

戦略的創造研究推進事業
発展研究（SORST）

研究課題

「腫瘍血管を選択的に破壊する
新しい遺伝子治療法の開発」

研究期間：平成13年3月1日～平成15年3月31日

研究代表者

高橋 克仁

大阪府立成人病センター 部長

1 . 研究実施の概要

がんによる血管新生の誘導を抑制するか、あるいは形成されつつある血管を破壊することができれば、画期的ながん治療法になる。これまでのがん血管新生抑制療法に関する国内外の研究は、すべて血管内皮細胞を標的としているため、血管新生の初期段階を抑制する効果はあるものの、実際の臨床の場で治療対象となる、ある程度の大きさをもったがんを退縮させる効果には乏しい。持続的で強力な抗がん作用を得るためには、内皮細胞の抑制に加えて、平滑筋細胞の遊走や増殖を抑制することにより血管の成熟をも抑制する必要がある。研究代表者らは、血管平滑筋のマーカであるカルポニン遺伝子を発見し、分子生物学的な研究を行ってきた。本研究の目的は、がん血管に選択性をもつ新しい1型単純ヘルペスウイルス (HSV-1)変異体を開発し、多様な固形がんに応用可能ながん治療法を開発することである。このウイルスは、平滑筋細胞特異的なカルポニンプロモーターによって制御される複製能をもち、増殖しつつある血管平滑筋細胞を選択的に破壊する。さらにカルポニンプロモーターの制御下に種々の治療遺伝子を搭載することが可能である。本研究は、全く新しい概念に基づくがん血管抑制遺伝子療法であり、世界的にみてもこれまで試みられたことのない極めて独創的なアプローチである。

ヒトカルポニン遺伝子の平滑筋特異的なプロモーター領域を、HSV-1 ウイルスの複製開始に必須な転写因子をコードする *ICP4* 遺伝子上流に挿入し、さらにその上流に標識遺伝子 *lacZ* を、*ICP4* の下流に Internal Ribosomal Entry Site (IRES)-EGFP を連結した相同組換えベクター-pKX2βG3 を構築した。この DNA 断片を *ICP4* 欠失 HSV 変異体 *d120* の Ribonucleotide reductase (*RR*, *UL39*)-locus に相同組み換え法を用いて挿入し、*ICP4* と *RR* の二重欠失変異体を作製した (*d12.CALP RR*)。この HSV 変異体が、カルポニン遺伝子を発現しかつ活発に増殖している細胞すなわち増殖平滑筋に感染すると細胞由来の *RR* を利用して増殖可能で、細胞溶解活性を示すことを検証した。また、この内在性の TK をもつ新規 HSV-1 変異体の ganciclovir 感受性を確認した。ヌードマウス静脈内投与後の生体内分布の解析では、24 時間でほぼ血中から消失し、脳、肝、肺、脾組織からは複製可能なウイルスは回収できなかった。また、血液生化学検査では、*d12.CALP RR* の静脈内投与は肝・腎機能、糖・脂質代謝に影響を及ぼさなかった。続いて、ヌードマウスの両側背部皮下にヒト平滑筋肉腫細胞を異種移植し、その片側 (右側) に *d12.CALP RR* を注入したところ、投与後 8 日目に反対側 (左側) の異種移植片に出血がおり、腫瘍が縮小した ($n=4$)。この実験で用いた平滑筋肉腫は、*d12.CALP RR* が腫瘍細胞自体を破壊しないことを *in vitro* の感染実験で確認して

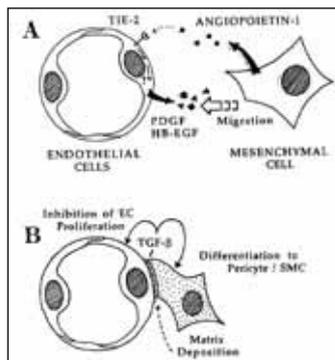
いるので、腫瘍の退縮は対側の腫瘍に血行性に到達した d12.CALP RR が腫瘍内血管を傷害したものと考えられた。一方、腫瘍と接する正常血管の平滑筋細胞には、細胞傷害を認めなかった。また、ヌードマウスの皮下に移植したマウス Lewis 肺がんに対して d12.CALP RR を 1 回尾静脈内に注入したところ、広範な腫瘍細胞の壊死を認めた。

腫瘍血管破壊作用をもつ次世代のがん治療薬 d12.CALP RR を開発した。現在 PCT 出願中であるが、知的所有権を取得できる見込がある。今後、腫瘍血管破壊作用の有効性と安全性をさらに検討し、d12.CALP RR の GMP (Good Manufacturing Practices) レベル精製を経て臨床応用を目指したい。

2 . 研究構想

病理学者は 100 年以上も前から、ほとんどの固形がんには血管が豊富にあることを観察してきた。がんの薄片をウサギの前眼房の中に浮遊させて増殖過程を研究していた Folkman と Gimbrone は、興味深い現象を見つけた。浮遊状態にあるがんには前眼房中の液体から栄養が供給されるが、直径数 mm 以上には大きくなれず、休眠腫瘍の状態にとどまっていた。ところががんを虹彩に移植すると、血管が形成され、がんは急激に増大した。この発見は、がんによる血管新生の誘導を抑制するか、あるいは形成されつつある血管を破壊することができれば、画期的ながん治療法になることを示唆していた。

血管は一層の内皮細胞とそれを囲む平滑筋細胞によって構成される。血管内皮増殖因子(VEGF)存在下で増殖する内皮細胞からなる新生初期の血管は、やがて血管平滑筋細胞が血小板由来増殖因子(PDGF)に応答して遊走、増殖し、内皮の周りを取り囲むことにより成熟血管になる(図1)。PDGF またはその受容体 PDGF-β のノックアウトマウスでは、内皮細胞の周りへの血管平滑筋細胞の動員が阻害され、脆弱な血管になることが報告されている。周囲に平滑筋をもたない未熟な血管は、VEGF を除去するとアポト-シスに陥り、消退することが報告されている。



