

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

**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**

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 温川 恭至

平成26(2014)年 5月

## 目 次

I . 総括研究報告	-----	1
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		
温川 恭至		
II . 分担研究報告	-----	13
1 . HPV持続感染機構の解析と複製阻害剤による感染排除に関する研究		
温川 恭至		
2 . HPV治療ワクチン臨床試験の実施に関する研究		
川名 敬		
3 . HPVの生活環と遺伝子機能の解明		
酒井 博幸		
4 . HPV と HBV を標的とする多価ワクチンの開発		
森 清一郎		
5 . HPV持続感染機構の解析と複製阻害剤による感染排除に関する研究		
中川 俊介		
6 . 子宮頸部高度異型上皮に対するRNAi 治療開発		
大和 建嗣		
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	45

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）

（総括・分担）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 蛋白を抗原とした第二世代 HPV 感染予防ワクチン開発を進めた。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。HPV16 E7 を抗原とし CTL 誘導と CIN3 病変の治療を目指した経口治療ワクチン（GLB101c）の探索的Ⅰ/Ⅱa 相臨床試験を終了し、CIN3 から CIN2 への退縮と手術の回避例 80%（8/10）における免疫学的解析を進めた。子宮頸部における CTL の誘導と病理組織像の改善との間には相関が見られた。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・治療法の開発が期待される。

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に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。

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が期待されていたが、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。

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。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。更に、研究協力者が開発した最新のナノ粒子ミセルDDSを用いることで、新たな子宮頸がん予防・治療のための新たなシーズを開拓する。

## B. 研究方法

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。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。

HPV 既感染者への治療ワクチンを開発する。HPV16型E7が細胞表面に提示された乳酸菌 *Lactobacillus casei*（乳酸菌E7ワクチン：GLBL101c）をGMP製造した製剤を作成し、第I/IIa相探索的臨床試験は昨年度中に終了した。今年度はCIN3からCIN2への退縮と手術の回避例80%(8/10)の追跡調査と免疫学的解析を進めた。末梢血

および病変部の生検組織より特異的細胞性免疫誘導能を解析し、組織診、細胞診による病理学的評価との関連を解析した。

E6の機能の大部分は、p53など標的蛋白質のユビキチン-プロテオソーム系による分解に依存している。そこでプロテオソーム阻害剤であるMG132内包化ナノミセルを研究協力者である片岡一則(疾患生命工学センター)らと共同開発し、腫瘍への薬剤集積性や抗腫瘍効果を種々の子宮頸がん細胞株を用いて解析した。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のDNA-RNAハイブリッド型核酸の改良を進めた。

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。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。なかでも、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-

ブ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

HPV16のE7を抗原とする経口治療ワクチンは腸管免疫が子宮頸部へのCTL誘導に有効であるとの基礎研究の結果からも、その有効性が期待されている。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3年間にわたり実施した。今年度は7症例を追加し臨床試験を終了した。予想された通りCIN3患者全17例に対し、全ての用量で有害事象はなく、CIN3病変の退縮も観察されている。子宮頸部粘膜リンパ球への抗E7細胞性免疫誘導の最大有効量(1g/日)における奏効率(CIN3退縮率)は80%(8/10)であった。退縮後のCIN3への増悪も観察されていない。集めた検体の病理、免疫学的解析からもその有効性と免疫反応との間の相関が確認されている。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。

## 3) 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を用いた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、分化を誘導することでL1,L2蛋白質の発現誘導にも成功した。L1,L2蛋白質の誘導には後期プロモーターと考えられるp670(HPV16)からの転写誘導に加え、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粒子産生の目途が立った。

## 4) 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性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。

#### 5) 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 ヘルパ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。

#### 6) 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。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。

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、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。

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。プロテオソーム阻害剤 (MG132)封埋ミセルは子宮頸がん細胞株 Xenograft に対し、腫瘍に集積する傾向を示し著名な抗腫瘍効果を観察しているが、製剤化には時間がかかるため既に臨床利用が認可されているベルケードを用いた臨床試験を優先する。siRNA の一部を DNA に置換した dsRDC や改良型の idRNA は細胞毒性が低く安定性が高いことが示されたが現状では DDS の開発に待つところが大きい。

#### 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IL2蛋白質を抗原とするワクチン抗原をもつ第二世代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。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。プロテオソーム阻害剤によるE6の機能抑制は子宮頸がんの治療に有効であることが動物実験で示されつつある。ミセル化など投与方法の改善には時間がかかるが、ベルケードなど承認薬を用いた早期の臨床試験開始を目指している。

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。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が、早期の臨床試験にはハードルが高く、地道な基礎研究とDDSの開発が必須な状況である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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* 33:4434-47, 2013.

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.

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.

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.

Kashiyama T, Oda K, Ikeda Y, Shiose Y, Hirota Y, Inaba K, Makii C, Kurikawa R, Miyasaka A, Koso T, Fukuda T, Tanikawa M, Shoji K, Sone K, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Kawana K, Nakagawa S, Matsuda K, McCormick F, Aburatani H, Yano T, Osuga Y, Fujii T. Antitumor activity and induction of TP53-dependent apoptosis toward ovarian clear cell adenocarcinoma by the dual PI3K/mTOR Inhibitor DS-7423, *PLoS One*, 2014

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*, in-press, 2014

Tanikawa M, Wada-Hiraike O, Yoshizawa-Sugata N, Shirane A, Hirano M, Hiraike H, Miyamoto Y, Sone K, Ikeda Y,

Kashiyama T, Oda K, Kawana K, Katakura Y, Yano T, Masai H, Roy AL, Osuga Y, Fujii T. Role of multifunctional transcription factor TFII-I and putative tumour suppressor DBC1 in cell cycle and DNA double strand damage repair. *Br J Cancer*, 109: 3042-3048, 2013

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, 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

Halimi SA, Maeda D, Shinozaki-Ushiku A, Koso T, Matsusaka K, Tanaka M, Arimoto T, Oda K, Kawana K, Yano T, Fujii T, Fukayama M. Claudin-18 over expression in intestinal-type mucinous borderline tumor of the ovary, *Histopathology*, 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

Ichinose M, Fujimoto A, Osuga Y, Minaguchi T, Kawana K, Yano T, Kozuma S. The Influence of Infertility Treatment on the Prognosis of Endometrial Cancer and Atypical Complex Endometrial Hyperplasia, *Int J Gynecol Cancer*, 23: 288-293, 2013

Todokoro T, Furniss D, Oda K, Kawana K, Narushima M, Mihara M, Kikuchi K, Hara H,

Yano T, Koshima I, Effective treatment of pelvic lymphocele by lymphaticovenular anastomosis, *Gynecol Oncol*, 128: 209-214, 2013

Fujii T, Takatsuka N, Nagata C, Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Kawana K, Mitsuhashi A, Hirai Y, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H, Association between carotenoids and outcome of cervical intraepithelial neoplasia: a prospective cohort study, *Int J Clin Oncol*, E-pub, 2013.

