

平成 21 年 4 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19390365  
 研究課題名（和文）  
 テロメラーゼ依存性ウイルス製剤の悪性中皮腫の分子病態に基づく診断・治療への応用  
 研究課題名（英文）  
 Telomerase-specific virotherapy for malignant mesothelioma  
 研究代表者  
 藤原 俊義（FUJIWARA TOSHIYOSHI）  
 岡山大学・医学部・歯学部附属病院・准教授  
 研究者番号：00304303

## 研究成果の概要：

悪性胸膜中皮腫は比較的稀な腫瘍であるが、多くの治療の抵抗性と浸潤性の局所進展、極めて不良な平均生存期間などから、何らかの新しい治療戦略の開発が必須と考えられる。本研究では、テロメラーゼ依存性腫瘍融解ウイルス製剤テロメライシンによる治療効果、および蛍光発現同製剤テロメスキャンによる診断機能について検討した。テロメライシンの胸腔内投与は同所性マウスモデルにおいて顕著な抗腫瘍活性を示し、テロメスキャンにて微小胸膜播種巣を可視化することが可能であった。これらのウイルス製剤は、悪性胸膜中皮腫の診断・治療に有用と考えられる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2008 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
年度			
総計	12,000,000	3,600,000	15,600,000

研究分野：腫瘍外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：テロメラーゼ、アデノウイルス、hTERT、ウイルス療法、遺伝子治療、悪性胸膜中皮腫、呼吸器外科学

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) テロメライシン&amp;テロメスキャン

最近の分子生物学の進歩により、癌細胞の悪性形質の発現に重要な分子を標的とした抗癌治療の開発が試みられている。染色体末端のテロメア長を保つ作用を持つ酵素テロメラーゼは85%以上の癌細胞でその活性の上昇が

知られており、現在、癌治療のターゲットとして最も注目を浴びている分子の一つである。岡山大学で開発した国産のウイルス製剤テロメライシン（Telomelysin、開発コード：OBP-301）は、テロメラーゼ構成分子である hTERT（human telomerase reverse

transcriptase) 遺伝子のプロモーターでアデノウイルスの増殖に必須のE1遺伝子を駆動することで作成した腫瘍融解ウイルスである。テロメライシンは、広範な癌細胞で選択的に増殖し、高率に細胞融解を引き起す。またわれわれは、テロメライシンにGFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子を組み込んだテロメスキャン (TelomeScan、OBP-401) により肺癌の微小転移検出が可能であることを明らかにしており、本技術の診断用医薬品としての有用性も示してきている。しかし、未だ特殊な標的疾患に対する胸腔や腹腔などの閉鎖空間への投与による安全性・有効性の検討は詳細には行われていない。

## (2) 悪性胸膜中皮腫の分子病態

悪性胸膜中皮腫は比較的稀な腫瘍であり、米国では年間2000から3000人の新たな患者が診断されるが、70%以上の患者でアスベストの暴露が認められている。1980年代から世界的にはその使用が控えられてきたにもかかわらず、本邦では1950年代以降アスベストの消費は急速に増加しており、本邦での悪性胸膜中皮腫の罹患率はこれからも増加を続けると考えられている。最近では、企業によるアスベストの環境汚染が社会的な問題となっており、中皮腫の治療開発は急務と考えられる。悪性胸膜中皮腫の特徴は、浸潤性の局所進展と9～16ヶ月という極めて不良な平均生存期間である。悪性胸膜中皮腫は多くの治療の抵抗性であり、外科手術や放射線療法のみでは生命予後の改善は期待できない。さまざまな化学療法レジメが試みられてきたが標準治療と呼べるものは確立されておらず、何らかの新しい治療戦略の開発が必須と考えられる。

多くの悪性胸膜中皮腫の発生にはSimian virus 40 (SV40) の感染が関連すると報告されており、その分子機構としては、SV40 T抗

原による複数の癌抑制遺伝子産物の不活化や、最近ではSV40感染による特定遺伝子のプロモーターのメチル化などが考えられている。しかし、正常細胞の不死化を検討した多くの実験から、SV40 large T抗原の導入のみでは癌化は起こらず、テロメラーゼの活性化、特にhTERT遺伝子導入が必要であることが明らかになっている。したがって、悪性胸膜中皮腫ではSV40の感染とともにhTERT発現が認められると推測され、テロメラーゼ (hTERT) 依存性のテロメライシン (テロメスキャン) の細胞内増殖の亢進が生じると思われる。すなわち、胸膜中皮腫はテロメライシンの顕著な効果が期待される標的疾患であり、臨床効果を予測する根拠となりえる。

## 2. 研究の目的

本研究では、悪性胸膜中皮腫にターゲットを絞り、テロメライシンおよびテロメスキャンを用いた診断・治療の臨床応用を目指した前臨床研究を推進し、新規ウイルス製剤の胸腔内投与による中皮腫の新たな治療戦略の早期開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株におけるテロメラーゼ発現の解析

hTERT 遺伝子を標的としたリアルタイム RT-PCR により、各種ヒト悪性胸膜中皮腫細胞およびヒト正常細胞におけるテロメラーゼ活性を測定する。

### (2) ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株におけるアデノウイルス受容体 (CAR) 発現の解析

フローサイトメトリーを用いて、各種ヒト悪性胸膜中皮腫細胞におけるアデノウイルス受容体 (coxsackie-adenovirus receptor: CAR) の発現レベルを定量する。

