

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モリコンピ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がプラスミノーゲ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、厚労科研究（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。

Surv.m-CRA の臨床化実現

m-CRA と癌幹細胞のオリジナルの基盤技術の開発

「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
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**

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。

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。

「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。

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。

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、確認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、検証してあるところである。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きた。

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 腫瘍形成能を関与する新規 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 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。

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。

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と、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(前衛)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

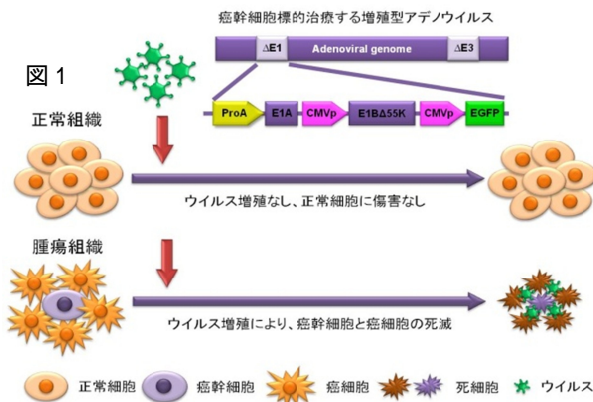
癌幹細胞とは転移や腫瘍形成能が高く、また様々な抗がん剤や放射線療法に抵抗性を示すため癌再発の原因であり、癌が難治性について、今後は癌幹細胞を標的とした治療法の開発が必須である。しかし、癌幹細胞を同定、標的治療する技術は未だ開発されていない。遺伝子治療、あるいは増殖型ウイルスを使った癌幹細胞の治療という研究も未だ報告されていない。

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, Komiyama 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+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 (2013.10)

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、各国で臨床試験が開始しており、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- α) 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- β 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- α 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- α decreases VEGF secretion in highly polarized RPE cells but increases it in non-polarized RPE cells related to crosstalk between JNK and NF- κ 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に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の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。

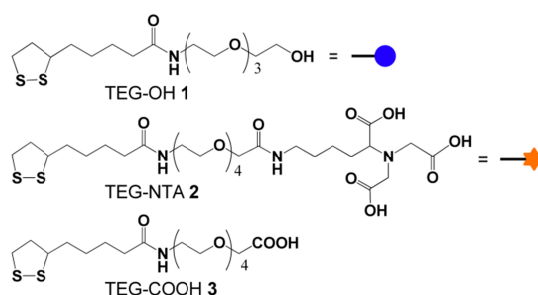


図1. FNPの調製に使用したコーティング剤

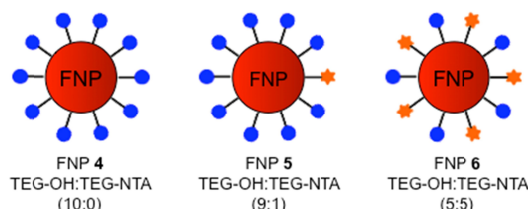


図2. 調製したFNP

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^[1]とS1TA3^[2]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^[3]、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^[4]。そこで本研究では、上記の

2つの方法について検討した(図3)。前者の方法では、FNP 4 とそれぞれの scFv を混合し、超遠心分離を行って FNP 沈殿画分を回収し、S1TSCFR3-1 を固定化した scFv-FNP 4a と S1TA3 を固定化した scFv-FNP 4b を得た。一方、後者の方法では、FNP に 5 または 6 を用い、塩化ニッケルで処理後、それぞれの scFv を作用させ、S1TSCFR3-1 を固定化した scFv-FNP 5a、6a と S1TA3 を固定化した scFv-FNP 5b、6b を得た。scFv の固定化は、SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングを行って、沈殿画分に scFv 由来のバンドが見られることで確認した(図4)。

