

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

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総合的研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小戩 健一郎

平成19（2007）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	-----	10
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	-----	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	-----	19

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 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・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。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。二年目は、最適m-CRA化と画期的な癌遺伝子治療法の確立、新規m-CRAの開発研究を進めた。

そして本年度は、これまでの研究成果を基盤として、科学的面でも臨床化への進展の面でも、より発展させる成果が得られた。まず4因子制御化により、癌治療効果を維持したまま、癌特異性をさらに向上させた改良型Surv.m-CRAを開発できた。また、治療遺伝子のユニット（新たな2因子）をこれに組み込むことで、癌特異性は維持したまま、癌への治療効果を増強させるという、さらに改良を加えた6因子搭載のSurv.m-CRAの開発も行ってきた。また一方、本年度は、新規分子による画期的なオリジナルm-CRA開発にも取り組み、2つの探索的研究にも取り組んで、基礎的研究レベルで成果を上げてきた。つまり最終年度にあたる本年度の成果は、Surv.m-CRAの臨床化への研究で着実な成果を上げ、またその準備も進めることができ、そしてさらに、Surv.m-CRAに続く革新的なm-CRAの開発研究も順次進めることができたというものである。

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 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
・教授  
神園 純一 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
・医員  
高橋 知之 久留米大学医学部・助教授

Shu-Hsia Chen Mount Sinai School of Medicine,  
Assistant Professor

A. 研究目的

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。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。そして次年度より、(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の開発研究を進めた。

そして最終年度にあたる本年度は、2年目までの研究成果を基盤として、科学的面でも発展するとともに、臨床化の具体的な見通しができるということを目指して、研究を進めた。

B. 研究方法

1. Surv.m-CRAの前臨床研究による臨床化の展望

平成16年度に種々のm-CRAを作製、解析し、ベストは我々が開発した（完全オリジナルの）Surv.CRAで、平成17年度はさらにより良いm-CRA化の2種類の研究を進めてきた。本年度はこのm-CRA化の研究をさらに進め、改良型Surv.m-CRAの前臨床評価としての動物実験を行い、臨床応用への展望を開く。

(1) m-CRA化の研究から、4因子制御Surv.m-CRAの動物治療実験まで

①m-CRA化の研究（Tert.m-CRAにて）

研究が先行しているテロメラゼ依存性m-CRA(Tert.m-CRA)にて、4因子制御m-CRA化のウイルス学的検討、特に癌治療効果と癌特異性の検討を、in vitroの実験系で詳細に行う

。これにより、E1の各パーツの影響と、4因子制御m-CRA化の一般的な特性、m-CRA化の基本的な進め方が明確となる。

## ②Surv.m-CRAでの具体的なm-CRA化による、癌治療効果と癌特異性の検討

前年度までに、E1AのプロモーターをSurvivin promoterで発現制御する基本形から、さらなるm-CRA化として、(a)E1Aのmutant化(Rb結合領域欠損によるRb依存性増殖の加味)、(b)E1Bの発現を他の腫瘍特異的因子(CEA、オステオカルシン、TERT、E2Fなど)のpromoterで制御、(c)E1Bのmutant化(p53結合領域の有無など)の各因子を組み入れた2~4因子制御のSurv.m-CRAを、多種作製している。その機能解析、有用性について、本年度に詳細に検討する。多種類を一度に解析はできないので、まず一つのモデルとしてE1BをCEA promoterに改変したSurv.m-CRAを胃癌(腺癌)モデルでの治療実験を行なう。これにより臨床化の展望を明らかにする。

## (2) 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

前年度より、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を計るため、Surv.m-CRAに腫瘍特異的プロモーターでHSV-tkやp53を発現する6因子m-CRAを作製、有用性を検証している。この継続発展の研究を同様に行う。

## 2. 新規分子による画期的なオリジナルm-CRA開発

### (1) 染色体異常を認識するCRAの開発の試み

前年度までに、2種類の候補分子に絞り、そのプロモーター活性の癌特異的を大まかに検証した。またその4種類の新規m-CRAも作製していた。よってさらに、この分子の内因性発現レベルの癌特異性、プロモーターの癌特異性活性について、より詳細に検討する。またこの分子依存的なm-CRAの作製を完成し、治療効果を検討していく。

### (2) 革新的なm-CRAの開発

新しい概念に基づく、画期的なm-CRAの開発を行う。

### (倫理面への配慮)

研究の動物実験計画は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. Surv.m-CRAの前臨床研究による臨床化の展望

#### ①臨床化のため、癌治療効果を維持したまま、癌特異性を増強するm-CRA化 (TERT m-CRA)

テロメラーゼは正常細胞でもS期で発現しているという新たな生理作用が科学的に報告されている(Cell, 2003)。よってTERT m-CRAの臨床化のため、TERT promoterの真の有用性を明らかにした。確かにS期特異的なテロメラーゼ発現とTERT promoter活性は癌細胞で生物学的には確認される現象であるが、正常細胞ではS期でも通常のアッセイではTERT promoterの活性が全くみられないように、そもそも発現レベルのオーダーが癌と正常の差はあまりにも違いがあることを明確にした。つまりTERT promoterを使ったm-CRA戦略は臨床化においても非常に安全であるという科学的担保が得られた。また既報告とは異なり、180bpの短いTERT promoterが癌特異的な強力な活性を得られ、より有用だということを明らかにした。

次に、この最適化したTERT promoterで、テロメラーゼ依存性m-CRA (Tert.m-CRA)において、4因子 m-CRA化でも「癌治療効果を維持したまま、癌特異性を増強できる」ことを、詳細な*in vitro*の検証に加え、癌動物モデルでも明らかにした。具体的には、(a)E1Aのmutant化(Rb結合領域欠損によるRb依存性増殖の加味)、(b)E1Bの発現を他の腫瘍特異的因子であるE2Fのpromoterで制御(癌では細胞周期が異常に恒常的に活性化している)、(c)E1Bのmutant化(p53結合領域の有無など)の各因子を組み入れた2~4因子制御のTert.m-CRAを作製し、その癌治療効果と癌特異性を検証した。In vitroの実験で、最も複雑な形の、独立した4因子でウイルス増殖制御するTert.m-CRAは、癌治療効果を有意に減じることなく、癌特異性の効果を向上した。さらに癌動物モデルでの治療実験でも、4因子制御型Tert.m-CRAは初期型の2因子制御Tert.m-CRAと同等の癌治療効果を示した。よってこの結果により、より複雑な独立4因子制御m-CRA化は、癌治療効果を維持したまま癌特異性を向上できると明確になり、次のSurv.m-CRAのさらなるm-CRA化へと進展した。

