

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小賤 健一郎

平成21(2009)年 4月

## 研究報告書目次レイアウト

## 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	-----	1
小賤 健一郎		
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	-----	4
室伏 善照		
2. 動物実験による前臨床研究に関する研究	-----	6
小宮 節郎		
3. 癌幹細胞の単離と機能解析に関する研究	-----	9
瀬戸口啓夫		
4. 細胞生物学的解析に関する研究	-----	10
坂本 泰二		
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	-----	15
隅田 泰生		
6. 幹細胞生物学での技術開発と解析に関する研究	-----	20
國貞 隆弘		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	23
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

研究代表者 小戩 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**」の新型**Surv.m-CRA**を開発し臨床化を目指す、②癌の新しい標的機構（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。

初年度の、①7因子制御**m-CRA**の作製、②各遺伝子プロモーターの癌特異的発現などの基礎研究データ獲得、③SP法などでの癌幹細胞の分離濃縮と前段階となる基礎研究成果を踏まえ、本年度は以下のような成果を挙げてきた。①の7因子制御**m-CRA**については他のプロモーターの成果を踏まえ、オリジナルの**Surv.m-CRA**での研究を進め、臨床化に向けて進めている。またsiRNA発現型**m-CRA**システムも構築している。②候補プロモーターによる**m-CRA**を作製し、治療効果と癌特性を示す、つまり**Surv.m-CRA**に続く医薬となる成果を得た。③CD133陽性細胞分画を中心に、ファイバー改変によるアデノウイルスの遺伝子導入効率、**Surv.m-CRA**と**Tert.m-CRA**での細胞障害性の予備実験、などを進め、成果を上げてきた。また③に関しては、分担研究者と共同で癌幹細胞に対する基礎研究を進めている（分担研究者の項を参照）。このように本年は、3研究とも当初の目的と計画通り進めることができた。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における・職名

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
國貞 隆弘	岐阜大学医学系研究科・教授

A) の開発が世界的に期待され、国外の臨床試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3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。これらの成果を踏まえ、平成19年度からは、この**m-CRA**技術、また**Surv.m-CRA**を用いて、癌幹細胞を標的治療する独自技術の開発を目指してきた。初年度の平成19年度には、①7因子制御**m-CRA**の作製、②各遺伝

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」(**CR**

子プロモーターの癌特異的発現などの基礎研究データ獲得、③SP法などでの癌幹細胞の分離濃縮と前段階となる基礎研究成果を踏まえ、本年度は以下のような成果を挙げてきた。これらを踏まえ、本年度は研究を進展させてきた。特に③に関しては、癌幹細胞の分離・濃縮で最も有名なCD133を中心に、CD133陽性細胞分画に対するアデノウイルスベクターの遺伝子導入、そしてSurv.m-CRAの治療効果の検証（本年はパイロットスタディー）を進めることを目的とする。

## B. 研究方法

### 1. 新型Surv.m-CRA（7因子搭載m-CRAのSurv.m-CRA）の開発と臨床化

- ① E1領域の4因子制御での癌特異化増強、治療遺伝子の2因子での治療効果増強に加え、RGD型へのファイバー改変による癌細胞への遺伝子導入効率増強という、7因子制御Surv.m-CRAを作製し、各機能解析を行う。
  - ② RNAi発現m-CRAのシステムを作製する。
  - ③ シュガーチップで、新たなアデノウイルス濃縮法を開発する。
2. 癌の染色体異常標的型の新m-CRAの開発  
→（分担研究者 室伏の項）
  3. 癌幹細胞を標的・治療するm-CRAの開発
    - ① 幾つかの種類のカンサ細胞株から、MACS法によりCD133陽性細胞を濃縮分離する。
    - ② CD133陽性細胞分画とその他の癌細胞の分画に、通常とRGD型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。
    - ③ CD133陽性細胞分画とその他の癌細胞の分画に、in vitroでSurv.m-CRAを感染させ、ウイルス増殖効果を比較する。同様に、Tert.m-CRAの実験を行う。

## C. 研究結果

### 1. 新型Surv.m-CRA（7因子搭載m-CRAのSurv.m-CRA）の開発と臨床化

- ① (1) ウイルス増殖を決定するE1領域の4因子制御化により癌特異的ウイルス増殖化の精度の上昇、(2) 癌特異的プロモーター/治療遺伝子の2因子搭載による癌治療効果の増強、(3) 変異ファイバーによる目的癌細胞の導入効率上昇、の7つまでの癌標的治療因子を搭載する高度m-CRA開発を、テロメラーゼ反応性m-CRA(Tert.m-CRA)、そしてさらに優れたオリジナルのSurv.m-CRAを中心に進めた。特に、(1)の変異E1Bの第二の腫瘍特異的プロモーター制御による癌特異化（安全性）増強を実証し、そのE1Bプロモーター置換の重要性に関する新たな科学知見を得た。
- ② 新たにRNAi搭載m-CRAシステムを作製でき

た。

- ③ 新たなファイバー変異法開発のため、ベクターの糖鎖結合性をシュガーチップとSPRイメージング法にて解析した。アデノウイルスはある糖鎖への高アフィニティがあることが明確となり、この糖鎖を利用した新しいウイルス濃縮ができる可能性の結果を得た。
2. 癌の染色体異常標的型の新m-CRAの開発  
→（分担研究者 室伏の項）
  3. 癌幹細胞を標的・治療するm-CRAの開発
    - ① これまでにCD133陽性細胞が報告されている大腸癌、前立腺癌、乳癌においてMACS及びFCMを行ったところ少ないpopulationながら確認できた。
    - ② 分離したCD133陽性・陰性細胞分画においてwtADVとRGD変異ファイバー部を持つmtADVの導入効率に大きな違いはないものの、CD133陽性細胞においても非常に高率に遺伝子導入できた。
    - ③ 分離したCD133陽性・陰性細胞分画においてSurv.m-CRAとhTERT.m-CRAを感染させたところ、両分画、両ウイルスとも効率よいウイルス増殖とマーカー遺伝子導入の広がりが見られた。それぞれの分画での差をみたが、大きな差は得られなかった。

## D. 考察

### 1. 新型Surv.m-CRA（7因子搭載m-CRAのSurv.m-CRA）の開発と臨床化

- ① 既にプロトタイプでも従来の増殖型アデノウイルス(CRA)を凌いでいたSurv.m-CRAを、m-CRA技術でさらに高性能化した。平成22年3月創業予定のベンチャーにて、製剤化の臨床試験を海外展開予定である。
  - ② RNAi搭載m-CRA、新規の治療分子搭載と、さらなる治療効果増強と基盤技術の発展が期待できる。
  - ③ 新しいアデノウイルス濃縮術は本研究に限らず、遺伝子治療全般に有用な成果となる。またこのシステムで、新たなアデノウイルスのターゲット分子機構を解明するきっかけとなることも期待できる。例えば、癌（幹）細胞に効率的に感染するm-CRA開発へと発展する意義を持つ。
2. 癌の染色体異常標的型の新m-CRAの開発  
新たに開発した二種類のカンサ治療薬も同様の戦略で臨床化が期待される。
  3. 癌幹細胞を標的・治療するm-CRAの開発  
非常に少ないpopulationとして癌幹細胞が存在し、これが癌の治療抵抗性や予後不良に繋がっていると推測され、現在世界中で実体解明と治療法の開発の研究が行われている。本年度はCD133を中心に検討したが、CD133陽性、陰

