

5. 単純ヘルペスウイルスを利用した癌に対するウイルス療法

西山 幸廣, 五島 典

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻 ウイルス学

ウイルスの特性を利用して、新たな癌治療法を開発するための研究が近年精力的に進められている。とくにウイルスの増殖能を保持させた形で用いる方法は“Oncolytic Virotherapy”として、様々なウイルスを対象に研究・開発が行われ、現在では臨床試験が実施されているものも少なくない。単純ヘルペスウイルス (HSV) を用いた oncolytic virotherapy では、1991年のチミジンキナーゼ欠損ウイルスによる脳腫瘍治療実験の報告 (Science 252, 1991) 以来、リボヌクレオチド還元酵素、ICP34.5の欠損ウイルスを中心にその有効性と安全性が検討されてきた。しかし、これまでの臨床試験では、高い安全性が証明されたものの有効性においては期待はずれの結果に終わっている。我々は、躯幹部の癌に対しては G207 や 1716 とは異なる弱毒化機序をもつ変異ウイルスの中に、より有効性が高く、安全性についても十分に確保しうるものがあると考えた。検討の結果、選択されたのが HF10 である。HF10 は多くの癌細胞由来の培養細胞株において極めて良好な増殖性を示すにもかかわらず、マウスに対する病原性はほとんどない。またゲノム上には L 領域の両端に 3.9kbp と 2.3kbp の大きな欠損があり、変異の安定性は高い。さらに塩基配列決定の結果から、UL56 と LAT に加えて、UL43, UL49.5, UL55 の発現が欠けていることが明らかになった。我々はこの HF10 に優れた抗腫瘍作用があることを見出し、HF10 療法の可能性を模索してきた。本稿では、oncolytic virotherapy の現状及び HF10 を用いたヒトの再発性乳癌、頭頸部癌に対するトランスレーショナル・リサーチの結果について概説する。

はじめに

がんの治療にウイルスを利用するという発想は、ウイルス発見当時まで遡ることができる。そして 1950 年代には実際、生ワクチン株や野生株のウイルス (狂犬病ワクチン、アデノウイルスなど) が末期癌患者に投与され、抗腫瘍作用に関する検討が行われた。その後も様々なウイルスを用いた動物実験や臨床試験に関する単発的な報告がでたが、体系立った研究としては発展できずに終わってきた。しかし、1991年の Martuza らの報告をきっかけに増殖型ウイルスを用

いた oncolytic viral therapy (最近では oncolytic virotherapy をよく用いる)、cancer gene therapy の研究分野は急速な展開をみることになり現在に至っている²¹⁾。ウイルス増殖、がん化、生体防御機構についての研究がこの数十年で著しく進展し、この領域も一時的な流行に終わる、いわゆる“際物”から分子的基盤に基づく戦略的研究へと変貌してきたといえる。とはいえ当初の期待に反して、15年以上経った現在でも臨床試験において画期的な結果を生み出すには至っておらず、さらなる工夫が要求されている。本稿では、様々な増殖型ウイルスを用いた oncolytic virotherapy の現状、及び我々が手がけている HF10 の開発の現状について概説する。

連絡先

〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町 65
 名古屋大学大学院医学系研究科
 分子総合医学専攻 ウイルス学
 TEL : 052-744-2450
 FAX : 052-744-2452
 E-mail : ynishiya@med.nagoya-u.ac.jp

I. oncolytic virotherapy の現状

1. 腫瘍溶解性ウイルス (oncolytic virus)

現在までに、oncolytic virus として可能性が検討されてきたウイルスを表 1 にまとめた。この分野になじみのない研究者は、表をみて予想以上に多くのウイルスが oncolytic virus として研究の対象になっていることに驚かれるだろ

表1 研究対象になっている腫瘍溶解性ウイルス (oncolytic viruses)

	ウイルス名	ウイルス科	選択性に関する主要な機序
DNA ウイルス	単純ヘルペスウイルス1型	ヘルペスウイルス科	インターフェロン感受性/抵抗性の関与, 癌遺伝子 Ras の活性化
	ヒトアデノウイルス5型	アデノウイルス科	腫瘍抑制遺伝子 p53 の異常
	ワクシニアウイルス	ポックスウイルス科	インターフェロン感受性/抵抗性の関与?
	ミクソマウイルス	ポックスウイルス科	インターフェロン感受性/抵抗性の関与
RNA ウイルス	エコーウイルス (1型)	ピコルナウイルス科	特定の腫瘍細胞 (インテグリン $\alpha_1\beta_2$ 発現) への選択的な吸着
	コクサッキーウイルス	ピコルナウイルス科	特定の腫瘍細胞(DAF 発現)への選択的な吸着
	ポリオウイルス	ピコルナウイルス科	特定の腫瘍細胞(CD155 発現)への選択的な吸着
	麻疹ウイルス	パラミクソウイルス科	特定の腫瘍細胞(CD46 発現)への選択的な吸着
	ニューカッスル病ウイルス	パラミクソウイルス科	インターフェロン感受性/抵抗性の関与
	ムンプスウイルス	パラミクソウイルス科	インターフェロン感受性/抵抗性の関与
	水疱口内炎ウイルス	ラブドウイルス科	インターフェロン感受性/抵抗性の関与
	レオウイルス	レオウイルス科	癌遺伝子 Ras の活性化
	インフルエンザウイルス	ミクソウイルス科	インターフェロン感受性/抵抗性の関与

