

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22年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 温川 恭至

平成26(2014)年 5月

目 次

I. 総合研究報告	-----	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. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	75
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	別冊

I 総合研究報告書

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）

総合研究報告書

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 蛋白のアミノ酸 56 から 75 (L2-56/75) 領域にある交差性中和エピトープを用いた次世代 HPV 感染予防ワクチン(L2 ワクチン)の実用化を目指し、1)L2 ワクチンの有効性を示す基礎データの蓄積、2)L2 ワクチン抗原の開発、3)L2 ワクチンの効果判定技術の確立、の3点を柱に研究を行い、それぞれ以下の成果を得た。1)L2-56/75 を認識するモノクローナル抗体を分離し、この領域に少なくとも2つの交差性中和エピトープがあること、これらエピトープに対する抗体は、幅広い HPV に有効であることがわかった。2)B 型肝炎ウイルスワクチンである HBs 抗原に L2-56/75 領域を挿入したキメラ抗原が、交差性 HPV 中和抗体を効率よく誘導できることを示した。3)L2 ワクチンにより誘導された血清中の交差性中和抗体を、ELISA で簡便に定量する方法を確立した。HPV 感染は、検体中の HPV-DNA の有無により判断されることから、主に使用されている HPV-DNA 検出用 PCR プライマーの検出精度を調べ、ワクチンの効果判定に用いる HPV 検査方法の選定に役立てた。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。

HPV 治療ワクチンとして HPV16E7 発現乳酸菌ワクチン (GLBL101c) を開発・製剤化し、子宮頸癌前癌病変 (CIN3) に対する臨床効果・安全性を検討するために第 I/IIa 相に準じた探索的自主臨床試験を実施した。17 例の HPV16 陽性 CIN3 患者に対して GLBL101c を経口投与し、研究期間内に最終解析まで行った。GLBL101c 経口投与で腸管に E7 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。至適用量において、80% の退縮効果が確認され根治手術を回避できた。臨床効果と抗 E7 細胞性免疫誘導能は相関した。GLBL101c に因果関係のある有害事象はなかった。さらに漢方薬アジュバント・粘膜アジュバント併用によるワクチン増強効果をマウス実験レベルで示し特許出願した。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。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。

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。siRNA は、高い RNAi 活性を有する反面、非特異的効果 (オフターゲット効果、細胞毒性) や血清中での不安定性などの問題がある。このような siRNA の欠点は、siRNA シード領域の DNA 置換体である短 2 本鎖 RNA-DNA キメラ型核酸 dsRDC に変更することによって部分的に克服できる。我々は、E6E7 を標的にした dsRDC が、E6E7 不死化ケラチノサイトの増殖を特異的に抑制し高度異型上皮/早期癌の治療への応用できることが示した。また、dsRDC の弱点である RNAi 活性の低下を、新しい DNA 置換体 (idRNA) によって解決できることを明らかにした。さらに siRNA の副作用である非特異的細胞増殖抑制効果は、AGO2 の競合による miRNA 生成抑制が原因ではなく、オフターゲット効果と関連しており、一部はインターフェロン反応である可能性を示した。オフターゲット効果は、dsRDC や idRNA で抑制できるため、これら DNA 修飾体は、E6E7 を標的とした RNAi 医薬への応用に有用であると考えられた。HPV 分子標的治療薬の開発をめざした基礎的研究として、E6 を標的とした核酸医薬 (E6 siRNA) を生体内で利用するため、ドラッグデリバリーシステム(DDS)を用いた。E6 siRNA をポリエチレングリコール(PEG)で内包した高分子ミセルを製し、E6siRNA 内包高分子ミセルの静脈投与による子宮頸癌担癌マウスに対する抗腫瘍効果を示した。 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。

当課題において HPV ゲノムを保持し、HPV 感染状態を模したヒト角化細胞を容易に樹立する実験系を開発した。さらに、その細胞を用いて皮膚モデル培養系を作成し、感染組織におけるウイルス生活環を観察できるモデルを構築した。

