

厚生科学研究費補助金

がん克服戦略研究事業

「がん細胞の 増殖制御による 総合的分子療法の開発」

平成12年度
総括・分担研究報告

主任研究者 湯尾 明

平成13(2001)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

がん細胞の増殖制御による総合的分子療法の開発 湯尾 明

II. 分担研究報告

1. ヒト白血病細胞に対するアンチセンステクノロジーを応用した
治療法の開発 湯尾 明
2. 「アポトーシス関連遺伝子の発現によるがんの遺伝子治療法の開発」に
関する研究 濱田 洋文
3. 増殖因子レセプターを標的とした遺伝子治療－ IGF-I receptor dominant
negative を用いた大腸癌治療－ 今井 浩三
4. 「がんに対する免疫細胞療法」に関する研究 平井 久丸
5. レセプター型チロシンキナーゼ阻害剤によるがん細胞増殖制御による
分子標的療法に関する研究 官澤 文彦
6. 「ウッドチャックラットを用いた肝細胞癌遺伝子治療法の開発」に
関する研究 間野 博行
7. 条件複製型ウイルスを基軸とした複合遺伝子治療法の開発 矢崎 貴仁
8. 細胞標的化を可能にするモノクローナル抗体の作成と
標的ペプチドへの展開 志村 まり
9. ヒト SMARCB1 遺伝子の機能に関する研究 北村 義浩
10. がんの増殖に関わる分子療法 望月 直樹

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

がん細胞の増殖制御による総合的分子療法の開発

主任研究者 湯尾 明 国立国際医療センター研究所部長

研究要旨 がん細胞の増殖などの生物学的な現象をつかさどる分子を用いて、新しいがんの分子標的療法を開発するために、さまざまな研究が行われた。その結果、CREB アンチセンスオリゴによる白血病細胞の増殖抑制、5-FU と Caspase-8 による相乗的ながん治療の可能性、IGF 受容体遺伝子変異体による *in vivo* での大腸癌細胞の増殖抑制、B 細胞特異的な CTL 誘導と治療への応用の可能性、レセプター型チロシンキナーゼ阻害剤によるがん細胞の増殖制御、ウッドチャックラットを用いた肝細胞癌遺伝子治療モデルの作成、条件複製型単純ヘルペスウイルスによる全身療法の可能性、モノクローナル抗体と標的ペプチドによるがん細胞標的化、SMARCB1 遺伝子欠損ヒト腫瘍における欠損遺伝子補充療法の可能性、などが示された。

分担研究者

濱田 洋文 札幌医科大学医学部
分子医学研究部門教授
今井 浩三 札幌医科大学医学部
内科学第一講座教授
平井 久丸 東京大学医学部附属病院
無菌治療部助教授
官澤 文彦 国立がんセンター研究所
薬効試験部室長
間野 博行 自治医科大学分子生物学教室
助教授
矢崎 貴仁 慶應義塾大学医学部
生理学教室講師
志村 まり 国立国際医療センター研究所
代謝疾患研究部室長
北村 義浩 国立感染症研究所
免疫部室長
望月 直樹 国立国際医療センター研究所
臨床病理研究部室長

ン反応性プロモーターを用いて構築した。

C. 研究結果

- 1) CREB に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドによる白血病細胞特異的な増殖抑制作用を明らかにした。
- 2) Caspase-8 遺伝子導入と 5-FU の相乗的な殺がん細胞作用を明らかにした。
- 3) Dominant negative IGF-I リセプター遺伝子による大腸癌細胞株の増殖抑制をヌードマウスの *in vivo* の系において確認した。
- 4) 造血幹細胞移植患者末梢血より B 細胞特異的な CTL を誘導した。
- 5) 抗 erbB2 抗体とシスプラチンの併用効果において、抗体による ADCC が重要であることを明らかにした。
- 6) ウッドチャックラットのウイルス性肝細胞癌モデルにおいて、ウイルスベクターと AFP プロモーターを用いた肝細胞癌の治療の可能性を示した。
- 7) 腫瘍特異的に複製増殖する変異 HSV-G207 を用いる oncolytic virus therapy の臨床応用を鑑みて、生体内における抗ウイルス活性が抗腫瘍化学療法によって抑制されることを明らかにした。
- 8) レセプター型チロシンキナーゼ RET 細胞外ドメインに結合するペプチドは、RET 発現腫瘍細胞の増殖を抑制した。
- 9) SMARCB1 陰性のヒト肉腫細胞株にこの遺伝子を導入することにより、G1 アレストとアポトーシスを惹起させることを確認した。
- 10) 転移、接着に関わる Ras ファミリー分子のがん細胞内シグナル伝達を探索した。

A. 研究目的

がん細胞の増殖、分化、アポトーシスを制御するさまざまな液性因子やその受容体、細胞内刺激伝達機構などは、現代の細胞生物学の中心的課題であり、がんの臨床や研究においてもこれらの事項はきわめて重要である。本研究においては、このような細胞生物学的な現象をつかさどる分子を用いて、新しく有効ながんの分子標的療法を開発することを目指す。

B. 研究方法

細胞は、分子標的、分子導入に使われうるさまざまなヒトおよびマウスの培養細胞株もしくはヒトの正常血球を用いた。CTL の誘導は標準的な手法により行った。遺伝子導入は、アデノウイルス、レトロウイルス等のウイルスを用いた系や、リポソームを関した系、膜受容体へのモノクローナル抗体を介したイムノジン法などを用いた。一部の研究においては、ウイルス自体が抗腫瘍活性を有するベクターの系（単純ヘルペスウイルス）を用いた。増殖は生細胞数の算定、アポトーシスは形態評価や DNA 断片化などによってそれぞれ同定した。殺細胞効果は動物実験系においても確認した。遺伝子発現調節系はテトラサイクリ

D. 考察

さまざまな種類のがん細胞において、特定の分子導入や特定の変異型ウイルスが腫瘍細胞のアポトーシスや増殖抑制を誘導することなどが明らかにされ、がんの分子療法の新しいモデルがいくつか示された。今後は、これらの実験系が臨床応用につながるような具体的な研究の推進が重要であると考えられた。また、得られた結果の中には全く新しい知見もあり、その機序の解析などの基礎検討も併せて進める必要があると考えられる。

E. 結論

本研究により、アンチセンスオリゴの効果、ウイルス自体の殺細胞効果、受容体や細胞内刺激伝達分子を介した増殖制御やアポトーシス誘導、CTL細胞免疫療法の効果、などが明らかにされ、新たながん細胞分子標的療法の可能性が示された。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

Saeki K, Yuo A, Okuma E, Yazaki Y, Susin SA, Kroemer G, Takaku F: Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL-60 cells. *Cell Death Diff* 7:1263-1269,2000.

Saeki K, Yuo A, Koizumi M, Fujiwara K, Kaneko M, Takaku F, Yazaki Y: CREB antisense oligonucleotides induce non-apoptotic cell death in proliferating leukemia cells, but not normal hematopoietic cells, by a bizarre non-antisense mechanism. *Leukemia* 15:238-245,2001.

Shinoura N, Yoshida Y, Asai A, Kirino T, Hamada H: Adenovirus-mediated transfer of caspase-8 augments cell death in gliomas: Implication for gene therapy. *Hum Gene Ther* 11:1123-1137,2000.

Shinoura N, Yamamoto N, Asai A, Kirino T, Hamada H: Adenovirus-mediated transfer of Fas ligand gene augments radiation-induced apoptosis in U-373MG glioma cells. *Jpn J Cancer Res* 91:1044-1050,2000.

Takekawa T, Adachi M, Nakahata A, Itoh F, Taya Y, Imai K: p53-inducible Wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J*, in press, 2001.

Takahashi T, Hirano N, Takahashi T, Chiba S, Yazaki Y, Hirai H: Immuno-gene therapy against mouse leukemia using B7 molecules. *Cancer Gene Ther* 7:144-150,2000.

Tanaka Y, Takahashi T, Nieda M, Masuda S, Kashiwase K, Ogawa S, Chiba S, Juji T, Hirai H: Generation of HLA-DRB1*1501-restricted p190 minor bcr-abl (e1a2)-specific CD4+ T-lymphocytes. *Br J Haematol* 109:435-437,2000.

Takahashi T, Nieda M, Koezuka Y, Nicol A, Porcelli SA, Ishikawa Y, Tadokoro K, Hirai H, Juji T J: Analysis of human Va24+ CD4+ NKT cells activated by a-glycosylceramide-pulsed monocyte-derived

dendritic cells. *J. Immunol* 164:4458-4464,2000.

Kanzawa F, Koizumi F, Koh Y, Nakamura T, Tatsumi Y, Fukumoto H, Saijo N, Yoshioka T, Nishio K: In vitro synergistic interactions between the cisplatin analog nedaplatin and the DNA topoisomerase I inhibitor irinotecan and the mechanism of this interaction. *Clin Cancer Res* 7:202-209,2001.

Matsuda KM, Madoiwa S, Hasumi Y, Kanazawa T, Saga Y, Kume A, Mano H, Ozawa K, Matsuda M: A novel strategy for the tumor angiogenesis-targeted gene therapy: generation of angiostatin from endogenous plasminogen by protease gene transfer. *Cancer Gene Ther* 7:589-596,2000.

