

特異的プロモータを用いた目的遺伝子発現システムの開発と癌治療への応用

深澤拓也*, 松岡順治, 山辻知樹, 田中紀章, 猶本良夫

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器腫瘍外科学

キーワード：組織特異的転写因子, プロモータ, 遺伝子治療, ウイルス療法, 分子標的治療

Development of novel transactivation systems for cancer therapy

Takuya Fukazawa*, Junji Matsuoka, Tomoki Yamatsuji, Noriaki Tanaka, Yoshio Naomoto

Department of Gastroenterological surgery, Transplant, and Surgical Oncology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

はじめに

2本鎖DNA型ウイルスであるアデノウイルスを改変したベクターの特徴として、多種の細胞に高い遺伝子導入が可能であり、またレトロウイルスベクターとは異なり、細胞の染色体に組み込まれることが無く、細胞の増殖を必要としない点が挙げられる。アデノウイルスベクターに代表される治療型ベクターの導入遺伝子発現過程においては、プロモータ遺伝子の働きが必要であり、従来多種の細胞に機能するプロモータ (e.g. CAG, CMV, RSV) が遺伝子治療に使用されてきた。アデノウイルスベクターでは任意のプロモータの応用が可能であることより、我々は標的組織・細胞特異的プロモータを用いた特異的目的遺伝子発現シ

ステムの開発を行っている。これらのプロモータを使用することにより、標的細胞・組織以外に目的遺伝子が導入されても蛋白は合成されず、治療の安全性を高めることが可能となる。

特異的転写エレメントの同定

マウス、ラットおよびヒトのインスリン遺伝子に関する研究は古くから進められてきており、特に5' flanking region 転写開始部位より上流約2 k bp までのプロモータ部位に関しては詳細な解析なされ報告されてきている¹⁻³⁾。我々は、当該プロモータにおける5' flanking region -363bp より-1 bp を選定し、同部位よりTATA box を除外した region -363~-31 を上流に直列化することで、インスリン産生細胞 MIN6 に特異的に動作し、強い転写活性を有する artificial promoter : hINS -363 3x を作製、当該システムにより GFP を発現させることで、ラット膵管由来 AR42J 細胞から分化したインスリン産生細胞を検出することに成功している⁴⁾。細胞・組織特異的プロモータから目

平成21年8月受理

*〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話：086-235-7259 FAX：086-221-8775

E-mail：Fukazawat@aol.com

プロフィール



深澤 拓也

昭和42年12月26日生

平成6年3月

岡山大学医学部卒業

平成11年4月

岡山大学大学院医学研究科修了

平成6年4月

岡山大学医学部附属病院第一外科医員 (研修医)

平成6年8月

国立岩国病院 外科研修医

平成11年11月

The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Department of Immunology,

平成13年1月

Postdoctoral Fellow

University of California Riverside, Department of Biomedical Science, Postdoctoral Fellow

平成15年6月

岡山大学医学部 客員研究員

平成15年11月

岡山大学産学連携研究員

平成19年6月

岡山刑務所医務課医師

岡山大学医歯薬学総合研究科非常勤講師

平成20年5月

岡山刑務所医務課医務課長

現在に至る

的遺伝子を発現するベクターを構築した場合、一般的にその転写活性は汎用型プロモータ (e.g. CAG, CMV, RSV) よりも低く、この方法では目的遺伝子の発現を得るために高濃度のウイルスが必要となる。転写活性を増強させる方法として、enhancer の挿入やアデノウイルス二重感染法が報告されているが^{5,6)}、我々はプロモータにおける細胞・組織特異的転写コア・エレメントを選択し、これらを tandemize することでその特異性を維持しつつ、目的遺伝子の発現に必要な転写活性を増強させている。

