

201109009A

別紙1

厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

難治がんに対する標的バイオ医薬の探索技術の確立と  
開発研究を支援する研究基盤の構築 (H23-政策探索-一般-009)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 青木 一教

平成24(2012)年 5月

## 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

## 目 次

I. 総括研究報告		
難治がんに対する標的バイオ医薬の探索技術の確立と 開発研究を支援する研究基盤の構築	-----	1
青木 一教		
II. 分担研究報告		
1. がんに対する標的ベクターの網羅的探索	-----	10
青木 一教		
2. 転写制御等を利用した腫瘍標的ベクターの構築と それによる抗腫瘍効果の検討	-----	15
田川 雅敏		
3. 標的ベクターに関する細胞表面分子の探索	-----	20
濱田 洋文		
4. アデノウイルスベクターに対する生体反応の解析	-----	25
水口 裕之		
5. 標的ベクターの臨床面からの検討と評価	-----	32
水野 正明		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	35
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	別添

難治がんに対する標的バイオ医薬の探索技術の確立と  
開発研究を支援する研究基盤の構築

研究代表者 青木 一教 国立がん研究センター研究所遺伝子免疫細胞医学研究分野・分野長

## 研究要旨

本研究では、がんを標的するバイオ医薬（ベクター）の探索技術を、ベクター・腫瘍細胞・生体反応の3つの観点から開発し、これらの技術を順次統合してベクターの基本骨格を構築する。ついで、個々の症例に最適ながん標的ベクターや腫瘍溶解ウイルスを開発するシステムを確立することを目的としている。本年度は、以下の研究成果を得た。①多種多様なリガンドをファイバー上に提示するアデノウイルス(Ad)ライブラリーを用いて、膵がん細胞株や腹膜播種モデルにおいてスクリーニングを行い、標的 Ad ベクターを同定し、標的配列を決定した。これらの結果は、本スクリーニング方法が個別化標的ベクターの開発基盤として有用であることを示している。②腫瘍特異的な遺伝子発現を可能にするために、ミッドカイン、サバイビン、COX-2 遺伝子の転写調節領域を決定した。さらに、この転写調節領域を用いて制限増殖型アデノウイルスを作製し、ヒト腫瘍において特異的に殺細胞効果を発揮できることを明らかとした。③ファイバー変異型アデノウイルス (Adv-FZ33) 系ならびにイミュノトキシン (iTox) 系を用いた高効率ながん標的化抗体のスクリーニングを行い、CEACAM、TROP2、CD44 および CD71 ながん標的化治療への応用が有望な抗原・抗体セットを樹立した。④Ad ベクターによる免疫応答誘導機構の解明に向けて、非増殖型 Ad ベクター感染後の Ad 遺伝子の発現について解析し、E4、pIX、E2A 遺伝子が有意に発現することを明らかとした。また、従来型 Ad ベクターと同等の遺伝子導入効率を示す VA-RNAs 欠損 Ad ベクターを作製することに成功した。本ベクターは、IFN 産生を誘導しない安全なベクターとして期待される。⑤難治がんに対する標的バイオ医薬の一つとして開発を進めている腫瘍標的型アデノウイルスベクターを、ファースト・イン・マン臨床試験に使用できるように、特に安全性の評価に焦点をあてて当該ベクターの安全性の評価項目を選定した。また、その評価を効率よく行うための新しい仕組みとして、Design Buildup Team の組織化を提案した。

## 研究分担者

青木 一教	国立がん研究センター研究所 分野長
田川 雅敏	千葉県がんセンター研究所 部長
濱田 洋文	東京薬科大学 教授
水口 裕之	大阪大学大学院 教授
水野 正明	名古屋大学医学部附属病院 准教授

を標的するバイオ医薬（ベクター）の探索技術を、ベクター・腫瘍細胞・生体反応の3つの観点から開発する。これらの技術を順次統合してベクターの基本骨格を構築し、個々の症例に最適な、生体内で高度にがん細胞を標的できるベクターや腫瘍溶解ウイルスを開発するシステムを確立することを目的とする。

1. ベクター側からの検討として、腫瘍細胞へ正確に遺伝子を運ぶ技術に関しては、特異的に感染する腫瘍標的化リガンドの探索を目指し、独自技術である多種多様なペプチドをキャプシド蛋白質上に提示するアデノウイルス(Ad)・ライブラリーを用いて、膵がんなどの難治がん細胞に対する標的ベクターを培養細胞系と腹膜播種動物モデルにおいて探索した。また、腫瘍細胞の中で正確に遺伝子を発現させる技術として、腫瘍で外来遺伝子の転写を惹起する特異的転写調節領域を決定し、それを用いた制限増殖型アデノウイルスを構築し

## A. 研究目的

生体内で腫瘍細胞やがん幹細胞を標的するバイオ医薬の効果的探索方法は、がん治療・医学に広く応用可能な基盤技術となる。本研究では、がん

た。

2. 腫瘍細胞側からの検討としては、抗体の Fc 部分に結合する黄色ブドウ球菌プロテイン A の Z33 モチーフを含むファイバー変異型 Adv-FZ33 アデノウイルスを作製し、これを用いたスクリーニングによって、すでにウイルス感染効率が高い標的分子・抗体をセット (57 種の抗原、615 個のモノクローナル抗体) で得ている。まず、それらの抗体が、標的医薬として期待されているイミュノトキシン (iTox) として応用可能であるか検討するため、細胞傷害活性を評価した。また、標的化抗体にタンパク合成阻害トキシンを結合させてイミュノトキシンを作製するユニークな系 (EZiTox 法) を樹立し、iTox 活性を指標として、新たな標的抗原の探索と抗体の樹立を行った。

3. ベクターの生体反応からの検討では、Ad ベクターによる免疫応答誘導機構の解明に向けて、Ad ベクター感染後の非特異的な Ad 遺伝子発現の解析と、VA-RNA による自然免疫応答の解析のための VA-RNA 欠損 Ad ベクターの構築を行った。

4. また、腫瘍標的型アデノウイルスベクターについて、臨床面から評価する仕組みの構築を目指した。具体的には、名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センターが持つベクター調製施設、バイオマテリアル調製ユニットにおいて腫瘍標的型アデノウイルスベクターの製造を行うことを前提に、その安全性並びに有効性を評価する仕組み作りを進めた。

## B. 研究方法

### B-1-1. *in vitro* 及び *in vivo* での膵がんに対する標的 Ad ベクターの探索

$2 \times 10^5$  以上の多様性を持つ Ad ライブラリーを用いて、3 種のヒト膵がん細胞 (AsPC-1、Panc-1、MIAPaCa-2) でスクリーニングを行った。スクリーニング方法は、まず標的とする培養細胞に MOI (Multiplicity of infection) 1-3 程度となるように Ad ライブラリーを感染させ、5-7 日後に細胞を回収して粗ウイルス液 (crude viral lysate: CVL) を抽出し、再び標的細胞に感染させる。この感染・回収の過程を 3-4 ラウンド繰り返した。

また、膵がん腹膜播種動物モデルを用いて、*in vivo* での標的ベクターのスクリーニングが可能であるか検討した。AsPC-1 ヒト膵がん細胞を、BALB/c ノードマウスの腹腔内に注入し、腹膜播種を作成した。ついで、Ad ライブラリーを腹腔内投与し、数日後に腹腔内の腫瘍を摘出し CVL を抽出した。この CVL を増幅したのち、再び腹膜播種マウスの腹腔内に投与し、数日後に腹腔内の腫瘍を摘出し、CVL を得た。

ついで、CVL から得られた DNA を用いて、HI ループのリガンドを挿入した部位をはさむ領域を PCR 法により増幅して、挿入されているリガンド配列をシーケンス解析した。ついで、最も頻度の高い配列を HI ループに挿入した非自己増殖型の Ad ベクターを構築し、標的がん細胞や他の各種細胞 (膵管上皮細胞、肝細胞、血管内皮細胞など) において、EGFP 発現細胞の FACS 解析やルミノメーターを用いたルシフェラーゼ・アッセイにより感染効率を比較検討した。

### B-1-2. 腫瘍特異的転写調節領域の決定と腫瘍溶解ウイルスへの応用

ヒト腫瘍において発現レベルが高い遺伝子である、midkine (MK)、survivin (Sur) および cyclooxygenase-2 (COX-2) の転写制御に関わる 5' 上流領域のゲノム遺伝子を、pGL2-Basic プラスミドベクターのルシフェラーゼ遺伝子上流に結合させた。このプラスミドを、標的とする腫瘍細胞に遺伝子導入した後に、当該細胞で発現したルシフェラーゼ蛋白質の活性をルミノメーターによって検出した。

ついで、E1 遺伝子上流に、これら外来性転写調節領域を挿入した Ad ベクターを構築し、膵がんや中皮腫細胞に感染させ、その細胞傷害活性を WST 法等にて検討した。

### B-2. がん細胞表面抗原の探索と抗体の樹立

まず、先行研究として Adv-FZ33 法により得られた抗体 (CD20, EGFR, IGF1R, CD44, EpCAM, CD46, CD55, EphA2, L1CAM, MCSP, CD147, CA12, CD276, PAP2a, CD59, IL-13R2a, TROP2, CD71 など) の、膵がん細胞あるいは肺がん細胞に対する細胞傷害活性について検討した。

ついで、独自技術であるイージーメイドイミュノトキシン (EZiTox) 法により作製した、Protein G の C ドメインとジフテリアトキシンの融合蛋白質 DT3C を基盤として、新規の標的化抗体のスクリーニングを行い、質量分析等によりその抗原を同定した。特に、陽性コントロールとして用いるトランスフェリン受容体 (CD71) と同等以上の iTox 活性を示す抗体に着目した。

### B-3. Ad 遺伝子の発現解析と VA-RNAs 欠損 Ad ベクターの構築

WI38 細胞 (ヒト胎児肺線維芽細胞) および SK Hep-1 細胞 (ヒト肝臓血管内皮細胞株) に、野生型 Ad およびルシフェラーゼ発現 Ad ベクターを MOI 10 および 100 で感染させた。経時的に Total RNA を回収し、定量的 PCR 法により、初期遺伝子 (E1A, E2A, E2B, E4) や後期遺伝子 (ヘキソン、ペント

ンベース、ファイバー遺伝子) など各 Ad 遺伝子の発現量を解析した。

また、VA-RNA による自然免疫応答の解析のために、VA-RNA 欠損 Ad ベクターの作成を試みた。

#### B-4. 当該ベクターの臨床応用に必要な評価項目の選定と、評価を効率よく進めるための新しい仕組みの提案

新規医薬品に求められる安全性評価項目を参考に、当該ベクターに必要とされる基本的評価項目を選定した。さらに、当該ベクターは通常のアデノウイルスベクターに求められる特異項目のほかに、腫瘍細胞標的リガンドの抗原性の検討も必要である。これらを踏まえ、当該ベクターの臨床応用にあたり、特別に求められると予想される評価項目を選定した。また、その評価を効率よく行うために、技術やノウハウを集約しパッケージ化を通して効率的に臨床開発を推進する仕組みについて検討した。

