

201019032A

厚生労働科学研究費補助金 第3次対がん総合戦略研究事業
ヒトパピローマウイルスを標的とする発がん予防の研究

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 清野 透

平成23(2011)年 5月

201019032A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

ヒトパピローマウイルスを標的とする発がん予防の研究

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 清野 透

平成23(2011)年 5月

目 次

I. 総括研究報告	-----	1
ヒトパピローマウイルスを標的とする発がん予防の研究		
清野 透		
II. 分担研究報告	-----	15
1. HPV持続感染機構の解析と複製阻害剤による感染排除に関する研究		
清野 透		
2. HPV治療ワクチン臨床試験の実施に関する研究		
川名 敬		
3. HPVの生活環の解明と、それを利用した抗腫瘍剤の探索に関する研究		
酒井 博幸		
4. ヒトパピローマウイルス(HPV)タイピング法の再検討に関する研究		
森 清一郎		
5. HPV持続感染機構の解析と複製阻害剤による感染排除に関する研究		
中川 俊介		
6. 子宮頸部高度異型上皮に対するRNAi治療開発に関する研究		
大和 建嗣		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	43
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	51

I 総括研究報告書

ヒトパピローマウイルスを標的とする発がん予防の研究

清野 透

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

（総括）・分担）研究報告書

ヒトパピローマウイルスを標的とする発がん予防の研究

研究代表者 清野 透 国立がん研究センター研究所ウイルス発がん研究分野 分野長

研究要旨 発がん性HPV群の感染予防、潜伏感染の阻止、前がん病変の排除等による子宮頸がんの予防法を開発し子宮頸がんの罹患率・死亡率を減少させることが研究の目的である。武田薬品工業による第2世代HPVワクチンの事業化を受け、臨床試験に必要な血清中の抗L2中和抗体価の測定法を開発した。今後も技術提供などにより臨床試験への導入を促進する。現行のHPVタイピング法を再評価し問題点を明らかにした。HPV既感染者への治療ワクチンとして、乳酸菌E7ワクチン(GLBL101c)による第I/IIa相探索的臨床試験を進め、安全性を確認し、特異的細胞性免疫誘導能を検出した。4カプセル/日内服の3例(全例)でCIN3からCIN1/2への退縮を観察した。潜伏感染の阻止のためHPVゲノムを複製維持する細胞株を樹立しHPV維持複製にはE1が不要であること、I型IFNが複製阻害することを示した。前がん病変～子宮頸がんの新たな治療法として、MG132内包化ミセルは腫瘍に集積し著名な抗腫瘍効果を示した。また、E6E7 DNA-RNAハイブリッド型核酸(dsRDC)の一つは、siRNAより正常細胞に対する細胞毒性が低く、E6E7発現細胞特異的な増殖抑制を観察した。

A. 研究目的

ウイルスが原因となるがんは、ウイルス感染や持続感染を阻害すれば予防できる。HPVはほぼ全ての子宮頸がんの原因であり、全がんの5%、女性のがんの11%の原因となっている。発がん性HPV群の感染予防、HPV潜伏感染の阻止、前がん病変の排除等による子宮頸がんの予防法を開発し子宮頸がんの罹患率・死亡率を減少させることが研究の目的である。特色としてウイルス遺伝子あるいは蛋白質を分子標的とし、副作用が少なく特異性の高い予防法・治療法の開発が期待される。

現行のHPVワクチンは16、18型にしかな効果がないが、先行研究である神田班の成果として開発された第

2世代HPVワクチンは発がん性HPV群すべての感染予防が期待できる。また、同グループが開発した中和抗体定量系は、世界で最も信頼性が高く、HPV感染の実態を調べる血清疫学、ワクチン臨床試験のデータ解析に応用できる。これらの特色を生かし第2世代HPVワクチンの実用化を目指す。

感染予防ワクチンは気感染者に対しては無効であるため異なる戦略が必要である。E7蛋白質を表面に持つ乳酸菌製剤を経口ワクチンとして投与し、粘膜CTL誘導によって前癌病変の治療を試みる臨床試験は、世界に類を見ない試みである。本治療ワクチンは安価な製剤化が可能で安全性も高いことが予想され有効性が確

認できれば、実用化が容易である。

細胞DNA合成と連動してHPVゲノムの複製が起る培養細胞系を、HPV潜伏感染のモデルとして用い、その分子機構を解析し、標的とすべきウイルス遺伝子・蛋白質を明確にする。研究代表者らは、正常子宮頸部角化細胞の培養、不死化と、前がん病変からがん化に至る過程を培養細胞系で忠実に再現することに成功している。正常子宮頸部からCIN、子宮頸がんに対応する細胞を三次元（ラフト）培養することで臨床病変に近い状態を再現することができ、低分子化合物、siRNA、プロテオソーム阻害剤などの効果をin vitroで検討することができる。独自のsiRNA設計プログラムに基づくHPV遺伝子に対するsiRNAは分担研究者が国際特許を有している。更に、研究協力が開発した最新のナノ粒子ミセルDDSを用い、これらの局所投与効果の評価法を確立する。また、HPV複製阻害剤のハイスループット・スクリーニング系を確立し阻害薬開発を促進させる。

B. 研究方法

全ての型の高リスク型HPVの感染予防を目指す第二世代HPVワクチン開発が武田薬品工業により事業化されることが決定されたのを受け、HPV16型L2抗原中の交叉性中和エピトープを明らかにし、交叉性中和抗体価の測定法を開発した。また、臨床試験開始後にはHPV感染予防効果を正確に把握するため正確なHPVタイプ