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

Arimoto T, Oda K, Nakagawa S, Kawana K, Tsukazaki T, Adachi K, Matsumoto Y, Yano T, Kozuma S, Taketani Y. Retreatment with nedaplatin in patients with recurrent gynecological cancer after the development of hypersensitivity reaction to carboplatin. *J Obstet Gynaecol Res*. 39: 336-340, 2013

Kashiyama T, Oda K, Kawana K, Arimoto T, Kanetaka Y, Takazawa Y, Maeda D, Nakagawa S, Yano T, Kozuma S. Low-grade endometrial stromal sarcoma developing in a postmenopausal woman under toremifene treatment for breast cancer. *J Obstet Gynaecol Res*. 39: 424-429, 2013

Kajitani N., Satsuka A., Yoshida S. and Sakai H.: HPV18 E1<sup>+</sup>E4 is assembled into aggresome-like compartment and involved in

sequestration of viral oncoproteins. *Frontiers in Virology* 4: article 251, 2013.

article 251, 2013.

Yamamoto M., Onogi H., Kii I., Yoshida S., Iida K., Sakai H., Abe M., Tsubota T., Ito N., Hosoya T., and Hagiwara M.: Novel CDK9-selective inhibitor prevents replication of broad DNA viruses. *J. Clin. Invest.* (in press, 2014)

Endo, S., Yamato, K., Hirai, S., Moriwaki, T., Fukuda, K., Suzuki, H., Abei, M., Nakagawa, I., Hyodo, I. Potent in vitro and in vivo antitumor effects of MDM2 inhibitor nutlin-3 in gastric cancer cells. *Cancer Sci.*102:605-613, 2011

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

Saito R1, Suzuki H, Yamada T, Endo S, Moriwaki T, Ueno T, Hirose M, Hirai S, Yamato K, Mizokami Y, Hyodo I. Predicting skin toxicity according to EGFR polymorphisms in patients with colorectal cancer receiving antibody against EGFR. *Anticancer Res.*33:4995-8, 2013

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

## 2 . 学会発表

中原 知美、田中 克征、大野 真一、温川 恭至、清野 透 ヒトパピローマウイルス 16 型のゲノム複製に関与する宿主因子の解析 / Cellular factors involved in suppression of human papillomavirus type 16 (HPV16) genome replication in keratinocytes. 第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、2013 年 10 月

中原 知美、江川 長靖、大野 真一、温川 恭至、清野 透 レポーター遺伝子を搭載したヒトパピローマウイルス 16 型 (HPV16)ゲノムの作製と評価 第 61 回日本

ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、  
2013年11月

Mori S, Kusumoto-Matsuo R, Kukimoto I.  
Molecular mechanism of replication  
interference between HPV16 and HPV18. DNA  
tumor virus meeting 2013 (Birmingham)

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、  
11 月、岐阜

梶谷直子、酒井博幸: HPV E1^E4 はアグリ  
ソームを形成しウイルス因子のタンパク量制御  
に関与する。第 72 回日本癌学会学術総会、

横浜、2013年10月3日-5日

梶谷直子、酒井博幸: Human  
papillomavirus (HPV) E1^E4 は aggresome を  
形成する。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、  
神戸、2013年11月10日-12日

Kenji Yamato, Takuma Nakajima, Ichiro  
Nakagawa

Enhanced specificity of HPV16 E6E7 siRNA  
by RNA-DNA chimera modification 第 3 3 回  
日本分子生物学会年会 平成 2 2 年 1 2 月  
神戸

Kenji Yamato, Shinji Endo

AGO2-association, microRNA suppression  
and cytotoxicity of RNA-DNA chimera  
modified siRNA 第 3 4 回日本分子生物学会年  
会 平成 2 3 年 1 2 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 7 1  
回日本癌学会学術総会平成 2 4 年 9 月札幌

Kenji Yamato, Shinji Endo  
Identification of a short RNA segment in  
the siRNA seed region required for  
efficient RNAi 第 35 回日本分子生物学会年  
会 平成 24 年 1 2 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 7 2 回日本  
癌学会学術総会 平成 2 5 年 1 0 月横浜

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願

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 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

特許出願番号 2011-268252 遺伝子発現阻害  
剤及び阻害方法 出願者：(株)バイオシン  
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

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）

（総括・分担）研究報告書

HPV 持続感染機構の解析と複製阻害剤による感染排除に関する研究  
分担研究者 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 正常ヒト子宮頸部角化細胞において環状HPV16ゲノムを細胞当たり約50コピーで安定に複製維持する細胞に、外来性E1とE2の発現を薬剤により誘導できる細胞集団を作製し、クローニングにより複数の細胞株を得て解析を進めた。ドキシサイクリンの添加によりHPV16ゲノムのコピー数が細胞当たり約1万コピーに増幅した。さらにCa添加による分化誘導によりL1とL2の発現が確認された。ゲノム増幅と分化誘導の組み合わせにより平皿培養細胞からの成熟HPVゲノムを精製できたが、それらの感染性を確認するには至らなかった。一方で、ゲノム増幅の際、NFκBの活性化が認められ、ゲノム増幅を抑制していることを見出した。NFκBは、E1のタンパク分解を促進することによりHPVゲノム複製を調節する可能性が示唆された。NFκBによるゲノム複製調節機構を破綻させることにより、(1)さらに効率良くコピー数を増加しウイルス産生系へ応用できるだけでなく、(2)持続感染細胞におけるHPVゲノム維持機構に介入し得る可能性を得た。

#### A. 研究目的

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が複数のグループより報告されており、中和活性を正しく評価するためには本物のHPV粒子を用いる必要がある。しかし、HPVは角化細胞の分化に伴いゲノムを増幅したのち分化に伴う後期遺伝子の発現誘導によりパッケージングされることから、in vitroにおける再現は困難である。従来の方法では、安定供給の難しい初代ヒト角化細胞にHPVゲノムを導入した後、3次元培養により角化細胞の分化を誘導することにより少量

のウイルス粒子を回収できることが報告されているにすぎない。本研究においては不死化したヒト正常角化細胞で環状HPVゲノムを安定して維持する細胞株の樹立とともに、平皿培養においてHPVゲノムを増幅、パッケージングさせる技術を開発する。それにより、中和活性評価や感染機構の解析に必須の本物のHPV粒子を安定供給する。また、HPVゲノムの複製機構を明らかにし、複製阻害により被感染細胞を排除する有効な新しい戦略を打ち立てる研究基盤を確立する。

#### B. 研究方法

昨年度までに、環状HPV16ゲノムを安定に複製維持する不死化正常子宮

頸部角化細胞株において、外来性にE1とE2の発現をドキシサイクリン添加により誘導できる細胞集団の作製に成功している。E1単独、E2単独、E1+E2の発現誘導により環状HPVゲノムの増幅が見られるかを検討した。さらに平皿培養細胞より成熟ウイルス粒子の産生を試みた。

また、昨年度までに野生型ならびにE1発現欠損HPV16ゲノムを不死化皮膚角化細胞内で複製する細胞株を樹立している。これら2つの細胞株におけるHPVゲノムの維持複製ならびに分化誘導時における後期複製を比較した。

