

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

創薬基盤型バイオイメージングに向けたヒトがん細胞株の SCID  
マウス体内動態と細胞傷害感受性のカタログ化に関する研究

( H20-生物資源-一般-006 )

平成 20～22 年度 総合研究報告書

研究代表者 村上 孝

平成 23 (2011) 年 5 月



## 目 次

### I. 総合研究報告

創薬基盤型バイオイメージングに向けたヒトがん細胞株の SCID  
マウス体内動態と細胞傷害感受性のカタログ化に関する研究 ----- 1

村上 孝

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 13

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 18

（総合）研究報告書

創薬基盤型バイオイメージングに向けたヒトがん細胞株の SCID  
マウス体内動態と細胞傷害感受性のカタログ化に関する研究

研究代表者 村上 孝 自治医科大学医学部 准教授

研究要旨：本研究開発（3年間）によって、試験管内から個体内観察可能なルシフェラーゼ発現がん細胞株を65種類作製することができた。これらのヒト細胞資源は、適宜宿主の間質細胞との共培養が可能であり、がん微小環境を模倣することができる。この条件では発光を指標に薬効評価が可能となる。このような細胞基盤のアッセイ系は重症免疫不全SCIDマウスでの薬効イメージング解析に移すことができる。したがって、本細胞資源開発は、in vitro から動物実験（in vivo）までを共通した資源を用いて評価することができる系と云える。本細胞資源は、がん創薬促進の観点では、ハイスループット（HTP）・スクリーニング、in vitro がん微小環境模倣型スクリーニングにも耐え、マウス個体内における化合物・薬物評価をカバーし得る「有効かつ高度化された細胞資源」である。これら充実した高度化細胞資源は次世代のがん創薬のプラットフォームを提供するに違いない。

研究分担者

なし

本研究では、簡便かつ高感度なルミネッセンス発光によるバイオイメージング創薬基盤の充実を目的に、  
1) ルシフェラーゼを発現するヒトがん細胞株を作製し、それらを公的細胞バンクへの登録・充実化した。  
2) 免疫不全マウス体内におけるがん細胞動態（転移）情報を可能な限り付与するとともに、2) 既存の薬物・分子標的化合物への感受性のプロファイルをも追加し、ヒトがん細胞に対する先端的医薬品開発の促進・支援に貢献することを目指した。

A. 研究目的

近年、分子生物学的な生命現象の解明を起点に、実際の生体内での生命現象を詳述する試みが成されている。個体があってこそ成立する固有の生命現象も近年のイメージング技術の進歩によって解明されようとしている。本研究では、生体エネルギー(ATP)に依存した「発光」に注目し、イメージング情報を試験管内から生きた個体内で統一できるシステムを開発することを目指した。特に、発生起源によって異なる特性を有するヒトがん細胞において、新規化合物（抗体医薬を含む）の in vitro 評価から個々のがん細胞の体内動態をシステム的に解析できるモデルは、ヒトがんの創薬研究で最も要求度の高いシステムの一つと考えられる。

B. 研究方法

1) ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の作製

肺がん、乳がん、膵臓がん、卵巣がん、メラノーマなどのヒトがん細胞株のソースはヒューマンサイエンス研究資源バンク（HSSRB）、American Type Culture Collection（ATCC）等から汎用性の高い細胞株を分譲・購入した。pMSCV-luc 発現ベクターを細胞にトランスフ

エクシオンし、ピューロマイシン耐性細胞を選択し、ルシフェラーゼ (*Photinus pyralis*) を安定発現するヒトがん細胞株を作製した。

ホタル由来ルシフェラーゼを発現するヒトがん細胞株の *in vitro* ルミネッセンス発光量をプロファイル化するため、ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の限界希釈系列を作製し、細胞数 ( $10^1 - 10^5$  個) とルミネッセンス発光量を試験した。機器は Thermo 社、Appliskan を用いた。

昨年度では、ピューロマイシン耐性を指標とした Luc 発現細胞の選別の際、胃がんや大腸がん細胞株では、極端に発光量が低いクローンしか得られない場合が多かったため、レンチウイルスベクター (pLL 3.7-CMV-Luc) による Luc 遺伝子導入試験を実施した。

## 2) SCID マウスにおける外科的侵襲に対する耐性試験

C. B-17/Icr-scid/scidJcl (SCID) および NOD C. B-17-Prkdc<sup>scid</sup>/J (NOD/SCID) マウスを用い、Isoflurane (Abbott Laboratories, North Chicago, IL) による麻酔下で、細胞移植に伴う外科的侵襲に耐えられるか否かを試験した。

また、ルシフェラーゼ発現がん細胞を SCID マウスの左腎臓被膜下に接種し、ルミネッセンス発光の検出感度の検定を行った。機器は Xenogen 社、IVIS®を用いた。

## 3) 免疫不全マウス体内におけるがん細胞動態解析

VeVo770 超音波解析装置 (VisualSonics 社) のガイド下に NOD/SCID マウスの左心室腔内へ樹立したルシフェラーゼ発現がん細胞株を注射し、全身散布による主要臓器 (肝臓、肺、脳など) への血行性転移動態についてイメージング解析を行った。使用機器は Xenogen 社 IVIS®を用いた。微少転移巣について観察するため、観察期間の終了時に各臓器を *ex vivo* に取り出しルシフェラーゼ発光の検定、もしくは病理検索を行なった。

## 4) 既存の薬物・分子標的化合物に対する感受性試験

ルミネッセンス発光は細胞内 ATP に依存する簡便か

つ鋭敏な評価系であり、細胞生存と極めて相関する。したがって、様々な細胞傷害の評価系として利用することができる。作製された細胞について、文科省がん特定領域研究 (化学療法基盤情報支援班) より分与された「標準阻害薬キット」(約 300 種類) を用いてパイロット試験を実施した。

## 5) Natural Killer (NK) 細胞による細胞傷害試験

NK細胞株をeffectorとして用い、Luc発現細胞株との共培養による細胞傷害試験を行った。対照にはJurkat T細胞を用いた。

### (倫理面への配慮)

本研究では、研究実施機関である自治医科大学DNA実験安全委員会の指針 (遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律: カルタヘナ法) に従い立案され、実験計画は同委員会の承認を得て行なった。

また動物実験に関しても、実験動物関連法規 (動物の保護及び管理に関する法律; 実験動物の飼養及び保管等に関する基準; 動物の処分方法に関する指針) を遵守し、同大学動物実験指針にしたがって実験を行った。

## C. 研究結果

### 1) ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の作製

平成20-22年度の3年間で、ヒトがん細胞株 (乳癌、大腸癌、前立腺癌、悪性黒色腫など) 約100種類についてルシフェラーゼヒトがん細胞株の樹立を試み、実質的にマウス生体内での発光が観察できる細胞株65種類を作製した。また、がんの治療学的な観点から、免疫学的に完全な動物個体内での腫瘍動態を解析できる系の需要が高まり、汎用性の高いC57BL/6マウスやBALB/cマウスに由来するマウスがん細胞も含まれる (表1: 平成23年3月31日まで)。これらの細胞はすべてヒューマンサイエンス研究資源バンク (HSSRB) に寄託を済ませている。

作製されたルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の細胞数を $10^1$ 個- $10^5$ 個までの限界希釈系列を作製し、Ther



mo社、Applisskanを用いた発光量の測定を行った。10<sup>5</sup>個細胞当たり100,000単位以上の高い発光を示すものを「very good」、100,000～50,000単位 (/10<sup>5</sup>個)を「good」、10,000単位以下 (/10<sup>5</sup>個)を「poor」とした(尚、「poor」と判断された細胞株はin vivoでの発光解析に不向きのため寄託していない)。

