

別紙1

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16年度～18年度 総合研究報告書

主任研究者 小賤 健一郎

平成19(2007)年 4月

目 次

| | | |
|--|-------|----|
| I. 総合研究報告 ベクター開発と研究総括に関する研究 小賤 健一郎 | ----- | 1 |
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- | 9 |
| III. 研究成果の刊行物・別刷 | ----- | 14 |

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）
総合研究報告書

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の開発に成功した。二年目は、その開発したSurv.m-CRAをさらにm-CRA化で改良するための最適m-CRA化の基本的研究、それに画期的な癌遺伝子治療法の確立として新規m-CRAの開発研究を進めた。そして最終年度の三年目は、科学的面でも臨床化への進展の面でも、これらの研究をさらに発展させた。最終的に、m-CRA化に関しては一般化できるm-CRA化の方法を確立し、具体的にウイルス増殖部の4因子制御化で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の研究も進めることができた。また新規分子によるさらに革新的なm-CRA開発にも取り組み、基礎研究として成果を上げた。

このように3年間の本研究成果は、独自開発の遺伝子治療技術から、具体的な癌治療薬となる第一弾のオリジナルSurv.m-CRAを開発し、臨床化を見据えてさらなる改良を加えることもできた。そしてさらにこれに続く新たなm-CRAも順次開発が進んだというものである。

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,
Associate Professor

* 室伏善照 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
・助手

* 平成17年度のみ

治療のブレイクスルーとはなっていない。その主因の一つは、*in vitro* でいくら遺伝子導入効率の高いベクターでも、「非」増殖型のベクターでは *in vivo* で体内の全癌細胞にもれなく遺伝子を導入することは「物理的」に不可能である（ベクター液が達しない癌細胞には当然、遺伝子は導入されない）ため、遺伝子「未」導入癌細胞からの再発が起こりえるからである。

この問題を根本的に解決するものとして近年期待されているのが、癌特異的増殖型アデノウイルス(CRA; Conditionally replicating adenovirus)であり、その開発が盛んである。CRAは、ウイルス増殖が正常細胞では阻止され、癌細胞内では旺盛に起こるため、生体内で高効率かつ癌細胞特異的な遺伝子導入を可能とするものである。またさらに CRA 自身が、癌細胞内で増幅されたウイルス蛋白により癌細胞を特異的に殺す「溶解性ウイルス療法」の医薬となる利点も併せ持つため、CRAは新世代の癌遺伝子治療として期待されている。

A. 研究目的

新たな治療法として期待された癌遺伝子治療は、数多くの臨床試験でその安全性は確認されたが、治療効果自体は当初期待されたような癌

ADV の増殖に必須かつ最重要な領域は、E1 遺伝子領域 (E1A、E1B に分けられ、幾つかの蛋白コード遺伝子を含む) であり、よって「非」増殖型 ADV ベクターではこの E1 領域を治療遺伝子に置換する方法をとっている。CRA はこの E1 領域を改変することでウイルス増殖を制御し、癌と正常の細胞でのウイルス増殖の違いを持たせたものであり、大きく二つのタイプに分けられる。一つは E1 領域内の Rb や p53 への結合領域を欠損させるもので、つまり ADV 増殖に必要な細胞環境の誘導に必須である「Rb や p53 の不活化」を阻害することで、正常細胞での効率的な ADV 増殖を阻止するというものである。もう一つは、E1 遺伝子の内因性プロモーターを癌特異的に高発現している遺伝子のプロモーターに置換することで、E1 の発現、即ちウイルス増殖を、その癌特異的遺伝子の発現依存性とする戦略である。しかし CRA 戦略自体は有望である一方、一 (あるいは二) 因子で癌特異化を試みる既存の CRA では、癌と正常の細胞を「完全に」識別可能とするレベルの癌特異化は困難であった。またこの 10 年で様々な方法が開発されキット販売もなされている「非」増殖型 ADV ベクターとは異なり、CRA に関しては未だ効率的・標準化作製技術が確立されていない。このため CRA の開発研究は一部の専門施設に限られ、しかもその CRA の作製や改変の作業に多大の労力と時間を要する「手作り」という状態のため、その研究は極めて非効率であった。

我々はこの CRA 問題を根本的に解決するため、「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) の効率的な作製法を全て独自に開発した。よって本研究では、この我々が開発した m-CRA 作製法により、全く新しい革新的な m-CRA による癌遺伝子治療法を開発し、そして臨床実用化へ向けた研究を行うことである。

