

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11301

研究課題名(和文) 子宮頸がんを発生させるHPVのE7蛋白を標的とした細胞内分子標的療法の開発

研究課題名(英文) Development of Intracellular Molecularly Targeted Therapy Targeting E7 Protein of HPV that Initiates Cervical Cancer

研究代表者

吉川 和宏 (Yoshikawa, Kazuhiro)

愛知医科大学・研究創出支援センター・特務研究教授

研究者番号：60109759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、子宮頸がんの発生原因として考えられているHPVのE7遺伝子産物に対する抗体を作製し、子宮がん治療に応用する事を目的として実施した。HPV16、18の感染が認められた子宮がん患者より採取されたリンパ節細胞のRNAより、抗体産生ファージライブラリー作成のための遺伝子構築を終えた。また、大腸菌で抗原を作成し、マウスモノクローナル抗体の作成も試みた。しかし、ウイルス感染細胞を特異的に染色できる抗体は得られなかった。また、評価系構築のため、市販の抗体のスクリーニングを行ったが、ウイルス抗原を特異的に染色できる抗体が得られず、評価系の構築ができなかった。そのため、目的の抗体が得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、子宮頸がんの発生原因として考えられているHPVのE7遺伝子産物に対する抗体を作製し、子宮がん治療に応用する事を目的として実施した。HPV16、18の感染が認められた子宮がん患者より採取されたリンパ節細胞から抗体産生ファージライブラリー作成のための遺伝子構築ができたことから、子宮がんだけでなく、その他のがんにおいても同様の抗体作成のためのライブラリー作成の可能性が示された。このことは、それらのライブラリーのスクリーニングより、がん治療用の抗体を得る可能性が示されたということも意義として大きく、今後とも研究を続けていく意味のある事と思われた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to generate antibodies against the E7 gene product of HPV, which is considered to be the cause of cervical cancer, and to apply them to uterine cancer treatment. The gene construction for the antibody-producing phage library was completed. We also attempted to generate mouse monoclonal antibodies by producing antigens with E. coli. However, no antibody that could specifically stain virus-infected cells was obtained. In addition, for the construction of the evaluation system, we screened commercially available antibodies, but were unable to obtain antibodies that could specifically stain viral antigens. Therefore, the desired antibodies could not be obtained.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：HPV 抗体 免疫治療 膜貫通 cell-penetrating peptide

1. 研究開始当初の背景

(1) 子宮頸がんは女性性器がんの中では最も発生頻度が高く、2012年の国立がん研究センターがん対策情報センターの資料によれば、部位別がん罹患数はおよそ11,000人となっている。近年のがん検診の普及から早期診断や、早期治療が進み死亡率は減少してきているが、いまだ難治症例も多い。近年、子宮頸がん予防の観点からHPVのワクチンも開発され、その効果も期待されたが、重篤な副作用も報告され、現在は、ワクチン接種については積極的な接種はなされていないのが現状となっている。また、発生年齢も徐々に若年化してきており、出産や育児に関わる20~30代の発症率が高くなってきており、より有効な治療法の開発が望まれている。子宮頸がんの発生原因としては、HPV感染によるものが多いため、HPVを標的とした治療法、予防法が模索されているが、有効な方法として開発されたワクチンも現状では使用が躊躇され、別の観点からの治療法の開発が望まれている。

本研究は、これまで培ってきた種々の技術を応用し、従来型の治療薬ではなく、細胞増殖を誘導するHPVの遺伝子産物であるE7を標的とした抗体、あるいはペプチド合成抗体を用いた治療法で、本研究の成果は、子宮頸がんにとどまらず、他のがん治療にも応用可能と考える。

(2) Luisa Accardiらは、ヒトリンパ球由来の抗体遺伝子を利用して抗E7単鎖抗体を作成し、HPV16陽性のCaski細胞に抗体遺伝子を入れ、細胞内で抗体を産生させたところ、細胞分裂を阻害するという報告をしている。(Int. J. Cancer: 116, 564-570, 2005) この結果は、E7に反応する抗体を、細胞内に入れることにより、細胞増殖抑制効果が得られる事を示唆している。

