

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17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 $\gamma$ 産生細胞)の誘導は、明らかにPBMC中よりも子宮頸部リンパ球中の方が優位であった。粘膜免疫誘導によって、粘膜リンパ球が多く存在する子宮頸部リンパ球で濃縮されていることを示している。

1~6 cap/日へのdose-escalationの検討では、4cap/日投与例の3例がE7-CMIを最も高いレベルで誘導された。興味深いことに、用量を高めた6cap/日投与例では、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(SD)し、円錐切除術を必要とした。E7-CMIが最も高いレベルであった4cap/日投与例では、3例全例が

CIN1-2(CR1例、PR2例)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、介入せずに経過観察中であるが2-2.5年経過しても全症例ともCIN3の再発を認めていない。

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(PR)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(SD)、後療法を必要とした。

これらの結果を効果安全性評価委員会で検討し、至適用量を4 cap/日と設定し、その用量で更に7例の症例を追加した。4 cap/日の全10例の有効性を検討したところ、10例中7例がエンドポイントの投与開始後9週で、CIN1-2(CR4例、PR3例)に退縮した。さらに13週目にさらに1例がCIN2(PR)に退縮した。エンドポイント(9週)における奏効率(CR+PR)は70%となり、投与後6か月時点での奏効率は80%となった。

全17例における薬理効果として、子宮頸部リンパ球中のE7-CMI誘導能を臨床効果別にまとめたところ(CR+PR vs. SD)、SD(n=8)ではE7-CMIが中央値16.1 cells/10<sup>5</sup>cellsであったのに対し、CR+PR(n=9)では、33.6 cells/10<sup>5</sup>cellsとなり、有意にE7-CMIが高くなっていることがわかった(Mann-Whitney検定, p=0.001)。子宮頸部リンパ球中のE7-CMIが臨床効果を反映するバイオマーカーになりうることを示された。

## 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補中益気湯（HET）と粘膜アジュバントである大腸菌トキシシン（LTB）をアジュバントとして、GLBL101cとともにマウス経口投与したところ、HETをGLBL101cに併用した場合に脾臓細胞ではE7-CMIが上昇すること、GLBL101cにLTBとHETの両方を併用した場合に腸管粘膜リンパ球で4-5倍高いE7-CMIが誘導されることを昨年度までに示してきた。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すると考えられたが、LTBは毒性の問題からヒトへの投与が難しい。

そこで、本年度は、LTBに代わって、ヒトでの使用経験のあるalpha-GalCerを粘膜アジュバントとして用い、同様の検討を行った。

マウスに1mg/headのGLBL101cを経口投与する際に、alpha-GalCerとHETを併用することにより、GLBL101c単独と比べて約2倍のE7-CMI上昇が観察された。

## 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、癌ワクチン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（E7-CMI）が高い症例では、CIN3に対する治療効果が示された。この薬理効果と臨床効果の間に相関性あるこ

とが本年度初めて示され、CIN3の病変退縮がGLBL101cによるものである可能性が高い。特に、4cap/日（1g/日）の10例では、投与開始から6か月後にCR4例、PR4例となり、奏効率（CR+PR）が80%となった。海外で行われた非介入観察研究の報告では、CIN3→CIN2への6か月観察後の自然退縮率は15%と言われている。本臨床試験では、プラセボ群を設定していないが、GLBL101cによる退縮率80%は明らかに薬剤依存的であると考えられた。

癌ワクチン療法では、安全性が高いものの、免疫寛容が問題となる。特に、経口投与ではoral toleranceが危惧される。本研究では検討していないが、本治療薬の長期投与、大量投与はかえってE7に対する特異的免疫寛容を誘導する可能性もある。そこで、E7-CMI誘導を増強する戦略として、アジュバントを導入することを検討した。漢方薬は実地臨床で日常的に使われている薬であり、かつ多くのアジュバント効果が報告されている。中でも補中益気湯（HET）は、昨年度までの検討から最も有望であった。全身性免疫の誘導にはHETのみでも相乗効果が示されたが、粘膜免疫誘導には、HETだけでは効果は乏しく、粘膜アジュバントが必要であることがわかった。そこで、今回の検討では、合成セラミドであるalpha-GalCerをLTBの代わりに用いた。Alpha-GalCerは、抗原提示分子であるCD1dによって提示され、NKT細胞の特異的リガンドである。この併用によって、NKT細胞が活性化され、NK細

