慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Mechanisms of the Growth-inhibitory Effect of the RNase-EGF Fused Protein Against EGFR-overexpressing Cells
Sub Title	EGFR過剰発現細胞に対するRNase-EGF融合タンパクの増殖抑制作用機構
Author	星本, 相淳
Publisher	慶應医学会
Publication year	2006
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.3 (2006. 9) ,p.12-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060902-0012

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Mechanisms of the Growth-inhibitory Effect of the RNase-EGF Fused Protein Against EGFR-overexpressing Cells

(EGFR過剰発現細胞に対するRNase-EGF融合タンパクの増殖抑制作用機構)

星本　相淳

内容の要旨

Epidermal growth factor (EGF) は細胞増殖調節因子であり、そのレセプターであるEGF receptor (EGFR) は様々な癌細胞において過剰発現していることが知られている。そのため、EGFRに対する分子標的治療は非常に合理的であり、既に臨床応用されているものも含め多くの分子標的治療薬が報告されている。我々は臨床応用可能な、より副作用の少ない分子標的治療薬の開発を目指し、ヒトEGF (hEGF) にRNA分解酵素であるヒトribonuclease1 (hRNase1) を化学的あるいは遺伝子工学的に結合させた融合タンパクhRNase1-hEGFを作製し、EGFR過剰発現細胞に対する増殖抑制効果を明らかにしてきた。しかしながら融合タンパクがEGFRを介して癌細胞内にinternalizationされているか、あるいは融合タンパクのRNase活性そのものが増殖抑制効果に寄与しているかといった点については証明されていなかった。そのため今回、我々はRNase-EGF融合タンパクの増殖抑制効果のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

RNase活性を細胞質内で阻害するRNase inhibitorの結合部位を削除したhRNase1すなわちdes.1-7 hRNase1遺伝子とhEGF遺伝子を結合させた発現プラスミドを作製し、既に報告している融合タンパクhRNase1-hEGFの発現プラスミドとともに発現用宿主大腸菌より融合タンパクの発現・精製を行った。FITCで標識したhRNase1-hEGFはEGFR過剰発現細胞株であるA431細胞に添加後30分で細胞膜上に強く認められ、18時間後にはA431細胞の細胞質内に広範囲に分布していた。hEGFで前処理したA431細胞やEGFR欠損細胞株であるH69細胞にはinternalizationされなかった。細胞質内でRNase inhibitorによる相互作用を軽減するために作製したdes.1-7 hRNase1-hEGFはhRNase1-hEGFと比較して約250倍のRNase活性の低下を認めたにもかかわらず、A431細胞に対するIC_{50}はそれぞれ0.55μM、0.35μMで、des.1-7 hRNase1-hEGFが1.5倍の低濃度で増殖を抑制し、10^{-7}Mから10^{-5}Mにおいて増殖抑制効果に統計学的有意差を認めた。いずれの融合タンパクもH69細胞に対しては増殖抑制効果を認めなかった。

今回の実験結果から融合タンパクはEGFRを介してinternalizationされていることが証明され、またRNase inhibitorとの親和性を低下させることによってRNase-EGF融合タンパクの増殖抑制効果が増強したことから、融合タンパクのRNase活性そのものが増殖抑制効果に寄与していることが明らかにされた。

論文審査の要旨

本研究では、従来より報告してきたRNase-EGF融合タンパクのEGFR過剰発現細胞に対する増殖抑制効果の作用機構について、EGFRを介したinternalizationを可視化する実験により証明した。さらに、細胞質内でRNase活性を強力に阻害するRNase inhibitorの結合部位をhRNase1より削除したdes.1-7 hRNase1とhEGFの融合タンパクを遺伝子工学的に作製し、EGFR過剰発現細胞に対する増殖抑制効果を検討することによりinternalizeされた融合タンパクのRNase活性が増殖抑制効果に寄与していることを明らかにした。

審査ではまず、融合タンパクの精製方法、可視化実験の結果に対する解釈について確認がなされた。続いて、融合タンパクのRNase活性が増殖抑制効果に関与していることが本研究結果より充分説明できるかとの質問がなされた。Des.1-7 hRNase1-hEGFはhRNase1-hEGFに比して著明なRNase活性の低下を認めるものの、hRNase1のN末端に存在する7つのアミノ酸を削除したdes.1-7 hRNase1はhRNase1に比してRNase inhibitorに対する親和性が著しく低下することが報告されていること、inhibitor結合部位をmodifyするのみで増殖抑制効果が有意に増強したことから、EGFRを介したsignal transductionのblockではなく細胞内にinternalizeされた融合タンパクのRNase活性が増殖抑制効果に寄与していることで説明できると回答された。実際に細胞内で発揮される融合タンパクのRNase活性の評価については今後の検討課題と指摘された。

さらに、A431細胞が高濃度のdes.1-7 hRNase1-hEGFにおいても20%以上のcell survivalを認めた点に関して質問がなされ、細胞膜上に存在するEGFRのdown regulationにより融合タンパクがinternalizeされにくくなるためと考えられると回答された。標的細胞としてA431細胞を選択した理由についてはA431細胞が他のEGFR発現細胞である食道癌あるいは乳癌細胞株より10倍から100倍EGFRを過剰発現していることが報告されていると回答されたが、融合タンパクの増殖抑制効果がEGFR数にdependentかどうか他の細胞株での検討が必要であるとの助言がなされた。

以上のように、本研究は今後、in vivoでの増殖抑制効果、正常細胞への影響などさらに検討されるべき課題を残しているものの、現在まで明らかにされていなかったRNase-EGF融合タンパクの増殖抑制効果のメカニズムを証明した点で有意義な研究と評価された。

論文審査担当者　主査　外科学　北島　政樹
先端医科学　河上　裕　病理学　岡田　保典
病理学　坂元　亨宇
学力確認担当者：池田　康夫、河上　裕
審査委員長：河上　裕

試問日：平成18年6月13日