増殖型ヘルペスウイルスを用いた脳腫瘍治療

宮本伸哉 藤堂具紀

Brain Tumor Therapy using Oncolytic Herpes Simplex Virus Vectors

by

Shinya Miyamoto, M.D., and Tomoki Todo, M.D., Ph. D.

from

Department of Neurosurgery, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

Despite recent advances in surgical techniques, chemotherapy and radiotherapy, the poor prognoses of malignant glioma patients have not changed in the past decades. The use of oncolytic viruses is a promising new strategy for treating cancer including malignant glioma. The basic concept of oncolytic virus therapy is to kill the tumor cells *via* infection with replication-competent viruses such as herpes simplex virus. This concept, however, was not practical until the recent progress in genetic engineering enabled a manipulation of the viral genome to restrict the virus replication to tumor cells. Oncolytic viruses can also serve as vectors that can provide an amplified transgene delivery within the tumor. Multiple oncolytic virus vectors have been tested in clinical trials for malignant gliomas, most by direct intratumoral administration, the results of which have demonstrated the feasibility and potential of this therapeutic approach. The efficacy of oncolytic virus therapy may be enhanced by combining it with other adjuvant therapies. There remain problems to be solved which include how to obtain maximum delivery of the virus to tumor cells *via* systemic administration without losing a substantial amount by attachment to the vessel wall, hemodilution, filtration in the liver, and inability to pass the blood-brain barrier. Nonetheless, the development of oncolytic virus therapy may lead to a breakthrough in the treatment for malignant gliomas.

(Received July 1, 2005 ; accepted September 7, 2005)

Key words : oncolytic virus therapy, herpes simplex virus vectors, malignant gliomas**Jpn J Neurosurg (Tokyo) 15 : 97-104, 2006**

はじめに

悪性神経膠腫は、数多い悪性新生物の中において、有病率は低いもののきわめて予後が悪く、しかも近年の画像診断、放射線療法、化学療法等の目覚ましい進歩にもかかわらず、治療成績の向上がほとんどみられていない。例えば、悪性神経膠腫の代表である膠芽腫においては、生存期間中央値 (median survival time ; MST) が約 12~14 カ月、5 年生存率が 10% 以下できわめて予後が悪い。

現在、悪性脳腫瘍に対する治療は、手術に加えて、化学療法、放射線療法を適宜併用する集学的治療が一般的である。しかしながら、放射線または化学療法が実際奏効するのは悪性脳腫瘍患者のごく一部であり、多くの場合効果は限定的である。ウイルス療法は、脳腫瘍に限らず多くの悪性腫瘍において有効性が報告されており、新たな補助療法として期待されている。

東京大学医学部大学院医学系研究科脳神経外科 / 〒113-8655 文京区本郷 7-3-1 [連絡先: 宮本伸哉]

Address reprint requests to: Shinya Miyamoto, M.D., Department of Neurosurgery, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

Oncolytic viruses

Fig. 1 Schematic demonstrating the concept of oncolytic virus therapy

ウイルス療法開発の背景

ウイルスを悪性腫瘍の治療に応用するという発想自体は、決して新しいものではない。すでに前世紀初頭には急性のウイルス感染を起こした白血病患者が緩解した例が観察されたことが契機となり⁷⁾、1950年までにウイルスを用いた数多くの動物実験が行われた²²⁾。しかし、著明な腫瘍縮小効果が認められたものの、当時は野生型ウイルスや継代による弱毒化ウイルス、自然に発生した変異ウイルスを用いたため、ウイルスによる毒性が問題となり、結局広く臨床応用されるに至らなかった。

その後、近年のウイルスゲノムの解明や遺伝子組換え技術等の目覚ましい進歩により、ウイルスの病原性を人為的に制御することが可能となった。また、癌は、癌遺伝子の発現、癌抑制遺伝子の不活化などの遺伝子異常により、多くの因子が関与する細胞増殖シグナルの伝達、制御系が破綻し、結果的に無秩序な細胞増殖が生ずることから発生すると考えられ、1つの因子をターゲットとしても、汎用される治療法とはなりにくい。ウイルス療法は、基本的には分子標的治療薬のような特定の因子を

攻撃する治療とは異なり、癌細胞に共通した性質を利用するため、一種類のウイルスがまったく成因の異なる種々の腫瘍に有効であり、汎用性が高い。以上のことから、正常組織を傷害せずに腫瘍細胞に対して直接溶解作用を持つ増殖型ウイルスベクターの開発の研究が再び活発となった¹⁸⁾。実際、さまざまな遺伝子改変型の増殖型ウイルスが多く研究者により開発され、一部ではすでに臨床試験が行われ、その有効性及び安全性が報告されている。現在では、さらに外来治療遺伝子をウイルスゲノムに直接組み込むことにより、増殖型の遺伝子治療ベクターとしての機能も持たせ、複合的な抗腫瘍効果を目指した研究が精力的に行われている。

