

200712009B

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

がん特異的増殖機能を有するウイルス製剤と高感度GFP蛍光
検出装置を用いた体外超早期がん診断および体内微小リンパ節
転移診断システムに関する研究

(H17-ナノ-一般-04)

平成17~19年度 総合研究報告書

主任研究者 藤原 俊義

平成20 (2008) 年 4月

目 次

I.	総合研究報告 -----	1
	「がん特異的増殖機能を有するウイルス製剤と高感度GFP蛍光検出装置を用いた 体外超早期がん診断および体内微小リンパ節転移診断システムに関する研究」	
II.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	13
III.	研究成果の刊行物・別刷 -----	15

がん特異的増殖機能を有するウイルス製剤と高感度GFP蛍光検出装置を用いた 体外超早期がん診断および体内微小リンパ節転移診断システムに関する研究

主任研究者 藤原 俊義（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・准教授）

【研究要旨】

近年増加を続けるがん患者の生存率や治療成績の向上には、早期発見、適格な悪性度の予知、適切な治療方針の決定が重要な因子となる。特に、微小リンパ節転移の検出は患者のQOLを重視した必要最小限の低侵襲外科手術の確立に役立つ。本研究では、テロメラーゼ活性（hTERT遺伝子発現）依存性のがん細胞で選択的に増殖し、オワンクラゲ由来の蛍光遺伝子GFP（Green Fluorescence Protein）を発現する改変アデノウイルス製剤 TelomeScan（Telomelysin-GFP、OBP-401）を標識薬剤とし、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・システムを開発する。まず、マウスモデルにおける微小リンパ節転移の検出の研究では、ヒト大腸がん細胞とヌードマウスを用いた同所性直腸がんモデルにおいて、TelomeScan製剤を直腸腫瘍に投与することで高感度に大動脈周囲の微小転移リンパ節がGFP蛍光にて可視化された。感度は、sensitivity 92.3%、specificity 86.6%であり、1 mm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。また、プローブ型の高感度GFP蛍光検出装置の試作機を作成し、操作性や検出範囲の妥当性、GFP蛍光強度と検出感度との相関などを検討してきた。第3号試作機では、レンズと蛍光励起のためのLEDを内蔵した先端プローブを軽量イメージファイバーで本体のカラーCCDカメラと接続することで、径6.6mmの撮像面積と34万画素の高解像度を実現した。TelomeScanと同様の蛍光波長を持つ蛍光ビーズを代替としたマウスおよび自然発症がんのイヌ実験では、患部近傍に蛍光ビーズを注入することで高感度に所属リンパ節を描出することが可能であった。このプローブ型高感度GFP蛍光検出装置とTelomeScan製剤を組み合わせることにより、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と期待される。

分担研究者：

田中 紀章
（岡山大学大学院医歯学総合研究科腫瘍制御学講座）
浦田 泰生
（オンコリスバイオファーマ・代表取締役社長）
永井 勝幸
（オンコリスバイオファーマ・神戸研究センター長）
河村 仁
（オンコリスバイオファーマ・事業開発部長）

A. 研究目的

日本人の主要な死因が感染症から成人病、いわゆる生活習慣病へと移行する中で、特にがんは1981年以来日本人の死亡原因の第1位となっており、今後の本邦のがん罹患数は2015年には男性55万4000人、女性33万6000人となると推測されている。がん患者の生存率や治療成績の向上には、早期発見、適格な悪性度の予知、適切な治療方針の決定が重要な因子となる。特に、微小リンパ節転移の検出は患者のQOLを重視した必要最小限の低侵襲外科手術の確立に役立つ。

本研究では、テロメラーゼ活性依存性のがん細胞で選択的に増殖してオワンクラゲ由来の蛍光遺伝子GFP（Green Fluorescence Protein）を発現する改変ア

デノウイルス製剤 TelomeScan（OBP-401）を標識薬剤とし、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・システムとしての有効性を検討する。微小リンパ節転移検出のためには、内視鏡などのアクセスを用いてTelomeScanを原発腫瘍内に局所投与することでリンパ流を経由するウイルスの所属リンパ節への拡散を促す。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あるいは開腹にて転移リンパ節を可視化することができる。肺がんや胃がんなどの進行固形がん手術の際に、TelomeScanはリンパ節内の微小転移巣で増殖しGFP蛍光を発するため、原発巣周辺の組織にプローブを接触させることで転移リンパ節を検出することができ、リンパ節廓清範囲決定の有効な指標となると期待される。胸膜あるいは腹膜播種病巣の検出には、胸腔や腹腔などの体腔内にTelomeScanを投与し、同様に一定期間の後に高感度GFP蛍光検出装置にて観察する。微小播種巣では選択的にTelomeScanが感染・増殖するため、肉眼では検出できない微小病巣を確認することができる。

医療機器としてのプローブ型高感度GFP蛍光検出装置を開発するとともに、TelomeScanの生物製

検証を行い、将来的なトランスレーショナル・リサーチを経て実用化を目指す。

B. 研究方法

1) TelomeScan (OBP-401)の作成

TelomeScanは幼児の「かぜ」症状の原因となるアデノウイルス5型を基本骨格とし、テロメラーゼ構成成分であるhTERT (human telomerase reverse transcriptase)遺伝子のプロモーターの下流にウイルス増殖に必須のE1AおよびE1B遺伝子がIRES配列で連結して組み込まれている。また、ウイルスゲノムのE3領域に、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターとオワンクラゲ由来のGFP (Green Fluorescent Protein)蛍光発現遺伝子が挿入されている (図1)。

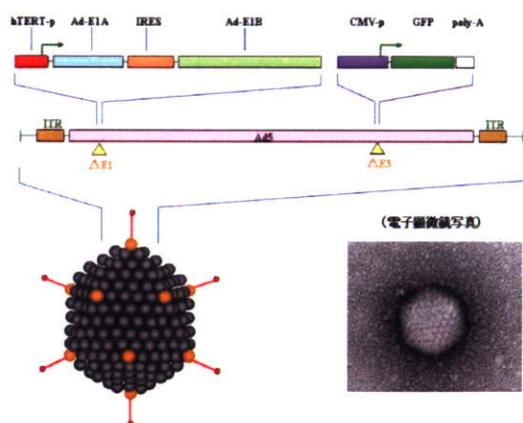


図1 TelomeScanの構造と概観

2) TelomeScan感染ヒトがん細胞での経時的GFP蛍光発現と細胞形態の変化

H1299ヒト非小細胞肺癌細胞に10 MOI (multiplicity of infection)の濃度のTelomeScanを感染させ、タイムラプス画像解析装置を用いて経時的に細胞形態の変化と蛍光発現を観察した。タイムラプス画像解析装置は、蛍光観察機能付き倒立顕微鏡、高感度CCDカメラ、CO₂および温度コントローラーと画像処理ソフトを備えている。顕微鏡舞台上で細胞を培養しつつ、一定時間おきに位相差視野および蛍光視野で細胞を連続的に観察記録することが可能である。

3) マウス同所性直腸がんモデルにおける微小転移リンパ節検出の検討

ヒト大腸がん細胞株HT29をヌードマウスの直腸に移植して約4-6週間置くと、傍大動脈リンパ節に高率に転移が発生する。この大腸がんリンパ節転移モデルを用いて、まず原発巣に投与したウイルス液が所属リンパ節に到達可能か否かを、青色色素によって確認した。さらに、 1×10^8 PFUのTelomeScanを腫瘍内に投与し、5日後に開腹して転移リンパ節のGFP蛍光を高感度CCDカメラにて観察

した。さらに、摘出リンパ節を組織学的に検討して、実際の転移陽性リンパ節個数を同定した。複数のマウスにて同実験を繰り返し、sensitivityおよびspecificityを確認した。

4) プローブ型高感度GFP蛍光検出装置の試作

a) 第1号試作機

プローブ型GFP蛍光検出装置の第1号試作機を作成した。プローブ内にインパクトロンCCDカメラと蛍光励起用青色抗原を内蔵し、プローブ先端には多重コート処理保護ガラスを装着した。このプローブユニットをカメラコントロールユニットに接続し、さらにビデオキャプチャーボードを介して画像処理用のパソコン本体に連結した。パソコンで処理された画像は、2色画像にてディスプレイ上に描出される。

b) 第2号試作機

第2号試作機では、プローブにはレンズとLEDのみを内蔵し、イメージファイバーでつないだ本体にカラーCCDカメラを設置する方法を採用した。

c) 第3号試作機

ファイバー形状を金属ブレードからPVCチューブと軽量化して柔軟性を持たせ、さらに撮像面積も広げた。

5) 大動物によるプローブ型高感度蛍光検出装置の機能検証

試作機を用いて大動物での実験を考えたが、担がん大動物を実験的に準備することは困難であるため、まずTelomeScanと同様の蛍光を発する蛍光ビーズを調達した。直径50 nmから500 nmまでの各種サイズのFluoresbrite Carboxylate Microspheres (フナコシ)を準備した。

東京農工大腫瘍科の伊藤博教授との共同研究で、飼主の同意を得た上で、担がんイヌの手術の際に蛍光ビーズを患部に注入し、所属リンパ節を蛍光にて確認しながら切除を行うセンチネル・ナビゲーション手術を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究は「ヒトのクローンに関する研究等」に該当するおそれはないと判断される。本研究に用いるTelomeScanは、「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令 (平成16年文部科学省・環境省令第1号)」の「別表第一 (第四条関係)」における「へ 自立的な増殖力及び感染力を保持したウイルス又はウイロイド」に相当する。したがって、本研究は「大臣確認実験」となるため、平成16年8月に「第二種使用等拡散防止措置確認申請書」を作成、学内の担当部署での検討の後

認申請書」を作成、学内の担当部署での検討の後に文部科学省に申請し、研究計画の実施が承認されている。

C. 研究結果

1) TelomeScan (OBP-401)の機能

TelomeScanには、hTERTプロモーターの下流にウイルス増殖に必須のE1AおよびE1B遺伝子がIRES配列で連結して組み込まれている。また、ウイルスゲノムのE3領域に、CMVプロモーターとGFP遺伝子が挿入されている(図1)。TelomeScanはがん細胞で選択的に増殖し、GFP蛍光を発するとともに、最終的には細胞死を誘導する。一方、テロメラーゼ活性を持たない正常細胞では、その増殖は抑制され、GFPもみられず、細胞死も生じることではない。

2) TelomeScan感染ヒト癌細胞での経時的GFP蛍光発現と細胞形態の変化

ヒト培養肺癌細胞H1299に10 MOIのTelomeScanを感染させ、位相差視野と蛍光視野でタイムラプス観察を行った。感染後20時間からGFP蛍光発現が認められ、40時間後にはほぼすべての細胞がGFP蛍光陽性となった。その後、50時間後から細胞は光沢を伴って円形化し、シャーレから浮遊して細胞死に至ることが明らかとなった。

