

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究機関：2008-2010

課題番号：20591938

研究課題名（和文）粘膜免疫活性化による子宮頸癌前癌病変の新規治療戦略に関する研究

研究課題名（英文）Development of a novel therapeutic vaccine for precursor lesion of cervical cancer using mucosal immunity

研究代表者

川名 敬（KAWANA KEI）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60311627

研究成果の概要（和文）：子宮頸癌の前癌病変(CIN3)は粘膜病変であり、その制御にはHPVに対する粘膜免疫誘導が有効である。本研究では子宮頸部の粘膜免疫を活性化することによりCIN3の治療をめざした戦略を見出し、トランスレーショナルリサーチとして臨床試験まで研究を進めた。

研究成果の概要（英文）：Mucosal cellular immunity against HPV is necessary for clearance of precursor lesion of cervical cancer (CIN3) since CIN develops in the mucosal epithelium at cervix. This study demonstrated a strategy to induce mucosal anti-HPV cellular immune responses into the cervical mucosa and we started Phase I/IIa clinical trial of a novel therapeutic vaccine for treatment of CIN3 as a translational research.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：子宮頸癌、前癌病変、乳酸菌ワクチン、CD1d、iNKT細胞

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌の大部分はヒトパピローマウイルス(以下、HPV)が原因であることがわかっている。HPV感染者は、全世界で年間数億人増え、全女性の50-80%が少なくとも1回はHPV感染をうけると推定される。しかし、HPV感染者の多くは、自身で獲得した免疫応答によって、HPV感染を一過性感染にとどめている。HPV感染に対する免疫制御が不十分な場合が

子宮頸癌のリスク因子であると考えられている。HPVは子宮頸部の粘膜上皮、特に基底～傍基底細胞、に感染し、扁平上皮の分化過程にしたがってウイルス増殖を行う。それを制御するためには、子宮頸部粘膜における局所粘膜免疫がHPVに対して誘導されなければならない。粘膜免疫に関する研究は、腸管、気道粘膜を題材に近年精力的に発展し、新しい概念が発見されてきた。しかし生殖器粘膜

に関する粘膜免疫の研究はまだ立ち後れている。したがって、HPV 感染に対する粘膜免疫の研究も皆無に等しい。

HPV による免疫誘導という点では、近年 HPV ワクチンが開発され、世界的に注目されている。しかし、現行の HPV ワクチンはあくまでも初感染を予防するための HPV 予防ワクチンであり、感染の既往のある女性にはワクチン効果がないことが示されている。

既感染者や有病者に対する治療を目的とした HPV 治療ワクチンでは、HPV 感染細胞や CIN 細胞を標的にする細胞性免疫（細胞傷害性 T cell: cytotoxic T cell [CTL]) を子宮頸部粘膜に誘導する必要がある。しかし最近の粘膜免疫の研究によって、全身性免疫と粘膜免疫では、異なった感作・メモリー・実効システムを持っていることがわかってきた。そのため、これまでの全身性免疫を誘導するタイプの HPV 治療ワクチンを用いた臨床試験では CIN3 に対する治療効果が得られていない。

2. 研究の目的

生殖器には、粘膜免疫を支配する粘膜リンパ組織は存在せず、腸管の粘膜リンパ組織がその代用をしている。そこで、本研究は子宮頸部の粘膜免疫を誘導するためのワクチンキャリアとして乳酸菌に注目した。ヒトの腸管由来の乳酸菌 *Lactobacillus casei* は、パイエル板などの腸管粘膜リンパ組織への移行性が高いため、乳酸菌に提示された抗原は効率的に腸管粘膜免疫を誘導できる。しかも、ヒトの腸管に常在し安全性が高いことから臨床試験を試行しやすい。本研究では、HPV 癌蛋白質 E7 を提示した乳酸菌 E7 ワクチンを作製し、経口投与することによって、腸管を介して子宮頸部に粘膜免疫を誘導することを考えた。まず HPV 自然感染に対する初期免疫から獲得免疫までの免疫誘導を知る必要があり、粘膜免疫誘導能の個人差を調べる方法を確認することをめざし、次に乳酸菌 E7 ワクチンの粘膜免疫誘導能をマウスとヒトで検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 粘膜免疫の誘導分子 CD1d と HPV 感染の関連を調べる。HPV の E5 蛋白質は、粗面小胞体 (ER) に存在し、ER シャペロン蛋白質を阻害することによって、糖タンパク質である MHC 分子の生合成を邪魔する。CD1d も MHC と同様の生合成系によって産生され、細胞膜表面に輸送されることから、E5 が CD1d に影響している可能性がある。レトロウイルスベクターを用いて CD1d 陽性の正常上皮細胞に HPV6, 16,

