

20092402PB

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～平成21年度 総合研究報告書

研究代表者 小賤 健一郎

平成22(2010)年 4月

目 次

I. 総合研究報告		
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	8
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	14

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総合研究報告書

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、最終年度の3年目には、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腫幹細胞マーカーの 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 での細胞傷害性の予備実験、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た。

このように3年間は、Surv.m-CRA の臨床化を進めながら、第二弾の新しい m-CRA 開発を行い、そしてさらなる革新的な研究として癌幹細胞を m-CRA で標的治療する技術を開発するという一方で、いずれも着実に研究を進め成果を上げることができた。

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

※ 高橋 知之 久留米大学医学部・准教授
平成19年度のみ

※ 室伏 善照 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・助教 平成19・20年度のみ

A. 研究目的

新たな治療法として期待された癌遺伝子治療は、数多くの臨床試験でその安全性は確認されたが、治療効果自体は当初期待されたような癌治療のブレイクスルーとはなっていない。その主因の一つは、*in vitro* でいくら遺伝子導入効率の高いベクターでも、「非」増殖型のベクターでは *in vivo* で体内の全癌細胞にもれなく遺伝子を導入することは「物理的」に不可能である（ベクター液が達しない癌細胞には当然、遺伝子は導入されない）ため、遺伝子「未」導入癌細胞からの再発が起こりえるからである。

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

解性ウイルス療法」の医薬となる利点も併せ持つため、CRAは新世代の癌遺伝子治療として期待されている。

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

平成16~18年度の第一期の第三次対がん(厚生労働科研)事業にて、m-CRA技術にて様々なm-CRAを作製し、さらに画期的な癌治療効果を示すSurvivin反応性m-CRAを開発した。

平成19~21年度の第二期の第三次対がん(厚生労働科研)事業である本研究において、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、研究目的として、以下のように研究を進めてきた。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を、この研究として行った。

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。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。つまり、癌治療効果を増強し、癌特異性(安全性)も向上させる、新型Surv.m-CRAを開発する。
- ② 最初に開発したSurv.m-CRAの臨床化への準備を進める。
- ③ RNAi発現型m-CRAを開発する。
- ④ 癌を標的する新たなファイバー改変のため、ベクターの糖鎖結合性を調べる。
- ⑤ 糖鎖ナノテクノロジーを利用したウイルス濃縮技術を開発する。

2. 癌の染色体異常標的型の新m-CRAの開発

- ① 染色体制御機構に関与すると思われる新規分子のうち2つの分子A、Bについて研究を進める。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 A、B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 A、B分子のpromoterによりE1A発現制御する新規m-CRAを作製し、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。
- ④ *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 of 癌細胞株から、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。
- ④ 軟部肉腫のがん幹細胞を濃縮分離するマーカーを探索する。
- ⑤ 見出したマーカーで濃縮分離した軟部肉腫

のがん幹細胞に対するm-CRA治療の有用性を検証する。

(倫理面への配慮)

研究の動物実験計画は取り扱い指針に従い、適切に動物実験を行う。

C. 研究結果

1. 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。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、米国の専門企業にてGLP/GMPの製造を開始した。
- ③ 糖鎖を利用した新しいウイルス濃縮技術を検討し、貴重な成果を得た。つまり、アデノウイルスとの糖鎖結合性をアレイ型のシュガーチップで調べた結果、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。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を用いたシステムにかけて、濃縮度を算定した。さらに濃縮したウイルスの感染価を測定した。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。
- ④ RNAi発現型のm-CRA作製技術を開発した。

2. 癌の染色体異常標的型の新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。

- ④A、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みられた。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。
- ④FGFR3が肉腫幹細胞の新しいマーカーとなることを見出した。
- ⑤FGFR3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。
- ⑥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。
- ⑦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

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

これに対し本研究は、ベクターの作製技術という点から全てがオリジナルであり、本邦での癌治療法の開発と臨床応用が可能となる能力を備えている。また知的財産としても、基盤の m-CRA ベクターの作製技術を国内特許が成立し、米欧にも特許申請というように確保している。また臨床応用により医薬開発する第一弾の Surv.m-CRA も日米に特許申請している。

そしてこれを踏まえ、科学的にはさらに m-CRA 技術で高性能の改良型 Surv.m-CRA を開発するとともに、臨床応用化の準備もすすめてきた。つまり、臨床試験のための GLP/GMP 製剤の製造も開始したように、一步一步、科学成果の臨床応用と最終的な国民福祉の向上の成果に向けて、取り組んできた。

また一方、科学面では新規の m-CRA の開発と癌幹細胞を治療する m-CRA 技術という研究で成果を上げてきた。特に後者は今回の研究事業における科学面での最大の挑戦研究であるが、結果に記載のように、独自の癌幹細胞マーカーの発見、そして m-CRA による癌幹細胞治療法の開発のための、基盤研究を進め成果をあげてきている。

この成果を今後も発展して、科学面と臨床応用化の両面で進めていきたい。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Miyata S, Takemura G, Kosai KI, Takahashi T,

Esaki M, Li L, Kanamori H, Maruyama R, Goto K, Tsujimoto A, Takeyama T, Kawaguchi T, Ohno T, Nishigaki K, Fujiwara T, Fujiwara H, Minatoguchi S.: Anti-Fas Gene Therapy Prevents Doxorubicin-induced Acute Cardiotoxicity through Mechanisms Independent of Apoptosis. *Am J Pathol.* 176(2):687-98, 2010.

- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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薬。ケミカルエンジニアリング, 54 (1), 32-38, 2009
- 6) Kondo T, Takemura G, Kosai K, Ohno T, Takahashi T, Esaki M, Goto K, Maruyama R, Murata I, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H.: Application of an adenoviral vector encoding soluble transforming growth factor-beta type II receptor to the treatment of diabetic nephropathy in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 35(11):1288-93. 2008.
- 7) 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
- 8) 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, 874-883, 2007

- 9) 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
- 10) 小賤健一郎: 先端医学開発の研究と医学教育. 鹿児島大学医学雑誌. 59(2), 17-23, 2007

2.学会発表

- 1) 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)
- 2) 小賤 健一郎.: 1) 癌治療薬と遺伝子導入試薬の両事業用の m-CRA ベクター、2) 肝再生治療薬 HB-EGF. バイオジャパン 2009 World Business Forum、2009 年 10 月 7~9 日 (東京)
- 3) 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)
- 4) 小賤 健一郎.: 1) 癌治療薬と DDS の両事業用の m-CRA ベクター、2) 肝再生治療薬. 第 8 回国際バイオ EXPO 併催 国際バイオフォーラム 大学・国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~, 2009 年 7 月 1-3 日 (東京)
- 5) 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)
- 6) 小賤健一郎.: アデノウイルスベクターの独自技術開発から遺伝子治療の応用へ. 岐阜大学再生医科学セミナー, 2009 年 11 月 26 日 (岐阜)
- 7) 上笹貫太郎、徳重沙織、坂本泰二、小賤健一郎.: CD9 発現抑制による新たな RNAi 血管新生抑制治療の開発. 第 3 回桜ヶ丘地区基礎系研究発表会, 2009 年 11 月 13 日 (鹿児島)
- 8) 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)
- 9) 小賤健一郎.: 独自ベクター技術を中心とした遺伝子治療と再生医学の開発. "Development of gene therapy and regenerative medicine based on original vector technology." 熊本大学グローバル COE リエゾンラボ研究会, 2008 年 12 月 24 日 (熊本)
- 10) 小賤 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)
- 11) 小賤 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)
- 12) 小賤健一郎.: 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)
- 13) 小賤 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)
- 14) 小賤 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)
- 15) 小賤健一郎.: 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)
- 16) 小賤健一郎.: 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)
- 17) Yoshiteru Murofushi, Junichi Kamizono, Ngin 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)

- 18)津山新一郎、前菌理恵、小賤健一郎.:壁細胞トランスフォーメーションにおけるリン酸エズリンと CD44 の動態解析、第 49 回日本顕微鏡学会学術講演会、2007 年 12 月 1 日 (福岡県春日市)
- 19)神囿純一、永野聡、室伏善照、小賤健一郎、小宮節郎.:多因子増殖制御増殖型アデノウイルスによる新規遺伝子治療法の開発、第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会、2007 年 10 月 25-26 日 (浜松)
- 20)室伏善照、神囿純一、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)
- 21)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)
- 22)津山新一郎、前菌理恵、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)
- 23)Yoshiteru Murofushi, Junichi Kamizono, Ngin 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)
- 24)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)
- 25)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)

26)小賤健一郎.: 遺伝子治療と再生医療のシーズの相乗的な事業化。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)

27)村上研一、高松英夫、田原博幸、下野隆一、林田良啓、小賤健一郎、津山新一郎、前菌理恵.: 胆道閉鎖動物モデルにおいてビタミン A 投与が肝線維化に及ぼす効果(第 2 報)、第 107 回日本外科学会定期学術集会、2007 年 4 月 11-13 日 (大阪)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

(出願した特許)

1)サービビンプロモーターを含む増殖制御型ウイルスベクターによる造血器腫瘍の遺伝子治療

発明者：小賤健一郎、有馬直道、鈴木紳介

出願人：鹿児島大学

国内出願日：2010 年 3 月 25 日

(特願 2010-070942)

2)癌を治療する増殖型アデノウイルスの医薬 (仮題)

発明者：小賤健一郎

出願人：鹿児島大学

出願準備中 (学内承認済み)

3)慢性関節リウマチを治療する医薬

発明者：小賤健一郎

出願人：鹿児島大学 (予定)

出願準備中 (学内承認済み)

4)血管新生抑制剤

発明者：小賤健一郎

出願人：鹿児島大学

国内出願日：2009 年 4 月 24 日

(特願 2009-105170)

国際出願：2010 年

(PCT/JP2010/057735)

5)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)

6) Rett 症候群を治療する医薬

発明者：小賤健一郎、飯盛健生、松石豊次郎

出願人：中部 TLO

国内出願日：2004 年 11 月 11 日（特願 2004-328158）

国際出願日：2005 年 8 月 3 日（PCT/JP2005/014617）

7) 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）

現在、米国、日本へ指定国移行中

8) CD9 遺伝子からなる心疾患を予防又は治療する医薬

発明者：小賤健一郎、牛越博昭

出願人：中部 TLO

国内出願日：2003 年 12 月 26 日（特願 2003-432279）

国際出願日：2004 年 12 月 23 日（PCT/JP2004/019774）

現在、JST 特許支援事業により、米国、欧州、国内へ指定国移行中。

9) 増殖制御型組み替えアデノウイルスベクター

の効率的な作製方法及びその作製用キット

発明者：小賤健一郎、永野聡

出願人：中部 TLO

国内特許成立：2010 年 3 月 26 日（特許第 4478775 号）

国内出願日：2003 年 7 月 31 日（特願 2003-283427）

国際出願日：2004 年 7 月（PCT/JP2004/010998）

現在、米国、欧州、国内へ指定国移行中。

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

発明者：小賤健一郎、高橋知之

出願人：小賤健一郎

国内出願日：2002 年 6 月 17 日（特願 2004-513486）

国際出願日：2003 年 6 月 12 日（PCT/JP03/07536）

□現在、米国、国内へ指定国移行中。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
隅田泰生	糖鎖アレ	伊藤嘉浩	マイクロアレ イ・バイオチ ップの最新技 術、第12章	(株) シ ーエムシ ー		2007	253-259

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Li L, Okada H, Takemura G, Kosai K, 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)	H1504-1513	2009
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	24-29	2009
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.

