

201220026B

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

光感受性ROS産生蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変
アデノウイルス製剤を用いた新たな癌の
光線力学療法システムの開発

(H22-3次がん-一般-027)

平成22～24年度 総合研究報告書

研究代表者 藤原 俊義

平成25 (2013) 年 5月

目 次

I.	総括研究報告 -----	1
	「光感受性ROS産生蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変アデノウイルス 製剤を用いた新たな癌の光線力学療法システムの開発」	
II.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	6
III.	研究成果の刊行物・別刷 -----	14

光感受性ROS産生蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変アデノウイルス製剤を用いた新たな癌の光線力学療法システムの開発

研究代表者 藤原 俊義

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・消化器外科学・教授

【研究要旨】

テロメライシンは岡山大学で開発された国産の抗癌アデノウイルス製剤であり、テロメラーゼ構成成分である*hTERT*遺伝子のプロモーターにより、癌細胞のみで選択的に増殖して腫瘍融解を引き起す。本研究では、テロメライシンに光感受性蛍光タンパク質をコードする遺伝子を搭載した改変アデノウイルス製剤を開発する。腫瘍選択的に光感受性蛍光タンパク質を発現させ、治療用デバイスにて励起光照射することで癌細胞のみで活性酸素（reactive oxygen species : ROS）を産生して細胞死を誘導する新たな癌の光線力学療法を確立する。

まず、光感受性蛍光タンパク質*KillerRed*遺伝子を発現するプラスミドを作成し、各種培養ヒト癌細胞株に遺伝子導入を行って励起・蛍光スペクトルを確認した。ヒト肺癌、子宮頸癌、骨肉腫細胞において*KillerRed*遺伝子を発現させ励起光照射を行ったところ、赤色蛍光は急速に退色し、約1時間以内に*KillerRed*発現細胞は死滅した。また、励起光照射による細胞死の分子機構について解析し、ROSの産生上昇とアポトーシス誘導を確認した。さらに、テロメライシンのE3領域に*KillerRed*遺伝子を搭載した*TelomeKiller*ウイルスを作成し、*TelomeKiller*を感染させ48時間経過したヒト癌細胞に励起光照射することで有意に強い抗腫瘍効果がみられることを明らかにした。大動物実験では、ミニブタの開腹下に*KillerRed*遺伝子発現ヒト癌細胞をリンパ節などに注入し、励起光照射硬性ビデオスコープにて赤色蛍光を検出可能であることを検証した。

A. 研究目的

テロメライシン（*Telomelysin*、開発コード：OBP-301）は岡山大学で開発された国産の抗癌アデノウイルス製剤であり、癌細胞で選択的に増殖・複製する機能を有しており、自立的に癌細胞を破壊することで増殖したウイルスが拡散していく。したがって、テロメライシン自体が新しい作用機構に基づく新規の画期的な医薬品となるが、ゲノム構造が明らかなアデノウイルスを基本骨格としているため、テロメライシンはベクターとして応用可能であり、導入遺伝子の癌選択的かつ長期的発現が期待できる。

最近、GFPをはじめとする蛍光タンパク質は分子イメージングのマーカーとして注目されているが、マーカー機能では細胞毒性が低いものが選択される。研究代表者らも、GFP遺伝子を搭載したテロメスキャン（*TelomeScan*、OBP-401）を診断用医薬品として開発してきたが、GFP自体の細胞毒性は極めて低い（Kishimoto *et al.*, *Nature Med.*, 12, 1213-1219, 2006）。その発想を転換し、本研究では診断と治療を融合した新しい研究分野「*Theranostics*」の医薬品として、光誘導細胞死を生じる新規蛍光赤色タンパク質*KillerRed*遺伝子を用いた光感受性武装化アデノウイルス製剤を開発する。標的癌細胞でウ

イルス増殖に伴う強い蛍光タンパク質発現により癌細胞の可視化を可能とし、また同時に励起光照射で産生されるROSによる強力な細胞傷害活性が発揮される。すなわち、遺伝子改変ウイルス製剤を基盤とする本技術は、分子イメージングと分子手術による全く新しい独創的な治療戦略と言える。

本研究では、テロメラーゼ依存性増殖機能を持つアデノウイルス製剤テロメライシンをベクターとして癌細胞選択的に光感受性蛍光タンパク質遺伝子を発現する次世代型武装化アデノウイルス製剤を作成し、新たな癌の光線力学療法としてその機能解析、小動物・大動物を用いた有効性・安全性の検討を終了することを目指す。

B. 研究方法

1) *KillerRed*遺伝子発現プラスミドの作成

*KillerRed*は*Anthomedusae*クラゲの発色タンパク質である*anm2CP*を改変して開発された新しい赤色蛍光タンパク質であり、540~580nmの緑色光照射によって活性酸素（reactive oxygen species : ROS）を産生して細胞死を誘導することができる。今回、励起光照射による細胞死の誘導効率を確認し、光線力学療法としての有用性を検証するために、*KillerRed*遺伝子発現プラスミドを準備した。ヒト非

小細胞肺癌細胞株H1299にKillerRed遺伝子発現プラスミドをリポフェクション法で導入し、G418（ネオマイシンアナログ）投与で細胞選択を行った後に限界希釈法でstable cloneを樹立した。

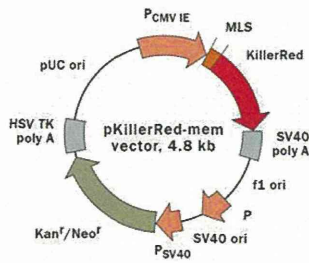


図1 KillerRed遺伝子発現プラスミドの構造

さらに、標的細胞でKillerRedとAequorea victoria由来のGreen Fluorescent Protein (GFP)を同時に発現するために、KillerRedとEGFPをIRES配列で連結した発現カセットを挿入したプラスミドも作成した。KillerRed遺伝子発現には、Evrogen社細胞膜局在ベクターpKillerRed-memを使用した。また、EGFPを共発現するベクターは以下の手順で作成した。

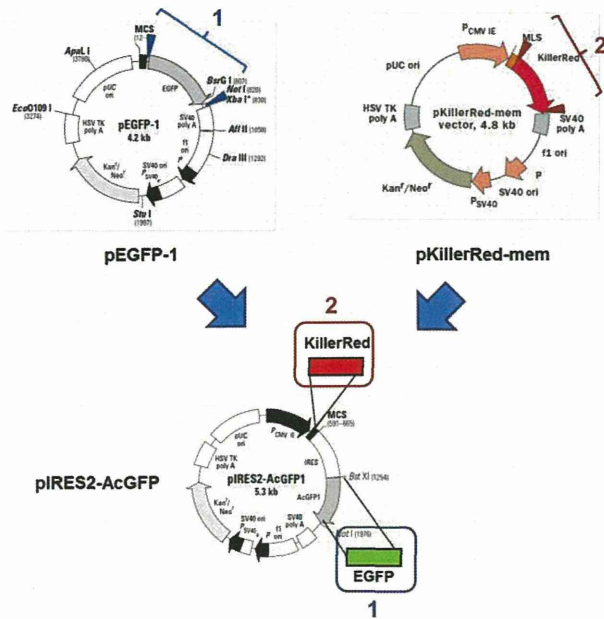


図2 KillerRed/EGFP遺伝子発現ベクターの作成

2) 各種培養ヒト癌細胞株におけるKillerRed遺伝子発現とタイムラプス観察

ヒト肺癌、子宮頸癌、骨肉腫細胞（H1299、HeLa、OST）にLipofectamin、FuGeneHD等の試薬を用いてKillerRedあるいはKillerRed/EGFP発現プラスミドを導入し、G418（ネオマイシンアナログ）添加でstable cloneを樹立した。540-580nmの緑色励起光を照射し、蛍光顕微鏡下でタイムラプス観察を行うことで細胞死誘導を比較検討した。

3) KillerRed遺伝子発現ヒト肺癌細胞のタイムラプ

ス観察と分子機構の解析

KillerRed遺伝子発現H1299細胞に励起光照射し、蛍光顕微鏡下でタイムラプス観察を行うことで細胞死誘導を観察した。また、その分子機構を解析するために、活性化カスパーゼ3の免疫染色を行い、さらに活性酸素反応性蛍光試薬（DCF-DA）を用いた細胞内活性酸素（ROS）レベルの測定を行った。

4) KillerRed遺伝子発現テロメラインの作成

テロメラインはhTERTプロモーターでアデノウイルスの増殖に必要なE1A、E1B遺伝子を駆動する増殖カセットを搭載しており、今回、サイトメガロウイルス・プロモーターの下流にKillerRed遺伝子を組み込み、テロメライン・ゲノムのE3領域に搭載することで、KillerRed遺伝子発現テロメラインであるTelomeKillerを作成した。癌細胞で選択的に増殖し、強力なKillerRed遺伝子発現を来す。

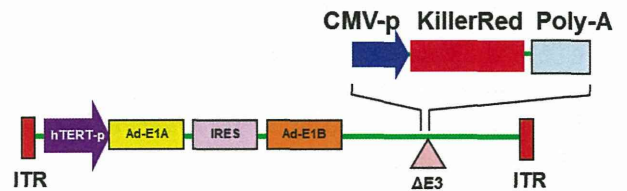


図3 TelomeKillerウイルスの構造

5) KillerRed用励起光照射デバイスの試作

オリンパスと共同で、KillerRedタンパク質に蛍光発現させるための励起光照射用ビデオスコープを試作した。励起波長570~590nmの励起光を発生し、KillerRed遺伝子発現細胞にて蛍光波長600~655nmの近赤外蛍光を誘導することができる。

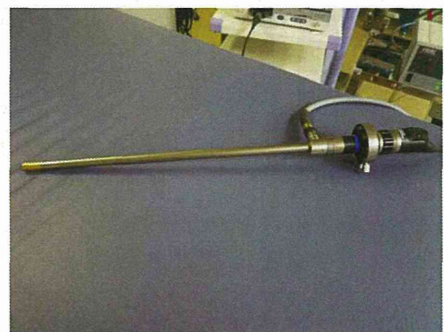


図4 KillerRedタンパク質励起用ビデオスコープ

6) 大動物におけるKillerRed遺伝子発現ヒト癌細胞の可視化

KillerRed遺伝子発現H1299ヒト肺癌細胞を濃縮懸濁液にして、全身麻酔下のミニブタに開腹にて胃壁や近傍リンパ節に注入した。気腹下に励起光照射用ビデオスコープを用いて静止画、動画撮影を行った。

(倫理面への配慮)

制限増殖型ウイルス製剤を用いる本研究は「大臣確認実験」となるため、「第二種使用等拡散防止措置確認申請書」を作成、学内の担当部署での検討の後に文部科学省に申請し、研究計画実施の承認を得ている。

C. 研究結果

1) 各種培養ヒト癌細胞株におけるKillerRed遺伝子発現とタイムラプス観察

ヒト肺癌、骨肉腫細胞においてKillerRed遺伝子を発現させ580nmの緑色励起光を照射したところ、KillerRedタンパク質発現による赤色蛍光は急速に退色がみられ、約1時間以内にKillerRed遺伝子発現細胞は死滅した。

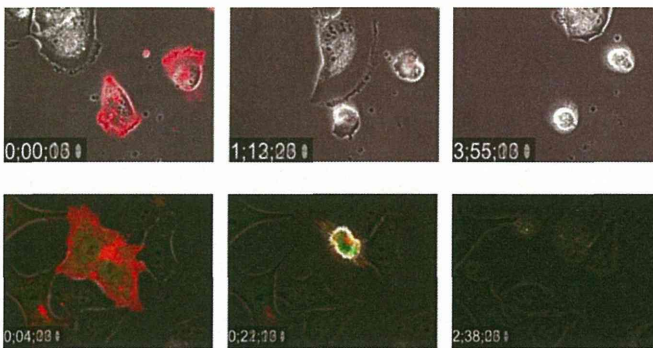


図5 KillerRed発現細胞のタイムラプス観察
(上段：H1299細胞、下段：OST細胞)

