

201313021A

別紙1

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

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

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小賤 健一郎

平成26(2014)年 5月



目 次

I. 総括研究報告	
研究総括	----- 1
小賤 健一郎	
II. 分担研究報告	
1. 幹細胞と分子生物学的解析、形態学的解析	----- 6
三井 薫、入江 理恵	
2. m-CRA ベクターの作製	----- 9
伊地知 暢広、王 宇清	
3. がん幹細胞の単離と機能解析	----- 12
小宮 節郎、瀬戸口 啓夫	
4. 細胞生物学的解析	----- 14
坂本 泰二	
5. 癌幹細胞の分離とm-CRAの治療効果の検討	----- 16
夏越 祥次	
6. 糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子の開発に関する研究	----- 18
隅田 泰生	
7. 幹細胞生物学での技術開発と解析	-----23
國貞 隆弘	
8. 人工グリオーマ幹細胞を用いた癌幹細胞制御機構の解明	-----25
近藤 亨	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 30

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）  
総括研究報告書

研究総括

研究代表者 小賤 健一郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究要旨

独自開発のm-CRA（多因子で癌特異化する増殖制御型アデノウイルスベクター）作製技術を基盤に、独創的な癌幹細胞の同定、標的治療技術の開発を目的としている。分担研究者の癌幹細胞と癌悪性化に関するオリジナルの研究成果を主任研究者らのm-CRAベクターに応用し、また糖鎖技術からのベクター技術の改良開発という連携した研究体制で以下の基礎研究成果をあげ、また治験への準備も進めて来た。概要は以下である。

- 1) 第一弾医薬候補の Survivin 反応性 m-CRA (Surv.m-CRA) の、医師主導治験の準備を進めた。
- 2) Surv.m-CRA は癌の全分画に治療効果があるだけでなく、「癌幹細胞（つまり悪性化が増せば）むしろ治療効果が増加する」という結果を得、従来の治療法への優位性を実証した。
- 3) 癌幹細胞で高発現する X 分子に反応性の m-CRA を作製・解析し、本年は特に in vivo 動物モデルでの治療効果の実験を進めた。
- 4) 癌幹細胞を標的する候補となる遺伝子プロモーターもリコンビネーションで簡単に交換可能で網羅的解析を可能とし、標的する蛍光蛋白、殺傷遺伝子も搭載したベクターシステムを開発して特許出願した。
- 5) 白血病治療薬の三酸化ヒ素(ATO)による、骨肉腫増殖抑制能を見出した。
- 6) マウス人工グリオーマ幹細胞株、ヒト各種グリオーマから樹立した浮遊細胞塊と正常神経幹細胞に発現亢進・消失しているmiRNA群を同定し、miR-340がプラスミノージェンアクチベーターを含む様々な機能因子の発現抑制を介して腫瘍形成を阻害することを明らかにした。
- 7) 癌と正常の幹細胞の分子機構解明という観点から、iPS 細胞の研究も進め、低酸素で培養することで DPSC からの iPS 細胞誘導効率が5倍程度上昇することを明らかにした。
- 8) ウイルスベクターへ結合する糖鎖の研究を進めた。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

三井 薫	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・講師
入江 理恵	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・助教
伊地知暢広	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・助教
王 宇清	鹿児島大学産学連携推進センター・プロジェクト研究員
小宮 節郎	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授
瀬戸口啓夫	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・助教
坂本 泰二	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授
夏越 祥次	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授

隅田 泰生	鹿児島大学大学院理工学研究科・教授
國貞 隆弘	岐阜大学医学系研究科・教授
近藤 亨	北海道大学遺伝子病制御研究所・教授

A. 研究目的

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

- ① Surv.m-CRA の臨床化実現

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

## B. 研究方法

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

- ① Surv.m-CRAの臨床応用（小賤研究室）  
三次がん（一～二期）で開発した Surv.m-CRAの臨床試験（医師主導治験）の実現を目指す。
- ② m-CRAと癌幹細胞のオリジナルの基盤技術の開発
  - (i) X分子依存性m-CRA(X.m-CRA)の開発（小賤研究室）：癌で高発現するX分子に注目して開発して基本性能まで確認したX.m-CRAを、臨床応用化の有用性を検証していく。
  - (ii) CD9 shRNA m-CRA癌治療（小賤研究室）：不妊の作用以外には機能未知だったY分子が、血管新生作用に必須の分子であることを見出した。Y shRNA搭載のSurv.m-CRA等で新規治療法を開発する。
  - (iii) 癌幹細胞分離技術の開発：グリオーマ（近藤、國貞）と横紋筋肉腫（瀬戸口）の幹細胞分離法を確立している。さらに新規マーカーや、その分子メカニズムを解明し、治療法開発に繋げる。またこれらの成果を新規のm-CRA癌治療にも応用開発していく。
  - (iv) 糖鎖ナノテクノロジーによる新技術（隅田）：分離濃縮した癌幹細胞の糖鎖チップ解析で癌幹細胞特異化の表面分子を見だし、ウイルス濃縮法を確立する。最終的にはm-CRAのターゲット技術に応用する。
- ③ 「癌幹細胞への分化誘導により悪性化除去」という新たな遺伝子治療法戦略の開発（近藤、小賤）  
ある分子の強発現で癌幹細胞の腫瘍形成能を阻止できることを見いだした。これを新たな遺伝子治療に応用する。
- ④ 癌幹細胞を真に同定し標的治療できる完全オリジナルのm-CRAベクターの開発

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

## ⑤ 癌と正常幹細胞からの新規標的機構と分子の解明

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

## C. 研究結果

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

- 1) 第三次対がん厚生労働科研等にて開発した基盤 m-CRA 技術（日米欧にて特許取得）による第一弾医薬候補の Survivin 反応性 m-CRA (Surv.m-CRA)（米国特許取得）に関し、この技術分野での本邦初の医師主導治験の準備（GMP 製造、GLP 基準の非臨床試験、PMDA 事前相談等）を進めた。平成 27 年度の医師主導治験開始のスケジュールに沿って、バイオディストリビューションスタディ、単回投与毒性試験、GMP 製造と品質試験など順調に進めることができた。昨年からは進めていたものが、計画通り今年もさらに進捗しており、平成 27 年度に医師主導治験が開始できる見込みである。  
また合わせて実施大学となる本学の革新医薬の治験実施への体制整備も進めた。
- 2) 難治の原因の癌幹細胞の治療に対する m-CRA 戦略の有効性を調べる研究は、さらに詳細に解析し進めている。まず上記のように治験を計画している Surv.m-CRA では、癌幹細胞分画では Survivin の内因性発現のさらなる増加、Survivin promoter 活性の上昇が有意に認められ、Surv.m-CRA の治療効果のさらなる増強という事実を、詳細な in vitro と in vivo の実験で実証できた。従来の治療法（抗癌剤、放射線など）は悪性化の高い癌細胞（癌幹細胞）では治療効果が無効になるのとは逆のベクトルで、Surv.m-CRA は全分画に治療効果があるだけでなく、「悪性化が増せばむしろ治

