} 入野 保³⁾ 梅村 茂人⁴⁾
向井 晃一⁵⁾ 逢坂光彦³⁾ 鈴木孝世⁶⁾

¹⁾ 滋賀県立小児保健医療センター 検査科

²⁾ 滋賀県立小児保健医療センター 小児科

³⁾ 滋賀県立成人病センター 研究所 がん研究部門

⁴⁾ 滋賀県立成人病センター 検査部

⁵⁾ 滋賀県立成人病センター 病理部

⁶⁾ 滋賀県立成人病センター 第二内科（血液内科）

CYTOMETRY RESEARCH

Vol.15-1 (Apr., 2005) 別刷

総説

フローサイトメトリーによる白血病細胞内アスパラギン合成酵素 蛋白量定量解析法の確立

八田 小百合¹⁾ 鬼頭 敏幸^{1) 2)} 入野 保³⁾ 梅村 茂人⁴⁾
向井 晃一⁵⁾ 逢坂光彦³⁾ 鈴木孝世⁶⁾

Establishment of Flow cytometrical detection of Asparagine Synthetase (AS) protein in leukemia cells

Sayuri Hatta M.T.¹⁾, Toshiyuki Kitoh M.D., Ph.D.^{1, 2)}, Tamotsu Irino M.T.³⁾, Shigeto Umemura M.T.⁴⁾,
Kouichi Mukai M.T.⁵⁾, Mitsuhiko Osaka M.D., Ph.D.³⁾, Takayo Suzuki M.D., Ph.D.⁶⁾

Department of ¹⁾Clinical Laboratory Medicine and ²⁾Department of Pediatrics Shiga Medical Center for Children

³⁾Division of Cancer Research, Shiga Medical Center Research Institute

⁴⁾Department of Clinical Laboratory Medicine, and ⁵⁾Department of Pathology, Shiga Medical Center for Adults,

⁶⁾Department of Hematology, Shiga Medical Center for Adults

Abstract

Asparagine depletion in the serum during L-asparaginase treatment causes the the death of lymphoblasts that lack ability to synthesize asparagine. Cellular levels of asparagine synthetase (AS) inversely correlate with cellular sensitivity to L-asparaginase. Human leukemia cells that do not express AS in detectable quantities are hypersensitive to the effects of L-asparaginase. In the present studies, we have established a flow cytometry for AS protein detection assay with the monoclonal anti-AS antibody, 3G6. We compared AS expression in single-cell suspensions with standard biochemical and Western blot assays to validate the fluorescence-activated cell sorting (FACS) method. FACS yielded a linear relationship between the mean fluorescence intensity and AS activity. Using this standard curve, FACS-analyzed AS activity in leukemia cells ranged from 25.8 to 436 pmol asparagine formed/mg protein /min, similar to those obtained by Western blot analyse and even to AS mRNA levels by RT-PCR. Thus, AS-FACS can rapidly assess the heterogeneity of steady-state AS in single-cell suspensions and may be useful for assay in peripheral blood cells, bone marrow cells and leukemic cells. This quantitative assay system should be developed as a potential application of AS estimation for fresh leukemia cells.

Keywords: asparagine synthetase, L-asparaginase, flow cytometry, leukemia

¹⁾ 滋賀県立小児保健医療センター 検査科
²⁾ 滋賀県立小児保健医療センター 小児科
³⁾ 滋賀県立成人病センター 研究所 がん研究部門
⁴⁾ 滋賀県立成人病センター 検査部
⁵⁾ 滋賀県立成人病センター 病理部
⁶⁾ 滋賀県立成人病センター 第二内科 (血液内科)

受付日：平成16年12月20日 受理日：平成17年1月19日

はじめに

急性白血病，特に小児の急性リンパ性白血病 (ALL) の治療のkey drugとしてL-asparaginase (L-asparaginase) が用いられている。L-asparaginaseに感受性のある白血病細胞とは特異的にasparagine synthetase (AS) の欠損したものであり，AS欠損，AS活性の低い細胞はL-asparaginase治療のよい適

