

hTERTプロモーターを使用した制限増殖型アデノウイルスによる肺癌および各種固形癌に対する治療の基礎研究

内野, 順治
九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設

高山, 浩一
アラバマ大学バーミンガム校遺伝子治療センター | 九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設

原田, 聡子
九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設

川上, 洋介
アラバマ大学バーミンガム校遺伝子治療センター

他

<https://doi.org/10.15017/16780>

出版情報：福岡医学雑誌. 100 (11), pp.338-348, 2009-11-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：



原 著

hTERT プロモーターを使用した制限増殖型アデノウイルス
による肺癌および各種固形癌に対する治療の基礎研究¹⁾九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設²⁾アラバマ大学バーミンガム校遺伝子治療センター内野 順治¹⁾, 高山 浩一¹⁾²⁾, 原田 聡子¹⁾, 川上 洋介²⁾,
井上 博之¹⁾, David T. Curiel²⁾, 中西 洋一¹⁾hTERT Promoter-based Conditionally Replicative
Adenoviruses are Useful for Lung Cancer and
Other Solid Cancer TreatmentJunji UCHINO¹⁾, Koichi TAKAYAMA¹⁾²⁾, Akiko HARADA¹⁾, Yosuke KAWAKAMI²⁾,
Hiroyuki INOUE¹⁾, David T. Curiel²⁾ and Yoichi NAKANISHI¹⁾¹⁾*Research Institute for Diseases of the Chest, Graduate School of Medical Sciences,
Kyushu University, Maidashi 3-1-1, Fukuoka 812-8582, Japan.*²⁾*Division of Human Gene Therapy, Departments of Medicine, Pathology and Surgery,
and the Gene Therapy Center, The University of Alabama at Birmingham,
Birmingham, Alabama 35294-2172*

Abstract Treatment of advanced SCLC remains one of the major challenges in current medicine because of the high morbidity and mortality of the disease. Advanced stage lung cancer is refractory to conventional therapies and it also has an extremely poor prognosis. As a result, new therapeutic approaches are needed. Telomere maintenance to the regulation of replicative life span strongly implies that alterations in telomere biology play an important role during malignant transformation. Cancers that exhibit high levels of telomerase activity, such as all of the small-cell lung cancers were examined in a previous study. In this study, we turned the expression of hTERT by tumors to a therapeutic advantage using a conditionally replication-competent adenovirus (CRAd) in which the expression of E1 is controlled by the hTERT promoter. This virus achieved good levels of viral replication in SCLC cells and induced a substantial anti-cancer effect in vitro and in vivo. As a further enhancement the cancer cell killing effect was improved with a tropism modification of the virus to express the knob domain of Ad3, and this improved infectivity for cancer cells. Conversely, the hTERT promoter has low activity in normal tissues, and the CRAd caused no damage to normal lung fibroblast cells. Since the telomerase activity is common in many types of cancers, these CRAds may be applicable to a wide range of tumors. We concluded that the use of hTERT promoter-based CRAds may be a potentially effective strategy for cancer treatment.

Key words : hTERT, replicative adenovirus, telomerase, chimeric vector

は じ め に

テロメアは真核生物染色体の終末に存在する核

酸と蛋白質の複合体で、その機能は染色体末端を
識別し複製を容易にすることである¹⁾。テロメア
DNAの末端構造の配列は有機体によって異なる

が、哺乳動物細胞では5'-TTAGGG-3'のようにグアニンに富んだ短い反復配列を持つ²⁾³⁾。またテロメアは広汎に発現しているRNAサブユニット[Telomerase RNA成分(TERC)]とタンパク質触媒サブユニットであるhuman Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT)で構成されるリボ核タンパク質テロメラーゼと呼ばれる逆転写酵素によって維持されている⁴⁾。

テロメアの維持は、細胞の癌化において重要な役割を果たしており、実際に多くの腫瘍組織でテロメラーゼの活性が検出されているが⁵⁾⁶⁾、正常ヒト細胞株ではほとんど活性はみられない⁷⁾。さらにテロメラーゼ活性は広く乳癌、前立腺癌、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、大腸癌などの癌種で検出されるが⁶⁾⁸⁾、小細胞肺癌(Small Cell Lung Cancer; SCLC)ではテロメラーゼ活性が非常に高値を示すことが知られている⁹⁾。本研究ではテロメラーゼ活性を制御しているhTERTプロモーターを利用した制限増殖型アデノウイルスの作成を試みた。

制限増殖型アデノウイルス(Conditionally Replicative Adenovirus; CRAd)は新規の癌治療ツールとして開発されたウイルスであり、作用機序はウイルスゲノムの増幅に必須のE1A遺伝子を腫瘍特異的プロモーターで制御することにより腫瘍細胞内でのみウイルスの増殖を可能にしている。現在多種の腫瘍特異的プロモーターを用いたCRAdが開発され、一部の癌種では臨床試験が進行している^{10)~12)}。

従来のアデノウイルスベクターはウイルスゲノムを内包するCapsidとして血清型5型のアデノウイルスを使用してきたため、その感染効率は細胞側の受容体であるCAR(Coxsackie and Adenovirus Receptor)の発現量と密接に関連すると考えられている^{13)~15)}。ところがCARの発現は癌種によっては低下しており、そのような細胞ではウイルスの感染性も相対的に低下することが報告されている^{16)~18)}。このような5型アデノウイルスのCAR依存的感染性を変化させるために種々の変異型アデノウイルスが考案された。5/3型キメラウイルスはそのひとつで、5型ウイルスファイバー先端のノブ領域を3型に置換しており、CARの発現レベルとは関係なく癌細胞に効率よく感染することが知られている¹⁹⁾。今回の研究

ではこのキメラウイルスを基にhTERT-CRAdを作成し(Ad5/3hTERTE1: hTERTプロモーターによってE1蛋白の発現をコントロールし、制限増殖を実現している5/3型キメラアデノウイルス)、SCLC細胞株をはじめその他の癌種に対するAd5/3hTERTE1の抗腫瘍効果を検討した。

