

201409034A

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業（臨床研究・治験推進研究事業）

子宮頸癌に対する粘膜免疫を介した
ヒトパピローマウイルス(HPV)
分子標的免疫療法の臨床応用に関する研究

(H25-医療技術一般-006)

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川名 敬

平成27（2015）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業（臨床研究・治験推進研究事業）

子宮頸癌に対する粘膜免疫を介した
ヒトパピローマウイルス (HPV)
分子標的免疫療法の臨床応用に関する研究

(H25-医療技術-一般-006)

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川名 敬

平成27（2015）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

子宮頸癌に対する粘膜免疫を介したヒトパピローマウイルス (HPV) 分子標的免疫療法の臨床応用に関する研究	----- 3
--	---------

川名 敬 (研究分担者 藤井 知行・永松 健)

II. 分担研究報告

1. 次世代乳酸菌発現系の作製・解析	----- 21
--------------------	----------

五十君 静信

2. 子宮頸癌に対するHPV分子標的免疫療法における HPV特異的T細胞応答の解析	----- 33
--	----------

立川 愛

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 41
---------------------	----------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 49
-----------------	----------

I．総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金
医療技術実用化総合研究事業（臨床研究・治験推進研究事業）
平成 26 年度（総括・分担）研究報告書

子宮頸癌に対する粘膜免疫を介したヒトパピローマウイルス(HPV)分子標的免疫療法の臨床応用に関する研究

研究代表者 川名 敬
東京大学・医学部附属病院・女性診療科産科/女性外科 准教授

研究要旨

子宮頸癌とその前駆病変(CIN1, 2, 3)はヒトパピローマウイルス(HPV)が関与している。子宮頸癌と CIN2-3（前癌病変）は HPV の E7 分子が、CIN1（HPV 感染症）は E2 分子が、恒常的に発現し癌抗原になっている。しかし全身免疫を誘導する HPV 分子を標的とした免疫療法は有効ではない。本研究では、粘膜免疫を介した HPV 分子標的免疫療法の実用化をめざしている。本年度は乳酸菌に HPV 分子を発現させた薬剤 GLBL101c を製造し、第 IIb 相相当の自主臨床試験を実施した。また GLBL101c の効果を増強させた E7 分子と乳酸菌菌体の量比を最適化する基礎実験を終えて、第二世代の E7 発現乳酸菌を開発し、特許出願した。また CIN1 治療のために E2 発現乳酸菌の作製するための準備を開始し、最適化された量比・発現規格に E2 分子を載せることとした。基礎実験から臨床試験につなげ、来年度以降の第二世代 HPV 分子発現乳酸菌の製剤化とそれを用いた医師主導治験の準備が整えられた。CIN1-3 に対する世界初の治療薬開発をめざしている。

【研究分担者】

- ・五十君 静信：国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部、部長
- ・立川 愛：東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野、准教授
- ・藤井 知行：東京大学医学部附属病院・女性診療科産科/女性外科、教授
- ・永松 健：東京大学医学部附属病院・女性診療科産科/女性外科、講師

A. 研究目的

子宮頸癌は、本邦で年間10000人が罹患し、年間3500人が死亡している。しかも20～30才代で罹患率・死亡率ともに増加

し、罹患のピークが30才前後となっている。

子宮頸癌患者の95%以上から HPV 遺伝子が検出されることから HPV は子宮頸癌の原因ウイルスと考えられている。HPV 感染者の約10%は子宮頸部上皮内腫瘍性病変（以下、CIN）へと病状が進行する。約15種類ある HPV 型の中で、HPV16 型が子宮頸癌の約半数を占める。CIN のステージは軽度（CIN1）、中等度（CIN2）及び高度（CIN3）に分類され、上皮内腫瘍性病変が CIN2～CIN3 のステージへと進展するに伴い、癌化に関係

するタンパク質である E6 あるいは E7 の発現が次第に増加し、子宮頸癌へと進展する。HPV の感染予防を目的とする HPV ワクチンが世界中で使用され、その予防効果が示されつつあるが、CIN 患者（既感染者）に対しては全く無効である。

CIN1, 2, 3の罹患者数は、国内で年間約10万人と推定され、CIN患者は通常3-4か月に1回の外来通院によって癌への進行がないかを観察する。CIN1(軽度上皮内腫瘍病変)はHPV感染病巣を示し、CIN2-3(中等度-高度上皮内腫瘍病変)はいわゆる前癌病変と位置付けられている。特にCIN3は子宮頸癌の直前の病変（上皮内癌）と考えられ、30%以上は2年以内に子宮頸癌に進行する。

現行の治療法は、子宮頸癌では子宮摘出、その前癌病変CIN2-3では子宮頸部円錐切除術である。30才前後の女性がこれらの外科的治療を受けることはその後の妊娠・出産に影響する。術後の妊娠時に切迫早産の入院管理、早産児の新生児管理を必要とし周産期における医療経済を大きく圧迫している。このような背景から、CIN に対する薬物療法の必要性が極めて高い。

子宮頸癌は、発癌性ヒトパピローマウイルス（HPV）によるウイルス発癌であり、HPV分子を標的とした分子標的治療薬が期待される。CIN1はウイルス感染症でありE2が発現する。CIN2-3は前癌状態でありE7が発現する。E2、E7ともにヒトでの抗原性が高く免疫療法の標的として最適である。

