

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

総合研究報告書

ヒトパピローマウイルスを標的とする発がん予防の研究

研究代表者 温川 恭至 国立がん研究センター

研究所ウイルス発がん研究分野 主任研究員

研究要旨 子宮頸がんの予防法を開発し子宮頸がんの罹患率・死亡率を減少させることが研究の目的である。HPV 型間で共通性の高い L2 蛋白のアミノ酸 56 から 75 (L2-56/75) 領域にある交差性中和エピトープを用いた次世代 HPV 感染予防ワクチン(L2 ワクチン)の実用化を目指し、1)L2 ワクチンの有効性を示す基礎データの蓄積、2)L2 ワクチン抗原の開発、3)L2 ワクチンの効果判定技術の確立、の3点を柱に研究を行い、それぞれ以下の成果を得た。1)L2-56/75 を認識するモノクローナル抗体を分離し、この領域に少なくとも2つの交差性中和エピトープがあること、これらエピトープに対する抗体は、幅広い HPV に有効であることがわかった。2)B 型肝炎ウイルスワクチンである HBs 抗原に L2-56/75 領域を挿入したキメラ抗原が、交差性 HPV 中和抗体を効率よく誘導できることを示した。3)L2 ワクチンにより誘導された血清中の交差性中和抗体を、ELISA で簡便に定量する方法を確立した。HPV 感染は、検体中の HPV-DNA の有無により判断されることから、主に使用されている HPV-DNA 検出用 PCR プライマーの検出精度を調べ、ワクチンの効果判定に用いる HPV 検査方法の選定に役立てた。B 型肝炎ウイルスワクチンである HBs 抗原と L2-56/75 との融合蛋白 (HBs-56/75) を新たに作製した。HBs-56/75 抗原は、抗 HBs 抗体に加え交差性 HPV 中和抗体を効率よく誘導した。HBs 抗原ワクチンは安全性・製造法が確立しておりコストも安いことから、幅広い型の HPV と HBV に有効な多価ワクチンとして有望である。

HPV 治療ワクチンとして HPV16E7 発現乳酸菌ワクチン(GLBL101c)を開発・製剤化し、子宮頸癌前癌病変 (CIN3) に対する臨床効果・安全性を検討するために第 I/IIa 相に準じた探索的自主臨床試験を実施した。17 例の HPV16 陽性 CIN3 患者に対して GLBL101c を経口投与し、研究期間内に最終解析まで行った。GLBL101c 経口投与で腸管に E7 抗原刺激を与え、E7 特異的粘膜免疫を介して子宮頸部への抗 E7 細胞性免疫を誘導できた。至適用量において、80% の退縮効果が確認され根治手術を回避できた。臨床効果と抗 E7 細胞性免疫誘導能は相関した。GLBL101c に因果関係のある有害事象はなかった。さらに漢方薬アジュバント・粘膜アジュバント併用によるワクチン増強効果をマウス実験レベルで示し特許出願した。子宮頸癌の発症およびその進展に HPV の癌蛋白による感染宿主であるヒトの癌抑制蛋白のユビキチン化を介する分解が深く関与している。HPV の持つ E6 癌蛋白はユビキチン化を介して p53 を分解

する。E6 癌蛋白はそれ以外にも膜蛋白を含め、多くの癌抑制蛋白を同様の機構で分解する。ユビキチン化されたこれらの標的蛋白は最終的にプロテアソームにおいて分解を受ける。このプロテアソームの阻害剤を用いて、子宮頸癌由来の細胞株の増殖抑制を見いだした。このプロテアソーム阻害剤の子宮頸癌に対する抗腫瘍効果は、シスプラチンとの併用で、相乗効果を示し、また p53 の発現回復を介するメカニズムで効果を示すことが明らかとなった。我々は新規ドラッグデリバリーシステムを用いてプロテアソーム阻害剤を内包するナノミセルを作成した。このナノミセルは腫瘍集積性が高く、ヌードマウスに移植した HPV 陽性の子宮頸癌を縮小させるが、HPV 陰性の子宮頸癌にも抗腫瘍効果を持つことが明らかとなった。

