

with DC protein assay reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Cell lysates or supernatants were heat-denatured, resolved by 10% SDS-PAGE, and electrotransferred to PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). The membranes were blocked in TBS-Tween 20 (10 mM Tris [pH 7.4], 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20) containing 5% non-fat milk for 2 h at room temperature and incubated overnight at 4°C with primary antibodies: anti-SPARC (Haematologic Technologies, Essex Junction, VT, USA), anti-p53 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-ERK (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), and anti- β -actin (Sigma), followed by reaction with HRP-conjugated secondary antibody (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA). In addition, polyclonal HRP-conjugated anti-p21 antibody (Santa Cruz Biotechnology) was used. The bands were visualized by ECL (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

Cell proliferation assay. HMV-I, MeWo, CRL1579, and SK-Mel-28 cells were transfected with SPARC siRNA or negative control siRNA at indicated concentrations, then seeded in 96-well flat bottom plates at 3×10^3 , 2×10^3 , 4×10^3 , or 2×10^3 cells/100 μ L per well, respectively. The cells were cultured in the presence of WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) (Dojindo, Kumamoto, Japan) for 3 h, followed by measurement of absorbance at 450 nm and 650 nm. For the swapping experiment, the conditioned media from siRNA-transfected MeWo cells (1×10^5 cells in six-well plate) were harvested at 72 h post-transfection, centrifuged at 1700g for 5 min to remove cellular debris, and stored at -80°C until use.

Cell cycle analysis and annexin V staining. For flow cytometric cell cycle analysis, the cells treated with siRNA were collected, washed with PBS, fixed in cold 70% ethanol, and stored at -20°C until staining. After fixation, the cells were washed with PBS and incubated with 50 μ g/mL RNaseA (Sigma) for 30 min at 37°C, before staining with 50 μ g/mL propidium iodide (Sigma). Apoptotic cells in early and late stages were detected using an annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit from BioVision (Mountain View, CA, USA). In brief, the cells were transfected with siRNA at 10 nM. At 96 h post-transfection, culture media and cells were collected and centrifuged. After washing, cells were resuspended in 490 μ L annexin V binding buffer, followed by the addition of 5 μ L annexin V-FITC and 5 μ L propidium iodide. The samples were incubated in the dark for 5 min at room temperature and analyzed using flow cytometry.

In vivo tumor experiment. For assessment of tumor growth *in vivo*, MeWo cells were transfected with SPARC siRNA-3 or negative control siRNA. Twenty-four hours later, the cells were trypsinized, and resuspended in serum-free DMEM. Four female athymic nude mice, ages 6- to 8-weeks-old were s.c. implanted with 1×10^6 or 3×10^5 MeWo cells per 0.1 mL into the right and left flanks resulting in two tumors per mouse. The tumor volume in mm³ was calculated by the formula: volume = (width)² \times length/2. The mice were maintained under specific pathogen-free conditions. Animal experiments in this study were approved by the Animal Research Committee of the National Cancer Center Hospital East (Kashiwa, Japan).

Statistical analysis. All data are presented as the mean \pm SD. The data from the WST-8 assay were statistically analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test or Tukey's multiple comparison test. Tumor volume between SPARC siRNA-treated cells and negative control siRNA-treated cells was compared for statistical significance using the Mann-Whitney *U*-test or Student's *t*-test. The results were considered significant when *P* < 0.05. All tests were carried out with Dr. SPSS II for Windows (SPSS Japan, Tokyo, Japan).

Results

Silencing of SPARC expression in human melanoma cell lines. We examined the knockdown effect of SPARC siRNAs on melanoma cells in this study. To assess the knockdown efficiency of SPARC, we transfected negative control siRNA or siRNAs targeted to SPARC (SPARC siRNA-1, -2, or -3) into SPARC expressing cell lines, MeWo, CRL1579, and SK-MEL-28 (Fig. 1A,B). Transfection with three SPARC siRNAs decreased the level of SPARC protein in all tested cell lines compared with negative control siRNA. This silencing effect was enhanced in a dose-dependent manner. The level of SPARC protein was not affected among the cells transfected with negative control siRNA at each concentration. Treatment with 10 nM SPARC siRNAs resulted in the robust downregulation of SPARC expression. SPARC siRNA-3 showed the strongest

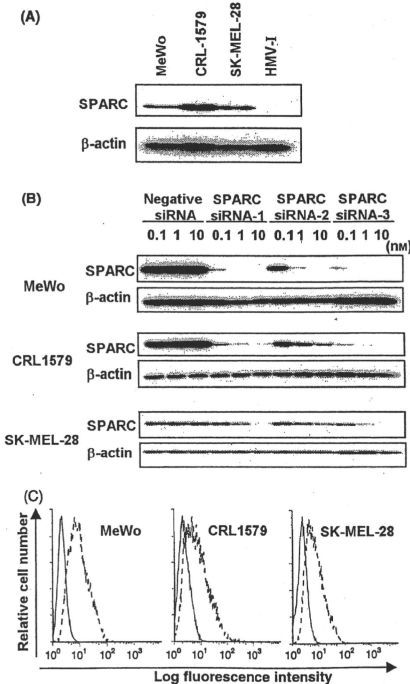


Fig. 1. Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) siRNA inhibits SPARC expression in melanoma cell lines. (A) The expression of SPARC protein in MeWo, CRL1579, SK-MEL-28, and HMV-1 cells was analyzed using Western blot. β -actin was used as an internal control. (B) Knockdown efficiency of three SPARC siRNAs. At 48 h post-transfection with indicated concentrations, the expression of SPARC protein in MeWo, CRL1579, and SK-MEL-28 cells was analyzed using Western blot. β -actin was used as an internal control. (C) Transfection efficiency of siRNA on melanoma cells was assessed by flow cytometry at 24 h post-transfection with 50 nM FITC-conjugated negative control siRNA. The plot shows the relative cell number of melanoma cells (y axis) and the log fluorescence intensity (x axis).

effect. Knockdown efficiency of SPARC protein was the highest in MeWo cells and the lowest in the SK-MEL-28 cells. These results suggest that these SPARC siRNAs successfully exert a silencing effect for SPARC expression. Transfection efficiency of siRNA was the highest in MeWo cells and the lowest in SK-MEL-28 cells (41.05%, 32.3%, and 27.97% at >10 of log fluorescence intensity in MeWo, CRL1579, and SK-MEL-28 cells, respectively) (Fig. 1C). This result was similar to knockdown efficiency among the melanoma cell lines.

Silencing of SPARC inhibits the growth of melanoma cells. We examined the effect of SPARC siRNA on the growth of melanoma cell lines. To check for non-specific side-effects of three siRNAs, we transfected SPARC siRNAs into SPARC non-producing cell line, HMV-1 (Fig. 2A). As SPARC siRNA-2 showed a growth inhibition in HMV-1 cells (data not shown), this siRNA was excluded from subsequent studies. SPARC siRNA-1 and -3 at 10 nM had no effect on cell growth. Therefore, we judged this

concentration of SPARC siRNA to be reasonable in the experiments. SPARC siRNA-3 showed a marked growth inhibitory effect compared to SPARC siRNA-1 in MeWo and CRL1579 cells. The inhibition of the proliferation in MeWo cells was stronger than in CRL1579 cells. Silencing of SPARC hardly affected the growth of SK-MEL-28 cells. SPARC siRNA-3 inhibited the growth of MeWo cells in a dose-dependent manner, but did not significantly inhibit the growth of CRL1579 cells at 1 nM (Fig. 2B). These data indicate that silencing of SPARC can inhibit the growth of melanoma cell lines *in vitro*. Furthermore, we investigated whether the growth inhibition by silencing of SPARC in MeWo cells could be canceled by the addition of exogenous SPARC (Fig. 3A). As a source of exogenous SPARC, we prepared the conditioned media from MeWo cells transfected with negative control siRNA, or SPARC siRNA-3 (Fig. 3B). Western blot analysis revealed that the conditioned media from MeWo cells treated with negative control siRNA contained a substantial amount of SPARC protein. In contrast, SPARC protein in conditioned media from SPARC siRNA-3-treated MeWo cells was negligible. At 24 h post-transfection, conditioned media were swapped, and SPARC-silenced MeWo cells were cultured under both conditioned media. The growth of SPARC-silenced MeWo cells was not significantly different between SPARC-containing and SPARC-free conditioned media. These results indicate that intracellular SPARC, but not extracellular, is involved in the growth of melanoma cells.

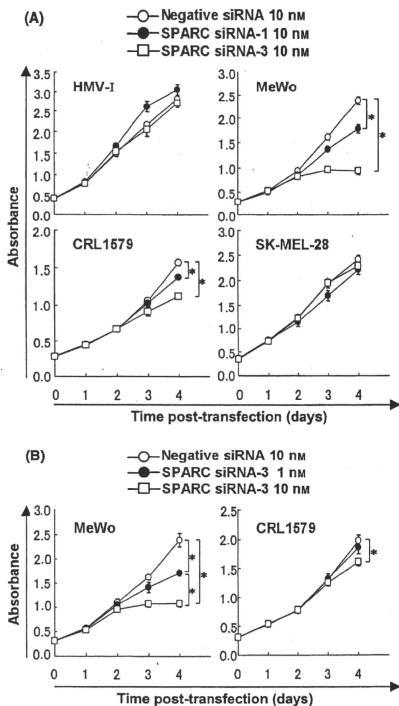


Fig. 2. Effects of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) knockdown on cell growth in melanoma cell lines. (A) HMV-1, MeWo, CRL1579, and SK-MEL-28 cells were transfected with SPARC siRNA-1, siRNA-3, or negative control siRNA at 10 nM. (B) MeWo and CRL1579 cells were transfected with SPARC siRNA-3 at the indicated concentrations. Cell growth was measured daily using WST-8 assay. The data at day 4 were statistically analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (A) or Tukey's multiple comparison test (B). Error bars indicate SD. * $P < 0.05$.

