

導する皮下注か筋注であり、末梢血 (PBMC) 中のCTLでモニターしていた。しかし、我々は粘膜免疫を誘導することに主眼を置いた。モニターも粘膜リンパ球、特にCIN3が発生する子宮頸部粘膜のリンパ球 (cervical lymphocytes) を用いた。これにより、粘膜病変であるCIN3に実際に作用している粘膜リンパ球を直接測定できる。

子宮頸部の粘膜免疫を誘導するためには、そのメモリー・誘導組織である腸管粘膜リンパ組織 (GALT) を刺激する経口投与が効率的であると考えた。安全性が高い乳酸菌は経口投与の際に製剤化しやすいキャリアーとなることに着目し、HPV E7癌蛋白質を発現している乳酸菌をワクチン抗原とした乳酸菌ワクチンを開発した。本研究では、E7発現乳酸菌 (GLBL101c) の有効性・安全性を臨床試験により評価し、更なる改善点を見だし、改良を加え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* (E7 発現乳酸菌ワクチン: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週のエンドポイントで組織診、細胞診による病理学的評価を行った。また PBMC、cervical lymphocyte を採取して E7 特異的 IFN $\gamma$  産生細胞、GranzymeB 産生細胞 (E7-CMI) 数を調べた。

これまでに 1cap/日 1 例、2cap/日 3 例、4cap/日 3 例、6cap/日 3 例の計 10 例 (4 コホート) に対して試験を行った。各コホート終了後に安全性、有効性について外部評価委員会の承認を得て、次のコホートで用量を増量していった。外部データセンターを設置し管理集計を行った。

臨床試験の結果をうけて、本年度からは E7 発現乳酸菌ワクチンの有効性を高めるための研究を行っている。臨床試験では有効例を認めたが、高用量では有効性が低下する傾向が示された (後述) ことから、用量依存性ではなく、アジュバントによる効果の増強を考え、安全性が担保されている漢方薬に注目した。

マウス実験により、GLBL101c と漢方薬の併用経口投与を行った。1, 2, 4, 6 週の4クールで経口投与し、7 週で腸管リンパ球と脾臓リンパ球を採取し、E7-CMIを調べた。さらに粘膜アジュバントとして大腸菌トキシンを併用することも

行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究にあたっては、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り、東京大学医学部の医学部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うえで、文書で同意を得た症例に対して研究を実施する。また、提供試料、個人情報などを厳格に管理・保存する。

### C. 研究結果

#### 1) 第I/IIa相探索的臨床試験:

##### (i) 安全性

全10例において、GLBL101c内服に関連した有害事象は1つも認めなかった。血液生化学データでも内服に伴った変動は認めなかった。外部評価委員会の審査の結果、GLBL101cは極めて安全性の高い薬剤であることが示された。

##### (ii) 有効性

子宮頸部粘膜にE7-CMI(E7特異的IFN $\gamma$ 産生、GranzymeB産生細胞)の誘導が2cap/日投与のコホート2から明らかに確認されてきた。興味深いことにPBMCよりもcervical lymphocyteの方がE7-CMIが有意に高いことがわかった。4cap/日がE7-CMIを最も高いレベルで誘導された。また、5週と比べ9週では2倍近い誘導が確認され、8週の内服によりブースター効果が発揮されていることが確認された。しかし、6cap/日投与のコホート4では、3例中2例はむしろE7-CMIの誘導が低かった。

病理学的評価としては、1cap/日もしくは2cap/日投与の4例は、CIN3病変が残存し、円錐切除術を必要とした。4cap/日投与のコホート3では、3例全例がCIN1-2に退縮し、臨床的有効性が示され、手術を回避できた。これらの3例は試験終了後、投薬はなく経過観察中(1.5-2年経過)であるが全症例ともCIN3の再発を認めない。

6cap/日投与のコホート4のうち、高いE7-CMIがcervical lymphocyteに誘導された1例はCIN2に退縮した。E7-CMIの誘導が弱かった2例ではCIN3が消失せず後療法を必要とした。

#### 2) 漢方アジュバント併用の検討:

免疫賦活作用が知られている十全大補湯(JTT)と補中益気湯(HET)を用いた。漢方薬は食餌に混ぜてGLBL101cのマウス投与期間中連日内服投与した。粘膜アジュバントである大腸菌トキシシン(LTB)はGLBL101c投与の週に週1回投与した。JTTもHETをGLBL101cに併用した場合は、脾臓細胞ではE7-CMIがGLBL101cのみと比して上昇したことから全身性免疫へのアジュバント効果が示された。しかし腸管粘膜リンパ球では明らかな上昇とは言えなかった。そこで、GLBL101cにLTBを添加した状態でJTT、HETを併用したところ、腸管粘膜リンパ球にGLBL101c単独よりも4-5倍高いE7-CMIが誘導された。また抗E7抗体も血清中、腸管洗浄液中に誘導された。とくにHETの誘導能が高いことがわかった。乳酸菌と漢方薬、粘

