

より評価した。また、遺伝子ノックダウン活性は、ルシフェラーゼに対する siRNA (siLuc) を用いて Luc 発光を測定することにより評価した。

3) ユニット PIC / 金ナノ粒子複合体の in vivo 機能評価

BALB/c マウス(♀)に AuNP およびユニット PIC/AuNP 複合体を投与し、一定時間後に回収した全血を硝酸処理した後の Au 量を ICP-MS により測定した。ユニット PIC のがん集積量は、投与 4 時間後に回収した腫瘍組織の Alexa-siRNA の蛍光強度を IVIS を用いて測定することにより評価した。in vivo における遺伝子ノックダウン活性に関しては、HeLa-Luc 移植 17、18 日目に 5.8μg の siRNA (siLuc および siCont) を投与し、19 日目の Luc 発光量を IVIS を用いて測定することにより評価した。

(倫理面への配慮)

本研究成果における動物実験に関しては、事前に動物実験計画書を提出し、東京工業大学の動物実験委員会による承認を得た上で実施した。動物実験を行うすべての者は、大学主催の動物実験教育訓練を受講し、認定を受けた上で、「動物の保護および管理に関する法律」などに従い、動物愛護の観点に十分に配慮した上で実験を行っている。

C. 研究結果

1) ユニット PIC / 金ナノ粒子複合体の調製

PEG-poly(L-Lysine)-SH (PEG-PLL-SH) (Lys 重合度 40) と siRNA による会合体形成を蛍光相関分光(FCS)法により評価したところ、PEG-PLL-SH と siRNA のモル比が 1:1 の時に 1 分子のポリマーと siRNA から形成される会合体(ユニット PIC)が形成されることが確認された(図 3)。形成されたユニット PIC は、150mM の NaCl や 10% のウシ胎児血清を含有するリン酸緩衝液 (pH7.2) でも非常に高い安定性を示すことが確認された。次に、ユニット PIC と金ナノ粒子(AuNP)を混合することによって複合体を調製した。ユニット PIC / AuNP 複合体の動的光散乱(DLS)測定を行ったところ、AuNP の流体力学直径が 20nm からユニッ

ト PIC の導入により 38nm に増大することが確認された。また、AuNP のゼータ電位は、ユニット PIC の導入により -31.3mV から -24.7mV に増大することも確認された。さらに、AuNP の粒子 1 個あたりに導入されたユニット PIC 量を評価したところ、約 20 分子の siRNA が AuNP の表面に導入されていることが確認された。

形成されたユニット PIC / AuNP 複合体のアニオン性多糖であるヘパリンによる置き換わりに対する安定性を評価した(図 4)。その結果、ユニット PIC を AuNP に導入することによりヘパリンに対する安定性が増大することが確認された。さらに、10mM のグルタチオン(GSH)を添加することにより、AuNP からの siRNA 放出が促進されることが確認された(10mM の GSH は細胞質内と同程度の濃度)。これは、AuNP 表面でユニット PIC と GSH が置き換わることによるものであると考えられ、この結果より、ユニット PIC / AuNP 複合体は、細胞質内の還元環境に応答してユニット PIC を放出する特性を有することが示唆された。

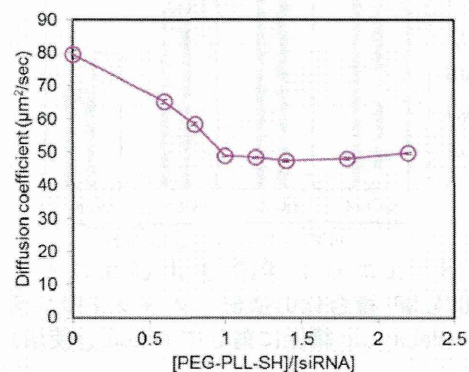


図 3. PEG-PLL-SH と siRNA の混合によるユニット PIC の形成 (FCS による評価)

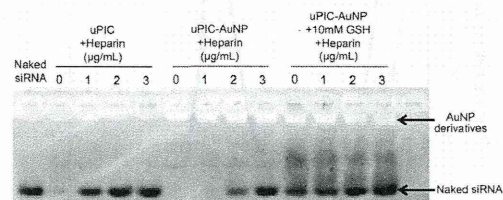


図 4. ユニット PIC およびユニット PIC / AuNP 複合体のヘパリン、GSH に対する安定性評価 (アガロースゲル電気泳動による siRNA のリリースの評価)

2) ユニット PIC/金ナノ粒子(AuNP)複合体の *in vitro* 機能評価

Luc を安定発現させた HeLa 細胞に対して、siLuc を 48 時間作用させた時の Luc 発現量を評価した結果を図 5 に示す。この結果より、ユニット PIC 単独では 100nM および 200nM の siRNA 濃度で有意な遺伝子ノックダウン活性が見られなかったが、ユニット PIC を AuNP 表面に導入することにより配列依存的な遺伝子ノックダウン活性が認められ、50%以上の標的遺伝子(Luc)がノックダウンされることが明らかになった。このメカニズムに関して、ユニット PIC およびユニット PIC/AuNP 複合体の細胞内取り込み量を Alexa-siRNA を用いてフローサイトメトリーにより解析したところ(図 6)、ユニット PIC を AuNP に導入することにより siRNA の細胞内取り込み量が顕著に増大することが確認された。

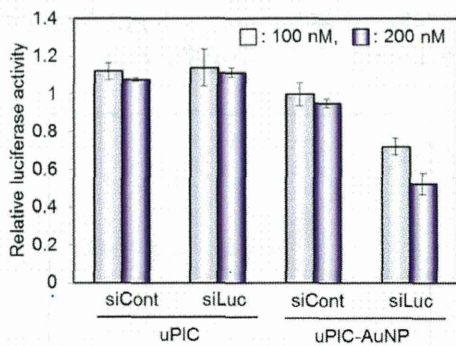


図 5. ユニット PIC およびユニット PIC/AuNP 複合体の遺伝子ノックダウン活性 (HeLa-Luc 細胞に対して siLuc を使用)

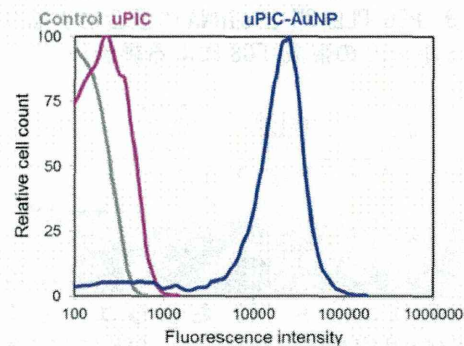


図 6. Alexa 標識 siRNA の HeLa-Luc 細胞による取り込み量 (フローサイトメトリーによる評価)

3) ユニット PIC/金ナノ粒子複合体の *in vivo* 機能評価

AuNP およびユニット PIC/AuNP 複合体を *i.v.*投与し、血中の Au 量を ICP-MS により測定した結果を図 7(A)に示す。この結果より、AuNP の血中滞留性はユニット PIC による表面修飾によって大幅に改善されることが分かった。次に、Alexa-siRNA のがん組織への集積性を評価した(図 7(B))。その結果、ユニット PIC/AuNP 複合体は、naked siRNA およびユニット PIC 単独と比べて顕著に高いがん集積性を示すことが明らかになった。

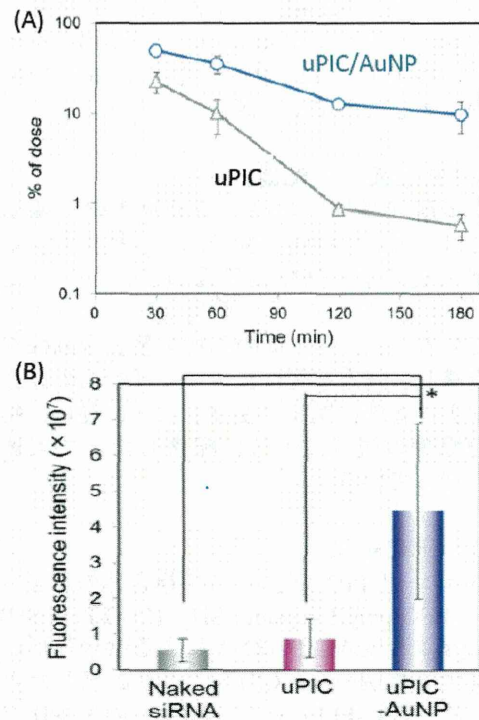


図 7. (A) ユニット PIC およびユニット PIC/AuNP 複合体の *i.v.* 投与後の血中の Au 濃度 ; (B) Alexa-siRNA の固形がん (HeLa-Luc) への集積性