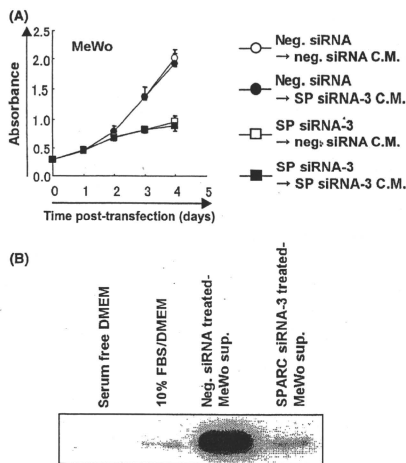


Fig. 3. Intracellular secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), but not extracellular, is involved in the growth of melanoma cells. (A) Effect of exogenous SPARC on SPARC-silenced melanoma cells. MeWo cells were transfected with SPARC (SP) siRNA-3 (squares) or negative control (neg.) siRNA (circles) at 10 nM. After 24 h, cell culture media were swapped for MeWo cells treated with SP siRNA-3 (closed squares and circles) or neg. siRNA (open squares and circles). Cell growth was measured by using WST-8 assay. The data were statistically analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. Error bars indicate SD. C.M., conditioned media. (B) The preparation of siRNA-treated MeWo cell conditioned media. The amount of SPARC protein in conditioned media was analyzed using Western blot. sup., supernatants.

Inhibition of SPARC expression induces cell cycle arrest in melanoma cells. We examined the effects of SPARC siRNA on cell cycle progression. Silencing of SPARC in MeWo cells increased G₁ and decreased S phase populations at 72 h post-transfection with SPARC siRNA-1 or -3 (Fig. 4A). These results indicate that silencing of SPARC induces G₁ arrest. Similarly, the induction of G₁ arrest was observed in SPARC-silenced CRL1579 cells. However, no change was observed in SPARC-silenced SK-MEL-28 cells. To confirm G₁ arrest induced by SPARC siRNA, p21 and p53 protein expressions were investigated (Fig. 4B). When SPARC siRNA induced G₁ arrest in MeWo and CRL1579 cells, notable p21 induction was observed. The base level of p21 protein was very low in SK-MEL-28 cells.

The accumulation of p21 protein was not observed in SPARC-silenced SK-MEL-28 cells. In SPARC-silenced MeWo cells, the level of p53 protein was increased compared with negative control siRNA-treated cells. However, it was not observed in SPARC-silenced CRL1579 or SK-MEL-28 cells. These results indicate that there is no correlation between p21 and p53 induction in CRL1579 and SK-MEL-28 cells. Taken together, these results indicate that the downregulation of SPARC induces growth inhibition with G₁ arrest and p53-dependent or -independent p21 accumulation in some melanoma cells.

Inhibition of SPARC expression enhances apoptosis in melanoma cells. We next tested whether silencing of SPARC induced cell death in melanoma cell lines. The treatment of

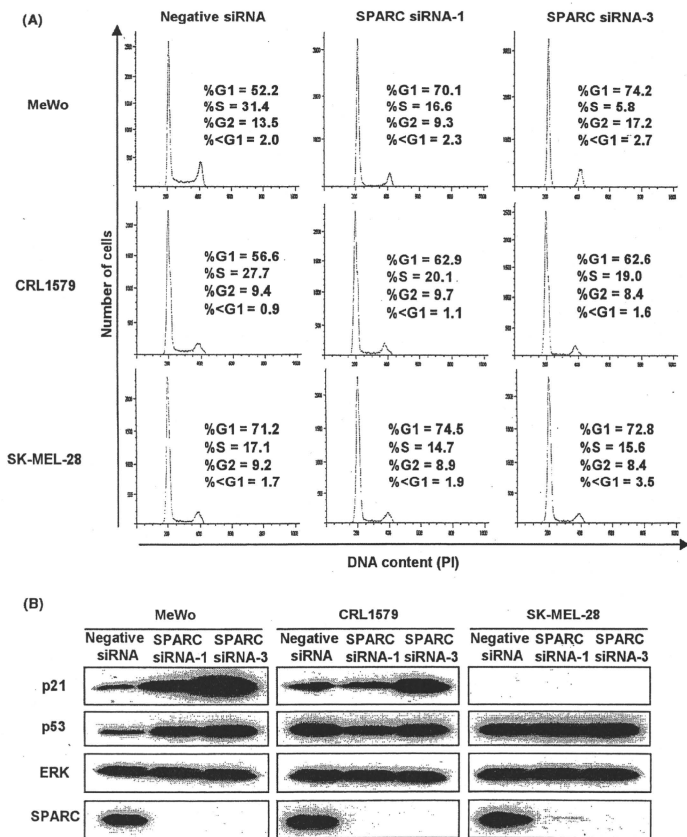


Fig. 4. Silencing of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) induces cell cycle arrest at G₁ phase in MeWo and CRL1579 melanoma cells. (A) Cell cycle distribution of melanoma cell lines transfected with SPARC siRNA. MeWo, CRL1579, and SK-MEL-28 cells were transfected with 10 nM SPARC siRNA-1, siRNA-3, or negative control siRNA. At 72 h post-transfection, DNA content was measured using propidium iodide (PI) staining on flow cytometry. The percentage of cells in each phase of the cell cycle is shown in each panel. (B) The expression of p21 and p53 proteins in MeWo, CRL1579, and SK-MEL-28 cells transfected with 10 nM SPARC siRNA-1, siRNA-3, or negative control siRNA. At 72 h post-transfection, total protein was analyzed using Western blot. ERK was used as an internal control.

MeWo and CRL1579 cells with SPARC siRNA-3 increased (more than two-fold) early apoptotic cells as well as late apoptotic cells, compared with negative control siRNA treatment (Fig. 5). In SK-MEL-28 cells, the increase of apoptotic cells was not observed. Similarly, no difference was observed in the ratio of apoptosis between negative control siRNA and SPARC siRNA-3-treated HMV-I cells. These findings suggest that SPARC is involved in apoptosis to maintain cellular survival in some melanoma cells.

Silencing of SPARC inhibits growth of melanoma cells *in vivo*. We attempted to examine the effect of silencing of SPARC on tumor growth *in vivo* with a xenograft model. To assess the persistence of SPARC siRNA-mediated silencing, the kinetics of the downregulation of SPARC protein in MeWo cells *in vitro* was shown using Western blot analysis (Fig. 6A). The duration of the downregulation by SPARC siRNA was 6 days *in vitro*. At 8 days post-transfection, SPARC expression increased slightly. On the basis of these findings, we examined whether silencing of SPARC inhibited tumor growth *in vivo* using a xenograft model. A similar number of MeWo cells, transfected with SPARC siRNA-3 or

negative control siRNA, were injected into both flanks of four nude mice. When tumors were palpable, their size was determined until 8 days post-implantation. As seen in Figure 6(B,C), the growth of tumors transfected with SPARC siRNA-3 was significantly suppressed compared with tumors transfected with negative control siRNA. At 8 days post-implantation, the growth inhibition of mice implanted with 1×10^6 or 3×10^6 cells transfected with SPARC siRNA-3 was 49% and 48%, respectively, as compared with negative control siRNA transfected cells ($P < 0.05$). These results indicate that downregulation of SPARC suppresses tumor growth *in vivo*.

Discussion

The underlying mechanisms of growth regulation by SPARC in tumor cells are complicated. We focused on cell growth, and showed that SPARC produced from melanoma cells functionally linked to their own growth in this study. The most significant finding was that the downregulation of SPARC expression induced growth inhibition with G₁ arrest. This growth inhibitory effect by silencing of SPARC was maintained in an *in vivo* xenograft model.

We showed that there was a correlation with the level of p21 accumulation and the growth inhibition by silencing of SPARC. To examine whether induced p21 was involved in growth arrest by the silencing of SPARC, p21 was knocked down in MeWo cells using three siRNAs targeted to p21. The transfection with p21 siRNAs resulted in the reduction of the level of p21 protein accumulated using SPARC siRNA-3 (data not shown). However, the induction of p21 protein did not contribute to cell cycle arrest in our model, because growth inhibition by silencing of SPARC was maintained in cells even after knockdown of the p21 protein level (data not shown). These results suggest that p21 is not a major player in mediating the growth inhibition by silencing of SPARC. It is well known that G₁ arrest is regulated by Ink4 and Cip/Kip family proteins.⁽²⁶⁾ We have not yet examined the correlation between other Ink4 or Cip/Kip family proteins and G₁ arrest caused by silencing of SPARC. To better understand the mechanism of G₁ arrest induction, further investigations are needed to examine the expression of these proteins in SPARC-silenced cells.

It has been described that p21 is a transcriptional target of p53.⁽²⁷⁾ The expression of p21 was positively correlated with the expression of p53 in SPARC siRNA transfected MeWo cells, whereas p53 expression was not changed in SPARC siRNA transfected CRL1579 or SK-MEL-28 cells. Therefore, we speculate that p53-dependent or -independent p21 induction occurred in the melanoma cells treated with SPARC siRNA. The mechanisms for p53 induction in SPARC-silenced MeWo cells are unclear. Many forms of stress have now been shown to activate p53.^(28,29) Although not examined in this study, it is possible that the loss of the protective effect of SPARC against some stress might affect p53 induction. Weaver *et al.* reported that SPARC protects lens epithelial cells from cell death induced by exposure to intracellular stressor, tunicamycin.⁽³⁰⁾ In addition, it has been reported that SPARC promotes glioma cell survival through Akt activation through integrin signaling under serum-free conditions.⁽²⁰⁾ These reports strongly suggest that SPARC plays a role as an antistress factor.

How does SPARC act? We showed that exogenous SPARC in culture conditioned media could not cancel the growth inhibition of MeWo cells with SPARC siRNA treatment. Thus, extracellular SPARC released from melanoma cells had no effect on cell proliferation in this system. We suggest that intracellular SPARC, but not secreted extracellular SPARC, contribute to cell growth or survival advantages. Martinek *et al.* have proposed intracellular SPARC functions as collagen-specific molecular

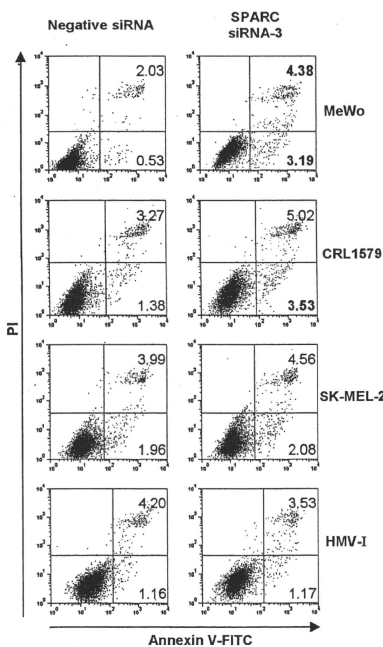


Fig. 5. Silencing of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) results in induction of early apoptosis in melanoma cell lines. For flow cytometric analysis, cells were harvested at 96 h after transfection with 10 nM SPARC siRNA-3 or negative control siRNA, then stained with annexin V-FITC and propidium iodide (PI). The percentages of annexin V⁺/PI⁺ (early apoptotic) and annexin V⁺/PI⁺ (late apoptotic) cells is shown in each panel. Values in bold indicate more than a two-fold increase in apoptotic cells using SPARC siRNA-3, compared with negative control siRNA.

