

200720044A

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

増殖型ベクターと幹細胞のオリジナル技術による
革新的な癌遺伝子治療法の開発

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小賤 健一郎

平成20(2008)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
研究総括、ベクターとES細胞の基盤技術の開発に関する研究 小賤 健一郎	----- 1
II. 分担研究報告	
1. アデノウイルスベクターの開発に関する研究 室伏 善照	----- 5
2. 動物実験による前臨床研究に関する研究 小宮 節郎	----- 7
3. 癌幹細胞の単離と機能解析に関する研究 瀬戸口 啓夫	----- 10
4. 細胞生物学的解析に関する研究 坂本 泰二	----- 11
5. 癌（幹）細胞の細胞表層の糖脂質からの機能解明に関する研究 隅田 泰生	----- 17
6. 幹細胞生物学での技術開発と解析に関する研究 高橋 知之	----- 21
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 24
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 26

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

研究総括、ベクターとES細胞の基盤技術の開発

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、独自開発のm-CRA技術を基盤に、革新的な癌治療法を開発し、その臨床応用実用化を実現することである。具体的には、①世界初の「7因子搭載m-CRA」のSurv.m-CRAを開発し臨床化を目指す、②癌の染色体異常標的型の新m-CRAの開発、③癌幹細胞を標的・治療する新コンセプトのm-CRAの開発を行うことを、研究目的とする。つまり①、②、③の順番に、成果が確実性の高い研究内容から、より挑戦的（革新的）な取り組みという性格の研究目的と内容である。

初年度である本年度は、まず①においては、7因子制御m-CRAは作製まで完了した。その前段階のm-CRAは、機能解析も行い、癌への特異性を増強、治療効果を増強という、成果を得た。②においては、染色体異常標的の候補分子について、癌と正常細胞での内因性発現レベルの差、各遺伝子プロモーターが癌特異的発現調節できるか、という整基礎研究データを得た。また、さらにその候補遺伝子プロモーターでE1を発現調節する、新規m-CRAも作製完了した。そして挑戦的研究の③においては、癌幹細胞の分離濃縮、遺伝子導入、そして網羅的解析という、癌幹細胞の標的化の前段階となる基礎的な研究に取り組み、次年度以降での、癌幹細胞標的化のm-CRA開発に繋がる研究成果を上げつつある。

このように、初年度にあたる本年は、3研究とも当初の目的と計画通り進める事ができた。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における・職名

室伏 善照	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・助教
小宮 節郎	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授
瀬戸口啓夫	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・助教
坂本 泰二	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授
隅田 泰生	鹿児島大学大学院理工学研究科・教授
高橋 知之	久留米大学医学部・准教授

験で良好な結果も示されている。しかしCRA戦略自体は有望である一方、既報告のCRAでは癌特異化、治療効果とも未だ不完全であった。これは第一に、我々のようなm-CRAでなく、僅か一、二因子での癌特異化に過ぎないこと、第二にはこれまでにCRA戦略に用いられた癌標的化の分子機構と戦略もシンプルだったからである。

また本邦で革新的な癌治療法を開発して臨床化（一般医薬化）するためには、オリジナルの基盤ベクター技術から独自に開発して、その知財を確保して、臨床研究へと展開することが望まれる。

我々はこの根本克服のため、まず平成16～18年の厚生労働科学研究（第三次対がん研究事業）で、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)の作製法を独自開発し、さらに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の開発を行った。

本研究は、その基盤となる成果を踏まえ、さらなる革新治療法を開発して、そしてそれを臨床化するという最終目標に向かうものである。具体的には、①世界初の「7因子搭載m-CRA」のSurv.m-CRAを開発し臨床化を目指す、②癌の染色体異常標的型の新m-CRAの

A. 研究目的

癌遺伝子治療が臨床応用で期待された成果を得なかったのは、「非」増殖型ベクターでは生体内で全癌細胞に遺伝子導入するのは「物理的に」不可能のため、遺伝子「未」導入癌細胞から再発が起りえるからである。近年、「癌で特異的にウイルス増殖・殺傷するアデノウイルス」(CRA)の開発が世界的に期待され、国外の臨床試

開発、③癌幹細胞を標的・治療する新コンセプトのm-CRAの開発を行うことを、研究目的とする。つまり①、②、③の順番に、成果が確実性の高い研究内容から、より挑戦的（革新的）な取り組みという性格の研究目的と内容である。

B. 研究方法

1. 7因子搭載m-CRAのSurv.m-CRAを開発

- ① これまで進めてきた、E1領域の4因子制御による精密な癌特異的ウイルス増殖、癌治療効果を増強させるプロモーターと治療遺伝子の2因子の研究を進め、発展させる。
- ② 今回、癌細胞特異的感染を可能とする変異ファイバーを開発する。まずRGD変異ファイバーを取り入れ、世界発の7因子搭載m-CRAのSurv.m-CRAを完成する。

2. 癌の染色体異常標的型の新m-CRAの開発

我々は、「癌の染色体異常」を標的治療する新規m-CRAの有用性を検討するため、染色体制御機構に関与する新規分子に注目した。よって以下のように研究を進めた。

- ① この分子の内因性発現レベルを、癌と正常細胞で調べる。
- ② この分子のプロモーターでマーカー遺伝子を発現するアデノウイルスを調整し、癌と正常細胞に感染させ、プロモーターアッセイにて、癌特異的な発現調節が可能か調べる。
- ③ この分子プロモーターでE1制御する新規のm-CRAを作製する。

3. 癌幹細胞を標的・治療するm-CRAの開発

- ① 幾つかの種類の癌細胞株から、SP法とCD133陽性細胞により、癌幹細胞を濃縮分離する。
- ② 癌幹細胞をその他の癌細胞分画で、DNAマイクロアレイ、糖鎖チップなどで、癌幹細胞を標的とする分子の探索を行う。
- ③ 癌幹細胞とその他の癌細胞の分画に、通常とファイバー改変の両方のアデノウイルス遺伝子導入を行い、最適なウイルス改変の方向性を得る。

C. 研究結果

1. 癌幹細胞を標的・治療するm-CRAの開発

- ① ウイルス増殖の4因子制御化による精密

な癌特異化、癌治療効果を増強させる癌特異的プロモーター／治療遺伝子の2因子、癌細胞への遺伝子導入効率を上昇させるRGD変異ファイバーを搭載した、世界初の7因子搭載型m-CRAが作製できた。これはまず、先行したテロメラゼ依存性m-CRAにて、研究を進めたものである。つまり、E1Aの制御プロモーターをhTERTプロモーターにし、E1Aは変異型化（Rb異常に特異的ウイルス増殖となる）、E1Bの制御プロモーターを細胞周期が活性化している細胞で高発現しているE2Fのプロモーターにし、E1Bも変異型化（p53異常に特異的ウイルス増殖となる）する4因子制御で、癌治療効果を維持したまま、癌特異化を向上できた。

- ② 癌特異的なSurvivinプロモーターで治療遺伝子（HSV-tkやP53）を発現する治療ユニットを組み込んだ（2因子の付加）。そして、癌細胞への遺伝子導入効率を向上させるべく、ファイバーをRGD型に変更した（1因子の付加）。よって、合計7因子の個別の癌特異化因子を一つのアデノウイルスに組み込んだ、7因子制御m-CRAが作製できた。我々の利点は、パーツを入れ替えて、簡単にm-CRAの作製や改良ができる点である。よって、このhTERTの結果と材料を有効利用し、我々オリジナルのSurvivin依存性m-CRA（Surv.m-CRA）の7因子m-CRA化も進めた。

2. 染色体異常標的型の新たなm-CRAの開発

染色体異常に関連する、ある分子A、Bに注目し、それらプロモーターでE1遺伝子を発現制御することで、癌細胞の染色体異常を標的とできる新規のm-CRAを開発することを目指し、以下のように研究を進め、成果を得た。

- ① A、Bの分子のmRNAの内因性発現レベルを、数種類の癌と正常の細胞で調べ、癌優位な発現であることが分かった。
- ② A、Bのプロモーター下にLacZを発現するアデノウイルスベクターで、癌と正常細胞でプロモーターアッセイを行い、癌特異的（優位）発現が得られることが分かった。
- ③ これを踏まえ、このA、BのプロモーターでE1Aを発現制御する、A、B発現の癌細胞を殺傷するA、B依存性m-CRAを作製、精製することができた。一部、性能