[図1、Folkman et al. 1996]

がん血管新生抑制療法に関する国内外の研究は、米国の Folkman らによる、アンジオスタチンやエンドスタチン、我が国では中村らによる、肝細胞増殖因子の分子内断片である NK4 が報告されている。米国の Cheresch らは、内皮細胞の表面でインテグリンを阻害するペプチドの血管新生抑制作用を報告した。また、VEGF 抗体や可溶性 VEGF 受容体、さらに、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害因子を用いた内皮細胞の抑制も報告されている。これらのアプローチはすべて血管内皮細胞を標的としているため、血管新生の初期段階を抑制する効果はあるものの、実際の臨床の場で治療対象となる、ある程度の大きさをもったがんを退縮させる効果は乏しい。これは、がんの増大とともに、平滑筋細胞を伴った成熟血管が形成されるため、内皮細胞だけを抑制してもがん血管を破壊することができないためと考えられる。

したがって、持続的で強力な抗がん作用を得るためには、内皮細胞の抑制に加えて、平滑筋細胞の遊走や増殖を抑制することにより血管の成熟をも阻害することが必要である。実際、PDGF 受容体阻害作用をもつ SU6668 (SUGEN) や STI-571 を VEGF 阻害剤と併用すると強力ながん血管新生抑制作用をもつことが、最近米国で報告された。しかし、SU6668 は FGF や VEGF 受容体の阻害作用、STI-571 は c-Kit 阻害作用をも合わせもつ薬剤で、血管への選択性はなく副作用の懸念もある。

研究代表者らは、血管平滑筋のマーカであるカルポニン遺伝子を発見し、分子生物学的な研究を行ってきた。本研究の構想は、がん血管を選択的に破壊する新しい 1 型単純ヘルペスウイルス (HSV-1) 変異体を開発し、多様な固形がんに応用可能ながん治療法を開発することである。このウイルスは、平滑筋細胞特異的なカルポニンプロモーターによって制御される複製能をもち、増殖する血管平滑筋細胞を選択的に破壊する。さらに、このウイルスは、血管内皮細胞の増殖を抑制する可溶性 VEGF 受容体遺

伝子などの外来遺伝子を同プロモーターの制御下に発現させることができる。本研究は、新しい概念に基づくがん血管抑制療法であり、世界的にみてもこれまで試みられたことのない極めて独創的なアプローチである。

最近、感染と複製によって次々と増殖細胞のみを選択的に破壊する制限増殖型 HSV-1 変異体を用いた悪性脳腫瘍の遺伝子治療臨床研究が米国と英国ではじまった。制限増殖型 HSV-1 は、ウイルス複製に必須な Ribonucleotide reductase (RR) または Thymidine kinase (TK) を欠失しているか中枢神経系への病原性にかかわる遺伝子を欠失する変異体である。これらの RR や TK 酵素は正常細胞では増殖時にのみ発現するが、腫瘍細胞では構成的に発現している。したがって、この HSV 変異体は増殖細胞や腫瘍細胞に感染すると、細胞由来の RR や TK を利用して複製することができるため細胞破壊活性を示す。

カルポニン遺伝子は、平滑筋肉腫細胞や新生血管の増殖平滑筋を除いて、本来最終分化した増殖しない平滑筋細胞に発現している。従って、(1) RR または TK を欠失し、(2) 既に我々がクローニングしたカルポニン遺伝子のプロモーターによって複製が開始されるような HSV 変異体ベクターを作製すれば、正常な平滑筋には影響を与えず、カルポニンを発現しかつ増殖する平滑筋細胞だけを選択的に破壊することができる。

3 . 研究内容

(1) 実施の内容

【ウイルスの構築】

まず、ウイルス複製の開始に必須の転写因子 ICP4 を欠失する HSV-1 変異体 (*d120*) を得た。ヒトカルポニン遺伝子プロモーターを ICP4 遺伝子上流に連結し、さらにその 5' 上流に、ウイルス感染細胞を同定するために、リボヌクレオチド還元酵素 (RR) プロモーターで制御される標識遺伝子 *lacZ* を連結した相同組み換え用ベクターを構築し、*d120* ゲノムの RR 遺伝子座に挿入した。この新規 HSV-1 変異体は、ICP4 遺伝子と RR 遺伝子の二重欠失変異体となる。

ICP4 のコード領域を含む pGH108 (J. Virol. 56, 558-570, 1985) 由来の 4.1 kb の平滑末端 SalI - MseI 断片 (Johns Hopkins School of Medicine の Hayward 博士より提供) を、pAMP1 プラスミドにクローニングした 333 bp ヒトカルポニンプロモーター (-260 ~ +73) の下流に挿入し、及びかかるプラスミドの 5' 側上流にヒト 4F2 重鎖転写エンハンサー (Mol. Cell Biol. 9, 2588-2597, 1989) の 444 bp をサブクローンした。この pAMP1/CALP-ICP4 プラスミドの 3' 側にある HindIII サイトを平滑化し、pIRES2-EGFP プラスミドを、BamHI と AflIII とを用いて二

重消化させることにより得られた 1576-bp 断片をサブクローンした。この BamHI-AflIII 断片は、IRES 配列と EGFP 配列および SV40 由来ポリ A シグナルから構成されている。次に、pAMP1/CALP-ICP4-IRES2-EGFP プラスミドを EcoRI と SphI とを用いて二重消化させることにより得られた 6.7-kb 断片を平滑化し、pKX2βG3 組換えベクターにサブクローニングした (pKX2βG3/CALP-ICP4-IRES2-EGFP)。pKX2βG3 組換えベクター (Connecticut 大学の Weller 氏より提供) は、RR 遺伝子 (ICP6) のコード配列の 2.3-kb XhoI 断片 (pKpX2) とその BamHI サイトに挿入された 3.0-kb の大腸菌 (*Escherichia Coli*) 由来の lacZ 配列及び pUC19 のバックボーンからなる (J. Virol. 62, 196-205, 1988)。

