

た試験薬は実用化に至ったものはない。E7の筋注・皮下注による全身性免疫誘導では子宮頸部粘膜の抗E7細胞性免疫が不十分であったと考えられる。本研究では、HPV分子を標的として粘膜免疫を誘導して治療効果を得る経口薬を開発した。E7分子のキャリアーとして、ヒトで食経験のある乳酸菌 *Lactobacillus casei* を用いた。E7を発現させた乳酸菌 (GLBL101c) を製剤化し、第I/IIa相探索的自主臨床試験を実施した。昨年度までに全17例への投与が終了し、その臨床効果を示してきた。本年度はこれらの投与患者から得られた臨床サンプルの免疫学的効果と臨床効果の関連性について検討することを目的とした。

②E6標的siRNA内包高分子ミセル: HPV癌蛋白質で子宮頸癌の不死化、抗アポトーシス作用に深く寄与する癌遺伝子E6の発現を阻害するためのsiRNAは以前からHPV分子標的治療薬として期待されてきた。しかし、核酸医学ではドラックデリバリーシステム (DDS) が大きな壁となっている。我々は東京大学臨床医工学の片岡教授、宮田准教授との共同研究によってナノ技術を用いた高分子ミセルによってE6を標的にしたsiRNA (E6siRNA) を開発した。本研究では、E6siRNAの生体内での抗腫瘍効果を検討することを目的とした。

B. 研究方法

(1)E7 標的癌ワクチン

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: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 21-25 年度まで実施した。

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。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。

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。さらに、至適用量と考えられた 4cap/日について 7 例を追加し、全 10 例で有効性を検討した。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。

CIN1 への退縮は CR、CIN2 への退縮は PR、CIN3 の不変は SD、浸潤癌への増悪は PD とした。

更に第二世代の HPV 分子標的乳酸菌を新規開発するため、乳酸菌の表面にアンカー蛋白質を介して、E7 タンパク汁を固着させ、E7 蛋白質と乳酸菌の量比を変動させた。GLBL101c と比較して免疫誘導能が最適となる量比を検討す

ることとした。

(2) E6標的siRNA内包高分子ミセル

HPV16, 18のE6siRNAは既報に基づき作成した。siRNAはマイナス電荷をもつことからプラス電荷を帯びさせたポリエチレングリコール (PEG) とイオン結合させることで、siRNAを内包できる。PEGの外郭側にはRGDを搭載させ、RGDは腫瘍血管や腫瘍細胞に特異的に発現しているインテグリン α V β 3という表面抗原と結合して腫瘍に特異的に運搬させることとなる。このsiRNAが内包された高分子ミセルは東京大学臨床医工学講座の宮田准教授より供与された。

E6siRNA内包高分子ミセルは、HPV16E6とHPV18E6について作製した。DDSの検討を行う前にin vitroでのsiRNAのE6発現阻害効果をSiHa細胞 (HPV16陽性)、HeLa細胞 (HPV18陽性)、C33A細胞 (HPV陰性) を用いて検討した。次に、これらの細胞をヌードマウスBALB/cに移植し腫瘍を形成させた。この腫瘍を3mm角にしたものを新たなマウス皮下に移植しその腫瘍径を経時的に追跡した。移植後5日目から、E6siRNA内包高分子ミセルもしくはHPVと無関係のsiRNAを内包したコントロール高分子ミセルをday0, 1, 3, 4, 7, 8日の6回尾静脈から静脈投与を行い、腫瘍径の増殖カーブを検討した。またday12の腫瘍内におけるE6発現量、p53蛋白質量を、RT-qPCR、ウエスタンブロット法により検討した。

(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した。また、提供試料、個人情報厳格に管理・保存した。

C. 研究結果

(1) E7標的癌ワクチン

GLBL101cの安全性と臨床効果 (有効性) は昨年までに報告した。本年度は試験終了後の追跡調査の結果をまとめた。

17例では試験薬と因果関係のある有害事象は認められなかった。CIN3が退縮して根治手術を回避できた症例 (退縮群) が9例、退縮が見られず手術を施行された症例 (非退縮群) が8例であった。9例の投与量は、8例が4カプセル/日、1例が6カプセル/日であった。9例の試験終了時の組織診はCIN2であった。退縮群の追跡期間は14-33か月であるが、9例全例でCIN3の再発はない。追跡している9例中、正常が3例、CIN1が2例、CIN2が4例となっている。

