

200/0434

厚生科学研究研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

遺伝子治療製剤の供給基盤整備と 遺伝子医療への応用に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉 田 純

平成14 (2002) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
遺伝子治療剤の供給基盤整備と遺伝子医療への応用に関する研究	2
吉田 純	
II. 分担研究報告	
1. 免疫学的検討に関する研究	11
高橋利忠	
2. シグナル伝達機構の解明に関する研究	14
妹尾久雄	
3. システム工学に関する研究	22
小林 猛	
4. アポトーシスに関する研究	24
田沼靖一	
5. 皮膚癌に対する遺伝子治療の開発に関する研究	27
斎田俊明	
6. 遺伝子治療剤の開発に関する研究	31
水野正明	
7. 人工染色体に関する研究	35
舛本 寛	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV. 研究成果の刊行物・別冊	43

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
（総括・分担）研究報告書
遺伝子治療剤の供給基盤整備と遺伝子医療への応用に関する研究
主任研究者 吉田 純 名古屋大学大学院医学研究科教授

研究要旨

本研究は名古屋大学医学部附属病院に設置され、すでに稼働している我が国初の遺伝子治療用製剤調製施設（遺伝子治療製剤調製室）を中心に総合的な遺伝子医療システムを構築し、我が国における遺伝子治療臨床研究を強力に推進しようとするものである。本年度は①汎用性の高い凍結乾燥製剤の大量調製法を確立し、調製施設を整備した。②純国産技術で開発された我が国最初の悪性グリオーマに対する遺伝子治療臨床研究を、新たに4症例で実施し、合計5症例とした5症例すべてにおいて大きな有害事象は認められなかった。③人工染色体や単鎖抗体の修飾等新しい遺伝子治療開発のための基盤研究を進めた。④ヒトβ型インターフェロン遺伝子治療を悪性黒色腫に適応拡大できる準備が整った。

分担研究者

高橋利忠 愛知県がんセンター研究所所長
妹尾久雄 名古屋大学環境医学研究所教授
小林 猛 名古屋大学大学院工学研究科教授
田沼靖一 東京理科大学薬学部教授
斎田俊明 信州大学医学部教授
水野正明 名古屋大学大学院医学研究科
助教授
舛本 寛 名古屋大学大学院理学研究科講師

A. 研究目的

本研究は名古屋大学医学部附属病院に設置され、すでに稼働している我が国初の遺伝子治療用製剤調製施設（遺伝子治療製剤調製室）を中心に総合的な遺伝子医療システムを構築し、我が国における遺伝子治療臨床研究を強力に推進しようとするもので、今年度は3年計画の2年目にあたる。この目的を実現するため、以下の3つの課題を押し進めている。

課題1 遺伝子治療剤の供給基盤整備及び凍結乾燥製剤の開発と実用化：

すでに稼働している遺伝子治療製剤調製室を充実し、他施設にクリニカルグレードのプラスミド DNA や遺伝子治療用リポソーム製剤を十分に供給できる体制を作り上げる。同時に製剤供給がスムーズに行えるよう製剤の改良に関する基礎研究（凍結乾燥製剤の実用化など）を進める。一方で、我が国における遺伝子治療臨床研究の実施を加速するため、2000年4月からスタートしている悪性グリオーマに対する遺伝子治療臨床研究をさらに推し進め、名古屋大学で調製している遺伝子治療剤（ヒトβ型インターフェロン遺伝子包埋リポソーム

製剤）の安全性と有効性を検討する。

課題2 基盤研究：

基盤研究としては、①インターフェロン（IFN）遺伝子で誘導されるアポトーシスのシグナル伝達機構を明らかにする。一方で、PPAR γ を中心としたシグナル伝達機構を解明する。②ヒト人工染色体形成に関わる因子を解明する。③遺伝子工学技術を用いた単鎖抗体の調製とその応用を検討する。④遺伝子療法との併用効果をシステム工学的に理解するために、DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現プロファイルの知識工学的解析を行った。

課題3 遺伝子医療への応用：

これまでに臨床研究がスタートしている悪性グリオーマに対するヒトβ型インターフェロン遺伝子治療を悪性グリオーマ以外の他の癌腫（悪性黒色腫、腎細胞癌等）に適応拡大する。そして本遺伝子治療を遺伝子医療として総合的にとらえた医療体制を確立する。

B. 研究方法及び結果

課題1：

はじめに開発したヒトβ型インターフェロン遺伝子包埋リポソーム製剤の剤形は液剤であり、その有効期間は1ヶ月と短く、多施設共同研究を展開するには実用性に難点があった。そのため、昨年度は剤形変更を検討し、中長期保存型の凍結剤及び凍結乾燥剤の開発に成功した。本年度は、これを他施設に十分供給できるよう大量調製法の確立と大量調製施設の設置を行った。具体的には、大量調製法の作業手順書を作成した。また、名古屋大

学医学部附属病院遺伝子治療製剤調製室に凍結乾燥機を設置し、凍結乾燥工程のプログラミングを行った。その結果、1回の作業で最高600バイアル程度の調製が可能となった(図1)。これにより多施設共同研究を遂行するための製剤供給準備がほぼ完了した。一方で、2000年4月より名古屋大学で展開されている遺伝子治療をさらに推し進めた。昨年度は遺伝子治療製剤のうち、初期に開発した液剤を用いて第1例目の悪性グリオーマの患者に遺伝子治療を行った。本年度は、製剤の剤形を凍結剤に変更し、4症例を追加し、計5症例となった(表1)。これまでの臨床研究では、製剤及び治療方法に伴う大きな有害事象は認められていない。また、有効性についても一定の評価が確立しつつある。情報ネットワークも個々の機器(移動型CTスキャン、ナビゲーションシステム、情報管理システム等)の機能のバージョンアップを行い、より快適な治療環境を作り上げた。

課題2:

①インターフェロン(IFN) 遺伝子及び PPAR γ で誘導されるシグナル伝達機構: インターフェロン(IFN) 遺伝子で誘導されるアポトーシスのシグナル伝達機構を検討したところ、以下の3つの経路のあることがわかった。(1) 脳腫瘍細胞のインターフェロンに対する感受性は、細胞内で産生されるインターフェロンの mRNA の量に比例する。(2) インターフェロンが受容体を介して細胞内にシグナルを伝達する経路のひとつである Jak-Stat 経路でのリン酸化が延長・増強されていることがわかった。(3) (1)と(2)の状況が細胞に備わった上で、リボソームが細胞膜と相互作用することで最終的には DNase γ が活性化されることがわかった(図2)。一方で、PPAR γ を中心としたシグナル伝達機構について検討した。その結果、PPAR γ の発現している脳腫瘍細胞株ではリガンドにより PPAR γ を活性化することで細胞の増殖抑制とアポトーシス(一部)を誘導することがわかった。

②ヒト人工染色体形成に関わる因子: 人工染色体前駆体へ挿入した遺伝子からの転写は、セントロメアクロマチン構造形成に影響を与えることが判明した。

③遺伝子工学技術を用いた単鎖抗体の調製とその応用: 本年度は単鎖抗体を臨床応用するため、lipid tag を付加した単鎖抗体を作製し、得られた抗体の活性について検討した。

産生された抗体の ELISA 法による反応特異性の検討では、親抗体、及び lipid tag の付加されていない初代単鎖抗体とほぼ同様の反応性を保っていることが明らかになった。

④発現プロファイルのクラスタリング手法として教師信号なし学習である Fuzzy-ART を開発した。また、非線形モデリング手法である人工ニューラルネットワーク発現プロファイルデータから直接、リンパ腫の4年生存率が93%の高い正答率で予測できることを示した。

課題3:

ヒト β 型インターフェロン遺伝子包埋リボソーム製剤を用いた遺伝子治療の対象疾患を広げるための研究を進め、悪性黒色腫を第2のターゲットとした。この悪性黒色腫においてはその基盤研究及び前臨床研究の成果がまとまったことから国へ申請することとなった(図3)。

C. 考察

課題1:

3年計画の2年目に当たる今年度は、ヒト β 型インターフェロン遺伝子包埋リボソーム製剤(液剤)の実用性や汎用性を高めるため、剤形を凍結剤または凍結乾燥剤に変更し、凍結乾燥剤の大量調製法を確立した。このことは、大学が中心となって行っていく遺伝子治療臨床研究開発のためのひとつのモデルが提唱できつつあることを示している。これをさらに強力に実践することで、社会に直接的に貢献できる体制がとれるものと思われた。

課題2:

インターフェロン遺伝子で誘導される細胞内変化を、分子レベルで解明することでインターフェロン遺伝子治療をより効果的なものに変えていくのに役立つと考えられた。人工染色体に関する研究では、人工染色体の実用化の可能性が大きくなった。また、単鎖抗体は、リボソーム等のベクターに結合することで、細胞あるいは組織特異性を持たせることができる。この技術を一般化することは、遺伝子治療の適応拡大に大いに役立つと考えられた。また、Fuzzy-ART 等工学的解析方法が、疾患の予後等を正確に評価できる可能性を示した。