本研究は、各研究者が所属する研究施設の組換え DNA 実験や動物実験に関わる各種委員会の承認を得た上で実施している。自己増殖型 Ad ライブラリーや制限増殖型 Ad ベクターを用いた研究は、拡散防止措置に関して大臣確認を得た上で実施している。

### C. 研究結果

#### C-1-1. *in vitro* 及び *in vivo* での膵がん標的ベクターの探索

まず、3 種類の膵がん細胞において、Ad ライブラリーのスクリーニングを行った。CVL から DNA を抽出しシーケンス解析を行ったところ、AsPC-1 細胞では SYENFSA 配列が 38% に認められた。また、Panc-1 細胞では FWRSGVD 配列が 38% に認められ、MIAPaCa-2 細胞では GFCLTGF 配列が 30% に認められた。そこで、これらの配列を HI ループに挿入した非増殖型 Ad ベクターを作成し、各種がん細胞や正常細胞に対する感染効率を検討したところ、非標的ベクターと比較して、4-10 倍程度に感染効率は上昇しており、一方、正常細胞に対しては非標的ベクターと同程度の感染効率であった。これらの結果は、本スクリーニングにより各種がん細胞に対する標的 Ad ベクターが得られることを示している。

また、Ad ライブラリーを、AsPC-1 腹膜播種マウスに腹腔内投与し *in vivo* でのスクリーニングを試みると、リガンド配列 (PFWSGAV) を提示するアデノウイルスが増えていることが明らかとなった。ルシフェラーゼを発現する PFWSGAV ベクターを構

築し、AsPC-1 腹膜播種マウスの腹腔内に投与して、腹腔内腫瘍や各種臓器のルシフェラーゼ活性を検討したところ、AsPC-1 腹腔内腫瘍においては非標的コントロールベクターに比べて 7 倍程度感染効率が上昇していた。この PFWSGAV アデノウイルスは、肝・脾・肺・膵・小腸などの正常臓器に対する感染効率は非標的ベクターと同等であり、AsPC-1 腹腔内腫瘍に対する特異性ベクターである可能性が示された。

#### C-1-2. 腫瘍特異的転写調節領域の決定と腫瘍溶解ウイルスへの応用

MK、Sur および COX-2 の転写調節領域を挿入した pGL2-Basic ベクターを、5 種類のヒト悪性中皮腫、4 種類の膵がん、9 種類の食道がん細胞に導入し、転写活性を検討した。その結果、MK、Sur、COX-2 転写調節領域の各腫瘍細胞における転写活性は、導入した細胞および用いる転写調節領域によって異なっていたが、おおむね SV40T 抗原の転写活性を上回っており、場合によっては強力な CMV の転写調節領域と同等の活性を示した。

ついで、これら転写調節領域により E1 領域の遺伝子の発現を調節するタイプ 5 型のアデノウイルスを作製した。ヒト悪性中皮腫、膵がん、食道がん細胞に感染させると、感染させた細胞の種類や使用したアデノウイルスによってその傷害活性に差があったが、同ウイルスは各種腫瘍細胞に対して高い殺細胞効果を示した。しかも、その細胞傷害活性は、CMV の転写調節領域を組み込んだアデノウイルスとほぼ同等であった。一方、対照としてヒト正常繊維芽細胞や血管内皮細胞を用いた場合、これらの細胞に対する傷害活性は腫瘍細胞に比較して低いものであった。さらに、悪性中皮腫や食道がん細胞を用いて、アデノウイルスの主要な細胞受容体であるコクサッキーウイルス・アデノウイルス受容体 (CAR) の発現とウイルスによる細胞傷害活性を検討してみると、CAR 発現が低い細胞では増殖性アデノウイルスの細胞傷害活性は低かったが、CAR 分子の発現レベルが高いものでは、必ずしも CAR の発現と細胞傷害活性とは直線的関係にはないことが明らかとなった。

#### C-2. がん細胞表面抗原の探索と抗体の樹立

Adv-FZ33 法により得られた抗体について、DT3C を用いた方法で細胞傷害活性を調べたところ、アデノウイルス感染の標的化に高効率な標的抗体であっても、その中のごく一部 (TROP2, IL-13R2a, CEACAMs, CD44, CD71, CD99 および CD59) だけが iTox として有効であった。

また、iTox を用いたスクリーニング系を用いて、膵がん等のがん細胞株等 (MIA-PaCa-2, PK-1, TF-1、

MY, KG1, SKM1 等) に対して、抗体ハイブリドーマ・ライブラリーから、各免疫細胞株に対して高効率な標的化抗体 (263 個のハイブリドーマ) を樹立した。そのうち 146 個の抗体に関しては、免疫沈降・質量分析により、重複を除き現在までに 23 種類の抗原の同定を終えている。これらの抗体は、いずれも優れた iTox 活性を持ち、CEACAM、TROP2、CD44 および CD71 などの抗体医薬の候補分子として注目されている抗体が含まれていた。これらの結果から、当方法が、強力な腫瘍標的分子候補のスクリーニング手段であることが示された。

### C-3. Ad 遺伝子の非特異的な発現解析と VA-RNA 欠損アデノウイルスベクターの作成

非増殖型 Ad ベクター感染後の各種 Ad 遺伝子の発現を定量的 RT-PCR 法により解析したところ、WI38 細胞では、E4 ならびに pIX 遺伝子が有意な発現を示した。E4 遺伝子と pIX 遺伝子の発現量は同程度であった。また E2A 遺伝子についても、MOI100 において有意な遺伝子発現が検出されが、その発現量は、E4 ならびに pIX 遺伝子と比較すると低いものであった。一方で、E2B ならびに後期遺伝子 (ヘキソン、ペントンベース、ファイバー遺伝子) の発現は検出限界以下であった。SK Hep-1 細胞においても WI38 細胞と同様の遺伝子発現プロファイルが認められた。全体的には、SK Hep-1 細胞の方が WI38 細胞よりも高い発現を示した。これは SK Hep-1 細胞が受容体である CAR を豊富に発現しているため、Ad ベクターが効率よく導入されたものと考えられた。

また、VA-RNA による自然免疫応答の解析のために、VA-RNAs をコードする遺伝子配列を欠損させた Ad ベクター作製用プラスミドを構築した。しかし、従来型 (FG: first generation) の Ad の増幅に用いられる HEK293 細胞では、VA-RNAs を欠損した Ad ベクター (Ad $\Delta$ VR ベクター) は増幅しなかった。そこで、VA-RNA I をドキシサイクリン (Dox) 添加時に発現する VR293 細胞を作製し、Ad $\Delta$ VR ベクターの産生を試みた。Dox を添加することで VA-RNA I の発現を誘導したところ、細胞内で Ad $\Delta$ VR ベクターが増幅することが確認された。この Ad $\Delta$ VR ベクターは、FG-Ad ベクターと同等の遺伝子導入効率を示した。

### C-4. 当該ベクターの臨床応用に必要な評価項目の選定と、評価を効率よく進めるための新しい仕組みの提案

新規医薬品に求められる安全性評価項目を参考に、当該ベクターに必要とされる基本的評価項目を、以下のように選定した。

- ・単回静脈内投与毒性試験
- ・単回静脈内投与毒性試験
- ・1 カ月間反復静脈内投与毒性試験及び 1 カ月間回復試験
- ・静脈内投与による受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験
- ・静脈内投与による胚・胎児発生に関する試験
- ・変異原性試験
- ・染色体異常試験
- ・単回静脈内投与による末梢血小核試験
- ・発熱性物質試験及びエンドトキシン試験

また、アデノウイルスベクターの繰り返し投与における安全性の確認は極めて重要であるため、単回または反復投与による反応性を評価できる方法が必要である。そこで、抗アデノウイルス抗体を測定して評価する方法を、Beer らの方法 (Beer SJ, et al. Gene Ther. 5:740-746, 1998) を参考に確立した。

これまでは、当該ベクターに関する基礎研究や前臨床研究にほぼ目処が経ってから、臨床を実施するために必要な研究者を探し、共同して臨床応用を目指す方法が主流であった。しかし、この方法では、規制当局への対応が遅れるとともに、実用化に向けた効率のよい、戦略的研究は難しい。そこで本研究では、Design Buildup Team を組織し、当該ベクター開発当初から、企業の選定、製剤・機器の目標設定、規制当局への対応、さらには承認を得るために必要な最小限の研究デザイン (戦略的研究) を実施することで成功確率を高めることが有効であると考え、そのコンセプトを提案した。

## D. 考察

### D-1-1. *in vitro* 及び *in vivo* での腫瘍に対する標的 Ad ベクターの探索

Ad ライブラリーを、腫瘍細胞株や腹膜播種動物モデルにおいてスクリーニングしたところ、それぞれの細胞に対する標的 Ad ベクターを同定することができ、標的リガンドを決定した。これらの結果は、本スクリーニング方法が、個別化標的ベクターを開発する基盤として有用であることを示していると考えられた。今後は、野生型ファイバーの混入を抑制した純度と多様性が高い新規 Ad ライブラリーを用いて、広範囲に各種がん細胞のスクリーニングを行う。また、これらスクリーニングにより得られた標的ベクターが、リガンドを介して細胞表面の特異的受容体に結合することにより感染することを確かめるために、標的となっている受容体の解析・同定が必要である。

来年度は、ミッドカイン遺伝子等の腫瘍特異的転写領域を用いて E1 遺伝子の発現を制御する腫瘍溶解ウイルスベクターに、Ad ライブラリーでのス

クリーニングで同定した標的リガンドを挿入することにより、腫瘍溶解 Ad ベクターの腫瘍標的化とそれに基づく抗腫瘍効果と安全性の強化が可能であるか検討を行う。

#### D-1-2. 腫瘍特異的転写調節領域の決定と腫瘍溶解ウイルスへの応用

外来性転写調節領域の利用によって、腫瘍特異的なウイルス増殖が可能となり、その結果として、細胞傷害活性が生じていると考えられた。しかし、各外来性転写調節領域を有するアデノウイルスの IC<sub>50</sub> 値と、同じ転写調節領域のルシフェラーゼ活性値について比較すると、両者には有意な相関は認められなかった。この理由は、ウイルスによる細胞傷害活性には複数の要因が関与していることにあると考えられる。CAR 受容体の発現レベルが低い細胞に対しては、殺細胞効果が低下していたが、CAR 分子の発現レベルがある程度の閾値を越えればそれ以上の感染性の上昇はなく、また CAR 以外の受容体も感染効率に関与していると考えられるが、標的細胞における複数の受容体の発現レベルと感染効率・細胞傷害活性との関連は明確でない。したがって、本研究が目指しているような、ウイルスの CAR 分子結合領域を欠損させ当該領域に腫瘍に結合する配列を組み入れた場合、感染の特異性が向上し、感染効率とウイルスの細胞傷害活性が相関する可能性が高いと想定される。