一方、KillerRed/EGFP発現させた子宮頸癌細胞にそれぞれの励起光を照射したところ、EGFPの緑色蛍光は比較的維持されたが、やはり赤色蛍光は早期に退色して細胞死が誘導された。



図6 KillerRed/EGFP遺伝子共発現HeLa細胞のタイムラプス観察

2) KillerRed遺伝子発現ヒト肺癌細胞の細胞死の分子機構の解析

KillerRed遺伝子発現H1299ヒト肺癌細胞に蛍光顕

微鏡下で励起光を照射しタイムラプス観察を行ったところ、5分以内に急速なPhotobleachingが生じ、照射領域では1時間以内に強力な細胞障害活性が認められた。

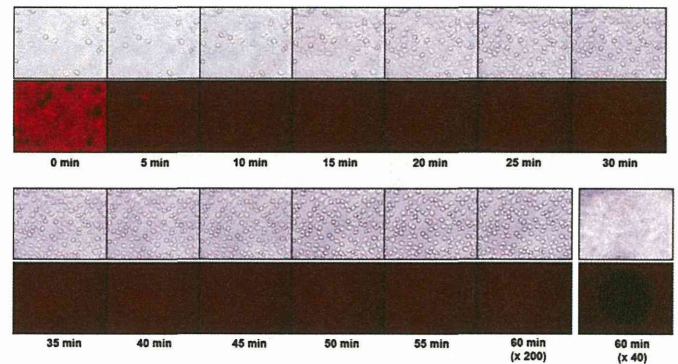


図7 励起光照射による細胞障害活性

また、照射部位の境界領域の細胞では活性化カスパーゼ3の免疫蛍光染色が陽性となり、励起光照射されたKillerRed遺伝子発現細胞ではアポトーシスが誘導されていると考えられた。

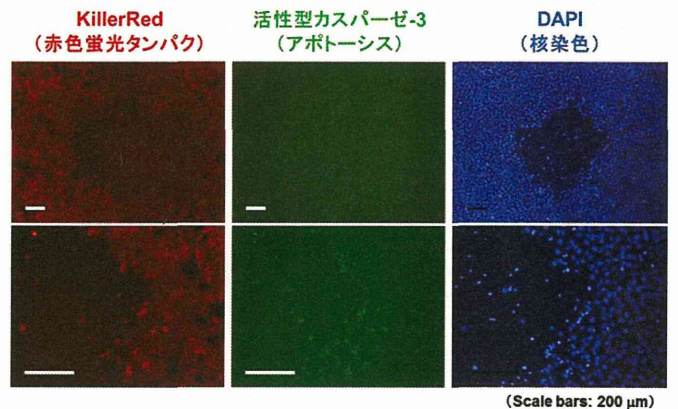


図8 KillerRed遺伝子発現細胞のアポトーシス誘導

さらに、KillerRed遺伝子発現H1299細胞に15分間励起光照射し、その1.5時間後に活性酸素反応蛍光試薬を添加して活性酸素 (ROS) 発現を調べたところ、無処置のH1299細胞やROS産生しない近赤外蛍光タンパク質Katushkaを発現するH1299に比較して、有意に高いROS産生が確認された。

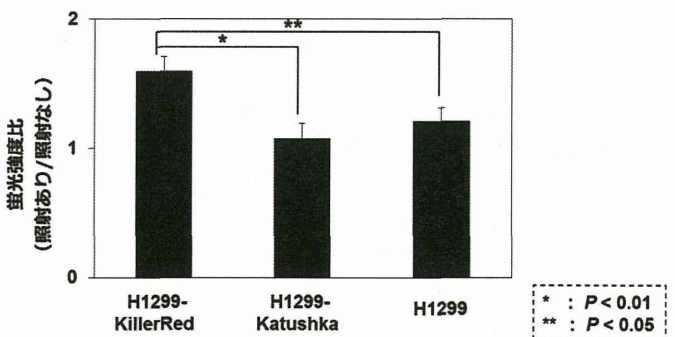


図9 励起光照射による活性酸素 (ROS) 産生

3) TelomeKiller感染によるKillerRed遺伝子発現H1299ヒト肺癌細胞に各種濃度のTelomeKillerウ

ウイルスを感染させ、24時間後に蛍光顕微鏡下に赤色蛍光発現を確認した。10 MOI (multiplicity of infection) のTelomeKillerウイルスの感染で、ほぼ100%のKillerRed遺伝子発現を確認できた。

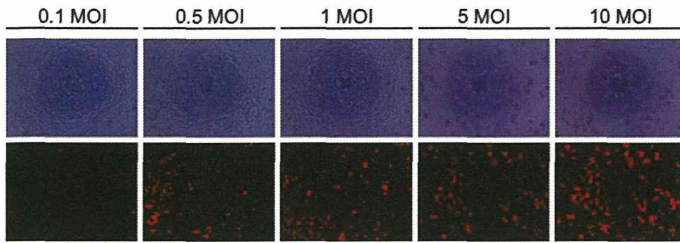


図10 TelomeKillerによるKillerRed遺伝子発現

4) TelomeKiller感染による抗腫瘍効果の検討

H1299ヒト肺癌細胞において、励起光非照射状態でのTelomeKillerの抗腫瘍効果をTelomelysinやGFP遺伝子を発現するTelomeScanと比較したところ、同等かより強い細胞障害活性が観察された。

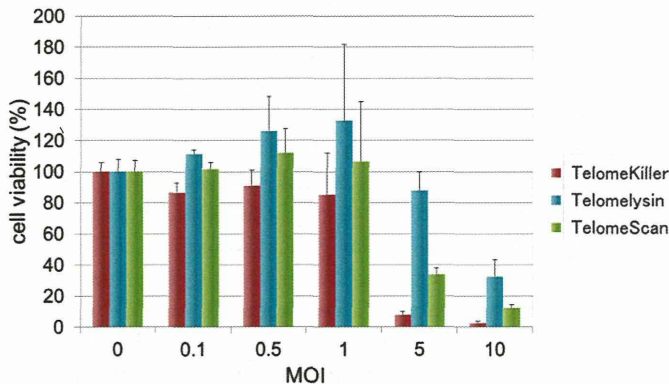


図11 TelomeKiller単独の抗腫瘍効果

また、TelomeKillerを感染させ48時間経過したヒト大腸癌細胞HCT-116に励起光照射することで、有意に強い抗腫瘍効果を確認できた。

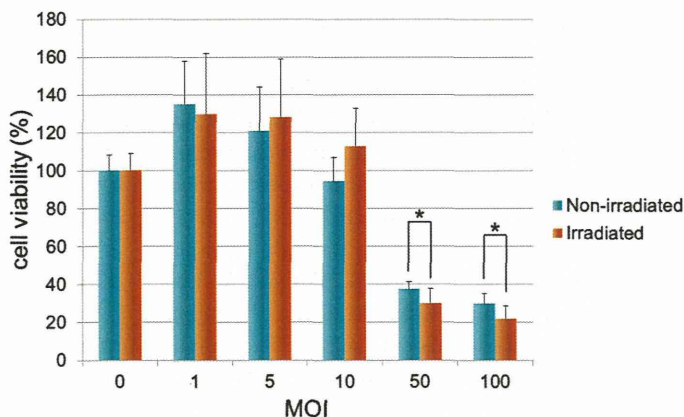


図12 励起光照射による抗腫瘍効果の増強

ヒト肺癌細胞H1299にTelomeKillerを感染させ励起光照射を行うと、5分以内に急速なPhotobleaching

が生じ、1時間以内でGFP蛍光が減弱する完全細胞死を誘導することが可能であった。

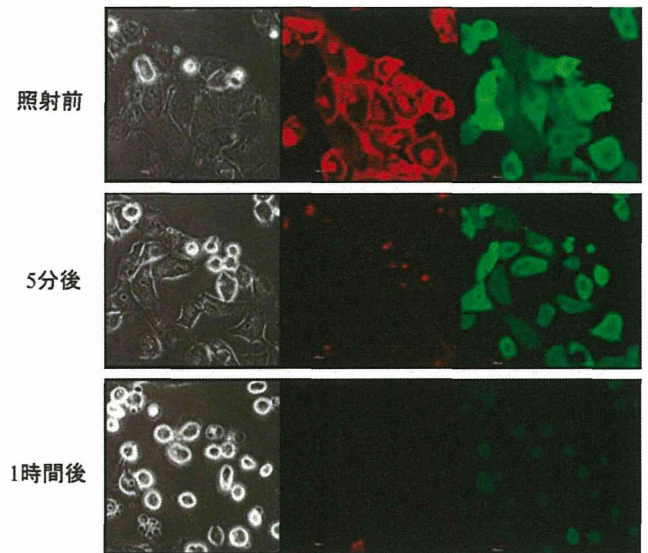


図13 励起光照射による蛍光発現と細胞死誘導

しかし、励起光照射による増強効果はそれぞれの癌細胞のTelomelysinの感受性に依存しており、Telomelysinのみで殺細胞効果が十分得られる癌細胞では有意な上乗せ効果を証明するのは困難であった。

5) 励起光照射硬性ビデオスコープの効果の検証

ミニブタの開腹下にKillerRed遺伝子発現H1299細胞の懸濁液を胃壁や周辺リンパ節に注入し、硬性ビデオスコープから励起光を照射した。しかし、赤色蛍光は極めて微弱であり、細胞障害活性は認められなかった。現行のシステムでは光強度が不十分であり、レーザー照射のような工夫が必要であると考えられた。

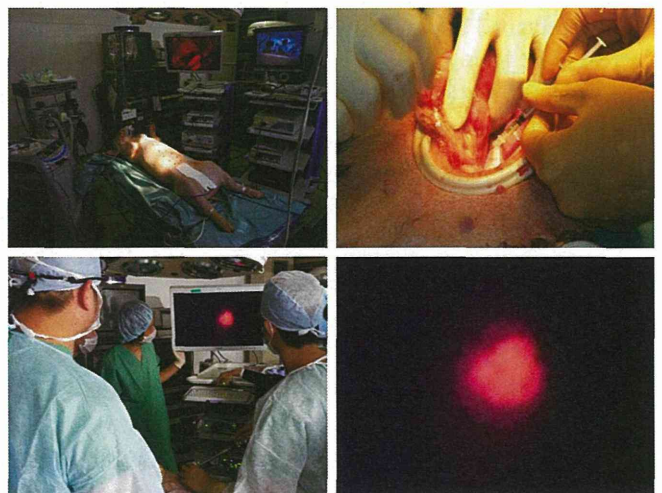


図14 ミニブタによる励起光照射実験

D. 考察

光感受性物質と励起光照射を組み合わせる

光線力学療法は、侵襲が少ない癌治療として一部の早期癌で臨床応用が試みられている。しかし、光感受性物質の標的とする生体内分子に対する選択性が小さいことや、光感受性物質の投与のために光線過敏症を引き起こすなどの問題点を残していた。本研究では、癌への選択性が強いテロメライシンをベクターとしてKillerRed遺伝子を発現するため、癌集積性は極めて高い。生物製剤、特にウイルス製剤と光照射を組み合わせた光線力学療法は、未だ世界で報告がなく、臨床応用に向けた試みももちろん存在しない。一方、蛍光タンパク質自体の発見や開発は最近のトピックスであり、これらを結びつけることで現実的な治療開発につながる可能性が高い。

