

- Med. 14:120-127, 2012.
- 4) 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.
  - 5) 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 antitumor effects on mesothelioma through apoptosis and S-phase arrest in p53-independent and Ras prenylation-independent manners. J. Thorac. Oncol. 7; 873-882, 2012.
  - 6) Nagakawa H, Shimozato 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. 275; 90-97, 2012.
  - 7) Kitazono-Saito M, Takiguchi Y, Kitazono S, Ashinuma H, Kitamura A, Tada Y, Kurosu K, Sakaida E, Sekine I, Tanabe N, Tagawa M, Tatsumi K. Interaction and cross-resistance of cisplatin and pemetrexed in malignant pleural mesothelioma cell lines. Oncol. Rep. 28: 33-40, 2012.
  - 8) Shimada H, Yajima S, Oshima Y, Hiwasa T, Tagawa M, Matsushita K, Nomura F. Impact of serum biomarkers on esophageal squamous cell carcinoma. Esophagus. 9: 131-140, 2012.
  - 9) Tagawa M, Kawamura K, Yu L, Tada Y, Hiroshima K, Shimada H. A gene medicine with the midkine-mediated transcriptional regulation as new cancer therapeutics. In: Midkine: From embryogenesis to pathogenesis and therapy. ed by Erguven, M., Muramatsu, T and Bilir A. Springer-Verlag Gmbh, Heidelberg, Germany. p237-246, 2012.
  - 10) Nagaya H, Tagawa M, Hiwasa K, Terao S, Kanno T, Nishizaki T, Gotoh A. Fiber-substituted conditionally replicating adenovirus for oncolysis of human renal carcinoma cells. Anticancer Res. 32: 2985-2990, 2012.
  - 11) Yamanaka M, Tada Y, Kawamura K, Li Q, Okamoto S, Chai K, Yokoi S, Liang M, Fukamachi T, Kobayashi H, Yamaguchi N, Kitamura A, Shimada H, Hiroshima K, Takiguchi Y, Tatsumi K, Tagawa M. E1B-55kD-defective adenoviruses activate p53 in mesothelioma and enhance cytotoxicity of anti-cancer agents. J. Thorac. Oncol. 7: 1850-1857, 2012.
  - 12) Wu D, Hiroshima K, Matsumoto S, Nabeshima K, Yusa T, Ozaki D, Fujino M, Yamakawa H, Nakatani Y, Tada Y, Shimada H, Tagawa M. Diagnostic usefulness of p16/CDKN2A FISH in distinguishing between sarcomatoid mesothelioma and fibrous pleuritis. Am. J. Clin. Pathol. 139: 39-46, 2013.
  - 13) Tada Y, Shimada H, Hiroshima K, Tagawa M. A potential therapeutic strategy for malignant mesothelioma with gene medicine. BioMed Res Int 2013: 572609, 2013.
  - 14) Tagawa M, Tada Y, Shimada H, Hiroshima K. Gene therapy for malignant mesothelioma: Current prospects and challenges. Cancer Gene Ther. 20; 150-156, 2013.
  - 15) Fukamachi T, Ikeda S, Wang X, Saito H, Tagawa M, Kobayashi H. Gene expressions for signal transduction under acidic conditions. Genes 4: 65-85, 2013.
  - 16) Okamoto S, Jiang Y, Kawamura K, Shingyoji M, Fukamachi T, Tada Y, Takiguchi Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K, Kobayashi H, Tagawa M. Zoledronic acid produces combinatory anti-tumor effects with cisplatin on mesothelioma by increasing p53 expression levels. PLoS ONE 8; e60297, 2013.
- 学会発表
- 17) Tagawa M, Okamoto S, Jiang Y, Kawamura K, Yang S, Yamauchi S, Tada Y, Takiguchi Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K, Kubo S, Li Q, Kobayashi H. Adenoviruses-mediated up-regulation of p53 expression produces cytotoxic effects on INK4A/ARF-defective mesothelioma and increases the susceptibility to chemotherapeutic agents and small G protein inhibitors. 15th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy, May 16-19, 2012, Philadelphia.
  - 18) S Kubo, M Takagi-Kimura, A Tamamoto, N Okamura, Y Maeyama, N Terada, M Tagawa, N Kasahara, H Okamura, T Hashimoto-Tamaoki. Midkine promoter-driven oncolytic adenovirus with Ad35 fiber achieves enhanced transfection of human malignant mesothelioma cells in vitro and in vivo. 15th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy, May 16-19, 2012, Philadelphia.
  - 19) M Tagawa, K Kawamura, S Yang, Y Jiang, K Chai, N Yamaguchi, Y Tada, Y Takiguchi, K Tatsumi, H Shimada, K Hiroshima. Activation of p53 pathways produces combinatory effects with chemotherapeutic agents on p53 wild-type mesothelioma. 18th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, June 28-30,

- 2012, Kumamoto.
- 20) M Takagi-Kimura, A Tamamoto, N Okamura, Y Maeyama, M Tagawa, N Kasahara, H Okamura, Tomoko Hashimoto-Tamaoki and Shuji Kubo: Enhanced transduction of human mesothelioma cells by midkine promoter-driven oncolytic adenovirus with Ad35 fiber modification. 18th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, June 28-30, 2012, Kumamoto.
- 21) H Nagaya, S Terao, K Hiwasa, M Tagawa, A Gotoh. Oncolytic effects of a fiber knob substituted adenovirus vector to human bladder carcinoma cells. 8th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, June 28-30, 2012, Kumamoto.
- 22) M Tagawa, Q Li, K Kawamura, M Shingyoji, Y Tada, Y Takiguchi, K Tatsumi, H Shimada, K Hiroshima. Reactivation of p53-mediated pathways induces apoptosis in mesothelioma with wild-type p53 gene and produces combinatory synergistic effects with anti-cancer agents. The 11th international conference of the international mesothelioma interested group, September 11-14, 2012, Boston.
- 23) K Hiroshima, D Wu, S Matsumoto, K Nabeshima, T Yusa, D Ozaki, M Fujino, Y Nakatani, Y Tada, H Shimada, M Tagawa. Diagnostic utility of p16 FISH in distinction between sarcomatoid mesothelioma and fibrous pleuritis. The 11th international conference of the international mesothelioma interested group, September 11-14, 2012, Boston.
- 24) Y Tada, Q Li, K Kawamura, H Kobayashi, I Sekine, Y Takiguchi, K Tatsumi, H Shimada, K Hiroshima, M Tagawa. Zoledronic acid, the third generation of bisphosphonates, produces anti-tumor effects on mesothelioma in vitro and in vivo through apoptosis or S phase arrest in p53-independent and Ras prenylation-independent manners. The 11th international conference of the international mesothelioma interested group, September 11-14, 2012, Boston.
- 25) M Tagawa, K Kawamura, S Yang, Y Jiang, K Chai, N Yamaguchi, Y Tada, Y Takiguchi, K Tatsumi, H Shimada, K Hiroshima. Gene therapy for malignant mesothelioma with restored p53 functions. Internatinal Society for Cell and Gene Therapy of Cancer 2012 Singapore Conference, October 4-6, 2012, Singapore.
- 26) M Tagawa, K Kawamura, S Okamoto, J Yuan, M Shingyoji, Y Tada, Y Takiguchi, K Tatsumi, H Shimada, K Hiroshima. A small G protein inhibitor, bisphosphonates, produces synergistic cytotoxicity on wild-type p53-bearing mesothelioma with adenoviruses up-regulating the p53 expression level. 20th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, October 25-29, 2012, Versailles, France.
- 27) 田川雅敏、川村希代子、楊珊、江媛媛、柴寛、久保秀司、山口直人、多田裕司、滝口裕一、巽浩一郎、島田英昭、廣島健三：ビスフォスフォネートは、Rab の機能を阻害して悪性中皮腫に細胞死を誘導し、抗がん剤との併用効果を示す Bisphosphonates induce apoptosis through the suppression of Rab and produce combinatory effects with anti-cancer agents. 第 71 回日本癌学会学術総会 平成 24 年 9 月 19 日ー21 日（札幌市）
- 28) 楊珊、川村希代子、江媛媛、柴 寛、久保秀司、山口直人、多田裕司、滝口裕一、巽浩一郎、島田英昭、廣島健三、田川雅敏：食道がんに対するファイバー領域改変型増殖性アデノウイルスの抗腫瘍効果は p53 遺伝子発現によって増強する Cytotoxicity of replication-competent adenoviruses in esophageal carcinoma was enhanced by forced p53 expression. 第 71 回日本癌学会学術総会 平成 24 年 9 月 19 日ー21 日（札幌市）
- 29) 久保秀司、山野智基、吉川良恵、森永伴法、玉置知子、田川雅敏、笠原典之：悪性中皮腫に対する二重制御型腫瘍溶解アデノウイルスの開発 Development of doubly regulated oncolytic adenovirus for human malignant mesothelioma. 第 71 回日本癌学会学術総会 平成 24 年 9 月 19 日ー21 日（札幌市）
- 30) 島田英昭、谷島 聡、小池淳一、田川雅敏、日和佐隆樹、松下一之、野村文夫：Stage I/II 消化器癌患者血清抗ガレクチン-1 抗体の解析 Analysis of serum anti-galectin-1 antibody in stage I/II gastroenterological carcinomas. 第 71 回日本癌学会学術総会 平成 24 年 9 月 19 日ー21 日（札幌市）
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## 標的ベクターに関する細胞表面分子の探索