課題3:

ヒト β 型インターフェロン遺伝子包埋リボ

ソーム製剤を用いた悪性グリオーマに対する遺伝子治療臨床研究をさらに推し進め、今年度は4症例を新たに追加した。これまでのところ、大きな問題はなく、臨床研究は順調に進んでいる。このことは現在、押し進めている本臨床研究の多施設共同研究計画を後押しするものと考えられた。

D. 結論

- 1) 汎用性の高い凍結乾燥製剤の大量調製法を確立し、調製施設を整備した。
- 2) 純国産技術で開発された我が国最初の遺伝子治療臨床研究に、新たに4症例を加えた。
- 3) 新しい遺伝子治療開発のための基盤研究が進んだ。
- 4) ヒト β 型インターフェロン遺伝子治療を悪性黒色腫に適応拡大できる準備が整った。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Kageshida T, Mizuno M, Ono T, Matsumoto K, Saida T, Yoshida J. Growth inhibition of human malignant melanoma transfected with the human interferon- β gene by means of cationic liposomes. *Melanoma Res*, 11: 337-342, 2001.
2. Yoshida T, Mizuno M, Taniguchi K, Nakayashiki N, Wakabayashi T, Yoshida J. Rat glioma cell death induced by cationic liposome-mediated transfer for the herpes simplex virus thymidine kinase gene followed by ganciclovir treatment. *J Surgical Oncol*, 76: 19-25, 2001.
3. Fukui T, Hayashi Y, Fukuhara H, Yamamoto N, Nishikawa M, Mitsudo K, Tohnai I, Ueda M, Mizuno M, Yoshida J. Suicide gene therapy for human oral squamous cell carcinoma with adeno-associated virus vector. *Oral Oncol*, 7: 187-189, 2001.
4. Yamamoto N, Hayashi Y, Fukuhara H, Fukui T, Nishikawa M, Mitsudo K, Tohnai I, Ueda M, Mizuno M, Yoshida J. Basic research on interferon gene therapy for oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 7: 492-494, 2001.
5. Nishikawa M, Hayashi Y, Yamamoto N, Fukui T, Fukuhara H, Mitsudo K, Tohnai I, Ueda M, Mizuno M, Yoshida J. Cell death of human oral squamous cell carcinoma cell line induced by herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir. *Oral Oncol*, 7: 578-580, 2001.
6. Wakabayashi T, Kajita Y, Mizuno M, Nagasaka T, Yoshida J. Efficacy of adjuvant therapy with procarbazine, MCNU and vincristine for oligodendroglial tumors. *Neurol Med Chir* 41:115-120, 2001.
7. Wakabayashi T, Yoshida J, Mizuno M, Kajita Y. Intratumoral microinfusion of nimustine (ACNU) for recurrent glioma. *Brain Tumor Pathol*. 18: 23-28, 2001.
8. Aoki H, Mizuno M, Natsume A, Tsugawa T, Tsujimura K, Takahashi T, Yoshida J. Dendritic cells pulsed with tumor extract-cationic liposomes complex increase the induction of cytotoxic T lymphocytes in mouse brain tumor. *Cancer Immunol Immunother*, 50: 463-468, 2001.
9. Okamoto K, Mizuno M, Nakahara N, Natsume A, Yoshida J, Mori T, Hori S, Kobayashi H. Process of apoptosis induced by TNF- α in murine fibroblast Ltk- cell: Continuous observation with video enhanced contrast microscopy. *Apoptosis*, 7: 77-86, 2001.
10. Haruko Ogawa, Takaaki Kobayashi, Itsuo Yokoyama, Naoki Nagatani, Masaaki Mizuno, Jun Yoshida, Kenji Kadomatsu, Hisako Muramatsu, Akimasa Nakao and Takashi Muramatsu. Reduction of α -Galactosyl Xenoantigen by Expression of Endo- β -galactosidase C in Pig Endothelial Cells. *Xenotransplantation*, in press
11. Yoshida J, Mizuno M, Nakahara N and Colosi P. Antitumor Effect of an Experimental Intracranial Human Glioma by Adeno-associated Virus Vector Containing the Human Interferon- β Gene. *Jpn J Cancer Res*, in press
12. Yazaki M, Takahashi T, Mizutani K, Ito Y, Wakiguchi H, Inoue M, Kawa K, Kato K, Kato T, Saito H, and Togari H: Generation of HLA-Cw specific

- cytotoxic T-lymphocytes from cord blood used for cord blood stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* (in press)
13. M. Kato, T. Nagaya, M. Fujieda, K. Saito, J. Yoshida, H. Seo: Growth inhibition of PPAR γ expressing brain tumor cells by its own ligand. *Environmental Medicine*, 45(1): 26-28, 2001.
 14. D. Sarkar, T. Imai, F. Kambe, A. Shibata, S. Ohmori, S. Hayasaka, H. Funahashi, H. Seo: Overexpression of glutathione-S-transferase A1 in benign adrenocortical adenomas from patients with chshing's syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(4): 1653-1659, 2001.
 15. A. Shibata, Y. Hayashi, T. Imai, H. Hunahashi, A. Nakao, H. Seo: Somatic gene alteration of A1B1 gene in patients with breast cancer. *Endocrine Journal*, 48(2): 199-204, 2001
 16. T. Imai, D. Sarkar, A. Shibata, H. Funahashi, T. Matsuyama-Morita, T. Kikumori, S. Ohmori, H. Seo: Expression of adrenocorticotropin receptor gene in adrenocortical adenomas from patients with Cushing syndrome: Possible contribution for the autonomous production of cortisol. *Annals of Surgery*, 234(1): 85-91, 2001.
 17. Saida T. Recent advances in melanoma research. *J Dermatol Sci* 24, 1-13, 2001
 18. Ishihara K, Saida T, Yamamoto A. Updated statistical data of malignant melanoma in Japan. *Int J Clin Oncol* 6, 109-116, 2001
 19. Kageshita T, Hamby CV, Ishihara T, Matsumoto K, Saida T, Ono T. Loss of β -catenin expression associated with disease progression in malignant melanoma. *Br J Dermatol* 145, 210-216, 2001
 20. Kiniwa Y, Fujita T, Akada M, Ito K, Shofuda T, Suzuki Y, Yamamoto A, Saida T, Kawakami Y: Tumor antigen isolated from a patients with vitiligo and T-cell-infiltrated melanoma. *Cancer Res* 61, 7900-7907, 2001
 21. Wakamatsu K, Kageshita T, Furue M, Hatta Y, Kiyohara Y, Nakayama J, Ono T, Saida T, Takata M, Tsuchida T, Uhara H, Yamamoto A, Yamazaki N, Naito A, Ito S. Evaluation of 5-S-cysteinyl-dopa as a marker of melanoma progression: 10 years' experience. *Melanoma Res* 12, 2002 (in press)
 22. Hayashi K, Okubo S, Watanabe T, Yamazaki Y, Horiuchi N, Saida T. Malignant melanoma on the sole showing prominent neural differentiation. *Int J Dermatol* 41, 2002 (in press)
 23. Uhara H, Saida T, Watanabe T, Takizawa Y. Lymphangitis of the foot: Lymphatic drainage of the sole. *J Am Acad Dermatol* 46, 2002 (in press)
 24. 小口真司、斎田俊明: メラノーマの早期病変診断における dermoscopy の有用性. *Skin Cancer* 16: 13-21, 2001
 25. 斎田俊明: 皮膚の早期癌・境界病変. *病理と臨床*, 19 (臨時増刊号): 218-223, 2001
 26. 斎田俊明、山本明史 (編): 悪性黒色腫の診断・治療指針、金原出版、東京、2001
 27. 斎田俊明: ホクロ、メラノーマ. *臨外* 56: 1382-1383, 2001
 28. 石原和之、斎田俊明、山本明史: 皮膚悪性腫瘍における固形がん薬物療法効果判定基準 (改訂版). *Skin Cancer* 16: 143-157, 2001
 29. 斎田俊明、宇原 久: 悪性黒色腫に対する抗がん剤の適正使用ガイドライン (試案). *Skin Cancer* 16: 158-1169, 2001
 30. 斎田俊明、宇原 久: 皮膚有棘細胞癌に対する抗がん剤の適正使用ガイドライン (試案). *Skin Cancer* 16: 170-173, 2001
 31. 斎田俊明: メラノーマの早期病変をどう診断するか. *日皮会誌* 111: 1673-1675, 2001
 32. 斎田俊明: ほくろはメラノーマになるか? *日皮会誌* 111: 1790-1792, 2002
 33. 斎田俊明: イボと皮膚癌. *臨外* 57: 216-218, 2002
 34. 舛本寛: ヒト 21 番染色体セントロメアの構造と機能解析: ヒト人工染色体の構築. *蛋白質核酸酵素*, 46, 2375-2378 (2001)
 35. Hayakawa A, Wu J, Kawamoto Y, Zhou YW, Tanuma S, Nakashima I, Suzuki H. Activation of caspase-8 is critical for sensitivity to cytotoxic anti-Fas antibody-induced apoptosis in human ovarian cancer cells. *Apoptosis*. 2002

