

総説

2. テロメラーゼ活性を標的とした悪性腫瘍に対するウイルス療法の開発

藤原 俊義^{1) 2)}, 田中 紀章²⁾

1) 岡山大学医学部・歯学部附属病院 遺伝子・細胞治療センター

2) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器・腫瘍外科

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。遺伝子工学技術によりこ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医薬品として用いることが可能となる。Telomelysin (OBP-301) は、かぜ症状の原因となるアデノウイルスを基本骨格とし、ウイルス増殖に必須の *E1* 遺伝子をテロメラーゼ・プロモーターで制御するよう改変された国産のウイルス製剤である。In vitro では肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、頭頸部癌、乳癌、肝癌、脾癌、前立腺癌、子宮頸癌、卵巣癌などに対して広範な抗腫瘍活性がみられ、in vivo では腫瘍内投与による有意な増殖抑制が認められるとともに、ウイルスは血中を循環し、遠隔部位の腫瘍内でも増殖することが確認された。固形癌に対する Telomelysin の第 I 相臨床試験は、米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) の治験承認のもと米国にて進行中である。Telomelysin に GFP 蛍光遺伝子を搭載した TelomeScan (OBP-401) は、高感度蛍光検出装置により微小癌組織を可視化することができ、診断用医薬品として応用可能である。原発巣内に投与された TelomeScan は所属リンパ域へ拡散し、微小リンパ節転移で GFP 発現を発する。高感度プローブあるいはビデオスコープにより転移リンパ節を同定することができ、本技術は微小癌、微小転移の早期発見に有用であるとともに、優れた外科ナビゲーション・システムとなりうると期待される。本稿では、従来のがん治療とは異なる新たな戦略として開発されているこれらの新規ウイルス製剤のがん診断・治療への応用の可能性を概説する。

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。組織学的に診断された Burkitt リンパ腫の黒人少年が、麻疹に罹患し治療し

た直後に完全寛解した症例報告もある¹⁾。また 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も積極的に試みられてきている²⁾。子宮がんや黒色腫に対する狂犬病ウイルスの投与や、コクサッキー B 型ウイルス、ミクソウイルス、アルポウイルスなどによる固形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本邦での研究成果が報告されている³⁾。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ん細胞に標的化することが可能となってきた⁴⁾。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。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

連絡先

〒700-8558 岡山市鹿田町 2-5-1

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

TEL: 086-235-7997

FAX: 086-235-7884

E-mail: toshi_f@md.okayama-u.ac.jp

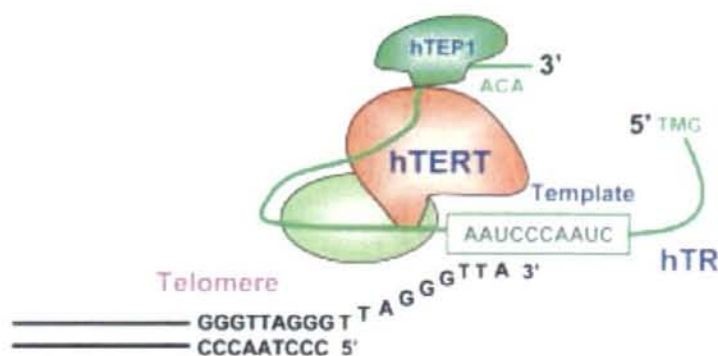


図1 テロメラーゼの構造と hTERT

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%
脾臓癌	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%

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、非増殖型のものが多くの遺伝子治療プロトコールで使用されることによって、その安全性に関する情報が蓄積されてきている⁵⁾。本稿では、テロメラーゼ活性依存性のがん細胞で選択的に増殖して細胞死を誘導するアデノウイルス製剤の開発の現況について紹介し、そのがん診断や治療への応用の可能性について考察する。

1. アデノウイルスへの腫瘍選択性の導入

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、49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る。

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⁶⁾。本来、E1B-55kD蛋白質はがん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⁷⁾、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⁸⁾。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⁹⁾。

がん選択性を持たず第二の試みは、腫瘍特異的および臓

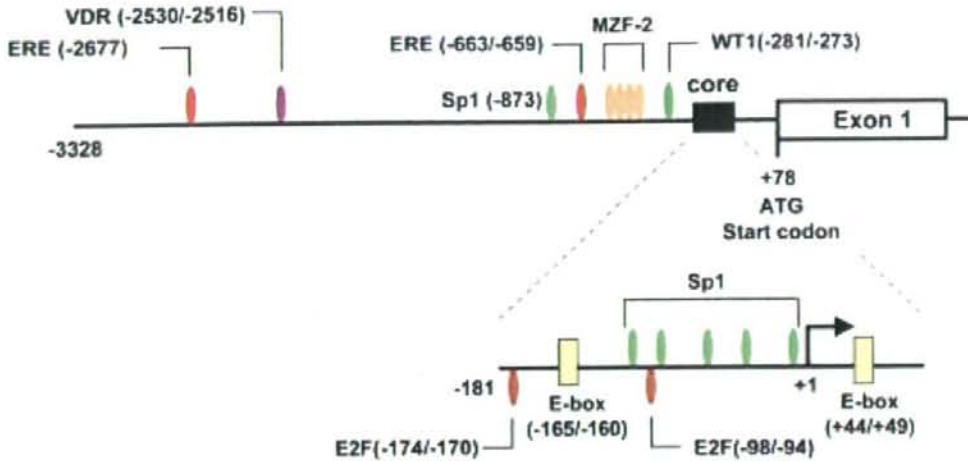


図2 hTERT プロモーターの構造

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。

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、様々な発生源を持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。

II. 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) の繰り返して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持つリボ核酸蛋白質であり、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1)。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¹⁰⁾。テロメラーゼは、きわ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¹¹⁾ (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。

III. 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、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¹²⁾ (図2)。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

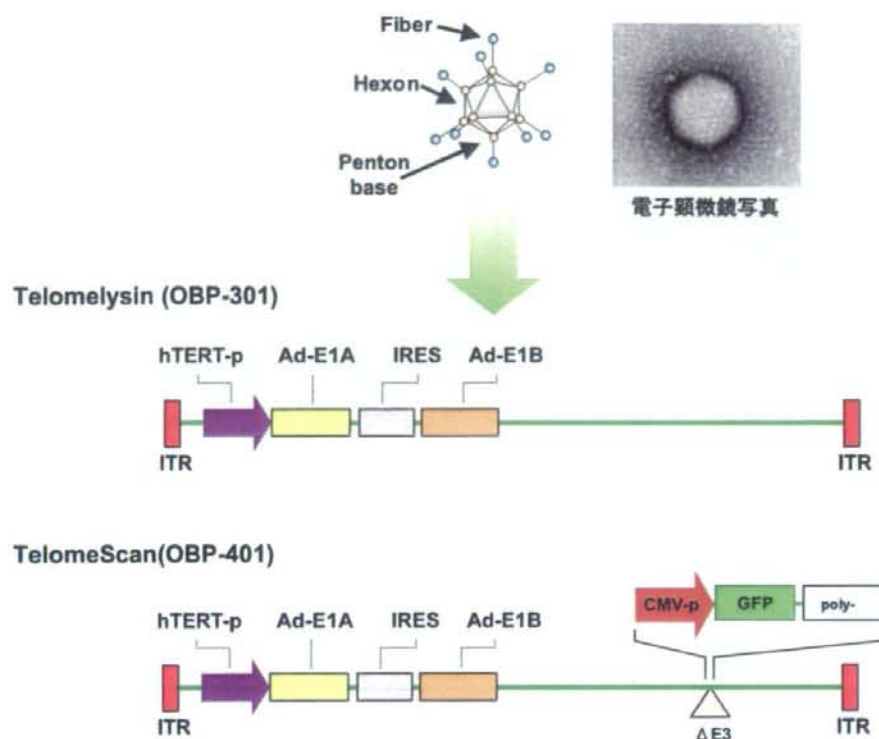


図3 Telomelysin (OBP-301) と TelomeScan (OBP-401) の構造

Telomelysin (OBP-301) は、野生型のアデノウイルスと同様、直径65~80 nmの正二十面体であり、各頂点からファイバーが突出している。構造上は、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遺伝子より成る増殖カセットが、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。

