

2013/3021B

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22年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 小賤 健一郎

平成26(2014)年 5月

目 次

I. 総合研究報告 研究総括 小賤 健一郎	-----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	10
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	15

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）
総合研究報告書

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

本研究の目的は、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であり、さらにこれらの技術を臨床応用に結びつけていくことである。主任研究者の研究室での技術開発を中心に、さらに分担研究者の癌幹細胞や癌悪性化に関するオリジナルの研究成果、さらに正常幹細胞や糖鎖技術といった異分野の分担研究者の技術も融合することで、研究グループとして一体となって上記の研究目的に即した各課題の研究開発を進めて来た。詳細は以下に記載するが、その概要をまとめると以下である。

- 1) 第一弾医薬候補の Survivin 反応性 m-CRA (Surv.m-CRA) は臨床応用を進めるべく、平成27年度に医師主導治験開始できるように GMP 製造、GLP 非臨床試験、当局 (PMDA) 対応など行ってきた。
- 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。さらにこれを一般化すべく、他の癌幹細胞モデル、他の m-CRA でも、この革新的治療効果を実証した。
- 3) 癌幹細胞のみを標的治療する技術の開発を試み、癌幹細胞で高発現する X 分子に反応性の m-CRA を新規で開発し、その機能解析や治療効果を確かめた。
- 4) 正常幹細胞(未分化)ならびに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た。この独自システムにて、癌幹細胞や正常幹細胞を標的できる適切なプロモーターの同定、ならびにこれらの正常や癌の幹細胞を効果的に殺傷治療できる自殺遺伝子の同定を開始した。
- 5) 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。さらに骨軟部肉腫における Hedgehog シグナルの機能解析を行い、最終的に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) 試験管内でグリオブラストーマ(神経膠芽腫、GBM)形成能力を有する人工がん幹細胞(mGIC)の作製に成功した。さらにその性状解析から治療標的分子の研究を進め、新規GIC特異的マイクロRNA(miRNA)群を同定した。特に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細胞の研究も進めた。また、がん幹細胞を標的にした遺伝子治療の実現化には、日本人由来のがん幹細胞株を用いた研究が必要だが、安定したがん幹細胞株の樹立はいまだに困難である。この克服のために、腫瘍細胞のモデルにもなり得るヒトiPSを多くの日本人から樹立することを目指し現在までに約300人分の親知らず由来の歯髄細胞を培養し、凍結保存してきた。この細胞を用いて10以上の日本人細胞からiPS細胞を安定して樹立することに成功した。また、iPS細胞の樹立効率の個人差を基に、新規リプログラミング因子を発見した。
- 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。その最終目的のため、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（平成 25 年度から）
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（平成 24 年度から）
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（平成 23 年度から）
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

- 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出した。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。

（倫理面への配慮） 遺伝子組換え、動物実験の計画は、承認されたものであり、それぞれの法規や規定に従い、適切に実験を行う。

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。

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た。

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 (J Trans Med 2014)。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。

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、意義深いものである。

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できる、新たな m-CRA 技術の開発に取り組んだ。この観点より、癌幹細胞で高発現するある分子 X に着目し、X の発現に反応して増殖制御する m-CRA の開発を行って来た。

まず X 遺伝子の 5 種類の候補プロモーターをクローニングし、これらの X 遺伝子プロモーターの特性解析、特に癌幹細胞でのプロモーター強度と特異性をそれぞれ検証した。つぎに実際に X 反応性 m-CRA (X.m-CRA) を作製した。In vitro で、正常細胞と癌細胞だけでなく、特にヒト患者から樹立した Glioblastoma の癌幹細胞と一般癌細胞のそれぞれの分画にて、X.m-CRA のウイルス増殖の程度、ならびに殺傷効果を調べた。さらに *in vivo* 動物モデルでの治療効果の実験も進めた。

癌幹細胞を標的する m-CRA が開発できるかということは非常に重大な意義を持つため、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、最終検証しているところである。但し最終的な治療結果としては、この X.m-CRA は他の m-CRA と比較しても、In vitro 実験だけでなく、*in vivo* の Xenograft 移植の動物腫瘍モデルでも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。さらに、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た。

5) 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。まず、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。この結果、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実証できた。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。さらに生体内での解析のため、Ex vivoでm-CRAを感染させたヒト多能性幹細胞を免疫不全マウスに移植し、奇形種の形成能の抑制実験を行い、m-CRAが生体での腫瘍形成抑制に著明な効果を示すことを実証できた。

- 6) 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。

次に、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。

- 7) がん幹細胞の精製は未だ難しいため、我々は試験管内でグリオブラストーマ(神経膠芽腫、GBM)形成能力を有する

人工がん幹細胞(mGIC)を作製し、その性状解析から治療標的の同定を試みた。まず試験管内で、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した(Hide et al, Cancer Res. 2009; Nishide et al, PLoS One 2009; Hide et al, Stem Cells 2011)。

つぎに、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。

- 8) 癌と正常の幹細胞の共通点と相違点からの分子機構解明という観点から、iPS細胞の研究も進めている。また、がん幹細胞を標的にした遺伝子治療の実現化には、日本人由来のがん幹細胞株を用いた研究が必要だが、安定したがん幹細胞株の樹立はいまだに困難である。この克服のために、腫瘍細胞のモデルにもなり得るヒトiPSを多くの日本人から樹立することを目指し現在までに約300人分の親知らず由来の歯髄細胞を培養し、凍結保存してきた。この細胞を用いて10以上の日本人細胞からiPS細胞を安定して樹立することに成功した。また、iPS細胞の樹立効率の個人差を基に、新規リプログラミング因子を発見した。

具体的には、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 DPSC を用いて明らかにした。

さらに市販の無血清培地をスクリーニングして、LONZA 社の 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。

- 9) 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。その最終目的のため、ウイルスベクターへ結合する糖鎖の研究を進めた。

まず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。まず糖鎖または、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た。中性糖を固定化した蛍光性ナノ粒子を約 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製し、各種培養細胞への結合性を検討した。

さらに半導体金属に直接 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、ニッケル、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・ニッケル・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。

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可能性がある。

D. 考察、ならびに E. 結論

本研究の目的は、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であり、さらにこれらの技術を臨床応用に結びつけていくことである。つまり主任研究者の研究室での技術開発を中心に、さらに分担研究者の癌幹細胞や癌悪性化に関するオリジナルの研究成果、さらに正常幹細胞や糖鎖技術といった異分野の分担研究者の技術も融合することで、研究グループとして一体となって上記の研究目的に即した各課題の研究開発を進めて来た。例えば FGFR3 陽性の癌幹細胞への Surv.m-CRA 治療などは、マーカーの発見から治療法確立まで本グループでの連携の成果の実例で、よって全て完全オリジナルでもある。