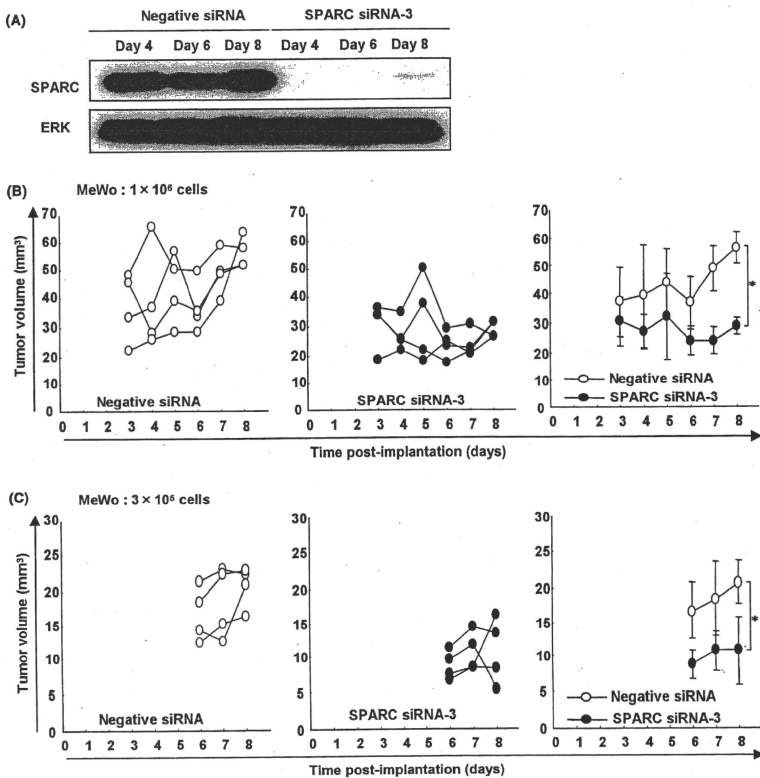


Fig. 6. Effect of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) knockdown on melanoma cell growth *in vivo*. (A) The duration of the knockdown effect of SPARC siRNA *in vitro*. At 4, 6, and 8 days post-transfection, SPARC protein was analyzed using Western blot. ERK was used as an internal control. MeWo cells were transfected with SPARC siRNA-3 or negative control siRNA in culture dishes. Twenty-four hours later, 1×10^6 (B) or 3×10^5 (C) tumor cells were s.c. implanted into both flanks of four nude mice. Individual tumor growth was measured with a caliper every day until 8 days post-implantation. Statistical differences were determined by Mann-Whitney *U*-test (B) or Student's *t*-test (C). The mean tumor volumes \pm SD. **P* < 0.05 compared to negative control siRNA treatment at day 8.

chaperone, prior to their export from the endoplasmic reticulum.⁽³¹⁾ Further study is needed to elucidate the roles of intracellular SPARC.

In our *in vivo* experiments, silencing of SPARC inhibited tumor growth, but did not lead to tumor rejection. This result might be due to the modest induction of apoptosis caused by silencing of SPARC. Other investigators showed that SPARC-silenced melanoma cells were abolished in *in vivo* xenograft models.⁽²¹⁾ Their strategies for SPARC knockdown used SPARC downregulated stable cell lines. Their report suggests that it is important for the persistence of SPARC knockdown to abolish tumor cells. We need to further confirm the efficacy of the sequential administration of SPARC siRNA in the *in vivo* xenograft model.

Our results showed that there were differences in the degree of growth inhibition among SPARC siRNA-treated cell lines.

Unlike MeWo and CRL1579 cells, the silencing of SPARC in SK-MEL-28 cells did not show growth inhibition. From our results, a reason for this might have been that the degree of knockdown of SPARC by siRNA in SK-MEL-28 cells was weaker than other cell lines. Second, the SPARC dependency on cell growth in SK-MEL-28 cells might have been less. We found that p53 was not induced by silencing of SPARC in CRL1579 and SK-MEL-28 cells. It is well known that p53 is important in the regulation of cell cycle checkpoints. Therefore, these results suggest that the regulation of cell cycle arrest by the checkpoint system in these cell lines might have been partial, compared with SPARC siRNA-treated MeWo cells. In addition, the antiproliferative effect of SPARC siRNA in CRL1579 cells was not clearly manifested, because the cell growth rate was lower in CRL1579 cells than in MeWo cells under ordinary culture conditions (data not shown). The differences of these

inherent features of cell lines may have influenced the outcome of SPARC siRNA treatment.

Although the functional role of SPARC in cancer have been controversial, there are reports that it might play antitumorigenic roles in ovarian cancer.⁽³²⁻³⁴⁾ It has been indicated that SPARC induces apoptosis in ovarian cancer cells.⁽³²⁾ In addition, SPARC normalizes the ovarian cancer microenvironment through vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling modulation.⁽³³⁾ Furthermore, it has been reported that SPARC attenuates integrin-mediated signaling and Akt survival signaling in ovarian cancer cells.⁽³⁴⁾ The possible causes of these contradictory roles of SPARC in cancers might be the difference in tumor origin, properties of malignant cells, and tumor microenvironment. There is a need for further studies to clarify the roles of SPARC not only on cancer cells, but also on the interplay of tumor cells and tumor stroma.

References

- Bradshaw AD, Sage EH. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest* 2001; 107: 1049-54.
- Yan Q, Sage EH. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem* 1999; 47: 1495-506.
- Hasselbar P, Sage EH. SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells. *J Cell Biochem* 1992; 49: 272-83.
- Raines EW, Lane TF, Iruela-Arispe ML, Ross R, Sage EH. The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1281-5.
- Kupprion C, Motamed K, Sage EH. SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 29635-40.
- Tremble PM, Lane TF, Sage EH, Werb Z. SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *J Cell Biol* 1993; 121: 1433-44.
- Porter PL, Sage EH, Lane TF, Funk SE, Gown AM. Distribution of SPARC in normal and neoplastic human tissue. *J Histochem Cytochem* 1995; 43: 791-800.
- Franson PE, Sage EH. SPARC and tumor growth: where the seed meets the soil? *J Cell Biochem* 2004; 92: 679-90.
- Podhajcer OL, Benedetti LG, Girotti MR, Prada F, Salvatierra E, Llera AS. The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host. *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27: 691-705.
- Ledda F, Bravo AI, Adris S, Bover L, Mordoh J, Podhajcer OL. The expression of the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma. *J Invest Dermatol* 1997; 106: 210-4.
- Barth PJ, Moll R, Ramaswamy A. Stromal remodeling and SPARC (secreted protein acidic rich in cysteine) expression in invasive ductal carcinomas of the breast. *Virchows Arch* 2005; 446: 532-6.
- Koukourakis MI, Giattromanolaki A, Brekken RA et al. Enhanced expression of SPARC/osteonectin in the tumor-associated stroma of non-small cell lung cancer is correlated with markers of hypoxia/acidity and with poor prognosis of patients. *Cancer Res* 2003; 63: 5376-80.
- Yamashita K, Upadhyay S, Mimori K, Inoue H, Mori M. Clinical significance of secreted protein acidic and rich in cysteine in esophageal carcinoma and its relation to carcinoma progression. *Cancer* 2003; 97: 2412-9.
- Goweldhi A, Kleeff J, Adwan H et al. Osteonectin influences growth and invasion of pancreatic cancer cells. *Ann Surg* 2005; 242: 224-34.
- Yamanaka M, Kanda K, Li NC et al. Analysis of the gene expression of SPARC and its prognostic value for bladder cancer. *J Urol* 2001; 166: 2495-9.
- Infante JR, Matsubayashi H, Sato N et al. Penturonic fibroblast SPARC expression and patient outcome with resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2007; 25: 319-25.
- Massi D, Franchi A, Borgognoni L, Reali UM, Santucci M. Osteonectin expression correlates with clinical outcome in thin cutaneous malignant melanomas. *Hum Pathol* 1999; 30: 339-44.

In conclusion, we provided a new finding regarding the functional roles of SPARC on the regulation of cell proliferation in melanoma cell lines. The SPARC siRNAs we used exerted a potent knockdown effect. These siRNAs will be useful tools for therapeutic intervention by targeting SPARC. Further studies will elucidate the roles of SPARC on the growth of melanoma cells. All of this information contributes to a better understanding of SPARC as a potential therapeutic target for the treatment of melanoma.

Acknowledgments

This work was supported in part by a grant-in-aid for the Third-Term Comprehensive 10-Year Strategy for Cancer Control from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan and a Research Resident Fellowship from the Foundation for Promotion of Cancer Research, Japan (to K.H.), are also acknowledged.

