

テロメラーゼ依存的腫瘍融解アデノウイルス製剤による放射線感受性増強作用

黒田新士^{a*}, 藤原俊哉^a, 白川靖博^a, 山崎泰源^a, 矢野修也^a, 宇野太^a, 田澤大^b, 橋本悠里^a, 渡辺雄一^{a,c}, 野間和広^a, 浦田泰生^c, 香川俊輔^a, 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株式会社

キーワード: アデノウイルス, E1B55kDa, MRN 複合体, DNA修復, 放射線感受性

Radiosensitization by telomerase-dependent oncolytic adenovirus

Shinji Kuroda^{a*}, Toshiya Fujiwara^a, Yasuhiro Shirakawa^a, Yasumoto Yamasaki^a, Syuya Yano^a, Futoshi Uno^a, Hiroshi Tazawa^b, Yuuri Hashimoto^a, Yuichi Watanabe^{a,c}, Kazuhiro Noma^a, Yasuo Urata^c, Shunsuke Kagawa^a, Toshiyoshi Fujiwara^{a,b}

^aDepartment of Gastroenterological Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, ^bCenter for Gene and Cell Therapy, Okayama University Hospital, ^cOncolys BioPharma Inc.

要 約

DNA 修復機能阻害は放射線感受性を増強させるため、DNA 修復に関与する因子の阻害剤は放射線増感剤となり得る。我々の開発したテロメラーゼ依存的腫瘍融解アデノウイルス製剤 OBP-301 (テロメライシン) は、アデノウイルス E1B55kDa タンパクを介して細胞の DNA 修復に重要な役割を果たす MRN 複合体 (Mre11, Rad50, NBS1) を分解する機能を有する。この MRN 複合体の分解により ATM (ataxia-telangiectasia mutated) の活性化が抑制され結果的に

DNA 修復機構が阻害される。我々は OBP-301 と放射線との併用が強力な相乗効果を生み出すことをマウスの皮下腫瘍モデルおよび食道癌同所性モデルにおいて証明した。これらの結果は OBP-301 が将来有望な放射線増感剤となり得ることだけでなく、E1B55kDa タンパクを産生する腫瘍融解アデノウイルス製剤と放射線との併用が悪性腫瘍に対する有力な治療戦略となり得ることを示す。

はじめに

放射線療法は現在進行癌に対する治療法のひとつであり、外科的切除や化学療法との併用など集学的治療の一部として使用されることも多い。各種固形癌が治療の対象となり、原発巣のみならず領域リンパ節への転移層が照射範囲に含まれることもあり、また再発・遠隔転移巣に対しても腫瘍縮小による症状の緩和を目

平成23年4月受理

*〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話: 086-235-7257 FAX: 086-221-8775

E-mail: shinkuro327@yahoo.co.jp

プロフィール



黒田新士

昭和52年3月27日生

平成14年3月 岡山大学医学部医学科 卒業

平成23年3月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程修了

平成14年5月 岡山大学医学部附属病院 医員 (研修医)

平成14年8月 広島市立広島市民病院 外科研修医

平成16年4月 岩国医療センター 外科研修医

平成17年4月 岩国医療センター 外科医員

平成21年4月 M.D. Anderson Cancer Center, University of Texas Research Fellow

現在に至る

的とした姑息的治療のために用いられるなど、多方面において使用されている。しかし、腫瘍組織だけでなく周囲の正常組織にも同様に照射範囲が及ぶため、局所に強い副作用を生じる可能性がある。その改善策として放射線定位照射や多分割照射などの技術改良が進められており、より効果的で副作用の少ない照射方法が開発されてきている。また、腫瘍細胞の放射線感受性を増強する薬剤の開発も進んでおり、いくつかは現在臨床試験段階にある^{1,2)}。

