

2. テロメラーゼ活性を標的とした悪性腫瘍に対するウイルス療法の開発

藤原 俊義^{1) 2)}, 田中 紀章²⁾

1) 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

2) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器・腫瘍外科

ウイルスは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。Telomelysin (OBP-301) は、かぜ症状の原因となるアデノウイルスを基本骨格とし、ウイルス増殖に必須の *E1* 遺伝子をテロメラーゼ・プロモーターで制御するよう改変された国産のウイルス製剤である。In vitro では肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、頭頸部癌、乳癌、肝癌、膵癌、前立腺癌、子宮頸癌、卵巣癌などに対して広範な抗腫瘍活性がみられ、in vivo では腫瘍内投与による有意な増殖抑制が認められるとともに、ウイルスは血中を循環し、遠隔部位の腫瘍内でも増殖することが確認された。固形癌に対する Telomelysin の第 I 相臨床試験は、米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) の治験承認のもと米国にて進行中である。Telomelysin に GFP 蛍光遺伝子を搭載した TelomeScan (OBP-401) は、高感度蛍光検出装置により微小癌組織を可視化することができ、診断用医薬品として応用可能である。原発巣内に投与された TelomeScan は所属リンパ域へ拡散し、微小リンパ節転移で GFP 発現を発する。高感度プローブあるいはビデオスコープにより転移リンパ節を同定することができ、本技術は微小癌、微小転移の早期発見に有用であるとともに、優れた外科ナビゲーション・システムとなりうると期待される。本稿では、従来のがん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規ウイルス製剤のがん診断・治療への応用の可能性を概説する。

はじめに

ウイルスによる腫瘍融解療法 (Oncolytic virotherapy) は、新たながん治療戦略として積極的に開発が進められている。ウイルスは、本来ヒトの細胞に感染して増殖複製し、その細胞を様々な機序により破壊する。組織学的に診断された Burkitt リンパ腫の黒人少年が、麻疹に罹患し治癒し

た直後に完全寛解した症例報告もある¹⁾。また 1900 年代の初めより、がん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がん治療も積極的に試みられてきている²⁾。子宮がんや黒色腫に対する狂犬病ウイルスの投与や、コクサッキー B 型ウイルス、ミクソウイルス、アルボウイルスなどによる固形がんの治療が行われてきた。1974 年には、進行がん患者へのムンプスウイルス投与の本邦での研究成果が報告されている³⁾。しかし、これらのウイルスはあらゆる細胞で増殖能を有する野生型であったため、毒性などにより一般的な治療としては使用されるには至らなかった。

遺伝子工学的技術の進歩とがんの分子病態解析の発展により、ウイルスの細胞傷害活性をがん細胞に標的化することが可能となってきた⁴⁾。理論的根拠に基づいたがん選択性の確保と正常細胞での毒性軽減は、ウイルス製剤の臨床応用を現実のものとしてきている。単純ヘルペスウイルスやワクシニアウイルスなどの改変が行われており、臨床応