胞、Th1細胞、CTLがIFN $\gamma$ によって活性化される。NKT細胞系による腸管粘膜免疫が賦活化され、E7に対する獲得免疫誘導が増強したと考えられた。Alpha-GalCerは、樹状細胞療法の活性化剤としてヒトでの投与経験も報告されていることから、今後のアジュバントとして漢方薬とともに実用化が期待される。

#### E. 結論

HPVE7発現型乳酸菌GLBL101cの経口投与は、粘膜免疫を介した世界初の癌ワクチンである。ヒトの子宮頸部におけるE7特異的細胞性免疫誘導を伴い、病理学的有効性が得られていることから、薬理効果に伴った臨床効果と考えられた。GLBL101cの4 cap/日投与における奏効率80%は、明らかな臨床効果を考えられた。

漢方や粘膜アジュバントの併用によってGLBL101cの投与量を減らすことができる可能性があり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) Nagasaka K, Seiki T, Yamashita A, Massimi P, Subbaiah VK, Thomas M, Kranjec C, Kawana K, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Fujii T, Kozuma S, Banks L, A novel interaction between hScrib and PP1 $\gamma$  downregulates ERK signaling and

suppresses oncogene-induced cell transformation, *PLOS One*, in-press, 2013

2) Todokoro T, Furniss D, Oda K, Kawana K, Narushima M, Mihara M, Kikuchi K, Hara H, Yano T, Koshima I, Effective treatment of pelvic lymphocele by lymphaticovenular anastomosis, *Gynecol Oncol*, E-pub, 2013

3) Fujii T, Takatsuka N, Nagata C, Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Kawana K, Mitsuhashi A, Hirai Y, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H, Association between carotenoids and outcome of cervical intraepithelial neoplasia: a prospective cohort study, *Int J Clin Oncol*, E-pub, 2013

4) Kojima S, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Taguchi A, Nagamatsu T, Nagasaka K, Matsumoto Y, Arimoto T, Oda K, Wada-Hiraike O, Yano T, Taketani Y, Fujii T, Schust DJ, Kozuma S, The prevalence of cervical regulatory T cells in HPV-related cervical intraepithelial neoplasia (CIN) correlates inversely with spontaneous regression of CIN, *Am J Reprod Immunol*, 69: 134-141, 2013

5) Kawana K, Adachi K, Kojima S,

Kozuma S, Fujii T, Therapeutic human papillomavirus (HPV) vaccines: a novel approach, *Open Virol J*, 6: 264-269, 2012

- 6) Shirane A, Wada-Hiraike O, Tanikawa M, Seiki T, Hiraike H, Miyamoto Y, Sone K, Hirano M, Oishi H, Oda K, Kawana K, Nakagawa S, Osuga Y, Fujii T, Yano T, Kozuma S, Taketani Y, Regulation of SIRT1 determines initial step of endometrial receptivity by controlling E-cadherin expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 424: 604-610, 2012
- 7) Taguchi A, Kawana K, Yokoyama T, Adachi K, Yamashita A, Tomio K, Kojima S, Oda K, Fujii T, Kozuma S; Adjuvant effect of Japanese herbal medicines on the mucosal type 1 immune response to human papillomavirus (HPV) E7 in mice immunized orally with *Lactobacillus*-based therapeutic HPV vaccine in a synergistic manner. *Vaccine*, 30: 5368-5372, 2012
- 8) Ikeda Y, Oda K, Nakagawa S, Murayama-Hosokawa S, Yamamoto S, Ishikawa S, Wang L, Takazawa Y, Maeda D, Wada-Hiraike O, Kawana K, Fukayama M, Aburatani H, Yano T, Kozuma S, Taketani Y. Genome-wide single nucleotide polymorphism arrays

as a diagnostic tool in patients with synchronous endometrial and ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 22: 725-731, 2012.

## 2. 学会発表

- 1) Kawana K, Current issues and future for prophylactic and therapeutic HPV vaccines, 第10回日本臨床腫瘍学会ワークショップ、7月、大阪
- 2) 川名 敬、性感染症に対する粘膜免疫を介したワクチン開発、第16回日本ワクチン学会、11月、東京
- 3) Kawana K, HPV-associated cancer and development of a novel anti-cancer HPV therapeutic vaccine; 19<sup>th</sup> International Charles Heidelberger Symposium, Feb, Kagoshima
- 4) 川名 敬、HPV に対する腸管粘膜免疫を介した子宮頸癌治療ワクチンの開発、日本薬学会 133 年会、3月、横浜

