

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15605

研究課題名(和文)非侵襲性次世代型経鼻噴霧タイプ子宮頸癌予防ワクチンの開発

研究課題名(英文)Development of the noninvasive nasal spray vaccine for prevention of cervical cancer using the next generation type virus vector.

研究代表者

河野 光雄(Kawano, Mitsuo)

三重大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00234097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトパピローマウイルス(HPV)は、子宮頸癌の原因ウイルスとして知られている。現行のHPVワクチンはその有効性が確認されているが、日本においてはその副作用により、HPVワクチン接種の積極的な勧奨の一時中止が決定された。

本研究においては、副作用のないより有効なHPVワクチンを開発するために、L2やE7遺伝子を挿入した非増殖型パラインフルエンザ2型ウイルスベクター(hPIV2)を作製し、マウスに経鼻投与しワクチンの有効性を検討した。

研究成果の概要(英文)：Human papillomaviruses (HPV) are known as a causative factor of cervical cancer. We confirm the efficacy of the HPV vaccines now in use in the world. However, positive action of HPV vaccination is temporarily stopped by side effects of those vaccinations in Japan.

In this study, to develop effective HPV vaccines with no side effects we have constructed replication-deficient hPIV2 vector introduced HPV-L2 or -E7 gene and investigated the protective effects of the HPV vaccines by intranasal administration to mice.

研究分野：ウイルス学

キーワード：子宮頸癌予防ワクチン 子宮頸癌治療ワクチン 次世代型ワクチン 非侵襲性ワクチン 粘膜免疫 腫瘍免疫

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトパピローマウイルス(HPV)は、子宮頸癌の原因ウイルスであり、癌を誘発する可能性の最も高い HPV16、18 型に対するワクチン開発が行われ、日本においても平成 25 年 4 月から定期接種化された。

しかしながら、国内では、他国と比較しワクチン接種者における慢性疼痛等の副作用の発生がやや多く、「接種の積極的な勧奨」の一時中止が決定された。現行のワクチンの有効性は、世界中で認められているが、ワクチンの副作用についても重視し、思春期の女子が安心して接種を受けることができる状況を確立すること、さらには副作用のない新規のワクチン開発も急務である。

近年我々は、世界に先駆けヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス(hPIV2)のベクター化に成功した(Kawano et al., Virology: 2001)。さらに hPIV2 粒子形成に必要な M 蛋白遺伝子を欠損させることで安全性の高い非増殖型 hPIV2 ベクター(hPIV2 M)を作製した。

このベクターの特徴として、弱毒生ワクチンとしての経鼻投与により、

鼻腔および気道粘膜に感染し、全身すべての粘膜に抗原に対する強い粘膜免疫を誘導できる、

導入遺伝子を高発現し、細胞性免疫(Th1/CTL)の誘導も可能である、

該ベクター自身が液性免疫(Th2)を誘導する強力なアジュバント活性をもつ点、などがあげられる。

既に、強力なヘルパー T 細胞誘導活性を示す抗酸菌由来の Ag85B 遺伝子を搭載した hPIV2 M を経鼻投与したマウスにおいて、結核の増殖抑制ならびに病態抑制を示す結果(Watanabe et al., Vaccine: 2014)、種々の疾患モデルマウスへの経鼻投与により喘息やアトピー性皮膚炎の病態抑制を示す結果(Kitagawa et al., PLoS One: 2013)、さらに、抗腫瘍ワクチンとして乳癌モデルマウスに経鼻投与し、乳癌の肺転移抑制効果を示唆する結果を得ている。

これらを背景に、国内で最も多い HPV16 型(L1/L2)遺伝子を搭載した hPIV2 M の非侵襲性経鼻投与による HPV 感染予防ワクチンとしての効果、また、HPV(E6/E7)遺伝子を搭載した hPIV2 M と Ag85B 遺伝子を搭載した hPIV2 M の同時投与による子宮頸癌治療の可能性を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究においては、これまでの hPIV2 ベクターを用いた研究成果を基盤とし、液性免疫(粘膜免疫)および細胞性免疫(CTL/Th1)の両側面からの相乗的アプローチを行い、安全かつ効果の高い HPV16 型に対するワクチン開発および子宮頸癌の治療の可能性を検討する。

