

20030157

厚生労働科学研究費補助金

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15年度
総括研究報告書

主任研究者 湯尾 明

平成16(2004)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. 微量融合メッセージを標的としたヒト白血病細胞アンチセンス療法の開発 湯尾 明
2. 変異型アデノウイルスを用いたがんの遺伝子治療 濱田 洋文
3. IGF- I 受容体 dominant negative を用いた膵臓がんに対する分子療法 今井 浩三
4. ミサイル療法に向けた薬物担体（ナノキャリア）の開発に関する研究 藤本 啓二
5. 小分子型チロシンキナーゼ阻害剤による難治がんの治療の可能性 大江 裕一郎
6. ヒト白血病細胞における新しい増殖機構の解明と分子標的療法への応用の可能性 戸邊 久美子
7. 細胞標的の画像化の試み 志村 まり
8. 白血病を標的とした新たな免疫細胞療法の開発研究 千葉 滋

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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

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、がん細胞増殖に関わる CREB/Alu 融合遺伝子のヒト白血病細胞株における発現と、それに対するアンチセンス RNA、siRNA の増殖阻害、細胞死誘導効果、CREB/Alu 融合遺伝子の全長の構造、造血因子依存性増殖型ヒト白血病細胞における c-myc の Internal Ribosome Entry Site (IRES) を介した翻訳による新しい増殖機構とその治療分子標的としての可能性、F/RGD 変異型アデノウイルスによって特定遺伝子を導入した神経幹細胞を介した脳腫瘍の遺伝子細胞治療の可能性、IGF 受容体を介した遺伝子治療の可能性とその作用機序（細胞内シグナル伝達機構）、機能性リポソームとポリペプチドナノ粒子などのナノ担体による Drug Delivery System (DDS) を駆使したがん治療モデル、低分子チロシンキナーゼ阻害剤を用いたスキルス胃がんの治療の可能性、受容体結合ペプチドによるがん細胞標的化、ヒト NKT 細胞による CD1d 拘束性造血器腫瘍免疫治療法開発、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
藤本 啓二 慶應義塾大学理工学部
応用化学科助教授
大江 裕一郎 国立がんセンター中央病院
第1領域外来部医長
戸邊久美子 国立国際医療センター研究所
血液疾患研究部室長
志村 まり 国立国際医療センター研究所
難治性疾患研究部室長
千葉 滋 東京大学医学部附属病院
無菌治療部助教授

にヒトのがんに臨床応用可能な手法・手順の開発につなげたい。

A. 研究目的

離れた部位に位置する細胞間の連絡をつかさどる液性因子や、隣接する細胞間の連絡に携わる因子の研究はいずれも細胞生物学における重要な研究課題である。その重要性は、がん細胞の増殖や進展においても同様であり、制御機構の解明は直接にがんの治療法にもつながる可能性を有している。さらに、がん細胞のアポトーシスに関わる液性因子やそれに関連する細胞内分子の研究も進んでおり、その臨床応用は直接に殺がん細胞につながる可能性を意味している。本研究においては、これらの細胞内外の増殖やアポトーシスなどに関わる分子の作用機序を解析して、その人工的な修飾を試みることにより、がん細胞の増殖を制御して、治療に応用することを目指している。最終的には、期待される治療効果（有効性）と懸念される副作用（安全性）のバランスを考慮して、実際

B. 研究方法

細胞は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。特に本年度は、不死化間葉系幹細胞を用いた実験を行った。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ベクターを用いた系や、ヌクレオフェクターなどのエレクトロポレーションを用いる方法、膜受容体へ結合するペプチドなどの手法を用いた。一部の研究においては、ナノ粒子（リポソーム、その他の高分子有機化合物）を合成して、DDS のための担体として用いた。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、細胞周期は FACS 解析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。また、今年度は低分子キナーゼ阻害剤の抗癌効果の検討も行った。

（倫理面への配慮）

患者検体や健常人検体の取り扱いに際しては、各々の施設の当該規定に則り、同意など十分な措置を行った。本年度は、ヒトへの何らかの物質の投与を行うような臨床研究は無かった。また、動物実験を行う際には所属施設の規定（実験動物取り扱いに関する規定など）や所定のガイドラインを責任を持って遵守した。

なお、本研究には、ヒトのクローンなどの生命倫理に抵触するような実験、研究はいっさい含まれない。また、患者の遺伝（子）情報の収集などの個人のプライバシーに関わるような調査、研究もいっさい含まれない。

C. 研究結果

1) cAMP 応答エレメント結合蛋白 CREB 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。この作用機序に関して、用いた白血病細胞株に CREB/Alu 融合遺伝子の発現が確認され、その融合遺伝子発現が用いたアンチセンスオリゴによって消失することも明らかにされた。亜鉛の系を用いた誘導発現系において Alu 配列部分を発現させたところ、ヒト白血病細胞の著明な増殖抑制と形態変化が認められた。形態変化の方は、CREB 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を添加したときの物と類似していた。また、融合遺伝子の融合部分をまたぐ領域を標的とした siRNA は、白血病細胞株の増殖を著明に抑制し、細胞死を誘導した。以上より、CREB/Alu 融合遺伝子を標的とした分子標的療法の可能性が示唆された。さらに、この融合遺伝子の全構造を解明するために、アンチセンス walking と 3'レースを行い、CREB 遺伝子の第 2 エクソンから第 4 イントロンの Alu に続き、その後第 4 イントロンの週末部位に近いポリ A サイトまで続いていることが示唆された。

2) 造血因子に依存して増殖するヒト白血病細胞株の増殖機序を解明し、その分子機構を治療の標的とするための基礎的な研究を行った。分子標的の候補としては、白血病細胞の増殖に重要とされている c-Myc を取り上げた。3種類のヒト白血病細胞株 (MO7e、F36P、UT7) を用いて造血因子 (GM-CSF、IL-3) がこれらの細胞株の増殖を誘導する機序を解析し、造血因子が IRES というユニークな機構による翻訳を介して c-Myc 蛋白の量を増やして、それが細胞周期の進行を促進することを明らかにした。この機構の上流には PI3K が関与する事も併せて明らかにした。今後は、患者検体でのこのような機構の存在の証明、正常血球でのこの機構の無いことの証明、この機構を直接制御する分子標的の探索が重要である。

3) 不死化間葉系幹細胞 MSC を樹立し、神経幹細胞に分化誘導することができた。MSC ないし神経幹細胞を静脈内投与すると、傷害を受けた中枢神経組織に特異的に集積した。神経幹細胞の正常脳組織内での遊走様式は、グリオーマ細胞の浸潤様式 (遊走様式) と類似しており、神経幹細胞は新規ウイルスベクターのキャリアーとして、神経腫瘍を標的とした細胞投与療法が可能であることがわかった。さらに、F/RGD 変異型アデノウイルスによって、骨髄由来の MSC 細胞に、従来型に比べ 30 倍も高い遺伝子導入効率を得られた。浸潤性の高いグリオーマに対する脳内腫瘍治療実験を行ったところ、MSC 細胞は、グリオーマ細

胞塊の辺縁に添って拡がり、サイトカイン遺伝子導入を併用することによって強い抗腫瘍効果が得られた。

4) Ad-IGF-Ir/482st とチロシンキナーゼを欠くが膜貫通ドメインと細胞外ドメインを保持するアミノ酸 950 の Ad-IGF-Ir/950st の 2 種の IGF-Ir/dn をアデノウイルスベクターに組み込み、膵がん細胞株に導入し、抗腫瘍効果を比較するとともに、IGF-Ir シグナル伝達への影響を検討した。Ad-IGF-Ir/482st は分泌型蛋白を産生し、培養上清に存在することを明らかにした。IGF-Ir/482st は IGF-Ir/950st より強いアポトーシス誘導能を有していた。IGF-Ir/482st 発現細胞の培養上清を用いて細胞株を培養すると、増殖が抑制され、アポトーシスの誘導が増加した。膵臓がん細胞に IGF-Ir/dn を導入すると、IGF-I、-II 刺激による Akt-1、p38 のリン酸化は抑制されたが、MAPK-1、-2 のリン酸化には影響しなかった。また、IGF 結合蛋白には影響しないことが示唆された。PI3-K 阻害剤と MEK1 阻害剤は膵臓がん細胞の増殖を抑制したが、p38 阻害剤は抑制しなかった。一方、PI3-K 阻害剤、p38 阻害剤はアポトーシス誘導を増強したが、MEK1 阻害剤は効果を認めなかった。IGF-Ir/dn は、腹膜播種モデルにおいてリンパ節転移数と肝転移数を減じ、マウスの生存期間を有意に延長した。

5) 高分子有機化学の手法を用いて、機能性リボソームの合成を行った。これまでにこのリボソームは還元環境において表層からポリマー鎖が解離することを見出している。今回はこの解離に伴って細胞透過性ペプチドが表面に露出することにより、リボソームの細胞への取り込みが促進されることを見出した。さらに抗ガン剤である MTX を封入させたリボソームでは、還元剤である L-cysteine を添加した系においてのみ細胞増殖を阻害することを見出した。次に、ポリレージンにポリエチレングリコールを結合させた後に架橋剤を添加してナノ粒子化を試みた。こうしてポリペプチドから作成されたナノ粒子は、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、蛍光物質をラベルしたペプチドナノ粒子はともにヒト扁平上皮癌細胞 (A431) の内部に取り込まれることがわかった。ホスファチジン酸を含有するナノ粒子はその高い疎水性のためにより多くの ADR を担持することができた。いずれのナノ粒子も低 pH で漏洩が増大することがわかった。また、free の ADR には及ばないが、細胞増殖を抑制することができた。

