

図2 TelomeScanによるリンパ節転移の *in vivo* イメージング

- a : 原発巣に局所投与された TelomeScan は、リンパ流に乗って所属リンパ節に到達する。そこで、微小リンパ節転移が存在すれば、ウイルスの複製・増殖とともに GFP 蛍光を発するため、転移リンパ節は緑色蛍光で可視化される。
- b : ヒト大腸癌細胞 HT29 をヌードマウスの直腸粘膜下に同所性に移植すると、直腸に腫瘍を形成するとともに5~6週間後に高率に傍大動脈リンパ節転移が認められる。TelomeScanを直腸腫瘍に直接投与し、5日後に開腹、蛍光励起して高感度3CCDカメラにて観察したところ、4個中3個のリンパ節で GFP 蛍光発現がみられた。この3個のリンパ節では、組織学的に微小転移が確認された。矢印：リンパ節。

出された¹⁷⁾(図2)。実際の臨床では、TelomeScanを手術前に内視鏡などで癌局所に注入し、高感度蛍光感知プローブ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ことが可能である。

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¹⁸⁾。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。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)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。

平成18年11月、米国食品医薬品庁(US FDA)による承認のもと、各種固形癌に対する Telomelysin の第I相臨床試験が開始された。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) Southam CM: Present status of oncolytic virus studies. *Ann NY Acad Sci* 656:673, 1960.
- 2) Fujiwara T, Tanaka N, Kanazawa S, et al: Multicenter phase I study of repeated intratumoral delivery of adenoviral p53 in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 24: 1689-1699, 2006.
- 3) Hawkins LK, Lemoine NR, Kirn D: Oncolytic biotherapy: a novel therapeutic platform. *Lancet Oncol* 3: 17-26, 2002.
- 4) Branca MA: Gene therapy: cursed or inching towards credibility? *Nat Biotech* 23: 519-521, 2005.
- 5) Goodrum FD, Ornelles DA: p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J Virol* 72: 9479-9490, 1998.
- 6) Rothmann T, Hengstermann A, Whitaker NJ, et al: Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J Virol* 72: 9470-9478, 1998.
- 7) Jia H, Kling J: China offers alternative gateway for experimental drugs. *Nat Biotechnol* 24: 117-118, 2006.
- 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 NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011-2015, 1994.
- 10) Rodriguez R, Schuur ER, Lim HY, 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 DC, 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 DE, Kovessi 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) 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.
- 15) 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* 119: 432-440, 2006.
- 16) 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.
- 17) Kishimoto H, Kojima T, Watanabe Y, et al: *In vivo* imaging of lymph node metastasis with telomerase-specific replication-selective adenovirus. *Nat Med* 12: 1213-1219, 2006.
- 18) 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.

テロメラーゼ特異的ウイルス製剤の癌診断・治療への応用

Telomerase-specific oncolytic virus for cancer therapy and diagnosis

磯原俊義, 田中紀章

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
岡山大学大学院医歯学総合研究科消化器・腫瘍外科学分科教授

はじめに

ウイルスによる腫瘍融解療法(Oncolytic virotherapy)は、新たな癌治療戦略として積極的に開発が進められている。ウイルスは、本来ヒトの細胞に感染して増殖複製し、その細胞をさまざまな機序により破壊する。1900年代の初めより、癌細胞でその殺細胞効果を期待して野生型のウイルスを用いた癌治療が試みられてきた¹⁾。子宮癌や黒色腫に対する狂犬病ウイルスの投与や、コクサッキーB型ウイルス、ミクソウイルス、アルポウイルスなどによる固形癌の治療が行われてきた。1974年には、進行癌患者へのムンプスウイルス投与の本邦での研究成果が報告されている²⁾。しかし、これらのウイルスはあらゆる細胞で増殖能を有する野生型であったため、毒性などにより一般的な治療として使用されるには至らなかった。

遺伝子工学的技術の進歩と癌の分子病態解析の発展により、ウイルスの細胞傷害活性を癌細胞に標的化することが可能となってきた³⁾(図1)。理論的根拠に基づ

いた癌選択性の確保と正常細胞での毒性軽減は、ウイルス製剤の臨床応用を現実のものとしてきている。単純ヘルペスウイルスやワクシニアウイルスなどの改変が行われており、臨床応用も積極的に進んでいる。しかし、アデノウイルスがその構造が最もよく研究されているウイルスのひとつであり、非増殖型のもので多くの遺伝子治療プロトコー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、その抗腫瘍および診断用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30~38 kb サイズの二重鎖 DNA ウィルスであり、41

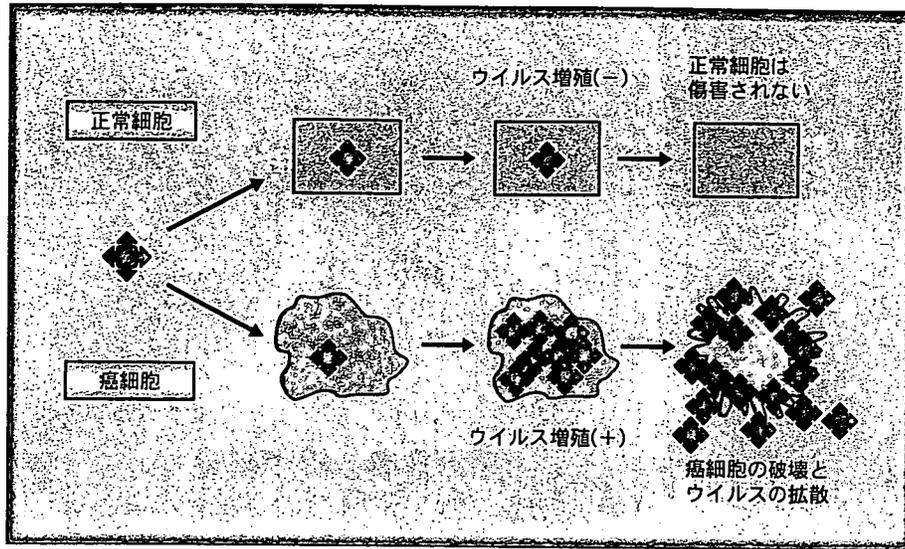


図1 癌細胞での選択的なウイルス増殖と細胞死誘導
(文献3より引用)

