

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ため、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。

#### E. 結論

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。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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*, 2010, 406: 181-8.

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.

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.

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.

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.

## 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. 27<sup>th</sup> 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. 28<sup>th</sup> 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、柗元巖、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、柗元 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、柗元巖、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、柗元 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、柗元巖、ヒトパピローマウイルス16型と18型間での複製干渉機構、第61回日本ウイルス学会学術総会 (神戸)

柗元巖、森清一郎、近藤一成、個々の臨床検体における HPV16 ゲノム多様性の解析、第72回日本癌学会学術総会 (横浜)

近藤一成、佐藤 奈加子、角田肇、森清一郎、竹内隆正、石井克幸、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)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

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

HPV/HB s キメラタンパク質を有効成分とする HPV 感染症及び/又は B 型肝炎用ワクチン (PCT/JP2013/082094) 出願日:2013年11月28日

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

総合研究報告書

HPV 持続感染機構の解析と複製阻害剤による感染排除に関する研究

分担研究者 中川俊介 帝京大学医学部 産婦人科教室 講師

研究要旨 子宮頸癌の発症およびその進展にHPVの癌蛋白による感染宿主であるヒトの癌抑制蛋白のユビキチン化を介する分解が深く関与している。HPVの持つE6癌蛋白はユビキチン化を介してp53を分解する。E6癌蛋白はそれ以外にも膜蛋白を含め、多くの癌抑制蛋白を同様の機構で分解する。ユビキチン化されたこれらの標的蛋白は最終的にプロテアソームにおいて分解を受ける。このプロテアソームの阻害剤を用いて、子宮頸癌由来の細胞株の増殖抑制を見いだした。このプロテアソーム阻害剤の子宮頸癌に対する抗腫瘍効果は、シスプラチンとの併用で、相乗効果を示し、またp53の発現回復を介するメカニズムで効果を示すことが明らかとなった。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。

A. 研究目的

HPVの持続感染陽性の子宮頸部上皮はHPVゲノムのうち、癌遺伝子であるE6遺伝子、E7遺伝子がひとのゲノムに組み込まれる。このことより、一旦HPVの癌遺伝子が組み込まれた子宮頸部の細胞では、これらの癌遺伝子が高発現することが知られている。E6癌蛋白はユビキチン化を介して癌抑制蛋白を分解する。プロテアソーム阻害剤によりこれらの蛋白の分解を抑制することにより子宮頸癌の増殖抑制効果がもたらさせるかを検討し、プロテアソーム阻害剤の他剤との併用効果の有無、またその子宮頸癌に対する抗腫瘍効果発揮のメカニズムの解明を目的とした。

B. 研究方法

我々は、プロテアソーム阻害剤であるMG132をナノミセルに内包化するシステムを東大工学部の片岡研と共同で開発した。このまたMG132内包ミセルが腫瘍集積性を持つかを検討するために、ミセルを傾向ラベルし、傾向の腫瘍への集積性を検討した。HPV陽性のHeLa、Caski細胞とHPV陰性のC33細胞をヌードマウスの皮下に移植し、プロテアソーム阻害剤であるMG132とそれを内包したナノミセルの抗腫瘍能を検討した。また、同時にシスプラチン等の化学療法剤を併用することにより、相乗効果があるかも検討した。今年度は更に、シスプラチン等の化学療法剤をプロテアソーム阻害剤と併用し、*in vitro* および *in vivo* で相乗効果を検討した。また、p53

に対する siRNA を用いて、プロテアソーム阻害剤による子宮頸癌に対する抗腫瘍効果が、P53 の発現回復を介するかを検討した。

(倫理面への配慮)

現在まで、患者に関わる実験や研究は行っておらず、倫理面への配慮の必要性は無い。

### C. 研究結果

プロテアソーム阻害剤である

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

現回復を介することが証明された。

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。

### D. 考察

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

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。

## E. 結論

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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

A novel interaction between hScrib and PP1 $\gamma$  downregulates ERK signaling and suppresses oncogene-induced cell transformation.

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.  
PLoS One. 2013;8(1):e53752.

Sequential effects of the proteasome inhibitor bortezomib and chemotherapeutic agents in uterine cervical cancer cell lines.

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.

Oncol Rep. 2013 Jan;29(1):51-7.

Regulation of SIRT1 determines initial step of endometrial receptivity by controlling E-cadherin expression.

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.

Biochem Biophys Res Commun. 2012 Aug 3;424(3):604-10. doi:

The mechanism and implications of hScrib regulation of ERK.

Nagasaka K, Massimi P, Pim D, Subbaiah VK, Kranjec C, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Banks L.  
Small GTPases. 2010 Sep;1(2):108-112.

Multifunctional transcription factor TFII-I is an activator of BRCA1 function.

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.

Br J Cancer. 2011 Apr 12;104(8):1349-55.

The cell polarity regulator hScrib controls ERK activation through a KIM site-dependent interaction.