療効果が増加する」という結果は従来の治療法に対する優位性として、この臨床開発を推進できる成果である。

さらに、「m-CRA は、癌一般で、癌全分画を殺傷できる上に、癌幹細胞はさらに強力に殺傷できるか」ということを検証するため、この Surv.m-CRA、あるいは新型の m-CRA で、他のマーカーで他の組織形の癌幹細胞に対する治療効果を同様の方法で検証した。この結果、やはり m-CRA は癌の全分画を効率よく殺傷できるだけでなく、癌幹細胞では治療効果が増強する、という、好ましい結果が得られた。

- 3) Surv.m-CRA の全癌分画への治療面での有用性とは別の観点で、癌幹細胞を標的治療する試みとして、癌幹細胞で高発現するある分子 X に反応して増殖制御する m-CRA の開発を行って来た。初年度、2年目まで、X 遺伝子プロモーターの活性と癌幹細胞特異性を明らかにし、実際に X 反応性 m-CRA を作製し、解析を行い、癌幹細胞分画を特異的に治療できる *in vitro* データーを一部得た。昨年度は特に、癌幹細胞特異性の点でさらに実験を重ねて詳細に検証し、また *in vivo* 動物モデルでの治療効果の実験も進めた。本年度は、この *in vitro*, *in vivo* の両実験系で、確証実験を精力的に行った。特に癌幹細胞の特異的標的性に関しては慎重かつ、繰り返しの実験で、検証しておるところである。但し最終的な結果としては、この X.m-CRA は他の m-CRA と比較しても、*In vitro*, *in vivo* の両方で強力な治療効果を示した。
- 4) 遺伝子導入・発現ウイルスベクターを使った革新的な癌幹細胞の単離技術を開発している。現在の癌幹細胞の分離濃縮法はマーカー膜蛋白や Sphere 法が中心だが、癌幹細胞同定の特異性が低いこと、単離レベルではない限界がある。候補となる遺伝子プロモーターもリコンビネーションで簡単に交換可能で網羅的解析を可能とし、標的する蛍光蛋白、殺傷遺伝子（異なる3種類を用意）も搭載したベクターシステムを作製し、基盤の作製技術は完成して特許出願した。よって本年度は、ベクターに搭載する殺傷遺伝子の機能解析に進み、つまりどの治療遺伝子が癌幹細胞、あるいは正常の幹細胞（未分化）を効率よく殺傷できるか、ということの詳細な実験を進めて来た。また合わせて、癌ならび正常の幹細胞の単離に適切なプロモーターの解析も行って来た。

また本年度は合わせて、癌用に開発したこの m-CRA 技術を、正常の幹細胞の未分化細胞に殺傷効果を示すか、詳細に調べた。

- 5) Hedgehog シグナルは正常な幹細胞やがん幹細胞の維持・増殖に関与していることが報告されているので骨軟部肉腫における Hedgehog シグナルの機能解析を行ってきた。近年になって、かねてより使用されていた抗がん剤である arsenic trioxide (ATO) に Hedgehog シグナル阻害作用があることが報告された。早期の臨床応用のために ATO の骨肉腫細胞に対する効果を検討した。また、欧米で基底細胞がん承認されている Hedgehog シグナル阻害薬 Vismodegib の効果を検討した。

その結果として、1)ヒト骨肉腫臨床検体・細胞株における GLI2 の発現が亢進、2)GLI2 の knock down で移動能と浸潤能は低下、3)GLI2 knock down 骨肉腫細胞株をヌードマウスに移植すると肺転移抑制、4)ATO の *in vitro* で骨肉腫細胞に投与で GLI の転写活性低下、腫瘍抑制、5)同 *in vivo* 動物モデルで ATO 投与で腫瘍増殖抑制、6) ATO, GANT61, Vismodegib を投与で骨肉腫細胞株の移動能・増殖能が低下、7)ATO, GANT61, Vismodegib の濃度を減らして併用で相乗的に骨肉腫細胞の浸潤能が低下、が得られた。

- 6) 試験管内で、神経幹細胞 (NSC) とオリゴデンドロサイト前駆細胞を起源とするグリオブラストーマ幹細胞 (mGIC) の作製に成功した。この mGIC は、10個をヌードマウス脳内に移植することによりヒト GBM と同じ病理所見を示す悪性脳腫瘍を形成する。(Hide et al, Cancer Res. 2009; Nishide et al, PLoS One 2009; Hide et al, Stem Cells 2011)。よって本年度は、新規 GIC マーカー・治療標的の同定を目的として、GIC 腫瘍形成能に関与する新規 miRNA 群の同定を試みた。

その結果として、2種類の mGIC、3種類の hGIC、2種類のヒト GBM 細胞株、ヒトとマウス NSC に発現している miRNA の網羅的な解析を行い、候補 miRNA 群を同定した。GBM における機能が報告されていない GIC-miRNA1 について検討を進めた結果、それが腫瘍抑制因子として機能することを発見した。更に、GIC-miRNA1 の標的因子が細胞外

マトリックスのリモデリング制御因子であることも明らかにした。これらの結果から、GIC-miRNA の強制発現やその誘導が新規 GBM 治療法となることを示した。

- 7) 癌と正常の幹細胞の共通点と相違点からの分子機構解明という観点から、iPS 細胞の研究も進めている。本年度は特に、DLX4 を OCT3/4, SOX2 とともに歯髄細胞に導入したところ (OSD)、c-MYC、KLF4 無しでも iPS 細胞が誘導できるという結果を得た。また、KLF4 を加えることによって、さらなる誘導効率の上昇が観察された。また、遺伝子以外に、リプログラミング処理中の酸素濃度が iPS 細胞の誘導効率に大きく影響することを DPSC を用いて明らかにし、国際誌に発表した。

さらに市販の無血清培地をスクリーニングして、LONZA 者の MSCGM-CD が、歯髄細胞培養に利用できることを明らかにした。そこで、無血清で樹立した歯髄細胞から、ゲノムへの組み込みとそれに伴う発がんリスクの少ないセンダイウイルスベクターを利用した。CytoTune-iPS(DNAVEC)を用いて、iPS 細胞を誘導したところ、十分な数の iPS 細胞クローンを得られ、さらにこれらの iPS 細胞は従来の方法と遜色ない分化能力を示した。

- 8) ウイルスベクターへ結合する糖鎖を同定し、糖鎖固定化ナノ粒子にて、アデノウイルスベクターの高効率かつ簡便な濃縮法を開発している。本年度は関連して、糖鎖または、特異糖鎖へ結合する一本鎖抗体を固定化した蛍光性ナノ粒子の開発を行っている。本年度は、中性糖を固定化した蛍光性ナノ粒子を 10 種類、また成人 T 細胞白血病患者から樹立した S 1 T 細胞に特異的に結合する一本鎖抗体 S1TSCFr3-1 を固定化した蛍光性ナノ粒子を調整し、各種培養細胞への結合性を検討した。

結果として、半導体金属に直接 His タグの親和性で固定化した scFv-FNP 4b の S1T 細胞に対する結合性は、細胞への結合性において再現性が得られなかった。scFv-FNP 4a も同様であった。この結果から、FNP 上の scFv は非特異的に脱着していると考えられる。一方、NTA、ニック

ル、His タグを介して固定化した scFv-FNP 5a、5b では、FACS 解析と共焦点顕微鏡による蛍光観察により、再現性よく、S1T 細胞に結合性を示し、非 ATL 細胞である CEM 細胞には結合性を示さなかった。このことから、NTA-ニックル・His タグ結合を介することによって、強固に FNP 上に固定化されており、また、scFv の方向性も規定されて抗原を認識できていると考えられる。

