

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、分化誘導により L1, L2 蛋白の誘導にも成功した。L1, L2 蛋白の誘導には後期プロモーターと考えられる p670 (HPV16) から転写誘導に加え、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

従来の報告に反し 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。1) L2-56/75領域には少なくとも2つの交差性中和エпитープ(13B及び24B)がある。各エピトープのアミノ酸配列は、高リスク型だけでなく、コンジローマ等の原因となる低リスク型でも保存されているので、これらのエピトープを認識する抗体は、幅広い型のHPVを中和できると考えられる。MAb13B、及び、24Bを混ぜた場合、中和能に相乗効果が認められたことから、ワクチン抗原は、それぞれのエピトープに対する抗体を同時に誘導できることが重要である。2) HBs-56/75キメラ抗原は13B、及び24Bエピトープに対する抗体を誘導したことから、次世代ワクチンとして期待できる。3) MAbを使用した交差

性中和抗体価測定法は、L2ワクチンの臨床試験において、被験者への交差性中和抗体の誘導を調べるのに必須な技術である。多くの女性が複数の型のHPVに同時感染している。型共通プライマーでは、複合感染するHPVの検出精度が低かったので、ワクチンの効果判定には、複数の型特異的プライマーを混ぜた混合プライマーを使用する必要がある。

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。

#### (1) 粘膜免疫を介した HPV 治療ワクチン

乳酸菌をベースに HPV16E7 癌蛋白質を発現させた抗 HPV 治療ワクチン (GLBL101c 内服) は、癌ワクチン療法として新規の抗癌剤になりうる。子宮頸部における免疫学的有効性 (E7-CMI) が高い症例では、CIN3 に対する治療効果が示された。この薬理効果と臨床効果の間に相関性あることが本年度初めて示され、CIN3 の病変退縮が GLBL101c によるものである可能性が高い。特に、4cap/日 (1g/日) の 10 例では、投与開始から 6 か月後に CR4 例、PR4 例となり、奏効率 (CR+PR) が 80% となった。海外で行われた非介入観察研究の報告では、CIN3→CIN2 への 6 か月観察後の自然退縮率は 15% と言われている。本臨床試験ではプラセボ群を設定していないが、GLBL101c による退縮率 80% は明らかに薬剤依存的であると考えられた。さらに追跡期間中には、根治治療を施行せずに済んだ 9 例中、3 例が正常、2 例が CIN1 (感染症レベル)、4 例が CIN2 となったことは特記すべき点である。海外では CIN2-3 を治療対象としているが、本試験薬投与によって、9 例中 5 例が海外の適応においても治療不要となったことになる。

癌ワクチン療法では、安全性が高いものの、免疫寛容が問題となる。特に、経口投与では oral tolerance が危惧され

る。本研究では検討していないが、本治療薬の長期投与、大量投与はかえって E7 に対する特異的免疫寛容を誘導する可能性もある。そこで、E7-CMI 誘導を増強する戦略として、アジュバントを導入することを検討した。漢方薬は実地臨床で日常的に使われている薬であり、かつ多くのアジュバント効果が報告されている。中でも補中益気湯 (HET) は、昨年度までの検討から最も有望であった。全身性免疫の誘導には HET のみでも相乗効果が示されたが、粘膜免疫誘導には、HET だけでは効果は乏しく、粘膜アジュバントが必要であることがわかった。そこで、今回の検討では、合成セラミドである alpha-GalCer を LTB の代わりに用いた。Alpha-GalCer は、抗原提示分子である CD1d によって提示され、NKT 細胞の特異的リガンドである。この併用によって、NKT 細胞が活性化され、NK 細胞、Th1 細胞、CTL が IFN $\gamma$  によって活性化される。NKT 細胞系による腸管粘膜免疫が賦活化され、E7 に対する獲得免疫誘導が増強したと考えられた。Alpha-GalCer は、樹状細胞療法の活性化剤としてヒトでの投与経験も報告されていることから、今後のアジュバントとして漢方薬とともに実用化が期待される。

さらに興味深いことに、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 $\gamma$  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 相に準じた自主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

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。

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、HPV 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物であ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。

## 1. HPV16 複製環における oncoprotein の働き

HPV のコードする主要な oncoprotein である E6 と E7 は、細胞の transformation やがん化における機能解析が進んでいるが、ウイルス複製における役割は分かっていない。いずれも細胞におけるウイルスゲノムのメンテナンスに必須であると報告されていたが、我々の HPV16 を用いた変異解析から、ゲノムメンテナンスには必須ではないことが示された。この差異は、効率の良い複製系の構築と、そ