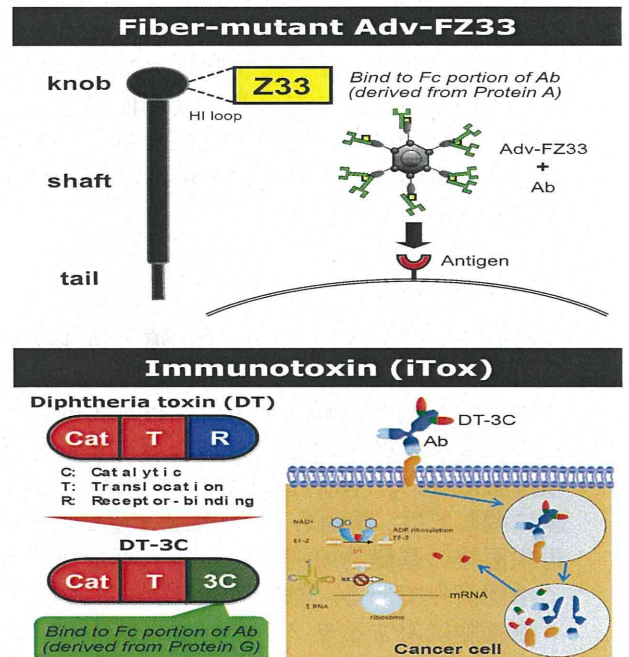
研究分担者 濱田 洋文 東京薬科大学生命科学部・教授

### 研究要旨

我々は、アデノウイルスベクターのがん標的化デリバリーに好適な表面抗原の系統的・網羅的探索を目的に、抗体結合変異型アデノウイルス Adv-FZ33 を作製し、抗体スクリーニングを施行した。この系で樹立した 615 クローンモノクローナル抗体のうち、昨年度までに 382 クローンの抗原同定を完了した。抗原リストは 57 種類の抗原（重複を除く）を含んでおり、この中にはがん標的化治療の候補分子として有望なものが高い比率で含まれていた。そこで本年度は、抗原が決定されていない 233 クローンモノクローナル抗体に対して、免疫沈降・質量分析による抗原同定を進めた。さらに、がん標的化抗体の新たな探索方法として、抗体にタンパク合成阻害毒素を結合させたイミュノトキシン（iTox）の殺細胞効果を指標とした抗体スクリーニング系を独自に樹立した。作動分子機構が異なる探索プラットフォームを適用することにより、がん標的化治療に好適な抗原・抗体ペアをさらに広く同定してゆける可能性がある。そこで本年度は、新たに樹立したこの iTox 系を用いた抗体スクリーニングを施行して、各種ヒトがん細胞に対する高性能標的化抗体を選抜し、その抗原同定を進めた。いずれの実験もきわめて順調に進捗しており、今後も本プロジェクトを継続することにより、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。

### A. 研究目的

膵がん・悪性中皮腫を含む難治性がんに対する効果的な遺伝子治療・ウイルス療法の開発のためには、ベクターをがん細胞へ特異的にデリバリーできるかどうかが発鍵となる。私たちは、アデノウイルスベクターのがん標的化デリバリーに好適な表面抗原の系統的・網羅的探索を目的に、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 モチーフを組み込んだファイバー変異型 Adv-FZ33 アデノウイルスを作製した。Adv-FZ33 の抗体依存的な細胞侵入を指標とした抗体スクリーニング系（右上図）を樹立し、選抜された高性能抗体の抗原分子の同定を免疫沈降・質量分析にて行った。その結果、この系で樹立した 615 クローンモノクローナル抗体のうち、昨年度までに 382 クローンの抗原同定を完了した。抗原リストは 57 種類の抗原（重複を除く）を含んでおり、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。このことから本スクリーニング法は、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。そこで本年度は、抗原が決定されていない 233



クローンのモノクローナル抗体に対して、免疫沈降・質量分析による抗原同定を進めた。

上記に加えて私たちは最近、がん標的化抗体の新たな探索方法として、抗体にタンパク合成阻害毒素を結合させたイミュノトキシン（iTox）の殺細胞効果を指標とした抗体スクリーニング系（右下図）を独自に樹立した。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 DT-3C は簡便に抗体へ

結合させることができ、抗体と DT3C の結合体すなわち iTox が表面抗原との結合を介してエンドサイトーシスで細胞内へ取り込まれると強力な殺細胞活性を示す。そこで本年度は、新たに樹立したこの iTox 系を用いた抗体スクリーニングを施行して、各種ヒトがん細胞に対する高性能標的化抗体を選抜し、その抗原同定を進めた。

## B. 研究方法

B-1. Adv-FZ33 系を用いたスクリーニングで得られた抗体の抗原同定

すでに Adv-FZ33 系で樹立した抗体 615 クロンのうち、その抗原が決定されていない 233 クロンに対し、免疫沈降ならびに質量分析を行うことにより抗原同定を進めた。

B-2. iTox 系を用いた新たな抗原・抗体セットの系統的・網羅的探索

右図は iTox 系を用いたがん標的化モノクローナル抗体樹立の方法と、対応する抗原の同定・特異性の確認など、実験の一連の流れを示す概念図である。本年度は膵がん細胞株、肺がん細胞株、精巣がん細胞株、メラノーマ細胞株、白血病細胞株などでマウスを免疫し、新規の標的化抗体のスクリーニングならびに抗原同定を進めた。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) に匹敵する高い効率の iTox 活性を示すがん標的化抗原・抗体である点、臨床応用の際の治療効果が十分に期待できる。

(倫理面への配慮)

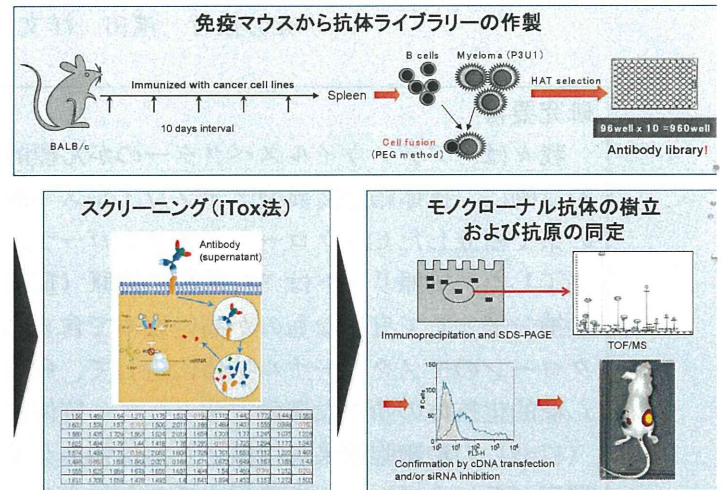
本研究では、がんの遺伝子治療・抗体療法などに関する基礎的な検討のみを行う。すでに樹立された細胞株と動物を用いて行う実験であるため、人権の保護などの問題に該当する留意事項は特になし。本研究に関連した組換え DNA 実験に関しては、課題名「抗体医薬・遺伝子治療・再生医療の基礎的研究」として、東京薬科大学で承認済みである。動物実験に関しても課題名「癌細胞に対するモノクローナル抗体の作製および癌の診断・治療の研究」として、東京薬科大学で承認済みである。