続いて、上記プラスミド pKX2βG3/CALP-ICP4-IRES2-EGFP を線状化し、pUC19 配列を除去した pRR - CALP-ICP4-IRES2-EGFP と d120 ウイルス DNA とを、製造者のプロトコルに従って Lipofectamine™ (GIBCO/BRL 社製) を使用し、6 ウェル組織培養プレート中の Vero E 5 細胞 (2.5×10^5 /well) のサブコンフルエント単層培養にコトランスフェクションした。トランスフェクション 3 時間後に 20% DMEM 培養液 1 ml を添加し、96 時間後まで、4-hydroxymethylbenzoic acid (HMBA) 0.5 mg/ml を含む前記培養液 (10% FBS/DMEM) で培養した。プラーク形成を確認した後、HMBA を含まない 10% FBS/DMEM で 24 時間培養した。

超音波処理 (30 秒間を 3 回) を組み合わせた凍結処理と解凍処理を三回行い、上記懸濁液を溶解した。懸濁液を段階的に希釈し、96 ウェル組織培養プレートのサブコンフルエント単層培養ヒト子宮平滑筋肉腫細胞株 SK-LMS-1 に感染させた。感染後 96 時間 1 ウェルあたり 100 μ l の $1.1 \sim 3 \mu$ g/ml のヒト IgG (Jackson ImmunoResearch Lab. 社製) を含む 1% FBS/DMEM で培養した。プラーク形成を確認し得たウェルを蛍光顕微鏡下での GFP の発現を指標にしてスクリーニングした。96 ウェル組織培養プレートを用いた同様の限界希釈感染・ガラクトシダーゼ酵素活性測定法を Vero E5 細胞を用いてさらに 2 回繰り返し、組換えウイルスベクター d12-CALP-RR を単一のプラークとして精製した。ウイルス DNA を精製した後、制限酵素 XhoI で消化し、RR (ICP6) cDNA の XhoI 断片 (2.3-kb) をプローブにしたサザンブロット分析によりリボヌクレオチド還元酵素遺伝子座での組換えを確認し得た (図 1)。

d12.CALP RRの特性

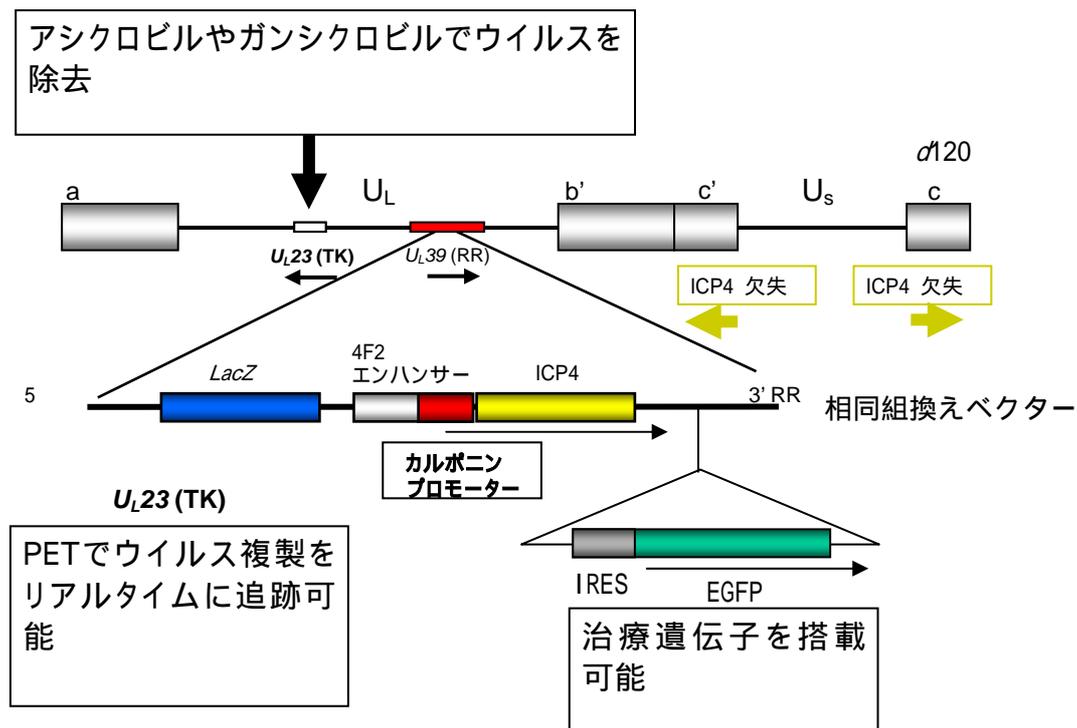


図 1

【ウィルス力価の測定】

ウィルス力価を感染多重度 $0.1 (2 \times 10^5 \text{ cells/ウェル})$ のシングルステップフローアッセイで評価した。d12.CALP RRは、カルボニン陽性SK-LMS-1細胞中で複製したが、d12.CALP RRの力価は感染の72時間後のカルボニン陰性OST細胞中ではSK-LMS-1細胞に比べて $1/10^5$ 程度に減少した。両細胞の増殖速度は同程度であった。また、感染22時間後の細胞抽出物のイムノブロット分析を行った結果、SK-LMS-1細胞ではICP4タンパク質が発現しているが、OST細胞ではICP4タンパク質が発現していないことがわかった。これはウイルス複製分析結果と一致していた。これに対し、相同組み換えの親株であるd120ウイルスは、SK-LMS-1及びOSTの培養において子孫ウイルスの産生はまったく見られなかった。

【抗ヘルペスウイルス剤に対する感受性】

d12.CALP RRをヒト腫瘍血管の治療に応用する場合、最も重要な特性は、TK遺伝子をインタクトな状態でもつため、抗ヘルペスウイルス剤であるganciclovirに感