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。

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、いく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考えられる。

IV. テロメラーゼ特異的アデノウイルス製剤の がん治療へ応用

1. Telomelysin (OBP-301) の構築と機能解析

広範ながんを対象とした分子標的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¹³⁾(図3)。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100-1000倍に抑えられていた。肺がん、大腸がん、胃がん、食道がん、頭頸部がん、乳がん、肝がん、膵がん、前立腺がん、子宮頸がん、卵巣がん、悪性胸膜中皮種などのヒト由来各種がん細胞では、1-50 multiplicity of infection (MOI) のTelomelysin感染で3-5日以内にcytopathic effect (CPE)が誘導され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がん腫瘍に、 10^7 plaque forming units (PFU) という低濃度のTelomelysinを腫瘍内局所投与したところ、無治療の腫瘍や非増殖型のコントロール・アデノウイルスの投与に比較して有意な増殖抑制が認められ、さらにTelomelysinは血中を循環し、遠隔部位の腫瘍内で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

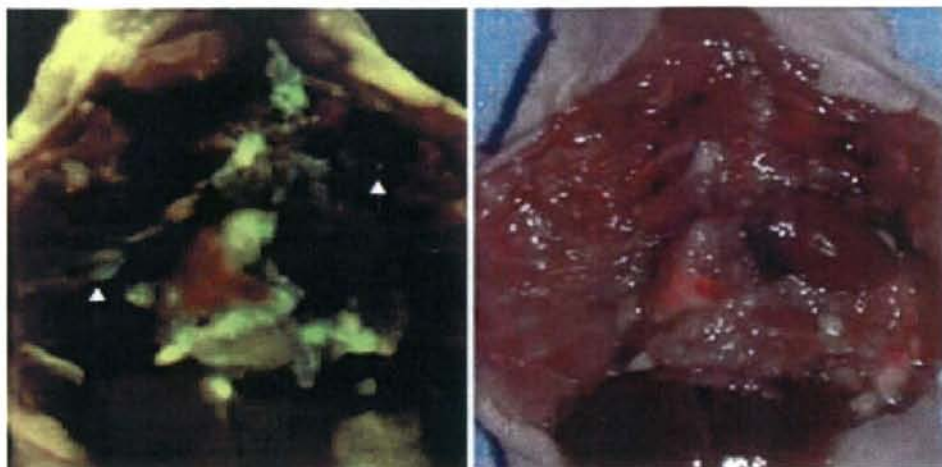


図4 Telomelysin の *in vivo* におけるがん診断への応用

Telomelysin と Ad-GFP を用いた胸膜播種巣の可視化。ヌードマウスの胸腔内に A549 ヒト肺がん細胞を移植し、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。(文献 14 より引用)

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、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。ヒト肺がん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¹⁴⁾ (図 4)。

2. Telomelysin を用いた集学的治療の可能性

Telomelysin の単剤としての安全性や生体内動態は、米国での第 I 相臨床試験にて確認されつつあるが、臨床的により強力な効果を期待するためには、既存の治療法との併用を検討する必要がある。Telomelysin は、*in vitro* において docetaxel (Taxotere), vinorelbine (Navelbine), および SN38 (Irinotecan の活性化代謝産物) との併用効果を示し、*in vivo* ではヌードマウス背部に移植したヒト肺がん腫瘍に Telomelysin を腫瘍内投与し、同時に docetaxel を腹腔

内投与することで顕著な相乗効果を得ることができた¹⁵⁾。また、Telomelysin とヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase, HDAC) 阻害剤である FR901228 (depsipeptide, FK228) との相乗効果も確認されている¹⁶⁾。FR901228 は標的細胞のアデノウイルス受容体 (Coxsackie adenovirus receptor, CAR) の発現を増強することで Telomelysin の感染効率を上げ、相乗効果を発揮すると考えられる。

さらに、Telomelysin の宿主免疫系に及ぼす影響も検討されている。生体内で最も強力な抗原提示能を持つ樹状細胞は種々の死細胞から腫瘍抗原及び danger signal を受け取り、免疫担当細胞間で直接的にあるいはサイトカインを介して免疫応答を惹起する。尿酸は傷害を受けた細胞で内因性 danger signal として作用し、生体の免疫機構を活性化することが報告されている。ヒトがん細胞に Telomelysin を感染させると、抗がん剤で処理されたアポトーシス細胞やネクローシス細胞に比べて有意に高い細胞内尿酸濃度が誘導され、ヒト末梢血単核球との共培養により高い細胞障害活性の誘導を認めた¹⁷⁾。これらの結果より、Telomelysin は直接的に細胞死を誘導するのみならず、樹状細胞の刺激により免疫系を介した抗腫瘍効果を発揮すると期待される。

3. 米国における Telomelysin の第 I 相臨床試験

Telomelysin をコア技術として、平成 16 年 3 月に著者らは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) を設立し、がんの治療用・診断用医薬品としての臨床開発を推進している。各種進行固形がんを対象とした臨床

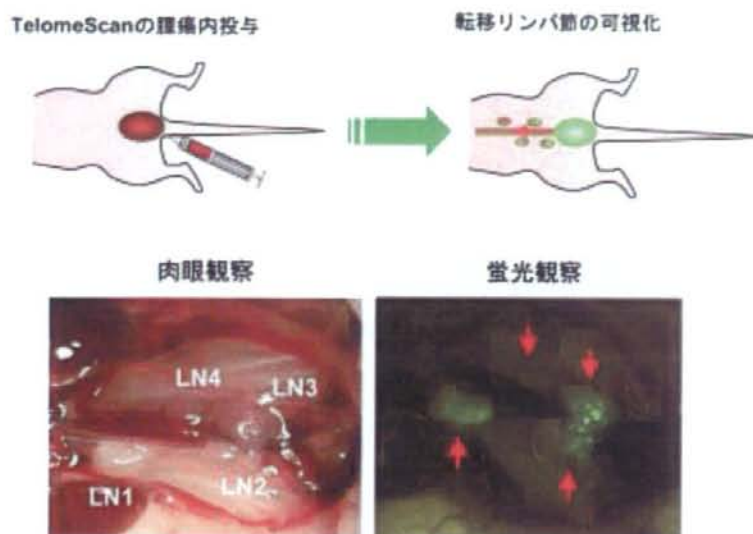


図5 TelomeScanによるリンパ節転移の *in vivo* イメージング

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。

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 4-6 週間後に高率に傍大動脈リンパ節転移が認められる。TelomeScan を直腸腫瘍に直接投与し、5 日後に開腹、蛍光励起して高感度 3CCD カメラにて観察したところ、4 個中 3 個のリンパ節で GFP 蛍光発現がみられた。この 3 個のリンパ節では、組織学的に微小転移が確認された。矢印：リンパ節。(文献 19 より引用)

