

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09303

研究課題名(和文) HPV分子を標的とした癌免疫療法剤のコンパニオン診断開発のための基礎的研究

研究課題名(英文) Exploration of a new biomarker for companion diagnostics of HPV-targeting cancer immunotherapy

研究代表者

川名 敬 (KAWANA, Kei)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：60311627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、HPV癌蛋白質E7を標的とした癌免疫療法として、HPV16E7発現乳酸菌製剤を開発中であり、この分子標的薬におけるコンパニオン診断となるバイオマーカーを探索することをめざした。最も有力なマーカーとして、高度子宮頸部上皮内腫瘍CIN2-3の病変から回収した擦過細胞におけるHPV16E7発現レベルが有望であると考え、RT-PCR法を用いたHPV16E7発現測定系を確立した。進行中の医師主導治験でHPV16E7発現のコンパニオン診断としての有用性を検討していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高度子宮頸部上皮内腫瘍CIN2-3に対する薬物療法は未だに未開発のアンメットニーズである。HPVには抗ウイルス薬は存在せず、現在、治療薬開発で最も有力な候補は免疫療法である。世界的に開発が進んでいる。免疫療法では有効例と無効例の差が大きい特徴があり、有効例選択の診断ツールの必要性が高く、その候補であるコンパニオン診断の測定系を開発したことは有意義である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to search for biomarkers that would serve as companion diagnostics for the HPV16E7-expressing lactobacillus vaccine that is being developed as a cancer immunotherapy targeting HPV16 onco-protein E7. We thought that HPV16E7 expression level in the exfoliated cells collected from high-grade cervical intraepithelial neoplasia CIN2-3 could be the most promising marker. We here established an assay system to measure HPV16E7 expression in the lesion using RT-PCR. We will examine the usefulness of HPV16E7 expression as a companion diagnosis in ongoing investigator-initiated clinical trials.

研究分野：産婦人科・婦人科腫瘍学・癌治療

キーワード：子宮頸癌 子宮頸部上皮内腫瘍 ヒトパピローマウイルス(HPV) 免疫療法 コンパニオン診断 HPV16E7発現

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌は、そのほぼ 100%からハイリスク HPV が検出され、かつ HPV がウイルス癌遺伝子を持つことから、ハイリスク HPV が子宮頸癌の必要条件である。子宮頸部の HPV ウイルス感染像は、軽度扁平上皮内病変 (LSIL/CIN1) として病理学的に捉えることができる。LSIL のうち 40-50%は腫瘍性変化を来し、病理学的には高度扁平上皮内病変 HSIL/CIN2-3 となる。HSIL では、HPV の E6、E7 癌蛋白質が強発現してくる。これらの癌蛋白質によって不死化した細胞の一部が、癌形質(遺伝子不安定性、浸潤性、転移能等)を獲得して子宮頸癌を発症する。

これまでの多くのコホート研究から、LSIL/CIN1 の 70%、HSIL/CIN2 の 50-60%は自然退縮することも知られている。これは宿主の免疫反応に依る。HPV 蛋白質は外来性の異物抗原であることから宿主免疫反応によって感染細胞、腫瘍細胞を排除しうる。子宮頸部の LSIL に対しては HPV の E2 蛋白質に対する細胞性免疫、HSIL に対しては E7 に対する細胞性免疫が誘導された場合に子宮頸部扁平上皮内病変は自然退縮しうる。HIV 感染者やステロイド常用者のような細胞性免疫能が低下している例では CIN は進展することから細胞性免疫が重要である。

ハイリスク HPV は外性器のどこにでも感染しうるが、HSIL 以上の病変を形成する場所は、子宮頸部の扁平上皮 円柱上皮境界部 (Squamocolumnar junction:以下、SCJ)が中心である。SCJ には、扁平上皮と円柱上皮に分化しうる多能性と自己複製能を持つ組織幹細胞様 (胚細胞様) の上皮細胞があり、SCJ にハイリスク HPV が感染することで HSIL 以上の病変が発生し、癌化しやすい環境があると考えられている。SCJ における抗 HPV 細胞性免疫反応の個人差が子宮頸部上皮内腫瘍性病変の進展、退縮に深く関与している。