表1. 細胞バンク寄託済みルシフェラーゼ発現細胞株

組織別	細胞株	Luc 発光
胃がん	NUGC-3	very good
	MKN-1	very good
	MKN-7	very good
	MKN-74	very good
	MKN-45	good
	KATO III	very good
	IM-95	very good
乳がん	HCC-1419	very good
	HCC-1954	very good
	HCC-1937	very good
	SK-BR-3	very good
	BT-20	very good
	BT-474	very good
	MDA-MB-231	very good
	HS578T	very good
	BT-549	good
	MCF7	good
	T-47D	very good
メラノーマ	MDA-MB-361	very good
	* 4T1	good
	SK-MEL-2	very good
	SK-MEL-28	very good
	COLO 679	very good
	Mewo	very good
	G361	very good
MM-RU	good	
グリオーマ	* B16-F0	very good
	* B16-F10	very good
グリオーマ	U251MG	very good
大腸がん	LoVo	very good
	HT-29	very good

表1. 細胞バンク寄託済みルシフェラーゼ発現細胞株 (つづき)

組織別	細胞株	Luc 発光
大腸がん	KM12	very good
	SW420	good
	SW620	very good
	HCT-116	very good
	HCT-15	good
	DLD-1	good
	COLO205	very good
	* Colon26	very good
肺がん(非小細胞)	NCI-H23	very good
	NCI-H460	very good
	A549/ATCC	very good
	NCI-H2009	very good
	NCI-H650	very good
	NCI-H1650	very good
	NCI-H441	very good
	NCI-H2228	very good
	HCC-827	very good
	NCI-H1975	very good
	RERF-LC-KJ	very good
膵臓がん	AsPC-1	very good
	KP-2	very good
	KP-3L	very good
	BxPC-3	very good
卵巣がん	OVCAR-3	very good
	SK-OV-3	very good
腎がん	786-0	very good
	A498	very good
	CAKI-1	very good
前立腺がん	G401	very good
	DU-145	very good
	PC-3	very good
白血病	K-562	good
線維芽細胞	* NIH3T3/ATCC	very good

\*: マウス由来細胞株

2) SCIDマウスは外科的侵襲に耐性である

SCIDマウス及びNOD/SCIDマウスの腹部を正中切開し、開腹した後、腹腔の滅菌生理食塩水による乾燥を防ぎな

から門脈内にPH 7.4のリン酸緩衝液 (PBS) を注射し閉腹した (その間約20分)。その後、約1ヶ月間にわたり行動等の観察をおこなったが、全例 (n=5) 生存することが判った。

また、エコーガイド下で30ゲージ針による左心室腔への生理食塩水の注射を行った (図1) ところ、心タンポナーデなどの重篤な肉眼的傷害は観察されなかった。これらのマウスは30日以上に渡って全例 (n=5) 生存することが判った。

**The use of a high-resolution ultrasound (25-75 MHz) allows accurate intra-cardiac injection.**

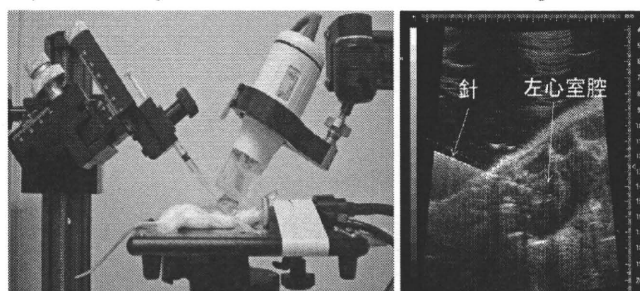


図1: マウス左心室腔内への正確な細胞接種技術の確立

これらの結果は、T細胞やB細胞等の重要な免疫担当細胞を欠落した重症免疫不全マウスであっても、適切な手術環境下では外科的侵襲に耐えることができることを示している。また、30ゲージ針による心室穿刺は当該マウスにおいて重篤な傷害を与えないことも判明した。すなわち、SCIDマウス及びNOD/SCIDマウスに対する左心室腔接種システムが実質的に確立することができた。

さらに、ルミネッセンス発光量とマウス個体内検出限界を知る目的でルシフェラーゼ発現を発現する小児腎臓がん由来細胞株G401をSCIDマウスの左腎臓被膜下に接種し、その検出感度について評価を行った。その結果、 $10^3$ 個での検出には現行の機器では約50,000単位 ( $/10^5$ 個) 以上の発光量が必要であることが判った。特に正面および背部からの撮影に位置によって検出される発光量が異なるため、観察期間中決まったポジションを定める必要性があった。

2) 免疫不全マウス体内におけるがん細胞動態解析  
作製されたルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株から「g

ood」以上の範疇にある細胞株についてNOD C. B-17-Prkdc<sup>scid</sup>/J(NOD/SCID)マウスにおける血行性転移の自然動態をモニタリングした。5 x  $10^5$ 個細胞を左心室腔内に接種し、「ルミネッセンス発光」を指標に経時的な変化を追跡した。例えば、悪性黒色腫細胞では脳、肝、肺に転移し易い傾向が観察されている (図2A)。

**ヒトがんの種類に依存した臓器選択的転移の特徴**

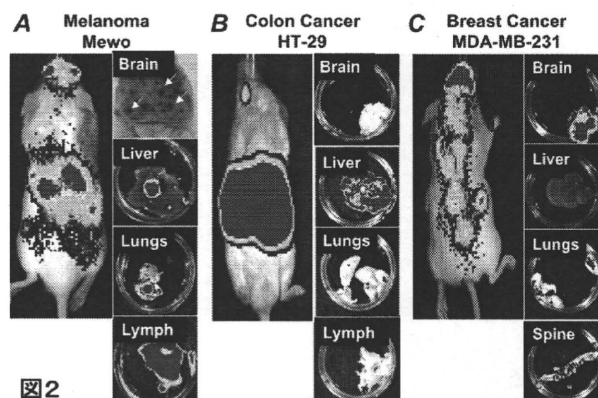


図2

マウス体内でもヒトのがん細胞の転移特性は引き継がれる傾向にある

実際、ex vivoに取り出しルシフェラーゼ発光の検定した結果でも、脳、肝、肺への転移が観察された。さらに、リンパ節、腸管への転移も観察された。脳転移に関しては、顕微鏡学的検索により脳表近くから実質に向かってがん細胞が浸潤する像が観察されている (図3)。

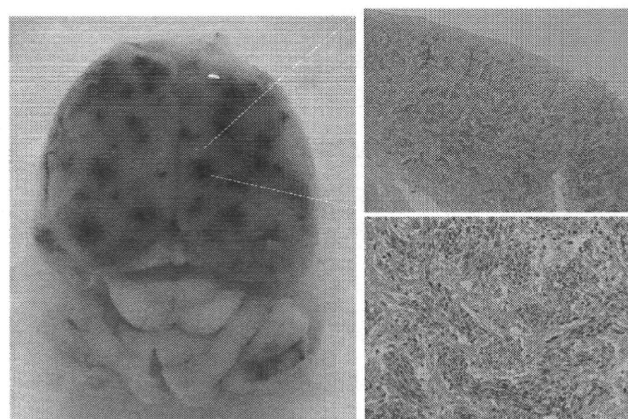


図3: Mewo-luc メラノーマ細胞の脳転移とその浸潤像

これら臓器に対する転移親和性は他のメラノーマ細胞においても同様の傾向を示した。その一方で、大腸がん細胞株HT-29-lucではin vivo イメージング解析では肝転移が顕著であり、ex vivoに取り出しルシフェラーゼ発光検定では、肝臓の他に、腎転移が顕著であり、肺やリンパ節にも小さな転移巣が検出された (図2B)。トリプルネガティブの乳がん細胞株の代表であるMDA-MB-23