プロトコール「A phase I injection study of intratumoral injection with telomerase-specific replication-competent oncolytic adenovirus, Telomelysin (OBP-301) for various solid tumors」は、米国食品医薬品庁 (US FDA) により承認され、平成 18 年 10 月から米国グラスにて第 I 相臨床試験が開始された。

現在、試験はまだ進行中であるが、Telomelysin の単回腫瘍内投与による安全性と体内動態、抗体産生をはじめとする免疫学的反応、生検サンプルによる組織学的解析、画像診断による臨床効果などを検討する。ウイルス量は 10^{10} virus particle (vp) から 10^{12} vp まで段階的に増量し、体内動態は定量的 DNA-PCR 法を用いて解析する¹⁸⁾。ウイルスゲノムは投与後 24 時間以内に末梢血中に検出可能であったが、さらに 10^{11} 、 10^{12} vp 投与症例では 7 日、あるいは 14 日後に第 2 のピークが認められ、投与された腫瘍内での Telomelysin の増殖が示唆された。初期 9 例の検討では、すべての症例で投与後 28 日間では Stable disease (SD) であり、6 例では 6.6-43% の腫瘍サイズの縮小が認められた。

今後、オンコリス社は米国を中心に食道がん、頭頸部がんを対象とした第 II 相臨床試験を行い、また台湾のバイオ

企業 Medigen 社は肝臓がんを対象とした第 II 相臨床試験を開始する予定である。

V. テロメラーゼ特異的アデノウイルス製剤の がん診断へ応用

1. 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 Tomography; 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に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未だ確立されていない。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。

2. TelomeScan (OBP-401) の構造と機能

Telomelysin と Ad-GFP を用いた診断の試みは前述した方が、より効率的にがん組織を可視化するために診断用ウイルス製剤 TelomeScan (OBP-401) を構築した¹⁵⁾¹⁶⁾ (図 3)。TelomeScan 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、生体内での微小がん組織、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。hTERT プロモーターと E1A/IRES/E1B 配列から成る増殖カセットを持ち、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、線維芽細胞を初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。

3. 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廓清が必要である。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がん細胞 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、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¹⁹⁾ (図 5)。これらの結果は、原発腫瘍内に局所投与された TelomeScan がリンパ節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あるいは開腹にて転移リンパ節を可視化することができる。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廓清範囲を同定する低侵襲外科手術が可能となる。

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。さらに、正常細胞に影響を与えずがん細胞を選択的に傷害するというコンセプトは重要であり、全身投与が可能となれば肉眼的に検出できない微小がん巣においても選択的増殖により抗腫瘍効果が期待できる。TelomeScan は診断用医薬品として開発を進めているが、基本的には Telomelysin と同じウイルス機能を有し、GFP 蛍光を発した後は標的細胞死を誘導する。すなわち、診断と治療を兼ね備えたウイルス製剤 (Theranostic virus) であり、リンパ節転移を対象に使用された場合、可視化できなかった極めて微小な転移結節は、最終的にはウイルス増殖により破壊されると考えられる。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) Bluming AZ, Ziegler JL: Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. *Lancet*. 2: 105-106, 1971.
- 2) Southam CM: Present status of oncolytic virus studies. *Ann NY Acad Sci* 656-673, 1960.
- 3) Asada T: Treatment of human cancer with mumps virus. *Cancer* 34: 1907-1928, 1974.
- 4) Hawkins LK, Lemoine NR, Kirn D: Oncolytic biotherapy: a novel therapeutic platform. *Lancet Oncol* 3: 17-26, 2002.
- 5) 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.
- 6) Branca MA: Gene therapy: cursed or inching towards credibility? *Nat Biotech* 23: 519-521, 2005.
- 7) Goodrum FD, Ornelles DA: p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J Virol* 72:9479-9490, 1998.
- 8) Rothmann T, Hengstermann A, Whitaker NJ, et al: Replication of ONYX-015, a potential anticancer aden-

- ovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J Virol* 72:9470-9478, 1998.
- 9) Jia H, Kling J: China offers alternative gateway for experimental drugs. *Nat Biotechnol* 24, 117-118, 2006.
 - 10) 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.
 - 11) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011-2015, 1994.
 - 12) Janknecht R.: On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells. *FEBS Lett* 564: 9-13, 2004.
 - 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) 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) 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.
 - 17) Endo Y, Sakai R, Ouchi M, et al: Virus-mediated oncolysis induces danger signal and stimulates cytotoxic T-lymphocyte activity via proteasome activator upregulation. *Oncogene* 27: 2375-2381, 2008.
 - 18) Hashimoto Y, Yatanabe Y, Shirakiya Y, et al: Establishment of biological and pharmacokinetic assays of telomerase-specific replication-selective adenovirus. *Cancer Sci.* 99: 385-390, 2008.
 - 19) 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.

Telomerase-Specific Oncolytic Virotherapy for Human Cancer with the hTERT Promoter

Toshiyoshi FUJIWARA^{1,2} and Noriaki TANAKA²

¹ Center for Gene and Cell Therapy, Okayama University Hospital, Okayama 700-8558, Japan.

² Division of Surgical Oncology, Department of Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama 700-8558, Japan

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. Telomelysin replicated efficiently and induced marked cell killing in a panel of human cancer cell lines, whereas replication as well as cytotoxicity was highly attenuated in normal human cells lacking telomerase activity. 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.

Interface on Cancer Therapy

Basic
Science

細胞死

ウイルスによる細胞死と がん治療への応用

*Virus-mediated cell death and its clinical application
for human cancer therapy*

藤原 俊義 / 田中 紀章*

Toshiyoshi Fujiwara / Noriaki Tanaka

岡山大学病院遺伝子・細胞治療センター准教授
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科消化器・腫瘍外科学教授*

KEY WORDS

テロメラーゼ
hTERT プロモーター
アデノウイルス
オートファジー
尿酸

SUMMARY

がん治療で大きな効果を期待するためには、いかに効率よく細胞死を誘導するかが重要である。放射線や各種の細胞傷害性抗がん剤による細胞死に関しては、アポトーシスを中心とした分子機構が明らかになってきている。遺伝子工学技術に基づくがんのウイルス療法は、これらの従来のがん治療とは異なる新たな戦略として、その臨床応用が進められている。本稿では、がん細胞で選択的に増殖し、細胞死を誘導するウイルス製剤の作用機構について、免疫学的活性化機構も含めて概説する。

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、その細胞をさまざまな機序により破壊する。1900年代の初めより、がん細胞で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¹⁾、子宮がん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、わが国での進行がん患者へのムンプスウイルス投与の研究結果が報告されている²⁾。しかし、これらのウイルスはあらゆる細胞で増殖能を有する野生型であったため、毒性などにより一般的な治療として使用されるには至らなかった。

遺伝子工学的技術の進歩と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ん細胞に標的化することが可能となってきた³⁾ (図1)。理論的根拠に基づいた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。たとえば、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。なかでもアデノウイルスはその構造が最もよく研究されているウイルスの1つであり、非増殖型のもので多くの遺伝子治療プロトコールで使用されることによって、その安全性に関する情報が蓄積されてきている⁴⁾。本稿では、テロメラーゼ活性依存性のがん細胞で選択的に増殖して細胞死を誘導するアデノウイルスの開発の現況について紹介し、その作用機構について考察する。

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2重鎖DNAウイルスであり、51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1つであり、米国で

