

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年10月15日(15.10.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/125626 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/053256
- (22) 国際出願日: 2009年2月24日(24.02.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-104070 2008年4月11日(11.04.2008) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 岡山大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION OKAYAMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市津島中一丁目1番1号 Okayama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 田中 紀章(TANAKA, Noriaki) [JP/JP]; 〒7008558 岡山県岡山市鹿田町二丁目5番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP). 松岡 順治(MATSUOKA, Junji) [JP/JP]; 〒7008558 岡山県岡山市鹿田町二丁目5番1号 岡山大学医学部・歯学部附属病院内 Okayama (JP). 深澤

拓也(FUKAZAWA, Takuya) [JP/JP]; 〒7008558 岡山県岡山市鹿田町二丁目5番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP).

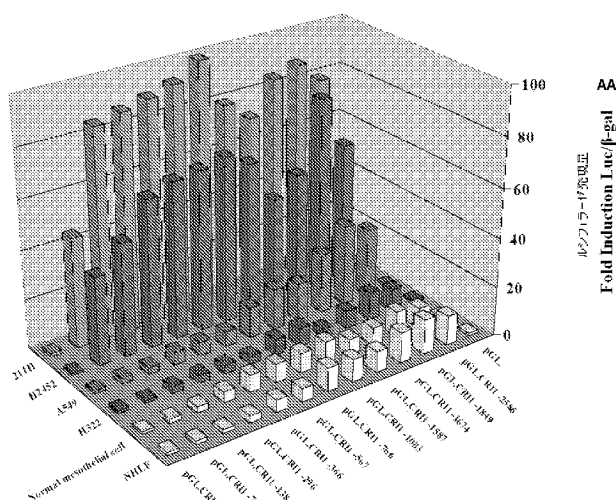
- (74) 代理人: 庄司 隆, 外(SHOJI, Takashi et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3-4-1 秋場ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF,

[続葉有]

(54) Title: MESOTHELIOMA-SPECIFIC PROMOTER AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 中皮腫特異的プロモータおよびその用途

[図5]



AA AMOUNT OF LUCIFERASE EXPRESSED Fold Induction Luc/β-gal

(57) Abstract: Disclosed is a promoter which has a transcriptional activity specific to mesothelioma and exhibits a low transcriptional activity on other cancer cells and normal cells including a mesothelium. Also disclosed is use of the promoter, specifically a vector for use in gene therapy or a therapeutic agent for mesothelioma, which comprises the promoter. Specifically disclosed is a promoter derived from a gene of CR1 which is one of the markers for mesothelioma. Also specifically disclosed is a vector having a cell death-inducing gene or a cell lysis-inducing gene as a transgene and carrying a promoter derived from CR1 gene upstream from the transgene. By using the vector, it becomes possible to elicit a cell death- or cell lysis-inducing activity in a mesothelioma-specific manner. Each of the vector for use in gene therapy and the therapeutic agent for mesothelioma comprises a viral vector carrying the promoter derived from CR1 gene.

(57) 要約: 本発明は、中皮腫特異的に転写活性を示し、他種癌細胞および中皮を含む正常細胞では転写活性の低いプロモータを提供することを課題とする。さらには、該プロモータの用途に関し、具体的には該プロモータを含む遺伝子治療用ベ

クターおよび中皮腫治療剤を提供することを課題とする。中皮腫マーカーの一種であるCR1の遺伝子由来プロモータによる。導入遺伝子として、細胞死誘導遺伝子、細胞融解誘導遺伝子を含み、導入遺伝子上流にCR1遺伝子由来プロモータを搭載するベクターを用いることで、中皮腫特異的に細胞死または細胞融解作用を誘導することができる。つまり、遺伝子治療用ベクターおよび中皮腫治療剤は、CR1遺伝子由来プロモータを搭載するウイルスベクターによる。

WO 2009/125626 A1

CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, — 明細書の別個の部分として表した配列リスト
TG). (規則 5.2(a))

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

中皮腫特異的プロモータおよびその用途

技術分野

[0001] 本発明は、中皮腫特異的に転写活性を示し、他種癌細胞および中皮を含む正常細胞では転写活性の低いプロモータに関する。さらには、該プロモータの用途に関し、具体的には該プロモータを含む遺伝子治療用ベクターおよび中皮腫治療剤に関する。

[0002] 本出願は、参照によりここに援用される場所の日本出願特願2008-104070号優先権を請求する。

背景技術

[0003] 胸部の肺あるいは心臓などの臓器や胃腸・肝臓などの腹部臓器は、それぞれ、胸膜・腹膜・心膜などという膜に包まれている。これらの膜の表面をおおっているのが「中皮」である。中皮腫とは、中皮細胞由来の腫瘍の総称をいい、悪性および良性の双方がある。発生場所は胸膜が多く、他に腹膜や心膜などがあり、それぞれ胸膜中皮腫、腹膜中皮腫、心膜中皮腫という。中皮腫はアスベスト(石綿)との関連で論じられることが多いが、この場合の中皮腫は、ほとんどが悪性胸膜中皮腫のことをいう。

[0004] 中皮腫は、アスベストの曝露が多いほど、また曝露歴が長いほど、リスクが高くなり、アスベストに曝露してから中皮腫が発生するまでの期間が長いのが特徴である。発生までに、早い場合で20年前後、平均で約40年程度の時間がかかるといわれている。アスベスト曝露と喫煙のリスクを併せ持つ人の肺癌の罹患率が数倍～50倍になることが指摘されているが、中皮腫と喫煙の関連はほとんどないといわれている。

[0005] 中皮腫の診断方法としては、画像所見、胸水の細胞診、組織生検および腫瘍マーカーの検出などが挙げられる。画像所見では多くの場合、X線では胸膜外徴候(extrapleural sign)や胸水貯留を認める。通常は片側性である。胸部CTでも同様の所見を得ることができる。またFDG-PETでは、集積像を認める。胸水の細胞診では腫瘍細胞を認める場合がある。組織生検はきわめて重要で確定診断をする最大の根拠となる。中皮腫のマーカーとして、WT1(Wilms' tumor susceptibility gene 1)(非特許文献

1～3)、Calretinin(非特許文献4、5)、Mesothelin(非特許文献5)、CRI1(CREBBP/EP300 inhibitory protein 1)(非特許文献6)の発現が認められることが報告されている。なお、CRI1は、CarimらのEST cluster解析によりC15ORF13として同定されたことが報告され(非特許文献7)、Gordonらの解析により中皮腫に有意に発現することが報告されている(非特許文献6)が、病原性に関する報告はない。CRI1をコードする遺伝子の配列は、GenBank Accession No. NM_014335に登録されており、別名EP300 interacting inhibitor of differentiation 1(EID1)ともいう。

[0006] 中皮腫の治療方法は、病期、例えば限局型胸膜中皮腫(I期)または進展型胸膜中皮腫(II、III、IV期)によっても異なる。例えば限局型胸膜中皮腫(I期)の場合には、治療は胸膜の一部とその周囲の組織を除去する外科療法が行われる。腫瘍が胸膜のより広い範囲にあれば、治療は症状を軽減するために胸膜とその近傍の組織を取り除く外科療法を行い、場合によっては放射線療法や化学療法を行う場合もある。進展型胸膜中皮腫(II、III、IV期)の場合は、その病期によっても異なるが、例えば胸部から液体を除去する胸腔穿刺や、外科療法、放射線療法、化学療法が行われる。中皮腫は、臓器転移を起こすことはほとんどないものの、診断時にすでに広範囲に進展し、根治手術が不可能であることが多い。予後はきわめて不良で、1年生存率が50%、2年生存率が20%であるといわれている。

