

Fig. 3

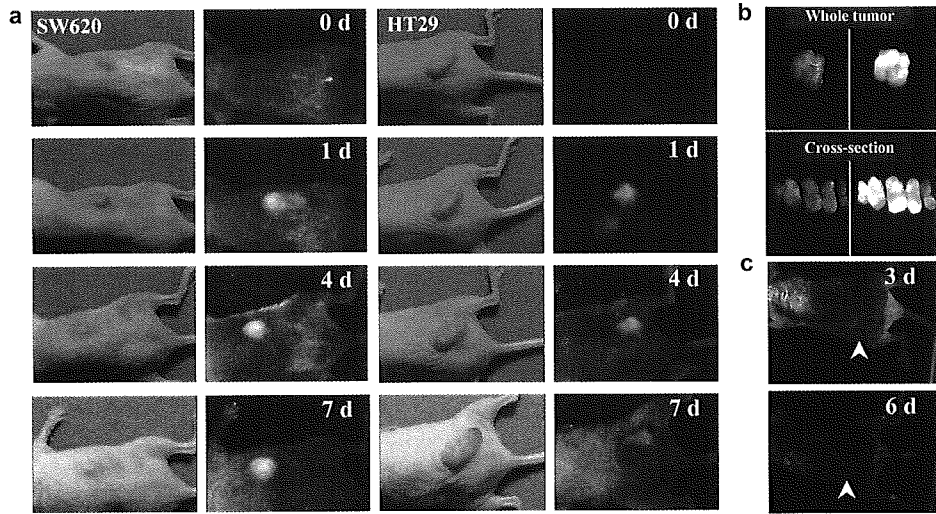
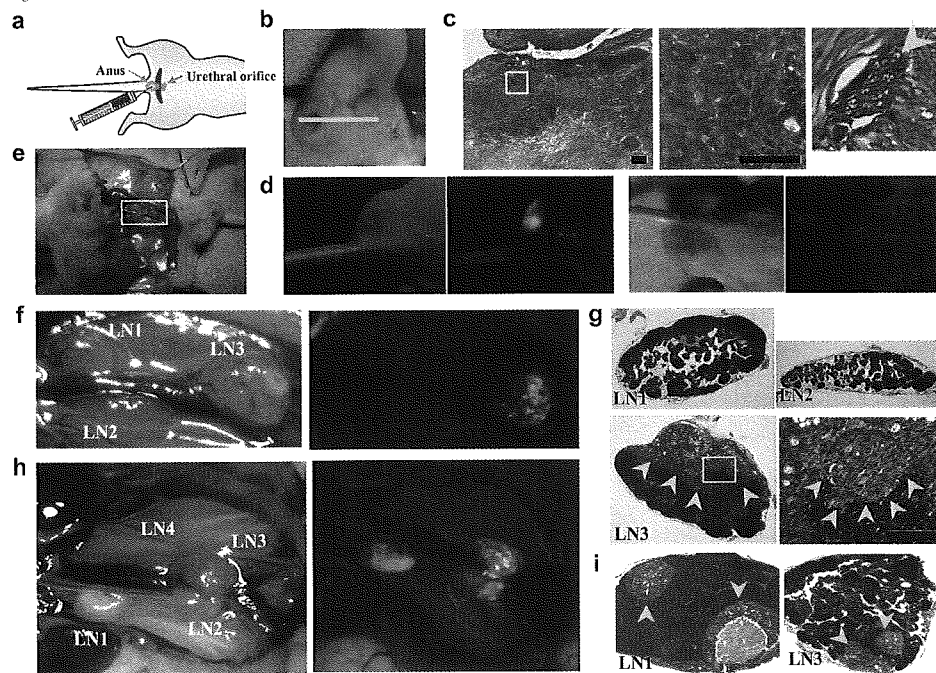


Fig. 4



悪性腫瘍に対するウイルス製剤

—Telomelysin の開発と臨床応用の可能性—

岡山大学医学部・歯学部附属病院 遺伝子・細胞治療センター助教授* / 同大学大学院医歯学総合研究科 消化器・腫瘍外科学教授**

藤原俊義*・田中紀章**

はじめに

最近の遺伝子工学の進歩により、ウイルスゲノムを改変し、その安全性を高めたり特殊な機能を増強することが可能となってきた。最初の試みは、ウイルスゲノムの一部を欠損させることで増殖性をおさえ、治療遺伝子を発現させることで安全性と機能を確保した。このウイルスベクターを用いた「遺伝子治療」がヒトに応用されてから、すでに10年以上が経過している。多くの非増殖型ウイルスベクターが臨床応用され、特定の患者群に対しては有用性が認められた^{1,2)}。しかし、*in vivo*における標的組織への遺伝子導入効率の限界などから、かならずしも前臨床試験で期待された臨床効果が認められているとはいえない。