Sasaki H, <u>Setoguchi T</u> , Matsunoshita Y, Gao H, Hirotsu M, <u>Komiya S</u> .	The knock-down of overexpressed EZH2 and BMI-1 does not prevent osteosarcoma growth.	Oncol Rep.	23(3)	677-84	2010
Hirotsu M, <u>Setoguchi T</u> , Sasaki H, Matsunoshita Y, Gao H, Nagao H, Kunigou O, <u>Komiya S</u> .	Smoothened as a new therapeutic target for human osteosarcoma.	Mol Cancer.	9(1)	5	2010
Hirotsu M, <u>Setoguchi T</u> , Matsunoshita Y, Sasaki H, Nagao H, Gao H, Sugimura K, <u>Komiya S</u> .	Tumour formation by single fibroblast growth factor receptor 3-positive rhabdomyosarcoma-initiating cells.	Br J Cancer.	101(12)	2030-7	2009
Taniguchi N, Caramés B, Kawakami Y, Amendt BA, <u>Komiya S</u> , 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
Arimura N, Kii Y, Hashiguchi T, Kawahara K, Biswas KK, Nakamura M, Sonoda Y, Yamakiri K, Okubo A, <u>Sakamoto T</u> , Maruyama I.	Intraocular expression and release of high-mobility group box 1 protein in retinal detachment.	Lab Invest.	89(3)	278-289	2009
Masuyama K, Yamakiri K, Arimura N, Sonoda Y, Doi N, <u>Sakamoto T</u> .	Posturing time after macular hole surgery modified by optical coherence tomography images: a pilot study.	Am J Ophthalmol.	147(3)	481-488	2009
Okubo A, Abematsu N, <u>Sakamoto T</u> .	Nasal and independent polypoidal lesions in polypoidal choroidal vasculopathy.	Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.	247(3)	421-425	2009
Yamashita T, Ohtsuka H, Arimura N, Sonoda S, Kato C, Ushimaru K, Hara N, Tachibana K, <u>Sakamoto T</u> .	Sonothrombolysis for Intraocular Fibrin Formation in an Animal Model.	Ultrasound Med Biol.	35(11)	1845-1853	2009

Tawaratsumida, K., Furuyashiki, M., Katsumoto, M., Fujimoto, Y., Fukase, K., Suda, Y., Hashimoto, M.	Characterization of N-terminal Structure of TLR2-activating Lipoprotein in <i>Staphylococcus aureus</i>	J. Biol. Chem.	284(14)	9147-9152	2009
Muraoka, S., Ito Y., Kamimura, M., Baba, M., Arima, N., Suda, Y., Hashiguchi, S., Torikai, M., Suganuma, 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
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
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.	<i>Development.</i>	136	2511-2521	2009.
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-1alpha.	<i>Oncogene.</i>	28	3949-3959	2009
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

<p>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.</p>	<p>Treatment with an adenoviral vector encoding hepatocyte growth factor mitigates established cardiac dysfunction in doxorubicin -induced cardiomyopathy.</p>	<p>Am J Physiol Heart Circ Physiol.</p>	<p>294(2)</p>	<p>H1048-1057</p>	<p>2008</p>
<p>堀川良治、小宮節 郎、小賤健一郎</p>	<p>増殖制御型アデノウイ ルスによる遺伝子治療</p>	<p>関節外科 基 礎と臨床. メ ジカルビュー 社.</p>	<p>27 (1)</p>	<p>132-133</p>	<p>2008</p>
<p>Wakao M, Saito A, Ohishi K, Kishimoto Y, Nishimura T, Sobel M, Suda Y</p>	<p>Sugar Chips Immobilize d with Synthetic Sulfat ed Disaccharides of He parin/Heparan Sulfate P artial Structure</p>	<p>Bioorg. Med. Chem. Lett.</p>	<p>vol.18, No.7</p>	<p>pp.2499-250 4</p>	<p>2008.4</p>
<p>Imamura A, Yoshikawa T, Komori T, Ando M, Ando H, Wakao M, Suda Y, Ishida H, Kiso M.</p>	<p>Design and synthesis of versatile ganglioside probes for carbohydrate microarrays</p>	<p>Glycoconjugat e J.</p>	<p>vol.25, No.3</p>	<p>pp.269-278</p>	<p>2008.4</p>
<p>Baba M, Okamoto M, Hamasaki T, Horai S, Wang X, Ito Y, Suda Y, Arima N.</p>	<p>Highly enhanced expression of CD70 on human T-lymphotropic virus type 1-carrying T-cell lines and adult T-cell leukemia cells</p>	<p>J. Virol.</p>	<p>vol.82, No.8</p>	<p>pp.3843-385 2</p>	<p>2008.4</p>
<p>Nakamura-Tsuruta S, Kishimoto Y, Nishimura T, Suda Y</p>	<p>One-Step Purification of Lectins from Banana Pulp Using Sugar-immobilized Gold Nano-Particles (SGNPs)</p>	<p>Journal of Biochemistry</p>	<p>vol. 143, No.6</p>	<p>pp.833-839</p>	<p>2008.6</p>
<p>Fukase Y, Fujimoto Y, Adachi S, Suda Y, Kusumoto S, Fukase K</p>	<p>Synthesis of Rubrivivax gelatinosus Lipid A and Analogues for Investigation of the Structural Basis for Immunostimulating and Inhibitory Activities.</p>	<p>Bull. Chem. Soc. Jpn.</p>	<p>vol. 81, No. 7</p>	<p>pp.796-819</p>	<p>2008.7</p>

3

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 Ophthalmol.	J92(5)	630-4.	2008 May
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	89(3)	278-89	2009 Mar
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
小賤健一郎	先端医学開発の研究と医学教育.	鹿児島大学医学雑誌.	59(2)	17-23	2007
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
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

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.	145(4)	676-681	2008
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.	6(8)	1276-83	2007
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.	283(6)	3594-3606	2008

Postinfarction gene therapy with adenoviral vector expressing decorin mitigates cardiac remodeling and dysfunction

Longhu Li,¹ Hideshi Okada,¹ Genzou Takemura,¹ Ken-ichiro Kosai,² Hiromitsu Kanamori,¹ Masayasu Esaki,¹ Tomoyuki Takahashi,³ Kazuko Goto,¹ Akiko Tsujimoto,¹ Rumi Maruyama,¹ Itta Kawamura,¹ Tomonori Kawaguchi,¹ Toshiaki Takeyama,¹ Takako Fujiwara,⁴ Hisayoshi Fujiwara,¹ and Shinya Minatoguchi¹

¹Division of Cardiology, Gifu University Graduate School of Medicine, Gifu; ²Department of Gene Therapy and Regenerative Medicine, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima; ³Division of Gene Therapy and Regenerative Medicine, Cognitive and Molecular Research Institute of Brain Diseases, Kurume University, Kurume; and ⁴Department of Food Science, Kyoto Women's University, Kyoto, Japan

