

図5. TroglitazoneによるPPAR $\gamma$ 発現株におけるDNA断片化の誘導  
 MWMは分子量マーカー、Pはキットに添付されているアポトーシス陽性DNA

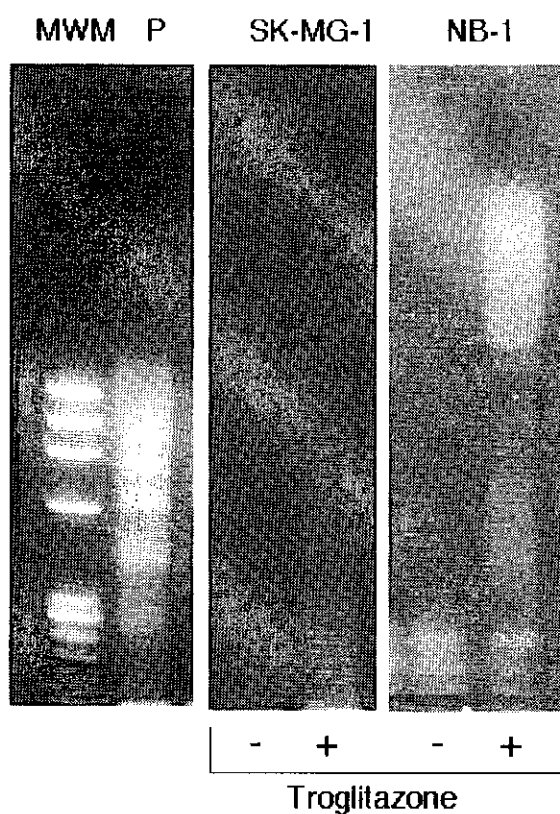


図6. Troglitazone (Tro)によるPPAR $\gamma$ 発現株におけるTUNEL陽性細胞の誘導  
 Tro添加によりTUNEL陽性細胞 (arrow)が増加する。

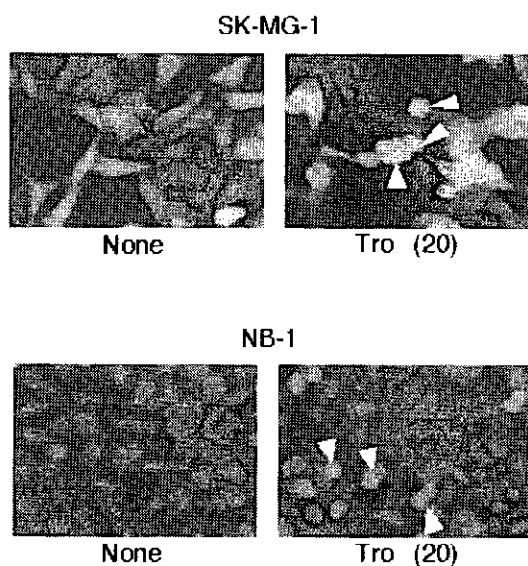
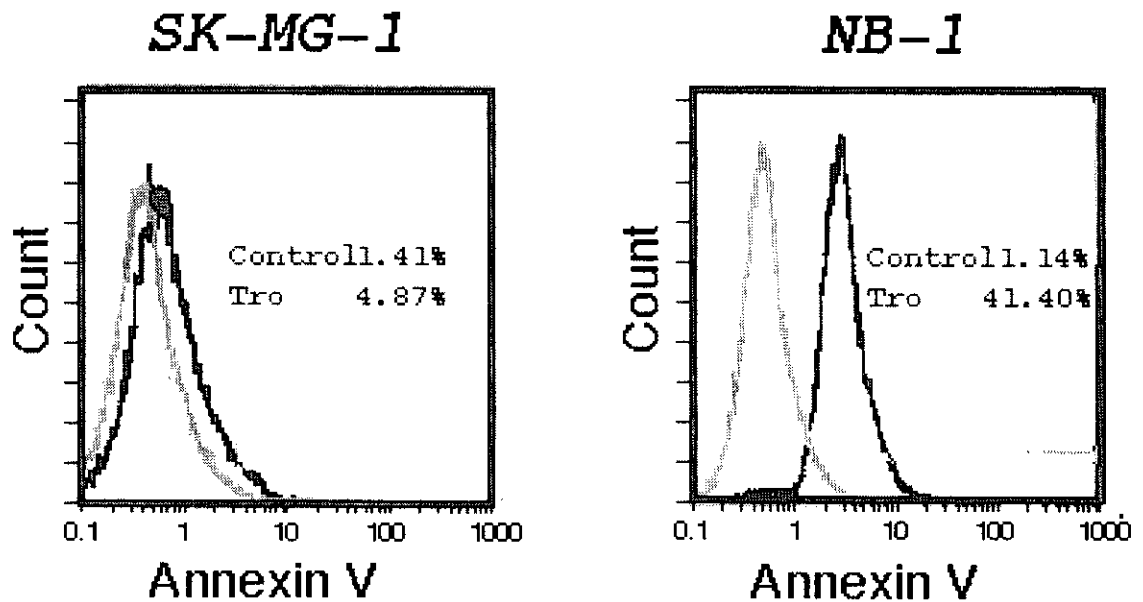


図7. Troglitazone (Tro) による PPAR $\gamma$  発現株における Annexin V 結合細胞の増加  
Tro 添加により SK-MG-1 では Annexin V 結合細胞が 3.5 倍に、NB-1 細胞では 36.3 倍に増加する。灰色線：Tro 非添加群、黒線：Tro 添加群、



