

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09656

研究課題名（和文）HPV E7癌蛋白質を標的とした免疫療法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）Basic research for the development of companion diagnostics for immunotherapy targeting the HPV E7 cancer protein

研究代表者

小松 篤史（KOMATSU, Atsushi）

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：90463851

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：子宮頸癌の前癌病変CIN2/3に高発現しているHPV癌蛋白質E7を標的にした免疫療法（癌ワクチン）として治療的HPVワクチンIGMCK16E7を開発した。これを用いた第I/II相医師主導治験の結果、CD86発現が高い患者ではエフェクター細胞の効果が乏しく、CD86低発現の患者では有効性が増強されていた。CD86とCTLA-4発現は正の相関を示し、T細胞を抑制していると推定された。CD86低発現患者はIGMCK16E7の高い有効性が期待できることがわかった。よってCD86低発現患者を見つけることがこのコンパニオン診断の開発につながると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、世界初の治療的HPVワクチンの開発を行っている。

第I/II相ランダム化比較試験の結果、プラセボ群と比べてIGMCK16E7（高用量群）において、有意なCIN2/3の治療効果を示した。本研究によって、治療前のCIN2/3患者の子宮頸部でCD86低発現の症例を選択することがIGMCK16E7の治療をより効果的にすることがわかった。CD86低発現の症例の選択が、この治療薬のコンパニオン診断になりうると思われる。この治療薬によって、CIN2/3に対する子宮頸部円錐切除術後の早産リスクが回避できる点は社会的意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：We have developed a therapeutic HPV vaccine, IGMCK16E7, as an immunotherapy (cancer vaccine) targeting HPV cancer protein E7, which is highly expressed in the precancerous lesion CIN2/3 of cervical cancer.

Results of a phase I/II investigator-initiated trial using this showed poor effector cell efficacy in patients with high CD86 expression and enhanced efficacy in patients with low CD86 expression. CD86 and CTLA-4 expression were positively correlated, presumably suppressing T cells. Patients with low CD86 expression were found to have high efficacy for IGMCK16E7. Therefore, finding patients with low CD86 expression may lead to the development of this companion diagnosis.

研究分野：産婦人科、婦人科腫瘍学

キーワード：子宮頸癌 HPV 癌ワクチン 粘膜免疫 子宮頸部高度上皮内腫瘍 第I/II相医師主導治験 E7発現乳酸菌製剤 コンパニオン診断

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

我々は、CIN2/3 に発現しているハイリスク HPV の E7 を標的とした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 CIN 治療薬である。HPV に対する免疫反応が弱い場合、HPV 感染から CIN2/3 に進展した患者に、HPV 特異的な細胞性免疫を獲得させる免疫療法であり、治療的 HPV ワクチンとも呼ばれる。HPV 予防ワクチンは未感染の女子に接種することで感染を予防するものであるが、治療的 HPV ワクチンは、HPV 感染者や CIN 発症者に対する治療効果を発揮するものである。治療的 HPV ワクチンはこれまでに 20 種以上がヒトでの臨床試験として実施されてきたが、いまま臨床応用されたものはない。ワクチンの標的はほとんどが HPV16/18 の E7 であり、様々なワクチンベクターが使われてきた。ほぼ全てが筋注か皮下注の投与経路であるが、我々の治療戦略は、それらとは異なり、プライミング相を腸管粘膜に委ね、HPV16 型 E7 に対する粘膜免疫（特に細胞性免疫）を誘導し、粘膜特異的なエフェクター細胞によって CIN 病変を免疫排除する。具体的には HPV16 型 E7 全長を菌体に出させた E7 発現乳酸菌 (*Lactobacillus casei*) 製剤を経口投与することで、腸内で放出された乳酸菌菌体がパイエル板・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 特異のエフェクター細胞が誘導される。子宮頸部上皮 (粘膜) にホーミングすることで、CIN2/3 を効率的に攻撃する、というものである。

