

Application of tumor-specific replicative adenovirus to cancer treatment and diagnosis

| | |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/27829 |

【総説】

腫瘍特異的増殖性アデノウイルスの癌治療および診断への応用
Application of tumor-specific replicative adenovirus to cancer treatment and diagnosis金沢大学大学院医学系研究科分子移植学
(産婦人科学)

京

哲

はじめに

腫瘍特異的増殖性アデノウイルスは、ウイルスが自己複製する性質を利用して腫瘍細胞内でのみ複製増殖するよう遺伝子操作を行い構築されたウイルスである。我々は腫瘍特異性を担保するためにhTERT遺伝子プロモーターを組み込み、さらにはウイルス感染細胞をマーキングするためにGFP遺伝子をも組み込んだ増殖型アデノウイルスをベンチャー企業との連携により開発してきた。このウイルスには新たな抗癌剤および診断薬としての可能性が示されつつある。本稿ではウイルスを開発した経緯を概説し、本ウイルスを用いた癌治療、癌診断の基礎実験から臨床応用の現状、将来展望までを示したい。

1 癌の遺伝子治療に用いられてきたアデノウイルスベクター

アデノウイルスは癌の遺伝子治療においてアポトーシス誘導遺伝子あるいは癌抑制遺伝子などを癌細胞に導入するためのベクターとして用いられてきた。アデノウイルスベクターは染色体に積極的に組み込まれるための機構を持ち合わせていない。したがってその効果は一過性であるが導入効率、発現効率が極めて高い。

アデノウイルスは細胞に感染すると複製増殖するので、そのまま用いるとウイルス毒性により著明な副作用が生じる恐れがある。このため、いわゆる第一世代のアデノウイルスベクターはアデノウイルスの増殖に必至な自己遺伝子E1A, E1B領域を欠失させ、そこに目的の遺伝子を挿入している。すなわち、アデノウイルスベクターは複製増殖というウイルス本来の特性を持たず、単に細胞に感染して目的の遺伝子を細胞内に運び込むための道具として利用されてきたわけである。

アデノウイルスベクターが感染する細胞は幅広く、多くの癌種において高い導入効率が期待できる。逆に言えば、細胞特異性が極めて低い。対照的にレトロウイルスベクターは増殖している細胞のみで染色体に組み込まれるために、増殖能の高い腫瘍細胞に比較的選択性が高いが、導入されるコピー数が限られるために発現量は低く、癌の遺伝子治療には不向きである。アデノウイルスベクターの細胞特異性の低さは、遺伝子導入が癌細胞のみならず正常細胞にも及び、思わぬ副作用の発現があり得ることを意味する。

2 腫瘍特異的遺伝子発現の戦略

このような背景から、アデノウイルスベクターに、癌細胞特異的に遺伝子を発現させる試みがなされるようになった。目的の導入遺伝子上流に癌細胞に特異性の高いプロモーターを組み込むというものである。たとえば肝癌に対しては肝癌に特異的なAFPプロモーターなどが試みられた。しかしながら、これらのプロモーターはさほど癌特異性が高くなく、プロモーター活性は汎用されている強力なプロモーターに比べ格段に低いことがわか

ってきた。このため、高い発現量を得るには大量のウイルスベクターを導入する必要があり、ウイルスそのものに対する毒性が問題となる。このような状況の中、我々はテロメラーゼの触媒サブユニットであるTERT (Telomerase reverse transcriptase) 遺伝子プロモーターのクローニングに成功した¹⁾。テロメラーゼはあらゆる癌種の90%以上で活性化し、しかも癌細胞特異的に発現している²⁾。テロメラーゼは3種類のsubunitからなる複合体で、その酵素活性はTERTが担っている。TERTの遺伝子発現はプロモーターからの転写レベルで調節され、その遺伝子発現はテロメラーゼ活性の決定因子となっている³⁾。すなわち、テロメラーゼ活性の癌細胞特異性はTERTのプロモーターレベルでの転写発現調節によってもたらされている⁴⁻⁶⁾。TERT遺伝子プロモーターの転写活性を調べてみると、活性は極めて癌細胞特異的で、かつ非常に強力なものであった^{1,4)}。これほどまでに癌特異性が高く強力なプロモーターはかつて存在しなかった。

以上の結果から、TERTプロモーターをアデノウイルスベクターの導入遺伝子上流に組み込み、癌細胞特異的に遺伝子発現をもたらしることが可能になると考えられた。このstrategyにしたがって、Baxやcaspaseなどのアポトーシス遊動遺伝子をTERTプロモーター下にアデノウイルスベクターに組み込んで癌細胞特異的にアポトーシスを誘導する戦略が試みられるようになった⁷⁻⁹⁾。