6) ヒトスキルス胃癌由来の signet ring cell carcinoma で 44As3 および 58As1 は国立がんセンター柳原らが樹立した。44As3 及び 58As1 細胞における各種 VEGF アイソタイプの発現をヒト特異的プライマーを用いて検討した。44As3 は VEGF-A、VEGF-C、58As1 は VEGF-A のみを分泌していた。同細胞株の各種抗腫瘍剤およびチロシンキナーゼ阻害剤に対する感受性を MTT アッセ

イで検討した。ZD6474 の 44As3 および 58As1 に対する IC50 値は 12.0、5.7 mM で、ZD6474 に対する *in vitro* 感受性は高くなかった。EGFR 特異的チロシンキナーゼ阻害剤ゲフィティニブの各細胞に対する IC50 値は 17.5、9.7 mM で中等度感受性を示した。胃壁移植モデルでの ZD6474 および各種抗癌剤の抗腫瘍効果の検討した。44As3 及び 58As1 細胞を胃壁に同所移植すると、ほぼ 100% 腹膜浸潤し、腹水が出現後、迅速に死に至る。同モデルにおける ZD6474 の抗腫瘍効果を検討した。各細胞を移植後、3 日後より 50、100 mg/kg/日 連日経口投与 (14 日間) を行った。微小管作用薬バクリタキセル (10 mg/kg/日) と比較すると弱い、ZD6474 は原発巣の直接的な腫瘍縮小効果を濃度依存性に示した。同モデルにおける ZD6474 投与の生存に及ぼす効果は、非常に効果の高いバクリタキセルにはおよばないが、ZD6474 投与群で優位に生存の延長がみとめられた。また、ZD6474 経口と静脈投与の比較では、効果は経口投与において優れ、44As3 細胞モデルでより顕著であった。以上により、ZD6474 はスキルス胃癌腹膜播種に有効である可能性が示唆された。

7) マウス腹腔に投与した RET 結合ペプチド (RBP) が皮下に移植した RET 陽性癌細胞に集積したことより、我々は、RBP 結合カルボキシメチルデキストラン磁性体 (CMDM-RBP) ナノ粒子を作成し、非侵襲的な MRI 診断に向けた基礎検討を行ってきた。本研究は、高輝度放射光を用いた蛍光放射光顕微鏡 (Scanning X-ray Fluorescence Microscopy; SX-FM) の開発と共に、細胞レベルで CMDM-RBP の結合状態を直接モニターすることに成功した。SX-FM により、磁性体鉄元素の経過時間に従った取り込み量や細胞内局在の評価が可能であり、標的化の詳細なモニターに有用と考える。

8) NKT 細胞による抗腫瘍効果を、担がんモデルマウスを用いて解析した。In vitro では、NKT 細胞は、CD1d 拘束性に抗腫瘍効果を持つ。マウス T 前駆細胞性白血病細胞株である EL-4 は、CD1d の発現レベルが高いほどマウス個体内での増殖速度が低下し、マウスの生存期間が延長した。マウス個体において、NKT 細胞が CD1d 依存性に T 前駆細胞性白血病細胞に対する抗腫瘍を示すことが明らかになった。

D. 考察

今年度の CREB アンチセンスの研究成果は、アンチセンスオリゴの作用機序に関して、標的とする融合メッセージという新しい概念を提唱できたことである。合成オリゴヌクレオチドの持つ生物効果に関しては「真のアンチセンス機序」と「アプタメリック効果」の 2 つが報告されている。しかし、多くの研究者がそのどちらでもない「不

可解な効果」を経験している。にもかかわらずこのことに関しては手つかずのままである。今回の発見はこれに答えを与えるものである。このような新しい概念 (既知の構造遺伝子と Alu が融合したメッセージが存在し、細胞内で機能している) は、合成オリゴの持つ不可解な作用を解明することに貢献するだけではなく、ヒトゲノムに特異的に存在する Alu 配列の意義を考える上でもきわめて有用である。ゲノムに多数存在していながら機能不明である Alu 配列の個々の役割が解明されると、生物学上の大きな発展が生み出される可能性が高い。今年度の研究において、融合遺伝子の全長の構造がほぼ解明されたので、全長遺伝子の発現系を作成して、その作用をさらに詳細に検討することも可能となった。

申請者が同定した融合メッセージは超微量に存在しているため、添加した合成アンチセンスオリゴの影響を極めて敏感に受ける。このことは、これまでに副作用の関係で投与量に制限があったアンチセンス療法に新たな展開を与えるものになると期待される。また、融合遺伝子を標的とするアンチセンス RNA と siRNA のいずれもがアンチセンスオリゴと同様に、白血病細胞の増殖抑制と細胞死を誘導したことは、この融合遺伝子を標的とする治療の可能性を強く示す物である。今後は、正常細胞でのこの融合遺伝子の役割や量など、腫瘍特異性の検討を進める必要がある。

今年度は、腫瘍標的化のターゲット候補を探索するために、抗体の Fc ドメインに結合する Protein A の Z33 モチーフを含む F40S ファイバー変異型 F40Z33 アデノウイルスを作成し、ベクターを抗体で架橋することによって遺伝子導入効率が高まるか否かを検討する系を樹立した。さまざまな腫瘍細胞に対して、選択的標的化の可能な表面分子の同定を試みるべく、準備を進めている。また、今年度は、不死化間葉系幹細胞の樹立と、その神経幹細胞への分化誘導を確立した。この神経幹細胞の正常脳組織内での遊走様式は、グリオーマ細胞の浸潤様式と類似しており、神経幹細胞は新規ウイルスベクターのキャリアーとして、神経膠腫を標的とした細胞投与療法が可能であることがわかった。さらに、F/RGD 変異型アデノウイルスによって不死化間葉系幹細胞に従来型の 30 倍も高い遺伝子導入効率を得られた。実際に、浸潤性の高いグリオーマに対する脳内腫瘍治療実験を行ったところ、この幹細胞はグリオーマ細胞塊の辺縁に添って拡がり、サイトカイン遺伝子導入を併用することによって強い抗腫瘍効果が得られた。悪性神経膠腫に選択的な DDS として有望であることがわかった。

昨年度に続いて、IGF- I 受容体遺伝子 dominant negative 変異体 (IGF-Ir/482st) の作用が検討された。本年度はマウスの実験系における *in vivo* の効果も示され、臨床応用の可能性が高まった。ちなみに、IGF- I 受容体の欠損マウスはほぼ正常に生まれてくること、この受容体変異体遺伝子は正常細胞に対しては増殖抑制しか起こさず腫瘍細胞の時のようにアポトーシスは起こさないことなど

から、正常細胞に対する副作用はあまり心配ないと考えられる。一方、IGF系の腫瘍増殖システムは、今回検討した膵臓の他に大腸癌、乳がん、肺がん、等の多くの固形癌で幅広く関与しているとされ、今回開発した治療法の応用範囲はきわめて広いと期待される。IGF-Ir/482stは分泌型蛋白を発現するため、導入細胞のみならずその周囲の細胞に対する効果 (bystander 効果) を発揮し、より効果的であったと考えられた。IGF-Ir/dnの膵臓がんにおける増殖抑制効果は主としてPI3-K/Akt系を介して、アポトーシスの誘導は主にPI3-K/Akt系とp38系の両者を介して発揮していると考えられた。IGF-Ir/dnは腹腔内リンパ節・肝臓への転移抑制効果を示し、膵臓がんの予後不良な理由の一つである腹膜播種にも効果が期待できると考えられた。

当班の研究のもう一つの大きな柱は、免疫療法である。昨年度までに、ヒトのNKT細胞の基礎検討と臨床応用へ向けての実験が行われた。その結果、T-ALL細胞の多くがCD1d分子を発現し、ヒトV α 24NKT細胞はこのCD1d分子依存性に直接の細胞傷害活性を示すことが明らかになった。さらに、NKT細胞が自己の白血病細胞に対して抗腫瘍活性を示すことも確認された。この際、腫瘍細胞がCD1d分子を発現していることが重要である。この結果と今回の担がんモデルマウスを用いた成果とを合わせて考えれば、ヒトT細胞性白血病やTリンパ芽球性リンパ腫においては、NKT細胞を利用した治療法の開発が可能ではないかと考えられた。すなわち、患者から単球を分離して樹状細胞に分化させ、 α -GalCerを利用した培養により、患者由来NKT細胞増やすことは容易である。これを単独で、あるいはさらに α -GalCerとともに投与することにより、T細胞性白血病やTリンパ芽球性リンパ腫の治療を行うことができる可能性があることが示された。

細胞膜透過性の低分子化合物は、新しい抗がん剤の候補として極めて重要である。特に、細胞内の特定のシグナル伝達分子を標的とする阻害剤の開発は、製薬会社、試薬会社などによって精力的に行われ、その中から極めて有望な抗がん剤が生まれつつある。例えば、ablチロシンキナーゼ等に特異的に作用するグリベックは、白血病などの様々の腫瘍に適応されて、顕著な成果を上げている。今年度は、低分子チロシンキナーゼ阻害剤のスキルス胃がんに対する作用が明らかになった。すなわち、難治性のがんに対する新規の薬剤として、企業の有する低分子化合物のlibraryは重要な財産であり、これを活用することが肝要である。国公立の研究機関の研究者は、がん細胞に特異的な新たな分子標的を提供することにより、企業との極めて相乗的な共同研究が展開できる。このような観点から、今年ではもう一つの重要な成果が報告された。すなわち、PI3Kというリン酸化酵素を介したc-mycのIRESを介した翻訳による造血因子依存性白血病細胞の増殖機構は、正常の細胞には考えにくく、極めて優れた分子標的となる可能性がある。この増殖機構の基盤研究の面にお