最後に、HeLa-Luc 細胞の固形がんモデルを使用し、siLuc の投与によるがん組織の Luc 発光量の変化を評価した結果を図 8 に示す。この結果より、ユニット PIC/AuNP 複合体は、*in vivo* においても有意な遺伝子ノックダウン活性を示すことが示された。

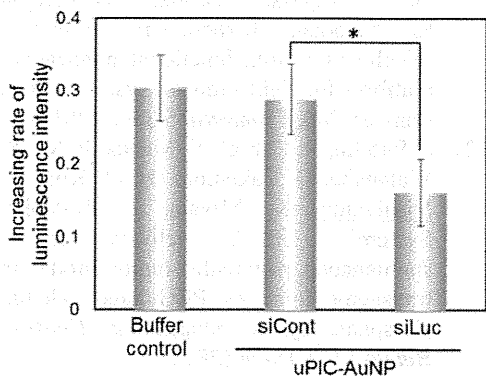


図 8. ユニット PIC/AuNP 複合体の *in vivo* 遺伝子ノックダウン活性 (HeLa-Luc 細胞に対して siLuc を使用)

D. 考察

前年度までの研究により、PEGasus-PLys と siRNA を混合することにより、1 分子の siRNA を搭載したユニット PIC が構築されることを見出した。そこで本研究では、ユニット PIC のがん集積性を高めることを目的として、PEGasus-PLys の末端にチオール基を導入し、チオール基と金との相互作用を利用して金ナノ粒子(AuNP)の表面にユニット PIC を導入した。今回使用したブロック共重合体の組成および実験条件では、ユニット PIC のがん細胞による取り込み量や *in vitro* での遺伝子ノックダウン活性は低く、単独での治療応用は難しいと考えられたが、本実験では、AuNP 表面への導入によって、ユニット PIC の細胞取り込み量や *in vitro* での遺伝子ノックダウン活性が顕著に改善されることを確認した(図 5、図 6)。また、*in vivo* 実験では、AuNP にユニット PIC を導入することによって、AuNP の表面が PEG 化され、ナノ粒子の血中滞留性が大幅に改善されることも分かった(図 7(A))。その結果、ユニット PIC/AuNP 複合体は、siRNA 単独およびユニット PIC と比べて優れたがん集積性を示すことが明らかになった(図 7(B))。最後に、HeLa-Luc 細胞の固形がんモデルに対して、ユニット PIC/AuNP 複合体を用いて siLuc をデリバリーしたところ、約 50%の標的遺伝子のノックダウン効果が確認された(図 8)。以上のように、本年度の研究では、ユニット PIC を AuNP と複合化することによって、細胞

内取り込み量、血中滞留性とがん集積性、さらには *in vitro* および *in vivo* における遺伝子ノックダウン活性が大きく向上できることが明らかになった。

E. 結論

本年度は、siRNA 1 分子と PEGasus-PLys から形成されるユニット PIC を AuNP の表面に導入することによって、ユニット PIC の siRNA 送達システムとしての機能を大きく改善することに成功した。今後は、研究代表者との連携による非臨床・臨床試験に向けて、デリバリーシステムの構造最適化を進めていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) J. -Y. Ahn, Y. Miura, N. Yamada, T. Chida, X. Liu, A. Kim, R. Sato, R. Tsumura, Y. Koga, M. Yasunaga, N. Nishiyama, Y. Matsumura, H. Cabral, K. Kataoka, Antibody fragment-conjugated polymeric micelles incorporating platinum drugs for targeted therapy of pancreatic cancer. *Biomaterials* 39 23-30 (2015)
- 2) H.-C. Yen, H. Cabral, P. Mi, K. Toh, Y. Matsumoto, X. Liu, H. Koori, A. Kim, K. Miyazaki, Y. Miura, N. Nishiyama, K. Kataoka, Light-induced cytosolic activation of reduction-sensitive camptothecin-loaded polymeric micelles for spatiotemporally controlled *in vivo* chemotherapy. *ACS Nano* 8 (11) 11591-11602 (2014)
- 3) H. -J. Kim, H. Takemoto, Y. Yi, M. Zheng, Y. Maeda, H. Chaya, K. Hayashi, P. Mi, F. Pittella, R. J. Christie, K. Toh, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles. *ACS Nano* 8 (9) 8979-8991 (2014)
- 4) H. Wu, H. Cabral, K. Toh, P. Mi, Y.-C. Chen, Y. Matsumoto, N. Yamada, X. Liu, H. Kinoh, Y. Miura, M. R. Kano, H. Nishihara, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polymeric micelles loaded with platinum anticancer drugs target preangiogenic micrometastatic niches associated with

- inflammation. *J. Control. Release* 189 1-10 (2014)
- 5) H. Uchida, K. Itaka, T. Nomoto, T. Ishii, T. Suma, M. Ikegami, K. Miyata, M. Oba, N. Nishiyama, K. Kataoka, Modulated protonation of side chain aminoethylene repeats in N-substituted polyaspartamides promotes mRNA transfection. *J. Am. Chem. Soc.* 136 (35) 12396-12405 (2014)
 - 6) Y. Oe, R. J. Christie, M. Naito, S. A. Low, S. Fukushima, K. Toh, Y. Miura, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Actively-targeted polyion complex micelles stabilized by cholesterol and disulfide cross-linking for systemic delivery of siRNA to solid tumors. *Biomaterials* 35 27 7887-7895 (2014)
 - 7) S. Quader, H. Cabral, Y. Mochida, T. Ishii, X. Liu, K. Toh, H. Kinoh, Y. Miura, N. Nishiyama, K. Kataoka, Selective intracellular delivery of proteasome inhibitors through pH-sensitive polymeric micelles directed to efficient antitumor therapy. *J. Control. Release* 188 67-77 (2014)
 - 8) Y. Mochida, H. Cabral, Y. Miura, F. Albertini, S. Fukushima, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Bundled assembly of helical nanostructures in polymeric micelles loaded with platinum drugs enhancing therapeutic efficiency against pancreatic tumor. *ACS Nano* 8 (7) 6724-6738 (2014)
 - 9) Y. Maeda, F. Pittella, T. Nomoto, H. Takemoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Fine-tuning of charge-conversion polymer structure for efficient endosomal escape of siRNA-loaded calcium phosphate hybrid micelles. *Macromol. Rapid Commun.* 35 13 1211-1215 (2014)
 - 10) H. -J. Kim, K. Miyata, T. Nomoto, M. Zheng, A. Kim, X. Liu, H. Cabral, R. J. Christie, N. Nishiyama, K. Kataoka, siRNA delivery from triblock copolymer micelles with spatially-ordered compartments of PEG shell, siRNA-loaded intermediate layer, and hydrophobic core. *Biomaterials* 35 (15) 4548-4556 (2014)
 - 11) T. Nomoto, S. Fukushima, M. Kumagai, K. Machitani, Arnida, Y. Matsumoto, M. Oba, K. Miyata, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Three-layered polyplex micelle as a multifunctional nanocarrier platform for light-induced systemic gene transfer. *Nat. Commun.* 5 3545 (2014)
 - 12) F. Pittella, H. Cabral, Y. Maeda, P. Mi, S. Watanabe, H. Takemoto, H. -J. Kim, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Systemic siRNA delivery to a spontaneous pancreatic tumor model in transgenic mice by PEGylated calcium phosphate hybrid micelles. *J. Control. Release* 178 18-24 (2014)
- ## 2. 学会発表
- 1) 西山伸宏, "生体イメージングを活用したナノ DDS 設計", 3S05a 疾患克服を目指したケミカルバイオフォトニクス技術第 87 回日本生化学会大会 (2014 年 10 月 15 日-18 日), 京都国際会館, 京都 2014 年 10 月 17 日(シンポジスト)
 - 2) 西山伸宏, "高分子ミセル型ナノ医薬品の研究開発", 新製剤技術とエンジニアリングを考える会 第 12 回技術講演会, 京都国際会館, 京都 2014 年 7 月 16 日(招待講演)
 - 3) N. Nishiyama, "Biological functionalities of polymeric micelle systems for targeting cancer", The European Summit for Clinical Nanomedicine 2014 (6th CLINAM 2014) (23-25 June), Congress Center Basel, Basel, Switzerland, June 23, 2014 (Invited Lecture)
 - 4) 西山伸宏, "高分子ナノテクノロジーを基盤とするナノ医薬品の開発", 第 10 回つくばがん遺伝子治療研究会, ステーションコンファレンス東京, 東京 2014 年 6 月 20 日(招待講演)
 - 5) 西山伸宏, "がんの診断・治療のための高分子ミセル型 DDS の開発", 日本病院薬剤師会東北ブロック第 4 回学術大会 (2014 年 5 月 31 日-6 月 1 日), 仙台国際センター, 仙台 2014 年 5 月 31 日(シンポジスト)
 - 6) N. Nishiyama, "Development of supramolecular nanocarriers for cancer diagnosis and therapy", Emerging Biomaterials 2014 (23 May), KAIST Institute, Korea, May 23, 2014 (Invited