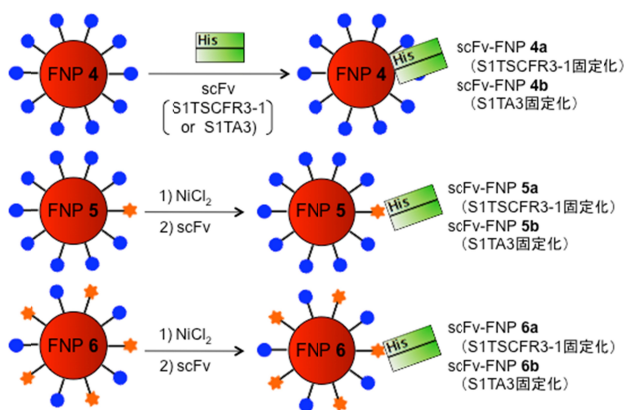


図3 . scFv-FNP の調製

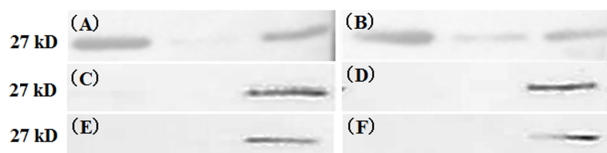


図4 調製した scFv-FNP のウェスタンブロッティング。(A) scFv-FNP 4a、(B) scFv-FNP 4b、(C) scFv-FNP 5a、(D) scFv-FNP 5b、(E) scFv-FNP 6a、(F) scFv-FNP 6b。左から上清画分1、上清画分2、沈殿画分。

1-4 scFv-FNP の細胞結合性解析

ATL細胞への scFv-FNP の結合性はフローサイトメトリー (FACS) と共焦点顕微鏡による細胞の蛍光観察により解析した(図5)。細胞は ATL 細胞株である S1T 細胞および非 ATL 細胞株である CEM 細胞を使用した。遠心分離で細胞画分を回収し懸濁した後、scFv-FNP を加えて 4 °C で 30 分インキュベートした。遠心分離後、PBS で洗浄して FACS または蛍光観察により解析を行った。

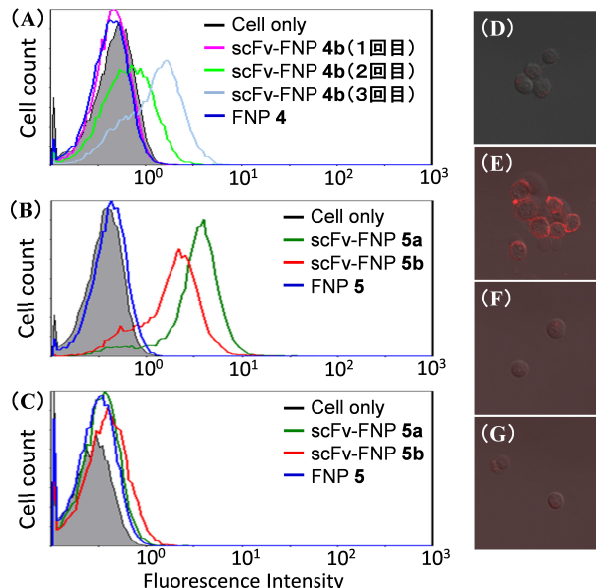


図5 .FACS 解析 (A) S1T 細胞に対する scFv-FNP 4b の結合性、(B) S1T 細胞に対する scFv-FNP 5a、5b の結合性、(C) CEM 細胞に対する scFv-FNP 5a、5b の結合性。共焦点顕微鏡解析による細胞観察 (オーバーレイ画像) Ex. 488 nm; (D) S1T 細胞、(E) scFv-FNP 5b を加えた S1T 細胞、(F) CEM 細胞、(G) scFv-FNP 5b を加えた CEM 細胞。

C 研究結果および

D 考察

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(図5A)。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(図5B、E) 非 ATL 細胞である CEM 細胞には結合性を示さなかった(図5C、G)。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。

E 結論

本研究で調製した NTA-ニッケル-His タグ結合を介した scFv-FNP は ATL 細胞に特異的に結合した。今後、低毒性の金属で構成されたナノ粒子を用いた scFv-FNP の開発と、これらを用いた ATL 診断薬・プローブとして応用を図る。

参考文献

1. 佐藤綾香, 鹿児島大学理工学研究科修士論文, 2013.
2. S. Muraoka, et al. J. Biochem. 2009, 145(6), 799-810.
3. U Loi Lao, et al. J. AM. CHEM. SOC. 2006, 128, 14756-14757.
4. Chenjie Xu, et al. J. AM. CHEM. SOC. 2004, 126, 3392-3393

F 健康危険情報

G 研究発表

1. 論文発表

○Shinchi,H., Wakao,M., Nagata,N., Sakamoto,M., Mochizuki, E., Uematsu,T., Kuwabata,S., Suda,Y., Cadmium-Free Sugar-Chain-Immobilized Fluorescent Nanoparticles Containing Low-Toxicity ZnS-AgInS₂ Cores for Probing Lectin and Cells, Bioconj. Chem. 2014, 25, 286–295

Mbanefo EC, Kikuchi M, Huy NT, Shuaibu MN, Cherif MS, Yu C, Wakao M, Suda Y, Hirayama K., Characterization of a gene family encoding SEA (sea-urchin sperm protein, enterokinase and agrin)-domain proteins with lectin-like and heme-binding properties from Schistosoma japonicum. PLoS Negl. Trop. Dis., 2014 Jan 9;8(1):e2644.

