

消化器がん治療における先端医療開発

藤原 俊義

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：消化器がん，テロメラーゼ，アデノウイルス，外科ナビゲーション

Development of innovative therapies for gastrointestinal cancer

Toshiyoshi Fujiwara

Department of Gastroenterological Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

はじめに

高齢化や生活習慣の変化により，日本人の主な死亡原因は結核や肺炎などの細菌感染が原因となる死亡から癌，脳卒中，心臓病へと大きく変化してきた。中でも，癌による死亡は年々増加傾向にあり，1986年以降は死亡原因の第1位を占めている。新たな抗癌剤による集学的治療の進歩により，いくつかの癌では5年生存率の改善が認められるが，様々な副作用が問題となることも少なくない。また，抗体医薬品や分子標的薬剤は最近のトピックスであるが，生存期間のさらなる延長を目指して革新的な抗癌医薬品の開発が切望されている。

ウイルスはその生活環として，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¹⁾。また，蛍光遺伝子などを搭載することで，癌細胞を特異的に標

識する診断用医薬品や外科ナビゲーション・システムとしても応用可能である²⁾。本稿では，従来の癌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たなウイルス製剤の癌診断・治療への臨床応用の可能性を概説する。

悪性腫瘍とテロメラーゼ活性

染色体 DNA 末端の短い塩基配列 (TTAGGG) の繰り返しで構成されるテロメアは，細胞増殖に伴いだいに短縮し細胞に老化を引き起す。このテロメアの短縮は発癌の抑制機構であり，前癌状態にある細胞が老化に陥り死滅することで癌化が阻止されている。逆に，無制限の増殖能を有する癌細胞はテロメアを維持する分子機構を獲得しており，代表的なものがテロメラーゼの活性化である。

テロメラーゼは，染色体の3'末端に TTAGGG 配列を伸長しテロメア長を保つ作用を持つリボ核酸蛋白酵素であり，触媒サブユニット hTERT (human telomerase reverse transcriptase) と鋳型となる RNA サブユニット (hTR) から構成される。テロメラーゼ活性は hTERT 遺伝子発現レベルと相関し，また hTERT 遺伝子導入によりテロメラーゼ活性を誘導することができることから，hTERT 分子がテロメラー

平成22年8月受理

〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話：086-235-7257 FAX：086-221-8775

E-mail：toshi_f@md.okayama-u.ac.jp

◆プロフィール◆



昭和60年 岡山大学医学部医学科卒業
 平成2年 岡山大学大学院医学研究科（第一外科学講座）修了
 平成3年 米国テキサス大学 MD アンダーソン癌センター留学
 平成6年 岡山大学医学部附属病院 第一外科 医員
 平成10年 岡山大学医学部 第一外科 助手
 平成15年 岡山大学医学部附属病院 遺伝子・細胞治療センター 助教授
 平成19年 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 准教授
 平成22年 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

平成11年，本邦における初めての癌遺伝子治療の臨床試験を中心となって推進した。最近，新しいウイルス製剤の開発を進め，外科治療を補完する技術としてがん治療・がん診断への応用を目指している。

ゼ活性を制御していると考えられる³⁾。

テロメラーゼは、きわめて多くの癌細胞でその活性の上昇が明らかになっており(表1), 早期の癌から進行癌へとその活性は徐々に上昇していく^{4,5)}。したがって、癌細胞では *hTERT* 遺伝子の発現制御を行っている *hTERT* プロモーターのスイッチがオンになると考えられる。

テロメライシンによる癌治療

1. テロメライシンの前臨床研究

広範な癌を対象とした分子標的ウイルス製剤を開発するために、われわれはアデノウイルスの増殖に必要な *E1A* 遺伝子と *E1B* 遺伝子を IRES 配列で結合した発現カセットを *hTERT* プロモーターにより選択的に発現するテロメラーゼ特異的腫瘍融解ウイルスであるテロメライシン (Telomelysin, OBP-301) を作成した(図1)⁶⁾。前臨床研究として、肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、頭頸部癌、乳癌、肝癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮頸癌、卵巣癌などのヒト由来各種癌細胞および肉腫細胞で、テロメライシンの顕著な抗腫瘍効果が認められた⁷⁾。また、ヌードマウス背部皮下に移植したヒト腫瘍にテロメライシンを腫瘍内局所投与したところ、有意な増殖抑制が観察された⁶⁾。

テロメライシンの抗腫瘍活性には様々な分子機構が関与しており、その感染により内因性 danger signal として作用して生体の免疫機構を活性化することが知られている細胞内尿酸濃度の上昇が確認された⁸⁾。すな