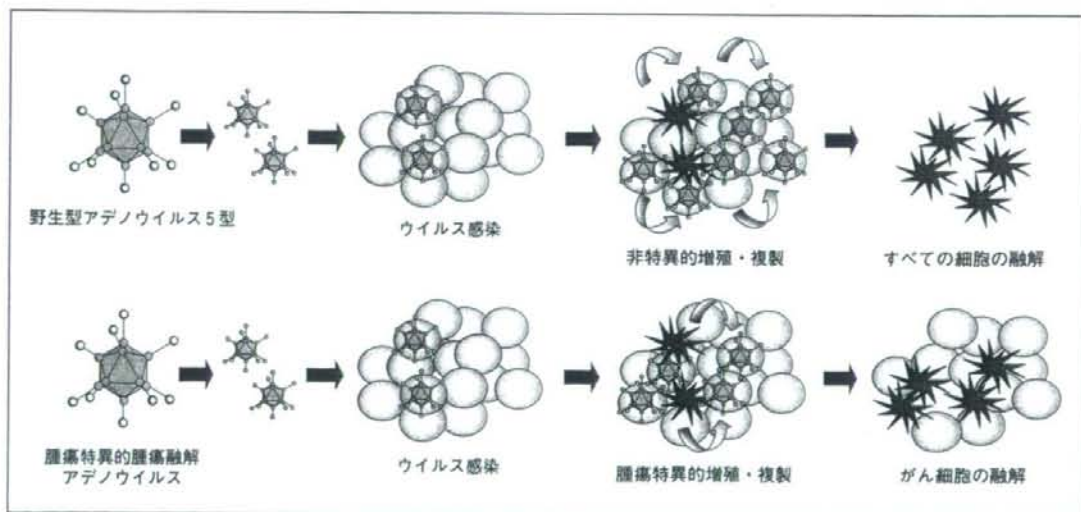


図1 がん細胞での選択的なウイルス増殖・複製と細胞死誘導

は30年以上の間、約100万人の軍人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が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の、大きく分けて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⁹⁾。本来、E1B-55kD蛋白質はがん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によるウイルスの増殖・複製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は増殖・複製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¹⁰⁾、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¹¹⁾。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¹²⁾。

がん選択性をもたせる第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、さまざまな発生母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) の繰り返して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質酵素であり、触媒サブユニットのヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (human telomerase reverse transcriptase ; hTERT) と鋳型となる RNA サブユニットのヒトテロメラーゼ RNA (human telomerase RNA ; 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可能であることから、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¹³⁾。

テロメラーゼは、きわ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¹⁰⁾、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 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

広範ながんを対象とした分子標的ウイルス製剤を開発するために、筆者らはアデノウイルスの増殖に必要な E1A 遺伝子と E1B 遺伝子を配列内リボソーム進入部位 (internal ribosome entry site ; 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である telomelysin (開発コード : OBP-301) を作成した¹⁴⁾ (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対して、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 $10^3 \sim 10^6$ 倍

のウイルス増殖・複製が認められたが、正常細胞では100~1000倍に抑えられていた。肺がん、大腸がん、胃がん、食道がん、頭頸部がん、乳がん、肝がん、膵がん、前立腺がん、子宮頸がん、卵巣がんなどのヒト由来各種がん細胞では、1~10感染効率(multiplicity of infection; MOI)の telomelysin 感染後3~5日以内に細胞変性効果(cytopathic effect; CPE)が誘導され、完

全な細胞死が観察された(図3)¹⁴⁾。ヌードマウス背部皮下に移植したヒト肺がん腫瘍に、10⁷プラーク形成単位(plaque forming unit; 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と比較して有意な腫瘍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

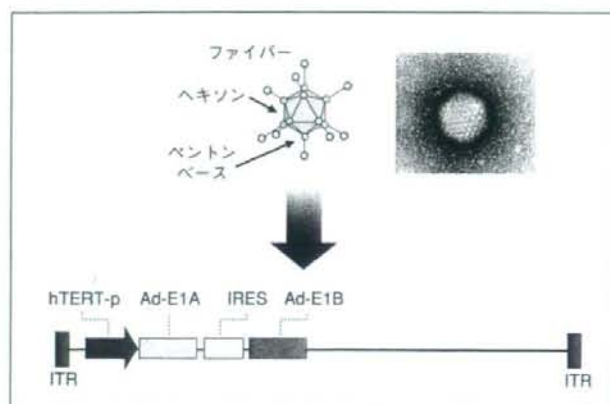


図2 Telomelysin の概観と構造

Telomelysin は、野生型のアデノウイルスと同様、直径65~80nmの正20面体であり、各頂点からファイバーが突出している。構造上は、ウイルスの増殖に必要なE1領域が除去されている第1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遺伝子から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。

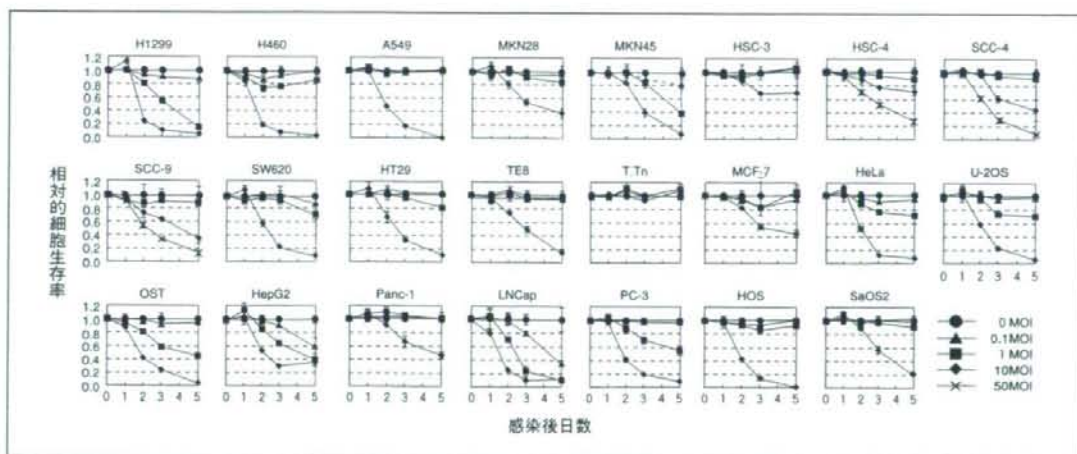


図3 各種がん細胞株に対する telomelysin の抗腫瘍効果¹⁴⁾

がん細胞に各 MOI で telomelysin を感染させ、経時的に XTT アッセイにて生細胞数を測定した。肺がん(H1299, H460, A549)、胃がん(MKN28, MKN45)、頭頸部がん(HSC-3, HSC-4, SCC-4, SCC-9)、大腸がん(SW620, HT29)、食道がん(TE8, T.Tn)、乳がん(MCF-7)、子宮がん(HeLa)、肉腫(U-2OS, OST, HOS, SaOS2)、肝臓がん(HepG2)、膵臓がん(Panc-1)、前立腺がん(LNCap, PC-3)。

ていることがDNA-PCR解析やEIA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。

4 テロメラーゼ特異的アデノウイルス製剤の作用機構

Telomelysin の感染により各種がん細胞株において効率的に細胞死が誘導されるが、Hoechst33342染色での核の分断化やフローサイトメトリー解析における sub-G0/G1分画の増加は観察されないため、その分子機構は典型的なアポトーシスとは異なると考えられる。また、膜破壊やミトコンドリアの膨潤などネクローシスに特徴的な形態学的変化もみられないことから、ネクローシスとも異なる機序である。

