



展 TENBO 望

放射線併用ウイルス療法による 食道癌治療



藤原 俊義

Fujiwara Toshiyoshi

(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器外科学)

1 はじめに

世界で約 40 万人以上が亡くなる食道癌は、本邦では毎年 10,000 人以上が罹患する。男性が圧倒的に多く、その頻度は 50 歳代以降、加齢とともに急激に増加し、ピークは 60 歳代で、70 歳以上が 30% 以上と高齢者が多いのが特徴である。食道癌の場合、胸部、腹部、頸部の 3 領域の操作を伴う外科治療は侵襲度が高く、進行症例や併存疾患を有する高齢者では手術困難な場合も多い。また、切除不能症例では 5-FU^{*1} と cisplatin^{*2} (CDDP) を用いた化学療法が標準的に行われるが、手術を上回る成績は得られず、血液毒性、消化器毒性、心肺毒性などの有害事象の出現頻度も高い。術前化学療法に続く外科治療などの集学的治療で一定の治療成績の向上はみられるが、高齢の患者には安全性と有効性を兼ね備えた新たな治療戦略の確立が望まれている。

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、ウイルスをがん細胞のみを殺傷する治療用医薬品として用いることが可能となる¹⁾。岡山大学で開発され、米国にて第 I 相臨床試験を終了したアデノウイルス 5 型を基本骨格とするがん治療用ウイルス製剤 Telomelysin は、標的がん細胞の放射線感受性を増強することが明らかになっている。現在、食道癌を対象に放射線併用 Telomelysin 治療の臨床研究が進んでいる。

2 ヒト悪性腫瘍のテロメララーゼ活性

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、細胞増殖に伴い次第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は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ラーゼの活性化である。テロメララーゼは、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

^{*1} 5-FU (5-フルオロウラシル)：フッ化ピリミジン系代謝拮抗剤抗悪性腫瘍剤。

^{*2} cisplatin (シスプラチン, CDDP)：白金 (プラチナ) 系抗悪性腫瘍剤。

る。テロメラーゼ活性は、その構成成分である *hTERT* (human telomerase reverse transcriptase) 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²⁾。

テロメラーゼは、極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^{3,4)}、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。食道癌においても、約80%でテロメラーゼ活性が検出されている⁵⁾。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* タンパク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。

3 Telomelysin の構造と放射線増感作用

広範ながんを対象とした遺伝子改変抗がんウイルス製剤を開発するために、筆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 (図1)⁶⁾。多くの制限増殖型アデノウイルスが *E1A* 遺伝子のみを選択的プロモーターで制御しているのに比べて、Telomelysin では *E1A* 及び *E1B* をいずれも *hTERT* プロモーターの制御下に置くことで、よりがん細胞での特異性が確保できている。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、膵癌、前立腺癌、子宮頸癌、卵巣癌などのヒト由来各種がん細胞及び肉腫細胞で、

Telomelysin の顕著な抗腫瘍効果が認められた⁶⁻⁸⁾。また、ヌードマウス背部皮下に移植したヒト腫瘍に Telomelysin 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。

放射線照射によって生じた標的がん細胞内の DNA 二重鎖切断部位には、Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) 複合体が集まり、さらに Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) が結合してリン酸化を受けることで活性化される。活性化した ATM は下流のタンパク質をリン酸化してシグナルを伝達し、細胞周期停止などの応答機構を介して DNA 修復を行う⁹⁾。この DNA 修復を抑制することで放射線感受性を増強することが可能である。筆者らは、Telomelysin が ATM のリン酸化を阻害して放射線治療との相乗効果を示すことを明らかにした¹⁰⁾。Telomelysin が感染したがん細胞で発現する *E1B*-55kD タンパク質は、MRN 複合体と結合してその分解を促進し、放射線照射による ATM のリン酸化を抑制する。放射線によって DNA 傷害が起こっても、Telomelysin によりその下流のシグナル伝達が断たれることで細胞周期チェックポイントが機能せず、DNA 修復は阻害されて細胞死につな