1-luc細胞では、乳がんの特徴的な骨転移が観られる他、脳転移や肺転移が観察されている（図2C）。これまでの結果を考えあわせると、がんの臨床的病態の特徴として知られていた「臓器選択的な転移」がマウスを宿主とする異種移植系においても再現されることが強く裏付けた。すなわち、これらのマウス体内における転移動態はまさにヒト固形がんの血行性遠隔転移の動態を模倣するものと考えられた（図4）。

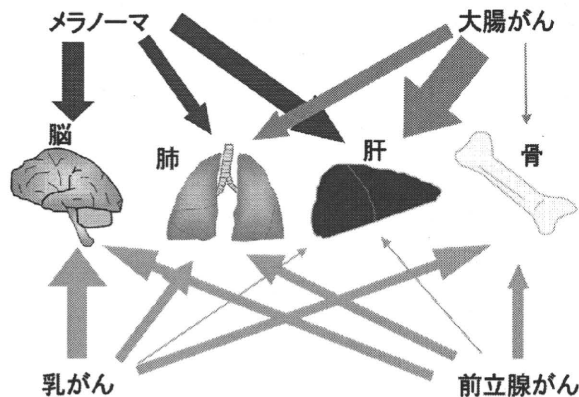


図4: がんの種類に依存した臓器選択的転移の特徴

### 3) 既存の薬物・分子標的化合物に対する感受性試験

文科省がん特定領域研究(化学療法基盤情報支援班)より供与して頂いた「標準阻害薬キット」(288種類)を用いて発光量を指標としたHTS (High Throughput Screening) 試験が可能か否かについて検定を行った。

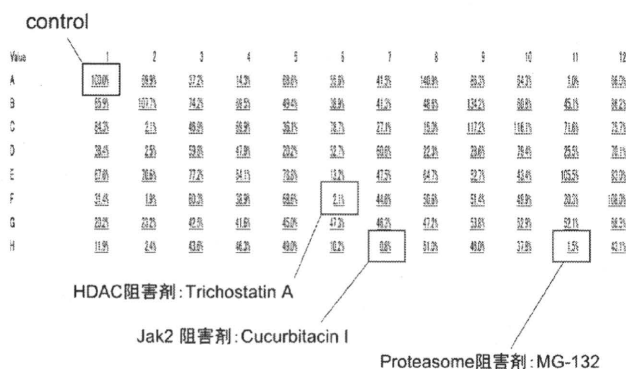


図5: Mewo-luc細胞を用いたLuc発光による薬剤感受性試験の方法

細胞は  $1 - 2 \times 10^4$  個を白色96穴プレートに播き、24時間培養した後に化合物を添加した。その48時間後に発光基質D-ルシフェリンを添加し、発光量を測定した。96穴の内対照(control)を100%としたスクリーニングを行っ

た(図5)結果、発光率10%以下の化合物が各細胞株に対して5%程度の頻度で検出された。メラノーマ細胞ではヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤:トリコスタチンA、JAK2阻害剤:Cucurbitacin-I、プロテアソーム阻害剤:MG-132、PKC阻害剤Staurosporine、p53阻害剤Pifithrin-1(cyclic)などに感受性を示すことが一目でわかるデータが得られている。さらに解析を進めていくとJak2阻害剤、AKT阻害剤、プロテアソーム阻害剤など、がんの種類にほぼ共通した阻害効果が観察されている(表2)。

表2: Luc発光による薬剤感受性試験の例(メラノーマ)

Well	Category	Compound	Mewo	SK-Mel-28	SK-Mel-2	Colo679	MM-RU
1-A	Blank	none (DMSO)	100	100	100	100	100
1-G	Janitumab (DNA)	Mitomycin C			2.4	6.6	
1-H	Janitumab (Abulin)	Vinorelbine sulfate			6.5		7.5
2-C	Janitumab (DNA)	Daunorubicin, HCl	2.1	6.1	0.7	5	
2-D	Janitumab (DNA)	Doxorubicin, HCl	2.5	5.5	0.5	4.9	
2-F	Janitumab (RNA)	Aciclovir D	1.9	3.5	0.5	6	
2-G	Janitumab (topo I)	Camptothecin			3.6	9.4	9.8
2-H	Janitumab (topo II)	Aciclovir D	2.4	4.2			
3-G	CAMKII	KNS3					8.3
4-A	CDC2	Kenpaullone					9.9
6-E	HDAC	Scybalid			3.4		7.8
6-F	HDAC	Trichostatin A	2.1	3.8	1.8		7.3
6-H	Leucine synthesis	Cycloheximide		8.2			4.2
7-C	HSP90	17-AAG		5.3			
7-H	Jak-2	Cucurbitacin I	0.8	0.1	0.1	0.6	2.4
8-C	MEK	PD 98059		6.3			7.3
11-A	PKC, PKA, PKG, MLCK	Staurosporine	1	0.3	0.2	0.2	1.4
11-B	PLA2	cPLA2 inhibitor					1.2
11-H	proteasome	MG-132	1.5	0.5	0.2	0.2	1.2
12-A	proteasome	Lactacystin		3.7			3
1-B	p53	Pifithrin- $\alpha$ (cyclic)		1.5	1.2	0.8	3.5
1-C	p53 activator	PRIMA-1	0.8				
2-C	F1-ATPase	Oligomycin					7.1
2-D	V-ATPase	Bafilomycin A1				1.7	3.4
3-B	cathepsin, cathepsin B, L	ALLN				5.9	1.8
3-D	cathepsin D	Peptatin A					5.7

他の特徴的な例として、胃がん細胞NUGC-3では、Cyclosporine AやFK506カルシニューリン阻害剤による顕著な増殖抑制が観察された。このことは、ピロリ菌のがん原因因子CagAの標的である転写因子NF-ATをカルシニューリン阻害剤でその活性を阻害すると、胃がん細胞の増殖を抑制できることを示唆する重要なケースと考えられた。これらの結果は、ルシフェラーゼ発光を基盤とした「in vitro」アッセイ系であるものの、次に問題となる動物モデルでの有効性をテストする上では、統一された細胞資源で試験できる意義は大きい。したがって、本細胞資源は、がん創薬促進の観点からは有用なものと捉える。

### 4) Natural Killer(NK)細胞による細胞傷害試験

がんに対する免疫監視機構においては、NK細胞が重要な役割を演ずる。アロ反応ではあるものの、NK細胞に対する細胞傷害の感受性評価はがんに対する細胞治療の可能性を探る上で重要な案件である。Luc発光を指標に

した膵臓がんのNK細胞感受性の例では（図6）、PANC-1、BxPC-3細胞はNK細胞に対して感受性が高いものの、KP-3L細胞では比較的抵抗性を示した。KP-3L細胞はNOD/SCIDマウス個体内において浸潤性が強く、高い転移能を有していた。このことは、悪性度の高いがん細胞はNK細胞に対する免疫監視機構から逃避することができ、がん細胞自身のNK細胞感受性をもたせる薬剤が個体内における治療に必要であることが示唆された。

