

# 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<sup>1</sup> 田中 紀章<sup>2</sup>

Theranostic application of telomerase-specific oncolytic adenovirus for human cancer

<sup>1</sup>Toshiyoshi Fujiwara, <sup>2</sup>Noriaki Tanaka

<sup>1</sup>Center for Gene and Cell Therapy, Okayama University Hospital

<sup>2</sup>Department 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<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<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

<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

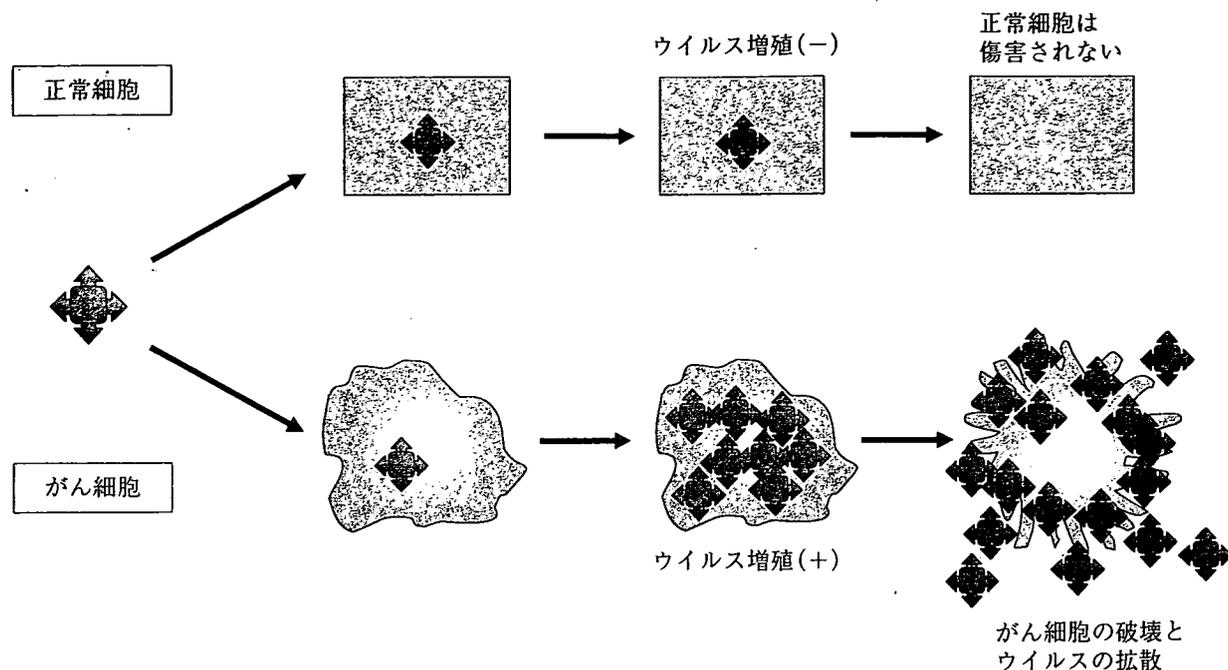


図1 がん細胞での選択的なウイルス増殖と細胞死誘導(文献<sup>3)</sup>より引用)

ん細胞に標的化することが可能となってきた<sup>3)</sup>。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<sup>4)</sup>。

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<sup>5,6)</sup>、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<sup>7)</sup>。

本稿では、テロメラーゼ活性依存性にか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30-38kB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<sup>8)</sup>。本来、E1B-55kD蛋白質はがん抑制遺伝子産物であるp53蛋