#### ②Surv.m-CRAでの具体的なm-CRA化による、癌治療効果と癌特異性の検討

前述のように、前年度までにE1AのプロモーターをSurvivin promoterで発現制御する基本形から、さらなるm-CRA化として、様々な因子を組み入れた2~4因子制御のSurv.m-CRAを、多種作製している。多種類を一度に解析はできないので、本年度はE1BをCEA promoterに改変したSurv.m-CRA(CEApr)を胃癌(腺癌)モデルでの治療実験を行った。

まず*in vitro*における、CEA産生癌、CEA非産生癌、正常細胞での検討を行った。CEA産生癌にお

いては改良型Surv.m-CRA(CEApr)は、初期型の2因子制御のSurv.m-CRA(2)と変わりなく障害を示した。一方、正常細胞や、CEA非産生癌に対しては、Surv.m-CRA(CEApr)はSurv.m-CRA(2)に比べて有意に低い細胞障害性であった。つまり、E1Bのプロモーターを腫瘍特異的プロモーターに改良した、3あるいは4因子制御の改良型Surv.m-CRAにより、より安全に癌特異性を向上した改良型Surv.m-CRA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

昨年度、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、4因子増殖制御Tert.m-CRAに載せたものを作製した。これは世界で初めての6因子搭載m-CRAである。しかし昨年度のパイロットスタディーでの結果は、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。

本年度は、その原因を探索し、その結果を踏まえて、正常への障害なしに、癌治療効果を増強する治療遺伝子ユニット搭載6因子m-CRAの開発を目指した。研究は進行中であるが、おそらく「Survivin promoterが高活性であるため正常細胞でも障害を起こしてしまう」可能性、またあるいは「癌細胞はあまりにも効率よく早期に殺傷するためウイルスが増殖する場なくなるのに対し、正常細胞ではウイルス溶解はおきないためこれらの治療遺伝子が長期間作用する」可能性などを考え、研究を進行している。

また我々の方法は、個々のパーツの基礎研究成果を、そのままの材料で簡単に改変m-CRAの最終形に組み替え作製できるメリットがあるため、基礎成果ができればすぐに最終的な目的の癌治療効果を増強する6因子搭載Surv.m-CRAまで研究を進展できると考えている。

## 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し、昨年度よりこの研究を進めてきた。つまり、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、基礎生物学的な解析も行なっている。前年度までに、2種類の候補分子に絞り、そのプロモーター活性の癌特異性を大まかに検証し、またその4種類の新規m-CRAも作製していた。特許出願前で成果が完成していないので詳細は記載しがたいが、本年度は基礎的な生物学的現象の解析により主力を注いだ。この分子の内因性発現レベルの癌特異性を確認し、プロモーターの癌特異性活性について、より詳細に検討して有

用性を検証できた。

### ② 癌をターゲットとする新規分子の腫瘍生物学的探索

初年度より行っているが、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ており、その分子機能、癌の特異性を調べている。

また一方で、癌の幹細胞をターゲットするm-CRAという斬新なアイデアに基づき、そのための基礎研究を進めてきた。特にES細胞を使用した純粋な再生医学研究も進め、アデノウイルスベクターを用いた画期的な技術開発もできた。

## 3. 臨床化への準備となる研究

前述のように、改良型Tert.m-CRAについては動物実験の前臨床の結果を得ている。また改良型Surv.m-CRAについては、動物モデルの問題から、改めて動物実験の系を構築しなおしている。

一方、科学的な研究成果は前述のように着実に進んできたので、Dr. Chen、その他の遺伝子治療専門施設の海外研究協力者とも共同研究によるSurv.m-CRAの臨床化の討議も行ってきた。

## 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、2年目、そして本年度と着実に研究を進めてきた。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の改良開発も中核と成る研究成果は得ている。今後は、米国の協力施設と共同研究の形で臨床応用化を計り、最終的には本邦での臨床応用化、そして一般製薬化を計って行きたいと思っている。

また一方で、このm-CRA技術を使い、さらに革新的なm-CRA癌治療法の開発の基礎研究も進めてきた。Surv.m-CRAの臨床化に続き、これらのより新たな研究成果も、順次臨床化へと応用していきたいと思っている。

## E. 結論

本年度の成果は、最適m-CRA化の科学的基盤はほぼ確立し、具体的に改良型Tert.m-CRAでの前臨床研究、改良型Surv.m-CRAの具体的な成果も得た。また米国の研究者とも討議を重ね、臨床化への道筋も開いてきた。また一方で、さらに発展的な新規m-CRA開発の基礎研究を進めることができた。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(主任研究者のもののみ記載。その他の分担研究者の論文は、各項を参照)

- 1) Takahashi T, Kawai T, Ushikoshi H, Nagano S, Oshika H, Inoue M, Kunisada T, Takemura G, Fujiwara H, Kosai K.: Identification and isolation of embryonic stem cell-derived target cells by adenoviral conditional targeting. *Mol Ther.* 14, 673-683, 2006
- 2) Murofushi Y, Nagano S, Kamizono J, Takahashi T, Fujiwara H, Komiya S, Matsuishi T, and Kosai K.: Cell cycle-specific changes in hTERT promoter activity in normal and cancerous cells in adenoviral gene therapy: A promising implication of telomerase-dependent targeting cancer gene therapy. *Int J Oncol.* 29: 681-688, 2006
- 3) Kuge H, Ohashi K, Yokoyama T, Kanehiro H, Hisanaga M, Koyama F, Bumgardner GL, Kosai K., Nakajima Y.: Genetic modification of hepatocytes towards hepatocyte transplantation and liver tissue engineering. *Cell Transplant.* 15:1-12, 2006
- 4) 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.* 44:1046-1054, 2006
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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) 199-204, 2006
- 8) 小賤健一郎. : 遺伝子治療と再生医学. 全日本鍼灸学会雑誌. (proceedings) 56: 16-26, 2006
- 9) 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术開発—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) 5: 43-51, 2006
- 10) 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