3 腫瘍特異的増殖型アデノウイルスの開発

腫瘍特異的アデノウイルスベクターの抗癌作用に関しては新たな問題も持ち上がってきた。アデノウイルスベクターによる遺伝子治療では癌への局所注入が投与法の主体となる。この方法では注入局所の細胞は死滅できても、周囲の細胞にまで効果は及びにくい。これはベクターシステムそのものが抱える問題でもあり、発想を根本的に変えない限り癌の遺伝子治療の進展は困難である。

そこで注目されたのがアデノウイルス療法である。ウイルスは本来病原生物であり、感染すると劇的に自己複製し、病原性を発揮する。それならば、ウイルスそのものを癌組織に感染させて、自己複製させ、ウイルス毒性により組織を死滅させられないか？これが増殖型ウイルス療法のコンセプトである(図1)。自己複製を防ぐためにE1A/E1B遺伝子を欠損させたのが従来のアデノウイルスベクターであるのに対し、増殖型アデノウイルスではE1A/E1B遺伝子を保持させる。そしてその上流にTERTプロモーターをつないでおけば、TERTプロモーターからの癌細胞特異転写により癌細胞でのみE1A/E1B遺伝子が発現する。したがって癌細胞のみでウイルスが複製できるようになるはずである。図2に我々が構築した増殖型アデノウイルスの遺伝子構造を示した(開発コード:OBP-301)。

我々はOBP-301の腫瘍細胞特異的複製を検証するため

に、正常細胞および各種癌細胞に感染させ、E1A遺伝子の発現をWestern blot法で確認した。その結果、癌細胞ではか高いレベルのE1A発現が確認できた(図3A)¹⁰。さらに感染後の細胞内のウイルスコピー数を測定し確認したところ、癌細胞では正常細胞に比べ1000倍程度増幅されていることがわかった(図3B)。ただ、正常細胞で全く複製しないというわけではない。癌細胞特異的な殺細胞効果については正常細胞および各種癌細胞にOBP-301感染後にクマーシーブルー染色にて細胞死を確認したところ、癌細胞でのみ有意な細胞死が確認できた(図3C)。

OBP-301のin vivoでの造腫瘍性の抑制効果は、ヌードマウス皮下に腫瘍を作らせてOBP-301を局注し、腫瘍の増殖サイズをモニターして調べた。コントロールとして用いたPBSや複製能を持たないベクター型のアデノウイルスを注射した場合に比べ、明らかに腫瘍の発育が阻害された(図4)¹⁰。またすでに大きく発育した腫瘍にOBP-301を局注した場合でも腫瘍体積の大幅な減少が確認されている¹¹。

このようにOBP-301の抗腫瘍効果は動物実験レベルでは確実にみられるが、副作用はどうであろうか? コットンラットに作らせた腫瘍にOBP-301を局注した場合のOBP-301の分布を各臓器別にDNA-PCRで確認すると、OBP-301は全身に拡散して幅広く分布するものの、病理

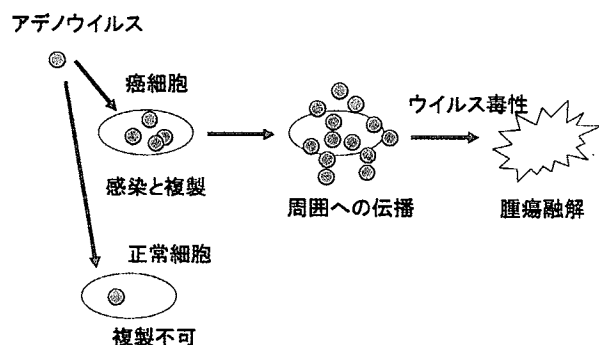
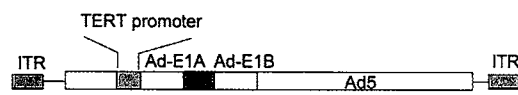


図1. 腫瘍特異的増殖性アデノウイルスによる癌治療の概念
腫瘍細胞でのみ複製増殖するアデノウイルスのウイルス毒性により腫瘍細胞は死滅するが、正常細胞には感染はするものの複製増殖しないため毒性はもたらさない。