性の両分画で同様の高い遺伝子導入効率と、効率よいウイルス増殖作用がみられた。最近、CD133は癌幹細胞のマーカーではないのではないかとの報告もなされているように、CD133の意義も議論が多い。この点も含め次年度はさらに詳細に解析していく。また、他の分担研究者の成果（國貞のSphere法、瀬戸口の独自のマーカー）も取り入れ、他のマーカーで分離濃縮された癌幹細胞と思われる分画に対しても、このm-CRA治療の油溶性を検証していく。

## E. 結論

Surv.m-CRAの臨床応用を確実に進めていくとともに、来年度、挑戦的な癌幹細胞に対するm-CRA治療の研究をまとめる。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 室伏善照, 小戩健一郎: 革新的癌治療薬となる遺伝子・ウイルス治療薬と肝疾患への再生医療. ケミカルエンジニアリング, 54 (1), 32-38, 2009
- 2) 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
- 3) 堀川良治, 小宮節郎, 小戩健一郎: 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) Murofushi Y, Nagano S, Komiya S and Kosai K.: Conditionally replicating adenovirus regulated with 4 independent cancer-specific factors enhances cancer-specificity without reducing potent anti-cancer effect; the importance of E1B promoter. The American Society of Gene Therapy's 11th Annual Meeting, May 28-Jun 1, 2008 (Boston, USA)
- 2) 小戩健一郎.: 多因子でウイルス増殖制御/癌特異化するアデノウイルス (m-CRA) の開発と治療応用を目指して. (国内・特別講演) 第12回 日本神経ウイルス研究会学術集会. 2008年7月17-19日 (屋久島)

3) 小戩健一郎.: 癌への遺伝子・ウイルス治療薬と肝疾患への再生医療. 南九州発新技術説明会, 2008年11月13-14日 (東京)

4) 小戩健一郎.: 1.癌への革新的なウイルス/遺伝子治療薬 2.肝疾患の再生治療薬. イノベーション・ジャパン 2008-大学見本市. 2008年9月16-18日 (東京)

5) 小戩健一郎.: 遺伝子治療と再生医学: 独自のベクター技術を中心に. 久留米大学分子生命科学研究所開設20周年記念セミナー(2) 2009年2月13日 (福岡)

6) 小戩健一郎.: 遺伝子治療と再生医療 -高血圧・心疾患の新しい治療戦略-. (国内・特別講演) 第二十七回 二十一人の会, 2008年10月7日 (鹿児島)

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

### 1. 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: 小戩健一郎、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: 小戩健一郎、神岡純一、永野聡

出願人: 小戩健一郎

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、日本へ指定国移行中

3. 新たな増殖制御型アデノウイルス (仮題)  
特許出願準備中。

### 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

研究分担者 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、独自開発した、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・効率的な作製技術（Nagano S, et al., *Gene Ther*, 2005）を基盤として、革新的な癌遺伝子治療法となりうる種々の新規m-CRAの開発を目的とする。

我々はこれまでに、種々の「E1領域の4因子制御型m-CRA」、これ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」の開発と評価、また既報告のSurvivin依存性m-CRA（Surv.m-CRA）（Kamizono J, et al., *Cancer Res*, 2005）を軸とした「7因子制御型m-CRA」の開発、さらに新たな発想に基づいた「癌の染色体異常」を標的治療する種々の新規m-CRAの開発を進めてきた。

本年度は、昨年度に引き続き、1)「7因子制御型m-CRA」の開発に向けた変異ファイバー型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、ウイルス学的、腫瘍学的評価と有用性の検討、本年度からの3)「癌幹細胞」を標的治療する新規m-CRAの作製、を順次進めているところである。

A. 研究目的

我々はこれまでに、1) 種々の4因子制御型ならびに6因子制御型m-CRAの開発とウイルス学的、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。特に、高い癌特異性および癌治療効果を示したSurvivin promoterを用い、E1B promoterを別の癌特異的promoter（TERT, E2F, CEA, OC）に改変した4因子制御型Surv.m-CRA、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の作製と評価を順次進め、成果を得てきた。また、2) 新たな発想に基づいた「癌の染色体異常」を標的治療する種々の新規m-CRAの開発に向け、染色体制御に関与する新規分子の癌特異性を示し、癌の染色体異常を標的とするm-CRA戦略の有用性を示唆する成果を得てきた。

本年度は、有用性が示された上記のm-CRAのうち、最も臨床化に適したものを検討し、それを基盤として、癌細胞特異的な感染効率の向上を可能とするRGD変異ファイバー化を進め、「7因子制御型m-CRA」の開発を目的とする。また、「癌の染色体異常」を標的治療する新規m-CRAの開発とウイルス学的、腫瘍学的な詳細な評価と有用性の検討を目的とする。さらに、我々は、癌の抗癌剤耐性や再発の根源とされる「癌幹細胞」を標的治療する新規のm-CRAの開発に向け、癌幹細胞マーカーとされる分子に注目し、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

独自開発した、3プラスミドのパーツ化からなるm-CRA作製技術を基盤として、これまでに有用性が示された4因子制御型Surv.m-CRAならびに6因子制御型m-CRAのうち、最も臨床化に適したものから順次、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アデノウイルスバックボーンに組換え、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. 最適な内因性コントロールを選択し、real-time PCR解析による多種の癌細胞および正常細胞における内因性mRNA発現レベルの解析を再度行う。
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用いて、各種細胞におけるpromoterの発現強度と特異性の*in vitro*解析を再度行う。
3. 各分子のpromoterによりE1A発現制御する新規m-CRAを用いて、各種細胞における*in vitro*でのウイルス特性、癌特異性と癌治療効果等の評価を行い、新規m-CRAの有用性の検討を行う。

3) 「癌幹細胞」を標的治療する新規m-CRAの開発  
独自開発したm-CRA作製技術を基盤として、癌幹細胞マーカーとされる分子のpromoterによりE1A発現制御する新規m-CRAの作製を行う。

## C. 研究結果

### 1) 「7因子制御型m-CRA」の開発

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Surv.m-CRAからRGD変異ファイバー型Surv.m-CRA (5因子制御型m-CRA)を順次作製を進め、一部評価も進めている。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については、これまでの評価と有用性を検討し、RGD変異ファイバー型m-CRA (7因子制御型m-CRA) を順次作製を行うところである。

### 2) 「癌の染色体異常」を標的治療する新規m-CRAの開発

1. 最適な内因性コントロールを選択し、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解析を再行した結果、各分子とも多くの癌細胞と正常細胞の間で発現レベルに差がみとめられ、癌特異性の再現性が得られた。

2. 肝癌細胞 (HepG2)、骨肉腫細胞 (HOS-MNNG)、正常繊維芽細胞 (WI-38)における各分子のpromoterによりLacZ発現制御する非増殖型アデノウイルスによるreporter gene assayを再行した結果、正常細胞では発現がみられず、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の再現性が得られた。

