

201118047A

別紙 1

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

独自m-CRAベクターによる癌幹細胞の同定・標的治療技術の開発
と革新的な遺伝子治療の実現

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小賤 健一郎

平成24(2012)年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
研究総括	-----1
小賤 健一郎	
II. 分担研究報告	
1. 幹細胞と分子生物学的解析、形態学的解析	-----6
三井 薫、前菌 理恵	
2. がん幹細胞の単離と機能解析	-----10
小宮 節郎、瀬戸口 啓夫	
3. 細胞生物学的解析	-----12
坂本 泰二	
4. 癌幹細胞の分離とm-CRAの治療効果の検討	-----16
夏越 祥次	
5. ウイルスベクターの簡便な濃縮法の開発	-----18
隅田 泰生	
6. 幹細胞生物学での技術開発と解析	-----23
國貞 隆弘	
7. 人工グリオーマ幹細胞を用いた癌幹細胞制御機構の解明	-----25
近藤 亨	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

研究総括

研究代表者 小賤 健一郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究要旨

独自開発の m-CRA（多因子で癌特異化する増殖制御型アデノウイルスベクター）作製技術を基盤に、独創的な癌幹細胞の同定・標的治療技術の開発を目的としている。分担研究者の癌幹細胞と癌悪性化に関するオリジナルの研究成果を主任研究者らの m-CRA ベクターに応用し、また糖鎖技術からのベクター技術の改良開発という連携した研究体制で、研究成果を上げてきた。

1. 臨床化を目指している Survivin 反応性 m-CRA (Surv.m-CRA) は、癌幹細胞分画も効率よく治療できるという成果を、さらに本年度、in vivo 実証も含め詳細に確認した。
2. 新たな癌特異化機構に基づく新型 m-CRA を開発した。その科学的な癌特異化実証を進めた。
3. アデノウイルス E1B プロモーターの m-CRA の置換の意義を明確にした。
4. アデノウイルスによる、ヒト幹細胞の未分化状態での適切なプロモーターを同定し、さらに新たな高効率の遺伝子導入法を確立した。
5. m-CRAに搭載する新たな血管新生阻害因子のCD9を見出し、そのin vivo効果まで実証した。
6. ウイルスベクターによる新たな癌幹細胞単離技術の preliminary な研究を行った。
7. Hedgehog シグナルが骨軟部の腫瘍化・増殖に重要で、Sarcoma-initiating cell の機能に関与しているという成果が得られた
8. マウス人工グリオーマ幹細胞の解析から抽出した候補因子群のヒトグリオーマでの働きを検討するために様々なヒトグリオーマ幹細胞株の樹立を試み、グリオブラストーマ (GBM)、オリゴデンドログリオーマ、アストロサイトーマから複数の腫瘍形成能を保持した癌幹細胞株の樹立に成功した。
9. クエン酸 (DS25-cGNP)、NaBH₄ (DS25-bGNP) のナノ粒子の、ウイルスのスパイクタンパク質への結合が確認された。これらナノ粒子でウイルスの濃縮効率を上昇できた。さらに各種糖鎖のウイルスベクターへの結合性を明らかにした。
10. 親知らずの歯髄幹細胞(DPSC)バンクより、本年度は2ラインの HLA ハプロタイプホモ DPSC から、エピゾーマルプラスミドや、センダイウイルスベクターを用いて、染色体への遺伝子挿入がない iPS 細胞を誘導する事ができる事を確認した。また、低酸素培養によって iPS 細胞誘導効率も高くなるという結果を得た。低分子量の硫酸化デキストランの糖鎖を固定化したナノ粒子を用いて、簡便かつ高効率のウイルスベクターの濃縮技術を開発した。
11. 微小癌細胞、循環癌細胞(CTC)の検出のため、リンパ節および循環血液中における癌細胞検出と、微小癌細胞の生着および増殖能の評価を、動物モデルを用いて確立した。さらに T 細胞の免疫応答の観点より、B7-H3、B7-H4 の末梢血中での発現は同時に CTC の存在を反映し、予後予測因子となりうることを見出した。

三井 薫	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・講師
前菌 理恵	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・助教
小宮 節郎	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授
瀬戸口啓夫	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・助教
坂本 泰二	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授
夏越 祥次	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授
隅田 泰生	鹿児島大学大学院理工学研究科・教授
國貞 隆弘	岐阜大学医学系研究科・教授
近藤 亨	北海道大学遺伝子病制御研究所・教授

A. 研究目的

独自開発の「多因子での癌特異的増殖制御型アデノウイルス」(m-CRA)技術を基盤に、厚労科研(三次がん一期)で「既存技術を治療効果と安全性能で大きく凌ぐ Survivin 依存性 m-CRA (Surv.m-CRA)の開発」等、同(二期)で「癌幹細胞治療への Surv.m-CRA の応用」等の成果を上げてきた。これを踏まえて本研究の主な目的は以下である。

- ① Surv.m-CRA の臨床化実現
- ② m-CRA と癌幹細胞のオリジナルの基盤技術の開発
- ③ 「癌幹細胞への分化誘導による悪性化除去」の新規遺伝子治療法戦略の開発
- ④ 癌幹細胞を真に同定し標的治療できる完全オリジナルの m-CRA ベクターの開発

B. 研究方法

* 基本的には前年度と同様の研究の発展である。下記に主な方法を記載し、各研究者の報告に詳細を記す。

- ① Surv.m-CRAの臨床応用(小賤研究室)
三次がん(一～二期)で開発した Surv.m-CRAの臨床試験の実現を目指す。申請用の前臨床試験のデータ収集、IND申請書を完成し、実績を持つ米国協力施設とも協力して臨床試験I相の実行を目指す。
- ② m-CRAと癌幹細胞のオリジナルの基盤技術の開発

- (i) X分子依存性m-CRA(X.m-CRA)の開発(小賤研究室)：癌で高発現するX分子に注目して開発して基本性能まで確認したX.m-CRAを、臨床応用化の有用性を検証していく。
- (ii) CD9 shRNA m-CRA癌治療(坂本、小賤研究室)：不妊の作用以外には機能未知だったY分子が、血管新生作用に必須の分子であることを見出した。Y shRNA搭載のSurv.m-CRA等で新規治療法を開発する。
- (iii) 癌幹細胞分離技術の開発：グリオーマ(近藤、國貞)と横紋筋肉腫(瀬戸口)の幹細胞分離法を確立している。さらに新規マーカーや、その分子メカニズムを解明し、治療法開発に繋げる。またこれらの成果を新規のm-CRA癌治療にも応用開発していく。
- (iv) 糖鎖ナノテクノロジーによる新技術(隅田)：分離濃縮した癌幹細胞の糖鎖チップ解析で癌幹細胞特異化の表面分子を見だし、ウイルス濃縮法を確立する。最終的にはm-CRAのターゲット技術に応用する。

- ③ 「癌幹細胞への分化誘導により悪性化除去」という新たな遺伝子治療法戦略の開発(近藤、小賤)

