The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	抗腫瘍活性の選択的増強を目指した腫瘍壊死因子TNF-α変異体の作製とその評価に関する研究
Author(s)	黒田, 賢聖
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42897
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【6】

氏　　名	黒田賢聖（くろだ けんせい）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学位記番号	第　15701　号
学位授与年月日	平成12年9月6日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	**抗腫瘍活性の選択的増強を目指した腫瘍壊死因子 TNF-α変異体の作製とその評価に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　真弓　忠範 （副査） 教　授　山元　弘　　教　授　前田　正知　　教　授　八木　清仁

論文内容の要旨

腫瘍壊死因子（Tumor Necrosis Factor-α, TNF）は、腫瘍に出血性の壊死を誘導する因子として見出された、サイトカインの一つである。TNF は *in vitro* においてもある種のガン細胞に対し直接細胞傷害を示すが、正常細胞にはまったく影響を与えなかった。そこで、発見当初「画期的抗癌剤の出現」と言われ注目された内因性生理活性物質の一つであったが、その後の臨床試験を含む精力的な研究の結果、目的とする抗腫瘍活性以外にも多彩な生理活性を発現することが明らかとなった。この多様性が予期せぬ副作用を招き、薬効（抗腫瘍活性）を引き出すだけの薬量を投与できなかったことが現在に至っても製造承認がなされていない一因となっている。しかしながら、TNF の持つ腫瘍壊死作用とそれに続く消失効果（Tumor Regression）は他では得られない鋭い薬効であり、この多様な生理活性を制御し、目的とする治療作用（抗腫瘍活性）のみを引き出すことが可能であれば、TNF は再び「画期的な抗癌剤」となって陽の目をみ、多くの進行癌患者の救命が期待できる。TNF の抗腫瘍活性の選択的増強を目的としたアプローチはいくつか考えられるが、その一つに遺伝子工学的手法を用いた種々の変異体作製の試みがある。これまでにも多くの変異体の作製が報告されているが、残念ながらそれら変異体は、現在までのところ「抗腫瘍剤としての TNF」には繋がっていない。それは、結果としてそれら変異体が、治療作用（抗腫瘍活性）と副作用の分離を達成できなかったことに他ならない。

以上の背景より、本研究では、ヒト TNF の臨床応用を念頭に置いた、野性型 TNF（rhTNF；^{1}SSS^{4}RTPSDK…^{29}RR…^{155}L）の遺伝子工学的改変を行った。最初に、TNF の抗腫瘍活性の特徴の一つである「癌細胞への直接細胞傷害作用」を選択的に引き出すことを試みた。次に、TNF のもう一つの特徴である「腫瘍血管特異的な傷害作用」に着目した rhTNF 変異体の更なる改変を試みた。

2 種類の TNF レセプターのうち、p55は細胞内領域に細胞死を誘導する領域 death domain をもつアポトーシス実行分子の一つである。また、マウス p75に結合できないヒト TNF はマウス TNF に比し、マウスに対する致死毒性が 50倍も低いことが知られている。現在では p55はアポトーシス誘導以外にも様々なシグナルを伝達していることが判明しているが、先に述べたマウスでの知見は、p55には結合するが p75には結合しないヒト TNF は「癌細胞への直接細胞傷害作用」を引き出し、優れた抗腫瘍活性を有するが、副作用発現は軽度な抗癌剤になる可能性を示唆している。以上のことから、本研究ではまず p55優先的に結合する rhTNF 変異体の作製を目標とした。既知の TNF の X 線結晶解析から分子表面に存在している N 末端から29 番目のアミノ酸^{29}Arg がレセプターと相互作用する

部位の一つと推測し、^{29}Arg を他アミノ酸に置換した 8 つの rhTNF 変異体（K29, H29, Q29, S29, L29, V29, P29, D29）を作製した。その結果、これらの全てが rhTNF に比し、両レセプターへの結合能低下を招いていたが、^{29}Arg を Val に置換した V29 は p55優先的に結合する変異体であることが明らかとなった。V29 は、rhTNF に比し、マウスの系ではあるが抗腫瘍効果試験においてその活性を維持する一方で、致死毒性軽減を達成した変異体であった。その理由の一つに、p55への結合能の低下が毒性軽減に寄与したことが考えられた。V29 は、ラット系ではあるが、TNF の臨床上の Dose Limiting Factor であった血圧低下も示さなかった。このように、V29 は rhTNF に比して明らかに副作用の改善が認められ、抗腫瘍活性の選択的増強を達成した変異体の一つであることが明らかとなった。