OBP-301



OBP-401

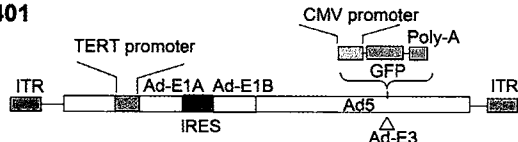


図2. 腫瘍特異的増殖性アデノウイルスの構造
アデノウイルスtype5のgenomeの中で、複製に必要なE1A/E1Bの上流に腫瘍特異的なTERTプロモーターを組み込むことで癌細胞でのみE1が発現し、その結果、癌細胞でのみ複製増殖が可能となる(OBP-301)。E1AおよびE1Bが個別に確実に発現するように間にIRES配列を入れ込んである。さらに下流のE3遺伝子領域にGFPのcDNAをCMV promoterの下に繋いだカセットを入れることで、このウイルスが複製増殖した場合にGFPが発現することになる(OBP-401)。(文献6からの改変)。

組織学的検討では全身組織の炎症や壊死、アポトーシスは確認されなかった¹¹。OBP-301は血流などに乗って遠隔臓器にも移行するが、癌細胞が存在しない限り特定の場所で複製増殖することはないようである。そのため臓器への副作用はほとんどないと考えられている。

4 抗癌剤としてのOBP-301の可能性および臨床応用に向けての展望

OBP-301はベンチャー企業であるOncolys BioPharmaにより製品化され、現在米国で癌患者による臨床第2相試験が行われている。その後の第3相試験、および我が国での同様の臨床試験をも目指している。OBP-301は既存の抗癌剤との作用機序の重複がないのが特徴である。その作用機序については解析が進んでおり、感染により細胞内の免疫細胞を賦活化してIFN-gammaを代表とする血管新生阻害因子を誘導することが抗腫瘍効果の主体であることもわかってきた¹²。OBP-301は既存の抗癌剤

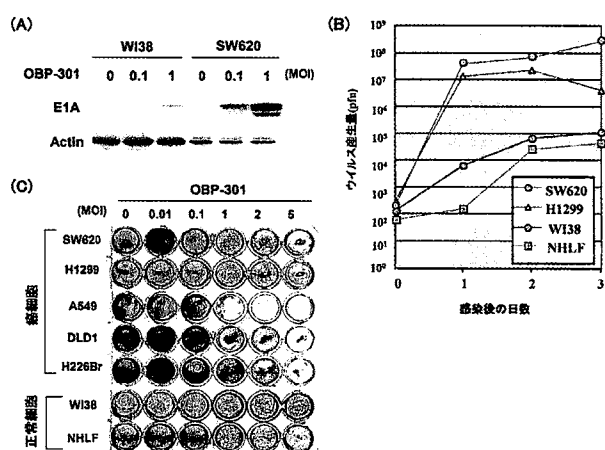


図3. OBP-301感染の効果
(A) 正常線維芽細胞(WI38)と癌細胞株(SW620)にOBP-301を感染させ、E1A遺伝子の発現をWestern Blot法で確認した。癌細胞で格段に高いE1A遺伝子の発現がみられる。(B) 正常線維芽細胞(WI38, NHLF)と癌細胞株(SW620, H1299)にOBP-301を感染させ、経時的に産生されるウイルス量を測定した。正常細胞に比し、癌細胞で約1000倍以上高い効率でウイルス複製がみられる。(C) 正常線維芽細胞(WI38, NHLF)と各種癌細胞株にOBP-301を感染させ、クマーシーブルー染色にて生細胞を確認した。感染量(MOI)が増えるにしたがい癌細胞でのみ細胞死がみられる。(文献4からの改変)

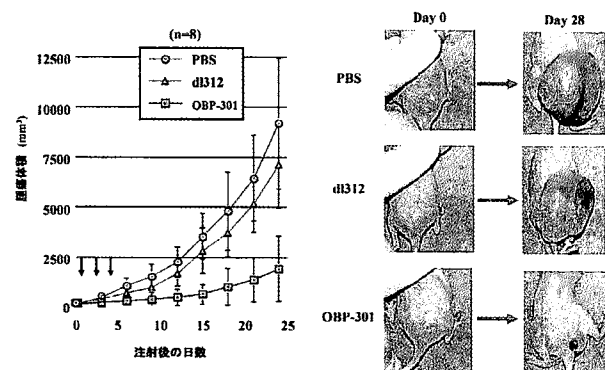


図4. OBP-301のin vivoでの抗腫瘍効果
ヌードマウスに肺癌細胞H1299を接種して腫瘍を形成した後OBP-301およびコントロールとしてPBSあるいは非増殖性のベクター型アデノウイルス(dl312)を3回局所注射(1×10⁷ pfu/50μl/body) (矢印)し、腫瘍サイズの変化をモニターした。OBP-301注射群で著明な腫瘍発育の抑制がみられた。(文献4からの改変)

