様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年　5 月　8 日現在

機関番号：１２１０２
研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2010～2012
課題番号：２２３９０３０９
研究課題名（和文）　子宮頸癌予防のための次世代ワクチンの開発研究

研究課題名（英文）　Development of new HPV vaccine for prevention of cervical cancer.

研究代表者
吉川　裕之（YOSHIKAWA HIROYUKI）
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：40158415

研究成果の概要（和文）：HPV16, 18, 31, 33, 52, 58の感染代用系を確立し、CIN1患者においてHPV16中和抗体を測定した。中和抗体の有無は、CIN１の病変推移には無関係であった。交差性中和エピトープとなる領域をモノクロナール抗体により解析した。16型L2のaa56/75領域には2つの交差性中和エピトープがあり、この2つのエピトープを提示出来る抗原は、幅広い型に有効なHPV感染予防ワクチンとなり得る。

研究成果の概要（英文）：Development of specific neutralizing antibodies following natural HPV 16 infection did not favor a better outcome of low-grade cervical lesions induced by HPV 16. There are at least two cross-neutralization epitopes in the region from aa56 to aa75 and an antigen capable of presenting the two cross-neutralization epitopes would be a good vaccine candidate for a broad-spectrum of high-risk HPVs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２０１０年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
２０１１年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
２０１２年度	4,200,000	1,260,000	5,460,,000
総　計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：産科婦人科学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学
キーワード：子宮頸癌、ワクチン、HPV、L2、VLP

1. 研究開始当初の背景

2009 年に本邦でも承認された子宮頸癌予防のためのHPV16/18ワクチンは、70%前後の原因であるHPV16、HPV18 の L1 蛋白で合成された人工ウイルス様粒子（VLP）である。HPV16 と HPV18 の L1VLP では、この2つの型以外の子宮頸癌関連HPVの感染を阻止することはできない。他の型の癌関連HPV感染を予防するには、1)多くの型の VLP を接種する、2)型共通の抗原性がある L2 蛋白を利用する、の2つの戦略がある。前者は強い局所反応と高価なことが問題である。

2. 研究の目的

我々は L2 蛋白を利用する戦略で、より多くの子宮頸癌関連 HPV の感染阻止に有効な HPV ワクチンを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

L2 単独のペプチドワクチンでは抗原性が不足することや先行する L1VLP の臨床試験の成果を活用しやすいことを考慮し、第2世代の HPV ワクチンとして、HPV16 などの L1VLP 表面に L2 エピトープを多量に発現させたキメラ VLP ワクチンの開発を行う。

これまでの研究成果をふまえ、HPV 型共通の予防ワクチンの研究を推進して行く。L2 領域の型共通ペプチド(P108-120)ワクチンの経験を踏まえ、L2 領域の 3 つのペプチド(P18/38、P56/75、P96/115)を L1 とともに発現させることにすでに成功しているが、これを予防ワクチンとしての実用化を進める。これらのペプチド領域は、我々の研究で HPV 感染に関わるレセプターと結合する部位であることも判明しており、子宮頸癌関連 HPV を含む性器 HPV でほぼ共通しており、特に子宮頸癌関連 HPV(HPV16, 18, 31, 33, 35, 52, 58 など)ではほぼ同一のアミノ酸配列を有している。中和活性の測定には、我々が開発した、HPVL1/L2 VLP にレポーター遺伝子(β-gal)を package した pseudo- virion を COS-1 細胞に導入し、発現させる HPV の感染代用系を用いる。

①. HPV16, 18, 31, 33, 52, 58 の感染代用系の確立(吉川、中尾[大学院生])pseudovirion を COS-1 細胞に導入し、レポーター遺伝子(β-gal)を発現させる系を用いて、中和活性を測定する。そのためには、多くの型の pseudovirion を作製する。