成果として、第一弾の Surv.m-CRA の医師主導治験を平成 27 年度開始できるように、GMP 製造や非臨床試験等を進めることができた。さらに前述のように、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。よって今後は第一弾の 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。

F. 研究発表

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

Derived from an MeCP2-null Mouse Model of Rett Syndrome. *PLoS ONE* 7(4):e35354, doi: 10.1371/journal.pone.0035354,2012

4. Hino S, Sakamoto A, Nagaoka K, Anan K, Wang Y, Mimasu S, Umehara T, Yokoyama S, Kosai K, and Nakao M.: FAD-dependent lysine-specific demethylase-1 regulates cellular energy expenditure. *Nat. Commun.* 3:758.doi:10.1038/ncomms1755,2012
 5. Horikawa Y, Wang Y, Nagano S, Kamizono J, Ikeda M, Komiya S, Kosai K.:Assessment of an altered E1B promoter on the specificity and potency of triple-regulated conditionally replicating adenoviruses (CRA) —Implications for the generation of ideal m-CRAs. *Cancer Gene Ther* 18(10):724-33, 2011
 6. Khai NC, Sakamoto K, Takamatsu H, Matsufuji H, Kosai K. : Recombinant soluble form of HB-EGF protein therapy drastically inhibits Fas-mediated fulminant hepatic failure: Implications in clinical application. *Hepatol Res.* 41(6):594-596, 2011
 7. Kamisanuki T, Wang Y, Tokushige S, Terasaki H, Khai NC, Wang Y, Sakamoto T, Kosai K; Targeting CD9 produces stimulus-independent antiangiogenic effects predominantly in activated endothelial cells during angiogenesis: A novel antiangiogenic therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413(1):128-35, 2011
 8. Okabe Y, Kusanaga A, Takahashi T, Mitsumasu C, Murai Y, Tanaka E, Higashi H, Matsuishi T, Kosai K. : Neural Development of Methyl-CpG-Binding Protein 2 Null Embryonic Stem Cells: A System for Studying Rett Syndrome. *Brain Res.* 1360: 17-27,2010
 9. Miyata S, Takemura G, Kosai K, Takahashi T, Esaki M, Li L, Kanamori H, Maruyama R, Goto K, Tsujimoto A, Takeyama T, Kawaguchi T, Ohno T, Nishigaki K, Fujiwara T, Fujiwara H, Minatoguchi S.: Anti-Fas Gene Therapy Prevents Doxorubicin-induced Acute Cardiotoxicity through Mechanisms Independent of Apoptosis. *Am J Pathol.* 176(2):687-98, 2010
 10. Wang Y, Asakawa A, Inui A, Kosai K. :Leptin gene therapy in the fight against diabetes. *Expert. Opin. Biol. Ther* 10(10);1405-14, 2010
- 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)
 8. Ken-ichiro Kosai: Development of conditionally replicating adenovirus specifically targeting and/or efficiently treating cancer stem cells. (国内、口演 [English]) 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19-21 日 (札幌)
 9. Kiyonori Tanoue, Yuqing Wang, Takao Setoguchi, Setsuro Komiya, Shoji Natusgoe, Ken-ichiro Kosai. :Survivin-Responsive Conditionally Replicating Adenovirus Efficiently Treats Rhabdomyosarcoma-Initiating Cells. (国内、口演 [Japanese]) 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19-21 日 (札幌)
 10. 小賤健一郎、三井薫、王宇清、高橋知之. ヒト ES/iPS 細胞での再生医療の課題を克服する独自のアデノウイルスベクターと発現技術の開発. (国内・パネルディスカッション) 第 11 回日本再生医療学会総会、2012 年 6 月 12-14 日 (横浜)
 11. 田上聖徳、王宇清、池田美奈子、三井薫、瀬戸口啓夫、小宮節郎、夏越祥次、小賤健一郎.