応であると考えられてきている^{1,2)}。L-asparaginase耐性の機序として、ASの高発現が古くより示唆されていて^{2,3,4)}、L-asparaginase耐性の十分条件がASの高発現であるということも遺伝子の発現実験でも証明されている⁵⁾。細胞株での実験結果からASの発現に関しては、AS mRNA、AS Protein量、ASの酵素活性これら三者は比例関係にあることが示されている⁴⁾。我々は、以前よりヒトASに対するモノクローナル抗体⁶⁾を用いて、主にImmunohistochemistryの手法を用いてAS蛋白発現とL-asparaginase感受性の関係を検討してきた^{7,8)}。また、RT-PCR系をもちいて、AS mRNAを定量し、L-asparaginase感受性の関係を検討し、AS低発現とL-asparaginase感受性の関係を証明してきた⁹⁾。小児ALL以外の腫瘍についても、AS蛋白低発現とL-asparaginase感受性の関係を見出し、免疫組織化学的に腫瘍内のAS蛋白陰性を証明し、その結果に基づいて、L-asparaginaseが投与され実際に有効であった例も経験している^{10,11,12)}。一連の検討に用いてきたヒトASに対するモノクローナル抗体3G6を用いて、より簡便で迅速に測定できるflow cytometry (FCM) によって細胞内AS蛋白量の定量化を試み、以前の方法との相関を検討したので報告する。

1. 対象および検討内容

AS活性既知の細胞株Molt-4, U937, K562 (Table 1) を用い、細胞数を $3 \sim 10 \times 10^6/\text{ml}$ に調整後使用した。使用したモノクローナル抗体はmouse hybridoma 3G6 cloneの培養上清で、kappa鎖をもち、IgG2a classに属する⁶⁾。Immunohistochemistryではcrudeの上清 (IgG2a 濃度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) を使用した。FCM用には精製一次抗体 (抗体濃度は $3.3 \text{mg}/\text{ml}$)、FITC標識した精製抗体 (抗体濃度は $0.72 \text{mg}/\text{ml}$) を、タカラバイオ社 (大津市) に依頼して作製した。

a. 直接法と間接法

上記細胞株を用いて、FITC標識した精製3G6抗体を使用した直接法と、一次抗体に精製3G6抗体、二次抗体にPE標識抗mouse IgG抗体を使用した間接法とで実施比較した。これらの検討後、正常人末梢血について同様の間接法で測定した。

b. 細胞内染色の方法

細胞内染色は、DAKO社製intrastainキットを使用した。陰性コントロールには、同isotype mouse IgGを使用し、精製3G6一次抗体は原液をPBSで希釈して、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ で使用した。細胞内染色を以下のようにおこなった。

- ①対象細胞 $100 \mu\text{l}$ に、Regent Aを $100 \mu\text{l}$ 加え、15分反応させ、膜固定を行う。
- ②PBSで洗浄後、300Gで5分遠心する。
- ③上清を捨て、Regent B (膜透過、赤血球溶血剤) $100 \mu\text{l}$ と3G6抗体 (直接法ではFITC標識3G6抗体を、間接法では精製3G6抗体) $10 \mu\text{l}$ を加え、15分反応させる。
- ④PBSで洗浄後、300Gで5分遠心する。
- ⑤(間接法の場合) FITCもしくはPE標識抗mouse IgG抗体 (DAKO社) (二次抗体) を $10 \mu\text{l}$ 加え、15分さらに反応させる。
- ⑥PBSで洗浄後、300Gで5分遠心し、上清を捨て、PBSに浮遊させる。

c. FCMでの測定・解析

Becton Dickinson社製のFACS Caliburを用いて測定し、Cell Questにて解析した。陰性コントロールが前方散乱光 (FSC) と側方散乱光 (SSC) で表したドットグラム上で蛍光強度が 10^1 内になるように設定し、細胞10,000個を取り込み、測定した。

正常人末梢血検体 (白血球数 $3 \sim 10 \times 10^6/\text{ml}$) においても上記プロトコールにて細胞内染色後、測定

Table 1 Level of Asparagine Synthetase Expression of and Δ MFI by FCM in leukemia cell lines.