B. 研究方法

1. 本法の有用性の検証と新規 m-CRA 開発のため、多種多様な m-CRA 作製

本作製技術の有用性を実証するため、さらに有用な新しい m-CRA を見つけるため、まず我々の m-CRA 作製技術により、種々の m-CRA を作製する。

具体的にはこの独自の 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. 第一弾のオリジナル癌治療薬 m-CRA としての Surv.m-CRA の開発と解析

上記の 1 で作製した中から、Survivin promoter で E1A の転写調節をする Survivin 依存性 m-CRA (Surv.m-CRA) に注目し、そのウイルス学的特性 (特に癌特異的増殖と殺傷) について、*in vitro* の正常と癌の各種細胞で検討する。さらに、癌動物モデルにて前臨床的実験として Surv.m-CRA の癌治療効果を評価する。

3. 最適の m-CRA 化の研究と改良型 Surv.m-CRA の確立による臨床化への展望

1 で作製した種々の m-CRA のうちで、理論的にも、ほとんどの癌に応用できる利点を持ち、また癌特異性も高いのは、テロメラゼ依存性 m-CRA (Tert.m-CRA) と、我々のオリジナルの Surv.m-CRA である。よってまず先行して作製した Tert.m-CRA をモデルとして、E1 領域を様々な改変した独立 2-4 因子制御 Tert.m-CRA を作製し、ウイルス学的特性と癌治療効果を検証することで、癌治療効果を減じることなく、癌特性がさらに向上できる m-CRA 化の方法を一般的なものとして確立する。さらにこの成果を基盤として、Surv.m-CRA に応用し、最適の改良型 Surv.m-CRA を開発、確立する。

また一方で、癌特性を維持したまま、癌治療効果を増強させる m-CRA の開発を試みる。つまり、前述の最適化 4 因子 m-CRA に、治療遺伝子のユニットを加えた 6 因子 m-CRA を作製し、その癌治療効果と癌特異性を癌細胞と正常細胞で検証する。

4. 新規 m-CRA の開発

Survivin が染色体制御に関わっていることより、染色体異常をターゲットとする新しい m-CRA 開発を進める。我々の作製法に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。

また一方、さらに新規性の高い m-CRA を開発するために、新しい癌特異化因子を見つける目的で、腫瘍細胞と正常細胞で DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子探索を行う。有望なものがあれば、m-CRA に応用する。

またさらに癌幹細胞をターゲットして治療する m-CRA の開発を目指し、まずは基盤となる技術を ES 細胞とアデノウイルスベクターで開発していく。

(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) 本法の有用性の検証と新規m-CRA開発のため、多種多様なm-CRA作製

まずこの独自のm-CRA作製技術で、主に初年度、癌抗原 (CEA、オステオカルシン)、テロメラーゼ(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。

このように我々はまず、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初年度に示し、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のパイロットスタディーとしての網羅的解析も行え、m-CRAの研究基盤を確立した。

2. 第一弾のオリジナル癌治療薬m-CRAとしてのSurv.m-CRAの開発と解析

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、まず初年度に、全く新規のCRAとしてSurvivin依存性m-CRA(Surv.mCRA)を開発した。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テロメラーゼ (TERT)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。但し、このSurv.m-CRAは2、3因子で癌特異化するプロトタイプのSurv.m-CRAであるが、癌特化としてのSurvivinの能力が高いため、これでも既存で最高のTert.CRAを凌ぐ能力となったものである。

3. 最適のm-CRA化の研究と改良型Surv.m-CRAの確立による臨床化への展望

①Tert.m-CRAでの、最適m-CRA化の検討

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示した。

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、癌特異化を増強できる」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化を検証した。*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、癌特異化の効果を向上した。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。

② Surv.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。

さらに我々は様々なプロモーターでE1Bを転写制御する、別のタイプの4因子Surv.m-CRAも作製している。よって今後の臨床化においては、癌のタイプに併せたオーダーメイドSurv.m-CRAという可能性もあるわけである。

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

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。

よってその原因を探索し、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がなくなるのに対し、正常細胞ではウイルス溶解はおきか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の最終形に組み換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。

4. 新規m-CRAの開発

① 染色体異常をターゲットとするm-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、さらに新しいオリジナルのm-CRA開発として、この研究を進めた。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っている。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

これは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。中々このような網羅的探索からすぐに画期的な因子を見つけることは難しいが、それでも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。

③ 癌の幹細胞をターゲットとするm-CRA開発のための基盤的研究

また新たな試みとして、癌の幹細胞をターゲットとする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（Mol Ther 2006など）。