や放射線に抵抗性の癌細胞においても効果を有することがわかっている(図5)¹³。さらにはこれら既存の抗癌剤との併用による効果増強も期待できることがわかってきた(図6)^{13,14}。併用による効果増強の分子機構は不明であるが、抗癌剤が腫瘍血管内皮細胞、特に静脈の内皮細胞を攻撃してOBP-301の腫瘍内貯留が増すことなどが考えられている。第2の利点として注入局所で確実に効果を示す一方で、全身に拡散することである。もし拡散先に癌病巣が存在すれば、その部位で複製増殖を開始する。これにより広汎に拡がる微小転移病巣にも作用する可能性がある。ウイルス本来の感染性、自己複製能が生かされるわけである。第3に副作用の少なさがあげられる。コトナラットを用いた詳細な実験では今のところOBP-301による副作用として目立ったものは報告されておらず、TERTプロモーターを利用することにより危惧するようなウイルス毒性は最小限にとどめられているようである。これに対し、OBP-301の問題点あるのか？現在までのところ腫瘍内局注では抗腫瘍効果が確認できるものの、全身投与として静脈内投与した場合の固形腫瘍への効果は未知であり、今後の課題である。特に原病巣や主病巣がある場合は同部位への局注により、そこを起点として複製し全身に拡散するが、癌性腹膜炎のように微細な癌病巣が多発している場合の投与方法については検討がなされていなかった。我々はOBP-301による卵巣癌腹膜播種病巣への治療効果を検討してきた。卵巣癌細胞株の腹膜播種を有するマウスモデルにOBP-301を腹腔内注入し、腹膜播種に対する効果及び生存期間に対する効果を検討した結果、これらの腹膜播種モデルにおいてシスプラチンとの併用による相乗効果とそれによる延命が確認されている(図7)¹³。このように体内内への注入も有効な投与経路となりそうである。

5 癌診断薬としてのOBP-401の開発と臨床応用

OBP-301が新規抗癌剤として有望であることが示される一方で、この癌細胞特異的増殖を利用した癌細胞検出

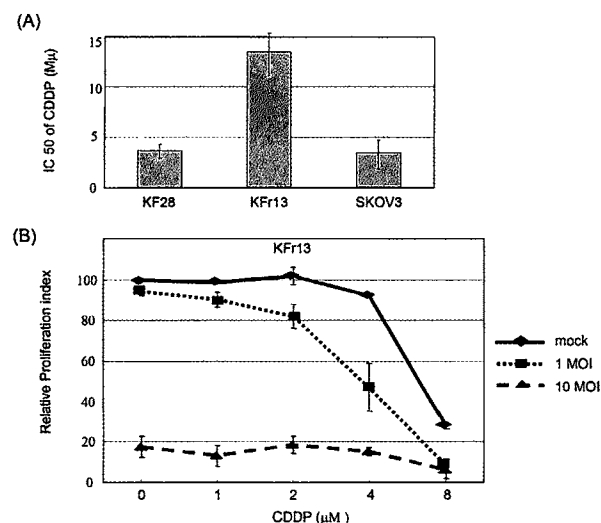


図5. シスプラチン耐性卵巣癌細胞に対するOBP-301の効果
各種卵巣癌細胞株KFr28, KFr12, SKOV3のシスプラチンに対するIC50を示す。シスプラチン耐性であることが知られているKFr13では高いIC50を呈する。
(B) KFr13細胞に各種濃度でシスプラチンを作用させ、同時に1MOI, 10MOIのOBP-301を感染させた際の細胞増殖曲線を示す。10MOIのOBP-301では単独で強力な抗癌作用を示す。1MOIのOBP-301ではシスプラチンに対する増感作用が認められた。(文献13からの抜粋)

法の開発も試みられてきた。我々はOBP-301のゲノムにGreen fluorescent protein (GFP) のcDNAを組み込み込んだウイルスを構築し(開発コードOBP-401(図2))、細胞に感染させると複製増殖した細胞内でGFPが産生され、蛍光顕微鏡下で観察すればその細胞を可視化できる¹⁵。ヌードマウスで作らせた皮下腫瘍内にOBP-401を局注し、キセノンファイバー光源をあててCCDカメラで撮影すると腫瘍全体に広がる蛍光が確認できた(図8)¹⁵。またヌードマウス胸腔内に肺癌細胞を注入して作らせた播種モデルでは、胸腔内へのOBP-401投与により播種巣に一致した蛍光を確認できた(図8)¹⁵。さらにはヒト直腸癌細胞をマウス直腸に注入して作らせた直腸癌モデルでは、癌組織へのOBP-401局注後、一定時間観察すると、所属の傍大動脈リンパ節の一部に蛍光を確認出来、同部を採取して病理組織学的に観察したところ、蛍光部位に一致して転移細胞が確認出来た(図8)¹⁶。この結果は非常に興味深く、原発巣にOBP-401を局注し一定時間後にGFP発光部位を検索することにより転移部位のナビゲーションが可能となることを意味する。現実的な臨床応用としては術前に原発巣にOBP-401を局注し、術中にキセノンファイバー光源を術野に照射して転移リンパ節を可視化する事が可能となるかもしれない。それによって系統的なリンパ節廓清から転移リンパ節だけを摘出する縮小手術へのシフト、あるいは転移がない場合にリンパ節廓清を省略する判断材料とすることも可能かもしれない。さらにはこのアプローチによりセンチネルリンパ節の同定も試みたいと考えている。