## C. 研究結果

C-1. Adv-FZ33 系を用いたスクリーニングで得られた抗体の抗原同定

膵がん細胞株を免疫原として樹立した抗体 22 クロン、前立腺がん細胞株を免疫原として樹立した抗体 11 クロン、乳がん細胞株を免疫原

として樹立した抗体 16 クロン、合計 49 クロンに対する抗原を決定することに成功した。この中には、昨年度までに同定した抗原リストには含まれていなかった新たな抗原が存在する点、非常に意義が大きい。今回新たに同定された抗原の代表的な例として、ALPP/ALPPL, PSCA,



CD142, LYPD3 などが挙げられる。

C-2. iTox 系を用いた新たな抗原・抗体セットの系統的・網羅的探索

膵がん細胞株、肺がん細胞株、精巣がん細胞株、メラノーマ細胞株、白血病細胞株などを免疫原とした抗体スクリーニングを行った。その結果、高い iTox 活性を呈するモノクローナル抗体を合計 165 クロン樹立することに成功した。このうち 56 クロンに対する抗原決定を完了した。この中には CD47, CD276, CD155, CD73, CD98hc, CD71, EpCAM など、がんの標的化治療のターゲットとして有望であると考えられるものが含まれていた。

## D. 考察

本年度は、すでに Adv-FZ33 系で樹立した抗体の抗原を決定することに加え、新たに iTox 系で抗体を樹立してその抗原の決定を精力的に進めた。実験は予想以上に順調に進捗し、その結果として、当初の期待どおり、がんの標的化治療への応用につながりうる有望ながん抗原が含まれていた。今後も様々なタイプのがん細胞を免疫原としてこれら私たち独自のスクリーニング系で抗体を選抜・樹立してゆくことにより、新たなターゲット分子を同定できる可能性が高い。

## 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 (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

調に稼働している。今後も本プロジェクトを進めることにより、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) Hasegawa N, Abei M, Yokoyama KK, Fukuda K, Seo E, Kawashima R, Nakano Y, Yamada T, Nakade K, Hamada H, Obata Y, Hyodo I. Cyclophosphamide enhances antitumor efficacy of oncolytic adenovirus expressing uracil phosphoribosyltransferase (UPRT) in immunocompetent Syrian hamsters. *Int J Cancer*. In press.
- 2) Liu B, Ohishi K, Orito Y, Nakamori Y, Nishikawa H, Ino K, Suzuki K, Matsumoto T, Masuya M, Hamada H, Mineno J, Ono R, Nosaka T, Shiku H, Katayama N. Manipulation of human early T lymphopoiesis by coculture on human bone marrow stromal cells: Potential utility for adoptive immunotherapy. *Exp Hematol*. In press.
- 3) 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*. 421, 349-54 (2013).
- 4) 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*. 157, 674-86 (2012).
- 5) Koyama T, Shimura M, Minemoto Y, Nohara S, Shibata S, Iida Y, Iwashita S, Hasegawa M, Kurabayashi 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*. 159, 413-8 (2012).

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## アデノウイルスベクターに対する生体反応の解析

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

### 研究要旨

制限増殖型アデノウイルス (Ad) を含め、Ad ベクターは、その優れた特性から革新的癌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 Ad ベクターによる遺伝子治療 (導入) の際には、生体に既存の抗 Ad 抗体が遺伝子導入効率に大きな影響を及ぼす。すなわち、全身投与された Ad ベクターは抗 Ad 抗体により速やかに中和されてしまう。このため、癌に対する遺伝子治療臨床研究では抗 Ad 中和抗体を回避することを目指し、Ad ベクターは主に腫瘍部位へ局所投与されているが、局所投与した Ad ベクターの遺伝子導入効率における抗 Ad 抗体の影響について詳細に検討した報告は皆無である。そこで本年度は、Ad ベクターを用いた癌遺伝子治療の有効性ならびに安全性について、よりヒトに近いモデルを使用することで新たな考察を加えるべく、血中抗 Ad 抗体価が Ad ベクター局所投与による遺伝子発現に及ぼす影響について検討を行った。また、非増殖型 Ad ベクターは、自己増殖に必須の E1 遺伝子を欠損させることで、理論上 Ad 遺伝子が発現しないよう設計されている。しかし Ad ベクター作用後、わずかに Ad タンパク質が発現し、組織障害が誘導される。そこで、microRNA (miRNA) を利用して Ad 遺伝子の発現を抑制可能な、新規 Ad ベクターの開発を試みた。

### 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、高タイトル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、革新的癌治療薬として期待されている。

現在使用されている Ad ベクターのほとんどがサブグループ C に属する 5 型 Ad を基本骨格としているが、多くのヒトは成人になるまでに 5 型 Ad に自然曝露しており、地域差や年齢差があるものの、健常成人の約 80% が 5 型 Ad に対する抗体を保持している。全身投与された Ad ベクターはこの既存の抗 Ad 抗体により速やかに中和されるため、抗体を保持しているヒトに対しては 5 型 Ad ベクターによる遺伝子導入は極めて困難である。一方で、Ad ベクターを特定の臓器や組織などに局所投与する場合は、直接標的細胞に感染する経路が主な経路であるため抗 Ad 抗体の影響は受けにくいと考えられている。

さて、癌に対する Ad ベクターを用いた遺伝子治療においては、腫瘍細胞で選択的に増殖し腫瘍細胞を破壊する腫瘍溶解性 (oncolytic) Ad を含め、現在では様々な種類の抗腫瘍作用を有する Ad ベクターが開発されており著効を示す

ことが報告されている。癌に対する臨床研究では抗 Ad 中和抗体を回避することを目指し、Ad ベクターは主に腫瘍部位へ局所投与されているが、局所投与した Ad ベクターの遺伝子導入効率における抗 Ad 抗体の影響については議論が分かれている。

また、世界各地域の成人における抗 Ad 抗体価についての疫学調査によると、抗 Ad 抗体価は 18 から 1000、またはそれ以上と個人差が非常に大きいことが報告されている。しかしながら、Ad ベクター局所投与による遺伝子発現と抗 Ad 抗体の関係についてのこれまでの検討では、その抗 Ad 免疫の強度、すなわち抗 Ad 抗体価は正確に評価されておらず、抗 Ad 抗体価に個人差が大きいというヒトを反映した評価が行われているとは言い難い。そこで、Ad ベクターによる癌遺伝子治療のさらなる最適化に向け、よりヒトに近いモデルを使用することで新たな考察を加えるべく、血中抗 Ad 抗体価が Ad ベクター局所投与による遺伝子発現にどのような影響を及ぼすのかについて検討することとした。

一方、非増殖型 Ad ベクターは、自己増殖に必須の E1 遺伝子を欠損させることで、理論上 Ad 遺伝子が発現しないよう設計されている。しかしながら Ad ベクター作用後、わずかに Ad タンパク質が発現することにより、Ad タンパク質に

対する細胞性免疫や Ad タンパク質そのものによる組織障害が誘導され、遺伝子発現が徐々に減弱することが問題となっている。そこで、microRNA (miRNA) を利用して、Ad ベクター作用後の Ad 遺伝子の発現を抑制可能な新規 Ad ベクターの開発を試みた。

## B. 研究方法

### B-1. マウスへの抗 Ad 免疫

抗 Ad 免疫には、Ad 自体に対する免疫応答のみを誘導するため遺伝子発現カセットを搭載していない Ad ベクター (Ad-null) を使用した。マウス各個体に  $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$  または  $1 \times 10^{10}$  VP/mouse で Ad-null を尾静脈内投与することにより抗 Ad 抗体価の異なるマウスを調製することを試みた。Ad-null 投与 19 日後に眼窩採血により血液を回収し、遠心操作により得られた血清中の抗 Ad 抗体価を評価した。抗 Ad 抗体価は、ヒトの疫学調査で用いられている方法に基づき Ad ベクターの感染阻害実験にて決定した。