ける重要性和独自性も鑑みて、さらなる研究が望まれる。

昨年度から開始されたもう一つの重要な研究プロジェクトに、ナノテクノロジー関連プロジェクトがある。これは、非ウイルスベクターの新しい候補として有望であり、ミサイル療法に用いる薬物担体としての役割が期待されている。また、基礎検討やモデル実験の段階であるが、今年度は、昨年度に引き続き、機能性リポソームやペプチド由来ナノ粒子が作成された。前者に関しては、酸化還元やpHの変化を利用して細胞に特異的にアクセスして薬剤を放出したり、エンドソームを破壊する機能が付与されており、実際の細胞系においても有効であることが確認された。今後更に臨床応用に向けたモデル実験が必要である。

本年度の研究でのベクターの改善に関するその他の成果としては、細胞表面の標的分子に結合した後に細胞内に取り込まれるペプチドが開発され、これをベクターとした新しい手法(分子標的診断と分子標的治療やDDS)が期待されたが、導入効率の改善など、来年度以降も引き続き検討がなされることとなった。

E. 結論

がん細胞増殖に関わるCREB/Alu融合遺伝子のヒト白血病細胞株における発現と、それに対するアンチセンスRNA、siRNAの増殖阻害、細胞死誘導効果、CREB/Alu融合遺伝子の全長の構造、造血因子依存性増殖型ヒト白血病細胞におけるc-mycのIRESを介した翻訳による新しい増殖機構とその治療分子標的としての可能性、変異型アデノウイルスによって特定遺伝子を導入した神経幹細胞を介した脳腫瘍の遺伝子細胞治療の可能性、IGF受容体を介した遺伝子治療の可能性とその作用機序、機能性リポソームなどのナノ粒子担体によるDDSを駆使したがん治療モデル、低分子チロシンキナーゼ阻害剤を用いたスキルス胃がんの治療の可能性、受容体結合ペプチドによるがん細胞標的化、ヒトNKT細胞による造血器腫瘍治療法開発、などが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) Inazawa Y, Saeki K, Yuo A: Granulocyte colony-stimulating factor-induced terminal maturation of human myeloid cells is specifically associated with up-regulation of receptor-mediated function and CD10 expression. *Int J Hematol* 77:142-151,2003.
- 2) Saeki K, Saeki K, Yuo A: Distinct involvement of cAMP-response element-dependent transcriptions in

- functional and morphological maturation during retinoid-mediated human myeloid differentiation. *J Leukoc Biol* 73:673-681,2003.
- 3) Kobayashi N, Saeki K, Yuo A: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 induce cell cycle progression through the synthesis of c-Myc protein by internal ribosome entry site-mediated translation via phosphatidylinositol 3-kinase pathway in human factor-dependent leukemic cells. *Blood* 102:3186-3195,2003.
 - 4) Saeki K, Zhang H, Nakatsu M, Yoshimori T, Kabeya Y, Yamamoto A, Kaburagi Y, Yuo A: Insulin-dependent signaling regulates azurophil granule-selective macroautophagy in human myeloblastic cells. *J Leukoc Biol* 74:1108-1116,2003.
 - 5) Inazawa Y, Nakatsu M, Yasugi E, Saeki K, Yuo A: Lipid droplet formation in human myeloid NB4 cells stimulated by all trans retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor: possible involvement of peroxisome proliferator-activated receptor α . *Cell Struct Funct* 28:487-493,2003.
 - 6) Kawano Y, Kobune M, Yamaguchi M, Nakamura K, Ito Y, Sasaki K, Takahashi S, Nakamura T, Chiba H, Sato T, Matsunaga T, Azuma H, Ikebuchi K, Ikeda H, Kato J, Niitsu Y, Hamada H: Ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitor cells using a coculture system with human telomerase catalytic subunit (hTERT)-transfected human stromal cells. *Blood* 101:532-540,2003.
 - 7) Uchida H, Shinoura N, Kitayama J, Watanabe T, Nagawa H, Hamada H: 5-Fluorouracil efficiently enhanced apoptosis induced by adenovirus-mediated transfer of caspase-8 in DLD-1 colon cancer cells. *J Gene Med* 5:287-299,2003.
 - 8) Tsuda H, Wada T, Ito Y, Uchida H, Dehari H, Nakamura K, Sasaki K, Kobune M, Yamashita T, Hamada H: Efficient BMP2 gene transfer and bone formation of mesenchymal stem cells by a fiber-mutant adenoviral vector. *Mol Ther* 7:354-365,2003.
 - 9) Nakamura T, Sato K, Hamada H: Reduction of natural adenovirus tropism to the liver by both ablation of fiber-Coxsackievirus and adenovirus receptor interaction and use of replaceable short fiber. *J Virol* 77:2512-2521,2003.
 - 10) Dehari H, Ito Y, Nakamura T, Kobune M, Sasaki K, Yonekura N, Kohama G, Hamada H: Enhanced antitumor effect of RGD fiber-modified adenovirus for gene therapy of oral cancer. *Cancer Gene Ther* 10:75-85,2003.
 - 11) Kobune M, Kawano Y, Ito Y, Chiba H, Nakamura K, Tsuda H, Sasaki K, Dehari H, Uchida H, Honmou O, Takahashi S, Bizen A, Takimoto R, Matsunaga T, Kato J, Kato K, Houkin K, Niitsu Y, Hamada H: Telomerized human multipotent mesenchymal cells can differentiate into hematopoietic and cobblestone area-supporting cells *Exp Hematol* 31:715-722,2003.
 - 12) Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Negishi H, Kikuchi H, Sasaki S, Imai K, Shibue T, Honda K, Taniguchi T: Integration of interferon- α signalling to p53 responses in tumor suppression and antiviral defence. *Nature* 424:516-523,2003.
 - 13) Min Y, Adachi Y, Yamamoto H, Ito H, Itoh F, Lee C-T, Nadaf S, Carbone DP, Imai K: Genetic blockade of the insulin-like growth factor-I receptor: a promising strategy for human pancreatic cancer. *Cancer Res* 63:6432-6441,2003.
 - 14) Toyota M, Sasaki Y, Satoh A, Ogi K, Kikuchi T, Suzuki H, Mita H, Tanaka N, Itoh F, Issa JP, Jair KW, Schuebel KE, Tokino T, Imai K: Epigenetic inactivation of CHFR in human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7818-7823,2003.
 - 15) Horiuchi S, Yamamoto H, Min Y, Adachi Y, Itoh F, Imai K: Association of Ets-related transcriptional factor E1AF expression with tumor progression and overexpression of MMP-1 and matrilysin in human colorectal cancer. *J Pathol* 200:568-576,2003.
 - 16) Satoh A, Toyota M, Itoh F, Sasaki Y, Suzuki H, Ogi K, Kikuchi T, Mita H, Yamashita T, Kojima T, Kusano M, Fujita M, Hosokawa M, Endo T, Tokino T, Imai K: Epigenetic inactivation of CHFR and sensitivity to microtubule inhibitors in gastric cancer. *Cancer Res* 63:8606-8613,2003.
 - 17) Obata T, Toyota M, Satoh A, Sasaki Y, Ogi K, Akino K, Suzuki H, Murai M, Kikuchi T, Mita H, Itoh F, Issa JP, Tokino T, Imai K: Identification of HRK as a target of epigenetic inactivation in colorectal and gastric cancer. *Clin Cancer Res* 9:6410-6418,2003.
 - 18) Yamamoto H, Iku S, Adachi Y, Imsumran A, Taniguchi H, Noshio K, Min Y, Horiuchi S, Idogawa M, Adachi M, Minami T, Yasui H, Imai K: Overexpression of BAD preferentially augments anoikis. *Int J Cancer* 107:215-223,2003.
 - 19) Adachi M, Zhang Y-B, Imai K: Mutation of BAD within the BH3 domain impairs its phosphorylation-mediated regulation. *FEBS Letters* 551:147-152,2003.
 - 20) Kikuchi T, Daigo Y, Katagiri T, Tsunoda T, Okada K, Kakiuchi S, Zembutsu H, Furukawa Y, Kawamura M, Kobayashi K, Imai K, Nakamura Y: Expression profiles of non-small cell lung cancers on cDNA microarrays: Identification of genes for prediction of lymph-node metastasis and sensitivity to anti-cancer drugs. *Oncogene* 22:2192-2205,2003.
 - 21) Shen L, Toyota M, Kondo Y, Obata T, Daniel S, Pierce S, Imai K, Guillemin GM: Aberrant DNA methylation of p57KIP2 identifies a cell-cycle regulatory pathway with prognostic impact in adult acute lymphocytic leukemia. *Blood* 101:4131-4136,2003.
 - 22) Sato Y, Fujimoto K, Kawaguchi H: Detection of an K-ras point mutation employing peptide nucleic acid at the surface of a SPR biosensor. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 27:23-31,2003.
 - 23) 藤本啓二: 微粒子の集積化。高分子 52:701-705,2003.
 - 24) 藤本啓二: ナノ粒子。血液・免疫・腫瘍・特集「DDS」 8:119-123,2003.
 - 25) 藤本啓二: 高分子材料の個性と医学的なはたらきー ナノバイオマテリアルで生体に挑むー、先端化

