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

Title	Anti-tumor effect in an in vivo model by human-derived pancreatic RNase with basic FGF insertional fusion protein through anti-angiogenic properties
Sub Title	FGF挿入型ヒト組み替えRNase-bFGFの血管新生阻害作用を介したin vivoモデルにおける抗腫瘍効果
Author	八木, 洋
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.47-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20070602-0047

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-tumor effect in an *in vivo* model by human-derived pancreatic RNase with basic FGF insertional fusion protein through anti-angiogenic properties

(FGF挿入型ヒト組み替えRNase-bFGFの血管新生阻害作用を介した*in vivo*モデルにおける抗腫瘍効果)

八　木　　洋

内容の要旨

悪性腫瘍の増殖が血管新生に依存しており、高密度の血管新生は予後不良に関連していることが最近の研究で明らかになってきている。このため悪性新生物の治療に最も効果的な方法の一つが血管新生を阻害することであると考えられている。

Fibroblast growth factor（FGF）は腫瘍特異的な血管新生に重要な役割を果たす増殖因子の一つであることが知られており、我々は正常な細胞に対して毒性をもたずに腫瘍血管新生を阻害する新たな分子標的薬剤を開発するため、ヒトbasic FGF（bFGF）を、ヒト膵由来リボヌクレアーゼ（RNase1）のリボヌクレアーゼ阻害蛋白（RI）結合部位に挿入した蛋白を遺伝子工学的に作製した。作製された新たな癒合蛋白（CL-RFN89）は、三次元的にRIの結合を阻害することが可能となったため、bFGFとRNase1双方の性質を合わせ持ち、FGF受容体を発現する血管内皮細胞などに特異的に結合した後、RNase1が細胞内へ取り込まれるとRIの抑制を受けずに高い殺細胞効果を示した。

本実験では、この新しい癒合蛋白であるCL-RFN89を用いて、血管新生阻害作用を介した*in vivo*マウスモデルでの抗腫瘍効果を検討した。マウスの右背部皮内にFGF受容体を発現しないヒト扁平上皮癌細胞（A431）を植え込んだ後、翌日CL-RFN89を腹腔内投与し、対照群としてbFGF、PBSをそれぞれ投与した。投与後それぞれの薬剤を同量浸透圧ポンプに封入し、マウス左背部皮下に埋め込み、この浸透圧ポンプから薬剤が７日間持続皮下投与された。腫瘍の最大径と最小径から推定腫瘍重量を連日測定し、持続皮下投与終了後腫瘍を摘出して最終腫瘍重量を計測した。さらに持続皮下投与終了後に腫瘍を摘出し凍結切片を作製して、ラット抗マウスCD31抗体を用いて免疫染色を行った。コンピューター画像解析を用いて微小血管密度（MVD）の測定を行い、腫瘍血管の占領面積率を求めた。

その結果CL-RFN89によるsystemicな投与で、*in vivo*における腫瘍増殖は有意差をもって抑制された（p＝0.0003）。また最終腫瘍重量比はコントロール群と比較し、CL-RFN89投与群で58.2%抑制された（P＜0.0001）。免疫染色ではコントロール群とbFGF単独投与群で、腫瘍内のviableな細胞の間に大口径で口径不均一な血管の高度な増生を認めたが、対照的にCL-RFN89投与群では、小口径で均一な血管の増生を認めるのみであった。CD31陽性血管を画像解析した結果、CL-RFN89の血管新生阻害作用により、腫瘍内での血管占領面積率がコントロール群・bFGF単独投与群と比較し有意差をもって低値を示した（p＜0.0001）。

これらの結果は、CL-RFN89が血管新生阻害効果を介した新しいsystemicな抗腫瘍薬剤として期待できることを示している。

論文審査の要旨

悪性腫瘍の増殖は血管新生に依存していることが明らかになってきており、bFGFはこの過程に重要な役割を担うと考えられている。我々はヒトbFGFをヒトRNase1のRI結合部位に挿入した蛋白を遺伝子工学的に作製した。この新たな融合蛋白（CL-RFN89）はbFGFとRNase1双方の性質を合わせ持ち、FGF受容体を発現する血管内皮細胞などに特異的に結合した後、細胞内へ取り込まれ、三次元的にRIの結合を阻害して高い殺腫瘍細胞効果を示した。本研究では*in vivo*マウスモデルを用いて、CL-RFN89の血管新生阻害作用を介した抗腫瘍効果が実験的に示された。

審査では、実験に用いたA431細胞の選択理由について質問がなされた。増殖の安定性と血管新生阻害のみを検討するためにFGF受容体が発現していない細胞を選択したと回答されたが、癌細胞が血管新生のみでなく細胞間質内のfibroblastなどに強い影響を受けることが指摘され、間質誘導の強い消化器癌細胞を用いた実験系での検討や、間質内の細胞壊死など詳細な病理学的検討の必要性が指摘された。またbFGFがfibroblastに与える影響について質問がなされ、促進的な効果を否定するために増殖因子活性が低いbFGFの変異株を用いた追加実験が検討されていることが示された。さらに*in vivo*における本融合蛋白の細胞内への取り込みの証明、或いは血管新生阻害がRNase1の直接作用の結果であることの肉眼的検討の有無について質問があったが、対象細胞の抑制や半減期の短さにより*in vivo*での局在証明が困難である点から本実験では施行していない旨が回答された。続いて投与方法についての再確認と臨床での投与の困難性についての指摘がなされた。様々な投与方法の検討から腫瘍植え込み直後の腹腔内投与とそれに続く持続皮下投与のみに効果を認めたことが示され、臨床応用時の至適投与方法について腫瘍切除後の予防的投与の提案がなされた。また腫瘍が産生するFGFとの競合について指摘がなされ、投与量や投与時期などの関連が示唆されたが理論的裏付けの必要性が示された。本融合蛋白の利点としてヒト由来による低免疫原性と、高分子化合物であるための固形腫瘍への高い選択性が示された。これに対し一部の構造変化がもたらす新たな免疫原性の獲得とそれによる臨床応用の困難性に加え、すでに臨床応用されているVFGF阻害剤との比較や併用効果についての指摘がなされたが、今後高分子化合物の腫瘍周囲の薬物動態についての確認と、他の薬剤との比較検討の必要性が課題として残された。最後に今後の展望と副作用についての質問がなされた。FGF受容体高発現細胞である悪性黒色種、乳癌、神経膠腫に対する抗腫瘍効果やリウマチモデルでの抗炎症効果について、また副作用として脳や創傷治癒遅延などの可能性について今後の検討課題として提示された。

以上のように、本研究ではさらに検討されるべき課題を残しているものの、*in vivo*でのsystemicな投与により腫瘍増殖抑制効果を示したことは、この挿入型組み替え蛋白がFGF受容体を分子標的とした新しい抗腫瘍薬剤の開発へ発展する可能性を示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　坂元　亨宇
　　内科学　日比　紀文
学力確認担当者：池田　康夫
　　審査委員長：河上　裕

試問日：平成18年12月20日