#### D. 考察

各研究項目に関する意義と発展性は各研究者の項に記載した。

本プロジェクトは、癌幹細胞を標的治療する m-CRA を開発するという最終的な目標に向かって、連携して研究を進めてきた。

最終年度となる本年度は、m-CRA の医師主導治験実現を強力に進めることができ (平成27年度開始予定)、さらに m-CRA 技術での革新的な癌幹細胞治療法開発に繋がる各成果を上げることができた。今後は第一弾の Surv.m-CRA の治験で安全性と治療効果を確認するのに加え、癌幹細胞への効果もヒトで検証していきたい。またさらに各技術については、今後も継続発展して研究を進め、実用化に向かいたい。

#### E. 結論

各成果の結論は、各分担研究者の報告に記載した。

総合的な結論として、m-CRA の医師主導治験実現を強力に進めることができ、さらに m-CRA 技術での革新的な癌幹細胞治療法開発に繋がる各成果を上げることができた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表 (主任研究者分のみ)

##### 1. 論文発表

1. Yuge K, Takahashi T, Khai NC, Goto K, Fujiwara T, Fujiwara H, Kosai K.: Intramuscular injection of adenoviral hepatocyte growth factor at a distal site ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Int J Mol Med.* 33(5):1064-1074, 2014
2. Tanoue K, Wang Y, Ikeda M, Mitsui K, Irie R, Setoguchi T, Komiya S, Natsugoe S, Kosai K.: Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus kills rhabdomyosarcoma stem cells more efficiently than their progeny. *J Trans Med.* 12:27.doi: 10.1186/1479-5876-12-27,2014

## 2.学会発表

1. 小賤健一郎：新しい遺伝子治療ウイルスベクターの開発と基礎・臨床への応用。（国内・ランチョンセミナー）第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 16 日（鹿児島）
2. 三井薫、高橋知之、井手佳菜子、小賤健一郎：アデノウイルスベクターでのヒト多能性幹細胞への効率的遺伝子導入技術の開発。（国内・ポスター）第 13 回日本再生医療学会総会、2014 年 3 月 4-6 日(京都)
3. 井手佳菜子、三井薫、小賤健一郎：多能性幹細胞の再生医療応用における新規腫瘍化阻止技術の開発(1)ヒト ES 細胞での検証。（国内・口頭発表）第 7 回桜ヶ丘地区基礎系研究発表会、2014 年 1 月 16 日（鹿児島）
4. 松下洋平、井手佳菜子、三井薫、小賤健一郎：多能性幹細胞の再生医療応用における新規腫瘍化阻止技術の開発(2)マウス ES 細胞での検証。（国内・口頭発表）第 7 回桜ヶ丘地区基礎系研究発表会、2014 年 1 月 16 日（鹿児島）
5. 小賤健一郎：癌を標的治療する増殖型アデノウイルスの独自技術開発と臨床応用への展望。鹿児島がんフォーラム 2013 年 11 月 30 日（鹿児島）
6. 宮崎 優美、王 宇清、三井 薫、丁 強、政幸一郎、松原 修一郎、小賤 健一郎、高尾 尊身：Immunohistochemical comparative analysis of the sphere cells of CD133-positive pancreatic cancer cells with iPS cells. CD133+膵がん Sphere 形成細胞と iPS 細胞の免疫組織学的比較解析。第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3-5 日(横浜)
7. 小賤健一郎：革新的ながん治療薬(癌だけを殺すウイルス)の開発と臨床応用に向けて。鹿児島大学公開講座 2013 年 7 月 27 日(鹿児島)

出願人：鹿児島大学

国内出願：2014 年 1 月 14 日

(特願 2014-004262)

2. 増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法及びその作製用キット  
発明者：小賤健一郎、永野聡  
出願人：小賤健一郎（国内）；財団法人 名古屋産業科学研究所（中部 TLO）（米、欧）  
国内出願：2003 年 7 月 31 日  
(特願 2003-283427)  
【国内特許取得】 2010 年 3 月 26 日  
(特許第 4478775 号)  
国際出願：2004 年 7 月 26 日  
(PCT/JP2004/010998)  
【米国特許取得】 2011 年 10 月 11 日  
(特許番号：US 8,034,589 B2)  
【欧州特許取得】 2013 年 11 月 20 日  
(特許番号：EP 1662004)  
JST 特許支援事業（採択）により欧州に指定  
国移行中
3. 癌幹細胞を標的とするウイルスベクター  
発明者：小賤健一郎、王宇清  
出願人：鹿児島大学  
国内出願：2011 年 3 月 25 日  
(特願 2011-068530)  
国際出願：2012 年 3 月 23 日  
(PCT/JP2012/002031)  
米国出願：2013 年 9 月 24 日(US 14/007,227)
4. Aurora キナーゼプロモーターを含む増殖制御型ウイルスベクター  
発明者：小賤 健一郎  
出願人：鹿児島大学  
国内出願：2010 年 9 月 30 日  
(特願 2010-223150)  
国際出願：2011 年 9 月 29 日  
(PCT/JP2011/72357)  
米国出願：2013 年 7 月 5 日(US 13/876,916)

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

### 1. 特許出願・取得

1. 幹細胞における腫瘍化原因細胞の新たな標識法と治療法  
発明者：小賤健一郎、三井薫、井手佳菜子

### 2. 実用新案登録

### 3. その他

幹細胞と分子生物学的解析  
形態学的解析

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

研究要旨

癌または正常の幹細胞の共通点と相違点から分子機構を解明するという観点から、癌幹細胞だけでなく正常幹細胞、特にヒト多能性幹細胞である ES 細胞および iPS 細胞を中心に研究を進めてきた。ヒト ES/iPS 細胞では腫瘍化(奇形腫ならびに癌化)が起こることが報告されている。この腫瘍化の解明や治療技術の開発は、癌幹細胞に対しても新しい展望を開くものと思われる。そこで、腫瘍化した ES/iPS 細胞の発現解析を元にした、標的治療するベクターの開発を合わせて行っている。本年度はがん治療を目的として開発された m-CRA の、未分化多能性細胞をターゲットとした ex vivo における殺傷効果の検討を中心に報告する。

A.研究目的

ある遺伝子は、ほとんどの癌で高発現する一方、分化した正常細胞ではその発現はほとんど見られないことが知られており、さらにその発現と癌の悪性度が相関する遺伝子等も報告されている。我々はこのような癌特異的に発現する遺伝子のプロモーターをアデノウイルスベクターの E1A 領域の発現調節に使用することで、この二つの遺伝子の発現を指標とした m-CRA を作製し、これらの m-CRA が癌治療に非常に有効なことを示して来た。

一方、「細胞のがん化」と「体細胞から iPS 細胞への変化」とでは“無限増殖能の獲得”、“広範囲な転写制御変化”など、共通項を持つ。また癌幹細胞と ES/iPS 細胞においても、自己複製能・多分化能を持つなど互いに共通する部分がある。たとえば分化細胞では非常に限定的で低レベルの発現であるある分子は、ほぼ全ての癌細胞で高発現しており、同様に未分化 ES/iPS 細胞にも高い発現があることが報告されている。

