

201118030A

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23年度 総括研究報告書

研究代表者 清野 透

平成24(2012)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. ナノミセルをもちいたHPVをターゲットとする新規治療法の開発		
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。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をもつ第二世代 HPV 感染予防ワクチンは、武田薬品工業による事業化を受け、大規模臨床試験に必要なタイピング法の評価、中和抗体価測定法の開発を進め特許申請した。HPV16 E7 を抗原とし CTL 誘導と CIN3 病変の治療を目指した経口治療ワクチン (GLB101c) は探索的 第 I/IIa 相臨床試験の、dose-escalation 試験を今年度終了し安全性を確認した。4 カプセル/日の 3/3 例、6 カプセル/日の 1/3 例で CIN3 から CIN2 への退縮と手術の回避例が得られ、CTL の誘導と病理組織像の改善との間には相関が見られた。HPV 感染の正確な中和活性評価や感染中和機構の理解とその応用には本物の HPV 粒子を用いる必要があり、簡便な大量産生法の足がかりを見つけた。HPV16 や HPV18 のゲノムを複製維持する細胞株を樹立し複製阻害剤の評価が可能なプラットフォームができた。実際の薬剤スクリーニングに必要なハイスループット化の目処が立った。米国などでシード化合物が取られている E1 阻害剤は、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

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 感染予防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、子宮頸がんに相当する細胞を三次元（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2010年10月より武田薬品工業により事業化されることが決定され

ている。大規模臨床試験時にワクチンにより誘導される交差性中和抗体を測定する必要がある。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簡便化し特許化を進めた。また、複数のHPV型の感染予防を評価するため、正確なHPVタイピング技術が必要になる。大規模臨床試験時に用いるべきHPVタイピング法の評価を進めた。

現在、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3次元培養法ではHPV粒子を大量に安定して供給することはできない。これを可能にする平皿培養細胞を用いた技術開発を進めた。

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計画に従って進めた。GLBL101c は、dose-escalation 試験を完了し安全性を確認する。また、末梢血および病変部における特異的細胞性免疫誘導能を解析し、組織診、細胞診による病理学的評価との関連を解析した。

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。そ

の効果をXenograftモデルで解析した。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改良と進めた。

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、薬剤の効果を評価できる系を作成した。HPVの初期遺伝子のHPV複製における役割を解析した。

(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

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製品化をめざしている。ワクチン抗原に使われている HPV16 L2 の 56/75 領域の抗原性解析に使うため、この領域に結合する 2 つのモノクローナル抗体(13B 及び 24B)を分離し、それぞれが認識する 2 つの交叉性中和エピトープ (13B 及び 24B エピトープ)を同定した。13B 及び 24B は、それぞれ幅広い高リスク型 HPV 偽ウイルスを中和した。競合 ELISA を用いて、13B または 24B の HPV L1/L2 キャプシドへの結合を阻害する抗体の有無を調べることにより、血清中の交叉性中和抗体価を簡便に測定する方法を開発した。これは、56/75-VLP ワクチンの臨床試験において、多くの検体においてヒトでの交叉性中和抗体の誘導を調べるために不可欠な技術であり、特許出願した。13B 及び 24B は、3 次元培養法で調製した HPV16 及び 31 ウイルス粒子の感染を中和したことから、抗 56/75 抗体は、これまで実験に使用してきた HPV 偽ウイルスだけでなく、HPV 粒子も中和で

きることが示された。これらの結果は、HPV16 L2 56/75 領域の次世代ワクチン抗原としての有用性をさらに裏付けるものである。また、臨床試験の評価においてはヒト検体からの正確な HPV DNA 検出技術が必要である。既存の HPV 検出用 PCR プライマーの特性を調べ、有効性判定に用いる HPV 検出法の選定に役立てた。