[0007] 近年、疾患に対する治療方法の一つとして、遺伝子治療の試みが多くなされている。このような遺伝子治療のために使用可能なベクターについても各種報告があり、抗腫瘍剤として応用されることが期待されている(特許文献1、2)。遺伝子治療に用いられるベクターの1種として、アデノウイルスベクター(「Adベクター」ともいう。)が挙げられる。現在、遺伝子治療用ベクターとして用いられるAdベクターは、サブグループC(sub-group C)に属した5型(あるいは2型)のヒトAdを基盤としている。

[0008] Adベクターは、その優れた遺伝子導入特性から、遺伝子治療用ベクターとして各種疾患への適用が期待されている。しかしながら、Adベクターを腫瘍局所へ投与した場合、一部のAdベクターは腫瘍から全身循環に漏出する場合がある。目的とする疾患部位以外で遺伝子が発現すると、好ましくない副作用が生じることが懸念される。例えば、遺伝子発現細胞に対して毒性を示すような遺伝子を用いる場合は、中皮

腫である腫瘍のみならず腫瘍ではない組織に対しても毒性を示してしまう場合がある。目的とする細胞や組織のみで所望の遺伝子を発現させることができれば、副作用を伴うことなく、効果的な遺伝子治療が行うことができると考えられる。

非特許文献1: Differentiation, 65: 89-96, 1999

非特許文献2: Cancer Research, 61: 921-925, 2001

非特許文献3: J. Pathol., 199: 479-487, 2003

非特許文献4: Human Pathology, 34: 994-1000, 2003

非特許文献5: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 136-140, 1996

非特許文献6: Am. J. Pathol., 166: 1827-1840, 2005

非特許文献7: Cytogenet. Cell Genet., 88: 330-332, 2000

特許文献1: 特開2007-209328号公報

特許文献2: 特開2007-190022号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明は、中皮腫特異的に転写活性を示し、他種癌細胞および中皮を含む正常細胞では転写活性の低いプロモータを提供することを課題とする。さらには、該プロモータの用途に関し、具体的には該プロモータを含む遺伝子治療用ベクターおよび中皮腫治療剤を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0010] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、中皮腫マーカーに着目し、中皮腫マーカーに関するプロモータであって、中皮腫特異的に転写活性を示し、他種癌細胞や中皮を含む正常細胞では転写活性を示さないプロモータを見出すことに成功し、本発明を完成した。

- [0011] すなわち、本発明は以下よりなる。

1. CRI1(CREBBP/EP300 inhibitory protein 1)遺伝子由来のプロモータであり、中皮腫特異的に転写活性を示すことを特徴とする新規プロモータ。
2. CRI1遺伝子由来のプロモータの配列が、CRI1遺伝子の-2586~+84の領域から選択される配列である、前項1に記載の新規プロモータ。

3. CRI1 遺伝子由来のプロモータの配列が、配列表の配列番号1～11に記載のいずれかである、前項1または2に記載の新規プロモータ。
4. 前項1～3のいずれか1に記載の新規プロモータを搭載してなるウイルスベクター。
5. ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである前項4に記載のウイルスベクター。
6. アデノウイルスが、制限増殖型アデノウイルスである前項5に記載のウイルスベクター。
7. さらに、細胞死誘導遺伝子および／または細胞融解誘導遺伝子をプロモータの下流に搭載してなる前項4～6のいずれか1に記載のウイルスベクター。
8. 前項4～7のいずれか1に記載のウイルスベクターからなる遺伝子治療型中皮腫治療用ベクター。
9. 前項8に記載の遺伝子治療型中皮腫治療用ベクターを含む中皮腫治療剤。
10. さらに、マーカー遺伝子をプロモータの下流に搭載してなる前項4～6のいずれか1に記載のウイルスベクター。
11. マーカー遺伝子が、蛍光タンパク質発現遺伝子である前項10に記載のウイルスベクター。
12. 前項10または11に記載のウイルスベクターからなる中皮腫検査用ウイルスベクター。
13. 前項12に記載の中皮腫診断用ウイルスベクターを用い、マーカーの発現の有無を観察することによる中皮腫の検査方法。

発明の効果

[0012] 本発明の新規プロモータは、中皮腫に有意な転写活性を示し、他種癌細胞および中皮腫を含む正常細胞での活性は低値であった。このことより、当該プロモータを搭載した細胞死誘導型または細胞融解誘導型ベクターを利用することで、効果的に中皮腫特異的に細胞死または細胞融解作用を誘導することができる。また、また、*in vivo*においても、抗腫瘍効果が確認された。*in vitro*および*in vivo*での確認の結果、ベクターがE1欠損型Adの場合に、本発明のプロモータとともに、E1領域をコードする遺

伝子を導入遺伝子として組み込むことで、中皮腫特異的にAdが増殖し、中皮腫を消滅させることができる。上記により、中皮腫にとって効果的な治療剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

- [0013] [図1]各種中皮腫マーカー遺伝子のプロモータ領域の部分を取り出し、ホタルルシフェラーゼ遺伝子と結合した発現コンストラクトを示す図である。(実施例1)
- [図2]各種中皮腫マーカー遺伝子由来プロモータの中皮腫または肺癌細胞における転写活性を示す図である。(実施例1)
- [図3]各種中皮腫マーカー遺伝子由来プロモータの正常細胞における転写活性を示す図である。(実施例1)
- [図4]CRI1遺伝子のプロモータ領域の部分を取り出し、ホタルルシフェラーゼ遺伝子と結合した発現コンストラクトを示す図である。(実施例2)
- [図5]CRI1遺伝子由来各プロモータの各種細胞における転写活性を示す図である。(実施例2)
- [図6]本発明のプロモータおよび各導入遺伝子を搭載したAdベクターのシェーマを示す図である。(実施例3)
- [図7]本発明のAdベクターを各種細胞に感染させたときのフローサイトメリーパターンを示す図である。(実験例1)
- [図8]本発明のAdベクターを各種細胞に感染させたときの生細胞数測定結果を示す図である。(実験例2)
- [図9]本発明のAdベクターを、腫瘍モデルマウスに投与したときの腫瘍細胞の体積を示す図である。(実験例3)

発明を実施するための最良の形態

- [0014] 本発明のCRI1(CREBBP/EP300 inhibitory protein 1)は、背景技術の欄に示すとおり、非特許文献6および7に報告されたもの (GenBank Accession No. NM_014335) であるが、本発明のCRI1遺伝子由来のプロモータは、染色体15q21(Chromosome 15 q21, GenBank Accession No. NW_925884.1)に示す塩基配列より選択される。
- [0015] 具体的には、配列表のGenBank Accession No. NW_925884.1に示す塩基配列のう

ち、CRI1遺伝子の上流部分であり、CRI1遺伝子の転写開始点を+1とした場合に、-2586～+84(配列番号1)の領域より選択される。より詳しくは、-1849～+84(配列番号2)より選択され、さらには-1674～+84(配列番号3)より選択され、-1587～+84(配列番号4)より選択され、-1083～+84(配列番号5)より選択され、-766～+84(配列番号6)より選択され、-567～+84(配列番号7)より選択され、-366～+84(配列番号8)より選択され、-296～+84(配列番号9)より選択され、最も好ましくは、-138～+84で示される塩基配列(配列番号10)からなるプロモータである。また、-74～+84(配列番号11)で示される塩基配列からなるプロモータであってもよい。配列表の配列番号1に示す配列からなるプロモータをCRI1^{-2586/+84}、配列番号2に示す配列からなるプロモータをCRI1^{-1849/+84}、配列番号3に示す配列からなるプロモータをCRI1^{-1674/+84}、配列番号4に示す配列からなるプロモータをCRI1^{-1587/+84}、配列番号5に示す配列からなるプロモータをCRI1^{-1083/+84}、配列番号6に示す配列からなるプロモータをCRI1^{-766/+84}、配列番号7に示す配列からなるプロモータをCRI1^{-567/+84}、配列番号8に示す配列からなるプロモータをCRI1^{-366/+84}、配列番号9に示す配列からなるプロモータをCRI1^{-296/+84}、配列番号10に示す配列からなるプロモータをCRI1^{-138/+84}、配列番号11に示す配列からなるプロモータをCRI1^{-74/+84}、と表すことができる。