う。DNA ウイルスだけでなく分類的に広い範囲の RNA ウイルスが含まれており、細胞溶解性 (cytolytic) の、あるいは細胞障害性 (cytopathic) の強い動物ウイルスのほとんどが oncolytic virus になりうるといえそうである。これらは様々な機序で選択的な抗腫瘍性を示すが、多くの場合インターフェロン系が関与している。すなわち、癌細胞ではしばしば PKR (プロテインキナーゼ R) の活性化に関わるシグナル伝達系に異常があり、正常細胞に比べウイルスに対する許容度が高く、また外からのインターフェロンに対して抵抗性となる。一方、単純ヘルペスウイルスなどでは PKR の作用を解除するように働くウイルス遺伝子産物 (例えば ICP34.5) を保有しており、それが欠損したウイルスは正常細胞では著しく増殖が抑制されるが、癌細胞においてはほとんど影響を受けることなく良く増殖する。

2. 臨床試験

1997 年に変異型アデノウイルス Onyx-015 を用いて臨床試験 (Phase I) が開始されて以来、現在までに 500 例以上の癌患者に対して oncolytic virotherapy の治療が行われてきた。その一部を表 2 にまとめた。臨床試験の結果を要約すれば、oncolytic virus の安全性は十分に高いことが示されたものの有効性に関しては期待された程のものは得られていないということである。その後の開発が断念されたものも多い。しかし、悪性グリオーマに対する HSV1716 の投与で生存例がでてきたこと⁸⁾、中国において H101 (Onyx-015 と同じ弱毒化機構を有するアデノウイルス) が頭頸部癌に対して薬剤として認可されたことなど^{49,59)}、今後を期待させる報告もある。後述するように我々が開発を行ってきた HF10 は、まだ症例数は少ないとはいえ頭頸部癌、乳癌への腫瘍内接種において今までの報告にはない優

れた効力を示しており^{6,27)}、本年度 (2007 年) から開始予定の米国での臨床試験の結果に期待がかかる。

3. 評価系の問題点

選択性、有効性の判定には評価系によってそれぞれの問題点があり、培養細胞レベルでの選択性が高いからといって動物モデルや臨床試験において有効性が高いともいえず、細胞レベルでの選択性が低いからといって、必ずしも動物実験での有効性、安全性が低いとは限らない。またヌードマウスを担癌動物とした評価系は、その背景を良く理解した上で利用しないと誤った判断を下すことになる。

Onxy-015, G207 はいずれも数多くの基礎データが積み上げられ、臨床試験へ入ったが、動物実験から予想した程には良い結果が得られなかった。現時点で振り返ればいくつかの理由が挙げられる。その中でも最大の問題は、ヌードマウスを担がん動物としてヒト由来の癌に対する有効性、選択性を判定の根拠にしていたことである。ヒト由来のウイルスは当然のことだがほとんどの場合、マウスの細胞に比べヒトの細胞により親和性を示し、より増殖性が高い。従って、マウスに移植されたヒト癌組織に対する選択性は見かけ上高く判定され、必ずしも信頼できないことである。また、ヌードマウスではウイルスに対する排除能力も弱く、ヌードマウスでは持続的な増殖により腫瘍細胞溶解能力が高くみえるウイルスでも、免疫能の正常な動物では速やかに排除されその能力を発揮できないことが多い。さらに、正常動物では一度ウイルスを接種されれば抗体や CTL が誘導され、二度目以降のウイルスの投与は著しく効力が減少することが予想される。モデル系として免疫能をもつマウスを用いた場合には、マウス由来の癌組織に対する有効性を評価することになり、増殖能が宿主細胞に大きく存在す

表2 腫瘍溶解性ウイルスを用いた臨床試験

ウイルス	対象	Phase	投与経路	ウイルス量 (PFU)	文献	
単純ヘルペスウイルス	G207	悪性グリオーマ	I	腫瘍内	$10^6 \sim 10^9$	20
	1716	悪性グリオーマ	I, II	腫瘍内	10^5	8
	1716	メラノーマ	I	腫瘍内	10^5	19
	NV1020	大腸癌 (肝転移)	I	肝動脈内	$10^6 \sim 10^7$	14
	HF10	乳癌	I	腫瘍内	$10^4 \sim 10^5$	27
	HF10	頭頸部癌	I	腫瘍内	$10^4 \sim 10^5$	6
アデノウイルス	OncoVex ^{GM-CSF}	乳癌他	I	腫瘍内	$10^6 \sim 10^8$	9
	ONYX-015	頭頸部癌	I, II	腫瘍内	$10^7 \sim 10^{11}$	31
	ONYX-015	卵巣癌	I	腫瘍内	$10^9 \sim 10^{11}$	47
	ONYX-015	大腸癌肝転移	I, II	肝動脈内	10^{12}	30, 37
	CV706	前立腺癌	I	腫瘍内	$10^{11} \sim 10^{13}$	4, 39
ワクシニアウイルス	H101	固形腫瘍	I, II	腫瘍内	$10^7 \sim 10^{12}$	49, 50
	JX-594	メラノーマ	I	腫瘍内	$10^4 \sim 10^7$	22
ニュースカル病ウイルス	Dryvax	膀胱癌	I	腫瘍内	$10^6 \sim 10^8$	7
	PV701	固形腫瘍	I	静脈内	$10^{10} \sim 10^{11}$	36
麻疹ウイルス	野生株/ワクチン株	悪性リンパ腫	I	静脈内	$10^6 \sim 10^7$	5
レオウイルス	Reolysin	固形腫瘍	I	腫瘍内	$10^7 \sim 10^{10}$	1