ング技術が必要になる。世界的に広く使われている異なるプライマーセットを比較しHPVタイピング法の再評価を進めた。

HPV 既感染者への治療ワクチンを開発する。HPV16型E7が細胞表面に提示された乳酸菌 *Lactobacillus casei*（乳酸菌 E7 ワクチン：GLBL101c）をGMP 製造した製剤を作成し、第 I/IIa 相探索的臨床試験を進める。GLBL101c は、最少量の 1cap/d から 6cap/d まで増量し、安全性と特異的細胞性免疫誘導能を解析した。内服治療による臨床的有効性検討のため、組織診、細胞診による病理学的評価を行った。

E6の機能の大部分は、p53など標的蛋白質のユビキチン-プロテオソーム系による分解に依存している。そこでプロテオソーム阻害剤であるMG132内包化ナノミセルを共同開発した。ミセルを蛍光ラベルしマウス血中での安定性を検討した。また、マウスに移植したHeLa細胞へのミセル化MG132の集積と移植腫瘍に対する縮小効果を調べた。また、E6,E7に標的としたsiRNAの細胞毒性を減らすため、DNA-RNAハイブリッド型核酸の細胞毒性とRNA干渉効果を検討した。

HPV複製機構の解明と複製阻害剤開発のため環状HPVゲノムを複製。維持する細胞株を樹立した。E1に変異を持つゲノムを用いてHPV複製におけるE1の役割を詳細に解析した。また、I型インターフェロンなどがHPVゲノム複製に対する影響を調べた。

(倫理面への配慮)

臨床試験、臨床検体の解析においては「臨床研究に関する倫理指針」に則り、施設の研究倫理審査委員会の承認を得て、インフォームドコンセントの上で、文書で同意を得た症例に対して研究を実施した。また、プライバシーの保護に万全を期し、提供試料、個人情報情報を厳格に管理・保存している。組換えウイルスの作成にあたっては、「カルタヘナ法」に則り、大臣確認、実施機関の承認の上実施した。動物実験は、5R の精神に則り、「動物の愛護及び管理に関する法律（昭和 48 年法律第 105 号、平成 17 年 6 月改正）」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成 18 年環境省告示第 88 号）」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年 6 月）」、内閣府告示の「動物の処分方法に関する指針」を踏まえ、適切に行なった。

C. 研究結果

1. 次世代感染予防ワクチン（森）
欧米で開発された第一世代HPVワクチンはL1蛋白質を抗原とするが16、18型に限定した予防効果しかない。HPV型間で共通性の高いL2蛋白質を抗原とするワクチン抗原により、全ての発がん性HPVの感染予防を期待できる。神田班の成果である第二世代HPVワクチンの臨床試験には製薬会社の参入が必須である。2010年10月 武田薬品工業（株）が第二世代HPVワクチン

に関する特許の独占的使用についてHS財団とライセンス契約を結び事業化が決定された。また、HPV16型L2中の交叉性中和エピトープを同定した。これを基に、血清中の交叉性中和抗体価を簡便に測定するELISA法を開発した（特許出願準備中）。この技術は多数の被験者の中和抗体価を正確に測定する上で必須である。また臨床検体中のHPVタイピングの再評価により、MY09/11とGP5+/6+では51、52型を、L1C1/L1C2C2Mでは16型を検出できないことが多いこと、18、16型がそれぞれ、4300、290コピー含まれる検体などでは、L1C1/L1C2C2Mを用いると16型が検出されなかった。

2. HPV 粒子産生（酒井、清野、森）

これまで、HPV 感染の中和活性評価には偽ウイルス粒子が使われてきた。しかし、本物のウイルス粒子とは挙動が異なることから、本物の HPV 粒子を用いる必要がある。しかし、これまでの方法では HPV を培養技術で大量に安定して供給することはできない。今年度は、3次元培養技術において HPV ゲノムを安定して維持する技術を開発した。また、不死化正常角化細胞株を用いて平皿培養において HPV ゲノムの増幅に成功した。これらの技術を組み合わせることで中和活性評価や感染機構の解析に必須の本物の HPV 粒子を安定供給できる可能性が示唆される。

3. 治療ワクチン（川名）

HPV16型のE7蛋白質を菌体表面に

提示する乳酸菌死菌を経口投与して、E7 特異的 CTL を誘導し、子宮頸部の前がん病変治療を目的とする探索的 第 I/IIa 相臨床試験を進めた。H22 年度までに、第 I/IIa 相探索的臨床試験を 7 症例に実施し、1-4 カプセル/日までの安全性が確認された。4 カプセル/日内服の 3 例(全例)で高度異形成病変から中等度異形成への退縮を観察した。

4. HPV 複製阻害剤スクリーニング系の開発 (清野・酒井)

遺伝子組換え HPV ゲノムを複製維持する細胞株を樹立した。HPV18 replicon の複製を IFN・が阻害、TNF・が促進することを見いだした。

5. ウイルス遺伝子を標的とした予防と治療 (清野・中川・大和・酒井)

従来報告と異なり HPV 維持複製には E1, E6, E7 が不要であるとの予備的結果より、ウイルス遺伝子 (産物) を標的とした維持複製の阻害は困難と判断した。しかし、CIN3 や子宮頸がんにおいては E6, E7 を標的とする予防・治療は有効である。これまでに、HPV16 E6/E7 を標的とした特異性の高い siRNA 配列を決定した。しかし元来 siRNA は、その miRNA との機能的類似性から、ガイド鎖を介する非標的遺伝子への効果 (オフターゲット効果)、miRNA 生成抑制、パッセンジャー鎖の RISC 形成による非特異効果、およびこれらに関連した細胞毒性の問題を有する。今年度は、siRNA seed 部分 (5'末より 1-6) の DNA 置換 (dsRDC 化) で E6/E7 siRNA のガイド鎖オフターゲット効果、パッセンジャー鎖非特