テロメライシンはテロメラーゼ活性を標的とする癌治療を目的とした生物製剤であり、生体内で自律性を持って増殖することによる従来の抗癌剤や分子標的薬剤にない抗腫瘍効果の増強が期待できる。本研究では、米国の臨床試験で安全性が確認されたこのテロメライシンをベクターとして全く新たな光線力学療法への応用を目指しており、その安全性と効果に関する理論的根拠が得られれば、創薬シーズとしては極めて魅力的なものになると思われる。中国では、すでに2種類の局所療法剤としてのウイルス製剤（Gendicine、H101）が中国FDAの承認を受けており、一般市場にて日常臨床に使用されている。しかし、遺伝子治療やペプチド医薬などに関しては中国以外の海外でも未だ実績がない分野だけに、新技術が製品の形で現実のものになれば、社会的インパクトは極めて大きく、抗癌剤市場はさらに高い伸びを示すと予測されている。

本研究では、TelomeKillerウイルス製剤によりKillerRedタンパク質を発現することで、癌細胞に選択的に光感受性を誘導することができ、Telomelysin本来の抗腫瘍効果の増強が可能であることが検証された。しかし、大動物用に試作した励起光照射硬性ビデオスコープからの照射では光強度が十分ではなく、レーザー照射等を検討する必要があると示唆された。また、in vivoにおける予備実験では、三次元における励起光照射深度は比較的浅く、対象となる癌組織も表在型のものに限られる可能性が出てきた。今後は、早期病変に標的を絞り、塗布用のDrug Delivery System (DDS) などを応用した技術を開発していきたいと考えている。

光感受性武装化アデノウイルス製剤は低侵襲な局所制御療法であり、光線力学療法への応用で選択的な抗腫瘍活性を増強することで、集学的治療として癌患者の生活の質（QOL）の向上に貢献する。また、有効な癌治療戦略の一つとなることで、国民の健康増進や医療経済の節減にも役立つと期待される。

E. 結論

緑色励起光によりKillerRed遺伝子発現ヒト癌細胞を選択的に殺傷することができ、光感受性武装化アデノウイルス製剤を用いたKillerRedの光線力学療法への応用の可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

【英文】

1. Kuroda, S., Fujiwara, T., Shirakawa, Y., Yamasaki, Y., Yano, S., Uno, F., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Watanabe, Y., Noma, K., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T. Telomerase-dependent oncolytic adenovirus sensitizes human cancer cells to ionizing radiation via inhibition of DNA repair machinery. *Cancer Res.*, 70: 9339-9348, 2010.
2. Sakai, R., Kagawa, S., Yamasaki, Y., Kojima, T., Uno, F., Hashimoto, Y., Watanabe, Y., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. Preclinical evaluation of differentially targeting dual virotherapy for human solid cancer. *Mol. Cancer Ther.*, 9: 1884-1893, 2010.
3. Huang, P., Kaku, H., Chen, J., Kashiwakura, Y., Saika, T., Nasu, Y., Urata, Y., Fujiwara, T., Watanabe, M., Kumon, H. Potent antitumor effects of combined therapy with a telomerase-specific, replication-competent adenovirus (OBP-301) and IL-2 in a mouse model of renal cell carcinoma. *Cancer Gene Ther.*, 17: 484-491, 2010.
4. Kojima, T., Watanabe, Y., Hashimoto, Y., Kuroda, S., Yamasaki, Y., Yano, S., Ouchi, M., Tazawa, H., Uno, F., Kagawa, S., Kyo, S., Mizuguchi, H., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. In vivo biological purging for lymph node metastasis of human colorectal cancer by telomerase-specific oncolytic virotherapy. *Ann. Surg.*, 251: 1079-1086, 2010.
5. Watanabe, Y., Kojima, T., Kagawa, S., Uno, F., Hashimoto, Y., Kyo, S., Mizuguchi, H., Tanaka, N., Kawamura, H., Ichimaru, D., Urata, Y., Fujiwara, T. A novel translational approach for human malignant pleural mesothelioma: heparanase-assisted dual virotherapy. *Oncogene*, 29:1145-1154, 2010.
6. Umeda, Y., Matsuda, H., Sadamori, H., Matsukawa, H., Yagi, T., Fujiwara, T. A prognostic model and treatment strategy for intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *World J. Surg.*, 35: 170-177, 2011.
7. Sugio, K., Sakurai, F., Katayama, K., Tashiro, K., Matsui, H., Kawabata, K., Kawase, A., Iwaki, M., Hayakawa, T., Fujiwara, T., Mizuguchi, H. Enhanced safety profiles of the telomerase-specific replication-competent adenovirus by incorporation of normal cell-specific microRNA-targeted sequences. *Clin. Cancer Res.*, 17: 2807-2818, 2011.
8. Sasaki, T., Tazawa, H., Hasei, J., Kunisada, T., Yoshida, A., Hashimoto, Y., Yano, S., Yoshida, R., Uno, F., Kagawa, S., Morimoto, Y., Urata, Y., Ozaki, T., Fujiwara, T. Preclinical evaluation of telomerase-specific oncolytic virotherapy for human bone and soft tissue sarcomas. *Clin. Cancer Res.*, 17: 1828-1838, 2011.
9. Umeda, Y., Matsuda, H., Sadamori, H., Shinoura, S., Yoshida, R., Sato, D., Utsumi, M., Yagi, T., Fujiwara, T. Leukoencephalopathy syndrome after living-donor liver transplantation. *Exp. Clin. Transplant.*, 9: 139-144, 2011.
10. Motoki, T., Naomoto, Y., Hoshiba, J., Shirakawa, Y.,

- Yamatsuji, T., Matsuoka, J., Takaoka, M., Tomono, Y., Fujiwara, Y., Tsuchita, H., Gunduz, M., Nagatsuka, H., Tanaka, N., [Fujiwara, T.](#) Glutamine depletion induces murine neonatal melena with increased apoptosis of the intestinal epithelium. *World J. Gastroenterol.*, 17: 717-726, 2011.
11. Li, G., Kawashima, H., Ogose, A., Ariizumi, T., Xu, Y., Hotta, T., Urata, Y., [Fujiwara, T.](#), Endo, N. Efficient virotherapy for osteosarcoma by telomerase-specific oncolytic adenovirus. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 137: 1037-1051, 2011.
 12. Ohara, T., Takaoka, M., Toyooka, S., Tomono, Y., Nishikawa, T., Shirakawa, Y., Yamatsuji, T., Tanaka, N., [Fujiwara, T.](#), Naomoto, Y. Inhibition of mTOR by temsirolimus contributes to prolonged survival of mice with pleural dissemination of non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Sci.*, 102: 1344-1349, 2011.
 13. Kishimoto, H., Aki, R., Urata, Y., Bouvet, M., Moriyama, M., Tanaka, N., [Fujiwara, T.](#), Hoffman, R. M. Tumor-selective adenoviral-mediated GFP genetic labeling of human cancer in the live mouse reports future recurrence after resection. *Cell Cycle*, 10: 2737-2741, 2011.
 14. Tanabe, S., Naomoto, Y., Shirakawa, Y., Fujiwara, Y., Sakuram, K., Noma, K., Takaoka, M., Yamatsuji, T., Hiraki, T., Okumura, Y., Mitani, M., Kaji, M., Kanazawa, S., [Fujiwara, T.](#) F-18 FDG PET/CT contributes to more accurate detection of lymph nodal metastasis from actively proliferating esophageal squamous cell carcinoma. *Clin. Nucl. Med.*, 36: 854-859, 2011.
 15. Tazawa, H., Kagawa, S., [Fujiwara, T.](#) MicroRNA as potential target gene in cancer gene therapy of gastrointestinal tumors. *Expert Opin. Biol. Th.*, 11: 145-155, 2011.
 16. [Fujiwara, T.](#), Shirakawa, Y., Kagawa, S. Telomerase-specific oncolytic virotherapy for human gastrointestinal cancer. *Expert Rev. Anticancer Th.*, 11: 525-532, 2011.
 17. [Fujiwara, T.](#) A novel molecular therapy using bioengineered adenovirus for human gastrointestinal cancer. *Acta Med. Okayama*, 65: 151-162, 2011.
 18. Nobuoka, D., Motomura, Y., Shirakawa, H., Yoshikawa, T., Kuronuma, T., Takahashi, M., Nakachi, K., Ishii, H., Furuse, J., Gotohda, N., Takahashi, S., Nakagohri, T., Konishi, M., Kinoshita, T., Komori, H., Baba, H., [Fujiwara, T.](#), Nakatsura, T. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma induces glypican-3 peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. J. Oncol.*, 40: 63-70, 2012.
 19. Yamasaki, Y., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Kojima, T., Kuroda, S., Yano, S., Yoshida, R., Uno, F., Mizuguchi, H., Ohtsuru, A., Urata, Y., Kagawa, S., [Fujiwara, T.](#) A novel apoptotic mechanism of genetically engineered adenovirus-mediated tumour-specific p53 overexpression through E1A-dependent p21 and MDM2 suppression. *Eur. J. Cancer*, 48: 2282-2291, 2012.
 20. Tazawa, H., Yano, S., Yoshida, R., Yamasaki, Y., Sasaki, T., Hashimoto, Y., Kuroda, S., Ouchi, M., Onishi, T., Uno, F., Kagawa, S., Urata, Y., [Fujiwara, T.](#) Genetically engineered oncolytic adenovirus induces autophagic cell death through an E2F1-microRNA-7-epidermal growth factor receptor axis. *Int. J. Cancer*, 131, 2939-2950, 2012.
 21. Yoshida, R., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Yano, S., Onishi, T., Sasaki, T., Shirakawa, Y., Kishimoto, H., Uno, F., Nishizaki, M., Kagawa, S., [Fujiwara, T.](#) Mechanism of resistance to trastuzumab and molecular sensitization via ADCC activation by exogenous expression of HER2-extracellular domain in human cancer cells. *Cancer Immuno. Immunother.*, 61: 1905-1916, 2012.
 22. Watanabe, Y., Hashimoto, Y., Kagawa, S., Kawamura, H., Nagai, K., Tanaka, N., Urata, Y., [Fujiwara, T.](#) Enhanced antitumor efficacy of telomerase-specific oncolytic adenovirus with valproic acid against human cancer cells. *Cancer Gene Ther.*, 19: 767-772, 2012.
 23. Sadamori, H., Yagi, T., Matsuda, H., Shinoura, S., Umeda, Y., [Fujiwara, T.](#) Intractable bile leakage after hepatectomy for hepatocellular carcinoma in 359 recent cases. *Dig. Surg.*, 29: 149-156, 2012.
 24. [Fujiwara, T.](#), Kagawa, S., Tazawa, H. Synergistic interaction of telomerase-specific oncolytic virotherapy and chemotherapeutic agents for human cancer. *Curr. Pharm. Biotechno.*, 13: 1809-1816, 2012.
 25. Kuroda, S., Urata, Y., [Fujiwara, T.](#) Ataxia-Telangiectasia Mutated and the Mre11-Rad50-NBS1 Complex: Promising Targets for Radiosensitization. *Acta Med. Okayama*, 66: 83-92, 2012.
 26. Hasei, J., Sasaki, T., Tazawa, H., Osaki, S., Yamakawa, Y., Kunisada, T., Yoshida, A., Hashimoto, Y., Onishi, T., Uno, F., Kagawa, S., Urata, Y., Ozaki, T., [Fujiwara, T.](#) Dual programmed cell death pathways induced by p53 transactivation overcome resistance to oncolytic adenovirus in human osteosarcoma cells. *Mol. Cancer Ther.*, 12: 314-325, 2013.
 27. Ohara, T., Noma, K., Urano, S., Watanabe, S., Nishitani, S., Tomono, Y., Kimura, F., Kagawa, S., Shirakawa, Y., [Fujiwara, T.](#) A novel synergistic effect of iron depletion on anti-angiogenic cancer therapy. *Int. J. Cancer*, 132: 2705-2713, 2013.
 28. Sasaki, T., Tazawa, H., Hasei, J., Osaki, S., Kunisada, T., Yoshida, A., Hashimoto, Y., Yano, S., Yoshida, R., Kagawa, S., Uno, F., Urata, Y., Ozaki, T., [Fujiwara, T.](#) A simple detection system for adenovirus receptor expression using a telomerase-specific replication-competent adenovirus. *Gene Ther.*, 20: 112-118, 2013.
 29. Shigeyasu, K., Kagawa, S., Uno, F., Nishizaki, M., Kishimoto, H., Gochi, A., Kimura, T., Takahata, T., Nonaka, Y., Ninomiya, M., [Fujiwara, T.](#) Multicenter phase II study of S-1 and docetaxel combination chemotherapy for advanced or recurrent gastric cancer patients with peritoneal dissemination. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 71: 937-943, 2013.
 30. Sadamori, H., Yagi, T., Shinoura, S., Umeda, Y., Yoshida, R., Satoh, D., Nobuoka, D., Utsumi, M., [Fujiwara, T.](#) Risk factor for major morbidity after liver resection for hepatocellular carcinoma. *Brit. J. Surg.*, 100: 122-129, 2013.
 31. Sadamori, H., Yagi, T., Shinoura, S., Umeda, Y., Yoshida, R., Satoh, D., Nobuoka, D., Utsumi, M., [Fujiwara, T.](#) New surgical approach to large splenorenal shunt in living donor liver transplantation: diversion of SMV and SPV blood flow. *J. Gastrointest. Surg.*, 17: 403-407, 2013.
 32. Sadamori, H., Yagi, T., Shinoura, S., Umeda, Y., Yoshida, R., Satoh, D., Nobuoka, D., Utsumi, M., Yoshida, K., [Fujiwara, T.](#) Risk factors for organ/space surgical site infection after hepatectomy for hepatocellular carcinoma in 359 recent cases. *J. Hepato-Bil- Panc. Sci.*, 20: 186-196, 2013.
 33. Umeda, Y., Nagasaka, T., Mori, Y., Sadamori, H., Sun, D. S., Shinoura, S., Yoshida, R., Satoh, D., Nobuoka, D., Utsumi,

