転移や再発の制御に向けたがん治療戦略

特集 がんの標的療法：基礎と実地臨床

金 田 安 史*

Therapeutic strategies for controlling metastasis and recurrence of cancers

Cancers remain difficult to treat despite recent advances in cancer therapy, including new surgical options and advances in chemotherapy, radiotherapy and gene therapy. Treatment is aimed at controlling advanced and metastatic cancers and preventing recurrence. A number of promising new chemotherapeutic agents have been developed and, to reduce the side effects of chemotherapy, tumor-selective delivery vectors have been also developed. However, it is impossible to kill all the cancer cells by anti-cancer reagents. Thus, cancer immunotherapy is gaining interest. Although current immunotherapy can reduce, delay, or prevent tumor recurrence, many tumors still progress due to the development of mechanisms to avoid recognition and elimination by the immune system. Therefore, it is expected that immunotherapy might be used to eradicate residual cancer cells following therapy to reduce tumor volume. A number of studies suggest that both tumor regression and anti-tumor immunity are required for complete tumor eradication. To achieve both tumor regression and anti-tumor immunity without causing serious side effects, tissue-targeted drug delivery vectors with beneficial adjuvant properties will be required in the future.

がんは1980年代以降、わが国の死亡率のトップを占めている。その原因は、いうまでもなく高頻度で起こるがんの転移や治療後に再発するがんの制御の難しさにある。がんの再発や転移をいかに治療するかががん治療の大きな課題であるが、基本的には、できる限りがん組織に選択的に治療分子を送達させてがんの縮小を図る一方、残存したがん細胞を宿主免疫を利用して排除するようながん標的治療が望まれる。期待されてきた遺伝子治療もまだ大きな成果をあげていないが、その試みを紹介しながらがん標的治療の現状と将来像について考察する。

Yasufumi Kaneda*

key words : targeting vector, oncolytic virus, immunotherapy, HVJ envelope

がん免疫療法にかかる期待と現状

がん治療法は外科的切除法、放射線療法、化学療法が古くからのスタンダードである。外科療法については、イメージング技術との併用によってできる限りのがん細胞の排除も可能になり、またroboticsの技術を応用し、複雑な手術手技も遠隔操作で行え、また大きな侵襲を与えることなくがん切除も可能になっており、手術成績の向上につながっている。放射線治療も従来のエックス線やガンマー線のような生体内でエネルギーの減衰する光子線から標的部位にエネルギーを集中できる粒子線治療の導入

によって、はるかに効果的ながん破壊が可能となっている。化学療法でも分子標的薬の開発が進んでいる。

しかしなお、がんによる死亡率は増加傾向にあり、さらに有効な治療戦略の必要性が示されてきている。やはりがんの転移や治療後の再発をいかに制御するかが、がんによる死亡を防ぐカギである。それには、宿主の持つ免疫力によってがんを異物と認識して排除する機構に期待せざるを得ない。実際にわれわれの体内では絶えずがんに成長する可能性のある変異細胞ができているが、図1の①に示すように、それらは大きくなる前に生体の免疫力によって排除されていると考えられる。この免疫力を強化すれば、がんを治療できるはずであるという考えは古くからあり、宿主の抗腫瘍免疫を増強させる免疫療

* Division of Gene Therapy Science, Graduate School of Medicine, Osaka University 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学

図1 がん治療のための戦略

法が開発されてきた。

異物であるがん細胞を用いた細胞ワクチン，がん抗原の同定・分離に伴うペプチドワクチンや遺伝子を用いた DNA ワクチンなどが開発され，これらの効果を高めるためのアジュバントも古典的な水酸化アルミニウムゲルから CpG オリゴヌクレオチドまで種々のものが用いられている．BCG のような菌体を用いたり，サイトカインの遺伝子導入などにより非特異的に全体の免疫力を高めて腫瘍に対する免疫反応の増強を期待する方法もある．これらは最終的にがんを攻撃できる T リンパ球の活性を高めることを目指すものである。

そのための方法の一つは T リンパ球に抗原を提示して活性化する樹状細胞の腫瘍抗原認識能を増強させようという試みである．樹状細胞に腫瘍抗原を積極的に暴露させつつ，樹状細胞の活性化を行うというアプローチがとられてきた¹⁾．腫瘍抗原については，本来は腫瘍での変異蛋白であるが，実際には

がん胎児性抗原(CEA)のような胎児期の蛋白，MAGE などの精巢の蛋白，MUC-1 などの組織特異蛋白で腫瘍に強く発現する腫瘍関連抗原で HLA 拘束性のペプチドが用いられている．腫瘍抗原が不明のがんも多数あり，その場合は腫瘍の抽出物や放射線照射したがん細胞，あるいは，がん細胞と樹状細胞の融合細胞が用いられる場合もある。