Lecture)

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1.特許取得

特になし

2.実用新案登録

特になし

3.その他

特になし

癌幹細胞を制御する転写因子を標的とした難治性乳癌治療法の開発

研究分担者 平田 公一 札幌医科大学外科学第一講座 教授

研究要旨

乳がん幹細胞に対する新規分子標的治療薬開発の候補として有望な PRDM14 遺伝子について、マイクロアレイや qRT-PCR などの遺伝子発現情報と臨床病理学的因子との関連解析を行った。Estrogen receptor, Progesteron receptor, Her-2 receptor と PRDM14 の発現状況の間には関連を示す傾向にあった。これらの受容体発現状況を検討したうえで、PRDM14 に対する核酸治療薬による治療を行うことで、より有効な乳がん個別化治療につながるものと考えられた。

A. 研究目的：

近年、患者数が増加し社会的に解決が急務である「乳がん」を対象に、がん幹細胞において強い発現量を認める PRDM14 を標的とした核酸治療薬が開発されつつある。本研究では、難治性乳がん、膵がんの治療成績向上のため、PRDM14 標的治療薬の開発を促進すると同時に、PRDM14 の発現量と ER, PgR, Her-2 などの受容体発現状況との関連を検討し、より有効性の高い乳がん薬物療法を開発することを目的とする。

B. 研究方法：

組織検体を用いて以下の研究を遂行した。具体的な研究方法としては、以下のとおりである。

- ① 病期別に分類された病情報のある凍結乳がん組織より cDNA を合成し、quantitative RT-PCR 法にて PRDM14 の mRNA 発現レベルを検討する。
- ② 基本データとして提供される、年齢、性別、病理診断による組織型、分化度、TNM 分類、病期と①の結果を統合し、PRDM14 遺伝子発現と病理組織学的因子との相関性を同定する。
- ③ Triple marker (ER, PgR, Her2) と PRDM14 発現状況の関係を検討し、より効果的な乳がん治療法の開発を行う。

(倫理面への配慮)

本研究は、札幌医科大学臨床研究審査委員会の承認を得て実施し、臨床検体の取り扱いについては同委員会の指針に従って行った。(承認番号 24-159)

C. 研究結果：

先行研究と合わせると、これまでに乳がん臨床

検体 112 例を用いた PRDM14 の発現解析が終了した。さらにこの 112 例中 79 例については独立した 2 サンプルセット（先行研究では乳がん臨床検体 29 例。本研究は 50 例）にてマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現プロファイル解析が行われた。用いられたサンプルは、閉経前：=24.7%：75.3%、cStage 1:2:3:4=30.8%:53.8%:14%:1.3%、ER, PgR, Her2 陽性はそれぞれ、70.9%、43.8%、16.3%であった。マイクロアレイ解析結果より PRDM14 遺伝子の発現量をがん組織と正常組織の間で比較したところ、90%以上の乳がん組織において、正常よりも高い発現を認めた。この結果は、上記 2 セットの発現解析結果において再現性が確認された。

ER 発現状況と PRDM14 の関連を検討したところ、生検組織・手術摘出組織いずれにおいても ER+ 症例で PRDM14 の発現が高い傾向を認めた（両組織とも $P=0.03$ ）。また Her2 発現状況との関係については、Her2 陰性症例で PRDM14 の発現が高い傾向を認めた（生検 $P=0.02$ 、摘出組織 $P=0.05$ ）。triple negative 乳がんとはそれ以外の乳がんの間で、PRDM14 発現量に有意な差を認めなかった。

D. 考察：

乳がん幹細胞および膵がんにおいて高い発現量を認める転写因子 PRDM14 遺伝子は転写制御を受ける遺伝子がいくつか報告されているものの、PRDM14 による転写制御を受けることが知られていない、未知の遺伝子が多数存在し得ることが推測されている。

先行研究において、PRDM14 の発現は乳がん幹細胞や、triple negative 乳がんにおいて高い発現を認めているという報告がなされていたが、本研究ではホルモンレセプター陽性症例でむしろ発現が高い傾向を認めた。いずれにせよ、Her2 陰性症例では PRDM14 の発現が高いことか

ら、全乳がんの70%程度を占めるHer2陰性乳がんの治療薬として、PRDM14核酸治療薬が期待できるものと考えられる。

E. 結論 :

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現情報やqRT-PCRによる発現情報と詳細な臨床病理学的情報からPRDM14は乳がん組織において正常組織より高い発現を示し、PRDM14標的治療薬は乳がんの中でも特にHer2陰性症例に対する新たな効果的治療薬として開発が期待されるものと考えられた。

F. 研究発表 :

1. 論文発表

1: Keira Y, Takasawa A, Murata M, Nojima M, Takasawa K, Ogino J, Higashiura Y, Sasaki A, Kimura Y, Mizuguchi T, Tanaka S, Hirata K, Sawada N, Hasegawa T. An immunohistochemical marker panel including claudin-18, maspin, and p53 improves diagnostic accuracy of bile duct neoplasms in surgical and presurgical biopsy specimens. *Virchows Arch*. 2015 Mar;466(3):265-77.

2: Mizuguchi T, Torigoe T, Satomi F, Shima H, Kutomi G, Ota S, Ishii M, Hayashi H, Asakura S, Hirohashi Y, Meguro M, Kimura Y, Nishidate T, Okita K, Ishino M, Miyamoto A, Hatakenaka M, Sato N, Hirata K. Trials of vaccines for pancreatic ductal adenocarcinoma: Is there any hope of an improved prognosis? *Surg Today*. 2015 Feb 5.

3: Tanaka T, Okuya K, Kutomi G, Takaya A, Kajiwara T, Kanaseki T, Tsukahara T, Hirohashi Y, Torigoe T, Hirata K, Okamoto Y, Sato N, Tamura Y. Heat shock protein 90 targets a chaperoned peptide to the static early endosome for efficient cross-presentation by human dendritic cells. *Cancer Sci*. 2015 Jan;106(1):18-24.

