

200924028A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小賤 健一郎

平成22(2010)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	-----	1
小賤 健一郎		
II. 分担研究報告		
1. 動物実験による前臨床研究に関する研究	-----	4
小宮 節郎		
2. 癌幹細胞の単離と機能解析に関する研究	-----	6
瀬戸口啓夫		
3. 細胞生物学的解析に関する研究	-----	8
坂本 泰二		
4. 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	-----	13
隅田 泰生		
5. 幹細胞生物学での技術開発と解析に関する研究	-----	16
國貞 隆弘		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	19
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	23

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。

1～2年目に、①7因子制御 m-CRA の作製技術の成果から Surv.m-CRA を改変して性能向上した新型を開発、②Surv.m-CRA に続く新型 m-CRA の開発と細胞実験での結果、③CD133を中心とした、がん幹細胞に対する m-CRA 治療法の可能性の検証、について取り組み、成果を上げてきた。これらの成果を踏まえ、本年度は、①Surv.m-CRA の臨床化として GLP/GMP 製造を開始し、さらに改変型 Surv.m-CRA の性能検証とその生物学的意義付けの解明、②新型 m-CRA の治療効果を in vivo で検証、③新たに分担研究者により同定された新規の肉集幹細胞マーカーの FGFR3 を中心に、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、m-CRA によるがん幹細胞治療の研究成果を上げてきた。また③に関しては、本研究の全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

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

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。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各遺伝子プロモーターの癌特異的発現などの

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こりえるからである。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、国外の臨床試験で良

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上げた。平成20年度には、①m-CRA技術成果をSurv.m-CRAに応用した改良型Surv.m-CRAの作製、②新規m-CRAのin vitro培養細胞での検証、③CD133を中心とした癌幹細胞に対するm-CRA治療法の可能性の検証、の研究を行い、成果を上げてきた。これらの成果を踏まえて最終年度の本年度は、①Surv.m-CRAの臨床化と改良型Surv.m-CRAの性能検証、②新型m-CRAの治療効果検証、③新たに同定された肉腫幹細胞マーカーのFGFR3を中心としたm-CRA治療法の有用性の検証を行うことを研究目的とする。

## 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性増強、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。また、それぞれの改変の効能と、その生物学的意義について、解明する。
- ② 初年度より取り組んでいるシュガーチップで、新たなアデノウイルス濃縮法、さらにその応用技術の開発を進める。→分担研究者 隅田の項

### 2. 癌の染色体異常標的型の新m-CRAの開発

- ① 昨年度までにin vitro培養実験で成果を得ているA, Bの分子反応性の新型m-CRAについて、動物実験にて治療効果を検証する。

### 3. 癌幹細胞を標的・治療するm-CRAの開発

- ① 幾つかの種類のカラ細胞株から、MACS法によりFGFR3陽性細胞を濃縮分離する。
- ② FGFR3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 FGFR3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。

## 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化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性(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。つまり、E1Bはプロモーター活性は重要でなく、癌特異性があれば、治療効果を減ずることなく、癌特異性(安全性)を向上させることができることを発見した。

② Surv.m-CRAの臨床開発を目指して、GLP/GMPの製造を行った。

③ 糖鎖を利用した新しいウイルス濃縮技術を検討した→分担研究者 隅田の項。

### 2. 癌の染色体異常標的型の新m-CRAの開発

① A, B分子のpromoter制御型新規m-CRAは、癌動物モデル(ヌードマウスへのヒト癌細胞の移植)の治療実験において、抗腫瘍の治療効果を示した。さらに、Surv.m-CRAやTert.m-CRAと、性能比較実験にて、A, B分子プロモーターのうち、同等かそれ以上の性能を示すものがみられた。

### 3. 癌幹細胞を標的・治療するm-CRAの開発

- ① FGFR3陽性細胞が発現しているとされている横紋筋肉腫細胞株において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FGFR3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の導入効率を検討し、有意義な成果がみられた。
- ③ 分離したFGFR3陽性・陰性細胞分画において標的分子のSurvivinとhTERTの発現を半定量PCR検索した。さらに、これらのm-CRAをFGFR3陽性・陰性細胞分画に感染実験を行い、肉腫細胞への治療効果を検討し、興味深い結果を得た。

## 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4月にベンチャー創業にて、製剤化の臨床試験を海外展開予定である。臨床化を目指しGLP/GMP製造を開始した。

② 新しいウイルス濃縮術は本研究に限らず、遺伝子治療全般、あるいはウイルス学全般に有用な成果となる。

### 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m-CRA癌治療薬も

同様の戦略で臨床化が期待される。治療効果を  
確認できたので、特許申請して、臨床化に備え  
る予定である。

### 3. 癌幹細胞を標的・治療するm-CRAの開発

非常に少ない populatoion 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 FGFR3 を中心に検討して、非常に有意義な  
新しい結果を得た（未発表；特許申請ならびに  
論文を準備中）。これは癌幹細胞の濃縮分離  
法から本研究グループのオリジナルであるた  
め、極めてオリジナリティーが高い。よって科  
学的にも、臨床的（厚生労働行政の観点から  
も）価値ある研究内容と考えられる。

### E. 結論

Surv.m-CRA の臨床応用を確実に進めていくと  
ともに、本研究の成果をさらに発展させていく。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Okada H, Takemura G, Kosai K, Tsujimoto A, Esaki M, Takahashi T, Nagano S, Kanamori H, Miyata S, Li Y, Ohno T, Maruyama R, Ogino A, Li L, Nakagawa M, Nagashima K, Fujiwara T, Fujiwara H, Minatoguchi S.: Combined therapy with cardioprotective cytokine administration and antiapoptotic gene transfer in postinfarction heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 296(3):H616-26. 2009
2. Umeno H, Chitose S, Murofushi Y, Kosai K, Sato K, Kawahara A, Nakashima T.: Efficacy of autologous fat injection laryngoplasty with an adenoviral vector expressing hepatocyte growth factor in a canine model. *J Laryngol Otol* ;123 Suppl 31:24-9. 2009
3. Li L, Okada H, Takemura G, Kosai KI, Kanamori H, Esaki M, Takahashi T, Goto K, Tsujimoto A, Maruyama R, Kawamura I, Kawaguchi T, Takeyama T, Fujiwara T, Fujiwara H, Minatoguchi S.: Postinfarction gene therapy with adenoviral vector expressing decorin mitigates cardiac remodeling and dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 97(4):H1504-13. 2009

#### 2. 学会発表

1. 小賤健一郎. ヒト ES 細胞と遺伝子治療. (国内・シンポジウム) 第 49 回日本先天異常学会 学術集会、2009 年 6 月 25-27 日 (鹿児島)
2. Taro Kamisasanuki, Taiji Sakamoto, Ken-ichiro