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ひとつであり、米国では30年以上のあいだ、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、癌細胞に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り、E1B初期遺伝子の55kDを欠損した2型および5型のキメラタイプの変異アデノウイルスである Onyx-015 (dl1520) が代表的である⁶⁾。本来、E1B-55kD蛋白質は癌抑制遺伝子産物である p53 蛋白質に結合し、その機能を不活化する働きを担っている。したがって、Onyx-015は、正常な p53 機能をもつ細胞では p53 によるウイルスの複製増殖の抑制を制御することができない。一方、p53 機能を喪失している癌細胞では、E1B-55kD が作用する必要がなく、Onyx-015 は複製増殖により細胞融解を誘導することが可能となる。しかし、その

後の研究により、Onyx-015 の増殖能は必ずしも p53 機能の有無によらないことが明らかになっており⁶⁾、また、ヒトの正常細胞での増殖複製の可能性も示唆されている⁷⁾。Onyx-015 と類似の腫瘍融解ウイルスである H101 は、中国食品医薬品局(State Food and Drug Administration ; sFDA)の承認を受け、すでに市場に出ている⁸⁾。

癌選択性をもたず第二の試みは、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、さまざまな発生源地をもつ広い範囲の癌に適應するためには、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)の繰り返りで構成されるテロメアは、細胞増殖にともない短縮し細胞に老化(replicative senescence)を引き起す。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質酵素であり、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⁹⁾。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¹⁰⁾(表 1)、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。

表 1 ヒト悪性腫瘍におけるテロメラーゼ活性

組織	テロメラーゼ陽性
肺癌	84 %
非小細胞肺癌	82 %
小細胞肺癌	100 %
頭頸部腫瘍	82 %
食道癌	87 %
胃癌	85 %
大腸癌	89 %
膵臓癌	95 %
肝細胞癌	86 %
乳癌	86 %
子宮癌	
子宮頸癌	93 %
子宮体癌	94 %
卵巣癌	86 %
前立腺癌	83 %
膀胱癌	93 %
腎臓癌	68 %
ウィルムス腫瘍	100 %
網膜芽細胞腫	50 %
脳腫瘍	49 %
神経芽細胞腫	94 %
皮膚癌	83 %
基底細胞腫	95 %
悪性黒色腫	86 %
甲状腺癌	
分化型	59 %
未分化型	86 %
肉腫	100 %

テロメラーゼ特異的アデノウイルス製剤の構造と機能

広範な癌を対象とした分子標的ナノバイオ・ウイルス製剤を開発するために、著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)を作成した¹¹⁾(図 2)。

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置くことで、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 100~1000 倍に抑えられていた。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。ヌードマ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、さらに Telomelysin[®]は血中を循環し、遠隔部位の腫瘍内で

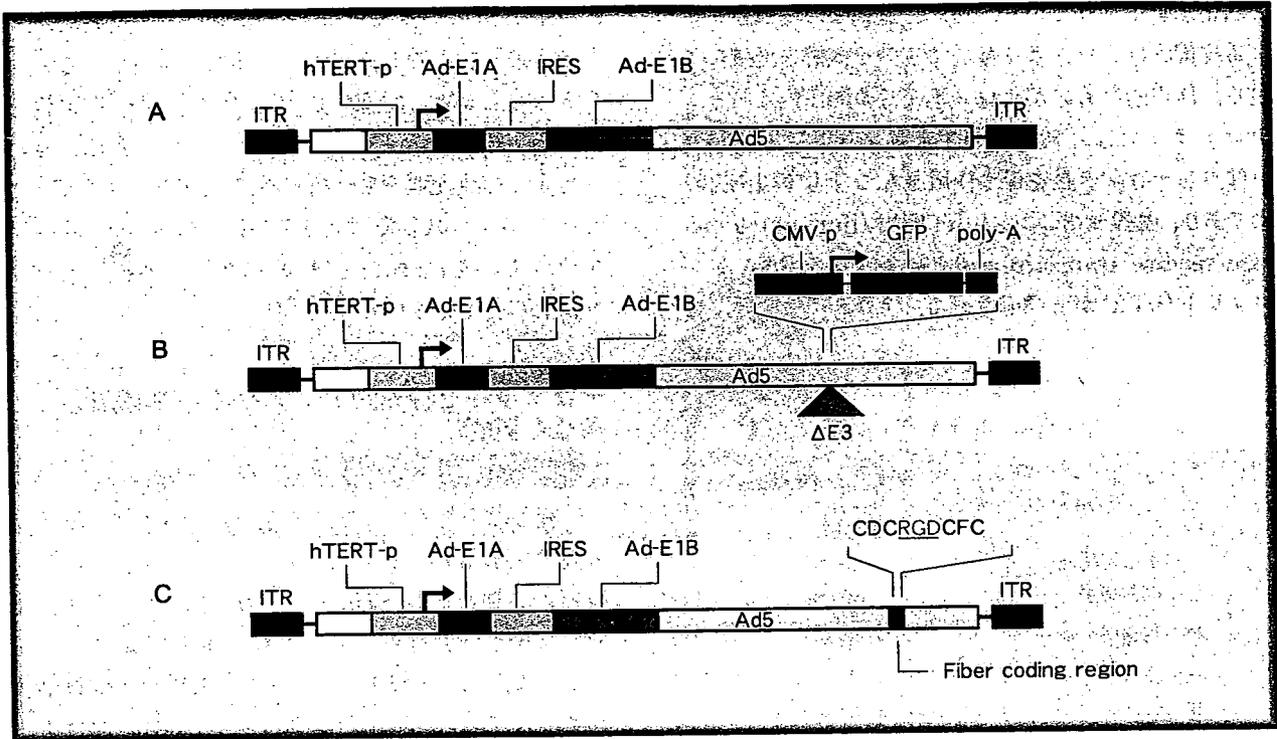


図2 ナノバイオ・アデノウイルス製剤の構造と特徴

- A : Telomelysin® (OBP-301)は、ウイルスの増殖に必要なE1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 : TelomeScan® (OBP-401)は、Telomelysin®を基本骨格としてオワンクラゲ由来の蛍光遺伝子GFP遺伝子をウイルスゲノムのE3領域に組み込んでおり、ウイルス増殖とともに癌細胞で選択的にGFP蛍光を発現する。
- C : Telomelysin-RGD (OBP-405)は、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モチーフをファイバーのHIループに組み込んでいる。