5. 臨床化への準備

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。

また将来の臨床応用、そして一般医薬化のため

に、このm-CRA作製法、ならびにSurv.m-CRAは、国際特許申請を行い、それぞれ欧米日、米日に指定国移行もしている。

D. 考察

癌遺伝子治療は、世界での10年間の初期プロトコルの臨床試験で期待された成果が得られていないことが社会的失望を招いた。さらに本邦の癌遺伝子治療は、「基本技術（特にオリジナルのベクター）を開発して、それを基盤として出来た研究成果をもとに臨床試験を行う」というものが少ないため、知財の面からも一般医薬化になりがたく、その本邦での臨床試験の成果が必ずしも厚生行政に反映されては来なかった。

これに対し本研究は、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。3年間の本研究で、着実に成果を上げ、臨床応用化に近づくことができた。特に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

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。このように3年間の本研究において、当初の実施計画にほぼ沿った形で研究を進め、期待した成果をあげることができたものである。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 targeted 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) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
 - 13) Li Y, Takemura G, Kosai K, Takahashi T, Okada H, Miyata S, Yuge K, Nagano S, Esaki M, Khai NC, Goto K, Mikami A, Maruyama R, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H.: Critical roles for the Fas/Fas ligand system in postinfarction ventricular remodeling and heart failure. *Circ.Res.* 95: 27-36, 2004
 - 14) Kawai T, Takahashi T, Esaki M, Ushikoshi H, Nagano S, Fujiwara H, Kosai K.: Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by FGF-2 and BMP-2. *Circ. J.* 68: 691-702, 2004
 - 15) 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. *Oncogene.* 23: 5266-5274, 2004
 - 16) 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
 - 17) 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
 - 18) 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. Oncol.* 24: 549-558, 2004
 - 19) 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
 - 20) 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
 - 21) 小賤健一郎 : 遺伝子治療と再生医学. 日本鍼灸学会雑誌. (*proceedings*) 56: 16-26, 2006
 - 22) 高橋知之、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」、(最新医学社編) :28-34, 2005
 - 23) 永野聡、小宮節郎、小賤健一郎 : 遺伝子治療. 「骨・関節・靭帯(特集;骨転移の診断と最新治療)」(アークメディア編) : 17 : 516-523, 2004
 - 24) 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) 5: 43-51, 2006
 - 25) 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
 - 26) 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
 - 27) 小賤健一郎 : 遺伝子治療と再生医学. 久留米医学会雑誌 67: 175-180, 2004
- 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) 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 遺伝子治療は病的な心肥大／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)
 - 7) 小財健一郎. :遺伝子治療と再生医学. 第32回日本小児栄養消化器肝臓学会. (教育講演) 2005年10月8-9日 (久留米)
 - 8) 小財健一郎、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な作製法の開発. (ワークショップ)、第64回日本癌学会学術総会、2005年9月14-16日 (北海道)
 - 9) 神園純一、室伏善照、小財健一郎. : 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. (ワークショップ)、第64回日本癌学会学術総会、2005年9月14-16日 (北海道)
 - 10) 室伏善照、神園純一、小財健一郎. :独立した4因子で増殖制御されるCRAの開発による癌治療効果と癌特異性の向上. (ワークショップ)、第64回日本癌学会学術総会、2005年9月14-16日 (北海道)
 - 11) Kosai K, Takahashi T. CD9 Gene Therapy Directly Normalizes Hypertrophy and Tachycardia on Cardiomyocytes and Abolishes the Fatality After Myocardial Infarction in Mice. (シンポジウム) 第11回日本遺伝子治療学会. 2005年7月28日～30日 (東京)
 - 12) 小財健一郎. :遺伝子治療と再生医学. 第54回(社)全日本鍼灸学会学術大会. (教育講演) 2005年6月10日. (福岡)
 - 13) 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 1-5, 2005 (St. Louis, MO, USA).
 - 14) 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 1-5, 2005 (St. Louis, MO, USA).
 - 15) 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. The 8th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, June 1-5, 2005 (ORAL PRESENTATION) (St. Louis, MO, USA).
 - 16) 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. The 8th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, June 1-5, 2005 (ORAL PRESENTATION) (St. Louis, MO, USA).
 - 17) 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)
 - 18) 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)
 - 19) 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).
 - 20) 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).
 - 21) 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).