(3) ペプチド技術については、現在新潟大学病理学講座近藤英作教授の考案した細胞膜透過性ペプチドを用いた癌治療を目的とした共同研究で、これまで、Bリンパ腫、脳腫瘍等を対象に治療効果を確認し、それぞれ論文に報告(Mol Cancer Ther. 3: 1623-1630, 2004, Mol Cancer Ther. 7: 1461-1471, 2008, Int J Oncol. 44:1879-85, 2014)しており、抗体を生細胞に導入する技術は得ている。

2. 研究の目的

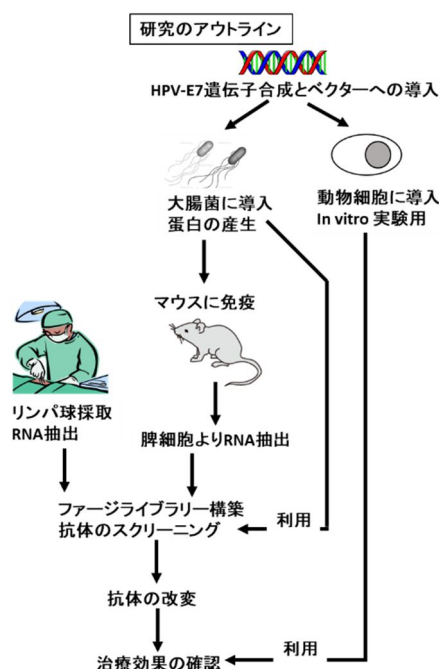
子宮頸がんの有効な治療法は未だ無く、また、ワクチンによる予防についても副作用の発生により使用が躊躇されている。ヒトパピローマウイルス(HPV)が子宮頸がんの発生原因と考えられており、そのE7遺伝子産物が細胞の増殖に関連する事が知られている。また、E7蛋白に反応する抗体をがん細胞の中で産生させると細胞増殖が抑制されることが報告されている。申請者らは、組換え型抗体の作成や細胞膜透過性ペプチドを用いたがん治療の研究を実施してきており、既に論文報告している。本研究では、この技術を用いて、E7蛋白と反応する組換え型抗体、あるいはペプチド合成抗体の細胞膜貫通型抗体薬を作成し、子宮頸がん治療に応用することを目的として実施する。本研究の成果により、子宮頸がんを対象とした臨床研究から先進医療に発展させたい。

3. 研究の方法

(1) 抗体の作成：ヒトにおいて発がんリスクの高いHPV16型と18型のE7遺伝子産物に対する抗体を作成する。そのため、子宮頸がん患者の感染HPVタイプをスクリーニングし、HPV16型あるいは18型感染患者よりリンパ球を得て抗体ファージライブラリーを作成する。次いで、HPV16型と18型のE7遺伝子産物の組換え型蛋白を用いてこれらに反応するファージ抗体を得る。また、組換えタンパクを用いてマウスモノクローナル抗体を作成する。

(2) 抗体の改変：E7抗原に反応する抗体を持つファージをクローニングし、遺伝子配列の決定、さらに、アミノ酸配列を決定するとともに、遺伝子操作技術を利用して治療用抗体に改変する。

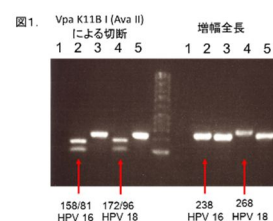
(4) 抗体の治療効果確認：HPV陽性細胞を対象として、改変型抗体を細胞膜貫通型ペプチドにより細胞に導入し、治療効果を確認する。また、HPV陽性細胞を対象に、治療効果の確認された抗体を用いて、HPV陽性細胞のマウス移植モデルを対象とした生体における治療効果を確認する。



4. 研究成果

(1) 患者のスクリーニングと患者リンパ球からの RNA 精製： 本研究計画について、本学倫理委員会の承認を得て、5 人の子宮頸がん患者から摘出されたがん組織の余剰分から、RNA を精製した。

タカラの HPV タイピングキットを用いて、RT-PCR と制限酵素切断を行い、電気泳動で得られたフラグメントを確認した。その結果、HPV-16 タイプと HPV-18 タイプそれぞれ 1 人ずつ確認できた (図 1 .)。