## 研究要旨

磁性微粒子を用いた細胞内加温ガン温熱治療において hsp70 タンパク質の添加でガン免疫が増強されることがわかった。サイトカイン療法や遺伝子療法との併用でガン治療の効果が増強すると期待できる。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。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。細胞内の遺伝子発現ネットワーク等の構築についても検討した。

### A. 研究目的

本研究では、我々が提案している温熱療法とサイトカイン遺伝子治療との併用療法による治療効果の飛躍的向上だけでなく、サイトカイン遺伝子治療全体の最適な治療プロトコルの提案を目指したシステム工学的研究を行う。

温熱治療の効果はヒートショックタンパク質(hsp)の発現によって向上することを既に確認している。またこれは、ガン免疫の増強という機構が働いていることを明らかにした。そこで、サイトカイン投与による hsp70 の発現増強、あるいは、hsp70 投与によるガン免疫の増強を調べる。さらに hsp70 導入細胞による温熱細胞死についても調べる。最適な治療プロトコルの提案に向けたシステム工学的な取り組みとして、細胞内の遺伝子発現と遺伝子発現ネットワークの解析が欠かせない。死滅過程における細胞内の分子応答メカニズムを明らかにするため、DNA チップを用いて遺伝子発現データを経時的に計測し、知識情報処理の手法を用いて解析を行う。ガンの悪性度や予後の関係などの生体反応についても調べる。さらに、遺伝子ネットワークを明らかにするため、必要なツールの開発を行う。

### B. 研究方法

温熱療法に関しては以下のように行った。ガン細胞として T-9 ラットグリオーマを移植した F344 ラット用い、hsp は温熱治療を施した組織から、定法通り ADP カラムを用いて抗原結合型 hsp として精製した。この hsp20  $\mu$ g を F344 ラットに注入し、グリオー

マの生着（チャレンジ）を検討した。

知識情報処理に関しては以下のように行った。モデルケースとして酵母の胞子形成過程の遺伝子発現プロファイルを解析した。従来のクラスタリング手法である階層的クラスタリングや k-mean クラスタリングを比較のために行った。予後の推定にはリンパ腫の患者 40 名の4年生存率と、5857 遺伝子の遺伝子発現プロファイルのデータを用いた。必要な発現データを迅速に絞り込むため、SWEEP 演算子と変数増加法を組み合わせた入力選択法を開発し、ファジィニューラルネットワーク (FNN) モデリングと組み合わせた。

### C. 研究結果

#### ①hsp70 添加による温熱療法の効果増大

サイトカイン療法との併用効果を調べる前に、まず、hsp を添加することで治療効果が上がるかどうかを確認した。hsp を F344 ラットに注入し、グリオーマの生着を検討したところ、5 匹中 1 匹で腫瘍が拒絶され、明らかなガン免疫の増強が確認できた。

#### ②hsp 遺伝子療法

上記の結果から、hsp70 遺伝子を用いる温熱遺伝子療法が提案できる。このため、hsp 遺伝子を CMV プロモータの下流につなぎ込んだプラスミド pCMV-HSP を入手し、この遺伝子をラットグリオーマにリポソーム法でトランスフェクションし、形質転換細胞を構築中である。

#### ③適応共鳴理論 (ART) などによる遺伝子発現情報のクラスタリング

遺伝子発現の因果関係を解析するために、経時的に採取した遺伝子発現データの発現

パターン変化から、発現遺伝子のクラスタリングを行う必要がある。そこで、教師信号なし学習によってクラスタリングができる適応共鳴原理 (ART) に基づく Fuzzy ART を開発した。クラスター数が未知の遺伝子発現解析には好適と考えられる。酵母の胞子形成過程の遺伝子発現プロファイルに適用したところ、従来のクラスタリング手法に比べ、生物学的に正しいクラスターが生成された。また、このクラスタリング手法が実験誤差などの外乱に強く、遺伝子発現プロファイルのクラスタリングに適していることが分かった。

④人工ニューラルネットワーク (ANN) 等による遺伝子発現解析

DNAチップを使うと細胞の遺伝子発現情報が網羅的に得られる。細胞の生理的な反応と遺伝子発現の因果関係を明らかにするツールは現在のところない。このため、入出力データ間の因果関係を正確に表現できるファジィニューラルネットワーク (FNN) を遺伝子発現解析に適用した。この手法をリンパ腫患者の4年生存率の解析に適用してところ、従来法では72%であるのに対して、93%という高い正答率で推定できることが判明した。また、選択された遺伝子はわずかに4つであり、遺伝子発現と生体応答を解析するには極めて優秀なツールであることがわかった。

#### D. 考察

hsp70 添加による温熱療法で効果があがることから、hsp70 を増加させる機能のあるサイトカインとの併用で治療効果があがることが期待できる。遺伝子療法との併用も可能であろう。Fuzzy-ART は遺伝子発現のクラスタリングを行うことができ、FNN は遺伝子発現と生体応答を解析できるツールであることがわかった。

#### E. 結論

温熱療法に関しては、hsp 添加が効果的であることがわかり、遺伝子療法との併用による治療効果の向上が期待される結果となった。遺伝子発現解析に関しては Fuzzy ART というクラスタリングツールと FNN というモデリングツールを開発した。細胞内の遺伝子ネットワークの解析に関しては現在検討中である。

#### F. 研究発表

##### 1. 学会発表

1) S. Tomida, T. Hanai, H. Honda, T.