連絡先

〒700-8558 岡山市鹿田町 2-5-1

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

TEL: 086-235-7997

FAX: 086-235-7884

E-mail: toshi_f@md.okayama-u.ac.jp

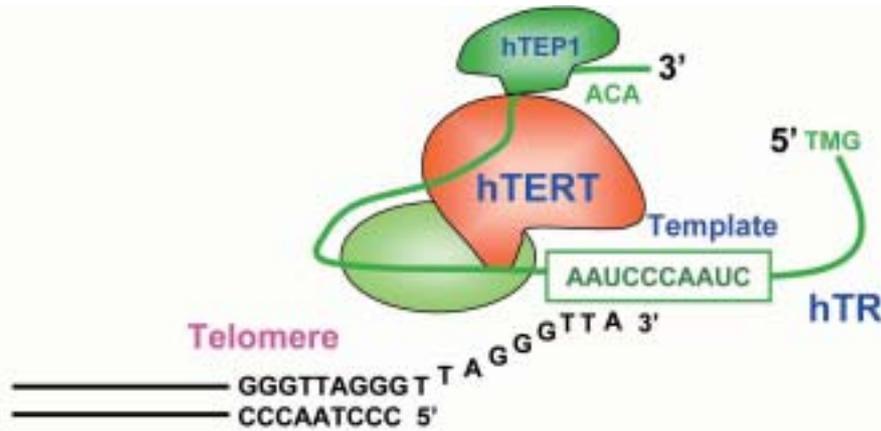


図1 テロメラーゼの構造と hTERT

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%

用も積極的に進んでいる。しかし、アデノウイルスがその構造が最もよく研究されているウイルスの一つであり、非増殖型のものが多くの遺伝子治療プロトコルで使用されることによって、その安全性に関する情報が蓄積されてきている⁵⁾。本稿では、テロメラーゼ活性依存性のがん細胞で選択的に増殖して細胞死を誘導するアデノウイルス製剤の開発の現況について紹介し、そのがん診断や治療への応用の可能性について考察する。

1. アデノウイルスへの腫瘍選択性の導入

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、49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る。

アデノウイルスゲノムはその構造が詳細に解析されており、がん細胞に特異的な増殖機能を発揮させるために、大きく二つの方法が開発されている。最初の試みは、アデノ

ウイルスの初期遺伝子に特定の変異あるいは欠失を加えることによりがん細胞の生物学的な特殊性に基づいた制限増殖性を期待する方法であり、E1B初期遺伝子の55kDを欠損した2型および5型のキメラタイプの変異アデノウイルスであるOnyx-015 (dl1520) が代表的である⁶⁾。本来、E1B-55kD蛋白質はがん抑制遺伝子産物であるp53蛋白質に結合し、その機能を不活化する働きを担っている。したがって、Onyx-015は、正常なp53機能を持つ細胞ではp53によるウイルスの複製増殖の抑制を制御することができない。一方、p53機能を喪失しているがん細胞では、E1B-55kDが作用する必要がなく、Onyx-015は複製増殖により細胞融解を誘導することが可能となる。しかし、その後の研究により、Onyx-015の増殖能は必ずしもp53機能の有無に因らないことが明らかになっており⁷⁾、またヒトの正常細胞での増殖複製の可能性も示唆されている⁸⁾。Onyx-015と類似の腫瘍融解ウイルスであるH101は、中国食品医薬品局(State Food and Drug Administration: sFDA)の承認を受け、すでに市場に出ている⁹⁾。