HPV16 感染に関連した高度異型上皮の治療のための、HPV16 E6E7 を標的とした RNAi 医薬開発を目指した研究をおこなう。我々は、これまでの研究で HPV16 関連癌細胞株の増殖抑制に有効な siRNA 配列を見いだした。siRNA は、高い RNAi 活性を有する反面、非特異的効果( オフターゲット効果、細胞毒性 ) や血清中での不安定性などの問題がある。このような siRNA の欠点は、siRNA シード領域の DNA 置換体である短 2 本鎖 RNA-DNA キメラ型核酸 dsRDC に変更することによって部分的に克服できる。我々は、E6E7 を標的にした dsRDC が、E6E7 不死化ケラチノサイトの増殖を特異的に抑制し高度異型上皮/早期癌の治療への応用できることが示した。また、dsRDC の弱点である RNAi 活性の低下を、新しい DNA 置換体 ( idRNA ) によって解決できることを明らかにした。さらに siRNA の副作用である非特異的細胞増殖抑制効果は、AGO2 の競合による miRNA 生成抑制が原因ではなく、オフターゲット効果と関連しており、一部はインターフェロン反応である可能性を示した。オフターゲット効果は、dsRDC や idRNA で抑制できるため、これら DNA 修飾体は、E6E7 を標的とした RNAi 医薬への応用に有用であると考えられた。HPV 分子標的治療薬の開発をめざした基礎的研究として、E6 を標的とした核酸医薬 ( E6 siRNA ) を生体内で利用するため、ドラッグデリバリーシステム(DDS)を用いた。E6 siRNA をポリエチレングリコール(PEG)で内包した高分子ミセルを製し、E6siRNA 内包高分子ミセルの静脈投与による子宮頸癌担癌マウスに対する抗腫瘍効果を示した。 HPV 感染は子宮頸癌発症の主要なリスクファクターである。本研究課題では、HPV の感染・複製機構を解明し、その情報に基づいて抗ウイルス剤、抗腫瘍剤の新規標的を同定することである。

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

これらの実験系を利用して、ウイルスのコードする oncoprotein, E7 がウイルスの生活環と細胞増殖性の維持に重要であること, また E6 はウイルスゲノムのメンテナンスに関与することを見出した。

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

また HPV 複製モデルを利用して 新規化合物の抗ウイルス効果を評価した。HPV ゲノムを複製維持する細胞株を樹立しゲノム内にレポーター遺伝子を搭載することで複製阻害剤のハイスループットスクリーニングも可能な細胞株を樹立した。新たな子宮頸がん治療法のシーズとなる探索研究を進めた。

#### A. 研究目的

ウイルスが原因となるがんは、ウイルス感染や持続感染を阻害すれば予防できる。HPV はほぼ全ての子宮頸がんの原因であり、全がんの 5%、女性のがんの 11%の原因となっている。発がん性 HPV 群の感染予防、HPV 潜伏感染の阻止、前がん病変の排除等による子宮頸がんの予防法を開発し子宮頸がんの罹患率・死亡率を減少させることが研究の目的である。特色としてウイルス遺伝子あるいは蛋白質を分子標的とし、副作用が少なく特異性の高い予防法・治療法が開発が期待される。

HPV16,18 の L1 蛋白を抗原とする現行 HPV 感染予防ワクチンは 16、18 型以外に対する感染予防効果がないか低い。一方、先行研究である神田班の成果として見出された L2 を抗原とする第二世代 HPV ワクチンは発がん性 HPV 群すべての感染予防が期待できる。また、同グループが開発した中和抗体定量系は、世界で最も信頼性が高く、HPV 感染の実態を調べる血清疫学、ワクチン臨床試験のデータ解析に応用できる。これらの特色を生かし第二世代 HPV

感染予防ワクチンの実用化を目指す。

感染予防ワクチンは既感染者に対しては無効であるため異なる戦略が必要である。E7 蛋白質を表面に持つ乳酸菌製剤を経口ワクチンとして投与し、粘膜 CTL 誘導によって前癌病変の治療を試みる臨床試験は、世界に類を見ない試みである。本治療ワクチンは安価な製剤化が可能で安全性も高いと考えられるため有効性が確認できれば、実用化が容易である。

本研究課題では HPV の生活環を分子レベルで解明し、その知見に基づいて HPV 感染に対する抗ウイルス剤や抗腫瘍剤の分子標的を提案することを目的としている。HPV の遺伝子発現や複製は、感染標的である上皮細胞の分化状態に強く依存しているために、通常の組織培養法ではその生活環を支持することが出来ない。そのために HPV の感染・複製機構は十分に解明されていない。

この研究では HPV の複製をサポートできる皮膚モデル培養系やセミ

ソリッド培地培養法などを利用してHPVの生活環を再現し、その感染・複製機構を解明することにした。さらにウイルス遺伝子の働きや、異形性・発がん誘導の機構に関しても解析を行う。細胞DNA合成と連動してHPVゲノムの複製が起る培養細胞系を、HPV潜伏感染のモデルとして用い、その分子機構を解析し、標的とすべきウイルス遺伝子・蛋白質を明確にする。ウイルスがコードする唯一の複製関連蛋白であるE1ヘリカーゼを標的とした治療法は期待されていたが、研究代表者らは、HPVゲノムの維持複製にはE1ヘリカーゼが不要であることを証明し、異なるアプローチによる複製阻害剤の開発が必要であることを示した。これに基づき、HPV複製阻害剤のハイスループット・スクリーニング系の開発を進める。