Cell lines	AS mRNA (AS/GAPDH) $\times 10^{-3}$	Relative protein amount (%) (Western blot)	Relative enzyme activity (pM Asn formed/min/mg protein)	Δ MFI (AU)
K562	110	100	436 ± 34	43.58
U937	7.9	6.4 ± 2.0	59.6 ± 7.4	6.37
Molt-4	0.81	0.7 ± 0.5	25.8 ± 4.1	2.86

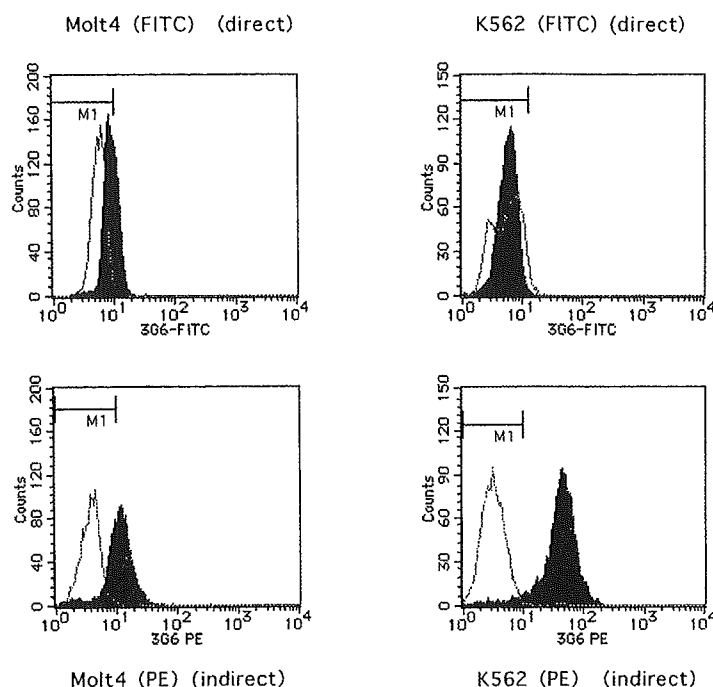


Fig. 1 Comparison of direct- and indirect method of AS protein detection by flow cytometry.

(A) Molt-4. (B) K562 Upper histogram (direct method); Cells were permeabilized, and were immunostained with a non-specific antibody (open histograms) or FITC-anti-AS (filled histograms). Lower histogram (indirect method); Cells were permeabilized, and were immunostained with a non-specific antibody (open histograms) or anti-AS (filled histograms) followed by PE-anti-mouse IgG.

- した。さらに、リンパ球や好中球などの各細胞を比較しやすいように、細胞集団ごとに陰性コントロールの蛍光強度を調整し直し、いずれの細胞の陰性コントロールも 10^1 内に入るように設定し測定した。
- d. 免疫組織細胞染色, 酵素活性測定, RT-PCR による AS mRNA 定量

それぞれ、cytospin 標本, cell lysate, 抽出 total RNA を作製し既報のごとく測定した⁹⁾。

2. 結 果

a. 直接法と間接法 (細胞株を使用)

各細胞株での反応を、横軸に蛍光強度、縦軸をカウント数として、直接法と間接法でヒストグラムで表した。(Fig. 1; 陰性コントロールを Overlay して表示)。Molt-4 では直接法・間接法ともに陰性コントロール・3G6 とともにひとつのピークとして表される。しかし K562 では、間接法ではピークがひとつであるが、直接法の陰性コントロールではピークが二峰性となるものもあった。蛍光強度の mean 値 (Mean Fluorescence Intensity; MFI) について全体 (ALL MFI) から陰性コントロールの mean 値 (M1 MFI) を差し引いたものを Δ MFI として評価