実験方法

培養細胞

NCI-N417(小細胞肺癌)、NCI-H1299(非小細胞肺癌)、HEK-293(ウイルス作成用細胞)、SKOV-3(卵巣癌)、DLD-1(大腸癌)、はATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA)から購入した。SBC1(小細胞肺癌)、SBC3(小細胞肺癌)、SBC5(小細胞肺癌)、WI38(正常線維芽細胞)、MKN-7(胃癌)はJCRB(Japanese Collection of Research Bioresources, Tokyo, Japan)から購入した。すべての細胞株は温度: 37°C、CO₂: 5%にて培養した。

アデノウイルスベクター

実験に使用した各種組み換え5/3型キメラアデノウイルスベクター(前研究において5型のノブを3型アデノウイルスのノブに置換し、外来遺伝子の挿入幅を確保するためにE3領域を削除しているpAdEasy system: Fig. 1)は、AdEasyシステムTM(Qbiogene)に従い、*Escherichia coli*(BJ5183株)での相同組み換えによって作成した²⁰⁾。hTERTプロモーター領域[(-393~+53)²¹⁾]は下記のプライマーを用いてPCR法によって増幅した。(sense: 5'-CCGCTCGAGG-GCCTCCACATCATGGC-3') (antisense: 5'-CCCAAGCTTCCCACGTGCGCAGCAG-GA-3')。陽性コントロールとしてCMVプロモーターを使用した(Ad5/3CMVE1: Fig. 1)。HEK-293細胞で増幅されたウイルスは、CsCl密度勾配遠心分離法によって濃縮され、10%グリセロールを含有したPBSを用いて透析後、実験に使用した。ウイルス粒子(VP)濃度はウイルス液より抽出したウイルスゲノムDNA量をOD260定量して算出した。感染粒子数はHEK-293細胞を使用したTCID50法²²⁾を用いて測定しpfuを算出した。HEK-293細胞ゲノム上に存在するE1遺伝子とAd5/3hTERTE1ウイルスゲノムとの相

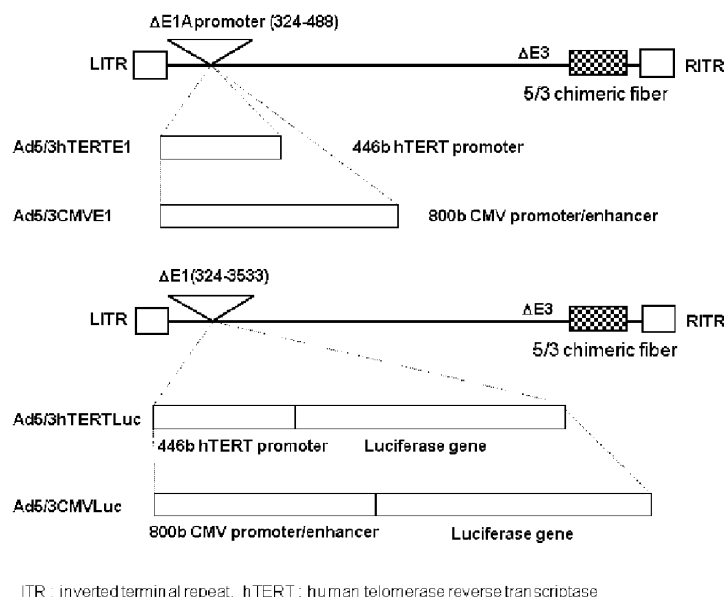


Fig. 1 Schematic diagram of the vector constructions. These vectors are constructed from an E3 region-deleted Ad5 backbone and are excluded the Ad E1A promoter region (from nucleotide 324 to 488 of the Ad genome) and have modified Ad5 fiber genes into Ad3 knob region (nts 647-1208 of accession no. X01998 M12411)⁵²⁾.

同組み換えによる偶発的な野生型アデノウイルス産生の可能性を除外するために、最終的に精製されたウイルス溶液より抽出されたウイルスゲノムをテンプレートとしPCR反応によって野生型E1プロモーター領域が増幅されないことを確認した。

テロメラーゼ活性の測定

細胞のテロメラーゼ活性は TRAPeze Telomerase Detection Kit (Intergen, Purchase, NY) を使用し測定した⁵⁾²³⁾。感度および定量性を得るために、細胞抽出物は各分析ごとに同数の細胞数で測定した。得られたPCR生成物は12%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、SYBR Green I (Takara, Ohtsu, Japan) を用いて染色した。各々サンプルにおいて3回ずつ測定を行った。

hTERT プロモーター活性の in vitro 分析

hTERT プロモーターの活性はルシフェラーゼアッセイによって定量化した²⁴⁾。1x10⁵個の細胞に Ad5/3hTERTLuc (hTERT プロモーターによって制御されるルシフェラーゼ遺伝子を含んだ5/3型キメラアデノウイルス: Fig. 1) および陽性コントロールとして Ad5/3CMVLuc (CMV プロモーターによって制御されるルシフェラーゼ遺伝

子を含んだ5/3型キメラアデノウイルス: Fig. 1) を1 MOI (Multiplicity Of Infection = ratio of infectious virus particles to cells) で3時間感染させウイルス混入メディアを回収し、2日間培養後に細胞を回収した。ルシフェラーゼアッセイは Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI) を使用し、ルシフェラーゼ反応は GENE LIGHT 55A (microtec nition, Tokyo) を用いて測定した。ルシフェラーゼ活性は細胞融解液中の蛋白濃度によって補正した。

hTERT プロモーター活性の in vivo 分析

正常臓器での hTERT プロモーター活性を評価するために、ヌードマウス (Kud:Hr-) に1x10⁹ pfu の Ad5/3CMVLuc もしくは Ad5/3hTERT-Luc を尾静脈より投与した²⁴⁾。2日後に肝臓、腎臓、脾臓、肺を切除し、エタノール/ドライアイスで急速凍結した。粉碎した凍結組織標本は Reporter lysis buffer (Promega) を用いて融解し、ルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は組織抽出物における蛋白濃度に基づいて標準化した。腫瘍組織におけるプロモーター活性については1x10⁷個のSBC5をヌードマウスの皮下に接種して腫瘍を形成した後、Ad5/3hTERTLuc