我々は、HSIL/CIN2-3 に発現しているハイリスク HPV の E7 を標的とした分子標的免疫療法を開発してきた。これは E7 を標的にした癌ワクチンによる世界初の HSIL/CIN 治療薬である。これは、HPV に対する免疫反応が弱いために HSIL まで進展した患者に薬物療法によって HPV 特異的な免疫を獲得させるものである。HPV16 型の E7 蛋白質を菌体に表出させた E7 発現乳酸菌 (*Lactobacillus casei*) を経口投与することで、パイエル板・腸間膜リンパ節といった腸管粘膜リンパ組織 (GALT) へ取り込まれ、E7 特異的な粘膜免疫 (Th1 作用優位) が誘導される。腸管粘膜の GALT で誘導された抗 E7 細胞性免疫細胞は、子宮頸部上皮にホーミング (帰巢) することが分かった。

2. 研究の目的

本研究では、本製剤に対する臨床的有効性の個体差を知るためのバイオマーカーを探索すること、本製剤が有効である患者を選択するためのコンパニオン診断を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

本製剤は、粘膜免疫を介して薬理効果である抗 E7 細胞傷害性免疫反応を発揮する。薬理効果に個体差が生じる要素としては、免疫誘導能の個体差、癌抗原の発現量の個体差、が考えられる。以下の臨床検体は、すべて研究倫理審査の承認のもとで、患者の同意を得て実施した。

(1)免疫誘導能と標的分子 E7 発現量の検討

我々は、上述の臨床研究の後に、第 IIb 相試験として HSIL/CIN2 を対象とした二重盲検ランダム化比較試験（本薬 20 例、プラセボ 20 例）を実施した。HSIL/CIN3 に対する第 I/IIa 相試験の臨床検体とともに、本試験で E7 発現乳酸菌製剤を内服した患者から採取した臨床検体も用いて、本免疫療法の標的分子である HPV16E7 分子の病変局所における発現量を最も有力なコンパニオン診断と考えた。有効例・無効例の E7 発現量を解析するために、子宮頸癌細胞株および CIN2-3 患者からの子宮頸部擦過細胞を用いた E7 発現測定系を樹立することを目標とした。さらに、本製剤の有効例、無効例ともに子宮頸部上皮内病変の E7 発現量および免疫組織学的検討を行い、局所の非特異的免疫反応の個体差を検討した。

(2)子宮頸部 SCJ における免疫学的特徴の検討

我々は、これまでに iPS 細胞から子宮頸部の SCJ に存在する組織幹細胞様細胞（以下、induced reserve cell : iRC）を作製している。iRC 細胞は、iPS 細胞から分化させて SCJ マーカー、幹細胞マーカーを有している。既に、この iRC 細胞に HPV16/18 を導入した細胞株（HPV16/iRC、HPV18/iRC）を樹立しており、これは HPV 発癌による一種の癌幹細胞の性質を有すると考えている。本研究では、子宮頸癌の癌幹細胞の免疫逃避機構を解明するために HPV16/iRC、HPV18/iRC を用いた in vitro 実験を行った。SCID マウスを用いた in vivo 実験では、子宮頸癌細胞株と iRC 細胞の生体内での E7 発現量を比較するとともに、起因するウイルスタイプの違いにも注目し、HPV16 と HPV18 型の比較を行った。

