

201309038A

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業（臨床研究・治験推進研究事業）

子宮頸癌に対する粘膜免疫を介した
ヒトパピローマウイルス
(HPV)
分子標的免疫療法の臨床応用に関する研究
(H25-医療技術-一般-006)

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川名 敬

平成26（2014）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業（臨床研究・治験推進研究事業）

子宮頸癌に対する粘膜免疫を介した
ヒトパピローマウイルス
(HPV)
分子標的免疫療法の臨床応用に関する研究
(H25-医療技術-一般-006)

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川名 敬

平成26（2014）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 子宮頸癌に対する粘膜免疫を介したヒトパピローマウイルス (HPV)
分子標的免疫療法の臨床応用に関する研究 ----- 3

川名 敬

II. 分担研究報告

1. 乳酸菌菌体成分精製分析に関する研究 ----- 19

五十君 静信

2. 子宮頸癌に対するHPV分子標的免疫療法における
HPV特異的T細胞応答の解析 ----- 27

立川 愛

3. 子宮頸癌組織内微小環境における癌関連線維芽細胞
を介した免疫制御機構に関する研究 ----- 31

藤井 知行・永松 健

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 37

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 43

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金
医療技術実用化総合研究事業（臨床研究・治験推進研究事業）
平成 25 年度(総括) 分担) 研究報告書

子宮頸癌に対する粘膜免疫を介したヒトパピローマウイルス(HPV)分子標的免疫療法の臨床応用に関する研究

研究代表者 川名 敬
東京大学・医学部附属病院・女性診療科産科/女性外科 准教授

研究要旨

子宮頸癌とその前駆病変(CIN1, 2, 3)はヒトパピローマウイルス(HPV)が関与している。子宮頸癌と CIN2-3(前癌病変)は HPV の E7 分子が、CIN1(HPV 感染症)は E2 分子が、恒常的に発現し癌抗原になっている。しかし全身免疫を誘導する HPV 分子を標的とした免疫療法は有効ではない。本研究では、粘膜免疫を介した HPV 分子標的免疫療法の実用化をめざしている。本研究開始前に実施した探索的臨床試験において、第一世代 HPV16E7 発現乳酸菌(GLBL101c)を CIN3 患者に経口投与することにより、腸管粘膜免疫が抗原特異的に惹起され、粘膜型の抗原特異的 T 細胞が腸管から子宮頸部粘膜に帰巢し、子宮頸部粘膜病変を退縮させることを示した。本研究では、第 IIb 相臨床試験に準じた体制を整え、免疫学的評価の最適化を行い、より高いエビデンスレベルの二重盲検ランダム化試験を開始した。HPV16 型の CIN2 を対象とし、順調に患者登録中である。

また GLBL101c の弱点を補うために E7 分子と乳酸菌菌体の量比を最適化するための基礎実験を開始している。その結果によって、第二世代の E7 発現乳酸菌を開発する。CIN1 治療のために E2 発現乳酸菌の精製準備を始めた。CIN1-3 に対する世界初の治療薬開発をめざしている。

【研究分担者】

- ・五十君 静信：国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部、部長
- ・立川 愛：東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野、准教授
- ・藤井 知行：東京大学医学部附属病院・女性診療科産科/女性外科、教授
- ・永松 健：東京大学医学部附属病院・女性診療科産科/女性外科、講師

A. 研究目的

子宮頸癌は、本邦で年間10000人が罹患し、年間3500人が死亡している(1)。しかも20~30才代で罹患率・死亡率ともに増加し(2, 3)、罹患のピークが30才前後となっている。

子宮頸癌患者の 95%以上から HPV 遺伝子が検出されることから HPV は子宮頸癌の原因ウイルスと

考えられている。HPV感染者の約10%は子宮頸部上皮内腫瘍性病変（以下、CIN）へと病状が進行する。約15種類あるHPV型の中で、HPV16型が子宮頸癌の約半数を占める。CINのステージは軽度（CIN1）、中等度（CIN2）及び高度（CIN3）に分類され、上皮内腫瘍性病変がCIN2～CIN3のステージへと進展するに伴い、癌化に関係するタンパク質であるE6あるいはE7の発現が次第に増加し、子宮頸癌へと進展する。HPVの感染予防を目的とするHPVワクチンが世界中で使用され、その予防効果が示されつつあるが、CIN患者（既感染者）に対しては全く無効である。

CIN1, 2, 3の罹患者数は、国内で年間約10万人と推定され、CIN患者は通常3-4か月に1回の外来通院によって癌への進行がないかを観察する。CIN1(軽度上皮内腫瘍病変)はHPV感染病巣を示し、CIN2-3(中等度-高度上皮内腫瘍病変)はいわゆる前癌病変と位置付けられている。特にCIN3は子宮頸癌の直前の病変（上皮内癌）と考えられ、30%以上は2年以内に子宮頸癌に進行する。

現行の治療法は、子宮頸癌では子宮摘出、その前癌病変CIN2-3では子宮頸部円錐切除術である。30才前後の女性がこれらの外科的治療を受けることはその後の妊娠・出産に影響する。術後の妊娠時に切迫早産の入院管理、早産児の新生児管理を必要とし周産期における医療経済を大きく圧迫して

