

厚生労働科学研究研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

独自開発した多因子による癌特異的増殖制御型アデノウィルスベクター
による革新的な癌遺伝子治療法の開発に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小財 健一郎

平成17(2005)年 4月

目 次

I. 総括研究報告		
ベクター開発と研究総括 に関する研究	-----	1
小財健一郎		
II. 分担研究報告		
1. 動物実験による治療効果の評価 に関する研究	-----	5
小宮節郎		
2. ウイルス学的・生物学的解析 に関する研究	-----	10
神面 純一		
3. 未知の癌特異化分子の同定と機能解析 に関する研究	-----	13
高橋 知之		
4. 大動物モデルで臨床応用の可能性の検討 に関する研究	-----	16
Shu-Hsia Chen		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	20

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書

ベクター開発と研究総括

主任研究者 小財 健一郎 久留米大学高次脳疾患研究所・教授

研究要旨

本研究の目的は、癌遺伝子治療の最大の問題点「生体内で遺伝子未導入癌細胞からの再発」の克服のため、我々が独自開発した多因子で制御可能な癌特異的増殖制御型アデノウイルスベクター(m-CRA)の作製法を用い、全く新しい革新的な癌遺伝子治療法を開発することである。

この観点より本年度はまず、癌特異化の候補因子による多種多様なm-CRAの迅速作製が実際にできるという成果を示し、本技術の有用性を実証し方法を確立することができた。そして当初の計画通りこれら種々のm-CRAの網羅的解析も行え、研究基盤を全て確立した。

次に我々は、最適m-CRA化の確立に取り組んだ。これは現在進行中で、次年度以降にさらに詳細を詰めて完成していく予定だが、今年度の研究成果だけでも、癌治療効果と癌特異化を同時に達成できるより最適なm-CRA化の概略の成果は得ている。

そして我々は本法で今年度、Survivin依存性m-CRA (Surv.m-CRA)という、新規のm-CRAの開発に成功した。Surv.m-CRAは非常に効果的で有効な癌治療薬（遺伝子治療法）になるという成果を得た。我々はさらに、既報告のなかでは最も有用であったTelomerase依存性CRA(Tert.CRA)と比較実験することにより、Surv.m-CRAがTert.CRAを、癌治療効果と癌特異性の両面で凌ぐという、具体的かつ画期的な成果を得た。

そして、よりよい新たなm-CRA開発を目指すことを目的として腫瘍生物学的基礎研究と遺伝子治療の基盤研究を行い、多くの成果を上げる事ができた。このように本年度は、当初の交付申請時における研究概要に記載した目的を順調に達成し具体的な成果を上げることができた。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

小宮説郎	鹿児島大学大学院・教授
神園純一	久留米大学高次脳疾患研究所・大学院生
高橋知之	久留米大学医学部・助教授
SH Chen	Mount Sinai School of Medicine, Assistant Professor

B. 研究方法

1. 新しい候補m-CRAの作製と解析

(1)複数の癌特異的因子でウイルス増殖を制御できるCRA (m-CRA) の迅速な作製

我々の新規m-CRA作製法により、癌抗原 (C EA、オステオカルシン等)、テロメラーゼ、細胞周期関連分子等、種々の癌特異化標的分子のプロモーターでのE1の発現調節、アデノウイルス(ADV)ゲノム上 (E1A, E1B, Fiber部分など) に改変、癌特異的治療効果遺伝子 (H Sv-tk, p53) など独立した多因子を組み合わせたm-CRAを作製する。

(2)種々の候補m-CRAの系統的なウイルス学的、腫瘍生物学的検討

これまでの単一因子でのCRAの癌特異化の一般性は未知数であり、またウイルス学的、生物学的解析が不十分であるため、一面的なデータが強調されている可能性がある。例えば、最近のテロメラーゼ依存性CRAの報告があるが (Cancer Res 2003, Gene Ther 2003)、これでは限られた細胞種でしか検討しておらず、ウイルス学的、生物学的検証も不十分であり、一方で「テロメラーゼ活性

A. 研究目的

本研究は、我々が最近独自開発したm-CRA作製システムにより、種々のオリジナルm-CRAを作製（開発）し、そしてこれらm-CRA遺伝子治療の臨床での治療効果、有用性を科学的に着実に検討することを目的とする。そして具体的に独自のm-CRAによる革新的な癌遺伝子治療法を世界に先駆け開発、確立することを最終目的とする。

は正常細胞でもS期には陽性となる」(Cell 2003)などの矛盾する基礎研究も最近報告されている。この解決のため、上記のm-CRAの迅速作成法で様々な組み合わせを持つ多くの候補m-CRAを次々に作製し、ウイルス学的、腫瘍生物学的に系統的な大規模なアプローチを行う。さらに新規因子によるm-CRAを創出する。

(倫理面への配慮)

研究の動物実験計画は久留米大学動物実験委員会での審査、承認されたものである。久留米大学動物実験取り扱い指針に従い、適切に動物実験を行う。

C. 研究結果

研究結果の概要としては、我々はまず、癌特異化の候補因子による多種多様なm-CRAの迅速作製が実際にできるという成果を示し、本技術の有用性を実証し方法を確立することができた。そして当初の計画通りこれら種々のm-CRAの網羅的解析も行え、研究基盤を全て確立した。次に我々は、最適m-CRA化の確立に取り組んだ。これは現在進行中で、次年度以降にさらに詳細を詰めて完成していく予定だが、今年度の研究成果だけでも、癌治療効果と癌特異化を同時に達成できるより最適なm-CRA化の概略の成果は得ている。そして我々は本法で今年度、Survivin依存性m-CRA (Surv.m-CRA)という、新規のm-CRAの開発に成功した。Surv.m-CRAは非常に効果的で有効な癌治療薬(遺伝子治療法)になるという成果を得た。我々はさらに、既報告のなかでは最も有用であったTelomerase依存性CRA(Tert.CRA)と比較実験することにより、Surv.m-CRAがTert.CRAを、癌治療効果と癌特異性の両面で凌ぐという、具体的かつ画期的な成果を得た。そして、よりよい新たなm-CRA開発を目指すことを目的として腫瘍生物学的基礎研究と遺伝子治療の基盤研究を行い、多くの成果を上げる事ができた。

このように当初の交付申請時における研究概要に記載した目的を順調に達成し具体的な成果を上げることができたわけである。また各分担研究者も各役割の詳細を後述しているが、本年度の研究の実施経過と研究結果の詳細をさらに以下に記載する。

1) 複数の癌特異的因子(CF)でウイルス増殖を制御できるCRA(m-CRA)の迅速な作製

この独自のm-CRA作製技術で、癌抗原(CEA、オステオカルシン)、テロメラゼ(TERT)、細胞周期関連分子(E2F)の各プロモーター(pr)でアデノウイルスのE1A、E1B(野生型wtと変異型mt)を発現調節する各種m-CRAを作製した。さらにCF prと治療遺伝子を挿入した、6種のCFを含むm-CRAも作製できた。つまりこれまで報告がない、短期間に多種のm-CRAを迅速作製と、6種のCFを含むm-CRA作製に

成功した。

2) 種々の候補m-CRAの系統的なウイルス学的、腫瘍学的検討

まず、各CF prでE1A(wt or mt)制御、E1Bをmt化した2~3因子制御の各m-CRAのin vitro機能解析を行った。基本的にどのm-CRAもCF内因性発現レベルとCFプロモーター活性に相関した癌治療効果をした。

次に、「癌治療効果を維持してさらなる癌特異性の向上(正常細胞でのウイルス増殖阻止)」を達成するm-CRA化を目的とし、E1の種々改変による2-4因子制御のTERT依存性m-CRA(Tert.mCRA)の増殖速度、癌特異性の変化を、多種多数の癌細胞と正常細胞で詳細にin vitro機能解を行い、m-CRA化による癌特異性の増強ができた。