受性を示すことである。24 ウェル (5×10^4 /ウェル) ディッシュ中の SK-LMS-1 細胞に、種々の濃度 (0 ~ 100 ng/ml) の ganciclovir 存在下で、d12 . CALP RR を多重感染度 0.01 で感染させ、感染の 48 時間後に、X-gal を基質にして染色し、1 ウェルあたりの β -ガラクトシダーゼ陽性のプラーク数を計測した。また、6 ウェルディッシュ中の VeroE5 細胞 (2.5×10^5 /ウェル) に 1 μ g/ml の ganciclovir 存在下と非存在下で、d12 . CALP RR を感染させ、感染の 48 時間後に、X-gal を基質にして染色した。

SK-LMS-1 細胞、VeroE5 細胞共に、ganciclovir の存在下で d12 . CALP RR の複製が抑制された。SK-LMS-1 細胞では、40 ng/ml の ganciclovir 存在下で完全に抑制された。d12 . CALP RR は、野性型ウイルスよりも同薬剤に感受性が高いことが報告されている (Cancer Res. 54, 3963-3966, 2001) 制限増殖型 HSV-1 変異体 hrR3 と同等の ganciclovir に対する感受性を示した。この結果は、d12 . CALP RR が治療後に ganciclovir または aciclovir でウイルス感染細胞を除去できる安全策を備えていることを示しており、この特性こそがこれまでに発表された細胞選択的制限増殖型 HSV-1 と決定的に異なる点である。

【d12 . CALP RR の体内分布と臓器毒性の検討】

d12 . CALP RR をヌードマウス眼窩下静脈より 2×10^7 p.f.u. / マウスで投与し、経時的に血液、各種組織を採取した。HSV-1 感受性細胞である VeroE5 を用いたウイルス複製活性の試験を行なったところ、マウス血清中の d12 . CALP RR の複製活性は 24 時間でほぼ消失した。組織学的には肝臓、脾臓、肺において、投与後 3 日目まで RR ベクターに特異的な β -galactosidase (LacZ) および HSV-1 最初期遺伝子産物である ICP4 の発現を認めた。しかし同一細胞内での両蛋白の同時発現は認められず、肝、脾、肺組織から複製活性のある d12 . CALP RR は検出されなかった。投与後 4 日目およびそれ以降では、これらの組織で LacZ、ICP4 とともに発現は認められず、病理学的にも明らかな組織障害は認められなかった。また血液生化学検査では、d12 . CALP RR の静脈内投与は肝・腎機能、糖・脂質代謝に影響を及ぼさなかった。

【腫瘍血管平滑筋細胞に対する選択的傷害活性】

ヌードマウスの両側背部皮下にヒト平滑筋肉腫細胞を異種移植し、その片側 (右側) に d12 . CALP RR を注入したところ、投与後 8 日目に反対側 (左側) の異種移

植片に出血がおり、腫瘍が縮小した (n=4)。この実験で用いた平滑筋肉腫は、d 1 2 . C A L P RR が腫瘍細胞自体を破壊しないことを *in vitro* の感染実験で確認しているので、腫瘍の退縮は対側の腫瘍に血行性に到達した d 1 2 . C A L P RR が腫瘍内血管を傷害したものと考えられた。実際、出血後 2 日目の腫瘍を組織学的に検討したところ、腫瘍細胞の広範な出血性壊死の像と血管の破壊像が認められた。また、免疫組織化学により、血管周囲の細胞に lacZ と ICP4 蛋白の発現が認められた。一方、腫瘍と接する正常血管の平滑筋細胞には、細胞傷害を認めなかった。また、ヌードマウスの皮下に移植したマウス Lewis 肺がんに対して d 1 2 . C A L P RR を 1 回尾静脈内に注入したところ、広範な腫瘍細胞の壊死を認めた (図 2)。ヘモジデリン染色の結果、腫瘍細胞は出血性壊死に陥っていることが明らかになった。

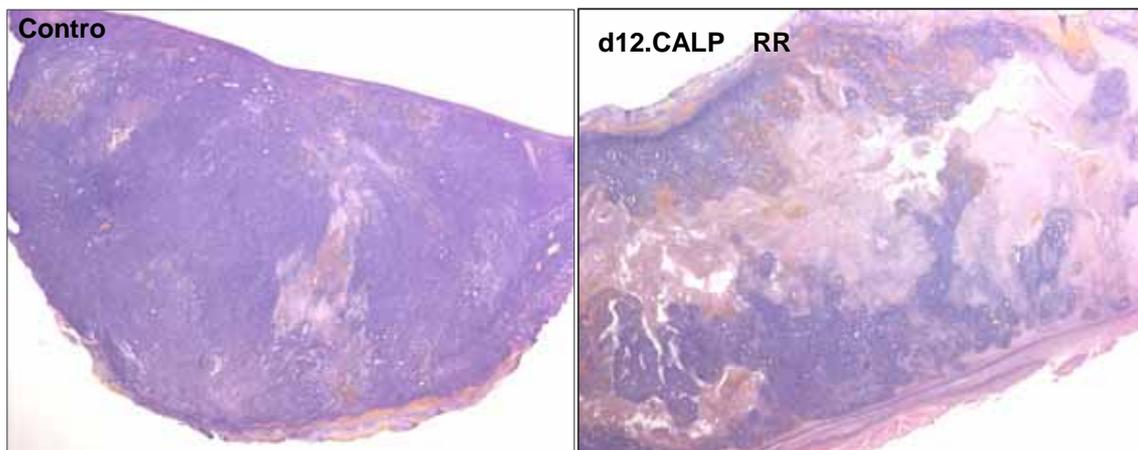


図 2、Lewis 肺がんの 1 例

ヒト手術標本から得た肝細胞がん、平滑筋肉腫、消化管ストローマ腫瘍などの腫瘍血管平滑筋細胞を増殖細胞のマーカーである抗 Ki-67 抗体と抗カルポニン抗体で二重染色すると、腫瘍内血管の増殖平滑筋細胞にカルポニン遺伝子が発現していることがわかった。このことは、RR 遺伝子の欠失による増殖細胞選択性とカルポニンプロモーターによるカルポニン発現細胞選択性を合わせもつ d 1 2 . C A L P RR が腫瘍血管を標的化して破壊できることを示している (図 3)。