ウイルスは、本来ヒトの細胞に感染、増殖し、その細胞をさまざまな機序により破壊する。その増殖機能に選択性を付加することにより、ウイル

スを癌細胞のみを傷害する治療用製剤として用いることができる(図1)³⁾。アデノウイルスはその構造がもっともよく研究されているウイルスの一つであり、非増殖型のものが多くの遺伝子治療プロトコルで使用されることによって、その安全性に関する情報が蓄積されてきている⁴⁾。

本稿では、テロメラーゼ活性依存性に癌細胞で選択的に増殖して細胞死を誘導するアデノウイルスの開発の現況について紹介し、その抗腫瘍医薬品としての臨床応用の可能性を考察する。

アデノウイルスの特徴と制限増殖能の分子機構

ヒトのアデノウイルスはエンベロープをもたない30~38kbサイズの二重鎖DNAウイルスであり、41種の亜型が存在し、6群に分類されている。遺伝子導入用ベクターの基本骨格としてよく用いられるアデノウイルス5型は、幼児期に気道感染

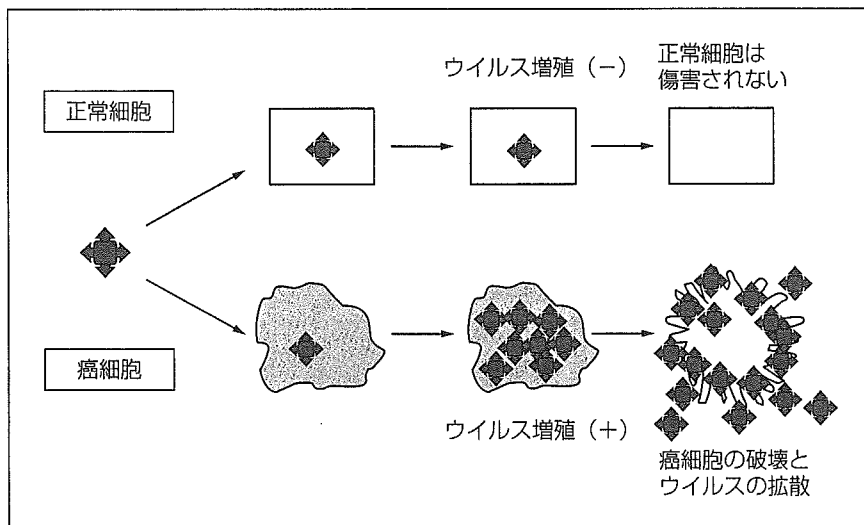


図1 癌細胞での選択的なウイルス増殖と細胞死誘導³⁾

によりいわゆる「かぜ」症状を起こす原因ウイルスの一つであり、アメリカでは30年以上の間、約100万人の兵士に対しワクチンとしてアデノウイルスが投与され、その後重篤な副作用の報告もなかったという実績をもつ。

アデノウイルスゲノムはその構造が詳細に解析されており、ウイルスの複製増殖のきわめて初期(immediate-early, IE)に働く遺伝子群、初期(early, E)に働く遺伝子群、および後期(late, L)に関与する遺伝子群に分けられる⁵⁾。

現在、アデノウイルスに癌細胞における特異的な増殖機能を発揮させるために、大きく2つの方法が開発されている。最初の試みは、アデノウイルスの初期遺伝子に特定の変異あるいは欠失を加えることにより、癌細胞の生物学的な特殊性に基づいた制限増殖性を期待する方法である。E1B初期遺伝子の55 kDaを欠損した変異ウイルスであるOnyx-015が代表的であり、いくつかの第I相および第II相臨床試験はすでに終了している^{6,7)}。第2の試みは、腫瘍特異的および臓器特異的なプロモーターによる初期遺伝子の転写制御をメカニズムとして、癌細胞特異的あるいは特定の臓器由来の癌細胞に特異的な制限増殖性を付加する方法である。この際、さまざまな発生源をもつ広い範囲の癌に適用するためには、より汎用性を有するプロモーターを用いる必要がある。