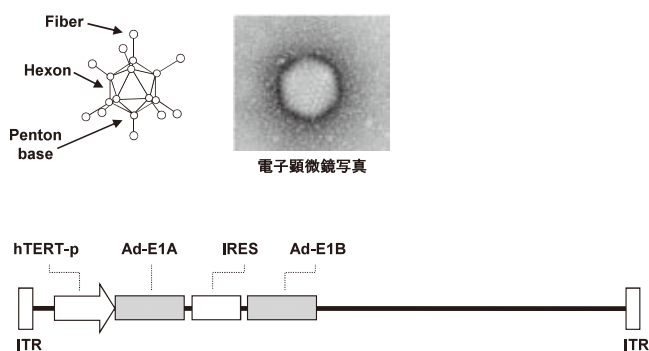


図1 Telomelysin (OBP-301) の構造と概観

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

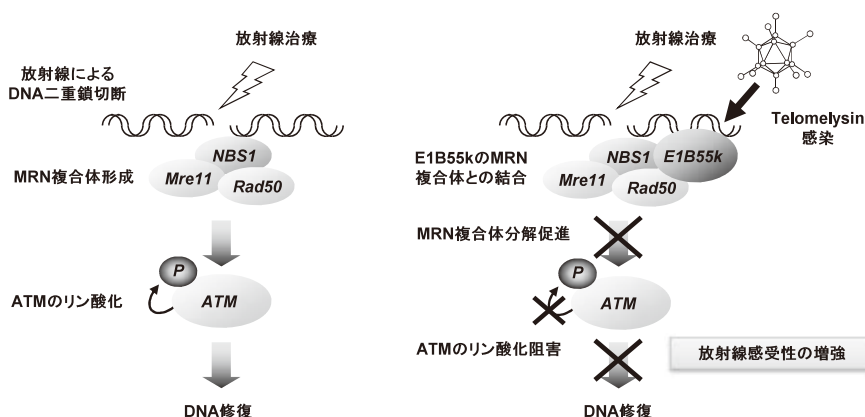


図2 Telomelysin による DNA 傷害修復阻害機構
Telomelysin が産生する E1B-55kDa タンパク質は、MRN 複合体と結合してその分解を促進し、放射線照射による ATM のリン酸化を抑制することで DNA 修復を阻害して放射線感受性を増強する

がるわけである（図2）。DNA 二重鎖切断の指標として γ H2AX タンパク質の発現が知られているが¹¹⁾、放射線照射後に一過性に上昇した γ H2AX レベルは DNA 修復が進むにつれて減弱する。しかし、Telomelysin が感染したがん細胞では γ H2AX の発現は維持され、DNA 傷害の修復が抑制されていることが示唆された。この E1B-55kDa タンパク質による放射線増感作用は Telomelysin に特徴的な機能であり、中国で既に承認されている E1B-55kDa を欠損した腫瘍融解ウイルス Onyx-015 では、MRN 複合体の分解促進や ATM のリン酸化阻害は極めて弱いものであった。

4 海外における Telomelysin の臨床試験

Telomelysin の臨床展開のために、平成 16 年 3 月に岡山大学発研究開発型バイオベンチャーとして、オンコリスバイオファーマが設立された。各種進行固形がんを対象とした臨床プロトコル「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) に企業治験としての Investigational New Drug (IND) 申請を行い、平成 18 年 8 月に承認され患者登録が可能となった。同年 10 月より米国ダラスで開始された試験では、ウイルス量は 10^{10} virus particle (vp) から 10^{12} vp まで 3 コホートで段階的に増量され、16 例の固形腫瘍患者に単回腫瘍内投与し、体内動態は定量的 DNA-PCR 法を用いて測定された。

全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。末梢血中には 16 例中 13 例で投与後 24 時間以内にウイルス DNA が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 Telomelysin の増殖が示唆された。1 例で投与部位の部分奏功 (partial response ; PR) が得られ、7 例では腫瘍サイズの縮小を伴う投与後 56 日間の不変 (stable disease ; SD) が認められた¹²⁾。さらに、コホート 4 として、6 例に Telomelysin を週 1 回、5 週間にわたり腫瘍内投与する反復投与が試みられ、その安全性が

