

- Kawamura, Shinya Okamoto, Shan Yang, Yuichi Takiguchi, Suguru Yamauchi, Liang Min, Hiroshi Kobayashi, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima, Masatoshi 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.
6. Shuji Kubo, Atsuko Tamamoto, Nobutaka Okamura, Yoshihiro Maeyama, Masatoshi Tagawa, Noriyuki Kasahara, Nobuyuki Terada, Haruki 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.
 7. Masatoshi Tagawa, Makako Yamanaka, Yuji Tada, Kiyoko Kawamura, Shinya Okamoto, Hiroshi Kobayashi, Shan Yang, Suguru Yamauchi, Wenchang Li, Yuan Yuan Jiang, Yuichi Takiguchi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima and Koichiro 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.
 8. Masatoshi Tagawa, Quanhai Li, Kiyoko Kawamura, Shinya Okamoto, Shan Yang Suguru Yamauchi, Jiang Yuan Yuan, Toshihiko Fukamachi, Hiroshi Kobayashi, Yuji Tada, Yuichi Takiguchi, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo 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.
 9. 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) .
 10. 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) .
 11. 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) .
 12. 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) .
 13. 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) .
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 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
 2. 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
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

標的ベクターに関する細胞表面分子の探索

研究分担者 濱田 洋文 東京薬科大学生命科学部・教授

我々は、ファイバー変異型 Adv-FZ33 アデノウイルスを用いたスクリーニングによりウイルス感染効率が低い標的分子と抗体をセットで得る系を確立させた。この系により、約 600 個のモノクローナル抗体（54 種の抗原）が得られ、この中には EGFR や CD20 などすでに抗体医薬品として使用されているもの、あるいは標的治療の候補分子として注目されているものが多く含まれていた。このことから、Adv-FZ33 を用いた方法は、強力な標的分子スクリーニング手段となることが明らかとなった。

さらに、イミュノトキシン(iTox)を容易に作製できるユニークな方法を開発した。これはプロテイン G の C 領域を 3 つ持つジフテリアトキシン(DT)融合蛋白 DT3C である。DT3C は抗体への結合が容易であり、抗体と DT3C の結合体が細胞内に内部移行すると強力な iTox 活性を示す。この系を用いたスクリーニングにより、膵がん細胞に対して優れた iTox 活性を持つ CEACAM、TROP2、CD44 および CD71 抗体などが得られた。

これらの結果から、Adv-FZ33 および DT3C を用いたスクリーニング方法は腫瘍細胞表面の標的分子探索に有用であることが示された。

A. 研究目的

膵がんなどの難治性がんに対する効果的な「標的治療法」の開発において、「選択的な治療薬剤の導入」はその戦略の鍵である。我々は、腫瘍の標的化に好適な表面抗原の探索を目的に、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 アデノウイルス作製した。これを用いたスクリーニングでウイルス感染効率が低い標的分子・抗体をセット（57 種の抗原、615 個のモノクローナル抗体）で得た。この中には、EGFR や CD20 などすでに抗体医薬として腫瘍の標的治療に用いられているもの、腫瘍標的治療の候補分子として注目され臨床開発途上(CD44, CD71, CA12, EpCAM, TROP2, MCSP, CD146, CD228, PSMA, CEA)のものが、高い比率で含まれていた。このことから、Adv-FZ33 を用いた方法は、強力な標的分子スクリーニング手段となることがわかった。

最近、さらに、我々は、新たながん標的抗体の探索方法として、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(iTox)を作製するユニークな系を樹立した。ジフテリアトキシン(DT)と連鎖球菌プロテイン G 由来の抗体結合ドメイン 3C を持つ DT3C は抗体への結合が容易であり、抗体と DT3C の結合体が細胞内へ内部移行すると強力な iTox 活性を示す(図 1)。

本年度は、第 1 に、既に Adv-FZ33 の系で得られた抗体が、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、その細胞傷害活性についての評価を行った。第 2 に、難治性がんに対する新たな分子標的の開発を目指して、DT3C を用いたスクリーニングにより、iTox 活性の優れた標的抗原と抗体を同時に樹立した。

B. 研究方法

B-1. Adv-FZ33 を用いたスクリーニングで得られた抗体における iTox

Adv-FZ33 で得られた抗体 (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での iTox 活性について検討した。

B-2. iTox 標的化に好適なターゲットの探索

図 2 は、イージーメイドイミュノトキシン (EZiTox) 法を用いた標的抗体樹立の方法と、対応する抗原の同定と特異性の確認といった、実験の一連の流れを示している。本年度は、特に新規の標的化抗体のスクリーニングと抗原同定に集中して実験を行った。これらはすべて、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)と同等以上の細胞障害活性を示し、iT_{ox} 標的治療に使うことのできる候補分子である。このパネルの中から、腫瘍細胞に対して選択性が高いものを抽出し、標的ベクターの実用化に必要な個別の解析を進める。

(倫理面への配慮)

本研究は、遺伝子治療、抗体療法などの基礎的な検討のみ行う。すでに樹立された細胞株と動物を用いて行う実験であるため、該当する留意事項は特になし。なお、当申請に関連した組換え DNA 実験計画に関しては、課題名「腫瘍に対する高性能標的抗体医薬の開発」として、研究実施施設において承認を受けて実施している。

C. 研究結果

DT3C を用いた方法で、細胞傷害活性を調べた実験の結果から、アデノウイルス感染の標的化に高効率な標的であっても、その中のごく一部 (TROP2, IL-13R2a, CEACAMs, CD44, CD71, CD99 および CD59) の標的だけが iT_{ox} として有効であった (表 1; 赤が iT_{ox} 活性を示した抗体)。また、同じ標的抗原に対する抗体であっても、その iT_{ox} 活性には大きな違いがあった。例えば、CD59 に対する iT_{ox} 活性は、Yuk1 抗体に比較し MYa5 抗体が 100 倍以上 (図 3-C)、TROP2 では A-Ab に比較し B-Ab で 1000 倍以上 (図 3-D) 優れていた。すなわち、高いアフィニティに加え、好適なエピトープ特性を持つことが iT_{ox} 活性に必須であることを見いだした。

