

200500497 A

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イルスベクター  
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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小賤 健一郎

平成18(2006)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  |
| 小賤 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     | ----- | 6  |
| 小宮 節郎                       |       |    |
| 2. ウイルス学的・生物学的解析に関する研究      | ----- | 9  |
| 神園 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  | ----- | 12 |
| 高橋 知之                       |       |    |
| 4. 増殖型ベクターの作製と開発に関する研究      | ----- | 15 |
| 室伏 善照                       |       |    |
| 5. 大動物モデルで臨床応用の可能性の検討に関する研究 | ----- | 18 |
| Shu-Hsia Chen               |       |    |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表         | ----- | 19 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷             | ----- | 21 |

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 小賤 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、そして臨床実用化へ向けた研究を行うことである。昨年度(初年度)は、多種多様なm-CRAの迅速作製が可能という本法の有用性の実証、そして新規の画期的な癌治療薬となるSurvivin依存性m-CRA (Surv.m-CRA)という新規m-CRAの開発にも成功した。

本年度は、(1)最適m-CRA化と画期的な癌遺伝子治療法の確立、(2)新規m-CRAの開発(さらなる発展へ)、という2点を主課題として研究を進めてきた。これらはいずれも先駆性、独創性が高い基礎研究であるが、特に(1)は本事業の主旨を踏まえた臨床応用化を見据えた着実な研究である。その本年度の成果として、(1)においてはm-CRA化(多因子の癌特異的因子によるウイルス増殖制御)を独立4因子で可能とし、これで実際に「癌治療効果を維持したまま癌特異性を増す」という成果を得た。これは臨床応用において正常細胞を障害しないでより安全性の高いm-CRA医薬をつくる基盤となる成果である。また一方(2)で、より革新的なm-CRA医薬となる新規m-CRAを作製し、その基礎研究成果を得た。

このように本年度は、当初の目的を順調に達成し具体的な成果を上げるとともに、次年度(最終年度)における発展の基盤もつくってきた。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

小宮節郎 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  
室伏善照 久留米大学高次脳疾患研究所・  
大学院生  
SH Chen Mount Sinai School of Medicine,  
Assistant Professor

A. 研究目的

本研究は、我々が独自開発したm-CRA作製システムによりオリジナルm-CRAを作製(開発)し、そのm-CRA癌遺伝子治療の治療効果と有用性を科学的に検討し、この独自の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。本年度の具体的な目標としては、(1)初年度に開発した画期的なm-CRAであるSurvivin依存性m-CRA (Surv.m-CRA)を中核として、さらなる最適のm-CRA化の研究によりその癌治療法の臨床応用

への道筋をつけること、(2)さらなる新規分子による画期的なオリジナルm-CRAを開発すること、の2項目に重点を置き、それに沿って研究を進めた。

B. 研究方法

1. 最適のm-CRA化(多因子による癌特異的増殖型アデノウイルスベクター化)と画期的な癌遺伝子治療法の確立

平成16年度に種々のm-CRAを作製、解析したが、m-CRAの能力としてベストは我々が開発したSurv.m-CRAであった。また一方我々は、テロメラーゼ(Tert)に依存して特異増殖化するm-CRA(Tert.m-CRA)の研究も進めてきた。よって本m-CRA作製技術に以下の①~③の目的にあった様々なm-CRAを作り、それらを、まずはin vitroでの腫瘍生物学的、ウイルス学的な解析を行う。

- ① 先行しているTert.m-CRAでm-CRA化一般としての研究を進める。
- ② ①の成果も併せて、最終的により優れたSurv.m-CRAのm-CRA化を確立する。
- ③ また一方、治療遺伝子を搭載した6因子m-CRAを作製し、この機能(さらなる有用性)を解析する。

## 2. 新規m-CRAの開発（さらなる発展へ）

- ① 前年度のSurv.m-CRAの成功、Survivinが染色体制御に関わっていることより、染色体異常を全面的にターゲットとする新しいm-CRAの開発を進める。我々の作製法で、関連するある分子に反応して制御されるm-CRAを作製し、同様の腫瘍生物学的手法でこのm-CRAの能力を解析する。
- ② また一方、さらに新規性の高いm-CRAを作製するための、全く新しい癌特異化因子を見つける目的で、腫瘍細胞とES細胞などの正常細胞でのDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子探索解析を行う。

### （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。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

### 1. 最適のm-CRA化（多因子による癌特異的増殖型アデノウイルスベクター化）と画期的な癌遺伝子治療法の確立

#### ① Tert.m-CRAでの、最適m-CRA化の検討（室伏の項に詳細記載）

まず、Tert.m-CRAの中核となる、テロメラーゼ、Tert、そしてTert promoterに関する腫瘍生物学的な研究を慎重に行った。その理由は近年の論文(*Cell* 2003)で「正常細胞でもS期でtelomerase活性がみられた」ということが報告され、これまでのTert promoterを用いた癌特異化全ての戦略の安全性の検証が必要だからである。適切なTert promoter領域は260bpのcore promoterであること、そして正常でのテロメラーゼの活性やTert promoterの活性は、癌遺伝子治療への応用へはあまり問題とならないという、安全性における画期的な成果を得た。

次に、具体的にTert.m-CRAのさらなるm-CRA化の研究を行った。Tert promoterでE1A mutantを発現し、E2F promoterでE1B mutantを発現するという、初めての完全4因子m-CRA化を作製し、解析した。本年度は主にin vitroの結果であるが、「癌の治療効果を維持したまま癌の特異性を増す」という画期的な成果を得られた。

#### ② Surv.m-CRAの増殖制御部の変更による最適m-CRA化（4因子）と癌治療法の確立（神園の項に詳細記載）

前年度に開発したSurv.m-CRAは、E1AのプロモーターをSurvivinプロモーターで発現制御するものであった。よって、m-CRA化として

、(a)E1Aの変異化、(b)E1Bの発現を他の癌特異的プロモーターで制御、(c)E1Bの改変があげられる。本年度は①のTert.m-CRAの成果も併せ、(b)のE1Bのプロモーターの変更に焦点を当てた。種々のSurv.m-CRAを作製したが、本年度は腺癌を対象に、E1BのプロモーターをCEAプロモーターに置換したSurv.m-CRAを作製し、癌治療効果と癌特異性を検証した。癌治療効果は弱める事無く、癌特異性（CEAを発現する腺癌だけを殺す）は著しく向上し、より臨床に近いSurv.m-CRAを改変、確立することができた。

#### ③ 治療遺伝子搭載m-CRA（6因子）による癌治療効果増強の試み（神園の項に詳細記載）

癌細胞内で増幅したウイルス蛋白による癌細胞死誘導に加え、治療遺伝子搭載による癌治療効果増強の可能性を検討した。癌細胞有意な治療効果を誘導可能分子(HSV-tk、P53)をSurvivinプロモーターで発現するという、治療遺伝子ユニットを、①で検証した4因子で増殖制御されるTert.m-CRAに載せた。これは世界で初めての6因子搭載m-CRAである。しかし結果は、癌細胞での治療効果増強だけでなく予想に反し正常細胞への比較的強い細胞障害を認めた。よってこの戦略は、次年度に新たに練り直し、また我々オリジナルでのSurv.m-CRAに搭載して進めていくことにしている。

### 2. 新規分子による画期的なオリジナルm-CRA開発

#### ① 染色体異常をターゲットとするCRAの開発

Survivin依存性CRA開発の成功の成果より、「癌の特異性」の機構のターゲットとして染色体異常が候補となるのではないかと推察する。ある染色体異常関連の分子に関連した、新規m-CRAを作製し、また基礎生物学的な解析も行なっている（特許出願前で成果が完成していないので詳細は次年度の報告書に記載する予定である）。

