

あるいは頭頸部扁平上皮癌細胞に導入しそれらの細胞をヌードマウスに投与すると、コントロールの細胞に比べて血管の数及び腫瘍の容積が低下するとともに腫瘍の成長が阻害され生存期間が延長する¹²⁷⁻¹²⁹。

1.13 Interferon-inducible protein 10

“Interferon-inducible protein 10” (IP-10) は *in vivo* において強力な抗血管新生活性を有することが明らかになった免疫調節ケモカインである¹³⁰。

RV を介して IP-10 遺伝子を皮下腫瘍モデルマウスに投与すると、腫瘍の血管形成及び増殖能が低下し皮下腫瘍及び転移領域における腫瘍の成長が阻害される¹³¹。RV を介して IP-10 遺伝子を黒色腫モデルマウスの静脈及び腫瘍内に投与すると腫瘍の拒絶が起き生存期間が延長する¹³²。この効果は Endostatin 遺伝子よりも高い。RV を介して IP-10 遺伝子を黒色腫細胞に導入しその細胞をヌードマウスの皮下に投与すると、コントロールの細胞に比べて微小血管密度が低下し腫瘍の成長が阻害される¹³³。

1.14 16-kDa Prolactin fragment

“16-kDa Prolactin fragment” (16-kDa PRL) は野生型である 23-kDa prolactin のタンパク質の分解的切断により生じたものであり、抗血管新生活性を有する¹³⁴。

AV を介して 16-kDa PRL 遺伝子を膀胱癌細胞に導入しその細胞をマウスに投与すると、腫瘍の形成能が減少する¹³⁵。

1.15 Tumstatin

Tumstatin は 4 型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖の非コラーゲン領域である。Tumstatin は血管新生を抑制し¹³⁶、いくつかの異なるモデルマウスにおいて腫瘍の成長を抑制する¹³⁷⁻¹³⁹。

Tumstatin 遺伝子の全長 (1-232) あるいは C 末端領域 (183-203) の遺伝子を黒色腫細胞に導入しその細胞を皮下に投与すると、コントロールの細胞に比べて腫瘍の成長が減少する¹⁴⁰。プラスミドを介して Tumstatin 遺伝子を Gemcitabine とともに結腸癌及びルイス肺腫瘍モデルマウスの腫瘍内に投与すると、腫瘍の血管新生が阻害されアポトーシスが促進され腫瘍の成長が阻害される。その抑制効果はそれぞれ単独で投与した場合に比べて強い¹⁴¹。ヒトテロメアーゼ遺伝子のプロモーターを有する AV を介して RGD-tumstatin 遺伝子を皮下腫瘍の

モデルマウスに投与すると、腫瘍の血管密度が低下し腫瘍の成長が阻害される¹⁴²。

1.16 Canstain

Canstain は 4 型コラーゲンの $\alpha 2$ 鎖の非コラーゲン領域である。Canstain は担癌モデルマウスにおいて腫瘍の成長を抑制する抗血管新生因子である¹⁴³。9 コピーの低酸素応答配列を有する発現ベクターを介して Canstain 遺伝子を導入した肺癌細胞をヌードマウスに移植すると、コントロールの細胞に比べて腫瘍は小さく微小血管は少ない¹⁴⁴。Canstain 遺伝子発現ベクターをヒト血清アルブミンとカップリングさせ眼癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の転移が少なく転移した腫瘍の成長が阻害され平均生存期間が延長される¹⁴⁵。

1.17 Vasostatin

Vasostatin は Calreticulin の N 末端領域 (1-180) であり担癌マウスにおいて腫瘍の成長を抑制する抗血管新生因子である¹⁴⁶。プラスミドを介して Vasostatin 遺伝子を繊維肉腫あるいはルイス肺癌モデルマウスの筋肉内に投与すると、腫瘍の血管新生及び成長が阻害されアポトーシスが增加し生存期間が延長する¹⁴⁷。エレクトロポレーション法を用いて Vasostatin 遺伝子を黒色腫モデルマウスの筋肉内に Cyclophosphamide と共投与すると、腫瘍の成長が阻害され生存期間が延長する¹⁴⁸。AV を介して Vasostatin 遺伝子を脾臓癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の容積が小さく微小血管密度が低下する¹⁴⁹。プラスミドを介して B7H3 及び Vasostatin 遺伝子を皮下肝臓癌モデルマウスの腫瘍内に投与すると、腫瘍は根絶されて複数の異なる領域における腫瘍結節が完全に退行する¹⁵⁰。なおこの効果は単独ではみられない。

1.18 Angiostatin

Angiostatin は Plasminogen の 38-kDa の断片でありマウス腫瘍モデルにおいて腫瘍の成長及び転移を抑制する抗血管新生因子である¹⁵¹⁻¹⁵³。

AV を介して Angiostatin 遺伝子を導入したグリオーマ細胞をヌードマウスに移植すると、コントロールの細胞に比べて腫瘍の成長及び血管新生が抑制され、腫瘍細胞のアポトーシスが促進され、その結果腫瘍の成長が抑制される¹⁵⁰。マウスにおいて生着したグリオーマあるいは乳癌の腫瘍内に AV を介して Angiostatin 遺伝子を導入すると腫瘍の中

いは近傍で血管新生が抑制され腫瘍の成長が停止する¹⁵⁴。肺転移性乳癌モデルマウスにおいてAVを介してAngiostatin 遺伝子をデリバリーすると腫瘍の成長が抑制される¹⁵⁵。Angiostatin 遺伝子を導入したマウス肺転移性乳癌細胞をマウスに移植すると、コントロールの細胞に比べ腫瘍の成長が抑制され、血管が顕著に減少しアポトーシスを起こした腫瘍細胞が多くみられる¹⁵⁶。白血病及び黒色腫モデルマウスにRVを介してAngiostatin及びEndostatin 遺伝子の両方を導入すると腫瘍形成が抑制される。特に白血病モデルでは投与を受けた動物の40%で完全に腫瘍の形成が抑制される。Angiostatin 遺伝子を導入したマウス腎臓癌細胞をマウスの皮下に移植すると、コントロールの細胞に比べて腫瘍の容積が低下し、腫瘍血管の形成が抑制される¹⁵⁷。また離れた部位に同時に移植した遺伝子非導入マウス腎臓癌細胞の増殖も抑制される。AAVを介してAngiostatin 遺伝子を投与するとヌードマウスの脳に生着したグリオーマの成長が抑制される。また、血管密度が低下し、新生血管を取り囲む腫瘍細胞のアポトーシスが增加する¹⁵⁸。AAVを介してAngiostatin 遺伝子を門脈から投与すると肝臓に生着した結節性及び転移性白血病腫瘍の成長が抑制される¹⁵⁹。新生血管の成長は抑制され腫瘍細胞の広範囲にわたるアポトーシスがみられる。AngiostatinとEndostatin 遺伝子を低電圧エレクトロポレーション法によりマウス結腸癌モデルに導入すると微小血管密度が減少し、腫瘍の成長が抑制される¹⁶⁰。AVを介して導入したAngiostatinのkringle領域1-3(K1-3)あるいはEndostatin 遺伝子の結腸直腸癌、肝細胞癌、ルイス肺癌マウスモデルに対する効果が調べられている¹⁶¹。両遺伝子は免疫能を有するマウスのルイス肺癌モデルでは同様な抗腫瘍効果を示すが、無胸腺マウスではAngiostatinのK1-3 遺伝子の阻害効果が高い。AngiostatinのK1-3 遺伝子はマウス結腸直腸癌モデル及びヒト肝細胞癌モデルでは腫瘍の成長を抑制するが、ヒトの結腸直腸癌モデルでは効果がない。ヒトEndostatinとAngiostatinの融合タンパク質を発現するAVである可溶型のAd-hEndo-angioと内皮特異的なチロシンキナーゼTie2を発現するAd-sTie2の腫瘍抑制効果が両側の前立腺癌マウスモデルで比較検討されている¹⁶²。Ad-hEndo-angioはAd-sTie2よりも腫瘍の成長

を強く抑制する。両方の遺伝子を導入すると投与した部位における腫瘍だけでなく投与していない反対側の腫瘍も完全に退行する。sFlt-1及びAngiostatin-Endostatin 融合遺伝子(stain-AE)のSleeping beauty transposonを用いた非ウイルス遺伝子導入による腫瘍抑制効果がグリア芽腫異種移植マウスモデルで検討されている¹⁶³。皮下の異種移植に両方の遺伝子を投与すると顕著な抗腫瘍活性が示され、腫瘍血管密度、グリア芽腫の成長の阻害あるいは撲滅が起こる。頭蓋内移植モデルでは両方の遺伝子を導入した場合においてのみ持続した腫瘍の退行が示されている。AngiostatinのK1-3, Endostatin, Saxatillin 遺伝子をhydrodynamic法により共導入すると、黒色腫マウスモデルにおいて腫瘍の成長及び肺転移が約90%抑制される¹⁶⁴。他の組み合わせにおける抑制効果は上記の組み合わせよりも低い。AngiostatinのK1-3 遺伝子を組み込んだAVをヒト血清アルブミンに結合させ転移性眼癌のトランスジェニックマウスに導入すると、腫瘍の転移が抑制される¹⁴⁵。

一方、マウス（ルイス肺癌腫瘍、繊維肉腫）及びヒト（膵臓癌）の担癌マウスモデルにおいては、AVを介してAngiostatinあるいはEndostatin 遺伝子を導入しても腫瘍の成長抑制効果はあまりみられない¹⁴⁵。また、AngiostatinのK1-3の遺伝子を組み込んだAVをヒト血清アルブミンと結合させ神経芽細胞腫異種移植マウスモデルに投与したが、腫瘍の成長抑制作用はみられていない¹⁶⁵。

1.19 Endostatin

Endostatinはマウスの腫瘍モデルにおいて腫瘍の成長を顕著に抑制する抗血管新生因子である^{166,167}。

AVを介してEndostatin 遺伝子を乳癌及びルイス肺癌腫瘍モデルマウスに導入すると、腫瘍の成長速度及び体積が低下する¹⁶⁸。ルイス肺癌腫瘍モデルマウスでは血管の数が減少し、肺への微小転移の形成が完全に阻止される。AVを介してEndostatin 遺伝子を結腸/肝臓腫瘍転移モデルマウスに投与すると、マウスの25%で腫瘍の成長が完全に抑制される¹⁶⁹。AVを介してEndostatin 遺伝子を腺腫内癌マウスモデルに導入すると腫瘍の成長が40%まで抑制される¹⁷⁰。Semliki Forest Virus (SFV)あるいはRVを介したEndostatin 遺伝子の腫瘍抑制効

果が悪性脳腫瘍モデルマウスで検討されている¹⁷¹⁾。RVよりもSFVを用いた場合のほうがより顕著に腫瘍の成長が阻害され、腫瘍内血管新生が低下する。RVを介してEndostatin遺伝子を導入した肝癌細胞をヌードマウスに皮下投与すると、コントロールの細胞に比べて腫瘍の容積が顕著に低下する¹⁷²⁾。RVを介してIFN- α 、Angiostatin、Endostatin遺伝子を導入したヒト乳癌細胞MCF7及びMDA-MB435をヌードマウスに移植し腫瘍成長に対する効果が調べられている¹⁷³⁾。両細胞にIFN- α 遺伝子を導入した場合はコントロールの細胞に比べて血管新生が低下し、腫瘍の成長が長期間顕著に阻害される。MCF-7細胞にEndostatin遺伝子を導入した場合は、コントロールの細胞に比べて腫瘍の成長が抑制される。一方、MDA-MB435細胞の場合はコントロールの細胞と比べて阻害されない。両細胞にAngiostatin遺伝子を導入してもコントロールの細胞と比べて腫瘍の成長は阻害されない。浸潤が起こる以前の段階まで乳腺腫瘍が発達したC3(1)/T抗原トランスジェニックマウスにAVを介してEndostatin遺伝子を導入すると、腫瘍の成長が抑制される¹⁷⁴⁾。RVを介したEndostatin遺伝子と放射線照射による腫瘍抑制効果が腺癌モデルマウスで検討されている¹⁷⁵⁾。Endostatin遺伝子により腫瘍の形成速度が遅れ、微小血管密度及び腫瘍の大きさが低下する。更に放射線照射を行うことにより、微小血管密度及び腫瘍の大きさの低下はより顕著になる。Herpes simplex virus 1 (HSV-1) ベクターを介してEndostatin遺伝子をマウス結腸癌モデルマウスの腫瘍部位に直接導入すると、腫瘍の破壊が起こり、血管の数が低下する¹⁷⁶⁾。AVを介してEndostatin遺伝子を悪性腹水マウスに導入すると、腹水の蓄積、腹膜の毛細血管の透過性、腫瘍組織の微小血管密度が減少し、腹水の腫瘍細胞数が減少する¹⁷⁷⁾。これらの治療効果はCisplatinとの組み合わせにより増加する。AAVを介してEndostatin遺伝子を鼻咽腔癌モデルマウスに導入すると、腫瘍の抑制、肺への転移の抑制、微小血管密度の低下が起こる¹⁷⁸⁾。ヌードマウスにおいて右脇腹に皮下移植あるいは舌に同所性移植されたヒト口腔扁平上皮癌の成長はAVを介したEndostatin遺伝子の導入により阻害される¹⁷⁹⁾。Endostatin遺伝子は同所性移植されたリンパ節の転移も阻害する。AVを介してEndos-

tatin 遺伝子が導入された舌の腫瘍の周囲では血管及びリンパ管の数が低下する。ヒト卵巣癌細胞を卵巣に同所移植したマウスにAAVを介して125番目のアミノ酸をプロリンからアラニンに置換したヒトEndostatin変異遺伝子を導入すると、卵巣癌の成長が抑制され、33%の動物が腫瘍の無い状態で長期間生存する¹⁸⁰⁾。Carboplatinと組み合わせて投与すると、60%の動物が腫瘍の無い状態で200日以上生存し、その生存期間はCarboplatin単独よりも長い。共投与により40%の動物で腫瘍の発現が遅れ、移植部位の腫瘍の大きさは小さく、腹膜に転移していない場合もある。AVを介してEndostatin遺伝子を鼻咽腔癌モデルマウスの腫瘍内に導入すると、腫瘍の成長及び血管新生が阻害される¹⁸¹⁾。