れに伴い初代培養細胞の増殖性を維持した状態でアッセイ出来るという条件が影響していると考えられる。

E6 の変異体では細胞あたりのウイルスゲノムコピー数が顕著に減少していた。この事は未分化状態の細胞で観察されたことから、E6 による上皮形質の変化というよりは、p53 を介した監視機構の破綻が影響している可能性が考えられた。エピゾーム状に外来の DNA が複製することで DNA 損傷反応が惹起され、ウイルスゲノムコピー数の低下が引き起こされており、E6 存在下ではそのような反応が抑制された結果、コピー数の増加が可能となっているものと推察される。

E7 に関しては、その変異の影響がほとんど観察されなかった。この点は HPV18 の結果と大きく異なる。今後ほかのサブタイプを用いた解析も必要となると考えている。

この E7 による分化抑制は、過形成誘導にも重要である。今回、E7 による JNK の恒常的活性化が分化の抑制に関与している可能性を示した。この活性化機構は不明であるが、これまでに E7 が TNFR シグナルを改変することが報告されており、TNFR シグナル抑制に伴う JNK の活性化が関与している可能性も考えられる。

## 2. HPV18 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認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示している。E7 の変異によるこのような効果は HPV16 では観察できなかった。皮膚モデル培養系に適用できたのは、これまでのところ HPV18 のみであり、HPV16 でも同様の解析が必要であると考えられる。

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。

### 3. E4 の機能

E4 には G2/M 期細胞周期停止機能が

あることを報告している。また E7 による分化抑制と拮抗して、ケラチノサイトの分化誘導を促進する活性を見出している。

HPV 感染上皮では E7 (と E6) の働きによって角化細胞の正常な分化が抑制され、過形成や異形性が誘導される。しかし HPV の産生的複製には角化細胞の正常な分化が必要である。E4 は分化層で発現誘導がかかり、E7 の作用を打ち消すことで細胞の分化を進め、HPV の産生的複製に適した細胞環境を整える働きがあるのかも知れない。

また E4 は細胞質で凝集塊を形成している。ここにはシャペロン蛋白の他、ユビキチン化タンパクも集合していることが確認され aggresome 様の構造体を形成していることが示された。

この 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。

#### 4. 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。

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。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。

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はマウスモデルにおいて、血中で安定であり、裸剤と比べ腫瘍への集積性を増すことにより、HPV 陽性の子宮頸癌に対して強い抗腫瘍効果を示す可能性が示唆された。ミセル化することにより、裸剤では抗腫瘍能を示さなかった HPV 陰性の C33 細胞由来の腫瘍に対しても強い抗腫瘍効果があることから、本ミセルは他癌腫でも抗腫瘍効果を示すことが期待される。HPV16 E6E7 を標的とする従来型 siRNA は、RNAi 活性が高い反面、非特異反応性としての細胞毒性が高く、これらは医薬応用には大きな問題である。dsRDC と本研究で見出された idRNA は、GS を介したオフターゲット効果が少ない上に、PS による RISC 形成が全くなく、共に細胞毒性が抑制されていた。特に idRNA は、dsRDC に比べて優れた特異的遺伝子発現抑制活性を有していた。idRNA による RNAi 活性の改善には、5' 性末端 2 塩基 RNA を介した RISC 形成効率の向上が関連していること、オフターゲット効果の減少にはシード領域 (5' 成端

より、2-8 番目)のうち6塩基がDNAであること、またPSのRISC形成欠如は、シード部分とその相補鎖がDNAになっているためと考えられた。

siRNAによるRNAi活性は細胞内RISCの形成効率に依存しており、特にその構成因子であるAGO2蛋白レベルが律速因子であると報告されている。今回の研究で、AGO2発現増加はsiRNAによるRNAi活性を増強し、これにともなってオフターゲット効果の増加も観察された。

miRNA生成は、siRNAと同様にRISC形成を必要するが、siRNAの導入によってAGO2が占拠され、miRNA生成を抑制する。これまで、siRNAの増殖抑制効果は、このmiRNAレベルの低下によるものと考えられていた。しかし、HeLa細胞において高レベルのAGO2発現はsiRNAによるmiRNAレベルの低下は阻止したのにも拘らず、非特異的増殖抑制を増強した。また、AGO2ノックダウンは、細胞増殖に全く影響を及ぼさないばかりか、ノックダウン後のsiRNA導入に伴う増殖抑制も部分的に抑制した。以上から、siRNAによる細胞毒性は、miRNA発現抑制ではなくオフターゲット効果によるものである可能性が示唆された。