Kosai.: CD9 siRNA gene therapy can generally inhibit diverse growth factors-induced angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. 第 15 回日本遺伝子治療学会、2009 年 7 月 9-11 日 (大阪)

3. 小賤健一郎. ; CD9 は血管新生に必須の膜蛋白である；新しい血管新生抑制剤としての siRNA CD9. 第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 1-3 日 (横浜)

### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

#### 1) 特許

1. 増殖制御型組換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

国内特許成立 2010 年 3 月 26 日 (特許第 4478775 号)

国内出願：2003 年 7 月 31 日 (特願 2003-283427)

国際出願：2004 年 7 月 (PCT/JP2004/010998)

現在、JST 特許支援事業 (採択) により、米国、欧州、国内へ広く指定国移行中。

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。

4. 血管新生抑制剤

発明者：小賤健一郎、坂本泰二、上笹貫太郎

出願人：鹿児島大学

国内出願：2009 年 4 月 24 日

(特願 2009-105170)

国際出願：2009 年 4 月 23 日

(PCT/JP2010/057735)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

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（整形外科学）・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（整形外科学）・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を行っている。今回我々は、腫瘍特異性の高い 2 種類のプロモーターを置換することによって、1 種類のプロモーター置換のみの m-CRA より安全性が増すということを確認した。また、E1B タンパクの量と m-CRA の強さの関係について、新しい知見を得ることができた。

A.研究目的

昨年までの本報告書で報告してきたように、我々は悪性腫瘍が特異的に産生するサバイピンに注目し、そのプロモーターで E1A 遺伝子を発現調節するようにアデノウイルスを改変した m-CRA、Surv.CRA を作製・解析し、その高い治療効果、癌特異性の高さは既存の CRA をはるかに凌ぐものであり、各種癌細胞に対する画期的な治療法になりうることを報告した (Kamizono J et al; Cancer Res. 65,5284-5291,2005)。

本研究の目的は、これまでにその有用性を明らかにできた Surv.CRA の構築を軸に、さらなる改変を加えることで癌特異性の向上を目的とするものである。また、これまで明らかにされていなかった E1B タンパクの量的条件について評価した。

B.研究方法

X は正常な生体にも若干存在しているが、骨肉腫や前立腺癌などの悪性腫瘍において高率に産生されるタンパクであり、Y によって活性化されるという特性を持つ。Surv.CRA の構築を軸とし、E1A を制御するサバイピンプロモーターに加え、E1B を制御するために X プロモーターを置換し (Surv.CRA.X)、Surv.CRA との比較評価を *in vivo*、*in vitro* にて行った。

C.研究結果

X プロモーターは比較的弱いものにも関わらず、Surv.CRA と Surv.CRA.X は骨肉腫・前立腺癌細胞に対し、同等の抗腫瘍効果を持っていた。また、正常細胞に対する安全性の面では、Surv.CRA.X が優れていた。

骨肉腫・前立腺癌細胞において、Y による X mRNA レベル上昇、プロモーター活性上昇 (X-LacZ 導入によるプロモーターアッセイ)、E1B タンパク量増加 (Surv.CRA.X 感染後) がみられたが、抗腫瘍効果の面においては Y 非存在下の場合と同等であった。

D.考察

サバイピンは腫瘍特異性が高く、多くの悪性腫瘍に発現が見られるため、CRA 治療の良いターゲット分子となる。しかし、高濃度のウイルス曝露が起こると、単一プロモーター置換のみでは正常細胞にも傷害を与えうる。今回の研究において E1B プロモーターを腫瘍特異性の高いものと置換することで、さらに高い特異性・安全性を得ることが確認できた。また、E1B タンパクの量は CRA の強さと必ずしも相関しないことを確認した。これらのことより、アデノウイルスを用いた遺伝子治療を、より安全に行うためには、E1B プロモーターを腫瘍特異性の高いものに置換することが重要であり、その活性は必ずしも高いものである必要はないということが示唆される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsuchimochi K, Otero M, Dragomir CL, Plumb DA, Zerbini LF, Libermann TA, Marcu KB, Komiya S, Ijiri K, Goldring MB. GADD45{beta} enhances Col10a1 transcription via the MTK1/MKK3/6/p38 axis and activation of C/EBP{beta}-TAD4 in terminally differentiating chondrocytes. J Biol Chem.. 2010. (in press)
- 2) Sasaki H, Setoguchi T, Matsunoshita Y, Gao H, Hirotsu M, Komiya S. The knock-down of overexpressed EZH2 and BMI-1 does not prevent osteosarcoma growth. Oncol Rep. 23(3):677-84, 2010.
- 3) Hirotsu M, Setoguchi T, Sasaki H, Matsunoshita Y, Gao H, Nagao H, Kunigou O, Komiya S. Smoothed as a new therapeutic target for human osteosarcoma. Mol Cancer. 9(1):5, 2010.
- 4) Hirotsu M, Setoguchi T, Matsunoshita Y, Sasaki H, Nagao H, Gao H, Sugimura K, Komiya S. Tumour formation by single fibroblast growth factor receptor 3-positive rhabdomyosarcoma-initiating cells. Br J Cancer. 101(12):2030-7, 2009.

- 5) Kawasoe Y, Yokouchi M, Ueno Y, Iwaya H, Yoshida H, Komiya S. Hyperbaric oxygen as a chemotherapy adjuvant in the treatment of osteosarcoma. Oncol Rep 22(5):1045-50, 2009.
- 6) Taniguchi N, Caramés B, Kawakami Y, Amendt BA, Komiya S, Lotz M. Chromatin protein HMGB2 regulates articular cartilage surface maintenance via beta-catenin pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 106(39):16817-22, 2009.
- 7) Tanaka M, Setoguchi T, Hirotsu M, Gao H, Sasaki H, Matsunoshita Y, Komiya S. Inhibition of Notch pathway prevents osteosarcoma growth by cell cycle regulation. Br J Cancer. 100(12):1957-65, 2009.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得予定

なし

2. 実用新案登録

なし

がん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

横紋筋肉腫の治療を目指してヒト横紋筋肉腫細胞株から Sarcoma-initiating cell 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 の分離方法を開発し、遺伝子発現や Sarcoma-initiating cell 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

ヒト横紋筋肉腫細胞株である KYM-1 と RD から Fibroblast growth factor receptor 3(FGFR3)陽性で腫瘍形成能力が有意に高い Rhabdomyosarcoma-initiating cells (RICs)の分離を可能とした。驚いたことにこの FGFR3 陽性の RICs は1個の細胞をヌードマウスの皮下に移殖した際にも腫瘍形成能力を示した。また RICs は定量的 PCR で未分化細胞マーカーを高発現しており、一方で分化マーカーの発現は低下していたことよ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 RICs 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 FGFR3 の発現を検討したところ定量的 RT-PCR で FGFR3 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 FGFR3 を heterogenous に発現していることが示された。

