

HPV16 L1-E7キメラ粒子産生酵母を用いた予防・治療的ワクチン

著者	笹川 寿之
著者別表示	Sasagawa Toshiyuki
雑誌名	平成16(2004)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	2003-2004
ページ	11p.
発行年	2005-05
URL	http://doi.org/10.24517/00056996

HPV16 L1-E7 キメラ粒子産生酵母を用いた予防・治療的ワクチン

(課題番号 15591735)

平成15年度～平成16年度科学研究費補助金(基盤研究(C))研究報告書

平成17年 5月

研究代表者 笹川寿之

(金沢大学医学部助教授)

金沢大学附属図書館



0500-04181-4

目次

1. はしがき
2. 研究実績報告書
3. 研究の背景とこれまでの研究成果
4. 研究方法と結果
5. 報告論文

研究組織

研究代表者： 笹川寿之 (金沢大学医学部助教授)
 研究分担者： 浜 祐子 (旭硝子中央研究所主幹研究員)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	2,000	0	2,000
平成16年度	700	0	700

研究発表

(1) 学会誌等

1. Minemoto Y, Uchida S. et al. Loss of p53 induces M-phase retardation following G2 DNA damage checkpoint abrogation. Arch. Biochem. and Biophysics 412, 13-19, 2003.
2. 北陸地方の若い女性の子宮頸部における性感染症 (ヒトパピローマウイルス、クラミジア、淋菌) の危険因子の解析 安田英代、笹川寿之、中野隆、山崎洋、井上正樹 日本性感染症学会 14, 60-68, 2003.
3. Sasagawa T, Rose RC et al. Mucosal immunoglobulin-A and -G responses to oncogenic human papilloma virus capsids. Int J Cancer. 104, 329-335, 2003.
4. Qi B, Qi Y, Watari A, et al, Pro-apoptotic ASY/Nogo-B protein associates with ASYIP. J Cell Physiol., 196, 312-318, 2003.
5. Shimakage M, Kawahara K. et al. Expression of Epstein-Barr virus in thyroid carcinoma correlated with tumor progression. Human pathology 34, 1170-1177, 2003.
6. Kim SJ, Lee C, Lee SY et al., Enhanced immunogenicity of human papillomavirus 16 L1 genetic vaccines fused to an ER-targeting secretory signal peptide and RANTES. Gene Therapy 10, 1268-1273, 2003.
7. Sasagawa T, Human papillomavirus infection and cervical cancer, Biomedical Reviews, 14, 75-93, 2003.
8. 笹川寿之(金沢大学 医学部保健学科), 安田英代, 宮澤貴磨呂, 石古博昭, 保科眞二 性風俗従事者の咽頭ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染、日本性感染症学会誌 (0917-0324)15 巻, 154-160, 2004.
9. Azar KK, H. Yasuda, M. et al., Increased secretion patterns of Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions, Human Pathol. 35, 1376-1384, 2004.
10. Sasagawa T., Tani M. et al, A human papillomavirus type16 vaccine by oral delivery of L1 protein, Virus Res. 101, 81-90, 2005.
11. Sasagawa T, Yasuda H, et al. Sexual behavior and cervical high-risk human papillomavirus (HPV) infections in Japanese women. Sexually Transmitted Infection. 81, 2005.

(2) 口頭発表

1. 若い女性の子宮頸部における性感染症 (ヒトパピローマウイルス、クラミジア、淋菌) の危険因子の解析 谷まゆこ、安田英代、アザール・ハリリ・ハディジェ、笹川寿之、井上正樹、中野隆、佐竹紳一郎、山崎洋、浮田俊彦、深江司 日本産婦人科感染症研究会 6/14 宇都宮, 2003
2. 若者に蔓延する子宮頸部HPV感染と追跡調査結果 (金沢STD研究会共同研究) 谷

まゆこ、安田英代、アザール・ハリリ・ハディジェ、笹川寿之、井上正佐竹紳一郎、中野隆、浮田俊彦、深江司、山崎洋、井上正樹、北陸STD研究会 7/5 金沢, 2003.