ある分子の強発現で癌幹細胞の腫瘍形成能を阻止できることを見いだした。これを新たな遺伝子治療に応用する。

- ④ 癌幹細胞を真に同定し標的治療できる完全オリジナルのm-CRAベクターの開発

癌幹細胞を標的する候補プロモーターでウイルス増殖制御されるm-CRAを開発し、癌幹細胞へのターゲット治療効果を検証する。

- ⑤ 癌と正常幹細胞からの新規標的機構と分子の解明

癌幹細胞だけでなく、正常幹細胞であるES/iPS細胞から、癌幹細胞の生物学的メカニズムを解明していく。その成果を最終的に治療法開発に応用する。

C. 研究結果

独自開発の m-CRA (多因子で癌特異化する増殖制御型アデノウイルスベクター) 作製技術を基盤に、独創的な癌幹細胞の同定、標的治療技術の開発を目的としている。分担研究者の癌幹細胞と癌悪性化に関するオリジナルの研究成果を主任研

研究者らの m-CRA ベクターに応用し、また糖鎖技術からのベクター技術の改良開発という連携した研究体制で、以下の成果を上げてきた。

- 1) まず、厚生労働科研等にて基盤技術ならび医薬として独自開発し臨床化を目指している Survivin 反応性 m-CRA (Surv.m-CRA) (米国特許成立・取得：特許 1、2) の、癌幹細胞に対する治療効果を確証した。具体的には、複数のモデルで CD133 陽性分画の癌幹細胞分画、さらには本研究グループ(瀬戸口、小宮ら)が同定した Fibroblast growth factor receptor 3(FGFR3)陽性分画のヒト横紋筋肉腫の Sarcom-initiating cell に、Surv.m-CRA は陰性分画と同等かそれ以上の治療効果を示すことを確証できた。従来の治療法(抗癌剤、放射線など)は悪性化の高い癌細胞(癌幹細胞)では治療効果が無効になるのとは逆のベクトルで、Surv.m-CRA は全分画に治療効果があるだけでなく、「悪性化が増せばむしろ治療効果が増加する」という結果は従来の治療法に比した臨床的な優位性として貴重な成果である。
- 2) アデノウイルス E1B プロモーターを組織特異的プロモーターに置換した改良型 Surv.m-CRA が同等の治療効果を持ったまま癌特異性を増強できること(よって上記の癌幹細胞の特異標的化への応用を示唆)を確証した(発表論文 4)。
- 3) Surv.m-CRA に続く第二弾 m-CRA は国際出願にて知財確保した(特許出願 2)。
- 4) m-CRA に搭載する新たな血管新生阻害因子の膜蛋白 CD9 を見出し in vivo での治療効果まで確証した(発表論文 5)。
- 5) これまでの癌幹細胞の分離濃縮法はマーカー膜蛋白や Sphere 法が中心だが、癌幹細胞同定の特異性が低いこと、単離レベルではないことである。ウイルスベクターを活用した全く新たな癌幹細胞同定・単離法の開発を進め、Preliminary study にて有望な成果を得ている。
- 6) Hedgehog 関連遺伝子が骨軟部肉腫で亢進し、下流の GLI の転写が亢進していること、GLI2 の強制発現で間葉系幹細胞の増殖促進がみられることを見出した。つまり Hedgehog シグナルが骨軟部の腫瘍化・増殖に重要で、Sarcoma-initiating cell の機能に関与しているという成果が得られた。この成果を基に、骨軟部肉腫に対する癌幹細胞特異的治療法の開発を試みている。
- 7) 癌幹細胞の精製は未だ難しいため、本研究グループの近藤は、試験管内で人工癌幹細胞を作製し、その性状解析から新規治療標的的同

定を試みている。本年度は、マウス人工グリオーマ幹細胞の解析から抽出した候補因子群のヒトグリオーマでの働きを検討するために様々なヒトグリオーマ幹細胞株の樹立を試み、グリオブラストーマ (GBM)、オリゴデンドログリオーマ、アストロサイトーマから複数の腫瘍形成能を保持した癌幹細胞株の樹立に成功した。樹立したヒトグリオーマ幹細胞株は、免疫不全マウスの脳内への移植によりヒト腫瘍と類似した病理所見を有する腫瘍を形成することが判明した。現在までに、ヒト GBM から多くの細胞株が樹立されているが、免疫不全マウス脳内への移植により本来の腫瘍と類似した病理所見を有する腫瘍を形成する細胞株は少ない。加えて AO と DA から腫瘍形成能を保持した細胞株を樹立できた報告は皆無であり、本研究結果が世界初と考えられる。今後他のヒトグリオーマ組織から腫瘍形成能を保持したグリオーマ幹細胞株を樹立し、これらの性状解析、真の治療標的の同定、薬剤のスクリーニング、さらには本 m-CRA 技術による新規治療薬の創出を目指す。

- 8) 癌と正常の幹細胞の共通点と相違点からの分子機構解明という観点からも、研究を進めてきた(國貞)。親知らずの歯髄幹細胞(DPSC)バンクより、本年度は 2 ラインの HLA ハプロタイプホモ DPSC から、エピゾーマルプラスミドや、センダイウイルスベクターを用いて、染色体への遺伝子挿入がない iPS 細胞を誘導する事ができる事を確認した。また昨年度高齢者の歯髄から低酸素下で初代培養を行うことにより効率的に DPSC を樹立できることを発見したことに続き、低酸素培養によって iPS 細胞誘導効率も高くなるという結果を得た。これらの結果より、iPS 細胞樹立に低酸素培養法が有益であることが示された。今後、m-CRA ベクターの有効性や安全性を患者個人の様々な細胞を用いて検討する際の細胞のソースとして患者と同様の遺伝的バックグラウンドを持つ iPS 細胞から分化誘導した細胞を用いることで、m-CRA ベクターを用いたガン遺伝子治療に貢献することが可能と思われる。
- 9) ウイルスベクターが結合する糖鎖を推定し、その糖鎖を固定化したナノ粒子を用いて、アデノウイルスベクターの高効率かつ簡便な濃縮法を開発している(隅田)。クエン酸(DS25-cGNP)、NaBH₄(DS25-bGNP)のナノ粒子の、ウイルスのスパイクタンパク質への結合が確認された。これらナノ粒子でウイルスの濃縮効率を上昇できた。さらにウイルスベクターの糖鎖結合性を、47 種類の糖鎖

を固定化したシュガーチップで再度調べ、ナノ粒子でウイルス濃縮の目的に最適な糖鎖の同定において、各種糖鎖の結合性を明らかにした。本法はウイルスベクター濃縮法として有用であり、さらに本法を遺伝子が導入されたウイルスベクターのみを選択的に濃縮するようなシステムを構築可能にすることも検討していく。

- 1 0) m-CRA が最終的に治療標的とする微小癌細胞、循環癌細胞(CTC)の検出のため、リンパ節および循環血液中における癌細胞検出と、微小癌細胞の生着および増殖能の評価を、動物モデルを用いて確立した。さらに T 細胞の免疫応答の観点より、B7-H3、B7-H4 の末梢血中での発現は同時に CTC の存在を反映し、予後予測因子となりうることを見出した。

D. 考察

各研究項目に関する意義と発展性は各研究者の項に記載した。

本プロジェクトは、癌幹細胞を標的治療する m-CRAを開発するという最終的な目標に向かって、連携して研究を進める体制であり、上記1)の FGFR3陽性の癌幹細胞へのSurv.m-CRA治療などは、マーカーの発見から治療法確立まで本グループでの連携の成果の実例で、よって全て完全オリジナルでもある。