ウイルス療法の基本理論と抗腫瘍免疫

元来ウイルス療法とは、増殖型ウイルスを腫瘍細胞に感染させ、ウイルス複製に伴うウイルスそのものの直接的な殺細胞作用により、腫瘍を縮小させる治療法である。すなわち、ウイルス本来の複製能力を最大限に利用することが基本となる。

腫瘍治療用の増殖型ウイルスは、腫瘍細胞内にて複製能力を保ちつつ、正常組織での病原性を最小限に抑える必要がある。ヒトを自然宿主とするウイルスを用いる場合、弱毒化野生株や自然変異株は、腫瘍細胞と正常細胞に対する効果の差、いわゆる therapeutic window が小さいことから、現在では遺伝子組換えウイルスが主に使用されている。

腫瘍細胞に感染したウイルスは細胞内で複製し、その過程で感染細胞を死滅させる。増えたウイルスは、周囲に散らばり、再び他の腫瘍細胞に感染し、同様なサイクルを繰り返す (Fig. 1)。正常組織を傷害しない機序は、ウイルスの種類により異なる。遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1) の場合は、正常細胞にも感染するが、正常細胞では複製できないようにウイルスゲノムに遺伝子操作が加えてある¹⁹⁾。

HSV-1 はまた、腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞活性の増加を伴う抗腫瘍免疫も誘導する。抗腫瘍免疫が誘導される機序は一般に次のように考えられている⁸⁾。腫瘍細胞がウイルス感染と複製によって破壊されると、樹状細胞 (dendritic cell; DC) を主とするプロフェッショナル抗原提示細胞 (professional antigen presenting cell; professional APC) により外来性蛋白として取り込まれる。癌抗原蛋白は、蛋白分解酵素によりペプチドの断片となり、大部分は endosome に入り、MHC クラス II 蛋白との複合体をつくる。しかし、一部は、細胞質に漏出し、MHC

クラス I 蛋白との複合体を作る。これらの複合蛋白は DC の細胞膜上に発現される。従来、外来性抗原は MHC クラス II 抗原提示経路に入るとされていたが、この DC によるクラス I MHC 抗原提示経路はクロスプレゼンテーションと呼ばれ、近年注目されている。DC はリンパ組織（リンパ節、脾臓など）に移動して、MHC クラス II 蛋白複合体を $CD4^+$ ヘルパー T リンパ球に、MHC クラス I 蛋白との複合体を感作 $CD8^+$ T リンパ球に提示する。これらのリンパ球は細胞膜上の T 細胞レセプター (TCR) を介してこれらを認識し、同時に活性化される。活性化 $CD4^+$ ヘルパー T リンパ球 (Th1) は主に IL-2 および IFN- γ を分泌し、感作 $CD8^+$ T リンパ球の活性化に寄与する。活性化した $CD8^+$ の細胞傷害性 T リンパ球 (Cytotoxic T lymphocyte; CTL) は、腫瘍組織に移行して、膜穿孔性蛋白であるパーフォリンと蛋白分解酵素グランザイムを用いる方法と Fas 分子などの death receptor を刺激する方法の 2 つの方法で腫瘍細胞を攻撃する。ウイルス療法において腫瘍細胞の膜表面に発現されたウイルス蛋白は、APC によるプロセッシングを促進し、またアジュバント効果を呈すると推測される。

一方、ナチュラルキラー (NK) 細胞は、腫瘍抗原を認識することなく、腫瘍細胞を攻撃することができる。NK 細胞は多くの活性化受容体と抑制性受容体を持ち、その両者のシグナルのバランスにより、細胞傷害性が決定される。抑制性受容体が MHC クラス I を認識するため、MHC クラス I の発現が低下している腫瘍細胞をパーフォリン、グランザイムにて攻撃する。NK 細胞は CTL と相補う形で抗腫瘍免疫を支えている。また、周囲組織より産生されるタイプ I IFN (IFN α , β)、Th1 の産生する IL-2、DC 等の産生する IL-12 は、NK 細胞を活性化する。活性化 NK 細胞自身も IL-12、タイプ II IFN (IFN- γ) を分泌し、autocrine 的に自身の活性化を維持する。さらに、IFN- γ は、マクロファージを活性化し、活性化マクロファージは NO、TNF- α により、腫瘍細胞を攻撃する。NO は腫瘍細胞中の活性酸素 reactive oxygen intermediate と結合し、peroxynitrite を生成して細胞傷害性に働くことが知られている。