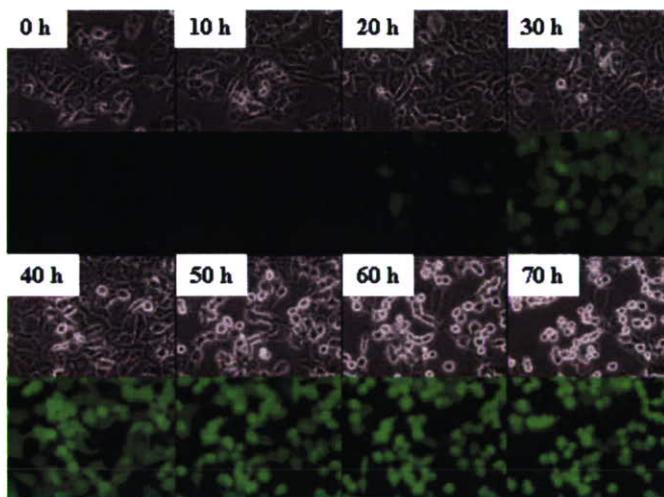


図2 TelomeScanによる選択的GFP発現

hTERT遺伝子とアデノウイルスE1A遺伝子を標的とする定量的PCR析を用いた解析では、一部の細胞においてはテロメラーゼ活性(hTERT遺伝子発現)とTelomeScanの増殖は相関しており、がん細胞での選択的GFP発現はウイルス増殖に由来すると確認された。また、H1299ヒト肺癌細胞、SW620ヒト大腸がん細胞ではTelomeScanは感染後24時間以内に10~100万倍に増殖したが、正常ヒト肺線維芽細胞(NHLF, normal human lung fibroblast)ではその増殖は3日後にも1000倍程度であり、がん細胞での

選択的増殖が認められた。

3) マウス同所性直腸がんモデルにおける微小転移リンパ節検出の検討

a) マウス同所性直腸がんモデルの作成とリンパ節転移

ヒト大腸がん細胞HT29を4-5週齢ヌードマウスの肛門を一部切開し、直腸粘膜下に微細注射針を用いて移植すると、2週間程度で直腸壁外に組織学的に確認可能な同所性直腸がんが形成され、約5-6週間後に大動脈周囲に高頻度にリンパ節転移が認められる(図3)。

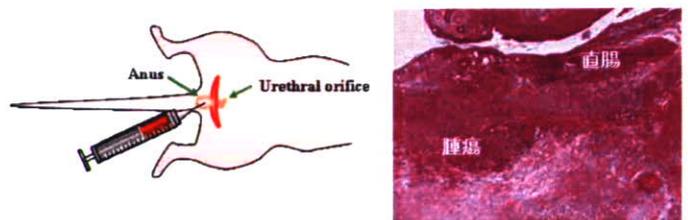
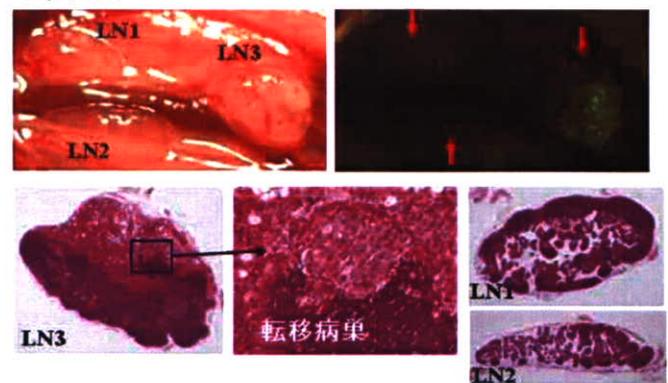


図3 同所性ヒト直腸がんモデル

b) マウス同所性直腸がんモデルにおけるリンパ節転移とGFP蛍光発現

このモデルにおいて、TelomeScan製剤を直腸腫瘍に直接投与し、5日後に開腹し、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。最終的に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(図4)。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(表1)。

マウス#1



マウス#2

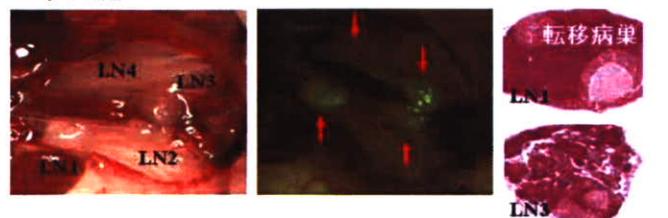


表1 転移リンパ節での GFP 蛍光と組織学的解析

マウス No.	転移	GFP 蛍光		合計 (%)
		陽性	陰性	
#1	陽性	1	0	1 (33.3)
	陰性	0	2	2 (66.6)
#2	陽性	3	0	3 (75.0)
	陰性	0	1	1 (25.0)
#3	陽性	1	0	1 (33.3)
	陰性	0	2	2 (66.6)
#4	陽性	0	0	0 (0)
	陰性	0	4	4 (100)
#5	陽性	1	1	2 (66.6)
	陰性	0	1	1 (33.3)
#6	陽性	3	0	3 (60.0)
	陰性	1	1	2 (40.0)
#7	陽性	3	0	3 (50.0)
	陰性	1	2	3 (50.0)

c) 炎症性リンパ節腫脹でのGFP蛍光発現

また、BALB/c マウスの直腸粘膜下にフロインドアジュバントを注入し、傍大動脈リンパ節の炎症性腫脹 (lymphadenopathy) を誘導し、同時に TelomeScan を投与したところ、5 日後に開腹下に観察しても GFP 陽性リンパ節は認められなかった。すなわち、TelomeScan による GFP 発現はがん病巣に特異的であり、炎症性腫大ではみられないと考えられる。

d) 腫瘍内投与による所属リンパ節への流入

マウス同所性直腸がんモデルにおいて、原発巣へのウイルス投与によるリンパ管内への拡散を確認するため、青色色素の腫瘍内投与を行った。直後に開腹して腹腔内を観察したところ、リンパ節への色素流入が明らかとなった (図5)。

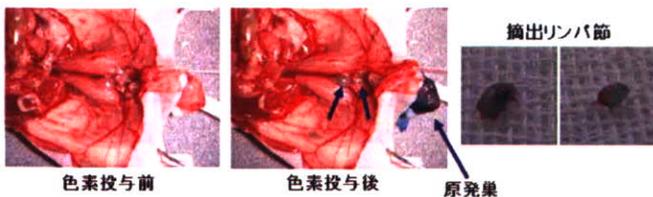


図5 原発腫瘍への投与によるリンパ流への拡散

4) プローブ型高感度GFP蛍光検出装置の試作

a) 第1号試作機

第1号試作機は、プローブ内にレンズとモノクロ CCDカメラ、および蛍光励起のためのLEDを内蔵したため、7 (縦) x 7.5 (横) x 29 (長さ) センチとサイズ的にかなり大型のものとなった。同機でマウス直腸がんリンパ節転移を開腹下に観察したところ、正常組織による自家蛍光がかなりのノイズとなることが判明したため、画像解析ソフトの

蛍光検知閾値を調整することで転移リンパ節のみを高感度に検知することが可能となった (図6)。

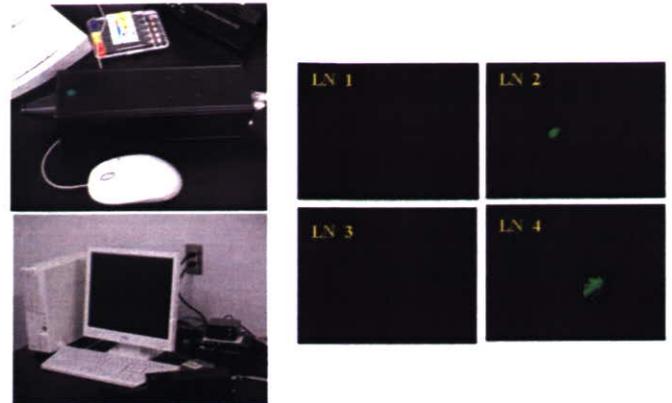


図6 第1号試作機の概観とGFP発現検出

b) 第2号試作機

第2号試作機では、プローブにはレンズとLEDのみを内蔵し、イメージファイバーでつないだ本体にカラーCCDカメラを設置することで、5 (縦) x 5 (横) x 17.4 (長さ) センチとプローブの小型化、軽量化が実現した (図7)。また、プローブ外筒を滅菌対応とすることで清潔操作も可能となった。さらに、フットスイッチにより画像キャプチャーを簡便化し、片手で操作可能とした (図8)。

ただ、イメージファイバーが剛性を有しているため、操作性はやや不良であり、撮像視野面積 (径3.6mm) が狭い点が欠点であった。

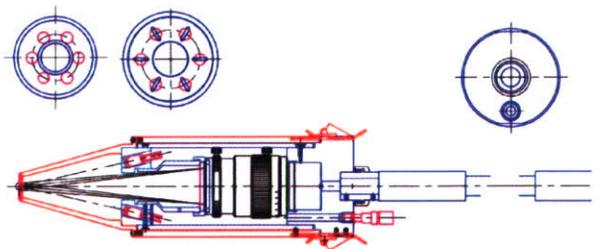


図7 第2号試作機プローブの構造図

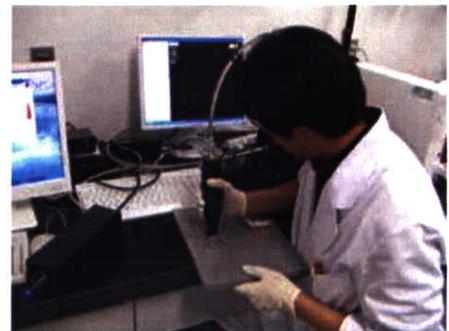


図8 第2号試作機プローブの実験風景

また、画像解析ソフトで微弱な蛍光を色別に表示するカラーディスプレイを採用したことで、極めて容易に蛍光部位を同定することができた (図9)。実際に、ヌードマウスの背部に移植したヒト

示すカラーディスプレイを採用したことで、極めて容易に蛍光部位を同定することができた(図9)。実際に、ヌードマウスの背部に移植したヒト大腸がん皮下腫瘍、および同所性に移植したヒト大腸がんの傍大動脈リンパ節転移を高感度に検出することが可能であった。