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

- 1) 名称：粘膜免疫賦活化剤及び HPV 感染症治療用経口医薬組成物  
出願番号：特願 2012-138943  
出願日：2012/6/20  
出願人：国立大学法人東京大学

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 がん蛋白質の機能解析並びにウイルス増殖機構の解析

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。本研究課題では、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。

今年度はウイルスのコードする oncoprotein、E7 がウイルスの生活環と細胞増殖性の維持に重要であること、また E6 はウイルスゲノムコピー数の増加に関与することを見出した。また後期遺伝子の発現が宿主細胞の分化段階により、選択制御されていることを示した。

後期に発現する E4 遺伝子産物は細胞質に凝集塊を形成する。この凝集塊にはシャペロン蛋白やユビキチン化した蛋白が集まっており、E4 が E6 や E7 などの蛋白の分解にかかわる可能性を示した。

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。そのために 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 の複製をサポート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 の生活環を再現し、その感染・複製機構を解明することにした。さらにウイルス遺伝子の働きや、異形性・発がん誘導の機構についても解析を行う。

B. 研究方法

【HPV 複製系の構築】

HPV の複製系としては、HPV6b、11、16、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ウイルスゲノム型 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 制御遺伝子変異体の作成】

HPV の各遺伝子に変異を導入するには、polymerase chain reaction (PCR) を利用した oligonucleotide-directed mutagenesis を用いた。ここでは一塩基置換により、ナンセンス変異を導入した。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。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。このゲル上で HFK を培養し、さらにゲル表面を空気に晒すことによって HFK は分化・層状化し、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】

HFK に各種遺伝子を導入する際には、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、LXSN, 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、48~96 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。

#### (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

#### 【E7 による過形成誘導機構】

我々はすでに皮膚モデルを利用して、E7 による過形成誘導活性を報告している。そこでは、この過形成誘導には E7 による pRb と p130 というポケット蛋白の分解 (不活化) が重要であることを示した。

しかし、E7 には他にも多くの機能が知られており、また低リスク型の E7 にも過形成誘導機構があることから、ポケット蛋白の分解の他の機能も関与している可能性が考えられる。

JNK は通常の皮膚モデルでは基底細胞でのみ活性化（リン酸化）が認められるが、E7 発現皮膚モデルでは、上層部でも活性化していることが認められた。カルシウムによる分化誘導実験では、JNK のリン酸化が分化に伴って失われることが分かった。E7 発現細胞は、分化誘導後も JNK のリン酸化状態が保たれていた。さらに、正常な HFK を JNK 阻害剤で処理すると、細胞分化が進行することが確かめられた。

これらのことから、E7 は分化刺激後も JNK を活性化状態に保つことで、細胞の増殖性を亢進すると同時に分化を抑制し、上皮の過形成を誘導する可能性が考えられた。

#### 【HPV 複製におけるウイルス oncoprotein の働き】

HPV16/18 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、各制御遺伝子にナンセンス変異を導入した。HFK に環状化したウイルスゲノム DNA と薬剤選択マーカーを発現するプラスミドとを同時に transfection し、薬剤（G418）で選別を行った。ウイルスゲノムがエピゾーム状に保持された細胞では、E1 と E2 が発現しており、それらがトランスに作用して、複製起点を有する選択用プラスミドも同時に保持される。これによって、長期間の薬剤選別が可能となり、ゲノムを保持していない細胞を除去することが可能となる。

今回は、HPV18 をもとにして E4, E5, E6, E7 の各遺伝子に変異を導入した。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。

いずれの変異体も、同程度の効率でウイルスゲノムを保持した細胞が得られた。このことから各遺伝子は、ゲ

ノムのメンテナンスの効率には関与しないことが示された。

E6 の変異体に関しては、ゲノムコピー数の顕著な現象が認められ、E6 が基底細胞レベルでのゲノム複製効率に影響していることが示された。この事は HPV16 でも同様の結果が得られている。

HPV ゲノムは HFK の分化に伴って、細胞あたりのコピー数が増大することが知られている。E7 の変異体では、この分化に応じたゲノム数の増加が観察されなかった。また、E7 変異体を導入した細胞では経時的な細胞死が認められ、E7 が細胞増殖性の維持や更新に機能していることが示唆された。

#### 【E4 発現による aggresome 形成】

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、その他の機能については分かっていない。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、我々は E4 が E7 の作用に拮抗して細胞分化を促進することを見出している。

