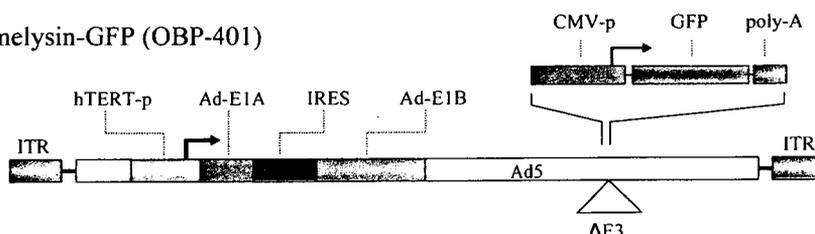


Telomelysin (OBP-301)



Telomelysin-GFP (OBP-401)



Telomelysin-RGD (OBP-405)

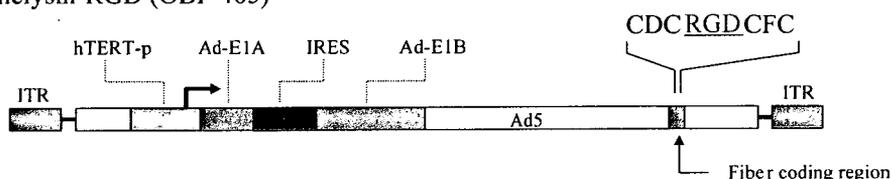


Fig. (2). Schematic DNA structures of telomerase-specific oncolytic viruses. Telomelysin (OBP-301), in which the hTERT promoter element drives the expression of E1A and E1B genes linked with an IRES. Telomelysin-GFP (OBP-401) is a telomerase-specific replication-competent adenovirus variant, in which GFP gene is inserted under CMV promoter into E3 region for monitoring viral replication. Telomelysin-RGD (OBP-405) has mutant fiber containing the RGD peptide, CDCRGDCFC, in the HI loop of the fiber knob.

about 50% reduction in cell viability in monolayer cultures (defined as ID₅₀) was less than 20 multiplicity of infections (MOIs) in almost all tumor cell lines examined in our study. These data clearly demonstrate that Telomelysin exhibits desirable features for use as an oncolytic therapeutic agent, as the proportion of cancers potentially treatable by Telomelysin is extremely high.

The *in vivo* antitumor effect of Telomelysin was also investigated by using athymic mice carrying xenografts. Intratumoral injection of Telomelysin into human tumor xenografts resulted in a significant inhibition of tumor growth and enhancement of survival [74, 75]. Macroscopically, massive ulceration was noted on the tumor surface after injection of high-dose Telomelysin, indicating that Telomelysin induced intratumoral necrosis of tumor cells due to direct lysis by virus replication *in vivo* (Fig. 3). For effective treatment of distant metastatic tumors, intravenously infused chemotherapeutic drugs will need to distribute in sufficient quantities into the tumor sites; oncolytic viruses, however, could still replicate in the tumor, cause oncolysis, and then release virus particles that could reach the distant metastatic lesions. Therefore, intratumoral administration that causes the release of newly formed virus from infected tumor cells might be theoretically suitable for oncolytic virus rather than systemic administration. Indeed, it was confirmed that, following intratumoral injection, Telomelysin replicated within tumors, spread into the bloodstream, and then replicated in distant tumor sites [74, 75]. The biodistribution of Telomelysin as assessed by PCR amplification targeting for the viral E1A

provides evidence that viral replication is highly specific for tumors despite its presence in the circulation. No significant elevation of liver enzymes was observed in mice intratumorally injected with Telomelysin. In addition, histopathological analysis of liver sections demonstrated absence of apoptotic hepatocytes and other histological signs of hepatocellular damage [75].

Chemotherapeutic drugs kill tumor cells mainly by inducing apoptosis, which is characterized by chromosome condensation and nuclear shrinkage and fragmentation; nuclear morphology of cells infected with Telomelysin, however, was distinct from apoptosis. Apoptosis in mammalian cells is mediated by a family of cysteine proteases known as caspases, which are the executioners of apoptosis and essential for the disassembly of the cell. No changes in procaspase-3 levels and no expression of cleaved form of caspase-3 in cells infected with Telomelysin were noted. Moreover, flow cytometric analysis demonstrated that Telomelysin infection had no effect on cell cycle distribution [76, 77]. Recently, Ito *et al.* have reported that hTERT-specific oncolytic adenovirus causes autophagic cell death, which is a type of programmed cell death that is an alternative to apoptosis, in malignant glioma cells via inhibition of the mTOR signal [78]. Although their data clearly indicate that autophagy may be one of the cell death machinery induced by oncolytic adenoviruses, our preliminary studies using the green fluorescent protein (GFP) and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) fusion plasmid (GFP-LC3) [79] demonstrated that Telomelysin did not induce GFP-LC3 dots, which represent pre-autophagosomes and

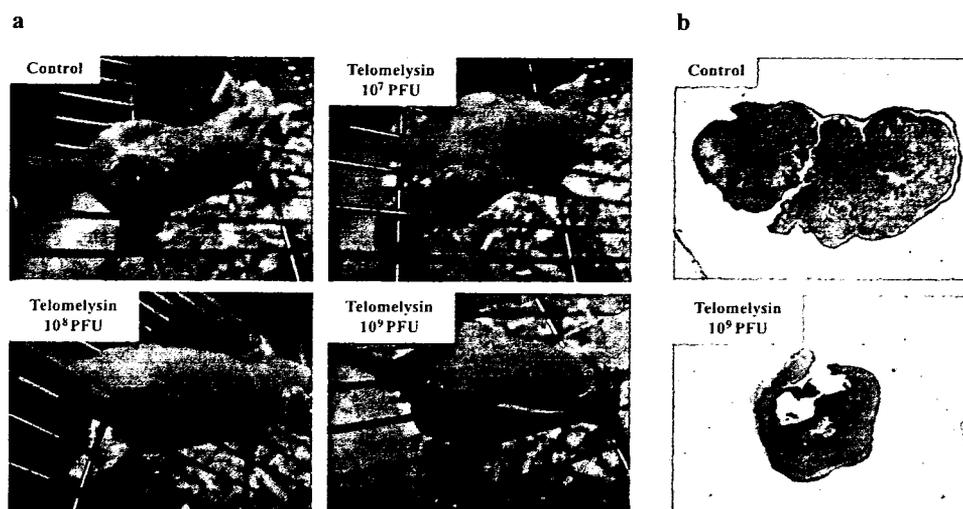


Fig. (3). Antitumor effect of intratumorally injected Telomelysin against established flank SW620 xenograft tumors in *nu/nu* mice. **(a)** Macroscopic appearance of tumors 15 days after treatment with various concentrations of Telomelysin. **(b)** Tumors were dissected 15 days after viral injection and paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin. Massive tumor cell death at the central portions of the tumors where Telomelysin was injected was observed.

autophagosomes in human lung cancer cells. Thus, further investigation in other types of cancer cells will be required to determine the exact mechanisms of Telomelysin-triggered cell death.

Multi-Disciplinary Therapy with Telomelysin

The development of Telomelysin as a monotherapy is currently underway clinically based on the promising results of preclinical studies; multi-modal strategies to enhance antitumor efficacy *in vivo*, however, are essential for successful clinical outcome. In fact, most of the clinical trials for oncolytic viruses have been conducted in combination with chemotherapy or radiotherapy [80-83]. In a report of clinical trial of ONYX-015, no clinical benefit was noted in the majority of patients, despite the encouraging biological activity [84]. Tumor progression was rapid in most patients, even though substantial necrosis was noted in the tumors after treatment [85, 86]. Therefore, multi-disciplinary therapy composed of oncolytic virotherapy combined with low-dose chemotherapeutic agent is required to enhance the antitumor efficacy. Moreover, combination of two agents may allow the use of reduced dosage of each agent, and reduce the likelihood of adverse effects.

Infection with Telomelysin (GFP-expressing Telomelysin was used as an alternative to Telomelysin in some experiments) alone or followed by treatment with docetaxel (Taxotere), a chemotherapeutic agent, resulted in a profound *in vitro* cytotoxicity in various human cancer cell lines originating from different organs (lung, colon, esophagus, stomach, liver, and prostate), although the magnitude of antitumor effect varied among the cell types [77]. Other chemotherapeutic drugs such as vinorelbine (Navelbine) and SN38 (the potent active metabolite of irinotecan) combined with Telomelysin also inhibited the growth of human cancer cells [77]. Quantitative real-time PCR analysis demonstrated that docetaxel did not affect viral replication. For *in vivo* evaluation, mice xenografted with human lung tumor received intratumoral injection of Telomelysin and intraperitoneal administration of docetaxel.

Analysis of growth of implanted tumors showed a significant, therapeutic synergism, while Telomelysin alone and docetaxel alone showed modest inhibition of tumor growth [77]. The antitumor effect of the combination therapy was likely additive *in vitro*; there might be, however, some particular interactions between Telomelysin and docetaxel to produce a synergistic effect *in vivo*. It has been reported that metronomic chemotherapy, which refers to long-term administration of comparatively low doses of cytotoxic drugs at close, regular intervals, has an antiangiogenic basis [87]. Like our approach, the potent antiangiogenic capacity of drugs administered in a metronomic fashion finds favor in a number of *in vivo* preclinical studies; to prove this efficacy by *in vitro* experiments is, however, technically difficult. There are some possible explanations for the superior *in vivo* antitumor activity in our experiments. Systemically administered docetaxel may attack the vascular endothelial cells at the tumor site, which in turn can block the escape of locally injected Telomelysin into the blood circulation. Another possibility is that Telomelysin itself may inhibit the vascular supply by killing endothelial cells.

FR901228 (depsipeptide, FK228) is a novel anticancer agent isolated from the fermentation broth of *Chromobacterium violaceum*. FR901228 has been identified as a potent histone deacetylase (HDAC) inhibitor. Histone deacetylation is an important component of transcriptional control, and it has been shown that FR901228 can increase Cocksackie's-adenovirus receptor (CAR) gene expression in various cancer cell lines [88-91]. Moreover, FR901228 is known to increase viral and transgene expression following adenovirus infection [88]. Indeed, FR901228 treatment upregulated CAR levels on target tumor cells, which in turn increased the amount of cellular Telomelysin replication, thereby promoting a synergistic antitumor effect [76]. These data indicate that FR901228 may be an appropriate partner for Telomelysin because it does not affect the virus life cycle. Delineating specific virus/drug combinations that are tailored to be particularly effective in human cancer could potentially improve the already encouraging results seen in the field of oncolytic virotherapy.