#### D-2. がん細胞表面抗原の探索と抗体の樹立

Adv-FZ33 や iTox スクリーニング系を中心に、膵がんなどのヒト悪性腫瘍細胞株に対する標的化抗体の探索・樹立を進め、そのうちの一部につき抗原を決定したところ、期待通り、がんの標的化治療への応用につながりうる有望な抗原が含まれていた。引き続き、残りの樹立抗体の抗原同定を進めていくとともに、さらに異なる細胞種を免疫原として用いることにより、新たながん抗原を認識する高効率標的化抗体の探索・樹立を行う。

#### D-3. Ad 遺伝子の非特異的な発現解析と VA-RNA 欠損アデノウイルスベクターの作成

Ad ベクター感染後の Ad 遺伝子の非特異的な発現を定量的 RT-PCR により解析し、E4、pIX、E2A 遺伝子が有意に発現することを明らかとした。さらに、IFN を誘導する小分子 RNA である VA-RNA 遺伝子を欠損させた Ad ベクターの作製方法を開発し、その特性を評価した。本研究で得られた結果は、来年度以降の Ad ベクターによる生体での免疫応答の解析において、重要な情報になるものと期待される。

#### D-4. 当該ベクターの臨床応用に必要な評価項目の選定と、評価を効率よく進めるための新しい仕組みの提案

当該ベクターの臨床応用にあたり求められる基本的評価項目と特別に求められると予想される評価項目の選定をそれぞれ行った。また、その評価を効率よく行うための新しい仕組みとして、Design Buildup Team の形成が重要であると提案し、このチームを通して技術やノウハウを集約しパッケージ化を図り、効率的に臨床開発を推進する方向性を打ち出した。本研究の成果が一定のレベルに達した後は、名古屋大学医学部附属病院で実施してきた医師主導治験や高度医療のノウハウをさらに追加し、プロジェクトの ICH-GCP 化を進め、臨床研究全体の国際標準化を目指す。また、他大学や関連病院などと円滑に連携し臨床試験を実施するための施設間調整を進める必要性があると考えられる。

#### E. 結論

- 1) Ad ライブラリーを用いて、3 種類の膵がん細胞や膵がん腹膜播種モデルでスクリーニングを行い、標的ベクターを探索・同定できることを示した。
- 2) 腫瘍特異的発現を可能にする外来性転写調節領域を決定した。さらに、この転写調節領域を用いた制限増殖型アデノウイルスは、ヒト腫瘍において特異的な殺細胞効果を発揮した。
- 3) ファイバー変異型アデノウイルス (Adv-FZ33) 系ならびにイミュノトキシン (iTox) 系を用いた高効率がん標的化抗体のスクリーニングは順調に稼働しており、がん標的化治療への応用が有望な抗原・抗体セットの樹立が見込まれる。
- 4) Ad ベクターによる免疫応答誘導機構の解明に向けて、非増殖型 Ad ベクター感染後の Ad 遺伝子の発現を明らかとした。また、従来型 Ad ベクターと同等の遺伝子導入効率を示す VA-RNAs 欠損 Ad ベクターを作製することに成功した。本ベクターは、IFN 産生を誘導しない安全なベクターとして期待される。
- 5) 腫瘍標的型 Ad ベクターをファースト・イン・マン臨床試験に使用できるよう、本年度は特に安全性の評価に焦点をあて、当該ベクターの安全性の評価項目の選定を行った。また、その評価を効率よく行うための新しい仕組みとして、Design Buildup Team の組織化を提案した。

F. 健康危険情報  
無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Narumi K, Udagawa T, Kobayashi A, Hara H, Kondoh A, Goto N, Ikarashi Y, Ohnami S, Takeshita F, Ochiya T, Okada T, Yamagishi M, Yoshida T, Aoki K. *In vivo* interferon- $\alpha$  gene transfer enhances antitumor immunity after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Gene Ther.* 19; 34-48, 2012
- 2) Udagawa T, Narumi K, Goto N, Aida K, Suzuki K, Makimoto A, Ochiya T, Yoshida T, Chikaraishi T, Aoki K. Syngeneic hematopoietic stem cell transplantation enhances the antitumor immunity of intratumoral type I interferon gene transfer for sarcoma. *Hum Gene Ther.* 23; 173-186, 2012
- 3) Yamazaki T, Aoki K, Heike Y, Kim SW, Ochiya T, Wakeda T, Hoffman RM, Takaue Y, Nakagama H, Ikarashi Y. Real-time *in vivo* cellular imaging of graft-versus-host disease and its reaction to immunomodulatory reagents. *Immunol Lett.* 144; 33-40, 2012
- 4) Miura Y, Yamazaki S, Julia D, Brown E, Aoki K, Vivkers S, Yamamoto M. Infectivity-selective oncolytic adenovirus developed by screening of high diversity targeting ligand library in the format of adenovirus capsid. *Mol Ther.* (in press).
- 5) Narumi K, Aoki K. Combination of immune gene therapy with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation against solid cancers. In: *Cellular and Genetic Practices for Translational Medicine* ed. by J-Y. Kwak and J-Y. Han. Research Signpost, Kerala, India 2011, p227-246.
- 6) 青木一教、膵癌に対する標的サイトカイン遺伝子治療の開発、膵・胆道癌 FRONTIER、メディカルビュー社、2011、p48-51.
- 7) 青木一教、遺伝子治療 がん、小児科診療、診断と治療社、2012、p115-1119.
- 8) Kitamura A, Matsushita K, Takiguchi Y, Shimada H, Tada Y, Yamanaka M, Hiroshima K, Tagawa M, Tomonaga T, Matsubara H, Inoue M, Hasegawa M, Sato Y, Levens D, Tatsumi K, Nomura F. Synergistic effect of non-transmissible Sendai virus vector encoding the c-myc suppressor FUSE-binding protein-interacting repressor plus cisplatin in the treatment of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Sci.* 102; 1366-1373, 2011.
- 9) Tagawa M, Kawamura K, Li Q, Tada Y, Hiroshima K, Shimada H. A possible anti-cancer agent, type III interferon, activates cell death pathways and produces anti-tumor effects. *Clin. Dev. Immunol.* Article ID 479013, 2011. doi:10.1155/2011/479013
- 10) Fujie H, Tanaka T, Tagawa M, Kaijun N, Watanabe M, Suzuki T, Nakayama K, Numasaki M. Antitumor activity of type III interferon alone or in combination with type I interferon against human non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci.* 102; 1977-1990, 2011.
- 11) Li Q, Kawamura K, Okamoto S, Fujie H, Numasaki M, Namba M, Nagata M, Shimada H, Kobayashi H, Tagawa M. Adenoviruses-mediated transduction of human esophageal carcinoma cells with the interferon-lambda genes produced anti-tumor effects. *Br. J. Cancer.* 105; 1302-1312, 2011.
- 12) Tagawa M, Tada Y, Hiroshima K, Shimada H. Type III interferon family-mediated anti-tumor responses through multiple mechanisms. In: *Cellular and genetic practices for translational medicine.* ed. by Jong-Young Kwak and Jin-Yeong Han. Research Signpost, Kerala, India. p247-260, 2011.
- 13) Iguchi K, Sakurai F, Tomita K, Katayama K, Yamaguchi T, Tagawa M, Kawabata M, Shirakawa T, Mizuguchi H. Efficient antitumor effects of carrier cells loaded with a fiber-substituted conditionally replicating adenovirus on CAR-negative tumor cells. *Cancer Gene Ther.* 19; 118-125, 2012.
- 14) Li Q, Kawamura K, Okamoto S, Yamanaka M, Yang S, Yamauchi S, Fukamachi T, Kobayashi H, Tada Y, Takiguchi Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K, Tagawa M. Upregulated p53 expression activates apoptotic pathways in wild-type p53-bearing mesothelioma and enhances cytotoxicity of cisplatin and pemetrexed. *Cancer Gene Ther.* 19; 218-228, 2012.
- 15) Hamada K, Yoshihara C, Ito T, Tani K, Tagawa M, Sakuragawa N, Itoh H, Koyama Y. Antitumor effect of chromatin sulfate-coated ternary granulocyte macrophage-colony-stimulating factor plasmid complex for ovarian cancer. *J. Gene Med.* 14;120-127, 2012.
- 16) Fukamachi T, Saito H, Tagawa M, Kobayashi H. The impact of extracellular low pH on the anti-tumor efficacy against mesothelioma. In: *Mesotheliomas-synonyms and definition, epidemiology, etiology, pathogenesis, cyto-histopathological features, clinic, diagnosis, treatment, prognosis.* ed by Zubritsky, A. InTech, Rijeka, Croatia. p187-210, 2012.
- 17) Okamoto S, Kawamura K, Li Q, Yamanaka M, Yang S, Fukamachi T, Tada Y, Tatsumi T, Shimada H, Hiroshima K, Kobayashi H, Tagawa M. Zoledronic acid produces anti-tumor effects on mesothelioma through apoptosis and S phase arrest in p53-independent and Ras prenylation-independent manners. *J. Thorac Oncol.* (in press)
- 18) Nagakawa H, Shimoizato O, Yu L, Wada A, Kawamura K, Li Q, Chada S, Tada Y, Takiguchi Y, Tatsumi K, Tagawa M. Expression of a murine homologue of apoptosis-inducing human IL-24/MDA-7 in murine tumors fails to induce