#### ② 癌をターゲットとする新規分子の腫瘍生物学的探索（高橋の項に詳細記載）

正常（特にES細胞に注目）と癌との間で、DNAマイクロアレイ解析で新規癌特異化の新規分子を探索してきた。幾つかの候補分子がピックアップできたので、その分子機能、癌の特異性を調べた。次年度も継続する進行中のものであるが、もし、新規分子で非常に興味ある癌特異化機構が発見できれば、その新規分子に関連したCRA開発を行うものである

### 3. 臨床化への準備となる研究

（小宮、Chenの項を参照）

本課題は厚生行政の意義から、最終的には臨床

化の実現を目指すものであり、研究期間(3年間)内にその道筋をつけることを目指している。そのため、上記の基礎的研究と併せて、前臨床を評価するための動物モデルの研究なども進めている。本年度は、特に小宮の項に記載したように、我々が開発し、本年度さらに改良しているSurv.m-CRAが役立つ臨床モデルを作製することを試みてきた。この種の研究は、時間と労力を費やす一方、地味であるが、しかし極めて重要な研究である。動物モデルでの具体的な治療実験より、ファイバー改変の必要性も示唆されるなど、今後のm-CRA開発にもフィードバックされる成果も、本年度得ている。

#### D. 考察

本研究は、ベクターの作製技術という点から全てがオリジナルであり、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。初年度は、実際にこの技術の有用性、そしてSurv.m-CRAという従来のCRAを凌ぐ性能を持つ、全く新規のm-CRA開発に成功した。そして2年目の本年度は、さらに基礎研究面で高いレベルの新規m-CRA開発なども進めている一方で、m-CRA化により、より治療効果が強く、そしてより安全なSurv.m-CRAの改良開発も着実に進めてきた。

次年度は、最終年度あり、臨床応用化への道筋をつけることが重要となる。この点からこれまでのオリジナリティーの高い基礎研究を一層進めることはもちろんであるが、本年度までに開発し最適化してきた4因子増殖制御のSurv.m-CRAを、臨床化という観点から動物での前臨床研究を強力に押し進める予定である。

#### E. 結論

本年度の成果は、1. 最適m-CRA化によるSurv.m-CRAの臨床化を一歩進めた、2. さらに発展的な新規m-CRA開発の基礎研究を進めている、3. 最終年度に主体となる前臨床研究の準備を進めてきた、というものである。このように、順調に成果を出し、着実に研究を進めているので、臨床化への道筋という最終目標を達成できると思われるし、次年度も誠意努力するものである。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Khai NC, Takahashi T, Ushikoshi H, Nagano S, Yuge K, Esaki M, Kawai T, Goto K, Murofushi Y,

Fujiwara T, Fujiwara H, Kosai K.: In vivo hepatic HB-EGF gene transduction inhibits Fas-induced liver injury and induces liver regeneration in mice: A comparative study to HGF. *J Hepatol*, [Epub ahead of print] *in press*

- 2) Misao Y, Takemura G, Arai M, Sato S, Suzuki K, Miyata S, Kosai K., Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H.: Bone marrow-derived myocyte-like cells and regulation of repair-related cytokines after bone marrow cell transplantation. *Cardiovasc Res*. 69: 476-490, 2006
- 3) Kagawa T., Takemura G., Kosai K., Murata I., Ohno T., Takahashi T., Esaki M., Maruyama R., Fujiwara T., Ohashi H., Fujiwara H.: Hepatocyte growth factor gene therapy slows down the progression of diabetic nephropathy in db/db mice. *Nephron Physiol*. 102: 92-102, 2006
- 4) 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. *Lab Invest* 85: 862-873, 2005
- 5) 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* 65: 5284-91, 2005
- 6) 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* 12: 1385-1393, 2005
- 7) Yuge K, Takahashi T, Nagano S, Terazaki Y, Murofushi Y, Ushikoshi H, Kawai T, Khai NC, Nakamura T, Fujiwara H, Kosai K.: Adenoviral Gene Transduction of Hepatocyte Growth Factor Elicits Inhibitory Effects for Hepatoma. *Int J Oncol* 27: 77-85, 2005
- 8) Tada T, Nguyen JB, Hitoshi Y, Watson NP, Dunn JF, Ohara S, Nagano S, Kosai K., Israel MA: Diffuse Encephaloventriculitis and Substantial Leukoencephalopathy after Intraventricular Administration of Recombinant Adenovirus. *Neurol Res* 27: 378-386, 2005
- 9) 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* 111: 2430-2437, 2005
- 10) 高橋知之、小賤健一郎 : 7. HGF 急性/劇症肝炎。「細胞増殖因子と再生医療」(メディカルレビュー社編) (*in press*) 2006
- 11) 高橋知之、藤原久義、國貞隆弘、小賤健一郎 : ES細胞再生医学の新技術開発—ヒトES細胞と遺伝子治療技術—再生医療 日本再生医療学会雑誌(メディカルレビュー社編) 5: 43-51, 2006

