

13-13 がんに対する遺伝子治療の基礎的及び臨床的研究

ー癌遺伝子治療増強法の開発ー

主任研究者 大阪大学医学系研究科 金 田 安 史

研究成果の要旨

遺伝子導入法であるが、アデノウイルスベクターのファイバー部位にProteinAの抗体結合ドメインを導入したファイバー改変型ベクターを作製し、抗腫瘍抗体と併用すると抗体依存的に遺伝子を標的腫瘍細胞に導入でき10-20倍の遺伝子発現の増強が確認された。制限増殖型ウイルスとして、テロメラーゼ特異的制限増殖型アデノウイルスOBP-301を作成したが、これはヒト非小細胞肺癌細胞および大腸癌細胞で選択的増殖性が確認できた。また肉腫特異的に増殖する単純ヘルペスウイルスのGMPレベルでの精製法を開発した。免疫遺伝子治療用遺伝子として、腫瘍抗体の抗原を検索し、testicular nuclear autoantigenic sperm proteinを同定した。またマウス肺癌遺伝子ライブラリーよりサブトラクション法を用いて抗腫瘍ワクチン用遺伝子として10種の遺伝子を分離した。樹状細胞と癌細胞の融合細胞とCpGオリゴ核酸の併用法により抗腫瘍免疫の誘導の増強と長期維持が極めて効率よくおこり、腫瘍を拒絶できる癌ワクチンとなりうることがわかった。

研究者氏名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
金田安史	大阪大学大学院医学系研究科 教授	癌治療用非ウイルスベクターの開発
谷憲三朗	九州大学生体防御医学研究所 教授	がんに対する免疫遺伝子治療の効果増強因子の検討
濱田洋文	札幌医科大学 教授	白血病に対する免疫遺伝子治療
藤原俊義	岡山大学医学部・歯学部附属病院 助教授	アデノウイルスを基本骨格とする新規ウイルス製剤のがん診断・治療への応用
黒岡正之	大阪大学大学院医学系研究科 研究員	異種動物蛋白発現ベクターを用いた抗腫瘍免疫の増強法の開発
高橋克仁	大阪府立成人病センター研究所 部長	難治がんに対する制限増殖型ウイルスベクターを用いた遺伝子治療法の開発

総括研究報告

1 研究目的

本研究の目的は癌遺伝子治療の効果を増強さ

せるための新規技術を開発し将来の臨床応用を目指すことにある。今年度は癌組織への有効な遺伝子導入技術、効果的な治療遺伝子、各種遺伝子治療法の効果増強因子などの評価を行い、有効な癌遺伝子治療法を提唱する。

2 研究成果

(1) 遺伝子導入法について； Protein A の Z33 モチーフをノブの HI ループ部位に持つアデノウイルス Ax3CA-FZ33 と抗 ErbB2 抗体を併用することで卵巣癌の標的化が可能か否か検討した。ヒト卵巣癌の細胞株として、SKOV3 ならびに RMG1 を用いた。アデノウイルスは、EGFP を発現する Ax3CAEGFP-FZ33、lacZ を発現する Ax3CAZ3-FZ33、そして 5-FU を活性型の FdUMP に効率的に変換する Uracil Phosphoribocyltransferase (UP) を発現する Ax3CAUP-FZ33 を作製して用いた。細胞を 6 ウェルプレートに播種し、抗 ErbB2 抗体を培地中に加え反応後、Ax3CAEGFP-FZ33 を感染させ、24 時間後に FACS で EGFP 陽性細胞を測定した。また、Ax3CAZ3-FZ33 を感染し、24 時間後に beta-gal Reporter Gene Assay にて lacZ の発現量を測定した。Ax3CAUP-FZ33 と抗 ErbB2 抗体を併用した、5FU の抗腫瘍効果の検討は SKOV3 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、抗 ErbB2 抗体 (SER4) を反応後、Ax3CAUP-FZ33 を感染させ、24 時間後に 5FU を加え、5 日後に WST-1 細胞増殖アッセイキットで生細胞数を測定した。SKOV3 細胞は、コントロール群 {Ax3CAEGFP-FZ33 のみ (5.5%)、マウス IgG1 と Ax3CAEGFP-FZ33 (4.8%)} と比較して、抗 ErbB2 抗体 (SER4) を併用して Ax3CAEGFP-FZ33 を感染させたものは、約 17 倍 (86.4%) の遺伝子導入の増加が認められた。一方、lacZ 遺伝子導入では、コントロール群 {Ax3CAZ3-FZ33 のみ (2459±291 URL)、マウス IgG1 と Ax3CAZ3-FZ33 (2711±828 URL)} と比較