ついで、我々は、iT_{ox} 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、高効率標的化抗体 (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、免疫沈降・質量分析により抗原の同定を終え、重複を除くと現在までに 23 種類の抗原を同定した (表 2)。これらの抗体は、いずれも優れた iT_{ox} 活性を持つ抗体であり、CEACAM、TROP2、CD44 および CD71 などの抗体医薬として標的治療の候補分子として注目されている抗体が含まれていた。このことから、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。

D. 考察

本年度は iT_{ox} 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・樹立を進めた。そのうちの一部につき抗原決定を行ったところ、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。

今後は、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。

E. 結論

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 (iT_{ox}) 系を用いた高効率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十分に見込まれる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

●論文発表

1. 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).
2. 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).
3. 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 (Engl)*. **124**, 1082-1087 (2011).
4. 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).

5. 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).
6. 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.
7. 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.
8. 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

●特許取得状況

1. 抗 TROP2-抗体 PCT/JP2011/63294 平成 23 年 6 月 9 日 濱田洋文など

表 1 Adv-FZ33 を用いたスクリーニングで得られた抗体

Tumor-targeting markers

<ul style="list-style-type: none"> •CD20 (B1 antigen) •EGFR (Epidermal growth factor receptor) •IGF1R •CD44 •EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) •TROP2 •EphA2 •L1CAM •CEACAMs (Carcinoembryonic antigens) •MCSP (Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan) •CD146 (Melanoma cell adhesion molecule) 	<ul style="list-style-type: none"> •CD228 (melanotransferrin) •PSMA (Prostate specific membrane antigen) •CD10 (CALLA) •CD71 (Transferrin receptor) •CD109 (r150) •CD99 (MIC2) •CD147 (EMMPRIN) •CA12 (Carbonic anhydrase XII) •CD276 (B7-H3) •PAP2a (Phosphatidic acid phosphatase 2a) •IL13Ra2 (as a melanoma antigen)
--	---

表 2 DT3C を用いたスクリーニングで得られた抗体

標的スクリーニング細胞
<ul style="list-style-type: none"> -肺癌 PK1, MIAPaCa2, AsPC1 -骨髄性白血病 MY,KG1,SKM1,HL60, MEG01,TF1 -成人T細胞白血病 TLom1, CCRL-CEM

標的化抗体・集計(Nov.17, 2011)

	抗原	抗体数
1	MHC Class I	24
2	CD71	19
3	CD47	18
4	MHC class II	15
5	CD69	11
6	CD88	11
7	CD30	9
8	CEACAMs	8
9	CD44	8
10	CD43	5
11	TROP2	4
12	CD147	3
13	CD4	3
14	CD107a	2
15	CD142	2
16	CD317	2
17	CD38	2
18	CD9	2
19	CD98hc	2
20	DR5	1
21	ICAM2	1
22	Integrin α 2	1
23	Prion Protein	1
		146
	未同定	117
	総数	263

146/263

図 1. DT3C と免疫毒素の概念図

Easy-made immunotoxins by SPG bridge

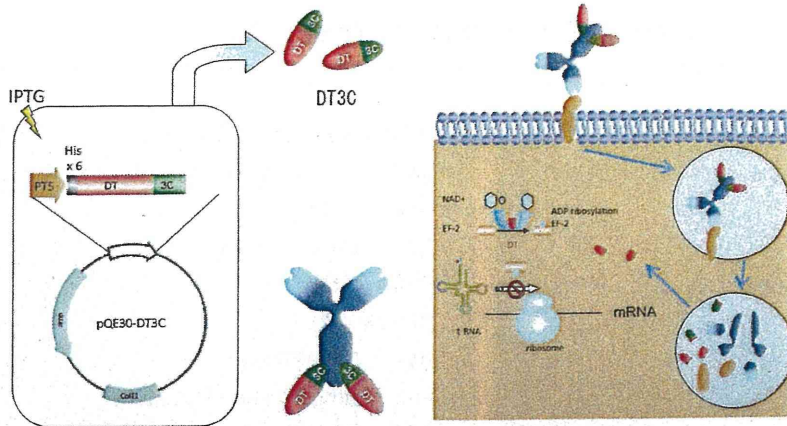


図 2 イージーメイド免疫毒素 (EZiTox) 法を用いた標的抗体樹立の方法

Search for novel cancer targeting Ab by our Easy-made Immunotoxin (EZiTox) method