3. Cervical cytokine and antibody secretions in Japanese women with cervical squamous intraepithelial lesions. Toshiyuki Sasagawa, Khadijeh K. Azar, Mayuko Tani, Hideyo Yasuda, Masaki Inoue. 2月23日、国際パピローマウイルス学会、メキシコシテイー, 2004

4. HPV感染とワクチンの開発、金沢大学十全会同窓会総会・学術講演・指定発言者, 2004

5. 女性の外陰部尖形コンジローマとボウエン様丘疹(VIN): 原因と臨床像、服部里佳、笹川寿之、深江司、井上正樹 北陸STD研究会 7月3日、金沢市, 2004.

6. 外陰部のHPV感染病変: 尖圭コンジローマとボウエン様丘疹、服部里佳、笹川寿之、深江司、井上正樹、北陸ウイルス研究会 9月4日 金沢, 2004

7. 尖圭コンジローマとボウエン様丘疹 服部里佳、笹川寿之、深江司、井上正樹、性感染症学会、12月4日、東京, 2004.

(3) ラジオ・テレビ

1. 子宮頸癌の分子疫学検診 6月放送 「キャンサートウデイ」 ラジオNIKKEI, 2004

2. 食べるヒトパピローマウイルス・ワクチン テレビ金沢10月放映, 2004

3. 子宮癌検診とHPV検査 NHK金沢12月6日放映, 2004.

(4) ニュース

1. オーラルサービスを行うCSW-約3割が口腔内HPVキャリアー Medical Tribune Vol. 37 No. 1, 2

1月1日, 2004

2. 食べるヒトパピローマウイルスワクチン 北陸中日新聞10月, 2004

3. 若い女性で蔓延するHPV感染 北国新聞 10月, 2004.

(5) 出版物

1. ヒトパピローマウイルス-母子感染としてのHPV (HPV: human papillomavirus) 笹川寿之 産婦人科の実際 52, 937-945, 2003

2. ストップ・ザ STD 笹川寿之
金沢大学保健管理センター センターだより No. 22, P2-6, 2003

3. 笹川寿之【子宮頸癌・子宮体癌・卵巣癌の診断と治療 最新の研究動向】子宮頸癌 子宮頸癌の診断 遺伝子診断
日本臨床 62巻 増刊10, 2004.

(6) 研究成果による工業所有権の出願・取得状況

特許出願、発明者: 笹川寿之、東田英毅、浜祐子、所有者: 旭硝子、金沢大学
特願 2004-263580、出願年月日: 9月10日、2004

(様式8)

平成 15 年度科学研究費補助金実績報告書 (研究実績報告書)

1. 機関番号 1 3 3 0 1 2. 研究機関名 金沢大学

3. 研究種目名 基盤C (2) 4. 研究期間 平成 15 年度 ~ 平成 16 年度

5. 課題番号 1 5 5 9 1 7 3 5

6. 研究課題名 HPV16 L1-E7キメラ粒子酵母を用いた^{経口}予防・治療的ワクチン

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
3 0 2 7 2 9 7 5	フカナ ささがわ としゆき 笹川 寿之	医学部	助教授

8. 研究分担者(主な者を5名以内。所属機関名については、研究代表者の所属機関と異なる場合のみ記入すること。)

研究者番号	研究分担者名	所属機関名・所属部局名	職名
9 9 9 9 9 9 9	フカナ はま ゆうこ 浜 祐子	旭硝子(株)・APSPEX. 事業推進部 研究開発グループ	主幹
	フカナ		
	フカナ		
	フカナ		
	フカナ		

9. 研究実績の概要(国立情報学研究所でデータベース化するため、600字~800字で記入。図、グラフ等は記載しないこと。)