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。

診断用ウイルス製剤TelomeScan® (OBP-401)は、Telomelysin®を基本骨格としてオワンクラゲ由来の蛍光遺伝子GFP (Green Fluorescence Protein) 遺伝子をウイルスゲノムに組み込んでおり(図2)、生体内で癌組織を可視化するナビゲーション・ツールとして使用可能である^{12,13)}。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まだ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ひとつに転移リンパ節の有無があり、それを知る方法としてTelomeScan®が活用できる。ヒト大腸癌細胞とヌードマウスを用いた同所性直腸癌モデルにおいて、TelomeScan®を直腸腫瘍に直接投与し、5日後に開腹、キセノン光で蛍光を励起して高感度3CCDカメラにて観察したところ、大動脈周囲のGFP陽性リンパ節では高頻度に微小転移が検出された¹⁴⁾(図3)。実際の臨床では、TelomeScan®を手術前に内視鏡などで癌局所に注入し、高感度蛍光感知プローブ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ことが可能である。

OBP-405は、Telomelysin®の標的細胞への感染性

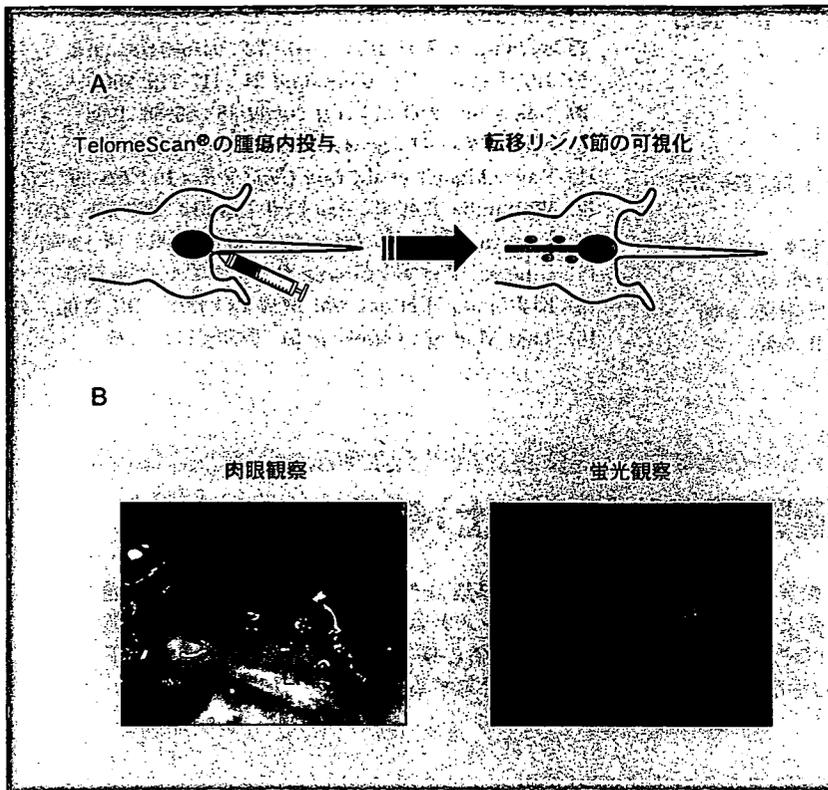


図3 TelomeScan[®]によるリンパ節転移の *in vivo* イメージング

A : 原発巣に局所投与された TelomeScan[®] は、リンパ流に乗って所属リンパ節に到達する。そこで、微小リンパ節転移が存在すれば、ウイルスの複製・増殖とともに GFP 蛍光を発するため、転移リンパ節は緑色蛍光で可視化される。

B : ヒト大腸癌細胞 HT29 をヌードマウスの直腸粘膜下に同所性に移植すると、直腸に腫瘍を形成するとともに 5~6 週間後に高率に傍大動脈リンパ節転移が認められる。TelomeScan[®] を直腸腫瘍に直接投与し、5 日後に開腹、蛍光励起して高感度 3CCD カメラにて観察したところ、4 個中 3 個のリンパ節で GFP 蛍光発現がみられた。この 3 個のリンパ節では、組織学的に微小転移が確認された。矢印：リンパ節。

(文献 15 より引用)

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⁾(図2)。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、癌治療の標的分子としてはきわめて魅力的である。Telomelysin[®]による癌治療は、従来の抗癌剤や放射線療法とは全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。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)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。平成 18 年 10 月、米国食品医薬品庁(US FDA)による承認のもと、各種固形癌に対する Telomelysin[®]の第 I 相臨床試験が開始された。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。

References

- 1) Southam CM et al : *Ann NY Acad Sci* 22 : 656-673, 1960
- 2) Asada T et al : *Cancer* 34 : 1907-1928, 1974
- 3) Hawkins LK et al : *Lancet Oncol* 3 : 17-26, 2002
- 4) Fujiwara T et al : *J Clin Oncol* 24 : 1689-1699, 2006
- 5) Branca MA : *Nat Biotechnol* 23 : 519-521, 2005
- 6) Goodrum FD et al : *J Virol* 72 : 9479-9490, 1998
- 7) Rothmann T et al : *J Virol* 72 : 9470-9478, 1998
- 8) Jia H et al : *Nat Biotechnol* 24 : 117-118, 2006
- 9) Nakayama J et al : *Nat Genet* 18 : 65-68, 1998
- 10) Kim NW et al : *Science* 266 : 2011-2015, 1994
- 11) Kawashima T et al : *Clin Cancer Res* 10 : 285-292, 2004
- 12) Watanabe T et al : *Exp Cell Res* 312 : 256-265, 2006
- 13) Fujiwara T et al : *Int J Cancer* 119 : 432-440, 2006
- 14) Umeoka T et al : *Cancer Res* 64 : 6259-6265, 2004
- 15) Kishimoto H et al : *Nat Med* 12 : 1213-1219, 2006
- 16) Taki M et al : *Oncogene* 24 : 3130-3140, 2005

テロメラーゼ依存性腫瘍融解ウイルス製剤の がん診断・治療への応用

藤原 俊義¹ 田中 紀章²

Theranostic application of telomerase-specific oncolytic adenovirus for human cancer

¹Toshiyoshi Fujiwara, ²Noriaki Tanaka

¹Center for Gene and Cell Therapy, Okayama University Hospital

²Department of Surgery, Okayama University Graduate School

Abstract

Replication-selective tumor-specific viruses present a novel approach for treatment of neoplastic disease. Telomerase activation is considered to be a critical step in carcinogenesis and its activity correlates closely with human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression. We constructed an attenuated adenovirus 5 vector (Telomelysin, OBP-301), in which the hTERT promoter element drives expression of *E1* genes. We further modified the E3 region of OBP-301 to contain green fluorescent protein (*GFP*) gene for monitoring viral replication (TelomeScan, OBP-401). When TelomeScan was intratumorally injected into human tumors orthotopically implanted into the rectum in mice, para-aortic lymph node metastasis could be visualized at laparotomy under a three-chip color cooled charged-coupled device camera. This article reviews recent highlights in this rapidly evolving field: cancer therapeutic and cancer diagnostic approaches using the telomerase-specific oncolytic adenoviruses.