[0016] 本発明の新規プロモータは、中皮腫特異的に転写活性を示すことを特徴とする。本発明のプロモータは、悪性胸膜中皮腫細胞株、例えば211H細胞やH2452細胞では有意に転写活性を認めるが、肺癌由来細胞株、例えばヒト扁平上皮肺癌由来A549細胞、ヒト細気管支肺胞上皮癌由来H322細胞では殆ど転写活性を認めないか、あるいは中皮腫由来細胞株における転写活性に比べて明らかに低いものである。また本発明のプロモータは、正常ヒト肺線維芽細胞(Normal Human Lung Fibroblasts)由来NHLF細胞や正常中皮細胞においても殆ど転写活性を認めないか、あるいは中皮腫由来細胞株における転写活性に比べて明らかに低いものである。

[0017] 本発明の新規プロモータを搭載してなるベクターは、使用の目的に応じて適宜選択することができるが、ウイルスベクターが好適に用いられる。また、ウイルスベクターとしては、アデノウイルス(Ad)ベクターが好適に用いられる。本発明において使用可能なAdは、in vivoまたはin vitroでDNAやRNAなどの核酸配列を種々のタイプの

細胞へ導入するビヒクルとしての機能を達成しうるものであれば良く、特に限定されない。代表的には、ヒトを宿主とする2型、5型、11型、35型の各Ad、ヒト以外を宿主とするサルAd、チンパンジーAd、マウスAd、イヌAd、ヒツジAdおよびトリAdなどが挙げられる。Adは、特定の細胞でのみ増殖するもの、例えば、E1欠損型Adや制限増殖型Adであってもよい。E1欠損型Adは、293細胞(細胞内にE1を有する)でのみ繁殖することができ、制限増殖型Adは、例えば特定の癌細胞でのみ増殖することができる。

[0018] 本発明のプロモータを、中皮腫特異的に発現させたい遺伝子とともに発現可能なベクターに組み込み、搭載することができる。プロモータの塩基配列は、例えば配列番号1~11のいずれかに示す塩基配列からなるものを選択することができる。組み込むプロモータの数は、ベクターに組み込み可能な長さであればよく、特に制限されず、複数個のプロモータを組み込んでも良い。また、本発明において、ベクターに搭載しうる中皮腫特異的に発現させたい遺伝子を、導入遺伝子という。

[0019] 本発明における導入遺伝子として、中皮腫細胞に対して損傷を与える遺伝子が好適であり、例えば、細胞死誘導遺伝子や細胞融解誘導遺伝子が挙げられる。細胞死誘導遺伝子の例として、例えばアポトーシス促進関連遺伝子が挙げられる。アポトーシスを阻害する物質として、ミトコンドリアからのシトクロムcの放出を部分的に阻止してアポトーシスを阻害するBcl-2ファミリータンパク質であるBcl-2やBcl-XLがあるが、逆にBadは、ファミリーの内、アポトーシスを阻害するタンパク質と結合して不活性化させ、プロカスペーゼの活性化とアポトーシスを促進する。また、BaxやBakは、ミトコンドリアからのシトクロムc放出を促進する刺激因子であり、アポトーシスを促進する。BaxとBakは、BidなどのBcl-2ファミリーのアポトーシス促進因子によって活性化される。従って、細胞死誘導遺伝子の例として、具体的にはBid遺伝子を例示することができる。例えば、本発明のプロモータとともに、細胞死誘導遺伝子や細胞融解誘導遺伝子をベクターに組み込むことで、中皮腫特異的に細胞死や細胞融解を誘導させることができ、正常細胞には影響を及ぼすことなく、効果的に中皮腫治療に使用することができる。

[0020] また、ベクターがE1欠損型Adの場合には、E1領域をコードする遺伝子を導入遺

伝子とし、本発明のプロモータとともに導入することができる。これにより、中皮腫特異的にAdが増殖することで、中皮腫細胞のAd感染により中皮腫細胞を消滅させることができる。

[0021] 本発明のベクターの作製は、作製工程において1または複数の制限酵素の認識配列を各々制限酵素で消化し、導入遺伝子を、シャトルベクターを介して、またはシャトルベクターを介することなく、インビトロライゲーションにより導入することができる。

[0022] 本発明のベクター、例えばAdベクターは以下の工程を含む製造方法により作製することができる。

- 1) 導入遺伝子の非翻訳領域に本発明のプロモータ配列を含む発現コンストラクトを構築する工程；
- 2) 上記1)の発現コンストラクトを含むシャトルベクターを構築する工程；
- 3) Adゲノムを準備する工程；
- 4) Adゲノムを制限酵素で切断し、2)で作製した遺伝子発現シャトルベクターをAdゲノムにライゲーションする工程。

[0023] 本発明は、プロモータを組み込んだベクターにも及び、具体的には該プロモータと、該プロモータの下流に導入遺伝子を搭載してなる組換えベクターにも及ぶ。導入遺伝子とは具体的には、中皮腫細胞に対して損傷を与える遺伝子が好適であり、例えば、細胞死誘導遺伝子や細胞融解誘導遺伝子が挙げられる。細胞死誘導遺伝子の例として、例えばアポトーシス促進関連遺伝子が挙げられる。アポトーシスを阻害する物質として、ミトコンドリアからのシトクロムcの放出を部分的に阻止してアポトーシスを阻害するBcl-2ファミリータンパク質であるBcl-2やBcl-XLがあるが、逆にBadは、ファミリーの内、アポトーシスを阻害するタンパク質と結合して不活性化させ、プロカスペーゼの活性化とアポトーシスを促進する。また、BaxやBakは、ミトコンドリアからのシトクロムc放出を促進する刺激因子であり、アポトーシスを促進する。BaxとBakは、BidなどのBcl-2ファミリーのアポトーシス促進因子によって活性化される。従って、細胞死誘導遺伝子の例として、具体的にはBid遺伝子を例示することができる。

[0024] 本発明のプロモータの下流に上記導入遺伝子を搭載したベクターを中皮腫治療剤

として利用することができる。本発明は、該導入遺伝子を組み込みこんだ組換えベクターを有効成分とする中皮腫治療剤にも及ぶ。

[0025] さらに、本発明のプロモータを組み込んだベクターは、中皮腫の検査においても使用することができる。具体的には、マーカー遺伝子を該プロモータの下流に搭載してなるウイルスベクターを用いることによる。本発明のプロモータは中皮腫に有意な転写活性を有することから、中皮腫の存在によりマーカー遺伝子が発現し、中皮腫を検査することができる。マーカー遺伝子としては、検査に使用可能なタンパク質を発現しうるものであれば良く、特に限定されないが、例えば蛍光タンパク質が挙げられ、より具体的にはGFP (Green Fluorescent Protein) が挙げられる。本発明は、中皮腫の存在によりマーカー遺伝子が発現しうる中皮腫検査用ウイルスベクターにも及び、該中皮腫検査用ウイルスベクターを用いてマーカーの発現の有無を観察することによる中皮腫の検査方法にも及ぶ。