Kobayashi : Gene expression analysis using Fuzzy ART, Abstract of GIW2001, 245 - 246 (2001)

- 2) T. Ando, T. Hanai, H. Honda, T. Kobayashi : Prognostic prediction of lymphoma by gene expression profiling using FNN, Abstract of GIW2001, 247 - 248 (2001)
- 3) 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)

分担研究者 田沼靖一 東京理科大学薬学部教授

## 研究要旨

DNase  $\gamma$  はアポトーシスの DNA 断片化を触媒するエンドヌクレアーゼの一つである。本年度はアポトーシスにおける DNase  $\gamma$  の生理的役割を理解することを目的とし、発生過程における神経細胞分化過程に見られる神経細胞死と DNase  $\gamma$  遺伝子発現との関係をマウス胎生期の脳、及びラット中枢神経由来株 B50 細胞の神経様細胞分化系を用いて検討した。その結果、DNase  $\gamma$  がアポトーシス実行因子として働く生理的的局面として神経細胞分化過程における細胞死が明らかとなった。

### A. 研究目的

DNase  $\gamma$  はアポトーシスの DNA 断片化を触媒するエンドヌクレアーゼの一つであり、癌化によりその遺伝子発現が強く抑制されることを報告している。昨年度の研究成果として DNase  $\gamma$  遺伝子のプロモーター解析を行い、5' 上流に転写抑制領域が存在することを明らかにした。本年度はアポトーシスにおける DNase  $\gamma$  の生理的役割を理解することを目的とし、発生過程における神経細胞分化過程に見られる神経細胞死と DNase  $\gamma$  遺伝子発現との関係をマウス胎生期の脳、及びラット中枢神経由来株 B50 細胞の神経様細胞分化系を用いて検討した。

### B. 研究方法

DNase  $\gamma$  遺伝子発現変化はノザンブロット法、RT-PCR法を用いて行った。DNase  $\gamma$  遺伝子の発現抑制は、ラット DNase  $\gamma$  オープンリーディングフレームを逆向きに挿入した動物細胞発現ベクターを標的細胞に導入、アンチセンス RNA を安定発現させることにより行った。

（倫理面への配慮）

細胞レベル及び遺伝子レベルでの研究であるので、倫理面での配慮は特に必要ない。

### C. 研究結果

マウスの各胎生期の脳における DNase  $\gamma$  遺伝子発現をノザンブロット法を用いて調べたところ、DNase  $\gamma$  遺伝子の発現は胎生12日頃から始まり、14、16日においてピークを迎え、18日以降減少することが明らかになった。この発現量の変化は既に報告されている脳の発

生過程における生理的な細胞死の量的変化と一致していた。そこで DNase  $\gamma$  の神経細胞死における DNA 断片化への関与を、ラット中枢神経由来細胞株である B50 細胞を用いて検討した。B50 細胞はジブチリル cAMP の添加により神経細胞へ分化し、さらに DNA 断片化を伴う細胞死が観察される。この一連の過程における DNase  $\gamma$  遺伝子の発現変動を調べたところ、神経細胞への分化後期、アポトーシスの誘発に先行し誘導されることが分かった。さらに、このとき観察される DNA 断片化はアンチセンス DNase  $\gamma$  発現ベクターの導入により抑制された。

### D. 考察

以上より、B50 細胞の神経細胞分化後の細胞死に伴う DNA 断片化は DNase  $\gamma$  が触媒していることが明らかになった。また、DNase  $\gamma$  が脳の発生過程における生理的な細胞死における DNA 断片化に関与することが示唆された。

### E. 結論

本研究において、DNase  $\gamma$  がアポトーシス実行因子として働く生理的的局面として神経細胞分化過程における細胞死が明らかとなった。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1: 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.

2: 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.

3: 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.

4: 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.

5: 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.

6: 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.

7: 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

丸田英晴、田沼靖一

アポトーシス細胞の食食除去機構に関する細胞膜シグナラーゼについて 2001.2.10 名古屋大学医学部 第5回東海アポトーシス研究会

丸田英晴、田沼靖一

アポトーシス細胞の食食除去機構に関する細胞膜シグナラーゼの解析 2001.3.28 ロイトン札幌 日本薬学会第121年会

塩川大介、田沼靖一

交感神経様 B50 細胞における神経細胞死の分子機構 2001.3.28 ロイトン札幌 日本薬学会第121年会

田沼靖一

UV 照射によって誘導される表皮細胞のアポトーシス制御機構 2001.3.28 ロイトン札幌 日本薬学会第121年会

田沼靖一

UV 照射によって誘導されるアポトーシスにおける caspase 活性制御機構 2001.8.24 東京歯科大学 アポトーシス研究会第10回研究集談会

塩川大介、田沼靖一

神経系細胞死の分子機構 2001.8.24 東京歯科大学 アポトーシス研究会第10回研究集談会

田沼靖一

UV 照射によって誘導される表皮細胞のアポトーシス制御機構 2001.9.26 パシフィコ横浜 第60回日本癌学会

田沼靖一

ナベルピンによるヒト培養癌細胞でのアポトーシス誘導機構に関する解析 2001.9.26 パシフィコ横浜 第60回日本癌学会

内海文彰、田沼靖一

Smbp-2 タンパク質の機能と発現の解析 2001.10.25 京都国際会館 第74回日本生化学会

塩川大介、田沼靖一

ヒト DLAD 遺伝子構造及びリコンビナントタンパクの性状検討 2001.10.25 京都国際会館 第74回日本生化学会

丸田英晴、田沼靖一

新規 NAD+ピロホスホリラーゼの cDNA クローニング 2001.10.25 京都国際会館 第74回日本生化学会

丸田英晴、田沼靖一  
ポリ (ADP-リボース) グリコヒドロラーゼの  
プロモーター領域の解析 2001. 10. 25 京都  
国際会館 第74回日本生化学会