3. 各分子のpromoter制御型新規m-CRAはいずれもpromoter活性に相関して、癌細胞において高い癌特異性と癌治療効果が期待できる成果が得られた。しかし、正常細胞におけるさらなる詳細な検討は必要である。

### 3) 「癌幹細胞」を標的治療する新規m-CRAの開発

癌幹細胞マーカーとされる分子のpromoterによりE1A発現制御する新規m-CRAの作製を行うところである。

## D. 考察

1) 「7因子制御型m-CRA」の開発については、最大7因子制御型-CRAの作製に向けて、独自開発したm-CRA作製技術を基盤として、これまでに成果が得られた多種のm-CRA (4因子制御型Surv.m-CRAあるいは6因子制御型m-CRA) のRGD変異ファイバー型m-CRAへの改変は、順次効率よく、順調に行うことができていると考える。

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活性解析の再行の結果、いずれも癌細胞と正常細胞間で顕著な差がみられて再現性が得られ、染色体制御に関与する新規分子の癌特異性が確認された。さらに、各分子のpromoter制御型新規m-CRAの癌特異性と癌治療効果の成果より、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。

さらに、3) 「癌幹細胞」を標的治療する新規m-CRAの開発については、独自開発したm-CRA作製技術を基盤として、新規m-CRAの作製を効率よく進めることができると考える。

## E. 結論

本年度は、本研究の目的とする革新的な癌遺伝子治療法の開発に向けて、m-CRA化戦略の有用性のさらなる検討と新規m-CRAの開発を着実に進めることができ、臨床化に向けた来年度への研究の発展につながる成果が得られたものと思われる。

m-CRA作製技術を有する我々が推し進めるm-CRA化戦略は、今後さらなる詳細な評価と有用性の検討を重ねることにより、革新的な癌遺伝子治療法の確立、さらには臨床化につながるものと期待される。

## F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 室伏善照, 小賤健一郎: 革新的癌治療薬となる遺伝子・ウイルス治療薬と肝疾患への再生医療。ケミカルエンジニアリング, 54 (1), 32-38, 2009

### 2. 学会発表

1) Murofushi Y, Nagano S, Komiya S and Kosai K.: Conditionally replicating adenovirus regulated with 4 independent cancer-specific factors enhances cancer-specificity without reducing potent anti-cancer effect; the importance of E1B promoter. The American Society of Gene Therapy's 11th Annual Meeting, May 28-Jun 1, 2008 (Boston, USA)

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

1) 癌の染色体異常を標的治療する新規m-CRAに関する特許出願予定

### 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

研究分担者 小宮 節郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科（整形外科）・教授  
研究協力者 堀川 良治 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科（整形外科）・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

骨肉腫にたいする治療法は、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や前立腺癌細胞にも発現がみられる）のプロモーターをアデノウイルスの増殖制御に関わるE1遺伝子領域に組み込み、骨肉腫への特異性を高めた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のプロモーターをアデノウイルスの増殖制御に関わるE1Aのプロモーターと置き換え、同じく増殖制御に関わるE1B遺伝子を腫瘍特異的に改変したm-CRA(X-CRA)

と、E1Aプロモーターを以前報告したサバイビンプロモーター、E1BプロモーターをXのプロモーターにそれぞれ置き換えたm-CRA(Surv.X-CRA)を新しく作成し、in vitro (①～③)、in vivo (④)の研究を行った。

① HOS-MNNG、KHOS-NP、MG-63、SaOS-2（骨肉腫細胞）、PC-3、DU145（前立腺癌細胞）、WI-38（正常繊維芽細胞）に対するアデノウイルス導入効率の比較。

② 上記①に記した各細胞へX-LacZを導入することによるプロモーター活性の測定。

③ 上記①に記した各細胞に対するX-CRA、Surv.X-CRAの細胞傷害評価。

④ HOS-MNNGを皮下移植したヌードマウスに対し、X-CRA、Surv.X-CRAを投与することによる生体内での抗腫瘍効果評価。

C.研究結果

①MG-63、SaOS-2を除いて、いずれの細胞も高い導入効率を示した。

②HOS-MNNG、KHOS-NP、MG-63、PC-3、DU145において、Xプロモーターの活性が確認された。SaOS-2、WI-38でのプロモーター活性は確認できなかった。

③Xプロモーターの活性が確認されたHOS-MNNG、KHOS-NP、MG-63、PC-3、DU145にて、X-CRAの細胞傷害が確認された(MOI 5)。また、WI-38を除くすべての細胞で、Surv.X-CRA、Surv.CRAの細胞傷害が確認された。いずれのCRAもMOI 5ではWI-38には傷害を与えなかったが、MOI 10と濃度をあげたところSurv.X-CRA以外のウイルスで細胞傷害がみられた。

④コントロール群（PBS）と比較し、ウイルス投与群において有意に腫瘍体積の減少がみられた。

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、Surv.X-CRAはSurv.CRAと同等の腫瘍抑制効果を持ち、正常細胞に対する傷害が弱いことが示された。

現在の問題点として、ウイルスベクターのデリバリー方法が挙げられる。今回の研究ではマウスの皮下腫瘍に直接注入する手法を用いたが、転移巣の存在を考えると静注などの効率的な全身投与が必要に



なると思われる。

この問題をクリアすれば、腫瘍特異性をこれまでよりも高めたm-CRAの有用性は大変期待できるものになると考える。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Smurf2 induces ubiquitin-dependent degradation of Smurf1 to prevent migration of breast cancer cells. Fukunaga E, Inoue Y, Komiya S, Horiguchi K, Goto K, Saitoh M, Miyazawa K, Koinuma D, Hanyu A, Imamura T. *J Biol Chem.* 283(51):35660-7, 2008
- 2) CCAAT/enhancer-binding protein beta promotes osteoblast differentiation by enhancing Runx2 activity with ATF4. Tominaga H, Maeda S, Hayashi M, Takeda S, Akira S, Komiya S, Nakamura T, Akiyama H, Imamura T. *Mol Biol Cell.* 19(12):5373-86, 2008.
- 3) Radiographic predictors for the development of myelopathy in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament: a multicenter cohort study.  
Matsunaga S, Nakamura K, Seichi A, Yokoyama T, Toh S, Ichimura S, Satomi K, Endo K, Yamamoto K, Kato Y, Ito T, Tokuhashi Y, Uchida K, Baba H, Kawahara N, Tomita K, Matsuyama Y, Ishiguro N, Iwasaki M, Yoshikawa H, Yonenobu K, Kawakami M, Yoshida M, Inoue S, Tani T, Kaneko K, Taguchi T, Imakiire T, Komiya S. *Spine.* 33(24):2648-50, 2008
- 4) Extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 is a coupling factor for hypoxia and inflammation in arthritis. Hamada T, Torikai M, Kuwazuru A, Tanaka M, Horai N, Fukuda T, Yamada S, Nagayama S, Hashiguchi K, Sunahara N, Fukuzaki K, Nagata R, Komiya S, Maruyama I, Fukuda T, Abeyama K. *Arthritis Rheum.* 58(9):2675-85, 2008