増殖型単純ヘルペスウイルス I 型 ベクターの特徴

HSV-1 やアデノウイルスは、腫瘍治療用として精力的に研究されてきた代表的な増殖型ウイルスベクターである。いずれもウイルス遺伝子機能の解明が進み、ウイルスゲノムの操作が可能であり、増殖型遺伝子導入ベク

ターとしても使用できる。

HSV-1 はエンベロープを有する二重鎖 DNA ウイルスに分類され、ウイルス療法に有利な以下の特徴を備えている。①強い殺細胞効果を呈する。②ヒトのあらゆる細胞に感染可能である。③ウイルスの生活環とゲノム配列が解明されている。④アシクロビルなどの抗ウイルス薬が存在する。⑤病原性に関連した遺伝子が解明されており、遺伝子操作が可能である。⑥ウイルスゲノムが大きい (約 152 kb) ので、大きな、あるいは複数の外来遺伝子を組み込むことができる。⑦HSV-1 に感受性を示すマウスやサルが存在するために、動物で安全性や効果の前臨床的評価を行える。⑧ヒトのゲノムに取り込まれない。

一方、不利な点としては、ゲノムサイズが大きいことから、従来の相同組換え法で行う遺伝子操作では目的の遺伝子組換え HSV-1 を得るのにかなりの時間と労力を要することである。しかし、近年の bacterial artificial chromosome (BAC) を用いた技術の開発により、HSV-1 ゲノムを丸ごとプラスミドに組み込んで扱うことが可能となり、遺伝子の組換えが格段に容易となった⁹⁾¹²⁾。

遺伝子組換え HSV-1 による 腫瘍細胞のターゲティング

HSV-1 の複製能を腫瘍細胞に限定するためには、ゲノムを操作して非必須遺伝子を 1~複数個除去あるいは不活化すればよい¹⁹⁾。 γ 34.5 遺伝子は、病原性 (virulence) に関連した遺伝子である。正常細胞では通常、ウイルス感染の拡大を防ぐために、ウイルスの侵入に呼応して、二本鎖 RNA 依存性プロテインキナーゼ (double-stranded RNA-activated protein kinase; PKR) がリン酸化され、最終的にウイルス蛋白の合成が遮断される。 γ 34.5 遺伝子産物は、この PKR に拮抗し、ウイルス蛋白の合成を可能とする。 γ 34.5 遺伝子は HSV-1 ゲノムに 2 コピーあり、その双方とも欠失させた遺伝子組換え HSV-1 は、正常細胞内では細胞の PKR を制御できないためウイルス複製が不可能となるが、腫瘍細胞内では腫瘍細胞の PKR が元来低下しているため、 γ 34.5 遺伝子がなくても複製可能となる。

また、チミジンキナーゼ (thymidine kinase; tk) やリボヌクレオチド還元酵素 (ribonucleotide reductase; RR) はウイルス DNA 合成に必須で、これらをコードするウイルス遺伝子を除去・不活化すると、変異 HSV-1 は分裂が盛んで、tk 活性や RR 活性の上昇した腫瘍細胞でのみウイルスの欠落酵素が補われてウイルス複製が可能となる。

Table 1 Representative recombinant oncolytic HSV-1 vectors

Recombinant HSV-1	Generation	Parental HSV-1	Mutation	Inserted gene
1716	1st	17 ⁺	759 bp deletion in both copies of γ 34.5	
R3616	1st	strain F	1000 bp deletion in both copies of γ 34.5	
R4009	1st	strain F	Stop codons in both copies of γ 34.5	Stop codon
NV1020 (R7020)	1st	strain F	Deletion of one copy of γ 34.5, tk, UL24, UL55, UL56, and IR	α 4 (p)-TK, HSV-2gG, gJ, gD, gI
NV1023	2nd	F/NV1020	Deletion of IR & α 47	lacZ, HSV-2gG, gJ, gD, gI
NV1034	2nd	F/NV1023	Deletion of IR & α 47	mGM-CSF, lacZ, HSV-2gG, gJ, gD, gI
NV1042	2nd	F/NV1023	Deletion of IR & α 47	mlL12, lacZ, HSV-2gG, gJ, gD, gI
G207	2nd	F/R3616	1 kb deletion in both copies of γ 34.5, lacZ insertion in ICP6/UL39	lacZ
G47 Δ	3rd	F/G207	Deletion in both copies of γ 34.5 & α 47 lacZ insertion in ICP6	lacZ
T-01	3rd	G47 Δ	Deletion in both copies of γ 34.5, α 47, & ICP6 lacZ insertion in ICP6	lacZ