がん選択性を持たず第二の試みは、腫瘍特異的および臓

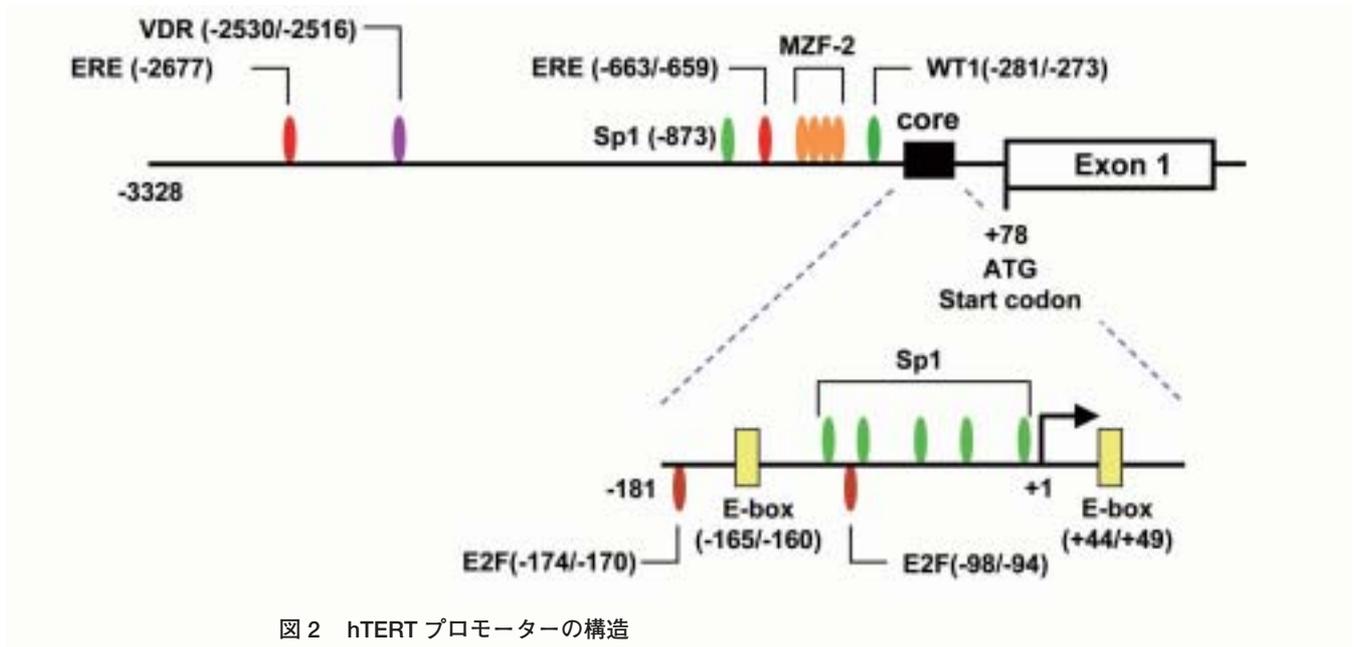


図2 hTERT プロモーターの構造

hTERT プロモーターのコア領域と転写因子の結合部位が示されている。

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、がん細胞特異的あるいは特定の臓器由来のがん細胞に特異的な制限増殖性を付加する方法である。この際、様々な発生母地を持つ広い範囲のがん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。

II. テロメラーゼ活性と hTERT 遺伝子

染色体 DNA 末端の短い塩基配列 (TTAGGG) の繰り返して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 (replicative senescence) を引き起す。このテロメアの短縮は発がんの抑制機構であり、前がん状態にある細胞が老化に陥り死滅することでがん化が阻止されている。逆に、無制限の増殖能を有するがん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 (図 1)。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¹⁰⁾。テロメラーゼは、きわめて多くのがん細胞でその活性の上昇が明らかになっており¹¹⁾ (表 1)、早期のがんから進行がんへとその活性は徐々に上昇していく。テロメラーゼ活性の上昇には、hTERT mRNA のスプライシングや hTERT 蛋白質の翻訳後修飾などが関与している

が、hTERT 遺伝子発現の増強が最も重要な分子機構と考えられている。したがって、がん細胞では 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。

III. hTERT プロモーターの制御機構

hTERT プロモーターの活性化や抑制には、多くのがん遺伝子やがん抑制遺伝子が複雑に関与している¹²⁾ (図 2)。hTERT プロモーターには、Myc/Max/Mad 転写因子が結合する E-box (CACGTG) 配列が存在しており、c-Myc/Max 複合体は hTERT 発現を増強し、逆に Mad1/Max 複合体は hTERT 発現を抑制する。他の転写因子である Sp1 も、c-Myc と共同して hTERT 活性化に作用する。また、epidermal growth factor (EGF) 受容体やその相同体である HER2/neu がん原遺伝子産物は、MAP キナーゼのリン酸化を介して転写因子 ETS1/ETS2 を活性化し、最終的に hTERT プロモーター活性を増強する。

hTERT プロモーターは、転写因子である核内受容体による制御も受けることが知られている。hTERT プロモーターには 2 個の estrogen response element (ERE) が存在し、エストロゲンによってその発現は増強する。また、プロゲステロンやアンドロゲンも、hTERT 発現増強によりテロメラーゼ活性を増強する。一方、ビタミン D 受容体やレチノイン酸受容体などの核内受容体は、逆に hTERT 発現に抑制的に作用する。