### 2. 学会発表

(自身の研究室が主体となった研究のみ以下に記載)

- 1) 神園純一、永野聡、小賤健一郎.、小宮節郎.: 独自の癌特異的増殖型アデノウイルスによる骨肉腫遺伝子治療法の開発. 2006年10月19-20日 (長崎)
- 2) Ngin Cin Khai, Tomoyuki Takahashi, Yoshiteru Murofushi, Ken-ichiro Kosai. HB-EGF Gene Therapy is more potently therapeutic (protective and mitogenic for hepatocytes) than HGF for hepatic injury in mice. The Japan Society of Gene Therapy. The 12th Annual Meeting 2006, Aug 24-26, 2006 (Tokyo)
- 3) Ken-ichiro Kosai. Ngin Cin Khai, Tomoyuki Takahashi. Hepatic HB-EGF (Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor) Gene Therapy for Fulminant Hepatic Failure in Mice: More Potent Protective and Mitogenic Effects for Hepatocytes Than HGF (Hepatocyte Growth Factor). The 9th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, May 31-June 4, 2006 (Baltimore, MD, USA).
- 4) 小賤健一郎. HB-EGF 肝遺伝子治療で HGF より強力に劇症肝炎を治療できる (一般演題) 2006年4月21-23日 (金沢)
- 5) 小賤健一郎. : CD9 遺伝子治療は病的心肥大/頻脈を直接正常化し、致死性心疾患を治療する (一般演題) 2006年4月21-23日 (金沢)
- 6) 小賤健一郎. : 遺伝子治療と再生医療を本邦で実現するための完全オリジナルの基盤技術の開発 (会頭要望演題) 2006年4月21-23日 (金沢)

### 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; 本年度のみ)

- 1) 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  
発明者: 小賤健一郎.、ニン・チン・カイ、高橋知之  
出願人: 鹿児島大学  
国内出願日: 2005年9月28日  
(特願2005-283085)  
国際出願日: 2006年9月27日  
(PCT/JP2006/319915)
- 2) 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: 小賤健一郎.、神園純一、永野聡  
出願人: 小賤健一郎.  
国内出願日: 2004年5月25日

(特願2004-154431)

国際出願日：2005年5月23日

(PCT/JP2005/009818)

\* 米国、日本へ指定国移行 (2006年)

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・整形外科学講座・教授

研究要旨

我々は、独自開発したm-CRA作製技術を用いて、さまざまなm-CRAを作製し、その機能を多種の癌細胞、正常細胞でウイルス、腫瘍生物学的に詳細に網羅的な*in vitro*機能解析し、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っている。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み。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を開発し、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った。

A. 研究目的

我々は昨年、一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み。

さらに新規に開発した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(TERT-mCRA)の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った。

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み。

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.ΔE1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。

TERT-mCRAの癌細胞移植モデルマウス評価に関しては、我々が既にその実験系を確立している皮下腫瘍モデルを作製してその評価を行った。

(倫理面への配慮)

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

癌の腹腔内播種モデルは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。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。

一方、我々が実験系を確立させている皮下腫瘍モデルではTERT-mCRAの優れた抗腫瘍効果を腫瘍体積による評価だけでなく、肉眼的にも組織学的にも明確に示すことができた。この成果は現在、*in vitro*のデータとあわせて投稿準備中である。

#### 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ットン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) Imamura K, Matsunaga S, Nagata M, Nakamura K, Yokouchi M, Yamamoto T, Hayashi K, Komiya S. Ossification of the posterior longitudinal ligament of the thoracic spine in association with polycystic ovary syndrome. *Neurol India*. 54(4):448-450, 2006.
- 2) Nagai T, Tanaka M, Tsuneyoshi Y, Matsushita K, Sunahara N, Matsuda T, Yoshida H, Komiya S, Onda M, Matsuyama T. In vitro and in vivo efficacy of a recombinant immunotoxin against folate receptor beta on the activation and proliferation of rheumatoid

arthritis synovial cells. *Arthritis Rheum*. 54(10):3126-3134, 2006.

- 3) Arishima Y, Setoguchi T, Yamaura I, Yone K, Komiya S. Preventive effect of erythropoietin on spinal cord cell apoptosis following acute traumatic injury in rats. *Spine*. 31(21):2432-2438, 2006.
- 4) Murofushi Y, Nagano S, Kamizono J, Takahashi T, Fujiwara H, Komiya S, Matsuishi T, Kosai K. Cell cycle-specific changes in hTERT promoter activity in normal and cancerous cells in adenoviral gene therapy: a promising implication of telomerase-dependent targeted cancer gene therapy. *Int J Oncol*. 29(3):681-688, 2006.
- 5) Tofuku K, Yokouchi M, Murayama T, Minami S, Komiya S. HAS3-related hyaluronan enhances biological activities necessary for metastasis of osteosarcoma cells. *Int J Oncol*. 29(1):175-183, 2006.
- 6) 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*. 44(7):461-464, 2006.
- 7) Abematsu M, Kagawa T, Fukuda S, Inoue T, Takebayashi H, Komiya S, Taga T. Basic fibroblast growth factor endows dorsal telencephalic neural progenitors with the ability to differentiate into oligodendrocytes but not gamma-aminobutyric acidergic neurons. *J Neurosci Res*. 83(5):731-743, 2006.
- 8) Sato T, Konomi K, Yamasaki S, Aratani S, Tsuchimochi K, Yokouchi M, Masuko-Hongo K, Yagishita N, Nakamura H, Komiya S, Beppu M, Aoki H, Nishioka K, Nakajima T. Comparative analysis of gene expression profiles in intact and damaged regions of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*. 54(3):808-817, 2006.
- 9) Shouda T, Hiraoka K, Komiya S, Hamada T, Zenmyo M, Iwasaki H, Isayama T, Fukushima N, Nagata K, Yoshimura A. Suppression of IL-6 production and proliferation by blocking STAT3 activation in malignant soft tissue tumor cells. *Cancer Lett*. 231(2):176-184, 2006.
- 10) 米 和徳, 林 協司, 山元拓哉, 長友淑美, 永田政仁, 中村俊介, 松永俊二, 小宮節郎 高齢者の圧迫性頸髄症の治療経験 整形外科と災害外科 55(3):293-296, 2006
- 11) 山元拓哉, 米 和徳, 松永俊二, 林 協司, 宮口文宏, 長友淑美, 今村勝行, 永田政仁, 小宮節郎 脊髄腹側の C2 神経根 schwannoma に対する側方進入摘出術の小経験 整形外科と災害外科 55(3):316-319, 2006
- 12) 松永俊二, 林 協司, 山元拓哉, 長友淑美, 永田政仁, 米 和徳, 小宮節郎 超高齢健康者(super-healthy elders)の頸椎 X 線所見の検討 整形外科と災害外科 55(3):320-322, 2006
- 13) 横内雅博, 有島善也, 山崎康平, 河村一郎, 小宮節郎 温熱化学放射線療法が奏効した sarcoma の 2 例 整形外科と災害外科 54(3):393-396, 2006
- 14) 長嶺智徳, 川畑英之, 小宮節郎, 貴島 稔, 山口正男 大腿骨内顆変形治療骨折の治療経験 整形外科と災害外科 55(4):408-409, 2006