テロメラーゼ活性とhTERT遺伝子

染色体DNA末端の短い塩基配列(TTAGGG)の繰り返しで構成されるテロメアは、細胞増殖に伴い、次第に短縮し細胞に老化(replicative senescence)を引き起こす。このテロメアの短縮は発癌の抑制機構であり、前癌状態にある細胞が老化に陥り死滅することで癌化が阻止されている。逆に、無制限の増殖能を有する癌細胞はテロメアを維持する分子機構を獲得しており、代表的なものがテロメラーゼの活性化である。テロメラーゼは、染色体の3'末端にTTAGGG配列を伸長しテロメア長を保つ作用をもつリボ核酸蛋白酵素であり、触媒サブユニットhTERT(human telomerase)

reverse transcriptase)と鋳型となるRNAサブユニット(hTR)から構成される。テロメラーゼ活性はhTERT遺伝子発現レベルと相関し、またhTERT遺伝子導入によりテロメラーゼ活性を誘導することができることから、hTERT分子がテロメラーゼ活性を制御していると考えられる⁸⁾。テロメラーゼは、きわめて多くの癌細胞でその活性の上昇が明らかになっており⁹⁾、癌細胞ではhTERT遺伝子の発現制御を行っているhTERTプロモーターのスイッチがオンになると考えられる。

テロメラーゼ特異的腫瘍融解アデノウイルスの構造と機能

前立腺癌に特異的なPSA¹⁰⁾をはじめとして、AFP¹¹⁾やMUC-1¹²⁾など、さまざまなプロモーターによる癌特異的に増殖するアデノウイルスが開発されており、それぞれのプロモーター機能に対応する癌細胞においてはその有効性が示されている。しかし、より広範な癌を対象とするために、筆者らはアデノウイルスの増殖に必要なE1A遺伝子とE1B遺伝子をIRES配列で結合した発現カセットをhTERTプロモーターにより選択的に発現する、テロメラーゼ特異的腫瘍融解ウイルスTelomelysin(開発コード:OBP-301)を作製した¹³⁾(図2-A)。

多くの制限増殖型アデノウイルスがE1A遺伝子のみを選択的プロモーターで制御しているのに比べて、TelomelysinではE1AおよびE1BをいずれもhTERTプロモーターの制御下におくことで、より癌細胞での特異性が確保できている。実際に、Telomelysin感染後3日までに、各種癌細胞においては $10^5 \sim 10^8$ 倍のウイルス複製増殖が認められたが、正常細胞では100~1,000倍におさえられていた。肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、頭頸部癌、乳癌、肝癌、膵癌、前立腺癌、子宮頸癌、卵巣癌などのヒト由来各種癌細胞では、1~10 multiplicity of infection(MOI)のTelomelysin感染で3~5日以内にcytopathic effect(CPE)が誘導され、完全な細胞死が観察された(図2-B)。ヌードマ