来年度は癌幹細胞とベクターに関する各項目の成果をさらに有機的に融合し、m-CRA技術での癌幹細胞治療法開発という最終目標に達する共同研究を、強力に進める予定である。

E. 結論

前年度から本年度にかけて、主任研究者ならびに分担研究者が夫々成果を出すとともに、また連携した共同研究成果も幾つかでているところである。計画通りに進んでいるが、さらに連携をはかり、研究を進める。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表 (主任研究者分のみ)

1.論文発表

1. Okabe Y, Takahashi T, Mitsumasu C, Kosai K, MD, Tanaka E, Matsuishi T.: Alterations of Gene Expression and Glutamate Clearance in Astrocytes

Derived from an MeCP2-null Mouse Model of Rett Syndrome. *PLoS ONE* 7(4):e35354, 2012

2. Hino S, Sakamoto A, Nagaoka K, Anan K, Wang Y, Mimasu S, Umehara T, Yokoyama S, Kosai K, and Nakao M.: FAD-dependent lysine-specific demethylase-1 regulates cellular energy expenditure. *Nat. Commun.* 3, doi:10.1038/ncomms1755 (Open journal) (2012)
3. Kamisasanuki T, Wang Y, Tokushige S, Terasaki H, Khai NC, Wang Y, Sakamoto T, Kosai K.; Targeting CD9 produces stimulus-independent antiangiogenic effects predominantly in activated endothelial cells during angiogenesis: A novel antiangiogenic therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16;413(1):128-35, 2011
4. Horikawa Y, Wang Y, Nagano S, Kamizono J, Ikeda M, Komiya S, Kosai K.:Assessment of an altered E1B promoter on the specificity and potency of triple-regulated conditionally replicating adenoviruses (CRA) –Implications for the generation of ideal m-CRAs. *Cancer Gene Ther* 18(10):724-33, 2011
5. Khai NC, Sakamoto K, Takamatsu H, Matsufuji H, Kosai K. : Recombinant soluble form of HB-EGF protein therapy drastically inhibits Fas-mediated fulminant hepatic failure: Implications in clinical application. *Hepatology Res.*41.594-596. 2011

2.学会発表

1. Kosai K, Sakamoto K, Khai NC, Wang Y, Maezono R, Tanoue K, Hideo T, Matsufuji H.: HB-EGF/HGF Hepatic Gene Therapy Effectively Inhibits Bile Duct Ligated Cholestatic Liver Injury In Mice In Their Different Therapeutic Modes. The American Society of Gene Therapy's 14h Annual Meeting, May 15-May 22, 2011 (Seattle, USA)
2. Sakamoto K, Khai NC, Wang Y, Maezono R, Tanoue K, Matsufuji H, Hideo T, Kosai K.: HB-EGF/HGF HEPATIC GENE THERAPY FOR BILE DUCT LIGATED CHOLESTATIC LIVER INJURY IN MICE: THEIR DIFFERENT AND/OR SYNERGIC THERAPEUTIC EFFECTS. (国内・口演) 第 17 回日本遺伝子治療学会 2011 年 7 月 15 日-17 日 (福岡)
3. Kosai K, Horikawa Y, Wang Y, Nagano S, Kamizono J, Ikeda M, Komiya S.: ASSESSMENT OF AN ALTERED E1B PROMOTER ON THE SPECIFICITY AND POTENCY OF TRIPLE-REGULATED CONDITIONALLY REPLICATING ADENOVIRUSES (CRA): A NEW INSIGHT TO GENERATE IDEAL m-CRAS. (国内・口演) 第 17 回日本遺伝子治療学会 2011 年 7 月 15 日-17 日 (福岡)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1) 特許取得

1. ヘパリン結合性上皮増殖因子様増殖因子の新規医薬用途
発明者：小賤健一郎、ニン・チン・カイ、高橋知之
出願人：鹿児島大学
【国内特許取得】 2011年10月14日（特許第4839476号）
2. サービビン(Survivin)プロモーターを含む増殖型ベクターを有効成分とする医薬
発明者：小賤健一郎、神囿純一、永野聡
出願人：小賤健一郎
【米国特許取得】（2011年11月8日）
(米国出願番号：US11/569,625／特許証発行中)
3. CD9 遺伝子からなる心疾患を予防又は治療する医薬
発明者：小賤健一郎、牛越博昭
出願人：財団法人 名古屋産業科学研究所（中部 TLO）
【国内特許取得】 2011年5月13日（特許第4736088号）
4. 増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法及びその作製用キット
発明者：小賤健一郎、永野聡
出願人：財団法人 名古屋産業科学研究所（中部 TLO）
【米国特許取得】 2011年10月11日（特許番号：US 8,034,589 B2）

出願人：鹿児島大学

国際出願：2012年3月29日

(PCT/JP/2012/58414)

2) 特許出願

1. ヒト ES/iPS 細胞における遺伝子発現方法
発明者：小賤健一郎、三井薫、高橋知之
出願人：鹿児島大学、久留米大学
国内出願：2012年5月23日
(特願 2012-117128)
2. 癌幹細胞を標的とするウイルスベクター
発明者：小賤健一郎、王宇清
出願人：鹿児島大学
国際出願：2012年3月23日
(PCT/JP2012/002031)
3. X を含む増殖制御型ウイルスベクター
発明者：小賤健一郎
出願人：鹿児島大学
国際出願：2011年9月29日
(PCT/JP2011/72357)
4. 幹細胞における腫瘍化原因細胞の除去方法
発明者：小賤健一郎、三井薫

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

幹細胞と分子生物学的解析
形態学的解析

研究分担者 三井 薫 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科（遺伝子治療・再生医学）・講師
研究分担者 前菌 理恵 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科（遺伝子治療・再生医学）・助教

研究要旨

癌と正常の幹細胞の共通点と相違点からの分子機構解明という観点からも、正常幹細胞においても研究を進めてきた。特にヒト ES 細胞および iPS 細胞では腫瘍化(奇形腫ならびに癌化)が起こることがよく知られており、ES/iPS 細胞の腫瘍化の解明や治療技術の解明は、癌幹細胞に対しても新しい展望を開くものと思われる。腫瘍化した ES 細胞や iPS 細胞の発現分子解析を元に、標的治療するベクターの開発も合わせて行ってきた。本年度もそれを多方面より進めてきたが、特にアデノウイルスベクターの感染、導入実験などを中心に報告する。

A.研究目的

癌細胞と ES/iPS 細胞とは多能性を持つこと、無限の増殖能をもつことなど、互いに共通する部分がある。たとえば分化細胞では非常に限定的に低レベルでの発現しかない TERT は、ほぼ全ての癌細胞で高発現しており、同様に未分化 ES/iPS 細胞にも高い発現があることが報告されている [Shuwen et al.(2007), Masaki et al(2007)]。本研究の目的は、ES/iPS 細胞の腫瘍化の解明から、癌幹細胞に対しても新しい治療ベクター開発へ応用することである。昨年度より、これらの癌関連分子の発現や、プロモーターの活性を、ES/iPS 細胞の未分化、分化状態での違いで調べてその可能性を調べてきたが、それらの研究を進める一方で、今年には特にアデノウイルスの感染、導入実験など基本的な技術の改良も行い、また癌幹細胞でも問題となるであろう、未分化と分化状態での適切な恒常的強発現プロモーターの選択なども行った。