- M., Yoshida, K., Yagi, T., Fujiwara T. Poor prognosis of KRAS or BRAF mutant colorectal liver metastasis without microsatellite instability. *J. Hepato-Biliary Pancreat. Sci.*, 20: 223-233, 2013.
34. Hashimoto, Y., Tazawa, H., Teraishi, F., Kojima, T., Watanabe, Y., Uno, F., Yano, S., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T. The hTERT promoter enhances the antitumor activity of an oncolytic adenovirus under a hypoxic microenvironment. *PLoS One*, (in press), 2013.
35. Nobuoka, D., Yoshikawa, T., Takahashi, M., Iwama, T., Horie, K., Shimomura, M., Suzuki, S., Sakemura, N., Nakatsugawa, M., Sadamori, H., Yagi, T., Fujiwara, T., Nakatsura, T. Intratumoral peptide injection enhances tumor cell antigenicity recognized by cytotoxic T lymphocytes: a potential option for improvement in antigen-specific cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, (in press), 2013.
- 【邦文】
1. 藤原俊義：テロメラーゼ活性を標的とする抗腫瘍ウイルス製剤の臨床開発：放射線感受性の増感作用. *放射線生物研究* 45: 23-34, 2010.
2. 藤原俊義：消化器がん治療における先端医療開発. *岡山医学会雑誌* 122:209-213, 2010.
3. 児島亨、橋本悠里、香川俊輔、田中紀章、浦田泰生、藤原俊義：制限増殖型アデノウイルス製剤を用いた新たな微小がん病変の検出法の開発と治療への応用（平成21年度岡山医学会賞（山田賞）受賞論文）. *岡山医学会雑誌* 122: 203—208, 2010.
4. 藤原俊義：癌の遺伝子診断・治療. 「*消化器外科学レビュー2012*」 pp203-208、総合医学社、東京、2012.
5. 黒田新士、藤原俊哉、白川靖博、山崎泰源、矢野修也、宇野太、田澤大、橋本悠里、渡辺雄一、野間和広、浦田泰生、香川俊輔、藤原俊義：テロメラーゼ依存的腫瘍融解アデノウイルス製剤による放射線感受性増強作用. *岡山医学会雑誌* 123: 103-109, 2011.
6. 永坂岳司、藤原俊義：糞便を用いた大腸がんの遺伝子診断（2）～便中メチル化 CpG 検出による大腸がんスクリーニング～. *大腸癌 Frontier* 5: 50-57, 2012.
7. 永坂岳司、母里淑子、煤田祐三、藤原俊義：疾患バイオマーカーの臨床研究：大腸がん. *日本臨床* 70: 802-808, 2012.
8. 藤原俊義：アカデミアにおける探索的医薬品開発の方向性～国産ウイルス製剤の米国での臨床試験への道程～. *Jpn. Pharmacol. Ther. (薬理と治療)* 40: 303-304, 2012.
9. 佐々木剛、田澤大、長谷井嬢、国定俊之、吉田晶、橋本悠里、矢野修也、吉田亮介、宇野太、香川俊輔、森本裕樹、浦田泰生、藤原俊義、尾崎敏文：テロメラーゼ依存的腫瘍融解ウイルス療法の前臨床的検討（平成23年度岡山医学会賞（山田賞）受賞論文）. *岡山医学会雑誌* 124: 105-110, 2012.
10. 藤原俊義：癌遺伝子と癌抑制遺伝子の多様性と治療への応用. *臨床と研究* 90: 38-42, 2013.
- 2010.
2. Fujiwara, T., Uno, F., Hashimoto, Y., Shirakawa, Y., Nagasaka, T., Kagawa, S., Urata, Y. Detection of viable human circulating tumor cells using telomerase-specific GFP-expressing bioengineered adenovirus in patients with gastric cancer: A feasibility study. *2011 ASCO Gastrointestinal Cancer Symposium*, San Francisco, January, 2011.
3. Nagasaka, T., Goel, A., Taniguchi, N., Mori, Y., Shigeyasu, K., Yamada, E., Oka, T., Sun, D., Fujiwara, T. Power of fecal DNA methylation analysis: Does it lead to development of a noninvasive screening tool for pancreatic cancer? *2011 ASCO Gastrointestinal Cancer Symposium*, San Francisco, January, 2011.
4. Yoshida, R., Uno, F., Kagawa, S., Fujiwara, T. Sensitization to trastuzumab via ADCC activation by exogenous expression of HER2 extracellular domain in HER2-negative human gastric cancer cells. *9th International Gastric Cancer Congress*, Seoul, April, 2011.
5. Kagawa, S., Yano, S., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Shirakawa, Y., Kuroda, S., Yamasaki, Y., Uno, F., Nagasaka, T., Kishimoto, H., Nishizaki, M., Urata, Y., Fujiwara, T. Three-dimensional visualization of eliminating human cancer stem cell by oncolytic adenovirus. *9th International Gastric Cancer Congress*, Seoul, April, 2011.
6. Uno, F., Kagawa, S., Nishizaki, M., Kishimoto, H., Gouchi, A., Kimura, T., Takahata, T., Nonaka, Y., Ninomiya, M., Fujiwara, T. Phase II study of S-1 and docetaxel combination chemotherapy for advanced or recurrent gastric cancer with peritoneal dissemination. *9th International Gastric Cancer Congress*, Seoul, April, 2011.
7. Nishizaki, M., Kagawa, S., Uno, F., Kishimoto, H., Gouchi, A., Fujiwara, T. A modified overlap method for performing Billroth-I anastomosis after laparoscopic distal gastrectomy. *9th International Gastric Cancer Congress*, Seoul, April, 2011.
8. Fujiwara, T. Telomerase-specific oncolytic adenovirus for human cancer therapy and diagnostic imaging. *14th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy: Scientific Symposium "Viral Vectors for Immunomodulation of Cancer: From Bench to Bed"*, Seattle, 2011.
9. Fujiwara, T. Telomerase-specific oncolytic virotherapy for human cancer. *US-Japan Joint Seminars "Trend of gene & cell therapy as translational research in USA and Japan"*, Fukuoka, 2011.
10. Fujiwara, T. Molecular imaging and multidisciplinary therapy for human cancer with telomerase-specific oncolytic adenovirus. *8th International Symposium on Minimal Residual Cancer (Plenary Lecture)*, Osaka, 2011.
11. Tazawa, H., Onishi, T., Yano, S., Urata, Y., Fujiwara, T. Oncolytic adenovirus inhibits the cancer stem cell properties through microRNA modulation. *8th International Symposium on Minimal Residual Cancer*, Osaka, September, 2011.
12. Kishimoto, H., Urata, Y., Fujiwara, T., Hoffman, R. M. Adenoviral GFP targeting of disseminated human tumors in nude mice for surgical navigation. *8th International Symposium on Minimal Residual Cancer*, Osaka, September, 2011.
13. Tazawa, H., Yano, S., Yoshida, R., Hashimoto, Y., Urata, Y., Fujiwara, T. Oncolytic adenovirus induces autophagic cell death through an E2F-1 microRNA7-epidermal growth factor