(1×10^8 pfu) もしくは Ad5/3CMVLuc (1×10^8 pfu) を直接腫瘍に注入してルシフェラーゼ活性を測定した。

腫瘍細胞内ウイルス増幅の定量

各細胞を 1×10^5 個/well の濃度で一晩培養後、Ad5/3hTERTE1 もしくは Ad5/3hTERTLuc を 0.1 MOI で 3 時間感染させた。感染に用いたウイルスの影響を除くため、感染後細胞はトリプシン処理後に新たなプレートで培養した。3, 6, 9 日間の培養後に細胞と培地を回収し 4 回の凍結融解にて細胞内で増幅したウイルスを抽出し、HEK-293 に感染させて TCID50 法にて pfu を算出した。

In vitro における細胞変性効果

CRAAd による殺細胞効果を定量するために、 5×10^3 個の細胞にアデノウイルスを 10 MOI で 3 時間感染させた後、3 日毎に MTS アッセイ (CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay; Promega) によって生存細胞を測定した。MTS の発色については Immuno-Mini NJ-2300 Microplate Reader (InterMed, Tokyo) を使用し OD 490nm で定量化した。さらに殺細胞効果を可視化するために、クリスタルバイオレットにて染色を行った。 1×10^5 個の細胞に

上記と同様に各ウイルスを感染させ、9 日後に細胞を固定し、70%エタノール+1%クリスタルバイオレットで 45 分間染色した。

In vivo における抗腫瘍効果

SBC5 細胞 (1×10^7 個) をヌードマウス (Kud: Hr-) の背部皮下に移植し腫瘍を形成した。腫瘍サイズが直径 5mm に達した時点より、各ウイルスを 1×10^8 pfu の濃度で直接腫瘍に注入し、以後 27 日間観察した。腫瘍容積は以下の式にて算出した。 $V_{\text{tumor}} = (a \times b^2)/2$ [a: 長径 b: 短径] 腫瘍サイズの比較には Student の st 検定を用いて、 $p < 0.05$ を有意差とした。

実験結果

TRAP assay によるテロメラーゼ活性の分析

TRAP assay において PCR 産物のラダーの量、濃度によってテロメラーゼ活性の強弱が半定量的に確認可能である。今回の研究では 4 つの SCLC 細胞株すべてがテロメラーゼ活性を有していたが活性レベルに若干の相違を認めた。Fig. 2 に示すように SBC1, SBC5, N417 は強いテロメラーゼ活性を示したが、SBC3 の活性は減弱していた。対照として用いた正常線維芽細胞である WI38 では全くテロメラーゼ活性を認めなかった。

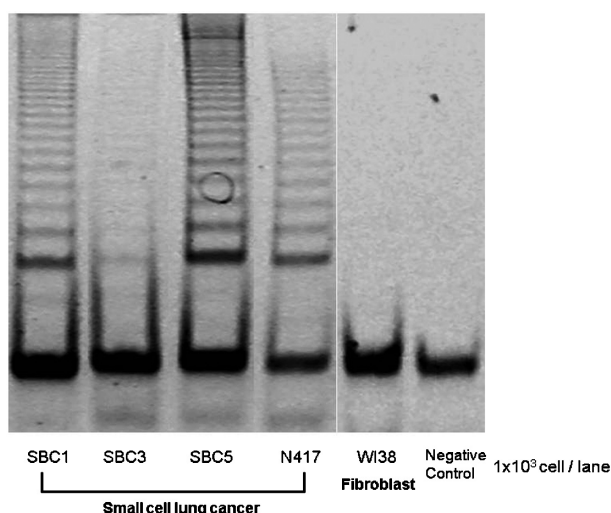


Fig. 2 TRAP assay of four SCLC cell lines and one normal lung-fibroblast cell line. In each cell line, lysate derived from 1000 cells was used for TRAP assay. Four cancer cell lines all showed significant telomerase activities with a different level. On the other hand, WI38, normal cell line did not show any telomerase activity⁵²⁾.

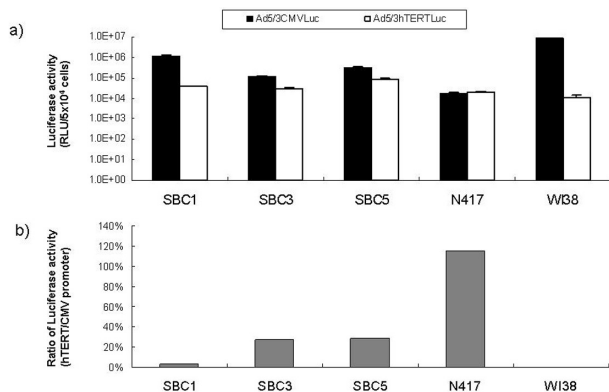


Fig. 3 Upper panel : a), Luciferase activities in various cell lines infected by Ad5/3CMVLuc or Ad5/3hTERTLuc. 1×10^5 cells of each cell line were infected by Ad5/3CMVLuc or Ad5/3hTERTLuc for 3 h at MOI 1. 48 h after infection cells were harvested and lysed in 100 μ l of lysis buffer. 10 μ l of each lysate was used for luciferase assay. The mean + SE of triplicate determination is shown. Lower panel : b), the ratio of hTERT promoter activity to CMV promoter activity. To standardize the hTERT promoter activity in each cell line, the luciferase activity with Ad5/3hTERTLuc was expressed as a percentage of luciferase activity with Ad5/3CMVLuc⁵²⁾.

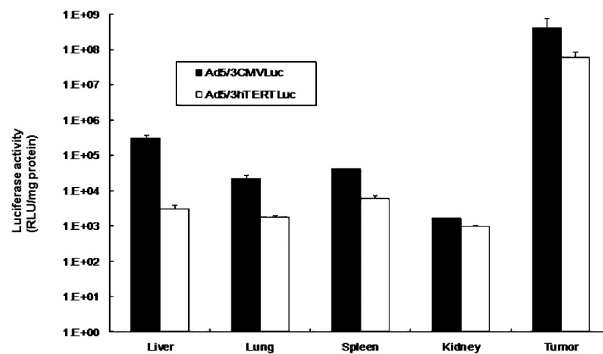


Fig. 4 Tumor specific activation of the hTERT promoter in the adenoviral context. Mice received 1×10^9 pfu of Ad5/3hTERTLuc or Ad5/3CMVLuc via a tail vein injection (three per group). Two days after virus injection, the mice were sacrificed to obtain the organ samples. Each organ lysate was assayed for luciferase activity and normalized by the protein concentration. The mean + SE of triplicate determinations is shown. Tumors were induced by the injection of 1×10^7 SBC5 cells on the nude mice subcutaneously. When tumor formation was confirmed (6-8mm in diameter), Ad5/3hTERTLuc (1×10^8 pfu) or Ad5/3CMVLuc (1×10^8 pfu) were injected into the tumor. The measurement of luciferase activity in tumor was performed same as described above⁵²⁾.