確認された。

米国 IND 承認データに基づいて、肝臓癌に対する Telomelysin 単独投与のプロトコールが作成され、台湾医薬品査驗中心 (Center for Drug Evaluation ; CDE) で承認された。現在、台湾、韓国において、Sorafenib を含む既存治療に抵抗性の肝細胞癌を対象に、Telomelysin を単回腫瘍内投与する用量逐次増量の第 I / II 相臨床試験が進行中である。現在、中用量までの安全性が確認され、最高用量群の患者登録が行われている。

5 本邦における食道癌の放射線併用 Telomelysin 療法の臨床研究

ヒト食道癌細胞に対して、Telomelysin と放射線は前述の分子機構に基づいて *in vitro* で相乗的に作用し、*in vivo* においてもヌードマウスに移植した背部腫瘍への Telomelysin の腫瘍内投与と局所放射線照射で相乗効果が認められた。また、ヌードマウスのヒト食道癌同所性モデルにおいて、Telomelysin の腫瘍内投与と放射線治療の併用は、非侵襲的体外イメージングシステム (IVIS) による経時的評価で極めて強

力な抗腫瘍活性を示した^{11,15)}。さらに、同所性ヒト直腸癌、頭頸部癌モデルでは、腫瘍局所に投与されたウイルスは所属リンパ節領域に拡散して微小リンパ節転移で増殖することが明らかになっており^{8,16-18)}、Telomelysin と放射線治療の治療域は臨床的にもオーバーラップすると考えられる。

遺伝子治療臨床研究プロトコール「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臨床研究」は、岡山大学病院の遺伝子治療臨床研究審査委員会での審議の後、厚生労働省科学技術部に提出され、平成 24 年 8 月 23 日、厚生労働大臣よりその実施が承認された。米国の第 I 相臨床試験で使用された Good Manufacturing Practice (GMP) 規格の Telomelysin の臨床ロットを輸入し、平成 25 年 11 月 29 日より第 1 例目の治療を開始している。

この用量逐次増量の医師主導臨床研究は、標準的な外科治療や化学療法が受けられない併存疾患を有する食道癌患者などを対象に、Telomelysin の内視鏡的投与と放射線治療を併用し、その安全性と臨床的な有効性を評価する。第 1 日目、第 18 日目、第 32 日目に

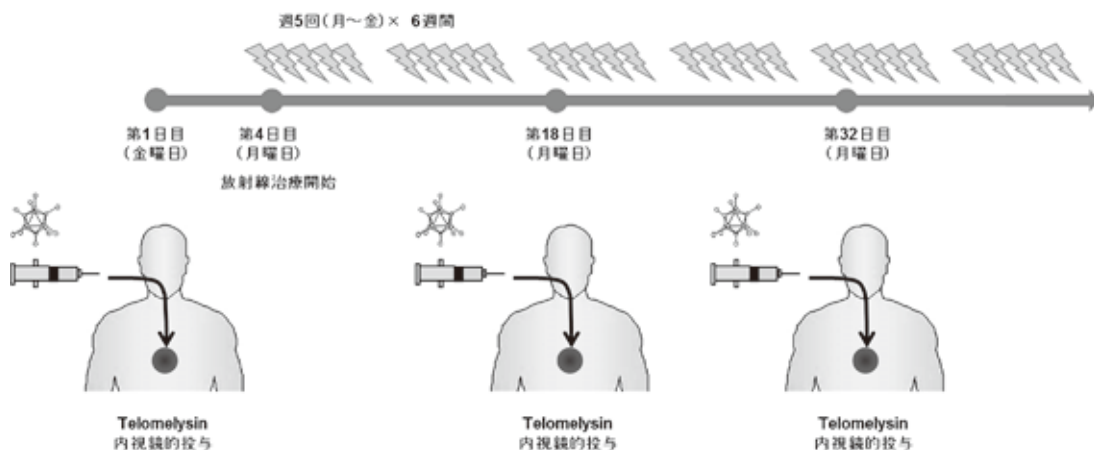


図3 食道癌に対する放射線併用 Telomelysin 療法の臨床研究
第 1 日目、第 18 日目、第 32 日目に Telomelysin の内視鏡的腫瘍内投与を行い、
第 4 日目から 2 Gy/日、週 5 回、6 週間の計 60 Gy の放射線治療を行う