放射線はDNA二重鎖を標的としており、二重鎖切断の増加あるいはその修復阻害により放射線感受性の増強が得られる。

ATM (ataxia-telangiectasia mutated) は、DNA修復や細胞周期チェックポイントに重要な役割を果たすタンパクであるため、ATMの機能欠失のある細胞は放射線感受性を示すことが報告されている³⁾。またMRN複合体 (Mre11, Rad50, NBS1) は、DNA二重鎖切断により速やかに誘導されその後ATMの活性化を促すため、DNA傷害反応における重要なセンサーの役割を果たすと考えられている⁴⁾。つまり、ATMシグナル経路やMRN複合体は放射線感受性増強のための重要な標的となり、実際KU55933やCGK733などのATM阻害剤、mirinなどのMRN複合体阻害剤はDNA傷害を誘導する治療に対する感受性を増強することが報告されている^{5,6)}。

OBP-301とE1B55kDaタンパク

我々は以前、テロメラーゼ依存的腫瘍融解アデノウイルス製剤OBP-301 (テロメライシン)を開発し、種々の固形癌に対する有効性を検証してきた⁷⁻¹⁰⁾。OBP-301は、多くの腫瘍細胞内で活性が上昇しているhTERT (human telomerase reverse transcriptase) プロモーターによりウイルスの増殖に必要なE1遺伝子 (E1AおよびE1B)の発現をコントロールすることで、腫瘍細胞内でのみ特異的に増殖し細胞死を引き起こすよう設計されたウイルス製剤である (図1)。アデノウイルスE1B遺伝子はE1B19kDaおよびE1B55kDaタンパクを産生する。E1B55kDaタンパクはアデノウイルスE4orf6タンパクと協調して、ウイルスのタンパク合成に至適な細胞内環境を構築するように働くことが報告されている^{11,12)}。その作用のひとつがMRN複合体の分解であり、これはDNAウイルスであるアデノウイルス同士の連結が細胞内で起こるの

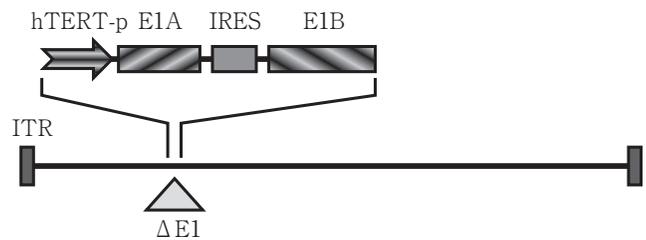


図1 OBP-301のDNA構造

OBP-301はE1領域に改変を加えhTERTプロモーターによりIRESで連結したE1AおよびE1B遺伝子の発現を制御するように組み換えられている。

を回避するための自己防衛機能のひとつと考えられている^{11,13-15)}。

OBP-301の放射線感受性増強作用

今回我々はOBP-301によるE1B55kDaタンパクを介したMRN複合体の分解が、細胞のDNA修復阻害を誘導し放射線感受性を増強させることを証明した¹⁶⁾。

1. 細胞増殖抑制試験およびアポトーシス試験

ヒト非小細胞肺癌細胞株 (A549)、ヒト食道扁平上皮癌細胞株 (TE8) およびヒト食道腺癌細胞株 (SEG1) に対し、まずOBP-301の治療を行い24時間後に放射線照射を行ったところ、すべての細胞株においてOBP-301の前治療は放射線の細胞障害効果を増強し、両者の併用がいずれの細胞株においても強い相乗効果を有することが示された (図2A)。また併用群において、治療5日後に活性型caspase-3と断片化PARPの有意な増加を認め、OBP-301が放射線照射によるアポトーシスの誘導を増強していることが示唆された (図2B, C)。

2. メカニズム

OBP-301投与24時間後よりE1B55kDaタンパクの発現が増強するにつれ、MRN複合体 (Mre11, Rad50, NBS1) の発現が経時的に減弱していった (図3A)。そこで、OBP-301感染24時間後に放射線照射を行いATMリン酸化の程度を比較すると、放射線単独群と比べOBP-301と放射線との併用群では著明にATMのリン酸化が抑制されていた。E1B遺伝子を欠失させた制限増殖型アデノウイルス製剤dl1520と放射線との併用でも放射線単独群と比べATMリン酸化が抑えられていたものの、その程度はOBP-301と放射線との併用ほどではなかった (図3B)。このOBP-301とdl1520との比較により、E1B55kDaタンパクの存在が