高リスク型ヒトパピローマウイルス(HPV)が子宮頸癌の発生を誘発することが明らかになってきた。したがって、HPVに対して有効な免疫を誘導することが感染防止や将来の癌発生防止に有効であると考えられている。米国のグループがHPV16型のウイルス様粒子(VLP)をワクチンとして免疫したところ、100%その感染は抑えられたと報じられた。このワクチンは注射ワクチンで、精製したウイルス様粒子を計3回の注射を行っている。効果はみとめられたが、このワクチンは単価が高く、また、低開発国など医療設備が充実していない地域における注射投与には問題点が多い。HPVは粘膜に感染するため、実際は粘膜免疫を誘導することが最も効率のいい方法である。実際、ウイルスVLPの注射投与では、粘膜にウイルス特異的なIgAは誘導されないと他のウイルスで報告されている。そこで、我々はHPV16型様粒子を産生する酵母を経口投与し、粘膜にHPV16型特異的な抗体を誘導することを試みた。経口投与単独ではHPV抗体は誘導されなかったが、微量のHPV16-VLPを経鼻的に投与したところ、中和能を有すると思われる抗体が誘導された。本研究では、これまでの研究を進展させ、HPV16型感染の防御のみならず、HPV16型特異的なキラーT細胞を誘導し、治療を目的としたワクチンの作成を試みた。S. pombeの発現ベクターにHPV16L1-E7(L1を短くしたC-末に全長のE7を導入したもの)を組み込んで発現させたところ、57kD, 63kD, 67kDの蛋白発現に成功した。このHPV16 L1-E7を発現する酵母を凍結乾燥させ、マウスに食べさせたところ、HPV16様粒子(VLP)に反応することを確認した。このことは、この融合蛋白がL1だけで構成される粒子と同じような粒子を形成し、それによって抗体産生が誘導されることを示唆する結果であった。

※ 成果の公表を見合わせる必要がある場合は、その理由及び差し控え期間等を記入した調書(A4判縦長横書き1枚)を添付すること。

10. キーワード

- | | | |
|-----------------|--------------|------------|
| (1) ヒトパピローマウイルス | (2) 酵母 | (3) 経口ワクチン |
| (4) ウイルス様粒子 | (5) L1, E7蛋白 | (6) 予防ワクチン |
| (7) 治療ワクチン | (8) 子宮頸癌 | |

(裏面に続く)

11. 研究発表(発表予定を含む。但し、投稿中、投稿準備中は除く。)

〔雑誌論文〕

著者名	論文標題			
Sasagawa T., Tani M. et al	A human papillomavirus type16 vaccine by oral delivery of L1 protein			
雑誌名	巻	発行年		ページ
Virus Res.	101	2	0 0 5	81 — 90

著者名	論文標題			
Sasagawa T, Yasuda H, et al.	Sexual behavior and cervical high-risk human papillomavirus (HPV) infections in Japanese women			
雑誌名	巻	発行年		ページ
Sexually Transmitted Infection	81	2	0 0 5	—

著者名	論文標題			
Azar KK, H. Yasuda, M. et al.	Increased secretion patterns of Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions			
雑誌名	巻	発行年		ページ
Human Pathology	35	2	0 0 4	1376 — 1384

著者名	論文標題			
Sasagawa T.	Human papillomavirus infection and cervical cancer			
雑誌名	巻	発行年		ページ
Biomedical Reviews	14	2	0 0 3	75 — 93

著者名	論文標題			
Kim SJ, Lee C, Lee SY et al.	Enhanced immunogenicity of human papillomavirus 16 L1 genetic vaccines fused to an ER-targeting secretory signal peptide and RANTES.			
雑誌名	巻	発行年		ページ
Gene Therapy	10	2	0 0 3	1268 — 1273

著者名	論文標題			
Shimakage M, Kawahara K. et al.	Expression of Epstein-Barr virus in thyroid carcinoma correlated with tumor progression. 34, 1170-1177, 2003.			
雑誌名	巻	発行年		ページ
Human pathology	34	2	0 0 3	1170 — 1177

著者名	論文標題			
Qi B, Qi Y, Watari A, et al	Pro-apoptotic ASY/Nogo-B protein associates with ASYIP			
雑誌名	巻	発行年		ページ
J Cell Physiol.	196	2	0 0 3	312 — 318