いる。このような背景から、CINに対する薬物療法の必要性が極めて高い。

子宮頸癌は、発癌性ヒトパピローマウイルス（HPV）によるウイルス発癌であり、HPV分子を標的とした分子標的治療薬が期待される。CIN1はウイルス感染症でありE2が発現する。CIN2-3は前癌状態でありE7が発現する。E2、E7ともにヒトでの抗原性が高く免疫療法の標的として最適である。

本研究の目的は、HPV分子を標的にした子宮頸癌と前駆病変（CIN1-3）に対する新規の分子標的治療薬を開発することである。

本研究の特長は、標的となるHPV分子を発現した感染細胞・腫瘍細胞に対する粘膜免疫（細胞性免疫）を誘導して殺細胞効果を発揮する経口薬を開発した点である。これまでに我々は、HPVの癌蛋白質E7に対する粘膜免疫を誘導するため、E7発現乳酸菌（*Lactobacillus casei*）GLBL101cを製剤化し、第I/IIa相に準じた探索的自主臨床試験を実施した。GLBL101cの経口投与によって腸管粘膜で惹起された抗E7細胞性粘膜免疫が誘導され、CIN3が退縮することを確認した。粘膜免疫を介した癌免疫療法の有効性を示したのは世界初である。

CINのうちCIN1がウイルス感染症、CIN2-3が子宮頸癌の前癌病変として扱われるが、細胞性免疫の標的となるウイルス分子はCIN1がE2、CIN2-3がE7である。そこで本研究では、E2発現乳酸菌とE7発現乳酸菌を開発す

ることをめざしている。

本研究によって、本研究の開発薬剤は、CIN1, 2, 3の全ての段階に対応した治療薬であり、世界初のCIN治療薬と期待される。また、既存治療である外科的治療を回避できるため、妊娠時の周産期予後も改善され、対がん対策としての日本発の創薬はもちろん、少子化、周産期問題に対する一助になる研究として本研究を位置付けている。

H25年度の研究目的として、①CIN2を対象とするGLBL101cの有効性を検証すること、②E7：乳酸菌の量比を最適化した第2世代のE7乳酸菌を開発すること、③第2世代の乳酸菌発現系を用いたE2乳酸菌を開発すること、を設定した。

B. 研究方法

(1) CIN2を対象とするGLBL101cの有効性試験の計画と実施（川名、藤井、永松、立川）

CIN2を対象とするGLBL101cの有効性を検証するため、探索的臨床研究として、第IIb相に相当する自主臨床試験を計画した。以下に本臨床試験の概略を示す。

試験薬：HPV16型 E7タンパク質発現乳酸菌（GLBL-101c）、コード名 GLBL-101c Cap.

対象患者：HPV16型感染に起因するCIN2（子宮頸部中等度上皮内腫瘍性病変）の患者

試験の種類・デザイン： ランダム

化、二重盲検、探索的後期第II相臨床試験とした。HPV16単独陽性のCIN2患者（前治療の有無は問わない）を登録し、GLBL101c投与群（試験アーム）とプラセボ投与群（標準アーム）とに、東大附属病院臨床研究支援センター中央管理ユニットにて、臨床研究支援システムUHCTAcessを用いて、試験責任医師または試験分担医師の意思が入らないよう、ランダムに割付けする。

目標症例数：GLBL-101c 投与群（試験アーム）20例、プラセボ投与群（標準アーム）20例、総症例数40例。

試験の全期間： 16週間①同意取得～投与開始： 1日～1週間、②投薬期間：8週間、③受診3：16週目で試験終了。

投与量・投与方法： 1日1回、朝食前に服用（ただし、1日目は院内で食間に服用）。受診1で薬剤全て（20回分）を渡し、服用カレンダーと健康日誌を参照しながら服用する。

服用量：4カプセル/日（1g/日）
（総服用量：80カプセル）

試験薬の管理・交付手順：東大附属病院臨床研究支援センター試験薬管理部門にて管理・調剤する。

主要評価項目：有効性：16週時の子宮頸部病変の病理学的寛解を東大病院病理部で判定する。

副次的評価項目：

有効性：a. 細胞診での悪化の有無を、病理部で判定し、悪化の場合は組織診にて確定診断を得る。b. コルポスコピー検査での寛解（病変部の写真記録に基づく判定）を、試験責任医師が判

定する。c. 子宮頸部及び血液中の細胞傷害性T細胞の誘導を、東大医科学研究所 先端医療研究センターで判定する（立川班員）。

安全性：被験薬に起因する有害事象・副作用

試験実施期間：承認日（2013年10月30日）から2018年(平成30年)3月31日（症例登録締切2017年(平成29年)11月30日）

データの集計および統計解析方法：東大病院臨床研究支援センター中央管理ユニットのモニターは、症例報告書に掲載されたデータとカルテ等原資料の記載との整合性を確認する。

免疫学的評価については、東京大学医科学研究所 先端医療研究センターの立川班員のもとで実施する。中央病理診断（CPR）を東大病院病理部に設置し、「reading center」として、盲検による病理学的評価を行う。データ管理については「データセンター」を東大病院臨床研究支援センター中央管理ユニット内に設置し、匿名化されたデータの管理を委ねる。有効性及び安全性の評価については外部に第三者による「効果安全性評価委員会」を設置し、有効性と安全性を客観的に評価していくこととする。

