

次世代乳酸菌発現系の作製・解析

五十君 静信・部長・国立医薬品食品衛生研究所

子宮頸癌の前癌病変の治療を目的とした乳酸菌経口ワクチンの開発が行われている。子宮頸癌は human papillomavirus (HPV) の感染が関わっており、発癌因子としてウイルタンパク E7 が知られている。この E7 にかかわる抗原を乳酸菌表層に提示させ経口投与することで、粘膜局所に E7 特異的免疫が誘導されるという先行する研究成果があるが、その免疫誘導能はまだ十分でないのが現状である。一般的にワクチンによる免疫誘導では最適な抗原量が存在すると考えられていることから、乳酸菌に提示させる E7 抗原量の調節により、さらに治療効果の高い製剤を得られると思われる。そこで本研究では、乳酸菌の菌体表層に提示させる E7 抗原量を正確に調節する固定化技術を新たに構築し、E7 発現量と乳酸菌の量比を変化させ、マウスを用いてその免疫誘導能の評価を行った。1.2×10⁸ 乳酸菌に対し、0.3μg 以上の抗原の固定化を行えば、最も高い免疫効果が期待できることが明らかとなった。菌体表層の TCA などを用いた酸処理は、乳酸菌の持つ免疫賦活効果を低下させることも確認された。この結果を受け、乳酸菌を用いた遺伝子組換え技術を応用し、上述の E7 発現量と乳酸菌の量比を実現する乳酸菌組換え体を作出した。この組換え体を用いて、それぞれ生菌と死菌について、同様な評価系で評価を行ったところ、いずれも充分と考えられる免疫効果が確認された。

A. 研究目的

子宮頸癌の約 50%を占める HPV16 型の E7 を乳酸菌 *Lactobacillus casei* に発現させた経口薬 GLBL101c は開発段階であり、細胞性免疫誘導能を高めるための E7 発現量（E7：乳酸菌の量比）の最適化が行われていない。さらに免疫効果の高いことが期待される実用的な第 2 世代の製剤を開発するために、乳酸菌々体表層に可変的に抗原を固定することの可能な新しい技術を開発し、E7 発現量と乳酸菌の量比の最適な条件を検討する。その情報を基に、E7 発現量と乳酸菌の量比の最適な条件となるように遺伝子組換え技術を用いて、組換え乳酸菌を作出する。

B. 研究方法

1. 乳酸菌々体表層に可変的に抗原を固定することの可能な新しい技術の開発

大腸菌に発現させた弱毒化 E7 タンパク精製した後、乳酸菌に固定化することで正確な固定量の調節を試みた。乳酸菌表層への E7Rb の固定は、*Lactococcus lactis* 由来のアンカータンパク cA を E7Rb と融合（cA=E7Rb）させることで行った。

この cA と E7Rb の融合配列を市販のプラスミド pQE31 に挿入し、*E. coli* JM109 株の形質転換を行った（図 1）。この形質転換体のタンパク発現誘導では、不溶性画分に cA=E7Rb を確認できた。

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。実験では、 1.2×10^8 乳酸菌に対し、それぞれ cA=E7Rb 量を 0.03、0.1、0.3、 $1.0 \mu\text{g}$ 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、分担研究者に免疫効果の評価を依頼した。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は、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 $\text{IFN } \gamma$ 産生細胞数で評価した。

2. E7 発現量と乳酸菌の量比の最適な条件となるような組換え乳酸菌の作出

1 の実験により、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、 $0.3 \mu\text{g}$ 以上が求められた。*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 E7Rb をコードする遺伝子を挿入 (図 2) 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、E7Rb 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 E7Rb の抗原量を評価した。

(倫理面への配慮)

本実験には、遺伝子組換え実験が含まれるため、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従い、実験を行った。

C. 研究結果

1. 乳酸菌々体表層に可変的に抗原を固定することの可能な新しい技術の開発

TCA 処理及び未処理の *L. casei* IGM393 菌体表層の cA=E7Rb の固定化確認はフローサイトメーター及び蛍光顕微鏡にて行った。 1.2×10^8 乳酸菌に対し、それぞれ cA=E7Rb 量を 0.03、0.1、0.3、 $1.0 \mu\text{g}$ 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 (図 3) と未処理 (図 4) で表面の抗原量をフローサイトメトリーにより評価した。その結果、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。