著者名	論文標題			
Sasagawa T, Rose RC et al.	Mucosal immunoglobulin-A and -G responses to oncogenic human papilloma virus capsids			
雑誌名	巻	発行年		ページ
Int J Cancer.	104	2	0 0 3	329 — 335

著者名	論文標題			
Minemoto Y, Uchida S. et al.	Loss of p53 induces M-phase retardation following G2 DNA damage checkpoint abrogation. 412, 13-19, 2003.			
雑誌名	巻	発行年		ページ
Arch. Biochem. and Biophysics	412	2	0 0 3	13 — 19

〔図書〕

著者名	出版者				
笹川寿之	ヒトパピローマウイルスー母子感染としてのHPV (HPV: human papillomavirus)				
書名	発行年		総ページ		
産婦人科の実際 52巻	2	0	0	3	8

著者名	出版者				
笹川寿之	ストップ・ザ STD 笹川寿之				
書名	発行年		総ページ		
金沢大学保健管理センター センターだより No. 22	2	0	0	3	5

著者名	出版者				
笹川寿之	【子宮頸癌・子宮体癌・卵巣癌の診断と治療 最新の研究動向】 子宮頸癌の診断 遺伝子診断				
書名	発行年		総ページ		
日本臨床 62巻 増刊10	2	0	0	4	5

12. 研究成果による工業所有権の出願・取得状況

工業所有権の名称	発明者名	権利者名	工業所有権の種類、番号	出願年月日	取得年月日
特許	笹川寿之 浜祐子 東田	金沢大学 旭硝子		2004/9/10	

研究の背景とこれまでの研究成果

近年における子宮癌検診の普及により、わが国を始めとする先進諸国での子宮頸癌死亡は著しく減少した。しかし、ここ10年間では子宮頸癌の発生は横ばいであり、30歳代の子宮頸癌が著しく増加している。その背景には、性交渉経験の若年齢化や若い女性における性感染症 (sexually transmitted disease: 以下 STD とする) の蔓延が関係している可能性がある。実際我々の北陸における調査では、10代女性の50%、20代前半の女性の36%が子宮頸部 HPV 感染していた (論文1, 5)。HPV 感染の多くは、感染後2年以内に自然治癒すると考えられているが、約1割が持続感染化し、子宮頸部異形成となる。さらに1-2%が子宮頸癌になると考えられている (論文3) が、HPV 感染者の増加は子宮頸癌発生につながるおそれは大いにある。性交渉経験の若年齢化はこの10年で著しく、これからの10年間に20-30歳代の女性の子宮頸癌の発生増加が危惧されている。世界全体でみると、子宮頸癌は女性の癌の中で乳癌について多い癌である。世界保健機構 (world health organization: 以下 WHO とする) の報告では年間47万人が子宮頸癌に罹患、20万人以上もの女性が亡くなっていると推計されている。HPV 感染と子宮頸癌の問題は、十分な医療が受けられない国ではより深刻であり、このような国では十分な医療が受けられない、あるいは、発見が遅れるなどの原因から、子宮頸癌の半数が死亡している。このような国や地域では、子宮癌検診の普及に限界があり、STD 予防のための啓発活動や HPV ワクチンの実施に期待がよせられている (論文5)。

HPV ワクチン開発はウイルス粒子を実験室で増殖させることができないため、ワクチン開発を含めた研究は遅れていた。しかし、遺伝子工学の手法を用い、これまでに HPV16 型の外殻蛋白のみからなるウイルス様粒子 (virus-like particles: 以下 VLP とする) が作成され大きく研究が進んできた。この粒子はウイルスに類似するがウイルス遺伝子を持たないため安全性が高く、人の血清とも反応する (論文2) ことが明らかになっており、安全で有効なワクチンとして期待されてきた。最近では VLP をワクチンとして用いたヒト治験も行われ、その有効性が確認されている (Koutsky et al., 2002; Nardelli-Haeffliger et al., 2003)。このヒト治験では VLP を筋肉注射で投与しており、大量の VLP が必要で、その精製や保存のためのコストが高いほか、後進国では注射を打つ医療従事者にも限りがあるという問題もある。これらの条件はワクチン普及を考える上で大きな障害となる。そこで、コストが低く、投与が簡易である経口投与ワクチンに期待が寄せられている。