一方，樹状細胞の機能強化のためには，上述のアジュバントや IL-2，IL-12 遺伝子の導入が行われてきた．このような樹状細胞を対象とするのではなく，がん患者の T リンパ球にがんを攻撃できる腫瘍抗原認識能を積極的に与える方法もある．これも古くから養子免疫療法として行われている方法で，古くはがん患者のリンパ球を取り出して体外で IL-2 などの刺激を与えて体内に戻す方法であった。

最近の試みは HLA 拘束性の腫瘍関連抗原を認識できる T cell receptor 遺伝子をクローニングして，これをがん患者の T リンパ球に導入し，このリン

バ球を体内に戻して機能させる方法である²⁾。

これら免疫療法は理論的にはどれも正しい方法である、思い描いたように功を奏すればがんは消滅するはずであり、現にそのような例も報告されている。しかし多くは図1の②に示すように依然としてがんが増殖・進展しつづけ個体を死に追いやってしまっている。上述した養子免疫療法の際に、がん患者の骨髄細胞を放射線や化学療法で破壊してから行うほうが奏功する場合が多いことが最近報告されている³⁾。

このことからがんが個体を免疫寛容の状態に陥れ、免疫細胞は弱体化されているのみならず、がんを攻撃する免疫細胞に悪影響を及ぼしていることも考えられる。そのメカニズムの解明ががん免疫療法を成功させるために必要である。

がん個体における腫瘍免疫活性化の問題点

がんによる免疫寛容の機構が最近徐々に解明されてきている⁴⁾。がんはさまざまな分子を分泌して増殖のための環境を維持しており、なかでも血管内皮細胞増殖因子(VEGF)は腫瘍血管新生の観点から有名であるが、この分子は骨髄にも作用して未熟な骨髄細胞をがん周囲に集積させる。この未熟な骨髄細胞は未熟な樹状細胞や未熟なマクロファージからなるが、これらの細胞はがん組織中でがんから分泌される IL-10, TGF- β , prostaglandin E₂ などによって成熟が阻害され、このような未熟な抗原提示細胞が所属リンパ節や脾臓に侵入し、末梢の血管に入って全身を循環するようになる。

このような細胞中では tryptophan を分解する indolamine-2,3-dioxygenase (IDO) の亢進, arginine 分解のための arginase I の活性が増強される。Tryptophan は T 細胞の増殖に必要であるが、これが分解される、また arginase I による arginine の分解によって活性酸素が放出される、などの作用で T 細胞の増殖が阻害され、また免疫担当細胞のアポトーシスが誘発される。

一方、がん組織ではさまざまな細胞のアポトーシスも頻繁に起こっているが、未熟なマクロファージはこれらを充分処理できず、抗 DNA 抗体のような

自己抗体が産生される。この自己抗体の濃度が高まり、未熟な樹状細胞が増えた状況下では、CD4⁺CD25⁺ の regulatory T cell (制御性 T 細胞, RegT) が増殖してくる。がん組織中での TGF- β は Effector T 細胞を RegT に変えてしまう作用も発揮する⁵⁾。この RegT は IL-10, IL-35, TGF- β を分泌して CD4⁺T cell, CD8⁺T cell の増殖をともに抑制し、また Granzyme や Perforin を作用させて Effector T 細胞の細胞死を誘導する。また、RegT の表面の CTLA-4 は樹状細胞の CD80, CD86 と結合し Effector T 細胞の樹状細胞への結合・活性化をも阻害する。

このように最近、がんの免疫療法の課題として特にこの RegT の関与が注目され、これのコントロールががんの免疫療法の一つの解決を与えるのではないかと考えられてきている。CTLA-4 に対する抗体を用いた治療法も試みられており、腫瘍の縮小などの効果が認められているが、全身性に RegT を抑制することによる自己免疫による障害の報告もなされている⁶⁾。RegT の腫瘍組織での抑制は一つの治療対象であることは確かであるが、実際にがん組織から産生されるさまざまな液性因子によって宿主の免疫系が無力化されることは明らかであるので、これらを抑制することも必要である。

