

図 3 Telomelysin (OBP-301) の *in vivo* における癌診断・治療への応用<sup>13,14)</sup>

- A: ヒト肺癌細胞 H1299 をヌードマウス背部皮下に移植し、腫瘍径が約 5 mm となった時点で  $10^7$  PFU の Telomelysin を 3 回腫瘍内に投与し、腫瘍径を測定して推定腫瘍重量の変化を観察した。コントロールとしては非増殖型アデノウイルス dl312 を用いた。右にコントロールおよび治療群の背部腫瘍のマクロ像を示す。
- B: Telomelysin と Ad-GFP を用いた胸膜播種巣の可視化。ヌードマウスの胸腔内に A549 ヒト肺癌細胞を移植し、2 週間後に GFP 発現アデノウイルスベクター (Ad-GFP) と Telomelysin (OBP-301) を胸腔内に投与した。Telomelysin の腫瘍選択的増殖とともに Ad-GFP も増殖し、肉眼的に同定不能な微小播種巣も緑色蛍光にて検出可能であった。左: 蛍光視野, 右: 明視野。

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

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

### armed(武装した)Telomelysin の開発

Telomelysin のウイルスゲノムにさまざまな機

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

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

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

## おわりに

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

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

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

## 文献

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



- 8) Nakayama, J., Tahara, H., Tahara, E., et al. : Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat. Genet.*, **18** : 65~68, 1998.
- 9) Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., et al. : Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, **266** : 2011~2015, 1994.
- 10) Rodriguez, R., Schuur, E. R., Lim, H. Y., et al. : Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706 : a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res.*, **57** : 2559~2563, 1997.
- 11) Li, Y., Yu, D. C., Chen, Y., Amin, P., et al. : A hepatocellular carcinoma-specific adenovirus variant, CV890, eliminates distant human liver tumors in combination with doxorubicin. *Cancer Res.*, **61** : 6428~6436, 2001.
- 12) Kurihara, T., Brough, D. E., Kovesdi, I., et al. : Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen. *J. Clin. Invest.*, **106** : 763~771, 2000.
- 13) Kawashima, T., Kagawa, S., Kobayashi, N., et al. : Tumor-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin. Cancer Res.*, **10** : 285~292, 2004.
- 14) Umeoka, T., Kawashima, T., Kagawa, S., et al. : Visualization of intrathoracically disseminated solid tumors in mice with optical imaging by telomerase-specific amplification of a transferred green fluorescent protein gene. *Cancer Res.*, **64** : 6259~6265, 2004.
- 15) Taki, M., Kagawa, S., Nishizaki, M., et al. : Enhanced oncolysis by a tropism-modified telomerase-specific replication selective adenoviral agent OBP-405 ("Telomelysin-RGD"). *Oncogene*, **24** : 3130~3140, 2005.

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、その基盤技術を確認なものとし、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。そのためは、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、利益を生みだ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

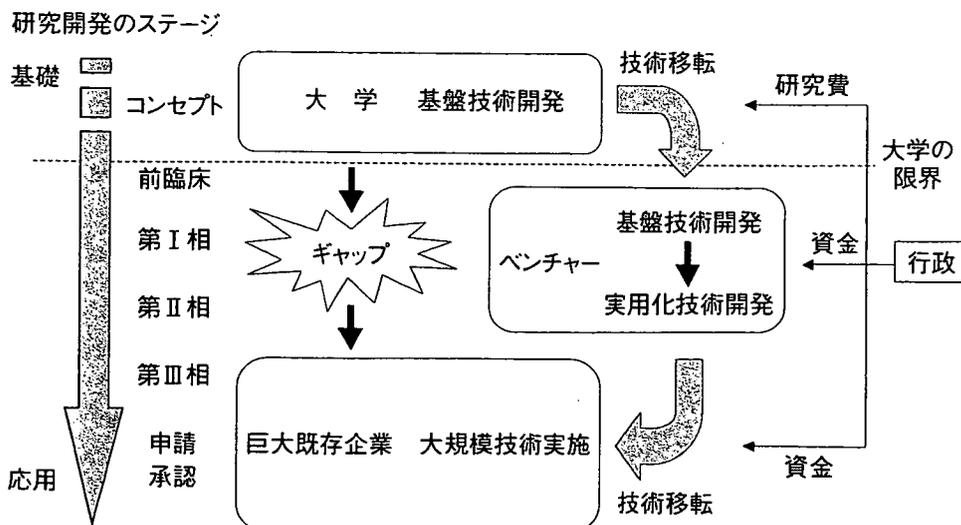


図1 大学発ベンチャーの役割

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、症例によっては明確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、様々な発生母地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*)と鑄型となる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

