

教授就任記念講演 先端医学開発の研究と医学教育

小 賤 健一郎

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 先進治療科学専攻 運動機能修復学講座 細胞生物構造学
(原稿受付 平成19年7月3日)

I. 緒 言

遺伝子治療と再生医学は21世紀の最先端医療の代表として、また脳の高次機能の解明は21世紀の生物学の最大の課題として、いずれも世界中で盛んな研究開発が行われている。本稿では、私の取り組んでいるこの三大分野の研究において、遺伝子治療は「癌遺伝子治療における独自ベクターと新規治療法の開発」、再生医学は「生体内再生医学とES細胞での再生医学」、脳は「Rett症候群の病態解明・治療法の開発と高次脳機能のエピジェネティック分子制御の解明」の研究について、その背景や方向性も踏まえて紹介したい。

II. 遺伝子治療

(1) 第一、第二世代の癌遺伝子治療

遺伝子治療は、(1982年に行われた無謀な臨床試験を除けば) 1990年に米国で行われた臨床試験が最初であり、まだ20年にも満たない新しい医療である。但しその後は

現在まで世界で1000以上の臨床プロトコルが発表・実施され、一般医薬も近々発売されるといわれているように、臨床化のスピードは決して遅くない。その臨床プロトコルの4分の3は癌であるように、現時点の遺伝子治療の代表的な対象疾患は癌である。一方、既存の癌治療法の現状は、近年の診断、治療技術の進歩により、早期の癌に関しては治療成績の向上がみられている。しかし進行癌、特に末期の遠隔転移癌に対しては、既存治療法では限界があるのは明白であり、このため遺伝子治療のような革新的治療法の開発が切望されているのである。今回は、我々の種々の疾患に対する遺伝子治療研究のうち、癌に対する研究開発について紹介する。

まず癌遺伝子治療の歴史を概説すると、第一世代の癌遺伝子治療は、1980年代に基礎研究が進み、90年代に臨床研究が行われたレトロウイルスベクターによる *ex vivo* 遺伝子治療である。これは切除した癌に、*in vitro* の培養下にレトロウイルスベクターでサイトカイン遺伝子などを導入し、放射線で増殖不能化した後に体内に戻し、抗腫瘍免疫を賦活化するという戦略である。しかし臨床試

著者のプロフィール



- ◆1988年3月 久留米大学医学部卒業、同5月 同大小児科研修医
 - ◆1988年4月 久留米大学大学院医学研究科(病理学)入学
 - ◆1992年3月 同上修了、学位(医学博士)取得
 - ◆1992年4月 久留米大学医学部・病理学 助手
 - ◆1993年3月 米国ペイラー医科大学 客員助教授
 - ◆1996年7月 大阪大学医学部・バイオ・腫瘍生化学 教務補佐員
 - ◆1997年11月 久留米大学先端癌治療研究センター・細胞発生工学 / (兼任) 人類遺伝学、小児科学、外科学 助手
 - ◆2000年11月 岐阜大学医学部・循環器再生医科学(2001年7月に遺伝子治療再生医科学へ改称) 助教授
 - ◆2003年5月 久留米大学高次脳疾患研究所・遺伝子治療再生医学部門、教授、(兼任) 同大小児科学 教授
 - ◆2006年7月 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 細胞生物構造学 教授 / (兼任) 久留米大学高次脳疾患研究所 客員教授、聖マリアンナ医科大学 客員教授、岐阜大学医学部 特別協力研究員
- 専門分野 遺伝子治療、再生医学、分子細胞生物学
専門医、資格 日本小児科学会専門医、死体解剖資格認定
受賞 日本小児科学会優秀演題賞(1999)、Mario Boni Award 2001(欧米加日・整形外科基礎学会最優秀賞)、第6回バイオビジネスコンペJAPAN審査委員特別賞(2005)
- 所属学会: 日本遺伝子治療学会(評議員)、日本解剖学会(評議員)、米国遺伝子治療学会、日本再生医療学会、日本癌学会、日本生化学会、日本分子生物学会、日本小児科学会など

