

氏名(本籍) 三 木 鉄 蔵

学位の種類 医 学 博 士

学位記番号 医 第 2 2 7 5 号

学位授与年月日 平成 3 年 2 月 27 日

学位授与の条件 学位規則第 5 条第 2 項該当

最終学歴 昭和 50 年 3 月 31 日
 東京都立大学理学部化学科卒業

学位論文題目 Preparation of Recombinant Protein A-Lym-
 photoxin Chimerical Protein and its Antitumor
 Effects in Mice.
 (組換えリンホカインの生体内作用の検討)

(主 査)

論文審査委員 教授 岩崎 祐三 教授 橘 武彦

 教授 菅村 和夫

論文内容要旨

血液溶解系の酵素ウロキナーゼなど、生体で働く生理活性タンパクの多くはその分子内にいくつかの異なる機能領域を有している。そしてそれらの領域の部分機能の組み合わせによって高度に制御された酵素作用の発現が行われていることが知られている。リンホカインにおいても新たな機能領域を付け加えることによって、効果の発現を調整したり局在化させたりすることが可能であるかもしれない。

最近の遺伝子組換え手法の進歩は人工的なタンパクを設計し、生産し、精製して、その生理活性を調べることを可能にした。リンホカインの分野においても、この遺伝子組換えの手法を用いたキメリックタンパク（組換えリンホカイン）が作成されている。

これまでにキメリックタンパクが融合に用いた両タンパクの機能を有していたことが *in vitro* の実験系で数例報告されているが、これらを動物に投与して生体内での機能の発現を確認したという報告は未だなされていない。

そのため本研究は、人工的に作成したキメリックタンパクが生体内において複合機能を発現することを実証することを目的とした。

筆者は、*Staphylococcus aureus* のプロテインAの抗体結合部位をリンホトキシンタンパクのN末端に融合させたキメリックタンパクを遺伝子工学的手法によって作成させたこと、そしてこの組換えリンホカイン（ALT）がプロテインAの抗体結合能力と、リンホトキシンの殺細胞活性を併せ持っていることを既に明らかにしている。

本研究においては、組換えリンホカインの生体内作用について検討を行った。すなわち担Meth-A腫瘍マウスへの腫瘍内投与における抗腫瘍効果と生体内動態について、キメリックタンパクALTとリンホトキシン誘導体（ Δ LT）の挙動を対比して検討した。

ALTは遺伝子組換え大腸菌を用いて発現させ、単離精製した。比較に用いた Δ LTは、ALTのプロテインA部分がプロテアーゼ分解によって脱落したタンパクであり、ALTを発現する大腸菌より分離精製した。リポ多糖の混在はリンホトキシンの活性発現に大きな影響を与えるため、注意深く除去した。

このように調整したALT、 Δ LTをそれぞれマウスLM細胞を用いた *in vitro* 試験にかけて殺細胞活性を測定した。ALTは等分子数あたり Δ LTの1/4の活性を示した。

7週令の雄のBALB/cマウスの皮内に 10^6 細胞のMeth-A腫瘍細胞を接種して担Meth-A腫瘍BALB/cマウスを調整した。このマウスにALT、 Δ LTをそれぞれ、腫瘍接種後5日目から9日まで腫瘍内に5連日投与することによって、腫瘍の退縮と腫瘍部位の出血壊死がおきることが

認められた。完全治癒を引き起こす50%有効投与量の比較では、ALTは等分子数あたり Δ LTの2/3の活性を示した。出血壊死作用は用量依存性であり、投与終了後の壊死の回復が見られた。

リンホトキシンの引き起こすカケクシス作用については未だ報告されていない。本実験においてALTを担Meth-A腫瘍マウスの尾静脈内に投与したところ抗腫瘍効果のほかに一過性の体重減少が認められた。実験マウスにおいて Δ LTでは顕著な、ALTでは軽度なカケクシス症状が観察された。