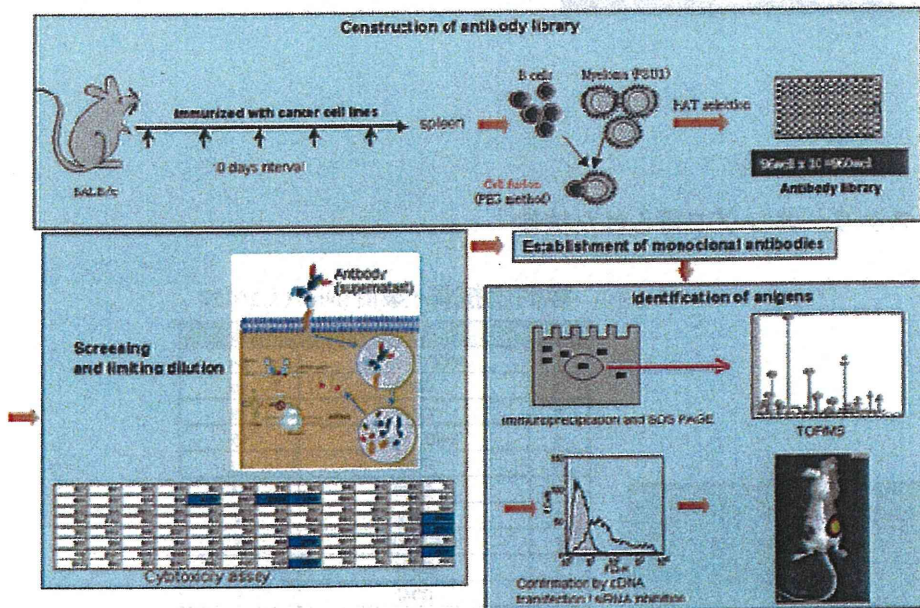
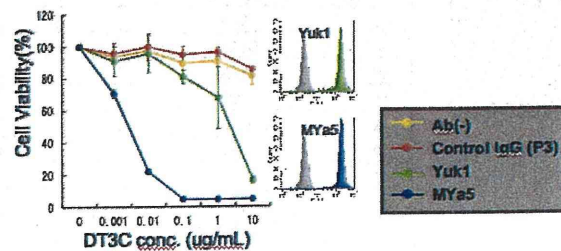
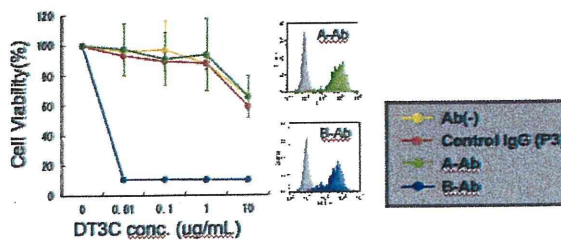


図 3 肺癌に対する CD59 および TROP2 の殺細胞効果

図C. 肺癌に対するCD59の殺細胞効果



図D. 肺癌に対するTROP2の殺細胞効果



アデノウイルスベクターに対する生体応答に関する解析

研究分担者 水口 裕之 大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野・教授

制限増殖型アデノウイルスを含め、アデノウイルスベクターは、その優れた特性から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、アデノウイルスベクターは、投与後強い免疫応答を誘導することが知られている。この特性は、炎症応答などの副作用と見なされる場合もあるが、一方でがん治療などではがん抑制作用を示すことから、むしろ長所ともなりうる。従って、アデノウイルスベクター投与後の免疫応答を自在に制御可能となれば、疾患に応じて使い分けられることができると期待される。そこで、本年度は、アデノウイルスベクターによる免疫応答の解析・制御に向けて、まず①非増殖型アデノウイルスベクター感染後の非特異的なアデノウイルス遺伝子の発現を定量的に解析するとともに、②インターフェロン産生を惹起することが知られている VA-RNA を欠損させた改良型アデノウイルスベクターを開発し、その遺伝子導入特性を解析した。

A. 研究目的

制限増殖型アデノウイルス (Ad) を含め、遺伝子組換え Ad ベクターは、高い遺伝子導入効率 (感染効率) を示すこと、比較的大きな外来遺伝子を搭載可能であること、高タイトーのウイルスを調製可能であることなど、多くの長所を有していることから、革新的がん治療薬として期待されている。しかし、Ad ベクターの問題点の一つとして、生体投与後、強い免疫応答を誘導することが明らかとなってきた。すなわち、Ad ベクターによって強い炎症応答および獲得免疫が誘導されることによって、遺伝子発現細胞が除去され、遺伝子発現が一過性になってしまう。

一方で、近年、Ad ベクターによる強い免疫応答ががん治療などにおいては、むしろ有利に働くことが明らかとなってきた。従って、治療目的に応じて Ad ベクターによる免疫応答を制御することが望ましい。そのためには、Ad ベクターによる免疫応答誘導機構を解明する必要がある。そこで Ad ベクターによる免疫応答誘導機構の解明に向けて、本年度は①Ad ベクター感染後の Ad 遺伝子の非特異的な発現の解析、ならびに②VA-RNA による自然免疫応答の解析のための VA-RNA 欠損 Ad ベクターの開発を行った。

B. 研究方法

B-1. Ad ベクターの作製

Ad ベクタープラスミドの作製は improved *in vitro* ライゲーション法により行った。作製した Ad ベクタープラスミドを Pac I で消化し、

SuperFect (Qiagen) を用いて 293 細胞にトランスフェクトすることにより、Ad ベクターを得た。常法により Ad ベクターの増殖・精製を行い、精製したベクターの物理学的力価は分光学的方法により測定した。また、Adeno-X Rapid Titer Kit (Clontech) を用いて生物学的力価を測定した。

B-2. Ad 遺伝子の発現解析

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 (Multiplicity of infection) 10 および 100 で 1 時間作用させた。その後新鮮培地に交換し、2, 6, 12, 24, 48, 72, 96 時間後の Total RNA を回収した。Total RNA を逆転写後、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) などの各 Ad 遺伝子の発現量を解析した。なお、使用したプライマーおよびプローブの配列は以下の通りである。E1B forward: 5'-GAC AGG GCC TCT CAG ATG CT-3'; E1B reverse: 5'-TGG CTA CGT GAA TGG TCT TCA G-3'; E1B probe: FAM-ACC TGC TCG GAC GGC AAC TGT CA-TAMRA; E2A forward: 5'-CAC TAC GGT GCG AGT GCA A-3'; E2A reverse: 5'-GGT AGC TGC CTT CCC AAA AAG-3'; E2A probe: FAM-TCA AAG CCT GGG CAC GCG C-TAMRA; E2B forward: 5'-ACG CGC TAC CCG TAG AAA AG-3'; E2B reverse: 5'-CGG TAA GAG CCT AGC ATG TAG AAC T-3'; E2B probe: FAM-TGC GCC TAC CAG GCC GTC AAC-TAMRA; hexon forward: 5'-ACG ATG ACA ACG AAG ACG AAG TAG -3';