- 22) 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)
- 23) 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)
- 24) 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)

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) 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) Rett症候群を治療する医薬

発明者：小賤健一郎、飯盛健生、松石豊次郎

出願人：中部TLO

国内出願日：2004年11月11日 (特願2004-328158)

国際出願日：2005年8月3日 (PCT/JP2005/014617)

3) サービピン(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)

現在、米国、日本へ指定国移行中

4) 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：小賤健一郎、牛越博昭

出願人：中部TLO

国内出願日：2003年12月26日

(特願2003-432279)

国際出願日：2004年12月23日

(PCT/JP2004/019774)

現在、JST特許支援事業により、米国、欧州、国内へ指定国移行中。

5) 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：小賤健一郎、永野聡

出願人：中部TLO

国内出願日：2003年7月31日

(特願2003-283427)

国際出願日：2004年7月

(PCT/JP2004/010998)

現在、米国、欧州、国内へ指定国移行中。

6) 胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離法及びそれに用いる単離用キット

発明者：小賤健一郎、高橋知之

出願人：中部TLO

国内出願日：2002年6月17日

(特願2004-513486)

国際出願日：2003年6月12日

(PCT/JP03/07536)

※現在、米国、国内へ指定国移行中。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

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. | 全日本鍼灸学会 | | 2006 | 16-26 |
| 3 | 高橋知之 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 | | 2005 | 28-34, |
| 4 | 永野聡 小宮節郎 小賤健一郎 | 遺伝子治療. 「骨・関節・靭帯 (特集; 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 |

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 |
|---|--|--|------------------------|----|---------|------|
| 5 | 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 |
| 6 | Murofushi Y, Nagano S, Kamizono J, Takahashi T, Fujiwara H, Komiya S, Matsui 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 targeted cancer gene therapy. | <i>Int J Oncol</i> | 29 | 681-688 | 2006 |
| 7 | 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 |

| | | | | | | |
|----|---|---|------------------------|-----|-----------|------|
| 8 | Khai NC, <u>Takahashi T</u> , Ushikoshi H, Nagano S, Yuge K, Esaki M, Kawai T, Goto K, <u>Murofushi Y</u> , Fujiwara T, Fujiwara H, <u>Kosai K</u> . | In vivo hepatic HB-E GF gene transduction inhibits Fas-induced liver injury and induces liver regeneration in mice: A comparative study to HGF. | <i>J Hepatol</i> | 44 | 1046-1054 | 2006 |
| 9 | 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 |
| 10 | 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 gene therapy slows down the progression of diabetic nephropathy in db/db mice. | <i>Nephron Physiol</i> | 102 | 92-102 | 2006 |
| 11 | Ushikoshi H, <u>Takahashi T</u> , Chen X, Khai NC, Esaki M, Goto K, Takemura G, Maruyama R, Minatoguchi S, Fujiwara T, Nagano S, Yuge K, Kawai T, <u>Murofushi Y</u> , Fujiwara H, <u>Kosai K</u> . | Local overexpression of HB-EGF exacerbates remodeling following myocardial infarction by activating noncardiomyocytes. | <i>Lab Invest</i> | 85 | 862-873 | 2005 |
| 12 | <u>Kamizono J</u> , Nagano S, <u>Murofushi Y</u> , <u>Komiya S</u> , Fujiwara H, Matsushima T, <u>Kosai K</u> . | <i>Survivin</i> -responsive conditionally replicating adenovirus exhibits cancer-specific and efficient viral replication. | <i>Cancer Res</i> | 65 | 5284-5291 | 2005 |

| | | | | | | |
|----|---|--|--------------------|-----|-----------|------|
| 13 | Nagano S, Oshika H, Fujiwara H, <u>Komiya S</u> , <u>Kosai K</u> . | An Efficient Construction of Conditionally Replicating Adenoviruses that Target Tumor Cells with Multiple Factors. | <i>Gene Ther</i> | 12 | 1385-1393 | 2005 |
| 14 | Yuge K, <u>Takahashi T</u> , Nagano S, Terazaki Y, <u>Murofushi Y</u> , Ushikoshi H, Kawai T, Khai NC, Nakamura T, Fujiwara H, <u>Kosai K</u> . | Adenoviral Gene Transduction of Hepatocyte Growth Factor Elicits Inhibitory Effects for Hepatoma. | <i>Int J Oncol</i> | 27 | 77-85 | 2005 |
| 15 | Tada T, Nguyen JB, Hitoshi Y, Watson NP, Dunn JF, Ohara S, Nagano S, <u>Kosai K</u> , Israel MA. | Diffuse Encephalomyelitis and Substantive Leukoencephalopathy after Intraventricular Administration of Recombinant Adenovirus. | <i>Neurol Res</i> | 27 | 378-386 | 2005 |
| 16 | Okada H, Takemura G, <u>Kosai K</u> , Li Y, <u>Takahashi T</u> , 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. | <i>Circulation</i> | 111 | 2430-2437 | 2005 |
| 17 | Li Y, Takemura G, <u>Kosai K</u> , <u>Takahashi T</u> , Okada H, Miyata S, Yuge K, Nagano S, Esaki M, Khai NC, Goto K, Mikami A, Maruyama R, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. | Critical roles for the Fas/Fas ligand system in postinfarction ventricular remodeling and heart failure. | <i>Circ Res</i> | 95 | 27-36 | 2004 |