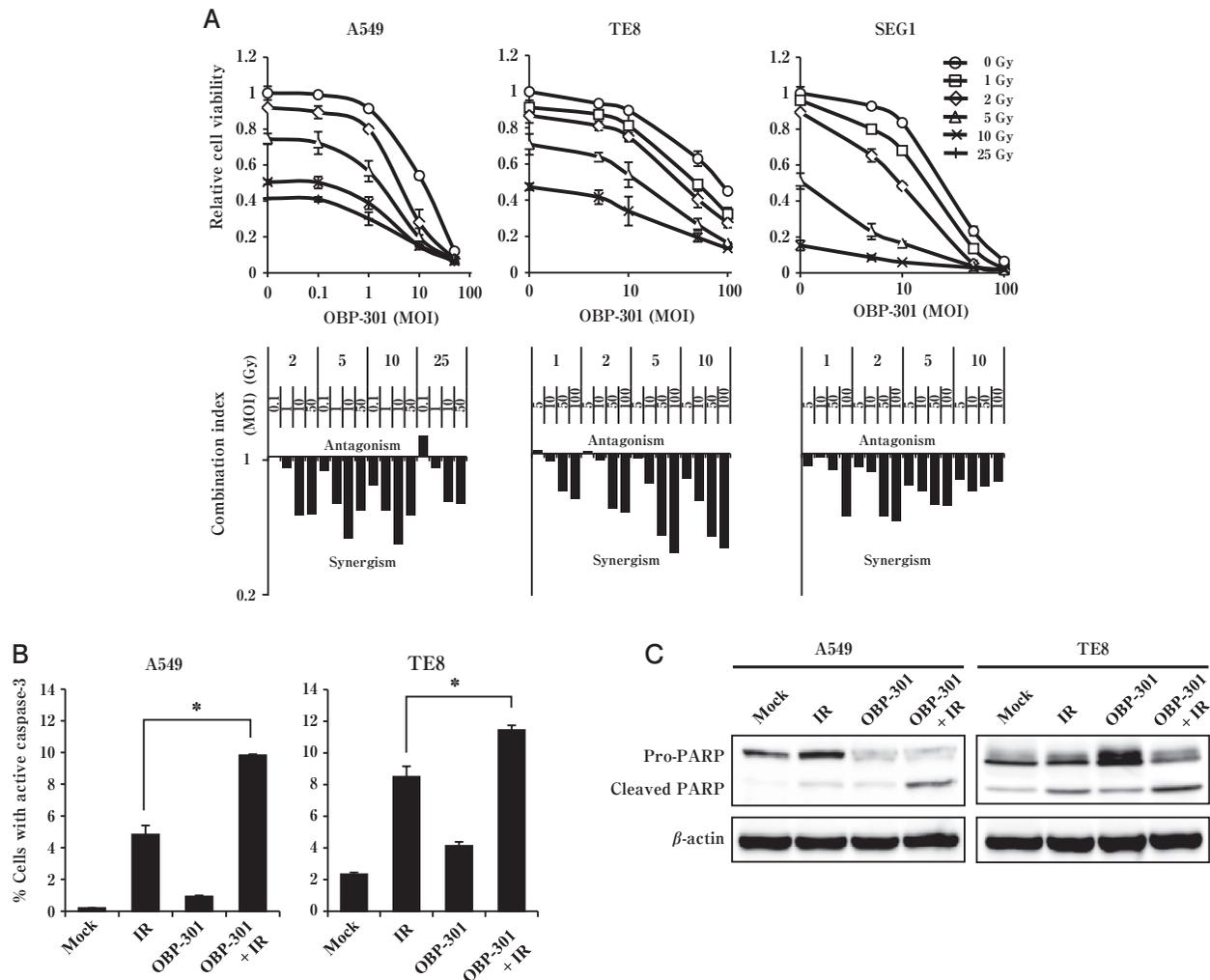


図2 ヒト癌細胞株に対する OBP-301 の放射線感受性増強作用

(A) A549, TE8 および SEG1 細胞に対し OBP-301 感染 24 時間後に放射線照射を行い、照射 5 日後に XTT アッセイにて細胞障害活性を測定した (上段)。CalcuSyn ソフトウェアを用い combination index (CI) を計算した (下段)。CI < 1, > 1 はそれぞれ相乗, 阻害効果を示す。(B, C) A549 と TE8 細胞に対し OBP-301 を 1MOI で感染させ 24 時間後に放射線照射 10Gy を行い、照射 5 日後に細胞を回収しフローサイトメトリーにて active caspase-3 (B) を、ウェスタンブロッティングにて PARP (C) を測定した。*: p < 0.01。

(文献 16 より改変して引用)

ATM 活性化抑制に重要な働きをしていることが確認された。次に DNA 傷害の指標として γ H2AX を用いて OBP-301 の DNA 修復機能に及ぼす影響を検討したところ、放射線単独では照射 3 時間後に 64% の細胞で DNA 傷害が修復されていたのに対し、OBP-301 との併用群ではその割合が 19% にまで抑制されていた (図 3 C, D)。以上のことから、OBP-301 感染細胞ではアデノウイルス E1B55kDa タンパクを介して MRN 複合体の分解誘導が起こり、それにより DNA 修復および細胞周期チェックポイントに重要な役割を果たす ATM シグナル経路が抑制され、結果的に細胞の DNA 修復機構が阻害されるため放射線照射による DNA 傷害が

正常に修復されず、より多くの細胞がアポトーシスへと誘導されるため放射線感受性増強がもたらされることが証明された。

3. マウス移植腫瘍モデル (皮下および同所性)

マウスに A549, TE8 および SEG1 の背部皮下移植腫瘍を作製し、OBP-301 腫瘍内投与と放射線照射を 3 回繰り返したところ (A549 に対しては 2 日毎, TE8 と SEG1 に対しては 1 週毎)、いずれの腫瘍においても併用群で著名な抗腫瘍効果を認めた (図 4 A)。またより進行した腫瘍への効果を検討するため、TE8 皮下腫瘍が前治療実験の約 10 倍の腫瘍体積となった時点で治療を開始し計 9 回繰り返したところ (2 日毎に週 3 回を