本研究の目的は、HPV分子を標的にした子宮頸癌と前駆病変（CIN1-3）に対す

る新規の分子標的治療薬を開発することである。

本研究の特長は、標的となるHPV分子を発現した感染細胞・腫瘍細胞に対する粘膜免疫（細胞性免疫）を誘導して殺細胞効果を発揮する経口薬を開発した点である。これまでに我々は、HPVのE7に対する粘膜免疫を誘導するため、E7発現乳酸菌(*Lactobacillus casei*) : GLBL101cを製剤化し、第I/IIa相に準じた探索的自主臨床試験を実施した。GLBL101cの経口投与によって腸管粘膜で惹起された抗E7細胞性粘膜免疫が誘導され、CIN3が退縮することを確認した。また有害事象は認めず安全性も確認された（Kawana K, et al, Vaccine, 2014）。

CINのうちCIN1がウイルス感染症、CIN2-3が子宮頸癌の前癌病変として扱われるが、細胞性免疫の標的となるウイルス分子はCIN1がE2、CIN2-3がE7である。そこで本研究では、E2発現乳酸菌とE7発現乳酸菌を開発することをめざしている。

本研究によって、本研究の開発薬剤は、CIN1, 2, 3の全ての段階に対応した治療薬であり、世界初のCIN治療薬と期待される。また、既存治療である外科的治療を回避できるため、妊娠時の周産期予後も改善され、対がん対策としての日本発の創薬はもちろん、少子化、周産期問題に対する一助になる研究として本研究を位置付けている。

H26年度の研究目的として、①CIN2に対するGLBL101cの検証的自主臨床試験を実施すること、②E7：乳酸菌の量比を最適化した第二世代のE7乳酸菌を開発し

特許出願すること、③第2世代の乳酸菌発現系を用いたE2乳酸菌を開発すること、を設定した。

B. 研究方法

(1) CIN2を対象とするGLBL101cの有効性試験の計画と実施（川名、藤井、永松、立川）

CIN2を対象とするGLBL101cの有効性を検証するため、探索的臨床研究として、第Ⅲb相に相当する自主臨床試験を実施した。実施にあたって、藤井班員、永松班員が患者リクルートを主体に行い、藤井班員、川名班員が中心となった試験実施した。以下に本臨床試験の概略を示す。

試験薬：HPV16型 E7タンパク質発現乳酸菌（GLBL-101c）、コード名 GLBL-101c Cap.

対象患者：HPV16型感染に起因するCIN2（子宮頸部中等度上皮内腫瘍性病変）の患者

試験の種類・デザイン：ランダム化、二重盲検、探索的後期第Ⅱ相臨床試験とした。HPV16単独陽性のCIN2患者（前治療の有無は問わない）を登録し、GLBL101c投与群（試験アーム）とプラセボ投与群（標準アーム）とに、東大附属病院臨床研究支援センター中央管理ユニットにて、臨床研究支援システムUHCTAcessを用いて、試験責任医師または試験分担医師の意思が入らないよう、ランダムに割付けする。

目標症例数：GLBL-101c 投与群（試験アーム）20例、プラセボ投与群（標準アーム）20例、総症例数40例。

試験の全期間：16週間①同意取得～投与開始：1日～1週間、②投薬期間：8週間、③受診3：16週目で試験終了。

投与量・投与方法：1日1回、朝食前に服用（ただし、1日目は院内で食間に服用）。受診1で薬剤全て（20回分）を渡し、服用カレンダーと健康日誌を参照しながら服用する。

服用量：4カプセル／日（1g／日）（総服用量：80カプセル）

試験薬の管理・交付手順：東大附属病院臨床研究支援センター試験薬管理部門にて管理・調剤する。

主要評価項目：有効性：16週時の子宮頸部病変の病理学的寛解を東大病院病理部で判定する（川名、藤井、永松が組織を採取する）。

副次的評価項目：

有効性：a. 細胞診での悪化の有無を、病理部で判定し、悪化の場合は組織診にて確定診断を得る。b. コルポスコピー検査での寛解（病変部の写真記録に基づく判定）を、試験責任医師が判定する。c. 子宮頸部及び血液中の細胞傷害性T細胞の誘導を、東大医科学研究所先端医療研究センターで判定する（立川班員）。

安全性：被験薬に起因する有害事象・副作用

試験実施期間：承認日（2013年10月30日）から2018年(平成30年)3月31日（症例登録締切2017年(平成29年)11月30日）

データの集計および統計解析方法：東大病院臨床研究支援センター中央管理ユニットのモニターは、症例報告書に掲載されたデータとカルテ等原資料の記載との整合性を確認する。

免疫学的評価については、東京大学医科学研究所 先端医療研究センターの立川班員のもとで実施する。中央病理診断 (CPR) を東大病院病理部に設置し、「reading center」として、盲検による病理学的評価を行う。データ管理については「データセンター」を東大病院臨床研究支援センター中央管理ユニット内に設置し、匿名化されたデータの管理を委ねる。有効性及び安全性の評価については外部に第3者による「効果安全性評価委員会」を設置し、有効性と安全性を客観的に評価していくこととする。

研究計画の登録:被験者登録を開始する前に、試験計画の内容を公開登録システム (大学病院医療情報ネットワーク:UMIN) に登録する。

研究資金および利益の衝突:本試験の経費については、本厚生労働省科学研究費 (医療技術実用化総合研究事業 (臨床研究・治験推進研究事業) のみで賄う。

本試験はアンジェスMG株式会社との共同研究である。共同研究者は被験薬の製造・非臨床試験での有効性、安全性情報の提供に関わるが、臨床試験の進行及びデータ測定・評価判定には関わらない。