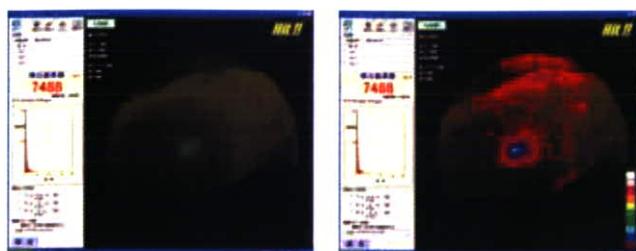


図9 画像解析ソフトによる高感度蛍光検出

c) 第3号試作機

第2号試作機の問題点は、ファイバーの剛性が操作性を損なっていることと、撮像視野面積が径3.6mmと小さく、臨床応用の際のスキャン範囲が限られることであった。そこで、さらにファイバーを軽量化して柔軟性を持たせ、撮像面積も約4倍(径6.6mm)に広げながらも34万画素の高解像度を維持した第3号試作機を作成した(図10)。ファイバー形状が金属ブレードからPVCチューブとなることで剛性が消失し操作性が向上した(図11)。

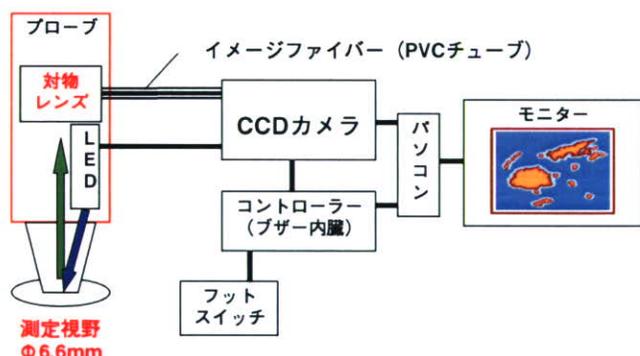


図10 第3号試作機のシステム図



図11 プロブ先端と柔軟なファイバー

マウスを用いた実験では操作性とスキャン範囲は格段に向上しており、2号機と同様の感度で転移リンパ節を描出することが可能であった。

5) 大動物によるプローブ型高感度蛍光検出装置の機能検証

手術野での清潔操作のために、脱着式プローブ外筒を前日ガス滅菌した。術野で細長い滅菌プラスチックバックに清潔な外套を入れ、バックの端をカットしてプローブ先端の接触部を出し、清潔な粘着テープにてプローブ外筒とプラスチックバックを固定した。次いで、プローブ本体をプラスチックバックの内側から外筒に装着し、術野操作に備えた(図12)。



図12 清潔なプローブ先端と蛍光ビーズ

右第5乳腺の腫瘍を持つ雑種犬に、全身麻酔下に腫瘍周辺に50 nmおよび200 nmの蛍光ビーズを注入した(図13)。15分後に体表から頭側に向かって流れるリンパ流に沿ってリンパ節を観察したところ、蛍光強度は弱かったものの、位置を確認することができた(図14)。治療は両側5個ずつの乳腺をすべて摘出する手術となるので、切除の際の皮膚切開部からプローブを当てるとより鮮明に描出可能であった。さらに、切除標本で強い蛍光を発するリンパ節を感知することができ、切除部位にリンパ節の遺残がないことも確認できた。50 nmの蛍光ビーズの方が所属リンパ節への到達速度が速く、30分後にはきわめて鮮明に検出可能であった。



図13 乳腺患部への蛍光ビーズの注入





図15 切開創からのリンパ管描出

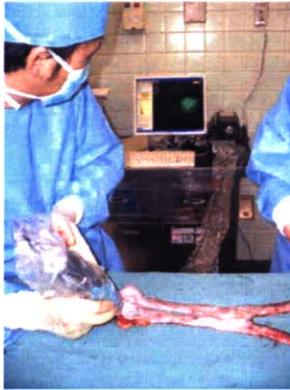


図16 切除標本でのリンパ節確認

前肢骨肉腫のGレトラバーの断脚に際して同様の実験を行い、所属リンパ節を鮮明に描出することが可能であった。すなわち、大動物を対象とした本実験によって、検出機器の感度と操作性を確かめることで臨床での有用性について検証することができたと考える。

D. 考察

ウイルスは本来ヒトの細胞に感染して、その構造蛋白質を産生することで複製・増殖する。その増殖機能に選択性を付加することにより、がん細胞を標識する診断用製剤として用いることが可能となる。「かぜ」症状の原因となるアデノウイルス5型を基本骨格とするTelomeScanは、ウイルス増殖に必須のE1遺伝子をテロメラーゼ構成分子であるhTERT (human telomerase reverse transcriptase) 遺伝子のプロモーターで制御することで、がん細胞のみで増殖するように改変されたウイルス製剤である。さらに、E3領域にGFP遺伝子が組込まれており、がん細胞のみで緑色蛍光を発する。

われわれが標的とするテロメラーゼは80-90%のがんで極めて高い活性の上昇がみられ、正常組織で活性が検出されるリンパ球や小腸上皮での発現レベルは低いため、TelomeScanのがん選択性はかなり厳格かつ広範である。また、TelomeScanはがん細胞で複製・増殖するため、経時的なGFP蛍光強度の増強が期待できることが画期的であり、ウイルスを細胞標識に用いる点が独創的であると言える。さらに、GFPは導入遺伝子発現などの目的で多

くの基礎研究で使用されているため、蛍光顕微鏡やFACSなどの検出技術の開発が進んでおり、TelomeScanのGFP蛍光を高感度に検出する装置の開発は技術的には可能と考えた。

本研究では当初、末梢血中に流れる浮遊がん細胞を高感度に、かつ定量的に検出する体外的超早期がん診断システムを開発することも目的としていた。末梢血中の浮遊がん細胞の検出は原発巣が認識されないがん患者の早期発見に有効であり(Racila *et al*, PNAS 95:4589, 1998)、また悪性度評価に基づく予後の予知にも有用であったと報告されている(Cristofanilli *et al*, N Engl J Med, 351:781, 2004)。1年目には、体外診断として末梢血中の浮遊がん細胞を検出する試みも平行して行った。しかし、動物モデルにおいて体内リンパ節転移診断に関する良好な研究成果が得られ、より体内診断および低侵襲手術のための外科ナビゲーション・システムの開発が現実的となってきたため、2年目以降は体内微小転移診断システムに重点をおいて研究開発を進めた。

TelomeScanを原発腫瘍内に局所投与すると、リンパ流を經由して所属リンパ節へ到達し、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、マウスモデルにおいては一定期間の後に転移リンパ節を可視化することが可能であった。また、平成18年10月から米国ダラスにて、米国食品医薬品庁 (FDA) の承認のもと、TelomeScanとGFP発現カセット以外の基本骨格を同じくする抗がんウイルス製剤 Telomelysinの臨床試験が行われており、その安全性が確認されつつある。この安全性情報は、今後のTelomeScanの臨床研究計画の立案に極めて有用な根拠となると期待される。

プローブ型高感度GFP蛍光検出装置の試作についても、第1号機から第3号機へと改良が進むにつれ、サイズ・重量の軽減やイメージファイバーの柔軟性の実現によって操作性が格段に向上した。また、撮像面積の拡大にも成功し、清潔操作にも対応可能な医療機器として臨床応用も現実的となってきた。実際に、マウスモデルおよび大動物モデルにおいて、TelomeScanと同様の緑色蛍光を発する蛍光ビーズが集積したリンパ節を操作性よく、かつ高感度に検出することが可能であった。

しかし、本技術を開発してきた3年間に、胃がんや肺がんなどの外科治療の主体が開腹・開胸手術から鏡視下手術へと急速に移行してきた。したがって、本研究で開発した接触型プローブによるGFP蛍光検出装置をこれらの手術に応用する機会は明らかに減少してきている。そこで今後は、プローブによる転移リンパ節検出を目指す本技術の対象を、センチネル・ナビゲーションが日常診療に用いられている乳がん、あるいは体表からの検出が

らかに減少してきている。そこで今後は、プローブによる転移リンパ節検出を目指す本技術の対象を、センチネル・ナビゲーションが日常診療に用いられている乳がん、あるいは体表からの検出が有効な肉腫系手術に集約し、臨床的有用性を検討していきたい。センチネルリンパ節はリンパの流れを示すのみで、転移リンパ節特異的な描出が可能なのわけではないため、本技術により転移リンパ節そのものを検出することができれば、リンパ節廓清範囲決定の有効な指標となると期待される。

E. 結論

テロメラーゼ活性依存性のがん細胞で選択的に増殖して蛍光遺伝子GFPを発現する改変アデノウイルス製剤TelomeScanは、標識薬剤として微小リンパ節転移検出外科手術ナビゲーション・システムに応用可能であり、高感度にその蛍光を検出するプローブ型検出器を開発することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