膜アジュバントを併用することによってE7-CMIを粘膜リンパ球に誘導する作用が相乗的に増強された。

#### D. 考察

乳酸菌をベースにHPV16E7癌蛋白質を発現させた抗HPV治療ワクチン（GLBL101c内服）は、癌免疫療法として新規の抗癌剤になりうる。子宮頸部における免疫学的有効性とCIN3治療効果(奏効率)が相関していることから本治療薬による効果を見ていると考えられる。特に、4cap/日（1g/日）のコホート3では全例CIN1-2に退縮したことはインパクトが大きい。

乳酸菌ワクチンを高用量（6cap/日）にすると、むしろE7-CMIの誘導が低下したことはE7特異的抑制性T細胞（Treg）が誘導され始めた可能性がある。腸管では高用量の抗原に曝露されるとTregが誘導されることが知られている。GLBL101cのlimiting doseは4cap/日程度であるかもしれない。

以上から、本臨床試験は来年度から4cap/日で用量を固定し残り、7例を追加する予定である。

乳酸菌経口投与では、免疫寛容が問題となる。今回の臨床試験の結果から高用量ではE7に対する免疫寛容が誘導されている可能性もある。そこで、E7-CMI誘導を増強するためにはアジュバントを導入することが肝要であると考えている。乳酸菌はもともと腸管免疫においてアジュバント効果が乏しいことも予想される。漢方薬は実

地臨床で日常的に使われている薬であり副作用もほとんどない。GLBL101cと同じ内服薬であるため併用しやすい。マウス実験の結果から補中益気湯（HET）が最も有望である。今回の検討では大腸菌トキシンLTBを添加しないとE7-CMI粘膜免疫は誘導されなかったことから、漢方薬だけでは粘膜免疫の細胞性免疫誘導は不十分であると考えられる。LTBはヒトでの応用は難しいため、我々はヒトでの使用経験のある $\alpha$ GalCer（合成セラミド）をLTBの代わりに用いる検討を来年度に行うことにしている。

#### E. 結論

本研究で証明されたGLBL101cの有効性は、ヒトの子宮頸部におけるE7特異的細胞性免疫誘導を伴った病理学的有効性であることから、臨床応用への実用化が近いと考えられる。至適用量が設定されたことから、今後用量を固定し、症例を蓄積したうえで、企業治験を検討する。

薬剤の効果をさらに増強するアジュバントが見出され、E7発現乳酸菌ワクチンの低コスト化や臨床的効果の増強が期待される。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ochi H, Matsumoto K, Kondo K, Oki A, Furuta R, Hirai Y, Yasugi T, Takatsuka N, Maeda H, Mitsuhashi 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*, in-press, 2012
- 2) Matsumoto K, Hirai Y, Furuta R, Takatsuka N, Oki A, Yasugi T, Maeda H, Mitsunashi 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
- 3) 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 loss involving  $\beta$ 2glycoprotein 1-dependent antiphospholipid antibodies and CD1d. *Am J Reprod Immunol*, 67: 54-65, 2012
- 4) 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 Jpn: A cost-effectiveness analysis. *Br J Obstet and Gynecol*, 119: 177-186, 2012
- 5) 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
- 6) 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*, Mar 10. [Epub ahead of print], 2011
- 7) 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*. Mar 6. [Epub ahead of print], 2011

## 2. 学会発表

- 1) 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

2) 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

3) 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

#### H. 知的財産の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

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）  
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  
(HPVの生活環の解明と、それを利用した抗腫瘍剤の探索)

分担研究者 酒井 博幸 京都大学ウイルス研究所・准教授

研究要旨 HPV感染は子宮頸癌発症の主要なリスクファクターである。本研究課題の目的はHPVの感染・複製機構を解明し、その情報に基づいて抗ウイルス剤、抗腫瘍剤の新規標的を同定することである。

今年度はHPV複製におけるウイルス制御遺伝子の機能解析をすすめた。その結果、E4とE5がHPVの分化依存的な複製に関与していることが示された。またE4には、E7の作用に拮抗して角化細胞の分化誘導をすすめる働きがあることを見出した。