経口ワクチンとして、HPV-VLP を発現する植物ワクチンが開発されているがこれまでのところ十分な免疫誘導効果は得られていない。目的抗原に対する免疫が有効に誘導されるためには、抗原が腸管にある免疫誘導部位である腸管関連リンパ組織 (gut associated lymphoid tissue: 以下 GALT とする) にたどり着き免疫細胞を適切に刺激する必要があり、そのための様々な工夫がなされている。

我々はまず、腸管に抗原を運ぶための物質として、酵母を用いた。酵母は真核生物の中で最も下等な生物で、パンやビールなどを作る際の発酵に用いられている。古くから広くヒトの食生活の中に溶け込んだ微生物で、安全性は確立されている。また、予備実験では、酵母をマウスに経口投与するとほとんどが消化されずに糞便中に排泄されるが、酵母を凍結乾燥してマウスに経口投与すると、腸管ではじめて細胞壁が壊され酵母内の蛋白が放出されることが確認されている。そこで、子宮頸癌で最もよく見つかるタイプである HPV16 型の VLP を発現している酵母を経口投与することによって、HPV16 型 VLP が腸管腔に放出され、腸管の GALT を直接刺激し、HPV16 型に対する抗体を誘導できるかについて BALB/c マウスを用いて検討を行ったところ、経鼻の VLP 微量投与との併用で中和能を持つと思われるワクチンが誘導された (論文4)。

研究方法と結果

(研究目的)

本研究は HPV の予防的かつ治療的ワクチンとして HPV16L1-E7 融合蛋白を酵母を用いた発現系で産生させ、これがウイルス様粒子を形成するかどうかについて明らかにする。

(方法と結果)

Extended PCR 法を用いて、HPV16 型 L1 遺伝子の C 末端 (nn6859, nn7009, nn7135) に HPV16 型 E7 遺伝子を結合させた construct を構築した (図 1)。それを *S. pombe* 酵母の発現ベクターに組み込み酵母に transfect した。