して、抗 ErbB2 抗体 (SER4) を Ax3CAZ3-FZ33 に併用して感染させたものは、100 倍以上の (298562±28412 URL) の遺伝子発現の増加が認められた。RMG1 細胞でも、SKOV3 細胞の場合と同様の増加が認められた。次に FZ33 アデノウイルスを用いて抗癌剤変換酵素遺伝子を腫瘍細胞に導入しその抗腫瘍効果 (腫瘍細胞増殖抑制効果) を検討した。その結果コントロール群 {マウス IgG1 と Ax3CAUP-FZ33 (IC₅₀=約 30μM)} と比較して、抗 ErbB2 抗体 (SER4) を併用して Ax3CAUP-FZ33 を感染させたものは、約 30 倍 (IC₅₀=約 1μM) の 5FU 感受性の増加が認められた。ErbB2 を高発現するヒト卵巣癌細胞 (SK-OV3 など) への遺伝子導入は、ErbB2 抗体の併用により、選択的に著明に (EGFP 遺伝子導入細胞で、5%から 90%へ) 増強できた。同じ抗原分子を認識する異なった抗体間で比較すると、驚くほどの効果の差が見られた。このような標的化テクノロジーにおいては、標的分子種だけでなく、抗原と対応する個々の抗体の特性が重要である。至適な抗体の分離が必要であり、腫瘍細胞と Z33 アデノウイルスとを架橋することによって遺伝子導入効率が高まるモノクローナル抗体スクリーニングを行っているところである。同様の手法で、各種のヒト骨髓腫細胞株に対して、麻疹ウイルス受容体 CD46 に対する抗体、あるいは骨髓腫のマーカー CD38 に対する抗体を併用して、FZ33 型アデノウイルスの遺伝子導入効率を測定した結果、ヒト骨髓腫細胞に対して、抗体の併用により、30 倍以上の遺伝子導入の増強が得られた。免疫賦活分子 CD40 リガンドを発現する FZ33 型アデノウイルスと抗 CD38 抗体を併用することによって、高い効率で CD40 リガンドの遺伝子発現を得ることができ、T 細胞補助刺激分子 (CD80, CD86, CD54, HLA-class II) の発現を誘導することができた。この手法で遺伝子導入された骨髓腫細胞

は遺伝子非導入骨髓腫細胞に比べてアロ T 細胞を有意に強く刺激し IFN- γ の産生が増強した。以上の結果より、抗腫瘍抗体と FZ33 型アデノウイルスを用いることにより B 細胞系の腫瘍に対して、標的化遺伝子導入が可能であり、免疫遺伝子療法等に応用できることが示唆された。