E4 は細胞質、核周辺部位に特異な凝集塊を形成する。我々は E4 とビメンチンの相互作用を同定しており、この凝集塊にビメンチンが含まれることを示した。このような凝集塊は aggresome と呼ばれる。aggresome にはシャペロンやユビキチン化した蛋白が集合していることが知られており、E4 による凝集塊にも DnaJ やユビキチン化タンパクが観察された。この凝集塊形成を介して、E4 はウイルス性蛋白や宿主性因子のターンオーバーにかかわっている可能性が考えられた。

そこで E6 や E7 の発現に対する E4 の効果を調べた。その結果、E4 の発現は強くこれらのタンパク量を減少させること、この現象がプロテアソ-

ム依存的であることが分かった。また E4 との相互作用が知られるビメンチンやサイトケラチン 8/18 も同様に減少させることが示された。

#### D. 考察

##### 【HPV 複製環における oncoprotein の働き】

HPV のコードする主要な oncoprotein である E6 と E7 は、細胞の transformation やがん化における機能解析が進んでいるが、ウイルス複製における役割は分かっていない。いずれも細胞におけるウイルスゲノムのメンテナンスに必須であると報告されていたが、我々の HPV16、HPV18 を用いた変異解析から、ゲノムメンテナンスには必須ではないことが示された。この差異は、効率の良い複製系の構築と、それに伴い初代培養細胞の増殖性を維持した状態でアッセイ出来るという条件が影響していると考えられる。

E6 の変異体では細胞あたりのウイルスゲノムコピー数が顕著に減少していた。この事は未分化状態の細胞で観察されたことから、E6 による上皮形質の変化というよりは、p53 を介した監視機構の破綻が影響している可能性が考えられた。エピゾーム状に外来の DNA が複製することで DNA 損傷反応が惹起され、ウイルスゲノムコピー数の低下が引き起こされており、E6 存在下ではそのような反応が抑制された結果、コピー数の増加が可能となっているものと推察される。

E7 に関しては、その変異によって分化依存的なゲノムコピー数の増加 (genome amplification) が抑制された。E7 は細胞分化を抑制し、それによって DNA 合成活性などを高い状態に保つことが考えられ、この機能が分化依

存的な genome amplification に重要なのではないかと考えられた。

この E7 による分化抑制は、過形成誘導にも重要である。今回、E7 による JNK の恒常的活性化が分化の抑制に関与している可能性を示した。この活性化機構は不明であるが、これまでに E7 が TNFR シグナルを改変することが報告されており、TNFR シグナル抑制に伴う JNK の活性化が関与している可能性も考えられる。

##### 【E4 の機能】

E4 には G2/M 期細胞周期停止機能があることを報告している。また E7 による分化抑制と拮抗して、ケラチノサイトの分化誘導を促進する活性を見出している。

ここでは、E4 による aggresome 形成に注目した。E4 による凝集塊形成は以前より報告されており、サイトケラチン 8/18 のネットワークを崩壊し、その凝集塊に取り込むことが知られている。aggresome はシャペロンやユビキチン化タンパクを含む複合体であり、細胞の中心体近傍に形成される。機能としては、外来蛋白や変性蛋白のたーノーバー-にかかわる可能性が示唆されている。一方で、HSV などではウイルスの複製に必要であることも示されている。

E4 による他のウイルス蛋白の代謝を調べたところ、E6 や E7 のタンパク量を著しく減少させることが分かった。分化層で強く発現する E4 は、E6 や E7 の分解を促進し、その機能を抑制することで、細胞を最終分化へと誘導すると同時に、サイトケラチンなどの細胞骨格成分を崩壊させることで、角化細胞からのビリオンのリリースを促進しているのではないかと考えられる。



## 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。

皮膚モデル培養系は、ハイスループットのスクリーニングには不適であるが、HPV 複製の動物モデルがない現状においては、薬剤評価の重要な指標となると考えられる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

梶谷直子、川手章史、酒井博幸：HPV 18E1<sup>Δ</sup>E4 の新規機能の探索：ビメンチンとの相互作用. 第 71 回 日本癌学会学術総会、札幌、2012 年 9 月 19 日-21 日

梶谷直子、川手章史、酒井博幸：HPV 18E1<sup>Δ</sup>E4 の新規機能の探索. 第 60 回 日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月 13 日-15 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