| | | | | | | |
|----|---|--|--------------------------|-----|-----------|------|
| 18 | Kawai T, <u>Takahashi T</u> , Esaki M, Ushikoshi H, Nagano S, Fujiwara H, <u>Kosai K</u> . | Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by FGF-2 and BMP-2. | <i>Circ J</i> | 68 | 691-702 | 2004 |
| 19 | Iida SI, Hirota T, Morisaki T, Marumoto T, Hara T, Kuninaka S, Honda S, <u>Kosai K</u> , 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 |
| 20 | Minatoguchi S, Takemura G, Chen XH, Wang N, Uno Y, Kodama M, Arai M, Misao Y, Lu C, Suzuki K, Gotoko K, Komada A, <u>Takahashi T</u> , <u>Kosai K</u> , 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 |
| 21 | Hisaka Y, Ieda M, Nakamura T, <u>Kosai K</u> , Ogawa S, Fukuda K. | Powerful and controllable angiogenesis by using gene-modified cells expressing human hepatocyte growth factor and thymidine kinase. | <i>J Am Coll Cardiol</i> | 43 | 1915-1922 | 2004 |
| 22 | Nagano S, Yuge K, Fukunaga M, Terazaki Y, Fujiwara H, <u>Komiyama S</u> , <u>Kosai K</u> . | 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 Oncol</i> | 24 | 549-558 | 2004 |

| | | | | | | |
|----|--|--|------------------------|----|-----------|------|
| 23 | <u>Ikoma T, Takahashi T, Nagano S, Li Y-M, Ohno Y, Ando K, Fujiwara T, Fujiwara H and Kosai K.</u> | A definitive role of RhoC in metastasis of orthotopic lung cancer in mice. | <i>Clin Cancer Res</i> | 10 | 1192-1200 | 2004 |
| 24 | <u>高橋知之、藤原久義、國貞隆弘、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 |
| 25 | <u>室伏善照、神園純一、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 |
| 26 | <u>神園純一、室伏善照、小賤健一郎</u> | 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 |
| 27 | <u>小賤健一郎</u> | 遺伝子治療と再生医学 | 久留米医学会雑誌 | 67 | 175-180 | 2004 |

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷
(収載論文 27 冊)

7. HGF

急性／劇症肝炎

高橋知之 TAKAHASHI Tomoyuki

久留米大学高次脳疾患研究所 遺伝子治療再生医学部門, 同 大学医学部 創薬再生医療学講座

小賤健一郎 KOSAI Ken-ichiro

久留米大学高次脳疾患研究所 遺伝子治療再生医学部門, 同 大学医学部 小児科学講座

急性・劇症肝炎とHGF

肝炎ウイルスの感染で生じる急性肝炎は、わが国だけでも毎年約20万人の発症がみられる。急性肝炎の多くは予後良好であるが、安静、栄養補給で自然治癒を待つ以外に、病気の本体を根本的に治療（つまり病気の進展を止め、治癒再生を促進）する医薬はいまだなく、1～2%の患者は劇症肝炎へと進行してしまう。劇症肝炎は、急激な広範性肝細胞死（肝炎ウイルスによる急性肝炎が最多の成因だが、薬剤性肝炎、自己免疫性肝炎などの急性肝障害もある）によって、肝性脳症をはじめとする肝不全症状が短期間（8週間以内）に生じる予後不良の難治性疾患であり、わが国での年間の発症数は約1,000人と推定されている。劇症肝炎の根幹の病態は急激に生じる（亜）広範性肝細胞死であるが、現在の内科的治療法は、全身管理、合併症対策、人工肝補助という対症療法にすぎないため、その救命率も依然30～40%（亜急性型では10～20%）と予後不良であり、諸外国では肝移植が唯一の効果的治療法とされている。つまり、劇症肝炎、またその前段階の急性肝炎やその他の急性肝障害に対して、これらの病気の本態である肝細胞死の進展を阻止する根治医薬の開発は、先端医学の最重要課題の一つである。