一方、RVを介してEndostatin遺伝子を導入した造血幹細胞をマウスに移植しても抗腫瘍活性はみられない¹⁸²⁾。

1.20 Melanoma differentiation-associated-7 遺伝子あるいは IL-24

“Melanoma differentiation-associated-7” (mda-7) 遺伝子はヒトメラノーマの分化、増殖、進行を調節する新規のメラノーマの分化関連遺伝子である。mda-7 遺伝子はアポトーシスを促進し血管新生を阻害する^{183,184)}。

肺癌細胞であるp53野生型A549細胞及びp53欠損H1299細胞にAVを介してmda-7遺伝子を導入し、その細胞を皮下に移植するとコントロールの細胞に比べてアポトーシスが誘導され腫瘍の成長が阻害される¹⁸⁵⁾。A549細胞を用いた異種移植腫瘍モデルマウスの腫瘍内にAVを介してmda-7遺伝子を投与するとともに放射線を照射すると、腫瘍の成長が阻害される¹⁸⁶⁾。腫瘍における微小血管密度の低下及びアポトーシスの促進は、併用処置のほうがそれぞれ単独処置よりも顕著である。コレステロールナノ粒子を介してmda-7遺伝子を原発性及び播種性肺癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の成長が抑制され血管新生が低下する¹⁸⁷⁾。肺癌モデルマウスにAVに組み込んだmda-7遺伝子を抗炎症薬であるSulindacとともに投与すると、それぞれを単独投与した場合に比べて腫瘍の成長がより抑制される¹⁸⁸⁾。乳癌モデルマウスにAVを介してmda-7遺伝子を投与するとともに放射線照射を行うと腫瘍の成長が抑制される¹⁸⁹⁾。肺癌移植モデルマウスに

AV を介して mda-7 遺伝子を Bebacizumab とともに投与すると、腫瘍の成長が阻害され生存期間が延長する¹⁹⁰⁾。また、腫瘍が完全に退行し少なくとも研究期間内は、腫瘍が観察されない。エーリッヒ腹水癌細胞を投与することにより作成した皮下腫瘍モデルマウスに AAV を介して mda-7 遺伝子を投与すると、腫瘍の成長が抑制され生存期間が延長する¹⁹¹⁾。また、腫瘍細胞に特異的なアポトーシスの誘導が起こり腫瘍内の微小血管の形成が低下する。

1.21 NK4

NK4 は hepatocyte growth factor (HGF) の N 末端ヘアピン領域とそれに続く 4 つの krigle 領域である。NK4 は抗血管新生活性を示すことが *in vitro* 及び *in vivo* で示されている^{192,193)}。NK4 の遺伝子治療による担癌マウスの治療効果については多くの報告がなされている。本項では 2005 年以降の報告について紹介する。それ以前の報告については総説を参照されたい^{192,193)}。

あらかじめ AV を介して NK4 遺伝子をマウスの腹膜内に投与後、胃癌細胞を移植すると、腹膜リンパ系組織に選択的な胃癌細胞の増殖が阻害され、その結果、腹膜における播種が抑制され生存が延長される¹⁹⁴⁾。AV を介して NK4 遺伝子を肝臓転移性膵臓癌モデルマウスの脾臓に投与すると、肝臓における転移結節の成長が阻害される¹⁹⁵⁾。また、腫瘍における微小血管密度が顕著に低下しアポトーシスが起きた腫瘍細胞の数が増加する。播種性腹膜スキルス胃癌モデルマウスの腹膜に NK4 発現複合体（陽イオン性脂質/核酸/HMG-1,2 タンパク質）を投与し、Gefitinib を経口で投与すると、腫瘍組織における増殖、血管新生、抗アポトーシス効果が阻害され病勢の進行が相乗的に減速される¹⁹⁶⁾。また、腹水が無い状態での生存期間の中央値及び安楽死までの期間も延長される。皮下及び肝臓に生着した肝臓癌モデルマウスに AV を介して NK 遺伝子を投与すると、腫瘍の成長が阻害され微小血管密度が減少する¹⁹⁷⁾。プラスミド DNA に組み込んだ NK4 遺伝子を天然多糖類の一種である Pullulan に Spermin を導入させカチオン化したものと複合体を形成させてリンパ腫モデルマウスの静脈に投与すると、複合体を形成させないで NK 遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を投与した場合に比べて、長期間生存し肝臓で成長した腫瘍細胞の数及び GPT のレベル

が低い¹⁹⁸⁾。皮下転移結腸腫瘍モデルマウスに AV を介して NK4 遺伝子を腫瘍内に投与すると、腫瘍の成長が抑制され微小血管密度が低下する¹⁹⁹⁾。また、播種した腫瘍の数及び重量も低下する。RGD モチーフを有する AV を介して NK4 遺伝子を骨髄由来間葉系幹細胞に導入し、その細胞を結腸癌肺転移モデルマウスの尾静脈に投与すると、腫瘍に関連した血管新生、リンパ管形成が阻害されるとともに腫瘍細胞のアポトーシスが誘導される²⁰⁰⁾。その結果、肺転移の進行が強く阻害され生存が延長される。

1.22 自殺遺伝子療法

自殺遺伝子療法は“Gene-directed enzyme prodrug therapy” (GDEPT) とも呼ばれている。このアプローチは酵素をコードする遺伝子を腫瘍組織にデリバリーし、非毒性プロドラッグを細胞傷害性ドラッグに転換することにより、腫瘍組織を破壊するものである。様々な酵素/プロドラッグの組み合わせが *in vitro* 及び *in vivo* で試験されている^{201,202)}。その中で癌治療において最も広く用いられる酵素/プロドラッグの組み合わせは“Ganciclovir” (GCV) と“Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase” (HSV-TK) である²⁰³⁾。本稿ではこの組み合わせを HSV-TK/GCV と略する。その他に大腸菌の酵素である Nitroreductase を用いてプロドラッグである CB1954 をアルキル化剤に転換する組み合わせもある²⁰⁴⁾。

以下に担癌モデル動物に対する GDEPT と他の遺伝子治療を併用した例について述べる。腹膜癌モデルラットの腹膜に HSV-TK/GCV 遺伝子治療を行うとともに RV を介して GM-CSF 及び IL-12 遺伝子を投与すると、HSV-TK/GCV 遺伝子治療単独の場合に比べて 480 日後において腫瘍の無い状態で生存する動物の割合及び生存期間が増加する²⁰⁵⁾。前立腺癌転移モデルマウスに HSV-TK/GCV 遺伝子治療を行うとともに AV を介して IL-12 遺伝子を投与すると、腫瘍の成長が抑制される²⁰⁶⁾。メラノーマ腫瘍モデルマウスに HSV-TK/GCV 遺伝子治療を行うとともに HSV-TK 遺伝子と同じベクター内に Secondary lymphoid tissue chemokine 遺伝子を組み込み投与すると、単独の遺伝子の場合に比べて抗腫瘍効果が顕著に促進される²⁰⁷⁾。腎細胞癌モデルマウスに HSV-TK/GCV 遺伝子治療を行うとともに AV を介して Endostatin 遺伝子を投与

すると、それぞれ単独の治療では腫瘍の成長が進行するのに対し、併用治療では腫瘍のほとんどは休眠しているか根絶する²⁰⁸⁾。また、併用治療では単独治療に比べて生存期間も延長する。皮下大腸腫瘍モデルマウスの腫瘍内にエレクトロポレーション法を用いて HSV-TK/GCV 遺伝子治療を行うとともに裸のプラスミドを介して IL-12 遺伝子を投与すると、単独治療に比べて高い初期の抗腫瘍効果及び治療率が得られる²⁰⁹⁾。また、大腸腫瘍細胞を尾静脈から投与した場合、この併用治療により肺転移が低下し生存期間が延長する。

以下にプロモーターを改変することにより腫瘍内皮細胞に対する特異性を付与した GDEPT の例について述べる。RV を用いて内皮特異的な Prepro-Endothelin-1 LTR ハイブリッドプロモーターの元で HSV-TK/GCV 遺伝子治療を結腸直腸癌及び乳癌モデルマウスに行うと、腫瘍の成長が抑制され生存期間が延長する²¹⁰⁾。また、広がった血管が破壊され、腫瘍細胞のアポトーシスが促進される。HRE を含む VEGF の低酸素応答配列を含むプロモーターの元で HSV-TK を発現する RV をルイス肺腫瘍から由来する高転移性 A11 細胞に導入し、その細胞をマウスの皮下に投与して形成された腫瘍は、GCV の投与により退行する²¹¹⁾。血管内皮-Cadherin プロモーターの元で HSV-TK の遺伝子発現が駆動されるトランスジェニックマウスからルイス肺腫瘍モデルマウスを作成し、GCV による治療効果が検討されている²¹²⁾。その結果、GCV の投与により腫瘍の容積及び腫瘍の血管密度が低下し、死滅する腫瘍細胞の数が増加する。最適化された低酸素反応性プロモーターの元で Cytochrome P450 (CYP2B6) を発現する AV を乳癌モデルマウスに投与するとプロドラッグ Cyclophosphamide により腫瘍の成長が抑制される²¹³⁾。また、AV を用いて CMV プロモーターの元で HSV-TK/GCV 遺伝子治療を行うと肝臓の壊死がみられるが、このベクターを用いて HSV-TK を発現させた場合は十分耐容である。

2. 癌に対する抗血管新生療法としての遺伝子治療の臨床研究

癌に対する抗血管新生療法としての遺伝子治療の臨床研究として、Anziozyme, IL-12, mda-7,

HSV-TK/GCV, TNFerade, VEGF に対する ASO, Endostatin について報告がなされている。そのなかで IL-12 及び HSV-TK/GCV については 2000 年以前から臨床研究が行われており、一部の患者では有効性が示されている。その他については、忍容性は示されているが臨床例数が少ないため有効性に対する客観的な評価は現時点では困難のように思われる。本稿ではこれらの臨床結果について述べる。

2.1 Anziozyme

Anziozyme を健常者に対して投与した結果、報告された有害事象のうち Anziozyme に関連したものは頭痛と眠気の 4 例で、十分耐容であった²¹⁴⁾。Anziozyme の臨床第 I 相試験が再発固形腫瘍の患者 28 人に対して行われた結果、患者のほとんどに共通な有害事象はグレード 1 から 2 の投与部位反応で、十分耐容であった²¹⁵⁾。Anziozyme の投与により、内皮細胞の機能不全のマーカーである血清の von Willebrand factor 値の上昇や抗体の産生がみられた患者もいたが、抗体に関連した有害事象はみられなかった。25% の患者で病勢が安定化し、2 人の患者でやや有効性が示された。Anziozyme を Carboplatin 及び Paclitaxel と併用した臨床試験が再発固形癌の患者 12 人に対して行われた²¹⁶⁾。最も共通な有害事象はグレード 3 から 4 の好中球減少、痛み、貧血、けん怠感であった。客観的な奏効がみられ、完全寛解した患者及び部分寛解した患者がそれぞれ 1 人ずついた。なお、これら化学療法剤において薬物動態の相互作用はみられなかった。

2.2 IL-12

IL-12 の癌に対する遺伝子治療の臨床研究については数多くの報告がある。本項では 2004 年以降の臨床試験について紹介する。それ以前の報告については成書を参考にされたい^{217,218)}。

AV を介した IL-12 遺伝子治療の臨床第 I 相試験が消化器腫瘍患者 21 人の腫瘍内への投与により行われた²¹⁹⁾。この治療は十分耐容で、投与量を制限する有害事象はなかった。頻繁ではあるが一過性の有害事象として発熱、けん怠感、発汗、リンパ球減少が観察された。なお、これらの有害事象は外来遺伝子の発現に起因するものではなく、ベクターの投与に関連していると思われた。蓄積毒性はなかった。投与部位における腫瘍において部分的ではあるが客観的な奏効が肝癌患者の 1 人にみられた。病勢の安

定が29%の患者でみられ、そのほとんどは原発性肝癌の患者であった。プラスミドDNAを介したIL-12遺伝子治療の臨床試験が転移性黒色腫の患者9人の腫瘍内への投与により行われた²²⁰⁾。治療は十分忍容であった。2人の患者で病勢が安定し、1人の患者が完全寛解した。治療効果がみられた患者において血管新生及びリンパ球の浸潤の局所的な低下がみられた。

2.3 mda-7

AVを介したmda-7遺伝子治療の臨床研究が切除可能な固形腫瘍の患者28人の腫瘍内投与により行われた。投与腫瘍内における細胞のアポトーシスが常に観察された。投与に関連する有害事象は各人に限定的で、軽度であった。繰り返し投与を行った腫瘍領域の44%で臨床活性が観察され、2人の黒色腫の患者で部分及び完全寛解がみられた。AVを介したmda-7遺伝子治療の臨床研究が進行性癌の患者22人の腫瘍内投与により行われた²²¹⁾。アポトーシスの誘導が投与した全ての腫瘍においてみられた。