- 独自開発の増殖型アデノウイルスベクターで癌幹細胞は効果的に治療できる。(国内・ポスター) 第11回日本再生医療学会総会、2012年6月12-14日(横浜)
12. 三井薫、井手佳菜子、高山明子、小賤健一郎。増殖型アデノウイルスベクターを用いた安全なヒトES/iPS細胞治療の開発。(国内・口演) 第11回日本再生医療学会総会、2012年6月12-14日(横浜)
 13. 小賤健一郎：癌の遺伝子異常を標的とした診断と治療の可能性。(国内・特別講演) 第175回日本医学放射線学会九州地方会 2012年6月9-10日(鹿児島)
 14. Tanoue K, Wang Y, Ikeda M, Mitsui K, Setoguchi T, Komiya S, Natsugoe S, Kosai K. : Efficient treatment of Rhabdomyosarcoma-initiating cells by Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus : Promising m-CRA strategy for treating cancer stem cells. (国際・ポスター) The American Society of Gene Therapy's 15th Annual Meeting, May 16-May 19, 2012 (Philadelphia, USA)
 15. Sakamoto K, Khai NC, Wang Y, Maezono R, Tanoue K, Matsufuji H, Hideo T, Kosai K.: HB-EGF/HGF HEPATIC GENE THERAPY FOR BILE DUCT LIGATED CHOLESTATIC LIVER INJURY IN MICE: THEIR DIFFERENT AND/OR SYNERGIC THERAPEUTIC EFFECTS. (国内・口演) 第17回日本遺伝子治療学会 2011年7月15日-17日(福岡)
 16. Kosai K, Horikawa Y, Wang Y, Nagano S, Kamizono J, Ikeda M, Komiya S.: ASSESSMENT OF AN ALTERED E1B PROMOTER ON THE SPECIFICITY AND POTENCY OF TRIPLE-REGULATED CONDITIONALLY REPLICATING ADENOVIRUSES (CRA): A NEW INSIGHT TO GENERATE IDEAL m-CRAS. (国内・口演) 第17回日本遺伝子治療学会 2011年7月15日-17日(福岡)
 17. Kosai K, Sakamoto K, Khai NC, Wang Y, Maezono R, Tanoue K, Hideo T, Matsufuji H.: HB-EGF/HGF Hepatic Gene Therapy Effectively Inhibits Bile Duct Ligated Cholestatic Liver Injury In Mice In Their Different Therapeutic Modes. The American Society of Gene Therapy's 14th Annual Meeting, May 15-May 22, 2011 (Seattle, USA)
 18. 岡部恭典、久佐賀晃、高橋知之、光益千秋、村井恵良、東英穂、松下豊次郎、小賤健一郎、田中永一郎。RTTモデルES細胞由来神経細胞の電気生理学的解析。(国内・シンポジウム) 第88回日本生理学会大会、2011年3月28-30日(横浜)
 19. 小賤健一郎、岡部共典、久佐賀晃、高橋知之、光益千秋、村井恵良、田中永一郎、松石豊次郎: MeCP2 遺伝子欠損ES細胞のin vitro文化誘導法による Rett 症候群/神経発生の研究システム (国内・口演) 第10回日本再生医療学会 2011年3月1-2日(東京)
 20. 坂本浩一、Ngin Cin Khai、王宇清、前蘭理恵、高松英夫、松藤凡、小賤健一郎：胆道閉塞性肝疾患へのHB-EGF生体内再生医療(国内・口演) 第10回日本再生医療学会 2011年3月1-2日(東京)
 21. 寺崎寛人、上笹貫太郎、徳重沙織、Ngin Cin Khai、Wang Yuqing、坂本泰二、小賤健一郎：膜蛋白CD9の標的治療はGeneralに作用する新規血管新生阻害剤となる(国内・ポスター) 第10回日本再生医療学会 2011年3月1-2日(東京)
 22. Yoshiharu Horikawa, Ken-ichiro Kosai. Improved survivin-responsive m-CRA for efficient and safer cancer therapy: A new rule of E1B promoter replacement. (国内・ポスター発表) 第69回日本癌学会学術総会、2010年9月22-24日(大阪)
 23. 上笹貫太郎、徳重沙織、坂本泰二、小賤健一郎。膜蛋白CD9標的RNAiはGeneralに作用する新たな血管新生阻害剤となる。(国内・ポスター発表) 第114回日本眼科学会総会、2010年4月15-18日
- G. 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
出願人：鹿児島大学
国内出願：2014年1月14日
(特願 2014-004262)
 2. シノビオリン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：2012年8月23日
(特願 2012-184651)
3. ヒト ES/iPS 細胞における遺伝子発現方法
発明者：小賤健一郎、三井薫、高橋知之
出願人：鹿児島大学、久留米大学
国内出願：2012年5月23日
(特願 2012-117128)
4. 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)
5. 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)
6. サービビンプロモーターを含む増殖制御型ウイルスベクターによる造血器腫瘍の遺伝子治療
【国内】
発明者：小賤健一郎、有馬直道、鈴木紳介
出願人：鹿児島大学
出願日：2010年3月25日(特願 2010-070942)
【国際】
発明者：小賤健一郎、有馬直道、鈴木紳介
出願人：有馬直道、鈴木紳介(全て)、小賤健一郎(USのみ)
出願日：2011年3月25日
(PCT/JP2011/57477)
7. 幹細胞における腫瘍化原因細胞の除去方法
発明者：小賤健一郎、三井薫
出願人：鹿児島大学
国内出願：2011年3月29日
(特願 2011-073690)
国際出願：2012年3月29日
(PCT/JP/2012/58414)
8. 血管新生抑制剤
発明者：小賤健一郎、坂本泰二、上笹貫太郎
出願人：鹿児島大学
国内出願：2009年4月23日
(特願 2009-105170)
国際出願：2010年4月19日
(PCT/JP2010/057735)
- ※JST 特許支援事業に採択
9. サービビン(Survivin)プロモーターを含む増殖型ベクターを有効成分とする医薬
発明者：小賤健一郎、神園純一、永野聡
出願人：小賤健一郎
国内出願：2004年5月25日
(特願 2004-154431)
国際出願：2005年5月23日
(PCT/JP2005/009818)
【米国特許取得】2012年3月27日
(特許番号：US 8,142,770 B2)
10. Drug Comprising As The Active Ingredient Proliferative Vector Containing Survivin Promoter
発明者：小賤健一郎、神園純一、永野聡
出願人：小賤健一郎
【米国特許取得】(特許証発行中)
米国出願：2012年3月21日(US 13/426,048)
【米国特許取得】2014年4月29日
(特許番号：US 8,709,812)
11. CD9 遺伝子からなる心疾患を予防又は治療する医薬
発明者：小賤健一郎、牛越博昭
出願人：財団法人 名古屋産業科学研究所(中部 TLO)
国内出願：2003年12月26日
(特願 2003-432279)
国際出願：2004年12月24日
(PCT/JP2004/019774)
【国内特許取得】2011年5月13日
(特許第 4736088 号)
【米国特許取得】2010年9月28日
(特許番号：US 7,803,780)
【欧州特許取得】2011年2月9日
(特許番号：EP 1716869)
12. 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

13. 胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法及び単離又は可視化用キット

発明者：小賤健一郎、高橋知之

出願人：小賤健一郎

国内出願：2003年6月13日

(特願 2004-513486)

【国内特許取得】2010年11月12日

(特許第 4624100 号)

国際出願：2003年6月13日

(PCT/JP03/07536)

2. 実用新案登録

3. その他

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

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
Yuge K, Takahashi T, Khai NC, Goto K, Fujiwara T, Fujiwara H, <u>Kosai K</u>	Intramuscular injection of adenoviral hepatocyte growth factor at a distal site ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice.	<i>Int J Mol Med</i>	33(5)	1064-1074	2014
Tanoue K, <u>Wang Y</u> , Ikeda M, <u>Mitsui K</u> , <u>Irie R</u> , <u>Setoguchi T</u> , <u>Komiya S</u> , <u>Natsugoe S</u> , <u>Kosai K</u>	Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus kills rhabdomyosarcoma stem cells more efficiently than their progeny.	<i>J Trans Med</i>	12		2014
<u>Irie-Maezono R.</u> and <u>Tsuyama S</u>	Immunohistochemical analysis of the acid secretion potency in gastric parietal cells.	Open journal of <i>Cell biology</i>	2	179-185	2013
<u>Ijichi N</u> , <u>Shigekawa T</u> , <u>Ikeda K</u> , <u>Miyazaki T</u> , <u>Horie-Inoue K</u> , <u>Shimizu C</u> , <u>Saji S</u> , <u>Aogi K</u> , <u>Tsuda H</u> , <u>Osaki A</u> , <u>Saeki T</u> , <u>Inoue S</u>	Association of positive EBAG9 immunoreactivity with unfavorable prognosis in breast cancer patients treated with tamoxifen	<i>Clin Breast Cancer</i>	13(6)	465-70	2013
<u>Ijichi N</u> , <u>Ikeda K</u> , <u>Horie-Inoue K</u> , <u>Inoue S</u>	FOXP1 and estrogen signaling in breast cancer.	<i>Vitam Horm</i>	93	203-12	2013