本試験の計画・実施・報告において、試験の結果および結果の解釈に影響を及ぼすような「起こりえる利益の衝突」は、現時点では存在しないが、将来生ずる可能性がある。その場合には、被験者の不利益につながらないように努める。

試験の実施が被験者の権利・利益を損ねることがないことを確認する。

(2) E7: 乳酸菌の量比最適化を含む第2世代E7乳酸菌の開発 (五十君、川名、永松)

アンジェスMG社から薬剤提供をうけたGLBL101c Cap.は、HPVのE7を乳酸菌に遺伝子導入し、一定の発現量で固定されている乳酸菌を用いているが、その薬理効果 (E7特異的免疫誘導能) をさらに増強した第二世代のHPV分子発現乳酸菌を開発し、本研究からの物質特許をめざしている。

そこで、このE7発現量 (E7: 乳酸菌菌体量の量比) が、粘膜免疫誘導において最適な量比 (規格) を検討することとした。

五十君班員は、大腸菌に発現させたHPV16 E7 を精製した後、乳酸菌に固定化することで正確な固定量の調節を行った。乳酸菌表層への E7 の固定 (結合型) は、*Lactococcus lactis* 由来のアンカータンパク cA を E7 と融合 (cA=E7Rb) させることで行った。cA=E7Rb を大量精製し、この取得したタンパクを用いて乳酸菌の菌体表層への固定化を行った。この技術を用いると、添加する E7 抗原量をコントロールすることにより、菌体表層の E7 と乳酸菌の量比を変えることが可能であることから、まず最適な量比を決定するうえで大変優れた方法と考えられた。1.2×10⁸ 乳酸菌に対し、それぞれ cA=E7Rb 量を 0.03、0.1、0.3、1.0 µg を加え、固定化した。乳酸菌は死菌体を用い、TCA で表面処理を行った場合と未処理で固定化させたものを試作し、川名班員、永松班員によって免疫効果の評価を担当した。すなわち、異なる量の cA=E7Rb を固定化した TCA 処理及び未処理の *L. casei* IGM393 株による免疫誘導能を、他の分担研究者により C57BL/6

(H-2b)マウスへの腹腔内投与後の粘膜リンパ球中における E7 特異的 IFN γ 産生細胞数で評価した。

これらの結果をもとに、五十君班員は、*L. casei* 393 株及びその派生株で形質転換効率の高い 394 株を用い、プロモーター活性の高い菌体表層発現用プラスミド pEK7 に E7 をコードする遺伝子を挿入し、形質転換を行った。得られた組換え体は、通常の培養では、E7 の発現量が少なかったため、増菌培地の pH に関する培養条件を検討し、発現する E7 の抗原量を評価した。

ここで作製された発現型 E7 乳酸菌を用いたマウスでの免疫誘導能実験を川名班員、永松班員が行った。

(3) 子宮頸部リンパ球の特性の確認研究 (立川)

立川班員は、HPV 特異的な T 細胞をより効率良く増殖させ、HPV 特異的 T 細胞の検出感度を上げるため、末梢血単核球 (PBMC) よりプロフェッショナル抗原提示細胞である樹状細胞を作成し、抗原提示細胞として刺激培養に用いる方法を検討した。

健康人 PBMC より抗 CD14 抗体を用いて CD14 陽性の単球を分画し、成熟樹状細胞 (mDC) の作成を行った。通常法として、50ng/ml GM-CSF と 50ng/ml IL-4 を含む培地にて 5 日間培養し、未成熟樹状細胞 (imDC) へと分化させた。さらに TNF- α /IL-1 β /IL-6/PGE2 を含む培地にて 2 日間培養し、mDC を作成した。もしくは迅速法として、50ng/ml GM-CSF と 50ng/ml IL-4 を含む培地にて一晩培養し、TNF- α /IL-1 β /IL-6/PGE2 を含む培地にて一晩培養し、mDC を作成した。そのうえで、

樹状細胞の性状解析を行った。

さらに立川班員は、樹状細胞を用いての抗原特異的 T 細胞の選択的増殖の検討するために、作成した mDC に CMV, EBV, AdV 由来のウイルス抗原のオーバーラップペプチドをパルスしたものを抗原提示細胞とし、PBMC の刺激培養を行った。

2 週間後、抗 IFN- γ 、CD107a 抗体を用いて、細胞内染色を行い、ウイルス抗原特異的 T 細胞の頻度を測定した。

(4) HPV16E2蛋白質の精製と検出系の確立 (川名、藤井、五十君)

川名班員、藤井班員によって、HPV16 型プロトタイプのウイルスゲノムから E2 を大腸菌発現プラスミドにサブクローニングし、His-tag を付けた精製蛋白質を大腸菌によって作製し、His-tag カラムによって精製した。抗 His 抗体、抗 HPV16E2 抗体を一次抗体として Western blotting 法によって蛋白質を確認した。

E2 の発現を確認した発現 plasmid から、遺伝子組換えによって、発現型 E7 乳酸菌と同様の発現システムに五十君班員によって、E2 を導入した。

(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) 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 (2013 年 12 月 1 日登録、UMIN000012229) を行い、実施する予定である。また、その後の医師主導治験は、独立行政法人医薬品

医療機器総合機構(PMDA)に届出を行い、GCP を遵守して実施する。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る。

