

がん遺伝子治療の基礎的研究

所属機関 (財) 癌研究癌化学療法センター
研究者名 濱田 洋文

《研究の概要》

当研究では、サイトカイン・接着分子などの遺伝子導入腫瘍ワクチン、並びに遺伝子導入 CTL の養子的移入などによる難治性悪性腫瘍の根治療法の開発をめざしている。現在までの研究により、以下のような結果を得ている。1) 腫瘍ワクチン療法：マウス皮下及び脳内移植腫瘍モデルにおけるサイトカイン発現腫瘍ワクチンの抗腫瘍効果を検討した。単独では GM-CSF が最も有効であったが、IL-6、LT、MIF、IL-3、IL-10 でも予防効果が得られた。さらに GM-CSF と IL-4 の組み合わせが、GM-CSF 単独を上回る治療効果をもたらした。私たちはさらに、将来の臨床治験に使用し得る GK (gag-killed) レトロウイルス・ベクターを作成した。これをもとにしてヒトのグリオブラストーマの手術サンプルからの培養細胞を用いて、ヒト GM-CSF プラス IL-4 遺伝子導入腫瘍ワクチンを作ることが出来た。2) 遺伝子導入 CTL による養子免疫療法：特異的 CD8+CTL 細胞に遺伝子を導入し、抗腫瘍効果を検討した。肺転移並びに脳内移植モデルで、CTL の抗腫瘍活性が IL-2 遺伝子導入により強化された。B16 メラノーマ並びに Colon26 の肺転移治療モデルでの現在までのスクリーニングにより、 γ IFN 遺伝子導入によって最も強い養子免疫効果増強が得られている。これに腫瘍ワクチンを併用することにより、さらに強い抗腫瘍効果が得られた。3) 抗原提示と T 細胞活性化：私たちは GM-CSF 産生腫瘍ワクチンの作用標的として考えられる抗原提示樹状細胞の大量培養法を開発した。これを用いて樹状細胞による腫瘍抗原提示能を証明することができた。さらに、抗原提示と T リンパ球の活性化のメカニズムを解析するため、抗原提示機構を修飾するモノクローナル抗体パネルを作成した。発現クロニング法により、樹状細胞に発現する共刺激分子ならびに T 細胞側の受容体の遺伝子の同定を行ってきた。そのうち一つ (53H5) は CD82 を抗原として認識していた。免疫学的な解析を行った結果、CD82 は T 細胞の初期活性化に重要な役割を担う分子であることが明らかとなった。今後これらの分子の腫瘍ワクチン療法への応用を検討してゆきたい。4) T 細胞によって認識される腫瘍拒絶抗原の同定を目的として、腫瘍特異的 CTL の樹立を試みている。5) 自殺遺伝子を組織固有のプロモーターの制御下に発現するような組み換えアデノウイルスを作成し、プロドラッグ・酵素療法の効果を検討した。癌細胞特異的に遺伝子導入細胞を殺すことが可能であった。今後、食道癌や悪性神経腫瘍などの治療への適用をめざしたい。

研究者氏名及び所属機関

研究者氏名	所属機関及び地位	分担研究課題
濱田 洋文	(財) 癌研究会癌化学療法センター 部長	研究の総括
花田 賢一	(財) 癌研究会癌化学療法センター 研究員	免疫遺伝子治療実験
中村 佳子	(財) 癌研究会癌化学療法センター 研究員	養子免疫治療実験 (平成 5, 6 年度)
脇本 浩明	(財) 癌研究会癌化学療法センター 研究員	ベクター作成とワクチン治療 (平成 5, 6 年度) 養子免疫療法 (平成 7 年度)
林 道夫	(財) 癌研究会癌化学療法センター 研究員	遺伝子導入法の改良 (平成 5 年度)
山口 聡	(財) 癌研究会癌化学療法センター 研究員	遺伝子導入法の改良 (平成 6, 7 年度)