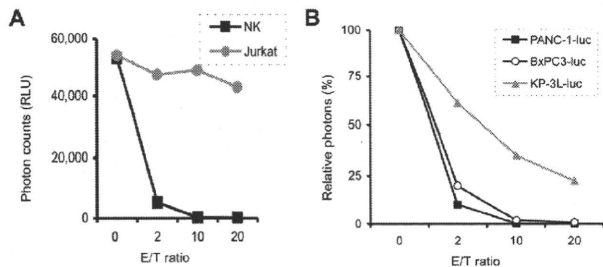


図6. NK細胞に対するin vitro 感受性試験

(A) NK細胞と膵臓がん細胞PANC-1とを一定の比率で混合し、腫瘍由来のLuc発光を指標に細胞傷害試験を行った。対照のeffector細胞として Jurkat T細胞を用いた。(B) 3種類の膵臓がん細胞を用いてNK細胞に対する感受性を比較した。PANC-1-luc細胞との比較では、KP-3L-luc細胞ではNK細胞に対して抵抗性を示した。

このような細胞治療の視点で、膵臓癌に対するNK細胞の治療応用の可能性について腹膜播種モデルによる検討した。細胞はPANC-1-luc細胞を用い、アロ培養NK細胞を腹膜に接種する実験を行なった（図7）。その結果、NOD/SCIDマウス体内において活性化培養アロNK細胞は膵臓癌の腫瘍性増殖を一定期間制御できることが示された。

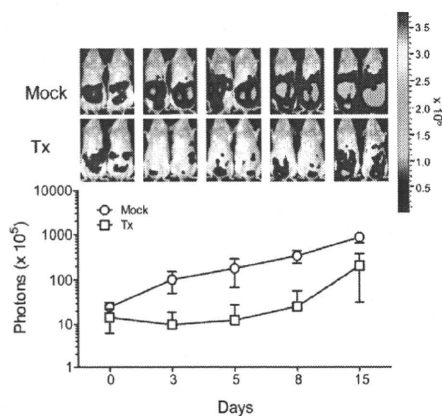


図7. NK細胞に対する膵臓がんPANC-1細胞のin vivo感受性試験

#### D. 考察

イメージング技術の発展により、がんに関する基礎研究だけでなく抗がん剤の創薬研究においても、動物

の個体内でのがん細胞動態をリアルタイムに把握しながら薬効評価を評価することが可能となった。しかしその一方で、動物の個体内でのイメージング試験に供されるべき細胞株が十分に整備されているとは言いがたく、評価系の構築に先立ってイメージング用プローブを遺伝子導入した細胞株を作製しなければならない場合が多い。また、がん細胞株を用いたin vitroの化合物スクリーニングとin vivoの評価系を統一された同じ細胞で利用することができれば、より精度の高い薬効評価につながると考えられる。さらに薬効評価に利用する細胞株に、その細胞株に関する遺伝子発現プロファイルや各種薬剤の応答性のデータが付随されていれば、抗がん剤のスクリーニングや作用機序解析の際に有用な情報となる可能性がある。本研究助成において、学会や研究会などでの当該細胞資源の開発状況を積極的に公表した結果、米国Harvard大学（Simon C Robson 教授）、東京大学大学院医学系研究科（松島綱治 教授）、群馬大学重粒子研究センター（吉田由香里 助教、中野隆史教授）、早稲田大学先進理工学部生命医科学科（仙波憲太郎 教授）、長崎大学大学院（田中邦彦 准教授）、東京薬科大学薬学部（根岸洋一 准教授）との技術開発を含めた共同研究につながっている（その他研究機関や製薬業界からの問い合わせも多数）。当該細胞資源の公的寄託機関からの細胞配付が安定してなされれば、さらに創薬研究開発が促進されるものと期待している。

発光用プローブとして代表的なルシフェラーゼはATP要求性であり、細胞内のATPの状態を反映することから、細胞の生存状態とよく相関する。また発光波長は600nm付近と長波長側であるため透過性が高く、in vivoの解析に有利である。短所としては、発光には基質（D-ルシフェリン）投与が必要な点が挙げられる。ただし、マウス体内の部位で基質が届かないことによって発光しないという問題はほとんどないと考えられる。またそれ以外に、深部と比較して体表面に近い光がより強く検出されること、黒色細胞では発光の検出感度が低いことが挙げられる。一方、「蛍光」用のパ



イオプローブとして代表的なGFPは必ずしも細胞内のエネルギー状態を反映しない（蛋白が存在すれば、死細胞でも光る）こと、バックグラウンドが高いことから、創薬細胞資源の用途には化学発光プローブの方が適していると考えられる。しかしながら、移植されたがん細胞の浸潤や初期動態を細胞単位で観察するには蛍光プローブを用いたイメージング解析は高い解像度が得られる点で魅力的である（二光子レーザー顕微鏡による観察）。将来的には、薬物（化合物）処理による細胞個々の動態（運動性）が生体内で観察できる細胞資源の開発も視野に置くべきかもしれない。

本研究開発では、ルシフェラーゼ遺伝子の導入後、ピューロマシ耐性細胞によって選別が為されてきた。ピューロマシ耐性株が樹立できているにもかかわらず、実質的なルシフェラーゼ発光に至らない細胞株が多く存在していた。この事象は細胞株に依存し、高分化型腺癌で顕著であった。導入ベクター非依存的にピューロマシ耐性を獲得している可能性があったため、元来の細胞株の特性を損なわない方法として選択薬剤の暴露を避ける方法論について試行錯誤を繰り返した。その結果、細胞分裂に依存しないレンチウイルスベクターを高濃度に濃縮する方法が極めて有効であることがわかった。平成20-21年度ではオンコウイルス型のレトロウイルスベクター(pMSCV-luc)中心であったが、平成21年度後半からは適宜、レンチウイルスベクター(pLL3.7-CMV-luc)を使い分けながら細胞作製の効率化を図ってきた。

本研究により作製された細胞資源は依然として試験管内における評価系では優れたパフォーマンスを発揮する。従来までのMTTアッセイやThymidineもしくはBrdUを用いた細胞傷害試験よりも操作が著しく簡便であり、しかも鋭敏なHTS (High Throughput Screening) 試験系として利用可能であった。このような評価は免疫担当細胞との相互作用による細胞傷害試験にも応用が可能であり、広く汎用性が期待できる。これまでのin vitro薬剤感受性の評価は二次元評価が通例であり、この方法論であっても一定のスクリーニング効果は観

察されていた。しかし、モデル動物を用いた評価ではしばしばin vitroで得られた結果を反映しないことが問題となっていた。最近、当該がん細胞資源に間質細胞として骨髄由来間質細胞を混和・供培養し、その条件下で薬効を評価する系が報告された(McMillin, et al. Nat Med 2010; 16: 483-489)。従来までの評価系ではがん微少環境とはほど遠く、間質細胞の存在下で発光を指標として評価することに意義がある。実際、マウスを用いたin vivo評価モデルとの相関性が示されている。本研究によって開発された細胞資源は上記のようなモデル系であればすぐに応用することが可能であり、また3次元培養法との組み合わせによりさらに臨床的がん微少環境を模倣した系に発展させることができる。このような評価系もLuc発現を可能にする充実した細胞資源があって実現することであり、本細胞資源を用いた新しい創薬局面が生まれることを期待している。

平成21年度以降では本邦で発生頻度の高い胃がん細胞、またしばしば治療に苦慮する膵臓がんなど、邦人細胞株を追加してきた。さらに、肺がん（非小細胞性肺がん）の罹患率にも配慮し、その主なドライバー変異とされるK-Ras変異やEGFR変異株、更にはEML4-ALK融合型変異陽性のルシフェラーゼ発現細胞株を作製した。これらの細胞資源は分子標的薬の開発や現在問題となっている薬剤耐性獲得の原因究明のよい素材になると考えている。すなわち、培養系を主軸としたin vitro研究から（マウス等の）個体研究をカバーすることが可能なため、がん細胞自身側の原因と個体内環境による原因の両サイドから研究することができる。したがって、本邦に固有の遺伝子変異を含めたがん創薬研究にも貢献できる素材を追加できたものと思われる。