4: Ota D, Kanayama M, Matsui Y, Ito K, Maeda N, Kutomi G, Hirata K, Torigoe T, Sato N, Takaoka A, Chambers AF, Morimoto J, Uede T. Tumor- α 9B1 integrin-mediated signaling induces breast cancer growth and lymphatic metastasis via the recruitment of cancer-associated fibroblasts. *J Mol Med (Berl)*. 2014 Dec;92(12):1271-81

5: Furuhashi T, Hirata K, Wakao F, Okita K, Imamura M, Maehara Y, Nishiyama M. Questionnaire survey for the development and publication of cancer clinical practice guidelines in Japan. *Int J Clin Oncol*. 2014 Oct;19(5):771-8

6: Iyama S, Sato T, Tatsumi H, Hashimoto A, Tatekoshi A, Kamihara Y, Horiguchi H, Ibata S, Ono K, Murase K, Takada K, Sato Y, Hayashi T, Miyanishi K, Akizuki E, Nobuoka T, Mizuguchi T, Takimoto R, Kobune M, Hirata K, Kato J. Efficacy of Enteral Supplementation Enriched with Glutamine, Fiber, and Oligosaccharide on Mucosal Injury following Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Case Rep Oncol*. 2014 Oct 22;7(3):692-9

7: Kyuno D, Yamaguchi H, Ito T, Kono T, Kimura Y, Imamura M, Konno T, Hirata K, Sawada N, Kojima T. Targeting tight junctions during epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 Aug 21;20(31):10813-24.

8: Kutomi G, Ohmura T, Satomi F, Takamaru T, Shima H, Suzuki Y, Otokoza S, Zembutsu H, Mori M, Hirata K. Lymph node shape in computed tomography imaging as a predictor for axillary lymph node metastasis in patients with breast cancer. *Exp Ther Med*. 2014 Aug;8(2):681-685

9: Kutomi G, Ohmura T, Satomi F, Maeda H, Shima H, Kameshima H, Okazaki M, Masuoka H, Sasaki K, Hirata K. A phase I study of combination therapy with nanoparticle albumin-bound paclitaxel and cyclophosphamide in patients with metastatic or recurrent breast cancer. *Int J Clin Oncol*. 2014 Jul 30.

G. 知的財産権の出願・登録状況 :
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

癌幹細胞を制御する転写因子を標的とした難治性乳癌治療法の開発

研究分担者 前佛 均 国立がん研究センター研究所 遺伝医学研究分野 ユニット長

研究要旨

乳がん幹細胞に対する新規分子標的治療薬開発の候補として有望な PRDM14 遺伝子について、遺伝子・タンパクレベルでの発現解析により薬効のバイオマーカーとなるコンパニオン診断薬を開発することを目的とした。乳がん臨床組織における網羅的な遺伝子発現解析により得られた発現情報から PRDM14 の発現と強い相関関係をもつ分泌タンパクを同定し、ELISA 法などを用いて検討を行った。また、サスペンションアレイキットを用いた、網羅的サイトカイン定量を行い、PRDM14 遺伝子発現量と強い相関をもつ遺伝子群の同定を行った。

A. 研究目的：

近年、患者数が増加し社会的に解決が急務である「乳がん」を対象に、がん幹細胞において高い発現量を認めるPRDM14を標的とした核酸治療薬が開発されつつある。本研究では、難治性乳がん、膵がんの治療成績向上のため、PRDM14標的治療薬の開発を促進すると同時に、PRDM14の発現量と強く相関する分泌タンパクを同定することで、実用的な薬効バイオマーカーを同定し、臨床応用可能なコンパニオン診断薬の開発を目指す。

B. 研究方法：

- ① 組織型、予後、治療歴、薬剤反応性、副作用など臨床情報を有する凍結乳癌組織より mRNA を抽出し、quality check を行った
- ② 網羅的な遺伝子発現プロファイルを解析するためにマイクロアレイ解析を行った。
- ③ 前年度までにPRDM14遺伝子発現量と強い相関をもつ分泌タンパク遺伝子について、本年度のマイクロアレイ解析により検証試験を行った。
- ④ また、本年度のマイクロアレイ解析により、新たにPRDM14遺伝子と相関関係をもつ遺伝子を同定した。
- ⑤ マイクロアレイ解析に用いた乳がん症例の血清検体を用いてELISA法などを用いて、PRDM14遺伝子発現量と相関の高い分泌タンパクの定量を行った。
- ⑥ ⑤の血清を用いてマルチプレックスサスペンションアレイ解析を行い、PRDM14遺伝子発現量と相関するサイトカインを同定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立がん研究センター審査委員会の承認を得て実施し、臨床検体の取り扱いについては

同委員会の指針に従って行った。(研究課題番号 2014-158)

C. 研究結果：

先行研究と合わせると、これまでに乳がん臨床検体112例を用いたPRDM14の発現解析が終了した。さらにこの112例中79例については独立した2サンプルセット(先行研究では乳がん臨床検体29例、本年度は50例)にてマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現プロファイル解析が行われた。マイクロアレイ解析結果よりPRDM14遺伝子の発現量と相関を有し、かつ分泌タンパクをコードする遺伝子として、ENOX2 (Ecto-NOX Disulfide-Thiol Exchanger 2)遺伝子が同定された(相関係数 $r=0.75$)。乳がん組織におけるPRDM14遺伝子の発現量と同一乳がん患者の血清を用いて、ELISA法にて血中ENOX2タンパクの定量を行ったが、乳がん組織の遺伝子発現量とENOX2タンパク量の間に有意な相関を認めなかった。また、血中CEAタンパク量と同一患者の乳がん組織におけるPRDM14の発現量を検討したが、有意な相関を認めなかった。現在マルチプレックスサスペンションアレイによる血中サイトカイン発現量解析結果と乳がんPRDM14遺伝子発現量の間で関連解析を行っている。

D. 考察：

乳がん幹細胞および膵がんにおいて高い発現量を認める転写因子PRDM14遺伝子は転写制御を受ける遺伝子がいくつか報告されているものの、PRDM14による転写制御を受けることが知られていない、未知の遺伝子が多数存在し得ることが推測されている。PRDM14遺伝子は分泌タンパクである可能性は低く、血中PRD

M14タンパクを定量化した報告は存在しない。そのため、PRDM14の発現量と強い相関を有する分泌タンパク、つまりPRDM14発現量の surrogate markerを同定することは、薬剤耐性を示す難治性の乳がんや膵がんに対する適切な治療法を選択するうえで、非常に臨床有用性が高いものと期待されている。マイクロアレイ解析結果およびqRT-PCRにより、PRDM14遺伝子の発現量と強い相関を示す遺伝子を同定したが、これらの遺伝子発現量は、必ずしも血清中のタンパク量と相関を示すとは限らないことが明らかとなった。サスペンションアレイの結果より、PRDM14遺伝子発現量と相関を示す候補遺伝子が同定されつつある。

E. 結論 :

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現情報より、PRDM14遺伝子の発現量と強い相関を示す候補分泌タンパク遺伝子を同定した。今後これらの候補タンパクについてELISAなどの血中タンパク定量により、PRDM14の surrogate markerとなるようなタンパクを検出するための血中マーカー測定系を確立することで、より有効性の高い新たな乳がん分子標的治療法を開発する予定である。

F. 研究発表 :

1. 論文発表

- 1: Zembutsu H. Pharmacogenomics toward personalized tamoxifen therapy for breast cancer. *Pharmacogenomics*. 2015 Mar;16(3):287-96.
- 2: Kutomi G, Ohmura T, Satomi F, Takamaru T, Shimá H, Suzuki Y, Otokozawa S, Zembutsu H. Mori M, Hirata K. Lymph node shape in computed tomography imaging as a predictor for axillary lymph node metastasis in patients with breast cancer. *Exp Ther Med*. 2014 Aug;8(2):681-685.
- 3: Aguilar H, Urruticoechea A, Halonen P, Kiyotani K, Mushiroda T, Barril X, Serra-Musach J, Islam A, Caizzi L, Di Croce L, Nevedomskaya E, Zwart W, Bostner J, Karlsson E, Pérez Tenorio G, Fornander T, Sgroi DC, Garcia-Mata R, Jansen MP, García N, Bonifaci N, Climent F, Soler MT, Rodríguez-Vida A, Gil M, Brunet J, Martrat G, Gómez-Baldó L, Extremera AI, Figueras A, Balart J, Clarke R, Burnstein KL, Carlson KE, Katzenellenbogen JA, Vizoso M, Esteller M, Villanueva A, Rodríguez-Peña AB, Bustelo XR, Nakamura Y, Zembutsu H. Stål O, Beijersbergen RL,

Pujana MA. VAV3 mediates resistance to breast cancer endocrine therapy. *Breast Cancer Res*. 2014 May 28;16(3):R53.