さてHGF (hepatocyte growth factor) は、肝再生の本体の因子として1984年に単離され、1989年にクローニングされた。血清HGF値は、健常者に比べ、急性肝炎や慢性肝炎患者では約2倍、劇症肝炎患者では約60倍の上昇がみられ、血清HGF値の上昇は肝性脳症の発症や死亡率の増加と正の相関がみられることから、予後判定の有用なマーカーとして臨床で利用されている。HGFが血清中で上昇している肝炎ほど予後が悪いという現象は一見矛盾しているかのようにみえ、また特に血清HGF値が上昇している劇症肝炎患者に外因性のリコンビナントHGFを投与し

でも何ら効果がないのではないか、という疑問も生じるかもしれない。しかし、この現象は実は、肝細胞消失に対する生体適応反応としてのHGFの産生増加と、肝細胞の障害、細胞死によるHGFクリアランスの減少を反映しているものである。さらに、劇症肝炎患者の血清中で上昇しているHGFは、必ずしも活性をもつ二本鎖HGFだけではなく、むしろ一本鎖の不活性型HGFや、生理活性はないが受容体結合能をもち活性型のHGFを阻害し得る断片化したHGFを多分に検出していることが示されている。よって、急性肝炎、急性肝障害、劇症肝炎において、活性を阻害するこのような不活性化HGFに競合し得るだけの多量の活性型HGFを人為的に補うことで、本来の生理的効果を回復するという治療法は、明確な理論的根拠をもつものである。

II 急性・劇症肝炎に対するHGFの治療効果とそのメカニズム

HGFの治療因子としての可能性は、四塩化炭素 (CCl₄) や α -ナフチルイソチオシアネート (ANIT) による薬剤性肝障害の動物モデルにて、まず確認された。一方、臨床的には発症頻度も多くより重要なのは、急性肝炎、劇症肝炎に対する治療薬の開発であるが、これに関しては筆者らとその治療効果・作用と分子メカニズムを明らかにしてきた。

さて、ウイルス学的、免疫学的研究に加え、1990年代にはアポトーシスの分子機構の研究が進み、急性肝炎、劇症肝炎も、その発症、進展の分子機構がより明らかとなってきた^{1) 2)}。肝炎ウイルスは肝細胞に特異的に感染し、肝細胞内で増殖するが、ウイルス蛋白自体で細胞を障害する溶解性ウイルスとは異なり、その肝細胞障害の主な機序は細胞性免疫を介した肝細胞アポトーシスの誘導である。つまり、肝炎ウイルス抗原を表出する肝細胞に、活性化された細胞傷害性T細胞 (キラー細胞) が結合し、キラー細胞に表出したFasリガンドが肝細胞のFasに結合することにより、肝細胞内にはアポトーシスのシグナル伝達が起こる。その後、炎症細胞が浸潤し、活性化したマクロファージから出されるTNF (tumor necrosis factor) - α などの複合因子が肝炎をより進展させる。このように、急性肝炎というのは元来、ウイルスを駆除するための生体防御の免疫反応ではあろうが、それが病的に過剰かつ急激に進展すると、不可逆性の劇症肝炎に陥るものと考えられる^{1) 2)}。

まず筆者らは、急性肝炎の最初に起こる病変で、劇症肝炎の進展に必須の病態でもあるFas誘導の肝細胞アポトーシスに対するHGFの治療作用を調べるため、以下のようにFas誘導の劇症肝炎に対するHGFの治療作用を検討した¹⁾。Fasリガンドと同様にFas受容体に対してアゴニスティックな作用を有する抗Fas抗体 (Jo-2) をマウスへ投与すると、急激な広範性肝細胞アポトーシスによる劇症肝炎が生じる。抗Fas抗体投与後、6時間には血清GPTは約7,000 IU/L、8時間後には15,000 IU/Lまで急激に上昇し、肝組織像でも6時間後に門脈域周辺に出現した肝細胞アポトーシスは8時間後には肝小葉全体に広がり、20時間以内に80%のマウスが肝不全により死亡する。これに対して、抗Fas抗体投与の、6時間前、30分前、3時間後の計3回、リコンビナントHGFを腹腔内投与したマウスでは、血清GPT上昇、肝細胞のアポトーシスがほぼ完全に抑えられ、