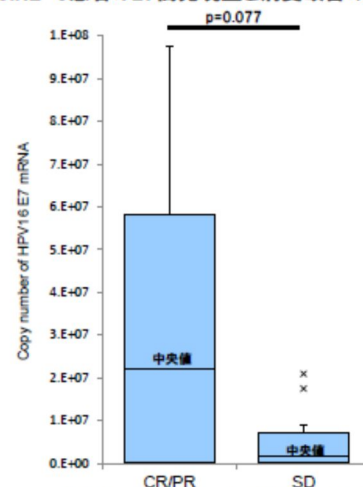
本研究は、実際に E7 発現乳酸菌製剤を臨床研究として投与された患者からの臨床検体を用いることができる点、その薬理効果、臨床的有効性がわかっていることから後向きコホートで検証できる点で独自性は極めて高い。本研究によって、本製剤の有効性を最も期待できる患者を抽出する方法を確立したい。個別化医療の観点から、HSIL/CIN2-3 に対する本治療薬のコンパニオン診断法を開発することは E7 発現乳酸菌製剤の開発（現在、医師主導治験の準備中）と併せて進めるべきと考えられる。また我々が樹立した子宮頸部の組織幹細胞様細胞から作製した子宮頸癌の癌幹細胞様細胞の免疫学的性質を調べることは子宮頸癌に対する腫瘍免疫や免疫療法の研究の一助になると考えられる。

4 . 研究成果

(1)免疫誘導能と標的分子 E7 発現量の検討

本研究により、コンパニオン診断の開発では、治験薬服用前の CIN2-3 病変からブラシを用いて擦過し採取した細胞（子宮頸がん検診液状細胞診と同じサンプル）を用いて、HPV16 型 E7 発現量（mRNA レベル）を RT-PCR 法によって測定する系を樹立した。これまでに各治験実施施設で採取、保管され、中央ラボに輸送された臨床検体についても E7 発現量を安定的に測定できている。右グラフに子宮頸部擦過細胞中に含まれる total RNA 1ng あたりの HPV16 型 E7 mRNA コピー数（copy/ng of tRNA）を縦軸にプロットした。本薬、プラセボ薬の割付け状況は現時点では不明であるが、奏効例（CR/PR 例）では、不変例（SD 例）に比して、E7 発現量が高い傾向がある（ $p=0.07$ ）ことを見出した。カットオフ値が設定できれば、“E7 発現-High”症例での IGMKK16E7

CIN2-3患者のE7高発現量と病変改善の相関



☆ 本薬群がプラセボ群かは現時点では不明のため IGMKK16E7の効果とはいえない。

の奏効割合が高くなることが示唆される。これらの基礎データをもとに、本研究では治験終了後にコンパニオン診断としての臨床的意義を検討していく予定である。

(2)子宮頸部 SCJ における免疫学的特徴の検討

2018,2019 年度は、我々が開発した粘膜免疫療法である HPV16E7 発現乳酸菌製剤に対する臨床的有効性の個体差として CIN 病変の E7 蛋白質発現の測定系樹立と臨床検体の測定を行った。2020 年度は、我々が樹立した iPS 細胞由来の子宮頸部組織幹細胞様細胞 (induced reserve cell : iRC) の解析を実施した。iRC 細胞に HPV16 もしくは HPV18 の E6/E7 癌遺伝子を導入した細胞株 (iRC-16, iRC-18) を樹立し、免疫不全マウスに接種したところ、それぞれ腫瘍を形成した。HPV の癌遺伝子 E6/E7 を導入しただけで腫瘍を形成したのは、先行研究ではなかった現象である。これには、iPS 細胞由来の幹細胞特性が関与していると考えられた。さらに HPV16 と HPV18 の比較をしたところ、iRC-18 腫瘍では浸潤性腺癌を形成した。子宮頸部腺癌の約 50% は HPV18 が原因であり、これを実験的に証明したのは世界初である。HPV 癌遺伝子を導入していない iRC-cont でも腫瘍形成したが、これは未分化腫瘍であった。これに対して、iRC-18 は浸潤性腺癌となった。iRC-16 にも腺系上皮を認めたが、過形成程度の病変であり、癌の形成は見られなかった。また、腫瘍増殖速度も $iRC > iRC-18 > iRC-16$ の順であった。iRC-16 は、腫瘍形成速度が iRC-18 よりも明らかに遅く、浸潤性癌の形成には至らなかった。このことは、iRC-18 が幹細胞としての特徴を保持しながら、腺系上皮に分化したことを意味する。上皮系、幹細胞系、腺系の各種マーカーについて、iRC-18, iRC-16 腫瘍の免疫染色を行ったところ、iRC-18 で、幹細胞マーカー (ALDH-1, p63, CD44, CK17) が陽性となった。同じ腫瘍内でも、浸潤性腺癌、上皮内腺癌、正常腺上皮が混在していた。