【英文】

1. Taki, M., Kagawa, S., Nishizaki, M., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Kyo, S., Nagai, K., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. Enhanced oncolysis by a tropism-modified telomerase-specific replication selective adenoviral agent OBP-405 ("Telomelysin-RGD"). *Oncogene*, 24: 3130-3140, 2005.
2. Tokunaga, N., Murakami, T., Endo, Y., Nishizaki, M., Kagawa, S., Tanaka, N., Fujiwara, T. Human monocyte-derived dendritic cells pulsed with wild-type p53 protein efficiently induce cytotoxic T-lymphocytes against p53-overexpressing human cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 11, 1312-1318, 2005.
3. Arima, Y., Nitta, M., Kuninaka, S., Zhang, D., Fujiwara, T., Taya, Y., Nakao, M., Saya, H. Transcriptional Blockade Induces p53-dependent Apoptosis Associated with Translocation of p53 to Mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 280: 19166-19176, 2005.
4. Teraishi, F., Kagawa, S., Watanabe, T., Tango, Y., Kawashima, T., Umeoka, T., Nishizaki, M., Tanaka, N., Fujiwara, T. ZD1839 (Gefitinib, 'Iressa'), an epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, enhances the anti-cancer effects of TRAIL in human esophageal squamous cell carcinoma. *FEBS Lett.*, 579: 4069-4075, 2005.
5. Watanabe, T., Hioki, M., Fujiwara, T., Nishizaki, M., Kagawa, S., Taki, M., Kishimoto, H., Endo, Y., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. 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.
6. Takahashi, K., Kohno, T., Ajima, R., Sasaki, H., Minna, J. D., Fujiwara, T., Tanaka, N., Yokota, J. Homozygous deletion and reduced expression of the DOCK8 gene in human lung cancer. *Int. J. Oncol.*, 28: 321-328, 2006.
7. Fujiwara, T., Tanaka, N., Kanazawa, S., Ohtani, S., Saijo, Y., Nukiwa, T., Yoshimura, K., Sato, T., Eto, Y., Chada, S., Nakamura, H., Kato, H. 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.
8. Fujiwara, T., Kagawa, S., Kishimoto, H., Endo, Y., Hioki, M., Ikeda, Y., Sakai, R., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. Enhanced antitumor efficacy of telomerase-selective oncolytic adenoviral agent (OBP-401) with docetaxel: Preclinical evaluation of chemovirotherapy. *Int. J. Cancer*, 119: 432-440, 2006.
9. Kishimoto, H., Kojima, T., Watanabe, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T., Uno, F., Teraishi, F., Kyo, S., Mizuguchi, H., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. *In vivo* imaging of lymph node metastasis with telomerase-specific replication-selective adenovirus. *Nature Med.*, 12, 1213-1219, 2006.
10. Takahashi, K., Kohno, T., Matsumoto, S., Nakanishi, Y., Arai, Y., Yamamoto, S., Fujiwara, T., Tanaka, N., Yokota, J. Clonal and parallel evolution of primary lung cancers and their metastases revealed by molecular dissection of cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 13: 111-120, 2007.
11. Sato, Y., Fujiwara, T., Mine, T., Shomura, H., Homma, S., Maeda, Y., Tokunaga, N., Ikeda, Y., Ishihara, Y., Yamada, A., Tanaka, N., Itoh, K., Harada, M., Todo, S. Immunological evaluation of personalized peptide vaccination in combination with a 5-fluorouracil derivative (TS-1) for advanced gastric or colorectal carcinoma patients. *Cancer Sci.*, 98: 1113-1119, 2007.
12. Kato, H., Honma, R., Sanda, T., Fujiwara, T., Ito, E., Yanagisawa, Y., Imai, J., Okamoto, T., Watamabe, S. Knock down of hSNF5/Ini1 causes cell-cycle arrest and apoptosis in a p53-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 361: 580-585, 2007.
13. Fujiwara, T., Urata, Y., Tanaka, N. Telomerase-specific oncolytic virotherapy for human cancer with the hTERT promoter. *Curr. Cancer Drug Targets*, 7: 191-201, 2007.
14. Endo, Y., Sakai, R., Ouchi, M., Onimatsu, H., Hioki, M., Kagawa, S., Uno, F., Watanabe, Y., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. Virus-mediated oncolysis induces danger signal and stimulates cytotoxic-T-lymphocyte activity via proteasome activator upregulation. *Oncogene*, (in press), 2007.
15. Hashimoto, Y., Watanabe, Y., Shirakiya, Y., Uno, F., Kagawa, S., Kawamura, H., Nagai, K., Tanaka, N., Kumon, H., Urata, Y., Fujiwara, T. Establishment of Biological and Pharmacokinetic Assays of Telomerase-Specific Replication-Selective Adenovirus (TRAD). *Cancer Sci.*, 99:385-390, 2008.
16. Fujiwara, T., Urata, Y., Tanaka, N. Diagnostic and therapeutic application of telomerase-specific oncolytic adenoviral agents. *Front. Biosci.*, 13: 1881-1886, 2008
17. Huang, P., Watanabe, M., Kaku, H., Kashiwakura, Y.,

- Ther.*, (in press), 2008.
18. Hioki, M., Kagawa, S., Fujiwara, T., Ikeda, Y., Kojima, T., Sakai, R., Uno, F., Teraishi, F., Shirakiya, Y., Watanabe, Y., Hashimoto, Y., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. Combination of oncolytic adenovirotherapy and Bax gene therapy in human cancer xenografted models. Potential merits and hurdles for combination therapy. *Int. J. Cancer*, (in press), 2008.
- 【邦文】
1. 藤原俊義、田中紀章：悪性腫瘍に対するウイルス製剤：Telomelysin の開発と臨床応用の可能性。 *Medical Technology* 33: 961-966, 2005.
 2. 藤原俊義、香川俊輔、田中紀章：癌に対する遺伝子治療：肺癌。 *遺伝子診療学（日本臨床 増刊号）* 63: 507-511, 2005.
 3. 藤原俊義、田中紀章：主要癌の遺伝子治療研究の現況：肺癌。 *Biotherapy* 20: 270-279, 2006.
 4. 藤原俊義、田中紀章、浦田泰生：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。 *Biotherapy* 20: 310-317, 2006.
 5. 藤原俊義、田中紀章：GFP 発現ウイルス製剤を用いた消化器癌微小転移の *in vivo* イメージングシステム。 *医学のあゆみ* 220: 659-661, 2007.
 6. 藤原俊義、田中紀章：癌のウイルス療法。 *外科治療「腫瘍外科治療の最前線」* 96 Suppl.: 368-373, 2007.
 7. 藤原俊義、田中紀章：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。 *ゲノム医学* 7: 129-134, 2007.
 8. 藤原俊義、田中紀章：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。 *日本臨床* 65: 1913-1922, 2007.
 9. 藤原俊義：ナノバイオ・ウイルス製剤のがん診断への応用。 *Medical Bio* 4: 39-43, 2007.
 10. 藤原俊義、田中紀章：微小癌転移の *in vivo* イメージング技術。 *Medical Science Digest* 34: 48-49, 2008.
2. 学会発表
- 【国際学会】
1. Fujiwara, T., Tanaka, N., Kawamura, H., Urata, Y. Replication-selective oncolytic adenovirus named Telomelysin, which replication is restricted by hTERT promoter. *ICH Workshop on Oncolytic Viruses*, 2005.
 2. Kishimoto, H., Kagawa, S., Fujiwara, T., Ikeda, Y., Hioki, M., Sakai, R., Nishizaki, M., Nagai, K., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. A novel navigation method to detect tiny neoplastic tissues *in vivo* by adenoviral-mediated telomerase-specific amplification of green fluorescent protein gene. *96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, 2005.
 3. Fujiwara, T., Kagawa, S., Kishimoto, H., Endo, Y., Hioki, M., Sakai, R., Nishizaki, M., Nagai, K., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. Enhanced antitumor efficacy of telomerase-selective oncolytic adenoviral agent (OBP-401) with docetaxel: preclinical evaluation of oncolytic chemovirotherapy. *96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, 2005.
 4. Endo, Y., Ikeda, Y., Sakai, R., Hioki, M., Kishimoto, H., Fujiwara, T., Nishizaki, M., Kagawa, S., Tanaka, N., Fujiwara, T. Conditionally replication-selective adenovirus (OBP-301)-induced oncolysis efficiently loads tumor antigen to dendritic cells. *96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, 2005.
 5. Kishimoto, H., Kagawa, S., Fujiwara, T., Ikeda, Y., Hioki, M., Sakai, R., Uno, F., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. A novel navigation method to detect cancer metastasis *in vivo* by adenoviral-mediated telomerase-specific amplification of green fluorescent protein gene. *18th Asia Pacific Cancer Conference*, 2005.
 6. Endo, Y., Ikeda, Y., Sakai, R., Hioki, M., Kishimoto, H., Fujiwara, T., Kagawa, S., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. Conditionally replication-selective adenovirus (OBP-301)-induced oncolysis efficiently loads tumor antigen to dendritic cells. *18th Asia Pacific Cancer Conference*, 2005.
 7. Fujiwara, T., Kagawa, S., Kishimoto, H., Endo, Y., Hioki, M., Sakai, R., Uno, F., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. Enhanced antitumor efficacy of telomerase-selective oncolytic adenoviral agent (OBP-401) with docetaxel: preclinical evaluation of oncolytic chemovirotherapy. *18th Asia Pacific Cancer Conference*, 2005.
 8. Hashimoto, Y., Teraishi, F., Watanabe, Y., Kagawa, S., Kawamura, H., Nagai, K., Tanaka, N., Urata, Y., Fujiwara, T. Development of telomerase specific antineoplastic adenovirus Telomelysin (OBP-301): Establishment of useful assay and assessment for antitumor activity. *9th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy*, 2006.
 9. Sakai, R., Teraishi, F., Kojima, T., Ikeda, Y., Hioki, M., Fujiwara, T., Uno, F., Kagawa, S., Hashimoto, Y., Watanabe, Y., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. Combination effect of telomerase-specific replication-competent adenovirus (Telomelysin, OBP-301) and p53 gene therapy in human non-small cell lung and colon cancer cells. *9th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy*, 2006.
 10. Ikeda, Y., Fujiwara, T., Kagawa, S., Hioki, M., Sakai, R., Kojima, T., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. Enhanced antitumor efficacy of telomerase-selective oncolytic adenoviral agent (OBP-401) with docetaxel: Preclinical evaluation of chemovirotherapy. *9th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy*, 2006.
 11. Watanabe, Y., Hashimoto, Y., Kojima, T., Kagawa, S., Kawamura, H., Nagai, K., Tanaka, N., Urata, Y., Fujiwara, T. Antitumor effect of telomerase-specific virotherapy in pleural dissemination of human malignant mesothelioma. *9th Annual Meeting of*