異効果および細胞毒性を減少させることが可能であることを明らかにした。E6/E7 dsRDC の一つは、不死化子宮頸部角化細胞に対する細胞毒性が低く、HPV16 E6/E7 発現細胞に特異的増殖抑制を引き起こすことを明らかにし、高度異型上皮や早期癌の治療応用への可能性が示唆された。

7. ウイルス蛋白質を標的とした免疫応答系の再活性化 (清野・中川・大和)

子宮頸がん細胞株の Xenograft モデルにおいてプロテオソーム阻害剤 (MG132) 単独では HPV 陰性の子宮頸癌移植腫瘍に対しての抗腫瘍効果は明らかではなかったが、MG132 封埋ミセルは腫瘍に集積する傾向を示し著名な抗腫瘍効果を示した。

D. 考察

子宮頸がんは、我が国で年間約 15,000 人が発症し、約 3,000 人が死亡している。出産・育児世代の女性が多く罹患することから海外では「マザーズ・キラー」とも呼ばれている。実際、我が国では HPV 感染の低年齢化と 40 歳以下の子宮頸がん罹患率増加が続いており、HPV 感染予防ワクチンの重要性が増している。全ての発がん性 HPV 群に有効な感染予防ワクチンは将来の子宮頸がんの発症を激減させ、集団検診の負担を軽減する。武田薬品工業 (株) による第二世代 HPV ワクチンの事業化が決定されたことにより、臨床試験への目途がついた。臨床試験においては必須となる信頼できる多検体の中和抗体測定法を開発し、

技術提供している。また、L2 中和抗体による感染防御機構には不明な点も多く、L2 中和抗体エピトープの同定により機構解明とワクチン抗原改良の可能性の検討を進める。長期的には発展途上国でも投与可能な安価な感染予防ワクチンの開発が望まれる。L2 中和抗体エピトープの同定や感染防御機構解明により、これまで失敗に終わっている L2 ペプチドワクチンなどについても抗原、投与方法などを改良し再評価を開始したい。

一方、感染予防ワクチンは HPV 既感染者に対して治療効果はない。既感染者に対しては、定期受診によるフォローアップと病変進行時の外科的治療が行われている。潜伏感染している HPV ゲノムの複製阻害や被感染細胞の排除は、HPV 既感染者の発がんリスクを低下させる唯一の方法であるが、現在 HPV を排除する内科的治療法はない。HPV 治療ワクチンや HPV ゲノム複製阻害剤は CIN3 患者さらには子宮頸がん患者に対する、現在の外科的治療に取って替わる可能性がある。

内科的治療法は、患者への負担が少なく、頸管部を正常に保ち、患者の妊娠・出産に対する影響もない。経口 HPV 治療ワクチンは製造工程の容易さから低価格で製造が可能であり、HPV ゲノム複製阻害剤とともに成功すれば医療経済効果は高く、発展途上国への医療援助も可能である。このような内科的治療法が確立すれば、患者は定期受診による肉体的および精神的負担から解放され、医療負担も軽減

される。この中で、HPV 複製阻害剤の開発につながるアッセイ系が樹立された。今後はハイスループット化を進める。また、探索的Ⅰ/Ⅱa 相臨床試験中の HPV16 の E7 を抗原とする経口治療ワクチンは腸管免疫が子宮頸部への CTL 誘導に有効であるとの基礎研究の結果からもその有効性が期待されている。予想された通りこれまでに有害事象はなく、CIN3 病変の CIN1/2 への退縮も観察されている。ワクチン投与と病変退縮の因果関係は不明であるが本治療ワクチンが有望であることを示唆するには十分の結果が得られた。大規模臨床試験の早期実現に向けて、症例数を増やし免疫学的解析を着実に進める。

一方、CIN3 病変や子宮頸がんは宿主免疫反応を逃れて進展した病変であることから経口治療ワクチン単独では限界も予想される。E6,E7 が病変の維持に必須であることから siRNA やプロテオソームインヒビターによる E6,E7 の機能抑制による予防・治療法の開発を進める。この中で、プロテオソーム阻害剤(MG132)封埋ミセルは子宮頸がん細胞株 Xenograft に対し、腫瘍に集積する傾向を示し著名な抗腫瘍効果を観察しており期待される。siRNA の一部を DNA に置換した dsRDC は細胞毒性が低く安定性が高いことが示された。しかし、臨床応用のためには優れた DDS の開発が必要である。

E. 結論

L2を抗原として用いる第2世代第2世代HPVワクチンが武田製薬(株)による事業化が決定された。臨床研究開始に向け必要な技術支援を続けていく。臨床研究においては型ごとの感染予防効果を詳細に検討する必要があるためHPVタイピングの再検討を進めた。E7を抗原とする治療ワクチンは探索的Ⅰ/Ⅱa相臨床試験において安全性と有効性が示唆された。症例の追加と詳細な免疫学的解析により効果に確信が持てれば画期的な前がん病変の治療法として企業治験へ移行すべきと考えている。班員の特許技術に基づくプロテオソーム阻害剤内包ミセルやRNA-DNAキメラ型核酸はE6,E7を標的としており前がん病変だけでなく浸潤がんに対する新規治療法になる可能性がある。

前がん病変におけるHPVの複製機構の解明と複製阻害による病変の治療を目指した基礎研究が着実に進んでいる。これまで有望視されていたE1ヘリケース阻害剤は病変治療につながる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。探索的Ⅰ/Ⅱa相臨床試験においても重篤な有害事象は認められなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Aoyagi T, Takahashi M, Higuchi M, Oie M, Tanaka Y, Kiyono T, Aoyagi Y, Fujii M. The PDZ domain binding motif (PBM) of human

T-cell leukemia virus type 1 Tax can be substituted by heterologous PBMs from viral oncoproteins during T-cell transformation. *Virus Genes* 40: 193-9 2010.