実施例

[0026] 以下に、本発明のプロモータおよび該プロモータを組み込んだ組換えベクターについて、実施例を示して本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではないことは明らかである。

[0027] (実施例1) 各種プロモータの各種細胞における転写活性の確認

1) 各種中皮腫マーカー遺伝子由来プロモータを含む発現コンストラクトの構築

中皮腫マーカーとしてCRI1、Calretinin、WT1(Wilms' tumor susceptibility gene 1) およびMesothelinについて、各マーカー遺伝子のプロモータ領域の部分を取り出し、ホタルルシフェラーゼ(Luciferase)遺伝子と結合した発現コンストラクトを構築した。各プロモータを含む発現コンストラクトのシェーマを図1に示した。ここで、Calretinin遺伝子由来プロモータは、染色体16q21.1(Chromosome 16 q21.1, GenBank Accession No. NT_010498.15)、WT1遺伝子由来プロモータは、染色体11p3(Chromosome 11 p3, GenBank Accession No. NT_079237.17)、Mesothelin遺伝子由来プロモータは、染色体16(Chromosome 16, GenBank Accession No. NT_037887.4)の各配列から選択される。各マーカー遺伝子の転写開始点を+1としたときの各プロモータ領域の配列は、配列表の配列番号2または12~14のいずれかで表され、具体的には以下

に示される。

CRI1遺伝子プロモータ:-2586/+84 (配列番号2)

Calretinin遺伝子プロモータ:-2179/+70 (配列番号12)

WT1遺伝子プロモータ:-1887/+39 (配列番号13)

Mesothelin遺伝子プロモータ:-2310/+44 (配列番号14)

[0028] 2)各プロモータの中皮腫または肺癌細胞における転写活性の確認

pGL3ルシフェラーゼレポーターベクター(Promega社)に、上記各プロモータを挿入した発現コンストラクトを作製した(pGL3 Luciferase Reporter Vectors, Promega社, Technical Manual No.033参照)。悪性胸膜中皮腫細胞株4株(H2452、211H、H2052、H28)および肺癌細胞株2種(A549、H322)の各細胞を、6ウェルプレートに、細胞数葉 4×10^6 を3ウェルずつ播種し、各細胞について生着を確認後、形質導入試薬Lipofectin^(R)(Invitrogen社)を用いて、各発現コンストラクト2 μ gを各細胞に形質導入した。24時間後に各細胞でのルシフェラーゼアッセイによりルシフェラーゼの発光を測定し、各プロモータの転写活性を確認した。

[0029] その結果、各マーカー遺伝子由来のプロモータは、中皮腫細胞特異的に転写活性を示し、肺癌細胞には低い転写活性を示す傾向であった。特に、CRI1遺伝子プロモータ:-2586/+84の場合は、他のプロモータに比べて、中皮腫細胞特異的に転写活性を認め、肺癌細胞では低い転写活性しか認めなかった(図2)。

[0030] 3)各種中皮腫マーカー遺伝子由来プロモータの正常細胞における転写活性の確認

上記2)と同手法によりpGL3ルシフェラーゼレポーターベクター(Promega社)に各プロモータ領域を挿入した各発現コンストラクトを作製した。正常中皮細胞、正常胸膜細胞(ラット胸膜由来の4/4RM-4細胞)および正常ヒト肺線維芽細胞(Normal Human Lung Fibroblasts)由来NHLF細胞の各細胞を上記2)と同様に培養し、各細胞について生着を確認後、各発現コンストラクト2 μ gを各細胞に形質導入した。24時間後に各細胞でのルシフェラーゼアッセイによりルシフェラーゼの発光を測定し、各プロモータの転写活性を確認した。

[0031] その結果、CRI1遺伝子プロモータ:-2586/+84(CRI1^{-2586/+84})の場合は、正常細胞に対して低い転写活性であったが、その他の各マーカー由来のプロモータは、正常

細胞でも転写活性を認めた(図3)。

[0032] 以上の結果により、CRI1^{-2586/+84}は、正常細胞および肺癌細胞に対しては低い転写活性であったが、中皮腫に対しては高い転写活性を認め、中皮腫特異的に転写活性を発揮することが確認された。

[0033] (実施例2)CRI1遺伝子由来プロモータの各種細胞における転写活性の確認

1)CRI1遺伝子由来プロモータを含む発現コンストラクトの構築

CRI1遺伝子のプロモータ領域の部分について、長さの異なる各領域を取り出し、ホタルルシフェラーゼ遺伝子と結合した発現コンストラクトを構築した。各プロモータを含む発現コンストラクトのシェーマを図4に示した。

CRI1遺伝子の転写開始点を+1としたときの各プロモータは、以下に示す配列番号に示す塩基配列よりなる。

CRI1^{-2586/+84} (配列番号1)

CRI1^{-1849/+84} (配列番号2)

CRI1^{-1674/+84} (配列番号3)

CRI1^{-1587/+84} (配列番号4)

CRI1^{-1083/+84} (配列番号5)

CRI1^{-766/+84} (配列番号6)

CRI1^{-567/+84} (配列番号7)

CRI1^{-366/+84} (配列番号8)

CRI1^{-296/+84} (配列番号9)

CRI1^{-138/+84} (配列番号10)

CRI1^{-74/+84} (配列番号11)

[0034] 2)各プロモータの各細胞における転写活性の確認

上記実施例1と同手法によりpGL3ルシフェラーゼレポーターベクター(Promega社)に、CRI1遺伝子由来各プロモータを挿入した各発現コンストラクトを作製した。悪性胸膜中皮腫細胞株2株(H2452、MSTO-211H)、肺癌細胞株2種(A549、H322)および正常細胞株2種(正常中皮細胞、NHLF)を実施例1と同様に培養し、各細胞について生着を確認後、各発現コンストラクト2 μ gを各細胞に形質導入した。24

時間後に各細胞でのルシフェラーゼアッセイによりルシフェラーゼの発光を測定し、各プロモータの転写活性を確認した。

[0035] その結果、CRI1遺伝子由来各プロモータは、全てについて悪性胸膜中皮腫細胞で強い転写活性を認めたのに対し、肺癌細胞および正常細胞では、低い転写活性であった。特に、CRI1^{-296/+84}、CRI1^{-138/+84}、CRI1^{-74/+84}の各プロモータを用いた場合に、より中皮腫特異性が認められ、特にCRI1^{-138/+84}において最も中皮腫特異性が認められた(図5)。

[0036] (実施例3) 治療型遺伝子組換えアデノウイルス(Ad)ベクターの作製

導入遺伝子およびその上流にCRI1遺伝子プロモータ(CRI1^{-138/+84})を搭載したAdベクターを作製した。導入遺伝子として、細胞死誘導遺伝子(BID)またはAd初期遺伝子E1を用いた。

[0037] 1) 導入遺伝子の非翻訳領域に本発明のプロモータ配列を含む発現コンストラクトの構築

導入遺伝子として、(A)細胞死誘導遺伝子(BID)およびヘマグルチニン(HA)遺伝子配列を結合したもの、と(B)Ad初期遺伝子E1を用いた。(A)または(B)の上流領域に、CRI1^{-138/+84}を直列で4つ連結したものを結合し、各発現コンストラクトを作製した。

[0038] 2) 上記1)の発現コンストラクトを含むシャトルベクターの構築

上記1)で構築した発現コンストラクトを含むシャトルベクターをTong-Chuan Heら, P roc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 2509-2514, 1998に記載の方法にしたがって構築した。