HPV18 は幹細胞特性を保持できる性質があり、それがヒトでの子宮頸部腺癌につながり、また予後不良の臨床特性と合致すると考えられた。これから、各段階の腺系病変をレーザーマイクロダイジェクションで切除し、それぞれのゲノム解析、発現解析を行っていく。HPV18 による子宮頸部腺癌の発生機序を解析し、新しい創薬開発を探索していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Ikeda Y, Adachi K, Tomio K, Eguchi-Kojima S, Tsuruga T, Uchino-Mori M, Taguchi A, Komatsu A, Nagamatsu T, Kawana-Tachikawa A, Uemura Y, Igimi S, Osuga Y, Fujii T, and Kawana K	4. 巻 9(4)
2. 論文標題 A placebo-controlled double-blind randomized (Phase IIB) trial of oral administration with HPV16 E7-expressing Lactobacillus, GLBL101c, for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 (CIN2).	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/vaccines9040329	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Onda T, Satoh T, Ogawa G, Saito T, Kasamatsu T, Nakanishi T, Mizutani T, Takehara K, Okamoto A, Ushijima K, Kobayashi H, Kawana K, Yokota H, Takano M, Kanao H, Watanabe Y, Yamamoto K, Yaegashi N, Kamura T, Yoshikawa H, on behalf of Japan Clinical Oncology Group,	4. 巻 13(130)
2. 論文標題 Comparison of survival between primary debulking surgery and neoadjuvant chemotherapy for stage III/IV ovarian, tubal, and peritoneal cancers in phase III randomized trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Cancer	6. 最初と最後の頁 114-125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejca.2020.02.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ikeda Y, Uemura Y, Asai-Sato M, Nakao T, Nakajima T, Iwata T, Akiyama A, Satoh T, Yahata H, Kato K, Maeda D, Aoki D, Kawana K	4. 巻 49(9)
2. 論文標題 Safety and efficacy of mucosal immunotherapy using human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing Lactobacillus-based vaccine for the treatment of high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL): the study protocol of a randomized placebo-controlled clinical trial (MILACLE study),	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Jap J Clin Oncol,	6. 最初と最後の頁 877-880
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jjco/hyz095.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ishibashi N, Maebayashi T, Asai-Sato M, Kawana K, Okada M	4. 巻 19(69)
2. 論文標題 Radiation therapy for vaginal cancer in complete uterine prolapse with intrauterine adhesion: a case report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Womens Health.	6. 最初と最後の頁 69-82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12905-019-0767-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Y, Kawana K, Yanaihara N, Banno K, Chhit M, Uy K, Kruiy L, Sann CS, Ishioka-Kanda M, Akaba H, Matsumoto Y, Fujita N, Yano T, Koum K, Okamoto A, Kimura T,	4. 巻 45(7)
2. 論文標題 Development and evaluation of a cervical cancer screening system in Cambodia: A collaborative project of the Cambodian Society of Gynecology and Obstetrics and Japan Society of Obstetrics and Gynecology.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res	6. 最初と最後の頁 1260-1267.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.13968	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuo K, Shimada M, Yamaguchi S, Kigawa J, Tokunaga H, Tabata T, Kodama J, Kawana K, Mikami M, Sugiyama T,	4. 巻 8(2)
2. 論文標題 Neoadjuvant chemotherapy with taxane and platinum followed by radical hysterectomy for stage IB2-IB3 cervical cancer: Impact of histology type on survival	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 E156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8020156.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura H, Taguchi A, Kawana K, Baba S, Kawata A, Yoshida M, Fujimoto A, Ogishima J, Sato M, Inoue T, Nishida H, Furuya H, Yamashita A, Eguchi S, Tomio K, Mori-Uchino M, Adachi K, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Oda K, Nagamatsu T, Osuga Y, Fujii T	4. 巻 9
