

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462599

研究課題名(和文) 子宮頸癌への細胞障害性Tリンパ球を介した新規ペプチドワクチン療法の開発と臨床応用

研究課題名(英文) Novel oligomannose liposome-DNA complex DNA vaccination efficiently evokes anti-HPV E6 and E7 CTL responses.

研究代表者

斉藤 豪 (Saito, Tsuyoshi)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：90145566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、既感染患者の癌予防と治療に有効なHPVワクチンを開発することを目的とした。そこで日本人に最も頻度が高いHLA-A24によって提示されるE6、E7蛋白由来の抗原ペプチドを同定し、「このペプチドをCTL-based HPVワクチンとして臨床応用することを目指し」とした。また、オリゴマンノースリポソームのアジュバントとしての可能性も検討し、有効性を証明した。これらの結果によってより効率的・有効なペプチドワクチンの開発が期待できる。本研究の到達目標は実際に臨床試験を行うことであり、癌患者の治療法の開発まで期待できるという意味で意義がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to establish an efficient HPV type 16-targeting cancer immunotherapy. HPV16-derived viral proteins E6 and E7 are expressed in cancerous cells through the progression of the disease and have a role in carcinogenesis but are not expressed in normal cells. In this study, we generated a novel HPV 16 E6 and E7 gene plasmid containing oligomannose liposomes (OML-HPV). We compared the cytotoxic T lymphocyte (CTL) induction efficiency of OML-HPV and that of standard liposome-HPV16 E6 and E7 DNA complex. HPV16 E6-specific CTLs could be generated from HPV 16-positive cervical carcinoma patient's peripheral blood mononuclear cells by stimulating OML-HPV, but could not by stimulating standard liposome-HPV 16 E6, E7 DNA complex. These results indicate that OML-HPV is a more effective approach than DNA vaccination using standard liposomes, and that a novel HLA-A24-restricted peptide, E6 66-74, might be a suitable target of cervical cancer immunotherapy.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：免疫療法 子宮頸癌 HPV ワクチン

1. 研究開始当初の背景

子宮頸がんは若年者において増加傾向であり新しい治療法が必要である

子宮頸癌は女性では4番目に発症頻度の多い癌で、世界では年間約50万人の女性が新たに子宮頸癌に罹患し、毎年27万人が死亡していると推計されている。日本では毎年8000人が子宮頸癌に罹患し、約2400人が死亡していると推計されている。これは、日本では1日に約7人の女性が子宮頸癌によって命を落としていることになる。国立がんセンターが公表しているデータでは、子宮頸癌の罹患率は20代後半から上昇し始め、30代に罹患率の大きなピークがあるのが特徴的である。日本産科婦人科学会の調査でも子宮頸癌の発症年齢の若年化が顕著で、早期発見のための取り組みと同時に、放射線や化学療法の他に新しい治療法の開発による予後の改善が望まれる。

子宮頸部癌と HPV

子宮頸癌のほぼ100%にヒトパピローマウイルス(HPV)が検出されており、High risk HPVの持続感染が発癌の原因であると考えられている。International Agency of Research on Cancer (IARC)は16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、69、73型をHigh risk HPVとして認定している。その中でもHPV16型は浸潤子宮頸癌の約半数に見られるが、これらのHPVサブタイプは国や地域によってその分布が異なることが知られている。世界的には16と18型がもっとも多く検出され、子宮頸癌症例の約70%がこれらによって占められる。これらの事実から、子宮頸癌の原因ウイルス、HPVは免疫療法の恰好の標的と考えられる。

2. 研究の目的

これまでに我々は骨肉腫、乳癌、肝細胞癌、

腎癌などに特異的な抗原ペプチドを同定し、これらは1相臨床試験に取り組んでいる。本研究では、既感染患者の癌予防と治療に有効なHPVワクチンを開発することを目的とした。そこで日本人に最も頻度が高いHLA-A24によって提示されるE6、E7蛋白由来の抗原ペプチドを同定し、「このペプチドをCTL-based HPVワクチンとして臨床応用することを目標」とした。また、オリゴマンノースリボソームのアジュバントとしての可能性も検討し、有効性を証明した。これらの結果によってより効率的・有効なペプチドワクチンの開発が期待できる。本研究の到達目標は実際に臨床試験を行うことであり、癌患者の治療法の開発まで期待できるという意味で意義がある。