一部のsiRNAとdsRDCは、HeLa細胞においてIFN $\beta$ の発現を引き起こした。これらの配列にはこれまで知られているTLRを活性化するものではなく、19塩基2本鎖核酸で3鎖に2塩基突出端を有する構造であっても自然免疫を活性化し、細胞増殖を抑制する可能性が示された。今後その機構

について検討する予定である。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薬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。

## 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HPV16のL1蛋白と融合させたVLPを抗原とする第二世代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。L2-56/75領域には少なくとも2つの交差性中和エピトープがある。これら2つのエピトープに対する抗体を誘導できる抗原は、すべ



ての高リスク型を含む幅広いHPVの感染予防が可能なワクチンと成り得る。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第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。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。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の臨床応用にも取り組んで行く。

今回は新規HPV複製系を用いた、reverse geneticsによる遺伝子機能解析を行った。この実験系は、HPV複製制御機構を理解する上で重要なアッセイ基盤になると考えられ、今後の抗ウイルス剤開発や、そのスクリーニングに貢献するものと期待される。

HPV制御遺伝子の中で、その役割がよく分かっていないE4やE5に関しても、その機能が明らかになれば、その知見に基づいて抗ウイルス剤の分

子標的の同定をすすめることが可能となる。今回の研究ではとくにE6が有望な分子標的であることが示された。

またHPVに対する抗ウイルス作用を示す化合物のスクリーニング系の開発も、今後改良を加えて実用的なものとする必要がある。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。これに関し、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。HPV分子標的治療薬として、HPV癌遺伝子のE6を標的にする核酸医薬（siRNA）にナノテクノロジーを活かしたDDSシステムを組み合わせた創薬の開発に着手した。今後、日本発の分子標的治療薬の開発につなげたい。HPV関連腫瘍においてE6E7を標的にするsiRNAは、新しい治療薬として有望であるが、オフターゲット効果や細胞毒性などの副作用の克服が不可欠である。本研究で我々は、オフターゲット効果がsiRNAの細胞毒性に関与していることを明らかにし、その解決法としてシード領域をDNA修飾したdsRDCが有効であることを示した。また、dsRDC化に伴うRISC形成の低下は、GS鎖5'端2塩基がDNAであるため、これらをRNAに戻したidRNA構造は、高い遺伝子抑制効果と

抑制された非特異反応（オフターゲット効果、細胞毒性）を示し、E6E7を標的にした核酸治療薬への応用に有用であると考えられた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Yugawa T, Narisawa-Saito M, Yoshimatsu Y, Haga K, Ohno S, Egawa N, Fujita M, Kiyono T. DeltaNp63alpha repression of the Notch1 gene supports the proliferative capacity of normal human keratinocytes and cervical cancer cells. *Cancer Res* 70: 4034-44, 2010.

Iwakawa R, Kohno T, Enari M, Kiyono T, Yokota J. Prevalence of human papillomavirus 16/18/33 infection and p53 mutation in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 101: 1891-6, 2010.

Aoyagi T, Takahashi M, Higuchi M, Oie M, Tanaka Y, Kiyono T, Aoyagi Y, Fujii M. The PDZ domain binding motif (PBM) of human T-cell leukemia virus type 1 Tax can be substituted by heterologous PBMs from viral oncoproteins during T-cell transformation. *Virus Genes* 40: 193-9, 2010.

Miura S, Kawana K, Schust DJ, Fujii T, Yokoyama T, Iwasawa Y, Nagamatsu T, Adachi K, Tomio A, Tomio K, Kojima S, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y: CD1d, a sentinel molecule bridging innate and adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV. *J Virol*, 84: 11614-11623, 2010

Adachi K, Kawana K, Yokoyama T, Fujii T, Tomio A, Miura S, Tomio K, Kojima S, Oda K, Sewaki T, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y: Oral immunization with *Lactobacillus casei* vaccine expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 is an effective strategy to induce mucosal cytotoxic lymphocyte against HPV16 E7. *Vaccine*, 28: 2810-2817, 2010

Yamashita H, Okuma K, Kawana K,

Nakagawa S, Oda K, Yano T, Kobayashi S, Wakui R, Ohtomo K, Nakagawa K.

Comparison Between Conventional Surgery Plus Postoperative Adjuvant Radiotherapy and Concurrent Chemoradiation for FIGO Stage IIB Cervical Carcinoma: A Retrospective Study. *Am J Clin Oncol*, 33:583-6, 2010

Satsuka, A., Yoshida, S., Kajitani, N., Nakamura, H. and Sakai, H.: A novel human papillomavirus type18 replicon and its application in screening the anti-viral effects of cytokines. *Cancer Sci*. 101: 536-542, 2010.

