

201313011A (1/2)

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25年度 総括研究報告書

研究代表者 温川 恭至

平成26(2014)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 | | |
| 温川 恭至 | | |
| II. 分担研究報告 | ----- | 13 |
| 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 | | |
| 温川 恭至 | | |
| 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の生活環と遺伝子機能の解明 | | |
| 酒井 博幸 | | |
| 4. HPV と HBV を標的とする多価ワクチンの開発 | | |
| 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 | | |
| 大和 建嗣 | | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- | 45 |
| 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

温川 恭至

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 温川 恭至 国立がん研究センター

研究所ウイルス発がん研究分野 主任研究員

研究要旨 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 蛋白を抗原とした第二世代 HPV 感染予防ワクチン開発を進めた。B 型肝炎ウイルスワクチンである HBs 抗原と L2-56/75 との融合蛋白（HBs-56/75）を新たに作製した。HBs-56/75 抗原は、抗 HBs 抗体に加え交差性 HPV 中和抗体を効率よく誘導した。HBs 抗原ワクチンは安全性・製造法が確立しておりコストも安いことから、幅広い型の HPV と HBV に有効な多価ワクチンとして有望である。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）の探索的Ⅰ/Ⅱa 相臨床試験を終了し、CIN3 から CIN2 への退縮と手術の回避例 80%(8/10)における免疫学的解析を進めた。子宮頸部における 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 ゲノムを複製維持する細胞株を樹立し、ゲノム内にレポーター遺伝子を搭載することで複製阻害剤のハイスループット スクリーニングも可能な細胞株を樹立した。新たな子宮頸がん治療法のシーズとなる探索研究を進めた。

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・治療法が開発が期待される。

HPV16,18 の L1 蛋白を抗原とする現行 HPV 感染予防ワクチンは 16、18 型以外に対する感染予防効果がな

いか低い。一方、先行研究である神田班の成果として見出された L2 を抗原とする第二世代 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二世代 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既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

クチンは安価に製剤化が可能で安全性も高いと考えられるため、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。ウイルスがコードする唯一の複製関連蛋白であるE1ヘリカーゼを標的とした治療法が期待されていたが、研究代表者らはHPVゲノムの維持複製にはE1ヘリカーゼが不要であることを証明し、異なるアプローチによる複製阻害剤の開発が必要であることを示した。これに基づき、HPV複製阻害剤のハイスループット・スクリーニング系の開発を進める。

一方、研究代表者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、研究協力者が開発した最新のナノ粒子ミセルDDSを用いることで、新たな子宮頸がん予防・治療のための新たなシーズを開拓する。

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。HPV L1蛋白とL2蛋白の一部(L2-56/75)の融合蛋白を抗原とする場合、現行HPVワクチンと同等の比較的高い製造コストが予想され、発展途上国における普及は困難である。一方、HBV感染予防ワクチン(HBs抗原ワクチン)は安価で高い安全性も確認されているが国内における接種率は低く、ほぼ医療従事者に限られている。そこで、HBs抗原とL2-56/75の融合蛋白を抗原とする安価な第二世代ワクチン開発を開始した。

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が、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、これまでの三次元培養法では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 相探索的臨床試験は昨年度中に終了した。今年度は CIN3 から CIN2 への退縮と手術の回避例 80%(8/10)の追跡調査と免疫学的解析を進めた。末梢血および病変部の生検組織より特異的

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研究協力者である片岡一則(疾患生命工学センター)らと共同開発し、腫瘍への薬剤集積性や抗腫瘍効果を種々の子宮頸がん細胞株を用いて解析した。また、E6,E7を標的としたsiRNAのノックダウン効果と特異性を落とさずに細胞毒性を減らすためのDNA-RNAハイブリッド型核酸の改良を進めた。

HPV複製機構の解明と複製阻害剤開発のため、異なる位置や方向でレポーター遺伝子を搭載した環状HPVゲノムを複製・維持する細胞株を樹立し、ゲノムコピー数とレポーター遺伝子の発現量を解析し、複製阻害剤の効果を評価できる系を作成した。