わち、テロメライシン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。さらに最近、テロメライシンによる細胞死により、腫瘍局所で誘導される IFN- γ をはじめとする複数の因子が、血管新生を効率的に抑制することが明らかになっている⁹⁾。

2. テロメライシンの第 I 相臨床試験

岡山大学で行われた前臨床研究の成果に基づき、各種進行固形癌を対象とした臨床プロトコール「A phase I dose-escalation study of intratumoral injection with telomerase-specific replication-competent oncolytic adenovirus, Telomelysin (OBP-301) for various solid tumors」は米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration ; FDA) により承認され、平成18年10月から米国ダラスにて第 I 相臨床試験が開始された。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 法を用いて測定された。

すべての患者で安全に投与可能であり、Grade 1/2 の副作用は投与部位の疼痛、硬結などの局所反応と全身的な発熱、悪寒のみであった。ウイルスの体内動態は定量的 DNA-PCR 法を用いて測定されたが、末梢血中には16例中13例で投与後24時間以内に一過性に検出された。さらに、4例では7日後あるいは14日後に血中、喀痰中にウイルスが検出され、投与された腫瘍内でのテロメライシンの増殖が示唆された。1例で投与部位の partial response (PR) が得られ、7例では腫

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%
膀胱癌		95%	皮膚癌		83%
肝細胞癌		86%	基底細胞腫		95%
乳癌		86%	悪性黒色腫		86%
子宮癌			甲状腺癌		
子宮頸癌		93%	分化型		59%
子宮体癌		94%	未分化型		86%
卵巣癌		86%	肉腫		100%

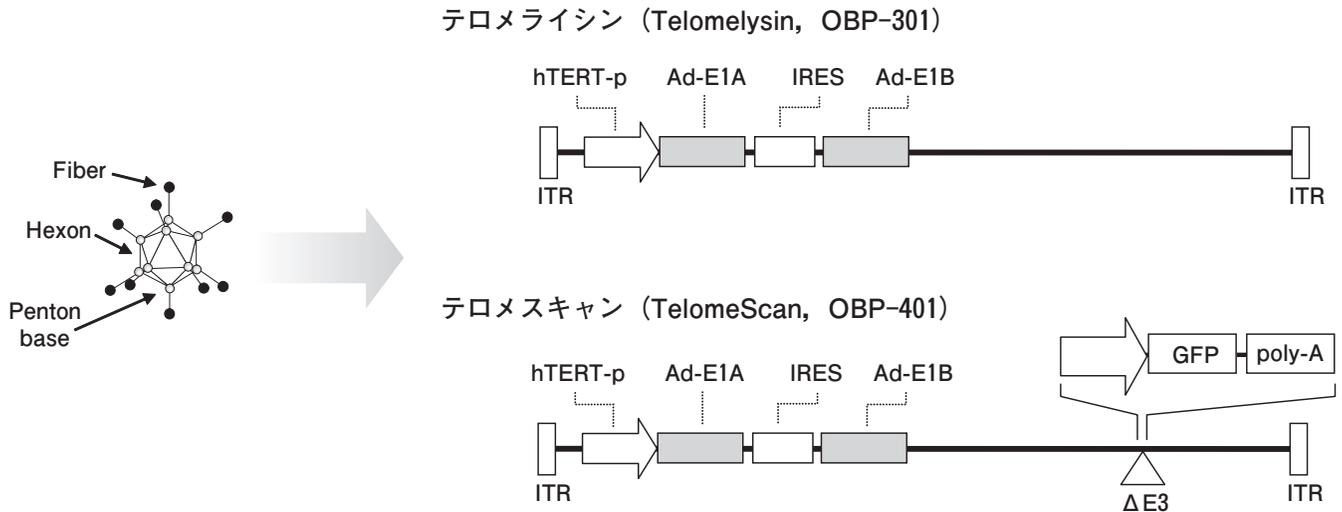


図1 テロメライシンとテロメスキャンの構造
 いずれのウイルス製剤も野生型のアデノウイルスと同様、直径65~80nmの正二十面体であり、各頂点 (penton base) からファイバーが突出している。テロメライシンでは、hTERT プロモーターと IRES 配列で結合した *E1A*, *E1B* 遺伝子より成る増殖カセットが、相同組み換えによりアデノウイルス5型由来のベクターの欠損した E1 部分に組み込んである。また、テロメスキャンは、テロメライシンを基本骨格としてオワンクラゲ由来の蛍光遺伝子 *GFP* 遺伝子をウイルスゲノムの E3 領域に組み込んでおり、ウイルス増殖とともにがん細胞で選択的に *GFP* 蛍光を発現する。