2) 経口治療ワクチン

HPV16 型の E7 蛋白質を菌体表面に提示する乳酸菌死菌製剤 (GLBL101c) を CIN3 患者に対して経口投与により、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 相臨床試験を進めている。GLBL101c (250mg/カプセル) を 1→2→4→6 カプセル/日までの dose-escalation 試験を今年度終了し安全性を確認した。投与 9 週後に 4 カプセル/日で 3/3 例で 6 カプセル/日では 1/3 例で CIN2 への退縮と手術の回避例が得られた。また、E7 特異的 CTL の誘導と病理組織像の改善との間には相関が見られた。

3). HPV 粒子産生

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、HPV ゲノムを持つ表皮角化細胞を 3 次元培養により分化誘導して安定してウイルス粒子を作成する技術を開

発し、抗体の中和活性測定に使用できることを確認した。

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 ゲノムを安定して維持する細胞株を樹立し、HPV ゲノムを 100-1000 倍に増幅させることに成功した。この細胞にキャプシド蛋白を発現し、中和活性評価や感染機構の解析に必須の野生型の HPV 粒子や特定の遺伝子に欠損や変異を持った HPV 粒子の大量安定供給が可能である。

4). HPV 複製阻害剤スクリーニング系の開発

昨年度までに、遺伝子組換え HPV ゲノムを複製維持する細胞株の簡便な樹立法を確立している。今年度は HPV16 及び 18 の複製における制御遺伝子の機能解析をすすめた。E1 はウイルスがコードするヘリケースであり HPV 複製に必須だと考えられてきたが、E1 欠損 HPV16 ゲノムは分化に伴うウイルスゲノムの増幅に必須であるものの、未分化基底細胞においては野生型と同等に複製維持されることが示された。しかし、E6 に関してはゲノムの複製維持に必要であるとのデータが得られた。また、E1 以外にも E4, E5 が分化に伴うウイルスゲノムの増幅に関わることが示された。以上より、米国などで開発中の E1 阻害剤は HPV 病変の完治には繋がらない可能性が示唆された。一方、E6 は抗ウイルス剤の標的候補となり得ることを示唆している。

E4 に関してはすでに細胞周期の進行を抑制することを報告しているが、

その分子機構として、新たに M 期染色体分配異常が関わっていることを示唆する知見を得た。また E7 は上皮細胞の分化を抑制することで過形成を誘導するが、E4 はその作用に拮抗して細胞分化を促進することが示された。

5). ウイルス遺伝子を標的とした予防と治療

従来の報告に反し HPV 維持複製には E1 が不要であるとの結果より、ウイルスがコードする唯一の酵素である E1 ヘリケースを標的とした維持複製阻害剤の開発は困難と判断した。一方、E6, E7 を標的とする薬剤などは子宮頸がんの治療に有効であるだけでなく、CIN 病変を対象にした予防治療に有効である可能性が高い。これまでに、HPV16 E6E7 を標的とした特異性の高い siRNA 配列を決定した。オフターゲット効果や細胞毒性を下げつつ、サイレンシング効果を維持した核酸医薬として、siRNA のガイド鎖シード領域 (5' 端から 1-8 番目まで) とパッセンジャー鎖相補領域を DNA としたプロトタイプキメラ型 siRNA (dsRDC) の 5' 端から 1-3 塩基のうち連続した 2 塩基とその相補部分を RNA に戻した idRNA を開発した (特許出願中)。また、HPV を標的とする核酸医薬を封埋したミセルの開発も片岡一則博士ら研究協力者と共に進めている。

6). ウイルス蛋白質を標的とした予防・治療法の開発

E6 はプロテオソーム系を用いて p53 などの分解を促進している。プロテアソーム阻害剤である MG132 封埋ミセル

は MG132 単独投与に比べ子宮頸癌由来の細胞株である HPV18 型陽性の HeLa および HPV16 型陽性の CaSki 細胞移植マウスに対して、著明な抗腫瘍効果を示した。蛍光ラベルしたミセル化 MG132 は腫瘍に集積する傾向を示した。移植腫瘍内で E6 がユビキチン化を介して分解の標的とする蛋白の発現回復を認めたことより、ミセル化 MG132 の抗腫瘍効果発現のメカニズムには、E6 が標的とする癌抑制蛋白の分解の抑制が関与している可能性が示唆された。また、MG132 封埋ミセルはこの HPV 陰性の子宮頸癌移植腫瘍に対しても、明らか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、製品化を目指した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、特許出願した。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標的と