(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

現行の第一世代HPV感染予防ワクチンは型特異性の高いL1蛋白質を抗原とするため、子宮頸がんに対してはほぼ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は、全ての発がん性HPVの感染予防効果を期待できる。神田班の成果であるこの第二世代HPV L2 56/75-VLPワクチンの製品化を目指し、2010年10月 武田薬品工業(株)による事業化が進められている。全てのキメラ抗原は、HPV16-VLPに結合する抗L2抗体を誘導した。なかでも、HBs-56/75-127により誘導される抗L2抗体価が最も高く、調べた全ての高リスク型HPV-VLPへの結合が確認された。また、抗HBs-56/75-127血清は、HPV16、18、35の偽ウイルスを中和した。全てのキメラ抗原は、L2-56/75領域にある2つのエピトープのうち13Bを認識する抗体を優位に誘導したが、HBs-56/75-127は、他のキメラ抗原に比べ、24Bエピトープを認識する抗体も効率よく誘導し

た。全てのキメラ抗原は、抗HBs抗体を誘導した。

2) 経口治療ワクチン

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。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Ⅰ/Ⅱa相臨床試験を3年間にわたり実施した。今年度は7症例を追加し臨床試験を終了した。予想された通りCIN3患者全17例に対し、全ての用量で有害事象はなく、CIN3病変の退縮も観察されている。子宮頸部粘膜リンパ球への抗E7細胞性免疫誘導の最大有効量(1g/日)における奏効率(CIN3退縮率)は80%(8/10)であった。退縮後のCIN3への増悪も観察されていない。集めた検体の病理、免疫学的解析からもその有効性と免疫反応との間の相関が確認されている。これは、経口薬によりCIN3に対する治療効果を示した世界初の成果である。

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、異なる型のHPVゲノムを持つ表皮角化細胞から三次元培養を用いた分化誘導により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、薬剤添加によりHPVゲノムを100-1000倍に増幅させると同時に、分化を誘導することでL1, L2蛋白質の発現誘導にも成功した。L1, L2蛋白質の誘導には後期プロモーターと考えられるp670(HPV16)からの転写誘導に加え、細胞分化に高度に依存することを見出した。これにより平皿上でのHPV粒子産生の目途が立った。

4) HPV複製阻害剤スクリーニング系の開発

独自に開発した遺伝子組換えHPVゲノムを複製維持する細胞株の簡便な樹立法を用い、HPV16及び18の複製における制御遺伝子の機能解析の結果、感染後の初期複製ならびにウイルス粒子産生時の後期複製にはウイルスがコードするヘリケースE1が必須であるものの、未分化基底細胞における維持複製には必要ないことを明らかにした。本成果はこれまで米国などで開発中のE1阻害剤はHPV病変の完治にはそれほど期待できないことを示しておりJ. Virol誌のSpotlightにも取り上げられた。同じ技術を用いL1, L2領域に分泌型ルシフェラーゼ遺伝子を挿入したHPVゲノムを複製する角化細胞株の樹立に成功した。この細胞株はHPV複製コピー数をほぼ同

時性にモニターすることができるため、HPV複製阻害剤スクリーニング系に用いることが可能である。一方、E7がウイルス生活環と細胞増殖性維持に重要であること、E6がゲノムコピー数の維持に関与すること、E7による上皮過形成誘導機構にはJNKの活性化が重要であることを見出した。

5) ウイルス遺伝子を標的とした予防と治療

従来報告に反し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配列をもとに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、RNAの一部をDNAに置き換えたdsRDCとidRNAを開発した(特許出願中)。これら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。腫瘍において

特異的にMG132の蓄積が維持されたことからナノミセルによるEPR効果によるものと推測された。

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英語圏では「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、大規模臨床試験に必要な技術開発を進めているが、製品化への目途は立っていない。今年度は新たにHBs抗原とL2蛋白の融合蛋白を抗原とするワクチン開発を進めた。昨年度までに、13B、及び24Bエピトープをそれぞれ認識するモノクローナル抗体MAb13B、及びMAb24Bを分離し、それらの中和活性を調べ、各MAb単独よりも2つのMAbを混ぜた場合、より高いHPV中和活性が認められることを明らかにしている。今回作成した3種類のHBs/L2キメラ抗原のうち、HBs-56/75-127が最も効率よく抗HPV中和抗体を誘導した理由の一つとして、この抗原が13Bだけでなく24Bエピトープに対する抗体も誘導したことが考えられる。全てのキメラ抗原は