Hoshi M, Harada A, Kawase T, Uyemura K, Yazaki T: Antitumor effects of defective herpes simplex virus-mediated transfer of the TIMP-2 gene in malignant glioma U87 in vitro: consequences for an anticancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 7:799-805,2000.

Oyama M, Ohigashi T, Hoshi M, Nakashima J, Tachibana M, Murai M, Uyemura K, Yazaki T: Intravesical and intravenous therapy of human bladder cancer by the herpes vector G207. *Hum Gene Ther* 11:1683-1693,2000.

Yano L, Shimura M, Taniguchi M, Hayashi Y, Suzuki T, Hatake K, Takaku, Ishizaka Y: Improved gene transfer to neuroblastoma cells by a monoclonal antibody targeting RET, a receptor tyrosine kinase. *Hum Gene Ther* 11:995-1004,2000.

Okui N, Sakuma R, Kobayashi N, Yoshikura H, Kitamura T, Chiba J, Kitamura Y: Packageable antiviral therapeutics against human immunodeficiency virus type 1: virion-targeted virus inactivation by incorporation of a single-chain antibody against viral integrase into progeny virions. *Hum Gene Ther* 11:537-546,2000.

Mochizuki N, Ohba Y, Kobayashi S, Otsuka N, Graybiel AM, Tanaka S, Matsuda M. Crk activation of JNK via C3G and R-Ras. *J Biol Chem* 275:12667-12671,2000.

- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得 RET結合ペプチド(石坂ら) (予定)
 2. 実用新案取得 なし
 3. その他 なし

ヒト白血病細胞に対するアンチセンステクノロジーを応用した治療法の開発

主任研究者 湯尾 明 国立国際医療センター研究所部長

研究要旨 cAMP応答エレメント結合蛋白CREBBに対するアンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチド(20量体、ホスホロチオエート型)は複数のヒト白血病細胞株と複数の治療抵抗性患者検体に対してアンチセンス特異的に増殖抑制と細胞死を誘導した。作用機序は、いわゆるアンチセンスではなかったがアプタメリック効果でもなく、細胞周期異常を伴うアポトーシスではない細胞死を介していた。

A. 研究目的

cAMP応答エレメント結合蛋白(cAMP responsive element binding protein、CREB)は、細胞内のcAMP濃度が上昇することによって転写が亢進する遺伝子の上流域の特定の塩基配列(CRE配列)に結合するタンパク質で、その蛋白の転写を調節する転写因子である。従来の研究においては、その臓器分布やノックアウトマウスの所見などから神経系における役割に焦点を当てた研究が行われてきた。一方、当研究者のグループは、CREBが線維芽細胞において特定の細胞周期に依存してリン酸化されていること、CREBを過剰発現させると同細胞のアポトーシスが誘導されることを発見してきた。本研究においては、CREBのアンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチド(ASODN)が白血病細胞にどのような作用を及ぼすかについて検討した。

B. 研究方法

ASODNおよびそれぞれのASODNに対応するセンスオリゴは、ホスホロチオエート型の20量体のものを合成した。細胞は、正常人末梢血単核球、正常人骨髄CD34陽性細胞、ヒト白血病細胞株であるHL-60、K562、Kasumi-1、OCI-AML1a、AML患者およびCML急性転化患者の芽球を用いた。細胞の増殖は生細胞の算定により行った。アポトーシスの同定は、DNA断片化の同定、TUNEL法、光顕による形態観察により行った。細胞周期はPI染色後、FACSを用いて解析した。

C. 研究結果

検討したASODNの中で、5'非翻訳領域と開始コドンを含む領域を対象としたもの3種が、アンチセンス特異的にHL-60細胞に対して用量依存的に強力な増殖抑制作用を有した。また、他の白血病細胞株(K562、Kasumi-1、OCI-AML1a)に対しても同様にアンチセンス特異的な増殖抑制作用を示した。さらに、治療抵抗性となった臨床検体(AML患者、CML急性転化患者)においても検討したASODNは有効であった。一方、正常人末梢血単核球、正常人骨髄CD34陽性細胞の増殖に対しては有意の作用を及ぼさなかった。

ASODNによって増殖抑制された細胞はDNA断片化の検討やTUNEL法から、アポトーシスには陥っていないことが確認された。細胞周期

の面から、G1期停止でもG2/M期停止でもなく、S期も保たれていた。

RNA解析や蛋白解析から、CREBの発現の低下を介した真のアンチセンス効果ではないことが明らかになったが、欠失変異体や置換変異体の結果から特定の短い配列に依存するアプタメリック効果ではなく、むしろ何らかの対象分子とのハイブリダイゼーションを介する作用であることが示唆された。

D. 考察

CREBに対するASODNが正常ヒト血球に影響を与えることなく白血病細胞のみに対して作用したということは、治療への応用の可能性を示唆するものである。その特異な作用機序に関していくつかの興味有る所見が得られたが、今後のさらなる検討が必要である。

E. 結論

CREBのアンチセンスが、正常血液細胞に影響を与えることなく、さまざまな白血病細胞の増殖を、未知の機序を介して、抑制することが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Saeki K, Yuo A, Okuma E, Yazaki Y, Susin SA, Kroemer G, Takaku F: Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL-60 cells. *Cell Death Diff* 7:1263-1269, 2000.

2. Saeki K, Yuo A, Koizumi M, Fujiwara K, Kaneko M, Takaku F, Yazaki Y: CREB antisense oligonucleotides induce non-apoptotic cell death in proliferating leukemia cells, but not normal hematopoietic cells, by a bizarre non-antisense mechanism. *Leukemia* 15:238-245, 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案取得 | なし |
| 3. その他 | なし |

研究要旨 当研究では、アポトーシス関連遺伝子の発現による癌の遺伝子治療法の開発を目的とした基礎研究を行っている。平成11年度までの検討で、アポトーシス関連遺伝子のうち Caspase-8 の遺伝子導入が特に強力な殺細胞効果を有することを見出した。そこで平成12年度は、Caspase-8 遺伝子導入に既存の治療法を組み合わせることによる抗腫瘍効果の検討を行った。その結果、大腸癌細胞に対し Caspase-8 遺伝子導入と 5-FU を併用すると、それぞれ単独ではほとんどアポトーシスを生じない条件で著明なアポトーシスを伴う殺細胞効果が得られることが判明した。これにより治療に用いるアデノウイルスベクターおよび抗癌剤の量を軽減することが可能となり、有望なストラテジーと考えられた。

A. 研究目的

本研究では、アポトーシス関連遺伝子の発現による癌の遺伝子治療法の開発を目的とする。本年度は、これまでの検討で特に有望な結果を得た Caspase-8 遺伝子導入を大腸癌に対する標準的治療薬である 5-FU と組み合わせることによる抗腫瘍効果を、大腸癌細胞を用いて検討した。

B. 研究方法

これまでに作成したアポトーシス関連遺伝子（特に Caspase-8 遺伝子）を発現するアデノウイルスベクターを用いて大腸癌細胞に遺伝子導入する。これに 5-FU を併用することによりアポトーシス誘導能が増強するかどうか、その併用効果はいかなる分子メカニズムによるのかを解析する。また 5-FU の併用効果を他の方法で代替できるか否か検討する。

C. 研究結果

Caspase-8 遺伝子導入と 5-FU の併用により、それぞれ単独ではほとんどアポトーシス誘導は検出されない条件で、早期（投与2日後）に著明なアポトーシスを伴う細胞死を生じた。この併用効果が生じる機序の1つは、5-FU の細胞増殖抑制作用により、アデノウイルスによって導入・発現した遺伝子産物が細胞分裂に際して分配・希釈される機会が減少する結果、細胞あたりの遺伝子発現が高まることが考えられた。Caspase-8 遺伝子導入に 5-FU を併用する代わりに、細胞周期停止作用を有する p21 あるいは p27 の遺伝子導入を併用することによっても著明なアポトーシス誘導が生じた。また、後期（投与5日後）には Caspase-8 遺伝子導入と 5-FU の併用により大腸癌細胞をほぼ全滅させることが可能であった。

D. 考察と結論

5-FU の抗腫瘍効果は早期には cytostatic effect にとどまり、アポトーシス誘導を介した cytotoxic effect が生じるには3～5日間を要することが多く、この time lag が治療抵抗性の原因の1つと考えられる。これに比較的少量の Caspase-8 遺伝子導入を併用することにより、5-FU による治療早期の cytostatic effect をアデノウイルスによる細胞あたりの遺伝子発現量を増強する形で生かすことで強力な抗腫瘍効果を早期に得ることが可能であった。さらに後期においても、両者のアポトーシスシグナルが相互に強め合うことにより全滅に近い殺細胞効果が得られた。本治療法は治療効果を得るために必要なウイルスベクターおよび抗癌剤の量を軽減し、治療の副作用を減ずる目的においても有効なストラテジーであると考えられる。遺伝子治

療と抗癌剤の併用療法においては、腫瘍および抗癌剤のタイプにより、どのアポトーシス関連遺伝子を併用すると有効な殺細胞効果が得られるかが異なる可能性が高い。今後は、癌細胞の分子生物学的特性および抗癌剤の作用機序・耐性機序の理解に基づいた合理的な併用療法を開発すべきであると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表（本研究に深く関連するもの）

- (1) Shinoura, N., Muramatsu, Y., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Adenovirus-mediated transfer of caspase-3 with Fas ligand induces drastic apoptosis in U373MG glioma cells. *Exp. Cell Res.* 256(2):423-433., 2000.
- (2) Shinoura, N., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Adenovirus-mediated transfer of caspase-8 augments cell death in gliomas: Implication for gene therapy. *Hum. Gene Ther.*, 11(8):1123-1137, 2000.
- (3) Shinoura, S., Yamamoto, N., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Adenovirus-mediated transfer of caspase-8 in combination with super-repressor of NF- κ B drastically induced apoptosis in gliomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000 May 10;271(2):544-552.
- (4) Shinoura, N., Sakurai, S., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Transduction of Apaf-1 or caspase-9 induces apoptosis in A172 cells, which are resistant to p53-mediated apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272(3):667-673, 2000.
- (5) Shinoura, N., Yamamoto, N., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Adenovirus-mediated transfer of Fas ligand gene augments radiation-induced apoptosis in U-373MG glioma cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 2000 Oct;91(10):1044-1050.