- 5) Expression of apoptosis signal-regulating kinase 1 in mouse spinal cord under chronic mechanical compression: possible involvement of the stress-activated mitogen-activated protein kinase pathways in spinal cord cell apoptosis. Takenouchi T, Setoguchi T, Yone K, Komiya S. *Spine.* 33(18):1943-50, 2008
- 6) Efficacy of the third-generation bisphosphonate risedronate alone and in combination with anticancer drugs against osteosarcoma cell lines. Murayama T, Kawasoe Y, Yamashita Y, Ueno Y, Minami S, Yokouchi M, Komiya S. *Anticancer Res.* 28(4B):2147-54, 2008
- 7) Differential expression of GADD45beta in normal and osteoarthritic cartilage: potential role in homeostasis of articular chondrocytes. Ijiri K, Zerbini LF, Peng H, Otu HH, Tsuchimochi K, Otero M, Dragomir C, Walsh N, Bierbaum BE, Mattingly D, van Flandern G, Komiya S, Aigner T, Libermann TA, Goldring MB. *Arthritis Rheum.* 58(7):2075-87, 2008
- 8) Spinal cord infarction following endoscopic variceal ligation. Tofuku K, Koga H, Yamamoto T, Yone K, Komiya S. *Spinal Cord.* 46(3):241-2, 2008
- 9) Ossification of the posterior longitudinal ligament in dizygotic twins with schizophrenia: a case report. Matsunaga S, Koga H, Kawabata N, Kawamura I, Otusji M, Imakiire T, Komiya S. *Mod Rheumatol.* 18(3):277-80, 2008

2. 学会発表

- 1) 有島善也, 横内雅博, 上野和人, 馬場康貴, 林 完男, 瀬戸口啓夫, 川添泰臣, 上菌直弘, 小宮節郎 悪性軟部腫瘍の肺転移に対するラジオ波焼灼治療 第81回日本整形外科学会総会 札幌市 2008.5.22-25
- 2) 佐々木裕美, 瀬戸口啓夫, 廣津匡隆, 小宮節郎 骨肉腫におけるポリコム蛋白の発現と機能 第41回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 浜松市 2008.7.17-18
- 3) 廣津匡隆, 瀬戸口啓夫, 佐々木裕美, 小宮節郎 Hedgehog シグナル制御による骨肉腫の腫瘍増殖抑制効果と細胞周期制御 第41回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 浜松市 2008.7.17-18

- 4) 川添泰臣, 横内雅博, 上野宜功, 吉田浩己, 小宮節郎 マウス骨肉腫細胞に対する高気圧酸素を併用した新たな治療法についての検討 第41回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 浜松市 2008.7.17-18
- 5) 廣津匡隆, 瀬戸口啓夫, 佐々木裕美, 小宮節郎 Hedgehog シグナル制御による骨肉腫の腫瘍増殖抑制効果と細胞周期との関連 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 京都市 2008.10-23-24
- 6) 永野 聡, Yves Boucher, 小宮節郎 アポトーシス誘導型の前治療はウイルスベクターの拡散と癌遺伝子治療の効果を向上する 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 京都市 2008.10-23-24
- 7) 川添泰臣, 横内雅博, 上野宜功, 吉田浩己, 岩谷博明, 小宮節郎 高気圧酸素治療による骨肉腫細胞への apoptosis 効果についての検討 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 京都市 2008.10.23-24
- 8) 瀬戸口啓夫, 廣津匡隆, 永尾宗子, 佐々木裕美, 竹之内剛, 杉村和久, 小宮節郎 骨・軟部腫瘍における癌幹細胞の研究 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 京都市 2008.10.23-24
- 9) 佐々木裕美, 瀬戸口啓夫, 廣津匡隆, 小宮節郎 骨肉腫におけるポリコーム蛋白の発現とヒストンメチル化状態の検討 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 京都市 2008.10.23-24
- 10) 廣津匡隆, 瀬戸口啓夫, 松野下幸弘, 小宮節郎 Hedgehog シグナル制御による骨肉腫の腫瘍増殖抑制効果と細胞周期との関連性 第116回西日本整形・災害外科学会 宮崎市 2008.11-29-30
- 11) 瀬戸口啓夫, 廣津匡隆, 小宮節郎 骨肉腫における Hedgehog の発現と機能 BMB2008(第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会) 神戸市 2008.12-9-12

癌幹細胞の単離と機能解析

研究分担者 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

研究要旨

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を用いて腫瘍形成能力が高いSarcoma-initiating cell (SIC)の分離方法を開発し、遺伝子発現やSICの維持・増殖に関与する因子を検討した。（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

骨軟部肉腫細胞株から腫瘍形成能力が有意に高いSICを高発現している抗原Xの抗体を用いて分離を可能とした。またSICは定量的RT-PCRで未分化細胞マーカー高発現・分化マーカー低発現しており、正常幹細胞様の性質を持っていることが明らかとなった。無血清培地でこの細胞株を培養するとはbFGFがSICの維持・増殖に必須の因子であった。またCNTFを培養液に加えると、SICの割合が著明に減少することが示された。この骨軟部肉腫の患者の組織での抗原Xの発現を検討したところ定量的RT-PCRでGene Xは患者腫瘍組織中で高発現していることが確認された。また免疫染色において患者組織の一部の細胞が抗原Xをheterogenousに発現していることが示された。

D. 考察

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がん幹細胞特異的新規

治療法開発を目指す。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Expression of apoptosis signal-regulating kinase 1 in mouse spinal cord under chronic mechanical compression: possible involvement of the stress-activated mitogen-activated protein kinase pathways in spinal cord cell apoptosis Takenouchi T, Setoguchi T, Yone K, Komiya S. Spine. 2008 Aug 15;33(18):1943-50.
- 2) Stem cell factor prevents neuronal cell apoptosis after acute spinal cord injury. Yamasaki K, Setoguchi T, Takenouchi T, Yone K, Komiya S. Spine. 2009 Feb 15;34(4):323-7.
- 3) Inhibition of Notch pathway prevents osteosarcoma growth by cell cycle regulation. Tanaka M., Setoguchi T, Hirotsu M., Gao H., Sasaki H., Matsunoshita Y., Komiya S. British Journal of Cancer 2009 in press

2. 学会発表

- 1) 日本整形外科基礎学術集会 10月23-24日  
骨軟部腫瘍におけるがん幹細胞の研究  
瀬戸口啓夫 他

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
予定
2. 実用新案登録  
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

分担研究者と研究協力者は、本研究課題において、細胞生物学的解析の全般を行っている。これについては研究代表者、ならびに分担研究者室伏らの報告に一括して記載した。併せて、本課題で遺伝子導入系について新たな試みを行ってきたので、本稿ではその成果について記載する。特に眼球をモデルとして、超音波やマイクロバブル(以下MB)を組み合わせた新しい遺伝子導入法について、遺伝子導入効率、および安全性について検討した。

A. 研究目的

近年、超音波を利用した薬物治療や、遺伝子導入法は注目を集めている。このデリバリーシステムのメカニズムは、超音波照射時に発生する小さな気泡によるキャビテーション効果が、細胞膜の構造を変化させることで膜透過性が亢進し、細胞周囲の物質が効率的に取り込まれるようになると考えられている。さらに、マイクロバブル(以下MB)を併用することによって、細胞への物質の取り込みがより効率的になることも分かっている。このMBとは、ガスによる構成されたマイクロサイズの泡をさす。今回網膜をモデルとして遺伝子導入について検討した。