このようにキメリックタンパクALTと Δ LTは、リンホトキシン様の同質の生理活性を発現した。等分子数あたりの活性はALTの方が小さく、これはリンホトキシン領域がプロテインA領域の付加による立体障害をうけているためと考えられる。

放射性沃素標識を行ったALT、 Δ LTを用いて、生体内動態について調べた。標識したタンパクをそれぞれ担Meth-A腫瘍マウスに腫瘍内投与して、腫瘍組織、腎臓、肝臓、血液中などにおける放射活性の経時変化を対比した。 Δ LTでは放射活性が投与部位から迅速に血液に移行し次いで減衰したが、ALTでは血液中への移行が遅く、放射活性の組織への滞留と減衰の遅延が認められた。

キメリックタンパクALTが Δ LTと異なった放射活性の生体内動態を示す理由としては、プロテインA領域の作用によって生体内での移行、分解、排出の各作用が遅延していることが考えられる。

本研究によりALTが、担Meth-A腫瘍マウスへの腫瘍内投与において、リンホトキシン様の抗腫瘍活性を発現することと、プロテインAの融合に起因する生体内動態の変化を起こすことが示された。

担Meth-A腫瘍マウスにおいて、ALTは融合した双方のタンパクの機能を発現すると考えられる。以上、キメリックタンパク（組換えリンホカイン）が生体内で複合機能を発現することを実証した。

審査結果の要旨

遺伝子組換え手法の進歩により、人工的なタンパクを設計、生産、精製して、その生理活性を調べることが可能になった。リンホカインの研究分野においても、この遺伝子組換えの手法を用いて、キメリックタンパク（組換えリンホカイン）が作成されている。既に、*in vitro*の実験系では、組換えリンホカインが融合に用いた二つのタンパクの機能を発現する事が示されているが、これの生体内での機能の発現に関する研究報告は、未だにみられない。

本研究は、人工的に作成した組換えリンホカインの実験動物における機能の発現を検証することを目的として行なわれた。われわれは、既にstaphylococcus aureusのプロテインAの抗体結合部位をリンホトキシンタンパクのN末端に融合させたキメリックタンパクを遺伝子工学的に作成し、この組換えリンホカイン（ALT）がプロテインAの抗体結合能力とリンホトキシンの殺細胞活性を合わせ持つことを組織培養系の実験で証明している。今回、このALTをMeth-A腫瘍マウスに局所投与した場合のALTの生体内動態と抗腫瘍効果を、リンホトキシン誘導体（ΔLT）投与の場合と比較検討した。

ALTは遺伝子組換え大腸菌で発現させ、単離、精製した。比較に用いたΔLTは、ALTのプロテインA結合部分をプロテアーゼ分解により除去したもので、ALTを発現する大腸菌から分離、精製し、混在するリボ多糖を注意ぶかくとり除いたものを用いた。単離精製したΔLTの殺細胞活性は、*in vitro*の検定でALTの1/4であった。

7週令の雄BALB/cマウスの皮内に 10^6 個のMeth-A腫瘍細胞を接種し、担Meth-A腫瘍BALB/cマウスを作成した。

腫瘍細胞接種後5日目から9日目のマウスに、ALT、ΔLTを5日間連続して局所投与することにより、腫瘍の退縮と腫瘍部位の出血壊死がおきた。腫瘍が完全の消失を指標とする50%有効投与量の等分子当りの比較では、ΔLTはALTの2/3の活性を示した。カヘキシー症状は、ΔLT投与マウスでは顕著であったが、ALT投与では軽度であった。

放射性ヨードで標識したALTとΔLTを腫瘍内に注入し、標識ALTとΔLTの体内動態を調べた。ΔLTは注入部位から迅速に血中に移行したが、ALTには注入局所での滞留と血液への移行の遅延が認められた。

本研究によりALTが担Meth-A腫瘍マウスで、リンホトキシン様の抗腫瘍効果とともに、プロテインAによる投与局所での滞留時間の延長効果を示すことが明らかになった。

本研究は複合タンパクの生体内での機能発現に関する先駆的研究で、学位の授与に値すると認める。