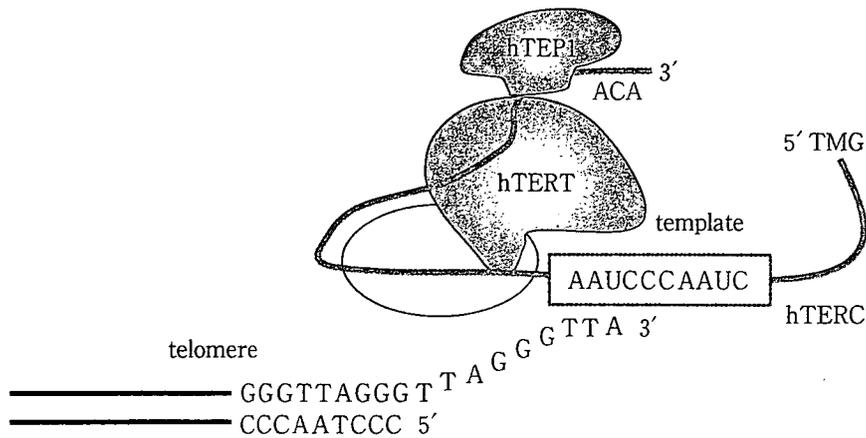


図2 テロメラーゼの構造とhTERT

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<sup>9)</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>10)</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、既に市場に出ている<sup>11)</sup>。

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<sup>12)</sup>。

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<sup>5,6)</sup>(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%	ウィルムス腫瘍	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%

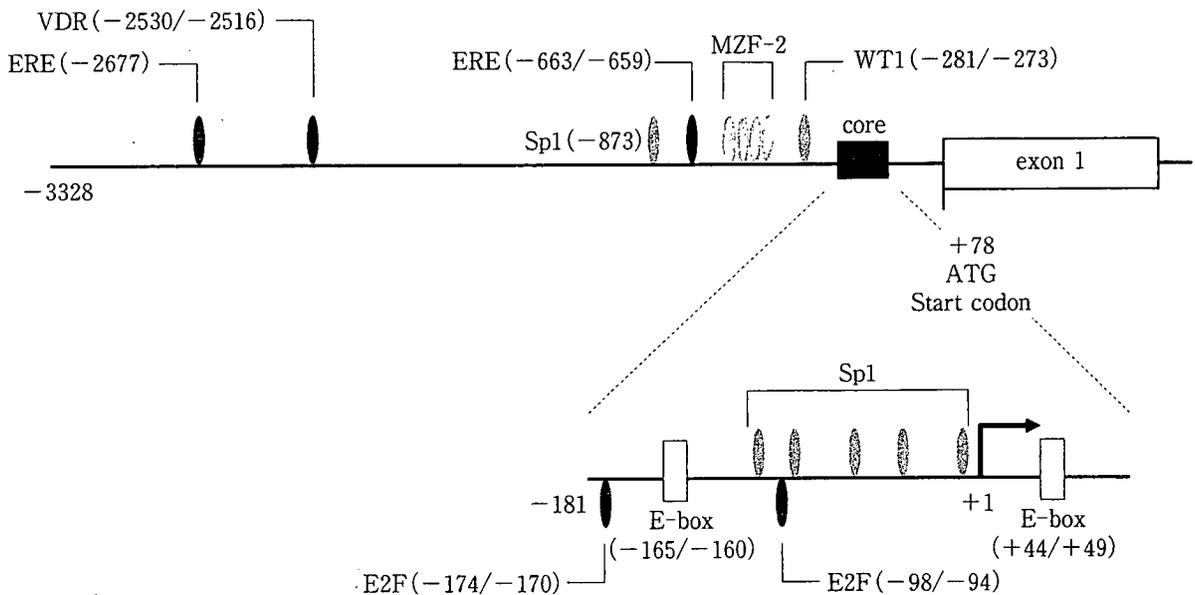


図 3 hTERTプロモーターの構造

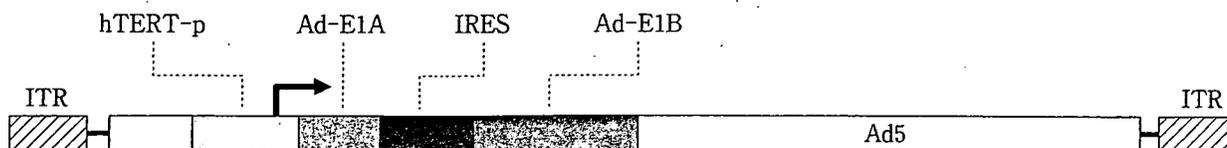
hTERTプロモーターのコア領域と転写因子の結合部位が示されている。

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<sup>13)</sup>(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)