これらの実験系を利用して、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 はウイルスゲノムのメンテナンスに関与することを見出した。

また E4 と E5 がウイルスの分化依存的な複製に関与していることを示した。さらに E4 には、E7 の作用に拮抗して角化細胞の分化誘導をすすめる働きがあることを見出した。

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。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・治療法の開発が期待される。

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な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。

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関しても解析を行う。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は期待されていたが、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クリーン・スクリーニング系の開発を進める。

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。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、子宮頸がんに相当する細胞を三次元（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。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を高度に発現し、これらの抑制で病変が排除できるため理想の治療標的ある。2本鎖RNA-DNAキメラ（dsRDC）はsiRNAのシード領域を2本鎖DNAに置換したもので、日本発のsiRNAに代るRNAi技術である。本研究ではHPV16 E6E7を標的としたsiRNA、dsRDおよびdsRDCの改変体を用いて、HPV16関連疾患の核酸医薬としての可能性を検討する。siRNAは、非特異反応としてseed領域の相補性を有するmRNAの翻訳抑制効果（オフターゲット効果）、自身のAGO2への結合を介したmiRNA生成抑制、自然免疫の活性化、細胞毒性などを引き起こす。オフターゲット効果を回避する方法として、dsRDCは有効であるが、siRNAに比べ、RNAi活性が低下する。本研究では、このdsRDCの活性化の改善方法について検討する。さらにsiRNAのもう一つの副作用である細胞毒性の機序と改善方法について検討する。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。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

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。1)L2-56/75に相当するペプチド (P56/75) で免疫したマウスから、抗P56/75モノクローナル抗体 (MAb) を得た。エピトープマッピングによりMAbが認識するアミノ酸配列を調べた。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) へのMAbの結合をELISAで調べた。上記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、MAbによる中和を調べた。三次元培養表皮 (ラフトカルチャー) から分離したHPV16、または、HPV31を用いて、MAbによる中和を調べた。2)L2-56/75をHBs抗原に挿入したキメラ抗原 (HBs-56/75) を作成し、マウスに免疫した。誘導された抗L2抗体のVLPへの結合、偽ウイルスの中和、認識するエピトープを1)と同様の方法で調べた。3)ELISAプレートに固定化し

たHPV16VLPへの抗P56/75 MAbの結合阻害の程度により、テスト血清 (P56/75で免疫したウサギ血清) 中の交差性中和抗体価を測定した。国内外で主に用いられているHPV-DNA検出用のPCRプライマーについて、特に複数の型のDNAが混在する場合の検出精度を、HPVゲノムを持つプラスミドを鋳型にして調べた。

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。

### (1) 粘膜免疫を介したHPV治療ワクチン

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。

Step1として、GLBL101cは、最少量の1cap/日から数例コホートを組みながら6cap/日まで増量した。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。

Step2: Step1において得られた臨床効果、免疫学的効果から、至適用量を決定し、その用量で固定して7例を追加し、全10例で有効性を検討することとした。

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。

臨床試験の結果をうけて、本年度からはE7発現乳酸菌ワクチンの有効性を高めるための研究を行っている。臨床試験では有効例を認めたが、高用量では有効性が低下する傾向が示された（後述）ことから、用量依存性ではなく、アジュバントによる効果の増強を考え、安全性が担保されている漢方薬に注目した。

マウス実験により、GLBL101cと漢方薬の併用経口投与を行った。1, 2, 4, 6週の4クールで経口投与し、7週で腸管リンパ球と脾臓リンパ球を採取し、E7-CMIを調べた。さらに粘膜アジュバントとして大腸菌トキシンを併用することも行った。

#### 【HPV複製系の構築】

HPV-FL (FL for full-length) 型の構築は、HPV16, 18型のゲノムDNAを制限酵素処理やライゲーション反応によってつなぎ換え、両端にLCR配列を持つようなウイルスゲノムを構築した。これをpEGFP1 (クロンテック) を改変したG418耐性プラスミド内に挿入したものをHPV-FLとした。