Clinical Application of Telomelysin

Preclinical models suggested that Telomelysin could selectively kill a variety of human cancer cells *in vitro* and *in vivo* via intracellular viral replication regulated by the hTERT transcriptional activity. Pharmacological and toxicological studies in mice and cotton rats demonstrated that none of the animals treated with Telomelysin showed signs of viral distress (e.g., ruffled fur, weight loss, lethargy, or agitation) or extensive histopathological changes in any organs at autopsy. These promising data led us to design a phase I clinical trial of Telomelysin as a monotherapy.

The proposed protocol "A phase I dose-escalation study of intratumoral injection with telomerase-specific replication-competent oncolytic adenovirus, Telomelysin (OBP-301) for various solid tumors" sponsored by Oncolys BioPharma, Inc. is an open-label, phase I, 3 cohort dose-escalation study. The Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) at the National Institutes of Health (NIH) has already reviewed this protocol. The safety, tolerability, and feasibility of intratumoral injection of the agent will be assessed in patients with advanced cancer. The humoral immune response to Telomelysin will be analyzed also. Biopsies will be taken to evaluate the pharmacokinetics and pharmacodynamics of Telomelysin in the injected tumor. Therapeutic response will be assessed by measuring changes in tumor dimensions, comparative analysis of tumor biopsies, and cytokine and/or viral measurements. Patients selected for this trial have histologically or cytologically proven, non-resectable solid tumors and exhibited lack of response to conventional therapies such as primary external beam radiation or systemic chemotherapy. Patients have a disease that is measurable and accessible to direct injection of Telomelysin. Doses of Telomelysin will be escalated from low to high virus particles (VP) in one log increment. Patients will be treated with a single dose intratumoral injection of Telomelysin and then monitored for one month. The trial has been started upon approval of the US Food and Drug Administration (FDA) on November, 2006.

The data of pharmacokinetics and biodistribution of Telomelysin will be of interest. In the phase I trial of Advexin, a replication-deficient adenoviral vector that delivers normally functioning p53 tumor suppressor gene to cancer cells, the vector was present in tumor tissue as well as proximal lymph nodes, indicating regional spread of the vector via the lymphatic vessels [92]. Moreover, clinical trials of intratumoral and intravenous administration of CG7870, a replication-selective oncolytic adenovirus genetically engineered to replicate preferentially in prostate tissue, demonstrated a second peak of the virus genome in the plasma [93, 94], suggesting active viral replication and shedding into the bloodstream. Therefore, it is anticipated that intratumorally administered Telomelysin can spread into the lymphatic vessels as well as the blood circulation, and potentially kill metastatic tumor cells in regional lymph nodes and distant organ tissues. Theoretically, Telomelysin can replicate continuously in the injected tumors and releases virus particles unless all tumor cells are completely eliminated, indicating that a single intratumoral injection should be sufficient to induce antitumor effect. Our preclinical study, however, showed that multiple injections of Telomelysin resulted in a profound inhibition of tumor growth in xenograft models [74, 75, 77]. Thus, once the safety of a single administration is confirmed, the feasibility of

the multi-cycle treatment with Telomelysin will be assessed in human.

hTERT PROMOTER FOR CANCER DIAGNOSTICS

Imaging of Tumor Cells using Telomelysin-GFP

A variety of imaging technologies is being investigated as tools for cancer diagnosis, detection, and treatment monitoring. Improvements in methods of external imaging such as computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), and ultrasound techniques have increased the sensitivity for visualizing tumors and metastases in the body [95]; a limiting factor in structural and anatomical imaging, however, is the inability to specifically identify malignant tissues. Positron emission tomography (PET), with the glucose analogue ^{18}F -2-deoxy-D-glucose (FDG), is the first molecular imaging technique that was widely applied for cancer imaging in clinical settings [96]. Although FDG-PET has high detection sensitivity, it has some limitations such as difficulty in distinguishing between proliferating tumor cells and inflammation and unsuitability for real-time detection of tumor tissues. Therefore, tumor-specific imaging would be of considerable value in treatment of human cancer by defining the location and area of tumors without microscopic analysis. In particular, if tumors too small for direct visual detection and therefore not detectable by direct inspection could be imaged *in situ*, surgeons could precisely excise tumors with appropriate surgical margins. This paradigm requires an appropriate "marker" that can facilitate visualization of physiological or molecular events that occur in tumor cells but not normal cells.

The green fluorescent protein (GFP), which was originally obtained from the jellyfish *Aequorea Victoria*, is an attractive molecular marker for imaging in live tissues because of the relatively non-invasive nature of fluorescent [97]. A new approach developed in our laboratories to specifically visualize human tumor cells involves the use of Telomelysin and a replication-deficient adenovirus expressing the GFP gene (Ad-GFP) (Fig. 4). Telomelysin infection could complement E1 gene functions and facilitate replication of E1-deleted Ad-GFP selectively in co-infected tumor cells [98]. When the human cancer cell lines were infected with Ad-GFP at low MOI, GFP expression could not be detected; in the presence of Telomelysin, however, Ad-GFP replicated in these tumor cells and showed strong green signals. By contrast, co-infection of Telomelysin and Ad-GFP did not show any fluorescence in normal cells such as fibroblasts and vascular endothelial cells because of the low levels of hTERT activity. This strategy was also applied successfully *in vivo*; intrathoracic administration of Telomelysin and Ad-GFP clearly labeled disseminated human lung tumor nodules in mice under the cooled charged-coupled device (CCD) camera (Fig. 4). These data indicate that locoregional injection of Telomelysin plus Ad-GFP in combination with the highly sensitive CCD imaging system might be a useful diagnostic tool for real-time visualization of macroscopically invisible tumor tissues.

The advantage of co-infection of an E1-deleted replication-deficient adenoviral vector and Telomelysin is that transgene expression can be amplified in target cells. Furthermore, many vectors previously constructed can be used to express genes of interest. However, the requirement for both viruses to infect the same cell for the amplified transgene expression is a significant limitation of this dual virus vector system. The degree of

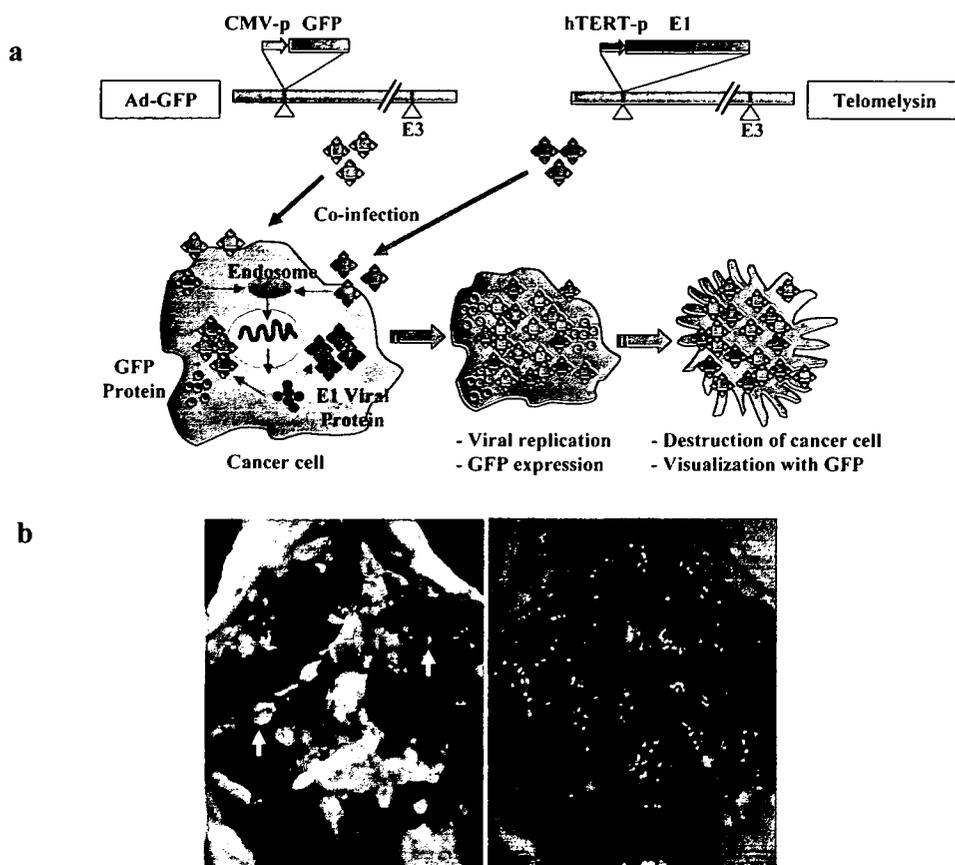


Fig. (4). (a) Concept of selective visualization of tumor cells with Ad-GFP and Telomelysin. (b) Internal images of pleural dissemination visualized by intrathoracic injection of Ad-GFP and Telomelysin. Female BALB/c *nu/nu* mice received intrathoracic implant with A549 human lung tumor cells. Five days after Ad-GFP and Telomelysin injection into the thoracic space, mice were sacrificed, and their thoracic spaces were examined. Fluorescent detection of disseminated tumors. *Arrows*, disseminated tiny tumor.

transgene expression has been shown to vary depending on the copy numbers of the viruses that initially infected the cells. To label efficiently and uniformly target tumor cells with green fluorescence, we modified Telomelysin to contain the GFP gene driven by the cytomegalovirus (CMV) promoter in the E3 deleted region (Fig. 2). The resultant adenovirus was termed Telomelysin-GFP or OBP-401 [76, 77]. Similar to Telomelysin, Telomelysin-GFP replicated 5-6 logs by 3 days after infection in human cancer cell lines and coordinately induced GFP expression; Telomelysin-GFP replication, however, was attenuated up to 2 logs in normal human fibroblasts without GFP expression. Subcutaneous human tumor xenografts could be visualized after intratumoral injection of Telomelysin-GFP. Tumor sections entirely expressed GFP, suggesting *in vivo* viral replication and spread throughout the tumors.