D. 考察

今回、我々は横紋筋肉腫の細胞株を用いて Sarcoma-initiating cells 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

現在、この手法を用いて精製した Rhabdomyosarcoma-initiating cells 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) 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;100(12):1957-65.
- 2) Retinal astrocyte differentiation mediated by leukemia inhibitory factor in cooperation with bone morphogenetic protein 2. Fukushima M.§, Setoguchi T.§, Komiya S., Tanihara H., Taga T. § These two authors contributed equally International Journal of Developmental Neuroscience. 2009; 27(7):685-90.
- 3) Tumour formation by single fibroblast growth factor receptor 3-positive rhabdomyosarcoma-initiating cells. Hirotsu M<sup>§</sup>, Setoguchi T<sup>§†</sup>, Matsunoshita Y, Sasaki H, Nagao H, Gao H, Sugimura K, Komiya S<sup>§</sup>Hirotsu M. and Setoguchi T. contributed equally. † Corresponding author Br J Cancer. 2009; (101):2030-37
- 4) Smoothed as a new therapeutic target for human osteosarcoma Hirotsu M. §, Setoguchi T. §†, Sasaki H. §, Matsunoshita Y., Gao H., Nagao H., Kunigou O., Komiya S. § These three authors contributed equally. † Corresponding author Molecular Cancer. 2010; (9):5
- 5) Knock down of over-expressed EZH2 and BMI-1 do not prevent osteosarcoma growth Sasaki H. §, Setoguchi T. §†, Matsunoshita Y., Gao H., Hirotsu M., Komiya S. § These two authors contributed equally. † Corresponding author Oncology Reports. 2010; (23):677-84
- 6) Upregulation of Notch pathway molecules in oral squamous cell carcinoma. Hijioka H, Setoguchi T†, Miyawaki A, Gao H, Ishida T, Komiya S, and Nakamura N. † Corresponding author



Int J Oncol. 2010; in press.

2. 学会発表

- 1) 日本整形外科基礎学術集会 11月5-6日

Sarcoma initiating cells の同定と解析

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

なし

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

眼科領域や各種の癌をはじめ、多くの分野で血管新生が病態悪化の原因となる疾患の治療法はまだ確立していない。細胞運動に関わると考えられる CD9 に着目し、CD9 を標的とした遺伝子干渉法による血管新生抑制効果について検討した。ヒト血管内皮細胞を対象としたマイグレーションアッセイ、およびインベジジョンアッセイでは、CD9 発現抑制による明らかな運動能抑制効果を認めた。ラット角膜を用いたマイクロポケットアッセイでは、有意な血管新生抑制効果を認めた。CD9 発現抑制による細胞死誘発は認めなかった。この新たな CD9 標的遺伝子干渉法は臨床での応用が期待できる。

A. 研究目的

眼科領域、各種癌など多くの分野で血管新生抑制を目的とした治療法が注目されている。血管新生抑制における主な機序として、血管内皮細胞の遊走、浸潤があげられる。血管内皮細胞に豊富に発現する因子として CD9 がある。細胞運動に関わると考えられているが、その機能の多くは未だ不明である。CD9 発現の変化によって血管内皮細胞の運動能が抑制されると仮定し、その検討を行った。CD9 発現抑制には、近年新たな治療法としても注目されている遺伝子干渉法を用いた。

B. 研究方法

細胞遊走能実験としてボイデンチャンバー(24well, pore size 8.0  $\mu$ m)の上層にヒト血管内皮細胞 HMVEC を、下層に遊走誘導因子として 20ng/ml の VEGF または HGF を含有したメディウム(2%FBS)をいれ、4、8、12 時間後の遊走細胞数を計測した。CD9 目標 siRNA 導入群(2種類、siRNA-CD9- $\alpha$ 、siRNA-CD9- $\beta$ )、対象として LamininA/C 目標 siRNA 導入群(siRNA-LamininA/C)、ランダム配列で作成した siRNA 導入群(siRNA-Random)、非導入群を設定した。さらに、細胞浸潤能実験としてマトリゲルコーティングボイデンチャンバーを用いて同様の実験を行った。

さらに、上記の各種 siRNA 導入による細胞増殖能の変化、および細胞死誘発効果を検討するために Ki67 染色、および TUNEL 染色を行った。

In vivo での検討として、角膜マイクロポケットアッセイを行った。ブラウンノルウェーラットの角膜を搬送切開して作成したポケットに、誘導因子として VEGF または HGF を含有させたペレットを挿入し、6 および 24 時間後に siRNA-CD9- $\alpha$ 、siRNA-Random、および PBS を結膜下に注射した。ペレット挿入から 7 日後に、角膜輪部からペレットに向かって出現する血管新生領域の面積を定量した。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

マイグレーションアッセイでは、どちらの誘導因子群でも siRNA-CD9 導入群、特に siRNA-CD9- $\alpha$  導入群において血管内皮細胞の遊走、浸潤能の抑制を認めた。インベジジョンアッセイでも、同様の結果が得られた。

免疫染色による細胞増殖能、細胞死誘発効果の比較では、siRNA-CD9- $\alpha$  群は有意に増殖能が抑制されたが、細胞死の誘発効果は認めなかった。

ラット角膜の血管新生領域は、siRNA-CD9- $\alpha$  注入群は、他の群に比べ、その面積が明らかに減少した。

D. 考察

CD9 は細胞運動と関わるインテグリンなどの細胞膜上タンパクと複合体を形成することから、CD9 の発現を抑制することで、血管内皮細胞膜上になんらかの変化が発生し、正常な細胞運動能が発揮されなかったと考えられる。