- 15) 宮口文宏, 山元拓哉, 林 協司, 松永俊二, 米和徳, 小宮節郎 頤・胸椎後縦靱帯骨化症の後方除圧術の適応について- X 線上の胸椎後彎角と脊柱管内の骨化部分の占拠率から- 整形外科と災害外科 55(4):500-502, 2006
- 16) 米 和徳, 長友淑美, 山元拓哉, 宮口文宏, 井尻幸成, 小宮節郎 【脊髄と疼痛】 各疾患における疼痛に対する"私の治療法" 腰仙椎部癒着性くも膜炎とその治療 脊椎脊髄ジャーナル 19(9):953-955,2006
- 17) 藤元祐介, 横内雅博, 石堂康弘, 有島善也, 小宮節郎, 北島信一, 義岡孝子, 救仁郷修 後腹膜原発腫瘍 日本整形外科学会雑誌 80(6):S785, 2006.
- 18) 有島善也, 横内雅博, 瀬戸口啓夫, 山崎康平, 榎博則, 濱田裕美, 小宮節郎 骨肉腫肺転移に対してカフェイン併用化学療法が著効した 1 例 日本整形外科学会雑誌 80(6):S741, 2006.
- 19) 横内雅博, 有島善也, 山崎康平, 濱田裕美, 河村一郎, 藤元祐介, 小宮節郎 軟部肉腫に対する温熱化学放射線療法の経験 日本整形外科学会雑誌 80(6):S628, 2006.
- 20) 松永俊二, 林 協司, 山元拓哉, 長友淑美, 米和徳, 小宮節郎 【脊椎脊髄疾患の治療戦略 方針決定に必要な情報とその提供】 疾患別・患者への情報提供の実際 私はこう説明している 変性・退行性疾患 頤椎後縦靱帯骨化症 脊椎脊髄ジャーナル 19(6):471-476, 2006.
- 21) 領木良浩, 下小野田一騎, 湯浅伸也, 林 協司, 井尻幸成, 松永俊二, 米 和徳, 小宮節郎 胸腰椎椎体骨折後遅発性脊髄障害に対し Vertebroplasty を併用した後方 Short Fusion を行った二例 西日本脊椎研究会誌 32(2):205, 2006.
- 22) 前田昌隆, 東福勝宏, 古賀公明, 小宮節郎, 米和徳, 松永俊二, 築瀬光宏, 児玉太郎, 福山勝朗 骨粗鬆症性椎体骨折偽関節に対するバイオアクティブ骨ペーストの使用経験 西日本脊椎研究会誌 32(2):179, 2006.
- 23) 山元拓哉, 米 和徳, 松永俊二, 林 協司, 長友淑美, 小宮節郎, 古賀公明, 宮口文宏 胸腔鏡補助下の小切開胸手術の経験 西日本脊椎研究会誌 32(2):136-139, 2006.
- 24) 山元拓哉, 米 和徳, 松永俊二, 林 協司, 宮口文宏, 長友淑美, 小宮節郎, 武富栄二, 川内義久, 築瀬光宏, 鮫島浩司, 井尻幸成, 古賀公明, 石堂康弘, 田辺 史 下肢神経症状を有す腰椎変性側彎症の術後短期成績 西日本脊椎研究会誌 32(1):25-28, 2006.
- 25) 田邊 史, 廣津匡隆, 古賀公明, 築瀬光宏, 武富栄二, 川内義久, 石堂康弘, 山元拓哉, 松永俊二, 米 和徳, 小宮節郎 椎間孔部神経根障害を呈した変性側彎の検討 西日本脊椎研究会誌 32(1):9-13, 2006.
- 26) 菊野竜一郎(菊野病院), 濱田 隆, 菊野光郎, 松永俊二, 小宮節郎 ハイドロキシアパタイト複合ポリ-L-乳酸内固定材料の使用経験 骨折 28 巻 Suppl.:S205, 2006.
- 27) 小宮節郎 関節症と関節軟骨の最新の知見 日本整形外科学会雑誌 80(5):296-306, 2006.
- 28) 林 協司, 米 和徳, 松永俊二, 山元拓哉, 長友淑美, 小宮節郎 下垂足を呈した胸腰椎移行部圧迫障害における神経症候の特徴 日本整形外科学会雑誌 80(4):S448, 2006.
- 29) 中村俊介, 砂原伸彦, 片平光昭, 松永俊二, 武富栄二, 小宮節郎 RA 骨粗鬆症におけるステロイドの影響 日本整形外科学会雑誌 80(4):S427, 2006.
- 30) 田口周平, 梅北善久, 益田義幸, 小宮節郎, 吉田浩己 類骨形成を伴った淡明細胞型軟骨肉腫の 1 例 診断病理 23(2):153-156, 2006.
- 31) 松永俊二, 小宮節郎, 林 協司, 山元拓哉, 長友淑美, 今村勝行, 武富栄二, 砂原伸彦, 米延策雄, 鹿児島リウマチ研究班 関節リウマチ患者における頸椎手術の新しい成績評価基準に関する研究九州リウマチ 25(2):136-139, 2006.
- 32) 砂原伸彦, 中村俊介, 片平光昭, 松永俊二, 武富栄二, 小宮節郎 RA における人工肘関節置換術の中期成績 日本整形外科学会雑誌 80(3):S114, 2006.
- 33) 益田義幸, 有島善也, 横内雅博, 東福勝宏, 中村俊介, 廣田仁志, 小宮節郎 骨形成不全症にみられた大腿骨頭軟骨下脆弱性骨折の 1 例 整形外科と災害外科 55(1):65-67, 2006.
- 34) 廣田仁志, 山元拓哉, 今村勝行, 長友淑美, 宮口文宏, 横内雅博, 林協司, 井尻幸成, 松永俊二, 米和徳, 小宮節郎 脊柱管内椎間関節腫瘍の治療経験 整形外科と災害外科 55(1): 25-27, 2006.
- 35) 今村勝行, 長友淑美, 松永俊二, 山元拓哉, 宮口文宏, 鶴亜里紗, 中村和史, 横内雅博, 林協司, 井尻幸成, 米 和徳, 小宮節郎 頤椎後縦靱帯骨化症における術後しびれの経過について 整形外科と災害外科 55(1):22-24, 2006.
- 36) 松永俊二, 瀬戸口啓夫, 小宮節郎 CLASSIC ARTICLES 1838 年世界初の後縦靱帯骨化症の報告論文 臨床整形外科 41(3): 244-253, 2006.
- 37) 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 整形外科と災害外科 55(2):205-207, 2006.
- 38) 石堂康弘, 武富栄二, 砂原伸彦, 永田政仁, 中村俊介, 松永俊二, 米 和徳, 小宮節郎 THA または TKA を施行されたりウマチ患者の腰椎病変 整形外科と災害外科 55(2):186-187, 2006.
- 39) 東福勝宏, 横内雅博, 松野下幸弘, 永田政仁, 小宮節郎 原発性副甲状腺機能亢進症に伴う brown tumor に手術を施行した 1 例 整形外科と災害外科 55(2):180-182, 2006.
- 40) 中村俊介, 横内雅博, 有島善也, 川畑英之, 山崎康平, 東福勝宏, 濱田裕美, 益田義幸, 廣田仁志, 永田政仁, 小宮節郎 自家液体窒素処理骨に血管柄付腓骨移植術を併用して再建した大腿骨遠位骨肉腫の一例 整形外科と災害外科 55(2):171-175, 2006.
- 41) 東福勝宏, 横内雅博, 有島善也, 山崎康平, 小宮節郎 術中体外照射処理骨にて再建した大腿骨骨幹部 Ewing 肉腫の 1 例 整形外科と災害外科 55(2):167-170, 2006.
- 42) 鮫島浩司(南風病院 整形外科), 川内義久, 山口聡, 藤元祐介, 小宮節郎 広範囲に及んだ硬膜外膿瘍の治療経験 整形外科と災害外科 55(2):155-158, 2006.