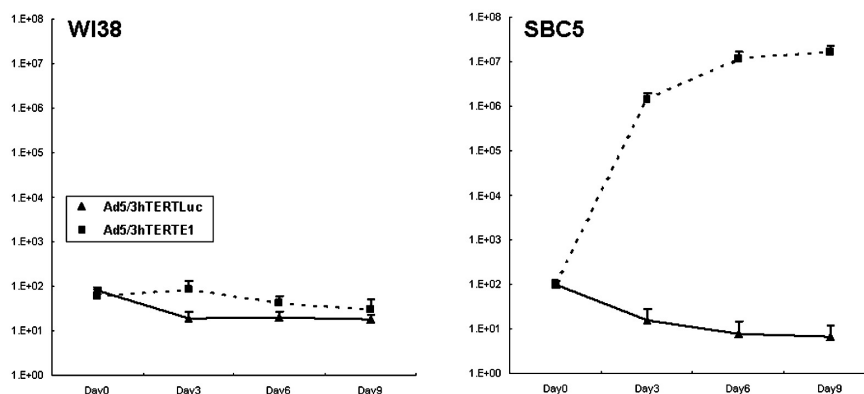


Fig. 5 Assessment of viral DNA replication 24 h after infection. 1×10^5 cells were infected with replication-competent Ads (Ad5/3hTERTE1) or non-replicative Ad (Ad5/3hTERTLuc) at an MOI of 0.1 for 3 h and then cultured for 24 h. And TCID50 assays on HEK-293 cells were performed to determine the presence of any infectious particles. The mean + SE of triplicate determination is shown⁵²⁾.

In vitro における hTERT プロモーター活性

アデノウイルスゲノム E1 領域上流に外来性プロモーターを挿入した場合、さらに上流にある ITR などのウイルスプロモーターの影響を受け、外来プロモーターの特異性が損なわれる可能性がある。プラスミドを用いた Takakura ら²¹⁾の報告より本研究では転写開始点より上流 446bp までの hTERT プロモーターを使用した。テロメラーゼ陰性細胞である WI38 細胞では同 hTERT

プロモーター活性は CMV プロモーター活性の 0.13% に抑制された (Fig. 3)。他の癌細胞株は様々なレベルの hTERT プロモーター活性を示したが、N417 細胞では CMV プロモーターに匹敵する高い活性が認められた。これらの hTERT プロモーター活性は TRAP assay におけるテロメラーゼ活性と概ね相関していた。これらの結果から、今回使用した 446bp の hTERT プロモーターは腫瘍細胞内で十分に活性化され、アデノウイルス

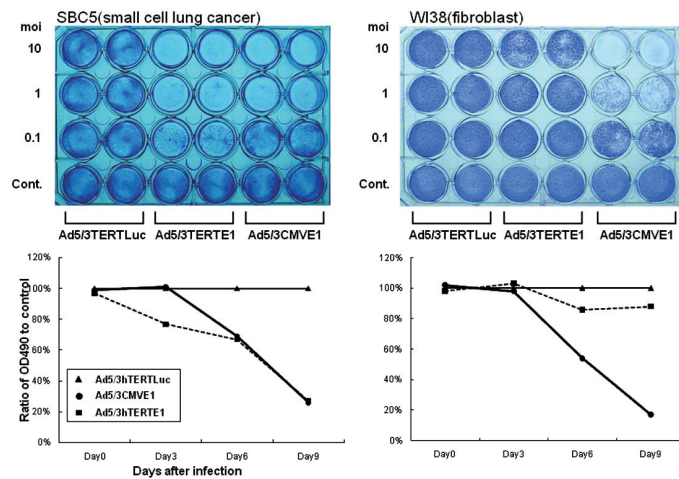


Fig. 6 Cell killing effect of Ad5/3hTERTE1 and control adenoviruses. Upper panel, 1×10^5 SBC5 cells and WI38 cells were infected with each Ad at MOI 0.1, 1.0 or 10. 9 days after infection all wells were stained by crystal violet to visualize the viable cells. Lower panel, the cell killing effect was evaluated by an MTS assay. 5×10^3 cells were infected with Ad5/3hTERTLuc (negative control), Ad5/3CMVE1 (positive control), or Ad5/3hTERTE1 at 10 MOI for 3 h. Viable cells using MTS assay (CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay; Promega) were evaluated every 3 days⁵²⁾.

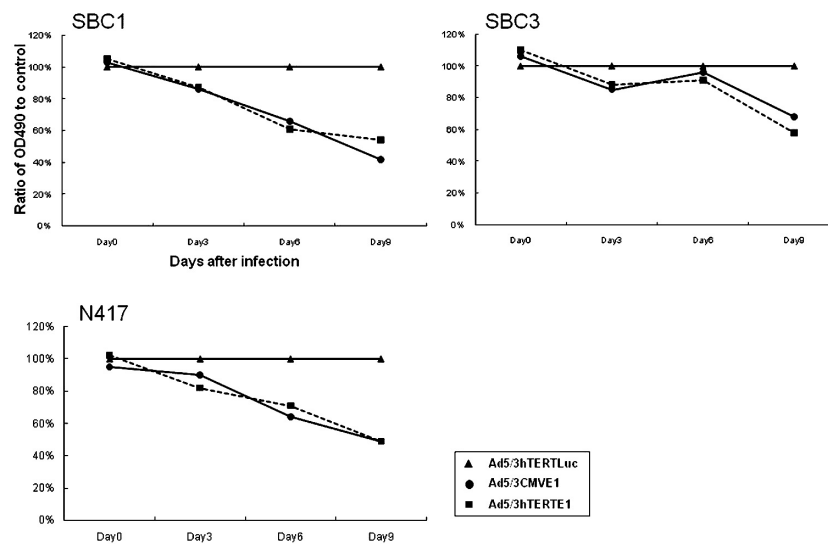


Fig. 7 Cells killing effect of Ad5/3hTERTE1 for other SCLC cell lines. The cell killing effect was evaluated by an MTS assay in the same manner, as described above⁵²⁾.