癌組織特異的プロモータを用いた治療型ベクターの開発

システムの悪性腫瘍治療への応用

これまで肝細胞癌、大腸癌、前立腺癌また乳癌治療を目的とし、それぞれ AFP や CEA, PSA, DF3/MUC1 のプロモータを用いたターゲティングベクターによる遺伝子治療法やウイルス療法が報告されている⁷⁻¹⁰⁾。我々は、Gordon らにより報告された中皮腫の candidate oncogene である CRII (CREBBP/EP300 INHIBITORY PROTEIN)¹¹⁾ に注目し、そのプロモータを用いて中皮腫を標的とする新規リコンビナント・アデノウイルスの開発を行った¹²⁾。胸膜中皮腫は現在、アスベスト公害病として社会問題化している予後不良疾患である。治療法として胸膜肺全摘術などの外科手術や放射線・化学療法が試みられているが、その治療効果は限られている¹³⁾。これまで中皮腫特異的に治療型遺伝子を発現させる方法として、Calretinin, Mesothelin などの中

皮腫マーカー遺伝子のプロモータを用いた発現システムが報告されている¹⁴⁾。しかしこれらの遺伝子は正常中皮細胞や神経細胞を含む正常細胞・組織で発現があり^{15,16)}、プロモータを治療型ベクターに用いた場合、正常組織障害が問題となる。

我々は低組織障害型中皮腫治療型ベクター開発のため、中皮腫に高発現し、正常胸膜および中皮に発現の無い遺伝子 CRII (CREBBP/EP300 INHIBITORY PROTEIN)¹¹⁾ に注目し、そのプロモータ領域における中皮腫特異的転写部位を同定することで、上述の方法により中皮腫特異的プロモータ・システム：CRII-138 4x を開発した¹²⁾。このシステムによりアデノウイルス初期蛋白：E1A を発現する制限増殖型アデノウイルス Ad-CRII^{-138 4x}/E1A (図1) は中皮腫細胞内で特異的増殖による細胞死を誘導でき、一方で E1A 発現に必要な転写活性が低い正常中皮および正常線維芽細胞では増殖しないという特徴を有する。Ad-CRII^{-138 4x}/E1A は中皮腫細胞 MSTO-211H より作製したヌードマウス皮下腫瘍においてコントロール群と比較して有意な腫瘍増殖抑制効果を示しており、現在抗癌剤との併用効果の検討を行っている。

組織および癌特異的プロモータを組み合わせた2ステップ転写システムによる肺癌ターゲティングベクターの開発

組織および臓器の発生や分化に関連する転写因子や関連遺伝子が、近年の再生医療研究の発展の中で明らかになってきている。Surfactant protein A1 (SPA1)