hexon reverse: 5'-GGC GCC TGC CCA AAT AC-3'; hexon probe: FAM-CGA GCA AGC TGA GCA GCA AAA AAC TCA -TAMRA; E4 forward: 5'-GGG ATC GTC TAC CTC CTT TTG A-3'; E4 reverse: 5'-GGG CAG CAG CGG ATG AT-3'; E4 probe: FAM-ACA GAA ACC CGC GCT ACC ATA CTG GAG-TAMRA (Note that these E4 primer and probe are complementary to E4 orf6 and orf6/7); penton base forward: 5'-GGC CGT CTA CTC CCA ACT CA-3'; penton base reverse: 5'-TCT CGG GAA AGC GAT TGA AC-3'; penton base probe: FAM-CCG CCA GTT TAC CTC TCT GAC CCA CG-TAMRA; fiber forward: 5'-GCG CCT ATC CGA ACC TCT AGT-3'; fiber reverse: 5'-AGA GGC CGT TGC CCA TTT-3'; fiber probe: FAM- ACC TCC AAT GGC ATG CTT GCG C-TAMRA; pIX forward: 5'-GCC CGC GGG ATT GTG-3'; pIX reverse: 5'-CGG GAA GCT GCA CTG CTT-3'; pIX probe: FAM-CTG ACT TTG CTT TCC TGA GCC CGC TT-TAMRA; luciferase forward: 5'-TCC TAT GAT TAT GTC CGG TTA TGT AAA-3'; luciferase reverse: 5'-TGT AGC CAT CCA TCC TTG TCA A-3'; luciferase probe: FAM-AAT CCG GAA GCG ACC AAC GCC-TAMRA; GAPDH forward: 5'-GGT GGT CTC CTC TGA CTT CAA CA-3'; GAPDH reverse: 5'-GTG GTC GTT GAG GGC AAT G-3'; GAPDH probe: FAM-CAC TCC TCC ACC TTT GAC GCT GGG-TAMRA.

B-3. VA-RNAs 欠損 Ad ベクタープラスミドの構築

VA-RNAs コード領域を欠損させた Ad ベクターは、E1 欠損領域に外来遺伝子を挿入できるベクタープラスミド pAdHM4 を元に、VA-RNA I 及び VA-RNA II 遺伝子の内部プロモーター領域の一部分を欠損させた VA-RNAs コード配列を含む配列及び VA-RNAs コード配列の近傍で線状化した pAdHM4 をエレクトロポレーションによって大腸菌 BJ5183 株 (Qbiogene 社) に共導入し、相同組換えを生じさせることで VA-RNAs 欠損 Ad ベクタープラスミド pAdHM4 Δ VR を得た。なお、本研究では、作製した各ベクターに蛍光タンパク質である GFP の発現カセットを搭載し、Ad ベクターの産生、増幅、および遺伝子導入用ベクターとしての能力を評価できるように設計した。

B-4. VA-RNA I 発現細胞の作製

テトラサイクリン依存性ヒト H1 プロモーターの制御下で VA-RNA I を発現するカセットを含む VA-RNA I 発現制御用レンチウイルスベクター (LV-H1tet0-VRI-ERP) を作製し、HEK293 細胞に導入し、ドキシサイクリン (doxycycline, DOX) にて VA-RNA I を発現誘導することが可能な細胞を作製した。作製した細胞を VA293 細胞と呼ぶこととした。

B-5. VA-RNAs および GFP 遺伝子の発現確認

VA-RNAs は、常法に従いノザンプロット法により確認した。GFP の発現は、蛍光顕微鏡下での観察、あるいはフローサイトメトリーにより解析した。

B-6. Ad Δ VR ベクター増幅の確認

増幅した Ad Δ VR ベクターの VA-RNAs をコードする DNA 配列の近傍を PCR 法により増幅した。その増幅産物を制限酵素 RsrII により処理し、Ad Δ VR ベクターと従来型 (FG: first generation) の Ad ベクター (FG-Ad ベクター) を確認した。Ad Δ VR ベクターは、VA-RNA II 遺伝子内の制限酵素 RsrII の認識部位の一部を欠損しているため、理論上、制限酵素 RsrII では消化されない。増幅された各ベクターについて、2%アガロースゲルにより電気泳動を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、分担研究者が所属する研究施設の各種委員会の承認を得た上で実施している。なお本研究においては、公知の細胞株以外のヒト由来の試料は使用していない。

C. 研究結果

C-1. Ad 遺伝子の非特異的な発現解析

本研究では、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 (Figure 1, 2)。WI38 細胞では、Ad 遺伝子のうち、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。pIX 遺伝子の発現が感染 72 もしくは 96 時間後に最大値を示したのに対し、E4 遺伝子については 24 時間後に最大値を示した。なお、E4 ならびに pIX 遺伝子の発現量は CMV プロモーターによって転写されているルシフェラーゼ遺伝子の mRNA 量と比較すると、それぞれ約 60~600 倍低いものであった。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たが、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。なお、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を示した。しかし全体的には、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。

C-2. VA-RNA 欠損アデノウイルスベクターの作成

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 pAdHM4 ΔVR-CMVGFP を構築した。常法に従いウイルスゲノム末端に存在する制限酵素 PacI で切断して線状化し、トランスフェクション試薬 SuperFect™ (Qiagen 社) を用いて HEK293 細胞へトランスフェクションした。対照として、従来型の FG-Ad ベクタープラスミド pAdHM4-CMVGFP を同手法によりトランスフェクションした。しかし、通常 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 (AdΔVR ベクター) が増幅しないことが明らかとなった。

次に、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、AdΔVR ベクターの産生を試みた (Figure 3A)。AdΔVR ベクタープラスミドを常法に従い VR293 細胞にトランスフェクションした後に 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 AdΔVR ベクターが増幅することが確認された (Figure 3B)。また、作製したベクターに搭載した外来遺伝子 (GFP) の発現量を比較することで遺伝子導入ベクターとしての能力を比較したところ、AdΔVR ベクターが FG-Ad ベクターと同等の遺伝子導入効率を示すことが確認された (Figure 4)。

D. 考察

当該事業年度は、Ad ベクター作用後の Ad 遺伝子の非特異的な発現に関して、定量的 RT-PCR により解析した。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。

E. 結論

- 1) 非増殖型 Ad ベクター作用後の Ad 遺伝子の発現について、定量的 RT-PCR により解析した。その結果、E4、pIX、E2A 遺伝子が有意に発現することが明らかとなった。
- 2) 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。

G. 研究発表

●論文発表

1. 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)
2. 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: 285-9. (2011).
3. 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).