2. 論文標題 Therapeutic significance of targeting survivin in cervical cancer and possibility of combination therapy with TRAIL"	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 13451-13461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24413	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Komatsu Atsushi, Igimi Shizunobu, Kawana Kei	4. 巻 36
2. 論文標題 Optimization of human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing lactobacillus-based vaccine for induction of mucosal E7-specific IFN -producing cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 3423 ~ 3426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2018.05.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogishima Juri, Taguchi Ayumi, Kawata Akira, Kawana Kei, Yoshida Mitsuyo, Yoshimatsu Yuki, Sato Masakazu, Nakamura Hiroe, Kawata Yoshiko, Nishijima Akira, Fujimoto Asaha, Tomio Kensuke, Adachi Katsuyuki, Nagamatsu Takeshi, Oda Katsutoshi, Kiyono Tohru, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 18
2. 論文標題 The oncogene KRAS promotes cancer cell dissemination by stabilizing spheroid formation via the MEK pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1201-1213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-018-4922-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuo Koji, Shimada Muneaki, Yamaguchi Satoshi, Kigawa Junzo, Tokunaga Hideki, Tabata Tsutomu, Kodama Junichi, Kawana Kei, Mikami Mikio, Sugiyama Toru	4. 巻 8
2. 論文標題 Neoadjuvant Chemotherapy with Taxane and Platinum Followed by Radical Hysterectomy for Stage IB2-IB Cervical Cancer: Impact of Histology Type on Survival	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 156 ~ 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8020156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 kei kawana
2. 発表標題 A novel HPV-targeting mucosal immunotherapy for treatment of cervical neoplasia: Phase I/II clinical trials,
3. 学会等名 The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology of Reproduction, (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川名 敬
2. 発表標題 ヒトパピローマウイルス(HPV)の発癌過程に基づく癌治療の創薬開発
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川名 敬
2. 発表標題 「HPV ワクチンを再開するためにどうしたらよいか？」
3. 学会等名 関東連合産科婦人科学会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川名 敬
2. 発表標題 HPV ワクチン問題をどう打開するべきか～次の一手は？
3. 学会等名 日本性感染症学会 第32回学術大会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川名 敬
2. 発表標題 産婦人科診療と性行為感染～梅毒・子宮頸部腫瘍の診療に役立つ知識のアップデート
3. 学会等名 第96回埼玉産科婦人科学会・産婦人科医会後期学術集会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川名 敬
2. 発表標題 子宮頸癌の発癌メカニズムに基づく創薬開発と産婦人科感染症
3. 学会等名 第6回島根産婦人科フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川名 敬
2. 発表標題 HPVと子宮頸癌 ～クリニカルクエスチョンから考えられた新しい治療戦略
3. 学会等名 第13回千葉産婦人科臨床問題研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川名 敬
2. 発表標題 女性の健康を守るために～今の日本で子宮頸癌予防に必要なことは
3. 学会等名 北海道女性医療セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川名 敬
2. 発表標題 婦人科癌に対する創薬研究：粘膜免疫療法と癌幹細胞標的療法
3. 学会等名 第59回日本婦人科腫瘍学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川名 敬
2. 発表標題 子宮頸癌/HPVワクチンの現状と課題 HPVワクチンの今取り組むべきこと 海外と日本の違い
3. 学会等名 日本性感染症学会 第31回学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------