従来の免疫療法は宿主免疫を強化するシグナルばかりが扱われてきたが、抗腫瘍免疫の抑制シグナルを減弱するというアプローチも併せて行う必要がある、というのが最近の考え方である。したがって、抑制シグナルの発生源であるがん組織をできる限り縮小させるという治療法が並行して行われていなければ、免疫療法の効果も薄いと考えられる。これらのことからがん治療においては図1の③に示すように、まず取れる限りのがん組織の切除を優先し、その後、図1の④の段階においては、免疫増強シグナルの強化と免疫抑制シグナルの減弱を合わせた免疫療法を行う治療戦略を立てねばならない。

そこでつぎに、生体に与える侵襲を最小限にとどめつつがん組織をできる限り縮小させる取り組みが必要になるわけであるが、ここではがん組織に選択的な治療薬の導入法開発の現状について紹介する。

かつてモノクローナル抗体の技術が導入された1980年代初頭には、がんを攻撃できるモノクローナル抗体ができてそれに治療薬を結合させてがんに対するミサイル療法が提唱されたことがあった。白血病のように表面抗原の解析が充分解析されている場合には、CD33やCD45などの抗体が用いられている。しかし固形がんに対しては理想的ながん特異抗体の分離や治療薬の選択の難しさ、がんの細胞質内への到達の非効率さなどから十分な治療効果が得られていない。抗体の分離法としては一本鎖抗体の技術が導入され遺伝子組み換えによるファージのスクリーニング系を用いた探索がつづけられている。また、抗体ではなくがん細胞に取り込まれるリガンド分子を利用する試みもあり、初期にはトランスフェリンが注目され、さらにはがん細胞上に発現する葉酸受容体に取り込まれる葉酸分子が特異性の高いものとして用いられている⁷⁾。

しかしがんへの選択的薬物送達の考え方としては、がん組織での脈管系の構造の解析から受動的標的化の考えが主流を占めるようになっていく。前田らによって提唱されたEPR(Enhanced permeability and retention)効果であり、その考えに基づいて、治療薬を内包したベクターのサイズを小さく(直径100 nm以下)すること、polyethyleneglycol(PEG)修飾などによるベクターの血液滞留性を強化することが考えられ、それらを実現できるベクターの開発がすすめられた⁸⁾。リポソームや高分子ミセルなどが日本で開発されたすぐれたベクターを用いた抗がん剤によるがん治療も試みられている。もちろんこれらのベクターを用いても投与ベクターの100%ががん組織に集積するわけではない。せいぜい10%程度と推定されていて、多くは循環中での分解や肝臓、脾臓、肺などのいわゆる細網内皮系にどうしても捕捉されてしまう。また、循環血液中での安定性の確保のためにPEG修飾は評価されてきたが、このために標的細胞との親和性も低下してしまうというジレンマもある。

原島らは、がん組織中で活性の高いメタロプロテアーゼに感受性の高い配列をPEGのリポソームへ

の結合に用いて、このジレンマを回避する試みを行っている⁹⁾。また、細胞質への治療分子の効果的な導入については膜透過性ペプチドを利用したベクターやプロトンスポンジ効果をもつDOPEのような脂質よりなるリポソームが開発されている¹⁰⁾。また、がん組織中でベクターを組織内部にまで浸透させることも必要であり、TGF- β のインヒビター、LY364947を低濃度で全身投与するとがん細胞の増殖に影響を与えることなく腫瘍組織の血管透過性を高めることによりEPR効果を増強するので、これと高分子ミセルよりなるナノキャリアを併用したがん治療法が報告されている¹¹⁾。また、マトリックスメタロプロテアーゼを増強させ細胞外基質の分解を促進するrelaxinを発現するoncolytic adenovirusによるがん治療効果の増強の報告もある¹²⁾。

DDSについては組織への移行、がん細胞への親和性、細胞内への治療分子の効果的な導入などそれぞれのステップでの障害を解決できる方策が示されてきたことは非常に価値があり、高く評価されるべきであろう。しかし、このDDSだけでがんが撲滅できるわけではない。100%のがん細胞に到達して確実にその細胞を死滅させることは、現状のDDSや抗がん剤の限界を超えていよう。あくまでがん治療のためには複合的な戦略が必要であり、DDSはその一端を担う療法であるという認識のもとにがん治療法が開発されるべきである。

また、がんへの標的導入の考え方としては、受動的標的化を基本としつつ、がん組織へ集積してからはがん細胞への標的分子のベクターへの付加によるがん細胞への選択的な導入も必要である。その時の考え方として、治療に抵抗性であるといわれるがん幹細胞(cancer stem cell, cancer-initiating cell)に選択的に治療分子を導入できるのが理想である。がん幹細胞のマーカーとしてはCD133が一時注目されたが現在では異論も多く、新たなマーカーの探索が進められている。これらが解明されれば再発を抑制できるDDSの開発が可能となるかもしれない。