子宮頸部リンパ球中のE7特異的IFN γ 産生リンパ球数 (E7-CMI) は、ELISPOT法で検討された。10⁵細胞あたりのE7-CMIは、退縮群 (n=9) で21.8-44.0 cellsであり、非退縮群 (n=8) で9.2-18.8 cellsであった。

Mann-Whitney U testにて、 $p=0.000004$ となり、子宮頸部リンパ球中のE7-CMI誘導能が臨床効果と強く相関していた。また、退縮するためのE7-CMIのcut-off値をROC曲線で設定したところ、E7-CMIが 10^5 細胞あたり21.8 cellsという値が最適であった。その場合の感度は94.5%、特異度が99.2%であり、CIN3からの退縮のバイオマーカーになると考えられた。

さらに、本研究では第二世代のE7発現乳酸菌を開発するために、E7蛋白質と乳酸菌の量比を最適化することを検討している。そのために乳酸菌菌体に出すE7蛋白質量を変動させるシステムを構築した。アンカーE7を作成し乳酸菌にアンカーのレセプターを発現させている。これによってGLBL101cと量比の異なるE7発現乳酸菌を作成し得た。現在、これらの粘膜免疫へのE7-CMI誘導能を比較している。

(2) E6標的siRNA内包高分子ミセル

まず、18E6siRNAのin vitroでの薬理効果を見るために、HeLa細胞にsiRNAを添加し細胞増殖抑制活性をMTSアッセイで調べた。HPVと無関係のコントロールsiRNAと比べ細胞増殖能は40%程度になった。16E6siRNAについても同様に施行し、SiHa細胞では50%程度の抑制であったが、HeLa細胞やC33A細胞では有意な抑制は見られなかった。E6siRNAはタイプ特異的にE6遺伝子発現を阻害することが示唆された。これらのsiRNAをRGD搭載PEG

と混合して内包させた高分子ミセルを合成した。18siRNA内包高分子ミセルはHeLa細胞担癌ヌードマウスへ、16E6siRNA内包高分子ミセルは、SiHa細胞担癌SCIDマウスへ、それぞれ6回静脈投与した。Day 12におけるHeLa細胞腫瘍の増殖能は、E6siRNA高分子ミセル投与によってコントロールに比して約70%減少した。SiHa細胞腫瘍の増殖能は約80%減少した。いずれも有意な差であった。また各腫瘍を摘出し、腫瘍内におけるE6発現をRT-qPCRで確認したところ、E6siRNA高分子ミセル群で有意にE6mRNAレベルが低下していた。E6の最も重要な機能であるp53の消化作用を見るために、摘出腫瘍のp53蛋白質をウェスタンブロット法で検出したところ、E6siRNA高分子ミセルの投与量に依存して、p53がレスキューされていることがわかった。コントロール高分子ミセルの投与ではp53は全く検出されなかった。

D. 考察

(1) E7標的癌ワクチン

本年度の研究から、GLBL101cによって高いE7-CMIが誘導された症例ではCIN3が退縮することが明確に証明された。また4カプセル/日が免疫学的にも臨床病理学的にも至適用量であることが確認された。興味深いことに、一度高いE7-CMIが誘導された症例では、全例においてその後試験薬の内服は全く行っていないにもかかわらず、臨床効果が持続しておりCIN3には至っていない。1-3年経過しても再発

- PI3K/mTOR Inhibitor DS-7423, *PLOS One*, in-press, 2014
- 2) 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
 - 3) 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
 - 4) 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
 - 5) 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
 - 6) 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
 - 7) 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
 - 8) 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
 - 9) 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
 - 10) 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
 - 11) 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
 - 12) 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,

を見ない（一般的にHPV16型CIN2がCIN3に増悪するリスクは5年以内に40%である）。このことは、CIN病変に存在するHPV蛋白質によるnatural booster効果によってE7-CMIが活性化されているのかも知れない。

子宮頸部リンパ球によるHPV標的癌ワクチンの免疫応答を評価した研究はこれまでに1つもない。本研究によって子宮頸部リンパ球 10^5 細胞あたり21.8 cells以上のE7特異的IFN γ 産生リンパ球数を有する患者ではCIN2以下に退縮しやすいことがわかり、CIN退縮のバイオマーカーとなりうるということがわかった。CIN患者のフォローアップにおいて、子宮頸部リンパ球を用いた検査法がCINの消長の予知マーカーになることを示唆している。