一方で我々は、OBP-401の細胞診への応用も試みた¹⁷。ヒト子宮頸癌細胞診にて採取される子宮頸部擦過細胞にOBP-401を感染させ、蛍光顕微鏡で確認すると蛍光を発する細胞が確認出来る。この細胞が癌細胞か否かは慎重な検討を要する。そこで我々は正常子宮頸部より採取した擦過細胞にあらかじめCellTracker stainingで染色した子宮頸癌細胞株を混ぜ、これらにOBP-401を感染させて

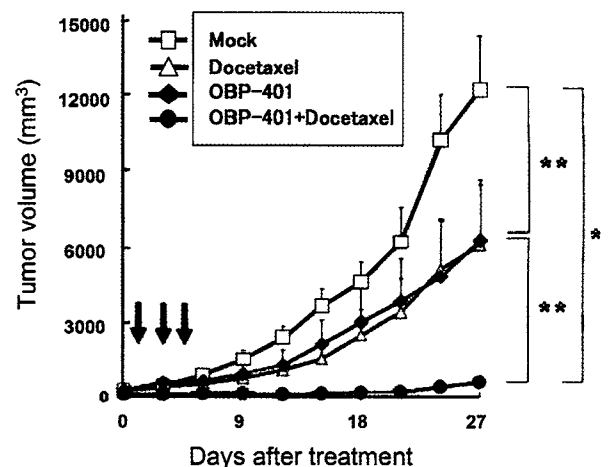


図6. OBP-401のdocetaxelとの併用効果
この実験では投与ウイルスの感染をモニターするためにGFP組み込み型のウイルス(OBP-401)が用いられている。肺癌細胞株H1299をヌードマウスに移植して作った腫瘍にOBP-401を腫瘍内局注(1x10⁷PFU)し、OBP-401単独または同時にdocetaxel(12.5mg/kg)を腹腔内投与する治療を3コース(矢印)行い、その後の腫瘍の体積をモニターした。併用により抗腫瘍効果が著明に増強している。 $p < 0.01$ (*), $p < 0.05$ (**)(Student's *t*-test)。(文献14からの抜粋)

蛍光顕微鏡で観察すると、CellTrackerにて青く染まった細胞のみがGFP蛍光を発しており(図9), 癌細胞の検出感度, 特異度とも80-90%と良好であった¹⁷⁾. 実際の一細胞診材料で確認したところ, 子宮頸癌のみならず子宮内膜癌の細胞診でも90%以上の感度で癌細胞を検出できることが明らかとなった.

6 血中循環がん細胞検出の試み

血中循環がん細胞 (Circulating Tumor Cell: CTC) の存在は2004年頃から注目されるようになった. 当初は血中に含まれる微量の上皮性細胞を, 上皮特異的のマーカであるサイトケラチンなどターゲットとしてRT-PCRにて検出しようとするもので, 様々な癌種で幅広く研究が行われるようになった¹⁸⁾. この原理の欠点として, 検出される上皮細胞が癌細胞であるか否かは問われていない.