- receptor axis in human cancer cells. *14th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy*, Seattle, May, 2011.
14. Hashimoto, Y., Yano, S., Tazawa, H., Yoshida, R., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T. Biological effects of oncolytic adenovirus on epithelial-mesenchymal transition in human lung cancer cells. *14th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy*, Seattle, May, 2011.
 15. Shigeyasu, K., Hashimoto, Y., Morikawa, T., Mori, Y., Sun, D-S., Kagawa, S., Uno, F., Tazawa, H., Nagasaka, T., Kyo, S., Mizuguchi, H., Urata, Y., Fujiwara, T. A highly sensitive detection system of genetic alterations in circulating tumor cells using a telomerase-specific replication-competent adenovirus. *2012 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, Chicago, April, 2012.
 16. Kikuchi, S., Kishimoto, H., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Uno, F., Nishizaki, M., Kagawa, S., Urata, Y., Hoffman, R. B., Fujiwara, T. A precise orthotopic rectal tumor model for evaluating therapeutic response of cancer treatment. *2012 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, Chicago, April, 2012.
 17. Osaki, S., Sasaki, T., Tazawa, H., Hasei, J., Hashimoto, Y., Nouse, K., Urata, Y., Ozaki, T., Fujiwara, T. A simple biological imaging system for detecting adenovirus receptor expression in tumor cells using a telomerase-specific replication-competent adenovirus. *2012 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, Chicago, April, 2012.
 18. Hasei, J., Sasaki, T., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Kunisada, T., Urata, Y., Ozaki, T., Fujiwara, T. p53-mediated apoptotic signaling overcomes the resistance to oncolytic adenovirus in human osteosarcoma cells. *2012 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, Chicago, April, 2012.
 19. Ohara, T., Noma, K., Nishitani, S., Watanabe, S., Tomono, Y., Hashimoto, Y., Tazawa, H., Fujiwara, T. Iron chelator contributes to anti-angiogenic therapy via selective induction of VEGF-A. *2012 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, Chicago, April, 2012.
 20. Watanabe, S., Nishitani, S., Noma, K., Ohara, T., Tomono, Y., Hashimoto, Y., Tazawa, H., Fujiwara, T. Iron deficiency suppresses EMT through down-regulation of N-cadherin in esophageal cancer. *2012 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, Chicago, April, 2012.
 21. Tazawa, H., Sasaki, T., Hashimoto, Y., Kikuchi, S., Kishimoto, H., Mizuguchi, H., Fujiwara, T. Preclinical evaluation of cytotoxic effect of photosensitive fluorescent protein in human cancer cells. *2012 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, Chicago, April, 2012.
 22. Hashimoto, Y., Tazawa, H., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T. Inhibitory effect of oncolytic adenovirus on transforming growth factor- β -induced epithelial-mesenchymal transition in human cancer cells. *2012 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, Chicago, April, 2012.
 23. Kurihara, Y., Sato, D., Shirota, T., Kondo, S., Kataoka, M., Urata, Y., Fujiwara, T., Shintani, S. Telomerase-specific replication-selective virotherapy combined with radiation therapy for oral squamous cell carcinoma cells. *2012 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, Chicago, April, 2012.
 24. Yano, S., Li, S., Han, Q., Tan, Y., Fujiwara, T., Hoffman, R. B. Color-coded selective chemotherapy of methioninase-synchronized S-phase cancer cells expressing cell-cycle-specific fluorescent reporters: A general approach to the treatment of cancer. *2012 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, Chicago, April, 2012.
 25. Yano, S., Li, S., Han, Q., Tan, Y., Fujiwara, T., Hoffman, R. B. Methioninase S-phase block of cancer cells imaged in real time by cell-cycle-specific fluorescence reporters. *2012 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, Chicago, April, 2012.
- 【国内学会】
1. 藤原俊義：テロメラーゼ活性を標的とするウイルス製剤の癌診断・治療への応用. 第110回日本外科学会定期学術集会（ワークショップ「癌治療向上のための translational research」）、名古屋、2010年4月.
 2. 藤原俊義：Telomerase-specific molecular radiosensitizer for human cancer. 第49回日本生体医工学会大会（オーガナイズドセッション「ナノテクノロジーと物理エネルギーを融合したハイブリッド標的化診断・治療」）、大阪、2010年6月.
 3. Fujiwara, T., Urata, Y., Nemunaitis, J. Phase I clinical trial of telomerase-specific oncolytic adenovirus for advanced solid tumors. 第16回日本遺伝子治療学会（Main Symposium）、宇都宮、2010年7月.
 4. 藤原俊義、宇野太、田澤大、香川俊輔、児島亨、矢野修也、吉田亮介、橋本悠里、浦田泰生：遺伝子改変ウイルス製剤を用いた蛍光イメージングによる血中循環がん細胞（CTC）の検出. 第65回日本消化器外科学会総会（パネルディスカッション「分子生物学を応用した消化器癌の悪性度診断」）、山口、2010年7月.
 5. 藤原俊義：Theranostic application of telomerase-specific replication-selective adenovirus for human cancer. 第69回日本癌学会学術総会（モーニングレクチャー）、大阪、2010年9月.
 6. Tazawa, H., Yano, S., Yoshida, R., Urata, Y., Fujiwara, T. Oncolytic adenovirus induces autophagic cell death through microRNA-7-mediated suppression of EGFR in human cancer cells. 第16回日本遺伝子治療学会、宇都宮、2010年7月.
 7. 橋本悠里、寺石文則、香川俊輔、宇野太、田澤大、矢野修也、浦田泰生、藤原俊義：Hypoxia promotes replication and therapeutic potency of telomerase-specific oncolytic adenovirus for human cancer cells. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月.
 8. 永坂岳司、田中紀章、松原長秀、藤原俊義：Somatic hypermethylation of MSH2 is a frequent event in Lynch syndrome colorectal cancers. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月.
 9. 田澤大、矢野修也、吉田亮介、浦田泰生、藤原俊義：E2F1-mediated microRNA-7 upregulation induces autophagic cell death through EGFR suppression during adenovirus infection. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月.
 10. 矢野修也、田澤大、橋本悠里、宇野太、香川俊輔、浦田泰生、藤原俊義：Visualizing treatment dynamics that oncolytic adenovirus promotes cell cycle progression of quiescent cancer stem cells. 第69回日本癌学会学術総会、

- 大阪、2010年9月。
11. 佐々木剛、田澤大、橋本悠里、国定俊之、森本裕樹、吉田晶、浦田泰生、尾崎敏文、藤原俊義：Telomerase-specific replication-selective virotherapy for bone and soft tissue sarcoma. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月。
 12. 水本泰成、高倉正博、京哲、中村充宏、毎田佳子、橋本学、森紀子、保野由紀子、浦田泰生、藤原俊義、井上正樹：Effect of telomerase-specific replication-selective adenovirus on ovarian cancer stem cells. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月。
 13. 高倉正博、京哲、中村充宏、毎田佳子、橋本学、森紀子、水本泰成、保野由紀子、橋本悠里、浦田泰生、藤原俊義、井上正樹：Detection of circulating tumor cells using telomerase-specific replication-selective adenovirus in gynecologic cancers. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月。
 14. 合地明、藤原俊義、猿木信裕、坂東悦郎、大西始、今泉明、山本浩史、光島徹、山門實：AminoIndex, a novel screening marker based on plasma free amino acid profile, for gastric cancer screening. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月。
 15. 藤原俊義、浦田泰生：テロメラーゼ活性を標的とするウイルス製剤の癌診断・治療への応用。第20回癌病態治療研究会（シンポジウム）、東京、2011年6月。
 16. Fujiwara, T., Urata, Y. Molecular imaging and multidisciplinary therapy for human cancer with telomerase-specific replication-selective adenovirus. 第17回日本遺伝子治療学会（シンポジウム）、福岡、2011年7月。
 17. 藤原俊義：アカデミアにおける探索的医薬品開発の方向性～国産ウイルス製剤の米国での臨床試験への道程～。第11回CRCと臨床試験のあり方を考える会議（特別講演）、岡山、2011年9月。
 18. 香川俊輔、藤原俊義：テロメラーゼ活性を標的とした増殖ウイルス Telomelysin の臨床応用。第24回日本バイオセラピー学会学術集会総会（ワークショップ）、和歌山、2011年12月。
 19. Yoshida, R., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Uno, F., Nishizaki, M., Kagawa, S., Fujiwara, T. Mechanism of resistance to trastuzumab and molecular sensitization via ADCC activation by exogenous expression of HER2 extracellular domain. 第17回日本遺伝子治療学会、福岡、2011年7月。
 20. Onishi, T., Tazawa, H., Yano, S., Hashimoto, Y., Yoshida, R., Kagawa, S., Fujiwara, T. MicroRNA-7 inhibits the stem-like properties of CD133+ human gastric cancer cells. 第17回日本遺伝子治療学会、福岡、2011年7月。
 21. Hashimoto, Y., Tazawa, H., Yoshida, R., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T. Oncolytic adenovirus inhibits transforming growth factor- β -induced epithelial-mesenchymal transition in human cancer cells. 第17回日本遺伝子治療学会、福岡、2011年7月。
 22. Tazawa, H., Sasaki, T., Hasei, J., Hashimoto, Y., Urata, Y., Ozaki, T., Fujiwara, T. Antitumor effect of telomerase-specific oncolytic adenovirus on human bone and soft tissue sarcoma cells. 第17回日本遺伝子治療学会、福岡、2011年7月。
 23. 橋本悠里、田澤大、吉田亮介、大西哲平、浦田泰生、香川俊輔、藤原俊義。Oncolytic adenovirus suppresses TGF- β -induced epithelial mesenchymal transition and invasiveness in human cancer cells. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月。
 24. 長谷井嬢、田澤大、橋本悠里、国定俊之、浦田泰生、尾崎敏文、藤原俊義。Antitumor effect of p53-armed telomerase-specific replication-selective oncolytic adenovirus in human osteosarcoma cells. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月。
 25. 大西哲平、田澤大、矢野修也、橋本悠里、吉田亮介、香川俊輔、藤原俊義。MicroRNA-7 inhibits the stem-like properties of CD133+ human gastric cancer MKN45 cells. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月。
 26. 田澤大、佐々木剛、橋本悠里、水口裕之、藤原俊義。Development of novel photodynamic therapy inducing photosensitive cytotoxic fluorescent protein in human cancer cells. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月。
 27. 西谷正史、野間和広、大原利章、長谷井嬢、佐々木剛、渡邊伸一郎、大西哲平、吉田亮介、橋本悠里、田澤大、宇野太、香川俊輔、藤原俊義。Iron deficiency suppress EMT through downregulation of N-cadherin in esophageal cancer. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月。
 28. 高倉正博、京哲、中村光宏、毎田佳子、水本泰成、保野由紀子、張秀智、藤原俊義、井上正樹。Circulating tumor cells detected by replication-selective adenovirus, a potent therapeutic marker in gynecologic cancers. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月。
 29. 信岡大輔、吉川聡明、高橋真理、岩間達章、堀江和峰、下村真菜美、鈴木史郎、酒村智子、中津川宗秀、八木孝仁、藤原俊義、中面哲也。Intratumoral peptide injection may enhance efficacy of peptide-specific cancer immunotherapy. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月。
 30. 藤原俊義：消化器がん治療における遺伝子工学技術に基づく先端医療開発。第20回日本消化器関連学会週間（第10回日本消化器外科学会大会）（特別企画「消化器癌治療を目指したトランスレーショナルリサーチ＜若手医師へのメッセージ＞」、神戸、2012年10月。
 31. 永坂岳司、森川達也、藤原俊義：便中メチル化 CpG 検出による消化器癌スクリーニング。第20回日本消化器関連学会週間（シンポジウム）、神戸、2012年10月。
 32. 永坂岳司、母里淑子、森川達也、久保田暢人、横道直祐、重安邦俊、竹原清人、吉田一博、榎田祐三、貞森裕、藤原俊義：大腸癌の再発を予測する新規バイオマーカーの検討 -Stage II/III 根治切除症例の検討から。第45回制癌剤適応研究会（シンポジウム）、東京、2012年3月。
 33. 香川俊輔、岸本浩行、宇野太、黒田新士、石田道弘、橋本悠里、重安邦俊、西崎正彦、白川靖博、永坂岳司、藤原俊義：胃癌における蛍光発現ウイルスによる腹腔洗浄液診断：生物学的悪性度指標としての可能性。第113回日本外科学会定期学術集会（シンポジウム）、福岡、2013年4月。
 34. 重安邦俊、橋本悠里、宇野太、永坂岳司、田澤大、香川俊輔、水口裕之、浦田泰生、藤原俊義：テロメラーゼ活性を指標とする血中遊離癌細胞の高感度検出法の開発と遺伝子解析技術への応用。第113回日本外科学会定期学術集会（ワークショップ）、福岡、2013年4月。
 35. 榎田祐三、八木孝仁、貞森裕、内海方嗣、篠浦先、吉田龍一、佐藤太祐、信岡大輔、藤智和、保田裕子、藤原俊義：生体肝移植の短期・晩期予後向上に向けた治療戦略個別化の可能性。第113回日本外科学会定期学術集会（パネルディスカッション）、福岡、2013年4月。

36. 稲田涼、永坂岳司、母里淑子、榎田祐三、森川達也、久保田暢人、近藤喜太、宇野太、貞森裕、八木孝仁、三嶋秀行、藤原俊義：遺伝子情報を用いた多臓器転移大腸癌の検討および治療戦略の構築. **第113回日本外科学会定期学術集会 (パネルディスカッション)**、福岡、2013年4月.