臨床効果として、数年にわたって追跡することによって、至適用量である4カプセル/日内服10例のうち4例がCIN1以下となった。海外ではCIN2-3は円錐切除術の対象となるが、CIN1はHPV感染症の扱いで治療対象とは考えられていない。GLBL101cには、抗腫瘍効果を発揮して、正常もしくは感染症レベルに戻す効果があることが証明された。本臨床試験は、1アームの探索的臨床試験であったが、今後CIN2を対象とする二重盲検ランダム化比較試験を実施して有効性について検証することが望まれる。そのため本年度より厚労省科研費（研究代表者：川名敬）によって第IIb相臨床試験を開始している。

本研究では、さらに薬理効果（E7

粘膜免疫誘導能）の優れているE7発現乳酸菌を新規開発するべく薬剤の最適化を試みている。この結果によっては第二世代のより強力な免疫誘導能を持つE7発現乳酸菌を新薬として開発することを考えている。

（2）E6標的siRNA内包高分子ミセル siRNAは単体では生体内に投与することはできない。投与してもRNase、マイナスイオンによる細胞への取り込み阻害、貪食細胞への取り込み、によってドラッグデリバリーシステム（DDS）無しには実用化は難しい。そこで、DDSとして高分子ミセルを利用している。PEG化された薬剤は昨今多くの薬剤で応用されていることから、実用化への道が近い。本研究で得られたマウス担癌子宮頸癌への抗腫瘍効果は、DDSによる生体への静脈投与であり、実現性のある投与方法であった。核酸医学によるsiRNAの最適化とともに本研究で用いたDDSによってHPV分子に対する核酸医学を利用した分子標的治療薬の開発につながると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kashiya 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-Hiraie 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

Sequential effects of the proteasome inhibitor bortezomib and chemotherapeutic agents in uterine cervical cancer cell lines, *Oncol Rep*, 29: 51-57, 2013

- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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

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, 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
- 6) 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

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 の生活環と遺伝子機能の解明

分担研究者 酒井 博幸 京都大学ウイルス研究所がん遺伝子研究分野 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18型HPVの複製モデルを利用して、各遺伝子の機能解析を行った。またE4遺伝子産物が、いくつかの宿主因子に加えて、E6やE7などのウイルス蛋白の不活化にかかわる可能性を示した。

またHPV複製モデルを利用して、新規化合物の抗ウイルス効果を評価した。

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。そのためにこれまでに 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関しても解析を行う。

B. 研究方法

【HPV 複製モデルの構築】

HPV18 の複製系として、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、HPV18 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% CO₂ 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】

細胞からのゲノム DNA の精製には市販のゲノム DNA 精製キットを利用した。回収した DNA (2µg) 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 (ロシユ)。

【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】

1.8mM CaCl₂ 含有 1.5%メチルセルロース/EpiLife-KG2 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. 研究成果

1. HPV18 の調節遺伝子機能の解析

HPV18 の全ゲノムを含むプラスミドをもとにして、E1、E2、E4、E5、E6、E7 の各

ORF、5'寄りの部位にナンセンス変異を導入し、各遺伝子の変異体を作成した。E4ORFはE2ORFと読み枠違いでオーバーラップしているため、E4に導入した点変異はE2に対してはサイレント変異となるようにデザインした。

これらのプラスミドからHPV18ゲノム領域を切り出し、リガーゼによってゲノム状に環状化したものをヒト角化細胞に導入し、その複製などを解析した。なお、HPV18の複製起点(ori)を含むネオマイシン耐性遺伝子発現ベクターを同時に導入し、その後G418を含む培地で培養を続けることで、HPVゲノム導入細胞の選別をおこなった。

得られた細胞内のHPVゲノムコピー数をサザンブロットによって解析したところ、E6変異体で顕著なゲノムコピー数の低下が確認された。その他の変異体はほぼ野生型と同程度のゲノムコピー数を維持していた(数百コピー/細胞)。

つぎに、カルシウム処理によって分化誘導をかけた場合のゲノムコピー数の変化を調べた。野生型では分化処理により10倍程度のコピー数増加が確認できた。それに対してE6変異体では全く増加が認められなかった。また、E7変異体ではコピー数の増加は野生型の1/3程度に下がっていた。E4とE5変異体に関しては、コピー数の増加は若干低下していたが、有意というには繰り返し実験が必要である。