交叉性中和抗体による HPV 中和の分子機構の解明と中和活性測定法の確立  
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 HPVに対する血清抗体価の測定は、ワクチン接種の効果やHPV自然感染歴を調べるのに重要である。HPV抗体価測定方法として、感染性偽ウイルス（Pseudovirion: PsV）を用いた中和活性測定法があるが、操作が煩雑で多検体の測定には向いていない。本研究では、簡便なHPV抗体価測定法を確立することを目的として、ウイルス様粒子（Virus-like particle: VLP）を抗原とするELISA（VLP-ELISA）と、従来のPsVを用いた中和試験を用いて、WHOから提供された血清パネルのHPV16/18に対する抗体価を測定し、両者の結果を比較した。VLP-ELISAによる抗体価測定結果は、血清パネルの陽性、陰性に完全に一致し、中和試験による中和抗体価とも高い相関が認められた。VLP-ELISA法は、簡便で信頼性の高いHPV抗体価測定法として、ワクチン接種者や自然感染者での抗体誘導を調べるのに有用である。

#### A. 研究目的

HPV抗体価測定方法として、感染性偽ウイルス（Pseudovirion: PsV）を用いた中和活性測定法があるが、操作が煩雑で多検体の測定には向いていない。ワクチン接種の効果や、自然感染者での抗体誘導を調べるには、多検体の処理が可能な抗体価測定法が必要である。本研究は、ウイルス様粒子（Virus-like particle: VLP）を抗原とするELISAによるHPV抗体価測定法の感度・特異性や信頼性を調べ、簡便なHPV抗体価測定法として確立することを目的とした。

#### B. 研究方法

HPV16または18のL1/L2キャプシド発現プラスミドを、HEK293FT細胞

（SV40 T抗原を発現するHEK293細胞）にトランスフェクションして、3日後に細胞を回収、細胞抽出液をオプチブレップ密度勾配遠心で分画し、HPV16または18のL1/L2からなるVLPを調製した。VLPを96穴プレートに固相化して、ELISA法により血清サンプル中のHPV16/18抗体価を測定した。血清サンプルとして、世界保健機関（WHO）から供給されたHPV16/18血清パネルを使用した。血清パネルには、HPV16/18国際標準血清、HPV自然感染者血清、HPVワクチン接種者血清、HPV陰性者血清が含まれる。また、血清の凍結による測定結果への影響を調べるため、同一の血清を凍結保存したものと凍結乾燥して保存したものが一部含まれる。HPV16/18国際標準血清の抗体価を

10 U/mlとした時の、各血清の相対力価を、平行線定量法にて算出した。さらにPsVを用いた中和試験でもHPV16/18抗体価を測定した。それぞれの方法で、2または3回測定を繰り返し、両者の結果を比較した。

#### (倫理面への配慮)

組換えDNA実験については、実施機関の承認を得て行った。WHOより提供された血清は符号化されており、患者のプライバシーに配慮されている。

#### C. 研究結果

VLP-ELISA法により、血清パネル中のHPV16およびHPV18抗体が型特異的に検出され、パネルの陽性・陰性に完全に一致した。高い抗体価を示すワクチン接種者だけでなく、自然感染者でも抗体が検出可能であった。

VLP-ELISA法で算出された抗体価はアッセイ間のばらつきも小さく、また、血清の凍結による測定結果への影響も認められなかった。VLP-ELISAで得られた抗体価と、PsVを使用した中和試験で得られた中和抗体価は高い相関を示し、相関係数は、HPV16については1.0、HPV18については0.97であった(図1)。

#### D. 考察

VLP-ELISAによるHPV16/18抗体価測定法は、PsVを使用した中和試験と同等の感度と特異性を示した。

VLP-ELISA法は、凍結保存した血清を使用したハイスループットな抗体価

測定が可能である。我が国でもHPV16/18を標的とするワクチンの接種が始まっており、ワクチン接種者での抗体価の変動を調べるのにVLP-ELISA法を利用できる。また、自然感染者で誘導される抗体も検出可能であったことから、HPVの血清疫学的研究も可能となる。今後は、他の発がん性HPVの抗体価測定についてもVLP-ELISA法を確立する。

#### E. 結論

VLP-ELISA法は、簡便で信頼性の高いHPV抗体価測定法として、ワクチン接種者や自然感染者での抗体誘導を調べるのに有用である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kondo K, Uenoyama A, Kitagawa R, Tsunoda H, Kusumoto-Matsuo R, Mori S, Ishii Y, Takeuchi T, Kanda T, Kukimoto I. Genotype distribution of human papillomaviruses in Japanese women with abnormal cervical cytology. *Open Virol J.* 2012, 6: 277-83.