2. 学会発表

内田 宏昭, 名川 弘一, 濱田 洋文. 第59回日本癌学会総会（横浜）. 大腸癌に対するアデノウイルスベクターを用いた caspase-8 遺伝子導入療法と 5-FU の併用効果の検討. 平成12年10月5日.

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

増殖因子レセプターを標的とした遺伝子治療

—IGF-I receptor dominant negative を用いた大腸癌治療—

分担研究者 今井 浩三 札幌医科大学医学部教授

研究要旨 IGF-I レセプターの dominant negative (IGF-Ir/dn)を、テトラサイクリン制御発現システムを用いて大腸癌細胞株に遺伝子導入した。IGF-Ir/dn を導入した大腸癌細胞株をマウスに移植し効果を検討した。IGF-Ir/dn 導入株は腫瘍の形成が小さく、5FU を併用すると対照の 70%の腫瘍抑制が認められた。*In vitro, in vivo* ともに IGF-Ir/dn は化学療法の効果を増強することが確認でき、大腸癌をはじめとする悪性腫瘍の治療への応用の可能性が期待された。

A. 研究目的

Insulin-like growth factor (IGF)等の増殖因子とそれらの受容体からのシグナル変化は細胞周期に影響し、腫瘍細胞の増殖亢進を引き起こす。IGF-I 受容体(IGF-Ir)を阻害すると、癌化抑制・腫瘍退縮がもたらされる。大腸癌でも IGF, IGF-Ir は増加しており、IGF が癌細胞増殖を促し、IGF-Ir ブロックで抑制される。さらに、血中 IGF-I 高濃度は大腸癌のリスクとなる。今回、IGF-Ir 阻害によるシグナル伝達の変化を解析すること、その臨床応用を目指し、dominant negative (dn)として働く IGF-Ir (IGF-Ir/dn)を作成し、大腸癌細胞株 HT29 に導入した (HT29dn)。

B. 研究方法

チロシンキナーゼと膜貫通ドメインを欠き、細胞外成分のみからなるアミノ酸 482 の IGF-Ir/dn を作成した。IGF-Ir/dn を tetracycline で発現が調節されるベクターに組み込み大腸癌細胞株 HT-29 に導入した (HT29dn)。IGF-Ir/dn による IGF-Ir シグナル伝達への影響を、Western blot 法、kinase assay を用いて検討した。IGF-Ir/dn の増殖抑制効果を soft agar assay を用いて検討した。IGF-Ir/dn のアポトーシス誘導効果を annexin V assay を用いて検討した。IGF-Ir/dn の生体内での抗腫瘍効果をマウス皮下移植モデルを用いて検討した。

C. 研究結果

HT29dn は IGF-Ir/dn を発現すると IGF-I, -II で刺激しても、IGF-Ir/dn を発現していない導入株・親株において観察された Akt-1 のリン酸化が観察されなかった。一方、MAPK-1, -2 は影響を受けなかった。よって、IGF-Ir/dn は Akt-1 シグナル系を主に阻害すると考えられた。

熱刺激、飢餓刺激および両刺激によるアポトーシス誘導は IGF-Ir/dn の発現により 2-3 倍に増強された。IGF-Ir/dn を発現させると、5FU, CDDP によって誘導されるアポトーシスが明らかに増強された。

ヌードマウスの皮下に親株と導入株を移植し、挿入株の皮下腫瘍の形成が明らかに小さかったことから、IGF-Ir/dn は生体内でも腫瘍形成抑制

作用があることが判明した。さらに皮下腫瘍形成後に腫瘍内に IGF-Ir/dn を発現させたところ、腫瘍は明らかに縮小した。

続いて、腫瘍マウスに 5FU もしくは PBS を週一回腹腔内投与した。5FU は対照群に対して約 25%の腫瘍抑制を示し、さらに、IGF-Ir/dn を発現させると約 70%まで抑制した。生体内でも、IGF-Ir/dn は化学療法の効果を増強することが明らかにされた。

D. 考察

今回用いた IGF-Ir/dn は大腸癌細胞に対して *in vitro, in vivo* 共に著明な抗腫瘍効果を示した。IGF-Ir/dn は化学療法剤誘導アポトーシスを増強したことから、悪性腫瘍を治療する際の問題点である薬剤耐性を克服するための一つの方法となりうると考えられた。今回用いた IGF-Ir/dn は膜貫通部を持たない分泌型のため、bystander 効果を合わせ持ち大きな効果が期待された。

IGF-Ir を阻害すると腫瘍細胞においてはアポトーシスが誘導されるが、正常細胞に対しては増殖抑制しか認められないと報告されている。IGF-Ir のノックアウト・マウスは小型ではあるがほぼ正常に生まれてくることが分かっている。したがって IGF-Ir は臨床的に有用な標的と考えられる。IGF 系は大腸癌の他にも乳癌、肺癌をはじめとする固形癌の多くで、腫瘍発生、増殖に大きな役割を果たしていることが知られており、IGF-Ir/dn 治療の応用範囲は広いと考えられる。

E. 結論

IGF-Ir/dn は大腸癌をはじめとする悪性腫瘍の治療に大きな可能性を持つことが期待された。

E. 研究発表

1. 論文発表

Adachi Y, Imai K, et al.,

Effects of genetic blockade of the insulin-like growth factor receptor on signal transduction, apoptosis, and sensitivity to chemotherapy in human tumor cell lines. (in press)

F. 研究発表 (続き)

1. 論文発表

2) Suzuki H, Itoh F, Toyota M, Kikuchi T, Kakiuchi H, Imai K : Inactivation of the 14-3-3 sigma gene is associated with 5' CpG island hypermethylation in human cancers. **Cancer Res** 60:4353-4357, 2000

3) Takekawa M, Adachi M, Nakahata A, Nakayama I, Itoh F, Tsukuda H, Taya Y, Imai K : p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. **EMBO J** 19:6517-6526, 2000

4) Shirakawa K, Shibuya M, Heike Y, Imai K, et al. Gene targeting Flt-1 and Tie2 inhibits tumor growth and metastases on WIBC-9, a human inflammatory breast cancer xenograft. **Cancer Res**, in press, 2001

5) Yamamoto H, Itoh F, Iku S, Adachi Y, Sasaki S, Imai K, et al : Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic adenocarcinomas : clinicopathological and prognostic significance of matrilysin expression. **J Clin Oncol**, in press, 2001

6) Iwata N, Yamamoto H, Sasaki S, Itoh F, Suzuki H, Kikuchi T, Kaneto H, Iku S, Ozeki I, Karino Y, Satoh T, Toyota J, Satoh M, Endo T, Imai K : Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3 sigma gene in human hepatocellular carcinoma. **Oncogene** 19:5298-5302, 2000

2. 学会発表

1) Adachi Y, et al. : Signaling and pro-apoptotic consequences of regulated dominant negative IGF-I receptor expression. 91st annual meeting of American association for cancer research. April 1-5, 2000 San Francisco, CA

2) 足立 靖, 石田禎夫, 今井浩三、他.
IGF-I レセプター・ドミナント・ネガティブによるシグナル伝達抑制とアポトーシスの誘導.
第 59 回 日本癌学会総会 2000, 10, 4-6. 横浜

分担研究報告書

「がん細胞の増殖制御による総合的分子療法の開発」班
「がんに対する免疫細胞療法」に関する研究
分担研究者：平井久丸（東京大学医学部無菌治療部・助教授）

研究要旨：がんに対する免疫細胞療法の開発を目的として本研究を行った。造血幹細胞移植患者末梢血よりGVHD期に得られたリンパ球を同患者の移植前血球細胞と混合培養することにより患者の移植前B細胞にのみ強い細胞障害活性を示す細胞障害性T細胞（CTL）を早期に大量に誘導することができた。このCTLは、CD3+CD8+CD56+細胞でNKT細胞であった。HLA拘束性は認められなかった。また、一部の同種B細胞やB細胞株に対しても同様の細胞障害活性を示した。今後、このCTLを用いて特にB細胞系造血器腫瘍の移植後再発などに対する治療法としての検討を予定している。また、現在このCTLを活性化するリガンドを検索中である。