Ito S, Ozawa S, Ikoma T, Yajima N, Kiyono T, Hata R. Expression of a chemokine BRAK/CXCL14 in oral floor carcinoma cells reduces the settlement rate of the cells and suppresses their proliferation in vivo. *Biomed Res* 31: 199-206 2010.

Iwakawa R, Kohno T, Enari M, Kiyono T, Yokota J. Prevalence of human papillomavirus 16/18/33 infection and p53 mutation in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 101: 1891-6 2010.

Kasahara K, Goto H, Enomoto M, Tomono Y, Kiyono T, Inagaki M. 14-3-3gamma mediates Cdc25A proteolysis to block premature mitotic entry after DNA damage. *EMBO J* 29: 2802-12 2010.

Mori N, Kyo S, Nakamura M, Hashimoto M, Maida Y, Mizumoto Y, Takakura M, Ohno S, Kiyono T, Inoue M. Expression of HER-2 affects patient survival and paclitaxel sensitivity in endometrial cancer. *Br J Cancer* 103: 889-98, 2010.

Roy BC, Kohno T, Iwakawa R, Moriguchi T, Kiyono T, Morishita K, Sanchez-Cespedes M, Akiyama T, Yokota J. Involvement of LKB1 in epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human lung cancer cells. *Lung Cancer* 70: 136-45, 2010.

Yoshida K, Sugimoto N, Iwahori S, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Kiyono T, Fujita M. CDC6 interaction with ATR regulates activation of a replication checkpoint in higher eukaryotic cells. *J Cell Sci* 123: 225-35, 2010.

Yugawa T, Narisawa-Saito M, Yoshimatsu Y, Haga K, Ohno S, Egawa N, Fujita M, Kiyono T. DeltaNp63alpha repression of the Notch1 gene supports the proliferative capacity of normal human keratinocytes and cervical cancer cells. *Cancer Res* 70: 4034-44, 2010.

Fujiwara S, Nawa A, Luo C, Kamakura M, Goshima F, Kondo C, Kiyono T, Kikkawa F, Nishiyama Y. Carrier cell-based delivery of replication-competent HSV-1 mutants enhances antitumor effect for ovarian cancer. *Cancer Gene Ther* 18: 77-86, 2011.

Ibi M, Zou P, Inoko A, Shiromizu T, Matsuyama M, Hayashi Y, Enomoto M, Mori D, Hirotsune S, Kiyono T, Tsukita S, Goto H, Inagaki M. Trichoplein controls microtubule anchoring at the centrosome by binding to Odf2 and ninein. *J Cell Sci* 124: 857-64, 2011.

Kyo S, Sakaguchi J, Kiyono T, Shimizu Y, Maida Y, Mizumoto Y, Mori N, Nakamura M, Takakura M, Miyake K, Sakamoto M, Inoue M. Forkhead transcription factor FOXO1 is a direct target of progestin to inhibit endometrial epithelial cell growth. *Clin Cancer Res* 17: 525-37, 2011.

Mizumoto Y, Kyo S, Kiyono T, Takakura M, Nakamura M, Maida Y, Mori N, Bono Y, Sakurai H, Inoue M. Activation of NF- κ B Is a Novel Target of KRAS-Induced Endometrial Carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 17: 1341-50, 2011.

Miura S, Kawana K, Schust DJ, Fujii T, Yokoyama T, Iwasawa Y, Nagamatsu T, Adachi K, Tomio A, Tomio K, Kojima S, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y: CD1d, a sentinel molecule bridging innate and

adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV. *J Virol*, 84: 11614-11623, 2010

Okuma K, Yamashita H, Kawana K, Nakagawa S, Oda K, Nakagawa K,

Advanced age is a significant determinant of poor prognosis in patients treated with surgery plus postoperative radiotherapy for endometrial cancer. *J Obstet Gynecol Res*, 36: 757-763, 2010

Shoji K, Oda K, Nakagawa S, Kawana K, Yasugi T, Ikeda Y, Takazawa Y, Kozuma S, Taketani Y. Aromatase inhibitor anastrozole as a second-line hormonal treatment to a recurrent low-grade endometrial stromal sarcoma: a case report. *Med Oncol*, Mar 31. [Epub ahead of print], 2010

Adachi K, Kawana K, Yokoyama T, Fujii T, Tomio A, Miura S, Tomio K, Kojima S, Oda K, Sewaki T, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y: Oral immunization with *Lactobacillus casei* vaccine expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 is an effective strategy to induce mucosal cytotoxic lymphocyte against HPV16 E7. *Vaccine*, 28: 2810-2817, 2010

Yamashita H, Okuma K, Kawana K, Nakagawa S, Oda K, Yano T, Kobayashi S, Wakui R, Ohtomo K, Nakagawa K.