塩川大介、田沼靖一  
交感神経様細胞 B50 細胞における細胞死の  
分子機構 2001. 10. 28 京都国際会館 第74  
回日本生化学会

塩川大介、田沼靖一  
抗 DNase  $\gamma$  モノクローナル抗体の作製及び  
性状検討 2001. 10. 28 京都国際会館 第74  
回日本生化学会

田沼靖一  
ヒトケラチノサイトにおけるUVB 照射による  
アポトーシス誘導機構 2001. 10. 28 京都国  
際会館 第74回日本生化学会

田沼靖一  
ADAM9, 10, 17の発現と生理活性の比較研究  
2001. 10. 28 京都国際会館 第74回日本生化学  
会

田沼靖一  
可溶性 Fas リガンドは炎症性サイトカイン  
産生を抑制するサイトカインとして機能  
する 2001. 12. 9 パシフィコ横浜 第24回日

本分子生物学会

塩川大介、田沼靖一  
DNase  $\gamma$  欠損マウスの作製と解析  
2001. 12. 10 パシフィコ横浜 第24回日本分  
子生物学会

内海文彰、田沼靖一  
天然の化合物によるHIV プロモーター活性の  
抑制 2001. 12. 11 パシフィコ横浜 第24回  
日本分子生物学会

田沼靖一  
ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ-1による  
DNA 依存性プロテインキナーゼの活性  
化機構 2001. 12. 11 パシフィコ横浜 第24  
回日本分子生物学会

丸田英晴、田沼靖一  
ポリ (ADP-リボース) グリコヒドロラーゼと  
相互作用する因子の単離 2001. 12. 11 パシ  
フィコ横浜 第24回日本分子生物学会

塩川大介、田沼靖一  
細胞分化過程におけるアポトーシスとDNase  
 $\gamma$   
2002. 2. 2 名古屋大学医学部 第6回東海ア  
ポトーシス研究会

## 研究要旨

皮膚癌の中でもっとも悪性度の高い悪性黒色腫（メラノーマ）に対する正電荷多重膜リポソーム包埋ヒト B 型インターフェロン遺伝子を用いる遺伝子治療の開発をめざし、基礎的研究を前年度に引き続いて進めた。これらの基礎データに基づいて遺伝子治療臨床研究の開始へむけ、プロトコルを検討し、申請書類を作成した。これを信州大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会と医学部倫理委員会へ提出し、平成 14 年 3 月 4 日に承認がえられた。今後、中央省庁へ申請し、認可を待って早期に臨床試験を開始する予定である。なお、その他の関連する研究として、SEREX 法による新規メラノーマ抗原の同定を行うとともに、メラノーマ抗原ペプチドや樹状細胞を用いる免疫療法の臨床研究を実施し、一定の臨床効果を認めた。

### A. 研究目的

主任研究者の吉田らが開発した正電荷多重膜リポソーム包埋ヒト B 型インターフェロン遺伝子製剤 IAB-1 の皮膚癌、とくに悪性黒色腫への有用性を検討する。

### B. 研究方法

前年度までの *in vitro* および *in vivo* の研究に引き続いて、吉田・木野らと共同で悪性黒色腫に対する B 型インターフェロン遺伝子の効果につき基礎研究を進める。これらの研究結果から、本製剤が進行期悪性黒色腫患者の遺伝子治療薬として有望と判断されたら、臨床研究の開始へ向けてプロトコルを検討、作成し、学部・附属病院の関係委員会へ申請を行い、臨床研究の開始へ向けて準備する。また、新たなメラノーマ抗原の同定や樹状細胞療法についても検討を進める。

#### （倫理面への配慮）

名古屋大学医学部附属病院遺伝子治療製剤調製室において作製される本遺伝子製剤の規格・品質は GLP などの基準に基づき十分に保証されている。生物学的な安全性についても既に吉田らがグリオーマの臨床研究開始に先立ってラットやカニクイザルなどで十分に検討し、確認されている。また、臨床試験の実施に際しては、患者側から文書に基づく綿密なインフォームドコンセントをえることを前提としており、かつ学部・附属病院の当該委員会の慎重な審査を経たうえで施行されるものであり、倫理面への配慮は十分であるといえる。

### C. 研究結果

1) 悪性黒色腫に対する B 型インターフェロン遺伝子の効果に関する基礎研究：

これまでにヒト悪性黒色腫細胞に対する正電荷多重膜リポソーム包埋ヒト B 型インターフェロン遺伝子の効果を *in vitro* 及びヌードマウス移植の *in vivo* 実験系で確認してきた。本年度はまず、B16 マウスメラノーマ細胞において遺伝子製剤の繰り返し投与が導入効率を有意に高めることを確認した。また、B16 マウスメラノーマ・C57BL/6 マウスの系において、正電荷多重膜リポソーム包埋マウス B 型インターフェロン遺伝子が腫瘍結節の増大を B 型インターフェロン蛋白に比べ、有意に強く抑制することを確認し、この系では NK 細胞が腫瘍増大抑制に大きな役割を果たしていることを見出した。さらに、2カ所に移植したマウスメラノーマの一方に B 型インターフェロン遺伝子製剤を局注することにより、他方の腫瘍結節にも増大抑制効果がえられることを明らかにした。

