

Title	Anti-angiogenic effect of an insertional fusion protein of human basic fibroblast growth factor and ribonuclease-1
Sub Title	ドメイン内挿入融合蛋白質による血管新生阻害効果の検討
Author	林田, 哲
Publisher	慶應医学会
Publication year	2007
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.84, No.2 (2007. 6) ,p.42-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20070602-0042">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20070602-0042</a>

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.

# Anti-angiogenic effect of an insertional fusion protein of human basic fibroblast growth factor and ribonuclease-1

(ドメイン内挿入融合蛋白質による血管新生阻害効果の検討)

林 田 哲

## 内容の要旨

近年分子標的療法が提唱され、国内外で積極的に研究・推進されているが、中でもbasic fibroblast growth factor (bFGF) を含む血管新生促進因子が標的分子として注目を集めている。我々は遺伝子融合によりbFGF遺伝子をヒト酵母由来ribonuclease I (RNase I) 遺伝子内部に挿入することにより、新しい融合蛋白質：CL-RFN89を作製した。RNase Iは細胞質内へ取り込まれることで初めて殺細胞効果を発揮するが、細胞質内ではRNase inhibitor (RI) により強力な抑制効果を受けることが知られている。CL-RFN89はRI結合部位にbFGFが挿入され、立体構造的にその結合を阻害するため、酵素比で200倍のRI濃度中においても約85%の活性を保ち、同時にFGF受容体陽性細胞に対し殺細胞効果を示すことが確認された。今回我々はこの融合蛋白質が血管新生に及ぼす影響を検討した。

血管内皮細胞が有するFGF受容体への結合特異性を確認するため、蛍光色素物質によりCL-RFN89を標識し、human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) と15日間共培養し、洗浄した。これらを蛍光顕微鏡にて観察したところCL-RFN89による細胞の蛍光が観察されたが、過剰量のbFGFをCL-RFN89と同時に添加した群では認められなかった。これは過剰量のbFGFが細胞膜上のFGF受容体を占拠し、競合的にCL-RFN89の結合を阻害したと考えられた。次に*in vitro*での血管新生阻害効果を観察するために、HUVECをコラーゲンゲルで挟み込んで培養し、3次元的に管腔形成を生じさせた。その際培養液中にCL-RFN89を各濃度で添加した。48時間後に得られた管腔の受さを測定したところ、これらはCL-RFN89により濃度依存性に阻害され、2  $\mu$ Mの濃度においてControl群に対し約43%の管腔形成を認めるのみであった。

さらに、膜フィルターで両面を覆ったチャンバーを作製し、内部にヒト扁平上皮癌由来細胞：A431を挿入して、マウス背部皮下に移植した。5日後これを切除し、皮下に形成された新生血管を観察した。その際にCL-RFN89をチャンバー内へ同時に添加したところ、腫瘍のみの群では、3 mm以上の新生血管を平均4.4本認めたが、2  $\mu$ MのCL-RFN89を添加した群では、平均0.8本認めるのみであった。

これらの結果により、CL-RFN89は特異的にFGF受容体を介して血管内皮細胞へ結合すると考えられ、さらに*in vitro*、*in vivo*の系でともに血管新生阻害効果が確認された。今後の研究の進捗により、FGF受容体への特異性を有する血管新生阻害剤として期待されると考えられた。

## 論文審査の要旨

分子標的治療の実現には、標的分子を発現する細胞への特異的結合と同時に、その細胞の細胞死を何らかのメカニズムで誘導することが必要である。これらを両立するため、本研究では細胞質内で殺細胞効果を発揮するribonuclease-1 (以下RNase-1) のRNase inhibitor (以下RI) 結合部位に、basic fibroblast growth factor (以下bFGF) が遺伝子組換えにより挿入された。この挿入融合法により、FGF受容体への結合能力を持たせると同時に、細胞質内でのRIの結合を阻害し、RNase-1の活性を維持することによって、FGF受容体発現細胞に対し、高い殺細胞効果が観察された。また、この新しい挿入融合蛋白質“CL-RFN89”によるFGF受容体への特異的結合、及び*in vitro*、*in vivo*における血管新生阻害効果について検証がなされた。

審査では、まず精製された挿入融合蛋白質の立体構造が、正常に巻き戻されていることが確認されたかが問われた。これに対し、直接立体構造の確認は実現されていないものの、本研究に先立ち挿入融合蛋白質のRNase-1活性が確認され、また本研究によりFGF受容体への特異的結合が確認されたため、機能的な面から立体構造の再構築がなされている可能性が高いと回答された。またRNase-1蛋白にシステイン残基を導入し、そのジスルフィド結合による、立体構造安定化が図られている、と説明された。次に、*in vitro*におけるCL-RFN89によるヒト臍帯血管内皮細胞増殖抑制効果、及び3次元培養法における血管新生抑制効果を調べた両実験において、RNase-1のみの添加群をコントロールとして実施すべきではなかったかの指摘があり、論文には記載されていないが、RNase-1のみの添加群も検証され、これによる増殖抑制及び血管新生阻害効果は認められなかった、と回答された。また、腫瘍形成初期の、血管新生を未だ伴わない腫瘍への対応について質問があり、FGF受容体を発現する腫瘍であれば、CL-RFN89による直接的な増殖抑制効果が期待できると回答された。これに関連し、腫瘍周囲血管が未成熟である状態や、また血管新生阻害剤により、腫瘍血管新生が抑制された状態でのdrug deliveryがどの様になされるべきかとの問題について、これらは血管新生阻害剤における恒常的な問題ながら、今後解決する必要性がある、との指摘がなされた。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき課題を残しているが、ドメイン内挿入融合蛋白質CL-RFN89がFGF受容体に特異的に結合し、また血管新生阻害効果を示すことを明らかにしたことで、将来的に分子標的治療の一候補になり得る可能性を示唆した点で有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹  
発生・分化生物学 須田 年生 医化学 末松 誠  
病理学 岡田 保典  
学力確認担当者：池田 康夫  
審査委員長：須田 年生

試問日：平成18年12月19日