Submitted 2 March 2009; accepted in final form 12 August 2009

Li L, Okada H, Takemura G, Kosai K, 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* 297: H1504–H1513, 2009. First published August 14, 2009; doi:10.1152/ajpheart.00194.2009.—The small leucine-rich proteoglycan decorin is a natural inhibitor of transforming growth factor- β (TGF- β) and exerts antifibrotic effects in heart and to stimulate skeletal muscle regeneration. We investigated decorin's chronic effects on postinfarction cardiac remodeling and dysfunction. Myocardial infarction (MI) was induced in mice by left coronary artery ligation. An adenoviral vector encoding human decorin (Ad.CAG-decorin) was then injected into the hindlimbs on day 3 post-MI (control, Ad.CAG-LacZ). Four weeks post-MI, the decorin-treated mice showed significant mitigation of the left ventricular dilatation and dysfunction seen in control mice. Although infarct size did not differ between the two groups, the infarcted wall thickness was greater and the segmental length of the infarct was smaller in decorin-treated mice. In addition, cellular components, including myofibroblasts and blood vessels, were more abundant within the infarcted area in decorin-treated mice, and fibrosis was significantly reduced in both the infarcted and noninfarcted areas of the left ventricular wall. Ten days post-MI, there was greater cell proliferation and less apoptosis among granulation tissue cells in the infarcted areas of decorin-treated mice. The treatment, however, did not affect proliferation and apoptosis of salvaged cardiomyocytes. Although decorin gene therapy did not affect TGF- β 1 expression in the infarcted heart, it inhibited Smad2/3 activation (downstream mediators of TGF- β signaling). In summary, postinfarction decorin gene therapy mitigated cardiac remodeling and dysfunction by altering infarct tissue noncardiomyocyte dynamics and preventing cardiac fibrosis, accompanying inhibition of Smad2/3 activation.

heart failure; myocardial infarction; transforming growth factor- β

CHRONIC HEART FAILURE HAS emerged as a leading cause of mortality and morbidity worldwide. At present, patients with chronic heart failure have a poor prognosis (26) and a high likelihood that they will have to be readmitted to hospital, despite treatment (16, 26). The most common cause of heart failure is myocardial infarction (MI)-induced remodeling of the left ventricle (LV), which is characterized by LV dilatation and

diminished cardiac performance (3, 13, 14, 39). Therefore, to improve clinical outcomes among patients with MI, it will be essential to develop therapies that effectively inhibit the resultant LV remodeling.

The most critical determinant of subsequent LV remodeling and eventual heart failure is the magnitude of the acute MI, which can be determined within several hours of an attack (41). The process of cardiac remodeling is complicated, however, and many other factors, including late death or hypertrophy of cardiomyocytes, fibrosis, and the expression of various cytokines, are associated with the continued disease progression during the chronic stage (5, 32, 47, 53). Several lines of evidence point to the critical role played by transforming growth factor- β (TGF- β) during the progression of myocardial fibrosis, suggesting that TGF- β plays a critical role during the healing process following MI and thus affects cardiac remodeling and function during the chronic stage (10, 17, 29). Soluble TGF- β type II receptor (sT β R_{II}) inhibits the action of TGF- β , most likely by adsorbing TGF- β or by acting as a dominant-negative receptor (20). Our laboratory previously reported that the postinfarction gene therapy with adenoviral vector encoding sT β R_{II} mitigated cardiac remodeling and dysfunction at the chronic stage of MI by affecting cardiac fibrosis and infarct tissue dynamics (37). It was thus suggested that a therapy aimed at suppressing TGF- β signaling might represent a new approach to the treatment of post-MI heart failure, applicable during the subacute stage.

Decorin is a small chondroitin-dermatan sulfate proteoglycan, consisting of a core protein and a single glycosaminoglycan chain (25, 43). Importantly, decorin negatively regulates TGF- β by binding it and neutralizing its biological activity, i.e., a natural inhibitor of TGF- β (54). Levels of decorin are reportedly increased in myocardial tissue from patients who have undergone implantation of an LV assist device, which induces regression of fibrosis (21). The most recent study suggests that in vivo transfer of decorin gene promotes skeletal muscle regeneration after injury (28). In the present study, therefore, we hypothesized that postinfarction treatment with decorin may mitigate chronic heart failure by affecting the LV remodeling process. Decorin protein, when intravenously administered, rapidly disappears from the circulation, and ~70% of the dose is trapped by the liver within 10 min (31). Thus a continuous protein supply is necessary to maintain the plasma level of decorin sufficient to display the effect on the target organ, and a gene therapy is appropriate for that purpose.

Address for reprint requests and other correspondence: G. Takemura, Division of Cardiology, Gifu Univ. Graduate School of Medicine, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1194, Japan (e-mail: gt@gifu-u.ac.jp).

However, a virus-mediated gene delivery directly into the systemic circulation is potentially harmful, occasionally lethal, through viremia or immune reaction (24, 30). Thus a local gene delivery is more preferable; at the site, decorin is continuously produced and released to the systemic circulation, reaching the heart. Direct injection of therapeutic genes into the heart may be more effective, but we selected less invasive and more feasible method (injection into hindlimb muscles) for gene delivery in the present study. Adenoviruses and adeno-associated viruses are currently the most effective vectors for delivering therapeutic genes in the cardiovascular system (42). In the present study, we initiated adenovirus-mediated transduction of the decorin gene into mouse hindlimb muscles on *day 3* of MI, times at which the therapy does not affect acute ischemic death of cardiomyocytes, and examined its effects on post-MI heart failure at the chronic stage.

MATERIALS AND METHODS

Recombinant adenoviral vectors. The adenoviral vector plasmid pAd-decorin, which harbors the cytomegalovirus immediate-early enhancer, a modified chicken β -actin promoter and human decorin cDNA (Ad.CAG-decorin), was constructed using the *in vitro* ligation method, as previously described (33). Control adenovirus harboring the LacZ gene (Ad.CAG-LacZ) was prepared as previously described (6).

Evaluation of decorin expression *in vitro*. HeLa cells were transfected with pHM5-CAG-decorin plasmid using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and cultured for 48 h at 37°C. Levels of human decorin in culture supernatants and in cell lysates were evaluated by Western blotting. In addition, levels of decorin in cultured cells were assessed immunohistochemically using anti-human decorin (R&D Systems) as the primary antibody and Alexa Fluor 488 anti-goat IgG (Invitrogen) as the secondary antibody. Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole. The cells were observed under a laser scanning confocal microscope (LSM510, Zeiss).

Animal experimental protocols. This study was approved by our institutional animal research committee and conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (National Institutes of Health publication no. 85-23, revised 1996). MI was induced in 10-wk-old male C57BL/6J mice (Japan SLC, Shizuoka, Japan) by ligating the left coronary artery, as previously described (36, 38). Ad.CAG-decorin (1×10^{11} particles per mouse) was then injected into the hindlimb muscles of the mice. As a control, Ad.CAG-LacZ was injected in the same manner. In sham-operated mice, the suture was passed but not tied.