(2) 癌治療用制限増殖型ウイルスの作成；Telomelysin は、ウイルス増殖に必須の E1A および E1B 遺伝子を IRES 配列でつなぎ、テロメラーゼ構成分子である hTERT (human telomerase reverse transcriptase) 遺伝子のプロモーターで制御することで、がん細胞のみで増殖し細胞死を生じるように改変されたウイルス製剤である。ヒトがん細胞および正常細胞に Telomelysin を感染させ、経時的に細胞を回収して細胞内のウイルス増殖を測定した。ヒト非小細胞肺癌細胞および大腸癌細胞では Telomelysin 感染後 3 日で $10^5 - 10^6$ 倍のウイルス増殖が認められたが、線維芽細胞などの正常細胞では 100-1000 倍の増殖にとどまり、その選択的増殖性が確認できた。次に各種ヒトがん細胞に *in vitro* で Telomelysin を感染させ、XTT アッセイにて経時的に細胞数の変化を観察すると、3 日以内に細胞死が誘導され明らかな抗腫瘍効果が観察された。そこでヌードマウス背部皮下にヒト肺癌細胞 H1299 を移植し、肉眼的腫瘍が形成された時点で Telomelysin を腫瘍内投与、増殖抑制効果を検討したところ、有意な増殖抑制と腫瘍内壊死が認められ、*in vivo* での有用性も明らかになった。このように正常細胞での増殖は癌細胞と比較すると 1%程度であるが、ウイルスが増えることには違いなく、安全性の評価が必要である。また抗ウイルス免疫がどのような作用を及ぼすかについての検討も必

要である。

一方、カルボニンプロモーターを用いた制限増殖型ヘルペスウイルス Δ 12. CALP Δ RR は平滑筋肉腫で特異的に増殖する。実際にヒト手術標本から樹立した平滑筋肉腫細胞を SCID マウス胸腔内に接種した転移モデルを作成し、胸腔内に Δ 12. CALP Δ RR (3.5×10^7 PFU) を投与すると微小な播種性平滑筋肉腫転移病巣が選択的にアポトーシスによって破壊され有意な延命効果を得た。平滑筋肉腫遺伝子治療の臨床応用にむけて、GMP レベルのウイルス精製を行うために、無血清培地を用いた組換えウイルスの精製を試みた。本研究では、 Δ 12. CALP Δ RR が ICP4 欠失変異体である Δ 120 を親株とするため、Vero 細胞にあらかじめ ICP4 cDNA を遺伝子導入した VeroE5 細胞を用いて、無血清培養条件下での Virus stock の作製を試みた。さらに、加熱処理による Δ 12. CALP Δ RR 不活性化の条件を決定した。無血清培地 VP-SFM (Invitrogen) を用いて、Single Step Growth Assay 法で Δ 12. CALP Δ RR の増殖を 1%CS/DMEM 培地と比較した。 Δ 12. CALP Δ RR は、感染後 24 時間までは、無血清、血清培地ともに同程度の増殖を示した。24 時間以後 96 時間では無血清培地では、血清培地の約 1% のウイルス産生量であった。培養液にすべて無血清培地を用いても、 Δ 12. CALP Δ RR の Large scale 精製は可能であり、 $\sim 10^9$ PFU にまで濃縮可能であった。無血清培地を用いて精製した Δ 12. CALP Δ RR は、平滑筋肉腫に対する細胞傷害活性、熱やガンシクロビルに対する感受性など、血清存在下で精製した lot と変わりはなかった。加熱による不活性化の検討では、 Δ 12. CALP Δ RR は 65°C、2 分間または 55°C、5 分間の加熱により増殖能を完全に失活させることができた。ガンシクロビルの IC50% は 1.3 ng/ml であり、野生型ウイルスよりも高い感受性を示した。VP-SFM を用いた ICP4 導