- 1 2) 高橋知之、藤原久義、國貞隆弘、小賤健一郎：  
ES細胞の心筋分化と再生医学への技術開発。  
ES細胞の分化。「幹細胞生物学の新たな展開」最新医学（最新医学社編）60: 28-34, 2005
- 1 3) 室伏善照、神園純一、小賤健一郎：新世代癌  
遺伝子治療のための多因子で増殖制御／癌特異化  
するアデノウイルスの作製法。細胞工学 25: 60-  
66, 2006
- 1 4) 神園純一、室伏善照、小賤健一郎：多因子で  
増殖制御／癌特異標的化するアデノウイルスベク  
ターのはじめての標準化作成技術。バイオテクノ  
ロジージャーナル 5: 728-731, 2005
- 1 5) 小賤健一郎：遺伝子治療と再生医学。全日本  
鍼灸学会雑誌. 56: 16-26, 2006
- 1 6) 小賤健一郎：生活習慣病としての心筋梗塞、難  
治性肝疾患に対する、新しい遺伝子治療法。(HB-  
EGF, CD9遺伝子治療) 開発の萌芽的研究。医科学  
応用研究財団研究報告書 23: 127-132, 2006
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) Kosai K, Takahashi T.: Definitive Identification  
and Isolation of Embryonic Stem Cell-Derived Target  
Cells by Adenoviral Conditional Targeting; Efficient  
Purification of Immature and Mature Cells in the  
Cardiac Lineage. (ORAL): The 8th Annual Meeting of  
the American Society of Gene Therapy. June, 2005.  
(St. Louis, USA)
- 2) Kosai K, Kusaga A, Isagai T, Hirata K, Nagano S,  
Murofushi Y, Takahashi T, Takashima S, Matsuishi T.:  
Rett Syndrome Is Reversible and Treatable by MeCP2  
Gene Therapy into the Striatum in Mice. (ORAL): The  
8th Annual Meeting of the American Society of Gene  
Therapy. June, 2005. (St. Louis, USA)
- 3) Kosai K, Kamizono J, Nagano S, Murofushi Y,  
Komiya S.: Survivin-Responsive Conditionally  
Replicating Adenovirus Exhibits Strictly Cancer-  
Specific and Efficient Viral Replication. The 8th  
Annual Meeting of the American Society of Gene  
Therapy. June, 2005. (St. Louis, USA)
- 4) Ushikoshi H, Takahashi T, Takemura G, Li Y,  
Esaki M, Khai NC, Kawai T, Fujiwara H, Kosai K.:  
CD9 Gene Therapy Inhibits Cardiac Hypertrophy and  
Tachycardia, and Attenuates the Remodeling after  
Myocardial Infarction in Mice. The 8th Annual  
Meeting of the American Society of Gene Therapy.  
June, 2005. (St. Louis, USA)
- 5) 小賤健一郎. 「遺伝子治療と再生医学」.(教  
育講演) 第32回 日本小児栄養消化器肝臓学会、  
2005年10月 (久留米)
- 6) 小賤健一郎. 「遺伝子治療と再生医学」.(教  
育講演) 第54回 (社) 全日本鍼灸学会学術大会  
、2005年6月 (福岡)
- 7) 小賤健一郎. 「遺伝子治療と再生医学」.(特  
別講演) 第435回 日本小児科学会福岡地方会例  
会、2005年6月 (福岡)
- 8) Kosai K, Takahashi T.: CD9 gene therapy directly  
normalizes hypertrophy and tachycardia on  
cardiomyocytes and abolishes the fatality after  
myocardial infarction. The 11th Annual Meeting 2005,  
The Japan Society of Gene Therapy. 2005年7月。  
(東京)
- 9) 小賤健一郎、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.2005年3月 (大阪)
- 1 0) 小賤健一郎、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」2005年3月 (大阪)
- 1 1) 小賤健一郎、神園純一、室伏善照。「多因子  
で癌特異化を可能とする増殖制御型アデノウイル  
スの効率的作製法の開発」第64回日本癌学会学  
術総会、2005年9月 (北海道)
- 1 2) 室伏善照、神園純一、小賤健一郎。「独立し  
た4因子で増殖制御されるCRA開発による癌治療  
効果と癌特異性の向上」第64回日本癌学会学術  
総会、2005年9月 (北海道)
- 1 3) 神園純一、室伏善照、小賤健一郎。「Survivin  
依存性増殖型アデノウイルスによる癌特異的効果  
的治療法の開発」第64回日本癌学会学術総会、  
2005年9月 (北海道)
- 1 4) 神園純一、永野聡、小宮節郎、小賤健一郎  
：Survivin依存性増殖制御型アデノウイルスを用  
いた骨軟部腫瘍に対する遺伝子治療法の開発。第  
20回日本整形外科学会基礎学術集会。2005年10月  
(三重)
- 1 5) Ken-ichiro Kosai, Tomoyuki Takahashi.:  
Definitive identification of embryonic stem cell-  
derived target cells by adenoviral conditional targeting;  
the successful purification of immature and mature  
cells in the cardiac lineage and the usefulness for  
HUMAN ES cells. 第11回日本遺伝子治療学会。  
2005年7月 (東京)
- 1 6) 小賤健一郎、飯盛健生、久佐賀晃、高嶋幸  
男、松石豊次郎: Rett症候群は可逆性で線条体への  
MeCP2遺伝子治療で治療できる—MeCP2欠損マウ  
スでの検討—。第47回日本小児神経学会総会.2005  
年5月 (熊本)
- 1 7) 飯盛健生、久佐賀晃、平田孝治、永野聡、  
室伏善照、高嶋幸男、松石豊次郎、小賤健一郎:  
Rett症候群は可逆性である—MeCP2欠損マウスへ  
の遺伝子治療—。第108回日本小児科学会学術集会  
.2005年4月 (東京)
- 1 8) 小賤健一郎、永野聡、神園純一、室伏善照:  
Survivin依存性増殖型アデノウイルスによる小児  
癌、骨肉腫の治療法の開発。第108回日本小児科学  
会学術集会.2005年4月 (東京)
- 1 9) 小賤健一郎、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による小児心疾患への再生療法の基盤技術開発. 第108回日本小児科学会学術集会. 2005年4月(東京)

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) 発明者: 小財健一郎、ニン・チン・カイ、高橋知之。「ヘパリン結合性上皮増殖因子様増殖因子の新規医薬用途」。国内出願: 特願2005-283085. 出願人: 久留米大学
- 2) 発明者: 小財健一郎、飯盛健生、松石豊次郎。「Rett症候群を治療する医薬」。国際PCT出願: PCT/JP2005/014617. 出願人: 久留米大学
- 3) 発明者: 小財健一郎、神圀純一、永野聡。「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」。国際PCT出願:

PCT/JP2005/009818. 出願人: 久留米大学

- 4) 発明者: 小財健一郎、永野聡。「増殖制御型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」。国際PCT出願:

PCT/JP2004/01099. 特願2003-283427. →欧州(EU)

、米国へ指定国移行(出願中). 出願人: 中部TLO

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

我々は既に Survivin 依存性 CRA(Surv.CRA)を開発し、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り得ることを明らかにしている。我々は今回、この Surv.CRA の構築を軸に E1B promoter をさらに CEA promoter へ置換するという新規の m-CRA の開発に取り組み、実際に *in vitro* で CEA 産生癌では治療効果を維持したまま、正常細胞への傷害が有意に軽減するという、画期的な結果を得ている。この新規 m-CRA の癌動物実験モデルにおける有用性を示すために新たな癌動物モデルの作製に取り組んだ。

A. 研究目的

我々は昨年の本報告書で報告したように、既に Survivin 依存性 CRA(Surv.CRA)を開発し、皮下腫瘍モデルで 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り得ることを明らかにしている(Kamizono et al; Cancer Res. 65,5284-5291,2005)。我々は今回、この Surv.CRA の構築を軸に E1B promoter をさらに CEA promoter へ置換するという新規の m-CRA(Surv-CEA.CRA)の開発に取り組み、実際に *in vitro* で CEA 産生癌では治療効果を維持したまま、正常細胞への傷害が有意に軽減するという、画期的な結果を得ている。この Surv.CRA の発展・改良型新規 m-CRA (Surv-CEA.CRA)の *in vivo* における有用性を示すために新たな癌動物モデルの作製に取り組んだ。

B. 研究方法

CRA の最大の特徴、長所は、従来の非増殖型アデノウイルスベクターとは異なり、理論的には、原発巣への一回投与で原発巣はもちろんのこと、体内に転移、播種したすべての癌細胞をターゲットとしてウイルスが増殖、癌細胞死へと誘導するという利点をもつことにある。そこで、我々は癌の腹腔内播種モデルは CRA の特性を最大限に生かすことが可能であるモデルと考え、そのモデル作りに取り組んだ。

CEA 産生ヒト胃癌細胞である MKN-45 を用い、過去の報告を参考に6週齢♀のヌードマウス腹腔内に MKN-45 を  $3 \times 10^6$  個/ 1ml culture

medium 投与(day0)。無作為に4群に分け、day6、day11 に Surv.CRA、Surv-CEA.CRA、Ad.  $\Delta$ E1 を  $1 \times 10^9$  pfu、およびコントロールとして PBS を腹腔内投与した。過去の報告を参考に腹水貯留による体重増加、癌の進展による体重減少を念頭に置き、経過を通して体重を測定し、各群の治療効果の評価とした。

(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

各群の治療効果に有意な差は認めず、しかも、day25以降に PBS 投与群を除く各ウイルス投与群でウイルスの種類にかかわらず、相次いでマウスが死亡するという現象が観察された。つまり、今回に関して言えば、ウイルスの毒性が前面に出てしまう結果となった。

また、モデルの適切さを評価する意味で、sacrifice 後に腹腔内を観察すると当初予想していたような腸管へ癌が播種しているイメージとは異なり、部分的に腫瘍が結節状になり存在していた。つまり、もちろん細胞種により特性は異なると思われるが、適切なモデル作りには、最初の癌細胞の腹腔内投与の時点で何らかの工夫を施す必要があったと考えられた。