抗ウイルス剤のスクリーニング系の開発として、HPVゲノムをエピゾームに保持した角化細胞を応用できることを確認した。

#### A. 研究目的

ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus: HPV) は標的組織である重層上皮に感染し、疣贅やコンジローマなどの良性腫瘍を誘発する病原ウイルスである。形成された腫瘍は自然治癒することがほとんどであるが、一部は長期にわたり持続感染し、まれに悪性腫瘍へと進展することが知られている。特に子宮頸がんでは、ほぼ全ての症例でHPVの感染が確認されており、HPVの感染が子宮頸がん発症の主要なリスクファクターであると考えられている。また、子宮頸がん以外でも肛門がんや頭頸部扁平上皮癌 (head and neck squamous cell carcinoma: HNSCC) への関与も示されており、このウイルスの感染を予防・治療する戦略を考案することが重要となっている。

本研究課題ではHPVの生活環を分子レベルで解明し、その知見に基づいてHPV感染に対する抗ウイルス剤

や抗腫瘍剤の分子標的を提案することを目的としている。HPVの遺伝子発現や複製は、感染標的である上皮細胞の分化状態に強く依存しているために、通常の組織培養法ではその生活環を支持することが出来ない。そのためHPVの感染・複製機構は十分に解明されていない。

この研究ではHPVの複製を再現できる皮膚モデル培養系やセミソリッド培地培養法などを利用してHPVの生活環を解析し、その感染・複製機構を解明することにした。さらに構築したHPV複製系を応用して、抗ウイルス剤のスクリーニング系の開発を目指す。

#### B. 研究方法

##### 【HPV複製系の構築】

HPV-FL (FL for full-length) 型の構築は、HPV16, 18型のゲノムDNAを制限酵素処理やライゲーション反応によってつなぎ換え、両端にLCR

配列を持つようなウイルスゲノムを構築した。これを pEGFP1 (クロンテック) を改変した G418 耐性プラスミド内に挿入したものを HPV-FL とした。

HPV-S (S for self-ligation) 型の複製系では, HPV16, 18 型の全ゲノムを含むプラスミドからウイルス DNA 領域のみを切り出し, それらを T4 DNA ligase によって環状化したものをゲノム型 DNA として利用した。HPV DNA を維持する細胞を選別する目的で, 各 HPV 由来の複製起点 (ori 配列または LCR) を含むネオマイシン耐性プラスミド (HPV-ori plasmid または LCR plasmid) を構築した。

HPV の各遺伝子に変異を導入する際には, polymerase chain reaction (PCR) を利用した oligonucleotide-directed mutagenesis を用いた。変異の導入は PCR 操作を行った部分の全配列を検証することで確認した。

#### 【細胞培養】

ヒト繊維芽細胞 (human foreskin fibroblast; HFF, クラボウ) は 10%FBS/DMEM を用いて, 5%CO<sub>2</sub> 37°C 条件において培養した。ヒト角化細胞 (human foreskin keratinocyte; HFK, クラボウ) は専用の培地 (EpiLife-KG2, クラボウ) を用いて, 同条件で培養した。

#### 【遺伝子導入】

HFF, HFK に対してはそれぞれ専用の試薬を用いて transfection を行った (nucleofector kit, AMAXA)。

#### 【サザンブロット解析】

細胞からのウイルス DNA の抽出には SDS-proteinase K を用いた total DNA 回収法を利用した。一部エピゾーム状の DNA のみを回収する目的で Hirt の方法を適用した。回収した DNA は制限酵素処理によって線状化し,

それをアガロースゲルで泳動したものをナイロンメンブレンに転写した。検出/可視化には DIG-標識・検出試薬を利用した (ロシュ)。

#### 【皮膚モデル培養系】

真皮モデルは HFF を type-I コラーゲンゲルに埋め込み, 数日の間収縮させることで構築した。このゲルの表面に HFK を重層させ, さらに HFK 表面を空気に晒すことによって HFK は層状化および分化し, 約 10 日間で皮膚モデルが構築される。

#### 【ウイルスベクターの構築】

ras や HPV 遺伝子を HFK に遺伝子導入する際には, MuLV 系のレトロウイルスベクターを用いた。導入する遺伝子に応じて, LXS<sub>N</sub>, LPCX (Clontech) を使い分け, それぞれの plasmid に目的遺伝子を挿入したものを作成した。ウイルスベクターの産生は, 各 plasmid を pCL10A1 パッケージングベクター (Retrogen) とともに 293T 細胞に transfection し, 培養上清中に放出されたウイルスベクターを回収し利用した。

#### 【メチルセルロース懸濁培養, および分化マーカーの確認】

1.5 % メチルセルロース /EpiLife-KG2+DMEM (1:1) に HFK を懸濁し, 10~48 時間培養することで分化誘導を行った。分化マーカーの発現誘導は transglutaminase, filaggrin, involucrin を Western 法によって検出することで行った。