を確認しつつある段階まで、本年度研究を進めることができた。

3. 癌幹細胞を標的・治療する新たなm-CRA癌遺伝子治療の開発
 - ① SP細胞分画とCD133陽性の二つの方法で、癌幹細胞を濃縮分離し、その細胞の癌幹細胞としての特性を確認した。数種類の組織系の癌細胞で、このような癌幹細胞の基本的実験を進めた。
 - ② この癌幹細胞とそれ以外の癌細胞の分画の間で、DNAマイクロアレイ、糖鎖チップで、網羅的解析を行った。特に糖鎖解析はシュガーチップという、隅田分担研究者が開発したオリジナル技術であるが、今回、生きた細胞の表層の変化を直接調べる実験系を初めて試みた。そして種々の条件を取り、生細胞の細胞表層の糖鎖や蛋白の変化を調べることができることが分かった。この条件で、癌幹細胞の特性を探索解析中である。
 - ③ マーカー遺伝子発現のアデノウイルスベクターにより、癌幹細胞と普通の癌細胞への遺伝子導入効率と発現解析という、基本的な検討を行った。今回のある組織の癌幹細胞と普通の癌細胞への遺伝子導入効率は、通常ならびにRGDファイバーで変化はなかった。

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。

本年度は、前述1-3の研究目的を掲げ、成果を得て来た。1、2、3の順番に、確実性の高い取り組みから、より挑戦的（革新的）な取り組みという性格である。以下のように、その性格に併せて今後は研究を発展させるものである。

1. 新型Surv. m-CRAの開発

現在の世界の臨床試験は僅か1因子でのCRAでも進められているが、我々が開発し特許出願しているSurv. m-CRAの7因子搭載型の詳細な特性解析も行い、臨床化は将来の製薬化も見据え、本邦の権利を確保・展開できる形での米国との協調を慎重に進めていく。

2. 癌の染色体異常標的型の新たなm-CRAの開発

新たなA, B依存性m-CRAの基本的データは得られたので、高度なm-CRA化、多種類の癌と正常細胞でのより詳細な特性解析、動物での前臨床研究へと進める。

3. 癌幹細胞を標的・治療する新たなm-CRA癌遺伝子治療の開発

癌幹細胞は世界的にも注目されている一方、治療法の研究は進んでいない。標的分子の探索、また一部の網羅解析の新技術確立を進める研究の初年度としては、順調に進んでいると思われる。独自の技術で癌幹細胞治療法が確立できれば、将来の本邦での一般製薬化も可能で、厚生行政的意義も大きいので、残り2年で本研究を着実に進める。

このように、我々の独自開発のm-CRA技術で、革新治療法を開発して、それを臨床化するという最終目標に向かい進行しており、来年度もそれを発展させていく。

E. 結論

本年度の成果は、1. 7因子制御のSurv. m-CRAの作製、2. 染色体異常を標的とする新規のm-CRAの開発、3. 癌幹細胞を標的とするm-CRAを開発するための標的分子の探索である。つまり、目的通りに研究を進め、ほぼ当初の目標の成果が得られたものといえる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Esaki M, Takemura G, Kosai KI, Takahashi T, Miyata S, Li L, Goto K, Maruyama R, Okada H, Kanamori, H, Ogino A, Ushikoshi H, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H.: Treatment with an adenoviral vector encoding hepatocyte growth factor mitigates established cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294(2): H1048-1057, 2008
- 2) Chen XH, Minatoguchi S, Kosai K, Yuge K, Takahashi T, Arai M, Wang N, Misao Y, Lu C, Onogi H, Kobayashi H, Yasuda S, Ezaki M, Ushikoshi H, Takemura G, Fujiwara T, Fujiwara H.: In vivo hepatocyte growth factor gene transfer reduces myocardial ischemiareperfusion injury through its multiple actions. *J Card Fail.* 13(10):874-883, 2007
- 3) 小賤健一郎: 先端医学開発の研究と医学教育. 鹿兒島大学医学雑誌. 59(2), 17-23, 2007
- 4) 堀川良治、小宮節郎、小賤健一郎: 増殖制御型アデノウイルスによる遺伝子

治療. 関節外科 基礎と臨床. メジカルビュー社. 27 (1):132-133, 2008

2. 学会発表

- 1) Yoshiteru Murofushi, Junichi Kamizono, Ngien Cin Khai, Tomoyuki Takahashi, Setsuro Komiya, Ken-ichiro Kosai.: Survivin-Responsive Conditionally Replicating Adenovirus Additionally Regulated with Cancer Specificity without Reducing Anti-Cancer Effect.(国際・一般演題) The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, May 30- Jun 3, 2007 (Seattle, Washington, USA)
- 2) 室伏善照, 神園純一, 小賤健一郎.: *Survivin*/CEA-responsive conditionally replicating adenovirus enhances cancer specificity with potent anti-cancer effect. 第 66 回日本癌学会学術集会, 2007 年 10 月 3-5 日 (横浜)
- 3) 小賤健一郎, 室伏善照.: 独立 2~6 因子で癌を標的化・治療する癌特異的増殖制御型アデノウイルス. 第 66 回日本癌学会学術集会, 2007 年 10 月 3-5 日 (横浜)
- 4) 津山新一郎, 前蘭理恵, 村田長芳, 小賤健一郎.: 胃底腺壁細胞におけるリン酸化エズリン分布の電顕免疫組織化学的検討. (国内・一般演題)第 48 回日本組織細胞化学会総会・学術集会(第 8 回日中合同組織細胞化学セミナー)、2007 年 9 月 28-29 日(山梨)
- 5) Yoshiteru Murofushi, Junichi Kamizono, Ngien Cin Khai, Tomoyuki Takahashi, Setsuro Komiya, Ken-ichiro Kosai.: Conditionally Replicating Adenovirus Regulated by Survivin and CEA Promoters Exerted More Strict Cancer Specificity and Potent Anti-Cancer Effect. (国内・一般演題) 第 13 回日本遺伝子治療学会, 2007 年 6 月 28-30 日 (愛知)
- 6) 小賤健一郎.: 遺伝子治療と再生医学の独自技術の開発と応用化. イノベーション・ジャパン 2007-大学見本市, 2007 年 9 月 12-14 日 (東京)
- 7) 小賤健一郎.: 遺伝子治療と再生医療の独自シーズによる試薬から医薬までの相乗的事業化の提案. 産学協同シーズイノベーション化事業 JST Innovation Bridge 九州・沖縄地区 10 大学・1 高専連携 シーズ発表会, 2007 年 7 月 4-5 日 (東京)

- 8) 小賤健一郎.: 遺伝子治療と再生医療のシーズの相乗的事業化. 第 6 回国際バイオ EXPO 併催 国際バイオフォーラム 大学・国公立研究所による研究成果発表フォーラム~バイオ アカデミック フォーラム~, 2007 年 6 月 20-22 日 (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

- 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)
* 米国、欧州、日本へ指定国移行中
- 2) 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)
* 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

アデノウイルスベクターの開発

分担研究者 室伏 善照 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・助教

研究要旨

本研究は、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、「7因子制御型m-CRA」の開発と臨床化、ならびに「癌の染色体異常」あるいは「癌幹細胞」を標的治療する新しい発想に基づいて種々の新規のm-CRAを作製し、革新的な癌遺伝子治療法の開発を目的とする。

我々は、これまでにm-CRA作製技術を基盤として、種々のE1領域の4因子制御型m-CRAおよび治療遺伝子による癌治療効果の向上を可能とする6因子制御型m-CRAを作製し、ウイルス学的、腫瘍学的評価を行い、成果を得てきた。特に、Survivin依存性m-CRA（Surv.m-CRA）については、これまでに最も有用とされるTelomerase依存性m-CRA（Tert.m-CRA）と比較して、より高い癌特異性および癌治療効果を得ている（Kamizono J et al: *Cancer Res*, 65: 5284-5291, 2005）。

本年度は、1) 「7因子制御型m-CRA」の開発に向けて、既に成果を得ているSurv.m-CRAを軸にE1B promoterを別の癌特異的promoterに置換した4因子制御型m-CRAならびに治療遺伝子を組込んだ6因子制御型m-CRAの癌細胞特異的な感染効率の向上を可能とする変異ファイバー型m-CRA（最大7因子制御型m-CRA）の開発、2) 「癌の染色体異常」を標的治療する新規m-CRAの作製に取り組み、ウイルス学的、腫瘍学的評価を順次進めているところである。