これらの事実から、がん細胞におけるテロメラーゼ活性や hTERT 発現が厳格に制御されていることが明らかであり、また薬剤や遺伝子、ホルモンなどにより外来性に発現

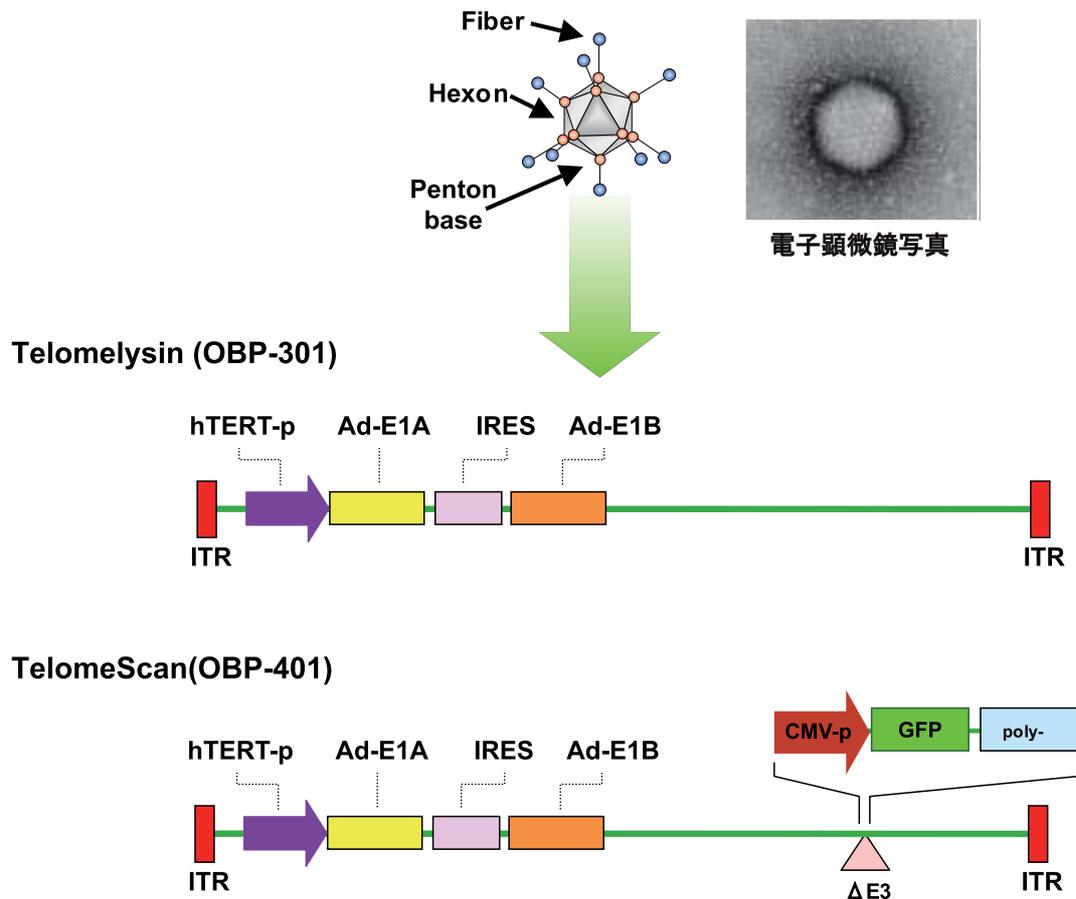


図3 Telomelysin (OBP-301) と TelomeScan (OBP-401) の構造

Telomelysin (OBP-301) は、野生型のアデノウイルスと同様、直径65~80 nmの正二十面体であり、各頂点からファイバーが突出している。構造上は、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。

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。

修飾を行うことも可能であることが示唆される。すなわち、いくつかの治療薬剤や治療法を集学的に行うことにより、テロメラーゼ依存性抗がん治療の効果を増強することができると考えられる。

IV. テロメラーゼ特異的アデノウイルス製剤のがん治療へ応用

1. Telomelysin (OBP-301) の構築と機能解析

広範ながんを対象とした分子標的ウイルス製剤を開発するために、著者ら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Telomelysin(開発コード: OBP-301)を作成した¹³⁾(図3)。Telomelysin感染後3日

までに、各種がん細胞においては 10^5 - 10^8 倍のウイルス複製増殖が認められたが、正常細胞では100-1000倍に抑えられていた。肺がん、大腸がん、胃がん、食道がん、頭頸部がん、乳がん、肝がん、脾がん、前立腺がん、子宮頸がん、卵巣がん、悪性胸膜中皮種などのヒト由来各種がん細胞では、1-50 multiplicity of infection (MOI) のTelomelysin感染で3-5日以内にcytopathic effect (CPE)が誘導され細胞死が観察された。ヌードマウス背部皮下に移植したヒト肺がん腫瘍に、 10^7 plaque forming units (PFU) という低濃度のTelomelysinを腫瘍内局所投与したところ、無治療の腫瘍や非増殖型のコントロール・アデノウイルスの投与に比較して有意な増殖抑制が認められ、さらにTelomelysinは血中を循環し、遠隔部位の腫瘍内でも増殖していることがDNA-PCR解析やE1A蛋白質に対する免疫染色などによ