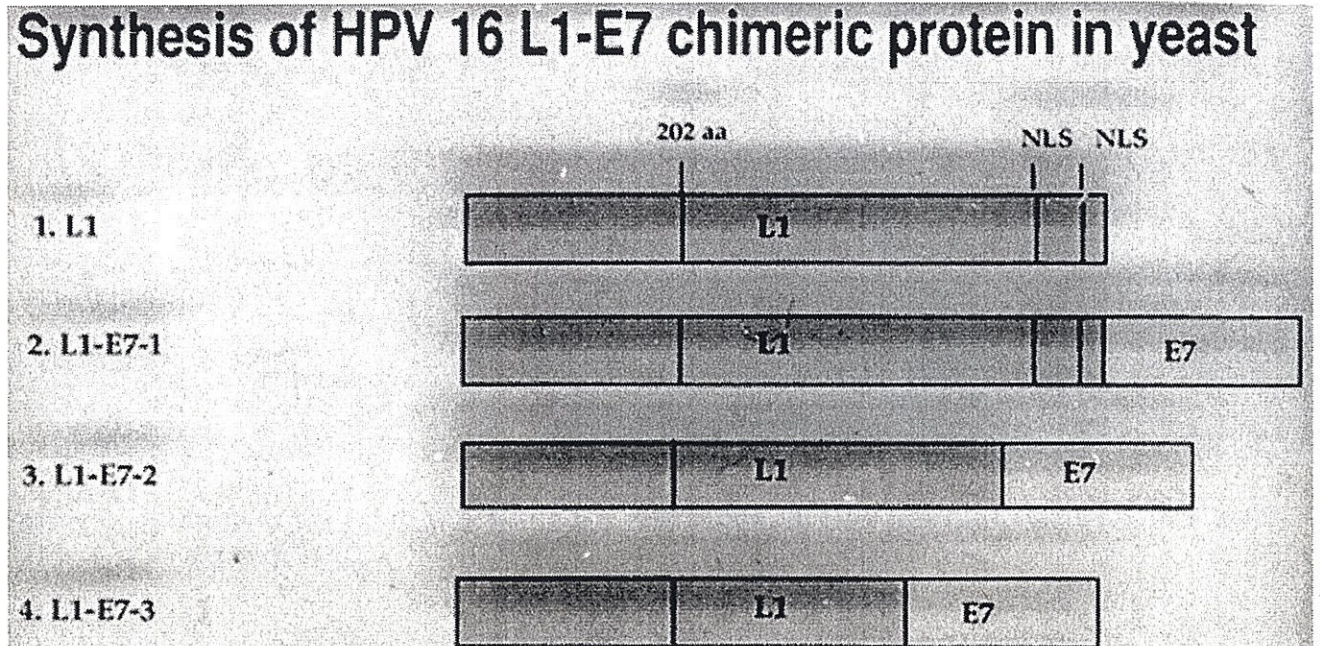
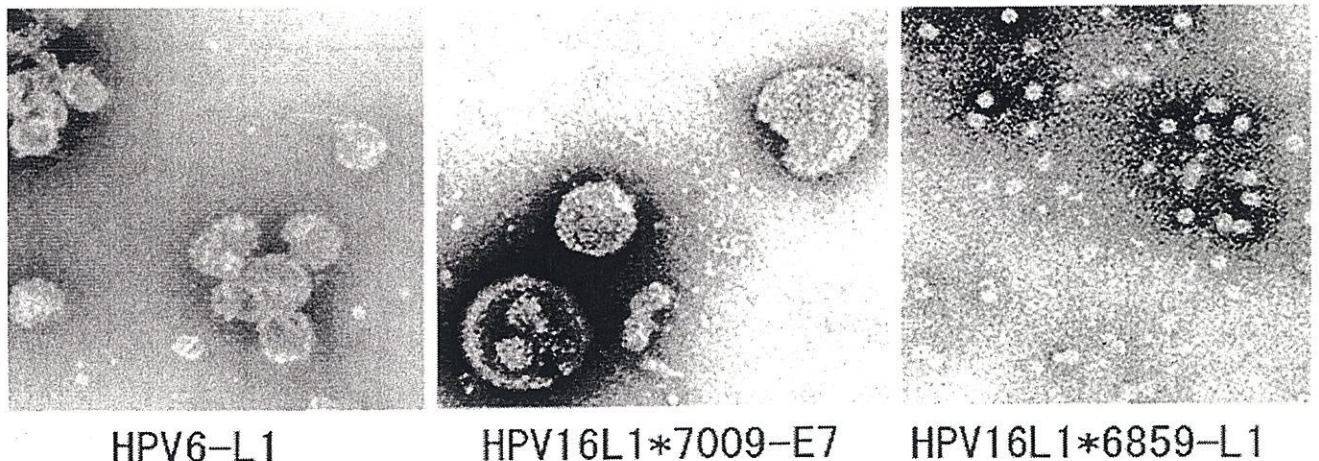


図 1. HPV16-L1-E7 construct

酵母に導入したクローンを、thiamine の欠如培地で培養し L1-E7 蛋白を発現させた。発現は抗 HPV16L1 抗体を用いて Western blot 法にて確認した。それぞれの L1-E7 construct から kD のバンドを認めた (図 2)。次にそれぞれのクローンを約 2 L ずつ培養し、破壊の後、CsCl-gradient 超遠心法にて L1-E7 分画を抽出し、電子顕微鏡による観察を行ったところ、L17009-E7 からは VLP 様構造物を認めた (図 2 A) が、L1-6859-E7 では、capsomere 様の構造のみ (図 2 B)、L1*7135-E7 ではそれらの構造物を認めなかった。次に、HPV16L1*7009-E7 粒子を電子顕微鏡下に HPV16L1 抗体で標識したところ、粒子様構造の半分のみ標識された (図 3) ことから、粒子の半分は正しい高次構造を取っていない可能性が示唆された。E 7 抗体による評価は行っていない。