2.4 HSV-TK/GCV

再発性多形成グリア芽腫の患者48人に対して腫瘍の切除後RV産生細胞を用いてHSV-TK/GCV遺伝子治療が脳内で行われた²²²⁾。重篤な有害事象はみられなかった。生存期間中央値は8.6箇月であり、12箇月における生存率は27%であった。6箇月及び12箇月で、それぞれ少なくとも7人及び2人の患者で腫瘍の再発はなかった。そのうち1人は24箇月以上腫瘍が再発しなかった。原発性多形成グリア芽腫で腫瘍を除去後に放射線治療を行った患者7人に対して同様な治療が行われた²²³⁾。患者により程度が異なるが、腫瘍を切除した空洞の周囲の腫瘍周辺でネクロシスがみられた。RV産生細胞を投与した部位に近接した箇所では増殖している腫瘍細胞はわずかしみられなかったが、脳において投与部位から離れた位置では多かった。soluble Fas ligand, IL-12, IFN- γ の血清レベルが増加した。局所的な前立腺癌の患者52人に対して複製欠損アデノウイルスを用いたHSV-TK/GCV遺伝子治療が前立腺内に行われた²²⁴⁾。有害事象が50%の患者で観察されたが、軽度であり治療が終了した後では完全に無くなった。2回の臨床試験において28人の患者のうちの43%において“Prostate-specific antigen” (PSA) が平均44%減少した。進行性悪

性脳腫瘍の患者13人に対して複製欠損アデノウイルスのベクター粒子を用いたRous sarcoma virusプロモーターにより駆動されるHSV-TK/GCV遺伝子治療が腫瘍内で行われた²²⁵⁾。2 \times 10¹¹個のベクター粒子を投与した場合は安全で忍容であったが、2 \times 10¹²個の場合は中枢神経系の有害事象が観察された。患者の1人は治療後29.2箇月生存し、病勢が安定していた。2人の患者は腫瘍が進行し25箇月以上生存した。10人の患者が治療10箇月以内に死亡した。死後の組織の神経病理学的な検査によると、投与部位における空洞、凝固壊死の腫瘍内巣、残存腫瘍に対するマクロファージ及びリンパ球の浸潤が観察された。再発性卵巣癌の患者14人に対してAVを用いたHSV-TK/GCV遺伝子治療が行われた²²⁶⁾。一過性のベクターに関連した発熱が4人の患者でみられた。腹痛、胃腸の症状などのベクターに関連している可能性のある他の全身症状が6人の患者でみられた。反応が評価可能な13人の患者のうち、5人で病勢が安定化し、8人で疾患が進行した。評価可能な11人の患者のうち10人で抗アデノウイルス抗体のタイターが増加した。悪性神経膠腫の患者に対してレトロウイルスパッケージング細胞及びアデノウイルスを用いたHSV-TK/GCV遺伝子治療が行われた²²⁷⁾。レトロウイルスパッケージング細胞は7人の患者における8個の腫瘍に、アデノウイルスは7人の患者における7個の腫瘍に用いられた。アデノウイルス投与の患者の4人において抗アデノウイルス抗体が増加し、そのうち2人が短期間発熱した。てんかん性発作の頻度が2人の患者において増加した。レトロウイルスのグループでは7人の患者のうち3人で病勢が安定化した。レトロウイルス、アデノウイルス、コントロールにおける生存期間中央値はそれぞれ7.4箇月、15.0箇月、8.3箇月であった。新しく診断され過去に治療したことのない多形成膠芽腫の患者248人に対してレトロウイルスを用いたHSV-TK/GCV遺伝子治療の臨床第III相試験が行われた²²⁸⁾。患者は標準的な治療（外科的な切除及び放射線治療）あるいは標準的な治療+補助的な遺伝子治療がなされた。遺伝子治療及びコントロール群における無増悪生存期間の中央値は、それぞれ180日及び183日であった。遺伝子治療及びコントロール群における生存期間中央値は、それぞれ365日及び354日であり、12箇月にお

ける生存率はそれぞれ50及び55%であった。このように遺伝子治療による有効性は示すことができなかったが、実行可能であり安全であることは支持された。なお、有効性が示されなかった原因として、HSV-TK 遺伝子が腫瘍細胞にうまくデリバリーされなかった可能性が指摘されている。難治性の癌患者16人（黒色腫が13人、乳癌が1人、非小細胞肺癌が1人、骨形成肉腫が1人）に対してRVを用いたHSV-TK/GCV 遺伝子治療が腫瘍内で行われた²²⁹⁾。投与後1人の患者において蜂巣炎に関連したグレードIIIの痛みがみられた。投与部位において腫瘍反応は確認されなかった。進行性黒色腫の患者13人のうち6人が1年以上生存した。放射線治療の後に局所的に再発した前立腺癌の患者36人に対してAVを用いたHSV-TK/GCV 遺伝子治療の臨床第I/II相試験が行われた²³⁰⁾。患者においてPSAの倍加時間が15.9箇月から42.5箇月に延長された。患者の28人でPSAが平均して28%減少した。PSAが初期のレベルまで戻るのに平均8.5箇月かかった。ベクター投与2週間後に血清におけるアデノウイルス抗体のタイターが徐々に増加した。この時期に末梢血におけるCD8陽性T細胞の割合が増加した。癌細胞を含む生検においてCD8陽性T細胞とアポトーシスを受けた細胞の数に相関関係がみられた。悪性の神経膠腫の患者27人に対して腫瘍を切除後、RV産生細胞を用いたHSV-TK/GCV 遺伝子治療が脳内で行われた²³¹⁾。上皮細胞への遺伝子導入を介した血管のネクロシスにより脳内において出血性のネクロシスがみられ、局所の炎症性免疫反応が高い頻度でみられた。局所における再発性及び転移性のAndrogen難治性前立腺癌の患者11人に対する臨床第I相試験で、AVを用いたOsteocalcinプロモーターにより駆動されるHSV-TK/GCV 遺伝子治療が腫瘍のリンパ組織及び骨転移で行われた²³²⁾。全ての患者がこの治療に忍容で重篤な有害作用はみられなかった。治療した領域における局所的な細胞死が7人の患者でみられた。1人の患者は、317日間治療した領域において病勢が安定化した。治療前に腫瘍に関連した症状を訴えていた患者2人のうち、骨に痛みがある患者1人は痛みが解除された。CD8陽性T細胞の割合がCD4陽性T及びB細胞、ナチュラルキラー細胞の割合よりも増加した。外科的に切除し放射線治療を行った後

再発した悪性神経膠腫の患者に対してAVを用いたHSV-TK/GCV 遺伝子治療が行われた²³³⁾。AVの脱落、局所的及び全身的な有害事象は認められなかった。脳において浮腫は増加しなかった。患者のKarnofsky Performance Statusスコアは3箇月及び6箇月で、それぞれ患者の80%及び55%で70あるいはそれ以上維持された。11人の患者のうち10人が52週間以上生存し、生存期間中央値は112.3週であった。患者の1人は248週間後も生存している。再発性の多形性神経膠腫の患者12人に対してRV産生細胞を用いたIL-12及びHSV-TK/GCV 遺伝子治療が腫瘍内で行われた²³⁴⁾。この治療は忍容であり、有害事象はごくわずかしみられなかった。Th1サイトカインが腫瘍内及び血漿において顕著にかつ持続的に増加した。2人の患者で部分寛解がみられ、そのなかの1人は投与部位とは離れた部位における腫瘍塊が消失した。4人の患者でやや有効であり、4人の患者で病勢が安定化し、2人の患者で疾患が進行した。6箇月及び12箇月における無増悪生存率は、それぞれ47%及び14%であった。6箇月及び12箇月における全生存率はそれぞれ58%及び25%であった。局所的前立腺癌ではあるが再発のリスクが高い患者23人に対してHSV-TK/GCV 遺伝子治療の臨床第I/II相試験が行われた²³⁵⁾。有害事象はわずかであった。細胞変性がみられ、その程度は腫瘍の大きさと相関した。局所的及び全身的な免疫反応が増加した。アポトーシスの増加及び微小血管密度の低下がみられた。前立腺癌の患者8人に対してAVを用いたHSV-TK/GCV 遺伝子治療が腫瘍内で行われた²³⁶⁾。顕著な有害事象は観察されなかった。血清におけるPSAの倍加時間が2.9ヶ月から6.2箇月に延長された。5人の患者で明らかなPSA値の低下がみられた。患者の1人において、繰り返しの投与により臨床反応が繰り返しみられた。CD8陽性/HLA-DR陽性細胞が増加する傾向がみられた。

2.5 TNFerade

TNFeradeは放射線に感受性のあるEgrプロモーターをTNF- α cDNAの上流につなぎ複製欠損アデノウイルス5型に組み込んだものである。TNFerade 遺伝子治療と放射線治療の組み合わせは担癌モデルマウスの非臨床試験で有効性が確かめられている²³⁷⁻²⁴¹⁾。以下に臨床試験の結果を示す。

放射線治療を行っている固形腫瘍の患者36人に TNFerade 遺伝子治療と放射線治療が行われた²⁴²⁾。全ての患者で有害事象がみられ、30人の患者で腫瘍反応がみられた。最も頻繁にみられた有害事象は、発熱(22%)、投与部位における痛み(19%)、悪寒(19%)であった。投与量が制限されるような有害事象はみられなかった。30人の患者のうち21人で客観的な腫瘍反応がみられた。その内訳は、完全寛解(5人)、部分寛解(9人)、やや有効(7人)であった。複数の部位に腫瘍がある患者5人で同一患者における放射線単独治療あるいは TNFerade 遺伝子治療と放射線治療を行った腫瘍部位における腫瘍反応を調べた結果、4人で両治療を行った場合のほうが良好な腫瘍反応が得られた。四肢に軟部組織肉腫のある患者14人に TNFerade 遺伝子治療と放射線治療の臨床第 I 相試験が行われた²⁴³⁾。TNFerade は十分忍容であり、投与量を制限する有害事象はみられなかった。最も共通な有害事象は、グレード I-II の悪寒(50.0%)、発熱(43.0%)、倦怠感(36.0%)、インフルエンザに似た症状(21.0%)であった。評価可能な患者13人のうち、11人に手術前 TNFerade が投与され、2人は苦痛緩和の治療が行われた。11人の患者で客観的あるいは病理的な腫瘍反応がみられ、2人は完全寛解し、9人は部分寛解した。1人は病勢が安定した。部分寛解は腫瘍が最大 675 cm² と非常に大きい場合でもみられた。手術を受けた患者11人のうち10人で病理的な完全あるいは部分寛解がみられた。様々な種類の癌患者16人に TNFerade 遺伝子治療と放射線治療が行われた²⁴⁴⁾。投与量を制限する有害事象はなかった。完全寛解、部分寛解、やや有効、病勢の安定がそれぞれ4人、2人、3人、4人でみられた。完全寛解の患者のうち3人が2年以上生存した。

2.6 VEGF に対する ASO

進行性悪性腫瘍の患者51人に VEGF に対する ASO が投与された²⁴⁵⁾。投与量が制限される有害事象にはグレード4の発熱、肺塞栓症が含まれた。軽い貧血、発熱、倦怠感、胃腸の病気が最も共通な有害事象であった。AIDS カポジ肉腫の患者の1人で完全寛解がみられた。皮膚の T 細胞リンパ腫の患者1人で劇的な反応がみられた。腎細胞癌、気管支肺癌、小細胞肺癌、甲状腺癌、卵巣癌、軟骨肉腫の患者の合計6人(12%)でレジメンを行うすぐ前

で得られた値と比較して無増悪生存期間の中央値の延長がみられた。

2.7 Endostatin

AV を介した Endostatin 遺伝子治療の臨床第 I 相試験が、固形腫瘍の患者15人に対して腫瘍内への29回の繰り返し投与により行われた²⁴⁶⁾。投与量が制限されるような有害事象は起こらず、最大忍容投与量には至らなかった。投与部位の発熱及び局所反応が共通な有害事象であったが、重篤になることはほとんどがなかった。患者の1人で軽い一過性の肝毒性がみられた。遺伝子が投与された腫瘍に対してやや有効性がみられた。鼻咽頭癌の患者1人で腫瘍のコントロールの改善がみられた。2人の患者で腫瘍のネクロシスが起きた。

3. 癌に対する抗血管新生療法としての遺伝子治療の問題点と今後の展望

癌に対する抗血管新生療法としての遺伝子治療の大きな課題は、治療用遺伝子の腫瘍組織特異的な高いデリバリー及び治療用遺伝子の腫瘍組織特異的な高発現と考えられる。本稿ではこれらの点を中心に遺伝子治療の問題点、その克服に向けた基礎的な取り組み及び今後の展望について述べる。

3.1 遺伝子導入の腫瘍内皮に対する

ターゲティング

3.1.1 播種性腫瘍転移に対するターゲティング

腫瘍に関連した血管内に治療用の導入遺伝子を効果的にデリバリーし発現させるには血流を介した遺伝子ベクターのデリバリーが必要である。しかし、感染に対して生体を防御するために微生物及び他の微粒子を破壊する因子が血流には存在する²⁴⁷⁾。したがって、ベクターが播種癌に近づくには、この厳しい環境で生存できなければならない。実際、静脈内投与後、ほとんどのウイルスベクターは恐らく肝臓のクッパー細胞による非特異的な食作用により肝臓で非常に速く除去される。これは血液を介したウイルスの末梢の標的に対する効果的なデリバリーの主要な障害となる。