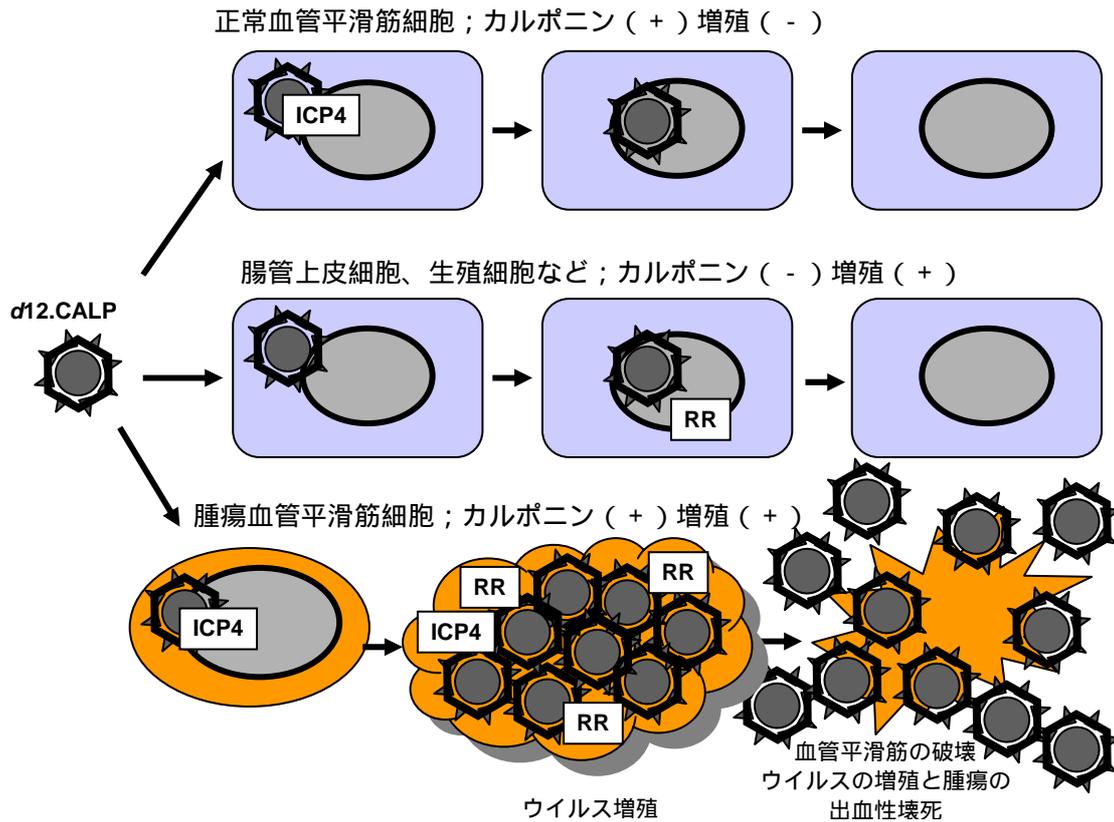


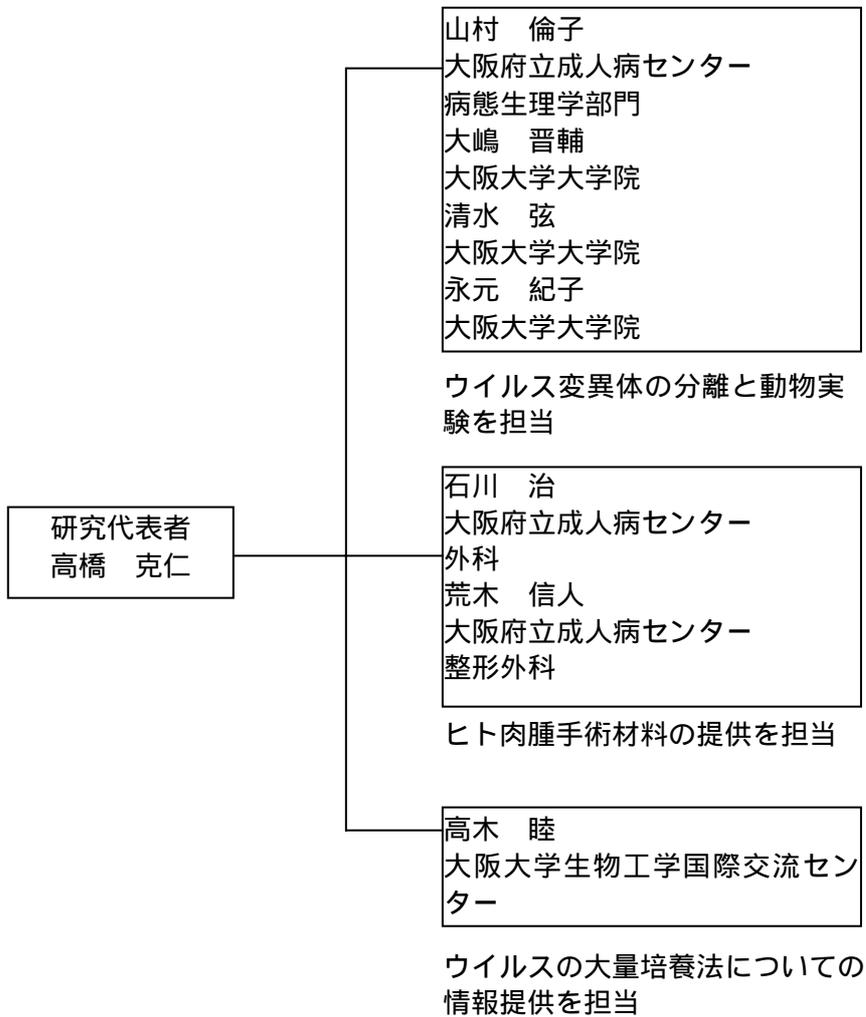
図 3

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

腫瘍血管を破壊するこの新規 HSV-1 変異体は、現在 P C T 出願中であるが、知的所有権を取得できる見込がある。今後の集中的な研究によって腫瘍血管破壊作用の有効性と安全性が確立され、G M P レベルの大量調整法が確立できれば臨床応用への実用化が見込まれる。この研究が実用化されれば、腫瘍血管新生を阻害して腫瘍を冬眠状態 (Tumor Dormant) に維持する治療法が現実のものとなり、がんとともに生きることが可能になる。がん遺伝子治療の分野で米国に大きく立ち遅れている我が国の医薬・医療産業の国際競争力の強化にも繋がるものと思われる。

4 .研究実施体制

(1)体制



(2)メンバー表

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
高橋 克仁	大阪府立成人病センター	部長	全般	平成13年4月～ 平成15年3月
山村 倫子	大阪府立成人病センター	主任研究員	ウイルス変異体の構築と動物実験	平成13年4月～ 平成15年3月
大嶋 晋輔	大阪大学大学院	院生	ウイルス変異体の安全性試験	平成13年4月～ 平成15年3月
清水 弦	大阪大学大学院	院生	動物実験	平成14年4月～ 平成15年3月
永元 紀子	大阪大学大学院	院生	動物実験	平成14年4月～ 平成15年3月
石川 治	大阪府立成人病センター	部長	ヒト肉腫手術材料の提供	平成13年4月～ 平成15年3月
荒木 信人	大阪府立成人病センター	部長	ヒト肉腫手術材料の提供	平成13年4月～ 平成15年3月
高木 睦	大阪大学生物工学国際交流センター	教授	ウイルスの大量培養法についての情報提供	平成13年4月～ 平成14年3月
藤原美恵子	大阪府立成人病センター	研究補助員	研究の事務処理	平成13年4月～ 平成15年3月

5 . 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成14年3月27日	セミナー	大阪府立成人病センター	32名	京都大学、野田 亮教授を招聘「トランスフォーメーション抑制遺伝子RECKの機能解析」
平成14年10月30日	セミナー	大阪府立成人病センター	38名	東京大学、田原秀晃教授を招聘「癌免疫遺伝子治療の開発」
平成14年12月12日	セミナー	大阪府立成人病センター	40名	東京大学、浅野茂隆教授を招聘「がん遺伝子治療の現状と展望」
平成15年3月18日	セミナー	大阪府立成人病センター	36名	岡山大学、藤原俊義助教授を招聘「癌に対する遺伝子治療の現況と展望：非増殖型ベクターから制限増殖型ベクターへ」

6 . 主な研究成果

(1)論文発表 (国内 7件、海外12件)

- 1) 山村倫子、余田貴洋、佐々木由美子、淡田修久、高橋克仁、カルポニン、Vascular Biologyナビゲーター (丸山征郎他編)、46-47、メディカルレビュー社、2001
- 2) 高橋克仁、山村倫子、細胞選択的に複製可能なウイルスベクター；がん治療の新たな戦略 遺伝子医学 5、588-589、2001
- 3) 高橋克仁、山村倫子、難治性肉腫に対する新しい標的遺伝子治療法の開発、遺伝子医学 5、670-678、2001
- 4) 高橋克仁、山村倫子、橋尾美穂、野口美香、淡田修久、平滑筋を標的とした遺伝子治療、細胞 33、334-337、2001
- 5) 高橋克仁、山村倫子、淡田修久、血管の発生分化におけるカルポニンの機能：カルポニン遺伝子欠失マウスにおける骨形成の亢進、Clinical Calcium 11、450-454、2001

- 6) 高橋克仁、めだかおよびゼブラフィッシュ変異体の網羅的ゲノムスクリーニングによる血管の形成と分化に必須な遺伝子群の同定-血管病の分子病態の解明と新しい病態モデル動物の開発-、医科学応用研究財団研究報告 20、159-160、2001
- 7) 高橋克仁、山村倫子、荒木信人、淡田修久、竜田正晴、大東弘明、石川 治、難治性肉腫に対する新しい標的遺伝子治療法の開発、成人病 41、35-41、2001