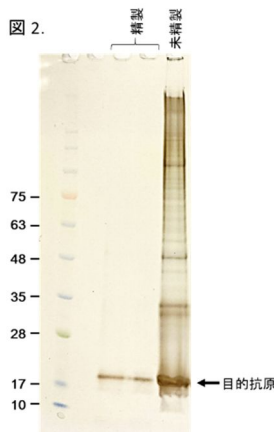


(2) 抗体のスクリーニングのためのタンパクと抗原発現細胞の作成：

抗体のスクリーニングには、大腸菌を用いたタンパクの発現と精製を行った。大腸菌発現用には HPV-E7 タンパクに His-tag を付加するよう pQE32 ベクターを用いて作成し、抗原の精製については Ni カラムで行った。また、抗原の検出には、抗 His-tag 抗体を用いて行った。その結果、精製度の高い抗原タンパクを得ることができた (図 2 .)。

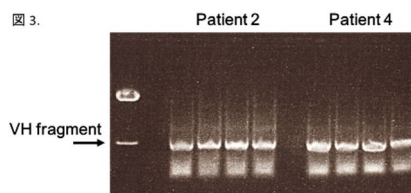
動物細胞においては、抗原発現のない細胞へ、抗原遺伝子発現用ベクターとして、動物細胞遺伝子発現用ベクター pcDNA3.1 に抗原遺伝子をクローニングし、電気穿孔法によりマウス線維芽細胞に導入して、作成予定の抗体の反応特異性を確認するための抗原発現細胞の作成を行った。作成したタンパクを用いて、マウスに免疫し、抗体産生マウスの作成、また、マウスモノクローナル抗体の作成も試みた。

マウスモノクローナル抗体は、免疫抗原を対象とした ELISA 法でスクリーニング、さらにはクローニングを行い、抗原に反応性を持つ抗体を産生する 1 クローンを得た。このモノクローナル抗体については、HPV ウイルス感染子宮がん細胞株、非感染細胞株を用いて、その反応性を確認したが、ウイルスに特異的な反応は、認められなかった。

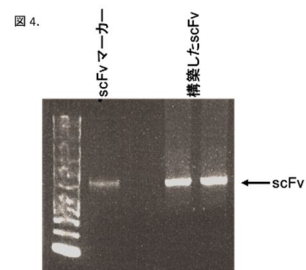


(3) ファージライブラリーの作成と抗体のスクリーニング：

ファージライブラリーは、ヒトリンパ球、および、(2) で作成された抗原を免疫したマウスの脾細胞を用いて行った。そのため、抗体遺伝子のクローニングと、クローニング後の遺伝子高地道用のための PCR プライマー等の設計を行い、ヒト用には 33 個、マウス用には 27 の遺伝子を設計・合成した。ヒト、マウスの各リンパ球よりキットを用いて RNA を精製し、RT 反応により cDNA を作成した。それぞれの cDNA を鋳型として で合成した PCR プライマーを用いて、VH、VL 遺伝子の増幅を行い、電気泳動による確認とフラグメントの抽出精製を行った (図 3 .)。次いで、VH、Linker、VL 遺伝子の結合とファージベクターへ接続のための遺伝子の付加の反応を行い、ファージベクターへ導入するまでの遺伝子 (scFv) 構築を終えることができた (図 4 .)。



次に、VH、Linker、VL 遺伝子の結合とファージベクターへ接続のための遺伝子の付加の反応を行い、ファージベクターへ導入するまでの遺伝子 (scFv) 構築を終えることができた (図 4 .)。



(4) HPV16、18-E7 の発現確認：目的とする抗原の発現を確認するため、市販抗体による、免疫染色を行った。対象は、これまで感染が確認され、また、報告のあった細胞株、抗体を用いて行った。現在入手可能な 4 種の抗体について、実施したが、いずれの抗体もその特異な反応が認められなかった。さらに、抗原発現遺伝子を導入した細胞においても、その特異的な反応を確認することができなかった。