### B-2. Ad ベクターの腫瘍内局所投与後の遺伝子発現

抗 Ad 免疫のための Ad-null 投与から 10 日後に B16 メラノーマ細胞を  $5 \times 10^5$  cells/mouse でマウス腹部に皮下投与し、固形腫瘍を形成させた。9 日後、腫瘍径が 5 mm 以上になったところで AdRGD-Luc を  $1 \times 10^9$  VP/mouse で腫瘍内投与した。AdRGD-Luc を腫瘍内投与した 48 時間後にマウスより腫瘍および肝臓を回収しホモジナイズした後、ホモジネート液中のルシフェラーゼ活性を測定した。

### B-3. Ad ベクターの腫瘍内局所投与後の Ad ゲノム集積

前節において、AdRGD-Luc を腫瘍内投与した 48 時間後にマウスより腫瘍および肝臓を回収し得たホモジネート液から Total DNA を抽出した。そしてサンプル中の Ad ゲノムコピー数を定量的 PCR 法により測定した。プライマーおよび蛍光標識プローブは Ad ゲノムの E4 領域に設定した。Ad ベクターのスタンダードとしては、Ad ベクタープラスミド pAdHM4 を用いた。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。Ad E4-forward: 5' -CAC CAC CTC CCG GTA CCA TA-3' ; Ad E4-reverse: 5' -CCG CAC CTG GTT TTG CTT-3' ; Ad E4-probe: 5' -FAM-AAC CTG CCC GCC GGC TAT ACA CTG-TAMRA-3'

### B-4. miRNA の標的配列を挿入した Ad ベクターの作製と遺伝子発現効率

Ad ベクター作用後に有意な発現を示した E2A、

E4、または pIX 遺伝子の 3' 非翻訳領域に、肝臓特異的 miR-122a、または脾臓特異的 miR-142-3p の完全相補配列 4 コピーを挿入した Ad ベクターを遺伝子工学的手法により作製した (Figure 4, 5)。作製した Ad ベクターはルシフェラーゼ遺伝子を搭載させているため、ルシフェラーゼアッセイにより遺伝子発現効率を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、各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-null 単回投与後に誘導される抗 Ad 中和抗体価

マウスに様々な力価の Ad-null を投与し、19 日目に回収した血清を用いて Ad ベクターの感染阻害実験を行い、抗 Ad 中和抗体価を決定した (Figure 1)。その結果、抗 Ad 抗体価は前投与した Ad ベクターの力価に相関していたが、同力価を投与したマウスにおいても誘導された抗 Ad 中和抗体価には個体差が認められた。

### C-2. Ad ベクター局所投与後の腫瘍および肝臓における遺伝子発現

Ad-null を前投与し抗 Ad 免疫を誘導したマウスの腫瘍に AdRGD-Luc を局所投与し、2 日後の腫瘍および肝臓における遺伝子導入効率を Luciferase assay にて評価した。腫瘍においては Ad ベクター前投与を行っていないマウス、すなわち抗 Ad 抗体をもたないマウスと比較し、 $1 \times 10^8$  VP で免疫したマウスでは約 8 分の 1、 $1 \times 10^9$  VP では約 15 分の 1、 $1 \times 10^{10}$  VP では約 12000 分の 1 に Luciferase 発現が低下していた

(Figure 2A)。また、縦軸にマウス各個体の遺伝子発現量、横軸に抗 Ad 抗体価をプロットすると、腫瘍における遺伝子導入効率は抗 Ad 抗体価の上昇に伴い低下したが、抗体価が 200 以下のマウスでは比較的高い遺伝子導入効率を得られたものの、抗体価が 200 以上になると顕著に導入効率が減少した (Figure 2B)。以上より、抗体価が 200 以下であれば腫瘍内投与後、効率的な遺伝子発現が得られることが明らかとなった。腫瘍内に投与した Ad ベクターは投与部位から漏れ出て全身循環に入り、全身投与したときと同様に肝臓に集積し、そこで遺伝子発現することが明らかとなっている。そこで、腫瘍内投与後の肝臓における Luciferase 発現を検討して

みたところ、Ad ベクター前投与を行っていないマウスでは高い遺伝子発現が認められたが、前投与を行ったマウスでは前投与の投与量に関わらず、ほとんど Luciferase 発現が認められなかった (Figure 2C, D)。以上より、投与部位から漏れ出した Ad ベクターは、少しでも抗 Ad 抗体が存在すれば全身循環中に中和され肝臓での遺伝子発現は顕著に阻害されると考察された。

#### C-3. Ad ベクター局所投与後の腫瘍および肝臓における Ad 集積量

Ad-null を前投与したマウスの腫瘍に AdRGD-Luc を局所投与し、2 日後の腫瘍および肝臓に残存していた Ad ゲノムコピー数を TaqMan Real Time PCR によって評価した。その結果、腫瘍においては抗 Ad 抗体価が高くなるとゲノム数は減少するという、遺伝子発現量と同様の傾向が認められた (Figure 3A)。一方、肝臓においては抗体価と Ad ゲノムコピー数に相関が認められず、どの抗体価においてもほぼ同程度の Ad ゲノムが検出された (Figure 3B)。

#### C-4. miRNA の標的配列を挿入した Ad ベクターの作製と遺伝子発現効率

作製した Ad ベクターが、E2A、E4、または pIX 遺伝子の 3' 非翻訳領域に、miR-122a または miR-142-3p の完全相補配列 4 コピーが挿入されていることを、Rapid amplification of 3' -cDNA ends (3' -RACE) 解析により確認した。これら Ad ベクターは、通常の Ad ベクターの調整法を用いて、従来型 Ad ベクターと同程度のタイターが回収可能であった。またルシフェラーゼアッセイにより、in vitro 遺伝子発現効率も従来型 Ad ベクターと同程度であった (Figure 6)。

#### D. 考察

当該事業年度は、生体に既存の Ad に対する免疫応答に着目し、抗 Ad 抗体存在下での Ad ベクター局所投与による遺伝子導入効率について検討を行った。ヒトが保持する抗 Ad 抗体価は個人差が非常に大きいことから、個体ごとに様々な強さの抗 Ad 免疫を誘導したマウスを調製し Ad ベクターを腫瘍へ局所投与したところ、投与部位局所における遺伝子導入効率はある閾値以下の抗体価 (今回では 200) では比較的効率よく保たれていたが、閾値以上となると顕著に導入効率が低下することが明らかとなった。本検討の結果は、抗 Ad 抗体価は臨床における治療効果と密接に関係することを示唆しており、Ad ベクターを用いた遺伝子治療の際に患者の持つ抗 Ad 抗体価を考慮することは非常に有用であることを示している。

また、E2A、E4、または pIX 遺伝子の 3' 非翻訳領域に miRNA の標的配列を挿入した Ad ベクターを開発した。これら開発した Ad ベクターは従来型 Ad ベクターと比較して同程度の遺伝子発現効率を示した。今後これら Ad ベクターの遺伝子導入特性の解析を進める予定である。

#### E. 結論

Ad ベクターの腫瘍局所投与の際に既存の抗 Ad 中和抗体が遺伝子導入効率に与える影響について、個体ごとに抗 Ad 中和抗体価の異なるマウスを調製し検討を行った。その結果、ある閾値以下の抗体価では腫瘍局所投与部位での遺伝子発現は阻害されず、効率的に遺伝子発現できることが明らかとなった。また、E2A、E4、または pIX 遺伝子の 3' 非翻訳領域に miRNA の標的配列を挿入した Ad ベクターの開発に成功した。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### ●論文発表

- 1) Tomita K., Sakurai F., Tachibana M., Mizuguchi H. Correlation between adenovirus-neutralizing antibody titer and adenovirus vector-mediated transduction efficiency following intratumoral injection. *Anticancer Res.*, 32, 1145-1152 (2012)
- 2) Shimizu K, Sakurai F, Tachibana M, Mizuguchi H. Development of a novel adenovirus vector exhibiting microRNA-mediated suppression of the leaky expression of adenovirus genes. *Yakugaku Zasshi*, 132, 1407-1412 (2012)