Nagasaka K, Pim D, Massimi P, Thomas M, Tomaić V, Subbiah VK, Kranjec C, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Myers M, Banks L.

Oncogene. 2010 Sep 23;29(38):5311-21.

Identification of DBC1 as a transcriptional repressor for BRCA1.

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.

Br J Cancer. 2010 Mar 16;102(6):1061-7.

## 2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

国外PCT出願 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

片岡一則, 西山伸宏, CabralHoracio, 宮本雄一郎, 中川俊介, 松本陽子

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

子宮頸部高度異型上皮に対する RNAi 治療開発

分担研究者 大和 建嗣 筑波大学医学医療系 消化器内科 研究員

研究要旨

HPV16 感染に関連した高度異型上皮の治療のための、HPV16 E6E7 を標的とした RNAi 医薬開発を目指した研究をおこなう。我々は、これまでの研究で HPV16 関連癌細胞株の増殖抑制に有効な siRNA 配列を見いだした。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 を標的とした 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。

A. 研究目的

子宮頸部高度異型上皮は、HPV16 型など高リスク HPV が原因の前癌病変である。高度異型上皮は、E6 および E7 を高度に発現し、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。



## B. 研究方法

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由来細胞株由来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。

(倫理面への配慮)

患者由来のサンプルは使用しておらず倫理面での問題はない。

## C. 研究結果

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に関連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。

#### D. 考察

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'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'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、これにともなう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IFNbeta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'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。

## E. 結論

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

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

Yamato, K., Egawa, K., Endo, S.,  
Ui-Tei, K., Yamada, T., Saigo, K., Hyodo,  
I., Kiyono, T., Nakagawa, I. Enhanced  
specificity of HPV16 E6E7 siRNA by  
RNA-DNA chimera modification.  
*Cancer Gene Ther.* 18: 587-597, 2011

Saito R1, Suzuki H, Yamada T, Endo S,  
Moriwaki T, Ueno T, Hirose M, Hirai S,  
Yamato K, Mizokami Y, Hyodo I.

Predicting skin toxicity according to  
EGFR polymorphisms in patients with  
colorectal cancer receiving antibody  
against EGFR. *Anticancer Res.* 33:4995-8,  
2013

Ueno, T, Endo, S. Saito, R., Hirose, M.,  
Hirai, S., Suzuki, H., Yamato, K., and  
Hyodo, I. The Sirtuin Inhibitor Tenovin-6  
Upregulates Death Receptor 5 and  
Enhances Cytotoxic Effects of  
5-Fluorouracil and Oxaliplatin in Colon  
Cancer Cells. *Oncol Res.* 21: 155-164,  
2013

## 2. 学会発表

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  
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 classIII  
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2  
4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 sirtuin 阻害剤 tenovin-6 の抗腫瘍  
効果 第72回日本癌学会学術総会  
平成25年10月横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況  
遺伝子発現阻害剤及び阻害方法  
特許出願番号2011-26825  
2

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

## II 研究結果に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表 平成22年度

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
中原知美 清野 透	第8章 ウイルス性腫瘍 のマウスモデル	秋山徹 奥山隆平 河府和義	マウス・ラッ ト疾患モデル 活用ハンドブ ック	羊土社	東京	2011	142-62
佐塚文乃 酒井博幸	HPVのライフサ イクル	江川清文	Visual Dermatology	秀潤社	東京	2010	267-71
中川俊介	HPVと子宮頸癌 発癌機構	吉川裕之	産科と婦人科	診断と治 療社	東京	2010	116-122

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshida K Sugimoto N Iwahori S Yugawa T Narisawa-Saito M Kiyono T Fujita M	CDC6 interaction with ATR regulates activation of a replication checkpoint in higher eukaryotic cells.	J Cell Sci.	123	225-35	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
Ito S Ozawa S Ikoma T Yajima N Kiyono T Hata R.	Expression of a chemokine BRAK/CXCL14 in oral floor carcinoma cells reduces the settlement rate of the cells and suppresses their proliferation in vivo.	Biomed Res	31	199-206	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
Kasahara K Goto H Enomoto M Tomono Y Kiyono T Inagaki M	14-3-3gamma mediates Cdc25A proteolysis to block premature mitotic entry after DNA damage.	EMBO J	29	2802-12	2010
Mori N Kyo S Nakamura M Hashimoto M Maida Y Mizumoto Y Takakura M Ohno S Kiyono T Inoue M	Expression of HER-2 affects patient survival and paclitaxel sensitivity in endometrial cancer.	Br J Cancer	103	889-98	2010
Roy BC Kohno T Iwakawa R Moriguchi T Kiyono T Morishita K Sanchez-Cespedes M Akiyama T Yokota J	Involvement of LKB1 in epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human lung cancer cells.	Lung Cancer	70	136-45	2010
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
Fujiwara S Nawa A Luo C Kamakura M Goshima F Kondo C Kiyono T Kikkawa F 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

Ibi M Zou P Inoko A Shiromizu T Matsuyama M Hayashi Y Enomoto M Mori D Hirotsune S Kiyono T Tsukita S Goto H Inagaki M	Trichoplein controls microtubule anchoring at the centrosome by binding to Odf2 and ninein.	J Cell Sci.	124	857-64	2011
Kyo S Sakaguchi J Kiyono T Shimizu Y Maida Y Mizumoto Y Mori N Nakamura M Takakura M Miyake K Sakamoto M Inoue M.	Forkhead transcription factor FOXO1 is a direct target of progestin to inhibit endometrial epithelial cell growth.	Clin Cancer Res	17	525-37	2011
Mizumoto Y Kyo S Kiyono T Takakura M Nakamura M Maida Y Mori N Bono Y Sakurai H Inoue M.	Activation of NF- $\kappa$ B Is a Novel Target of KRAS-Induced Endometrial Carcinogenesis.	Clin Cancer Res	17	1341-50	2011
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	11614-23	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	2810-7	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,	Epub	Epub	2010
Okuma K Yamashita H Kawana K Nakagawa S Oda K Nakagawa K	Advanced age is a significant determinant of poor prognosis in patients treated with surgery plus postoperative radiotherapy for endometrial cancer.	J Obstet Gynecol Res	36	757-763	2010
Shoji K Oda K Nakagawa S Kawana K Yasugi T Ikeda Y Takazawa Y Kozuma S Taketani Y	Aromatase inhibitor anastrozole as a second-line hormonal treatment to a recurrent low-grade endometrial stromal sarcoma: a case report.	Med Oncol	Epub	Epub	2010
Satsuka A Yoshida S Kajitani N Nakamura H Sakai H	A novel human papillomavirus type 18 replicon and its application in screening the anti-viral effects of cytokines	Cancer Sci.	101	536-42	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	181-8	2010

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		in press	2011
Maeda D, Chen X, Guan B, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Fukayama M, Wang TL, Shih IeM.	Rsf-1 (HBXAP) expression is associated with advanced stage and lymph node metastasis in ovarian clear cell carcinoma.	Int J Gynecol Pathol.	30	30-5	2011
Maeda D, Ota S, Takazawa Y, Ohashi K, Mori M, Imamura T, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Fukayama M.	Mucosal carcinoma of the fallopian tube coexists with ovarian cancer of serous subtype only: a study of Japanese cases.	Virchows Arch	457	597-608	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
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.	29	1061-7	2010

Koyama S, Wada-Hiraike O, Nakagawa S, Tanikawa M, Hiraike H, Miyamoto Y, Sone K, Oda K, Fukuhara H, Nakagawa K, Kato S, Yano T, Taketani Y.	Repression of estrogen receptor beta function by putative tumor suppressor DBC1.	Biochem Biophys Res Commun.	392	357-62	2010
Murayama-Hosokawa S, Oda K, Nakagawa S, Ishikawa S, Yamamoto S, Shoji K, Ikeda Y, Uehara Y, Fukayama M, McCormick F, Yano T, Taketani Y, Aburatani H.	Genome-wide single-nucleotide polymorphism arrays in endometrial carcinomas associate extensive chromosomal instability with poor prognosis and unveil frequent chromosomal imbalances involved in the PI3-kinase pathway.	Oncogene	29	1897-908	2010
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	605-13	2011

研究成果の刊行に関する一覧表 平成23年度

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
中原知美 清野 透	第8章 ウイルス 性腫瘍のマウスモ デル	秋山徹 奥山隆平 河府和義	マウス・ラッ ト疾患モデル 活用ハンドブ ック	羊土社	東京	2011	142-62

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Zushi Y, Narisawa-Saito M, Noguchi K, Yoshimatsu Y, Yugawa T, Egawa N, Fujita M, Urade M, 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
Shaker M Yokoyama Y Mori S Tsuji moto M Kawaguchi N Kiyono T Nakano T Matsuura N	Aberrant expression of disintegrin-metalloprotease proteins in the formation and progression of uterine cervical cancer.	Pathobiology	78	149-161	2011
Shibata T, Kokubu A, Saito S, Narisawa-Saito M, Sasaki H, Aoyagi K, Yoshimatsu Y, Tachimori Y, Kushima R, Kiyono T, Yamamoto M	2011 NRF2 mutation confers malignant potential and resistance to chemoradiation therapy in advanced esophageal squamous cancer.	Neoplasia	13	864-873	2011
Kyo S Sakaguchi J Kiyono T Shimizu Y Maida Y Mizumoto Y Mori N Nakamura M Takakura M Miyake K Sakamoto M Inoue M	Forkhead transcription fact or FOXO1 is a direct targ et of progestin to inhibit endometrial epithelial cell growth.	Clin Cancer Res	17	525-537	2011