Comparison Between Conventional Surgery Plus Postoperative Adjuvant Radiotherapy and Concurrent Chemoradiation for FIGO Stage IIB Cervical Carcinoma: A Retrospective Study. *Am J Clin Oncol*, [Jan 15, Epub.], 2010

Hiraike H, Wada-Hiraike O, Nakagawa S, Koyama S, Miyamoto Y, Sone K, Tanikawa M, Tsuruga T, Nagasaka K, Matsumoto Y, Oda K, Shoji K, Fukuhara H, Saji S, Nakagawa K, Kato S, Yano T, Taketani Y. Identification of DBC1 as a transcriptional repressor for BRCA1. *Br J Cancer* 102: 1061-7. 2010

Koyama S, Wada-Hiraike O, Nakagawa S, Tanikawa M, Hiraike H, Miyamoto Y, Sone K, Oda K, Fukuhara H, Nakagawa K, Kato S, Yano T, Taketani Y. Repression of estrogen receptor beta function by putative tumor suppressor DBC1. *Biochem Biophys Res Commun* 392: 357-62. 2010

Maeda D, Chen X, Guan B, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Fukayama M, Wang TL, Shih Ie M. Rsf-1 (HBXAP) expression is associated with advanced stage and lymph node metastasis in ovarian clear cell carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 30: 30-5.2011

Maeda D, Ota S, Takazawa Y, Ohashi K, Móri M, Imamura T, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Fukayama M. Mucosal carcinoma of the fallopian tube coexists with ovarian cancer of serous subtype only: a study of Japanese cases. *Virchows Arch* 457: 597-608.2010

Maeda D, Takazawa Y, Ota S, Takeuchi Y, Seta A, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Fukayama M. Bilateral microscopic adenocarcinoma of the fallopian tubes detected by an endometrial cytologic smear. *Int J Gynecol Pathol* 29:

273-7.2010

Murayama-Hosokawa S, Oda K, Nakagawa S, Ishikawa S, Yamamoto S, Shoji K, Ikeda Y, Uehara Y, Fukayama M, McCormick F, Yano T, Taketani Y, Aburatani H. Genome-wide single-nucleotide polymorphism arrays in endometrial carcinomas associate extensive chromosomal instability with poor prognosis and unveil frequent chromosomal imbalances involved in the PI3-kinase pathway. *Oncogene* 29: 1897-908.2010

Nagasaka K, Pim D, Massimi P, Thomas M, Tomaic V, Subbiah VK, Kranjec C, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Myers M, Banks L. The cell polarity regulator hScrib controls ERK activation through a KIM site-dependent interaction. *Oncogene* 29: 5311-21.2010

Tanikawa M, Wada-Hiraike O, Nakagawa S, Shirane A, Hiraike H, Koyama S, Miyamoto Y, Sone K, Tsuruga T, Nagasaka K, Matsumoto Y, Ikeda Y, Shoji K, Oda K, Fukuhara H, Nakagawa K, Kato S, Yano T, Taketani Y. Multifunctional transcription factor TFII-I is an activator of BRCA1 function. *Br J Cancer*. Mar 15 2011

Mori S, Nakao S, Kukimoto I, Kusumoto-Matsuo R, Kondo K, Kanda T. Biased amplification of HPV DNA in specimens containing multiple HPV types by PCR with consensus primers. *Cancer Sci* (in press).

Ishii Y, Tanaka K, Kondo K, Takeuchi

T, Mori S, Kanda T. Inhibition of nuclear entry of HPV16 pseudovirus-packaged DNA by an anti-HPV16 L2 neutralizing antibody. *Virology* 406: 181-8 2010.

Satsuka, A., Yoshida, S., Kajitani, N., Nakamura, H., and Sakai, H.: A novel human papillomavirus type18 replicon and its application in screening the anti-viral effects of cytokines. *Cancer Sci.* 101: 536-542, 2010.

Endo, S., Yamato, K., Hirai, S., Moriwaki, T., Fukuda, K., Suzuki, H., Abei, M., Nakagawa, I., Hyodo, I. Potent in vitro and in vivo antitumor effects of MDM2 inhibitor nutlin-3 in gastric cancer cells. *Cancer Sci.* 3:605-613, 2011

Yamato, K., Egawa, K., Endo, S., Ui-Tei, K., Yamada, T., Saigo, K., Hyodo, I., Kiyono, T., Nakagawa, I. Enhanced specificity of HPV16 E6E7 siRNA by RNA-DNA chimera modification. *Cancer Gene Ther.* In press.

2. 学会発表

Yugawa T., Narisawa-Saito M., Fujita M., Kiyono T. p63 supports proliferation of normal keratinocytes and cervical cancer cells via NOTCH1 repression. 26th International papillomavirus conference 2010, E Abst 211 (Montreal, Canada).

Zushi Y, Saito-Narisawa M, Yoshimatsu Y, Yugawa T, Egawa N, Ohno S-I, Fujita, M, Noguchi K, Urade M, Kiyono T. An in vitro multi-step carcinogenesis model for both

HPV-positive and -negative oral squamous cell carcinoma. 26th International papillomavirus conference 2010 E Abst P-246 (Montreal, Canada).

Saito-Narisawa M, Yoshimatsu Y, Yugawa T, Ohno S-I, Haga K, Kiyono T. HRAS confers tumor-initiating properties through endogenous c-MYC on human cervical keratinocytes. 26th International papillomavirus conference 2010 E Abst P-244 (Montreal, Canada).

Yoshimatsu Y, Saito-Narisawa M, Yugawa T, Ohno S-I, Kiyono T. Analysis of HPV 16E6 protein in oncogenic transformation of human cervical keratinocytes. 26th International papillomavirus conference 2010, E Abst P-245 (Montreal, Canada).