最近、新しい細胞死の形態として、オートファジー(自食作用、2型プログラム細胞死)が目ざされている。細胞が新陳代謝のために自らの細胞質や細胞小器官(オルガネラ)の一部を消化するために備えている機能で、細胞が栄養飢餓に陥るとこの機能が亢進し、自己の一部を分解して栄養源にするとされている。オートファジーではオートファゴソームが細胞質の蛋白質などを包み込んで分解するため、オートファゴソームに局在することが知られている LC3に緑色蛍光蛋白質(*green fluorescence protein*; GFP)遺伝子を結合したベクターを導入した細胞でオートファジーの定量を行うことができる。また、アクリジンオレンジで染色される acidic vesicular organelles(AVO)の形成も、フローサイトメトリー解析で定量することができ、オートファジーの指標とされている。実際に、telomelysin の感染によって容量依存性に AVO 陽性細胞率は2%以下から18.8%まで上昇しており(図4)、GFP-LC3が集積するドットも部分的に増加していることが明らかとなった¹³⁾。すなわち、telomelysin が誘導する細胞死には、部分的にオートファジーが関与していると考えられる。Itoらも同様の現象を報告しているが¹⁴⁾、すべての telomelysin 感染細胞で AVO 形成が認められるわけではないことから、他の分子機構の関与も否

定できない。

5 アデノウイルスによる細胞死の免疫学的効果

生体内で最も強力な抗原提示能をもつ樹状細胞は種々の死細胞から腫瘍抗原および danger signal を受け取り、免疫担当細胞間で直接的にあるいはサイトカインを介して免疫応答を惹起することが知られている。しかし、樹状細胞の刺激に始まる腫瘍免疫において、どのようなかたちでの刺激が最も効果的な抗腫瘍効果をもたらすかはわかっていない。Telomelysin による細胞死は、前述のごとく形態学的にはアポトーシスやネクローシスとは異なっており、その腫瘍免疫系に及ぼす影響についても不明である。そこで、3種類の細胞死の形態(telomelysin による腫瘍融解、抗がん剤によるアポトーシス、凍結/融解によるネクローシス)による腫瘍免疫活性の惹起を比較検討した¹⁵⁾。

尿酸は傷害を受けた細胞で内因性 danger signal として作用し、生体の免疫機構を活性化することが報告されている。実際に、ヒト肺がん細胞に telomelysin を感染させると、抗がん剤で処理されたアポトーシス細胞やネクローシス細胞に比べて有意に高い細胞内尿酸濃度が誘導された(図5)。非増殖型のアデノウイルスの感染では尿酸の濃度は上昇せず、また抗ウイルス薬 cidofovir によってその上昇が阻害されることから、アデノウイルスの増殖が尿酸の誘導には必要と考えられる。また、ヒト肺がん細胞に telomelysin を感染させて72時間後に回収、あるいは50nM のドセタキセルで72時間処理して回収し、顆粒球単球コロニー刺激因子(*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*; GM-CSF)およびインターロイキン(*interleukin*; IL)-4で誘導したヒト末梢血単球由来の樹状細胞と共培養した。また、凍結/融解を3回繰り返した肺がん細胞も同様に共培養した。ELISA 法にて72時間後の上清中インターフェロン(*interferon*; IFN)- γ を測定したところ、telomelysin 感染細胞で他の2群よりも高濃度であった(図5)。INF- γ で刺激された細胞は、プロテアソーム活性化因子 PA28の誘導を介して効率

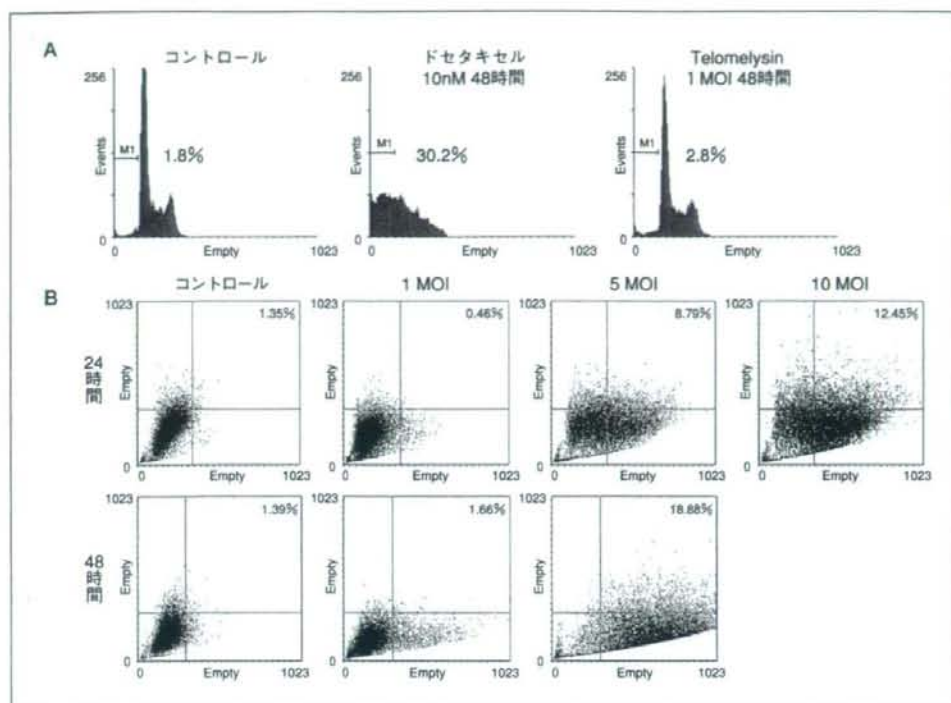


図4 Telomelysinによる細胞死の分子機構の解析

- A: ヒト肺がん細胞に telomelysin 1 MOI を感染, あるいは10nM のドセタキセルで処理し, 48時間後に細胞周期をフローサイトメトリーにて解析した。Sub-G0/G1期の細胞比率を示す。ドセタキセルではアポトーシスが誘導されているが, telomelysin ではそのような変化はみられない。
- B: ヒト肺がん細胞に各 MOI で telomelysin を感染させ, 24, 48時間後にアクリジンオレンジにて染色し, フローサイトメトリー解析を行った。AVO 陽性細胞の比率を示す。Telomelysin 感染によってオートファジー細胞の部分的な増加がみられた。

よく抗原提示を行う。Telomelysin によって免疫担当細胞より産生された $\text{INF-}\gamma$ によって標的細胞内の PA 28が上昇し, 抗原を効果的に分断化して免疫活性を増強していると推測できる。

さらに, これらの各種処理を施したヒト肺がん細胞をヒト末梢血単核球と1週間共培養し, リンパ球腫瘍細胞混合培養 (mixed lymphocyte tumor cell culture; MLTC) を行った。 ^{51}Cr 放出アッセイにてヒト肺がん細胞に対する特異的な細胞傷害性 T リンパ球 (cytotoxic T-lymphocyte; CTL) 活性を測定したところ, telomelysin 感染細胞群で他の2群よりも高い細胞傷害活性の誘導を認めた。これらの結果より, telomelysin

は直接的に細胞死を誘導するのみならず, 樹状細胞の刺激により免疫系を介した抗腫瘍効果を発揮すると考えられる。

おわりに

テロメラーゼはきわ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非常に魅力的である。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

