

ターは溶解性、安定性、生体適合性のいづれにおいても従来から知られている合成ベクターの特性を凌駕するものであり、特に、本年度得られた成果である in vivo における安定性と遺伝子導入活性の確認は、本システムの将来の臨床応用にとって特筆すべき意義を有している。本研究の成果は国際的にも注目されており、6. 研究発表の項に示すように国外における国際研究集会での講演招請という形で表れている。

### 3) 今後の展望について

次年度以降は、ラクトース以外のリガンドについても検討を行い、本システムの普遍性を検証する。さらには、細胞内分布や核内移行等の intracellular trafficking についても検討を行う。また、PEG-PLys 系以外のミセル型ベクターについても血清存在下における評価、さらには、動物実験による in vivo 評価を行い、臨床へ向けた最適組成を決定して行きたいと考えている。

### E. 結論

以上のように、本研究を通じて、高分子ミセル型遺伝子ベクターの生体条件における安定性ならびに遺伝子導入活性を確認する事が出来た。更に、ミセル表層へのリガンド導入法やポリカチオン構造の制御に基づいて広範な性質を有するミセル型ベクターの構築が可能である事が明らかとなり、臨床応用へ向けた素地が築かれたと言える。

### F. 健康危険情報

本研究では健康に危険を及ぼす可能性は皆無である。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) M. Harada-Shiba, K. Ymauchi, A. Harada, K. Shimokado, K. Kataoka, Polyion complex micelles as a vector for gene therapy -Pharmacokinetics and in vivo gene transfer-, *Gene Therapy*, in press.
- 2) Y. Kakizawa, K. Kataoka, Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54(2), 203-222 (2002)
- 3) Y. Nagasaki, K. Yasugi, Y. Yamamoto, A. Harada, K. Kataoka, Sugar-Installed

Block Copolymer Micelles: Their Preparation and Specific Interaction with Lectin Molecules, *Biomacromolecules* 2(4), 1067-1070 (2001)

- 4) Y. Yamamoto, Y. Nagasaki, Y. Kato, Y. Sugiyama, K. Kataoka, Long-circulating Poly(ethylene glycol) - Poly(D,L-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge, *J. Controlled Release* 77(1-2), 27-38 (2001)
- 5) N. Nishiyama, K. Kataoka, Preparation and characterization of size-controlled polymeric micelle containing cis-dichlorodiammineplatinum (II) in the core, *J. Controlled Release* 74(1-3), 83-94 (2001)
- 6) N. Nishiyama, Y. Kato, Y. Sugiyama, K. Kataoka, Cisplatin-loaded polymer-metal complex micelle with time-modulated decaying property as a novel drug delivery system, *Pharmaceutical Research* 18(7), 1035-1041 (2001)
- 7) Y. Kakizawa, A. Harada, K. Kataoka, Glutathione-sensitive stabilization of block copolymer micelles composed of antisense DNA and thiolated poly(ethylene glycol)-block-poly(L-lysine): A potential carrier for systemic delivery of antisense DNA, *Biomacromolecules* 2(2), 491-497 (2001)
- 8) H. Otsuka, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Self-assembly of block copolymers, *Materials Today* 4(3), 30-36 (2001)
- 9) A. Harada, K. Kataoka, Pronounced activity of enzymes through the incorporation into the core of polyion complex micelles made from charged block copolymers, *J. Controlled Release* 72(1-3), 85-91 (2001)
- 10) A. Harada, H. Togawa, K. Kataoka, Physicochemical properties and nuclease resistance of antisense-oligodeoxynucleotides entrapped in the core of polyion complex micelles composed of poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymers, *Eur. J. Pharm. Sci.* 13(1), 35-42 (2001)
- 11) K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki,

- Block copolymer micelles for drug delivery: Design, characterization and biological significance, *Adv. Drug Delivery Review* 47(1), 113-131 (2001)
- 12) H. Otsuka, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Self-assembly of poly(ethylene glycol) (PEG) based block copolymers for biomedical application, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 6(1), 3-10 (2001)
2. 学会発表
- 1) Y. Nagasaki, K. Yasugi, Y. Yamamoto, A. Harada, K. Kataoka, Sugar-installed polymeric micelle for a vehicle of an active targeting drug delivery system, 221st ACS National Meeting "Macromolecular Self-Assembly at Surfaces and Interfaces", San Diego Marriott, San Diego, Calif., 2001.4.4
  - 2) 片岡一則, 高分子の自己組織化を利用した人工ウイルスベクターの開発, 遺伝子・デリバリー研究会第一回シンポジウム, 慶應義塾大学三田キャンパス北ホール, 2001.5.11 (招待講演)
  - 3) 分林大輔, 原田敦史, 長崎幸夫, 片岡一則, 表層にラクトースを導入した plasmid DNA 内包ミセルの調整とその遺伝子発現評価, 第 50 回高分子学会年次大会, 大阪国際会議場, 2001.5.23-5.25
  - 4) 宮田完二郎, 柿澤資訓, 原田敦史, 片岡一則, 酸化還元環境に応答する架橋を導入したプラスミド DNA 内包ポリイオンコンプレックスの構築, 第 50 回高分子学会年次大会, 大阪国際会議場, 2001.5.23-5.25
  - 5) 柿澤資訓, 原田敦史, 片岡一則, 還元環境下で解裂する結合を有するポリイオンコンプレックスミセルの構築とそのアンチセンス DNA 担体としての応用, 第 50 回高分子学会年次大会, 大阪国際会議場, 2001.5.23-5.25
  - 6) N. Nishiyama, S. Okazaki, Y. Kato, Y. Sugiyama, K. Kataoka, Development of cisplatin-loaded polymeric micelles with a prolonged circulation in the bloodstream and an enhanced accumulation in the solid tumor, 28th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, Hyatt Reagencey San Diego, USA, 2001.6.25
  - 7) K. Itaka, A. Harada, H. Kawaguchi, K. Nakamura, K. Kataoka, A novel method to observe plasmid DNA compaction inside gene vectors by fluorescence resonance energy transfer, 28th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, Hyatt Reagencey San Diego, USA, 2001.6.25
  - 8) K. Itaka, H. Kawaguchi, K. Nakamura, K. Kataoka, Clinically available endosomolytic agent for gene edlivery, 28th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, Hyatt Reagencey San Diego, USA, 2001.6.27
  - 9) 片岡一則, コア-シェル型高分子ナノ・アッセンプリーの構築と標的治療デバイスへの展開, 第 3 回分子ダイナミック分光ワークショップ, ホテルコンコルド浜松, 2001.7.5-6 (招待講演)
  - 10) K. Okamoto, H. Ochiai, K. Hara, K. Nishikawa, T. Okano, M. Yokoyama, Y. Sakurai, K. Kataoka, Enhanced accumulation and antitumor activity of NK911, a novel polymer micelle-entrapped doxorubicin, International Symposium on Polymer Therapeutics: Recent Progress in Clinic and Future Prospects, Nara Centennial Hall, Japan, 2001.7.14
  - 11) Y.Kakizawa, A. Harada, K. Kataoka, Glutathione-sensitive stabilization of block copolymer micelles composed of antisense DNA and thiolated poly(ethylene glycol)-block-poly(L-lysine), International Symposium on Polymer Therapeutics: Recent Progress in Clinic and Future Prospects, Nara Centennial Hall, Japan, 2001.7.14
  - 12) Y. Nagasaki, E. Takamoto, K. Yasugi, Y. Yamamoto, A. Harada, K. Kataoka, Sugar-installed polymeric micellar system for an active targeting, International Symposium on Polymer Therapeutics: Recent Progress in Clinic and Future Prospects, Nara Centennial