研究報告

I 研究目的

外科的に完全に切除することのできない進行固形癌に対しては、現在決定的な治療法は存在しない。これに対し私たちは外科的に摘出した腫瘍細胞にサイトカインなどの遺伝子を導入した特異的なワクチンを宿主に投与し、宿主の抗腫瘍免疫を強化し癌細胞を排除する「免疫遺伝子治療法」の開発を行っている。私たちは GM-CSF の遺伝子を腫瘍細胞に導入してワクチンとする治療法が、動物実験モデルで有効であることを見出した。さらに私たちは多数のサイトカインのレトロウイルス発現ベクターのパネルを作成し腫瘍細胞に対して遺伝子導入を行い、これらのワクチンとしての治療効果を検討してきた。その結果、GM-CSF に加えてさらに IL-4 の遺伝子を導入した腫瘍ワクチンが高い治療効果をもたらすことを見出した。本研究では、難治性の癌に対する効果的な治療法の開発を目的として、サイトカイン遺伝子を導入発現させた腫瘍ワクチンによる免疫遺伝子治療法の基礎研究を行う。この研究によって得られた基礎実験データは、今後癌に対する免疫遺伝子治療の臨床治療プロトコールを作成してゆく上で、導入すべきサイトカイン遺伝子の選択ならびに治療スケジュール決定のための基礎的資料となる。

II 研究計画及び方法と成果

1. サイトカイン発現による腫瘍ワクチン療法：

a) 30 種類以上のサイトカインや接着分子を発現する組み換えレトロウイルス産生細胞を作製した。これを用いて各種腫瘍細胞に対して高効率遺伝子導入を行った。サイトカイン発現腫瘍を 10,000 ラッドの放射線照射により不活性化し、特異的ワクチンとして用い、

B16 マウスメラノーマ移植腫瘍の予防実験を行った。皮下移植のモデルでは、GM-CSF 発現腫瘍ワクチンが最も有効であった。IL-6、LT、MIF、IL-3、IL-10 でも予防効果が得られた。さらにマウス皮下及び脳内移植腫瘍の治療モデルを用いて 2 種のサイトカインの併用効果について検討した結果、GM-CSF と IL-4 の組み合わせが GM-CSF 単独を上回る治療効果をもたらした。b) 従来使われていたレトロウイルス・ベクターMFG の gag と env を改変して gag-killed (GK) ベクターを作成した。さらに 5'側の LTR のエンハンサーを CMV-IE に置換した Rx ベクターを作成した。これらは将来、臨床治験に使用し得るベクターである。これを骨格としてヒトの GM-CSF と IL-4 を発現する組換えレトロウイルスを作成した。10⁶cfu/ml 以上の高タイトーのウイルスが得られ、ヘルパーウイルスは検出されなかった。c) グリオブラストーマの臨床サンプルから腫瘍細胞を培養し、GM-CSF と IL-4 の遺伝子を導入して、サイトカイン産生量を測定した。手術サンプル 6 例中全例で大量 (>10⁹) の腫瘍細胞の培養に成功し、レトロウイルス GK ベクターによって高効率・高発現の GM-CSF プラス IL-4 の遺伝子導入が可能であった。以上の結果より、グリオブラストーマの腫瘍ワクチンの作成が可能であることが示された。

2. ワクチン療法と受動免疫療法の併用：

a) 動物モデルによるサイトカインのスクリーニング：腫瘍細胞を見分けて特異的に殺すことのできるエフェクター T 細胞への遺伝子導入は、抗腫瘍免疫強化のための有力な手法と考えられる。私たちはアデノウイルスベクターの使用により、マウスの CD8+CTL に 100% に近い高効率で遺伝子導入を行い、CTL の *in vivo* での抗腫瘍効果を増強させるサイトカインのスクリーニングを行った。その結果、 γ IFN 遺伝子導入によって最も強い抗腫瘍効果増強が得られることがわかった。さらに、GM-CSF 遺伝子導入腫瘍ワクチンと養子免疫遺伝子治療を複合することにより、それぞれの効果をさらに高められることがわかった。b) 担癌患者の末梢血からの、腫瘍特異的 T リンパ球培養の試み：腫瘍特異的 CTL を得るために、悪性脳腫瘍術後患者の末梢血リンパ球を自己腫瘍細胞で刺激して培養を行った。グリオーマ症例では試みた 3 例ともに CTL は得られなかった。一方、転移性メラノーマの症例 (1 例) では、腫瘍特異的 CTL を樹立することができた。