一方、E1とE2の発現誘導に加えCa添加により角化細胞の分化を誘導すると、ゲノムコピー数の増加と共に、複製ゲノムからのL1とL2の発現が確認された。密度勾配遠心法により成熟ウイルス粒子と思われる分画を精製し、ウイルスDNAの検出により回収ウイルス粒子量を推定した。

さらに、HPV複製阻害剤のスクリーニングを簡易に行うために、レポーター遺伝子を搭載したHPVゲノムを種々作製し、それらの有用性について検討した。HPVゲノム後期遺伝子コード領域内の様々な部分を分泌型ルシフェラーゼ発現カセットと置換したHPVゲノムを作製し、皮膚及び子宮頸部由来の角化細胞に導入後、ゲノム複製効率とレポーター遺伝子の発現量について検討した。

(倫理面への配慮)

手術材料よりの細胞の入手にあた

っては各機関の倫理委員会の承認のもと患者のインフォームドコンセントを得たものを用いている。また、使用にあたっては細胞名を符号化することにより患者のプライバシーの保全に万全を期している。

### C. 研究結果

環状HPV16ゲノムを安定に複製維持する不死化正常子宮頸部角化細胞株にE1とE2の発現をドキシサイクリン添加により誘導すると、ゲノムは24時間以内に細胞あたり約50コピーから1万コピー以上に増幅した。しかし、E1とE2の発現誘導後にはATMおよびATRの活性化やNFκBの活性化と共に細胞増殖抑制が誘導された。ATMおよびATRを含むPI3Ksを抑制する阻害薬ウォルトマニン添加や、NFκB活性化を抑える分解抵抗性のIκBの高発現によりゲノムコピー数は更に約2倍以上増加することが示された。さらに、NFκB活性化を抑制すると、E1のタンパク分解が抑制されることを見出した。NFκBは、E1の安定性を調節することにより、HPVゲノム複製を制御する可能性が高い。

E1とE2の発現誘導とCa添加によって分化誘導した角化細胞からウイルス粒子分画を回収し、HeLa細胞へ感染したが、感染成立に伴うE1<sup>+</sup>E4 mRNAの発現は確認できなかった。

一方、HPV複製阻害剤のスクリーニングに有用なレポーター遺伝子搭載HPVゲノムを作製した。このレポーターHPVは、角化細胞内で野生型と同様の効率で維持複製し、培養上清のルシ

フェラーゼ活性測定により、ゲノムコピー数の変化を容易にモニターすることができた。

#### D. 考察

不死化角化細胞の平皿培養系において、E1,E2の発現誘導によりHPVゲノムが数千倍に増幅可能な細胞集団を樹立し、その中から増幅効率の高いクローナルな細胞株を複数樹立した。これらの細胞株に、Ca添加による角化細胞の分化誘導を行うと、複製された内在性ゲノムからL1とL2の発現を誘導できることが分かった。これまでL1とL2の発現に至る高度な分化誘導には、3次元培養が必須であると考えられていた。本研究では、Ca添加による角化細胞のスフェロイド形成および、スフェロイド形成時にL1とL2の発現が良く見られる傾向が観察された。さらに、密度勾配遠心法により、スフェロイド化した細胞からHPVゲノムDNAを含む成熟ウイルス粒子分画を精製できた。すなわち、効率よくスフェロイド形成を誘導することにより、3次元培養のような煩雑な手順を経ずとも、平皿培養系から細胞分化に依存して産生される真の成熟HPV16ウイルス粒子を、比較的容易に産生できる可能性が示唆された。今後、L1とL2をより高発現する分化誘導条件の最適化などを行い、感染性を有した成熟ウイルス粒子の精製法を確立し、平皿培養からの大量安定産生技術を確立したい。

一方HPVの複製阻害剤はCINの治療

薬あるいは子宮頸がんの予防薬として期待できる。昨年度の研究結果より、E1阻害剤を用いたとしても、ウイルス感染時の初期複製と粒子形成に至るウイルス増殖期の複製を阻害できるものの、持続感染病変の基底細胞における複製を抑制し被感染細胞を排除することは理論的に困難であることが示された。従って、E1阻害剤に拘らず、広くHPV複製を阻害する薬剤のスクリーニングが必要である。今年度は、HPV複製阻害剤のハイスループットスクリーニングが可能な細胞株の作製に成功した。また、NFκBがE1のタンパク分解を促進することを見出し、持続感染細胞においてE1依存的な複製が抑制される要因であると推察された。NFκBによるHPVゲノム複製の調節機構に介入することにより、(1)E1,E2によりゲノム複製を増強することから、より効率よいウイルス産生系法の確立への応用や、(2)E1タンパク分解を抑制することにより、持続感染細胞に溶解感染等を惹起し、感染細胞の排除を狙うという新たな抗ウイルス薬デザイン戦略が考えられる。

今後は、これらの知見に基づいた抗ウイルス薬スクリーニングを行いたい。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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 33:4434-47, 2013.

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.

## 2. 学会発表

中原 知美、田中 克征、大野 真一、  
温川 恭至、清野 透 ヒトパピローマウ  
イルス 16 型のゲノム複製に関する宿主  
因子の解析 /Cellular factors involved in  
suppression of human papillomavirus type 16  
(HPV16) genome replication in keratinocytes.  
第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横  
浜、2013 年 10 月

中原 知美、江川 長靖、大野 真一、  
温川 恭至、清野 透 レポーター遺伝子  
を搭載したヒトパピローマウイルス 16 型  
(HPV16)ゲノムの作製と評価 第 61 回日本  
ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、  
2013 年 11 月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

（総括・分担）研究報告書

HPV 治療ワクチン臨床試験の実施に関する研究

研究分担者 川名 敬

東京大学大学院医学系研究科産婦人科学講座 准教授

**研究要旨** 本研究のもと施行された第I/IIa相探索的自主臨床試験が終了し、最終解析を行った。E7発現乳酸菌ワクチン（GLBL101c）を経口投与によって、腸管に抗原刺激を与え、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。至適用量を投与された10例のうち、8例において子宮頸癌前癌病変（CIN3）の退縮が確認され、根治手術を回避できた。

E6を標的とした核酸医学であるE6siRNAを生体内で利用するためにsiRNAを高分子ミセルで内包したドラックデリバリーシステム(DDS)を応用した。E6siRNA内包高分子ミセルを静脈投与することによって子宮頸癌担癌マウスに対する抗腫瘍効果を発揮し、HPV関連癌に対する分子標的治療薬の可能性を示唆した。

#### 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。減少傾向にあった本邦の子宮頸癌の年齢調整死亡率はこの20年間は下げ止まっている。しかも20～30才代で罹患率・死亡率ともに増加している。子宮頸癌のほぼ100%が発癌性ヒトパピローマウイルス(HPV)に因る。

子宮頸癌は必ずしも高い死亡率ではなく外科的治療・放射線治療を中心として治療が奏効する比較的予後の良い癌である。しかし、子宮頸癌に対する既存の治療法として挙げられる子宮摘出や放射線照射では、妊孕能は断たれ、またその前癌病変（CIN3）に対する既存治療法である子宮頸部円錐切除術では、その後の早産リスクが3倍近く高まり、術後の周産期予後