Nakao S, Mori S, Kondo K, Matsumoto K, Yoshikawa H, Kanda T. Monoclonal antibodies recognizing cross-neutralization epitopes in human papillomavirus 16 minor capsid protein L2. *Virology.* 2012, 434: 110-7.

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

森清一郎、松尾理加、石井克幸、近藤一成、柗元巖、Virus-like particleを用いた新たなHPV16/18抗体価測定系の確立、第60回日本ウイルス学会学術総会（大阪）

石井克幸、中原知美、森清一郎、竹内隆正、柗元 巖、神田忠仁、Trappc8はヒトパピローマウイルスの侵入に必要な宿主蛋白質である、第60回日本ウイルス学会学術総会（大阪）

神田忠仁、森清一郎、柗元 巖、HPVワクチン - 有効性と残された課題、第60回日本ウイルス学会学術総会（大阪）

石井克幸、中原知美、森清一郎、竹内隆正、柗元 巖、神田忠仁、Trappc8はヒトパピローマウイルスの侵入に必要な宿主蛋白質である、第85回日本生化学会学術大会（福岡）

Iwao Kukimoto, Tomohiko Maehama, Seiichiro Mori, Rika Kusumoto-Matsuo, Kazunari Kondo, Tsuyoshi Sekizuka, and Makoto Kuroda. A novel method to determine the full-genome sequence of human papillomavirus type 16 using full-circle PCR followed by deep sequencing. 28<sup>th</sup> International

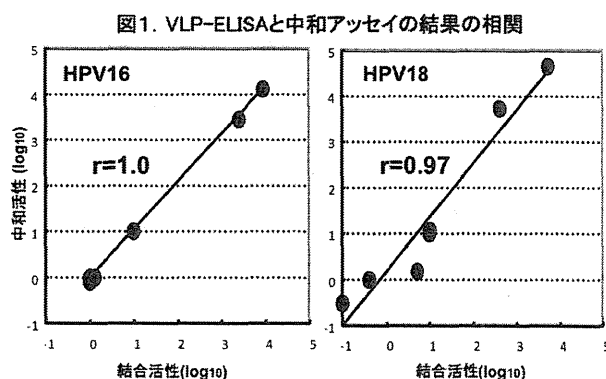
Papillomavirus Conference (Puerto Rico)

Yoshiyuki Ishii, Tomomi Nakahara, Shiho Demoto, Seiichiro Mori, Takamasa Takeuchi, Iwao Kukimoto, and Tadahito Kanda. Identification of Trappc8 as a host factor that is required for human papillomavirus entry. The DNA Tumour Virus Meeting 2012 (Montreal)

## 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

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 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。HPVの持つE6癌蛋白はユビキチン化を介してp53を分解する。E6癌蛋白はそれ以外にも膜蛋白を含め、多くの癌抑制蛋白を同様の機構で分解する。ユビキチン化されたこれらの標的蛋白は最終的にプロテアソームにおいて分解を受ける。このプロテアソームの阻害剤を用いて、子宮頸癌由来の細胞株の増殖抑制を見いだした。我々は新規ドラッグデリバリーシステムを用いてプロテアソーム阻害剤を内包するナノミセルを作成した。このナノミセルは腫瘍集積性が高く、ヌードマウスに移植したHPV陽性の子宮頸癌を縮小させるが、HPV陰性の子宮頸癌にも抗腫瘍効果を持つことが明らかとなった。

#### A. 研究目的

HPVの持続感染陽性の子宮頸部上皮はHPVゲノムのうち、癌遺伝子であるE6遺伝子、E7遺伝子がひとのゲノムに組み込まれる。このことより、一旦HPVの癌遺伝子が組み込まれた子宮頸部の細胞では、これらの癌遺伝子が高発現することが知られている。E6癌蛋白はユビキチン化を介して癌抑制蛋白を分解する。プロテアソーム阻害剤によりこれらの蛋白の分解を抑制することにより子宮頸癌の増殖抑制効果がもたらされるかを検討することを目的とした。

#### 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

ルが腫瘍集積性を持つかを検討するために、ミセルを傾向ラベルし、傾向の腫瘍への集積性を検討した。HPV陽性のHeLa、Caski細胞とHPV陰性のC33細胞をヌードマウスの皮下に移植し、プロテアソーム阻害剤であるMG132とそれを内包したナノミセルの抗腫瘍能を検討した。また、同時にシスプラチン等の化学療法剤を併用することにより、相乗効果があるかも検討した。