B.研究方法

1) ヒト多能性幹細胞とマウス多能性幹細胞で、未分化、分化状態で異なる動態を示す恒常的強発現プロモーターの解明

昨年度、二つの癌特異的プロモーターについて、ES/iPS 細胞での未分化状態における活性動態は解析した。一方で、恒常的強発現プロモーターの、ヒト幹細胞の未分化状態での動態は、系統だって研究されていないため、代表的な3つのプロモーターにおいて、未分化状態のマウス、ヒトの ES 細胞、iPS 細胞について活性動態を調べた

2) アデノウイルスのヒト多能性幹細胞への効率的な感染・導入法の検討

アデノウイルスの受容体の CAR 遺伝子、ヒトとマウスの ES 細胞、ヒト iPS 細胞における遺伝子導入効率を調べた。またファイバー改変型アデノウイルスの有用性も検討した。さらにヒト ES 細胞、iPS 細胞（つまりマウスではない、ヒトの未分化な幹細胞）への効率的な感染、遺伝子導入法を開発した。

C.研究結果

1)-1. ヒトとマウスの ES 細胞に対するアデノウイルスベクターでの遺伝子導入

アデノウイルスベクターは E1 領域欠損の非増殖

型ベクターで、Promoter A(PA), Promoter B(PB), Promoter C(PC)の各プロモーターで LacZ 遺伝子を発現する Ad.PA-LacZ, Ad.PB-LacZ, Ad.PC-LacZ の 3 種類を用いた。各ウイルスベクターを 3×10^8 PFU/mL (PFU; plaque forming units, 感染力を持つウイルス数/1mL あたり) でヒトとマウスの ES 細胞に 1 時間感染後、X-gal 染色にて LacZ 遺伝子の発現を見た。結果は、Ad.PC-LacZ は、全ての種類の ES 細胞、ならびに MEF 細胞ともに、強い LacZ 遺伝子発現がみられた。Ad.PB-LacZ と Ad.PA-LacZ は、マウス ES 細胞では、MEF との共培養の有無に関わらず、ES 細胞で LacZ の強い発現がみられる。これとは対称的に、ヒト ES 細胞では、共培養の MEF 細胞では強い LacZ の発現がみられるのとは対称的に、LacZ の発現が全くみられない。一方、Ad.PC-LacZ は、マウス、ヒトの ES 細胞とも、強い LacZ の発現を認めた。このように、ヒト ES 細胞では、マウス ES 細胞とは全く異なりを示し、PA, PB の各プロモーターは未分化状態では活性が消失するものである。

1)-2. アデノウイルスの受容体の CAR 遺伝子発現と、ヒト ES 細胞と癌細胞株でのアデノウイルス遺伝子導入の比較

アデノウイルス受容体の CAR 遺伝子の mRNA 発現を、ヒト ES 細胞(KhES)、代表的な癌細胞株 2 種類で調べた (図 2 a)。GAPDH はコントロールのハウスキーピング遺伝子。いずれの細胞でも CAR の発現がみられ、KhES 細胞では、むしろ癌細胞より CAR 発現は高かった。次に、ヒト ES 細胞には 1×10^8 PFU/mL、癌細胞には 30 MOI (Multiplicity of infection; 感染ウイルス数/細胞数) でのアデノウイルスを実験 1 と同様に感染させて X-gal 染色をした。癌細胞ではいずれにおいても、いずれのアデノウイルスでも LacZ 発現がみられた。一方、Ad.PA-LacZ と Ad.PB-LacZ は、MEF 細胞で強い発現みられるのに、ヒト ES 細胞では発現がみられなかった。Ad.PC-LacZ はヒト ES 細胞、MEF 細胞とも、LacZ の強い発現を認めた。

つまり、PA, PB の各プロモーターは、癌細胞株、

未分化のマウス ES 細胞、MEF 細胞ではプロモーター活性を示す一方、ヒト ES 細胞では未分化状態では活性を全く示さない。一方、PC プロモーターは、癌細胞株、未分化のマウス ES 細胞、MEF 細胞だけでなく、未分化のヒト ES 細胞のいずれでも高いプロモーター活性を示して外来遺伝子の発現誘導ができることが確認できた。

1)-3. ファイバー改変型のアデノウイルスベクターによるヒト ES 細胞と癌細胞株での遺伝子導入効率の変化

癌や一般の正常細胞へのアデノウイルス遺伝子導入において、CAR が低発現だったり、遺伝子導入効率の低い細胞には、アデノウイルスのファイバーを改変してファイバーノブに RGD ペプチドを付加すれば、導入効率が上昇するケースが多いことが報告されている。よって前実験で確認した、ヒト ES 細胞の未分化でも機能する PC プロモーターで蛍光分子の EGFP 遺伝子を発現する、野生型のファイバーの Ad.PC-EGFP と、ファイバーを RGD ペプチド付加に改変した Ad.PC-EGFP/F-RGD の二つで同様の比較実験を行った。感染 48 時間後に蛍光顕微鏡で観察した。

結果は、Ad.PC-EGFP/F-RGD でむしろ共培養の mEF 細胞への遺伝子導入効率が上昇する一方で、マウス、ヒトのどちらの ES 細胞とも、遺伝子導入効率は上昇しなかった。

よって以降の実験は、Ad.PC-EGFP で行うこととした。

これまでの実験で、PA, PB プロモーターはヒト ES 細胞では未分化ではプロモーター活性が消失し、分化細胞 (癌細胞株、正常の分化細胞である MEF 細胞) ではプロモーター活性がみられることがわかった。一方、PC プロモーターを使えば、アデノウイルスベクターで遺伝子導入された後にも、未分化状態のヒト ES 細胞でもプロモーター活性が高く維持されることが分かった。

一方で、アデノウイルスベクターで簡単に高効率でヒト ES 細胞に遺伝子導入し、PC プロモーターで高発現できる一方で、共培養の MEF 細胞にも同等か

それ以上にアデノウイルスが感染して遺伝子導入・発現することも分かった。フィーダー細胞なしでも培養可能にできるマウス ES 細胞とは異なり、ヒト ES 細胞においては、未分化維持には MEF 細胞のようなフィーダー細胞との共培養が一般には必要である。よってアデノウイルスベクターではヒト ES 細胞だけでなくフィーダー細胞にも遺伝子が導入されてしまうため、ヒト ES 細胞特異的に遺伝子を導入し発現させることが不可能である。

これを解決する方法を以下のように開発した。

2). 新しいアデノウイルスベクターによるヒト ES 細胞への高効率で、ヒト ES 細胞特異的な遺伝子導入法「無フィーダー感染法」の確立

一般的なアデノウイルスの感染・遺伝子導入の方法は、フィーダー細胞と共培養のヒト ES 細胞の培地を抜いて、最小量のアデノウイルス液を加えて 1 時間培養した後、新鮮な培地と交換するという方法である。