E. 結論

CD9 の発現抑制によって血管内皮細胞の運動能抑制が可能であった。この現象は、ラット角膜を用いた生体実験で、初めて実証された。CD9 を新たな目標タンパクとすることで、新たな血管新生抑制治療の開発につながる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Arimura N, Ohtsuka 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*. 2009 May;116(5):921-6.
- 2) Shimura M, Yasuda K, Nakazawa T, Shiono T, Sakamoto T, Nishida K. Drug reflux during posterior subtenon infusion of triamcinolone acetonide in diffuse diabetic macular edema not only brings insufficient reduction but also causes elevation of intraocular pressure. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009 Jul;247(7):907-12.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Yamashita T, Ohtsuka H, Arimura N, Sonoda S, Kato C, Ushimaru K, Hara N, Tachibana K, Sakamoto T. Sonothrombolysis for Intraocular Fibrin Formation in an Animal Model. *Ultrasound Med Biol*. 2009 Nov;35(11):1845-53.
- 7) Yamashita T, Kodama Y, Tanaka M, Yamakiri K, Kawano Y, Sakamoto T. Steroid-induced Glaucoma in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia: A Possible Complication. *J Glaucoma*. 2009 Aug 5. [Epub ahead of print]
- 8) Shimura M, Yasuda K, Nakazawa T, Abe T, Shiono T, Iida T, Sakamoto T, Nishida K. Panretinal photocoagulation induces pro-inflammatory cytokines and macular thickening in high-risk proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009 Jul 29. [Epub ahead of print]
- 9) Nakao K, Mizushima Y, Abematsu N, Goh N, Sakamoto T. Anterior ischemic optic neuropathy associated with Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009 Oct;247(10):1417-25.
- 10) Sakamoto T, Ishibashi T. Visualizing vitreous in vitrectomy by triamcinolone. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009 Sep;247(9):1153-63.
- 11) 吉永和歌子, 水島由佳, 精松徳子, 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イルス網膜炎. *日本眼科学会雑誌* 112(8): 684-687.2008
- 12) 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): 117-120.2009.
- 13) 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.
- 14) 田中 実, 鶴木一彦, 坂本泰二: 上方視神経低形成の眼底像. *臨床眼科* 63(7): 1103-1108. 2009.
- 15) 木下 茂, 根木 昭, 井上幸次, 黒坂大次郎, 坂本泰二, 外園千恵, 松下卓郎, 日本眼科学会戦略企画会議第一委員会: 「眼科医トレーニング」女性医師、病欠者の対応に関するアンケート調査報告. *日本眼科学会雑誌* 113(4): 526-531.2009.

### 2. 学会発表

- 1) 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 High-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 17 日
- 2) 大塚寛樹, 有村 昇, 山切啓太, 橋口照人, 丸山征郎, 坂本泰二: 「裂孔原性網膜剥離における硝子体中 SDF-1 とその他のサイトカイン」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
- 3) 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

- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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) 2009 年 1 月 23~25 日
- 7) 園田祥三, Parameswaran Sreekumar, 加瀬 諭, Christine Spee, Stephan Ryan, Ram Kannan, 坂本泰二, David Hinton:「Transwell を用いた極性ヒト網膜色素上皮細胞の培養及びその評価」第 113 回日本眼科学会総会 (東京国際フォーラム・東京都) 2009 年 4 月 16 日
- 8) 園田恭志, 坂本泰二:「トリアムシノロン硝子体注入直後の中心窩網膜厚の変化」第 113 回日本眼科学会総会 (東京国際フォーラム・東京都) 2009 年 4 月 17 日
- 9) 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 High-mobility group box 1 protein の関与」第 113 回日本眼科学会総会 (東京国際フォーラム・東京都) 2009 年 4 月 17 日
- 10) Arimura N, Ohtsuka H, Yoshinaga N, Nakamura M, Kawahara K.-I, Hashiguchi T, Maruyama I, Sakamoto T:「Inhibition of HMGB1 With Neutralizing Antibody Reduces Retinal Cell Viability and Disturbs Structural Integrity of the Retina」Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting, May 3rd - May 7th, 2009.
- 11) Yoshinaga N, Okubo A, Arimura N, Abematsu N, Sakamoto T:「Effect of Intravitreal Triamcinolone Acetonide for Polypoidal Choroidal Vasculopathy in Japanese」Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting, May 3rd - May 7th, 2009.
- 12) Fujita A, Uchino E, Ohtsuka H, Yamakiri K, Arimura N, Sonoda Y, Sakamoto T:「Postoperative inflammation of ocular surface in eyes after small incision vitrectomy」Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting, May 3rd - May 7th, 2009.
- 13) Ohtsuka H, Arimura N, Yamakiri K, Hashiguchi T, Maruyama I, Sakamoto T:「Vitreous SDF-1 and other cytokines in rhegmatogenous retinal detachment」Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting, May 3rd - May 7th, 2009.
- 14) 藤田敦子, 鮫島誠治, 坂本泰二, 佐々本研二:「副鼻腔内視鏡手術中の内直筋損傷による外斜視に対し筋移動術を施行した 1 例」第 79 回九州眼科学会 (アクロス福岡・福岡市) 2009 年 5 月 29 日
- 15) 吉村寿彦, 中澤祐則, 田中 実, 山下高明, 山切啓太, 坂本泰二, 鶴木一彦:「白内障手術後に毛様体浮腫による眼圧上昇をきたした 1 例」第 79 回九州眼科学会 (アクロス福岡・福岡市) 2009 年 5 月 29 日
- 16) 鮫島誠治, 有村 昇, 精松徳子, 園田恭志, 大久保明子, 坂本泰二:「傍中心窩毛細血管拡張症に対しベバシズマブ硝子体注射を行った 2 例」第 79 回九州眼科学会 (アクロス福岡・福岡市) 2009 年 5 月 29 日
- 17) Kamisanuki T, Sakamoto T, Kosai K: CD9 siRNA GENE THERAPY INHIBITS DIVERSE GROWTH FACTORS-INDUCED ANGIOGENESIS IN VITRO AND IN VIVO. 第 15 回 JSGT 学術集会 (JSGT=日本遺伝子治療学会) 大阪大学コンベンションセンター (大阪府吹田市) 2009 年 7 月 9 日
- 18) 精松徳子, 精松泰子, 中尾久美子, 坂本泰二:「Vogt-小柳-原田病に類似した臨床所見を呈した悪性リンパ腫の 1 例」スリーサムインなにわ (グランキューブ大阪・大阪市) 2009 年 7 月 12 日
- 19) 山下敏史, 林 京子, 山切啓太, 坂本泰二:「白内障手術中の合併症 2 例 (眼内レンズの機械的損傷と水晶体核落下)」平成 21 年県南眼科手術研究会 (ホテルメリージュ・宮崎市) 2009