2) 正電荷多重膜リポソーム包埋ヒト B 型インターフェロン遺伝子製剤 IAB-1 を用いる進行期悪性黒色腫の遺伝子治療臨床研究開始へ向けての準備状況：

これまでの基礎研究にて悪性黒色腫に対する正電荷多重膜リポソーム包埋ヒト B 型インターフェロン遺伝子の有用性が確認されたので、臨床研究開始へ向けて準備を進めた。悪性黒色腫に関するこれまでのデータを整理するとともに、吉田らがグリオーマの遺伝子治療臨床研究の申請に際して整えた研究資料も参照し、臨床試験のためのプロトコルを作



成した。これをもとに「正電荷多重膜リポソーム包埋ヒトβ型インターフェロン遺伝子を用いる進行期悪性黒色腫の遺伝子治療臨床研究」の申請書を作成し、信州大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会へ申請した。遺伝子製剤は IAB-1 の凍結剤あるいは凍結乾燥剤を名古屋大学医学部附属病院遺伝子治療製剤調製室より輸送して用いる。対象は皮膚、皮下あるいはリンパ節に転移巣を有する第 IV 期の悪性黒色腫患者とする。各転移巣に 1 回量 30μg の DNA を週 3 回、計 6 回局注する。第 1 例目で安全性を確認後、dose escalation し、一時に 5 個までの転移巣に同様の局注を行い、効果が確認された場合は計 3 コースまで繰り返すことができるものとする。臨床的に注意深く観察して効果と安全性を評価するとともに、適宜に検体を採取し、遺伝子の発現、アポトーシスの誘導、浸潤細胞の解析などを行う。以上の内容を骨子とする申請書が平成 14 年 3 月 4 日に遺伝子治療臨床研究審査委員会にて審査され、適正な臨床研究であると判定され、同日に開催された医学部倫理委員会においても承認された。今後、中央の省庁へ書類を上げて、許可がえられれば、早急に臨床試験を開始する予定で準備を整えている。

3) 樹状細胞及びメラノーマ抗原ペプチドを用いる進行期悪性黒色腫の臨床試験：

東大医科研先端診療部の山下直秀博士、慶應大医学部河上裕博士らと共同で、進行期悪性黒色腫患者から leukapheresis でえた樹状細胞を GM-CSF と IL-4 で増やし、自家悪性黒色腫細胞融解液でパルスし、TNF-α で成熟化して患者の皮内へ注入する樹状細胞療法を 10 例に施行した。うち 2 例でかなり大きな転移巣の完全消失が認められた。しかし、新生する転移巣もみられ、mixed response と判定された。一部の症例では皮内反応の増強や CTL の誘導を示唆する所見もみられた。また、東大医科研田原秀晃博士らと共同で HLA-A2, -A24 で提示されるメラノーマ抗原 gp100 のペプチドを用い、同じく進行期悪性黒色腫患者に対するペプチド療法を施行した。ペプチドをフロインドアジュバントとともに接種したところ、転移巣の一時的縮小や白斑の出現などの効果が一部の症例で認められた。

4) SEREX 法による新規メラノーマ抗原の同定：

原発巣の自然消退現象と白斑を伴い、リンパ節転移をきたしていたにもかかわらず予後

の良い悪性黒色腫患者の血清を用い、SEREX 法 (serological analysis of antigens of recombinant cDNA ex-pression cloning) にて新規メラノーマ抗原の検出を試みた。悪性黒色腫細胞株 SK-mel23 由来の mRNA をこの患者血清でスクリーニングし、IgG 抗体で認識される 50 個の陽性クローンをえた。このうち 6 個が機能不明な蛋白をコードする cDNA であった。その中の一つ、KU-MEL-1 は悪性黒色腫細胞とメラノサイト及び一部の癌細胞に発現していたが、正常組織には精巣を除いて発現がみられなかった。この KU-MEL-1 蛋白に対する IgG 抗体は悪性黒色腫患者 (9/29) と他の癌患者 (9/26)、および Vogt-Koyanagi-Harada 病患者 (7/11) で検出されたが、健常人 30 人ではまったく検出されなかった。なお、KU-MEL-1 蛋白は 665 アミノ酸よりなり、一部で β-カテニンの armadillo repeats と homology を有することが明らかにされた。

#### D. 考察

悪性黒色腫の遺伝子治療に関しては、これまでの基礎研究により正電荷多重膜リポソーム包埋ヒトβ型インターフェロン遺伝子がきわめて有望であることが確認されている。今年度の研究では、繰り返し投与が遺伝子発現効率を高めること、B16 マウスメラノーマの系で NK 細胞が奏効機序に関与していること、非局注結節への効果も含めた全身の効果も期待できること、などが明らかにされた。これらのデータを根拠に臨床試験の申請を行い、現在、信州大学医学部内の承認をえたところである。今後、中央省庁の認可をえて、早急に臨床試験を開始する予定である。

本遺伝子治療に関しては、将来的には樹状細胞療法との併用もきわめて有用と考えられるので、その方面の研究も進めた。その結果、進行期悪性黒色腫患者に対する樹状細胞療法やペプチド療法にて一定の臨床効果がうかがえたことは大きな成果である。さらにまた、SEREX 法にて新たなメラノーマ抗原 KU-MEL-1 を発見することができた。