表3 様々な腫瘍溶解性 DNA ウイルス

ウイルス	種	欠損遺伝子	付加遺伝子	文献
dlspk	HSV-1	UL23		21
1716	HSV-1	RL1 (x2)		18, 38
hrR3	HSV-1	UL39		10
G207	HSV-1	RL1 (x2), UL39		24
NV1020	HSV-1/HSV-2	RL1 (x1), UL24 他		3,23
HF10	HSV-1	UL56, UL43, LAT 他		44,46
L1BR1	HSV-2	US3		12,35
HL	HSV-1/HSV-2	US3, UL56, LAT 他		42
Hh101	HSV-1	UL39, UL56, LAT 他		16
OncoVex GM-CSF	HSV-1	RL1, UL39	GM-CSF	9
ONYX-015	AdV	E1B (55K), E3B		26
CV706	AdV	E1A, E3		2
H101	AdV	E1B (55K), E3		49,50
Ad5-CD/Tkrep	AdV	E1B (55K), E3B	CD, TK	40
JX-594	Vaccinia	TK	GM-CSF	15

るウイルスの抗癌活性をこうしたモデルで判定することは難しい。従って、対象とする癌、ウイルスの投与経路、oncolytic virus の性質などを考慮しながら総合的に適性のあるウイルスを選択することが要求される (表3)。臨床試験に入る前に、様々な前臨床試験で有効性、安全性について徹底的に検討しておくことは当然であるが、結局はヒトでの臨床試験をやってみないとわからないというのが現状だろう。

II. 単純ヘルペスウイルス HF10 を用いた oncolytic virotherapy

1. hrR3 を用いた動物実験

1991年に Science 誌に HSV-TK (チミジンキナーゼ) 欠

損ウイルスを用いたマウスでの脳腫瘍治療実験が報告された時、我々は RR (リボヌクレオチド・レダクターゼ) 欠損ウイルス (hrR3) を初めとする種々の変異 HSV の病原性について検討していた^{34,35,48}。ウイルスを癌の治療に利用することに関しては、1970年代に我々が分離した弱毒セングダイウイルス HVJpi で既に経験していたので^{33,43}、直ちに追試的な実験を行うことにした。病原性その他の比較検討から TK 欠損 HSV より RR 欠損 TK の方がより適性があると考え、oncolytic virus として hrR3 を用いることにした。ヌードマウスの背部に、hrR3 の増殖を許容するヒトの癌細胞を移植し、直径 1.5 ~ 2cm になった腫瘍塊に hrR3 (1×10^7 PFU) を接種して経過をみた。この結果は期待はずれなもので、接種部分が部分的にネクローシスを起こし

表4 HF10を用いた臨床試験

患者	年齢	性	接種量 (PFU) /回数	腫瘍の病理診断	副作用
乳癌					
1	61	Female	1x10 ⁴ / x1	Invasive ductal carcinoma	(-)
2	62	Female	1x10 ⁵ / x1	Invasive ductal carcinoma	(-)
3	4	Female	1x10 ⁵ / x3	Invasive ductal carcinoma	(-)
4	66	Female	5x10 ⁵ / x1	Invasive ductal carcinoma	(-)
5	72	Female	5x10 ⁵ / x3	Mucinous carcinoma	(-)
6	76	Female	5x10 ⁵ / x3	Scirrhus carcinoma	(-)
頭頸部癌					
7	58	Male	1x10 ⁴ / x3	Squamous cell carcinoma	(-)*
8	79	Female	1x10 ⁵ / x3	Squamous cell carcinoma	(-)*
9	64	Male	1x10 ⁵ / x3	Squamous cell carcinoma	(-)*
膵臓癌					
10	46	Male	1x10 ⁵ / x3	Invasive ductal carcinoma	(-)
11	69	Male	1x10 ⁵ / x3	Invasive ductal carcinoma	(-)
12	61	Male	5x10 ⁵ / x3	Invasive ductal carcinoma	(-)

*接種後、軽度の発熱が認められた。表は文献6), 27), 28)の結果をまとめたもの。

たとえどまり、ウイルスが腫瘍全体に広がっていくことはなかった。これは、腫瘍のサイズが評価系としては大きすぎたため、この結果をみて断念した。一方、欧米ではその後 HSV1716 や G207 などを用いた実験例が次々と報告され、次いでアデノウイルスも加わり、oncolytic virotherapy の分野は急速な広がりを見せた。臨床試験へと進むものもできた。それまでに我々は評価系に様々な問題点があることに気づき始めていたので、再開するにあたって、固形腫瘍でなく腹膜播種系を用いることにした。ヌードマウスにヒトの膵癌、卵巣癌由来の腫瘍動物を腹腔内に接種し、一週間以上経過した後、hrR3 を投与した。驚いたことにコントロール群が全例死亡するに対し、hrR3 投与群では半数以上のマウスが生存し、抗癌剤投与時に見られる体重減少もない^{13,29)}。病理組織学的にも腫瘍細胞で選択的に hrR3 が増殖していることが確認された。ウイルス量を上げれば100%の生存も可能であると思われ、oncolytic virotherapy の可能性に強い印象を受けた。