●学会発表

1. 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)
2. Kahori Shimizu, Fuminori Sakurai, Masashi Tachibana, Hiroyuki 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
3. 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
4. Kahori Shimizu, Fuminori Sakurai, Kazufumi Katayama, Hiroyuki 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
5. Mitsuhiro Machitani, Kazufumi Katayama, Fuminori Sakurai, Hayato Matsui, Tomoko Yamaguchi, Takayuki Suzuki, Kenji Kawabata, Hiroyuki 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

6. 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
7. Mitsuhiro Machitani, Kazufumi Katayama, Fuminori Sakurai, Hayato Matsui, Tomoko Yamaguchi, Takayuki Suzuki, Hiroyuki Miyoshi, Kenji Kawabata, Hiroyuki 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

G. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し。

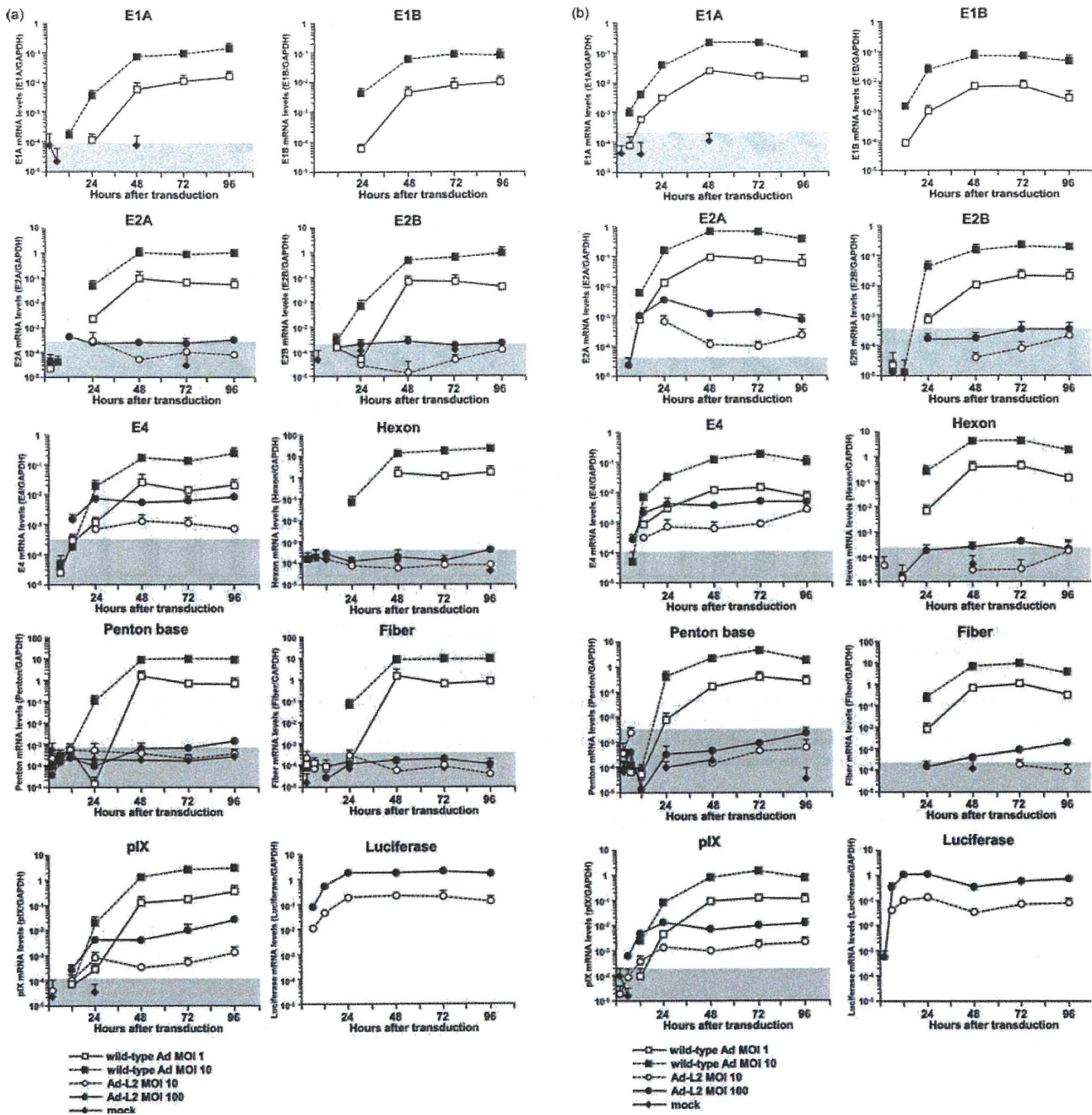


Figure 1. Time course profiles of Ad gene expression in WI38 and SK HEP-1 cells following transduction with a replication-incompetent Ad vector. WI38 (a) and SK HEP-1 (b) cells were transduced with Ad-L2 at MOIs of 10 (○) and 100 (●), with a wild-type Ad at MOIs of 1 (□) and 10 (■), or mock-transduced (◆) for 1 h, and the Ad gene expression levels were determined 2, 6, 12, 24, 72, and 96 h after transduction as described in the Experimental Section. The gray shaded boxes mean mRNA levels with no significant differences between gene expression in cells transduced with Ad-L2 and mock-transduced cells ($p > 0.05$). Expression of E1B and luciferase gene was undetectable by real-time RT-PCR analysis in mock-transduced cells. The data are expressed as the mean values \pm SD ($n = 3-4$).