ステルス(ポリマーコート)ベクターの使用²⁴⁸⁾、ビスホスホネート(クロドロネート)リポソームを用いたクッパー細胞の除去²⁴⁹⁾、最初の投与で食作用によるクリアランスをダウンレギュレートした後2回目の投与で循環を改善させる方法²⁵⁰⁾など食作

用によるウイルスベクターのクリアランスを克服するための数々の戦略が開発されている。遺伝子導入ウイルスベクターの投与により生じる有害事象の原因は、導入した遺伝子の発現よりもベクター自体により生じる場合が多いので、有害事象が起これないようにベクターを改善することも重要な問題である。

5型AVを静脈投与するとマウスの肝細胞に効率よく感染するように、多くのウイルスベクターは標的としない細胞への感染に内在的な指向性を有している。その結果、標的細胞へデリバリーされるベクターの量が低下する。また導入遺伝子が標的細胞ではない肝臓に発現することにより、毒性を含む様々な有害事象も誘導される²⁵¹⁾。腫瘍に関連した血管に効率良くベクターをデリバリーするためには、標的としない細胞及び組織への感染を回避して効率良く血中で持続させ、標的細胞及び組織に感染できるようにする必要がある。

3.1.2 遺伝的な改変によるウイルスベクターのターゲティングの回避及びターゲティングの獲得

ウイルスの指向性を遺伝的に改変して正常な指向性を除去し新しい指向性を導入することは有用である。CAR結合、インテグリン結合、ヘパリン硫酸結合部位を除去することにより5型AVのマウス肝臓に対するターゲティングを回避する試みがなされているが^{252,253)}、その結果はグループにより異なっている。*in vivo*における感染経路が多様であるため成功例は多くないが、遺伝子の改変によりターゲティングが回避できる場合がある。一方、このような遺伝子レベルにおける変異の導入により新たな感染が生じる可能性及び*in vivo*における遺伝子再構成により複製可能なウイルスが生じる可能性について注意深く考慮する必要がある。

低分子のペプチドはウイルスタンパク質に挿入することにより、ウイルスタンパク質全体の構造には影響を与えないで再ターゲティングができるため、リガンドとして注目されている。RGDペプチドは $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを再ターゲティングするために最近最も広く用いられているペプチドリガンドである。その他のペプチドも血管内皮における未知の受容体のターゲティングに用いられている。ウイルスゲノムに対するRGD配列の遺伝的な挿入がアデノウイルス及びアデノ随伴ウイルスで行われている。

アデノウイルスにおいて元々存在するCAR結合の除去後RGD配列がファイバーのH1ループに挿入された。このRGD配列の挿入によりヒト伏在静脈内皮細胞及び初代ヒト内皮細胞におけるAVの導入効率が増加したが、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)における導入効率は野生型と同じであった^{254~256)}。ヘパリン硫酸プロテオグリカン受容体(HSPG)を介して細胞に感染する性質を有するAAV-2において、RGD配列がウイルスのVP3部位に挿入された。このRGD挿入によりインテグリンを発現している癌細胞へ感染することができた^{257,258)}。

血管内皮をターゲティングすることを目的として、ファージライブラリーにより同定されたペプチドに対する遺伝子がウイルス表面タンパク質をコードする遺伝子に挿入された。例えば、MTPFPTSNEANLをAAV-2カプシドに導入した結果、HSPGに対する結合が低下し血管内皮細胞に対するターゲティングが増加した。この導入により*in vivo*においてAAV-2が血漿で循環する期間が延長するとともに肝臓における蓄積が低下し、大静脈からの静脈内皮細胞に対し野生型AAVよりもターゲティングの効率が2.5倍以上増加した²⁵⁹⁾。SIGYPLPをアデノウイルスファイバーのH1ループに導入するとHUVEC及びヒト伏在静脈内皮細胞のような内皮細胞に対するターゲティングが増加した²⁶⁰⁾。

3.1.3 生理的なターゲティングの回避及び新たなターゲティングの獲得

ターゲティングの回避を目的としたより単純で安全であると考えられる戦略の1つは、ポリエチレングリコールのような反応性の疎水性ポリマーでAVの表面をコーティングして本来有する指向性を除去し²⁶¹⁾、新しいリガンドを付着させて新たな感染の指向性を有するようにさせることである²⁶²⁾。AVの周囲に物理的な障害物を形成させることにより、AVは抗AV抗体及び受容体から非特異的に防御される。例えば“poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]” (pHPMA)でコーティングしたAVでこのような検討が行われている²⁶³⁾。pHPMAでコートしたAVでは本来のAVでみられるA549細胞及びHUVECに対する感染が顕著に低下する。pHPMAでコートしたAVにFGFあるいはVEGFを結合させるとHUVECに対する感染が増加する。

また、HUVEC及びCAR発現SUIT2細胞の共培養においてpHPMAでコートしたAVはHUVECに対して選択的に感染するようになる。更に、pHPMAでコートしたAVは静脈投与後血漿における循環期間が延長される²⁴⁸⁾。これら増殖因子の代わりに細胞結合性SIGYPLPペプチドを付着させた非ウイルスベクター及びAVにおいてHUVECに対する感染効率が増加することが示されている²⁶⁴⁾。

非ウイルスベクターあるいはウイルスベクターの表面にポリマーを介してRGDペプチドを合成あるいは挿入することにより、腫瘍血管に対する結合が増加することも示されている。リポソームあるいはナノ粒子のような非ウイルスベクターは指向性を有さないが、PEGと結合したRGDを介してターゲティングできる。例えば、PEG化ポリエチレンミンにRGDペプチドを結合させたナノ粒子を静脈内におけるVEGFR-2-siRNAのデリバリーに用いると、VEGFR-2の発現、腫瘍の成長及び血管新生が阻害される²⁶⁵⁾。陽性ポリマー脂質及び低分子のインテグリン $\alpha_v\beta_3$ に対するターゲティングリガンドを用いたナノ粒子はインテグリンにターゲティングできる。このベクターにはpRbのシグナリングを破壊して細胞増殖及びVEGFを介した毛細管腔の形成を阻害する変異Raf-1遺伝子²⁶⁶⁾が組み込まれており、腫瘍血管のアポトーシス、原発性腫瘍の退行、肺転移が阻害される²⁶⁷⁾。PEGを介してRGDペプチドを付加したAVは内皮細胞にターゲティングされ、血液循環が増加し活性化された内皮細胞における導入遺伝子の発現が促進される²⁶⁸⁾。

3.1.4 ウイルスベクターのPseudotyping

Pseudotypingとはあるウイルスの細胞表面タンパク質を他のウイルスのものと交換し本来有する指向性を他のウイルスが有する指向性に変化させる過程である。例えば、AAVは異なった血清型からのカプシドを用いてPseudotypingすることにより新たにターゲティングできる場合が多い。しかし、利用頻度の高いAAV-2はHUVECに対して本来感染しやすいので^{269,270)}、PseudotypingによりAAV-2の内皮に対するターゲティングが改善されることは考えにくい。対照的に、アデノウイルスのなかで利用頻度の高い血清型であるAd5型の血管選択性はサブグループBアデノウイルス16からのファイバーでPseudotypingすることにより増加する。こ

のターゲティングは主にCD46を介したものであるが²⁷¹⁾、Ad5型の血管導入効率が改善され、その例として*ex vivo*におけるヒト伏在静脈及び*in vitro*におけるHUVECがある²⁷²⁾。サブグループBのアデノウイルスはAd5型よりも*in vivo*におけるマウス肝細胞への感染が低いためクリアランスは低く、末梢部位へ高い効率でターゲティングされる²⁷³⁾。

レンチウイルスは内皮に対する感染性は低いが他のウイルスに由来する様々な非レトロウイルス糖タンパク質でPseudotypingできる。それらのウイルスの例として、ベシクロウイルス、リッサウイルス、ヘパドナウイルス、フラビウイルス、パラミクソウイルス、オルトミクソウイルス、フィロウイルス、アルファウイルスがある²⁷⁴⁾。しかし、これらPseudotypingレンチウイルスの中でどれがより選択的に内皮にターゲティングされるかは不明である²⁷⁵⁾。

3.1.5 抗体を用いたターゲティング

抗体を腫瘍血管に特異的な受容体に結合させ、ベクターを特異的にターゲティングすることもできる。戦略の1つはアデノウイルスのカプシドと腫瘍血管に関連したエピトープの両方に結合できる二官能性抗体を用いることである。例えば、アデノウイルスのファイバー及びEndoglinの両方を認識する抗体を用いることにより、AVはEndoglinを介してHUVECにターゲティングできる。しかし、この抗体を結合させたAVはCARを除去していないため、CARを介して他の細胞へターゲティングされる²⁷⁶⁾。モロニーマウス白血病ウイルスのエンベロープを遺伝子改変してIgG結合ペプチド（プロテインA）を挿入すると、このウイルスが抗体と結合しターゲティングできる。例えば、抗Flk-1/KDR抗体を用いることにより、このRVは活性化内皮細胞にターゲティングできる²⁷⁷⁾。また、ポリマーをウイルスのコートに用いると、抗体を用いたターゲティングが可能である。例えば、アデノウイルスの表面をPEGと結合しE-Selectinに特異的な抗体を連結すると、血液循環時間が延長され活性化血管内皮細胞における導入遺伝子の発現が促進される²⁶⁸⁾。低酸素応答配列を有するVEGF及びErythropoietinのプロモーターは正常時に比べ低酸素においてより効率良く転写を促進する²⁷⁸⁾。

3.2 転写の腫瘍内皮に対するターゲティング

遺伝子発現が正常な血管と腫瘍の血管では異なる

場合がある。したがって、治療用の導入遺伝子を腫瘍の血管に関連したプロモーターの下流に配置し、腫瘍血管に対して特異的に発現させることが可能である。このようなプロモーターは腫瘍関連血管系に過剰発現している転写因子により調節される。例えば、Engoglin, Endothelin-1, VEGF, Pro-Endothelin-1, ICAM-2, Flt-1, KDR のプロモーターは GDEPT 遺伝子, 抗血管新生因子, アポトーシス誘導タンパク質, ウイルス療法の鍵となるウイルス遺伝子の転写に用いることができる。

治療に有効な腫瘍内皮選択的プロモーターを同定する試みがなされている。例えば、Flt-1, ICAM-2, KDR のような内皮のプロモーターとレトロウイルスのハイブリッド LTR を組み合わせると *in vivo* の腫瘍内皮に対してより選択的な遺伝子の転写が起きるが、その中で LTR-ICAM-2 プロモーターの組み合わせが最も特異性において優れている²⁷⁹⁾。自己不活性化 LV に Tie1, Tie2, FLK-1 を含む各種プロモーターを組み込み、様々な初代細胞及びセルラインを用いて内皮特異的な遺伝子の転写が比較されている。その結果、Tie2 プロモーター/エンハンサー配列は内皮における遺伝子の転写により特異的であった²⁷⁸⁾。

3.2.1 アポトーシス促進タンパク質の内皮における転写

腫瘍血管関連プロモーターとアポトーシスを促進する遺伝子の組み合わせにより腫瘍血管を選択的に破壊することができる。例えば、Prepro-Endothelin-1 の改変プロモーターが TNFR1 の細胞外部分及び Fas の膜貫通/細胞外部分の両方を含むキメラ death receptor の発現を駆動するために用いられた。この AV は腫瘍血管を傷害するとともに転移を減少し、腫瘍の成長を遅らせた²⁸⁰⁾。RV において TNF- α 遺伝子を KDR 及び E-selectin のプロモーターと組み合わせると、その発現は選択的ではあるが内皮細胞では低いことが示された²⁸¹⁾。VEGFR2 プロモーターの調節の元で誘導性カスパーゼ-9 を発現する AV はその誘導剤である AP20187 と一緒にデリバリーすると *in vitro* で内皮細胞のアポトーシスを誘導し、組織における微小血管密度を減少させた²⁸²⁾。E-selectin のプロモーターの元でジフテリアトキシン A 鎖遺伝子を発現させると HUVEC に選択的に発現しアポトーシスが誘導された²⁸³⁾。

3.2.2 抗血管新生タンパク質の内皮における転写
腫瘍内皮内に抗血管新生因子を発現させると腫瘍血管内に局所的な抗血管新生環境を作ることができ。例えば、10 X “hypoxia responsive element” (HRE) で調節される HSV プロモーターの元に sFlk-1 を配置すると、内皮及び腫瘍細胞を含む低酸素状況下の細胞内で発現する。このベクターにより *in vitro* における顕著な毛細血管の形成阻害及び *in vivo* の腫瘍の成長阻害が起きた²⁸⁴⁾。

3.2.3 血管選択的なプロモーターを用いたウイルス療法

ウイルス療法は正常細胞が生存した状態で癌細胞を殺傷するために考案された。しかし、鍵となるウイルス遺伝子を腫瘍内皮関連プロモーターの元に配置することにより腫瘍血管と関連した正常な血管を破壊することができる。例えば、Flk-1 エンハンサー/プロモーター及び Engoglin プロモーターはそれぞれアデノウイルスの E1A 及び E1B 遺伝子の転写を駆動するために用いられている。両方の “Conditionally replicating adenovirus” (CRAd) は分裂している内皮細胞内で選択的に複製し、*in vitro* で毛細血管様構造を破壊するが、その効率は野生型アデノウイルスと同様であった²⁸⁵⁾。E1A 領域を調節する HRE を有する他の CRAd は低酸素における癌細胞そして VHL 変異細胞で選択的に複製する^{286,287)}。したがって、低酸素腫瘍関連血管を殺傷できる可能性があるが、マウスのモデルでは腫瘍血管に対する活性の増強はまだ証明されていない。