#### 【FACS による細胞周期解析】

細胞は必要に応じてメタノール固定, あるいはホルマリン固定し, PI 染色によって染色体をマークし, EPICS XL-MCL (Beckman Coulter) を用いて FACS 解析を行った。

(倫理面への配慮)

この研究の遂行において用いた実験材料や方法は個人情報、および倫理面での問題を生じない。

### C. 研究結果

#### 【HPV 複製におけるウイルス制御遺伝子の働き】

HPV16 複製環における制御遺伝子の機能解析をおこなうために、HFK に環状化したウイルスゲノム DNA と選択マーカーを発現するプラスミドとを同時に導入するという系を用いた。ここではこの系を HPV-S 型の実験系と呼ぶ。今回の解析では、制御遺伝子のうち E4, E5, E6, E7 に関して変異導入解析をおこなった。変位の導入には PCR を利用した点変位導入法を用い、各 ORF の 5' 末に近い部位にナンセンス変位を導入した (E4u, E5u, E6u, E7u; u for upstream)。E5 と E6, E7 に関しては ORF のほぼ中央部位にナンセンス変異を導入したのもも構築した (E5c, E6c, E7c; c for center)。なお、全ての点変異は重複する他の ORF のコドンには影響しないようにデザインした。

今回はウイルスの遺伝子発現や複製に重要であることが分かっている E1 と E2 は対象としなかった。

E4u 変異体は未分化状態の HFK では、野生型と同程度の複製効率を示した。同じ細胞をメチルセルロース培地で懸濁培養し、分化誘導した場合、E4u では野生型に比べゲノムの増幅効率が低下していることが確認された。

E5 変異体は、興味深いことに、未分化状態でのゲノム複製効率が野生型より高くなっていた。しかし分化誘導に対する反応性は維持していた。

この結果は E5u でも E5c でも同様であった。

E6 に関しては、未分化状態でのゲノムのメンテナンスの効率に重要であることが確認され、従来からの報告を再現した。しかし、従来からの報告と異なり必須ではないことが示された。分化誘導に対するゲノム増幅は確認できたが、未分化状態での低コピー数を反映して、野生型ほどの増幅は認められなかった。

E7 は未分化状態でのコピー数、分化に応じたゲノム増幅ともに、野生型との有意の差は認められなかった。

今回の実験系では E6 と E7 の u 型と c 型で、表現型の違いは観察されなかった。

#### 【E4 発現による角化細胞分化への影響】

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、M 期進行にかかわる細胞骨格成分に作用することで、G2/M 期で細胞周期停止を誘導する可能性を示した。

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、メチルセルロース懸濁培養法を用いた実験系で、E4 は E7 の作用に拮抗して細胞分化を促進することが示された。

E4 は細胞質、各周辺部位に特異な凝集塊を形成することが知られている。ここにはビメンチンなどの細胞骨格成分とともに、シャペロン蛋白や、ユビキチン化タンパクが含まれることを見出した。また E4 の過剰発現により、HeLa 細胞中での E6, E7 のタンパク量の増加が観察された。



【HPV 複製系を用いた抗ウイルス剤スクリーニング系の開発】

FL 型, および S 型の HPV を導入した HFk は, ウイルスゲノムを長期間エピゾーム状に維持することを報告している。またこの細胞は raft culture において, 上皮の過形成を再現できることも確認している。

これらの HPV 陽性細胞はその選択に G418 を利用しており, その耐性は複製可能な HPV の存在に依存している。この細胞を化合物で処理することによって細胞内の HPV コピー数が低下すると G418 耐性も減弱し, 細胞数の減少によって化合物の抗 HPV 効果を検証できると考えられた。

今回はすでにある程度の抗 HPV 効果が観察されている I 型インターフェロンを用いて実験系の有効性を検証したところ, インターフェロン $\beta$  の添加によって, HPV 陽性細胞の増殖性が堅調に抑制されることが確認できた。

#### D. 考察

##### 【HPV 制御遺伝子の役割】

HPV16 の生活環における制御遺伝子の解析をおこなった。基底細胞の状態は, 通常の増殖条件を用いて, 分化状態はメチルセルロース懸濁培養法により観察した。

E6 に関してはこれまで, HPV ゲノムのメンテナンスに必須であると報告されていた。しかし今回の実験条件では, ゲノムメンテナンスの効率には重要であるが, 必須ではないことが確認できた。ここでは G418 による薬剤選択をおこなっているため, 低コピー数であっても, ゲノムを維持した細胞が選別されたものを考えられる。E6 はゲノムメンテナンスに必須ではなくとも, 抗ウイルス剤の

標的としては十分か効果があると期待された。Chow LT らによって HPV18 の E6 は産生的ゲノム複製に重要であると報告されているが, 今回の結果から, 未分化状態でのゲノムコピー数の少なさが影響している可能性が示唆された。

E4 は分化層で発現が上昇することから, 分化に応じたウイルス生活環に影響する可能性が考えられてきた。今回の結果はそれを一部支持するものである。しかしその効果はあまり大きくなく, 他の論文で raft culture を用いた場合にも顕著な作用が認められないことから, E4 のウイルス複製における役割に関しては, 更に検証が必要である。

E5 変異体は, 未分化状態でのウイルスコピー数の増加が確認された。E5 は EGFR や PDGFR 経路を活性化する作用が報告されており, E5 の発現は角化細胞を基底細胞状態にとどめる作用があり, それによってウイルスコピー数の過剰な増幅を抑えている可能性が考えられた。しかしこの結果は HPV31 で示されたものと異なるため, 比較実験が必要であると思われる。

E7 は raft culture において過形成を誘導することから, 細胞分化に影響して HPV の生活環に関与していると考えられたが, 今回の結果では, E7 の役割は分からなかった。今後, raft culture なども用いて再検討をおこなう予定である。

##### 【E4 の機能】

E4 が E7 の機能に拮抗して, 角化細胞の分化を促進することを見出した。HPV 感染上皮では E7 (と E6) の働きによって角化細胞の正常な分化が抑制され, 過形成や異形性が誘導される。しかし HPV の産生的複製には角

化細胞の正常な分化が必要である。E4 は分化層で発現誘導がかかり、E7 の作用を打ち消すことで細胞の分化を進め、HPV の産生的複製に適した細胞環境を整える働きがあるのかも知れない。

また E4 は細胞質で凝集塊を形成している。ここにはシャペロン蛋白の他、ユビキチン化タンパクも集合していることが確認された。HeLa 細胞内の E6 や E7 は蛋白分解を受けて不安定であることが知られており、E4 の過剰発現はこれらの蛋白の安定化を誘導した。この現象については、現在も解析をすすめている。

#### 【抗 HPV 剤のスクリーニング系】

これまでに構築した HPV 陽性細胞、HPV 複製系が抗ウイルス剤のスクリーニング系に応用できる可能性を示した。しかしこの系については、まだ簡便とはいえないことから、細胞の増殖性などを指標に、よりハイスループットの評価系の構築を進める必要がある。

#### E. 結論

今回は新規 HPV 複製系を用いた、reverse genetics による遺伝子機能解析を行った。未だ途中段階であるが、HPV 複製制御機構を理解する上で重要なアッセイ基盤になると考えられ、今後の抗ウイルス剤開発や、そのスクリーニングに貢献するものと期待される。

HPV 制御遺伝子の中で、その役割がよく分かっていない E4 や E5 に関しても、その機能が明らかになれば、その知見に基づいて抗ウイルス剤の分子標的の同定をすすめることが可能となる。

また HPV に対する抗ウイルス作用を示す化合物のスクリーニング系の

開発も、今後改良を加えて実用的なものとする必要がある。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>E4. 第70回日本癌学会学術総会，名古屋，2011年10月3日—5日

##### 3. 総説

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)

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

HPV16 副キャプシドタンパク質 L2 の交差性中和エпитープを認識するモノクローナル抗体の分離と解析

分担研究者 森 清一郎 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官

研究要旨 HPV16の副キャプシドタンパク質L2のアミノ酸56から75（L2-56/75）にある交差性中和エピトープの詳細を調べた。L2-56/75領域を認識する2つのモノクローナル抗体（MAb）13B及び24Bを分離した。MAb13B及び24BはそれぞれL2のアミノ酸64から73及び58から64を認識し、複数の高リスク型HPVを中和した。MAb13B又は24B単独の場合よりも2つを混ぜた場合の方が高い中和活性が得られた。これらの結果は、L2-56/75領域には、少なくとも2つの交差性中和エピトープがあり、これらのエピトープを提示する抗原は、すべての高リスク型HPVの感染予防が可能な次世代ワクチンと成り得ることを示している。

A. 研究目的

現行HPVワクチンは主キャプシドタンパク質L1を抗原としており、子宮頸がんの原因となる約15の高リスク型のうち16型と18型にのみ有効である。副キャプシドタンパク質L2には複数の交差性中和エピトープがあり、その中でも、16型L2のアミノ酸56から75（L2-56/75）が最も幅広い交差性を持つ。我々は、L2-56/75を抗原とする次世代ワクチンの開発を進めている。実現すれば、1種類で全ての高リスク型HPVの感染予防が可能になると期待される。本研究は、L2-56/75を認識する抗体の性質やL2-56/75領域にある中和エピトープの詳細を調べ、ワクチン開発に役立てるとともに、次世代ワクチンの実用化を促進するための科学的基盤を強化することを