②. L2 ペプチド P18/38、P56/75、P96/115 を抗原とした中和抗体の誘導確認(吉川、中尾[大学院生]、松本);HPV16L2 ペプチドの中で、最も高い型共通中和活性を誘導する可能性が高い P18/38、P56/75、P96/115 の組合せを MHC クラス II ハプロタイプの異なる複数の系統マウスに接種し、高い中和活性誘導を確認する。

③. L1VLP と L2 ペプチドのキメラワクチンの作製(吉川、中尾[大学院生]);L1 VLP の表面に型共通性エピトープである L2 ペプチドを多く発現させたキメラワクチンを用いた臨床試験の計画を、昨年度の実績に加え、さらに続行する。

4. 研究成果

(1) HPV16, 18, 31, 33, 52, 58の感染代用系の確立と中和抗体の測定

軽度の子宮頸部前癌病変である子宮頸部上皮腫瘍(CIN)1を持つ患者217名においてHPV16, 18, 31, 52, 58に対する中和抗体を測定し、病変の消失、存続、進展との関係について調べた。偽ウイルス粒子をCOS-1細胞に導入し、発現させるHPV6およびHPV16の感染代用系を用いて、中和抗体を測定した。84名、35名、17名、1名が、1タイプ、2タイプ、3タイプ、4タイプに対する低レベルの抗体価を保有していた。多くは24か月後にも抗体価は不変であった。中和抗体の有無、抗体価は、CIN1の病変推移には無関係であった。

(2) 交差性中和エピトープとなる領域の特定ーモノクロナール抗体による解析ー

HPV16 L2 タンパク質の表面領域のうち、アミノ酸 56~75 の配列を持つ合成ペプチド(P56/75)で免疫したウサギの抗血清は、複数の高リスク型 HPV を中和することが示され、ワクチン抗原への応用が期待されている。本研究は、P56/75 をマウスに免疫して得たモノクローナル抗体(MAb)を解析し、中和エピトープとなる領域の特定と交差性の程度を明らかにすることを目的とした。HPV16 型副キャプシド蛋白質 L2 の交差性中和エピトープを認識する MAb が2種得られた。MAb 13B の 16、18、31、33、51、58 型キャプシドへの結合は確認できた。しかし、35 と 52 型キャプシドへの結合は検出できなかった。MAb 24B と調べた全てのキャプシドとの結合は確認できた。MAb 13B は、16、18、31、33、51、58 型 PsV を中和したが、35 と 52 型 PsV は中和しなかった。MAb 24B は調べた全ての PsV を中和した。抗体の総量は同じでも、2 つの MAb を 1:1 で混ぜると中和活性が増強した。16 型 L2 の aa56/75 領域には少なくとも 2 つの交差性中和エピトープがある。これら 2 つのエピトープを提示出来る抗原は、1 種類で幅広い型に有効な HPV 感染予防ワクチンとなり得る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 22 件)

(1) Matsumoto K, Maeda H, Oki A, Takatsuka N, Yasugi T, Furuta R, Hirata R, Mitsuhashi A, Fujii T, Hirai Y, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H. HLA Class II DRB1*1302 1 allele protects against progression to cervical intraepithelial neoplasia grade 3: A multicenter, prospective, cohort study. Int J Gynecol Cancer, 2012, 22(3):471-478. 査読有 doi: 10.1097/IGC.0b013e3182439500.

(2) Ochi H, Matsumoto K, Kondo K, Oki A, Furuta R, Hirai Y, Yasugi T, Takatsuka N, Maeda H, Mitsuhashi A, Fujii T, Kawana K, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Kanda T, Yoshikawa H. Do neutralizing antibody responses generated by human papillomavirus infections favor a better outcome of low-grade cervical