Ishii Y, Tanaka K, Kondo K, Takeuchi T, Mori S, Kanda T, Inhibition of nuclear entry of HPV16 pseudovirus-packaged DNA by an anti-HPV16 L2 neutralizing antibody. *Virology*. 406: 181-188, 2010.

Nagasaka K, Pim D, Massimi P, Thomas M, Tomaić V, Subbaiah VK, Kranjec C, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Myers M, Banks L. The cell polarity regulator hScrib controls ERK activation through a KIM site-dependent interaction. *Oncogene* 29:5311-21, 2010.

Nagasaka K, Massimi P, Pim D, Subbaiah VK, Kranjec C, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Banks L. The mechanism and implications of hScrib regulation of ERK. *Small GTPases*. 2010 Sep;1(2):108-112.

Hiraike H, Wada-Hiraike O, Nakagawa S, Koyama S, Miyamoto Y, Sone K, Tanikawa M, Tsuruga T, Nagasaka K, Matsumoto Y, Oda K, Shoji K, Fukuhara H, Saji S, Nakagawa K, Kato S, Yano T, Taketani Y. Identification of DBC1 as a transcriptional repressor for BRCA1. *Br J Cancer*. 2010 Mar 16;102(6):1061-7.

Zushi Y, Narisawa-Saito M, Noguchi K, Yoshimatsu Y, Yugawa T, Egawa N, Fujita M, Urade M, and Kiyono T. An in vitro multistep carcinogenesis model for both HPV-positive and -negative human oral squamous cell

- carcinomas. *Am J Cancer Res* 1:869-881, 2011.
- Yamato K, Egawa N, Endo S, Ui-Tei K, Yamada T, Saigo K, Hyodo I, Kiyono T, and Nakagawa I. Enhanced specificity of HPV16 E6E7 siRNA by RNA-DNA chimera modification. *Cancer Gene Ther* 18:587-597, 2011.
- Sugimoto N, Yugawa T, Iizuka M, Kiyono T, and Fujita M. Chromatin Remodeler Sucrose Nonfermenting 2 Homolog (SNF2H) Is Recruited onto DNA Replication Origins through Interaction with Cdc10 Protein-dependent Transcript 1 (Cdt1) and Promotes Pre-replication Complex Formation. *J Biol Chem* 286:39200-39210, 2011.
- Shiomi K, Kiyono T, Okamura K, Uezumi M, Goto Y, Yasumoto S, Shimizu S, and Hashimoto N. CDK4 and cyclin D1 allow human myogenic cells to recapture growth property without compromising differentiation potential. *Gene Ther* 18:857-866, 2011.
- Shibata T, Kokubu A, Saito S, Narisawa-Saito M, Sasaki H, Aoyagi K, Yoshimatsu Y, Tachimori Y, Kushima R, Kiyono T, and Yamamoto M. NRF2 mutation confers malignant potential and resistance to chemoradiation therapy in advanced esophageal squamous cancer. *Neoplasia* 13:864-873, 2011.
- Shaker M, Yokoyama Y, Mori S, Tsujimoto M, Kawaguchi N, Kiyono T, Nakano T, and Matsuura N. Aberrant expression of disintegrin-metalloprotease proteins in the formation and progression of uterine cervical cancer. *Pathobiology* 78:149-161, 2011.
- Mizumoto Y, Kyo S, Kiyono T, Takakura M, Nakamura M, Maida Y, Mori N, Bono Y, Sakurai H, and Inoue M. Activation of NF- $\kappa$ B Is a Novel Target of KRAS-Induced Endometrial Carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 17:1341-1350, 2011.
- Matsuyama M, Goto H, Kasahara K, Kawakami Y, Nakanishi M, Kiyono T, Goshima N, and Inagaki M. Nuclear Chk1 prevents premature mitotic entry. *J Cell Sci* 124:2113-2119, 2011.
- Kyo S, Sakaguchi J, Kiyono T, Shimizu Y, Maida Y, Mizumoto Y, Mori N, Nakamura M, Takakura M, Miyake K, Sakamoto M, and Inoue M. Forkhead transcription factor FOXO1 is a direct target of progestin to inhibit endometrial epithelial cell growth. *Clin Cancer Res* 17:525-537, 2011.
- Ibi M, Zou P, Inoko A, Shiromizu T, Matsuyama M, Hayashi Y, Enomoto M, Mori D, Hirotsune S, Kiyono T, Tsukita S, Goto H, and Inagaki M. Trichoplein controls microtubule anchoring at the centrosome by binding to Odf2 and ninein. *J Cell Sci* 124:857-864, 2011.
- Fujiwara S, Nawa A, Luo C, Kamakura M, Goshima F, Kondo C, Kiyono T, Kikkawa F, and Nishiyama Y. Carrier cell-based delivery of replication-competent HSV-1 mutants enhances antitumor effect for ovarian cancer. *Cancer Gene Ther* 18:77-86, 2011.
- Mori S, Nakao S, Kukimoto I, Kusumoto-Matsuo R, Kondo K, Kanda T. Biased Amplification of HPV DNA in Specimens Containing Multiple HPV Types by PCR with Consensus Primers. *Cancer Sci*, 2011, 102: 1223-7.
- Kojima S, Kawana K, Fujii T, Yokoyama T, Miura S, Tomio K, Tomio A, Yamashita A, Adachi K, Sato H, Nagamatsu T, Schust DJ, Kozuma S, Taketani Y; Characterization of intraepithelial lymphocytes (IELs) residing in the cervical mucosa of patients with human papillomavirus (HPV)-infected intraepithelial neoplastic lesions. *Am J Reprod Immunol*, 66: 435-443, 2011
- Tanikawa M, Wada-Hiraike O, Nakagawa S, Shirane A, Hiraike H, Koyama S, Miyamoto Y, Sone K, Tsuruga T, Nagasaka K, Matsumoto Y, Ikeda Y, Shoji K, Oda K, Fukuhara H, Nakagawa K, Kato S, Yano T, Taketani Y. Multifunctional transcription factor TFII-I is an activator of BRCA1 function. *Br J Cancer*. 2011 Apr 12;104(8):1349-55.
- 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