研究計画の登録：被験者登録を開始する前に、試験計画の内容を公開登録システム（大学病院医療情報ネットワーク：UMIN）に登録する。

研究資金および利益の衝突：本試験の経費については、本厚生労働省科学研究費（医療技術実用化総合研究事業

（臨床研究・治験推進研究事業）のみで賄う。

本試験はアンジェスMG株式会社との共同研究である。共同研究者は被験薬の製造・非臨床試験での有効性、安全性情報の提供に関わるが、臨床試験の進行及びデータ測定・評価判定には関わらない。

本試験の計画・実施・報告において、試験の結果および結果の解釈に影響を及ぼすような「起こりえる利益の衝突」は、現時点では存在しないが、将来生ずる可能性がある。その場合には、被験者の不利益につながらないように努める。

試験の実施が被験者の権利・利益を損ねることがないことを確認する。

(2) E7：乳酸菌の量比最適化を含む第2世代E7乳酸菌の開発（五十君、川名、立川）

CIN3に対する本研究前の臨床試験、および本研究のCIN2に対する臨床試験においてアンジェスMG社から薬剤提供をうけたGLBL101c Cap.は、HPVのE7を乳酸菌に遺伝子導入し、一定の発現量で固定されている乳酸菌を用いている。このE7発現量（E7：乳酸菌菌体量の量比）が、粘膜免疫誘導において最適な量比であるかは不明であった。

本研究では、五十君班員によってGLBL101cと同じ乳酸菌株であるLactobacillus casei株に、様々な量比でE7を表面固定化した試料を作成し

た。マウスへの経口投与によって、GLBL101cと比較しながら、E7に対する粘膜免疫誘導能を検討する（川名、永松班員、藤井班員）。誘導能の最も高い量比を決定し、その量比になるようにE7発現系を改築する。その結果でGLBL101cより優れた粘膜免疫誘導能を示す量比が決定したら、特許出願を行う予定である。

大腸菌によるHPVE7-アンカータンパクの作成するために、HPV-16由来のE7配列(変異E7:E7Rb)に*Lactococcus lactis*由来の細胞壁結合タンパクAcmAのアンカー部分(cA)をコードする遺伝子を結合させ、発現プラスミドを作成した。このプラスミドで形質転換した組換え体により、E7Rb=cA融合タンパクを大量に産生させ、his タグを使って、回収・精製した。

乳酸菌の菌体表層へのcA=E7Rbの固定化するために、*Lactobacillus casei* IGM393株を酸処理した後、Tjibbe Bosmaら(2006)の方法で、E7Rb=E7の精製物を、菌体表層へ固定化した。固定化の確認は、蛍光顕微鏡での蛍光検出により確認した。また、E7Rb=E7の精製物の濃度を変えて乳酸菌表層に固定化し、FACSにより、菌体表層への固定化の状態を確認した。

(3) 子宮頸部リンパ球の特性の確認研究 (立川)

立川班員は、上述のように(1)のCIN2に対するGLBL101cの自主臨床試験、および本研究において今度実施

する臨床試験においてHPV分子に対する免疫誘導能を評価することを担っている(評価は盲検である)。そのために、子宮頸部リンパ球、PBMCを東大病院で採取し、いったん凍結した後、立川班員の東大医科学研究所に凍結搬送することとなる。アッセイ間の実験誤差をなくすためにこれらの免疫学的評価は同時に実施する予定である。そこで、本年度は凍結保存された子宮頸部リンパ球の特性について事前に検討した。

凍結保存されていた子宮頸部擦過細胞(通常診療での細胞診検査のため採取された子宮頸部擦過検体の余剰分)を抗CD3抗体で刺激し、IL-2存在下で培養した。培養後、抗CD3、CD4、CD8、Integrin-beta7抗体で染色し、フローサイトメトリーにて解析を行った。

(4) 子宮頸癌の腫瘍内環境調節因子の検討 (永松、藤井)

永松班員、藤井班員によって子宮における癌腫瘍内微小環境の検討を始めている。癌腫瘍内微小環境は、本研究の創薬の根幹である癌免疫療法において極めて重要な要素である。すなわち腸管粘膜を介してHPV分子を標的とした細胞性免疫を誘導しても、子宮局所の粘膜腫瘍内に免疫寛容状態が形成されていると有効な細胞傷害活性が腫瘍内で発揮できない可能性が出てくる。腫瘍内微小環境では、癌細胞、癌関連繊維芽細胞(cancer-associated fibroblast: CAF)な

どによって腫瘍浸潤リンパ球 (tumor-infiltrating lymphocyte: TIL) を抑制系に誘導する可能性がある。

本研究では子宮頸部の腫瘍内から採取した子宮頸部リンパ球を、腫瘍内リンパ球 (tumor-infiltrating lymphocyte: TIL) と考え、TIL を用いて直接的に癌ワクチンの免疫学的評価を実施している。一方、CAF についての検討は行っていない。