これに対し、「無フィーダー感染法」という新しいプロトコルを開発した。これを比較した。

従来の方法では、ヒト ES 細胞だけでなく、共培養のフィーダーの MEF 細胞にも高率に遺伝子導入されていた。2 回の洗浄にて若干のフィーダー細胞への遺伝子導入は減った。一方、新しい無フィーダー感染法では、フィーダー細胞への遺伝子導入が劇的に減少していた。さらに洗浄を重ねるに従いフィーダー細胞への感染・遺伝子導入がさらに劇的に減少して行き、5 回の洗浄では僅か 2~3%の MEF 細胞が遺伝子導入されただけとなった。

2)-2. アデノウイルスベクターでの遺伝子導入後の未分化マーカーの発現 (図 7; ; Fig.7 と記載の図)

次に、ヒト ES 細胞の未分化状態を確認した。免疫細胞染色により、ヒト ES 細胞の未分化マーカーの発現を調べた。TRA-1-60, STAT3, Oct3/4 などの未分化マーカーを、アデノウイルスで EGFP 遺伝子が導入されたヒト ES 細胞は、依然高発現していること、つまりアデノウイルスによる遺伝子導入でヒト ES 細胞の未分化性維持に影響がなかったことが

確認された。

2)-3. 「接着感染法」と「無フィーダー感染法」での、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞における遺伝子導入効率の比較実験

「接着感染法」の方はほぼコンフルエントな状態まで細胞が増殖し、MOI 0 では 90%以上で EGFP の発現が観察された。一方、「無フィーダー感染法」では、生存細胞数が極めて少ないが、生存細胞は MOI 1 でもほとんどの細胞で EGFP が発現しているように観察された。

次に、ヒト ES 細胞だけでなく、ヒト iPS 細胞での遺伝子導入効率を調べた。細胞間で多少の効率の差はあるものの、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞 (2 種類) の合計 3 種類のいずれの細胞とも、高い導入効率を示した。

D. 考察

今回の方法で、極めて低い MOI でも、ヒト幹細胞 (ES、iPS 細胞) に極めて高い遺伝子導入効率を得ることができた。我々が以前調べた代表的な 7 種類の癌細胞株でのアデノウイルス遺伝子導入効率では、最高野結果だった癌種でさえ MOI 1 での遺伝子導入効率は約 30%であることから (INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY 27: 77-85, 2005)、今回はこれを大きく凌ぐもので、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞に極めて高い遺伝子導入効率を達成できたことは客観的に実証できている。

また一方、発現プロモーターに関しては、PC というプロモーターを使用すれば、ヒト幹細胞においても恒常的な強発現が得られることが分かった。

以上のように、ヒト ES/iPS 細胞において、「アデノウイルスベクターと無フィーダー感染法と PC プロモーター」を使うことで、非常に簡単に高効率でヒト ES 細胞に特異的に遺伝子導入し、未分化細胞でも (分化に関係なく) 安定的に強発現させることができる技術を発明できた。

E. 結論

正常幹細胞である ES/iPS 細胞を用い、アデノウイルスによる新たな高効率感染・遺伝子導入法を確立した。またマウスとは異なるヒト幹細胞の未分化状態でのプロモーター特性を明らかにした。今後はこの成果を、ヒト癌幹細胞に応用する予定である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得予定

【特許出願】

幹細胞における腫瘍化原因細胞の除去方法

発明者：三井薫、小賤健一郎

出願人：鹿児島大学

国際出願：2012年3月29日

(PCT/JP/2012/58414)

ヒト ES/iPS 細胞における遺伝子発現方法

発明者：小賤健一郎、三井薫、高橋知之

出願人：鹿児島大学、久留米大学

国内出願：2012年5月23日(特願 2012-117128)

2. 実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

がん幹細胞の単離と機能解析

研究分担者 瀬戸口啓夫 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科（近未来運動器医療創生学）・特任准教授
研究分担者 小宮 節郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科（整形外科学）・教授

研究要旨

横紋筋肉腫の治療を目指してヒト横紋筋肉腫細胞株から Sarcoma-initiating cell の同定法を確立し、解析を行った。また骨軟部肉腫における Hedgehog シグナルの腫瘍増殖・腫瘍化への機能解析を行った。

A. 研究目的

がん幹細胞は、腫瘍の再発や転移のメカニズムの一端を担っていることが示唆されており、がん幹細胞を標的とした治療法の開発は不可欠である。がん幹細胞を標的とした治療の確立にはがん幹細胞の単離精製が必要であるため、我々は骨軟部悪性腫瘍細胞において、Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)陽性細胞ががん幹細胞様の性質を持つことを見いだした。一方で Hedgehog シグナルは正常な幹細胞やがん幹細胞の維持・増殖に関与していることが報告されているので骨軟部肉腫における Hedgehog シグナルの機能解析を行った。

B. 研究方法

骨軟部肉腫細胞株を表面マーカーを用いて腫瘍形成能力が高い FGFR3 陽性 Sarcoma-initiating cell の分離方法を開発し、遺伝子発現や Sarcoma-initiating cell の維持・増殖に関与する因子を検討した。また骨軟部肉腫における Hedgehog シグナルの機能を調べるために骨軟部肉腫細胞での Hedgehog シグナル関連遺伝子の発現や機能をノックダウンや強制発現により検討を行った。（倫理面への配慮）

患者は個人を特定出来ないようにした。

C. 研究結果

ヒト横紋筋肉腫細胞株である KYM-1 と RD から FGFR3 陽性で腫瘍形成能力が有意に高い Rhabdomyosarcoma-initiating cells (RICs) の分離を可能とした。驚いたことにこの FGFR3 陽性の RICs は1個の細胞をヌードマウスの皮下に移殖した際にも腫瘍形成能力を示した。また RICs は定量的 PCR で未分化細胞マーカーを高発現しており、幹細胞様の性質を持っていることが明らかとなった。また bFGF は RICs の維持・増殖に必須の因子であった。一方 CNTF には RICs を減少する作用があった。

骨肉腫や横紋筋肉腫などのヒト骨軟部腫瘍の細胞株・患者腫瘍組織において Hedgehog 関連遺伝子が高発現していることを見いだした。また

Luciferase assay にて Hedgehog 下流の転写因子である GLI の転写が骨肉腫で亢進していることを見出した。薬剤や RNAi を用いて Hedgehog シグナルを阻害すると横紋筋肉腫および骨肉腫の増殖が *in vitro*, *in vivo* において抑制された。Hedgehog シグナル下流の転写因子である GLI2 を骨軟部肉腫の起源細胞のひとつであると考えられている間葉系幹細胞で強制発現させると間葉系幹細胞の増殖が促進した。これらの結果より、Hedgehog シグナルは骨軟部肉腫の増殖・腫瘍化に関与していることが示唆された。現在、Hedgehog シグナルをノックダウン、もしくは強制発現することで骨軟部肉腫における Sarcoma-initiating cell の維持・増殖への機能解析を行っている。また、低分子化合物による Hedgehog シグナル制御による Sarcoma-initiating cell の維持・増殖への制御機構の解析を行っている。

D. 研究成果の意義

これらの結果は、Hedgehog シグナルが骨軟部肉腫の腫瘍化・腫瘍増殖に重要であり、Sarcoma-initiating cell の腫瘍幹細胞としての機能に関与していることを示唆している。

E. 今後の発展性

低分子化合物をもちいた Hedgehog シグナル制御により骨軟部肉腫において、薬剤によるがん幹細胞特異的治療法の開発が期待される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Role of GOLPH3 and GOLPH3L in the proliferation of human rhabdomyosarcoma

Kunigou O., Nagao H., Kawabata N., Ishidou Y., Nagano S., Maeda S., **Komiya S.**, and **Setoguchi T.**

Oncology Reports. 2011;5:1337-42

Pharmacological inhibition of the Hedgehog pathway prevents human rhabdomyosarcoma cell growth.