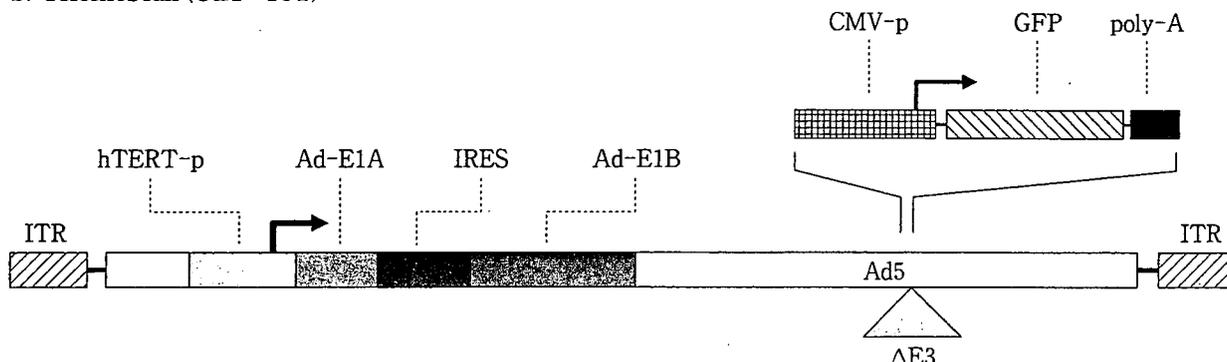


図4 ナノバイオ・アデノウイルス製剤の構造と特徴

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<sup>14)</sup>(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

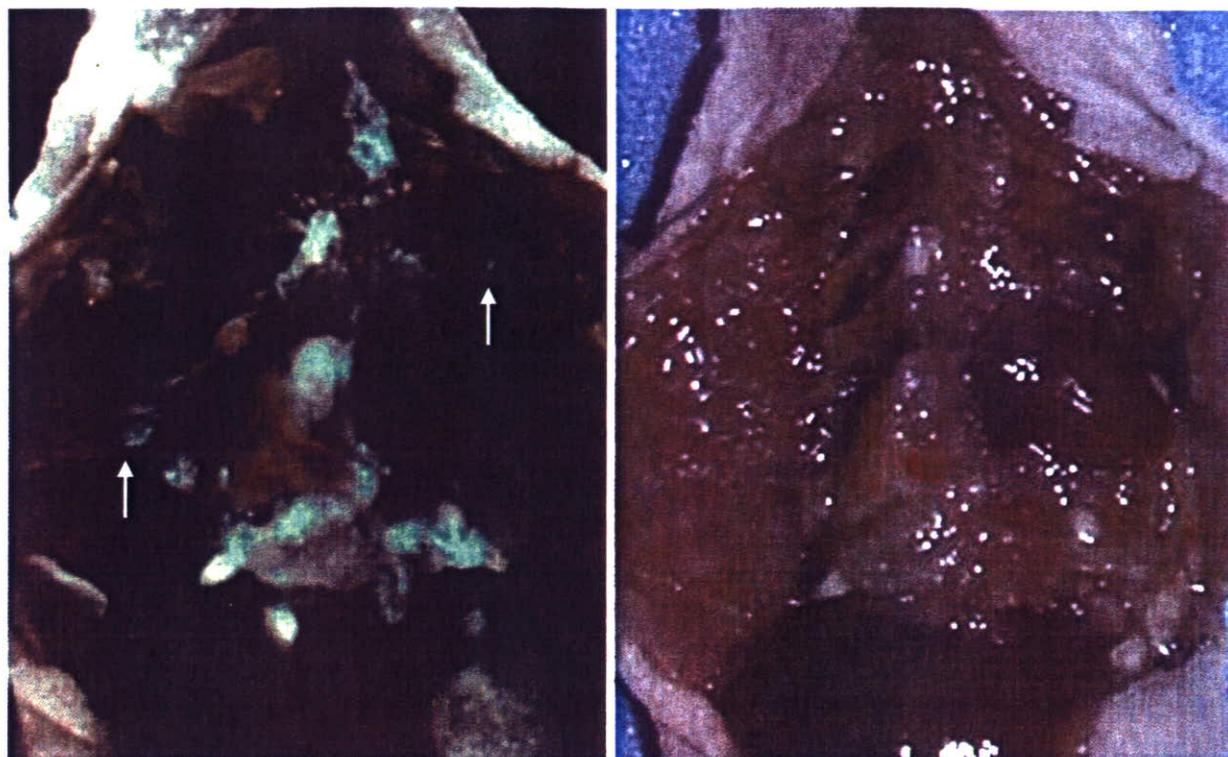


図5 Telomelysin の *in vivo* におけるがん診断への応用

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.