本研究で使用する PIV2 ベクターは、ウイ

ルス粒子形成に必要な不可欠な PIV2-M 遺伝子を欠損させ、さらに安全性を高めた非増殖型医療用スペックとして改良を加えてあり、次世代型の経鼻噴霧型ワクチンとしての斬新性をもつ。また、経鼻投与ワクチンの利便性として、

- 1) ワクチン接種方法が簡易、
- 2) 接種時の安全性が高い、
- 3) 痛み等の接種時のストレスがない、
- 4) 強い粘膜免疫が誘導できる、

点があげられる。これらは、現行の HPV ワクチンの欠点である慢性疼痛の根本原因にある痛みをなくし接種を受ける者に安心をもたらす。さらに血中から滲みだす IgG に加え IgA を粘膜面に誘導でき、現行ワクチン以上の効果が期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) リバースジェネティクス法を用いた非増殖型 hPIV2 ベクターの作製およびウイルスの回収

図 1 に示したように、M 遺伝子を欠損させた pPIV2 M ならびに HN 遺伝子を欠損させた pPIV2 HN の Not I サイトに 4 種の HPV-遺伝子(A、B、C、D)を挿入したプラスミド DNA を作製した。上記の hPIV2 ゲノムを含むプラスミド(9 µg)と共に 4 種のプラスミド(pM; 5.0 µg あるいは pHN; 2.0 µg、pNP; 1.25 µg、P; 0.25 µg、L; 1.25 µg)を、ViaFect(5 vol.)を用いて BSRT7/5 細胞(6well)にトランスフェクトし、Vero 細胞との共培養によりレプリコン細胞を作製した。このレプリコン細胞と M 遺伝子あるいは HN 遺伝子を発現させた Vero 細胞を共培養し、ワクチン抗原を導入した非増殖型 hPIV2 を回収した。

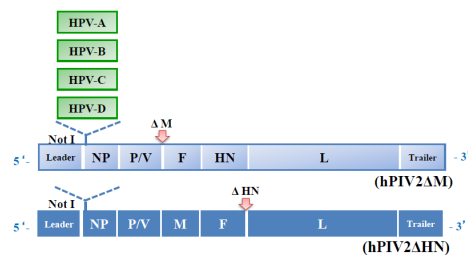


図1. 子宮頸癌予防・治療ワクチンコンストラクト

### (2) RT-PCR による hPIV2 感染細胞の RNA 解析

hPIV2 ベクター感染細胞から TRIZOL Reagent を用いて Total RNA を抽出した。Total RNA 3 µg から 1st strand DNA 合成キット(TAKARA)を用いて、添付のプロトコルに従い cDNA を合成した。この cDNA を鋳型に LA Taq DNA polymerase と、各 primer を用いて 94 30 秒、58 30 秒、72 1 分の PCR を 30 サイクル行い、hPIV2-RNA ゲノムならびに mRNA の有無を確認した。

### (3) 非増殖型 hPIV2 ワクチンベクターの増殖能解析

非増殖型ワクチンベクター作製にあたり、hPIV2 ゲノムから欠損させた M ならびに HN 遺

伝子を発現する細胞 (Cos-M、Vero-HN) に、(1)で回収したワクチンベクターを MOI=0.01~0.1 で感染させ24時間ごとに培養上清中のウイルスを回収し、TCID<sub>50</sub> を用いてその増殖能を解析した。

#### (4)子宮頸癌予防・治療ワクチンベクター経鼻投与による効果の検討

図2に示したプロトコルに従って、1群5匹、6週齢の Balb/c マウス ( ) を用いて、ワクチン(20μl/匹)を経鼻投与し、

導入した HPV-B 抗原に対する抗体産生能を調べ、予防効果について検討した。実際には、HPV-B 蛋白発現 Cos 細胞と既知の B 蛋白の中和エピトープを含む2種のペプチドに対するマウスの血清中の抗体価を測定した。