(5) 総括： ウイルス感染の認められた患者より、リンパ球が得られ、抗体遺伝子 (VH、VL) の増幅と scFv 構築はできた。大腸菌による抗原の作成、精製も予定通り実施でき、精製抗原を得ることができた。標的とする抗原を発現する動物細胞の作成のための遺伝子構築と導入も確認できた。しかし、抗原の発現については、抗原を検出する抗体がないため、確認ができなかった。最終的に、抗原についての評価系が確立できなかったため、本来の目的の抗体を得ることができなかった。本研究の助成期間は終了したが、本研究は継続して行っており、評価系とともに、治療に有効な抗体を得て、早期に臨床に向けた開発を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yutaro Kondo, Susumu Suzuki, Shoya Ono, Mitsuo Goto, Satoru Miyabe, Tetsuya Ogawa, Hiromi Tsuchida, Hideaki Ito, Taishi Takahara, Akira Satou, Toyonori Tsuzuki, Kazuhiro Yoshikawa, Ryuzo Ueda, Toru Nagao	4. 巻 7
2. 論文標題 In Situ PD-L1 Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma Is Induced by Heterogeneous Mechanisms among Patients.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 4077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23084077.	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 Shoya Ono, Susumu Suzuki, Yutaro Kondo, Ikuko Okubo, Mitsuo Goto, Tetsuya Ogawa, Hidefumi Kato, Hideaki Ito, Taishi Takahara, Akira Satou, Toyonori Tsuzuki, Kazuhiro Yoshikawa, Toru Nagao, Ryuzo Ueda	4. 巻 15
2. 論文標題 Trametinib improves Treg selectivity of anti-CCR4 antibody by regulating CCR4 expression in CTLs in oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 21678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23084077	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 Tomio Hayashi, Kazuhiro Yoshikawa, Susumu Suzuki, Masahiko Goshō, Ryuzo Ueda, Yoshiaki Kazaoka	4. 巻 8
2. 論文標題 Tumor-infiltrating FoxP3+ T cells are associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin Exp Dent Res.	6. 最初と最後の頁 152-159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-021-00446-8.	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 Suzuki Susumu, Ogawa Tetsuya, Sano Rui, Takahara Taishi, Inukai Daisuke, Akira Satou, Tsuchida Hiromi, Yoshikawa Kazuhiro, Ueda Ryuzo, Tsuzuki Toyonori	4. 巻 111
2. 論文標題 Immune checkpoint molecules on regulatory T cells as a potential therapeutic target in head and neck squamous cell cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1943 ~ 1957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14422	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 Murakami Satsuki, Suzuki Susumu, Hanamura Ichiro, Yoshikawa Kazuhiro, Ueda Ryuzo, Seto Masao, Takami Akiyoshi	4. 巻 38
2. 論文標題 Combining T cell based immunotherapy with venetoclax elicits synergistic cytotoxicity to B cell lines in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hematological Oncology	6. 最初と最後の頁 705 ~ 714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hon.2794	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 Watanabe Masahito, Kanao Kent, Suzuki Susumu, Muramatsu Hiroyuki, Morinaga Singo, Kajikawa Keishi, Kobayashi Ikuo, Nishikawa Genya, Kato Yoshiharu, Zennami Kenji, Nakamura Kogenta, Tsuzuki Toyonori, Yoshikawa Kazuhiro, Ueda Ryuzo, Sumitomo Makoto	4. 巻 79
2. 論文標題 Increased infiltration of CCR4 positive regulatory T cells in prostate cancer tissue is associated with a poor prognosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Prostate	6. 最初と最後の頁 1658 ~ 1665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pros.23890	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 Asai Nobuhiro, Kubo Akihito, Suzuki Susumu, Murotani Kenta, Numanami Hiroki, Yoshikawa Kazuhiro, Ueda Ryuzo, Yamaguchi Etsuro	4. 巻 37
2. 論文標題 CCR4 Expression in Tumor-Infiltrating Regulatory T Cells in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Lung: A Prognostic Factor for Relapse and Survival	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Investigation	6. 最初と最後の頁 163 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/07357907.2019.1582848	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Muramatsu Hiroyuki, Sumitomo Makoto, Morinaga Shingo, Kajikawa Keishi, Kobayashi Ikuo, Nishikawa Genya, Kato Yoshiharu, Watanabe Masahito, Zennami Kenji, Kanao Kent, Nakamura Kogenta, Suzuki Susumu, Yoshikawa Kazuhiro	4. 巻 42
