

図3 Telomelysin (OBP-301) の抗腫瘍効果^{12,14)}

- 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を示す。
- b: H1299 肺癌細胞, SW620 大腸癌細胞に 0, 0.1, 1 MOI で OBP-401 を感染させ、24 時間後に docetaxel, vinorelbine, SN-38 (irinotecan) を加えた。5 日目の生細胞数を XTT アッセイにて測定し、抗癌剤の用量依存曲線をプロットした。

れ (図 3a), 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 EIA 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 は各種抗癌剤との併用効果も確認されており^{13,14)}, 集

学的治療の一つの選択肢としての臨床応用も期待される (図 3b)。

2) 診断用標識薬剤としての Telomelysin

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 Green Fluorescence Protein (GFP) を組み込んだ非増殖型アデノウイルスベクター Ad-

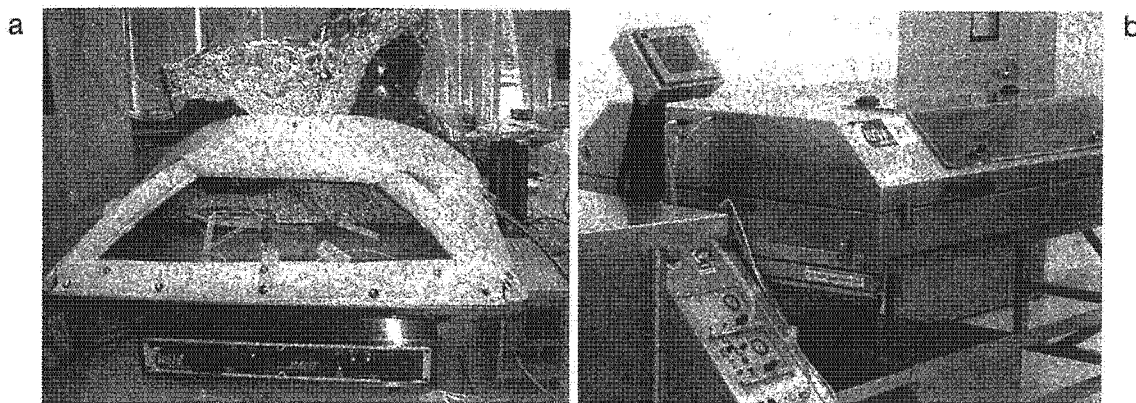


図4 Telomelysin (OBP-301) 製造のためのバイオリアクター
ウイルス製剤を大量に培養・精製するためのバイオリアクター。
20 l培養用の Wave 20 (a) と 200 l用の Wave 200 (b)。

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¹⁵⁾。

3) Armed (武装化) Telomelysin の開発

Telomelysin のウイルスゲノムに様々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未だ開発されていない。手術の縮小化による低侵襲化をめざす場合に欲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¹⁶⁾。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。

III. Telomelysin の臨床応用の現状

1. Telomelysin の GMP 製造

ウイルス製剤の大量製造は、特殊な宿主細胞に種となるウイルスを感染させ、細胞内でウイルスが十分複製、増殖した時点で上清と細胞融解液を回収し、カラムなどで精製することで行う。実際に臨床で用いるロットは、GMP 基準に準拠した施設と製造工程で生産される必要がある。臨床用の Telomelysin は、遺伝子治療用アデノウイルスベクターの製造経験が豊富な米国バイオベンチャーにて、ウイルス感染から培養、回収、精製までが閉鎖式回路で完結できるバイオリアクターを用いて製造された (図4)。各工程のバリデーションの後、高濃度のウイルス液が得られるため

の至適条件の検討が行われ、すでに米国での臨床試験や将来的な日本での使用まで見込んだ十分量のバイアルが確保されている。

2. Telomelysin の前臨床研究

Telomelysin の *in vitro* における各種ヒト悪性腫瘍に対する抗腫瘍活性や正常細胞での影響、癌細胞と正常細胞でのウイルス増殖の差、各種細胞株の hTERT 発現レベルとウイルス増殖能の相関などについて検討した。また、ヒト癌細胞移植ヌードマウスを用いて、Telomelysin の腫瘍内投与による *in vivo* の抗腫瘍効果について、投与量や投与回数との関係を検討した。さらに、Telomelysin に特異的な配列である E1A や IRES 配列を標的としたリアルタイム PCR 解析で、血中や組織中の Telomelysin の濃度を測定するアッセイ法を確立した。