***In vivo* Imaging of Metastatic Tumor Cells with Telomelysin-GFP**

Metastatic spread of tumor cells plays a major role in the morbidity and mortality of human cancer. Although there are few life-prolonging treatments for the majority of patients with distant sites of metastasis, early detection of occult metastasis and early therapeutic interventions may decrease the rate of metastatic spread and extend survival. Lymphatic invasion is one of the major routes for cancer metastasis, and adequate resection of locoregional lymph nodes is required for curative

treatment in patients with advanced malignancies. The risk of lymph node metastasis can be partially predicted by clinical data such as tumor stage, serum tumor marker level, and medical images; there are, however, no noninvasive approaches to accurately predict the presence of lymph node metastasis, in particular, microscopic metastasis. Although molecular analysis based on detection of genetic markers of cancer cells is clinically relevant in some patients, the procurement of sufficient tissue to confirm the diagnosis can be associated with significant morbidity and cost depending on the size and location of the lesion. Therefore, the utility of Telomelysin-GFP that can be used for real-time imaging of tumor tissues *in vivo* offers a practical, safe, and cost-effective alternative to the traditional, cumbersome procedures of histopathological examination.

Following intratumoral injection of Telomelysin-GFP into human colorectal tumors orthotopically implanted into the rectum in mice, para-aortic lymph node metastasis could be visualized at laparotomy under a CCD camera. Histopathological analysis confirmed the presence of metastatic adenocarcinoma cells in the lymph nodes with fluorescence emission, whereas GFP-negative lymph nodes contained no tumor cells. Of interest, metastatic lymph nodes were imaged in spots with GFP fluorescence, which was in agreement with histologically-confirmed micrometastasis. The sensitivity and specificity of this imaging technique are 92.3% and 86.6%,

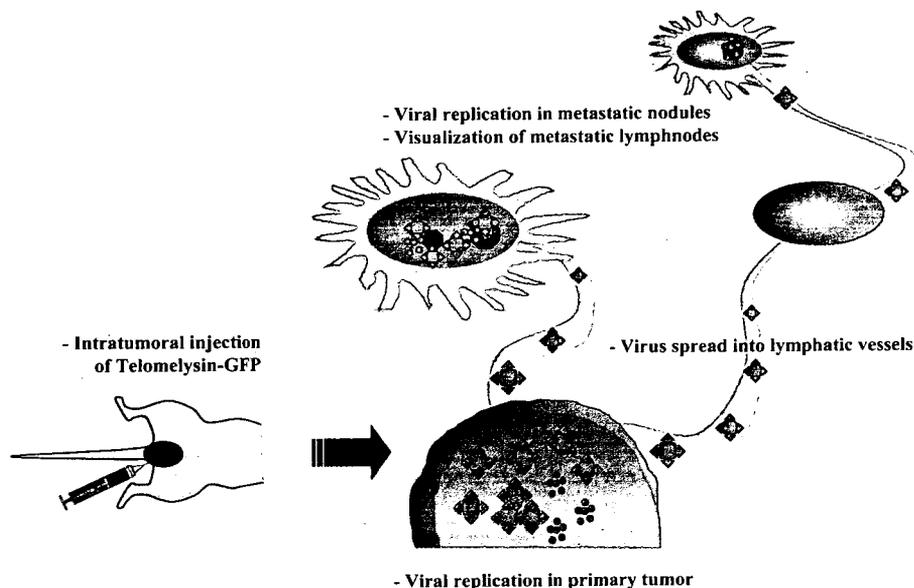


Fig. (5). Concept of selective visualization of lymph node metastasis with Telomelysin-GFP.

respectively, which are sufficiently reliable to support the concept of this approach [99]. These data indicate that Telomelysin-GFP causes viral spread into the regional lymphatic area and selectively replicates in neoplastic lesions, resulting in GFP expression in metastatic lymph nodes (Fig. 5). This experiment mimics the clinical scenario where patients with gastrointestinal malignancies and lymph node metastasis undergo surgery, and the data suggest that the surgeon can identify metastatic lymph nodes by illuminating the abdominal cavity with a Xenon lamp.

Administration of Telomelysin-GFP offers an additional advantage in cancer therapy. Telomelysin-GFP, similar to Telomelysin, is an oncolytic virus, and selectively kills human tumor cells by viral replication; the process of cell death by Telomelysin-GFP, however, is relatively slow compared to apoptosis-inducing chemotherapeutic drugs, because the virus needs time for replication. Therefore, tumor cells infected with Telomelysin-GFP express GFP fluorescence, followed by loss of viability, allowing the timing of detection. Thus, Telomelysin-GFP can spread into the regional lymph nodes after intratumoral injection, express GFP signals in tumor cells by virus replication, and finally kill tumor cells even if the surgeon failed to remove all nodes containing micrometastasis.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

There have been very impressive advances in our understanding of the molecular aspects of human cancer and in the development of technologies for genetic modification of viral genomes. Nevertheless, there are many remaining hurdles, ethical and technical that must be solved before virotherapy including virus-mediated gene therapy ever reach routine clinical application. The safety considerations in the virus manufacture and clinical protocols are among the most important issues to be studied. Another important issue is to find ways to selectively deliver viruses into a high percentage of malignant cells in an existing tumor mass. The use of tissue or cell-type specific promoters could perhaps achieve

specificity of virus-mediated antitumor effect. The hTERT promoter-based transcriptional targeting in adenoviral constructs is a powerful tool for cancer diagnosis and therapy. In particular, the hTERT-specific oncolytic adenovirus achieves a more strict targeting potential due to the amplified effect by viral replication, and is a promising therapeutic alternative to replication-deficient gene therapy vectors. Several independent studies that used different regions of hTERT promoter and different sites of adenoviral genome responsible for viral replication, have shown that the hTERT promoter allows adenoviral replication as a molecular switch and induces selective cytopathic effect in a variety of human tumor cells [70-72, 74]. Among these viral constructs, to the best of our knowledge, Telomelysin seems to be the first hTERT-dependent oncolytic adenovirus that has been used in a clinical trial based on preclinical pharmacological and toxicological studies.

Although Telomelysin showed a broad and profound antitumor effect in human cancer originating from various organs, one weakness of Telomelysin is that virus infection efficiency depends on CAR expression, which is not highly expressed on the cell surface of some types of human cancer cells. Thus, tumors that lost CAR expression may be refractory to infection with Telomelysin. Since modification of fiber protein is an attractive strategy for overcoming the limitations imposed by the CAR dependence of Telomelysin infection, we modified the fiber of Telomelysin to contain RGD (Arg-Gly-Asp) 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 (Fig. 2). The resultant adenovirus, termed Telomelysin-RGD or OBP-405, mediated not only CAR-dependent virus entry but also CAR-independent, RGD-integrin-dependent virus entry [75]. Telomelysin-RGD had an apparent oncolytic effect on human cancer cell lines with low CAR expression. Intratumoral injection of Telomelysin-RGD into CAR-negative tumor xenografts in mice resulted in significant inhibition of tumor growth and long-term survival. These data suggest that fiber-modified Telomelysin-RGD exhibits a broad target ranges by increasing infection efficiency, although one needs to be

cautious about increased toxicity since hematopoietic cell population such as dendritic cells can be efficiently infected with RGD-modified adenovirus [100].

A possible future direction for Telomelysin includes combination therapy with conventional therapies such as chemotherapy, radiotherapy, surgery, immunotherapy, and new modalities such as antiangiogenic therapy. Since clinical activities observed by intratumoral injection of Telomelysin suggest that even partial elimination of the tumor could be clinically beneficial, the combination approaches may lead to the development of more advanced biological therapy for human cancer. The combination of systemic chemotherapy and local injection of Telomelysin has been shown to be effective as described above [77]. In addition, we found that oncolysis induced by Telomelysin infection could be the most effective stimulus for immature dendritic cells to induce specific activity against human cancer cells. Therefore, Telomelysin can be effective not only as a direct cytotoxic drug but also as an immunostimulatory agent that induces specific cytotoxic T-lymphocytes (CTL) for the remaining antigen-bearing tumor cells. Peri- or postoperative administration of Telomelysin may be also valuable as adjuvant therapy in areas of microscopic residual disease at tumor margins to prevent recurrence or regrowth of tumors.

To our knowledge, no experimental viral agents that target human cancer including gene therapy products have been clinically approved in the world except in China. Advexin, which delivers normally functioning p53 tumor suppressor gene to cancer cells, will most likely be the first gene therapy drug approved in the US; the clinical development phase of Advexin, however, may be more than 10 years from the year the clinical study was initiated. The transition from phase I to phase III is also necessary for the development of Telomelysin. The recent surge in the approval rate for therapeutic monoclonal antibodies that were unsuccessful in the early 1980s is encouraging. Once one or more viral agents are approved in the US, the clinical development of oncolytic viruses is expected to move rapidly to the market.

The field of virotherapy is progressing considerably and is rapidly gaining medical and scientific acceptance. Although many technical and conceptual problems await to be solved, ongoing and future clinical studies will no doubt continue to provide important clues that may allow substantial progress in human cancer therapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by Grants-in-Aid from the Ministry of Education, Science, and Culture, Japan; and Grants from the Ministry of Health and Welfare, Japan. We thank Drs. Hitoshi Kuwamura and Katsuyuki Nagai (Oncolys BioPharma, Inc.) for helpful discussions at all stages of this work.