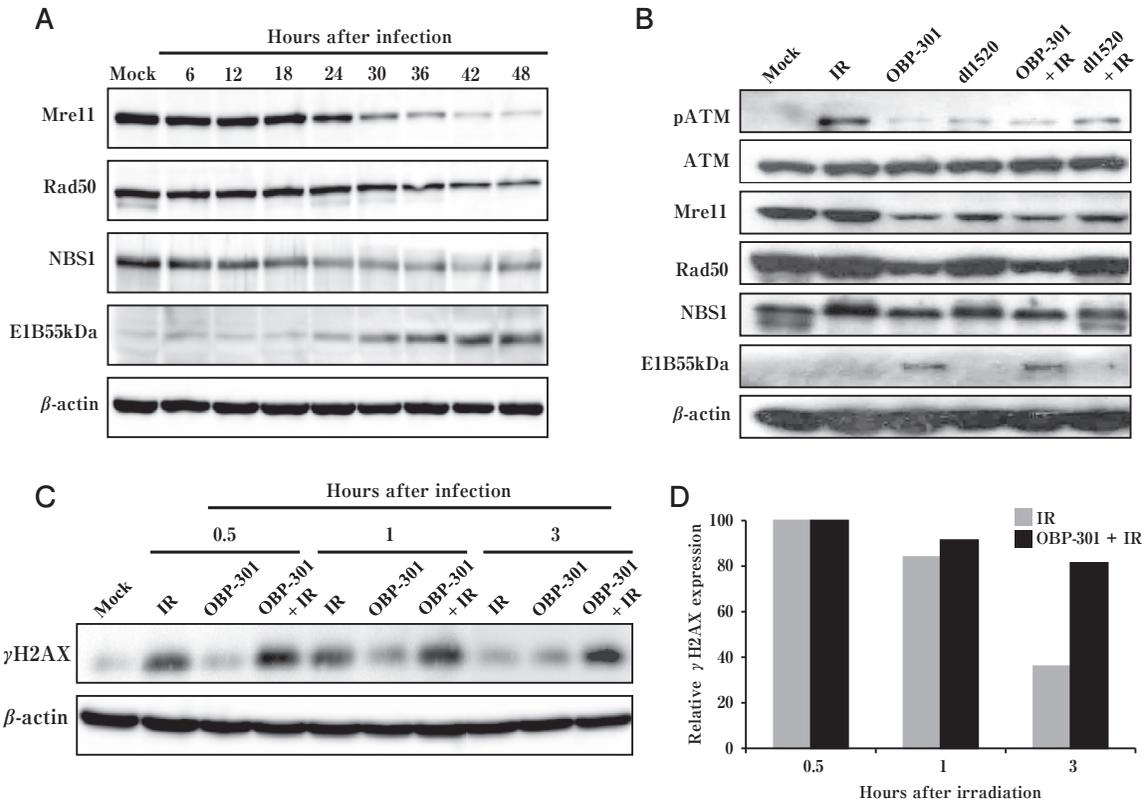


図3 OBP-301の放射線感受性増強メカニズム

(A) A549細胞にOBP-301を10MOIで感染させ細胞を回収した後、ウェスタンブロットングにてMre11, Rad50, NBS1およびE1B55kDaタンパク発現の推移を経時的に観察した。(B) A549細胞にOBP-301およびdl1520を10MOIで感染させ、24時間後に放射線照射10Gyを行い、照射30分後に細胞を回収し、ウェスタンブロットングにてpATM, ATM, Mre11, Rad50, NBS1およびE1B55kDaタンパクの検出を行った。(C) A549細胞にOBP-301を10MOIで感染させ24時間後に放射線照射10Gyを行い、照射0.5, 1, 3時間後に細胞を回収しウェスタンブロットングにて γ H2AXタンパク発現の推移を観察した。(D) CのウェスタンブロットングをもとにImage Jソフトウェアにて γ H2AXタンパクの発現強度を定量化し、30分での γ H2AXタンパク発現強度を100とした時のそれに対する各時間(1および3時間)における発現強度の割合を示した。(文献16より改変して引用)

3週), OBP-301と放射線との併用により10匹中9匹で腫瘍が根治された(図4B). 投与量増加に伴い治療期間中は一時的に体重減少を認めたが(コントロール群と有意差なし), 治療後体重の回復がコントロール群と比べ有意に良好であった. 最後に, ルシフェラーゼ遺伝子を導入したTE8 (TE8-Luc) 細胞を用いてマウスの腹部食道に食道癌同所性腫瘍を作製し(図4C), OBP-301腫瘍内投与と放射線照射との併用効果を検討したところ, 同所性モデルにおいても併用群において有意な抗腫瘍効果を認めた(図4D, E).

OBP-301と放射線の併用療法に対する期待と展望

これまでOBP-301が放射線照射による細胞障害活性を増強させることを述べてきたが, 我々は同時に放射線照射がOBP-301の細胞障害活性を増強させることも証明した¹⁶⁾. これは放射線照射が, アデノウイルス

の細胞内への取り込みに重要な働きをする細胞表面のCAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) 発現を増強させることでOBP-301の細胞内への取り込みが増えるためにもたらされる効果と考えられた. つまりOBP-301と放射線は相互に効果を高め合う関係にあり, 治療回数が増えるほどより強い相乗効果を期待できる. 実際, 図4BのTE8巨大皮下腫瘍モデルにて治療回数を9回に増やしたところ, 10匹中9匹において根治が可能であった. この事実は通常繰り返し治療の行われる実際の臨床において, OBP-301と放射線が非常に魅力的な組み合わせであることを証明している.