さらに、高度に上皮細胞の分化の影響を調べるために、得られた細胞を用いて皮膚モデル培養系(raft culture)を構築した。野生型HPV DNAを導入したもの

は、角質層の顕著な肥大が観察された。E4、E5両変異体でも野生型と同程度の異形性が確認された。しかしE6とE7の変異体では、全く異形性は観察されなかった。ビリオン構成タンパクであるL1タンパクに対する組織免疫染色を行ったところ、野生型では角質層にL1の発現が確認された。それに対し、E6、E7の変異体ではL1の発現は検出できなかった。E4とE5変異体では野生型と同程度に、角質層でのL1発現が認められたが、その発現量は有意に低下していた。

2. HPV18 E4 遺伝子機能の解析

E4(遺伝子産物としてはRNAスプライシングによってE1のN末5アミノ酸がE4タンパクに融合したE1^{E4}タンパクとして発現する)は感染組織の分化層で高発現しており、ウイルス複製の後期過程に関わる可能性が示されていた。我々は以前に、HPV18型及び16型のE4をHeLaやCV1細胞で発現させると、G2/M細胞周期停止を誘導すること、E4は細胞質に凝集塊を形成することを報告している。ここではこの凝集塊形成の意義を解析した。

18E4はすでに報告したように、細胞質に凝集塊を形成する。その凝集塊は(i)周りにビメンチンケージが形成されている、(ii)HDAC6、Hsp40、ユビキチン化タンパクが凝集塊に含まれる、(iii)凝集塊形成は微小管形成、HDAC6、およびダイニンに依存的である、という点から、aggresome様の構造体であることが分かった。

またこのaggresomeにはγチューブリンがリクルートされ、細胞内の正常な中心

体形成が抑制されていた。さらに HPV18 の E6 と E7 も aggresome に捕獲されており、E4 発現細胞では E6、E7 による p53、RB 発現抑制が解除されていることが分かった。

3. HPV 複製モデルを利用した、新規化合物の抗ウイルス活性の評価

抗 HPV 活性を持つ化合物のスクリーニングには、HPV 複製系の確立が必要である。ここでは我々が構築した HPV 複製系を用いて、いくつかの新規化合物の抗ウイルス活性を評価した。

HPV18 を導入した角化細胞で、新規化合物の効果を調べたところ、5 μ M で細胞内のゲノムコピー数が約 1/2 にまで低下させるものが見つかった。同じような効果はカルシウム分化時にも観察された。

D. 考察

1. HPV 調節遺伝子の機能について

今回は HPV18 の調節遺伝子の、ウイルス複製における機能を解析した。その結果 E6 はゲノムメンテナンスに必須ではないが重要な役割を持つことが示された。これにより E6 変異体では細胞内の HPV 遺伝子の発現量は非常に低く抑えられ、その結果、分化に応じたゲノムコピー数の増加や、皮膚モデル培養系での異形性誘導、L1 タンパク発現などが求められなくなったと考えられた。

E7 はメンテナンスには関与しないが、分化時のゲノム増加に関与していた。さらに皮膚モデル培養系では、E7 変異体は異形性や L1 の発現が認められなかった。この事は E7 が分化プログラム(異形性)の制御に重要であり、E7 による分化

改変がゲノムコピー数の増加や後期遺伝子の発現に関与している可能性を認めした。

E4 と E5 は分化に応じたゲノムコピー数の増加に、E7 ほどではないが関与している可能性が考えられた。皮膚モデルでも、ほぼ野生型と同様の異形性を誘導したが、L1 の発現量は有意に低下していた。これらの作用機序は現在のところ不明である。

以上の点から、E6 が有望な薬剤標的であると考えられた。ここでの E6 の作用機序を考えることが次の目標である。

2. HPV 複製における E4 の役割に関して

E4 による aggresome 形成が、 γ チューブリンなど種々の細胞性因子の補足、及び不活化に関与する可能性が示された。特に γ チューブリンは M 期進行に重要な中心体の主要構成因子であり、E4 による G2/M 期細胞周期停止に寄与している可能性が示唆された。