このような選択的ながんへの導入法は非ウイルスベクターに限ったものではなく、ウイルスベクターによってもさまざまな腫瘍標的ベクターが作成されてきた。アデノウイルスベクターのゲノムを改変

し、その fiber 遺伝子にがん細胞と反応するリガンド分子を結合させたもの、fiber 自体をがん細胞と反応する分子に取り換えたもの、fiber の先端の knob にがん関連抗原と反応する一本鎖抗体を結合させた改変型、などが構築されている¹³⁾。アデノウイルスベクターの全身投与はまだ臨床応用はなされていないが、将来の遺伝子治療用ベクターとして期待されている。このようなウイルスベクターでは遺伝子治療になるわけであるが、その治療分子の選択も考えられねばならない。

がんの縮小を期待する方法としては、がん抑制遺伝子の利用が遺伝子治療のはじまった 1990 年代から考えられてきた。1995 年にがん抑制遺伝子である p53 を発現するアデノウイルスベクター (Ad5CMV-p53) を、外科的切除不能の非小細胞性肺癌を対象として局所投与による投与量決定のための第 1 相臨床試験がアメリカの M.D. アンダーソンがんセンターにおいてなされた¹⁴⁾。

10¹¹ PFU (plaque forming unit) 以下のアデノウイルスベクターの投与が安全に行えることが証明された後、1998 年からは Ad5CMV-p53 の局所投与と放射線療法を併用した第 2 相臨床試験が局所に進展した非小細胞性肺癌を対象にして実施され、半数の患者において 50% 以上の腫瘍縮小が認められた。この成果をもとに岡山大学では 1999 年から上記の第 1 相試験に則った臨床試験を実施し、一部の患者において呼吸機能の改善や咳嗽の減少など、症状の軽減を認めた¹⁵⁾。また、千葉大学では同様のベクターで食道がんの遺伝子治療臨床研究を実施された¹⁶⁾。

p53 によるがん遺伝子治療は局所投与であり、患者の症状の一時的な改善ができたとしても、がんの根絶までには至らない。少なくとも単独投与よりも抗がん剤や放射線療法との併用を行ったほうが効果が期待できる。2008 年には p53 遺伝子を持つアデノウイルスベクター (Advexin) を用いて頭頸部がんの遺伝子治療が試みられている。

最近、mda-7/IL-24 分子ががん遺伝子治療の有力な遺伝子として注目されている¹⁷⁾。これはメラノーマを分化させて増殖性を喪失させる遺伝子群のなかから見いだされた遺伝子で、本来は分泌されて

IL-22R1/IL-20R2 あるいは IL-20R1/IL-20R2 からなるサイトカイン受容体にはたらき、TNF- α 、IL-6、Interferon- γ などの分泌を促進すると考えられてきた。しかしアデノウイルスベクターを用いて強発現させた場合には、endoplasmic reticulum (ER) に局在し、ER-stress 反応を引き起こす¹⁸⁾ ことにより、細胞をアポトーシスに導くさまざまな遺伝子を活性化する。これに加えて血管新生を抑制、転移の抑制作用なども見いだされているので、アメリカでは進行性のメラノーマ患者への mda-7 遺伝子発現アデノウイルスベクターの投与が行われている。

岡山大学のグループも c-Jun-NH(2)kinase のリン酸化からアポトーシスをおこす REIC/D 一個 pf-3 (Dkk-3) 遺伝子の強発現ががん選択的に細胞死を誘導することを見いだし¹⁹⁾、前立腺がんや中皮腫治療への応用を目指している。

しかし遺伝子の発現だけではがん組織の破壊が充分ではない。そこで見いだされたのが制限増殖型ウイルスであり、これはがん組織選択的にウイルスを増殖させてがんを破壊する方法である。

がんを選択的に破壊する oncolytic virus 開発の現状

ウイルス研究においては、その初期のころから新種のウイルスの発見後は、細胞での増殖力を利用したがん治療への応用が試みられてきた。わが国でも 1970 年代には mumps virus のがん治療への利用が目指されていたこともあったが副作用も激しく、がん細胞への強い親和性やがん細胞に選択的に増殖できるウイルスが必要であった。

ニワトリを宿主とするニューキャッスル病ウイルス (NDV) に感染したニワトリに胃がんが生じないことが見いだされて、それを利用したがん治療研究が進んだ結果、2002 年より NDV の連続静脈内投与によって結腸がん、膵臓がん、頭頸部がん、中皮腫、再発性のグリオーマに臨床研究がアメリカやカナダで行われている²⁰⁾。抗腫瘍効果としては minor response がほとんどであるが、副作用は最初の感冒様症状が主たる症状で投与を繰り返すと軽減する。

