

制限増殖型アデノウイルス製剤を用いた新たな微小がん病変の検出法の開発と治療への応用

児島 亨^{a*}, 橋本悠里^{a,b}, 香川俊輔^{a,b}, 田中紀章^a, 浦田泰生^c, 藤原俊義^{a,b}

^a岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器・腫瘍外科学, ^b岡山大学病院 遺伝子・細胞治療センター,

^cオンコリスバイオファーマ

キーワード: telomerase, oncolytic adenovirus, GFP, micrometastasis, circulating tumor cell

Development of novel detecting systems and therapies for micro cancer using replication-competent oncolytic adenovirus

Toru Kojima^{a*}, Yuuri Hashimoto^{a,b}, Shunsuke Kagawa^{a,b}, Noriaki Tanaka^a, Yasuo Urata^c, Toshiyoshi Fujiwara^{a,b}

^aDepartment of Gastroenterological Surgery, Transplant, and Surgical Oncology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences,

^bCenter for Gene and Cell Therapy, Okayama University Hospital, ^cOncolys BioPharma, Inc.

はじめに

消化器領域をはじめ、癌患者の生存率や治療成績の向上には、病気の早期発見、適切な悪性度および病変部位の特定、新たな治療法の開発といったことが必要と考えられる。近年の医療技術の進歩により、癌の局所制御および全身の転移病変に対する治療のいずれも、以前より多くの治療の選択肢が存在するようになってきた。こういった状況においては、病状の迅速で正確な把握が、治療法決定においては何より重要である。つまり、微小な癌組織や転移病変の検出を鋭敏に行うことができる手法の確立が望まれているといえる。本稿では癌細胞に特異的に感染・増殖するアデノ

ウイルス製剤の微小癌転移巣の検出薬としての有効性と、その治療薬としての可能性について述べる。

腫瘍融解ウイルスの癌細胞への作用

ウイルスは本来、ヒトの細胞に感染し構造蛋白質を産生することで複製・増殖し、その細胞を様々な機序により破壊する。1900年代の初めより、癌細胞でその殺細胞効果を期待して野生型のウイルスを用いた癌治療が試みられてきた。ウイルス増殖機能に選択性を付加することにより、ウイルスが癌細胞のみを標識し、傷害する作用を発揮させることができる^{1,2)}(図1)。ウイルスに癌細胞で特異的に増殖する機能を発揮させるためには、いくつかの方法が開発されているが、われわれが用いた方法は、腫瘍特異的および臓器特異的なプロモーターによる初期遺伝子の転写制御をメカニズムとして、癌細胞特異的あるいは特定の臓器由来の癌細胞に特異的な制限増殖能を付加する方法である。

われわれはアデノウイルスを用いているが、この際、

平成22年8月受理

*〒700-8511 岡山市北区伊福町1-17-18

岡山済生会総合病院 外科

電話: 086-252-2211 FAX: 086-255-2224

E-mail: t-kojima@pb4.so-net.ne.jp

プロフィール



児島 亨

昭和49年5月7日生

平成11年3月 岡山大学医学部卒業

平成22年3月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科修了

平成11年6月 心臓病センター榊原病院外科・心臓血管外科 医員

平成13年11月 岡山済生会総合病院外科 医員

平成15年4月 津山中央病院心臓血管外科 医員

平成16年4月 広島市立広島市民病院勤務 外科医員

平成21年8月 岡山済生会総合病院外科 医師

現在に至る

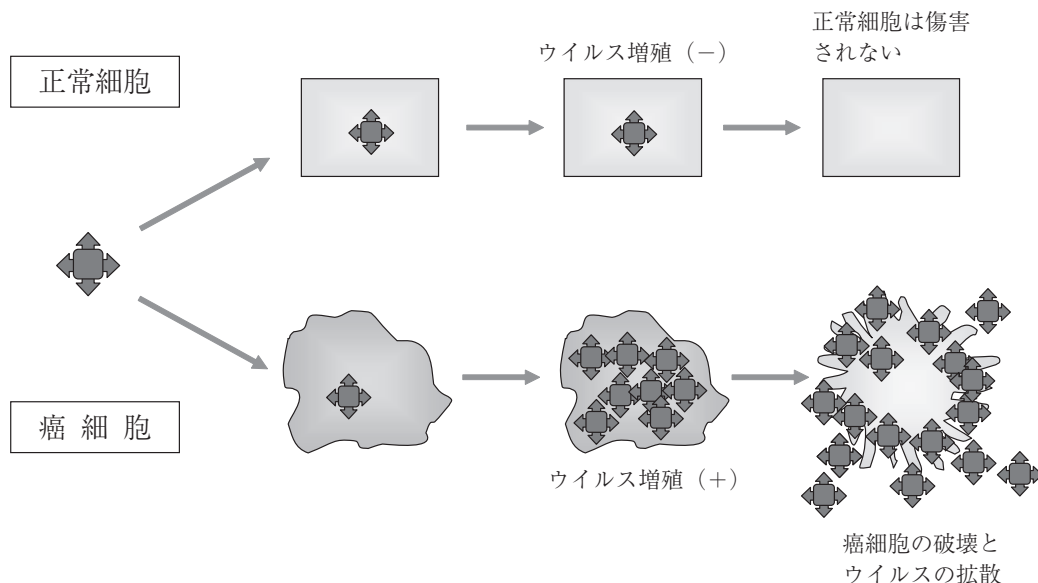


図1 癌細胞での選択的なウイルス増殖と細胞死誘導 (文献2より引用)

様々な発生母地を持つ広い範囲の癌に適応するためには、より汎用性を有するプロモーターを用いる必要がある。われわれの使用するアデノウイルス製剤も、詳しくは後述するがこの概念に基づいて作成されたものである。

テロメラーゼ活性とhTERTプロモーター

染色体DNA末端には短い塩基配列(TTAGGG)の繰り返しで構成されるテロメアと呼ばれる構造があり、細胞増殖に伴い次第に短縮し細胞の老化に関係するとされている。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、3つのサブユニットから構成される。テロメラーゼ活性はhTERT遺伝子発現レベルと相関し、またhTERT遺伝子導入によりテロメラーゼ活性を誘導することができることから、hTERT分子がテロメラーゼ活性を制御していると考えられる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となっており⁴⁾(表1)、癌細胞ではhTERT遺伝子の発現制御を行っているhTERTプロモーターのスイッチがオンになると考えられる。

テロメラーゼ特異的制限増殖型アデノウイルスの構造と機能

ヒトのアデノウイルスはエンベロープを持たない30~38KBサイズの二重鎖DNAウイルスであり、41種の亜型が存在し6群に分類されている。遺伝子導入用ベクターの基本骨格としてよく用いられるアデノウイルス5型は、幼児期に気道感染によりいわゆる「かぜ」症状を起こす原因ウイルスの一つであり、米国では30年以上の間約百万人の兵士に対し、ワクチンとして投

表1 ヒト悪性腫瘍におけるテロメラーゼ活性

組 織	テロメラーゼ陽性	組 織	テロメラーゼ陽性
肺癌	84%	前立腺癌	83%
非小細胞肺癌	82%	膀胱癌	93%
小細胞肺癌	100%	腎臓癌	68%
頭頸部腫瘍	82%	ウィルムス腫瘍	100%
食道癌	87%	網膜芽細胞腫	50%
胃癌	85%	脳腫瘍	49%
大腸癌	89%	神経芽細胞腫	94%
膵臓癌	95%	皮膚癌	83%
肝細胞癌	86%	基底細胞腫	95%
乳癌	86%	悪性黒色腫	86%
子宮癌		甲状腺癌	
子宮頸癌	93%	分化型	59%
子宮体癌	94%	未分化型	86%
卵巣癌	86%	肉腫	100%

与され重篤な副作用の報告もなかったという実績がある。

前立腺癌に特異的な PSA⁵⁾をはじめとして、AFP⁶⁾ や MUC-1⁷⁾ など様々なプロモーターによる癌特異的に増殖するアデノウイルスが開発されており、それぞれのプロモーター機能に対応する癌細胞においてはその有効性が示されている。しかしより広範な癌を対象とするために、われわれはアデノウイルス5型の増殖に必要な *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⁸⁾ (図 2 A)。

さらにわれわれは、Telomelysin を基本骨格としてオワンクラゲ由来の蛍光遺伝子 GFP (green fluorescence protein) 遺伝子をウイルスゲノムに組み込むことを試みた。その結果作成されたものが TelomeScan (開発コード：OBP-401) である^{9,10)} (図 2 B)。本ウイルスは 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

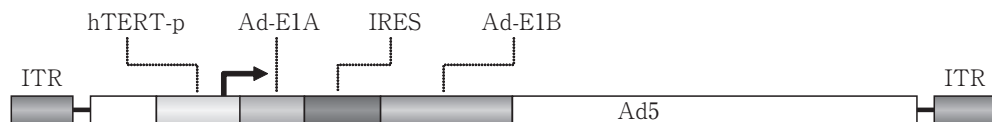
発現カセットをアデノウイルス E3 領域に有する。詳しくは後述するが、TelomeScan は生体内での微小な癌組織、特に播種病巣や転移リンパ節、あるいは末梢血中の浮遊がん細胞を可視化するナビゲーションツールとして有用である¹¹⁾。

TelomeScan (OBP-401) を用いた生体内微小リンパ節転移診断

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郭清が必要である。そこで TelomeScan を用いて生体内リンパ節転移イメージングを試みた。

ヌードマウスの直腸粘膜下にヒト大腸癌細胞 HT29 を移植すると、同所性に直腸腫瘍を形成するとともに、4～6 週後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 を原発直腸腫瘍内へ投与し、その転移所属リンパ節内へのウイルスの取り込みと GFP 発現について検討した。ウイルス投与5日後に開腹、所属リンパ節の蛍光発現を CCD カメラにて観察した (図 3)。リンパ節を採取して病理組織学的に確

A Telomelysin (OBP-301)



B TelomeScan (OBP-401)

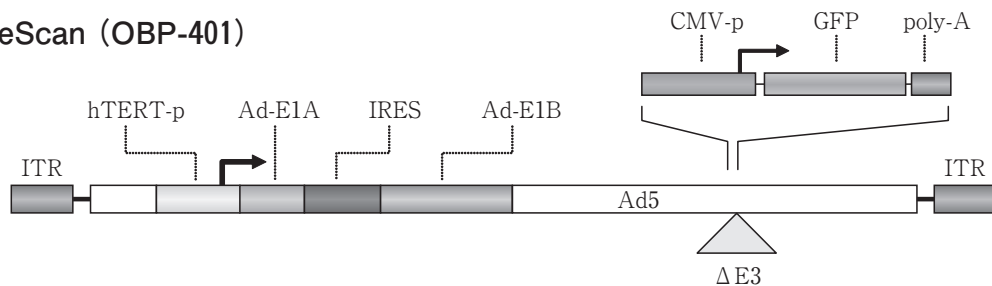


図 2 テロメラーゼ特異的制限増殖型アデノウイルス製剤の構造と特徴

(A) Telomelysin (OBP-301) は、ウイルスの増殖に必要な E1 領域が除去されている第一世代のアデノウイルスベクターを基本骨格としている。hTERT プロモーターと IRES 配列で結合した *E1A*, *E1B* 遺伝子より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。(B) TelomeScan (OBP-401) は、Telomelysin を基本骨格としてオワンクラゲ由来の蛍光遺伝子 *GFP* 遺伝子をウイルスゲノムの E3 領域に組み込んでおり、ウイルス増殖とともにがん細胞で選択的に GFP 蛍光を発現する。

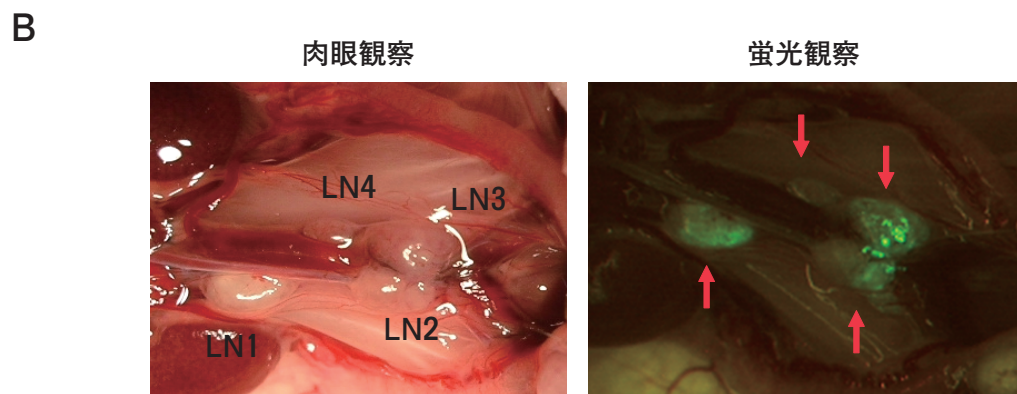
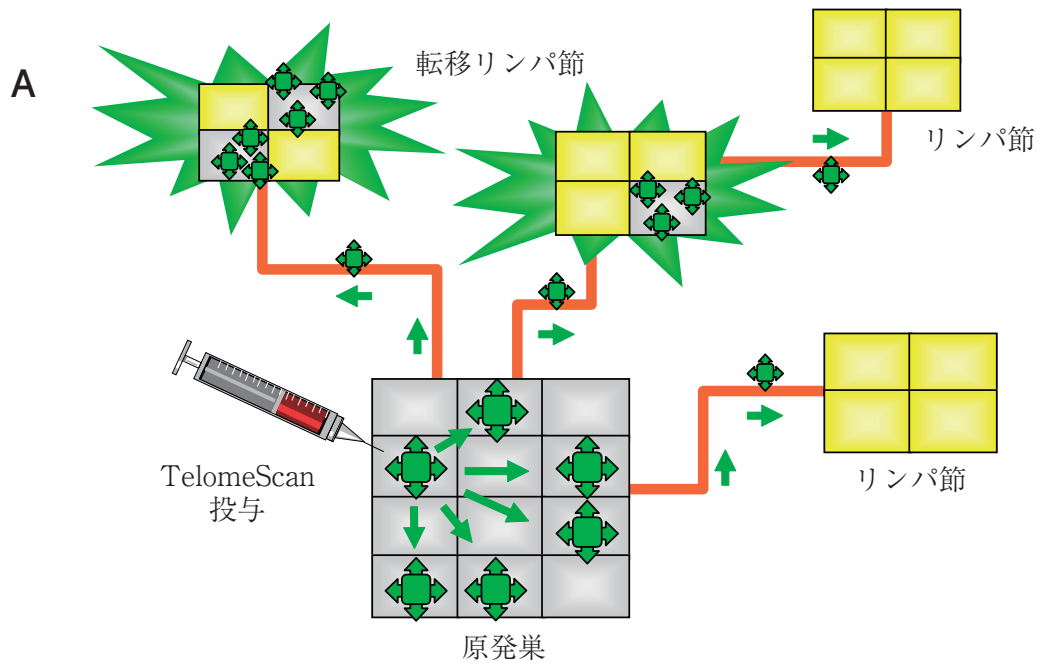


図3 TelomeScanによるリンパ節転移の *in vivo* イメージング (文献12より引用)
 (A) 原発巣に局所投与された TelomeScan は、リンパ流に乗って所属リンパ節に到達する。そこで、微小リンパ節転移が存在すれば、ウイルスの複製・増殖とともに GFP 蛍光を発するため、転移リンパ節は緑色蛍光で可視化される。(B) ヒト大腸がん細胞 HT29 をヌードマウスの直腸粘膜下に同所性に移植すると、直腸に腫瘍を形成するとともに 4~6 週間後に高率に傍大動脈リンパ節転移が認められる。TelomeScan を直腸腫瘍に直接投与し、5 日後に開腹、蛍光励起して高感度 3CCD カ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。

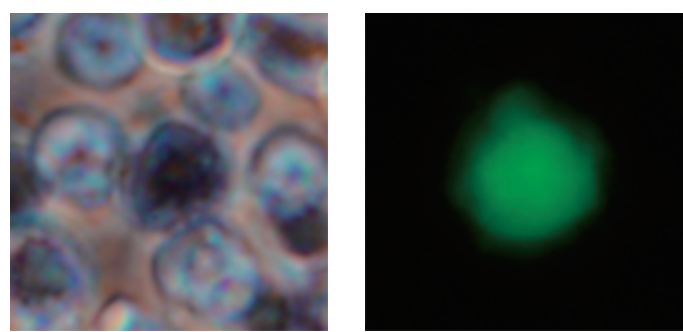


図4 TelomeScanによって可視化された末梢血中生存浮遊がん細胞
 多発肝転移を有する胃癌患者より、末梢血を 5 ml 採血する。赤血球を溶血させ除去した後、TelomeScan を感染させる。感染 24 時間後に蛍光発現を顕微鏡下に観察した。明視野にて周囲の白血球とは明らかに形態の異なる異型細胞を認め、同細胞に GFP 発現を認めた。

認したところ、GFP 陽性リンパ節では高頻度に微小転移巣が検出された。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スポットとして同定することが可能であった¹²⁾。これらの結果は、原発腫瘍内に局所投与された TelomeScan がリンパ流を經由して所属リンパ節へ拡散し、リンパ節内の微小転移巣で感染・増殖して選択的に GFP 蛍光を発したことを示唆している。

TelomeScan (OBP-401) を用いた末梢血中浮遊がん細胞の検出

がんは発育のある段階に達すると、原発巣から離れ循環血中へと移動していき、やがて遠隔転移巣を形成する。この過程において循環血中にがん細胞が存在する時期があり、この循環血中の腫瘍細胞が血中浮遊がん細胞 (circulating tumor cell, CTC) と呼ばれている。CTCの検出は病勢の理解と予後推定のために臨床上有用である。われわれは TelomeScan を用いて、CTC の検出を試みた。

多発肝転移を伴う胃癌患者から末梢血 5 ml を採取し、赤血球を溶血させて取り除いた後、TelomeScan を加え24時間後に蛍光発現を観察した (図 4)。末梢血中に GFP 発現を伴った腫瘍細胞を認めた。また化学療法の前後で CTC の検出を試みた (図 5)。腫瘍マーカーの減少とともに CTC 検出個数も減少しており、CTC は治療効果判定において有用な指標となることが示唆され、またその検出法として TelomeScan が有用であることが示された¹³⁾。

考 察

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。Telomelysin 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。さらに正常細胞に影響を与えず癌細胞を選択的に傷害するというコンセプトは重要であり、全身投与が可能となれば肉眼的に検出できない微小癌巣においても、選択的増殖により抗腫瘍効果が期待できる。

大きな固形腫瘍はその同定も容易であり、外科的切除のよい適応となる。微小ながん病変というものは、その発見が困難であり、治療よりもむしろ診断において困難さがある。

TelomeScan はさまざまな状況のなかで、微小ながん病変を可視化でき、非常に有用なツールであることが期待できる。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する。すなわち、診断と治療を兼ね備えたウイルス製剤 (Theranosticvirus) であり、微小ながん細胞を可視化した後には、殺細胞効果を発揮する。

テロメラーゼ特異的ナノバイオウイルス製剤を使用した癌治療および診断システムは、従来のものとは全く異なる概念に基づくものであり、既存の方法の欠点を克服できる可能性を持つ。今後基礎研究、臨床研究

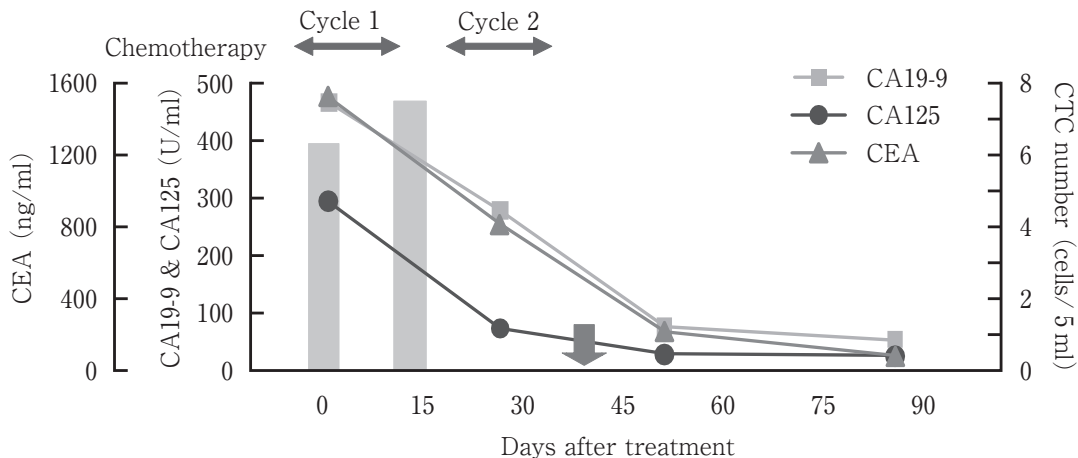


図 5 化学療法と CTC 検出数の推移
高度進行胃癌症例において、化学療法の前後で CTC の計測を行った。腫瘍マーカーの減少と CTC の推移は一致していた。同時期に施行された画像検査においても、腫瘍の縮小が認められた。

が進むにつれて、テロメラーゼ活性を標的とした新しいナノバイオウイルス製剤 Telomelysin および TelomeScan の安全性や有効性が確認され、さまざまな難治癌治療、癌診断に広く使用され、癌治療成績の向上に寄与するようになることを期待したい。

文 献

- 1) Branca MA : Gene therapy : cursed or inching towards credibility? *Nat Biotech* (2005) 23, 519-521.
- 2) Hawkins LK, Lemoine NR, Kim D : Oncolytic biotherapy : a novel therapeutic platform. *Lancet Oncol* (2002) 3, 17-26.
- 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) Rodriguez R, Schuur ER, Lim HY, Henderson GA, Simons JW, Henderson DR : Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706 : a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res* (1997) 57, 2559-2563.
- 6) Li Y, Yu DC, Chen Y, Amin P, Zhang H, Nguyen N, Henderson DR : A hepatocellular carcinoma-specific adenovirus variant, CV890, eliminates distant human liver tumors in combination with doxorubicin. *Cancer Res* (2001) 61, 6428-6436.
- 7) Kurihara T, Brough DE, Kovesdi I, Kufe DW : Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen. *J Clin Invest* (2000) 106, 763-771.
- 8) Kawashima T, Kagawa S, Kobayashi N, Shirakiya Y, Umeoka T, Teraishi F, Taki M, Kyo S, Tanaka N, Fujiwara T : Telomerase-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin Cancer Res* (2004) 10, 285-292.
- 9) Watanabe T, Hioki M, Fujiwara T, Nishizaki M, Kagawa S, Taki M, Kishimoto H, Endo Y, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T : Histone deacetylase inhibitor FR901228 enhances the antitumor effect of telomerase-specific replication-selective adenoviral agent OBP-301 in human lung cancer cells. *Exp Cell Res* (2006) 312, 256-265.
- 10) Fujiwara T, Kagawa S, Kishimoto H, Endo Y, Hioki M, Ikeda Y, Sakai R, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T : Enhanced antitumor efficacy of telomerase-selective oncolytic adenoviral agent OBP-401 with docetaxel : preclinical evaluation of chemovirotherapy. *Int J Cancer* (2006) 119, 432-440.
- 11) Umeoka T, Kawashima T, Kagawa S, Teraishi F, Taki M, Nishizaki M, Kyo S, Nagai K, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T : Visualization of intrathoracically disseminated solid tumors in mice with optical imaging by telomerase-specific amplification of a transferred green fluorescent protein gene. *Cancer Res* (2004) 64, 6259-6265.
- 12) 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.
- 13) 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.