また、マウスへの腹腔内投与後における粘膜リンパ球中の E7 特異的 $\text{IFN } \gamma$ 産生細胞数は、TCA 処理 (図 5) 及び未処理 (図 6) の結果を示した。TCA 処理菌体では、cA=E7Rb の固定量依存的に増加していることが確認された (図 5)。TCA 未処理菌体の免疫評価では、 $0.1 \mu\text{g}$ を超えると免疫効果は一定である結果が得られた (図 6)。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 $\text{IFN } \gamma$ 産生細胞の誘導能が高いことが明らかとなった。

2. E7 発現量と乳酸菌の量比の最適な条件となるような組換え乳酸菌の作出

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、 $0.3 \mu\text{g}$ 以上が求められた。このため、現有の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。得られた組換え体は、通常の培養では、E7Rb の発現量が少なかったが、増菌培地の pH を 7 以上に保つと、発現する E7Rb の抗原量は増大した。この培養条件で培養を行った組換え体について、分担研究者に免疫効果の評価を依頼した。目標とする免疫効果が得られた（図 7）ので、このクローンを今後製剤化を検討していくこととした。

D. 考察

1. 乳酸菌々体表層に可変的に抗原を固定することの可能な新しい技術の開発

アンカータンパク cA は乳酸菌表層へ提示させる抗原量を正確に調節するツールとして非常に有用であることが示唆された。また、菌体の TCA 処理は cA の固定化を妨げる分子の除去により固定可能な抗原量を高める効果がある一方、乳酸菌の表層に存在する免疫調節分子の脱落も引き起こす可能性のあることが示唆された。

一方、乳酸菌に固定化する E7 抗原量を制御することが可能となったことから、この技術を用いれば、子宮頸癌の前癌病変の治療に最も有効と思われる菌体表層の E7 と乳酸菌の量比を評価することが

可能であると思われた。他の分担研究者の免疫の効果に関する評価結果は、固定する抗原量が 1.2×10^8 乳酸菌に対し、 $0.3 \mu\text{g}$ であれば、最も高いと思われる免疫効果が期待でき、 $0.3 \mu\text{g}$ 以上の発現では、抗原量を増やしても免疫効果が一定であることを明確にした。この結果から、遺伝子組換えにより乳酸菌々体表層に発現する E7 の抗原量は、上述の値を超えれば良いと思われる。

2. E7 発現量と乳酸菌の量比の最適な条件となるような組換え乳酸菌の作出

得られた乳酸菌組換え体は、当初発現する抗原量が少なかったが、pH を 7 以上として培養することにより、免疫効果に必要と思われる抗原量を菌体表層に固定化出来ることが明らかとなった。

E. 結論

1. 乳酸菌々体表層に可変的に抗原を固定することの可能な新しい技術の開発

新たに構築した cA=E7Rb の固定化技術は、乳酸菌表層に意図する濃度での抗原量の固定化を可能とした。 1.2×10^8 乳酸菌に対し、それぞれ cA=E7Rb 量を 0.03、0.1、0.3、 $1.0 \mu\text{g}$ を加え、菌体表層に固定化し、免疫効果进行评估したところ、 $0.3 \mu\text{g}$ 以上の固定化を行えば、最も高い免疫効果が期待できることが明らかとなった。菌体表層の TCA 処理は、免疫効果を低下させることも確認された。

2. E7 発現量と乳酸菌の量比の最適な条件となるような組換え乳酸菌の作出

E7 を菌体表層に発現する組換え乳酸菌のクローンが、得られた。このクローンを培地の pH コントロール下で培養したところ、上述検討により得られた E7 と乳酸菌の量比となるような組換え体を得ることが出来た。この条件で培養した乳酸菌組換え体は、生菌、死菌ともほぼ同じ程度の免疫効果が得られ、期待したレベルの免疫効果が、検証された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定含）