HPV16 型 E7 全長を菌体に出させた E7 発現乳酸菌 (*Lactobacillus casei*) 製剤を、臨床研究として使用できる GCP 基準で製造した。2009~2016 年で第一世代の E7 発現乳酸菌製剤である GLBL101c の 2 つの探索的臨床研究の第 I/IIa 相試験、第 IIb 試験を実施した。GLBL101c の経口投与開始後 12 週で、HPV16 単独陽性 CIN3 の 80% が CIN2 に退縮し、投与開始後 40 週で 30% が CIN1 以下になった。さらに、本研究開始当初に、第二世代の E7 発現乳酸菌製剤 IGMKK16E7 を開発し、IGMKK16E7 の第 I/II 相臨床試験 (医師主導治験: MILACLE 試験) を多施設共同試験として開始していた。HPV16 陽性の CIN2-3 患者 165 例を対象として、プラセボ、低用量、中用量、高用量の 4 群 (1:1:1:1 割付) の群間並行型ランダム化比較試験 (RCT) である。本研究では、その臨床試験で治療開始前の臨床検体を用いる予定としていた。本研究では、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見出したい、と考えた。

### 2. 研究の目的

CIN2/3 に対する粘膜免疫を介した HPV 分子標的癌ワクチンの第 I/II 相医師主導治験: MILACLE 試験の臨床検体 (子宮頸部細胞、末梢血) と臨床の有効性データを用いて、IGMKK16E7 の治療効果を予測できるバイオマーカーを探索することである。その結果として、IGMKK16E7 の効果増強をめざした併用療法としての免疫チェックポイント阻害剤を選択することである。本研究によって見いだされた成果によって、アンメットニーズである CIN2/3 治療薬の実装化に近づけることである。

### 3. 研究の方法

2019 年から開始された IGMKK16E7 の第 I/II 相臨床試験 (医師主導治験: MILACLE 試験) は、本研究期間中の 2022 年 8 月にキーオープンし、最終解析を行った。その結果、全症例では、IGMKK16E7 高用量群で 31% が病理学的に正常 (CR) となり、プラセボ群に比して、有意に CR 率が

高かった。直線的な量依存的に CR 率が高くなった。特に、HPV16 単独陽性の CIN2/3 患者における CR 率は、プラセボ群 11.5%に対し、IGMCK16E7 高用量群 40%となった (difference 28.5: 95%CI, 4.3-50.0)。IGMCK16E7 高用量では、明らかな治療効果が示された。が、高用量群でも治療効果が乏しい症例もあり、その要素としては、プライミング相の個体差、エフェクター相の個体差、が考えられた。そこで以下の 2 つの方法を検討した。

#### (1) E7 癌抗原の発現量から見た効果向上の戦略の検討

HSIL はハイリスク HPV の E7 発現が恒常的に見られるが、その一方で、宿主免疫からの逃避機構の 1 つとして HPV 蛋白質 (異物抗原) の発現を抑制する機序が多く報告されている。多くの報告をまとめると HPV16 型 E6/E7 癌蛋白質の組織内での発現率は、CIN の進展とともに増加するが、CIN1 では約 20%、CIN2/3 では約 80%である。そのため CIN2/3 を対象とする本免疫療法において、標的分子である E7 分子の発現量は個体差があると考えた。本研究では、上記の第 I/II 相臨床試験の HPV16 型陽性 CIN2/3 患者から採取した子宮頸部擦過細胞を用いて、HPV16 型 E7 発現量の定量的に測定する系を検討した。