3. 抗原提示と T リンパ球活性化のメカニズムの解析：

a) GM-CSF プラス IL-4 腫瘍ワクチン療法の作用標的として、私たちは抗原提示細胞、特に樹状細胞を考えている。当研究では、GM-CSF 産生腫瘍を接種した担癌マウスの脾臓から、樹状細胞を分離培養する方法を開発し、樹状細胞によって腫瘍特異抗原が効果的に提示されるかどうか検討した。私たちの B16 メラノーマの皮下移植予防モデルを用いて行った実験の結果では、放射線照射 B16 細胞と共培養してから抗原提示樹状細胞 (DC) をワクチンとして用いた場合に、B16 に対する特異的な免疫誘導が得られた。この実験結果により、可溶性の抗原のみでなく腫瘍抗原も樹状細胞によって効果的に提示されることが初めて明らかとなった。b) 次に私たちは、樹状細胞に発現する未知の T 細胞活性化共刺激分子ならびに T 細胞側のレセプターの分子クローニングを目的として基礎研究を開始した。方法としては、樹状細胞による T 細胞活性化を指標として、抗原提示機能を修飾するモノクローナル抗体を作成し、これをプローブとして COS7 細胞を用いた発現クローニングを行うこ

ととした。現在までに約 200 クローンモノクローナル抗体を得ている。そのうちの 1 つ (53H5) は、発現クローニングの結果、CD82 を抗原として認識することがわかった。CD82 は CD9, 37, 63, 81 などと共に TM4 スーパーファミリーに属し、TCR・抗原レセプター・Fc レセプターなどと会合する分子として知られている。得られた全長 cDNA と抗体を用いて詳しい解析を行った結果、CD82 は T 細胞の初期活性化に重要な役割を担う分子であることが明らかとなった。今後はこれらの分子の腫瘍ワクチン療法への応用が可能かどうかの検討を進めてゆきたい。

4. 腫瘍拒絶抗原の同定とワクチン治療への応用：

T 細胞によって認識される腫瘍拒絶抗原を同定し、そのペプチド抗原をワクチン治療に応用することは、将来臨床において重要な手段となると考えられる。当研究では、腫瘍拒絶抗原同定のための基礎的な方法として、担癌患者の末梢血リンパ球あるいは TIL を自己腫瘍細胞で刺激することにより、腫瘍特異的 CTL の樹立を試みている。現在までにメラノーマ症例において CTL の樹立に成功している。他の腫瘍（大腸癌、グリオーマなど）では、CTL の培養が困難であった。今後、新しい方法を開発していかななくてはならない。現在メラノーマ、腎細胞癌等の症例で、腫瘍拒絶抗原ペプチドの同定を目的として実験を行っている。

5. プロドラッグ・酵素療法：

癌に対する免疫療法を成功させるためには、その前提として、腫瘍細胞数を軽減しておくことが大切である。外科的にできるだけ切除することが主要な手段であるが、場合によっては機能の温存等が必要なため、拡大外科手術が不適當である。そのような時に外科切除を補う方法としてプロドラッグ・酵素療法の適用が考えられる。これは HSV チミジン・キナーゼや大腸菌のシトシン・デアミナーゼなどのいわゆる自殺遺伝子を標的細胞に導入発現させ、ガンシクロビル、5FC などのプロドラッグ投与によって遺伝子導入細胞を特異的に殺す方法である。私たちは自殺遺伝子を組織固有のプロモーター (AFP や CEA のプロモーター) の制御下に発現するような組み換えアデノウイルスを作成し、肝癌や大腸癌のモデルを用いて治療効果を検討した。in vitro 実験結果では、組織固有のプロモーターを用いることによって、癌細胞特異的に遺伝子導入細胞を殺すことが可能であった。

III. 考察

サイトカイン遺伝子導入による腫瘍ワクチン治療に関して従来の報告の多くは、1 種ないし 2 種のサイトカインの効果についての散発的なものであった。本研究で作成した 20 数種のサイトカインのベクターのパネルは、各臓器由来の腫瘍についてどのサイトカインが最も有効であるかを統一的に比較検討するために、大変有用な道具となるであろう。私たちがこれまでに得た動物実験結果により、GM-CSF と IL-4 の両方を発現する腫瘍ワクチンにより顕著な治療効果をあげられることが明らかとなった。私たちは、次のステップとして、GM-CSF プラス IL-4 腫瘍ワクチンの作用標的の解析と、それにもとづいたさらに強力なワクチン療法の開発とを目標として研究を進めていくことにした。また、その一方で、このようなワクチン療法の効果を臨床治験によって確認してゆくことが大切となる。その