年8月1日

- 20) 山下敏史, 山切啓太, 坂本泰二:「シリコンオイルの前房内脱出2例」第2回 Next Generation Workshop (ホテル日航福岡・福岡市) 2009年8月29日
- 21) 鮫島誠治, 有村 昇, 精松徳子, 園田恭志, 大久保明子, 坂本泰二:「傍中心窩毛細血管拡張症に対しベバシズマブ硝子体注射を行った2例」第222回鹿児島眼科集談会(鹿児島県医師会館・鹿児島市) 2009年9月12日
- 22) 藤田敦子, 鮫島誠治, 坂本泰二, 佐々本研二:「副鼻腔内視鏡手術中の内直筋損傷による外斜視に対し筋移動術を施行した1例」第222回鹿児島眼科集談会(鹿児島県医師会館・鹿児島市) 2009年9月12日
- 23) 松元智子, 山下敏史, 坂本泰二:「術後炎症の再燃をきたした1例」第222回鹿児島眼科集談会(鹿児島県医師会館・鹿児島市) 2009年9月12日
- 24) 山切啓太, 坂本泰二:「黄斑円孔術後早期のWatzke-Allen test と Spectral-Domain OCT 所見の比較」第63回日本臨床眼科学会(福岡国際会議場・福岡市) 2009年10月10日
- 25) 園田恭志, 有村 昇, 坂本泰二:「糖尿病性黄斑浮腫に対する bevacizumab 硝子体内投与直後の黄斑部網膜厚変化」第63回日本臨床眼科学会(福岡国際会議場・福岡市) 2009年10月11日
- 26) 黒岩宣宏, 精松徳子, 松尾由紀子, 中尾久美子, 坂本泰二:「メトトレキセート硝子体内投与により網膜に有害事象がみられた眼内悪性リンパ腫の1例」第63回日本臨床眼科学会(マリンメッセ福岡・福岡市) 2009年10月10日
- 27) 尾辻 太, 山切啓太, 園田恭志, 坂本泰二:「bevacizumab 硝子体内投与後に滲出性網膜剥離が改善した Coats 病および網膜血管腫の3例」第63回日本臨床眼科学会(マリンメッセ福岡・福岡市) 2009年10月11日
- 28) 柿内奈保子, 精松徳子, 有村 昇, 大久保明子, 坂本泰二:「中心性漿液性網脈絡膜症に対する光線力学的療法」第63回日本臨床眼科学会(マリンメッセ福岡・福岡市) 2009年10月11日
- 29) 齋藤司朗, 大塚寛樹, 坂本泰二:「Goldmann-Farve 病の1例」第63回日本臨床眼科学会(マリンメッセ福岡・福岡市) 2009年10月11日
- 30) 吉村寿彦, 藤田敦子, 中尾久美子, 坂本泰二, 上村昭典:「眼球癆に伴う疼痛に対してトリアムシロン注射を行い改善を認めた2例」第63回日本臨床眼科学会(マリンメッセ福岡・福岡市) 2009年10月11日
- 31) 田中 実, 吉村寿彦, 山下高明, 坂本泰二:「慢性の悪性緑内障に対し、硝子体カッターによる周辺虹彩切除、隅角癒着解離術が奏功した症例」第20回日本緑内障学会(沖縄コンベンションセンター・沖縄県宜野湾市) 2009年11月13~15日
- 32) Sakamoto T:「Immediate Change after Intravitreal Injection with Triamcinolone or Bevacizumab for Diabetic Macula」4<sup>th</sup> Congress of the Asia-Pacific Vitreo-Retinal Society (台湾) 2009年11月12日
- 33) 山下敏史, 大塚寛樹, 坂本泰二:「非動脈炎性網膜動脈閉塞症についての検討」第48回日本網膜硝子体学会(名古屋国際会議場・名古屋市) 2009年12月4~6日
- 34) 山切啓太, 坂本泰二:「Spectral-Domain OCT を用いた黄斑円孔非閉鎖例の検討」NOW2009(名古屋国際会議場・名古屋市) 2009年12月4~6日
- 35) 有村 昇, 大塚寛樹, 吉永就正, 園田祥三, 中村 誠, 大久保明子, 坂本泰二:「中和抗体投与による high-mobility group box 1 protein 阻害と網膜障害」NOW2009(名古屋国際会議場・名古屋市) 2009年12月4日
- 36) 大塚寛樹, 有村 昇, 山下敏史, 平川真由美, 精松徳子, 大久保明子, 中尾久美子, 坂本泰二:「抗 VEGF 薬硝子体注射後に非感染性内眼炎を来した3症例」NOW2009(名古屋国際会議場・名古屋市) 2009年12月4~6日
- 37) 園田祥三, Danhong Zu, 加瀬 諭, Ryan Stephen, Kannan Ram, Hinton David, 坂本泰二:「レーザー誘発 CNV モデルにおける Bone morphogenetic protein-4 の役割についての検討」NOW2009(名古屋国際会議場・名古屋市) 2009年12月4日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし  
3. その他  
なし

1. 特許取得(出願した特許)

2. 実用新案登録

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

癌（幹）細胞の細胞表層の糖脂質からの機能解明  
-ウイルスベクターの簡便な濃縮法の開発-

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 張 旭 鹿児島大学 大学院理工学研究科・D1

研究要旨

数ナノメートルの大きさの糖鎖は、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、これらのナノバイオデバイスを用いて、シュガーチップで解析したアデノウイルスベクターの糖鎖結合特性を利用し、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. 研究目的

ウイルスベクターは一般には超遠心によって濃縮する。しかし、遺伝子導入のための大量のウイルスベクターを濃縮することは手間と時間がかかる。本研究ではウイルスと細胞表層の糖鎖との結合性に着目し、ウイルスベクターが結合する糖鎖を推定し、その糖鎖を固定化したSGNPを用いて、アデノウイルスベクターの簡便な濃縮法を確立することを目的とする。

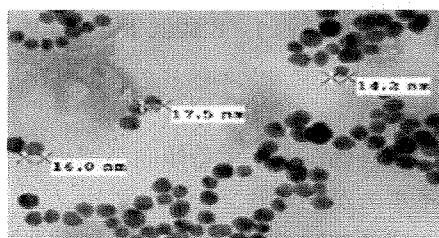
B. 方法

シュガーチップは（株）スティックスバイオテックから購入した48種類の糖鎖を固定化しているアレイタイプの標準チップを使用し、SPRイメージング(Multi SPRinter, Toyobo)によってウイルスの糖鎖結合性を調べた。SPRイメージングによって選択した糖鎖は、 $\text{NaAuCl}_4$ をクエン酸によって還元して調製したナノ粒子（図1）に我々独自のリンカーを介して結合させて調製した。アデノウイルスベクターAd. CA-EGFPは小

財教授からご提供いただいた。ウイルスベクターの感染実験は常法に準じて行った。

C. 研究結果

アデノウイルスベクター Ad. CA-EGFP の糖鎖結合活性をアレイ型のシュガーチップで調べた結果（図2）、マンノース-6-リン酸、ヘパリン、及びヘパリン部分二糖構にこのウイルスベクターが結合することが判った。



Particle size:  
16.2 +/- 2.3 nm

図1 ヘパリン固定化金ナノ粒子 (Hep-GNP)