NDV ががん細胞を選択的に増殖できるのはウイルス増殖を抑制する interferon が多くのがん細胞では欠損しているためであるという説明がなされているだけで、その分子機構の説明は充分ではない。また measles virus のワクチン株 (Edmonston strain) は CD46 を受容体とするため、これが多く発現している multiple myeloma の細胞での増殖が選択的に起こることが見いだされ、これを利用したがん治療臨床研究が行われている²¹⁾。

これら RNA ウィルスばかりでなく、DNA ウィルスのなかにも E1B 欠損のアデノウィルスが p53 欠損細胞で増殖することが見いだされ、これを用いたがん治療法が 1997 年以降試みられている²²⁾。アデノウィルス感染細胞内では、その E1A 蛋白により増殖に関与する E2F が活性化されるが、この転写因子は同時に p53 遺伝子も活性化してしまい、細胞は DNA 合成を行う前にアポトーシスに陥り死滅する。ここで E1B があると p53 と結合してアポトーシスを阻害するので感染細胞はウィルス DNA の複製が可能になる。E1B が欠失したアデノウィルスの感染が起こると、p53 がある正常細胞はアポトーシスに陥りウィルス増殖はできなくなるが、p53 欠損のがん細胞では E1B がなくてもウィルス増殖は可能になり、ウィルスによってがん細胞が駆逐される、というのがその原理であると考えられ、前立腺がん、膀胱がん、卵巣がんなどの治療に応用されてきた。

しかし最近、このウィルスの増殖は p53 依存性ではなく、細胞増殖依存性であることが明らかにされている。さらにこの変異アデノウィルスを遺伝子導入ベクターとしても利用し、前述の自殺遺伝子治療へ応用して、さらに効果を高める工夫もなされており、がん治療の臨床研究がすでに行われている。E1B 欠損アデノウィルスは自然の変異体だが、遺伝子工学的にがん細胞特異的なプロモーターを用いてウィルス増殖に必要な遺伝子を発現できるように組み換えたアデノウィルスも開発されている。テロメラゼ遺伝子のプロモーターを利用した Telomelysin が岡山大学の藤原により開発され²³⁾、米国での第 1 相試験が終了した。

また、アデノウィルスの E1A 蛋白には p53 と並

ぶがん抑制経路を司る retinoblastoma (Rb) 蛋白の結合部位をもつが、これを変異させた E1A 遺伝子をもつアデノウィルスは、Rb 変異のあるがん細胞での選択的増殖が可能である²⁴⁾。

ヘルペスウィルスでは ICP34.5 遺伝子欠損が作成され、これは増殖細胞で発現の高い MAP kinase, PI3 kinase に依存した増殖を起こすため oncolytic virus としてすでに臨床応用がはじまっている²⁵⁾。Vaccinia virus の thymidine kinase や virus growth factor を変異させると thymidine triphosphate や EGF receptor 下流のシグナル伝達が高い細胞、すなわちがん細胞での選択的な増殖が可能になる²⁶⁾。これら oncolytic virus に治療遺伝子を発現できる技術も開発された。p53 や GM-CSF などの治療用遺伝子をもった制限増殖型のアデノウィルスやワクシニアウィルス²⁶⁾も構築され、臨床応用に入っている。

筆者らの開発しているがん治療戦略

1. HVJ-E の抗腫瘍効果

筆者らは難病治療を目指して、HVJ (hemagglutinating virus of Japan : Sendai virus) を用いたドラッグデリバリーシステム (DDS) を開発してきた。HVJ はパラミキソウィルス科のパラミキソウィルス属の一つで、平均直径 300 nm のウィルス粒子であり、その内部には約 15 kB の minus-strand RNA を含むマウスのウィルスで高い細胞融合能をもつ。

HVJ の融合能を利用した高分子導入が 1970 年代から試みられてきたが、ウィルスのゲノムが完全な形で残っていると、感染後抗原性の高いウィルス蛋白が大量に細胞内で生産され、強い細胞毒性が現れる。そこでこのウィルスを不活性化し、ウィルス蛋白の産生をなくし殻 (エンベロープ) の膜融合機能のみを利用して高分子物質の導入を行う研究がなされてきた。その過程で筆者らは不活性化した HVJ 粒子中に簡単に治療分子を封じ込める方法を開発することに成功した。