入Vero細胞の無血清培養でマスターセルバンクを作成するための条件が整った。

(3) 免疫遺伝子治療のための治療遺伝子の分離；1つのアプローチは遺伝子治療を受けた患者血清中の抗体を用いた新たな腫瘍関連抗原の探索である。東京大学医科学研究所病院で実施された第IV期腎細胞がん患者を対象とした遺伝子治療臨床研究は、自家腫瘍細胞にGM-CSF遺伝子を導入／発現させ放射線照射で不活化した後、腫瘍ワクチンとして患者に投与したもので、GM-CSFの作用により腫瘍本来の免疫原性を人為的に高めることで患者体内の抗腫瘍免疫能の誘導増殖を期待したものであった。既に我々の報告により、本臨床研究を実施された患者体内に自己RCCに対する細胞誘導性T細胞活性の誘導とRCCタンパク質に対する液性免疫反応の誘導が報告されている。本研究では後者に注目し、液性免疫反応の標的となった腫瘍抗原を同定することを目的にGM-CSF遺伝子導入ワクチン接種後に良好な臨床経過を示した患者(Case2)の腎癌細胞および株化腎癌細胞であるVMRC-RCWを用いて腫瘍細胞の発現ライブラリーを構築し、同患者体内に誘導された抗体を用いてSEREX(Serological identification by recombinant expression cloning)法を実施した。それにより同定されたSEREX抗原について新たな免疫療法の開発につながる可能性を期待してGM-CSF遺伝子導入ワクチン接種前後における抗体価の変動の解析とそのRCC特異性を正常組織と癌組織における抗原mRNAの発現量及び健常人と癌患者における血清中抗体の出現頻度の観点から検討した。その結果、tNASP(testicular nuclear autoantigenic sperm protein)mRNA発現が癌組織において有意に増加している傾向が見られた。また、tNASPとTMF(TATA element modulatory factor 1)に対する抗体価がGM-CSF

遺伝子導入ワクチン接種後に有意に増加している傾向が見られた。そして、健常人23名及び各種癌患者計107名の血清を検討した段階では、抗tNASP抗体価は健常人に対して子宮体癌患者血清で陽性率に統計学的に有意な差が認められ、特に抗TMF抗体価は健常人全員が検出限界以下であったのに対し、癌患者ではRCC(69%の陽性率)をはじめとして大腸癌、子宮癌で50%以上の患者血清が陽性を示し、メラノーマ(39%の陽性率)、食道癌(33%の陽性率)においても統計学的に有意な差が認められた。tNASPとTMFについては、癌抗原になりうる可能性ばかりでなく、その抗体を用いて癌診断にも大きな示唆を与えるものと考えられた。

もう1つのアプローチはサブトラクション法による癌特異的に発現している遺伝子の探索である。マウス肺癌サブトラクティブライブラリーより選択した10種の遺伝子についてワクチンを作成し抗腫瘍効果の検討を行った。この結果、osteopontinおよびc-mycを単独で用いたワクチンにて癌特異的な細胞障害性T細胞(CTL)の誘導が確認され、さらにこの効果は候補遺伝子を全て用いた場合に増強した。これらより、サブトラクティブライブラリーを抗原として用いることと、さらにこれらの中の有効な遺伝子を複数組み合わせるpolyvalentワクチンの有用性が示唆された。また、以上のワクチンはnaked DNAとアデノウイルスの組み合わせ投与方法を用いており、抗腫瘍ワクチンにおけるこの投与方法の有用性が示されたと考えている。さらに、HVJ(Hemagglutinating virus of Japan) envelopeベクターを用いたHigh-Throughput gene screening systemを用いて新たな腫瘍関連抗原や腫瘍由来免疫抑制性分子の探索を行っている。具体的には、マウス肺癌cDNAライブラリーから、樹状細胞のサイトカイン分泌を誘導す