HPV-S (S for self-ligation) 型の複製系では、HPV16, 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の各遺伝子に変異を導入する際には、polymerase chain reaction (PCR) を利用した oligonucleotide-directed mutagenesisを用いた。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。一部エピゾーム状のDNAのみを回収する目的でHirtの方法を適用した。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。このゲルの表面にHFKを重層させ、さらにHFK表面を空気に晒すことによってHFKは層状化および分化し、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】

rasやHPV遺伝子をHFKに遺伝子導入する際には、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、10~48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。

#### 【FACSによる細胞周期解析】

細胞は必要に応じてメタノール固定、あるいはホルマリン固定し、PI染色によって染色体をマークし、EPICS XL-MCL (Beckman Coulter) を用いてFACS解析を行った。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、ミセルを蛍光ラベルし、蛍光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。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、DNA-RNAハイブリッド型核酸の改良を進めた。

## (2) E6標的siRNA内包高分子ミセル

siRNA は、コントロール 2 種類 (siCont1, siCont2)、ホタルルシフェラーゼ (FLuc, siFLuc)、ウミシイタケルシフェラーゼ (RLuc, siRLuc) および HPV16 E6E7 に対するもの 3 種類 (siE6-497, siE7-573, siE7-752) を siDirect ソフトウェアで設計し、これらの DNA 修飾体 (dsRDC、dsCont などと表記) とともに化学合成した。RNAi 活性は、SiHa 細胞株由来の FLuc・RLuc-E6 安定発現細胞 (RLE6-FL-SiHa-10)、FLuc・RLuc-E7 安定発現細胞 (RLE7-FL-SiHa-2)、あるいは FLuc・RLuc-標的配列発現プラスミドの一過性発現を用いたデュアル・ルシフェラーゼアッセイと定量的 RT-PCR によって解析した。オフターゲット遺伝子は、siDirect ソフトウェアで検索後、オリゴDNA を合成し RLuc-下流に挿入し、FLuc・RLuc-オフターゲット配列発現プラスミドを作製した。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。特異的増殖抑制効果と非

特異的細胞毒性は、それぞれ HPV16 陽性細胞 (SiHa、E6E7 不死化ケラチノサイト) と陰性細胞 (HeLa、TERT 不死化ケラチノサイト、HuH-7 肝癌細胞) を用いて WST-8 アッセイにより解析した。RISC 形成した siRNA と miRNA (miR-21, miR-24) は、抗 AGO2 抗体ビーズで AGO2 を免疫精製し、RNA 抽出後、stem-loop RT-PCR で定量した。siRNA の血清安定性は、50%血清存在下、37°C で様々な時間インキュベーション後核酸を抽出し、それぞれの RNAi 活性より定量後、半減期を算出した。ヒト AGO2 cDNA は、コドン最適化 cDNA を化学合成後、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、AGO2/pLenti6.3 をパッケージングプラスミドとともに 293FT 細胞に導入し作製した。細胞への AGO2 の導入は、レンチウイルスを用いて行い、発現細胞をブラスチジンによって選択した。プラスミドと合成 siRNA はそれぞれリポフェクタミン 2000 とリポフェクタミン RNAiMAX を用いて導入した。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。

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 Consent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。(1) HPV16 L2のアミノ酸64から73、及び、58から64をそれぞれ認識するMAb13B、及び、24Bを得た。MAb13BはHPV16、18、51偽ウイルスを中和した。MAb24Bは調べた全ての型の偽ウイルスを中和した。2つのMAbを混ぜると、中和能に相乗効果が認められた。MAb13B、及び、24Bはラフトカルチャー由来のHPV16、及び、HPV31を中和した。(2) HBs-56/75キメ