(実施済みのGLBL101c試験でも、遺伝子治療に該当しないことを確認の上で実施されている。)

・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。

・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。

また、五十君班員による遺伝子組換え実験は、委員会の審査を受けた後、国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則にしたがい、実験を行った。

また、立川班員においては、臨床材料の提供を受ける場合には研究目的や必要事項を、文書を用いて説明し、書面でインフォームドコンセントを得た。研究対象者への負担は、臨床上必要な検査に加えて少量の血液採取のみであり、倫理面への問題はないと判断される。本研究内容は東京大学、東京大学医科学研究所倫理審査委員会により承認されている。

永松班員、藤井班員による子宮がん臨床検体の使用については、東京大学医学部研究倫理審査委員会の承認を得て文書で同意を得た患者から採取された。

C. 研究結果

(1) CIN2を対象とするGLBL101cの有効性試験の計画と実施（川名、藤井、永松、立川）

研究方法で記載した臨床試験「HPV16型陽性の子宮頸部中等度上皮内腫瘍性病変(CIN2)に対する乳酸菌を利用したCIN治療薬(GLBL-101c Cap.)の探索的臨床研究」が当該施設における臨床試験審査委員会において、2013年10月30日に承認された。東大病院臨床試験支援センター、中央管理ユニットにおけるプロトコル検討委員会の審議を経て、プロトコルの軽微な変更を行った。

2014年3月10日から登録が開始し、2015年1月までに12例を登録し、9例が試験を終了した。9例において因果関係のある有害事象は認めなかった。1例が試験薬内服期間中に妊娠が判明したため、試験を中止とした。それ以外の8例は試験を完遂できた。最初の6例はモニターリングを実施し、適格に試験が遂行されていることが確認された。今年度中に15例が登録する予定である。ランダム化二重盲検試験であるため、現時点では有効性は確認できないが、2例はCIN2から正常化している。またCIN2からCIN3に増悪した症例はいなかった。

平成26年度は20例を目標にして、15例前後の登録に留まったことから、平成27年度には、登録患者数を増やすための工夫が必要であることが判明した。藤井班員、永松班員によって、試験の啓発活動としてパンフレットを作成した。当該試

験実施施設の関連医療機関（約15施設）に試験の案内を出し、適格症例候補患者をリクルートすることとした。本年度中にパンフレットを作成し、各医療機関に配布することとした（パンフレット添付）。

(2) E7: 乳酸菌の量比最適化を含む第2世代E7乳酸菌の開発（五十君、川名、永松）

TCA 処理及び未処理の *L. casei* IGM393 菌体表層の cA=E7Rb の固定化確認では、 1.2×10^8 乳酸菌に対し、それぞれ cA=E7Rb 量を 0.03、0.1、0.3、1.0 μg を加え、固定化されていることをフローサイトメーター及び蛍光顕微鏡にて確認できた。

乳酸菌は死菌体を用い、TCA 未処理に対して TCA 処理をした *L. casei* IGM393 において cA=E7Rb の固定能がより高く、cA=E7Rb の添加量依存的な固定化が観察された。

マウスへの経口投与における腸管上皮内の粘膜リンパ球中の E7 特異的 IFN γ 産生細胞数の検討では、cA=E7Rb の固定量依存的に増加していることが確認された。TCA 未処理菌体の免疫評価では、0.1～0.3 μg を超えると免疫効果は一定である結果が得られた。cA=E7Rb を同一量固定化した場合では TCA 未処理の方が E7 特異的 IFN γ 産生細胞の誘導能が高かった。

以上のことから、遺伝子組換えにより発現が求められる最適な E7Rb 抗原量は、 1.2×10^8 乳酸菌に対し、0.3 μg 以上であることが判明した。五十君班員が有している発現ベクターのうち、最も高いプロモ

ーター活性を持つプラスミドpEK7を用い、*L. casei* 393株の派生株で形質転換効率の高い394株を用い、形質転換を行った。増菌培地のpHを7以上に保つことにより、発現するE7Rbの抗原量は増大することがわかった。

この培養条件で培養を行った組換え体、発現型E7乳酸菌について、川名班員、永松班員が、免疫誘導能の評価をマウス実験によって行った。

まず五十君班員によって作製されて発現型E7乳酸菌について、物質特性を確認した。cA=E7Rbを使った結合型E7乳酸菌で言うところのE7量 0.3・gの乳酸菌とほぼ同様のE7発現量(ELISA法)であり、かつ細胞表面表出E7分子数(フローサイトメトリー)であることが確認された。すなわち、結合型E7乳酸菌を用いた最適化実験で最適化比(規格)と考えられたものを発現型で再現できた。

この薬理効果を実証するために、マウス実験でのE7特異的な粘膜免疫誘導能も、E7量 0.3・gの結合型E7乳酸菌と同等かそれ以上であることを確認できた。これは既存のGLBL101cの約2倍の免疫誘導能であった。

目標とする免疫効果が得られたので、このクローンを用いて、第2世代のE7乳酸菌として、GMP製剤化を検討していくこととした。

(3) 子宮頸部リンパ球の特性の確認研究 (立川)