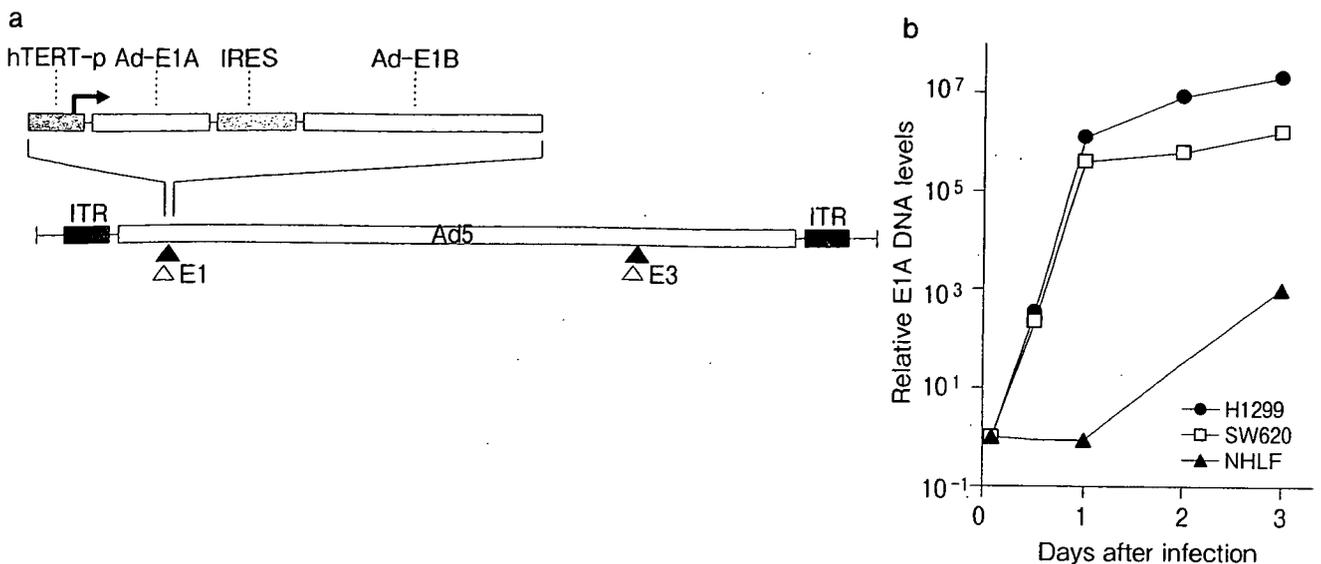


図2 Telomelysin (OBP-301) の構造と選択的増殖能

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部分に組み込まれている。

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<sup>5</sup>~10<sup>8</sup>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、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<sup>7</sup> 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