Telomelysin の腫瘍内投与を行い、第4日目から2 Gy/日、週5回、6週間の放射線治療を行う(図3)。低用量治療群(レベル1; 10^{10} vp)として、53~92歳の食道癌患者7例が登録され、増悪(progression disease; PD)のため脱落となった1例を除き6例が治療を完遂している。有害事象としては、発熱、食道炎、放射線肺臓炎、白血球減少などが40%以上でみられ、リンパ球減少は全例に認められたが無症候性であった。治療完遂した6例の治療効果はCR 4例、PR 1例、SD 1例であった。今後、中用量治療群(レベル2; 10^{11} vp)へと進めていく予定である。

6 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、従来の抗がん剤とは全く異なる作用機序に基づく治療戦略であり、その耐性機構を克服することができるという利点がある。放射線との相乗効果の分子機構を理論的根拠として、また所属リンパ節への拡散など生体内分布の情報などからも、Telomelysin では放射線治療との併用による臨床的な抗腫瘍効果の増強が期待できる。今後、更に臨床研究、医師主導治験、及び企業治験などが進むことで、テロメラーゼ活性を標的とした新しいウイルス製剤 Telomelysin の有効性が確認され、様々な難治がん治療に広く使用されるようになることを切望する。

参考文献

- 1) Russell, S.J., Peng, K.W., and Bell, J.C., *Nat Biotechnol*, **30**, 658–670 (2012)
- 2) Nakayama, J., Tahara, H., Tahara, E., *et al.*, *Nat Genet*, **18**, 65–68 (1998)
- 3) Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., *et al.*, *Science*, **266**, 2011–2015 (1994)
- 4) Shay, J.W., and Bacchetti, S.A., *Eur J Cancer*, **33**, 787–791 (1997)
- 5) Mitsui, A., Kuwabara, Y., Iwase, H., *et al.*, *J Surg Oncol*, **79**, 37–45 (2002)
- 6) Kawashima, T., Kagawa, S., Kobayashi, N., *et al.*, *Clin Cancer Res*, **10**, 285–292 (2004)
- 7) Hashimoto, Y., Yatanabe, Y., Shirakiya, Y., *et al.*, *Cancer Sci*, **99**, 385–390 (2008)
- 8) Kurihara, Y., Watanabe, Y., Onimatsu, H., *et al.*, *Clin Cancer Res*, **15**, 2335–2343 (2009)
- 9) Carson, C.T., Schwartz, R.A., Stracker, T.H., *et al.*, *EMBO J*, **22**, 6610–6620 (2003)
- 10) Kuroda, S., Fujiwara, T., Shirakawa, Y., *et al.*, *Cancer Res*, **70**, 9339–9348 (2010)
- 11) Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., *et al.*, *Nucleic Acids Res*, **36**, 5678–5694 (2008)
- 12) Nemunaitis, J., Tong, A.W., Nemunaitis, M., *et al.*, *Mol Ther*, **18**, 429–434 (2010)
- 13) Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., *et al.*, *Nature*, **414**, 105–111 (2001)
- 14) Yano, S., Tazawa, H., Hashimoto, Y., *et al.*, *Clin Cancer Res*, **19**, 6495–6505 (2013)
- 15) Kuroda, S., Kubota, T., Aoyama, K., *et al.*, *PLoS One*, **9**, e114562 (2014)
- 16) Kishimoto, H., Kojima, T., Watanabe, Y., *et al.*, *Nat Med*, **12**, 1213–1219 (2006)
- 17) Kojima, T., Watanabe, Y., Hashimoto, Y., *et al.*, *Ann Surg*, **251**, 1079–1086 (2010)
- 18) Kikuchi, S., Kishimoto, H., Tazawa, H., *et al.*, *Mol Ther*, **23**, 501–509 (2015)