Bayasula, Iwase A, Kiyono T, Takikawa S, Goto M, Nakamura T, Nagatomo Y, Nakahara T, Kotani T, Kobayashi H, Kondo M, Manabe S, and Kikkawa F: Establishment of a human nonluteinized granulosa cell line that transitions from the gonadotropin-independent to the gonadotropin-dependent status. *Endocrinology.*153:2851-2860, 2012.

Bono Y, Kyo S, Takakura M, Maida Y, Mizumoto Y, Nakamura M, Nomura K, Kiyono T, and Inoue M: Creation of immortalised epithelial cells from ovarian endometrioma. *Br J Cancer.*106:1205-1213, 2012.

Egawa N, Kawai K, Egawa K, Honda Y, Kanekura T, and Kiyono T: Molecular cloning and characterization of a novel human papillomavirus, HPV 126, isolated from a flat wart-like lesion with intracytoplasmic inclusion bodies and a peculiar distribution of Ki-67 and p53. *Virology.*422:99-104, 2012.

Egawa N, Nakahara T, Ohno S, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Yamato K, Natori Y, and Kiyono T: The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J Virol.*86:3276-3283, 2012.

Nishimoto N, Watanabe M, Watanabe S, Sugimoto N, Yugawa T, Ikura T, Koiwai O, Kiyono T, and Fujita M: Heterocomplex formation by Arp4 and beta-actin is involved in the integrity of the Brg1 chromatin remodeling complex. *J Cell Sci.*125:3870-3882, 2012.

Yokoi T, Seko Y, Makino H, Hatou S, Yamada M, Kiyono T, Umezawa A, Nishina H, and Azuma N: Establishment of functioning human corneal endothelial cell line with high growth potential. *PloS one* 7:e29677, 2012.

Narisawa-Saito M, Inagawa Y, Yoshimatsu Y, Haga K, Tanaka K, Egawa N, Ohno S I, Ichikawa H, Yugawa T, Fujita M, and Kiyono T: A critical role of MYC for transformation of human cells by HPV16 E6E7 and oncogenic HRAS. *Carcinogenesis*, 2012.

Li P, Goto H, Kasahara K, Matsuyama M,

Wang Z, Yatabe Y, Kiyono T, and Inagaki M.P90 RSK arranges Chk1 in the nucleus for monitoring of genomic integrity during cell proliferation. *Mol Biol Cell*, 2012.

Kitamura-Muramatsu Y, Kusumoto-Matsuo R, Kondo K, Mori S, Saito S, Tsukahara Y, Kukimoto I. Novel Multiplexed Genotyping of Human Papillomavirus Using a VeraCode-Allele Specific Primer Extension Method. *Micrbiol Immunol.* 2012, 56: 128-33.