2. hrR3 から HF10 へ

以上のような結果を得て、免疫能のあるマウスを担がん動物としたモデル系での検討を開始した。様々な弱毒 HSV を腹膜播種モデル、固形腫瘍モデルで比較したところ、いずれのモデル系においても HF10 と名付けた弱毒 HSV-1 に優れた抗腫瘍作用があることがわかってきた^{17,44)}。また HF10 投与により生残したマウスは同系腫瘍の移植に対して抵抗性を示し、特異的な腫瘍免疫が誘導されていることが示唆された。HF10 は癌細胞を含む多くの培養細胞において極めて良い増殖性を示し、細胞膜融合を誘導する結果、多核巨細胞形成を起こす¹¹⁾。また培養細胞での増殖性にも

かわらず、マウスでの病原性は著しく減弱し、10⁸PFU を末梢に接種しても死亡させることはない。野生株と比べ LD₅₀/PFU 値では少なくとも 10⁴ 倍高い。しかし、hrR3 や HSV1716 と異なり脳内に直接接種すればかなり強い神経病原性を示す。すなわち HF10 は中枢神経系への侵襲性を欠くウイルスである^{25,32)}。またゲノム解析の結果、UL 領域の両端 (UL-US 結合部を含む) に大きな欠損があり、その結果 UL56, LAT (Latency-associated transcripts) の欠失を有するとともに、N 末端領域での frame-shift 変異により UL43, UL49.5, UL55 の発現欠損をもつことが判明した^{44,46)}。これらの事実やウイルスの継代歴から考えゲノムの安定性は高いと判断された。

3. HF10 を用いてのトランスレーショナル・リサーチ

ヒトの癌を対象としたトランスレーショナル・リサーチを始めるにあたり、どのような癌を対象にしたらよいのかについて臨床医を交えて検討した。様々な条件を考慮した結果、再発性乳癌患者に対して HF10 療法を実施し、安全性及び有効性を評価することにした²⁷⁾。

対象は皮膚または皮下への再発がみられた乳癌患者 6 例で、腫瘍径はいずれも 1 ~ 2cm であった。1 × 10⁴PFU/0.5ml, 1 × 10⁵PFU/0.5ml, 5 × 10⁵PFU/0.5ml のいずれかを 1 回または 3 日間連続して腫瘍内に直接注入した。投与 2 週間後に腫瘍を切除し、病理組織学的に効果を判定した。なお、安全性を考慮しあらかじめ血液中の抗体価を測定し、抗体陽性例のみを本試験の対象とした。組織学的効果は、grade 1a (やや有効、軽度の効果) が 1 例、grade 1b (やや有効、中等度の効果) が 2 例、grade 2 (かなり有効) が 1 例、grade 2 ~ 3 (かなり有効 ~ 著効) が 1 例であっ