瘍サイズの縮小を伴う投与後56日間の stable disease (SD) が認められた¹⁰⁾。

3. 今後のテロメライシンの開発方針

外科手術は化学療法、放射線療法とともに癌治療の重要な柱の一つであるが、根治切除不能な進行癌患者において、いかに外科治療を応用して予後を延ばすかは大きな課題である。安全に投与でき、腫瘍縮小などの局所効果が期待できるテロメライシンは、その使用方法によっては外科治療の有効な補助療法と成り得る。

平成22年7月、岡山大学病院遺伝子治療臨床研究審査委員会にて「頭頸部・胸部悪性腫瘍に対する腫瘍選択的融解ウイルス Telomelysin を用いた放射線併用ウイルス療法の第 I / II 相臨床研究」の実施計画が承認された。今後、厚生労働省科学技術部に申請・承認されれば、岡山大学で開発されたテロメライシンの本邦ではじめての臨床応用が可能となる。さらに、将来的には切除可能な進行食道癌に対するネオアジュバント療法としての応用を考えており、標準的な放射線化学療法との併用による down staging を期待する。

テロメスキャンによる癌診断

1. テロメスキャンの構造と機能

診断用ウイルス製剤テロメスキャン (TelomeScan, OBP-401) は、テロメライシンを基本骨格として *GFP*

遺伝子をウイルスゲノムに組み込んでおり (図1)、生体内での癌組織、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。テロメスキャンの感染により極めて広範な癌細胞で *GFP* 蛍光の発現が観察され、一方、線維芽細胞を初めとする正常細胞では *GFP* 陰性であった¹¹⁾。

2. テロメスキャンによる血中循環癌細胞の体外検出システム

末梢血中を循環する浮遊癌細胞 (circulating tumor cells : CTC) の存在は以前から知られており、最近では予後因子や治療効果の surrogate marker として注目されている^{12,13)}。CTC 検出には、一般的に免疫染色や定量的 PCR による解析が用いられているが、生きた CTC を高感度に検出する方法はいまだ確立されていない。われわれは、テロメスキャンを用いて多くの白血球の中に浮遊する CTC を高感度に検出する簡便な蛍光イメージング法を開発した¹⁴⁾。まず、赤血球を溶血し、細胞ペレットにテロメスキャンを添加、24時間後に蛍光顕微鏡下にオートスキャンすることで、*GFP* 陽性細胞数をカウントした。

組織学的に診断された胃癌患者37例、およびその他のがん患者9例（大腸癌、肝臓癌、乳癌、非小細胞肺癌）を解析したところ、26例の胃癌患者（70.3%）、6例のその他のがん患者（66.7%）でCTCが検出された。本技術の治療効果のモニタリングへの応用を検討するために、化学療法あるいは外科的切除を受けた患者におけるCTC数の変化を観察したところ、2クルルの化学療法後に腫瘍マーカーが低下した進行・再発胃癌患者においてはCTC数の減少が認められたが、化学療法にもかかわらず画像上腹膜播種が進行した患者ではCTC数は徐々に増加した。さらに、根治切除を受けた4例の胃癌患者および大腸癌患者では、術後4週間でCTC数の減少がみられ、本技術によって生きたCTCを検出することが局所および全身的な治療効果のモニタリングに有用であると示唆された。

3. テロメスキャンによる微小リンパ節転移診断システム

リンパ節転移は代表的な癌の転移経路の一つであり、癌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。われわれは、テロメスキャンを用いた生体内リンパ節転移イメージングシステムを開発した^{11,15)}。ヌードマウスの直腸粘膜下にヒト大腸癌細胞を移植すると、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、テロメスキャンを直腸腫瘍に直接腫瘍内投与し、5日後に開腹、キセノン光で蛍光を励起して高感度3色冷却CCDカメラにて観察した。GFP蛍光を発したリンパ節を採取して、最終的に病理組織学的に確認したところ、GFP陽性リンパ節では高頻度に微小転移が検出された。感度は、sensitivity 92.3%，specificity 86.6%であり、1mm以下の微小転移巣を蛍光spotとして同定することが可能であった。

現在、テロメスキャンを標識薬剤として、高感度GFP蛍光検出装置を用いた微小癌組織診断用の外科手術ナビゲーション・システムを開発中である。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、テロメスキャンはリンパ節内の微小転移巣で癌細胞に感染・増殖して選択的にGFP蛍光を発するため、一定期間の後に開胸、開腹、あるいは鏡視下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。このシステムでは、センチネルリンパ節生検と異なり、転移リンパ節そのものを同定できる点で確実性の面から極めて実用的と言える。