(3) *In vitro*におけるテロメラインおよびテロメスキャンの抗腫瘍活性

各種ヒト悪性胸膜中皮腫細胞にテロメスキャンを感染させ、蛍光顕微鏡下に GFP 蛍光発現を観察して、テロメスキャンの増殖と GFP 遺伝子発現の相関性を検証する。また、各種ヒト悪性胸膜中皮腫細胞にテロメラインを感染させ、経時的な生細胞数の変化を XTT アッセイにて検討する。ウイルス増殖と細胞障害活性 (cytopathic effect、CPE) の相関、およびテロメラインの容量依存性について検証する。

(4) *In vivo*におけるテロメスキャンの選択的増殖と GFP 蛍光発現の検討

同所性胸膜中皮腫モデルを用いて、テロメスキャンを胸腔内に投与し、一定時間の後に胸骨正中切開にて開胸、高感度蛍光観察システムでテロメスキャンの播種病巣内での増殖を検証する。さらに、ファイバー型の高感度蛍光検出装置 (Cell<sup>~</sup>vizio [フランス Mauna Kea Technologies 社]) を用いて、肋骨間からファイバー先端を挿入して胸腔内を観察し、臨床的に胸腔鏡下と同様の状況での観察を行うことにより、診断用技術としての応用の可能性を検討する。

(5) *In vivo*におけるテロメラインの胸腔内投与による抗腫瘍効果の検討

ヌードマウスの胸腔内に悪性胸膜中皮腫細胞を移植後、早期 (移植翌日) から晩期 (移植後 28 日以上) までの様々な時期に各濃度のテロメラインを投与し、一定期間の後にマウスを犠牲死させ、播種病巣の個数と重量を測定し、抗腫瘍効果を検討する。

(6) ヘパラナーゼ発現アデノウイルスベクターの併用によるテロメラインの効果増

強

*In vitro*におけるヘパラナーゼ発現を確認するために、各種ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株に非増殖型ヘパラナーゼ発現アデノウイルスベクター (Ad-S/hep) を感染させ、ウエスタンブロット解析にてヘパラナーゼ蛋白質発現を測定する。次に、中皮腫細胞をスフェロイドとして *in vitro* で培養し、Ad-S/hep の共感染によりテロメスキャンのスフェロイド内への浸透が促進されるかどうかを蛍光顕微鏡下に比較検討する。さらに、胸膜播種モデルにおいてテロメライン投与と同時に Ad-S/hep も胸腔内投与を行い、抗腫瘍効果の増強を腫瘍重量および生存期間の延長で検討する。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株におけるテロメラナーゼ発現の解析

ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株 H2052、H2452、H28、211H のいずれにおいても hTERT 遺伝子発現が確認され、一方、血管内皮細胞、線維芽細胞では検出限界以下であった。

(2) ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株におけるアデノウイルス受容体 (CAR) 発現の解析

ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株 H2052、H2452、H28、211H のいずれにおいても、発現レベルに差はあるものの、アデノウイルス受容体は高率に発現していた。

(3) *In vitro*におけるテロメラインおよびテロメスキャンの抗腫瘍活性

ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株 H2052、H2452、H28、211H のいずれにおいても、テロメラインの感染により容量依存性に顕著な細胞死が誘導され、10 multiplicity of infection (MOI) で 3 日以内に細胞傷害活性は十分に観

察された。また、同容量のテロメスキャンの感染により、すべての細胞株で強力な GFP 蛋白質発現が確認され、細胞内でのウイルス増殖が示唆された。

#### (4) *In vivo* におけるテロメスキャンの選択的増殖と GFP 蛍光発現の検討

H2452 細胞をヌードマウスの胸腔内に投与すると多数の胸腔内結節が形成され、ヒト悪性胸膜中皮腫と臨床的に類似した同所性胸膜播種モデルとなる。このモデルにおいてテロメスキャンを胸腔内に投与し、開胸下に高感度 3CCD カメラで、あるいは微細ファイバー型の蛍光検出装置 (Cell<sup>^</sup>vizio) で観察することで、肉眼的に確認できない微小結節を含めて播種巣を GFP 蛍光で可視化することが可能であった。

#### (5) *In vivo* におけるテロメラインシンの胸腔内投与による抗腫瘍効果の検討

H2452 細胞の胸腔内投与による同所性モデルにおいて、 $10^8$  plaque forming units (PFU) のテロメラインシンの第 1、8 日、第 8、15 日、第 15、22 日、および第 29、36 日、いずれの胸腔内投与によっても明らかな播種結節数の減少と腫瘍総重量の低下が観察された。一方、同容量のコントロール非増殖性アデノウイルス dl312 の投与では全く抗腫瘍効果は認められなかった。