- 学シリーズ<糖鎖、バイオマテリアル、分子認識、バイオインフォマティクス>、日本化学会 編、丸善、pp172-179, 2003.
- 26) 藤本啓二：生体に働きかけるマテリアル、生命の科学と工学—その最先端、三共出版、pp72-82, 2003.
- 27) Ohe Y, Niho S, Kakinuma R, Kubota K, Ohmatsu H, Goto K, Nokihara H, Kunitoh H, Saijo N, Aono H, Watanabe K, Tango M, Yokoyama A, Nishiwaki Y: A phase II study of cisplatin and docetaxel administered as three consecutive weekly infusions for advanced non-small-cell lung cancer in elderly patients. *Ann Oncol* 15:45-50,2004.
- 28) Watanabe H, Yamamoto S, Kunitoh H, Sekine I, Yamamoto N, Ohe Y, Tamura T, Kodama T, Sugimura K, Saijo N: Tumor response to chemotherapy: The validity and reproducibility of RECIST guidelines in NSCLC patients. *Cancer Sci* 94:1015-1020,2003.
- 29) Natsume T, Watanabe J, Koh Y, Fujio N, Ohe Y, Horiuchi T, Saijo N, Nishio K, Kobayashi M: Antitumor activity of TZT-1027 (Soblidotin) against vascular endothelial growth factor-secreting human lung cancer in vivo. *Cancer Sci* 94:826-833,2003.
- 30) Ohe Y, Ishizuka N, Tamura T, Sekine I, Nishiwaki Y, Saijo N: Long-term follow-up of patients with unresectable locally advanced non-small cell lung cancer treated with chemoradiotherapy: a retrospective analysis of the data from the Japan Clinical Oncology Group trials (JCOG0003A). *Cancer Sci* 94:729-34,2003.
- 31) Sekine I, Nishiwaki Y, Kakinuma R, Kubota K, Hojo F, Matsumoto T, Ohmatsu H, Goto K, Kodama T, Eguchi K, Shinkai T, Tamura T, Ohe Y, Kunitoh H, Yoshimura K, Saijo, N: Phase I/II trial of weekly cisplatin, etoposide, and irinotecan chemotherapy for metastatic lung cancer: JCOG 9507. *Br J Cancer* 88:808-813,2003.
- 32) Minemoto Y, Uchida S, Ohtsubo M, Shimura M, Sasagawa T, Hirata M, Nakagami H, Ishizaka Y, Yamashita K: Loss of p53 induces M-phase retardation following G2 DNA damage checkpoint abrogation. *Arch Biochem Biophys* 412:13-19,2003.
- 33) Chiba S, Takeshita K, Imai Y, Kumano K, Kurokawa M, Masuda S, Shimizu K, Nakamura S, Ruddle FR, Hirai H. A homeoprotein DLX-1 interacts with Smad4 and blocks a signaling pathway from activin A in hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci, USA* 100:15577-15582, 2003.
- 34) Takahashi T, Tanaka Y, Nieda M, Azuma T, Chiba S, Juji T, Shibata Y, Hirai H: Dendritic cell vaccination for patients with chronic myelogenous leukemia. *Leuk Res* 27:795-802,2003.
- 35) Saito T, Chiba S, Ichikawa M, Kunisato A, Asai T, Shimizu K, Yamaguchi T, Yamamoto G, Seo S, Kumano K, Nakagami-Yamaguchi E, Hamada Y, Aizawa S, Hirai H: Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* 18:675-685,2003.
- 36) Kumano K, Chiba S, Kunisato A, Sata M, Saito T, Nakagami-Yamaguchi E, Yamaguchi T, Masuda S, Shimizu K, Takahashi T, Ogawa S, Hamada Y, Hirai H: Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells. *Immunity* 18:699-711,2003.
- 37) Kunisato A, Chiba S, Nakagami-Yamaguchi E, Kumano K, Saito T, Masuda S, Yamaguchi T, Osawa M, Kageyama R, Nakauchi H, Nishikawa M, Hirai H: HES-1 preserves purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo. *Blood* 101:1777-1783,2003.
- 38) Kanda Y, Chiba S, Hirai H, Sakamaki H, Iseki T, Kodera Y, Karasuno T, Okamoto S, Hirabayashi N, Iwato K, Maruta A, Fujimori Y, Furukawa T, Mineishi S, Matsuo K, Hamajima N, Imamura M: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from family members other than HLA-identical siblings over the last decade (1991-2000). *Blood* 102:1541-1547,2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

①細胞製造装置ならびに細胞製造方法
特願 2003-123629

②急性白血病細胞死誘導体
特願 2003-334125

③無フィーダーES細胞の
血液分化培地と分化方法
特願 2004-061470

2. 実用新案取得 なし

3. その他 なし

II. 分担研究報告

1. 微量融合メッセージを標的としたヒト白血病細胞アンチセンス療法の開発
湯尾 明
2. 変異型アデノウイルスを用いたがんの遺伝子治療
濱田 洋文
3. IGF- I 受容体 dominant negative を用いた膵臓がんに対する分子療法
今井 浩三
4. ミサイル療法に向けた薬物担体（ナノキャリア）の開発に関する研究
藤本 啓二
5. 小分子型チロシンキナーゼ阻害剤による難治がんの治療の可能性
大江 裕一郎
6. ヒト白血病細胞における新しい増殖機構の解明と分子標的療法への応用の可能性
戸邊 久美子
7. 細胞標的の画像化の試み
志村 まり
8. 白血病を標的とした新たな免疫細胞療法の開発研究
千葉 滋

微量融合メッセージを標的としたヒト白血病細胞アンチセンス療法の開発

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 CREB 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。この作用機序に関して、用いた白血病細胞株に CREB/Alu 融合遺伝子の発現が確認され、その融合遺伝子発現が用いたアンチセンスオリゴによって消失することも明らかにされた。亜鉛の系を用いた誘導発現系において Alu 配列部分を発現させたところ、ヒト白血病細胞の著明な増殖抑制と形態変化が認められた。形態変化の方は、CREB 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を添加したときの物と類似していた。また、融合遺伝子の融合部分をまたぐ領域を標的とした siRNA は、白血病細胞株の増殖を著明に抑制し、細胞死を誘導した。以上より、CREB/Alu 融合遺伝子を標的とした分子標的療法の可能性が示唆された。さらに、この融合遺伝子の全構造を解明するために、アンチセンス walking と 3'レースを行い、CREB 遺伝子の第 2 エクソンから第 4 イントロンの Alu に続き、その後第 4 イントロンの週末部位に近いポリ A サイトまで続いていることが示唆された。

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 (Biochem J 338:49-54, 1999)、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 (Biochem J 343:249-255, 1999) を発見してきた。さらに、CREB 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) が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することを確認した (Leukemia 15:238-245, 2001)。

今年度においては、CREB のアンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチドの白血病細胞への作用機序についてさらに検討加えると共に、その全長の構造決定を試みた。

B. 研究方法

細胞は、ヒト白血病細胞株である HL-60 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、光顕による形態観察により行った。融合遺伝子の検出やアンチセンス walking は、オリゴ dT による逆転写の後、エクソン1、エクソン2、Alu 配列、Alu 配列に続くイントロン4からそれぞれプライマーを選んで、ネステッド PCR を行った。3'レースは、適当な5側のプライマーとアダプターを付加したオリゴ dT プライマーにより行った。

遺伝子誘導発現系は、メタロチオネインプロモーターを用いる系を採用した。siRNA は、融合遺伝子の融合領域を標的とした物を合成した。(倫理面への配慮)

本研究には、動物実験、ヒトへの何らかの物質の投与を行うような臨床研究、ヒトのクローンなどの生命倫理に抵触するような実験、患者の遺伝(子)情報の収集などの個人のプライバシーに関わるような調査、研究は、いっさい含まれない。

C. 研究結果

メタロチオネインプロモーターを用いた遺伝子誘導発現系によって Alu 配列の作用を検討したところ、亜鉛による誘導の有無に関わらず Alu 配列を導入した細胞において強い増殖抑制と形態変化が認められた。形態変化の方は、CREB 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を添加したときの物と類似していた。このようなアンチセンス RNA の効果は、Alu 部分のみから構成されるアンチセンス RNA、CREB の第 1 エクソン、第 2 エクソンと Alu 配列の一部から構成されるアンチセンス RNA のいずれにおいても認められた。

融合遺伝子の白血病細胞における役割をさらに解明するために、融合遺伝子の融合部分 (エクソン2と Alu 配列) をまたぐ領域を標的とした siRNA を合成して、その作用を検討した。合成された siRNA は、白血病細胞株の増殖を著明に抑制し、細胞死を誘導した。

さらに、この融合遺伝子の全構造を解明するために、アンチセンス walking と 3'レースを行った。アンチセンス walking においては、ネステッド PCR の 1st PCR の 3'側のプライマーを第 4 エクソンの中で、次第に 3'側に移してゆき、第 4 エクソンの週末部分に近いポリ A サイトの 3'側において増幅が行われなくなることが判明した。また、3'レースにおいても、第 4 エクソンの最も 3'側のポリ

A サイトを用いていることを示す結果を得た。以上より、CREB 遺伝子の第2エクソン途中から第4イントロンの Alu に続き、その後、第4イントロンの週末部位に近いポリ A サイトまで転写されている融合メッセージであることが示された。