が問題となる。CIN3の罹患年齢ピークが30才前後であることを考えると公衆衛生学的に大きな問題となる。

発癌性HPVには15タイプあり、現行のHPV予防ワクチンは、そのうち2タイプを予防するだけである。HPV予防ワクチンでは子宮頸癌の40%は予防できない。

本研究では、HPV分子を標的にした2つのHPV分子標的治療薬(薬物療法)を念頭に考え、これらによって手術回避、子宮温存療法を開発することを目的としている。

E7標的癌ワクチン；HPVウイルス蛋白質のうちE7は、癌形質の維持に必須で、子宮頸癌細胞で恒常的に強発現している癌抗原である。そこで抗E7細胞性免疫を利用した免疫療法が期待される。これまでの海外で実施され

た試験薬は実用化に至ったものはない。E7の筋注・皮下注による全身性免疫誘導では子宮頸部粘膜の抗E7細胞性免疫が不十分であったと考えられる。本研究では、HPV分子を標的として粘膜免疫を誘導して治療効果を得る経口薬を開発した。E7分子のキャリアーとして、ヒトで食経験のある乳酸菌*Lactobacillus casei*を用いた。E7を発現させた乳酸菌（GLBL101c）を製剤化し、第I/IIa相探索的自主臨床試験を実施した。昨年度までに全17例への投与が終了し、その臨床効果を示してきた。本年度はこれらの投与患者から得られた臨床サンプルの免疫学的効果と臨床効果の関連性について検討することを目的とした。

E6標的siRNA内包高分子ミセル：HPV癌蛋白質で子宮頸癌の不死化、抗アポトーシス作用に深く寄与する癌遺伝子E6の発現を阻害するための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

### (1)E7 標的癌ワクチン

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。

GLBL101c は、最少量の 1cap/d から数例コホートを組みながら 6cap/d 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。

これまでに 1cap/日 1 例、2cap/日 3 例、4cap/日 3 例、6cap/日 3 例の計 10 例(4 コホート) に対して試験を行った。さらに、至適用量と考えられた 4cap/日について 7 例を追加し、全 10 例で有効性を検討した。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。

更に第二世代の HPV 分子標的乳酸菌を新規開発するため、乳酸菌の表面にアンカー蛋白質を介して、E7 タンパク汁を固着させ、E7 蛋白質と乳酸菌の量比を変動させた。GLBL101c と比較して免疫誘導能が最適となる量比を検討す

ることとした。

## (2) E6標的siRNA内包高分子ミセル

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回尾静脈から静脈投与を行い、腫瘍径の増殖カーブを検討した。またday12の腫瘍内におけるE6発現量、p53蛋白質量を、RT-qPCR、ウエスタンブロット法により検討した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り、東京大学医学部の医学部研究倫理審査委員会の承認を得て、インフォームドコンセントのうえで、文書で同意を得た症例に対して研究を実施した。また、提供試料、個人情報を厳格に管理・保存した。

## C. 研究結果

### (1) E7標的癌ワクチン

GLBL101cの安全性と臨床効果(有効性)は昨年までに報告した。本年度は試験終了後の追跡調査の結果をまとめた。

17例では試験薬と因果関係のある有害事象は認められなかった。CIN3が退縮して根治手術を回避できた症例(退縮群)が9例、退縮が見られず手術を施行された症例(非退縮群)が8例であった。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。退縮群の追跡期間は14-33か月であるが、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法で検討された。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相関していた。また、退縮するためのE7-CMIのcut-off値をROC曲線で設定したところ、E7-CMIが $10^5$ 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。

さらに、本研究では第二世代のE7発現乳酸菌を開発するために、E7蛋白質と乳酸菌の量比を最適化することを検討している。そのために乳酸菌菌体に出すE7蛋白質量を変動させるシステムを構築した。アンカーE7を作成し乳酸菌にアンカーのレセプターを発現させている。これによってGLBL101cと量比の異なるE7発現乳酸菌を作成し得た。現在、これらの粘膜免疫へのE7-CMI誘導能を比較している。

## (2) E6標的siRNA内包高分子ミセル

まず、18E6siRNAのin vitroでの薬理効果を見るために、HeLa細胞にsiRNAを添加し細胞増殖抑制活性をMTSアッセイで調べた。HPVと無関係のコントロールsiRNAと比べ細胞増殖能は40%程度になった。16E6siRNAについても同様に施行し、SiHa細胞では50%程度の抑制であったが、HeLa細胞やC33A細胞では有意な抑制は見られなかった。E6siRNAはタイプ特異的にE6遺伝子発現を阻害することが示唆された。これらのsiRNAをRGD搭載PEG

と混合して内包させた高分子ミセルを合成した。18siRNA内包高分子ミセルはHeLa細胞担癌ヌードマウスへ、16E6siRNA内包高分子ミセルは、SiHa細胞担癌SCIDマウスへ、それぞれ6回静脈投与した。Day 12におけるHeLa細胞腫瘍の増殖能は、E6siRNA高分子ミセル投与によってコントロールに比して約70%減少した。SiHa細胞腫瘍の増殖能は約80%減少した。いずれも有意な差であった。また各腫瘍を摘出し、腫瘍内におけるE6発現をRT-qPCRで確認したところ、E6siRNA高分子ミセル群で有意にE6mRNAレベルが低下していた。E6の最も重要な機能であるp53の消化作用を見るために、摘出腫瘍のp53蛋白質をウエスタンブロット法で検出したところ、E6siRNA高分子ミセルの投与量に依存して、p53がレスキューされていることがわかった。コントロール高分子ミセルの投与ではp53は全く検出されなかった。

## D. 考察

### (1) E7標的癌ワクチン

本年度の研究から、GLBL101cによって高いE7-CMIが誘導された症例ではCIN3が退縮することが明確に証明された。また4カプセル/日が免疫学的にも臨床病理学的にも至適用量であることが確認された。興味深いことに、一度高いE7-CMIが誘導された症例では、全例においてその後に試験薬の内服は全く行っていないにもかかわらず、臨床効果が持続しておりCIN3には至っていない。1-3年経過しても再発

を見ない（一般的にHPV16型CIN2がCIN3に増悪するリスクは5年以内に40%である）。このことは、CIN病変に存在するHPV蛋白質によるnatural booster効果によってE7-CMIが活性化されているのかも知れない。

子宮頸部リンパ球によるHPV標的癌ワクチンの免疫応答を評価した研究はこれまでに1つもない。本研究によって子宮頸部リンパ球 $10^5$ 細胞あたり21.8 cells以上のE7特異的IFN $\gamma$ 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ということがわかった。CIN患者のフォローアップにおいて、子宮頸部リンパ球を用いた検査法がCINの消長の予知マーカーになることを示唆している。

臨床効果として、数年にわたって追跡することによって、至適用量である4カプセル/日内服10例のうち4例がCIN1以下となった。海外ではCIN2-3は円錐切除術の対象となるが、CIN1はHPV感染症の扱いで治療対象とは考えられていない。GLBL101cには、抗腫瘍効果を発揮して、正常もしくは感染症レベルに戻す効果があることが証明された。本臨床試験は、1アームの探索的臨床試験であったが、今後CIN2を対象とする二重盲検ランダム化比較試験を実施して有効性について検証することが望まれる。そのため本年度より厚労省科研費（研究代表者：川名敬）によって第IIb相臨床試験を開始している。