すべきウイルス分子も特定が進んでいる。今後はアッセイ系を単純化しハイスループット化を進める。また、探索的第 I/IIa 相臨床試験がコホート 4 まで終了した。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。集めた検体の病理、免疫学的解析を進めその有効性と免疫反応を確認する。予想された通り全ての用量で有害事象はなく、4 カプセル/日では 3/3 例で CIN3 病変の退縮も観察されている。来年度は 4 カプセル/日の臨床試験を 7 症例追加してその効果を検討し、大規模臨床治験の早期実現を目指す。

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。CIN3 から CIN2 へ退縮した症例ではその後の経過観察でも CIN3 の再発は見られないものの、CIN 病変の消失は得られていない。これは抗原である E7 の発現が CIN1/2 病変では低いためであると考えられる。来年度は CIN1/2 の退縮を促進できるような経口治療ワクチン開発の検討を進める予定である。

子宮頸がんにおいては E6, E7 が病変の維持にも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・治療法を開発を進める。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 や改良型の idRNA は細胞毒性が低く安定性が高いことが示された。

E. 結論

本研究班では新たなシーズ開発を目指した基礎研究から臨床応用へ向けたTRまでを2名の婦人科臨床医、4名のウイルス学者と基礎研究者で構成し複数の共同研究により有機的に進めている。TRとしては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をもつ第二世代HPV感染予防ワクチンは、製薬会社により事業化され、製品化を目指した大規模臨床試験に必要な検査法などを開発整備している。また、HPV感染の正確な中和活性評価や感染中和機構の理解とその応用には必要な本物のHPV粒子を、簡便かつ大量に産生する技術開発は予定通り順調に進んでおり研究期間内の達成も期待できるところとなっている。一方、HPV16 E7を抗原としCTL誘導によるCIN3病変の治療を目指した経口治療ワクチンは探索的Ⅰ/Ⅱa相臨床試験を進め、症例数は少ないものの有望な結果を得ている。さらに症例数を増やし、研究期間内の大規模臨床試験への橋渡しを目指し計画通りに進んでいる。プロテオソーム阻害剤によるE6の機能抑制は子宮頸がんの治療に有効であることが動物実験で示されつつある。ミセル化など投与法の改善には時間がかかるが、ベルケー

ドなど承認薬を用いた早期の臨床試験開始を目指している。

新たなシーズ開発としてのHPV複製阻害剤の開発に必要なプラットフォームができた。研究期間内にハイスループット化の目途が立った。また、米国などでは有望なHPV複製阻害剤としてシード化合物が取られているE1阻害剤は、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。別の角度からHPV特異的な複製阻害剤の開発が必要である。もう1つのシーズ開発としてHPV特異的mRNAを標的とする核酸医薬は理論的には特異性も高く効果も期待されるが、早期の臨床試験にはハードルが高く、地道な基礎研究とDDSの開発が必須な状況である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Zushi Y, Narisawa-Saito M, Noguchi K, Yoshimatsu Y, Yugawa T, Egawa N, Fujita M, Urade M, and Kiyono T. An in vitro multistep carcinogenesis model for both HPV-positive and -negative human oral squamous cell carcinomas. *Am J Cancer Res* 1:869-881, 2011.

Shibata T, Kokubu A, Saito S, Narisawa-Saito M, Sasaki H, Aoyagi K, Yoshimatsu Y, Tachimori Y, Kushima R, Kiyono T, and Yamamoto M. NRF2 mutation confers malignant potential and resistance to chemoradiation therapy in advanced esophageal squamous cancer. *Neoplasia* 13:864-873, 2011.