現在、腹腔内播種モデル作製を再検討する一方で、我々が既に実験系を確立している皮



下腫瘍モデルでの検討を始めている。

#### D. 考察

CRA の特性、長所を最大限に生かす意味でも、癌の腹腔内播種モデルは最適と思われたが、今回は結果としてモデル作製が不適切であり、上手く評価することが不可能であった。

皮下腫瘍モデルで腫瘍内に直接ウイルスを投与する場合と異なり、腹腔内にウイルスを投与する場合、初期感染で目的とする目的とする遺伝子がどの程度、癌細胞に導入されるかという導入効率の問題が非常に重要になってくる。アデノウイルスのファイバーの改変により導入効率が飛躍的に向上することはこれまでも多々報告がある。我々独自の m-CRA 作製システムを用いれば、ファイバーの改変ももちろん容易に可能（我々のシステムは最大 7 因子以上の癌特異的因子を組みこむことが可能でファイバーの改変はそのうちの一つにすぎない）であり、現在新たなプロジェクトの一つとしてファイバー改変型の m-CRA 開発に着手している。

また、将来の臨床応用を見据えて、詳細な正常臓器、組織への影響の評価は必須であり、現在、ヒトアデノウイルスの増殖が可能なコトナラットモデルの検討など、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

将来の臨床応用を見据える上では、新規 m-CRA の抗腫瘍効果を適切に評価することはもちろん、その安全性に関しても真摯に検討する必要がある、さまざまな観点から臨床に即した動物モデルの作製に取り組んでいる。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yone K, Hayashi K, Ijiri K, Yamamoto T, Nagatomo Y, Shimada H, Matsunaga S, Komiya S. Delayed segmental motor paralysis following laminoplasty: two case reports. *Spinal Cord*. 2005
- 2) Ijiri K, Zerbini LF, Peng H, Correa RG, Lu B, Walsh N, Zhao Y, Taniguchi N, Huang XL, Otu H, Wang H, Wang JF, Komiya S, Ducy P, Rahman MU, Flavell RA, Gravallese EM, Oettgen P, Libermann TA, Goldring MB. A novel role for GADD45beta as a mediator of MMP-13 gene expression during chondrocyte terminal differentiation. *J Biol Chem*. 280(46):

38544-55, 2005

- 3) Nagayoshi R, Nagai T, Matsushita K, Sato K, Sunahara N, Matsuda T, Nakamura T, Komiya S, Onda M, Matsuyama T. Effectiveness of anti-folate receptor beta antibody conjugated with truncated Pseudomonas exotoxin in the targeting of rheumatoid arthritis synovial macrophages. *Arthritis Rheum*. 52(9): 2666-75, 2005
  - 4) 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*. 12(18): 1385-93, 2005
  - 5) Tsuchimochi K, Yagishita N, Yamasaki S, Amano T, Kato Y, Kawahara K, Aratani S, Fujita H, Ji F, Sugiura A, Izumi T, Sugamiya A, Maruyama I, Fukamizu A, Komiya S, Nishioka K, Nakajima T. Identification of a crucial site for synoviolin expression. *Mol Cell Biol*. 25(16): 7344-56, 2005
  - 6) 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*. 65(12):5284-91, 2005
  - 7) Ijiri K, Tsuruga H, Sakakima H, Tomita K, Taniguchi N, Shimonoda 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*. 64(6): 816-23, 2005
- ##### 2. 学会発表
- 1) 瀬戸口啓夫, 近藤 享, 米 和徳, 田賀哲也, 小宮節郎 癌幹細胞の同定とその悪性腫瘍形成への関与 第 78 回日本整形外科学会学術総会, 2005 年 5 月 横浜市
  - 2) 前田真吾, 林 真琴, 小宮節郎, 今村健志, 宮園浩平 内因性 TGF- $\beta$ シグナルは間葉系前駆細胞の骨芽細胞分化成熟を抑制する 第 78 回日本整形外科学会学術総会 2005 年 5 月 横浜市
  - 3) 小宮節郎 関節症と関節軟骨の最新の知見 第 78 回日本整形外科学会学術総会 2005 年 5 月 横浜市
  - 4) 癌幹細胞の同定と解析 瀬戸口啓夫, 近藤 享, 米 和徳, 田賀哲也, 小宮節郎 第 109 回西日本整形・災害外科学会 2005 年 6 月 久留米市
  - 5) 瀬戸口啓夫, 近藤 享, 米 和徳, 田賀哲也, 小宮節郎 癌幹細胞の同定と特異的性質の解析 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会 2005 年 10 月 伊勢市
  - 6) 川畑英之, 米 和徳, 有島善也, 宮口文宏, 長嶺智徳, 小宮節郎 急性脊髄損傷後の Apoptosis 発現における HMGB-1(High Mobility Group Box Chromosomal Protein 1)

の役割 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会 2005 年 10 月 伊勢市

- 7) 東福勝宏, 横内雅博, 村山 隆, 南 周作, 小宮節郎 骨肉腫の浸潤・転移において重要な役割をはたすヒアルロン酸の検討 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会 2005 年 10 月 伊勢市
- 8) 瀬戸口啓夫, 米 和徳, 木青松昌彦, 小宮節郎, 近藤 亨 OLIG2 による神経幹細胞のアストロサイト分化抑制メカニズム 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会 2005 年 10 月 伊勢市
- 9) 宮口文宏, 米 和徳, 有島善也, 瀬戸口啓夫, 川畑英之, 小宮節郎 脊髄損傷後に生じる神経細胞の Apoptosis を抑制するエリスロポイエチンのシグナル伝達機構 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会 2005 年 10 月 伊勢市
- 10) 神園純一, 永野 聡, 小宮節郎, 小賤健一郎 Survivin 依存性増殖制御型アデノウイルスを用いた骨軟部腫瘍に対する遺伝子治療法の開発 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会 2005 年 10 月 伊勢市
- 11) OLIG2 による神経幹細胞のアストロサイト分化制御 瀬戸口啓夫, 米 和徳, 小宮節郎, 近藤 亨 第 110 回西日本整形・災害外科学会 宇部市

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)  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

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作製法を用いて、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promoterを用いてE1Aを制御、すなわち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るという有望な結果を報告している。さらにこれまででベストとされるTetromerase依存性CRA(Tert.CRA)との比較でも、より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可能であることを報告している。

今回はSurv.CRAの発展・改良型として、1) 腫瘍特異的promoterで治療遺伝子 (HSV-tk, p53) を発現させる新規m-CRAの開発、2) E1A promoterのsurvivin promoterへの改変に加え、E1B promoterを別の腫瘍特異的promoterに置換することで癌特異性の向上したm-CRAの開発、の2つのプロジェクト、さらには、3) TERT promoterでE1A mutantを発現制御し、E2F promoterでE1B mutantを発現制御する初めての完全4因子m-CRAにsurvivin promoterで治療遺伝子(HSV-tk,p53)を発現させる6因子m-CRAの開発、というあわせて3つのプロジェクトに取り組み、作製をほぼ終了し、ウイルス、腫瘍生物学的に順次解析作業を進行中である。

A. 研究目的

昨年の本報告書で報告したように、我々は新規分子survivinに注目し、そのpromoterでE1A遺伝子を発現調整する新規m-CRAであるSurvivin依存性CRA(Surv.CRA)を作製し、ウイルス、腫瘍生物学的に解析をすすめ、その高い治療効果、癌特異性の高さは既存のCRAをはるかに凌ぐものであり、各種癌細胞に対する画期的な治療法になりうることを報告した(Kamizono et al; Cancer Res. 65,5284-5291,2005)。