B. 研究方法

ウィスターラットの硝子体腔に33G針を用いてルシフェラーゼプラスミドを10 $\mu$ l注射し、超音波照射装置(ソニトロン 2000<sup>TM</sup>)を使用して角膜から各種条件ごとに超音波を照射した。さらに、MB(オプチゾン<sup>TM</sup>)を付加し、同様に実験を行った。摘出した眼球の網膜をホモジナイズし得られたサンプルを用いて、ルシフェラーゼアッセイを施行し、注射群、超音波群、超音波MB併用群について遺伝子導入効率を判定した。網膜への遺伝子導入部位を調べるため、抗ルシフェラーゼ抗体による免疫染色を行った。さらに、サーモグラフィやH.E.染色による組織への安全性についても検討した。

動物実験は、鹿児島大学動物実験倫理規定に基づき行った。

C. 研究結果

プラスミド硝子体注射群、超音波照射群では軽度の網膜への遺伝子導入効果を認めた。最も効率的に遺伝子導入が行われたのは、超音波照射(1MHz、2w/cm<sup>2</sup>、duty cycle 50%、240秒)にMBを併用した群であった。免疫染色では、プラスミド単独群、超音波照射群ではほとんど陽性所見は認められなかったが、MB併用群では網膜神経節線維層、内顆粒層といった硝子体腔に近い層に多くの陽性所見を認めた。また、今回の超音波条件では組織学的な異常はなく、サーモグラフィでも超音波照射部の温度も37度を超えなかった。

D. 考察

硝子体腔に近い網膜の層に、強く遺伝子導入がなされていたことと、MB併用群が有意に導入効率が高かったことから、超音波とMBの併用によって網膜のバリア機能を可逆的に変化させ、網膜への効率的な遺伝子導入がなされた可能性が高い。

E. 結論

超音波照射およびMBによって効率的なラット網膜への遺伝子導入が可能であった。このデリバリー法による新たな治療法の開発につながる可能性がある。これを基盤に、本研究のm-CRAの遺伝子導入にも将来的に応用できる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 Apr;145(4):676-681.
- 2) Hirakawa M, Tanaka M, Tanaka Y, Okubo A, Koriyama C, Tsuji M, Akiba S, Miyamoto K, Hillebrand G, Yamashita T, **Sakamoto T**: Age-related maculopathy and sunlight exposure evaluated by objective measurement. *Br J Ophthalmol.* 2008 May;92(5):630-4.
- 3) Yamakiri K, **Sakamoto T**, Noda Y, Nakahara M, Ogino N, Kubota T, Yokoyama M, Furukawa M, Ishibashi T: One-year results of a multicenter controlled clinical trial of triamcinolone in pars plana vitrectomy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2008 Jul;246(7):959-66.
- 4) Arimura N, Ki-i Y, Hashiguchi T, **Sakamoto T**, Maruyama I: High-mobility group box 1 protein in endophthalmitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2008 Jul;246(7):1053-8.
- 5) Nakao K, Shimonagano Y, Doi N, **Sakamoto T**: Reply to comment by S. Kase and N. Rao regarding our publication "Conjunctival nodules associated with Vogt-Koyanagi-Harada disease". *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 246:325-326, 2008
- 6) Okubo A, Hirakawa M, Ito M, Sameshima M, **Sakamoto T**: Clinical features of early and late stage polypoidal choroidal vasculopathy characterized by lesion size and disease duration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* Apr;246(4):491-9, 2008.
- 7) Yamashita T, Uemura A, Kita H, **Sakamoto T**: Long-term outcomes of visual field defects after indocyanine green-assisted macular hole surgery. *Retina* (in press)
- 8) Shimura M, Nakazawa T, Yasuda K, Shiono T, Iida T, **Sakamoto T**, Nishida K: Comparative therapy evaluation of intravitreal bevacizumab and triamcinolone acetonide on persistent diffuse diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol.* 2008 May;145(5):854-61.
- 9) 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: 眼科領域におけるシリコンオイル使用状況全国調査結果. *日本眼科学会雑誌*112(9) 790-800.2008
- 10) Masuyama K, Yamakiri K, Arimura N, Sonoda Y, Doi N, **Sakamoto T**: Posturing time after macular hole surgery modified by OCT images: A pilot study. *Am J Ophthalmol*(in press)
- 11) Arimura N, Otsuka H, Yamakiri K, Sonoda Y, Nakao S, Noda Y, Hashiguchi T, Maruyama I, **Sakamoto T**. Vitreous Mediators after Intravitreal Bevacizumab or Triamcinolone Acetonide in Eyes with Proliferative Diabetic Retinopathy. *Ophthalmology* (in press)
- 12) Okubo A, Abematsu N, **Sakamoto T**: 「Nasal and independent polypoidal lesions in polypoidal choroidal vasculopathy」 *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009 Mar;247(3):421-5.
- 13) Masuyama K, Yamakiri K, Arimura N, Sonoda Y, Doi N, **Sakamoto T**: 「Posturing time after macular hole surgery modified by optical coherence tomography images: a pilot study」 *Am J Ophthalmol.* 2009 Mar;147(3):481-488.
- 14) Arimura N, Ki-i Y, Hashiguchi T, Kawahara K, Biswas KK, Nakamura M, Sonoda Y, Yamakiri K, Okubo A, **Sakamoto T**, Maruyama I: 「Intraocular expression and release of high-mobility group box 1 protein in retinal detachment」 *Lab Invest.* 2009 Mar;89(3):278-89.
- 15) 大井城一郎, 山切啓太, 園田恭志, 坂本泰二: 「2種類の光干渉断層計を用いて観察した外傷性低眼圧黄斑症の1例」 *あたらしい眼科* 26(1):117-20,2009