Hashimoto M, Obara K, Ozono M, Furuyashiki M, Ikeda T, Suda Y, Fukase K, Fujimoto Y, Shigehisa H., Separation and characterization of the immunostimulatory components in unpolished rice black vinegar (kurozu). J. Biosci. Bioeng., 2013 Dec;116(6):688-96

Mbanefo EC, Kikuchi M, Huy NT, Shuaibu MN, Cherif MS, Yu C, Wakao M, Suda Y, Hirayama K., Characterization of a gene family encoding SEA (sea-urchin sperm protein, enterokinase and agrin)-domain proteins with lectin-like and heme-binding properties from Schistosoma japonicum. PLoS Negl. Trop. Dis., 2014 Jan 9;8(1):e2644.

Fujimoto Y, Mitsunobe K, Fujiwara S, Mori M, Hashimoto M, Suda Y, Kusumoto S, Fukase K., Synthesis and biological activity of phosphoglycolipids from Thermus thermophilus. Org. Biomol. Chem., 2013 Aug 14;11(30):5034-41.

Kodama Y, Okamoto Y, Nishi J, Hashiguchi S, Yamaki Y, Kurauchi K, Tanabe T, Shinkoda Y, Nishikawa T, Suda Y, Kawano Y., Ramsay Hunt syndrome in a girl with acute lymphoblastic leukemia during maintenance therapy. J Pediatr Hematol Oncol. 2013 Jul;35(5):e224-5.

2. 学会等発表

新地浩之、結城伸泰、石田秀治、石田秀治、石田秀治、若尾雅広、隅田泰生、「糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子を用いたギラン・バレー症候群の簡易診断法」B06、発表、5 / 1 8 14:00、佐賀大学本庄キャンパス 農学部、平成 25 年度日本生化学会九州支部会例会、2013 年 5 月 18 日 -19 日

Yasuo Suda “Sugar-chain immobilized nano-particles for clinical diagnosis of HIV/Flu” June 4 , FBPS 2013 Tenth International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers ,Vancouver, Canada, June 3-6, 2013

若尾雅広、新地浩之、永田野々香、坂本雅弥、望月衛子、上松太郎、桑畑進、隅田泰生、糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子を用いた相互作用解析、0-29 10:45 ~ 11:00、6 月 21 日発表、日本ケミカルバイオロジー研究会 第 8 回年会 平成 25 年 6 月 19 日 (水) ~ 21 日 (金) 東京医科歯科大学

隅田泰生、西順一郎、村上直樹、中嶋一彦、青山和枝、横山理沙、大園まみ、永友真実、糖鎖固定化金ナノ粒子を用いた唾液中インフルエンザの高感度診断、6月29日発表、第27回インフルエンザ研究者交流会 2013年6月28日(金)~30日(日)、北海道大学 大学院獣医学研究科 講堂

○Shinchi H, Yuki N, Ishida H, Hirata K, Wakao M, Suda Y, 143-Quick and convenient diagnostic method for Guillain-Barré syndrome using sugar-chain immobilized fluorescent nano-particles, June 24, Glyco22, Dalian, China, June23-28, 2013

新地浩之、結城伸泰、石田秀治、平田幸一、若尾雅弘、隅田泰生、ガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子を用いたギラン・バレー症候群簡易診断法、P-074、8月6日発表、ポスター発表、第32回日本糖質学会年会、平成25年8月5日(月)~7日(水)、大阪国際交流センター

大和田尚、松本千恵子、隅田泰生、篠原直也、蕎麦田理恵子、金子萌、内田茂治、佐竹正博、田所憲治、E型肝炎ウイルス(HEV)関連蛋白について、その化学ウイルス学的検討、日本ウイルス学会学術集会、11月11日発表、平成25年11月10日~12日、神戸国際会議場