験で明らかな治療効果が見られなかった上に、一人の患者の治療に多大な労力と多額の経費がかかるということから、一般医療化されるには至らなかった。

私が米国留学した1990年初頭は、現在は癌遺伝子治療の主流のベクターとなったアデノウイルスベクター(ADV)が開発されたばかりであり、第二世代の癌遺伝子治療となる、*in vivo*遺伝子治療(癌結節に直接ベクターを注射して遺伝子導入する)の研究が限られた専門施設で始まっていた。我々の米国ペイラー医科大学の研究グループは、世界に先駆けADVを用いた「コンビネーション癌遺伝子治療法」を開発した^{1,2)}。これは強力な癌細胞死誘導効果を持つ自殺遺伝子の単純ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子と、種々のサイトカイン遺伝子を導入・発現する2~3種のADVを同時に癌結節に注入し、その後にガンシクロビル(GCV)を投与するという戦略である。HSV-tk遺伝子/GCVは癌細胞優位な殺傷、強力なバイスタンダード効果(僅か数%の癌細胞に遺伝子導入できれば結節内の多くの癌細胞が細胞死に陥る)で腫瘍を減らすと同時に癌抗原を散らばらせ、そこでサイトカインで免疫細胞を誘導すれば、細胞性免疫を中心とする特異的な全身性抗腫瘍免疫が効率的に誘導できるという、理想的な免疫療法である。一部は米国の共同研究者が臨床試験を行っているが、私自身もその後は本邦で、自殺遺伝子の至適発現レベル³⁾、サイトカインの至適発現レベル⁴⁾、同所性モデルでの前臨床研究など^{5,6)}、臨床化における新たな重要事項を明らかにしてきた。

(2) 第三世代癌遺伝子治療の癌優位増殖型アデノウイルス(CRA)と、我々が開発した次世代の「多因子による癌特異的増殖制御型アデノウイルス」(m-CRA)

前述のように、第一世代、第二世代の癌遺伝子治療は米国を中心に数多く臨床試験(研究)がなされてきたわけであるが、その結論は、「遺伝子治療は癌には安全で一般医療の一つと成り得るが、但しその治療効果は当初期待されたような癌治療のブレイクスルーというレベルではない」というものである。治療効果が劇的なものになっていない主因の一つは、*in vitro*でいくら遺伝子導入効率の高いベクターでも、「非」増殖型のベクターでは*in vivo*で体内の全癌細胞にもれなく遺伝子を導入することは「物理的」に不可能である(ベクター液が達しない癌細胞には当然、遺伝子は導入されない)ため、遺伝子「未」導入癌細胞からの再発が起こりえるからである。この問題を認識していない戦略も数多く臨床試験がなされ、その結果が社会的失望も招いてしまった感もあるが、ただ我々は当初よりこの問題を最大の克服課題と正確に捉え、前述のコンビネーション遺伝子治療のように、当

初より「遺伝子未導入癌細胞も治療可能な戦略」を開発してきた。

さてこの問題を根本的に解決するものとして近年期待されているのが、癌特異的に増殖する変異ウイルスの開発であり、中でも特に癌優位増殖型ADV(CRA; Conditionally replicating adenovirus)の研究が盛んである^{7,8)}。CRAは、ウイルス増殖が正常細胞では阻止され、癌細胞内では旺盛に起こるため、生体内で高効率かつ癌細胞特異的な遺伝子導入を可能とするものである。またさらにCRA自身が、癌細胞内で増幅されたウイルス蛋白により癌細胞を特異的に殺す「溶解性ウイルス療法」の医薬となる利点も併せ持つため、CRAは新世代の癌遺伝子治療として期待されている^{7,8)}。

その要点のみ述べると、「非」増殖型ADVベクターではウイルス増殖に必須のE1領域を治療遺伝子に置換する方法をとっているが、CRAはこのE1領域を改変することでウイルス増殖を制御し、癌と正常の細胞でのウイルス増殖に違いを持たせるというものである(図1)。E1領域の一部欠失変異化と、内因性プロモーターを癌特異的遺伝子プロモーターへ置換するという二つの戦略があるが、両者とも基礎研究、臨床試験で良好な結果が示されている。その一方、たかだか一(あるいは二)因子で癌特異性を試みる既存のCRAでは、癌と正常の細胞を「完全に」識別可能とするレベルの癌特異性は困難で、特に正常細胞でも僅かながらウイルスが増殖するという潜在的な問題が残されていた。また最大の問題は、CRAに関しては未だ効率的・標準化作製技術が確立されていないことであり、このためCRAの開発研究は一部の専門施設に限られ、その「手作り」状態は多大な時間と労働力を要するため、研究は極めて非効率ということであった。真のCRAを開発するために我々は、従来の単一因子で癌特異性を試みるCRAとは一線を画す「多数」の異なる癌特異性因子で精密なウイルス増殖の制御が可能なCRA(m-CRA)を、簡単・迅速・効率よく作製、改良可能な