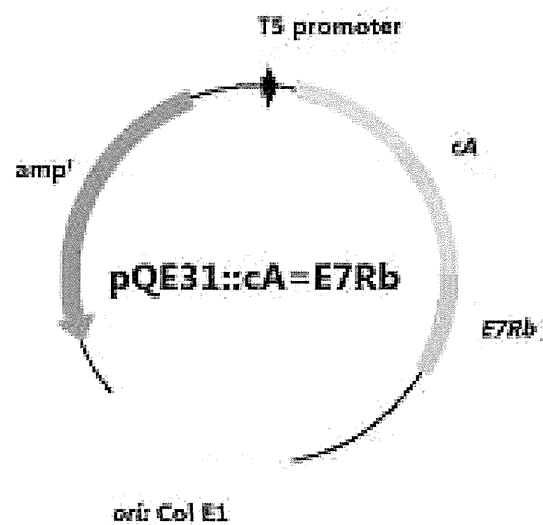
1. 特許取得

出願済み

2. 実用新案登録

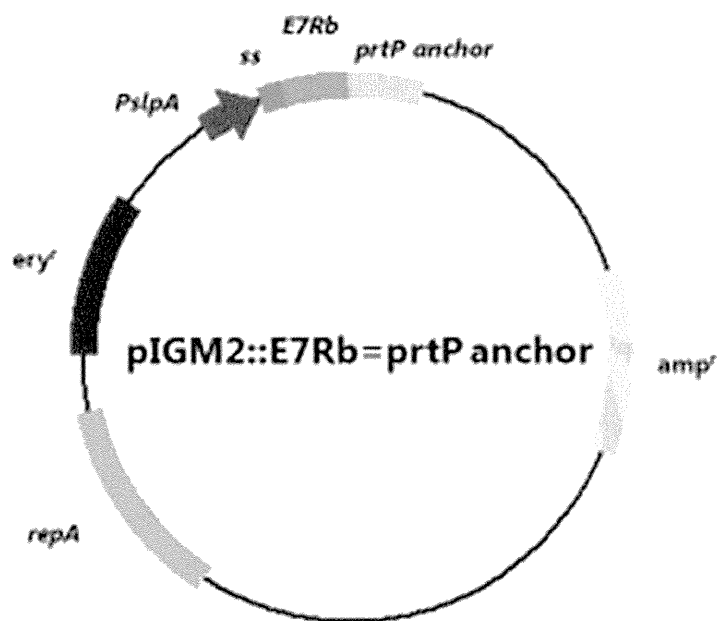
なし

3. その他



cA *Lactococcus lactis* IL1403 *AcmA* gene
E7Rb Human papillomavirus E7 gene

図 1. 抗原精製用に構築した大腸菌用組換えプラスミド



<i>PslpA</i>	promoter sequence of <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC1559 S-layer protein
<i>ss</i>	secretion signal of <i>L. brevis</i> ATCC1559 <i>prtP</i> gene
<i>E7Rb</i>	Human papillomavirus E7 gene
<i>anchor</i>	proteinase sequence of <i>Lactobacillus casei</i>
<i>amp^r</i>	ampicillin resistant gene of plasmid pGEM-3
<i>ery^r</i>	erythromycin resistant gene of <i>Staphylococcus aureus</i> plasmid pE194