- apoptosis or produce anti-tumor effects. Cell Immunol. (in press).
- 19) 田川雅敏：細胞性免疫応答に基づく免疫細胞治療の基本戦略 肝と膵 32: 117-121, 2011
- 20) 谷島聡, 田川雅敏, 島田英昭：遺伝子治療癌に対する遺伝子・ウイルス治療の現状 臨床外科 66: 272-275, 2011
- 21) Takahashi S, Kato K, Nakamura K, Nakano R, Kubota K, Hamada H. Neural cell adhesion molecule 2 as a target molecule for prostate and breast cancer gene therapy. Cancer Sci. 102; 808-814, 2011.
- 22) Takenouchi M, Hirai S, Sakuragi N, Yagita H, Hamada H, Kato, K. Epigenetic modulation enhances the therapeutic effect of anti-IL-13R(alpha)2 antibody in human mesothelioma xenografts. Clin Cancer Res. 17; 2819-2829, 2011.
- 23) Wang H, Satoh M, Chen GP, Li DC, Hamada H, Arai Y. E1A, E1B double-restricted adenovirus enhances the cytotoxicity and antitumor activity of gemcitabine to renal cell carcinoma. Chin Med J. 124; 1082-1087, 2011.
- 24) Kawashima R, Abei M, Fukuda K, Nakamura K, Murata T, Wakayama M, Seo E, Hasegawa N, Mizuguchi H, Obata Y, Hyodo I, Hamada H, Yokoyama KK. EpCAM- and EGFR-targeted selective gene therapy for biliary cancers using Z33-fiber-modified adenovirus. Int J Cancer. 129; 1244-1253, 2011.
- 25) Suzuki K, Ono R, Ohishi K, Masuya M, Kataoka I, Liu B, Nakamori Y, Ino K, Monma F, Hamada H, Kitamura T, Katayama N, Nosaka T. IKAROS isoform 6 enhances BCR-ABL1-mediated proliferation of human CD34+ hematopoietic cells on stromal cells. Int J Oncol. 40; 53-62, 2012.
- 26) Koyama T, Shimura M, Minemoto Y, Nohara S, Shibata S, Iida Y, Iwashita S, Hasegawa M, Kurabayash T, Hamada H, Kono K, Honda E, Aoki I, Ishizaka Y. Evaluation of selective tumor detection by clinical magnetic resonance imaging using antibody-conjugated superparamagnetic iron oxide. J Control Release (in press).
- 27) Nakamori Y, Liu B, Ohishi K, Suzuki K, Ino, K, Matsumoto T, Masuya M, Nishikawa H, Shiku H, Hamada H, Katayama N. Human bone marrow stromal cells simultaneously support B and T/NK lineage development from human haematopoietic progenitors: a principal role for flt3 ligand in lymphopoiesis. Br J Haematol. (in press).
- 28) Hamada S, Masamune A, Takikawa T, Suzuki N, Kikuta K, Hirota M, Hamada H, Kobune M, Satoh K, Shimosegawa T. Pancreatic stellate cells enhance stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. (in press).
- 29) Shimizu K, Sakurai F, Machitani M, Katayama K, Mizuguchi H. Quantitative analysis of the leaky expression of adenovirus genes in cells transduced with a replication-incompetent adenovirus vector. Mol.Pharm., 8;1430-1435, 2011.
- 30) Machitani M, Katayama K, Sakurai F, Matsui H, Yamaguchi T, Suzuki T, Miyoshi H, Kawabata K, Mizuguchi H. Development of an adenovirus vector lacking the expression of virus-associated RNAs. J Control Release. 154; 285-289, 2011.
- 31) Machitani M., Yamaguchi T., Shimizu K., Sakurai F., Katayama K., Kawabata K., Mizuguchi H.: Adenovirus vector-derived VA-RNA-mediated innate immune responses. Pharmaceutics, 3; 338-353, 2011.
- 32) Eshita Y, Higashihara J, Onishi M, Mizuno M, Yoshida J, Takasaki T, Yoshioka H, Kubota N and Onishi Y. Mechanism of the Introduction of Exogenous Genes into Cultured Cells Using DEAE-Dextran-MMA Graft Copolymer as a Non-Viral Gene Carrier.II. Its Thixotropy Property. J Nanomedic Nanotechnol 2;1-8, 2011.
- 33) Arata J, Tada Y, Kozuka H, Wada T, Saito Y, Ikedo N, Hayashi Y, Fujii M, Kajita Y, Mizuno M, Wakabayashi T, Yoshida J, Fujimoto H. Neurosurgical robotic system for brain tumor removal. Int J Comput Assist Radiol Surg. 6;375-385, 2011.
2. 学会発表
- 34) Aoki K. Development of targeted virus therapy using the adenovirus library displaying random peptides on the fiber knob (Symposium). 第17回日本遺伝子治療学会学術集会. July 15-17, 2011
- 35) Udagawa T, Narumi K, Ochiya T, Yoshida T, Aoki K. Syngeneic hematopoietic stem cell transplantation enhances the antitumor immunity of type I interferon gene transfer for sarcoma. 第17回日本遺伝子治療学会学術集会. July 15-17, 2011
- 36) Udagawa T, Narumi K, Ikarashi Y, Ohnami S, Yoshida T, Aoki K. Autologous hematopoietic stem cell transplantation suppresses immunotolerant environment in tumors and induces antitumor immunity. 第70回日本癌学会総会. Oct 3-5, 2011.
- 37) Aida K, Udagawa T, Narumi K, Suzuki K, Goto N, Ikarashi Y, Ohnami S, Yoshida T, Aoki K. Inhibition of regulatory T cells enhances antitumor immunity induced by intratumoral IFN-α gene transfer. 第70回日本癌学会総会. Oct 3-5, 2011.
- 38) Aoki K. Development of targeted virus therapy using the adenovirus library displaying random peptides on the fiber knob. MRCCMT International symposium. January 2011

- (Busan)
- 39) Narumi K, Udagawa T, Ikarashi Y, Ochiya T, Yoshida T, Aoki K. *In vivo* delivery of interferon- $\alpha$  gene enhances tumor immunity and suppresses immunotolerance after autologous hematopoietic stem cell transplantation. The American Society of Gene Therapy's 14th Annual Meeting. May 18- 21, 2011 (Seattle).
- 40) M Tagawa, Y Tada, H Shimada and K Hiroshima: A possible therapeutic strategy for mesothelioma with genetic medicine. Turkish Japanese Scandinavian mesothelioma workshop, April 18-22, 2011, Eskisehir, Turkey.
- 41) K Morinaga, Y Shinohara, H Miura, N Kohyama, T Yusa, M Tagawa, K Hiroshima: Epidemiology of mesothelioma with special reference to "Kubota shock". Turkish Japanese Scandinavian mesothelioma workshop, April 18-22, 2011, Eskisehir, Turkey.
- 42) K Hiroshima, M Tagawa, T Yusa: Pathological diagnosis of early mesothelioma. Turkish Japanese Scandinavian mesothelioma workshop, April 18-22, 2011, Eskisehir, Turkey.)
- 43) M Tagawa, S Yamauchi, K Kawamura, S Okamoto, S Yang, WC Li, H Kobayashi, S Kubo, Y Tada, Y Takiguchi, K Tatsumi, K Hiroshima, H Shimada: Promoter-mediated replication of adenoviruses induces apoptosis-independent cell death in p53-null pancreatic carcinoma cells. 14th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy, May 18-21, 2011, Seattle.
- 44) Y Tada, M Yamanaka, K Kawamura, S Okamoto, S Yang, Y Takiguchi, S Yamauchi, L Min, H Kobayashi, K Tatsumi, H Shimada, K Hiroshima, M Tagawa: E1B-55kDa deleted adenoviruses induce p53 up-regulation and apoptosis with mitosis arrest in human malignant mesothelioma. 14th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy, May 18-21, 2011, Seattle.
- 45) S Kubo, A Tamamoto, N Okamura, Y Maeyama, M Tagawa, N Kasahara, N Terada, H Okamura: Complete and sustained tumor regression of human malignant mesothelioma xenografts in athymic mice following local injection of midkine promoter-regulated oncolytic adenovirus. 14th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy, May 18-21, 2011, Seattle.
- 46) M Tagawa, MYamanaka, Y Tada, K Kawamura, S Okamoto, H Kobayashi, S Yang, S Yamauch, W Li, YY Jiang, Y Takiguchi, H Shimada, K Hiroshima, K Tatsumi: E1B-55kDa-defective adenoviruses produce anti-tumor effects by inducing polyploidy. 17th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, July 15-17, 2011, Fukuoka.
- 47) M Tagawa, Q Li, K Kawamura, S Okamoto, SYSYamauchi, JY Yuan, T Fukamachi, H Kobayashi, Y Tada, Y Takiguchi, K Tatsumi, H Shimada, K Hiroshima: Up-regulated p53 expression activates apoptotic pathways in wild-type p53-bearing mesothelioma and enhances cytotoxicity of the first-line chemotherapeutic agents. 19th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, October 27-31, 2011, Brighton, UK.
- 48) 楊珊、山中満佳子、川村希代子、岡本慎也、山内 駿、深町利彦、小林 弘、多田裕司、巽浩一郎、島田英昭、廣島健三、田川雅敏 : Adenoviruses defective of E1B-55kDa molecules activates p53 pathways and induces hyperploidy in malignant mesothelioma.第 70 回日本癌学会学術総会 平成 23 年 10 月 3 日-5 日 (名古屋市) .
- 49) 山内 駿、川村希代子、岡本慎也、楊珊、江媛媛、深町利彦、小林 弘、多田裕司、巽浩一郎、島田英昭、廣島健三、田川雅敏 : Replication-competent adenoviruses induce cell death in pancreatic carcinoma irrelevant to apoptosis and autophagy 第 70 回日本癌学会学術総会 平成 23 年 10 月 3 日-5 日 (名古屋市) .
- 50) 北村淳史、松下一之、滝口裕一、島田英昭、多田裕司、山中満佳子、廣島健三、田川雅敏、朝長 毅、巽浩一郎、野村文夫、井上誠 : Sendai virus vector encoding the c-myc suppressor FBP plus cisplatin in treatment of malignant pleural mesothelioma 第 70 回日本癌学会学術総会 平成 23 年 10 月 3 日-5 日 (名古屋市) .
- 51) 岡本慎也、川村希代子、楊珊、山内 駿、江媛媛、深町利彦、小林 弘、多田裕司、巽浩一郎、島田英昭、廣島健三、田川雅敏 : Bisphosphonates-induced S-phase arrest and apoptosis in mesothelioma are due to unpreylated small G proteins except Ras 第 70 回日本癌学会学術総会 平成 23 年 10 月 3 日-5 日 (名古屋市) .
- 52) 島田英昭、谷島 聡、小池淳一、田川雅敏、竹田明彦、松下一之、日和佐隆樹、野村文夫 : Serum tumor markers for gastric carcinoma targeting SEREX antigens 第 70 回日本癌学会学術総会 平成 23 年 10 月 3 日-5 日 (名古屋市) (10 月 5 日) .
- 53) 清水かほり、櫻井文教、立花雅史、水口裕之 : マイクロ RNA を利用してウイルス遺伝子の非特異的な発現を抑制可能な新規アデノウイルスベクターの開発、日本薬学会第 132 年会、札幌、2012 年 3 月 30 日 (招待講演)
- 54) K Shimizu, F Sakurai, M Tachibana, H Mizuguchi : Development of a novel adenovirus vector exhibiting microRNA-mediated reduction in leaky expression of adenovirus genes, 第 70