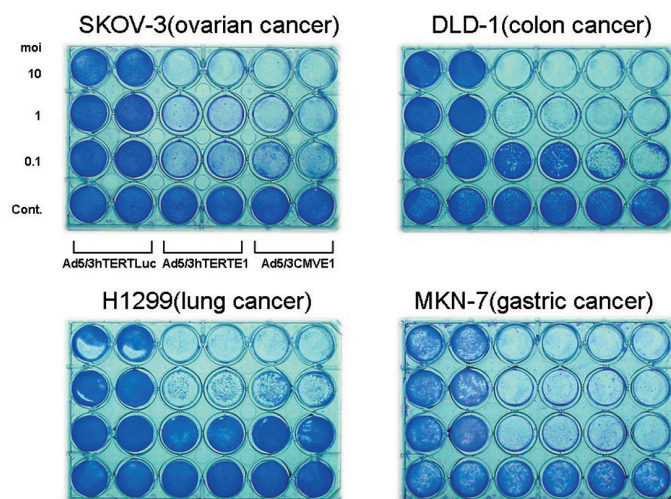


Fig. 8 Cells killing effect of Ad5/3hTERTE1 for other cancer cell lines. The cell killing effect was evaluated by crystal violet stain in the same manner, as described.

スゲノム内に組み込まれてもその特異性を保持していると考えられた。

In vivo における hTERT プロモーター活性

正常臓器における hTERT プロモーター活性を調べるために Ad5/3hTERTLuc もしくは Ad5/3CMVLuc (陽性コントロール) をヌードマウスの尾静脈から注入し、各種臓器におけるルシフェラーゼ活性を測定した (Fig. 4)。その結果 hTERT プロモーターに依存したルシフェラーゼの発現は最も高値を示した肝臓でも CMV プロモーターと比較して 1% に抑制されていた (hTERTLuc/CMVLuc 肺: 7.8% 脾臓: 14.1% 腎臓: 59.2%)。一方、腫瘍内でのルシフェラーゼ活性は CMV プロモーターの 15% を示した。これらの結果から in vivo でも in vitro と同様に正常細胞では hTERT プロモーターの活性が低いことを確認した。

hTERT-CRAd の腫瘍特異的増殖

Ad5/3hTERTE1 の制限増殖を検証するために、hTERT 陽性細胞株 (SBC5) および陰性細胞株 (WI38) に Ad5/3hTERTE1 を感染させ 3 日毎に、増幅されたウイルスの濃度を TCID₅₀ によって測定した。非増殖型のウイルスである Ad5/3hTERTLuc を陰性コントロールとして使用した。Fig. 5 に示すように SBC5 細胞では、

Ad5/3hTERTE1 は 3 日目で 1.5×10^4 倍まで急速に増幅し、9 日目には 1.7×10^5 倍にまで増幅された。しかし Ad5/3hTERTLuc は 1/16 倍に減少した。他方、WI38 細胞においては非増殖型の Ad5/3hTERTLuc と増殖型の Ad5/3hTERTE1 の両ウイルスは全く増殖しなかった。

hTERT-CRAd の特異的細胞傷害性

次に Ad5/3hTERTE1 のすべての細胞株に対する細胞傷害性を MTS assay を用いて定量した。Fig. 6 に示すとおり SBC5 では Ad5/3hTERTE1 は Ad5/3CMVE1 と同程度の強い細胞傷害を示し、ほとんどすべての細胞が 9 日目に死滅した。これに対し、WI38 は Ad5/3hTERTE1 に対して抵抗性であった。これらの結果はクリスタルバイオレット染色の結果とも一致していた。また Fig. 7 に示されるように Ad5/3hTERTE1 は他の SCLC 細胞株においても有意な殺細胞効果を認めた。各細胞株において TRAP assay の結果と Ad5/3hTERTE1 の殺細胞効果は密接な相関関係を示した。さらに小細胞肺癌以外に胃癌 (MKN-7)、大腸癌 (DLD-1)、卵巣癌 (SKOV-3)、非小細胞肺癌 (H1299) の各細胞株を用いて同様に Ad5/3hTERTE1 の感染実験を行ったところ、クリスタルバイオレット染色結果に示すとおり良好な殺細胞効果を示した (Fig. 8)。

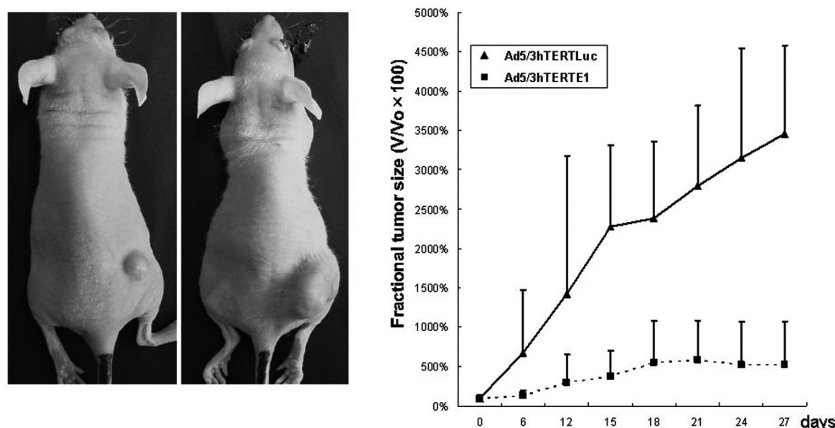


Fig. 9 Ad5/3hTERTE1 suppressed tumor growth in vivo. Intact SBC5 cells (1×10^7) were injected s.c. into nude mice. When tumor formation was seen 10 days after inoculation, 1×10^8 pfu of each virus (diamond, Ad5/3hTERTE1; square, Ad5/3hTERTLuc) was injected into the tumor directly. Three similar sized tumors were injected with each virus, and the mean volume + SE is shown⁵²⁾.