ヒト頸癌症例の臨床検体より CAF を分離培養した。また、第3者の末梢血を採取してそこから磁気ビーズ法を用いて NK 細胞を分離して、CAF との共培養による NK 細胞の細胞障害活性の変化を調べた。

また免疫寛容状態をもたらす代表的な因子である TGF- β を介した CAF の機能修飾にともなう NK 細胞との相互作用の変化を調べるために、CAF 培養系に TGF- β を添加して、細胞機能の変化を誘導した後に、NK 細胞との共培養を行った。

(5) HPV16E2蛋白質の精製と検出系の確立 (川名、五十君)

HPV16型プロトタイプのウイルスゲノムから E2 を大腸菌発現プラスミドにサブクローニングし、His-tag を付けた精製蛋白質を大腸菌によって作製し、His-tag カラムによって精製した。

抗 His 抗体、抗 HPV16E2 抗体を一次抗体として Western blotting 法によって蛋白質を確認した。

(倫理面への配慮)

・自主臨床研究の実施においては「臨床研究に関する倫理指針」(平成 15 年厚生労働省告示第 255 号) 従い、研究機関 (東京大学医学部) の臨床試験審査 (IRB) 委員会での審査・承認の後に、UMIN 公開 (2013 年 12 月 1 日登録、UMIN000012229) を行い、実施する予定である。また、その後の医師主導治験は、独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (PMDA) に届出を行い、GCP を遵守して実施する。なお、本研究で用いる組換え乳酸菌製剤は製造過程において加熱処理による死菌化をしたものであり、「遺伝子組換え生物等の使用などの規制による生物多様性の確保に関する法律 (カルタヘナ法)」によるところの「遺伝子組換え生物等」には当たらないことから、遺伝子治療には該当しないものであると考ええる。

(実施済みの GLBL101c 試験でも、遺伝子治療に該当しないことを確認の上で実施されている。)

・各被験者のデータについては、連結可能匿名化され保存される。個々の患者とデータの対応表は研究代表者 (川名 敬) が管理する。学会発表・論文発表などでこれらの情報が記載される際には被験者のプライバシーが確保される。

- ① 各被験者は ID 番号で表記する。
- ② 研究期間中 (5 年間) は、研究代表者 (川名 敬) が対応表及び個人データを産科婦人科学教室医局内の鍵付き金庫に保管し、管理責

任を負う。試料は番号のみを記載して冷所保存となる。

- ③ 試料は本研究以外の目的ではいっさい使用せず、研究期間中は産婦人科医局内で保管する。
- ④ 本研究期間の終了後は、将来の免疫学的蛋白質に関する研究に使用することが同意された検体を除き、全て廃棄する。研究期間終了後も保存することに同意が得られた検体は引き続き産婦人科医局内で試料番号により保管する。
- ⑤ HPV検査については希望があれば被験者に伝え、その臨床的意義を説明しカウンセリングに応じる。免疫学的検査の結果については個々の利益につながらないため被験者に伝えない。
- ⑥ 患者が研究に参加することは自由であり、参加を拒否しても一切不利益を被らない。また、研究開始後いつでも参加意思を撤回することができる。

・動物実験については、実施施設における動物実験に関する倫理規定を遵守して実施することとする。

また、五十君班員による遺伝子組換え実験は、委員会の審査を受けた後、国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則にしたがい、実験を行った。

また、立川班員においては、臨床材料の提供を受ける場合には研究目的や必要事項を文書を用いて説明し、書

面でインフォームドコンセントを得た。研究対象者への負担は、臨床上必要な検査に加えて少量の血液採取のみであり、倫理面への問題はないと判断される。本研究内容は東京大学、東京大学医科学研究所倫理審査委員会により承認されている。

永松班員、藤井班員による子宮がん臨床検体の使用については、東京大学医学部研究倫理審査委員会の承認を得て文書で同意を得た患者から採取された。

C. 研究結果

(1) CIN2を対象とするGLBL101cの有効性試験の計画と実施(川名、藤井、永松)

研究方法で記載した臨床試験

「HPV16型陽性の子宮頸部中等度上皮内腫瘍性病変(CIN2)に対する乳酸菌を利用したCIN治療薬(GLBL-101c Cap.)の探索的臨床研究」が当該施設における臨床試験審査委員会において、2013年10月30日に承認された。東大病院臨床試験支援センター、中央管理ユニットにおけるプロトコル検討委員会の審議を経て、プロトコルの軽微な変更を行った。

2014年1月にスタートアップミーティングを実施した。

2014年3月10日に第1例目の登録が開始した。3月中に3例が登録され試験が開始している。これらの症例に関する東大病院臨床研究支援センター

中央管理ユニットのモニターリングにおいては、特に問題を認めなかった。

(2) E7: 乳酸菌の量比最適化を含む第2世代E7乳酸菌の開発 (五十君、川名、立川)

大腸菌用のプラスミド pQE-31 に、*cA=E7Rb* を組み込み、大腸菌 *E. coli* JM 109 を形質転換した。抗HPV16 E7 抗体を用いた Western-blot によりその発現を確認した。得られた組換え体を大量培養し、his タグを利用し回収・精製した。Western-blot 法により画分を確認した結果、不溶性画分であることが確認された。そのため、一度タンパクを変性させて抽出し、TALON® Metal Affinity Resin を用いて精製を行った。