ラ抗原は、13B、24Bそれぞれのエピトープを認識する抗体を誘導した。それら抗L2抗体は調べた全ての型のVLPに結合した。抗HBs-56/75血清は、HPV16、18、35の偽ウイルスを中和した。(3) テスト血清中の交差性中和抗体の濃度に応じてMAbのVLPへの結合が阻害され、平行線定量法によって抗体価を算出した。これまで主に使用されてきた型共通プライマーでは、PCRでの干渉により、混在する複数の型のHPV-DNAを正確に検出できなかった。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。中でも、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

(1) 粘膜免疫を介したHPV治療ワクチン

### (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

#### <臨床的検討>

Step1: 子宮頸部粘膜にE7-CMI(E7特異的IFN $\gamma$ 産生、GranzymeB産生細胞)の誘導が2cap/日投与のコホート2から明らかに確認されてきた。興味深いことにPBMCよりもcervical lymphocyteの方がE7-CMIが有意に高いことがわかった。4cap/日がE7-CMIを最も高いレベルで誘導された。また、5週と比べ9週では2倍近い誘導が確認され、8週の内服によりブースター効果が発揮されていることが確認された。しかし、6cap/日投与のコホート4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病変が残存し、円錐切除術を必要とした。4cap/日投与のコホート3では、3例全例がCIN1-2に退縮し、臨床的有效性が示され、手術を回避できた。これらの3例は試験終了後、投薬はなく経過観察中(1.5-2年経過)であるが全症例ともCIN3の再発を認めない。

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が消失せず後療法を必要とした。

Step2: これらStep1の結果を安全

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。至適用量の4 cap/日投与例10例のうち8例において、臨床的効果 (CIN3→CIN2) が示された。6 cap/日の1例を加えて9例で有効と判断された。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。

#### <試験終了後の追跡調査研究>

研究倫理審査委員会の承認のもと、文書で同意を得て、CIN3が退縮して根治手術を回避できた症例 (退縮群) の9例について試験終了後、追跡調査を行った。

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。追跡期間は14-33か月であった。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。子宮頸部病変が正常化した症例が3例存在していたことは特記すべきことである。

#### <免疫学的検討>

子宮頸部リンパ球中のE7特異的IFN $\gamma$ 産生リンパ球数 (E7-CMI) は、ELISPOT法で検討した。10<sup>5</sup>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関連していた。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<sup>5</sup>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。

#### <漢方アジュバント併用に関する基礎的検討>

免疫賦活作用が知られている十全大補湯 (JTT) と補中益気湯 (HET) を用いた。漢方薬は食餌に混ぜてGLBL101cのマウス投与期間中連日内服投与した。粘膜アジュバントである大腸菌トキシシン (LTB) はGLBL101c投与の週に週1回投与した。JTTもHETをGLBL101cに併用した場合、脾臓細胞ではE7-CMIがGLBL101cのみと比して上昇したことから全身性免疫へのアジュバント効果が示された。しかし腸管粘膜リンパ球では明らかな上昇とは言えなかった。そこで、GLBL101cにLTBを添加した状態でJTT、HETを併用したところ、腸管粘膜リンパ球にGLBL101c単独よりも4-5倍高いE7-CMIが誘導された。また抗E7抗体も血清中、腸管洗浄液中に誘導された。とくにHETの誘導能が高いことがわかった。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されたが、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。

HPV-FL型のレプリコンを利用したHPV複製系に関してはすでに学術誌に報告済みである(Cancer Sci., 2010)。従来の方法に比べFL型を利用すると、効率よく安定にHPV DNAを維持した細胞を得ることが出来、また細胞分化に応じたHPVの産生的複製(vegetative replication)も再現可能である。

このFL型を用いた実験系を利用して、I型インターフェロンによりHPV複製抑制効果を検証することができた。またある種のキナーゼ阻害剤を標的とした化合物で、HPVの産生的DNA複製が抑制できることも確認した。これらの結果は、FL型を用いた実験系が抗HPV化合物の評価系として利用可能であることを示している。