A. 研究目的

これまでに我々は、種々のE1領域の4因子制御型m-CRA、さらに癌特異的な治療遺伝子発現ユニットの2因子を加えた6因子制御型m-CRAのウイルス学的、腫瘍学的な詳細な評価と有用性の検討を行い、成果を得てきた。その中でも、特に高い癌特異性および癌治療効果を示したSurv.m-CRAを軸に、E1B promoterを別の癌特異的promoter（TERT, E2F, CEA, OC）に置換した4因子制御型m-CRAの作製と評価を進め、成果を得てきた。また、治療遺伝子（HSV-tk, p53）を癌特異的promoter（survivin, OC）で発現させる治療遺伝子発現ユニット加えた6因子制御型m-CRAについても評価を行い、成果を得てきた。

本年度は、上記のようにその有用性が示されたm-CRAを基盤に、癌細胞特異的な感染効率の向上のため、既に確立しているRGD変異ファイバー型m-CRAを作製し、「7因子制御型m-CRA」の開発を目的とする。また、Survivinは、その作用として、細胞周期（有糸分裂期, G₂/M期）特異的発現がみられ、染色体制御への関与が報告されている（Li F. et al., *Nature*, 1998）ことから、我々は、「癌の染色体異常」を標的治療する新規m-CRAの有用性を検討するため、染色体制御機構に関与する新規分子に注目し、そのpromoterによりE1A発現制御する新規m-CRAの開発を目的とする。

B. 研究方法

1) 「7因子制御型m-CRA」の開発

3プラスミドシステムを採用し、プラスミドのパーツ化を可能とした独自開発したm-CRA作製技術を基盤として、これまでに作製した4因子制御型m-CRAならびに6因子制御型m-CRAのアデノウイルスバックボーンパーツをRGD変異ファイバー型パーツに組換え、最大7因子制御型m-CRAの作製を行う。

2) 「癌の染色体異常」を標的治療する新規m-CRAの開発

染色体制御機構に関与する新規分子のうち最もよく研究されている2つの分子について研究を進める。

1. 多種の癌細胞および正常細胞における内因性mRNA発現レベルのreal-time PCR解析を行う。
2. 各分子のpromoterによりLacZ発現制御する非増殖型アデノウイルスを作製し、各種細胞におけるpromoterの発現強度と特異性の*in vitro*解析を行う。
3. 各分子のpromoterによりE1A発現制御する新規m-CRAを作製し、癌細胞および正常細胞における*in vitro*での染色体異常と、ウイルス特性、癌特異性と癌治療効果の相関を検討し、新規m-CRAの有用性の検討を行う。

C. 研究結果

1) 「7因子制御型m-CRA」の開発

Surv.m-CRA を含め、Surv.m-CRA を軸に E1B promoter 領域を別の癌特異的 promoter (TERT, E2F, CEA, OC) 改変した 4 因子制御型 m-CRA から RGD 変異ファイバー型 m-CRA を順次作製しているところである。また同様に、治療遺伝子 (HSV-tk, p53) を癌特異的 promoter (survivin, OC) で発現させる治療遺伝子発現ユニットを加えた 6 因子制御型 m-CRA についても RGD 変異ファイバー型 m-CRA (7 因子制御型 m-CRA) を順次作製しているところである。

2) 「癌の染色体異常」を標的治療する新規 m-CRA の開発

1. 多種の癌細胞および正常細胞における内因性 mRNA 発現レベルの real-time PCR 解析の結果、癌細胞と正常細胞の間で発現レベルに差がみとめられ、両分子ともに癌特異性が示された。
2. reporter gene assay を行うために各分子の promoter の下流に LacZ 遺伝子を組み込んだ非増殖型アデノウイルスベクターを作製した。次に、肝癌細胞 (HepG2)、骨肉腫細胞 (HOS-MNNG)、正常繊維芽細胞 (WI-38) を用いて reporter gene assay を行った結果、癌細胞と正常細胞の間で顕著な promoter 活性の差がみとめられ、両分子の promoter ともに癌特異的発現制御が示された。
3. 各分子の promoter により E1A 発現制御する新規 m-CRA を作製し、ウイルス精製まで終えた。

D. 考察

我々が独自開発した m-CRA 作製技術を基盤とすることにより、1) 「7 因子制御型 m-CRA」の開発については、これまでに成果が得られた多種の m-CRA (4 因子あるいは 6 因子制御型 m-CRA) の RGD 変異ファイバー型 m-CRA への改変を簡便かつ高効率に行うことができたと考える。

また、2) 「癌の染色体異常」を標的治療する新規 m-CRA の開発については、内因性 mRNA の発現レベルの real-time PCR 解析ならびに reporter gene assay による promoter 活性解析、特に promoter 活性解析より癌細胞と正常細胞間で顕著な差がみられたという結果は、染色体制御に関与する新規分子の癌特異性を示すものであり、癌の染色体異常を標的とする m-CRA 戦略は革新的な癌遺伝子治療法になると期待できる。

E. 結論

本研究は、我々がこれまでに取り組んできた m-CRA 化戦略の有用性をさらに検討し、その臨床化を目的としている。加えて、新規 m-CRA 戦略による革新的な癌遺伝子治療法の開発を目的としている。本年度は、両目的達成に向けて順調に研究計画を進めることができ、来年度以降の詳細な解析と検討に速やかに移行できるものと確信する。

m-CRA 戦略は、m-CRA 作製技術を有する我々のみが可能であるため、今後さらに詳細な評価と有用

性の検討を行うことにより、革新的な癌遺伝子治療法の確立、さらには臨床化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

なし

2. 学会発表

- 1) Murofushi Y, Kamizono J, Khai NC, Takahashi T, Komiya S and Kosai K.: *Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus additionally regulated with cancer-specific promoter achieved more strict cancer specificity without reducing anti-cancer effect.* The American Society of Gene Therapy's 10th Annual Meeting, May 30-Jun 3, 2007 (Seattle, USA)
- 2) 室伏善照, 神園純一, 小賤健一郎: *Survivin/CEA-responsive conditionally replicating adenovirus enhances cancer specificity with potent anti-cancer effect.* 第 66 回日本癌学会学術集会, 2007 年 10 月 (横浜)
- 3) 小賤健一郎, 室伏善照: 独立 2~6 因子で癌を標的化・治療する癌特異的増殖制御型アデノウイルス. 第 66 回日本癌学会学術集会, 2007 年 10 月 (横浜)
- 4) Murofushi Y, Kamizono J, Khai NC, Takahashi T, Komiya S and Kosai K.: *Conditionally replicating adenovirus regulated by survivin and CEA promoters exerted more strict cancer specificity and potent anti-cancer effect.* 第 13 回日本遺伝子治療学会総会, 2007 年 6 (名古屋)

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

動物実験による前臨床研究

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
研究協力者 堀川良治 鹿児島大学大学院・整形外科学講座・大学院生

研究要旨

我々は、独自開発したm-CRA作製技術を用いて、様々なm-CRAの作製を行い、その腫瘍生物学的な機能解析・癌治療効果や副作用の評価などを行なっている。今回、腫瘍に応じた腫瘍特異的因子を採用するという計画に基づき、原発性骨腫瘍である骨肉腫に焦点を当て、m-CRAの作製及び抗腫瘍効果の評価を行った。

A. 研究目的

骨肉腫に対する治療法は、手術による腫瘍切除と化学療法の併用により、以前より格段に進歩してきているが、肺転移例などは依然予後不良であり、難治性疾患のひとつにあげられ、新しい根治的治療法の開発が望まれている。これまでにCRAを用いた骨肉腫治療の研究はみられるものの、さらに特異性を高めると推測されるm-CRAを用いた研究はみられていない。

本研究の目的は、骨肉腫が産生するタンパクX（ある一部の正常細胞では発現がみられる）に特異的なpromoterでE1A遺伝子を発現調整するのに加え、E1A及びE1B遺伝子を変異させて腫瘍特異性を高めたm-CRAの、抗腫瘍効果・正常細胞への安全性を検討することである。

B. 研究方法

骨肉腫細胞は、ある特定の正常細胞のみ産生するタンパクXを産生していることが知られている。Xのpromoterをウイルス増殖促進に用いるのに加え、E1A及びE1Bを変異させることで腫瘍細胞特異性を持たせたm-CRA (X. CRA) を、独自開発した技術で作製した。

また、X promoterは活性化因子Yの応答配列を持つことが知られており、Yの存在下でX. CRAの抗腫瘍効果が増強すると予測されたため、X. CRAをヒト骨肉腫細胞株及び正常細胞株へ感染させ、Yの存在有無でどのように影響を与えるかを検討した。

まず、X. CRA評価の前段階として、アデノウイルスの導入効率を確認するために、各細胞株にGFPで標識したアデノウイルスを感染させ、導入効率の評価を行なったところ、いずれも高い導入効率を示した。