癌治療に開発した m-CRA 戦略、搭載するプロモーターを考慮することで、ES/iPS 細胞における未分化細胞も標的できるのではないかと発想するにいたった。

まずは、アデノウイルスの感染、導入実験など基本的な技術の改良も行った。次に、癌幹細胞でも問題となるであろう、未分化と分化状態での適切な恒常的強発現プロモーターの選択なども行った。昨年度の報告では ES/iPS 細胞由来の分化細胞では、正常分化細胞(HDF)と同様に m-CRA による殺傷効果はほとんど見られず、m-CRA の殺傷効果は未分化細胞に限定されることを示した。さらに、残存未分化細胞のモデルとして、未分化多能性幹細胞と HDF を共培養して m-CRA を感染させたところ、未分化細胞のみが選択的に除去できていることを示し、分化誘導後の残存未分化細胞においても効果があることを示唆した。

本年度の目的は、1)昨年度示した残存未分化細胞除去モデル実験において、m-CRA 感染後の未分化細胞の残存についての分子学的定量方法の検討、2)未分化多能性細胞の奇形腫形成における m-CRA の効果についての検討、を行うものである。

B.研究方法

1) 残存未分化細胞除去モデル実験における、未分化細胞残存の確認のための分子学的定量方法の検討

HDF の細胞数に対し、約 10%の数のヒト ES 細胞を播種し、6well plate または 96well plate で共培養を行った。ES 細胞は赤色蛍光タンパク質 mKate2 を恒



常的に発現しているものを使用した。播種翌日に各ウイルスを MOI3 で感染させた。6well plate で培養したグループは、ウイルス感染 7 日目の細胞から得られた RNA より cDNA を調整し、これを鋳型に用いて定量 PCR (qPCR)を行った(N=4)。96well plate で培養したグループはウイルス感染 7 日目に細胞イメージアナライザーCellomics CellInsight (Thermo)を用いて、ES 細胞残存率を計測した(N=8)。

## 2) ヒト ES 細胞由来奇形腫形成における m-CRA の効果についての検討

各ウイルスを MOI3 (X.m-CRA のみ MOI3 および MOI0.3) で感染後、30%マトリゲル/PBS に懸濁したヒト ES 細胞を、NOD/SCID マウスの皮下に移植した。播種後、それぞれのマウスについて奇形腫の形成の有無、さらに形成された奇形腫の組織学的解析を行った(N=8)。

## C.研究結果

### 1) 残存未分化細胞除去モデル実験における、未分化細胞残存の確認のための分子学的定量方法の検討

使用した ES 細胞は mKate2 を恒常的に発現しているので、ES 細胞の残存状態を測るための基準として mKate2 を用いた。さらに ES 細胞の未分化マーカーの一つである Lin28、m-CRA 増殖の指標でもある X、Y 遺伝子の四種類について qPCR を行った。Nanog や Oct3/4 については、ゲノム DNA 中に存在する偽遺伝子配列と mRNA との区別をつけることができる Primer の設計が難しかったため、今回は用いなかった。

96well plate で共培養した各 m-CRA 感染群(X.m-CRA, Y.m-CRA)、非増殖型 E1 欠損型アデノウイルスベクター感染群(Ad.CA.EGFP)、非感染群(NC)について、DAPI で核染色後、Cell insight で各 Well の細胞数を計測し、また mKate2 の発現を指標にし、残存 ES 細胞数を計測した。全細胞数に対する ES 細胞の割合(%)を図 1 中の折れ線グラフに示す(右軸)。

6well plate で共培養したウイルスベクター感染群(X.m-CRA, Y.m-CRA, Ad.CA.EGFP)、非感染群(NC)それぞれの細胞から精製した RNA より cDNA を調整し、これを鋳型として qPCR を行った。X と Y については、今回使用した Primer セットでは、ES 細胞の残存数を反映していなかった。Lin28 および mKate2 では ES 細胞がごく少量(約 0.1%)しか含まれない X.m-CRA 感染群でも、mRNA の発現を検出す

ることができた。

これらの結果から、残存未分化細胞の検出には Lim28 が適していることが確認できた。

### 2) ヒト ES 細胞由来奇形腫形成における m-CRA の効果についての検討

各 m-CRA 感染群(X.m-CRA: MOI3 および MOI0.3, Y.m-CRA: MOI3)、非増殖型 E1 欠損型アデノウイルスベクター感染群(Ad.dE1,3: MOI3)、および非感染群(NC)の五種類の細胞群について、それぞれ 4 匹の NOD/SCID マウスの脇腹 2 箇所に移植した(N=8)。X.m-CRA (MOI0.3)、Ad.dE1,3 および NC 群では移植後 4 週目から奇形腫の形成が確認できた。一方 X.m-CRA(MOI3)および Y.m-CRA 感染群では移植後 8 週間後も奇形腫の形成は確認できなかった(表 1)。

	4 週目	6 週目	8 週目
X.m-CRA (MOI 0.3)	1/8	3/8	4/8
X.m-CRA (MOI 3)	0/8	0/8	0/8
Y.m-CRA (MOI 3)	0/8	0/8	0/8
Ad.dE1,3 (MOI 3)	6/8	8/8	8/8
NC	1/8	6/8	6/8

表 1. m-CRA 感染による奇形腫形成への影響

得られた奇形腫は、ホルマリン固定後パラフィン包埋し、薄切した組織切片を HE 染色し、観察した。その結果、X.m-CRA(MOI 0.3)、Ad.dE1,3、NC のどの奇形腫からも三胚葉性の分化細胞が確認できた。

これらの結果から、実験に用いた ES 細胞は多能性を維持していたこと、m-CRA を感染させた ES 細胞は、奇形腫を形成することができないことが確認できた。さらに m-CRA の感染が十分でない、残存した ES 細胞から奇形腫が形成されてしまうことも確認できた。

#### D. 考察

これまでに腫瘍特異性の高い X や Y が、癌細胞のみならず、未分化多能性幹細胞においても発現が観察されること、またこれら遺伝子のプロモーターを利用した m-CRA の細胞殺傷効果は未分化幹細胞においても有効であることを示した。さらに昨年には、m-CRA の殺傷効果は未分化細胞に限定されること、分化細胞中に残存する未分化細胞のみを選択的に除去できることを示した。今回の研究では、分化細胞中に残存する未分化細胞の検出に適した遺伝子について解析を行った。Nanog や Oct3/4 はタンパク質の検出(免疫染色や Western blot 等)には適しているが、ゲノム DNA に偽遺伝子が多数存在することから、mRNA の検出には適していない。また X や Y は微量な未分化細胞を検出することが難しかった。今回確認した未分化マーカー遺伝子では Lin28 が微量(約 0.1%)の未分化細胞も検出できることが示され、残存未分化細胞の検出に適していることを示した。また、NOD/SCID マウスへの ex vivo 実験において、移植前の未分化細胞に m-CRA を感染させることで、腫瘍発生を防げるが、m-CRA の感染が十分でない、殺傷できず残存してしまった未分化細胞から奇形腫が形成されることを示した。これについては、m-CRA はマウス体内では免疫応答などの理由から増殖の効率が in vitro 条件下ほど良くなく、そのため殺傷できず残ってしまった未分化細胞から腫瘍が形成されたもの、あるいは移植時に m-CRA に感染していない未分化細胞が、m-CRA 感染前に分化してしまったため、m-CRA が感染できなかったのではないかと示唆される。