すると、明らかに AS 活性に差の存在する Molt-4 と K562 との間で直接法ではあまりその差がはっきりしなかった。一方間接法において、 Δ MFI 値は Molt-4 では 2.86, U937 では 6.37, K562 では 43.58 となり、それぞれの AS 酵素活性との間により相関があった。

b. 間接法による正常人末梢血での測定

細胞株で Δ MFI 値と AS 酵素活性との間により相関の見られた間接法によって、正常末梢血中の各細胞分画がどのように反応するかを確認した。各細胞分画は横軸 FSC、縦軸 SSC のドットグラム上で gating を行い、リンパ球: R1, 好酸球: R2, 好中球: R3, 単球: R4 と gate して、細胞を取り込んだ (Fig. 2)。各細胞集団のヒストグラムは細胞数によってピークの大きさに差があるが、それぞれひとつの集団として表すことができた。好酸球の陰性コントロールの MFI はかなり高くなり、陽性群と分離できず、非特異反応と思われた。好酸球以外の細胞では、 Δ MFI 値の小さいものからリンパ球、単球、好中球の順になり、リンパ球では AS 低発現、好中球では AS 高発現であると考えられた。単球はその中間の値であった。

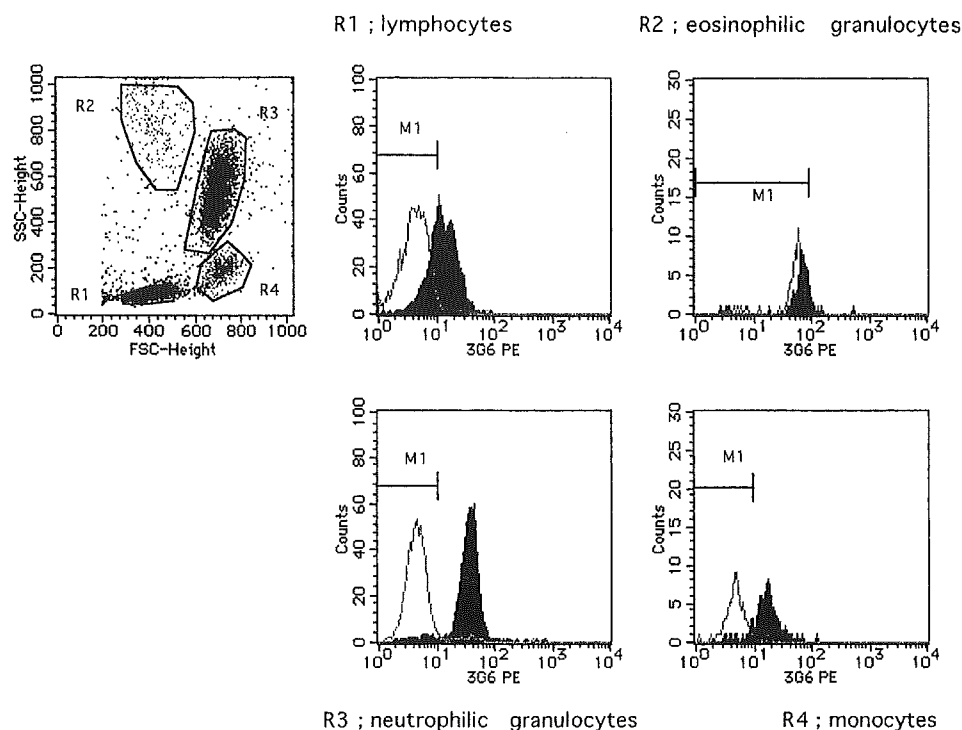


Fig. 2 Differential AS protein expression among WBC differential subfraction.

(A) Scattered dot blots of peripheral blood cells from a healthy volunteer

(B) Flow cytometric histogram of lymphocytes; R1, eosinophils; R2, neutrophilic granulocytes; R3, monocytes; R4. Cells were permeabilized, and were immunostained with a nonspecific antibody (open histograms) or anti-AS (filled histograms) followed by PE-anti-mouse IgG.