α 47 遺伝子産物は、抗原提示関連トランスポーター (transporter associated with antigen presentation; TAP) を阻害することによって、ウイルス蛋白が細胞表面に提示されることを防ぎ、ウイルスが宿主の免疫サーベイランスから逃れる作用を有する。HSV-1 が感染すると α 47 遺伝子産物により宿主細胞の MHC クラス I 発現が低下するが、 α 47 遺伝子を欠失させると宿主細胞の MHC クラス I 発現レベルが維持されるため、抗腫瘍効果惹起に有利に働くことが期待される。また、 α 47 遺伝子と重なる *US11* 遺伝子プロモーターが同時に欠失すると、*US11* 遺伝子発現時期が変化することに伴い、 γ 34.5 欠失 HSV-1 の減弱したウイルス複製能を腫瘍細胞に限って回復させ、殺腫瘍細胞効果を向上させる。

各種遺伝子組換え HSV-1 の分類と概要 (Table 1)

① 第一世代遺伝子組換え HSV-1

ウイルスの非必須遺伝子を 1 つだけ変異させた増殖型遺伝子組換え HSV-1、または単一の機序により腫瘍細胞特異性を得ているものを第一世代と呼ぶ。第一世代は、一般に第二世代より複製能力を維持するが、病原性減弱の不徹底や、変異が一箇所だけであるため相同組換えによって野生型 HSV-1 へ自然に戻ってしまう可能性などがあり、安全性の面で問題が残る。HSV1716 や NV1020 (R7020) がこれに該当する。

② 第二世代遺伝子組換え HSV-1

γ 34.5 遺伝子と DNA 合成酵素遺伝子など、2 つの異なる機序を介して腫瘍特異的なウイルス複製を得た増殖型遺伝子組換え HSV-1 を第二世代と呼ぶ。病原性が一層弱められ、野生型に戻る可能性がきわめて少なく、安全性が著明に改善した。G207 は第二世代の代表で、米国で再発悪性グリオーマを対象とした臨床試験が行われた¹⁷⁾¹⁹⁾。

③ 第三世代遺伝子組換え HSV-1

3 つの異なる機序を介して腫瘍特異性を持たせた増殖型遺伝子組換え HSV-1 を第三世代と呼ぶ。G47 Δ は、G207 と同じ γ 34.5 遺伝子欠失と *ICP6* 遺伝子 (RR) 変異に加えて、さらに α 47 遺伝子およびそれと重なる *US11* プロモーター領域を欠失する²⁶⁾。最近、G47 Δ の *ICP6* 遺伝子の不活化変異を欠失変異に改良した T-01 も開発された。第三世代は、第二世代の安全性を保ちつつ、ウイルス複製能と抗腫瘍効果が著しく向上した。

④ 「武装」遺伝子組換え HSV-1

増殖型 HSV-1 のゲノムに外来治療遺伝子 (transgene) を直接組み込むと、増殖型 HSV-1 そのものを増殖型の治療遺伝子発現ベクターとして機能させることができる。現在、治療効果をさらに高めるための外来治療遺伝子を組み込んだウイルスの開発が精力的に進められてい

Fig. 2 HSV-1 structures and their representative recombinant oncolytic HSV-1 vectors

る。例えば、NV1020 (R7020) を少し修飾した NV1023 の基本骨格でマウス IL-12 を発現する NV1042 (Fig. 2) は、ウイルスによる直接的な殺細胞作用に加えて、抗腫瘍免疫の惹起と腫瘍血管新生の抑制効果を呈し、マウス IL-12 を発現しない NV1023 に比べ抗腫瘍効果を有意に増強することが、複数のマウス腫瘍モデルにおいて示された³⁾²⁸⁾。

⑤ 臓器・腫瘍特異的プロモーターを利用した遺伝子組換え HSV-1

ある臓器、腫瘍に特異的に発現される蛋白質の遺伝子のプロモーターでウイルスの遺伝子を制御することにより、その臓器や腫瘍においてのみウイルスが複製可能になるか複製能が向上するように遺伝子操作した増殖型 HSV-1 である。肝細胞に特異的なアルブミン²¹⁾や未分化神経細胞に特異的なネスチンのプロモーター¹⁴⁾などを利用したウイルスベクターが開発されている。

中間径フィラメントを構成する蛋白であるネスチンはグリオーマのマーカーの一つであるとされる。ネスチンは、神経細胞の発生の段階で発現されるが、成熟脳では発現が抑制されており、腫瘍細胞などの増殖細胞中のみ