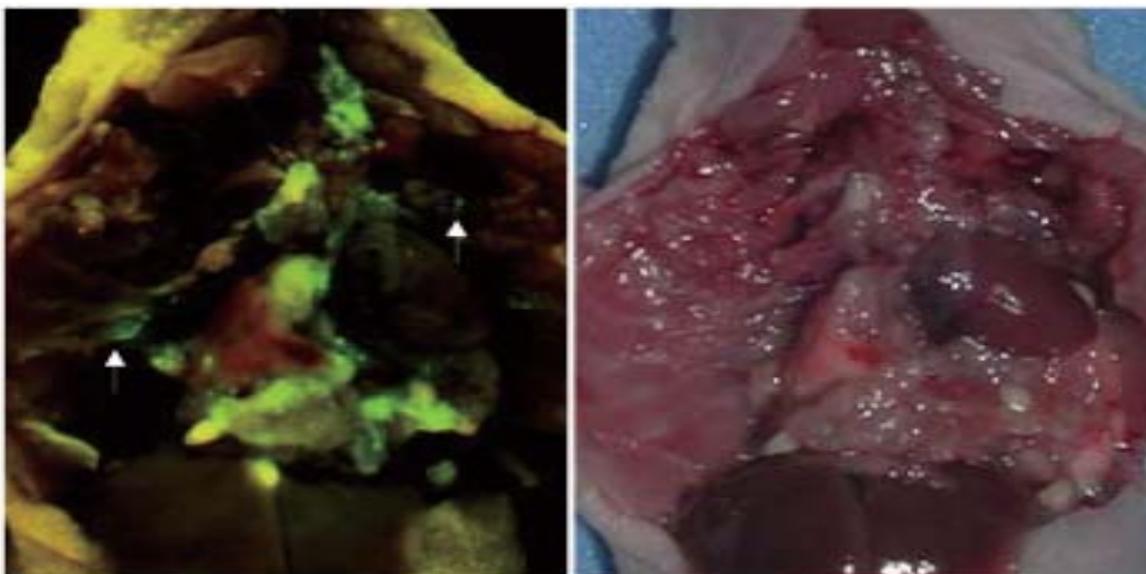


図4 Telomelysin の *in vivo* におけるがん診断への応用

Telomelysin と Ad-GFP を用いた胸膜播種巣の可視化. ノードマウスの胸腔内に A549 ヒト肺がん細胞を移植し, 2 週間後に GFP 発現アデノウイルスベクター (Ad-GFP) と Telomelysin (OBP-301) を胸腔内に投与した. Telomelysin の腫瘍選択的増殖とともに Ad-GFP も増殖し, 肉眼的に同定不能な微小播種巣も緑色蛍光にて検出可能であった. (文献 14 より引用)

り確認された. これらの結果は, 原発腫瘍内投与した Telomelysin による微小転移巣の治療の可能性を示唆している.

Telomelysin は, 診断用医薬品としても応用可能である. すなわち, オワンクラゲ由来の蛍光遺伝子 *GFP* (Green Fluorescence Protein) を組み込んだ非増殖型アデノウイルスベクター Ad-GFP を Telomelysin と共感染させると, がん細胞では Telomelysin が産生する E1 蛋白質を使って Ad-GFP も増殖するが, 正常細胞ではいずれの増殖も抑制される. その結果, がん細胞では特異的に GFP 緑色蛍光が観察され, *in vitro* では蛍光顕微鏡下に, またマクロでは高感度 3CCD カメラを用いた蛍光観察システム下に検出することが可能である. ヒト肺がん細胞をノードマウスの胸腔内に移植した胸膜播種モデルにおいて, Telomelysin と Ad-GFP の胸腔内投与により肉眼的には確認できなかった微小胸膜播種巣の選択的な可視化が可能であった¹⁴⁾ (図 4).