紫外線などで HVJ を不活化し、その粒子を精製後、治療遺伝子と混合し低濃度の界面活性剤処理と遠心力によって不活化 HVJ 粒子内に遺伝子を封入

図2 Targeting HVJ-E の開発

(Tf : transferrin. Tf-F : transferrin-F protein chimera. shRNA : short hairpin RNA)

し、強い融合活性を保ったまま培養細胞へも生体組織へも遺伝子導入が可能なHVJ envelope vector (HVJ-E)が完成した²⁷⁾。Plasmid DNA は約 20% の効率で封入される。HVJ-E は細胞融合活性を有しており、10 秒以内に細胞膜での融合を起こし、封入物を直接細胞質内に導入できる。この能力を利用して、HVJ-E vector は多くの培養細胞ばかりでなく生体組織への遺伝子導入にもすぐれていることが明らかになった。遺伝子ばかりでなく siRNA のような合成核酸、抗体などの蛋白質や抗がん剤などの封入・導入も可能であり、すなわち DDS として用いることもできる。実際に、細胞分裂時の紡錘体形成に関わるモーター蛋白(Eg5)を抑制する siRNA を封入した HVJ-E は、正常細胞を傷害することなくがん細胞にアポトーシスを誘導できる。

筆者らは悪性グリオーマ細胞を脳内移植して形成させた腫瘍塊にこの siRNA を封入した HVJ-E を単回投与すると、完全に腫瘍消失を実現することに成功した²⁸⁾。

このような治療実験を行う過程で、このベクターそのものに抗腫瘍効果があることが明らかになってきた。その一つは多彩な抗腫瘍免疫活性化作用であ

り、もう一つは直接的な細胞死誘導である。

HVJ-E は、腫瘍組織に作用して各種ケモカインを分泌させて免疫担当細胞の浸潤を促す。さらに樹状細胞から CXCL10 を分泌させて NK 細胞の浸潤を起こし、さらに interferon- α , β によって NK 細胞の活性化を引き起こす²⁹⁾。また、Toll-like receptor 非依存性に NF κ B の活性化を介して樹状細胞の成熟を促進し、腫瘍抗原を MHC-class I, II を介して樹状細胞に提示させ、CD4⁺, CD8⁺ リンパ球に認識させ、interferon- γ の作用で、これらエフェクター T 細胞を活性化し細胞障害性 T 細胞を増強できることが明らかになってきた³⁰⁾。一方、HVJ-E は抗腫瘍免疫を抑制する RegT による抑制作用からエフェクター T 細胞を救済する能力を保持することが確認され、その機序として HVJ-E が腫瘍中や所属リンパ節中の樹状細胞より誘導した IL-6 が大きな役割を担っていることがわかった^{30,31)}。

一方、HVJ-E をヒトがん細胞に作用させると dose-dependent に細胞死を誘導する場合が見いだされた。特にヒト前立腺がん細胞にかけるとホルモン抵抗性の前立腺がん由来の PC3 や DU145 細胞には著明なアポトーシスを誘導することが明らかに

なった。しかしホルモン感受性の LNCap 細胞や正常前立腺上皮由来の PNT2 細胞はまったく影響を受けない。これはホルモン抵抗性の前立腺がんでは HVJ の受容体となりうる ガングリオシド (GD1a, Sialyl paragloboside) が著明に産生されているが、ホルモン感受性の前立腺がんや正常前立腺上皮細胞ではきわめて産生が低いことによっている。

HVJ-E がホルモン抵抗性の前立腺がん細胞の受容体に結合すると、速やかに膜融合が起こって HVJ-E に含まれるウイルスゲノム断片が細胞質内に導入され、RIG-I によって認識されると IRF-3 が活性化し、Type I-IFN が産生される。腫瘍は自身の産生した IFN を感知して JAK-STAT 経路によって Caspase 3, 8 を活性化してアポトーシスを起こす、すなわち腫瘍が自殺することが明らかになった³²⁾。

また、腫瘍細胞自体の細胞融合も顕著になって増殖の障害が起こる。したがって、ホルモン抵抗性のヒト前立がん細胞を移植した免疫不全マウス (SCID, NOD-SCID) では HVJ-E の直接投与によって著明な腫瘍抑制が得られており、SCID マウスにおいては 100% 腫瘍が消失する。また、マウス前立腺への腫瘍細胞の接種による正所性モデルでも 1 回の HVJ-E 投与で腫瘍の増殖はみられなくなる。このような細胞死誘導は悪性グリオーマやメラノーマでもみられている。