図 2. 乳酸菌表層固定発現用に構築したプラスミド

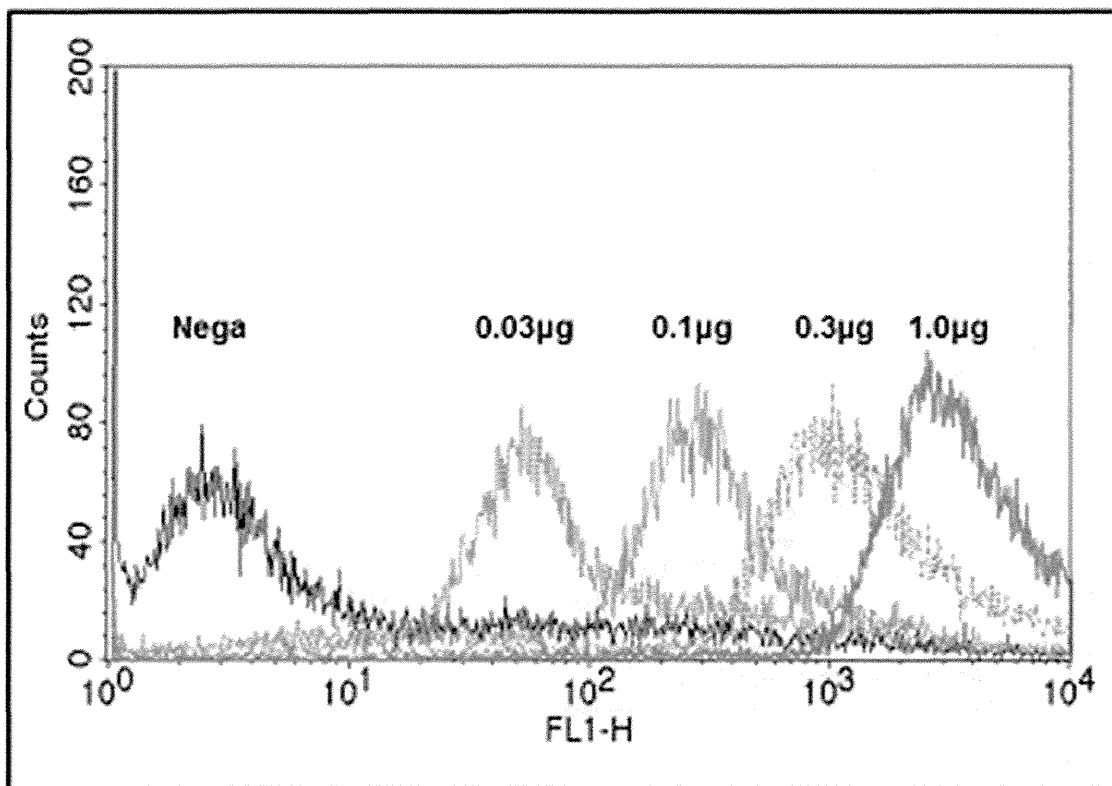


図3. フローサイトメトリーを用いた菌体表層抗原の評価
TCA処理後、乳酸菌々体表層に固定した場合

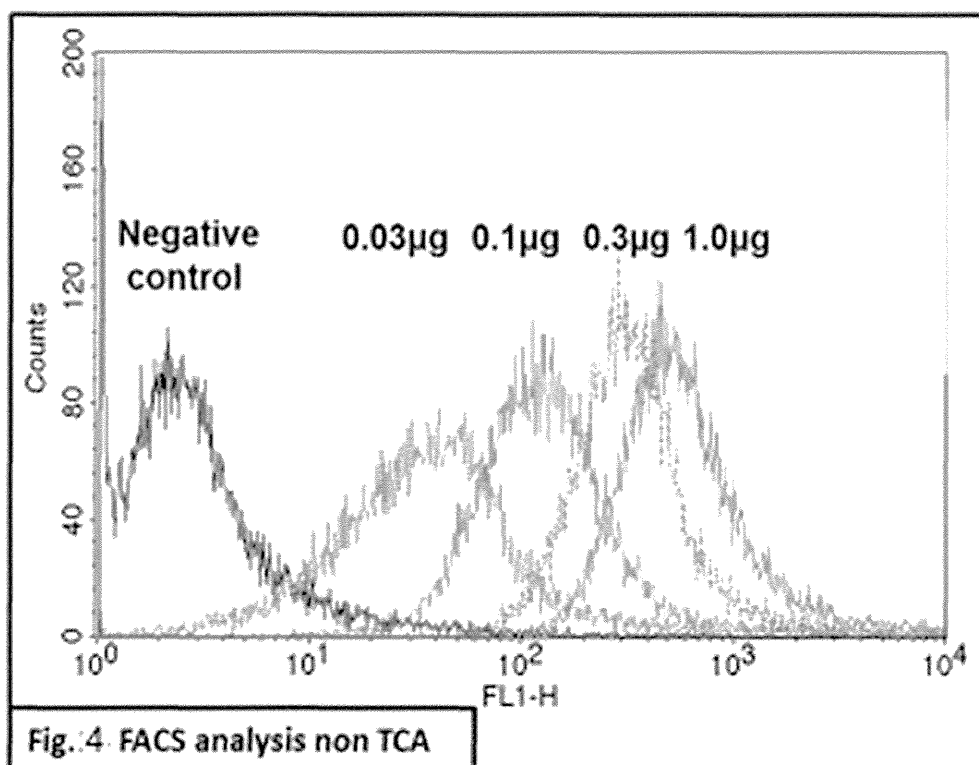


図 4. フローサイトメトリーを用いた菌体表層抗原の評価
TCA未処理で、乳酸菌々体表層に固定した場合

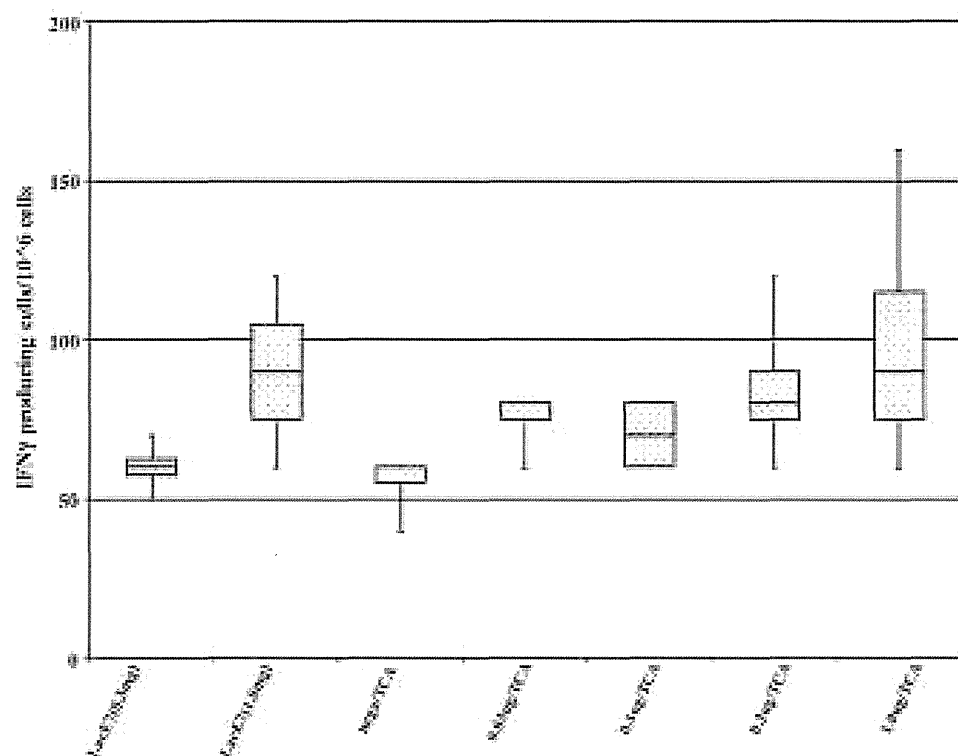