Shaker M, Yokoyama Y, Mori S, Tsujimoto M, Kawaguchi N, Kiyono T, Nakano T, and Matsuura N. Aberrant expression of disintegrin-metalloprotease proteins in the formation and progression of uterine cervical cancer. *Pathobiology* 78:149-161, 2011.

Mizumoto Y, Kyo S, Kiyono T, Takakura M, Nakamura M, Maida Y, Mori N, Bono Y, Sakurai H, and Inoue M. Activation of NF- κ B is a novel target of KRAS-induced endometrial carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 17:1341-1350, 2011.

Kyo S, Sakaguchi J, Kiyono T, Shimizu Y, Maida Y, Mizumoto Y, Mori N, Nakamura M, Takakura M, Miyake K, Sakamoto M, and Inoue M. Forkhead transcription factor FOXO1 is a direct target of progesterin to inhibit endometrial epithelial cell growth. *Clin Cancer Res* 17:525-537, 2011.

Fujiwara S, Nawa A, Luo C, Kamakura M, Goshima F, Kondo C, Kiyono T, Kikkawa F, and 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.

Yokoi T, Seko Y, Makino H, Hatou S, Yamada M, Kiyono T, Umezawa A, Nishina H, and Azuma N. Establishment of functioning human corneal endothelial cell line with high growth potential. *PLoS one* 7:e29677, 2012.

Narisawa-Saito M, Inagawa Y, Yoshimatsu Y, Haga K, Tanaka K, Egawa N, Ohno S I, Ichikawa H, Yugawa T, Fujita M, and Kiyono T. A critical role of MYC for transformation of human cells by HPV16 E6E7 and oncogenic HRAS. *Carcinogenesis*, 33:910-7 2012.

Egawa N, Nakahara T, Ohno S, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Yamato K, Natori Y, Kiyono T. The E1 Protein of Human Papillomavirus Type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J Virol*, *J Virol* 86:3276-3283, 2012.

Egawa N, Kawai K, Egawa K, Honda Y, Kanekura T, and Kiyono T. Molecular cloning and characterization of a novel human papillomavirus, HPV 126, isolated from a flat wart-like lesion with intracytoplasmic inclusion bodies and a peculiar distribution of Ki-67 and p53. *Virology* 422:99-104, 2012.

Bono Y, Kyo S, Takakura M, Maida Y, Mizumoto Y, Nakamura M, Nomura K, Kiyono T, and Inoue M. Creation of immortalised epithelial cells from ovarian endometrioma. *Br J Cancer*, 106:1205-13 2012.

Ochi H, Matsumoto K, Kondo K, Oki A, Furuta R, Hirai Y, Yasugi T, Takatsuka N, Maeda H, Mitsunashi A, Fujii T, Kawana K, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Kanda T, Yoshikawa H; Do neutralizing antibody responses generated by human papillomavirus infections favor a better outcome of low-grade cervical lesions? *J*

Med Virol, 84:1128-34, 2012

Matsumoto K, Hirai Y, Furuta R, Takatsuka N, Oki A, Yasugi T, Maeda H, Mitsuhashi A, Fujii T, Kawana K, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H; Subsequent risks for cervical precancer and cancer in women with low-grade squamous intraepithelial lesions unconfirmed by colposcopy-directed biopsy: Results from a multicenter, prospective, cohort study, Int J Clin Oncol, E-pub, 2011

Iwasawa Y, Kawana K, Fujii T, Schust DJ, Nagamatsu T, Kawana Y, Sayama S, Miura S, Matsumoto J, Adachi K, Hyodo H, Yamashita T, Kozuma S, Taketani Y: A possible coagulation-independent mechanism for pregnancy 1 loss involving β 2glycoprotein 1-dependent antiphospholipid antibodies and CD1d. Am J Reprod Immunol, 67: 54-65, 2012