Shimizu et al, *Mol. Pharm.*, 8; 1430-1435 (2011)より抜粋

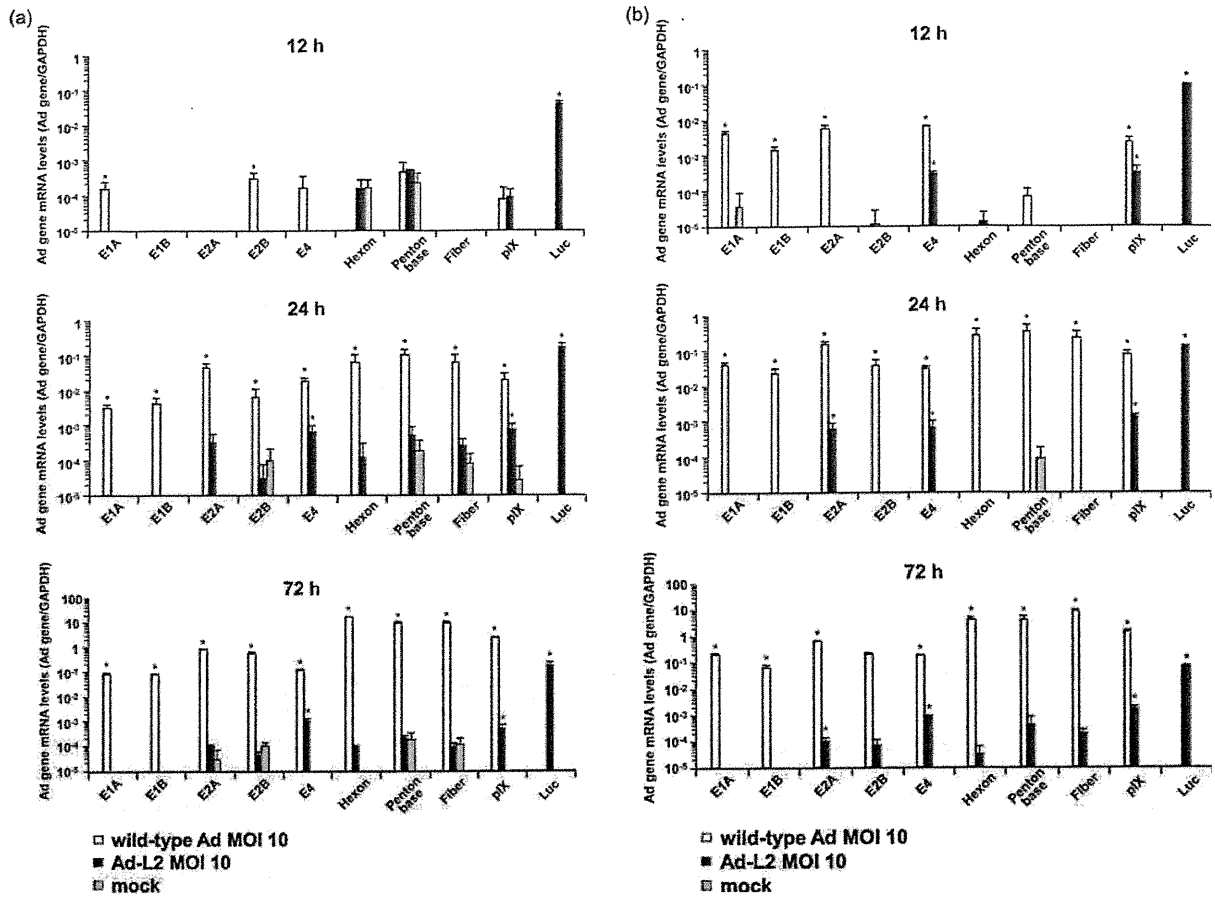


Figure 2. Comparison of Ad gene expression levels between a replication-incompetent Ad vector and a wild-type Ad at MOI 10. WI38 (a) and SK HEP-1 cells (b) were transduced with Ad-L2 (closed bar), the wild-type Ad at a MOI of 10 (open bar), or mock (gray bar), and the Ad gene expression levels were determined 12, 24, and 72 h after transduction as described in the Experimental Section. Significant difference, * $p < 0.05$ compared with mock-transduced cells. The data are expressed as the mean values \pm SD ($n = 3-4$).

Shimizu et al, *Mol. Pharm.*, 8; 1430-1435 (2011)より抜粋

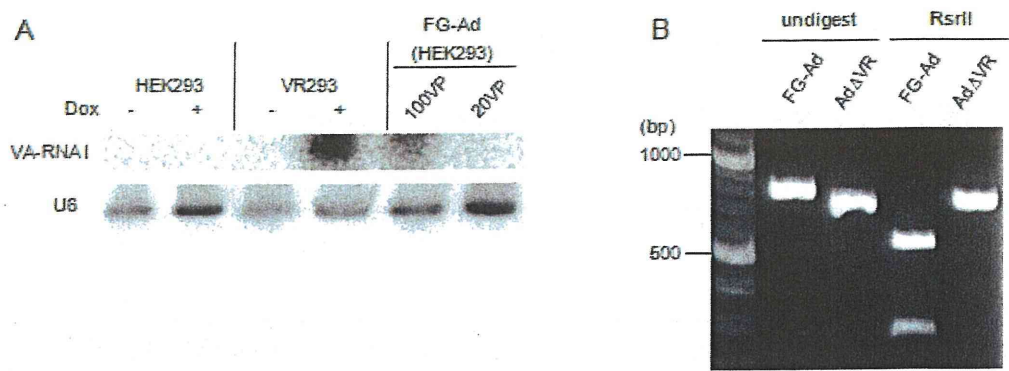


Figure 3. HEK293 cells inducibly expressing VA-RNA I allowed the generation and propagation of AdΔVR vector.