OBP-301と放射線療法との併用の利点は他の点からも上げることができる. ひとつは, 局所投与されたOBP-301はリンパ流を介し領域リンパ節内にも到達するため, 転移リンパ節においても放射線との相乗効果が期待できる¹⁷⁻¹⁹⁾. 二つ目に, 放射線照射は腫瘍組織

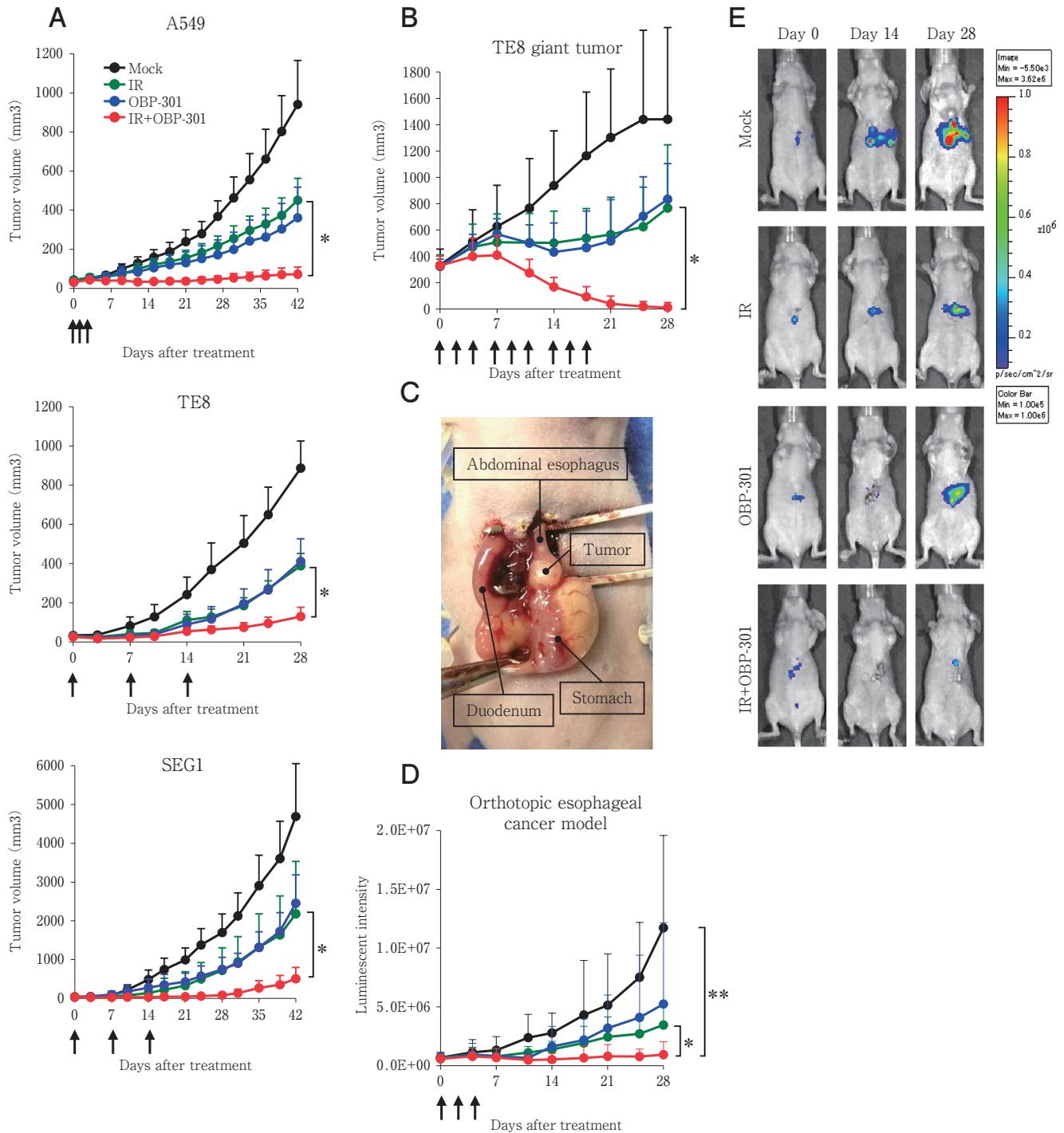


図4 マウス移植腫瘍に対する OBP-301と放射線との併用効果

(A) A549, TE8およびSEG1細胞 (200万) をBALB/cヌードマウスの背部皮下に移植し、腫瘍径が3~5mmとなった時点で放射線照射 (A549に対しては3Gy, TE8およびSEG1に対しては2Gy) および OBP-301腫瘍内投与 (1.0×10^8 PFU/回) を3回 (A549に対しては2日毎, TE8およびSEG1に対しては1週毎) 行った (各群6~8匹). 週2回腫瘍径測定を行い、腫瘍体積 \pm SDとして腫瘍増殖曲線を描いた. 矢印は治療のタイミングを示す. *: $p < 0.01$. (B) TE8皮下腫瘍径が8~10mm (腫瘍体積量はAの約10倍) となった時点で放射線照射 (2Gy) および OBP-301腫瘍内投与 (1.0×10^8 PFU/回) を2日毎に週3回を3週間 (計9回) 行った (各群10匹). *: $p < 0.01$. (C) TE8-Luc細胞 (200万) をマウスの腹部食道に移植後3週間での肉眼所見. (D) TE8-Lucマウス同所性食道癌に対し放射線照射 (2Gy) および OBP-301腫瘍内投与 (1.0×10^8 PFU/回) を2日毎に計3回行った (各群5匹). 治療評価はIVISにより得られたイメージから腹部食道周囲の発光強度を計測して行った. *: $p < 0.01$, **: $p < 0.05$. (E) 治療0, 14および28日における各治療群のIVISイメージ. (文献16より改変して引用)

の血管上皮を傷害し血管を閉塞させるため、局所投与されたOBP-301の体循環への漏出を抑えるかもしれない²⁰⁾。また、放射線抵抗性の低酸素組織においてもOBP-301はhTERTプロモーターの特性からその効果を維持できることが期待されている²¹⁾。さらに、OBP-301は宿主免疫系を刺激し、インターフェロン γ などの抗新生血管阻害因子の産生を促すことも確認されている²²⁾。