発現している。rQNestin34.5 は、ネスチンプロモーターにより $\gamma 34.5$ をコントロールし、 $\gamma 34.5$ を腫瘍細胞の中でのみ発現させ、腫瘍細胞のみでウイルスの複製能を向上して抗腫瘍効果を発揮させるべくデザインされた HSV-1 ベクターである¹⁴⁾。

脳腫瘍に対する増殖型遺伝子組換え HSV-1 の臨床試験

臨床に応用された増殖型遺伝子組換え HSV-1 の代表として、HSV1716、G207 が挙げられる。HSV1716 は、 $\gamma 34.5$ 遺伝子のみを欠失した第一世代の増殖型 HSV-1 ベクターである (Fig. 2)。1990 年代後半、英国のグループにより、再発悪性グリオーマに対する HSV1716 の第 I 相臨床試験が行われた。腫瘍内に定量的に 10^3 , 10^4 , 10^5 プラーク形成単位 (plaque-forming units; pfu) の HSV1716 を 3 人ずつ投与が行われたが、どの患者においても脳炎などの副作用や潜在性 HSV-1 の再活性化などは認められず、安全性が確認された。またその 9 人の患者のうち、投与 14~24 カ月後において 4 人の生存が確認され、HSV1716 の有効性も示唆された²⁴⁾。

また同グループは、あらかじめ HSV-1 の抗体値を測定した 12 人の悪性グリオーマの患者に対して生検を兼ねて、まず 10^5 pfu の HSV1716 を定位的に投与した。その 4~9 日後に腫瘍を切除し、その検体を調べたところ、10 人から HSV-1 DNA、2 人より抗 HSV-1 免疫染色で HSV1716 の複製が確認された。また、5 人に血清 HSV-1 抗体の陽転を認め、HSV-1 に対する免疫反応が認められた。この試験において HSV-1 抗体保有の有無にかかわらず、毒性を惹起することなく、悪性脳腫瘍内で HSV1716 が複製することが示された²³⁾。

さらに同グループにより、12 人の悪性グリオーマの患者に対して、今度は腫瘍切除後の腫瘍腔壁に HSV1716 を直接投与する臨床試験が行われた。術後、適応があれば放射線療法、化学療法も行われた。術後 14 カ月後の時点で、画像上 10 人の患者において腫瘍の増大を認め、術後 15 カ月の時点で 3 人の生存が確認された¹⁰⁾。

HSV1716 は、弱毒化の程度が低く複製能を維持するため、少ないウイルス量で高い殺細胞効果が得られる可能性がある一方で、毒性や野生型への復元 (spontaneous reversion) の危険性が第二世代などに比べて高いため、高い投与量を実施し得ない。その点、第二世代の G207 は元来脳腫瘍治療用に開発され、 γ 34.5 遺伝子の欠失と *lacZ* 遺伝子挿入による *ICP6* 遺伝子 (RR) の不活化の二重変異が施されて、安全性が格段に改善されている (Fig. 2)²⁰⁾。再発悪性グリオーマ患者 21 名を対象に米国で第 I 相臨床試験が行われた。ウイルス投与量は、 1×10^6 から 3×10^9 pfu まで 3 名ずつ段階的に増量した。造影 CT の増強部位に定位的に腫瘍内投与されたところ、どの患者においてもグレード 3、4 相当の重篤な有害事象はみられなかった¹⁷⁾。この最高投与量は、英国で臨床試験が行われた HSV1716 の最高 10^5 pfu と比べ 3 万倍で、G207 の安全性の高さが推測される。効果については、6 例 (29%) に Karnofsky スコアの一時的な改善がみられた。MRI にて腫瘍体積の経時的評価を行ったところ、投与前と比較し投与 1 カ月後において 20 例中 6 例に腫瘍の縮小を認めたが、死亡した 1 例を除いた全例にて再増大を認めた。生検あるいは再摘出術で得られた腫瘍組織 7 例中 2 例で、PCR にて G207 の DNA が検出された。剖検 5 例中 3 例にて腫瘍が脳の一領域に局限し、神経膠芽腫に通常みられるような腫瘍細胞の周囲脳組織への著明な浸潤を認めなかった¹⁷⁾。第 II 相試験では、脳腫瘍摘出後、摘出腔壁に G207 を直接投与する方法が採られた。放射線治療や化学療法と G207 を併用した臨床試験が米国で計画されている。