- Apr;7(2):107-113.
36. Sudo E, Tanuma S, Yoshida A, Takahashi Y, Kobayashi C, Ohama Y. The effects of pulmonary rehabilitation with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) Nippon Ronen Igakkai Zasshi. 2001 Nov;38(6): 780-784.
 37. Shiokawa D, Tanuma SI. Isolation and characterization of the DLAD/Dlad genes, which lie head-to-head with the genes for urate oxidase. Biochem Biophys Res Commun. 2001 Nov 16;288(5):1119-1128.
 38. Sudo E, Tanuma S, Higuchi N, Yoshida A, Takahashi Y, Kobayashi C, Ohama Y, Okubo A. Swallowing rehabilitation in two elderly patients with cerebral infarction Nippon Ronen Igakkai Zasshi. 2001 Jul;38(4): 554-559.
 39. Yao H, Takasawa R, Fukuda K, Shiokawa D, Sadanaga-Akiyoshi F, Ibayashi S, Tanuma S, Uchimura H. DNA fragmentation in ischemic core and penumbra in focal cerebral ischemia in rats. Brain Res Mol Brain Res. 2001 Jul 13;91(1-2):112-118.
 40. Funahashi H, Imai T, Mase T, Sekiya M, Yokoi K, Hayashi H, Shibata A, Hayashi T, Nishikawa M, Suda N, Hibi Y, Mizuno Y, Tsukamura K, Hayakawa A, Tanuma S. Seaweed prevents breast cancer? Jpn J Cancer Res. 2001 May;92(5):483-487.
 41. Shiokawa D, Tanuma S. Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase gamma during apoptosis. Biochemistry. 2001 Jan 9;40(1):143-152.
2. 学会発表
1. Yoshida J, Mizuno M, Wakabayashi T, Kajita Y. Antitumor mechanisms of interferon- β gene therapy for malignant glioma on basic and clinical studies. The XIV International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, Ashville (2001. 5. 27-30)
 2. Tsugawa T, Natsume A, Mizuno M, Yoshida J. Inhibition of angiogenesis by using the adenovirus vector AdVEGF-ExR expressing extradomain of Flt-1 had antitumor effect to glioma. The XIV International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, Ashville (2001. 5. 27-30)
 3. Nobayashi M, Mizuno M, Okamoto K, Tsugawa T, Yoshida J. Cellular and molecular dynamics of cationic liposomes in human glioma cells. The XIV International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, Ashville (2001. 5. 27-30)
 4. Saito R, Mizuno M, Okamoto K, Tsugawa T, Nobayashi N, Ryuke Y, Yoshida J. Apoptosis Induced by Interferon-beta in Human Glioma Cells. The XIV International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, Ashville (2001. 5. 27-30)
 5. Mizuno M, Yoshida J, Wakabayashi T, Kajita Y. Antitumor mechanisms of interferon- β gene therapy for malignant glioma on basic and clinical studies. The IV Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, Seattle (2001. 5. 30-6. 3)
 6. Saito R, Mizuno M, Okamoto K, Tsugawa T, Nobayashi N, Ryuke Y, Yoshida J. Apoptosis Induced by Interferon-beta in Human Glioma Cells. The IV Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, Seattle (2001. 5. 30-6. 3)
 7. Nobayashi M, Mizuno M, Okamoto K, Tsugawa T, Yoshida J. Cellular and molecular dynamics of cationic liposomes in human glioma cells. The IV Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, Seattle (2001. 5. 30-6. 3)
 8. 水野正明 悪性脳腫瘍に対する遺伝子治療の現状と将来 第1回富山県消化器疾患研究会 富山(2001. 10. 17)
 9. 水野正明、吉田 純 悪性脳腫瘍に対する遺伝子治療 DDS 学会総会
 10. 水野正明、吉田 純 メラノーマの遺伝子治療の展望 第39回日本癌治療学会 広島(2001. 11. 7-9)
 11. 水野正明 グリオブラストーマの遺伝子治療 第30回日本神経放射線学会 大阪(2001. 2. 7-9)
 12. 齋藤竜太、水野正明、岡本健太、津川隆彦、中原紀元、吉田 純 サイトカイン蛋白質またはその遺伝子が誘導するヒトグリオー

- マ細胞のアポトーシス 第2回日本分子脳神経外科学会 (2001. 9. 7-8)
13. 齋藤竜太、水野正明、岡本健太、中原紀元、吉田 純 INTERFERON- β によるヒトグリオーマ細胞のアポトーシス 第60回日本癌学会 (2001. 9. 26-28)
 14. 波多野 学、水野正明、吉田 純、三木恒治 腎細胞癌に対するサイトカイン遺伝子治療の有効性について 第60回日本癌学会 (2001. 9. 26-28)
 15. 水野正明、野林美里、藤井正純、梶田泰一、若林俊彦、吉田 純 ヒト β 型インターフェロン遺伝子包埋リポソームを用いた悪性グリオーマに対する遺伝子治療の基礎と臨床 第60回日本癌学会 (2001. 9. 26-28)
 16. 齋藤竜太、水野正明、岡本健太、中原紀元、吉田 純 INTERFERON- β によるヒトグリオーマ細胞のアポトーシス 第60回日本脳神経外科学会総会 岡山 (2001. 10. 24-26)
 17. 齋藤竜太、水野正明、吉田 純、田沼靖一 DNase γ で誘導されるヒトグリオーマ細胞のアポトーシス 第10回日本脳腫瘍カンファレンス 別府(2001. 12. 2-4)
 18. 波多野 学、水野正明、吉田 純、三木恒治 腎細胞癌に対するサイトカイン遺伝子治療の有効性について 第25回東海遺伝子治療研究会 名古屋(2001. 1. 27)
 19. 水野正明、若林俊彦、吉田 純 悪性グリオーマに対する遺伝子治療臨床研究 第5回がん分子標的治療研究会総会 東京 (2001. 6. 21-22)
 20. 高須俊太郎、岡本健太、中屋敷典久、吉川和宏、水野正明、若林俊彦、佐賀信介、吉田 純、高橋利忠: 99mTcを標識した Type III mutant EGFR を認識する単鎖抗体による神経膠腫の画像診断への応用。第60回日本癌学会総会 2001. 9. 28
 21. 小幡裕一、高橋利忠: SEREX法によるがん抗原の同定(シンポジウム) 第60回日本癌学会総会 2001. 9. 26
 22. Takasu S, Okamoto K, Mizuno M, Wakabayashi T, Yoshikawa K, Takahashi T, Yoshida J: Specific targeting of glioma xenografts by 99m Technetium-labeled single chain variable fragment antibody recognizing type III mutant epidermal growth factor receptor. The American Association of Neurological Surgeons 69th Annual Meeting (Toronto, Canada) 2002. 4. 26
 23. 加藤美穂子、長屋 敬、齊藤 清、吉田 純、妹尾久雄: PPAR γ リガンドによる悪性脳腫瘍細胞株のアポトーシス誘導。第74回日本内分泌学会学術総会, 2001. 6. (横浜)
 24. 柴田有宏、長屋 敬、今井常夫、中尾昭公、舟橋啓臣、妹尾久雄: 転写因子 NF- κ Bによる VEGF 遺伝子発現機構: 新たな乳癌治療のターゲット。第74回日本内分泌学会学術総会, 2001. 6. (横浜)
 25. 李 鍾国、林 良敬、三輪佳子、張 麗艶、妹尾久雄、児玉逸雄: 甲状腺ホルモン受容体遺伝子導入による心臓電気特性の調節。第74回日本内分泌学会学術総会, 2001. 6. (横浜)
 26. 加藤美穂子、長屋 敬、齊藤 清、妹尾久雄、吉田 純: グリオーマにおける PPAR γ 発現の検討。第60回日本脳神経外科学会総会, 2001. 10.
 27. S. Tomida, T. Hanai, H. Honda, T. Kobayashi: Gene expression analysis using Fuzzy ART, Abstract of GIW2001, 245 - 246 (2001)
 28. T. Ando, T. Hanai, H. Honda, T. Kobayashi: Prognostic prediction of lymphoma by gene expression profiling using FNN, Abstract of GIW2001, 247 - 248 (2001)
 29. 安藤達哉、花井泰三、本多裕之、小林猛: FNNを用いたマイクロアレイデータからのリンパ腫の予後診断、化学工学会第68年会(於:福岡)、(2002)
 30. Saida T: Acral pigmented lesions (Tutorial), 1st World Congress of Dermoscopy, Rome, Italy, 2001.2.
 31. Oguchi S, Oguchi M, Matsumoto M, Saida T: Epidemiological study of acquired melanocytic nevi in Japanese population. The 5th International Conference on Melanoma, Venice, Italy, 2001.3
 32. Kaniwa Y, Fujita Y, Suzuki Y, Saida Y, Kawakami Y: Isolation of human melanoma antigens recognized by IgG antibodies in serum from a melanoma patient who developed vitiligo vulgaris, The 5th International Conference on Melanoma, Venice, Italy, 2001.3
 33. Kaneko M, Takeoka M, Oguchi M, Koganehira, Y, Ehara T, Saida T, Taniguchi T: Calponin h1 suppressed