- Kawamura, H., Nagai, K., Tanaka, N., Urata, Y., Fujiwara, T. Antitumor effect of telomerase-specific virotherapy in pleural dissemination of human malignant mesothelioma. *9th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy*, 2006.
12. Kojima, T., Kishimoto, H., Watanabe, Y., Kagawa, S., Teraishi, F., Hioki, M., Ikeda, Y., Sakai, R., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. *In vivo* imaging of lymph node metastasis with telomerase-specific replication-competent adenovirus containing green fluorescent protein gene. *9th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy*, 2006.
 13. Hioki, M., Kagawa, S., Fujiwara, T., Ikeda, Y., Kojima, T., Sakai, R., Uno, F., Teraishi, F., Shirakiya, Y., Watanabe, Y., Hashimoto, Y., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. Combination of oncolytic adenovirotherapy and Bax gene therapy does not augments antitumor efficacy. *9th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy*, 2006.
 14. Kagawa, S., Fujiwara, T., Saijo, Y., Nukiwa, T., Yoshimura, K., Nakamura, H., Kato, H., Tanaka, N., A multicenter phase I study of adenoviral p53 in Japanese patients with advanced non-small cell lung cancer. *42nd Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology*, 2006.
 15. Uno, F., Fujiwara, T., Kagawa, S., Teraishi, F., Jayachandra, G., Roth, J. A., Ji, L. Activation of apoptosis signaling pathway by direct interaction between tumor suppressor Fus1 and Apaf-1 proteins in lung cancer cells. *2006 International Society of Cell and Gene Therapy Japan*, 2006.
 16. Teraishi, F., Hashimoto, Y., Kojima, T., Uno, F., Kagawa, S., Gouchi, A., Fujiwara, T., Tanaka, N. Potential role of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) as diagnostic marker and target for virotherapy in human gastrointestinal stromal tumor (GIST). *2006 International Society of Cell and Gene Therapy Japan*, 2006.
 17. Watanabe, Y., Hashimoto, Y., Kojima, T., Kagawa, S., Kawamura, H., Hagai, K., Tanaka, N., Urata, Y., Fujiwara, T. Antitumor effect of telomerase-selective oncolytic adenoviral agent OBP-301 (Telomelysinb) in pleural dissemination of human malignant mesothelioma. *2006 International Society of Cell and Gene Therapy Japan*, 2006.
 18. Fujiwara, T., Urata, Y. Telomerase-specific oncolytic virotherapy for human cancer with hTERT promoter. *15th International Conference on Gene Therapy of Cancer*, 2007.
 19. Kojima, T., Watanabe, Y., Hashimoto, Y., Sakai, R., Kuroda, S., Uno, F., Kagawa, S., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. Telomerase-specific virotherapy targeting lymph node metastasis of gastrointestinal cancer. *10th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy*, 2007.
 20. Ouchi, M., Kawamura, H., Nagai, K., Urata, Y., Fujiwara, T. Antiviral activity of cidofovir against telomerase-specific replication-competent adenovirus, Telomelysin (OBP-301). *10th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy*, 2007.
 21. Watanabe, Y., Hashimoto, Y., Kagawa, S., Kawamura, H., Nagai, K., Tanaka, N., Urata, Y., Fujiwara, T. Valproic acid (VPA) enhances the antitumor effect of telomerase-specific replication-competent adenoviral agent OBP-301 (Telomelysin) in human lung cancer cells. *10th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy*, 2007.
 22. Hashimoto, Y., Teraishi, F., Watanabe, Y., Sakai, R., Kuroda, S., Kagawa, S., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. Assessment for antitumor activity of telomerase-specific oncolytic virotherapy in the hypoxic microenvironment. *10th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy*, 2007.
 23. Kuroda, S., Fujiwara, T., Watanabe, Y., Hashimoto, Y., Kojima, T., Sakai, R., Ouchi, M., Uno, F., Onimatsu, H., Urata, Y., Kagawa, S., Tanaka, N., Fujiwara, T. Mutual sensitization with telomerase-specific oncolytic virotherapy and ionizing radiation in cytotoxic activity against human cancer. *10th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy*, 2007.
 24. Kagawa, S., Watanabe, Y., Hashimoto, Y., Kojima, T., Uno, F., Kuroda, S., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. Antitumor effect of telomerase-selective oncolytic adenoviral agent OBP-301 (Telomelysin) in pleural dissemination of human malignant mesothelioma. *12th World Conference on Lung Cancer*, 2007.
 25. Kuroda, S., Fujiwara, T., Kagawa, S., Uno, F., Kojima, T., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. Mutual sensitization with telomerase-specific oncolytic virotherapy and ionizing radiation in cytotoxic activity against human cancer. *12th World Conference on Lung Cancer*, 2007.
- 【国内学会】
1. 岸本浩行、香川俊輔、藤原俊哉、渡辺貴紀、遠藤芳克、日置勝義、京哲、水口裕之、田中紀章、藤原俊義：GFP 発現テロメラーゼ特異的制限増殖型ウイルス Telomelysin-GFP を用いた腫瘍組織ナビゲーション・システム。第9回遺伝子医療研究会、2005。
 2. 藤原俊哉、香川俊輔、岸本浩行、遠藤芳克、水口裕之、田中紀章、藤原俊義：テロメラーゼ特異的制限増殖型アデノウイルス Telomelysin と微小管作用型抗癌剤の併用効果の検討。第9回遺伝子医療研究会、2005。
 3. 橋本悠里、香川俊輔、藤原俊義、向井伸枝、白木屋佳子、永井勝幸、河村仁、浦田泰生：テロメラーゼ特異的制限増殖型アデノウイルス Telomelysin (OBP-301) の各種ヒトがん細胞に対する抗腫瘍効果の検討。第9回遺伝子医療研究会、2005。
 4. Kagawa, S., Fujiwara, T., Kishimoto, H., Endo, Y., Hioki, M., Sakai, R., Kawamura, H., Nagai, K., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. Enhanced antitumor efficacy of telomerase-selective oncolytic adenoviral agent with docetaxel: preclinical evaluation of oncolytic chemovirotherapy. 第11回日本遺伝子治療学会 (シンポジウム)、2005。

- ラーゼ特異的制限増殖型アデノウイルス
Telomelysin (PBP-301)の抗腫瘍効果の検討. **第64回日本癌学会学術総会 (ワークショップ)**、2005.
6. 藤原俊哉、藤原俊義、香川俊輔、岸本浩行、遠藤芳克、酒井亮、日置勝義、池田義博、浦田泰生、田中紀章：抗癌剤耐性細胞におけるテロメラーゼ特異的制限増殖型アデノウイルス Telomelysin (PBP-301)の抗腫瘍効果の検討. **第64回日本癌学会学術総会 (ワークショップ)**、2005.
 7. 日置勝義、遠藤芳克、池田義博、香川俊輔、田中紀章、藤原俊義：悪性腫瘍に対するウイルス製剤 Telomelysin の開発と臨床応用の可能性：腫瘍免疫系への影響の解析. **第18回日本バイオセラピー学会学術集会総会 (ワークショップ)**、2005.
 8. 遠藤芳克、徳永尚之、池田義博、酒井亮、日置勝義、岸本浩行、藤原俊哉、香川俊輔、田中紀章、藤原俊義：テロメラーゼ特異的腫瘍融解アデノウイルス (Telomelysin: PBP-301) の新たな抗腫瘍分子機構の解析. **第26回癌免疫外科研究会**、2005.
 9. 橋本悠里、河村仁、永井勝幸、向井伸枝、白木屋佳子、渡邊雄一、香川俊輔、田中紀章、藤原俊義、浦田泰生：テロメラーゼ特異的制限増殖型アデノウイルス Telomelysin (OBP-301)の開発：アッセイ系の確立と広範な抗癌活性の検証. **第64回日本癌学会学術総会**、2005.
 10. 遠藤芳克、徳永尚之、池田義博、酒井亮、日置勝義、岸本浩行、藤原俊哉、香川俊輔、浦田泰生、田中紀章、藤原俊義：テロメラーゼ特異的腫瘍融解アデノウイルス (Telomelysin: OBP-301) の新たな抗腫瘍分子機構：腫瘍免疫系への影響の解析. **第64回日本癌学会学術総会**、2005.
 11. 藤原俊義、寺石文則、香川俊輔、宇野太、齊藤達也、田中紀章：A novel method for gene delivery and expression in esophageal epithelium with fibrin glues containing replication-deficient adenovirus vector. **第58回日本胸部外科学会定期学術集会**、2005.
 12. 藤原俊義、岸本浩行、香川俊輔、宇野太、田中紀章、河村仁、浦田泰生：発現テロメラーゼ依存性 GFP 蛍光発現ウイルス製剤 OBP-401 を用いた微小癌組織ナビゲーション・システムの開発. **第43回日本癌治療学会総会**、2005.
 13. 香川俊輔、常光洋輔、宇野太、寺石文則、合地明、田中紀章、藤原俊義：胃癌に対する gene-virotherapy：トランスレーショナルリサーチをめざした前臨床研究. **第78回日本胃癌学会総会 (ワークショップ)**、2006.
 14. 香川俊輔、常光洋輔、宇野太、寺石文則、合地明、田中紀章、藤原俊義：胃癌に対する gene-virotherapy：トランスレーショナルリサーチをめざした前臨床研究. **第78回日本胃癌学会総会 (ワークショップ)**、2006.
 15. 児島亨、藤原俊義、岸本浩行、橋本悠里、香川俊輔、宇野太、浦田泰生、田中紀章、：テロメラーゼ特異的 GFP 蛍光発現ウイルス製剤 OBP-401 を用いた消化器癌微小転移の *in vivo* イメージング・システムの開発. **第106回日本外科学会定期学術集会 (ワークショップ)**、2006.
 16. 藤原俊義、香川俊輔、宇野太、寺石文則、浦田泰生、田中紀章：消化器癌に対するテロメラーゼ活性を標的とした新規ウイルス療法の開発と臨床応用の可能性. **第61回日本消化器外科学会定期学術総会 (パネルディスカッション)**、2006.
 17. 藤原俊義、渡辺雄一、橋本悠里、香川俊輔、宇野太、寺石文則、浦田泰生、田中紀章：悪性胸膜中皮腫に対するテロメラーゼ活性を標的とした新規腫瘍融解ウイルス療法の開発と臨床応用の可能性. **第44回日本癌治療学会総会 (ワークショップ)**、2006.
 18. 藤原俊義、香川俊輔、宇野太、寺石文則、合地明、浦田泰生、田中紀章：GFP 発現ウイルス製剤 OBP-401 を用いた消化器癌微小転移の *in vivo* イメージング・システムの開発. **第78回日本胃癌学会総会**、2006.
 19. 藤原義朗、木浦勝行、田端雅弘、瀧川奈義夫、堀田勝幸、藤原慶一、梅村茂樹、岸野大蔵、片山英樹、上岡博、藤原俊義、豊岡伸一、青江基、伊達洋至、谷本光音：肺非小細胞肺癌術後再発例に対する放射線化学療法の有用性に関する検討. **第4回日本臨床腫瘍学会総会**、2006.
 20. 寺石文則、B. Fang、J. Liu、白澤専二、笹月健彦、香川俊輔、藤原俊義、田中紀章：K-ras 変異型腫瘍に対するプロテアソームインヒビター bortezomib の有用性およびその作用機序に関する検討. **第106回日本外科学会定期学術集会**、2006.
 21. 寺石文則、宇野太、香川俊輔、藤原俊義、合地明、田中紀章：胃原発性 GIST の臨床病理学および免疫組織学的検討—hTERT の発現の検討を中心に— . **第61回日本消化器外科学会定期学術総会**、2006.
 22. Kagawa, S., Hioki, M., Sakai, R., Tanaka, N., Fujiwara, T., Combination effect of oncolytic adenovirus, OBP-301, and proapoptotic gene therapy: potential synergies and hurdles for arming oncolytic adenovirus with therapeutic genes. **第12回日本遺伝子治療学会**、2006.
 23. Teraishi, F., Kagawa, S., Fujiwara, T., Tanaka, N. JNK2 deficient cells acquire high adenoviral infectivity and adenovirus-mediated transgene expression. **第12回日本遺伝子治療学会**、2006.
 24. 寺石文則、橋本悠里、児島亨、宇野太、香川俊輔、藤原俊義、合地明、田中紀章：胃原発性 GIST 切除例の臨床病理学的検討—hTERT の発現およびその標的治療分子となる可能性の検討を中心に— . **第81回中国四国外科学会総会**、2006.
 25. 香川俊輔、藤原俊義、宇野太、寺石文則、合地明、田中紀章：限局性腹膜炎を呈した胃異所性