A. 研究目的

養子免疫療法は、がんに対する免疫細胞療法として以前から注目されてきた。実際、臨床の場においてLAK療法やTIL療法が行われてきたが、十分な抗腫瘍効果を得るには至らなかった。近年、造血幹細胞移植後再発に対して行われるドナーリンパ球輸注（DLI）は多くの患者で再寛解が得られ効果をあげているが、GVHDの副作用が問題となる場合も多くまた、リンパ球系腫瘍の場合その効果は低い。我々は、特に移植後再発の患者に対し副作用の少ない抗腫瘍効果が得られる免疫細胞療法の開発を目的とし患者移植前血球に対する細胞障害性T細胞の樹立を検討した。

B. 研究方法

造血器幹細胞移植後患者の急性GVHD発症期に、患者末梢血よりリンパ球を採取しこれを放射線照射した患者の移植前単核球と混合培養する。1週間後、同様の方法で再刺激を行い、その後培養液中にIL-2 100 u/mlを加え、培養を続ける。数回刺激を繰り返した後、増えてきたリンパ球より抗CD8抗体ビーズを用いてCD8陽性細胞をソーティングする。CD8陽性T細胞が十分得られたら以下の解析を行う。1) フローサイトメトリーにて細胞表面マーカーを調べる。特にNKレセプターの発現を評価する。2) 移植前後の患者血球細胞集団（B細胞をEBウイルスにて不死化させたEBV-LCLやT細胞をPHAで幼若化させたPHA blastなどを標的として用いる）に対する細胞障害活性を⁵¹Cr放出試験にて評価する。3) 細胞障害活性の機序やHLA拘束性などを調べる。4) 同様の細胞障害活性が他の同種細胞や細胞株にあるか否かを調べる。5) IFN- γ 産生に関して調べる。6) 発現クローニング法にてCTLが認識する分子を同定する。

C. 研究結果

上述の方法にて2例の患者で、CD3+CD8+CD56+NKT細胞が、速やかに大量に得られた。同細胞はCD16陰性でCD94やCD161などのNKレセプターは、陰性～弱陽性であった。この細胞は移植前患者EBV-LCLに対し強い細胞障害活性を示し、移植後患者EBV-LCLに対しては細胞障害活性はみられなかった。また、B細胞系以外の血球系に対しては細胞障害活性はみられなかった。K562細胞に対する細胞障害活性も認められずNK

活性はないと考えられた。この細胞障害活性は、HLAに非拘束性でありanti-class I, anti-CD8, anti-ICAM-1等の抗体で障害活性は抑制できなかった。また、他の同種EBV-LCL細胞やB細胞腫瘍株の一部に対し細胞障害活性を認めた。また、細胞障害活性に相関してIFN- γ 産生が認められた。現在、患者移植前EBV-LCLよりcDNA libraryを作製しこのCTLが認識する分子を検索中である。

D. 考察

今回得られた結果は、B細胞系造血器悪性腫瘍患者での移植後再発に対しわずかな副作用で治療できる免疫細胞療法となる可能性があると思われた。得られた細胞集団のCIK (Cytokine-induced killer) cellとの異同に関しては、今後の解析が必要である。K562に対する細胞障害活性やICAM-1でのblocking結果などに差がみられている。移植後患者で同様のCTLがどのような頻度で得られるかまた非移植患者や健常人で同様のCTL誘導が得られるか否か今後の検討が必要である。

E. 結論

移植後患者のGVHD期リンパ球より患者の移植前Bリンパ球に細胞障害活性を示すNKT細胞を速やかに大量に誘導し得た。今後、移植後再発の治療に役立つ可能性があると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tsuyoshi Takahashi, Naoto Hirano, Tokiharu Takahashi, Shigeru Chiba, Yoshio Yazaki and Hisamaru Hirai
Immuno-Gene Therapy against Mouse Leukemia using B7 Molecules. Cancer Gene Therapy vol 7(1):144-50. 2000

Tsuyoshi Takahashi, Mie Nieda, Yasuhiko Koezuka, Andrew Nicol, Steven A. Porcelli, Yoshihide Ishikawa, Kenji Tadokoro, Hisamaru Hirai and Takeo Juji
Analysis of human V α 24+ CD4+ NKT cells activated by α -glycosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. Journal of Immunology vol 164(9):4458-4464. 2000

レセプター型チロシンキナーゼ阻害剤によるがん細胞の増殖制御による分子標的療法に関する研究

分担研究者 官澤文彦 国立がんセンター研究所薬効試験部

研究要旨

分子標的療法として、(1) CytopathicアデノウイルスのCos-TPC法による全身療法の試み、(2) レセプター型チロシンキナーゼ(RTK)作用薬の抗腫瘍効果および細胞障害性薬剤との併用効果の検討をおこなっている。リポ化した細胞障害性アデノウイルスDNA-TPCの静脈内投与による同DNAの腫瘍特異的分配にVEGFが関与することが示唆された。また抗erbB2抗体(Herceptin)とシスプラチンの併用効果に抗体によるADCCが重要であると示した。これらの結果は既存抗癌剤との併用療法を考慮した分子標的療法の可能性を示唆する。

目的

我々は、cytopathic adenovirusの蛋白付加DNAをリポソーム化し、マウスに静脈内投与し抗腫瘍効果を示すことを報告した。これはp53を標的とする分子標的療法である。同法によりウイルスDNAが腫瘍特異的に分配することが示されたが、同法の腫瘍特異性の機序を明らかにし、選択的抗腫瘍効果を発揮する方法の発展を目指した。また分子標的療法と既存抗がん剤との併用を考慮した治療を考える上で、同法のみならず、レセプター型チロシンキナーゼ阻害剤等の分子標的薬と既存抗がん剤との併用に関する検討をおこなった。

研究方法

(1) アデノウイルスDNAの腫瘍への分配に対する腫瘍血管の関与を検討する目的で、ヒト小細胞肺癌株SBC-3にVEGFを導入したSBC-3/VEGFを作成、マウス皮下に移植し、腫瘍血管をdorsal sac法で評価した。移植後にliposome AdexLacZDNA-TPCを5 μ gを静注後sac直下の皮膚を採取。PCRによるAdexLacZDNAの検出をおこなった。

(2) HER2/neu発現ヒト乳がん、肺がん、卵巣がん等の細胞株を用いてtrastuzumabとCDDPの併用効果を検討した。エフェクター細胞としてヒト末梢血単核球を用いMTT assayおよびCr release assayを用いて抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)を評価した。

結果

(1) liposome AdexLacZDNA-TPC 静注後sac下組織中のアデノウイルスDNAの有無をPCRにより検出したところ、SBC-3/VEGF移植周辺において発現が多い傾向を示し、腫瘍への分配の規定因子としてVEGFが関与している可能性が示唆された。

(2) trastuzumabのシスプラチン併用時のtrastuzumabのADCC活性を測定した。CDDPとの併用療法の検討において12.5 μ M以下のCDDP存在下ではPBMはCDDPの影響を受けず、一方Trastuzumabの部分的アンタゴニスト作用もCDDPの細胞増殖抑制効果に影響を及ぼさないことが示された。同条件下でCDDPによる直接的細胞障害活性およびtrastuzumabによるADCC活性が増殖抑制効果の要因であることが確認された。

考察

細胞障害性アデノウイルスのリポ化DNA-TPC法および細胞増殖因子レセプターに対する作用薬は細胞増殖抑制による分子標的として期待される。一方同法のみで十分な腫瘍縮小をもたらさない場合には臨床において従来の抗癌剤との併用が重要な意味を持つと考えられる。また細胞障害性アデノウイルスのリポ化DNA-TPC法および抗erbB2抗体などmacromoleculeを用いた分子標的療法においても併用療法の重要性が示唆された。

結論

リポ化アデノウイルスDNA-TPC法による遺伝子分布の腫瘍特異性は、新生腫瘍血管が関与する可能性が示唆された。抗erbB2抗体などレセプター型チロシンキナーゼを標的とする分子標的療法は既存抗がん剤との併用により有効性を発揮する可能性が示唆された。

論文発表

Fukumoto H, Kanzawa F, et al.. Activation-induced apoptosis of peripherallymphocytes treated with 7-hydroxystaurosporine,UCN-01. Invest New Drugs, 17:335-341, 2000

Kanzawa F, et al. In vitro synergistic interactions between the cisplatin analog nedaplatin and the DNA topoisomerase I inhibitor irinotecan and the mechanism of this interaction. Clin Cancer Res (in press)

学会発表

Kanzawa F, et al, Optimal schedule of in vitro combination chemotherapy of nedaplatin and irinotecan and its mechanism of action. 91th Ann. Meet. Am Assoc Cancer Res, 2000

分担研究者： 間野 博行 自治医科大学分子病態治療研究センターゲノム機能研究部助教授

研究要旨：肝細胞癌(HCC)は現在においてなお予後不良の疾患であり、新たな視点からの治療法開発が望まれている。しかし真に有効な臨床プロトコルを開発するためには、適切な疾患モデル動物の利用が不可欠である。ヒト B 型肝炎ウイルス(HBV)に類似した Woodchuck 肝炎ウイルス(WHV)の感染によって Woodchuck ラットは高率に HCC を発症し、ヒト HCC の良い疾患モデル動物となる。我々は HCC 特異的に発現するアルファフェトプロテイン (AFP) 遺伝子のプロモーターによって自殺遺伝子である cytosine deaminase (CD)を発現するユニットを作製し、これを組み込んだアデノウイルスおよびレトロウイルスを用いて外科的に HCC 発症 Woodchuck ラットの総肝動脈より投与する研究を行った。その結果、ウイルス動注療法が有効なことが明らかになり、現在さらなる遺伝子導入高率の改善のために動脈内カテーテルにリザーバーを接続し、ウイルスの持続投与方法などを試みている。