- 8) Yamamura H., Hashio M., Noguchi M., Sugeno Y., Osakada M., Hirano N., Sasaki Y., Yoden T, Awata N., Araki N., Tatsuta M., Miyatake S. and Takahashi K. Identification of the transcriptional regulatory sequences of human calponin promoter and their use in targeting of a conditionally replicating herpes vector to malignant human soft tissue and bone tumors. *Cancer Research* 61, 3969-3977, 2001
- 9) Taniguchi S., Takeoka M., Ehara T., Hashimoto S., Shibuki H., Yoshimura N., Shigematsu H., Takahashi K. and Katsuki M. Structural fragility of blood vessels and peritoneum in calponin h1-deleted mice, resulting in an increase in hematogenous metastasis and peritoneal dissemination of malignant tumor cells. *Cancer Research* 61, 7627-7634, 2001
- 10) Fujii T., Nakamura K., Ootani H., Koizumi Y. and Takahashi K. A novel actin-binding site in the single calponin homology (CH) domain of basic calponin. *Journal of Biochemical and Molecular Biology and Biophysics* 5, 399-405, 2001
- 11) Ueda T., Araki N., Mano M., Myoui A., Joyama S., Ishiguro S., Yamamura H., Takahashi K., Kudawara I. and Yoshikawa H. Frequent expression of smooth muscle markers in malignant fibrous histiocytoma of bone. *Journal of Clinical Pathology* 55, 853-858, 2002
- 12) Sasaki Y., Yamamura H., Kawakami Y., Yamada T., Ohigashi H., Hiratsuka M., Kameyama M., Ishikawa O., Imaoka S., Ishiguro S. and Takahashi K. Expression of smooth muscle calponin in tumor vessels of human hepatocellular carcinoma and its possible association with prognosis. *Cancer* 94, 1777-1186, 2002
- 13) Sugeno Y., Yoshimura A., Yamamura H., Inui K., Morita H., Yamabe H., Ueki N., Ideura T. and Takahashi K. Smooth-muscle calponin in mesangial cells: Regulation of expression and a role in suppressing glomerulonephritis. *Journal of American Society of Nephrology* 13, 322-331, 2002