Nakao S, Mori S, Kondo K, Matsumoto K, Yoshikawa H, Kanda T. Monoclonal antibodies recognizing cross-neutralization epitopes in human papillomavirus 16 minor capsid protein L2. *Virology*, 2012, 434: 110-7.

Kondo K, Uenoyama A, Kitagawa R, Tsunoda H, Kusumoto-Matsuo R, Mori S, Ishii Y, Takeuchi T, Kanda T, Kukimoto I. Genotype distribution of human papillomaviruses in Japanese women with abnormal cervical cytology. *Open Virol J*, 2012, 6: 277-83.

佐塚文乃, 酒井博幸: HPVのライフサイクル. *Visual Dermatology*, 9: 264-271, 2010. (総説)

Kajitani, N., Satsuka, A., Kawate, A., and Sakai, H.: Productive lifecycle of human papillomavirus that depends upon squamous epithelial differentiation. *Front. Microbiol.* 3: 152, 2012 (総説、査読あり)

Kawana K, Adachi K, Kojima S, Kozuma S, Fujii T, Therapeutic human papillomavirus (HPV) vaccines: a novel approach, *Open Virol J*, 6: 264-269, 2012

Taguchi A, Kawana K, Yokoyama T, Adachi K, Yamashita A, Tomio K, Kojima S, Oda K, Fujii T, Kozuma S; Adjuvant effect of Japanese herbal medicines on the mucosal type 1 immune response to human papillomavirus (HPV) E7 in mice immunized orally with *Lactobacillus*-based therapeutic HPV vaccine in a synergistic manner. *Vaccine*, 30: 5368-5372, 2012

Ochi H, Matsumoto K, Kondo K, Oki A, Furuta R, Hirai Y, Yasugi T, Takatsuka N,

Maeda H, Mitsunashi A, Fujii T, Kawana K, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Kanda T, Yoshikawa H; Do neutralizing antibody responses generated by human papillomavirus infections favor a better outcome of low-grade cervical lesions? *J Med Virol*, 84: 1128-1134, 2012

Matsumoto K, Hirai Y, Furuta R, Takatsuka N, Oki A, Yasugi T, Maeda H, Mitsunashi A, Fujii T, Kawana K, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H; Subsequent risks for cervical precancer and cancer in women with low-grade squamous intraepithelial lesions unconfirmed by colposcopy-directed biopsy: Results from a multicenter, prospective, cohort study, *Int J Clin Oncol*, 17: 233-239, 2012

Yamamoto N, Mori R, Jacklin P, Osuga Y, Kawana K, Shibuya K, Taketani Y; Introducing HPV vaccine and scaling up screening procedures to prevent deaths from cervical cancer in Japan: A cost-effectiveness analysis. *Br J Obstet and Gynecol*, 119: 177-186, 2012

Shirane A, Wada-Hiraike O, Tanikawa M, Seiki T, Hiraike H, Miyamoto Y, Sone K, Hirano M, Oishi H, Oda K, Kawana K, Nakagawa S, Osuga Y, Fujii T, Yano T, Kozuma S, Taketani Y. Regulation of SIRT1 determines initial step of endometrial receptivity by controlling E-cadherin expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Aug 3;424(3):604-10.

Teng Z, Yoshida T, Okabe M, Toda A, Higuchi O, Nogami M, Yoneda N, Zhou K, Kyo S, Kiyono T, and Nikaido T: Establishment of immortalized human amniotic mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*.22:267-278, 2013.

Unno J, Takagi M, Piao J, Sugimoto M, Honda F, Maeda D, Masutani M, Kiyono T, Watanabe F, Morio T, Teraoka H, and Mizutani S: Artemis-dependent DNA double-strand break formation at stalled replication forks. *Cancer Sci*. 2013.

Zhou K, Koike C, Yoshida T, Okabe M,

Fathy M, Kyo S, Kiyono T, Saito S, and Nikaido T: Establishment and characterization of immortalized human amniotic epithelial cells. *Cellular reprogramming*.15:55-67, 2013.

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*. 2013 Nov;33(22):4434-47.

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.

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.

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

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

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 $\gamma$  downregulates ERK signaling and suppresses oncogene-induced cell transformation, *PLOS One*, 8: e53752, 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

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

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

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.

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*, E-pub, 2014

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, 2014

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

Mori S, Nakao S, Kondo K, Yoshikawa H, Kanda T, Monoclonal Antibodies Recognizing Cross-Neutralization Epitopes in HPV16 L2 aa56-75 Region. 27th International papillomavirus conference 2011 (Berlin)

Kukimoto I, Maehama T, Mori S, Kusumoto-Matsuo R, Kondo K, Sekizuka T, Kuroda M. A novel method to determine the full-genome sequence of human papillomavirus type 16 using full-circle PCR followed by deep

sequencing. 28th International Papillomavirus Conference (Puerto Rico)

Ishii Y, Nakahara T, Demoto S, Mori S, Takeuchi T, Kukimoto I, Kanda T. Identification of Trappc8 as a host factor that is required for human papillomavirus entry. DNA Tumour Virus Meeting 2012 (Montreal)

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

石井克幸、田中恵子、近藤一成、竹内隆正、森清一郎、神田忠仁 高リスク型共通中和抗体によるヒトパピローマウイルス (HPV)感染抑制機構 第58回日本ウイルス学会学術集会 (徳島)

中尾砂理、森清一郎、近藤一成、吉川裕之、神田忠仁、HPV16副キャプシドタンパク質L2の交叉性中和エピトープを認識するモノクローナル抗体の分離と解析、第70回日本癌学会学術総会 (名古屋)

森清一郎、松尾理加、石井克幸、近藤一成、終元巖、Virus-like particleを用いた新たなHPV16/18抗体価測定系の確立、第60回日本ウイルス学会学術総会 (大阪)

石井克幸、中原知美、森清一郎、竹内隆正、終元 巖、神田忠仁、Trappc8はヒトパピローマウイルスの侵入に必要な宿主蛋白質である、第60回日本ウイルス学会学術総会 (大阪)

神田忠仁、森清一郎、終元巖、HPVワクチン - 有効性と残された課題、第60回日本ウイルス学会学術総会 (大阪)

石井克幸、中原知美、森清一郎、竹内隆正、終元 巖、神田忠仁、Trappc8はヒトパピローマウイルスの侵入に必要な宿主蛋白質である、第85回日本生化学会学術大会 (福岡)

森清一郎、松尾理加、終元巖、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)

終元巖、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、終元巖、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 51<sup>th</sup> 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 23<sup>rd</sup> 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 12<sup>th</sup> 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 感染症を見直す一基礎から臨床まで一、日本性感染症学会教育講演、平成 25 年 11 月、岐阜

Kawana K, HPV-associated cancer and development of a novel anti-cancer HPV therapeutic vaccine; 19<sup>th</sup> International Charles Heidelberger Symposium, Feb, 2013, Kagoshima

Kawana K, Current issues and future for prophylactic and therapeutic HPV vaccines, 第 10 回日本臨床腫瘍学会ワークショップ、平成 24 年 7 月、大阪

川名 敬、性感染症に対する粘膜免疫を介したワクチン開発、第 16 回日本ワクチン学会、平成 24 年 11 月、東京

川名 敬、HPV に対する腸管粘膜免疫を介した子宮頸癌治療ワクチンの開発、日本薬学会 133 年会、平成 24 年 3 月、横浜

Kawana K, Development of novel HPV vaccines: broad-spectrum prophylactic and therapeutic, 第 63 回日本産科婦人科学会、日韓シンポジウム、平成 23 年 8 月、大阪

Kawana K, Novel immunotherapy and the clinical trial for cervical cancer via mucosal immunity to human papillomavirus E7., 第 70 回日本癌学会、平成 23 年 10 月、名古屋

川名 敬, 日本エイズ学会日本性感染症学会合同シンポジウム: 婦人科領域における性感染症~HPV ワクチンによる予防を含めて、第 23 回日本性感染症学会、平成 23 年 12 月、東京

川名 敬, CIN3 に対する乳酸菌 HPV 治療ワクチン臨床試験例の免疫学的解析、日本産科婦人科学会総会、東京、平成 22 年 4 月。

川名 敬, 子宮頸癌前癌病変に対する HPV E7 を標的とした癌ワクチン療法の臨床試験における有用性、日本癌治療学会、シンポジウム 20 癌免疫療法、京都、平成 22 年 10 月

川名 敬, 子宮頸がん前癌病変に対する乳酸菌を利用した HPV 治療ワクチンの第 I/IIa 相臨床試験症例における有効性の免疫学的解析、日本癌学会、大阪、平成 22 年 9 月。

Kenji Yamato, Takuma Nakajima, Ichiro Nakagawa

Enhanced specificity of HPV16 E6E7 siRNA by RNA-DNA chimera modification 第 33 回日本分子生物学会年会 平成 22 年 12 月 神戸

Kenji Yamato, Shinji Endo

AGO2-association, microRNA suppression and cytotoxicity of RNA-DNA chimera modified siRNA 第 34 回日本分子生物学会年会 平成 23 年 12 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 class III HDAC 阻害剤 tenovin-6 の抗腫瘍効果に関する検討

