

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ク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。

E7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

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。

E6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グ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 $\alpha V\beta 3$ 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、個人情報を厳格に管理・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蛋白質をウエ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に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

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) 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*, 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,

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) Kashiwama 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