MI was induced in 50 mice. Of those, 34 remained alive on *day 3* post-MI and were entered into the study, randomly assigned to the decorin ($n = 16$) or LacZ ($n = 18$) treatment group, and followed up for 4 wk. Sham-operated mice ($n = 8$) were injected with the same volume of saline in a similar manner and examined 4 wk later. In another experiment, 14 mice were divided into decorin and LacZ treatment groups ($n = 7$ each) on *day 3* post-MI, and the survivors ($n = 5$ in the decorin group and $n = 4$ in the LacZ group) were examined on *day 10* post-MI.

Physiological studies. Echocardiography and cardiac catheterization were performed before death, as previously described (36, 38). Animals were anesthetized with halothane (induction, 2%; maintenance, 0.5%) in a mixture of N₂O and O₂ (0.5 l/min each) via a nasal mask. Echocardiograms were recorded 4 wk post-MI using an echocardiographic system (Vevo770, Visualsonics) equipped with a 45-MHz imaging transducer. The right carotid artery was then cannulated with a micromanometer-tipped catheter (SPR 671, Millar Instrument) that was advanced into the LV via the aorta to record pressures and change in pressure over time.

Histological analysis. After the physiological studies were complete, all surviving mice were euthanized, and their hearts removed. The excised hearts were cut into two transverse slices. The basal specimens were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin, after which 4- μ m-thick sections were stained with hematoxylin-eosin, Masson's trichrome, and Sirius red F3BA (0.1% solution in saturated aqueous picric acid) (Aldrich). Quantitative assessments of cardiomyocyte size (as the transverse diameter), cell population, and fibrotic area were made using a LUZEX F multipurpose color image processor (Nireco) with 20 randomly chosen high-power fields in each section.

Immunohistochemical analysis. Deparaffinized 4- μ m-thick sections were incubated with a primary antibody against human decorin (R&D Systems), complement 9 (C9; Novo Castra) at a dilution of 1:100, α -smooth muscle actin (α -SMA; 1A4) at 1:100, von Willebrand factor (vWF) at 1:100, Ki-67 at 1:25 (all from Dako), or CD45 at 1:100 (Pharmingen), after which they were immunostained using an ABC kit (Vector) with the chromogen diaminobenzidine HCl or immunolabeled with Alexa Fluor 488 or 568 at 1:500 (Molecular Probes). Nuclei were stained with hematoxylin or Hoechst 33342.

Apoptosis was evaluated using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated *in situ* nick-end labeling (TUNEL) method with

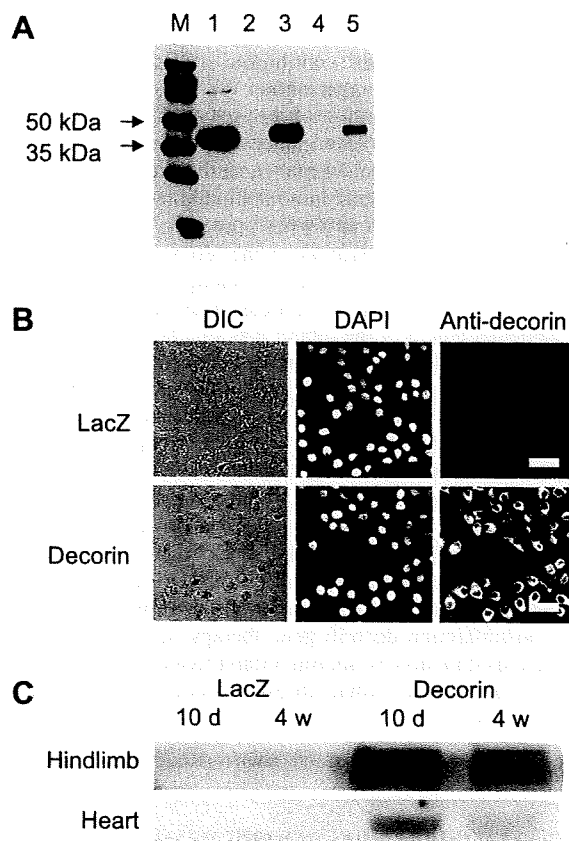


Fig. 1. Expression of decorin *in vitro* and *in vivo* through human decorin gene transfer. **A:** Western analysis of human decorin (40 kDa) in HeLa cells: M, molecular weight markers; *lane 1*, recombinant decorin (a positive control); *lanes 2 and 3*, total cell lysate from HeLa cells transfected with LacZ (*lane 2*) or decorin (*lane 3*) plasmid; *lanes 4 and 5*, supernatant from HeLa cells transfected with LacZ (*lane 4*) or decorin (*lane 5*). **B:** immunohistochemical analysis of human decorin expressed in HeLa cells transfected with decorin plasmid. DIC, differential interference contrast image; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole. Scale bars, 20 μ m. **C:** Western analysis of human decorin in hindlimb muscle and heart tissue from mice bearing 10-day- or 4-wk-old myocardial infarctions (MIs) following transduction with Ad.CAG-LacZ or Ad.CAG-decorin on *day 3* post-MI.

an ApoptTag kit (Chemicon) according to the supplier's instructions. Mouse mammary tissue served as a positive control. For double immunofluorescent labeling, tissue sections were first stained with Fluorescein-FragEL (Oncogene) and then labeled with anti- α -SMA or anti-vWF, followed by Alexa Fluor 568. In addition, to evaluate cell proliferative activity and apoptosis of the salvaged cardiomyocytes, we performed double immunofluorescence for myoglobin (1:1,000), combined with Ki-67 (1:25) or TUNEL. Tissue sections were first stained with anti-Ki-67 followed by Alexa 488 or Fluorescein-FragEL and then labeled with anti-myoglobin antibody (DAKO) followed by Alexa 568. Nuclei were stained with Hoechst 33342. Immunofluorescence preparations were observed under a confocal microscope (LSM510, Zeiss).