Yamamoto N, Mori R, Jacklin P, Osuga Y, Kawana K, Shibuya K, Taketani Y; Introducing HPV vaccine and scaling up screening procedures to prevent deaths from cervical cancer in Japn: A cost-effectiveness analysis. Br J Obstet and Gynecol, 119: 177-186, 2012

Kojima S, Kawana K, Fujii T, Yokoyama T, Miura S, Tomio K, Tomio A, Yamashita A, Adachi K, Sato H, Nagamatsu T, Schust DJ, Kozuma S, Taketani Y; Characterization of intraepithelial lymphocytes (IELs) residing in the cervical mucosa of

patients with human papillomavirus (HPV)-infected intraepithelial neoplastic lesions. Am J Reprod Immunol, 66: 435-443, 2011

Inaba K, Arimoto T, Hoya M, Kawana K, Nakagawa S, Kozuma S, Taketani Y; Interstitial pneumonitis induced by pegylated liposomal doxorubicin in a patient with recurrent ovarian cancer. Med Oncol, 29:1255-7, 2012.

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, 2011 102: 1223-7.

Kitamura-Muramatsu Y, Kusumoto-Matsuo R, Kondo K, Mori S, Saito S, Tsukahara Y, Kukimoto I. Novel Multiplexed Genotyping of Human Papillomavirus Using a VeraCode-Allele Specific Primer Extension Method. Microbiol Immunol. 2012 56: 128-33.

Maeda D, Shibahara J, Sakuma T, Isobe M, Teshima S, Mori M, Oda K, Nakagawa S, Taketani Y, Ishikawa S, Fukayama M. β -catenin (CTNNB1) S33C mutation in ovarian microcystic stromal tumors. Am J Surg Pathol. 35:1429-40, 2011.

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*. 104: 1349-55, 2011.

Arimoto T, Nakagawa S, Oda K, Kawana K, Yasugi T, Taketani Y. Second-line chemotherapy with docetaxel and carboplatin in paclitaxel and platinum-pretreated ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancer. *Med Oncol*. 29:1253-4, 2012.

Maeda D, Chen X, Guan B, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Fukayama M, Wang TL, Shih IeM. 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.

Morita Y, Wada-Hiraike O, Yano T, Shirane A, Hirano M, Hiraike H, Koyama S, Oishi H, Yoshino O, Miyamoto Y, Sone K, Oda K, Nakagawa S, Tsutsui K, Taketani Y. Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary. *Reprod Biol Endocrinol*. 10:14, 2012.

Yamato K, Egawa N, Endo S, Ui-Tei K, Yamada T, Saigo K, Hyodo I, Kiyono T, and Nakagawa I. Enhanced specificity of HPV16 E6E7 siRNA by RNA-DNA chimera modification. *Cancer Gene Ther* 18:587-597, 2011.

Kajitani, N., Satsuka, A., Kawate, A., and Sakai, H.: Productive lifecycle of human papillomavirus that depends upon squamous epithelial differentiation. *Front. Microbiol*. 3: 152, 2012 (査読あり)

2. 学会発表

Egawa N, Nakahara T, Ohno S, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Kiyono T. HPV16 E1 is not required for the viral genome maintenance. 27th International papillomavirus conference 2011, (Berlin, Germany).

Yugawa T, Kiyono T. Regulation of Notch1 gene expression by p53 family members and its disruption by HPV-16 E6. ICGEB DNA tumor virus meeting 2011, (Trieste, Italy).