[0039] 3) Adベクターの作製

E1欠損型の5型Adゲノムを準備し、Adゲノムを制限酵素で切断し、2)で作製した遺伝子発現シャトルベクターを、Heらの方法に従い相同組換え(homologous recombination)を行うことで、上記各種発現コンストラクトを搭載したAd(Ad-CRI1^{-138 4x}/HA-BID、Ad-CRI1^{-138 4x}/E1A)を得た。本実施例においてBID発現コンストラクトにHAタグを結合したのは、内在性のBIDと識別するためである。

[0040] (実験例1) Ad-CRI1^{-138 4x}/HA-BIDの中皮腫細胞に対する効果

実施例3で得たAd-CRI1^{-138 4x}/HA-BIDについて中皮腫細胞に対する殺細胞効果を調べた。対照として、同手法にて作製したGFP(green fluorescent protein)を発現する遺伝子を組み込んだAd-CRI1^{-138 4x}/GFPを用いた。ここでは、いずれのAdベクターもE1欠損型であり、中皮腫細胞では非増殖型であるが、細胞死誘導遺伝子(BID)を含むか、非毒性のGFP遺伝子を含む点において相違する。

[0041] 得られた各Adベクターを、悪性胸膜中皮腫細胞株2株(H2452、211H)、肺癌細胞株2種(H322、A549)、正常細胞株2種(正常中皮細胞、NHLF)および肺癌以外の癌細胞株2株(肝癌細胞:Hep3B、乳癌細胞:MCF7)に感染させた。Ad感染後の各細胞における細胞死について、プロピジウムヨウダイド(PI)染色後のフローサイトメトリー法による定量を行った。

[0042] その結果、図7に示すように、細胞死誘導遺伝子を含むAdを感染した悪性胸膜中皮腫細胞株2株(H2452、211H)では、細胞周期G₁とG₀の間にピークが出現するsubG₀/G₁ポピュレーションの増加を認め、アポトーシスが起きていることが確認された。一方、肺癌細胞、正常細胞およびその他の癌細胞では、細胞死誘導遺伝子を含む場合と含まない場合で、フローサイトメトリーのパターンに違いは認められなかった。以上の結果より、Ad-CRI1^{-138 4x}/HA-BIDは、中皮腫細胞特異的に発現することが確認された。

[0043] (実験例2) Ad-CRI1^{-138 4x}/E1Aの中皮腫細胞に対する効果

実施例3で得たAd-CRI1^{-138 4x}/E1Aについて、中皮腫細胞に及ぼす効果を調べた。実験例1と同様に対照としてAd-CRI1^{-138 4x}/GFPを用いた。ここでは、Ad初期遺伝子E1を含むAdベクターは中皮腫細胞では増殖可能であるが、GFP遺伝子を含むAdベクターは中皮腫細胞において非増殖型である点において相違する。

[0044] 得られた各Adベクターを、悪性胸膜中皮腫細胞株2株(H2452、MSTO-211H)、および正常細胞株2種(正常中皮細胞、NHLF)に導入し、生存細胞数を測定した。生存細胞の測定は、MTSアッセイ(生細胞内においてテトラゾリウム塩(MTS*[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt])がホルマザンへ変換される反応に基づき、培養液中に放出された水溶性ホルマザンを490 nmで測定するアッセイ)により行った。

[0045] その結果、図8に示すようにAd-CRI1^{-138 4x}/E1Aの感染により、Ad-CRI1^{-138 4x}/GFPの感染やPBSのみの場合に比べて中皮腫細胞は明らかに減少することが確認されたが、正常細胞ではAd-CRI1^{-138 4x}/GFPの感染やPBSの場合と差が認められなかった。以上の結果より、Ad-CRI1^{-138 4x}/E1Aによっても、中皮腫細胞特異的に殺細胞効果を有することが確認された。

[0046] (実験例3) Ad-CRI1^{-138 4x}/HA-BIDまたはAd-CRI1^{-138 4x}/E1Aの中皮腫(in vivo)に対する効果

実施例3で得たAd-CRI1^{-138 4x}/HA-BIDまたはAd-CRI1^{-138 4x}/E1Aについて、in vivoでの中皮腫細胞に対する殺細胞効果を調べた。対照ベクターとして、実験例1および2と同様に、GFPを発現する遺伝子を組み込んだAd-CRI1^{-138 4x}/GFPを用いた。ここで、細胞死誘導遺伝子(BID)または非毒性のGFP遺伝子を含むAdベクターはE1欠損型であり、中皮腫細胞では非増殖型である。また、Ad初期遺伝子E1を含むAdベクターは中皮腫細胞では増殖可能である。

[0047] 中皮腫モデルマウスは、週齢6週の雌BALB/cヌードマウスの皮下に 2.5×10^6 個の211H細胞を接種して作製した。211H細胞接種後8日目の中皮腫モデルマウスに、PBS、Ad-CRI1^{-138 4x}/GFP、Ad-CRI1^{-138 4x}/HA-BIDまたはAd-CRI1^{-138 4x}/E1Aを、 5×10^7 pfu (plaque forming unit)ずつ3日連続局所投与し、接種後56日間腫瘍の大きさを観察した(各条件についてn=8)。

[0048] その結果、図9に示すように、Ad-CRI1^{-138 4x}/HA-BIDまたはAd-CRI1^{-138 4x}/E1Aの感染により、対照であるAd-CRI1^{-138 4x}/GFPの感染やPBSのみの場合に比べて、抗腫瘍効果が認められた。

産業上の利用可能性

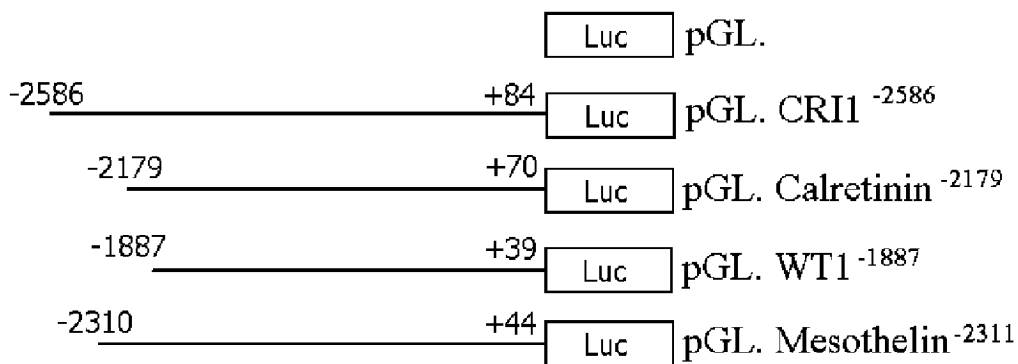
[0049] 以上詳述したように、本発明の新規プロモータは、中皮腫特異的に転写活性を有することが確認された。また、該新規プロモータおよび細胞死誘導遺伝子などを搭載するベクターを細胞に導入することにより、中皮腫特異的にアポトーシスの作用が認められ、殺細胞作用を示すことが確認された。また、in vivoにおいても、抗腫瘍効果が確認された。これらの結果より、本発明の新規プロモータを含むベクターは、中皮腫特異的に何らかの作用をさせたい場合に利用することができ、例えば上述のような

細胞死誘導遺伝子や、細胞融解誘導遺伝子とともに細胞に導入することで、中皮腫特異的に細胞に傷害を与えることができる。これらの結果より、本発明の新規プロモータを含むベクターは、効果的な中皮腫治療剤となりうる。さらに、本発明の新規プロモータおよびマーカー遺伝子を含むベクターは、中皮腫の検査においても使用することができる。