Key words: telomerase, hTERT, adenovirus, GFP, imaging

はじめに

ウイルスによる腫瘍融解療法 (oncolytic virotherapy) は、新たながん治療戦略として積極的に開発が進められている。ウイルスは、本来ヒトの細胞に感染して増殖複製し、その細胞を様々な機序により破壊する。1900年代の初めより、がん細胞でその殺細胞効果を期待して野生型のウイルスを用いたがん治療が試みられてきた¹⁾。子宮癌や黒色腫に対する狂犬病ウイ

ルスの投与や、コクサッキー B 型ウイルス、ミクソウイルス、アルボウイルスなどによる固形がんの治療が行われてきた。1974年には、進行がん患者へのムンプスウイルス投与の我が国での研究成果が報告されている²⁾。しかし、これらのウイルスはあらゆる細胞で増殖能を有する野生型であったため、毒性などにより一般的な治療としては使用されるには至らなかった。

遺伝子工学的技術の進歩とがんの分子病態解析の発展により、ウイルスの細胞傷害活性をが

¹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 ²岡山大学大学院医歯学総合研究科消化器・腫瘍外科学分野

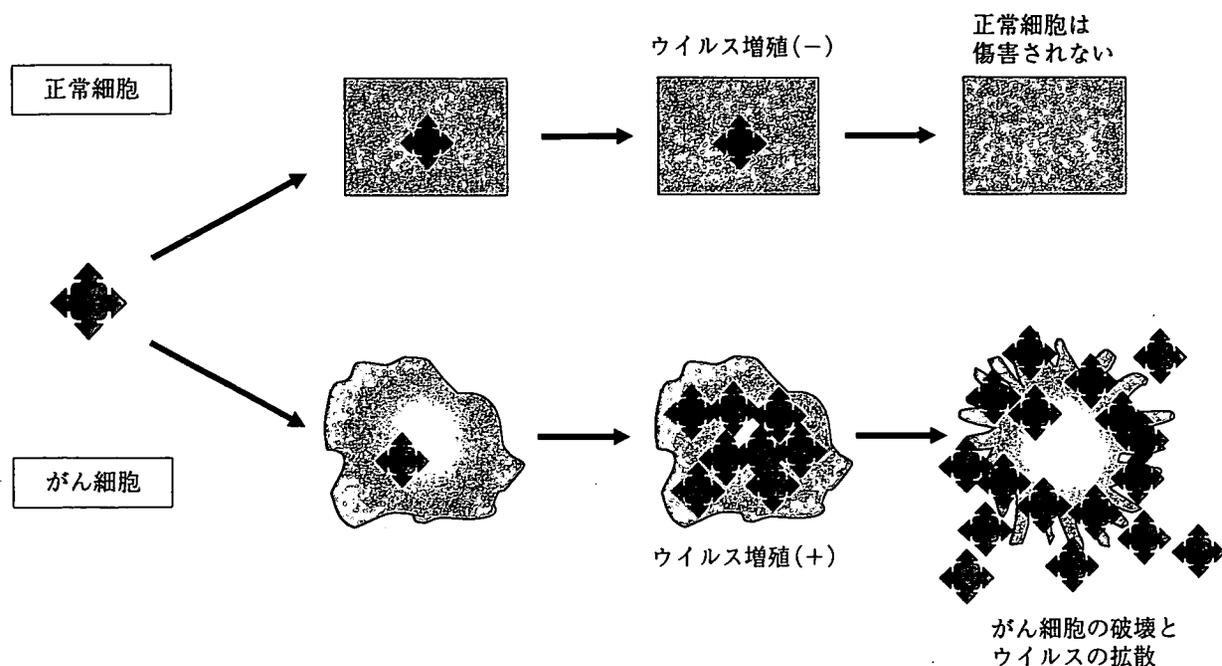


図1 がん細胞での選択的なウイルス増殖と細胞死誘導(文献³⁾より引用)

ん細胞に標的化することが可能となってきた³⁾。理論的根拠に基づいたがん選択性の確保と正常細胞での毒性軽減は、ウイルス製剤の臨床応用を現実のものとしてきている(図1)。単純ヘルペスウイルスやワクシニアウイルスなどの改変が行われており、臨床応用も積極的に進んでいる。しかし、アデノウイルスがその構造が最もよく研究されているウイルスの一つであり、非増殖型のもので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⁾。

テロメラーゼは多くのヒト悪性腫瘍でその活性の上昇が認められており^{5,6)}、活発な増殖能を反映していると考えられている。したがって、テロメラーゼはがんの診断・治療において極めて魅力的な分子標的であり、polymerase chain reaction(PCR)を用いた遺伝子診断やアポトーシス遺伝子との組み合わせによる遺伝子治療用ベクターの開発などの研究が進められている⁷⁾。

本稿では、テロメラーゼ活性依存性ながん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、蛍光遺伝子を搭載することによる診断用医薬品としての臨床応用の可能性を考察する。

1. 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30-38kD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、がん細胞に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がん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り、E1B初期遺伝子の55kDを欠損した2型および5型のキメラタイプの変異アデノウイルスであるOnyx-015(dl1520)が代表的である⁸⁾。本来、E1B-55kD蛋白質はがん抑制遺伝子産物であるp53蛋