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<sup>15)</sup> (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ふ仮説が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<sup>16)</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。

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<sup>17,18)</sup>。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

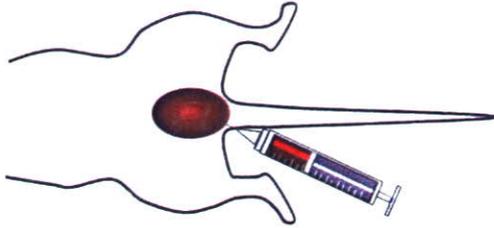
リンパ節転移は代表的ながんの転移経路の一つであり、がん患者の根治を目指すためには、原発巣の切除とともに的確なリンパ節郭清が必要である。TelomeScanを用いた生体内リンパ節転移イメージングを試みた。

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<sup>19)</sup>(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。

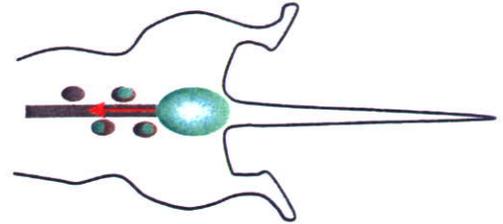
現在、TelomeScanを標識薬剤として、プローブ型の高感度GFP蛍光検出装置を用いた微小がん組織診断用の外科手術ナビゲーション・システムを開発中である。臨床的には、内視鏡

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

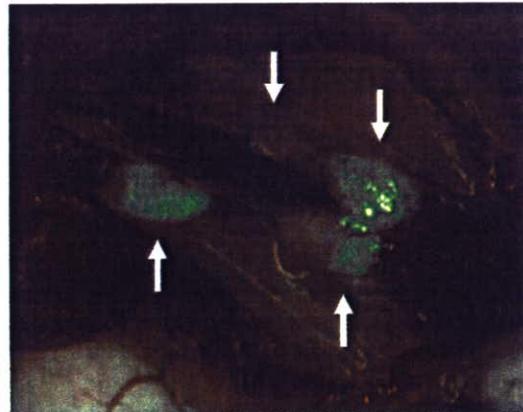


図6 TelomeScan によるリンパ節転移の *in vivo* イメージング

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<sup>19)</sup>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確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蛍光を発した後に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、

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.

# 微小癌転移の*in vivo*イメージング技術

藤原 俊義<sup>1, 2)</sup>・田中 紀章<sup>2)</sup>

Key Words

テロメラーゼ, アデノウイルス, GFP

## ■ Abstract ■

生体内における癌の診断法として、CT (Computed Tomography) や MRI (Magnetic Resonance Tomography) 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。テロメラーゼ特異的に増殖する緑色蛍光タンパク質 (GFP) 発現アデノウイルス (OBP-401) を原発腫瘍内に投与すると、局所リンパ域へのウイルス浸透を引き起こし、転移病変で選択的に増殖して転移リンパ節で GFP を発現する。この技術は、外科手術ナビゲーションとしてリンパ節転移検出に適用できる。

## ■はじめに

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。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、例えば PET (Positron Emission Tomography) による生物学的反応に基づく画像解析などが汎用されている。しかし、癌細胞へのターゲッティングの困難さから、術中 *in situ* での癌検出システムは未だ開発されていない。

## ■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持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>1)</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。

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死を誘導するように改変されたウイルス製剤である<sup>2, 3)</sup>。抗癌剤としての Telomelysin は、米国食品医薬品庁 (Food and Drug Administration, FDA) の承認のもと、2006年10月より米国にて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) を搭載したウイルス製剤である<sup>4)</sup>。TelomeScan の感染により、極めて広範な癌細胞で GFP 蛍光の発現が観察され、一方、線維芽細胞を初めとする正常細胞では GFP 陰性であった<sup>5)</sup>。