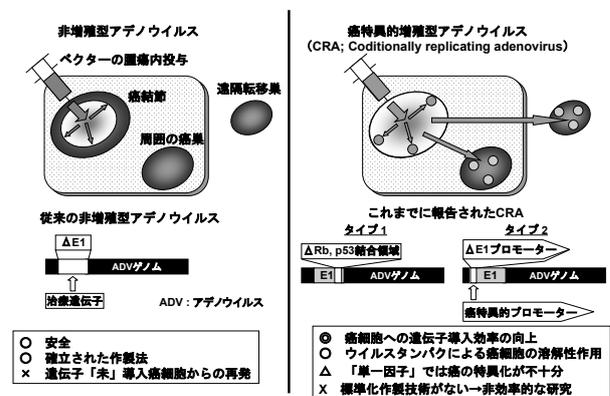


図1. 非増殖型アデノウイルスと癌特異的増殖型アデノウイルス(CRA)の比較

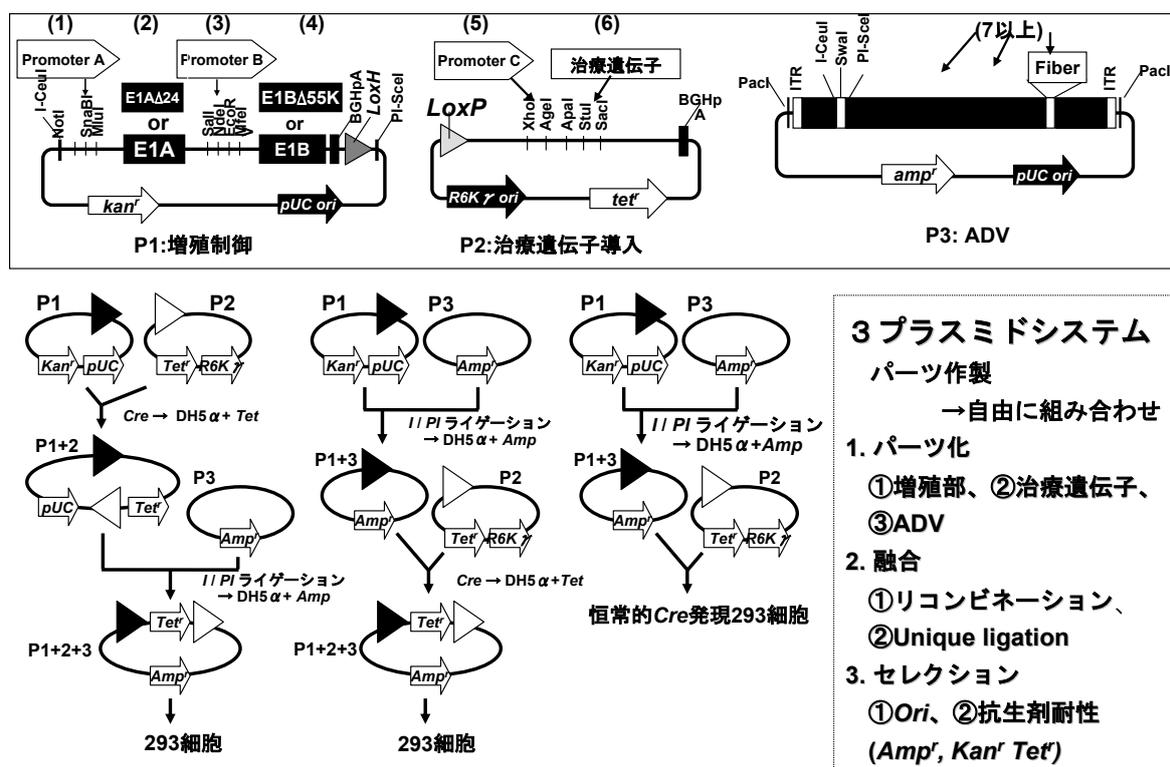


図2. 我々が開発したm-CRA作製技術

「標準化」作製技術を独自開発した⁷⁻⁹⁾。その基本的な発想は、「それぞれのパーツを独立して作製し、後で自由に組み合わせる」という「3プラスミドシステム」である(図2)。つまりウイルス増殖制御部(P1)、治療(導入)遺伝子(P2)、ADVゲノム(P3)の3要素を独立した3つのプラスミドに収載させて各パーツの個別の自由設計を可能とし、様々な遺伝子組換え技術を導入することで、簡単・確実にこの3プラスミドを融合させ一つのm-CRA(プラスミド)にできるようにした。これにより7因子以上の癌特異化因子の挿入/ADVの修飾が、各プラスミドの通常の遺伝子組換え作業で簡単に行うことが可能となった。