##### ●学会発表

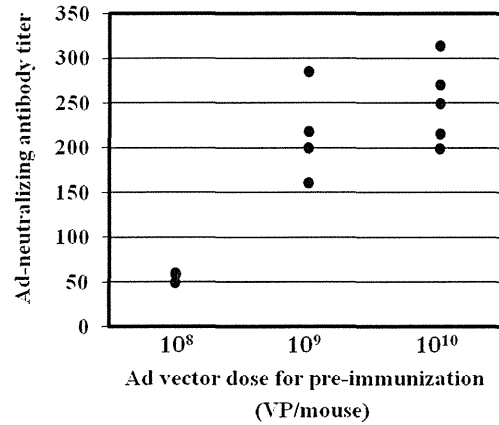
- 3) 富田恭子、櫻井文教、庄司正樹、立花雅史、水口裕之。アデノウイルスベクター局所投与による遺伝子発現への抗アデノウイルス抗体の影響、日本薬学会第 132 回年会、北海道、2012 年 3 月
- 4) Kyoko Tomita, Fuminori Sakurai, Masashi Tachibana, Hiroyuki Mizuguchi. Effect of adenovirus-neutralizing antibody on adenovirus vector-mediated transgene expression following intratumoral injection. 第 18 回日本遺伝子治療学会年次学術集会、熊本、2012 年 6 月
- 5) Kahori Shimizu, Fuminori Sakurai, Masashi Tachibana, Hiroyuki Mizuguchi. Development of a novel adenovirus vector carrying microRNA-targeted sequences in the



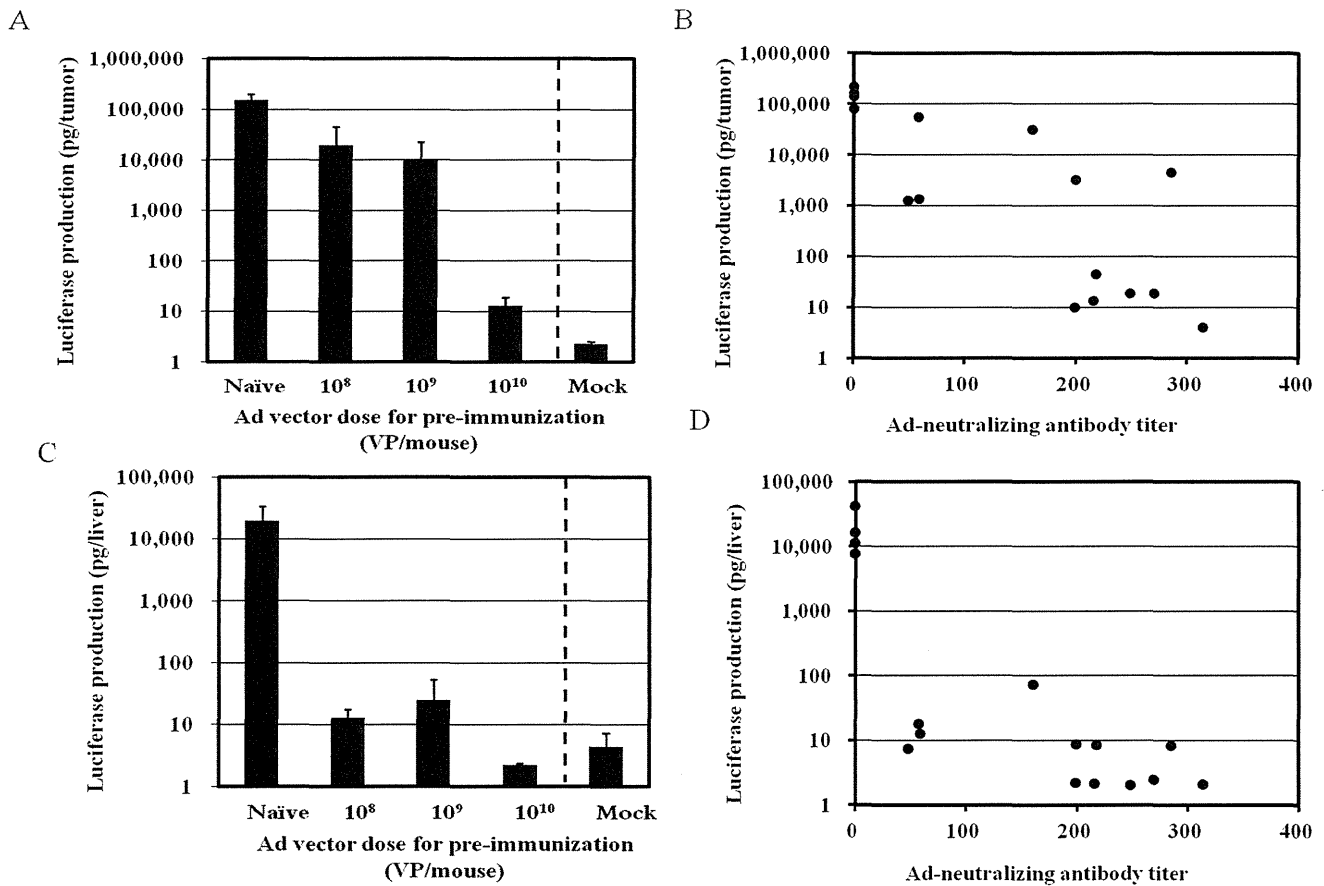
3' -untranslated region of the pIX, E2A, or E4 gene for suppression of the leaky expression of adenovirus genes, American Society of Gene and Cell Therapy 15th Annual Meeting、フィラデルフィア (アメリカ)、2012年5月

- 6) Kahori Shimizu, Fuminori Sakurai, Masashi Tachibana, Hiroyuki Mizuguchi. Development of a novel adenovirus vector by incorporating microRNA-targeted sequences into E2A, E4, or pIX genes for suppression of the leaky expression of adenovirus genes、第18回日本遺伝子治療学会年次学術集会、熊本、2012年6月
- 7) 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発現を抑制可能なアデノウイルスベクターの遺伝子導入特性に関する検討、アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2012、仙台、2012年9月
- 8) 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発現を抑制可能なアデノウイルスベクターの遺伝子導入特性解析、第62回日本薬学会近畿支部総会・大会、神戸、2012年10月
- 9) 清水かほり、櫻井文教、立花雅史、水口裕之、microRNA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、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月

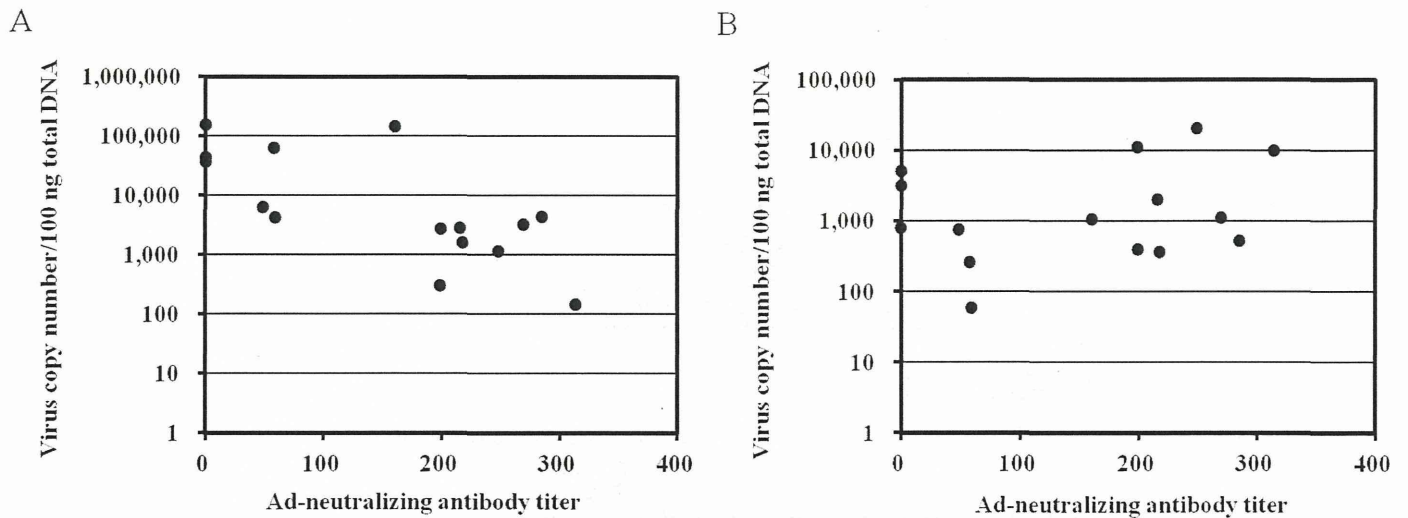
H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし



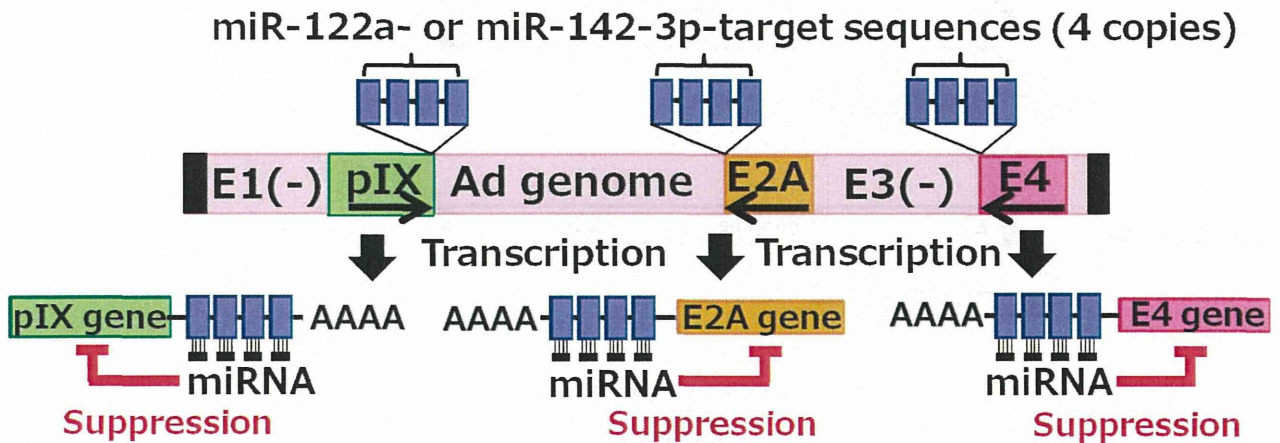
**Figure 1. AdNAb titer in the serum of pre-immunized mice.** Immunocompetent mice were immunized *via* intravenous injection of the indicated doses of null vector (n=3-5). On day 19 post-immunization, the serum samples were collected and subjected to the analysis of AdNAb titer by neutralizing assay. Each plot in the graph indicates an individual mouse.



**Figure 2. Luciferase expression in the tumor and liver after intratumoral administration of AdRGD-L2 into the non-immunized and pre-immunized mice.** AdRGD-L2 ( $1 \times 10^9$  VP/tumor) was intratumorally administered on day 19 after pre-immunization. Two days later, luciferase expression in the tumor (A) and liver (C) was measured by luciferase assay (n=3-5). Correlation between the AdNAb titer in serum and luciferase production in the tumor (B) and liver (D) of an individual mouse. Each plot indicates data from an individual mouse.



**Figure 3. Correlation between the AdNAb titer in serum and the copy numbers of Ad vector genome in the tumor and liver.** AdRGD-L2 ( $1 \times 10^9$  VP/tumor) was intratumorally administered on day 19 after pre-immunization. Two days after intratumoral administration, the tumor (A) and liver (B) were harvested, and the copy numbers of the adenovirus vector genome were measured by quantitative TaqMan PCR assay. Each plot indicates data from an individual mouse.



**Figure 4. Development of an Ad vector exhibiting miRNA-mediated suppression of the leaky expression of Ad Genes.** Four copies of sequences perfectly complementary to miRNA were incorporated into the 3'-untranslated region of the Ad gene.

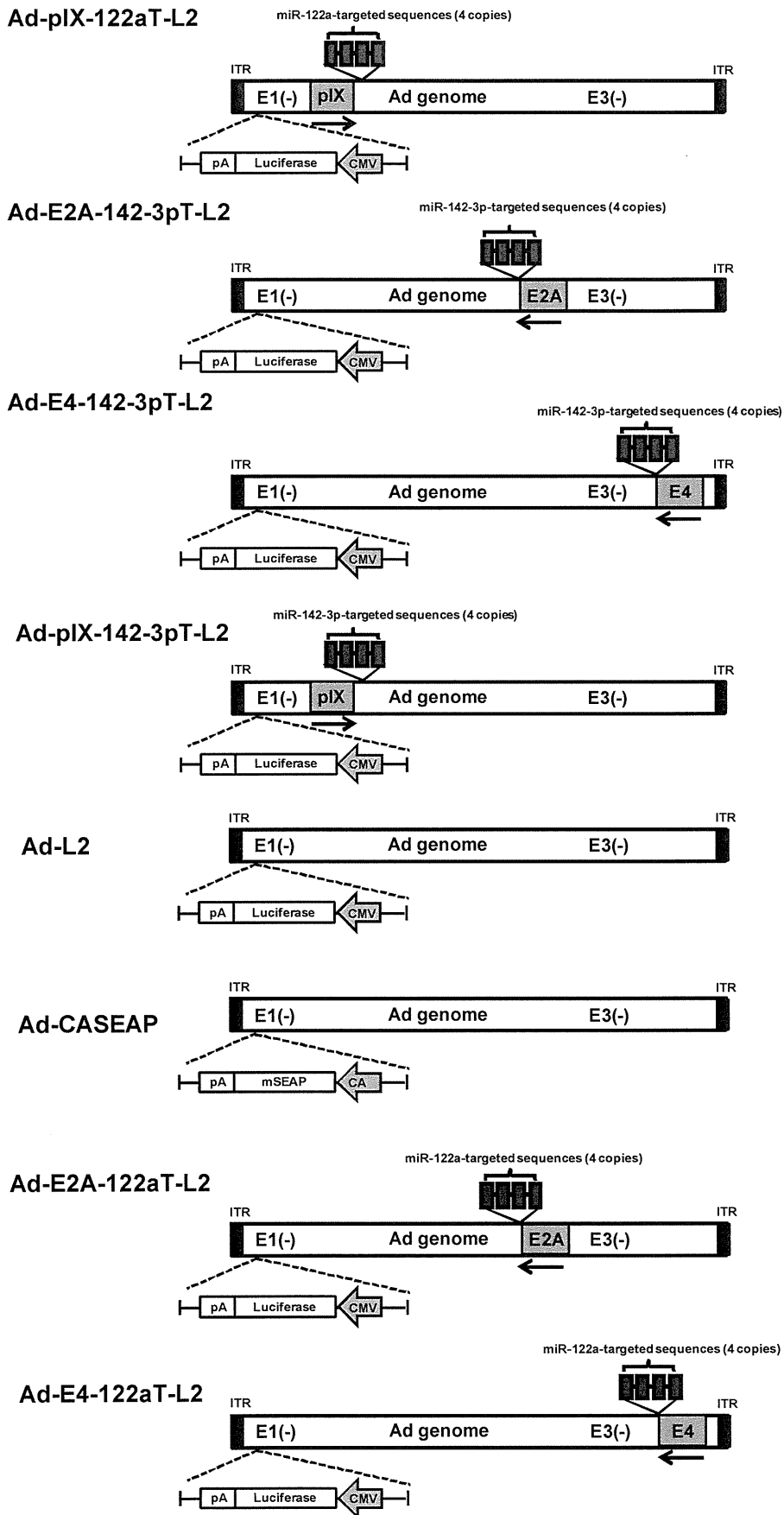
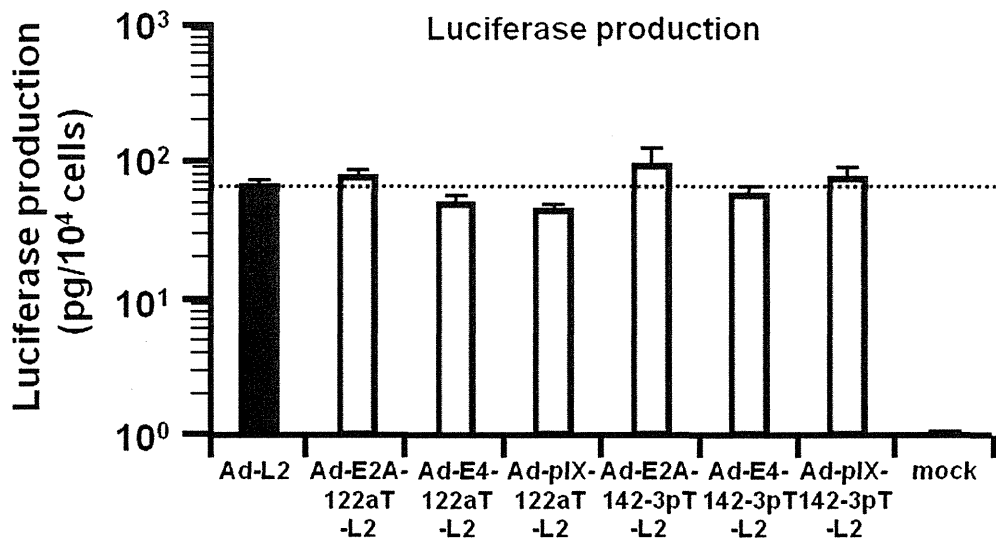


Figure 5. Schematic diagrams of plasmid DNA for Ad vectors.