*In vivo* imaging of micrometastasis of human cancer

Toshiyoshi Fujiwara and Noriaki Tanaka

<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> Center for Gene and Cell Therapy, Okayama University Hospital Department of Surgery, Okayama university Graduate School

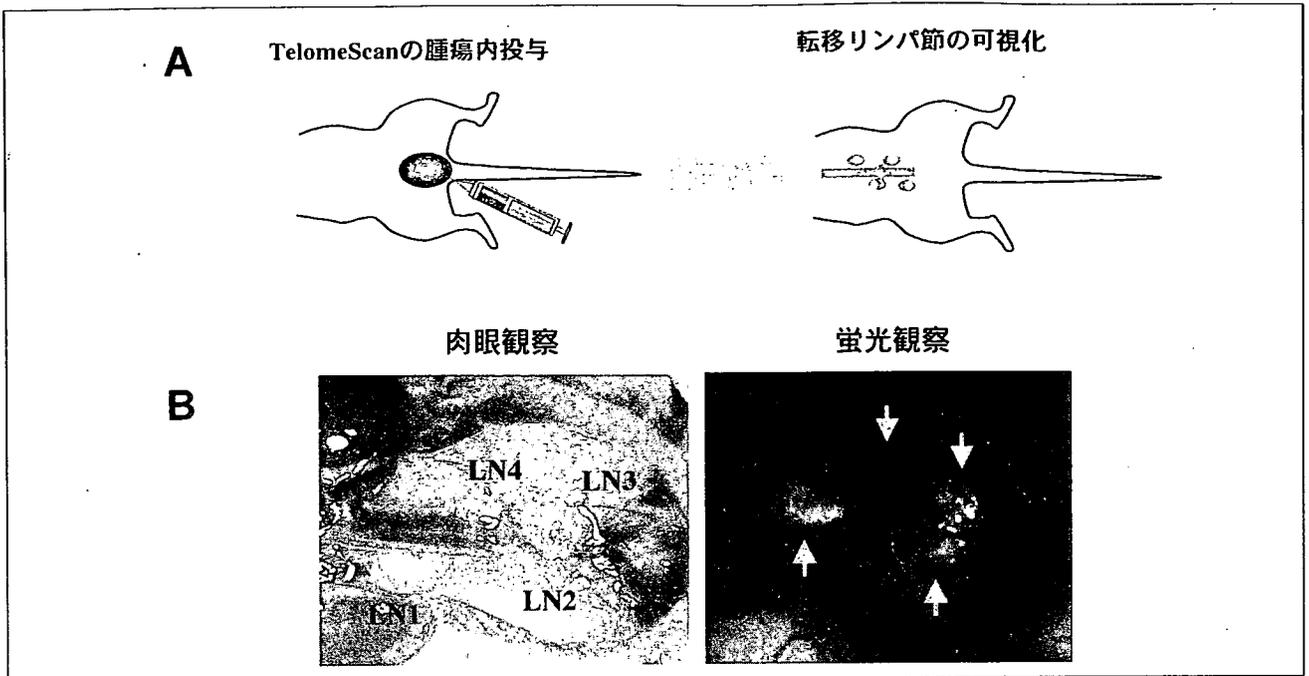


図 TelomeScanによるリンパ節転移の*in vivo*イメージング

(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) ヒト大腸がん細胞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<sup>5)</sup>より引用)

#### ■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)<sup>5)</sup>。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。これらの結果は、原発腫瘍内に局所投与されたTelomeScanがリンパ流を経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。

#### ■おわりに

今後は、TelomeScanを標識薬剤とし、ビデオスコープ型の高感度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。

#### 文 献

- 1) Kim NW *et al.*: Science 266: 2011-2015, 1994.
- 2) Kawashima T *et al.*: Clin Cancer Res 10: 285-292, 2004.
- 3) Umeoka T *et al.*: Cancer Res 64: 6259-6265, 2004.
- 4) Fujiwara T *et al.*: Int J Cancer 119: 432-440, 2006.
- 5) Kishimoto H *et al.*: Nat Med 12:1213-1219, 2006.