3. 研究の方法

平成25年度

1. 子宮頸部病変の HPV タイピング

書面により同意を得た子宮頸部異形成および子宮頸癌患者から得られた組織検体を用い、DNAを採取し、HPVタイピングを行う。目標症例は50例。これらの検体をそれぞれのHPV型に特異的なPCRプローブを用いてHPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59および68型の13種類の型を検出・分類する。

2. 子宮頸癌患者末梢血単核球細胞 (PBMC)の採取と HLA タイピング

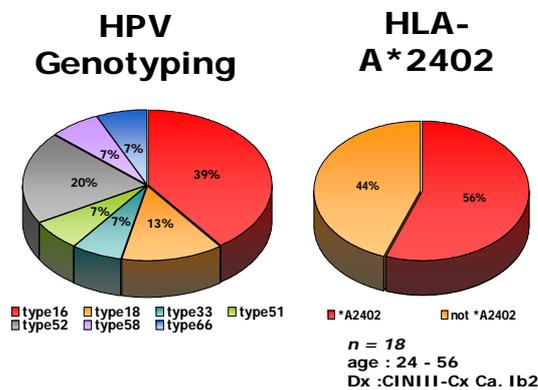
上記患者より末梢血50mlを採血し、末梢血単核球細胞を採取し、これを用いてHLAタイピングを行う。HLAは、ヒト主要組織的合抗原と呼ばれる糖蛋白で、マウスにおけるH-2抗原に相当する。ヒトでは、HLA-A、B、C抗原などからなるクラスII抗原と、HLA-DR、DQ抗原などからなるクラスIII抗原に大別される。

本検査は、PCR-rSSO法によりHLAのAおよびB Locus, DR(B1) Locusについて、その対立遺伝子(allele)に対する2桁(粗

分類; low resolution) で判別し、HLA 型を推定する。

3. HLA-A24 結合モチーフを持つペプチドの作成

日本人では HLA の A Locus では A24 を有している割合が 56% と最も高く、ペプチドワクチンを作成するうえで最も効率が良いと考えられる。そこで本研究ではこの HLA-A24 をターゲットとして研究を進める。HPV16 E6E7 の塩基配列から HLA-A24 結合モチーフを持つペプチドを E6、E7 で合成する。



われわれがこれまで調べたデータでは HPV16 の占める割合は 39%、HLA-A*2402 の占める割合は 56%であった。

4. 研究成果

平成 25 年度の研究成果

1. 子宮頸部病変の HPV タイピング

検体をそれぞれの HPV 型に特異的な PCR プローブを用いて HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 および 68 型の 13 種類の型を検出・分類した。この中で HPV16 型が 49% と約半数を占めていた。

2. 子宮頸癌患者末梢血単核球細胞(PBMC)の採取と HLA タイピング

本検査は、PCR-rSSO 法により HLA の A および B Locus, DR(B1) Locus について、その対立遺伝子 (allele) に対する 2 桁 (粗

分類; low resolution) で判別し、HLA 型を推定した。

3. HLA-A24 結合モチーフを持つペプチドの作成

E6-由来の E6 66-74) は ELISPOT assay にて HPV16 陽性患者の CTL に強い反応を示したが、E6 49-57, E6 82-90, E6 87-95, E6 98-106、E7 83-93 の反応は弱かった。

平成 26, 27 年度の成果

1. OML-HPV の作成

発現ベクターが抗原提示細胞へ効率よく取り込まれるようオリゴマンノースリポソーム (OML) 内に、pCAGGS/E5E6E7 を包埋した (OML-HPV)。

2. IFN γ -ELISPOT Assay

患者から採取した末梢血を分離して得られた末梢血単核球細胞 (PBMC) に OML-HPV を添加し共培養した。共培養後 48 時間以降 IL-2 を添加し、10-14 日目に IFN γ -ELISPOT Assay により細胞障害活性を評価した。OML-HPV は樹状細胞に代表される抗原提示細胞に取り込まれ、内因性たんぱくとして腫瘍抗原が発現し、プロセッシングを受けたペプチドが MHC I 分子上で提示されることにより CTL が誘導され抗腫瘍効果が発揮されることを期待された。

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 13 件)

1. Sugimoto K, Ichikawa-Tomikawa N, Satohisa S, Akashi Y, Kanai R, Saito T, Sawada N, Chiba H. The Tight-Junction Protein Claudin-6 Induces Epithelial Differentiation from Mouse F9 and Embryonic Stem Cells. PLoS One. 2013, 8:e75106
2. Ogawa M, Kojima T, Someya M, Nomura K, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Saito T, Sawada N.