本研究では、さらに薬理効果（E7

粘膜免疫誘導能）の優れているE7発現乳酸菌を新規開発するべく薬剤の最適化を試みている。この結果によっては第二世代のより強力な免疫誘導能を持つE7発現乳酸菌を新薬として開発することを考えている。

（2）E6標的siRNA内包高分子ミセル siRNAは単体では生体内に投与することはできない。投与してもRNase、マイナスイオンによる細胞への取り込み阻害、貪食細胞への取り込み、によってドラッグデリバリーシステム（DDS）無しには実用化は難しい。そこで、DDSとして高分子ミセルを利用している。PEG化された薬剤は昨今多くの薬剤で応用されていることから、実用化への道が近い。本研究で得られたマウス担癌子宮頸癌への抗腫瘍効果は、DDSによる生体への静脈投与であり、実現性のある投与方法であった。核酸医学によるsiRNAの最適化とともに本研究で用いたDDSによってHPV分子に対する核酸医学を利用した分子標的治療薬の開発につながると考えられた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kashiyama T, Oda K, Ikeda Y, Shiose Y, Hirota Y, Inaba K, Makii C, Kurikawa R, Miyasaka A, Koso T, Fukuda T, Tanikawa M, Shoji K, Sone K, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Kawana K, Nakagawa S, Matsuda K, McCormick F, Aburatani H, Yano T, Osuga Y, Fujii T, Antitumor activity and induction of TP53-dependent apoptosis toward ovarian clear cell adenocarcinoma by the dual

- PI3K/mTOR Inhibitor DS-7423, *PLoS One*, in-press, 2014
- 2) 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*, in-press, 2014
  - 3) Tanikawa M, Wada-Hiraike O, Yoshizawa-Sugata N, Shirane A, Hirano M, Hiraike H, Miyamoto Y, Sone K, Ikeda Y, Kashiyama T, Oda K, Kawana K, Katakura Y, Yano T, Masai H, Roy AL, Osuga Y, Fujii T, Role of multifunctional transcription factor TFII-I and putative tumour suppressor DBC1 in cell cycle and DNA double strand damage repair. *Br J Cancer*, 109: 3042-3048, 2013
  - 4) 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, 2013
  - 5) 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
  - 6) 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
  - 7) Halimi SA, Maeda D, Shinozaki-Ushiku A, Koso T, Matsusaka K, Tanaka M, Arimoto T, Oda K, Kawana K, Yano T, Fujii T, Fukayama M, Claudin-18 over expression in intestinal-type mucinous borderline tumor of the ovary, *Histopathology*, E-pub, 2013
  - 8) 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
  - 9) Ichinose M, Fujimoto A, Osuga Y, Minaguchi T, Kawana K, Yano T, Kozuma S, The Influence of Infertility Treatment on the Prognosis of Endometrial Cancer and Atypical Complex Endometrial Hyperplasia, *Int J Gynecol Cancer*, 23: 288-293, 2013
  - 10) Todokoro T, Furniss D, Oda K, Kawana K, Narushima M, Mihara M, Kikuchi K, Hara H, Yano T, Koshima I, Effective treatment of pelvic lymphocele by lymphaticovenular anastomosis, *Gynecol Oncol*, 128: 209-214, 2013
  - 11) Fujii T, Takatsuka N, Nagata C, Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Kawana K, Mitsuhashi A, Hirai Y, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H, Association between carotenoids and outcome of cervical intraepithelial neoplasia: a prospective cohort study, *Int J Clin Oncol*, E-pub, 2013
  - 12) 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

- 13) 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
- 14) Arimoto T, Oda K, Nakagawa S, Kawana K, Tsukazaki T, Adachi K, Matsumoto Y, Yano T, Kozuma S, Taketani Y. Retreatment with nedaplatin in patients with recurrent gynecological cancer after the development of hypersensitivity reaction to carboplatin. *J Obstet Gynaecol Res*. 39: 336-340, 2013
- 15) Kashiwama T, Oda K, Kawana K, Arimoto T, Kanetaka Y, Takazawa Y, Maeda D, Nakagawa S, Yano T, Kozuma S. Low-grade endometrial stromal sarcoma developing in a postmenopausal woman under toremifene treatment for breast cancer. *J Obstet Gynaecol Res*. 39: 424-429, 2013

## 2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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

- 3) 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
- 4) 川名 敬, HPV と子宮頸癌 ~ HPV を標的とした創薬の臨床応用 ~ 第 61 回日本ウイルス学会、平成 25 年 11 月、京都
- 5) 川名 敬, 尖圭コンジローマに対するレーザー蒸散治療例における母子感染率の検討、日本性感染症学会シンポジウム、平成 25 年 11 月、岐阜
- 6) 川名 敬, HPV 感染症を見直すー基礎から臨床までー、日本性感染症学会教育講演、11 月、岐阜

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし



厚生労働科学研究費補助金(第3次対がん総合戦略研究事業)

(総括(分担)研究報告書

HPV の生活環と遺伝子機能の解明

分担研究者 酒井 博幸 京都大学ウイルス研究所がん遺伝子研究分野 准教授

#### 研究要旨

HPV感染は子宮頸癌発症の主要なリスクファクターである。本研究課題では、HPVの感染・複製機構を解明し、その情報に基づいて抗ウイルス剤、抗腫瘍剤の新規標的を同定することである。

今年度は18型HPVの複製モデルを利用して、各遺伝子の機能解析を行った。またE4遺伝子産物が、いくつかの宿主因子に加えて、E6やE7などのウイルス蛋白の不活化にかかわる可能性を示した。

またHPV複製モデルを利用して、新規化合物の抗ウイルス効果を評価した。

#### A. 研究目的

ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus: HPV) は標的組織である重層上皮に感染し、疣贅やコンジローマなどの良性腫瘍を誘発する病原ウイルスである。形成された腫瘍は自然治癒することがほとんどであるが、一部は長期にわたり持続感染し、まれに悪性腫瘍へと進展することが知られている。特に子宮頸がんでは、ほぼ全ての症例で HPV の感染が確認されており、HPV の感染が子宮頸がん発症の主要なリスクファクターであると考えられている。また、子宮頸がん以外でも肛門がんや頭頸部扁平上皮癌 (head and neck squamous cell carcinoma: HNSCC) への関与も示されており、このウイルスの感染を予防・治療する戦略が重要となっている。

本研究課題では HPV の生活環を分子レベルで解明し、その知見に基づいて HPV 感染に対する抗ウイルス剤や抗腫

瘍剤の分子標的を提案することを目的としている。HPV の遺伝子発現や複製は、感染標的である上皮細胞の分化状態に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。そのためこれまで HPV の感染・複製機構は十分に解明されていない。