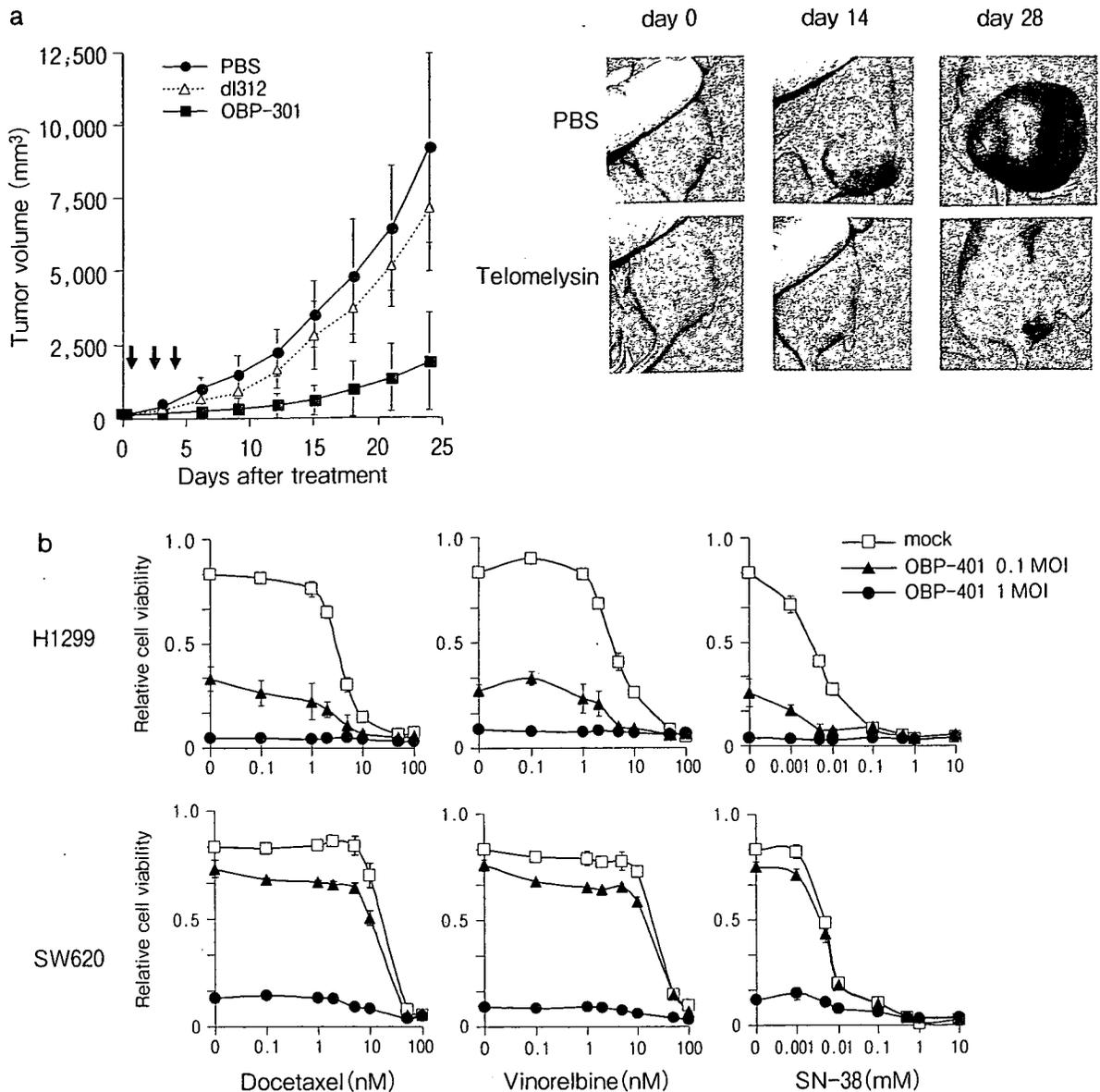


図3 Telomelysin (OBP-301) の抗腫瘍効果<sup>12,14)</sup>

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 E1A 蛋白質に対する免疫染色などにより確認された。これらの結果は、原発腫瘍内投与した Telomelysin による微小転移巣の治療の可能性を示唆している。Telomelysin は各種抗癌剤との併用効果も確認されており<sup>13,14)</sup>, 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-