Kawabata N, Ijiri K, Ishidou Y, Yamamoto T, Nagao H, Nagano S, Maeda S, **Komiya S, Setoguchi T.**

Int J Oncol. 2011; 399: 899-906

Role of GLI2 in the growth of human osteosarcoma

Nagao H., Ijiri K., Hirotsu M., Ishidou Y., Yamamoto T., Nagano S., Takizawa T., Nakashima K.,

Komiya S., and Setoguchi T.

The Journal of Pathology. 2011; 224: 169-79

Suppression of Osteosarcoma Cell Invasion by Chemotherapy Is Mediated by Urokinase Plasminogen Activator Activity via Up-Regulation of EGR1.

Matsunoshita Y, Ijiri K, Ishidou Y, Nagano S, Yamamoto T, Nagao H, **Komiya S, Setoguchi T.**[†]

PLoS ONE. 2011; 6(1):e16234.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得予定

なし

2. 実用新案登録

なし。

細胞生物学的解析

研究分担者 坂本 泰二 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究協力者 寺崎 寛人 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・大学院生

研究要旨：眼組織に遺伝子導入する際の大きな問題は、血液眼関門の存在である。網膜色素上皮細胞は外血液眼関門の重要構成因子であるが、炎症などの際にどの程度影響するかについては定説がなかった。我々はその原因を探るために、生体下網膜色素上皮細胞と極めて近い培養系を確立した。その結果、外血液眼関門の機能獲得には一定の成熟が必要であり、それを欠いた培養系では十分な結果が得られないこと、その過程には ZO-1、p38MAPK が強く関与していることを見出した。この発見は、眼球遺伝子導入について重要な問題解決の手段となる。

A. 研究目的

眼科領域の遺伝子治療は、臨床応用がすでに始まりつつあるが、眼組織への遺伝子導入効率は十分ではないことが、汎用化への大きな障害になっている。その大きな原因は、血液眼関門の存在である。血液眼関門は内血液眼関門と外血液眼関門からなり、外血液眼関門は網膜色素上皮細胞により構成される。網膜色素上皮細胞バリアーは以前から研究されてきたが、培養細胞は生体の状況を十分に反映していなかった。その大きな原因は、網膜色素上皮細胞が環境により性質を大幅に変えるからである。我々は、特殊な技術を用いることで、生体に極めて近い網膜色素上皮細胞の培養系を確立した(Sonoda et al. Nature Protoc, 2009)。今回はその培養系を用いて、最も一般的な炎症性サイトカイン tumor necrosis factor(TNF- α)がどのように働くかを研究した。

B. 研究方法

図1のように、ポイデンチェンバーを用いた培養系を用いた。通常の網膜色素上皮細胞培養では、

極性を持った状況を再現できない。そこで、特殊培養液を用いて、ブタ網膜色素上皮細胞を培養した。

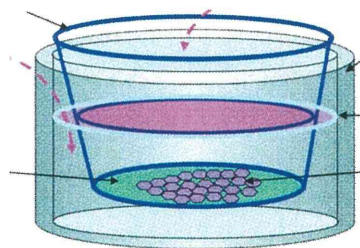
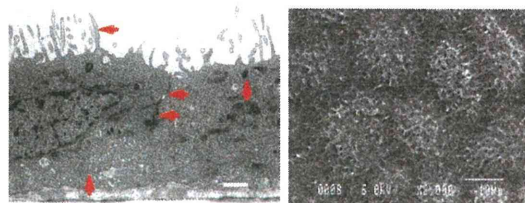


図1 網膜色素上皮細胞培養系の図
このメンブレンの間の電気抵抗を測定した (transepithelial resistance, TER Ωcm^2)。

培養3日目の細胞と2週間後の細胞を比較した。その結果、図2のように培養14日目は極性の発達した生体網膜色素上皮細胞と類似した性質を示した。



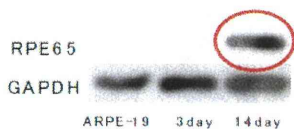


図2 培養網膜色素上皮細胞の特徴

よって、3日目細胞を、非極性網膜色素上皮細胞、14日目の物を極性網膜色素上皮細胞と定義して以下の実験を行った。TNF- α 添加の有無で、TERがどのように変化するか。その際にどの因子が関連するかを解析した。

(倫理面への配慮)

培養ブタ網膜色素上皮細胞を用いたので、ヒトに関する倫理面の配慮は不要であった。ブタ組織は許可を得た機関から、購入した。

C. 研究結果

TNF- α を添加すると、非極性網膜色素上皮細胞では、TERの変化はないが、極性網膜色素上皮細胞では、24時間後に明らかにTERが減少した(図3)。

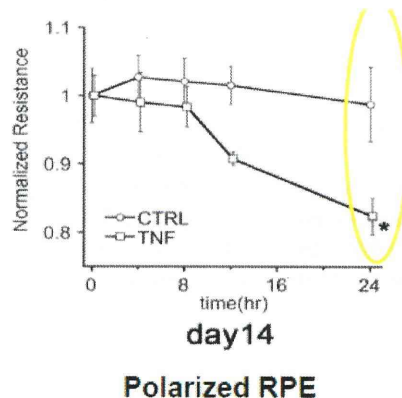
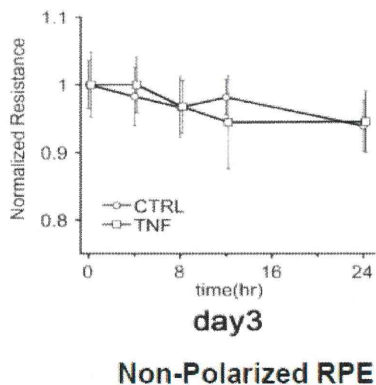


図3 極性の有無によるTERの変化

次に、極性網膜色素上皮細胞のTERが減少する際にどの因子が影響するかを、p38 MAPK inhibitor、Nf-kB inhibitor、caspase inhibitor、JNK inhibitorを用いて検討した。その結果、図4のようびp38 MAPK inhibitorによってのみTNF- α の変化を消去できた。