#### (2) 免疫誘導能の個体差から見たコンパニオン診断の検討

免疫学的特徴として、anti-E7 immune response、抑制性リンパ球 (Treg 等) 子宮頸部病変の局所環境、局所免疫 (粘膜免疫) と全身免疫 (末梢血) の相違性を解析することにした。治験参加患者 165 例の子宮頸部擦過細胞を、治験薬もしくはプラセボ薬の内服開始時に液状細胞診検体 (LBC) として採取した。この子宮頸部細胞は一般的な頸がん検診で用いる器具、Thinprep (70%アルコール) に保管した細胞である。これらは CIN2/3 病変から擦過されており、子宮頸部局所の細胞であり、IGMCK16E7 で誘導されたリンパ球のエフェクター相の細胞集団である。免疫因子として Foxp3、PD-L1、PD-1、CD8、CD4、CD28、CD80、CD86、CTLA-4、CD103 の発現量を定量的 RT-PCR 法で測定し、IGMCK16E7 の有効性 (CR) の相関を調べ、臨床的有效性との相関を調べた。

## 4. 研究成果

本研究の母体となる第 I/II 相臨床試験 MILACLE 試験が本研究期間中に終了し、2022 年 8 月にキーオープンとなった。最終解析が行われた結果、IGMCK16E7 の CIN2/3 に対する有効性が証明された。この治験に参加した 165 例のうち、有効性評価の対象となった PPS 解析の臨床効果を用いている。主要評価項目である病理学的正常化 CR (complete response) では、プラセボ群と IGMCK16E7 高用量群で有意な差を認めた。しかし、低用量、中用量とプラセボとの差は見られなかった。臨床的効果が証明された IGMCK16E7 は高用量であったことから高用量群が本研究の対象とすることにした。プラセボ群 41 例と高用量群 42 例を対象とした (43 例のうち 1 例は臨床検体不良で除外)。

高用量群 42 例のうち 13 例 (31%) が CR となった。内服開始時に全例から子宮頸部細胞として、病変部からの擦過細胞を採取し液状細胞診検体として収集した。子宮頸部細胞は total RNA から cDNA にされ、Foxp3、PD-L1、PD-1、CD8、CD4、CD28、CD80、CD86、CTLA-4、CD103 の 10 種の免疫学的因子と HPV16E7 の発現量を計測した。

組織学的 CR と組織学的 CR とワクチンエフェクター期である子宮頸部粘膜におけるバイオマーカーの遺伝子発現との関連を診断 ROC 曲線により解析した。各バイオマーカーの遺伝子発現

は、IGMCK の経口投与前に患者から採取した剥離子宮頸部細胞を用いて、定量的 RT-PCR により測定した。IGMCK16E7 の経口投与前に患者から採取した剥離子宮頸部細胞を用いて、定量的 RT-PCR により各バイオマーカーの発現を測定した。CD4、CD8、Foxp3、PD-1、CTLA-4、リンパ球関連因子として CD103 (インテグリン E7) および CD28 を測定し、そして CD80、CD86、CD103、PD-L1 は抗原提示細胞または上皮細胞関連因子として測定した。CD86 レベルは組織学的 CR と最も強く関連していた。これは有意な関連であった (AUC 0.71, 95% CI 0.53-0.88,  $p=0.020$ )。CD86 は CR の予測バイオマーカーとして機能した (感度 62%、特異度 72%であった)。子宮頸部 CD103 レベルも組織学的 CR と関連したが、統計学的有意性はわずかであった (AUC 0.66, 95% CI 0.48-0.85,  $p=0.084$ )。他の組織学的 CR を予測できるような相関を示すバイオマーカーは見つからなかった。

各バイオマーカーの RT-PCR 遺伝子発現レベルを CR 群と非 CR 群について比較した。CR 群と非 CR 群の各バイオマーカーの RT-PCR 値を比較するために、Mann-Whitney U 検定を行った。CD86 のみが CR 群と非 CR 群間で有意に異なり、CR 患者は非 CR 患者より CD86 遺伝子発現が有意に低かった ( $p=0.035$ )。CD103 レベルもまた、非 CR 群に比べ CR 群で遺伝子発現が低いという有意でない傾向を示した ( $p=0.094$ )。