また、E4 aggresome は HPV の E6、E7 という主要な oncoprotein も捕獲し、細胞質中のこれらの因子量を抑制することが分かった。E6、E7 は HPV 感染による腫瘍形成に関わることが知られており、E4 はこれらの因子の機能を抑制することで、HPV 複製において何らかの機能を有していることが推測された。特に E7 は角化細胞の分化を抑制することが知られており、一方で HPV のビリオン産生には細胞の最終分化が必要であることが報告されている。E4 は感染組織上層部で発現し E7 の機能を抑制することで、感染細胞をビリオン産生に必要な分化状態へ移行させるというモデルが考えられた。

3. 我々の HPV 複製モデルの有用性に関して

ここで利用されている HPV 複製系は、(i) 構築が容易である、(ii) 短期間に樹立できる、(iii) 皮膚モデル培養系に適用できる、という利点がある。HPV 導入細胞は、長期間培養することで形質が変わり、がん化形質を持つようになる。またウイルスゲノムのインテグレーションも認められるようになる。そのような細胞では、正常なウイルス複製の観察は困難であるが、ここで用いた系ではそのような問題の発生は低く抑えられている。

いくつかの新規化合物の評価を行ったところ、有望と思われるものが見つかった。今後は皮膚モデル培養系にも適用して、その異形性誘導やビリオン産生の抑制効果を評価する予定である。

E. 結論

ヒト角化細胞に HPV ゲノム型 DNA を導入する系によって、HPV 複製機構解析のための基盤が構築された。それを用いて、HPV 調節遺伝子の役割を解析し、抗ウイルス剤の標的因子の検索をすすめることが可能となった。

また、種々の化合物の抗ウイルス活性の評価を行うプラットフォームとしても利用できることが示された。今後は、スクリーニング系としてハイスループット化を目指す必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

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)

2. 学会発表

梶谷直子、酒井博幸: HPV E1^{E4} はアグリス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

H. 知的財産権の出願・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

HPV と HBV を標的とする多価ワクチンの開発

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 昨年度までに、HPV16キャプシドタンパク質L2のアミノ酸56から75領域（L2-56/75）には少なくとも2つの交差性中和エピトープがあることが分かり、これらのエピトープを提示する抗原は、幅広い型のHPVに対する次世代ワクチンと成り得ることを示した。本年度は、L2-56/75を使用したワクチンの実用化を目指すため、製薬会社と共同研究を行った。B型肝炎ウイルスワクチンであるHBs抗原にL2-56/75を挿入したキメラ抗原（HBs-56/75）を作成し、マウスに免疫した。HBs-56/75抗原は、交差性HPV中和抗体、及び、抗HBs抗体を効率よく誘導したことから、幅広い型のHPVとHBVに有効な多価ワクチンとして有用である。

A. 研究目的

現行 HPV ワクチンは主要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 HPV16 と HPV18 にのみ有効である。昨年度までに、HPV16 の副キャプシドタンパク質 L2 のアミノ酸 56 から 75 領域（L2-56/75）に、少なくとも2つの交差性中和エピトープ（13B、及び、24B）があることが分かり、これら2つのエピトープを認識する抗体を誘導できる抗原は、全ての高リスク型を含む幅広い HPV に有効な次世代ワクチンと成り得ることを示した。本年度の研究目的は、L2-56/75 を使用したワクチンの実用化を目指すため、13B、及び、24B エピトープを認識する抗体を効率よく誘導でき、かつ、ヒトに接種可能なワクチン抗原を開発することである。

B 型肝炎ウイルス(HBV)ワクチンとして既に実用化されている HBs 抗原に L2-56/75 を挿入したキメラ抗原を作成し、マウスにおける抗 L2 抗体、抗 HBs 抗体の誘導を調べた。

B.研究方法

L2-56/75をHBs抗原のN末端に付加したキメラ抗原（HBs-56/75-N）、アミノ酸127と128の間に挿入したキメラ抗原（HBs-56/75-127）、C末端に付加したキメラ抗原（HBs-56/75-C）をコードする遺伝子を作成し、CHO細胞で発現させた。精製した各キメラ抗原を各群10匹のマウス大腿部にアルミアジュバントともに5µg/dose、4週おきに2回接種し、2回目の接種から4週間後に血清を採取した。比較として、HBs抗原も同様に接種した。10匹分の血清を等量ずつ混合し、各抗原に対する抗

血清とした。高リスク型であるHPV16、18、31、33、35、51、52、58のウイルス様粒子（VLP）を抗原とするELISAで、各抗血清に含まれる抗L2抗体価を調べた。上記高リスク型VLP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、各抗血清のHPV中和活性を調べた。L2-56/75に相当するペプチド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、各キメラ抗原により誘導された抗L2抗体が認識するエピトープを調べた。HBs抗原を用いたELISAで、抗HBs抗体の誘導を調べた。

（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

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。

D. 考察

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た。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た。今回作成した3種類のキメラ抗原のうち、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。

E. 結論

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に有効な多価ワクチンとして有用である。

G. 研究発表

1. 論文発表

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. Virol J, 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.