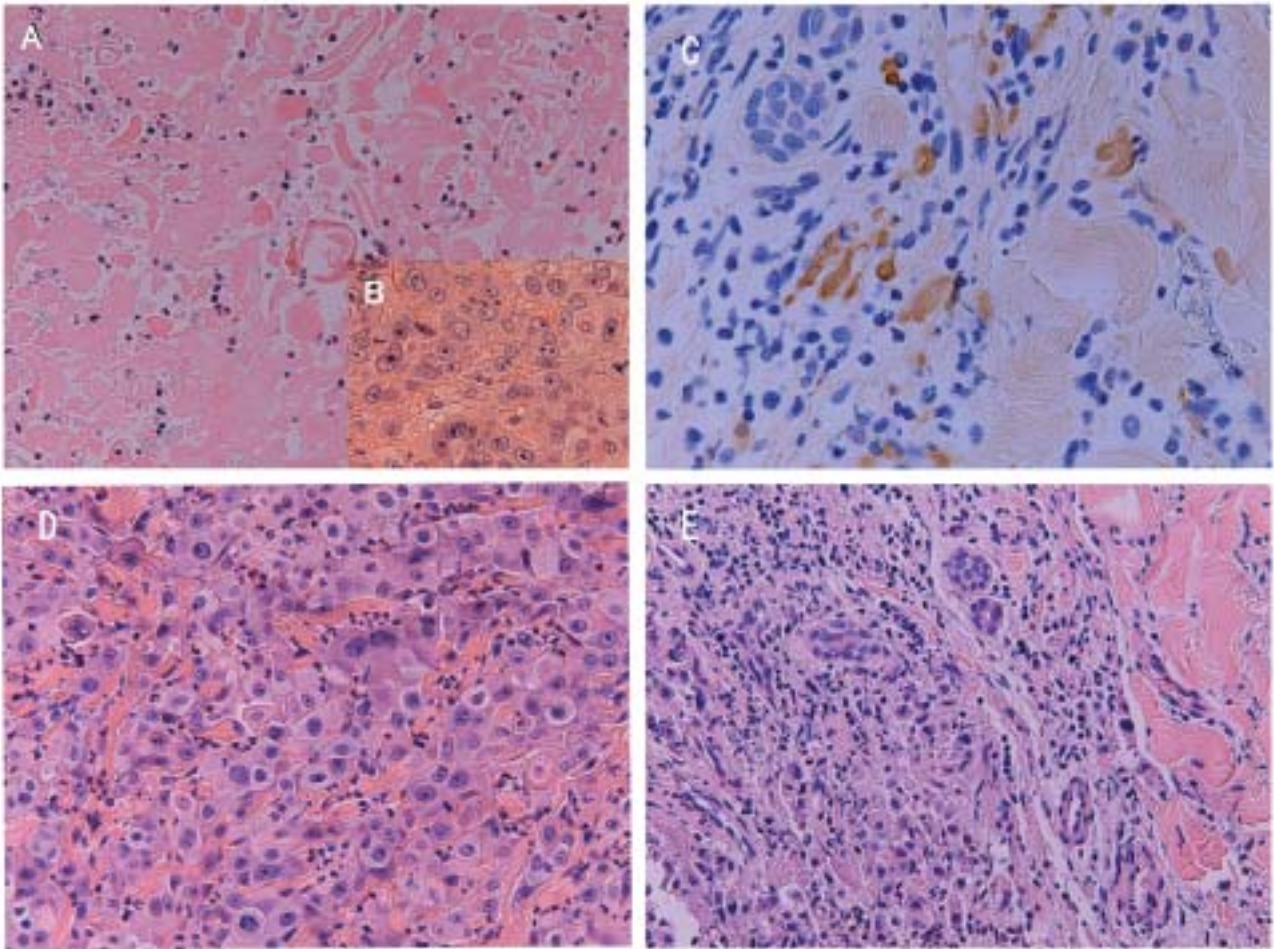


図1 HF10 接種による腫瘍細胞の変化. 頭頸部癌患者 No.2 (A,B) および No.3 (C,D,E). A : HF10 接種後 14 日目の HE 染色像, B : 接種前, C : HF10 接種後 15 日目の HSV 抗原の検出, D : 接種前, E : 接種後 15 日目の HE 染色像.

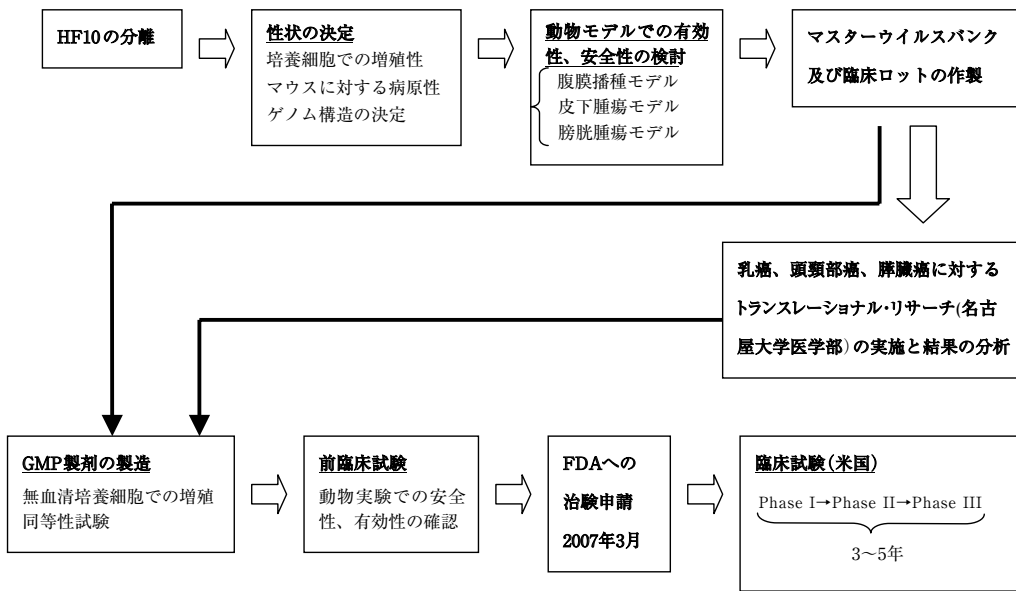


図2 HF10 開発の現状

た。grade 2～3の症例の組織像では、癌細胞がほぼ100%破壊されており、蛍光抗体法では核内にウイルス抗原が局在している状況が観察された。また、白血球数の変動、発熱などの全身症状や注射部位の発赤、痛みといった局所症状は全く認められなかった(表4)。

続いて、頭頸部癌患者3例に対しても同様な臨床試験を施行し、安全性とともにHF10の強い腫瘍細胞溶解能(oncolytic activity)が確認された⁶⁾(図1)。HSV抗体陽性の患者において、接種後2週間経過しても腫瘍内にHF10感染癌細胞が検出されたことは、正常マウスでの結果からはまったく予想していなかったのが驚きであった。

4. HF10 開発の現在と今後

以上のような動物実験での結果、トランスレーショナル・リサーチの結果から本格的な臨床試験を実施するのが適当であると判断された。その後、協力関係にあるベンチャー企業により英国においてHF10の製剤化に成功し、前臨床試験を終了、現在米国FDAへIND(Initial investigational new drug application)を提出したところである。FDAの認可が得られれば直ちに頭頸部癌患者に対するPhase Iが米国で開始される予定である(図2)。臨床試験にはうまく行っても結論が出るまでに3～5年かかると予想されるので、我々としてはHF10をうまく生かして、さらに抗腫瘍作用を増強するための実験の一つには行っている⁴¹⁾。既にGM-CSFを搭載したアンプリコンを、HF10をヘルパーとして作製し動物実験で良い結果を得ている。様々なサイトカイン、プロドラッグの活性化酵素など、どんな遺伝子もアンプリコンに搭載することが可能であり、HF10投与のいろいろなタイミングでアンプリコンを加えることにより、腫瘍溶解活性や腫瘍免疫をさらに増強させることなども考えられる^{45,51)}。HF10をヘルパーとして用いる方法はワクチン開発にも適用でき応用性は広いと思われる。