(A) Northern blot analysis for the expression and induction levels of VARNAs I in VR293 cells. HEK293 and VR293 cells were cultured with Dox-containing medium (Dox +; 50 ng/ml) or normal medium (Dox -) for 48 h. As a positive control, HEK293 cells were transduced with a FG-Ad vector (FG-Ad-GFP; 100 or 20 VP per cell) and cultured for 24 h. Expression levels of human U6 were detected as an internal control. (B) A PCR based analysis to confirm the propagation of AdΔVR vector. The sequences corresponding to VA-RNAs coding region were amplified with the DNA samples which were purified from the cells transduced with FG-Ad-GFP or AdΔVR-GFP. The PCR-amplicons were digested by *Rsr*II and loaded on a 2 % agarose gel.

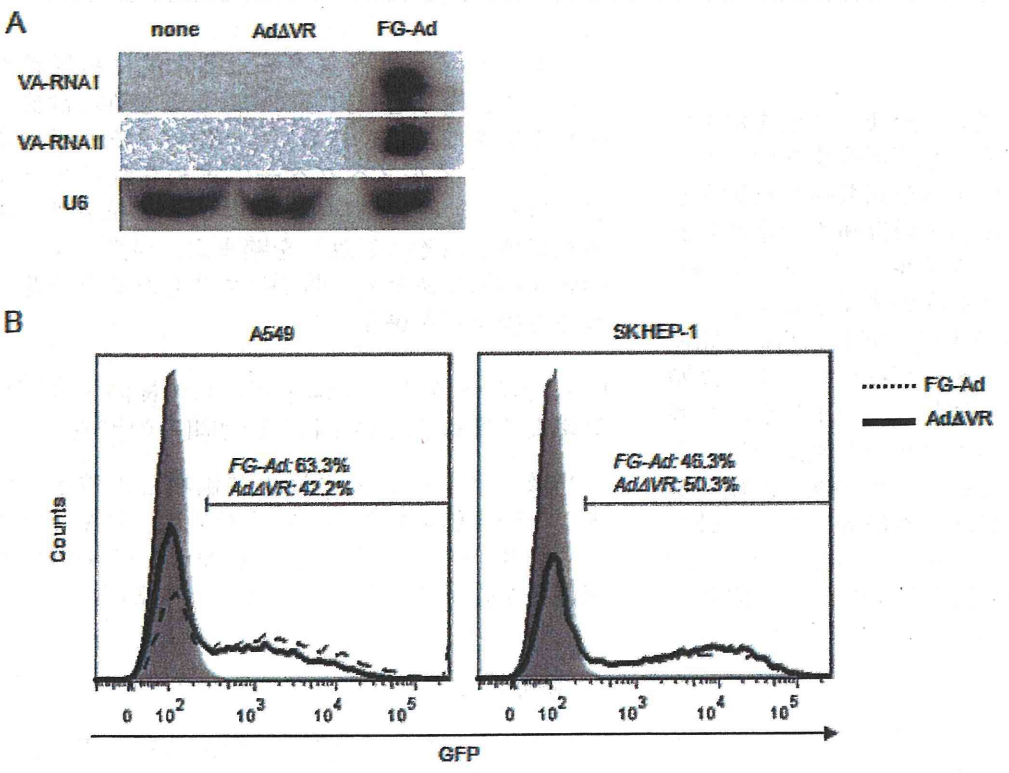


Figure 4. AdΔVR-GFP showed efficient transduction in human cultured cell lines.

(A) VARNAs I expression in the cells transduced with Ad vectors. HEK293 cells were transduced with FG-Ad-GFP or AdΔVR-GFP at 0.1 MOI and then cultured for 24 h. Expression levels of VA-RNA I and VA-RNA II were determined by Northern blot analysis. (B) Comparison of the transduction efficiency of FG-Ad and AdΔVR vectors. A549 or SKHEP1 cells were transduced with FG-Ad-GFP (dashed line) or AdΔVR-GFP (solid line) at 5 MOI and culred for 24 h. The gray region represents no transduced cells. These experiments were repeated at least three times, and representative data are shown.

標的ベクターの臨床面からの検討と評価

研究分担者 水野 正明 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・准教授

本研究は、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、その安全性や有効性について臨床面から評価する仕組みを構築することを目的としている。分担研究者の所属する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は、我が国初の遺伝子治療用製剤を純国産技術で開発した実績を持っており、この実績とノウハウをもって上記目的を達成する。腫瘍標的型アデノウイルスベクターの仕様については、現在、本研究班内で別途腫瘍細胞標的リガンドの探索や腫瘍特異的プロモータの検討が加えられていることから、当該ベクターの最終仕様はまだ決まっていない。そこで本年度は、当該ベクターの最終仕様を予測した上での安全性及び有効性評価の在り方並びにそれらを実施するための基盤研究を開始した。具体的には、当該ベクターの安全性の評価項目の選定に続き、その評価を効率よく行うための新しい仕組みとして、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（Design Buildup Team (DBT)）を提案した。

A. 研究目的

本研究では、分担研究者の所属する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、我が国初の遺伝子治療用製剤を純国産技術で開発した実績を元に、本研究班内で進められている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。なお、本研究では、当該ベクターの臨床応用を直接目指すものではなく、創薬基盤作りの一環として類似のベクター開発にも役立つ普遍的な仕組み作りをスコープとした。

B. 研究方法

B-1. 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の選定

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。

B-2. 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の選定

アデノウイルスベクターは基本的に抗原性が高いため、繰り返し投与における安全性の評価は極めて重要である。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。

B-3. 当該ベクターの臨床面からの検討と評価を効率よく進めるための新しい仕組みの提案

当該ベクターの安全性の評価項目の選定に続き、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を加えた。

C. 研究結果

C-1. 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の選定

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。なお、評価を行う動物等の種類は、対象疾患でも異なるため、評価項目だけを表1に示した。