ABBREVIATIONS

AFP	=	α - Fetoprotein
CAR	=	Coxsackie's-adenovirus receptor
CCD	=	Cooled charged-coupled device
CMV	=	Cytomegalovirus
COX	=	Cyclooxygenase

CT	=	Computed tomography
CTL	=	Cytotoxic T-lymphocytes
EGF	=	Epidermal growth factor
ERE	=	Estrogen response element
FDA	=	Food and Drug Administration
FDG	=	^{18}F -2-deoxy-D-glucose
GFP	=	Green fluorescent protein
HDAC	=	Histone deacetylase
HPV	=	Human papilloma virus
hTERT	=	Human telomerase reverse transcriptase
LC3	=	Light chain 3
MOI	=	Multiplicity of infection
MRI	=	Magnetic resonance imaging
MZF-2	=	Myeloid-specific zinc finger protein 2
NIH	=	National Institutes of Health
NSAID	=	Nonsteroidal anti-inflammatory drug
PET	=	Positron emission tomography
PSA	=	Prostate-specific antigen
RAC	=	Recombinant DNA Advisory Committee
TSA	=	Tricostatin A
WT1	=	Wilm's tumor suppressor 1

REFERENCES

- [1] Collins, K. Mammalian telomeres and telomerase. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, *12*, 378-383.
- [2] Blackburn, E. H. Switching and signaling at the telomere. *Cell* **2001**, *106*, 661-673.
- [3] Aviv, A.; Aviv, H. Telomeres, hidden mosaicism, loss of heterozygosity, and complex genetic traits. *Hum. Genet.* **1998**, *103*, 2-4.
- [4] Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
- [5] Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* **1993**, *9*, 138-141.
- [6] Wright, W. E.; Shay, J. W. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 849-851.
- [7] Counter, C. M. The roles of telomeres and telomerase in cell life span. *Mutat. Res.* **1996**, *366*, 45-63.
- [8] Morin, G. B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* **1989**, *59*, 521-529.
- [9] Collins, K.; Mitchell, J. R. Telomerase in the human organism. *Oncogene* **2002**, *21*, 564-579.
- [10] Nugent, C. I.; Lundblad, V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 1073-1085.
- [11] Kim, N. W.; Piatyszek, M. A.; Prowse, K. R.; Harley, C. B.; West, M. D.; Ho, P. L.; Coviello, G. M.; Wright, W. E.; Weinrich, S. L.; Shay, J. W. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **1994**, *266*, 2011-2015.
- [12] Shay, J. W.; Bacchetti, S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer* **1997**, *33*, 787-791.
- [13] Blackburn, E. H. Telomere states and cell fates. *Nature* **2000**, *408*, 53-56.
- [14] Dong, C. K.; Masutomi, K.; Hahn, W. C. Telomerase: regulation, function and transformation. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2005**, *54*, 85-93.
- [15] Shay, J. W.; Wright, W. E. Telomerase: a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2002**, *2*, 257-265.
- [16] Feng, J.; Funk, W. D.; Wang, S. S.; Weinrich, S. L.; Avilion, A. A.; Chiu, C. P.; Adams, R. R.; Chang, E.; Allsopp, R. C.; Yu, J. The RNA component of human telomerase. *Science* **1995**, *269*, 1236-1241.
- [17] Harrington, L.; McPhail, T.; Mar, V.; Zhou, W.; Oulton, R.; Bass, M. B.; Arruda, I.; Robinson, M. O. A mammalian telomerase-associated protein. *Science* **1997**, *275*, 973-977.
- [18] Meyerson, M.; Counter, C. M.; Eaton, E. N.; Ellisen, L. W.; Steiner, P.; Caddle, S. D.; Ziaugra, L.; Beijersbergen, R. L.; Davidoff, M. J.; Liu, Q.;

- Bacchetti, S.; Haber, D. A.; Weinberg, R. A. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 1997, 90, 785-795.
- [19] Nakamura, T. M.; Morin, G. B.; Chapman, K. B.; Weinrich, S. L.; Andrews, W. H.; Lingner, J.; Harley, C. B.; Cech, T. R. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 1997, 277, 955-959.
- [20] Nakayama, J.; Tahara, H.; Tahara, E.; Saito, M.; Ito, K.; Nakamura, H.; Nakanishi, T.; Tahara, E.; Ide, T.; Ishikawa, F. Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat. Genet.* 1998, 18, 65-68.
- [21] Beattie, T. L.; Zhou, W.; Robinson, M. O.; Harrington, L. Reconstitution of human telomerase activity *in vitro*. *Curr. Biol.* 1998, 8, 177-180.
- [22] Takakura, M.; Kyo, S.; Kanaya, T.; Hirano, H.; Takeda, J.; Yutsudo, M.; Inoue, M. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res.* 1999, 59, 551-557.
- [23] Cong, Y. S.; Wen, J.; Bacchetti, S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum. Mol. Genet.* 1999, 8, 137-142.
- [24] Horikawa, I.; Cable, P. L.; Afshari, C.; Barrett, J. C. Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene. *Cancer Res.* 1999, 59, 826-830.
- [25] Wick, M.; Zubov, D.; Hagen, G. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene* 1999, 232, 97-106.
- [26] Abdul-Ghani, R.; Ohana, P.; Matouk, I.; Ayesb, S.; Ayesb, B.; Laster, M.; Bibi, O.; Giladi, H.; Molnar-Kimber, K.; Sughayer, M. A.; de, G. N.; Hochberg, A. Use of transcriptional regulatory sequences of telomerase (hTERT and hTERT) for selective killing of cancer cells. *Mol. Ther.* 2000, 2, 539-544.
- [27] Komata, T.; Koga, S.; Hirohata, S.; Takakura, M.; Germano, I. M.; Inoue, M.; Kyo, S.; Kondo, S.; Kondo, Y. A novel treatment of human malignant gliomas *in vitro* and *in vivo*: FADD gene transfer under the control of the human telomerase reverse transcriptase gene promoter. *Int. J. Oncol.* 2001, 19, 1015-1020.
- [28] Komata, T.; Kondo, Y.; Kanzawa, T.; Hirohata, S.; Koga, S.; Sumiyoshi, H.; Srinivasula, S. M.; Barna, B. P.; Germano, I. M.; Takakura, M.; Inoue, M.; Alnemri, E. S.; Shay, J. W.; Kyo, S.; Kondo, S. Treatment of malignant glioma cells with the transfer of constitutively active caspase-6 using the human telomerase catalytic subunit (human telomerase reverse transcriptase) gene promoter. *Cancer Res.* 2001, 61, 5796-5802.
- [29] Komata, T.; Kondo, Y.; Kanzawa, T.; Iro, H.; Hirohata, S.; Koga, S.; Sumiyoshi, H.; Takakura, M.; Inoue, M.; Barna, B. P.; Germano, I. M.; Kyo, S.; Kondo, S. Caspase-8 gene therapy using the human telomerase reverse transcriptase promoter for malignant glioma cells. *Hum. Gene Ther.* 2002, 13, 1015-1025.
- [30] Gu, J.; Kagawa, S.; Takakura, M.; Kyo, S.; Inoue, M.; Roth, J. A.; Fang, B. Tumor-specific transgene expression from the human telomerase reverse transcriptase promoter enables targeting of the therapeutic effects of the Bax gene to cancers. *Cancer Res.* 2000, 60, 5359-5364.
- [31] Ito, H.; Kanzawa, T.; Miyoshi, T.; Hirohata, S.; Kyo, S.; Iwamaru, A.; Aoki, H.; Kondo, Y.; Kondo, S. Therapeutic efficacy of PUMA for malignant glioma cells regardless of p53 status. *Hum. Gene Ther.* 2005, 16, 685-698.
- [32] Roth, J. A. Adenovirus p53 gene therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2006, 6, 55-61.
- [33] Kircheis, R.; Wagner, E. Technology evaluation: TNFerade, GenVec. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2003, 5, 437-447.
- [34] Wildner, O. *In situ* use of suicide genes for therapy of brain tumours. *Ann. Med.* 1999, 31, 421-429.
- [35] Hawkins, L. K.; Lemoine, N. R.; Kim, D. Oncolytic biotherapy: a novel therapeutic platform. *Lancet Oncol.* 2002, 3, 17-26.
- [36] Davis, J. J.; Fang, B. Oncolytic virotherapy for cancer treatment: challenges and solutions. *J. Gene Med.* 2005, 7, 1380-1389.
- [37] Aghi, M.; Martuza, R. L. Oncolytic viral therapies - the clinical experience. *Oncogene* 2005, 24, 7802-7816.
- [38] Takakura, M.; Kyo, S.; Kanaya, T.; Tanaka, M.; Inoue, M. Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. *Cancer Res.* 1998, 58, 1558-1561.
- [39] Hiyama, E.; Hiyama, K. Telomerase as tumor marker. *Cancer Lett.* 2003, 194, 221-233.
- [40] Hiyama, K.; Hirai, Y.; Kyoizumi, S.; Akiyama, M.; Hiyama, E.; Piattyszek, M. A.; Shay, J. W.; Ishioka, S.; Yamakido, M. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* 1995, 155, 3711-3715.
- [41] Tahara, H.; Yasui, W.; Tahara, E.; Fujimoto, J.; Ito, K.; Tamai, K.; Nakayama, J.; Ishikawa, F.; Tahara, E.; Ide, T. Immuno-histochemical detection of human telomerase catalytic component, hTERT, in human colorectal tumor and non-tumor tissue sections. *Oncogene* 1999, 18, 1561-1567.
- [42] Aisner, D. L.; Wright, W. E.; Shay, J. W. Telomerase regulation: not just flipping the switch. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2002, 12, 80-85.
- [43] Greenberg, R. A.; O'Hagan, R. C.; Deng, H.; Xiao, Q.; Hann, S. R.; Adams, R. R.; Lichtsteiner, S.; Chin, L.; Morin, G. B.; DePinho, R. A. Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene* 1999, 18, 1219-1226.
- [44] Wu, K. J.; Grandori, C.; Amacker, M.; Simon-Vermot, N.; Polack, A.; Lingner, J.; Dalla-Favera, R. Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat. Genet.* 1999, 21, 220-224.
- [45] Gunes, C.; Lichtsteiner, S.; Vasserot, A. P.; Englert, C. Expression of the hTERT gene is regulated at the level of transcriptional initiation and repressed by Mad1. *Cancer Res.* 2000, 60, 2116-2121.
- [46] Oh, S.; Song, Y. H.; Yim, J.; Kim, T. K. Identification of Mad as a repressor of the human telomerase (hTERT) gene. *Oncogene* 2000, 19, 1485-1490.
- [47] Kyo, S.; Takakura, M.; Taira, T.; Kanaya, T.; Itoh, H.; Yutsudo, M.; Ariga, H.; Inoue, M. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, 669-677.
- [48] Yarden, Y.; Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001, 2, 127-137.
- [49] Sharrocks, A. D. The ETS-domain transcription factor family. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001, 2, 827-837.
- [50] Veldman, T.; Horikawa, I.; Barrett, J. C.; Schlegel, R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J. Virol.* 2001, 75, 4467-4472.
- [51] Oh, S. T.; Kyo, S.; Laimins, L. A. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J. Virol.* 2001, 75, 5559-5566.
- [52] Gwin, L.; Galloway, D. A. E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc. *J. Virol.* 2001, 75, 7198-7201.
- [53] Oh, S.; Song, Y.; Yim, J.; Kim, T. K. The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 37473-37478.
- [54] Fujimoto, K.; Kyo, S.; Takakura, M.; Kanaya, T.; Kitagawa, Y.; Itoh, H.; Takahashi, M.; Inoue, M. Identification and characterization of negative regulatory elements of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter: possible role of MZF-2 in transcriptional repression of hTERT. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, 2557-2562.
- [55] Crowe, D. L.; Nguyen, D. C.; Tsang, K. J.; Kyo, S. E2F-1 represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29, 2789-2794.
- [56] Won, J.; Yim, J.; Kim, T. K. Opposing regulatory roles of E2F in human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression in human tumor and normal somatic cells. *FASEB J.* 2002, 16, 1943-1945.
- [57] Kyo, S.; Takakura, M.; Kanaya, T.; Zhuo, W.; Fujimoto, K.; Nishio, Y.; Orimo, A.; Inoue, M. Estrogen activates telomerase. *Cancer Res.* 1999, 59, 5917-5921.
- [58] Misiti, S.; Nanni, S.; Fontemaggi, G.; Cong, Y. S.; Wen, J.; Hirte, H. W.; Piaggio, G.; Sacchi, A.; Pontecorvi, A.; Bacchetti, S.; Farsetti, A. Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. *Mol. Cell Biol.* 2000, 20, 3764-3771.
- [59] Wang, Z.; Kyo, S.; Takakura, M.; Tanaka, M.; Yatabe, N.; Maida, Y.; Fujiwara, M.; Hayakawa, J.; Ohmichi, M.; Koike, K.; Inoue, M. Progesterone regulates human telomerase reverse transcriptase gene expression via activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res.* 2000, 60, 5376-5381.
- [60] Takakura, M.; Kyo, S.; Sowa, Y.; Wang, Z.; Yatabe, N.; Maida, Y.; Tanaka, M.; Inoue, M. Telomerase activation by histone deacetylase inhibitor in normal cells. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29, 3006-3011.
- [61] He, H.; Xia, H. H.; Wang, J. D.; Gu, Q.; Lin, M. C.; Zou, B.; Lam, S. K.; Chan, A. O.; Yuen, M. F.; Kung, H. F.; Wong, B. C. Inhibition of human telomerase reverse transcriptase by nonsteroidal antiinflammatory drugs in colon carcinoma. *Cancer* 2006, 106, 1243-1249.
- [62] Ikeda, N.; Uemura, H.; Ishiguro, H.; Hori, M.; Hosaka, M.; Kyo, S.; Miyamoto, K.; Takeda, E.; Kubota, Y. Combination treatment with 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and 9-cis-retinoic acid directly inhibits human telomerase reverse transcriptase transcription in prostate cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 2003, 2, 739-746.
- [63] Pendino, F.; Dudognon, C.; Delhommeau, F.; Sahraoui, T.; Flexor, M.; naceur-Grisicelli, A.; Lanotte, M.; Segal-Bendirjian, E. Retinoic acid receptor alpha and retinoid-X receptor-specific agonists synergistically target telomerase expression and induce tumor cell death. *Oncogene* 2003, 22, 9142-9150.
- [64] Rodriguez, R.; Schuur, E. R.; Lim, H. Y.; Henderson, G. A.; Simons, J. W.; Henderson, D. R. Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res.* 1997, 57, 2559-2563.
- [65] Kurihara, T.; Brough, D. E.; Kovesdi, I.; Kufe, D. W. Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen. *J. Clin. Invest.* 2000, 106, 763-771.
- [66] Matsubara, S.; Wada, Y.; Gardner, T. A.; Egawa, M.; Park, M. S.; Hsieh, C. L.; Zhai, H. E.; Kao, C.; Kamidono, S.; Gillenwater, J. Y.; Chung, L. W. A conditional replication-competent adenoviral vector, Ad-OC-E1a,