- Huang H, Colella S, Kurrer M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. *Cancer Res* 2006; 66: 6868-74.
- Huang C, Li M, Chen C, Yao Q. Small interfering RNA therapy in cancer: mechanism, potential targets, and clinical applications. *Expert Opin Ther Targets* 2008; 12: 637-45.
- Shi Q, Bao S, Song L et al. Targeting SPARC expression decreases glioma cellular survival and invasion associated with reduced activities of FAK and ILK kinases. *Oncogene* 2007; 26: 4084-94.
- Ledda MF, Adris S, Bravo AI et al. Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nat Med* 1997; 3: 171-6.
- Alvarez MJ, Prada F, Salvatierra E et al. Secreted protein acidic and rich in cysteine produced by human melanoma cells modulates polymorphonuclear leukocyte recruitment and antitumor cytotoxic capacity. *Cancer Res* 2005; 65: 5123-32.
- Prada F, Benedetti LG, Bravo AI, Alvarez MJ, Carbone C, Podhajcer OL. SPARC endogenous level, rather than fibroblast-produced SPARC or stroma reorganization induced by SPARC, is responsible for melanoma cell growth. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 2618-28.
- Ikuta Y, Nakatsura T, Kageshita T et al. Highly sensitive detection of melanoma at an early stage based on the increased serum secreted protein acidic and rich in cysteine and glypican-3 levels. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8079-88.
- Ikuta Y, Hayashida Y, Hirata S et al. Identification of the H2-Kd-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes of a tumor-associated antigen, SPARC, which can stimulate antitumor immunity without causing autoimmune disease in mice. *Cancer Sci* 2009; 100: 132-7.
- Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; 13: 1501-12.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-25.
- Ashcroft M, Vousden KH. Regulation of p53 stability. *Oncogene* 1999; 18: 7637-43.
- Ashcroft M, Taya Y, Vousden KH. Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 3224-33.
- Weaver MS, Workman G, Sage EH. The copper binding domain of SPARC mediates cell survival in vitro via interaction with integrin beta1 and activation of integrin-linked kinase. *J Biol Chem* 2008; 283: 22826-37.
- Martinek N, Shahab J, Sodek J, Ringuette M. Is SPARC an evolutionarily conserved collagen chaperone? *J Dent Res* 2007; 86: 296-305.
- Yiu GK, Chan WY, Ng SW et al. SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells. *Am J Pathol* 2001; 159: 609-22.
- Said N, Socha MJ, Olearczyk JJ, Elmarakby AA, Imig JD, Motamed K. Normalization of the ovarian cancer microenvironment by SPARC. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 1015-30.
- Said N, Najwer I, Motamed K. Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) inhibits integrin-mediated adhesion and growth factor-dependent survival signaling in ovarian cancer. *Am J Pathol* 2007; 170: 1054-63.

ペプチドワクチン 国内で臨床試験の行われている ペプチドワクチン療法 GPC3

中面哲也 (国立がん研究センター東病院 臨床開発センター がん治療開発部 機能再生室 室長)

Point

- 肝細胞がん特異的ながん胎児性抗原としてGPC3を同定し、GPC3が肝細胞がんの腫瘍マーカーとしても有用であることも示した。
- 進行肝細胞がん患者を対象としたGPC3由来ペプチドワクチンの臨床第I相試験の結果、免疫学的効果や臨床的な効果が認められた。無増悪期間中央値は4ヵ月、全生存期間中央値は9ヵ月であった。
- GPC3ペプチドワクチン3回投与で終了した後は末梢血中ペプチド特異的CTLの頻度は持続せず、4回目以降のワクチンは意味があると考えられた。
- 初回肝細胞がん根治的治療後の再発予防効果を検証する第II相試験を実施中であり、腫瘍量が少なく免疫抑制のない患者での検証が行われている。卵巣明細胞腺がんを対象とした第II相臨床試験も行われている。
- わが国でのがんワクチンの医師主導の臨床試験は、資金面、体制面とも不足しており、国家プロジェクトでしっかりとエビデンスを構築できるような支援が必要とされる。

がんの免疫療法の概念はすでに19世紀からあった。医師たちはがん患者が細菌に感染すると、がんが小さくなる場合があることに気づいていた。そこ

から生まれたColey's vaccine (toxin) は、時にはがんの完全退縮を得たが、広くは受け入れられなかった。また、がんにはまれではあるが、自然退縮が

起こる。これにはおそらく免疫も関与している。1967年ごろには、がん細胞の自家移植の報告がなされている。手術で得られたがん組織からがん細胞をばらばらにして、1万個、10万個、100万個、1,000万個、1億個とその患者の皮下に移植した結果、進行がんの患者でも1万個は完全に拒絶され、10万個では時に移植が成立し、1億個ではほとんど移植が成立することがわかった。これらの研究結果は、がんに対する免疫の確かな存在と、一方ではその限界も示しているといえよう。

1991年にBoonらにより、ヒトの免疫系ががんを異物として認識し、排除しうること科学的な根拠が与えられた¹⁾ことによって、またがん免疫研究は勢いを盛り返し現在に至っている。現在までに、さまざまながん拒絶抗原およびペプチドが同定され、世界中で臨床試験が進められている。最近では、前立腺がんに対して「Provenge®」という樹状細胞療法がFDAに承認され話題になったが、その他にもいくつかの第Ⅲ相臨床試験での有効性も報告されている。日本国内でもさまざまな施設からがんに対するペプチドワクチンの有効例の報告が散見される。一方では、最近、子宮頸がんの予防ワクチンが話題であるが、免疫療法がより有効であるのは、がんの再発予防や予防であると考えられ、免疫療法を用いた根治治療後の再発予防法やがん発症予防法の開発も必要である。本稿では、われわれが研究している glypican-3 (GPC3) ペプチドを用いたワクチン療法について述べたいと思う。

がん特異的抗原 glypican-3 (GPC3) の同定

われわれは、東大医科研・ヒトゲノムセンターの中村祐輔教授(現国立がん研究センター研究所長)との共同研究により、cDNA マイクロアレイを利用した2万種類を超える遺伝子の肝細胞がんと正常組織における発現解析データを用いて、肝細胞がん特異的ながん胎児性抗原としてGPC3を同定した。GPC3遺伝子および蛋白質は、ほとんどの肝細胞がん組織ならびに細胞株で高発現するが、正常組織においては、胎生期の肝臓あるいは免疫学的に隔離された胎盤でしか発現がみられない。GPC3は肝細胞がんの腫瘍マーカーとしても有用であることも示した²⁾。われわれは、GPC3が理想的な腫瘍拒絶抗原になりうるかどうかを検討した。日本人の約60%が陽性であるHLA-A24とBALB/cマウスのMHCクラスI分子のK^dにはほぼ同じペプチドが結合することがわかっている。さらに、ヒトとマウスのGPC3では93%のホモロジーを認めることから、HLA-A24、K^dのいずれにも結合しうるGPC3由来のペプチドを合成した。これらをBALB/cマウスに免疫して解析し、K^d拘束性のHLA-A24結合性CTLエリートペプチド(EYILSLEEL)を同定した³⁾。同様にこれらをHLA-A24 transgenic mouse (Tgm)に免疫して解析した結果もやはり、同じCTLエリートペプチド(EYILSLEEL)が同定された。このHLA-A24結合性GPC3由来ペプチド(EYILSLEEL)を用いて、

ヒトのHLA-A24陽性の肝細胞がん患者の末梢血リンパ球を刺激することで、約半数からGPC3特異的CTLを誘導することができた⁴⁾。GPC3特異的CTL株を、GPC3高発現ヒト肝細胞がん細胞株を移植したヌードマウスに移入して、その治療効果を証明した⁴⁾。また、日本人の40%が陽性で、欧米白人のメジャータイプであるHLA-A24拘束性のCTLエリートペプチドを同定するために、HLA-A2に結合しうるペプチドを合成し、これらをHLA-A2 Tgmに免疫して解析した。同定したHLA-A2結合性GPC3由来ペプチド(FVGEFFTDV)を用いてヒトのHLA-A2陽性の肝細胞がん患者の末梢血リンパ球を刺激することで、約半数からGPC3特異的CTLを誘導することができた⁴⁾。また、非常に重要なことであるが、以上のいずれのマウスの実験においても、GPC3抗原の免疫によって、ペプチド特異的CTLが誘導され、抗腫瘍効果は認められたが、自己免疫現象は決して誘導されなかった^{3,4)}。

進行肝細胞がん患者を対象としたGPC3由来ペプチドワクチンの臨床第Ⅰ相試験の結果

平成19年2月、臨床第Ⅰ相試験をスタートし、平成21年11月に完了した。

1回の投与量を0.3、1、3、10、30mgの5段階とし、2週間おきに3回、左右の腋窩部、腹部および鼠径部の皮内に不完全フロイントアジュバント(incomplete Freund's adjuvant; IFA)とともに、安全性を確認しながら

有害事象	Grade 1	Grade 2
アレルギー反応(潮紅あるいは皮疹) 24 (80%)	投与時の一過性の潮紅 22 (73.3%)	異所性の皮疹あるいは潮紅 2 (6.7%)
アレルギー反応(薬剤熱) 6 (20%)	<38℃の薬剤熱 3 (10%)	≥38℃の薬剤熱 3 (10%)
注射部位の反応 30 (100%)	掻痒・紅斑 30 (100%)	炎症反応を伴う疼痛や腫脹 0
掻痒 5 (16.7%)	軽度または局所性の掻痒 5 (16.7%)	激しいまたは広範囲の掻痒 0

表1 CTCAE v3.0による有害事象の評価(計30例中の出現頻度)

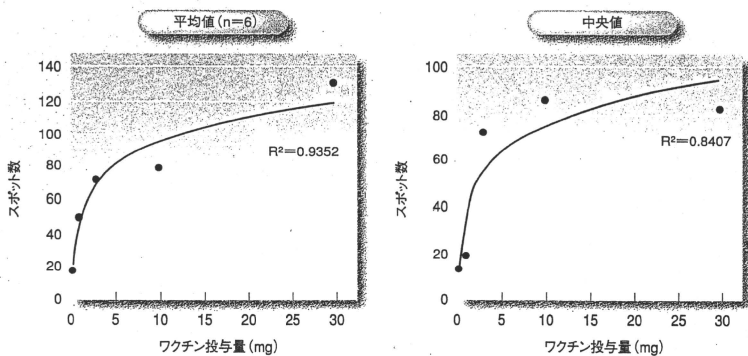


図1 ワクチンの投与量と投与後GPC3特異的CTLの頻度の最大値の相関

用量を増して投与した。
合計30症例全例に用量規制毒性(dose limiting toxicity; DLT)は発現せず、安全性に問題はないと判断された。投与時の一過性の潮紅は24例(80%)に認められ、うち1例には一過性の異所性の皮疹、1例には一過性の広範の潮紅を認めた。発熱は37.5℃

以上が6例で、うち38℃以上が3例にみられたがいずれも一過性で、解熱剤の使用を要しなかった。注射部の紅斑は30例全例にみられ、うち5例には軽度の掻痒があり、クロタミトン(オイラックス®)クリームを処方した。炎症反応を伴う疼痛や腫脹は認められなかった(表1)。

免疫学的解析を実施した全30例中27例(90%)に末梢血中ペプチド特異的CTLの頻度の増加が検出され、その頻度は投与量依存性に増加しており(図1)、免疫学的有効性も確認された。7例ではワクチン後の腫瘍の生検を行い、うち5例でワクチン前の腫瘍内には浸潤していなかったCD8陽性