抗HBs抗体を誘導したことから、HBVへの有効性も維持していることが期待される。HBsワクチンは製造法・安全性が確立しており製造コストは現行HPVワクチンに比べ著しく安価である。HBs/L2キメラワクチンも安価に製造できると共にHBVワクチンとしての機能も維持している。そのため発展途上国でも投与可能な安価な感染予防ワクチンとして有望である。また現行HPVワクチンの適応は女性に限られているが、近年のHPV陽性中咽頭がんの増加を考慮すると、男性への適応拡大への対応も可能なワクチンである。

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、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Ⅰ/Ⅱa相臨床試験を昨年度までに終了し、至適投与量における奏効率（退縮率）は80%（8/10）であった。経口薬によりCIN3に対する治療効果を示した世界初の成果である。子宮頸部リンパ球におけるE7特異的CTLの誘導と治療効果との間には明らかな相関が見られ、本治療ワクチンの効果が期待通りの機構によることを強く示唆している。さらに、アジュバント併用の有用性、乳酸菌・HPV分子の量比の再検討等による改良を非臨床で進め、第二世代乳酸菌経口薬を製剤化し、研究期間内に臨床試験の実施をめざす。一方で、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り、今回の経口治療ワクチン単独ではCIN病変の消失までは期待できないことも明らかとなった。今回の結果をもとにCIN1/2病変の排除も期待できる経口治療ワクチン開発を進める必要がある。

E6,E7の高発現はCIN3以上の病変の維持に必須であることから siRNA

やプロテオソーム阻害剤による E6,E7 の機能抑制による予防・治療法の開発を進めている。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いるが、製剤化には時間がかかるため既に臨床利用が認可されているベルケードを用いた臨床試験を優先する。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が現状では DDS の開発に待つところが大きい。

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。さらに、新たに開発したHBs抗原にHPV16 L2-56/75領域を挿入したキメラ抗原は、幅広い型のHPVとHBVの双方に有効な多価ワクチンとして有望である。

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相臨床試験を終了し、CIN3からCIN2への退縮と外科的手術の回避を80% (8/10)で

観察し有望な結果を得ている。今後は、ワクチンのさらなる改良と共に、研究期間内の大規模臨床試験への橋渡しを目指している。さらにCIN1/2に対する経口治療ワクチン開発も今後推進すべき課題である。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。ミセル化など投与方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。

また、米国などにおいて有望な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を示している。本研究では、HPV複製阻害剤の開発に必要なハイスループットのスクリーニング系の開発に成功した。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

Yugawa T, Nishino K, Ohno S, Nakahara T, Fujita M, Goshima N, Umezawa A, Kiyono T. Noncanonical NOTCH signaling limits self-renewal of human epithelial and induced pluripotent stem cells through ROCK activation. *Mol Cell Biol* 33:4434-47, 2013.

Iwahori S, Kohmon D, Kobayashi J, Tani Y, Yugawa T, Komatsu K, Kiyono T, Sugimoto N,

Fujita M. ATM regulates Cdt1 stability during the unperturbed S phase to prevent re-replication. *Cell Cycle* 13: 471-481, 2014.

Mori S, Kusumoto-Matsuo R, Ishii Y, Takeuchi T, Kukimoto I. Replication interference between human papillomavirus types 16 and 18 mediated by heterologous E1 helicases. *Virology*, 2014 11:11.

Kukimoto I, Maehama T, Sekizuka T, Ogasawara Y, Kondo K, Kusumoto-Matsuo R, Mori S, Ishii Y, Takeuchi T, Yamaji T, Takeuchi F, Hanada K, Kuroda M. Genetic variation of human papillomavirus type 16 in individual clinical specimens revealed by deep sequencing. *PLoS One*; 2013 8: e80583.

Ishii Y, Nakahara T, Kataoka M, Kusumoto-Matsuo R, Mori S, Takeuchi T, Kukimoto I. Identification of TRAPPC8 as a host factor required for human papillomavirus cell entry. *PLoS One*, 2013 8: e80297.