3. 考 察

3G6抗体を用いた細胞内染色により、FCMでもAS蛋白量を測定することが可能であった。

標識3G6抗体を使用する直接法よりも、3G6精製抗体を一次抗体に、PE標識mouseIgG抗体を二次抗体とした間接法で行う方が、非特異反応もなく、細胞によるAS蛋白量の差がはっきり表れた。直接法では標識する蛍光色素にFITCを使用したのに対し、間接法ではFITCよりも明るいと言われているPEを使用した影響もあると考えられ、本測定系においてはPE標識二次抗体を用いた間接法が最適であると思われた。Table 1に今まで、我々が報告してきた数値を示した⁹⁾。Immunohistochemistryでの検討 (Fig. 3) によるとASの比較的高発現のK562, U937ではAS蛋白の分布が偏在しているのに対し、ASの低発現のMolt-4では細胞質に均等に分布しているのが認められる。偏在したAS蛋白からの蛍光signalの総和であるMFI値は実際よりも、見かけ上低値をとっている可能性がある。あくまで蛍光量の総和を測定しているFCMとcell lysateを用いて測定したWestern Blotting法との違いは、AS蛋白の分布

の違いによるものによるのかも知れない。

正常人末梢血においては、好中球でAS高発現、リンパ球で低発現となった。FCMにおける Δ MFIは、検討数が少ないため相対値となるにとどまっている。したがって、今後新鮮な白血病患者のサンプルにおいて、芽球 (blast) のASが高いのか低いのかを判定するためには、同一サンプル内にリンパ球や好中球などの内部コントロールが必要で、目的とする細胞がその内部コントロールに比べてASが低いか高いかで判定しなければならない。すなわち内部コントロールであるリンパ球や好中球がサンプル内に含まれていることが必要になる。この点がmRNAの定量などと大きく違う点で、mRNA定量の場合は、サンプル全体のAS活性をまるごと測定するので、サンプル内の細胞が同一細胞であるほど、測定目的の細胞 (blastなど) の割合が高いほど、その精度が高くなる。逆に、FCMではリンパ球や好中球が混ざっているほうが、blastのAS活性を正確に示しやすいということになる。今回の検討の結果、実際の臨床検体に含まれる正常リンパ球、好中球といった細胞集団は、FCMによる白血球細胞のAS蛋白測定時

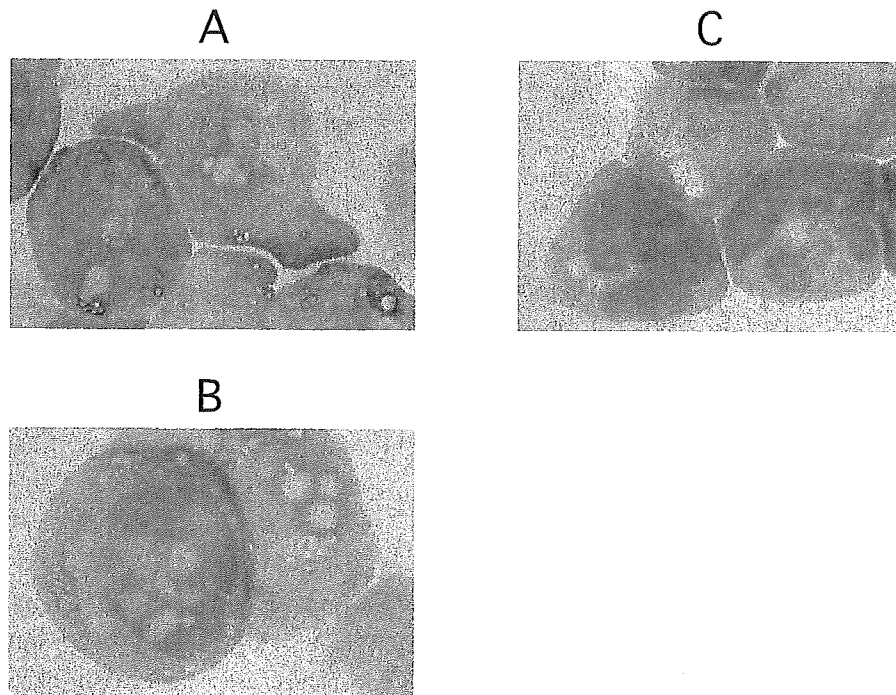


Fig. 3 Immunocytochemical staining of human leukemic cell lines

(A)K562 (B)U937 (C)Molt-4. Staining was performed with the automated immunohistochemistry system (EX-IHC, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) using the DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems).