2. 腫瘍標的 HVJ-E の開発

筆者らは HVJ の融合蛋白の遺伝子を改変して、標的導入ベクターを作成する方法を開発した (図 2)。まず一本鎖抗体遺伝子と融合蛋白とのキメラ遺伝子を作成し、これを導入した細胞を作成した。この細胞でキメラ分子が細胞膜に運ばれ、野生型のウイルスが感染したときに、出芽してくるウイルスの融合蛋白の一部にこのキメラ分子が取り込まれていれば、抗体分子をもつ HVJ が安定に得られることが期待される。実際にこの方法が機能することがわかった³³⁾。しかしこの段階の標的導入 HVJ-E ベクターには本来の HVJ の受容体に結合する HN 蛋白が含まれているため、受容体を発現している細胞への感染が免れない。そこで HN の

mRNA に特異的な siRNA をベクター産生細胞に導入すると、そこから産生される HVJ は HN を欠損していること、HN によって引き起こされる赤血球凝集反応をほぼ完全に抑制できることに成功した³⁴⁾ (図 2)。

この siRNA の技術と標的分子を有する HVJ 作成技術を組み合わせることにより、目的とする組織や細胞以外への遺伝子導入を回避でき副作用の軽減につながる HVJ envelope を開発することができる。モデルケースとして標的分子としてトランスフェリンを持ち HN を欠損した HVJ によってトランスフェリン受容体の多いがん細胞への高効率遺伝子導入を行うことができるようになった³⁵⁾。

HVJ-E の特長は、多彩な抗腫瘍活性を持ったベクターであって、治療分子を封入することでその効果を増強でき、さらに標的化が可能になる点である。この利点を生かしたがん治療戦略を立てる必要がある。

すでに HVJ-E 単剤でのがん治療臨床研究が 2009 年 6 月 30 日に大阪大学医学部医学倫理委員会で承認された。メラノーマに対する Phase I/II 試験である。今後は前立腺がんへの対象を拡大するとともに、遺伝子を封入した HVJ-E による遺伝子治療、さらには標的導入ベクターを用いた全身投与によるがん治療へ進む計画である。

文 献

- 1) O'Neill D, Bhardwaj N : Exploiting dendritic cells for active immunotherapy of cancer and chronic infection. *Methods Mol Med* 109 : 1-18, 2005.
- 2) Uckert W, Schumacher TN : TCR transgenes and transgene cassettes for TCR gene therapy : status in 2008. *Cancer Immunol Immunother* 58 : 809-822, 2009.
- 3) Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R et al. : Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma : evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol* 26 : 5233-5239, 2008.
- 4) Muller AJ, Scherle PA : Targeting the mechanism of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Nature Rev Cancer* 6 : 613-626, 2006.
- 5) Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ : How regulatory T cells work. *Nature Rev Immunol* 8 : 523-532, 2008.
- 6) Comin-Anduix B, Lee Y, Jalil J, Algazi A, de la Rocha P et al. : Detailed analysis of immunologic effects of the cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4-blocking monoclonal antibody tremelimumab in peripheral blood of patients with melanoma. *J Transl Med* 6 : 22, 2008.
- 7) Reddy JA, Abburi C, Hofland H, Howard SJ, Vlahov I et