る遺伝子の screening を進めており、現在までに二次スクリーニングを施行し、約 20 の候補遺伝子を得ている。

(4) 新たな癌ワクチン増強法の開発；1つのアプローチは腫瘍免疫抑制因子に対する抗体の産性による免疫の活性化である。実際には腫瘍から分泌される免疫抑制性サイトカインである TGF β を標的としてワクチンを作成し、腫瘍由来 TGF β を中和することにより有効に宿主の抗腫瘍免疫能を賦活させることを目的に研究を行った。これまでにマウスに対してカエル (*Xenopus laevis*) TGF β 2、ヒト TGF β 1 が自己抗原に対する液性免疫の誘導に有利であることが判明し、さらにヒト TGF β 1 ワクチン投与群では腫瘍増殖抑制効果も認められた。しかしながらヒト TGF β 1 ワクチンのみでは腫瘍を完全に消退させることはできず、他の免疫抑制性サイトカインワクチンとの組み合わせ、あるいは化学療法や放射線等と併用が必要であると思われた。したがって現在、もう一つの腫瘍由来免疫抑制性サイトカインとして IL-10 を標的として異種動物ホモログワクチンの開発を行っている。

もう1つのアプローチは樹状細胞と癌細胞ワクチンの増強である。X線照射またはマイトマイシン処理により増殖能をなくさせたマウス癌細胞 200 万個 (腎癌細胞の RENCA, メラノーマの B16BL6) とマウス骨髓由来樹状細胞 400 万個 (マウスの大腿骨、頸骨の骨髓より取り出した単核球を GM-CSF で 1 週間培養して分離した浮遊細胞) を不活性化 HVJ と混合し、試験管内で 37 度 30 分インキュベートして融合させた。マウス癌細胞は緑色色素で樹状細胞は赤色色素でラベルし、融合効率を FACS で解析した。癌細胞 (B16BL6) と樹状細胞を融合し、CpG オリゴ核酸の有無による 24 時間後のサイトカインの分泌を測定した。次にメラノーマ細胞で脾臓細胞を刺激したとき

の細胞傷害性 T 細胞の活性をクロミウムの放出により調べた。同様にマウスを免疫し、10 日後に 10 万個のメラノーマ細胞を皮内に移植し、マウスの腫瘍の生着、生存率、肺への転移を調べた。ワクチン接種後マウス足底部にメラノーマをうち、腫瘍塊を形成させ、その後の肺への転移を調べた。HVJ の量に依存して融合効率が上昇し約 30% の融合細胞が再現性よく得られた。500 HAU (1.5×10^9 particles) の HVJ envelope vector を用いたときが最も効率がよく、かつ 24 時間後の細胞も 90% 以上が生存していた。また樹状細胞を CD11c に対する抗体で検出し、メラノーマ細胞を gp100 に対する抗体で検出する方法を用いて融合を調べたところ、25% 程度の確率で両方の抗体で同定できる細胞が出現し、融合細胞が作成されたこと、その中では両細胞に由来する抗原がたしかに存在していることが明らかになった。位相差顕微鏡を用いて形態を調べたが、樹状細胞由来の樹状突起を有する大きな細胞 (樹状細胞の約 2 倍直径) が見られ、融合細胞であることが形態学的にも示唆された。また 1 対 1 で融合したと思われる dikaryon が半数を占めていた。HVJ envelope vector の量を 1000 HAU 以上用いると多核細胞が多く認められ、これらは 1, 2 日で死滅すると考えられた。二核のヘテロカリオンを如何に効率よく作成できるかが融合細胞の寿命を延長して抗腫瘍効果を期待できるかの鍵である。ポリエチレングリコールや電気パルス法ではこの調節が難しい。融合 24 時間後のサイトカインの分泌を測定した。TNF- α , IL12 の発現が融合細胞を用いると 2500 pg/ml 程度分泌されたが、CpG オリゴ核酸を同時に用いると有意に高い (1.5 から 2 倍の) 分泌が見られた。これをマウス皮内に 1 週間隔で 2 回接種し 10 日後に脾臓を取り出しメラノーマ細胞で刺激したときの interferon- γ の分