- 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月
- 55) 清水かほり、櫻井文教、立花雅史、水口裕之：  
非増殖型アデノウイルスベクター作用後に  
発現するウイルス遺伝子の定量的解析とそ  
れらを抑制可能なベクターの開発、アンチセ  
センス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2011、  
大阪、2011年9月1-2日
- 56) K Shimizu, F Sakurai, K Katayama, H  
Mizuguchi : Suppression of leaky expression of  
adenovirus genes following transduction with a  
replication-incompetent adenovirus vector by  
incorporation of microRNA-targeted sequences  
into the E2A and E4 genes, 第17回日本遺伝子  
治療学会年次学術集会、福岡、2011年7月  
15-17日
- 57) M Machitani, K Katayama, F Sakurai, H Matsui,  
T Yamaguchi, T Suzuki, K Kawabata, H  
Mizuguchi: Development of a virus-associated  
RNA-deleted adenovirus vector., American  
Society of Gene & Cell Therapy, 14th Annual  
Meeting 2011, Seattle, WA, USA, May, 2011
- 58) 町谷充洋、形山和史、櫻井文教、立花雅史、  
山口朋子、鈴木孝幸、川端健二、水口裕之：ア  
デノウイルス由来小分子RNA (VA-RNA) の  
機能解析に向けた新規ベクターの開発、第  
21回アンチセンスシンポジウム・第11回遺  
伝子・デリバリー研究会シンポジウム合同シ  
ンポジウム、大阪、2011年9月1-2日
- 59) M Machitani, K Katayama, F Sakurai, H Matsui,  
T Yamaguchi, T Suzuki, H Miyoshi, K Kawabata,  
H Mizuguchi: Development of adenovirus vector  
lacking virus-associated RNA expression, 第17  
回日本遺伝子治療学会総会、福岡、2011年7  
月15-17日

出願状況：特許成立 特許番号第 4845327 号  
登録日 平成 23 年 10 月 21 日 発行日 平成  
23 年 12 月 28 日

- 4) 発明の名称：抗 TROP2-抗体  
PCT/JP2011/63294  
発明人：濱田洋文など  
登録日 平成 23 年 6 月 9 日

2. 実用新案登録  
特になし

3. その他  
特になし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得状況

- 1) Method of treating solid tumor (Patent No.: US  
7,985,407 B2)  
Inventors : Kazunori Aoki, Teruhiko Yoshida  
Date of Patent : Jul 26, 2011  
Assignee : National Cancer Center
- 2) 発明の名称：P28 分子またはその遺伝子を含む  
医薬製剤  
発明人：田川雅敏、下里 修  
出願人：千葉県  
出願状況：特許成立 特許番号第 4839434 号  
登録日 平成 23 年 10 月 14 日 発行日 平成  
23 年 12 月 21 日
- 3) 発明の名称：腫瘍特異的プロモーター  
発明人：田川雅敏  
出願人：千葉県

## がんに対する標的ベクターの網羅的探索

研究分担者 青木 一教 国立がん研究センター研究所遺伝子免疫細胞医学研究分野・分野長

腫瘍溶解ウイルス療法は、正常細胞内では増殖できず腫瘍細胞内だけで増殖するように遺伝子工学的に改変したウイルスであり、革新的がん治療薬として大きな期待が寄せられている。しかしながらアデノウイルスベクターには、腫瘍標的化能が不足している。そこで、我々は、独自技術である、多種多様なペプチドをファイバー上に提示するアデノウイルス・ライブラリーを構築し、標的ベクターの探索を行っている。本年度は、膵がん細胞等を *in vitro* 及び *in vivo* でスクリーニングし、非標的ベクターを比較して、4-10 倍程度感染効率が上昇する標的ベクターを同定することができ、本スクリーニング方法が個別化標的ベクターを開発する基盤として有用であることを示した。また、より純度と多様性の高いアデノウイルス・ライブラリーの新たな構築方法を開発し、今後のスクリーニングに応用する予定である。

### A. 研究目的

現在、生体内での遺伝子導入効率の高いアデノウイルスやヘルペスウイルスを基盤に構築された腫瘍溶解ウイルスの臨床開発が世界的に進められている。しかし、その臨床開発が進むにつれて、2つの課題が存在することが明らかとなってきた。まず、腫瘍溶解効果を一層増強する必要があることである。これは、腫瘍細胞への感染効率の低さや、ベクターの腫瘍組織内での拡散が不十分であることによる。また、腫瘍内で増殖したウイルスが血中に漏れて臓器への異所性感染をおこすことがわかってきた。ウイルスによる予期しない副作用を防ぐために、がん細胞以外の正常細胞・組織への感染を抑制する必要がある。これらの課題を解決するためには、ウイルスの自然の感染域を抑制することと、一方で、溶解効果は腫瘍への感染力に依存するので腫瘍に対する標的特異性を高めること、を両立する技術の開発が重要である。

アデノウイルス5型の細胞へ感染は、キャプシド蛋白質のファイバーノブがコクサッキーウイルス・アデノウイルスレセプター（CAR）に吸着し、ついでペントンベースに存在するRGD配列が細胞表面のインテグリンと結合して細胞内に取り込まれるという2段階の感染様式をとる。理論的には、アデノウイルスベクターのキャプシド蛋白質を遺伝子工学的に改変して標的リガンドを挿入することにより、細胞・組織特異的に感染する標的アデノウイルスベクターを構築することが可能である。しかし、現実的には、多くのがん細胞において特異的なリガンドとレセプターの

組み合わせが明らかでなく、同じがん種でも個人によって感染に利用できる細胞表面の受容体は大きく異なる。そこで、我々は、特異的に感染する腫瘍標的化リガンドの探索を目指し、多種多様なペプチドをキャプシド蛋白質上に提示するアデノウイルス（Ad）ライブラリーを用いて、グリオーマ等の細胞を用いてスクリーニングし、標的Adベクターを開発する方法を確立してきた。本年度は、このライブラリーを用いて、膵がんなどの難治がん細胞に対する標的ベクターの探索を行った。

一方、従来のアデノウイルス・ライブラリーの作成方法では、原理的にファイバーノブにリガンドを提示しないアデノウイルスが混入する。そこで、多くの種類のがん細胞での標的リガンドの探索を行う前に、ペプチドをファイバー上に提示しないウイルスの混入を防ぎ、純度の高いライブラリーの作成を試みている。

### B. 研究方法

#### B-1. アデノウイルスライブラリーの構築

ランダムな7つのアミノ酸配列をアデノウイルスのファイバーノブHIループ上に提示するシャトル・プラスミド（pBHI-library）を作製する。このシャトルプラスミドには、欠損したE3領域に1コピーのloxP配列を有している。また、ウイルスの可視化を可能とするために、同欠損E3領域には、CMVプロモーターにより発現するenhanced green fluorescent gene（EGFP）が挿入してある。一方、Adの増殖・産生効率を上げると考えられている末端蛋白質（TPC）を付着したアデ

ノウイルスゲノム DNA (TPC-DNA) を調整する。このアデノウイルスゲノム DNA にも、シャトルプラスミドと同様に、欠損した E3 領域に 1 コピーの loxP 配列が挿入されている。*in vitro* における、Cre-loxP 組換え反応を利用して、シャトルプラスミドと TPC-DNA の分子交換反応をおこすことで、全長のアデノウイルスゲノム DNA ライブラリーを作製する。最終的に、この DNA ライブラリーを、ヘルパー細胞 (293 細胞) に導入し、ウイルスに転換する。この Ad ライブラリーは、野生型の E1 領域を有しており、自己増殖型である。したがって、本ライブラリーは、感染効率と増殖能の 2 つの観点で最も効率のよい標的 Ad ベクターを選ぶことができ、腫瘍溶解ウイルスへの応用に有利である。6cm ディッシュ 1 枚あたり  $1 \times 10^4$  以上の多様性を持った Ad ライブラリーを得ることができる。

#### B-2. *in vitro* での膵がんに対する標的 Ad ベクターの探索

$2 \times 10^5$  以上の多様性を持つ Ad ライブラリーを用いて、3 種の膵がん細胞 (AsPC-1、Panc-1、MIAPaCa-2) のスクリーニングを行った。スクリーニング方法は、まず標的とする培養細胞に MOI 1-3 程度となるように Ad ライブラリーを感染した。5-7 日後に細胞を回収し、凍結融解操作を 3 回行って、粗ウイルス液 (crude viral lysate: CVL) を得た。CVL の一部をプロネース処理し、DNA を抽出した。また CVL を再び標的細胞に感染させ、回収・再感染の過程を 3-4 ラウンド繰り返した。

#### B-3. *in vivo* での膵がんに対する標的 Ad ベクターの探索

細胞受容体の発現状況は、培養細胞と生体での腫瘍の状態とは、異なっている可能性がある。そこで、膵がん腹膜播種動物モデルを用いて、*in vivo* での標的ベクターのスクリーニングが可能であるか検討した。AsPC-1 ヒト膵がん細胞を、BALB/c ノドマウスの腹腔内に注入し、腹膜播種を作成した。ついで、膵がん細胞移植 14 日後に、Ad ライブラリーを腹腔内投与し、5 日後に腹腔内の腫瘍を摘出し、凍結融解操作を 3 回行って、CVL を抽出した。この CVL を 293 細胞に感染させて、ウイルスを増幅したのち、再び腹膜播種マウスの腹腔内に投与し、5 日後に腹腔内の腫瘍を摘出し、CVL を得た (図 1)。

#### B-4. HI ループ挿入配列の解析

CVL から得られた DNA を用いて、HI ループにおけるリガンド挿入配列をはさむ領域の PCR を行い、得られた PCR 産物を TA クローニングベクターに

挿入した。ついで、シーケンを行い、HI ループに挿入されている配列を解析した。各ラウンド毎に 20-40 クローンほど解析し、出現頻度の多い配列を決定した。

#### B-5. 選択された Ad ベクターの感染効率の検討

最も頻度の高い配列を pBHI シャトルプラスミドに挿入し、E1 領域に EGFP-luciferase fusion gene をもった非自己増殖型の Ad ベクターを構築した。ついで、標的細胞や他の各種がん細胞あるいは正常細胞 (膵管上皮細胞、肝細胞、血管内皮細胞など) を用いて、EGFP の発現を蛍光顕微鏡で観察し、EGFP 発現細胞の FACS 解析やルミノメーターを用いたルシフェラーゼ・アッセイにより感染効率を比較検討した。

#### B-6. 新規 Ad ライブラリー構築方法の開発

B-1 に記載したように、従来の Ad ライブラリー作成方法では、Ad の増殖・産生効率を上げると考えられている末端蛋白質 (TPC) を付着したアデノウイルスゲノム DNA (TPC-DNA) を調整するが、このアデノウイルスゲノム DNA は、野生型のファイバーを有する。ライブラリー作成時には、TPC-DNA の loxP 配列の 3' 側を制限酵素 ClaI で切断して、野生型ファイバーを持つ Ad ベクターのライブラリーへの混入を抑止しているが、ClaI 切断が完全ではないため、野生型ファイバーをもつ Ad ベクターが約 30% 程度混入してしまう。そこで、ファイバー遺伝子を欠損したファイバーレス Ad ゲノムを用いて、ライブラリー作成を行った。ファイバーレス Ad ベクターは自己増殖できないため、野生型ファイバーを発現している 633 細胞に、ファイバーレス Ad ベクター DNA を導入することにより作製することに成功した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、所属する研究施設の組換え DNA 実験や動物実験に関わる各種委員会の承認を得た上で実施した。自己増殖型 Ad ライブラリーを用いた研究は、拡散防止措置に関して大臣確認を得た上で実施した。