我々はこのように基盤となるm-CRA作製技術から開発し、実際にこの技術で革新的な癌治療m-CRA医薬として様々なものを作製し、機能を評価しているが、本稿では第一弾となるサバイビン依存性m-CRAを紹介する(図3)¹⁰⁾。サバイビンはIAP(Inhibitor of apoptosis)ファミリーとして同定されたが、その後、サバイビンはほとんどの種類の癌で高発現している一方、分化した正常細胞では発現がみとめられないことが分かった。さらにサバイビンの発現レベルと癌患者の予後が相関するということが分かり、現在はサバイビン自体が癌治療の新たなターゲット分子として注目されている。我々は、サバイビン遺伝子プロモーターでADV E1Aを発現制御するサバイビン依存性m-CRA(Surv.m-CRA)を開発し、実際にこのSurv.m-CRAは極めて高い癌治療効果と癌特異性の両面を兼ね備える画期的な新規CRAであることを明らかにした¹⁰⁾。さらに我々は、これまでに報告されたCRAの中では最良のテロメラーゼ(TERT; telomerase reverse transcriptase)依存性m-CRA(Tert.m-CRA)も同様に作製し、詳細な比較実験まで行った(図3)。その結果、Surv.m-CRAはTert.m-CRAを、癌治療効果と癌特異性(即ちウイルス増殖と細胞死誘導効果が、癌細胞ではより旺盛である一方、逆に正常細胞ではより消退する)の「両面」で凌ぐということが明確となり、つまりSurv.m-CRAは現時点では最高性能を持つ新規CRAの一つという有望

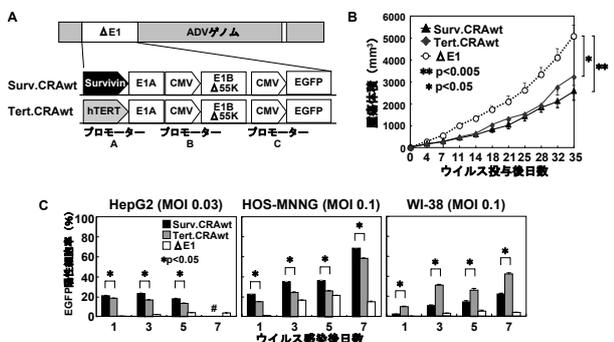


図3. サバイビン依存性m-CRAとテロメラーゼ依存性m-CRAの性能比較

な結果が得られた¹⁰⁾。加えて、前述のようにサバイビンは大部分の癌で高発現しているため、Surv.m-CRAはほぼ全ての種類の癌を治療対象とできるという長所を持つ。

現在我々は、この独自のm-CRA技術によりSurv.m-CRAをさらに精巧に改良していると同時に、第二、第三弾の新規m-CRAも開発しているところである。最終的には、完全に癌細胞だけを認識するm-CRAを開発し、それを癌の主結節に注射すれば主結節を細胞死に陥らせ、さらにそのm-CRAは体内を駆け巡って全身の転移巣を探し出して副作用なく根絶するという、究極の治療法を確立することを目指している。また一方、m-CRAの作製技術、Surv.m-CRAとも、特許出願により知財確保もしており、最終的には本邦での国民福祉の向上を目指し、早期の臨床試験、そして一般医薬化を最終目標とした産業界への技術移転、起業化なども併せて目指して行きたいと思っている。

III. 再生医学

(1) 生体内再生医学 (*in vivo* 再生療法)