泌を測定した。融合細胞のみを用いると 1500 pg/ml 程度であったが、CpGオリゴ核酸を併用すると 3000 pg/ml 以上に上昇した。免疫部位はいくつか検討したが、皮内か皮下が最もよく、特に皮内投与では注入樹状細胞が所属リンパ節まで移動することがわかっている。静脈注射では安全性の問題があり、骨格筋投与や腹腔内投与では免疫効果が乏しかった。なお融合細胞のみをセルソーターで分離して免疫した場合とソーティングせずに融合細胞と非融合細胞を混合して免疫した場合とでは、産生される interferon-gamma などのサイトカインには差がなかったため、これ以降はソーティングせずに免疫することにした。メラノーマの場合、脾細胞とターゲットの癌細胞の比率が 90 のときに約 30% の特異的な細胞破壊が得られた。CpGオリゴ核酸により細胞破壊はさらに約 50% まで高められた。この CTL はメラノーマ特異的であり、同じ C57Black/6 由来のリンパ腫細胞の EL4 に対してはどの群も反応しなかった。融合細胞を用いないと全てのマウスは約 50 日後に死亡した。融合細胞で免疫した場合の生存率 20% であったが、すべてのマウスに腫瘍生着がおこった。融合細胞と同時 CpGオリゴ核酸導入を行った場合は、生存率は 80% であり、8 匹中 6 匹のマウスに腫瘍ができなかった。肺転移については無処理ではマウス 1 匹あたり約 65 個の腫瘍転移巣がみられ、CpGオリゴ核酸のみ、或いは、樹状細胞と癌細胞の混合物の注入でもほとんど減少しなかった。一方、樹状細胞と癌細胞を混合し、CpGオリゴ核酸を併用すると約 35 個まで減少した。融合細胞を用いると約 25 個に減少し、融合細胞と CpGオリゴ核酸の併用でさらに転移巣の数も減少し 10 個以下になった。この効果はメラノーマに限ったものではなく、腫瘍関連抗原が未知の腎癌細胞 RENCA と樹状細胞を融合したときにも同様の

抗腫瘍免疫の活性化が見られ、高い CTL が得られた。また CpGオリゴ核酸による増強も同様にみられた。このときも RENCA 特異的な CTL 活性が得られ、同じ Balb/c マウス由来の大腸癌細胞 CT26 に対しては CTL は誘導されなかった。ただし RENCA 細胞は増殖が遅く、マウスの生存率では大きな差が出なかった。しかし腫瘍フリーのマウスは融合細胞のみの免疫で 50%、融合細胞と CpGオリゴ核酸の併用で 80% であり、やはり併用による効果が見られた。メラノーマと樹状細胞の融合細胞と CpGオリゴ核酸併用により腫瘍生着がおこらなかったマウスに対して再度同じメラノーマ細胞を 60 日後に移植したが、全て拒絶された。しかし EL4 はすべてに生着した。RENCA と樹状細胞の融合細胞を移植して得られた腫瘍フリーのマウスに RENCA 細胞を移植すると 40% が腫瘍を拒絶し 60% が生着した。融合細胞と CpGオリゴ核酸を用いて得られた腫瘍フリーマウスに RENCA 細胞を移植すると 100% のマウスが腫瘍拒絶を示した。CT26 を接種するとすべて生着した。このような腫瘍細胞と樹状細胞の融合による利点は腫瘍関連抗原が知られていなくても、また癌細胞が抗原提示能がなくなっている、樹状細胞側から供給される MHC class I, costimulatory molecule などによりすべての腫瘍関連分子が抗原提示される点である。RENCA 細胞においても抗腫瘍免疫が効果的に誘導されたことはこのことを実証している。融合細胞により異種抗原以外の分子が提示されて自己免疫疾患のような病態に陥る危険性もあるが、メラノーマ細胞との融合ではメラノーマ細胞特異的な CTL が誘導されリンパ腫には反応しなかったため、そのような懸念はまずないと思われる。本研究において見出されたもう 1 つのメリットは CpGオリゴ核酸の同時導入によって樹状細胞の活性化、ナイーブ T 細胞の成熟もおこり、Th1 反