研究成果の刊行に関する一覧表 (1)

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
Watanabe, Y., Kojima, T., Kagawa, S., Uno, F., Hashimoto, Y., Kyo, S., Mizuguchi, H., Tanaka, N., Kawamura, H., Ichimaru, D., Urata, Y., Fujiwara, T.	A novel translational approach for human malignant pleural mesothelioma: heparanase-assisted dual virotherapy.	Oncogene	29	1145-1154	2010
Kojima, T., Watanabe, Y., Hashimoto, Y., Kuroda, S., Yamasaki, Y., Yano, S., Ouchi, M., Tazawa, H., Uno, F., Kagawa, S., Kyo, S., Mizuguchi, H., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T.	In vivo biological purging for lymph node metastasis of human colorectal cancer by telomerase-specific oncolytic virotherapy.	Annals of Surgery	251	1079-1086	2010
Sakai, R., Kagawa, S., Yamasaki, Y., Kojima, T., Uno, F., Hashimoto, Y., Watanabe, Y., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T.	Preclinical evaluation of differentially targeting dual virotherapy for human solid cancer.	Molecular Cancer Therapeutics	9	1884-1893	2010
Kuroda, S., Fujiwara, T., Shirakawa, Y., Yamasaki, Y., Yano, S., Uno, F., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Watanabe, Y., Noma, K., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T.	Telomerase-dependent oncolytic adenovirus sensitizes human cancer cells to ionizing radiation via inhibition of DNA repair machinery.	Cancer Research	70	9339-9348	2010
Sasaki, T., Tazawa, H., Hasei, J., Kunisada, T., Yoshida, A., Hashimoto, Y., Yano, S., Yoshida, R., Uno, F., Kagawa, S., Morimoto, Y., Urata, Y., Ozaki, T., Fujiwara, T.	Preclinical evaluation of telomerase-specific oncolytic virotherapy for human bone and soft tissue sarcomas.	Clinical Cancer Research	17	1828-1838	2011
Sugio, K., Sakurai, F., Katayama, K., Tashiro, K., Matsui, H., Kawabata, K., Kawase, A., Iwaki, M., Hayakawa, T., Fujiwara, T., Mizuguchi, H.	Enhanced safety profiles of the telomerase-specific replication-competent adenovirus by incorporation of normal cell-specific microRNA-targeted sequences.	Clinical Cancer Research	17	2807-2818	2011
Kishimoto, H., Aki, R., Urata, Y., Bouvet, M., Momiyama, M., Tanaka, N., Fujiwara, T., Hoffman, R. M.	Tumor-selective adenoviral-mediated GFP genetic labeling of human cancer in the live mouse reports future recurrence after resection.	Cell Cycle	10	2737-2741	2011

研究成果の刊行に関する一覧表 (2)

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
Tazawa, H., Kagawa, S., Fujiwara, T.	MicroRNAs as potential target gene in cancer gene therapy of gastrointestinal tumors.	Expert Opinion on Biological Therapy	11	145-155	2011
Fujiwara, T., Shirakawa, Y., Kagawa, S.	Telomerase-specific oncolytic virotherapy for human gastrointestinal cancer.	Expert Review of Anticancer Therapy	11	525-532	2011
Yamasaki, Y., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Kojima, T., Kuroda, S., Yano, S., Yoshida, R., Uno, F., Mizuguchi, H., Ohtsuru, A., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T.	A novel apoptotic mechanism of genetically engineered adenovirus-mediated tumour-specific p53 overexpression through E1A-dependent p21 and MDM2 suppression.	European Journal of Cancer	48	2282-2291	2012
Tazawa, H., Yano, S., Yoshida, R., Yamasaki, Y., Sasaki, T., Hashimoto, Y., Kuroda, S., Ouchi, M., Onishi, T., Uno, F., Kagawa, S., Urata, Y., Fujiwara, T.	Genetically engineered oncolytic adenovirus induces autophagic cell death through an E2F1-microRNA-7-epidermal growth factor receptor axis.	International Journal of Cancer	131	2939-2950	2012
Yoshida, R., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Yano, S., Onishi, T., Sasaki, T., Shirakawa, Y., Kishimoto, H., Uno, F., Nishizaki, M., Kagawa, S., Fujiwara, T.	Mechanism of resistance to trastuzumab and molecular sensitization via ADCC activation by exogenous expression of HER2-extracellular domain in human cancer cells.	Cancer Immunology, Immunotherapy	61	1905-1916	2012
Fujiwara, T., Kagawa, S., Tazawa, H.	Synergistic interaction of telomerase-specific oncolytic virotherapy and chemotherapeutic agents for human cancer.	Current Pharmaceutical Biotechnology	13	1809-1816	2012
Kuroda, S., Urata, Y., Fujiwara, T.	Ataxia-Telangiectasia Mutated and the Mre11-Rad50-NBS1 Complex: Promising Targets for Radiosensitization.	Acta Medica Okayama	66	83-92	2012
Sasaki, T., Tazawa, H., Hasei, J., Osaki, S., Kunisada, T., Yoshida, A., Hashimoto, Y., Yano, S., Yoshida, R., Kagawa, S., Uno, F., Urata, Y., Ozaki, T., Fujiwara, T.	A simple detection system for adenovirus receptor expression using a telomerase-specific replication-competent adenovirus.	Gene Therapy	20	112-118	2013

研究成果の刊行に関する一覧表 (3)

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
Hasei, J., Sasaki, T., Tazawa, H., Osaki, S., Yamakawa, Y., Kunisada, T., Yoshida, A., Hashimoto, Y., Onishi, T., Uno, F., Kagawa, S., Urata, Y., Ozaki, T., Fujiwara, T.	Dual programmed cell death pathways induced by p53 transactivation overcome resistance to oncolytic adenovirus in human osteosarcoma cells.	Molecular Cancer Therapeutics	12	314-325	2013
Ohara, T., Noma, K., Urano, S., Watanabe, S., Nishitani, S., Tomono, Y., Kimura, F., Kagawa, S., Shirakawa, Y., Fujiwara, T.	A novel synergistic effect of iron depletion on antiangiogenic cancer therapy.	International Journal of Cancer	132	2705-2713	2013
Hashimoto, Y., Tazawa, H., Teraishi, F., Kojima, T., Watanabe, Y., Uno, F., Yano, S., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T.	The hTERT promoter enhances the antitumor activity of an oncolytic adenovirus under a hypoxic microenvironment.	PLoS One		In press	2013

ORIGINAL ARTICLE

A novel translational approach for human malignant pleural mesothelioma: heparanase-assisted dual virotherapy

Y Watanabe^{1,2,3}, T Kojima³, S Kagawa^{1,3}, F Uno^{1,3}, Y Hashimoto^{2,3}, S Kyo⁴, H Mizuguchi⁵, N Tanaka³, H Kawamura², D Ichimaru², Y Urata² and T Fujiwara^{1,3}

¹Center for Gene and Cell Therapy, Okayama University Hospital, Okayama, Japan; ²Oncolys BioPharma, Inc., Minato-ku, Tokyo, Japan; ³Department of Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan; ⁴Department of Obstetrics and Gynecology, Kanazawa University School of Medicine, Kanazawa, Japan and ⁵Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka, Japan

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a highly aggressive tumor that is related to asbestos exposure. MPM is characterized by rapid and diffuse local growth in the thoracic cavity, and it has a poor prognosis because it is often refractory to conventional therapy. Although MPM is an extraordinarily challenging disease to treat, locoregional virotherapy may be useful against this aggressive disease because of the accessibility by intrapleural virus delivery. In this study, we show that telomerase-specific, replication-selective adenovirus OBP-301 can efficiently infect and kill human mesothelioma cells by viral replication. Intrathoracic administration of virus significantly reduced the number and size of human mesothelioma tumors intrathoracically implanted into *nu/nu* mice. A high-definition, fluorescence optical imaging system with an ultra-thin, flexible fibered microprobe clearly detected intracellular replication of green fluorescent protein-expressing oncolytic virus in intrathoracically established mesothelioma tumors. As the extracellular matrix (ECM) may contribute to the physiological resistance of a solid tumor by preventing the penetration of therapeutic agents (including oncolytic viruses), we also examined whether the co-expression of heparanase, an endoglucuronidase capable of specifically degrading heparan sulfate, that influences the physiological barrier to macromolecule penetration, can modify the permeability of the ECM, resulting in profound therapeutic efficacy. Co-injection of OBP-301 and a replication-defective adenovirus (Ad-*S/hep*)-expressing heparanase resulted in more profound antitumor effects without apparent toxicity in an orthotopic pleural dissemination model. Our results suggest that intrathoracic dual virotherapy with telomerase-specific oncolytic adenovirus in combination with heparanase-expressing adenovirus may be efficacious in the prevention and treatment of pleural dissemination of human malignant mesothelioma.

Oncogene (2010) 29, 1145–1154; doi:10.1038/onc.2009.415; published online 23 November 2009

Correspondence: Dr T Fujiwara, Center for Gene and Cell Therapy, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700-8558, Japan. E-mail: toshi_f@md.okayama-u.ac.jp
Received 12 July 2009; revised 23 September 2009; accepted 19 October 2009; published online 23 November 2009

Keywords: telomerase; adenovirus; mesothelioma; heparanase; dual virotherapy

Introduction

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is an uncommon neoplasm with an annual estimated incidence of 2000–3000 new cases in the United States (Connelly *et al.*, 1987; Price, 1997). In more than 70% of patients, the origin of the tumor is linked to a history of exposure to asbestos fibers (Chahinian *et al.*, 1982; Chailleux *et al.*, 1988). The use of asbestos in Japan increased rapidly after the 1950s and remained at a high level even as the worldwide use of asbestos decreased substantially after the 1980s, therefore, the mortality rate for MPM is expected to continuously increase in Japan (Murayama *et al.*, 2006). MPM is characterized by progressive local tumor invasion and poor median survival ranging from 9 to 16 months (Ruffie *et al.*, 1989). MPM is notoriously refractory to treatment, and neither surgery nor radiotherapy alone results in increased survival (Ball and Cruickshank, 1990; Rusch *et al.*, 1991). Although many chemotherapeutic regimens have been suggested, a standard treatment strategy for MPM remains elusive (Alberts *et al.*, 1988; Ryan *et al.*, 1998). Therefore, the development of novel therapeutic options is required.

Clinical trials of patients with MPM have established the safety of the intrapleural delivery of replication-deficient adenoviral vectors expressing the suicide gene, herpes simplex thymidine kinase, followed by the administration of ganciclovir, an antiviral drug. Some evidence indicates that this approach induces an effective antitumor immune response (Serman *et al.*, 1998, 2005; Molnar-Kimber *et al.*, 1998). Moreover, intrapleural interferon- β gene transfer with a replication-defective adenoviral vector may potentially be a useful approach for the generation of antitumor immune responses in MPM patients (Serman *et al.*, 2007). A significant obstacle to these approaches is the limited distribution of the non-replicative vectors within the tumor mass, even after direct intratumoral administration. Histopathological analyses have shown that these vectors transduce only a few tumor cells,

despite the successful antitumor responses. Therefore, more efficient strategies for the virus to spread within tumors may be required to increase the clinical benefit.

Replication-selective, tumor-specific viruses present a novel approach for the treatment of neoplastic diseases. These vectors are designed to induce virus-mediated lysis of tumor cells after selective viral propagation within the tumor. Telomerase activation is a critical step in carcinogenesis, and it correlates closely with human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression. We constructed an attenuated adenovirus 5 vector (OBP-301, Telomelysin), in which the hTERT promoter element drives expression of the *E1A* and *E1B* genes linked with an internal ribosome entry site. OBP-301 replicated efficiently and induced marked cell killing in a panel of human cancer cell lines, whereas replication as well as cytotoxicity was highly attenuated in normal human cells lacking telomerase activity (Kawashima *et al.*, 2004; Taki *et al.*, 2005). In this study, we examined the therapeutic potential of intrapleural delivery of OBP-301 against human MPM tumors intrathoracically implanted

into *nu/nu* mice. As the extracellular matrix (ECM) may contribute to the physiological resistance of a solid tumor by preventing the penetration of therapeutic agents (including oncolytic viruses), we also examined whether the co-expression of heparanase, an endoglucuronidase capable of specifically degrading heparan sulfate, that influences the physiological barrier to macromolecule penetration, can modify the permeability of the ECM, resulting in profound therapeutic efficacy.