- Hall, Japan, 2001.7.14
- 13) M. Harada-Shiba, K. Yamauchi, A. Harada, K. Kataoka, Polyion complex micelles as vectors in gene therapy - Pharmacokinetics and in vivo gene transfer, International Symposium on Polymer Therapeutics: Recent Progress in Clinic and Future Prospects, Nara Centennial Hall, Japan, 2001.7.14
  - 14) 片岡一則, 高分子のアッセンブリーに基づくバイオナノシステムの構築ードラッグ・遺伝子デリバリーへの展開ー, JST 異分野研究者交流ワークショップ「バイオマイクロシステム」, 小名浜スプリングホテル(茨城), 2001.8.25-27 (招待講演)
  - 15) Eduardo Jule, Yukio Nagasaki, Kazunori Kataoka, Interactions between Poly(ethylene glycol)-Poly(D,L-lactide) Micelles and Lectins. A Study by Surface Plasmon Resonance, 50th Fall Annual Meeting of The Society of Polymer Science, Japan, Waseda University, 2001.9.12-14
  - 16) 宮田完二郎, 柿澤資訓, 原田敦史, 片岡一則, 還元環境に応答する架橋を導入したプラスミド DNA 内包ポリイオンコンプレックスミセルの構築と機能評価, 第 50 回高分子討論会, 早稲田大学大久保キャンパス, 2001.9.12-14
  - 17) 分林大輔, 原田敦史, 長崎幸夫, 片岡一則, 新規遺伝子ベクターとしての plasmid DNA 内包ミセルの構造特性と機能解析, 第 50 回高分子討論会, 早稲田大学大久保キャンパス, 2001.9.12-14
  - 18) 柿澤資訓, 片岡一則, ブロック共重合体と DNA からなる自己組織化粒子の創製とその細胞内 DNA 導入システムへの展開, 第 50 回高分子討論会, 早稲田大学大久保キャンパス, 2001.9.12-14
  - 19) K. Kataoka, Block copolymer micelles for gene and drug delivery, First Japanese-Swiss Joint Workshop on Biomaterials "Biomaterial-Tissue Interaction: Regeneration and Reconstitution in Medicine", Leysin, Switzerland, 2001.9.18 (招待講演)
  - 20) K. Kataoka, Block copolymer micelles for gene and drug delivery, Biosurf IV "Spatial Organization and Dynamics of Biomolecules and Cells at Surfaces", Swiss Federal Institute, Lausanne (Switzerland), 2001.9.21 (招待講演)
  - 21) K. Kataoka, Possible future between biotechnology and nano-fabrication, 2001 International Conference on Solid State Devices and Materials, Diamond Hotel, Tokyo, 2001.9.27 (招待講演)
  - 22) 片岡一則, メディカルフロンティアへ向けての高分子ナノアッセンブリー設計, 日本学術振興会 未踏・ナノデバイステクノロジー第 1 5 1 委員会第 5 9 回研究会, 東京・弘済会館, 2001.10.12 (招待講演)
  - 23) G.-D. Zhang, N. Nishiyama, D.-L. Jiang, T. Aida, K. Kataoka, Polyion complex micelles from dendrimer zinc porphyrin and poly(ethylene glycol)-b-poly(aspartic acid), Second International Dendrimer Symposium, University of Tokyo, Japan, 2001.10.15
  - 24) K. Kataoka, N. Nishiyama, H. R. Stapert, G.-D. Zhang, D.-L. Jiang, T. Aida, Polyion complex micelles encapsulating light-harvesting ionic dendrimer porphyrins for photo-dynamic therapy, Second International Dendrimer Symposium, University of Tokyo, Japan, 2001.10.15 (招待講演)
  - 25) 秋山好嗣, 原田敦史, 片岡一則, 長崎幸夫, 末端反応性ポリエチレングリコール-ポリエチレンイミンブロック共重合体とプラスミド DNA からなるポリイオンコンプレックスミ