図5. E7-乳酸菌表面結合 (TCA処理あり) の免疫効果の評価結果

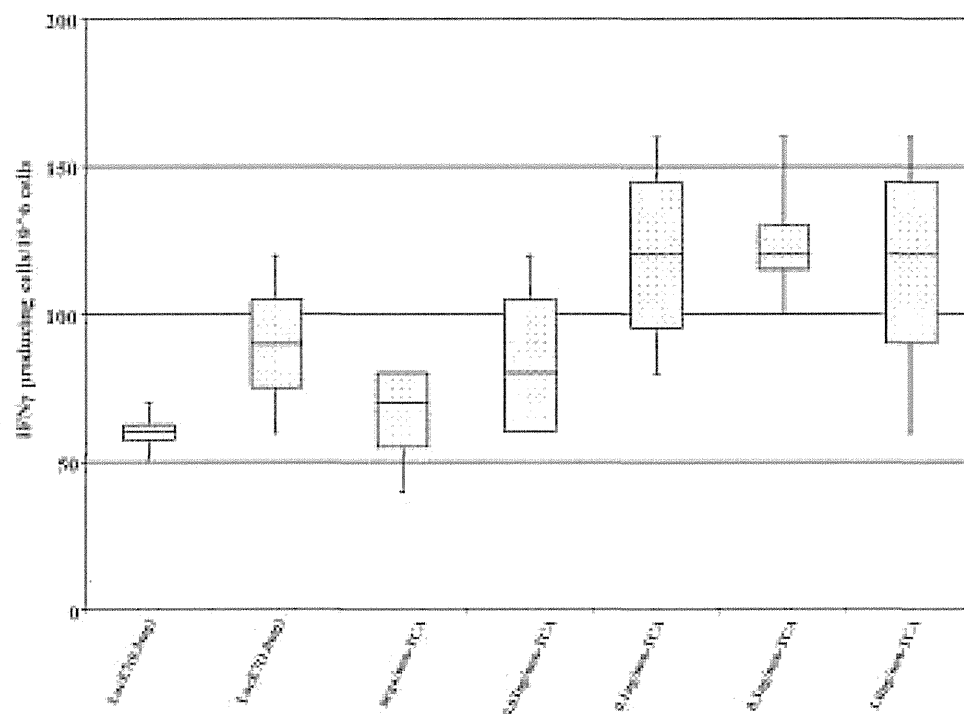


図6. E7-乳酸菌表面結合 (TCA処理なし) の免疫効果の評価結果

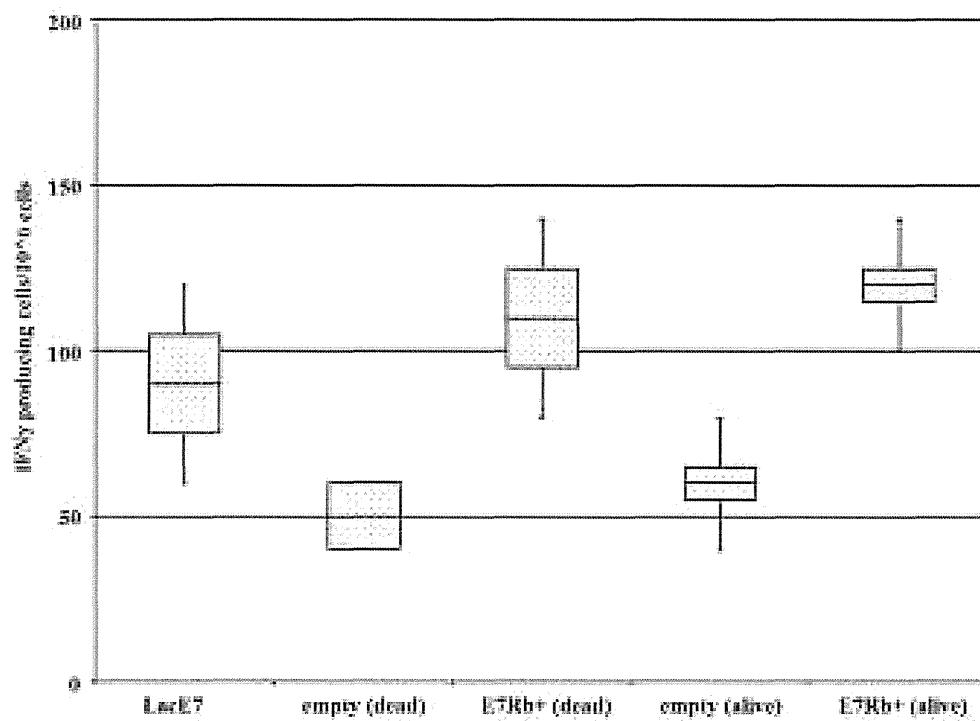


図7. 組換え乳酸菌-E7発現の免疫効果の評価結果

厚生労働科学研究費補助金（臨床応用基盤研究事業）

分担研究報告書

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

研究分担者 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

(国立感染症研究所エイズ研究センター 室長)

研究要旨

HPV 分子標的免疫療法により誘導された HPV 特異的 T 細胞応答の高感度な検出系の確立のため、抗原特異的 T 細胞の選択的増殖に有用な樹状細胞の作成法を検討した。迅速な樹状細胞作成法を用いることで、末梢血単球より 48 時間で成熟樹状細胞を作成することが可能であった。抗原提示細胞の存在しない子宮頸部擦過細胞や、低頻度にしか存在しない抗原特異的 T 細胞の刺激培養に有用である。