乳酸菌としては、*Lactobacillus casei* IGM393 を用いた。菌体表層へアンカータンパク *cA* との融合タンパクを固定化には、培養した菌体をあらかじめ酸処理を行い *cA=E7Rb* を固定化した。蛍光顕微鏡での蛍光検出により *cA=E7Rb* の *L. casei* IGM393 菌体表層への固定化を確認した。また、固定化する *cA=E7Rb* の濃度を変化させて固定化した場合の実際の表面上の *cA=E7Rb* の状態については、FACS により確認した。E7: 乳酸菌量比を段階的に変動 (10^8 cell の乳酸菌当たり、0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 μg の E7 蛋白質) させた E7 アンカー固定化乳酸菌を用意した。

これらの 5 段階の量比に設定した E7 乳酸菌に加え、(1) の臨床試験で用いている GLBL101c (10^8 cell の乳酸

菌当たり 1.0 μg の E7 蛋白質)、乳酸菌のみ (陰性コントロール) の 7 群で 5 匹ずつのマウスに経口投与 (1, 2, 4, 6 週で 5 日間/週) による免疫誘導を実施中である。

(3) 子宮頸部リンパ球の特性の確認研究 (立川)

凍結保存された子宮頸部擦過細胞は溶解後の生存細胞数の割合は末梢血単核球 (PBMC) と比べて低いことがわかった。ただし、T 細胞を抗 CD3 抗体にて非特異的に刺激し、増殖因子として IL-2 を添加し、培養を行うことはできた。培養開始時の細胞数が 10^5 個オーダーの生細胞で開始した場合、3-4 週間の培養を行うことで、増殖が確認され、ELISpot assay やフローサイトメトリー解析等の T 細胞の特異性や機能解析に必要な細胞数を確保することができた。

また、培養後の T 細胞性状解析では、T 細胞の性状解析を行うため、試験管内での抗 CD3 抗体 + IL-2 による刺激培養後の細胞を CD3, CD4, CD8、Integrin beta7 に対する抗体で染色した。その結果、CD4 陽性、CD8 陽性 T 細胞いずれもほぼ全てが Integrin beta7 が発現し、粘膜リンパ球であることが確認された。

(4) 子宮頸癌の腫瘍内環境調節因子の検討 (永松、藤井)

CAF のマーカー蛋白質である α

SMAの発現を調べることで子宮頸癌組織から分離培養した細胞がCAFであることが確認できた。

NK細胞の単独培養と比較して、CAFとの共培養に伴ってNK細胞は細胞障害活性を有意に減弱していた。この変化は臍帯静脈血管内皮細胞との共培養では生じず、CAFに特徴的な細胞特性であると考えられた。

TGF- β 刺激後の CAF では無刺激の場合と比較してNK細胞抑制作用が増強した。CAF上にTGFBR2を強制発現させたところその作用がさらに増強し、一方でsiRNAを用いてTGFBR2の発現抑制を行うと同作用の減弱を生じた。これら一連の結果によって、CAFによるNK細胞の細胞障害活性抑制作用を制御する分子機構として、TGFBR2を介したCAFへのTGF- β シグナル経路が重要であることが示唆された。

(5) HPV16E2蛋白質の精製と検出系の確立 (川名、五十君)

HPV16E2蛋白質の発現・精製が確認された。検出系も確立したことから、乳酸菌での発現系を作製するために五十君班員によって、乳酸菌プロモーターの下流に遺伝子導入している。

D. 考察

本年度は、子宮頸癌に対するHPV分子標的免疫療法の実用化のステッ

プとして、現行の試験薬であるGLBL101cの有効性を探るための自主臨床試験の登録を開始した。本研究ではHPV分子標的免疫療法を実用化するための乳酸菌をベースとした製剤を開発する5年計画のロードマップを計画した(図参照)。そのスタートラインが本年度に開始した自主臨床試験である。このロードマップでは、子宮頸癌およびその前駆病変(CIN)をターゲットにした3つの製剤開発を用意している。

CINは国内で年間約10万人が罹患し、その多くが30才前後の女性である。本研究の開発薬剤は、CIN1, 2, 3の全ての段階に対応した治療薬であり、世界初のCIN治療薬と期待される。また、既存治療である外科的治療を回避できるため、妊娠時の周産期予後も改善される。

子宮頸癌とその前癌病変CIN2-3ではE7分子が発現していることから、標的分子はE7になる。最も初期病変であるCIN1はE2分子が発現していることから、標的分子はE2になる。いずれの分子も各病変において恒常的に全例で発現し、かつヒトにおける免疫原性がある。

E7標的免疫療法は、2012年に終了したCIN3に対する臨床試験、および本年度に開始したCIN2に対する臨床試験で試験薬として用いたGLBL101cが第一世代となる。CIN3は早期に癌へ移行することから倫理面を配慮し、試験薬群のみの第I/IIa相当の試験とした。本研究ではフォロ

ーアップが許容されるCIN2を対象にしたことから、プラセボ群を置いて第IIb相に準じたデザインの二重盲検ランダム化比較試験とした。これによってGLBL101cの有効性を高いエビデンスレベルで証明できると考える。そのために東大臨床試験支援センターに委託する体制を整えるために一定の時間を要した。今回の臨床試験を医師主導で行う理由を明確にした契約を企業と締結し、透明性を持たせている。