セルの調製，第23回日本バイオマテリアル学会大会，京都テルサ、京都，2001.10.22-23

- 26) 片岡一則，生体機能性高分子ミセルの創製と特性評価，第13回散乱研究会，日本薬学会長井記念ホール（東京・渋谷），2001.11.20（招待講演）

H. 知的所有権の出願・取得状況  
なし

# 厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業） 分担研究報告書

部位特異的組換え酵素を用いた多段階発現制御系の遺伝子治療への応用

分担研究者 鐘ヶ江 裕美 東京大学医科学研究所・助手

## 研究要旨

癌に対する遺伝子治療のベクターとしては、導入効率が高く任意のプロモーターを用いることが可能であるという点からアデノウイルスベクターが有用であると考えられているが、有用性特に安全性への配慮が重要である。本研究では部位特異的組換え酵素による発現制御系を応用した発現制御系の検討を培養細胞を中心に行っているが、本年度はCre/loxPと変異型loxPを用いた複数遺伝子同時発現制御系の確立を行った。本系ではloxPを有する標的配列と変異型loxPを有する標的配列にCre発現組換えアデノウイルスを導入することで、標的配列上の目的遺伝子の発現を同時期にONあるいはOFFへと誘導することが可能となる。本年度の研究から、我々の同定した変異型loxPを用いることで、効率・精度ともに高い発現制御系の確立に成功し、複数の治療遺伝子を任意のプロモーターを用いて同時に癌細胞へ導入することが可能となった。今後はFLP/FRT系と併用した多段階発現制御系との組み合わせについても検討を行っていく。

## A. 研究目的

アデノウイルスベクターを用いた癌への遺伝子治療は既に日本でも臨床治験が始まっている。しかし依然として重症度の高い癌へ適用されているため、有効性の判断は非常に難しいのが現状である。今後早期癌への遺伝子治療を考えた場合、安全性の向上に向けた発現制御系の確立が必須である。我々は部位特異的組換え酵素Cre/loxP系を応用した発現制御系を用いて癌細胞で特異的に治療遺伝子を発現する系を確立してきた。本研究では、新しい発現制御系である出芽酵母由来の部位特異的組換え酵素FLP/FRT系の検討を行い、Cre/loxP系と組み合わせることにより複数遺伝子同時発現制御系や多段階発現制御系の確立を目的とする。本法が確立すれば、アデノウイルスベクターだけでなくあらゆる遺伝子治療において、複数の遺伝子の同時発現制御や、目的遺伝子の発現をONとした後過剰発現による毒性が認められた場合に発現をOFF

へと制御する等が可能となり、二重三重の安全性の確保に向け有用な方法となる。また近年注目されている再生医療や発生分野においてもこの多段階発現制御系を用いれば、一過性にある遺伝子を発現誘導しその後発現をOFFとすることが可能となり、今まで以上に自然に近い状態での検討に向けて有用な方法であると考えられる。

## B. 研究方法

本年度はCre/loxPと変異型loxPを併用した複数遺伝子の同時発現制御系について主に検討を加えた。同時発現制御系における組換え効率の解析は、in vitro法と細胞株を樹立化しマーカー遺伝子の定量及び染色体のDNA解析により行った。本来の標的配列であるloxP(以下L)とは組換えを起こさないが変異を加えたもの同士では比較的効率よく組換えを起こす変異型loxPは既に同定が終わっており、その中でも効率・精度ともに高いloxP V(以下V)を変異型loxPとして用いた。本研究のために、GFPのcDNAあるいは発現

単位をVで挟んだV標的ユニットとCAGプロモーターの下流にLを両側に持つstuffer (neo耐性遺伝子)、その下流にLacZを有するL標的ユニットを同一分子上に持つ同時発現制御用プラスミドを構築した。in vitro法には、Cre発現組換えウイルスを293細胞に感染して得られた細胞粗抽出液を組換え酵素として用いた。同時発現制御用プラスミド及びV標的ユニットあるいはL標的ユニットのみを持つ単独制御用プラスミドを制限酵素により切断した基質を調製した。これらの酵素と基質を37℃で30分間反応し、制限酵素で切断後電気泳動を行い組換え体の生成率を算定した。培養細胞での解析のために、CV-1細胞に同時発現制御用プラスミドをStratagene社のTransfastを用いて導入後stufferとして挿入したneo耐性遺伝子を応用してG-418耐性細胞をクローニングし、同時発現制御用細胞株を作製した。Southern法による解析から1コピー挿入されていた3株(GFPのcDNAをVで挟んだ2株：E-13, E-14とGFPの発現単位をVで挟んだ1株：V-9)と約5コピー挿入されていた1株(E-7)を選んで実験に供した。Cre発現組換えアデノウイルスを細胞株に所定の多重感染価(MOI)で感染し、2~3日後にLacZ遺伝子の発現をX-gal染色とストラタジーン社のCPRGを用いる発色定量法による $\beta$ -galactosidase活性の測定により確認した。またGFP遺伝子の発現はGFP蛋白が非常に安定であるため、Cre発現ウイルス導入後9日目にバイオラボ社のアセントを用いて定量した。Southern法は6cmシャーレの細胞株からprotenaseK-SDSを用いて総DNAを抽出しSacIで切断後標準的な方法で行った。また本法の精度の検討はPCRを用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究は主に動物細胞を用いたモデル的検討であり、倫理面への抵触は少ないものと思われる。しかしながら本法を癌への治療に向けて応用する場合にはきちんとした対応が必要であると考えられる。