HPVの持続感染陽性の子宮頸部上皮はHPVゲノムのうち、癌遺伝子であるE6遺伝子、E7遺伝子がひとのゲノムに組み込まれる。このことより、一旦HPVの癌遺伝子が組み込まれた子宮頸部の細胞では、これらの癌遺伝子が高発現することが知られている。E6癌蛋白はユビキチン化を介して癌抑制蛋白を分解する。プロテアソーム阻害剤によりこれらの蛋白の分解を抑制することにより子宮頸癌の増殖抑制効果がもたらさせるかを検討し、プロテアソーム阻害剤の他剤との併用効果の有無、またその子宮頸癌に対する抗腫瘍効果発揮のメカニズムの解明を目的とした。一方、研究代表者は

正常子宮頸部角化細胞の培養、不死化と、前がん病変からがん化に至る過程を培養細胞系で忠実に再現することに成功している。正常子宮頸部からCIN、子宮頸がんに対応する細胞を三次元（ラフト）培養することで臨床病変に近い状態を再現することができ、低分子化合物、siRNA、プロテオソーム阻害剤などの効果をin vitroで検討することができる。子宮頸部高度異型上皮は、HPV16型など高リスクHPVが原因の前癌病変である。高度異型上皮は、E6およびE7を高度に発現し、これらの抑制で病変が排除できるため理想の治療標的ある。2本鎖RNA-DNAキメラ（dsRDC）はsiRNAのシード領域を2本鎖DNAに置換したもので、日本発のsiRNAに代るRNAi技術である。本研究ではHPV16 E6E7を標的としたsiRNA、dsRDおよびdsRDCの改変体を用いて、HPV16関連疾患の核酸医薬としての可能性を検討する。siRNAは、非特異反応としてseed領域の相補性を有するmRNAの翻訳抑制効果（オフターゲット効果）自身のAGO2への結合を介したmiRNA生成抑制、自然免疫の活性化、細胞毒性などを引き起こす。オフターゲット効果を回避する方法として、dsRDCは有効であるが、siRNAに比べ、RNAi活性が低下する。本研究では、このdsRDCの活性化の改善方法について検討する。さらにsiRNAのもう一つの副作用である細胞毒性の機序と改善方法について検討する。独自のsiRNA設計プログラムに基づくHPV遺伝子に対するsiRNAは分担研究者が

国際特許を有している。siRNAは以前からHPV分子標的治療薬として期待されてきた。しかし、核酸医学ではドラッグデリバリーシステム(DDS)が大きな壁となっている。我々は東京大学臨床医工学の片岡教授、宮田准教授との共同研究によってナノ技術を用いた高分子ミセルによってE6を標的にしたsiRNA(E6siRNA)を開発した。本研究では、E6siRNAの生体内での抗腫瘍効果を検討することを目的とした。

## B. 研究方法

### I. HPV治療ワクチンに関する研究

全ての型の高リスク型HPVの感染予防を目指す第二世代HPVワクチン開発が2010年10月より武田薬品工業により事業化されることが決定されている。1)L2-56/75に相当するペプチド(P56/75)で免疫したマウスから、抗P56/75モノクローナル抗体(MAb)を得た。エピトープマッピングによりMAbが認識するアミノ酸配列を調べた。高リスク型であるHPV16、18、31、33、35、51、52、58のウイルス様粒子(VLP)へのMAbの結合をELISAで調べた。上記VLPにレポータープラスミドをパッケージした偽ウイルスを作成し、MAbによる中和を調べた。三次元培養表皮(ラフトカルチャー)から分離したHPV16、または、HPV31を用いて、MAbによる中和を調べた。2)L2-56/75をHBs抗原に挿入したキメラ抗原(HBs-56/75)を作成し、マウスに免疫した。誘導された抗L2抗体のVLP

への結合、偽ウイルスの中和、認識するエピトープを1)と同様の方法で調べた。3)ELISAプレートに固定化したHPV16VLPへの抗P56/75 MAbの結合阻害の程度により、テスト血清(P56/75で免疫したウサギ血清)中の交差性中和抗体価を測定した。国内外で主に用いられているHPV-DNA検出用のPCRプライマーについて、特に複数の型のDNAが混在する場合の検出精度を、HPVゲノムを持つプラスミドを鋳型にして調べた。

HPV L1蛋白とL2蛋白の一部(L2-56/75)の融合蛋白を抗原とする場合、現行HPVワクチンと同等の比較的高い製造コストが予想され発展途上国における普及は困難である。一方、HBV感染予防ワクチン(HBs抗原ワクチン)は安価で高い安全性も確認されているが国内における接種率は低く、ほぼ医療従事者に限られている。そこで、HBs抗原とL2-56/75の融合蛋白を抗原とする安価な第二世代ワクチン開発を開始した。

これまで、HPV感染の中和活性評価には偽ウイルス粒子が使われてきたが、本物のウイルス粒子とは挙動が異なることから、本物のHPV粒子を用いる必要がある。しかし、これまでの三次元培養法ではHPV粒子を大量に安定して供給することはできない。これを可能にする平皿培養細胞を用いた技術開発を進めた。

【粘膜免疫を介したHPV治療ワクチン】

HPV16型E7が細胞表面に提示された乳酸菌Lactobacillus casei (E7発現乳酸菌: GLBL101c) をGMP製造した製剤を作成した。施設研究倫理委員会の承認を得て、第I/IIa相探索的臨床試験を計画し、平成21-25年度まで実施した。

Step1として、GLBL101cは、最少量の1cap/日から数例コホートを組みながら6cap/日まで増量した。1日1回5日間を1クールとして、1, 2, 4, 8週の4クール内服した。安全性とHPV16E7に対する細胞性免疫誘導能(末梢血リンパ球と子宮頸部リンパ球)を解析した。内服治療による臨床的有効性を検討するために、5, 9週で細胞診を施行し、9週のエンドポイントで組織診、細胞診による病理学的評価を行った。

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

安全性、有効性について外部評価委員会の承認を得て、次のコホートで用量を増量していった。外部データセンターを設置し管理集計を行った。

CIN1への退縮はCR、CIN2への退縮はPR、CIN3の不変はSD、浸潤癌への増悪はPDとした。

臨床試験の結果をうけて、本年度からはE7発現乳酸菌ワクチンの有効性を高めるための研究を行っている。臨床試験では有効例を認めたが、高用量では有効性が低下する傾向が示され

た(後述)ことから、用量依存性ではなく、アジュバントによる効果の増強を考え、安全性が担保されている漢方薬に注目した。

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

## II. HPV生活環と遺伝子機能の解明、並びに感染排除に関する研究

### 【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 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 LXS<sub>N</sub> LPCX ( Clontech ) を使い分け , それぞれのplasmidに目的遺伝子を挿入したものを作成した。ウイルスベクターの産生は , 各plasmidをpCL10A1パッケージングベクター ( Retrogen ) とともに 293T 細胞に transfection し , 培養上清中に放出されたウイルスベクターを回収し利用した。

#### 【メチルセルロース懸濁培養 , および分化マーカーの確認】

1.5 % メチルセルロース / EpiLife-KG2+DMEM ( 1:1 ) にHFkを懸濁し , 10 ~ 48時間培養することで分化誘導を行った。分化マーカーの発現誘導は transglutaminase , filaggrin , involucrin を Western 法によって検出することで行った。

#### 【FACSによる細胞周期解析】

細胞は必要に応じてメタノール固定 , あるいはホルマリン固定し , PI 染色によって染色体をマークし , EPICS XL-MCL ( Beckman Coulter ) を用いてFACS解析を行った。プロテアソーム阻害剤であるMG132をナノミセルに内包化するシステムを東大工学部の片岡研と共同で開発した。このまたMG132内包ミセルが腫瘍集積性を持つかを検討するために , ミセルを蛍光ラベルし , 蛍光の腫瘍への集積性を検討した。HPV陽性のHeLa , Caski 細胞とHPV陰性のC33細胞をヌードマ

ウスの皮下に移植し、プロテアソーム阻害剤であるMG132とそれを内包したナノミセルの抗腫瘍能を検討した。また、同時にシスプラチン等の化学療法剤を併用することにより、相乗効果があるかも検討した。今年度は更に、シスプラチン等の化学療法剤をプロテアソーム阻害剤と併用し、in vitroおよびin vivoで相乗効果を検討した。また、p53に対するsiRNAを用いて、プロテアソーム阻害剤による子宮頸癌に対する抗腫瘍効果が、p53の発現回復を介するかを検討した。また、E6,E7を標的としたsiRNAのノックダウン効果と特異性を落とさずに細胞毒性を減らすため、DNA-RNAハイブリッド型核酸の改良を進めた。

#### 【E6標的siRNA内包高分子ミセル】

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

ゴ DNA を合成し RLuc-下流に挿入し、FLuc・RLuc-オフターゲット配列発現プラスミドを作製した。インターフェロン反応遺伝子 (IFNbeta, OAS1, GIP2, MX1, IFIT1) の発現は、定量的 RT-PCR で解析した。特異的増殖抑制効果と非特異的細胞毒性は、それぞれ HPV16 陽性細胞 (SiHa, E6E7 不死化ケラチノサイト) と陰性細胞 (HeLa, TERT 不死化ケラチノサイト, HuH-7 肝癌細胞) を用いて WST-8 アッセイにより解析した。RISC 形成した siRNA と miRNA (miR-21, miR-24) は、抗 AGO2 抗体ビーズで AGO2 を免疫精製し、RNA 抽出後、stem-loop RT-PCR で定量した。siRNA の血清安定性は、50% 血清存在下、37℃ 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、発現細胞をプラスチジンによって選択した。プラスミドと合成 siRNA はそれぞれリポフェクタミン 2000 とリポフェクタミン RNAiMAX を用いて導入した。HPV16, 18 の E6siRNA は既報に基づき作成した。siRNA はマイナス電荷をもつことからプラス電荷を帯びさせたポリエチレングリコール (PEG) とイオン結合させることで、siRNA を内包