目的とする。

B. 研究方法

L2-56/75に相当するペプチド（P56/75）で免疫したBALB/cマウスから脾臓細胞を採取し、抗P56/75モノクローナル抗体（MAb）を産生するハイブリドーマを得た。ハイブリドーマを接種したマウスの腹水から抗P56/75MAbを精製した。P56/75に欠失とアラニン置換を導入した変異ペプチドを抗原とするELISAで、MAbが認識するエピトープを調べた。高リスク型HPVである16、18、31、33、35、51、52、58型の各キャプシドにレポータープラスミドをパッケージした偽ウイルスを作成し、抗P56/75MAbによる中和を調べた。16型又は31型のゲノムをもつ角化細胞を3次元培養（ラフトカルチ

ヤー)して得たHPVを用いて、抗P56/75 MAbによる中和を調べた。ELISAプレートに固定化した16型キャプシドとテスト血清 (P56/75で免疫したウサギ血清) を反応させ、その後、抗P56/75MAbを結合させた。抗P56/75MAbの結合阻害の程度により、テスト血清中の交差性中和抗体価を測定した。

#### (倫理面への配慮)

動物実験は、「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、適切に行った。

#### C. 研究結果

16型L2のアミノ酸64から73及び58から64をそれぞれ認識するMAb13B及び24Bを得た。MAb13Bは16、18、31、33、51、58型偽ウイルスを中和した。MAb24Bは調べた全ての型の偽ウイルスを中和した。MAb13B及び24Bが偽ウイルスを中和する能力は、それぞれ単独のときよりも、2つを混ぜたときの方が高かった。MAb13B及び24Bはラフトカルチャー由来の16型及び31型を中和した。テスト血清 (P56/75で免疫したウサギ血清) により、MAb13B又は24BのHPVキャプシドへの結合が阻害された。阻害の程度により、血清中の

交差性中和抗体価を測定できた。

#### D. 考察

MAb13B及び24Bは、これまで実験に使用してきた偽ウイルスだけでなく、ラフトカルチャー由来のHPVも中和した。MAb13B及び24Bが認識するエピトープのアミノ酸配列は、高リスク型だけでなく、コンジローマ等の原因となる低リスク型でも保存されているので、これらのエピトープを認識する抗体は、幅広い型のHPVを中和できると考えられる。MAb13B及び24Bを混ぜた場合、より高い中和活性が認められたことから、ワクチン抗原は、2つのエピトープを同時に提示できることが重要である。MAb13B及び24Bを使用した血清中の交差性中和抗体価測定法は、次世代ワクチンの臨床試験において、被験者への交差性中和抗体の誘導を調べるのに有用な技術である。

#### E. 結論

L2-56/75領域には少なくとも2つの交差性中和エピトープがある。これら2つのエピトープを提示する抗原は、すべての高リスク型HPVの感染予防が可能なワクチン抗原と成り得る。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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. *Micrbiol Immunol.* 2012 56: 128-33.

## 2. 学会発表

Mori S, Nakao S, Kondo K, Yoshikawa H, Kanda T, Monoclonal Antibodies Recognizing Cross-Neutralization Epitopes in HPV16 L2 aa56-75 Region. 27<sup>th</sup> 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）

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

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（特願 2010-291067）

発明者：森清一郎、神田忠仁

出願者：ヒューマンサイエンス振興財団

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

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

分担研究者 中川俊介 東京大学医学部 女性診療科・産科 講師

帝京大学医学部 産婦人科教室 講師

研究要旨 子宮頸癌の発症およびその進展にHPVの癌蛋白による感染宿主であるヒトの癌抑制蛋白のユビキチン化を介する分解が深く関与している。このHPVの癌蛋白のうち、E6癌蛋白はヒトの癌抑制蛋白p53を分解することでアポトーシス誘導の阻害により癌化に関わっている。この癌抑制蛋白の分解に関わる系を抑制する機能を持つものにプロテアソーム阻害剤がある。我々はプロテアソーム阻害剤であるMG132内包のミセルによる新規ドラッグデリバリーシステムを開発した。また、E6癌遺伝子に対するsiRNAを同様にミセルに組み込むことに成功した。

#### A. 研究目的

HPV感染陽性の子宮頸部上皮はHPVゲノムがヒトのゲノムに組み替えを起こすことにより、HPVの癌遺伝子であるE6およびE7癌遺伝子が高率に発現することとなる。ヒトのゲノムにHPVの癌遺伝子であるE6およびE7癌遺伝子が組み込まれた細胞は不死化することで癌化のプロセスへと向かう。また、癌化した子宮頸癌もそのE6およびE7癌遺伝子の発現を阻害すると、増殖を停止する。このことより、子宮頸癌の不死化、癌化にHPVの癌遺伝子の発現は不可欠である。我々はE6遺伝子の発現を抑制するため、プロテアソーム阻害剤とsiRNAを内包したミセルを開発し、子宮頸癌細胞の増殖抑制をコントロールし得るかを検討した。