### C. 研究結果

#### C-1. *in vitro* での膵がん標的ベクターの探索

本研究では、3 種類の膵がん細胞において、Ad ライブラリーのスクリーニングを行った。CVL から DNA を抽出しシーケンス解析を行ったところ、AsPC-1 細胞では SYENFSA 配列が 38% に認められた。また、Panc-1 細胞では FWRSGVD 配列が 38% に認められ、MIAPaCa-2 細胞では GFCLTGF 配列が 30%

に認められた。これらの配列は、すでに第1ラウンドで認められ、スクリーニング繰り返すにつれて頻度が高くなった。また、それぞれの細胞で得られる配列は同じではなかった。これらの配列をHIループに挿入した非増殖型Adベクターを作成し、各種がん細胞や正常細胞に対する感染効率を検討したところ、非標的ベクターと比較して、4-10倍程度に感染効率は上昇しており、また、正常細胞に対しては、感染効率は非標的ベクターと同程度であった。これらの結果は、本スクリーニングにより各種がん細胞に対する標的Adベクターが得られたことを示している。特に、SYE配列を持ったAdベクターは、5種類のヒト膵がん細胞のうち4種類において、感染効率が2倍以上に上昇しており、膵がんのある集団を標的できる可能性が示された。

### C-2. *in vivo*での膵がん標的ベクターの探索

Adライブラリーを、AsPC-1腹膜播種マウスに腹腔内投与し*in vivo*でのスクリーニングを試みると、ある特定のリガンド配列(PFWSGAV)を提示するアデノウイルスが濃縮していることが明らかとなった。ルシフェラーゼを発現するPFWSGAVベクターを構築し、AsPC-1腹膜播種マウスの腹腔内に様々な用量で投与( $1 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $10 \times 10^7$  PFU)して、2日後に腹腔内腫瘍や各種臓器のルシフェラーゼアッセイを行ったところ、AsPC-1腹腔内腫瘍においては非標的コントロールベクターに比べて7倍程度感染効率が上昇していた(図2)。このPFWSGAVアデノウイルスは、肝・脾・肺・膵・小腸などの正常臓器に対する感染効率は非標的ベクターと同等であり、AsPC-1腹腔内腫瘍に対する特異性ベクターである可能性が示された。

### C-3. 新規Adライブラリーの作成

ファイバーレスAdベクターからTPC-DNAを抽出し、シャトルプラスミドライブラリーpBHI-libraryとCre-loxP反応後に、293細胞に導入し、Adライブラリーの作成を試みた。遺伝子導入後10-14日でAdの産生が認められた。CVLを抽出し、293細胞に感染させることを4回繰り返し、それぞれのCVLからDNAを抽出した。ついで、ファイバーレスAdベクターDNAとライブラリーDNAを識別できるプライマーによるPCR法により、AdライブラリーにおけるファイバーレスAdの混入の程度を検討した。第1シードでは50%程度がファイバーレスAdであったが、次第にその割合は低下し、第4シードでは10%以下に減少した。本ファイバーレスAdは、非自己増殖型なので、Adライブラリーに混入していても、標的ベク

ターのスクリーニングに影響せず、ライブラリーの増幅とともにやがて消失するので、今後、ライブラリースクリーニングを行うのに適していると考えられた。多様性が確保されているかどうかに関しては、現在確認している。

### D. 考察

本年度は、Adライブラリーを用いて、膵がん細胞株や腹膜播種モデルにてスクリーニングしたところ、それぞれに対する標的Adベクターを同定することができた。これらの結果は、本スクリーニング方法が、個別化標的ベクターを開発するシステムを確立する基盤として有用であると考えられた。今後は、野生型ファイバーの混入を抑制した新規Adライブラリーを用いて、広範囲に各種細胞のスクリーニングを行う予定である。また、これらスクリーニングにより得られた標的ベクターが、リガンドを介して特異的な受容体に結合することにより感染することを確かめるためには、標的となっている受容体の解析・同定が必要である。

来年度は、当初の予定通り、田川分担研究者が開発したミッドカイン遺伝子等の腫瘍特異的転写領域を用いてE1遺伝子の発現を制御する腫瘍溶解ウイルスに、標的リガンドを挿入することにより、腫瘍溶解Adベクターの腫瘍標的化とそれに基づく抗腫瘍効果と安全性の強化が可能であるか検討を行う。

### E. 結論

- 1) Adライブラリーを用いて、3種類の膵がん細胞や膵がん腹膜播種モデルでスクリーニングを行い、標的ベクターを同定できることを示した。
- 2) ファイバーレスAdベクターを用いることにより、原理的に従来型Adライブラリー作成法では混入する野生型ファイバーの混入を、効率良く抑制できた。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### ●論文発表

1. Narumi K, Udagawa T, Kobayashi A, Hara H, Kondoh A, Goto N, Ikarashi Y, Ohnami S, Takeshita F, Ochiya T, Okada T, Yamagishi M, Yoshida T, Aoki K. *In vivo* interferon- $\alpha$  gene transfer enhances antitumor immunity

- afterautologous hematopoietic stem cell transplantation. *Gene Ther*, 19; 34-48, 2012
2. Udagawa T, Narumi K, Goto N, Aida K, Suzuki K, Makimoto A, Ochiya T, Yoshida T, Chikaraishi T, Aoki K. Syngeneic hematopoietic stem cell transplantation enhances the antitumor immunity of intratumoral type I interferon gene transfer for sarcoma. *Hum Gene Ther*, 23; 173-186, 2012
  3. Yamazaki T, Aoki K, Heike Y, Kim SW, Ochiya T, Wakeda T, Hoffman RM, Takaue Y, Nakagama H, Ikarashi Y. Real-time *in vivo* cellular imaging of graft-versus-host disease and its reaction to immunomodulatory reagents. *Immunol Lett*. 144; 33-40, 2012
  4. Miura Y, Yamazaki S, Julia D, Brown E, Aoki K, Vivkers S, Yamamoto M. Infectivity-selective oncolytic adenovirus developed by screening of high diversity targeting ligand library in the format of adenovirus capsid. *Mol Ther*, in press.
  5. Narumi K, Aoki K. Combination of immune gene therapy with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation against solid cancers. In: *Cellular and Genetic Practices for Translational Medicine* ed. by J-Y. Kwak and J-Y. Han. Research Signpost, Kerala, India 2011, p227-246.
  6. 青木一教、膵癌に対する標的サイトカイン遺伝子治療の開発、膵・胆道癌 FRONTIER、メディカルビュー社、2011, p48-51.
  7. 青木一教、遺伝子治療 がん、小児科診療、診断と治療社、2012, p115-1119.

●学会発表

1. Aoki K. Development of targeted virus therapy using the adenovirus library displaying random peptides on the fiber knob (Symposium). 第 17 回日本遺伝子治療学会学術集会. July 15-17, 2011
2. Udagawa T, Narumi K, Ochiya T, Yoshida T, Aoki K. Syngeneic hematopoietic stem cell transplantation enhances the antitumor immunity of type I interferon gene transfer for sarcoma. 第 17 回日本遺伝子治療学会学術集会. July 15-17, 2011
3. Udagawa T, Narumi K, Ikarashi Y, Ohnami S, Yoshida T, Aoki K. Autologous hematopoietic stem cell transplantation suppresses immunotolerant environment in tumors and induces antitumor immunity. 第 70 回日本癌学会総会. Oct 3-5, 2011.
4. Aida K, Udagawa T, Narumi K, Suzuki K, Goto N, Ikarashi Y, Ohnami S, Yoshida T, Aoki K. Inhibition of regulatory T cells enhances antitumor immunity induced by

intratumoral IFN- $\alpha$  gene transfer. 第 70 回日本癌学会総会. Oct 3-5, 2011.

5. Aoki K. Development of targeted virus therapy using the adenovirus library displaying random peptides on the fiber knob. MRCCMT International symposium. January 2011 (Busan)
6. Narumi K, Udagawa T, Ikarashi Y, Ochiya T, Yoshida T, Aoki K. *In vivo* delivery of interferon- $\alpha$  gene enhances tumor immunity and suppresses immunotolerance after autologous hematopoietic stem cell transplantation. The American Society of Gene Therapy's 14th Annual Meeting. May 18- 21, 2011 (Seattle).

H. 知的財産権の出願・登録状況

●特許取得状況

1. Method of treating solid tumor (Patent No.: US 7,985,407 B2)  
Date of Patent : Jul 26, 2011  
Inventors : Kazunori Aoki, Teruhiko Yoshida  
Assignee : National Cancer Center