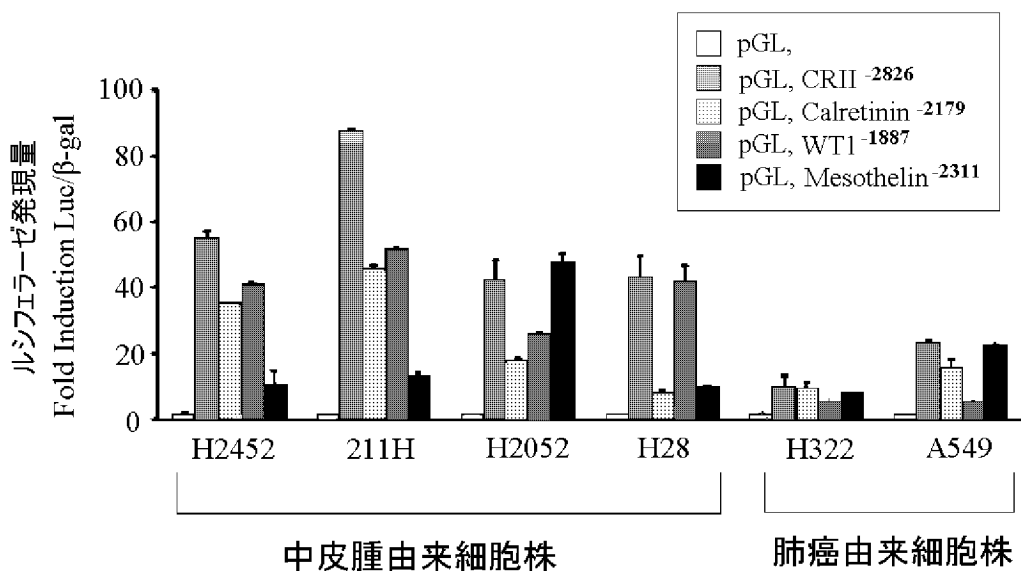
請求の範囲

- [1] CRI1(CREBBP/EP300 inhibitory protein 1)遺伝子由来のプロモータであり、中皮腫特異的に転写活性を示すことを特徴とする新規プロモータ。
- [2] CRI1遺伝子由来のプロモータの配列が、CRI1遺伝子の-2586～+84の領域から選択される配列である、請求項1に記載の新規プロモータ。
- [3] CRI1遺伝子由来のプロモータの配列が、配列表の配列番号1～11に記載のいずれかである、請求項1または2に記載の新規プロモータ。
- [4] 請求項1～3のいずれか1に記載の新規プロモータを搭載してなるウイルスベクター。
- [5] ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである請求項4に記載のウイルスベクター。
- [6] アデノウイルスが、制限増殖型アデノウイルスである請求項5に記載のウイルスベクター。
- [7] さらに、細胞死誘導遺伝子および／または細胞融解誘導遺伝子をプロモータの下流に搭載してなる請求項4～6のいずれか1に記載のウイルスベクター。
- [8] 請求項4～7のいずれか1に記載のウイルスベクターからなる遺伝子治療型中皮腫治療用ベクター。
- [9] 請求項8に記載の遺伝子治療型中皮腫治療用ベクターを含む中皮腫治療剤。
- [10] さらに、マーカー遺伝子をプロモータの下流に搭載してなる請求項4～6のいずれか1に記載のウイルスベクター。
- [11] マーカー遺伝子が、蛍光タンパク質発現遺伝子である請求項10に記載のウイルスベクター。
- [12] 請求項10または11に記載のウイルスベクターからなる中皮腫検査用ウイルスベクター。
- [13] 請求項12に記載の中皮腫診断用ウイルスベクターを用い、マーカーの発現の有無を観察することによる中皮腫の検査方法。

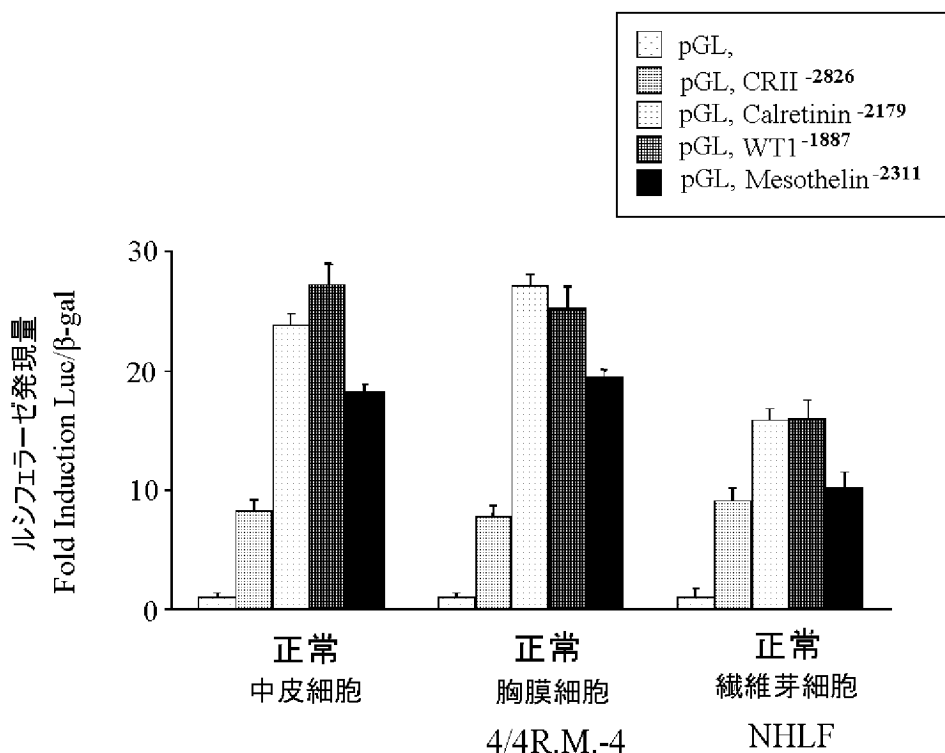
[図1]



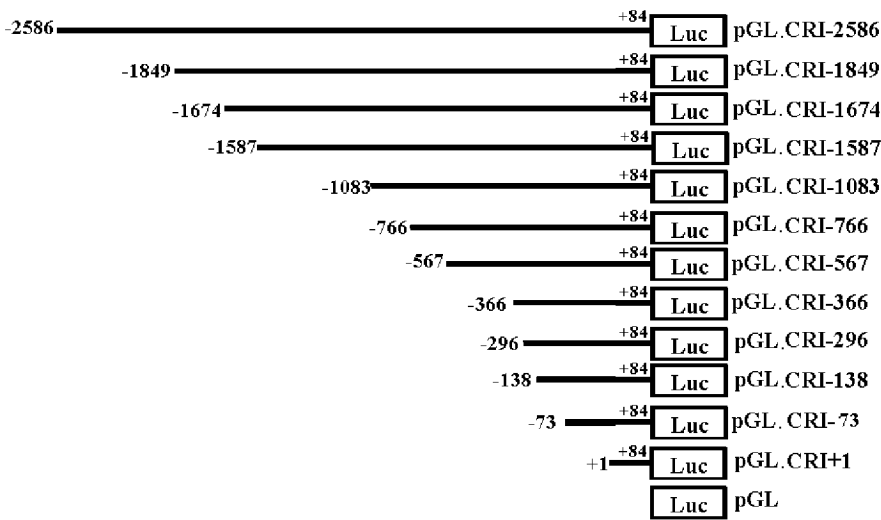
[図2]