X. CRA感染は、96wellプレートに細胞を90%~100%となるように準備したうえで、MOI 10のウイルス液で1時間行った。コントロールには、非増殖性のア

デノウイルスを用いた。1時間の感染後、通常のmedium及びYを添加したmediumにmedium changeし、1、3、7、10日目にWST-8 assay法にて生細胞数の測定を行なった。

（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

数種類の骨肉腫細胞株において、X. CRA感染群で抗腫瘍効果を認めしたが、正常細胞株に対して細胞障害は認められなかった。

また、抗腫瘍効果を認めた骨肉腫細胞株のY投与群において、非投与群に比べ強い腫瘍抑制効果を認めた。

コントロール群では、細胞障害は認められなかった。

D. 考察

これまで様々なウイルスベクターを用いた遺伝子治療が報告されているが、一因子の組み換えだけでは、腫瘍細胞と正常細胞を完全に識別することは困難である。我々の開発したm-CRA作製技術を用いることにより、多数の因子を簡単・確実にベクターへ取り込むことが可能となり、より腫瘍特異性を高めることができると考えられる。今回の研究においても、正常細胞群でのX. CRAによる細胞障害は確認されなかった。

今回の研究における問題点は、すべての骨肉腫細胞株において、抗腫瘍効果が認められたわけではないということである。この問題の原因を確認するため、現在promoter activityの解析や、Yの至適濃度の調整などを行なっている。

将来的に臨床応用につながれば、局所の治療だけでなく、転移巣への治療へとつながる可能性もあり、

開発が期待される。

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

Matsunaga S, Koga H, Kawabata N, Kawamura I, Otusji M, Imakiire T, Komiya S.

Ossification of the posterior longitudinal ligament in dizygotic twins with schizophrenia: a case report. *Mod Rheumatol*. 2008 (in press)

2: Tofuku K, Koga H, Yamamoto T, Yone K, Komiya S. Spinal cord infarction following endoscopic variceal ligation. *Spinal Cord*. 46(3):241-242, 2008

3: Matsunaga S, Imakiire T, Koga H, Ishidou Y, Sasaki H, Taketomi E, Higo M, Tanaka H, Komiya S. Occult spinal canal stenosis due to C-1 hypoplasia in children with Down syndrome. *J Neurosurg*. 107(6 Suppl):457-459, 2007

4: Tofuku K, Koga H, Kawabata N, Yuasa S, Yone K, Komiya S. Dorsally sequestered cervical disc herniation. *Spine*. 32(26):E837-E840, 2007

5: Tofuku K, Koga H, Yone K, Komiya S. Continuous irrigation in pyogenic spondylitis accompanied by iliopsoas abscess. *Spine*. 2007 Jun 15;32(14):E382-E387, 2007

6: Taniguchi N, Yoshida K, Ito T, Tsuda M, Mishima Y, Furumatsu T, Ronfani L, Abeyama K, Kawahara K, Komiya S, Maruyama I, Lotz M, Bianchi ME, Asahara H. Stage-specific secretion of HMGB1 in cartilage regulates endochondral ossification. *Mol Cell Biol*. (16):5650-5663, 2007

7: Tofuku K, Koga H, Yone K, Komiya S. Hypoplasia of the atlas causing cervical myelopathy with situs inversus totalis. *Spinal Cord*. 45(12):806-808, 2007

2. 学会発表

1) 上野宜功, 横内雅博, 川添泰臣, 小宮節郎, 園田祥三, 坂本泰二, 鈴木 亮, 丸山一雄 超音波とバブルリポソームを併用したドキシソルピシンのマウス骨肉腫細胞に対する抗腫瘍効果 第46回鹿児島整形外科懇話会 鹿児島市 2007. 4. 7

2) 川添泰臣, 横内雅博, 上野宜功, 小宮節郎, 吉田浩己 マウス骨肉腫細胞に対する高気圧酸素療法と抗癌剤治療併用の検討 第113回西日本整形・災害外科学会 福岡市 2007. 6. 9-10

3) 田中源幸, 瀬戸口啓夫, 小宮節郎 悪性骨・軟部腫瘍における Notch の発現とその意義 第40回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 甲府市 2007. 7. 12-13

4) 上野宜功, 横内雅博, 川添泰臣, 小宮節郎, 園田祥三, 坂本泰二, 鈴木 亮, 丸山一雄 超音波と Gasliposome を併用したドキシソルピシンのマウス骨肉腫細胞に対する抗腫瘍効果 第40回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 甲府市 2007. 7. 12-13

5) 瀬戸口啓夫, 小宮節郎, 精松昌彦, 近藤 亨 OLIG2 の核外移行による神経幹細胞分化制御メカニズム 第8回運動器科学研究会 鳴門市 2007. 8. 24-25

6) 廣津匡隆, 瀬戸口啓夫, 小宮節郎 Hedgehog Signaling の骨肉腫における発現とその意義 第22回日本整形外科学会基礎学術集会 浜松市 2007. 10. 25-26

7) 田中源幸, 瀬戸口啓夫, 小宮節郎 骨肉腫における Notch の発現とその機能 第22回日本整形外科学会基礎学術集会 浜松市 2007. 10. 25-26

8) 上野宜功, 小宮節郎, 園田祥三, 坂本泰二, 鈴木亮, 丸山一雄 超音波と Bubble Liposome を併用したドキシソルピシンのマウス骨肉腫細胞に対する抗腫瘍効果 第22回日本整形外科学会基礎学術集会 浜松市 2007. 10-25-26

9) 竹之内剛, 瀬戸口啓夫, 小宮節郎 骨・軟部悪性腫瘍細胞株におけるがん幹細胞様細胞の研究 第22回日本整形外科学会基礎学術集会 浜松市 2007. 10-25-26

10) 瀬戸口啓夫, 田中源幸, 廣津匡隆, 佐々木裕

美, 小宮節郎 Notch シグナル制御による骨肉腫の増殖抑制と細胞周期制御 第 114 回西日本整形・災害外科学会 鹿児島市 2007.12-8-9

- 11) 瀬戸口啓夫, 田中源幸, 廣津匡隆, 佐々木裕美, 小宮節郎 骨肉腫における Notch の発現と機能 BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会) 横浜市 2007-12.11-15

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

1. 実用新案登録
なし

2. その他
なし

癌幹細胞の単離と機能解析

分担研究者 瀬戸口啓夫 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科（整形外科学）・助教
研究協力者 佐々木裕美 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科（整形外科学）・大学院生

研究要旨

整形外科領域の悪性腫瘍である骨軟部肉腫の治療を目指して骨軟部肉腫細胞株からがん幹細胞様細胞の同定法を確立し、解析を行った。

A. 研究目的

がん幹細胞は、腫瘍の再発や転移のメカニズムの一端を担っていることが示唆されており、がん幹細胞を標的とした治療法の開発は不可欠である。がん幹細胞を標的とした治療の確立にはがん幹細胞の単離精製が必要であるため、我々は骨軟部悪性腫瘍細胞において、がん幹細胞様の性質を持つ細胞集団の同定法の開発と解析を行った。

B. 研究方法

骨軟部肉腫細胞株を表面マーカー等を用いて2つの細胞集団、main-population (MP) 細胞とsmall-population (SP) 細胞に分離して悪性腫瘍形成能を検討した。さらに移植後腫瘍形成部より再度細胞を培養し、二次腫瘍形成能力を検討した。
(倫理面への配慮)

患者は個人を特定出来ないようにした。

C. 研究結果

SP細胞群はMP群と比較し、腫瘍形成能が高いことを見出した。またSP細胞から形成された腫瘍のみ二次腫瘍形成能力を認めた。さらに、SP細胞から形成された腫瘍細胞を再度培養するとSP細胞とMP細胞が出現しており、SP細胞は、自己複製能と分化能を有することが判明した。

D. 考察

骨軟部悪性腫瘍中からのがん幹細胞同定の報告は未だ見られない。今回、我々はヒト骨軟部肉腫の細胞株を用いてがん幹細胞様細胞を精製することを可能とした。この手法はがん幹細胞をターゲットとした骨軟部悪性腫瘍治療法の開発に有用であると考えられる。

E. 結論

今後この手法を用いて精製したがん幹細胞のキャラクターを解析することにより骨軟部肉腫の新規治療法開発を目指す。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

1. 日本整形外科基礎学術集会 10月25-26
2. 骨軟部悪性腫瘍細胞株におけるがん幹細胞様細胞の研究
3. 竹之内剛、瀬戸口啓夫、廣津匡隆、佐々木裕美、小宮節郎
4. 日本分子生物学会 12月11-15日
5. Expression and function of notch signaling related gene in osteosarcoma
6. Takao Setoguchi, Motoyuki Tanaka, Masataka Hirotsu, Hiromi Sasaki, Setsuro Komiyama