図1 腹膜播種モデルでのスクリーニング

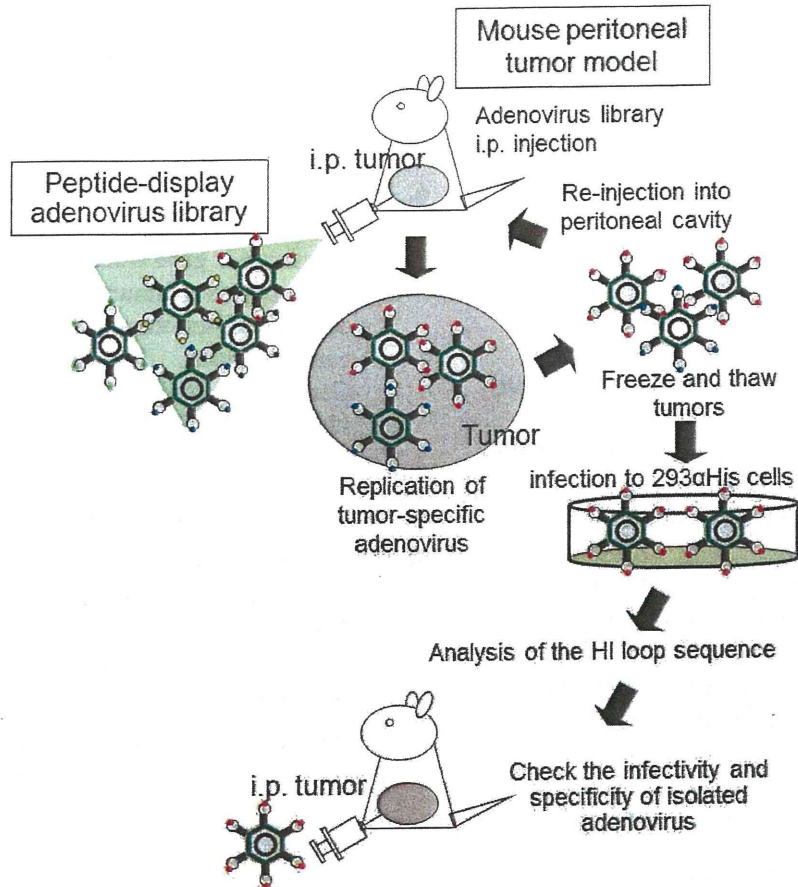
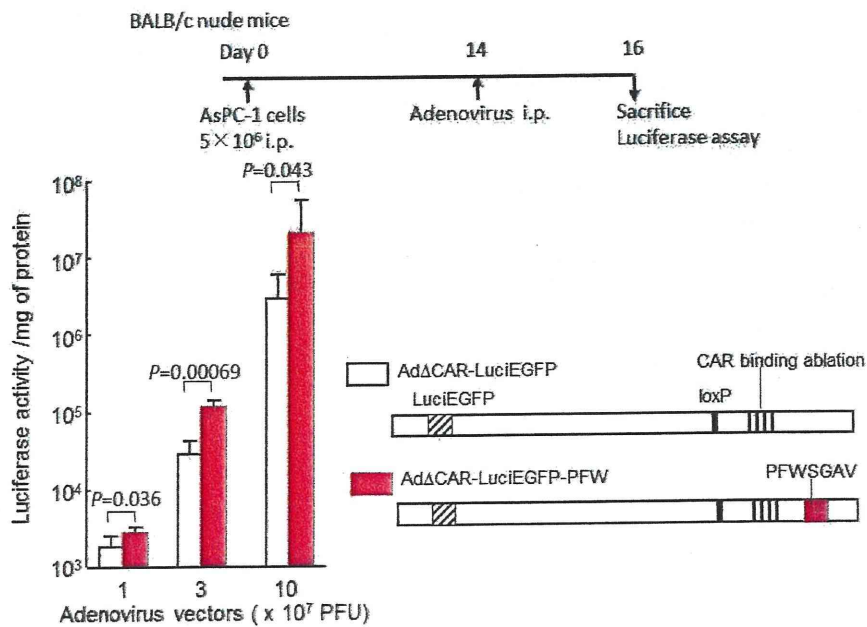


図2 PFWアデノウイルスの腹膜播種への感染効率





## 転写制御等を利用した腫瘍標的ベクターの構築とそれによる抗腫瘍効果の検討

研究分担者 田川 雅敏 千葉県がんセンターがん治療開発グループ・部長

腫瘍への標的性を有したベクターのヒトにおける安全性を向上させるため、目的遺伝子を腫瘍内で特異的に転写させる機構をアデノウイルスで構築した。まず、ヒト腫瘍において、高頻度の高発現を示す *midkine*, *survivin*, *cyclooxygenase-2* 遺伝子の 5'側転写調節領域において、腫瘍特異的な転写を担う領域を決定した。さらに、この領域によってアデノウイルスの初期転写遺伝子 E1 の発現を制御するウイルスを作製すると、腫瘍特異的にウイルスの増殖がおり、感染細胞の効率的な細胞死を誘導することが可能であった。

### A. 研究目的

標的とする細胞・臓器に外来遺伝子を高効率で導入し、しかも標的細胞内で適切に発現させる技術は、バイオ技術の医療への利用を考える上で、当該医療の安全性の確保と効率の向上に大きく貢献できる。近年のナノ技術の進展や幹細胞の医療への応用を考慮すれば、当該技術の開発に関して新たな展開が必要である。とりわけ、腫瘍を標的としたバイオ医薬品開発は、遺伝子医薬への道筋を切り拓くために、非常に良いモデルとなりうる。本研究では、腫瘍における標的化の一つとして、当該腫瘍で外来遺伝子の転写を惹起する転写調節領域を決定し、さらに、それらを用いて初期転写調節領域を制御する制限増殖型アデノウイルスの腫瘍特異的な細胞傷害効果の検討を行う。

### B. 研究方法

#### B-1. 転写調節機能の検討

ヒトの腫瘍において発現レベルが高い遺伝子である、*midkine* (MK)、*survivin* (Sur) および *cyclooxygenase-2* (COX-2) の転写制御に関わる 5'上流領域のゲノム遺伝子を、pGL2-Basic プラスミドベクターのルシフェラーゼ遺伝子上流に結合させたベクターを作成した。MK については開始コドン+1 として-559 から+50、Sur は-478 から+43 まで、COX-2 は-327 から+59 を用いることにした。例えば、MK については、転写開始点から 2.3kb 上流までのゲノム遺伝子を単離し、これを 5'側より制限酵素部位を利用して順次欠損させた各配列を、上記ルシフェラー

ゼ遺伝子上流に結合させたベクターを用意し、これらのベクターDNA を、標的とする腫瘍細胞に遺伝子導入した後に、当該細胞で発現したルシフェラーゼ蛋白質の活性をルミノメーターによって検出した。また遺伝子導入効率による差異をなくすために、*herpes simplex virus-thymidine kinase* (HSV-TK) 遺伝子の転写調節領域を組み込んだベクターを使用し、当該導入効率を各細胞ならびに各ベクターで標準化した。このようなアッセイ法を用いて、上記の各遺伝子に関して最良の転写調節領域を決定した。

#### B-2. アデノウイルス構築に必要なベクター系の確立

外来性の転写調節領域によってアデノウイルス初期転写遺伝子である E1 の発現を制御するために、マルチクロニングサイトを有するベクターを作成する必要がある。このため、Clontech 社の pShuttle2 ベクターを、Mun I と Nhe I で切断して、cytomegalovirus (CMV) の転写調節領域 (pShuttle2 の 184-918 に相当) を除き、そこに Mun I-Sca I-Bam HI-Eco RV-Sal I のマルチクロニング部位を有するオリゴヌクレオチド DNA を挿入し、pS-PL ベクターを作製した。その結果 pS-PL は Mun I-Sca I-Bam HI-Eco RV-Sal I-Nhe I-Dra I-Apa I-Xba I-Not I-Bst XI-Kpn I-Aff II のクロニング部位を有するベクターとなった。アデノウイルスの遺伝子 E1A 及び E1B 領域は、accession number M73260 において 560-3509 に相当しており、同領域の転写調節領域は、accession number M73260 における 341-548 に相当している。そこで、E1A 及び E1B 遺伝子の固有の転写調節領域を除き、その箇所に外来

性の転写調節領域を導入して、E1A 及び E1B 遺伝子の発現を制御するベクターを作製した。このために、E1A および E1B 領域をいくつかの制限酵素部位を利用して PCR 反応により結合させる必要があったが、最終的には、作製した当該 E1A+E1B 配列を上記 pS-PL の Not I 部位に挿入し、pS-PL/E1A-E1B ベクターを完成させた。この pS-PL/E1A-E1B ベクターは、複数のクローニング部位に、任意の転写調節領域を組み込んで、この領域の制御下に E1A 及び E1B 遺伝子の発現を制御できるベクターである。

### B-3. アデノウイルスの作製

上記 pS-PL/E1A-E1B ベクターの Eco RV 部位に、MK、Sur、COX-2 等の各種外来性転写調節領域を挿入し、同プラスミドをさらに制限酵素 I-Ceu I 及び PI-SceI で切断して抽出した。ついで、タイプ 5 型の pAdenoX ベクターを I-Ceu I 及び PI-SceI で切断したものと結合させた後、HEK293 細胞に当該 DNA を導入した。細胞傷害 (cytopathic effect) が生じた細胞を回収し、アデノウイルスを Adeno-X ウイルス精製キット (BD Biosciences 社) を用いて精製した。

(倫理面への配慮)

なお当該研究においてヒトの倫理に関する事項はなく、また動物実験等においても、組換え DNA 実験に関わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等をする間に執る拡散防止措置がなされていることを確認の上実施している。

## C. 研究結果

### C-1. 腫瘍細胞における転写制御調節

上記転写調節領域を挿入した pGL2-Basic ベクターを、難治性腫瘍の代表例として、5 種類のヒト悪性中皮腫、4 種類の膵がん、9 種類の食道がん細胞に導入し、各転写活性を検討した。陽性対照として SV40T 抗原の転写調節領域を用いた。その結果 MK、Sur、COX-2 の転写調節領域の各腫瘍細胞における転写活性は、導入した細胞および用いる転写調節領域によって異なっていたが、おおむね SV40T 抗原の転写活性化能を上回っており、場合によっては強力な CMV の転写調節領域と同等の活性を示した。

また、当該 pGL2-Basic ベクターを正常繊維芽細胞に導入して、ルシフェラーゼ活性を測定すると、上記腫瘍細胞の場合と比較して、その値は低値であった。これらの転写調節領域の転写活性は、一般に細胞増殖能が高いほど高値を示す傾向があり、HSV-TK 遺伝子によって遺伝子

導入効率を換算しているとは言え、正常細胞の方がプラスミド DNA の当該効率が低いことを考慮する必要がある。また、このような方法で測定した転写活性は、細胞培養という *in vitro* の系であるため、*in vivo* における状況を正確には反映できない欠点がある。さらに、正常繊維芽細胞といえども細胞培養系ではある程度増殖しており、一方当該細胞自体が上記腫瘍細胞より大きい場合、遺伝子導入効率が高まる可能性もある。このような条件下での転写活性の検討であるため、アデノウイルスベクターに当該転写調節領域を組み込んだ上で、*in vivo* アッセイ系において、転写活性を測定する方が望ましいといえる。

### C-2. アデノウイルスの構築とその細胞傷害活性

上記転写調節領域により E1 領域の遺伝子の転写を調節するタイプ 5 型のアデノウイルスを作製した。また、ウイルスのコントロールとして、大腸菌のベータガラクトシダーゼ (beta-galactosidase: LacZ) 遺伝子を E1 遺伝子の代わりに組み込んだ非増殖性のウイルス、および CMV の転写調節領域によって E1 領域遺伝子の発現を制御する増殖性ウイルスを作製した。これらの外来性転写調節領域を有するアデノウイルスを、上記のヒト悪性中皮腫、膵がん、食道がん細胞に感染させ、その細胞傷害活性を WST 法等にて検討すると、感染させた細胞の種類や使用したアデノウイルスによってその傷害活性に差があったが、同ウイルスは各種腫瘍細胞に対して高い殺細胞効果を示した。しかも、その細胞傷害活性は、CMV の転写調節領域を組み込んだアデノウイルスとほぼ同等であった。LacZ 遺伝子を発現するアデノウイルスは、全く殺細胞効果を示さなかった。