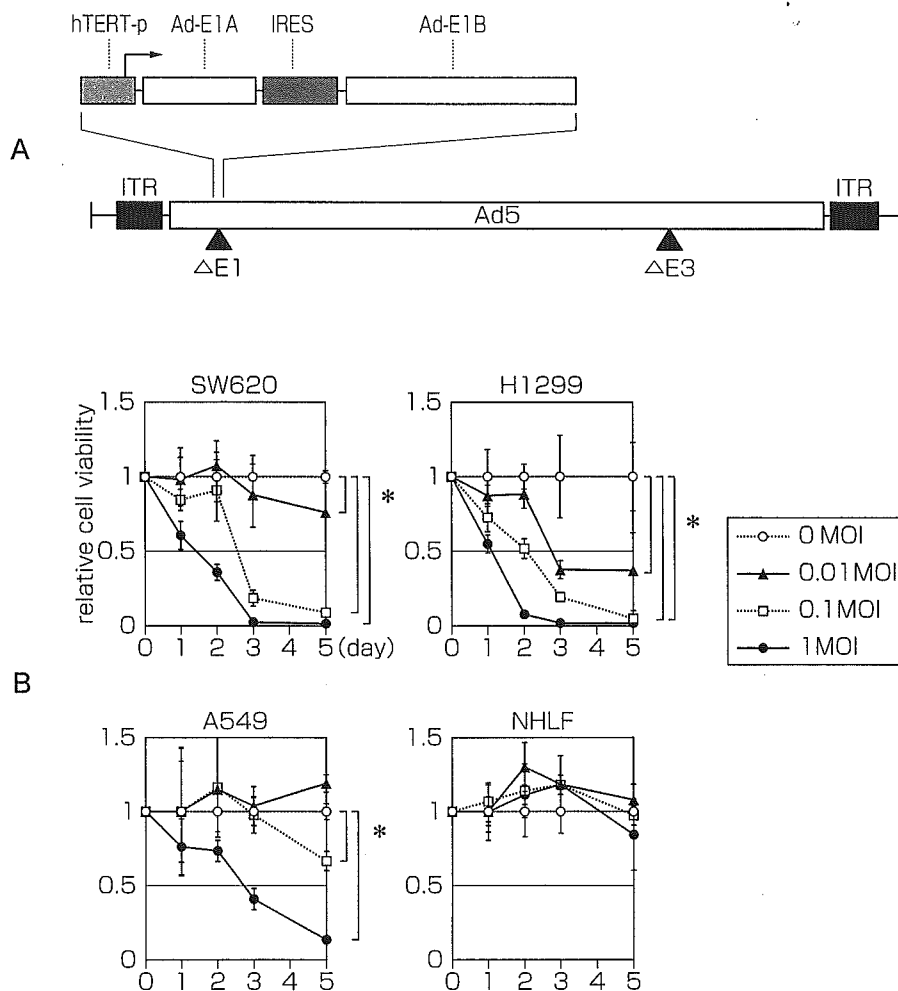


図 2 Telomelysin (OBP-301) の構造と抗腫瘍活性¹³⁾

- A : Telomelysin は、ウイルスの増殖に必要な E1 と E3 領域が除去されている第一世代のアデノウイルスベクターを基本骨格としている。hTERT プロモーターと IRES 配列で結合した E1A, E1B 遺伝子よりなる増殖カセットが、相同組み換えによりアデノウイルス 5 型由来のベクターの欠損した E1 部分に組み込まれている。
- B : ヒト大腸癌細胞 SW620, ヒト肺癌細胞 H1299, A549, および正常ヒト肺線維芽細胞 (NHLF) に Telomelysin を 0, 0.01, 0.1, 1 MOI で感染させ、経日的に細胞数をカウントし、生細胞数の比率で示した。* $p < 0.01$ 。

ウス背部皮下に移植したヒト肺癌腫瘍に、 10^7 plaque forming units (PFU) という低濃度の Telomelysin を腫瘍内局所投与したところ、無治療の腫瘍や非増殖型のコントロール・アデノウイルスの投与に比較して有意な増殖抑制が認められ (図 3-A)¹³⁾、さらに Telomelysin は血中を循環し、遠隔部位の腫瘍内でも増殖していることが、DNA-

PCR 解析や E1A 蛋白質に対する免疫染色などにより確認された。これらの結果は、原発腫瘍内投与した Telomelysin による微小転移巣の治療の可能性を示唆している。

Telomelysin は、診断用医薬品としても応用可能である。すなわち、オワンクラゲ由来の蛍光遺伝子 GFP (green fluorescence protein) を組み込ん

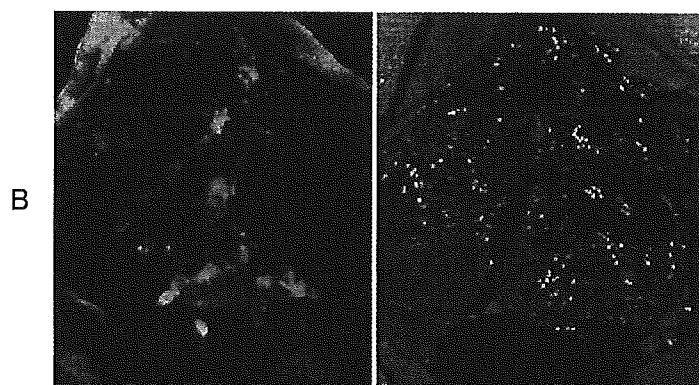
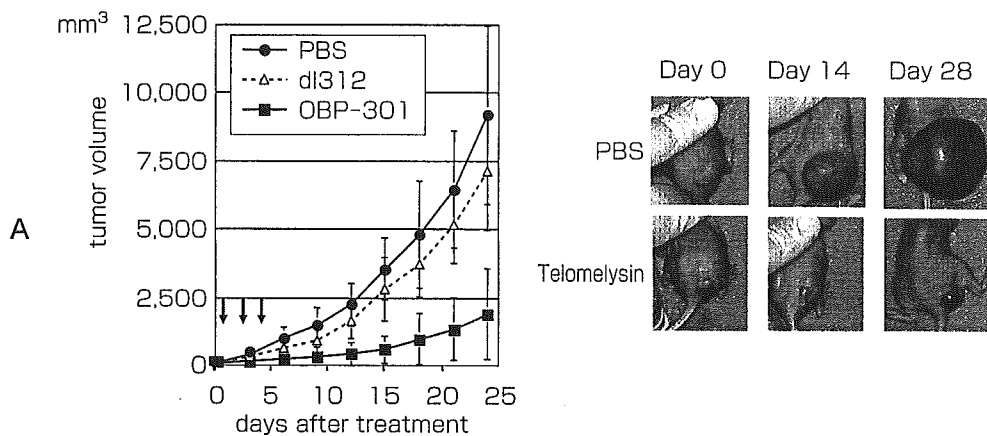