一方、GLBL101cの弱点を補強するための第二世代のE7標的免疫療法の開発を始めている。免疫療法は安全性が高い反面、有効性については宿主の生体反応に左右される。特に、ワクチン抗原に対する免疫寛容を引き起こさずに癌抗原を発現する細胞に対する細胞傷害活性を誘導する必要がある。そのためには、乳酸菌と標的分子の量比の最適化が重要である。GLBL101cの発現システムでは、量比の最適化は不可能であったことから、本年度は、第二世代HPV分子発現乳酸菌として、量比を変動させた薬剤を開発し、その免疫誘導能を比較することで最適な量比を決定し、さらにそれを製剤化するプロジェクトを開始した。現在、様々なE7発現乳酸菌を用意して免疫実験を行っているので、次年度初頭には結果が出る見込みである。この結果を以て、本研究班から特許申請を行い、その後、先進医療Bを申請のうえ、医師主導治験を検討したいと考えている。

その結果を待って、E2発現乳酸菌の作製を開始させるために、HPV16型E2の精製を終了した。

本臨床試験において、CIN病変がある子宮頸部粘膜にホーミングしている子宮頸部リンパ球の免疫学的評価は試験薬の薬効を知るうえで非常に有効な手段である。病変そのものに局在するリンパ球を採取できるのが本研究の長所の1つである。一方で、子宮頸部リンパ球は末梢血と比して採取量が少なくなるため、保存、評価法を子宮頸部リンパ球用に最適化することが望ましい。本研究では採取した子宮頸部リンパ球のcharacterizationを行い、かつそのex vivoで増加させることで評価の範囲を拡充することを目指した。サンプル間でのばらつきがあったが、培養による細胞数の増加が確認された。培養後も、integrin $\beta 7$ がすべてで表出していることから粘膜リンパ球の性質を維持していると言える。免疫学的効果の評価系として子宮頸部リンパ球が試料になることを確認した。

E. 結論

本研究では、CIN2に対するHPVE7標的免疫療法の第IIb相に準じた二重盲検ランダム化自主臨床試験を開始した。臨床試験の質と透明性を高めるための準備を十分に行った後に試験を開始している。

本年度は、第二世代のE7標的免疫療

法は特許出願をにらんで独自性を持たせた製剤を選定する実験に入った。基礎実験の結果をもとに、次年度には特許出願のうえ、新規薬剤を製剤化する予定である。

HPV分子を標的とする治療法は未だ世界的にも存在しない。粘膜免疫を介した免疫療法も存在しない。これらを融合させることで、独創性のある治療法の開発を始めた。

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Taguchi A, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Isobe Y, Nagasaka K, Adachi K, Matsumoto Y, Arimoto T, Koga K, Wada-Hiraike O, Oda K, Kang JX, Arai H, Arita M, Osuga Y, Fujii T, Matrix metalloproteinase (MMP)-9 in the cancer-associated fibroblasts (CAFs) is suppressed by omega-3 polyunsaturated fatty acid in vitro and in vivo, *PLOS One*, in-press, 2014
- 2) Inaba K, Nagasaka K, Kawana K, Arimoto T, Matsumoto Y, Tsuruga T, Mori-Uchino M, Miura S, Sone K, Oda K, Nakagawa S, Yano T, Kozuma S, Fujii T, High-risk HPV correlates with recurrence after laser ablation for treatment of patients with CIN3: a long-term follow-up retrospective study, *J Obstet Gynaecol Res*, E-pub, 2013
- 3) Nagasaka K, Kawana K, Osuga Y, Fujii T, PDZ Domains and Viral Infection: Versatile Potentials of HPV-PDZ Interactions in relation to Malignancy, *Biomed Res Int*, 2013:369712. E-pub, 2013
- 4) 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 γ downregulates ERK signaling and suppresses oncogene-induced cell transformation, *PLOS One*, 8: e53752, 2013
- 5) 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
- 6) Miyamoto Y, Nakagawa S, Wada-Hiraike O, Seiki T, Tanikawa M, Hiraike H, Sone K, Nagasaka K, Oda K, Kawana K, Nakagawa K, Fujii T, Yano T, Kozuma S, Taketani Y, Sequential effects of the proteasome inhibitor bortezomib and chemotherapeutic agents in uterine cervical cancer cell lines, *Oncol Rep*, 29: 51-57, 2013
- 7) 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
- 8) Kawana-Tachikawa A, Llibre JM, Bravo I, Escrig R, Mothe B, Puig J, Puertas MC, Martinez-Picado J,