この研究では HPV の複製をサポートできる皮膚モデル培養系やセミソリッド培地培養法などを利用して HPV の生活環を再現し、その感染・複製機構を解明することにした。さらにウイルス遺伝子の働きや、異形性・発がん誘導の機構に関しても解析を行う。

#### B. 研究方法

【HPV 複製モデルの構築】

HPV18 の複製系として、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ウイルスゲノム型 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、HPV18 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 制御遺伝子変異体の作成】

HPV の各遺伝子に変異を導入するには、polymerase chain reaction (PCR) を利用した oligonucleotide-directed mutagenesis を用いた。ここでは一塩基置換により、ナンセンス変異を導入した。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% CO<sub>2</sub>

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)。

#### 【サザンプロット解析】

細胞からのゲノム DNA の精製には市販のゲノム DNA 精製キットを利用した。回収した DNA (2µg) 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 (ロシユ)。

#### 【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。このゲル上で HFK を培養し、さらにゲル表面を空気に晒すことによって HFK は分化・層状化し、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】

HFK に各種遺伝子を導入する際には、MuLV 系のレトロウイルスベクターを用いた。導入する遺伝子に応じて、LXSN, LPCX (Clontech) を使い分け、それぞれの plasmid に目的遺伝子を挿入したものを作成した。ウイルスベクターの産生は、各 plasmid を pCL10A1 パッケージングベクター (Retrogen) とともに 293T 細胞に transfection し、培養上清中に放出されたウイルスベクターを回収し利用した。

#### 【メチルセルロース懸濁培養、および分化マーカーの確認】

1.8mM CaCl<sub>2</sub> 含有 1.5% メチルセルロース/EpiLife-KG2 に HFK を懸濁し、48~96 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。

#### (倫理面への配慮)

この研究の遂行において用いた実験材料や方法は個人情報、および倫理面での問題を生じない。

## C. 研究成果

### 1. HPV18 の調節遺伝子機能の解析

HPV18 の全ゲノムを含むプラスミドをもとにして、E1、E2、E4、E5、E6、E7 の各

ORF、5'寄りの部位にナンセンス変異を導入し、各遺伝子の変異体を作成した。E4ORF は E2ORF と読み枠違いでオーバーラップしているため、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プ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。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、有意というには繰り返し実験が必要である。

さらに、高度に上皮細胞の分化の影響を調べるために、得られた細胞を用いて皮膚モデル培養系(raft culture)を構築した。野生型 HPV DNA を導入したもの

は、角質層の顕著な肥大が観察された。E4、E5 両変異体でも野生型と同程度の異形性が確認された。しかし E6 と E7 の変異体では、全く異形性は観察されなかった。ビリオン構成タンパクである L1 タンパクに対する組織免疫染色を行ったところ、野生型では角質層に L1 の発現が確認された。それに対し、E6、E7 の変異体では L1 の発現は検出できなかった。E4 と E5 変異体では野生型と同程度に、角質層での L1 発現が認められたが、その発現量は有意に低下していた。

## 2. HPV18 E4 遺伝子機能の解析

E4(遺伝子産物としては RNA スプライシングによって E1 の N 末 5 アミノ酸が E4 タンパクに融合した E1<sup>E4</sup> タンパクとして発現する)は感染組織の分化層で高発現しており、ウイルス複製の後期過程に関わる可能性が示されていた。我々は以前に、HPV18 型及び 16 型の E4 を HeLa や CV1 細胞で発現させると、G2/M 細胞周期停止を誘導すること、E4 は細胞質に凝集塊を形成することを報告している。ここではこの凝集塊形成の意義を解析した。

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)周りにピ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。

### 3. HPV 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。

## D. 考察

### 1. HPV 調節遺伝子の機能について

今回は HPV18 の調節遺伝子の、ウイルス複製における機能を解析した。その結果 E6 はゲノムメンテナンスに必須ではないが重要な役割を持つことが示された。これにより E6 変異体では細胞内の HPV 遺伝子の発現量は非常に低く抑えられ、その結果、分化に応じたゲノムコピー数の増加や、皮膚モデル培養系での異形性誘導、L1 タンパク発現などが求められなくなったと考えられた。

E7 はメンテナンスには関与しないが、分化時のゲノム増加に関与していた。さらに皮膚モデル培養系では、E7 変異体は異形性や L1 の発現が認められなかった。この事は E7 が分化プログラム(異形性)の制御に重要であり、E7 による分化

改変がゲノムコピー数の増加や後期遺伝子の発現に関与している可能性を認めした。

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。

### 2. HPV 複製における E4 の役割に関して

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。

### 3. 我々の HPV 複製モデルの有用性に関して

ここで利用されている HPV 複製系は、(i)構築が容易である、(ii)短期間に樹立できる、(iii)皮膚モデル培養系に適用できる、という利点がある。HPV 導入細胞は、長期間培養することで形質が変わり、がん化形質を持つようになる。またウイルスゲノムのインテグレーションも認められるようになる。そのような細胞では、正常なウイルス複製の観察は困難であるが、ここで用いた系ではそのような問題の発生は低く抑えられている。

いくつかの新規化合物の評価を行ったところ、有望と思われるものが見つかった。今後は皮膚モデル培養系にも適用して、その異形性誘導やビリオン産生の抑制効果を評価する予定である。

### E. 結論

ヒト角化細胞に HPV ゲノム型 DNA を導入する系によって、HPV 複製機構解析のための基盤が構築された。それを用いて、HPV 調節遺伝子の役割を解析し、抗ウイルス剤の標的因子の検索をすすめることが可能となった。

また、種々の化合物の抗ウイルス活性の評価を行うプラットフォームとしても利用できることが示された。今後は、スクリーニング系としてハイスループット化を目指す必要がある。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

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.

article 251, 2013.

Yamamoto M., Onogi H., Kii I., Yoshida S., Iida K., Sakai H., Abe M., Tsubota T., Ito N., Hosoya T., and Hagiwara M.: Novel CDK9-selective inhibitor prevents replication of broad DNA viruses. *J. Clin. Invest.* (in press, 2014)

#### 2. 学会発表

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

### H. 知的財産権の出願・登録状況

#### 1. 特許取得

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

（総括・分担）研究報告書

HPV と HBV を標的とする多価ワクチンの開発

分担研究者 森 清一郎 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官

研究要旨 昨年度までに、HPV16キャプシドタンパク質L2のアミノ酸56から75領域（L2-56/75）には少なくとも2つの交差性中和エピトープがあることが分かり、これらのエピトープを提示する抗原は、幅広い型のHPVに対する次世代ワクチンと成り得ることを示した。本年度は、L2-56/75を使用したワクチンの実用化を目指すため、製薬会社と共同研究を行った。B型肝炎ウイルスワクチンであるHBs抗原にL2-56/75を挿入したキメラ抗原（HBs-56/75）を作成し、マウスに免疫した。HBs-56/75抗原は、交差性HPV中和抗体、及び、抗HBs抗体を効率よく誘導したことから、幅広い型のHPVとHBVに有効な多価ワクチンとして有用である。