おわりに

HF10はHSVの既感染者に対しても、局所的には今までの報告にはない程の強い腫瘍溶解性を示した。また、使用した 10^5 PFU程度ではHSV抗体価の上昇もなく副作用も見られなかったため、繰り返し何度でも局注できると考えられる。臨床試験の結果を待たねばならないが、 10^7 ～ 10^8 PFU投与も十分可能だと考えている。そうであれば、かなりの大きさの腫瘍塊でもHF10単独で消滅させることは十分可能だと思われる。動物実験では腫瘍免疫も誘導されることが示されており、我々としては“From local treatment and local control to systemic anti-tumor effects”をコンセプトに「癌に対するウイルス療法」を何とか成功させたいと願っている。

文 献

- 1) Carlson LE, Bultz BD, and Morris DG. : Individual quality of life, standardized quality of life, and distress inpatients undergoing a phase I trial of the novel therapeutic Reolysin (reovirus). *Health Qual Life Outcomes* 27: 7, 2005.
- 2) Chen Y, DeWeese T, Dilley J, Zhang Y, Li Y, Ramesh N, Lee J, Pennathur-Das R, Radzyminski J, Wypych J, Brignetti D, Scott S, Stephens J, Karpf DB, Henderson DR, and Yu DC. : CV706, a prostate cancer-specific adenovirus variant, in combination with radiotherapy produces synergistic antitumor efficacy without increasing toxicity. *Cancer Res* 61: 5453-5460, 2001.
- 3) Chung SM, Advani SJ, Bradley JD, Kataoka Y, Vashistha K, Yan SY, Markert JM, Gillespie GY, Whitley RJ, Roizman B, and Weichselbaum RR. : The use of a genetically engineered herpes simplex virus (R7020) with ionizing radiation for experimental hepatoma. *Gene Ther* 9: 75-80, 2002.
- 4) 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.
- 5) Dingli D, Peng KW, Harvey ME, Greipp PR, O'Connor MK, Cattaneo R, Morris JC, and Russell SJ. : Image-guided radiotherapy for multiple myeloma using a recombinant measles virus expressing the thyroidal sodium iodide symporter. *Blood* 103:1641-1646, 2004.
- 6) Fujimoto Y, Mizuno T, Sugiura S, Goshima F, Kohno S, Nakashima T, and Nishiyama Y. : Intratumoral injection of herpes simplex virus HF10 in recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 126: 1115-1117, 2006.
- 7) Gomella LG, Mastrangelo MJ, McCue PA, Maguire HC JR, Mulholland SG, and Lattime EC. : Phase I study of intravesical vaccinia virus as a vector for gene therapy of bladder cancer. *J Urol* 166: 1291-1295, 2001.
- 8) Harrow S, Papanastassiou V, Harland J, Mabbs R, Petty R, Fraser M, Hadley D, Patterson J, Brown SM, and Rampling R. : HSV1716 injection into the brain adjacent to tumour following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival. *Gene Ther* 11: 1648-1658, 2004.
- 9) Hu JC, Coffin RS, Davis CJ, Graham NJ, Groves N, Guest PJ, Harrington KJ, James ND, Love CA, McNeish I, Medley LC, Michael A, Nutting CM, Pandha HS, Shorrock CA, Simpson J, Steiner J, Steven NM, Wright D, and Coombes RC. : A phase I study of OncoVEX^{GM-CSF}, a second-generation oncolytic herpes simplex virus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res* 15: 6737-6747, 2006.
- 10) Jacobson JG, Leib DA, Goldstein DJ, Bogard CL, Schaffer PA, Weller SK, and Coen DM. : A herpes sim-

plex virus ribonucleotide reductase deletion mutant is defective for productive acute and reactivatable latent infections of mice and for replication in mouse cells. *Virology* 173: 276-283, 1989.