Results

Expression of CAR and hTERT levels in human mesothelioma cell lines

To examine the biological characteristics of human mesothelioma cells, we first used flow cytometry to determine the cell surface expression of coxsackie and adenovirus receptor (CAR). CAR was expressed in all four cell lines tested, although the expression levels varied (Figure 1b). H2052 and H2452 cells showed low,

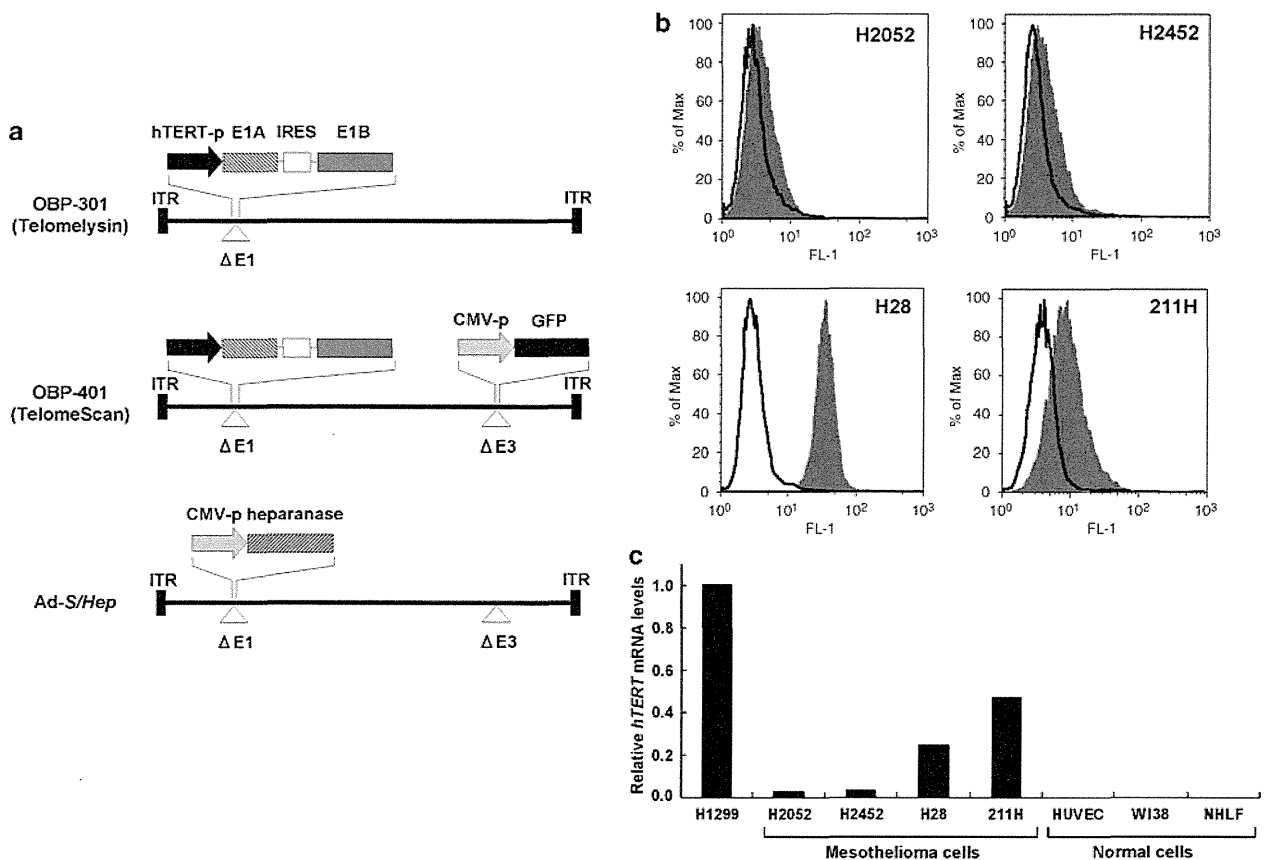


Figure 1 Schematic DNA structures of telomerase-specific viruses and characteristics of human mesothelioma cell lines. (a) OBP-301 is a telomerase-specific, replication-competent adenovirus that contains the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter sequence inserted into the adenovirus genome to drive transcription of the *E1A* and *E1B* bicistronic cassette linked by internal ribosome entry site (IRES). OBP-401 is a variant of OBP-301 and contains the green fluorescent protein (*GFP*) gene inserted under the cytomegalovirus (CMV) promoter into the *E3* region for monitoring viral replication. Ad-S/*hep* vector contains human heparanase complementary DNA (cDNA) driven by the CMV promoter. (b) Flow cytometric analysis of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) expression in human mesothelioma cell lines. Cells were incubated with anti-CAR monoclonal antibodies followed by fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated rabbit anti-mouse IgG (gray area). An isotype-matched normal mouse IgG conjugated to FITC was used as a control (black line). (c) Relative *hTERT* messenger RNA (mRNA) expression in human mesothelioma cell lines and normal cell lines was determined by real-time reverse transcription (RT)-PCR analysis. The *hTERT* mRNA expression of H1299 human lung cancer cells was considered 1.0, and the relative expression level of each cell line was calculated against that of H1299 cells.

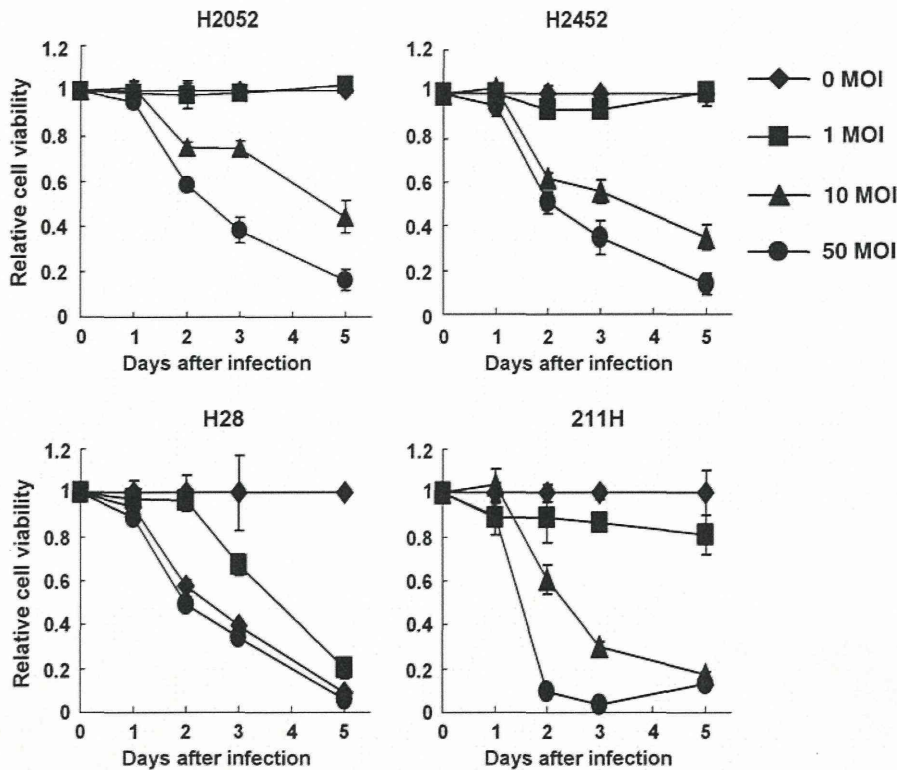


Figure 2 Selective cytopathic effect of OBP-301 in human mesothelioma cell lines *in vitro*. Cells were infected with OBP-301 at the indicated multiplicity of infection (MOI) values, and the surviving cells were quantitated over 5 days by XTT assay. The cell viability of mock-treated cells on day 1 was considered 1.0, and the relative cell viability was calculated. Values represent the mean \pm s.d. of triplicate experiments.

but detectable CAR expression compared with CAR-negative cell lines such as LN444, LNZ308 and H1299R5 that we reported earlier (Tango *et al.*, 2004; Taki *et al.*, 2005). A real-time reverse transcription-PCR method showed that all cell lines expressed detectable levels of *hTERT* messenger RNA (mRNA), suggesting that the *hTERT* promoter element can be used to target human mesothelioma cells (Figure 1c).

In vitro cytopathic efficacy of OBP-301 on human mesothelioma cell lines

To determine whether OBP-301 infection induces selective cell lysis, mesothelioma cells were infected with OBP-301 at various multiplicity of infections (MOIs), and then the XTT cell viability assay was performed over 5 days. All mesothelioma cell lines were efficiently killed by OBP-301 in a dose-dependent manner (Figure 2). Infection at an MOI of 10 was sufficient to induce cell lysis within 3 days. To visually confirm the viral replication and spread, we modified OBP-301 to express the green fluorescent protein (GFP) reporter gene under the control of the cytomegalovirus promoter in the E3 region (modified virus, OBP-401) (Figure 1a). We have confirmed earlier that the propagation and yields of OBP-301 and OBP-401 are equivalent (Kawashima *et al.*, 2004; Kishimoto *et al.*, 2006). After OBP-401 infection, phase-contrast images showed a rapid loss of viability because of massive cell

death, as evidenced by ballooning and floating cells. We observed a strong and persistent GFP fluorescence expression in these mesothelioma cells under a fluorescence microscope, indicating the viral replication and spread into the neighboring tumor cells (Figure 3a).

Intrathoracic virus spread and infection in an orthotopic pleural human mesothelioma model

We also evaluated the viral infection and replication in human mesothelioma cells growing intrathoracically in athymic *nu/nu* mice. When H2052 and H2452 mesothelioma cells were inoculated into the thoracic space, disseminated tumor nodules were detected in the visceral pleura, parietal pleura, diaphragmatic pleura and mediastinum. We used H2452 cells with low CAR and *hTERT* mRNA expression that were considered to be most refractory to OBP-301 for the further *in vivo* experiments. Tumor weights at autopsy more than 40 days after tumor cell inoculation were significantly greater than tumor weights at <30 days, indicating the tumor growth in the thoracic cavity (Supplementary Figure 1). Optical charged-coupled device imaging detected GFP-labeled tumors at the gross level during a midsternal thoracotomy 6 days after intrathoracic injection of 1×10^8 plaque-forming units (PFU) of OBP-401. Moreover, GFP expression in macroscopically invisible tumors could be detected at the microscopic level with a hand-held flexible probe inserted through