- 43) 湯浅伸也, 領木良浩, 井尻幸成, 松永俊二, 米和徳, 小宮節郎 胸椎椎体骨折後遅発性脊髄障害に対し vertebroplasty と後方固定術を行った 1 例 整形外科と災害外科 55(2):151-154, 2006.
- 44) 瀬戸口啓夫, 米和徳, 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 日本脊椎脊髄病学会雑誌 17(1)(2/2):549, 2006.
- 45) 宮口文宏, 川畑英之, 瀬戸口啓夫, 有島善也, 米和徳, 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エチンのシグナル伝達機構 日本脊椎脊髄病学会雑誌 17(1)(2/2):554, 2006.
- 46) 山崎康平, 瀬戸口啓夫, 米和徳, 川畑英之, 有島善也, 宮口文宏, 小宮節郎 急性脊髄損傷後の Stem cell factor(SCF),c-kit の増加と Apoptosis への関与 日本脊椎脊髄病学会雑誌 17(1)(2/2):553, 2006.
- 47) 川畑英之, 米和徳, 瀬戸口啓夫, 宮口文宏, 有島善也, 小宮節郎 急性脊髄損傷後の apoptosis 誘導における HMGB-1(High Mobility Group Box Chromosomal Protein 1)の役割 日本脊椎脊髄病学会雑誌 17(1)(2/2):552, 2006.
- 48) 松永俊二, 林 協司, 山元拓哉, 長友淑美, 米和徳, 小宮節郎 超高齢健康者の頸椎レントゲン所見からみた変性の位置づけ 日本脊椎脊髄病学会雑誌 17(1)(2/2):445, 2006.
- 49) 長友淑美, 廣田仁志, 山元拓哉, 松永俊二, 米和徳, 小宮節郎 脊柱管内椎間関節嚢腫の治療経験 日本脊椎脊髄病学会雑誌 17(1)(2/2):437, 2006.
- 50) 山元拓哉, 米和徳, 松永俊二, 林 協司, 石堂康弘, 長友淑美, 小宮節郎, 武富栄二, 川内義久, 築瀬光宏, 古賀公明, 田邊 史 Foraminal stenosis と椎間板楔状変形の関連についての検討 日本脊椎脊髄病学会雑誌 17(1)(2/2):292, 2006.
- 51) 松永俊二, 林 協司, 小宮節郎 【脊柱靱帯骨化症 そのシステムティックレビュー】 頸椎後縦靱帯骨化症の成因・病態について 脊椎脊髄ジャーナル 19(2):107-116, 2006.
2. 学会発表
- 1) 瀬戸口啓夫, 近藤 亨, 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 亨, 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 亨, 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, 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 鹿児島大学大学院運動機能修復学講座整形外科学・医員

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。これまでに、m-CRA化は、「癌治療効果を維持した癌特異性の向上（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。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つのプロジェクトに取り組んだ。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の開発、4) 3)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4つのプロジェクトに取り組み、作製を終了し、ウイルス、腫瘍生物学的に順次解析作業を進行中である。

また、新規m-CRAの開発を進める一方で、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。

A. 研究目的

昨年、一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て、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 J et al; Cancer Res. 65,5284-5291, 2005)。

本研究の目的は、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、既報告の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の開発、この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の開発に取り組むことである。

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、4) 3)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)～4)すべてに関してウイルス精製まで終了、順次、ウイルス学的、生物学的にその特性について解析段階に入っている。