D. 考察

これまでに合成オリゴヌクレオチドの持つ生物効果に関しては「真のアンチセンス機序」と「アプタメリック効果」の2つが報告されている。しかし、多くの研究者がそのどちらでもない「不可解な効果」を経験している。にもかかわらずこのことに関しては手つかずのままである。今回の発見はこれに答えを与えるものである。このような新しい概念（既知の構造遺伝子と Alu が融合したメッセージが存在し、細胞内で機能している）は、合成オリゴの持つ不可解な作用を解明することに貢献するだけではなく、ヒトゲノムに特異的に存在する Alu 配列の意義を考える上でもきわめて有用である。ゲノムに多数存在しているながら機能不明である Alu 配列の個々の役割が解明されると、生物学上の大きな発展が生み出される可能性が高い。今年度の研究において、融合遺伝子の全長の構造がほぼ解明されたので、全長遺伝子の発現系を作成して、その作用をさらに詳細に検討することも可能となった。

申請者が同定した融合メッセージは超微量に存在しているため、添加した合成アンチセンスオリゴの影響を極めて敏感に受ける。このことは、これまでに副作用の関係で投与量に制限があったアンチセンス療法に新たな展開を与えるものになると期待される。また、融合遺伝子を標的とするアンチセンス RNA と siRNA のいずれもがアンチセンスオリゴと同様に、白血病細胞の増殖抑制と細胞死を誘導したことは、この融合遺伝子を標的とする治療の可能性を強く示す物である。今後は、正常細胞でのこの融合遺伝子の役割や量など、腫瘍特異性の検討を進める必要がある。

E. 結論

cAMP 応答エレメント結合蛋白 CREB 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が有する白血病細胞増殖抑制（細胞死誘導）作用機序に関して、白血病細胞に存在する CREB/Alu 融合遺伝子標的遺伝子であることが示された。この融合遺伝子の白血病細胞増殖における役割と、この融合遺伝子の治療標的分子としての可能性をより明らかにするために、この融合遺伝子を標的とした2種類の実験（アンチセンス RNA の誘導発現、siRNA 投与）を行った。亜鉛の系を用いた誘導発現系において Alu 配列部分を発現させたところ、ヒト白血病細胞の著明な増殖抑制と形態変化が認められた。また、融合遺伝子の融合部分をまたぐ領域を標的とした siRNA は、白血病細胞株の増殖を著明に抑制し、細胞死を誘導した。以上より、CREB/Alu 融合遺伝子を標的とした分子標的療法

の可能性が示唆された。また、この融合遺伝子は、CREB 遺伝子の第2エクソンから第4イントロンの Alu に続き、その後第4イントロンの週末部位に近いポリ A サイトまで続いていることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Inazawa Y, Saeki K, Yuo A: Granulocyte colony-stimulating factor-induced terminal maturation of human myeloid cells is specifically associated with up-regulation of receptor-mediated function and CD10 expression. *Int J Hematol* 77:142-151, 2003.
2. Saeki K, Saeki K, Yuo A: Distinct involvement of cAMP-response element-dependent transcriptions in functional and morphological maturation during retinoid-mediated human myeloid differentiation. *J Leukoc Biol* 73:673-681, 2003.
3. Kobayashi N, Saeki K, Yuo A: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 induce cell cycle progression through the synthesis of c-Myc protein by internal ribosome entry site-mediated translation via phosphatidylinositol 3-kinase pathway in human factor-dependent leukemic cells. *Blood* 102:3186-3195, 2003.
4. Saeki K, Zhang H, Nakatsu M, Yoshimori T, Kabeya Y, Yamamoto A, Kaburagi Y, Yuo A: Insulin-dependent signaling regulates azurophil granule-selective macroautophagy in human myeloblastic cells. *J Leukoc Biol* 74:1108-1116, 2003.
5. Inazawa Y, Nakatsu M, Yasugi E, Saeki K, Yuo A: Lipid droplet formation in human myeloid NB4 cells stimulated by all trans retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor: possible involvement of peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Cell Struct Funct* 28:487-493, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
①細胞製造装置ならびに細胞製造方法
特願2003-123629
②急性白血病細胞死誘導体
特願2003-334125
③無フィーダーES細胞の
血液分化培地と分化方法
特願2004-061470
2. 実用新案取得 なし
3. その他 なし

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」分担研究報告書

変異型アデノウイルスを用いたがんの遺伝子治療

分担研究者 濱田 洋文、札幌医科大学 分子医学研究部門教授

研究要旨 F/RGD 変異型アデノウイルスによって、骨髄由来の MSC 細胞に、従来型に比べ 30 倍も高い遺伝子導入効率を得られた。浸潤性の高いグリオーマに対する脳内腫瘍治療実験を行ったところ、MSC 細胞は、グリオーマ細胞塊の辺縁に添って拡がり、サイトカイン遺伝子導入を併用することによって強い抗腫瘍効果を得られた。悪性神経膠腫に選択的な DDS として有望である。

A. 研究目的

腫瘍細胞上に発現する分子を特異的に認識する新規ファイバー変異型アデノウイルスを作製し、アデノウイルスベクターによる腫瘍特異的遺伝子治療法を開発する。

B. 研究方法と結果、考察

1. 平成 15 年度には、腫瘍標的化のターゲット候補を探索するために、抗体の Fc ドメインに結合する Protein A の Z33 モチーフを含む F40S ファイバー変異型 F40Z33 アデノウイルスを作成し、ベクターを抗体で架橋することによって遺伝子導入効率が高まるか否かを検討する系を樹立した。さまざまな腫瘍細胞に対して、選択的標的化の可能な表面分子の同定を試みるべく、準備を進めている。

2. 不死化間葉系幹細胞 MSC を樹立し、神経幹細胞に分化誘導することができた。MSC ないし神経幹細胞を静脈内投与すると、傷害を受けた中枢神経組織に特異的に集積した。神経幹細胞の正常脳組織内での遊走様式は、グリオーマ細胞の浸潤様式（遊走様式）と類似しており、神経幹細胞は新規ウイルスベクターのキャリアーとして、神経膠腫を標的とした細胞投与療法が可能であることがわかった。さらに、F/RGD 変異型アデノウイルスによって、骨髄由来の MSC 細胞に、従来型に比べ 30 倍も高い遺伝子導入効率を得られた。浸潤性の高いグリオーマに対する脳内腫瘍治療実験を行ったところ、MSC 細胞は、グリオーマ細胞塊

の辺縁に添って拡がり、サイトカイン遺伝子導入を併用することによって強い抗腫瘍効果を得られた。悪性神経膠腫に選択的な DDS として有望であることがわかった。

C. 研究発表

1. Kawano Y, et al. Hamada H, *Ex vivo* expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitor cells using a coculture system with human telomerase catalytic subunit (hTERT)-transfected human stromal cells. *Blood*, 101(2): 532-540, 2003.
2. Tsuda H, et al., Hamada H, Efficient BMP2 gene transfer and bone formation of mesenchymal stem cells by a fiber-mutant adenoviral vector. *Mol. Ther.*, 7(3): 354-365, 2003.
3. Nakamura T, Sato K, and Hamada H. Reduction of natural adenovirus tropism to the liver by both ablation of fiber-Coxsackievirus and adenovirus receptor interaction and use of replaceable short fiber. *J. Virol.*, 77(4): 2512-2521, 2003.
4. Dehari H, et al., Hamada H. Enhanced antitumor effect of RGD fiber-modified adenovirus for gene therapy of oral cancer. *Cancer Gene Therapy*, 10(1): 75-85, 2003.
5. Kobune M, et al., Hamada H, Telomerized human multipotent mesenchymal cells can differentiate into hematopoietic and cobblestone area-supporting cells. *Exp. Hematol.* 31(8):715-22, 2003.

IGF-I 受容体 dominant negative を用いた膵臓がんに対する分子療法

分担研究者 今井浩三 札幌医科大学医学部内科学第一講座 教授

研究要旨 ヒト膵臓がん細胞株において insulin-like growth factor (IGF)-I 受容体 dominant negative (IGF-Ir/dn)による IGF-Ir 阻害が下流のシグナル伝達に及ぼす影響ならびに IGF-Ir/dn の腹膜播種モデルにおける抗腫瘍効果を検討した。膜貫通ドメインと細胞外ドメインを保持する IGF-Ir/dn に比べ、細胞外成分のみからなる分泌型の IGF-Ir/dn は、より強い抗腫瘍効果を示し、bystander 効果が示唆された。IGF-Ir/dn による増殖抑制効果は主として PI3-K/Akt 系を介して、一方、アポトーシスの誘導は主に PI3-K/Akt 系と p38 系の両者を介して発揮されていると考えられた。IGF-Ir/dn は、腹膜播種モデルにおいてリンパ節転移数と肝転移数を減じ、マウスの生存期間を有意に延長した。従って、IGF-Ir/dn は膵臓がんの有望な分子治療法と成りえることが示唆された。

A. 研究目的

Insulin-like growth factor (IGF)等の増殖因子とその受容体からのシグナル伝達は、がん細胞の増殖を引き起こす。dominant negative (dn)として働く IGF-Ir (IGF-Ir/dn)は膵臓がん細胞に対して *in vitro* およびヌードマウス皮下腫瘍モデルにおいて著明な抗腫瘍効果を示すことを報告してきた。本年度は、ヒト膵臓がん細胞株において、細胞外成分のみからなるアミノ酸 482 の IGF-Ir/dn (Ad-IGF-Ir/482st)の bystander 効果を検討した。更に、IGF-Ir/dn による腫瘍増殖抑制とアポトーシス誘導時におけるシグナル伝達に与える影響および腹膜播種モデルにおける効果を検討し、膵臓がんにおける IGF-Ir/dn を用いた新規分子療法の可能性を追求した。