FL型レプリコンを用いた実験はHPV研究に役立つと考えられるが、構造が本来のゲノムDNAとは異なり、HPVゲノムの機能を完全に再現している保証はない。

そこで従来法に用いられていた環状化HPV DNA(ここではHPV-S型DNAと呼ぶ)を利用して、HPV DNAを維持した細胞を効率よく得る方法を試みた。従来法でS型DNAを用いる場合、transfectionされた細胞の選別にpSV2neoなど、薬剤耐性遺伝子を発現するプラスミドを同時に細胞に導入し、1週間程度薬剤による選択を行っていた。この選別法ではtransfection時にHPV-S型DNAとpSV2neoがco-transfectionされたものを回収することが可能であるが、HPV DNAに関しては何ら選択圧がかかっていない。そのために薬剤で選別した細胞を経代しているうちにHPV DNAが欠落する可能性がある。この問題を避ける目的で、薬剤選択用のプラスミドにHPVの複製起点(ori)を含むDNAを組み込んだ。このプラスミドはHPV DNAの複製に応じて、細胞内で複製することが可能であり、細胞を長期にわたって薬剤選択することが出来る。ここで回収された細胞は全てHPVの複製を支持していることも保証される。

この新しいHPV-S複製系を用いた場合、薬剤選択後に残った細胞内でのHPVの平均コピー数はFL型と同程度、従来法に比べると数倍~10倍程度多いことが分かり、本来のHPVゲノムDNAを用いて効率の良い複製系を確立できたことが分かった。

## 2. HPV16におけるウイルス制御遺伝子の働き

HPV16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、HPV-S

複製系をヒト角化細胞に導入する系を用いた。今回の解析では、制御遺伝子のうち E4, E5, E6, E7 に関して変異導入解析をおこなった。変位の導入には PCR を利用した点変位導入法を用い、各 ORF の 5' 末に近い部位にナンセンス変位を導入した (E4u, E5u, E6u, E7u; u for upstream)。E5 と E6, E7 に関しては ORF のほぼ中央部位にナンセンス変位を導入したのも構築した (E5m, E6m, E7m; m for middle)。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。

今回はウイルスの遺伝子発現や複製に重要であることが分かっている E1 と E2 は対象としなかった。

E4 変異体は未分化状態の HFK で、野生型と同程度の複製効率を示した。同じ細胞をメチルセルロース培地で懸濁培養し分化誘導した場合、E4u では野生型に比べゲノムの増幅効率が低下していることが確認できた。

E6 に関しては、未分化状態でのゲノムのメンテナンスの効率に重要であることが確認され、従来からの報告を再現した。しかし、従来からの報告と異なり必須ではないことが示された。分化誘導に対するゲノム増幅は確認できたが、未分化状態での低コピー数を反映して、野生型ほどの増幅は認められなかった。

E7 は未分化状態でのコピー数、分化に応じたゲノム増幅ともに、野生型との有意の差は認められなかった。

今回の実験系では E6 と E7 の u 型と

m 型で、表現型の違いは観察されなかった。

### 3. 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ので、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。この点は HPV16 型との顕著な違いである。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、有意というため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へ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。

4. E4 による aggresome 形成の意義に関して

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、その分子機構として M 期進行にかかわる細胞骨格成分に作用することで、G2/M 期で細胞周期停止を誘導する可能性を示した。

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、メチルセルロース懸濁培養法を用いた実験系で、E4 は E7 の作用に拮抗して細胞分化を促進することが示された。

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  $\gamma$  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。この現象が、先に述べた E4 と E7 の拮抗作用に関連している可能性が示唆された。

5. HPV 複製系を用いた抗ウイルス剤スクリーニング系の開発

FL 型、および S 型の HPV を導入した HFK は、ウイルスゲノムを長期間エピゾーム状に維持することを報告している。またこの細胞は raft culture において、上皮の過形成を再現できることも確認している。

これらの HPV 陽性細胞はその選択に G418 を利用しており、その耐性は複製可能な HPV の存在に依存している。この細胞を化合物で処理することによって細胞内の HPV コピー数が低下すると G418 耐性も減弱し、細胞数の減少によって化合物の抗 HPV 効果を検証できると考えられた。