今回の本研究は、これまでにその有用性を明らかにできたSurv.CRAの構築を軸にさらなる改変を加えることで、治療効果の増強、癌特異性の向上を目的とするものである。また、TERT promoterでE1A mutantを発現制御し、E2F promoterでE1B mutantを発現制御する初めての完全4因子m-CRAにsurvivin promoterで治療遺伝子(HSV-tk,p53)を発現させる6因子m-CRAによる癌治療効果の増強を目的にしたものである。

B. 研究方法

いずれの戦略も我々が独自開発したm-CRA作製法を基盤におこなうものであるが、具体的には、Surv.CRAの構築を軸に、1) 腫瘍特

異的promoter (OC promoter)で治療遺伝子 (HSV-tk, p53) を発現させる新規m-CRAの開発、2) E1A promoterのsurvivin promoterへの改変に加え、E1B promoterを別の腫瘍特異的プロモーター(CEA,OC,E2F,TERTの各promoter : これまでの検討で我々はその特性を把握している)に置換することで癌特異性の向上 (安全性の向上) したm-CRAの開発、さらには、3) TERT promoterでE1A mutantを発現制御し、E2F promoterでE1B mutantを発現制御する初めての完全4因子m-CRAにsurvivin promoterで治療遺伝子(HSV-tk,p53)を発現させる6因子m-CRAの開発、に取り組んだ。1) に関してはウイルス精製まで終了、解析準備中、2) に関してはウイルス精製まで終了し、その中からE1B promoterをCEA promoterに置換したものを先行させて解析段階に入り、3) に関しては、ウイルス精製まで終了、解析中である。

C. 研究結果

プロジェクト1) 前述のように現時点では解析準備中であるが、ウイルス精製まで終了しており、我々の既に確立している実験系によりその有用性を明らかにする予定である。

プロジェクト2) まず、survivinのpromoter活性測定の結果から、survivinのpromoter活性のある正常細胞をピックアップした。これらの正常細胞は、そのプロモーターの特性から既報告のSurv.CRAでは正常細胞での細胞傷害が予想される細胞群である。実際に、これらの正常細胞においてSurv.CRAは細胞傷害を誘導したが、E1B promoter (Surv.CRAでは恒常的に強発現するCMV promoterによる制御であった)をCEA promoterに置換するという新たな改良を施すことでその細胞傷害を有意に抑制することが可能であることが明らかになった。また、CEA産生癌での治療効果はSurv.CRAと同等であり、つまり、癌治療効果を維持したまま癌特異性が増す(正常細胞をより傷害しないで安全性がさらに高い)という画期的な成果を得た。

プロジェクト3) TERT promoter、E1A mutant、E2F promoter、E1B mutant、survivin promoter、治療遺伝子(HSV-tk, p53)という初の完全6因子m-CRAの試みであるが、治療遺伝子を搭載することで治療効果自体の増強効果はみられたが、予想外に正常細胞での傷害をもきたす結果となった。

#### 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。

プロジェクト2)に関しては、癌治療効果を維持したまま癌特異性が増す(正常細胞をより傷害しないで安全性がさらに高い)という画期的な成果を得ており、臨床応用化を目指す上での我々の戦略の中心であるm-CRA化の有用性を示すものである。今後は癌種に応じた癌特異的因子の採用、その組み合わせによりさらなる癌の特異標的化の達成、治療効果の向上が期待できる。

プロジェクト3)は、抗腫瘍効果が増強するという期待された結果が得られる一方、予想外に正常細胞への傷害が強く出現する結果となった。TERT promoterでE1A mutantを発現制御し、E2F promoterでE1B mutantを発現制御する4因子m-CRAでは、癌と比べ正常細胞での傷害を効果的に抑制出来た事実とあわせて考えると、治療遺伝子の搭載に問題があったと言わざるをえない。一つは治療遺伝子を発現させるpromoterの問題、もう一つは治療遺伝子そのものの問題が考えられるわけであるが、まずは治療遺伝子を発現させるpromoterを他のpromoterに置換するというアプローチ

でこの問題の解決に取り組んでいる。

#### E. 結論

我々が取り組んでいるm-CRA化戦略は、様々な特性をもつ癌特異的因子の組み合わせ、さらには、治療遺伝子の搭載といった改変を加えることで、既報告のCRAを遙かに凌ぐ高い治療効果、高い安全性を兼ね備えた理想的な癌治療法の開発につながると期待される。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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* 65: 5284-91, 2005

2) 室伏善照、神園純一、小賤健一郎：新世代癌遺伝子治療のための多因子で増殖制御／癌特異化するアデノウイルスの作製法。細胞工学 25: 60-66, 2006

3) 神園純一、室伏善照、小賤健一郎：多因子で増殖制御／癌特異標的化するアデノウイルスベクターのはじめての標準化作成技術。バイオテクノロジージャーナル 5: 728-731, 2005

##### 2. 学会発表

1) Kosai K, Kamizono J, Nagano S, Murofushi Y, Komiya S.: *Survivin-Responsive Conditionally Replicating Adenovirus Exhibits Strictly Cancer-Specific and Efficient Viral Replication. The 8th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy. June, 2005. (St. Louis, USA)*

2) 小賤健一郎、神園純一、室伏善照。「多因子で癌特異化を可能とする増殖制御型アデノウイルスの効率的作製法の開発」第64回日本癌学会学術総会、2005年9月(北海道)

3) 室伏善照、神園純一、小賤健一郎。「独立した4因子で増殖制御されるCRA開発による癌治療効果と癌特異性の向上」第64回日本癌学会学術総会、2005年9月(北海道)

4) 神園純一、室伏善照、小賤健一郎。

「Survivin依存性増殖型アデノウイルスによる癌特異的効果的治療法の開発」第64回日本癌学会学術総会、2005年9月(北海道)

5) 神園純一、永野聡、小宮節郎、小賤健一郎：Survivin依存性増殖制御型アデノウイ

ルスを用いた骨軟部腫瘍に対する遺伝子治療法の開発. 第20回日本整形外科学会基礎学術集会.2005年10月 (三重)

- 6) 小賤健一郎、永野聡、神園純二、室伏善照: Survivin依存性増殖型アデノウイルスによる小児癌、骨肉腫の治療法の開発. 第108回日本小児科学会学術集会. 2005年4月 (東京)

#### 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、神園純二、永野聡.  
PCT/JP2005/009818

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

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

本研究は、m-CRAに新規の癌特異化分子を組み合わせる事によって、更に新しい革新的な癌遺伝子治療法を開発する事を目的としている。これまでに、肝癌細胞に対しては増殖抑制活性を、正常肝細胞に対しては増殖促進活性を有するHGFのユニークな反応性に着目して、癌遺伝子治療法の開発ならびに、DNAマイクロアレイ解析による正常と癌細胞のHGFに対する反応性を比較解析後、癌細胞で高発現する機能未知分子の探索を行なってきた。今回は、更に正常細胞としてES細胞と癌細胞における発現遺伝子をプロファイリングする事によって、癌化や正常増殖メカニズムの維持に関わる新規分子の探索を効率良く進めた。即ち、ES細胞は多能性を有し、無限増殖するが、癌細胞の無制限な増殖とは異なり、染色体数も保持し、良性のテラトーマを形成する事はあっても、悪性の癌を形成する事は無い。この事から、マウス胚性幹（ES）細胞と癌細胞における遺伝子発現プロファイルを行う事によって、癌細胞で当然の如く強い発現を示す細胞の分裂を駆動するための実動遺伝子を除いた、正常な細胞増殖維持や癌抑制メカニズム、或は癌の発症に関わる分子の同定が可能と思われる。そこで、ES細胞と同様に、光学顕微鏡レベルでは形態的な特徴が少なく、比較的未分化な浸潤性の癌細胞に分類されるmouse Lewis lung carcinoma（LLC）細胞または神経芽種のC1300N18細胞とES細胞におけるDNAマイクロアレイによる遺伝子発現の比較解析を行った。