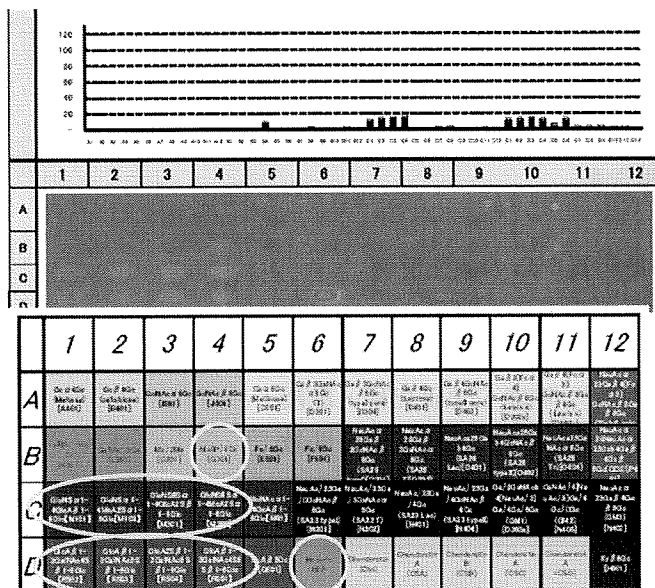


図2 糖鎖のスクリーニング

この結果からヘパリンを選択し、ヘパリンを固定化したSGNPを調製し、アデノウイルスベクター Ad. CA-EGFP の濃縮を図3にしたがって行った。濃縮度はリアルタイムPCRを用いたシステム(図2)にかけて、濃縮度を算定した(表1)。さらに濃縮したウイルスの感染価を測定した。

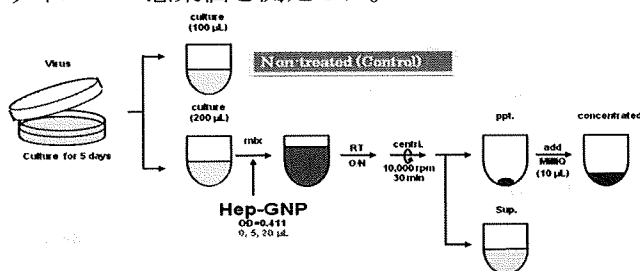


図3 SGNPによるウイルスベクターの濃縮

ウイルス濃度によって濃縮度は異なるが、1/40希釈ではウイルスの遺伝子は8サイクル以上(濃縮効率300倍以上)濃縮された。しかし、その再懸濁液をそのまま細胞に作用させ、ウイルスの感染価を測定したところ、逆に感染価が約1/6に低下した。

#### D. 考察

濃縮度が高いほど、感染価が低下する傾向が認められたことから、ウイルスがヘパリンを介してナノ粒子に強固に結合し、感染細胞表層のヘパリン硫酸との親和性がヘパリンよりも低くなるために、細胞へウイルスが移行しないことが示唆された。この結果は、我々が以前に行ったレンチウイルスベクターを濃縮した際に認められた感染価の向上とは異なっていた。レンチウイルスよりもアデノウイルスの方がヘパリンへの親和性が高いのであろう。現在、ウ

イルスへの親和性を下げるために、ヘパリンを低分子化し、その低分子化ヘパリンを固定化したナノ粒子を調製しており、今後それを用いて同様の実験を行う予定である。

#### E. 結論

今年度の研究からアデノウイルスベクターのヘパリンに対する強い親和性が明らかと成った。ヘパリンを固定化したSGNPを用いることによって、ウイルスは濃縮出来たが、SGNPへの親和性が強すぎて、ウイルスがSGNPから細胞へ移行しにくいのではないかと考えている。

2008/11/25_Adenoviral#2/1						
with & without SGNP	Dilution	Ct	CF	Tm	Titer	Titer (pfu/ml)
- SGNP (no SGNP)	x 1	15.29	1.0	83.71	$3.5 \times 10^{10}$	$3.5 \times 10^{10}$
	x 1/4	13.42	1.0	83.95	$3.94 \times 10^9$	$1.576 \times 10^{10}$
	x 1/40	18.53	1.0	84.08	$8.9 \times 10^8$	$3.56 \times 10^{10}$
	x 1/400	21.82	1.0	83.99	$3.42 \times 10^7$	$1.368 \times 10^{10}$
	x 1/4000	25.14	1.0	83.98	$2.68 \times 10^6$	$1.072 \times 10^{10}$
+ SGNP (pp)	x 1	13.97	2.5	84.27		
	x 1/4	13	1.3	84.14	$4.8 \times 10^7$	$1.92 \times 10^8$
	x 1/40	10.18	326.3	84.31	$1.42 \times 10^8$	$5.68 \times 10^9$
	x 1/400	12.86	498.0	84.16	$1.06 \times 10^6$	$4.24 \times 10^8$
	x 1/4000	17.6	186.1	84.02	$4.2 \times 10^5$	$1.68 \times 10^9$

#### 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

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tawaratsumida, K., Furuyashiki, M., Katsumoto, M., Fujimoto, Y., Fukase, K., Suda, Y., Hashimoto, M., Characterization of N-terminal Structure of TLR2-activating Lipoprotein in *Staphylococcus aureus*, *J. Biol. Chem.*, 284(14), 9147-9152 (2009)
- 2) Muraoka, S., Ito Y., Kamimura, M., Baba, M., Arima, N., Suda, Y., Hashiguchi, S., Torikai, M., Nakashima, T., Sugimura, K., Effective induction of cell death on adult T-cell leukaemia cells by HLA-DRbeta-specific small antibody fragment isolated from human antibody phage library, *J. Biochem.*, 145(6), 799-810 (2009)
- 3) 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. *J. Biochem.*, 146(1), 33-41 (2009)
- 4) Fujimoto, Y., Hashimoto, M., Furuyashiki, M., Katsumoto, M., Seya, T., Suda, Y., Fukase, K., Lipopeptides from *Staphylococcus aureus* as Tlr2 Ligands: Prediction with mRNA Expression, Chemical Synthesis, and Immunostimulatory Activities, *ChemBioChem*, 10(14), 2311-2315 (2009)
- 5) Fujimoto, F., Hashimoto, M., Furuyashiki, M., Katsumoto, M., Seya, T., Suda, Y., Fukase, K., Lipopeptides from *Staphylococcus aureus* as

Tlr2 Ligands: Prediction with mRNA Expression, Chemical Synthesis, and Immunostimulatory Activities, *ChemBioChem.*, in press

2. 学会発表 (シンポジウムなど)
  - 1) 若尾雅広、小幡瑠美、酒見千穂、杜若祐平、近藤宇男、満下宣子、隅田泰生、「コンドロイチン硫酸部分二糖構造ライブラリーの構築とシュガーチップへの応用」、第 29 回日本糖質学会年会、平成 21(2009)年 9 月 9 日~11 日、岐阜県高山市
  - 2) 山口憂三、佐藤昌紀、岩切健二、若尾雅広、隅田泰生、「蛍光性リンカーを用いた微量糖鎖のチップ化と局在プラズモン共鳴法による相互作用解析」、第 29 回日本糖質学会年会、平成 21(2009)年 9 月 9 日~11 日、岐阜県高山市
  - 3) 田中小代里、若尾雅広、隅田泰生、「Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> をコア成分とした糖鎖固定化磁性金ナノ粒子の開発」、第 29 回日本糖質学会年会、平成 21(2009)年 9 月 9 日~11 日、岐阜県高山市
  - 4) 張旭、青山和枝、若尾雅広、隅田泰生、「糖鎖固定化金ナノ粒子を用いたインフルエンザウイルスの高感度検出」、第 29 回日本糖質学会年会、平成 21(2009)年 9 月 9 日~11 日、岐阜県高山市
  - 5) 隅田泰生、張旭、青山和枝、鶴田一、中村祥子、加瀬哲男、小財健一郎、若尾雅広、「糖鎖固定化金ナノ粒子を用いたウイルスの濃縮と高感度検出」、第 82 回日本生化学会大会、平成 21(2009)年 10 月 21 日~24 日、兵庫県神戸市