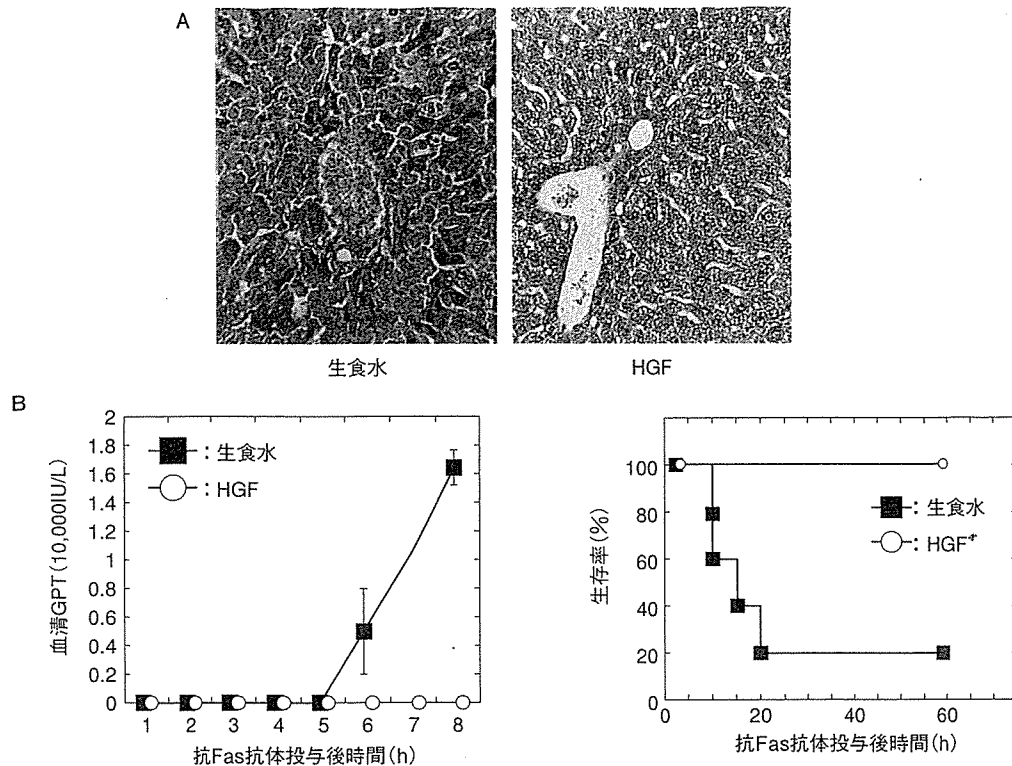


図1 HGFによる劇症肝炎の発症防止・治療効果

A：抗Fas抗体投与後24時間における肝組織像

B：抗Fas抗体投与後の血清GPT値と生存率

(文献1より引用)

全マウスが生存した¹⁾ (図1)。この結果より、HGFは、Fas誘導の肝細胞アポトーシス、劇症肝炎の発症を阻止できることが、まず明らかとなった。

さて前述のように、ヒトの劇症肝炎の原因は、肝炎ウイルス以外にも薬剤や原因不明のものもあり、またその劇症肝炎への進展の病態も、Fas誘導の劇症肝炎マウスモデルよりさらに複雑になると思われる。そこで筆者らは、TNF- α やその他の複合因子が関与し、ヒトの病態を反映するモデルとして広く用いられてきたエンドトキシン誘導劇症肝炎モデルマウスで、さらにHGFの治療作用を検じた²⁾。このモデルは、細菌細胞壁成分のリポポリサッカライド (LPS) が肝マクロファージのクッパー細胞を活性化し、種々のサイトカイン放出を誘導することによって、肝細胞死を引き起こすものである。さらに、LPSと併せてその感受性を高めるD-ガラクトサミン (GalN) をマウスの腹腔内に投与すると、その5時間後より血清GPT値の急激な上昇が認められ、肝組織でも6時間後には70%以上の肝細胞が細胞死に陥り、8時間以内に全マウスが肝不全によって死亡する。一方、LPS+GalN投与前後に計3回、HGFを腹腔内投与したマウスでは、血清GPT値の上昇、肝細胞アポトーシス、広範囲の肝細胞死が強力に抑制され、75%ものマウスが生存した²⁾。このようにHGFの治療作用は、ヒト病態を反映した複合因子による劇症肝