Kawana K, Development of novel HPV vaccines: broad-spectrum prophylactic and therapeutic, 第 63 回日本産科婦人科学会、日韓シンポジウム、8 月、大阪

Kawana K, et al, Novel immunotherapy and the clinical trial for cervical cancer via mucosal immunity to human papillomavirus E7., 第 70 回日本癌学会、10 月、名古屋

川名敬、日本エイズ学会日本性感染症学会合同シンポジウム：婦人科領域における性感染症～HPV ワクチンによる予防を含めて、第 24 回日本性感染症学会、12 月、東京

佐塚文乃, 梶谷直子, 川手章史, 酒井博幸 : Analysis of HPV genome replication. International Union of Microbiological Societies Congresses

2011, Sapporo, Sep11-16

梶谷直子, 佐塚文乃, 川手章史, 酒井博幸 : HPV 18 E1^{E4}, a viral gene product encoded by the early gene region of HPV genome, interacts with vimentin intermediate filaments in vitro and in vivo. International Union of Microbiological Societies Congresses 2011, Sapporo, Sep11-16

佐塚文乃, 梶谷直子, 川手章史, 酒井博幸 : HPV ゲノムの複製メカニズムの解析. 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011年10月3日—5日

梶谷直子, 佐塚文乃, 川手章史, 酒井博幸 : Identification of a function of Human papillomavirus 18 E1^{E4}. 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011年10月3日—5日

Mori S, Nakao S, Kondo K, Yoshikawa H, Kanda T, Monoclonal Antibodies Recognizing Cross-Neutralization Epitopes in HPV16 L2 aa56-75 Region. 27th International papillomavirus conference 2011 (Berlin, Germany).

中尾砂理、森清一郎、近藤一成、吉川裕之、神田忠仁、HPV16副キャプシドタンパク質L2の交叉性中和エピトープを認識するモノクローナル抗体の分離と解析、第70回日本癌学会学術総会 (名古屋)

Kenji Yamato, Shinji Endo
AGO2-association, microRNA suppression and cytotoxicity of RNA-DNA chimera modified siRNA
第34回日本分子生物学会年会 平

成23年12月 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

特許出願番号 PCT/JP2010/052556
プロテアソームインヒビター内包高分子ミセル 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

特許出願番号 2010-291067 ヒトパピローマウイルス(HPV)L2 蛋白質を認識するモノクローナル抗体とそれを使用した HPV 中和抗体価測定法 出願者：ヒューマンサイエンス振興財団、発明者：森清一郎、神田忠仁

特許出願番号 2011-268252 遺伝子発現阻害剤及び阻害方法 出願者：(株)バイオシンクタンク、発明者：大和建嗣、名取幸和

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. ナノミセルをもちいた HPV をターゲットとする新規治療法の開発
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 環状HPV16ゲノムを安定に複製維持する正常ヒト正常子宮頸部角化細胞に外来性E1とE2の発現を薬剤により誘導できる細胞株を樹立した。この細胞はドキシサイクリンの添加によりHPV16ゲノムのコピー数が数千コピー/cellに増幅した。さらにCa添加による分化誘導によりL1とL2の発現が確認された。ゲノム増幅と分化誘導の条件を至適化することで平皿培養細胞から成熟HPVゲノムを産生できる可能性が示唆された。一方、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、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。E1阻害剤は有望な抗HPV薬として米国などで開発が進められているが、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、これまでの培養技術ではHPV粒子を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樹立法や、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

昨年度までに、環状HPV16ゲノムを安定に複製維持する不死化正常子宮頸部角化細胞株を得た。この細胞に外来性にE1とE2の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製し導入した。E1単独、E2単独、E1+E2の誘導により環状HPVゲノムの増幅が見られるかを検討した。さらに平皿培養細胞より成熟ウイルス粒子の産生させるためL1とL2の発現誘導を試みた。

また、昨年度までに野生型ならびにE1発現欠損HPV16ゲノムを不死化皮膚角化細胞内で複製する細胞株を樹立している。これら2つの細胞株におけるHPVゲノムの維持複製ならびに分化誘導時における後期複製を比較した。（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