Western blotting. Proteins extracted from cultured cells, whole ventricles of hearts, or hindlimb muscles were subjected to 14% polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred to polyvinylidene difluoride membranes. The membranes were then probed with a primary antibody against human decorin, mouse decorin (both from R&D Systems), TGF- β , Smad2, the phosphorylated form of Smad2 (p-Smad2), Smad3, p-Smad3 (all from Cell Signaling), or plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1; Santa Cruz). Three to five hearts or hindlimb muscles from each group were subjected to the blotting. The blots were visualized using enhanced chemiluminescence (Amersham), and the signals were quantified by densitometry. α -Tubulin (Santa Cruz) served as the loading control.

Electron microscopy. After the hearts were excised, cardiac tissue was quickly cut into 1-mm cubes, immersion fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 mol/l phosphate buffer (pH 7.4) overnight at 4°C, and postfixed in 1% buffered osmium tetroxide. The specimens were then dehydrated through a graded ethanol series and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections (90 nm), double-stained with uranyl acetate and lead citrate, were examined under an electron microscope (H-800, Hitachi).

Statistical analysis. Values are shown as means \pm SE. Survival was analyzed using the Kaplan-Meier method with the log-rank Cox-Mantel method. The significance of differences was evaluated using *t*-tests or one-way ANOVA followed by the Newman-Keul's multiple-comparison test. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Expression of human decorin in vitro and in vivo. Human decorin was strongly expressed on Hela cells transfected with the human decorin gene (Fig. 1, A and B). In MI mice administered the gene via intramuscular injection into hindlimbs, human decorin was expressed not only in hindlimb muscles, but also in hearts 1 wk after administration (Fig. 1C), indicating that the gene product reached the hearts. However, we failed in immunohistochemical detection of human decorin in the heart (photographs not shown), suggesting that the amount of decorin fixed in the cardiac tissue was too small to be detected by the immunohistochemical assay, and that the decorin protein detected by Western blots was mostly the circulating one within the heart. Four weeks later, the expression was markedly reduced but still detectable in both the hindlimb muscles and hearts. No human decorin was detected in the LacZ-treated (control) mice at any time.

Effect of decorin gene treatment on MI at the chronic stage. Within 10 days after induction of MI, six (34%) of the controls and five (31%) of the decorin-treated mice had died. The remaining mice all survived to the end of the observation period (4 wk post-MI). In total, the survival rate was 66% in

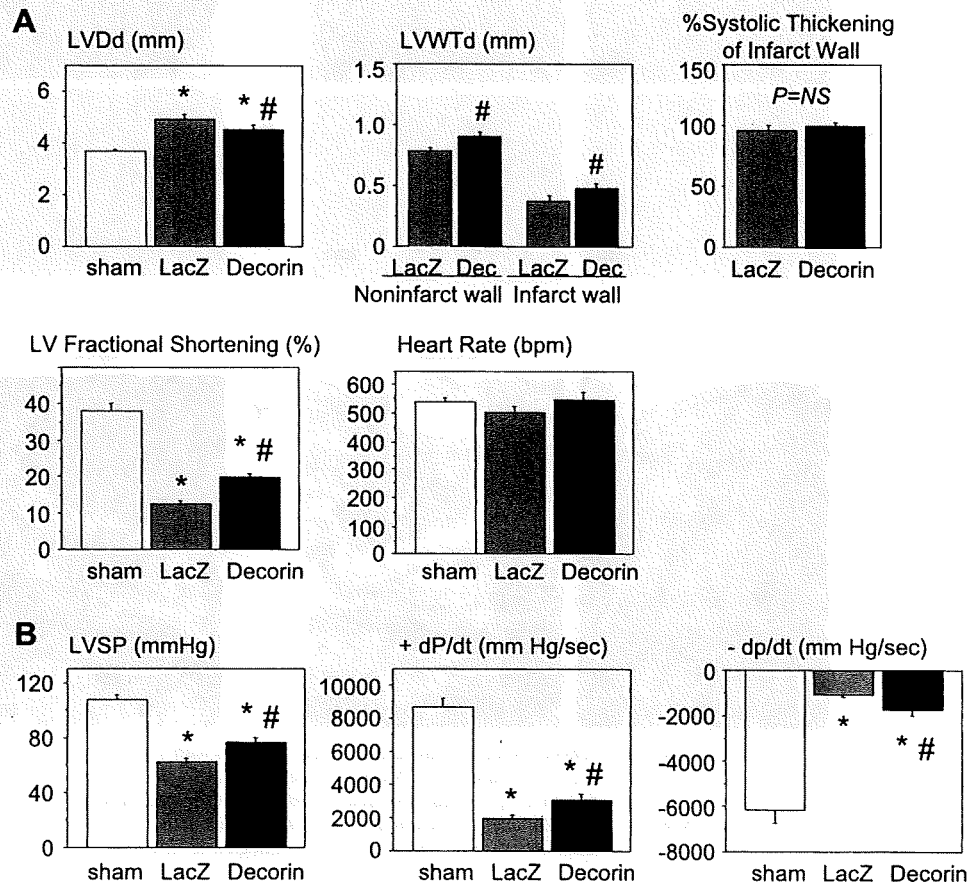


Fig. 2. Left ventricular (LV) geometry and function at the chronic stage (4 wk post-MI) in mice receiving decorin or LacZ gene on day 3 after MI. *A*: echocardiographic data. *B*: cardiac catheterization data. LVDd, LV end-diastolic diameter; LVWTd, left ventricular wall thickness at diastole; LVSP, LV peak systolic pressure; dp/dt, change in pressure over time; NS, nonsignificant; bpm, beats/min. Values are means \pm SE. * $P < 0.05$ vs. sham-operated mice; # $P < 0.05$ vs. LacZ-treated MI mice.

the control group and 69% in the decorin-treated group 4 wk post-MI ($P =$ nonsignificant).

Echocardiography and cardiac catheterization carried out 4 wk post-MI revealed that, compared with the sham-operated mice, control MI mice had marked enlargement of the LV cavity and reduced cardiac function, as indicated by increased LV end-diastolic diameter, increased diastolic thickness of both noninfarct and infarct walls, reduced LV percent fractional shortening, increased LV peak systolic pressure, and increased change in pressure over time (Fig. 2). All of these structural and functional parameters were attenuated in decorin-treated mice, suggesting decorin in some way mitigates post-MI remodeling and cardiac dysfunction. However, the systolic thickening of infarct wall was not increased by the decorin treatment (Fig. 2).