（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。HPV陽性のHeLa、Caski細胞を移植した

マウスの腫瘍に対して、強い抗腫瘍能を示した。また、ミセルの抗腫瘍効果はシスプラチンと相乗効果を示すことが判明した。プロテアソーム阻害剤であるMG132は単独では、HPV陰性のC33細胞をヌードマウスの皮下に移植した腫瘍に対して抗腫瘍効果を示さなかったが、MG132内包ミセルはこのHPV陰性の腫瘍に対しても高い抗腫瘍効果を示すことが判明した。

#### 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すことにより、HPV陽性の子宮頸癌に対して強い抗腫瘍効果を示す可能性が示唆された。ミセル化することにより、裸剤では抗腫瘍能を示さなかったHPV陰性のC33細胞由来の腫瘍に対しても強い抗腫瘍効果があることから、本ミセルは他癌腫でも抗腫瘍効果を示すことが期待される。

#### E. 結論

我々は新規ドラッグデリバリーシステムをもちいて、プロテアソーム阻害剤内包ミセルを開発した。本ミセルはHPV陽性の子宮頸癌のみならず、HPV陰性の子宮頸癌にも高い抗腫瘍効果を持つことが示された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Regulation of SIRT1 determines initial step of endometrial receptivity by controlling E-cadherin expression. Shirane A, Wada-Hiraike O, Tanikawa M, Seiki T, Hiraike H, Miyamoto Y, Sone K, Hirano M, Oishi H, Oda K, Kawana K, Nakagawa S, Osuga Y, Fujii T, Yano T, Kozuma S, Taketani Y. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Aug 3;424(3):604-10.

Genotype-dependent efficacy of a dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235, and an mTOR inhibitor, RAD001, in endometrial carcinomas. Shoji K, Oda K, Kashiyama T, Ikeda Y, Nakagawa S, Sone K, Miyamoto Y, Hiraike H, Tanikawa M, Miyasaka A, Koso T, Matsumoto Y, Wada-Hiraike O, Kawana K, Kuramoto H, McCormick F, Aburatani H, Yano T, Kozuma S, Taketani Y. *PLoS One*. 2012;7(5):e37431.

Genome-wide single nucleotide polymorphism arrays as a diagnostic tool in patients with synchronous endometrial and ovarian cancer. Ikeda Y, Oda K, Nakagawa S, Murayama-Hosokawa S, Yamamoto S, Ishikawa S, Wang L, Takazawa Y, Maeda D, Wada-Hiraike O, Kawana K, Fukayama M, Aburatani H, Yano T, Kozuma S, Taketani Y. *Int J Gynecol Cancer*. 2012 Jun;22(5):725-31.

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;10:14.

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*. 2012 Jun;29(2):1255-7.

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*. 2012 Jun;29(2):1253-4.

## 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

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 筑波大学医学医療系 消化器内科 研究員

#### 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、非特異的増殖抑制効果）は siRNA の部分 DNA 置換によって軽減できることを明らかにした。本年度の研究ではさらにこれらの siRNA の RNAi 活性と特異性を向上させるために、AGO 蛋白発現がこれらにどのような効果を有するかを検討した。

#### 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 配列を見だした。siRNA は、その配列特異性ばかりではなく、様々な機序を介した非特異反応を有し、これらは臨床応用における問題となる。本年度では siRNA による RNAi 効果の発現において中心的役割を果たしている AGO 蛋白発現導入が siRNA による RNAi 活性と非特異的増殖抑制効果にどのような影響を検討した。

#### B. 研究方法

コドン最適化ヒト AGO1 および AGO2 cDNA を合成し、発現プラスミドとレンチウイルスを構築した。HeLa 細胞由来

ホタルルシフェラーゼ安定発現細胞株および SiHa 細胞由来ホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼ安定発現細胞株にレンチウイルスを用いてヒト AGO1 あるいは AGO2 遺伝子を発現導入した。

AGO1 および AGO2 発現プラスミドと合成 siRNA（ヒト AGO2、HPV16-E6E7、ホタルルシフェラーゼ）は Lipofetamine2000 を用いて導入した。RNAi 活性および細胞毒性はそれぞれルシフェラーゼアッセイと WST8 アッセイにより解析した。

（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

##### (1) AGO 蛋白と RNAi 活性

SiHa 細胞および HeLa 細胞において AGO1 の高レベル発現は、全ての siRNA の RNAi 活性を低下させた。



HeLa細胞へのAGO2発現導入は、内因性AGO2発現抑制時あるいは競合するsiRNA存在下でsiRNAによるRNAi活性を著しく改善したが、未処理のHeLa細胞およびSiHa細胞におけるsiRNAのRNAi活性を僅かな上昇させただけであった。