ウイルス療法の展望

ウイルス療法の臨床試験はまだ黎明期であり、抗腫瘍効果を最適化するプロトコルの開発や腫瘍内のウイルス複製のイメージング評価の確立などまだ課題も多い。*In vivo* におけるウイルス複製の評価は、非侵襲的にルンフェラーゼを用いてイメージングすることがすでにマウスでは実用化されている。さらに、最近 tk の選択的基質である

5-iodo-2'-fluoro-1- β -D-arabinofuranosyl-uracil (FIAU) を用いた PET imaging において、HSV-1 の tk 遺伝子の発現レベルを非侵襲的にモニターすることが可能であることが報告された。Bennett ら²⁾は、大腸癌細胞株 HCT8 のラット側腹部 0.5 cm 径の皮下腫瘍内に HSV-1 ベクターを投与し、その 8 時間、48 時間後に ¹²⁴I-labeled FIAU を投与し、さらにそれぞれその 3 日後に PET を施行した。その結果、 1×10^7 pfu の低投与量でも FIAU の集積を検出可能であり、0.5log のウイルス投与量の差を集積度の違いにより検出できた。またウイルス投与 8 時間後よりも 48 時間後に FIAU を投与したほうが集積が強かった。このことから、HSV-1 の tk 遺伝子発現レベルを PET で検出することにより、増殖型 HSV-1 ベクターの複製の程度と分布を非侵襲的に体外から確認できることを示した。ヒトにおいても、ウイルス療法の効果を PET にて判定できることが今後期待される。

また、ウイルス療法と他の補助療法との併用の有効性が指摘されている⁶⁾。Advani ら¹⁾は、ヌードマウスにおける U87 MG の皮下腫瘍モデルにおいて、R3616 ウイルス治療および放射線の併用療法とそれぞれの単独治療との抗腫瘍効果の比較検討を行った。ウイルス投与の 1 日後に 20 Gy、そして 2 日後に 25 Gy という分割照射放射線の併用療法は、R3616 ウイルス単独治療と比べ、ウイルスの複製を 2~5 倍に増加させることにより抗腫瘍効果を相乗的に増強し、著明な延命効果がみられた。また、ヌードマウスの扁平上皮癌細胞株皮下腫瘍モデルにおける G207 ウイルス治療と放射線療法 (5 Gy の 1 回照射) の併用療法¹⁵⁾やヌードマウスの U87 MG の脳腫瘍モデルにおける R3616 ウイルス治療と分割放射線療法 (5 Gy を 1 日おきに計 6 回、Total 30 Gy) の併用療法⁵⁾を検証した異なる腫瘍モデルにおいても、同様の結果が観察されている。G207 に関しては、放射線による DNA の損傷により、腫瘍細胞の ribonucleotide reductase (RR) およびウイルスの複製に直接関与していると考えられている GADD34 蛋白の up-regulation がウイルス複製増強の機構ではないかと推察されている¹⁵⁾¹⁶⁾²⁵⁾。その一方でヒ

ト前立腺癌細胞株 LNCap をヌードマウスに、またマウス前立腺癌細胞株 TRAMP を C57BL/6 マウスに植えたそれぞれの皮下腫瘍モデルにおいて、G207 と放射線の同時投与が行われたが、その相乗効果はみられなかった¹³⁾。このように、放射線療法との併用の相乗効果に関しては、依然 controversial であるが、放射線照射のタイミング、線量などの条件が最適化できれば、将来臨床においても、ウイルス治療と放射線療法の併用による治療成績の向上が期待できる。

化学療法についても、マウスの非小細胞癌細胞株 NCI-H460 の皮下腫瘍に対して、HSV-1716 の投与 1 日後にマイトマイシン C の静注を施行したところ、単独治療と比べ、有意に腫瘍縮小効果を認めたという²⁷⁾。また、マウスの胃癌モデルにおいて、マイトマイシン C の併用が腫瘍細胞の GADD34 を誘導し、G207 の抗腫瘍効果を著明に増強したと報告されている⁴⁾。

これら従来の補助療法が、ウイルス療法と併用できるのみでなく、相乗的抗腫瘍効果が期待できることは、実際の臨床においては特に重要な点であるが、現時点ではまだ報告は少数であり、今後の研究課題となっている。動物実験と臨床試験を経て、適切なプロトコルが確立されることが望まれる。

おわりに

ウイルス療法は、ウイルスが腫瘍細胞内で選択的に複製して直接細胞を破壊することが基本であり、腫瘍細胞に共通した性質を利用するため腫瘍の種類を問わないこと、患者の年齢、性別などによる適用制限が少ないこと、放射線療法、化学療法、免疫療法など他の補助療法との併用で相乗効果が期待できること、増殖型治療遺伝子発現ベクターとして遺伝子分配も可能であることなど多くの優れた点を有する。