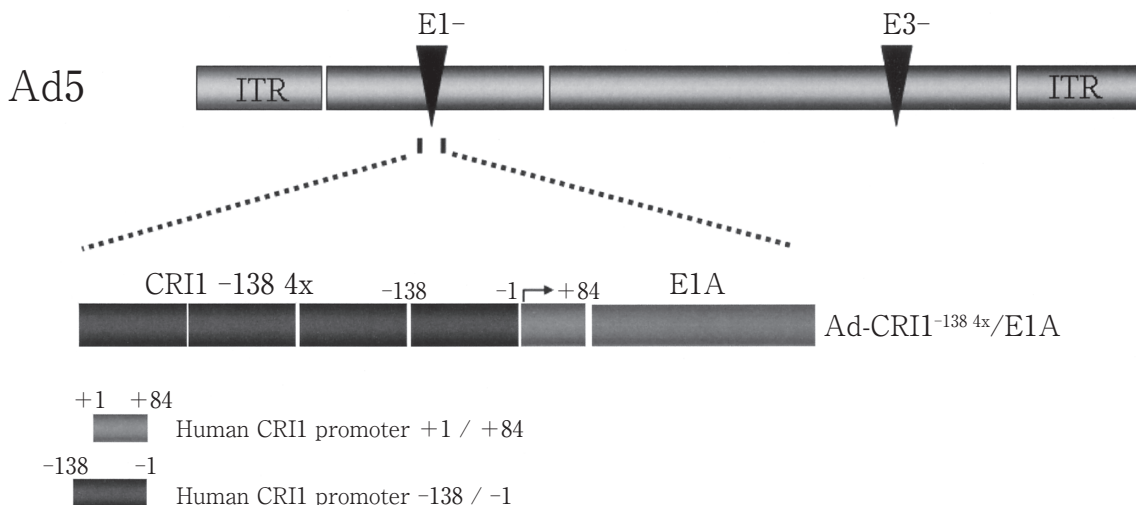


図1 Ad-CRII-138 4x/E1A 構造図

は，Ⅱ型肺胞上皮のみに発現する肺特異的マーカーであり，肺の分化転写因子 Thyroid transcription factor 1 (TTF1) により強く制御されている．我々は，癌特異的 hTERT プロモータ（癌特異的なテロメアの活性に相関）により発現させた TTF1 を，SPA1 プロモータの TTF1 依存性肺特異的転写領域に結合させることで，正常組織で発現せず，肺癌特異的に目的遺伝子を発現できる 2 step transactivation system : TTS (TTF1 gene under the control of hTERT promoter and SPA1 promoter) を開発し，報告している（図 2）¹⁷．TTS は，特に SPA1 の発現が高率に認められる肺腺癌での転写活性が強く¹⁸，本プロモータ・システムにより pro-apoptotic 遺伝子：Bax を発現できるリコンビナント・アデノウイルスベクター：Ad-TTS/Bax は肺腺癌細胞に有意な apoptosis を誘導した¹⁹．当該システムは，1）正常細胞でありながらテロメラーゼ活性を有する幹細胞を標的としない．2）強い転写活性を有するという点で hTERT プロモータ単独による遺伝子発現系より実用的な肺癌ターゲティング転写システムといえる．またこのような Cancer targeted tissue specific promoter system¹⁷は治療対象とする悪性腫瘍由来である組織特異的転写機構を解析することで，肺腺癌以外の他種の癌治療への

応用が可能である^{20,21}）．

Drug controllable な目的遺伝子発現系の開発

ヒト SPA1 プロモータは，negative glucocorticoid responsible element を持つため，SPA1 発現はステロイドホルモンにより発現制御を受けている²²．前述の TTS システムには同部位を有し，dexamethasone 投与は目的遺伝子の発現を抑制することができる（図 2）¹⁹．このような drug controllable な遺伝子発現系は，患者に投与後，必要が生じた場合 dexamethasone を用いて目的遺伝子の発現を抑制できる安全な治療型ベクター開発を可能とする²³．また，これまで報告されている tetracycline や mifepriston (RU486) 等の薬剤を用いた遺伝子発現調節システム^{24,25}に比し，dexamethasone はベクター投与後，ウイルス由来蛋白質に惹起される炎症を抑制できる利点がある^{26,27}．

治療型ベクターの持つ課題

アデノウイルスベクターは多種の細胞に標的化することが可能であるが，感染効率が低い細胞では遺伝子導入は困難となる．このためウイルスの侵入・吸着に関与するファイバーやペントンベース改変型ベクターの開発が報告されてきた．ヒトを宿主とするアデノウ