Kashiyama T, Oda K, Ikeda Y, Shiose Y, Hirota Y, Inaba K, Makii C, Kurikawa R, Miyasaka A, Koso T, Fukuda T, Tanikawa M, Shoji K, Sone K, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Kawana K, Nakagawa S, Matsuda K, McCormick F, Aburatani H, Yano T, Osuga Y, Fujii T, Antitumor activity and induction of TP53-dependent apoptosis toward ovarian clear cell adenocarcinoma by the dual PI3K/mTOR inhibitor DS-7423, *PLOS One*, 2014

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

Tanikawa M, Wada-Hiraike O, Yoshizawa-Sugata N, Shirane A, Hirano M, Hiraike H, Miyamoto Y, Sone K, Ikeda Y, Kashiyama T, Oda K, Kawana K, Katakura Y, Yano T, Masai H, Roy AL, Osuga Y, Fujii T,

Role of multifunctional transcription factor TFII-I and putative tumour suppressor DBC1 in cell cycle and DNA double strand damage repair. *Br J Cancer*, 109: 3042-3048, 2013

Asada K, Kawana K, Teshima S, Saito A, Kawabata M, Fujii T, Poor prognosis of ovarian cancer with large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC): case report and review of literatures, *J Obstet Gynaecol Res*, E-pub, 2013

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

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

Halimi SA, Maeda D, Shinozaki-Ushiku A, Koso T, Matsusaka K, Tanaka M, Arimoto T, Oda K, Kawana K, Yano T, Fujii T, Fukayama M, Claudin-18 over expression in intestinal-type mucinous borderline tumor of the ovary, *Histopathology*, E-pub, 2013

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

Ichinose M, Fujimoto A, Osuga Y, Minaguchi T, Kawana K, Yano T, Kozuma S, The Influence of Infertility Treatment on the Prognosis of Endometrial Cancer and Atypical Complex Endometrial Hyperplasia, *Int J Gynecol Cancer*, 23: 288-293, 2013

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*, 128: 209-214, 2013

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.

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.

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

Arimoto T, Oda K, Nakagawa S, Kawana K, Tsukazaki T, Adachi K, Matsumoto Y, Yano T, Kozuma S, Taketani Y. Retreatment with nedaplatin in patients with recurrent gynecological cancer after the development of hypersensitivity reaction to carboplatin. *J Obstet Gynaecol Res*. 39: 336-340, 2013

Kashiyama T, Oda K, Kawana K, Arimoto T, Kanetaka Y, Takazawa Y, Maeda D, Nakagawa S, Yano T, Kozuma S. Low-grade endometrial stromal sarcoma developing in a postmenopausal woman under toremifene treatment for breast cancer. *J Obstet Gynaecol Res*. 39: 424-429, 2013

Kajitani N., Satsuka A., Yoshida S. and Sakai H.: HPV18 E1^{E4} is assembled into aggresome-like compartment and involved in sequestration of viral oncoproteins. *Frontiers in Virology* 4: article 251, 2013.

article 251, 2013.

Yamamoto M., Onogi H., Kii I., Yoshida S., Iida K., Sakai H., Abe M., Tsubota T., Ito N., Hosoya T., and Hagiwara M.: Novel CDK9-selective inhibitor prevents replication of broad DNA viruses. *J. Clin. Invest.* (in press, 2014)

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*.102:605-613, 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*. 18: 587-597, 2011

Saito R1, Suzuki H, Yamada T, Endo S, Moriwaki T, Ueno T, Hirose M, Hirai S, Yamato K, Mizokami Y, Hyodo I. Predicting skin toxicity according to EGFR polymorphisms in patients with colorectal cancer receiving antibody against EGFR. *Anticancer Res*.33:4995-8, 2013

Ueno, T, Endo, S, Saito, R., Hirose, M., Hirai, S., Suzuki, H., Yamato, K., and Hyodo, I. The Sirtuin Inhibitor Tenovin-6 Upregulates Death Receptor 5 and Enhances Cytotoxic Effects of 5-Fluorouracil and Oxaliplatin in Colon Cancer Cells. *Oncol Res*. 21: 155-164, 2013

2. 学会発表

中原 知美、田中 克征、大野 真一、温川 恭至、清野 透 ヒトパピローマウイルス 16 型のゲノム複製に関する宿主因子の解析 / Cellular factors involved in suppression of human papillomavirus type 16 (HPV16) genome replication in keratinocytes. 第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、2013 年 10 月

中原 知美、江川 長靖、大野 真一、温川 恭至、清野 透 レポーター遺伝子を搭載したヒトパピローマウイルス 16 型 (HPV16) ゲノムの作製と評価 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、2013 年 11 月