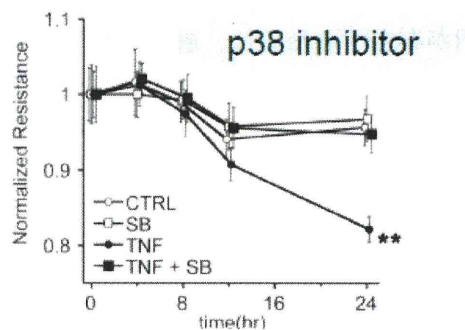
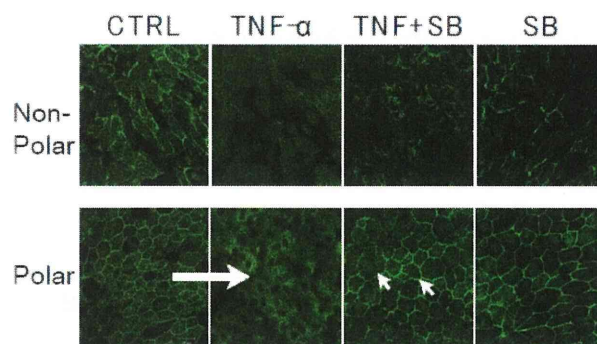


図4 抑制剤によるTERの変化

次に、細胞バリエーに関連する分子について、どのように変化するかを調べた。



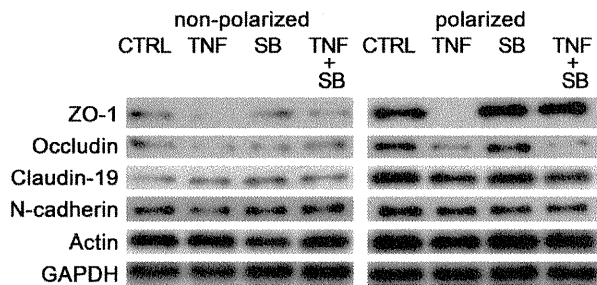


図5 細胞閉鎖関連因子の変化

その結果、ZO-1はTNF- α で有意に減少した。その作用は 38 MAPK inhibitorにより完全に消去された。同様に変化を示したものはなかった。非極性網膜色素上皮細胞においては、そのような変化は見られなかった。

D. 考察

眼組織を含む中枢神経系には、血液と組織を隔絶する閉鎖が存在するために、遺伝子導入効率が低かった。特に眼球は網膜色素上皮細胞バリアーの存在が大きな障壁になっていた。問題解決のために、培養系が用いられたが、十分なバリアー機能を再現できないために、結論が得られていなかった。今回我々は、特殊な培養系を確立して、生体に極めて近い極性網膜色素上皮細胞培養に成功した。その結果、TNF- α は単独で、バリアー機能を低下させ、その過程にZO-1やp38MAPKが関与していることを明らかにした。

今までの培養系では、TNF- α はバリアー機能を傷害しないというのが大勢であったが、その理由は過去の研究では、十分なバリアー機能を再現できていなかったことが証明できた。また、網膜色素上皮細胞のバリアー機能の獲得には、一定の時間が必要であった。

E. 結論

外血液眼閉鎖を形成する網膜色素上皮細胞バリアーには、**maturation**が必要であり、特にZO-1

が重要であった。またZO-1が形態的に出現してから、機能を発揮するまでには、数日から1週間程度の期間が必要であった。現在多くの網膜色素上皮細胞培養実験が行われているが、バリアー機能研究に関して言えば、それを欠くものは、実験系として、適していない。今回の知見を活かして、遺伝子導入期間は、p38 MAPKなどを抑制して、一時的にバリアー機能を抑制する方法も有効であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表（関連するもの）

Sonoda Y, Arimura N, Shimura M, Sakamoto T. Early change of central macular thickness after intravitreal triamcinolone or bevacizumab. *Retina* 2011 Feb;31(2):290-7

Sakamoto T, Ishibashi T. Hyalocytes: Essential cells for vitreoretinal pathophysiology? *Retina* 2011 Feb;31(2):222-8.

Fujita A, Uchino E, Otsuka H, Arimura N, Noda N, Ishibashi T, Sakamoto T. Ocular surface molecule after transconjunctival vitrectomy. *Br J Ophthalmol* 2011 Mar;95(3):419-23.

Yoshinaga N, Arimura N, Otsuka H, Hashiguchi T, Maruyama I, Sakamoto T. NSAIDs inhibit neovascularization of choroid through HO-1-dependent pathway. *Lab Invest* 2011, Sep;91(9):1277-90.

Kamisanuki T, Tokushige S, Terasaki T, Khai NC, Wang Y, Sakamoto T, Kosai KI. Targeting CD9 produces stimulus-independent antiangiogenic effects predominantly in activated endothelial cells during angiogenesis: A novel antiangiogenic therapy. *Biochem Biophys Res Comm* 2011 Sep 16;413(1):128-35

Ueno Y, Sonoda S, Suzuki R, Yokouchi M, Kawasoe Y, Tachibana K, Maruyama K, Sakamoto T, Komiya S. Combination of ultrasound and Bubble liposome enhance the effect of doxorubicin and inhibit murine osteosarcoma growth. *Cancer Biol Ther*. 2011 Aug 15;12(4).

日本網膜硝子体学会トリアムシノロン調査グループ: 坂本泰二, 石橋達朗, 小椋祐一郎, 白神

史雄, 竹内忍, 山下英俊. トリアムシノロンによる無菌性眼内炎調査. *日眼会誌* 2011 Jun;115(6):523-8.

. (発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

2. 学会発表

Shirasawa M, Terasaki H, Sakamoto T. TNF- α disrupts barrier function of RPE cells. ARVO annual meeting: Fort Lauderdale, USA, May 5-9, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

癌幹細胞の分離と m-CRA の治療効果の検討

分担研究者 夏越 祥次 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科（消化器・乳腺甲状腺外科）・教授
研究協力者 田上 聖徳 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科（消化器・乳腺甲状腺外科）・大学院生

研究要旨

小賤らの開発した Survivin 反応性 m-CRA(Surv.m-CRA)、また現在開発中の癌幹細胞を特異的に標的とする新規の m-CRA の臨床応用を目指し、複数の癌幹細胞モデルでその治療効果を検証した。いずれのモデルにおいても、Surv.m-CRA、新規の m-CRA と他癌細胞と同等かそれ以上の治療効果を示した。Surv.m-CRA、現在開発中の新規の m-CRA は、癌幹細胞に対する有効な治療法となることが期待される。

A.研究目的

化学療法や放射線療法などの従来の癌治療法では根治に至らない原因の一つとして、癌幹細胞の存在が言われている。増殖する細胞を標的とする従来の癌治療法ではこの癌幹細胞に対する効果は期待できず、今後は癌幹細胞を標的とした治療法の開発が必須である。

Survivin はほとんどの癌で高発現しており、またいくつかの癌では悪性度との相関が報告されている。悪性度の高い癌幹細胞でも、Survivin は高発現していると考えられ、Surv.m-CRA は通常癌細胞に効果があることは、種々の癌で証明されたが、癌幹細胞に対してはより強い効果を示すことが予想される。以上より複数の癌幹細胞モデルを作成し、Surv.m-CRA と現在開発中の癌幹細胞を標的とした新規の m-CRA の癌幹細胞に対する治療効果を検討した。

B.研究方法

一つの癌幹細胞モデルとして瀬戸口らが報告した横紋筋肉腫幹細胞マーカーである Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)を用いて、ヒト横紋筋肉腫細胞株である KYM-1 から、FGFR3 陽性細胞を cell sorter で分離し、横紋筋肉腫幹細胞モデルを作成した。