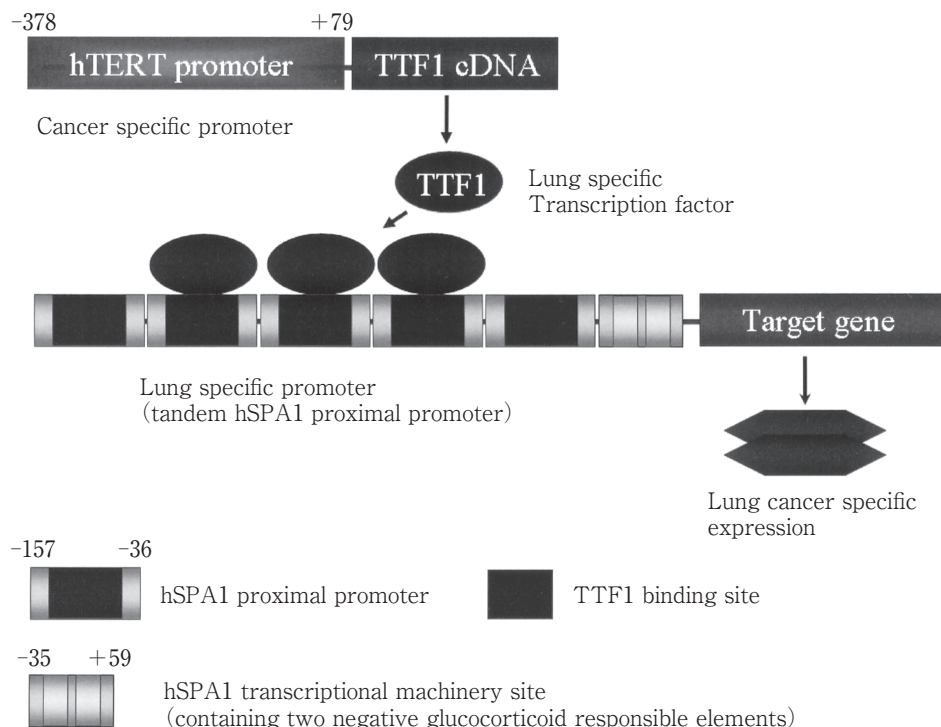


図 2 TTS system

ウイルスについて、これまで51種類以上の血清型が報告されているが、遺伝子治療用に用いられてきたアデノウイルスの血清型は2型と5型である。5型アデノウイルスは252個のカプソメアよりなる正20面体構造をとり、頂点にあるカプソメアは突起構造を持ったペントン（ペントンベースとファイバーから成る）、他の240個はヘキソンと呼ばれる^{28,29}。5型アデノウイルスを含む多くのアデノウイルスは、そのレセプターとして coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) を認識して細胞に感染するため³⁰、ヘパラン硫酸に親和性があるポリリジンペプチドや α integrin に親和性がある RGD ペプチドをファイバーに発現させることにより、CAR を発現していない細胞に対しても効率良く遺伝子を導入することが可能となった^{31,32}。この方法は癌細胞の表面に発現する分子を標的化する方法として応用可能であるが、問題点としてベクターの作製効率が低い点等が挙げられる³³。また5型アデノウイルスにおいて、ファイバー・ノブ領域を35型アデノウイルスの同領域で置換したキメラ型アデノウイルスは、ヒトに対する5型の特性を生かした上で、35型アデノウイルスのレセプターであるCD46を発現する広汎な細胞に遺伝子導入が可能であり、CAR発現の少ない細胞への効率的な遺伝子導入が可能であることが報告されている^{34,35}。

リコンビナント・アデノウイルスによる癌治療に関与する他の課題として、アデノウイルスに対する免疫の問題があげられる。一般に *in vivo* におけるアデノウイルスベクターの目的遺伝子発現は一過性（3～4週）であり、長期発現には反復投与が必要であるが、アデノウイルス中和抗体によるウイルスベクターの不活化が問題となる³⁶。この免疫応答を抑制するために、抗CD40リガンド抗体を投与することで、活性化Tリンパ球を介した、抗原提示細胞とB細胞間の相互作用を抑制する方法³⁷、またE1、E3領域さらにE2a、E4領域等のウイルス遺伝子を欠損させた低抗原性アデノウイルスベクターの開発^{38,39}、さらに中和抗体のエピトープが主としてアデノウイルスのヘキソンおよびファイバーであることより、これらの型を変えたキメラ型アデノウイルスの開発が進められてきている^{40,41}。このように特異的プロモータの利用に加え、免疫回避型ウイルスベクターの開発、カプシド蛋白の遺伝子改変さらには抗体、蛋白質、高分子によるベクター表面の修飾を行うことでさらに有効な治療型ベクターを作

製することができる。

1997年米国においてオルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) 欠損症の18歳男性が、アデノウイルスベクターの全身投与後、血液凝固異常と多臓器不全にて4日後に死亡した症例では、血液中の多量のアデノウイルスが強い免疫反応を誘起し、全身性炎症反応症候群 (SIRS) に陥ったことが推測されている⁴²。アデノウイルスは、現在臨床で用いられている遺伝子治療ベクターの中では免疫原性・炎症惹起性が強く、全身投与については特に慎重を期すべきウイルスでもある。

システムの分子創薬への応用

成長因子あるいはサイトカインに属するミッドカイン (MK) は塩基性の低分子量タンパク質で、細胞の生存や移動を促進し、癌の進行、炎症性疾患の発症、組織傷害後の修復に関与し、その発現は、食道癌、胃癌、大腸癌、肝癌、膵癌等の癌において増強していることが報告されている⁴³⁻⁴⁶。特異的プロモータを活用した癌治療への新しい試みとして、現在我々は海外共同研究によりヒトMKプロモータ下にルシフェラーゼを発現できるプラスミドから作製したトランスフェクタント癌細胞株に対して、ライブラリー由来の化合物を順次添加後のルシフェラーゼ活性を測定することで、MKに対する複数の標的化合物の選定に成功している。この方法は一般に Cell-based target specific assay と呼ばれ、被験化合物によりルシフェラーゼ活性が低下すればMK遺伝子の転写活性を抑制作用があると評価することができる⁴⁷。