できる。PEGの外郭側にはRGDを搭載させ、RGDは腫瘍血管や腫瘍細胞に特異的に発現しているインテグリン $\alpha V\beta 3$ という表面抗原と結合して腫瘍に特異的に運搬させることとなる。このsiRNAが内包された高分子ミセルは東京大学臨床医工学講座の宮田准教授より供与された。

E6siRNA内包高分子ミセルは、HPV16E6とHPV18E6について作製した。DDSの検討を行う前にin vitroでのsiRNAのE6発現阻害効果をSiHa細胞（HPV16陽性）、HeLa細胞（HPV18陽性）、C33A細胞（HPV陰性）を用いて検討した。次に、これらの細胞をヌードマウスBALB/cに移植し腫瘍を形成させた。この腫瘍を3mm角にしたものを新たなマウス皮下に移植しその腫瘍径を経時的に追跡した。移植後5日目から、E6siRNA内包高分子ミセルもしくはHPVと無関係のsiRNAを内包したコントロール高分子ミセルをday0, 1, 3, 4, 7, 8日の6回尾静脈から投与を行い、腫瘍径の増殖カーブを検討した。またday12の腫瘍内におけるE6発現量、p53蛋白質量を、RT-qPCR、ウエスタンブロット法により検討した。

HPV複製機構の解明と複製阻害剤開発のため、異なる位置や方向でレポーター遺伝子を搭載した環状HPVゲノムを複製・維持する細胞株を樹立し、ゲノムコピー数とレポーター遺伝子の発現量を解析し、複製阻害剤の効果を評価できる系を作成した。

（倫理面への配慮）

臨床試験、臨床検体の解析においては「臨床研究に関する倫理指針」に則り、施設の研究倫理審査委員会の承認を得て、インフォームドコンセントの上で、文書で同意を得た症例に対して研究を実施した。また、プライバシーの保護に万全を期し、提供試料、個人情報情報を厳格に管理・保存している。組換えウイルスの作成にあたっては、「カルタヘナ法」に則り、大臣確認、実施機関の承認の上実施した。動物実験は、5Rの精神に則り、「動物の愛護及び管理に関する法律（昭和48年法律第105号、平成17年6月改正）」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成18年環境省告示第88号）」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月）」、「内閣府告示の「動物の処分方法に関する指針」を踏まえ、適切に行なった。

## C. 研究結果

### 1) 次世代感染予防ワクチン

現行の第一世代HPV感染予防ワクチンは型特異性の高いL1蛋白質を抗原とするため、子宮頸がんに対してはほぼ16、18型に限定した予防効果しかない。HPV型間で共通性の高いL2蛋白質を抗原とするワクチン抗原は、全ての発がん性HPVの感染予防効果を期待できる。(1) HPV16 L2のアミノ酸64から73、及び、58から64をそれぞれ認識するMAb13B、及び、24Bを得た。MAb13BはHPV16、18、51偽ウイルス

を中和した。MAb24Bは調べた全ての型の偽ウイルスを中和した。2つのMAbを混ぜると、中和能に相乗効果が認められた。MAb13B、及び、24Bはラフトカルチャー由来のHPV16、及び、HPV31を中和した。(2) HBs-56/75キメラ抗原は、13B、24Bそれぞれのエピトープを認識する抗体を誘導した。それら抗L2抗体は調べた全ての型のVLPに結合した。抗HBs-56/75血清は、HPV16、18、35の偽ウイルスを中和した。(3) テスト血清中の交差性中和抗体の濃度に応じてMAbのVLPへの結合が阻害され、平行線定量法によって抗体価を算出した。これまで主に使用されてきた型共通プライマーでは、PCRでの干渉により、混在する複数の型のHPV-DNAを正確に検出できなかった。神田班の成果であるこの第二世代HPV L2 56/75-VLPワクチンの製品化を目指し、2010年10月 武田薬品工業(株)による事業化が進められている。全てのキメラ抗原は、HPV16-VLPに結合する抗L2抗体を誘導した。中でも、HBs-56/75-127により誘導される抗L2抗体価が最も高く、調べた全ての高リスク型HPV-VLPへの結合が確認された。また、抗HBs-56/75-127血清は、HPV16、18、35の偽ウイルスを中和した。全てのキメラ抗原は、L2-56/75領域にある2つのエピトープのうち13Bを認識する抗体を優位に誘導したが、HBs-56/75-127は、他のキメラ抗原に比べ、24Bエピトープを認識する抗体も効率よく誘導した。全てのキメラ抗原は、抗HBs抗体を誘導した。