に、AS発現の基準として内部コントロールとなると思われた。

今回示したFCMによる白血球細胞のAS蛋白測定法は、試料作成操作が煩雑である。試料作成操作自体は難しくないが、染色・洗浄を何度も繰り返すため、最初に十分な細胞数を必要とすること、測定までにかなりの時間がかかることが欠点である。また対象とする検体が、末梢血や骨髄血であるため、迅速に測定できる利点を持つ反面、保存がきかず、採取したその日中に測定しなければならないという時間的制約もある。リンパ球や好中球をFCMでgateするには、FSCとSSCを指標としたドットプロットだけでもgatingが可能であるが、blastや異型リンパ球などのAS蛋白量を測定するには、やはりFSCとSSCだけでは、正常リンパ球や単球などと分けて正確にgatingすることはむずかしいと考えられる。blastなどの目的とする細胞がFSCとSSCでgateできるか、またはさらにCD45によるblast gatingの併用が今後の課題である。

4. 結 語

モノクローナル抗体3G6を使用して、FCMにおいて

もAS蛋白量測定が可能であった。細胞株を対象にして、3G6抗体を一次抗体として、さらにPE標識二次抗体を反応させる間接法で、良好な結果が得られ、FCMによる測定でも、AS酵素活性測定と同様な結果が得られた。また、臨床検体を用いた検討により、正常リンパ球はAS低発現、好中球は高発現となり、内部コントロールとなりうると思われた。

本研究の一部は厚生労働省がん研究助成金指定研究14指-1（主任研究者 堀田知光、分担研究者 鈴木孝世）によった。

References

- 1) Koishi T, Minowada J, Henderson ES, et al: Distinctive sensitivity of some T-leukemia cell lines to L-asparaginase, *Gann*, 75:275 ~ 283, 1984
- 2) Kiriya Y, Kubota M, Takimoto T, et al: Biochemical characterization of U937 cells resistant to L-asparaginase: the role of asparagine synthetase, *Leukemia*, 3: 294 ~ 297, 1989
- 3) Haskell CM, Canellos GP: L-asparaginase resistance in human leukemia-asparagine synthetase, *Biochem*

- Pharmacol, 18: 2578 ~ 2580, 1969
- 4) Hutson RG, Kitoh T, Moraga Amador DA, et al: Amino acid control of asparagine synthetase: relation to asparaginase resistance in human leukemia cells, *Am J Physiol*, 272: C1691 ~ 1699, 1997
 - 5) Aslanian AM, Fletcher BS, Kilberg MS: Asparagine synthetase expression alone is sufficient to induce L-asparaginase resistance in MOLT-4 human leukaemia cells, *Biochem J*, 357: 321 ~ 328, 2001
 - 6) Sheng S, Moraga DA, Van Heeke G, et al: High-level expression of human asparagine synthetase and production of monoclonal antibodies for enzyme purification, *Protein Expr Purif*, 3: 337 ~ 346, 1992
 - 7) Kitoh T, Shirahase H, Usami I, et al: Immunocytochemical Analysis of Asparagine Synthetase Protein of Leukemia Cells: Indication for L-Asparaginase Treatment, *Blood*, 88 (Suppl. 1): 86a, 1996
 - 8) Kitoh T, Shirahase H, Hamahata K, et al: Asparagine Synthetase Protein Expression in Leukemia Cells: Application of L-Asparaginase Treatment for Leukemia, *Blood*, Vol 92 (Suppl. 1): 400a, 1998
 - 9) Irino T, Kitoh T, Koami K, et al: Establishment of real-time polymerase chain reaction method for quantitative analysis of asparagine synthetase expression, *J Mol Diagn*, 6: 217 ~ 224, 2004
 - 10) Tezuka K, Nakayama H, Honda K, et al: 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, 2002
 - 11) Matsumoto Y, Nomura K, Kanda-Akano Y, et al: Successful treatment with Erwinia L-asparaginase for recurrent natural killer/T cell lymphoma, *Leuk Lymphoma*, 44: 879 ~ 882, 2003
 - 12) Hyakuna N, Toguchi S, Higa T, et al: Childhood blastic NK cell leukemia successfully treated with L-asparaginase and allogeneic bone marrow transplantation, *Pediatr Blood Cancer*, 42: 631 ~ 634, 2004