応が促進されたと考えられる。以上の2つがあいまって効果的なCTLを誘導できたのではないだろうか。融合細胞を用いた癌治療が行われているが、目立った成果が得られていない。末期癌の患者が多いということも原因であろうが、融合細胞だけではTh1 反応が進まないと考えられる。効果的なアジュバントを用いなければならぬと判断できる。またHVJは他の融合剤よりも効果的で再現性高く細胞融合をおこすことができるが、樹状細胞の場合でも同様な効果が収められた。しかしそれ以外にこのウイルス自体たとえ不活性化されていてもアジュバントとしての効果があると思われる。もちろん不活性化されていない野生株では極めて強いインターフェロンの誘導が知られているが、細胞毒性も強く正常細胞への影響が想定されるので治療としてはかえって良くないのではないかと考えられる。

以上のように、遺伝子導入法についてはアデノウイルスベクターのファイバー改変型を開発により腫瘍特異抗体との併用による腫瘍選択的な遺伝子導入が可能になった。制限増殖型ウイルスを2種作成でき動物実験での有効性を示すことに成功した。癌治療においては転移や再発の抑制が重要であるが、そのためには免疫治療の増強が望ましい。本研究を通じて将来の癌の免疫治療に有効であると判断できる材料や方法が開発された。ここで得られた成果を組み合わせることにより治療効果を増強できる可能性が高く、今後はそのような複合化が望まれるところである。

3 倫理面への配慮

本研究における倫理面への配慮については、主として動物愛護の観点から実験動物に与える

苦痛を極力除去するようにつとめ、各実験施設における動物実験ガイドラインに沿った動物実験を行った。また患者サンプルの利用については各施設での倫理委員会での承認を受けた後に実施している。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Ito, M., Kaneda, Y., et al., Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anticancer effect of cisplatin J. Gene Medicine, in press
2. Mima, H., Kaneda, Y., et al., Biocompatible polymer enhances the *in vitro* and *in vivo* transfection efficiency of HVJ envelope vector J. Gene Medicine in press
3. Hiraoka, K., Kaneda, Y., et al., Enhanced tumor-specific long-term immunity of HVJ-mediated DC-tumor fused cell vaccination by coadministration with CpG oligodeoxynucleotides. J. Immunology, 173, 4297-4307, 2004.
4. Maruyama, M., Kaneda, Y., et al., Subcellular trafficking of exogenously expressed interferon-beta in Mardin-Darby canine kidney cells. J. Cellular Physiology, 201, 117-125, 2004.
5. Takeda, S., Kaneda, Y., et al., Hemagglutinating virus of Japan protein is efficient for induction of CD4+ T-cell response by a hepatitis B core particle-based HIV vaccine. Clinical Immunology, 112, 92-105, 2004.
6. Masuda, K., Kaneda, Y., et al., Transposon-independent enhancement of transcription by Sleeping Beauty transposase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 317, 796-800,