再生医学 (医療) は、「主に生物学的な知見の応用と技術により、障害・疾病で失われた組織を補完する治療法の研究」を総称とする新たな医学、医療であり、その開発には社会的にも大きな期待が寄せられている。再生医学といっても、個々の内容、対象疾患によって様々ではあるが、大きく二つに分類できる¹¹⁾。第一の再生医学は、ある物質や遺伝子を体内に投与することにより、元来持っている生体の再生能力を劇的に賦活化し、病気を治療するというものであり、我々はこれを「生体内再生医学 (*in vivo* 再生療法)」と呼んでいる¹²⁾。我々が先駆けとして報告したHGF (肝細胞増殖因子)^{13,14)}、そして最近報告したHB-EGF (ヘパリン結合EGF様増殖因子)¹⁵⁾による劇症肝炎の治療は、理想的な生体内再生治療法の代表であるので、これらを紹介する (図4)。

劇症肝炎とは急性肝炎患者の1~2%にみられるもので、急激に進展する広範性肝細胞死がその病態であるが、未だ効果的な治療法がないために、数日から数週間で40~70%の患者は死亡するという難治性疾患である。我々はまずFasとエンドトキシンの2種類のマウスモデルにて、肝栄養因子のHGFの投与により、肝細胞死を強力に抑制し生存率を劇的に向上させることを見いだした^{13,14)}。さらに我々は最近、別の肝栄養因子であるHB-EGFが、HGFより強力に肝障害抑制と肝再生誘導作用を示すことを見出し、より効果的な劇症肝炎治療法となるHB-EGF生体内肝再生療法を開発した¹⁵⁾。このように、再生誘導因子を治療薬として投与することで、生体内で病気の進展が止まり同時に障害臓器が再生治療していくと

いう「生体内再生医学 (*in vivo* 再生医療)」は、臨床的にも応用し易く、まさに理想的な治療法といえる (図4)。但しこれは生後もある程度の再生能力を保持している臓器、すなわち血球、皮膚、肝臓、などの臓器では最大の効果を示すが、生後は再生能力が失われている心臓、中枢神経などの臓器は、増殖因子のみでは生体内で再生が効率的に誘導されることはないため、これらの臓器疾患には第二の再生医学の開発が必要となる。

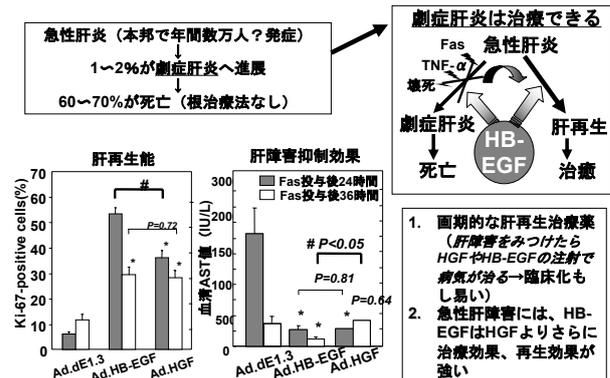


図4. 劇症肝炎への生体内再生医学

(2) ES細胞による再生医学 (再建療法)

第二の再生医学は、体外で何らかの細胞から目的の細胞や組織を分化誘導して創造し、それを障害臓器に細胞 (組織) 移植して治療するというもので、つまり臓器移植に代わる「再建療法」である。その源の細胞として、我々はES (胚性幹) 細胞を選び、心筋と神経の研究を行っている¹¹⁾。循環器疾患は先進諸国の三大死因の一つであるが、種々の心疾患後の終末病態の心不全に対する根治療法は、現在のところは心臓移植しかない。しかし心臓移植は、その患者数 (本邦だけでも循環器疾患で毎年15万人が死亡) に比べて圧倒的にドナーは不足しており、また加えて多額な経費、手術侵襲など、とても万人への一般医療と成り得るものではない。一方、近年の動物レベルの研究によると、臓器ではなくとも心筋の「細胞」の移植でも、心筋梗塞などではその病巣に生着し機能することが示唆されている。即ち、いかなる細胞種にでも分化できる多能性を保持したまま無尽蔵に増やす事ができるES細胞から、体外で目的の心筋細胞を創造することができ、その目的の心筋細胞種だけを単離することができれば、ES細胞由来の心筋細胞移植療法が確立できる可能性がでてくる。

そのためには第一に、心筋細胞を優位に誘導する方法の確立が必要である。我々はまず、胚様体形成法 (初期胚の三葉形成を体外で模倣する方法) にFibroblast growth factor-2, Bone morphogenetic protein-2を至適濃度で至適のタイミングで加える事で、マウスES細胞から