B. 研究方法

Ad-IGF-Ir/482st とチロシンキナーゼを欠くが膜貫通ドメインと細胞外ドメインを保持するアミノ酸 950 の Ad-IGF-Ir/950st の 2 種の IGF-Ir/dn をアデノウイルスベクターに組み込み、膵臓がん細胞株に導入し、抗腫瘍効果を比較するとともに、IGF-Ir シグナル伝達への影響を検討した。また、IGF-Ir/dn の生体内での抗腫瘍効果をマウス腹膜播種モデルを用いて検討した。

C. 研究結果

Ad-IGF-Ir/482st は分泌型蛋白を産生し、培養上清に存在することを明らかにした。IGF-Ir/482st は IGF-Ir/950st より強いアポトーシス誘導能を有していた。IGF-Ir/482st 発現細胞の培養上清を用いて細胞株を培養すると、増殖が抑制され、アポトーシスの誘導が増加した。膵臓がん細胞に IGF-Ir/dn を導入すると、IGF-I、-II 刺激による Akt-1、p38 のリン酸化は抑制されたが、MAPK-1、-2 のリン酸化には影響しなかった。また、IGF 結合蛋白には影響しないことが示唆された。PI3-K 阻害剤

と MEK1 阻害剤は膵臓がん細胞の増殖を抑制したが、p38 阻害剤は抑制しなかった。一方、PI3-K 阻害剤、p38 阻害剤はアポトーシス誘導を増強したが、MEK1 阻害剤は効果を認めなかった。IGF-Ir/dn は、腹膜播種モデルにおいてリンパ節転移数と肝転移数を減じ、マウスの生存期間を有意に延長した。

D. 考察

IGF-Ir/482st は分泌型蛋白を発現するため、導入細胞のみならずその周囲の細胞に対する効果 (bystander 効果) を発揮し、より効果的であったと考えられた。IGF-Ir/dn の膵臓がんにおける増殖抑制効果は主として PI3-K/Akt 系を介して、アポトーシスの誘導は主に PI3-K/Akt 系と p38 系の両者を介して発揮していると考えられた。IGF-Ir/dn は腹腔内リンパ節・肝臓への転移抑制効果を示し、膵臓がんの予後不良な理由の一つである腹膜播種にも効果が期待できると考えられた。

E. 結論

IGF-Ir/dn は、PI3-K/Akt 系や p38 系の抑制を介し、抗転移効果を含めた著明な抗腫瘍効果を示した。従って、IGF-Ir/dn、特に bystander 効果を併せ持つ分泌型は、膵臓がんの有望な分子治療法と成りうることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Min Y, Adachi Y, Yamamoto H, Imai K, et al., Genetic blockade of the insulin-like growth factor-I receptor: a promising strategy for human pancreatic cancer. *Cancer Res.*, 63: 6432-6441, 2003.

2. 学会発表

Adachi Y, Yamamoto H, Imai K, et al., The dominant negative inhibitor of insulin-like growth factor-I receptor is promising strategy for human human pancreatic cancer cells. The 93rd annual meeting of AACR, 2003, Washington, DC.

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

ミサイル療法に向けた薬物担体（ナノキャリア）の開発に関する研究
研究者 藤本啓二 慶應義塾大学大学院理工学研究科助教授

研究要旨 薬剤を細胞質内に送達させるためのナノキャリアの作製を行った。リポソームキャリアは還元状態することによってのみ細胞質内に抗ガン剤を送達させることができた。抗ガン剤を封入させたペプチドナノ粒子も細胞の増殖を抑えることができた。

A. 研究目的

抗癌剤および遺伝子の細胞への効率的な送達のために、標的指向性を提示し、かつ作用分子を保持するナノサイズの担体（ナノキャリア）を作製することを目的とする。

B. 研究方法

機能性リポソームはジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、コレステリルヘキサクシネート（CHEMS）、およびジスルフィド（S-S）結合を持つ PEG-S-S-DOPE を用いて作製した。さらに膜透過性を付与するために、HIV-1 ウィルスの膜透過性ペプチドである TAT(49-57)に相同性の高いオリゴペプチドであるアルギニン8量体を膜上に固定化した。このリポソームに水溶性の抗癌剤 Methotrexate(MTX)を内封し、癌細胞に添加して細胞の増殖阻害率を測定した。

一方、ポリエチレングリコール鎖をグラフト化したポリ-L-リジンを作製し、 β シート形成能を利用してナノ粒子化を行った。このポリマーにさらにホスファチジン酸を導入して、疎水性相互作用によりナノ粒子を作製した。これらナノ粒子を FITC をラベルして細胞内在化を観察した。次に抗癌剤 アドリアマイシン(ADR)を担持させて薬物の放出能について検討を行った。さらに細胞の増殖阻害活性について検討を行った。

C. 研究結果

（リポソーム） これまでにこのリポソームは還元環境において表層からポリマー鎖が解離することを見出している。今回はこの解離に伴って細胞透過性ペプチドが表面に露出することにより、リポソームの細胞への取り込みが促進されることを見出した。さらに抗ガン剤であるMTXを封入さ

せたリポソームでは、還元剤であるL-cysteineを添加した系においてのみ細胞増殖を阻害することを見出した。

（ペプチドナノ粒子） 共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、蛍光物質をラベルしたペプチドナノ粒子はともにヒト扁平上皮癌細胞(A431)の内部に取り込まれることがわかった。ホスファチジン酸を含有するナノ粒子はその高い疎水性のためにより多くの ADR を担持することができた。いずれのナノ粒子も低 pH で漏洩が増大することがわかった。また、free の ADR には及ばないが、細胞増殖を抑制することができた。

D. 考察

開発したリポソームは細胞への薬物送達を OFF から ON へと制御することが可能である。これにより目的とする細胞のみに作用させることが可能となる。一方、ナノ粒子は内封物質を徐放することができる新しい担体となる可能性が示された。ペプチド性医薬等への応用が期待できる。

E. 結論

還元剤をトリガーとして細胞内に物質を送達可能なリポソームが得られた。物質を徐放可能なペプチドナノ粒子が得られた。

F. 健康危険情報

現段階では特になし。

G. 研究発表

1. 学会発表

第 25 回日本バイオマテリアル学会、環境変化により細胞指向性を発現するリポソームの開発
第 25 回日本バイオマテリアル学会、 β シート構造形成を駆動力とするナノ粒子の創製とキャリアとしての応用

小分子型チロシンキナーゼ阻害剤による難治がんの治療の可能性
ZD6474の作用 VEGFR, EGFR kinase inhibition

分担研究者 大江裕一郎 国立がんセンター中央病院内科 医長

研究要旨

A. 研究目的

小分子型チロシンキナーゼ阻害剤による難治がんの治療の可能性を検討する目的で、マルチターゲットチロシンキナーゼ阻害剤である ZD6474 の胃癌に対する抗腫瘍効果とその感受性因子について検討した。

B. 研究方法

1. 細胞株の性状解析:ヒトスキルス胃癌由来の signet ring cell carcinoma で 44As3 および 58As1 は国立がんセンター柳原らが樹立した。同細胞株を胃壁への同所移植担がんマウスモデルはスキルス胃癌の腹膜播種、腹水の貯留をしめす。同細胞のVEGF産生をELISAおよびRT-PCRで、チロシンキナーゼ阻害剤に対する *in vitro* 感受性試験をMTTアッセイで行った。

2. 胃壁移植モデルでの ZD6474 および各種抗癌剤の抗腫瘍効果の検討:44As3 および 58As1 を胃壁に同所移植し、ZD6474 を経口あるいは皮下投与し、腹水の出現をサロゲートエンドポイントとしてマウス生存を検討した。

C. 研究結果

1. 44As3 および 58As1 の性状

44As3 及び 58As1 細胞における各種VEGFアイソタイプの発現をヒト特異的プライマーを用いて検討した。44As3 は VEGF-A, VEGF-C, 58As1 は VEGF-A のみを分泌していた。同細胞株の各種抗癌剤およびチロシンキナーゼ阻害剤に対する感受性をMTTアッセイで検討した。ZD6474 の 44As3 および 58As1 に対する IC_{50} 値は 12.0, 5.7 μ M で、ZD6474 に対する *in vitro* 感受性は高くなかった。EGFR 特異的チロシンキナーゼ阻害剤ゲフィティニブの各細胞に対する IC_{50} 値は 17.5, 9.7 μ M で中等度感受性を示した。

2. 胃壁移植モデルでの ZD6474 および各種抗癌剤の抗腫瘍効果の検討: 同細胞を胃壁に同所移植すると、ほぼ 100% 腹膜浸潤し、腹水が出現後、迅速に死に至る。同モデルにおける ZD6474 の抗腫瘍効果を検討した。

各細胞を移植後、3 日後より 50, 100 mg/kg/日 連日経口投与(14 日間)を行った。

微小管作用薬パクリタキセル (10 mg/kg/日)と比較すると弱いが、ZD6474 は原発巣の直接的な腫瘍縮小効果を濃度依存性に示した。

同モデルにおける ZD6474 投与の生存に及ぼす効果は、非常に効果の高いパクリタキセルにはおよばないが、ZD6474 投与群で優位に生存の延長がみとめられた。

また、ZD6474 経口と静脈投与の比較では、効果は経口

投与において優れ、44As3細胞モデルでより顕著であった。以上により、ZD6474はスキルス胃癌腹膜播種に有効である可能性が示唆された。

D. 考察

1. ZD6474などのチロシンキナーゼ阻害剤が経口投与で、スキルス胃癌腹膜播種に有効である可能性が示された。
2. VEGF-C 産生がZD6474に対する腫瘍の感受性に関わる可能性が示唆される。VEGF-Cがリンパ管増殖に関連することから、腹膜播種進展機序に同アイソタイプが関連している可能性が示唆される。作用機序を検討中である。

E. 結論

Multitarget チロシンキナーゼ阻害剤がスキルス胃癌腹膜播種に有効である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohe, Y., et al. A phase II study of cisplatin and docetaxel administered as three consecutive weekly infusions for advanced non-small-cell lung cancer in elderly patients. *Ann. Oncol.* 15: 45-50, 2004.