- 11) Jiang, YM, Daikoku T, Yamamoto M, Morishima T, and Nishiyama Y. : Growth and cytopathogenicity of herpes simplex virus in a macrophage cell line, RAW264: A good indicator of intraperitoneal pathogenicity. *Microbiol Immunol* 39: 905-909, 1995.
- 12) Kasuya H, Nishiyama Y, Nomoto S, Goshima F, Takeda S, Watanabe I, Nomura N, Shikano T, Fujii T, Kanazumi N, and Nakao A. : Suitability of a US3-inactivated HSV mutant(L1BR1) as an oncolytic-virus for pancreatic cancer therapy. *Cancer Gene Ther*, in press.
- 13) Kasuya H, Nishiyama Y, Nomoto S, Hosono J, Takeda S, and Nakao A. : Intraperitoneal delivery of hrR3 and ganciclovir prolongs survival in mice with disseminated pancreatic cancer. *J Surg Oncol* 72: 136-141, 1999.
- 14) Kim JH, Oh JY, Park BH, Lee DE, Kim JS, Park HE, Roh MS, Je JE, Yoon JH, Thorne SH, Kirn D, and Hwang TH.: Systemic armed oncolytic and immunologic therapy for cancer with JX-594, a targeted poxvirus expressing GM-CSF. *Mol Ther* 14: 361-370, 2006.
- 15) Kemeny N, Brown K, Covey A, Kim T, Bhargava A, Brody L, Guilfoyle B, Haag NP, Karrasch M, Glasschroeder B, Knoll A, Getrajdman G, Kowal KJ, Jarnagin WR, and Fong Y. : Phase I, open-label, dose-escalating study of a genetically engineered herpes simplex virus, NV1020, in subjects with metastatic colorectal carcinoma to the liver. *Hum Gene Ther* 17: 1214-1224, 2006.
- 16) Kimata H, Takakuwa H, Goshima F, Teshigawara O., Nakao A, Kurata T, Sata T, and Nishiyama Y. : Effective treatment of disseminated peritoneal colon cancer with new replication-competent herpes simplex viruses. *Hepatogastroenterology* 50: 961-966, 2003.
- 17) Kohno S, Luo C, Goshima F, Nishiyama Y, Sata T, and Ono Y. : Herpes simplex virus type 1 mutant HF10 oncolytic viruthery for bladder cancer. *Urology* 66: 1116-1121, 2005.
- 18) Liu BL, Robinson M, Han ZQ, Branston RH, English C, Reay P, McGrath Y, Thomas SK, Thornton M, Bullock P, Love CA, and Coffin RS. : ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther* 10: 292-303, 2003.
- 19) MacKie RM, Stewart B, and Brown SM. : Intralesional injection of herpes simplex virus 1716 in metastatic melanoma. *Lancet* 357: 525-526, 2001.
- 20) Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, Gillespie GY, Todo T, Hunter WD, Palmer CA, Feigenbaum F, Tornatore C, Tufaro F, and Martuza RL. : Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther* 7: 867-874, 2000.
- 21) Martuza RL, Malick A, Markert JM, Ruffner KL, and Coen DM. : Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* 252: 854-856, 1991.
- 22) Mastrangelo MJ, Maguire HC Jr, Eisenlohr LC, Laughlin CE, Monken CE, McCue PA, Kovatich AJ, and Lattime EC. : Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. *Cancer Gene Ther* 6: 409-422, 1999.
- 23) Meignier B, Longnecker R, and Roizman B. : In vivo behavior of genetically engineered herpes simplex viruses R7017 and R7020: construction and evaluation in rodents. *J Infect Dis* 158: 602-614, 1988.
- 24) Mineta T, Rabkin SD, Yazaki T, Hunter WD, and Martuza RL. : Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nat Med* 1: 938-943, 1995.
- 25) Mori I, Liu B, Goshima F, Ito H, Koide N, Yoshida T, Yokochi T, Kimura Y, and Nishiyama Y. : HF10, an attenuated herpes simplex virus (HSV) type 1 clone, lacks neuroinvasiveness and protects mice against lethal challenge with HSV types 1 and 2. *Microb Infect* 7: 1492-1500, 2005.
- 26) Morley S, MacDonald G, Kirn D, Kaye S, Brown R, and Soutar D. : The dl1520 virus is found preferentially in tumor tissue after direct intratumoral injection in oral carcinoma. *Clin Cancer Res* 10: 4357-4362, 2004.
- 27) Nakao A, Kimata H, Imai T, Kimumori T, Teshigahara O, Nagasaka T, Goshima F, and Nishiyama Y. : Intratumoral injection of herpes simplex HF10 in recurrent breast cancer. *Ann Oncol* 15: 988-989, 2004.
- 28) Nakao A, Takeda S, Shimoyama S, Kasuya H, Kimata H, Teshigahara O, Sawaki M, Kikumori T, Kodera Y, Nagasaka T, Goshima F, Nishiyama Y, and Imai T. : Clinical experiment of mutant herpes simplex virus HF10 therapy for cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 7: 169-174, 2007.
- 29) Nawa A, Nozawa N, Goshima F, Nagasaka T, Kikkawa F, Niwa Y, Nakanishi T, Kuzuya K, and Nishiyama Y. : Oncolytic viral therapy for human ovarian cancer using a novel replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant in a mouse model. *Gynecol Oncol* 91: 81-88, 2003.
- 30) Nemunaitis J, Cunningham C, Buchanan A, Blackburn A, Edelman G, Maples P, Netto G, Tong A, Randlev B, Olson S, and Kirn D. : Intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in cancer patients: safety, feasibility and biological activity. *Gene Ther* 8:746-759, 2001
- 31) Nemunaitis J, Ganly I, Khuri F, Arseneau J, Kuhn J, McCarty T, Landers S, Maples P, Romel L, Randlev B, Reid T, Kaye S, and Kirn D. : Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Res* 15: 6359-6366, 2000.
- 32) Nishiyama Y. : Herpes simplex virus gene products: the accessories reflect her lifestyle well. *Rev Med Virol* 14: 33-46, 2004.
- 33) Nishiyama Y, Ito Y, Shimokata K, Kimura Y, and Nagata I. : Relationship between establishment of per-