図 3 Telomelysin (OBP-301) の *in vivo* における癌診断・治療への応用^{13,14)}

A: ヒト肺癌細胞 H1299 をヌードマウス背部皮下に移植し、腫瘍径が約 5 mm となった時点で 10^7 PFU の Telomelysin を 3 回腫瘍内に投与し、腫瘍径を測定して推定腫瘍重量の変化を観察した。コントロールとしては非増殖型アデノウイルス dl312 を用いた。右にコントロールおよび治療群の背部腫瘍のマクロ像を示す。

B: Telomelysin と Ad-GFP を用いた胸膜播種巣の可視化。ヌードマウスの胸腔内に A549 ヒト肺癌細胞を移植し、2 週間後に GFP 発現アデノウイルスベクター (Ad-GFP) と Telomelysin (OBP-301) を胸腔内に投与した。Telomelysin の腫瘍選択的増殖とともに Ad-GFP も増殖し、肉眼的に同定不能な微小播種巣も緑色蛍光にて検出可能であった。左: 蛍光視野, 右: 明視野。

だ非増殖型アデノウイルスベクター Ad-GFP を Telomelysin と共感染させると、癌細胞では Telomelysin が産生する E1 蛋白質を使って Ad-GFP も増殖するが、正常細胞ではいずれの増殖も抑制される。その結果、癌細胞では特異的に GFP 緑色蛍光が観察され、*in vitro* では蛍光顕微鏡下に、またマクロでは高感度 3CCD カメラを用いた蛍光観察システム下に検出することが可能である。

ヒト肺癌細胞をヌードマウスの胸腔内に移植した胸膜播種モデルにおいて、Telomelysin と Ad-GFP の胸腔内投与により肉眼的には確認できなかった微小胸膜播種巣の選択的な可視化が可能であった (図 3-B)¹⁴⁾。

armed(武装した)Telomelysin の開発

Telomelysin のウイルスゲノムにさまざまな機

能遺伝子を組み込むことで、特殊機能の付加や抗腫瘍活性の増強を期待することができる。

OBP-401 は、Telomelysin を基本骨格として GFP 遺伝子をウイルスゲノムに組み込んでおり、生体内で癌組織を可視化するナビゲーションツールとしても使用可能である。生体内で癌組織や転移リンパ節を検出する試みは画像診断の分野で研究が進んでいるが、手術中に直接検出・診断するシステムはいまだ開発されていない。手術の縮小化による低侵襲化を目指す場合に、ほしい情報の一つに転移リンパ節の有無があり、それを知る方法として OBP-401 が活用できる。OBP-401 を手術前に癌局所に注入し、高感度蛍光感知カメラにより転移陽性リンパ節を直接術中にリアルタイムに同定し、切除範囲のナビゲーションとするものである。

OBP-405 は、Telomelysin の標的細胞への感染性を増強するために、細胞表面のインテグリンに親和性を有する RGD (Arg-Gly-Asp) モチーフをファイバーに組み込んだ改変 Telomelysin である¹⁵⁾。OBP-405 はコクサッキー・アデノウイルス受容体 (coxsackie-adenovirus receptor, CAR) 非依存性にインテグリンを介して標的細胞に感染することができ、CAR 陰性のヒト悪性腫瘍細胞でも顕著な抗腫瘍効果を発揮することが可能であった。CAR 発現低下により、Telomelysin に耐性となった癌に対しても OBP-405 は抗腫瘍効果を発揮すると推測され、Telomelysin の back up として有用であると思われる。