- 14) Ueda, T., Araki, N., Mano, M., Myoui, A., Joyama, S., Ishiguro, S., Yamamura, H., Takahashi, K., Kudawara, I., Yoshikawa, H. Frequent expression of smooth muscle markers in malignant fibrous histiocytoma of bone. *Journal of Clinical Pathology* 55, 853-858, 2002
- 15) Morioka T., Koyama H., Yamamura H., Tanaka S., Fukumoto S., Emoto M., Mizuguchi H., Hayakawa T., Kojima I., Takahashi K. and Nishizawa Y. Role of H1-calponin in pancreatic AR42J cell differentiation into insulin-producing cells. *Diabetes* 52, 760-766, 2003
- 16) Yamamura H., Yoshikawa H. and Takahashi K. Aberrant methylation and silencing of the calponin gene in human sarcoma cells. *Anticancer Research* 23, 107-114, 2003
- 17) Bannai M., Yoshimoto R., Mitsui-Saito M., Hori M., Nishihara M., Takahashi K., Yamamura H., Taniguchi S., Katsuki M., Ozaki H. and Karaki H. Increased locomotor activity, increased food and water intake and decreased PVN neurons in H1 calponin gene-deficient mice. *Journal of Veterinary Medicine and Science* 65, 153-155, 2003
- 18) Kinouchi T, Mano M, Matsuoka I, Kodama S, Aoki T, Okamoto M, Yamamura H, Usami M and Takahashi K. Immature tumor angiogenesis in high-grade and high-stage renal cell carcinoma. *Urology* (2003) 62, 765-70.
- 19) Takahashi K. and Yamamura H. Studies and perspectives of calponin in smooth muscle regulation and cancer gene therapy. *Advances in Biophysics*. 37, 91-111, 2003

(2) 口頭発表

招待、口頭講演 (国内 13件、海外 2件)

- 1) 特別講演、大阪、2月7日、2001、「特定の細胞だけを破壊する遺伝子治療への取り組み、科学技術振興事業団シンポジウム「生命の誕生や修復のしくみを探る」
高橋克仁
- 2) University of Calgary, Faculty of Medicine, Invited lecture, June 4, Calgary, 2001. Studies and perspectives of calponin in cancer and cardiovascular gene therapy, Takahashi K.
- 3) 第12回大阪大学産婦人科オープンクリニカルカンファレンス特別講演、大阪、2

- 002年7月21日、難治性肉腫に対する新しい標的ウイルス療法の開発、高橋克仁
- 4) 大阪市立大学消化器病フォーラム特別講演、大阪、2003年1月24日、複製可能型ヘルペスウイルスを用いたGISTの遺伝子治療、高橋克仁
- 5) 京都大学再生医科学研究所セミナー招待講演、京都、2003年6月27日、がん破壊ヘルペスウイルスによる平滑筋肉腫およびGISTの細胞標的治療、高橋克仁
- 6) The Sixth Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, June 4-8, Washington DC, 2003. Preclinical safety testing and biodistribution of a novel ribonucleotide reductase- defective and ganciclovir/ acyclovir-sensitive recombinant type I herpes simplex virus (HSV-1) α 12.CALP Δ RR designed to target human leiomyosarcoma, gastrointestinal stromal tumors, malignant fibrous histiocytoma and myoma. Takahashi K., and Yamamura H.
- 7) 第6回Vascular Medicine 学会シンポジウム指定演題、東京、2001年6月29 - 30日、 SM22・遺伝子プロモーターを用いたCreトランスジェニックマウスの作成：血管特異的変異マウス作成への応用、高橋克仁、佐々木由美子、山村倫子、淡田修久
- 8) 日本癌学会第60回総会、2001年9月28日(横浜)、カルポニンh1 および p53 遺伝子二重欠失マウスの作製、野口美香、橋尾美穂、山村倫子、淡田修久、春日井務、高橋克仁
- 9) 日本癌学会第60回総会、2001年9月28日(横浜)、カルポニンプロモーターをもつ条件つき複製可能型単純ヘルペスウイルスベクターを用いたヒト平滑筋肉腫の標的遺伝子治療、山村倫子、橋尾美穂、野口美香、小阪田正和、大嶋晋輔、中西啓文、荒木信人、大東弘明、石川 治、宮武伸一、高橋克仁
- 9) 第25回日本分子生物学会年会、2002年12月11日(横浜)、ウイルス工学を用いた腫瘍選択的に複製可能なHSV-1 遺伝子治療ベクターの開発、大嶋晋輔、山村倫子、淡田修久、石川 治、高橋克仁
- 10) 第31回日本心臓血管作動物質学会、2002年2月2日(東京)
平滑筋を標的にした第二世代HSV-1 複製・発現ベクターの開発
橋尾美穂、高橋克仁、山村倫子、淡田修久
- 11) 第31回日本心臓血管作動物質学会、2002年2月2日(東京)、メダカ(*Oryzias latipes*)血管におけるカルポニンの発現と遺伝子クローニング、小阪田正和、山村倫子、淡田修久、成瀬 清、清木 誠、諏訪 寛、近藤寿人、高橋克仁
- 12) 第61回日本癌学会総会 ワークショップ、東京、2002年10月3日、次世代

HSV-1複製・発現ベクターを用いた難治性肉腫に対する新しい標的ウイルス療法の開発、
高橋克仁、山村倫子、大嶋 晋輔、淡田 修久、大東弘明、平塚 正弘、佐々木 洋、石川
治