lesions? J Med Virol,2012, 84(7):1128-1134. 査読有 doi: 10.1002/jmv.23258.
(3) Kitagawa R, Katsumata N, Ando M, Shimizu C, Fujiwara Y, Yoshikawa H, Satoh T, Nakanishi T, Ushijima K, Kamura T. A multi-institutional phase II trial of paclitaxel and carboplatin in the treatment of advanced or recurrent cervical cancer. Gynecol Oncol,2012, 125(2):307-311. 査読有 doi: 10.1016/j.ygyno.2012.02.009.
(4) Takeda T, Wong TF, Adachi T, Ito K, Uehara S, Kanaoka Y, Kamada M, Kitagawa H, Koseki S, Gomibuchi H, Saito J, Shirasu K, Sueoka K, Sugimoto M, Suzuki M, Sumi T, Takeda S, Tasaka K, Noguchi Y, Fujii S, Fujii T, Fujiwara M, Maeda T, Matsumoto K, Momoeda M, Morita M, Yoshimura K, Hirai Y, Kubota T, Sakuragi N, Kawabata M, Yoshikawa H, Kobayashi H, Yaegashi N. Guidelines for office gynecology in Japan: Japan Society of Obstetrics and Gynecology and Japan Association of Obstetricians and Gynecologists 2011 edition. J Obstet Gynaecol Res, 38(4):615-631, 2012. 査読有 doi: 10.1111/j.1447-0756.2012.01858.x.
(5) Matsumoto K, Hirai Y, Furuta R, Takatsuka N, Oki A, Yasugi T, Maeda H, Mitsuhashi A, Fujii T, Kawana K, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H. Subsequent risks for cervical precancer and cancer in women with low-grade squamous intraepithelial lesions unconfirmed by colposcopy-directed biopsy: results from a multicenter, prospective, cohort study. Int J Clin Oncol, 17(3):233-239, 2012. 査読有 doi: 10.1007/s10147-011-0280-9.
(6) Inamine M, Nagai Y, Mitsuhashi A, Nagase S, Yaegashi N, Yoshikawa H, Aoki Y. Cigarette smoke stimulates VEGF-C expression in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 1 and 2 lesions. Int J Clin Oncol, 17(5):498-504, 2012. 査読有 doi: 10.1007/s10147-011-0322-3.
(7) Nakao S, Mori S, Kondo K, Matsumoto K, Yoshikawa H, Kanda T. Monoclonal antibodies recognizing cross-neutralization epitopes in human papillomavirus 16 minor capsid protein L2. Virology, 2012, 434(1):110-117. 査読有 doi: 10.1016/j.virol.2012.09.006.
(8) Satoh T, Matsumoto K, Fujii T, Sato O, Gemma N, Onuki M, Saito H, Aoki D, Hirai Y, Yoshikawa H. Rapid genotyping of carcinogenic human papillomavirus by loop-mediated isothermal amplification using a new automated DNA test (Clinichip HPV). J Virol Methods, 188(1-2):83-93, 2012. 査読有 doi: 10.1016/j.jviromet.2012.10.014.
(9) Matsumoto K, Yoshikawa H. Human papillomavirus infection and risk for cervical cancer in Japan. J Obstet Gynaecol Res, 2013, 39(1):7-17. 査読有 doi: 10.1111/j.1447 -0756.2012.01977.x.
(10) Michikami H, Minaguchi T, Ochi H, Onuki M, Okada S, Matsumoto K, Satoh T, Oki A, Yoshikawa H. Safety and efficacy of substituting nedaplatin after carboplatin hypersensitivity reactions in gynecologic malignancies. J Obstet Gynecol Res,2013, 39(1):330-335. 査読有 doi: 10.1111/j.1447-0756.2012.01893.x.
(11) Abe A, Minaguchi T, Ochi H, Onuki M, Okada S, Matsumoto K, Satoh T, Oki A, Yoshikawa H. PIK3CA overexpression is a possible prognostic factor for favorable survival in ovarian clear cell carcinoma. Human Pathology, 2013, 44(2):199-207. doi: 10.1016/j.humpath.2012.05.005.
(12) Fujii T, Takatsuka N, Nagata C, Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Kawana K, Mitsuhashi A, Hirai Y, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, and Yoshikawa H. Association between carotenoids and outcome of cervical intraepithelial neoplasia: a prospective cohort study. Int J Clin Oncol, 査読有 in press
(13) Yoshikawa H, Ebihara K, Tanaka Y, Noda K. Efficacy of quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) vaccine (GARDASIL®) in Japanese women aged 18 to 26 years. Cancer Science, 2013, 104(4):465-472. 査読有 doi: 10.1111/cas.12106.
(14) Satoh T, Matsumoto K, Tanaka YO, Akiyama A, Nakao S, Sakurai M, Ochi H, Onuki M, Minaguchi T, Sakurai H, Yoshikawa H. Incidence of venous thromboembolism before treatment in cervical cancer and the impact of management on venous thromboembolism after commencement of treatment. Thrombosis Research, in press, 査読有 doi: 10.1016/j.thromres.2013.01.027.
(15) Matsumoto T, Hiura M, Baba T, Ishiko O, Shiozawa T, Yaegashi N, Kobayashi H, Yoshikawa H, Kawamura N, Kaku T. Clinical Management of Atypical Polypoid Adenomyoma of the Uterus. A Clinicopathological Review of 29 Cases. Gynecol Oncol, 2013, 129(1):54-57. 査読有 doi: 10.1016/j.ygyno.2012.12.040.