おわりに

テロメラーゼはきわめて多くの癌細胞で活性の上昇が認められており、癌治療の標的としては魅力的な分子である。Telomelysin による癌治療は、従来の抗癌剤や放射線療法とはまったく異なる作用機序に基づく治療戦略であり、これらの標準治療の耐性機構を克服することができるという利点がある。さらに、正常細胞に影響を与えず癌細胞を選択的に傷害するというコンセプトは重要であり、全身投与が可能となれば肉眼的に検出できな

い微小癌巢においても選択的増殖により抗腫瘍効果が期待できる。しかし現実的には、ウイルスに対する免疫反応や全身投与の際の生体内分布、さらには腫瘍内でのウイルスの拡散分布など、今後検討すべき問題点は多い。

Telomelysin や関連ウイルス製剤をコア技術として、岡山大学発バイオベンチャー、オンコリスバイオファーマ (株) (<http://www.oncolys.com/>) が設立され、癌の治療用・診断用医薬品としての臨床開発を推進している。現在、アメリカにて Good Manufacturing Practice (GMP) 規格の Telomelysin の製造が進んでおり、近い将来、米国食品医薬品庁 (Food and Drug Administration, FDA) による承認を受けて臨床試験が開始される予定である。今後、これらの基礎研究、臨床研究が進むことで、テロメラーゼ活性を標的とした新しいウイルス製剤 Telomelysin の安全性や有効性が確認され、さまざまな難治癌治療に広く使用されるようになることを期待する。

文献

- 1) Swisher, S. G., Roth, J. A., Nemunaitis, J., et al. : Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **91** : 763~771, 1999.
- 2) Swisher, S. G., Roth, J. A., Komaki, R., et al. : Induction of p53-regulated genes and tumor regression in lung cancer patients after intratumoral delivery of adenoviral p53 (INGN 201) and radiation therapy. *Clin. Cancer Res.*, **9** : 93~101, 2003.
- 3) Hawkins, L. K., Lemoine, N. R., Kirn, D. : Oncolytic biotherapy : a novel therapeutic platform. *Lancet Oncol.*, **3** : 17~26, 2002.
- 4) Branca, M. A. : Gene therapy : cursed or inching towards credibility? *Nat. Biotech.*, **23** : 519~521, 2005.
- 5) Russell, W. C. : Update on adenovirus and its vectors. *J. Gen. Virol.*, **81** : 2573~2604, 2000.
- 6) Khuri, F. R., Nemunaitis, J., Ganly, I., et al. : A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat. Med.*, **6** : 879~885, 2000.
- 7) Reid, T., Galanis, E., Abbruzzese, J., et al. : Hepatic arterial infusion of a replication-selective oncolytic adenovirus (dl1520) : phase II viral, immunologic, and clinical endpoints. *Cancer Res.*, **62** : 6070~6079, 2002.

- 8) Nakayama, J., Tahara, H., Tahara, E., et al. : Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat. Genet.*, **18** : 65~68, 1998.
- 9) Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., et al. : Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, **266** : 2011~2015, 1994.
- 10) Rodriguez, R., Schuur, E. R., Lim, H. Y., et al. : Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706 : a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res.*, **57** : 2559~2563, 1997.
- 11) Li, Y., Yu, D. C., Chen, Y., Amin, P., et al. : A hepatocellular carcinoma-specific adenovirus variant, CV890, eliminates distant human liver tumors in combination with doxorubicin. *Cancer Res.*, **61** : 6428~6436, 2001.
- 12) Kurihara, T., Brough, D. E., Kovesdi, I., et al. : Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen. *J. Clin. Invest.*, **106** : 763~771, 2000.
- 13) Kawashima, T., Kagawa, S., Kobayashi, N., et al. : Tumor-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin. Cancer Res.*, **10** : 285~292, 2004.
- 14) Umeoka, T., Kawashima, T., Kagawa, S., 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.
- 15) Taki, M., Kagawa, S., Nishizaki, M., et al. : Enhanced oncolysis by a tropism-modified telomerase-specific replication selective adenoviral agent OBP-405 ("Telomelysin-RGD"). *Oncogene*, **24** : 3130~3140, 2005.