#### B. 研究方法

我々は、プロテアソーム阻害剤であるMG132をナノミセルに内包化するシステムを東大工学部の片岡研と共同で開発した。このまたMG132内包ミセルがin vivoにおいて安定して腫瘍に集積し得るかを検討するため、ミセルに蛍光ラベルを施した。ヌードマウスの皮下に頸部腺癌から樹立されたHeLa細胞を移植し、マウスの尾静脈からMG132内包ミセルを投与し、ミセルの腫瘍集積性と抗腫瘍効果を検討した。また、子宮頸部腺癌の発生に関与すると考えられるHPV18型のE6遺伝子の発現を抑制し得るsiRNAをデザインし、そのE6遺伝子発現抑制効果を検討した。方法としては、E6により分解の標的となる癌抑制蛋白であるp53や膜に発現するhDlgやhScribの発現の上昇をウエスタンブロット法や蛍光抗体染色により検討する。

(倫理面への配慮)

現在まで、患者に関わる実験や研究は行っておらず、倫理面への配慮の必要性は無い。

### C. 研究結果

蛍光でラベルしたMG132内包ミセルはヌードマウスの皮下に移植した頸癌の腫瘍に集積することが示された。投与したマウスの血中におけるミセルの安定性を調べたところ、裸剤のMG132に比べ、ミセル化したMG132は長期にわたり、薬剤として安定であることが示された。マウス移植モデルにおいて、ミセル化したMG132は裸剤に比べ、強力な抗腫瘍効果を持つことが示された。HPV18型のE6遺伝子の発現を抑制し得るsiRNAをデザインし、HeLa細胞においてこのsiRNAをトランスフェクションしたところ、E6により分解の標的となる癌抑制蛋白であるp53や膜に発現するhDlgやhScribの発現の上昇をウェスタンブロット法や蛍光抗体染色により確認した。

### D. 考察

プロテアソーム阻害剤であるMG132をナノミセルに内包化するシステムはマウスモデルにおいて、血中で安定であり、裸剤と比べ、腫瘍への集積性を増し、より強い抗腫瘍効果を示すことが証明された。このことから、MG132内包ミセルは新規の子宮頸癌治療薬として有効である可能性が示された。

また、HPV18型のE6遺伝子の発現を抑

制し得るsiRNAを含有するミセルを開発したことより、こちらも新たな子宮頸癌を標的とした分子標的治療薬となり得ると考えられる。

### E. 結論

我々は今までの抗腫瘍薬剤と全く異なる作用のメカニズムを有する分子標的治療薬として、MG132およびE6遺伝子の発現を抑制し得るsiRNA内包ミセルを開発した。これらは従来の抗がん剤と異なり、骨髄抑制等の副作用は少なく、治療効果の優れた新規治療薬候補となり得る可能性が示された。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary.

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.

Reprod Biol Endocrinol. 2012 Feb 23;10(1):14.

$\beta$ -catenin (CTNNB1) S33C mutation in ovarian microcystic stromal tumors.

Maeda D, Shibahara J, Sakuma T, Isobe M, Teshima S, Mori M, Oda K, Nakagawa S, Taketani Y, Ishikawa S, Fukayama M.

Am J Surg Pathol. 2011 Oct;35(10):1429-40.

Small Gtpases. 2010 Sep;1(2):108-112.



Multifunctional transcription factor TFII-I is an activator of BRCA1 function.

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.

Br J Cancer. 2011 Apr 12;104(8):1349-55. Epub 2011 Mar 15.

Interstitial pneumonitis induced by pegylated liposomal doxorubicin in a patient with recurrent ovarian cancer.

Inaba K, Arimoto T, Hoya M, Kawana K, Nakagawa S, Kozuma S, Taketani Y.

Med Oncol. 2011 Mar 10. [Epub ahead of print]

Second-line chemotherapy with docetaxel and carboplatin in paclitaxel and platinum-pretreated ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancer.

Arimoto T, Nakagawa S, Oda K, Kawana K, Yasugi T, Taketani Y.

Med Oncol. 2011 Mar 6. [Epub ahead of print]

Rsf-1 (HBXAP) expression is associated with advanced stage and lymph node metastasis in ovarian clear cell carcinoma.

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

Int J Gynecol Pathol. 2011 Jan;30(1):30-5.

Resveratrol promotes expression of

SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary.

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.