- Blanco J, Manzardo C, Miro JM, Iwamoto A, Pozniak AL, Gatell JM, Clotet B, Brander C; MARAVIBOOST investigators. Effect of Maraviroc Intensification on HIV-1-Specific T Cell Immunity in Recently HIV-1-Infected Individuals. *PLoS One*. 9:e87334, 2014.
- 9) Shimizu A, Kawana-Tachikawa A, Yamagata A, Han C, Zhu D, Sato Y, Nakamura H, Koibuchi T, Carlson J, Martin E, Brumme CJ, Shi Y, Gao GF, Brumme ZL, Fukai S, Iwamoto A. Structure of TCR and antigen complexes at an immunodominant CTL epitope in HIV-1 infection. *Sci Rep*. 3:3097, 2013
- 10) Teeranaipong P, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Koibuchi T, Nakamura H, Koga M, Kondo N, Gao GF, Hoshino H, Matsuda Z, Iwamoto A. Development of a rapid cell-fusion-based phenotypic HIV-1 tropism assay. *J Int AIDS Soc*. 16:18723, 2013.
- 11) Sayama S, Nagamatsu T, Schust DJ, Itaoka N, Ichikawa M, Kawana K, Yamashita T, Kozuma S, Fujii T. Human decidual macrophages suppress IFN- γ production by T cells through costimulatory B7-H1:PD-1 signaling in early pregnancy. *J Reprod Immunol*, 100: 109-117, 2013
2. 学会発表
- 1) Kawana K, Immunotherapy for cervical neoplasia through HPV E7-specific mucosal immunity, The 51th Annual meeting of Japanese Society of Clinical Oncology (JSCO2013), Kyoto, 2013. 10. 25
- 2) Kawana K, Immunology of HPV infection and pathophysiology of cervical cancer, The 23rd Asian and Oceanic Congress of Obstetrics and Gynecology (AOCOG2013), Bangkok, 2013. 10. 21
- 3) Kawana K, A novel approach: Immunotherapy for cervical intraepithelial neoplastic (CIN) lesions through HPV E7-specific mucosal immunity, The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2013.9.11
- 4) 川名 敬, HPV と子宮頸癌～HPV を標的とした創薬の臨床応用～第 61 回日本ウイルス学会、平成 25 年 11 月、京都
- 5) 川名 敬, HPV 感染症を見直すー基礎から臨床までー、日本性感染症学会教育講演、11 月、岐阜
- 6) Nakayama-Hosoya K, Ishida T, Hosoya T, Nakamura H, Koga M, Koibuchi T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A. Low IL-2 expression by epigenetic modification is associated with immunosenescence in HIV non-controllers. Keystone symposia, HIV Pathogenesis – Virus vs Host. Banff, Alberta, Canada, Mar 2014.
- 7) Meribe SC, Hasan Z, Gatanaga H, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Oka S, Ueno T. Linkage between disease status and a naturally-arising mutation in functional region of HIV-1 Nef. 21th conference on retroviruses and opportunistic infections. Boston, USA. Mar 2014.
- 8) Kawana-Tachikawa A. The 9th China-Japan Laboratory Workshop: Pathogenesis, Gene regulation, and signal transduction. “Interaction between virus and host immune response during chronic HIV-1 infection.”, Beijing, China, Nov 2013.
- 9) Nakayama-Hosoya K, Ishida T, Hosoya T, Nakamura H, Koga M, Koibuchi T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A. The essential role of epigenetic regulation for CD4+ T cell dysfunction during

chronic HIV-1 infection. AIDS Vaccine 2013 Conference. Barcelona, Spain, Oct 2013.

10) Meribe SC, Kawana-Tachikawa A, Takamasa Ueno T. Naturally arising amino-acid polymorphisms within functional regions of HIV-1 Nef influence viral persistence in vivo. 第42回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2013年12月.

11) 石坂彩、立川(川名)愛、中村仁美、古賀道子、細谷紀彰、鯉渕智彦、野本明男、岩本愛吉、水谷莊利. HIV-1 陽性者末梢血からの HIV-1 短鎖 RNA の検出および定量法の確立. 第27回日本エイズ学会学術集会, 熊本, 2013年11月.

12) 立川(川名)愛、韓忠勇、清水晃尚、細谷紀彰、中村仁美、古賀道子、鯉渕智彦、岩本愛吉. 重複する CTL エピトープ部位に生じた1

アミノ酸変異によるエピトープの消滅と出現. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013年11月.

13) 井上知子、川名敬、田口歩、大須賀穰、藤井知行. CIN治療を目的としたE7発現型乳酸菌HPV経口ワクチンによるE7特異的粘膜免疫誘導能は合成セラミド α -GalCerと漢方薬併用経口投与により増強する. 日本産科婦人科学会第65回学術講演会 2013年5月