多能性幹細胞の分化誘導後に残存する分化抵抗性未分化細胞は腫瘍形成の大きなリスクファクターであることがマウスの実験において示されている [Miura et al.(2009)]。本研究の結果から、m-CRA が分化抵抗性細胞の混入による腫瘍発生の防止に効果のある技術であることが強く示唆される。

#### E. 結論

今後は、in vivo 動物モデルで ES/iPS 由来細胞の移植における腫瘍抑制効果、臨床での有用性を明確にする。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Irie-Maezono R. and Tsuyama S.: Immunohistochemical analysis of the acid secretion potency in gastric parietal cells., Open journal of *Cell biology*. 2, 179-185,2013

2. Tanoue K, Wang Y, Ikeda M , Mitsui K, Irie R , Setoguchi T, Komiya S, Natsugoe S, Kosai K.: Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus kills rhabdomyosarcoma stem cells more efficiently than their progeny. *J Trans Med* .12:27.doi: 10.1186/1479-5876-12-27,2014

##### 2. 学会発表

1. 三井薫、高橋知之、井手佳菜子、小賤健一郎：アデノウイルスベクターでのヒト多能性幹細胞への効率的遺伝子導入技術の開発. 第13回日本再生医療学会総会、2014年3月4-6日(京都)
2. 入江(前蘭)理恵、津山新一郎：「胃底腺壁細胞の腺内分布と酸分泌能の関与」第69回日本解剖学会九州支部学術集会、2013年11月2日(鹿児島)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得予定

###### 【特許出願】

幹細胞における腫瘍化原因細胞の新たな標識法と治療法

発明者：小賤健一郎、三井薫、井手佳菜子

出願人：鹿児島大学

国内出願：2014年1月14日

(特願 2014-004262)

##### 2. 実用新案登録

なし

m-CRA ベクターの作製

研究分担者 伊地知 暢宏 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科（遺伝子治療・再生医学）・助教  
研究分担者 王 宇清 鹿児島大学産学官連携推進センター・プロジェクト研究員

研究要旨

本研究は、癌の治療抵抗性の原因となる癌幹細胞を標的として、同定・診断・治療可能な増殖制御型アデノウイルスベクターを構築、検証するものである。m-CRAと癌幹細胞のオリジナルの基盤技術を用いて、癌幹細胞を同定し、標的治療できるX依存性m-CRA (X.m-CRA)を開発し、独自アプローチから癌幹細胞の腫瘍生物性を解明し、癌幹細胞標的とした殺傷効果の検討について報告する。今後、癌幹細胞に対する有効な治療法となること並び難治性の癌を根治する革新的遺伝子治療医療技術となるものと期待される。

A. 研究目的

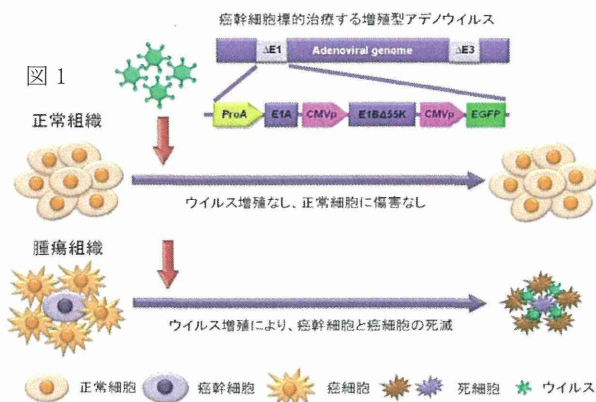
癌幹細胞とは転移や腫瘍形成能が高く、また様々な抗がん剤や放射線療法に抵抗性を示すため癌再発の原因であり、癌が難治性について、今後は癌幹細胞を標的とした治療法の開発が必須である。しかし、癌幹細胞を同定、標的治療する技術は未だ開発されていない。遺伝子治療、あるいは増殖型ウイルスを使った癌幹細胞の治療という研究も未だ報告されていない。

現在、固形癌において、癌幹細胞を濃縮する最有力の細胞マーカーとして、細胞膜タンパク X が報告されているが、その生物学的意義や確実性、汎用性（一般化）などは、確定していない。

上述の現状を踏まえ、よって、本研究室独自に開発した m-CRA の作製法を基盤として、癌幹細胞標的治療する増殖型アデノウイルス (X 反応性 m-CRA) を開発し、癌幹細胞分離技術と融合し、新たな革新的、安全な癌遺伝子治療法の確立を目指す (図 1)。

B. 研究方法

- 1) 今まで報告されている X 分子を転写制御する 5 種類のプロモーターのクローニングし、X の 5 種類のプロモーターを非増殖型アデノウイルスベクターに組み込んで、Ad.Xpr-LacZ を構築した。それを用いて、X 高発現する消化器癌細胞株と臨床グリオブラストーマから浮遊細胞塊形成法で濃縮してきた神経癌幹細胞 [Soeda et al (2008)] における X プロモーターの制御活性を解析する。
- 2) X 遺伝子発現癌幹細胞をターゲティングする増殖型アデノウイルスベクター (X 反応性 m-CRA) を構築し、各種の X 発現する消化器癌細胞株と臨床グリオブラストーマから浮遊細胞塊形成法で濃縮してきた神経癌幹細胞に X.m-CRA を感染させ、生細胞測定法 WST assay を用いて、*in vitro* の殺傷効果を評価する。
- 3) ヒト肺由来正常線維芽細胞と皮膚由来正常線維芽細胞における X.m-CRA の毒性影響を 2) と同様生細胞測定法 WST assay を用いて確認する。
- 4) NOD-SCID 免疫不全マウスを用いて、*ex vivo* と *in vivo* の動物実験で、X.m-CRA の癌幹細胞標的治療効果は腫瘍形成能と腫瘍抑制効果で評価



する。

### C. 研究結果

- 1) 臨床グリオブラストーマから浮遊細胞塊形成法で濃縮してきた神経癌幹細胞の未分化細胞は分化細胞より内因性の X の発現が高い。また、未分化細胞の X 陽性分画も陰性分画より X の発現が高い。神経癌幹細胞の未分化マーカー Nanog と Oct4 の発現も確認された。In vivo で NOD-SCID 免疫不全マウスに未分化の神経癌幹細胞を皮下移植後、腫瘍の形成が確認され、腫瘍のサイズが移植した細胞数に依存する。一方、分化した神経幹細胞の腫瘍形成は認めなかった。
- 2) X 高発現する消化器癌細胞株と臨床グリオブラストーマから浮遊細胞塊形成法で濃縮してきた神経癌幹細胞における X プロモーターの制御活性解析に、癌細胞より癌幹細胞には X のプロモーター活性が顕著に高いと示され、その中にあるプロモーター領域の活性は最も高かった。
- 3) X 発現癌細胞株と癌幹細胞に X.m-CRA は有意な癌細胞と癌幹細胞の殺傷効果が示された。
- 4) 一方、正常細胞 2 種に X.m-CRA の毒性は見られず、in vitro の安全性も示された。
- 5) X.m-CRA に感染した神経幹細胞を ex vivo の実験で NOD-SCID 免疫不全マウスに皮下移植し、コントロール群に比べると、腫瘍の形成は有意に抑制された。