また、新規m-CRAの開発を進める一方で、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。

### 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。特にOC promoterを導入したことにより、骨肉腫をはじめとする原発性骨腫瘍、転移性骨腫瘍に対する効果を期待するものである。

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て現在、投稿準備中である。

プロジェクト3) 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、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い、多因子制御(m-CRA化)を図ることで、癌細胞での細胞傷害効果を増強、正常細胞での細胞傷害を軽減させることが可能であることを明らかにできた。現在、投稿準備中である。

プロジェクト4) プロジェクト3)の改良、応用型でsurvivin promoterで治療遺伝子(HSV-tk, p53)を発現させるという初の完全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。現在、その副作用発生の機序、改善に向けて詳細に解析を続けている。

hTERTプロモーターを用いた癌遺伝子治療の安全性の検証に関しては、詳細に*in vitro*解析を行い、その問題を検証した結果、「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。(Murofushi Y et al: Int J Oncol. 29,3 :681-688, 2006)

### 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。

我々の戦略の中心であるm-CRA化は、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。

### 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

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Murofushi Y, Nagano S, Kamizono J, Takahashi T, Fujiwara H, Komiya S, Matsuishi T, Kosai K. Cell cycle-specific changes in hTERT promoter activity in normal and cancerous cells in adenoviral gene therapy: a promising implication of telomerase-dependent targeted cancer gene therapy. *Int J Oncol.* 29(3):681-688, 2006.
- 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

#### 2. 学会発表

- 1) 神園純一, 永野聡, 小賤健一郎, 小宮節郎: 独自の癌特異的増殖型アデノウイルスによる癌遺伝子治療法の開発. 第11回南九州腫瘍研究会, 2006年7月3日(鹿児島)
- 2) 神園純一, 永野聡, 小賤健一郎, 小宮節郎: 独自開発した癌特異的増殖制御型アデノウイルスによる癌遺伝子治療法の開発. 第7回運動器科学研究会, 2006年8月25日(滋賀)
- 3) 神園純一, 永野聡, 小賤健一郎, 小宮節郎: 独自の癌特異的増殖型アデノウイルスによる骨肉腫遺伝子治療法の開発. 第21回日本整形外科学会基礎学術集会. 2006年10月20日(長崎)
- 4) 神園純一 有島善也 廣津匡隆 山下芳隆 瀬戸口啓夫 横内雅博 小宮節郎: 母指中手骨発生骨巨細胞腫の1例. 第112回西日本整形・災害外科学会. 2006年11月18日(米子)
- 5) 神園純一 横内雅博 有島善也 山下芳隆 廣津匡隆 小宮節郎 松永俊二: 当科における温熱併用化学放射線療法 of 短期成績. 第34回日本生体電気刺激研究会. 2007年2月24日(名古屋)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

1. 特許取得

なし

3. その他

なし

2. 実用新案登録

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、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、DNAマイクロアレイによる肝癌細胞に対するHGFのユニークな生理活性に着目した癌関連分子の解析や、癌細胞とマウス胚性幹（ES）細胞における遺伝子プロファイリング比較による癌化に関わる分子を抽出し、m-CRAシステムに応用可能な癌特異化因子の探索を進めてきた。しかし、以上の研究から新しい癌関連分子は得られるものの、得られた分子のm-CRA癌遺伝子治療開発における有用性を体系だって評価するシステムは確立されておらず、効率良いm-CRA癌遺伝子治療法の開発には、得られた癌関連遺伝子プロモーターのm-CRAにおける有用性（機能解析）を簡便に評価するシステムが必要と考えられた。

そこで今回は、m-CRAに応用可能な新規癌関連分子の評価システムを整備するために、既に癌細胞や幹細胞で機能する事が広く知られているTERT（telomerase reverse transcriptase）遺伝子のプロモーターをモデルとして利用した癌細胞ならびに正常細胞における癌特異的遺伝子プロモーター評価システムの確立を行った。即ち、新規癌関連遺伝子のプロモーターをm-CRAへ応用するにあたって、TERTプロモーターをモデルとした癌、正常細胞内におけるプロモーター活性を評価するシステムを確立し、新たに得られた癌関連遺伝子のm-CRA癌遺伝子治療の開発への応用を促す評価システムの完成を目指すものである。

## A. 研究目的

本研究は、これまでの研究から得られた新規癌関連分子のm-CRAシステム応用における有用性評価システムの整備を目的としている。そこで、既に癌細胞やES細胞で機能する事が広く知られているTERT遺伝子プロモーターに様々なマーカー遺伝子を繋いだウイルスベクターを作製し、癌細胞や正常細胞の様々な状況下における癌特異的遺伝子プロモーターの評価システムを開発することで、癌特異性活性の確かなTERTプロモーターをモデルとした新規癌関連分子プロモーターの細胞内活性を評価するシステムの確立を目標とする。最終的には、本評価システムの整備によって、得られた癌関連遺伝子をm-CRA癌遺伝子治療法の開発へ速やかに応用し、新たな癌関連遺伝子によるm-CRAの科学的な治療効果、臨床応用における有用性を着実に検討することを目指すものである。

## B. 研究方法

### 1. ヒトTERTプロモーター依存性マーカー遺伝子発現細胞株の作成と癌特異的マーカー発現の解析

TERTは染色体DNA末端テロメア配列の伸長に関わるテロメラーゼの酵素活性を司り、TERT遺伝子は多くの癌細胞や幹細胞で強く発現することから、そのプロモーターは癌細胞や幹細胞で特異的に機能する事が

示されている。そこで本研究では、TERT遺伝子を癌特異的遺伝子のモデル因子とした癌特異遺伝子評価システムを確立する為に、ヒトTERT（hTERT）遺伝子プロモーターの下流に、マーカー遺伝子としてEGFP（Enhanced green fluorescence protein）または、単純ヘルペスのチミジンキナーゼ遺伝子（HSV-tk）を連結したレンチウイルス（LV）を作成し、3種類の癌細胞株（HeLa、HepG2、HT1080）、1種類の正常細胞株（WI-38）における遺伝子安定導入細胞の作成を行った。更に作成後の安定遺伝子導入細胞、それぞれにおけるEGFP発現の解析ならびに、ガンシクロビル（GCV）添加による細胞傷害効果を解析する事によって、癌特異性の確かなTERTプロモーター利用による癌細胞特異性や治療効果を検討し、m-CRAへの応用が期待される癌特異性プロモーターの有用性評価システムの確立を行った。