- Epidermal growth factor modulates claudins and tight junctional functions in ovarian cancer cell lines. *Histochem Cell Biol.* 2012 Aug;138(2):323-38. doi: 10.1007
3. Kuroda T, Hirohashi Y, Torigoe T, Yasuda K, Takahashi A, Asanuma H, Morita R, Mariya T, Asano T, Mizuuchi M, Saito T, Sato N. ALDH1-high ovarian cancer stem-like cells can be isolated from serous and clear cell adenocarcinoma cells, and ALDH1 high expression is associated with poor prognosis. *PLoS One.* 2013 Jun 6;8(6):e65158. doi: 10.1371
 4. Yasuda K, Torigoe T, Morita R, Kuroda T, Takahashi A, Matsuzaki J, Kochin V, Asanuma H, Hasegawa T, Saito T, Hirohashi Y, Sato N. Ovarian cancer stem cells are enriched in side population and aldehyde dehydrogenase bright overlapping population. *PLoS One.* 2013 Aug 13;8(8):e68187. doi: 10.1371
 5. Sugimoto K, Ichikawa-Tomikawa N, Satohisa S, Akashi Y, Kanai R, Saito T, Sawada N, Chiba H. The tight-junction protein claudin-6 induces epithelial differentiation from mouse F9 and embryonic stem cells. *PLoS One.* 2013 Oct 8;8(10):e75106. doi: 10.1371/journal.pone.0075106. eCollection 2013.
 6. Teramoto M¹, Suzuki T, Satohisa S, Akashi Y, Matsuura M, Suzuki M, Tanaka R, Saito T. Low-dose SN-38 with paclitaxel induces lethality in human uterine cervical adenocarcinoma cells by increasing caspase activity. *Med Mol Morphol.* 2014 Mar;47(1):31-7. doi: 10.1007
 7. Matsuura M¹, Tamate M, Tabuchi Y, Takada S, Tanaka R, Iwasaki M, Saito T. Prediction of the therapeutic effect of dienogest in ovarian endometrial cysts using the apparent diffusion coefficient. *Gynecol Endocrinol.* 2014 Aug;30(8):597-9. doi: 10.3109/09513590.2014.911277.
 8. Sugio A, Iwasaki M, Habata S, Mariya T, Suzuki M, Osogami H, Tamate M, Tanaka R, Saito T. BAG3 upregulates Mcl-1 through downregulation of miR-29b to induce anticancer drug resistance in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2014 Sep;134(3):615-23. doi: 10.1016
 9. Mariya T, Hirohashi Y, Torigoe T, Asano T, Kuroda T, Yasuda K, Mizuuchi M, Sonoda T, Saito T, Sato N. Prognostic impact of human leukocyte antigen class I expression and association of platinum resistance with immunologic profiles in epithelial ovarian cancer. *Cancer Immunol Res.* 2014 Dec;2(12):1220-9. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0101. Epub 2014 Oct 16.
 10. Yasuda K, Torigoe T, Mariya T, Asano T, Kuroda T, Matsuzaki J, Ikeda K, Yamauchi M, Emori M, Asanuma H, Hasegawa T, Saito T, Hirohashi Y, Sato N. Fibroblasts induce expression of FGF4 in ovarian cancer stem-like cells/cancer-initiating cells and upregulate their tumor initiation capacity. *Lab Invest.* 2014

Dec;94(12):1355-69. doi:
10.1038/labinvest.2014.122. Epub
2014 Oct 20.