次に TNF のもう一つの抗腫瘍作用として特徴的な、腫瘍血管傷害性のより選択的発現を目指した V29 の更なる改変を行った。接着分子インテグリンが認識するリガンド中のモチーフとして、細胞接着配列 Arg-Gly-Asp（RGD）が幅広く認識配列として利用されている。その一つ、腫瘍血管新生中の内皮細胞に発現を認める $\alpha_v\beta_3$もまた RGD を認識しており、実際 *in vivo* において RGD は腫瘍部位特異的に集積する配列であると報告されている。以上のことから V29 の N-末端に^{4}R^{5}G^{6}D を導入した変異体 RGD-V29（^{1}SSS^{4}R^{5}G^{6}D…^{29}VR…^{155}L）を作製した。RGD-V29 は V29 と同様 p55に優先的に結合し、かつ RGD を介して細胞と相互作用をすることが可能な変異体であった。その抗腫瘍効果は rhTNF と同等以上で、かつ RGD-V29 の安全域は rhTNF に比し広がっていた。興味深いことに、rhTNF において深刻な副作用であった出血を伴う消化管毒性が極めて軽度であった。そこで、RGD-V29 の腫瘍血管への作用を検討した。まず、腫瘍細胞の培養上清を利用した腫瘍血管内皮細胞傷害性を評価する *in vitro* モデルアッセイ系を作製した。本系を用い RGD-V29 と rhTNF を比較したところ、RGD-V29 は rhTNF に比し、腫瘍血管内皮様細胞に選択的に傷害作用を示すことが判明した。この選択性向上は正常血管内皮細胞への傷害性軽減に起因するものであった。また、この選択性の向上には^{4}R^{5}G^{6}D, ^{29}V 両方の変異が寄与していた。さらに^{4}R^{5}G^{6}D が、癌細胞の接着・浸潤を抑制することにより TNF の有害作用の一つである転移亢進作用を抑制できることを見出した。

以上の検討結果から、ヒト p55に優先的に結合し、かつ細胞接着能を有するヒト TNF 変異体 RGD-V29 は、rhTNF の「癌細胞への直接細胞傷害作用」および「腫瘍血管特異的な傷害作用」を優先的に引き出すことに成功した変異体の一つであることが明らかになった。さらに、N 末端に RGD 配列を導入することにより TNF の有害作用の一つである癌転移の亢進を抑制できることから、RGD-V29 は副作用の低い、有効な抗腫瘍剤としての応用が期待される。また、本研究を通して腫瘍血管特異的傷害作用を評価するアッセイ系を開発することができた。

論文審査の結果の要旨

腫瘍壊死因子（Tumor Necrosis Factor-α、TNF-α）は、鋭い抗腫瘍活性を有していることから、発見当初「夢の抗癌剤の出現」と最も期待された内因性生理活性物質であった。しかし、その後の臨床試験を含む精力的な研究の結果、目的とする抗腫瘍活性以外にも多様な生理活性を発揮することが明らかとなった。この多様性が予期せぬ副作用を招き、その強い副作用が原因で現在に至っても製造承認はなされていない。もしこの多様な生理活性を制御し、目的治療作用（抗腫瘍活性）のみを引き出すことが可能になれば、TNF-αは再び夢の抗癌剤として再登場することは間違いない。

著者はこれらの問題を解決すべく、遺伝子工学的に改変した TNF-α（TNF 変異体）の臨床応用を念頭に、TNF-αが有する多彩な生理活性の中から抗腫瘍活性のみを引き出すことを目的に研究を行った。その結果、以下の成果が得られた。

1) rhTNF-αの^{29}Arg を Val に置換することにより、アポトーシス実効分子の一つである TNF レセプター p55に、優先的に結合する TNF 変異体 V29 を作製することに成功した。V29 は、担癌マウスを用いた抗腫瘍効果試験において、致死毒性が軽減し、治療域が広がることを見出した。

2) TNF-αの有する多様な抗腫瘍活性の中で、腫瘍血管傷害活性の選択的発現を目指して V29 の更なる改変を試みた。その結果、N-末端に^{4}R^{5}G^{6}D を導入した RGD-V29 は、さらに顕著な抗腫瘍活性を有すること、そのうえ深刻な副作用であった消化管毒性が極めて軽度であること等を見出した。

3) 腫瘍血管内皮細胞傷害性を評価する in vitro アッセイ系を確立した。本アッセイ系において RGD-V29 は、正常血管内皮細胞に比べ460倍もの腫瘍血管内皮細胞選択的傷害性を示すことを明らかにした。

4) さらに RGD-V29 は、TNF-αの有害作用の一つである癌転移亢進作用を克服できることを見出した。そのメカニズムとして少なくとも一部は、TNF 分子内 RGD による癌細胞の接着・浸潤の抑制が関与していることを証明した。

以上の成果は、夢の抗癌剤としての TNF-αの実用化に向けた極めて有効な改善を行うと共に新しい方向性を提示しており、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考える。