A. 研究目的

本研究は、正常状態を保ちながら無限に増殖するES細胞と典型的な二種類の浸潤能を有する癌細胞（LLC細胞、C1300N18細胞）における発現遺伝子を比較する事によって、癌細胞としての性質の獲得、或は無限の増殖能ならびに正常状態を保つメカニズムに関わる分子を探索し、新規の癌特異化分子を同定する事が目的である。そこで、正常細胞（ES細胞）と癌細胞（LLC細胞、C1300N18細胞）における、DNAマイクロアレイ解析を行う事によって、癌組織で高発現する機能未知分子の探索を行なう。更に、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、最終的に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-DNAマイクロアレイによるES細胞と癌細胞との遺伝子発現の比較検討

ES細胞はleukemia inhibitory factor (LIF)の存在下では、多分化能を維持しながら、癌化する事無く、未分化状態で無限に増殖を繰り返す。一方、ES細胞をLIF非存在下で培養する事によって、様々な組織・細胞へ分化誘導する事が可能となる。そこで、正常細胞の試料として、LIF存在下にて培養した未分化状態のES細胞からRNAを回収した。一方、浸潤・転移能を有する典型的な二種類の癌細胞として選択したLLC細胞、C1300N細胞については各々の、増殖培地で培養後、RNAを抽出し、癌細胞の試料とした。DNAマイクロアレイは機能既知及び機能推定遺伝子を中心に総遺伝子約6400遺伝子のオリゴチップ（スポット）からなり、cDNAをCy3（コントロールサンプル）、ならびにCy5（テストサンプル）（Cy3:ES細胞 v.s. Cy5:LLC細胞、Cy3:ES細胞 v.s. Cy5:C1300N18細胞）の二種類の蛍光標識後、ハイブリダイゼーションを行った。

C. 研究結果

ES細胞は無限の増殖能を有するものの、良性のテラトーマを形成するのみで、移植しても命を脅かすような癌を形成する事は無い、

これに対して、LLC細胞やC1300N18細胞は細胞を移植する事によって、浸潤・転移能を有する癌を形成することが知られている。そこで、先ず、DNAマイクロアレイによって得られたデータから、ES細胞に比較して、LLC細胞やC1300N18細胞において、2倍以上の発現強度を示す遺伝子を抽出する事にした。その結果、LLC細胞では118遺伝子、C1300N18細胞では408遺伝子が検出された。更に、LLC細胞ならびにC1300N18細胞の両癌細胞において、共に強く発現する遺伝子を調べたところ、機能未知の未同定遺伝子を含む30遺伝子が同定された。以上の結果から、今回、ES細胞とLLC細胞やC1300N18細胞のような癌細胞における遺伝子プロファイリングの比較検討を行った結果、ES細胞に比較して、癌細胞で強く発現する分子の同定に成功した。また更に、正常なES細胞に対して、今回用いたLLC細胞とC1300N18細胞のような、それぞれ肺癌、神経芽種の様に、異なる起源の癌細胞の両癌細胞において強く発現する30遺伝子の同定に成功した。

#### D. 考察

制御不能な増殖・細胞分裂は癌細胞をあらゆるもっとも重要な形質の一つであることから、正常細胞とのDNAマイクロアレイ等の遺伝子プロファイリング比較によって癌特異遺伝子を同定する場合には、細胞増殖や分裂に関わる遺伝子群の多くが、癌細胞で強く発現する遺伝子として濃縮されると考えられ、この事が、本来、癌細胞特異的に増殖に関わる増殖制御遺伝子や癌化に関わるイニシエータ遺伝子、更には癌形質を維持する遺伝子の同定・抽出の障害となる。その為、癌特異的遺伝子探索研究のデザインとして比較に用いる正常細胞の選択が、癌特異的遺伝子同定を成功へ導く鍵となり、今回、我々は癌細胞と同様に、増殖・細胞分裂を繰り返すものの、移植しても悪性の癌を形成する事のないES細胞を正常細胞として、二種類の癌細胞と遺伝子プロファイリングの比較解析を行った。その結果、ES細胞に比較して、LLC細胞やC1300N18細胞において、2倍以上の発現強度を示す遺伝子をLLC細胞では118遺伝子、C1300N18細胞では408遺伝子抽出する事に成功した。これらの遺伝子の中には、細胞の分裂を駆動するための実動遺伝子は含まれておらず、癌細胞の増殖制御、或は癌化や浸潤・転移のような、各々の癌細胞において、癌細胞としての特性を示す為には何らかの役割を示

すと考えられた。また、LLC細胞ならびにC1300N18細胞の両癌細胞に共通して強く発現する30遺伝子は、比較的一般的な癌細胞としての性質を維持するのに必要な分子であると考えられた。今後、ES細胞に比較して、特に両癌細胞で強く発現する30遺伝子をターゲットとして解析を進める事によって、新しい癌特異的遺伝子発現可能なプロモーターの同定や、発癌、癌形質獲得メカニズムの解明に役立つものと考えられる。

#### E. 結論

- 1) 正常細胞としてES細胞と二種類の起源の異なる癌細胞、LLC細胞やC1300N18細胞の遺伝子プロファイリングの比較検討を行った結果、ES細胞に対して癌細胞で強く発現する分子各々、118遺伝子、408遺伝子の同定に成功した。
- 2) また、LLC細胞の118遺伝子、C1300N18細胞の408遺伝子の中に、共通して強く発現する30遺伝子の同定に成功した。
- 3) LLC細胞ならびにC1300N18細胞の両癌細胞で強く発現する30遺伝子をターゲットとして、解析を進める事で癌細胞特異的遺伝子発現プロモーターの同定や発癌、癌形質発現メカニズムの解明に役立つものと考えられる。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Khai N. C., Takahashi T., Ushikoshi H., Nagano S., Yuge K., Esaki M., Kawai T., Goto K., Murofushi Y., Fujiwara T., Fujiwara H., Kosai K. In vivo hepatic HB-EGF gene transduction inhibits Fas-induced liver injury and induces liver regeneration in mice: a comparative study to HGF. *J. Hepatol.* (2005) *in press*
- 2) Kagawa T., Takemura G., Kosai K., Murata I., Ohno T., Takahashi T., Esaki M., Maruyama R., Fujiwara T., Ohashi H., Fujiwara H. Hepatocyte growth factor gene therapy slows down the progression of diabetic nephropathy in db/db mice. *Nephron Physiol.* 6;102(3-4): 92-102 (2005)
- 3) Misao Y., Arai M., Ohno T., Ushikoshi H., Takahashi T., Takemura G., Minatoguchi S., Fujiwara T., Fujiwara H. Cyclophosphamide