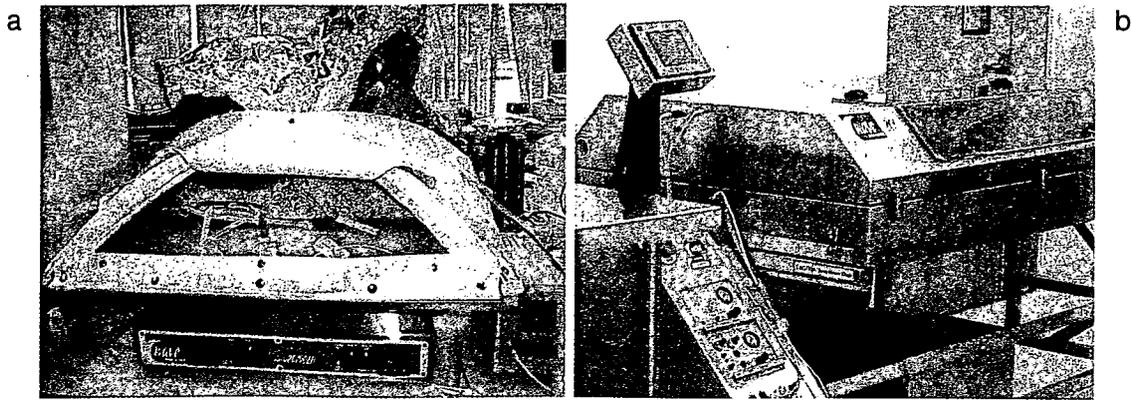


図4 Telomelysin (OBP-301) 製造のためのバイオリアクター  
ウイルス製剤を大量に培養・精製するためのバイオリアクター。  
20 l 培養用の Wave 20 (a) と 200 l 用の Wave 200 (b)。

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<sup>15)</sup>。

### 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<sup>16)</sup>。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.

ングの困難さから、術中 *in situ* の癌検出システムはいまだ開発されていない。

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じるという仮説が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、その検証がはじ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<sup>1)</sup>、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。

消化器外科学

## 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

*In vivo imaging for micrometastasis of gastrointestinal cancer with tumor-specific GFP-expressing adenovirus*

近年増加を続ける癌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などが重要な因子となる。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めざす際に有用な情報のひと

つに転移リンパ節の有無がある。生体内で微小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おり、たとえばpositron emission tomography (PET)による生物学的診断や、ニューラルネットワークを駆使した画像解析などが検討されている。しかし、癌細胞へのターゲティ

### テロメラーゼ活性を指標とする癌細胞の可視化

ウイルスは本来ヒトの細胞に感染して構造蛋白質を産生することで複製・増殖し、その細胞をさまざまな機序により破壊する。その増殖機能に選択性を付加することにより、ウイルスを癌細胞のみを標識する診断用製剤として用いることができる。染色体末端のテロメアを伸長する作用をもつ酵素テロメラーゼは85%以上のヒト悪性腫瘍でその活性の上昇が知られており<sup>2)</sup>、癌細胞ではその発現制御を行っている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)。

Telomelysin® (OBP-301)は、幼児の“かぜ”症状の原因となる5型アデノウイルスの増殖に必須のE1遺伝子をテロメラーゼ構成成分であるヒトテロメラーゼ逆転写酵素(human telomerase reverse transcriptase: hTERT)遺伝子のプロモーターで駆動することで、癌細胞のみで選択的に増殖して細胞

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%	腎癌	68%
頭頸部腫瘍	82%	Wilms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%