- 4: Chhibber A, Mefford J, Stahl EA, Pendergrass SA, Baldwin RM, Owzar K, Li M, Winer EP, Hudis CA, Zembutsu H. Kubo M, Nakamura Y, McLeod HL, Ratain MJ, Shulman LN, Ritchie MD, Plenge RM, Witte JS, Kroetz DL. Polygenic inheritance of paclitaxel-induced sensory peripheral neuropathy driven by axon outgrowth gene sets in CALGB 40101 (Alliance). *Pharmacogenomics J*. 2014 Aug;14(4):336-42

- 5: Province MA, Goetz MP, Brauch H, Flockhart DA, Hebert JM, Whaley R, Suman VJ, Schroth W, Winter S, Zembutsu H. Mushiroda T, Newman WG, Lee MT, Ambrosone CB, Beckmann MW, Choi JY, Dieudonné AS, Fasching PA, Ferraldeschi R, Gong L, Haschke-Becher E, Howell A, Jordan LB, Hamann U, Kiyotani K, Krippel P, Lambrechts D, Latif A, Langsenlehner U, Lorizio W, Neven P, Nguyen AT, Park BW, Purdie CA, Quinlan P, Renner W, Schmidt M, Schwab M, Shin JG, Stingl JC, Wegman P, Wingren S, Wu AH, Ziv E, Zirpoli G, Thompson AM, Jordan VC, Nakamura Y, Altman RB, Ames MM, Weinsilboum RM, Eichelbaum M, Ingle JN, Klein TE; International Tamoxifen Pharmacogenomics Consortium. CYP2D6 genotype and adjuvant tamoxifen: meta-analysis of heterogeneous study populations. *Clin Pharmacol Ther*. 2014 Feb;95(2):216-27.
- 6: Zembutsu H. Precision Medicine for Cancer and Pharmacogenomics. 血液内科 2015 in press.

2. 学会発表

- 1: 前佛 均、中村 清吾、明石 定子、桑山 隆志、渡邊 知映、武井 寛幸、石川 孝、長谷川 善枝、リー スーチン、松方 絢美、松本 広志、九富 五郎、中村 祐輔. CYP2D6 genotype とタモキシフェン治療反応性の関係を解明する多施設共同前向き研究. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜市 (2014.9)
- 2: 高田 亮、加藤 陽一郎、前佛 均、片桐 豊雅、角田 達彦、藤岡 知昭、中村 祐輔、小原 航 網羅的遺伝子発現解析による筋層浸潤性膀胱がんのオーダーメイド医療. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜市 (2014.9)

- 3: 清谷 一馬、薙田 泰誠、前佛 均、中村 祐輔. PGxによるタモキシフェン治療効果予測: CYP2D6研究から学ぶこと. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜市 (2014.9)
- 4: 前佛 均、中村 清吾、明石 定子、桑山 隆志、渡邊 知映、武井 寛幸、石川 孝、長谷川 善枝、リー スーチン、松方 絢美、松本 広志、九富 五郎、中村 祐輔. CYP2D6 genotypeとタモキシフェン治療反応性の関係を解明する多施設共同前向き研究. 日本人類遺伝

G. 知的財産権の出願・登録状況:
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

麻疹ウイルスベクターを用いた乳癌幹細胞特異的PRDM14分子標的 新規癌治療法の開発に関する研究

研究分担者 谷 憲三郎 九州大学 生体防御医学研究所 教授

研究要旨

麻疹ウイルスは癌治療用ベクターとして様々な利点を有している可能性が高いと考えられる。我々は安全性の確立された弱毒化麻疹ウイルスに乳癌特異的な二つの分子、すなわち腫瘍細胞標的化遺伝子と発癌関連遺伝子標的 RNAi を付与し、この二重の腫瘍特異的機能を有する麻疹ウイルスベクターの有効性と安全性を最大限に活用した新規乳癌治療法の開発を目指した研究を実施した。

我々が治療の標的と考えている X は、乳癌臨床検体での高い発現が報告されている。我々は、もう一つの標的である細胞表面分子 Y との高い発現相関性を確認している。

そこで我々は、Y に対する一本鎖抗体 (single chain Fv; scFv) 遺伝子を導入することで、乳癌細胞のみに選択的に感染する新規組換え麻疹ウイルスの作成を進めた。さらに、ウイルスゲノム中に組込んだ X 遺伝子標的 RNAi により X 遺伝子の発現を阻害し、癌細胞の増殖を特異的に抑制する新たな分子標的薬剤の開発に取り組み、その骨格を完成させた。

医薬品への実用化に向け、さらなる検証を重ねる必要があると考えられる。

A. 研究目的

核酸医薬の臨床応用においては安全で効率的なドラッグデリバリーシステムの構築が不可欠であるが、麻疹ウイルスは生活環が細胞質にあるため、オンコウイルスベクターで問題視されている核内染色体への遺伝子挿入変異によるゲノム毒性のリスクを回避できる可能性が高い。また、ウイルスゲノム中に外来遺伝子を複数個組込むことで、腫瘍細胞中へ治療遺伝子を運び、癌関連遺伝子発現を制御させるベクターとしても有望と考えられる。さらにスターシステム (Nat Biotech 2004, Nat Biotech 2005) を利用して、正常細胞ではなく、特定の腫瘍細胞にのみ感染するウイルスを構築することが可能である。我々は、本来ワクチンとして開発され、安全性が確立されている弱毒化麻疹ウイルスを用いた、新規麻疹ウイルスベクターの開発を進めてきている。治療標的としている X は乳癌幹細胞性に関与し (Cancer Res, 2007)、Y は乳癌幹細胞の発現には

ば一致していることが既に報告されており (J Clin Invest 2012)、乳癌におけるこれら二つの分子の特性は極めて高いと考えられる。本研究の目的は、安全性が確認されている弱毒化麻疹ウイルスをベクターとして用い、これら二分子を標的とすることで、再発・遠隔転移が問題となっている、既存治療に抵抗性の難治性乳癌に対する新規分子標的薬剤を開発することである。

B. 研究方法

本年度は、乳癌幹細胞を標的とする組換え麻疹ウイルスベクターの構築のため、以下の実験を行った。

1. 乳癌幹細胞標的ウイルスの作製

ワクチン株 Edmonston 麻疹ウイルスは、CD46, CD150 および Nectin4 レセプターを介して宿主細胞に感染する。癌標的麻疹ウイルスを構築するためには、ウイルス親和性を排除すること、そして新しい腫瘍特異的親和性を導入する二つのステ

ップが必要となる。そこで、H 蛋白への遺伝子変異の導入によって親和性を排除したウイルスは、すべての宿主細胞に感染することが不可能となる。これに対し、親和性の排除と同時に腫瘍特異的に結合するリガンドを導入したウイルスは、特定の標的分子を介して癌細胞にのみ感染することが可能となる。リガンドとしては、標的分子に対して高い特異性と親和性を併せ持つ一本鎖抗体 (single chain Fv: scFv) を使用することとした。この scFv は、抗体が抗原を認識するために必要な最小単位である VH(重鎖可変領域) および VL(軽鎖可変領域) から構成される可変領域 (Fv) を、フレキシブルなペプチドリンカーで結合した単鎖可変領域フラグメントである。我々の研究室に在籍した中村は、野生株とワクチン株のウイルス H 蛋白の遺伝子解析やリバースジェネティクス法を用いて、CD46 と CD150 レセプターの結合に関与するアミノ酸を同定している。これを基にして H 蛋白に点変異を導入し、乳癌幹細胞に高発現する標的分子 Y に結合する scFv を、リンカーとともに、この変異 H 蛋白の細胞外 C 末端に連結することとした。