2. Telomelysin を用いた集学的治療の可能性

Telomelysin の単剤としての安全性や生体内動態は, 米国での第 I 相臨床試験にて確認されつつあるが, 臨床的により強力な効果を期待するためには, 既存の治療法との併用を検討する必要がある. Telomelysin は, *in vitro* において docetaxel (Taxotere), vinorelbine (Navelbine), および SN38 (Irinotecan の活性化代謝産物) との併用効果を示し, *in vivo* ではノードマウス背部に移植したヒト肺がん腫瘍に Telomelysin を腫瘍内投与し, 同時に docetaxel を腹腔

内投与することで顕著な相乗効果を得ることができた¹⁵⁾. また, Telomelysin とヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase, HDAC) 阻害剤である FR901228 (depsipeptide, FK228) との相乗効果も確認されている¹⁶⁾. FR901228 は標的細胞のアデノウイルス受容体 (Coxsackie adenovirus receptor, CAR) の発現を増強することで Telomelysin の感染効率を上げ, 相乗効果を発揮すると考えられる.

さらに, Telomelysin の宿主免疫系に及ぼす影響も検討されている. 生体内で最も強力な抗原提示能を持つ樹状細胞は種々の死細胞から腫瘍抗原及び danger signal を受け取り, 免疫担当細胞間で直接的にあるいはサイトカインを介して免疫応答を惹起する. 尿酸は傷害を受けた細胞で内因性 danger signal として作用し, 生体の免疫機構を活性化することが報告されている. ヒトがん細胞に Telomelysin を感染させると, 抗がん剤で処理されたアポトーシス細胞やネクローシス細胞に比べて有意に高い細胞内尿酸濃度が誘導され, ヒト末梢血単核球との共培養により高い細胞障害活性の誘導を認めた¹⁷⁾. これらの結果より, Telomelysin 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期待される.

3. 米国における Telomelysin の第 I 相臨床試験

Telomelysin をコア技術として, 平成 16 年 3 月に著者らは岡山大学発バイオベンチャー オンコリスバイオファーマ (株) を設立し, がんの治療用・診断用医薬品としての臨床開発を推進している. 各種進行固形がんを対象とした臨床

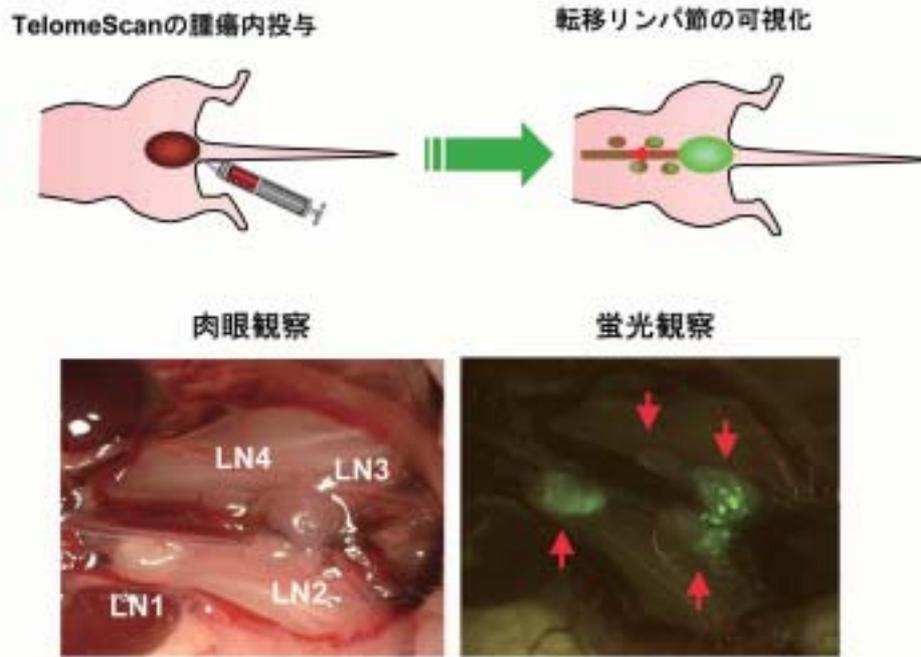


図5 TelomeScanによるリンパ節転移の *in vivo* イメージング

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。

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。(文献 19 より引用)

プロトコール「A phase I injection study of intratumoral injection with telomerase-specific replication-competent oncolytic adenovirus, Telomelysin (OBP-301) for various solid tumors」は、米国食品医薬品庁 (US 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。