2. 学会発表

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）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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 (PCT/JP2013/082094) 出願日：2013 年 11 月 28 日

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 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。このプロテアソーム阻害剤の子宮頸癌に対する抗腫瘍効果は、シスプラチンとの併用で、相乗効果を示し、またp53の発現回復を介するメカニズムで効果を示す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せるかを検討し、プロテアソーム阻害剤の他剤との併用効果の有無、またその子宮頸癌に対する抗腫瘍効果発揮のメカニズムの解明を目的とした。

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。今年度は更に、シスプラチン等の化学療法剤をプロテアソーム阻害剤と併用し、*in vitro* および *in vivo* で相乗効果を検討した。また、p53に対するsiRNAを用いて、プロテアソーム阻害剤による子宮頸癌に対する抗腫瘍効果が、P53の発現回復を介するかを検討した。

（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

プロテアソーム阻害剤である

bortezomibを子宮頸癌細胞に投与し、フローサイトメトリーにより解析したところ、bortezomibはシスプラチン、カルボプラチン、パクリタキセル等の化学療法剤を上回るアポトーシス誘導能を示した。また、bortezomibの子宮頸癌細胞に対するアポトーシス誘導能に関しては、シスプラチン、カルボプラチン、パクリタキセル等の化学療法剤との相乗効果を持つことが示された。また、これらの化学療法剤と併用する場合、bortezomibを先行投与する方が、より強いアポトーシス誘導能を有することが明らかとなった。子宮頸癌細胞に対するbortezomibの抗腫瘍効果発現のメカニズムを解明するために、その投与により発現が増強する遺伝子を検索したところ、癌抑制蛋白であるp53の下流遺伝子群に発現の増強を認めたが、p53そのものの発現の増強はRNAレベルでは認められなかった。P53をsiRNAによりノックダウンすることで、子宮頸癌細胞に対するbortezomibの抗腫瘍効果は消失することから、その抗腫瘍効果はp53の発現回復を介することが証明された。

D. 考察

bortezomibの子宮頸癌細胞に対するアポトーシス誘導能に関して、シスプラチン、カルボプラチン、パクリタ

キセル等の化学療法剤と相乗効果があることが示されたことから、実際の子宮頸癌患者に対するプロテアソーム阻害剤の投与にあたっては、これらの化学療法剤との併用が有効であり、投与順序としては、プロテアソーム阻害剤をシスプラチン、カルボプラチン、パクリタキセル等の化学療法剤よりも先行投与させた方がより効果的である可能性が示唆された。

今後は自主臨床試験を通して、再発、再燃を示した子宮頸癌患者に対して、bortezomib等のプロテアソームを臨床応用につなげる研究を進展させて行きたい。

E. 結論

bortezomibの子宮頸癌細胞に対するアポトーシス誘導能に関しては、シスプラチン、カルボプラチン、パクリタキセル等の化学療法剤との相乗効果を持つことが示された。その子宮頸癌に対する抗腫瘍効果は、p53の発現回復を介することが証明された。

F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

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配列を見いだした。しかし、siRNAは、その最大の弱点として非特異的細胞増殖抑制効果を有する。この副作用の発現機構を、オフターゲット効果、miRNA生成抑制およびインターフェロン反応などから解析検討した。レンチウイルスによるAGO2レベルの増加とsiRNAによるノックダウンを用いて、siRNAの非特異的細胞増殖抑制は、miRNAの抑制ではなく、オフターゲット効果が原因であること示唆した。また一部の配列はインターフェロン反応を引き起こし、これらも細胞毒性に関与している可能性を示した。

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 配列を見いだした。siRNAは、その配列特異性ばかりではなく、様々な機序を介して臨床応用における問題となる非特異反応を引き起こす。AGO2は、siRNAによる標的遺伝子の抑制（特異効果）とオフターゲット効果（非特異効果）の双方において中心的役割を果たしている。本年度の研究ではAGO2レベルをコントロールすることによって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