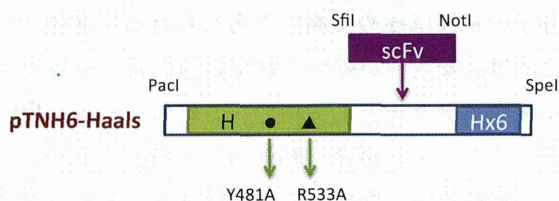


図 1. 麻疹ウイルス H 蛋白への遺伝子変異導入と一本鎖抗体導入による親和性の改変

抗 Y 一本鎖抗体については、平成 25 年度にヒト scFv を体外免疫法により作製し、マウス scFv を米国 Memorial Sloan-Kettering Cancer Center の Nai-Kong V. Cheung 博士より配列情報をいただき、それをもとに遺伝子合成して得ることができた。

最初に、ヒトおよびマウスの候補 scFv を麻疹ウイルス H タンパク質発現ベクター pTNH6-H (Nakamura ら, Nat. Biotech., 23:209, 2005) に

挿入し、これらのキメラ H 蛋白の中から、腫瘍標的麻疹ウイルスを構築するうえで、最適な変異の組み合わせをスクリーニングした。ウイルスレセプター陽性細胞に、H 蛋白と F 蛋白を発現するプラスミドをコトランスフェクションすると、細胞融合を誘導し、多核巨細胞を形成する。この特性を利用し、ウイルスレセプターである CD46、CD150 を発現する Vero 細胞、または標的分子である Y を発現する細胞株に、各キメラ H 蛋白と F 蛋白を発現させ、CD46、または CD150 発現 Vero 細胞ではなく、Y 発現細胞のみで細胞融合を示すものをスクリーニングした。

2. 麻疹ウイルスの作出 (レスキュー) と増殖
麻疹ウイルスのゲノム全長をコードするプラスミドから感染性ウイルスを作出する方法(リバースジェネティクス法)は確立されている。それゆえ、ワクチン株麻疹ウイルスの H 遺伝子を標的細胞融合キメラ H 遺伝子に変換すれば、腫瘍細胞特異的に感染するウイルスの作出が理論上可能となる。従来のリバースジェネティクス法によって作出される麻疹ウイルスは、その H 蛋白質の CD46 ウイルスレセプターへの吸着を介して、CD46 陽性 Vero 細胞 (アフリカミドリザル腎臓由来) で作出、増殖される。しかし、腫瘍標的麻疹ウイルスの場合は、H 蛋白に変異が導入され、CD46 レセプターに対する親和性を排除されているため、通常のリバースジェネティクス法はレスキュー、増殖させることはできない。この問題を解決させるため、H 蛋白にヒスチジンタグを挿入し、このタグを認識する偽レセプター分子を Vero 細胞に発現させる「スターシステム」を中村は開発している。ウイルスゲノムの H 遺伝子には、①CD46 および CD150 レセプターに対する親和性を排除するための二つのアミノ酸変異の導入、②標的分子 Y に結合する scFv をコードする遺伝子の挿入、③六つのヒスチジンタグ (Hx6) をコードする遺伝子の挿入が加えられている。スターシステムでは、腫瘍標的ウイルスが CD46 (および CD150) を認識するこ

とができなくても、ヒスチジンタグを介して Vero 細胞のためレセプター分子を吸着し、感染、増殖することが可能となる。

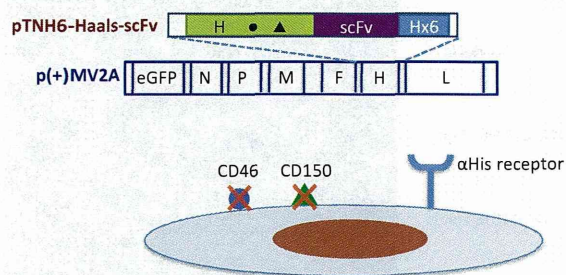


図 2. 腫瘍標的麻疹ウイルスの作出
組換え H 遺伝子を持つウイルスゲノムから、スターシステムによってウイルスがレスキューされる。

3. 乳癌幹細胞標的 RNAi のデザインと構築

RNA 干渉 (RNAi) 法とは、相補的な塩基配列をもつ遺伝子の機能を抑制する方法であり、これを応用した RNAi 医薬は次世代の分子標的治療として大きく期待されている。合成 small interfering RNA (siRNA) の導入では RNAi の効果が一過性である。RNAi の効果を高効率でかつ長期的に持続させることを期待するため、short hairpin RNA (shRNA) を麻疹ウイルスベクターに組み込み、細胞内へ導入する計画を立てた。通常、shRNA は核外に輸送されたのち Dicer によってループ配列が切断されて二本鎖 siRNA となり、RNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれ、RNAi の効果をもつと考えられている。しかしながら、麻疹ウイルスベクターは細胞質内でのみ増殖するため、Dicer による切断が期待できない。そこで、麻疹ウイルスベクターを用いた X-shRNA が RISC に取り込まれるために、リボザイム (Ribozyme) の配列を用いて shRNA が切断されるようにデザインすることにした。

リボザイムは、触媒作用をもつリボ核酸 (RNA) で、RNA 分子を特定の部位で切断したり、低分子の物質と結合させる働きを持つ。Cech らの発見以降、1987 年ころまでに多くの新しいタイプのリボ

ザイムが発見されているが、そのうちの一つに自己切断 RNA があり、その代表的なものとしてハンマーヘッド型またはヘアピン型リボザイムと呼ばれるものがある。この特性を利用して、X-shRNA を設計することとした。つまり、X-shRNA 配列の 5 末端側にハンマーヘッドリボザイム

(Hammerhead ribozyme: HHRz)、そして 3 末端側に D 型肝炎ウイルスリボザイム (Hepatitis delta virus ribozyme: HDVRz) を配する RNA を設計し、自己切断後に shRNA が放出され、RISC に取り込まれるようにするものである。

C. 研究結果

1. 乳癌幹細胞標的ウイルスの作製

麻疹ウイルスは、そのエンベロープの全面に、H (ヘマグルチニン又は血球凝集素) タンパク質と F (膜融合) タンパク質とがスパイク状に突起して存在する。麻疹ウイルスエンベロープタンパク質は、麻疹ウイルスとその細胞受容体との相互作用に関わり、特に H タンパク質が、細胞受容体に結合する性質を持ち、F タンパク質は、細胞膜との融合に関わる。

本研究では、麻疹ウイルス H タンパク質発現ベクターは pTNH6-H (Nakamura ら, Nat. Biotech., 23:209, 2005) を用い、F タンパク質発現ベクターは CAG プロモータ (cytomegalovirus early enhancer/ chicken β -actin promoter) の転写制御下にある F 遺伝子を発現させるプラスミド pCAG-T7-F を用いた。pCAG-T7 は、Niwa, H. ら、Gene 108: 193-199 (1991), Okuma, K. ら、Virology 254:235-244 (1999), Richard, S. B. ら、J. Virol. 77: 8962-8972 (2003) に記載されている。

4×10^4 の Vero, Vero/SLAM, U87 細胞を、 1.8×10^5 の MCF10A, CA1d 細胞を 24 穴クラスターの 1 ウェルに播種し、 $0.5 \mu\text{g}$ ずつの pTNH6-H および pCAG-T7-F を、非リボソームタイプのトランスフェクション試薬 FuGENE HD (Promega) により導入した。H/F タンパク質発現プラスミドをトランス

フェクトすると、細胞表面に発現した H/F タンパク質の作用により隣接する細胞との間で融合が起き、多核細胞（合胞体）が生じる。481 番目のアミノ酸をアスパラギンからアラニンに、533 番目のアミノ酸をアルギニンからアラニンに置換したキメラ蛋白は、CD46 または CD150 ではなく、標的分子に対する scFv を介した効率のよい標的細胞融合を示した。この結果から、細胞の表面には機能的な H/F タンパク質が発現していることが確認された。