#### E. 結論

正電荷多重膜リポソーム包埋ヒトβ型インターフェロン遺伝子を用いる進行期悪性黒色腫の遺伝子治療臨床研究を開始する準備が整った。また、同遺伝子治療と樹状細胞療法の併用へ向けて基礎的、臨床的研究を進め、成果を上げた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kageshita T, Mizuno M, Ono T, Matsumoto K, Saida T, Yoshida J. Growth inhibition of human malignant melanoma transfected with the human IFN- $\beta$  gene by means of cationic liposomes. *Melanoma Res* 11, 337-342, 2001
- 2) Saida T. Recent advances in melanoma research. *J Dermatol Sci* 24, 1-13, 2001
- 3) Ishihara K, Saida T, Yamamoto A. Updated statistical data of malignant melanoma in Japan. *Int J Clin Oncol* 6, 109-116, 2001
- 4) Kageshita T, Hamby CV, Ishihara T, Matsumoto K, Saida T, Ono T. Loss of  $\beta$ -catenin expression associated with disease progression in malignant melanoma. *Br J Dermatol* 145, 210-216, 2001
- 5) Kiniwa Y, Fujita T, Akada M, Ito K, Shofuda T, Suzuki Y, Yamamoto A, Saida T, Kawakami Y: Tumor antigen isolated from a patient with vitiligo and T-cell-infiltrated melanoma. *Cancer Res* 61, 7900-7907, 2001
- 6) 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-cysteinyldopa as a marker of melanoma progression: 10 years' experience. *Melanoma Res* 12, 2002 (in press)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 小口真司、齋田俊明：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
- 10) 齋田俊明：皮膚の早期癌・境界病変. *病理と臨床*, 19 (臨時増刊号): 218-223, 2001
- 11) 齋田俊明、山本明史 (編)：悪性黒色腫の診断・治療指針、金原出版、東京、2001
- 12) 齋田俊明：ホクロ、メラノーマ. *臨外* 56: 1382-1383, 2001
- 13) 石原和之、齋田俊明、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

- 14) 齋田俊明、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: 158-169, 2001

- 15) 齋田俊明、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

- 16) 齋田俊明：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

- 17) 齋田俊明：ほくろはメラノーマになるか? *日皮会誌* 111: 1790-1792, 2002

- 18) 齋田俊明：イボと皮膚癌. *臨外* 57:216-218, 2002

### 2. 学会発表

- 1) Saida T: Acral pigmented lesions (Tutorial), 1st World Congress of Dermoscopy, Rome, Italy, 2001.2.
- 2) 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
- 3) Kiniwa 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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

- 7) 齋田俊明：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
- 8) 齋田俊明：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
- 9) 山崎自子、宇原 久、齋田俊明：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
- 10) 野呂佐知子、山本明史、山崎直也、山崎自子、宇原 久、齋田俊明：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
- 11) 小金平容子、村田 浩、齋田俊明、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、カルポニン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
- 12) 小金平容子、竹岡みち子、村田 浩、齋田俊明、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
- 13) 宇原 久、関 詩穂、林 宏一、小口真司、齋田俊明：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
- 15) 山崎自子、小口真司、松本和彦、齋田俊明、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ランス。第21回医療情報学連合大会、東京、2001.11

G. 知的所有権の取得状況  
とくになし。

## 研究要旨

長期保存型ヒトβ型インターフェロン遺伝子包埋リポソーム製剤（凍結乾燥製剤）の大量調製法の確立と調製施設の準備が完了し、他施設への製剤供給体制が整備できた。

正電荷リポソーム包埋ヒトβ型インターフェロン遺伝子で誘導される細胞死のメカニズムには、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、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。③①と②の状況が細胞に備わった上で、リポソームが細胞膜と相互作用することで最終的には DNase ④が活性化されることがわかった。これらのメカニズムの解明は、インターフェロン遺伝子治療をより効果的なものにするのに役立つと考えられた。

## A. 研究目的

本年度は、長期保存型ヒトβ型インターフェロン遺伝子包埋リポソーム製剤（凍結乾燥製剤）の大量調製法の確立とヒトβ型インターフェロン遺伝子包埋リポソーム製剤で誘導される細胞死のメカニズムの解明に関する研究を行った。

## B. 研究方法

1) 長期保存型ヒトβ型インターフェロン遺伝子包埋リポソーム製剤（凍結乾燥製剤）の大量調製法の確立：平成12年4月にスタートした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支えた遺伝子治療製剤は液剤であり、その有効期間はわずか1ヶ月であった。このため、緊急時の対応ができない、追加治療ができない等の問題点を抱えていた。これを打開するために、中長期保存型の遺伝子治療製剤の開発が必要となった。さまざま薬剤との併用を試み、リポソームの性状変化を検討した。

2) 正電荷リポソーム包埋ヒトβ型インターフェロン遺伝子で誘導される細胞死のメカニズム：①ヒトβ型インターフェロン遺伝子を腫瘍細胞に導入したときにヒトβ型インターフェロン蛋白に対する感受性の変化を調べた。②遺伝子導入後のシグナル伝達機構をウエスタンブロットを中心に蛋白のリン酸化状態を調べた。対象は JAK2、TYK2、STAT1 である。③最終的に遺伝子を消化する酵素が DNase④であることが昨年の研究でわかったが、この酵素を活性化するためのトリガーがなんであるかを検討した。

## C. 研究結果及び考察

1) 長期保存型ヒトβ型インターフェロン遺伝子包埋リポソーム製剤（凍結乾燥製剤）の大量調製法の確立（図1）：ある種の糖類を添加し、凍結乾燥化することで長期保存が可能となることがわかった。そしてこの系を大量調製システムへ移行させた。これにより学内で長期保存型のヒトβ型インターフェロン遺伝子包埋リポソーム製剤（凍結乾燥製剤）を大量に調製できるようになった。このことは本研究の課題である遺伝子治療製剤の供給基盤整備に直接寄与するものと考えられた。