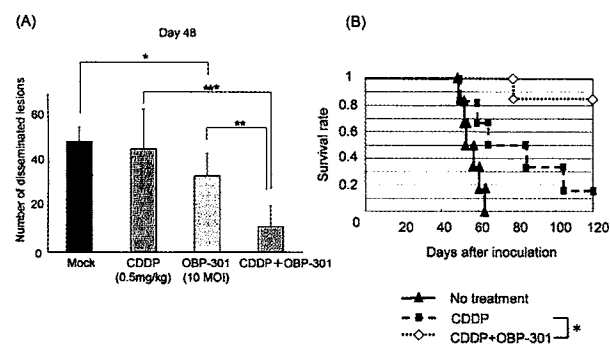


図7. OBP-301のシスプラチンとの併用効果
(A) 卵巣癌細胞株SKOV3をヌードマウスの腹腔内に散布後, シスプラチン (0.5mg/kg) およびOBP-301 (10MOI) を隔日て計3回腹腔内注入し, さらにOBP-301はweeklyで継続投与した. 48日後に腹腔内播種病変の数を評価した. 両者の併用による抗腫瘍効果の増強が確認出来る. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.
(B) 同様の処置を施したマウスの生存曲線を示す. シスプラチン (0.5mg/kg) 単剤に比べ, OBP-301 (10MOI) の併用により延命効果が認められた. * $P < 0.05$. (文献13からの抜粋)

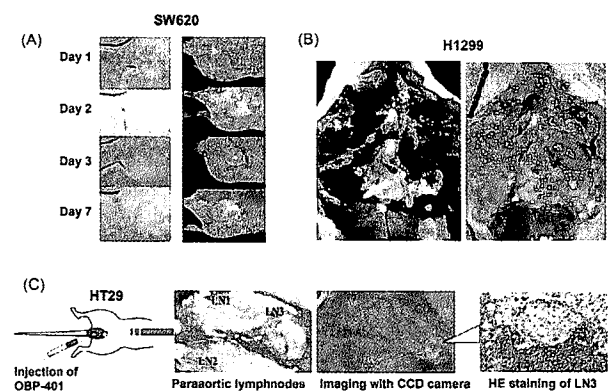


図8. OBP-401による腫瘍細胞のイメージング
(A) 大腸癌細胞SW620をヌードマウス皮下に移植して腫瘍を作らせ, OBP-401を局注し, 経時的にCCDカメラでモニターした. 時間とともに腫瘍内のGFPシグナルが確認出来る.
(B) 肺癌細胞H1299をヌードマウス胸腔内に注入して播種を作らせ, OBP-401を胸腔内注入し, 経時的にCCDカメラでモニターした. 播種巣に一致してGFPシグナルが確認出来る.
(C) 直腸癌細胞HT29をヌードマウスの直腸に移植して腫瘍を形成させ, その後腫瘍にOBP-401を局注し, 一定期間後に傍大動脈リンパ節を確認すると, 3つの腫大リンパ節 (LN1, LN2, LN3) (矢印) を認めた. CCDカメラにて観察すると, LN3にのみGFPシグナルを認めた. これらのリンパ節をすべて摘出し, 組織学的に検討したところ, LN1, LN2は非特異的腫大であり, LN3にのみ転移癌細胞を認めた. (文献15 (A, B) および文献16 (C) からの改変)

また仮に癌細胞であったとしてもその細胞のviabilityまではサイトケラチンの発現ではわからない. このような背景より我々はOBP-401をCTC検出に応用することを目的とした基礎実験を進めてきた. OBP-401は癌細胞特異的に, かつviableな細胞でのみ複製増殖してGFPシグナルを励起する原理を利用するわけである.

方法としては5-10mlの採血後に溶血操作を加えて遠心し, 残った細胞成分を懸濁してOBP-401を感染させ, 一定時間後にGFP陽性細胞をカウントするというものである. まずはコントロール実験として健常者から採血した検体に癌細胞を様々な個数混入させて実験を行い, GFP陽性細胞数をカウントしたところ, 混入癌細胞とGFP陽性細胞のカウントは直線的な相関を認め, GFP陽性細胞をCTCと見なして問題ないことが確認された¹⁹⁾. この方

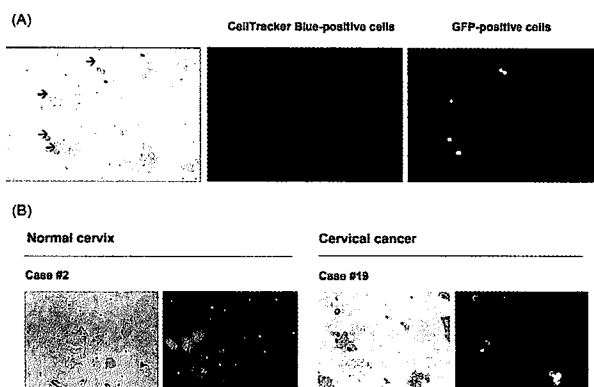


図9. OBP-401の細胞診への応用
(A) 子宮頸癌細胞C33AをあらたじめCellTrackerで染色しておき, 正常子宮頸部より採取した細胞診検体と混ぜ合わせた. これにOBP-401を感染させ, 24時間後に蛍光顕微鏡で観察すると, CellTracker陽性 (青色) の細胞のほとんど全てにGFPシグナルが確認出来た. その他の細胞にはGFPシグナルは確認出来なかった. 矢印は形態的に明らかに癌細胞と思われるものを示す. (正常頸部細胞は大きく, 平べったい).
(B) 正常子宮頸部および頸癌患者の病変より採取した細胞診検体にOBP-401を感染させ, 24時間後に蛍光顕微鏡で観察すると, 頸癌患者の異型細胞に強いGFPシグナルを認めた. 正常患者の検体にはGFPシグナルは全く認められない. (文献17からの改変)