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

細胞生物学的解析

分担研究者 坂本 泰二 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授
研究協力者 上笹貫太郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・大学院生

研究主旨

本研究は、独自開発したm-CRA作成技術新規の癌特異化分子を組み合わせて、その機能をウイルス、腫瘍生物学的に詳細に検討し、さらに癌細胞移植モデルマウスを用いてより臨床的な効果の評価を目的としている。既に開発されたSurvivin依存性CRA (Surv. m-CRA) は、各種癌細胞の癌特異因子Survivinの量に依存したウイルス増殖能と細胞傷害作用を示すが、さらにE1B promoterをCEA promoterへ置換することで、さらなるCEA産生癌への特異化、正常細胞傷害の軽減を実現している。次のステップとして、この新規m-CRAを、RGDペプチドモチーフをファイバーに有するファイバー改変型に進化させることによって (Surv-CEA-RGD. m-CRA)、coxsackievirus adenovirus receptor (CAR) に依存しない吸着を実現し、CARの発現の少ない癌細胞に対しても十分な遺伝子導入を可能とすることを目的としている。この新規m-CRAの有効性を検証するため、CEA産生癌移植動物モデルの作製に取り組み、前臨床的な癌治療効果の評価を行った。

A. 研究目的

過去に高い治療効果、癌特異性を持つことが示されたSurvivin依存性CRA (Surv. m-CRA) を、さらにE1B promoterをCEA promoterに置換したSurv-CEA. m-CRAは、昨年の報告書に報告されたようにCEA産生癌に対しSurv. m-CRAと同等の治療効果を持ちながら正常細胞に対する細胞傷害性の有意な抑制を示した。

今回の目的は、Surv-CEA. m-CRAのファイバーをRGDペプチドモチーフを有するファイバーに改変することで、癌治療効果、癌特異性の向上を目指すものである。さらに、CEA産生癌移植モデルマウスを作製し、Surv-CEA. m-CRA、Surv-CEA-RGD. m-CRAの前臨床的な治療効果の評価を行った。

B. 研究方法

体内への一回投与で、原発巣だけでなく転移、播種した癌細胞すべてをターゲットに感染し、ウイルスの増殖によって癌細胞の根絶を可能にするのがCRAの特徴である。この特徴を最大限に検討するため、癌の腹腔内播種モデルの作成を試みた。CEA産生癌として、CEA産生ヒト胃癌細胞MKN-45を採用した。前回の報告でも試みられたが、最初の癌細胞の腹腔内投与の時点で腫瘍が局所的に結節状し、ウイルスの治療効果を検討する前にマウスが死亡する現象を認め

た。そこで、事前にMKN-45にウイルスを感

染させた上で腹腔内投与するex vivoでのモデル作製を試みた。3×10⁶個/ml PBSのMKN-45にSurv-CEA-RGD. m-CRA、Surv-CEA. m-CRA、Surv. m-CRA、Ad. dE1, 3を3×10⁷pfuで一時間感染させ、PBSで洗浄後、6週齢♀のヌードマウスの腹腔内へ投与した。この4群に、コントロールとして非感染MKN-45投与群、PBSのみ投与群の2群を合わせた計6群を設定した。癌の進展による体重増加、または腹水貯留による体重増加を想定し、経時的な体重変化を測定することで、各群の治療効果を評価した。動物実験は、動物実験取扱い指針にのっとり、適切に行った。

C. 研究結果

実験開始からday2で、まず非感染MKN-45投与群の体重が減少し始め、以後体重は減少し続けday58で死亡した。他の群の体重は増加傾向で、day14までは群間での差は認めなかったが、day14を過ぎたころからAd. dE1, 3感染MKN-45投与群の体重が減少し始めた。以後減少傾向は止まらず、day76までに3分の2が死亡し、残りの3分の1も実験終了のday79には最大体重の約78%まで減少した。それ以外の治療m-CRA感染MKN-45投与群は、PBSのみ投与群とほぼ同じ体重増加の経過をたどった。体重増加の推移に、

各治療m-CRAの間に差はなかった。実験終了後、各群のマウスをsacrificeし、腹腔内を観察すると、非感染MKN-45投与群、Ad. dE1, 3感染MKN-45投与群では、腸管に沿って癌の播種を認めた。また、m-CRA感染MKN-45群に関しては、Surv-CEA-RGD. m-CRA感染MKN-45投与群、Surv. m-CRA感染MKN-45投与群において、腹腔内への癌播種を認めた。腹腔内の癌播種の程度は、この2群と、非感染MKN-45投与群、Ad. dE1, 3感染MKN-45投与群に差はなかったが、マウスの全体的な印象では、後者の2群は明らかに羸瘦(るいそう)を認めた。一方、Surv-CEA. m-CRA群では、癌の腹膜内播種は認めなかった。腹水はどの群にも発生を認めなかった。

D. 考察

非感染MKN-45投与群に比べ、12日程度Ad. dE1, 3感染MKN-45投与群の体重減少が遅れたのは、ウイルス自体の細胞傷害性によるものと考えられる。Surv. m-CRA感染MKN-45投与群とSurv. CEA. m-CRA感染MKN-45投与群では、体重の推移に差はないものの、腹腔内の癌播種の有無に相違を認め、CEAプロモーター搭載による治療効果の増大の可能性が示唆された。RGDファイバー改変による治療効果の向上は認めなかった。Surv. CEA-RGD. m-CRA感染MKN-45投与群とSurv. m-CRA感染MKN-45投与群では癌の腹腔内播種の消失は認めなかったものの、体重減少に至るほどの癌進展を抑制する一定の治療効果を示した。Surv. CEA-RGD. m-CRAについては、Surv. CEA. m-CRAと比較すると治療効果が劣っているため、ウイルスベクターへのRGD改変ファイバーが実際に発現しているか確認し、その有効性をもう一度検討し直す必要がある。また、今回はex vivoで癌腹腔内播種モデルの作成に成功したが、今後は、より臨床的な治療を見据えて、in vivoでの同様の実験が必要となる。今回の実験でのノウハウを生かし、安定したin vivoモデルの作製を検討中である。

E. 結論

新規m-CRAは、高い抗腫瘍効果が期待でき、その有効性をより高める研究が進められている。その治療効果を適切に評価し、臨床応用を踏まえた安全性の検討も今後さらに必要とされる。信頼性の高い前臨床的評価が行えるように、安定した動物モデル作製の技術向上を目指している。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamakiri K, Sakamoto T, Noda Y, Nakahara M, Ogino N, Kubota T, Yokoyama M, Furukawa M, Sonoda Y, Yamada T, Doi N, Enaida H, Hata Y, Ishibashi T. : Reduced incidence of intraoperative complications in a multicenter controlled clinical trial of triamcinolone in vitrectomy. *Ophthalmology*. 2007 Feb;114(2):289-96.
- 2) Shimonagano Y, Makiuchi R, Miyazaki M, Doi N, Uemura A, Sakamoto T. : Results of visual acuity and foveal thickness in diabetic macular edema after vitrectomy. *Jpn J Ophthalmol*. 2007;51(3):204-9.
- 3) Nakao K, Isashiki Y, Sonoda S, Uchino E, Shimonagano Y, Sakamoto T. : Nitric oxide synthase and superoxide dismutase gene polymorphisms in Behcet disease. *Arch Ophthalmol*. 2007 Feb;125(2):246-51.
- 4) Yamashita T, Uemura A, Kita H, Sakamoto T. : Intraocular pressure after intravitreal injection of triamcinolone acetate following vitrectomy for macular edema. *J Glaucoma*. 2007 Mar;16(2):220-4.
- 5) Nakao K, Shimonagano Y, Doi N, Sakamoto T. : Conjunctival nodules associated with Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007 Sep;245(9):1383-6.
- 6) Tsuji M, Kimura K, Tsuji H, Goto M, Yoshikawa H, Sakamoto T. : Histological study of choroidal malignant melanoma treated by carbon ion radiotherapy. *Jpn J Ophthalmol*. 2007 Mar-Apr;51(2):127-30.
- 7) Shimonagano Y, Doi N, Noda Y, Uemura A, Sakamoto T. : Recurrence of diabetic macular edema after intravitreal injection of triamcinolone following vitrectomy. *Jpn J Ophthalmol*. 2007 Jul-Aug;51(4):278-84.
- 8) Matsumoto H, Yamanaka I, Hisatomi T, Enaida H, Ueno A, Hata Y, Sakamoto