- improves the function of post-infarct hearts by reducing old infarct area and accelerating the mobilization of CD34 (+) cells. *Circ J.* 69, 763-765 (2005)
- 4) 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 KI. Local overexpression of HB-EGF exacerbates remodeling following myocardial infarction by activating noncardiomyocytes. *Lab. Invest.* 85, 862-873 (2005)
- 5) 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.* 27, 77-85 (2005)
- 6) 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* 111, 2430-2437 (2005)
- 7) 高橋知之・藤原久義・國貞隆弘・小賤健一郎 "3. ES 細胞と遺伝子治療技術" 特集 : I. ヒトおよびサルES細胞. 再生医療 日本再生医療学会雑誌 Vol.5 No.1 p61-69 (2006)(メディカルレビュー社)
- 8) 高橋知之・小賤健一郎 "急性/劇症肝炎" 7.HGF. 増殖因子と再生医療 単行本 p105-111 (2005)(メディカルレビュー社)
- 9) 高橋知之・藤原久義・國貞隆弘・小賤健一郎 "ES細胞の心筋分化と再生医学への技術開発" 幹細胞生物学の新たな展開 - ES細胞の分化-最新医学 Vol.60 8月 特集 p1688-1694 (2005)(最新医学社)
2. 学会発表
- 1) Kosai K, Takahashi T.: Definitive Identification and Isolation of Embryonic Stem Cell-Derived Target Cells by Adenoviral Conditional Targeting; Efficient Purification of Immature and Mature Cells in the Cardiac Lineage. (ORAL): The 8th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy. June, 2005. (St. Louis, USA)
- 2) Kosai K, Kusaga A, Isagai T, Hirata K, Nagano S, Murofushi Y, Takahashi T., Takashima S, Matsuishi T.: Rett Syndrome Is Reversible and Treatable by MeCP2 Gene Therapy into the Striatum in Mice. (ORAL): The 8th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy. June, 2005. (St. Louis, USA)
- 3) Ushikoshi H, Takahashi T., Takemura G, Li Y, Esaki M, Khai NC, Kawai T, Fujiwara H, Kosai K.: CD9 Gene Therapy Inhibits Cardiac Hypertrophy and Tachycardia, and Attenuates the Remodeling after Myocardial Infarction in Mice. The 8th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy. June, 2005. (St. Louis, USA)
- 4) Kosai K, Takahashi T.: CD9 gene therapy directly normalizes hypertrophy and tachycardia on cardiomyocytes and abolishes the fatality after myocardial infarction. The 11th Annual Meeting 2005, The Japan Society of Gene Therapy. (シンポジウム) 2005年7月 (東京)
- 5) 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)
- 6) 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
- 1) 発明の名称 : 『ヘパリン結合性上皮増殖因子様増殖因子の新規医薬用途』 国名 : 日本 出願No. : 特願2005-283085 出願日 : 2005年9月28日 発明者 ; 小財健一郎、ニン・チン・カイ、高橋知之
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



増殖型ベクターの作製と開発

分担研究者 室伏 善照 久留米大学高次脳疾患研究所・大学院生

研究要旨

本研究の目的は、癌遺伝子治療の最大の問題点である「遺伝子未導入の癌細胞からの再発」の克服を目指し、我々が独自に開発した多因子で制御可能な癌特異的増殖型アデノウイルスベクター (m-CRA) の迅速・効率的作製技術を基盤として種々の新規のm-CRAを作製し、その網羅的な機能解析を行い、遺伝子未導入癌細胞をも治療可能な革新的な癌遺伝子治療法を開発することである。

我々は、既存のconditionally replicating adenovirus (CRA) ではhuman telomerase reverse transcriptase (hTERT) プロモーター依存性CRA (Tert.CRA) が最も有用であるという知見から、平成16年度より、独自開発したm-CRA作製技術を用いて、hTERTプロモーター制御を基盤とした複数の癌特異的因子でウイルス増殖を制御するm-CRA (Tert.m-CRA) を作製し、その網羅的な機能解析を行い、ウイルス学的、腫瘍生物学的評価を進めている。そして、これまでに、m-CRA化は、「癌治療効果を維持した癌特異化の向上（正常細胞でのウイルス増殖抑制）」を可能にする決定的な要素となる成果を得た。一方、最近、「正常細胞でもS期ではtelomerase活性化がみられた」との報告があったため、我々は、hTERTプロモーターを用いた癌遺伝子治療の安全性の検証が必要であると考え、詳細に*in vitro*解析を行い、その問題を検証した。そして、「正常細胞でのS期特異的telomerase活性化は、癌細胞と比較して極めてレベルが低い」という結果を得て、hTERTプロモーターを用いた癌遺伝子治療の安全性を初めて明確にした。

今回の成果から、m-CRA化戦略に基いて種々の新規m-CRAの作製と網羅的解析を進めていくことにより、遺伝子未導入癌細胞をも治療可能な革新的な癌遺伝子治療法の確立、さらには癌遺伝子治療法の臨床応用が可能になると期待される。

A. 研究目的

Telomeraseは、染色体末端構造であるtelomereの短縮を補い伸長することから体細胞の分裂回数に関与するとされる酵素であり、その活性はヒト癌の90%以上で検出されるが、正常細胞では検出されない (Kim NW et al, *Science*, 1994)。また、その活性は、その構成物である逆転写酵素hTERTの活性と相関することが明らかにされている (Nakamura TM et al, *Science*, 1997; Meyerson M et al, *Cell*, 1997)。実際、プロモーター解析より、hTERTプロモーター活性は癌特異的に高発現し、正常細胞では全くないという特性を示した (Takakura M. et al., *Cancer Res*, 1999; Horikawa I. et al., *Cancer Res*, 1999)。これらのことから、hTERTプロモーターを用いることにより様々な治療遺伝子の癌特異的発現が可能になると考えられた。実際、種々のhTERT依存性遺伝子導入ベクターが報告され、いずれも有用な癌特異化、癌治療効果の成果を示した (Gu J. et al., *Cancer Res*, 2000; Koگا S. et al., *Hum Gene Ther*, 2001; Majumdar AS. et al., *Gene Ther*, 2001)。しかし、従来の非増殖

型遺伝子導入ベクターでは、全ての癌に遺伝子を導入することは不可能であった。その問題を克服するベクターとして癌特異的に増殖するCRAが考案された (Alemany R. et al., *Nat Biotechnol*, 2000; Curiel DT. et al., *Clin Cancer Res*, 2000; Krut FA. and Curiel DT., *Hum Gene Ther*, 2002)。近年、Tert.CRAがいくつか報告され、いずれも有用な成果を示した (Wirth T. et al., *Cancer Res*, 2003; Huang TG. et al., *Gene Ther*, 2003; Kawashima T. et al., *Clin Cancer Res*, 2004)。しかし、これまでのCRAは、単一因子での制御であり癌特異化が不十分であったため、さらなるCRAの癌特異化の向上には多因子によりウイルス増殖を制御するm-CRA化が重要であると我々は考えた。一方、最近、「正常細胞でもS期ではtelomerase活性化がみられた」 (Masutomi K et al, *Cell*, 2003) との報告があり、hTERTプロモーターを用いた癌遺伝子治療の安全性の検証が必要であると我々は考えた。

本研究は、はじめにhTERTプロモーターを用いた癌遺伝子治療の安全性について、「正常細胞で

もS期でのtelomerase活性化がみられる」という問題を検証し、明らかにすることを目的とする。次に、我々が独自開発したm-CRA作製技術により、種々のTert.m-CRAを作製し、ウイルス学的、腫瘍生物学的評価を行い、m-CRA化戦略の有用性を検討することを目的とする。そして、「癌治療効果を維持した癌特異化の向上」を可能とすることにより、遺伝子未導入癌細胞をも治療可能な革新的な癌遺伝子治療法の確立を最終的な目的とする。

## B. 研究方法

### 1. hTERTプロモーターを用いた癌遺伝子治療の安全性の検証

細胞周期同調した正常細胞、癌細胞の内因性telomerase活性、hTERT mRNA発現、アデノウイルスベクター遺伝子導入後のhTERTプロモーター活性測定を解析し、比較検討を行う。