以上、我々の最近の研究について書かせていただいた。このような細胞・組織特異的プロモータは新規ウイルス療法や分子標的療法の開発に応用可能であり、今後も新しい癌治療法開発にむけて取り組んで行きたい。

文 献

- 1) Nir U, Walker MD, Rutter WJ : Regulation of rat insulin 1 gene expression: evidence for negative regulation in nonpancreatic cells. Proc Natl Acad Sci USA (1986) 83, 3180-3184.
- 2) Whelan J, Cordle SR, Henderson E, Weil PA, Stein R : Identification of a pancreatic beta-cell insulin gene transcription factor that binds to and appears to activate cell-type-specific expression: its possible relationship to other cellular factors that bind to a common insulin gene

- sequence. *Mol Cell Biol* (1990) 10, 1564-1572.
- 3) Boam DS, Clark AR, Docherty K : Positive and negative regulation of the human insulin gene by multiple trans-acting factors. *J Biol Chem* (1990) 265, 8285-8296.
 - 4) Fukazawa T, Matsuoka J, Naomoto Y, Nakai T, Durbin ML, Kojima I, Lakey JR, Tanaka N : Development of a novel beta-cell specific promoter system for the identification of insulin-producing cells in in vitro cell cultures. *Exp Cell Res* (2006) 312, 3404-3412.
 - 5) Suzuki S, Tadakuma T, Asano T, Hayakawa M : Coexpression of the partial androgen receptor enhances the efficacy of prostate-specific antigen promoter-driven suicide gene therapy for prostate cancer cells at low testosterone concentrations. *Cancer Res* (2001) 61, 1276-1279.
 - 6) Sakai Y, Kaneko S, Sato Y, Kanegae Y, Tamaoki T, Saito I, Kobayashi K : Gene therapy for hepatocellular carcinoma using two recombinant adenovirus vectors with alpha-fetoprotein promoter and Cre/lox P system. *J Virol Methods* (2001) 92, 5-17.
 - 7) Kanai F, Lan KH, Shiratori Y, Tanaka T, Ohashi M, Okudaira T, Yoshida Y, Wakimoto H, Hamada H, Nakabayashi H, Tamaoki T, Omata M : In vivo gene therapy for alpha-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene. *Cancer Res* (1997) 57, 461-465.
 - 8) Schrewe H, Thompson J, Bona M, Hefta LJ, Maruya A, Hassauer M, Shively JE, von Kleist S, Zimmermann W : Cloning of the complete gene for carcinoembryonic antigen : analysis of its promoter indicates a region conveying cell type-specific expression. *Mol Cell Biol* (1990) 10, 2738-2748.
 - 9) Wu L, Matherly J, Smallwood A, Adams JY, Billick E, Beldegrun A, Carey M : Chimeric PSA enhancers exhibit augmented activity in prostate cancer gene therapy vectors. *Gene Ther* (2001) 8, 1416-1426.
 - 10) Kurihara T, Brough DE, Kovesdi I, Kufe DW : Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen. *J Clin Invest* (2000) 106, 763-771.
 - 11) Gordon GJ, Rockwell GN, Jensen RV, Rheinwald JG, Glickman JN, Aronson JP, Pottorf BJ, Nitz MD, Richards WG, Sugarbaker DJ, Bueno R : Identification of novel candidate oncogenes and tumor suppressors in malignant pleural mesothelioma using large-scale transcriptional profiling. *Am J Pathol* (2005) 166, 1827-1840.