ヒトAGO2 cDNAのコード最適化後、化学合成し、pcDNA3およびpLenti6.3にサブクローニングした。AGO2レンチウイルスは、パッケージングプラスミドとともにAGO2/pLenti6.3を293FT細胞に導入して作成した。HuH-7肝臓癌細胞株、HeLa由来細胞株（HeLa細胞、FL-HeLaホタルルシフェラーゼ安定発現細胞）、SiHa由来細胞株（ホタルルシフェラーゼ（FLuc）・ウミシイタケルシフェラーゼ（RLuc）-E6(RLE6-FL-SiHa-10) および FLuc・RLuc-E7安定発現細胞（RLE7-FL-SiHa-2）にレンチウイルスを用いてヒトAGO2を導入後し、ブラシチジンにより選択した。

siRNAは、コントロール(siCont1, siCont2)、FLuc (siFLuc) およびHPV16 E6E7 を標的にしたもの(siE6-497, siE7-573, siE7-752)を化学合成したものをを用いた。また、これらのDNA修飾体、dsRDC(ガイド鎖5'端よりnt 1-6およびその相補部分をDNA化したもの)、idRNA(ガイド鎖5'端よりnt 3-8およびその相補部分をDNA化したもの)をLipofetamineRNAiMAX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。miR-21およびmiR-24は、stemloop RT-PCRで定量した。インターフェロン反応遺伝子(IFNbeta, OAS1, GIP2, MX1, IFIT1)の発現は、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

AGO2蛋白と非特異細胞毒性

HeLa細胞およびHuH-7細胞にレンチウイルスでAGO2を導入すると、いずれの細胞でもsiFLuc, siE6-497, siE7-573, siE7-752の細胞毒性を増強した。またAGO2ノックダウンによってこれらsiRNAによるHeLa細胞における細胞毒性が緩和された。

AGO2のオフターゲット効果およびmiRNA発現への影響

HeLa細胞において高レベルのAGO2導入は、siE6-497およびsiE7-573のオフ

ターゲット効果を増強した。また、AGO2導入した細胞では、siRNA導入によるmiR-21およびmiR-24発現低下が全く見られなかったが、siRNAの細胞毒性は却って増強していた。

siRNAによるインターフェロン反応遺伝子発現への影響

HeLa細胞にsiRNA (siCont1, siCont2, siFLuc, siE6-497, siE7-573, siE7-752)とこれらのDNA修飾体を導入した後に、IFNbeta, OAS1, GIP2, MX1およびIFIT1の発現を解析した。これらの中でdsRDC-Cont1, siE7-573, siE7-752, dsRDC-E7-752によって6倍程度のIFNbeta mRNAの誘導が見られ。

D. 考察

siRNAは、配列依特異的な遺伝子ノックダウン効果と非特異効果の両方を引き起こす。非特異効果には、シード配列を介したオフターゲット効果、AGO2競合によるmiRNA生成抑制、自然免疫活性化および機序のよくわかっていない細胞毒性がある。AGO2は、miRNA生成とオフターゲット効果に中心的役割を果たしている。このAGO2レベルを増加させると、siRNAの細胞毒性とオフターゲット効果を増強し、siRNAによるmiRNAレベル低下を解消した。反対に、AGO2ノックダウンは、siRNAの細胞毒性を緩和した。以上から、siRNAによる細胞毒性は、単純なmiRNA発現抑制ではなく、オフターゲット効果が関与している可能性が示唆された。さらに一部のsiRNAとdsRDCにおいてIFNbetaの軽

度の発現誘導が観察された。この siRNA と dsRDC にはこれまで知られている TLR 活性化配列はない。この反応の誘導機構と細胞毒性の関連との関連について検討予定である。

E. 結論

siRNA の非特異効果である細胞毒性の発現機構がこれまで不明であったが我々の研究によって一部オフターゲット効果が関係していることが示唆された。このように siRNA を用いた核酸治療においてこのオフターゲット効果の回避は重要で、siRNA シード領域の DNA 修飾 (dsRDC, idRNA) によって改善できる。今後 siRNA による自然免疫の活性化について検討する。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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 72 回日本癌学会学術総会 平成 25 年 10 月横浜

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