18E5 の各 E5 を遺伝子導入した。CD1d の細胞表面の発現レベルを、転写、ER 内、細胞膜の各段階で調べ、E5 の有無で比較する。E5 導入細胞では、CD1d と E5 の結合能と細胞内局在を免疫沈降や共焦点レーザー顕微鏡で検討した。

2) 乳酸菌を用いた HPV 治療ワクチン開発の研究では、HPV16 型 E7 蛋白質（癌原性は消失させた全長）が細胞表面に提示された *Lactobacillus casei* (乳酸菌 E7 ワクチン) を死菌化したものを製剤として用いた。マウスにおける乳酸菌 E7 ワクチン粘膜免疫誘導能を調べるために、乳酸菌 E7 ワクチンを C57/BL6 マウスに 4 回経口接種して (priming 3 回, boost 1 回)、最終免疫から 4 週間後にマウスの腸管を取り出し、腸管粘膜リンパ球を分離・培養し、HPV16 型 E7 蛋白質の CTL エピトープの合成ペプチドによる刺激によって E7 に対する特異的な獲得免疫能 (IFN・産生細胞) を ELISPOT 法で調べた。この方法をベースに、投与間隔、投与量、等を最適化した。また、粘膜免疫誘導能について、先行研究で用いられていた筋注、皮下注の E7 ワクチンと比較した。

3) これまでに我々はヒトの子宮頸部粘膜に常在する粘膜上皮内リンパ球 (以下子宮頸部リンパ球) の採取法を確立している。本研究では、まず CIN 患者の子宮頸部から採取された子宮頸部リンパ球の構成細胞を調べ、抗原提示細胞、CD4 陽性 T cell、CD8 陽性 T cell、腸管由来リンパ球の存在をフローサイトメトリーによって確認した。また、各 CIN 症例における子宮頸部リンパ球中の E7-CTL を調べ、臨床的予後との関連性を検討した。

4) 東京大学医学部研究倫理委員会の承認を得て、乳酸菌 E7 ワクチンの安全性と有効性を検証する Phase I/IIa 臨床試験を計画した。ワクチンはジェノラック BL 社により GMP 製造で精製され、毒性試験等の前臨床試験を経たものを用いた。HPV16 単独陽性の CIN3 患者を対象として、4クール (1, 2, 4, 8 週目) の内服投与 (1クールは 5 日間連日投与、1 回/日) を行い、末梢血と子宮頸部リンパ球中の E7 特異的 IFN・産生細胞を ELISPOT 法で調べた。

4. 研究成果

1) HPV の E5 が CD1d の細胞表面への輸送を阻害することによって、HPV 感染細胞では CD1d が欠損することを見出した。E5 は粗面小胞体 (ER) 内で CD1d 生合成に関わる ER シャペロンと結合しシャペロンの糖鎖修飾作用を阻害した。糖鎖修飾のない不完全な CD1d は ER に停滞し、その後プロテアソーム分解系で消化

された。また、E5 が存在する初期感染状態 (CIN1 相当) では CD1d 発現が見られなかった。E5 による CD1d 制御は、HPV の新しい免疫監視回避メカニズムである。

2) 乳酸菌 E7 ワクチンをマウスに経口接種をすると、腸管粘膜に局限して存在する粘膜リンパ球(integrin・4・7+ T cells)中に E7 特異的 IFN・産生細胞が誘導された。E7 特異的 IFN・産生細胞誘導数はブースト投与により著明に増加したことから、粘膜リンパ組織に抗 E7 細胞性免疫が記憶されていると推察される。投与量を 0.03-3.0mg/head まで振って比較したところ、1.0mg/head が最も高い E7 特異的 IFN・産生細胞数が誘導された。以上から、ヒトに投与する場合は乳酸菌 E7 ワクチンとして 1g/body/日が最適な量であると概算された。また、筋注、皮下注における E7 特異的 IFN・産生細胞は末梢血には強く誘導されたが、粘膜リンパ球中には誘導が低かった。経口投与では末梢血中よりも粘膜リンパ球の方が優位に高い E7 特異的 IFN・産生細胞数が観察され、粘膜病変を標的とする場合には、粘膜免疫を誘導できる経口投与が有効であると推察された。