川名 敬ら、CIN3 に対する乳酸菌 HPV 治療ワクチン臨床試験例の免疫学的解析、日本産科婦人科学会総会、東京、4月。

川名 敬ら、子宮頸癌前癌病変に対する HPV E7 を標的にした癌ワクチン療法の臨床試験における有用性、日本癌治療学会、シンポジウム 20 癌免疫療法、京都、10月

川名 敬ら、子宮頸がん前癌病変に対する乳酸菌を利用した HPV 治療ワクチンの第 I/IIa 相臨床試験症例における有効性の免疫学的解析、日本癌学会、大阪、9月。

Takayuki Seiki, Shunsuke Nakagawa, Michihiri Tanikawa, Osamu Hiraike, Tetsu Koyama, Yuichiro Miyamoto, Tomoko Kashiya, Yuji Ikeda, Keiko

Shoji, Katsutoshi Oda, Tetsu Yano, Yuji Taketani Deleted in breast cancer-1 is targeted for the ubiquitin-mediated degradation by human papillomavirus E6 oncoprotein. 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Osaka, Japan)

石井克幸、田中恵子、近藤一成、竹内隆正、森清一郎、神田忠仁 高リスク型共通中和抗体によるヒトパピローマウイルス (HPV) 感染抑制機構 第58回日本ウイルス学会学術集会 (徳島)

佐塚文乃, 梶谷直子, 酒井博幸: エストロジェン刺激による HPV 陽性細胞の増殖制御. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010.

佐塚文乃, 梶谷直子, 酒井博幸: Mechanisms of the HPV-induced transformation. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010.

佐塚文乃, 梶谷直子, 酒井博幸: Novel human papillomavirus type 18 replicon and its application in screening the antiviral effects of cytokines. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学大会合同大会, 神戸, 2010.

Yamato K, Nakajima T, Nakagawa I. Enhanced specificity of HPV16 E6E7 siRNA by RNA-DNA chimera modification 第 33 回日本分子生物学会年会 平成 22 年 12 月 (神戸) Abs 1P-1236

Endo S, Suzuki H, Hirai S, Hyodo I, Yamato K. The anti-tumor effect of MDM2 antagonist nutlin-3 in gastric

cancer cell in vitro and in vivo. American Association of Cancer Research 101st Annual Meeting 2010, (Washington, DC) Abs 4530

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「不死化子宮内膜腺上皮細胞株及びその作製方法」特願2010-184161 発明者: 京哲、高倉正博、保野由紀子、井上正樹、清野透

プロテアソームインヒビター内包高分子ミセル 特許出願番号 PCT/JP2010/052556 出願者: 東京大学、発明者: 片岡一則、西山伸宏、松本陽子、中川俊介、宮本雄一郎

Ⅱ 分担研究者報告書

1. HPV 持続感染機構の解析と複製阻害剤による感染排除に関する研究
清野 透
2. HPV 治療ワクチン臨床試験の実施に関する研究
川名 敬
3. HPV の生活環の解明と、それを利用した抗腫瘍剤の探索に関する研究
酒井 博幸
4. ヒトパピローマウイルス (HPV) タイピング法の再検討に関する研究
森 清一郎
5. HPV 持続感染機構の解析と複製阻害剤による感染排除に関する研究
中川 俊介
6. 子宮頸部高度異型上皮に対する RNAi 治療開発に関する研究
大和 建嗣

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

（総括・**分担**）研究報告書

HPV 持続感染機構の解析と複製阻害剤による感染排除に関する研究

分担研究者 清野 透 国立がん研究センター研究所ウイルス発がん研究分野 分野長

研究要旨 正常子宮頸部上皮細胞を用いHPV16ゲノムの複製機構を解析した。野生型およびE1欠損HPV16ゲノムを複製する正常子宮頸部上皮細胞中を樹立した。トランスフェクションしたHPV16ゲノムDNAが複製する細胞が樹立されるときにはE1の供給が必要であることが示された。従来の報告通り、ウイルス産生に必要な後期複製にはE1が必須であったが、一旦HPV16ゲノムの複製を開始した細胞ではE1の供給を止めても安定に複製が維持されることが示され維持複製にはE1ヘリケースが不要であることが証明された。このことはE1阻害剤が持続感染病変に対して無効であり、複製阻害の標的遺伝子（産物）として不適であることが示唆された。

A. 研究目的

これまで、HPV感染の中和活性評価には偽ウイルス粒子が使われてきた。しかし、本物のウイルス粒子とは挙動が異なる可能性があることから、本物のHPV粒子を用いて検証する必要がある。しかし、これまでの方法ではHPV粒子を培養技術で大量に安定して供給することはできない。そこで、3次元培養技術においてHPVゲノムを安定して維持する細胞株の作成法や、不死化正常角化細胞株を用いて平皿培養においてHPVゲノムの増幅させる技術を開発する。それにより、中和活性評価や感染機構の解析に必須の本物のHPV粒子を安定供給する。また、HPVゲノムの複製機構を明らかにし複製阻害により被感染細胞を排除するのに有効な新たな戦略を見いだす。

B. 研究方法

まず、不死化正常子宮頸部角化細胞

内で環状HPV16ゲノムを形成するようなplasmid DNAを設計した。このplasmid DNAは線状化したHPV16ゲノムの両端にloxP配列を有し、Creリコンビナーゼにより環状化すると同時に、残りの配列より薬剤耐性遺伝子の発現plasmidを生じる。このplasmid DNAをCre発現plasmidと共にトランスフェクションし、薬剤選択することで環状HPV16ゲノムをもつ細胞を選択できるようにした。次にHPV16ゲノムのE1遺伝子の翻訳開始コドン下流に終止コドンを導入したplasmid(以下E1-deadと呼ぶ)を同様に作成した。これら2つを比べることで環状HPVゲノム複製維持細胞の樹立におけるE1の必要性を調べた。次にE1を外来性に供給するためE1発現レトロウイルスベクターを調製した。この発現ベクターにはHSV TK遺伝子と薬剤耐性遺伝子の融合遺伝子発現カセットを持たせ、E1