 - 12) Fukazawa T, Matsuoka J, Naomoto Y, Maeda Y, Durbin ML, Tanaka N : Malignant pleural mesothelioma-targeted CREBBP/EP300 inhibitory protein 1 promoter system for gene therapy and virotherapy. *Cancer Res* (2008) 68, 7120-7129.
 - 13) Robinson BW, Lake RA : Advances in malignant mesothelioma. *N Engl J Med* (2005) 353, 1591-1603.
 - 14) Inase N, Miyake S, Yoshizawa Y : Calretinin promoter for suicide gene expression in malignant mesothelioma. *Anticancer Res* (2001) 21, 1111-1114.
 - 15) Lugli A, Forster Y, Haas P, Nocito A, Bucher C, Bissig H, Mirlacher M, Storz M, Mihatsch MJ, Sauter G : Calretinin expression in human normal and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis on 5233 tissue samples. *Hum Pathol* (2003) 34, 994-1000.
 - 16) Gulyas M, Hjerpe A : Proteoglycans and WT1 as markers for distinguishing adenocarcinoma, epithelioid mesothelioma, and benign mesothelium. *J Pathol* (2003) 199, 479-487.
 - 17) Fukazawa T, Maeda Y, Sladek FM, Owen-Schaub LB. Development of a cancer-targeted tissue-specific promoter system. *Cancer Res* (2004) 64, 363-369.
 - 18) Zamecnik J, Kodet R : Value of thyroid transcription factor-1 and surfactant apoprotein A in the differential diagnosis of pulmonary carcinomas: a study of 109 cases. *Virchows Arch* (2002) 440, 353-361.
 - 19) Fukazawa T, Maeda Y, Durbin ML, Nakai T, Matsuoka J, Tanaka H, Naomoto Y, Tanaka N : Pulmonary adenocarcinoma-targeted gene therapy by a cancer- and tissue-specific promoter system. *Mol Cancer Ther* (2007) 6, 244-252.
 - 20) Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF : Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet* (1997) 15, 106-110.
 - 21) Nagy P, Bisgaard HC, Thorgeirsson SS : Expression of hepatic transcription factors during liver development and oval cell differentiation. *J Cell Biol* (1994) 126, 223-233.
 - 22) Hoover RR, Thomas KH, Floros J : Glucocorticoid inhibition of human SP-A1 promoter activity in NCI-H441 cells. *Biochem J* (1999) 340 (Pt 1), 69-76.
 - 23) Check E : A tragic setback. *Nature* (2002) 420, 116-118.
 - 24) van Woensel JB, van Aalderen WM, de Weerd W, Jansen NJ, van Gestel JP, Markhorst DG, van Vught AJ, Bos AP, Kimpen JL : Dexamethasone for treatment of patients mechanically ventilated for lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus. *Thorax* (2003) 58, 383-387.
 - 25) Molin M, Shoshan MC, Ohman-Forslund K, Linder S, Akusjärvi G : Two novel adenovirus vector systems permitting regulated protein expression in gene transfer experiments. *J Virol* (1998) 72, 8358-8361.
 - 26) Zsengeller ZK, Wert SE, Hull WM, Hu X, Yei S, Trapnell BC, Whitsett JA : Persistence of replication-deficient adenovirus-mediated gene transfer in lungs of immune-deficient (nu/nu) mice. *Hum Gene Ther* (1995) 6, 457-467.
 - 27) Ottolini MG, Curtis SJ, Porter DD, Mathews A, Richardson JY, Hemming VG, Prince GA : Comparison of