2. Natsume, T., Ohe, Y., et al. Antitumor activity of TZT-1027 (Soblidotin) against vascular endothelial growth factor-secreting human lung cancer *in vivo*. *Cancer Sci.* 94: 826-833, 2003.

3. Ohe, Y., et al. Long-term follow-up of patients with unresectable locally advanced non-small cell lung cancer treated with chemoradiotherapy: A retrospective analysis of the data from the Japan Clinical Oncology Group trials (JCOG0003A). *Cancer Sci.* 94: 729-734, 2003.

4: Sekine, I., Ohe, Y., et al. Phase I/II trial of weekly cisplatin, etoposide, and irinotecan chemotherapy for metastatic lung cancer: JCOG 9507. *Br. J. Cancer* 88: 808-813, 2003.

2. 学会発表

1. Ohe, Y., et al. Preliminary results of the four-arm cooperative study (FACS) for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) in Japan. 2003 ASCO Ann. Meet., A2509, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

ヒト白血病細胞における新しい増殖機構の解明と分子標的療法への応用の可能性

分担研究者 戸邊 久美子 国立国際医療センター研究所室長

研究要旨 造血因子に依存して増殖するヒト白血病細胞株の増殖機序を解明し、その分子機構を治療の標的とするための基礎的な研究を行った。分子標的の候補としては、白血病細胞の増殖に重要とされている c-Myc を取り上げた。3種類のヒト白血病細胞株 (MO7e、F36P、UT7) を用いて造血因子 (GM-CSF、IL-3) がこれらの細胞株の増殖を誘導する機序を解析し、造血因子が IRES というユニークな機構による翻訳を介して c-Myc 蛋白の量を増やして、それが細胞周期の進行を促進することを明らかにした。この機構の上流には PI3K が関与する事も併せて明らかにした。今後は、患者検体でのこのような機構の存在の証明、正常血球でのこの機構の無いことの証明、この機構を直接制御する分子標的の探索が重要である。

A. 研究目的

造血器悪性腫瘍は、発病当初から腫瘍細胞がびまん性に広がり、その増殖速度も早く「悪性度の高いがん」である。抗がん剤への感受性は比較的良好であるが、耐性も獲得しやすく「難治性のがん」でもある。したがって、治療法の開発が最も重要な研究課題である。

近年の先端研究の進歩のなかで、細胞内の新たな標的分子を同定して、それにねらいを定めて治療薬を開発する流れが加速している。いったん適当な標的を発見すれば、それに作用する「低分子化合物」の探索は、製薬会社などの研究開発部門によって精力的に進めることができる。細胞内のチロシンキナーゼ (abl) を標的とした抗白血病剤 (グリベック) の開発成功例は有名である。公的機関の研究者は、新しい有望な分子標的を民間に提示することが求められている。

今回の研究では、造血因子依存性のヒト白血病細胞株を用いて、新しい増殖機構の探索を行った。分子標的の候補としては、白血病細胞の増殖に重要とされている c-Myc を取り上げ、その遺伝子の転写ではなく翻訳に関する事項に焦点を当てて研究を進めた。

B. 研究方法

3種類のヒト白血病細胞株 (MO7e、F36P、UT7) を用いた。これらはいずれも造血因子 (GM-CSF、IL-3) に依存性 (反応性) である。細胞周期の分布は、PI で染色した後にフローサイトメトリーによって測定した。一部の実験では、G1期の細胞のみをエルトリエーターで純化して用いた。蛋白の同定は、通常のエスタンプロットによったが、mRNA の同定は RNase protection assay を用いた。蛋白の細胞内安定性 (細胞内半減期) は、35S メチオニンラベル法で行った。IRES 検出のための reporter gene assay は、2種類のルシフェラーゼ遺伝子を組み合わせたプラスミドを、ヌクレオフェクターを用いた遺伝子導入法を駆使して白血病細胞に導入して測定した。DNA 合成は、BrdU を用いた手法で測定した。(論理面への配慮)

本研究には、動物実験、ヒトへの何らかの物質の投与を行うような臨床研究、ヒトのクローンな

どの生命倫理に抵触するような実験、患者の遺伝 (子) 情報の収集などの個人のプライバシーに関わるような調査、研究は、いっさい含まれない。

C. 研究結果

2種類のヒト白血病細胞株 (MO7e、F36P) は、造血因子 (GM-CSF、IL-3) を除去すると増殖を停止して G1期になり、造血因子を再添加すると増殖を開始して通常の細胞周期分布となった。この時、c-Myc 蛋白の量は、増殖停止とともに著明に減少して、再増殖と共に増加した。この時に、c-myc の mRNA は全く変化せず、また、c-Myc 蛋白の細胞内での動態、半減期も変化しなかった。以上より、造血因子の有無による c-Myc 蛋白のダイナミックな変化は、遺伝子の転写や蛋白の安定性ではなく、mRNA から蛋白への翻訳レベルで制御されていると考えられた。

通常翻訳機構は、キャップ依存性翻訳と呼ばれ、ラバマイシンによって阻害を受ける刺激伝達機構を介して機能している。我々は、用いたヒト白血病細胞において、キャップ依存性の翻訳機構がラバマイシンによって阻害されていること確認した上で、造血因子による c-Myc 蛋白の増加がラバマイシンによって阻害されか否かを検討したが、2種類の白血病細胞株 (MO7e、F36P) いずれにおいても、阻害は認められなかった。したがって、通常キャップ依存性翻訳機構ではない機構が作用していることが示唆される。

c-Myc 蛋白の翻訳においては、キャップ依存性の機序とは異なる IRES (internal ribosome entry site) という特異な機序が機能しうることが既に知られている。これは、c-myc の mRNA の5'非翻訳領域 (5'UTR) に翻訳装置が直接結合して翻訳を行う機序で、c-myc の5'UTR を組み込んだコンストラクト (2種類のルシフェラーゼ遺伝子も組み込んで、通常キャップ依存性翻訳か IRES かを識別するプラスミド) を用いて測定できる。その結果、造血因子 (GM-CSF、IL-3) に依存して、2種類の細胞株のいずれにおいても IRES を介した翻訳が機能していることが明らかとなった。

このような造血因子による c-myc の翻訳機構が、どの様な上流のシグナル伝達機構を介しているかを明らかにするために、PI3K の特異的阻害剤 LY

294002の影響を検討した。LY294002は、造血因子による c-Myc 蛋白の増加を完全に阻害しただけではなくて、c-myc の5'UTR を組み込んだコンストラクト（2種類のルシフェラーゼ遺伝子も組み込んで、通常のキャップ依存性翻訳か IRES かを識別するプラスミド）を用いた測定における造血因子依存性の IRES 活性をも、完全に抑制した。従って、IRES による翻訳を介した c-Myc の増加において PI3K が重要な役割をはたしていることが明らかとなった。

最後に、c-myc の転写が造血因子によって増強されるヒト白血病細胞株 UT7 においても、PI3K を介した IRES による翻訳が機能しているか検討したところ、機能していることが確認できた。

なお、上記全ての細胞株において、PI3K を介した IRES の経路が、Rb のリン酸化、細胞周期の進行、DNA 合成に関与していること確認した。

D. 考察

造血因子 (GM-CSF、IL-3) によるヒト白血病細胞株の増殖に関わる分子機序として、これまでに報告されていない新しい機序、すなわち、PI3K を介した IRES 機序を用いて c-myc の翻訳が増加して細胞周期が進行するという機序、を明らかにした。このような造血因子の新しい細胞内シグナル伝達機序が、今回の研究対象のような白血病細胞特有の現象なのか、正常細胞でも普遍的に起こりうる現象なのかは、現時点では明らかではない。正常ヒト骨髓単核球を用いた実験を繰り返したが、GM-CSF などのよる c-Myc の増加や増殖は検出できず、正常ヒト血液細胞では機能していない機序ではないかと考えている。

一方、細胞株ではなくて、患者検体ではどうかは、これからの検討課題である。一般的に、GM-CSF や IL-3 が有名な白血病細胞増殖因子であることを鑑みると、患者検体でも同様の機序が存在する可能性は高いと想定する。ただし、患者検体においては白血病細胞が造血因子を産生して autocrine growth をきたすことが知られており、造血因子のシグナルが常に on の状態であると考えられ、外から添加した造血因子による作用を検出するのが困難である可能性も否定できない。

今回の IRES を介するユニークな機序が白血病細胞特異的で分子標的となりうるとしても、上流の PI3K の様な一般的なシグナル伝達分子が、がん治療の分子標的になりうるかどうかは不明で、IRES に直接関わる標的分子の探索が重要である。今後の網羅的な探索が、新たな分子標的を提供する事を期待したい。

E. 結論

3種類のヒト白血病細胞株 (MO7e、F36P、UT7) を用いて造血因子 (GM-CSF、IL-3) がこれらの細胞株の増殖を誘導する機序を解析し、造血因子が IRES というユニークな機序による翻訳を介して c-Myc 蛋白の量を増やして、それが細胞周期の進行を促進することを明らかにした。この機序の上流には PI3K が関与する事も併せて明らか