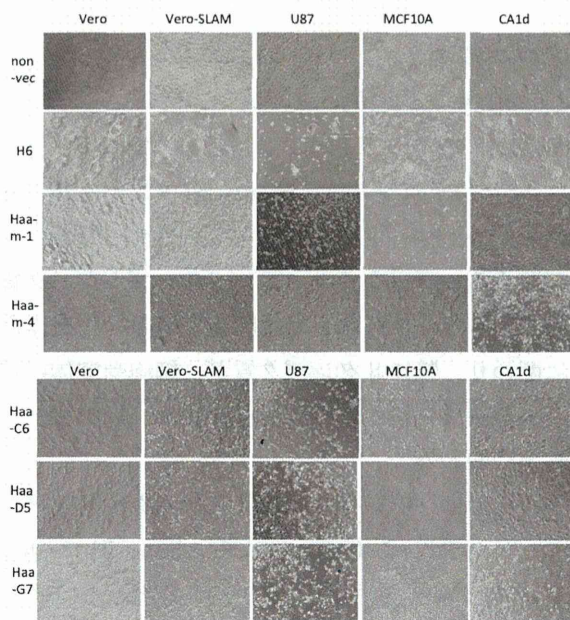


図 3 a. キメラ H 蛋白による標的細胞融合
キメラ H 蛋白と F 蛋白による多核巨細胞が標的分子 Y 発現細胞でみられた。

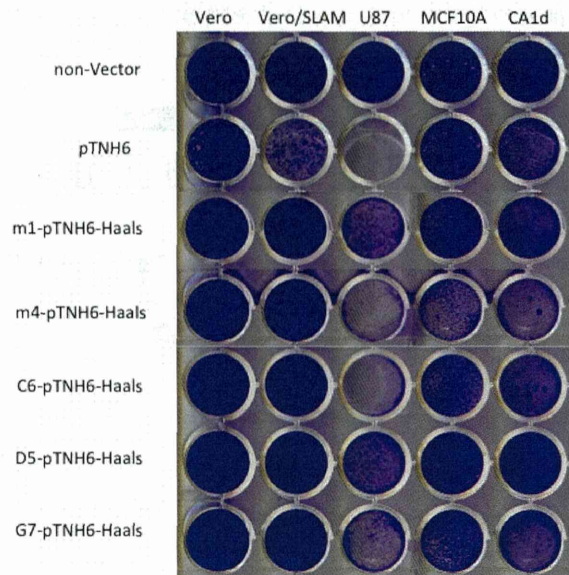


図 3 b. クリスタルバイオレット染色による生細胞数の判定

2. 乳癌幹細胞標的 RNAi のデザインと構築

X 遺伝子の発現阻害作用を介して、癌細胞の増殖を抑制するとともに、抗癌剤に対する感受性を増大させて抗癌剤により惹起される癌細胞のアポトーシスを増強する効果を目的に、X 遺伝子の発現を阻害する shRNA を麻疹ウイルスベクターに組み込み、細胞に感染させることによって、細胞内に遺伝子を導入する。

本研究代表である谷口は、X に対する複数の shRNA 配列候補を見出しており、その情報をもとに、麻疹ウイルスに組み込む発現プラスミドのコンストラクトを作成した。

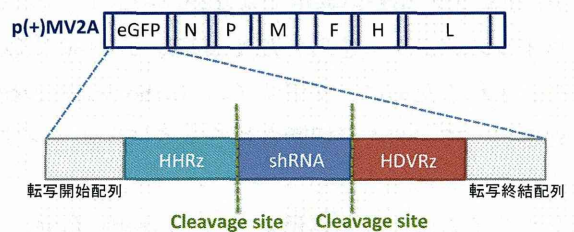


図 4. X-shRNA の構築デザイン

D. 考察

弱毒化した麻疹ウイルスワクチン株は強力な抗腫瘍活性を持っているが、本来の受容体が広範囲に分布しているため、完全に腫瘍特異的であるわけではない。このことから本研究では、単鎖抗体断片を提示することによって完全に標的を改めたウイルスの回収および伝播を可能とする擬似受容体システムを用いることにした。

昨年度作製した一本鎖抗体を麻疹ウイルスに組み込み、Y 発現乳癌細胞の標的化の可能性を検証したところ、元来のウイルス感染受容体を発現している正常細胞には何ら影響なく、標的とする Y 分子を発現している腫瘍細胞にのみ感染するウイルスベクターを構築することが可能であることが示された。

また、X 阻害に用いる shRNA の構築により、癌細胞の増殖を抑制することおよび癌細胞の抗癌剤感受性を増強する効果を検証し、実用化に向けた試験を実施する必要がある。

E. 結論

平成 24 年度において、本研究の治療標的として用いられる X と Y 両分子が乳癌において発現が高く、またこの二つの分子が癌幹細胞とされる細胞内に高発現していることが確認された。したがって、これら二分子を標的とすることで、高い治療効果が期待できる新規治療法の開発が可能と考えられた。

平成 25 年度は X をサイレンシングする shRNA の遺伝子配列を決定し、また、Y に対する一本鎖抗体についてヒトとマウスのものを作製した。

平成 26 年度は、作製した一本鎖抗体の標的化の可能性を検証した。また、X 阻害に用いる shRNA の構築を行い、乳癌幹細胞を標的とする遺伝子組換え麻疹ウイルスベクターの基盤を完成させた。本研究は、乳癌のための治療薬として安全に使用することができ、かつ高い治療効果が得られるものとして大いにその可能性が示唆されるが、臨床試験へ進むために、より多くの検証が必要である。引き続き、癌幹細胞を含む乳癌細胞の増殖抑制効

果および抗癌剤に対する感受性を高める効果を *in vitro* および *in vivo* において検証し、医薬品への応用を目指すものである。

特許出願を鑑み、治療標的分子二つを X と Y で表現させていただきましたこと、何卒ご了承ください。

F. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

- 1) Narusawa, M., Inoue, H., Sakamoto, C., Matsumura, Y., Takahashi, A., Inoue, T., Watanabe, A., Miyamoto, S., Miura, Y., Hijikata, Y., Tanaka, Y., Inoue, M., Takayama, K., Okazaki, T., Hasegawa, M., Nakanishi, Y., Tani, K. TLR7 ligand augments GM-CSF-initiated antitumor immunity through activation of plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Immunology Research*. 2(6), 568-580, 2014
- 2) Nii T, Marumoto T, Kawano H, Yamaguchi S, Liao J, Okada M, Sasaki E, Miura Y, Tani K. Analysis of essential pathways for self-renewal in common marmoset embryonic stem cells. *FEBS Open Bio*. 21; 4: 213-9, 2014
- 3) Yamaguchi, S., Marumoto, T., Nii T., Kawano, H., Liao, J., Nagai, Y., Okada, M., Takahashi, A., Inoue, H., Sasaki, E., Fujii, H., Okano, S., Ebise, H, Sato, T., Suyama, M., Okano, H., Miura, Y., Tani, K. Characterization of common marmoset dysgerminoma like tumor induced by the lentiviral expression of reprogramming factors. *Cancer Science*. 105(4), 402-408, 2014
- 4) Kummalue, T., Inoue, T., Miura, Y., Narusawa, M., Inoue, H., Komatsu, N., Wanachiwanawin, W., Sugiyama, D., Tani, K. Ribosomal protein L11 and retinol dehydrogenase 11 induced erythroid proliferation without erythropoietin in UT-7/Epo erythroleukemic cells. *Exp Hematol*. 2015 (in press)
- 5) Hamada, K., Shirakawa, T., Terao, S., Gotoh, A., Tani, K., Huang W. Biosafety studies of carrier cells infected with a replication-competent adenovirus introduced by IAI.3B promoter. *Mol Ther Meth Clin Develop*. 2015 (in press)

2. 学会発表

- 1) Takenobu Nii, Tomotoshi Marumoto, Saori Yamaguchi, Jiyuan Liao, Kenzaburo Tani (2014,

12/6-12/9). Improved Hematopoietic Differentiation of Primate Embryonic Stem Cells. The 56th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting, San Francisco, CA, USA.

2) Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Yumiko Matsumura, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani (2014, 11/7-11/8). The role of plasmacytoid dendritic cells in GM-CSF-based antitumor immunity. The 24th Hot Spring Harbor International Symposium, Fukuoka.

3) Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Miyako Sagara, Misoto Kai, Masaki Kuroda, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani (2014, 11/7-11/8). MicroRNA-targeted coxsackievirus B3 abrogates its pathogenicity retaining oncolytic activity.

4) Hiroyuki Inoue, Yuki Nakano, Beibei Wang, Shohei Miyamoto, Megumi Narusawa, Chika Sakamoto, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani (2014, 5/21-5/24). Coxsackievirus A11 possesses extensive oncolytic activity against human non-small cell lung cancer cells.

5) Beibei Wang, Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Yuki Nakano, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Coxsackievirus A11 displays remarkable oncolytic activity against oxaliplatin-resistant human colorectal cancer cells. The 17th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Washington DC, May 21-24, 2014

6) Miyako Sagara, Misoto Kai, Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Yuto Takishima, Kyosuke Kobayashi, Yuki Nakano, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani (2014, 5/21-5/24). Coxsackievirus B3 exhibits potent oncolytic activity against both human malignant pleural mesothelioma and triple-negative breast cancer cells. The 17th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Washington DC, USA.

7) Chika Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Megumi Narusawa, Yumiko Matsumura, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani (2014, 5/21-5/24). Therapeutic vaccination with irradiated GM-CSF gene-transduced cancer side population cells effectively suppress tumor growth and lung metastasis.

The 17th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Washington DC, USA.

8) Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Megumi Narusawa, Chika Sakamoto, Takafumi Hiramoto, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Tomoki Todo and Kenzaburo Tani (2014, 4/5-4/9). Therapeutic vaccination with GM-CSF gene-transduced iPS cells induces potent T cells-mediated antitumor immunity.

9) Yasuki Hijikata, Hiroyuki Inoue, Mutsunori Murahashi, Shinji Okano, Yoshihiro Tanaka, Atsushi Takahashi, Toshihiko Okazaki, Yoichi Nakanishi, Koji Yoshida, Takuya Tsunoda, Yusuke Nakamura, Kenzaburo Tani (2014, 4/5-4/9). A phase I clinical trial of RNF43 peptide-specific immune cell therapy combined with low-dose cyclophosphamide for patients with advanced solid tumors. The 105th Annual Meeting of American Association of Cancer Research, San Diego, CA, USA.

3. シンポジウム

1. Kenzaburo Tani (2014, 9/25-9/27).

Our immune and gene therapy trials towards conquering cancers.

第73回日本癌学会学術総会, 横浜.

2. Kenzaburo Tani (2014, 12/4-12/5).

シンポジウム1, 癌免疫療法の現状と展望.

第27回日本バイオセラピー学会学術集会総会, 大阪.

G. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

特記事項なし。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
長村文孝	FDAにおける抗がん剤の審査 医薬品／医療機器の承認申請書の上手な書き方・まとめ方		医薬品／医療機器の承認申請書の上手な書き方・まとめ方	技術情報協会	東京	2014	216-219
長村文孝	その他のがん	大木桃代	がん患者のところに寄り添うためにサイコオンコロジーの基礎と実践	真興交易(株)医書出版部	東京	2014	92-95
長村文孝	がん関連の臨床研究	大木桃代	がん患者のところに寄り添うためにサイコオンコロジーの基礎と実践	真興交易(株)医書出版部	東京	2014	114-117

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
Adachi Y, Ohashi H, Imusumran A, Yamamoto H, Matsunaga Y, <u>Taniguchi H</u> , Nosho K, Suzuki H, Sasaki Y, Arimura Y, Carbone DP, Imai K, Shinoumura Y.	The effect of IGF-I receptor blockade for human esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma.	<i>Tumor Biol</i> ,	35(2)	973-985	2014

Yamamoto H, Watanabe Y, Maehata T, Morita R, Yoshida Y, Oikawa R, Ishigooka S, Ozawa S, Matsuo Y, Hosoya K, Yamashita M, <u>Taniguchi H</u> , Nosho K, Suzuki H, Yasuda H, Shinomura Y, Itoh F.	An updated review of gastric cancer in the next-generation sequencing era: insights from bench to bedside and vice versa.	<i>World J Gastroenterol</i>	20	3927-3937	2014
Kato N, Yamamoto H, Adachi Y, Ohashi H, <u>Taniguchi H</u> , Suzuki H, Nakazawa M, Kaneto H, Sasaki S, Imai K, Shinomura Y.	Cancer detection by ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 methylation in pancreaticobiliary fluids.	<i>World J Gastroenterol</i>	19(11)	1718-1727	2013
Ohashi K, Nagamura-Inoue T, <u>Nagamura F</u> , Tojo A, Miyamura K, Mori T, Kurokawa M, Taniguchi S, Ishikawa J, Morishima Y, Atsuta Y, Sakamaki H.	Effect of graft sources on allogeneic hematopoietic stem cell transplantation outcome in adults with chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitors: a Japanese Society of Hematopoietic Cell Transplantation retrospective analysis.	<i>Int J Hematol</i>	100	296-306	2014
長村文孝	トランスレーショナルリサーチの重要性	病院	73(7)	540-544	2014
H. -J. Kim, <u>N. Nishiyama</u> , <u>K. Kataoka</u> , et al.	Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles.	<i>ACS Nano</i>	8 (9)	8979-8991	2014
Y. Maeda, <u>N. Nishiyama</u> , <u>K. Kataoka</u> , et al.	Fine-tuning of charge-conversion polymer structure for efficient endosomal escape of siRNA-loaded calcium phosphate hybrid micelles.	<i>Macromol. Rapid Commun.</i>	35 (13)	1211-1215	2014

Y. Oe, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Actively-targeted polyion complex micelles stabilized by cholesterol and disulfide cross-linking for systemic delivery of siRNA to solid tumors.	<i>Biomaterials</i>	35(27)	7887-7895	2014
Keira Y, Takasawa A, Hirata K, et al.	An immunohistochemical marker panel including claudin-18, maspin, and p53 improves diagnostic accuracy of bile duct neoplasms in surgical and presurgical biopsy specimens.	<i>Virchows Arch.</i>	466卷3号	265 ~ 277	2015
Mizuguchi T, Torigoe T, Hirata K. et al.	Trials of vaccines for pancreatic ductal adenocarcinoma: Is there any hope of an improved prognosis?	<i>Surg Today.</i>		Review Article	2015
Tanaka T, Okuya K, Hirata K et al.	Heat shock protein 90 targets a chaperoned peptide to the static early endosome for efficient cross-presentation by human dendritic cells.	<i>Cancer Sci.</i>	106卷1号	18 ~ 24	2015
Ota D, Kanayama M, Hirata K, et al.	Tumor- $\alpha 9\beta 1$ integrin-mediated signaling induces breast cancer growth and lymphatic metastasis via the recruitment of cancer-associated fibroblasts.	<i>J Mol Med (Berl).</i>	8卷5号	1271 ~ 1281	2014
Furuhata T, Hirata K, Wakao F, et al.	Questionnaire survey for the development and publication of cancer clinical practice guidelines in Japan.	<i>Int J Clin Oncol.</i>	19卷5号	771 ~ 778	2014
Iyama S, Sato T, Hirata K, et al.	Efficacy of Enteral Supplementation Enriched with Glutamine, Fiber, and Oligosaccharide on Mucosal Injury following Hematopoietic Stem Cell Transplantation.	<i>Case Rep Oncol.</i>	7卷3号	692 ~ 699	2014