表1 現時点で当該ベクターに必要とされる基本的評価項目の一覧

- ・ 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

C-2. 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の選定

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。そこで本研究では、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。また、腫瘍細胞標的リガンドの抗原性の検討は、リガンドの同定を待つ新ためて検討するが、先に開発した上記方法を理論的には活用できるものと考えている。

C-3. 当該ベクターの臨床面からの検討と評価を効率よく進めるための新しい仕組みの提案

これまで行われてきた検討と評価は、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。しかしながら、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、当該ベクター開発当初から、基礎研究者に加え、病院内からは臨床研究に携わる医師、看護師、薬剤師等が、病院外からは他の大学人、企業人、弁理士等がそれぞれ連携したDesign Buildup Team (DBT)を組織し、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とし、そのコンセプトを提案した。

D. 考察

本年度は、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。そして、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 (DBT)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。

E. 結論

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、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。そして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 (DBT)の組織化を提案し、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

●論文発表

1. 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
2. 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

●学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Narumi K, <u>Aoki K.</u>	Combination of immune gene therapy with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation against solid cancers.	J-Y. Kwak and J-Y. Han.	Cellular and Genetic Practices for Translational Medicine	Research Signpost	Kerala, India	2011	227-246
<u>Tagawa, M.</u> , Tada, Y., Hiroshima, K. and Shimada, H.	Type III interferon family-mediated anti-tumor responses through multiple mechanisms.	Jong-Young Kwak and Jin-Yeong Han.	Cellular and genetic practices for translational medicine.	Research Signpost	Kerala, India.	2011	247-260
Fukamachi, T., Saito, H., <u>Tagawa, M.</u> and Kobayashi, H.	The impact of extracellular low pH on the anti-tumor efficacy against mesothelioma.	Zubritsky, A	Mesothelioma-synonyms and definition, epidemiology, etiology, pathogenesis, cyto-histopathological features, clinic, diagnosis, treatment, prognosis.	InTech	Rijeka, Croatia	2012	187-210
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	古瀬 純司	膵・胆道癌FRONIER	メディカルレビュー社	大阪	2011	48-51
青木一教	遺伝子治療の進歩—がん	有賀 正	小児科診療	診断と治療社	東京	2012	115-119
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	谷 憲三郎	胆と膵	医学図書出版	東京	2011	117-121
谷島聡, <u>田川雅敏</u> , <u>田島英昭</u>	遺伝子治療 癌に対する遺伝子・ウイルス治療の現状	瀬戸 泰之	臨床外科	医学書院	東京	2011	272-275

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
K Narumi, T Udagawa, A Konoh, A Kobayashi, H Hara, Y Ikarashi, S Ohnami, F Takeshita, T Ochiya, T Okada, M Yamagishi, T Yoshida and <u>K Aoki</u>	<i>In vivo</i> delivery of interferon- α gene enhances tumor immunity and suppresses immunotolerance in reconstituted lymphopenic hosts	Gene Ther	19	34-48	2012
Udagawa T, Narumi K, Goto N, Aida K, Suzuki K, Makimoto A, Ochiya T, Yoshida T, Chikaraishi T, <u>Aoki K.</u>	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
T. Yamazaki, <u>K. Aoki</u> , Y Heike, SW, Kim, T. Ochiya, T. Wakeda, RM. Hoffman, Y. Takaue, H. Nakagama and Y. Ikarashi.	Real-time <i>in vivo</i> cellular imaging of graft-versus-host disease and its reaction to immunomodulatory reagents.	Immunol Lett	144	33-40	2012
Miura Y, Yamazaki S, Julia D, Brown E, <u>Aoki K</u> , 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
Kitamura, A., Matsushita, K., Takiguchi, Y., Shimada, H., Tada, Y., Yamana, M., Hiroshima, K., <u>Tagawa, M.</u> , Tomonaga, T., Matsubara, H., Inoue, M., Hasegawa, M., Sato, Y., Levens, D., Tsumi, 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

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.				2011
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
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
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
Li, Q., Kawamura, K., Okamoto, S., Yamanaka, M., Yang, S., Yamauchi, S., Fukamachi, T., Kobayashi, H., Tada, Y., Takiguchi, Y., Tsumi, 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
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

Okamoto, S., Kawamura, K., Li, Q., Yamana, M., Yang, S., Fukamachi, T., Tada, Y., Tsumi, T., Shimada, H., Hiroshima, K., Kobayashi, H. and <u>Tagawa, M.</u>	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
Nagakawa, H., Shimozato, O., Yu, L., Wada, A., Kawamura, K., Li, Q., Chada, S., Tada, Y., Takiguchi, Y., Tatsumi, K. and <u>Tagawa, M.</u>	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
Takahashi, S., Kato, K., Nakamura, K., Nakano, R., Kubota, K., and <u>Hamada, H.</u>	Neural cell adhesion molecule 2 as a target molecule for prostate and breast cancer gene therapy.	Cancer Sci.	102	808-814	2011	
Takenouchi, M., Hirai, S., Sakuragi, N., Yagita, H., <u>Hamada, H.</u> , and 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	
Wang, H., Sato, M., Chen, G. P., Li, D.C., <u>Hamada, H.</u> , and Arai, Y.	E1A, E1B double-restricted adenovirus enhances the cytotoxicity and antitumor activity of gemcitabine to renal cell carcinoma.	Chin Med J (Engl).	124	1082-1087	2011	
Kawashima, R., Abei, M., Fukuda, K., Nakamura, K., Murata, T., Wakayama, M., Seo, E., Hasegawa, N., Mizuguchi, H., Obata, Y., Hyodo, I., <u>Hamada, H.</u> , and Yokoyama, K.K.	EpCAM- and EGFR-targeted selective gene therapy for biliary cancers using Z33-fiber-modified adenovirus.	Int J Cancer	129	1244-1253	2011	