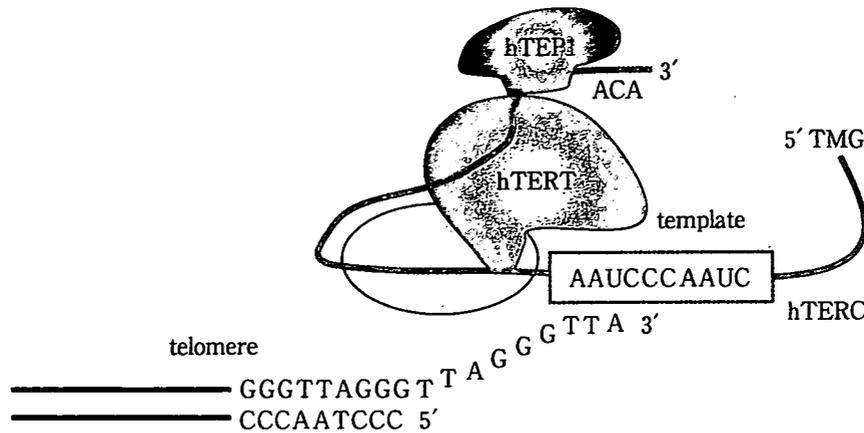


図2 テロメラーゼの構造と hTERT

白質に結合し、その機能を不活化する働きを担っている。したがって、Onyx-015は、正常な p53 機能をもつ細胞では p53 によるウイルスの複製増殖の抑制を制御することができない。一方、p53 機能を喪失しているがん細胞では、E1B-55kD が作用する必要がなく、Onyx-015 は複製増殖により細胞融解を誘導することが可能となる。しかし、その後の研究により、Onyx-015 の増殖能は必ずしも p53 機能の有無に因らないことが明らかになっており⁹⁾、またヒトの正常細胞での増殖複製の可能性も示唆されている¹⁰⁾。Onyx-015 と類似の腫瘍融解ウイルスである H101 は、中国食品医薬品局(State Food and Drug Administration: sFDA)の承認を受け、既に市場に出ている¹¹⁾。

がん選択性をもたす第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、がん細胞特異的あるいは特定の臓器由来のがん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、様々な発生源地をもつ広い範囲のがん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. 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

縮は発がんの抑制機構であり、前がん状態にある細胞が老化に陥り死滅することでがん化が阻止されている。逆に、無制限の増殖能を有するがん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(図2)。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¹²⁾。

テロメラーゼは、極めて多くのがん細胞でその活性の上昇が明らかになっており^{5,6)}(表1)、早期のがんから進行がんへとその活性は徐々に上昇していく。テロメラーゼ活性の上昇には、hTERT mRNA のスプライシングや hTERT 蛋白質の翻訳後修飾などが関与しているが、hTERT 遺伝子発現の増強が最も重要な分子機構と考えられている。したがって、がん細胞では 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。

3. hTERT プロモーターの制御機構

hTERT プロモーターの活性化や抑制には、

表 1 ヒト悪性腫瘍におけるテロメラーゼ活性

組織	テロメラーゼ陽性	組織	テロメラーゼ陽性
肺癌	84%	前立腺癌	83%
非小細胞肺癌	82%	膀胱癌	93%
小細胞肺癌	100%	腎臓癌	68%
頭頸部腫瘍	82%	ウイルス腫瘍	100%
食道癌	87%	網膜芽細胞腫	50%
胃癌	85%	脳腫瘍	49%
大腸癌	89%	神経芽細胞腫	94%
膵臓癌	95%	皮膚癌	83%
肝細胞癌	86%	基底細胞腫	95%
乳癌	86%	悪性黒色腫	86%
子宮癌		甲状腺癌	
子宮頸癌	93%	分化型	59%
子宮体癌	94%	未分化型	86%
卵巣癌	86%	肉腫	100%

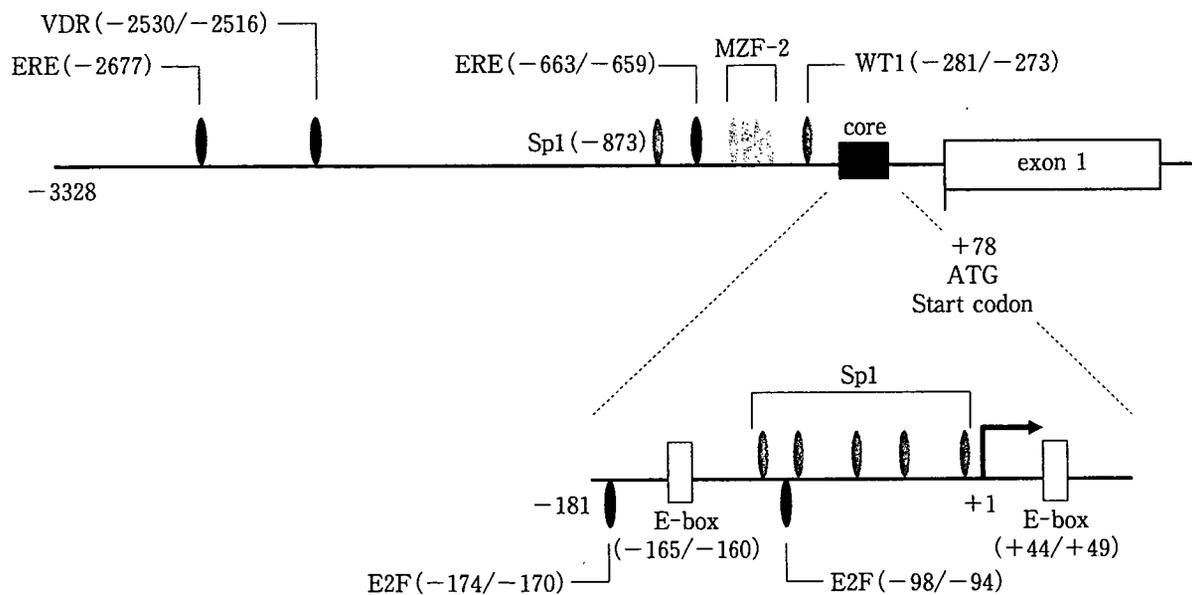


図 3 hTERT プロモーターの構造

hTERT プロモーターのコア領域と転写因子の結合部位が示されている。

多くのがん遺伝子やがん抑制遺伝子が複雑に
関与している¹³⁾(図 3)。hTERT プロモーターに
は、Myc/Max/Mad 転写因子が結合する E-box
(CACGTG) 配列が存在しており、c-Myc/Max
複合体は hTERT 発現を増強し、逆に Mad1/Max
複合体は hTERT 発現を抑制する。他の転写因
子である Sp1 も、c-Myc と共同して hTERT 活
性化に作用する。また、epidermal growth factor
(EGF) 受容体やその相同体である HER2/neu が