すでに米国で先行した「NCI60」細胞パネルは国際的にも非常に有用であり、日本人由来のがん細胞株を含めた「JFCR-39」の作成により一層進化したがん創薬細胞基盤ができています。本研究ではこれらの情報にin vivo情報を重ねることにより、一層有用なカタログになることを期待している。前述した間質細胞との相互

作用を含めた薬剤感受性情報による修正が加わるとその有用性はさらに増すことが期待できる。

本プロジェクトの関連で、ルミネッセンス発光の利用が「がん幹細胞」研究への応用性についても検討を行なった。その結果、発光イメージングが「がん幹細胞」研究にも応用可能性が示された (Yanagisawa, et al. Clin Cancer Res. 2009)。現在、がん幹細胞の純粋な培養系は存在しないが、このハードルを乗り越えることでがん幹細胞を標的とした新しいHTP創薬研究が提案できると考えている。

作製した細胞資源は公共の細胞バンクに登録し、研究者が利用できる仕組みを構築する予定である。最近、高速シーケンサーの出現により従来までとは異なる高い精度の遺伝子発現研究が成されようとしている。当該研究資源による転移動態 (時空間的データ) と高い精度の遺伝子発現情報を統合したシステムが出来上がることにより、特定のがん腫の臓器転移を予測することが可能になるかもしれない。大量のデータによって複雑度が増加するものの、情報処理システムやバイオインフォマティクス解析の革新により容易な抽出系が確立されることを期待したい。今後は遺伝子発現と転移動態が時空間的に統合されたデータの公開方法について検討したい。

#### E. 結論

本研究開発 (3年間) によって、試験管内から個体内観察可能なルシフェラーゼ発現がん細胞株を65種類作製することができた。これらのヒト細胞資源は、適宜宿主の間質細胞との共培養が可能であり、がん微少環境を模倣することができる。この条件では発光を指標に薬効評価が可能となる。このような細胞基盤のアッセイ系は重症免疫不全SCIDマウスでの薬効イメージング解析に移すことができる。したがって、本細胞資源開発は、in vitro から動物実験 (in vivo) までを共通した資源を用いて評価することができる系と云える。本細胞資源は、がん創薬促進の観点では、ハイスループット (HTP) ・スクリーニング、in vitro がん微少環境模倣型スク

リーニングにも耐え、マウス個体内における化合物・薬物評価をカバーし得る「有効かつ高度化された細胞資源」である。これら充実した高度化細胞資源は次世代のがん創薬のプラットフォームを提供するに違いない。

#### F. 健康危険情報 該当なし (省略)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Murakami T, Sato A, Chun NAL, Hara M, Naito Y, Kobayashi Y, Kano Y, Furukawa Y, Kobayashi E. Transcriptional modulation using HDACi depsipeptide promotes immune cell-mediated tumor destruction of murine B16 melanoma. *J Invest Dermatol* 2008; 28(6): 1506-1516.
2. Inoue H, Murakami T, Ajiki T, Hara M, Hoshino Y, Kobayashi E. Bioimaging assessment and effect of skin wound healing using bone marrow-derived mesenchymal stromal cells with the artificial dermis in diabetic rats. *J Biomed Opt.* 2008 Nov-Dec; 13(6): 064036.
3. Hara M, Murakami T, Kobayashi E. In vivo bioimaging using photogenic rats: fate of injected bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J Autoimmun* 2008; 30: 163-171.
4. 村上 孝, 小林英司: 「ラット」を基盤とした In vivo バイオイメージング. *実験医学* 2008; 26(17): 110-117.
5. 村上 孝, 小林英司: 臓器組織再生を目指した細胞・幹細胞移植研究の動向. *今日の移植* 2008; 21(4): 313-318.
6. 村上 孝, 小林英司: 蛍光発生トランスジェニックラットがもたらすイノベーション. *日本コンピュータ外科学会誌* 10 (4): 495-499, 2008.
7. 村上 孝: 悪性黒色腫の転写修飾による免疫学的感受性の増強. *医薬の門*. 48(4): 106-110, 2008.
8. 小林英司, 村上 孝: 再生医療研究用幹細胞や癌細胞の動態観察に貢献する『color-engineered』ラットシステム. *BIO EX-press* 新緑号: 34-39, 2008.



9. 井上泰一、安食孝士、遠藤照顕、中間季雄、星野雄一、村上 孝、小林英司：トランスジェニックラットを用いた移植骨髄由来細胞のバイオイメージング。日本整形外科学会誌 82: 983-988, 2008.
10. Murakami T, Chun NAL. Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. *SPIE Newsroom. The International Society for Optical Engineering*. 2009; 10.1117/2.1200912.002501.
11. Yanagisawa S, Kadouchi I, Yokomori K, Hirose M, Hakozaiki M, Hojo H, Maeda K, Kobayashi E, Murakami T. Identification and metastatic potential of tumor-initiating cells in malignant rhabdoid tumor of the kidney. *Clin Cancer Res*. 2009, 5(9): 3014-22.
12. Horie M, Sekiya I, Muneta T, Ichinose S, Matsumoto K, Saito H, Murakami T, Kobayashi E. Intra-articular Injected Synovial Stem Cells Differentiate into Meniscal Cells Directly and Promote Meniscal Regeneration Without Mobilization to Distant Organs in Rat Massive Meniscal Defect. *Stem Cells* 2009; 27(4): 878-7.
13. Kadouchi I, Sakamoto K, Tangjiao L, Murakami T, Kobayashi E, Hoshino Y, Yamaguchi Y. Latexin is involved in bone morphogenetic protein-2-induced chondrocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 378(3): 600-4.
14. Endo T, Ajiki T, Inoue H, Kikuchi M, Yashiro T, Nakama T, Hoshino Y, Murakami T, Kobayashi E. Implication of a neuropathic pain by enforced stepping exercise with aberrant axonal sprouting through brain-derived neurotrophic factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 381(3):339-44.
15. Arai Y, Hakamata Y, Igarashi Y, Sato Y, Kayama Y, Takahashi M, Kobayashi E, Murakami T. Characterization of hepatic sexual dimorphism in Alb-DsRed2 transgenic rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 382(1):46-50.
16. Kawarasaki T, Uchiyama K, Hirao A, Azuma S, Otake M, Shibata M, Tsuchiya S, Enosawa S, Takeuchi K, Konno K, Yoshino H, Hakamata Y, Wakai T, Ookawara S, Tanaka H, Kobayashi E, Murakami T. Profile of new green fluorescent protein (GFP)-transgenic *Jinhua* pigs as an imaging source. *J Biomed Opt.* 2009, Sep-Oct;14(5): 054017.
17. 村上 孝：発光・蛍光タンパク質による細胞標識の基本的手法とその応用。Surgery Frontier. 2009. Vol. 16 (3): 97-102.
18. 村上 孝：光イメージングが開く新しいトランスレーショナル・ツール。Medical Tribune. Vol. 42, No. 22: pp 84. 特別企画 p6. 2009年5月28日
19. 菊地健志、堀田 淳、村上 孝、高橋将文、小林英司：Luciferase Transgenic ラットを用いた迅速な組織内 ATP の評価法- 効果的な臓器保存液の開発のために-。Surgery Frontier. 2009. Vol. 16 (3): 103-8.
20. 高橋将文、村上 孝、小林英司。トランスジェニックラットを用いた in vivo バイオイメージング。日本血栓止血学会誌。2009. 第 20 巻 第 6 号。608-14.
21. Chun NAL, Murakami T. Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. "Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications II", edited by Samuel Achiefu & Ramesh Raghavachari. *Progr Biomed Opt Imaging*. 2010; 11 (29): 757606 (1-7).
22. Kimura M, Murakami T, Kizaka-Kondoh S, Itoh M, Yamamoto K, Hojo Y, Takano M, Kario K, Shimada K, Kobayashi E. Functional molecular imaging of integrin-linked kinase-Akt/PKB-mediated signaling and associated role of beta-parvin. *J Cell Sci*. 2010; 123: 747-55.
23. Murai K, Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, Igarashi T, Seo N, Murakami T, Kobayashi E, Mochida J. Primary immune system responders to nucleus pulposus cells: evidence for immune response in disc herniation. *Eur Cells Mater*. 2010; 19:13-21.