Nakamura S, Nagano S, Nagao H, Ishidou Y, Yokouchi M, Abematsu M, Yamamoto T, <u>Komiya S</u> , <u>Setoguchi T</u>	Arsenic trioxide prevents osteosarcoma growth by inhibition of GLI transcription via DNA damage accumulation.	<i>PLoS One</i>	8(7)	e69466	2013
Imamura K, Maeda S, Kawamura I, Matsuyama K, Shinohara N, Yahiro Y, Nagano S, <u>Setoguchi T</u> , <u>Yokouchi M</u> , <u>Ishidou Y</u> , <u>Komiya S</u> .	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.	<i>J Biol Chem</i>	289(14)	9865-79	2014
Kakoi H, Maeda S, Shinohara N, Matsuyama K, Imamura K, Kawamura I, Nagano S, <u>Setoguchi T</u> , <u>Yokouchi M</u> , <u>Ishidou Y</u> , <u>Komiya S</u>	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.	<i>J Biol Chem</i>	289(12)	8135-50	2014
<u>Natsugoe S</u> , <u>Arigami T</u> , <u>Uenosono Y</u> , <u>Yanagita S</u> , <u>Nakajo A</u> , <u>Matsumoto M</u> , <u>Okumura H</u> , <u>Kijima Y</u> , <u>Sakoda M</u> , <u>Mataki Y</u> , <u>Uchikado Y</u> , <u>Mori S</u> , <u>Maemura K</u> , <u>Ishigami S</u>	Lymph node micrometastasis in gastrointestinal tract cancer--a clinical aspect.	<i>Int J Clin Oncol</i>	18(5)	752-61	2013
Uenosono Y, Arigami T, Kozono T, Yanagita S, Hagihara T, Haraguchi N, Matsuhita D, Hirata M, Ariama H, Funasako Y, Kijima Y, Nakajo A, Okumura H, Ishigami S, Hokita S, Ueno S, <u>Natsugoe S</u>	Clinical significance of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer.	<i>Cancer</i>	119(22)	3984-91	2013
Shinchi H, Wakao M, Nagata N, Sakamoto M, Mochizuki E, Uematsu T, Kuwabata S, <u>Suda Y</u> .	Cadmium-Free Sugar-Chitin-Immobilized Fluorescent Nanoparticles Containing Low-Toxicity ZnS-AgInS ₂ Cores for Probing Lectin and Cells.	<i>Bioconj Chem</i>	25	286-295	2014

Yamada K, Ohno T, Aoki H, Semi K, Watanabe A, Moritake H, Shiozawa S, Kunisada T, Kobayashi Y, Toguchida J, Shimizu K, Hara A. and Yamada Y.	<i>EWS/ATF1</i> expression induces sarcomas from neural crest-derived cells in mice.	<i>J. Clin. Invest</i>	123	600-610	2013
Iida K, Takeda-Kawaguchi T, Hada M, Yuriguchi M, Aoki H, Tamaoki N, Hatakeyama D, Kunisada T, Shibata T, Tezuka K.	Hypoxia-enhanced derivation of iPSCs from human dental pulp cells.	<i>J Dent Res</i>	92	905-910	2013
Okabe Y, Takahashi T, Mitsumasa C, Kosai K, MD, Tanaka E, Matsuishi T	Alterations of Gene Expression and Glutamate Clearance in Astrocytes Derived from an MeCP2-null Mouse Model of Rett Syndrome	<i>PLoS ONE</i>	7	e35354	2012
Hino S, Sakamoto A, Nagaoka K, Anan K, Wang Y, Mimasu S, Umehara T, Yokoyama S, Kosai K, and Nakao M	FAD-dependent lysine-specific demethylase-1 regulates cellular energy expenditure	<i>Nat. Commun</i>	3	758	2012
Kawamura I, Maeda S, Imamura K, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, Komiyama S	SnoN suppresses maturation of chondrocytes by mediating signal cross-talk between transforming growth factor- β and bone morphogenetic protein pathways	<i>J Biol Chem</i>	287	29101-29113	2012
Nagao H, Setoguchi T, Kitamoto S, Ishidou Y, Nagano S, Yokouchi M, Abematsu M, Kawabata N, Maeda S, Yonezawa S, Komiyama S	RBPJ Is a Novel Target for Rhabdomyosarcoma Therapy	<i>PLoS One</i>	7	e39268	2012
Notomi S, Hisatomi T, Murakami Y, Terasaki H, Sonoda S, Asato R, Takeda A, Iwakeda Y, Enaida H, Sakamoto T, Ishibashi T	Dynamic increase in extracellular ATP accelerates photoreceptor cell apoptosis via ligation of P2RX7 in subretinal hemorrhage	<i>PLoS One</i>	8	e53338	2013

Arigami T, Uenosono Y, Ishigami S, Hagiwara T, Haraguchi N, Matsushita D, Yanagita S, Nakajo A, Okumura H, Hokita S, Natsugoe S	Expression of stanniocalcin 1 as a potential biomarker of gastric cancer	<i>Oncology</i>	83	158-164	2012
Aoki H, Hara A, Era T, Kunisada T, Yamada Y	Genetic ablation of Rest leads to in vitro-specific derepression of neuronal genes during neurogenesis	<i>Development</i>	139	667-677	2012
Horikawa Y, Wang Y, Nagano S, Kamizono J, Ikeda M, Komiyama S, Kosai K.	Assessment of an altered E1B promoter on the specificity and potency of triple-regulated conditionally replicating adenoviruses (CRA) –Implications for the generation of ideal m-CRAs.	<i>Cancer Gene Ther</i>	18	724-733	2011
Khai NC, Sakamoto K, Takamatsu H, Matsufuji H, Kosai K.	Recombinant soluble form of HB-EGF protein therapy drastically inhibits Fas-mediated fulminant hepatic failure: Implications in clinical application.	Hepatology Res	41	594-596	2011
Kamisasanuki T, Wang Y, Tokushige S, Terasaki H, Khai NC, Wang Y, Sakamoto T, Kosai K.	Targeting CD9 produces stimulus-independent antiangiogenic effects predominantly in activated endothelial cells during angiogenesis: A novel antiangiogenic therapy.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	413	128-135	2011
Ueno Y, Sonoda S, Suzuki R, Yokouchi M, Kawasoe Y, Tachibana K, Maruyama K, Sakamoto T, Komiya S.	Combination of ultrasound and Bubble liposome enhance the effect of doxorubicin and inhibit murine osteosarcoma growth.	<i>Cancer Biol Ther.</i>	12	1-8	2011
Setoyama T, Zhang X, Natsugoe S, Calin GA	microRNA-10b: a new marker or the marker of pancreatic ductal adenocarcinoma?	<i>Clin Cancer Res.</i>	17	5527-5529	2011
Yohei Seki, Misaharu Mizukura, Tomomi Ichimiya, Yasuo Suda, Shoko Nishihara, Michiaki Masuda, Sayaka Takase-Yoden.	O-sulfate groups of heparin are critical for inhibition of ecotropic murine leukemia virus infection by heparin.	<i>Virology</i>	424	56-66	2012

Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, Hong H, Nakagawa M, Tanabe K, Tezuka K, Shibata T, <u>Kunisada T</u> , Takahashi M, Takahashi J, Saji H, Yamanaka S.	A more efficient method to Generate Integration-Free Human iPS Cells.	<i>Nature Methods</i>	8	409-412	2011
Kondo T.	Tumorigenesis of glioma-initiating cells: Role of Sox11. Stem Cells and Cancer Stem Cells	<i>Springer</i>	1	93-98	2011
Okabe Y, Kusanaga A, Takahashi T, Mitsumasa C, Murai Y, Tanaka E, Higashi H, Matsuishi T, <u>Kosai K</u> .	Neural Development of Methyl-CpG-Binding Protein 2 Null Embryonic Stem Cells: A System for Studying Rett Syndrome.	Brain Res	1360	17-27	2010
Miyata S, Takemura G, <u>Kosai K</u> , Takahashi T, Esaki M, Li L, Kanamori H, Maruyama R, Goto K, Tsujimoto A, Takeyama T, Kawaguchi T, Ohno T, Nishigaki K, Fujiwara T, Fujiwara H, Minatoguchi S	Anti-Fas Gene Therapy Prevents Doxorubicin-induced Acute Cardiotoxicity through Mechanisms Independent of Apoptosis.	Am J Pathol	176(2)	687-698	2010
Wang Y, Asakawa A, Inui A, <u>Kosai K</u> .	Leptin gene therapy in the fight against diabetes.	Expert.Opin.Biol.Ther	10(10)	1405-1414	2010
JP Yang, R. Yoshida, Y. Kariya, X. Zhang, S. Hashiguchi, T. Nakashima, Y. Suda, A. Takada, Y. Ito and K. Sugimura	Characterization of human single-chain antibodies against highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses: mimotope and neutralizing activity	The Journal of Biochemistry	148(4)	507-515	2010
Hide, T., Takezaki, T., Nakatani, Y., Nakamura, H., Kuratsu, J., & <u>Kondo, T.</u>	Combination of a Ptg2 inhibitor and an EGFR signaling inhibitor prevents tumorigenesis of oligodendrocyte-lineage derived glioma-initiating cells.	StemCells	29	590-599	2011

Intramuscular injection of adenoviral hepatocyte growth factor at a distal site ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice

KENTARO YUGE^{1,2}, TOMOYUKI TAKAHASHI^{1,3}, NGIN CIN KHAI^{1,3,4}, KAZUKO GOTO¹, TAKAKO FUJIWARA⁶, HISAYOSHI FUJIWARA^{1,5,7} and KEN-ICHIRO KOSAI^{1,3,4}

¹Department of Gene Therapy and Regenerative Medicine, Graduate School of Medicine, Gifu University, Gifu 502-1194; ²Division of Respiratory, Neurology and Rheumatology, Department of Medicine, Kurume University School of Medicine, ³Division of Gene Therapy and Regenerative Medicine, Cognitive and Molecular Research Institute of Brain Diseases, Kurume University, Kurume 830-0011; ⁴Department of Gene Therapy and Regenerative Medicine, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima 890-8544; ⁵Department of Cardiology, Graduate School of Medicine, Gifu University, Gifu 502-1194; ⁶Department of Food Science, Kyoto Women's University, Kyoto 605-8501; ⁷Department of Cardiology, Hyogo Prefectural Amagasaki Hospital, Amagasaki, Hyogo 660-0828, Japan

Received November 4, 2013; Accepted February 19, 2014

DOI: 10.3892/ijmm.2014.1686

Abstract. Inflammatory bowel disease (IBD) severely affects the quality of life of patients. At present, there is no clinical solution for this condition; therefore, there is a need for innovative therapies for IBD. Hepatocyte growth factor (HGF) exerts various biological activities in various organs. However, a clinically applicable and effective HGF-based therapy for IBD has yet to be developed. In this study, we examined the therapeutic effect of injecting an adenoviral vector encoding the human HGF gene (Ad.HGF) into the hindlimbs of mice with dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. Plasma levels of circulating human HGF (hHGF) were measured in injected mice. The results showed that weight loss and colon shortening were significantly lower in Ad.HGF-infected mice as compared to control (Ad.LacZ-infected) colitic mice. Additionally, inflammation and crypt scores were significantly reduced in the entire length of the colon, particularly in the distal section. This therapeutic effect was associated with increased cell proliferation and an antiapoptotic effect, as well as a reduction in the number of CD4⁺ cells and a decreased CD4/CD8 ratio. The levels of inflammatory, as well as Th1 and Th2 cytokines were higher in Ad.HGF-infected mice

as compared to the control colitic mice. Thus, systemically circulating hHGF protein, produced by an adenovirally transduced hHGF gene introduced at distal sites in the limbs, significantly ameliorated DSS-induced colitis by promoting cell proliferation (i.e., regeneration), preventing apoptosis, and immunomodulation. Owing to its clinical feasibility and potent therapeutic effects, this method may be developed into a clinical therapy for treating IBD.

Introduction

The breakdown of normal mucosal immunity causes the development of inflammatory bowel disease (IBD), which can be classified as Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) (1). IBD is a chronically relapsing and remitting condition of unknown origin that exhibits various features of immunological inflammation and affects at least 1 in 1,000 people in western countries. IBD is characterized by inflammation in the intestine, and is associated with diarrhea, occult blood, abdominal pain, weight loss, anemia and leukocytosis. IBD primarily affects young adults, and the disease initially manifests in childhood in 15-25% of cases. Therefore, IBD patients often develop severe symptoms that decrease their quality of life (2). Consequently, there is a need for innovative therapies for IBD.