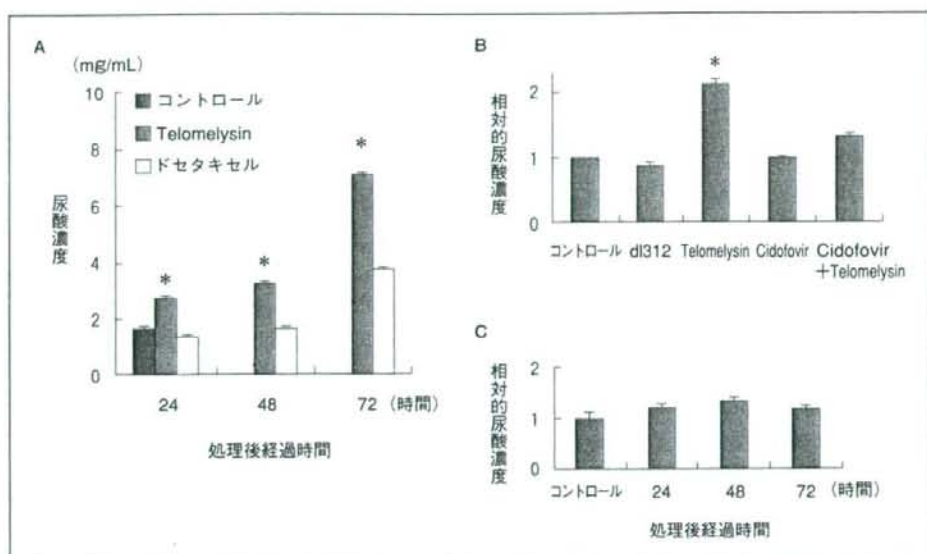


図5 Telomelysinによる細胞内尿酸の産生¹³⁾

A: ヒト肺がん細胞に1 MOIの telomelysinを感染させ、あるいは10nMのドセタキセルで処理し、経時的に細胞内の尿酸濃度を測定した。

B: ヒト肺がん細胞に1 MOIの telomelysinあるいは非増殖型アデノウイルス dl312を感染させ、24時間後に尿酸濃度を測定した。また、抗ウイルス薬 cidofovir(100 μ M)の存在下で telomelysinを感染させ、やはり尿酸濃度を測定した。Telomelysinが増殖した場合にのみ、尿酸産生が認められた。

C: 正常ヒト肺線維芽細胞(normal human lung fibroblast; NHLF)に1 MOIの telomelysinを感染させ、経時的に細胞内の尿酸濃度を測定した。Telomelysinは正常細胞内では増殖しないため、尿酸の産生はみられなかった。

*: $p < 0.01$

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。

Telomelysinをコア技術として岡山大学発のバイオベンチャーであるオンコリスバイオファーマ株式会社が設立され、がんの治療用・診断用医薬品としての臨床開発を推進している。2006年10月、米国食品医薬品局(Food and Drug Administration; 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。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の有効性が確認さ

れ、さまざまな難治がん治療、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 N Y Acad Sci* 22: 657-673, 1960
- 2) Asada T: Treatment of human cancer with mumps virus. *Cancer* 34: 1907-1928, 1974
- 3) Hawkins LK, Lemoine NR, Kirn D: Oncolytic biotherapy; a novel therapeutic platform. *Lancet Oncol* 3: 17-26, 2002
- 4) 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

- 5) Branca MA : Gene therapy ; cursed or inching towards credibility? *Nat Biotechnol* **23** : 519-521, 2005
- 6) Goodrum FD, Ornelles DA : p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J Virol* **72** : 9479-9490, 1998
- 7) 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
- 8) Jia H, Kling J : China offers alternative gateway for experimental drugs. *Nat Biotechnol* **24** : 117-118, 2006
- 9) 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
- 10) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al : Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266** : 2011-2015, 1994
- 11) Kawashima T, Kagawa S, Kobayashi N, et al : Telomerase-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin Cancer Res* **10** : 285-292, 2004
- 12) Hashimoto Y, Watanabe Y, Shirakiya Y, et al : Establishment of biological and pharmacokinetic assays of telomerase-specific replication-selective adenovirus. *Cancer Sci* **99** : 385-390, 2008
- 13) Endo Y, Sakai R, Ouchi M, et al : Virus-mediated oncolysis induces danger signal and stimulates cytotoxic T-lymphocyte activity via proteasome activator upregulation. *Oncogene* **27** : 2375-2381, 2008
- 14) Ito H, Aoki H, Kühnel F, et al : Autophagic cell death of malignant glioma cells induced by a conditionally replicating adenovirus. *J Natl Cancer Inst* **98** : 625-636, 2006

XVI がんに対する遺伝子治療の現況と展望

藤原俊義^{a,b*}, 田中紀章^b

^a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,

^b岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器・腫瘍外科学

キーワード: 遺伝子治療, アデノウイルスベクター, p53, テロメラゼ

Current status and perspectives of gene therapy for cancer

Toshiyoshi Fujiwara^{a,b*}, Noriaki Tanaka^b

^aCenter for Gene and Cell Therapy, Okayama University Hospital, ^bDepartment of Gastroenterological Surgery, Transplant, and Surgical Oncology, Okayama University Graduate School for Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

はじめに

近年、ゲノム情報の蓄積により新薬開発のプロセスは様変わりしてきた。特に、特定の分子の機能を阻害する分子標的医薬品の開発が活発に進められており、多くの新薬が臨床試験を経て市場展開を果たしている。「遺伝子治療」も機能遺伝子を標的細胞に導入するという意味では分子標的治療の一つであり、はじめてヒトに応用されてからすでに15年以上が経過している。米国国立衛生研究所(National Institute of Health: NIH)の組換え DN A諮問委員会(Recombinant DNA Advisory Committee: RAC)が実施を承認した臨床プロトコル数は2008年6月の時点で908となっており、なかでもがんに対する遺伝子治療は620プロトコルで68.3%に達している¹⁾。免疫機構の活性化を目指した方法がもっとも多く、がん細胞への自殺遺伝子の導入やがん関連遺伝子の発現制御により細胞死を誘導する方法、さらにはがん細胞で選択的に増殖する腫瘍融解ウイルスを用いた方法(oncolytic virotherapy)、造血細胞への薬剤耐性遺伝子の導入や移植するリンパ球への自殺遺伝子の導入で宿主の安全性を高める方法など様々な試みが進められている。本稿では、これらのがんの遺伝子治療の治療戦略を概説し、新しい試みとして岡山大学で開発した新規腫瘍融解ウイルス療法の臨床応用の状況も紹介する。

遺伝子導入のためのベクターシステム

1. レトロウイルスベクター

遺伝子を効率よく標的細胞に導入するためによく用いられているのが、非増殖性ウイルスベクターによる方法である。マウス白血病ウイルスを改変したレトロウイルスベクターが、標的細胞の染色体ゲノムに治療遺伝子を組み込み永続的な遺伝子発現を得るためには有用であり、遺伝性疾患の治療に多く使われている²⁾。しかし、挿入変異による白血病の発症などが問題となり³⁾、さらに安全性の高いベクター改変が求められている。また、導入効率を向上させた増殖可能なレトロウイルスベクター(replication-competent retrovirus: RCR)や神経細胞などの静止している細胞にも遺伝子導入可能なレンチウイルス由来のベクターも開発されてきている⁴⁾。