- al. : Folate-targeted, cationic liposome-mediated gene transfer into disseminated peritoneal tumors. *Gene Ther* 9 : 1542-1550, 2002.
- 8) Litzinger DC, Buiting AM, van Rooijen N, Huang L : Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1190 : 99-107, 1994.
- 9) Kogure K, Akita H, Yamada Y, Harashima H : Multifunctional envelope-type nano device (MEND) as a non-viral gene delivery system. *Adv Drug Deliv Rev* 60 : 559-571, 2008.
- 10) El Ouahabi A, Thiry M, Pector V, Ruysschaert JM et al. : The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids. *FEBS Lett* 414 : 187-192, 1997.
- 11) Kano MR, Bae Y, Iwata C, Morishita Y, Yashiro M et al. : Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF- β signaling. *Proc Natl Acad Sci(USA)* 104 : 3460-3465, 2007.
- 12) Ganesh S, Edick MG, Idamakanti N, Abramova M, Van Roey M et al. : Relaxin-expressing, fiber chimeric oncolytic adenovirus prolong survival of tumor-bearing mice. *Cancer Res* 67 : 4399-4407, 2007.
- 13) Bachtarzi H, Stevenson M, Fisher K : Cancer gene therapy with targeted adenoviruses. *Expert Opin Drug Deliv* 5 : 1231-1240, 2008.
- 14) Moon C, Oh Y, Roth JA : Current status of gene therapy for lung cancer and head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 9 : 5055-5067, 2003.
- 15) Fujiwara T, Tanaka N, Kanazawa S, Ohtani S, Saijo Y 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.
- 16) Shimada H, Matsubara H, Shiratori T, Shimizu T, Miyazaki S et al. : Phase I / II adenoviral p53 gene therapy for chemoradiation resistant advanced esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 97 : 554-561, 2006.
- 17) Lebedeva IV, Sauane M, Gapalkrishnan RV, Sarkar D, Su ZZ et al. : mda-7/IL-24 : Exploiting cancer's Achilles heel. *Mol Ther* 11 : 4-18, 2005.
- 18) Pataer A, Hu W, Xiaolin L, Chada S, Roth JA et al. : Adenoviral endoplasmic reticulum-targeted mda-7/interleukin-24 vector enhances human cancer cell killing. *Mol Cancer Ther* 7 : 2528-2535, 2008.
- 19) Kashiwakura Y, Ochiai K, Watanabe M, Abarzua F, Sakaguchi M et al. : Down-regulation of inhibition of differentiation-1 via activation of activating transcription factor 3 and Smad regulates REIC/Dickkopf-3-induced apoptosis. *Cancer Res* 68 : 8333-8341, 2008.
- 20) Pecora AL, Rizvi N, Cohen GI, Meropol NJ, Stermann D et al. : Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. *J Clin Oncol* 20 : 2251-2266, 2002.
- 21) Kelly E, Russell SJ : History of oncolytic viruses : Genesis to genetic engineering. *Mol. Ther* 15 651-659, 2007.
- 22) Davis JJ, Fang B : Oncolytic virotherapy for cancer treatment : Challenges and solutions. *J Gene Med* 7 : 1380-1389, 2005.
- 23) Liu D, Kojima T, Ouchi M, Kuroda S, Watanabe Y et al. : Preclinical evaluation of synergistic effect of telomerase-specific oncolytic virotherapy and gemcitabine for human lung cancer. *Mol Cancer Ther* 8 : 980-987, 2009.
- 24) Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, Lee PS, McDonnell TJ et al. : A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* 19 : 2-12, 2000.
- 25) Liu BL, Robinson M, Han ZQ, Branston RH, English C et al. : ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther* 10 : 292-303, 2003.
- 26) Kirn DH, Thorne SH : Targeted and armed oncolytic poxviruses : a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat Rev Cancer* 9 : 64-71, 2009.
- 27) Kaneda Y, Nakajima T, Nishikawa T, Yamamoto S, Ikegami H et al. : HVJ (hemagglutinating virus of Japan) envelope vector as a versatile gene delivery system. *Molecular Therapy* 6 : 219-226, 2002.
- 28) Matsuda M, Yamamoto T, Matsumura A, Kaneda Y : Highly efficient eradication of intracranial glioblastoma using Eg5 siRNA combined with HVJ envelope. *Gene Therapy* 16 : 1465-1476, 2009.
- 29) Fujihara A, Kurooka M, Miki T, Kaneda Y : Intratumoral injection of inactivated Sendai virus particles elicits strong antitumor activity by enhancing local CXCL10 expression and systemic NK cell activation. *Cancer Immunology Immunotherapy* 57 : 73-84, 2008.
- 30) Kurooka M, Kaneda Y : Inactivated Sendai virus particles eradicate tumors by inducing immune responses through blocking regulatory T cells. *Cancer Research* 67 : 227-236, 2007.
- 31) Suzuki H, Kurooka M, Hiroaki Y, Fujiyoshi Y, Kaneda Y : Sendai virus F glycoprotein induces IL-6 production in dendritic cells in a fusion-independent manner. *FEBS Letters* 582 : 1325-1329, 2008.
- 32) Kawaguchi Y, Miyamoto Y, Inoue T, Kaneda Y : Efficient eradication of hormone-resistant human prostate cancers by inactivated Sendai virus particle. *Int J Cancer* 124 : 2478-2487, 2009.
- 33) Kawachi M, Tamai K, Saga K, Yamazaki T et al. : Development of tissue-targeting HVJ envelope vector for successful delivery of therapeutic gene to mouse skin. *Human Gene Therapy* 18 : 881-894, 2007.
- 34) Saga K, Tamai K, Kawachi M, Shimbo T et al. : Functional modification of Sendai virus by siRNA. *J Biotechnology* 133 : 386-394, 2008.
- 35) Shimbo T, Kawachi M, Saga K, Fujita H, et al. : Development of a transferrin receptor-targeting HVJ-E vector. *Biochem Biophys Res Comm* 364 : 423-428, 2007.