Telomelysin は癌細胞で選択的に増殖するため、正常個体に投与されてもウイルス増殖による副作用はないと考えられる。しかし、安全性と体内動態を確認するために、非担癌動物に Telomelysin を投与して、その毒性と各正常臓器での組織学的・分子生物学的解析データを収集した。

3. Telomelysin の IND 申請

米国での臨床試験を想定した場合、すべての医薬品は米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration, FDA) の承認を受けなければならない。その申請は investigational new drug (IND) 申請と呼ばれており、血液製剤やワクチン、モノクローナル抗体医薬品、遺伝子治療薬などの生物製剤に関しては生物学的製剤評価研究センター (Center for Biologics Evaluation and Research, CBER) がその審査を担当している。FDA では、新規医薬品の有効性が、その副作用などの危険性を上回る利益を与えると判断されると、その使用が承認される。

Telomelysin に関しては、2005 年 11 月に担当 FDA 審査官と治験計画届出前相談 (Pre-IND meeting) を行い、製造法・品質管理、臨床試験プロトコル、薬物動態・毒性・安全性試験について、その方向性が妥当なものであることを確認している。2006 年 3 月には、すべての前臨床研究資料とともに IND 申請パッケージを FDA に提出する。初回申請の審査期間は原則 30 日以内

であり、その間に「clinical hold」を受けずに「allowed to proceed」となれば、患者登録を開始することができる。

すべてのプロセスが順当に進んだ場合、国産ウイルス製剤である Telomelysin の米国での第 I 相臨床試験を、2006 年 6 月ごろには開始することができると考えている。対象はすべての進行固形癌であり、段階的増量基準に従って Telomelysin の単回腫瘍内投与を試みる予定である。

おわりに

テロメラーゼは極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巣においても選択的増殖により抗腫瘍効果が期待できる。

Telomelysin の臨床開発は、急激に加速してきている産学連携の波に乗って、オンコリスバイオファーマ株式会社が積極的に進めてきている。米国では大学発ベンチャーの創出を含め、産学の密接な関係が国際競争力の大きな強みとなっている。日本においても、大学はあくまで研究と教育の場という規制概念が転換しつつあり、技術競争力を高めたい国の方針がこれを後押ししている。創出期をすぎた大学発ベンチャーが順調に成長期に入ることにより、大学発の研究シーズが多く社会に還元され、創薬分野においても有効な医薬品開発が実現することを期待する。

文 献

- 1) 経済産業省大学連携推進課「平成 16 年度大学発ベンチャーに関する基礎調査」結果について。
- 2) 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.
- 3) Hawkins, L.K., Lemoine, N.R. and Kirn, D.: Oncolytic biotherapy: a novel therapeutic plat-

- form. *Lancet Oncol.* 3: 17-26, 2002.
- 4) Russell, W.C.: Update on adenovirus and its vectors. *J. Gen. Virol.* 81: 2573-2604, 2000.
 - 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) Li, Y., Yu, D.C., Chen, Y., *et al.*: A hepatocellular carcinoma-specific adenovirus variant, CV890, eliminates distant human liver tumors in combination with doxorubicin. *Cancer Res.* 61: 6428-6436, 2001.
 - 11) 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.
 - 12) Kawashima, T., Kagawa, S., Kobayashi, N., *et al.*: Tumor-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin. Cancer Res.* 10: 285-292, 2004.
 - 13) Watanabe, T., Hioki, M., Fujiwara, 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.
 - 14) Fujiwara, T., Kagawa, S., Kishimoto, H., *et al.*: Enhanced antitumor efficacy of telomerase-selective oncolytic adenoviral agent OBP-401 with docetaxel: Preclinical evaluation of chemovirotherapy. *Int. J. Cancer*: 2006. (in press)
 - 15) 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.
 - 16) 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.