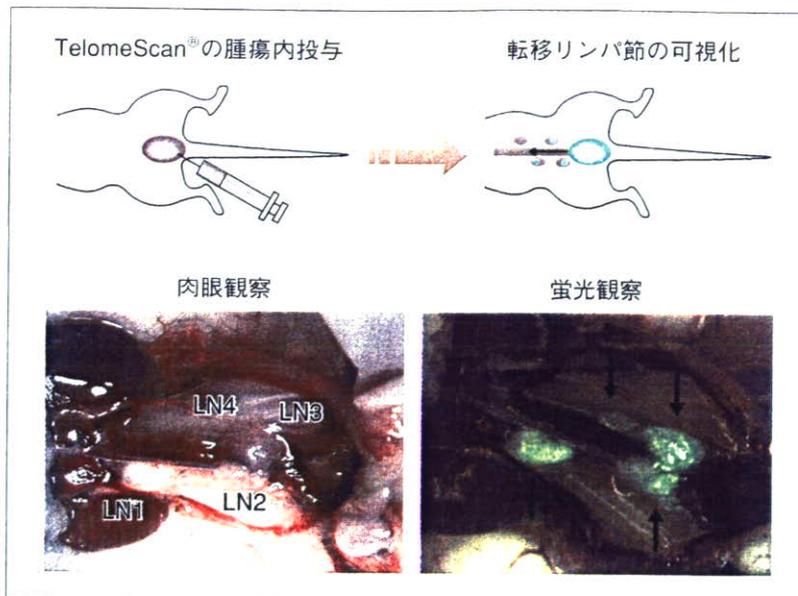


図1 TelomeScan®によるリンパ節転移の*in vivo*イメージング<sup>7)</sup>

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。

死を誘導するように改変されたウイルス製剤である<sup>3,4)</sup>。抗癌剤としてのTelomelysin®はアメリカ食品医薬品庁(Food and Drug Administration: FDA)の承認のもと、2006年11月よりアメリカで各種固形癌を対象とした第I相臨床試験が開始されており、その安全性と有効性のデータが集積されつつある。

TelomeScan® (OBP-401)は、Telomelysin®にオワンクラゲ由来の蛍光遺伝子GFP(green fluorescence protein)を搭載したナノバイオ・ウイルス製剤であり、癌の診断および治療に有効であると考えられる<sup>5,6)</sup>。TelomeScan®の感染により、きわめて広範な癌細胞で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癌組織に選択的な緑色蛍光発現が観察された<sup>7)</sup>。

### TelomeScan®による微小リンパ節転移の同定

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(図1)。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<sup>7)</sup>。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®が癌細胞に感染・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、癌細胞に選択的に誘導されることが明らかとなった。

今後はTelomeScan®を標識薬剤とし、ペンプローブ型の高感度GFP蛍光検出装置を用いた微小癌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。臨床的には内視鏡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癌細胞に感染・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で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。このシステムではセンチネルリンパ節生検と異なり、転移リンパ節そのものを同定できる点で確実性の面からきわめて実用的といえる。

- 1) Sowa, M. et al.: Surgical approach to early gastric cancer with lymph node metastasis. *World J. Surg.*, **13**: 630-635, 1989.
- 2) Kim, N. W. et al.: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, **266**: 2011-2015, 1994.
- 3) Kawashima, T. et al.: Tumor-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin. Cancer Res.*, **10**: 285-292, 2004.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Fujiwara, T. et al. : Enhanced antitumor efficacy of telomerase-selective oncolytic adenoviral agent OBP-401 with docetaxel : preclinical evaluation of chemoviro-
- therapy. *Int. J. Cancer*, 119 : 432-440, 2006.
- 7) Kishimoto, H. et al. : *In vivo* imaging of lymph node metastasis with telomerase-specific replication-selective adenovirus. *Nat. Med.*, 12 : 1213-1219, 2006.
- 藤原俊義, 田中紀章 / Toshiyoshi FUJIWARA and Noriaki TANAKA  
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, 同大学院医歯薬学総合研究科消化器・腫瘍外科

# 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*

藤原俊義, 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・腫瘍外科学分野教授

## 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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>(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<sup>4)</sup>。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 ウイルスであり、41