A. 研究目的

現行 HPV ワクチンは主要キャプシドタンパク質 L1 を抗原としており、子宮頸がんの原因となる約 15 の高リスク型のうち HPV16 と HPV18 にのみ有効である。昨年度までに、HPV16 の副キャプシドタンパク質 L2 のアミノ酸 56 から 75 領域（L2-56/75）に、少なくとも2つの交差性中和エピトープ（13B、及び、24B）があることが分かり、これら2つのエピトープを認識する抗体を誘導できる抗原は、全ての高リスク型を含む幅広い HPV に有効な次世代ワクチンと成り得ることを示した。本年度の研究目的は、L2-56/75 を使用したワクチンの実用化を目指すため、13B、及び、24B エピトープを認識する抗体を効率よく誘導でき、克つ、ヒトに接種可能なワクチン抗原を開発することである。

B 型肝炎ウイルス(HBV)ワクチンとして既に実用化されている HBs 抗原に L2-56/75 を挿入したキメラ抗原を作成し、マウスにおける抗 L2 抗体、抗 HBs 抗体の誘導を調べた。

B.研究方法

L2-56/75をHBs抗原のN末端に付加したキメラ抗原（HBs-56/75-N）、アミノ酸127と128の間に挿入したキメラ抗原（HBs-56/75-127）、C末端に付加したキメラ抗原（HBs-56/75-C）をコードする遺伝子を作成し、CHO細胞で発現させた。精製した各キメラ抗原を各群10匹のマウス大腿部にアルミアジュバントともに5µg/dose、4週おきに2回接種し、2回目の接種から4週間後に血清を採取した。比較として、HBs抗原も同様に接種した。10匹分の血清を等量ずつ混合し、各抗原に対する抗

血清とした。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）を抗原とするELISAで、各抗血清に含まれる抗L2抗体価を調べた。上記高リスク型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、各抗血清のHPV中和活性を調べた。L2-56/75に相当するペプチドに欠失とアラニン置換を導入した変異ペプチドを抗原とするELISAで、各キメラ抗原により誘導された抗L2抗体が認識するエピトープを調べた。HBs抗原を用いたELISAで、抗HBs抗体の誘導を調べた。

（倫理面への配慮）

動物実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律（昭和48年法律第105号、平成17年6月改正）」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成18年環境省告示第88号）」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月）」、内閣府告示の「動物の処分方法に関する指針」を踏まえ、適切に行った。

### C. 研究結果

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。なかでも、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。

### D. 考察

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た。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た。今回作成した3種類のキメラ抗原のうち、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。

### E. 結論

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に有効な多価ワクチンとして有用である。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Mori S, Kusumoto-Matsuo R, Ishii Y, Takeuchi T, Kukimoto I. Replication interference between human papillomavirus types 16 and 18 mediated by heterologous E1

helicases. Virol J, 2014 11:11.

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.

## 2 . 学会発表

Mori S, Kusumoto-Matsuo R, Kukimoto I. Molecular mechanism of replication interference between HPV16 and HPV18. DNA tumor virus meeting 2013 (Birmingham)

森 清一郎、松尾 理加、柊元 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）

柊元 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、柊元 巖、子宮頸部細胞診異常者の年齢と HPV 型の関連における検討、第72回日本癌学会学術総会（横浜）

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

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



厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

（総括・分担）研究報告書

HPV 持続感染機構の解析と複製阻害剤による感染排除に関する研究

分担研究者 中川俊介 帝京大学医学部 産婦人科教室 講師

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

#### A. 研究目的

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

#### B. 研究方法

我々は、プロテアソーム阻害剤であるMG132をナノミセルに内包化するシステムを東大工学部の片岡研と共

同で開発した。このまたMG132内包ミセルが腫瘍集積性を持つかを検討するために、ミセルを傾向ラベルし、傾向の腫瘍への集積性を検討した。HPV陽性のHeLa、Caski細胞とHPV陰性のC33細胞をヌードマウスの皮下に移植し、プロテアソーム阻害剤であるMG132とそれを内包したナノミセルの抗腫瘍能を検討した。また、同時にシスプラチン等の化学療法剤を併用することにより、相乗効果があるかも検討した。今年度は更に、シスプラチン等の化学療法剤をプロテアソーム阻害剤と併用し、*in vitro* および *in vivo* で相乗効果を検討した。また、p53に対するsiRNAを用いて、プロテアソーム阻害剤による子宮頸癌に対する抗腫瘍効果が、P53の発現回復を介するかを検討した。

（倫理面への配慮）

現在まで、患者に関わる実験や研究は

行っておらず、倫理面への配慮の必要性は無い。

### C. 研究結果

プロテアソーム阻害剤である

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

### D. 考察

bortezomibの子宮頸癌細胞に対するアポトーシス誘導能に関して、シスプラチン、カルボプラチン、パクリタ

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

今後は自主臨床試験を通して、再発、再燃を示した子宮頸癌患者に対して、bortezomib等のプロテアソームを臨床応用につなげる研究を進展させて行きたい。

### E. 結論

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。その子宮頸癌に対する抗腫瘍効果は、p53の発現回復を介することが証明された。

### F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし

労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

（総括・分担）研究報告書

子宮頸部高度異型上皮に対する RNAi 治療開発

分担研究者 大和 建嗣 筑波大学医学医療系 消化器内科 研究員

#### 研究要旨

HPV16感染に関連した高度異型上皮の治療のための、HPV16 E6E7を標的としたRNAi医薬開発を目指した研究をおこなう。我々は、これまでの研究でHPV16関連癌細胞株の増殖抑制に有効なsiRNA配列を見いだした。しかし、siRNAは、その最大の弱点として非特異的細胞増殖抑制効果を有する。この副作用の発現機構を、オフターゲット効果、miRNA生成抑制およびインターフェロン反応などから解析検討した。レンチウイルスによるAGO2レベルの増加とsiRNAによるノックダウンを用いて、siRNAの非特異的細胞増殖抑制は、miRNAの抑制ではなく、オフターゲット効果が原因であること示唆した。また一部の配列はインターフェロン反応を引き起こし、これらも細胞毒性に関与している可能性を示した。

#### A. 研究目的

子宮頸部高度異型上皮は、HPV16型など高リスク HPV が原因の前癌病変である。高度異型上皮は、E6およびE7を高発現し、これらの抑制で病変が排除できるため RNAi 治療の理想の治療標的ある。これまで E6E7 に対する遺伝子発現抑制活性の強い siRNA 配列を見いだした。siRNA は、その配列特異性ばかりではなく、様々な機序を介して臨床応用における問題となる非特異反応を引き起こす。AGO2 は、siRNA による標的遺伝子の抑制（特異効果）とオフターゲット効果（非特異効果）の双方において中心的役割を果たしている。本年度の研究では AGO2 レベルをコントロールすることによって siRNA による RNAi 活性と非特異的増殖抑制効果にどのような影響を