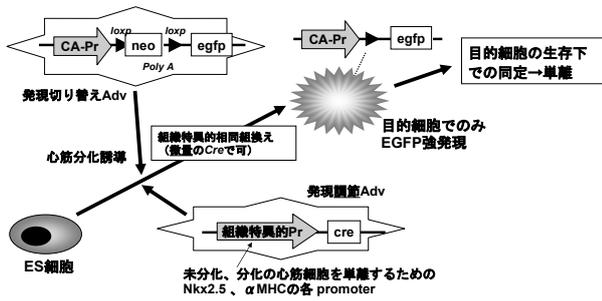


図5. Adenoviral conditional targeting in ES cell法

心筋細胞を効率よく分化誘導できることを見いだした¹⁶⁾。次にヒトES細胞でも同様に心筋細胞の分化誘導の研究を行ったが、マウスES細胞に比べヒトES細胞は操作に技術的制約があり、胚様体形成の効率も悪かった。そこで間葉系細胞と共培養することで心筋の分化誘導ができないか、様々な細胞をスクリーニングし、ある細胞と共培養するとマウス、ヒトES細胞でも心筋細胞が誘導できることを見いだした¹¹⁾。但しヒトES細胞における心筋分化誘導効率はマウスES細胞ほど高くなく、あるいは安定性などで改善すべき問題があり、さらなる方法の改良を試みている。

さて一方、ES細胞より目的の心筋細胞を分化誘導できるとなれば、次にその目的細胞のみを純粋に単離、同定する技術が必要となる。細胞膜表面抗原マーカーを有する血球・血管系などのような一部の細胞種は、蛍光抗体法で目的細胞を可視化後、セルソーターで分離する技術が確立されている。しかしマーカーとなる細胞表面抗原がない、心筋細胞や神経細胞のような多くの細胞種には、組織特異的に発現する遺伝子のプロモーター制御下にレポーター遺伝子を安定発現するES細胞株を作製するという方法が、これまで唯一の戦略であった。我々は特にこれまでに報告のない、できるだけ初期の心筋系統細胞を同定、単離しようと試み、心臓の発生初期に発現する転写因子のNkx2.5遺伝子のプロモーターでGFPを安定発現するES細胞株を多数作製し検証したが、ES細胞から効率よく心筋分化誘導はできているのにも関わらず、GFPで可視化される細胞は全く認められなかった。このように従来の方法は材料作製に多大な労力と時間を費やす上に成功の保証がない不確実な方法で、特に分化初期の細胞には有効ではないことが明確となり、つまりこの問題の根本解決こそが、ES細胞再生医学一般における最重要課題であると分かった。

我々はプロモーターアッセイで、転写因子Nkx2.5、そしてサルコメア蛋白 α MHCのプロモーター活性も、一般の発現実験に用いるCAGプロモーター活性より桁違いに低いことを明らかにし、つまり組織特異的プロモ-

ターは活性強度が低すぎるということが従来法の根本原因であることが分かった。そこで我々は、アデノウイルスベクターとリコンビネーションシステムのAdenoviral conditional targeting法をES細胞の分化系に用い、簡単効率よく遺伝子導入・発現し、リコンビネーション反応でプロモーターの組織特異性を保持したままその活性を上昇させることでこの問題を解決し、ES細胞由来の目的細胞を簡単、確実に同定・単離することに成功した(図5)¹⁷⁾。実際、Nkx2.5、 α MHCの各プロモーターを含む調節アデノウイルスを用いた本法で、目的細胞が生存下で蛍光可視化され、マウスES細胞の心筋分化誘導が進むにつれ、この可視化細胞も増加していった。さらにセルソーターで各々の目的細胞を単離したところ、 α MHC調節アデノウイルスで単離した細胞は、単一細胞化して培養しても自動収縮をくり返し、サルコメア構成蛋白質を発現することから、成熟心筋の性質を持つ細胞種と考えられた。一方、Nkx2.5調節アデノウイルスによって単離された細胞は、収縮能もサルコメア構造も認めず、さらにDNAマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析では未分化と心筋系統の両マーカーを混在して発現していた。よってこの細胞は、未だES細胞から単離されていない、心筋系統の拍動前の未分化初期細胞であろうという、非常に興味深い所見であった。また我々は、DNAマイクロアレイ解析で、この細胞から幾つかの重要と思われる未知遺伝子を同定しており、現在その幾つかの遺伝子の機能解析を行なっているところである。このように本法を用いれば、理論的には、いかなる組織・細胞系でも、興味ある遺伝子発現状態にのみ依存して、プロモーター活性に依存することなく、いかなる目的細胞でも確実に可視化することができると思われる。単離できた細胞は再生医療の移植用のドナー細胞として利用できるのはいうまでもなく、上記で示したように発生学の画期的な新しい実験手法としても、非常に有用と思われる。今後は、ヒトES細胞とこのオリジナル技術を基盤として、心疾患モデル動物での治療実験による細胞移植療法の開発、心筋の初期発生における新規分子の同定とメカニズムの解明など、研究を進めていきたいと思っている。