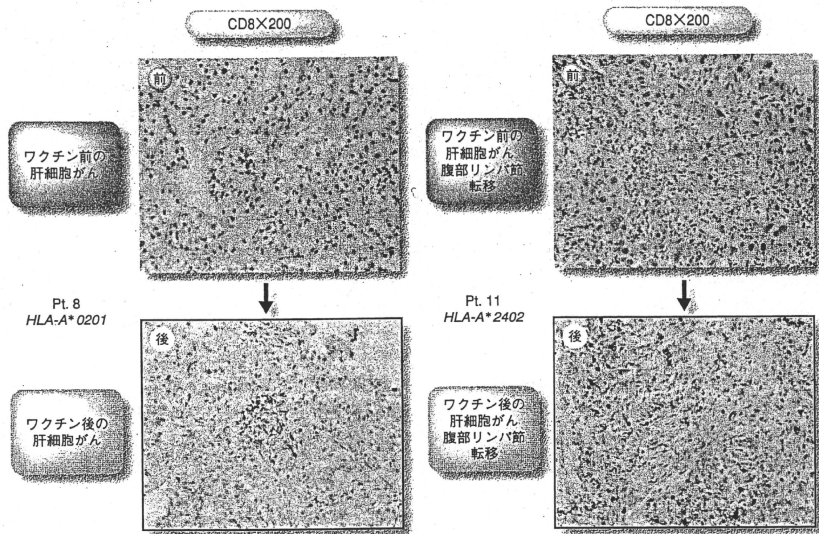


図2 ワクチン前の腫瘍内には浸潤していなかったCD8陽性キラーT細胞がワクチン後の腫瘍内に多数浸潤している2例

のキラーT細胞がワクチン後の腫瘍内に多数浸潤している像も観察できた(図2)。

3回のワクチン投与後1ヵ月後のCTのRECIST version 1.0での評価では、30人中1人がpartial response ; PR(図3)、18人がstable disease ; SD(SD以上63.3%)で、11人はprogression disease ; PDであったが、その内訳は0.3mgの6人中3人(50.0%)、1.0mgでは6人中4人(66.7%)、3.0mgでは6人中4人(66.7%)、10mgでは6人中4人(66.7%)、30mgでは6人中1人の

PRを含む4人(66.7%)がSD以上であり、0.3mgの1人、3.0mgの3人、30mgの1人の計5人には腫瘍内の壊死、一部腫瘍の縮小などの所見も認められた。経過中に一度でもAFP、PIVKA-II、あるいはGPC3の腫瘍マーカーの低下がみられた症例は、29例中22例(75.9%)で、その内訳は、0.3mgの6人中1人(16.7%)、1.0mgでは6人中4人(66.7%)、3.0mgでは5人中5人(100%)、10mgでは6人中6人(100%)、30mgでは6人中6人(100%)と、臨床効果に関しても投与

量に依存して増加する傾向が示唆された(表2)。

腫瘍量も多く免疫抑制もかかっている患者が多いと考えられる(実際、サイトメガロウイルス由来のペプチドに反応するキラーT細胞の頻度が少ない患者も多かった)今回の進行肝細胞がんの対象に対してわずか3回のワクチン投与で、以上に示したように、免疫学的効果や臨床的な効果が認められた。

全30例の最終結果においても、DLTは1例も発生せず、GPC3ペプチ

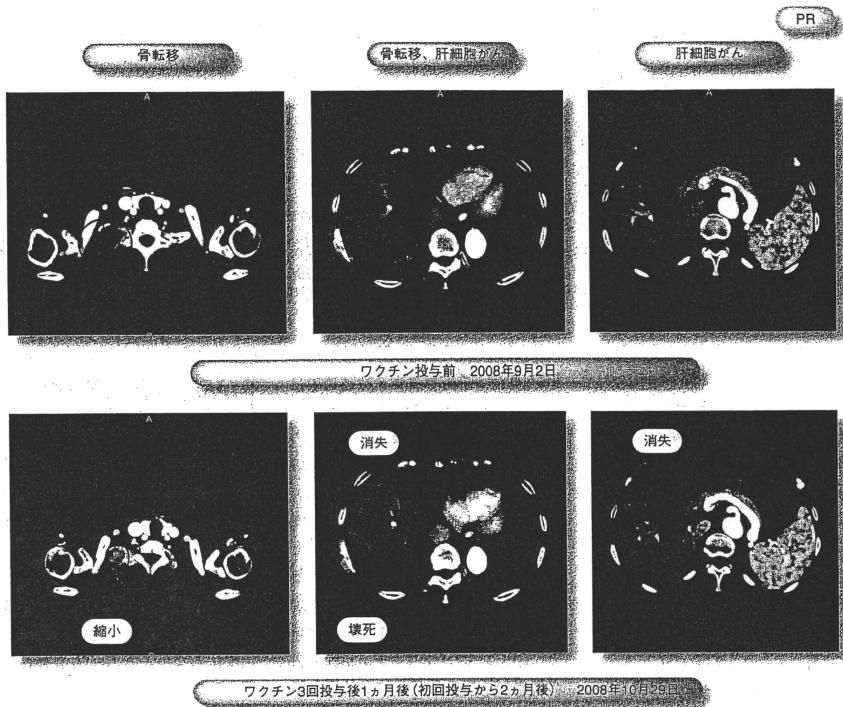


図3 Pt. 24 75歳女性 多発肝細胞がん、骨転移、肺転移、リンパ節転移 HLA-A*0207/1101
 HLA-A2 glypican-3 ペプチドワクチン療法：1回30mg、3回投与により著明な臨床効果出現

ドワクチンの安全性は証明されたが、DLTを基に推奨用量を決定することはできなかった。30mg投与の1例にPRの臨床効果が認められたこと、腫瘍マーカーならびに免疫学的モニタリングの結果において用量依存性が認められたことから高用量投与の優位性が

示唆されたものの、30mg投与例では、Grade 2の有害事象が全体の30例中5例(0.3mg投与に1例、3.0mg投与に1例)に対して6例中3例(発熱2例、広範な潮紅1例)と高頻度に認められたこと、3.0mg投与の10倍量の6mLも

の量を皮下に投与するため投与手技が煩雑なうえ、患者の苦痛も大きく、投与部位の発赤・硬結が同じGrade 1でも6例中4例では明らかに大きかったことから、その臨床効果と合わせて考えるとGPC3ペプチドワクチンの推奨投与量は3.0mgが妥当であると判断した。

	PR	SD	PR+SD	PD	腫瘍内の壊死、一部腫瘍の縮小	腫瘍マーカーの低下がみられた症例
0.3mg	0	3	3 (50.0%)	3	1	1/6 (16.7%)
1.0mg	0	4	4 (66.7%)	2	0	4/6 (66.7%)
3.0mg	0	4	4 (66.7%)	2	3	5/5 (100%)
10mg	0	4	4 (66.7%)	2	0	6/6 (100%)
30mg	1	3	4 (66.7%)	2	1	6/6 (100%)
計	1	18	19 (63.3%)	11	5	22/29 (75.9%)

表2 3回のワクチン投与後1ヵ月後のCTのRECIST version 1.0での評価と、腫瘍内の壊死、一部腫瘍の縮小がみられた症例数、および、経過中に一度でもAFP、PIVKA-II、あるいはGPC3の腫瘍マーカーの低下がみられた症例数

また、2週間に1回の3回皮内投与で30例中27例において末梢血中ペプチド特異的CTLの頻度が増加する効果は認められたものの、3回投与で終了した後はその頻度は30例中25例で減少し持続しなかった。継続投与を可能とするプロトコル改訂後、12例において継続投与を実施したが、そのうち9例で末梢血中ペプチド特異的CTLの頻度の増加を認め、4回目以降のワクチンは意味があると考えられた。また、本臨床試験参加30例の、無増悪期間 (time to progression ; TTP) 中央値は4ヵ月、全生存期間 (overall Survival : OS) 中央値は9ヵ月であった。

現在実施中もしくは 計画中のGPC3ペプチド ワクチン療法臨床試験

このようなワクチン療法は元来、腫瘍がない、あるいはCTで見えない腫瘍があったとしても腫瘍量が少ない状態でこそ威力を発揮すると考えら

れ、現在、手術やラジオ波焼灼療法 (radiofrequency ablation ; RFA) による初回肝細胞がん根治的治療後の再発予防効果を検証する第II相試験を実施中である。進行肝細胞がん患者にとって有用であるかを検証する第II相試験としては、ソラフェニブとGPC3ペプチドワクチンの併用療法とソラフェニブと比較する非盲検多施設共同ランダム化比較第II相臨床試験と、GPC3ペプチドワクチン単独療法との腫瘍局所での免疫学的有効性を評価する第II相臨床試験の2種類の試験を計画している。

GPC3は肝細胞がんだけでなく、一部の小児がん (肝芽腫、神経芽腫、腎芽腫)、卵巣明細胞腺がん、肺扁平上皮がんにも発現しており、それらががん種に対しての応用も期待される。卵巣明細胞腺がんを対象とした第II相臨床試験はすでに名古屋大学で開始されている。GPC3を発現する小児がんおよび肺扁平上皮がんを対象とした臨床試験も計画している。

がんワクチン療法の 臨床導入への問題点

まず、免疫療法自体が、そもそも有望な治療法と思われてこなかったことがブレーキをかけてきた。ペプチドワクチンは初めて科学的根拠をもって開発された免疫療法であったが、当初のペプチドワクチンの臨床第I相の臨床試験は従来の抗がん剤と同じくもう治療法のない、そもそも有効性を証明することが難しい進行がんを対象として実施されてきたため、かえって失望感を与えてしまった。米国NCIのRosenberg SAらが、2004年のNat Med.にがんワクチンのReviewとして、440例中complete response ; CR、PRのresponse rateはわずか2.6%であったと報告した⁵⁾ことがさらに追い討ちをかけた。この点に関しては、われわれも含めた日本各地のグループから有効例の報告も増えてきて、エビデンスも次第に証明されつつあり、その結果、国内の製薬企業の参画も出

てきた。

製薬企業が本気で参画して開発するかどうかは、今後がんワクチン市場がどうなっていくかの鍵を握っている。そのため、われわれを含めて日本全国で展開されている医師主導の臨床試験でどれだけの説得力のあるエビデンスを出せるかがもちろん一番重要であり、必須である。そのためには資金も必要である。

通常、抗がん剤や分子標的治療薬などの開発において、大規模な治験に行くためには、大金をつぎ込んだPhase 0の毒性試験などの実施が必要であるが、ペプチドワクチンのようなものは従来の抗がん剤のPhase 0より省略できるところも多いと考えられる。多くの臨床試験が安全性を証明している。医薬品医療機器総合機構(PMDA)がどれだけ規制緩和してくれるかもポイントである。