現在、試験はまだ進行中であるが、Telomelysin の単回腫瘍内投与による安全性と体内動態、抗体産生をはじめとする免疫学的反応、生検サンプルによる組織学的解析、画像診断による臨床効果などを検討する。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 法を用いて解析する¹⁸⁾。ウイルスゲノムは投与後 24 時間以内に末梢血中に検出可能であったが、さらに 10^{11} 、 10^{12} vp 投与症例では 7 日、あるいは 14 日後に第 2 のピークが認められ、投与された腫瘍内での Telomelysin の増殖が示唆された。初期 9 例の検討では、すべての症例で投与後 28 日間では Stable disease (SD) であり、6 例では 6.6-43% の腫瘍サイズの縮小が認められた。

今後、オンコリス社は米国を中心に食道がん、頭頸部がんを対象とした第 II 相臨床試験を行い、また台湾のバイオ

企業 Medigen 社は肝臓がんを対象とした第 II 相臨床試験を開始する予定である。

V. テロメラーゼ特異的アデノウイルス製剤の がん診断へ応用

1. 分子イメージングと外科手術ナビゲーション

生体内におけるがんの診断法として、コンピューター断層撮影 (Computed Tomography; CT) や磁気共鳴画像法 (Magnetic Resonance Tomography; MRI) などの画像診断が一般的に行われているが、これらの手法は腫瘍に特化されたものではない。また、ポジトロン (陽電子) を放出するアイソトープで標識された薬剤を注射し、その体内分布を特殊なカメラで映像化する新しい診断法である PET (Positron Emission Tomography) は、がんを選択的に描出する分子イメージング技術としてがん診断に積極的に応用されている。これらの診断技術は、スクリーニングや術前にがんの部位を同定するためには有用であるが、術中にリアルタイムに転移や播種病巣を同定するナビゲーション技術は未だ確立されていない。術中に正確にリンパ節転移を同定する方法が確立されれば、術者に適正な切除範囲を

示すナビゲーションとなると同時に、患者への過剰な外科侵襲を回避することが可能となる。

2. TelomeScan (OBP-401) の構造と機能

Telomelysin と Ad-GFP を用いた診断の試みは前述したが、より効率的にがん組織を可視化するために診断用ウイルス製剤 TelomeScan (OBP-401) を構築した¹⁵⁾¹⁶⁾ (図 3)。TelomeScan は Telomelysin 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、生体内での微小がん組織、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。TelomeScan の感染により極めて広範ながん細胞で 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。また、ヌードマウスの背部皮下に移植したヒト悪性腫瘍内に TelomeScan を投与したところ、24 時間後から 7 日以上長期にわたりがん組織に選択的な緑色蛍光発現が観察された。

3. TelomeScan (OBP-401) を用いた生体内微小リンパ節転移診断システムの開発

リンパ節転移は代表的ながんの転移経路の一つであり、がん患者の根治を目指すためには、原発巣の切除とともに確かなリンパ節廓清が必要である。TelomeScan を用いた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がん細胞 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、TelomeScan 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、1 mm 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¹⁹⁾ (図 5)。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 TelomeScan ががん細胞に感染・増殖して選択的に GFP 蛍光を発したことを示唆している。また、TelomeScan の複製・増殖はフロイドアジュバントの直腸粘膜投与で生じた炎症性のリンパ節腫大ではみられず、がん細胞に選択的に誘導されることが明らかとなった。

現在、TelomeScan を標識薬剤として、プローブ型の高感度 GFP 蛍光検出装置を用いた微小がん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、TelomeScan はリンパ節内の微小転移巣でがん細胞に感染・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あるいは開腹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。