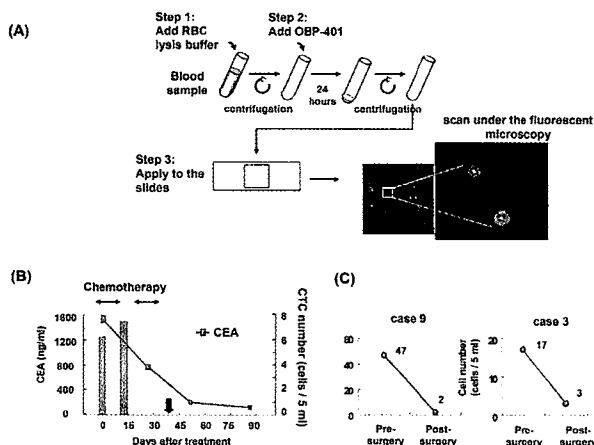


図10. OBP-401の循環腫瘍細胞 (CTC) 検出への応用
(A) CTC検出法の概略
(B) 多発性肝転移を来した進行胃がん患者に化学療法を2回施行し, 経時的にCEAとCTC countの動きを比較した. 矢印の時点でCTC countはゼロとなった.
(C) 胃がん (case 9) および直腸癌 (case 3) の腫瘍摘出術前後のCTC countの動き. いずれも手術摘出により大幅に減少している. (文献19からの改変)

法で、実際に担癌患者の血液検体からはCTCが検出され、腫瘍の摘出術後にはCTCが大幅に減少することも確認している¹⁸⁾。

CTC検出の際には白血球によるnon-specific signalが最も大きな問題となる。通常この方法でGFPシグナルを発する非癌細胞は、計測者が慣れてくればその細胞の形態から目視で判別可能であるが、より精度を上げるために2重染色により白血球を客観的に除外する金沢大学方法を構築し²⁰⁾、現在症例を集積して癌の進展とCTCの関係、さらには治療効果との関係などを検討している。

おわりに

以上述べたように腫瘍特異的増殖性アデノウイルスの応用範囲は予想以上に広い。アデノウイルスの病原性を逆手にとった発想により新規抗癌剤としての道が開けてきた。特にOBP-301は米国での臨床試験が進行中である。上述したようにこのウイルスの現実的な使い道としては既存の抗癌剤との併用による増感剤としての効果を期待したい。さらには既存の治療に抵抗性となった再発癌患者への治療のオプションという方向性も目指している。またOBP-401のCTC検出への応用に関しては、良い腫瘍マーカーのない癌種の病勢把握、さらには再発予測などに応用できる可能性が高く、企業との連携により臨床試験を目指してゆきたい。CTC検出の実用の成否は、より簡便であること、安価であること、侵襲が少ないことにかかっているが、我々の構築した金沢大学方式²⁰⁾では1検体あたり、800円で行えるめどが付いた。結果も24時間で判明する。腫瘍マーカー測定のための採血検体をそのまま使えるため侵襲も少なく、極めて実地的なtranslational researchとして期待している。

謝 辞

今回の一連の研究を遂行するにあたり、ご指導、激励いただいた産婦人科主任教授、井上正樹先生に深謝致します。研究の一部は岡山大学消化器・腫瘍外科学の藤原俊義教授との共同によるものであり、また精製ウイルスの提供等ではOncolys Biopharmaの浦田泰生社長に多大な御協力を頂きました。誌面を借りて両氏に御礼申し上げます。また、今回の執筆の機会を与えていただきました金沢大学十全医学界編集委員長 井関尚一教授ならびに関係方々に厚く御礼申し上げます。最後に、研究に日夜奮闘している産婦人科分子病理研究室のメンバーに感謝致します。

文 献

- 1) Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Takeda J, Yutsudo M, Hirano H, Inoue M. Cloning of human telomerase reverse transcriptase gene promoter and identification of proximal core promoter essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res.*, 59: 551-557, 1999
- 2) Kyo S, Kanaya T, Ishikawa H, Ueno H, Inoue M. Telomerase activity in gynecologic tumor. *Clin. Cancer Res.*, 2: 2023-2028, 1996.
- 3) Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Tanaka M, and Inoue M. Expression of telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. *Cancer Res.*, 58: 1558-1561, 1998.
- 4) Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Taira T, Kanaya T, Itoh H, Yutsudo M, Ariga H, and Inoue M. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Nucleic Acids Res.*, 28: 669-677, 2000.
- 5) Kyo S and Inoue M. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: How can we apply them for cancer therapy? *Oncogene*, 21: 688-697, 2002.
- 6) Kyo S, Takakura M, Fujiwara T and Inoue M. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for

diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Sci.* 9: 1528-1538, 2008.