- to cotarget prostate cancer and bone stroma in an experimental model of androgen-independent prostate cancer bone metastasis. *Cancer Res.* 2001, 61, 6012-6019.
- [67] Peng, X. Y.; Won, J. H.; Rutherford, T.; Fujii, T.; Zelterman, D.; Pizzomo, G.; Sapi, E.; Leavitt, J.; Kacinski, B.; Crystal, R.; Schwartz, P.; Deisseroth, A. The use of the L-paclitaxin promoter for adenoviral-mediated, tumor-specific gene expression in ovarian and bladder cancer cell lines. *Cancer Res.* 2001, 61, 4405-4413.
- [68] Adachi, Y.; Reynolds, P. N.; Yamamoto, M.; Wang, M.; Takayama, K.; Matsubara, S.; Muramatsu, T.; Curiel, D. T. A midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus for treatment of pediatric solid tumors and bone marrow purging. *Cancer Res.* 2001, 61, 7882-7888.
- [69] Tsukada, K.; Wiewrodt, R.; Molnar-Kimber, K.; Jovanovic, V. P.; Amin, K. M. An E2F-responsive replication-selective adenovirus targeted to the defective cell cycle in cancer cells: potent antitumoral efficacy but no toxicity to normal cell. *Cancer Res.* 2002, 62, 3438-3447.
- [70] Wirth, T.; Zender, L.; Schulte, B.; Mundt, B.; Plentz, R.; Rudolph, K. L.; Manns, M.; Kubicka, S.; Kuhnel, F. A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer. *Cancer Res.* 2003, 63, 3181-3188.
- [71] Lanson, N. A., Jr.; Friedlander, P. L.; Schwarzenberger, P.; Kolls, J. K.; Wang, G. Replication of an adenoviral vector controlled by the human telomerase reverse transcriptase promoter causes tumor-selective tumor lysis. *Cancer Res.* 2003, 63, 7936-7941.
- [72] Irving, J.; Wang, Z.; Powell, S.; O'Sullivan, C.; Mok, M.; Murphy, B.; Cardozo, L.; Lebkowski, J. S.; Majumdar, A. S. Conditionally replicative adenovirus driven by the human telomerase promoter provides broad-spectrum antitumor activity without liver toxicity. *Cancer Gene Ther.* 2004, 11, 174-185.
- [73] Li, Y.; Yu, D. C.; Chen, Y.; Amin, P.; Zhang, H.; Nguyen, N.; Henderson, D. R. A hepatocellular carcinoma-specific adenovirus variant, CV890, eliminates distant human liver tumors in combination with doxorubicin. *Cancer Res.* 2001, 61, 6428-6436.
- [74] Kawashima, T.; Kagawa, S.; Kobayashi, N.; Shirakiya, Y.; Umeoka, T.; Teraishi, F.; Taki, M.; Kyo, S.; Tanaka, N.; Fujiwara, T. Telomerase-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10, 285-292.
- [75] 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* 2005, 24, 3130-3140.
- [76] 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.* 2006, 312, 256-265.
- [77] 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* 2006, 119, 432-440.
- [78] Ito, H.; Aoki, H.; Kuhnel, F.; Kondo, Y.; Kubicka, S.; Wirth, T.; Iwado, E.; Iwamaru, A.; Fujiwara, K.; Hess, K. R.; Lang, F. F.; Sawaya, R.; Kondo, S. Autophagic cell death of malignant glioma cells induced by a conditionally replicating adenovirus. *J. Natl. Cancer Inst.* 2006, 98, 625-636.
- [79] Kabeya, Y.; Mizushima, N.; Ueno, T.; Yamamoto, A.; Kirisako, T.; Noda, T.; Kominami, E.; Ohsumi, Y.; Yoshimori, T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000, 19, 5720-5728.
- [80] Khuri, F. R.; Nemunaitis, J.; Ganly, I.; Arseneau, J.; Tannock, I. F.; Romel, L.; Gore, M.; Ironside, J.; MacDougall, R. H.; Heise, C.; Randlev, B.; Gillenwater, A. M.; Brusco, P.; Kaye, S. B.; Hong, W. K.; Kim, D. H. 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.* 2000, 6, 879-885.
- [81] Reid, T.; Galanis, E.; Abbruzzese, J.; Sze, D.; Wein, L. M.; Andrews, J.; Randlev, B.; Heise, C.; Uprichard, M.; Hatfield, M.; Rome, L.; Rubin, J.; Kim, D. Hepatic arterial infusion of a replication-selective oncolytic adenovirus (dl1520): phase II viral, immunologic, and clinical endpoints. *Cancer Res.* 2002, 62, 6070-6079.
- [82] Hecht, J. R.; Bedford, R.; Abbruzzese, J. L.; Lahoti, S.; Reid, T. R.; Soetikno, R. M.; Kim, D. H.; Freeman, S. M. A phase I/II trial of intratumoral endoscopic ultrasound injection of ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2003, 9, 555-561.
- [83] Galanis, E.; Okuno, S. H.; Nascimento, A. G.; Lewis, B. D.; Lee, R. A.; Oliveira, A. M.; Sloan, J. A.; Atherton, P.; Edmonson, J. H.; Erlichman, C.; Randlev, B.; Wang, Q.; Freeman, S.; Rubin, J. Phase I-II trial of ONYX-015 in combination with MAP chemotherapy in patients with advanced sarcomas. *Gene Ther.* 2005, 12, 437-445.
- [84] Nemunaitis, J.; Ganly, I.; Khuri, F.; Arseneau, J.; Kuhn, J.; McCarty, T.; Landers, S.; Maples, P.; Romel, L.; Randlev, B.; Reid, T.; Kaye, S.; Kim, D. Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Res.* 2000, 60, 6359-6366.
- [85] Jacobs, C.; Lyman, G.; Velez-Garcia, E.; Sridhar, K. S.; Knight, W.; Hochster, H.; Goodnough, L. T.; Mortimer, J. E.; Einhorn, L. H.; Schacter, L. A phase III randomized study comparing cisplatin and fluorouracil as single agents and in combination for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *J. Clin. Oncol.* 1992, 10, 257-263.
- [86] Vokes, E. E. Chemotherapy and integrated treatment approaches in head and neck cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 1991, 3, 529-534.
- [87] Shaked, Y.; Emmenegger, U.; Francia, G.; Chen, L.; Lee, C. R.; Man, S.; Paraghamian, A.; Ben-David, Y.; Kerbel, R. S. Low-dose metronomic combined with intermittent bolus-dose cyclophosphamide is an effective long-term chemotherapy treatment strategy. *Cancer Res.* 2005, 65, 7045-7051.
- [88] Kitazono, M.; Goldsmith, M. E.; Aikou, T.; Bates, S.; Fojo, T. Enhanced adenovirus transgene expression in malignant cells treated with the histone deacetylase inhibitor FR901228. *Cancer Res.* 2001, 61, 6328-6330.
- [89] Goldsmith, M. E.; Kitazono, M.; Fok, P.; Aikou, T.; Bates, S.; Fojo, T. The histone deacetylase inhibitor FK228 preferentially enhances adenovirus transgene expression in malignant cells. *Clin. Cancer Res.* 2003, 9, 5394-5401.
- [90] Pong, R. C.; Lai, Y. J.; Chen, H.; Okegawa, T.; Frenkel, E.; Sagalowsky, A.; Hsieh, J. T. Epigenetic regulation of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) gene promoter in urogenital cancer cells. *Cancer Res.* 2003, 63, 8680-8686.
- [91] Hemminki, A.; Kanerva, A.; Liu, B.; Wang, M.; Alvarez, R. D.; Siegal, G. P.; Curiel, D. T. Modulation of coxsackie-adenovirus receptor expression for increased adenoviral transgene expression. *Cancer Res.* 2003, 63, 847-853.
- [92] 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 in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2006, 24, 1689-1699.
- [93] DeWeese, T. L.; van der, P. H.; Li, S.; Mikhak, B.; Drew, R.; Goemann, M.; Hamper, U.; DeJong, R.; Detorie, N.; Rodriguez, R.; Haulk, T.; DeMarzo, A. M.; Piantadosi, S.; Yu, D. C.; Chen, Y.; Henderson, D. R.; Carducci, M. A.; Nelson, W. G.; Simons, J. W. A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy. *Cancer Res.* 2001, 61, 7464-7472.
- [94] Small, E. J.; Carducci, M. A.; Burke, J. M.; Rodriguez, R.; Fong, L.; van, U. L.; Yu, D. C.; Aimi, J.; Ando, D.; Working, P.; Kirn, D.; Wilding, G. A Phase I trial of intravenous CG7870, a replication-selective, prostate-specific antigen-targeted oncolytic adenovirus, for the treatment of hormone-refractory, metastatic prostate Cancer. *Mol. Ther.* 2006, 14, 107-117.
- [95] Tearney, G. J.; Brezinski, M. E.; Bouma, B. E.; Boppart, S. A.; Pitris, C.; Southern, J. F.; Fujimoto, J. G. *In vivo* endoscopic optical biopsy with optical coherence tomography. *Science* 1997, 276, 2037-2039.
- [96] Kelloff, G. J.; Hoffman, J. M.; Johnson, B.; Scher, H. I.; Siegel, B. A.; Cheng, E. Y.; Cheson, B. D.; O'shaughnessy, J.; Guyton, K. Z.; Mankoff, D. A.; Shankar, L.; Larson, S. M.; Sigman, C. C.; Schilsky, R. L.; Sullivan, D. C. Progress and promise of FDG-PET imaging for cancer patient management and oncologic drug development. *Clin. Cancer Res.* 2005, 11, 2785-2808.
- [97] Hoffman, R. M. The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer *in vivo*. *Nat. Rev. Cancer* 2005, 5, 796-806.
- [98] Umeoka, T.; Kawashima, T.; Kagawa, S.; Teraishi, F.; Taki, M.; Nishizaki, M.; Kyo, S.; Nagai, K.; Urata, Y.; Tanaka, N.; Fujiwara, T. Visualization of intrathoracically disseminated solid tumors in mice with optical imaging by telomerase-specific amplification of a transferred green fluorescent protein gene. *Cancer Res.* 2004, 64, 6259-6265.
- [99] Kishimoto, H.; Kojima, T.; Watanabe, Y.; Kagawa, S.; Fujiwara, T.; Uno, F.; Teraishi, F.; Kyo, S.; Mizuguchi, H.; Hasimoto, Y.; Urata, Y.; Tanaka, N.; Fujiwara, T. *In vivo* imaging of lymph node metastasis with telomerase-specific replication-selective adenovirus. *Nat. Med.* 2006, 12, 1213-1219.
- [100] Okada, N.; Tsukada, Y.; Nakagawa, S.; Mizuguchi, H.; Mori, K.; Saito, T.; Fujita, T.; Yamamoto, A.; Hayakawa, T.; Mayumi, T. Efficient gene delivery into dendritic cells by fiber-mutant adenovirus vectors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, 282, 173-179.