一方、対照としてヒト正常繊維芽細胞や血管内皮細胞を用いた場合、これらの細胞に対する傷害活性は腫瘍細胞に比較して低いものであった。正常細胞といえども細胞培養系ではある程度細胞が増殖するため、完全にウイルスの増殖を抑制することは出来ない。しかし、これを *in vivo* の系で検討すれば、より一層の腫瘍特異性が示せるものと期待される。作製した増殖性ウイルスを用いて、ウイルス産生能を Tissue Culture Infectious Dose 50 法で検討すると、腫瘍細胞と正常細胞との間のウイルス増殖能の差は約 1,000 倍と考えられた。

今回検討したアデノウイルスはタイプ 5 型であるため、感染効率はその細胞受容体発現によって左右されることが考えられる。タイプ 5 型

の代表的な細胞受容体は coxsackie virus and adenovirus receptor (CAR) である。悪性中皮腫や食道がん細胞を用いて、CAR 発現とウイルスによる細胞傷害活性を検討してみると、CAR 発現が低い細胞では増殖性アデノウイルスの細胞傷害活性は低かったが、CAR 分子の発現レベルが高いものでは、必ずしも CAR の発現と細胞傷害活性とは直線的関係にはなかった。

### C-3. アデノウイルスベクター系の確立

上記の結果は、pS-PL/E1A-E1B ベクターを用いることによって、細胞受容体結合領域を変えた増殖性アデノウイルスの作製が、比較的容易であることを意味している。すなわちタイプ 5 型の pAdenoX ベクターを用いて、主任研究者青木らが検討している、Ad ディスプレライブラリーより得られた標的配列を当該領域で置換し、pS-PL/E1A-E1B ベクターを結合させることによって、標的化が可能でかつ上記転写調節領域によってウイルス増殖が制御されるアデノウイルス DNA を、数回の遺伝子クローニングで作製することが可能である。

### D. 考察

外来性転写調節領域によって、腫瘍特異的なウイルス増殖が可能となり、その結果として、細胞傷害活性が生じていると考えられる。この細胞傷害活性が、使用した転写調節領域の転写活性と相関するのか、すなわち同活性が抗腫瘍効果のバイオマーカーになりうるか検討をした。細胞傷害活性の指標としては WST 法による IC<sub>50</sub> 値を使用し、転写活性として SV40T 抗原の転写活性を基準として当該ルシフェラーゼ活性の相対値を使用して、4 種類の腫瘍がん細胞を対象に検討した。各外来性転写調節領域を有するアデノウイルスの IC<sub>50</sub> 値と、同じ転写調節領域のルシフェラーゼ活性値について比較すると、両者には有意な相関は認められなかった。このことは、ウイルスによる細胞傷害活性には複数の要因が関与していることが理由であると考えられる。

まず、ウイルスの感染効率がその要因の一つであり、確かに CAR 受容体の発現が低い細胞に対しては、殺細胞効果が低下していた。しかし、CAR 分子の発現レベルもある程度の閾値を越えれば、それ以上の感染性の上昇はなく、また CAR 以外の受容体発現レベルも感染効率に関与していると考えられるが、標的細胞における複数の受容体の発現レベルと、感染効率・細胞傷害活性との関連は明確ではない。したがって、本研

究で目指しているような、ウイルスの CAR 分子結合領域を欠損させ当該領域に腫瘍に結合する配列を組み入れた場合、感染の特異性が向上し、感染効率とウイルスの細胞傷害活性が相関する可能性が高いと想定される。その場合、感染効率を検出するために、当該改変型アデノウイルスに green fluorescence protein 遺伝子等のマーカー分子を組み入れたものを作製することが望ましい。

また、細胞死の感受性を規定する要因も細胞傷害活性に影響を与える一因である。ウイルスによる細胞傷害活性が果たしてどのような細胞死によって生じるか、明確なことは検討されていないが、アポトーシスがその主因であった場合、プロアポトーシスあるいは抗アポトーシスの経路に関する分子の発現レベルなどが、そのウイルスによる細胞死のバイオマーカーとなりうると思われる。さらにウイルス感染によって誘導される分子、たとえばインターフェロンなども、細胞死を左右する因子の一つになると想定される。より特異性が高く、抗腫瘍効果の高いウイルスの医薬品化には、どのような要因がその遺伝子医薬の効果を左右しうるか、そのバイオマーカーの同定も同時に必要となることが予期される。

### E. 結論

腫瘍特異的発現を可能にする外来性の転写調節領域を同定し、それを用いてアデノウイルスの E1 遺伝子発現を、ヒト腫瘍において効率的に制御しうるベクター系を構築した。さらに、この転写調節領域を用いた制限増殖型アデノウイルスは、ヒト腫瘍において腫瘍特異的な殺細胞効果を発揮した。

### F. 健康危険情報

特記すべきことなし

### G. 研究発表

#### ●論文発表

1. Kitamura, A., Matsushita, K., Takiguchi, Y., Shimada, H., Tada, Y., Yamanaka, M., Hiroshima, K., Tagawa, M., Tomonaga, T., Matsubara, H., Inoue, M., Hasegawa, M., Sato, Y., Levens, D., Tatsumi, K. and Nomura, F: Synergistic effect of non-transmissible Sendai virus vector encoding the c-myc suppressor FUSE-binding protein-interacting repressor plus cisplatin in the treatment of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Sci.* 102: 1366-1373, 2011.

2. Tagawa, M., Kawamura, K., Li, Q., Tada, Y., Hiroshima, K. and Shimada, H.: A possible anti-cancer agent, type III interferon, activates cell death pathways and produces anti-tumor effects. Clin. Dev. Immunol. Article ID 479013, 2011. doi:10.1155/2011/479013
  3. Fujie, H., Tanaka, T., Tagawa, M., Kaijun, N., Watanabe, M., Suzuki, T., Nakayama, K. and Numasaki, M.: Antitumor activity of type III interferon alone or in combination with type I interferon against human non-small-cell lung cancer. Cancer Sci. 102: 1977-1990, 2011.
  4. Li, Q., Kawamura, K., Okamoto, S., Fujie, H., Numasaki, M., Namba, M., Nagata, M., Shimada, H., Kobayashi, H. and Tagawa, M.: Adenoviruses-mediated transduction of human esophageal carcinoma cells with the interferon-lambda genes produced anti-tumor effects. Br. J. Cancer. 105: 1302-1312, 2011.
  5. Tagawa, M., Tada, Y., Hiroshima, K. and Shimada, H.: Type III interferon family-mediated anti-tumor responses through multiple mechanisms. In: Cellular and genetic practices for translational medicine. ed. by Jong-Young Kwak and Jin-Yeong Han. Research Signpost, Kerala, India. p247-260, 2011.
  6. Iguchi, K., Sakurai, F., Tomita, K., Katayama, K., Yamaguchi, T., Tagawa, M., Kawabata, M., Shirakawa, T. and Mizuguchi, H.: Efficient antitumor effects of carrier cells loaded with a fiber-substituted conditionally replicating adenovirus on CAR-negative tumor cells. Cancer Gene Ther. 19: 118-125, 2012.
  7. Li, Q., Kawamura, K., Okamoto, S., Yamanaka, M., Yang, S., Yamauchi, S., Fukamachi, T., Kobayashi, H., Tada, Y., Takiguchi, Y., Tatsumi, K., Shimada, H., Hiroshima, K. and Tagawa, M.: Upregulated p53 expression activates apoptotic pathways in wild-type p53-bearing mesothelioma and enhances cytotoxicity of cisplatin and pemetrexed. Cancer Gene Ther. 19: 218-228, 2012.
  8. Hamada, K., Yoshihara, C., Ito, T., Tani, K., Tagawa, M., Sakuragawa, N., Itoh, H. and Koyama, Y.: Antitumor effect of chromatin sulfate-coated ternary granulocyte macrophage-colony-stimulating factor plasmid complex for ovarian cancer. J. Gene Med. 14:120-127, 2012.
  9. Fukamachi, T., Saito, H., Tagawa, M. and Kobayashi, H.: The impact of extracellular low pH on the anti-tumor efficacy against mesothelioma. In: Mesotheliomas-synonyms and definition, epidemiology, etiology, pathogenesis, cyto-histopathological features, clinic, diagnosis, treatment, prognosis. ed by Zubritsky, A. InTech, Rijeka, Croatia. p187-210, 2012. ISBN 978-953-307-845-8.
  10. Okamoto, S., Kawamura, K., Li, Q., Yamanaka, M., Yang, S., Fukamachi, T., Tada, Y., Tatsumi, T., Shimada, H., Hiroshima, K., Kobayashi, H. and Tagawa, M.: Zoledronic acid produces anti-tumor effects on mesothelioma through apoptosis and S phase arrest in p53-independent and Ras prenylation-independent manners. J. Thorac Oncol. (in press)
  11. Nagakawa, H., Shimozato, O., Yu, L., Wada, A., Kawamura, K., Li, Q., Chada, S., Tada, Y., Takiguchi, Y., Tatsumi, K. and Tagawa, M.: Expression of a murine homologue of apoptosis-inducing human IL-24/MDA-7 in murine tumors fails to induce apoptosis or produce anti-tumor effects. Cell. Immunol. (in press).
  12. 田川雅敏：細胞性免疫応答に基づく免疫細胞治療の基本戦略 肝と膵 32: 117-121, 2011
  13. 谷島聡, 田川雅敏, 島田英昭：遺伝子治療癌に対する遺伝子・ウイルス治療の現状 臨床外科 66: 272-275, 2011
- 学会発表
1. Masatoshi Tagawa, Yuji Tada, Hideaki Shimada and Kenzo Hiroshima: A possible therapeutic strategy for mesothelioma with genetic medicine. Turkish Japanese Scandinavian mesothelioma workshop, April 18-22, 2011, Eskisehir, Turkey.
  2. Kenji Morinaga, Yasushi Shinohara, Hirotaro Miura, Norihiko Kohyama, Toshikazu Yusa, Masatoshi Tagawa, Kenzo Hiroshima: Epidemiology of mesothelioma with special reference to "Kubota shock". Turkish Japanese Scandinavian mesothelioma workshop, April 18-22, 2011, Eskisehir, Turkey.
  3. Kenzo Hiroshima, Masatoshi Tagawa, Toshikazu Yusa: Pathological diagnosis of early mesothelioma. Turkish Japanese Scandinavian mesothelioma workshop, April 18-22, 2011, Eskisehir, Turkey.)
  4. Masatoshi Tagawa, Suguru Yamauchi, Kiyoko Kawamura, Shinya Okamoto, Shan Yang, Wen Chang Li, Hiroshi Kobayashi, Shuji Kubo, Yuji Tada, Yuichi Takiguchi, Koichiro Tatsumi, Kenzo Hiroshima, Hideaki Shimada: Promoter-mediated replication of adenoviruses induces apoptosis-independent cell death in p53-null pancreatic carcinoma cells. 14th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy, May 18-21, 2011, Seattle.
  5. Yuji Tada, Makako Yamanaka, Kiyoko