一方で、増殖型ウイルスとはいえ、臨床においてすべての腫瘍細胞に感染をいき渡らせることは困難であり、より効果的なウイルス投与方法と抗腫瘍効果の増強法を開発していく必要がある。静脈内投与など非観血的投与方法で効果的なウイルス療法を行うのが理想だが、血液による希釈や、血管壁への吸着、肝臓での補足などの問題に加え、特に脳腫瘍治療においては脳血液関門 (blood brain barrier; BBB) という障壁が存在し、血管内投与方法の実用化にはなお工夫を要する。ラットでは増殖型 HSV-1 を頸動脈内に投与する際に、cyclophosphamide やマニトールを予め投与しておくことで脳腫瘍へのウイルス分配が格段に向上することが観察されている¹¹⁾。

ウイルス療法は、より効果的で安全な治療遺伝子発現型ウイルスベクターの開発や他の補助療法との併用など今後大きな発展性を有している。新たな delivery system の開発により静脈内投与方法や頻回反復投与などが確立されれば、ウイルス療法に近い将来脳腫瘍補助療法の first line therapy となることが期待される。

文 献

- 1) Advani SJ, Sibley GS, Song PY, Hallahan DE, Kataoka Y, Roizman B, Weichselbaum RR: Enhancement of replication of genetically engineered herpes simplex viruses by ionizing radiation: A new paradigm for destruction of therapeutically intractable tumors. *Gene Ther* 5: 160-165, 1998.
- 2) Bennett JJ, Tjuvajev J, Johnson P, Doubrovin M, Akhurst T, Malholtra S, Hackman T, Balatoni J, Finn R, Larson SM, Federoff H, Blasberg R, Fong Y: Positron emission tomography imaging for herpes virus infection: Implications for oncolytic viral treatments of cancer. *Nat Med* 7: 859-863, 2001.
- 3) Bennett JJ, Malhotra S, Wong RJ, Delman K, Zager J, St-Louis M, Johnson P, Fong Y: Interleukin 12 secretion enhances antitumor efficacy of oncolytic herpes simplex viral therapy for colorectal cancer. *Ann Surg* 233: 819-826, 2001.
- 4) Bennett JJ, Adusumilli P, Petrowsky H, Burt BM, Roberts G, Delman KA, Zager JS, Chou TC, Fong Y: Up-regulation of GADD34 mediates the synergistic anticancer activity of mitomycin C and a γ_1 34.5 deleted oncolytic herpes virus (G207). *FASEB J* 18: 1001-1003, 2004.
- 5) Bradley JD, Kataoka Y, Advani S, Chung SM, Arani RB, Gillespie GY, Whitley RJ, Markert JM, Roizman B, Weichselbaum RR: Ionizing radiation improves survival in mice bearing intracranial high-grade gliomas injected with genetically modified herpes simplex virus. *Clin Cancer Res* 5: 1517-1522, 1999.
- 6) Chahlav A, Todo T, Martuza RL, Rabkin SD: Replication-competent herpes simplex virus vector G207 and cisplatin combination therapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia* 1: 162-169, 1999.
- 7) Dock G: The influence of complicating diseases upon leukaemia. *Am J Med Sci* 127: 563-592, 1904.
- 8) 藤原大: 腫瘍免疫学, 第 2 版. 東京, 中外医学社, 2003.
- 9) Fukuhara H, Ino Y, Kuroda T, Martuza RL, Todo T: Triple gene-deleted oncolytic herpes simplex virus vector double-armed with IL-18 and soluble B7-1 constructed by bacterial artificial chromosome-mediated system. *Cancer Res* 65: 10663-10668, 2005.
- 10) Harrow S, Papanastassiou V, Harland J, Mabbs R, Petty R, Fraser M, Hadley D, Patterson J, Brown SM, 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.
- 11) Ikeda K, Ichikawa T, Wakimoto H, Silver JS, Deisboeck TS, Finkelstein D, Harsh GR 4th, Louis DN, Bartus RT, Hochberg FH, Chiocca EA: Oncolytic virus therapy of multiple tumors in the brain requires suppression of innate and elicited antiviral responses. *Nat Med* 5: 881-887, 1999.
- 12) Ino Y, Saeki Y, Fukuhara H, Todo T: Triple combination of