3.3 導入及び転写のターゲティングの組み合わせ

原理的には導入及び転写のターゲティングを組み合わせることにより腫瘍血管に対する高い選択性が得られるはずである。Flt-1 プロモーターを用いた内皮細胞に対する転写ターゲティングと RGD ペプチドを介して内皮細胞への感染を改善する導入ターゲティングを組み合わせると、内皮細胞に対してより選択的な導入が起こることがレポーター遺伝子の発現から示されている²⁸⁸⁾。

3.4 内皮細胞以外の細胞において発現する抗血管新生遺伝子治療

抗血管新生機能を有する治療用遺伝子は内皮細胞以外の細胞でも発現でき、その細胞は血液循環に活性タンパク質を分泌する細胞工場となる。この戦略で多様なウイルス及び非ウイルスベクターが多くの

抗血管新生遺伝子をデリバリーするようデザインされており、顕著な抗腫瘍効果を示すものもある。

AAVを用いて抗血管新生因子遺伝子を内皮にターゲティングしても抗血管新生活性は得られていないが、腫瘍あるいは肝臓にターゲティングすると抗血管新生活性が得られる。このようにAAVを用いて効果的にデリバリーする抗血管新生遺伝子の例としては先に示したものの以外に分泌型のAngiostatin及びEndostatin²⁹⁹、Flk-1²⁹⁰があり、AngiostatinとEndostatinでは相乗効果が得られている。

細胞において長期間にわたって抗血管新生因子を産生させることは特に抗血管新生遺伝子治療において重要であり、その場合LVは有用なベクターである。LVを用いて抗血管新生遺伝子を内皮にターゲティングしても抗血管新生活性は得られていないが、内皮細胞以外の細胞にターゲティングすると腫瘍関連血管が顕著に低下する。このようにLVを用いて効果的にデリバリーする抗血管新生因子の例としては先に示したものの以外にEndostatin²⁹¹、MMP-2の非触媒フラグメントであるPEX²⁹²がある。

AVは多くの型の細胞に感染できるため抗血管新生因子のデリバリーにおいて様々な目的に使用できるベクターである。その例としては先に示したものの以外にTIMP-3²⁹³、PF4²⁹⁴、Flt-1²⁹⁵及びFGF受容体²⁹⁶のような増殖因子受容体の可溶性細胞外領域、sNeuropilin-1-Fc²⁹⁷のような抗体のFc部分を含む融合タンパク質、Tie受容体表面の発現を抑制する因子²⁹⁸がある。AVを用いたこれら抗腫瘍血管新生治療は腫瘍の血管新生及び腫瘍の成長の顕著な低下を示した。また、抗腫瘍因子の組み合わせにより相乗的な効果が示されている²⁹⁴。

ターゲティング能を持たないリポソームのような非ウイルスベクターは多くの型の細胞に遺伝子導入でき、抗血管新生遺伝子のデリバリーのベクターとしても用いられている。プラスミド内にコードされる遺伝子としては先に示したものの以外にAngiostatin、Endostatin、TIMP-2²⁹⁹、Salmosinと呼ばれる蛇毒Disintegrin³⁰⁰などがあり、リポソームを用いてデリバリーされている。これらの例ではマウスにおいて腫瘍の大きさ及び転移の数の低下が示されている。

3.5 腫瘍血管をターゲティングする細胞ベクター 内皮前駆細胞“Endothelial progenitor cell”

(EPC)は血管新生の部位に本来指向性を有しており^{301,302}、腫瘍の血管新生に関与する³⁰³。EPCは*in vitro*でウイルスベクターを導入することにより遺伝的に改変でき、動物の血液循環に再導入できる。したがって、EPCは細胞傷害活性を有する遺伝子のデリバリーにおいて血管新生に選択的なターゲティングベクターとして用いることができる。EPCにLVを用いてTie2/Tekプロモーターにより発現が調節されるHSV-TK遺伝子を導入し乳癌、ルイス肺腫瘍、黒色腫モデルマウスに投与後GCVを投与すると、EPCは腫瘍に選択的にホーミングし腫瘍の成長が遅れる³⁰⁴。EPCにRVを介してHSV-TK遺伝子を導入し神経膠腫モデルマウスに投与後GCVを投与すると腫瘍のネクロシスが起きる³⁰⁵。胎児性EPCに自殺遺伝子を導入し肺腫転移モデルマウスに投与後プロドラッグを投与した場合でも胎児性EPCが腫瘍に対して選択的にホーミングし生存の延長あるいは肺転移の根絶のような抗腫瘍効果がおきる^{306,307}。このような自殺遺伝子とプロドラッグを用いた場合、全身的な有害事象は観察されない。RVを介して可溶性の切断型Flk-1遺伝子を導入した骨髓由来内皮前駆細胞を神経芽細胞腫及びWilms腫瘍異種移植モデルマウスに移植すると、腫瘍の成長が抑えられる³⁰⁸。PEXを発現するヒト神経系幹セルラインを神経膠腫モデルマウスに投与すると、腫瘍に遊走して血管新生及び腫瘍の容積が減少する³⁰⁹。

おわりに

抗血管新生遺伝子治療は癌の治療の新しいアプローチであり、抗血管新生タンパク質治療に比べて様々な利点がある。そして、これまでに得られている非臨床試験及び一部の臨床試験の結果から本治療法が将来有望であることが示唆されている。今後克服すべき課題は多いが、分子生物学的な手法の発達、デリバリー及び発現システムなどの改良により、本治療法がこれまでの治療法の補助的治療法としてだけでなく、新たな治療法となることを期待したい。

謝 辞

本研究の一部は厚生科学研究費補助金医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業(H18-医薬-002)として実施されたものである。

文 献

- 1) Satchi-Fainaro, R., Puder, M., Davies, J. W., Tran, H. T., Sampson, D. A., Greene, A. K., Corfas, G. and Folkman, J.: *Nat Med*, **10**(3), 255-61 (2004).
- 2) Kerbel, R. and Folkman, J.: *Nat Rev Cancer*, **2**(10), 727-39 (2002).
- 3) Kisker, O., Becker, C. M., Prox, D., Fannon, M., D'Amato, R., Flynn, E., Fogler, W. E., Sim, B. K., Allred, E. N., Pirie-Shepherd, S. R. and Folkman, J.: *Cancer Res*, **61**(20), 7669-74 (2001).
- 4) Scappaticci, F. A.: *J Clin Oncol*, **20**(18), 3906-27 (2002).
- 5) Kong, H. L. and Crystal, R. G.: *J Natl Cancer Inst*, **90**(4), 273-86 (1998).
- 6) Bergers, G. and Benjamin, L. E.: *Nat Rev Cancer*, **3**(6), 401-10 (2003).
- 7) Folkman, J. and Kalluri, R.: *Nature*, **427**(6977), 787 (2004).
- 8) Marx, J.: *Science*, **301**(5632), 452-4 (2003).
- 9) Sedlacek, H. H.: *Crit Rev Oncol Hematol*, **37**(3), 169-215 (2001).
- 10) Tanaka, T., Cao, Y., Folkman, J. and Fine, H. A.: *Cancer Res*, **58**(15), 3362-9 (1998).
- 11) 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 野間誠司, 川西 徹, 早川堯夫: *医薬品研究*, **37**(10), 641-670 (2006).
- 12) 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 山口照英, 早川堯夫: *医薬品研究*, **39**(1), 1-37 (2008).
- 13) Persano, L., Crescenzi, M. and Indraccolo, S.: *Mol Aspects Med*, **28**(1), 87-114 (2007).
- 14) Liu, C. C., Shen, Z., Kung, H. F. and Lin, M. C.: *World J Gastroenterol*, **12**(43), 6941-8 (2006).
- 15) Benouchan, M. and Colombo, B. M.: *Int J Oncol*, **27**(2), 563-71 (2005).
- 16) Tandle, A., Blazer, D. G., 3rd and Libutti, S. K.: *J Transl Med*, **2**(1), 22 (2004).
- 17) Bazan-Peregrino, M., Seymour, L. W. and Harris, A. L.: *Cancer Gene Ther*, **14**(2), 117-27 (2007).
- 18) Masiero, M., Nardo, G., Indraccolo, S. and Favaro, E.: *Mol Aspects Med*, **28**(1), 143-66 (2007).
- 19) Milkiewicz, M., Ispanovic, E., Doyle, J. L. and Haas, T. L.: *Int J Biochem Cell Biol*, **38**(3), 333-57 (2006).
- 20) Quesada, A. R., Munoz-Chapuli, R. and Medina, M. A.: *Med Res Rev*, **26**(4), 483-530 (2006).
- 21) Fayette, J., Soria, J. C. and Armand, J. P.: *Eur. J Cancer*, **41**(8), 1109-16 (2005).
- 22) Izquierdo, M.: *Cancer Gene Ther*, **12**(3), 217-27 (2005).
- 23) Kwon, H. S., Shin, H. C. and Kim, J. S.: *Nucleic Acids Res*, **33**(8), e74 (2005).
- 24) Guan, H., Zhou, Z., Wang, H., Jia, S. F., Liu, W. and Kleinerman, E. S.: *Clin Cancer Res*, **11**(7), 2662-9 (2005).
- 25) Shen, H. L., Xu, W., Wu, Z. Y., Zhou, L. L., Qin, R. J. and Tang, H. R.: *Leuk Res*, **31**(4), 515-21 (2007).
- 26) Takei, Y., Kadomatsu, K., Yuzawa, Y., Matsuo, S. and Muramatsu, T.: *Cancer Res*, **64**(10), 3365-70 (2004).
- 27) Detwiller, K. Y., Fernando, N. T., Segal, N. H., Ryeom, S. W., D'Amore, P. A. and Yoon, S. S.: *Cancer Res*, **65**(13), 5881-9 (2005).
- 28) Tao, J., Tu, Y. T., Huang, C. Z., Feng, A. P., Wu, Q., Lian, Y. J., Zhang, L. X., Zhang, X. P. and Shen, G. X.: *Br J Dermatol*, **153**(4), 715-24 (2005).
- 29) Wannenes, F., Ciafre, S. A., Niola, F., Frajese, G. and Farace, M. G.: *Cancer Gene Ther*, **12**(12), 926-34 (2005).
- 30) Kim, W. J., Christensen, L. V., Jo, S., Yockman, J. W., Jeong, J. H., Kim, Y. H. and Kim, S. W.: *Mol Ther*, **14**(3), 343-50 (2006).
- 31) Jia, R. B., Zhang, P., Zhou, Y. X., Song, X., Liu, H. Y., Wang, L. Z., Luo, M., Lu, J., Ge, S. F. and Fan, X. Q.: *Ophthalmic Res*, **39**(2), 108-15 (2007).
- 32) Riedel, F., Gotte, K., Li, M., Hormann, K. and Grandis, J. R.: *Int J Oncol*, **23**(3), 577-83 (2003).
- 33) Wu, H. P., Feng, G. S., Liang, H. M., Zheng, C. S. and Li, X.: *World J Gastroenterol*, **10**(6), 813-8 (2004).
- 34) Tong, Y. J., Zhang, M., Zou, P., Guo, R. and Yuan, Y. H.: *Ai Zheng*, **24**(1), 62-6 (2005).
- 35) Hotz, H. G., Hines, O. J., Masood, R., Hotz, B., Foitzik, T., Buhr, H. J., Gill, P. S. and Reber, H. A.: *Surgery*, **137**(2), 192-9 (2005).
- 36) Li, C., Cheng, X., Jiang, H. and Sun, X.: *Tumour Biol*, **27**(3), 158-65 (2006).
- 37) Li, K., Tao, J., Li, T., Yu, Z., Yang, Z., Wu, H., Xiong, J. and Wang, C.: *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, **27**(1), 51-3