3) 子宮頸部リンパ球を 46 名の CIN 患者から採取し、フローサイトメトリーで検討したところ、いずれの症例においても T cell が多く含まれ、B cell はほとんどなかった。T cell のうち、CD8 T cell が末梢血に比べ多く含まれていた。単球系細胞には CD14+, CD83+ の抗原提示細胞 (樹状細胞や macrophage 等) も存在した。また子宮頸部リンパ球の半数は CD45RO+ の effector/memory T cell であった。子宮頸部上皮内には腸管粘膜由来の integrin+ T cell が存在し、その割合は CIN 症例によって 6-60% と幅があった。Integrin+ T cell の割合が多い症例では CIN が退縮しやすい傾向があり、腸管粘膜リンパ組織からの獲得免疫能を得た integrin+ T cell が子宮頸部上皮で何らかの抗 HPV 細胞性免疫に重要であることがかった。

4) 本年度までに 7 例の CIN3 患者へ投与を行った。1cap=250mg のカプセル錠であり、1cap/日が 1 例、2cap/日が 3 例、4cap/日が 3 例とした。全例有害事象は認めなかった。安全に投与できることがわかった。E7 特異的 IFN・産生細胞は、子宮頸部リンパ球に優位に誘導されており、末梢血では検出感度以下であった。第 4 クール(8 週目)によりブースター効果が見られた。乳酸菌 E7 ワクチンの経口投与により、子宮頸部粘膜上皮内に抗 E7 細胞性免疫が誘導されることを初めて見出した。臨床的有効性は現在追跡中である。

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 19 件)

- 1) Yamamoto N, Mori R, Jacklin P, Osuga Y, Kawana K, Shibuya K, Taketani Y; Introducing HPV vaccine and scaling up screening procedures to prevent deaths from cervical cancer in Japan: A cost-effectiveness analysis. *Int. J Obstet and Gynecol*, 査読有 in-press, 2011
- 2) Kojima S, Kawana K, Fujii T, Yokoyama T, Miura S, Tomio K, Tomio A, Yamashita A, Adachi K, Sato H, Nagamatsu T, Schust DJ, Kozuma S, Taketani Y; Characterization of intraepithelial lymphocytes (IELs) residing in the cervical mucosa of patients with human papillomavirus (HPV)-infected intraepithelial neoplastic lesions. *Am J Reprod Immunol*, 査読有 in-press, 2011
- 3) Iwasawa Y, Kawana K, Fujii T, Schust DJ, Nagamatsu T, Kawana Y, Sayama S, Miura S, Matsumoto J, Adachi K, Hyodo H, Yamashita T, Kozuma S, Taketani Y: A possible coagulation-independent mechanism for pregnancy 1 loss involving β 2glycoprotein 1-dependent antiphospholipid antibodies and CD1d. *Am J Reprod Immunol*, 査読有 in-press, 2011
- 4) Inaba K, Arimoto T, Hoya M, Kawana K, Nakagawa S, Kozuma S, Taketani Y; Interstitial pneumonitis induced by pegylated liposomal doxorubicin in a patient with recurrent ovarian cancer. *Med Oncol*, 査読有 Mar 10. [Epub ahead of print], 2011
- 5) Arimoto T, Nakagawa S, Oda K, Kawana K, Yasugi T, Taketani Y: Second-line chemotherapy with docetaxel and carboplatin in paclitaxel and platinum-pretreated ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancer. *Med Oncol*. 査読有 Mar 6. [Epub ahead of print], 2011
- 6) Miura S, Kawana K, Schust DJ, Fujii T, Yokoyama T, Iwasawa Y, Nagamatsu T, Adachi K, Tomio A, Tomio K, Kojima S, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y: CD1d, a sentinel molecule bridging innate and adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV. 査読有 *J Virool*, 84: 11614-11623, 2010