通常法と迅速法のいずれの方法によっても、PBMC 由来単球から imDC、mDC

を作成することが確認された。

迅速法にて作成した mDC の抗原特異的T細胞の選択的増殖効果を調べるため、CMV, EBV, AdV 由来のウイルス抗原を用いて PBMC の刺激培養を行ったところ、DC を用いなかった場合と比べて、ウイルス特異的CD8+T細胞が高頻度に検出された。このことから、HPV 特異的 CD8+T細胞の評価をする際には、臨床試験の登録患者から採取した PBMC を用いて、迅速法によって mDC を作成すれば、抗原提示細胞の存在しない子宮頸部擦過細胞中の抗原特異的 T 細胞の選択的増殖が可能となる。また、末梢血中の HPV 特異的 T細胞が検出されることは稀であったが、本法を用いて選択的に HPV 特異的 T細胞を増殖することで検出感度の改善が期待できる。

(4) HPV16E2 蛋白質の精製と検出系の確立 (川名、藤井、五十君)

HPV16E2蛋白質の発現・精製が確認された。検出系も確立したことから、乳酸菌での発現系を作製するために五十君班員によって、乳酸菌プロモーターの下流にアンカー蛋白質(prtP)とfusionさせるように遺伝子導入している。prtP-E2の菌体表面への表出をフローサイトメトリーで確認中である。

D. 考察

平成26年度は、第一世代のHPV分子発現乳酸菌であるGLBL101cの有効性を検

証するための自主臨床試験を実施した。また、第二世代薬の基礎開発を終え、特許出願に至った。これらは昨年提示した開発ロードマップとほぼ遵守できている。第一世代（GLBL101c）の臨床的有効性は、二重盲検試験を終え、キーオープンしてから評価するが、少なくとも動物実験では、粘膜免疫へのE7特異的細胞性免疫誘導能が2倍になっていることから、GLBL101cよりも高い臨床効果が期待され、その開発に成功したことは大きい成果であった。

本年度の基礎研究において、乳酸菌 *Lactobacillus casei* 株の菌体表面に表出するE7分子数の飽和量がわかり、また最適な免疫誘導能に必要な表出分子数、菌体含有量も決定できた。これらをもとにE2分子を発現する乳酸菌の作製プロトコルも完成した。

既に論文掲載したGLBL101cの最初の自主臨床試験は、CIN3に対する臨床試験であった。CIN3は早期に癌へ移行することから倫理面を配慮し、試験薬群のみの第I/IIa相相当の試験とした。GLBL101cの有効性は単アーム試験では投与開始から9週間で70%退縮率という極めて良好な成績であったが、プラセボを置いたランダム化二重盲検試験による検証が必要となった。本研究ではフォローアップが許容されるCIN2を対象にしたことから、プラセボ群を置いて第IIb相に準じたデザインの二重盲検ランダム化比較試験が倫理的に許容されるデザインとなった。これによってGLBL101cの有効性を高いエビデンスレベルで証明できると考える。

キーオープンする40例終了を平成27年度末に設定し、登録患者のリクルートが本年度の最大の課題となった。本年度中の登録患者は15例の見込みであり、来年度に25例の登録を確保すべくパンフレットによる試験参加依頼を関連医療機関に発送することとした。

一方、GLBL101cを上回る第二世代のE7発現乳酸菌の開発を狙い、五十君班員、川名班員を中心に、規格を検討しなおした。またGLBL101cの物質特許は韓国のバイオリーダース社が所有していることもあり、日本発の創薬もめざしている。GLBL101cの臨床的有効性が示されていることから、GLBL101cを対照として、それを上回る免疫誘導能を発揮する薬剤の創出を本年度の目的とした。

乳酸菌 *Lactobacillus casei* 株の菌体表面に提示するHPV分子数の検討では、乳酸菌とHPV分子をアンカーによって結合させる結合型E7乳酸菌を用いた。結合させるE7分子数をこまかく振ることによって、菌体表面に表出する最高HPV分子量は、 10^8 菌体あたりE7分子1 μ gであり、これ以上発現させても菌体表面には提示されないことがわかった。さらに、E7特異的粘膜免疫誘導能をマウス実験による検討では、 10^8 菌体あたり0.3 μ g以上ではE7特異的粘膜免疫誘導能は飽和しており、最高誘導能であることを発見した。これは同じ菌体量のGLBL101cをマウスに投与して誘導させたE7特異的粘膜免疫誘導能の約2倍にあたり、既存のGLBL101cと比べて、最適な規格を見出した。

次に、このE7特異的粘膜免疫誘導能を得るための最適な規格を獲得した製剤を

作製することに着手した。本研究では、結合型E7乳酸菌を製剤化していない。その理由は、アンカー付きE7が大腸菌で精製する必要があり、大腸菌菌体の混入があるとヒトへの投与が難しくなるからである。そこで、乳酸菌から内因性にE7

(prtPアンカー融合)を発現させた発現型E7乳酸菌を別途作製し、その特性を検討している。その結果、結合型E7乳酸菌のE7量として0.3μg結合型と同様の発現量、細胞表面表出分子数の製剤を得て、かつマウスでのE7粘膜免疫誘導能が同結合型E7乳酸菌と同等かそれ以上であることを確認できた。この結果を以て、本研究班から物質特許の特許出願を行った(2015.1.30付け)。

先行研究のGLBL101c試験では、70%のCIN3退縮率であったが、その際に非退縮群と比べ、退縮群では子宮頸部のE7特異的粘膜免疫誘導能が2倍であった。第2世代の発現型E7乳酸菌が2倍の粘膜免疫誘導能を示していることから、臨床的な有効性の向上は2倍の差でも十分に期待できると考えている。