第 71 回日本癌学会学術総会 平成 24 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 24 年 12 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 siRNA 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

佐塚文乃、梶谷直子、酒井博幸: エストロジェン刺激による HPV 陽性細胞の増殖制御. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 7 日-9 日

佐塚文乃、梶谷直子、酒井博幸: Mechanisms of the HPV-induced transformation. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22 日-24 日

佐塚文乃、梶谷直子、酒井博幸: Novel human papillomavirus type 18 replicon and its application in screening the antiviral effects of cytokines. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010 年 12 月 7 日-10 日

佐塚文乃、梶谷直子、川手章史、酒井博幸: Analysis of HPV genome replication. International Union of Microbiological Societies Congresses 2011, Sapporo, Sep 11-16

梶谷直子、佐塚文乃、川手章史、酒井博幸: HPV 18 E1<sup>E4</sup>, a viral gene product encoded by the early gene region of HPV genome, interacts with vimentin intermediate filaments in vitro and in vivo. International Union of Microbiological Societies Congresses 2011, Sapporo, Sep 11-16

佐塚文乃、梶谷直子、川手章史、酒井博幸: HPV ゲノムの複製メカニズムの解析. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月 3 日-5 日

梶谷直子、佐塚文乃、川手章史、酒井博幸: Identification of a function of Human papillomavirus 18 E1<sup>E4</sup>. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月 3 日-5 日

梶谷直子、川手章史、酒井博幸: HPV 18 E1<sup>E4</sup> の新規機能の探索: ビメンチンとの相互作用. 第 71 回 日本癌学会学術総会、札幌、2012 年 9 月 19 日-21 日

梶谷直子、川手章史、酒井博幸: HPV 18 E1<sup>E4</sup> の新規機能の探索. 第 60 回 日本



ウイルス学会学術集会，大阪，2012年11月  
13日-15日

梶谷直子，酒井博幸：HPV E1^E4はアグ  
リ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agosome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

### 3. 総説

知的財産権の出願・登録状況

特許出願

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 (特願  
2010-291067) 出願日：2011年12月26日

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

名称：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

遺伝子発現阻害剤及び阻害方法

特許出願番号 2011-268252

出願日 2011年12月7日

出願人 (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

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）

H22-H25 年度総合研究報告書

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

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。

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学（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作製し、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。

#### 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。

#### (1) 粘膜免疫を介したHPV治療ワクチン

CIN3では、HPV癌蛋白質E6, E7が恒常的に発現していることかHPVのE6, E7を標的にしたHPV治療ワクチンは有望な治療薬になりうる。特にE7分子はヒトでの免疫原性が明確であり、E7に対する細胞傷害性T細胞(CTL)を誘導する免疫療法が期待される。HPV治療ワクチンとして、海外で8つの臨床試験が施行されているが、いずれも実用化されていない。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。

我々は、これまでのHPV治療ワクチンとは全く違う戦略を考えた。従来のHPV治療ワクチンは全身性免疫を誘導する皮下注か筋注であり、末梢血(PBMC)中のCTLでモニターしていた。しかし、我々は粘膜免疫を誘導することに主眼を置いた。モニターも粘膜リンパ球、特にCIN3が発生する子宮頸部粘膜のリンパ球(cervical lymphocytes)を用いた。これにより、粘膜病変であるCIN3に実際に作用している粘膜リンパ球を直接測定できる。

子宮頸部の粘膜免疫を誘導するためには、そのメモリー・誘導組織であ

る腸管粘膜リンパ組織(GALT)を刺激する経口投与が効率的であると考えた。安全性が高い乳酸菌は経口投与の際に製剤化しやすいキャリアーとなることに着目し、HPVE7癌蛋白質を発現している乳酸菌をワクチン抗原とした乳酸菌ワクチンを開発した。本研究では、E7発現乳酸菌(GLBL101c)の有効性・安全性を臨床試験により評価し、更なる改善点を見だし、改良を加えることを目的とした。

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相に準じた探索的自主臨床試験を実施し、その臨床効果、免疫学的効果の評価することを目的としている。

さらに、HPV治療ワクチンの有効性を増強するために、漢方アジュバントを組み合わせることを考えた。漢方薬は安全性が高く、ヒトでの臨床応用が容易である。粘膜アジュバントとともに粘膜免疫、特に細胞性免疫を増強するかを検討することを併せて行った。

#### (2) 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) 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/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。

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。

### (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。