ん原遺伝子産物は、MAP キナーゼのリン酸化
を介して転写因子 ETS1/ETS2 を活性化し、最
終的に hTERT プロモーター活性を増強する。

hTERT プロモーターは、転写因子である核
内受容体による制御も受けることが知られてい
る。hTERT プロモーターには 2 個の estrogen
response element(ERE) が存在し、エストロゲ
ンによってその発現は増強する。また、プロゲ
ステロンやアンドロゲンも、hTERT 発現増強

a. Telomelysin (OBP-301)



b. TelomeScan (OBP-401)

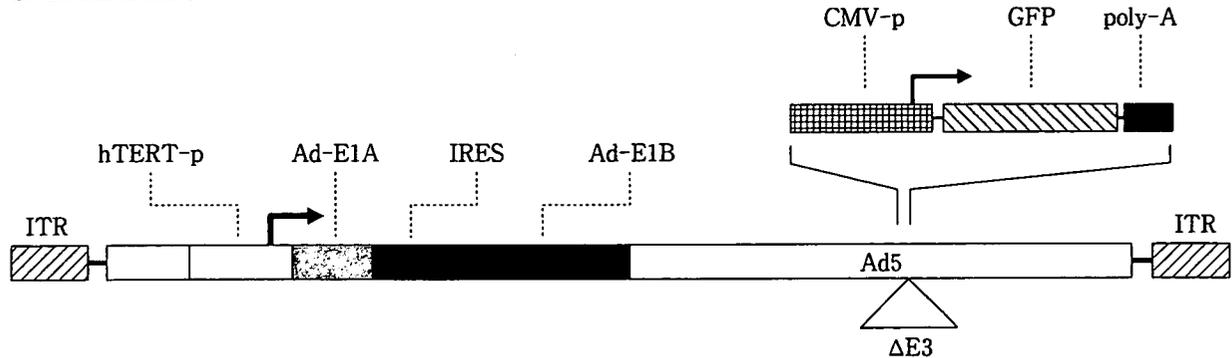


図4 ナノバイオ・アデノウイルス製剤の構造と特徴

a: Telomelysin (OBP-301)は、ウイルスの増殖に必要なE1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: TelomeScan (OBP-401)は、Telomelysinを基本骨格としてオワンクラゲ由来の蛍光遺伝子GFP遺伝子をウイルスゲノムのE3領域に組み込んでおり、ウイルス増殖とともにがん細胞で選択的にGFP蛍光を発現する。

によりテロメラーゼ活性を増強する。一方、ビタミンD受容体やレチノイン酸受容体などの核内受容体は、逆にhTERT発現に抑制的に作用する。

これらの事実から、がん細胞におけるテロメラーゼ活性やhTERT発現が厳格に制御されていることが明らかであり、また薬剤や遺伝子、ホルモンなどにより外来性に発現修飾を行うことも可能であることが示唆される。すなわち、幾つかの治療薬剤や治療法を集学的に行うことにより、テロメラーゼ依存性抗がん治療の効果を増強することができると思われる。

4. テロメラーゼ特異的アデノウイルス製剤のがん治療への応用

a. Telomelysin (OBP-301)の抗腫瘍効果

広範ながんを対象とした分子標的ナノバイオ・ウイルス製剤を開発するために、著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)を作成した¹⁴⁾(図4-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置くことで、よりがん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、各種がん細胞においては 10^5 - 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。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がん細胞および肉腫細胞では、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

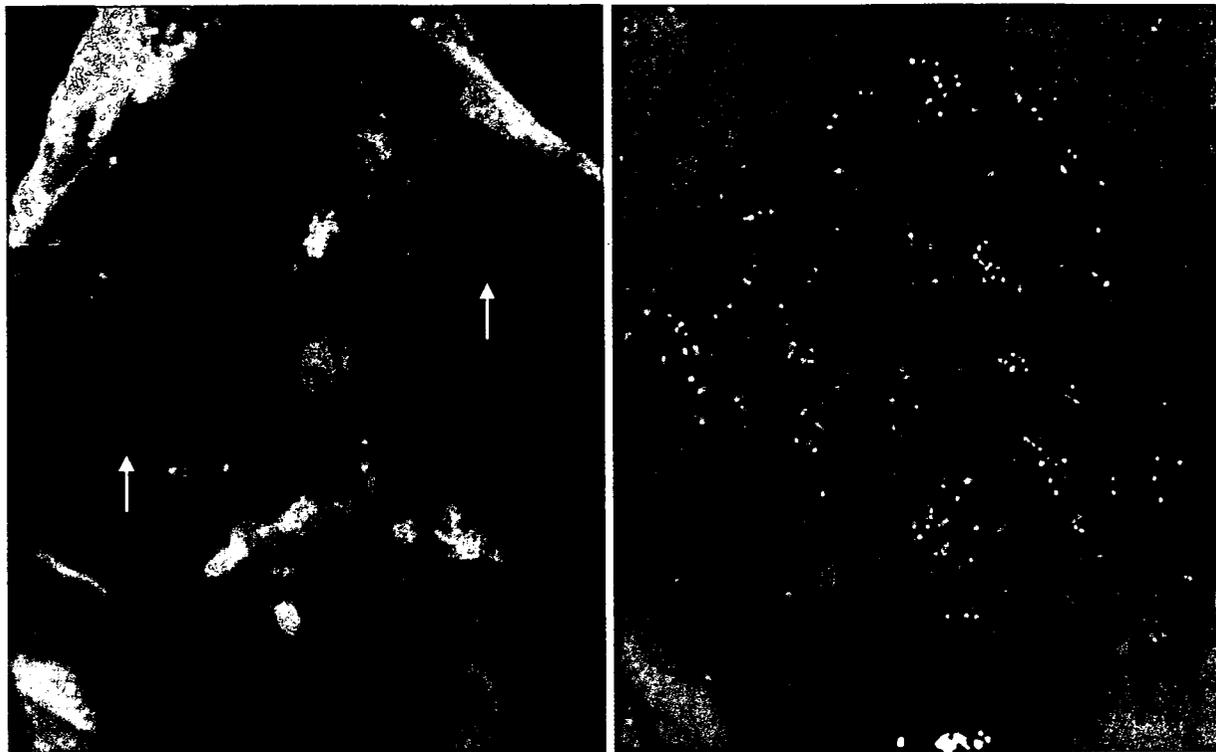


図5 Telomelysin の *in vivo* におけるがん診断への応用

Telomelysin と Ad-GFP を用いた胸膜播種巣の可視化. ノ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.