Reprod Biol Endocrinol. 2012 Feb 23;10(1):14.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

国外PCT出願 PCT/JP2010/052556

名称: プロテアソームインヒビター内包高分子ミセル

片岡一則, 西山伸宏, CabralHoracio, 宮本雄一郎, 中川俊介, 松本陽子

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

子宮頸部高度異型上皮に対する RNAi 治療開発

分担研究者 大和 建嗣 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 講師

#### 研究要旨

HPV16感染に関連した高度異型上皮の治療のための、HPV16 E6E7を標的とした RNAi医薬開発を目指した研究をおこなう。我々は、これまでの研究でHPV16関連癌細胞株の増殖抑制に有効なsiRNA配列を見だし、さらにsiRNAの弱点である非特異的効果（オフターゲット効果、細胞毒性）を短2本鎖RNA-DNAキメラ型核酸（dsRDC）によって克服できることを明らかにした。本年度ではさらにdsRDCの弱点であるRNAi活性の低下を新規DNA置換体を用いることによって解決できることを明らかにした。

#### A. 研究目的

子宮頸部高度異型上皮は、HPV16型など高リスクHPVが原因の前癌病変である。高度異型上皮は、E6およびE7を高発現し、これらの抑制で病変が排除できるためRNAi治療の理想の治療標的である。これまでE6E7に対する遺伝子発現抑制活性の強いsiRNA配列を見だし、これを2本鎖RNA-DNAキメラ型siRNA（dsRDC）に変換することによって、非特異反応が著しく改善できる事を報告したが、dsRDCはRNAi活性の低下する欠点を持っていた。本研究では、非特異反応が低く克つ遺伝子抑制効果の高い核酸構造について検討した。

#### B. 研究方法

標的遺伝子（E6、E7、ホタルルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼ）に対するsiRNAとその様々なDNA置換体について、RNAi活性、オフターゲット

効果および細胞毒性を調べ、従来技術（siRNA、dsRDC）よりも優れたDNA置換体の構造を決定した。RNAi活性は、HPV16陽性子宮頸癌細胞株（SiHa）を用いたルシフェラーゼアッセイと定量的RT-PCRによって解析した。増殖抑制効果と細胞毒性は、HPV16陽性細胞（SiHa、E6E7不死化ケラチノサイト）と陰性細胞（HeLa、TERT不死化ケラチノサイト）を用いて解析した。RISC形成能とmiRNA発現に及ぼす効果は、HeLa細胞にトランスフェクション後RISCを免疫精製し、stem-loop RT-PCRで短鎖RNAを定量した。オフターゲット効果は、ルシフェラーゼアッセイと定量的RT-PCRで解析した。

（倫理面への配慮）

患者由来のサンプルは使用しておらず倫理面での問題はない。

#### C. 研究結果

siRNAの様々な部位のDNA置換体を合成し検討したところ、ガイド鎖の5'端より3番目から8番目までとパッセンジャー鎖上の相補部分をDNAに置換したもの(idRNA)は、下記にあるようにsiRNAとdsRDCのそれぞれの欠点を克服した優れた特性を有していた。

(1) RISC形成能

siRNA>idRNA>>dsRDC

(2) RNAi活性

siRNA>idRNA>>dsRDC

(3) オフターゲット効果

siRNA>>idRNA>dsRDC

(4) 細胞毒性

siRNA>idRNA>dsRDC

(5) パッセンジャー鎖RISC形成

siRNA (+), dsRDC (-), idRNA (-)

(6) miRNA抑制

siRNA>idRNA>dsRDC

さらにE6E7を標的にしたidRNAは、hTERT不死化ケラチノサイトに対する非特異的増殖抑制効果が少なくE6E7不死化ケラチノサイトに強い増殖抑制を有し、高度異型上皮の治療応用に適している事を示した。

D. 考察

我々の見出した新規siRNA修飾体idRNAは、従来型siRNAやdsRDCに比べて優れた特異的遺伝子発現抑制活性を有していた。これは5'末端2塩基を介したRISC形成効率の向上とシード領域6塩基がDNAであるによるオフターゲット効果の減少が関与していると思われた。

E. 結論

idRNAは、siRNAやdsRDCよりもHPV関連疾患のRNAi医薬候補として多くの点で優れていることを明らかにした。今後、idRNAの高度異型上皮へのデリバリー法を確立しなければならない。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.* 18: 587-597, 2011

2. 学会発表

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. 特許申請準備中

【発明の仮名称】 遺伝子発現阻害剤及び阻害方法

特許出願番号 2011-268252

出願日 2011年12月7日

出願人 (株) バイオシンクタンク

発明者 大和 建嗣、名取 幸和

### Ⅲ 研究結果に関する一覧表