## 2) 経口治療ワクチン

(1) 粘膜免疫を介したHPV治療ワクチン

(i) 安全性

全17例において、GLBL101c内服に関連した有害事象は1つも認めなかった。血液生化学データでも内服に伴った変動は認めなかった。外部評価委員会の審査の結果、GLBL101cは極めて安全性の高い薬剤であることが示された。

(ii) 有効性

< 臨床的検討 >

Step1: 子宮頸部粘膜にE7-CMI(E7特異的IFN $\gamma$ 産生、GranzymeB産生細胞)の誘導が2cap/日投与のコホート2から明らかに確認されてきた。興味深いことにPBMCよりもcervical lymphocyteの方がE7-CMIが有意に高いことがわかった。4cap/日がE7-CMIを最も高いレベルで誘導された。また、5週と比べ9週では2倍近い誘導が確認され、8週の内服によりブースター効果が発揮されていることが確認された。しかし、6cap/日投与のコホート4では、3例中2例はむしろE7-CMIの誘導が低かった。

病理学的評価としては、1cap/日もしくは2cap/日投与の4例は、CIN3病変が残存し、円錐切除術を必要とした。4cap/日投与のコホート3では、3例全例がCIN1-2に退縮し、臨床的有效性が示され、手術を回避できた。これらの3例は試験終了後、投薬はなく経過観察中(1.5-2年経過)であるが全症例ともCIN3の再発を認めない。

6cap/日投与のコホート4のうち、高いE7-CMIがcervical lymphocyteに誘導された1例はCIN2に退縮した。E7-CMIの誘導が弱かった2例ではCIN3が消失せず後療法を必要とした。

Step2： これらStep1の結果を安全性評価委員会で検討し、至適用量を4 cap/日と設定し、その用量で更に7例の症例を追加した。4 cap/日の全10例の有効性を検討したところ、10例中7例がエンドポイントの投与開始後9週で、CIN1-2 (CR4例、PR3例)に退縮した。さらに13週目に1例がCIN2 (PR)に退縮した。エンドポイント (9週)における奏効率 (CR+PR)は70%となり、投与後6か月時点での奏効率は80%となった。至適用量の4 cap/日投与例10例のうち8例において、臨床的効果 (CIN3 → CIN2)が示された。6 cap/日の1例を加えて9例で有効と判断された。これは、経口薬によりCIN3に対する治療効果を示した世界初の成果である。

#### <試験終了後の追跡調査研究>

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

9例の投与量は、8例が4カプセル/日、1例が6カプセル/日であった。9例の試験終了時の組織診はCIN2であった。追跡期間は14-33か月であった。9例全例でCIN3の再発はない。追跡している9例中、正常が3例、CIN1が2例、CIN2が4例となっている。子宮頸部病変が

正常化した症例が3例存在していたことは特記すべきことである。

#### <免疫学的検討>

子宮頸部リンパ球中のE7特異的IFN $\gamma$ 産生リンパ球数 (E7-CMI)は、ELISPOT法で検討した。10<sup>5</sup>細胞あたりのE7-CMIは、退縮群 (n=9)で21.8-44.0 cellsであり、非退縮群 (n=8)で9.2-18.8 cellsであった。Mann-Whitney U testにて、p=0.000004となり、子宮頸部リンパ球中のE7-CMI誘導能が臨床効果と強く関連していた。また、退縮するためのE7-CMIのcut-off値をROC曲線で設定したところ、E7-CMIが10<sup>5</sup>細胞あたり21.8 cellsという値が最適であった。その場合の感度は94.5%、特異度が99.2%であり、CIN3からの退縮のバイオマーカーになると考えられた。

#### <漢方アジュバント併用に関する基礎的検討>

免疫賦活作用が知られている十全大補湯 (JTT)と補中益気湯 (HET)を用いた。漢方薬は食餌に混ぜてGLBL101cのマウス投与期間中連日服用投与した。粘膜アジュバントである大腸菌トキシン (LTB)はGLBL101c投与の週に週1回投与した。JTTもHETをGLBL101cに併用した場合、脾臓細胞ではE7-CMIがGLBL101cのみと比して上昇したことから全身性免疫へのアジュバント効果が示された。しかし腸管粘膜リンパ球では明らかな上昇とは言えなかった。そこで、GLBL101cにLTBを添加した状態でJTT、HETを併用したところ、腸管粘

膜リンパ球にGLBL101c単独よりも4-5倍高いE7-CMIが誘導された。また抗E7抗体も血清中、腸管洗浄液中に誘導された。とくにHETの誘導能が高いことがわかった。乳酸菌と漢方薬、粘膜アジュバントを併用することによってE7-CMIを粘膜リンパ球に誘導する作用が相乗的に増強されたが、LTBは毒性の問題からヒトへの投与が難しい。そこで、本年度は、LTBに代わって、ヒトでの使用経験のあるalpha-GalCerを粘膜アジュバントとして用い、同様の検討を行った。

マウスに1mg/headのGLBL101cを経口投与する際に、alpha-GalCerとHETを併用することにより、GLBL101c単独と比べて約2倍のE7-CMI上昇が観察された。