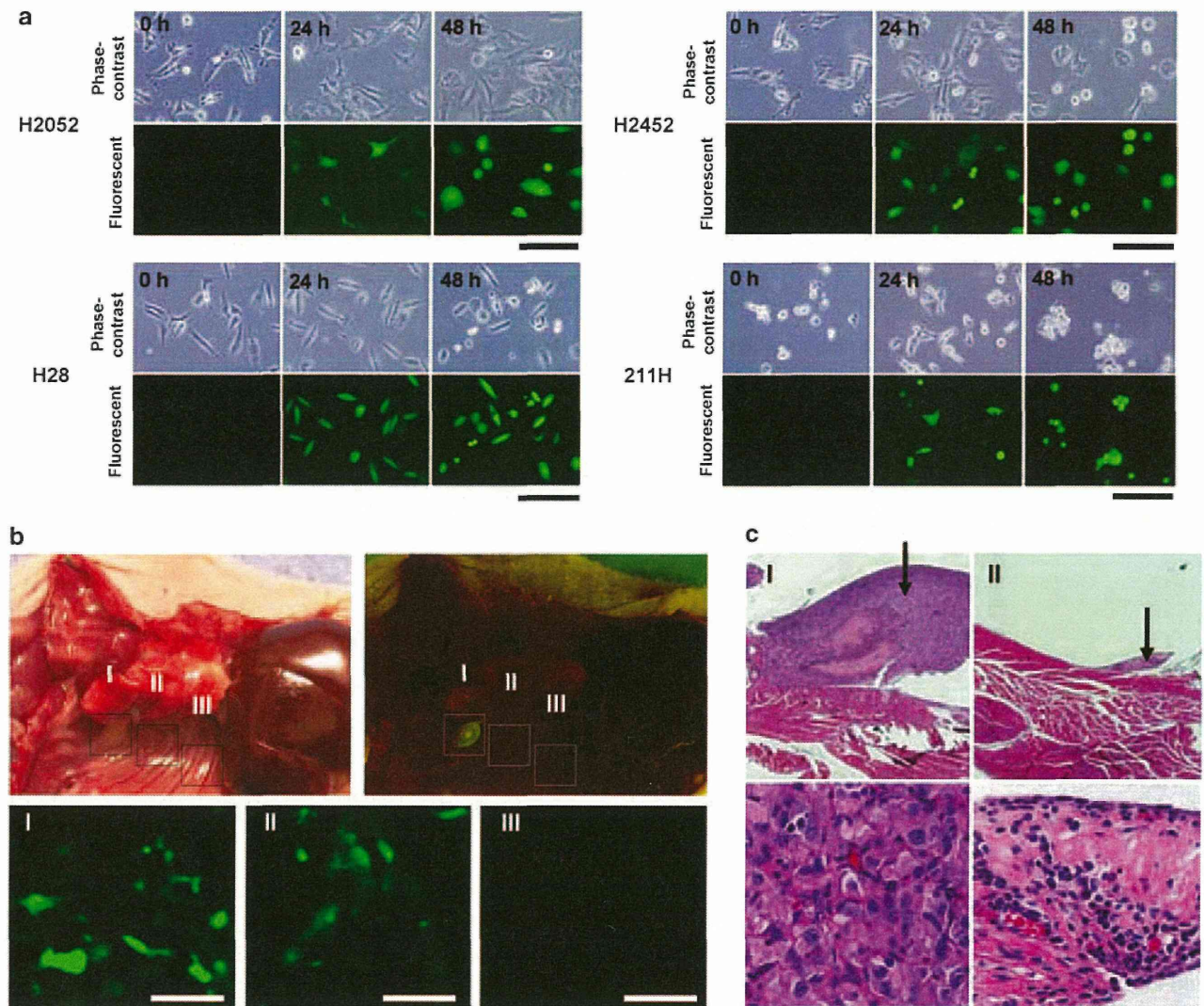


Figure 3 Visualization of human mesothelioma cells *in vitro* and *in vivo* by OBP-401 infection. (a) H2052, H2452, H28 and 211 H cells were infected with OBP-401 at an multiplicity of infection (MOI) of 10. Cell morphology and green fluorescent protein (GFP) expression were evaluated by fluorescence microscopy at the indicated time. Bar = 200 μ m. (b) Internal images of pleural mesothelioma dissemination visualized by intrathoracic injection of OBP-401. Six weeks after intrathoracic inoculation of 5×10^6 H2452 cells, mice received an intrathoracic injection of 1×10^8 plaque-forming units (PFU) of OBP-401. The GFP fluorescence expression was detected 6 days after virus administration by a 3-charged-coupled device (CCD) camera (top panels) and an *in situ* molecular imaging system (bottom panels). Top-left panel, gross appearance of disseminated H2452 tumors; top-right panel, fluorescent detection. Bottom panels, I, II and III represent the boxed regions of the top panels. Bar = 30 μ m. (c) Histologic sections stained with hematoxylin and eosin showing local growth of H2452 mesothelioma cells (arrows) in the thoracic spaces. Top panels, $\times 40$ magnification; bottom panels, $\times 400$ magnification. I and II represent the boxed regions of (b).

the intercostal small incision (Figure 3b and Supplementary Figure 2). Histological analysis confirmed the presence of disseminated tumors in the sites of fluorescence emission (Figure 3c). These results suggest that intrathoracically injected oncolytic virus can infect and selectively replicate in disseminated tumor tissues.

In vivo antitumor effect of intrathoracic delivery of OBP-301 in an orthotopic pleural human mesothelioma model
To examine the therapeutic effect of telomerase-specific oncolytic virus, mice received an injection of 1×10^7 or 1×10^8 PFU of OBP-301, 1×10^8 PFU of replication-defective control adenovirus (dl312), or phosphate-buffered saline into the thoracic space injections

were administered twice at a 1-week interval beginning 24 h after tumor cell inoculation. Injection of 10^8 PFU of OBP-301 significantly reduced the incidences of tumor cell dissemination and the total weights of tumor nodules as compared with mice that received dl312 or phosphate-buffered saline injection, although 10^7 PFU of OBP-301 had no apparent effect (Figures 4a and b). Next, we examined treatment schedules with different starting points. Two injections of 1×10^8 PFU of OBP-301 administered at a 1-week interval starting on day 1, 8, 22 or 29 after tumor inoculation showed statistically significant antitumor effects when mice were killed on day 43 (Figure 4c and Supplementary Figure 3). These results suggest that oncolytic virotherapy could be

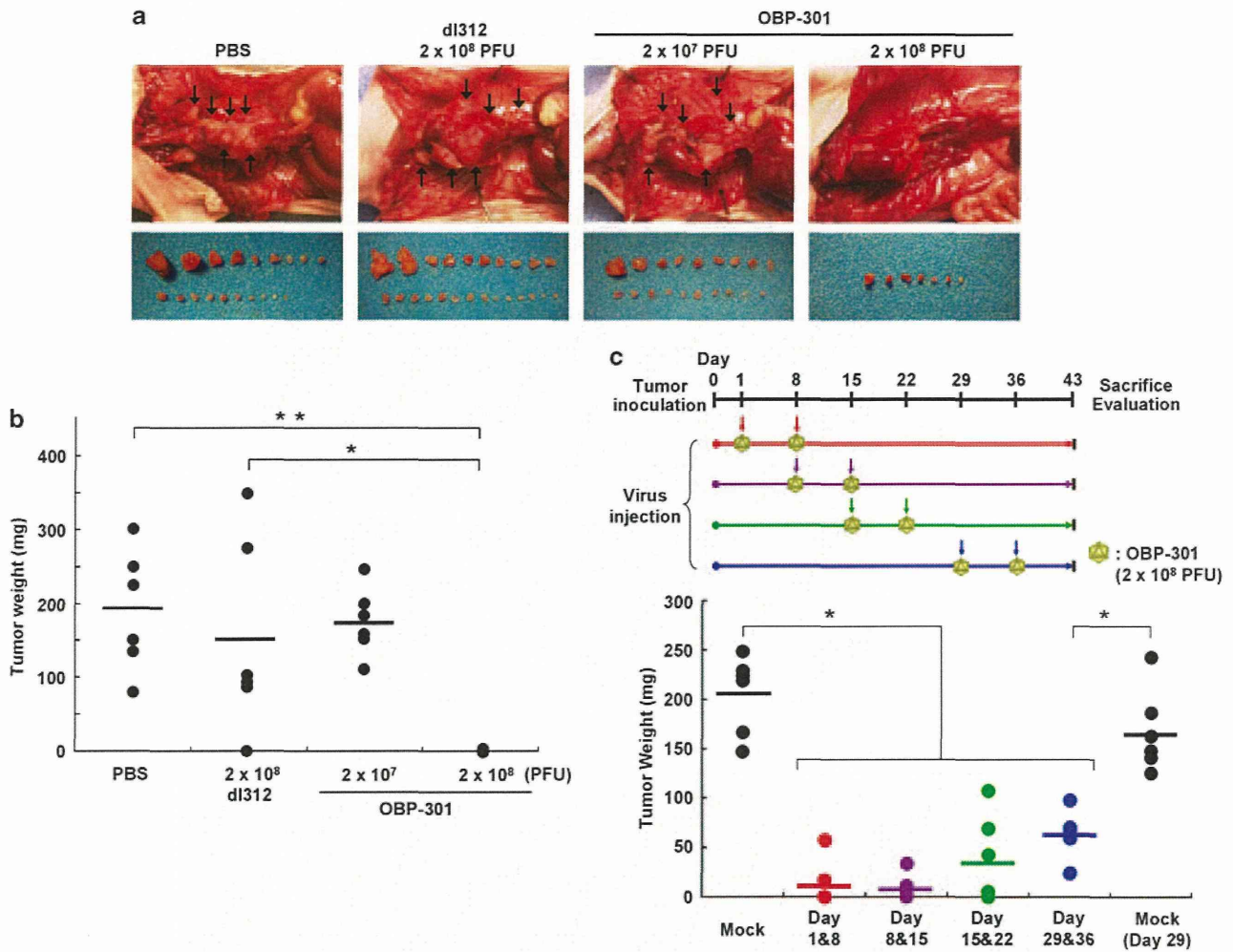


Figure 4 *In vivo* antitumor effect of OBP-301 on pleural dissemination of H2452 human mesothelioma cells. (a) Gross appearance of H2452 tumors grown orthotopically in the thoracic spaces. H2452 cells (5×10^6) were inoculated into the thoracic space of athymic *nu/nu* mice. After 24 h, either 1×10^7 plaque-forming units (PFU)/100 μ l or 1×10^8 PFU/100 μ l of OBP-301, 1×10^8 PFU/100 μ l of dl312 (replication-deficient adenovirus), or phosphate-buffered saline (PBS) were injected into the thoracic space twice at a 1-week interval (total dose: 2×10^7 or 2×10^8 PFU). Eight weeks after tumor cell inoculation, the mice were killed, and the pleural dissemination of the thoracic spaces was assessed. (b) The weight of each tumor nodule found in the thoracic spaces was determined. Closed circles: individual tumor weights. Bars: mean weight. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (c) The antitumor effect of OBP-301 administered in different treatment schedules was also assessed on an orthotopic pleural dissemination model. Top panel, treatment schedule. Bottom panel, tumor weight of each tumor nodule found in the thoracic spaces after treatment. The treated mice were killed and assessed for pleural dissemination 43 days after tumor inoculation. Closed circles: individual tumor weights. Bars: mean weight. * $P < 0.05$.

effective for preventing the dissemination of mesothelioma cells as well as shrinking established tumors; complete eradication of disseminated nodules, however, was not achieved.

Enhanced antitumor effect of OBP-301 in combination with heparanase-expressing adenovirus in an orthotopic pleural human mesothelioma model

To further enhance the *in vivo* therapeutic potential of telomerase-specific virotherapy, we examined the combination effect of OBP-301 and a replication-defective adenovirus vector expressing the human *heparanase* gene (Ad-*S/hep*) (Uno et al., 2001). Heparan sulfate is a major constituent of the ECM that is responsible for a barrier to macromolecular diffusion in tumors. Thus, heparanase-mediated ECM degradation may be a

critical requisite for virus penetration and distribution into tumor tissues. Western blot analysis revealed the expression of both proheparanase (*Mr* 65 000) and cleaved, active heparanase (*Mr* 50 000) in H2542 cells after Ad-*S/hep* infection expression of these proteins was not affected by the presence of OBP-301 (Figure 5a). In addition, an *in vitro* XTT analysis showed that co-infection of Ad-*S/hep* at various MOIs did not affect OBP-301-mediated cytotoxicity on human mesothelioma cells (Supplementary Figure 4).

We next examined whether heparanase expression enhanced the virus penetration into three-dimensional tumor structures using a human mesothelioma spheroid model. Tumor spheroids provide an excellent *in vitro* three-dimensional model resembling *in vivo* tumor masses for visualizing the dynamics of the virus and