24. Kobayashi M, Murakami T, Uchibori R, Chun NAL, Kobayashi E, Morita T, Ozawa K. Establishment and characterization of transplantable luminescence-labeled rat renal cell carcinoma cell lines. *J Urol*. 2010; 183(5): 2029-35.
  25. Murakami T. Transcriptional modulation using histone deacetylase inhibitors for cancer immunotherapy. Chapter 14 in "Experimental and Applied Immunotherapy". Edited by Medin JA & Fower DH. 2010, Nov. 30 (pp 307-322). Humana Press, Springer (New York).
  26. Iwasaki J, Hata T, Hishikawa S, Fujimoto Y, Uemoto S, Murakami T, Kobayashi E. Use of rat segmental intestine for fetal pancreatic transplantation. *Microsurgery* 2010 May;30(4):296-301.
  27. Ohsawa I, Murakami T, Guo L, Enosawa S, Ishibashi N, Isaji S, Uemoto S, Kobayashi E. Chemopreventive anti-cancer agent acyclic retinoid suppresses allogeneic immune responses in rats. *Int Immunopharmacol*. 2010;10(8):985-9.
  28. Sun X, Wu Y, Gao W, Enyoji K, Csizmadia E, Muller CE, Murakami T, Robson SC. Adenosine generation by CD39/ENTPD1 on CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells dampens anti-tumor immunity. *Gastroenterology* 2010; 139 (3):1030-40.
  29. Yamaguchi A, Murakami T, Takahashi M, Kobayashi E, Sugawara Y. Luminescence imaging of regenerating free bone graft in rats. *Plast Reconstr Surg* 2011 Jan;127(1):78-87.
  30. Feng L, Sun X, Csizmadia E, Han L, Murakami T, Wang X, Robson SC, Wu Y. Vascular CD39/ENTPD1 directly promotes tumor cell growth by scavenging extracellular ATP. *Neoplasia* 2011 Mar;13(3):206-16.
  31. Miyagaki T, Sugaya M, Murakami T, Kadono T, Okochi H, Tamaki K, Sato S. CCL11-CCR3 interaction promotes survival of anaplastic large cell lymphoma cells via ERK1/2 activation. *Cancer Res*. 2011 Mar 15;71(6):2056-65.
2. 学会発表
    1. Kai K, Teraoka S, Adachi Y, Ikehara S, Murakami T, Kobayashi E. In vivo cell kinetics of bone marrow transplantation using dual colored transgenic rat system. Jan. 21-22, 2008. San Jose, CA, USA.
    2. Horie M, Sekiya I, Muneta T, Murakami T, Kobayashi E. Establishment of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and synovium of transgenic rats expressing dual reporter genes. Jan. 21-22, 2008. San Jose, CA, USA.
    3. Kikuchi T, Hotta J, Murakami T, Kobayashi E. A Novel Visualization System of Organ/Tissue ATP Levels Using Luciferase Transgenic Rats. American Transplant Congress 2008; May 30-June 4, 2008. Toronto, Canada.
    4. Sato A, Murakami T, Kaneko R, Ohtsuki M, Hirabayashi M, Kobayashi E. Telomerase reverse transcriptase transgenic rats develop severe dermatitis. International Investigative Dermatology 2008, Kyoto, May14-17, 2008.
    5. 柳澤智彦、前田貢作、田辺好英、久田正昭、馬場勝尚、村上孝、小林英司、横森欣司。腎横紋筋肉腫様腫瘍におけるがん幹細胞の分離と挙動。第45回日本小児外科学会学術集会。2008年5月28-30日。つくば。
    6. 村上孝、小林英司：ラット生体内イメージングがもたらす臓器移植研究の進歩。シンポジウム「臓器移植関連の生体イメージング」第35回日本臓器保存生物医学会定期学術集会 2008年11月23日東京。
    7. 村上孝：光イメージングが開く新しいトランスレーショナル研究・ツール。教育講演。第6回日本免疫治療学研究会学術集会 2009年2月21日東京
    8. 柳澤智彦、前田貢作、田辺好英、久田正昭、馬場勝尚、村上孝、小林英司、横森欣司。がん幹細胞理論と同調した腎横紋筋肉腫様腫瘍モデルの確立とその治療戦略。第46回日本小児外科学会学術集会。大阪。2009年6月1-3日。



9. Murakami T, Chun AL N, Matsui A. Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. 第 68 回日本癌学会学術総会 横浜 2009 年 10 月 1-3 日.
10. Chun AL N, Matsui A, Murakami T. Bio-luminescent imaging of the brain metastasis in a xenogeneic tumor transplantation mouse model. 第 68 回日本癌学会学術総会 横浜 2009 年 10 月 1-3 日.
11. Matsui A, Chun AL N, Murakami T. Ultrasonographic analysis with Doppler in CXCL17/VCC/DMC-expressing tumor of mice. 第 68 回日本癌学会学術総会 横浜 2009 年 10 月 1-3 日.
12. Kobayashi M, Murakami T, Uchibori R, Ozawa K, Kobayashi E, Morita T. Establishment and characterization of transplantable luminescence-labeled rat renal cell carcinoma cell lines. 第 68 回日本癌学会学術総会 横浜 2009 年 10 月 1-3 日.
13. Sekine H, Shimizu T, Matsuura K, Yamato M, Takahashi M, Murakami T, Kobayashi E, Hagiwara N, Okano T. Cell Sheet Transplantation Improves Damaged Heart Function Via More Cell Survival In Comparison With Dissociated Cell Injection. American Heart Association. November 15-17, 2009. Orlando, Miami.
14. Murakami T. Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. December 4-6, 2009. Fukuoka, Japan.
15. Murakami T. Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. "Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications"; SPIE Photonics West. January 23-28, 2010. San Francisco, CA, USA.
16. 小俣大樹、根岸洋一、村上 孝、野水基義、新槇幸彦. ラミノニン由来 AG73 ペプチド修飾リポソームによる siRNA 導入効率の評価. 日本薬学会 第 130 年会. 岡山 2010 年 3 月 28-30 日.
17. Miyagaki T, Sugaya M, Kadono T, Murakami T, Okochi H, Tamaki K and Sato S. Eotaxin-CCR3 interaction promotes survival of anaplastic largecell lymphoma cells via ERK1/2 activation. The 70<sup>th</sup> Society for Investigative Dermatology. Atlanta, GA, May 5-8, 2010.
18. 村上 孝. 株化ヒトがん細胞を用いた NOD/SCID マウス体内における転移動態の発光イメージング. 第 20 回日本サイトメトリー学会学術集会 (ワークショップ 3 : 生体内イメージングの現状と応用). 東京 (港区 : 東京慈恵医科大学). 2010 年 6 月 27 日.
19. Murakami T, Chun AL N Takahashi M. Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. 第 16 回日本遺伝子治療学会年次学術集会. 栃木 (宇都宮) 2010 年 7 月 1-3 日.
20. Murakami T, Chun ALN, Matsui A, Sato A. Kinetics of brain metastasis in human melanoma cells using the bio-luminescent imaging. 第 69 回日本癌学会学術総会 大阪 2010 年 9 月 22-24 日.
21. Matsui A, Chun ALN, Murakami T. Human cancer cell lines for in vitro and in vivo bio-luminescence assay. 第 69 回日本癌学会学術総会 大阪 2010 年 9 月 22-24 日.
22. Ohsawa I, Murakami T, Guo L, Enosawa S, Ishibashi N, Isaji S, Uemoto S, Kobayashi E. Chemopreventive anti-cancer agent acyclic retinoid suppresses allogeneic immune responses in rats. 第 69 回日本癌学会学術総会 大阪 2010 年 9 月 22-24 日.
23. Masuyama J-I, Iwamoto S, Murakami T, Miyazaki A, Fujita S. Selective expansion of human NK cells from peripheral blood mononuclear cells costimulated with OKT3 and Campath-1H. 第 69 回日本癌学会学術総会 大阪 2010 年 9 月 22-24 日.