わが国でのがんワクチンの医師主導

の臨床試験は、資金面、体制面とも不足しており、そこで有望そうな結果が出たとしても、しっかりとしたエビデンスを証明できるに至っていない。そのため、製薬企業が開発に乗り出さず、大規模にスピード感をもって進まなかった。例えば、国家プロジェクトでできるだけ可能性のある多くの臨床試験に対してしっかりとエビデンスを構築できるような惜しみない支援をし、製薬企業が開発意欲をそそる臨床試験を拾い上げられるような仕組みをつくる必要がある。日本中の患者や、紹介する医師側に、現在登録できる臨床試験のリストがいつでも閲覧できるような仕組みも必要であろう。

おわりに

がん特異抗原を標的とした免疫療法は、理論上、重篤な有害事象は起

こりえず、有効性さえ証明できれば、標準的な治療法や補助療法となりうる可能性がある。また将来的にこれらワクチンなどの免疫療法によりがんの予防法が確立できれば、国内がん患者数の減少に寄与することができ、国民の健康維持に大いに貢献できるものと考えられる。ワクチンはより安価に提供でき、一般の医療施設でもできる治療である。今後示される有効性によっては、抗がん剤治療に頼ってきたがん治療を大きく変える可能性があり、患者のQOLの改善にとっても大きな役割を果たすものと考えられる。まだまだ越えなければいけないハードルは多いが、がん特異的免疫療法ががん治療を変えられる可能性は十分にあるのではないだろう。

文献

- 1) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254: 1643-7.
- 2) Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, Monji M, Komori H, Motomura Y, et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306: 16-25.
- 3) Nakatsura T, Komori H, Kubo T, Yoshitake Y, Senju S, Katagiri T, et al. Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, glypican-3, evokes T-cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8630-40.
- 4) Komori H, Nakatsura T, Senju S, Yoshitake Y, Motomura Y, Ikuta Y, et al. Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2689-97.
- 5) Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004; 10: 909-15.

免疫療法

国立がん研究センター東病院臨床開発センター 機能再生室 室長 中面 哲也

はじめに

がんの3大治療は、未だに切除手術、抗がん剤による化学療法、放射線治療である。がんの免疫療法が第4の治療法と期待されて久しい。

がんの免疫療法の概念はすでに19世紀からあった。医師たちはがん患者が細菌に感染すると、がんが小さくなる場合があることに気づいていた。そこからColey's vaccine (toxin) が生まれた。時にはがんの完全退縮を得たが、いつも同じ結果が出たわけではなかった。広くは受け入れられなかった。また、がんにはまれではあるが、10万例に1例くらいの頻度で自然退縮が起こる。これにはおそらく免疫も関与している。また、私が生まれた1967年のころには、今では考えられないが、がん細胞の自家移植の報告がなされている。手術で得られたがん組織からがん細胞をばらばらにして、1万個、10万個、100万個、1000万個、1億個とその患者の皮下に移植するのである。その結果、進行がんの患者でも1万個は完全に拒絶され、10万個では時に移植が成立し、1億個ではほとんど移植が成立することが分かった。この研究結果は、がんに対する免疫の確かな存在と、一方ではその限界も示していると言えよう。

がん免疫研究の歴史はしばしばサインカーブに例えられるように、一喜一憂を繰り返してきた。モノクローナル抗体やサイトカインの出現時はそれだけでがんが治るのではとい

う期待が一気に高まったが、がんは手ごわかった。現在では、一部の腫瘍抗原に対するモノクローナル抗体による免疫療法が標準化しているに過ぎない。1991年にBoonらにより、ヒトの免疫系ががんを異物として認識し、排除しうることによって、またがん免疫研究は勢いを盛り返し現在に至っている。

現在までに、さまざまながん拒絶抗原およびペプチドが同定され、海外では、各種がんにも効果的ながん抗原ペプチド、タンパク質、遺伝子、ウイルスベクター、患者自己腫瘍由来抗原タンパク質、がん抗原感作樹状細胞を利用したがんワクチンの開発が精力的に行われ、臨床試験が進められている。最近では、前立腺がんに対して「Provence」という樹状細胞療法がFDAに承認され話題になったが、その他にもいくつかの第3相臨床試験での有効性も報告されている。日本国内でもさまざまな施設からがんに対するペプチドワクチンの有効例の報告が散見される。

一方では、最近、子宮頸がんの予防ワクチンが話題であるが、免疫療法がより有効であるのは、がんの再発予防や予防であると考えられ、免疫療法を用いた根治治療後の再発予防法やがん発症予防法の開発も必要である。果たして、がんの免疫療法は今後、期待にどこまで応えられるのであろうか？研究者たちの試行錯誤が続いている。がん免疫療法といっても幅広く、さまざまなものが存在するが、本稿では、我々が主に研究しているがん

特異的な抗原ペプチドを用いた免疫療法について述べたいと思う。

免疫療法における科学的根拠

1991年にBoonらによりメラノーマ抗原MAGE遺伝子が同定され、ヒトの免疫系ががんを異物として認識し、排除しようことに科学的な根拠が与えられた¹⁾。すなわち、がん化に関連して特異なタンパク質が産生されると、これらに由来するペプチドが、HLAクラスI分子に結合して細胞の表面に発現し、CD8⁺細胞傷害性T細胞(キラーT細胞, CTL)がこれらを識別して活性化され、がん細胞を破壊するというメカニズムが存在する。現在までに、さまざまながん拒絶抗原およびペプチドが同定され、それらを用いた臨床試験が世界中で行われている。

米国国立がん研究所(NCI)のRosenberg SAらは、2004年のNature MedicineにがんワクチンのReviewとして、440例中奏効例はわずか2.6%であったと報告した²⁾が、そのことは2009年の米国がん学会でも議論になり、ペプチドワクチン単独では進行がんにはあまり有効ではないかもしれないが、生存期間や無増悪期間の延長等の可能性はあり、再発予防にも有効な可能性はある、また、さまざまな免疫抑制分子に対する抗体との併用などに期待が持てるとの意見も多かった。

一方、最近、日本国内のさまざまな施設からがんに対するペプチドワクチンの有効例の報告も散見される。大阪大学の杉山治夫らはWT1ペプチドワクチンが、骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病、乳がん、肺がん、glioblastoma(脳腫瘍)などで有効例を報告しているが、中でもglioblastomaでは、奏効例がみられている³⁾。札幌医大の佐藤昇志らのグループはサバイピン2Bペプチドワクチンにより進行大腸直腸がんで奏効例の報告をしている⁴⁾。久留米大学の伊東恭悟らはテーラードがんペプチドワクチン療法により、

子宮頸がん、大腸がん、脳腫瘍、膀胱がんで著効例を報告しているが、なかでもglioblastomaでは、奏効例を複数認めている⁵⁾。また、近畿大学泌尿器科の植村天受らは、腎がんに対するCA9ペプチドワクチンによる複数の奏効例を報告している⁶⁾。山口大学の岡正朗らは、東大医科研の中村祐輔らとの共同研究により、大腸がんに対して、KOC1, RNF43, TOMM34, VEGFR1, VEGFR2の5種類のペプチドワクチン同時投与により、奏効例を報告している⁷⁾。山梨医大の河野らは、東大医科研の中村らとの共同研究により、食道がんに対して、TTK, LY6K (URLC10), IMP-3 (KOC1)の3種類のペプチドワクチン同時投与により、奏効例を報告している⁸⁾。岩手医大の藤岡らは、東大医科研の中村らとの共同研究により、膀胱がんに対して、MPHOSH1, DEPDC1の2種類のペプチドワクチンを用いて、抗腫瘍効果を報告している⁹⁾。さらに、和歌山医大の山上らは、東大医科研の中村らとの共同研究により、腫瘍新生血管を標的とするVEGFR2ペプチドワクチン療法を開発し、切除不能進行肺癌に対し、ゲムシタビンとの併用の臨床第I相試験を実施した¹⁰⁾。良好と思われる生存期間中央値が得られて、現在、PEGASUS-PCスタディと呼ばれる臨床第II/III相試験が進行中であり、結果が待たれるところである。

我々も国立がんセンター東病院において、進行肝細胞がん患者を対象に、肝細胞がん特異抗原glypican-3 (GPC3)のペプチドワクチン臨床第I相試験を完了した。詳細は後述するが、計30例の結果からワクチンの安全性と免疫学的有効性ならびに臨床効果を確認している。

理想的ながん拒絶抗原が備えているべき性質

免疫療法への応用を考える場合には、多くの患者に適用できるかという汎用性、がん特

異性, 免疫原性, がん拒絶能, 抗原消失性および自己免疫などの有害事象誘導の危険性などによって各抗原の特徴をとらえる必要がある。理想的ながん拒絶抗原が備えているべき性質として, 1) がん患者の体内において免疫応答を誘導する抗原, 2) 発現の組織特異性が優れた抗原, 3) 免疫系からの逃避が起こりにくい抗原の3つが重要である。

がん特異的抗原 glypican-3 (GPC3) の同定

我々は, 東大医科研・ヒトゲノムセンターの中村祐輔教授との共同研究により, cDNAマイクロアレイを利用した2万種類を超える遺伝子の肝細胞がんと正常組織における発現解析データを用いて, 上記の理想的ながん抗原としてふさわしい肝細胞がん特異的な新規がん胎児性抗原, GPC3を同定した¹¹⁾。マウスモデルでGPC3ががん拒絶抗原としても有用であることを証明し, マウスGPC3を導入したES細胞由来樹状細胞の抗腫瘍効果も証明した^{12), 13)}。さらに, ヒトHLA-A2, A24によりキラーT細胞に提示されるGPC3ペプチドを同定した¹⁴⁾。

GPC3ペプチドワクチンの 臨床第1相試験

肝細胞がんにおいては, 海外では目立った成績を示すがんワクチンは開発されていない。国内では, 我々が, HLA-A24, -A2陽性進行肝細胞がん患者を対象に, GPC3ペプチドワクチンの臨床第1相試験を完了した。安全性に問題はなく, ほほ全例の血液中にペプチド特異的CTLの頻度の増加が検出され, その頻度はペプチド投与量が多いほど増えることが示唆された。また, CD8陽性CTLが, ペプチドワクチン後のがん組織内に多数浸潤してがん細胞を攻撃していることを, 複数の患者で証明できた。約60%の症例において初回ワクチン投与後2ヵ月の間に腫瘍マーカー