3) 新規のm-CRAの開発

理想のCRAは、「全ての癌をターゲットでき、癌へは強力な治療効果(癌細胞では旺盛にウイルス増殖)を示しながら、正常組織へは副作用が無い(正常細胞では全くウイルス増殖しない)」特性を持つものである。この観点から、全く新規のCRAである、Survivin依存性m-CRA(Surv.mCRA)を開発したが、以下はその結果である。1. survivinは正常細胞では極めて低レベルの発現である一方、種々の癌細胞株で(発現レベルの差はあるが)比較的高発現していた。2. survivinプロモーターは、癌細胞ではCMVやRSVなどの強発現プロモーターと同等かそれ以上の活性を示す一方、正常細胞では活性を示さなかった。3. マーカー遺伝子のEGFPを持つSurv.CRAの解析では、癌では旺盛かつ内因性survivinの量に依存したウイルス増殖能と細胞障害作用を示す一方、正常細胞ではウイルス増殖能は著しく抑制され、明らかな細胞障害はみられなかった。4. 変異E1A(Rb結合領域)のCRAが報告されているため、野生型と変異型のE1Aを持つSurv.CRAを比較したが、能力に差はみられなかった。5. 敢えてsurvivinを低~中等度しか発現しない癌動物モデルで治療効果を評価したが、著明な腫瘍縮小効果を示した。6. さらに同様に癌一般を標的でき有用性が報告されているTelomerase(TE RT)依存性CRA(Tert.CRA)と詳細に比較したところ、Surv.CRAは癌でのウイルス増殖能、癌特異化(正常でのウイルス抑制能)の両者でTert.CRAを凌いでいた。よって結論としては、Surv.CRAはこれまで報告されているCRAと比べても、より高い癌特異性(正常への障害がない)と高い治療効果を持ち、種々の癌をターゲットできる利点を持つ。この点からSurv.CRAは有用な癌治療法となると期待される。

D. 考察

本年度の研究により得られた成果は非常に先駆的なものである。特に全てオリジナルである本研究成

果は、本邦での癌治療法の開発と臨床応用が可能となる能力を備えているため、特に既に具体的成果が得られているSurv. m-CRAに関しては、今後我が国での画期的な癌治療法の臨床応用への発展が期待されるものである。また本邦では遺伝子治療の基盤となるベクター開発から行っている施設は少ないため、本邦でのCRA研究の基盤確立という本成果は、本邦での今後の癌遺伝子治療研究の発展に活用していくことが望ましい。

E. 結論

本年度の科学的成果は、(1)6因子のm-CRA、多種多様のm-CRAの迅速作製、(2)m-CRA化による最適のCRA癌治療法の確立、(3)既存のCRAを凌ぐSurv. m-CRAの開発、である。このように順調に成果を出しているため、次年度以降もさらに本研究課題を進めていくことが期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagano S, Oshika H, Fujiwara H, Komiya S, Kosai K.: An Efficient Construction of Conditionally Replicating Adenoviruses that Target Tumor Cells with Multiple Factors. *Gene Ther* 2005 (in press)
- 2) Kamizono J, Nagano S, Murofushi Y, Komiya S, Fujiwara H, Matsuishi T, Kosai K.: Survival-in-responsive conditionally replicating adenovirus exhibits cancer-specific and efficient viral replication. *Cancer Res* 2005 (in press)
- 3) Yuge K, Takahashi T, Nagano S, Terazaki Y, Murofushi Y, Ushikoshi H, Kawai T, Khai T, Nakamura T, Fujiwara H, Kosai K.: Adenoviral Gene Transduction of Hepatocyte Growth Factor Elicits Inhibitory Effects for Hepatoma. *in press. Int J Oncol* 2005
- 4) Ikoma T, Takahashi T, Nagano S, Li Y-M, Ohno Y, Ando K, Fujiwara T, Fujiwara H and Kosai K.: A definitive role of RhoC in metastasis of orthotopic lung cancer in mice. *Clin Cancer Res.* 10; 1192-1200, 2004
- 5) Nagano S, Yuge K, Fukunaga M, Terazaki Y, Fujiwara H, Komiya S, Kosai K.: Gene Therapy eradicating distant disseminated micro-metastases by optimal cytokine expression in the primary lesion only -novel concepts for successful cytokine gene therapy. *Int. J. Onol.* 24: 549-558, 2004
- 6) Iida SI, Hirota T, Morisaki T, Marumoto T, Hara T, Kuninaka S, Honda S, Kosai KI, Kawasuji M, Pallas DC, Saya H.: Tumor suppressor WARTS ensures genomic integrity by regulating both mitotic progression and G(1) tetraploidy che

ckpoint function. *Oncogene.* 23(31): 5266-5274, 2004

- 7) Okada H, Takemura G, Kosai K., Li Y, Takahashi T, Esaki M, Yuge K, Miyata S, Maruyama R, Mikami A, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H.: Postinfarction gene therapy against transforming growth factor-beta signal modulates infarct tissue dynamics and attenuates left ventricular remodeling and heart failure. *Circulation* 2005 (in press)
 - 8) Minatoguchi S, Takemura G, Chen XH, Wang N, Uno Y, Koda M, Arai M, Misao Y, Lu C, Suzuki K, Goto K, Komada A, Takahashi T, Kosai K., Fujiwara T, Fujiwara H.: Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation.* 109; 2572-2580, 2004
 - 9) Li Y, Takemura G, Kosai K., Takahashi T, Fujiwara H.: Critical roles for the Fas/Fas ligand system in postinfarction ventricular remodeling and heart failure. *Circ.Res.* 95(6): 27-36,2004
 - 10) Hisaka Y, Ieda M, Nakamura T, Kosai K., Ogawa S, Fukuda K.: Powerful and controllable angiogenesis by using gene-modified cells expressing human hepatocyte growth factor and thymidine kinase.. *J Am Coll Cardiol.* 43:1915-22, 2004
 - 11) Ushikoshi H, Takahashi T, Chen X, Khai N C, Esaki M, Goto K, Takemura G, Maruyama R, Minatoguchi S, Fujiwara T, Nagano S, Yuge K, Kawai T, Murofushi Y, Fujiwara H, Kosai K.: Local overexpression of HB-EGF exacerbates remodeling following myocardial infarction by activating non-cardiomyocytes. *Lab Invest* 2005 (in press)
 - 12) Kawai T, Takahashi T, Fujiwara H, Kosai K.: Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by FGF-2 and BMP-2. *Circ. J.* 68(7): 691-702,2004
 - 13) Tada T, Nguyen JB, Hitoshi Y, Watson NP, Dunn JF, Ohara S, Nagano S, Kosai K., Israel MA.: Diffuse Encephaloventriculitis and Substantia Leukoencephalopathy after Intraventricular Administration of Recombinant Adenovirus. *Neurol Res* 2005 (in press)
2. 学会発表
(主な学会発表のみ；海外学会とワークショップ以上の国内学会の発表)
- 1) Murofushi Y, Nagano S, Komiya S, Kosai K.: A rapid, efficient and feasible method for constructing conditionally-replicating adenoviral vectors that specifically target cancer cells with multiple factors. The American Society of Gene Therapy's 7th Annual Meeting, 2-6 Jun, 2004 (Minneapolis; USA)