In vivo における Ad5/3hTERTE1 による腫瘍増殖抑制

Ad5/3hTERTE1 の in vivo における腫瘍増殖抑制能を検討した。ヌードマウスの皮下に SBC5 腫瘍細胞を移植して腫瘍を形成させ、その後直接腫瘍内に 1×10^8 pfu の Ad5/3hTERTLuc もしくは Ad5/3hTERTE1 を投与した。腫瘍増殖の経過については移植後 27 日間観察し、経時的に腫瘍サイズを計測した。Fig. 9 に示すとおり陰性コントロールウイルス (Ad5/3hTERTLuc) の投与後腫瘍は指数関数的に増大したが、Ad5/3hTERTE1 は比較的長期間にわたって腫瘍の増大を抑制した。

考 察

制限増殖型アデノウイルスは腫瘍特異的な増殖によって、抗腫瘍効果をもたらす新しい癌治療法として注目されている。実際に前立腺癌の腫瘍マーカーである PSA プロモーターを用いた CRAd ; CV706 が作成され既に臨床試験が行われている¹¹⁾。最近ではアデノウイルス以外にヘルペスウイルスを用いた制限増殖型ウイルスの作成も試みられており²⁵⁾、今後も様々なタイプの制限増殖型ウイルスの研究が進むものと思われる。

腫瘍特異的プロモーターで制御される CRAd を臨床応用に考えた場合、対象とする腫瘍において当該プロモーターが十分に活性化される必要がある。本研究でも示したように、プロモーター活性が低い腫瘍では CRAd による抗腫瘍効果が得られないため^{24)26~28)}、あらかじめプロモーター活性を評価するのは治療効果の予測という点から重要と考えられる。しかしながら肺癌治療への臨床応用を考えた場合、RNA 発現レベルを定量的に評価できる検体を手術以外で得るのは容易ではなく、ルシフェラーゼのようなレポーター遺伝子を挿入してプロモーター活性を調べることはさらに困難である。この点で hTERT プロモーターには、テロメラーゼ活性レベルから hTERT プロモーター活性を予測できるという利点がある。テロメラーゼ活性は比較的少量の体液サンプルか組織試料を対象とした TRAP assay にて容易に検出可能である。ただし TRAP assay は PCR 法に基づくため、リンパ球の混入による偽陽性をさけるために、1 アッセイにつき細胞 1000 個の抽出物を

使用することが推奨されている²⁹⁾。実際に気管支肺胞洗浄液 (BALF) や悪性胸水におけるテロメラーゼ活性の検出が可能であり、診断における有用性が報告されている^{30)~33)}。

アデノウイルスゲノムへ外来性の DNA を挿入する場合、そのスペースは限られているため、CRAd の作成においては挿入するプロモーターの長さは制限される。我々の経験では野生型 E1 プロモーターと E3 を除去したアデノウイルスゲノムをバックボーンベクターとして用いる場合、挿入できるプロモーター長は約 3 kb が限界である。このような観点から hTERT プロモーターを検討すると、プロモーター活性を制御する重要なトランス側の因子である、c-Myc^{21)34~38)}、Sp1³⁸⁾、estrogen³⁹⁾⁴⁰⁾、p53⁴¹⁾、wt-1⁴²⁾、Mad1⁴³⁾ が結合するシスエレメントは転写開始点の上流 500bp までに含まれており、十分挿入可能な長さである。実際に我々は種々の長さの hTERT プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイによって検討したが、500bp の hTERT プロモーターは比較的良好な活性と特異性を示した (未発表データ)。

血清型 5 型アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療における問題点のひとつは同ベクターの感染効率が細胞側のウイルス受容体である CAR の発現レベルに依存していることである。CAR 本来の役割については明らかではないが、その発現レベルは細胞によって異なり^{17)~19)44)~48)}、さらに癌細胞の悪性度に比例して発現が低下する傾向にあると報告されている⁴⁹⁾。一般にアデノウイルスは気道上皮に対して高い親和性を示し、同上皮に由来する非小細胞肺癌細胞に対して血清型 5 型アデノウイルスベクターは比較的良好な遺伝子導入効率を示す。しかしながら小細胞肺癌は発生母地が気道上皮とは異なり 5 型アデノウイルスに対する親和性について検討した報告はない。

前研究にて小細胞肺癌株の CAR 発現レベルを FACS で比較したところその発現量は様々で全体的に非小細胞肺癌株よりも低値を示した (data not shown)。本研究で用いた 5/3 キメラウイルスは、5 型アデノウイルス感染における CAR 依存性を克服するために作成され、多くの癌種で 5 型アデノウイルスに比較して高い感染性を示しており¹⁶⁾、感受性の高い細胞株では約 100 倍の感染効率の増強がみられた⁵⁰⁾。3 型アデノウイルス

の細胞側受容体については現在解析が進められているが, Short らが CD80, CD86 が同受容体として機能している可能性について報告している⁵¹⁾. 本研究においても 5/3 型キメラウイルスをバックボーンベクターに用い, hTERT プロモーターを使用することで小細胞肺癌に対して良好な感染性および抗腫瘍効果が得られ, この結果に関してはすでに別紙に報告済みである⁵²⁾. 今回は *in vitro* での結果ではあるが胃癌, 大腸癌, 卵巣癌, 非小細胞肺癌においても抗腫瘍効果を認め, hTERT は広汎に多くの腫瘍で発現していることから 5/3 型 hTERT-CRA_d は汎用性のある癌治療ベクターと考えられる. 今後はさらに多くの癌種について共同研究を進める予定である.

謝 辞

本研究において TRAP assay を指導していた九州大学病院がんセンター水元一博准教授に深く感謝いたします.