2) 正電荷リポソーム包埋ヒトβ型インターフェロン遺伝子で誘導される細胞死のメカニズム（図2）：①ヒトβ型インターフェロン遺伝子を腫瘍細胞内に導入することで、ヒトβ型インターフェロン蛋白に対する感受性が大きく変化することがわかった。すなわち、ヒトβ型インターフェロン遺伝子が発現して産生されるヒトβ型インターフェロン mRNA の量がヒトβ型インターフェロン蛋白の感受性と相関することが判明した。②ヒトβ型インターフェロン遺伝子を導入し、ヒトβ型インターフェロン蛋白を産生することで JAK2、TYK2、STAT1 のリン酸化は連続的に順次誘導されることを昨年明らかにしたが、本年度は、このリン酸化の持続時間が遺伝子導入時と蛋白添加時とは大きく異なっていることを見出した。また、このリン酸化の持続時間の違いが細胞を死に追いやるか、または増殖抑制効果に留まるかを決定していることがわかった。③また、DNase ④の活性化には、リポソーム

そのものと細胞膜との相互作用が必要であることがわかった。

#### D. 結論

長期保存型ヒト $\beta$ 型インターフェロン遺伝子包埋リポソーム製剤（凍結乾燥製剤）の大量調製法の確立と調製施設の準備が完了し、他施設への製剤供給体制が整備できた。

ヒト $\beta$ 型インターフェロン遺伝子を導入後、導かれる細胞死には少なくとも3つのメカニズムが関与していることがわかった。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kageshida T, Mizuno M, Ono T, Matsumot K, Saida T, Yoshida J. Growth inhibition of human malignant melanoma transfected with the human interferon- $\beta$  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. *Neurologia medico-chirurgica* 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- $\alpha$  in murine fibroblast Ltk- cell: Continuous observation with video enhanced contrast microscopy. *Apoptosis*, 7: 77-86, 2002.
10. Haruko Ogawa, Takaaki Kobayashi, Itsuo Yokoyama, Naoki Nagatani, Masaaki Mizuno, Jun Yoshida, Kenji Kadomatsu, Hisako Muramatsu, Akimasa Nakao and Takashi Muramatsu. Reduction of a-Galactosyl Xenoantigen by Expression of Endo- $\beta$ -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- $\beta$  Gene. *Jpn J Cancer Res*, in press

##### 2. 学会発表

1. Yoshida J, Mizuno M, Wakabayashi T, Kajita Y. Antitumor mechanisms of interferon- $\beta$  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)

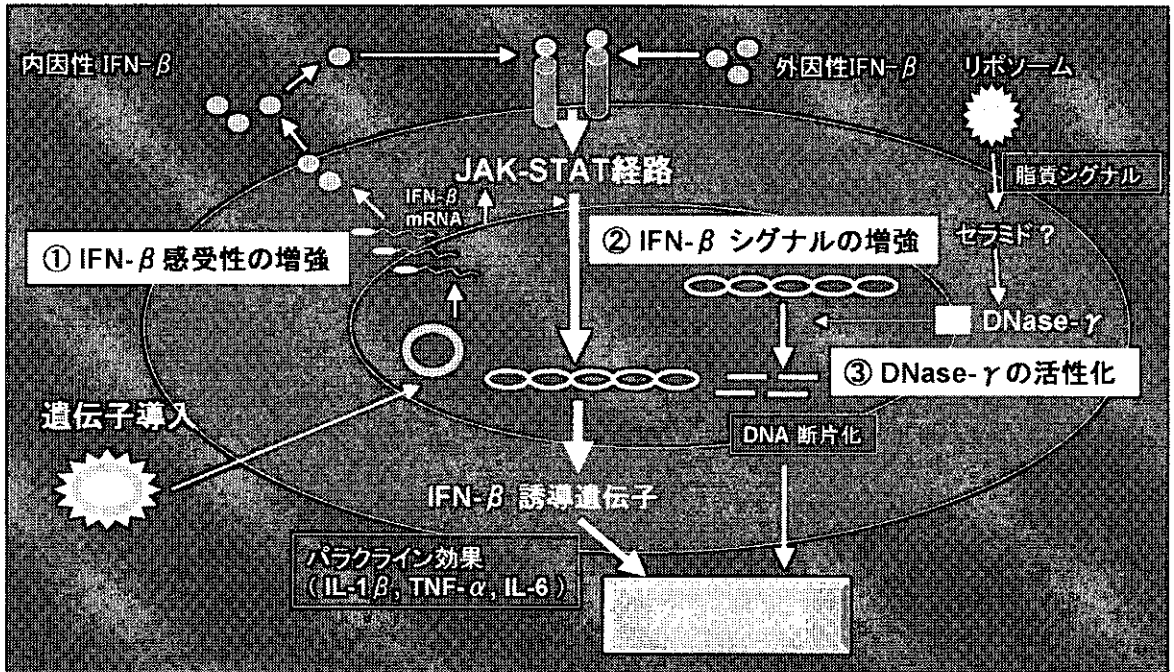
2. Tsugawa T, Natsume A, Mizuno M, Yoshida J. Inhibition of angiogenesis by using the adenovirus vector AdvVEGF-ExR expressing extradomain of Flt-1 had antitumor effect to glioma. The XIV International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, Ashville (2001. 5. 27-30)
3. Nobayashi M, Mizuno M, 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- $\beta$  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- $\beta$ 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)
15. 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 $\beta$ 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- $\beta$ 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  $\gamma$ 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)

F. 知的所有権の取得状況  
とくになし。

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



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  
人工染色体に関する研究  
分担研究者 舩本 寛 名古屋大学大学院理学研究科講師