- 2) Kosai K., Isagai T, Kusaga A, Hirata K, Nagano S, Murofushi Y, Matsuishi T.: Adenoviral MeCP2 Gene Therapy Partially Improves Neurological Symptoms of Rett Syndrome in Mice. 5th Annual Rett Syndrome Symposium. June 28-30, 2004. (Baltimore, USA) (国際学会・招請講演)
- 3) Kosai K., Kamizono J, Nagano S, Murofushi Y.: A rapid, efficient and feasible method for constructing conditionally-replicating adenoviral vectors that specifically target cancer cells with multiple factors: Potentials for new cancer gene therapies. 9th World Congress on Advances in Oncology and 7th International Symposium on Molecular medicine. October 14-16, 2004 (Crete, Greece). (国際学会・招請講演)
- 4) Kamizono J, Nagano S, Murofushi Y, Kosai K.: Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus achieves specific and efficient cancer therapy. 9th World Congress on Advances in Oncology and 7th International Symposium on Molecular medicine. October 14-16, 2004 (Crete, Greece).
- 5) H. Ushikoshi, T. Takahashi, M. Esaki, N.C.Khai, T. Kawai, S. Minatoguchi, T. Fujiwara, K. Kosai.: Membrane protein CD9 regulates hypertrophy and heart failure via EGFR signaling in vitro and in vivo. The 77th Scientific Sessions of American Heart Association. 2004, November 7-10, 2004 (New Orleans, LA, USA).
- 6) H. Okada, G. Takemura, K. Kosai, Y. Li, K. Yuge, M. Esaki, T. Takahashi, S. Nagano, S. Miyata, R. Maruyama, T. Fujiwara, H. Fujiwara.: Postinfarction gene therapy against transforming growth factor- β signal modulates infarct tissue dynamics and attenuates left ventricular remodeling and heart failure. The 77th Scientific Sessions of American Heart Association. 2004, November 7-10, 2004 (New Orleans, LA, USA).
- 7) 小財健一郎、高橋知之、河合隆雄、藤原久義、國貞隆弘.: 独自技術開発によるヒト、マウスES細胞での心筋再生医学. 第4回日本再生医療学会総会. (ワークショップ) 2005年3月1-2日. (大阪)
- 8) 小財健一郎、高橋知之、河合隆雄、藤原久義、國貞隆弘.: ヒト、マウスES細胞と遺伝子治療技術応用による再生医学の基盤技術開発. 第4回日本再生医療学会総会. (ワークショップ) 2005年3月1-2日. (大阪)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
(出願した特許)
 - 1) サービビン(Survivin)プロモーターを含む増殖型ベクターを有効成分とする医薬. 発明者: 小財健一郎、神園純一、永野聡. 2004年5月25日 (国内出願)
 - 2) 増殖制御型組み替えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法及びその作製用キット. 発明者: 小財健一郎、永野聡. 2004年7月 (国際PCT出願)
 - 3) CD9遺伝子からなる心疾患を予防又は治療する医薬. 発明者: 小財健一郎、牛越博昭. 2004年12月23日 (国際PCT出願)
 - 4) Rett症候群を治療する医薬. 発明者: 小財健一郎、飯盛健生、松石豊次郎. 2004年11月1日 (国内出願)
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他

1. 動物実験による治療効果の評価 に関する研究

分担研究者 小宮節郎 鹿児島大学大学院・整形外科科学講座・教授

《研究要旨》

既に我々は新しい癌特異因子として注目されているSurvivinに着目し、そのプロモーターを用いてアデノウイルスの増殖を制御するSurvivin依存性CRA(Surv.CRA)を作製し、Surv.CRAの癌細胞特異性をウイルス、腫瘍生物学的に詳細に解析し、Surv.CRAの癌特異的なウイルス増殖能と細胞傷害作用を示している。

本研究ではこのSurv.CRAのin vivoレベルにおける有用性を解析し、Surv.CRAを用いた遺伝子治療の臨床応用による治療効果、有用性を示す事が目的であり、Surv.CRAの癌動物実験モデルにおける治療効果の有無、臨床での有用性を検証した。その結果、Surv.CRAは一回の腫瘍内投与で、著明な腫瘍体積の減少、肉眼的に広範な壊死領域、組織学的に著明な細胞死誘導を示し、有用な癌治療法になることが期待された。

A. 研究目的

Survivinは癌特異的に発現し、分化した正常組織での発現は認められない (Ambrosini G et al; Nat Med. 3,917-921,1997)。また、Survivinは癌細胞の糸状分裂期であるG2/M期に最大発現し、分裂していない静止期の細胞ではその発現が抑制される (Li F et al; Nature. 396,580-584,1998)。実際にプロモーター解析によって、Survivinプロモーターは強い癌特異的活性を有しており (Bao R et al; J Natl Cancer Instl.) 4,522-528, 2002)、正常細胞ではほとんど遺伝子発現の活性を持たないという特性が示されている。つまりこのSurvivin遺伝子のプロモーターを利用することで、種々の癌治療遺伝子を癌細胞特異的に発現させれば、癌の特異標的化が可能となると考えられた。

本研究は、我々が最近独自開発したm-CRA作製システムにおいて、この新しい癌特異的遺伝子であるSurvivinのプロモーターを用いる事によって、これまでに無いオリジナルm-CRA(Surv.CRA)を作製し、このSurv.CRAの癌組織特異性をin vivoの癌動物実験モデルで評価し、臨床での遺伝子治療効果、有用性を科学的に検討することを目的とする。そして具体的にSurv.CRAをはじめとする独自のm-CRAによる革新的な癌遺伝子治療法を世界に先駆け開発、確立することを最終目的とする。

B. 研究方法

ヌードマウス背部皮下に骨肉腫細胞 (HOS-MNNG) を注入し、腫瘍形成後、我々が独自に新規開発したSurv.CRAを腫瘍内一回投与し、経時的に腫瘍径を観察した。また、sacrifice後、

肉眼的観察、組織学的検討を行い、治療効果および正常臓器、組織への副作用についての検討を行った。

(倫理面への配慮)

研究の動物実験計画は久留米大学動物実験委員会で審査、承認されたものである (審査結果通知書を添付)。
久留米大学動物実験取り扱い指針に従い、適切に動物実験を行う。

C. 研究結果

- Survivinはその発現、プロモーター活性、共に癌種間で差があるが、今回、Surv.CRAが癌一般に応用できるかを併せて評価するために、敢えてsurvivinを低～中等度しか発現しない癌細胞を選択、使用した。この制約された条件下にもかかわらず、Surv.CRAはわずか一回の腫瘍内投与で著明な腫瘍体積の減少を示した。
- この腫瘍体積減少効果を調べるため、詳細な組織学的解析を行なった結果、肉眼的には腫瘍は広範な壊死領域を認め、組織学的には著明な細胞死誘導を示した。
- 一方、各種正常臓器において、肉眼的にも組織学的にも明らかな臓器障害を思わせる所見は認められなかった。
- これまででベストとされるTelomerase依存性CRA(Tert.CRA)との比較実験で、Surv.CRAはより高い抗腫瘍効果を示すという有望な結果が得られた。

以上の結果はSurv.CRAの高い抗腫瘍効果、癌組織特異性を示しており、検討内で明らかな副

作用がない点は実際の臨床での有用性を期待させるものであった。

D. 考察

Survivinは各種癌細胞特異的に発現しており、正常組織での発現はほとんど認められない。しかしながら、癌細胞におけるその発現レベルは癌細胞種間で異なることが示されており、我々のSurvivinプロモーターならびに発現解析結果でも、A細胞は強く発現するのに対して、B細胞では弱い発現しか認められなかった。このことから、A癌細胞ではSurv.CRAは機能するが、B細胞ではほとんど効果が得られないといった結果が容易に予想される。今回、我々はSurv.CRAが癌一般に応用できるかを併せて評価するために、敢えてSurvivinを低～中等度しか発現しない癌細胞（骨肉腫のモデル）を選択、使用した。この制約された条件下にもかかわらず、Surv.CRAはわずか一回の腫瘍内投与で著明な抗腫瘍効果を示した。この結果はSurv.CRAの有用性（癌一般への応用可能性）を示すものである。更に、今回の検討では、各種正常臓器において、肉眼的にも組織学的にも明らかな正常臓器障害を思わせる所見は認められなかった。この事は、Surv.CRAの癌特異性を示す重要な結果であると考えられる。

今後、臨床応用を見据えて、更に詳細な正常臓器、組織への影響を評価することが必要と考えられ、現在、ヒトアデノウイルスの増殖が可能なコットンラットでSurv.CRAの効果を検討するといった、より臨床に重視したモデル作りの準備を進めているところである。

E. 結論

今回、我々が世界に先駆けて開発したSurv.CRAによる癌遺伝子治療法は、癌細胞を用いたin vitro 実験同様にin vivo実験でも、非常に高い抗腫瘍効果を示し、各種癌細胞に対する画期的な治療法になることが期待された。今後、更に治療効果遺伝子（HSV-tk, p53等）を組み込むことで治療効果の増強を目指す一方、正常臓器、組織への影響を詳細に検討する事で、Surv.CRAをはじめとする臨床応用可能な新規のm-CRAが開発可能であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Maeda S, Hayashi M, Komiya S, Imamura T,

Miyazono K. Endogenous TGF- β signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells. *EMBO J.* 23: 552-563, 2004.