#### (2) AGO発現とsiRNA非特異的増殖抑制効果

HeLa細胞とSiHa細胞においてAGO1およびAGO2発現導入はいずれも、siRNAの非特異的増殖抑制効果を阻害しなかった。

#### D. 考察

siRNAによるRNAi活性は細胞内RISC (RNA-induced silencing complex) の形成効率に依存しているが、RISC構成因子の中でも特にAGO2レベルが活性に大きな影響をもつと報告されている。本研究で、AGO2発現導入はsiRNAによるRNAi活性をわずかな上昇させただけであった。しかし、内因性AGO2を発現抑制するか、あるいは競合するsiRNAを導入した場合に外因性AGO2の導入はsiRNAによるRNAi活性を増強した。これは元々AGO2レベルが十分ある細胞に、RISC形成能の高いsiRNA (ガイド鎖の5'端がU/Aで熱力学的非対称性を有する) を導入した場合は、すでに最大効果を発揮しており、AGO2の追加導入による増強効果が得られないことを示唆している。AGO1蛋白は、AGO2と同様にsiRNAとRISC形成をするが、RNA切断活性がなく、強発現によって却ってsiRNAの取り込みをAGO2と

競合し、AGO2を介するRNAi活性を低下させたと考えられた。

miRNA生成は、siRNAと同様AGO2をはじめとするRISC形成因子を必要とする。このためsiRNA導入は、RISC構成因子、特にAGO2を消費することでmiRNA生成を抑制する。siRNAによる非特異的増殖抑制効果の原因の一つは、miRNA生成抑制によるものと報告されている。しかし、HeLa細胞およびSiHa細胞においてAGO1あるいはAGO2導入はsiRNAの非特異的増殖抑制効果を抑制しなかった。これは、これらの細胞におけるsiRNAの増殖抑制効果がAGO2の消費によるものではないことを示唆している。今後、この増殖抑制効果の機序について自然免疫の活性化とoff-target効果から検討する必要がある。

#### E. 結論

siRNAのRNAi活性は、AGO2レベルによって影響され、AGO2レベル低下時には、AGO2発現誘導によってRNAi活性を上げる事ができる。siRNAの非特異的細胞増殖効果は、siRNAによるAGO2の消費によるものではなく、今後この細胞内シグナルを明らかにし、siRNAの非特異反応を解決しなければならない。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(1) 廣瀬充明、遠藤慎治、齋藤梨絵、  
上野 卓教、鈴木英雄、大和 建嗣、  
兵頭一之介 ヒト胃癌細胞に対する  
classIII HDAC 阻害剤 tenovin-6 の抗  
腫瘍効果に関する検討

第 7 1 回日本癌学会学術総会平成 2  
4 年 9 月札幌

(2) Kenji Yamato, Shinji Endo  
Identification of a short RNA  
segment in the siRNA seed region  
required for efficient RNAi

第 35 回日本分子生物学会年会 平成  
24 年 1 2 月 博多

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

### Ⅲ 研究結果に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Egawa N, Nakahara T, Ohno S, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Yamato K, Natori Y, <u>Kiyono T</u>	The e1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome.	J Virol	86	3276-3283	2012
Narisawa-Saito M, Inagawa Y, Yoshimatsu Y, Haga K, Tanaka K, Egawa N, Ohno S, Ichikawa H, Yugawa T, Fujita M, <u>Kiyono T</u>	A critical role of MYC for transformation of human cells by HPV16 E6E7 and oncogenic HRAS.	Carcinogenesis	33	910-917	2012
Egawa N, Kawai K, Egawa K, Honda Y, Kanekura T, <u>Kiyono T</u>	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
Nagasaka K, Seiki T, Yamashita A, Massimi P, Subbaih VK, Thomas M, Kranjec C, <u>Kawana K</u> , <u>Nakagawa S</u> , Yano T, Taketani Y, Fujii T, Kozuma S, Banks L	A novel interaction between hScrib and PP1 $\gamma$ downregulates ERK signaling and suppresses oncogene-induced cell transformation	PLOS One	E-pub		2013
<u>Kawana K</u> , Adachi K, Kojima S, Kozuma S, Fujii T	Therapeutic human papillomavirus (HPV) vaccines: a novel approach	Open Virology Journal	6	264-269	2012