**Figure 6.** *In vitro* transduction efficiencies of Ad vectors in cultured cells. HuH-7 cells were transduced with Ad vectors at an MOI of 10 for 1.5 h. Two days after the transduction, the luciferase production in HuH-7 cells was measured by a luminescence assay. The data are expressed as the mean values  $\pm$  S.D. (n=4).

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

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・教授

研究要旨

本研究では、難治がんに対する標的バイオ医薬の一つとして開発が進められ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・ヒューマン臨床試験で使用することを視野に入れ、その品質保証や製造法について検討を加えている。昨年度は腫瘍標的型アデノウイルスベクターの安全性と有効性について検討したが、本年度は倫理性に焦点を当てた。昨年構築した Design Buildup Team (DBT) に、新たに臨床試験を実施する上で必要なプロジェクトマネージャー、企画立案担当、生物統計家、データマネージャー、薬事担当を加え、検討を行った。そしてその結果を開発研究にフィードバックするリバーストランスレーションの道筋を作った。今後はこれらを活用し、より戦略的な研究開発スタイルを実現することで、腫瘍標的型アデノウイルスベクターを用いる臨床試験の早期実施を目指す。また、昨年度確立した安全性や有効性を評価するためには細胞レベルでの腫瘍検出技術の確立が重要であることから、これについても検討を加えた。

A. 研究目的

本研究では、昨年度から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先端医療開発実績を元に、本研究班内で開発が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づくりを検討している。昨年度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臨床試験用の腫瘍標的型アデノウイルスベクターを製造することを前提に、安全性及び有効性を評価するための仕組み作りを開始し、腫瘍標的型アデノウイルスベクターを用いた臨床試験を実施する際に求められる基本的評価項目並びに特殊評価項目の選定を行った。そこで今年度は腫瘍標的型アデノウイルスベクターを用いる臨床試験を実施するにあたり求められる倫理性について検討を加えるとともに、トランスフェリン (Tf) を結合させた量子ドットを腫瘍標的型アデノウイルスベクターに見立てた細胞レベルの腫瘍検出技術の開発にも着手した。

B. 研究方法

B-1. 腫瘍標的型アデノウイルスベクターを用いる臨床試験を実施するにあたり求められる倫理性

人を対象にした臨床試験は、安全性が十分担保された環境下で実施されなければならない。その

際、規範となるのが 1964 年に世界医師会総会で採択されたヘルシンキ宣言である。この宣言はその後、数回の改定を受け、現在に至っているが、ここでは、1) 科学的・倫理的に適正な配慮を記載した臨床試験実施計画書を作成すること、2) 治験倫理審査委員会で臨床試験計画の科学的・倫理的な適正さが承認されること、3) 被験者に、事前に説明文書を用いて臨床試験計画について十分に説明し、臨床試験への参加について自由意思による同意を文書で得ることを基本原則に掲げている。我が国では 1997 年に「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成 9 年 3 月 27 日 厚生省令第 28 号）（ICH-GCP 省令）が発行され、国際基準に則った臨床試験の基盤が整備された。そこで本研究ではこの流れに沿って、腫瘍標的型アデノウイルスベクターを用いる臨床試験の実施を前提に、ICH-GCP に基づいた臨床試験の支援体制を提供するための整備を進めた。

B-2. 腫瘍検出技術の開発

本研究では、対象となる膵がん等を標的化するための標的分子の同定を進めているが、一方で標的化できたかどうかを評価するための技術開発が必要になっている。標的分子の候補は出ているが、まだ調製等が追いついていないことから今年度はがん細胞で高い発現が確認されている Tf 受容体に注目し、Tf を結合させた量子ドット (QDs-Tf) を使って培養膵がん細胞株等で腫瘍検出技術の開発に着手した。

## C. 研究結果

### C-1. 腫瘍標的型アデノウイルスベクターを用いる臨床試験を実施するにあたり求められる倫理性

本研究が目指す腫瘍標的型アデノウイルスベクターを用いる臨床試験は、「臨床研究に関する倫理指針」及び「遺伝子治療臨床研究に関する指針」に則り、実施する必要がある。これまでの我々の経験から開発をスムーズに進めるためには、臨床試験計画を可能な限り早期に策定し、開発研究との間で情報交換を頻回に行い、互いにブラッシュアップしていくことが重要であるとわかっている（トランスレーションとリバーストランスレーション）。そこで、昨年度構成した Design Build-up Team (DBT) に、臨床試験を実施する上で必要なプロジェクトマネージャー、企画立案担当、生物統計家、データマネージャー、薬事担当を加え、臨床試験計画の検討を行った。検討した項目は、試験デザイン、選択基準・除外基準、用法・用量、観察期間、評価項目、統計解析方法、目標症例数である。今後、これらと基礎研究データを対応して最終的な試験計画につなげていく。

### C-2. 腫瘍検出技術の開発

培養腫瘍がん細胞株等で腫瘍検出技術の開発を行った。Tf 受容体の発現には細胞株による違いがあったが、それぞれの細胞株で発現を確認した。そして、対象とした培養がん細胞に QDs-Tf が効率よく取り込まれることを確認し、イメージ化した。

## D. 考察

腫瘍標的型アデノウイルスベクターを用いる臨床試験を推進するにあたり、ICH-GCP に基づいた臨床試験を実施・支援する体制は極めて重要である。こういった支援体制の整備は従来、基礎研究と前臨床試験が終了し、ファースト・イン・ヒューマン臨床試験を実施できる可能性がでてきてはじめて検討対象になっていた。しかしながらこの形では時間や研究に無駄の多いことがわかり、我々は開発当初より Design Build-up Team (DBT) を構成し、戦略的に研究を進める試みを展開している。こういった試みは、文部科学省・厚生労働省の「臨床研究・治験活性化5か年計画 2012」(平成 24 年 3 月 30 日)においても求められている。名古屋大学医学部附属病院では、2012 年度から文部科学省「橋渡し研究加速ネットワークプログラム」及び厚生労働省「臨床研究中核病院整備事業」にそれぞれ採択されたことで、質の高い臨床研究を実施できる体制の整備を、病院長を中心に進めている。そこで本研究もこの体制を意識した進め方を実践している。

一方、本年度着手した腫瘍検出技術については来年度、in vivo での検証にも取り組む方向性を出していく予定である。

## 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・ヒューマン臨床試験で早期に使用できるようにするには、ICH-GCP に基づいた臨床試験の支援体制の中で、開発研究側と連携を強化していくことが重要であることがわかった。今後は本年度、機能拡充を行った DBT を中心に検証していく予定である。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### ●論文発表

- 1) Tanaka H., Mizuno M., Ishikawa K., Nakamura K., Kajiyama H., Kano H., Kikkawa F., and Hori M. Plasma-Activated Medium Selectively Kills Glioblastoma Brain Tumor Cells by Down-Regulating a Survival Signaling Molecule, AKT Kinase. *Plasma Medicine*: 1(3-4), 265-277, 2013
- 2) Takaha N, Nakanishi H, Kimura Y, Hongo F, Kamoi K, Kawauchi A, Mizuno M, Yoshida J, Wakabayashi T, Miki T. Significant induction of apoptosis in renal cell carcinoma cells transfected with cationic multilamellar liposomes containing the human interferon- $\beta$  gene through activation of the intracellular type 1 interferon signal pathway. *Int J Oncol*. 40(5):1441-6, 2012