IV. 高次脳機能のエピジェネティック分子制御の解明

最後に、最近始めた我々の脳研究を紹介する。Rett症候群は一人に一人の発症と女性の精神発達遅滞で最も頻度が高い疾患で、一歳頃より精神遅滞・自閉的傾向、てんかん、発達停滞などを特徴とする神経疾患であり、効果的治療法は未だない。Rett症候群の原因は長年不明であったが、DNAのメチル化部位に直接結合して標的遺

伝子をエピジェネティックに発現抑制しているMeCP2遺伝子の変異が原因遺伝子と最近分かり、さらにRett症候群のモデルマウスであるMeCP2遺伝子欠損マウスも最近作製されたばかりである。しかしRett症候群の病態、病因とも未だ不明の部分が多く、MeCP2の生理的役割とメカニズムについても、Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)のプロモーター部にMeCP2が直接結合して発現制御しているという報告以外、未知の部分が多く、MeCP2からの高次脳機能のメカニズム解明というのは世界的にも注目を浴びている。

我々はいち早くRett症候群モデルマウスのMeCP2欠損マウスを入手し、MeCP2発現アデノウイルスを作製し、遺伝子治療実験を行ってきた。またこれまでのES細胞の技術と経験を生かし、同様にES細胞の神経分化系で細胞、遺伝子レベルでそのメカニズムの解明の研究を進めている。我々は本研究には約3年前より取り組んだばかりで未だ進行中の段階ではあるが、高次脳機能のエピジェネティック分子制御の機構は全く未知だけに、我々のオリジナルの研究手法により興味深い発見が得られるのではないかと思いつながりながら研究を進めている。

V. 結 語

以上のように、我々の行っている、遺伝子治療、再生医学、脳の三分野における主な研究について述べた。これらの研究成果は特許出願して知財を確保しており、産学協同による技術移転、あるいは自身での起業化などにより、新しい治療法の本邦での一般医療化の実現を目指していきたいと思っている。鹿児島大学は歴史ある国立大学(法人)であり、また鹿児島の風土は歴史的にも証明されているように、独自の世界を築くための力を付与してくれるものと思っている。真のオリジナルの治療法を鹿児島から世界に発信し、最終的に本邦の国民福祉の向上に少しでも貢献できるよう、今後は鹿児島大学の基礎、臨床、そして他学部の諸先生と共同研究を積極的に進めていきたいと思っている。

最後に私事で恐縮だが、私の実家は開業医で親族の多くも医師という環境で育ったため、医学部生の頃は、自分の進路として、患者と直接接する臨床医以外は想像したこともなかった。しかし実際に小児科研修医として臨床の現場に出てみて、根治療法のない病気は未だ多く、そして多くの患者さんが亡くなっておられることを現実として知った。臨床に近い基礎医学ということで大学院は病理学を選んだが、研究に関わるにつれ、分子生物学のより専門的な知識と遺伝子工学の強力な新技術を身につけ、自分自身で直接に新しい治療法を開発できるような研究に携わってみたいと思いつながりながら、遺伝

子組換えの真似事を始めた。それからは国内外の様々な専門施設に所属し、13年前より遺伝子治療、10年前より再生医学、3年前からは脳と、独自に研究領域を広げてきた。ともかく15年前の「自身の手で治療法を開発できるようにになりたい」という憧れが、今も私の先端医学開発に関わる研究のモチベーションの源となっている。個人の能力、小研究室の規模を遥かに超える研究内容に小さな研究室で取り組んでしまっていることに加え、私はオリジナリティーを最重視するため(科学的理由だけでなく、上記のように将来社会還元するためには知財確保が必要のため)、基盤の研究材料と技術開発から自身の研究室で行うため、時間が非常にかかることもあり、まだまだ発展途上の研究が多い。15年前に憧れていた先端治療法開発の研究に現在自身が毎日取り組めることに感謝するとともに、初めて患者を受け持った時の感動、自分自身で大腸菌での遺伝子組換え実験を最初に行った時の感動をいつまでも忘れる事無く、今後も研究と教育に邁進したいと思っている。