### 2. Tert.m-CRAの作製と機能解析

癌特異的に高発現する異なる2種の分子のプロモーターhTERTプロモーター (260-bp)、細胞周期特異的因子E2Fプロモーター (330-bp)、そしてE1A、E1Bの野生型、変異型の最大4つの癌特異的因子を組み合わせた4種のm-CRA (Tert.m-CRA) を作製し、多種の癌細胞、正常細胞で癌特異的なウイルス増殖能、癌治療効果の網羅的な*in vitro*機能解析を行い、ウイルス学的、腫瘍生物学的評価とその有用性の検討を行う。さらに、癌細胞移植モデルマウスを用いた*in vivo*での前臨床的な癌治療効果と正常組織への副作用の評価を行う。

## C. 研究結果

### 1. hTERTプロモーターを用いた癌遺伝子治療の安全性の検証

- 1) 内因性telomerase活性、hTERT mRNA発現とも、12癌細胞種で高かったが、11正常細胞種では検出されなかった。
- 2) 細胞周期同調した正常細胞、癌細胞の内因性telomerase活性は、癌細胞ではG<sub>1</sub>/S、S期で最も高く、最も低いG<sub>2</sub>/M期の2-3倍高かったが、正常細胞ではS期を含む全細胞周期で検出されなかった。
- 3) 細胞周期同調した正常細胞、癌細胞でのアデノウイルスベクター遺伝子導入後のhTERTプロモーター活性は、内因性telomerase活性と相関して、癌細胞ではS期で高く、G<sub>0</sub>期の7倍高かったが、正常細胞ではS期を含む全細胞周期で検出されなかった。また、260-bpの短いhTERTプロモーターは、癌細胞で1454-bpの長いプロモーターより

も活性が強いことを明らかにした。

### 2. Tert.m-CRAの作製と機能解析

- 1) 本研究で作製した4種のTert.m-CRAのウイルス増殖能は、いずれも癌細胞で内因性hTERT mRNA発現に相関して高かったが、正常細胞ではほとんどみとめられなかった。
- 2) 本研究で作製した4種のTert.m-CRAの癌治療効果は、ウイルス増殖能の結果と同様にいずれも癌細胞で強かったが、正常細胞ではより多因子で制御したTert.m-CRAで細胞傷害が弱かった。
- 3) 癌細胞移植モデルマウスを用いた*in vivo*での前臨床的な癌治療効果と正常組織への副作用の評価は、現在進行中である。

## D. 考察

我々が本研究で得た、「正常細胞でのS期特異的telomerase活性化は、癌細胞と比較して極めてレベルが低い」という結果は、hTERTプロモーターを用いた癌遺伝子治療の安全性を初めて明確にしたことから重要な意義を持つ。また、ウイルス増殖を司るE1領域のE1AとE1Bを異なる2種のプロモーターで制御するという発想に基づくm-CRA化は、「癌治療効果を維持した癌特異化の向上」を可能にする決定的な要素となり得る。

## E. 結論

本研究は、m-CRA化が「癌治療効果を維持した癌特異化の向上」を可能とする鍵となることを示した。このことから、m-CRA作製技術を有する我々のみが可能である種々の新規m-CRAの作製、網羅的解析を進めていくことにより、遺伝子未導入癌細胞をも治療可能な革新的な癌遺伝子治療法の確立、さらには癌遺伝子治療法の臨床応用が可能になると期待される。

## F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Khai NC, Takahashi T, Ushikoshi H, Nagano S, Yuge K, Esaki M, Kawai T, Goto K, Murofushi Y, Fujiwara T, Fujiwara H, Kosai K.: In vivo hepatic HB-EGF gene transduction inhibits Fas-induced liver injury and induces liver regeneration in mice: A comparative study to HGF. *J Hepatol*, [Epub ahead of print] *in press*
- 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* 65: 5284-91, 2005

3) Yuge K, Takahashi T, Nagano S, Terazaki Y, Murofushi Y, Ushikoshi H, Kawai T, Khai NC, Nakamura T, Fujiwara H, Kosai K.: Adenoviral Gene Transduction of Hepatocyte Growth Factor Elicits Inhibitory Effects for Hepatoma. *Int J Oncol* 27: 77-85, 2005

4) 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 noncardiomyocytes. *Lab Invest* 85: 862-873, 2005

## 2. 学会発表

1) Kosai K, Kusaga A, Isagai T, Hirata K, Nagano S, Murofushi Y, Takahashi T, Takashima S, Matsuishi T.: Rett Syndrome Is Reversible and Treatable by MeCP2 Gene Therapy into the Striatum in Mice. (ORAL): The 8th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy. June, 2005. (St. Louis, USA)

2) Kosai K, Kamizono J, Nagano S, Murofushi Y, Komiyama S.: Survivin-Responsive Conditionally Replicating Adenovirus Exhibits Strictly Cancer-Specific and Efficient Viral Replication. The 8th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy. June, 2005. (St. Louis, USA)

3) Kosai K, Kusaga A, Isagai T, Hirata K, Nagano S, Murofushi Y, Takahashi T, Takashima S, Matsuishi T.: Rett Syndrome Is Reversible and Treatable by MeCP2 Gene Therapy into the Striatum in Mice. (ORAL): The 8th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy. June, 2005. (St. Louis, USA)

4) 室伏善照、神園純一、小賤健一郎。「独立した4因子で増殖制御されるCRA開発による癌治療効果と癌特異性の向上」第64回日本癌学会学術総会、2005年9月(北海道)

5) 小賤健一郎、神園純一、室伏善照。「多因子で癌特異性を可能とする増殖制御型アデノウイルスの効率的作製法の開発」第64回日本癌学会学術総会、2005年9月(北海道)

6) 神園純一、室伏善照、小賤健一郎。「Survivin依存性増殖型アデノウイルスによる癌特異的効果的治療法の開発」第64回日本癌学会学術総会、2005年9月(北海道)

7) 小賤健一郎、永野聡、神園純一、室伏善照:

Survivin 依存性増殖型アデノウイルスによる小児癌、骨肉腫の治療法の開発. 第108回日本小児科学会学術集会.2005年4月(東京)

8) 飯盛健生、久佐賀晃、平田孝治、永野聡、室伏善照、高嶋幸男、松石豊次郎、小賤健一郎: Rett 症候群は可逆性である—MeCP2 欠損マウスへの遺伝子治療—. 第108回日本小児科学会学術集会.2005年4月(東京)

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

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）  
分担研究報告書

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, Associate Professor

《研究要旨》

本プロジェクトにおいて、小賤研究室で開発された増殖型アデノウイルスによる癌治療を、最終的に臨床応用への道筋までつけることも大きな課題である。本格的には最終年度修了までにトランスレーショナルの道筋をより具体化する必要があるが、本年度は主任研究者と討論を行い、その準備実験と、併せて自身の癌遺伝子治療の基礎研究を進めてきた。

主な研究発表論文

1. Xu DP, Sauter BV, Huang TG, Meseck M, Woo SL, Chen SH.: The systemic administration of Ig-4-1BB ligand in combination with IL-12 gene transfer eradicates hepatic colon carcinoma. *Gene Ther.* 2005; 12:1526-33.
2. Huang B, Zhao J, Li H, He KL, Chen Y, Chen SH, Mayer L, Unkeless JC, Xiong H.: Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res.* 2005; 65:9108.
3. Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, Divino CM, Chen SH.: Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* 2006; 66:1123-31.