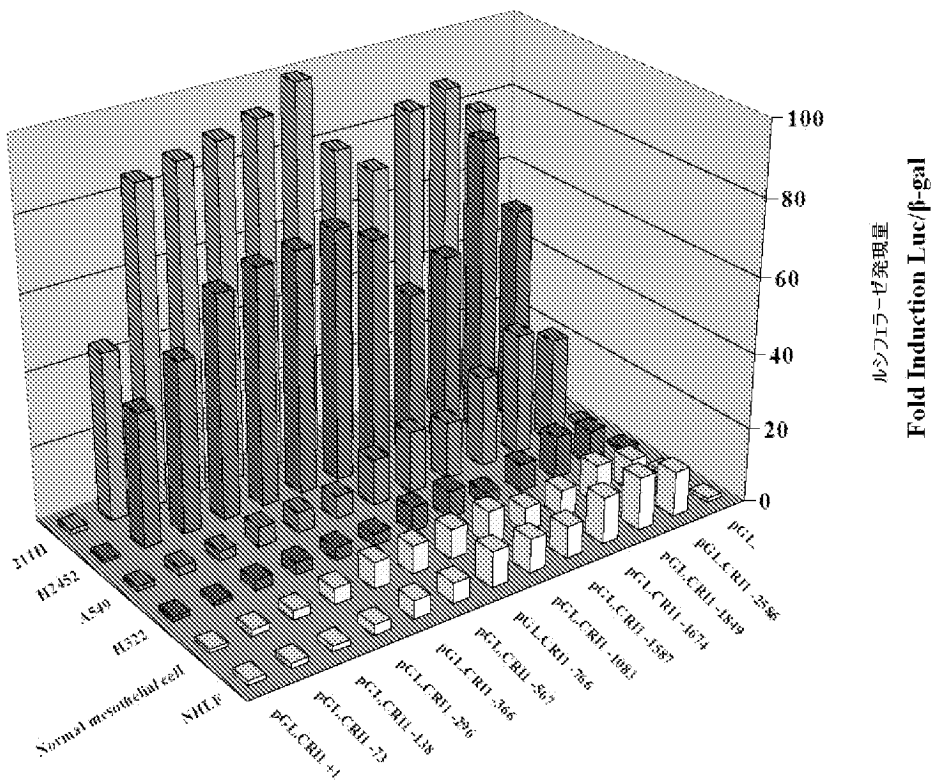
[図3]



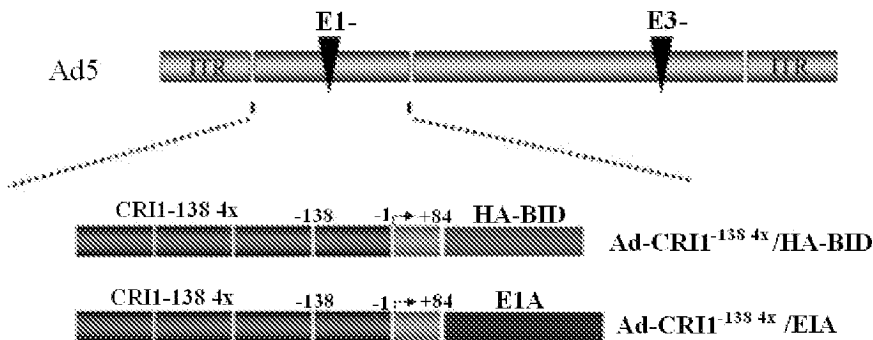
[図4]



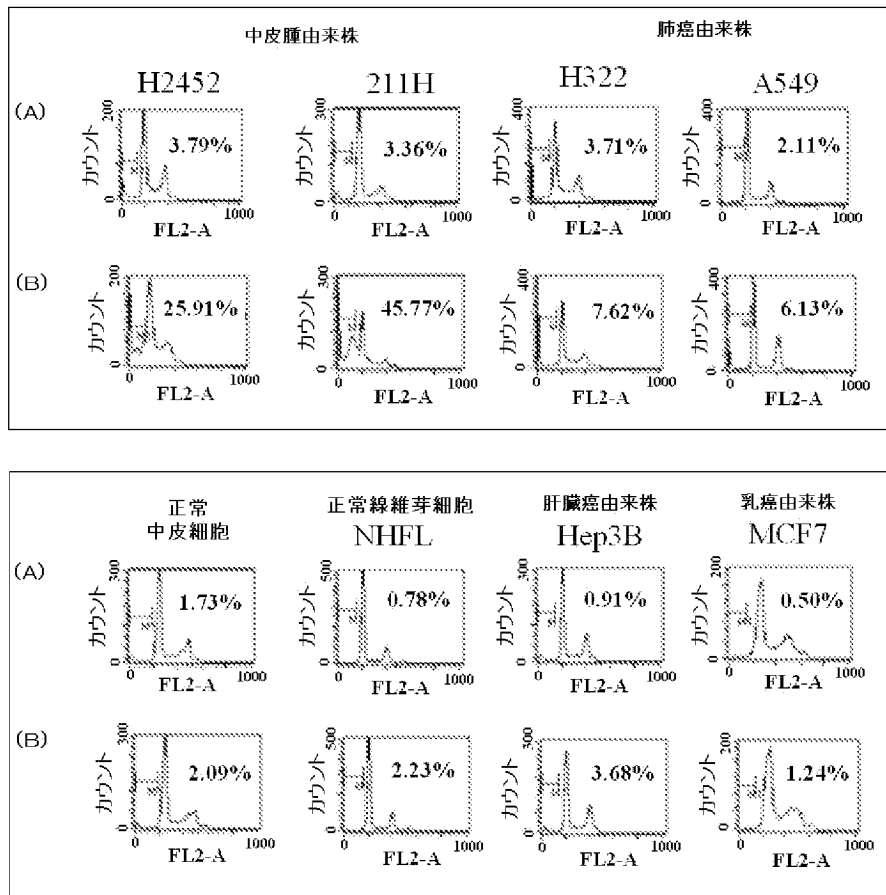
[図5]



[図6]



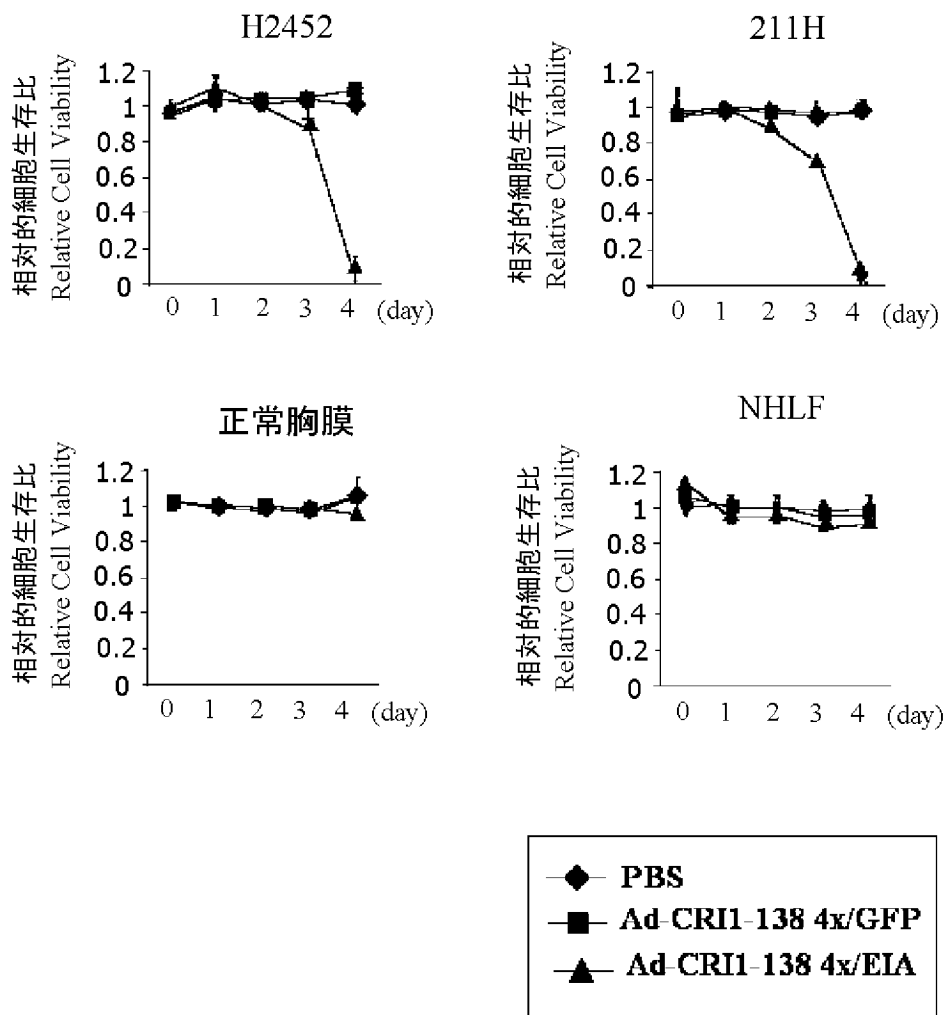
[図7]