表 題

著 者 名

醫學のあゆみ 別 刷

第 卷・第 号： 年 月 日号

感受性遺伝子の同定の可能性がある。今後、言語の神経科学に FOXP2 を通じて遺伝子レベルからボトムアップなアプローチが発展していくことが予想される。

- 1) Fisher, S. E. et al. : Deciphering the genetic basis of speech and language disorders. *Annu. Rev. Neurosci.*, **26** : 57-80, 2003.
- 2) Lai, C. S. L. et al. : A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature*, **413** : 519-523, 2001.
- 3) Lai, C. S. L. et al. : Foxp2 expression during brain development coincides with adult sites of pathology in a severe speech and

language disorder. *Brain*, **126** : 2455-2462, 2003.

- 4) Takahashi, K. et al. : Expression of Foxp2, a gene involved in speech and language, in the developing and adult striatum. *J. Neurosci. Res.*, **73** : 61-72, 2003.
- 5) Ullman, M. T. : A neurocognitive perspective on language: the declarative/procedural model. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2** : 717-726, 2001.

高橋 薫, 高橋浩士 / Kaoru TAKAHASHI and Hiroshi TAKAHASHI
 三菱化学生命科学研究所アルツハイマー病研究チーム

ングの困難さから、術中 *in situ* で 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¹⁾、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。

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²⁾、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

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

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%

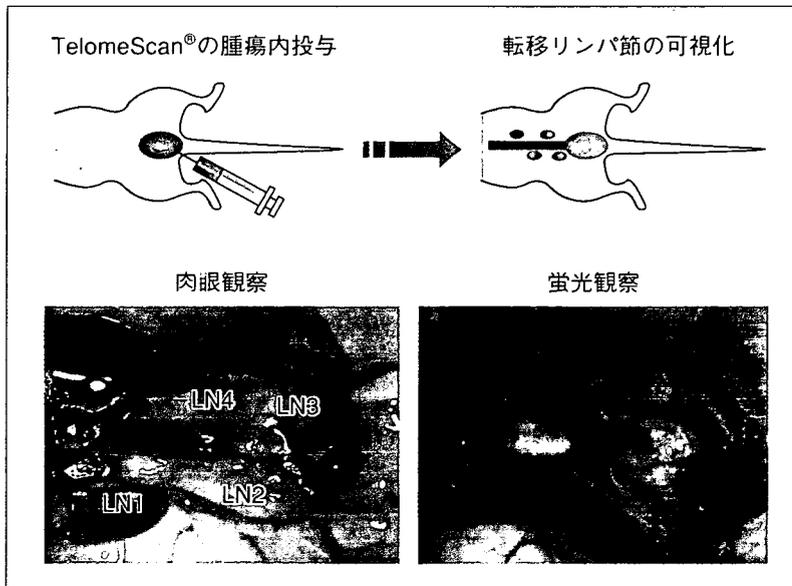


図 1 TelomeScan®によるリンパ節転移の*in vivo*イメージング⁷⁾

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^{3,4)}。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^{5,6)}。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⁷⁾。

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、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⁷⁾。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

●お知らせ●

■第11回腸内細菌学会

日時: 6月14日(木)~15日(金)

場所: 北里大学薬学部「薬学部コンベンションホール」
 [東京都港区白金 5-9-1 TEL: 03-5791-6256
 (微生物学教室内)]

テーマ: 腸内フローラ研究からプロバイオティクスへ
 会長: 田中隆一郎(株式会社ヤクルト本社中央研究所)
 プログラム:

特別講演 1 「Intestinal flora and inflammatory bowel disease (仮題)」 Sartor BR (North Carolina University)

特別講演 2 「How bacteria establish, disrupt, regulate homeostasis of intestinal inflammation: the Yin and Yang of innate immunity.」 Philippe J. SANSON-ETTI (INSTITUT PASTEUR)

特別講演 3 「未熟児・新生児期は Probiotics 投与の Critical window (Optimal window)」 山城雄一郎(順天堂大学医学部)

シンポジウム 1 「腸内菌と宿主のクロストーク」

- ・腸内細菌叢が宿主免疫系に及ぼす影響 鈴木敬一朗 (理化学研究所 横浜研究所)
- ・Paneth 細胞の抗菌ペプチドによる腸内自然免疫 綾部時芳 (北海道大学大学院先端生命科学研究院)

- ・微生物に対する腸管免疫系の認識および応答機構 八村敏志 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
- ・腸内細菌と上皮細胞とのクロストーク——炎症性腸疾患の病態解明への試み 福島浩平 (東北大学大学院医学系研究科)
- シンポジウム 2 「プロバイオティクスの臨床応用」
- ・シンバイオティクスによる術後感染性合併症の予防 榎野正人 (名古屋大学大学院医学系研究科)
- ・臨床試験によるプロバイオティクスの評価 石川秀樹 (京都府立医科大学分子標的癌予防医学)
- ・プロバイオティクスと下部消化管疾患 加藤公敏 (日本大学医学部)
- ・アレルギー疾患予防/治療におけるプロバイオティクスの位置づけ 下条直樹 (千葉大学大学院医学研究院)
- ・Helicobacter pylori 感染におけるプロバイオティクスの役割 高木敦司 (東海大学医学部)

他

参加費: 会員 7,000 円, 一般 8,000 円, 学生 2,000 円
 問合わせ先: 財団法人日本ビフィズス菌センター(〒170-0002 東京都豊島区巢鴨 1-24-12, TEL. 03-5319-2669, FAX. 03-5978-4068, URL <http://www.soc.nii.ac.jp/jbf/>)

平成18年度 上原賞および

上原賞(研究業績褒賞：正賞 金牌、副賞 2,000万円)

審良 静男 (大阪大学微生物病研究所 教授)

「自然免疫による病原体認識機構の解明」

寒川 賢治 (国立循環器病センター研究所 副所長)