- (2007).
- 38) Zhang, Y. H., Wang, C., Pang, B. S., Zhai, Z. G. and Weng, X. Z.: *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 86(11), 749-52 (2006).
 - 39) Niwa, H., Wentzel, A. L., Li, M., Gooding, W. E., Lui, V. W. and Grandis, J. R.: *Clin Cancer Res*, 9(13), 5028-35 (2003).
 - 40) Shi, W. and Siemann, D. W.: *Br J Cancer*, 87(1), 119-26 (2002).
 - 41) Kamiyama, M., Ichikawa, Y., Ishikawa, T., Chishima, T., Hasegawa, S., Hamaguchi, Y., Nagashima, Y., Miyagi, Y., Mitsunashi, M., Hyndman, D., Hoffman, R. M., Ohki, S. and Shimada, H.: *Cancer Gene Ther*, 9(2), 197-201 (2002).
 - 42) Kendall, R. L., Wang, G. and Thomas, K. A.: *Biochem Biophys Res Commun*, 226(2), 324-8 (1996).
 - 43) Hasumi, Y., Mizukami, H., Urabe, M., Kohno, T., Takeuchi, K., Kume, A., Momoeda, M., Yoshikawa, H., Tsuruo, T., Shibuya, M., Taketani, Y. and Ozawa, K.: *Cancer Res*, 62(7), 2019-23 (2002).
 - 44) Mahasreshti, P. J., Navarro, J. G., Kataram, M., Wang, M. H., Carey, D., Siegal, G. P., Barnes, M. N., Nettelbeck, D. M., Alvarez, R. D., Hemminki, A. and Curiel, D. T.: *Clin Cancer Res*, 7(7), 2057-66 (2001).
 - 45) Kuo, C. J., Farnebo, F., Yu, E. Y., Christofferson, R., Swearingen, R. A., Carter, R., von Recum, H. A., Yuan, J., Kamihara, J., Flynn, E., D'Amato, R., Folkman, J. and Mulligan, R. C.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(8), 4605-10 (2001).
 - 46) Takei, Y., Mizukami, H., Saga, Y., Yoshimura, I., Hasumi, Y., Takayama, T., Kohno, T., Matsushita, T., Okada, T., Kume, A., Suzuki, M. and Ozawa, K.: *Int J Cancer*, 120(2), 278-84 (2007).
 - 47) Mahendra, G., Kumar, S., Isayeva, T., Mahasreshti, P. J., Curiel, D. T., Stockardt, C. R., Grizzle, W. E., Alapati, V., Singh, R., Siegal, G. P., Meleth, S. and Ponnazhagan, S.: *Cancer Gene Ther*, 12(1), 26-34 (2005).
 - 48) Kim, W. J., Yockman, J. W., Jeong, J. H., Christensen, L. V., Lee, M., Kim, Y. H. and Kim, S. W.: *J Control Release*, 114(3), 381-8 (2006).
 - 49) Liu, J., Li, J., Su, C., Huang, B. and Luo, S.: *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 39(7), 499-506 (2007).
 - 50) Millauer, B., Shawver, L. K., Plate, K. H., Risau, W. and Ullrich, A.: *Nature*, 367(6463), 576-9 (1994).
 - 51) Kou, B., Li, Y., Zhang, L., Zhu, G., Wang, X., Li, Y., Xia, J. and Shi, Y.: *Exp Mol Pathol*, 76(2), 129-37 (2004).
 - 52) Kou, B., Li, Y., Shi, Y., Xia, J., Wang, X. and Wu, S.: *Oncol Res*, 15(5), 239-47 (2005).
 - 53) Wu, Y., Li, Z. Y., Zhao, X., Kan, B. and Wei, Y. Q.: *Hum Gene Ther*, 17(9), 941-8 (2006).
 - 54) Minakuchi, Y., Takeshita, F., Kosaka, N., Sasaki, H., Yamamoto, Y., Kouno, M., Honma, K., Nagahara, S., Hanai, K., Sano, A., Kato, T., Terada, M. and Ochiya, T.: *Nucleic Acids Res*, 32(13), e109 (2004).
 - 55) Newman, P. J.: *J Clin Invest*, 99(1), 3-8 (1997).
 - 56) Santel, A., Aleku, M., Keil, O., Endruschat, J., Esche, V., Durieux, B., Loffler, K., Fechtner, M., Rohl, T., Fisch, G., Dames, S., Arnold, W., Giese, K., Klippel, A. and Kaufmann, J.: *Gene Ther*, 13(18), 1360-70 (2006).
 - 57) Xu, M., Kumar, D., Stass, S. A. and Mixson, A. J.: *Mol Genet Metab*, 63(2), 103-9 (1998).
 - 58) Streit, M., Velasco, P., Brown, L. F., Skobe, M., Richard, L., Riccardi, L., Lawler, J. and Detmar, M.: *Am J Pathol*, 155(2), 441-52 (1999).
 - 59) Jin, R. J., Kwak, C., Lee, S. G., Lee, C. H., Soo, C. G., Park, M. S., Lee, E. and Lee, S. E.: *Cancer Gene Ther*, 7(12), 1537-42 (2000).
 - 60) Streit, M., Stephen, A. E., Hawighorst, T., Matsuda, K., Lange-Asschenfeldt, B., Brown, L. F., Vacanti, J. P. and Detmar, M.: *Cancer Res*, 62(7), 2004-12 (2002).
 - 61) Kragh, M., Quistorff, B., Tenan, M., Van Meir, E. G. and Kristjansen, P. E.: *Cancer Res*, 62(4), 1191-5 (2002).
 - 62) Liu, P., Wang, Y., Yang, R. C., Cai, Y. L. and Han, Z. C.: *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 83(6), 485-8 (2003).
 - 63) Liu, P., Wang, Y., Li, Y. H., Yang, C., Zhou, Y. L., Li, B., Lu, S. H., Yang, R. C., Cai, Y. L., Tobelem, G., Caen, J. and Han, Z. C.: *Leuk Res*, 27(8), 701-8 (2003).
 - 64) Hahn, W., Ho, S. H., Jeong, J. G., Hahn, E. Y., Kim, S., Yu, S. S., Kim, S. and Kim, J. M.: *Gene Ther*, 11(9), 739-45 (2004).
 - 65) Lee, C. H., Wu, C. L. and Shiau, A. L.:

- Cancer Gene Ther*, 12(2), 175-84 (2005).
- 66) Zhang, M., Maass, N., Magit, D. and Sager, R.: *Cell Growth Differ*, 8(2), 179-86 (1997).
- 67) Watanabe, M., Nasu, Y., Kashiwakura, Y., Kusumi, N., Tamayose, K., Nagai, A., Sasano, T., Shimada, T., Daida, H. and Kumon, H.: *Hum Gene Ther*, 16(6), 699-710 (2005).
- 68) Zou, Z., Anisowicz, A., Hendrix, M. J., Thor, A., Neveu, M., Sheng, S., Rafidi, K., Seftor, E. and Sager, R.: *Science*, 263(5146), 526-9 (1994).
- 69) Shi, H. Y., Liang, R., Templeton, N. S. and Zhang, M.: *Mol Ther*, 5(6), 755-61 (2002).
- 70) Fu, P., Chen, J., Tian, Y., Watkins, T., Cui, X. and Zhao, B.: *Cancer Gene Ther*, 12(3), 268-75 (2005).
- 71) Kurachi, K., Davie, E. W., Strydom, D. J., Riordan, J. F. and Vallee, B. L.: *Biochemistry*, 24(20), 5494-9 (1985).
- 72) Chen, J. X., Gao, Y., Liu, J. W., Tian, Y. X., Zhao, J. and Cui, X. Y.: *Int J Biochem Cell Biol*, 37(6), 1219-31 (2005).
- 73) Wang, T., Yang, M., Chen, J., Watkins, T. and Xiuyun, C.: *Angiogenesis*, 8(1), 73-81 (2005).
- 74) Botella-Estrada, R., Malet, G., Revert, F., Dasi, F., Crespo, A., Sanmartin, O., Guillen, C. and Alino, S. F.: *Cancer Gene Ther*, 8(4), 278-84 (2001).
- 75) Ambrosini, G., Adida, C. and Altieri, D. C.: *Nat Med*, 3(8), 917-21 (1997).
- 76) O'Connor, D. S., Schechner, J. S., Adida, C., Mesri, M., Rothermel, A. L., Li, F., Nath, A. K., Pober, J. S. and Altieri, D. C.: *Am J Pathol*, 156(2), 393-8 (2000).
- 77) Tu, S. P., Cui, J. T., Liston, P., Huajiang, X., Xu, R., Lin, M. C., Zhu, Y. B., Zou, B., Ng, S. S., Jiang, S. H., Xia, H. H., Wong, W. M., Chan, A. O., Yuen, M. F., Lam, S. K., et al.: *Gastroenterology*, 128(2), 361-75 (2005).
- 78) Jiang, G., Li, J., Zeng, Z. and Xian, L.: *Cancer Biol Ther*, 5(4), 435-40 (2006).
- 79) Hou, J. Q., He, J., Wang, X. L., Wen, D. G. and Chen, Z. X.: *Chin Med J (Engl)*, 119(20), 1734-9 (2006).
- 80) Sun, Y., Lin, R., Dai, J., Jin, D. and Wang, S. Q.: *Oligonucleotides*, 16(4), 365-74 (2006).
- 81) Zhu, D. E., Hoti, N., Song, Z., Jin, L., Wu, Z., Wu, Q. and Wu, M.: *Cancer Gene Ther*, 13(8), 762-70 (2006).
- 82) Caldas, H., Holloway, M. P., Hall, B. M., Qualman, S. J. and Altura, R. A.: *J Med Genet*, 43(2), 119-28 (2006).
- 83) Folkman, J.: *Apmis*, 112(7-8), 496-507 (2004).
- 84) Albini, A., Marchisone, C., Del Grosso, F., Benelli, R., Masiello, L., Tacchetti, C., Bono, M., Ferrantini, M., Rozera, C., Truini, M., Belardelli, F., Santi, L. and Noonan, D. M.: *Am J Pathol*, 156(4), 1381-93 (2000).
- 85) Santodonato, L., Ferrantini, M., Palombo, F., Aurisicchio, L., Delmastro, P., La Monica, N., Di Marco, S., Ciliberto, G., Du, M. X., Taylor, M. W. and Belardelli, F.: *Cancer Gene Ther*, 8(1), 63-72 (2001).
- 86) Indraccolo, S., Habeler, W., Tisato, V., Stievano, L., Piovan, E., Tosello, V., Esposito, G., Wagner, R., Uberla, K., Chieco-Bianchi, L. and Amadori, A.: *Cancer Res*, 62(21), 6099-107 (2002).
- 87) Indraccolo, S., Tisato, V., Tosello, V., Habeler, W., Esposito, G., Moserle, L., Stievano, L., Persano, L., Chieco-Bianchi, L. and Amadori, A.: *Hum Gene Ther*, 16(8), 957-70 (2005).
- 88) Indraccolo, S., Moserle, L., Tisato, V., Gola, E., Minuzzo, S., Roni, V., Persano, L., Chieco-Bianchi, L. and Amadori, A.: *Gene Ther*, 13(12), 953-65 (2006).
- 89) Hara, H., Kobayashi, A., Yoshida, K., Ohashi, M., Ohnami, S., Uchida, E., Higashihara, E., Yoshida, T. and Aoki, K.: *Cancer Sci*, 98(3), 455-63 (2007).
- 90) Qin, X. Q., Tao, N., Dergay, A., Moy, P., Fawell, S., Davis, A., Wilson, J. M. and Barsoum, J.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(24), 14411-6 (1998).
- 91) Dong, Z., Greene, G., Pettaway, C., Dinney, C. P., Eue, I., Lu, W., Bucana, C. D., Balbay, M. D., Bielenberg, D. and Fidler, I. J.: *Cancer Res*, 59(4), 872-9 (1999).
- 92) Cao, G., Su, J., Lu, W., Zhang, F., Zhao, G., Marteralli, D. and Dong, Z.: *Cancer Gene Ther*, 8(7), 497-505 (2001).
- 93) Tada, H., Maron, D. J., Choi, E. A., Barsoum, J., Lei, H., Xie, Q., Liu, W., Ellis, L., Moscioni, A. D., Tazelaar, J., Fawell, S., Qin, X., Propert, K. J., Davis, A., Fraker, D. L., et al.: *J Clin Invest*, 108(1), 83-95 (2001).

- 94) Izawa, J. I., Sweeney, P., Perrotte, P., Kedar, D., Dong, Z., Slaton, J. W., Karashima, T., Inoue, K., Benedict, W. F. and Dinney, C. P.: *Clin Cancer Res*, 8(4), 1258-70 (2002).
- 95) Streck, C. J., Zhang, Y., Miyamoto, R., Zhou, J., Ng, C. Y., Nathwani, A. C. and Davidoff, A. M.: *Surgery*, 136(2), 183-9 (2004).
- 96) Choi, E. A., Lei, H., Maron, D. J., Mick, R., Barsoum, J., Yu, Q. C., Fraker, D. L., Wilson, J. M. and Spitz, F. R.: *Clin Cancer Res*, 10(4), 1535-44 (2004).
- 97) Streck, C. J., Dickson, P. V., Ng, C. Y., Zhou, J., Gray, J. T., Nathwani, A. C. and Davidoff, A. M.: *Clin Cancer Res*, 11(16), 6020-9 (2005).
- 98) Streck, C. J., Dickson, P. V., Ng, C. Y., Zhou, J., Hall, M. M., Gray, J. T., Nathwani, A. C. and Davidoff, A. M.: *Cancer Gene Ther*, 13(1), 99-106 (2006).
- 99) Saleh, M., Jonas, N. K., Wiegmanns, A. and Stylli, S. S.: *Gene Ther*, 7(20), 1715-24 (2000).
- 100) ten Hagen, T. L. and Eggermont, A. M.: *Technol Cancer Res Treat*, 2(3), 195-203 (2003).
- 101) Lopez, C. A., Kimchi, E. T., Mauceri, H. J., Park, J. O., Mehta, N., Murphy, K. T., Beckett, M. A., Hellman, S., Posner, M. C., Kufe, D. W. and Weichselbaum, R. R.: *Mol Cancer Ther*, 3(9), 1167-75 (2004).
- 102) Voest, E. E., Kenyon, B. M., O'Reilly, M. S., Truitt, G., D'Amato, R. J. and Folkman, J.: *J Natl Cancer Inst*, 87(8), 581-6 (1995).
- 103) Brunda, M. J., Luistro, L., Warriar, R. R., Wright, R. B., Hubbard, B. R., Murphy, M., Wolf, S. F. and Gately, M. K.: *J Exp Med*, 178(4), 1223-30 (1993).
- 104) Asselin-Paturel, C., Lassau, N., Guinebretiere, J. M., Zhang, J., Gay, F., Bex, F., Hallez, S., Leclere, J., Peronneau, P., Mami-Chouaib, F. and Chouaib, S.: *Gene Ther*, 6(4), 606-15 (1999).
- 105) Gyorffy, S., Palmer, K., Podor, T. J., Hitt, M. and Gaudie, J.: *J Immunol*, 166(10), 6212-7 (2001).
- 106) Barajas, M., Mazzolini, G., Genove, G., Bilbao, R., Narvaiza, I., Schmitz, V., Sangro, B., Melero, I., Qian, C. and Prieto, J.: *Hepatology*, 33(1), 52-61 (2001).
- 107) Morini, M., Albini, A., Lorusso, G., Moelling, K., Lu, B., Cilli, M., Ferrini, S. and Noonan, D. M.: *Gene Ther*, 11(3), 284-91 (2004).
- 108) Li, P. Y., Lin, J. S., Feng, Z. H., He, Y. F., Zhou, H. J., Ma, X., Cai, X. K. and Tian, D. A.: *World J Gastroenterol*, 10(15), 2195-200 (2004).
- 109) Harada, N., Shimada, M., Okano, S., Suehiro, T., Soejima, Y., Tomita, Y. and Maehara, Y.: *J Immunol*, 173(11), 6635-44 (2004).
- 110) Imagawa, Y., Satake, K., Kato, Y., Tahara, H. and Tsukuda, M.: *Auris Nasus Larynx*, 31(3), 239-45 (2004).
- 111) Keke, F., Hongyang, Z., Hui, Q., Jixiao, L. and Jian, C.: *Cancer Biother Radiopharm*, 19(5), 649-57 (2004).
- 112) Shibata, M. A., Ito, Y., Morimoto, J., Kusakabe, K., Yoshinaka, R. and Otsuki, Y.: *J Gene Med*, 8(3), 335-52 (2006).
- 113) Jiang, Y., Goldberg, I. D. and Shi, Y. E.: *Oncogene*, 21(14), 2245-52 (2002).
- 114) Moses, M. A., Sudhalter, J. and Langer, R.: *Science*, 248(4961), 1408-10 (1990).
- 115) Moses, M. A. and Langer, R.: *J Cell Biochem*, 47(3), 230-5 (1991).
- 116) Moses, M. A.: *Stem Cells*, 15(3), 180-9 (1997).
- 117) Imren, S., Kohn, D. B., Shimada, H., Blavier, L. and DeClerck, Y. A.: *Cancer Res*, 56(13), 2891-5 (1996).
- 118) Rigg, A. S. and Lemoine, N. R.: *Cancer Gene Ther*, 8(11), 869-78 (2001).
- 119) Bloomston, M., Shafii, A., Zervos, E. E. and Rosemurgy, A. S.: *J Surg Res*, 102(1), 39-44 (2002).
- 120) Lee, Y. K., So, I. S., Lee, S. C., Lee, J. H., Lee, C. W., Kim, W. M., Park, M. K., Lee, S. T., Park, D. Y., Shin, D. Y., Park, C. U. and Kim, Y. S.: *J Gene Med*, 7(2), 145-57 (2005).
- 121) Yu, X. F., Yang, C., Liang, L. H., Liu, B., Zhou, B., Li, B. and Han, Z. C.: *Leukemia*, 20(1), 1-8 (2006).
- 122) Zacchigna, S., Zentilin, L., Morini, M., Dell'Eva, R., Noonan, D. M., Albini, A. and Giacca, M.: *Cancer Gene Ther*, 11(1), 73-80 (2004).
- 123) Maione, T. E., Gray, G. S., Petro, J., Hunt, A. J., Donner, A. L., Bauer, S. I., Carson, H. F. and Sharpe, R. J.: *Science*, 247(4938), 77-9 (1990).
- 124) Sharpe, R. J., Byers, H. R., Scott, C. F.,