### D. 考察

癌幹細胞モデルにおいて、新規開発した癌幹細胞を標的とした X.m-CRA の治療効果を検証し、癌幹細胞に対し有意な治療効果が in vitro と ex vivo で証明され、また in vitro で正常細胞に対する安全性も確認された。今後、in vivo で X.m-CRA の治療効果と安全の研究を進めていく予定。

### E. 結論

癌幹細胞特異的増殖制御型アデノウイルスベクター(m-CRA)作製と癌幹細胞分離技術を融合し、新たな「癌幹細胞を標的治療する m-CRA」(X 反応性

m-CRA: X.m-CRA)を開発した。腫瘍生物学分野に、癌治療の現状の難治性癌は課題である、癌幹細胞を標的する技術は未だに報告がなく、さらに増殖制御型アデノウイルスを使って癌幹細胞を同定・診断・遺伝子治療するというものは X に限らず未だ報告されていないため、本研究は極めて新規性が高く、独創性・先駆性が高い。その効果は、今後、難治性の癌を根治する革新的遺伝子治療医療技術となるものと期待される。

### F. 健康危険情報

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Tanoue K, Wang Y, Ikeda M, Mitsui K, Irie R, Setoguchi T, Komiya S, Natsugoe S, Kosai K.: Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus kills rhabdomyosarcoma stem cells more efficiently than their progeny. *J Trans Med* .12:27.doi: 10.1186/1479-5876-12-27,2014
- 2) Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, Miyazaki T, Horie-Inoue K, Shimizu C, Saji S, Aogi K, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S.: Association of positive EBAG9 immunoreactivity with unfavorable prognosis in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Clin Breast Cancer*. 13(6):465-70. doi: 10.1016/j.clbc.2013.08.015, 2013
- 3) Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S.: FOXP1 and estrogen signaling in breast cancer. *Vitam Horm*. 93:203-12. doi: 10.1016/B978-0-12-416673-8.00006-X, 2013

#### 2. 学会発表

- 1) 宮崎 優美、王 宇清、三井 薫、丁 強、政幸一郎、松原 修一郎、小賤 健一郎、高尾 尊身。Immunohistochemical comparative analysis of the sphere cells of CD133-positive pancreatic cancer cells with iPS cells. CD133+腫がんSphere



形成細胞とiPS細胞の免疫組織学的比較解析。第  
72回日本癌学会学術総会 (2013.10)

発明者：小賤 健一郎、王 宇清

出願人：鹿児島大学

国内出願番号：特願2011-068530

PCT出願番号：(PCT/JP2012/002031)

米国出願番号： 14/007, 227

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得予定

#### 【特許出願】

- 1) 癌幹細胞を標的とするウイルスベクター  
(VIRAL VECTOR TARGETING STEM CELLS)

### 2. 実用新案登録

なし

がん幹細胞の単離と機能解析

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

**研究要旨**

がん幹細胞の機能に重要な Hedgehog シグナルの骨肉腫における腫瘍増殖・転移能への機能解析を行い、臨床応用のためにすでに臨床利用されている分子標的薬による効果の検討を行った。

**A. 研究目的**

がん幹細胞は、腫瘍の再発や転移のメカニズムの一端を担っていることが示唆されており、がん幹細胞を標的とした治療法の開発は不可欠である。がん幹細胞を標的とした治療の確立にはがん幹細胞の単離精製が必要であるため、我々は骨軟部悪性腫瘍細胞において、Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)陽性細胞ががん幹細胞様の性質を持つことを見いだした。一方で Hedgehog シグナルは正常な幹細胞やがん幹細胞の維持・増殖に関与していることが報告されているので骨軟部肉腫における Hedgehog シグナルの機能解析を行ってきた。近年になって、かねてより使用されていた抗がん剤である arsenic trioxide (ATO)に Hedgehog シグナル阻害作用があることが報告された。早期の臨床応用のために ATO の骨肉腫細胞に対する効果を検討した。また、欧米で基底細胞がん承認されている Hedgehog シグナル阻害薬 Vismodegib の効果を検討した。

**B. 研究方法**

骨肉腫における Hedgehog シグナルの機能を調べるために、骨肉腫細胞での Hedgehog シグナル関連遺伝子の発現確認、機能をノックダウンにより検討を行った。また臨床応用のために低分子化合物である ATO, GANT61(GLI 阻害薬)、vismodegib の効果の検討を行った。

(倫理面への配慮)

患者は個人を特定出来ないようにした。

**C. 研究結果**

A. ヒト骨肉腫における Hedgehog シグナル下流転写因子 GLI2 の機能解析

- 1) ヒト骨肉腫臨床検体・細胞株における GLI2 の発現を RT-PCR, 免疫染色にて検討したところ GLI2 の発現が亢進していた。
- 2) GLI2 を RNAi をもちいて knock down すると migration assay と invasion assay で移動能と浸潤能は低下していた。
- 3) GLI2 を RNAi をもちいて knock down した骨肉腫細胞株をヌードマウスに移植すると肺転移抑制効果認められた。
- 4) ATO を骨肉腫細胞に投与すると GLI の転写活性が低下した。さらに ATO の投与により

、骨肉腫細胞の増殖が in vitro で抑制された。

- 5) 骨肉腫細胞をヌードマウスの皮下に移植して ATO を投与すると in vivo で腫瘍の増殖が抑制された。
- 6) ATO, GANT61, Vismodegib を投与すると骨肉腫細胞株の移動能・増殖能が低下した。
- 7) ATO, GANT61, Vismodegib の副作用軽減のために、各々の濃度を減らして併用を行うと相乗的に骨肉腫細胞の浸潤能が低下することが示された。

**D. 考察**

今年度は幹細胞の機能を制御することが報告されている Hedgehog シグナルについて検討を行った。さらに早期の臨床応用を目指して、すでに臨床使用可能な薬剤である ATO と欧米で使用されている Vismodegib により骨肉腫の増殖・転移が抑制できることを in vitro, in vivo において明らかとした。これらの結果は Hedgehog シグナルの抗がん剤による抑制治療が早期に実現できる可能性を示した。

**E. 結論**

本研究は、Hedgehog シグナルの下流因子の制御が骨肉腫幹細胞の新たな治療ターゲットとなり得ることを示唆している。

**F. 健康危険情報**

**G. 研究発表**

1. 論文発表

- i. Nakamura S, Nagano S, Nagao H, Ishidou Y, Yokouchi M, Abematsu M, Yamamoto T, **Komiya S, Setoguchi T** Arsenic trioxide prevents osteosarcoma growth by inhibition of GLI transcription via DNA damage accumulation. *PLoS One*. 2013; 8(7):e69466
- ii. Kakoi H, Maeda S, Shinohara N, Matsuyama K, Imamura K, Kawamura I, Nagano S,

**Setoguchi T**, Yokouchi M, Ishidou Y, **Komiya S.**: Bone Morphogenic Protein (BMP) Signaling Up-regulates Neutral Sphingomyelinase 2 to Suppress Chondrocyte Maturation via the Akt Protein Signaling Pathway as a Negative Feedback Mechanism. *J Biol Chem.* 2014; 289(12):8135-50.