- 中心に一. 第81回中国四国外科学会総会, 2006.
25. 香川俊輔、藤原俊義、宇野太、寺石文則、合地明、田中紀章：限局性腹膜炎を呈した胃異所性腺の一例. 第81回中国四国外科学会総会, 2006.
 26. 池田義博、日置勝義、酒井亮、児島亨、香川俊輔、宇野太、寺石文則、浦田泰生、田中紀章、藤原俊義：テロメラーゼ依存性腫瘍融解ウイルス OBP-301 (Telomelysin) の宿主機能を介した血管新生抑制効果の検討. 第65回日本癌学会学術総会, 2006.
 27. 橋本悠里、渡邊雄一、香川俊輔、寺石文則、河村仁、永井勝幸、田中紀章、浦田泰生、藤原俊義：バルプロ酸ナトリウム (デパケン) による腫瘍融解ウイルス製剤 OBP-301 の抗腫瘍活性の増強とその分子機構の解析. 第65回日本癌学会学術総会, 2006.
 28. 児島亨、藤原俊義、岸本浩行、橋本悠里、香川俊輔、宇野太、浦田泰生、田中紀章：テロメラーゼ特異的 GFP 発現ナノバイオ・ウイルス製剤 (OBP-401) を用いた微小癌組織の *in vivo* イメージング・システム. 第65回日本癌学会学術総会, 2006.
 29. 酒井亮、香川俊輔、宇野太、寺石文則、日置勝義、池田義博、児島亨、浦田泰生、田中紀章、藤原俊義：p53 遺伝子治療におけるテロメラーゼ依存性ナノバイオ・ウイルス製剤 OBP-301 (Telomelysin) の併用効果. 第65回日本癌学会学術総会, 2006.
 30. 日置勝義、香川俊輔、宇野太、寺石文則、池田義博、児島亨、酒井亮、橋本悠里、浦田泰生、田中紀章、藤原俊義：TRAIL 発現制限増殖型アデノウイルスを用いた胃癌に対するウイルス療法 of 検討. 第65回日本癌学会学術総会, 2006.
 31. 渡邊雄一、橋本悠里、児島亨、香川俊輔、河村仁、永井勝幸、田中紀章、浦田泰生、藤原俊義：悪性胸膜中皮腫に対するテロメラーゼ依存性腫瘍融解アデノウイルス OBP-301 (Telomelysin) の抗腫瘍効果の検討. 第65回日本癌学会学術総会, 2006.
 32. 高橋健司、河野隆志、松本慎吾、中西幸浩、新井康仁、藤原俊義、田中紀章、横田 淳：肺がん転移巣に蓄積している遺伝子異常の全ゲノム探索. 第65回日本癌学会学術総会, 2006.
 33. 高倉正博、京哲、中村充宏、毎田佳子、橋本学、水本泰成、藤原俊義、浦田 泰生、井上正樹：腫瘍特異的増殖性アデノウイルスによる卵巣癌治療の試み. 第65回日本癌学会学術総会, 2006.
 34. 藤原俊義、渡邊雄一、橋本悠里、香川俊輔、宇野太、寺石文則、浦田泰生、田中紀章：テロメラーゼ活性を標的とした新規腫瘍融解ウイルスによる悪性胸膜中皮腫の診断と治療. 第47回日本肺癌学会総会, 2006.
 35. 香川俊輔、日置勝義、宇野太、寺石文則、児島亨、酒井亮、黒田新士、田中紀章、藤原俊義：ヒト胃癌細胞に対する TRAIL 発現腫瘍溶解ウイルス療法. 第79回日本胃癌学会総会 (ワークショップ)、2007.
 36. 児島亨、藤原俊義、渡邊雄一、橋本悠里、酒井亮、黒田新士、浦田泰生、宇野太、香川俊輔、田中紀章：消化器癌の微小リンパ節転移を標的とする新規ウイルス製剤 OBP-301 による治療開発. 第107回日本外科学会定期学術集会 (シンポジウム)、2007.
 37. Fujiwara, T., Kagawa, S., Tanaka, N., Mizuguchi, H., Urata, Y., Theranostic application of telomerase-specific oncolytic adenoviral agents. 第13回日本遺伝子治療学会 (Clinical Research Enterprise)、2007.
 38. 藤原俊義、浦田泰生、田中紀章：In vivo imaging of lymph node metastasis with telomerase-specific replication-selective adenovirus expressing GFP gene. 第66回日本癌学会学術総会 (シンポジウム)、2007.
 39. 藤原俊義、浦田泰生、田中紀章：ナノバイオ・ウイルス製剤のがん診断・治療への応用. 第45回日本癌治療学会総会 (シンポジウム)、2007.
 40. 香川俊輔、日置勝義、池田義博、児島亨、酒井亮、宇野太、寺石文則、橋本悠里、浦田泰生、田中紀章、藤原俊義：胃癌腹膜播種に対する TRAIL 発現 oncolytic adenovirus の抗腫瘍効果. 第107回日本外科学会定期学術集会, 2007.
 41. 寺石文則、橋本悠里、児島亨、宇野太、香川俊輔、合地明、田中紀章、藤原俊義：切除不能 gastrointestinal stromal tumor (GIST) に対する制限増殖型アデノウイルス (Telomelysin) を用いた新規癌ウイルス療法 of 確立. 第107回日本外科学会定期学術集会, 2007.
 42. Watanabe, Y., Hashimoto, Y., Kagawa, S., Kawamura, H., Nagai, K., Tanaka, N., Urata, Y., Fujiwara, T. Enhanced antitumor efficacy of telomerase-specific replication-competent adenoviral agent OBP-301 with valproic acid (VPA) in human lung cancer cells. 第13回日本遺伝子治療学会, 2007.
 43. Hashimoto, Y., Teraishi, F., Watanabe, Y., Sakai, R., Kuroda, S., Kagawa, S., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. Assessment for antitumor activity of telomerase-specific oncolytic virotherapy in the hypoxic microenvironment. 第13回日本遺伝子治療学会, 2007.
 44. 児島亨、渡邊雄一、橋本悠里、黒田新士、宇野太、香川俊輔、浦田泰生、田中紀章、藤原俊義：Telomerase-specific virotherapy targeting lymph node micrometastasis of human cancer. 第66回日本癌学会学術総会, 2007.
 45. 岸本浩行、Zhao Ming、林克洋、浦田泰生、藤原俊義、Michael Bouvet、Robert M. Hoffman：Screening of RFP tumor cell lines for sensitivity to the telomerase-specific replicating adenovirus expressing GFP. 第66回日本癌学会学術総会, 2007.
 46. 橋本悠里、寺石文則、渡邊雄一、河村仁、浦田泰生、田中紀章、藤原俊義：Telomerase-specific oncolytic virotherapy for human tumor cells in the hypoxic microenvironment. 第66回日本癌学会学

Visualization of cancer cells with telomerase-specific replicating adenovirus and its application to cancer screening. 第66回日本癌学会学術総会、2007.

48. 鬼松秀樹、河村仁、渡邊雄一、橋本悠里、大内正明、一丸大樹、永井勝幸、田中紀章、浦田泰生、藤原俊義：Preclinical characterization of OBP-301: in vitro and in vivo cytopathic activity with or without E3 region. 第66回日本癌学会学術総会、2007.
49. 大内正明、河村仁、渡邊雄一、橋本悠里、鬼松秀樹、一丸大樹、永井勝幸、田中紀章、浦田泰生、藤原俊義：Antiviral activity of cidofovir against telomerase-specific replication-competent adenovirus, OBP-301 (Telomelysin). 第66回日本癌学会学術総会、2007.
50. 黒田新士、藤原俊哉、児島亨、渡邊雄一、橋本悠里、宇野太、香川俊輔、浦田泰生、田中紀章、藤原俊義：Mutual sensitization with telomerase-specific oncolytic virotherapy and ionizing radiation in antitumor activity. 第66回日本癌学会学術総会、2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許番号：3867968、発明の名称：腫瘍細胞において選択的に増殖する腫瘍融解ウイルス、発明者：藤原俊義、白木屋佳子、川嶋健、田中紀章、京哲、出願年月日：平成14年7月8日、登録年月日：平成18年10月20日
2. 特許出願番号：11/158479、発明の名称：Telomelysin/GFP-expressing recombinant virus、発明者：Toshiyoshi Fujiwara, Noriaki Tanaka, Satoru Kyo, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa、出願年月日：平成17年6月21日
3. PCT 特許出願番号：PCT/JP2005/018401、発明の名称：テロメライン-GFP 遺伝子含有組換えウイルス、発明者：藤原俊義、田中紀章、京哲、水口裕之、早川堯夫、出願年月日：平成17年9月28日

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Taki, M., Kagawa, S., Nishizaki, M., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Kyo, S., Nagai, K., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T.	Enhanced oncolysis by a tropism-modified telomerase-specific replication selective adenoviral agent OBP-405 ("Telomelysin-RGD")	Oncogene	24	3130-3140	2005
Watanabe, T., Hioki, M., Fujiwara, T., Nishizaki, M., Kagawa, S., Taki, M., Kishimoto, H., Endo, Y., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T.	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
Fujiwara, T., Kagawa, S., Kishimoto, H., Endo, Y., Hioki, M., Ikeda, Y., Sakai, R., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T.	Enhanced antitumor efficacy of telomerase-selective oncolytic adenoviral agent (OBP-401) with docetaxel: Preclinical evaluation of chemovirotherapy.	Int. J. Cancer	119	432-440)	2006
Kishimoto, H., Kojima, T., Watanabe, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T., Uno, F., Teraishi, F., Kyo, S., Mizuguchi, H., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T.	<i>In vivo</i> imaging of lymph node metastasis with telomerase-specific replication-selective adenovirus	Nature Med.	12	1213-1219	2006
Fujiwara, T., Urata, Y., Tanaka, N.	Telomerase-specific oncolytic virotherapy for human cancer with the hTERT promoter.	Curr. Cancer Drug Targets	7	191-201	2007
Endo, Y., Sakai, R., Ouchi, M., Onimatsu, H., Hioki, M., Kagawa, S., Uno, F., Watanabe, Y., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T.	Virus-mediated oncolysis induces danger signal and stimulates cytotoxic-T-lymphocyte activity via proteasome activator upregulation.	Oncogene	(in press)		2007
Hashimoto, Y., Watanabe, Y., Shirakiya, Y., Uno, F., Kagawa, S., Kawamura, H., Nagai, K., Tanaka, N., Kumon, H., Urata, Y., Fujiwara, T.	Establishment of Biological and Pharmacokinetic Assays of Telomerase-Specific Replication-Selective Adenovirus (TRAD).	Cancer Science	99	385-390	2008
藤原俊義 田中紀章	悪性腫瘍に対するウイルス製剤：Telomelysinの開発と臨床応用の可能性	Medical Technology	33	961-966	2005
藤原俊義 田中紀章 浦田泰生	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	Biotherapy	20	310-317	2006

藤原俊義、田中紀章	GFP発現ウイルス製剤を用いた消化器癌微小転移の <i>in vivo</i> イメージングシステム.	医学のあゆみ	220	659-661	2007
藤原俊義、田中紀章	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.	ゲノム医学	7	129-134	2007
藤原俊義、田中紀章	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.	日本臨床	65	1913-1922	2007
藤原俊義、田中紀章	微小癌転移の <i>in vivo</i> イメージング技術.	Medical Science Digest	34	48-49	2008