### ●学会発表

- 1) Tanaka H, Nakamura K, Iseki S, Moriyama H, Kajiyama H, Ishikawa K, Kano H, Kikkawa F, Mizuno M, Hori M. Plasma-activated medium effectively killed glioma cancer cells. The 5th International Conference on Plasma-Nanotechnology & Science 2012 Inuyama, Japan, Mar. 9-10, 2012
- 2) Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Kikkawa F, Hori M. Analysis of the intracellular molecular mechanisms of plasma-activated medium mediated cell death in glioma brain tumor cells. APCPST-2012 (Kyoto, Japan), Oct 2-5-2012
- 3) Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Kikkawa F, Hori M. Plasma-activated medium induced apoptosis on glioblastoma brain tumor cells. The 5th PLACIA & PLAM International Symposium. Nagoya, Japan, Oct 24, 2012

- 4) Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Kikkawa F, Hori M. Characterization of anti-tumor effect of glioblastoma brain tumor cells by Plasma-activated medium. The 6th International Conference on Plasma-Nanotechnology & Science 2013 Gero, Japan, Jan. 2-3, 2013
- 5) Tanaka H, Nakamura K, Iseki S, Moriyama H, Kajiyama H, Ishikawa K, Kano M, Kikkawa F, Mizuno M, Hori M. Anti-tumor effects of glioma cancer cells by plasma activated medium 2012年 春季 第58回応用物理学会学術講演会(東京) 2012年3月15-18日
- 6) Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Kikkawa F, Hori M. Selective killing of glioma brain tumor cells by plasma-activated medium 2012年 秋季 第59回応用物理学会学術講演会(松山) 2012年9月11-14日
- 7) Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Kikkawa F, Iori M. Intracellular molecular mechanisms of apoptosis in glioblastoma brain tumor cells by plasma-activated medium 2013年 秋季 第60回応用物理学会学術講演会(厚木) 2013年3月27-29日
- 8) 権田亮、田中宏昌、竹田圭吾、田島聡美、近藤博基、石川健治、関根誠、加納浩之、水野正明、堀勝。混合ガスプラズマ培養液によるグリオーマ脳腫瘍培養細胞に対する抗腫瘍効果の解析 2013年 秋季 第60回応用物理学会学術講演会(厚木) 2013年3月27-29日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

- 特許取得状況  
特になし



## 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
Tagawa M, Kawamura K, Yu L, Tada Y, Hiroshima K, Shimada H.	A gene medicine with the midkine-mediated transcriptional regulation as new cancer therapeutics.	Erguven M, Muramatsu T, Bilir A.	Midkine: From embryogenesis to pathogenesis and therapy.	Springer- Verlag GmbH	Heidelberg, Germany.	2012	237-246
Fukamachi T, Saito H, Tagawa M, Kobayashi H.	The impact of extracellular low pH on the anti-tumor efficacy against mesothelioma.	Zubritsky A.	Mesotheliomas -synonyms and definition, epidemiology, etiology, pathogenesis, cyto-histopatho logical features, clinic, diagnosis, treatment, prognosis.	InTech	Rijeka, Croatia	2012	187-210

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
Nishimoto T, Yamamoto Y, Yoshida K, Goto N, Ohnami S, <u>Aoki K.</u>	Development of peritoneal tumor-targeting vector by in vivo screening with a random peptide-displaying adenovirus library.	PLoS ONE	7	e45550	2012
Miura Y, Yamazaki S, Julia D, Brown E, <u>Aoki K.</u> , Vivkers S, Yamamoto M.	Infectivity-selective Oncolytic Adenovirus Developed by High-throughput Screening of Adenovirus-formatted Library.	Mol Ther	21	139-148	2013
Kimura J, Ono H, Kosaka T, Makino H, Akiyama H, Ichikawa Y, Nagashima Y, Hirai S, Ohno S, <u>Aoki K.</u> , Davydova J, Yamamoto M, Kunisaki C, Endo I.	Conditionally replicative adenoviral vectors for imaging the effect of chemotherapy on pancreatic cancer cells.	Cancer Sci.			in press
Iguchi K, Sakurai F, Tomita K, Katayama K, Yamaguchi T, <u>Tagawa M.</u> , 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
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, <u>Tagawa M.</u>	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, <u>Tagawa M.</u> , 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
Okamoto S, Kawamura K, Li Q, Yamanaka M, Yang S, Fukamachi T, Tada Y, Tatsumi T, Shimada H, Hiroshima K, Kobayashi H, <u>Tagawa M.</u>	Zoledronic acid produces antitumor effects on mesothelioma through apoptosis and S-phase arrest in p53-independent and Ras prenylation-independent manners.	J Thorac Oncol	7	873-882	2012

Nagakawa H, Shimozato 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	275	90-97	2012
Kitazono-Saito M, Takiguchi Y, Kitazono S, Ashinuma H, Kitamura A, Tada Y, Kurosu K, Sakaida E, Sekine I, Tanabe N, <u>Tagawa M</u> , Tatsumi K	Interaction and cross-resistance of cisplatin and pemetrexedin malignant pleural mesothelioma cell lines.	Oncol Rep	28	33-40	2012
Shimada H, Yajima S, Oshima Y, Hiwasa T, <u>Tagawa M</u> , Matsushita K, Nomura F.	Impact of serum biomarkers on esophageal squamous cell carcinoma.	Esophagus	9	131-140	2012
Nagaya H, <u>Tagawa M</u> , Hiwasa K, Terao S, Kanno T, Nishizaki T, Gotoh A.	Fiber-substituted conditionally replicating adenovirus for oncolysis of human renal carcinoma cells.	Anticancer Res	32	2985-2990	2012
Yamanaka M, Tada Y, Kawamura K, Li Q, Okamoto S, Chai K, Yokoi S, Liang M, Fukamachi T, Kobayashi H, Yamaguchi N, Kitamura A, Shimada H, Hiroshima K, Takiguchi Y, Tatsumi K, <u>Tagawa M</u> .	E1B-55kD-defective adenoviruses activate p53 in mesothelioma and enhance cytotoxicity of anti-cancer agents.	J Thorac Oncol	7	1850-1857	2012
Wu D, Hiroshima K, Matsumoto S, Nabeshima K, Yusa T, Ozaki D, Fujino M, Yamakawa H, Nakatani Y, Tada Y, Shimada H, <u>Tagawa M</u> .	Diagnostic usefulness of p16/CDKN2A FISH in distinguishing between sarcomatoid mesothelioma and fibrous pleuritis.	Am J Clin Pathol	139	39-46	2013
Tada Y, Shimada H, Hiroshima K, <u>Tagawa M</u> .	A potential therapeutic strategy for malignant mesothelioma with gene medicine.	BioMed Res Int	572609	120-127	2013

Tagawa M, Tada Y, Shimada H, Hiroshima K.	Gene therapy for malignant mesothelioma: Current prospects and challenges.	Cancer Gene Ther	20	150-156	2013
Fukamachi T, Ikeda S, Wang X, Saito H, Tagawa M, Kobayashi H.	Gene expressions for signal transduction under acidic conditions.	Genes	4	65-85	2013
Okamoto S, Jiang Y, Kawamura K, Shingyoji M, Fukamachi T, Tada Y, Takiguchi Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K, Kobayashi H, Tagawa M.	Zoledronic acid produces combinatory anti-tumor effects with cisplatin on mesothelioma by increasing p53 expression levels.	PLoS ONE	8	e60297	2013
Li Q, Kawamura K, Tada Y, Shimada H, Hiroshima K, Tagawa M.	Novel type III interferons produce anti-tumor effects through multiple functions.	Front Biosci			in press
Hasegawa N, Abei M, Yokoyama KK, Fukuda K, Seo E, Kawashima R, Nakano Y, Yamada T, Nakade K, Hamada H, Obata Y, Hyodo I.	Cyclophosphamide enhances antitumor efficacy of oncolytic adenovirus expressing uracil phosphoribosyltransferase (UPRT) in immunocompetent Syrian hamsters.	Int J Cancer			in press
Liu B, Ohishi K, Orito Y, Nakamori Y, Nishikawa H, Ino K, Suzuki K, Matsumoto T, Masuya M, Hamada H, Mineno J, Ono R, Nosaka T, Shiku H, Katayama N.	Manipulation of human early T lymphopoiesis by coculture on human bone marrow stromal cells: Potential utility for adoptive immunotherapy.	Exp Hematol			in press
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	421	349-354	2013
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	157	674-686	2012