導入した HPV-D 抗原に特異的な細胞性免疫誘導能を調べ、子宮頸癌に対する治療効果について検討した。実際には、マウスの脾臓を培養し、HPV-D に対する既知の CTL エピトープで刺激し、ELISPOT アッセイを行い D 特異的 INF- $\gamma$  産生 CD8 陽性 T 細胞数を比較した。

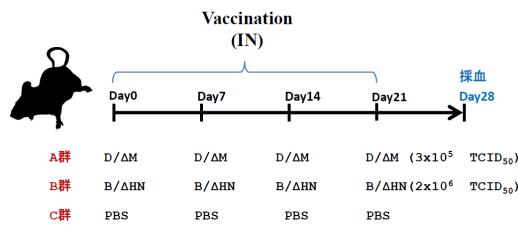


図2. 非増殖型hPIV2ベクター経鼻投与実験のプロトコル

## 4. 研究成果

### (1)子宮頸癌予防・治療ワクチンの作製

リバースジェネティクス法を用いて、当初の研究計画に従い、図1に示したように4種の HPV 抗原を挿入した hPIV2 M ベクターの作製を複数回行ったが、A および C を挿入した hPIV2 M ベクターは研究期間内には作製できなかった。作製できた B/hPIV2 M ならびに D/hPIV2 M については、それぞれのウイルス感染細胞からの RT-PCR による抗原の発現確認を行った。また、hPIV2-M 遺伝子発現 Cos 細胞に MOI=0.1 で感染させそれぞれのウイルスの増殖能を調べた (図3)。

回収したウイルスをシュークロースを用いた高速遠心により濃縮したが、高いウイルスタイトルは得られなかった [B/hPIV2 M: 2.0 x10<sup>6</sup> (TCID<sub>50</sub>/ml)、D/hPIV2 M: 1.5 x 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/ml]。

A ならびに C 遺伝子を挿入した hPIV2 M が回収できなかったため、hPIV2 ウイルス粒子の放出とレセプターへの結合能をもつ HN 遺伝子を欠損させた hPIV2 HN (図1) を用いてウイルスの回収を試みた。B、C、D については、ウイルス回収に成功したが、A に関しては hPIV2 M と同様にウイルス回収はできなかった。得られた3種のウイルス(B/hPIV2

HN、C/hPIV2 HN、D/hPIV2 HN) については、RT-PCR による抗原発現の確認 (図4) と hPIV2-HN 遺伝子発現 Vero 細胞に MOI=0.01 で感染させウイルスの増殖能を調べた (図3)。図3に示したように HPV 抗原を挿入した hPIV2 HN 系のワクチンベクターは hPIV2 M 系と比較し、高タイターで安定したウイルス産生能が認められた。

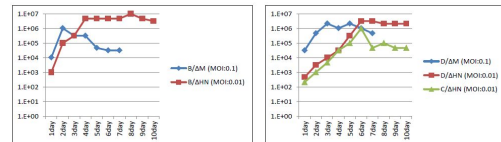


図3. HPV抗原挿入hPIV2の増殖

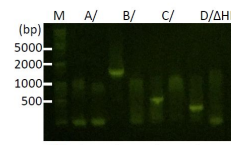


図4. RT-PCRによる抗原発現(mRNA)の確認

### (2)子宮頸癌ワクチンの予防効果の解析

得られたワクチンベクターの子宮頸癌に対する予防効果を確認するために、作製した B/hPIV2 HN [2x10<sup>6</sup> (TCID<sub>50</sub>)] を、マウスに経鼻投与 (1週おき4回) し、血清中の HPV 抗原に対する抗体産生能ならびに中和抗体価を蛍光抗体法ならびに ELISA で解析した。ワクチンベクターに導入した HPV-B 抗原に特異的な抗体産生が認められ (図5)、さらに HPV に対する既知の中和エピトープに反応するマウス血清も確認できた (図6)。これらの結果により子宮頸癌予防ワクチンとしての有効性が示唆された。