環状HPV16ゲノムを安定に複製維持する不死化正常子宮頸部角化細胞株にE1とE2の発現をドキシサイクリンにより誘導すると、ゲノムは細胞あたり数千コピーにまで増幅した。しかし、E1とE2の発現誘導後にはATMの活性化と細胞のapoptosisが誘導された。ATM阻害剤やアポトーシス阻害剤の添加により細胞死は抑制されゲノムコピー数も最大2倍程度増加することが示された。しかし、E6の発現によるp53の不活化ではゲノムコピー数の増加は得られていない。また、E1単独の発現誘導ではゲノムコピー数の増加はほとんど見られなかった。この細胞にL1とL2の発現を誘導できるようにレンチウイルスベクターで導入したが、これまでのところL1とL2の発現は確認できていない。

一方、E1とE2の発現誘導に加えCa添加により角化細胞の分化を誘導すると、ゲノムコピー数の増加と共に、複製ゲノムからのL1とL2の発現が確認された。

また、E1欠損ゲノムを複製維持する不死化正常子宮頸部角化細胞ではCa添加により角化細胞の分化を誘導しても後期複製は全く見られず、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確認された。

D. 考察

不死化角化細胞の平皿培養においてHPVゲノムを薬剤添加により増幅可能な細胞株を樹立した。この細胞株へ外来性にL1とL2を発現誘導できればウイルス粒子の産生が期待できるがこれまでのところ成功していない。しかし、Ca添加による角化細胞の分化誘導を組み合わせることにより複製ゲノムからL1とL2の発現が確認された。これまでL1とL2の発現誘導は3次元培養を用いなければ不可能だと考えられていたが、この結果より平皿培養より成熟ウイルス粒子を産生できる可能性が高まった。今後、E1とE2の誘導時にゲノムをより多く増幅するクローンの選択とL1とL2をより高発現する分化誘導法の至適化により平皿培養からの成熟HPV粒子の産生技術を確立したい。

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。E1阻害剤は有望な抗HPV薬候補としてリード化合物が取られ米国などで薬剤開発が進められている。しかし、今回の結果は、このようなE1阻害剤が持続感染病変からHPVゲノムを排除できず、E1が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。今後はルシフェラーゼなどのマーカー遺伝子を搭載したHPVゲノムを複製維持する角化細胞株を樹立し複製阻害剤のスクリーニング系の確立を目指すべきである。

E. 結論

平皿培養においてHPVゲノムの増幅を薬剤によって制御し細胞あたり数千コピーに増幅できる不死化角化細胞株の樹立に成功した。また、Ca添加による分化誘導によりL1とL2の発現が確認されており平皿培養細胞からの成熟HPV粒子作製技術開発に大きく近づいた。

一方HPVの複製阻害剤は子宮頸がんの予防薬として期待できる。HPV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阻害剤ができたとしても、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

Zushi Y, Narisawa-Saito M, Noguchi K, Yoshimatsu Y, Yugawa T, Egawa N, Fujita M, Urade M, and Kiyono T. An in

vitro multistep carcinogenesis model for both HPV-positive and -negative human oral squamous cell carcinomas. *Am J Cancer Res* 1:869-881, 2011.

Shibata T, Kokubu A, Saito S, Narisawa-Saito M, Sasaki H, Aoyagi K, Yoshimatsu Y, Tachimori Y, Kushima R, Kiyono T, and Yamamoto M. NRF2 mutation confers malignant potential and resistance to chemoradiation therapy in advanced esophageal squamous cancer. *Neoplasia* 13:864-873, 2011.

Shaker M, Yokoyama Y, Mori S, Tsujimoto M, Kawaguchi N, Kiyono T, Nakano T, and Matsuura N. Aberrant expression of disintegrin-metalloprotease proteins in the formation and progression of uterine cervical cancer. *Pathobiology* 78:149-161, 2011.

Mizumoto Y, Kyo S, Kiyono T, Takakura M, Nakamura M, Maida Y, Mori N, Bono Y, Sakurai H, and Inoue M. Activation of NF- κ B is a Novel Target of KRAS-Induced Endometrial Carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 17:1341-1350, 2011.