11. Hirohashi Y, Torigoe T, Mariya T, Kochin V, Saito T, Sato N. HLA class I as a predictor of clinical prognosis and CTL infiltration as a predictor of chemosensitivity in ovarian cancer. *Oncoimmunology*. 2015 Mar 23;4(5):e1005507. eCollection 2015 May.
12. Habata S, Iwasaki M, Sugio A, Suzuki M, Tamate M, Satohisa S, Tanaka R, Saito T. BAG3 increases the invasiveness of uterine corpus carcinoma cells by suppressing miR-29b and enhancing MMP2 expression. *Oncol Rep*. 2015 May;33(5):2613-21. doi: 10.3892/or.2015.3831. Epub 2015 Mar 4.
13. Asano T, Hirohashi Y, Torigoe T, Mariya T, Horibe R, Kuroda T, Tabuchi Y, Saijo H, Yasuda K, Mizuuchi M, Takahashi A, Asanuma H, Hasegawa T, Saito T, Sato N. Brother of the regulator of the imprinted site (BORIS) variant subfamily 6 is involved in cervical cancer stemness and can be a target of immunotherapy. *Oncotarget*. 2016 Feb 3. doi: 10.18632/oncotarget.7165. [Epub ahead of print]

[学会発表](計 8件)

1. **Isolation and analysis of cancer stem-like cells from primary epithelial ovarian cancer**
Takafumi kuroda, Masahito Mizuuchi, Takuya asano, Tasuku Mariya, Ryouichi Tanaka, Masahiro

Iwasaki, Takahiro Suzuki¹, Noriyoshi Fukunaka², Satoshi Tanaka², Eiki ito, Tsuyoshi Saito **公益社団法人日本産科婦人科学会第 65 回学術講演会**

- 2 **ヒト上皮性卵巣癌におけるアルデヒド脱水素酵素遺伝子 ALDH1 の発現と stemness の検討** 黒田 敬史、廣橋 良彦¹、鳥越 俊彦¹、安田 和世¹、高橋 あかり¹、浅野 拓也、真里谷 奨、水内 将人、齋藤 豪、佐藤 昇志¹ **第 102 回日本病理学会総会**
4. **The relationship between the volume of endometrial cancer and lymph node metastasis**
Yuta Tabuchi , Motoki Matsuura , Sakura Takada , Ryoichi Tanaka , Masahiro Iwasaki , Tsuyoshi Saito **第 55 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会・第 3 回アジア婦人科腫瘍学会**
5. **Down regulation of HLA Class expression is a risk factor of poor prognosis in ovarian cancer of Japanese female**
Tasuku Mariya, Yoshihiko Hirohashi¹ , Takahumi Kuroda , Kazuyo Yasuda¹ , Toshihiko Torigoe¹ , Tsuyoshi Saito , Noriyuki Sato¹ **第 55 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会・第 3 回アジア婦人科腫瘍学会**
6. **婦人科癌における癌精巢抗原 BORIS の発現ならびに癌幹細胞性の検討**
浅野 拓也、廣橋 良彦¹、真里谷 奨、黒田 敬史、浅沼 広子¹、鳥越 俊彦¹、齋藤 豪、佐藤 昇志¹ **第 73 回日本癌学会学術総会**
7. **MMP10 regulates stemness of ovarian cancer stem cells and platinum resistance** Tasuku Mariya, Masato Tamate, Shutaro Habata, Takuya Asano, Takafumi Kuroda, Masahito

Mizuuchi, Masahiro Iwasaki,
Takahiro Suzuki, Tsuyoshi Saito **公益
社団法人日本産科婦人科学会第 67 回
学術講演会**

8. **BORIS variants are expressed in
gynecological cancer stem cells-specific
manner and associated with stemness**
Takuya Asano, Tasuku Mariya,
Takafumi Kuroda, Masahito
Mizuuchi, Madoka Takahashi, Seiro
Satohisa, Mizue Teramoto, Ryoichi
Tanaka, Masahiro Iwasaki, Tsuyoshi
Saito **公益社団法人日本産科婦人科学
会第 67 回学術講演会**

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 豪 (Tsuyoshi Saito)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：90145566

(2) 研究分担者

岩崎雅宏 (Masahiro Iwasaki)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20516504

田中綾一 (Ryoichi Tanaka)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：60448602

佐藤昇志 (Noriyuki Sato)
札幌医科大学・その他・名誉教授
研究者番号：50158937