- 16) 土居範仁, 坂本泰二: 「タンポナーデ物質の種類と概要」眼科手術 22(1):11-14,2009
- 17) 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血管新生緑内障の3例」あたらしい眼科 26(1):113-116,2009
2. 学会発表
- 1) 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」第112回日本眼科学会総会(パシフィコ横浜・横浜市) 2008年4月17~20日
- 2) 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」第112回日本眼科学会総会(パシフィコ横浜・横浜市) 2008年4月17~20日
- 3) 山下敏史, 園田祥三, 園田恭志, 坂本泰二: 「超音波血栓溶解療法の眼科応用の検討」第112回日本眼科学会総会(パシフィコ横浜・横浜市) 2008年4月17~20日
- 4) 山下高明, 児玉祐一, 河野嘉文, 坂本泰二: 「小児急性リンパ性白血病の維持療法によるステロイド緑内障」第112回日本眼科学会総会(パシフィコ横浜・横浜市) 2008年4月17~20日
- 5) Shimura M, Nakazawa T, Yasuda K, Shiono T, Iida T, Sakamoto T, Nishida K: 「Comparative Therapy Evaluation of Intravitreal Bevacizumab and Triamcinolone Acetonide on Persistent Diffuse Diabetic Macular Edema」 The Association for Reseach in Vision andophthalmology(Fort Lauderdale,U.S.A)April27~May1,2008
- 6) Masuyama K, Yamakiri K, Sonoda Y, Doi N, Sakamoto T: 「Macular Hole Closure in GasFilled Eyes at Early Post-Operative Time Proven by Fourier-Domain Optical Coherence Tomography」 The Association for Reseach in Vision andophthalmology(Fort Lauderdale,U.S.A)April27~May1,2008
- 7) Arimura N, Ki-i Y, Sonoda Y, Yamakiri K, Hashiguchi T, Maruyama I, Sakamoto T: 「High-Mobility Group Box 1 Protein in Endophthalmitis」 The Association for Reseach in Vision andophthalmology(Fort Lauderdale,U.S.A)April27~May1,2008
- 8) Yamashita T, Kodama Y, Kawano Y, Sakamoto T: 「Intraocular Pressure Profile of Children With Acute Lymphoblastic Leukemia on a Systemic Corticosteroid」 The Association for Reseach in Vision andophthalmology(Fort Lauderdale,U.S.A)April27~May1,2008
- 9) Otsuka H, Arimura N, Ki-I Y, Yamakiri K, Doi N, Hashiguchi T, Maruyama I, Sakamoto T: 「Concentration of Cytokines After Intravitreal Injection of Bevacizumab or Triamcinolone」 The Association for Reseach in Vision andophthalmology(Fort Lauderdale,U.S.A)April27~May1,2008
- 10) 坂本泰二, 山下敏史, 園田祥三, 立花克郎: 「超音波による眼科領域疾患に対する治療の可能性」日本超音波医学会 第81回学術集会(神戸国際展示場・神戸市) 2008年5月23日
- 11) 大井城一郎, 山切啓太, 園田恭志, 坂本泰二: 「2種類の光干渉断層系を用いて比較した外傷性低眼圧黄斑症の1例」第78回九州眼科学会(別府コンベンションセンター・別府市) 2008年5月30日
- 12) 斎藤司朗, 内野英輔, 坂本泰二, 川島雅樹, 松根彰志: 「眼窩深部に発生した嚢胞状病変の一例」第78回九州眼科学会(別府コンベンションセンター・別府市) 2008年5月30日
- 13) 寺崎寛人, 山下高明, 有村 昇, 坂本泰二: 「無虹彩症に水晶体融解を合併した緑内障の1例」第78回九州眼科学会(別府コンベンションセンター・別府市) 2008年5月31日
- 14) Sakamoto T: 「Possible role of high-mobility group box 1protein(HMGB1)in retinal diseases」 World Ophthalmology Congress 2008 (Hong Kong Convention&Exhibition Center,Hong Kong), June 28~July2,2008
- 15) Nakao K, Mizushima Y, Goh N, Abematsu N, Sakamoto T: 「Anterior ischemic optic neuropathy associated with Vogt-Koyanag-Harada disease」 World Ophthalmology Congress 2008 (Hong Kong Convention&Exhibition Center,Hong

- Kong) June28~July2,2008
- 16) Okubo A, Abematsu N, Hirakawa M, **Sakamoto T**: 「Benign natural course of a patient with polypoidal vasculopathy observed over a five-year period」 World Ophthalmology Congress 2008 (HongKong Convention&Exhibition Center,Hong Kong) June28~July2,2008
  - 17) 尾辻 太, 精松徳子, 中尾久美子, **坂本泰二**: 「急速に失明に至った悪性腫瘍随伴網膜症の1例」スリーサムイン福岡(福岡国際会議場・福岡市) 2008年7月4日
  - 18) 精松徳子, 水島由佳, 中尾久美子, **坂本泰二**, 今中啓之: 「インフリキシマブが有効であった小児サルコイドーシスの2例」スリーサムイン福岡(福岡国際会議場・福岡市) 2008年7月6日
  - 19) **坂本泰二**: 「黄斑円孔のうつ伏せ体位期間の考察」3rd OWHS Summer School (ホテルグリーンパーク津・三重県津市) 2008年8月15日
  - 20) **坂本泰二**: 「黄斑円孔手術後の考察」Japan Macula Club 第10回総会(蒲都市プリンスホテル・蒲都市) 2008年8月23日
  - 21) 山下高明, 田中 実, 土屋有希, **坂本泰二**: 「強膜が菲薄化した外傷性緑内障に線維柱帯切除術を施行した1例」第19回日本緑内障学会(グランキューブ大阪・大阪市) 2008年9月12~13日
  - 22) 田中 実, 山下高明, 園田恭志, **坂本泰二**: 「25ゲージ還流システムを用いた無硝子体眼に対する線維柱帯切除術の検討」第19回日本緑内障学会(グランキューブ大阪・大阪市) 2008年9月13日
  - 23) **坂本泰二**, 益山京子, 有村 昇, 山切啓太, 土居範仁, 園田恭志: 「手術直後の黄斑円孔所見」第13回眼創傷治癒研究会(東京国際フォーラム・東京都) 2008年10月23日
  - 24) 大塚寛樹, 有村 昇, 山切啓太, 橋口照人, 丸山征郎, **坂本泰二**: 「非虚血性眼疾患における硝子体中SDF-1濃度」第13回眼創傷治癒研究会(東京国際フォーラム・東京都) 2008年10月23日
  - 25) 中尾久美子, 精松徳子, 水島由佳, **坂本泰二**: 「鹿児島における内眼炎発症の季節変動」第62回日本臨床眼科学会(東京国際フォーラム)2008年10月26日
  - 26) 精松泰子, 藤田敦子, 内野英輔, **坂本泰二**: 「鹿児島県におけるアカントアメーバ角膜炎発症の季節変動」第62回日本臨床眼科学会(東京国際フォーラム) 2008年10月24日
  - 27) 吉永就正, 大久保明子, 精松徳子, **坂本泰二**: 「ポリリーブ状脈絡膜血管症に対するトリアムシノロン硝子体内投与」第62回日本臨床眼科学会(東京国際フォーラム) 2008年10月24日
  - 28) 山切啓太, 尾辻 太, 園田恭志, 土居範仁, **坂本泰二**: 「血管新生緑内障に対するベバシズマブの使用の有無による硝子体手術成績の比較」第62回日本臨床眼科学会(東京国際フォーラム) 2008年10月24日
  - 29) 園田恭志, 山切啓太, **坂本泰二**: 「トリアムシノロン硝子体注入直後に中心窩網膜厚が減少した3例」第62回日本臨床眼科学会(東京国際フォーラム) 2008年10月24日
  - 30) 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開放性眼外傷症例」第62回日本臨床眼科学会(東京国際フォーラム) 2008年10月24日
  - 31) 白澤 誠, 山切啓太, 久保田秀紀, **坂本泰二**: 「後部硝子体剥離に伴って中心窩下視細胞層が断裂したと考えられた1例」第62回日本臨床眼科学会(東京国際フォーラム) 2008年10月24日
  - 32) 志村雅彦, 安田佳奈子, 中澤 徹, 塩野 貴, 阿部俊明, 西田幸二, **坂本泰二**: 「網膜静脈分枝閉塞に対する治療別成績の比較検討」第62回日本臨床眼科学会(東京国際フォーラム) 2008年10月23日
  - 33) 鶴木一彦, 有馬知子, 牧内玲子, 鶴木滋子, 田中 実, **坂本泰二**: 「上方視神経低形成40例の眼底像」第62回日本臨床眼科学会(東京国際フォーラム) 2008年10月24日
  - 34) Okubo A, Abematsu N, **Sakamoto T**: Nasal and independent polypoidal lesions in polypoidal choroidal vasculopathy. The first joint meeting of Korea-China- Japan Ophthalmologists (Seoul, Korea) November 1-2, 2008
  - 35) 尾辻 太, 山切啓太, **坂本泰二**: 「滲出性網膜剥離を伴ったCoats病に対しbevacizumab硝子体注射が有効であった1例」第47回日本網膜硝子体学会総会 第25回日本眼循環学会 合同学会(国立京都国際会館・京都市) 2008年11月29日
  - 36) 大久保明子, 精松徳子, **坂本泰二**: 「ポリリーブ状