OBP-301は近年アメリカにて各種進行固形癌を対象として第I相臨床試験を終了し、その体内動態および人体における安全性が確認された。この第I相臨床試験の結果と上述した基礎データをもとに、岡山大学にて“進行頭頸部・食道癌に対するOBP-301と放射線との併用”の臨床研究が計画された。現在、厚生労働省にて審議中であり、OBP-301付加による患者生存率の向上または患者QOLの向上が期待されている。OBP-301はhTERTプロモーターによりその増殖をコントロールされているため各種固形癌に対しその効果を期待でき、臓器別治療のカテゴリーにとらわれず使用することが可能である。ただ、アデノウイルス製剤である以上その使用は現時点では局所投与に限られており、今後、遠隔転移を有する症例もターゲットとするためには全身投与が可能なベクター開発が必要となるかもしれない。

おわりに

我々の開発したテロメラーゼ依存的腫瘍融解アデノウイルス製剤OBP-301は、E1B55kDaタンパクのMRN複合体分解作用を介して細胞のDNA修復機構を阻害することで放射線の細胞障害活性を増強させることが証明され、OBP-301が将来有望な放射線増感剤となり得ることが示された。さらにOBP-301と放射線照射は相互に効果を高め合う理想的な組み合わせであり、マウスでの皮下腫瘍および同所性モデルにおいてその併用の有効性が立証された。またこの放射線感受性増強作用はOBP-301のみならずE1B55kDaタンパクを産生する腫瘍融解アデノウイルス製剤全般に適応される可能性があり、アデノウイルス療法の臨床応用に向けてのひとつの糸口になるかもしれない。

文 献

1) Bentzen SM, Harari PM, Bernier J: Exploitable mechanisms for combining drugs with radiation:

concepts, achievements and future directions. *Nat Clin Pract Oncol* (2007) 4, 172-180.