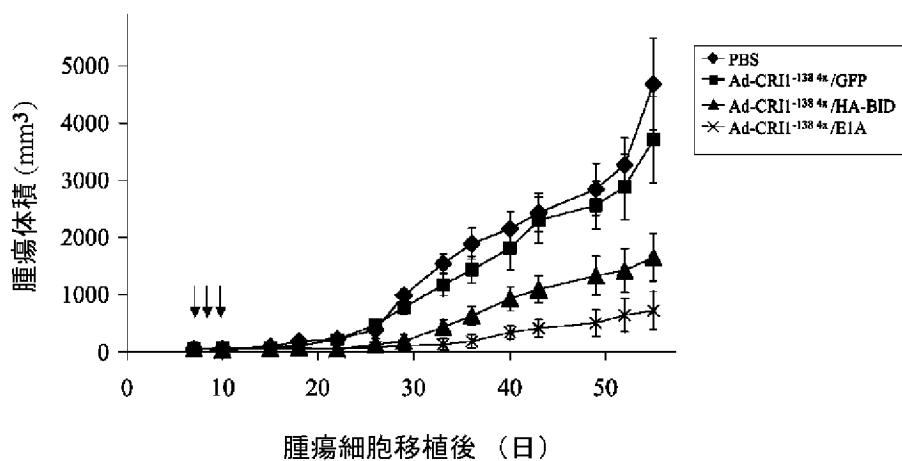
(A) 上段パネル: Ad-CR11⁻¹³⁸ 4x / GFP

(B) 下段パネル: Ad-CR11⁻¹³⁸ 4x / HA-BID

[圖8]



[圖9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/053256

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01) i, A61K35/76(2006.01) i, A61K48/00(2006.01) i, A61P35/00(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/09, A61K35/76, A61K48/00, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/CAPLUS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Gordon GJ et al., 'Identification of novel candidate oncogenes and tumor suppressors in malignant pleural mesothelioma using large-scale transcriptional profiling.', Am. J. Pathol., 2005, Vol. 166, No. 6, p. 1827-1840	1-13
A	Prins JB et al., 'Identification of regulatory sequences in the promoter of the PDGF B-chain gene in malignant mesothelioma cell lines.', Biochim. Biophys. Acta, 1996, Vol. 1317, p. 223-232	1-13
A	Inase N et al., 'Calretinin promoter for suicide gene expression in malignant mesothelioma.', Anticancer Res., 2001, Vol. 21, p. 1111-1114	1-13

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 25 March, 2009 (25.03.09)	Date of mailing of the international search report 07 April, 2009 (07.04.09)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/053256

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Ishiwata N et al., 'Suicide gene therapy using keratin 19 enhancer and promoter in malignant mesothelioma cells.', Anticancer Res., 2003, Vol. 23, p. 1405-1409	1-13
A	Fukazawa T et al., 'Development of a cancer-targeted tissue-specific promoter system.', Cancer Res., 2004, Vol. 64, p. 363-369	3-13
A	von der Most RG et al., 'Gene therapy for malignant mesothelioma: beyond the infant years.', Cancer Gene Ther., 2006, Vol. 13, p. 897-904	6-13
A	Lo HW et al., 'Cancer-specific gene therapy.', Adv. Genet., 2005, Vol. 54, p. 235-255	7-13
A	EP 1795604 A1 (Oncolys Biopharma, Inc.), 13 June, 2007 (13.06.07), Claims 17, 18 & US 2006/0067890 A1 & US 2008/0032283 A1 & WO 2006/036004 A1 & CA 2581969 A & KR 10-2007-0059191 A & CN 101035906 A	12,13
P,X P,Y	Fukazawa T et al., 'Malignant pleural mesothelioma-targeted CREBBP/EP300 inhibitory protein 1 promoter system for gene therapy and virotherapy.', Cancer Res., 2008.09, Vol. 68, No. 17, p. 7120-7129	1-11 12,13

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K35/76(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N15/09, A61K35/76, A61K48/00, A61P35/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2009年 日本国実用新案登録公報 1996-2009年 日本国登録実用新案公報 1994-2009年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） BIOSIS/CAPLUS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, PubMed, JSTPlus(JDreamII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Gordon GJ et al., 'Identification of novel candidate oncogenes and tumor suppressors in malignant pleural mesothelioma using large-scale transcriptional profiling.', Am. J. Pathol., 2005, Vol. 166, No. 6, p. 1827-1840	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 25.03.2009	国際調査報告の発送日 07.04.2009	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/JP） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 引地 進 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 4504

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Prins JB et al., 'Identification of regulatory sequences in the promoter of the PDGF B-chain gene in malignant mesothelioma cell lines.', Biochim. Biophys. Acta, 1996, Vol. 1317, p. 223-232	1-13
A	Inase N et al., 'Calretinin promoter for suicide gene expression in malignant mesothelioma.', Anticancer Res., 2001, Vol. 21, p. 1111-1114	1-13
A	Ishiwata N et al., 'Suicide gene therapy using keratin 19 enhancer and promoter in malignant mesothelioma cells.', Anticancer Res., 2003, Vol. 23, p. 1405-1409	1-13
A	Fukazawa T et al., 'Development of a cancer-targeted tissue-specific promoter system.', Cancer Res., 2004, Vol. 64, p. 363-369	3-13
A	von der Most RG et al., 'Gene therapy for malignant mesothelioma: beyond the infant years.', Cancer Gene Ther., 2006, Vol. 13, p. 897-904	6-13
A	Lo HW et al., 'Cancer-specific gene therapy.', Adv. Genet., 2005, Vol. 54, p. 235-255	7-13
A	EP 1795604 A1 (Oncolys Biopharma, Inc.) 2007.06.13, 請求項 1 7、18 & US 2006/0067890 A1 & US 2008/0032283 A1 & WO 2006/036004 A1 & CA 2581969 A & KR 10-2007-0059191 A & CN 101035906 A	12、13
PX	Fukazawa T et al.,	1-11
PY	'Malignant pleural mesothelioma-targeted CREBBP/EP300 inhibitory protein 1 promoter system for gene therapy and virotherapy.', Cancer Res., 2008.09, Vol. 68, No. 17, p. 7120-7129	12、13