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

- 1) 隅田泰生、若尾雅広、「糖鎖固定化磁性金属ナノ粒子の製造方法」特願 2009-175001 (2009/7/28)、出願人：国立大学法人鹿児島大学、株式会社スディックスバイオテック
- 2) 隅田泰生、荒野明男、楠本正一、「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」、登録番号 4364853 (2009/8/28)、出願人：独立行政法人科学技術振興機構(100%)
- 3) 隅田泰生、荒野明男、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」、登録番号 4430344 (2009/12/25)、出願人：独立行政法人科学技術振興機構、国立大学法人鹿児島大学

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

幹細胞生物学での技術開発と解析

研究分担者 國貞隆弘 岐阜大学大学院医学系研究科・教授

《研究要旨》

悪性脳腫瘍は再発率・致死率の高い腫瘍であり、外科手術と放射線が主な治療手段になっている。臨床成績を向上させるためには腫瘍の悪性度のより精密な判定、効果的な放射線量の決定、新規の化学療法・遺伝子治療の開発等が望まれる。我々は日本人の悪性脳腫瘍患者から脳腫瘍幹細胞株の樹立を行い、多くの患者から腫瘍幹細胞が分離可能であることを確認し、最終的に3人の患者から長期間維持可能な脳腫瘍幹細胞株(がん幹細胞株)を樹立することに成功した。これらの腫瘍幹細胞株はいずれも多分化能を持つこと、由来した患者の腫瘍と同じ病理組織学的な腫瘍をマウスに移植後も形成することから、腫瘍幹細胞(がん幹細胞)であると判断された。これらの腫瘍幹細胞は低酸素状態(1%O<sub>2</sub>)ではCD133陽性の癌幹細胞分画の自己複製能力が増強され、低酸素で維持された癌幹細胞は通常の酸素濃度で維持された癌幹細胞に比べて未分化性を強く保持していることが明らかにされた。本発見は腫瘍幹細胞の病態の理解に有用であり、ガン治療の標的が腫瘍幹細胞であることを明確にした。

A.研究目的

近年、悪性脳腫瘍組織から自己複製能を有し、二次腫瘍を形成する元となる腫瘍幹細胞が単離され、腫瘍の概念に変革を迫っている(Singh SK et al, Nature 432, 396-401, 2004)。この概念によると、摘出術・化学療法・放射線療法等により一旦縮小をみた腫瘍が再増大することは、残存した腫瘍幹細胞が再度腫瘍形成を起こしていると考えられる。つまり、真の治療の標的は全腫瘍ではなく腫瘍幹細胞ということになる。本研究では、日本人脳腫瘍組織(多形性神経膠芽腫と診断された症例)を用いて長期間の継代に成功した腫瘍幹細胞株の低酸素条件下での自己複製能を検討する。

B.研究方法

【脳腫瘍幹細胞株の低酸素条件下での自己複製能力の測定】  
腫瘍幹細胞の浮遊培養はDMEM-F12, penicillin G, streptomycin sulfate, B-27, recombinant human FGF-2 (20 ng/ml), recombinant human EGF (20 ng/ml)を用いて行った。接着培養はgelatinおよびpoly-L-ornithine コートされたディッシュ上で上記の未分化培養培地を用いて行った。我々が樹立した脳腫瘍幹細胞株 X01GB, X03AOAを用い、1%, 5%, 20%の酸素濃度でそれぞれ培養する。この時、酸素の拡散条件を同一に保つため、浮遊培養で維持された腫瘍幹細胞を接着培養に移し、細胞数を経時的に測定した。腫瘍幹細胞の自己

複製能力の測定には各酸素濃度での接着培養時の細胞増殖の他、各酸素濃度下で浮遊培養で維持された細胞を一旦解離させた後のコロニー形成能力を指標にした。

【脳腫瘍幹細胞株の低酸素条件下での遺伝子発現とシグナル伝達】

浮遊培養により各酸素濃度で維持された腫瘍幹細胞株で発現されている遺伝子の動態をまず DNA アレーを用いて調べ、HIF1 $\alpha$ を含む低酸素下で発現の上昇が確認された遺伝子についてRT-PCRを用いてそれらの発現を確認した。シグナル伝達系のタンパクについては、既に腫瘍幹細胞の増殖に影響を与えることが報告されているEGF/PI3K/ERK シグナルの活性化状況をウエスタンブロッティングにより測定した。

C.研究結果

【低酸素条件下では脳腫瘍幹細胞株の自己複製能力と増殖能力が亢進する】

X01 および X03 株の接着培養を低酸素下で行うと20%に比べて5%では培養時間あたり倍以上の増殖亢進が観察された。96穴プレートに20個の細胞を播種した際のコロニー形成率は20%では10%と低下したが、1%では80%近い高率が維持された。

【低酸素条件下では脳腫瘍幹細胞株にHIF1 $\alpha$ の発現が上昇する】

腫瘍幹細胞株は様々な分化段階の細胞を含むヘテロな集団として維持されるが、低酸素

下では(5%)CD133 陽性の未分化幹細胞分画の増殖が選択的に亢進した。CD44 陽性細胞の増殖は低下していた。

【HIF1 $\alpha$ は EGF 誌 g なるとは独立に低酸素条件下で脳腫瘍幹細胞株の自己複製能力を向上させる】

様々な酸素濃度下で脳腫瘍幹細胞を維持し、ウエスタンブロッティングにより HIF1 $\alpha$  発現を定量したところ、20%では以前から知られているように HIF1 $\alpha$  は検出されなかった。20%から 5%に低下させると 4 時間後に HIF1 $\alpha$  の発現上昇が観察され、12 時間目までは継続的に発現が上昇し、その後定常状態に戻った。1%では 2 時間以内に HIF1 $\alpha$  の発現上昇が見られ、6 時間で定常状態に戻った。HIF1 $\alpha$  の阻害剤 YC - 1 を添加すると、CD133 陽性幹細胞分画が減少した。さらに HIF1 $\alpha$  siRNA を培地に添加し HIF1 $\alpha$  をノックダウンすると低酸素下でも HIF1 $\alpha$  の発現上昇が見られず、CD133 陽性分画が顕著に減少した。