13) 第61回日本癌学会総会 ワークショップ、東京、2002年10月3日、転移性
肺腫瘍を選択的かつ網羅的に破壊する新しいがん標的ウイルス療法の開発 山村倫子、
大嶋晋輔、道澤雅裕、永元紀子、淡田修久、由良義明、高橋克仁、

14) 第32回日本心脈管作動物質学会、2003年、2月2日(大阪)
血管狭窄病変を標的にしたヘルペスウイルス複製・発現ベクターの前臨床安全性試験、
大嶋晋輔、山村倫子、淡田修久、高橋克仁

ポスター発表 (国内 0件、海外 4件)

1) Takahashi K., Yamamura H., Hashio M., Noguchi M., Osakada M., Araki N., Miyatake
S. and Awata N. Identification of the transcriptional regulatory sequences of
human calponin promoter and their use in construction of a conditionally
replicating herpes vector targeting to malignant human soft tissue and bone tumors.
The Fourth Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, May 30-June
3, Seattle, 2001

2) Takahashi K., Yamamura H., Hashio M., Awata N., Fletcher J.A., Ohigashi H.,
Sasaki Y. and Ishikawa O. Targeted destruction of gastrointestinal tumors (GIST)
by a novel engineered ribonucleotide reductase-defective herpes simplex virus
mutant capable of expressing ICP4 and an exogenous gene under the control of human
calponin promoter. The Fifth Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy,
June 5-9, Boston, 2002

3) Yamamura H., Michizawa M., Oshima S., Yura Y. and Takahashi K. Targeted gene
therapy to malignant fibrous histiocytoma with an engineered
replication-selective HSV-1 mutant harboring human calponin promoter. The Fifth
Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, June 5-9, Boston, 2002

4) Yamamura H. and Takahashi K. Targeted disruption of tumor vasculature with a
multi-mutated, replication-competent type I herpes simplex virus (HSV-1)
expressing RS1 (ICP4) gene under the control of smooth muscle-specific human
calponin promoter. The Sixth Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy,
Washington DC, June 4-8, 2003

(3)特許出願 (国内 3件、海外 2件)

国内

- 1)発明者「高橋 克仁、山村 倫子」、発明の名称「細胞特異的発現複製ベクター」、出願番号「特願2001-402102」、出願日「平成13年12月28日」
・追加出願；発明者「高橋 克仁、山村 倫子」、発明の名称「細胞特異的発現複製ベクター」、出願番号「特願2002-255395」、出願日「平成14年8月30日」

海外

- 1)発明者「高橋 克仁、山村 倫子」、発明の名称「細胞特異的発現複製ベクター」、出願番号「PCT/JP02/13683」、出願日「平成14年8月30日」

(4) 新聞報道等

新聞報道

読売新聞ニュース(平成13年5月16日朝刊)「肉腫細胞狙い撃ち；組換えウイルスで」

朝日新聞ニュース(平成13年5月16日朝刊)「難治の肉腫狙い撃ち；遺伝子使い新療法」

中国新聞ニュース(平成14年9月7日朝刊)岡山大学消化器・腫瘍外科学グループ(藤原俊義助手ら)「がん破壊アデノウイルス開発」記事の解説文。

読売新聞ニュース(平成14年9月29日朝刊)「転移性肺腫瘍を選択的かつ網羅的に破壊する新しいがん標的ウイルス療法の開発」

産経新聞ニュース(平成15年2月13日朝刊)「新しい遺伝子治療：がん細胞ウイルスが内部から破壊；大阪の病院国内初の実施へ」

毎日新聞ニュース(平成15年2月13日朝刊)「遺伝子治療室を開設」

朝日新聞ニュース(平成15年2月13日朝刊)「遺伝子組み換えがん治療臨床へ」

神戸新聞、愛媛新聞ニュース(平成15年2月17日朝刊)「遺伝子操作ウイルス がん細胞のみ直接破壊 国内初の臨床応用へ」

受賞

平成14年 2月、高松宮妃癌研究基金癌研究助成賞 受賞

7 . 結 び

HSV-1ウイルスの相同組換え体の分離が時間と労力のかかる実験であることを考慮すると、2年間でウイルス変異体の作製とその有効性およびマウスでの安全性試験を終えることができたのは幸運であったと思う。これまで、多くのグループが細胞特異的なプロモーターを用いた転写活性標的化に基づくウイルス増殖の制御と、ウイルス増殖に必要な酵素の欠失変異による増殖細胞選択性をもつHSV-1ウイルスの作製を試みたが成功していなかった。今回、我々は2種類のプロモーターをもつ2つの異なる標識遺伝子（lacZとEGFP）を用いて、限界希釈法を用いることによってはじめて目的とする変異体の分離に成功した。今後は、さらに強力な抗腫瘍作用を得るためにカルポニンプロモーターの制御下にサイトカインや血管内皮細胞増殖抑制遺伝子などの治療遺伝子をIRESを用いてカルポニンプロモーターの制御下に発現し得る次世代制限増殖型HSV-1の開発が目標になる。本研究で d 1 2 . C A L P RR が単離できたことによってはじめてそのゲノムDNAを精製し、相同組み換え法によって新たな治療遺伝子を挿入する準備が整った。また、変異体の迅速な作製と分離を可能にするBACシステムと大腸菌遺伝学の技術導入も今後の目標である。

臨床応用を勧めるためには、d 1 2 . C A L P RR のGMPレベル精製を勧める必要があるが、現在のところ国内にはその施設がない。外国に委託すると約 1 0 - 2 0 名の患者に対して第 I / II 相臨床試験を実施するためのGMPレベル精製薬剤を準備するためには3,000~5,000万円が必要である。d 1 2 . C A L P RR の国内、国際特許を申請中（JSTが出願人）であり、研究成果最適移転事業などでのさらなる研究開発費の助成を切にお願い申し上げる次第です。