Mori S, Kusumoto-Matsuo R, Kukimoto I. Molecular mechanism of replication interference between HPV16 and HPV18. DNA tumor virus meeting 2013 (Birmingham)

森 清一郎、松尾 理加、柗元 巖、ヒトパピローマウイルス16型と18型間での複製干渉機構、第61回日本ウイルス学会学術総会 (神戸)

柗元 巖、森 清一郎、近藤 一成、個々の臨床検体における HPV16 ゲノム多様性の解析、第72回日本癌学会学術総会 (横浜)

近藤 一成、佐藤 奈加子、角田 肇、森 清一郎、竹内 隆正、石井 克幸、柗元 巖、子宮頸部細胞診異常者の年齢と HPV 型の関連における検討、第72回日本癌学会学術総会 (横浜)

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

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

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

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

川名 敬、尖圭コンジローマに対するレーザー蒸散治療例における母子感染率の検討、日本性感染症学会シンポジウム、平成 25 年 11 月、岐阜

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

梶谷直子、酒井博幸: HPV E1^{E4} はアグロソームを形成しウイルス因子のタンパク量制御に関与する。第 72 回日本癌学会学術総会、横浜、2013 年 10 月 3 日-5 日

梶谷直子、酒井博幸: Human papillomavirus (HPV) E1^{E4} は aggresome を形成する。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 10 日-12 日

Kenji Yamato, Takuma Nakajima, Ichiro Nakagawa

Enhanced specificity of HPV16 E6E7 siRNA by RNA-DNA chimera modification 第 3 3 回日本分子生物学会年会 平成 2 2 年 1 2 月 神戸

Kenji Yamato, Shinji Endo

AGO2-association, microRNA suppression and cytotoxicity of RNA-DNA chimera modified siRNA 第 3 4 回日本分子生物学会年会 平成 2 3 年 1 2 月 横浜

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

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 2 4 年 1 2 月 博多

上野 卓教、遠藤慎治、齋藤梨絵、廣瀬充明、平井 祥子、鈴木英雄、大和 建嗣、兵頭一之介 大腸癌細胞株における sirtuin 阻害剤 tenovin-6 の抗腫瘍効果 第 7 2 回日本癌学会学術総会 平成 2 5 年 1 0 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/JP2013/082094

HPV/HBs キメラタンパク質を有効成分とする HPV 感染症及び/又は B 型肝炎用ワクチン
出願日: 2013 年 11 月 28 日

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, CabralHoracio, 宮本雄一郎, 中川俊介, 松本陽子

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 発明者：森清一郎他

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

特許出願番号：特願 2012-138943 「粘膜免
疫賦活化剤及びHPV感染症治療用経口医
薬組成物」 出願日：2012/6/20 出願人：国
立大学法人東京大学 発明者：川名敬他

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
温川 恭至
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 の生活環と遺伝子機能の解明
酒井 博幸
4. HPV と HBV を標的とする多価ワクチンの開発
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. 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
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 温川恭至 国立がん研究センター研究所

ウイルス発がん研究分野 主任研究員

研究要旨 正常ヒト子宮頸部角化細胞において環状HPV16ゲノムを細胞当たり約50コピーで安定に複製維持する細胞に、外来性E1とE2の発現を薬剤により誘導できる細胞集団を作製し、クローニングにより複数の細胞株を得て解析を進めた。ドキシサイクリンの添加によりHPV16ゲノムのコピー数が細胞当たり約1万コピーに増幅した。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組み合わせにより平皿培養細胞からの成熟HPVゲノムを精製できたが、それらの感染性を確認するには至らなかった。一方で、ゲノム増幅の際、NFkBの活性化が認められ、ゲノム増幅を抑制していることを見出した。NFkBは、E1のタンパク分解を促進することによりHPVゲノム複製を調節する可能性が示唆された。NFkBによるゲノム複製調節機構を破綻させることにより、(1)さらに効率良くコピー数を増加しウイルス産生系へ応用できるだけでなく、(2)持続感染細胞におけるHPVゲノム維持機構に介入し得る可能性を得た。

