

## 学位論文の要旨

### Abstract of Thesis

研究科 School	自然科学研究科
専攻 Division	化学生命工学専攻
学生番号 Student No.	51424451
氏名 Name	木下 理恵

学位論文題目 Title of Thesis (学位論文題目が英語の場合は和訳を付記)

Development of REIC/Dkk-3 biologics using a novel gene expression system  
(新規遺伝子発現システムを用いた REIC/Dkk-3 バイオ医薬品の開発)

### 学位論文の要旨 Abstract of Thesis

がん治療の奏効率の改善は 21 世紀における最大の医療課題である。既存の 3 大療法である外科手術・化学療法・放射線治療には限界があり、特に進行性の転移がんや再発がんの治療は困難で、奏効率を低下させている。現在、このような完治困難ながんに対する次世代の治療法として遺伝子治療・免疫療法への期待が高まっている。これら次世代型治療における共通認識は、「がん細胞の選択的アポトーシス誘導」と「抗がん免疫の活性化」の達成が重要である点で、世界中で様々な方向から研究が進められている。

私たちは、上記の 2 つのがん治療に好ましい生理活性を 1 つの遺伝子発現で実現する方法として、岡山大学で 2000 年に発見されたがん抑制遺伝子 REIC/Dkk-3 (Reduced expression immortalized cell/Dickkopf-3) を用いたバイオ医薬品の開発を進めている。REIC 遺伝子は、プロモーター領域のメチル化により前立腺がん、腎がん、悪性中皮腫などの多岐にわたるがん種において発現が低下しており、がん抑制遺伝子として機能することが明らかになっている。REIC/Dkk-3 を用いたがんの遺伝子治療では、次の 2 段階の作用機序が示唆されている。最初の作用点として、REIC/Dkk-3 タンパク質をがん細胞内で過剰発現させることで小胞体ストレスを介した高効率な「がん細胞の選択的アポトーシス誘導」がおこる。一方で REIC/Dkk-3 を大量に発現する周辺の正常細胞ではアポトーシスは誘導されず、小胞体ストレス応答として IL (Interleukin) -7 の産生が誘導され、NK 細胞が活性化されて抗腫瘍効果を増強する。さらに細胞外に分泌した REIC/Dkk-3 タンパク質には樹状細胞を活性化する作用があり総合的ながん免疫を誘導する。ここで活性化された樹状細胞はアポトーシス後のがん細胞から効率的にがん特異抗原を選別し、生体内で「抗がん免疫の活性化」を誘導することから、転移がんを含めた広範囲に抗がん作用を及ぼすことができる。この様な 2 段階作用機構を発揮する REIC がもつ抗がん作用を利用した第一のバイオ医薬品として、私たちは、アデノウイルスを用いた遺伝子治療製剤 (Ad-REIC/Dkk-3) を開発し、現在、岡山大学病院において前立腺がんを対象とした局所腫瘍内投与での臨床研究を実施中である。その一方で、生体内では複製・増殖しないアデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療は、ゲノム内へ遺伝子が組み込まれない一過性発現であり、安全性は既に確立されてものの、ウイルスの投与量には限界がある。安全性を確保し、より高い治療効果を発揮するためには、ウイルス投与量あたりの遺伝子の発現量・タンパク質の産生量を増強する必要がある。さらにアデノウイルス製剤は、全身性の免疫反応を惹起し、中和抗体を生成することによる 2 回目投与以降の効果の減弱が懸念される。それを補

う治療方法として、抗がん免疫活性化剤としての可能性を有する REIC/Dkk-3 タンパク質を製剤化し、遺伝子治療製剤と併用して使用方法を確立することで、REIC/Dkk-3 による治療方法の選択肢は格段に広がる。

本研究では、REIC/Dkk-3 遺伝子のもつ抗がん作用を最大限に発揮するための第 2 世代の REIC/Dkk-3 医薬品の開発を目指して実験を進めた。最初の課題として、REIC/Dkk-3 遺伝子の発現量・タンパク質の産生量を増強したアデノウイルスベクターを開発することを目標に発現ベクターの改良を行った。第 1 世代のアデノウイルス製剤は、既存の CMV や CAG プロモーターにより治療遺伝子の過剰発現を誘導してきたが、本研究では、治療遺伝子の下流にエンハンサー領域を挿入することにより、高効率に遺伝子を発現可能な新システムを構築した。この新規遺伝子発現システムを搭載したアデノウイルスベクターを既存の第 1 世代のベクターと比較検証した結果、がん細胞における REIC/Dkk3 タンパク質の発現量、アポトーシスの誘導能、マウス腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果のすべてにおいて、既存のベクターより優れた抗がん効果を示した。

さらに第 2 の課題として、本研究では、REIC/Dkk-3 タンパク質の製剤化を目標に、新規高発現ベクターシステムを用いた REIC/Dkk-3 タンパク質の高生産系を確立し、REIC/Dkk-3 タンパク質の抗がん免疫活性化を担当するドメインを同定した。その分子量 17kDa のドメインは、20 個のシステイン (Cys) を有する C 末端の領域 (S135-F288) で構成され、安定な機能ドメインであることを確認した。さらにそのドメインタンパク質は、マウスの皮下腫瘍モデルへの腹腔内投与において、全長の REIC/Dkk-3 タンパク質と同程度の抗腫瘍効果を示した。

本研究により、優れた抗がん効果が実証されている Ad-REIC/Dkk-3 製剤を進展させ、多岐にわたる癌種への適応が期待される第 2 世代のバイオ医薬品の開発、さらに抗がん免疫活性化剤として実用化が期待される REIC/Dkk-3 タンパク質製剤の基盤となる技術が開発された。