遺伝子とこの融合遺伝子カセットはFLP/FRTリコンビネーションシステムにより切り出すことができるように設計した。これにより外来性E1発現細胞はG418耐性、ガンシクロビル感受性となり、FLPによる組換え後はG418感受性、ガンシクロビル耐性となる。さらに、外来性E1発現をドキシサイクリンにより誘導できるレンチウイルスベクター系を作成した。

(倫理面への配慮)

手術材料よりの細胞の入手にあたっては各機関の倫理委員会の承認のもと患者のインフォームドコンセントを得たものを用いている。また、使用にあたっては細胞名を符号化することにより患者のプライバシーの保全に万全を期している。

C. 研究結果

線状化したHPV16ゲノムの両端にloxP配列をもつplasmid DNAをCre発現plasmidと共にコトランスフェクションし、薬剤選択することで環状HPV16ゲノムを維持複製する細胞を高効率に作出することができた。この細胞は細胞あたり約100コピーのHPV16ゲノムを維持するが、分裂毎に約10%のゲノムを消失していき、約2ヶ月間の培養でHPVゲノムをほとんど失った細胞が増えるようになった。次に、E1-deadのHPV16ゲノムもつplasmid DNAを用いて同様の実験を行うとHPV16ゲノムを維持する細胞はほとんど得られなかった。あらかじめ角化細胞にE1遺伝子を外来性に発現する細胞を用いると

E1-deadのHPV16ゲノムを複製する細胞を容易に得ることができるようになった。このようにして得られたE1-deadのHPV16ゲノムを複製する細胞から外来性のE1遺伝子の発現をFLP/FRPシステムにより除去しても複製維持効率には有意の差が見られずHPVゲノムは安定に複製維持されることが分かった。また、E1-deadのHPV16ゲノムは従来の報告通り、角化細胞の分化に伴う後期複製は見られず、外来性にE1を供給したときのみゲノムの増幅が見られ、後期複製においてはE1の機能が必須であることが示された。

D. 考察

不死化正常子宮頸部角化細胞の他に不死化皮膚角化細胞を用いた実験からHPV16のE1遺伝子は遺伝子導入後のゲノムDNAの一過性複製に関わっているものの、その後の維持複製には必要ないことが示唆された。すなわち、HPV16の維持複製にはE1ヘリケースが不要であることが証明された。このことはE1阻害剤が持続感染病変に対して無効であり、複製阻害の標的遺伝子(産物)として不適であることが示唆された。

E. 結論

HPVのゲノムがコードする唯一のDNA複製関連酵素はE1ヘリケースであり、海外ではこれを標的とすることで特異的なHPV複製阻害剤の開発を進めている研究グループがいる。今回の研究結果より、E1阻害剤ができた

しても、ウイルス感染時の初期複製と粒子形成に至るウイルス増殖期の複製を阻害できるものの、持続感染病変の基底細胞でのHPVゲノム複製を抑制し被感染細胞を排除することは理論的に困難であることが示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Aoyagi T, Takahashi M, Higuchi M, Oie M, Tanaka Y, Kiyono T, Aoyagi Y, Fujii M. The PDZ domain binding motif (PBM) of human T-cell leukemia virus type 1 Tax can be substituted by heterologous PBMs from viral oncoproteins during T-cell transformation. *Virus Genes* 40: 193-9 2010.

Ito S, Ozawa S, Ikoma T, Yajima N, Kiyono T, Hata R. Expression of a chemokine BRAK/CXCL14 in oral floor carcinoma cells reduces the settlement rate of the cells and suppresses their proliferation in vivo. *Biomed Res* 31: 199-206 2010.

Iwakawa R, Kohno T, Enari M, Kiyono T, Yokota J. Prevalence of human papillomavirus 16/18/33 infection and p53 mutation in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 101: 1891-6 2010.

Kasahara K, Goto H, Enomoto M, Tomono Y, Kiyono T, Inagaki M. 14-3-3gamma mediates Cdc25A proteolysis to block premature mitotic entry after DNA damage. *EMBO J* 29: 2802-12 2010.

Mori N, Kyo S, Nakamura M, Hashimoto M, Maida Y, Mizumoto Y, Takakura M, Ohno S, Kiyono T, Inoue M. Expression of HER-2 affects patient survival and paclitaxel sensitivity in endometrial cancer. *Br J Cancer*

103: 889-98, 2010.

Roy BC, Kohno T, Iwakawa R, Moriguchi T, Kiyono T, Morishita K, Sanchez-Cespedes M, Akiyama T, Yokota J. Involvement of LKB1 in epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human lung cancer cells. *Lung Cancer* 70: 136-45, 2010.

Yoshida K, Sugimoto N, Iwahori S, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Kiyono T, Fujita M. CDC6 interaction with ATR regulates activation of a replication checkpoint in higher eukaryotic cells. *J Cell Sci* 123: 225-35, 2010.

Yugawa T, Narisawa-Saito M, Yoshimatsu Y, Haga K, Ohno S, Egawa N, Fujita M, Kiyono T. DeltaNp63alpha repression of the Notch1 gene supports the proliferative capacity of normal human keratinocytes and cervical cancer cells. *Cancer Res* 70: 4034-44, 2010.