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が複数のグループより報告されており、中和活性を正しく評価するためには本物のHPV粒子を用いる必要がある。しかし、HPVは角化細胞の分化に伴いゲノムを増幅したのち分化に伴う後期遺伝子の発現誘導によりパッケージングされることから、*in vitro*における再現は困難である。従来の方法では、安定供給の難しい初代ヒト角化細胞にHPVゲノムを導入した後、3次元培養により角化細胞の分化を誘導することにより少量

のウイルス粒子を回収できることが報告されているにすぎない。本研究においては不死化したヒト正常角化細胞で環状HPVゲノムを安定して維持する細胞株の樹立とともに、平皿培養においてHPVゲノムを増幅、パッケージング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有効な新しい戦略を打ち立てる研究基盤を確立する。

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

頸部角化細胞株において、外来性にE1とE2の発現をドキシサイクリン添加により誘導できる細胞集団の作製に成功している。E1単独、E2単独、E1+E2の発現誘導により環状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。

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。密度勾配遠心法により成熟ウイルス粒子と思われる分画を精製し、ウイルスDNAの検出により回収ウイルス粒子量を推定した。

さらに、HPV複製阻害剤のスクリーニングを簡易に行うために、レポーター遺伝子を搭載したHPVゲノムを種々作製し、それらの有用性について検討した。HPVゲノム後期遺伝子コード領域内の様々な部分を分泌型ルシフェラーゼ発現カセットと置換したHPVゲノムを作製し、皮膚及び子宮頸部由来の角化細胞に導入後、ゲノム複製効率とレポーター遺伝子の発現量について検討した。

(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添加により誘導すると、ゲノムは24時間以内に細胞あたり約50コピーから1万コピー以上に増幅した。しかし、E1とE2の発現誘導後にはATMおよびATRの活性化やNFκBの活性化と共に細胞増殖抑制が誘導された。ATMおよびATRを含むPI3Ksを抑制する阻害薬ウォルトマニン添加や、NFκB活性化を抑える分解抵抗性のIkBの高発現によりゲノムコピー数は更に約2倍以上増加することが示された。さらに、NFκB活性化を抑制すると、E1のタンパク分解が抑制されることを見出した。NFκBは、E1の安定性を調節することにより、HPVゲノム複製を制御する可能性が高い。

E1とE2の発現誘導とCa添加によって分化誘導した角化細胞からウイルス粒子分画を回収し、HeLa細胞へ感染したが、感染成立に伴うE1/E4 mRNAの発現は確認できなかった。

一方、HPV複製阻害剤のスクリーニングに有用なレポーター遺伝子搭載HPVゲノムを作製した。このレポーターHPVは、角化細胞内で野生型と同様の効率で維持複製し、培養上清のルシ

フェラーゼ活性測定により、ゲノムコピー数の変化を容易にモニターすることができた。

D. 考察

不死化角化細胞の平皿培養系において、E1,E2の発現誘導によりHPVゲノムが数千倍に増幅可能な細胞集団を樹立し、その中から増幅効率の高いクローナルな細胞株を複数樹立した。これらの細胞株に、Ca添加による角化細胞の分化誘導を行うと、複製された内在性ゲノムからL1とL2の発現を誘導できることが分かった。これまでL1とL2の発現に至る高度な分化誘導には、3次元培養が必須であると考えられていた。本研究では、Ca添加による角化細胞のスフェロイド形成および、スフェロイド形成時にL1とL2の発現が良く見られる傾向が観察された。さらに、密度勾配遠心法により、スフェロイド化した細胞からHPVゲノムDNAを含む成熟ウイルス粒子分画を精製できた。すなわち、効率よくスフェロイド形成を誘導することにより、3次元培養のような煩雑な手順を経ずとも、平皿培養系から細胞分化に依存して産生される真の成熟HPV16ウイルス粒子を、比較的容易に産生できる可能性が示唆された。今後、L1とL2をより高発現する分化誘導条件の最適化などを行い、感染性を有した成熟ウイルス粒子の精製法を確立し、平皿培養からの大量安定産生技術を確立したい。