- Bauer, S. I. and Maione, T. E.: *J Natl Cancer Inst*, 82(10), 848-53 (1990).
- 125) Kolber, D. L., Knisely, T. L. and Maione, T. E.: *J Natl Cancer Inst*, 87(4), 304-9 (1995).
- 126) Tanaka, T., Manome, Y., Wen, P., Kufe, D. W. and Fine, H. A.: *Nat Med*, 3(4), 437-42 (1997).
- 127) Li, Y., Liu, Y., Jin, Y., Zhou, Y., Cai, Y., Chen, H., Zhang, L. and Han, Z.: *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 82(1), 35-8 (2002).
- 128) Li, Y., Jin, Y., Chen, H., Jie, G., Tobelem, G., Caen, J. P. and Han, Z. C.: *Cancer Biother Radiopharm*, 18(5), 829-40 (2003).
- 129) Wu, L. H., Song, G. L., Diao, S. Y., Cai, Y. L., Li, Y. H., Li, S. Z., Yang, R. C. and Han, Z. C.: *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 24(8), 426-9 (2003).
- 130) Neville, L. F., Mathiak, G. and Bagasra, O.: *Cytokine Growth Factor Rev*, 8(3), 207-19 (1997).
- 131) Sun, Y., Finger, C., Alvarez-Vallina, L., Cichutek, K. and Buchholz, C. J.: *Cancer Gene Ther*, 12(11), 900-12 (2005).
- 132) Regulier, E., Paul, S., Marigliano, M., Kintz, J., Poitevin, Y., Ledoux, C., Roecklin, D., Cauet, G., Calenda, V. and Homann, H. E.: *Cancer Gene Ther*, 8(1), 45-54 (2001).
- 133) Feldman, A. L., Friedl, J., Lans, T. E., Libutti, S. K., Lorang, D., Miller, M. S., Turner, E. M., Hewitt, S. M. and Alexander, H. R.: *Int J Cancer*, 99(1), 149-53 (2002).
- 134) Clapp, C., Martial, J. A., Guzman, R. C., Rentier-Delure, F. and Weiner, R. I.: *Endocrinology*, 133(3), 1292-9 (1993).
- 135) Kim, J., Luo, W., Chen, D. T., Earley, K., Tunstead, J., Yu-Lee, L. Y. and Lin, S. H.: *Cancer Res*, 63(2), 386-93 (2003).
- 136) Kalluri, R.: *Nat Rev Cancer*, 3(6), 422-33 (2003).
- 137) Maeshima, Y., Colorado, P. C. and Kalluri, R.: *J Biol Chem*, 275(31), 23745-50 (2000).
- 138) Maeshima, Y., Colorado, P. C., Torre, A., Holthaus, K. A., Grunkemeyer, J. A., Erickson, M. B., Hopfer, H., Xiao, Y., Stillman, I. E. and Kalluri, R.: *J Biol Chem*, 275(28), 21340-8 (2000).
- 139) Maeshima, Y., Manfredi, M., Reimer, C., Holthaus, K. A., Hopfer, H., Chandamuri, B. R., Kharbanda, S. and Kalluri, R.: *J Biol Chem*, 276(18), 15240-8 (2001).
- 140) Pasco, S., Ramont, L., Venteo, L., Pluot, M., Maquart, F. X. and Monboisse, J. C.: *Exp Cell Res*, 301(2), 251-65 (2004).
- 141) Yao, B., He, Q. M., Tian, L., Xiao, F., Jiang, Y., Zhang, R., Li, G., Zhang, L., Hou, J. M., Wang, L., Cheng, X. C., Wen, Y. J., Kan, B., Li, J., Zhao, X., et al.: *Hum Gene Ther*, 16(9), 1075-86 (2005).
- 142) Miyoshi, T., Hirohata, S., Ogawa, H., Doi, M., Obika, M., Yonezawa, T., Sado, Y., Kusachi, S., Kyo, S., Kondo, S., Shiratori, Y., Hudson, B. G. and Ninomiya, Y.: *Faseb J*, 20(11), 1904-6 (2006).
- 143) Kamphaus, G. D., Colorado, P. C., Panka, D. J., Hopfer, H., Ramchandran, R., Torre, A., Maeshima, Y., Mier, J. W., Sukhatme, V. P. and Kalluri, R.: *J Biol Chem*, 275(2), 1209-15 (2000).
- 144) Li, Y. Y., Qian, G. S., Huang, G. J., Chen, F., Qian, P., Yu, S. C., Wang, C. Z., Li, Q., Wang, J. C. and Wu, G. M.: *Cancer J*, 12(2), 136-46 (2006).
- 145) Frau, E., Magnon, C., Opolon, P., Connault, E., Opolon, D., Beermann, F., Abitbol, M., Perricaudet, M. and Bouquet, C.: *Cancer Gene Ther*, 14(3), 251-61 (2007).
- 146) Pike, S. E., Yao, L., Jones, K. D., Cherney, B., Appella, E., Sakaguchi, K., Nakhasi, H., Teruya-Feldstein, J., Wirth, P., Gupta, G. and Tosato, G.: *J Exp Med*, 188(12), 2349-56 (1998).
- 147) Xiao, F., Wei, Y., Yang, L., Zhao, X., Tian, L., Ding, Z., Yuan, S., Lou, Y., Liu, F., Wen, Y., Li, J., Deng, H., Kang, B., Mao, Y., Lei, S., et al.: *Gene Ther*, 9(18), 1207-13 (2002).
- 148) Jazowiecka-Rakus, J., Jarosz, M. and Szala, S.: *Acta Biochim Pol*, 53(1), 199-202 (2006).
- 149) Li, L., Yuan, Y. Z., Lu, J., Xia, L., Zhu, Y., Zhang, Y. P. and Qiao, M. M.: *Gut*, 55(2), 259-65 (2006).
- 150) Ma, L., Luo, L., Qiao, H., Dong, X., Pan, S., Jiang, H., Krissansen, G. W. and Sun, X.: *J Hepatol*, 46(1), 98-106 (2007).
- 151) O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Cao, Y., Moses, M., Lane, W. S., Sage, E. H. and Folkman, J.: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 59, 471-82 (1994).
- 152) O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., Lane,

- W. S., Cao, Y., Sage, E. H. and Folkman, J.: *Cell*, **79**(2), 315-28 (1994).
- 153) O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Chen, C. and Folkman, J.: *Nat Med*, **2**(6), 689-92 (1996).
- 154) Griscelli, F., Li, H., Bennaceur-Griscelli, A., Soria, J., Opolon, P., Soria, C., Perricaudet, M., Yeh, P. and Lu, H.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(11), 6367-72 (1998).
- 155) Gyorffy, S., Palmer, K. and Gaudie, J.: *Am J Pathol*, **159**(3), 1137-47 (2001).
- 156) Matsumoto, G., Ohmi, Y. and Shindo, J.: *Oral Oncol*, **37**(4), 369-78 (2001).
- 157) Fukumori, T., Nishitani, M., Naroda, T., Onishi, T., Oka, N., Kanayama, H. and Kagawa, S.: *Urology*, **59**(6), 973-7 (2002).
- 158) Ma, H. I., Guo, P., Li, J., Lin, S. Z., Chiang, Y. H., Xiao, X. and Cheng, S. Y.: *Cancer Res*, **62**(3), 756-63 (2002).
- 159) Xu, R., Sun, X., Tse, L. Y., Li, H., Chan, P. C., Xu, S., Xiao, W., Kung, H. F., Krissansen, G. W. and Fan, S. T.: *Hepatology*, **37**(6), 1451-60 (2003).
- 160) Uesato, M., Gunji, Y., Tomonaga, T., Miyazaki, S., Shiratori, T., Matsubara, H., Kouzu, T., Shimada, H., Nomura, F. and Ochiai, T.: *Cancer Gene Ther*, **11**(9), 625-32 (2004).
- 161) Schmitz, V., Wang, L., Barajas, M., Gomar, C., Prieto, J. and Qian, C.: *Gut*, **53**(4), 561-7 (2004).
- 162) Raikwar, S. P., Temm, C. J., Raikwar, N. S., Kao, C., Molitoris, B. A. and Gardner, T. A.: *Mol Ther*, **12**(6), 1091-100 (2005).
- 163) Ohlfest, J. R., Demorest, Z. L., Motooka, Y., Vengco, I., Oh, S., Chen, E., Scappaticci, F. A., Saplis, R. J., Ekker, S. C., Low, W. C., Freese, A. B. and Largaespada, D. A.: *Mol Ther*, **12**(5), 778-88 (2005).
- 164) Kim, K. S., Kim, D. S., Chung, K. H. and Park, Y. S.: *Cancer Gene Ther*, **13**(6), 563-71 (2006).
- 165) Joseph, J. M., Bouquet, C., Opolon, P., Morizet, J., Aubert, G., Rossler, J., Gross, N., Griscelli, F., Perricaudet, M. and Vassal, G.: *Cancer Gene Ther*, **10**(11), 859-66 (2003).
- 166) O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R. and Folkman, J.: *Cell*, **88**(2), 277-85 (1997).
- 167) Bergers, G., Javaherian, K., Lo, K. M., Folkman, J. and Hanahan, D.: *Science*, **284**(5415), 808-12 (1999).
- 168) Sauter, B. V., Martinet, O., Zhang, W. J., Mändeli, J. and Woo, S. L.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(9), 4802-7 (2000).
- 169) Chen, C. T., Lin, J., Li, Q., Phipps, S. S., Jakubczak, J. L., Stewart, D. A., Skripchenko, Y., Forry-Schaudies, S., Wood, J., Schnell, C. and Hallenbeck, P. L.: *Hum Gene Ther*, **11**(14), 1983-96 (2000).
- 170) Feldman, A. L., Restifo, N. P., Alexander, H. R., Bartlett, D. L., Hwu, P., Seth, P. and Libutti, S. K.: *Cancer Res*, **60**(6), 1503-6 (2000).
- 171) Yamanaka, R., Zullo, S. A., Ramsey, J., Onodera, M., Tanaka, R., Blaese, M. and Xanthopoulos, K. G.: *Cancer Gene Ther*, **8**(10), 796-802 (2001).
- 172) Feldman, A. L., Alexander, H. R., Hewitt, S. M., Lorang, D., Thiruvathukal, C. E., Turner, E. M. and Libutti, S. K.: *J Natl Cancer Inst*, **93**(13), 1014-20 (2001).
- 173) Indraccolo, S., Gola, E., Rosato, A., Minuzzo, S., Habeler, W., Tisato, V., Roni, V., Esposito, G., Morini, M., Albin, A., Noonan, D. M., Ferrantini, M., Amadori, A. and Chieco-Bianchi, L.: *Gene Ther*, **9**(13), 867-78 (2002).
- 174) Calvo, A., Feldman, A. L., Libutti, S. K. and Green, J. E.: *Cancer Res*, **62**(14), 3934-8 (2002).
- 175) Ling, C. H., Ji, C., Chen, Y. B., Fu, J. X., Zhou, J. Y., Chen, W. C., Yang, J. C. and Su, L. Y.: *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, **27**(10), 683-6 (2004).
- 176) Mullen, J. T., Donahue, J. M., Chandrasekhar, S., Yoon, S. S., Liu, W., Ellis, L. M., Nakamura, H., Kasuya, H., Pawlik, T. M. and Tanabe, K. K.: *Cancer*, **101**(4), 869-77 (2004).
- 177) Wu, Y., Zhao, M., Yang, L., Liu, J., Wei, Y. Q. and Zhao, X.: *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, **35**(3), 316-9 (2004).
- 178) Li, X. H., Peng, Y., Li, X. P., Liu, X. and Li, G.: *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, **40**(12), 881-6 (2005).
- 179) Fukumoto, S., Morifuji, M., Katakura, Y., Ohishi, M. and Nakamura, S.: *Clin Exp Metastasis*, **22**(1), 31-8 (2005).
- 180) Subramanian, I. V., Bui Nguyen, T. M.,