- sistent infection of HVJ and the properties of the virus. *J Gen Virol* 32: 85-96, 1976.
- 34) Nishiyama Y, Kimura H, and Daikoku T. : Complementary lethal invasion of the central nervous system by nonneuroinvasive herpes simplex virus types 1 and 2. *J Virol* 65: 4520-4524, 1991.
 - 35) Nishiyama Y, Yamada Y, Kurachi R, and Daikoku T. : Construction of a US3 lacZ insertion mutant of herpes simplex virus type 2 and characterization of its phenotype in vitro and in vivo. *Virology* 190: 256-268, 1992.
 - 36) Pecora AL, Rizvi N, Cohen GI, Meropol NJ, Sterman D, Marshall JL, Goldberg S, Gross P, O'Neil JD, Groene WS, Roberts MS, Rabin H, Bamat MK, and Lorence RM. : Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. *J Clin Oncol* 20: 2251-2266, 2002.
 - 37) Reid T, Galanis E, Abbruzzese J, Sze D, Wein LM, Andrews J, Randlev B, Heise C, Uprichard M, Hatfield M, Rome L, Rubin J, and Kirn D. : Hepatic arterial infusion of a replication-selective oncolytic adenovirus (dl1520): phase II viral, immunologic, and clinical endpoints. *Cancer Res* 62: 6070-6079, 2002.
 - 38) Randazzo BP, Kesari S, Gesser RM, Alsop D, Ford JC, Brown SM, Maclean A, and Fraser NW. : Treatment of experimental intracranial murine melanoma with a neuroattenuated herpes simplex virus 1 mutant. *Virology* 211: 94-101, 1995.
 - 39) Rodriguez R, Schuur ER, Lim HY, Henderson GA, Simons JW, and Henderson DR. : Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res* 57: 2559-2563, 1997.
 - 40) Rogulski KR, Wing MS, Paielli DL, Gilbert JD, Kim JH, and Freytag SO. : Double suicide gene therapy augments the antitumor activity of a replication-competent lytic adenovirus through enhanced cytotoxicity and radiosensitization. *Hum Gene Ther* 11: 67-76, 2000.
 - 41) Shimoyama S, Goshima F, Teshigahara O, Kasuya H, Kodera Y, Nakao A, and Nishiyama Y. : Enhanced efficacy of herpes simplex virus mutant HF10 combined with paclitaxel in peritoneal cancer dissemination models. *Hepatogastroenterology*, in press.
 - 42) Sugiura S, Goshima F, Takakuwa H, Sata T, Nakashima T, and Nishiyama Y. : Treatment of solid sarcomas in immunocompetent mice with novel oncolytic herpes simplex viruses. *Otolaryngol Head Neck Surg* 130: 470-478 (2004).
 - 43) Takeyama H, Kawashima K, Yamada K, and Ito Y. : Induction of tumor resistance in mice by L1210 leukemia cells persistently infected with HVJ (Sendai virus). *Gann* 70: 493-501, 1979.
 - 44) Takakuwa T, Goshima F, Nozawa N, Yoshikawa T, Kimura H, Nakao A, Nawa A, Kurata T, Sata T, and Nishiyama Y. : Oncolytic viral therapy for peritoneally disseminated tumor using a spontaneously generated herpes simplex virus type 1 variant in immunocompetent mice. *Arch Virol* 148: 813-825, 2003.
 - 45) Tanino T, Nawa A, Kondo E, Kikkawa F, Daikoku T, Tsurumi T, Luo C, Nishiyama Y, Takayanagi Y, Nishimori K, Miki Y, and Iwaki M. : Paclitaxel-2'-ethylcarbonate prodrug can overcome P-glycoprotein-mediated multidrug resistance to increase drug cytotoxicity. *Pharm Res*, in press.
 - 46) Ushijima Y, Luo C, Goshima F, Yamauchi Y, Kimura H, and Nishiyama Y. : Determination and analysis of the DNA sequence of highly attenuated herpes simplex virus type 1 mutant HF10, a potential oncolytic virus. *Microb Infect* 9: 142-149, 2007.
 - 47) Vasey PA, Shulman LN, Campos S, Davis J, Gore M, Johnston S, Kirn DH, O'Neill V, Siddiqui N, Seiden MV, and Kaye SB. : Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 20: 1562-1569, 2002.
 - 48) Yamada Y, Kimura H, Morishima T, Daikoku T, Maeno K, and Nishiyama Y. : The pathogenicity of ribonucleotide reductase null mutants of herpes simplex virus type 1 in mice. *J Infect Dis* 164:1091-1097, 1991.
 - 49) Yu W, and Fang H. : Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. *Curr Cancer Drug Targets* 7: 141-148, 2007.
 - 50) Yuan ZY, Zhang L, Li S, Qian XZ, and Guan ZZ. : Safety of an E1B deleted adenovirus administered intratumorally to patients with cancer. *Ai Zheng* 22: 310-313, 2003.
 - 51) Zhang L, Daikoku T, Ohtake K, Ohtsuka J, Nawa A, Kudoh A, Iwahori S, Isomura H, Nishiyama Y, and Tsurumi T. : Establishment of a novel foreign gene delivery system combining an HSV amplicon with an attenuated replication-competent virus, HSV-1 HF10. *J Virol Methods* 137:177-83, 2006.

Oncolytic Virotherapy using Replication-Competent Herpes Simplex Viruses

Yukihiro NISHIYAMA and Fumi GOSHIMA

Department of Virology, Nagoya University Graduate School of Medicine,
65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan
E-mail: ynishiya@med.nagoya-u.ac.jp

Oncolytic virotherapy using replication-competent viruses has attracted us as a new modality for cancer treatment. The fundamental concept of oncolytic virotherapy is that the viruses selectively replicate in and lyse tumor cells. Since 1997, numbers of clinical trials have been done in over 500 cancer patients. However, the results of those trials have been disappointing in most cases. We have isolated a spontaneously occurring herpes simplex virus type 1 mutant, designated HF10, which efficiently replicates and induces cell fusion in most transformed cells, but is highly attenuated in mice. HF10 has a number of deletions and insertions in the genome, resulting in the lack of the functional expression of UL43, UL49.5, UL55, UL56 and latency-associated transcripts. We have found that HF10 can be used as an oncolytic virus for treatment of malignant tumors in various animal models. Clinical trials have shown that intratumoral injection of HF10 can induce extensive tumor cell death in patients with recurrent breast cancer and head and neck squamous cell carcinoma without significant adverse effects. HF10 is a promising agent for use in oncolytic virotherapy in non-central nervous system malignancies.