- iii. Imamura K, Maeda S, Kawamura I, Matsuyama K, Shinohara N, Yahiro Y, Nagano S, **Setoguchi T**, Yokouchi M, Ishidou Y, **Komiya S.** Human Immunodeficiency Virus Type 1 Enhancer-binding Protein 3 Is Essential for the Expression of

Asparagine-linked Glycosylation 2 in the Regulation of Osteoblast and Chondrocyte Differentiation. *J Biol Chem.* 2014; 289(14):9865-79.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得予定  
なし
2. 実用新案登録  
なし

## 細胞生物学的解析

研究分担者 坂本 泰二 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 (眼科学)・教授

研究要旨：眼科領域の遺伝子治療は、各国で臨床治験が開始しており、すでに具体的方法を議論、研究する段階に来ている。そこで、具体的に網膜に遺伝子を導入するための問題点を、臨床的に評価した。

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

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Yamashita T, Kii Y, Tanaka M, Yoshinaga W, Yamashita T, Nakao K, Sakamoto T.: Relationship between supernormal sectors of retinal nerve fibre layer and axial length in normal eyes. *Acta Ophthalmol*. doi:10.1111/aos.12382,2014 [Epub ahead of print]
2. Kawano H, Ito T, Yamada S, Hashiguchi T,

- Maruyama I, Hisatomi T, Nakamura M, Sakamoto T.: Toxic effects of extracellular histones and their neutralization by vitreous in retinal detachment. *Lab Invest*. 94(5):569-85, doi: 10.1038/labinvest.2014.46,2014 (in press)
3. Takenouchi K, Shrestha B, Yamakuchi M, Yoshinaga N, Arimura N, Kawaguchi H, Nagasato T, Feil R, Kawahara K, Sakamoto T, Maruyama I, Hashiguchi T.: Upregulation of non- $\beta$  cell-derived vascular endothelial growth factor A increases small cluster of insulin-producing cells in the pancreas. *Exp Clin Endocrinol & Diabetes*. 122(5):308-15, 2014 (in press)
  4. Kida T, Kozai S, Takahashi H, Isaka M, Tokushige H, Sakamoto T.: Pharmacokinetics and Efficacy of Topically Applied Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in Retinochoroidal Tissues in Rabbits. *Plos One*. 9(5):e96481, 2014 (in press)
  5. Sonoda S, Sakamoto T, Yamashita T, Otsuka H, Shirasawa M, Kakiuchi N, Uchino E, Terasaki H, Kawano H.: Effect of intravitreal triamcinolone acetonide or bevacizumab on choroidal thickness in eyes with diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014 (in press)
  6. Sonoda S, Sakamoto T, Yamashita T, Shirasawa M, Otsuka H, Sonoda Y.: RETINAL MORPHOLOGIC CHANGES AND CONCENTRATIONS OF CYTOKINES IN EYES WITH DIABETIC



MACULAR EDEMA.

*Retina*.34(4):741-8,2014

7. Ki-I Y, Yamashita T, Uemura A, Sakamoto T.: Long-term intraocular pressure changes after combined phacoemulsification, intraocular lens implantation, and vitrectomy. *Jpn J Ophthalmol*. 57(1):57-62, 2013
8. Yamashita T, Yamashita T, Kawano H, Sonoda Y, Yamakiri K, Sakamoto T. :Early imaging of macular hole closure: a diagnostic technique and its quality for gas-filled eyes with spectral domain optical coherence tomography. *Ophthalmologica*. 229(1):43-9, 2013
9. Okubo A, Unoki K, Yoshikawa H, Ishibashi T, Sameshima M, Sakamoto T.:Hyperreflective dots surrounding the central retinal artery and vein in optic disc melanocytoma revealed by spectral domain optical coherence tomography. *Jpn J Ophthalmol*. 57(1):108-12, 2013
10. Otsuka H, Kawano H, Sonoda S, Nakamura M, Sakamoto T.: Particle-induced endophthalmitis: Possible mechanisms of sterile endophthalmitis after intravitreal triamcinolone. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 54(3):1758-66, 2013
11. Shirasawa M, Sonoda S, Terasaki H, Arimura N, Otsuka H, Yamashita T, Uchino E, Hisatomi T, Ishibashi T, Sakamoto T. :TNF- $\alpha$  disrupts morphologic and functional barrier properties of polarized retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res*. 110:59-69,2013
12. Sonoda S, Sakamoto T, Shirasawa M, Yamashita T, Otsuka H, Terasaki H.: Correlation between reflectivity of subretinalfluid in OCT images and concentration of intravitrealVEGF in eyes with diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 54(8):5367-74, 2013
13. Yamashita T,Asaoka R, Tanaka M, Kii Y, Yamashita T, Nakao K, Sakamoto T. :Relationship between position of peak retinal nerve fiber layer thickness and retinal arteries on sectoral retinal nerve fiber layer thickness. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 54(8):5481-8, 2013
14. Kamisasanuki T, Uchino E, Fukushima J, Yoshikawa H, Ishibashi T, Sakamoto T.: A case of Muir-Torre syndrome with multiple cancers of bilateral eyelids and breast. *Korean J Ophthalmol*. 27(3):204-7, 2013
15. Sonoda S, Sakamoto T, Otsuka H, Yoshinaga N, Yamashita T, Ki-I Y, Okubo A, Yamashita T, Arimura N.: Responsiveness of eyes with polypoidal choroidal vasculopathy with choroidal hyperpermeability to intravitreal ranibizumab. *BMC Ophthalmology*, 13:43, 2013
16. Terasaki H, Kase S, Shirasawa M, Otsuka H, Hisatomi T, Sonoda S, Ishida S, Ishibashi T, Sakamoto T.:TNF- $\alpha$  decreases VEGF secretion in highly polarized RPE cells but increases it in non-polarized RPE cells related to crosstalk between JNK and NF- $\kappa$ B pathways. *PLoS One*. 8(7):e69994, 2013
17. Okubo A, Sameshima M, Sakamoto T.: Choroidal Venous Pulsations at an Arterio-venous Crossing in Polypoidal Choroidal Vasculopathy. *Korean J Ophthalmol*. 27(5):384-7, 2013
18. Okubo A, Unoki K, Yamakiri K, Sameshima M, Sakamoto T.: Early structural changes during spontaneous closure of idiopathic full-thickness macular hole determined by optical coherence tomography: a case report.*BMC Res Notes*. 6:396, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

癌幹細胞の分離と m-CRA の治療効果の検討

分担研究者 夏越 祥次 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科（消化器・乳腺甲状腺外科）・教授  
研究協力者 上之園 芳一 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科（分子応用外科学）・特任准教授  
研究協力者 田上 聖徳 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科（消化器・乳腺甲状腺外科）・大学院生

研究要旨

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

A.研究目的

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

Survivin はほとんどの癌で高発現しており、またいくつかの癌では悪性度との相関が報告されている。悪性度の高い癌幹細胞でも、Survivin は高発現していると考えられ、Surv.m-CRA は通常の癌細胞に対して強力な治療効果があり、また最良の m-CRA と言われていた TERT m-CRA より優れた治療効果を示すことを、種々の癌で証明してきた。さらに複数の癌幹細胞モデルを作成し、Surv.m-CRA と現在開発中の癌幹細胞を標的とした新規の m-CRA の癌幹細胞に対する治療効果を検討した。