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, 更に 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.

b. Telomelysin の播種病巣診断への応用

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, がん細胞では 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, がん細胞では特異的に 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. ヒト肺癌細胞をノ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⁾ (図5).

5. テロメラーゼ特異的アデノウイルス製剤のがん診断への応用

a. 分子イメージングと外科手術ナビゲーション

生体内におけるがんの診断法として, コンピューター断層撮影 (computed tomography: CT) や磁気共鳴画像法 (magnetic resonance imaging: MRI) などの画像診断が一般的に行われているが, これらの手法は腫瘍に特化されたもので

はない。また、ポジトロン(陽電子)を放出するアイソトープで標識された薬剤を注射し、その体内分布を特殊なカメラで映像化する新しい診断法であるPET(positron emission tomography)は、がんを選択的に描出する分子イメージング技術としてがん診断に積極的に応用されている。これらの診断技術は、スクリーニングや術前がんの部位を同定するためには有用であるが、術中にリアルタイムに転移や播種病巣を同定するナビゲーション技術はいまだ確立されていない。

より低侵襲な治療の導入は、患者の生活の質(quality of life: QOL)を維持するためにも必要であり、手術の縮小化による低侵襲化を目指す際に有用な情報の一つに転移リンパ節の有無がある。最近、低侵襲手術のナビゲーションとして、センチネルリンパ節(sentinel node: SN)が注目されている。SNとは腫瘍から最初にリンパ流を受けるリンパ節であり、ここに最初の微小転移が生ずるという仮説がSN理論である。乳癌では欧米を中心に大規模な臨床試験が開始されているが、その他の固形腫瘍にもこの考え方が通用するかについてはいまだ不明であり、その検証が始まったところである。胃癌の単発リンパ節転移部位の解析から10%前後のskip転移、すなわち第1群リンパ節を飛び越した第2群以遠リンパ節への初発転移が報告されており¹⁶⁾、これを根拠としてSNナビゲーションの危険性を唱える意見もある。

術中に正確にリンパ節転移を同定する方法が確立されれば、術者に適正な切除範囲を示すナビゲーションとなると同時に、患者への過剰な外科侵襲を回避することが可能となる。

b. TelomeScan (OBP-401)の構造と機能

診断用ウイルス製剤TelomeScan(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(図4-b)、生体内でのがん組織、特に転移リンパ節を可視化するナビゲーション・ツールとして使用可能である^{17,18)}。TelomeScanはhTERTプロモーターとE1A/IRES/E1B配列からなる増殖カセットをもち、かつサイトメガロウイルス(CMV)・

プロモーターとGFP遺伝子による蛍光発現カセットをアデノウイルスE3領域に有する。TelomeScanの感染により極めて広範ながん細胞でGFP蛍光の発現が観察され、一方、線維芽細胞をはじめとする正常細胞ではGFP陰性であった。また、ヌードマウスの背部皮下に移植したヒト悪性腫瘍内にTelomeScanを投与したところ、24時間後から7日以上長期にわたりがん組織に選択的な緑色蛍光発現が観察された。

c. TelomeScan(OBP-401)を用いた生体内微小リンパ節転移診断システムの開発

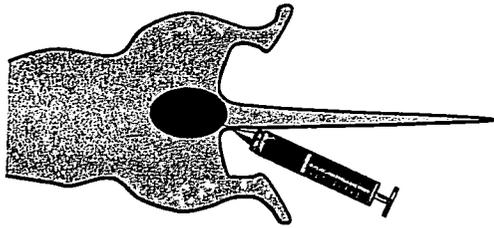
リンパ節転移は代表的ながんの転移経路の一つであり、がん患者の根治を目指すためには、原発巣の切除とともに的確なリンパ節郭清が必要である。TelomeScanを用いた生体内リンパ節転移イメージングを試みた。

ヌードマウスの直腸粘膜下にヒト大腸癌細胞HT29を移植すると、同所性に直腸腫瘍を形成するとともに、4-6週間後に高率に傍大動脈リンパ節転移を生じる。このモデルにおいて、TelomeScanを直腸腫瘍に直接腫瘍内投与し、5日後に開腹、キセノン光で蛍光を励起して高感度3色冷却CCDカメラにて観察した。GFP蛍光を発したリンパ節を採取して、最終的に病理組織学的に確認したところ、GFP陽性リンパ節では高頻度に微小転移が検出された。感度は、sensitivity 92.3%, specificity 86.6%であり、1mm以下の微小転移巣を蛍光spotとして同定することが可能であった¹⁹⁾(図6)。これらの結果は、原発腫瘍内に局所投与されたTelomeScanがリンパ流を經由して所属リンパ節へ拡散し、リンパ節内の微小転移巣でTelomeScanががん細胞に感染・増殖して選択的にGFP蛍光を発したことを示唆している。また、TelomeScanの複製・増殖はフロイドアジュバントの直腸粘膜投与で生じた炎症性のリンパ節腫大ではみられず、がん細胞に選択的に誘導されることが明らかとなった。

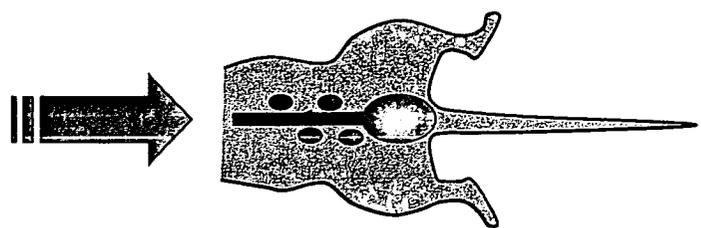
現在、TelomeScanを標識薬剤として、プローブ型の高感度GFP蛍光検出装置を用いた微小がん組織診断用の外科手術ナビゲーション・システムを開発中である。臨床的には、内視鏡

a.

