

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、ウェスタンブロット法により検討した。

（倫理面への配慮）

・自主臨床研究の実施においては「臨床研究に関する倫理指針」（平成15年厚生労働省告示第255号）に従い、研究機関（東京大学医学部）の臨床試験審査（IRB）委員会での審査・承認の後に、UMIN公開（2009年2月6日登録、UMIN000001686）を行い、実施する。なお、本研究で用いる組換え乳酸菌製剤は製造過程において加熱処理による死菌化をしたものであり、「遺伝子組換え生物等の使用などの規制による生物多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）」によるところの「遺伝子組換え生物等」には当たらないことから、遺伝子治療には該当しないもの

であると考えます。

・各被験者のデータについては、連結可能匿名化され保存される。個々の患者とデータの対応表は研究代表者（川名 敬）が管理する。学会発表・論文発表などでこれらの情報が記載される際には被験者のプライバシーが確保される。

- ① 各被験者はID番号で表記する。
- ② 研究期間中（5年間）は、研究代表者（川名 敬）が対応表及び個人データを産科婦人科学教室医局内の鍵付き金庫に保管し、管理責任を負う。試料は番号のみを記載して冷所保存となる。
- ③ 試料は本研究以外の目的ではいっさい使用せず、研究期間中は産婦人科医局内で保管する。
- ④ 本研究期間の終了後は、将来の免疫学的蛋白質に関する研究に使用することが同意された検体を除き、全て廃棄する。研究期間終了後も保存することに同意が得られた検体は引き続き産婦人科医局内で試料番号により保管する。
- ⑤ HPV検査については希望があれば被験者に伝え、その臨床的意義を説明しカウンセリングに応じる。免疫学的検査の結果については個々の利益につながらないため被験者に伝えない。
- ⑥ 患者が研究に参加することは自由であり、参加を拒否しても一切不利益を被らない。また、研究開始後いつでも参加意思を撤回することができる。

その他の研究にあたっては、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、個人情報等を厳格に管理・保存した。動物実験については、実施施設における動物実験に関する倫理規定を遵守して実施することとする。

C. 研究結果

(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 γ 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、臨床的有効性が示され、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の結果を効果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週目にさらに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。

<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）が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 γ 産生リンパ球数(E7-CMI)は、ELISPOT法で検討した。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10⁵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に併用した場合は、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。

(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) 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 γ 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。

E. 結論

HPVE7を標的としたHPV治療ワクチンとして、世界で初めて粘膜免疫を介した抗E7細胞性免疫を誘導するワクチン（GLBL101c）を開発した。GLBL101c経口投与によって、腸管粘膜の粘膜免疫機構に抗原刺激を与え、

そこで誘導された抗E7細胞性免疫（mucosal T cells）がヒトの子宮頸部においてE7特異的細胞性免疫を発揮し、それに伴って病理学的有効性が得られていることから、薬理効果に伴った臨床効果と考えられた。GLBL101cの4 cap/日投与における奏効率80%は、明らかな臨床効果を考えられた。

漢方や粘膜アジュバントの併用によってGLBL101cの投与量を減らすことができる可能性があり低コスト化や臨床的効果の増強が期待される。

一方、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学（siRNA）にナノテクノロジーを活かしたDDSシステムに組み合わせた創薬の開発を始めた。今後、日本発の分子標的治療薬の開発につなげたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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
- 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) 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
 - 5) 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
 - 6) 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
 - 7) 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
 - 8) 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
 - 9) 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
 - 10) 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
 - 11) 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
 - 12) Ochi H, Matsumoto K, Kondo K, Oki A, Furuta R, Hirai Y, Yasugi T, Takatsuka N, Maeda H, Mitsuhashi 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
- 13) Matsumoto K, Hirai Y, Furuta R, Takatsuka N, Oki A, Yasugi T, Maeda H, Mitsuhashi 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
 - 14) 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 Japn: A cost-effectiveness analysis. *Br J Obstet and Gynecol*, 119: 177-186, 2012
 - 15) 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
 - 16) 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
 - 17) 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
 - 18) 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: 583-586, 2010
- ## 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、平成 25 年 11 月、岐阜
 - 7) Kawana K, HPV-associated cancer and development of a novel anti-cancer HPV therapeutic vaccine; 19th International Charles Heidelberger Symposium, Feb, 2013, Kagoshima
 - 8) 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
 - 9) 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
 - 10) 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
 - 11) 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
 - 12) 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
 - 13) 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
 - 14) 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。
 - 15) 川名 敬、子宮頸癌前癌病変に対する HPV E7 を標的に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
 - 16) 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。
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 - 1) 名称：粘膜免疫賦活化剤及び HPV 感染症治療用経口医薬組成物
出願番号：特願 2012-138943
出願日：2012/6/20
出願人：国立大学法人東京大学

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

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・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。

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。

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・

治療する戦略を考案すること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。

B. 研究方法

【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%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 (ロシュ)。

【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, flaggrin, 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。

(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. 研究結果

1. 新規複製系を利用した HPV 遺伝子機能の解析

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ことが保証できない。

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が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異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 では、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する、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。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す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。ここでは、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、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. 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しめした。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。

E. 結論

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

Satsuka, A., Yoshida, S., Kajitani, N., Nakamura, H., and Sakai, H.: A novel human papillomavirus type 18 replicon and its application in screening the anti-viral effects of cytokines. *Cancer Sci.* 101: 536-542, 2010.

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.

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

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, Sep11-16

梶谷直子, 佐塚文乃, 川手章史, 酒井博幸: HPV 18 E1^{E4}, 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, Sep11-16

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^{E4}. 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 18E1^{E4} 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 18E1^{E4} 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 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

3. 総説

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

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 (査読あり)

H. 知的財産の出願・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）

総合研究報告書

次世代 HPV 感染予防ワクチンの開発

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 HPV16のキャプシドタンパク質L2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。

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。全ての高リスク型に有効な次世代ワクチンの開発が求められている。副キャプシドタンパク質L2には複数の交差性中和エピトープがあり、中でも、HPV16 L2のアミノ酸56から75 (L2-56/75) が最も幅広い交差性を持つことから、ワクチン抗原として注目されている。本研究の目的は、1)L2-56/75にある中和エピトープの詳細を調べ、ワクチン開発に役立つとともに、実用化を促進するための科

学的基盤を強化すること、2) L2-56/75を使用した、ヒトに接種可能なワクチン抗原を開発すること、3) 臨床試験においてL2ワクチンの効果を判定するための方法を確立すること、である。

B. 研究方法

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。3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。

(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

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。

D. 考察

1) 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 (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、