2. アデノウイルスベクター

幼児期のかぜ症状を引き起こす DNA ウイルスであるアデノウイルス5型由来のアデノウイルスベクターは、高い感染効率や標的細胞の多様性から *in vivo* 遺伝子治療に適しているとされている⁵⁾。第一世代のアデノウイルスベクターでは、多くのウイルスゲノムが残っていたためアデノウイルス由来の蛋白質に対する細胞性および液性免疫が問題となっていたが、最近開発された新世代のベクター(gutless もしくは gutted ベクター)では、ほとんどのウイルスゲノムが削除されており、免疫原性が低下するとともに大きな遺伝子挿入スペースが確保されている⁶⁾。

3. アデノ随伴ウイルスベクター

アデノ随伴ウイルス(adenovirus-associated virus: AAV)ベクターは、低い免疫原性や非病原性ウイルス

平成20年10月受理

*〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1

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

電話: 086-235-7997 FAX: 086-235-7884

E-mail: toshi_f@md.okayama-u.ac.jp

に由来することによる安全性などの点から注目されているベクターの一つである。AAVベクターは静止細胞にも感染することが可能であり、神経系および筋肉組織の標的細胞のゲノムへの安定した遺伝子導入に有効と考えられている⁷⁾。

4. 非ウイルス系ベクター

非ウイルス系の遺伝子導入ベクターとしては、薬剤キャリアーとして開発されたナノ粒子やカチオンリポソーム、ポリリジン-DNA-蛋白複合体、naked DNAなどを用いた方法が開発されているが、導入効率や効果の持続性という点ではまだウイルス系ベクターのレベルに至っていない⁸⁾。ただ、ウイルス系と非ウイルス系のハイブリッドベクターとして開発されたHVJ-リポソームは、多くの遺伝子導入実験において高い導入効率と広範囲の標的組織が確認されており、その動物実験の成果から今後の臨床応用が期待される⁹⁾。

がんに対する宿主の免疫機構を活性化する遺伝子治療

1. 腫瘍ワクチン遺伝子治療

米国で進行中のがんに対する遺伝子治療の多くは、遺伝子操作を行ったがん細胞をワクチンとして接種して宿主の免疫機構を活性化することで抗腫瘍効果を期待する、いわゆる腫瘍ワクチン遺伝子治療である。患者から採取した自己のがん細胞 (autologous) あるいは同種 (allogeneic) のがん細胞株にサイトカイン遺伝子、免疫を活性化する炎症誘発性分子 (pro-inflammatory molecule)、強力な抗原性蛋白質遺伝子などを導入し、それらの遺伝子導入がん細胞を放射線や抗がん剤処理で不活化してワクチンとして担がん患者に接種する。Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) 遺伝子をかん細胞に導入した GVAX は、ホルモン抵抗性前立腺がんを対象にタキソールとの有効性を比較する第Ⅲ相臨床試験 (VITAL-1) が進行中であり¹⁰⁾、さらに臓がん、白血病に対する第Ⅱ相臨床試験も行われている。2006年、同種前立腺がん細胞を用いた GVAX は米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA) の迅速審査対象となっており、今後のデータ蓄積による臨床展開が期待される。

Bリンパ球の活性化抗原である B7-1, intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), lymphocyte function-associated antigen 3 (LFA-3) の3分子を使用する

TRICOM ワクチンでは、初期ワクチンにワクシニアウイルスを使い、ブースターに鶏痘ウイルス (Fowlpox virus) を用いて、TRICOM とともに mucin-1 (Muc-1) と CEA を発現する PANVAC-VF レジメで、膀胱がんに対する第Ⅲ相臨床試験を終了している¹¹⁾。

2. サイトカイン遺伝子治療

サイトカイン遺伝子そのものを *in situ* でがん細胞に導入する方法も試みられており、interleukin 2 (IL-2) や interferon- γ (IFN- γ)、より強力な免疫活性化能を持つ interleukin 12 (IL-12) 遺伝子などが用いられている¹²⁾。サイトカインを局所的に発現させ、その濃度依存性の全身的な毒性を軽減させる工夫であり、免疫原性の高いメラノーマや腎臓がんを対象としてヒトへの臨床応用が行われてきた。

サイトカインの一つである MDA-7 (IL-24) 遺伝子が発現するアデノウイルスベクター (INGN241) の腫瘍内投与は、頭頸部がんを対象に放射線併用での第Ⅲ相臨床試験が進行中であり、メラノーマと固形がんでは第Ⅱ相臨床試験が行われている。メラノーマに対する第Ⅰ相臨床試験では、22例で全身性の免疫活性の上昇と組織学的に腫瘍内でのアポトーシスの誘導が確認された¹³⁾。

TNFerade は、放射線感受性 Egr-1 プロモーターで tumor necrosis factor α (TNF- α) を発現する非増殖型アデノウイルスベクターである¹⁴⁾。TNFerade の腫瘍内投与と局所放射線治療の併用で、TNF の全身投与で認められる重篤な毒性を抑えつつ局所的に強力な抗腫瘍活性を得ることが可能となる。現在、切除不能膀胱がんに対して TNFerade の腫瘍内投与と5-FUの全身投与に放射線を併用するランダム化第Ⅱ/Ⅲ相比較臨床試験 (PACT study) が進行中であり、直腸がんと転移性メラノーマでは第Ⅱ相臨床試験が、また頭頸部がんに対しては第Ⅰ/Ⅱ相臨床試験が行われている。PACT study の中間報告では、標準治療の生存期間中央値が11ヵ月に対して TNFerade 併用で19ヵ月と延長が認められている。しかし、食道がんを対象とした第Ⅱ相臨床試験は、肺梗塞のリスクが有意に高まったとして中止となっている。

細胞死を誘導する治療遺伝子の導入による遺伝子治療

1. 自殺遺伝子によりプロドラッグを活性化する遺伝子治療

がん細胞に特異的に薬剤感受性を誘導できれば、正

常細胞に影響を与えず，選択的にがん細胞を破壊することが可能となる。単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ (*HSV-tK*) 遺伝子を発現するがん細胞では，ヘルペス治療薬であるガンシクロビル (GCV) がリン酸化され，その代謝産物の毒性によりがん細胞は死に至る。悪性グリオーマや前立腺がん，悪性胸膜腫を対象に，*HSV-tK* 遺伝子発現アデノウイルスベクターを直接腫瘍内や胸腔内に投与する臨床試験も行われており，グリオーマに対する大規模第I相臨床試験では，生存期間中央値が39週から70.6週に延長したと報告されている¹⁵⁾。局所再発前立腺がんに対する第I相臨床試験は米国で行われており，18例に *HSV-tk* 遺伝子発現アデノウイルスベクターの腫瘍内投与と GCV の全身投与が行われ，3例で PSA 低下による臨床効果が認められた。しかし，ヨーロッパで行われた248例の悪性グリオーマに対する標準治療(外科切除+放射線)へのアジュバントとしての第III相臨床試験の結果では，その有効性は否定的であった。

2. p53がん抑制遺伝子を用いた遺伝子治療

1) 治療遺伝子としての p53

ヒト第17番染色体短腕上に存在するがん抑制遺伝子である p53 遺伝子は，約50%のヒト悪性腫瘍でその機能喪失が認められ，生体ストレスに対するゲノムの安定性の維持に重要な役割を果たしている。p53蛋白質は，特定の塩基配列に結合する転写因子として多くの遺伝子群の発現を調節することで多様な生理機能を発揮している。すなわち，G1期，G2期チェックポイントとしての細胞周期制御，細胞の自殺経路であるアポトーシスの誘導，ゲノムの安定性を維持するための DNA 修復，あるいは血管新生抑制などである¹⁶⁾。正常なヒト p53 遺伝子を導入することで，多くのがん細胞でアポトーシス細胞死を惹起することができる。