にした。今後は、患者検体でのこのような機序の存在の証明、正常血球でのこの機序のないことの証明、この機序を直接制御する分子標的の探索が重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Inazawa Y, Saeki K, Yuo A: Granulocyte colony-stimulating factor-induced terminal maturation of human myeloid cells is specifically associated with up-regulation of receptor-mediated function and CD10 expression. *Int J Hematol* 77:142-151, 2003.
2. Saeki K, Saeki K, Yuo A: Distinct involvement of cAMP-response element-dependent transcriptions in functional and morphological maturation during retinoid-mediated human myeloid differentiation. *J Leukoc Biol* 73:673-681, 2003.
3. Kobayashi N, Saeki K, Yuo A: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 induce cell cycle progression through the synthesis of c-Myc protein by internal ribosome entry site-mediated translation via phosphatidylinositol 3-kinase pathway in human factor-dependent leukemic cells. *Blood* 102:3186-3195, 2003.
4. Saeki K, Zhang H, Nakatsu M, Yoshimori T, Kabeya Y, Yamamoto A, Kaburagi Y, Yuo A: Insulin-dependent signaling regulates azurophilic granule-selective macroautophagy in human myeloblastic cells. *J Leukoc Biol* 74:1108-1116, 2003.
5. Inazawa Y, Nakatsu M, Yasugi E, Saeki K, Yuo A: Lipid droplet formation in human myeloid NB4 cells stimulated by all trans retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor: possible involvement of peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Cell Struct Funct* 28:487-493, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
 - ①細胞製造装置ならびに細胞製造方法
特願2003-123629
 - ②急性白血病細胞死誘導体
特願2003-334125
 - ③無フィーダーES細胞の
血液分化培地と分化方法
特願2004-061470
2. 実用新案取得 なし
3. その他 なし

細胞標的の画像化の試み

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

マウス腹腔に投与した RET 結合ペプチド (RBP) が皮下に移植した RET 陽性癌細胞に集積したことより、我々は、RBP 結合カルボキシメチルデキストラン磁性体 (CMDM-RBP) ナノ粒子を作成し、非侵襲的な MRI 診断に向けた基礎検討を行ってきた。本研究は、高輝度放射光を用いた蛍光放射光顕微鏡 (Scanning X-ray Fluorescence Microscopy; SX-FM) の開発と共に、細胞レベルで CMDM-RBP の結合状態を直接モニターすることに成功した。SX-FM により、磁性体鉄元素の経過時間に従った取り込み量や細胞内局在の評価が可能であり、標的化の詳細なモニターに有用と考える。

A. 研究目的

RET binding peptide (RBP1) は、8つのペプチドからなり、神経芽腫に高率に発現する RET 蛋白や卵巣癌で認められる RET 様蛋白を認識する。臨床診断応用のために、3価の Fe を有する磁性体ナノパーティクルに RBP1 を結合させることに成功し、これまでに、MRI (4.7T) により 5×10^6 個の RET 陽性細胞を認識している。しかしながら、標的化について、磁性体を細胞レベルで直接評価することは困難であった。本研究では、蛍光放射光顕微鏡 (SX-FM) の開発により、細胞内元素分布の画像化を目的とする。

B. 研究方法

1. SX-FM 試料作成

細胞を SX-FM 専用基盤へ播種し、21時間後 CMDM-RBP を細胞培養上清中に添加処置する。12時間後、2% パラホルムアルデヒド PBS および 70% 氷冷エタノール固定を施す。固定処理後 12時間乾燥処理を施す。微分干渉像を得る。

2. CMDM-RBP の細胞結合および取り込み能

(ア) 黒鉛炉加熱原子吸光分析による鉄元素測定

(イ) SX-FM による鉄元素の測定

測定は、理化学研究所播磨研究所 (SPRING-8) 施設による高輝度放射光にて、大阪大学工学部との共同研究で行った。高感度蛍光放射光検知計 (DSS) により、細胞内元素特異エネルギースペクトルを、X-ray Beam Size: $0.1\text{H} \times 0.2\text{V}\mu\text{m}$, Scanning Pitch: $0.2\mu\text{m}$, 150×150 pts., 0.5sec/pt . 12HRS で測定した。

C. 研究結果

- 細胞由来の鉄元素量は、黒鉛炉加熱原子吸光分析により約 10fg/cell 以下であったのに対し、RET 陽性細胞では 500fg/cell であった。
- SX-FM による RET 陽性細胞での CMDM-RBP による標的をモニターした。選択した測定条件では、細胞固有の鉄元素分布は僅かにしか認められず、細胞全体および核内に特に強い鉄元素シグナルが認められた。

D. 考察

SX-FM を用いた CMDM の高分解画像により、RBP の標的分子に対する特異性、MRI 診断のための CMDM-RBP の適正投与時間、濃度などの詳細な評価が可能である。また、CMDM 鉄磁性体以外で、生体に存在しない、例えばチタン、プラチナ、金などの元素を目的分子に標識することで、細胞内特定

分子の画像化も可能であることから、今後多様な応用が期待される。

E. 結論

RET 陽性癌細胞に対して、CMDM-RBP 結合を評価するために、SX-FM による高分解画像化が有用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

- Uchida, S., Kuma, A., Ohtsubo, M., Shimura, M., Hirata, M., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Yamashita, K. Binding of 14-3-3b but not 134-3-3s controls the cytoplasmic localization of CDC25B: binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B. *J. Cell Sci.*, in press.
- Minemoto, Y., Uchida, S., Ohtsubo, M., Shimura, M., Sasagawa, T., Hirata, M., Nakagama, H., Ishizaka, Y., and Yamashita, K. Loss of p53 Induces M-phase retardation following G2 DNA damage Checkpoint abrogation. *Arch. Biochem. Biophys.* 412, 13-19, 2003.

2. 学会発表

- Disrupted nuclear HP1 with premature chromatid separation by epigenetic effects of HIV-1 VPR. EMBL meeting; Chromatin and Epigenetics, Heidelberg, Germany, 6月, 2003.
- HIV アクセサリー遺伝子 VPR によるゲノム不安定性と HP1 α 第25回日本分子生物学会, 神戸, 12月, 2003.

H. 知的財産権の出願

RET 結合ペプチドについて国内特許申請中

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

白血病を標的とした新たな免疫細胞療法の開発研究

研究者 千葉 滋 東京大学医学部附属病院無菌治療部助教授

研究要旨 NKT 細胞による抗腫瘍効果を、胆癌モデルマウスを用いて解析した。In vitro では、NKT 細胞は、CD1d 拘束性に抗腫瘍効果を持つ。マウス T 前駆細胞性白血病細胞株である EL-4 は、CD1d の発現レベルが高いほどマウス個体内での増殖速度が低下し、マウスの生存期間が延長した。マウス個体において、NKT 細胞が CD1d 依存性に T 前駆細胞性白血病細胞に対する抗腫瘍を示すことが明らかになった。

A. 研究目的

Natural killer T (NKT)細胞は、CD1d 拘束性に抗腫瘍効果を持つ。胆癌モデルマウスを用いて、NKT 細胞を利用した抗腫瘍療法の可能性を探ることを目的とした。

B. 研究方法

マウス T 前駆細胞リンパ腫由来の細胞株である EL-4 を用いた、NKT 細胞の in vivo 抗腫瘍モデルを作成した。すなわち、CD1d を低レベルにしか発現していない親株 EL-4 に、CD1d cDNA を導入し、CD1d 発現レベルの異なる EL-4 細胞株を数種類樹立した。高発現、中発現の細胞株をそれぞれ複数用意し、これを同系の B57BL/6 マウスに静注し、マウスの生存率を解析した。

C. 研究結果

CD1d 発現レベルの高い EL-4 細胞ほど、in vitro においてより強く NKT 細胞による細胞障害を受けた。また、CD1d の発現レベルの高い EL-4 細胞を移植されたマウスほど、長期間生存した。この結果は、内因性の NKT 細胞が CD1d を介して腫瘍増殖に抑制的に働いたものと考えられた。

D. 考察

平成 14 年度までに、ヒト T 細胞性白血病や T リンパ芽球性リンパ腫においては、CD1d を高発現し、NKT 細胞の抗腫瘍活性の標的となることを in vitro の実験で示した。この結果と今回の胆癌モデルマウスを用いた成果とを合わせて考えれば、ヒト T 細胞性白血病や T リンパ芽球性リンパ腫においては、NKT 細胞を利用した治療法の開発が

可能ではないかと考えられた。

すなわち、患者から単球を分離して樹状細胞に分化させ、 α GalCer を利用した培養により、患者由来 NKT 細胞増やすことは容易である。これを単独で、あるいはさらに α GalCer とともに投与することにより、T 細胞性白血病や T リンパ芽球性リンパ腫の治療を行うことができる可能性があることが示された。

E. 結論

NKT 細胞は in vivo で T 細胞性白血病や T リンパ芽球性リンパ腫に対して抗腫瘍効果を示す。このことを利用した治療法の開発に道が開かれた。

F. 健康危険情報

現段階では特になし。

G. 研究発表

1. Chiba S, et al. A homeoprotein DLX-1 interacts with Smad4 and blocks a signaling pathway from activin A in hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci, USA* 100:15577-15582, 2003.
2. Maekawa Y, Tsukumo S, Chiba S, et al. Delta1-Notch3 interactions bias the functional differentiation of activated CD4⁺ T Cells. *Immunity* 19:549-559, 2003.
3. Takahashi T, Tanaka Y, Nieda M, Azuma T, Chiba S, et al. Dendritic cell vaccination for patients with chronic myelogenous leukemia. *Leuk Res* 27:795-802, 2003.