Current treatments for IBD focus on suppressing inflammation or modulating the immune response using corticosteroids, mercaptopurines, 5-ASA, or monoclonal antibodies against inflammatory cytokines, e.g., the anti-tumor necrosis factor (TNF)- α antibody infliximab (3). However, despite the wide variety of pharmacologic options for patients with IBD, consistent cures and prolonged remissions have yet to be achieved.

Hepatocyte growth factor (HGF) was originally identified (4-7) and cloned (8,9) as a potent mitogen for hepatocytes, but has since been established as a multifunctional cytokine

Correspondence to: Dr Ken-Ichiro Kosai, Department of Gene Therapy and Regenerative Medicine, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan
E-mail: kosai@m2.kufm.kagoshima-u.ac.jp

Key words: hepatocyte growth factor, inflammatory bowel disease, gene therapy, adenoviral vector, antiapoptosis, immunomodulation, regeneration, cytokine, clinical application

that exhibits mitogenic, motogenic, morphologic, angiogenic, antiapoptotic and organotrophic effects in a variety of tissues (10). HGF is upregulated in inflamed colonic mucosal tissue in patients with CD or UC (11-13), and plasma HGF levels are elevated in animal models of acute colitis (14). *In vitro*, HGF modulates intestinal epithelial cell proliferation and migration (15), thereby enhancing epithelial cell restitution, which is the initial step of gastrointestinal wound healing. In addition, administration of recombinant human HGF (hHGF) protein reduces the severity of colitis and accelerates colonic mucosal repair in models of TNBS-induced and DSS-induced colitis (16-19), as well as in HLA-B27 transgenic rats with colitis (20). Mukoyama *et al* (21) showed that the intrarectal administration of an adenoviral (Ad) vector carrying the HGF gene prevented TNBS-induced colitis. Additionally, Hanawa *et al* (22) demonstrated the attenuation of mouse DSS colitis by naked gene transfer of rat HGF into the liver, and Kanbe *et al* (23) reported the amelioration of mucosal damage in DSS colitis by the intrarectal administration of the naked HGF gene. In their study, Kanayama *et al* (24) demonstrated the promotion of colonic epithelial regeneration by HGF gene transfer through electroporation. Findings by those authors suggest that HGF is potentially an important new treatment modality for promoting the repair of intestinal mucosa in patients with IBD.

In the majority of previous studies, HGF was provided in the form of recombinant hHGF protein. However, due to the rapid clearance of the HGF protein, large doses and frequent administration of recombinant hHGF were required. Naked gene transfer is a simple and easy method, but the efficiency of gene transduction is extremely low, possibly leading to insufficient clinical effectiveness in human patients. By contrast, the intrarectal administration of an Ad carrying the HGF gene is considered to be extremely stressful for patients. Therefore, in this study we injected an Ad carrying the hHGF gene in single rounds of injections into both hindlimbs of mice 1 day after administration of DSS. We then investigated the therapeutic effects and mechanisms of systemically circulating HGF protein, produced by a gene introduced into the limbs, in the DSS-induced acute colitis model.

Materials and methods

Recombinant Ad. The Ad expressing hHGF under the transcriptional control of the cytomegalovirus immediate-early enhancer and a modified chicken β -actin promoter (Ad.HGF) was generated as described previously (25). The Ad.HGF and the control Ad expressing the LacZ gene (Ad.LacZ) were amplified in HEK-293 cells, purified twice on CsCl gradients, and desalted as described previously (26-29).

Animal studies. Six- to 7-week-old female BALB/c mice weighing 17-20 g (Japan SLC, Inc., Hamamatsu, Japan) were housed in cages in a temperature-controlled environment under a 12-h light-dark cycle with free access to food and water. The animal studies were performed in accordance with the National Institutes of Health guidelines, as specified by the Animal Care Facility at Gifu University School of Medicine.

To induce dextran sodium sulfate (DSS) colitis, the mice were provided with distilled drinking water containing 5% (w/v)

DSS (MW, 36,000-50,000; ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH, USA) for 7 days. Subsequently, colitis was maintained by feeding the mice 1% DSS (30-32) in the drinking water.

One day after the administration of DSS, Ad.HGF was injected into both hindlimbs of each mouse for a total dose of 1×10^{11} particles/mouse (i.e., 5×10^{10} particles each into the left and right thigh muscles) (n=8). Ad.LacZ was injected in a similar manner into control mice (n=8). These groups were followed until day 15 (i.e., 8 days after the end of the 7-day period of 5% DSS administration). To evaluate the severity of colitis, body weight was examined on a daily basis. On day 15, all the mice were sacrificed by inhaled anesthetics, and colon samples were collected for examination. In other experiments, on day 5 of 5% DSS administration, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, 100 mg/kg) was administered intraperitoneally to mice (n=8) infected with Ad.HGF or Ad.LacZ, and the animals were sacrificed by inhaled anesthetics 2 h later. These samples were used for analyses of HGF signal transduction, cell proliferation, apoptosis, cytokines and lymphocyte surface markers. The concentration of exogenous hHGF in serum was analyzed using the same dose (i.e., 1×10^{11} particles/mouse) of Ad.LacZ or Ad.HGF in intact mice (n=16).

Enzyme-linked immunosorbent assay. The plasma concentration of hHGF following adenoviral intramuscular gene transduction (IMGT) was measured in mice at each time point (n=4) using the Quantikine human HGF Immunoassay kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA). TNF- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, interferon (IFN)- γ , IL-2, IL-4 and IL-5 levels in the colons of colitic mice were measured using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (BioSource International, Inc., Camarillo, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Immunoprecipitation and c-Met receptor phosphorylation assay. The phosphorylation and activation of the c-Met receptor in colon tissues were detected by immunoprecipitation, as described previously (33,34). In brief, 1 g of colon tissue was homogenized in 4 ml of lysis buffer [1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10% glycerol, 1 mM vanadate, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride] with a protease-inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan). Following centrifugation, the supernatant was incubated with 0.5 μ g/ml anti-mouse c-Met antibody (sc-162; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) for 4 h, and then sequentially incubated with 5 μ l of protein G-Sepharose beads for 3 h. After washing, proteins bound to the beads were dissolved in sample buffer and subjected to SDS-PAGE. Phosphorylated c-Met was immunoblotted using the anti-phosphotyrosine antibody PY20 (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA).