おわりに

テロメラーゼは極めて多くの癌細胞で活性の上昇が認められており、癌治療の標的としては魅力的な分子である。テロメラインによる癌治療は、従来の抗癌剤や放射線療法とは全く異なる作用機序に基づく治療戦略であり、これらの標準治療の耐性機構を克服することができるという利点がある。テロメスキャンは診断用医薬品として開発を進めているが、基本的にはテロメラインと同じウイルス機能を有し、GFP蛍光を発した後には標的細胞死を誘導する。すなわち、診断と治療を兼ね備えたウイルス製剤(Theranostic virus)であり、リンパ節転移を対象に使用された場合、可視化できなかった極めて微小な転移結節は、最終的にはウイルス増殖により破壊されると考えられる。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が様々な難治癌治療、癌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) Hawkins LK, Lemoine NR, Kirn D: Oncolytic biotherapy: a novel therapeutic platform. *Lancet Oncol* (2002) 3, 17-26.
- 2) Hoffman RM: The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer *in vivo*. *Nat Rev Cancer* (2005) 10, 796-806.
- 3) Nakayama J, Tahara H, Tahara E, Saito M, Ito K, Nakamura H, Nakanishi T, Tahara E, Ide T, Ishikawa F: Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* (1998) 18, 65-68.
- 4) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* (1994) 266, 2011-2015.
- 5) Shay JW, Bacchetti SA: Survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* (1997) 33, 787-791.
- 6) Kawashima T, Kagawa S, Kobayashi N, Shirakiya Y, Umeoka T, Teraishi F, Taki M, Kyo S, Tanaka N, Fujiwara T: Tumor-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin Cancer Res* (2004) 10, 285-292.

- 7) Hashimoto Y, Yatanabe Y, Shirakiya Y, Uno F, Kagawa S, Kawamura H, Nagai K, Tanaka N, Kumon H, Urata Y, Fujiwara T : Establishment of biological and pharmacokinetic assays of telomerase-specific replication-selective adenovirus. *Cancer Sci* (2008) 99, 385-390.
- 8) Endo Y, Sakai R, Ouchi M, Onimatsu H, Hioki M, Kagawa S, Uno F, Watanabe Y, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T : Virus-mediated oncolysis induces danger signal and stimulates cytotoxic T-lymphocyte activity via proteasome activator upregulation. *Oncogene* (2008) 27, 2375-2381.
- 9) Ikeda Y, Kojima T, Kuroda S, Endo Y, Sakai R, Hioki M, Kishimoto H, Uno F, Kagawa S, Watanabe Y, Hashimoto Y, Urata Y, et al. : A novel antiangiogenic effect for telomeras-specific virotherapy through host immune system. *J Immunol* (2009) 182, 1763-1769.
- 10) Nemunaitis J, Tong AW, Nemunaitis M, Senzer N, Phadke AP, Bedell C, Adams N, Zhang YA, Maples PB, Chen S, Pappen B, Burke J, et al. : A phase I study of telomerase-specific replication competent oncolytic adenovirus (Telomelysin) for various solid tumors. *Mol Ther* (2010) 18, 429-434.
- 11) Kishimoto H, Kojima T, Watanabe Y, Kagawa S, Fujiwara T, Uno F, Teraishi F, Kyo S, Mizuguchi H, Hashimoto Y, Urata Y, Tanaka N, et al. : *In vivo* imaging of lymph node metastasis with telomerase-specific replication-selective adenovirus. *Nat Med* (2006) 12, 1213-1219.
- 12) Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF : Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* (2004) 351, 781-791.
- 13) Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Matera J, Allard WJ, Miller MC, Fritsche HA, Hortobagyi GN, et al. : Circulating tumor cells : a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* (2005) 23, 1420-1430.
- 14) Kojima T, Hashimoto Y, Watanabe Y, Kagawa S, Uno F, Kuroda S, Tazawa H, Kyo S, Mizuguchi H, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T : A simple biological imaging system for detecting viable human circulating tumor cells. *J Clin Invest* (2009) 119, 3172-3181.
- 15) Kurihara Y, Watanabe Y, Onimatsu H, Kojima T, Shirota T, Hatori M, Liu D, Kyo S, Mizuguchi H, Urata Y, Shintani S, Fujiwara T : Telomerase-specific virotheranostics for human head and neck cancer. *Clin Cancer Res* (2009) 15, 2335-2343.