参 考 文 献

- 1) Blackburn EH : Switching and signaling at the telomere. *Cell*. 106: 661-673, 2001.
- 2) Meyne J, Ratliff RL, and Moyzis RK : Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86 : 7049-7053, 1989.
- 3) Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, and Wu JR : A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85 : 6622-6626, 1988.
- 4) Feng J, Funk, WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J, and et al. : The RNA component of human telomerase. *Science*. 269 : 1236-1241, 1995.
- 5) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, and Shay JW : Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 266: 2011-2015, 1994.
- 6) Shay JW and Bacchetti S : A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*. 33: 787-791, 1997.
- 7) Bryan TM, Marusic L, Bacchetti S, Namba M, and Reddel RR : The telomere lengthening mechanism in telomerase-negative immortal human cells does not involve the telomerase RNA subunit. *Hum Mol Genet*. 6 : 921-926, 1997.
- 8) Kim NW : Clinical implications of telomerase in cancer. *Eur J Cancer*. 33 : 781-786, 1997.
- 9) Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Inai K, Gazdar AF, Piatyszek M A, and Shay JW : Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst*. 87 : 895-902, 1995.
- 10) Ganly I, Kirn D, Eckhardt G, Rodriguez GI, Soutar DS, Otto R, Robertson AG, Park O, Gulley ML, Heise C, Von Hoff DD, Kaye SB, and Eckhardt SG : A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. *Clin Cancer Res*. 6 : 798-806, 2000.
- 11) DeWeese TL, van der Poel H, Li S, Mikhak B, Drew R, Goemann M, Hamper U, DeJong R, Detorie N, Rodriguez R, Haulk T, DeMarzo AM, Piantadosi S, Yu DC, Chen Y, Henderson DR, Carducci MA, Nelson WG, and Simons JW : A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy. *Cancer Res*. 61 : 7464-7472, 2001.
- 12) Benjamin R, Helman L, Meyers P, and Reaman G : A phase I/II dose escalation and activity study of intravenous injections of OCaP1 for subjects with refractory osteosarcoma metastatic to lung. *Hum Gene Ther*. 12 : 1591-1593, 2001.
- 13) Zabner J, Freimuth P, Puga A, Fabrega A, and Welsh MJ : Lack of high affinity fiber receptor activity explains the resistance of ciliated airway epithelia to adenovirus infection. *J Clin Invest*. 100 : 1144-1149, 1997.
- 14) Kaner RJ, Worgall S, Leopold PL, Stolze E, Milano E, Hidaka C, Ramalingam R, Hackett NR, Singh R, Bergelson J, Finberg R, Falck-Pedersen E, and Crystal RG : Modification of the genetic program of human alveolar macrophages by adenovirus vectors *in vitro* is feasible but inefficient, limited in part by the low level of expression of the coxsackie/adenovirus receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 20 : 361-370, 1999.
- 15) Nalbantoglu J, Larochelle N, Wolf E, Karpati G, Lochmuller H, and Holland P C : Muscle-specific overexpression of the adenovirus primary receptor CAR overcomes low efficiency of gene transfer to mature skeletal muscle. *J Virol*. 75 : 4276-4282, 2001.

- 16) Takayama K, Reynolds PN, Short JJ, Kawakami Y, Adachi Y, Glasgow JN, Rots MG, Krasnykh V, Douglas JT, and Curiel DT : A mosaic adenovirus possessing serotype Ad5 and serotype Ad3 knobs exhibits expanded tropism. *Virology*. 309 : 282-293, 2003.
- 17) Miller CR, Buchsbaum DJ, Reynolds PN, Douglas JT, Gillespie GY, Mayo MS, Raben D, and Curiel DT : Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor-independent gene transfer. *Cancer Res*. 58 : 5738-5748, 1998.
- 18) Hemmi S, Geertsens R, Mezzacasa A, Peter I, and Dummer R : The presence of human coxsackievirus and adenovirus receptor is associated with efficient adenovirus-mediated transgene expression in human melanoma cell cultures. *Hum Gene Ther*. 9 : 2363-2373, 1998.
- 19) Kanerva A, Mikheeva GV, Krasnykh V, Coolidge CJ, Lam JT, Mahasreshti PJ, Barker SD, Straughn M, Barnes MN, Alvarez RD, Hemminki A, and Curiel DT : Targeting adenovirus to the serotype 3 receptor increases gene transfer efficiency to ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res*. 8 : 275-280, 2002.
- 20) He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, and Vogelstein B : A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95 : 2509-2514, 1998.
- 21) Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Hirano H, Takeda J, Yutsudo M, and Inoue M : Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res*. 59 : 551-557, 1999.
- 22) Nyberg-Hoffman C, Shabram P, Li W, Giroux D, and Aguilar-Cordova E : Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination. *Nat Med*. 3 : 808-811, 1997.
- 23) Niiyama H, Mizumoto K, Sato N, Nagai E, Mibu R, Fukui T, Kinoshita M, and Tanaka M : Quantitative analysis of hTERT mRNA expression in colorectal cancer. *Am J Gastroenterol*. 96 : 1895-1900, 2001.
- 24) Adachi Y, Reynolds PN, Yamamoto M, Wang M, Takayama K, Matsubara S, Muramatsu T, and Curiel DT : A midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus for treatment of pediatric solid tumors and bone marrow tumor purging. *Cancer Res*. 61 : 7882-7888, 2001.
- 25) Nakano K, Todo T, Zhao G, Yamaguchi K, Kuroki S, Cohen JB, Glorioso JC, and Tanaka M : Enhanced efficacy of conditionally replicating herpes simplex virus (G207) combined with 5-fluorouracil and surgical resection in peritoneal cancer dissemination models. *J Gene Med*. 2005.
- 26) Matsubara S, Wada Y, Gardner TA, Egawa M, Park MS, Hsieh CL, Zhou HE, Kao C, Kamidono S, Gillenwater JY, and Chung LW : A conditional replication-competent adenoviral vector, Ad-OC-E1a, to cotarget prostate cancer and bone stroma in an experimental model of androgen-independent prostate cancer bone metastasis. *Cancer Res*. 61 : 6012-6019, 2001.
- 27) Nettelbeck DM, Rivera AA, Balague C, Alemany R, and Curiel DT : Novel oncolytic adenoviruses targeted to melanoma : specific viral replication and cytolysis by expression of E1A mutants from the tyrosinase enhancer/promoter. *Cancer Res*. 62 : 4663-4670, 2002.
- 28) Kurihara T, Brough DE, Kovesdi I, and Kufe DW : Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen. *J Clin Invest*. 106 : 763-771, 2000.
- 29) Iwao T, Hiyama E, Yokoyama T, Tsuchida A, Hiyama K, Murakami Y, Shimamoto F, Shay JW, and Kajiyama G : Telomerase activity for the preoperative diagnosis of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst*. 89 : 1621-1623, 1997.
- 30) Hiyama K, Ishioka S, Shay JW, Taooka Y, Maeda A, Isobe T, Hiyama E, Maeda H, and Yamakido M : Telomerase activity as a novel marker of lung cancer and immune-associated lung diseases. *Int J Mol Med*. 1 : 545-549, 1998.
- 31) Sen S, Reddy VG, Khanna N, Guleria R, Kapila K, and Singh N : A comparative study of telomerase activity in sputum, bronchial washing and biopsy specimens of lung cancer. *Lung Cancer*. 33 : 41-49, 2001.
- 32) Yahata N, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwama H, Hayashi S, Ando K, Hirano T, Tsuchida T, Kato H, Shay JW, and Toyama K : Telomerase activity in lung cancer cells obtained from bronchial washings. *J Natl Cancer Inst*. 90 : 684-690, 1998.
- 33) Yang CT, Lee MH, Lan RS, and Chen JK : Telomerase activity in pleural effusions : diagnostic significance. *J Clin Oncol*. 16 : 567-573, 1998.
- 34) Horikawa I, Cable PL, Afshari C, and Barrett JC : Cloning and characterization of the promo-