Hearts from control mice showed marked LV dilatation with a thin infarcted segment, while those from decorin-treated mice

showed substantially smaller LV cavities and thicker infarcted segments, with shorter circumferential lengths (Fig. 3A and Table 1). On the other hand, both the absolute area of the infarct and the percentage of the LV taken up by the infarct were comparable between the two groups (Table 1).

By 4 wk post-MI, the infarct area had been replaced by fibrous scar tissue in the control mice (Fig. 3B). In the decorin-treated mice, by contrast, not only collagen fibers but also abundant cellular components were present. As a result, the population of noncardiomyocyte interstitial cells within the infarct area was significantly greater, and the percentage of fibrotic tissue was significantly smaller in decorin-treated mice (Table 1). The number of vWF-positive blood vessels within the infarct area and the percent area of extravascular α -SMA-positive cells were also greater in decorin-treated mice than control mice (Fig. 3, C and D, and Table 1). On the other hand, there was no significant difference in the populations of CD45-

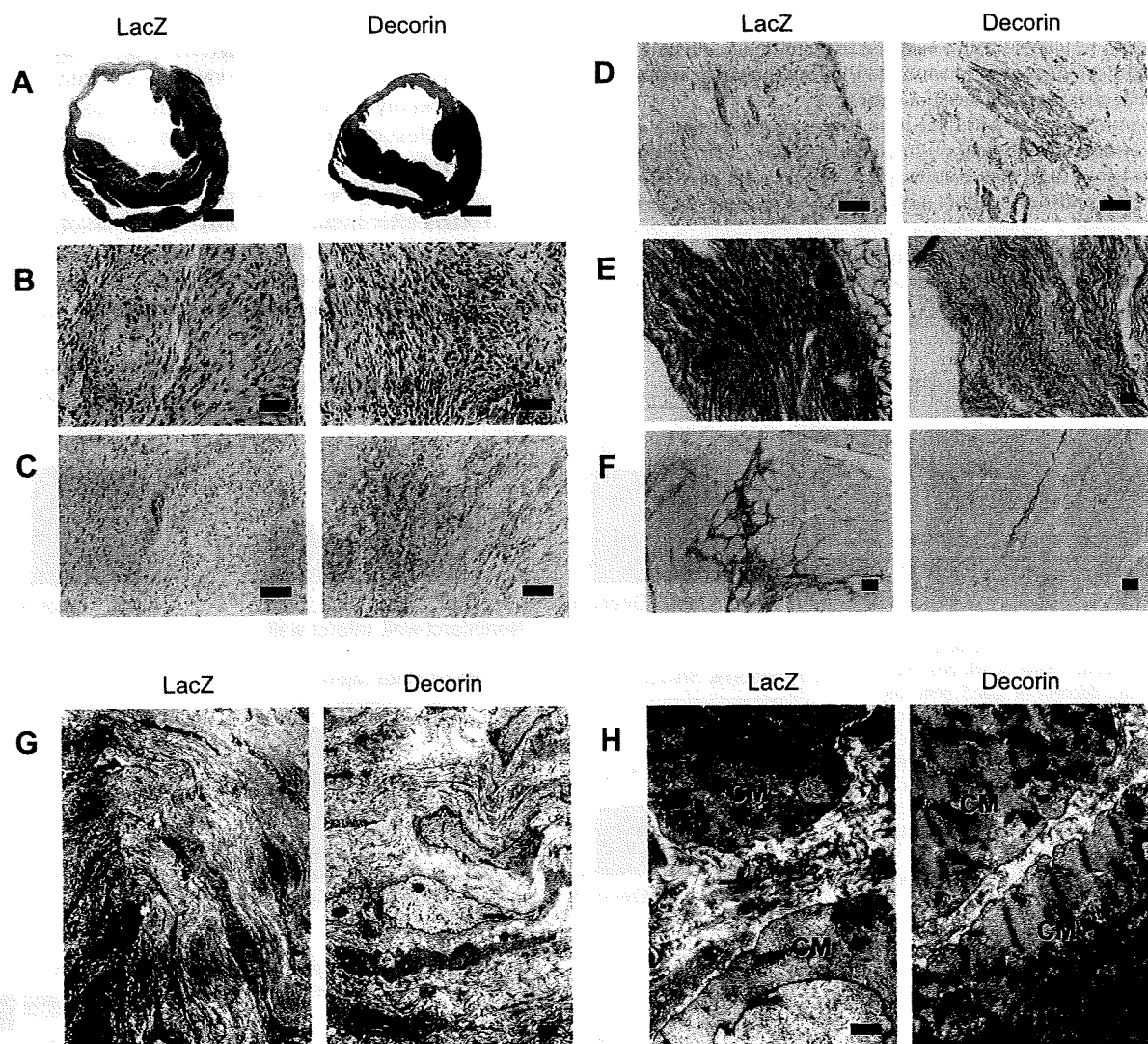


Fig. 3. Gross morphology, histology, immunohistochemistry, and ultrastructure of hearts with 4-wk-old MIs. *A*: transverse ventricular sections of hearts collected from LacZ- and decorin-treated mice. Sections were stained with Masson's trichrome. Note the smaller LV cavity, shorter infarct segments, and thicker infarct walls in the decorin-treated heart. Scale bars, 1 mm. *B–E*: infarcted areas in hearts stained with Masson's trichrome (*B*), anti-von Willebrand factor (vWF; *C*), anti- α -smooth muscle actin (α -SMA; *D*), or Sirius red (*E*). *F*: noninfarcted areas stained with Sirius red. Scale bars, 20 μ m. *G* and *H*: electron photomicrographs of collagen fibrils in the infarcted (*G*) and noninfarcted areas (*H*) of the hearts collected from LacZ- and decorin-treated mice. CM, cardiomyocyte. Scale bars, 1 μ m.