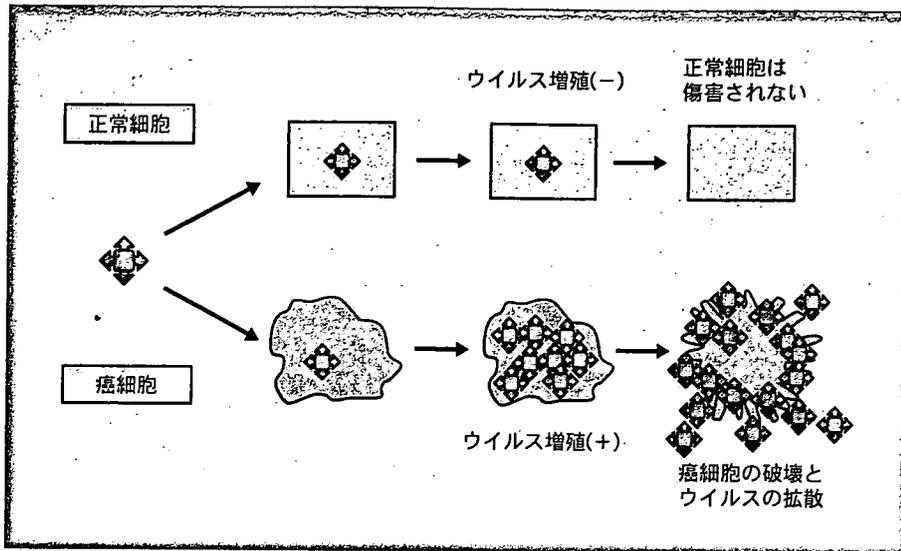


図1 癌細胞での選択的なウイルス増殖と細胞死誘導  
(文献3より引用)

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(d11520)が代表的である<sup>5)</sup>。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<sup>6)</sup>、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<sup>7)</sup>。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<sup>8)</sup>。

癌選択性をもたす第二の試みは、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、さまざまな発生母地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。

### 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<sup>9)</sup>。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<sup>10)</sup>(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%
膀胱癌	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%
ウィルムズ腫瘍	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<sup>®</sup>(開発コード:OBP-301)を作成した<sup>11)</sup>(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<sup>®</sup>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<sup>®</sup>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、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<sup>®</sup>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<sup>®</sup>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<sup>®</sup>は血中を循環し、遠隔部位の腫瘍内で

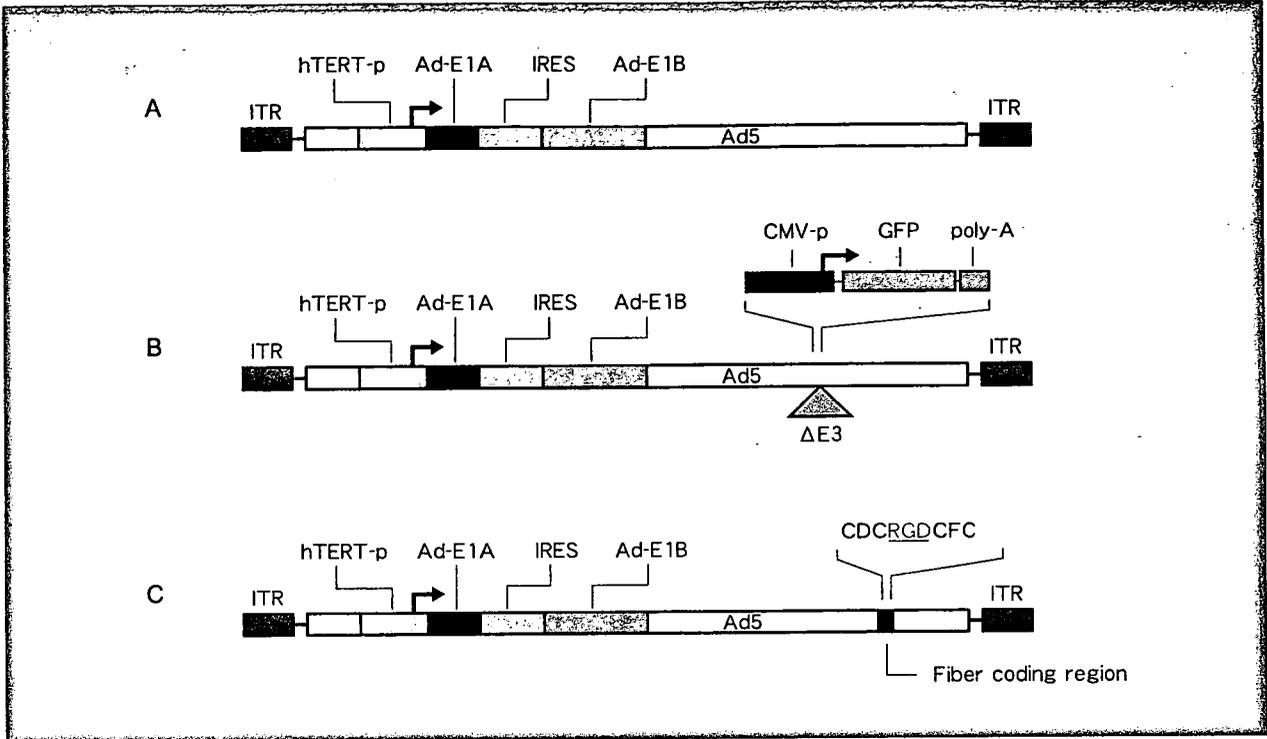
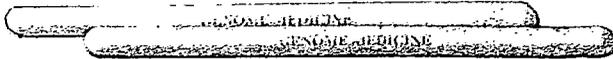