【低酸素条件下の脳腫瘍幹細胞株のシグナル伝達】

脳腫瘍幹細胞株を低酸素下で各種阻害剤を添加して培養した(EGFR tyrosine kinase inhibitor (AG1478), PI3K inhibitor (LY294002), ERK inhibitor (PD98059), mTOR inhibitor (rapamycin))。細胞は 2 時間ほど各阻害剤で前処理し、その後 1%酸素で培養した。阻害剤処理により低酸素による HIF1 $\alpha$  誘導は低下した。ERK, Akt, mTOR, p70S6-kinase のリン酸化それぞれの阻害剤により抑制されることを確認した。これらの結果は、低酸素による HIF1 $\alpha$  誘導には Akt-mTOR と ERK 経路が関与し、EGFR 経路は働いているがこれらの経路とはある程度独立している(クロストークが少ない)ことを示唆している。

【低酸素により脳腫瘍幹細胞の分化が抑制される】

低酸素下で脳腫瘍幹細胞を 10%FCS を含む培地で接着培養し、グリア細胞と神経細胞への分化を調べたところ、一定時間後の細胞数はほぼ倍増し、それぞれのマーカーを発現する分化した細胞は著減した。

#### D. 考察

我々が用いた脳腫瘍幹細胞株は我が国で初めて樹立された日本人由来の腫瘍幹細胞株(がん幹細胞株)であり、腫瘍幹細胞の様々な研究対象として有用と考えられる。今回、腫瘍形成部位の微小環境をある程度反映する低酸素培養を行い、未分化な腫瘍幹細胞が選択的に維持されることを確認した。我々は現在、ゲフィチニブなどの抗ガン剤に対する感受性の測定を様々な細胞シグナル阻害剤存在下に行っており、このときの培養条件として低酸素培養を採用する予

定である。本研究班によって開発されたがん遺伝子治療の新しいストラテジーを検証する実験系としても有用と考えられるので、班内の共同研究をさらに推進したい。

#### E. 結論

- 1) 脳腫瘍幹細胞株は低酸素条件下で増殖および自己複製能力が亢進した。
- 2) 低酸素条件下では脳腫瘍幹細胞株の HIF1 $\alpha$  の発現が上昇した。
- 3) HIF1 $\alpha$  は低酸素条件下で脳腫瘍幹細胞株の自己複製能力を向上させた。この作用は EGF シグナルとは独立に発揮された。
- 4) 低酸素条件の腫瘍幹細胞では Akt-mTOR と ERK 経路が活性化され、EGFR 経路は働いているがこれらの経路とのクロストークは限定的らしい。
- 5) 低酸素条件下では脳腫瘍幹細胞株の分化が抑制される。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Shimada H, Yoshimura N, Tsuji A, Kunisada T. Differentiation of dopaminergic neurons from human embryonic stem cells: modulation of differentiation by FGF-20. *J Biosci Bioeng.* 2009 ;107:447-454
- 2) Aoki H, Hara A, Niwa M, Yamada Y, Kunisada T. In vitro and in vivo differentiation of human embryonic stem cells into retina-like organs and comparison with that from mouse pluripotent epiblast stem cells. *Aoki H. Dev Dyn.* 238, 2266-2279, 2009.
- 3) Motohashi T, Yamanaka K, Chiba K, Aoki H, Kunisada T. Unexpected multipotency of melanoblasts isolated from murine skin. *Stem Cells.* 2009; 27:888-897.
- 4) Aoki H, Yamada Y, Hara A, Kunisada T. Two distinct types of mouse melanocyte: differential signaling requirement for the maintenance of non-cutaneous and dermal versus epidermal melanocytes. *Development.* 136:2511-2521, 2009.
- 5) Soeda A, Park M, Lee D, Mintz A, Androutsellis-Theotokis A, McKay RD, Engh J, Iwama T, Kunisada T, Kassam AB, Pollack IF, Park DM. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1 $\alpha$ . *Oncogene.* 28, 3949-3959, 2009.
- 6) Yamada, Y, Aoki, H, Kunisada, T, Hara, A. Rest promotes the early differentiation

of mouse ESCs but is not required for their maintenance. Cell Stem Cell 8:10-15, 2010.

- 7) 青木仁美、國貞隆弘、幹細胞を用いた再生医療の可能性、幹細胞の分化誘導と応用、p575-590(株式会社エヌ・ディー・エヌ)、2009/2/20
- 8) 山田泰広、青木仁美、國貞隆弘、原明、iPS細胞と疾患解析、細胞工学 2008 ; 28 巻 ; 228-231、2009/2/20
- 9) 副田明男、國貞隆弘、岩間亨、幹細胞の光と陰—iPS細胞・ガン幹細胞が脳腫瘍研究を変える、脳神経外科速報 2009 ; 19 巻 ; 1046-1053, 2009/9

## 2. 学会発表

- 1) 再生医療の実現化プロジェクト第二回夏のワークショップ :JST 山中 iPS 細胞特別プロジェクト研究要旨 7/16/2009 箱根
- 2) 日本臨床検査医学会東海北陸支部総会、2009年3月8日、幹細胞・iPS細胞と再生医療、招待講演
- 3) 第8回日本再生医療学会総会(東京国際フォーラム,2009/3/5,ES細胞の浮遊培養法:動物由来物質はどこまで排除できるか?)
- 4) 第8回日本再生医療学会総会(東京国際フォーラム),2009/3/5,ヒト歯胚幹細胞からの人工多能性幹細胞の誘導
- 5) 第8回日本再生医療学会総会、2009年3月5日、ヒトES細胞をマウス眼球内への移植することにより形成される眼胞様構造の解析
- 6) 第113回日本眼科学会総会』、東京、2009年4月16日、ヒトES細胞の眼胞様構造への in vitro 及び in vivo 分化系。
- 7) 42th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biology.

Unexpected multipotency of melanoblasts isolated from embryonic and neonatal skin. 2009 5/28-31 Niigata Toki-Messe.

- 8) 第22回日本色素細胞学会、福岡、2008年12月5日、毛包以外の場所で維持される色素細胞の機能解析
- 9) The 79<sup>th</sup> Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology』、4813-A4,Florida, USA, May 6・2009. *In vitro* and *in vivo* differentiation of human embryonic stem cells into retina-like organs and comparison with those from mouse pluripotent epiblast stem cells
- 10) 15<sup>th</sup> the Pan American Society for Pigment Cell Research, Memphis, Tennessee, September 4-7, 2009. Differential signaling requirement for the maintenance of non-cutaneous and dermal melanocytes versus epidermal melanocytes.

## 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