また、この発現型乳酸菌システムにHPVE2分子を載せることで、最適なCIN1治療薬も開発できると考えている。

本研究班で開発、特許出願した第2世代発現型E7乳酸菌は、アンジェスMG社の協力のもと、GMP製造を開始することとなっている。プロセス開発を経て、大量生産し、それを用いてH27年夏頃より、GLP準拠の前臨床試験を開始する予定である。11月頃をめどに前臨床試験を終えて、12月頃には次のPOC(第I/IIa相当)自主臨床試験のプロトコール作成を始め、

H28年初めには試験を開始する予定である。本年度の研究進捗状況を踏まえた開発ロードマップを添付する(図参照)。

E. 結論

本研究では、CIN2に対するHPVE7標的免疫療法の第IIb相に準じた二重盲検ランダム化自主臨床試験を実施中である。H27年度末のキーオープンに向け、登録症例数の向上を図る必要がある。

第2世代E7乳酸菌は、予定通り特許出願に至った。第2世代の発現型E7乳酸菌は、マウス実験でGLBL101cの約2倍の免疫誘導能であったことから、先行研究で示された臨床効果を上回る有効性が期待できる。

HPV分子を標的とする治療法は未だ世界的にも存在しない。粘膜免疫を介した免疫療法も存在しない。これらを融合させることで、これまで開発に至っていないHPV分子標的治療剤が開発できると期待される。

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawana K, Adachi K, Kojima S, Taguchi A, Tomio K, Yamashita A, Nishida H, Nagasaka K, Arimoto T, Yokoyama T, Wada-Hiraike O, Oda K, Sewaki T, Osuga Y, Fujii T, Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients, *Vaccine*, 32:

6233-6239, 2014

- 2) Taguchi A, Nagasaka K, Kawana K, Hashimoto K, Kusumoto-Matsuo R, Plessy C, Miranda T, Nakamura H, Bonetti A, Oda K, Kukimoto I, Carninci P, Banks L, Osuga Y, Fujii T, Characterization of novel transcripts of human papillomavirus type 16 using CAGE technology, *J Virol*, 89: 2448-2452, 2015
- 3) Nagasaka K, Kawana K, Tomio K, Eguchi S, Miura S, Tsuruga T, Mori-Uchino M, Tanikawa M, Tsukazaki T, Sone K, Adachi K, Matsumoto Y, Arimoto T, Oda K, Osuga Y, Fujii T, Positive peritoneal cytology at interval debulking surgery is independent poor prognostic factor in patients with stage T3c advanced ovarian carcinoma: A retrospective study, *J Obstet Gynecol Res*, in-press, 2014
- 4) Azuma Y, Kusumoto-Matsuo R, Takeuchi F, Uenoyama A, Kondo K, Tsunoda H, Nagasaka K, Kawana K, Morisada T, Iwata T, Aoki D, Kukimoto I, Human papillomavirus genotype distribution in cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3 and invasive cervical cancer in Japanese women, *Japan J Clin Oncol*, E-pub, 2014
- 5) Taguchi A, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Isobe Y, Nagasaka K, Koga K, Inoue T, Nishida H, Kojima S, Adachi K, Matsumoto Y, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Oda K, Kang JX, Arai H, Arita M, Osuga Y, Fujii T, Matrix metalloproteinase (MMP)-9 in cancer-associated fibroblasts (CAFs) is suppressed by omega-3 polyunsaturated fatty acid *in vitro* and *in vivo*, *PLOS One*, 9: e89605, 2014
- 6) Taguchi A, Wada-Hiraike O, Kawana K, Koga K, Yamashita A, Shirane A, Urata Y, Kozuma S, Osuga Y, Fujii T, Resveratrol suppresses inflammatory responses in endometrial stromal cells derived from endometriosis: a possible role of the sirtuin 1 pathway. *J Obstet and Gynecol Res*, 40: 770-778, 2014
- 7) 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*, 40: 554-60, 2014
- 8) Nakayama-Hosoya K, Ishida T, Youngblood B, Nakamura H, Hosoya N, Koga M, Koibuchi T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A. Epigenetic repression of interleukin-2 expression in senescent CD4+ T cells during chronic human immunodeficiency virus type-1 infection. *J Infect Dis*. 211:28-39, 2015.
- 9) Gu L, Kawana-Tachikawa A, Shiino T, Nakamura H, Koga M, Kikuchi T, Adachi E, Koibuchi T, Ishida T, Gao GF, Matsushita M, Sugiura W, Iwamoto A, Hosoya N. Development and Customization of a Color-Coded Microbeads-Based Assay for Drug Resistance in HIV-1 Reverse Transcriptase. *PLoS One*. 9:e109823, 2014.
- 10) Han C, Kawana-Tachikawa A, Shimizu A, Zhu D, Nakamura H, Adachi E, Kikuchi T, Koga M, Koibuchi T, Gao GF, Sat Y, Yamagata A, Martin E, Fukai S, Brumme ZL, Iwamoto A. Switching and emergence of CTL epitopes in HIV-1 infection. *Retrovirology*. 11:38, 2014.
- 11) Toshimitsu M, Nagamatsu T, Nagasaka T, Iwasawa-Kawai Y, Komatsu A, Yamashita T, Osuga Y, Fujii T, Increased risk of pregnancy-induced hypertension and operative delivery after conception induced by in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection in women aged 40 years and older. *Fertil Steril*. 014;102:1065-1070.e1.

- 12) Nagamatsu T, Iwasawa-Kawai Y, Ichikawa M, Kawana K, Yamashita T, Osuga Y, Fujii T, Schust DJ, Emerging roles for lysophospholipid mediators in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2014;72:182-91.
 - 13) Yamamoto Y1, Yamashita T, Tsuno NH, Nagamatsu T, Okochi N, Hyodo H, Ikeda T, Kawabata M, Kamei Y, Nagura Y, Sone S, Fujii T, Takahashi K, Kozuma S, Safety and efficacy of preoperative autologous blood donation for high-risk pregnant women: experience of a large university hospital in Japan. *J Obstet Gynaecol Res*. 2014;40:1308-1316.
 - 14) Itaoka N, Nagamatsu T, Schust DJ, Ichikawa M, Sayama S, Iwasawa-Kawai Y, Kawana K, Yamashita T, Osuga Y, Fujii T, Cervical Expression of Elafin and SLPI in Pregnancy and Their Association With Preterm Labor. *Am J Reprod Immunol*. 2015 Jan 5. ahead of print
2. 学会発表
- 1) 川名 敬、「HPVを標的とした抗腫瘍、抗ウイルス免疫療法の新展開」第62回日本ウイルス学会、東京、11月
 - 2) 川名 敬、ワークショップ
「CINに対するHPV分子標的経口癌ワクチンに関するTR研究」、第56回日本婦人科腫瘍学会、宇都宮、7月
 - 3) 足立克之、川名 敬、長阪一憲、横山照史、江口聡子、富尾賢介、松本陽子、有本貴英、織田克利、大須賀穰、藤井知行、優秀演題賞「CIN3に対する粘膜免疫を介した抗HPV分子標的癌免疫療法の第I/IIa 相臨床試験の最終解析」日本産科婦人科学会、東京、4月
 - 4) Kawana-Tachikawa A. Disruption of T cell immunity during chronic HIV-1 infection. The 21st East Asia Joint Symposium on Biomedical Research. Seoul, Korea. Jul 2014.
 - 5) Hirao M, Suzuki K, Kawana-Tachikawa A, Nakauchi H, Cooper DA, Kelleher AD, Kaneko S. Proposal of new immune cell source for HIV-1 infection study based on iPSCs and evaluation of impact of viral replication in iPSCs-derived macrophage expressing shRNAs targeting HIV-1 promoter. 20th International AIDS Conference, Melbourne, Australia, Jul 2014
 - 6) Kamori D, 村上知行、Hasan Z, Meribe S, Carlson J, Siarot L, 三浦聡之、立川(川名)愛、岩本愛吉、瀧永博之、岡慎一、間陽子、上野貴将: Effects of natural variability of an immunodominant Vpr region on immunological footprints, clinical outcome and protein functions. 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
 - 7) 細谷(中山)香、石田尚臣、中村仁美、細谷紀彰、古賀道子、鯉渕智彦、岩本愛吉、立川(川名)愛: HIV-1感染におけるCD4陽性T細胞のIL2遺伝子発現低下分子メカニズムの解明. 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月

- 8) Gu L, Han Y, Guan S, Yang F, Zhu T, 合田仁、Cao Y, 立川(川名)愛、細谷紀彰、Gao FG, 岩本愛吉、Li T, 石田尚臣：中国HIV-1感染者の未治療検体における副受容体指向性の検査。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 9) 佐藤秀憲、細谷(中山)香、菊地正、安達英輔、古賀道子、中村仁美、鯉渕智彦、岩本愛吉、立川(川名)愛：HIV感染者のCD8陽性T細胞における補助刺激分子OX40の検討。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 10) 石坂彩、佐藤秀憲、立川(川名)愛、中村仁美、古賀道子、細谷紀彰、鯉渕智彦、野本明男、岩本愛吉、水谷壮利：HIV-1残存感染細胞の活性と免疫活性化の相関。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 11) 藤田由利子、小野敏明、落合央、立川愛、Leen AM, Heslop HE, 森尾友宏、高橋聡：実臨床応用に向けたウイルス特異的T細胞療法の開発。第6回血液疾患免疫療法研究会学術集会、京都、2014年9月
- 12) 小野敏明、藤田由利子、立川(川名)愛、高橋聡、森尾友宏：臨床応用に向けた多ウイルス特異的T細胞培養法の確立とその特性解析。第42回日本臨床免疫学会総会、東京、2014年9月

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許出願

発明の名称：「乳酸菌含有組成物、H P V感染症及びH P V関連腫瘍の少なくともいずれかの治療用経口医薬組成物、及び粘膜免疫誘導剤」

特許出願人：国立大学法人 東京大学、公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明者：川名 敬、五十君 静信

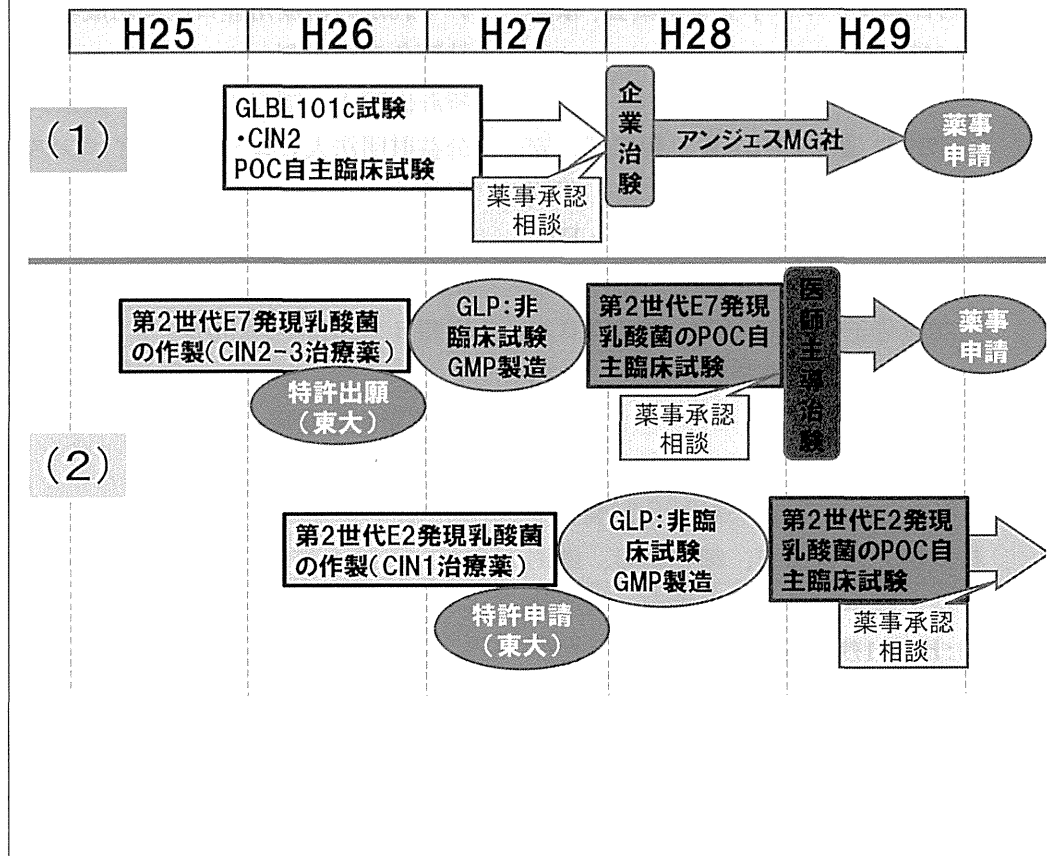
出願番号：特願2015-017407

出願日：2015年1月30日

2. 実用新案登録

なし

HPV分子標的治療薬開発までのロードマップ



「HPV16型陽性の子宮頸部中等度上皮内
腫瘍性病変（CIN2）に対する乳酸菌を
利用したCIN治療薬の探索的臨床研究」
にご参加いただける可能性がある患者様の
ご紹介のお願い

HPV16単独陽性のCIN2と診断され
外科的治療を選択されない患者様がいらっしゃいましたら
ご紹介をお願い致します。

「HPV16型陽性の子宮頸部中等度上皮内
腫瘍性病変（CIN2）に対する乳酸菌を
利用したCIN治療薬の探索的臨床研究」
にご参加いただける可能性がある患者様の
ご紹介のお願い

厚生労働科学研究費補助金
医療技術実用化総合研究事業
独立行政法人
日本医療研究開発機構研究費
「子宮頸癌に対する粘膜免疫を介したヒトパピローマウイルス
(HPV)分子標的免疫療法の臨床応用に関する研究」班

平素より大変お世話になっております。

当院では、2013年から2017年度末（2018年3月31日）
まで、中等度子宮頸部上皮内腫瘍性病変（CIN2）に対し
乳酸菌を用いた治療薬の探索的臨床試験を行っております。
本臨床試験は、厚生労働科学研究費補助金によって実施
されております。現在、多くの試験参加者を募集しておりま
す。CINを罹患した患者さんに対しての治療薬は未だ誰も開
発に成功しておらず、本薬剤は世界初のCIN治療薬として期
待されております。
同試験薬は、経口投与であり、自宅でも20日間服用してい
たできます。先行の第1相の探索的臨床試験（17例に経口投
与）によって、その安全性は確認されています（因果関係
のある有害事象はみとめていません）。また効果は、CIN3に
対して70%の患者様の病変が軽減しており、子宮頸部円錐切
除術を回避できました。

今回、ご紹介していただきたい患者様としては、

1. 子宮頸部異形成であること
2. 20歳以上-50歳未満であること
3. 乳酸菌製品に対してアレルギーがないこと

でございます。

本臨床試験の対象はHPV16型のCIN2ですが、異形成
の程度やHPVタイプについては当院で検査の上で適格性を
吟味し、参加可否について患者様に説明をさせていただきます。
従いまして、ご紹介いただく段階では、患者様を厳密に
選定いただく必要も結構でございます。
適格性が不一致であった場合は、患者様と相談し、
貴院に逆紹介させて頂こうと考えております。

お忙しいところ大変申し訳ございませんが、ご協力いた
だけますと幸いです。

厚生労働科学研究費補助金
医療技術実用化総合研究事業
独立行政法人
日本医療研究開発機構研究費
（臨床研究・治療推進研究事業）

「子宮頸癌に対する粘膜免疫を介したヒトパピローマウイルス
(HPV)分子標的免疫療法の臨床応用に関する研究」
(H25-医療技術-一般-006)
UMIN試験ID: UMIN000012229

研究代表者
川名 敬
（東京大学医学部附属病院女性外科 准教授）
電話：03-3815-6411 内線：39407
Mail address: kkawana-ky@umin.org

Ⅱ. 分担研究報告