- tumorigenicity of Src-induced transformed 3Y1 cells. 92nd Annual Meeting American Association for Cancer Research, New Orleans, USA, 2001.3
34. Koganehira Y, Takeoka M, Ehara T, Hashimoto S, Murata H, Saida T, Taniguchi S: Close relation of reduced expression of actin-binding proteins, Calponin-h1, and h-caldesmon in the vascular smooth muscle inside human malignant melanoma with the poor prognosis. The Society for Investigative Dermatology, 62nd Annual Meeting, Washington DC, USA, 2001.5
35. Saida T: Acral melanocytic lesions: Detection of early melanoma on volae skin by the characteristic dermoscopic features. (Symposium), 8th World Congress on Cancers of the Skin, Zurich, Switzerland, 2001.7
36. 斎田俊明: メラノーマの早期病変をどう診断するか. 教育講演、第100回日本皮膚科学会総会、東京、2001.4
37. 斎田俊明: ホクロはメラノーマになるか. シンポジウム、第100回日本皮膚科学会総会、東京、2001.4
38. 山崎自子、宇原 久、斎田俊明: 信州大学皮膚科学教室におけるメラノーマ患者の統計学的考察- AJCC の新病期分類を中心に-. ワークショップ: メラノーマ、第100回日本皮膚科学会総会、東京、2001.4
39. 野呂佐知子、山本明史、山崎直也、山崎自子、宇原 久、斎田俊明: メラノーマのTNM分類と予後- 現行 UICC-TNM 分類と新AJCC-TNM 分類の比較-. 第17回日本皮膚悪性腫瘍学会総会、東京、2001.5
40. 小金平容子、村田 浩、斎田俊明、谷口俊一郎: ヒト悪性黒色腫内の血管におけるアクチン結合分子、カルボニン h1、h-カルデスモンの発現低下は予後不良と相関する. 第26回日本研究皮膚科学会、松山、2001.9
41. 小金平容子、竹岡みち子、村田 浩、斎田俊明、板野直樹、木全弘治、谷口俊一郎: ヒトメラノーマ細胞の造腫瘍性とヒアルロン酸発現. 第60回日本癌学会総会、横浜、2001.9
42. 宇原 久、関 詩穂、林 宏一、小口真司、斎田俊明: インジゴカルミンを用いたセンチネルリンパ節の同定. 第65回日本皮膚科学会東部支部総会、札幌、2001.9
- 14) 宇原 久: 進行期メラノーマの化学療法・免疫化学療法. シンポジウム: メラノーマ、第39回日本癌治療学会総会、広島、2001.11
43. 山崎自子、小口真司、松本和彦、斎田俊明、太田由子、石原八州司、堀米玲子、中井桂司、滝沢正臣、村瀬澄夫: テレビ電話を用いた多施設間遠隔皮膚科カンファレンス. 第21回医療情報学連合大会、東京、2001.11
44. H. Masumoto, M. Nakano, N. Suzuki and J. Oozeki: Epigenetic inactivation and re-assembly of active centromere chromatin on ectopic alpha satellite sites on human chromosomes. 5th International Workshop on Chromosome Segregation and Aneuploidy. Chartres, France, July 7-11, 2001
45. H. Masumoto, M. Nakano, N. Suzuki and J. Oozeki: De novo assembly, inactivation and re-assembly of centromere chromatin on Human Artificial Chromosomes. Genome Medicine: Gene Therapy for the Millennium. Rome, Italy, Sep. 30-Oct. 2, 2001
46. 舛本寛、中野めぐみ、鈴木伸卓、大関淳一郎: ヒト染色体セントロメアの新規形成機構とヘテロクロマチン化. 第54回細胞生物学会大会、岐阜、2001年5月29日-6月1日
47. 舛本寛: 染色体を動かす: 「ヒト人工染色体を用いたセントロメアの解析」染色体学会第52回大会、米子、2001年11月2日
48. 舛本寛、中野めぐみ、鈴木伸卓、大関淳一郎: ヒト新規セントロメア構造形成に関する因子の解析. 第24回日本分子生物学会年会、横浜、2001年12月9日-12日
49. 舛本寛、中野めぐみ、鈴木伸卓、大関淳一郎、岡本康秀: ヒトセントロメア構造の新規形成と変換機構. 第19回染色体ワークショップ、神戸、2002年1月30日-2月1日