#### (6) ヘパラナーゼ発現アデノウイルスベクターの併用によるテロメラインシンの効果増強

H2452 中皮腫細胞の三次元的スフェロイド培養を行い、培養液中にテロメスキャンと細胞外マトリックスであるヘパラン硫酸を分解する酵素であるヘパラナーゼを発現する非増殖型アデノウイルスベクター (Ad-S/hep) を

投与し、一定時間後に共焦点蛍光顕微鏡下に GFP 発現を観察した。テロメスキャン単独に比べて、Ad-S/hep を併用することでより深部へのウイルス浸透が認められた。

また、H2452 細胞の胸腔内投与による同所性モデルにおいて、 $10^8$  PFU のテロメラインシンと  $10^7$  PFU の Ad-S/hep を第 8、15 日に胸腔内投与すると、テロメラインシンとコントロールウイルス dl312 の投与に比べて有意な播種結節数の減少と腫瘍総重量の低下が観察され、生存期間も有意に延長した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Ikeda Y, Kojima T, Kuroda S, Endo Y, Sakai R, Hioki M, Kishimoto H, Uno F, Kagawa S, Watanabe Y, Hashimoto Y, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T. A novel antiangiogenic effect for telomerase-specific virotherapy through host immune system. *J Immunol* 2009; 182: 1763-1769. (査読有)
2. Nakajima O, Matsunaga A, Ichimaru D, Urata Y, Fujiwara T, Kawakami K. Telomerase-specific virotherapy in an animal model of human head and neck cancer. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 171-177. (査読有)
3. Kyo S, Takakura M, Fujiwara T, Inoue M. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Sci* 2008; 99: 1528-1538. (査読有)
4. 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. (査読有)
5. Hashimoto Y, Watanabe 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  
(TRAD). *Cancer Sci* 2008; 99:385-390.  
(査読有)

6. Hioki M, Kagawa S, Fujiwara T, Sakai R, Kojima T, Watanabe Y, Hashimoto Y, Uno F, Tanaka N, Fujiwara T. Combination of oncolytic adenovirotherapy and Bax gene therapy in human cancer xenografted models. Potential merits and hurdles for combination therapy. *Int J Cancer* 2008; 122: 2628-2633. (査読有)
7. Yokoyama T, Iwado E, Kondo Y, Aoki H, Hayashi Y, Georgescu MM, Sawaya R, Hess KR, Mills GB, Kawamura H, Hashimoto Y, Urata Y, Fujiwara T, Kondo S. Autophagy-inducing agents augment the antitumor effect of telomerase-selective oncolytic adenovirus OBP-405 on glioblastoma cells. *Gene Ther* 2008; 15: 1233-1239. (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

1. Fujiwara, T. Telomerase-specific oncolytic virotherapy for human cancer. *The 2<sup>nd</sup> Annual Meeting of Korean Society of Gene Therapy*, 2008/11/28 (ソウル)
2. 藤原俊義、京哲、水口裕之、浦田泰生、田中紀章: Telomerase-specific oncolytic adenovirus for theranostic application. *第 67 回日本癌学会学術総会 (シンポジウム)*. 2008/10/28-30 (名古屋)
3. Fujiwara, T, Tanaka, N., Nemunaitis, J., Senzer, N., Tong, A., Ichimaru, D., Shelby, S., Hashimoto, Y., Kawamura, H., Urata, Y. Phase I trial of intratumoral administration of telomerase-specific oncolytic adenovirus OBP-301 in patients with advanced solid cancer. *第 14 回日本遺伝子治療学会 (Plenary Session)*, 2008/6/12 (札幌)
4. Fujiwara, T, Tanaka, N., Nemunaitis, J., Snzer, N., Tong, A., Ichimaru, D., Shelby, S. M., Hashimoto, Y., Kawamura, H., Urata, Y. Phase I trial of intratumoral administration of OBP-301, a novel telomerase-specific oncolytic virus, in patients with

advanced solid cancer: evaluation of biodistribution and immune response. *44th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology*, 2008/5/30-6/3 (シカゴ)

5. 藤原俊義、香川俊輔、宇野太、浦田泰生、田中紀章: テロメラーゼ活性を標的とした新規ウイルス製剤Telomelysin/TelomeScanの癌診断・治療への応用. *第 108 回日本外科学会定期学術集会 (ワークショップ)*, 2008/5/15-20. (長崎)
6. Hashimoto, Y., Watanabe, Y., Kojima, T., Kuroda, S., Tanaka, N., Kawamura, H., Nagai, K., Urata, Y., Fujiwara, T. Heparanase-assisted oncolytic virotherapy for disseminated malignant pleural mesothelioma in mice. *2008 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, 2008/4/12-16 (サンディエゴ)
7. 藤原俊義、浦田泰生、田中紀章: *In vivo* imaging of lymph node metastasis with telomerase-specific replication-selective adenovirus expressing *GFP* gene. *第 66 回日本癌学会学術総会 (シンポジウム)*. 2007/10/3-5 (横浜)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤原 俊義 (FUJIWARA TOSHIYOSHI)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・准教授

研究者番号: 00304303

### (2) 研究分担者

香川 俊輔 (KAGAWA SYUNSUKE)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号: 00362971