今回はすでにある程度の抗 HPV 効果が観察されている I 型インターフ

ェロンを用いて実験系の有効性を検証したところ、インターフェロンβの添加によって HPV 陽性細胞の増殖性が堅調に抑制されることが確認できた。

#### 6. 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。

#### 7. HPV18 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、5μM 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。

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。

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。

(E6E7を標的にしたsiRNA、dsRDCおよび新しいDNA修飾体の特性 (2010-2011年度)

HPV16 E6E7を標的とするdsRDCは、siRNAに比較して、(1) オフターゲット効果が少ない (2) 細胞毒性が低い (3) 血清安定性が高い (siRNA半減期、0.5時間; dsRDC、8時間) (4) siRNAは、ガイド鎖 (GS) とパッセンジャー鎖 (PS) によるRNAiを誘導するが、dsRDCはGSによるRNAiのみを誘導する、などの多数の優位点が見られた。反面、dsRDCはRISC形成能が低く、そのためのRNAi活性の低下があった。(以上2010年度)

dsRDCのRNAi活性の低下を改善するために様々なDNA修飾体を調べ、GSの5'端 1-2番目とPSの相補部分をRNAのまま、3-8番目とPSの相補部分

をDNAに置換したDNA置換体 (idRNA) は、下記にあるようにsiRNAとdsRDCのそれぞれの欠点を補った優れた特性を有していた。

(1) RISC形成能 siRNA > idRNA >> dsRDC

(2) RNAi活性 siRNA > idRNA >> dsRDC

(3) オフターゲット効果 siRNA >> idRNA > dsRDC

(4) 細胞毒siRNA>idRNA>dsRDC

(5) パッセンジャー鎖RISC形成  
siRNA (+), dsRDC (-), idRNA (-)

(以上2011年度)

idRNAのE6E7特異的増殖抑制効果 (2011年度)

idRNAは、siRNAとdsRDCのそれぞれの優れた特性を継承しているが、E6E7を標的としたidRNAの特異的増殖抑制効果についてsiRNAおよびdsRDCと比較検討を行なった。またHPV16型E6E7を標的にしたidRNA(E6-497)は、hTERT不死化ケラチノサイトに対する非特異的増殖抑制効果が少なくE6E7不死化ケラチノサイトに強い増殖抑制を有し、高度異型上皮の治療応用に適している事を示した。

siRNAの非特異反応 (2012-2013年度)  
siRNAの細胞毒性は、これまで外来性siRNAによるAGO2の占拠によってmiRNA生成が抑制されるためと考えられていた。本研究においてAGO2導入は、HeLa細胞とHuH-7細胞において、siRNAのRNAi活性とともにオフターゲット効果と細胞毒性を亢進させた。またHeLa細胞においてAGO2ノック

ダウンは、細胞増殖に全く影響なく、ノックダウン後に導入した様々なsiRNAによる細胞毒性を部分的に緩和した。(以上2012年度)

高レベルのAGO2を発現させたHeLa細胞においてsiRNA導入により引き起こされるmiR-21およびmiR-24発現抑制は全く見られなかった。以上からsiRNAの細胞毒性は、miRNA生成抑制ではなくオフターゲット効果が関与していることが示唆された。(以上2013年度)

siRNAによるインターフェロン反応遺伝子発現への影響(2013年度)

HeLa細胞に6種類のsiRNA (siCont1, siCont2, siFLuc, siE6-497, siE7-573, siE7-752)とこれらのdsRDC修飾体を導入後に、インターフェロン反応遺伝子(IFNbeta, OAS1, GIP2, MX1, 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の誘導が見られた。これらのsiRNAの細胞毒性の一部は、インターフェロン反応が関連している可能性がある。

## 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、E6 siRNA高分子ミセル群で有意にE6 mRNA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、E6 siRNA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。

## 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により分化誘導により安定して