Enhanced oncolysis by a tropism-modified telomerase-specific replication-selective adenoviral agent OBP-405 ('Telomelysin-RGD')

Masaki Taki¹, Shunsuke Kagawa^{1,2}, Masahiko Nishizaki¹, Hiroyuki Mizuguchi³, Takao Hayakawa³, Satoru Kyo⁴, Katsuyuki Nagai⁵, Yasuo Urata⁵, Noriaki Tanaka¹ and Toshiyoshi Fujiwara^{*1,2}

¹Division of Surgical Oncology, Department of Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry, Okayama 700-8558, Japan; ²Center for Gene and Cell Therapy, Okayama University Hospital, Okayama 700-8558, Japan; ³Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan; ⁴Department of Obstetrics and Gynecology, Kanazawa University School of Medicine, Kanazawa 920-8641, Japan; ⁵Oncolys BioPharma, Inc., Tokyo 106-0031, Japan

Replication-competent oncolytic viruses are being developed for human cancer therapy. We previously reported that an attenuated adenovirus (OBP-301, 'Telomelysin'), in which the hTERT promoter element drives expression of E1A and E1B genes linked with an IRES, could replicate in cancer cells, and causes selective lysis of cancer cells. We further constructed OBP-405 ('Telomelysin-RGD') that contains an RGD motif in the HI loop of the fiber knob. We examined whether OBP-405 could be effective in overcoming the limitations of OBP-301, specifically their inefficient infection into cells lacking the primary receptor, the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR). By flow cytometric analysis, H1299 (lung) and SW620 (colorectal) tumor cells showed high levels of CAR expression, whereas LN444 (glioblastoma), LN2308 (glioblastoma), and H1299-R5 (lung) tumor cells were negative for CAR expression. A quantitative real-time PCR analysis demonstrated that fiber-modified OBP-405 infected more efficiently than OBP-301, although the intracellular replication rate of both viruses was consistent. The comparative antitumor effect of fiber-modified OBP-405 and unmodified OBP-301 for human cancer cells was evaluated *in vitro* by XTT assay as well as *in vivo* by using athymic mice carrying xenografts. OBP-405 had a profound oncolytic effect on human cancer cell lines compared to OBP-301, in particular on cells with low CAR expression. Intratumoral injection of 10⁷ plaque-forming units of OBP-405 into CAR-negative H1299-R5 lung tumor xenografts in *nu/nu* mice resulted in a significant inhibition of tumor growth and long-term survival in all treated mice. Moreover, selective replication of OBP-405 in the distant, uninjected H1299-R5 tumors was demonstrated. Our results suggest that fiber-modified replication-competent adenovirus OBP-405 exhibits a broad target range by increasing infection efficiency, an

outcome that has important implications for the treatment of human cancers.

Oncogene (2005) 24, 3130–3140. doi:10.1038/sj.onc.1208460
Published online 21 February 2005

Keywords: RGD; adenovirus; telomerase; replication; gene therapy

Introduction

The optimal treatment for human cancer requires an improvement of therapeutic ratio to increase cytotoxic efficacy on the tumor cells and decrease that on the normal cells. This may not be an easy task because most of normal cells surrounding tumors are sensitive to the cytotoxic treatment. Thus, to establish reliable therapeutic strategies for human cancer, it is important to seek the genetic and epigenetic targets present only in cancer cells. The emerging fields of functional genomics and functional proteomics provide an expanding repertoire of clinically applicable targeted therapeutics (Kohn *et al.*, 2004). Telomerase is a ribonucleoprotein complex responsible for the addition of TTAGGG repeats to the telomeric ends of chromosomes (Greider and Blackburn, 1985; Collins and Mitchell, 2002), and contains the enzymatic subunit human telomerase reverse transcriptase (hTERT) (Nakamura *et al.*, 1997). The hTERT proximal promoter can be used as a molecular switch for the selective expression of target genes in tumor cells (Koga *et al.*, 2000; Komata *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2000, 2002), since almost all advanced human cancer cells express telomerase and most normal cells do not (Kim *et al.*, 1994; Shay and Wright, 1996). Genetically modified adenoviruses have emerged as a new biological anticancer agent (McCormick, 2001; Fang and Roth, 2003). We previously constructed an adenovirus vector (OBP-301, 'Telomelysin'), in which the hTERT promoter element drives expression of E1A and E1B genes linked with an internal ribosome entry site (IRES), and showed that OBP-301 induced selective

*Correspondence: T Fujiwara, Center for Gene and Cell Therapy, Okayama University Hospital, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700-8558, Japan; E-mail: toshi_f@md.okayama-u.ac.jp
Received 17 August 2004; revised 22 November 2004; accepted 15 December 2004; published online 21 February 2005

E1A and E1B expression in human cancer cells, but not in normal cells (Kawashima *et al.*, 2004). Therefore, OBP-301 can replicate and lyse only cancer cells, but not normal cells. In addition, OBP-301 will infect neighboring cancer cells, and induce oncolysis throughout the whole tumor mass *in vivo*.

Infection efficiency of the presently available adenoviral agent, which is derived from human adenovirus serotype 5, varies widely depending on the expression of Coxsackie-adenovirus receptor (CAR) (Wickham *et al.*, 1993). The initial step of adenovirus infection involves at least two sequential steps. The first step is the attachment of the virus to the cell surface through binding of the knob domain of the fiber to CAR (Bergelson *et al.*, 1997). Following attachment, the viral internalization into the cells occurs by the interaction of RGD (Arg-Gly-Asp) motifs of penton base with integrin receptors, $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$, expressed on most cell types (Wickham *et al.*, 1993). Therefore, the interaction of the fiber knob with CAR on the cell is the key mediator by which adenoviral agents enter the cells. Modification of fiber protein is an attractive strategy for overcoming the limitations imposed by the CAR dependence of adenovirus infection (Wickham *et al.*, 1997; Dmitriev *et al.*, 1998; Krasnykh *et al.*, 1998; Mizuguchi *et al.*, 2001).

We modified the fiber of OBP-301 to contain RGD peptide, which binds with high affinity to integrins ($\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$) on the cell surface, on the HI loop of the fiber protein. The resultant adenovirus, termed OBP-405 or 'Telomelysin-RGD', mediated not only CAR-dependent virus entry but also CAR-independent, RGD-integrin ($\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$)-dependent virus entry. We explored whether OBP-405 containing RGD peptide on the fiber knob had more oncolytic efficacy on several types of human cancer cells (CAR-positive or -negative), as compared with OBP-301 containing wild-type fiber *in vitro* and *in vivo*.

Results

Expression of CAR and integrins in human cancer and normal cells

To investigate the antitumor effect of the fiber-modified OBP-405, we used several human cell lines. We first examined the expression levels of CAR and αv integrin family, $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$, on each cell surface by flow cytometric analysis (Figure 1). Apparent amounts of CAR expression were detected on H1299 and SW620 cells, whereas LN444, LNZ308, and H1299-R5 cells expressed extremely low levels of CAR. The normal human lung fibroblast (NHLF) cell also exhibited detectable CAR expression. In contrast to CAR, $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ integrins were readily expressed in all cell lines.

Increased infection efficiency and selective replication of OBP-405

To assess whether incorporation of an RGD motif into the HI loop of the fiber knob domain would enhance its

infectivity, CAR-positive parental H1299, CAR-negative LN444, and NHLF (normal cell) were infected with OBP-301 or OBP-405 at an multiplicity of infection (MOI) of 1. Quantitative real-time PCR analysis with DNA extracted 2 h after infection demonstrated that the amount of E1A DNA after OBP-405 infection was higher than that after OBP-301 infection in two human cancer cell lines, whereas infectivity of both viruses was almost similar in NHLF (Figure 2a). These results suggest that RGD-modified OBP-405 showed increased infectivity to neoplastic cells regardless of the levels of CAR expression, although the infectivity enhancement was greater in CAR-negative cancer cells.

We next examined the replication ability of OBP-301 and OBP-405 in different cell lines by measuring the relative amounts of E1A DNA. H1299, LN444, and NHLF cells were harvested at the indicated time points over 72 h after infection with OBP-301 or OBP-405, and subjected to quantitative real-time PCR analysis. The ratios were normalized by dividing the value of cells obtained 2 h after viral infection. As shown in Figure 2b, both OBP-301 and OBP-405 replicated 5–6 logs by 72 h after infection; their replication, however, were attenuated up to 3 logs in normal NHLF cells.

Enhanced viral spread of OBP-405 in human cancer cells

To examine whether increased infectivity of OBP-405 could facilitate viral spread, H1299, LN444, and NHLF cells cultured in chamber slides were infected either with OBP-301 or OBP-405 at an MOI of 1, and then immunohistochemically stained for viral hexon at 24 and 48 h of postinfection. Viral hexon was detectable in H1299 cells infected with OBP-301 and OBP-405 in a time-dependent manner, although the amount of positive cells after OBP-405 infection was higher than that after OBP-301 infection (Figure 3a). In contrast, viral hexon was only present in CAR-negative LN444 cells infected with OBP-405, but not in OBP-301-infected LN444 cells (Figure 3b), suggesting the selective replication of OBP-405 in CAR-negative human cancer cells. NHLF human normal cells exhibited no hexon-positive cells after OBP-301 or OBP-405 infection (Figure 3c).