次に FGFR3 陽性細胞と陰性細胞で Survivin 遺伝子の内因性発現レベルの解析を行った。

quantative RT-PCR で mRNA の発現を評価し、さらに X-gal assay で、Survivin のプロモーター活性を評価した。プロモーター活性では、LacZ 遺伝子上流に Survivin プロモーターを組み込んだアデノウイルスベクター(Ad.Surv-LacZ)を用いて測定を行った。

治療効果の検証として、未分化培地での培養で FGFR3 陽性細胞を濃縮した KYM-1 細胞、また cell sorter で分離した FGFR3 陽性細胞への Surv.m-CRA の治療効果を検証した。また動物実験では FGFR3 陽性細胞を濃縮した KYM-1 細胞で腫瘍を形成したマウスモデルを作成し、その治療効果を検証した。

C.研究結果

FGFR3 陽性細胞を濃縮した KYM-1 細胞では、通常の血清入り培地で培養した KYM-1 より Survivin の mRNA 発現も、プロモーター活性も高く、さらに Cell Sorter で分離した FGFR3 陽性細胞と陰性細胞では、さらにその傾向は強かった。

細胞実験では Surv.m-CRA は FGFR3 陽性の横紋筋肉腫幹細胞でより選択的に強い細胞傷害効果を示し、さらに動物実験でも、腫瘍増大を有意に抑制した。

現在、ヒト肝癌幹細胞モデルを CD13 [Haraguchi et al.(2010)]や、その他の既存のマーカーを用いて作成し、Surv.m-CRA と開発中の新規の m-CRA の

癌幹細胞に対する効果を検討しているが、やはり同様に癌幹細胞により選択的に強い治療効果を有する傾向にある。今後さらに詳細に検討を進めていく予定である。

また癌幹細胞の分離法についても、非増殖のアデノウイルスベクターを用いて、内因性の分子の発現から、癌幹細胞を分離する独自の分離法を開発中であり、さらに信頼できる癌幹細胞モデルの作成が期待される。

D. 考察

癌幹細胞モデルにおいて、Surv.m-CRA と新規開発した癌幹細胞を標的とした m-CRA の治療効果を検証し、これらの m-CRA が癌幹細胞分画に対し、より強い治療効果を有することが証明された。さらにいくつかの癌幹細胞モデルの作成を行っており、また現在開発中の癌幹細胞分離法が樹立されれば、さらに悪性度の高い、より信頼できる癌幹細胞分画を分離することが可能となり、より詳細に癌幹細胞に対する m-CRA の治療効果を、in vitro、in vivo で検証することができると考えられる。

E. 結論

癌幹細胞に対する Surv.m-CRA, 新規の m-CRA

の治療効果を検証し、これらの m-CRA の癌幹細胞に対する強い治療効果を確認することができた。これらの m-CRA が癌幹細胞のように悪性度の高い細胞に対してより強い効果を示すことから、既存の治療では効果の得られなかった種々の悪性疾患に対して、有効な治療薬となることが期待される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 該当なし

2. 学会発表

1. Kiyonori Tanoue, Yuqing Wang, Shoji Natsugoe, Ken-ichiro Kosai. Efficient treatment of Rhabdomyosarcoma-initiating cells by Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus: Promising m-CRA strategy for treating cancer stem cells. (アメリカ・ポスター発表) ASGCT 15th Annual Meeting May 15-19, 2012 Philadelphia, PA

H. 知的財産権の出願・登録状況
 なし

2. 実用新案登録

なし

ウイルスベクターの簡便な濃縮法の開発

研究分担者 隅田泰生 鹿児島大学 大学院理工学研究科・教授

研究協力者 若尾雅広 鹿児島大学 大学院理工学研究科・助教

研究協力者 張 旭 鹿児島大学 大学院理工学研究科・D3

研究協力者 池田 美奈子 鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科・特任研究員

研究協力者 前園 理恵 鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科・助教

研究要旨

我々は糖鎖の機能を分子レベルで簡便に調べるためのツールとして「シュガーチップ」及び糖鎖固定化ナノ粒子を開発している。本研究では、以前にシュガーチップを用いて解析したアデノウイルスベクターの糖鎖結合特性を利用し、アデノウイルスベクターに高親和性の糖鎖を固定化したナノ粒子を用いたウイルスの効率的な濃縮と感染価の上昇を検討した。

A. 研究目的

遺伝子導入のための大量のウイルスベクターを超速心分離によって濃縮することは効率的でない。本研究ではウイルスと細胞表層の糖鎖との結合性に着目し、ウイルスベクターが結合する糖鎖を推定し、その糖鎖を固定化したナノ粒子を用いて、アデノウイルスベクターの高効率かつ簡便な濃縮法を確立し、さらに培養ウイルスベクターの細胞への感染効率を高めることを目的とする。本年度は、昨年度の成果を踏まえ、低分子量の硫酸化デキストラン（DS25 と略）を固定化した糖鎖固定化金ナノ粒子を還元剤を変えて2種類調製し、GFP 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター（Ad. CA-EGFP）を用いて、(i) 透過型電子顕微鏡（TEM）によるウイルスベクターとナノ粒子との複合体観察；(ii) ナノ粒子による濃縮効果の検討；(iii) 複合体の細胞への感染性を検討した。さらに、(iv) シュガーチップを用いた糖鎖への親和性の再検討をおこなった。

B. 方法

糖鎖固定化金ナノ粒子を調製する際に、還元剤としてクエン酸を用いたナノ粒子（DS25-cGNP と略）、または NaBH_4 を用いたナノ粒子（DS25-bGNP と略）の2種類を調製した。ウイルスベクターとナノ粒子を混合して、常法またはイオン性液体中で TEM を測定した。さらにウイルスベクターとナノ粒子を混合

して培養細胞（WI-38, HOS-MNNG, Colo-205）に加えて感染させ、1時間後および24時間後の細胞を、常法により染色して TEM 観察した。ウイルスベクター濃縮実験は、DS25-cGNP または DS25-bGNP をウイルスベクター溶液と混合し、遠心分離（10,000 x g、10分）によってナノ粒子を全て回収し、ウイルスを濃縮した。そして、濃縮の前後でリアルタイム PCR を行い、検出サイクル数（Ct 値）の比較から濃縮効率を計算した。ウイルス感染実験は、WI-38, HOS-MNNG, および colo-205 の3種の培養細胞を用いて行った。また、ウイルスベクターの糖鎖結合性を、47種類の糖鎖を固定化したシュガーチップ（SUDx-Biotec 社製）で再度調べた。

（倫理面の配慮）

本研究では、人由来の検体の使用や動物実験は行っていないため、倫理面の配慮は行う必要がなかった。

C. 研究結果

DS25-cGNP は、約 20~40 nm、DS25-bGNP は 2~8 nm の粒径を持ち、よい分散性を保っていた。ウイルスベクターと混合して、イオン性液体中で TEM 観察をしたところ、特に DS25-bGNP の場合に、ナノ粒子がウイルスベクター表面に多数局在化して結合しているイメージが得られ、ウイルスのスパイクタンパク質へ DS25-bGNP が結合していることを示唆した（図1参照）。