A 研究目的

ヒト肝細胞癌(HCC)は、本邦における成人悪性腫瘍死因の第 4 位を占める予後不良の疾患である。HCC を根治目的の外科切除術が可能ほど早期に発見することは稀であり、現在のところ HCC に対して有効な治療は無い。我々は、HCC がアルファフェトプロテイン(AFP)を腫瘍特異的に産生することを利用して、AFP 遺伝子のエンハンサー・プロモーター領域を組み合わせることにより腫瘍選択性および発現誘導能ともに高い転写調節ユニットを作製することに成功し、これを用いて「自殺遺伝子」の一つである cytosine deaminase (CD)を発現するユニット(AFP-CD)を作製し、AFP-CD 組込レトロウイルスが HCC 細胞株特異的に細胞死を誘導可能であることを確認している。しかし実際の臨床応用のためには、「どの様なウイルス」を「どの様な系路」で投与することが最も有効か、を疾患モデル動物で検証する必要がある。本研究計画では Woodchuck hepatitis virus (WHV)感染によって HCC を高率に発症する Woodchuck ラットを用い、これらの問題点を明らかにすることを目指した。

B 研究方法

- 1) 遺伝子導入高率の検定のために AFP 転写調節領域により LacZ を発現するユニットを作製し、これを組み込んだアデノウイルス(Ad-AFP-LacZ)およびレトロウイルス(Ret-AFP-LacZ)を作製した。
- 2) HCC を発症した Woodchuck ラットにまず経静脈的に Ad-AFP-LacZ を投与し肝臓での LacZ 発現を検討した。
- 3) HCC 発症ラットの胃十二指腸動脈にカテーテルを挿入し、Ad-AFP-LacZ または Ret-AFP-LacZ を single injection にて投与した。また胃十二指腸動脈にカテーテルを留置し、皮下へ埋め込んだリザーバーと接続した。本システムによりウイルスあるいは 5-FC の繰り返し投与が可能になる。

C 研究結果

- 1) HCC 発症ラットへ Ad-AFP-LacZ を経静脈的に投与したところ、肝臓内の HCC に選択的に

LacZ 発現が誘導されることが示された。

- 2) Ad-AFP-LacZ あるいは Ret-AFP-LacZ を動注した場合、いずれの例でも肝臓内の HCC に選択的に LacZ 発現が誘導された。レトロウイルスでの導入高率はアデノウイルスに比べて約半分程度であり、予想より高かった。しかしいずれの場合も HCC 全体の 10%以下にしか導入されず、臨床応用のためには更なる改良が必要と思われた。現在リザーバーを利用したウイルス投与プロトコルの最適化を検討中である。

D 考察

Woodchuck ラットはヒト HCC の実際の臨床プロトコル開発の上で極めて有用であることが示された。動注療法以外の様々な投与方法を含めて今後検討していくことが必要と考えられた。

E 研究発表

- 1 A. Miyazato, et al., "Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by background-matched population (BAMP) screening" *Blood*, in press.
- 2 W. Ellmeier, et al., "Severe B Cell Deficiency in Mice Lacking the Tec Kinase Family Members Tec and Btk" *J. Exp. Med.* **192**: 1611-1624, 2000
- 3 K. Yoshida, et al., "Mediation by the protein-tyrosine kinase Tec of signaling between the B cell antigen receptor and Dok-1" *J. Biol. Chem.* **275**: 24945-24952, 2000
- 4 K. M. Matsuda, et al., "A novel strategy for the tumor angiogenesis-targeted gene therapy: generation of angiostatin from endogenous plasminogen by protease gene transfer" *Cancer Gene Ther.* **7**: 589-596, 2000
- 5 Y. Maeda, et al., "Endogenously generated nitric oxide by nitric-oxide synthase gene transfer inhibits cellular proliferation" *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **292**: 387-393, 2000
- 6 T. B. van Dijk, et al., "Stem cell factor induces phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent Lyn/Tec/Dok-1 complex formation in hematopoietic cells" *Blood* **96**: 3406-3413, 2000
- 7 Y. Ogasawara, et al., "Potential application of dominant negative retinoic acid receptor genes for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells" *Gene Ther. Mol. Biol.* **3**: 293-300, 2000

条件複製型ウイルスを基軸とした複合遺伝子治療法の開発

分担研究者 矢崎 貴仁 慶應義塾大学医学部 脳神経外科学 専任講師

研究要旨 増殖細胞特異的に複製増殖して殺細胞効果を発揮する条件複製型ヘルペスベクター G207 を開発し、複数の癌細胞に対して実験動物における全身投与や正所性投与での抗腫瘍効果を確認した。本年度は、生体においてウイルスの感染力、ウイルス産生力、複製力を減弱して治療効果の弊害となる抗ウイルス免疫系を抑制することにより、ウイルスの広がりや治療効果の増強をなし得るかどうかを検討し、さらに化学療法施行中の患者血清を用いて、抗ウイルス活性を解析した。その結果、実験動物においてはサイクロホスファミド(CPM)の同時投与でウイルス産生能が有意に向上し、抗腫瘍治療効果の改善が認められた。また、CPM, MCNU, VP16 を含む化学療法中の患者血清は、化学療法初期において抗ウイルス活性が抑制されていることが判明した。

A. 研究目的

癌に対する遺伝子治療である異常遺伝子を正常遺伝子で置換するという発想には限界がある。これらを克服するため、細胞傷害性ウイルスそのものを腫瘍内で特異的に複製させ、それに追従して複数の機能遺伝子を効率良く発現させることで効率の高い複合治療システムを得ること、さらに治療ウイルスに対する免疫抑制を同調させ、治療効率を上げられるかどうか検討することを目的とする。

B. 研究方法

本年度は、複製型ヘルペスベクターを用いたウイルス療法において、これまで行ってきた浸潤抑制蛋白を同時に発現させる方法を動物実験にて検証するとともにその安全性の確認を行い、さらにウイルスを投与後に腫瘍内で抗ウイルス免疫によって攻撃され不活化することを抑制することによって、抗腫瘍効果の増大を図る研究を行った。さらに、ウイルスの腫瘍特異性を高めるため、前立腺癌特異抗原 PSA、悪性グリオーマ特異抗原として Musashi-1 に着目しそのプロモーター活性を解析した。

C. 研究結果

(1) TIMP2 発現 HSV ベクターを高濃度に濃縮し、生存解析上十分な治療効果を示す濃度にて、正常マウスに静脈内投与したのち、各臓器別にウイルスによる傷害が起こっていないかどうかを、組織および免疫化学的に解析したところ、明かな傷害は認められなかった。(2) 患者血清により治療用ウイルスが不活化されるかどうかを解析したところ、抗HSV抗体を有する患者で有意に不活化され、その期間は殆ど24時間以内であった。(3) 化学療法(CHOP)、(MCNU + VCN)中の患者血清では、抗ウイルス活性は有意に抑制されていた。(4) 抗ウイルス免疫を抑制するため、シクロホスファミドをウイルスと同時に腹腔内投与したところ、ウイルスの不活化が有意に抑制され、動物実験で抗腫瘍効果

の有意な増加を認めた。(5) 以上よりウイルス療法を悪性腫瘍に対する化学療法と同調させることで、より高い治療効果が得られることが予想された。

(6) PSA および Musashi-1 プロモータ下流に LacZ を挿入し、各種細胞株に遺伝子導入したところ、他の細胞株と比べて PSA では前立腺癌、Musashi-1 ではグリオーマで有意なプロモータ活性を示した。

D. 考察

毒性減弱型 G207 と機能遺伝子発現ベクターは、膀胱内投与や静脈投与が副作用無く可能であることが示唆された。化学療法中で抗ウイルス免疫が抑制された患者ではウイルスの増殖と抗腫瘍効果が増大し、化学療法とウイルス療法の同調療法が有望と考えられた。また腫瘍特異プロモータによりウイルス複製を制御させることによって、より特異性の高い治療用ベクターが開発出来ることが示唆された。

E. 結論

ウイルス療法と化学療法の併用によって、ウイルスを排除する宿主の免疫機構を押さえて、ウイルス療法の効率を上げることが示された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

Oyama M., Yazaki T.他 Mol Urol. 4(2), 83-87, 2000
Hoshi M., Yazaki T.他 Cancer Gene Ther. 7(5), 799-805, 2000

Oyama M., Yazaki T.他 Hum Gene Ther. 11 (12), 1683-1693

Oyama M. Yazaki T.他 Japan J. Cancer Res. 91, 83, 2000

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

細胞標的化を可能にするモノクローナル抗体の作製と標的ペプチドへの展開 分担研究者 志村まり 国立国際医療センター研究所難治性疾患研究部

既知のがん細胞膜抗原 RET に着目し、RET 発現細胞に対する標的化を試みた。これまでに、RET に特異的に結合するペプチド (RET Binding Peptide; RBP-1) を見出した。ビオチン化 RBP-1 は、RET 発現細胞に特異的に取り込まれた。RBP-1 はこれまでに作成した RET モノクローナル抗体と共に、RET 発現細胞に対して増殖抑制を示した。今後、RBP-1 と遺伝子、細胞死を誘導するペプチド、アンチセンス、抗癌剤との複合体を形成し、がん治療の標的化を試みる。