- 7) Gu J, Kagawa S, Takakura M, Kyo S, Inoue M, Roth JA, Fang B. Tumor-specific transgene expression from hTERT promoter: Targeting pharmaceutical effects of the Bax gene to cancer. *Cancer Res.*, 60: 5359-5364, 2000.
- 8) Komata T, Kondo Y, Kanzawa T, Hirohata S, Koga S, Sumiyoshi H, Srinivasula SM, Barna BP, Alnemri ES, Germano IM, Takakura M, Inoue M, Alnemri ES, Shay JW, Kyo S and Kondo S. Treatment of malignant glioma cells with the transfer of constitutively active caspase-6 using the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene. *Cancer Res.*, 61: 5796-5802, 2001.
- 9) Nakamura M, Kyo S, Kanaya T, Yatabe N, Maida Y, Ishida Y, Fujii C, Kondo T, Inoue M and Mukaida N. hTERT-promoter-based tumor specific expression of MCP-1 effectively sensitize cervical cancer cells to a low dose of cisplatin. *Cancer Gene Ther.*, 11: 1-7, 2004
- 10) Kawashima T, Kagawa S, Kobayashi N, Shirakiya Y, Umeoka T, Teraishi F, Taki M, Kyo S, Tanaka N and Fujiwara T. Telomerase-specific replication selective virotherapy for human cancer. *Clin. Cancer Res.*, 10: 285-292, 2004.
- 11) ONcolys BioPharma 社内資料
- 12) Ikeda Y, Kojima T, Kuroda S, Endo Y, Sakai R, Hioki M, Kishimoto H, Uno F, Kagawa S, Watanabe Y, Hashimoto Y, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T. A novel antiangiogenic effect for telomerase-specific virotherapy through host immune system. *J Immunol.* 182:1763-1769, 2009.
- 13) Takakura M, Nakamura M, Kyo S, Hashimoto M, Mori N, Ikoma T, Mizumoto Y, Fujiwara T, Urata Y and Inoue M. Intraperitoneal administration of telomerase-specific oncolytic adenovirus sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin and affects survival in a xenograft model with peritoneal dissemination *Cancer Gene Ther.* 17: 11-19, 2010.
- 14) Fujiwara T, Kagawa S, Kishimoto H, Endo Y, Hioki M, Ikeda Y, Sakai R, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T. Enhanced antitumor efficacy of telomerase-selective oncolytic adenoviral agent OBP-401 with docetaxel: preclinical evaluation of chemovirotherapy. *Int J Cancer.* 2006 Jul 15; 119 (2): 432-40.
- 15) 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.* 64: 6259-6265, 2004.
- 16) Kishimoto H, Kojima T, Watanabe Y, Kagawa S, Fujiwara T, Uno F, Teraishi F, Kyo S, Mizuguchi H, Hashimoto Y, Urata Y, Tanaka N and Fujiwara T. A novel in vivo imaging of lymph node metastasis with telomerase-specific replication-competent adenovirus containing green fluorescent protein gene. *Nat. Med.* 12: 1213-1219, 2006.
- 17) Maida Y, Kyo S, Sakaguchi J, Mizumoto Y, Hashimoto M, Mori M, Ikoma T, Nakamura M, Takakura M, Urata Y, Fujiwara T, and Inoue M. Diagnostic potential and limitation of imaging cancer cell in cytological sample using telomerase-specific replicative adenovirus. *Int. J. Oncol.* 34: 1549-1556, 2009.
- 18) Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 351: 781-791, 2004.
- 19) Kojima T, Hashimoto Y, Watanabe Y, Kagawa S, Uno F, Kuroda S, Tazawa H, Kyo S, Mizuguchi H, Urata Y, Tanaka N and Fujiwara T. A simple biological imaging system for detecting viable human circulating tumor cells. *J. Clin. Invest.* 119: 3172-3181, 2009.
- 20) Takakura M, Kyo S, Inoue M. In submission.