ための下準備として当研究では a) 安全性の高い、高効率のレトロウイルス・ベクターの作成、並びに、b) 各種組織由来の腫瘍細胞の大量培養法と遺伝子導入法の検討を行った。これによって、GM-CSF プラス IL-4 遺伝子導入腫瘍ワクチンの作成が比較的容易に出来ることが示された。現在、国内・国外の研究施設との共同研究として、私たちの作成したベクター系を用いて、動物を使用した基礎的な検討並びにヒト臨床サンプルを用いた前臨床試験が行われている。将来これらの基礎的なデータをもとに、臨床治験を計画し、注意深く評価してゆくこととなる。

これらの腫瘍ワクチン療法の作用標的として、私たちは抗原提示細胞とくに樹状細胞を考えている。当研究では、GM-CSF 産生腫瘍を接種した担癌マウスの脾臓から、樹状細胞を分離培養する方法を開発した。この方法では一匹のマウスから通常 10^7 個もの樹状細胞を得ることができ、これは従来の報告の 10~20 倍に相当する大変効率の良い方法である。このようにして得られた樹状細胞を用いた実験により、この細胞によって従来示されて来たような可溶性の抗原のみでなく、細胞性の腫瘍特異抗原も効果的に提示されることが明らかとなった。GM-CSF、IL-4、TNF などは、樹状細胞の増殖・分化・活性化などを促進するサイトカインとしていくつかの報告がなされており、本研究で見出された GM-CSF プラス IL-4 腫瘍ワクチンの効果も、この樹状細胞の働きを介していると考えられる。そこでその詳細についてさらに検討してゆくこととした。

樹状細胞はマクロファージ系の細胞と協調して、非常に強力な T 細胞活性化を行う。本研究ではこの現象を試験管内の簡単なアッセイ系で見られるようにし (costimulation assay)、機能修飾活性をもつモノクローナル抗体をスクリーニングし、多くのクローンを樹立した。T 細胞共刺激分子として B7 (CD80 と CD86) が代表的であり、よく研究されている。しかし、本研究の腫瘍ワクチン実験の結果では、CD80、CD86 とともに十分な抗腫瘍免疫の誘導が得られなかった。また、私たちの樹立したモノクローナル抗体は大多数が B7/CD28 系の分子を抗原としているものではなかった。私たちは B7/CD28 系の分子以外に、必須な共刺激分子が存在することを想定して、抗体を用いた発現クローニングを進めている。

このうちの一つ (53H5) のクローンは、発現クローニングの結果 CD82 を抗原としていることが示された。CD82 は、TCR や CD4 などと会合することから、TCR 共受容体と呼ばれるべき分子かもしれない。本研究で得られた全長 cDNA と抗体を用いて、現在 CD82 の機能の解析を行っている。

一方、腫瘍細胞を見分けて特異的に殺すことのできるエフェクター T 細胞への遺伝子導入も、抗腫瘍免疫強化のための有力な手法と考えられるが、今まで余り多くの研究がなされていなかった。これは、T 細胞への効率のよい遺伝子導入が困難であったことが大きな要因であろう。本研究ではアデノウイルスベクターの使用により、マウスの CD8+CTL に 60~95% の高効率で遺伝子導入が可能であることを見出した (Cancer Res. 54:5757-5760, 1994)。さらに、CTL の *in vivo* での抗腫瘍効果を増強させるサイトカインを選択するために動物実験を行い、以下の知見を得た。1) IL-2 遺伝子導入は、肺転移腫瘍中和モデル、転移治療モデル、脳内同時接種モデルで抗腫瘍効果増強に有効であった。2) IL-2 遺伝子導入 CTL を用いた養子免疫治療では、GM-CSF 遺伝子導入腫瘍ワクチンとの併用でさらに強い治療効果が得られた。3) γ IFN 遺伝子導入 CTL により、肺転移モデルで IL-2 遺伝子導入 CTL と同等またはそれ以上の治療効果が得られた。 γ IFN や IL-2 遺伝子導入を含んだ養子