ROC 曲線から得られた CD86 のカットオフ値を用いて、遺伝子発現の低い患者 (CD86-low) と高い患者 (CD86-high) を亜分類した。ワクチン高用量群では、CD86 低値患者の CR 率が有意に高く ( $p=0.047$ )。CD86 低値患者の CR 率は 50%であったのに対し、CD86 高値患者の CR 率は 19%であった。低レベルの CD86 を示す患者 (CD86-low) の CR 率は、高用量患者全体の CR 率 31%よりも 1.5 倍高かった。また、ROC 曲線で定義された子宮頸部 CD86 低値の状態と組織学的 CR との関連が、プラセボ群の患者においても同様であったかどうかを検討した。プラセボ群では CD86 遺伝子発現レベルとの関係において CR 率は変化しなかったため、CD86-low 患者が CR を示す傾向は IGMCK16E7 の経口投与に特異的であった。組織学的に非 CR の CD86-low 患者がプライミング期に E7 特異的 T 細胞のレベルが低かったかどうかを調べるために、hyper-responder における CD86-low 患者の CR 率を調べた。ここで hyper-responder とは、SFC の変化が全患者の中央値より高い患者を指す ; hyper-responder の CR 率は用量依存的に増加した。同定された 21 人の hyper-responder の CR 率は、CD86 低値で 55%、CD86 高値で 10%であった ( $p=0.064$ )。IGMCK16E7 によって誘導された高レベルの E7 特異的循環 T 細胞にもかかわらず、CD86 高値患者の 90%は組織学的 CR を示さなかった。

HPV16 陽性 CIN2/3 において、治療前の子宮頸部 CD86 低値 (CD86-low) が、治療用経口 HPV ワクチン IGMCK16E7 に対する反応性の予測バイオマーカーであることを見出した。子宮頸部局所微小環境において CD86 高値の患者は、高用量の IGMCK16E7 によって腸管粘膜に E7 特異的 T 細胞が誘導されても、組織学的 CR を示す可能性は低かった。CD86-低ステータスで選択された患者では、IGMCK16E7 による CR 率は 50%に増加し、したがって、IGMCK16E7 内服後に最適な臨床効果を実現する可能性が最も高い患者を選択するための有用な診断バイオマーカーとなる可能性がある。

CD86-CTLA-4 の高遺伝子発現が子宮頸部での T 細胞抑制による非 CR をもたらすと仮定すると、抗 CTLA-4 抗体による免疫チェックポイント阻害は、特に CD86 高発現患者に対する IGMCK16E7 の有効性を高める可能性がある。悪性腫瘍に対するがんワクチンと抗 CTLA-4 抗体との併用療法は、

数多くの臨床試験の対象となっている。IGMKK167 は、腫瘍抗原である HPV16 E7 を標的とするがんワクチンと考えることができる。IGMKK16E7 と抗 CTLA-4 抗体の併用療法が、浸潤性子宮頸癌や他の HPV 関連癌に対して抗腫瘍効果を示すかどうかを調べる臨床試験が今後検討されるであろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawana K, Kobayashi O, Ikeda Y, Yahata H, Iwata T, Satoh T, Akiyama A, Maeda D, Hori-Hirose Y, Uemura Y, Nakayama-Hosoya, Katoh K, Katoh Y, Nakajima T, Taguchi A, Komatsu A, Asai-Sato M, Tomita N, Kato K, Aoki D, Igimi S, Kawana-Tachikawa A, Schust DJ	4. 巻 7
2. 論文標題 Phase I and II randomized clinical trial of an oral therapeutic vaccine targeting human papillomavirus for treatment of cervical intraepithelial neoplasia 2 and 3	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JNCI Cancer Spectrum	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jncics/pkad101	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	川名 敬  (KAWANA Kei)  (60311627)	日本大学・医学部・教授   (32665)	

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
---------	---------