Histopathological analysis. After each mouse was sacrificed, the intestine was dissected from the anus to the cecum and rinsed with physiological saline. The colon length was measured, and the colon sample was divided into three sections (cecum, proximal colon and distal colon), with the cecum being separated first, and then the remaining part of the colon being divided into two equal segments (proximal colon and distal colon). The cecum, proximal colon and distal colon were opened longitudinally, and the proximal and distal colon

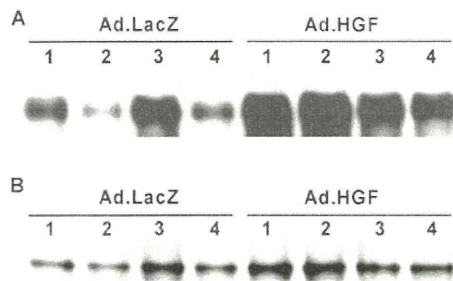


Figure 1. Tyrosine phosphorylation of c-Met in the colon epithelium. Colonic mucosal tissue of dextran sodium sulfate (DSS)-treated mice injected with Ad.LacZ (n=4) or Ad.HGF (n=4) was solubilized in lysis buffer. Lysates were immunoprecipitated with anti-c-Met antibody and blotted with (A) anti-phosphotyrosine antibody or (B) anti-c-Met antibody. Each lane represents the colonic tissue lysate of individual animals. Adenoviral human hepatocyte growth factor (hHGF) intramuscular gene transduction (IMGT) led to the strong stimulation of c-Met phosphorylation in colonic mucosal tissue.

were equally divided longitudinally and transversely. Thus, the cecum was divided into two sections, and the proximal and distal colon were divided into four sections. The colon tissues were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin, and 4- μ m sections were cut and stained with hematoxylin and eosin (H&E) to determine the inflammation and crypt scores (35). Briefly, the sections were graded on a scale of 0-3 to indicate the severity of inflammation: 0, none; 1, mucosa; 2, mucosa and submucosa; and 3, transverse, and on a scale of 0-4 to indicate the severity of crypt damage: 0, none; 1, basal 1/3 damage; 2, basal 2/3 damage; 3, loss of the entire crypt with the surface epithelium remaining intact; and 4, loss of the entire crypt and surface epithelium. The changes were also scored with regard to the extent of tissue involvement, measured as a percentage: i) 1-25%, ii) 26-50%, iii) 51-75%, and iv) 76-100%. Each section was then separately scored for each feature by taking the product of the severity score and the score for the extent of tissue involvement. Thus, the inflammation score ranged from 0 to 12, and the crypt score ranged from 0 to 16. Apoptotic cells were detected using a light microscope (Olympus, Tokyo, Japan) and the terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick end-labeling (TUNEL) assay (ApopTag kit; Intergen Co., Purchase, NY, USA), as described previously (25,33,36). To detect proliferating cells, BrdU incorporation was measured using a staining kit (Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Endothelial cells, CD4⁺ T lymphocytes, and CD8⁺ T lymphocytes were detected *in situ* using an anti-vWF antibody (Dako Cytomation Co., Ltd., Kyoto, Japan), anti-CD4 antibody and anti-CD8 antibody (both from Zymed Laboratories, Inc.), respectively, as described previously (25,36).

Statistical analysis. Values provided are the means \pm SEM values. The significance of differences was evaluated using the Student's t-test.

Results

Intramuscular injection of Ad.HGF produces circulating plasma hHGF, leading to c-Met activation in the colonic

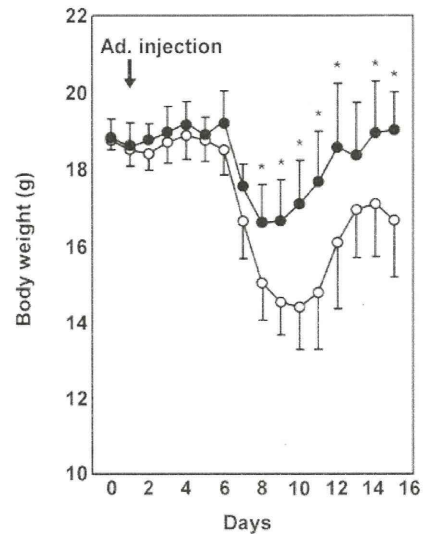


Figure 2. Adenoviral human hepatocyte growth factor (hHGF) intramuscular gene transduction (IMGT) ameliorated weight loss. Mice were given distilled drinking water containing 5% dextran sodium sulfate (DSS) for 7 days and 1% DSS for 8 days, *ad libitum*. One day after DSS administration, Ad.HGF (closed circles; n=8) was injected into both hindlimb muscles of 8 mice. As a control, Ad.LacZ (open circles; n=8) was injected into both hindlimb muscles of another group of 8 mice. Ad.HGF injection significantly prevented weight loss in colitic mice. *P<0.05.

mucosa. DSS-induced colitis was induced in 6- to 7-week-old female BALB/c mice. One day after DSS administration, Ad.HGF was administered in a single procedure involving injections into both hindlimbs (total dose, 1×10^{11} particles/mouse; as mentioned in Materials and methods). In the hHGF-overexpressing mice, the plasma levels of hHGF were $1,140 \pm 101$, 634 ± 341 and 33.9 ± 15.8 pg/ml at 2, 4 and 6 days after injection, respectively. No hHGF was detected in the Ad.LacZ-treated mice at any time point, demonstrating that this method accurately detected only hHGF protein expressed from the hHGF transgene, without a cross-reaction resulting in detection of the endogenous mouse HGF protein. These results indicate that hHGF expression was effectively induced by the intramuscular injection of Ad.HGF, leading to the presence of hHGF in the plasma of the mice.

The biological effects of HGF are mediated by its receptor c-Met, which is capable of activating multiple intracellular transducers and signaling pathways. Therefore, we examined c-Met tyrosine phosphorylation in the colonic mucosal epithelium by western blotting (Fig. 1). Phosphorylated c-Met was detected at low or moderate levels in the injured colonic mucosa of mice treated with Ad.LacZ, presumably as a result of a DSS-induced increase in endogenous HGF in response to colonic mucosal injury (14). By contrast, the injured colonic mucosa of mice treated with Ad.HGF exhibited high levels of c-Met tyrosine phosphorylation.