B.研究方法

癌幹細胞モデルとして、横紋筋肉種幹細胞モデルとある癌幹細胞のモデルを作成した。横紋筋肉種幹細胞は瀬戸口らが報告した横紋筋肉腫幹細胞マーカー

である Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)を用いて、cell sorter で分離した。また、もう一つの癌幹細胞はあるマーカーX とその他の既存のマーカーY の二つを用いて分離した。

腫瘍幹細胞分画とそれ以外の分画で Survivin と新規の m-CRA で増殖領域の制御に用いているプロモーター遺伝子の発現を定量 RT-PCR と X-gal assay によるプロモーター活性を測定し評価した。

治療効果の検証として、腫瘍幹細胞分画とそれ以外の分画、それぞれにおける Surv.m-CRA、新規の Z.m-CRA の細胞傷害効果を比較した。また動物実験では腫瘍幹細胞分画を濃縮して腫瘍を形成したマウスモデルを作成し、その治療効果を検証した。

C.研究結果

FGFR3 で濃縮した KYM-1 細胞では、FGFR3 陰性細胞より Survivin の mRNA 発現も、プロモーター活性も高かった。もう一つの幹細胞モデルにおいても、癌幹細胞分画で、Survivin、新規 m-CRA で用いているプロモーター遺伝子の発現は高い傾向にあった。

In vitro での癌細胞（各分画）の殺傷効果実験では横紋筋肉種幹細胞モデル、もう一つの癌幹細胞モデ

ルいずれにおいても、Surv.m-CRA は癌幹細胞分画でより選択的に強い細胞傷害効果を示した。もう一つの癌幹細胞モデルでは、開発中の新規 Z.m-CRA も癌幹細胞により強い細胞傷害効果を示した。Surv.m-CRA も新規の Z.m-CRA も既存の TERT m-CRA と比較して、癌幹細胞に対し優れた治療効果を示した。さらに動物実験でも、横紋筋肉種幹細胞で作成した腫瘍の増大を有意に抑性した。

#### D. 考察

癌幹細胞モデルにおいて、Surv.m-CRA と新規開発した癌幹細胞を標的とした m-CRA の治療効果を検証し、これらの m-CRA が癌幹細胞分画に対し、より強い治療効果を有することが証明された。

#### E. 結論

Surv.m-CRA と新規開発の m-CRA は、癌幹細胞に対して、より強い治療効果を示すことから、既存の治療では効果が得られなかった種々の悪性疾患に対して、有効な治療薬となることが期待される。

医師主導治験開始予定であり、当科においては、難治性癌である食道癌、膵癌の切除不能、化学放射線療法無効例に対して予定している。具体的な症例の適応投与方法など決定した。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tanoue K, Wang Y, Ikeda M, Mitsui K, Irie R, Setoguchi T, Komiya S, Natsugoe S, Kosai K.: Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus kills rhabdomyosarcoma stem cells more efficiently than their progeny. *J Trans Med* .12:27.doi: 10.1186/1479-5876-12-27,2014
2. Natsugoe S, Arigami T, Uenosono Y, Yanagita S, Nakajo A, Matsumoto M, Okumura H, Kijima Y, Sakoda M, Mataka Y, Uchikado Y, Mori S, Maemura K, Ishigami S.: Lymph node micrometastasis in gastrointestinal tract cancer--a clinical aspect. *Int J Clin Oncol*. 18(5):752-61,2013
3. Uenosono Y, Arigami T, Kozono T, Yanagita S, Hagihara T, Haraguchi N, Matsushita D, Hirata M, Arima H, Funasako Y, Kijima Y, Nakajo A, Okumura H, Ishigami S, Hokita S, Ueno S, Natsugoe S.: Clinical significance of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer. *Cancer*. 119(22): 3984-91,2013

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子の開発に関する研究

研究分担者 隅田泰生 鹿児島大学 大学院理工学研究科・教授

研究協力者 若尾雅弘 鹿児島大学 大学院理工学研究科・助教

研究協力者 新地浩之 鹿児島大学 大学院理工学研究科・D2

〈研究要旨〉

我々は糖鎖または、特異糖鎖へ結合する一本鎖抗体を固定化した蛍光性ナノ粒子の開発を行っている。本年度は、中性糖を固定化した蛍光性ナノ粒子を10種類、また成人T細胞白血病患者から樹立したS1T細胞に特異的に結合する一本鎖抗体S1TSCFr3-1を固定化した蛍光性ナノ粒子を調整し、各種培養細胞への結合性を検討した。

A 研究目的

細胞が癌化すると、その表層の糖鎖構造が変化すること、また細胞には種々の糖鎖が結合することも知られている。細胞を糖鎖に基づいて簡単に分類・識別することは需要であり、本法により癌細胞の簡便な検査法を確立させ、遺伝子治療をさらに有効なものに発展させることを目的とする。本研究では、成人T細胞白血病（ATL）細胞をターゲットとし、蛍光性ナノ粒子（FNP）上にATL細胞表層の糖鎖に特異的に結合する一本鎖抗体（scFv）を固定化したscFv固定化FNP（scFv-FNP）の開発を行い、ATL細胞に対する結合性について評価した。

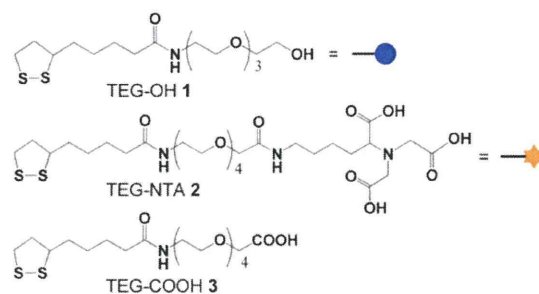


図1. FNPの調製に使用したコーティング剤

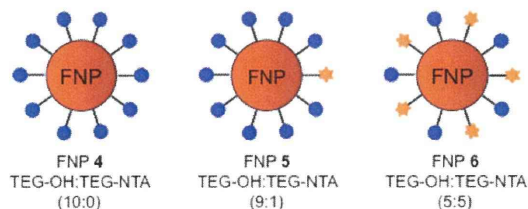


図2. 調製したFNP

B 研究方法

1. scFv-FNPの調製と細胞結合性解析

1-1 FNPの調製

FNPのコア成分にはCdTe/CdSを使用した。FNPのコーティング剤には、TEG-OH 1とTEG-NTA 2を用いた。TEG-NTA 2は、当研究室で合成されたTEG-COOH 3に対し、縮合剤を反応させた後、N-(5-アミノ-1-カルボキシペンチル)イミノジ酢酸（AB-NTA）を加えて合成した。FNPは、還元条件下、図2下部に示した割合でコーティング剤を作用させて調製し、FNP 4、5、ならびに6を合成した。

1-2 scFvの調製

scFvには、ATL細胞株S1T細胞に高い結合性を示す、当研究室で見出されたS1TSCFR3-1<sup>[1]</sup>とS1TA3<sup>[2]</sup>を用いた。scFvは、常法に従い、上記のscFv遺伝子を有するファージを感染させた大腸菌で発現させた後、精製して使用した。

1-3 scFv-FNPの調製

FNPへのscFvの固定化は、半導体金属成分とHisタグ成分の親和性を利用する方法<sup>[3]</sup>、およびNTA、ニッケルイオン、Hisタグ成分の親和性を利用する方法が知られている<sup>[4]</sup>。そこで本研究では、上記の