A. 研究目的

癌に対する宿主免疫応答として癌抗原特異的細胞傷害性 T リンパ球(CTL)が有効であると考えられており、近年各種癌に対する CTL を賦活化する免疫細胞療法の開発が進んでいる。子宮頸癌はヒトパピローマウイルス

ス (HPV) によるウイルス発癌である。HPV 抗原に対する CTL 応答が癌化を制御しているという報告もあり、HPV 特異的 CTL を賦活化する治療ワクチンの効果が期待される。

これまでに行われている癌に対する CTL 賦活化を目指した治療法は主に全身性の CTL を増強することを目的とされている。しかしながら、子宮頸癌は生殖器粘膜に生ずることから、粘膜免疫、特に生殖器系の所属リンパ組織である腸管リンパ組織における CTL の増強を目指す必要がある。

本研究班では HPV 発癌の責任分子である HPV-E7 タンパク質に対する粘膜免疫系での細胞性免疫応答の誘導を目的とした分子標的薬の開発に取り組んでおり、第二世代 E7 乳酸菌経口薬、また HPV-E2 タンパク質を標的とした乳酸菌経口薬を製剤化し、前駆病変 (CIN1, CIN2) への治療効果を調べることを目的としている。本分担研究では、乳酸菌経口薬の免疫誘導能の評価系を確立し、惹起された E7, E2 に対する細胞性免疫応答と治療効果の因果関係を明らかにする。

昨年度は、抗 CD3 抗体と T 細胞増殖因子 IL-2 を用いて非特異的に T 細胞を刺激することで、ごく少量の子宮頸部擦過検体からの上皮内リンパ球の刺激培養系を確立した。HPV 特異的 T 細胞の頻度は低いことが予想されるため、HPV 抗原で刺激し特異的な T 細胞を選択的に増殖させることができれば、

高感度に HPV 特異的 T 細胞を検出することが可能になる。しかしながら、子宮頸部擦過検体中には、抗原提示細胞となり得る細胞がほとんど存在せず、抗原特異的な刺激培養を行うことが不可能である。また、子宮頸部擦過検体に比べて安定的に細胞数が確保できる末梢血での評価も有用であると考えられるが、自然感染では非常に低頻度にしか存在しないことが報告されている。そこで、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することとした。通常、PBMC から樹状細胞を作成する際、分画した単球を GM-CSF と IL-4 を用いて樹状細胞へと分化させる。成熟樹状細胞の作成には 1 週間程度の日数が必要となるが、その後の刺激培養にかかる時間を考慮すると、より短時間で成熟樹状細胞を作成する必要がある。本研究では、迅速な樹状細胞の作成法を検討した。

B. 研究方法

樹状細胞の作成

健常人 PBMC より抗 CD14 抗体を用いて CD14 陽性の単球を分画し、以下の 2 通りで成熟樹状細胞(mDC)の作成を行った。

- 1) 通常法 : 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。
- 2) 迅速法 : 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。

樹状細胞の性状解析

得られた imDC, mDC を、抗 CD14, CD80, CD86, CD83, HLA-ABC, HLA-DR 抗体にて染色し、フローサイトメトリーにて解析を行った。

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

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。

(倫理面への配慮)

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。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。

C. 研究結果

通常法と迅速法を用いて、PBMC 由来単球から imDC, mDC を作成した。迅速法で作成した imDC, mDC いずれも CD14 陰性であり、単球から DC への分化が見られた。さらに、TNF- α /IL-1 β /IL-6/PGE2 を用いて成熟させた DC は、迅速法においても成熟化のマーカーである CD83 が陽性となっており、imDC に比べて CD80, CD86, HLA-DR いずれも発現が亢進していた (図)。これらの結果から、迅速法により作成した mDC は、通常法で作成した mDC と同様の性質を有することが明らかとなった。

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。

D. 考察

従来の方法では1週間を必要とした単球からの mDC の作成が 48 時間で可能であることが示された。時間の短縮のみでなく、分化に必要な高額なサイトカインも半分以下の量で mDC を作成可能であった。mDC を用いることによって、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。

E. 結論

短時間かつ低コストで PBMC 由来単球より mDC を作成可能であった。迅速法で作成した mDC は、抗原特異的 CD8+T 細胞を効率良く増殖することが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 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.
2. 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,