免疫療法の有用性が当研究によって示されたが、これをヒトの治療に応用できるようにするためには、今後いくつかの技術的困難を克服しなければならない。例えば、腫瘍特異的殺細胞効果を持つ CTL を大量に培養することが、現在でも非常に難しい。培養の条件（サイトカインの補充、抗原による刺激、など）の改良も重要な研究課題であろう。また、非特異的な CD8+CTL を大量培養することは比較的容易であるため、これに遺伝子導入することによって、腫瘍特異的 CD8+CTL に改変するというアプローチも考えられる。私たちはこのような発想に基づいて、非特異的な抗原（ウイルス抗原など）による刺激で大量に増殖させた CD8+CTL に、腫瘍特異抗原を認識するモノクローナル抗体の単鎖 V フラグメント（scFv）と T 細胞受容体（TCR）の CD3 ζ との融合タンパク（scFv $\cdot\zeta$ ）を、レトロウイルスベクターを用いて発現させ、抗原特異的 CD8+CTL に改変する試みを行っている。腫瘍特異的な抗体が得られる場合には、このような方法も有力な治療手段となりうると期待される。

腫瘍ワクチン療法で、これから重要となるのは、腫瘍拒絶抗原の同定とその知見にもとづいた治療法の開発である。腫瘍抗原と、MHC との関連が明らかとなれば、免疫療法の効果の期待される患者をあらかじめ選択することが可能となり、この療法の成功率が高められるであろう。1991 年にベルギーの Boon らのグループによってヒメ・メラノーマに発現する腫瘍拒絶抗原（MAGE）が報告された。以来メラノーマに関しては 9 種以上の抗原が同定され、これを用いたワクチン療法が計画されている。本研究でも、メラノーマに対する腫瘍特異的 CTL の作成に成功し、抗原同定へと進んでいる。しかし、他の組織由来の腫瘍に関しては、今のところ成功していない。CTL の安定した培養のために新しい方法の確立が望まれる。一方、最近ドイツの Pfreundschuh らが報告したように、CTL の細胞株樹立をバイパスできるような抗原同定法も面白いアプローチであろう。私たちも、メラノーマや腎細胞癌・消化器系の癌などで、この方法を試みている。これからの特異的免疫療法の方向は、腫瘍拒絶抗原を同定し、これを抗原提示細胞によって効果的に提示させ、T 細胞を活性化してゆくという流れであろう。これに、遺伝子導入発現などをはじめとする最新の技術を上手に適用してゆくことになるだろう。

V. 研究成果の発表

1. Nakamura, Y., Wakimoto, H., Abe, J., Kanegae, Y., Saito, I., Aoyagi, M., Hirakawa, K., and Hamada, H. Adoptive immunotherapy with murine tumor-specific T lymphocytes engineered to secrete interleukin-2. *Cancer Res.* 54: 5757-5760, 1994.
2. Abe, J., Wakimoto, H., Nakamura, Y., Kanegae, Y., Saito, I., and Hamada, H. Immunogene therapy for cancer by cytokine gene-modified tumor vaccine and tumor-infiltrating lymphocytes (TIL). *CancerGeneTher.* 1: 312, 1994.
3. Wakimoto, H., Abe, J., Aoyagi, M., Hirakawa, K., and Hamada, H. Enhanced antitumor immunity by tumor vaccines expressing cytokine genes. in press in "The Symposium: Molecular and Cellular Biology of Gene Therapy" in the Third Internet World Congress on Biomedical Sciences [<http://www.3iwc.riken.go.jp>] held in December 9-20, 1996