PIVKA-IIの低下を認めCTやMRIの画像検査での評価では約60%の症例で2ヵ月間がんの増悪なし(安定SD)であった。30mg, 3回投与の1例に腫瘍の縮小や消失などの著明な臨床効果(部分奏効PR)が出現した。

今後は, もう他に治療法がない進行肝細胞がん患者にとって有用であるかを第2相試験で検証するとともに, このようなワクチン療法は元来, 腫瘍がない, あるいはCTで見えない腫瘍があったとしても腫瘍量が少ない状態でこそ威力を発揮すると考えられ, 現在, 手術やラジオ波焼灼療法(RFA)などの肝細胞がん根治的治療後の再発予防効果を検証する第2相試験を実施中である。GPC3は肝細胞がんだけでなく, 小児がん(肝芽腫, 神経芽腫, 腎芽腫), 卵巣明細胞がん, 肺扁平上皮がんにも発現しており, それらのがん種に対しての応用も期待される。

Rosenberg SAらによるヒトがん に対する強力な免疫療法の報告

米国国立がん研究所のRosenberg SAらは, 体外で培養したCTLを戻す養子免疫療法Adoptive-Cell-Transfer therapyに, T細胞のHomeostatic Proliferationという考え方を組み合わせた免疫療法について発表した¹⁵⁾。Homeostatic Proliferationとは, 体内のリンパ球の数は一定に保たれており, その数を減らしてやると, 新たに移入されたリンパ球が生き延びて一定数に達するまで増殖するという現象である。あらかじめシクロホスファミドとフルダラビンの前投与により患者のリンパ球数を減らしておいて, そこへ大量に増やしておいた, がん細胞を傷害するCTLを移入すると, CTLが体内で長期にわたって生存し, ついには転移性メラノーマ約50%の例で劇的な腫瘍縮小をもたらし, 今までのがんの免疫療法では考えられないほどの抗腫瘍効果が観察された¹²⁾。最近では, 抗がん剤と全身放射線照射にて体内リンパ球除去前処置後, 体外で

大量培養した腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を体内へ戻すTIL養子免疫療法によって、奏効率70%という驚異的な結果を報告している¹⁶⁾。

一方、この治療で用いられたCTLは、MART-1, gp100といったメラノサイト分化抗原由来のペプチドを用いて誘導したもので、この治療により、正常メラノサイトへの攻撃による白斑やぶどう膜炎などの自己免疫現象も観察された¹²⁾。このことは、がんを拒絶できるほどの免疫療法が行われた場合、そのCTLを誘導するのに使われた抗原が自己の正常臓器にも発現するものであれば、その臓器を傷害してしまう可能性があることを示している。すなわち我々は、がん特異的に発現する、あるいは重要な正常臓器には発現しないがん拒絶抗原を同定しなければならない。免疫療法も、工夫したり他の治療と併用したりすることでペプチドワクチンよりもさらに有効な画期的治療法となり得る可能性を十分に秘めている。

日本ではメラノーマの患者は少ないが、日本人に多いがんを対象に、がん特異抗原を用いて培養したCTLの養子免疫療法を開発することで、日本人のがん治療に大きなブレイクスルーが起こることは十分期待できる。我々も、がん患者末梢血単核球 (PBMC) より、GPC3由来エピトープペプチドを用いて、抗原特異的CTLの増殖が可能な条件を検討し、ペプチド特異的CTLを効率よく誘導し増幅させる技術を確立して、GMPグレードの細胞培養施設Cell Processing Center (CPC) を利用したGPC3由来エピトープペプチド特異的CTLの養子免疫療法の実施を目指している。

おわりに

現在、がんの補助療法あるいは手術などの局所療法が無効ながんに対する治療法として主流の抗がん剤は、確かに有効な場合もあるが、無効で有害事象だけが生じる場合も少なくない。最近脚光をあびている分子標的治療薬は高額であることも問題である。まだ元気

なのに、「あなたにはもう治療法はありません」と宣告される患者も少なくない。我々が実施するがん特異抗原を標的とした免疫療法は、理論上、重篤な有害事象は起こりえず、有効性さえ証明できれば、標準的な治療法や補助療法となりうる可能性がある。また将来的にこれらワクチン等の免疫療法によりがんの予防法が確立できれば、国内がん患者数の減少に寄与することができ、国民の健康維持に大いに貢献できるものと考ええる。

ワクチンはより安価に提供でき、開業医などどこでも医療施設でもできる治療である。さらには、がん特異抗原を用いて抗腫瘍T細胞を大量に培養して投与する養子免疫療法の開発により、患者個々にオーダーメイドで有害事象のない画期的な治療が可能になれば、抗がん剤治療に頼ってきたがん治療を大きく変える可能性があり、患者のQOLの改善にとっても大きな役割を果たすものと考ええる。まだまだ越えなければいけないハードルは多いが、がん特異的免疫療法ががん治療を変える可能性は十分にあると信じて、日夜研究に励んでいる。

参考文献

- 1) van der Bruggen P *et al.* Science 254, 1643 (1991)
- 2) Rosenberg SA *et al.* Nat Med 10, 909 (2004)
- 3) 岡 芳弘, 他, Biotherapy 23, 170 (2009)
- 4) 鶴間 哲弘, 他, Biotherapy 23, 178 (2009)
- 5) 峯 孝志, Biotherapy 23, 185 (2009)
- 6) Uemura H *et al.* Clin Cancer Res 2, 1768 (2006)
- 7) 裕 彰一, 他, Biotherapy 23, 160 (2009)
- 8) Kono K *et al.* Cancer Sci 100, 1502 (2009)
- 9) 小原 航, 他, がんペプチドワクチン療法 中村 祐輔 編 63 中山書店
- 10) Miyazawa M *et al.* Cancer Sci 101, 433 (2009)
- 11) Nakatsura T *et al.* Biochem Biophys Res Comm 306, 16 (2003)
- 12) Nakatsura T *et al.* Clin Cancer Res 10, 6612 (2004)
- 13) Nakatsura T *et al.* Clin Cancer Res 10, 8630 (2004)
- 14) Komori H *et al.* Clin Cancer Res 12, 2689 (2006)
- 15) Dudley ME *et al.* Science 298, 850 (2002)
- 16) Dudley ME *et al.* J Clin Oncol 26, 5233 (2008)

A Phase I Study of Telomerase-specific Replication Competent Oncolytic Adenovirus (Telomelysin) for Various Solid Tumors

John Nemunaitis¹⁻⁴, Alex W Tong^{3,4}, Michael Nemunaitis¹, Neil Senzer¹⁻⁴, Anagha P Phadke⁴, Cynthia Bedell¹, Ned Adams¹, Yu-An Zhang^{3,4}, Phillip B Maples⁴, Salina Chen⁴, Beena Pappen⁴, James Burke⁵, Daiju Ichimaru⁶, Yasuo Urata⁶ and Toshiyoshi Fujiwara⁷

¹Mary Crowley Cancer Research Centers, Dallas, Texas, USA; ²Texas Oncology PA, Dallas, Texas, USA; ³Baylor Sammons Cancer Center, Dallas, Texas, USA; ⁴Gradalis, Inc., Dallas, Texas, USA; ⁵Billings Clinic, Billings, Montana, USA; ⁶Oncolys BioPharma, Tokyo, Japan; ⁷Center for Gene and Cell Therapy, Okayama University Hospital, Okayama, Japan

A phase I clinical trial was conducted to determine the clinical safety of Telomelysin, a human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter driven modified oncolytic adenovirus, in patients with advanced solid tumors. A single intratumoral injection (IT) of Telomelysin was administered to three cohorts of patients (1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} viral particles). Safety, response and pharmacodynamics were evaluated. Sixteen patients with a variety of solid tumors were enrolled. IT of Telomelysin was well tolerated at all dose levels. Common grade 1 and 2 toxicities included injection site reactions (pain, induration) and systemic reactions (fever, chills). hTERT expression was demonstrated at biopsy in 9 of 12 patients. Viral DNA was transiently detected in plasma in 13 of 16 patients. Viral DNA was detectable in four patients in plasma or sputum at day 7 and 14 post-treatment despite below detectable levels at 24h, suggesting viral replication. One patient had a partial response of the injected malignant lesion. Seven patients fulfilled Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) definition for stable disease at day 56 after treatment. Telomelysin was well tolerated. Evidence of antitumor activity was suggested.

Received 16 July 2009; accepted 15 October 2009; advance online publication 24 November 2009. doi:10.1038/mt.2009.262

INTRODUCTION

Conditionally replicative oncolytic viruses are engineered to replicate selectively in cancer cells with specified oncogenic phenotypes. Multiple viral backbones have been employed, although the most commonly utilized is derived from the adenovirus serotype 5.

Two different approaches have been used to limit adenoviral replication to cancer cells. One approach is to delete components of viral genes (*E1A*, *E1B*) that function in part to neutralize normal cell defense (p53, Rb) mechanisms. Loss of function of the cell defense genes in cancer cells renders the virus cytotoxic to tumor cells but incapable of replication in normal cells, as exemplified by ONYX-015 or $\Delta 24$.¹ Alternatively, native viral promoters that

govern the initiation of viral replication can be replaced with a promoter region for genes that are active and/or overexpressed in cancer cells.^{2,3} The resulting constructs display viral cytolytic activity that is confined to cancer cells but at a level that approaches that of wild-type adenovirus.² Numerous studies have confirmed that administration of live, wild-type adenovirus to healthy, adult humans is safe.³

Telomelysin is a novel, replication-competent adenovirus serotype 5-based adenoviral construct that incorporates a human telomerase reverse transcriptase gene (*hTERT*) promoter. *hTERT* encodes for the catalytic protein subunit of telomerase, a polymerase that acts to stabilize telomere lengths and is highly expressed in tumors but not in normal, differentiated adult cells.^{4,5}

Additional modifications of Telomelysin include the replacement of the normal transcriptional element of viral *E1B* gene by an IRES (Internal Ribosomal Entry Site) sequence to minimize "leakiness" further enhancing specificity. Furthermore, Telomelysin is the first replication-competent adenovirus that retains a fully functional viral E3 region.⁶

In vitro studies have validated the selective infectivity and direct cytolysis of Telomelysin in cancer cells but not nonmalignant cells.⁵ In animal experiments, intratumoral injection (IT) of Telomelysin demonstrated antitumor activity without significant toxicity to normal organs. Additionally, distant viral uptake was observed following IT evidenced by the presence of adenoviral protein identified in noninjected tumor following intratumoral treatment of the contralateral tumor.⁵

These encouraging preclinical findings of safety and directed antitumor activity form the basis of our phase I study, which is designed to validate safety, response and pharmacodynamics of Telomelysin in advanced cancer patients.

RESULTS

Patient profile

Sixteen patients were entered into trial: three each into cohorts 1 and 2 and 10 into cohort 3. The age, sex, histological diagnosis, and prior treatments of the evaluated patients are shown in Table 1.

Correspondence: John Nemunaitis, 1700 Pacific Avenue, Suite 1100, Dallas, Texas 75201, USA. E-mail: jnemunaitis@marycrowley.org

Table 1 Patient demographics

Patient	Age	Sex	Histological diagnosis	Prior treatments
1 (101)	57	F	Squamous cell ca unknown primary	XRT, carboplatin, docetaxel, anastrozole
2 (102)	54	M	Melanoma	Interferon, dacarbazine
3 (103)	34	F	Melanoma	Lenalidomide, dacarbazine, vinblastine, cisplatin, IL-2, interferon
4 (204)	60	M	Salivary gland tumor	XRT, perfosine
5 (205)	69	M	Squamous cell ca base of tongue	Cisplatin, XRT
6 (206)	60	F	Leiomyosarcoma	Doxorubicin, ifosfamide, gemcitabine, docetaxel, perfosine
7 (307)	52	F	Neuroendocrine tumor	Irinotecan, cisplatin, topotecan, docetaxel, pemetrexed, CT 2103, XRT
8 (308)	78	F	Melanoma	Interferon
9 (309)	54	M	NSCLC	Paclitaxel, carboplatin, pemetrexed, XRT
10 (310)	49	M	Squamous cell ca base of tongue	Paclitaxel, carboplatin, cisplatin, fluorouracil, cetuximab, XRT
11 (311)	60	M	Squamous cell ca floor of mouth	Cisplatin, XRT
12 (312)	48	M	Melanoma	Interferon, melphalan, actinomycin-D
13 (313)	54	F	Sarcoma	None
14 (314)	38	M	Basal cell carcinoma	Cisplatin, fluorouracil
15 (315)	54	F	Squamous cell ca of gall bladder	Capecitabine, gemcitabine
16 (316)	46	F	Breast cancer	Doxorubicin, cyclophosphamide, paclitaxel, herceptin, tamoxifen, anastrozole, capecitabine, docetaxel

M, male; F, Female.

Adverse events

No clinically significant grade 3 or 4 treatment related toxic events were experienced by any patients. There were multiple grade 1 and 2 adverse events, with the most common being fever, chills, fatigue, and injection site pain (Table 2). Thirteen patients developed asymptomatic transient lymphocyte decreases, seven grade 2, five grade 3 and one grade 4, 24 hours after Telomelysin injection with complete recovery by day 7 following injection.

Clinical response

Eleven patients satisfied Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) criteria for stable disease response to the injected lesion at Day 28, three had progressive disease and two more unevaluable. Seven of the day 28 stable disease patients had stable disease at day 56, two had progressive disease and two were unevaluable. One patient (pt 308) had 33% reduction of injected lesion at day 28 and 56.7% reduction of injected lesion at day 56 (see Figure 1).

Table 2 List of common* adverse events

	Grade 1	Grade 2	Grade 3, 4	Overall (N = 16)
Cardiac arrhythmia				
Supraventricular and nodal arrhythmia—sinus tachycardia	2	1	0	3
Gastrointestinal				
Nausea	3	1	0	4
Constitutional Symptoms				
Chills	1	5	0	6
Fatigue	7	2	0	9
Edema peripheral	1	2	0	3
Fever	3	3	0	6
Pain				
Bone	2	1	0	3
Muscle	0	3	0	3
Extremity	2	1	0	3
Pain	3	1	0	4
Headache	3	1	0	4
Pulmonary/upper respiratory				
Nasal cavity/paranasal reactions	2	1	0	3
Dermatology/skin				
Erythema	0	0	3	3
Injection site bruising	3	0	0	3
Injection site erythema	1	4	0	5
Injection site pain	4	2	0	6

*Occurring in >15% of patients (n = 16).

Postinjection biopsies performed at day 28 on four of the patients with stable disease revealed necrosis that may or may not be treatment induced. Three of these patients had melanoma. Survival of all patients ranged from 1 to 21 months (median 10).

Viral pharmacokinetics analysis

Systemic dissemination of Telomelysin was evaluated by collection of patient plasma, urine, sputum, and saliva at time points before and after IT. Quantitative real-time PCR analysis was carried out with primers that were specific for the Telomelysin E1A and IRES regions. We detected the presence of viral DNA in 13 of 16 patient plasma samples tested, including 9 of 10 patients in cohort 3 (Table 3). Plasma viral DNA was detected between 30 minutes and 6 hours in most patients, at concentrations that ranged from 2.1×10^3 to 1.5×10^7 viral copies/ml. We detected the presence of plasma viral particles in two cohort 3 patients. Viral DNA copies detected on day 7 (pt 312: 3.7×10^4 ; pt 316: 2×10^4 viral copies/ml, respectively) were ~10–50-fold higher than detection threshold (400 vp/ml). Viral DNA was also detected in one cohort 2 patient on days 7 and 14 [pt 205: 3.7×10^3 (day 7), 6.0×10^3 (day 14)] but not at (Figure 2). No viral DNA was detected at 24 hours post-treatment for these patients, suggesting that detectable levels of viral DNA at days 7 and 14 may constitute a second

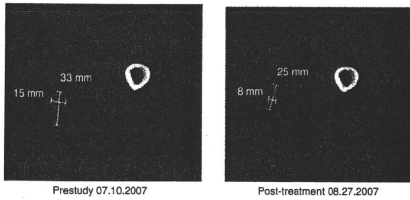


Figure 1 Patient 308: Initial response of the largest of three metastatic melanoma lesions involving the right thigh.

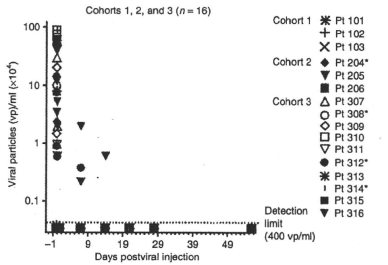


Figure 2 Detection of Telomelysin viral DNA in patient plasma samples on various days post-treatment. Data represented at day 1 constituted peak values determined at up to 6 hours post-treatment. All patients exhibited below detection levels of plasma viral particles (≤ 400 vp/ml) at day 1 post-treatment.

wave of viremia from replication. Viral DNA was detected in two cohort 3 sputum specimens on day 1 (pt 310; 8.2×10^4 viral copies/ml) and day 7 (pt 307, 5×10^3 viral copies/ml) but not at earlier time points post-treatment. Viral DNA was not detected in any other body fluid compartments examined. The systemic detection of viral DNA at these extended time points is suggestive of viral replicative activity.

Viral E1A and hexon expression in treated tumors

Immunohistochemical evaluation of adenoviral hexon protein expression in treated tumor biopsies was carried out as a surrogate indicator of viral replicative activity at days 28 and 56 postinjection. Viral hexon protein expression was not detected in Telomelysin treated tumor biopsies collected at days 28 and 56 from 15 of 16 patients (Table 3), whereas one patient displayed an equivocal reaction at day 56 but not day 28. Viral E1A expression was uniformly negative from all 16 patients. The negative findings indicate that viral replicative activity did not extend to these time points, despite suggestion of viral dissemination for up to day 7–14 after the single viral injection.

Neutralizing antibody response

To identify systemic immune-activating events from intratumoral Telomelysin treatment, a functional assay with Telomelysin-infected HEK 293 cells was used to determine the neutralizing

Table 3 Pharmacokinetics and immune response assessments

Analyses performed ^a	No. positive ^b /No. tested			
	Total	Cohort 1	Cohort 2	Cohort 3
Viral DNA in plasma	13/16	2/3	2/3	9/10
Viral DNA in sputum	2/16	0/3	0/3	2/10
Viral DNA in urine and saliva	0/16	0/3	0/3	0/10
Endogenous hTERT expression	9/12 ^b	2/3	1/1	6/8
ADV neutralizing antibody (D28)	14/14	3/3	3/3	8/8 ^c
Viral plaque assay	3/16	0/3	0/3	3/10
Serum IL-6	8/9 ^d	3/3	2/3	3/3
Serum IL-10	7/9 ^d	2/3	2/3	3/3
Serum IFN- γ	2/9 ^d	2/3	0/3	0/3
<i>In situ</i> viral hexon (D56)	1/16	0/3	0/3	1/10
Lymphocyte subset alterations by immunophenotyping analysis	0/10	0/0	0/0	0/10

^aPositive at any post-treatment time point tested. ^b12 of 15 patients with adequately recovered RNA were analyzed. ^cD28 plasma samples were not collected from patients 313 and 316 in cohort 3. ^dOnly first 3 patients per cohort were analyzed, per protocol.

antibody (NAb) titer of patients entered into trial. Blocking activity of graded concentrations of the patient's pre- and post-treatment plasma was determined by light microscopy. An elevated NAb titer was observed in 14 of 14 plasma samples collected at day 28 (Table 3). Two patients (pt 313 and pt 316) did not have samples collected. The increase in titer ranged from 8- to 512-fold (Figure 3). However, the magnitude of titer increase did not correlate either with dose or with the presence or absence of a pre-existing NAb titer (Figure 3).

Serum cytokines

Non specific systemic immune activation from intratumoral Telomelysin treatment was observed as evidenced by an elevated increase in serum cytokine levels, in particular, interleukin-6 (IL-6) and IL-10 in all cohorts (Table 3). An elevated IL-6 level (>50%) was observed in 8 of 9 patients tested, as early as 30 minutes after treatment. Increased IL-10 level was also observed in 7 of 9 patients, whereas two patients had elevated interferon- γ .

Peripheral blood lymphocyte immunophenotyping

There were no demonstrable trends of altered post-treatment changes in the frequency distribution of CD4⁺ T, CD8⁺ T, B, and NK cells that correlated with viral treatment (Table 3) in 10 tested patients.

hTERT mRNA

To validate viral replication permissiveness of injected tumor specimens, real time, quantitative real-time-PCR assays were carried out retrospectively using tumor biopsy specimens collected before treatment, using total RNA from frozen patient tumor biopsy and primers and a TaqMan probe specific to hTERT or the