2. 論文標題 Targeting lactate dehydrogenase?A promotes docetaxel?induced cytotoxicity predominantly in castration?resistant prostate cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 224-230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2019.7171	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 Hatanaka Y, de Velasco MA, Oki T, Shimizu N, Nozawa M, Yoshimura K, Yoshikawa K, Nishio K, Uemura H	4. 巻 79
2. 論文標題 HOXA10 expression profiling in prostate cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Prostate	6. 最初と最後の頁 554-563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pros.23761.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Systemic transduction of p16INK4a antitumor peptide inhibits lung metastasis of the MBT-2 bladder tumor cell line in mice	4. 巻 17
2. 論文標題 Shimazui T, Yoshikawa K, Ishitsuka R, Kojima T, Kandori S, Yoshino T, Miyazaki J, Uchida K, Nishiyama H	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology letters	6. 最初と最後の頁 1203-1210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.9655.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takao A, Yoshikawa K, Karnan S, Ota A, Uemura H, De Velasco MA, Kura Y, Suzuki S, Ueda R, Nishino T, Hosokawa Y	4. 巻 40
2. 論文標題 Generation of PTEN knockout (-/-) murine prostate cancer cells using the CRISPR/Cas9 system and comprehensive gene expression profiling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology reports	6. 最初と最後の頁 2455-2466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2018.6683.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishio-Nagai Mayako, Suzuki Susumu, Yoshikawa Kazuhiro, Ueda Ryuzo, Kazaoka Yoshiaki	4. 巻 51
2. 論文標題 Adoptive immunotherapy combined with FP treatment for head and neck cancer: An in vitro study	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1471 ~ 1481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2017.4142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐久間 要, 城井 友幸, 高橋 悠, 上田 潤, 鈴木 進, 吉川 和宏, 小川 徹也, 田中 彰
2. 発表標題 マウス口腔扁平上皮癌細胞株を用いた抗PD-1抗体低用量局所投与と全身投与の比較検討
3. 学会等名 日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤 祐太郎, 高原 大志, 小野 翔矢, 後藤 満雄, 小川 徹也, 伊藤 秀明, 佐藤 啓, 都築 豊徳, 吉川 和宏, 上田 龍三, 鈴木 進
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌の免疫療法におけるTGF- 阻害剤の有用性
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野 翔矢, 鈴木 進, 近藤 祐太郎, 後藤 満雄, 小川 徹也, 伊藤 秀明, 高原 大志, 佐藤 啓, 都築 豊徳, 吉川 和宏, 長尾 徹, 上田 龍三
2. 発表標題 TrametinibはTCR/TGF- シグナルを介してCTLに発現するCCR4を制御することで、抗CCR4抗体のTreg選択性を高める (Trametinib improves Treg selectivity of -CCR4 mAb by regulating CCR4 expression in CTLs induced via TCR/TGF- signaling)
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐野 隼, 鈴木 進, 小川 徹也, 犬飼 大輔, 岡本 啓希, 高原 大志, 佐藤 啓, 吉川 和宏, 都築 豊徳, 上田 龍三
2. 発表標題 Characterization of immune-suppressive microenvironment in head & neck cancer
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 デベラスコ・マルコ, 倉 由史恵, 森 康範, 清水 信貴, 大關 孝之, 坂井 和子, 野澤 昌弘, 吉村 一宏, 吉川 和宏, 西尾 和人, 植村 天受
2. 発表標題 Interrogating genetically engineered mouse models of prostate cancer to aid in immunotherapy development
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川 徹也, 犬飼 大輔, 岡本 啓希, 山中 俊平, 佐野 壘, 植田 広海, 都築 豊徳, 鈴木 進, 吉川 和宏, 上田 龍三
2. 発表標題 頭頸部がん外科免疫治療の開発 手術検体を用いた腫瘍局所における免疫関連細胞・分子の解析から考える
3. 学会等名 日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 進, 西村 邦宏, 小川 徹也, 都築 豊徳, 吉川 和宏, 上田 龍三
2. 発表標題 頭頸部がん手術検体を用いたeffector Tregの腫瘍内発現の解析
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 エフェクター制御性T細胞の検出と調整	発明者 鈴木進、吉川和宏	権利者 愛知医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、7061342	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔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
研究分担者	藪下 廣光 (Yabushita Hiromitsu) (00140046)	愛知医科大学・医学部・教授 (33920)	
研究分担者	鈴木 進 (Suzuki Susumu) (70518422)	愛知医科大学・その他部局等・准教授 (33920)	

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