「独自の探索法による新規生理活性ペプチドの発見と
その基盤的研究：グレリンを中心として」

研究助成金(1件 500万円 70名)

赤井周司(静大)、石井 晃(藤田保衛大)、井上 誠(愛知学院大)、及川哲郎(北里研)、
菊地和也(阪大)、喜多敏明(千葉大)、小城勝相(奈女大)、小林淳一(北大)、
近藤稔和(和医大)、佐藤英世(山形大)、三田智文(東大)、鈴木健之(阪大)、
征矢英昭(筑波大)、徳山英利(東北大)、中村正治(京大)、水村和枝(名大)、
山本恵司(千葉大)、今泉和則(宮崎大)、岩下寿秀(愛知医大)、榎本和生(国立遺伝学研)、
改正恒康(理研)、片山佳樹(九大)、嘉村 巧(名大)、河上 裕(慶大)、
川口泰雄(生理研)、五嶋良郎(横市大)、斎藤哲一郎(千葉大)、酒井規雄(広大)、
渋谷 彰(筑波大)、白崎竜一(阪大)、千本松孝明(埼玉大)、高田昌彦(都神経研)、
多賀谷光男(東薬大)、竹島 浩(京大)、田中伸哉(北大)、津田玲生(国立長寿医療セ)、
中嶋弘一(阪市大)、中山敬一(九大)、中山啓子(東北大)、西村栄美(金大)、
根本信乃(東大)、野口光一(兵医大)、林 良夫(徳大)、古瀬幹夫(神戸大)、
星野幹雄(京大)、細川暢子(京大)、真鍋俊也(東大)、水野健作(東北大)、
森 泰生(京大)、森田隆司(明薬大)、安井正人(慶大)、山梨裕司(医歯大)、
横溝岳彦(九大)、米満吉和(千葉大)、脇田隆宇(国立感染症研)、池田勝久(順大)、
江頭健輔(九大)、岡崎俊朗(鳥取大)、加藤智啓(聖マリ医大)、神田善伸(東大)、
佐藤伸一(長崎大)、塩井哲雄(京大)、清水 涉(国立循環器病セ)、中島祥介(奈医大)、
広田昌彦(熊大)、丸毛啓史(慈医大)、安井夏生(徳大)、安川正貴(愛媛大)、
横田隆徳(医歯大)、渡部則彦(京大)

海外留学助成金

■ポストドクトラルフェローシップ(40名)

川崎昌紀(シカゴ大)、小林豊晴(関学大)、中村 聡(東大)、野田博之(阪大)、
東 泰弘(千葉大)、福澄岳雄(名工大)、榊田祥子(東大)、山本大介(スタンフォード大)、
池内与志穂(東大)、大西雅之(東大)、梶 紀子(東北大)、加藤洋平(京大)、
金井 誠(国立遺伝学研)、加野真一(東大)、川上広宣(九大)、川野雅章(東工大)、
小山 実(コーネル大)、坂本泰久(阪大)、笹井美和(奈良先端大学院大)、
繁富英治(慈医大)、田嶋優子(阪大)、田村 康(名大)、照沼美穂(ペンシルバニア大)、
濱崎万穂(京大)、林 朗子(理研)、張ヶ谷有里子(東大)、松崎秀紀(神戸大)、
山口紀子(東大)、山田朋子(東工大)、山田芳樹(スクリプス研)、吉田盛史(京大)、
相澤義泰(マソニック医学研)、阿部雅修(東大)、安藤 涉(阪大)、
大前博路(メイヨークリニック医大)、清水良子(慶大)、谷口博昭(札幌医大)、東梅友美(北大)、
水内秀城(九大)、山田大介(ハーバード大)

外科治療 Vol. 96 (2007:増刊)

腫瘍外科治療の最前線

癌のウイルス療法

藤原 俊義 田中 紀章

永 井 書 店

9. 癌のウイルス療法

Oncolytic virotherapy

藤原 俊義^{*1*2}

FUJIWARA Toshiyoshi

田中 紀章^{*3}

TANAKA Noriaki

^{*1}岡山大学医学部・歯学部附属病院 遺伝子・細胞治療センター 助教授

^{*2}岡山大学大学院医歯学総合研究科消化器・腫瘍外科学分野 ^{*3}同教授

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。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。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。本稿では、著者らが開発をすすめるテロメラゼ依存性腫瘍融解ウイルス Telomelysin を中心に、癌のウイルス療法の可能性を概説する。

key word アデノウイルス/テロメラゼ/臨床試験

はじめに

ウイルスは、本来ヒトの細胞に感染して増殖複製し、その細胞をさまざまな機序により破壊する。1900年代の初めより、癌細胞でその殺細胞効果を期待して野生型のウイルスを用いた癌治療が試みられてきた¹⁾。子宮癌や黒色腫に対する狂犬病ウイルスの投与や、コクサッキー B 型ウイルス、ミクソウイルス、アル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²⁾。しかし、これらのウイルスはあらゆる細胞で増殖能を有する野生型であったため、毒性などにより一般的な治療としては使用されるには至らなかった。

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押え、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10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³⁾。しかし、*in vivo*における標的組織への遺伝子導入効率の限界などから、必ずしも前臨床試験で期待された臨床効果が認められているとはいえない。

そこで、ウイルス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ようとする試みがなされるようになってきた⁴⁾(図1, 表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。

本稿では、テロメラ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、その抗腫瘍医薬品としての臨床応用の可能性を考察する。

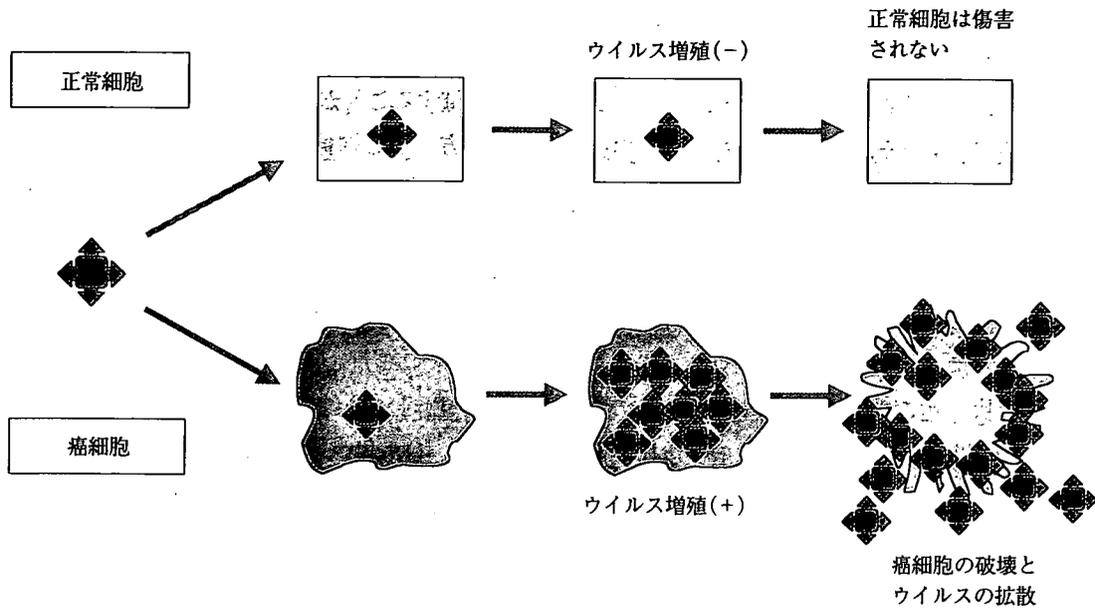


図1 癌細胞での選択的なウイルス増殖と細胞死誘導(文献3より)

表1 癌のウイルス療法の臨床応用

ウイルス & 薬剤名	作用機序	対象疾患	臨床試験
アデノウイルス			
Onyx-015	E1B 55kd 欠損	頭頸部癌 卵巣癌 原発性 & 転移性肝臓癌 膵臓癌 大腸癌	II-III I I-II I I-II
Ad5-CD/TKrep	E1B 55kd 欠損 + HSV-tk/CD 遺伝子挿入	前立腺癌	I
CV706	PSA プロモーターによる E1A 遺伝子制御	前立腺癌	I-II
CV787	Probasin プロモーターで E1A, PSA プロモーターで E1B 制御	前立腺癌	I-II
OBP-301 (Telomelysin)	hTERT プロモーターで E1A および E1B 遺伝子制御	各種固形癌	I
ヘルペスウイルス			
G207	γ 34.5 欠損と ICP6 の機能欠損	悪性グリオーマ	I-II
NV1020	γ 34.5 欠損と内因性 tk 欠損と外来性 tk 遺伝子挿入	転移性肝臓癌	I
OncoVEX	γ 34.5 欠損と ICP47 領域への GM-CSF 遺伝子挿入	乳癌 頭頸部癌 悪性黒色腫	I-II I-II I-II
ワクシニアウイルス			
Vaccinia-oncolysate	腫瘍融解産物とウイルスによる免疫賦活	悪性黒色腫	III
Vaccinia-GM-CSF	GM-CSF 遺伝子挿入	悪性黒色腫	I
Vaccinia-CEA	CEA 遺伝子発現による抗原提示	CEA 産生腫瘍	I
Vaccinia-PSA	PSA 遺伝子発現による抗原提示	前立腺癌	I
ニューキャッスル病ウイルス			
PV701	弱毒化株	各種固形癌	I
MTH-68/H	弱毒化株	グリオブラストーマ	I
レオウイルス			
Reolysin	自然株	頭頸部癌	I
ムンプスウイルス			
MV-CEA	MV-Edm 株に可溶性 CEA 挿入	卵巣癌	I

■ 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持たない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持つ。

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きわめて初期(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。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⁴⁾。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機能を持つ細胞では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機能の有無に因らないことが明らかになっており⁵⁾、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⁶⁾。Onyx-015と類似の腫瘍融解ウイルス(Oncolytic virus)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⁷⁾。

癌選択性を持たず第二の試みは、腫瘍特異的および臓器特異的なプロモーターによる初期遺伝子の転写制御をメカニズムとして、癌細胞特異的あるいは特定の臓器由来の癌細胞に特異的な制限増殖性を付加する方法である。この際、さまざまな発生源地を持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、細胞増殖に伴いしだいに短縮し細胞に老化(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