Kyo S, Sakaguchi J, Kiyono T, Shimizu Y, Maida Y, Mizumoto Y, Mori N, Nakamura M, Takakura M, Miyake K, Sakamoto M, and Inoue M. Forkhead transcription factor FOXO1 is a direct target of progestin to inhibit endometrial epithelial cell growth. *Clin Cancer Res* 17:525-537, 2011.

Fujiwara S, Nawa A, Luo C, Kamakura M, Goshima F, Kondo C,

Kiyono T, Kikkawa F, and 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.

Yokoi T, Seko Y, Makino H, Hatou S, Yamada M, Kiyono T, Umezawa A, Nishina H, and Azuma N. Establishment of functioning human corneal endothelial cell line with high growth potential. *PLoS one* 7:e29677, 2012.

Narisawa-Saito M, Inagawa Y, Yoshimatsu Y, Haga K, Tanaka K, Egawa N, Ohno S I, Ichikawa H, Yugawa T, Fujita M, and Kiyono T. A critical role of MYC for transformation of human cells by HPV16 E6E7 and oncogenic HRAS. *Carcinogenesis*, 33:910-7 2012.

Egawa N, Nakahara T, Ohno S, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Yamato K, Natori Y, Kiyono T. The E1 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Is Dispensable for Maintenance Replication of the Viral Genome. *J Virol*, *J Virol* 86:3276-3283, 2012.

Egawa N, Kawai K, Egawa K, Honda Y, Kanekura T, and Kiyono T. Molecular cloning and characterization of a novel human papillomavirus, HPV 126, isolated from a flat wart-like lesion with intracytoplasmic inclusion bodies and a peculiar distribution of Ki-67 and p53. *Virology* 422:99-104, 2012.

Bono Y, Kyo S, Takakura M, Maida Y, Mizumoto Y, Nakamura M, Nomura K, Kiyono T, and Inoue M. Creation of immortalised epithelial cells from ovarian

endometrioma. *Br J Cancer*, 106:1205-13 2012.

2. 学会発表

Egawa N, Nakahara T, Ohno S, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Kiyono T. HPV16 E1 is not required for the viral genome maintenance. 27th International papillomavirus conference 2011, (Berlin, Germany).

Yugawa T, Kiyono T. Regulation of Notch1 gene expression by p53 family members and its disruption by HPV-16 E6. ICGEB DNA tumor virus meeting 2011, (Trieste, Italy).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

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 講師

研究要旨

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、HPV16E7発現乳酸菌ワクチンを経口投与し、腸管免疫を介して子宮頸部への抗E7粘膜免疫誘導を行う戦略で探索的の第I/IIa相臨床試験を施行してきた。投与量を10例の登録症例のうち4例は前癌病変が退縮し手術を回避された。最も有効な用量は1g/日であること判明した。臨床的有効性が証明された。さらに、治療効果を高めるためにアジュバントを組み合わせることが有効であることがわかった。

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癌蛋白質E7を標的にしたHPV治療ワクチンを開発することを目的とした。

現在、CIN3に対する治療法は手術療法(子宮頸部切除術)である。しかしこの手術を施行された女性は妊娠時に早産率が3-4倍、低出生体重児率が3倍と周産期予後が有意に悪化するこ

とがわかっている。一方でCIN3の平均罹患年齢は30歳前後であり、現代社会においては未婚、未産婦が圧倒的に多い。そのため手術療法に変わる新規の治療戦略、特に薬物療法、が急務となっている。しかしCIN3に対する治療薬は皆無である。

CIN3では、HPV癌蛋白質E6, E7が恒常的に発現していることかHPVのE6, E7を標的にしたHPV治療ワクチンは有望な治療薬になりうる。すなわち、E6、E7に対する細胞傷害性T細胞(CTL)を誘導する免疫療法である。HPV治療ワクチンとして、海外で8つの臨床試験が施行されているが、いずれも実用化されていない。子宮頸部へのHPV特異的CTLの誘導が不十分であるためと考察されている。

我々は、これまでのHPV治療ワクチンとは全く違う戦略を考えた。従来のHPV治療ワクチンは全身性免疫を誘