1. 研究目的

がん細胞特異的膜抗原を認識する抗体および結合ペプチドを作製し、細胞死を誘導する分子との複合体により、がん細胞に選択的に障害を与える標的化を試みる。まず、既知の細胞膜抗原として RET に着目し、RET 発現細胞に対する標的化を試みる。

B. 研究方法

1. 既知がん膜抗原 RET リコンビナント蛋白の作製後、ランダムペプチドライブラリーにより RET リコンビナント蛋白に特異的に結合するペプチド配列 (RBP) を見出す。
2. ビオチン化ペプチド合成
3. RET 発現細胞に対するビオチン化 RBP の結合能を調べる。
4. ストレプトアビジン、ビオチン化レポーター遺伝子及びビオチン化 RBP からなる複合体を細胞に添加し、レポーター遺伝子発現を判定する。

C. 研究結果

1. RET に特異的に結合する 8 個のアミノ酸からなるペプチド (RET Binding Peptide; RBP-1) を見出した。その内の 4 個のアミノ酸からなるペプチドでも選択的結合性を認めた。
2. RBP-1 は、RET 発現細胞に対して増殖抑制を示した。
3. ストレプトアビジン、ビオチン化レポーター遺伝子及びビオチン化 RBP-1 複合体により、RET 発現細胞でレポーター遺伝子発現が高く認められた。

D. 考察

RBP-1 は RET 発現細胞の標的化を可能性を示唆した。しかしながら、今回用いた、ストレプトアビジン-ビオチン化レポーター遺伝子/RBP-1 複合体については、いくつかの問題点あると考える。ストレプトアビジン-ビオチン複合体は、photobiotin により遺伝子がランダムにビオチン化されるため、巨大な分子になる可能性がある。一遺伝子について一個のビオチンを発現させる試みや、細胞死を誘導するペプチドやアンチセンスを用い、低分子化を試みるのが有用と考える。

さらに、外来遺伝子導入効率が著しく低いことが問題点としてあげられる。RBP-1 のアミノ酸配列を組み込んだウイルスベクターにより、標的化と導入効率の向上が期待される。

E. 結論

RET 発現がん細胞に対して、RBP-1 による標的化は可能であることが示唆された。

F. 健康危険情報；特記事項なし

G. 研究発表

1 論文発表

1. Yano L, Shimura M, Taniguchi M, Hayashi Y, Suzuki T, Hatake K, Takaku F and Ishizaka Y: Improved gene transfer to neuroblastoma cells by a monoclonal antibody targeting RET, a receptor tyrosine kinase. Human Gene Therapy, 11, 995-1004, 2000.
2. 石坂幸人, 志村まり, 非ウイルス性ベクターシステムの構築, 日本ビジネスレポートバイオテクノロジー編, 技術予測レポート 4; 157-165, 2000.

2. 学会発表

1. HIV アクセサリー遺伝子 VPR の細胞間トランス効果. 第 23 回日本分子生物学会, 神戸, 12 月, 2000.
2. HIV-1/Vpr による M 期特異的阻害機構と染色体不安定性の検討. 第 23 回日本分子生物学会, 神戸, 12 月, 2000.
3. Preparation of monoclonal antibodies useful as vectors for cell specific gene transfer. 第 5 回日本遺伝子治療学会, 6 月, 1999.
4. Specific gene transfer to neuroblastoma cells by a monoclonal antibody to RET. 第 5 回日本遺伝子治療学会, 6 月, 1999.

H. 知的財産権の出願

RET 結合ペプチドについて国際特許申請予定

分担研究報告書

ヒト *SMARCB1* 遺伝子の機能に関する研究

分担研究者 北村義浩 国立予防衛生研究所免疫部免疫細胞室 室長

研究要旨

SMARCB1 (SWI/SNF-Related, Matrix-associated, Actin-dependent Regulator of Chromatin, Subfamily B, member 1) 遺伝子は、HIV-1の組み込み酵素と結合する細胞蛋白質として同定・クローン化された。小児における極めて悪性度の高い腫瘍群 (rhabdoid tumor群) においてこの *SMARCB1* 遺伝子の homozygous な欠失が高率に見られたので癌抑制遺伝子の範疇に属する遺伝子とされる。*SMARCB1* が欠失した細胞株、G401, KYM, TM87-16において、*SMARCB1* を発現するアデノウイルスベクターを利用して、*SMARCB1* 蛋白質を大量に発現させたところ、細胞増殖がG1期で停止し (G1アレスト)、その後アポトーシスに移行した。*SMARCB1* 遺伝子に欠失のないHeLa細胞では、G1アレストは起こらず、増殖は抑制されなかった。*SMARCB1* 遺伝子は実験的にも癌抑制遺伝子といえよう。

A. 研究目的

SMARCB1 (SWI/SNF-Related, Matrix-associated, Actin-dependent Regulator of Chromatin, Subfamily B, member 1) 遺伝子は、HIV-1の組み込み酵素と結合する細胞蛋白質として同定・クローン化された。小児における極めて悪性度の高い腫瘍群 (rhabdoid tumor群) においてこの *SMARCB1* 遺伝子の homozygous な欠失が高率に見られたので癌抑制遺伝子の範疇に属する遺伝子とされる。しかし、実際に *SMARCB1* 遺伝子が癌抑制遺伝子であるかどうか実験的には示されていない。そこで、私は、*SMARCB1* 遺伝子を欠失した細胞株に *SMARCB1* 遺伝子を発現させて増殖が抑制されるかどうか調べることにした。

象は大腸菌の *lacZ* を発現するアデノウイルスベクターを感染した場合には起こらなかった。また、野生型 *SMARCB1* 遺伝子を有する細胞株、HeLa細胞で、*SMARCB1* 遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを利用して、*SMARCB1* 蛋白質を大量に発現させた場合にも、起こらなかった。

D. 考察

SMARCB1 遺伝子が癌抑制遺伝子であることを実験的に証明した。今後は、どのようなメカニズムでG1アレストを起こすのかを明らかにすることで、発ガンのメカニズムを明らかにする。その成果を利用してガンの治療方法の開発に発展させる。

B. 研究方法

ヒト小児癌由来の3つの細胞株、G401, KYM, TM87-16は *SMARCB1* が homozygous に欠失した細胞株である。これらに、*SMARCB1* 遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを利用して、*SMARCB1* 蛋白質を大量に発現させた。発現は、ウェスタンブロットで確認した。細胞増殖をモニタするために細胞の核酸量をフローサイトメーターで調べた。

C. 研究結果

3種類のいずれの細胞株においても、*SMARCB1* 蛋白質は十分に発現した。発現後40～48時間後に解析をすると、細胞増殖サイクルのG1期に相当する細胞群が有意に増加していた。72時間以降では、sub G1 population に相当する、アポトーシスを起こした細胞が出現し時間とともにこれが増加した。この現

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

がんの増殖に関わる分子療法

分担研究者 望月 直樹 国立国際医療センター研究所
臨床病理研究部組織形態研究室長

研究要旨：低分子量蛋白質、特に Ras、Rap を GEF（GDP/GTP 交換因子）と GAP（水解促進因子）を細胞内に導入することで細胞を制御することを目的とする。GEF、GAP の基質特異性を予め検討しておくことが重要であり今年度は癌細胞転移で接着を制御する R-Ras ファミリーに着目した。M-Ras が GEF、GAP に対する反応性から R-Ras ではなく H-Ras ファミリーに属していることを明らかにした。

A. 研究目的

癌細胞の増殖・接着を低分子量 GTP 結合蛋白質を制御することでコントロール可能か否かを調べることを目的とする。GEF、GAP を細胞内に導入することで制御を試みるため、始めに GEF、GAP の基質特異性を調べる。

B. 研究方法

癌細胞の転移・接着に関わる R-Ras ファミリー分子の GEF、GAP に対する基質特異性を調べた。

- (1)R-Ras ファミリー分子の R-Ras、TC-21、M-Ras について検討した。
- (2)GEF として Sos、RasGRF、C3G、CalDAG-GEF-I, II, III、Epac と PDZ-GEF を、GAP として Gap1m、R-RasGAP、rap1GAP をそれぞれ用いた。

C. 研究結果

- (1)R-Ras、TC-21 は GEF では C3G、RasGRF、CalDAG-GEF-I, II, III により活性化され、R-RasGAP により水解が促進される。
- (2)M-Ras は Sos、RasGRF、CalDAG-GEF-II, III で活性化され、Gap1m により水解が促進される。

以上から、これまで M-Ras はアミノ酸の相同性から R-Ras ファミリー群に属していると考えられてきたが本研究により M-Ras は H-Ras ファミリーと同様な GEF、GAP に対する基質特異性を有していることがわかった。

D. 考察

細胞内に GEF、GAP を導入して細胞の増殖と接着を試みるには今後ゲノム情報により明らかとなる新規低分子量 GTP 結合蛋白質の GEF、GAP に対する基質特異性を明らかにしていくことが重要である。

E. 結論

R-Ras に分類されていた M-Ras は実は GEF、GAP に対する基質特異性から H-Ras ファミリーに属する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
Ohba Y, Mochizuki N, Yamashita S, Chan AM, Schrader JW, Hattori S, Nagashima K, Matsuda M. Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. *J Biol Chem* 275: 20020-20026, 2000.
2. 学会発表
大場雄介他 第59回日本癌学会総会
ミニシンポジウム