- 2) Kamizono J, Nagano S, Murofushi Y, Komiya S, Fujiwara H, Matsuishi T, Kosai K.: *Survivin*-responsive conditionally replicating adenovirus exhibits cancer-specific and efficient viral replication. *Cancer Res* 2005 (*in press*)
- 3) Nagano S, Oshika H, Fujiwara H, Komiya S, Kosai K.: An Efficient Construction of Conditionally Replicating Adenoviruses that Target Tumor Cells with Multiple Factors. *Gene Ther* 2005 (*in press*)
- 4) Nagano S, Yuge K, Fukunaga M, Terazaki Y, Fujiwara H, Komiya S, Kosai K: Gene Therapy eradicating distant disseminated micro-metastases by optimal cytokine expression in the primary lesion only -novel concepts for successful cytokine gene therapy. *Int. J. Onol.* 24: 549-558, 2004
- 5) Motobe T, Hashiguchi T, Uchimura T, Yamakuchi M, Taniguchi N, Komiya S, Maruyama I. Endogenous cannabinoids are candidates for lipid mediators of bone cement implantation syndrome. *Shock.* 21(2): 8-12, 2004.
- 6) Yone K, Ijiri K, Hayashi K, Yokouchi M, Takenouchi T, Manago K, Nerome Y, Ijichi O, Ikarimoto N, Komiya S. Primary malignant peripheral nerve sheath tumor of the cauda equina in a child case report. *Spinal Cord.* 42(3): 199-203, 2004.
- 7) Matsunaga S, Sakou T, Taketomi E, Komiya S. Clinical course of patients with ossification of the posterior longitudinal ligament: a minimum 10-year cohort study. *J Neurosurg Spine.* 100(3): 245-248, 2004.
- 8) Nakamura M, Matsunaga S, Yoshino S, Ohnishi T, Higo M, Sakou T, Komiya S. Long-term result of combination of open reduction and femoral derotation varus osteotomy with short enin for developmental dislocation of the hip. *J Pediatr Orthop B.* 13(4): 248-253, 2004.
- 9) Setoguchi T, Nakashima K, Takizawa T, Yanagisawa M, Ochiai W, Okabe M, Yone K, Komiya S, Tada T. Treatment of spinal cord injury by transplantation of fetal neural precursor cells engineered to express BMP inhibitor. *Exp Neurol.* 189(1): 33-44, 2004.
- 10) Ijiri K, Tsuruga H, Sakakima H, Tomita K, Taniguchi N, Shimo-onoda K, Komiya S, Goldring MB, Majima HJ, Matsuyama T. Increased

expression of humanin peptide in diffuse type pigmented villonodular synovitis: implication of its mitochondrial abnormality. *Ann Rheum Dis.*, 2004.

2. 学会発表

- 1) 吉野伸司、長嶺智徳、福元銀竜、福島佳織、小宮節郎；骨肉腫切除後の骨延長術に対する超音波治療器 (SAFHS) の使用経験. 第7回超音波骨折治療研究会. (大阪)2004年1月17日
- 2) 吉野伸司、有島善也、小宮節郎、本部卓志、中村雅洋、肥後 勝；Ilizarov創外固定器を用い重度尖足変形矯正を行った一例. 第20回九州小児整形外科集談会. (福岡)2004年1月31日
- 3) 有島善也、吉野伸司、長嶺智徳、福島佳織、小宮節郎；骨肉腫切除後の骨延長術に対するLIPUSの経験. 第31回日本生体電気刺激研究会. (鹿児島)2004年3月6日
- 4) 濱田裕美、砂原伸彦、吉玉珠美、大坪秀雄、武富栄二、泉原智磨、松田剛正、横内雅博、松永俊二、小宮節郎；RA上位頸椎手術例における予後の検討. 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会. (岡山)2004年4月15日～17日
- 5) Ijiri K, Peng H, Komiya S, Towia A, Libermann Mary, B Goldring,; Increased GADD45 gene expression in immortalized human chondrocytes by bone morphogenetic protein -2
50th annual meeting of the Orthopaedic Research Society. (San Francisco, CA, USA.) March 7-10, 2004
- 6) 濱田裕美、砂原伸彦、吉玉珠美、大坪秀雄、武富栄二、泉原智磨、松田剛正、横内雅博、松永俊二、小宮節郎；RA上位頸椎手術例における予後の検討. 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会. (岡山) 2004年4月15日～17日
- 7) 廣津匡隆、安松英夫、丸山裕之、米 和徳、小宮節郎；頸椎椎弓形成術後の早期運動療法法の検討. 第43回鹿児島整形外科懇話会. (鹿児島) 2004年5月8日 (土)
- 8) 土持兼之 山崎聡士、八木下尚子、中島利博、加藤幸祐、小宮節郎；Synoviolin 転写制御による滑膜増殖の検討. 第43回鹿児島整形外科懇話会. (鹿児島) 2004年5月8日
- 9) 林 協司、木青松昌彦、米 和徳、松永俊二、長友淑美、河村一郎、小宮節郎；高齢頸椎症性脊髄症患者非手術例の検討. 第77回日本整形外科学会学術総会. (神戸) 2004年5月20日～23日
- 10) 中村和史、砂原伸彦、川畑直也、横内雅博、井尻幸成、林 協司、松永俊二、武富栄二、小宮節郎；RA手術例におけるアミロイドーシス. 第77回日本整形外科学会学術総会. (神戸) 2004年5月20日～23日
- 11) 丸山裕之、武富栄二、中村和史、川畑直也、横内雅博、林 協司、井尻幸成、砂原伸彦、松永俊二、小宮節郎；下肢人工関節置換術例におけるRA上位頸椎病変の検討. 第77回日本整形外科学会学術総会. (神戸) 2004年5月20日～23日
- 12) 松永俊二、林 協司、長嶺智徳、神園純一、片平光昭、河村一郎、米 和徳、小宮節郎；鹿児島県における後縦靭帯骨化症患者申請の実態調査—診療かによる申請状況の差異. 第77回日本整形外科学会学術総会. (神戸) 2004年5月20日～23日
- 13) 吉野伸司、長嶺智徳、福元銀竜、福島佳織、小宮節郎；有茎腓骨移植とIlizarov法にて再建を行った径骨骨肉腫の2例. 第37回日本整形外科学会. 骨・軟部腫瘍学術集会 (東京) 2004年7月15日・16日
- 14) 川畑英之、米 和徳、有島善也、長嶺智徳、木青松昌彦、小宮節郎；ラット脊髄損傷モデルにおけるHMGB-1のapoptosisシグナル伝達との関連性. 第23回日本運動器移植・再生医学研究会. (岡山) 2004年9月18日
- 15) Kawabata H, Yone K, Arishima Y, Nagamine T, Abematsu M, Komiya S; Role of the HMGB-1(High Mobility Group Box Chromosomal Protein) on expression of apoptosis in acute spinal cord injury. 5th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies of Canada, U.S.A., Japan and Europe. (Banff, Alberta, Canada) October 10-13, 2004
- 16) Katahira M, Yone K, Yoshino S, Komiya S, Inoue K, Iwata S, Sahimizu T, Miyata A; Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide(PACAP)prevents apoptosis after spinal cord injury(SCI) in rats. 5th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies of Canada, U.S.A., Japan and Europe. (Banff, Alberta, Canada) October 10-13, 2004
- 17) Murayama T, Masahiro Y, Yamashita Y, Matsunaga S, Yone K, Komiya S; The nitrogen-containing bisphosphonate risedronate is a potent inhibitor of osteosarcoma cell growth. 5th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies of Canada, U.S.A., Japan and Europe. (Banff, Alberta, Canada) October