脈絡膜血管症の長期自然経過」 第47回日本網  
膜硝子体学会総会 第25回日本眼循環学会合同  
学会(国立京都国際会館・京都市) 2008年11月2  
9日

- 37) 有村 昇, 喜井裕哉, 橋口照人, 川原幸一, 中村  
誠, 園田恭志, 山切啓太, 大久保明子, 丸山征  
郎, 坂本泰二:「網膜剥離における視細胞死とH  
igh-mobility group box 1 Protein」厚生労働省難  
治性疾患克服研究事業 網膜脈絡膜・視神経萎  
縮症調査研究班 平成20年度会議(名古屋市立  
大学・名古屋市) 2009年1月16日
- 38) 大久保明子, 精松徳子, 有村 昇, 坂本泰二:  
「ポリープ状脈絡膜血管症の長期自然経過」厚  
生労働省難治性疾患克服研究事業 網膜脈絡  
膜・視神経萎縮症調査研究班 平成20年度会議  
(名古屋市立大学・名古屋市) 2009年1月17日
- 39) 藤田敦子, 内野英輔, 大塚寛樹, 有村 昇, 坂本  
泰二:「涙液サイトカイン濃度から見た23G硝  
子体手術と20G硝子体手術との術後炎症の差」  
第32回日本眼科手術学会総会(ポートピアホテ  
ル, 神戸国際展示場・神戸市) 2009年1月23日
- 40) 土居範仁, 園田恭志, 白澤 誠, 芳原直也, 堂園  
貴保子, 坂本泰二:「糖尿病黄斑症に対する治  
療:硝子体手術とtriamcinolone硝子体内注入との  
比較」第32回日本眼科手術学会総会(ポートピ  
アホテル, 神戸国際展示場・神戸市) 2009年1  
月23日
- 41) 芳原直也, 山切啓太, 大久保明子, 坂本泰二:  
「滲出性加齢黄斑変性の沈静化に硝子体手術が  
奏功したと思われる2例」第32回日本眼科手術学  
会総会(ポートピアホテル, 神戸国際展示場・  
神戸市)

#### 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)

眼球組織への生理活性薬剤導入のための組成物お  
よび装置。

出願番号 特許2005-221346

##### 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20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解明

研究分担者 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 佐藤昌紀 鹿児島大学 大学院理工学研究科・D3  
 研究協力者 張 旭 鹿児島大学 大学院理工学研究科・M2

研究要旨

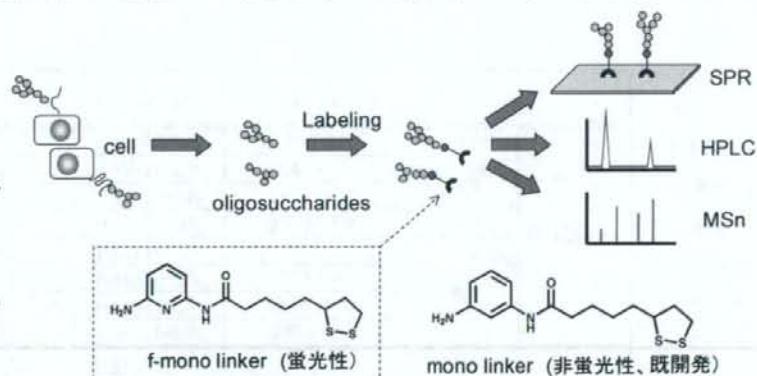
数ナノメートルの大きさのオリゴ糖鎖は、生体内で多彩な機能を示し、生命現象に不可欠な役割を有する [1]。我々は糖鎖の機能を分子レベルで簡便に調べるためのツールとして「シュガーチップ」及び糖鎖固定化金ナノ粒子「SGNP」を開発している [2-8]。本研究では、昨年度に引き続き、これらのナノバイオデバイスを用いて、新たな癌細胞表層の糖鎖解析を行うことを目的とした。さらに今年度は、ウイルスベクターの糖鎖結合特性をシュガーチップで解析したのち、選択した糖鎖を固定化したSGNPによってウイルスベクターの効率的な濃縮を検討した。

A. 新たな癌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、昨年度に引き続き鹿児島大学医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SIT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、昨年度行った研究から現存の試薬を使用している研究を効率的に進めることができなかつたため、細胞から得られる微量の糖鎖のラベル化、質量分析による構造解析と抗体スクリーニ

ングのための糖鎖固定化チップ（シュガーチップ）の作製を同時に達成する新規蛍光性リンカー化合物（f-mono）を開発した(図1参照)。f-monoは



特願 2008-108561

図1. 新規リンカー化合物 f-mono

励起波長315 nm、発光波長380 nmで蛍光を発生し、従来の固定化リンカー(mono)

をもちいた時に比べて千分の1量の微量糖鎖をHPLCで分析でき、MS/MSによる糖鎖の構造解析が可能であり、かつ非特異吸着をほとんど無視できるシュガーチップを作成することができた。このf-monoを用いて、SIT細胞株とMOLT-4細胞株間の糖鎖の差を検討したところ、HPLC分析で、少なくとも4つのピークがSIT細胞株に特異的であることがわかった。現在、それら糖鎖f-mono複合体の単離とそれらのMS/MS解析による糖鎖推定を行っている。

### B. ウイルスペクターの糖鎖結合活性

小財教授からご提供頂いた2種類のアデノウイルススペクター、Ad.CA-EGFPならびにAd.EGFP-RGDの糖鎖結合活性をアレイ型のシュガーチップで調べた。その結果、両ペクター間で糖鎖の結合パターンに差はみられなかったが、X、Yに結合し、特にZへの結合度が高いことが判った。

### C. SGNPによるウイルススペクターの濃縮

Cの結果から、Zを固定化したSGNPを調製し、アデノウイルススペクターAd.CA-EGFPの濃縮を試み、昨年度開発したリアルタイムPCRを用いたシステム(図2)に

添加しない時を1として、SGNPの添加効果を比較すると、ウイルス濃度が高いときには濃縮はかからなかったが、ウイルス濃度を下げると濃縮効率は高くなり、このウイルスペクターがSGNPによって濃縮可能であることが明確となった。