Table 1. Effects of treatment with the indicated gene on the morphometry and histology of hearts bearing 4-wk-old MI

	LacZ	Decorin
<i>n</i>	12	11
Infarcted area		
MI wall thickness, $\times 10^2 \mu\text{m}$	2.9 \pm 0.4	4.7 \pm 0.4*
MI segmental length, mm	14.2 \pm 1.1	10.5 \pm 0.7*
%MI segment in LV	50.9 \pm 3.9	33.6 \pm 2.1*
%MI area in LV	29 \pm 8.4	26 \pm 6.1
Cell population, no./HPF	1,102 \pm 105	1,521 \pm 133*
vWF ⁺ vessels, no./HPF	4.8 \pm 1.4	9.8 \pm 1.3*
α -SMA ⁺ area, %	2.7 \pm 0.4	5.1 \pm 0.7*
CD45 ⁺ leukocytes, no./HPF	2.3 \pm 0.3	2.4 \pm 0.5
%Fibrosis	62 \pm 1.3	51 \pm 2.9*
Noninfarcted area		
Myocyte size, μm	17.6 \pm 0.8	15.0 \pm 0.7*
%Fibrosis	7.1 \pm 0.5	4.4 \pm 0.5*

Values are means \pm SE; *n*, no. of mice. MI, myocardial infarction; LV, left ventricular; HPF, high-power field; α -SMA, α -smooth muscle actin; vWF, von Willebrand factor. **P* < 0.05 vs. LacZ-treated MI mice.

positive leukocytes between the control and decorin-treated hearts (Table 1). Sirius red staining revealed significantly less fibrosis in both the infarcted and noninfarcted LV walls of the decorin-treated mice than the control mice (Fig. 3, *E* and *F*, and Table 1). In addition, the transverse diameter of the cardiomyocytes in the noninfarcted area was significantly greater in the control group than in the decorin-treated group (Table 1), suggesting that compensatory hypertrophy of cardiomyocytes

was less developed in the latter. Finally, electron microscopic examination confirmed that collagen fibrils were less developed and scantier in both the infarcted and noninfarcted areas of decorin-treated hearts than control hearts 4 wk post-MI (Fig. 3, *G* and *H*).

Subacute stage of MI. As mentioned above, we observed greater numbers of cells, especially α -SMA-positive myofibroblasts and vWF-positive endothelial cells (in blood vessels), within the infarcted areas of decorin-treated hearts during the chronic stage of MI (4 wk post-MI). To clarify the mechanisms responsible for the difference in the composition of infarct tissue during the chronic stage, we next evaluated cell proliferation and apoptosis among granulation tissue cells in the hearts 10 days post-MI (subacute stage), i.e., 1 wk after gene transfection. Immunohistochemical detection of Ki-67 antigen showed that the incidence of Ki-67 positivity was markedly greater in cardiac tissue from decorin-treated mice than in that from control mice (Fig. 4*A*). Double immunofluorescent staining also revealed that decorin treatment significantly enhanced proliferation of both myofibroblasts and endothelial cells (Fig. 4, *B* and *C*). Conversely, the incidence of TUNEL positivity was significantly smaller in the decorin-treated group than in the control group, suggesting decorin treatment reduced the incidence of apoptosis among granulation tissue cells (Fig. 5*A*). According to Western blot analysis, the cleaved (active) form of caspase-3 was detected, not in the sham-operated mouse hearts, but in the hearts with 10-day-old MI. However, the signal was apparently attenuated in the hearts treated with the decorin

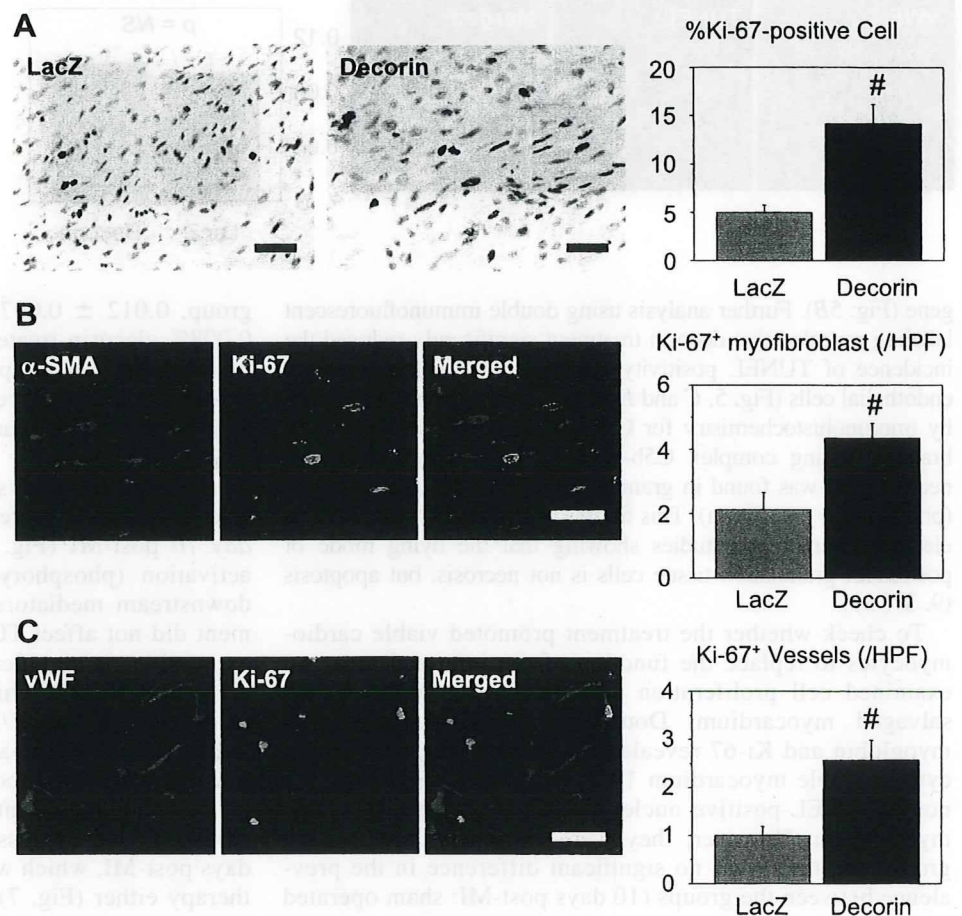


Fig. 4. Cell proliferation within granulation tissue 10 days post-MI. *A*: photomicrographs showing Ki-67-positive cells (*left*) and a graph comparing the incidences of proliferating cells in each group (*right*). *B* and *C*, *left*: confocal photomicrographs of tissue sections from a decorin-treated heart immunolabeled with antibodies against Ki-67 (green fluorescence) plus α -SMA (*B*) or vWF (*C*) (red fluorescence). Scale bars, 20 μm . *Right*: graphs showing the incidences of Ki-67 positivity separately evaluated in myofibroblasts and endothelial cells. HPF, high-powered field. Values in graphs are means \pm SE. #*P* < 0.05 vs. LacZ-treated MI mice.