- ter region of human telomerase reverse transcriptase gene. *Cancer Res.* 59 : 826-830, 1999.
- 35) Cong YS, Wen J, and Bacchetti S : The human telomerase catalytic subunit hTERT : organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet.* 8 : 137-142, 1999.
 - 36) Wu KJ, Grandori C, Amacker M, Simon-Vermot N, Polack A, Lingner J, and Dalla-Favera R : Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet.* 21 : 220-224, 1999.
 - 37) Oh S, Song YH, Kim UJ, Yim J, and Kim TK : In vivo and in vitro analyses of Myc for differential promoter activities of the human telomerase (hTERT) gene in normal and tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 263 : 361-365, 1999.
 - 38) Kyo S, Takakura M, Taira T, Kanaya T, Itoh H, Yutsudo M, Ariga H, and Inoue M : Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res.* 28 : 669-677, 2000.
 - 39) Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Zhuo W, Fujimoto K, Nishio Y, Orimo A, and Inoue M : Estrogen activates telomerase. *Cancer Res.* 59 : 5917-5921, 1999.
 - 40) Misiti S, Nanni S, Fontemaggi G, Cong YS, Wen J, Hirte HW, Piaggio G, Sacchi A, Pontecorvi A, Bacchetti S, and Farsetti A : Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. *Mol Cell Biol.* 20 : 3764-3771, 2000.
 - 41) Kanaya T, Kyo S, Hamada K, Takakura M, Kitagawa Y, Harada H, and Inoue M : Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin Cancer Res.* 6 : 1239-1247, 2000.
 - 42) Oh S, Song Y, Yim J, and Kim TK : The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *J Biol Chem.* 274 : 37473-37478, 1999.
 - 43) Gunes C, Lichtsteiner S, Vasserot AP, and Englert C : Expression of the hTERT gene is regulated at the level of transcriptional initiation and repressed by Mad1. *Cancer Res.* 60 : 2116-2121, 2000.
 - 44) Cripe TP, Dunphy EJ, Holub AD, Saini A, Vasi NH, Mahller YY, Collins MH, Snyder JD, Krasnykh V, Curiel DT, Wickham TJ, DeGregori J, Bergelson JM, and Currier MA : Fiber knob modifications overcome low, heterogeneous expression of the coxsackievirus-adenovirus receptor that limits adenovirus gene transfer and oncolysis for human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res.* 61 : 2953-2960, 2001.
 - 45) Davidoff AM, Stevenson SC, McClelland A, Shochat SJ, and Vanin EF : Enhanced neuroblastoma transduction for an improved antitumor vaccine. *J Surg Res.* 83 : 95-99, 1999.
 - 46) Fechner H, Wang X, Wang H, Jansen A, Pauschinger M, Scherubl H, Bergelson JM, Schultheiss HP, and Poller W : Trans-complementation of vector replication versus Cocksackie-adenovirus-receptor overexpression to improve transgene expression in poorly permissive cancer cells. *Gene Ther.* 7 : 1954-1968, 2000.
 - 47) Kelly FJ, Miller CR, Buchsbaum DJ, Gomez-Navarro J, Barnes MN, Alvarez RD, and Curiel DT : Selectivity of TAG-72-targeted adenovirus gene transfer to primary ovarian carcinoma cells versus autologous mesothelial cells in vitro. *Clin Cancer Res.* 6 : 4323-4333, 2000.
 - 48) Li Y, Pong RC, Bergelson JM, Hall MC, Sagalowsky AI, Tseng CP, Wang Z, and Hsieh JT : Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells : a potential impact on the efficacy of gene therapy. *Cancer Res.* 59 : 325-330, 1999.
 - 49) Okegawa T, Li Y, Pong RC, Bergelson JM, Zhou J, and Hsieh JT : The dual impact of coxsackie and adenovirus receptor expression on human prostate cancer gene therapy. *Cancer Res.* 60 : 5031-5036, 2000.
 - 50) Kawakami Y, Li H, Lam JT, Krasnykh V, Curiel DT, and Blackwell JL : Substitution of the adenovirus serotype 5 knob with a serotype 3 knob enhances multiple steps in virus replication. *Cancer Res.* 63 : 1262-1269, 2003.
 - 51) Short JJ, Pereboev AV, Kawakami Y, Vasu C, Holterman MJ, and Curiel DT : Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors. *Virology.* 322 : 349-359, 2004.
 - 52) Uchino J, Takayama K, Hrada A, Kawakami Y, Inoue H, Curiel DT, Nakanishi Y : Infectivity enhanced, hTERT promoter-based conditionally replicative adenoviruses are useful for SCLC treatment. *Cancer Gene Ther.* 12 : 737-748, 2005.

(Received for publication November 17, 2009)