図5. 経鼻ワクチン投与によるHPV-L2抗原特異的抗体産生の確認

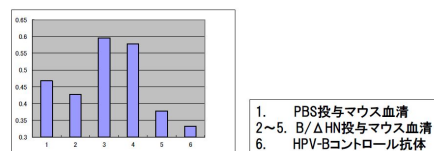


図6. HPV中和エピトープに対する抗体産生の確認

### (3)子宮頸癌ワクチンの治療効果の解析

得られたワクチンベクター D/hPIV2 M [3x10<sup>5</sup> (TCID<sub>50</sub>)] を同様にマウスに経鼻投与し、子宮頸癌に対する治療効果の解析を行った。ワクチンの接種量が少なかった為か、既知の CTL エピトープ刺激による ELISPOT アッセイ (INF- $\gamma$ ) では、そのワクチン効果は確認できなかった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

(1) Endo F, Tabata T, Sadato D, Kawamura M, Ando N, Oboki K, Ukaji M, Kobayashi K, Kobayashi Y, Ikeda T, Shibasaki F.

Development of a simple and quick immunochromatography method for detection of anti-HPV-16/-18 antibodies.

PLoS One. 2017;12:e0171314.

doi:10.1371/journal.pone.0171314 (査読有)

(2) Yamanaka K, Nakanishi T, Isono K, Hasegawa C, Inada H, Mizutani K, Matsushima Y, Okada K, Mabuchi T, Kondo M, Yamagiwa A, Kakeda M, Habe K, Nosaka T, Gabazza EC, Yamazaki H, Mizutani H, Kawano M.

Restrictive IL-10 induction by an innocuous parainfluenza virus vector ameliorates nasal allergy.

J Allergy Clin Immunol, 2017;139:682-686.

doi:10.1016/j.jaci.2016.05.044 (査読有)

(3) Kondo M, Akachi S, Kawano M, Yamanaka K, Yamagiwa A, Gabazza EC, Ando K, Mizutani H.

Improvement in early diagnosis of Japanese spotted fever by using a novel Rick PCR system.

J Dermatol, 2015;42:1066-1071.

doi: 10.1111/1346-8138.13015 (査読有)

[学会発表](計 4 件)

(1) 植松 淳、酒井香江、山本秀孝、河野光雄、鶴岡雅人、駒田 洋

フィットヘムアグルチニンのヒトパラインフルエンザウイルス 2 型増殖への作用

日本薬学会 137 年会

2017 年 3 月 27 日

仙台国際センター(宮城県・仙台市)

(2) 尾上健太郎、河野光雄、保富康宏

Paramyxovirus V protein is a key molecule to escape from host antiviral immune responses.

第 45 回日本免疫学会

2016 年 12 月 5 日

沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

(3) Takahiro Nagatake, Yasuko Wada, Naomi Matsumoto, Michiko Shimojō, Soichiro Hirata, Ayaka Nasu, Hidehiko Suzuki, Koji Hosomi, Kentaro Ogami, Yusuke Tsujimura, Mitsuo Kawano, Tetsuya Nosaka, Yasuhiro Yasutomi and Jun Kunisawa.

Inducible bronchus-associated lymphoid tissue plays an important role in the induction of antigen-specific immune response by Ag85B-hPIV2- based anti-

tuberculosis vaccine in mice

AAI annual meeting 2016

May 13-17, 2016

Seattle (USA)

(4) 植松 淳、酒井香江、山本秀孝、河野光雄、鶴岡雅人、駒田 洋

ミコフェノール酸によるヒトパラインフルエンザウイルス 2 型増殖阻害

日本薬学会 136 年会

2016 年 3 月 29 日

パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 光雄 (KAWANO, Mitsuo)

三重大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 00234097

(2) 研究分担者

田畑 務 (TABATA, Tsutomu)

三重大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 40252358

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )