

**Figure 1** hTERT expression and selective replication of OBP-401 in human cancer cells. (a) Relative *hTERT* mRNA expression in human tumor and normal cell lines determined by real-time RT-PCR analysis. The *hTERT* mRNA expression of H1299 human lung cancer cells was considered as 1.0, and the relative expression of each cell line was calculated against that of H1299 cells. (b) Immunohistochemical analysis of the hTERT protein expression in surgical specimens of human gastric cancer and their microscopic metastases in lymph nodes. Representative microscopic images of primary tumor (left panel) and metastatic foci in lymph node (middle and right) are shown. Positive staining is reddish brown. Counterstain is blue-purple. Original magnification:  $\times 200$  (left and middle) and  $\times 400$  (right). Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ . (c) DNA structures of OBP-401. (d) Assessment of viral DNA replication in H1299, SW620 and NHLF cells. Cells were infected with OBP-401 at an MOI of 10 for 2 h. Subsequent to the removal of virus inocula, cells were additionally incubated for the indicated time periods and then subjected to real-time quantitative PCR assay. The amounts of viral E1A copy number are defined as the fold increases for each sample relative to that at 2 h (2 h equals 1). (e) Relationship between viral replication and hTERT expression determined by real-time RT-PCR analysis. Plots represent the relative *E1A* DNA levels at 24 h after OBP-401 infection and the relative *hTERT* mRNA levels in SW620, LNCaP and MCF-7 cell lines. The slope represents the positive correlation between these two factors ( $R^2 = 0.9951$ ).

metastatic lymph nodes, thereby leading to the direct imaging of micrometastases. This technology is adaptable to detect lymph node metastasis *in vivo* as a preclinical model of surgical navigation.

**RESULTS**

**hTERT levels in human cell lines and lymph node metastases**

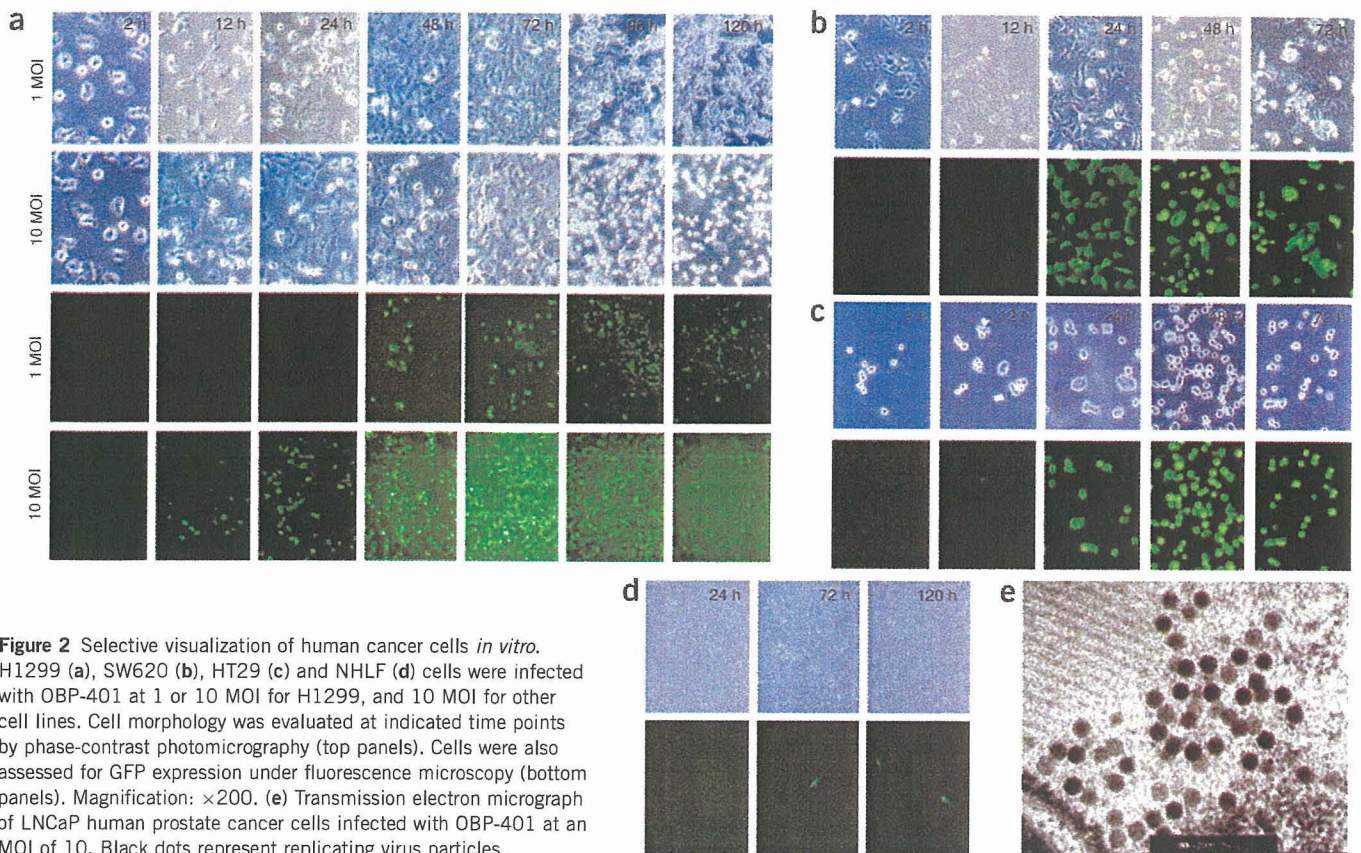
To confirm the specificity of telomerase activity in human cancer cells, we measured expression of *hTERT* mRNA in a panel of human tumor and normal cell lines using a real-time RT-PCR method. Although the expression varied widely, all tumor cell lines derived from different organs expressed detectable levels of *hTERT* mRNA, whereas human fibroblast cells lines such as the normal human lung fibroblast (NHLF) and normal human lung diploid fibroblast (WI38), human vascular endothelial cells, and normal human renal epithelial cells were negative for *hTERT* expression (Fig. 1a). We also examined samples of 30 primary tumors and 39 lymph node metastases obtained from gastric cancer patients for hTERT protein expression by immunohistochemistry (Supplementary Table 1 online). As shown in Fig. 1b, hTERT staining was clearly observed in metastatic foci of gastric cancers, although most of the lymphocytes present in lymph nodes

were negative for hTERT except in some germinal centers. These results suggest that the hTERT promoter element can be used to target human cancer.

**Selective visualization of human cancer cells *in vitro***

We constructed the tumor-specific replication-competent adenovirus OBP-401, which expresses GFP by inserting the GFP gene under the control of the CMV promoter at the deleted E3 region of the telomerase-specific replication-selective type 5 adenovirus OBP-301 (refs. 16,17) (Fig. 1c). To evaluate the replication ability of OBP-401 in different cell lines, we measured the relative amounts of *E1A* DNA by quantitative real-time PCR analysis. Human cancer cells (H1299 and SW620) and normal cells (NHLFs) were infected with OBP-401 at a multiplicity of infection (MOI) of 10 for 2 h, followed by incubation in the medium. Cells were harvested at various times during the 3 d after infection, and the virus yield was determined by quantitative real-time PCR assay targeting for the viral *E1A* sequence. The ratios were normalized by dividing the value of cells obtained 2 h after viral infection. In SW620 and H1299 cells, OBP-401 replicated 6–7 logs by 3 d after infection;





**Figure 2** Selective visualization of human cancer cells *in vitro*. H1299 (a), SW620 (b), HT29 (c) and NHLF (d) cells were infected with OBP-401 at 1 or 10 MOI for H1299, and 10 MOI for other cell lines. Cell morphology was evaluated at indicated time points by phase-contrast photomicrography (top panels). Cells were also assessed for GFP expression under fluorescence microscopy (bottom panels). Magnification:  $\times 200$ . (e) Transmission electron micrograph of LNCaP human prostate cancer cells infected with OBP-401 at an MOI of 10. Black dots represent replicating virus particles.

OBP-401 replication, however, was attenuated up to 3 logs in normal NHLFs (Fig. 1d). These findings indicate that OBP-401 viral recovery was reduced by 3–4 logs in normal cells as compared with cancer cells. We also found an apparent correlation between viral yields at 24 h after OBP-401 infection and *hTERT* mRNA expression in human cancer cell lines (Fig. 1e).

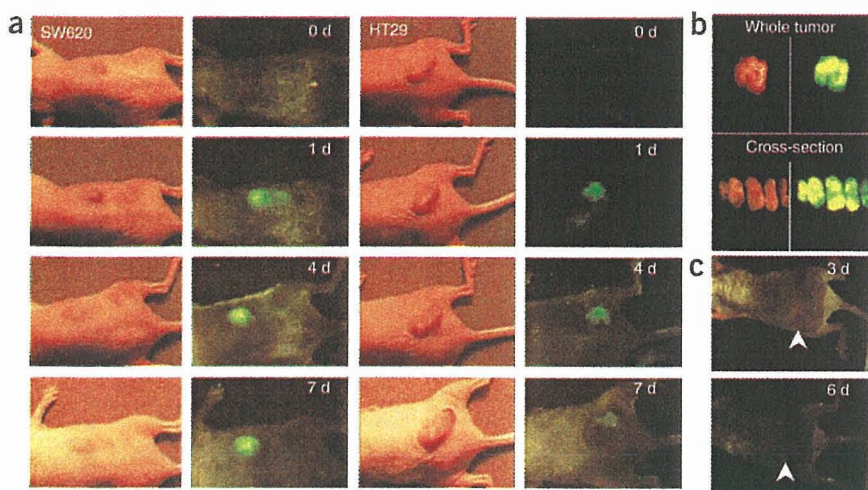
To determine whether OBP-401 replication is associated with selective GFP expression, cells were analyzed and photographed by fluorescent microscope after OBP-401 infection. As shown in Fig. 2a, H1299 human non-small-cell lung cancer cells expressed bright GFP fluorescence as early as 12 h after OBP-401 infection at an MOI of 10. The fluorescence intensity gradually increased in a dose-dependent fashion until  $\sim 72$  h after infection, followed by rapid cell death due to the cytopathic effect of OBP-401, as shown by floating, highly light-refractile cells under phase-contrast photomicrographs. In SW620 and HT29 human colorectal cancer cells we detected GFP expression 24 h after infection with 10 MOI of OBP-401, and cells showed the cytopathic effect at 72 h after infection (Fig. 2b,c). In contrast, normal NHLF cells were negative for GFP expression after OBP-401 infection (Fig. 2d). These results indicate that OBP-401 can replicate exclusively in human cancer cells, leading to tumor cell-specific GFP fluorescence expression *in vitro*. We detected replicating virus particles in human cancer cells by transmission electron microscopy (Fig. 2e). The cytopathic effect of OBP-401 was also assessed by the cell viability assay using the tetrazolium salt XTT. In both SW620 and HT29 cells, OBP-401 infection induced rapid cell death in a dose-dependent manner (Supplementary Fig. 1a online). In *nu/nu* mice carrying subcutaneous SW620 human colorectal tumor xenografts, intratumoral injection of OBP-401 resulted in

a significant inhibition of tumor growth as compared with mock-treated tumors (Supplementary Fig. 1b online).

#### Selective visualization of subcutaneous tumors *in vivo*

It is reported that the *hTERT* promoter could be used to induce transgene expression in syngenic tumors in mice<sup>19</sup>. We first confirmed that OBP-401 could replicate and express GFP fluorescence in Colon-26 cells *in vitro* as well as *in vivo* (Supplementary Fig. 2a,b online). In contrast, OBP-401 replication was attenuated in mouse splenocytes (Supplementary Fig. 2a online). These results suggest that the *hTERT* promoter can efficiently use the mouse transcriptional machinery and, therefore, the selectivity of OBP-401 can be examined in human tumor xenografts in mice.

To assess the specificity of the GFP-based fluorescent optical detection of tumors *in vivo*, we examined the kinetics of GFP transgene expression in subcutaneous SW620 and HT29 tumors after intratumoral injection of  $1 \times 10^7$  PFU per 100  $\mu$ l of OBP-401 with the charged-coupled device (CCD) noninvasive imaging system. Whole-body images of mice showed that intratumoral GFP fluorescence signals were detectable within 24 h after local delivery of viruses (Fig. 3a). The fluorescence intensity reached maximum levels within 4 d after injection and was maintained for at least 7 d. When SW620 tumors were removed 14 d after intratumoral injection of OBP-401, the high GFP transgene expression was visible on the surface of tumors as well as across serially sliced sections (Fig. 3b). No GFP fluorescence was detected when non-tumor-bearing mice were subcutaneously injected with  $1 \times 10^7$  PFU per 100  $\mu$ l of OBP-401 (Fig. 3c), suggesting confinement of GFP expression to the tumor.



**Figure 3** Selective visualization of subcutaneous tumors *in vivo*. (a) Time course of external images of subcutaneous SW620 and HT29 tumors after intratumoral injection of OBP-401. When tumors grew to ~6–7 mm in diameter after subcutaneous inoculation of SW620 and HT29 tumor cells ( $5 \times 10^6$  cells per mouse), OBP-401 viruses at the concentration of  $1 \times 10^7$  PFU were directly injected into established tumors. The GFP fluorescence intensity was monitored for 7 d under the CCD noninvasive imaging system. Left panels, macroscopic appearance of subcutaneous tumors; right panels, fluorescence detection. (b) SW620 tumors were excised 14 d after OBP-401 injection and then assessed for GFP fluorescence as a whole tumor or in cross-sections. Left panels, macroscopic appearance of subcutaneous tumors; right panels, fluorescence detection. (c) Photographs of non-tumor-bearing *nu/nu* mice injected with OBP-401. Mice were subcutaneously injected with  $1 \times 10^7$  PFU of OBP-401 and documented as photographs for GFP expression 3 d and 6 d after injection. Arrowheads, injected area.

**Orthotopic mouse model of human rectal cancer with metastasis**

The development of the orthotopic implantation technique for human rectal cancer has been described<sup>20</sup>. Our preliminary experiments revealed that, when  $5 \times 10^6$  HT29 human colorectal cancer cells suspended in Matrigel are inoculated into the rectum submucosa of athymic *nu/nu* mice, rectal tumors appeared within 7 d after tumor injection (Fig. 4a,b). Histopathological examination of the excised primary tumor showed a submucosal tumor formation composed of implanted HT29 cells with a solid architecture and invasion into the muscularis propria and submucosa (Fig. 4c). Examination under high magnification showed tumor cell-filled lymphatic vessels in the muscularis propria layer (Fig. 4c). As expected, we detected the green fluorescence expression from 24 h after intratumoral administration of OBP-401 in the primary rectal tumors, with maximum signal occurring 2–4 d after injection, whereas tumors not injected with OBP-401 were completely GFP negative (Fig. 4d).

**Selective visualization of lymph node metastasis**

In our preliminary experiments, we confirmed that most mice with rectal tumors subsequently developed lymph node metastasis around the abdominal aorta from the lower margin of the renal vein to the aortic bifurcation, which were microscopically detectable ~4 weeks after tumor inoculation. Five days after injection of  $1 \times 10^8$  PFU of OBP-401 into the implanted rectal tumors, we explored the abdominal cavity at laparotomy. Analyses of two representative mice are shown in Figure 4. Three lymph nodes (LN1, LN2 and LN3) were macroscopically identified adjacent to the aorta (Fig. 4e,f); the optical CCD imaging of the abdominal cavity, however, demonstrated that only one lymph node (LN3) could be detected as light-emitting spots with GFP fluorescence (Fig. 4f). In the other mouse, three of four lymph nodes could be imaged as GFP signals (Fig. 4h). We detected no GFP

fluorescence in abdominal lymph nodes after injection of  $1 \times 10^7$  PFU of OBP-401 into the rectal tumors (data not shown). Histopathological analysis confirmed the presence of metastatic adenocarcinoma cells in the lymph nodes with fluorescence emission, whereas GFP-negative lymph nodes contained no tumor cells (Fig. 4g,i). In addition, immunohistochemical analysis for GFP protein demonstrated that the reddish brown GFP-immunoreactive cells corresponded to the microscopic metastatic nodules in the lymph nodes but were not detected in the nonmetastatic lymphocyte area (Supplementary Fig. 3 online).

We verified the GFP-based fluorescence detection with OBP-401 and histological correlation of lymph node metastasis in a series of *in vivo* experiments. Representative examples of the data are summarized in Table 1. Among the 7 tumor-bearing mice, 6 mice (85.7%) developed histologically confirmed lymph node metastasis. Of 28 lymph nodes excised from 7 mice, histopathological analysis demonstrated that 13 nodes (46.4%) contained micrometastatic nodules. The optical CCD imaging detected 12 lymph nodes labeled in spots with GFP fluorescence in 13 metastatic nodes (sensitivity of 92.3%). Among 15 metastasis-free lymph nodes, 2 nodes were GFP positive (specificity of 86.7%). Our results indicate that intratumoral injection of OBP-401 causes viral spread into the regional lymphatic area and selective replication in cancer cells in metastatic lymph nodes, which in turn could be imaged with GFP fluorescence. Moreover, the finding that OBP-401 did not express GFP fluorescence in a mouse para-aortic lymphadenitis model induced by inoculating complete Freund adjuvant into the rectum submucosa of

**Table 1** GFP fluorescence and histopathology status in para-aortic lymph nodes of HT29 tumor-bearing mice

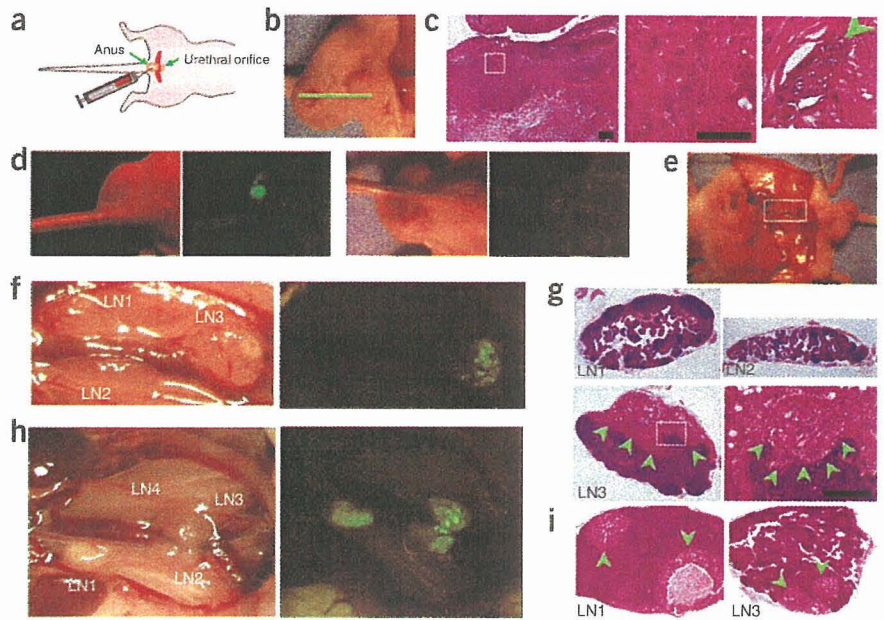
Mouse no.	Metastasis <sup>a</sup>	GFP fluorescence <sup>b</sup>		Total (%) <sup>c</sup>
		Positive	Negative	
1	Positive	1	0	1 (33.3)
	Negative	0	2	2 (66.6)
2	Positive	3	0	3 (75.0)
	Negative	0	1	1 (25.0)
3	Positive	1	0	1 (33.3)
	Negative	0	2	2 (66.6)
4	Positive	0	0	0 (0)
	Negative	0	4	4 (100)
5	Positive	1	1	2 (66.6)
	Negative	0	1	1 (33.3)
6	Positive	3	0	3 (60.0)
	Negative	1	1	2 (40.0)
7	Positive	3	0	3 (50.0)
	Negative	1	2	3 (50.0)

<sup>a</sup>Metastatic foci were detected histologically by hematoxylin and eosin staining. <sup>b</sup>Nodes with light-emitting spots and GFP fluorescence were evaluated as positive. <sup>c</sup>The percentage of nodes with or without histologically confirmed metastasis in each mouse.

© 2006 Nature Publishing Group http://www.nature.com/naturemedicine



**Figure 4** Orthotopic xenografts of human colorectal cancer cells and selective visualization of lymph node metastasis in two representative mice (no. 1 and no. 2). (a) Method used to produce HT29 human rectal tumors in BALB/c *nu/nu* mice. The rectums of mice were inoculated with  $5 \times 10^6$  HT29 cells. (b) Macroscopic appearance of HT29 rectal tumor 4 weeks after tumor inoculation. Mice were killed and subjected to autopsy. Green line, the direction of tumor cross-sections. (c) Histologic sections stained with H&E showing local growth of HT29 tumor in the submucosal layer of the rectum. Scale bar, 100  $\mu$ m. Left, magnification:  $\times 40$ ; middle (detail of the boxed region of left panel), magnification:  $\times 400$ ; right, lymphatic vessel invasion of HT29 tumor cells (arrowhead), magnification:  $\times 400$ . (d) External images of orthotopic HT29 tumor-bearing *nu/nu* mice injected with OBP-401. OBP-401 at the concentration of  $1 \times 10^8$  PFU were directly injected into implanted HT29 tumor (left). The GFP fluorescence could be detected as early as 24 h after OBP-401 injection under CCD imaging. Macroscopic and fluorescent images of HT29 tumor without OBP-401 injection (right). (e) Gross appearance of the abdominal cavity (mouse no. 1). At 5 d after intratumoral injection of OBP-401 at the concentration of  $1 \times 10^8$  PFU, HT29 tumor-bearing *nu/nu* mice were assessed for lymph node metastasis at laparotomy. The white box outlines a region of f. (f) Three para-aortic lymph nodes were identified in mouse no. 1 (LN1, LN2 and LN3) (left). Internal imaging with the optical CCD camera visualized one of three nodes with GFP fluorescence (LN3) (right). (g) H&E staining of lymph node sections. Lymph nodes without metastatic tumors (LN1 and LN2). Lymph node containing metastatic tumors (arrowheads) (LN3) (Left, magnification:  $\times 200$ ; right, magnification:  $\times 400$ ). Scale bar, 100  $\mu$ m. (h) Four para-aortic lymph nodes were identified in mouse no. 2 (LN1, LN2, LN3 and LN4) (left). Three of four nodes were positive for light-emitting spots with GFP fluorescence (LN1, LN2 and LN3) (right). (i) Histopathological detection of metastatic foci in nodes (LN1 and LN3) (arrowheads).



immunocompetent BALB/c mice suggests that this strategy could distinguish cancer metastasis from inflammatory lymphadenopathy (Supplementary Fig. 4 online).

**DISCUSSION**

Lymph node status provides important information for both the diagnosis and treatment of human cancer<sup>21,22</sup>. Lymphatic invasion is one of the major routes for cancer cell dissemination, and adequate resection of locoregional lymph nodes is required for curative treatment in patients with advanced malignancies. The risk of having lymph node metastasis can be partially predicted by clinical data such as tumor stage, serum tumor marker concentration and medical images; there are, however, no noninvasive approaches to accurately predict the presence of lymph node metastasis, in particular, microscopic metastasis.

The specific aim of the present study was to determine the suitability of telomerase-specific amplification of the *GFP* gene for real-time imaging tumor tissues and, if so, detect nodal metastasis *in vivo* before the traditional, cumbersome procedures of histopathological examination. GFP-based fluorescence imaging can allow real-time detection of target cells without time-consuming steps such as fixation and tissue processing<sup>13–15</sup>. Indeed, Yang *et al.* have shown that GFP-expressing tumors growing and metastasizing in intact animals could be viewed externally with a whole-body optical imaging system<sup>13</sup>. Moreover, the *GFP* gene could be delivered to metastatic tumor cells *in vivo* by viral vectors<sup>14</sup>.

To distinguish normal from neoplastic tumor tissues, selective labeling of tumor cells is required. OBP-401 produced a viral yield of 6–7 logs in human cancer cells within 3 d of infection, which was 3–4 logs higher than that in normal cells, suggesting the reliable tumor

selectivity of OBP-401. Although the reason why OBP-401 replicated slightly in NHLFs despite the lack of *hTERT* mRNA expression is unclear, the fact that NHLFs could be maintained in the culture up to passages 10–20 indicates that NHLFs might have a weak telomerase activity that is undetectable by standard PCR assay. However, the attenuated replication property of OBP-401 in normal cells seems not to interfere with the visualization of tumor cells *in vivo*. In fact, we detected no GFP expression in adjacent normal tissues in subcutaneous human cancer xenografts after intratumoral injection of OBP-401, although the cross-sections of the tumor were entirely imaged with GFP fluorescence. Thus, OBP-401 provides possible probing of tumor cells *in vivo*.

Experiments using a three-CCD optical imaging system demonstrated that metastatic lymph nodes could be detected at laparotomy in mice 5 d after OBP-401 injection into implanted primary human rectal tumors. Notably, metastatic lymph nodes were imaged in spots with GFP fluorescence, which coincided with histologically confirmed micrometastasis. This experiment mimics the clinical scenario in which patients with gastrointestinal malignancies with lymph node metastasis undergo surgery, and the data suggest that the surgeon can identify metastatic lymph nodes by illuminating the abdominal cavity with a xenon lamp. The sensitivity and specificity of this imaging strategy are 92.3% and 86.7%, respectively; these results are sufficiently reliable to support the concept of this approach. In our phase I trial of a replication-deficient adenovirus vector expressing the wild-type *p53* gene (AdCMV-*p53*, ADVEXIN), DNA-PCR analysis targeting the viral genome indicated that the virus was present in tumor tissue as well as proximal lymph nodes, suggesting regional spread of the vector via the lymphatic vessels<sup>23</sup>. Therefore, OBP-401 is likely to be accessible to the regional lymph nodes via intratumoral administration in humans.

Currently, analysis of lymph nodes with H&E staining and microscopic examination usually involves review of only one or two tissue sections, and small foci of tumor cells can be missed. For intraoperative frozen-section analysis of SLNs, this underestimation is even more pronounced as a result of poor tissue architecture. In the treatment of breast cancer and melanoma, in which SLN biopsy is commonly used, the sensitivity of intraoperative frozen-section analysis ranges from 38% to 74% (refs. 6–9). In our experiments, additional serial sectioning was needed in 4 of 12 (33.3%) lymph nodes with GFP fluorescence to detect micrometastasis. This finding suggests that this GFP-based approach has higher sensitivity for detecting occult lymph node metastasis as compared with standard histopathological examination. Thus, the two GFP-positive nodes, in which tumor cells were not detected histologically, could have contained microscopic metastasis that would have been identified by further sectioning. Other possible explanations of false-positive detection include either that GFP protein itself was produced in the primary tumor spread into regional lymph nodes or that high doses of OBP-401 entered nodes and incidentally replicated in normal lymphocytes in that they have low telomerase activity<sup>24</sup>.

Although the molecular imaging strategy using OBP-401 is considered promising, some limitations of the system exist, the main one being the relatively short wavelength of excitation light of GFP. In contrast to luciferase, which is also commonly used for molecular imaging<sup>25</sup>, if objects are located in the deep layer or covered with thick adjacent tissues, the excitation light for GFP may not be able to reach them. For example, when tumor foci were exposed to the surface of nodes opposite the illuminated field, GFP fluorescence could not be detected, thereby leading to false-negative detection. The extension of exposure time to the illumination allows increasing the fluorescence intensity; the excitation light, however, cannot penetrate deeper. To raise the imaging sensitivity, one possible approach is to make the specimen thinner, for example, by pressing the excised lymph nodes flat; the architecture of the nodes, however, may be destroyed. Alternatively, it might be useful to develop a hand-held probe, in which the outlet of the excitation beam light and the sensor of GFP fluorescence are combined. During surgery, metastatic lymph nodes could be positively identified with GFP fluorescence guided by this probe like a gamma probe for SLN biopsy. At least, a hand-held flashlight to excite GFP fluorescence has been reported<sup>26</sup>.

Administration of OBP-401 can provide an additional advantage in cancer therapy. OBP-401, similar to OBP-301, is an oncolytic virus and selectively kills human tumor cells by viral replication; the process of cell death by OBP-401, however, is relatively slow in comparison with apoptosis-inducing chemotherapeutic drugs, because the virus needs time for replication. Therefore, tumor cells infected with OBP-401 express GFP fluorescence and then lose viability, allowing the timing of detection. We could speculate that OBP-401 would spread into the regional lymph nodes after intratumoral injection, express GFP signals in tumor cells by virus replication and finally kill tumor cells even if the surgeon failed to remove all nodes containing micrometastasis. Thus, the oncolytic activity of OBP-401 may function as a backup safety antitumor program.

In conclusion, we have demonstrated that the GFP-expressing telomerase-specific replication-selective adenovirus OBP-401 can be delivered into human tumor cells in regional lymph nodes and replicate with selective GFP fluorescence after injection into the primary tumor in an orthotopic rectal tumor model. The feasibility of original OBP-301 (Telomelysin) for human cancer therapy will be confirmed in clinical trials in the near future. Because the safety profiles of these two viruses are considered homologous, this

molecular imaging strategy using OBP-401 has a potential of being widely available in humans as a navigation system in the surgical treatment of malignancy.

**METHODS**

**Cell culture.** The human non-small-cell lung cancer cell lines H1299 and H460, the human gastric cancer cell lines MKN28 and MKN45, the human colorectal cancer cell lines SW620 and HT29, the human esophageal cancer cell lines TE8 and T.Tn, the human prostate cancer cell lines LNCaP and PC-3, the human tongue squamous carcinoma cell lines HSC-3, HSC-4, SCC-4 and SCC-9, the human cervical adenocarcinoma cell line HeLa, the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2, the human pancreatic cancer cell line Panc-1, the human mammary gland adenocarcinoma cell line MCF-7, the human osteosarcoma cell line U-2OS (ATCC), the NHLF cell line, the normal human renal epithelial cell line HRE, the human umbilical vascular endothelial cell line HUVEC (TaKaRa Biomedicals) and the normal human lung diploid fibroblast cell line WI38 (HSRRB) were cultured according to the vendor's specifications.

**OBP-401.** OBP-401 is a telomerase-specific replication-competent adenovirus variant in which the hTERT promoter element drives the expression of *E1A* and *E1B* genes linked with an internal ribosome entry site, with the *GFP* gene inserted under the CMV promoter into the E3 region for monitoring viral replication<sup>27,28</sup>. The virus was purified by ultracentrifugation in cesium chloride step gradients, their titers were determined by a plaque-forming assay using 293 cells and they were stored at -80 °C.

**Quantitative real-time PCR analysis.** Total RNA from the cultured cells was obtained using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN). The *hTERT* mRNA copy number was determined by real-time quantitative RT-PCR using a LightCycler instrument and a LightCycler DNA TeloTAGGG Kit (Roche Molecular Biochemicals). DNA was extracted with the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), and quantitative real-time PCR assay for the *E1A* gene was also performed. The sequences of specific primers used for *E1A* were, sense: 5'-CCTGTGCTAGAGAATGCAA-3'; antisense: 5'-ACAGCTCAAGTCCAAAG GTT-3'. PCR amplification began with a 600-s denaturation step at 95 °C and then 40 cycles of denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 58 °C for 15 s and extension at 72 °C for 8 s. Data analysis was performed using LightCycler Software (Roche Molecular Biochemicals). The ratios normalized by dividing the value of untreated cells were presented for each sample.

**Fluorescence microscopy.** Human cancer cell lines (H1299, SW620 and HT29) and normal cells (NHLFs) were infected with either 1 or 10 MOI of OBP-401 for 2 h *in vitro*. Expression of the *GFP* gene was assessed and photographed (magnification: ×200) using an Eclipse TS-100 fluorescent microscope (Nikon).

**Electron microscopy.** Human prostate cancer cell line LNCaP was infected with 10 MOI of OBP-401. Thin sections were cut on coated copper grids and stained with uranyl acetate. The samples were examined and photographed with a Hitachi H-7100 transmission electron microscope.

**Immunohistochemistry.** Immunohistochemical staining was performed using a Histofine SAB PO kit (Nichirei) according to the manufacturer's instructions. Paired tissues of primary tumors and lymph node metastases were obtained from gastric cancer patients who underwent surgery at Okayama University Hospital. Informed consent was obtained from each individual as approved by the Ethics Review Committee for Clinical Investigation of our institution. Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections were mounted on silanized slides and deparaffinized. After blocking of nonspecific reactivity with rabbit or goat serum for 10 min at 25 °C, sections were incubated overnight at 4 °C with the monoclonal antibody to hTERT (Kyowa Medex). After rinsing, the slides were incubated with biotinylated rabbit antibody to mouse, and then with avidin-biotin-peroxidase complex. Peroxidase activity was determined using DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution (Histofine DAB substrate kit; Nichirei). The slides were counterstained with methyl green and Mayer's hematoxylin.

**Animal experiments.** The experimental protocol was approved by the Ethics Review Committee for Animal Experimentation of our institution. We



produced SW620 and HT29 xenografts on the back in 5-week-old female BALB/c *nu/nu* mice by subcutaneous injection of  $5 \times 10^6$  SW620 or HT29 cells in 100  $\mu$ l of HBSS using a 27-gauge needle. When tumors grew to ~6–7 mm in diameter, both tumors were intratumorally injected with OBP-401 ( $1 \times 10^7$  PFU/100  $\mu$ l). Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (50 mg/kg) and examined for GFP expression. Six mice were used for each tumor cell line. To generate an orthotopic rectal cancer model, female BALB/c *nu/nu* mice were anesthetized and then placed in a supine position. The anorectal wall was cut at a length of 7 mm to prevent colonic obstruction resulting from rectal tumor progression. We injected cell suspension of HT29 cells at a density of  $5 \times 10^6$  cells in 100  $\mu$ l of Matrigel basement membrane matrix (Becton Dickinson Labware) slowly into the submucosal layer of the rectum through a 27-gauge needle (Fig. 4a). Four weeks later we injected  $1 \times 10^8$  PFU/100  $\mu$ l of OBP-401 directly into the rectal tumors. Mice were killed, and their abdominal spaces were examined at laparotomy 5 d after virus injection.

**Cooled CCD imaging.** *In vivo* GFP fluorescence imaging was acquired by illuminating the animal with a xenon 150-W lamp. The re-emitted fluorescence was collected through a long-pass filter on a Hamamatsu C5810 3-chip color CCD camera (Hamamatsu Photonics Systems). High-resolution images were acquired using an EPSON PC. Images were processed for contrast and brightness with the use of Adobe Photoshop 4.0.1J software (Adobe).

Note: Supplementary information is available on the Nature Medicine website.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (T.F. and S.K.); and by grants from the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan (T.F.). We thank K. Nagai and H. Kawamura for the helpful discussion, and Y. Shirakiya and N. Mukai for the excellent technical support.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

T.F. conceived the idea for this project, designed all experiments and wrote the manuscript. H.K., Y.W. and Y.H. performed all laboratory experiments and H.K., T.K. and Y.W. performed all animal experiments. S.K. provided crucial ideas and helped with data interpretation. T.F., F.U., F.T. and N.T. provided technical assistance. S.K. provided the hTERT promoter. H.M. constructed the OBP-401 virus. Y.U. developed a protocol for virus manufacture and validation.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare competing financial interests (see the Nature Medicine website for details).

Published online at <http://www.nature.com/naturemedicine/>  
Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

1. Tearney, G.J. *et al.* *In vivo* endoscopic optical biopsy with optical coherence tomography. *Science* **276**, 2037–2039 (1997).
2. MacDonald, S.L. & Hansell, D.M. Staging of non-small cell lung cancer: imaging of intrathoracic disease. *Eur. J. Radiol.* **45**, 18–30 (2003).
3. Kelloff, G.J. *et al.* Progress and promise of FDG-PET imaging for cancer patient management and oncologic drug development. *Clin. Cancer Res.* **11**, 2785–2808 (2005).

4. McMasters, K.M. *et al.* Sentinel lymph node biopsy for melanoma: controversy despite widespread agreement. *J. Clin. Oncol.* **19**, 2851–2855 (2001).
5. Kuerer, H.M. & Newman, L.A. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy for breast cancer: developments and resolving controversies. *J. Clin. Oncol.* **23**, 1698–1705 (2005).
6. Koopal, S.A. *et al.* Frozen section analysis of sentinel lymph nodes in melanoma patients. *Cancer* **89**, 1720–1725 (2000).
7. Tanis, P.J. *et al.* Frozen section investigation of the sentinel node in malignant melanoma and breast cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **8**, 222–226 (2001).
8. Gulec, S.A., Su, J., O’Leary, J.P. & Stoller, A. Clinical utility of frozen section in sentinel node biopsy in breast cancer. *Am. Surg.* **67**, 529–532 (2001).
9. Chao, C. *et al.* Utility of intraoperative frozen section analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Am. J. Surg.* **182**, 609–615 (2001).
10. Misteli, T. & Spector, D.L. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nat. Biotechnol.* **15**, 961–964 (1997).
11. van Roesel, P. & Brand, A.H. Imaging into the future: visualizing gene expression and protein interactions with fluorescent proteins. *Nat. Cell Biol.* **4**, E15–E20 (2002).
12. Ehrhardt, D. GFP technology for live cell imaging. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 622–628 (2003).
13. Yang, M., Baranov, E., Moossa, A.R., Penman, S. & Hoffman, R.M. Visualizing gene expression by whole-body fluorescence imaging. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 12278–12282 (2000).
14. Hasegawa, S. *et al.* *In vivo* tumor delivery of the green fluorescent protein gene to report future occurrence of metastasis. *Cancer Gene Ther.* **7**, 1336–1340 (2000).
15. Ohtani, S. *et al.* Quantitative analysis of p53-targeted gene expression and visualization of p53 transcriptional activity following intratumoral administration of adenoviral p53 *in vivo*. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 93–100 (2004).
16. Kawashima, T. *et al.* Telomerase-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**, 285–292 (2004).
17. Taki, M. *et al.* Enhanced oncolysis by a tropism-modified telomerase-specific replication selective adenoviral agent OBP-405 (“Telomelysin-RGD”). *Oncogene* **24**, 3130–3140 (2005).
18. Umeoka, T. *et al.* Visualization of intrathoracically disseminated solid tumors in mice with optical imaging by telomerase-specific amplification of transferred green fluorescent protein gene. *Cancer Res.* **64**, 6259–6265 (2004).
19. Gu, J., Andreeff, M., Roth, J.A. & Fang, B. hTERT promoter induces tumor-specific Bax gene expression and cell killing in syngenic mouse tumor model and prevents systemic toxicity. *Gene Ther.* **9**, 30–37 (2002).
20. Tsutsumi, S., Kuwano, H., Morinaga, N., Shimura, T. & Asao, T. Animal model of para-aortic lymph node metastasis. *Cancer Lett.* **169**, 77–85 (2001).
21. Maehara, Y. *et al.* Clinical significance of occult micrometastasis in lymph nodes from patients with early gastric cancer who died of recurrence. *Surgery* **119**, 397–402 (1996).
22. Coello, M.C., Luketich, J.D., Litle, V.R. & Godfrey, T.E. Prognostic significance of micrometastasis in non-small-cell lung cancer. *Clin. Lung Cancer* **5**, 214–225 (2004).
23. Fujiwara, T. *et al.* Multicenter phase I study of repeated intratumoral delivery of adenoviral p53 (ADVEXIN) in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **24**, 1689–1699 (2006).
24. Hiyama, K. *et al.* Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* **155**, 3711–3715 (1995).
25. Adams, J.Y. *et al.* Visualization of advanced human prostate cancer lesions in living mice by a targeted gene transfer vector and optical imaging. *Nat. Med.* **8**, 891–897 (2002).
26. Yang, M., Luiken, G., Baranov, E. & Hoffman, R.M. Facile whole-body imaging of internal fluorescent tumors in mice with an LED flashlight. *Biotechniques* **39**, 170–172 (2005).
27. Watanabe, T. *et al.* Histone deacetylase inhibitor FR901228 enhances the antitumor effect of telomerase-specific replication-selective adenoviral agent OBP-301 in human lung cancer cells. *Exp. Cell Res.* **312**, 256–265 (2006).
28. Fujiwara, T. *et al.* Enhanced antitumor efficacy of telomerase-selective oncolytic adenoviral agent OBP-401 with docetaxel: preclinical evaluation of chemovirotherapy. *Int. J. Cancer* **119**, 432–440 (2006).

特集

● わが国における癌遺伝子治療の今 ●

## 主要癌の遺伝子治療研究の現況

## —肺癌—

\*<sup>1</sup>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, \*<sup>2</sup>岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・消化器・腫瘍外科藤原 俊義\*<sup>1,2</sup> 田中 紀章\*<sup>2</sup>

**要旨** *p53* 遺伝子はヒト悪性腫瘍の約 50% で変異や欠失が検出される癌抑制遺伝子であり, その機能喪失は悪性形質の獲得につながる。われわれは, *p53* 遺伝子の異常が認められる非小細胞肺癌患者に, 正常な *p53* 遺伝子を導入する遺伝子治療の臨床研究を行った。*p53* 遺伝子発現アデノウイルスベクター (Ad5CMV-*p53*) を 4 週間に一度, 気管支鏡下あるいは CT ガイド下にて腫瘍内に注入する。多施設共同で 15 例に  $10^9 \sim 10^{11}$  PFU の Ad5CMV-*p53* の投与が施行された。9 例はベクター単独, 6 例は CDDP (80 mg/m<sup>2</sup>) との併用が試みられている。15 例に 63 回の投与が行われたが, 一過性の発熱以外は特に重篤な副作用はなく, その安全性が確認された。抗アデノウイルス中和抗体の存在にもかかわらず, 生検サンプルの *p53* 遺伝子発現が持続的に認められた。Ad5CMV-*p53* の生体内分布では, 喀痰中や血中には認められるものの, 尿中にはほとんど検出されなかった。15 例中 13 例の臨床効果が判定可能であったが, PR 1 例, SD 10 例, PD 2 例であり, うち 2 例では 9 か月以上の SD が確認された。非小細胞肺癌に対する Ad5CMV-*p53* の腫瘍内投与は安全に施行可能であり, 臨床的にも有用であると考えられる。

[Biotherapy 20 (3): 270-279, May, 2006]

## Gene Therapy for Lung Cancer

Toshiyoshi Fujiwara\*<sup>1,2</sup> and Noriaki Tanaka\*<sup>2</sup>\*<sup>1</sup>Center for Gene and Cell Therapy, Okayama University Hospital,\*<sup>2</sup>Department of Surgery, Okayama University Graduate School

## Summary

This study was conducted to determine the feasibility, safety, humoral immune response, and biological activity of multiple intratumoral injections of Ad5CMV-*p53*, and to characterize the pharmacokinetics of Ad5CMV-*p53* in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). Fifteen patients with histologically confirmed NSCLC and *p53* mutations were enrolled in our phase I trial. Nine patients received escalating dose levels of Ad5CMV-*p53* ( $1 \times 10^9$  to  $1 \times 10^{11}$  PFU [plaque-forming units]) as monotherapy once every 4 weeks. Six patients were treated on a 28-day schedule with Ad5CMV-*p53* in combination with intravenous administration of cisplatin (80 mg/m<sup>2</sup>). Patients were monitored for toxicity, vector distribution, antibody formation, and tumor response. Fifteen patients received a total of 63 intratumoral injections of Ad5CMV-*p53* without dose-limiting toxicity. The most common treatment-related toxicity was a transient fever. Specific *p53* transgene expression was detected using reverse-transcriptase polymerase chain reaction in biopsied tumor tissues throughout the period of treatment despite the presence of neutralizing anti-adenovirus antibody. Distribution studies revealed that the vector was detected in the gargle and plasma, but rarely in the urine. Thirteen of 15 patients were assessable for efficacy; one patient had a partial response (squamous cell carcinoma at the carina), 10 patients had stable disease, with three lasting  $\geq 9$  months, and 2 patients had progressive disease. Multiple courses of intratumoral Ad5CMV-*p53*

injection alone or in combination with intravenous administration of cisplatin were feasible and well tolerated in advanced NSCLC patients, and appeared to provide clinical benefit.

**Key words :** p53, Adenovirus, Apoptosis, Lung cancer

**Address request for reprints to :** Dr. Toshiyoshi Fujiwara, Center for Gene and Cell Therapy, Okayama University Hospital, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700-8558, Japan

## はじめに

肺癌は、世界中で男性、女性ともに癌による死亡原因の上位にランクされている。本邦でも、肺癌による死亡者数は年間5万人を超えており、その罹患率、死亡率は急速な増加傾向にある。1993年には肺癌死亡数は胃癌死亡数を抜いて男性癌死亡原因の第1位を占めるに至っており、2001年の統計では男性39,880人、女性15,122人が肺癌によって亡くなっている<sup>1)</sup>。今後も喫煙を含めた生活習慣や社会環境を背景に増加傾向にあると予測されており、新しい治療戦略が積極的に研究されている。その難治性の要因として、肺癌細胞が胸膜播種や遠隔臓器転移を来しやすいという生物学的特徴と、その有効な治療法が確立されていないという現状が考えられる。しかし、局所病巣に対する放射線治療は生命予後の改善に貢献しているという報告もあり<sup>2)</sup>、局所制御と転移制御の両側面から肺癌に対する治療戦略を考慮していく必要がある。

ここ20年来の分子レベルでの基礎研究により、前癌病変から早期癌、進行癌へと至る過程で癌遺伝子と癌抑制遺伝子の二つの遺伝子群に段階的な異常が生じることが明らかになってきた<sup>3)</sup>。癌細胞の悪性形質である分化増殖の異常や不死化に伴うアポトーシス抵抗性の獲得などが、これらの遺伝子変異による正常機能の喪失に直接起因していることが証明されてきている。悪性化のプロセスに重要な遺伝子を標的とした「遺伝子治療」は、実験的には抗腫瘍効果が認められ、既存の化学療法や放射線療法とは異なるコンセプトに基づいた治療戦略として臨床的にも有用性が期待できる。実際に、発癌過程で異常を来した遺伝子の正常分子を補ったり、特殊な機能遺伝子を外来性に導入することで、直接的あるいは間接的に抗腫瘍効果が観察される。しかし、現実にはまだ開発の緒に

就いたばかりであり、トランスレーショナルスタディとしての臨床展開と基礎研究へのフィードバックが重要と考えられる。本稿では、癌抑制遺伝子であるp53を用いた遺伝子治療臨床研究の進行状況を概説する。

## I. p53の機能と遺伝子治療への応用

### 1. 肺癌に対する遺伝子治療

米国立衛生研究所 (National Institute of Health, NIH) の組換えDNA諮問委員会 (Recombinant DNA Advisory Committee, RAC) が実施を承認した臨床プロトコル数は、2005年12月の時点で729件となっており、なかでも癌に対する遺伝子治療は428プロトコルで66.1%に達している<sup>4)</sup>。そのうち肺癌を対象としたプロトコルは30件以上であり、特にp53遺伝子を用いたものが多くみられる。その他にもサイトカインや自殺遺伝子を利用した試みもあり、最近では新規癌抑制遺伝子候補 *Fus1* とリポソームを用いた全身投与による遺伝子治療も行われている。

### 2. 治療遺伝子としてのp53

ヒト第17番染色体短腕上に存在する癌抑制遺伝子であるp53遺伝子は、約50%のヒト悪性腫瘍でその機能喪失が認められ、生体ストレスに対するゲノムの安定性の維持に重要な役割を果たしている。p53は1979年にSV40腫瘍ウイルスのlarge T抗原と結合する分子量53 kDaの蛋白質として同定されたが、1989年に癌抑制遺伝子としての機能が明らかになり<sup>5)</sup>、その後の研究で特定の塩基配列に結合する転写因子として多くの遺伝子群の発現を調節することで多様な生理機能を発揮していることがわかってきた<sup>6)</sup>。すなわち、G<sub>1</sub>期、G<sub>2</sub>期チェックポイントとしての細胞周期制御、細胞の自殺経路であるアポトーシスの誘導、ゲノムの安定性を維持するためのDNA修復、



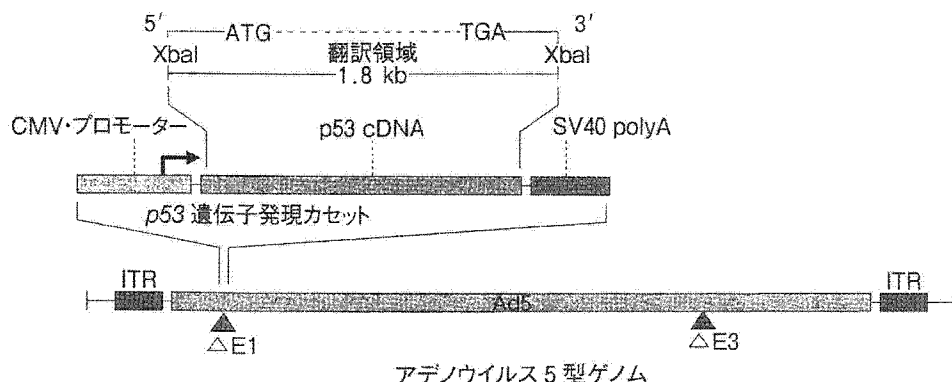


図1 Ad5CMV-p53 (ADVEXIN) の構造

第一世代のアデノウイルスベクターではウイルスの増殖に必要なE1とE3領域が除去されており、相同組み換えによりE1領域に治療遺伝子を含む発現カセットが挿入される。本ベクターでは、サイトメガロウイルス (CMV)・プロモーター、ヒト正常型p53 cDNA, SV40 polyadenylation signalよりなるp53遺伝子発現カセットが、アデノウイルス5型由来のベクターの欠損したE1部分に組み込んである。このベクターをE1遺伝子を導入した293細胞に感染させることで、大量の治療用ベクターを産生、精製することができる。

あるいは血管新生抑制などである。正常なヒトp53遺伝子を導入することで、感受性の差はあるものの、多くの癌細胞でアポトーシス（細胞死）を惹起することができる<sup>7)</sup>。一方、正常なヒト気管支上皮細胞に外来性にp53を過剰発現させても、アポトーシスや細胞増殖抑制は観察されず<sup>8)</sup>、この選択性は、*in vivo* 遺伝子治療を行う際の安全性を確保する上での重要な根拠となり得る。

### 3. p53を用いた肺癌の遺伝子治療

正常なヒトp53遺伝子を発現するアデノウイルスベクターAd5CMV-p53 (ADVEXIN) は、ウイルス増殖に必要なE1遺伝子領域を除去し、その部分にサイトメガロウイルス (CMV)・プロモーターとヒト由来の正常なp53 cDNAを組み込んであるため<sup>7,8)</sup> (図1), E1遺伝子でトランスフォームした293細胞内でのみ増殖可能である。すなわち、標的である癌細胞内で、投与されたウイルス濃度に応じたp53遺伝子発現を誘導するが、理論的にはウイルス増殖がみられることはない。Ad5CMV-p53の感染により、非小細胞肺癌細胞H1299においては単独で<sup>7)</sup>、またH358においては抗癌剤シスプラチン (CDDP) との併用下で高率にアポトーシスが誘導される<sup>9)</sup>。さらに、p53は血管新生関連分子の発現を制御し、血管新生に抑制的に作用したり<sup>10)</sup>、CD95リガンドの発現増強を介して好中球の腫瘍局所への遊走を

惹起し<sup>11)</sup>、これらの現象によりp53遺伝子導入されなかった周辺の癌細胞にも影響を与えることが期待される。この“バスタンダー効果”は、抗癌剤や放射線治療では認められない機能であり、Ad5CMV-p53製剤の特性の一つとして特記すべき点である。

## II. p53遺伝子治療の臨床応用の現況

### 1. 米国における第I相および第II相臨床試験

米国テキサス大学M.D. Anderson Cancer Centerを中心に、1995年10月～1997年12月までAd5CMV-p53による外科的切除不能な標準治療が無効であった非小細胞肺癌を対象とした第I相臨床試験が行われた<sup>12,13)</sup>。 $10^6$  PFU (plaque-forming units) から $10^{11}$  PFUまで段階的にウイルスを増量し、またAd5CMV-p53単独局所投与するArm IとAd5CMV-p53局所投与と $80 \text{ mg/m}^2$ のCDDP全身投与を併用するArm IIの2群が設定されている。それぞれ28例、24例、計52例がエントリーされている。最も高頻度に見られた副作用はAd5CMV-p53投与に伴う一過性の発熱であった。臨床効果に関してはそれぞれ25例、23例が評価可能であり、Arm Iではpartial response (PR) 2例 (8%), stable disease (SD) 16例 (64%), progressive disease (PD) 7例 (28%), Arm IIではPR 2例 (8.7%), SD

17例 (73.9%), PD 4例 (17%) であった。PR症例のうち1例は5年以上の生存が得られており、局所効果以外の免疫系を介した影響などが示唆される。

第I相臨床試験の結果、臨床的に $10^{11}$  PFUまでのAd5CMV-p53が投与可能であることが明らかになったので、1998年5月から高濃度のAd5CMV-p53局所投与と局所放射線療法を併用する第I/II相臨床試験が開始されている<sup>14)</sup>。第1, 18, 32日目に経気管支鏡的に、あるいはCTガイド下穿刺により高濃度のAd5CMV-p53ベクター液を投与し、第4日目から2 Gy/日, 5日/週, 計60 Gyの放射線照射を行う。第I相臨床試験の場合は、外科的に切除不能な、すでに化学療法や放射線療法などの標準治療が試みられた患者が対象であったが、第II相臨床試験では切除不能な局所進展した非小細胞肺癌で、通常なら放射線治療の適応となる患者が対象である。19例 (CTガイド下投与15例, 気管支鏡下投与4例)の非小細胞肺癌患者での結果は、CR 1例 (5%), PR 11例 (58%), SD 3例 (16%), PD 2例 (11%)であり、63%に50%以上の腫瘍縮小がみられた。また、治療3か月後の生検では、12例 (63%)で癌細胞が認められなかった。生存率は1年40%, 2年16%であった。最近、第II相臨床試験で治療を受けた2症例で5年以上の生存が確認されており、その長期的な有用性も示唆された<sup>15)</sup>。

## 2. 細気管支肺胞型腺癌のp53遺伝子治療

細気管支肺胞型腺癌 (bronchioloalveolar carcinoma, BAC) に対するp53遺伝子治療のパイロット第I相臨床試験も、Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) によって行われている (ECOG6597)<sup>16)</sup>。BACでは癌細胞は肺胞内皮に沿って進展するため、Ad5CMV-p53は肺胞洗浄液として2週間間隔で2回肺葉内に投与された。27登録症例中25例が治療を受けたが、最高14回までの肺葉内投与が可能であった。発熱が最も高頻度にもみられた副作用であるが、低酸素血症や呼吸困難も認められた。評価可能であった24例中、1例で画像上のPR, 1例で病理学的反応が認められ、SD 17例, PD 7例であった。呼吸機能を評価できた22例中3例で20%以上の改善が確認でき、症状緩和などの臨床効果が認めら

れた。BACは非小細胞肺癌のごく一部を占めるにすぎないが、切除不能あるいは再発性の病変に有効な治療がない現状を考えると、局所療法としてのAd5CMV-p53の肺葉内投与は臨床的にも有用と思われる。

## 3. 樹状細胞を用いたp53免疫遺伝子治療

樹状細胞はT細胞を抗原特異的に活性化することのできる最も強力な抗原提示細胞であり、近年癌治療への応用が積極的に進められている。Ad5CMV-p53の腫瘍内局注は局所的には有効であると思われるが、遠隔転移巣や微小病変に対してはアプローチが困難である。そこで、第II相臨床試験として、Ad5CMV-p53と樹状細胞を用いた全身療法としての免疫遺伝子治療の可能性が検討されている<sup>17)</sup>。化学療法を終了した22例の進行小細胞肺癌患者にAd5CMV-p53を感染させた末梢血単球由来の樹状細胞を3回皮内投与したところ、評価可能であった20例中11例 (55%)で明らかな免疫学的反応の増強が観察された。臨床的には5例でSDとなり、さらに3回投与が追加された。17例はPDであったが、second-lineの化学療法に13例中9例 (SD 2例, PR 7例 [53.8%]) が反応し、本治療が小細胞肺癌細胞の抗癌剤感受性を増強する可能性が示唆された。

## 4. 本邦におけるp53遺伝子治療の多施設共同第I相臨床試験

岡山大学医学部附属病院を中心に、米国と同様のプロトコールにより1999年3月～2003年7月まで、非小細胞肺癌に対するAd5CMV-p53による第I相臨床試験が行われた<sup>18)</sup>。本臨床試験は、多施設共同研究として当施設で9例、東京医科大学で3例、東北大学加齢医学研究所で2例、東京慈恵会医科大学で1例、計15例の患者に63回のAd5CMV-p53投与が行われている (表1)。

### 1) 安全性

副作用としては発熱が14例 (93.3%) でみられたが、grade 3を越えるものはなく、ほとんどが48時間以内に回復した。血液毒性では、1例 (6.7%) のgrade 1の白血球減少と3例 (20%) のgrade 2/3の貧血のみであった。その他、高い確率をもって発症する重篤な副作用は認められず、CTガイド下投与の際の気胸やCDDP由来と思われる嘔気、食欲不振はみられている

表1 本邦での p53 遺伝子治療を受けた患者の背景と臨床効果<sup>18)</sup>

Patient No.	Sex	Age (years)	Histology	Location of tumor	Prior therapy	TNM Stage	Method of injection	Viral dose +/- cisplatin	Number of courses	Response
1	Male	58	Squamous	Carina	Chemotherapy Radiotherapy	cT4N0M0 Stage IIIB	Bronch	10 <sup>9</sup> PFU	14	PR
2	Male	58	Squamous	Left lower lobe	Chemotherapy Radiotherapy	cT4N2M0 Stage IIIB	Bronch CT	10 <sup>9</sup> PFU	9	SD
3	Male	66	Squamous	Right mainstem bronchus	Surgery, Laser Chemotherapy	cT2N0M0 Stage I B (pre-operative)	Bronch	10 <sup>9</sup> PFU	4	PD
4	Female	46	Adeno	Left upper lobe	Chemotherapy	cT2N3M1 Stage IV	CT	10 <sup>9</sup> PFU + cisplatin	10	SD
5	Male	55	Squamous	Right lower lobe	Chemotherapy Radiotherapy	cT4N1M0 Stage IIIB	Bronch CT	10 <sup>9</sup> PFU + cisplatin	3	SD
6	Male	54	Squamous	Left upper lobe	Chemotherapy Radiotherapy	cT3N2M0 Stage IIIB	CT	10 <sup>9</sup> PFU + cisplatin	2	SD
7	Male	71	Squamous	Left upper lobe	Chemotherapy Radiotherapy	cT4N1M0 Stage IIIB	Bronch	10 <sup>10</sup> PFU	2	PD
8	Male	52	Squamous	Right lower lobe	Chemotherapy Radiotherapy	cT2N2M0 Stage IIB	Bronch	10 <sup>10</sup> PFU	1	Not evaluable*
9	Male	66	Squamous	Left upper lobe	Surgery, Laser Chemotherapy	cT2N0M0 Stage I B (pre-operative)	CT	10 <sup>10</sup> PFU	4	SD
10	Male	51	Adeno	Right lower lobe	Chemotherapy	cT2N2M1 Stage IV	CT	10 <sup>10</sup> PFU + cisplatin	1	SD
11	Male	51	Adeno	Right upper lobe	Chemotherapy	cT4N3M0 Stage IIIB	CT	10 <sup>10</sup> PFU + cisplatin	2	SD
12	Male	61	Squamous	Right upper lobe	Chemotherapy Radiotherapy	cT4N2M0 Stage IIIB	Bronch	10 <sup>10</sup> PFU + cisplatin	2	SD
13	Male	62	Squamous	Left mainstem bronchus	Chemotherapy Radiotherapy	cT4N3M0 Stage IIIB	Bronch	10 <sup>11</sup> PFU	1	Not evaluable*
14	Male	70	Squamous	Left upper lobe	Chemotherapy	cT2N2M0 Stage IIIA	Bronch	10 <sup>11</sup> PFU	4	SD
15	Male	62	Squamous	Right upper lobe	Chemotherapy Radiotherapy	cT4N2M0 Stage IIIB	Bronch	10 <sup>11</sup> PFU	4	SD

Squamous : squamous cell carcinoma, Adeno : adenocarcinoma, Laser : laser therapy, Bronch : bronchoscopic injection,

CT : computed tomography (CT)-guided injection

\* : Not evaluable because their tumor sizes could not be measured due to obstructive pneumonia

表2 Ad5CMV-p53投与後の生検組織におけるp53遺伝子発現<sup>18)</sup>

Patient No.	Viral dose +/- cisplatin	RT-PCR results													
		Course 1	Course 2	Course 3	Course 4	Course 5	Course 6	Course 7	Course 8	Course 9	Course 10	Course 11	Course 12	Course 13	Course 14
1	10 <sup>9</sup> PFU	-/+*	+/-	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-
2	10 <sup>9</sup> PFU	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
3	10 <sup>9</sup> PFU	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-
4	10 <sup>9</sup> PFU + cisplatin	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-
5	10 <sup>9</sup> PFU + cisplatin	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
6	10 <sup>9</sup> PFU + cisplatin	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
7	10 <sup>10</sup> PFU	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
8	10 <sup>10</sup> PFU	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
9	10 <sup>10</sup> PFU	-/+	-/+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
10	10 <sup>10</sup> PFU + cisplatin	-/+	-/+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
11	10 <sup>10</sup> PFU + cisplatin	-/+	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
12	10 <sup>10</sup> PFU + cisplatin	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+

NA : not available

\* : Paired samples were collected before and 48 hours after Ad5CMV-p53 injection in each course of treatment

が、いずれも米国の臨床試験の結果から予測される範囲内であり、日本人においても本治療は安全に施行可能であると考えられる。

### 2) 生体内分布

喀痰から抽出したDNAをテンプレートとしてベクター特異的なプライマーを用いて行ったPCR解析では、 $10^9$  PFUの気管支鏡下投与の場合、投与翌日の喀痰に最も高濃度のベクター断片が検出され、以後漸減し、平均して7日目の喀痰では検出されなくなっていた。CTガイド下投与では気管支鏡下投与の際ほど検出はされないが、サイクルによっては投与翌日に強いバンドが認められた。また、腫瘍内局所投与にもかかわらず、投与後30分をピークに血漿中にベクターが検出された。しかし、ベクター断片の全身循環に由来すると思われる副作用は認められていない。一方、尿中にはほとんどベクターは検出されておらず、2症例で一時的に認められたのみであった。Ad5CMV-p53投与前後の生検サンプルの解析では、48時間後に採取した組織のDNA-PCRにより42回の投与のうち37回でベクターが確認されており、ほとんどのケースで確実にベクターが標的部位にdeliverされていることが証明された。2症例では、それぞれ最終投与後25日目、151日目に剖検が可能であった。いずれも腫瘍組織からはDNA-PCRにてベクター断片が検出され、近位リンパ節でも確認された。また、同サンプルのRT-PCRにより42回中34回でp53 mRNA発現が認められ、高率にp53遺伝子発現が誘導されていることが明らかになった(表2)。さらに、血中抗アデノウイルス中和抗体価は、ほぼ全例で初回投与後に上昇していた。すなわち、抗体価の上昇にもかかわらずp53遺伝子発現は持続的に保たれており、局所投与の場合には全身循環する血中中和抗体は導入遺伝子発現に顕著な影響を及ぼさないと推測された。また、血中抗p53抗体価は3例で比較的継続的に上昇がみられたが、2例は治療前から上昇しており、その他の症例では有意な変化は認められなかった。

### 3) 臨床効果

臨床効果は15例中13例(86.7%)で評価可能であったが、PR 1例(7.7%)、SD 10例(76.9%)、PD 2例(15.4%)であり、2例のSD症例では9

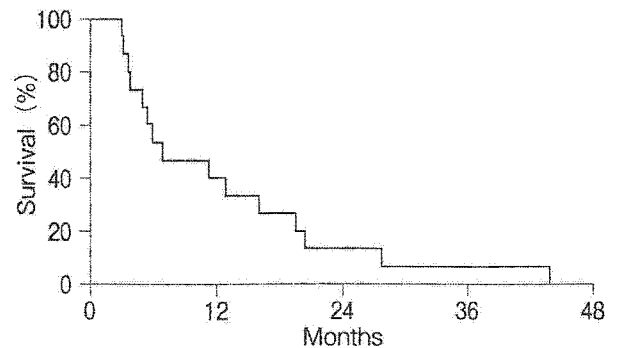


図2 p53遺伝子治療による生存曲線<sup>18)</sup>  
治療を受けた15例のKaplan-Meier解析による生存曲線。

か月以上にわたる病状の安定がみられた(表1)。さらに、1例のPR症例と2例のSD症例、計3例は6回以上の治療を受けており、呼吸機能の改善、血痰の消失、肺活量の増加と咳症状の軽快などのquality of life (QOL)の改善や腫瘍マーカーの低下などの臨床的有用性が確認された。生存率は1年40%、2年13%、3年7%であった(図2)。

第1例目の症例では、気管分岐部の扁平上皮癌の退縮(PR)がみられ、1年間、計14回の投与を行うことが可能であった。治療期間中、病理学的にはCRには至らなかったが、腫瘍量は明らかに減少し、そこからの腫瘍増殖は月1回のベクター投与で抑制されていた(図3a)。左肺上葉の腺癌をもつ第4例目の症例でも、前医で大量の抗癌剤を使用したにもかかわらず増大していた腫瘍が、遺伝子治療とCDDPの併用を開始するとその増殖が止まり、治療を中止した約10か月後までほぼサイズが変化しなかった(図3b)。さらに興味深い点は、この症例では両肺野に多数みられた微小肺内転移も治療期間中増大しなかったことである。東京医科大学で治療された右肺上葉の腺癌をもつ第10例目では、CDDPを併用する遺伝子治療を2回施行した後、放射線療法を行った。その後、3年以上にわたり腫瘍サイズはほとんど変化せず、治療開始から3年9か月の生存が得られた。本症例では、p53遺伝子導入により放射線感受性が誘導された可能性が示唆された。これらの症例では明らかに腫瘍の増殖抑制が観察されており、最終的には再増殖に至ったとしても、その

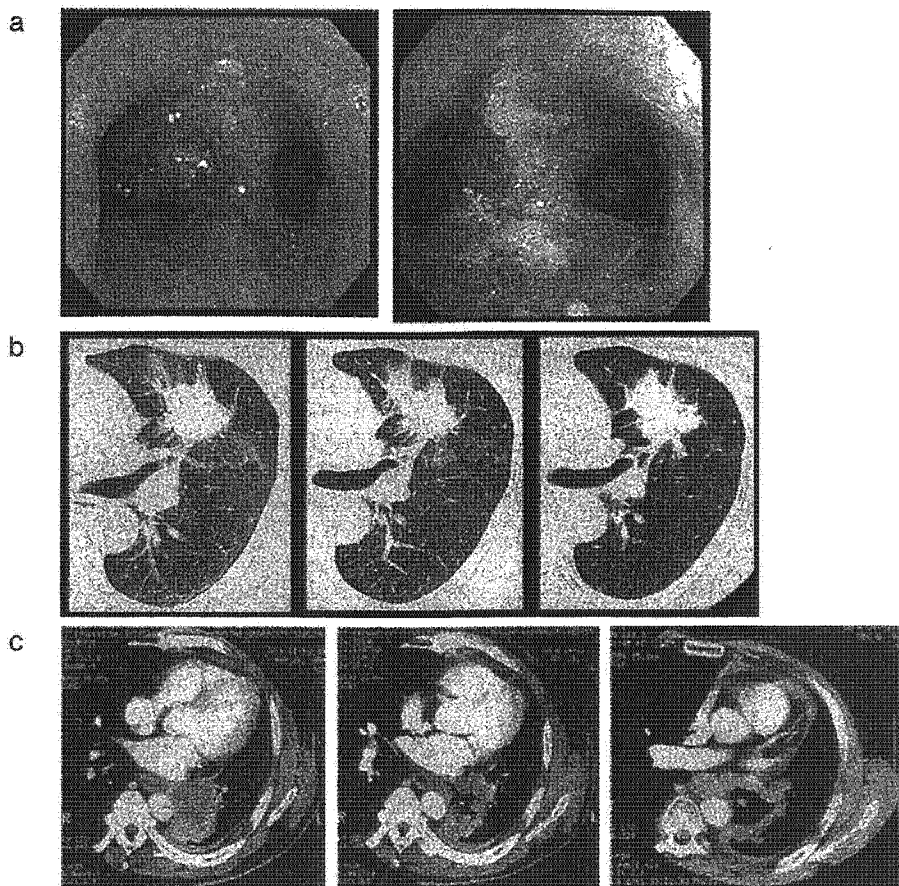


図3 本邦における p53 遺伝子治療の臨床効果<sup>18)</sup>

- a: 症例1。58歳，男性。気管分岐部から左主気管支にかけて増殖する易出血性の扁平上皮癌に，気管支鏡下に Ad5CMV-p53 の腫瘍内投与を14回施行した。(左) 治療前，(右) 4回治療後，5か月目の気管支鏡所見。腫瘍は崩れ，気管分岐部は平坦になっている。出血もほとんど止まっている。
- b: 症例4。46歳，女性。左肺上葉の腺癌と両側肺野に多発性肺内転移を認める。Ad5CMV-p53 の腫瘍内投与と CDDP の全身投与を受け，長期 SD が観察された。(左) 治療前，(中) 4回治療後，(右) 10回治療後。
- c: 症例2。58歳，男性。(左) 治療前には左肺下葉に切除不能な扁平上皮癌を認める。(中) 2か月後 (2回治療後)，(右) 9か月後 (9回治療後) の CT 画像では腫瘍中心の組織破壊が認められる。

有効性は評価可能と考えられる。

### Ⅲ. 肺癌に対する遺伝子治療の今後の方向性

腫瘍内投与を行う現行の方法では，たとえ局所的には臨床的効果が認められても限界があり，進行肺癌症例において p53 遺伝子治療による治療は期待できない。本邦の臨床試験において，左肺下葉原発の扁平上皮癌を呈した第2例目では，気管支鏡下の Ad5CMV-p53 投与により左下葉支の部分的開通と腫瘍中心部の破壊像が認められ，左下肺の無気肺に一部含気が戻り，呼吸機能の改善，具体的には肺活量の増加と咳症状の軽快が観

察された (図 3c)。計9回の投与を行い良好な時期は比較的長期間継続したが，肋骨転移が出現したため臨床試験は中止となった。最後の CT でも原発巣内部が崩壊し局所的効果は持続していたと考えられるが，最終的には治療開始から約11か月後に亡くなった。また第6例目では，左肺尖部の扁平上皮癌は治療期間中増大はみられなかったが，CDDP を併用していたにもかかわらず右上腕の筋肉内に転移が出現し，約6か月後に死亡した。いずれの症例でも局所制御に関しては有用であったが，全身病である肺癌に対する予後の改善には残念ながら貢献しているとはいえない。

今後の方向性として、より早期の無治療症例における集学的治療の一つとしての応用が考えられる。また、外科治療との併用において腫瘍縮小により切除率を上げたり、術中の癌細胞の散布を予防することが期待される。さらに気管支閉塞症例において、ステント挿入後に腫瘍内投与を行うことでその再増殖を阻止することが可能となるかもしれない。適応症例や投与方法を検討することで、より臨床応用に即した、簡便に施行可能な治療法としての有用性を検討していく必要がある。さらに、前述の p53 を標的とした免疫療法などの新しい試みの臨床応用も進めていく必要があると考える。

### おわりに

p53 は多彩な生理機能によりゲノムの安定性を保っており、遺伝子治療の治療遺伝子として極めて魅力的な分子である。p53 が正常細胞にほとんど影響を与えず、癌細胞を選択的にアポトーシスに誘導する機能は重要であり、また血管新生抑制や分化/老化誘導などの複数の作用機構が期待できる点は大きな利点と思われる。簡便に投与でき、しかも重篤な副作用がなく抗腫瘍効果が得られれば、たとえ治癒に至らなくとも十分に臨床的には有用である。米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration, FDA) は 2003 年 9 月、アデノウイルスベクター Ad5CMV-p53 (ADVEXIN) を、第 III 相臨床試験が進んでいる頭頸部腫瘍に対して fast track product として認定した<sup>19)</sup>。ADVEXIN はバイオベンチャー Introgen Therapeutics 社の開発製品であるが、これによりオーファンドラッグとしての承認が加速され、初めての遺伝子治療製剤として日常臨床で使用されるようになると思われる。今後さらに基礎研究、臨床研究が進むことで p53 遺伝子治療の安全性や有効性が確認され、非小細胞肺癌をはじめとする肺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

- 厚生労働省大臣官房統計情報部: 人口動態統計。
- Saunders, M., Dische, S., Barrett, A., *et al.*: Continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy (CHART) versus conventional radiotherapy in non-small-cell lung cancer: a randomised multicentre trial. CHART Steering Committee. *Lancet* 350: 161-165, 1997.
- Fearon, E.R. and Vogelstein, B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767, 1990.
- Recombinant DNA Advisory Committee—Protocol List. (<http://www4.od.nih.gov/oba/rac/documents1.htm>).
- Finlay, C.A., Hinds, P.W. and Levine, A.J.: The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57: 1083-1093, 1989.
- Levine, A.J.: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331, 1997.
- Ohtani, S., Kagawa, S., Tokunaga, N., *et al.*: Quantitative analysis of p53-targeted gene expression and visualization of p53 transcriptional activity following intratumoral administration of adenoviral p53 *in vivo*. *Mol. Cancer Ther.* 3: 93-100, 2004.
- Zhang, W.W., Alemany, R., Wang, J., *et al.*: Safety evaluation of Ad5CMV-p53 *in vitro* and *in vivo*. *Hum. Gene Ther.* 6: 155-164, 1995.
- Fujiwara, T., Grimm, E.A., Mukhopadhyay, T., *et al.*: Induction of chemosensitivity in human lung cancer cells *in vivo* by adenovirus-mediated transfer of the wild-type p53 gene. *Cancer Res.* 54: 2287-2291, 1994.
- Nishizaki, M., Fujiwara, T., Tanida, T., *et al.*: Recombinant adenovirus expressing wild-type p53 is antiangiogenic: a proposed mechanism for bystander effect. *Clin. Cancer Res.* 5: 1015-1023, 1999.
- Waku, T., Fujiwara, T., Shao, J., *et al.*: Contribution of CD95 ligand-induced neutrophil infiltration to the bystander effect in p53 gene therapy for human cancer. *J. Immunol.* 165: 5884-5890, 2000.
- Swisher, S.G., Roth, J.A., Timmons, T., *et al.*: Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 91: 763-771, 1999.
- Nemunaitis, J., Swisher, S.G., Timmons, T., *et al.*: Adenovirus-mediated p53 gene transfer in sequence with cisplatin to tumors of patients with non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 18: 609-622, 2000.
- 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.
- CancerWise — Gene Therapy Shows Promising Results. ([http://www.cancerwise.org/August\\_2004/](http://www.cancerwise.org/August_2004/)).
- Carbone, D.P., Adak, S., Schiller, J., *et al.*: Adenovirus p53 administered by bronchoalveolar lavage in patients with bronchioalveolar cell lung carcinoma (BAC). *Proc. Am. Soc.*

- Clin. Oncol.* **22**: 620, 2003.
- 17) Gabrilovich, D.I., Mirza, N., Chiappori, A., *et al.*: Initial results of a Phase II trial of patients with extensive stage small cell lung cancer (SCLC) immunized with dendritic cells (DC) transduced with wild-type p53. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **23**: 2543, 2005.
- 18) Fujiwara, T., Tanaka, N., Kanazawa, S., *et al.*: Multicenter phase I study of repeated intratumoral delivery of adenoviral p53 (ADVEXIN) in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **24**: 1689-1699, 2006.
- 19) Introgen Receives FDA Fast Track Designation for Advexin. (<http://www.introgen.com/main.html>).

---

0914-2223/06/¥500/論文/JCLS



## 特集

● わが国における癌遺伝子治療の今 ●

## 大学発ベンチャーの研究開発 —悪性腫瘍に対するウイルス製剤 Telomelysin の臨床開発—

\*<sup>1</sup> 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, \*<sup>2</sup> 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・消化器・腫瘍外科,  
\*<sup>3</sup> オンコリスバイオフーマ株式会社

藤原 俊義<sup>\*1,2</sup> 田中 紀章<sup>\*2</sup> 浦田 泰生<sup>\*3</sup>

**要旨** 高齢化や生活習慣の変化により、日本人の主な死亡原因は結核や肺炎などの細菌感染が原因となる死亡から癌、脳卒中、心臓病へと大きく変化してきた。なかでも癌による死亡は年々増加傾向にあり、1986年以降は死亡原因の第1位を占めている。新たな抗癌剤による集学的治療の進歩により、いくつかの癌では5年生存率の改善が認められるが、様々な副作用が問題となることも少なくない。また、抗体医薬品や分子標的薬剤は最近のトピックスであるが、さらなる革新的な抗癌医薬品の開発が切望されている。オンコリスバイオフーマ株式会社は、癌治療に有用なウイルス製剤の開発から臨床応用に特化した大学発バイオベンチャーである。岡山大学で開発された Telomelysin は、癌細胞で選択的に複製・増殖して癌細胞死を誘導する腫瘍融解ウイルスであり、実験レベルでは固形腫瘍に対する著明な抗腫瘍活性を示す。このウイルス製剤の開発を通じて、オンコリスバイオフーマ株式会社は癌治療領域における飛躍的な進歩をめざしている。

[Biotherapy 20 (3) : 310-317, May, 2006]

### Clinical Development of Virotherapy for Cancer with Telomelysin

Toshiyoshi Fujiwara<sup>\*1,2</sup>, Noriaki Tanaka<sup>\*2</sup> and Yasuo Urata<sup>\*3</sup>

\*<sup>1</sup>Center for Gene and Cell Therapy, Okayama University Hospital, \*<sup>2</sup>Department of Surgery, Okayama University Graduate School, \*<sup>3</sup>Oncolys BioPharma, Inc.

#### Summary

The major cause of death in Japan has evolved from infectious diseases to aging and lifestyle-related causes, with cancer now the leading cause of death. Although the survival rate five years after cancer detection has been increasing due to novel anti-tumor drugs and chemotherapy combinations, side effects such as blood disorders, hair loss, nausea, neuropathy, and other complications still accompany the disease. Antibodies and molecular-targeted medicine have proved to be effective and safe for specific types of cancers, however, the whole world is waiting for more potent, safe, and innovative anticancer agents. Oncolys BioPharma, Inc. is a biopharmaceutical bioventure company focused on the discovery, development and commercialization of viral products for the treatment of cancer. Oncolys has established product-driven collaborative arrangements with Okayama University. Telomelysin is a replication-competent oncolytic adenovirus designed in Okayama University. When injected directly to solid tumors, Telomelysin infects tumor cells and replicates consequently, causing tumor cell death and demonstrating clear therapeutic benefits. Oncolys BioPharma believes that through the development of the replication-competent oncolytic virus, we produce safer, more effective, QOL-improving approaches which will revolutionize the current mode of cancer therapy.

**Key words :** Adenovirus, Virotherapy, Bioventure

**Address request for reprints to :** Dr. Toshiyoshi Fujiwara, Center for Gene and Cell Therapy, Okayama University Hospital, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700-8558, Japan

はじめに

大学における研究成果を活用して起業あるいは事業化する大学発ベンチャーは、低迷する経済再生の鍵として大きな期待を集めている。ベンチャーの設立により、その基盤技術を確かなものとし、かつ市場展開することで、研究成果を社会、経済に還元することができる。経済産業省は、2001年度に「新事業・雇用創出に向けた重点プラン」を発表し、2004年度末には大学発ベンチャーを1,000社にするという目標を掲げた。実際に、2004年度末には大学発ベンチャーは1,099社に達しており、産学連携の推進による創出支援が順調に進んできたことを示唆している<sup>1)</sup>。

事業分野別にみると、大学の研究シーズを活用しやすいバイオ分野が38.1%と最も多く、次いでITソフト分野(30.0%)、機械・装置分野(15.7%)と続く。しかし、創薬や臨床応用をゴールとするバイオの領域では、売上高研究開発費比率は高いものの市場展開までの道程は長く、長期にわたる安定した資金調達が必要である。そのため、迅速かつ確実な開発スキームと、それを実行する人材、体制が要求される。

われわれは、岡山大学で開発した腫瘍融解ウイルス(oncolytic virus)であるTelomelysinを技術シーズとして、2003年3月に大学発ベンチャー、オンコリスバイオファーマ株式会社を設立した

(<http://www.oncolys.com/>)。現在、このウイルス製剤の癌治療領域への応用をめざして研究開発を進めており、本稿ではTelomelysinの機能と効果について概説するとともに、その臨床開発の現状について紹介する。

I. 創薬におけるバイオベンチャーの役割

創薬をめざすバイオ研究開発には、長い期間と莫大なコストが要求される。たとえば、製剤の作製・精製(培養)、有効性の検証、good laboratory practice (GLP)規格の製造、前臨床研究(安全性、有効性、薬理)、good manufacturing practice (GMP)規格の製造、各種申請・承認、臨床試験(第I相~第III相)、データ解析、最終承認・市場展開と、いくつもの複雑な開発段階を着実に進む必要がある。当然、利益を生み出すまでには一定の時間が必要であり、製品開発の成功のリスクは高くなっていくわけである。さらに、バイオ分野では技術の進歩が急速であり、それに応じて研究開発の方向性を機敏に変更する柔軟性が要求される。

巨大製薬企業(Big Pharma)にとって、これらの条件をクリアして大学などの研究シーズを基盤とする医薬品開発を直接推進することは困難である。そのギャップを埋める存在として注目されているのが、バイオベンチャー企業である(図1)。バイオベンチャーのビジネスモデルでは、特定領域に特化した技術に基づいて大学などの研究

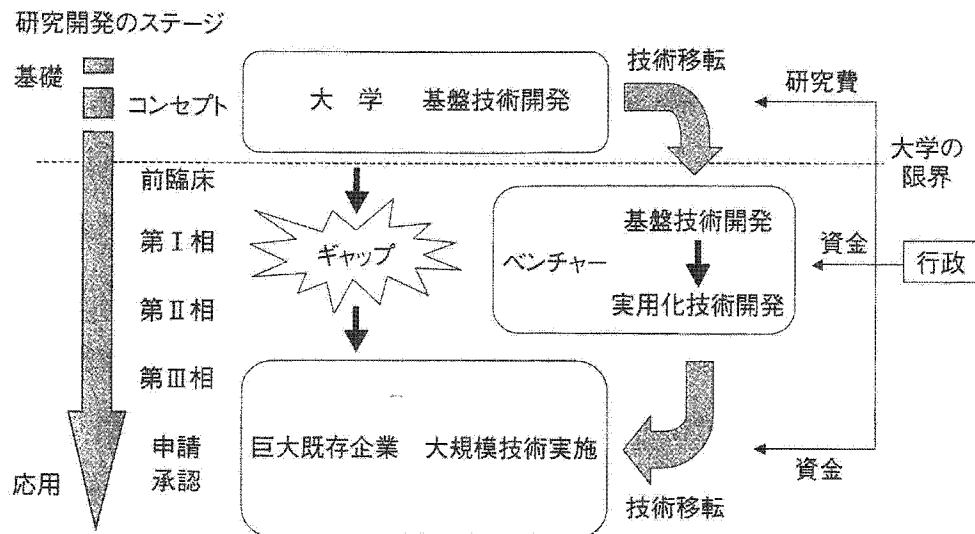


図1 大学発ベンチャーの役割

機関で生みだされた有望なシーズの研究開発を進め、その研究成果により将来的な収益を確保する。先端技術の供給元や特化技術のアウトソーシング先としての事業展開を行うことで、基礎研究機関と製薬企業の橋渡しの役割を担うことができる。

オンコリスバイオファーマ株式会社は、製薬企業で医薬品開発の経験をもつ研究者、技術者を中心とする研究開発型バイオベンチャーであり、Telomelysinをはじめとするいくつかの生物製剤のパイプラインを有する。

## II. Telomelysin の研究開発

### 1. ウイルスを用いた生物製剤

#### 1) 遺伝子治療用ベクター

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抑え、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15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。われわれも、p53 癌抑制遺伝子を搭載したアデノウイルスベクター Ad5CMV-p53 (ADVEXIN) による肺癌遺伝子治療の臨床試験を行い、症例によっては明らかな抗腫瘍効果を確認した<sup>2)</sup>。しかし、標的組織への遺伝子導入効率の限界や遠隔転移巣に対する効果など、まだまだ改善すべき問題点は多い。

ウイルスは、本来ヒトの細胞に感染・増殖し、その細胞を様々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<sup>3)</sup>。

#### 2) 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30~38 kb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、米国では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極めて初期(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<sup>4)</sup>。現在、アデノウイルスに癌細胞に特異的な増殖機能を発揮させるために、大きく二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 kD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<sup>5,6)</sup>。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、様々な発生源をもつ広い範囲の癌に適応するためには、より汎用性を有するプロモーターを用いる必要がある。

### 2. Telomelysin の機能

#### 1) 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human telomerase reverse transcriptase (hTERT)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

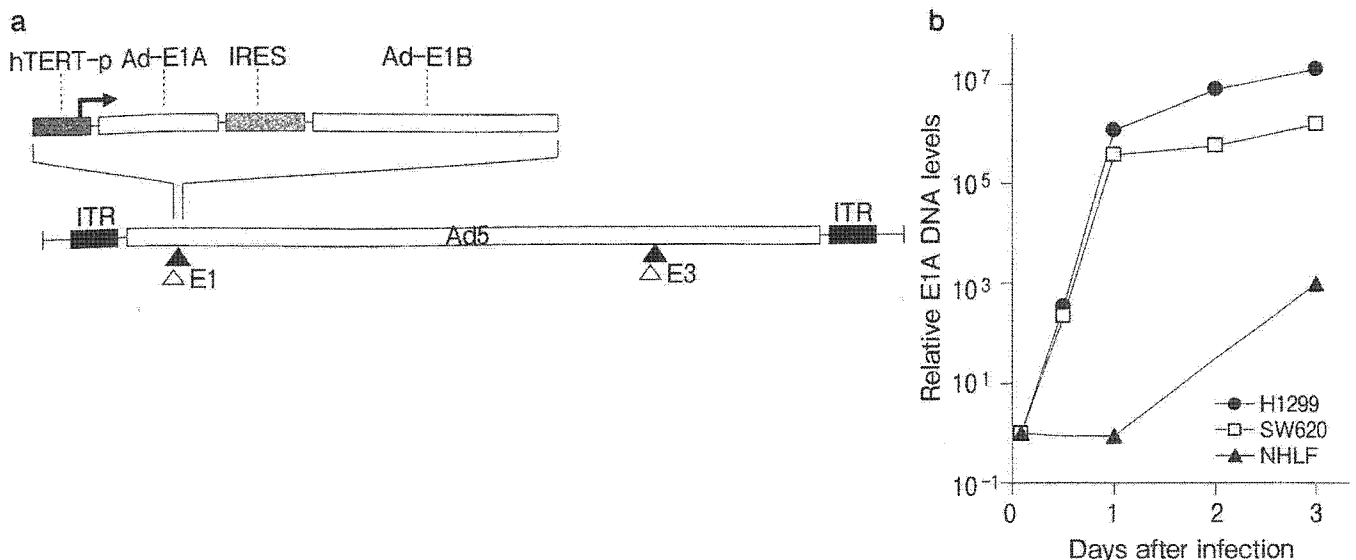


図2 Telomelysin (OBP-301) の構造と選択的増殖能

- 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部分に組み込んである。
- b: ヒト大腸癌細胞SW620、ヒト肺癌細胞H1299および正常ヒト肺線維芽細胞(NHLF)にTelomelysinを1MOIで感染させ、経日的にDNAを抽出し、E1Aに対するプライマーを用いてリアルタイムPCR解析を行った。E1A DNA量はTelomelysinの複製・増殖を反映している。

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<sup>7)</sup>。テロメラーゼは、極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<sup>8)</sup>、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。

## 2) Telomelysinの構造

前立腺癌に特異的なPSA<sup>9)</sup>をはじめとして、AFP<sup>10)</sup>、MUC-1<sup>11)</sup>などの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、われわれ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(図2a)<sup>12)</sup>。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。

## 3. Telomelysinの前臨床研究

### 1) 培養細胞およびマウスモデルにおけるTelomelysinの抗腫瘍活性

Telomelysinの癌細胞での選択的な増殖を確認する実験では、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倍に抑えられていた(図2b)。肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、頭頸部癌、乳癌、肝癌、膀胱癌、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。ヌードマウス背部皮下に移植したヒト肺癌腫瘍に、 $10^7$  PFU (plaque-forming units)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