おわりに

テロメラーゼは極めて多くのがん細胞で活性の上昇が認められており、がん治療の標的分子としては極めて魅力的である。Telomelysin によるがん治療は、従来の抗がん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がん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がん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。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し、GFP 蛍光を発した後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。今後、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 Telomelysin および TelomeScan の有効性が確認され、様々な難治がん治療、がん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) Bluming AZ, Ziegler JL: Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. *Lancet*. 2: 105-106, 1971.
- 2) Southam CM: Present status of oncolytic virus studies. *Ann NY Acad Sci* 656-673, 1960.
- 3) Asada T: Treatment of human cancer with mumps virus. *Cancer* 34: 1907-1928, 1974.
- 4) Hawkins LK, Lemoine NR, Kirn D. Oncolytic biotherapy: a novel therapeutic platform. *Lancet Oncol* 3: 17-26, 2002.
- 5) Fujiwara T, Tanaka N, Kanazawa S, et al: Multicenter phase I study of repeated intratumoral delivery of adenoviral p53 in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 24: 1689-1699, 2006.
- 6) Branca MA: Gene therapy: cursed or inching towards credibility? *Nat Biotech* 23: 519-521, 2005.
- 7) Goodrum FD, Ornelles DA: p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J Virol* 72:9479-9490, 1998.
- 8) Rothmann T, Hengstermann A, Whitaker NJ, et al: Replication of ONYX-015, a potential anticancer aden-

- ovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J Virol* 72:9470-9478, 1998.
- 9) Jia H, Kling J: China offers alternative gateway for experimental drugs. *Nat Biotechnol* 24, 117-118, 2006.
 - 10) Nakayama J, Tahara H, Tahara E, et al: Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* 18: 65-68, 1998.
 - 11) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011-2015, 1994.
 - 12) Janknecht R.: On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells. *FEBS Lett* 564: 9-13, 2004.
 - 13) Kawashima T, Kagawa S, Kobayashi N, et al: Tumor-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin Cancer Res* 10: 285-292, 2004.
 - 14) Umeoka T, Kawashima T, Kagawa S, et al: Visualization of intrathoracically disseminated solid tumors in mice with optical imaging by telomerase-specific amplification of a transferred green fluorescent protein gene. *Cancer Res.* 64: 6259-6265, 2004.
 - 15) Fujiwara T, Kagawa S, Kishimoto H, et al: Enhanced antitumor efficacy of telomerase-selective oncolytic adenoviral agent OBP-401 with docetaxel: preclinical evaluation of chemovirotherapy. *Int J Cancer* 119: 432-440, 2006.
 - 16) Watanabe T, Hioki M, Fujiwara T, et al: 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* 312: 256-265, 2006.
 - 17) Endo Y, Sakai R, Ouchi M, et al: Virus-mediated oncolysis induces danger signal and stimulates cytotoxic T-lymphocyte activity via proteasome activator upregulation. *Oncogene* 27: 2375-2381, 2008.
 - 18) Hashimoto Y, Yatanabe Y, Shirakiya Y, et al: Establishment of biological and pharmacokinetic assays of telomerase-specific replication-selective adenovirus. *Cancer Sci.* 99: 385-390, 2008.
 - 19) Kishimoto H, Kojima T, Watanabe Y, et al: *In vivo* imaging of lymph node metastasis with telomerase-specific replication-selective adenovirus. *Nat Med* 12:1213-1219, 2006.

Telomerase-Specific Oncolytic Virotherapy for Human Cancer with the hTERT Promoter

Toshiyoshi FUJIWARA^{1,2} and Noriaki TANAKA²

¹ Center for Gene and Cell Therapy, Okayama University Hospital, Okayama 700-8558, Japan.

² Division of Surgical Oncology, Department of Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama 700-8558, Japan

Replication-selective tumor-specific viruses present a novel approach for treatment of neoplastic disease. Telomerase activation is considered to be a critical step in carcinogenesis and its activity correlates closely with human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression. We constructed an attenuated adenovirus 5 vector (Telomelysin, OBP-301), in which the hTERT promoter element drives expression of *E1* genes. Telomelysin replicated efficiently and induced marked cell killing in a panel of human cancer cell lines, whereas replication as well as cytotoxicity was highly attenuated in normal human cells lacking telomerase activity. We further modified the E3 region of OBP-301 to contain green fluorescent protein (*GFP*) gene for monitoring viral replication (TelomeScan, OBP-401). When TelomeScan was intratumorally injected into human tumors orthotopically implanted into the rectum in mice, para-aortic lymph node metastasis could be visualized at laparotomy under a three-chip color cooled charged-coupled device camera. This article reviews recent highlights in this rapidly evolving field: cancer therapeutic and cancer diagnostic approaches using the telomerase-specific oncolytic adenoviruses.