(16) Tanaka YO, Okada S, Satoh T, Matsumoto K, Oki A, Saida T, Yoshikawa H, Minami M. Diversity in size and signal intensity in multilocular cystic ovarian masses: New parameters for distinguishing metastatic from primary mucinous ovarian neoplasms. J Magn Reson Imaging. in press, 査読有 doi: 10.1002/jmri.24058.
(17) 吉川裕之:「HPV DNA テスト」産科と婦人科(増刊号)診断と治療社 79(suppl) :121-125.2012.査読無
(18) 吉川裕之:「局所進行子宮頸癌のシスプラチン併用化学放射線療法に初めて優った臨床試験」 CRITICAL EYES 42:2, 2012. 査読無
(19) 吉川裕之:「子宮頸がんの発生-我が国および世界の動向-」 婦人科がん 日本臨牀社 70(増刊号 4):73-76,2012, 査読無
(20) 松本光司、紀 美和、小泉基生、平井康夫、吉川裕之:「HPV 核酸検出検査試薬「インベーダー®Cervista ®HPVHR」の評価」 医療と検査機器・試薬 宇宙堂八木書店 35(3): 387-394, 2012, 査読無
(21) 近藤一成、吉川裕之:「HPVブロードペクトラム・ワクチンの開発」 産婦人科の実際 金原出版 62(3):315-321.2013. 査読無
(22) 監修 井上裕美、峯岸 敬、大場 隆、松崎利也、鈴木(堀田)眞理、緒方 勤、竹下俊行、三鴨廣繁、北村邦夫、若槻明彦、吉川裕之、深谷孝夫、林 保良、新倉 仁、小林浩、松井英雄、中原健次、苛原 稔、杉浦真弓、福富隆志、松村譲兒:病気がみえる Vol.9 メディックメディア 東京 2013 年 査読無