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

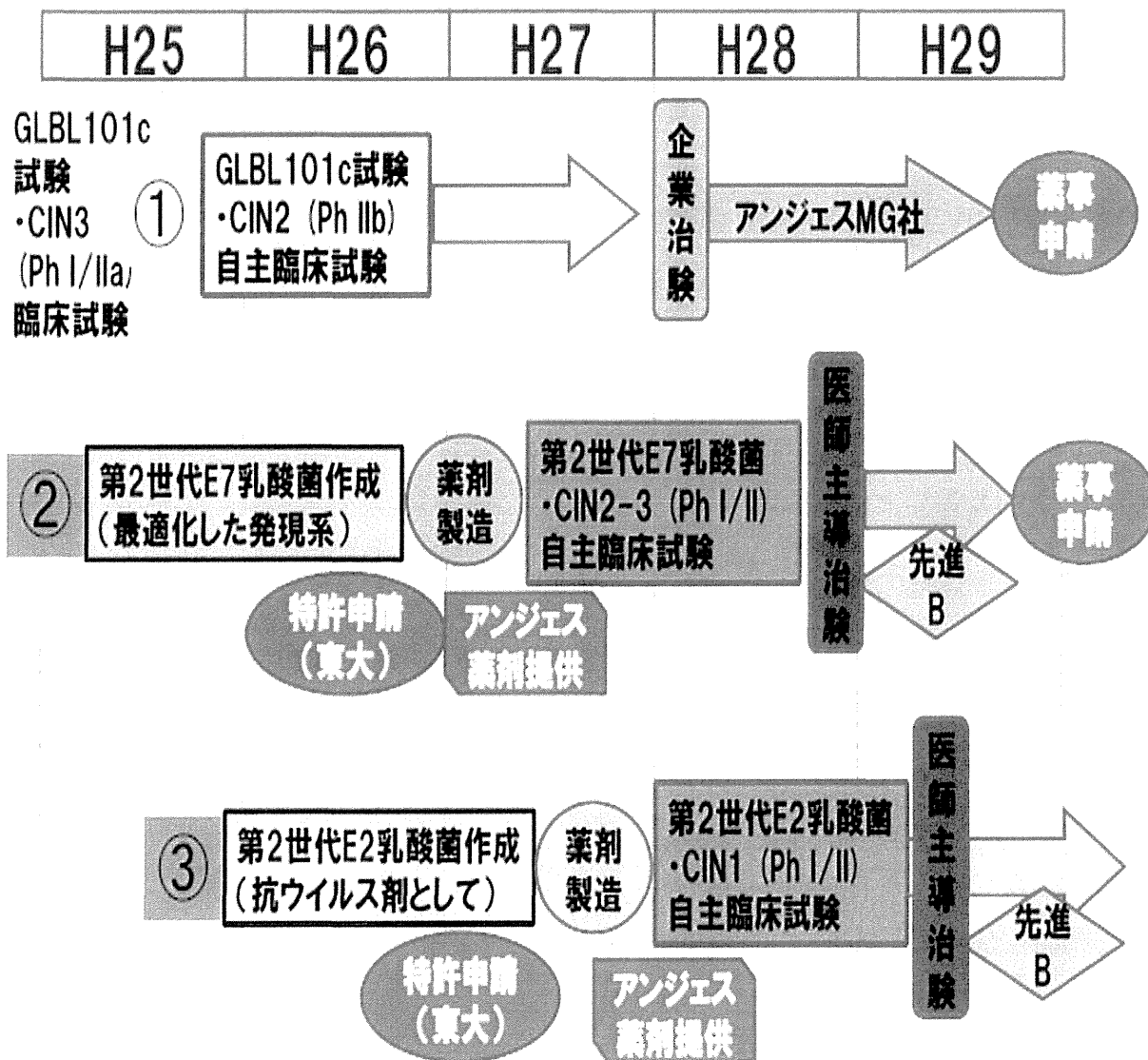
なし

2. 実用新案登録

なし

参照) HPV分子標的免疫療法の開発ロードマップ

HPV分子標的治療薬開発までのロードマップ



II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
（総括・分担）研究報告書

乳酸菌菌体成分精製分析に関する研究

研究分担者 五十君 静信
国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部

研究要旨

HPV E7を標的にしたE7乳酸菌経口薬(GLBL101c)の探索的第1/11a相臨床試験は実施済みである。これは世界で初の経口による抗HPV細胞性免疫を粘膜免疫に誘導した治療薬である。経口投与によって腸管粘膜で抗E7細胞性粘膜免疫が惹起され、子宮頸部にホーミングし、子宮頸癌前癌病変(CIN3)に対する治療効果を示した。この成功を受け、本分担研究では、その後継である第二世代E7乳酸菌経口薬の開発に関する研究を行う。GLBL101cの第二世代経口薬（E7標的免疫療法）の開発をめざし、HPV E7と乳酸菌の最適な量比を検討することにより、より効果の高い製剤を作出することにした。まず、E7と乳酸菌の量比を自由に変化させることのできる遺伝子組換え技術を確認した。この技術を用いて、E7エピトープと乳酸菌を様々な量比で菌体表面に結合させた製剤を作出した。FACSを用いた検討により、意図する量比の製剤が作成できていることが検証された。作出した製剤は研究チームに提供し、第一世代の製剤であるGLBL101cと比較してその免疫効果に関する評価を行い、E7と乳酸菌の最適な組成を検証する予定である。

A. 研究目的

HPV E7を標的にしたE7乳酸菌経口薬(GLBL101c)の探索的第1/11a相臨床試験により、その効果が実証されたことから、その後継である、より効果の高い第二世代経口薬（E7標的免疫療法）の開発をめざしE7と乳酸菌を任意の割合で結合可能な技術を開発し、様々な量比の製剤を作成することを目的とした。作成した製剤は、今後マ

ウスを用いた評価系で免疫効果の最も高いことが期待されるE7エピトープと乳酸菌の最適な量比を検討する予定である。

B. 研究方法

①大腸菌によるE7-アンカータンパクの作成