隅田泰生、糖鎖とナノバイオテクノロジーを用いたウイルスの高感度検査診断システム、平成25年11月11日、金沢医科大学病院、本館4階、C42 講義棟(依頼講演)

隅田泰生、第23回WSフォーラム タンパク質・ペプチド研究の現状と展望、糖鎖に基づくバイオナノテクノロジーによるウイルス感染症の早期診断法開発、平成25年11月29日、九州大学箱崎キャンパス中央図書館視聴覚室ホール4階

H 知的財産権の出願・登録状況

特許出願

PCT/JP2014/056073(2014/3/7)、免疫性末梢神経障害症由来抗体を認識する組成物とその利

用;隅田泰生、若尾雅弘、石田秀治、結城伸泰;株式会社スティックスバイオテック、国立大学法人鹿児島大学、国立大学法人岐阜大学

特許取得

カナダ特許 2,556,406(2013/4/2)糖鎖リガンド複合体、およびそのリガンド複合体を用いたタンパク質の分析方法;独立行政法人科学技術振興機構、国立大学法人 鹿児島大学

日本特許 5278992(2013/5/31)生体関連物質と糖鎖との相互作用の測定方法、生体関連物質の糖鎖選択性の評価方法、生体関連物質のスクリーニング方法、および生体関連物質のパターニング方法、並びにこれらの方法を実施するためのキット;独立行政法人科学技術振興機構、国立大学法人 鹿児島大学、隅田泰生

日本特許 5339310(2013/08/16)糖鎖リガンド複合体、およびそのリガンド複合体を用いたタンパク質の分析方法;独立行政法人科学技術振興機構、国立大学法人 鹿児島大学

カナダ特許 2,591,496(2014/4/)生体関連物質と糖鎖との相互作用の測定方法、生体関連物質の糖鎖選択性の評価方法、生体関連物質のスクリーニング方法、および生体関連物質のパターニング方法、並びにこれらの方法を実施するためのキット;独立行政法人科学技術振興機構、隅田泰生

2. 実用新案登録
該当なし。

3. その他

2011年9月14日 日本経済新聞

「唾液でHIV検出 鹿児島大発ベンチャー 初期段階で発見」

2013年7月17日 MBC ニュースNOW放送

「唾液でウイルス検出、隅田泰生教授」

2013年11月13日 TBS Nスタ放送

2014年1月27日 毎日新聞

「インフル 唾液から検出する新技術 従来より精
度 50 万倍」

2014 年 1 月 27 日 毎日新聞

「インフルエンザ 唾液でチェック 鹿児島の本
チャー、5 年以内の実用化目指す」

2014 年 2 月 2 日 南日本新聞

「唾液でインフル検査 鹿児島大学発の本チャー
が検出法、年内治験へ」

幹細胞生物学での技術開発と解析

研究分担者 國貞隆弘 岐阜大学大学院医学系研究科・教授

《研究要旨》

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てその効果を最終確認する必要がある。しかし、安定したがん幹細胞株の樹立はいまだに困難であり、現在までに脳腫瘍患者組織から樹立され安定に維持されているものは少ない。このような困難を克服するために、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。

A. 研究目的

小児らにより開発が進められている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てその効果を最終確認する必要がある。我々はこれまでの本事業の成果として日本人の悪性脳腫瘍組織から自己複製能を有し、二次腫瘍を形成する元となるがん瘍幹細胞を単離した。しかし、安定したがん幹細胞株の樹立は困難であり、現在までに40以上の脳腫瘍患者組織から3株のみが樹立後も安定に維持されているにすぎない。このような困難を克服するために、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た。様々な遺伝的背景を持つ日本人由来 iPS からがん幹細胞を誘導することで、治療に最適なモデル系が提供できる。

B. 研究方法

岐阜大学医学部では、2005年より、若年者を中心に親知らずの歯髄幹細胞(DPSC)を収集している。2013年12月までに、約300人分の細胞を培養し、凍結保存した。その中で、iPS細胞誘導に関する同意が得られた200人について、山中因子を発現するレトロウイルスベクターあるいは細胞のゲノムに組み込まれにくいプラスミドベクターを用いてiPS細胞を誘導した（現在15人分程度）。その中には、日本人人口の約20%以上に移植可能であると予測されている主要HLAローカスホモ細胞が3株含まれてい