### **3) HPV16におけるウイルス制御遺伝子の働き**

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

このFL型を用いた実験系を利用して、I型インターフェロンによりHPV複製抑制効果を検証することができた。またある種のキナーゼ阻害剤を標的とした化合物で、HPVの産生的DNA複製が抑制できることも確認し

た。これらの結果は、FL型を用いた実験系が抗HPV化合物の評価系として利用可能であることを示している。

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

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

この新しいHPV-S複製系を用いた場合、薬剤選択後に残った細胞内でのHPVの平均コピー数はFL型と同程度、

従来法に比べると数倍～10倍程度多いことが分かり、本来の HPV ゲノム DNA を用いて効率の良い複製系を確立できたことが分かった。

#### **4) HPV16 複製環における制御遺伝子の機能**

HPV16 複製環における制御遺伝子の機能解析をおこなうために、HPV-S 複製系をヒト角化細胞に導入する系を用いた。今回の解析では、制御遺伝子のうち E4, E5, E6, E7 に関して変異導入解析をおこなった。変位の導入には PCR を利用した点変位導入法を用い、各 ORF の 5' 末に近い部位にナンセンス変位を導入した (E4u, E5u, E6u, E7u; u for upstream)。E5 と E6, E7 に関しては ORF のほぼ中央部位にナンセンス変位を導入したのも構築した (E5m, E6m, E7m; m for middle)。なお、全ての点変異は重複する他の ORF のコドンには影響しないようにデザインした。

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

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

E6 に関しては、未分化状態でのゲノムのメンテナンスの効率に重要であることが確認され、従来からの報告を再現した。しかし、従来からの報告と異

なり必須ではないことが示された。分化誘導に対するゲノム増幅は確認できたが、未分化状態での低コピー数を反映して、野生型ほどの増幅は認められなかった。

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

今回の実験系では E6 と E7 の u 型と m 型で、表現型の違いは観察されなかった。

#### **5) 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位を導入し、各遺伝子の変異体を作成した。E4ORF は E2ORF と読み枠違いでオーバーラップしているので、E4 に導入した点変異は E2 に対してはサイレント変異となるようにデザインした。

これらのプラスミドから HPV18 ゲノム領域を切り出し、リガーゼによってゲノム状に環状化したものをヒト角化細胞に導入し、その複製などを解析した。なお、HPV18 の複製起点 (ori) を含むネオマイシン耐性遺伝子発現ベクターを同時に導入し、その後 G418 を含む培地で培養を続けることで、HPV ゲノム導入細胞の選別をおこなった。

得られた細胞内の HPV ゲノムコピー数をサザンブロットによって解析したところ、E6 変異体で顕著なゲノムコピー数の低下が確認された。その

他の変異体はほぼ野生型と同程度のゲノムコピー数を維持していた(数百コピー/細胞)。

つぎに、カルシウム処理によって分化誘導をかけた場合のゲノムコピー数の変化を調べた。野生型では分化処理により 10 倍程度のコピー数増加が確認できた。それに対して E6 変異体では全く増加が認められなかった。また、E7 変異体ではコピー数の増加は野生型の 1/3 程度に下がっていた。この点は HPV16 型との顕著な違いである。E4 と E5 変異体に関してはコピー数の増加は若干低下していたが、有意というためには繰り返し実験が必要である。

さらに、高度に上皮細胞の分化への影響を調べるために、得られた細胞を用いて皮膚モデル培養系 (raft culture) を構築した。野生型 HPV DNA を導入したものは、角質層の顕著な肥大が観察された。E4, E5 両変異体でも野生型と同程度の異形性が確認された。しかし E6 と E7 の変異体では、全く異形性は観察されなかった。ビリオン構成タンパクである L1 タンパクに対する組織免疫染色を行ったところ、野生型では角質層に L1 の発現が確認された。それに対し、E6, E7 の変異体では L1 の発現は検出できなかった。E4 と E5 変異体では野生型と同程度に角質層での L1 発現が認められたが、その発現量は有意に低下していた。

## **6) E4 による aggresome 形成の意義に関して**

E4 に関してはすでに細胞周期の進行を抑制することを報告しているが、その分子機構として M 期進行にかかわる細胞骨格成分に作用することで、G2/M 期で細胞周期停止を誘導する可能性を示した。

E7 は上皮細胞の分化を抑制することで過形成を誘導するが、メチルセルロース懸濁培養法を用いた実験系で、E4 は E7 の作用に拮抗して細胞分化を促進することが示された。

18E4 はすでに報告したように、細胞質に凝集塊を形成する。その凝集塊は(i)周りにビメンチンケージが形成されている、(ii) HDAC6, Hsp40, ユビキチン化タンパクが凝集塊に含まれる、(iii)凝集塊形成は微小管形成、HDAC6 およびダイニンに依存的であるという点から、aggresome 様の構造体であることが分かった。

またこの aggresome には 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。

## **7) HPV 複製系を用いた抗ウイルス剤スクリーニング系の開発**

FL 型、および S 型の HPV を導入した HFK は、ウイルスゲノムを長期間エピゾーム状に維持することを報告している。またこの細胞は raft culture

において、上皮の過形成を再現できることも確認している。

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

今回はすでにある程度の抗 HPV 効果が観察されている I 型インターフェロンを用いて実験系の有効性を検証したところ、インターフェロンの添加によって 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。

## **8) E7 による過形成誘導機構**

我々はすでに皮膚モデルを利用して、E7 による過形成誘導活性を報告している。そこでは、この過形成誘導には E7 による pRb と p130 というポケット蛋白の分解（不活化）が重要であることを示した。

しかし、E7 には他にも多くの機能が知られており、また低リスク型の E7 にも過形成誘導機構があることからポケット蛋白の分解の他の機能も関与している可能性が考えられる。JNK は通常の皮膚モデルでは基底細胞でのみ活性化（リン酸化）が認められるが、E7 発現皮膚モデルでは、上層部でも活性化していることが認められた。カルシウムによる分化誘導実験では、JNK のリン酸化が分化に伴っ

て失われることが分かった。E7 発現細胞は、分化誘導後も JNK のリン酸化状態が保たれていた。さらに、正常な HFK を JNK 阻害剤で処理すると、細胞分化が進行することが確かめられた。

これらのことから、E7 は分化刺激後も JNK を活性化状態に保つことで細胞の増殖性を亢進すると同時に分化を抑制し、上皮の過形成を誘導する可能性が考えられた。

## **9) 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 $\mu$ 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。

## **10) プロテアソーム阻害剤による抗腫瘍効果**

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と、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。

### 1 1 ) E6E7を標的にしたsiRNA、dsRDCおよび新しいDNA修飾体の特

### 性

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 (-)

### 1 2 ) idRNAのE6E7特異的増殖抑制効果

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。

### 1 3 ) siRNAの非特異反応

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。

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

### 1 4 ) siRNAによるインターフェロン反応遺伝子発現への影響

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。

### 1 5 ) E6標的siRNA内包高分子ミセル

まず、18E6siRNAのin vitroでの薬理効果を見るために、HeLa細胞にsiRNAを添加し細胞増殖抑制活性をMTSアッセイで調べた。HPVと無関係のコントロールsiRNAと比べ細胞増殖能は40%程度になった。16E6siRNAについても同様に施行し、SiHa細胞では50%程度の抑制であったが、HeLa細胞やC33A細胞では有意な抑制は見られなかった。E6siRNAはタイプ特異的にE6遺伝子発現を阻害することが示唆された。これらのsiRNAをRGD搭載PEGと混合して内包させた高分子ミセルを合成した。18siRNA内包高分子ミセルはHeLa細胞担癌ヌードマウスへ、16E6siRNA内包高分子ミセルは、SiHa細胞担癌SCIDマウスへ、それぞれ6回静脈投与した。Day 12におけるHeLa細胞腫瘍の増殖能は、E6siRNA高分子ミセル投与によってコントロールに比して約70%減少した。SiHa細胞腫瘍の増殖能は約80%減少した。いずれも有意な差であった。また各腫瘍を摘出し、腫瘍内におけるE6発現をRT-qPCRで確認したところ、E6 siRNA高分子ミセル群で有意にE6 mRNAレベルが低

下していた。E6の最も重要な機能であるp53の消化作用を見るために、摘出腫瘍のp53蛋白質をウエスタンブロット法で検出したところ、E6 siRNA高分子ミセルの投与量に依存して、p53がレスキューされていることがわかった。コントロール高分子ミセルの投与ではp53は全く検出されなかった。

### **16) HPV 粒子産生**

これまで、HPV 感染の中和活性評価には偽ウイルス粒子が使われてきた。しかし、本物のウイルス粒子とは挙動が異なることから、本物の HPV 粒子を用いる必要がある。しかし、これまでの方法では HPV を培養技術で大量に安定して供給することはできない。今年度は、異なる型の HPV ゲノムを持つ表皮角化細胞から三次元培養により分化誘導により安定して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 粒子産生の目的が立った。

### **17) 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。

### **18) 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。

### 19) 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、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。そのために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。

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。

## 2 )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参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 の活性化が参与している可能性も考えられる。

### 3 ) 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。

### 4 ) 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、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 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。

#### 5) 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 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 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発展させて行きたい。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 progesterone 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, Kashiwama 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, Mitsunashi 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. *Virology*, 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、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、柗元巖、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

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

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 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 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 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

佐塚文乃、梶谷直子、酒井博幸：エストロゲン刺激による 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<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, 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<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 18E1<sup>E4</sup>の新規機能の探索:ピ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<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<sup>E4</sup>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<sup>E4</sup>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

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