H. 知的財産権の出題・登録

特になし

1. Okuma E, Saeki K, Shimura M, Ishizaka Y, Yasugi E, Yuo A: Induction of apoptosis in human hematopoietic U937 cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: possible existence of caspase 3-like pathway. *Leukemia* 14:612-619,2000.
2. Shimura M, Osawa Y, Yuo A, Hatake K, Takaku F, Ishizaka Y: Oxidative stress as a necessary factor in room temperature-induced apoptosis of HL-60 cells. *J Leukoc Biol* 68:87-96,2000.
3. Yasugi E, Kumagai T, Nishikawa Y, Okuma E, Saeki K, Oshima M, Susin SA, Kroemer G, Yuo A: Involvement of apoptosis-inducing factor during dolichyl monophosphate-induced apoptosis in U937 cells. *FEBS Lett* 480:197-200,2000.
4. Saeki K, Yuo A, Abe I, Seki T, Noguchi H, Isemura M: Apoptosis-inducing activity of lipid derivatives of gallic acid. *Biol Pharm Bull* 23:1391-1394,2000.
5. Saeki K, Yuo A, Okuma E, Yazaki Y, Susin SA, Kroemer G, Takaku F: Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL-60 cells. *Cell Death Diff* 7:1263-1269,2000.
6. Hagiwara S, Yagisawa M, Iki S, Mimura T, Urabe A, Miwa A, Togawa A, Higashihara M, Takaku F, Yuo A: Tyrosine phosphorylation of proteins in primary human myeloid leukemic cells stimulated by macrophage colony-stimulating factor: analysis by disease types and comparison with normal human hematopoietic cells. *Int J Hematol* 73:100-107,2001.
7. Saeki K, Yuo A, Koizumi M, Fujiwara K, Kaneko M, Takaku F, Yazaki Y: CREB antisense oligonucleotides induce non-apoptotic cell death in proliferating leukemia cells, but not normal hematopoietic cells, by a bizarre non-antisense mechanism. *Leukemia* 15:238-245,2001.
8. Shinoura N, Muramatsu Y, Yoshida Y, Asai A, Kirino T, Hamada H: Adenovirus-mediated transfer of caspase-3 with Fas ligand induces drastic apoptosis in U373MG glioma cells. *Exp Cell Res* 256:423-433,2000.
9. Koyama F, Sawada H, Hirao T, Fujii H, Hamada H, Nakano H: Combined suicide gene therapy for human colon cancer cells using adenovirus-mediated transfer of Escherichia coli cytosine deaminase gene Escherichia coli uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Cancer Gene Ther* 7:1015-1022,2000.
10. Shinoura N, Yoshida Y, Asai A, Kirino T, Hamada H: Adenovirus-mediated transfer of caspase-8 augments cell death in gliomas: Implication for gene therapy. *Hum Gene Ther* 11:1123-1137,2000.
11. Shinoura S, Yamamoto N, Yoshida Y, Asai A, Kirino T, Hamada H: Adenovirus-mediated transfer of caspase-8 in combination with super-repressor of NF- κ B drastically induced apoptosis in gliomas. *Biochem Biophys Res Commun* 271:544-552,2000.
12. Shinoura N, Sakurai S, Asai A, Kirino T, Hamada H: Transduction of Apaf-1 or caspase-9 induces apoptosis in A172 cells, which are resistant to p53-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 272:667-673,2000.
13. Motoi F, Sunamura M, Ding L, Duda DG, Yoshida Y, Zhang W-P, Matsuno S, Hamada H: Effective gene therapy for pancreatic cancer by cytokines mediated by restricted replication-competent adenovirus. *Human Gene Ther* 11:223-235,2000

14. Adachi Y, Tamiya T, Ichikawa T, Terada K, Ono Y, Matsumoto K, Furuta T, Hamada H, Ohmoto T: Experimental gene therapy for brain tumors using adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene and uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Hum Gene Ther* 11:77-89,2000.
15. Shinoura N, Sato R, Yoshida Y, Asai A, Kirino T, Hamada H: Adenovirus-mediated transfer of Bcl-xl protects neuronal cells from Bax-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 254:221-231,2000.
16. Ichikawa T, Tamiya T, Adachi Y, Ono Y, Matsumoto K, Furuta T, Yoshida Y, Hamada H, Ohmoto T: In vivo efficacy and toxicity of 5-fluorocytosine / cytosine deaminase gene therapy for malignant gliomas mediated by adenovirus. *Cancer Gene Ther* 7:74-82,2000.
17. Narita M, Takanaga K, Yoshida Y, Kadomatsu K, Muramatsu T, Matsubara S, Hamada H, Goto S, Saisho H, Sakiyama S, Tagawa M: Polyadenylation signal facilitates the expression of foreign gene that is driven by an internal promoter located in the reverse orientation to long terminal repeat of retrovirus. *Anticancer Res* 20(1A):279-282,2000.
18. Qiu JH, Asai A, Chi S, Saito N, Hamada H, Kirino T: Protease inhibitors induce cytochrome c-caspase-3-like protease-mediated apoptosis in cultured cortical neurons. *J Neuroscience* 20:259-265,2000.
19. Kobayashi T, Okamoto K, Kobata T, Hasunuma T, Kato T, Hamada H, Nishioka K: Novel gene therapy for rheumatoid arthritis by FADD gene transfer: Induction of apoptosis of rheumatoid synoviocytes but not chondrocytes. *Gene Ther* 7:527-533,2000.
20. Kasaoka Y, Nakamoto T, Wang J, Usui T, Hamada H: Gene therapy for murine renal cell carcinoma using Genetically engineered tumor cells to secrete interleukin-12. *Hiroshima J Med Sci* 49:29-35,2000.
21. Kobayashi T, Okamoto K, Kobata T, Hasunuma T, Kato T, Hamada H, Nishioka K: Differential regulation of Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synoviocytes by TNF α and bFGF is associated with the expression of apoptosis-related molecules. *Arthritis & Rheumatism* 43:1106-1114,2000.
22. Wang J, Nakamoto T, Kasaoka Y, Usui T, Hamada H: Antitumor effect of murine renal cell carcinoma cells genetically modified to express B7-1 combined with cytokines secreting fibroblasts. *Hiroshima J Med Sci* 49:73-82,2000.
23. Ju DW, Tao Q, Cheng DS, Zhang W, Zhang M, Hamada H, Cao X: Adenovirus-mediated lymphotactin gene transfer improves therapeutic efficacy of cytosine deaminase suicide gene therapy in established murine colon carcinoma. *Gene Ther* 7:329-338,2000.
24. Kimura, Miyata T, Hamada H, et al. In vivo retention of endothelial cells adenovirally transduced with tissue-type plasminogen activator and seeded onto expanded polytetrafluoroethylene. *J Vascular Surgery* 32:353-363,2000.
25. Kosuga M, Takahashi S, Sasaki K, Li XK, Fujino M, Hamada H, Suzuki S, Yamada M, Matsuo Y, Okuyama T: Adenovirus-mediated gene therapy for mucopolysaccharidosis VII: involvement of cross-correction in wide-spread distribution of the gene products and long-term effects of CTLA-4Ig. *Molecular Therapy* 1:406-413,2000.
26. Kawamura K, Namba H, Bahar R, Miyauchi M, Maeda T, Hamada H, Sakiyama S, Tagawa

- M: Transduction of the human deoxycytidine kinase gene in rodent tumor cells induces in vivo growth retardation in syngeneic hosts. *Cancer Lett* 156:151-157,2000.
27. Shiota G, Kunisada T, Oyama K, Udagawa A, Nomi T, Tanaka K, Tsutsumi A, Isono M, Nakamura T, Hamada H, Sakatani T, Sell S, Sato K, Ito H, Kawasaki H: In vivo transfer of hepatocyte growth factor gene accelerates proliferation of hepatic oval cells in a 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model in rats. *FEBS Lett* 470:325-330,2000.
28. Cao X, Huang X, Ju DW, Zhang W, Hamada H, Wang J: Enhanced antitumoral effect of adenovirus-mediated cytosine deaminase gene therapy by induction of antigen-presenting cells through stem cell factor/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer. *Cancer Gene Ther* 7:177-186,2000.
29. Lei H, Ju DW, Yu Y, Tao Q, Chen G, Gu S, Hamada H, Cao X: Induction of potent antitumor response by vaccination with tumor lysate-pulsed macrophages engineered to secrete macrophage colony-stimulating factor and interferon-gamma. *Gene Ther* 7:707-713,2000.
30. Tani K, Nakazaki Y, Hase H, Takahashi K, Azuma M, Ohata J, Kitamura R, Komine F, Oiwa M, Masunaga A, Maekawa T, Satoh N, Adachi D, Soda Y, Machida U, Endo M, Yamazaki T, Watari K, Tojo A, Yamashita N, Tomikawa S, Eriguchi M, Hamada H, Wakumoto Y, Hanazawa K, Okumura K: Progress reports on immune gene therapy for stage IV renal cell cancer using lethally irradiated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced autologous renal cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 46 Suppl:S73-76,2000.
31. Matsuoka N, Miyatake S, Yukawa H, Takahashi JC, Saiki M, Mori H, Ishii K, Akimoto M, Hamada H, Hashimoto N: Adenovirus-mediated gene transfer of basic fibroblast growth factor promotes the survival of primary-cultured rat neuronal cells. *Neuroreport* 11:2001-2006,2000.
32. Shinoura N, Yamamoto N, Asai A, Kirino T, Hamada H: Adenovirus-mediated transfer of Fas ligand gene augments radiation-induced apoptosis in U-373MG glioma cells. *Jpn J Cancer Res* 91:1044-1050,2000.
33. Shinoura N, Sakurai S, Asai A, Kirino T, Hamada H: Transduction of a fiber-mutant adenovirus for the HSVtk gene highly augments the cytopathic effect towards gliomas. *Jpn J Cancer Res* 91:1028-1034,2000.
34. Kawamura K, Bahar R, Namba H, Seimiya M, Takenaga K, Hamada H, Sakiyama S, Tagawa M: Bystander effect in uracil phosphoribosyltransferase/5-fluorouracil-mediated suicide gene therapy is correlated with the level of intercellular communication. *Int J Oncology* 181:117-120,2001.
35. Suzuki H, Itoh F, Toyota M, Kikuchi T, Kakiuchi H, Imai K: Inactivation of 14-3-3 sigma gene is associated with 5'CpG island hypermethylation in human cancers. *Cancer Res* 60:4353-4357,2000.
36. Iwata N, Yamamoto H, Sasaki S, Itoh F, Suzuki H, Kikuchi T, Kaneto H, Iku S, Ozeki I, Endo T, Imai K: Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3 sigma gene in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 19:5298-5302,2000.
37. Yamashita K, Itoh F, Arimura Y, Kurokawa S, Endo T, Hirata K, Imamura A, Kondo M, Sato T, Imai K: Microsatellite instability in patients with multiple primary cancers of the