る。さらに、これまでのiPS細胞の誘導実験のデータを調べ、歯が完成する20歳前後を境に、iPS細胞誘導効率に差があることが確認され、若年齢層（CCおよびRFステージ）と成人層（RCステージ）の親知らずから得られた複数の細胞ラインを用いて遺伝子発現比較をおこない、若年齢層で高発現している遺伝子をunpaired t-testによって、統計学的に抽出した。これらの遺伝子はiPS細胞の誘導に関わる新規遺伝子である可能性があり、既知のリプログラミング因子とともに歯髄細胞に導入して確認した。

C. 研究結果

歯髄細胞に導入したところ、そのうちのひとつ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。

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。

D. 考察

抜歯された親知らずは、医療機関において医療廃棄物として処分されている。岐阜大学において収集されたヒトDPSCは特に再生治療に有用なHLAハプロタイプホモDPSCを含めて遺伝子改変を伴わない誘導法によってiPS細胞に誘導可能であることが確認され、iPS細胞を用いた再生医療の実用化に不可欠なiPS細胞バンクの構築をおこなう際の有用なリソースとなることが示された。

iPS細胞は生体に移植するとテラトーマ(異形腫)を形成するという意味ではがん細胞であり、事実iPS細胞に由来するクローン動物には様々な頻度で悪性腫瘍が出現する。今後、再生医療にも治療可能な日本人由来のiPS細胞を、HLA等を指標に個人別に分類し、将来確立される可能性が高いiPS細胞からの確実な腫瘍幹細胞誘導法を利用して、腫瘍幹細胞の治療を初めとした様々な治療モデルを確立することが可能であろう。

さらに、m-CRAベクターの有効性や安全性を患者個人の様々な細胞を用いて検討する際の細胞のソースとして患者と同様の遺伝的バックグラウンドを持つiPS細胞から分化誘導した細胞を用いることで、m-CRAベクターを用いたがんの遺伝子治療に直接貢献することが可能であろう。

E. 結論

再生治療に有用なHLAハプロタイプホモDPSCを含めて、DPSCがゲノム遺伝子への組み込みを伴わない誘導法によって従来の方法で誘導されたものと同等のiPS細胞に誘導可能であることが確認され、iPS細胞を用いた再生医療の実用化に不可欠なiPS細胞バンクの構築をおこなう際の有用なリソースとなることが示された。

iPS細胞の誘導効率の個体差を担う因子の発見はiPS細胞の効率的な樹立に役立つとともに、再生

能力の個体差を説明し、克服する有力な手段に発展する可能性がある。

m-CRAベクターの有効性や安全性を患者個人の様々な細胞を用いて検討する際の細胞のソースとして、患者自信の歯髄細胞から誘導したiPS細胞とともに、我々の細胞コレクションから選別した患者と同様の遺伝的背景を持つ他人のiPS細胞から分化誘導した細胞を用いることも、m-CRAベクターを用いたがんの遺伝子治療に貢献すると考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

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. *EWS/ATF1* expression induces sarcomas from neural crest-derived cells in mice. *J. Clin. Invest.* 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. *J Dent Res.* 92, 905-910, 2013.

H. 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

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

研究分担者 近藤 亨 北海道大学遺伝子病制御研究所・教授

《研究要旨》

自己複製能、腫瘍形成能、抗がん剤・放射線療法耐性能を有するがん幹細胞は、がん治療の重要な標的であり、その性状解析を通じた治療標的の同定は新規がん根治療法の創出に繋がると期待されている。しかし、がん幹細胞の精製は未だ難しく、私たち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ている。本年度は、mGIC と昨年度までに樹立したヒト GBM 浮遊細胞塊（hGIC）を用いて、新規 GIC 特異的マイクロ RNA（miRNA）群の同定とそれらの機能解析を行った。

A. 研究目的

腫瘍に存在するがん幹細胞は、幹細胞能力・腫瘍形成能・治療抵抗性を有する。このためがん幹細胞を性状解析し治療標的を同定することは、新規がん根治療法の創出に繋がる。私たちは試験管内でがん幹細胞の作製を試み、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）。

本研究では、新規 GIC マーカー・治療標的の同定を目的として、GIC 腫瘍形成能を関与する新規 miRNA 群の同定を試みた。

B. 研究方法

DNA マイクロアレイを用いて、mGIC、hGIC および正常 NSC で発現している miRNA の網羅的な解析を行い、GIC で発現が増減する miRNA 群を同定した。抽出した候補 miRNA について、その強制発現による GIC への影響（細胞増殖・細胞死・運動能・腫瘍形成能）を検討した。