24. Shin-ichi Takeda, Junko Chinda, Akihiko Numata, Takashi Murakami, Masafumi Takahashi, and Eiji Kusano. Development of features of glomerulopathy in tumor-bearing rats: a potential model for paraneoplastic glomerulopathy The 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Colorado Convention Center. Denver, CO. November 16-21, 2010.
25. Takeshi Kikuchi, Jun Hotta, Kohji Negishi, Tomohiro Arata, Takashi Murakami, Yasutaka Fujita, Eiji Kobayashi. Tissue ATP levels visualization system: Introducing luciferase transgenic rat. 10<sup>th</sup> Congress of the International Society for Experimental Microsurgery. Oct. 29-Nov.1, 2010. Sao Paulo, Brazil.

### 3. その他の発表

1. 村上 孝. 「創薬基盤型バイオイメージングに向けたヒトがん細胞株の SCID マウス体内動態と細胞傷害感受性のカタログ化」 Work in Progress. 第3回日本分子イメージング学会学術集会. 2008年5月23日 (大宮).
2. 村上 孝. がんの発光イメージングと治療モデルへの応用. 関西医科大学大学院講座 (大阪). 2008年11月17日.
3. 村上 孝. 「創薬基盤型バイオイメージングに向けたヒトがん細胞株の SCID マウス体内動態と細胞傷害感受性のカタログ化」 ヒューマンサイエンス振興財団主催. 2008年11月27日. (HSレポート No. 65 「臨床予測性を高める創薬研究テクノロジー、研究資源の動向調査」 Part II - テーラーメイド医療実現に向けてのバイオマーカー関連施設、探索研究およびトランスレショナルリサーチ. 研究資源委員会調査報告書 (平成21年3月 ヒューマンサイエンス振興財団) p249-258 収載.
4. 村上 孝. 「発光イメージングによるヒトがん細胞の臓器特異的転移の動態」 Work in Progress 第4回日本分子イメージング学会学術集会. 2009年5月14-15日 (東京千代田区).

5. Takashi Murakami. Transcriptional modulation using the histone deacetylase inhibitor and cancer immunotherapy (Invited Speaker). DNA Vaccines Conference in Asian 2009 (at Beijing International Convention Center), July 9-10, 2009. Beijing, China.
6. 村上 孝. 『NOD/SCID マウス体内におけるヒトがん細胞株の臓器特異的転移の発光イメージングのカタログ化』 第4回 IVIS ユーザー会 In vivo イメージングシンポジウム (住商ファーマインターナショナル株式会社主催). 2009年9月30日. 東京国際フォーラム (有楽町).
7. 村上 孝、Nicole AL Chun、高橋将文. NOD/SCID マウス体内におけるヒトがん細胞株の臓器特異的転移の発光イメージング. 第1回細胞機能可視化研究会. 2009年10月9日. 東京大学医学部教育研究棟 13F (東京).
8. 村上 孝. NOD/SCID マウスの体内における株化ヒトがん細胞の臓器特異的転移の発光イメージング. 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 大学院セミナー (長崎) 2009年11月5日.
9. 村上 孝. NOD/SCID マウスの体内における株化ヒトがん細胞の臓器特異的転移と発光イメージング. 群馬大学大学院医学系研究科 平成21年度がんプロフェッショナル養成プラン 腫瘍放射線学・特別講演 (第3回). 2009年12月18日 (前橋).

### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

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
<u>Murakami T</u>	Transcriptional modulation using histone deacetylase inhibitors for cancer immunotherapy (Chapter 14)	Medin JA & Fower DH	<i>Experimental and Applied Immunotherapy</i>	Humana Press (Springer)	New York	2011

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
<u>Murakami T</u> , Sato A, Chun NAL, Hara M, Naito Y, Kobayashi Y, Kano Y, Furukawa Y, Kobayashi E.	Transcriptional modulation using HDACi depsipeptide promotes immune cell-mediated tumor destruction of murine B16 melanoma.	<i>J Invest Dermatol.</i>	28(6)	1506-1516	2008
Inoue H, <u>Murakami T</u> , Ajiki T, Hara M, Hoshino Y, Kobayashi E.	Bioimaging assessment and effect of skin wound healing using bone marrow-derived mesenchymal stromal cells with the artificial dermis in diabetic rats.	<i>J Biomed Opt.</i>	13(6)	64036 (1-6)	2008
Hara M, <u>Murakami T</u> , Kobayashi E.	In vivo bioimaging using photogenic rats: fate of injected bone marrow-derived mesenchymal stromal cells.	<i>J Autoimmun.</i>	30(3)	163-171	2008
<u>村上 孝</u> , 小林英司	「ラット」を基盤とした In vivo バイオイメーキング	<i>実験医学</i>	26(17)	110-117	2008



村上 孝、小林英司	臓器組織再生を目指した細胞・幹細胞移植研究の動向	今日の移植	21(4)	313-318	2008
村上 孝、小林英司	蛍光発生トランスジェニックラットがもたらすイノベーション	日本コンピュータ外科学会誌	10(4)	495-499	2008
村上 孝	悪性黒色腫の転写修飾による免疫学的感受性の増強	医薬の門	48(4)	106-110	2008
井上泰一、安食孝士、遠藤照頭、中間季雄、星野雄一、村上 孝、小林英司	トランスジェニックラットを用いた移植骨髄由来細胞のバイオイメーjing	日本整形外科学会誌	82	983-988	2008
小林英司、村上 孝	再生医療研究用幹細胞や癌細胞の動態観察に貢献する『color-engineered』ラットシステム	BIO EX-press	新緑号	34-39	2008
Murakami T, Chun NAL.	Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice.	SPIE Newsroom. The International Society for Optical Engineering	10.1117/2.1200912.002501.1.	10.1117/2.1200912.002501.	2009
Yanagisawa S, Kadouchi I, Yokomori K, Hirose M, Hakozaaki M, Hojo H, Maeda K, Kobayashi E, Murakami T.	Identification and metastatic potential of tumor-initiating cells in malignant rhabdoid tumor of the kidney.	Clin Cancer Res.	5(9)	3014-3022	2009
Horie M, Sekiya I, Muneta T, Ichinose S, Matsumoto K, Saito H, Murakami T, Kobayashi E.	Intra-articular Injected Synovial Stem Cells Differentiate into Meniscal Cells Directly and Promote Meniscal Regeneration Without Mobilization to Distant Organs in Rat Massive Meniscal Defect.	Stem Cells	27(4)	878-887	2009
Kadouchi I, Sakamoto K, Tangjiao L, Murakami T, Kobayashi E, Hoshino Y, Yamaguchi Y.	Latexin is involved in bone morphogenetic protein-2-induced chondrocyte differentiation.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	378(3)	600-604	2009