図2. リアルタイムPCRを用いたウイルス濃縮度の測定システム

表1 SGNPによるウイルスペクターの濃縮

		Virus Dilution	Detection	Ct	Concentrating Factor $2^{-(Ct(-SGNP)-Ct)}$
+ SGNP	ppt	× 1/4	Ad-Hexon	15.2	0.9
		× 1/40	Ad-Hexon	12.4	2.8
		× 1/400	Ad-Hexon	9.8	26.6
		× 1/4000	Ad-Hexon	12.1	37.6
	sup	× 1/4	Ad-Hexon	15.1	1.0
		× 1/40	Ad-Hexon	16.0	0.2
		× 1/400	Ad-Hexon	19.0	0.0
		× 1/4000	Ad-Hexon	22.8	0.0
- SGNP	× 1	Ad-Hexon	17.0		
	× 1/4	Ad-Hexon	15.1	1	
	× 1/40	Ad-Hexon	13.9	1	
	× 1/400	Ad-Hexon	14.5	1	
	× 1/4000	Ad-Hexon	17.3	1	
	negative control	Ad-Hexon	Undetermined		

かけて、濃縮度を算定した(表1)。SGNPを

D. 参考文献

- [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、マイケルソペール、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、マイケルソペール、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

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wakao M, Saito A, Ohishi K, Kishimoto Y, Nishimura T, Sobel M, Suda Y. Sugar Chips immobilized with synthetic sulfated disaccharides of heparin/heparan sulfate partial structure. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18(7):2499-2504 2008.
- 2) Imamura A, Yoshikawa T, Komori T, Ando M, Ando H, Wakao M, Suda Y, Ishida H, Kiso M. Design and synthesis of versatile ganglioside probes for carbohydrate microarrays. *Glycoconjugate J.*, 25(3):269-278, 2008.
- 3) Baba M, Okamoto M, Hamasaki T, Horai S, Wang X, Ito Y, Suda Y, Arima N. Highly enhanced expression of CD70 on human T-lymphotropic virus type 1-carrying T-cell lines and adult T-cell leukemia cells. *J. Virol.*, 82(8):3843-3852, 2008.
- 4) Nakamura-Tsuruta S, Kishimoto Y, Nishimura T, Suda Y, One-Step Purification of Lectins from Banana Pulp Using Sugar-immobilized Gold Nano-Particles (SGNPs). *J. Biochem.*, 143(6): 833-839, 2008.
- 5) Fukase Y, Fujimoto Y, Adachi S. Suda Y, Kusumoto S, Fukase K. Synthesis of Rubrivivax gelatinosus Lipid A and Analogues for Investigation of the Structural Basis for Immunostimulating and Inhibitory Activities. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 81(7):796-819, 2008.
- 6) Sato M, Ito Y, Arima N, Baba M, Sobel M, Wakao, M, Suda Y, High sensitivity analysis

of naturally occurring sugar-chains, using a novel fluorescent linker molecule. *The Journal of Biochemistry*, in press.

## 2. 学会発表 (シンポジウムなど)

- 1) 隅田泰生 (招待講演), シュガーチップと糖鎖固定化金ナノ粒子(SGNP): 糖鎖と蛋白質やウイルスとの結合相互作用を解析するための新しい分析ツール. 第12回日本神経ウイルス研究会, 屋久島, 2008年7月17日-19日.
- 2) 小幡瑠美, 近藤宇男, 酒見千穂, 鶴田 (中村) 祥子, 満下宣子, 西村知晃, 若尾雅広, 隅田泰生, コンドロイチン硫酸二糖構造の合成とシュガーチップ化ならびに相互作用解析. 第28回日本糖質学会年会, つくば, 2008年8月18日-20日.
- 3) 齊藤彰寛, 大石 紘, 出口弘史, 馬渡 彩, 山口憂三, 春山まみ, 満下宣子, 西村知晃, Errol S. Wijelath, M. Sobel, 若尾雅広, 隅田泰生, ヘパリン/ヘパラン硫酸部分二糖構造の合成研究(II). 第28回日本糖質学会年会, つくば, 2008年8月18日-20日.
- 4) 若尾雅広, 下釜宏美, 田中小代里, 隅田泰生, Au-Feをコア成分とした糖鎖固定化磁性ナノ粒子の調製. 第28回日本糖質学会年会, つくば, 2008年8月18日-20日.
- 5) 佐藤昌紀, 時任真衣子, 濱崎隆之, 馬場昌範, 有馬直道, 伊東祐二, 伊藤浩美, 澤木弘道, 成松久, 若尾雅広, 隅田泰生, 成人T細胞白血病細胞表層に特異的に発現する糖鎖解析. 第28回日本糖質学会年会, つくば, 2008年8月18日-20日.
- 6) 隅田泰生, 西村知晃, 山下早希子, 青山和枝, 繁田麻衣, 高橋優子, 若尾雅広, 奥野寿臣, 森川佐依子, 廣井聡, 加瀬哲男, シアル酸含有糖鎖への結合性を利用したインフルエンザウイルスの新しい識別法. BMB2008, 神戸市, 2008年12月9日-12日.
- 7) 佐々木紀彦, 沖汐和彦, 平野拓也, 程久美子, 豊田亜希子, 豊田英尚, 西村知晃, 隅田泰生, 早坂美智子, 花岡和則, 等誠司, 池中的一裕, 西原祥子, ヘパラン硫酸はマウス胚性幹細胞の未分化性と多能性を制御する. BMB2008, 神戸市, 2008年12月9日-12日.
- 8) Hashimoto M, Tsunemi K, Suda Y, Nagata M, Kucho K, Abe M, Uchiumi T. Studies of NO-inducing glycoconjugates from *Mesorhizobium Loti*. BMB2008, 神戸市, 2008年12月9日-12日.
- 9) 佐藤昌紀, 時任真衣子, 濱崎隆之, 馬場昌範, 有馬直道, 伊東祐二, 伊藤浩美, 澤木弘道, 成松久, 若尾雅広, 隅田泰生, 成人T細胞白血病細胞株 S1T に特異的に発現する糖鎖の解析. BMB2008, 神戸市, 2008年12月9日-12日.
- 10) Nakamura-Tsuruta S, Kishimoto Y, Nishimura T, Wakao M, Saito A, Ohishi K, Kondo T, Chou K, Obata R, Ichinomiya N, Okuno T, Suda Y. Sugar-binding specificities of human herpesviruses (HHVs) and their effective concentration with Heparin-immobilized gold nano-particles. BMB2008, 神戸市, 2008年12月9日-12日.
- 11) Kariya H, Masuda S, Yoshihara Y, Ueno M, Hashimoto M, Suda Y. Carboxymethyl-chitin promotes chondrogenesis through the production of growth factor from immune cells. BMB2008, 神戸市, 2008年12月9日-12日.
- 12) 村岡賢, 伊東祐二, 上村将樹, 橋口周平, 馬場昌範, 有馬直道, 隅田泰生, 鳥飼正治, 中島敏博, 杉村和久, 成人T細胞白血病細胞(ATL)を標的にした細胞死誘導を持つ低分子抗体. BMB2008, 神戸市, 2008年12月9日-12日.
- 13) Tawaratsumida K, Furuyashiki M, Suda Y, Hashimoto M. Identification of TLR2-activating lipoproteins in *Staphylococcus aureus*. BMB2008, 神戸市, 2008年12月9日-12日.
- 14) 若尾雅広, 田中小代里, 下釜宏美, 隅田泰生, 糖鎖固定化磁性ナノ粒子を用いた糖鎖-