- 7) Okuma K, Yamashita H, Kawana K, Nakagawa S, Oda K, Nakagawa K, Advanced age is a significant determinant of poor prognosis in patients treated with surgery plus postoperative radiotherapy for endometrial cancer. *J Obstet Gynecol Res*, 査読有 36: 757-763, 2010
- 8) Shoji K, Oda K, Nakagawa S, Kawana K, Yasugi T, Ikeda Y, Takazawa Y, Kozuma S, Taketani Y. Aromatase inhibitor anastrozole as a second-line hormonal treatment to a recurrent low-grade endometrial stromal sarcoma: a case report. *Med Oncol*, 査読有 Mar 31. [Epub ahead of print], 2010
- 9) Adachi K, Kawana K, Yokoyama T, Fujii T, Tomio A, Miura S, Tomio K, Kojima S, Oda K, Sewaki T, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y: Oral immunization with *Lactobacillus casei* vaccine expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 is an effective strategy to induce mucosal cytotoxic lymphocyte against HPV16 E7. *Vaccine*, 査読有 28: 2810-2817, 2010
- 10) Yamashita H, Okuma K, Kawana K, Nakagawa S, Oda K, Yano T, Kobayashi S, Wakui R, Ohtomo K, Nakagawa K. Comparison Between Conventional Surgery Plus Postoperative Adjuvant Radiotherapy and Concurrent Chemoradiation for FIGO Stage IIB Cervical Carcinoma: A Retrospective Study. 査読有 *Am J Clin Oncol*, 33: 583-586, 2010
- 11) Kawana K, Yasugi T, Taketani Y: Human papillomavirus vaccines: current issues and future: Review. 査読有 *Indian J Med Res*, 130: 341-347, 2009
- 12) Sato H, Kusumoto-Matsuo R, Ishii Y, Mori S, Nakahara T, Shinkai-Ouchi F, Kawana K, Fujii T, Taketani Y, Kanda T, Kukimoto I, Identification of nucleolin as a protein that binds to human papillomavirus type 16 DNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有 387: 525-530, 2009
- 13) Iwasawa Y, Fujii T, Nagamatsu T, Kawana K, Okudaira S, Miura S, Matsumoto J, Tomio A, Hyodo H, Yamashita T, Oda K, Kozuma S, Aoki J, Yatomi Y, Taketani Y: Expression of autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, in human placenta. *Am J Reprod Immunol*, 査読有 62: 90-95, 2009
- 14) Shoji K, Oda K, Nakagawa S, Hosokawa S, Nagae G, Uehara Y, Sone K, Miyamoto Y, Hiraike H, Hiraike-Wada O, Nei T, Kawana K, Kuramoto H, Aburatani H, Yano T, Taketani Y. The oncogenic mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in endometrial carcinomas. *Br J Cancer*, 査読有 101: 145-148, 2009.
- 15) Huang Z, Hyodo H, Fujii T, Nagamatsu T, Matsumoto J, Kawana K, Yamashita T, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y: Effect of progesterone on HLA-E gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cell line. *Am J Reprod Immunol*, 査読有 61: 221-226, 2009
- 16) Kawana K, Matsumoto J, Miura S, Shen L, Kawana Y, Nagamatsu T, Yasugi T, Fujii T, Yang H, Quayle AJ, Taketani Y, Schust DJ: Expression of CD1d and ligand-induced cytokine production are tissue-specific in mucosal epithelia of the human lower reproductive tract. *Infect Immun*, 査読有 76: 3011-3018, 2008
- 17) Matsumoto J, Kawana K, Nagamatsu T, Schust DJ, Fujii T, Sato H, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y: Expression of surface CD1d in the extra-villous trophoblast cells of early gestation placenta is downregulated through TGF- β 1 in a manner dependent on trophoblast differentiation. 査読有 *Biochem Biophys Res Commun*, 371: 236-241, 2008
- 18) Tomio A, Schust DJ, Kawana K, Yasugi T, Kawana Y, Mahalingaiah S, Fujii T, Taketani Y: Prolactin can modulate CD4⁺ T cell response through receptor-mediated alterations in the expression of T-bet. *Immunol Cell Biol*, 査読有 86: 616-621, 2008
- 19) Inman DA, Kawana K, Schust DJ, Lininger RA, Young SL: Cyclic Regulation of T-Bet and GATA-3 in Human Endometrium. *Reproductive Sciences*, 査読有 15: 83-90, 2008
- [学会発表] (計 5 件)
- 1) 川名 敬、HPV ワクチンの導入と HPV 関連癌の予防の可能性～子宮頸癌を中心に～、日本エイズ学会、2010. 11. 24、東京
 - 2) 川名 敬、子宮頸癌前癌病変に対する HPV E7 を標的にした癌ワクチン療法の臨床試験における有用性、日本癌治療学会、2010. 10. 29、京都
 - 3) 川名 敬、CIN3 に対する乳酸菌 HPV 治療ワクチン臨床試験例の免疫学的解析、日

- 本産科婦人科学会、2010.4.23、東京
- 4) Kawana K, Oral immunization with *Lactobacillus casei* vaccine expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 elicits mucosal cytotoxic cellular immune response to HPV16 E7. International congress of mucosal immunology, 2009.7.8, Boston, USA
 - 5) Kawana K, Oral Immunization with *Lactobacillus casei* expressing HPV E7 elicits strong mucosal CTL response to HPV16 E7. Asia Oceania Research Organization on Genital Infections and Neoplasia, 2008.5.27, Seoul, Korea

[図書] (計1件)

- 1) Kanda T, Kawana K, Yoshikawa H, Structure-based study of viral replication, Chapter 19: Human papillomavirus type 16 capsid proteins: Immunogenicity and possible use as prophylactic vaccine antigens. *World Scientific Publishing Co.*, 517-538, 2008

[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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川名 敬 (KAWANA KEI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60311627

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし