

## 癌微小リンパ節転移を標的とするテロメラーゼ特異的制限増殖型ウイルス製剤の開発

児島 亨<sup>a\*</sup>, 渡邊雄一<sup>b</sup>, 橋本悠里<sup>a,c</sup>, 黒田新士<sup>a</sup>, 山崎泰源<sup>a</sup>, 矢野修也<sup>a</sup>,  
田澤 大<sup>a,c</sup>, 宇野 太<sup>a,c</sup>, 香川俊輔<sup>a,c</sup>, 田中紀章<sup>a</sup>, 浦田泰生<sup>b</sup>, 藤原俊義<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器外科学, <sup>b</sup>オンコリスバイオファーマ, <sup>c</sup>岡山大学病院 遺伝子・細胞治療センター

キーワード: telomerase, oncolytic adenovirus, lymph node metastasis, orthotopic colorectal cancer model, *Alu* sequence

### Telomerase-specific virotherapy targeting lymph node micrometastasis of human cancer

Toru Kojima<sup>a\*</sup>, Yuichi Watanabe<sup>b</sup>, Yuuri Hashimoto<sup>a,c</sup>, Shinji Kuroda<sup>a</sup>, Yasumoto Yamasaki<sup>a</sup>, Shuya Yano<sup>a</sup>, Hiroshi Tazawa<sup>a,c</sup>, Futoshi Uno<sup>a,c</sup>, Shunsuke Kagawa<sup>b</sup>, Noriaki Tanaka<sup>a</sup>, Yasuo Urata<sup>b</sup>, Toshiyoshi Fujiwara<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Department of Gastroenterological Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, <sup>b</sup>Oncolys BioPharma, Inc, <sup>c</sup>Center for Gene and Cell Therapy, Okayama University Hospital

#### はじめに

リンパ系への癌浸潤は癌細胞が全身へと拡散していく重要なルートであり、多くの癌で所属リンパ節への転移が認められ、その治療は臨床上非常に重要である。現在では癌リンパ節転移病変に対しては外科的切除が行われることが多いが、侵襲が大きくなるというデメリットもある。また化学療法や分子標的治療が行われる癌種も存在するが、その治療効果にはさらなる改善の余地がある。そこでわれわれはヒト癌細胞内で特異的に増殖する制限増殖型アデノウイルス製剤 (OBP-301) を、癌リンパ節転移病変を標的として使用するこ

とを考えた。その効果と可能性について述べる。

#### 制限増殖型アデノウイルス製剤 OBP-301 と OBP-401

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。そのウイルス増殖機能に選択性を付加することにより、ウイルスを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。

ヒトのきわめて多くの癌細胞でテロメラーゼという酵素活性が上昇していることが明らかになっている<sup>1)</sup>。その詳細な生化学的作用についてはここでは割愛するが、癌細胞の無制限増殖能に深く関わっているとされている。テロメラーゼは3つのサブユニットから構成されており、その中でも hTERT と呼ばれる部分の発現レベルがテロメラーゼ活性に強く関わっていることがわかっている<sup>2)</sup>。そこで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

平成25年1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年生まれ

平成11年3月 岡山大学医学部医学科卒業

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 外科 医員

平成16年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科入学 (社会人大学院生)

平成20年12月 津山中央病院 外科 副部長

平成21年8月 岡山済生会総合病院 外科医長

平成22年3月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科修了

現在に至る

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<sup>3)</sup> (図 1)。本ウイルスは癌細胞に感染し特異的に増殖することができるが、テロメラーゼ活性の低い正常細胞内では増殖することが出来ないため、殺細胞効果は腫瘍細胞に対してのみ発揮されることが期待される。また Telomelysin を基本骨格としてオワンクラゲ由来の蛍光遺伝子 GFP (green fluorescence protein) 遺伝子をウイルスゲノムに組み込んだものが TelomeScan (開発コード: OBP-401) である<sup>4,5)</sup> (図 1)。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、末梢血浮遊癌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<sup>6,7)</sup>。

### ウイルスの所属リンパ節への拡散と増殖

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 週後に高率に傍大動脈リンパ節転移を生じる (図 2)。このモデルにおいて、TelomeScan を原発直腸腫瘍内へ投与しすると、投与 5 日後には所属リンパ節に GFP 蛍光の発現を認める。リンパ節を採取して病理組織学的に検討したところ、GFP 蛍光発現が認められたリンパ節では高頻度に癌微小転移巣が検出された。その感度と特異度は高いものであった。このことは、原発腫瘍内に局所投与されたウイルス製剤がリンパ流を経由して所属リンパ節へ拡散し、リンパ節内の転移癌細胞に感染・増殖していることを示唆している<sup>8)</sup>。

### OBP-301 の癌リンパ節転移病変に対する抗腫瘍効果

前述した直腸癌リンパ節転移モデルを用いて、OBP-301 のリンパ節転移病変に対する治療効果を検討した。直腸癌リンパ節転移モデルの原発腫瘍内に OBP-301 を局所投与し、一定期間経過した後、所属リンパ節をすべて回収し検討した。組織学的に検討すると、OBP-301 投与群では非投与群、及び非増殖型アデノウイルスを投与した群と比較し、有意にリンパ節転移数が減少していた。またヒトに特有な Alu 配列を利用した real-time PCR アッセイを行い、所属リンパ節内の転移腫瘍細胞数を測定し、本ウイルス製剤の治療効果を検討した。すると組織学的検討と同様に有意差を持って、OBP-301 投与群において所属リンパ節内での転移癌細胞数の低下を認めた。この転移リンパ節内での抗腫瘍効果は局所に限定して放射線照射を行うことと比較しても遜色ないものであり、放射線照射を行った群では体重減少という副作用が出現したが、OBP-301 投与群ではそういった副作用が認められなかったという優位点も認められた。また外科的に原発巣を切除するという治療法との併用効果も認められた<sup>9)</sup> (図 3)。

### おわりに

癌転移病変に対する治療には、外科的切除、化学療法、分子標的治療、放射線療法などがあるが、さらなる治療効果の改善が望まれる現況にある。また内視鏡治療の進歩により、消化管癌では手術療法を行わずに原発巣を切除することができる症例も出現してきた。そういった症例においては所属リンパ節転移の有無とその治療が大きな問題となってくる。癌微小リンパ節

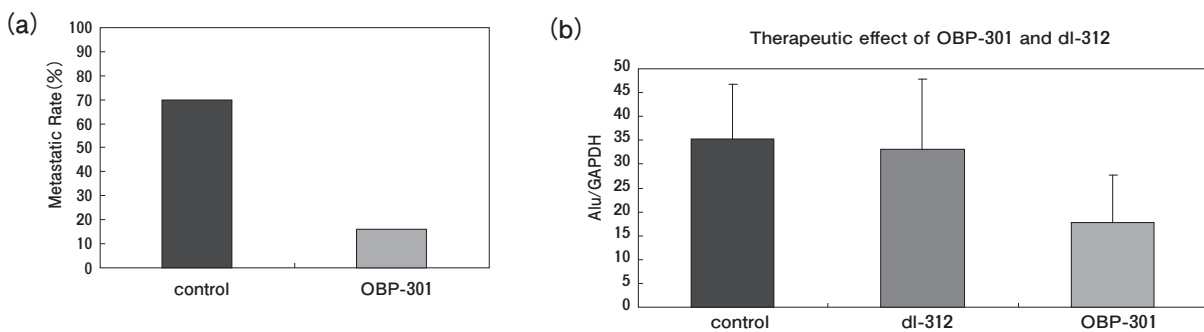


図 3 本ウイルス製剤の微小リンパ節転移病変に対する治療効果  
a: 転移陽性リンパ節数の組織学的評価。Telomelysin (OBP-301) 投与群では転移陽性リンパ節数が有意に減少している。b: real-time PCR 法を用いた検討。Telomelysin 投与群では所属リンパ節内の HT29 腫瘍細胞数が有意に低下している。

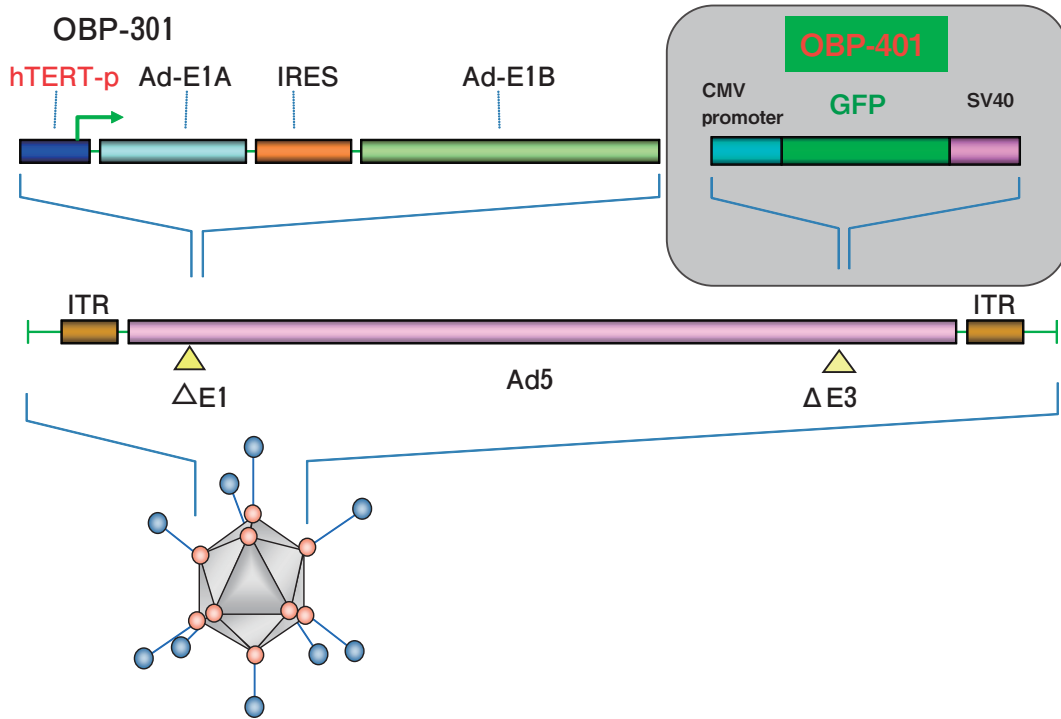


図1 テロメラーゼ特異的制限増殖型アデノウイルス製剤の構造と特徴  
 Telomelysin (OBP-301) では hTERT プロモーターと IRES 配列で結合した *E1A*, *E1B* 遺伝子からなる増殖カセットがアデノウイルス 5 型由来のベクターに組み込まれている。TelomeScan (OBP-401) は OBP-301 を基本骨格として、オワンクラゲ由来の蛍光遺伝子 GFP 遺伝子をウイルスゲノム E3 領域に組み込んでいる。

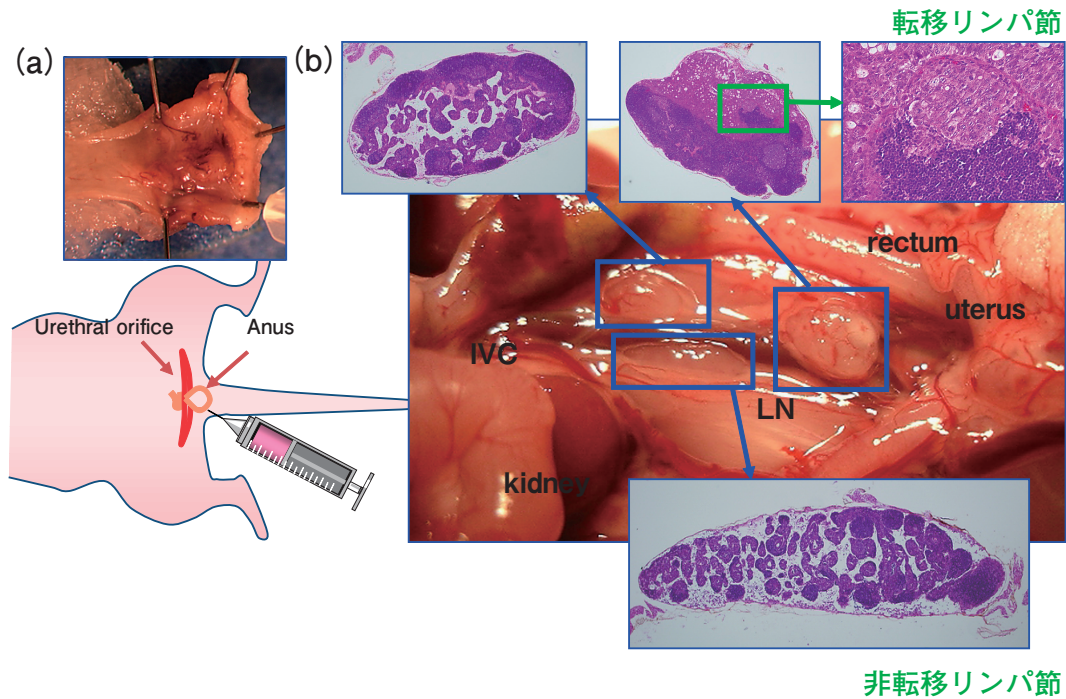


図2 直腸癌傍大動脈リンパ節転移モデル  
 a：ヌードマウス直腸粘膜下にヒト大腸がん細胞 HT29 を注入。b：ヌードマウスの開腹所見。傍大動脈リンパ節に直腸癌の転移を認める。

転移を標的とする治療法の開発と出現は、臨床上非常に望まれているものと考えている。

制限増殖型アデノウイルスを使用した癌へのアプローチは、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っている。今後さらに基礎研究、臨床研究が進み、本ウイルス製剤がさまざまな難治癌治療やがん診断に応用され効果を上げていくことを期待している。

## 文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Kojima T, Watanabe Y, Hashimoto Y, Kuroda S, Yamasaki Y, Yano S, Ouchi M, Tazawa H, Uno F, Kagawa S, Kyo S, Mizuguchi H, et al. : In Vivo Biological Purging for Lymph Node Metastasis of Human Colorectal Cancer by Telomerase-Specific Oncolytic Virotherapy. *Ann Surg* (2010) 251, 1079-1086.