- oncolytic HSV-1 vectors “armed” with interleukin 12, interleukin 18 or soluble B7-1 results in enhanced antitumor efficacy. *Clin Cancer Res* (in press).
- 13) Jorgensen TJ, Katz S, Wittmack EK, Varghese S, Todo T, Rabkin SD, Martuza RL: Ionizing radiation does not alter the antitumor activity of herpes simplex virus vector G207 in subcutaneous tumor models of human and murine prostate cancer. *Neoplasia* 3: 451-456, 2001.
 - 14) Kambara H, Okano H, Chiocca EA, Saeki Y: An oncolytic HSV-1 mutant expressing ICP34.5 under control of a nestin promoter increases survival of animals even when symptomatic from a brain tumor. *Cancer Res* 65: 2832-2839, 2005.
 - 15) Kim SH, Wong RJ, Kooby DA, Carew JF, Adusumilli PS, Patel SG, Shah JP, Fong Y: Combination of mutated herpes simplex virus type 1 (G207 virus) with radiation for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer* 41: 313-322, 2005.
 - 16) Kuo ML, Kinsella TJ: Expression of ribonucleotide reductase after ionizing radiation in human cervical carcinoma cells. *Cancer Res* 58: 2245-2252, 1998.
 - 17) Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, Gillespie GY, Todo T, Hunter WD, Palmer CA, Feigenbaum F, Tornatore C, Tufaro F, 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.
 - 18) Martuza RL, Malick A, Markert JM, Ruffner KL, Coen DM: Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* 252: 854-856, 1991.
 - 19) Martuza RL: Conditionally replicating herpes vectors for cancer therapy. *J Clin Invest* 105: 841-846, 2000.
 - 20) Mineta T, Rabkin SD, Yazaki T, Hunter WD, Martuza RL: Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nat Med* 1: 938-943, 1995.
 - 21) Miyatake S: Gene therapy using tissue-specific replication competent HSV. *Hum Cell* 15: 130-137, 2002.
 - 22) Moore AE: Effects of viruses on tumors. *Ann Rev Microbiol* 8: 393-410, 1954.
 - 23) Papanastassiou V, Rampling R, Fraser M, Petty R, Hadley D, Nicoll J, Harland J, Mabbs R, Brown M: The potential for efficacy of the modified (ICP 34.5⁻) herpes simplex virus HSV1716 following intratumoural injection into human malignant glioma: A proof of principle study. *Gene Ther* 9: 398-406, 2002.
 - 24) Rampling R, Cruickshank G, Papanastassiou V, Nicoll J, Hadley D, Brennan D, Petty R, MacLean A, Harland J, McKie E, Mabbs R, Brown M: Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene Ther* 7: 859-866, 2000.
 - 25) Stanziale SF, Petrowsky H, Joe JK, Roberts GD, Zager JS, Gusani NJ, Ben-Porat L, Gonen M, Fong Y: Ionizing radiation potentiates the antitumor efficacy of oncolytic herpes simplex virus G207 by upregulating ribonucleotide reductase. *Surgery* 132: 353-359, 2002.
 - 26) Todo T, Martuza RL, Rabkin SD, Johnson PA: Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6396-6401, 2001.
 - 27) Toyoizumi T, Mick R, Abbas AE, Kang EH, Kaiser LR, Molnar-Kimber KL: Combined therapy with chemotherapeutic agents and herpes simplex virus type 1 ICP34.5 mutant (HSV-1716) in human non-small cell lung cancer. *Hum Gene Ther* 10: 3013-3029, 1999.
 - 28) Wong RJ, Chan MK, Yu Z, Kim TH, Bhargava A, Stiles BM, Horsburgh BC, Shah JP, Ghossein RA, Singh B, Fong Y: Effective intravenous therapy of murine pulmonary metastases with an oncolytic herpes virus expressing interleukin 12. *Clin Cancer Res* 10: 251-259, 2004.

要 旨

増殖型ヘルペスウイルスを用いた脳腫瘍治療

宮本 伸哉 藤堂 具紀

悪性神経腫瘍の治療成績がこの数十年間改善されない中、ウイルス療法は新しい治療法として注目される。増殖型ウイルスを腫瘍細胞に感染させ、直接的な殺細胞作用で死滅させる。遺伝子工学の発達により、ウイルス複製を腫瘍細胞に限定し、さらに治療遺伝子発現型ベクターとして利用することも可能となった。悪性神経腫瘍を対象に、すでに複数の増殖型ウイルスを用いた臨床試験が行われ、安全性と有効性が示された。免疫療法や化学療法、放射線治療の併用により相乗効果が期待される。血管内投与方法などに改善の余地が残る一方で、実用性は着実に向上しており、悪性神経腫瘍治療に革新をもたらす治療法としてその発展が期待される。

脳外誌 15: 97-104, 2006