### 2. ヒトTERTプロモーターの癌細胞特異性と細胞周期特異的活性変化の解析

上述のようにテロメラーゼの癌特異的な活性化の知見によって、hTERTプロモーターは癌標的治療において有用とされている。しかしながら、近年では正常細胞においても、S期ではテロメラーゼ活性がみられるとの報告もあり、正常細胞の細胞周期における癌特異的プロモーター活性の変化を想定した安全性を評価するシステムが必要と考

えられた。そこで本研究では、hTERT遺伝子プロモーター下流にマーカー遺伝子として、LacZ遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (Ad) を作製し、細胞周期を同調させた癌細胞ならびに正常細胞におけるプロモーターアッセイを行った。即ち、TERT遺伝子プロモーターをモデルとした、細胞周期など様々な条件下におけるプロモーター活性の変化を検討する方法の確立を行うことによって、安全性の高い癌標的遺伝子治療に有用な癌特異遺伝子評価システム確立の一助とした。

## C. 研究結果

### 1. ヒトTERTプロモーター依存性マーカー遺伝子発

#### 現細胞の作成と癌特異的マーカー発現の解析

TERTプロモーターとテロメラーゼ活性の相関を調べる為に、利用した細胞それぞれのテロメラーゼ活性を測定したところ、正常線維芽細胞のWI-38ではテロメラーゼ活性がほとんど認められないのに対して、癌細胞のHeLa、HepG2、HT1080は高いテロメラーゼ活性を示した。更に、これらの細胞にLV.hTERT-EGFPならびにLV.hTERT-tkを感染後、安定遺伝子導入細胞を濃縮・選別し、それぞれの細胞におけるEGFP発現ならびに、GCVに対する感受性を検討した。その結果、HeLa、HepG2、HT1080においてEGFPは強く検出されるのに対して、WI-38ではほとんど検出されない事から、LVシステムの利用によってhTERTプロモーターは細胞内で正常に機能し、その活性はテロメラーゼ活性に相関する事が示された。また、更にLV.hTERT-tkを導入したHeLa、HepG2、HT1080は、GCVに感受性を示すのに対して、WI-38では細胞傷害が認められなかった。以上の結果から、hTERTのような癌特異的プロモーターとマーカー遺伝子を組み合わせるLVシステムを利用する事で、簡便な遺伝子構築安定導入細胞の作成が可能であり、癌特異的プロモーターの安定な評価システムを確立できることが明らかとなった。

### 2. ヒトTERTプロモーターの癌細胞特異性と細胞周

#### 期特異的活性変化の解析

癌特異的遺伝子プロモーターを利用した癌標的化遺伝子治療の開発では、癌細胞における効果は当然の事として示されるものの、正常細胞におけるプロモーターの活性等についての詳細な報告は少ない。実際、hTERTプロモーターを用いた多くの癌特異化遺伝子治療研究が報告されているが、その安全性を詳細に評価した報告はほとんどなかった。そこで本研究では、細胞周期を同調した正常細胞と癌細胞に

おけるテロメラーゼ活性、hTERT遺伝子発現、Adによる遺伝子導入後のhTERTプロモーター活性の解析を行った (Murofushi-Y et al. Int J Oncol. '06)。その結果、テロメラーゼ活性ならびにhTERT遺伝子発現は癌細胞の全12種では高かったが、11種の正常細胞では検出されなかった。更にテロメラーゼ活性は癌細胞 (HepG2) ではG<sub>1</sub>/S、S期で最も高かったが、正常細胞 (WI-38) では、S期を含む何れの細胞周期でも検出されず、プロモーター活性も認められなかった。以上の結果によって、正常細胞におけるS期特異的プロモーター活性は癌細胞に比較して極めて低く、hTERTプロモーターを用いた癌標的遺伝子治療の安全性が示されるとともに、正常細胞を含む様々な条件下 (細胞周期) における癌特異的プロモーターの詳細な評価システムの確立が可能である事が示された。

## D. 考察

本来、癌遺伝子治療に利用するベクターは、ウイルスベクター自体の癌細胞傷害作用も見込む事が出来るAdが適している。しかしながら、このベクター自体の細胞傷害によって、Adを利用した細胞に対する基礎研究ではベクター構築自身の癌治療効果を過剰に評価してしまう事が少なくない。これに対して、本研究で用いたLVは遺伝子を安定導入した細胞の作製が容易であり、一旦細胞へ遺伝子が導入されてしまえば、解析毎のウイルス感染操作や細胞傷害を除外できることから、ベクター構築本来の生物学的活性が安定して評価できると言った利点がある。ただし、LVを利用した場合は、ベクター構築が取り込まれる染色体領域によって、ベクター構築の遺伝子発現が影響される可能性も考えられ、本研究では、その影響を最小限に抑える目的で、遺伝子導入後の細胞クローンは作成せず、遺伝子導入の多様性が期待できる感染細胞の選別・濃縮による遺伝子導入細胞を作成した。また、今回、癌特異的遺伝子のモデルとはいえ作成したTERTプロモーターを利用した遺伝子導入細胞は、癌、正常細胞におけるTERTプロモーター活性の詳細な解析や、最近話題となる事の多い癌幹細胞の同定に役立つ可能性が考えられ、癌標的遺伝子治療の開発に極めて有用と思われる。今後、m-CRAに利用可能な癌特異的プロモーター評価システムの確立のみならず、得られた癌関連遺伝子、個々のプロモーターを利用した癌発生メカニズムの解析等の基礎研究へも役立てて行きたいと考えている。

一方で、hTERTプロモーターは、既に多くの癌標的化遺伝子治療に利用されている。しかしながら、最近になって、正常細胞のS期にはテロメラーゼ活性が認められるなど、本来、遺伝子治療に用いる段



階までに重要と考えられる詳細なプロモーター解析が行われていないといった問題に直面した。実際に本研究によって、正常細胞におけるhTERTプロモーターの活性は、癌細胞における活性と比較すると微々たるもので、その癌標的化遺伝子治療の安全性には問題ない事が初めて示されたが、今後、m-CRAで応用を目的とした癌特異遺伝子プロモーターについてはその同定・利用にともない癌、正常細胞における系統立てた活性評価を行う必要があると考えられる。以上の点から、活性評価システムの一つとして、細胞周期を同調した細胞におけるAdを利用した癌特異遺伝子プロモーター解析は有効と考えられ、今後、新たなm-CRA遺伝子治療法の開発に役立つものと期待される。