Endo T, Ajiki T, Inoue H, Kikuchi M, Yashiro T, Nakama T, Hoshino Y, <u>Murakami T</u> , Kobayashi E.	Implication of a neuropathic pain by enforced stepping exercise with aberrant axonal sprouting through brain-derived neurotrophic factor.	<b>Biochem. Biophys. Res. Commun.</b>	381(3)	339-344	2009
Arao Y, Hakamata Y, Igarashi Y, Sato Y, Kayama Y, Takahashi M, Kobayashi E, <u>Murakami T</u> .	Characterization of hepatic sexual dimorphism in Alb-DsRed2 transgenic rats.	<b>Biochem. Biophys. Res. Commun.</b>	382(1)	46-50	2009
Kawarasaki T, Uchiyama K, Hirao A, Azuma S, Otake M, Shibata M, Tsuchiya S, Enosawa S, Takeuchi K, Konno K, Yoshino H, Hakamata Y, Wakai T, Ookawara S, Tanaka H, Kobayashi E, <u>Murakami T</u> .	Profile of new green fluorescent protein (GFP)-transgenic <i>Jinhua</i> pigs as an imaging source.	<b>J Biomed Opt.</b>	14(5)	54017	2009
<u>村上 孝</u>	発光・蛍光タンパク質による細胞標識の基本的手法とその応用	<b>Surgery Frontier</b>	16(3)	97-102	2009
菊地健志、堀田 淳、 <u>村上 孝</u> 、高橋将文、小林英司	Luciferase Transgenic ラットを用いた迅速な組織内 ATP の評価法—効果的な臓器保存液の開発のために—	<b>Surgery Frontier</b>	16(3)	103-108	2009
<u>村上 孝</u>	光イメージングが開く新しいトランスレーショナル・ツール	<b>Medical Tribune</b>	42(22)	84	2009
高橋将文、 <u>村上 孝</u> 、小林英司.	トランスジェニックラットを用いた in vivo バイオイメージング.	<b>日本血栓止血学会誌</b>	20(6)	608-614	2009
Chun NAL, <u>Murakami T</u> .	Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice.	<b>Progr Biomed Opt Imaging.</b>	11(29)	757606 (1-7)	2010

Kimura M, <u>Murakami T</u> , Kizaka-Kondoh S, Itoh M, Yamamoto K, Hojo Y, Takano M, Kario K, Shimada K, Kobayashi E.	Functional molecular imaging of integrin-linked kinase-Akt/PKB-mediated signaling and associated role of beta-parvin.	<i>J Cell Sci.</i>	123(Pt 5)	747-755	2010
Murai K, Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, Igarashi T, Seo N, <u>Murakami T</u> , Kobayashi E, Mochida J.	Primary immune system responders to nucleus pulposus cells: evidence for immune response in disc herniation.	<i>Eur Cells Mater.</i>	19	13-21	2010
Kobayashi M, <u>Murakami T</u> , Uchibori R, Chun NAL, Kobayashi E, Morita T, Ozawa K.	Establishment and characterization of transplantable luminescence-labeled rat renal cell carcinoma cell lines.	<i>J Urol.</i>	183(5)	2029-2035	2010
Iwasaki J, Hata T, Hishikawa S, Fujimoto Y, Uemoto S, <u>Murakami T</u> , Kobayashi E.	Use of rat segmental intestine for fetal pancreatic transplantation.	<i>Microsurgery</i>	30(4):	296-301	2010
Ohsawa I, Murakami T, Guo L, Enosawa S, Ishibashi N, Isaji S, Uemoto S, Kobayashi E.	Chemopreventive anti-cancer agent acyclic retinoid suppresses allogeneic immune responses in rats.	<i>Int Immunopharmacol.</i>	10(8)	985-989	2010
Sun X, Wu Y, Gao W, Enyoji K, Csizmadia E, Muller CE, <u>Murakami T</u> , Robson SC.	Adenosine generation by CD39/ENTPD1 on CD4+Foxp3+ regulatory T cells dampens anti-tumor immunity	<i>Gastroenterology</i>	139 (3)	1030-1040	2010
Yamaguchi A, <u>Murakami T</u> , Takahashi M, Kobayashi E, Sugawara Y.	Luminescence imaging of regenerating free bone graft in rats.	<i>Plast Reconstr Surg</i>	127(1)	78-87	2011



<p>Feng L, Sun X, Csimazmadia E, Han L, <u>Murakami T</u>, Wang X, Robson SC, Wu Y.</p>	<p>Vascular CD39/ENTPD1 directly promotes tumor cell growth by scavenging extracellular ATP</p>	<p><b>Neoplasia</b></p>	<p>13(3)</p>	<p>206-216</p>	<p>2011</p>
<p>Miyagaki T, Sugaya M, <u>Murakami T</u>, Kadono T, Okochi H, Tamaki K, Sato S.</p>	<p>CCL11-CCR3 interaction promotes survival of anaplastic large cell lymphoma cells via ERK1/2 activation.</p>	<p><b>Cancer Res.</b></p>	<p>71(6)</p>	<p>2056-2065</p>	<p>2011</p>

**Chapter 14** 1  
**Transcriptional Modulation Using Histone** 2  
**Deacetylase Inhibitors for Cancer** 3  
**Immunotherapy** 4

**Takashi Murakami** 5

**Abstract** Epigenetic processes, in addition to well-characterized genetic abnormalities, play a critical role in cancer initiation and progression. The acetylation status of histones affects levels of gene expression, and causes aberrant transcriptional repression in cancer cells. As a result, this is also implicated with unresponsiveness to immune-based therapies as well as conventional chemotherapies against cancer. To sensitize cancer cells to those therapies, histone deacetylase inhibitors (HDACi) have attracted much attention as epigenetic-modulating agents, because these compounds possess the pleiotropic effects on malignant cells such that they are more prone to differentiation, growth arrest, and apoptosis. This chapter will highlight the pleiotropic antitumor effects of HDACi when combined with antigen-specific tumor immunotherapy, and describe the potential clinical implications for the improved cancer immunotherapy. 6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17

**Keywords** Adoptive immune cell transfer • Gene expression • Histone acetylation 18  
• Histone deacetylase inhibitors • Tumor-sensitization 19

**Introduction** 20

Great efforts and innovations in biomedical science have been made in the field of cancer immunology since the latter part of the twentieth century, and attempts to enhance cellular immune responses have used various cancer antigens and immunizing vectors (e.g., [1, 2]). However, the effectiveness of cancer immunotherapy in humans remains limited [2, 3]. For example, IL-2, a cytokine that nonspecifically stimulates T cells, is approved by the US Food and Drug Administration for the treatment of patients with metastatic melanoma or renal cancer, and can mediate 21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

---

T. Murakami (✉)  
Division of Bioimaging Sciences, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical  
University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi, 329-0498, Japan  
e-mail: takmu@jichi.ac.jp

J. Medin and D. Fowler (eds.), *Experimental and Applied Immunotherapy*,  
DOI 10.1007/978-1-60761-980-2\_14, © Springer Science+Business Media, LLC 2011