Fujiwara S, Nawa A, Luo C, Kamakura M, Goshima F, Kondo C, Kiyono T, Kikkawa F, Nishiyama Y. Carrier cell-based delivery of replication-competent HSV-1 mutants enhances antitumor effect for ovarian cancer. *Cancer Gene Ther* 18: 77-86, 2011.

Ibi M, Zou P, Inoko A, Shiromizu T, Matsuyama M, Hayashi Y, Enomoto M, Mori D, Hirotsune S, Kiyono T, Tsukita S, Goto H, Inagaki M. Trichoplein controls microtubule anchoring at the centrosome by binding to Odf2 and ninein. *J Cell Sci* 124: 857-64, 2011.

Kyo S, Sakaguchi J, Kiyono T, Shimizu Y, Maida Y, Mizumoto Y, Mori N, Nakamura M, Takakura M, Miyake K, Sakamoto M, Inoue M. Forkhead transcription factor FOXO1 is a direct target of progestin to inhibit endometrial epithelial cell growth. *Clin Cancer Res* 17:

525-37, 2011.

Mizumoto Y, Kyo S, Kiyono T, Takakura M, Nakamura M, Maida Y, Mori N, Bono Y, Sakurai H, Inoue M. Activation of NF- κ B Is a Novel Target of KRAS-Induced Endometrial Carcinogenesis. Clin Cancer Res 17: 1341-50, 2011.

2. 学会発表

Yugawa T., Narisawa-Saito M., Fujita M., Kiyono T. p63 supports proliferation of normal keratinocytes and cervical cancer cells via NOTCH1 repression. 26th International papillomavirus conference 2010, E Abst 211 (Montreal, Canada).

Zushi Y, Saito-Narisawa M, Yoshimatsu Y, Yugawa T, Egawa N, Ohno S-I, Fujita, M, Noguchi K, Urade M, Kiyono T. An in vitro multi-step carcinogenesis model for both HPV-positive and -negative oral squamous cell carcinoma. 26th International papillomavirus conference 2010 E Abst P-246 (Montreal, Canada).

Saito-Narisawa M, Yoshimatsu Y, Yugawa T, Ohno S-I, Haga K, Kiyono T. HRAS confers tumor-initiating properties through endogenous c-MYC on human cervical keratinocytes. 26th International papillomavirus conference 2010 E Abst P-244 (Montreal, Canada).

Yoshimatsu Y, Saito-Narisawa M, Yugawa T, Ohno S-I, Kiyono T. Analysis of HPV 16E6 protein in oncogenic transformation of human cervical keratinocytes. 26th International papillomavirus conference 2010, E Abst P-245 (Montreal, Canada).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「不死化子宮内膜腺上皮細胞株及びその作製方法」特願2010-184161 発明者：京哲、高倉正博、保野由紀子、井上正樹、清野透

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
（総括（分担））研究報告書

HPV 治療ワクチン臨床試験の実施に関する研究

分担研究者 川名 敬 東京大学医学部附属病院・産科婦人科学 助教

研究要旨

HPV関連腫瘍細胞を免疫学的に排除することは、子宮頸癌前癌病変の新規の治療になりうる。本研究では、HPV16型陽性の子宮頸癌前癌病変を有する症例に対して、乳酸菌にHPV16E7蛋白質を提示させた治療ワクチンを経口投与させ、その抗癌作用を探索的Ⅰ/Ⅱa相臨床試験において検討した。

A. 研究目的

子宮頸癌は近年、20-40才代を中心に増加傾向にある。それに対して、HPV感染を予防するHPV(予防)ワクチンが開発され、本邦でも接種が開始している。しかし、現行のHPVワクチンは、HPV16/18型のみ感染予防であるために、仮に学童女兒に100%接種されたとしても子宮頸癌の30-40%は発生する。また、既に病変を有する患者に対する治療効果はない。

そこで本研究では、子宮頸癌前癌病変(以下CIN3)の患者に対する新規の経口抗癌剤として、HPVをターゲットにした免疫誘導を行うことによるHPV治療ワクチンを開発している。従来の手術療法（子宮頸部円錐切除術）に変わる新規の治療戦略になり得る。HPVによる前癌病変を退縮させる薬物療法は存在しない。

我々はHPV E7癌蛋白質を標的にした細胞傷害性T細胞(E7-CTL)を誘導するために、乳酸菌を利用した治療ワクチンを開発・製剤化した。本研究では、

本ワクチンの安全性と免疫応答、臨床効果を調べることを目的とした。

B. 研究方法

HPV16 型 E7 が細胞表面に提示された乳酸菌 *Lactobacillus casei* (乳酸菌 E7 ワクチン:GLBL101c)を GMP 製造した製剤を作成した。施設研究倫理委員会の承認を得て、第Ⅰ/Ⅱa 相探索的臨床試験を計画し、平成 21 年から、臨床試験が開始している。

GLBL101c は、最少量の 1cap/d から数例コホートを組みながら 6cap/d まで増量した。1日1回5日間を1クールとして、1, 2, 4, 8 週の4クール内服した。安全性とHPV16E7に対する細胞性免疫誘導能(末梢血リンパ球と子宮頸部リンパ球)を解析した。ここでCIN3 病変が粘膜病変であることから、粘膜免疫を優位に誘導できる経腸管投与を選択し、子宮頸部粘膜内の粘膜リンパ球における細胞性免疫誘導能をELISPOT法により検討した。

内服治療による臨床的有効性を検討するために、5, 9週で細胞診を施行し、9