一方HPVの複製阻害剤はCINの治療

薬あるいは子宮頸がんの予防薬として期待できる。昨年度の研究結果より、E1阻害剤を用いたとしても、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における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。従って、E1阻害剤に拘らず、広くHPV複製を阻害する薬剤のスクリーニングが必要である。今年度は、HPV複製阻害剤のハイスループットスクリーニングが可能な細胞株の作製に成功した。また、NF κ BがE1のタンパク分解を促進することを見出し、持続感染細胞においてE1依存的な複製が抑制される要因であると推察された。NF κ BによるHPVゲノム複製の調節機構に介入することにより、(1)E1,E2によりゲノム複製を増強することから、より効率よいウイルス産生系法の確立への応用や、(2)E1タンパク分解を抑制することにより、持続感染細胞に溶解感染等を惹起し、感染細胞の排除を狙うという新たな抗ウイルス薬デザイン戦略が考えられる。今後は、これらの知見に基づいた抗ウイルス薬スクリーニングを行いたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yugawa T, Nishino K, Ohno S, Nakahara T, Fujita M, Goshima N, Umezawa A, Kiyono T. Noncanonical NOTCH signaling limits self-renewal of human epithelial and induced

pluripotent stem cells through ROCK activation.
Mol Cell Biol 33:4434-47, 2013.

Iwahori S, Kohmon D, Kobayashi J, Tani Y,
Yugawa T, Komatsu K, Kiyono T, Sugimoto N,
Fujita M. ATM regulates Cdt1 stability during
the unperturbed S phase to prevent
re-replication. Cell Cycle 13: 471-481, 2014.

2. 学会発表

中原 知美、田中 克征、大野 真一、
温川 恭至、清野 透 ヒトパピローマウ
イルス 16 型のゲノム複製に関与する宿主
因子の解析 /Cellular factors involved in
suppression of human papillomavirus type 16
(HPV16) genome replication in keratinocytes.
第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横
浜、2013 年 10 月

中原 知美、江川 長靖、大野 真一、
温川 恭至、清野 透 レポーター遺伝子
を搭載したヒトパピローマウイルス 16 型
(HPV16)ゲノムの作製と評価 第 61 回日本
ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、
2013 年 11 月

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

研究分担者 川名 敬

東京大学大学院医学系研究科産婦人科学講座 准教授

研究要旨 本研究のもと施行された第I/IIa相探索的自主臨床試験が終了し、最終解析を行った。E7発現乳酸菌ワクチン（GLBL101c）を経口投与によって、腸管に抗原刺激を与え、E7特異的粘膜免疫を介して子宮頸部への抗E7細胞性免疫を誘導できた。至適用量を投与された10例のうち、8例において子宮頸癌前癌病変（CIN3）の退縮が確認され、根治手術を回避できた。

E6を標的とした核酸医学であるE6siRNAを生体内で利用するためにsiRNAを高分子ミセルで内包したドラッグデリバリーシステム(DDS)を応用した。E6siRNA内包高分子ミセルを静脈投与することによって子宮頸癌担癌マウスに対する抗腫瘍効果を発揮し、HPV関連癌に対する分子標的治療薬の可能性を示唆した。

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。減少傾向にあった本邦の子宮頸癌の年齢調整死亡率はこの20年間は下げ止まっている。しかも20～30才代で罹患率・死亡率ともに増加している。子宮頸癌のほぼ100%が発癌性ヒトパピローマウイルス(HPV)に因る。

子宮頸癌は必ずしも高い死亡率ではなく外科的治療・放射線治療を中心として治療が奏効する比較的予後の良い癌である。しかし、子宮頸癌に対する既存の治療法として挙げられる子宮摘出や放射線照射では、妊孕能は断たれ、またその前癌病変（CIN3）に対する既存治療法である子宮頸部円錐切除術では、その後の早産リスクが3倍近く高まり、術後の周産期予後

が問題となる。CIN3の罹患年齢ピークが30才前後であることを考えると公衆衛生学的に大きな問題となる。

発癌性HPVには15タイプあり、現行のHPV予防ワクチンは、そのうち2タイプを予防するだけである。HPV予防ワクチンでは子宮頸癌の40%は予防できない。

本研究では、HPV分子を標的にした2つのHPV分子標的治療薬（薬物療法）を念頭に考え、これらによって手術回避、子宮温存療法を開発することを目的としている。

①E7標的癌ワクチン；HPVウイルス蛋白質のうちE7は、癌形質の維持に必須で、子宮頸癌細胞で恒常的に強発現している癌抗原である。そこで抗E7細胞性免疫を利用した免疫療法が期待される。これまでの海外で実施され