- 1) Ogino N, Ishibashi T. :TRIAMCINOLONE ACETONIDE-ASSISTED PARS PLANA VITRECTOMY IMPROVES RESIDUAL POSTERIOR VITREOUS HYALOID REMOVAL: Ultrastructural Analysis of the Inner Limiting Membrane. *Retina*. 2007 Feb;27 (2) :174-179.
- 9) Ueno A, Enaida H, Hata Y, Hisatomi T, Nakamura T, Mochizuki Y, Sakamoto T, Ishibashi T. : Long-term clinical outcomes and therapeutic benefits of triamcinolone-assisted pars plana vitrectomy for proliferative vitreoretinopathy: A case study. *Eur J Ophthalmol*. 2007 May-Jun;17 (3) :392-8.
- 10) Sonoda S, Tachibana K, Uchino E, Yamashita T, Sakoda K, Sonoda KH, Hisatomi T, Izumi Y, Sakamoto T. :Inhibition of Melanoma by Ultrasound-Microbubble-Aided Drug Delivery Suggests Membrane Permeabilization. *Cancer Biol Ther*. 2007 Mar 24;6 (8) [Epub ahead of print]
- 11) Yamashita T, Sakamoto T, Yamakiri K, Miura M, Enaida H, Ueno A, Atsumi I, Matsuhisa K, Sakamoto Y, Kida T, Ishibashi T. Polylactic acid for visualizing the vitreous body during vitrectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Jul;48 (7) :3277-82.
- 12) Ueno A, Enaida Y, Hisatomi T, Nakamura T, Mochizuki Y, Sakamoto T, Ishibashi T. :Long-term clinical outcomes and therapeutic benefits of triamcinolone-assisted pars plana vitrectomy for proliferative vitreoretinopathy : A case study. *Eur J ophthalmol*. 2007 17 (3) :392-398.
- 13) Ki-i Y, Arimura N, Noda Y, Yamakiri K, Doi N, Hashiguchi T, Maruyama I, Shimura M, Sakamoto T. :Stromal-Derived Factor-1 and Inflammatory Cytokines in Retinal Vein Occlusion. *Current Eye Research*. 2007 Dec;32 (12) :1065-72.
- 14) Inatani M, Iwao K, Kawaji T, Hirano Y, Ogura Y, Hirooka K, Shiraga F, Nakanishi Y, Yamamoto H, Negi A, Shimonagano Y, Sakamoto T, Shima C, Matsumura M, Tanihara H. :Intraocular Pressure Elevation after Injection of Triamcinolone Acetonide: A Multicenter Retrospective Case-Control Study. *Am J Ophthalmol*. 2008 Feb 1 [Epub ahead of print]
- 15) 園田祥三, 立花克郎, 坂本泰二. : 眼瞼メラノーマに対する超音波とマイクロバブル併用時のプレオマイシンの抗腫瘍効果の検討 *超音波医学*. 34(2)224, 2007..
- 16) 坂本泰二, 樋田哲夫, 田野保雄, 根木昭, 竹内忍, 石橋達朗, 井上幸次, 大黒伸行, 岡田アナベルあやめ. : 眼科領域におけるトリアムシノロン使用状況全国調査結果 *日本眼科学会雑誌*.111(12) 936-945,2007
- 17) 坂本泰二, 樋田哲夫, 根木 昭, 竹内忍, 石橋達朗, 井上幸次, 大黒伸行, 岡田アナベルあやめ. : 「眼科領域における長期滞留ガス使用状況全国調査結果」 *日本眼科学会雑誌*112(1) 45-50, 2008
- 18) 坂本泰二. : 内科的薬物治療と眼 *日本眼科学会雑誌* 136(9):1752, 2007
2. 学会発表
- 1) 喜井裕哉, 山切啓太, 園田恭志, 土居範仁, 坂本泰二, 橋口照人, 丸山征郎. : 裂孔原性網膜剥離におけるHigh mobility group box1の病態形成の関与. 2007年1月19~20日 (福岡)
- 2) 有村 昇, 喜井裕哉, 野田佳宏, 山切啓太, 土居範仁, 橋口照人, 丸山征郎, 志村雅彦, 坂本泰二. : 網膜静脈閉塞症患者の硝子体中のSDF1, VEGF, 炎症性サイトカイン濃度の評価. 2007年1月19~20日 (福岡)
- 3) 大久保明子, 平川真由美, 坂本泰二. : 初期のポリープ状脈絡膜血管症の特徴. 2007年1月19~20日 (福岡)
- 4) 平川真由美, 田中最高, 田中 実, 大久保明子, 坂本泰二. : 加齢黄斑変性および加齢黄斑症と日光暴露量の関係. 2007年1月19~20日 (福岡)
- 5) 山下敏史, 園田祥三, 坂本泰二, 立花克郎, 鈴木 亮. : 超音波とバブルリポソームを利用した培養角膜細胞およびラット結膜への遺伝子導入. 2007年1月19~20日 (福岡)
- 6) 園田祥三, 山下敏史, 坂本泰二, 立花克郎. : 硝子体手術併用眼内超音波遺伝子導入法の開発. 2007年1月19~20日

- (福岡)
- 7) 大塚寛樹,吉永就正,吉永和歌子,田中最高,山切啓太,土居範仁,上村昭典,坂本泰二.
: 網膜剥離に対する硝子体手術後の増殖硝子体網膜症への移行; 10年前との比較. 2007年1月26-28日(京都)
 - 8) 吉永就正,下長野由佳,園田恭志,土居範仁,坂本泰二.
: 眼内レンズが嚢内固定のまま硝子体腔内に落下した症例の検討. 2007年1月26-28日(京都)
 - 9) 山切啓太,坂本泰二,荻野誠周,古川真理子,熊谷和之,横山光伸,久保田敏昭,中原正彰.
: トリアムシノロン併用硝子体手術1年後の眼圧と合併症: 多施設無作為前向き調査結果. 2007年1月26-28日(京都)
 - 10) 堂園貴保子, あべ松泰子, 土居範仁, 坂本泰二.
: 糖尿病黄斑症の自然経過の検討. 2007年3月2-4日(京都)
 - 11) 山下敏史, 園田祥三, 坂本泰二, 立花克郎, 鈴木 亮.
: 超音波とバブルリポソームを利用した培養角膜上皮細胞およびラット結膜への遺伝子導入. 2007年4月19-22日(大阪)
 - 12) 大久保明子, 平川真由美, 坂本泰二.
: 初期のポリープ状脈絡膜血管症の特徴. 2007年4月19-22日(大阪)
 - 13) 有村 昇, 喜井裕哉, 野田佳宏, 山切啓太, 土居範仁, 橋口照人, 丸山征郎, 志村雅彦, 坂本泰二.
: 網膜静脈閉塞症患者硝子体中のSDF1, VEGF, 炎症性サイトカイン濃度の評価. 2007年4月19-22日(大阪)
 - 14) 喜井裕哉, 山切啓太, 園田恭志, 土居範仁, 坂本泰二, 橋口照人, 丸山征郎.
: 裂孔原性網膜剥離におけるHigh mobility group box 1 proteinの病態形成への関与. 2007年4月19-22日(大阪)
 - 15) 中尾久美子, 下長野由佳, 坂本泰二, 黒木辰雄.
: HTLV-1感染者の眼内液中可溶性インターロイキン2受容体. 2007年4月19-22日(大阪)
 - 16) 辻 正敏, 坂本泰二, 木村勝哲, 後藤正道, 辻比呂志.
: 重粒子線治療後に血管新生緑内障を発症した脈絡膜悪性黒色腫の1例. 2007年4月19-22日(大阪)
 - 17) Sakamoto T, Yamashita T, Yamakiri K, Miura M, Enaida H, Ishibashi T, Atsumi I, Matsuhisa K, Sakamoto Y, Kida T.
: Polylactic Acid for Visualizing Vitreous Body During Vitrectomy. The Association for Research in Vision and ophthalmology, May6-10, 2007 (Fort Lauderdale, U.S.A)
 - 18) Sonoda S, Uchino E, Yamashita T, Sakamoto T, Tachibana K.
: Inhibition of Melanoma by Ultrasound-Microbubble-Aided Drug Delivery Suggests Membrane Permeabilization. The Association for Research in Vision and ophthalmology, May6-10, 2007 (Fort Lauderdale, U.S.A)
 - 19) Shimura M, Nakawaza T, Yasuda K, Imoue E, Kunikata H, Sakamoto T, Nishiba K.
: Vitreous Levels of SDF-1 and RANTES in Patients With Macular Edema-Retinal Vein Occlusion and Diabetic Macular Edema. The Association for Research in Vision and ophthalmology, May6-10, 2007 (Fort Lauderdale, U.S.A)
 - 20) Arimura N, Kii Y, Noda Y, Yamakiri K, Doi N, Hashiguchi T, Maruyama I, Shimura M, Sakamoto T.
: Evaluation of Vitreal Stromal-Derived Factor 1 Levels in Patients With Retinal Vein Occlusion (RVO). The Association for Research in Vision and ophthalmology, May6-10, 2007 (Fort Lauderdale, U.S.A)
 - 21) Kamisasanuki T, Uemura A, Sakamoto T.
: Late Re-Opening and Spontaneous Closure of Macular Holes After Initially Successful Treatment with Vitreous Surgery. The Association for Research in Vision and ophthalmology, May6-10, 2007 (Fort Lauderdale, U.S.A)
 - 22) Yamashita T, Sonoda S, Tachibana K, Suzuki R, Sakamoto T.
: Gene Delivery by Combination of Bubble Liposome and Ultrasound for Corneal Epithelial Cells. The Association for Research in Vision and ophthalmology, May6-10, 2007 (Fort Lauderdale, U.S.A)
 - 23) Kii Y, Yamakiri K, Sonoda Y, Doi N, Sakamoto T, Hashiguchi T, Maruyama S.
: Retinal Detachment Causes Expression of High Mobility Group Box 1 and Retinal Pigment Epithelial Cell Death. The Association for Research in Vision and ophthalmology, May6-10, 2007 (Fort Lauderdale, U.S.A)
 - 24) Yamashita T, Uemura A, Kita H, Sakamoto T.
: Long-Term Course of Visual Field Defects After Intravitreal Administration of Indocyanine Green in Macular Hole Surgery. The Association for Research in Vision and ophthalmology, May6-10, 2007 (Fort Lauderdale, U.S.A)