図1 ヒトβ型インターフェロン遺伝子包埋リポソーム製剤（凍結乾燥剤）の大量調製施設

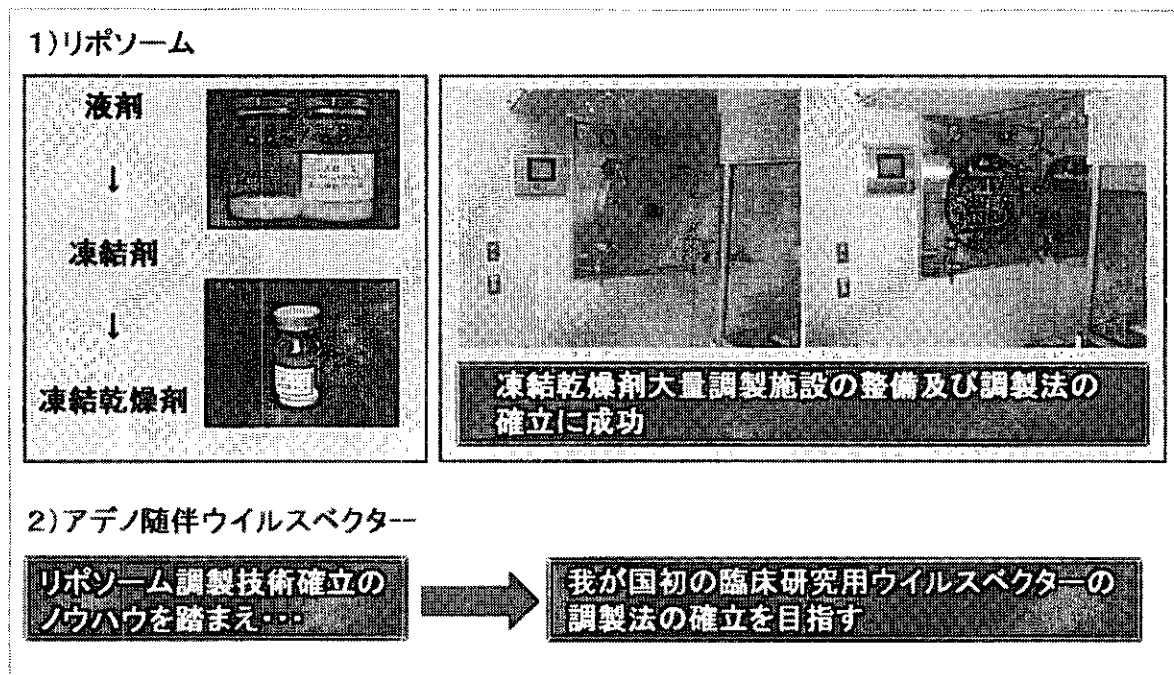


図2 ヒトβ型インターフェロン遺伝子が誘導する細胞死のメカニズム

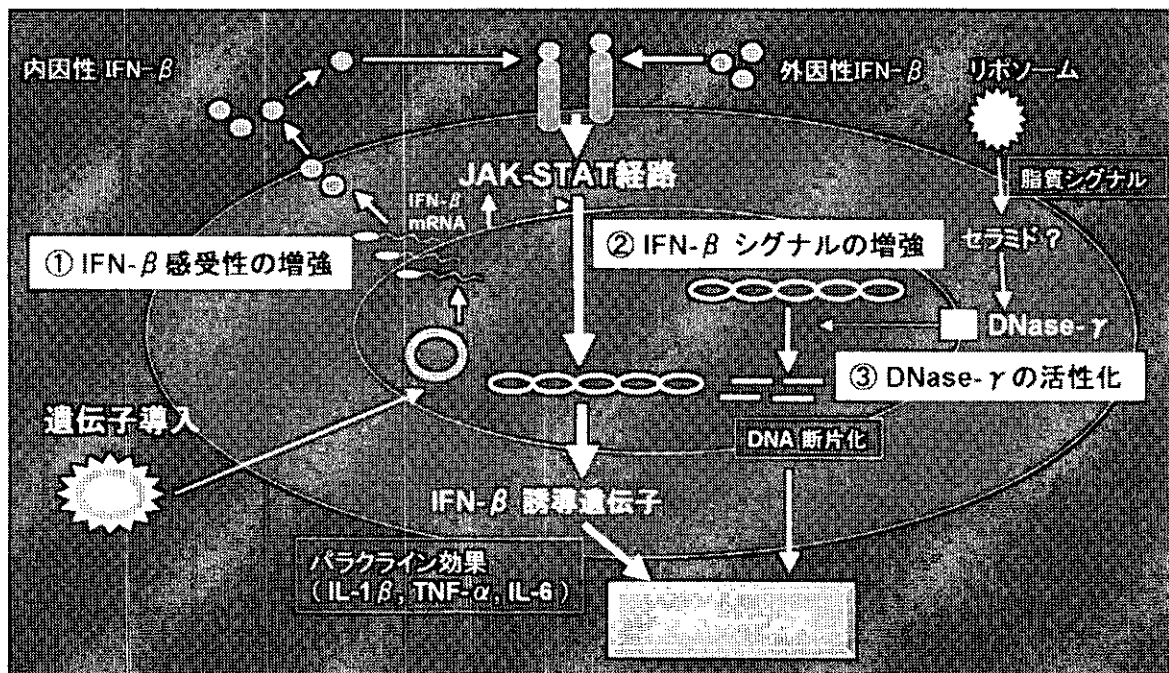
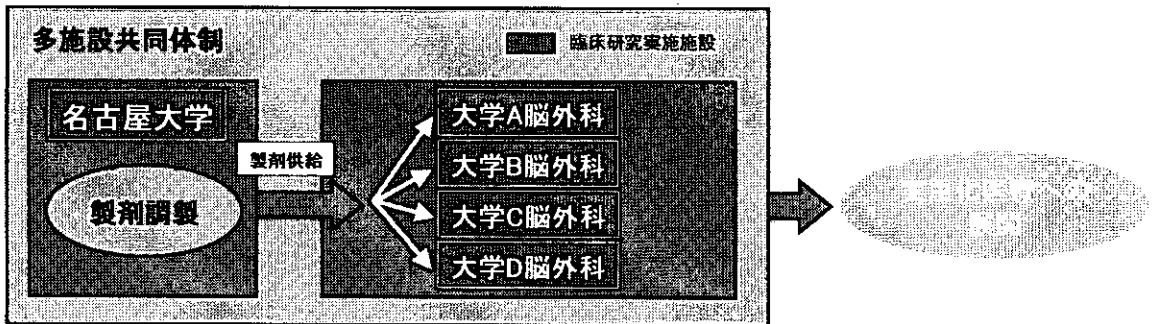


図3 ヒトβ型インターフェロン遺伝子治療臨床研究の適応拡大

1) 悪性グリオーマ : 新しい臨床研究のあり方のモデル1



2) 悪性黒色腫 : 新しい臨床研究のあり方のモデル2

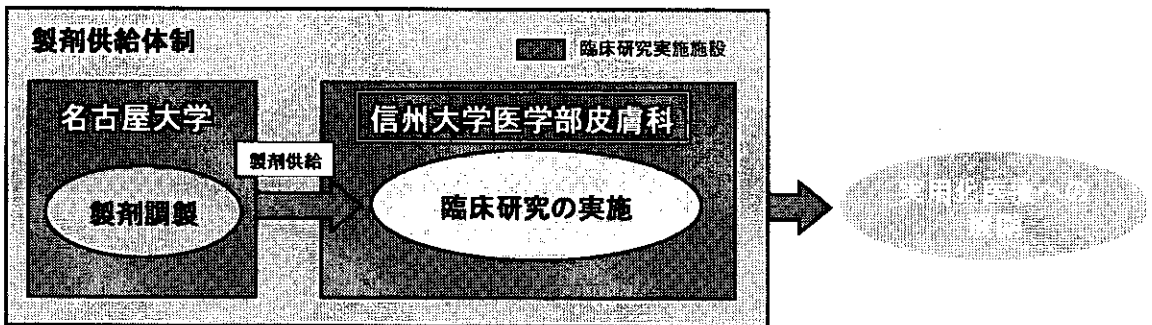


表1 悪性グリオーマに対するヒトβ型インターフェロン遺伝子治療臨床研究

症例番号	年齢/性	組織型	フォローアップ期間 (月)	生死
1	31/F	GBM	7	死亡
2	64/F	AA	8	生存
3	54/M	AA	7	生存
4	47/F	AA	2	生存
5	28/F	AA	1	生存

GBM: 膠芽腫 AA: 退形成性星細胞腫

研究要旨

タイプ III 変異 EGFR を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマより抗体遺伝子を単離し、組み換え型単鎖抗体を大腸菌発現系を用いて作製することに成功した。本年度は単鎖抗体の臨床応用のための抗体の修飾として lipid tag を付加した単鎖抗体を作製し、得られた抗体の活性について検討した。産生された抗体の ELISA 法による反応特異性の検討では、親抗体、及び lipid tag の付加されていない初代単鎖抗体とほぼ同様の反応性を保っていることが明らかになった。この抗体のリポソームへの結合能を検討したが、残念ながら結合は観察されなかった。また、初代単鎖抗体をイメージングに用いた際、腫瘍と共に腎臓への高い集積が認められた。この腎臓への集積について免疫組織学的に検討したところ、単鎖抗体は集合管に集積していることが認められた。

A. 研究の目的

腫瘍に特異的に発現する抗原を認識する組み換え型単鎖抗体 (scFv) を作製し、臨床応用のための基礎的検討を行うことが本研究の目的である。そのモデルとしてヒトグリオブラストーマを選択した。グリオブラストーマには EGFR (Epidermal growth factor receptor) の過剰発現が認められるが、この遺伝子の一部を欠損している腫瘍細胞があり、この欠損部の再構成の結果、正常な分子内には無い新しいアミノ酸が発現する。この分子は腫瘍特異的に発現しているため治療等の標的分子として非常に有望と思われる。そこでこの変異 EGFR を認識するマウスモノクローナル抗体 (3C10) を作製し、この抗体の組み換え型単鎖抗体、及び修飾単鎖抗体 (lipid-tag 付加: Fig. 1) を作製し、以下の基礎的検討を行った。

1) すでに得られた単鎖抗体より抗体遺伝子を単離し、lipid tag との融合蛋白作成用ベクターに組み込み、大腸菌を用いて単鎖抗体を産生させた。産生された抗体蛋白より、初代単鎖抗体と同様に、親抗体作製時に免疫源として用いた変異ペプチドによるアフィニティークラムを用いて活性ある抗体を精製した。

2) 得られた単鎖抗体の反応特異性を、ELISA 法を用いて、親抗体であるモノクローナル抗体、初代単鎖抗体と比較した。

3) 得られた lipid-tag 付加単鎖抗体のリポソームへの結合能を検討した。

4) 初代単鎖抗体の腎臓組織における分布を免疫組織学的に検討した。

B. 実験方法

1) lipid-tag 付加単鎖抗体の作製

初代単鎖抗体発現用ベクターより、抗体遺伝子を分離し、lipid-tag との融合蛋白作製用ベクター (pMAL3.7) に組み込んだ。発現は初代単鎖抗体と同様に IPTG 誘導により行い、菌体を回収した。lipid-tag 抗体は、大腸菌の細胞外膜脂質層に結合した形で産生されるため、回収した菌体より Triton X-100 を用いて菌体膜の可溶化を行い、不溶成分を遠心で除いた後、可溶化分画よりアフィニティークラムを用いて活性ある抗体分子を精製した。

精製された抗体は SDS-PAGE による分子量、および精製度の確認を行った。

2) 産生された単鎖抗体の活性測定

初代単鎖抗体、lipid-tag 単鎖抗体と親抗体であるモノクローナル抗体の活性評価には ELISA 法を用いた。抗原をコートしたプレートに各濃度の一次抗体を反応させた。単鎖抗体の検出には二次抗体 (抗 3C10 scFv ウサギ抗体) を反応させ、peroxidase 標識抗ウサギ IgG 抗体を用い発色させた。

3) 抗体のリポソームへの結合能の検討

lipid-tag 単鎖抗体及び初代単鎖抗体をリポソームと一晩混合後、遠心によりリポソームと可溶成分を分離した。それぞれの成分を SDS-PAGE 後、抗 3C10 scFv ウサギ抗体、peroxidase 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより抗体の検出を行い、結合能を検討した。