- corticosteroids for treatment of respiratory syncytial virus bronchiolitis and pneumonia in cotton rats. *Antimicrob Agents Chemother* (2002) 46, 2299-2302.
- 28) Norrby E, Nyberg B, Skaaret P, Lengyel A : Separation and characterization of soluble adenovirus type 9 components. *J Virol* (1967) 1, 1101-1108.
 - 29) Neumann R, Chroboczek J, Jacrot B : Determination of the nucleotide sequence for the penton-base gene of human adenovirus type 5. *Gene* (1988) 69, 153-157.
 - 30) Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW : Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* (1997) 275, 1320-1323.
 - 31) Dmitriev IP, Kashentseva EA, Curiel DT : Engineering of adenovirus vectors containing heterologous peptide sequences in the C terminus of capsid protein IX. *J Virol* (2002) 76, 6893-6899.
 - 32) Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T, Ishii-Watabe A, Uchida E, Utoguchi N, Watanabe Y, Hayakawa T : CAR- or alphav integrin-binding ablated adenovirus vectors, but not fiber-modified vectors containing RGD peptide, do not change the systemic gene transfer properties in mice. *Gene Ther* (2002) 9, 769-776.
 - 33) Krasnykh VN, Mikheeva GV, Douglas JT, Curiel DT : Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J Virol* (1996) 70, 6839-6846.
 - 34) Fleischli C, Verhaagh S, Havenga M, Sirena D, Schaffner W, Cattaneo R, Greber UF, Hemmi S : The distal short consensus repeats 1 and 2 of the membrane cofactor protein CD46 and their distance from the cell membrane determine productive entry of species B adenovirus serotype 35. *J Virol* (2005) 79, 10013-10022.
 - 35) Sakurai F, Kawabata K, Koizumi N, Inoue N, Okabe M, Yamaguchi T, Hayakawa T, Mizuguchi H : Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction into human CD46-transgenic mice. *Gene Ther* (2006) 13, 1118-1126.
 - 36) Kass-Eisler A, Falck-Pedersen E, Elfenbein DH, Alvira M, Buttrick PM, Leinwand LA : The impact of developmental stage, route of administration and the immune system on adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther* (1994) 1, 395-402.
 - 37) Kay MA, Meuse L, Gown AM, Linsley P, Hollenbaugh D, Aruffo A, Ochs HD, Wilson CB : Transient immunomodulation with anti-CD40 ligand antibody and CTLA4Ig enhances persistence and secondary adenovirus-mediated gene transfer into mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997) 94, 4686-4691.
 - 38) Lusky M, Christ M, Rittner K, Dieterle A, Dreyer D, Mourot B, Schultz H, Stoeckel F, Pavirani A, Mehtali M : In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J Virol* (1998) 72, 2022-2032.
 - 39) Armentano D, Sookdeo CC, Hehir KM, Gregory RJ, St George JA, Prince GA, Wadsworth SC, Smith AE : Characterization of an adenovirus gene transfer vector containing an E4 deletion. *Hum Gene Ther* (1995) 6, 1343-1353.
 - 40) Roberts DM, Nanda A, Havenga MJ, Abbink P, Lynch DM, Ewald BA, Liu J, Thorner AR, Swanson PE, Gorgone DA, Lifton MA, Lemckert AA, et al. : Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity. *Nature* (2006) 441, 239-243.
 - 41) Toyoda E, Doi R, Kami K, Mori T, Ito D, Koizumi M, Kida A, Nagai K, Ito T, Masui T, Wada M, Tagawa M, et al. : Adenovirus vectors with chimeric type 5 and 35 fiber proteins exhibit enhanced transfection of human pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* (2008) 33, 1141-1147.
 - 42) Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, Wilson JM, Batshaw ML : Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* (2003) 80, 148-158.
 - 43) Shimada H, Nabeya Y, Tagawa M, Okazumi S, Matsubara H, Kadomatsu K, Muramatsu T, Ikematsu S, Sakuma S, Ochiai T : Preoperative serum midkine concentration is a prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* (2003) 94, 628-632.
 - 44) Wesseling JG, Yamamoto M, Adachi Y, Bosma PJ, van Wijland M, Blackwell JL, Li H, Reynolds PN, Dmitriev I, Vickers SM, Huibregtse K, Curiel DT : Midkine and cyclooxygenase-2 promoters are promising for adenoviral vector gene delivery of pancreatic carcinoma. *Cancer Gene Ther* (2001) 8, 990-996.
 - 45) Ono HA, Davydova JG, Adachi Y, Takayama K, Barker SD, Reynolds PN, Krasnykh VN, Kunisaki C, Shimada H, Curiel DT, Yamamoto M : Promoter-controlled infectivity-enhanced conditionally replicative adenoviral vectors for the treatment of gastric cancer. *J Gastroenterol* (2005) 40, 31-42.
 - 46) Ohhashi S, Ohuchida K, Mizumoto K, Egami T, Yu J, Cui L, Toma H, Takahata S, Nabae T, Tanaka M : Midkine mRNA is overexpressed in pancreatic cancer. *Dig Dis Sci* (2009) 54, 811-815.
 - 47) Balis FM : Evolution of anticancer drug discovery and the role of cell-based screening. *J Natl Cancer Inst* (2002) 94, 78-79.