- 2) Hoskin P, Rojas A, Saunders M: Accelerated radiotherapy, carbogen, and nicotinamide (ARCON) in the treatment of advanced bladder cancer: mature results of a Phase II nonrandomized study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2009) 73, 1425-1431.
- 3) Shiloh Y: Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annu Rev Genet* (1997) 31, 635-662.
- 4) D'Amours D, Jackson SP: The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2002) 3, 317-327.
- 5) Crescenzi E, Palumbo G, de Boer J, Brady HJ: Ataxia telangiectasia mutated and p21CIP1 modulate cell survival of drug-induced senescent tumor cells: implications for chemotherapy. *Clin Cancer Res* (2008) 14, 1877-1887.
- 6) Dupré A, Boyer-Chatenet L, Sattler RM, Modi AP, Lee JH, Nicolette ML, Kopelovich L, Jasin M, Baer R, Paull TT, Gautier J: A forward chemical genetic screen reveals an inhibitor of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat Chem Biol* (2008) 4, 119-125.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Taki M, Kagawa S, Nishizaki M, Mizuguchi H, Hayakawa T, Kyo S, Nagai K, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T: Enhanced oncolysis by a tropism-modified telomerase-specific replication-selective adenoviral agent OBP-405 ('Telomelysin-RGD'). *Oncogene* (2005) 24, 3130-3140.
- 10) 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. *Cancer Sci* (2008) 99, 385-390.
- 11) Stracker TH, Carson CT, Weitzman MD: Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-NBS1 DNA repair complex. *Nature* (2002) 418, 348-352.
- 12) Blackford AN, Grand RJ: Adenovirus E1B 55-kilodalton protein: multiple roles in viral infection and cell transformation. *J Virol* (2009) 83, 4000-4012.
- 13) Carson CT, Schwartz RA, Stracker TH, Lilley CE, Lee DV, Weitzman MD: The Mre11 complex is required for

- ATM activation and the G2/M checkpoint. *EMBO J* (2003) 22, 6610–6620.
- 14) Querido E, Marcellus RC, Lai A, Charbonneau R, Teodoro JG, Ketner G, Branton PE : Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. *J Virol* (1997) 71, 3788–3798.
 - 15) Schwartz RA, Lakdawala SS, Eshleman HD, Russell MR, Carson CT, Weitzman MD : Distinct requirements of adenovirus E1b55K protein for degradation of cellular substrates. *J Virol* (2008) 82, 9043–9055.
 - 16) Kuroda S, Fujiwara T, Shirakawa Y, Yamasaki Y, Yano S, Uno F, Tazawa H, Hashimoto Y, Watanabe Y, Noma K, Urata Y, Kagawa S, et al. : Telomerase-dependent oncolytic adenovirus sensitizes human cancer cells to ionizing radiation via inhibition of DNA repair machinery. *Cancer Res* (2010) 70, 9339–9348.
 - 17) 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.
 - 18) Kurihara Y, Watanabe Y, Onimatsu H, Kojima T, Shiota T, Hatori M, Liu D, Kyo S, Mizuguchi H, Urata Y, Shintani S, Fujiwara T : Telomerase-specific virotheranostics for human head and neck cancer. *Clin Cancer Res* (2009) 15, 2335–2343.
 - 19) 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.
 - 20) Tsai JH, Makonnen S, Feldman M, Sehgal CM, Maity A, Lee WM : Ionizing radiation inhibits tumor neovascularization by inducing ineffective angiogenesis. *Cancer Biol Ther* (2005) 4, 1395–1400.
 - 21) Nishi H, Nakada T, Kyo S, Inoue M, Shay JW, Isaka K : Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT). *Mol Cell Biol* (2004) 24, 6076–6083.
 - 22) Ikeda Y, Kojima T, Kuroda S, Endo Y, Sakai R, Hioki M, Kishimoto H, Uno F, Kagawa S, Watanabe Y, Hashimoto Y, Urata Y, et al. : A novel antiangiogenic effect for telomerase-specific virotherapy through host immune system. *J Immunol* (2009) 182, 1763–1769.