2) p53 遺伝子発現アデノウイルスベクター

正常なヒト p53 遺伝子を発現するアデノウイルスベクター (Ad5CMV-p53, Advexin) は，ウイルス増殖に必要な *E1* 遺伝子領域を除去し，その部分にヒト由来の正常な p53 cDNA を組み込んであるため，*E1* 遺伝子でトランスフォームした293細胞内でのみ増殖可能である (図1)。すなわち，標的であるがん細胞内で，投与されたウイルス濃度に応じた p53 遺伝子発現を誘導するが，理論的にはウイルス増殖がみられることはない。Advexin の感染により，様々なヒトがん細胞で高率にアポトーシスが誘導される¹⁷⁾。さらに，p53

は血管新生関連分子の発現を制御することで血管新生に抑制的に作用して¹⁸⁾，また CD95リガンドの発現増強を介して好中球の腫瘍局所への遊走を惹起し¹⁹⁾，これらの現象により p53 遺伝子導入されなかった周辺のがん細胞にも影響を与えることが確認されている。

3) p53 遺伝子を用いた遺伝子治療の臨床試験

(1) 非小細胞肺癌

岡山大学医学部附属病院を中心に，1999年3月から2003年7月まで多施設共同研究として非小細胞肺癌に対する Advexin による第I相臨床試験が行われた²⁰⁾。岡山大学で9例，東京医科大学で3例，東北大学加齢医学研究所で2例，東京慈恵会医科大学で1例，計15例の患者に63回の治療が施行されている。Advexin は，経気管支鏡的に，あるいは CT ガイド下穿刺により腫瘍内に局所注入された。ウイルスは段階的に増量し，また Advexin 単独局所投与する群と Advexin 局所投与とシスプラチンの全身投与を併用する群の2群が設定されていた。発熱以外に顕著な副作用はなく，本治療は安全に施行可能であると考えられる。評価可能であった13例の臨床効果は，PR (partial response) 1例，SD (stable disease) 10例 (3例は9ヶ月以上持続)，PD (progressive disease) 2例であり，1例の PR 症例と2例の SD 症例，計3例では，呼吸機能の改善，血痰の消失，肺活量の増加と咳症状の軽快などの QOL (quality of life) の改善や腫瘍マーカーの低下などの臨床的有用性が確認された。

米国テキサス大学 MD アンダーソンがんセンターでは，第I相臨床試験による安全性の確認の後，1998年4月から2000年5月まで高濃度の Advexin 局所投与と局所放射線療法を併用する第II相臨床試験が行われた²¹⁾。第1，18，32日目に Advexin を局所投与し，第4日目から2 Gy/日，5日/週，計60 Gyの放射線照射を行う。19例 (CT ガイド下投与：15例，気管支鏡下投与：4例) の非小細胞肺癌患者での結果は，CR (complete response) 1例 (5%)，PR 11例 (58%)，SD 3例 (16%)，PD 2例 (11%) であり，63%に50%以上の腫瘍縮小がみられた。また，治療3ヵ月後の生検では，12例 (63%) でがん細胞が認められなかった。生存率は1年40%，2年16%であった。第II相臨床試験で治療を受けた2症例で5年以上の生存が確認されており，その長期的な有用性も示唆された。

(2) 小細胞肺癌

樹状細胞はT細胞を抗原特異的に活性化することの

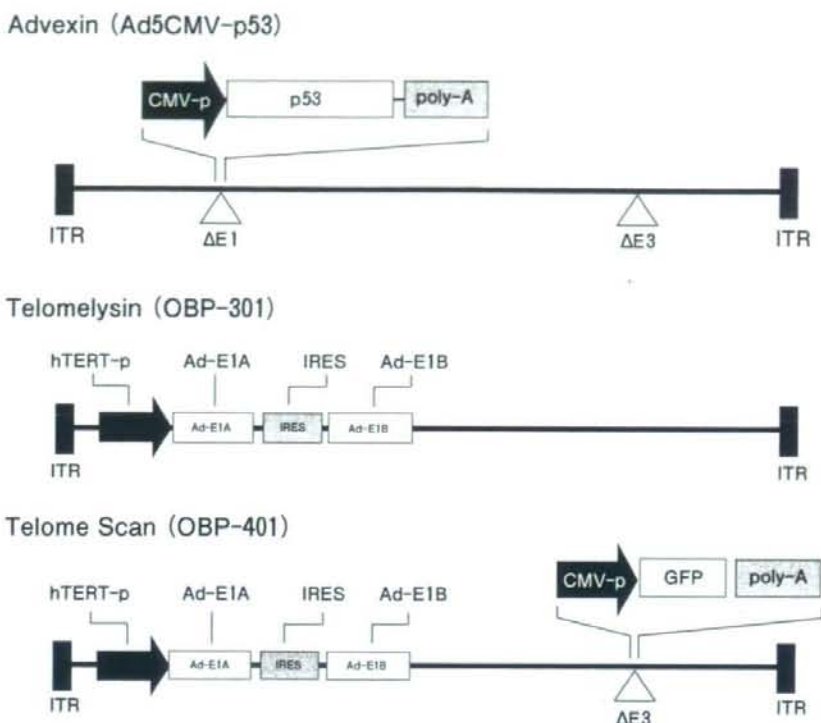


図1 アデノウイルスベクターの構造と概観

第一世代のアデノウイルスベクターでは、ウイルスの増殖に必要なE1とE3領域が除去されており、相同組み換えによりE1領域に治療遺伝子を含む発現カセットが挿入される。Advexin (Ad5CMV-p53)では、サイトメガロウイルス (CMV)・プロモーター、ヒト正常型 p53 cDNA, SV40 polyadenylation signal より成る p53遺伝子発現カセットが、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。このベクターを、E1 遺伝子を導入した293細胞に感染させることで、大量の治療用ベクターを産生、精製することができる。

Telomelysin (OBP-301)では、hTERT プロモーターと IRES 配列で結合した E1A, E1B 遺伝子より成る増殖カセットが、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部分に組み込んである。また、TelomeScan (OBP-401)は、Telomelysin を基本骨格としてオウツ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。

できる最も強力な抗原提示細胞であり、近年癌治療への応用が積極的に進められている。Advexin の腫瘍内局注は局所的には有効であると思われるが、遠隔転移巣や微小病変に対してはアプローチが困難である。そこで、Advexin を感染させた末梢血単球由来の樹状細胞 (INGN225) を用いた全身療法としての免疫遺伝子治療の可能性が検討されている。化学療法を終了した19例の進行小細胞肺癌患者に INGN225 を3回皮内投与したところ、評価可能であった28例中16例 (57.1%) で明らかな免疫学的反応の増強が観察された。また、臨床的には29例中1例で PR, 7例で SD であった。21例は PD であったが、second-line の化学療法に13例

(SD + PR [61.9%]) が反応し、本治療が小細胞肺癌細胞の抗癌剤感受性を増強する可能性が示唆された。この臨床効果は、免疫学的反応と相関していた²⁾。

(3) 頭頸部がん

頭頸部がんは、反復投与の簡便さと腫瘍の局所制御の臨床的有用性により、早い時期から Advexin のよい対象疾患と考えられてきた。MD アンダーソンがんセンターを中心に第 I 相臨床試験を終了し、その後217例の患者を対象に米国とヨーロッパで3つの多施設共同の第 II 相臨床試験を実施した。さらに2000年には、米国、カナダ、およびヨーロッパのおよそ80施設で、治療抵抗性の頭頸部がん患者240例に対する Advexin