10-13, 2004

- 1 8) Yamashita Y, Yokouchi M, Murayama T, Minami S, Matsunaga S, Yone K, Komiya S; The role of SRC in signal transduction of osteosarcoma. 5th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies of Canada, U.S.A., Japan and Europe. (Banff, Alberta, Canada) October 10-13, 2004
- 1 9) 永吉隆作、小宮節郎、松山隆美；葉酸リセプターベータを標的としたRA治療の可能性. 第19回日本整形外科学会基礎学術集会. (東京) 2004年10月21日～22日
- 2 0) 松永俊二、小宮節郎、森本典夫；低出力超音波パルスと変動電磁場刺激による造骨系細胞の活性変化. 第19回日本整形外科学会基礎学術集会. (東京) 2004年10月21日～22日
- 2 1) 前田真吾、今村健志、宮園浩平、小宮節郎；骨芽細胞分化におけるBMPシグナルとTGF- β シグナルのクロストークと腫瘍性骨形成抑制の可能性. 第19回日本整形外科学会基礎学術集会. (東京) 2004年10月21日～22日
- 2 2) 米 和徳、有島善也、瀬戸口哲夫、片平光昭、川畑英之、小宮節郎；脊髄損傷後のアポトーシスとその抑制. 第19回日本整形外科学会基礎学術集会. (東京) 2004年10月21日～22日
- 2 3) 川畑英之、米 和徳、有島善也、長嶺智徳、木青松昌彦、小宮節郎；急性脊髄損傷後のApoptosis発現におけるHMGB-1の役割. 第19回日本整形外科学会基礎学術集会. (東京) 2004年10月21日～22日
- 2 4) 山下芳隆、横内雅博、村山隆、南 周作、小宮節郎；骨肉腫のシグナル伝達におけるSrcの役割. 第19回日本整形外科学会基礎学術集会. (東京) 2004年10月21日～22日
- 2 5) 村山 隆、山下芳隆、横内雅博、松永俊二、米 和徳、小宮節郎；骨肉腫細胞株におけるPDGF受容体の発現とc-Cblシグナル抑制機構. 第19回日本整形外科学会基礎学術集会. (東京) 2004年10月21日～22日
- 2 6) 村山隆、横内雅博、南 周作、松永俊二、米 和徳、小宮節郎；窒素含有ビスフォスフォネート剤リセドロンによる骨肉腫細胞株に対する増殖抑制効果の検討. 第19回日本整形外科学会基礎学術集会. (東京) 2004年10月21日～22日
- 2 7) 三好敢太、小宮節郎、吉村昭彦；Spredによるマウス骨肉腫細胞の転移抑制. 第19回日本整形外科学会基礎学術集会. (東京) 2004年10月21日～22日
- 2 8) 河村一郎、川畑英之、横内雅博、山崎康平、小宮節郎；Sarcomaと鑑別を要した好酸球性肉芽腫の3例. 第108回西日本整形・災害外科学会. (宜野湾) 11月26日～27日 (琉球大学医学部高次機能医科学講座)
- 2 9) 益田義幸、宮口文宏、米 和徳、小宮節郎；下垂体腫瘍と線維性骨異形性を合併したMcCune-Albright症候群の病的骨折の1手術症例. 第108回西日本整形・災害外科学会. (宜野湾) 11月26日～27日 (琉球大学医学部高次機能医科学講座)
- 3 0) 中村俊介、有島善也、坂本 光、山崎康平、横内雅博、小宮節郎；腫瘍用人工膝関節破損例に対する再置換術の経験. 第108回西日本整形・災害外科学会. (宜野湾) 11月26日～27日 (琉球大学医学部高次機能医科学講座)
- 3 1) 濱田裕美、武富栄二、石堂康弘、砂原伸彦、松永俊二、小宮節郎；頸椎病変を有するRA患者の椎骨動脈の検討—MRangiographyによる評価—. 第108回西日本整形・災害外科学会. (宜野湾) 11月26日～27日 (琉球大学医学部高次機能医科学講座)
- 3 2) 永田政仁、松永俊二、長友淑美、宮口文宏、山元拓哉、林 協司、米 和徳、小宮節郎；稀な頸椎分離症の一例. 第108回西日本整形・災害外科学会. (宜野湾) 11月26日～27日 (琉球大学医学部高次機能医科学講座)
- 3 3) 鮫島浩司、川内義久、永吉隆作、小宮節郎；透析患者の腰椎変性疾患に対する手術成績. 第108回西日本整形・災害外科学会. (宜野湾) 11月26日～27日 (琉球大学医学部高次機能医科学講座)
- 3 4) 田邊 史、廣津匡隆、古賀公明、山元拓哉、米 和徳、小宮節郎；遅発性脊髄麻痺に対する脊椎創外固定を併用した椎体形成術の治療経験. 第108回西日本整形・災害外科学会. (宜野湾) 11月26日～27日 (琉球大学医学部高次機能医科学講座)
- 3 5) 川村英樹、東福勝宏、宮口文宏、横内雅博、米 和徳、小宮節郎；多発性に発生した神経鞘腫の1例. 第108回西日本整形・災害外科学会. (宜野湾) 11月26日～27日 (琉球大学医学部高次機能医科学講座)
- 3 6) 永田政仁、今村勝行、長嶺智徳、東福勝宏、横内雅博、小宮節郎；小児に発生した線維肉腫の2例. 第108回西日本整形・災害外科学会. (宜野湾) 11月26日～27日 (琉球大学医学部高次機能医科学講座)

- 37) 川添泰臣、川畑英之、横内雅博、小宮節郎；切除術を要した悪性リンパ腫の症例。第108回西日本整形・災害外科学会。(宜野湾) 11月26日～27日(琉球大学医学部高次機能医科学講座)
- 38) 石堂康弘、武富栄二、砂原伸彦、濱田裕美、小宮節郎；腰椎椎間板ヘルニアを合併したFar out syndromeの1例。第108回西日本整形・災害外科学会。(宜野湾) 11月26日～27日(琉球大学医学部高次機能医科学講座)
- 39) 廣田仁志、松永俊二、長友淑美、宮口文宏、山元拓哉、林 協司、米 和徳、小宮節郎；小児椎間板ヘルニアに対する手術成績—tight hamstringsの予後を中心として—。第108回西日本整形・災害外科学会。(宜野湾) 11月26日～27日(琉球大学医学部高次機能医科学講座)
- 40) 山元拓哉、長友淑美、林 協司、松永俊二、米 和徳、小宮節郎、古賀公明、下小野田一騎；胸腰椎外傷に対する前方固定術の経験—鏡視下アプローチとMINI ALIFを用いて—。第108回西日本整形・災害外科学会。(宜野湾) 11月26日～27日(琉球大学医学部高次機能医科学講座)

- 41) 泉 俊彦、中村雅洋、吉野伸司、肥後勝、小宮節郎；当園における両側ペルテス病の長期成績。第108回西日本整形・災害外科学会。(宜野湾) 11月26日～27日(琉球大学医学部高次機能医科学講座)
- 42) 東福勝宏、米 和徳、林 協司、川添泰臣、濱田裕美、松永俊二、小宮節郎；軸椎歯突起後方偽腫瘍の2症例。第108回西日本整形・災害外科学会。(宜野湾) 11月26日～27日(琉球大学医学部高次機能医科学講座)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

2. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

2. ウイルス学的・生物学的解析 に関する研究

分担研究者 神園純一 久留米大学高次脳疾患研究所・大学院生

《研究要旨》

本研究は、我々独自のm-CRA作製法で種々の候補m-CRAを作製し、その機能をウイルス、腫瘍生物学的に詳細に解析し、遺伝子治療の臨床での治療効果、有用性を科学的に着実に検討することを目的としている。既に我々は独自のm-CRA作製法でTERTやE2Fを始めとする既知の候補m-CRAを作製し、ウイルス、腫瘍生物学的に詳細に解析している。しかしながら、これらの既に汎用される癌特異遺伝子プロモーターは近年、正常細胞でも細胞分裂期に活性を有する事が報告され、正常細胞における治療遺伝子のリークの可能性が指摘されている。そこで我々は新しい癌特異因子として注目されているSurvivinに着目し、そのプロモーターを用いてアデノウイルスの増殖を制御するSurvivin依存性CRA(Surv.CRA)を作製し、Surv.CRAの癌細胞特異性をウイルス、腫瘍生物学的に詳細に解析した。その結果、Surv.CRAは各種癌細胞で、内因性のSurvivinの量に依存した癌特異的なウイルス増殖能と細胞傷害作用を示す一方、正常細胞ではウイルス増殖能は著しく抑制され、明らかな正常細胞での傷害活性は認められなかった。つまり、Surv.CRAはin vitroで解析した結果、TERTやE2Fを用いた場合に比較して、高いレベルでの癌の特異化、効率よいウイルス増殖を達成することが可能であった。今回明らかになったウイルス、腫瘍生物学的特徴から、我々が世界に先駆け開発したSurv.CRAは各種癌細胞に対する画期的な治療法になることが期待された

A. 研究目的

Survivinは癌特異的に発現し、分化した正常組織での発現は認められない (Ambrosini G et al; Nat Med. 3,917-921,1997)。また、Survivinは癌細胞の有糸分裂期であるG2/M期に最大発現し、分裂していない静止期の細胞ではその発現が抑制される (Li F et al; Nature. 396,580-584,1998)。実際にプロモーター解析によって、Survivinプロモーターは強い癌特異的活性を有しており (Bao R et al; J Natl Cancer Inst. 94,522-528, 2002)、正常細胞ではほとんど遺伝子発現の活性を持たないという特性が示されている。つまりこのSurvivin遺伝子のプロモーターを利用することで、種々の癌治療遺伝子を癌細胞特異的に発現させれば、癌の特異標的化が可能となると考えられた。

本研究は、我々が最近独自開発したm-CRA作製システムにおいて、この新しい癌特異的遺伝子であるSurvivinのプロモーターを用いる事によって、これまでに無いオリジナルm-CRA(Surv.CRA)を作製し、このSurv.CRAの癌細胞特異性をウイルス、腫瘍生物学的に評価し、臨床での遺伝子治療効果、有用性を科学的に検討することを目的とする。そして具体的にSurv.CRAをはじめとする独自のm-CRAによる革新的な癌遺伝子治療法を世界に先駆け開発、確立することを最終目的とする。

B. 研究方法

我々はgenomic PCRにより、mouse survivin promoterを独自にcloningした。このsurvivin promoterでアデノウイルスのE1A遺伝子を、恒常的強発現のCMV promoterでE1B遺伝子を発現調節させ、マーカー遺伝子としてCMV promoterの下流にEGFPを組み込んだ新規のsurvivin依存性CRA(Surv.CRA)を我々独自のm-CRA作製法を用いて、世界に先駆け開発し、その機能をウイルス、腫瘍生物学的に詳細に解析し、遺伝子治療の臨床での治療効果、有用性を科学的に詳細に検討した。

具体的には癌細胞、正常細胞でのsurvivinの発現確認、プロモーター強度の測定を行った。また、マーカー遺伝子として組み込んだEGFP陽性細胞の増加、すなわち、ウイルスの増殖能、ならびにその結果としての細胞傷害作用を経時的に評価した。また、これまで最も遺伝子治療効果が強力なCRAであるTelomerase依存性CRA(Tert.CRA)との比較実験も行い、Surv.CRAの有用性を検討した。

C. 研究結果

1. 内因性survivinは種々の癌細胞株で高発現する一方、正常細胞ではほとんど発現が認められなかった。
2. survivin プロモーターは、癌細胞でCMVやRSVなどの恒常的強発現プロモーターと同等か、そ

れ以上の活性を示す一方、正常細胞では活性を示さなかった。

3. *in vitro*でSurv.CRAは、種々の癌細胞株で、旺盛かつ内因性survivinの発現量に依存したウイルス増殖能と細胞傷害作用を示す一方、正常細胞におけるウイルス増殖能をほとんど示さず、明らかな細胞傷害作用も認められなかった。
4. さらにこれまで最も遺伝子治療効果が強力なCRAであるTelomerase依存性CRA(Tert.CRA)との比較実験で、Surv.CRAは癌特異性、治療効果の両面でTert.CRAを凌ぐという有望な結果が得られた。

D. 考察

我々は、本研究の基盤となる独自のm-CRA作製システムを既に開発しており、このシステムを用いることで、新規CRAの迅速な作製、系統的なウイルス学的、腫瘍生物学的解析が可能であった。

今回、世界に先駆けて新規開発したsurvivin依存性CRA(Surv.CRA)は、アデノウイルスのE1A遺伝子をsurvivinのプロモーターで発現させ、ウイルスの増殖を制御するものである。E1Aは野生型E1A、あるいは変異型E1A (RB binding domain欠損)のいずれかとした。さらにE1Bは55KD欠損としており、併せて、3種類の癌特異的因子で、癌の特異化を達成しようとする試みである。

系統的なウイルス学的、腫瘍生物学的解析から、Surv.CRAは高いレベルでの癌の特異化、効率よいウイルス増殖を達成することが可能であり、各種癌細胞に対する画期的な治療法になることが期待された。

また、我々のm-CRA作製システムは最大7因子以上の癌特異的因子を組み込むことが可能であるため、種々の癌特異化標的分子のプロモーターでのE1の発現調節、アデノウイルス(ADV)ゲノム上(E1A, E1B, Fiber部分など)の改変、癌特異的治療効果遺伝子(HSv-tk, p53)の発現を効果的に組み合わせることで、さらなる癌の特異化の達成が可能である。

E. 結論

我々が世界に先駆けて開発したSurv.CRAは、正常組織への傷害なしに、癌特異的に効率よく治療することができ、各種癌細胞に対する画期的な治療法になることが期待された。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kamizono J, Nagano S, Murofushi Y, Komiya S, Fujiwara H, Matsuishi T, Kosai K.: *Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus exhibit its cancer-specific and efficient viral replication. Cancer Res* 2005 (in press)

2. 学会発表

- 1) 神岡純一、永野 聡、小宮節郎、小財健一郎；癌特異的増殖制御型アデノウイルスベクターを用いた骨・軟部腫瘍に対する遺伝子治療。第37回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 平成16年7月16日 (東京)
- 2) Kamizono J, Nagano S, Murofushi Y, Kosai K I ; Survivin-dependent conditionally replicating adenovirus achieves specific and efficient cancer therapy. 第10回日本遺伝子治療学会総会, 2004年8月5日~7日 (東京)
- 3) Kosai KI, Nagano S, Oshika H, Murofushi Y, Kamizono J, Komiya S and Fujiwara H ; A rapid, efficient and feasible construction of conditionally replicating adenoviral vectors that target cancer cells with multiple factors. 第10回日本遺伝子治療学会総会, 2004年8月5日~7日 (東京)
- 4) Murofushi Y, Nagano S, Kamizono J, Kosai K I ; Conditionally replicating a regulated with telomerase and E2F in combination with mutated E1A and E1B increased cancer-specificity. 第10回日本遺伝子治療学会総会, 2004年8月5日~7日 (東京)
- 5) Kosai KI, Kamizono J, Nagano S, Murofushi Y ; A rapid, efficient and feasible method for constructing conditionally-replicating adenoviral vectors that specifically target cancer cells with multiple factors: Potentials for new cancer gene therapies. 9th World Congress on Advances in Oncology and 7th International Symposium on Molecular Medicine. October 14-16, 2004 (Crete, Greece)
- 6) Kamizono J, Nagano S, Kosai KI ; A rapid, efficient and feasible method for constructing conditionally-replicating adenoviral vectors that specifically target cancer cells with multiple factors: Potentials for new cancer gene therapies. 9th World Congress on Advances in Oncology and 7th International Symposium on Molecular medicine. October 14-16, 2004 (Crete, Greece)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

5. 特許取得

(出願)

サービビン(Survivin)プロモーターを含む増殖型ベクターを有効成分とする医薬.