## C. 研究結果

今回樹立化した同時発現制御用細胞株は、Cre非存在下ではV標的ユニット上のGFPの発現はONに、L標的ユニット上のLacZの発現はOFFに制御されており、Creを導入することによりGFPの発現はOFFへ、LacZの発現はONへと誘導される様に設計されている。本研究からCre発現組換えアデノウイルス導入前はGFPは100%の細胞で発現し、またLacZの発現は全く確認されず厳密なOFF状態であったことが確認された。これらの細胞株にCre発現ウイルスをMOI 2で導入することにより標的ユニットが1コピー挿入されていた細胞株では100%の細胞でGFPの発現はOFFへ、LacZの発現はONへと誘導されていた。また5コピー挿入されていたE-7細胞株においてもMOIを5以上に上げることで100%の細胞での同時発現制御が可能であった。これらの細胞株のDNA解析を行った結果、これらの発現制御はV同士、L同士の独立した組換えの結果であったことが示され、非常に効率・精度とも高い系であると考えられた。

In vitro法での解析からはVはLと比較して組換え効率が約2/3に低下していたため、Cre発現ウイルスのMOIが低い条件ではV標的ユニットの制御が充分に行えていない可能性があると考え、5コピー挿入されているE-7細胞株を用いてCre発現ウイルスのMOIを段階的に変えSouthern法により解析を行ったところ、MOI 2以下ではL、Vいずれも組換えの起こらなかったバンドが検出されたが、Lだけ組換えが起きた場合に想定されたバンドは全く検出されなかった。In vitro法では組換え反応は平衡状態にあり、培養細胞での結果と必ずしも一致しないが、この結果はCreをCAGという非常に強力なプロモーターから発現した場合には、Creが導入された全ての細胞でVの組換えが十分に可能であったことを示唆していると考えている。またGFPのcDNAをVで挟んだ細胞株(E-13)と発現単位をVで挟んだ細胞株(V-9)においては、V標的ユニットの組換え効率

には差は認められず、Vの挿入位置による影響は確認されなかった。更にVの精度が低くLと組換えが起きるかどうかを検討するためにPCRを行ったが、検出限界（0.01copies/cell）以下であり、Vが非常に精度の高い変異型loxPであったことも確認された。以上の結果から本研究で検討したCre/loxPと変異型loxPを併用した複数遺伝子同時発現制御系は効率・精度ともに非常に高く有用な系であると考えられた。

更に本年度はFLP/FRTを組み合わせた多段階発現制御系に関しては、昨年度検討を行った野生型FLPによりGFPの発現をOFFからONへ制御するためのFLP標的ユニット全体をCreの標的配列であるloxPで挟んだ多段階発現制御用プラスミドだけではなく、FLP標的ユニットとCre標的ユニットを有する新たな多段階発現制御用プラスミドの構築を始めた。昨年度のプラスミドではGFPの発現が持続したため、Creにより最終的にOFFへ制御されていたかどうかの判定が困難であり、また実用性を考えると新たに構築するプラスミドは非常に有用性が高いと考えられるため、このプラスミドを用いて来年度詳細に検討を加えていく予定である。

#### D. 考察

本年度は細胞株を用いて前者の複数遺伝子同時発現制御系の有用性を実証した。多段階発現制御系に関しては進展は少ないが、これらの発現制御用プラスミドの構築の過程で、これらのプラスミドへ目的遺伝子を挿入するためのカセットもほぼ完成しており、本年度の目標は十分に達成されたものと考えている。