7. HGF

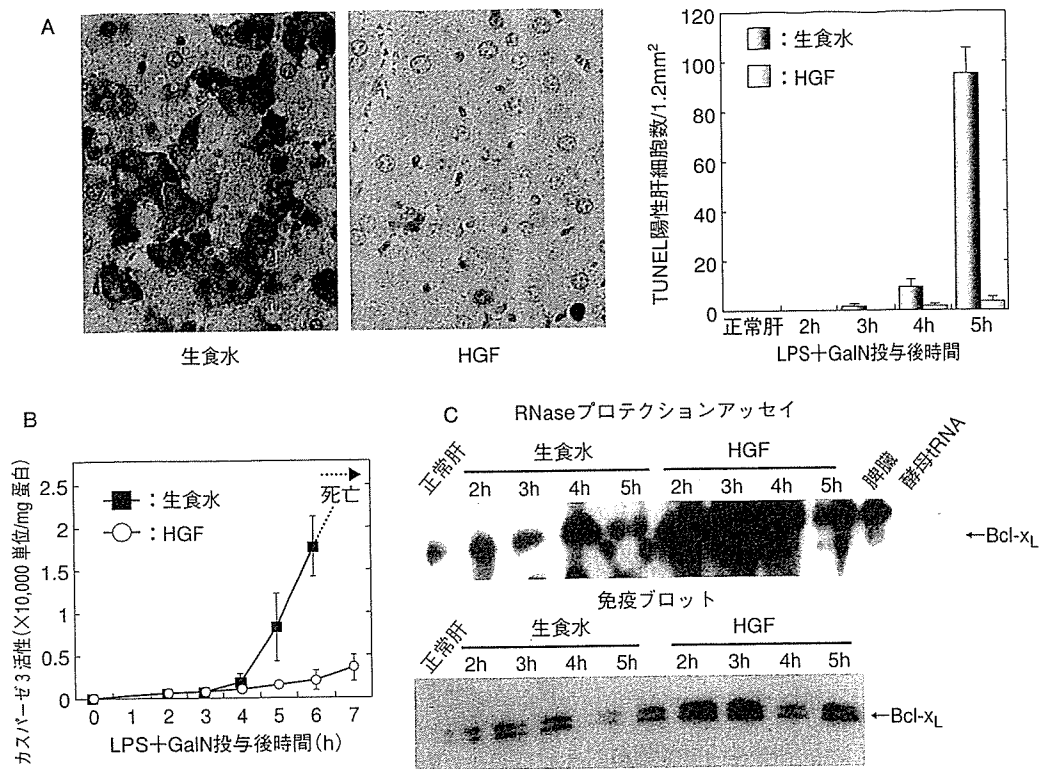


図2 HGFによる抗アポトーシス作用

A: LPS+GalN投与後5時間における肝TUNEL組織像とTUNEL陽性肝細胞数
 B: LPS+GalN劇症肝炎モデルマウスに対するHGF投与による肝カスパーゼ3の活性変動
 C: LPS+GalN劇症肝炎モデルマウスに対するHGF投与によるBcl-x_L発現誘導

(文献2より引用)

炎モデルでも、しかも肝障害発症から3～4時間以内に肝不全によって100%死亡するというヒトの劇症肝炎とは比べ物にならないほど急激で重篤な劇症肝炎モデルでも、明確に証明された。

それではこの治療作用、分子メカニズムはいかなるものであろうか。筆者らは以下の事実から、HGFは肝細胞への強力な抗アポトーシス活性を賦与することにより、急性・劇症肝炎の病態の主因である肝細胞アポトーシスを阻止して、治療作用を生じているということを明らかにしている。まず、HGFは初代培養肝細胞に直接作用し、抗Fas抗体とアクチノマイシンDによって誘導される肝細胞アポトーシスを阻害した¹⁾。また、HGFは抗Fas抗体投与による純粋な*in vivo*アポトーシス誘導系のモデルと同様に、エンドトキシンモデルにおいても、TUNEL陽性肝細胞の出現、DNA断片化を強力に抑制していた²⁾ (図2)。さらに、Fas誘導、エンドトキシン誘導の両*in vivo*モデルの肝臓において、アポトーシスシグナルの下流に位置するカスパーゼ3の活性の急激な上昇が、HGF投与のマウス肝臓では強力に抑制されていた^{1) 2)}。さらに、HGFは同モデルの肝臓に、抗アポトーシス分子のBcl-x_L蛋白の発現を著明に誘導していた^{1) 2)}。よってHGFは、肝細胞に直接作用し、Bcl-x_Lの発現誘導を介してカスパーゼ3の上流でアポトーシスのシグナル伝達を阻止し、抗アポトーシス活性を賦与しているものと考えられる。