- 2004.
7. Matsuki, A., Kaneda, Y., et al., No influence of tumor growth by intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid DNA: safety evaluation of therapeutic angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 315, 59-65, 2004.
8. Kurozumi, K., Hamada, H., et al., Apoptosis induction with 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapy for human malignant glioma cells mediated by adenovirus. *J Neurooncol.* 66(1-2):117-127, 2004.
9. Okada, T., Hamada, H., et al., In situ generation of pseudotyped retroviral progeny by adenovirus-mediated transduction of tumor cells enhances the killing effect of HSV-tk suicide gene therapy in vitro and in vivo. *J Gene Med.* 6(3):288-299, 2004.
10. Kobune, M., Hamada, H., et al., Indian hedgehog gene transfer augments hematopoietic support of human stromal cells including NOD/SCID- β 2m^{-/-} repopulating cells. *Blood.* 2004 Apr 22 [Epub ahead of print] *Blood.* 104(4):1002-1009, 2004.
11. Sako, A., Hamada, H., et al., Transduction of soluble Flt-1 gene to peritoneal mesothelial cells can effectively suppress peritoneal metastasis of gastric cancer. *Cancer Res.* 64(10):3624-3628, 2004.
12. Uchida, H., Hamada, H., et al., Adenovirus-Mediated Transfer of siRNA against Survivin Induced Apoptosis and Attenuated Tumor Cell Growth in Vitro and in Vivo. *Mol Ther.* 10(1):162-171, 2004.
13. Sagawa, T., Hamada, H., et al., Prolonged survival of mice with multiple liver metastases of human colon cancer by intravenous administration of replicable E1B-55K-deleted adenovirus with E1A expressed by CEA promoter. *Mol Ther.* 10(6):1043-1050, 2004.
14. Yasui, H., Hamada, H., et al., Adenovirus-mediated gene transfer of caspase-8 sensitizes human adenocarcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Int J Oncol.* 26(2):537-544, 2004.
15. Kawashima, T., Fujiwara, T., et al., Telomerase-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin. Cancer Res.*, 10: 285-292, 2004.
16. Ohtani, S., Fujiwara, T., et al., Quantitative analysis of p53-targeted gene expression and visualization of p53 transcriptional activity following intratumoral administration of adenoviral p53 in vivo. *Mol. Cancer Ther.*, 3: 93-100, 2004.
17. Tsunemitsu, Y., Fujiwara, T., et al., Molecular therapy for peritoneal dissemination of xenotransplanted human MKN-45 gastric cancer cells with adenovirus-mediated Bax gene transfer. *Gut*, 53: 554-560
18. Arima, Y., Fujiwara, T., et al., Down-regulation of nuclear protein ICBP90 by p53/p21Cip1/WAF1-dependent DNA-damage checkpoint signals contributes to cell cycle arrest at G1/S transition. *Genes Cells*, 9:131-141, 2004.
19. Murakami, T., Fujiwara, T., et al., Antitumor effect of intratumoral administration of bone marrow-derived dendritic cells transduced with wild-type p53 gene. *Clin. Cancer Res.*, 10: 3871-3880, 2004.

20. Tango, Y., Fujiwara, T., et al., Late resistance to adenoviral p53-mediated apoptosis caused by decreased expression of coxsackie-adenovirus receptors in human lung cancer cells. *Cancer Sci.*, 95: 495-463, 2004.
21. Umeoka, T., Fujiwara, T., et al., Visualization of intrathoracically disseminated solid tumors in mice with optical imaging by telomerase-specific amplification of a transferred green fluorescent protein gene. *Cancer Res.*, 64: 6259-6265, 2004.
22. Tokunaga, N., Fujiwara, T., et al., Human monocyte-derived dendritic cells pulsed with wild-type p53 protein efficiently induce cytotoxic T-lymphocytes against p53-overexpressing human cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, in press.
23. Taki, M., Fujiwara, T., et al., Enhanced oncolysis by a tropism-modified telomerase-specific replication selective adenoviral agent OBP-405 ("Telomelysin-RGD"). *Oncogene*, in press.
24. Soda Y, Tani K. et al., A novel Maxizyme vector targeting a bcr-abl fusion gene induced specific cell death in Philadelphia chromosome-positive lymphoblastic acute leukemia. *Blood*104: 356-363, 2004
25. Harata M, Tani K. et al., CD19-targeting liposomes containing imatinib efficiently kill Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 104: 1442-1449, 2004.
26. Tani, K., et al., Phase I Study of Autologous Tumor Vaccines Transduced with the GM-CSF Gene (GVAX[®]) in Four Patients with Stage IV Renal Cell Cancer in Japan: Clinical and Immunological Findings. *Mol Ther* 10: 799-816, 2004.
27. Takahashi, S., Tani, K., et al., Single-institute comparative analysis of unrelated bone marrow transplantation and cord blood transplantation for adult patients with hematological malignancies. *Blood* in press.