4. Abe, J., Wakimoto, H., Aoyagi, M., Hirakawa, K., and Hamada, H. Cytokine gene-modified tumor vaccination intensified by a streptococcal preparation OK-432. *Cancer Immunol. Immunother.* 41: 82-86, 1995.
5. Yamaguchi, S., Wakimoto, H., Yoshida, Y., Kanegae, Y., Saito, I., Aoyagi, M., Hirakawa, K., Amagasa, T., and Hamada, H. Enhancement of retrovirus-mediated gene transduction efficiency by transient overexpression of the amphotropic receptor, GLVR2. *Nucleic Acids Res.* 23: 2080-2081, 1995.
6. Abe, J., Wakimoto, H., Yoshida, Y., Aoyagi, M., Hirakawa, K., and Hamada, H. Antitumor effect induced by GM-CSF gene-modified tumor vaccination: Comparison of adenovirus- and retrovirus mediated genetic transduction. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 121: 587-592, 1995.
7. Abe, J., Wakimoto, H., Okabe, S., Yoshida, Y., Aoyagi, M., Hirakawa, K., and Hamada, H. Enhanced antitumor effect by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes producing interleukin-10 by adenovirus-mediated genetic transduction. *Chi. J. Cancer Biother.* 3: 96-103, 1996.
8. Abe, J., Wakimoto, H., Tsunoda, R., Okabe, S., Yoshida, Y., Aoyagi, M., Hirakawa, K. and Hamada, H. In vivo antitumor effect of cytotoxic T lymphocytes engineered to produce interferon-g by adenovirus-mediated genetic transduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218: 164-170, 1996.
9. Wakimoto, H., Abe, J., Tsunoda, R, Aoyagi, M., Hirakawa, K., and Hamada, H. Intensified antitumor immunity by a cancer vaccine that produces granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4. *Cancer Res.* 56: 1828-1833, 1996.
10. Kanai, F., Shiratori, Y. Yoshida, Y., Wakimoto, H., Hamada, H., Kanegae, Y., Saito, I., Nakabayashi, H., Tamaoki, T., Tanaka, T., Lan, K.-H., Kato, N., Shiina, S., and Omata, M. Gene therapy for alpha-fetoprotein-producing human hepatoma cells by adenovirus-mediated transfer of herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Hepatology* 23: 1359-1368, 1996.
11. Lan, K.-H., Kanai, F., Okabe, S., Yoshida, Y., Wakimoto, H., Hamada, H., Tanaka, T., Shiratori, Y., and Omata, M. Gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human gastric cancer cells by adenovirus-mediated expression of cytosine deaminase. *Gastroenterology* in press.
12. Tanaka, T., Kanai, F., Okabe, S., Yoshida, Y., Wakimoto, H., Hamada, H., Shiratori, Y., Lan, K.-H., Ishitobi, M., and Omata, M. Adenovirus-mediated prodrug gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human gastric carcinoma cells in vitro. *Cancer Res.* 56: 1341-1345, 1996.
13. Kato, K., Shimozato, O., Hoshi, K., Wakimoto, H., Hamada, H., Yagita, H., and Okumura, K. Local production of IL-12p40 suppresses Th1-mediated immune responses and prevents allogeneic myoblast rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* in press.

14. Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34^{low}/⁻ hemopoietic stem cell. *Science* 273: 242-245, 1996.
15. Hanada, K., Tsunoda, R., and Hamada, H. GM-CSF-induced in vivo expansion of splenic dendritic cells and their functional characterization. *J. Leukocyte Biol.* 60: 181-190, 1996.
16. Nishio, N., Hisha, H., Ogata, H., Inaba, M., Yamamoto, Y., Amoh, Y., Yasumizu, R., Hanada, K., Hamada, H., and Ikehara, S. Changes in markers, receptors, and adhesion molecules expressed on murine hemopoietic stem cells after a single injection of 5-fluorouracil. *Stem Cells* in press, 1996.
17. Sato, Y., Koshita, Y., Hirayama, M., Matuyama, T., Wakimoto, H., Hamada, H., and Niitsu, Y. Augmented anti-tumor effects of killer cells induced by tumor necrosis factor gene-transduced autologous tumor cells from gastrointestinal cancer patients. *Human Gene Ther.*, in press October 1, 1996.
18. Kanai, F., Lan, K.-H., Shiratori, Y., Tanaka, T., Ohashi, M., Yoshida, Y., Wakimoto, H., Hamada, H., Nakabayashi, H., Tamaoki, T., and Omata, M. In vivo gene therapy for α -fetoprotein producing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene., *Cancer Research*, in press.