〔学会発表〕(計 13 件)
(1) 小宮春奈、小貫麻美子、加藤 敬、田中勝洋、吉川智之、櫻井 学、八木洋也、越智寛幸、水口剛雄、松本光司、佐藤豊実、吉川裕之:「子宮頸部最小偏倚型粘液性腺癌(MDA)と鑑別を要した分葉状頸管腺過形成(LEGH)の一例」 第 124 回関東連合産科婦人科学会総会・学術集会 10 月 28 日.2012. 山梨
(2) 吉川裕之:「HPV ﾜｸﾁﾝと HPV 検査による子宮頸癌予防」 第 51 回日本臨床細胞学会秋期大会 11 月 10 日, 2012, 新潟
(3) 吉川裕之:ｼﾝﾎﾟｼﾞｳﾑ「子宮頸がん治療の近未来展望 化学療法への期待と縮小手術」 第 50 回日本癌治療学会学術集会 10 月 25 日.2012 横浜
(4) Tanabe H, Kitagawa R, Shibata T, Saito M, Okamoto A, Takakura S, Sasaki H, Ochiai K, Yoshikawa H, Kamura T: Does paclitaxel plus carboplatin (TC) substitute for paclitaxel plus cisplatin (TP) in cervical cancer without prior platinum treatment? (subset analysis of Japan Clinical Oncology Group trial (JCOG 0505). The 37th ESMO, September 28 - October 2, 2012, Vienna, Austria
(5) 喜多川 亮、勝俣 範之、柴田 大朗、中西透、西村 貞子、西尾 真、高野 政志、佐藤 豊実、横田 治重、落合 和徳、紀川 純三、小林 裕明、金戸 啓介、吉川裕之、嘉村 敏治:「IVb 期・再発子宮頸癌に対する Paclitaxel/Cisplatin 併用療法と Paclitaxel/Carboplatin 併用療法のランダム化比較試験(JCOG0505)」 第 10 回日本臨床腫瘍学会学術集会 7 月 26 日～28 日.2012.大阪 A randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin (TC) versus paclitaxel plus cisplatin (TP) in stage IVB or recurrent cervical cancer: Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG0505). The 10th Annual Meeting of Japan Society of Medical Oncology.
(6) 志鎌あゆみ、佐藤豊実、新 夏樹、加藤 敬、道上大雄、吉川智之、越智寛幸、小貫麻美子、水口剛雄、松本光司、櫻井英幸、吉川裕之:「当院における子宮頸癌 4 期の治療成績」 第 52 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 7 月 19 日～21 日.2012.東京
(7) 吉川裕之:発表・座長「子宮頸部発癌における喫煙の関与とそのしくみ-子宮頸部前癌病変の消失・進展と喫煙との関連に関する総合解析-」 平成 23 年度助成研究発表会 7 月 18 日.2012.東京
(8) 吉川裕之:「子宮頸がんと HPV -ワクチンと HPV テスト-」 HPV ワクチンフォーラム 7 月 14 日.四日市(三重)
(9) 吉川裕之:「サーバリックス 海外、国内における最新の臨床試験結果」 第 1 回ワクチンフォーラム 6 月 24 日.東京
(10) 中村優子、松本光司、島袋剛二、西出 健、永井公洋、佐藤豊実、沖 明典、吉川裕之:「コルポスコピー下生検の見逃しを減らすための前方視的研究」 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 4 月 13 日～15 日.2012.神戸
(11) 小貫麻美子、松本光司、越智寛幸、岡田智志、水口剛雄、佐藤豊実、沖 明典、吉川裕之:「CICIN2-3 治療後のフォローアップにおける HPV DNA 検査の有用性:メタアナリシス解析による検討」 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 4 月 13 日～15 日.2012.神戸
(12) 中尾砂里、松本光司、近藤一成、吉川裕

之:「ヒトパピローマウイルス(HPV)16 型副キャプシド蛋白質L2 の交差性中和エピトープの解析:型共通 HPV ワクチンの開発を目指して」第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 4 月 13 日～15 日.2012.神戸

(13)松本光司、中村優子、島袋剛二、西出 健、永井公洋、佐藤豊実、沖 明典、吉川裕之:「LSIL･HSIL トリアージのための HPV タイピング検査の有用性」第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 4 月 13 日～15 日.2012.神戸

６．研究組織

(1)研究代表者

吉川 裕之（YOSHIKAWA HIROYUKI）
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：40158415

(2)研究分担者

(3)連携研究者

松本 光司(MATSUMOTO KOUJI)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：30302714