検討した。

#### B. 研究方法

ヒトAGO2 cDNAのコドン最適化後、化学合成し、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、パッケージングプラスミドとともにAGO2/pLenti6.3を293FT細胞に導入して作成した。HuH-7肝臓癌細胞株、HeLa由来細胞株（HeLa細胞、FL-HeLaホタルルシフェラーゼ安定発現細胞）、SiHa由来細胞株（ホタルルシフェラーゼ（FLuc）・ウミシイタケルシフェラーゼ（RLuc）-E6(RLE6-FL-SiHa-10) および FLuc・RLuc-E7安定発現細胞（RLE7-FL-SiHa-2）にレンチウイルスを用いてヒトAGO2を導入後し、ブラシジンにより選択した。

siRNAは、コントロール(siCont1, siCont2)、FLuc ( siFLuc ) およびHPV16 E6E7 を標的にしたもの(siE6-497, siE7-573, siE7-752)を化学合成したものをを用いた。また、これらのDNA修飾体、dsRDC(ガイド鎖5'端よりnt 1-6およびその相補部分をDNA化したもの)、idRNA(ガイド鎖5'端よりnt 3-8およびその相補部分をDNA化したもの)をLipofetamineRNAiMAXを用いて導入した。RNAi活性および細胞毒性はそれぞれルシフェラーゼアッセイとWST8アッセイにより解析した。miR-21およびmiR-24は、stemloop RT-PCRで定量した。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。

(倫理面への配慮)

患者由来のサンプルは使用しておらず倫理面での問題はない。

### C. 研究結果

#### AGO2蛋白と非特異細胞毒性

HeLa細胞およびHuH-7細胞にレンチウイルスでAGO2を導入すると、いずれの細胞でもsiFLuc, siE6-497, siE7-573, siE7-752の細胞毒性を増強した。またAGO2ノックダウンによってこれらsiRNAによるHeLa細胞における細胞毒性が緩和された。

#### AGO2のオフターゲット効果およびmiRNA発現への影響

HeLa細胞において高レベルのAGO2導入は、siE6-497およびsiE7-573のオフ

ターゲット効果を増強した。また、AGO2導入した細胞では、siRNA導入によるmiR-21およびmiR-24発現低下が全く見られなかったが、siRNAの細胞毒性は却って増強していた。

#### 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siRNA (siCont1, siCont2, siFLuc, siE6-497, siE7-573, siE7-752) とこれらのDNA修飾体を導入した後に、IFNbeta, OAS1, GIP2, MX1および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。

### D. 考察

siRNAは、配列依特異的な遺伝子ノックダウン効果と非特異効果の両方を引き起こす。非特異効果には、シード配列を介したオフターゲット効果、AGO2競合によるmiRNA生成抑制、自然免疫活性化および機序のよくわかっていない細胞毒性がある。AGO2は、miRNA生成とオフターゲット効果に中心的役割を果たしている。このAGO2レベルを増加させると、siRNAの細胞毒性とオフターゲット効果を増強し、siRNAによるmiRNAレベル低下を解消した。反対に、AGO2ノックダウンは、siRNAの細胞毒性を緩和した。以上から、siRNAによる細胞毒性は、単純なmiRNA発現抑制ではなく、オフターゲット効果が関与している可能性が示唆された。さらに一部のsiRNAとdsRDCにおいてIFNbetaの軽

度の発現誘導が観察された。この siRNA と dsRDC にはこれまで知られている TLR 活性化配列はない。この反応の誘導機構と細胞毒性の関連との関連について検討予定である。

#### E. 結論

siRNA の非特異効果である細胞毒性の発現機構がこれまで不明であったが我々の研究によって一部オフターゲット効果が関係していることが示唆された。このように siRNA を用いた核酸治療においてこのオフターゲット効果の回避は重要で、siRNA シード領域の DNA 修飾 ( dsRDC , idRNA ) によって改善できる。今後 siRNA による自然免疫の活性化について検討する。

#### G. 研究発表

##### 1 . 論文発表

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

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

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

##### 2 . 学会発表

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 7 2 回日本癌学会学術総会 平成 2 5 年 1 0 月横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

研究成果の刊行に関する一覧表 平成25年度

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
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	33	4434-47	2013
Iwahori S, Kohmon D, Kobayashi J, Tani Y, <u>Yugawa T</u> , 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
Kashiyama T, Oda K, Ikeda Y, Shiose Y, Hirota Y, Inaba K, Makii C, Kurikawa R, Miyasaka A, Koso T, Fukuda T, Tanikawa M, Shoji K, Sone K, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Kawana K, Nakagawa S, Matsuda K, McCormick F, Aburatani H, Yano T, Osuga Y, Fujii T	Antitumor activity and induction of TP53-dependent apoptosis toward ovarian clear cell adenocarcinoma by the dual PI3K/mTOR Inhibitor DS-7423	PLOS One	9(2)	E87220	2014

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 Acids In Vitro and In Vivo.	PLoS One	9	e89605	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	3	869-872	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,	The journal of obstetrics and gynaecology research	40(2)	554-60	2014
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
Nagasaka K, Kawana K, Osuga Y, Fujii T.	PDZ domains and viral infection: versatile potentials of HPV-PDZ interactions in relation to malignancy.	BioMed research international	2013	369712	2013

Halimi SA, Maeda D, Shinozaki-Ushiku A, Koso T, Matsusaka K, Tanaka M, Arimoto T, Oda K, Kawana K, Yano T, Fujii T, Fukayama M	Claudin-18 over expression in intestinal-type mucinous borderline tumor of the ovary	Histopathology	63	534-44	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
Ichinose M, Fujimoto A, Osuga Y, Minaguchi T, Kawana K, Yano T, Kozuma S	The Influence of Infertility Treatment on the Prognosis of Endometrial Cancer and Atypical Complex Endometrial Hyperplasia	Int J Gynecol Cancer	23	288-293	2013
Todokoro T, Furniss D, Oda K, Kawana K, Narushima M, Mihara M, Kikuchi K, Hara H, Yano T, Koshima I,	Effective treatment of pelvic lymphocele by lymphaticovenular anastomosis	Gynecol Oncol	128	209-214	2013
Fujii T, Takatsuka N, Nagata C, Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Kawana K, Mitsuhashi A, Hirai Y, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H,	Association between carotenoids and outcome of cervical intraepithelial neoplasia: a prospective cohort study	Int J Clin Oncol	18	1091-101	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,	Oncology Repts	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
Arimoto T, Oda K, Nakagawa S, Kawana K, Tsukazaki T, Adachi K, Matsumoto Y, Yano T, Kozuma S, Taketani Y	Retreatment with nedaplatin in patients with recurrent gynecological cancer after the development of hypersensitivity reaction to carboplatin	J Obstet Gynaecol Res	39	336-340	2013
Kashiyama T, Oda K, Kawana K, Arimoto T, Kanetaka Y, Takazawa Y, Maeda D, Nakagawa S, Yano T, Kozuma S	Low-grade endometrial stromal sarcoma developing in a postmenopausal woman under toremifene treatment for breast cancer.	J Obstet Gynaecol Res	39	424-429	2013
Kajitani N., Satsuki 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

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
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	11	11	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	8	e80583	2013
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	8	e80297	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.	<i>Anticancer Res.</i>	33	4995-8	2013

Ueno, T, Endo,S. Saito,R., Hirose,M., Hirai, S., Suzuki, H., <u>Yamato, K.</u> , 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	55–164	2013
---	--	------------	----	--------	------