発明者：小財健一郎、神園純一、永野聡. 2004年5月25日 (国内出願)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

3. 未知の癌特異化分子の同定と機能解析に関する研究

分担研究者 高橋 知之 久留米大学医学部・創薬再生医療学講座・助教授

《研究要旨》

これまでに、我々独自のm-CRA作製法でTERTやE2Fを始めとする既知の候補m-CRAを作製し、ウイルス、腫瘍生物学的に詳細に解析している。また既に確立してきた前臨床研究システムで、m-CRAによる革新的な癌遺伝子治療法の可能性を検討してきた。本研究は、このm-CRAに新規の癌特異化分子を組み合わせる事で、更に新しい革新的な癌遺伝子治療法を開発することを目的とする。具体的にはまず、DNAマイクロアレイ、プロテオーム解析によって、正常と癌組織の比較解析後、癌組織で高発現する機能未知分子の探索を行なう。次にそこで得られた分子のプロモーター領域を通常の分子生物学的手法で新規の癌特異化因子候補としてクローニング後、その因子を様々な組み合わせで用いたm-CRAを作製し、解析を進めていく。既に本研究の基盤となる独自のm-CRA作製システムを開発しており、また前臨床研究システムの確立、あるいは臨床試験までの実績を持つため、新規の癌特異化因子候補のクローニングによって、本研究目標は確実に実行可能である。また、その成果は癌治療のみならず、癌基礎研究においてブレークスルーとなると期待される。

A. 研究目的

本研究は、我々が独自開発したm-CRA作製システムに新規の癌特異化分子を組み合わせる事で、更に新しい革新的な癌遺伝子治療法を開発することを目的とする。その為、まず、正常と癌組織のDNAマイクロアレイ、プロテオーム解析によって、癌組織で高発現する機能未知分子の探索を行ない、得られた分子のプロモーター領域を通常の分子生物学的手法で新規の癌特異化因子候補としてクローニングする。得られた因子を基に種々のオリジナルm-CRAを作製（開発）し、そしてこれらm-CRA遺伝子治療の臨床での治療効果、有用性を科学的に着実に検討することを目的とする。

B. 研究方法

新規癌特異化因子の探索(1)-DNAマイクロアレイによる癌細胞と成常細胞の比較検討

肝細胞増殖因子（HGF）は肝再生の本体としてクローニングされ、初代培養肝細胞をはじめとする様々な細胞に対する強力な増殖促進因子である。しかしながら、その後の研究により、肝癌細胞に対してHGFは増殖阻害活性を示めし、アポトーシスを誘導する事が示されている。即ち、この事は正常肝細胞と癌細胞では異なるHGFシグナル伝達メカニズムが存在する事を示しており、癌細胞においてHGFシグナル伝達メカニズムに関わる分子群の同定・単離は癌特異化因子のクローニングに直結するものと考えられる。

そこで我々はアデノウイルスベクターによっ

て発現させたHGFのヒト肝癌細胞のHepG2ならびにHep3Bに及ぼす影響を検討した (*Int. J Oncol. in press*)。更にHGFを作用後のヒト初代培養肝細胞ならびにHepG2、Hep3BにおけるHGF反応性遺伝子プロファイリングをDNAマイクロアレイによって行なった。

C. 研究結果

HGF発現アデノウイルスベクター（Ad.RSV-HGF）をヒト肝癌細胞HepG2ならびにHep3Bに感染後、その増殖・生存活性を検討した結果、コントロールウイルスベクター（Ad.RSV-LacZ）を感染させた細胞群に比較して有意に細胞増殖阻害ならびに生存活性の低下が認められた。更にこの生存阻害活性について詳しく解析するため、Ad.RSV-HGFを感染した細胞のTUNEL assayを行なった結果、Ad.RSV-LacZを感染させた細胞群に比較してTUNEL陽性細胞の有意な増加を認めた。同様の実験をHeLa細胞でも行なった、Ad.RSV-HGFによる細胞増殖・生存阻害活性は認められなかった。以上の結果から、ヒト肝癌細胞HepG2ならびにHep3Bの増殖・生物活性を抑制するAd.RSV-HGFは、有用な肝癌遺伝子治療のツールになると考えられた。更に、このHGFによる阻害活性は肝癌細胞特異的であり、ヒト肝癌細胞HepG2ならびにHep3BにおけるHGFのシグナル伝達メカニズムを解析することで、癌特異的なシグナル伝達分子の同定・単離が可能と期待された。

D. 考察

HGFの添加直後、ヒト肝癌細胞 (HepG2、Hep3B) のc-met/HGFレセプターのリン酸化はコントロールの細胞と同様に観察されるのに対して、Ad.RSV-HGFによる肝癌細胞に対する増殖阻害・生存活性低下はウイルスベクター感染後、4日目以降に顕著に認められた。即ち、HGFによる増殖阻害・生存活性低下はHGF刺激後、速やかに起こる蛋白質間のリン酸化シグナルをはじめとする修飾によって誘導されるというよりは、むしろHGFのシグナル伝達により、引き起こされた蛋白合成の結果、新たに発現した特異的分子の活性によると考えられる。このことから、HGFによって増殖が促進されるヒト初代培養肝細胞と増殖が阻害されるヒト肝癌細胞 (HepG2、Hep3B) をそれぞれHGF刺激後、発現誘導された遺伝子をDNAマイクロアレイによってプロファイリングを行ない比較検討する事は癌特異的遺伝子の探索に有用な実験系であり、癌特異的なシグナル伝達分子の同定・単離が可能と期待される。

E. 結論

- 1) Ad.RSV-HGFはHepG2ならびにHep3Bの増殖を阻害し、アポトーシスを誘導した。このことから、Ad.RSV-HGFは肝硬変や肝癌の遺伝子治療に有用と考えられた。
- 2) HGFによる肝癌細胞の増殖阻害・アポトーシス誘導効果はHeLaや成常肝細胞では認められず、肝癌細胞特異的であった。その為、HGF刺激した肝癌細胞と成常肝細胞の遺伝子発現を比較する事で、癌細胞特異的遺伝子の同定が可能と考えられた。
- 3) 現在、HGF刺激した肝癌細胞と成常肝細胞のDNAマイクロアレイによる遺伝子プロファイリングを行ない、発現遺伝子の比較検討を行なう事によって、癌特異的なシグナル伝達分子の同定を行なっている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yuge, K., Takahashi, T., Nagano, S., Terazaki, Y., Murofushi, Y., Ushikoshi, H., Kawai, T., Khai, N.C., Nakamura, T., Fujiwara, H., Kosai, K. Adenoviral gene transduction of hepatocyte growth factor elicits inhibitory effects for hepatoma. *Int. J Oncol.* 26, *in press* (2005)
- 2) Ushikoshi, H., Takahashi, T., Chen, X-H., Esaki, M., Goto, K., Takemura, G., Maruyama, R., Nagano, S., Yuge, K., Khai, N. C., Kawai, T., Minatoguchi, S., Fujiwara, T., Fujiwara, H., Kosai, K. The roles of overexpression of heparin-binding EGF-like growth factor in heart disorders. *Lab. Invest. in press* (2005)