## E. 結論

- 1) hTERTプロモーターをモデルとした本研究から、hTERT遺伝子プロモーターの癌標的遺伝子治療における有用性を改めて示すとともに、新規癌特異的遺伝子プロモーターとマーカー遺伝子を組み合わせたLVシステムを利用する事で、簡便な遺伝子安定導入細胞の作成による癌特異的遺伝子プロモーターの評価システムの確立に成功した。
- 2) hTERTプロモーターを用いた癌標的遺伝子治療の安全性を示すとともに、Adシステムの利用によって、癌細胞、ならびに正常細胞の様々な条件下（細胞周期）における新たな癌特異的プロモーターの詳細な評価システムの確立に成功した。
- 3) 今後、これまでの研究成果によって得られた新規の癌特異的遺伝子プロモーターを、LV、Adを用いた解析システムで詳細に解析する事によって、m-CRAに有用な新規の癌特異的遺伝子プロモーターの体系的な評価が可能となると期待される。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1)論文発表

- 1) Takahashi T., Kawai T., Ushikoshi H., Nagano S., Oshika H., Inoue M., Kunisada T., Takemura G., Fujiwara H., Kosai K. Identification and isolation of embryonic stem cell-derived target cells by adenoviral conditional targeting. *Mol. Ther.* 14(5), 673-683 (2006)

- 2) Murofushi Y., Nagano S., Kamizono J., Takahashi T., Fujiwara H., Komiya S., Matsuishi T., Kosai K. Cell cycle-specific changes of hTERT promoter activity in normal and cancerous cells in adenoviral gene therapy: A promising implication of telomerase-dependent targeted cancer gene therapy. *Int. J. Oncol.* 29(3), 681-688 (2006)
- 3) 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.* 44(6), 1046-1054 (2006)
- 4) Misao Y., Takemura G., Arai M., Ohno T., Onogi H., Takahashi T., Minatoguchi S., Fujiwara T., Fujiwara H. Importance of recruitment of bone marrow-derived CXCR4(+) cells in post-infarct cardiac repair mediated by G-CSF. *Cardiovasc Res.* 71(3), 455-465 (2006)
- 5) 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)

### 2)学会発表

1. 高橋知之 演題名：「再生医療ってなんだろう？」 第五回 久留米大学 高次脳疾患研究所 市民公開講座 久留米大学旭町キャンパス 筑水会館イベントホール 平成19年2月3日

## 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

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

本研究課題では、厚生行政の意義から、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の臨床化の実現を目指すものであるため、研究期間（3年間）の内に最終的に臨床応用への道筋をつけることも大きな課題の一つであった。本年度は、本格的な臨床応用に向けて、主任研究者と討論を行い、その準備実験と、癌遺伝子治療の基礎研究を進めてきた。また、最終年度にあたる本年度は、具体的なトランスレーショナルリサーチの道筋をつけるため、主任研究者と直接会合を持ち、本研究課題についてお互いの成果、進展状況等の情報交換を行った。加えて、Mount Sinai School of Medicineが有する施設や設備をお互いに確認したうえで、臨床試験での共同研究の詳細な打ち合わせも行った。

主な研究発表論文

- 1) Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, Colombo MP, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, Schreiber H.: The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 67: 425, 2007
- 2) 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* 66: 1123-31, 2006

## 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	高橋知之 小賤健一郎	細胞増殖因子と再生医療 (7. HGF 急性/劇症肝炎)	高木彰史	細胞増殖因子と再生医療	メディカルレビュー社	大阪	2006	199-204
2	小賤健一郎	遺伝子治療と再生医学. 全日本鍼灸学会雑誌.		遺伝子治療と再生医学	全日本鍼灸学会		2006	16-26

## 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	Takahashi T, Kawai T, Ushikoshi H, Nagano S, Oshika H, Inoue M, Kunisada T, Takemura G, Fujiwara H, Kosai K.	Identification and isolation of embryonic stem cell-derived target cells by adenoviral conditional targeting.	<i>Mol Ther</i>	14	673-683	2006
4	Murofushi Y, Nagano S, Kamizono J, Takahashi T, Fujiwara H, Komiya S, Matsuishi T, and Kosai K.	Cell cycle-specific changes in hTERT promoter activity in normal and cancerous cells in adenoviral gene therapy: A promising implication of telomerase-dependent targeting cancer gene therapy.	<i>Int J Oncol</i>	29	681-688	2006
5	Kuge H, Ohashi K, Yokoyama T, Kanehiro H, Hisanaga M, Koyama F, Bumgardner GL, Kosai K, Nakajima Y.	Genetic modification of hepatocytes towards hepatocyte transplantation and liver tissue engineering.	<i>Cell Transplant</i>	15	1-12	2006
6	Khair NC, Takahashi T, Ushikoshi H, Nagano S, Yuge K, Esaki M, Kawai T, Go to 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.	<i>J Hepatol</i>	44 • 6	1046-1054	2006

7	Misao Y, Takemura G, Arai M, Sato S, Suzuki K, Miyata S, <u>Kosai K</u> , Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H	Bone marrow-derived myocyte-like cells and regulation of repair-related cytokines after bone marrow cell transplantation.	<i>Cardiovasc Res</i>	69	476-490	2006
8	Kagawa T., Takemura G., <u>Kosai K.</u> , Murata I., Ohno T., <u>Takahashi T.</u> , Esaki M., Maruyama R., Fujiwara T., Ohashi H., Fujiwara H.	Hepatocyte growth factor or gene therapy slows down the progression of diabetic nephropathy in db/db mice.	<i>Nephron Physiol</i>	102	92-102	2006
9	<u>高橋知之</u> 、 <u>藤原久義</u> 、 <u>國貞隆弘</u> 、 <u>小賤健一郎</u>	ES細胞再生医学の新技术開発—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	5	43-51,	2006
10	<u>室伏善照</u> 、 <u>神園純一</u> 、 <u>小賤健一郎</u>	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