gastrointestinal tract. *Gut* 46:790-794,2000.

38. Takekawa T, Adachi M, Nakahata A, Itoh F, Taya Y, Imai K: p53-inducible Wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J*, in press, 2001.
39. Shirakawa K, Shibuya M, Heike Y, Shimizu A, Tsuda H, Goldman CK, Imai K, Wakasugi H: Gene targeting Flt-1 and Tie2 inhibits tumor growth and metastases on WIBC-9, a human inflammatory breast cancer xenograft. *Cancer Res* in press 2001.
40. Yamamoto H, Itoh F, Iku S, Adachi Y, Sasaki S, Mukaiya M, Hirata K, Imai K: Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic adenocarcinomas: clinicopathological and prognostic significance of matrilysin expression. *J Clin Oncol* 19:1118-1127,2001.
41. Kaneto H, Sasaki S, Yamamoto H, Itoh F, Toyota M, Suzuki H, Ozeki I, Iwata N, Ohmura T, Endo T, Imai K: Detection of hypermethylation of the p16INK4A gene promoter in chronic hepatitis and cirrhosis associated with hepatitis B or C virus. *Gut* 48:372-377,2001.
42. Takahashi T, Hirano N, Takahashi T, Chiba S, Yazaki Y, Hirai H: Immuno-gene therapy against mouse leukemia using B7 molecules. *Cancer Gene Ther* 7:144-150,2000.
43. Honda H, Ushijima T, Wakazono K, Oda H, Tanaka Y, Aizawa S, Ishikawa T, Yazaki Y, Hirai H: Acquired loss of p53 induces blastic transformation in p210bcr/abl-expressing hematopoietic cells: a transgenic study for blast crisis of human CML. *Blood* 95:1144-1150,2000.
44. Ueno H, Kondo E, Yamamoto-Honda R, Tobe K, Nakamoto T, Sasaki K, Mitani K, Furusaka A, Tanaka T, Tsujimoto Y, Kadowaki T, Hirai H: Association of IRS proteins with Bcl-2 and their effects on its phosphorylation and anti-apoptotic function. *Mol Biol Cell* 11:735-746,2000.
45. Nakamoto T, Yamagata T, Sakai R, Ogawa S, Honda H, Ueno H, Hirano N, Yazaki Y, Hirai H: CIZ: a zinc finger protein that interacts with p130cas and activates the expression of matrix metalloproteinases. *Mol Cell Biol* 20:1649-1658,2000.
46. Tanaka Y, Takahashi T, Nieda M, Masuda S, Kashiwase K, Ogawa S, Chiba S, Juji T, Hirai H: Generation of HLA-DRB1*1501-restricted p190 minor bcr-abl (e1a2)-specific CD4+ T-lymphocytes. *Br J Haematol* 109:435-437,2000.
47. Kurokawa M, Mitani K, Yamagata T, Takahashi T, Izutsu K, Ogawa S, Moriguchi T, Nishida E, Yazaki Y, Hirai H: The Evi-1 oncoprotein inhibits c-Jun N-terminal kinase and prevents stress-induced cell death. *EMBO J* 19:2958-2968,2000.
48. Shimizu K, Chiba S, Kumano K, Hosoya N, Takahashi T, Hamada Y, Yazaki Y, Hirai H: Binding of Delta1, Jagged1, and Jagged2 to Notch2 rapidly induces cleavage, nuclear translocation and hyperphosphorylation of Notch2. *Mol Cell Biol* 20:6913-6922,2000.
49. Yamagata T, Mitani K, Oda H, Suzuki T, Honda H, Asai T, Maki K, Nakamoto T, Hirai H: Acetylation of GATA-3 affects T-cell survival and homing to secondary lymphoid organs. *EMBO J*. 19:4676-4687,2000.
50. Miyazaki T, Takayanagi H, Isshiki M, Takahashi T, Okada M, Fukui Y, Oda H, Nakamura

- K, Hirai H, Kurokawa T, Tanaka S: In vitro and in vivo suppression of osteoclast function by adenovirus vector-induced csk gene. *J. Bone Mineral Res* 15:41-51,2000.
51. Shimizu K, Chiba S, Saito T, Kumano K, Hirai H: Physical interaction of Delta1, Jagged1 and Jagged2 with Notch1 and Notch3 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 276:385-389,2000.
52. Tanaka Y, Kami M, Ogawa S, Machida U, Takahashi T, Ichikawa M, Yuji K, Izutsu K, Asai T, Kanda Y, Honda H, Mitani K, Chiba S, Hirai H, Yazaki Y, Sasaki M, Sasaki K, Mineishi S: Hyperacute graft-versus-host disease and NKT cells. *Am J Hematol* 63:60-61,2000.
53. Seo S, Kami M, Honda H, Kashima K, Matsumura T, Moriya A, Machida U, Kanda Y, Chiba S, Hirai H: Extramedullary relapse in the so-called "sanctuary" sites for chemotherapy after donor lymphocyte infusion. *Bone Marrow Transplant* 25:226-227,2000.
54. Machida U, Kami M, Fukui T, Kazuyama Y, Kinoshita M, Tanaka Y, Kanda Y, Ogawa S, Honda H, Chiba S, Mitani K, Muto Y, Osumi K, Kimura S, Hirai H: Real-time automated polymerase chain reaction for early diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *J Clin Microbiol* 38:2536-2542,2000.
55. Takahashi T, Nieda M, Koezuka Y, Nicol A, Porcelli SA, Ishikawa Y, Tadokoro K, Hirai H, Juji T J: Analysis of human Va24+ CD4+ NKT cells activated by a-glycosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol* 164:4458-4464,2000.
56. Kanda Y, Hamaki T, Yamamoto R, Chizuka A, Suguro M, Matsuyama T, Takezako N, Miwa A, Kami M, Hirai H, Togawa A: Clinical significance of CD34 expression on response to therapy in acute myeloid leukemia: an overview of 2483 patients from 22 studies. *Cancer* 88:2529-2533,2000.
57. Takimoto E, Mizuno T, Terasaki F, Shimoyama M, Honda H, Shiojima I, Hiroi Y, Oka T, Hayasho D, Hirai H, Kudoh S, Toko H, Kawamura K, Nagai R, Yazaki Y, Komuro I: Up-regulation of natriuretic peptides in the ventricle of Csx/Nkx2-5 transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 270:1074-1079,2000.
58. Kanda Y, Yamamoto R, Chizuka A, Hamaki T, Suguro M, Arai C, Matsuyama T, Takezako N, Miwa A, Kern W, Kami M, Akiyama H, Hirai H, Togawa A: Prophylactic action of oral fluconazole against fungal infection in neutropenic patients: a meta-analysis of 16 randomized controlled studies. *Cancer* 89:1611-1625,2000.
59. Imai Y, Kurokawa M, Izutsu K, Hangaishi A, Takeuchi K, Maki K, Ogawa S, Chiba S, Mitani K, Hirai H: Mutations of the AML1 gene in patients with myeloblastic syndrome and their functional implications in leukemogenesis. *Blood* 96:3154-3160,2000.
60. Hasegawa K, Kubota K, Hirai H, Imai Y, Midorikawa Y, Makuuchi M. Hepatocellular carcinoma followed by Waldenstrom's macroglobulinemia: a case report. *Hepato-Gastroenterology* 47:842-845,2000.
61. Kami M, Matsumura T, Tanaka Y, Mikami Y, Miyakoshi S, Ueyama J, Morinaga S, Mori S, Machida U, Kanda Y, Chiba S, Sakamaki H, Hirai H, Muto Y: Serum levels of soluble interleukin-2 receptor after bone marrow transplantation: a true marker of acute graft-versus-host disease. *Leukemia and Lymphoma*. 38:533-540,2000.