## 研究要旨

アルフォイド配列はヒト培養細胞中で人工染色体と機能的セントロメア構造を効率よく形成する。ところが、この配列中の CENP-B 結合配列に 2 塩基だけ塩基置換した変異型配列では人工染色体を形成せず、CENP-B の結合がセントロメア形成に必要であることが判明した。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。そこで、クロマチン構造を遮断する境界配列を遺伝子の両端へ挿入した。

### A. 研究目的

本研究課題では、ヒト培養細胞中で安定保持されるヒト人工染色体 (MAC) を作成し、染色体安定維持の機構解明をめざすと共に、MAC を用いた染色体工学を進展させ遺伝子治療へ応用する基本技術の開発を目的として研究を進めた。

### B. 研究方法

- 1) 染色体安定維持に必要な機能配列の限定: ヒト人工染色体を効率よく形成するアルフォイド DNA の野生型繰り返し配列とセントロメアタンパク CENP-B 結合配列に 2 塩基だけ塩基置換した変異型のアルフォイド繰り返し配列をそれぞれ合成し、大腸菌環状人工染色体 (BAC) へクローン化した。この配列をヒト培養細胞へ導入し、人工染色体形成に必須な配列の限定を進めた。
- 2) MAC を用いた染色体工学: MAC 前駆体 YAC へ挿入したマーカー遺伝子からの転写を効率よくおこさせる技術の開発を進めるため、この遺伝子からの転写とクロマチン構造との関連について調べた。さらにこのマーカー遺伝子の両外側に、 $\gamma$ -グロビン遺伝子由来境界配列を挿入し人工染色体前駆体へ組み込んだ。

### C. 研究結果

- 1) 合成アルフォイド DNA でも野生型繰り返し配列はヒト培養細胞中で人工染色体と機能的セントロメア構造を効率よく形成した。ところが CENP-B 結合配列に 2 塩基だけ塩基置換した変異型の繰り返し配列では全く人工染色体を形成せず、CENP-B の結合がセントロメ

ア形成に必要であることが判明した。さらにテロメアのない環状人工染色体前駆体からでもテロメアをつけた線状人工染色体前駆体とほぼ同等の効率で人工染色体が形成されることも判明した。

- 2) MAC 前駆体へ挿入した遺伝子からの転写をおこさせることで、セントロメアクロマチン構造形成を活性化させることがわかった。その反面、強力なプロモーターからの転写はセントロメア構造形成を阻害した。転写とセントロメア構造形成は強く影響しあうことが判明したので、マーカー遺伝子の両外側に境界配列を挿入しセントロメア構造と挿入遺伝子のクロマチン構造を分離する試みを行った。

### D. 考察

- 1) 達成度: 人工染色体、セントロメア形成に必要な配列の限定が進み、目標のいくつかは達成できた。人工染色体挿入遺伝子からの転写とセントロメアクロマチン構造形成との関わりについての情報が得られ、基本的な問題の解明につながる試みを開始した。
- 2) 研究成果の意義: セントロメア形成に必要なアルフォイド DNA ( $\alpha 21-1$ ) の配列や挿入遺伝子からの転写とセントロメア構造との関連が明らかにされたことで、より効率の良い人工染色体ベクター開発に向けて重要な情報を提供した。不明な点が多く残されている染色体の学術研究にとっても貴重な情報である。
- 3) 今後の展望: 他の培養細胞株や正常なマウス受精卵でも基礎的な研究を行うとともに、リボソームを用いた導入方法や遺伝子発現レベルの向上に向けた研究へと発展させること



が実用的な人工染色体につながると期待できる。

#### E. 結論

人工染色体形成にはアルフォイド配列と CENP-B の結合が必要である。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。そこで、クロマチン構造を遮断する境界配列を遺伝子の両端へ挿入した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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)

##### 2. 学会発表

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

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

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

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

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与する因子の解析. 第 24 回日本分子生物学会年会、横浜、2001 年 12 月 9 日～12 日

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

#### G. 知的所有権の出願・取得状況

##### 1. 特許取得

岡崎恒子、舛本寛、池野正史: Mammalian Artificial Chromosome. 国際特許 PCT/JP96/02381 (US6297029B1) 2001 年 10 月 2 日取得

## 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	巻号	ページ	出版年
Kageshida T, Mizuno M, Ono T, Matsumot K, Saida T, Yoshida J.	Growth inhibition of human malignant melanoma transfected with the human interferon- $\beta$ gene by means of cationic liposomes.	Melanoma Res	11	337-342	2001
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
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
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
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
Wakabayashi T, Yoshida J, Mizuno M, Kajita Y.	Intratumoral microinfusion of nimustine (ACNU) for recurrent glioma.	Brain Tumor Pathol.	18	23-28	2001
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
Okamoto K, Mizuno M, Nakahara N, Natsume A, Yoshida J, Mori T, Hori S, Kobayashi H.	Process of apoptosis induced by TNF- $\alpha$ in murine fibroblast Ltk- cell: Continuous observation with video enhanced contrast microscopy.	Apoptosis	7	77-86	2002
H Ogawa, T Kobayashi, I Yokoyama, N Nagatani, M Mizuno, J Yoshida, K Kadomatsu, H Muramatsu, A Nakao and T Muramatsu.	Reduction of $\alpha$ -Galactosyl Xenoantigen by Expression of Endo- $\beta$ -galactosidase C in Pig Endothelial Cells.	Xenotransplan tation	in press		
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- $\beta$ Gene.	Jpn J Cancer Res	in press		