- 3) Okada H., Takemura G., Kosai K., Li Y., Takahashi, T., Esaki M., Yuge K., Miyata S., Maruyama R., Mikami A., Minatoguchi S., Fujiwara T., Fujiwara H. Postinfarction gene therapy against transforming growth factor-beta signal modulates infarct tissue dynamics and attenuates left ventricular remodeling and heart failure. *Circulation in press* (2005)
- 4) Kawai T., Takahashi, T., Esaki M., Ushikoshi H., Nagano S., Fujiwara H., Kosai K. Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic factor 2. *Circ. J.* 68, 691-702, (2004)
- 5) Minatoguchi, S., Takemura, G., Chen, X-H., Wang, N., Uno, Y., Koda, M., Arai, M., Misao, Y., Lu, C., Suzuki, K., Goto, K., Kodama, A., Takahashi, T., Kosai, K., Fujiwara, T., Fujiwara, H. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation.* 109, 2572-2580 (2004)
- 6) Ikoma T., Takahashi, T., Nagano S., Li Y-M., Ohno Y., Ando K., Fujiwara T., Fujiwara H., Kosai K. A definitive role of RhoC in metastasis of orthotopic lung cancer in mice. *Clin Cancer Res.* 10, 1192-1200 (2004)

3. 学会発表

- 1) H. Ushikoshi, T. Takahashi, M. Esaki, N.C.Khai, T. Kawai, S. Minatoguchi, T. Fujiwara, K. Kosai.: Membrane protein CD9 regulates hypertrophy and heart failure via EGFR signaling in vitro and in vivo. The 77th Scientific Session of American Heart Association. 2004, November 7-10, 2004 (New Orleans, LA, USA).
- 2) H. Okada, G. Takemura, K. Kosai, Y. Li, K. Yuge, M. Esaki, T. Takahashi, S. Nagano, S. Miyata, R. Maruyama, T. Fujiwara, H. Fujiwara.: Postinfarction gene therapy against transforming growth factor- β signal modulates infarct tissue dynamics and attenuates left ventricular remodeling and heart failure. The 77th Scientific Session of American Heart Association. 2004, November 7-10, 2004 (New Orleans, LA, USA).

fic Sessions of American Heart Association. 2004, November 7-10, 2004 (New Orleans, LA, USA).

- 3) 小財健一郎、高橋知之、河合隆雄、藤原久義、國貞隆弘.: 独自技術開発によるヒト、マウスES細胞での心筋再生医学. 第4回日本再生医療学会総会. (ワークショップ) 2005年3月1-2日. (大阪)
- 4) 小財健一郎、高橋知之、河合隆雄、藤原久義、國貞隆弘.: ヒト、マウスES細胞と遺伝子治療技術応用による再生医学の基盤技術開発. 第4回日本再生医療学会総会. (ワークショップ) 2005年3月1-2日. (大阪)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

4.大動物モデルでの臨床応用の可能性の検討 に関する研究

分担研究者 Shu-Hsia Chen, Mount Sinai School of Medicine, Assistant Professor

《研究要旨》

本プロジェクトにおいて、我々は臨床応用の可能性を検討することが課題であるため、次年度から最終年度にかけてと主体となる研究成果がでるものである。本年度は、その準備実験、ならびに癌遺伝子治療の基盤研究を着々と進めてきた。

主な研究発表論文

- ① Pan PY, Gu P, Li Q, Xu D, Weber K, Chen SH:. Regulation of dendritic cell function by NK cells: mechanisms underlying the synergism in the combination therapy of IL-12 and 4-1BB activation. *J Immunol.* 172:4779-89, 2004.
- ② Li Q, Pan PY, Gu P, Xu D, Chen SH:. Role of immature myeloid Gr-1+ cells in the development of antitumor immunity. *Cancer Res.* 64:1130-9, 2004.
- ③ Xu D, Gu P, Pan PY, Li Q, Sato AI, Chen SH:. NK and CD8+ T cell-mediated eradication of poorly immunogenic B16-F10 melanoma by the combined action of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation. *Int J Cancer.* 109:499-506, 2004.
- ④ Pan PY, Li Y, Li Q, Gu P, Martinet O, Thung S, Chen SH:. In situ recruitment of antigen-presenting cells by intratumoral GM-CSF gene delivery. *Cancer Immunol Immunother.* 53:17-25, 2004.

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
1 永野聡、小宮節郎、小財健一郎	骨転移の診断と最新治療		骨・関節・靭帯	アークメディア		2004	516-523
2 小財健一郎	遺伝子治療と再生医学		久留米医学会雑誌			2004	175-180

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
3 Nagano S, Oshika H, Fujiwara H, Komiya S, Kosai K.	Efficient Construction of Conditionally Replicating Adenoviruses that Target Tumor Cells with Multiple Factors	<i>Gene Ther</i>		<i>In press</i>	2005
4 Kamizono J, Nagano S, Murofushi Y, Komiya S, Fujiwara H, Matsushima T, Kosai K	<i>Survivin</i> -responsive conditionally replicating adenovirus exhibits cancer-specific and efficient viral replication	<i>Cancer Res</i>		<i>In press</i>	2005
5 Yuge K, Takahashi T, Nagano S, Terazaki Y, Murofushi Y, Ushikoshi H, Kawai T, Khai T, Nakamura T, Fujiwara H, Kosai K	Adenoviral Gene Transduction of Hepatocyte Growth Factor Elicits Inhibitory Effects for Hepatoma. <i>in press</i>	<i>Int J Oncol</i>		<i>In press</i>	2005
6 Ikoma T, Takahashi T, Nagano S, Li Y-M, Ohno Y, Ando K, Fujiwara T, Fujiwara H and Kosai K	A definitive role of RhoC in metastasis of orthotopic lung cancer in mice	<i>Clin Cancer Res.</i>	10	1192-1200	2004
7 Nagano S, Yuge K, Fukunaga M, Terazaki Y, Fujiwara H, Komiya S, Kosai K	Gene therapy eradicating distant disseminated micro-metastases by optimal cytokine expression in the primary lesion only -novel concepts for successful cytokine gene therapy-	<i>Int. J. Onol.</i>	24	549-558	2004

8	Iida SI, Hirota T, Morisaki T, Marumoto T, Hara T, Kuninaka S, Honda S, Kosai K, Kawasuji M, Pallas DC, Saya H	Tumor suppressor WARTS ensures genomic integrity by regulating both mitotic progression and G(1) tetraploidy checkpoint function.	<i>Oncogene.</i>	23	5266-5274	2004
9	Li Y, Takemura G, Kosai K, Takahashi T, Fujiwara H	Critical roles for the Fas/Fas ligand system in postinfarction ventricular remodeling and heart failure.	<i>Circ.Res.</i>	95(6)	627-36	2004
10	Hisaka Y, Ieda M, Nakamura T, Kosai K, Ogawa S, Fukuda K.	Powerful and controllable angiogenesis by using gene-modified cells expressing human heparin-binding epidermal growth factor and thymidine kinase.	<i>J Am Coll Cardiol.</i>	43	1915-22	2004
11	Kawai T, Takahashi T, Fujiwara H, Kosai K	Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by FGF-2 and BMP-2.	<i>Circ J.</i>	68(7)	691-702	2004
12	Minatoguchi S, Takemura G, Chen XH, Wang N, Uno Y, Kodama M, Arai M, Misao Y, Lu C, Suzuki K, Goto K, Komada A, Takahashi T, Kosai K, Fujiwara T, Fujiwara H	Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment.	<i>Circulation.</i>	109	2572-2580	2004
B	Ushikoshi H, Takahashi T, Chen X, Khai NC, Esaki M, Goto K, Takemura G, Maruyama R, Minatoguchi S, Fujiwara T, Nagano S, Yuge K, Kawai T, Murofushi Y, Fujiwara H, Kosai K	Local overexpression of HB-EGF exacerbates remodeling following myocardial infarction by activating non-cardiomyocytes	<i>Lab Invest</i>		<i>In press</i>	2005