4) 単鎖抗体の腎臓への集積性の検討

99mTc 標識抗体を用いた単鎖抗体の生体内

分布を検討した際、腎臓組織への高い集積が観察された。そこで、今回未標識初代単鎖抗体 100 μ g を心臓より投与し、24 時間後に腎臓を摘出し、パラフィン切片作成後抗 3C10 scFv ウサギ抗体、peroxidase 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いて単鎖抗体の検出、観察を行った。

C. 実験結果

1) lipid-tag 単鎖抗体は大腸菌により産生し、ペプチドを用いたアフィニティークラムにより、活性ある抗体の精製を行うことができた。(Fig. 2)

2) ペプチド抗原を用いた ELISA の結果、親抗体、初代単鎖抗体と同様の反応特異性を保っていた。(Fig. 3)

3) 今回用いたリポソームとの結合能については、残念ながら観察できなかった。

4) 単鎖抗体は腎臓組織内では、糸球体、尿管細管にはほとんど検出されず、集合管に観察された。

D. 考察

親抗体とほぼ同様の反応性ある単鎖抗体、lipid-tag 付加単鎖抗体が作製できたが、予想に反してリポソームへの結合を認めなかった。しかしながら、この結果は、初代単鎖抗体が作製された後は、容易に各種修飾抗体を作製できる可能性を示したという点で、評価できると考えられる。

E. 結論

3C10scFv は大腸菌で効率的に産生でき、また、この抗体を元として、各種修飾抗体の作製が可能であることが明らかとした。この結果、今後のグリオーマ治療への応用のための様々な修飾抗体の作製が期待できる。

F. 研究発表

1. 発表論文

1) Aoki M, Mizuno M, Natsume A, Tsugawa T, Tsujimura K, Takahashi T, Yoshida J: Dendritic cells pulsed with tumor extract-cationic liposome complex increase the induction of cytotoxic T lymphocytes in mouse brain tumor. *Cancer Immunol. Immunother.* 50: 463-468, 2001

2) Yazaki M, Takahashi T, Mizutani K, Ito Y, Wakiguchi H, Inoue M, Kawa K, Kato K, Kato T, Saito H, and Togari H: Generation of

HLA-Cw specific cytotoxic T-lymphocytes from cord blood used for cord blood stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* (in press)

2. 学会発表

1) 高須俊太郎、岡本健太、中屋敷典久、吉川和宏、水野正明、若林俊彦、佐賀信介、吉田純、高橋利忠 : 99mTc を標識した Type III mutant EGFR を認識する単鎖抗体による神経膠腫の画像診断への応用。第 60 回日本癌学会総会 2001.9.28

2) 小幡裕一、高橋利忠 : SEREX 法によるがん抗原の同定 (シンポジウム) 第 60 回日本癌学会総会 2001.9.26

3) Takasu S, Okamoto K, Mizuno M, Wakabayashi T, Yoshikawa K, Takahashi T, Yoshida J: Specific targeting of glioma xenografts by 99m Technetium-labeled single chain variable fragment antibody recognizing type III mutant epidermal growth factor receptor. The American Association of Neurological Surgeons 69th Annual Meeting (Toronto, Canada) 2002. 4. 26

Fig 1. Lipid-tagged scFv

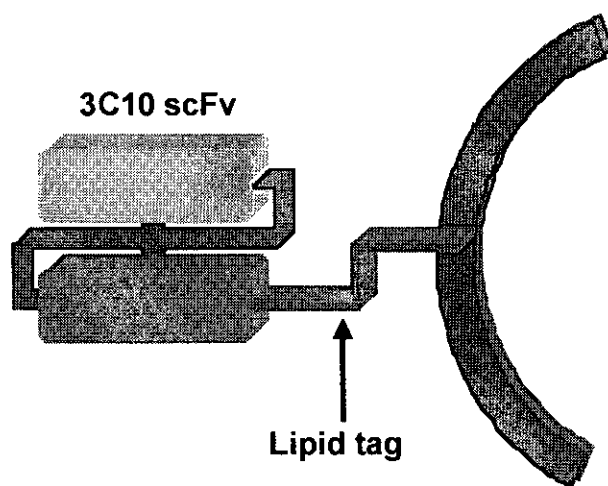


Fig 2. SDS-PAGE analysis of parental and lipid-tagged scFv

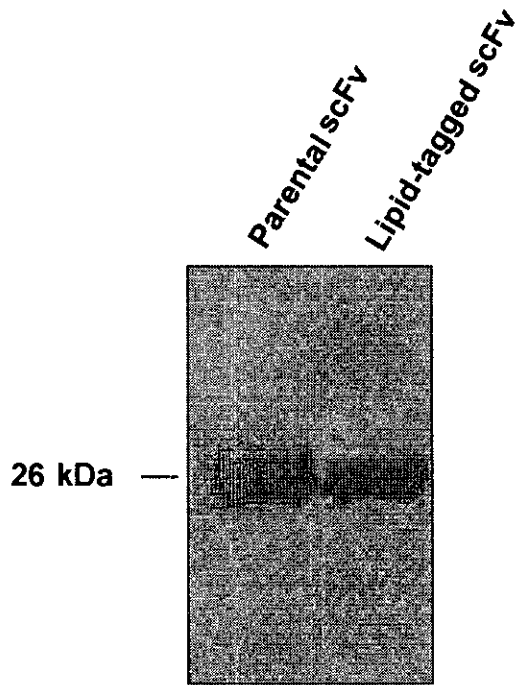
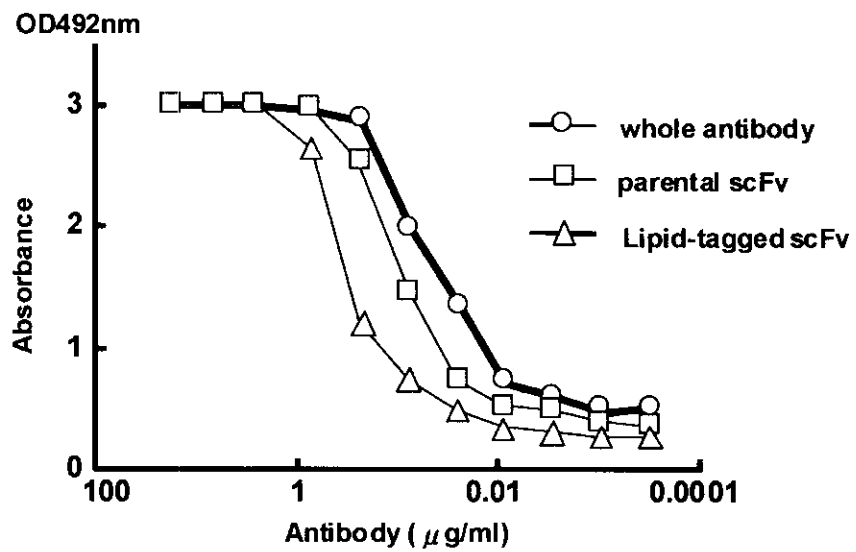


Fig 3. ELISA of lipid-tagged 3C10 scFv



研究要旨

悪性脳腫瘍は手術療法、化学療法、放射線療法を併用しても、その予後は極めて不良で、有効な治療法の開発が望まれている。近年、PPAR γ が前立腺癌、乳癌、大腸癌などの腫瘍細胞に発現し、そのリガンドの投与による細胞増殖の抑制が報告されている。しかしながら、脳腫瘍におけるPPAR γ の発現は検討されていない。そこで、開頭術により摘出され20例のグリオーマ組織、および9つの脳腫瘍細胞株におけるPPAR γ の発現を検討した。更に、細胞株にはPPAR γ のリガンドであるtroglitazoneを添加し、増殖抑制効果の有無を解析した。

3例のastrocytoma, 5例のanaplastic astrocytoma, 18例のglioblastomaにおけるPPAR γ の発現をRT-PCR法により検討すると95%と極めて高率にその発現が認められた。一方、9種類の脳腫瘍細胞株のうち2種類の細胞株(SK-MG-1, NB-1)においてPPAR γ mRNAの発現を認めた。これらPPAR γ 発現細胞株にtroglitazoneを添加した場合、非添加群と比較して有意な細胞増殖の抑制を認めた。一方、PPAR γ を発現していない細胞株では、troglitazoneによる増殖抑制を認めなかった。Troglitazoneは、2種類の細胞株の細胞周期には全く影響を与えなかった。従って、増殖抑制がアポトーシスの誘導によると考えられた。事実、各種のアポトーシス検出法を用い、troglitazoneの添加がSK-MG-1, NB-1細胞のアポトーシスを誘導することが確認された。以上、PPAR γ の発現している脳腫瘍細胞株ではリガンドによりPPAR γ を活性化することにより細胞の増殖抑制を引き起こし、その一部はアポトーシスを介することが明らかにされた。手術症例において95%という高率にPPAR γ の発現が認められ、PPAR γ のリガンドが脳腫瘍に対する新たな治療薬となる得る可能性が示された。

A. 研究目的

悪性脳腫瘍は、手術療法、化学療法、放射線療法を用いても5年生存率は10%と報告され、極めて予後不良の疾患である。従って、有効な治療法の開発が切望されている。

近年、核内受容体に属するperoxisomal proliferator activated receptor (PPAR γ)が発現する前立腺癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌等が存在することが示された。これらの癌細胞に対してPPAR γ のリガンドを投与すると、癌細胞の増殖抑制が引き起こされることが明らかにされ、PPAR γ の発現している癌細胞に対する新たな治療法として脚光を浴びつつある。一方、PPAR γ の発現は、主に肝臓、免疫組織、消化管そして脂肪組織に認められているが、中枢神経系においては網膜のみに発現し、その他の細胞での発現は報告されていない。また、脳腫瘍におけるPPAR γ の発現を検討した報告も認められない。

そこで、本研究では、脳腫瘍手術標本ならびに脳腫瘍細胞株におけるPPAR γ の発現を検討し、リガンドであるtroglitazoneのPPAR γ 発現細

胞株に対する増殖抑制効果の有無を解析した。さらに、troglitazoneによる細胞増殖抑制機序を検討した。

B. 研究方法

1. 脳腫瘍組織におけるPPAR γ 発現の検討

開頭術により摘出されたグリオーマ標本を用いた。3例のastrocytoma, 5例のanaplastic astrocytoma, 18例のgliomaの20標本よりtotal RNAを抽出し、RT-PCRによりPPAR γ mRNAの発現を検討した。

2. 脳腫瘍細胞株におけるPPAR γ 発現の検討

8種類のヒト神経膠芽腫由来の細胞株U-251MG, U-251SP, U-251nu/nu, AO2, T-98G, SK-MG-1, Jones, U178と1種類のヒト神経膠芽腫由来の細胞株NB-1を実験に用いた。それぞれの培養細胞よりtotal RNAを抽出し、Northern blot法を用いてPPAR γ mRNA発現を検討した。

3. 細胞増殖能の解析

Troglitazoneの細胞増殖能に対する影響を検討するため各細胞を96穴プレートに播種し、24時間後にtroglitazone (10 μ M)を添加した。これをday 0とし、day 0, 1, 3, 4に生存細胞数をCell Counting Kit (Dojindo,

Kumamoto, Japan)により検討した。

4. アポトーシスによる DNA 断片化の検出

アポトーシスの検出法として、TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling) 法を行った。TUNEL 法はアポトーシスにより断片化した DNA の末端にビオチン化した deoxyuridine を結合させ、そのビオチンを免疫組織学的に検出するもので、Clontech 社の ApoAlert™ DNA Fragmentation Assay Kit を用いて行った。更に、Clontech 社の ApoAlert LM-PCR Ladder Assay Kit を用い、DNA の断片化を確認した。

5. フローサイトメトリー

Troglitazone による細胞周期への影響およびアポトーシス誘導により細胞膜内側から外側に転移するフォスファチジルセリンの検出はフローサイトメトリーにより行った。細胞周期は propidium iodide による染色後解析し、フォスファチジルセリンの検出は FITC-conjugated Annexin V との結合により解析した。

C. 研究結果

1. 脳腫瘍標本における PPAR γ mRNA 発現の検討

20 症例の腫瘍標本中 19 例において PPAR γ mRNA の発現が認められた (図 1)。しかしながら、その発現度は 5 症例においては低く、また病理組織学的な悪性度との関連も認められなかった。

2. ヒト脳腫瘍細胞株における PPAR γ mRNA 発現の検討

Northern blot 法により、9 種類の細胞株の中で神経膠芽腫由来の SK-MG1 細胞と神経芽腫由来の NB-1 細胞に PPAR γ mRNA を示すバンドを認めた (図 2)。その他 7 種類の細胞株では PPAR γ に相当するバンドはなかった。さらに、これらの細胞株について RT-PCR 法を用いて PPAR γ の発現を検討したが、その発現は認められなかった。PPAR γ 遺伝子の発現は、そのリガンドにより誘導されることが知られている。そこで、SK-MG1 および NB-1 細胞において troglitazone の添加が PPAR γ mRNA の増加をもたらすか否かを検討した。図 3 に示す如く、SK-MG-1 細胞においては troglitazone 添加 12 時間後に、NB-1 細胞においては 12~48 時間後に PPAR γ mRNA の増加が認められ、この 2 つの細胞株に発現している PPAR γ が生物活性を有しているこ

とが示された。

3. Troglitazone 添加による細胞増殖抑制効果の検討

PPAR γ 発現株および非発現株を用いて、PPAR γ のリガンドである troglitazone の細胞増殖に対する作用を検討した。PPAR γ 発現株である SK-MG1 細胞および NB-1 細胞では、Troglitazone 添加後 4 日後において有意な細胞増殖の抑制が認められた (図 4)。一方、PPAR γ 非発現株である T98G, U251-SP, SK-MG-1, U-251MG, A02, U178, Jones 等のグリオーマ由来の細胞株では troglitazone 添加の有無に関わらず細胞増殖能には変化がなかった (図 4)。

Troglitazone 添加による細胞増殖の抑制は、用量依存性であり、20 μ M では、SK-MG-1、NB-1 共にその増殖が抑制された。

4. SK-MG-1、NB-1 細胞の分化に及ぼす troglitazone の影響

Troglitazone (20 μ M) 添加 4 日後の形態学的変化を観察したが、樹状突起の延長など分化を示す所見は認められず、細胞増殖の抑制が分化誘導によるのではなくアポトーシスの誘導によると考えられ、以下の実験を行った。

5. Troglitazone によるアポトーシス誘導の検討

細胞増殖抑制効果の認められた PPAR γ 発現株である NB-1 細胞および SK-MG1 細胞について、troglitazone による細胞増殖抑制効果がアポトーシスの誘導によるものか否かを検討した。

Troglitazone 存在下で 3 日間培養した後、LM-PCR Ladder Assay により DNA 断片化の検討すると、troglitazone 添加群では SK-MG1 細胞および NB-1 細胞においてアポトーシス誘導による DNA の断片化が認められた (図 5)。また、TUNEL 染色を行うと図 6 に示すように、SK-MG1 細胞および NB-1 細胞において TUNEL 陽性細胞 (矢頭) の増加を認めた。Annexin V との結合によるフォスファチジルセリンの細胞膜外側への転移をフローサイトメトリーにより検討すると図 7 の如く、troglitazone 添加により Annexin V 結合細胞の増加が SK-MG1 細胞および NB-1 細胞において認められた。

6. SK-MG-1、NB-1 の細胞周期に及ぼす troglitazone の影響

Troglitazone による細胞増殖抑制がセル

サイクルアレストによるか否かをフローサイトメトリーを用いて検討した。図8に示す如く、SK-MG-1、NB-1 何れの細胞においても troglitazone の添加により、G0 + G1、S、G2 + M 期の比率は変化しなかった。

D. 考察

PPAR γ が発現している悪性腫瘍に対してそのリガンドを投与することで、細胞増殖抑制を引き起こすことが前立腺癌、乳癌、大腸癌などで報告されている。しかしながら、脳腫瘍における検討はなく、今回我々は悪性脳腫瘍手術摘出標本において PPAR γ の発現が高率に認められることを示し、更に2種類の脳腫瘍細胞株において PPAR γ が発現していることを明らかにした。これらの細胞株にリガンドである troglitazone を添加することで細胞増殖抑制効果を認め、その抑制効果がアポトーシスを介していることを示した。

以上、PPAR γ のリガンドが脳腫瘍に対する新たな治療薬となる得る可能性が示された。

E. 結論

PPAR γ を発現する脳腫瘍細胞株で PPAR γ のリガンドが細胞増殖抑制を引き起こしたことより、PPAR γ を介する系路の活性化が脳腫瘍の治療法となりうる可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Kato, T. Nagaya, M. Fujieda, K. Saito, J. Yoshida, H. Seo: Growth inhibition of PPAR γ expressing brain tumor cells by its own ligand. *Environmental Medicine*, 45(1): 26-28, 2001.
2. D. Sarkar, T. Imai, F. Kambe, A. Shibata, S. Ohmori, S. Hayasaka, H. Funahashi, H. Seo: Overexpression of glutathione-S-transferase A1 in benign adrenocortical adenomas from patients with Cushing's syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(4): 1653-1659, 2001.
3. A. Shibata, Y. Hayashi, T. Imai, H. Funahashi, A. Nakao, H. Seo: Somatic gene alteration of AIB1 gene in patients

with breast cancer. *Endocrine Journal*, 48(2): 199-204, 2001

4. D. Sarkar, T. Imai, F. Kambe, A. Shibata, S. Ohmori, A. Siddiq, S. Hayakawa, S. Hayasaka, H. Funahashi, H. Seo: The human homolog of Diminuto/Dwarf1 gene (hDiminuto): A novel ACTH-responsive gene overexpressed in benign cortisol-producing adrenocortical adenomas. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(11), 5130-5137, 2001.
5. T. Imai, D. Sarkar, A. Shibata, H. Funahashi, T. Matsuyama-Morita, T. Kikumori, S. Ohmori, H. Seo: Expression of adrenocorticotropin receptor gene in adrenocortical adenomas from patients with Cushing syndrome: Possible contribution for the autonomous production of cortisol. *Annals of Surgery*, 234(1): 85-91, 2001.

2. 学会発表

1. 加藤美穂子, 長屋 敬, 齊藤 清, 吉田 純, 妹尾久雄: PPAR γ リガンドによる悪性脳腫瘍細胞株のアポトーシス誘導. 第74回日本内分泌学会学術総会, 2001. 6. (横浜)
2. 柴田有宏, 長屋 敬, 今井常夫, 中尾昭公, 舟橋啓臣, 妹尾久雄: 転写因子 NF- κ B による VEGF 遺伝子発現機構: 新たな乳癌治療のターゲット. 第74回日本内分泌学会学術総会, 2001. 6. (横浜)
3. 李 鍾国, 林 良敬, 三輪佳子, 張 麗艶, 妹尾久雄, 児玉逸雄: 甲状腺ホルモン受容体遺伝子導入による心臓電気特性の調節. 第74回日本内分泌学会学術総会, 2001. 6. (横浜)
4. 加藤美穂子, 長屋 敬, 齊藤 清, 妹尾久雄, 吉田 純: グリオーマにおける PPAR γ 発現の検討. 第60回日本脳神経外科学会総会, 2001. 10.

G. 知的所有権の取得状況 特になし

図1. 脳腫瘍手術例における PPAR γ mRNA の発現

RT-PCR 法を用いて PPAR γ mRNA の発現を検討した。症例 4, 5, 11, 12, 20 では、増幅度が低かった。

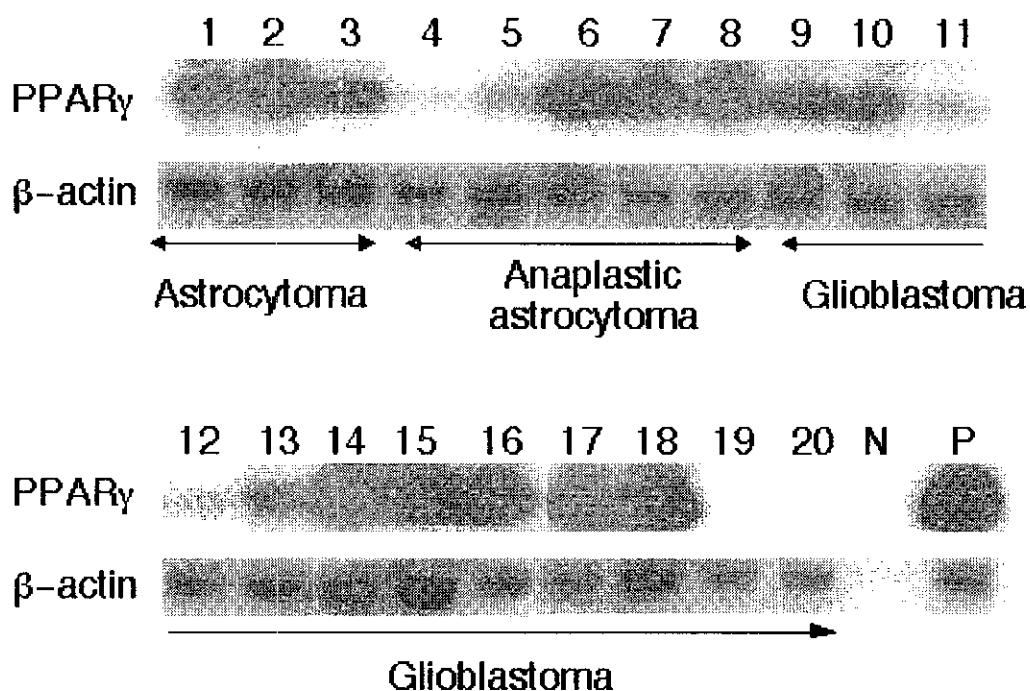


図 2. 脳腫瘍細胞株における PPAR γ mRNA の発現

ノーザンプロット法により PPAR γ mRNA の発現を検討した。発現の認められなかった細胞株については、RT-PCR 法による解析も行ったが、全て陰性であった。

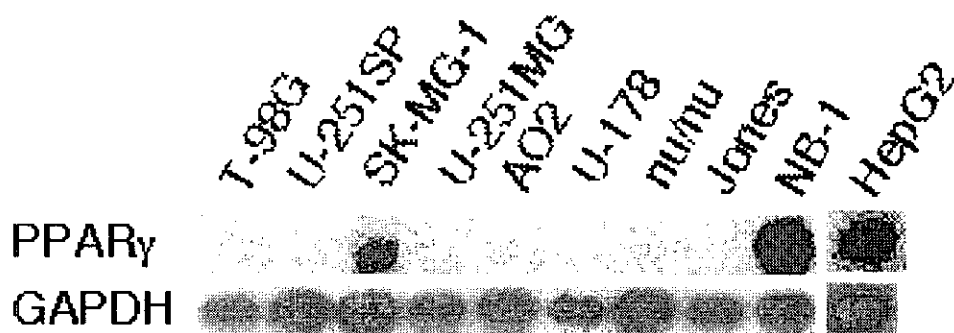


図3. PPAR γ 発現脳腫瘍細胞株におけるリガンド依存性のPPAR γ mRNAの増加

PPAR γ 遺伝子は、それ自身のリガンドの標的遺伝子であり、正の調節を受けることが知られている。SK-MG-1細胞においてはtroglitazone添加12時間後に、NB-1細胞においては12-48時間後にPPAR γ mRNAの増加が認められ、この2つの細胞株に発現しているPPAR γ が生物活性を有していることが示された。

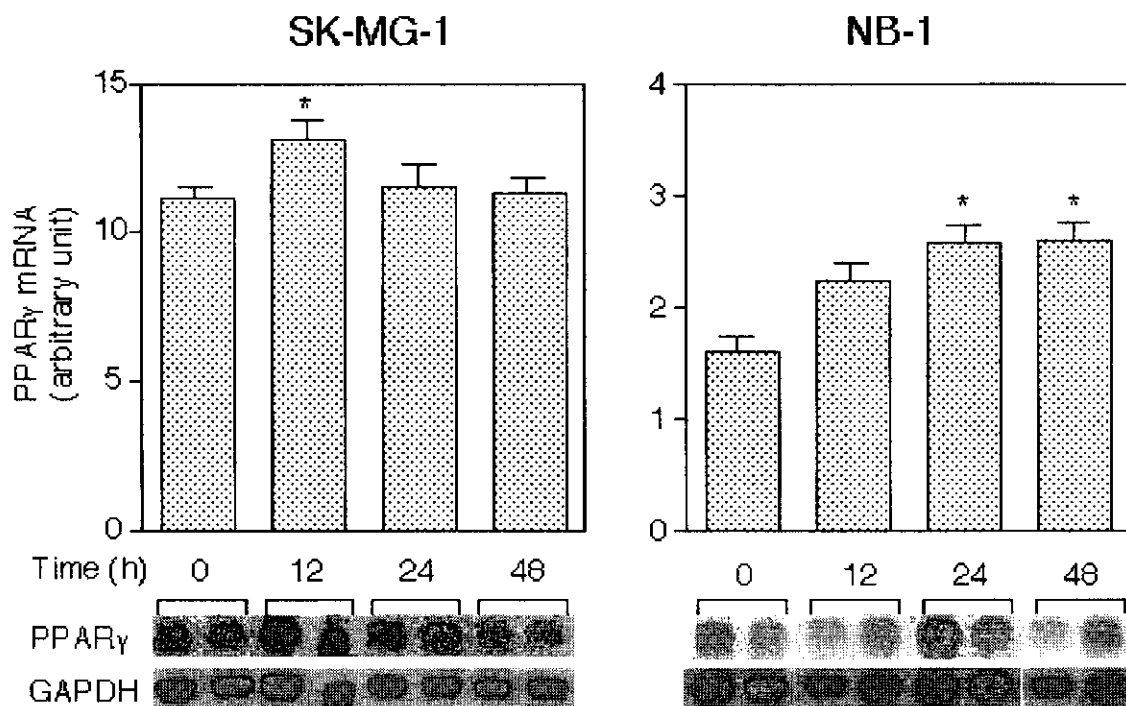


図4. PPAR γ 発現株におけるリガンド依存性の細胞増殖抑制
 G, Hに示されるSK-MG-1, NB-1の2細胞株がPPAR γ 発現株で増殖抑制が明らかである