In vitro cytopathic efficacy of OBP-405 in CAR-negative human cancer cells

To test whether the increased infectivity and replication of OBP-405 translated to improved oncolysis, we compared the cytopathic effect of OBP-405 with that of OBP-301 on various human cell lines *in vitro* (Figure 4). Both OBP-301 and OBP-405 killed CAR-positive H1299 and SW620 human cancer cells in a dose-dependent manner; OBP-405 at an MOI of 0.1, however, killed these cells as efficiently as OBP-301 at an MOI of 1, suggesting that OBP-405 showed approximately 10-fold more profound tumor cell killing compared with OBP-301. In contrast, only OBP-405 was lytic in CAR-negative LN444, LNZ308, and H1299-R5 cells, likely due to the higher infectivity of OBP-405

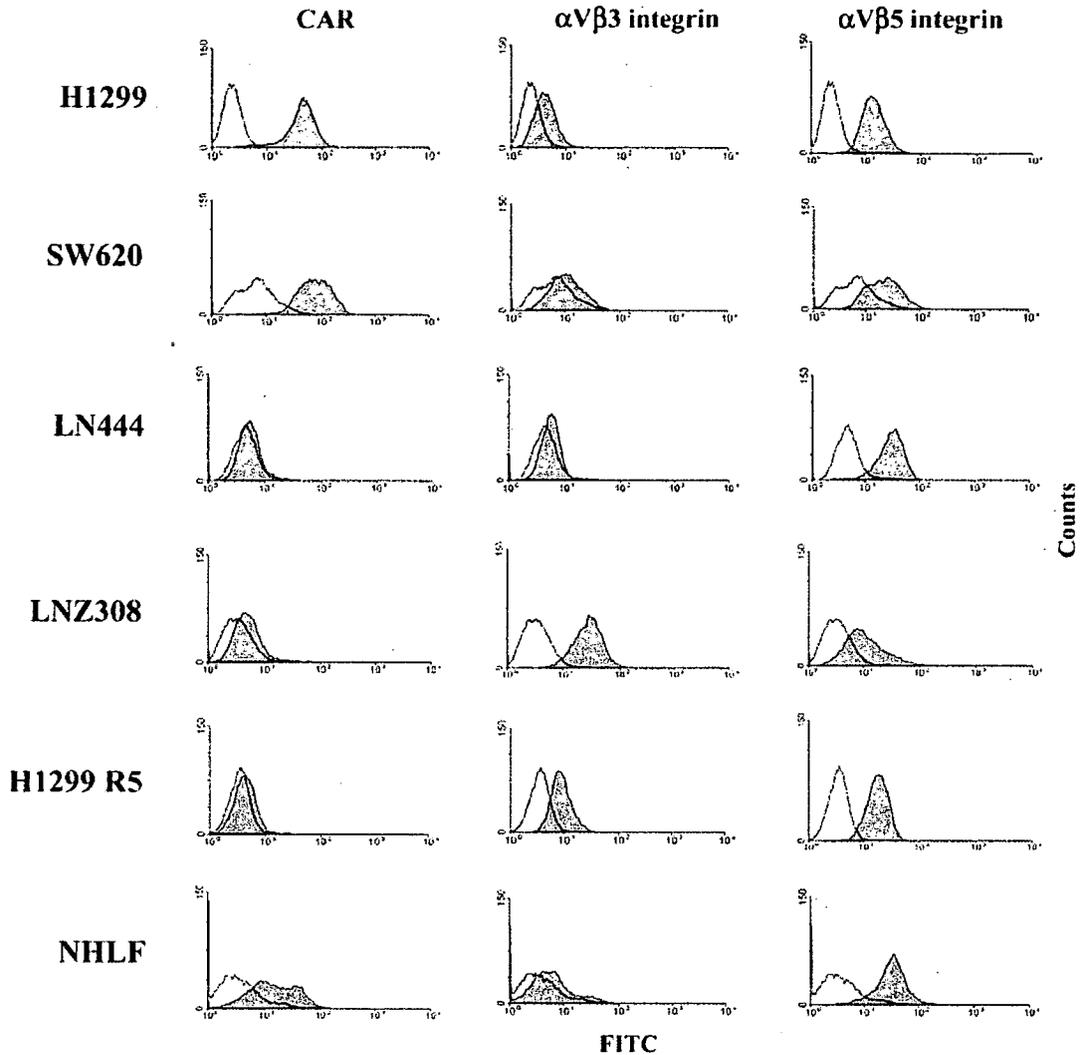


Figure 1 Flow cytometric analysis of CAR and integrin ($\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$) expression in human cancer and normal cell lines. Cells were incubated with anti-CAR (RmcB), anti- $\alpha v\beta 3$ integrin (LM609), and anti- $\alpha v\beta 5$ integrin (PIF6) monoclonal antibodies, followed by detection with FITC-labeled goat anti-mouse IgG secondary antibody. An isotype-matched normal mouse IgG1 conjugated to FITC was used as a control in all experiments (solid line)

in these cell lines. Most of these cells were dead within 5 days after OBP-405 infection, whereas OBP-301-infected cells were still intact at 5 days postinfection (Figure 4b). Neither OBP-301 nor OBP-405 exhibited cytopathic effect on NHLF cells.

Enhanced oncolysis of CAR-negative tumor xenografts by OBP-405

We next examined whether OBP-405 cause enhanced oncolysis and spread *in vivo*. Subcutaneous H1299-R5 tumor xenografts with a diameter of 5–6 mm received three daily courses of intratumoral injection of 1×10^7 plaque-forming units (PFU) of OBP-301, OBP-405 or replication-deficient control adenovirus (dl312), or PBS (mock). As shown in Figure 5, administration of OBP-405 resulted in significant growth suppression compared to mock- or dl312-treated tumors 34 days after virus

injection ($P < 0.01$). In addition, one of the six mice treated with OBP-405 showed the complete eradication of the established H1299-R5 tumor. We previously reported that intratumoral injection of OBP-301 significantly inhibited the growth of H1299 tumor xenografts; a modest, insignificant growth inhibition, however, occurred with administration of OBP-301 on H1299-R5 tumors. Treatment with replication-deficient dl312 had no apparent effect on the growth of H1299-R5 tumors.

Targeting replication of OBP-405 in tumor tissues in vivo

To evaluate selective replication of OBP-301 and OBP-405 *in vivo*, we examined mouse tissues including implanted tumors for the presence of viral DNA and protein by quantitative real-time PCR and immunohistochemistry, respectively, following intratumoral viral

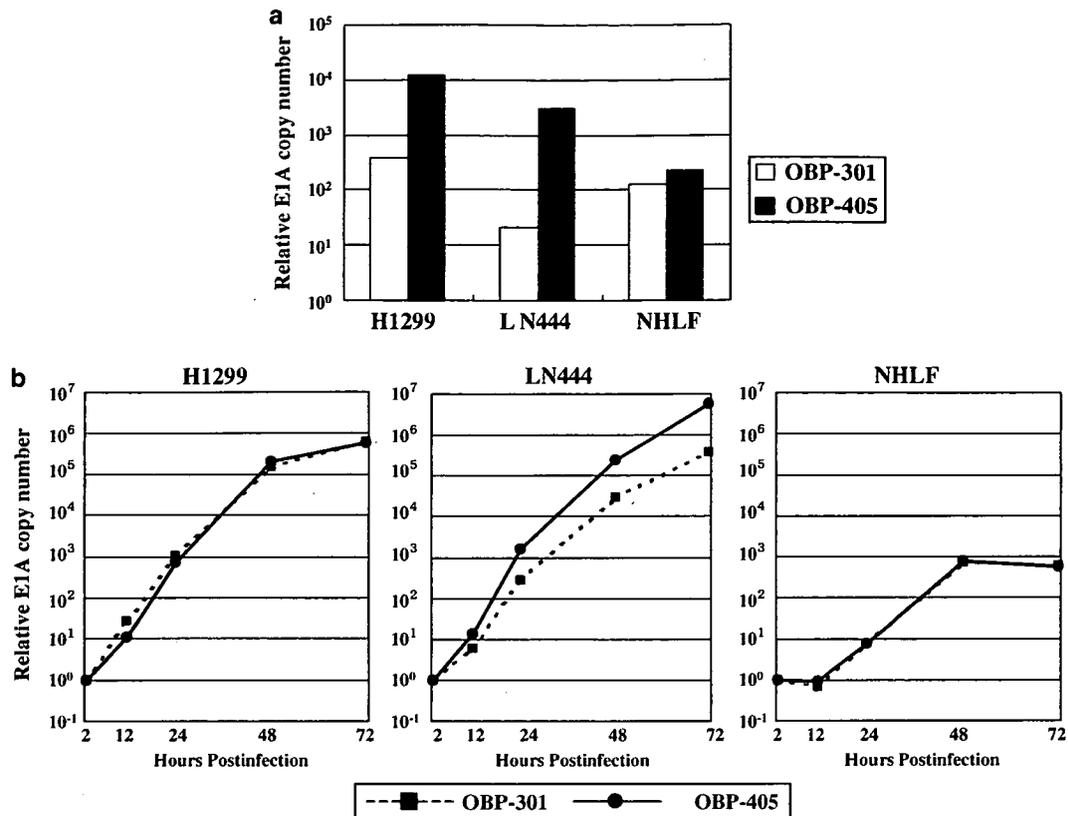


Figure 2 (a) Comparative analysis of the infection efficiency with OBP-301 and OBP-405 in H1299 (CAR-positive lung cancer), LN444 (CAR-negative glioblastoma), and NHLF (normal fibroblast) cells. Cells were infected with either OBP-301 or OBP-405 at an MOI of 1 for 2 h, and the viral infection rate was evaluated by measuring the EIA copy number using the real-time quantitative PCR method. (b) Assessment of viral DNA replication in H1299, LN444, and NHLF cells. Cells were infected with either OBP-301 or OBP-405 at an MOI of 1 for 2 h. Following the removal of virus inocula, cells were further incubated for the indicated periods of time, and then subjected to the real-time quantitative PCR assay. The amounts of viral EIA copy number are defined as the fold increase for each sample relative to that at 2 h (2 h equals 1)

injection. Mice with established subcutaneous H1299-R5 tumors received three daily courses of intratumoral injection of 1×10^7 PFU of OBP-301 or OBP-405, or PBS (mock), and killed 7 days after treatment. EIA DNA was not detected in any normal tissues examined (liver, kidney, pancreas, and spleen), however, it was apparently detected in tumors (Figure 6a). Tumors from mice treated with OBP-405 contained 100-fold more EIA DNA than tumors from OBP-301-treated mice (Figure 6a). Immunohistochemical staining of adenoviral hexon protein revealed that OBP-405 mediated viral spread throughout the tumor tissues that was less evident in OBP-301-treated animals (Figure 6b). In other normal organs, adenoviral hexon protein was absent (data not shown).

To directly address whether OBP-405 is not toxic, we measured levels of liver enzymes as an indicator of hepatocellular damages 7 days after intratumoral injection of 1×10^7 PFU of viruses. As shown in Table 1, no significant elevation of liver enzymes was observed in mice intratumorally injected with OBP-301 or OBP-405. In addition, histopathological analysis of liver sections demonstrated that there were no apoptotic hepatocytes or other histological signs of hepatocellular

damages in mice treated with either OBP-301 or OBP-405 (data not shown).

Viral spread of OBP-405 in distant tumor tissues after intratumoral injection

We finally tested whether intratumoral injection of OBP-405 could mediate a therapeutic benefit on distant, uninjected H1299-R5 tumors in a dual tumor model. H1299-R5 tumors were established in the flanks at both left and right sides of *nu/nu* mice and viral replication in the left tumors was assessed after intratumoral inoculation of 1×10^7 PFU of either OBP-301 or OBP-405 into tumors in the right flank. Quantitative real-time PCR analysis on postinfection day 14 demonstrated that OBP-405 caused approximately 100-fold more efficient replication than OBP-301 in H1299-R5 tumors injected with viruses, whereas only OBP-405 replicated on distant, uninjected H1299-R5 tumors (Figure 7a).

At four weeks after viral injection, OBP-301 also replicated in uninjected H1299-R5 tumors; OBP-405, however, resulted in an approximately 100-fold more replication at uninjected sites (Figure 7b). In contrast,