表2 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%

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持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⁸⁾。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⁹⁾(表2)、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。

■ テロメラーゼ特異的腫瘍融解アデノウイルスの構造と機能

前立腺癌に特異的なPSA¹⁰⁾をはじめとして、AFP¹¹⁾やMUC-1¹²⁾などさまざまな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、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¹³⁾。

多くの制限増殖型アデノウイルスがE1A遺伝子のみを選択的プロモーターで制御しているのに比べて、TelomelysinではE1AおよびE1BをいずれもhTERTプロモーターの制御下に置くことで、より癌細胞での特異性が確保できている。実際に、Telomelysin感染後3日までに、各種癌細胞においては $10^5 \sim 10^8$ 倍のウイルス複製増殖が認められたが、正常細胞では100~1,000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、低濃度のTelomelysinを腫瘍内局所投与したところ、無治療の腫瘍や非増殖型のコントロール・アデノウイルスの投与に比較して有意な増殖抑制が認められ、さらにTelomelysinは血中を循環し、遠隔部位の腫瘍内で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。

■ Armed(武装化) 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。

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¹⁴⁾¹⁵⁾、生体内で癌組織を可視化する診断用医薬品、あるいはナビゲーション・ツールとしても使用可能である。TelomeScanは癌細胞で選択的に増殖してGFP緑色蛍光を発するため、*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癌組織を検出することが可能である。実際に、ヒト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、TelomeScan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¹⁶⁾。

また、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

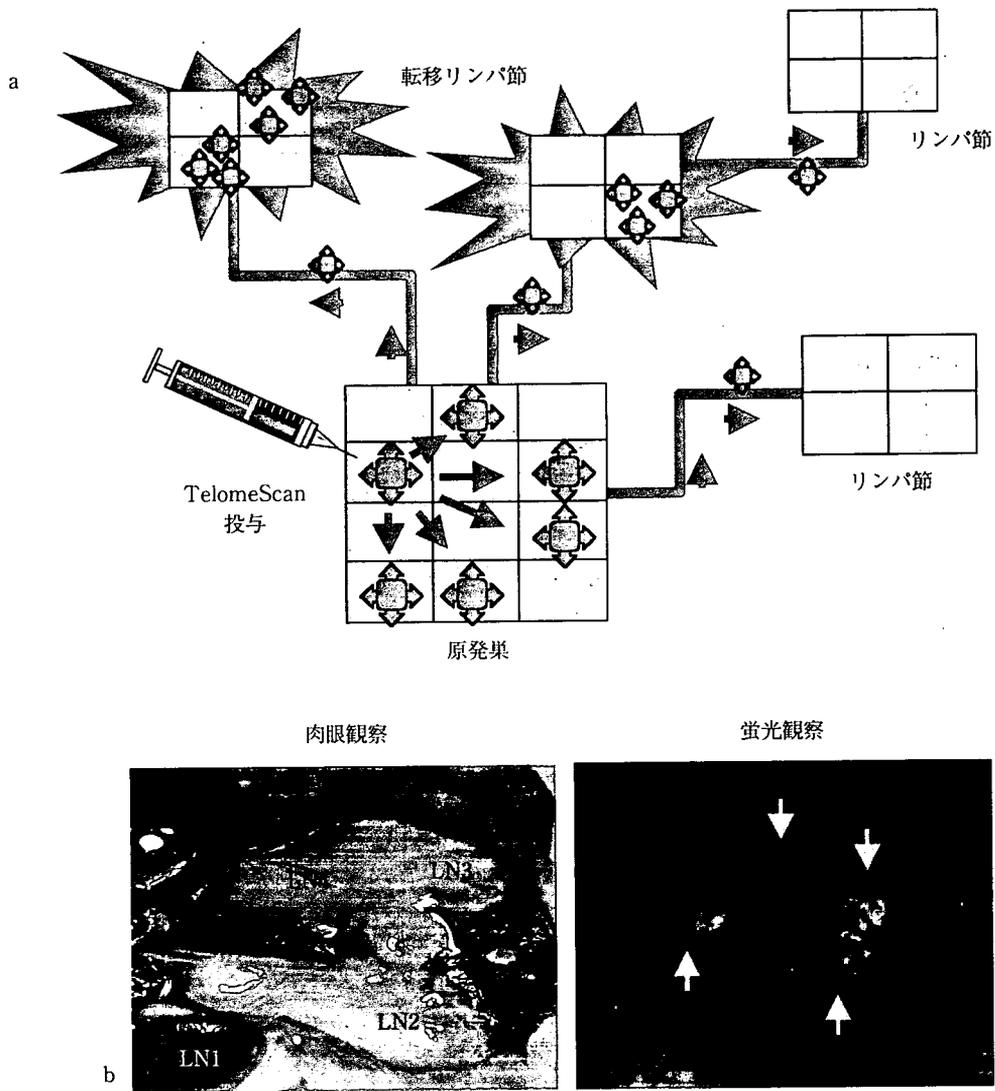


図2 TelomeScanによるリンパ節転移の *in vivo* イメージング

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

出された¹⁷⁾(図2)。実際の臨床では、TelomeScanを手術前に内視鏡などで癌局所に注入し、高感度蛍光感知プローブにより転移陽性リンパ節を直接術中にリアルタイムに同定し、切除範囲のナビゲーションとすることが可能である。

OBP-405は、Telomelysinの標的細胞への感染性を増強するために、細胞表面のインテグリンに親和性を有するRGD(Arg-Gly-Asp)モチーフをファイバーに組み込んだ改変Telomelysinである¹⁸⁾。OBP-

405はコクサッキー・アデノウイルス受容体(Coxsackie-adenovirus receptor: CAR)非依存性にインテグリンを介して標的細胞に感染することができ、CAR陰性のヒト悪性腫瘍細胞でも顕著な抗腫瘍効果を発揮することが可能であった。CAR発現低下によりTelomelysinに耐性となった癌に対してもOBP-405は抗腫瘍効果を発揮すると推測され、Telomelysinのback upとして有用であると思われる。

おわりに

テロメラゼはきわめて多くの癌細胞で活性の上昇が認められており、癌治療の標的としては魅力的な分子である。Telomelysin による癌治療は、従来の抗癌剤や放射線療法とはまったく異なる作用機序に基づく治療戦略であり、これらの標準治療の耐性機構を克服することができるという利点がある。さらに、正常細胞に影響を与えず癌細胞を選択的に傷害するというコンセプトは重要であり、全身投与が可能となれば肉眼的に検出できない微小癌巣においても選択的増殖により抗腫瘍効果が期待できる。しかし現実的には、ウイルスに対する免疫反応や全身投与の際の生体内分布、さらには腫瘍内でのウイルス

の拡散分布など、今後検討すべき問題点は多い。Telomelysin や関連ウイルス製剤をコア技術として岡山大学発バイオベンチャー オンコリスバイオファーマ(株)が設立され、癌の治療用・診断用医薬品としての臨床開発を推進している。

平成18年11月、米国食品医薬品庁(US FDA)による承認のもと、各種固形癌に対する Telomelysin の第I相臨床試験が開始された。今後、これらの基礎研究、臨床研究が進むことで、テロメラゼ活性を標的とした新しいウイルス製剤 Telomelysin の安全性や有効性が確認され、さまざまな難治癌治療に広く使用されるようになることを期待する。

文 献

- 1) Southam CM: Present status of oncolytic virus studies. *Ann NY Acad Sci* 656-673, 1960.
- 2) Fujiwara T, Tanaka N, Kanazawa S, et al: Multicenter phase I study of repeated intratumoral delivery of adenoviral p53 in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 24: 1689-1699, 2006.
- 3) Hawkins LK, Lemoine NR, Kirn D: Oncolytic biotherapy: a novel therapeutic platform. *Lancet Oncol* 3: 17-26, 2002.
- 4) Branca MA: Gene therapy: cursed or inching towards credibility? *Nat Biotech* 23: 519-521, 2005.
- 5) Goodrum FD, Ornelles DA: p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J Virol* 72: 9479-9490, 1998.
- 6) Rothmann T, Hengstermann A, Whitaker NJ, et al: Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J Virol* 72: 9470-9478, 1998.
- 7) Jia H, Kling J: China offers alternative gateway for experimental drugs. *Nat Biotechnol* 24: 117-118, 2006.
- 8) Nakayama J, Tahara H, Tahara E, et al: Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* 18: 65-68, 1998.
- 9) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011-2015, 1994.
- 10) Rodriguez R, Schuur ER, Lim HY, et al: Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res* 57: 2559-2563, 1997.
- 11) Li Y, Yu DC, Chen Y, Amin P, et al: A hepatocellular carcinoma-specific adenovirus variant, CV890, eliminates distant human liver tumors in combination with doxorubicin. *Cancer Res* 61: 6428-6436, 2001.
- 12) Kurihara T, Brough DE, Kovacs I, et al: Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen. *J Clin Invest* 106: 763-771, 2000.
- 13) Kawashima T, Kagawa S, Kobayashi N, et al: Tumor-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin Cancer Res* 10: 285-292, 2004.
- 14) Watanabe T, Hioki M, Fujiwara T, et al: Histone deacetylase inhibitor FR901228 enhances the antitumor effect of telomerase-specific replication-selective adenoviral agent OBP-301 in human lung cancer cells. *Exp Cell Res* 312: 256-265, 2006.
- 15) Fujiwara T, Kagawa S, Kishimoto H, et al: Enhanced antitumor efficacy of telomerase-selective oncolytic adenoviral agent OBP-401 with docetaxel: preclinical evaluation of chemovirotherapy. *Int J Cancer* 119: 432-440, 2006.
- 16) Umeoka T, Kawashima T, Kagawa S, et al: Visualization of intrathoracically disseminated solid tumors in mice with optical imaging by telomerase-specific amplification of a transferred green fluorescent protein gene. *Cancer Res* 64: 6259-6265, 2004.
- 17) Kishimoto H, Kojima T, Watanabe Y, et al: *In vivo* imaging of lymph node metastasis with telomerase-specific replication-selective adenovirus. *Nat Med* 12: 1213-1219, 2006.
- 18) Taki M, Kagawa S, Nishizaki M, et al: Enhanced oncolysis by a tropism-modified telomerase-specific replication selective adenoviral agent OBP-405 ("Telomelysin-RGD"). *Oncogene* 24: 3130-3140, 2005.