本研究は、北海道大学遺伝子組換え実験、動物実験、ヒト試料を用いた研究に関する倫理審査会の承認を得て遂行した。

C. 研究結果

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。

D. 考察

本研究では GIC-miRNA1 を含めた複数の抗腫瘍効果が期待できる miRNA を同定しており、今後 m-CRA に組み込むことにより新規抗癌作用を有する世界初の組換えアデノウイルスの創出が可能と考えられる。また、本研究で抽出した miRNA 群が他腫瘍にも有効であるかどうかの検討は非常に重要である。

E. 結論

人工 GIC とヒト GBM サンプルを用いて、GBM に有効な GIC-miRNA を同定し、その分子メカニズムを明らかにした。

F . 健康危険情報

G . 研究発表

1. 論文発表

GIC-miRNA1 abolishes tumorigenesis of glioblastoma-initiating cells by inhibiting a

cellular matrix remodeling factor.

Yamashita et al, Submitted.

2. 学会発表

Investigation of miRNAs involved in gliomagenesis. Anticancer Drugs 2013, Stockholm Sweden, August 2013

H . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許出願

グリオーマ形成阻害作用を有する microRNA 出願番号2013-238279

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 Tsuyama S	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> , 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.	<i>Clin Breast Cancer</i>	13(6)	465-70	2013
<u>Ijichi N</u> , Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S	FOXP1 and estrogen signaling in breast cancer.	<i>Vitam Horm</i>	93	203-12	2013

Nakamura S, Nagan o S, Nagao H, Ishi dou Y, Yokouchi M, Abematsu M, Ya amamoto T, <u>Komiya</u> <u>a S</u> , <u>Setoguchi T</u>	Arsenic trioxide prevent s osteosarcoma growth by inhibition of GLI tr anscription via DNA da mage accumulation.	<i>PLoS One</i>	8(7)	e69466	2013
Imamura K, Maeda S, Kawamura I, Ma atsuyama K, Shinoh ara N, Yahiro Y, N agano S, <u>Setoguchi</u> <u>T</u> , Yokouchi M, Ish idou Y, <u>Komiya S</u> .	Human Immunodeficien cy Virus Type 1 Enhanc er-binding Protein 3 Is Essential for the Expre ssion of Asparagine-link ed Glycosylation 2 in t he Regulation of Osteo blast and Chondrocyte Differentiation.	<i>J Biol Chem</i>	289(14)	9865-79	2014
Kakoi H, Maeda S, Shinohara N, Mats uyama K, Imamura K, Kawamura I, Na gano S, <u>Setoguchi</u> <u>T</u> , Yokouchi M, Ish idou Y, <u>Komiya S</u>	Bone Morphogenic Prot ein (BMP) Signaling U p-regulates Neutral Sphi ngomyelinase 2 to Supp ress Chondrocyte Matur ation via the Akt Protei n Signaling Pathway as a Negative Feedback Mechanism.	<i>J Biol Chem</i>	289(12)	8135-50	2014
<u>Natsugoe S</u> , Arigami T, Uenosono Y, Yanagita S, Nakajo A, Matsumoto M, Okumura H, Kijima Y, Sakoda M, Mat saki Y, Uchikado Y, Mori S, Maemura K, Ishigami S	Lymph node micrometa stasis in gastrointestinal tract cancer--a clinical aspect.	<i>Int J Clin Oncol</i>	18(5)	752-61	2013
Uenosono Y, Ariga mi T, Kozono T, Ya nagita S, Hagihara T, Haraguchi N, Matsushita D, Hirat a M, Arima H, Fun asako Y, Kijima Y, Nakajo A, Okumur a H, Ishigami S, H okita S, Ueno S, <u>N</u> <u>atsugoe S</u>	Clinical significance of circulating tumor cells i n peripheral blood from patients with gastric c ancer.	<i>Cancer</i>	119(22)	3984-91	2013

Shinchi H, Wakao M, Nagata N, Sakahimoto 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, Semikawa K, Watanabe A, Moritake H, Shiozawa S, <u>Kunisada T</u> , 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, <u>Kunisada T</u> , Shibata T, Tezuka K.	Hypoxia-enhanced derivation of iPSCs from human dental pulp cells.	<i>J Dent Res</i>	92	905-910	2013