- tion for Reseach in Vision and ophthalmology, May6~10, 2007 (Fort Lauderdale, U. S. A)
- 25) Okubo A, Hirakawa M, Sakamoto T. : Early Indications of Polypoidal Choroidal Vasculopathy. The Association for Reseach in Vision and ophthalmology, May6~10, 2007 (Fort Lauderdale, U. S. A)
- 26) 辻 正敏, 坂本泰二. : 塩酸ペチジン (オピスタン) による術中鎮静について. 2007年5月11~13日 (宮崎)
- 27) 土居範仁, 坂本泰二., 堂園貴保子. : 糖尿病黄斑症に対する硝子体手術とtriamcinolone硝子体内注入との治療効果の比較. 2007年5月11~13日 (宮崎)
- 28) 吉永就正, 園田恭志, 土居範仁, 坂本泰二. : 角膜内皮障害眼に硝子体腔内落下IOLを逢着した1例. 2007年5月11~13日 (宮崎)
- 29) 坂本泰二., 園田祥三, 山下敏史, 鈴木亮, 丸山一雄, 立花克郎. : 超音波を利用したDrug Delivery Systemの最前線眼科疾患に対する超音波とマイクロバブルを用いた薬物送達. 2007年5月18~20日 (鹿児島)
- 30) 吉永和歌子, 水島由佳, 中尾久美子, 坂本泰二. : 免疫能正常者に発症したサイトメガロウィルス網膜炎. 2007年7月6日~8日 (東京)
- 31) 田中最高, 山下高明, 山切啓太, 坂本泰二. : 眼内毛様体光凝固を施行した難治性血管新生緑内障の3例. 2007年9月14~16日 (岐阜)
- 32) 中尾久美子, 水島由佳, 郷 奈々子, あべ松徳子, 坂本泰二. : 虚血性視神経症を合併したVogt-小柳-原田病. 2007年10月11日~14日 (京都)
- 33) 園田恭志, 土居範仁, 山切啓太, 坂本泰二. : 3D-OCTにより全層黄斑円孔と診断された3例. 2007年10月11日~14日 (京都)
- 34) 藤田敦子, 内野英輔, 郷奈々子, 坂本泰二., 園田祥三, 速見佳代子, 平瀬純伸. : 鹿児島大学眼科における角膜感染症の最近の動向. 2007年10月11日~14日 (京都)
- 35) 尾辻 太, 園田恭志, 坂本泰二. : インジェクターを用いて眼内レンズを挿入・逢着した2症例. 2007年10月11日~14日 (京都)
- 36) 山切啓太, 坂本泰二. : 3D OCT-1000を用いた正常眼の黄斑部網膜厚. 2007年10月11日~14日 (京都)
- 37) 木村勝哲, 坂本泰二. : 鹿児島大学における先天鼻涙管閉塞の治療成績. 2007年10月11日~14日 (京都)
- 38) 喜井裕哉, 園田恭志, 山切啓太, 坂本泰二. : bevacizumab硝子体注射が著効した網膜血管腫の1例. 2007年10月11日~14日 (京都)
- 39) 辻 正敏, 坂本泰二. : 塩酸ペチジンの使用経験. 2007年10月11日~14日 (京都)
- 40) 大久保明子, あべ松徳子, 平川真由美, 坂本泰二. : 視神経乳頭の鼻側にポリーブ状血管を伴うポリーブ状脈絡膜血管症. 2008年1月18~19日 (福岡)
- 41) 山下敏史, 園田祥三, 園田恭志, 坂本泰二., 立花克郎. : 超音波血栓融解療法の眼科応用の検討. 2008年1月18~19日 (福岡)
- 42) 有村 昇, 喜井裕哉, 園田恭志, 山切啓太, 橋口照人, 丸山征郎, 坂本泰二. : 眼内炎におけるHigh-Mobility Group Box 1 Proteinの発現. 2008年1月18~19日 (福岡)
- 43) 大塚寛樹, 有村 昇, 喜井裕哉, 山切啓太, 土居範仁, 橋口照人, 丸山征郎, 坂本泰二. : PDRに対するBevacizumab, TA投与による硝子体中サイトカイン濃度. 2008年1月18~19日 (福岡)
- 44) 坂本泰二. : 後部硝子体剥離の基本手技と合併症予防. 2008年2月1~3日 (横浜)
- 45) 山切啓太, 坂本泰二., 荻野誠周, 古川真理子, 熊谷和之, 横山光伸, 久保田敏昭, 中原正彰, 石橋達朗. : トリアムシノロン併用硝子体手術の多施設無作為前向き調査における層別解析2008年2月1~3日 (横浜)
- 46) 藤田敦子, 内野英輔, 園田祥三, 坂本泰二. : 結膜上皮内癌・結膜扁平上皮癌切除術に併施した羊膜移植術単独による眼表面再建術. 2008年2月1~3日 (横浜)
- 47) 益山京子, 山切啓太, 坂本泰二. : フーリエドメイン光干渉断層計による術後早期の黄斑円孔閉鎖の確認. 2008年2月1~3日 (横浜)
- 48) 寺崎寛人, 山切啓太, 土居範仁, 坂本泰二. : 鹿児島大学における小児の裂孔

原性網膜剥離. 2008年2月1～3日（横浜）

49) 藤原悠子, 山切啓太, 園田恭志, 土居範仁, 坂本泰二. : 鹿児島大学病院における穿孔性眼外傷症例. 2008年2月23日（鹿児島）

50) 堂園貴保子, 吉永就正, 土居範仁, 坂本泰二, 鎌田哲郎. : 2型糖尿患者の24時間血圧変動と糖尿病網膜症との関連. 2008年3月14～16日（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)

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）
「増殖型バクテールと幹細胞のオリジナル技術による革新的な癌遺伝子治療法の開発」
平成19年度 分担研究報告書

癌（幹）細胞の細胞表層の糖脂質からの機能解明

分担研究者 隅田泰生 鹿児島大学 大学院理工学研究科・教授
研究協力者 若尾雅弘 鹿児島大学 大学院理工学研究科・助教
研究協力者 鶴田祥子 鹿児島大学 産学官連携推進機構・

VB部門プロジェクト研究員

研究協力者 佐藤昌紀 鹿児島大学 大学院理工学研究科・D2

A. 研究要旨

数ナノメートルの大きさのオリゴ糖鎖は、生体内で多彩な機能を示し、生命現象に不可欠な役割を有する [1]。糖鎖の生理活性を解析することは非常に重要であるが、構造明確な糖鎖を十分量得ることは困難が伴う。また、糖鎖1分子の活性は弱く、生体内ではそれらが集合して働いている。これらの特徴を持つ糖鎖とその作用相手である蛋白質や細胞、ウイルス等との結合相互作用を、作用相手を標識することなく迅速に解析するツールとして、我々は「シュガーチップ」及び糖鎖固定化金ナノ粒子「SGNP」を開発している [2-8]。本研究では、これらのナノバイオデバイスを用いて、新たな癌細胞表層ターゲットの探索ならびに細胞表層の糖鎖解析を行うことを目的とした。さらに今年度は、ウイルスベクターの効率的な濃縮についても検討した。