- Truskinovsky, A. M., Tolar, J., Blazar, B. R. and Ramakrishnan, S.: *Cancer Res*, **66**(8), 4319-28 (2006).
- 181) Li, L., Liu, R. Y., Huang, J. L., Liu, Q. C., Li, Y., Wu, P. H., Zeng, Y. X. and Huang, W.: *Int J Cancer*, **118**(8), 2064-71 (2006).
- 182) Pawliuk, R., Bachelot, T., Zurkiya, O., Eriksson, A., Cao, Y. and Leboulch, P.: *Mol Ther*, **5**(4), 345-51 (2002).
- 183) Gupta, P., Su, Z. Z., Lebedeva, I. V., Sarkar, D., Sauane, M., Emdad, L., Bachelor, M. A., Grant, S., Curiel, D. T., Dent, P. and Fisher, P. B.: *Pharmacol Ther*, **111**(3), 596-628 (2006).
- 184) Inoue, S., Shanker, M., Miyahara, R., Gopalan, B., Patel, S., Oida, Y., Branch, C. D., Munshi, A., Meyn, R. E., Andreeff, M., Tanaka, F., Mhashilkar, A. M., Chada, S. and Ramesh, R.: *Curr Gene Ther*, **6**(1), 73-91 (2006).
- 185) Saeki, T., Mhashilkar, A., Swanson, X., Zou-Yang, X. H., Sieger, K., Kawabe, S., Branch, C. D., Zumstein, L., Meyn, R. E., Roth, J. A., Chada, S. and Ramesh, R.: *Oncogene*, **21**(29), 4558-66 (2002).
- 186) Nishikawa, T., Ramesh, R., Munshi, A., Chada, S. and Meyn, R. E.: *Mol Ther*, **9**(6), 818-28 (2004).
- 187) Ramesh, R., Ito, I., Saito, Y., Wu, Z., Mhashilkar, A. M., Wilson, D. R., Branch, C. D., Roth, J. A. and Chada, S.: *DNA Cell Biol*, **23**(12), 850-7 (2004).
- 188) Oida, Y., Gopalan, B., Miyahara, R., Inoue, S., Branch, C. D., Mhashilkar, A. M., Lin, E., Bekele, B. N., Roth, J. A., Chada, S. and Ramesh, R.: *Mol Cancer Ther*, **4**(2), 291-304 (2005).
- 189) Chada, S., Mhashilkar, A. M., Liu, Y., Nishikawa, T., Bocangel, D., Zheng, M., Vorburgher, S. A., Pataer, A., Swisher, S. G., Ramesh, R., Kawase, K., Meyn, R. E. and Hunt, K. K.: *Cancer Gene Ther*, **13**(5), 490-502 (2006).
- 190) Inoue, S., Hartman, A., Branch, C. D., Bucana, C. D., Bekele, B. N., Stephens, L. C., Chada, S. and Ramesh, R.: *Mol Ther*, **15**(2), 287-94 (2007).
- 191) Tahara, I., Miyake, K., Hanawa, H., Kurai, T., Hirai, Y., Ishizaki, M., Uchida, E., Tajiri, T. and Shimada, T.: *Mol Ther*, **15**(10), 1805-1811 (2007).
- 192) Matsumoto, K. and Nakamura, T.: *Cancer Sci*, **94**(4), 321-7 (2003).
- 193) Matsumoto, K. and Nakamura, T.: *Biochem Biophys Res Commun*, **333**(2), 316-27 (2005).
- 194) Fujiwara, H., Kubota, T., Amaike, H., Inada, S., Takashima, K., Atsui, K., Yoshimura, M., Maemondo, M., Narumi, K., Nukiwa, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Hagiwara, A. and Yamagishi, H.: *Cancer Gene Ther*, **12**(2), 206-16 (2005).
- 195) Murakami, M., Nagai, E., Mizumoto, K., Saimura, M., Ohuchida, K., Inadome, N., Matsumoto, K., Nakamura, T., Maemondo, M., Nukiwa, T. and Tanaka, M.: *Int J Cancer*, **117**(1), 160-5 (2005).
- 196) Ogura, Y., Mizumoto, K., Nagai, E., Murakami, M., Inadome, N., Saimura, M., Matsumoto, K., Nakamura, T., Maemondo, M., Nukiwa, T. and Tanaka, M.: *Cancer Gene Ther*, **13**(5), 520-9 (2006).
- 197) Son, G., Hirano, T., Seki, E., Iimuro, Y., Nukiwa, T., Matsumoto, K., Nakamura, T. and Fujimoto, J.: *J Hepatol*, **45**(5), 688-95 (2006).
- 198) Jo, J., Yamamoto, M., Matsumoto, K., Nakamura, T. and Tabata, Y.: *J Nanosci Nanotechnol*, **6**(9-10), 2853-9 (2006).
- 199) Jie, J. Z., Wang, J. W., Qu, J. G. and Hung, T.: *World J Gastroenterol*, **13**(13), 1938-46 (2007).
- 200) Kanehira, M., Xin, H., Hoshino, K., Maemondo, M., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Nukiwa, T. and Saijo, Y.: *Cancer Gene Ther*, **14**(11), 894-903 (2007).
- 201) Greco, O. and Dachs, G. U.: *J Cell Physiol*, **187**(1), 22-36 (2001).
- 202) Yazawa, K., Fisher, W. E. and Brunnicardi, F. C.: *World J Surg*, **26**(7), 783-9 (2002).
- 203) Fillat, C., Carrio, M., Cascante, A. and Sangro, B.: *Curr Gene Ther*, **3**(1), 13-26 (2003).
- 204) Palmer, D. H., Mautner, V., Mirza, D., Oliff, S., Gerritsen, W., van der Sijp, J. R., Hubscher, S., Reynolds, G., Bonney, S., Rajaratnam, R., Hull, D., Horne, M., Ellis, J., Mountain, A., Hill, S., et al.: *J Clin Oncol*, **22**(9), 1546-52 (2004).
- 205) Lechanteur, C., Delvenne, P., Princen, F., Lopez, M., Fillet, G., Gielen, J., Merville, M.

- P. and Bours, V.: *Gut*, **47**(3), 343-8 (2000).
- 206) Hall, S. J., Canfield, S. E., Yan, Y., Hassen, W., Selleck, W. A. and Chen, S. H.: *Gene Ther*, **9**(8), 511-7 (2002).
- 207) Warren, P., Song, W., Holle, E., Holmes, L., Wei, Y., Li, J., Wagner, T. and Yu, X.: *Anticancer Res*, **22**(2A), 599-604 (2002).
- 208) Pulkkanen, K. J., Laukkanen, J. M., Fuxe, J., Kettunen, M. I., Rehn, M., Kannasto, J. M., Parkkinen, J. J., Kauppinen, R. A., Pettersson, R. F. and Yla-Herttuala, S.: *Cancer Gene Ther*, **9**(11), 908-16 (2002).
- 209) Goto, T., Nishi, T., Kobayashi, O., Tamura, T., Dev, S. B., Takeshima, H., Kochi, M., Kuratsu, J., Sakata, T. and Ushio, Y.: *Mol Ther*, **10**(5), 929-37 (2004).
- 210) Mavria, G., Harrington, K. J., Marshall, C. J. and Porter, C. D.: *J Gene Med*, **7**(3), 263-75 (2005).
- 211) Koshikawa, N., Takenaga, K., Tagawa, M. and Sakiyama, S.: *Cancer Res*, **60**(11), 2936-41 (2000).
- 212) Dancer, A., Julien, S., Bouillot, S., Pointu, H., Vernet, M. and Huber, P.: *Gene Ther*, **10**(14), 1170-8 (2003).
- 213) Binley, K., Askham, Z., Martin, L., Spearman, H., Day, D., Kingsman, S. and Naylor, S.: *Gene Ther*, **10**(7), 540-9 (2003).
- 214) Sandberg, J. A., Parker, V. P., Blanchard, K. S., Sweedler, D., Powell, J. A., Kachensky, A., Bellon, L., Usman, N., Rossing, T., Borden, E. and Blatt, L. M.: *J Clin Pharmacol*, **40**(12 Pt 2), 1462-9 (2000).
- 215) Weng, D. E., Masci, P. A., Radka, S. F., Jackson, T. E., Weiss, P. A., Ganapathi, R., Elson, P. J., Capra, W. B., Parker, V. P., Lockridge, J. A., Cowens, J. W., Usman, N. and Borden, E. C.: *Mol Cancer Ther*, **4**(6), 948-55 (2005).
- 216) Kobayashi, H., Eckhardt, S. G., Lockridge, J. A., Rothenberg, M. L., Sandler, A. B., O' Bryant, C. L., Cooper, W., Holden, S. N., Aitchison, R. D., Usman, N., Wolin, M. and Basche, M. L.: *Cancer Chemother Pharmacol*, **56**(4), 329-36 (2005).
- 217) Mazzolini, G., Prieto, J. and Melero, I.: *Curr Pharm Des*, **9**(24), 1981-91 (2003).
- 218) Sangro, B., Melero, I., Qian, C. and Prieto, J.: *Curr Gene Ther*, **5**(6), 573-81 (2005).
- 219) Sangro, B., Mazzolini, G., Ruiz, J., Herraiz, M., Quiroga, J., Herrero, I., Benito, A., Larache, J., Pueyo, J., Subtil, J. C., Olague, C., Sola, J., Sadaba, B., Lacasa, C., Melero, I., et al.: *J Clin Oncol*, **22**(8), 1389-97 (2004).
- 220) Heinzerling, L., Burg, G., Dummer, R., Maier, T., Oberholzer, P. A., Schultz, J., Elzaouk, L., Pavlovic, J. and Moelling, K.: *Hum Gene Ther*, **16**(1), 35-48 (2005).
- 221) Tong, A. W., Nemunaitis, J., Su, D., Zhang, Y., Cunningham, C., Senzer, N., Netto, G., Rich, D., Mhashikar, A., Parker, K., Coffee, K., Ramesh, R., Ekmekcioglu, S., Grimm, E. A., van Wart Hood, J., et al.: *Mol Ther*, **11**(1), 160-72 (2005).
- 222) Shand, N., Weber, F., Mariani, L., Bernstein, M., Gianella-Borradori, A., Long, Z., Sorensen, A. G. and Barbier, N.: *Hum Gene Ther*, **10**(14), 2325-35 (1999).
- 223) Rainov, N. G., Kramm, C. M., Banning, U., Riemann, D., Holzhausen, H. J., Heidecke, V., Burger, K. J., Burkert, W. and Korholz, D.: *Gene Ther*, **7**(21), 1853-8 (2000).
- 224) Shalev, M., Kadmon, D., Teh, B. S., Butler, E. B., Aguilar-Cordova, E., Thompson, T. C., Herman, J. R., Adler, H. L., Scardino, P. T. and Miles, B. J.: *J Urol*, **163**(6), 1747-50 (2000).
- 225) Trask, T. W., Trask, R. P., Aguilar-Cordova, E., Shine, H. D., Wyde, P. R., Goodman, J. C., Hamilton, W. J., Rojas-Martinez, A., Chen, S. H., Woo, S. L. and Grossman, R. G.: *Mol Ther*, **1**(2), 195-203 (2000).
- 226) Alvarez, R. D., Gomez-Navarro, J., Wang, M., Barnes, M. N., Strong, T. V., Arani, R. B., Arafat, W., Hughes, J. V., Siegal, G. P. and Curiel, D. T.: *Mol Ther*, **2**(5), 524-30 (2000).
- 227) Sandmair, A. M., Loimas, S., Puranen, P., Immonen, A., Kossila, M., Puranen, M., Hurskainen, H., Tynnela, K., Turunen, M., Vanninen, R., Lehtolainen, P., Paljarvi, L., Johansson, R., Vapalahti, M. and Yla-Herttuala, S.: *Hum Gene Ther*, **11**(16), 2197-205 (2000).
- 228) Rainov, N. G.: *Hum Gene Ther*, **11**(17), 2389-401 (2000).
- 229) Singh, S., Cunningham, C., Buchanan, A., Jolly, D. J. and Nemunaitis, J.: *Mol Ther*, **4**(2), 157-60 (2001).
- 230) Miles, B. J., Shalev, M., Aguilar-Cordova,