TelomeScan の腫瘍内投与

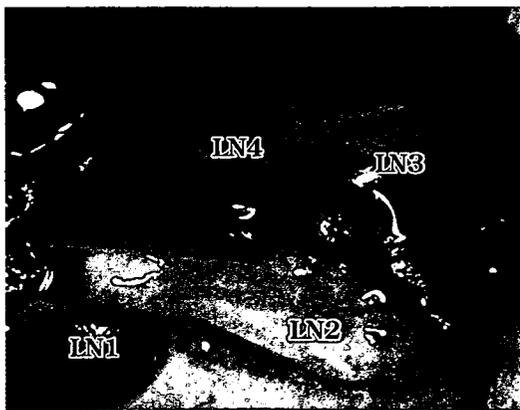


転移リンパ節の可視化



b.

肉眼観察



蛍光観察

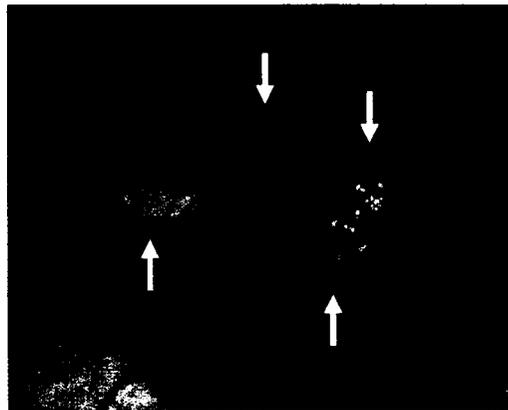


図6 TelomeScan によるリンパ節転移の *in vivo* イメージング

a: 原発巣に局所投与された TelomeScan は、リンパ流に乗って所属リンパ節に到達する。そこで、微小リンパ節転移が存在すれば、ウイルスの複製・増殖とともに GFP 蛍光を発するため、転移リンパ節は緑色蛍光で可視化される。

b: ヒト大腸癌細胞 HT29 をヌードマウスの直腸粘膜下に同所性に移植すると、直腸に腫瘍を形成するとともに 4-6 週間後に高率に傍大動脈リンパ節転移が認められる。TelomeScan を直腸腫瘍に直接投与し、5 日後に開腹、蛍光励起して高感度 3CCD カメラにて観察したところ、4 個中 3 個のリンパ節で GFP 蛍光発現がみられた。この 3 個のリンパ節では、組織学的に微小転移が確認された。矢印：リンパ節。

(文献¹⁹⁾より引用)

などのアクセスを用いて原発腫瘍内に局所投与することで、TelomeScan はリンパ節内の微小転移巣でがん細胞に感染・増殖して選択的に GFP 蛍光を発するため、一定期間の後に開胸、開腹、あるいは鏡視下手術にて転移リンパ節を可視化することができる。この技術により、微小リンパ節転移を手術中にリアルタイムに検出してリンパ節郭清範囲を同定する低侵襲外科手術が可能となる。このシステムでは、SN 生検と異なり、転移リンパ節そのものを同定できる点で現実性の面から極めて実用的といえる。

おわりに

テロメラーゼは極めて多くのがん細胞で活性の上昇が認められており、がん治療の標的分子としては極めて魅力的である。Telomelysin によるがん治療は、従来の抗がん剤や放射線療法とは全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。更に、正常細胞に影響を与えずがん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がん巣にお

いても選択的増殖により抗腫瘍効果が期待できる。

TelomeScanは診断用医薬品として開発を進めているが、基本的にはTelomelysinと同じウイルス機能を有し、GFP蛍光を発した後は標的細胞死を誘導する。すなわち、診断と治療を兼ね備えたウイルス製剤(theranostic virus)であり、リンパ節転移を対象に使用された場合、可視化できなかった極めて微小な転移結節は、最終的にはウイルス増殖により破壊されると考えられる。TelomelysinやTelomeScan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式会社が設立され、が

んの治療用・診断用医薬品としての臨床開発を推進している。平成18年10月、米国食品医薬品局(US FDA)による承認のもと、各種固形がんに対するTelomelysinの第I相臨床試験が開始された。この試験によりTelomelysinの安全性が確認されれば、同様のウイルス機能をもつTelomeScanの安全性も担保される。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およびTelomeScanの有効性が確認され、様々な難治がん治療、がん診断に広く使用されるようになることを期待する。

■ 文 献

- 1) Southam CM: Present status of oncolytic virus studies. *Trans NY Acad Sci*: 657-673, 1960.
- 2) Asada T: Treatment of human cancer with mumps virus. *Cancer* 34: 1907-1928, 1974.
- 3) Hawkins LK, et al: Oncolytic biotherapy: a novel therapeutic platform. *Lancet Oncol* 3: 17-26, 2002.
- 4) Fujiwara T, et al: Multicenter phase I study of repeated intratumoral delivery of adenoviral p53 in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 24: 1689-1699, 2006.
- 5) Kim NW, et al: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011-2015, 1994.
- 6) Shay JW, Bacchetti SA: Survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33: 787-791, 1997.
- 7) Gu J, Fang B: Telomerase promoter-driven cancer gene therapy. *Cancer Biol Ther* 2: S64-70, 2003.
- 8) Branca MA: Gene therapy: cursed or inching towards credibility? *Nat Biotechnol* 23: 519-521, 2005.
- 9) Goodrum FD, Ornelles DA: p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J Virol* 72: 9479-9490, 1998.
- 10) Rothmann T, et al: Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J Virol* 72: 9470-9478, 1998.
- 11) Jia H, Kling J: China offers alternative gateway for experimental drugs. *Nat Biotechnol* 24: 117-118, 2006.
- 12) Nakayama J, et al: Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* 18: 65-68, 1998.
- 13) Janknecht R: On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells. *FEBS Lett* 564: 9-13, 2004.
- 14) Kawashima T, et al: Tumor-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin Cancer Res* 10: 285-292, 2004.
- 15) Umeoka T, 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) Sowa M, et al: Surgical approach to early gastric cancer with lymph node metastasis. *World J Surg* 13: 630-635, 1989.

- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) Kishimoto H, et al: *In vivo* imaging of lymph node metastasis with telomerase-specific replication-selective adenovirus. *Nat Med* 12: 1213-1219, 2006.