

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 低酸素誘導転写因子が活性化した悪性がんの根治に向けた新薬開発
2. 研究開発代表者： 近藤 科江（国立大学法人東京工業大学）
3. 研究開発の成果

本事業で臨床応用への展開をめざしている融合タンパク質 TAT-ODD-Procaspase-3 (TOP3) は、低酸素誘導転写因子 (HIF) が活性化しているがん組織細胞に、細胞死を誘導するプロドラッグ型機能性タンパク質である。HIF-1 活性は HIF-1 $\alpha$  タンパク質の発現に依存しており、HIF-1 $\alpha$  タンパク質の過剰発現は、がんの治療抵抗性や悪性化に強い相関があることが報告されている。本事業の分担機関である国立がん研究センター東病院で切除された多癌種の検体を用いて HIF-1 $\alpha$  タンパク質発現解析を行ったところ、大腸癌、膵臓癌で特に発現量が高くなっているという結果を得ている。また、実験室で調製された TOP3 融合タンパク質を用いて実施した実験動物での薬効評価実験において、ヒト子宮頸癌、腎癌、乳癌、膵臓癌の細胞移植腫瘍の増殖抑制効果や、ヒト膵臓癌細胞移植腫瘍の放射線治療や標準化学療法との併用による腫瘍の縮小、転移・浸潤抑制、および、延命などの効果が確認されている。HIF-1 $\alpha$  タンパク質の発現分布、および TOP3 の薬効が確認された細胞株のデータから、膵臓癌が TOP3 療法のよい適応であることが示唆された。

臨床応用を目指した GMP 製造準備と高純度 TOP3 融合タンパク質を用いた薬効試験を東工大で進めている。GMP レベルの TOP3 融合タンパク質の調製は、大腸菌発現系を用いて行う事を計画しており、本年度は、GMP 製造にむけて、目標とする精製タンパク質の品質を明確にするために、研究室における高純度 TOP3 融合タンパク質の調製法を検討し、精製した TOP3 融合タンパク質が、SDS-PAGE ゲルでの解析で純度ほぼ 100%となる調製法を確立した。また、精製した高純度 TOP3 融合タンパク質の温度・pH・凍結融解・血清中での安定性などの物性評価、および、内毒素除去処理の検討を行い、高い安定性があることと、生理的検出限度以下まで内毒素除去が可能であることを確認した。並行して、ヒト膵臓癌細胞を用いて、培養細胞系、および同所移植マウスモデルにて、高純度 TOP3 融合タンパク質の薬効を評価し、十分な薬効を支持する解析結果が得られたため、協力企業と連携して、200 L の大量培養系での調製プロトコールの作成に着手した。

分担機関である国立がん研究センター先端医療開発センターでは、非 GMP 製造 TOP3 融合タンパク質を用いた薬物動態の予備的解析のために、高純度 TOP3 融合タンパク質をヨウ素標識する条件の検討を行うと共に、TOP3 融合タンパク質の非臨床 POC 取得に向けて、TOP3 融合タンパク質が集積した標的組織における病理組織学的変化を免疫組織学的な検討、正常臓器への集積と病理組織学的変化の検索や、毒性発現の予測を行うために、腫瘍切片を用いた HIF-1 $\alpha$  タンパク質の免疫染色法の条件決定を行い、薬効薬理研究の基盤整備を行った。更に、膵臓癌において HIF を標的とした抗がん剤を用いる臨床試験での問題点を抽出し解明するために、国立がん研究センター東病院での膵臓癌患者データベースの整備を行い、膵臓癌の肝臓転移患者の背景、腫瘍状況、治療効果、生存期間などの臨床情報等を解析した結果、これらの検体を使用した HIF-1 $\alpha$  タンパク質の発現解析を行うことで、転移性膵臓癌患者における HIF-1 $\alpha$  タンパク質の発現の臨床的意義を確認することが可能であるとの結論を得た。

今後、高純度 TOP3 融合タンパク質の GMP 製造のための調製プロトコールの確立、マウスモデルを用いた体内動態解析と病理解析、前臨床にむけた臨床検体の更なる解析により、本事業の有用性が示されることが期待される。