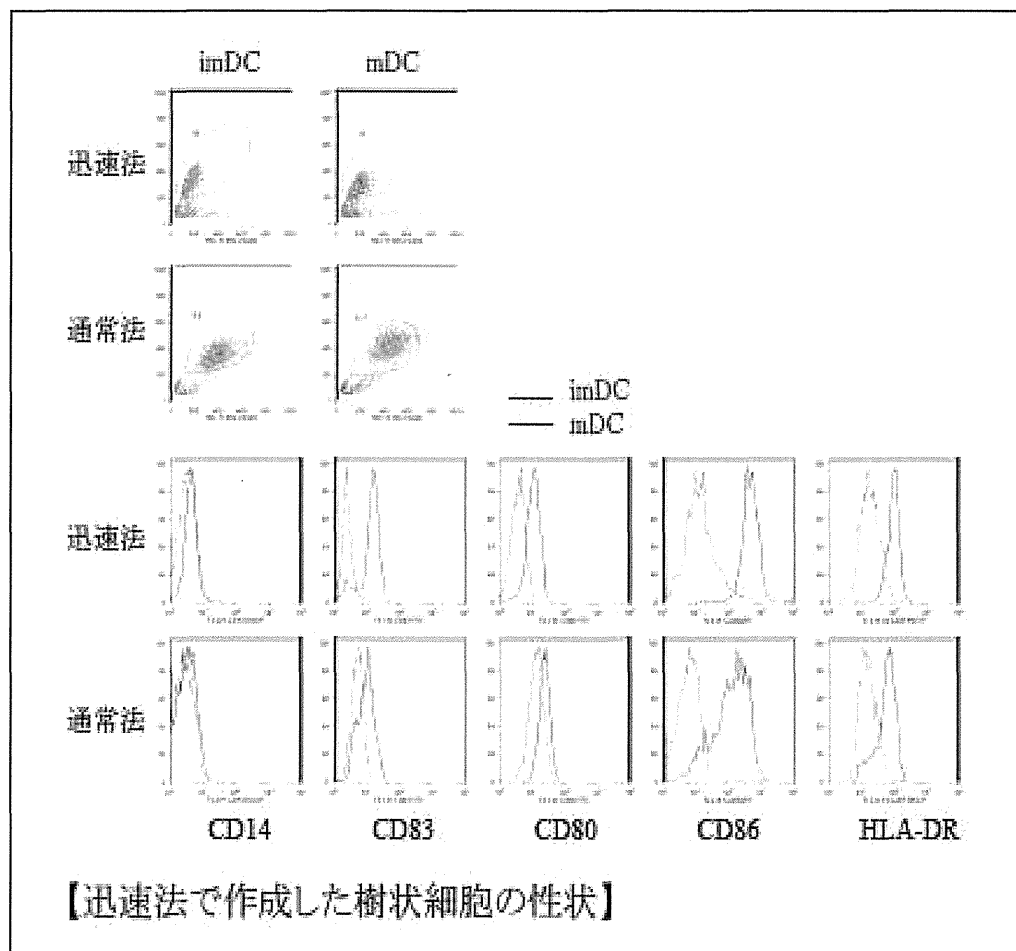
Hosoya N. Development and Customization of a Color-Coded Microbeads-Based Assay for Drug Resistance in HIV-1 Reverse Transcriptase. *PLoS One*. 9:e109823, 2014.

3. 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.

2. 学会発表

1. **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.
2. 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
3. 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
4. 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
 5. 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
 6. 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
 7. 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
 8. 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
 9. 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. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし



III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
<u>Kawana K</u> , 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(47)	6233- 6239	2014
Taguchi A, Nagasaka K, Kawana K, Hashimoto K, Kusumoto-Matsu o 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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nagasaka K, <u>Kawana K,</u> 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	40	12616	2014
Azuma Y, Kusumoto-Matsu o R, Takeuchi F, Uenoyama A, Kondo K, Tsunoda H, Nagasaka K, <u>Kawana K,</u> 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	44(10)	910-7	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Taguchi A, <u>Kawana K</u> , 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(2)	e89605	2014
Taguchi A, Wada-Hiraike O, <u>Kawana K</u> , 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
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- 560	2014