本研究から、これまでに我々が同定してきた変異型loxPの一つであるVは非常に精度が高く、またCreにより複数遺伝子を同時期に100%の細胞で発現制御することが可能であったことを明らかとした。この研究成果は世界的にも初めての知見であり、これまでCre/loxPにおいては単独遺伝子の発現制御以外は不可能であるという問題を解決する成果であり、実用性が非常に高

いと考える。

今後は我々のCre/loxP系における多くの実績をふまえて今後FLP/FRT系においても改良を加えていく。具体的にはFLPがより効率よく組換えを起こす変異型FRTの検索や、hFLPeで認められた毒性の軽減に向けた改良も行っていく。また多段階発現制御系に関する検討については、今後新しい標的プラスミドを用いてin vitro法による詳細な検討や細胞での条件の最適化を行っていく予定である。

#### E. 結論

本年度の結果から、CAGプロモーターからCreを発現する組換えアデノウイルスと精度の高い変異型loxPを用いれば100%の細胞で複数遺伝子の同時発現ON/OFF制御が可能であった。しかしin vitro法の解析から変異型loxPの組換え効率は野生型loxPよりも劣っていたため、Creを細胞特異的プロモーターなど発現効率の低いプロモーターから発現する場合には更に検討が必要である可能性が示唆された。しかし本系の効率・精度は非常に高いと考えられたため、細胞毒性を有する遺伝子を複数細胞に導入する研究や、複数の遺伝子が協調して作用する発生期の研究においては、本系は大変有用な系になると考える。

#### F. 健康危険情報

本研究においては特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nakano, M., Ishimura, M., Chiba, J., Kanegae, Y., and Saito, I. DNA substrates influence the recombination efficiency mediated by FLP recombinase expressed in mammalian cells, *Microbiol Immunol.* 45: 657-665, 2001.

Sakai, Y., Kaneko, S., Sato, Y., Kanegae, Y., Tamaoki, T., Saito, I., and Kobayashi, K. Gene therapy for hepatocellular carcinoma using two recombinant adenovirus vectors

with alpha-fetoprotein promoter and Cre/lox P system, *J Virol Methods*. 92: 5-17., 2001.

Nakano, M., Odaka, K., Ishimura, M., Kondo, S., Tachikawa, N., Chiba, J., Kanegae, Y., and Saito, I. Efficient gene activation in cultured mammalian cells mediated by FLP recombinase-expressing recombinant adenovirus, *Nucleic Acids Res*. 29: E40., 2001.

Haruta, M., Kosaka, M., Kanegae, Y., Saito, I., Inoue, T., Kageyama, R., Nishida, A., Honda, Y., and Takahashi, M. Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue, *Nat Neurosci*. 4: 1163-1164., 2001.

Ijima, K., Murakami, M., Okamoto, H., Inobe, M., Chikuma, S., Saito, I., Kanegae, Y., Kawaguchi, Y., Kitabatake, A., and Uede, T. Successful gene therapy via intraarticular injection of adenovirus vector containing CTLA4IgG in a murine model of type II collagen-induced arthritis, *Hum Gene Ther*. 12: 1063-1077., 2001.

Takehara, M., Murakami, M., Inobe, M., Tanaka, K., Chikuma, S., Saito, I., Kanegae, Y., Yasunami, Y., Nakano, M., Yamashita, K., Todo, S., and Uede, T. Long-term acceptance

of allografts by in vivo gene transfer of regulatable adenovirus vector containing CTLA4IgG and loxP, *Hum Gene Ther*. 12: 415-426., 2001.

## 2. 学会発表

渡辺卓郎、堀江良一、石田尚臣、鐘ヶ江裕美、小岩司、塩之入智恵子、古賀震、山口一成、斎藤泉、東原正明、渡邊俊樹. 組み換えアデノウイルスベクターを用いた成人T細胞性白血病の細胞特異的、分子標的遺伝子治療の基礎的検討、第60回日本癌学会総会、横浜（2001）

斎藤泉、近藤小貴、鐘ヶ江裕美. 遺伝子置換法を利用したアデノウイルスベクター作製法の開発、第24回日本分子生物学会年会、横浜（2001）

近藤小貴、奥田亜矢、佐藤弘実、寺島美保、鐘ヶ江裕美、斎藤泉. 部位特異的組換え酵素による染色体上での複数遺伝子発現制御系の解析、第24回日本分子生物学会年会、横浜（2001）

Kanegae Y., Kondo S., Nakano M., Saito I., and Tachikawa N. Regulation of multiple-gene expression using site-specific recombinase Cre and mutant loxPs. American society of gene therapy 4th annual meeting, Seattle (2001)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



## 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Ochiya, T., et al.	Biomaterial for gene delivery .	Current Gene Ther,	1	31-52	2001
Yamamoto, H., Ochiya, T. et al.	HST-1/FGF-4 gene activation induces spermatogenesis and prevents adriamycin-induced testicular toxicity.	Oncogene	21	899-908	2001
Honma, K., Ochiya, T., et al.	Atelocollagen-based gene transfer in cells allows high-throughput screening of gene functions.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	289	1075-1081	2001
Nakano, M., Kanegae, Y. et al.	Efficient gene activation in cultured mammalian cells mediated by FLP 3. recombinase-expressing recombinant adenovirus.	Nucleic Acids Res.	29	E40	2001
Takehara, M., Kanegae, Y., et al.	Long-term acceptance of allografts by in vivo gene transfer of regulatable adenovirus vector containing CTLA4IgG and loxP	Hum Gene Ther.	12	415-426	2001
Sakai, Y., Kanegae, Y., et al.	Gene therapy for hepatocellular carcinoma using two recombinant adenovirus vectors with alpha-fetoprotein promoter and Cre/lox P system	J Virol Methods.	92	5-17	2001
Kawamura, K., Hamada, H., et al.	Bystander effect in uracil phosphoribosyltransferase/5-fluorouracil-mediated suicide gene therapy is correlated with the level of intercellular communication.	Int. J. Oncology	18	117-120	2001

## 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Lin Hui Wang, Hamada, H., et al.	The potent antitumor effects of combined p16 gene and GM-CSF gene therapy through efficient induction of antitumor immunity	J Cancer Res Clin Oncol.	127	101-108	2001
Harada-Shiba, M., Kataoka, K., et al.	Polyion complex micelles as a vector for gene therapy -Pharmacokinetics and in vivo gene transfer.	Gene Therapy			in press
Desaknai, Sz., Hamada, H. et al.	Brain tumor treatment with IL-2 and IL-12 producing autologous cancer cell vaccines.	Adv. Exp. Med. Biol.	495	369-372	2001
Nishimura S, Hamada, H. et al.	Adenovirus-mediated transfection of caspase-8 augments anoikis and inhibits peritoneal dissemination of human gastric carcinoma cells.	Cancer Res.	61	7009-7014	2001
Lumniczky, K., Hamada, H., et al.	Local tumor irradiation augments the antitumor effect of cytokine-producing autologous cancer cell vaccines in a murine glioma model.	Cancer Gene Ther.	9	44-52	2002
Kakizawa, Y., Kataoka, K., et al.	Glutathione-sensitive stabilization of block copolymer micelles composed of antisense DNA and thiolated poly(ethylene glycol)-block-poly(L-lysine): A potential carrier for systemic delivery of antisense DNA",	Biomacromolecules,	2	491-497	2001

## 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Nakano, M. Yoshida, T, et al.	Suppression of colorectal cancer growth using an adenovirusvector expressing an antisense K-ras RNA.	Mol Ther,	3	491-499	2001
Aoki, K., Yoshida, T., et al.	Polyethylenimine-mediated gene transfer into pancreatictumor disseminated in the murine peritoneal cavity.	Gene Ther.	8	508-514	2001
Uchida H, Hamada, H. et al.,	Caspase-8 gene transduction augments radiation-induced apoptosis in DLD-1 cells.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>			in press
Nakamura T, Sato K. and Hamada, H.	Effective gene transfer for human melanomas by integrin-targeted adenoviral vectors.	Hum. Gene Ther.			in press
Yamamoto S., Hamada, H., et al.	Reduced transduction efficiency of adenoviral vectors expressing human p53 gene by repeated transduction into glioma cells in vitro.	Clinical Cancer Res.			in press