Adenoviral hHGF IMGT prevents weight loss in DSS-induced colitis mice. DSS-induced colitis is characterized by bloody stools and severe weight loss (30). In mice treated with Ad.LacZ, we observed persistent liquid stool and waste with subsequent severe weight loss. By contrast, colitic mice that received a single round of injections of Ad.HGF exhibited

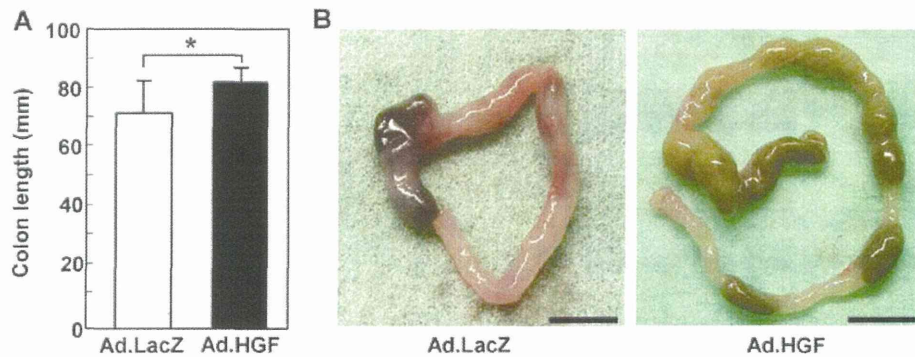


Figure 3. Adenoviral human hepatocyte growth factor (hHGF) intramuscular gene transduction (IMGT) reduced inflammation in the colon and prevented colon shortening in dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. Colon lengths were measured from the colocecum junction to the anal verge on day 15 (Ad.LacZ, n=8; Ad.HGF, n=8). (A) Ad.HGF treatment prevented shortening of the colon in mice with DSS-induced colitis. * $P < 0.05$. Representative colon pictures from the Ad.LacZ- and Ad.HGF-injected groups are shown in (B). The scale bar indicates 1 cm.

significant reductions in liquid stool and gross bleeding from the rectum (data not shown). Fig. 2 shows the mean weight change, and that the body weights of Ad.HGF-treated mice were significantly higher than those of the Ad.LacZ-treated mice. In the Ad.LacZ-treated control mice, weight loss occurred 6-7 days after the initiation of DSS administration. Ad.HGF treatment significantly prevented this weight loss.

Adenoviral hHGF IMGT reduces colitis-induced intestinal shortening and pathological scores. Shortening of the colon correlates well with histologic changes, and colon length is therefore frequently used as a morphologic parameter to indicate the degree of inflammation (35). The colon lengths of mice treated with Ad.LacZ and Ad.HGF were 72.0 ± 10.6 and 82.0 ± 4.7 mm, respectively (Fig. 3A). In contrast to the colons in the Ad.HGF-treated group, the colons in the Ad.LacZ-treated group were short and severely inflamed, with evident hemorrhages (Fig. 3B).

To validate this finding, we evaluated the effect of Ad.HGF on DSS-induced colonic mucosal injury in mice by histological analysis at day 15. In the cecum and proximal part of the colon (i.e., towards the end of the cecum), the inflammation and crypt scores appeared to be decreased by Ad.HGF administration although this difference was not statistically significant (Figs. 4A and B, 5A and B). By contrast, treatment with Ad.HGF significantly decreased the inflammation and crypt scores in the distal part (i.e., towards the anus) and in the colon overall (Figs. 4C and D, 5C and D).

Kinetics of inflammation in colitic mice. To elucidate the mechanism underlying the therapeutic effect of hHGF, we studied the expression of TNF- α and IL-1 β in the colon and evaluated the inflammation and crypt scores at days 4, 7, 10 and 14 of the experimental colitis model (Fig. 6). The expression of TNF- α and IL-1 β peaked as early as day 4 (Fig. 6A and B). The inflammation and crypt scores peaked as early as day 7 (Fig. 6C and D). Given that the plasma concentration of hHGF protein peaked on day 2 and decreased thereafter, colon tissue were sampled and hHGF functions were analyzed on day 5.

Adenoviral hHGF IMGT suppresses apoptosis and enhances regeneration of the colonic epithelium. In DSS-induced

colitis, loss of colonic mucosal epithelial cells is closely associated with apoptosis (37,38). To evaluate the role of Ad.HGF in preventing apoptosis in colonic epithelial cells, we performed the TUNEL assay to detect apoptotic cells (Fig. 7A). Ad.HGF-treated colitic mice had significantly (2.1-fold) fewer TUNEL-positive cells per high-power field (HPF) than Ad.LacZ-treated colitic mice.

To determine whether Ad.HGF-injection stimulated the proliferation of colonic epithelial cells, we measured the DNA labeling index in the colonic mucosal epithelium. As shown in Fig. 7B, the average number of BrdU-positive cells in the colonic mucosal epithelium was significantly (1.8-fold) higher in Ad.HGF-treated as compared to Ad.LacZ-treated mice, suggesting that hHGF stimulates proliferation in the colonic epithelial cells of colitic mice. These results suggested that adenoviral hHGF IMGT promoted survival and regeneration of the colonic mucosal epithelium in mice with DSS-induced colitis. HGF is known to promote angiogenesis (10). Therefore, we hypothesized that the angiogenic effect of HGF may contribute to the repair of the damaged colonic epithelium. However, when we analyzed angiogenesis in the distal part of the colon by anti-vWF immunohistochemistry, the number of blood vessels in the colon did not differ significantly between Ad.HGF-treated mice and controls, although a few more vessels appeared to be present in Ad.HGF-treated animals (Fig. 7C).

Effects of adenoviral hHGF IMGT on immunoreactive cells and inflammatory cytokines in DSS-induced colitis. To determine whether IMGT of hHGF affected the immune system of DSS-treated mice, we directly detected immune cells in the colon. Adenoviral hHGF IMGT decreased the number of CD4⁺ T cells and the CD4/CD8 ratio, but not the number of CD8⁺ T cells (Fig. 8).

The inflammatory cytokine cascade plays an important role in the pathogenesis of DSS-induced colitis. Therefore, we analyzed the cytokine profile of the entire colon by ELISA. In general, we observed upregulation of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) in the colitic mice (39,40). The expression levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 were further increased by hHGF IMGT (Fig. 9).

We also examined the effect of hHGF IMGT on Th1 (IFN- γ and IL-2) and Th2 (IL-4 and IL-5) cytokine expres-