文 献

1. Chen SH, Chen XH, Wang Y, Kosai K, Finegold MJ, Rich SS, et al. Combination gene therapy for liver metastasis of colon carcinoma in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 2577-2581.
2. Chen SH, Kosai K, Xu B, Pham-Nguyen K, Contant C, Finegold MJ, et al. Combination suicide and cytokine gene therapy for hepatic metastases of colon carcinoma: sustained antitumor immunity prolongs animal survival. *Cancer Res* 1996; 56: 3758-3762.
3. Terazaki Y, Yano S, Yuge K, Nagano S, Fukunaga M, Guo ZS, et al. An optimal therapeutic expression level is crucial for suicide gene therapy for hepatic metastatic cancer in mice. *Hepatology* 2003; 37: 155-163.
4. Nagano S, Yuge K, Fukunaga M, Terazaki Y, Fujiwara H, Komiya S, et al. Gene therapy eradicating distant disseminated micro-metastases by optimal cytokine expression in the primary lesion only: novel concepts for successful cytokine gene therapy. *Int J Oncol* 2004; 24: 549-558.
5. Fukunaga M, Takamori S, Hayashi A, Shirouzu K, Kosai K. Adenoviral herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy in an orthotopic lung cancer model. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1740-1746.
6. Ikoma T, Takahashi T, Nagano S, Li YM, Ohno Y,

- Ando K, et al. A definitive role of RhoC in metastasis of orthotopic lung cancer in mice. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1192-1200.
7. 室伏善照, 神園純一, 小賤健一郎, 新世代癌遺伝子治療のための多因子で増殖制御/癌特異化するアデノウイルスの作製法. *細胞工学* 2005; 25: 60-66.
8. 神園純一, 室伏善照, 小賤健一郎, 多因子で増殖制御/癌特異標的化するアデノウイルスベクターのはじめの標準化作製技術. *バイオテクノロジージャーナル* 2005; 5: 728-731.
9. Nagano S, Oshika H, Fujiwara H, Komiya S, Kosai K. An efficient construction of conditionally replicating adenoviruses that target tumor cells with multiple factors. *Gene Ther* 2005; 12: 1385-1393
10. Kamizono J, Nagano S, Murofushi Y, Komiya S, Fujiwara H, Matsuishi T, et al. Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus exhibits cancer-specific and efficient viral replication. *Cancer Res* 2005; 65: 5284-5291.
11. 高橋知之, 藤原久義, 國貞隆弘, 小賤健一郎. 【ヒトおよびサルES細胞】ES細胞再生医学の新技术開発 ヒトES細胞と遺伝子治療技術. *再生医療* 2006; 5: 43-51.
12. 高橋知之, 小賤健一郎. HGF 急性/劇症肝炎. 松本邦夫, 田畑安彦 編. *細胞増殖因子と再生医療*. 大阪: メディカルレビュー社, 2006: 199-204.
13. Kosai K, Matsumoto K, Nagata S, Tsujimoto Y, Nakamura T. Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244: 683-690.
14. Kosai K, Matsumoto K, Funakoshi H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents endotoxin-induced lethal hepatic failure in mice. *Hepatology* 1999; 30: 151-159.
15. Khai NC, Takahashi T, Ushikoshi H, Nagano S, Yuge K, Esaki M, et al. In vivo hepatic HB-EGF gene transduction inhibits Fas-induced liver injury and induces liver regeneration in mice: a comparative study to HGF. *J Hepatol* 2006; 44: 1046-1054.
16. Kawai T, Takahashi T, Esaki M, Ushikoshi H, Nagano S, Fujiwara H, et al. Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J* 2004; 68: 691-702.
17. Takahashi T, Kawai T, Ushikoshi H, Nagano S, Oshika H, Inoue M, et al. Identification and isolation of embryonic stem cell-derived target cells by adenoviral conditional targeting. *Mol Ther* 2006; 14: 673-683.