図2 ナノバイオ・アデノウイルス製剤の構造と特徴

- 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 部分に組み込まれている。
- 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<sup>12,13)</sup>。生体内で癌組織や転移リンパ節を検出する試みは画像診断の分野で研究が進んでいるが、手術中に直接検出・診断するシステムはいまだ開発されていない。手術の縮小化による低侵襲化を目指

す場合にほしい情報の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<sup>14)</sup> (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

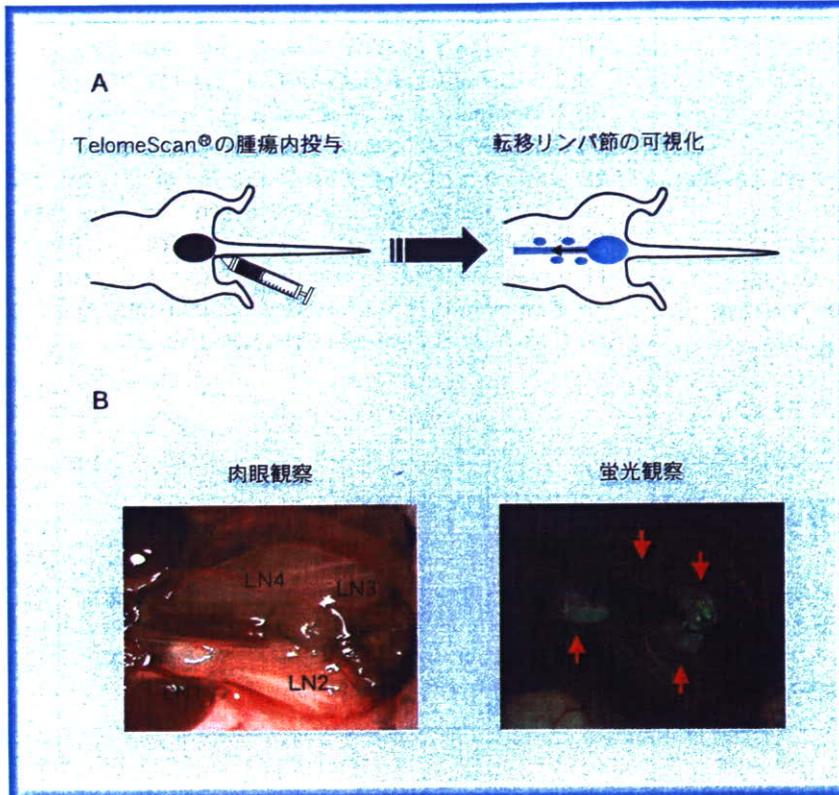


図3 TelomeScan®によるリンパ節転移の *in vivo* イメージング

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。

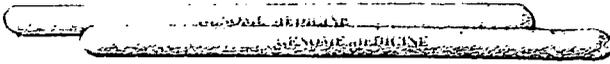
B: ヒト大腸癌細胞 HT29 をヌードマウスの直腸粘膜下に同所性に移植すると、直腸に腫瘍を形成するとともに 5~6 週間後に高率に傍大動脈リンパ節転移が認められる。TelomeScan® を直腸腫瘍に直接投与し、5 日後に開腹、蛍光励起して高感度 3CCD カメラにて観察したところ、4 個中 3 個のリンパ節で GFP 蛍光発現がみられた。この 3 個のリンパ節では、組織学的に微小転移が確認された。矢印: リンパ節。  
(文献 15 より引用)

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<sup>15)</sup>(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