B. 新たな癌細胞表層ターゲットの探索ならびに細胞表層の糖鎖解析

成人T細胞白血病（ATL）はHTLV-1ウイルスによって発症するきわめて予後の悪い血液癌である。本年度は、鹿児島大学医歯学総合研究科の有馬教授らによってATL患者のT細胞から樹立された培養細胞S1Tと、ATLではない癌培養細胞MOLT4を用いて細胞表層糖鎖のDifferential Analysisを行った。

まず、糖鎖転移酵素遺伝子の違いを（独）産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センターの成松博士との共同研究として実施した。その結果、シアリルルイス抗原糖鎖、コンドロイチン硫酸合成酵素、ヘパリン硫酸合成酵素に大きな違いがあることが示唆された。

次に、両細胞を大量に培養（培養に関しては、鹿児島大学医歯学総合研究科の馬場教授ならびに濱崎博士の協力を得た）し、酵素（Endo-F）によるN-型糖鎖の切り出し、ヒドラジン分解によるO-型糖鎖の切り出し、Blot Glyco（住友ベークライト社）による糖鎖の濃縮と質量分析（MALDI-TOF/MS）によって、それぞれN-型糖鎖とO-型糖鎖の細胞特異性を検討した。上記遺伝子解析の結果を反映するMSピークが観測され、ATL細胞表層のターゲット候補を複数発見することができた。これら候補糖鎖を簡便に固定化するために、蛍光性のリンカー分子を新たに開発し

た。現在、この新規開発したリンカーを用いた実験を継続している。

C. ヘパリンを固定化したSGNPによるウイルスの濃縮

我々が開発した糖鎖固定化金ナノ粒子（SGNP）は結合タンパク質の探索、蛋白質の精製、50%阻害濃度の決定、ドットブロティング用のプローブといった基礎研究に用いることができ、さらに検査・診断用のツールとしての利用を検討し、図1に示すようなシステムを考案した。すなわち、ウイルスのレセプター糖鎖をSGNPやアレータイプのシュガーチップを用いてスクリーニングし、決定する。その糖鎖を固定化したSGNPとウイルスを混合し、遠心分離して沈殿を得る。その沈殿からDNAもしくはRNAを抽出して、PCRにかける。PCRだけでウイルスが同定できない場合には、DNAのシーケンスを行い、同定する。このシステムの有効性をまず1型ヒト単純ヘルペスウイルスに対して適用した。図2に示すように、ウイルスを培養し、ウイルスのレセプターであるヘパリン（あらかじめアレータイプのシュガーチップで決定）を固定化したSGNPを混合し、遠心分離後、沈殿物を水に分散させ、それをリアルタイムPCRで調べた。

結果を図3に示す。SGNPの濃度が多すぎると蛍光消光が起り、PCRの検出に用いる

インターカレーターの蛍光強度が低下するが、SGNPを加えた場合は、10サイクル程度早くヘルペスウイルスのDNAが増幅されたこと、すなわち1000倍程度の濃縮が達成されたことが判明した(図3参照)。

このように、ヘパリン固定化SGNPの有効性が明確になったので、これを遺伝子ベクターであるレンチウイルスに適用(鹿児島大学歯学総合研究科の竹中准教授および吉満助教との共同研究)した。なお、レンチウイルスがヘパリンを固定化したアフィニティークロマトグラフィーで精製されうるとの報告があったので、この場合はアレイ型シュガーチップによる結合糖鎖の解析は行わなかった。現在までに、ヘパリン固定化SGNPによって、ウイルスの抗体価が100倍以上に濃縮されたことが判明し、現在さらなる検討を続けている。

◎参考文献など

- [1] Varki, A.(1999) in *Essentials of Glycobiology*, (Eds.: Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY, pp. 57-68, and references therein.
- [2] Suda, Y., Nishimura, T., Kishimoto, Y., Yamashita, S., Sato, M., Uetani, M., Hamamatsu, M., Saito, A., Wakao, M., Murray-Wijelath, J., Wijelath, E., Strand, K., Sobel, M. (2005) Advanced analytical systems for the binding interaction of structurally defined oligosaccharides with proteins/cells: use of surface plasmon resonance (SPR) or gold nanoparticles (GNP), *Glycoconjugates J.* 22, 201.
- [3] Sugar-Immobilized Gold Nano-Particles (SGNP): Novel Bioprobe for the On-Site analysis of the Oligosaccharide-Protein Interactions, Suda Y, Kishimoto Y, Nishimura T, Yamashita S, Hamamatsu M, Saito A, Sato M, Wakao M., *Polymer Preprints*, 47(2), 156-157(2006).
- [4] Immobilization and Clustering of Structurally Defined Oligosaccharides for Sugar Chips: An Improved Method for Surface Plasmon Resonance Analysis of Protein-Carbohydrate Interactions, Suda Y, Arano A, Fukui Y, Koshida S, Wakao M, Nishimura T, Kusumoto S, Sobel M., *Bioconjug Chem.*, 17(5), 1125-1135 (2006).
- [5] 隅田泰生、荒野明男、楠本正一、マイケルソベール、リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造方法、特開 2004-155762、WO 2004/022565 A1
- [6] 隅田泰生、荒野明男、林秀樹、楠本正一、マイケルソベール、多岐用途型リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造方法、特開 2004-157108、WO 2004/022583 A1
- [7] 隅田泰生、楠本正一、荒野明男、リンカー化合物およびリガンド並びにオリゴ糖鎖の固定化方法および蛋白質分析用の支持体、特開 2003-83969
- [8] 隅田泰生、西村知晃、岸本裕子、中川裕美、新規糖固定化金属ナノ粒子およびこれを用いて糖-タンパク質相互作用を測定する方法、並びに糖-タンパク質相互作用体からタンパク質を回収する方法、特願 2005-154550

◎研究発表

1. 論文発表

- 1) M. Hashimoto, M. Furuyashiki, R. Kaseya, Y. Fukada, M. Akimaru, K. Aoyama, T. Okuno, T. Tamura, T. Kirikae, F. Kirikae, N. Eiraku, H. Morioka, Y. Fujimoto, K. Fukase, K. Takashige, Y. Moriya, S. Kusumoto, Y. Suda, "Evidence of immunostimulating lipoprotein co-existing in natural lipoteichoic acid fraction", *Infect. Immun.*, 75(4), 1926-1932(2007)
- 2) Y. Fujimoto, M. Iwata, N. Imakita, A. Shimoyama, Y. Suda, S. Kusumoto, K. Fukase, "Synthesis of immunoregulatory Helicobacter pylori lipopolysaccharide partial structures", *Tetrahedron Lett.*, 48, 6577-6581(2007)
- 3) H. Kariya, A. Kiyohara, S. Masuda, Y. Yoshihara, M. Ueno, M. Hashimoto, Y. Suda, "Biological roles of carboxymethyl-chitin associated for the growth factor production", *J. Biomed. Mater. Res.*, 83A, 58-63(2007)
- 4) 隅田泰生, 「糖鎖アレイ」, マイクロアレイ・バイオチップの最新技術 第12章(伊藤嘉浩監修), (株)シーエムシー, 2007年12月
- 5) M. Hashimoto, K. Takashige, M. Furuyashiki, K. Yoshidome, R. Sano, Y. Kawamura, S. Ijichi, H. Morioka, H. Koide, N. Oku, Y. Moriya, S. Kusumoto, Y. Suda, "Enhancement of antitumor activity of OK-432 (Picibanil) by Triton X-114 phase partitioning", *International Immunopharmacology*, 8, 12-19(2008)
- 6) N. Sasaki, K. Okishio, K. Ui-Tei, K. Saigo, A. Kinoshita-Toyoda, H. Toyoda, T. Nishimura, Y. Suda, M. Hayasaka, K. Hanaoka, S. Hitoshi, K. Ikenaka, and S. Nishihara, "Heparan sulfate regulates self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells", *J. Biol. Chem.*, in press
- 7) M. Wakao, A. Saito, K. Ohishi, Y. Kishimoto, T. Nishimura, M. Sobel, Y. Suda, "Sugar Chips Immobilized with Synthetic Sulfated Disaccharides of Heparin/Heparan Sulfate Partial Structure",