Immuno-gold staining in electron microscopy

HPV 16 L1-E7 VLP
Ab: anti-HPV16 L1

HPV 16 L1-VLP
Ab: anti-HPV16 L1

HPV 16 L1-VLP
Ab: control

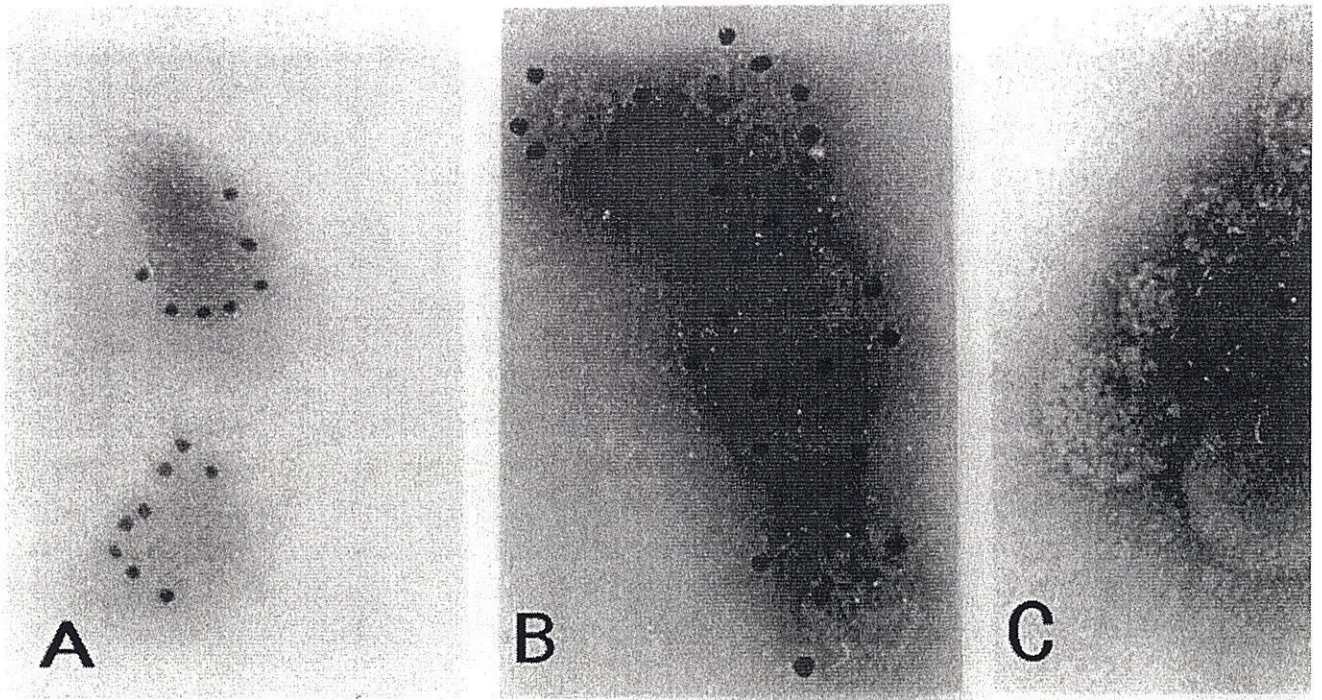


図3. A: HPV16L1*7009-E7 VLP を HPV16L1 抗体で標識, B: HPV16-VLP, C: HPV16L1*7009-E7 VLP を HPV-E2 抗体で標識

発表論文

1. 北陸地方の若い女性の子宮頸部における性感染症（ヒトパピローマウイルス、クラミジア、淋菌）の危険因子の解析 安田英代、笹川寿之、中野隆、山崎洋、井上正樹 日本性感染症学会 14, 60-68, 2003.
2. Sasagawa T, Rose RC et al. Mucosal immunoglobulin-A and -G responses to oncogenic human papilloma virus capsids. *Int J Cancer*. 104, 329-335, 2003.
3. Sasagawa T, Human papillomavirus infection and cervical cancer, *Biomedical Reviews*, 14, 75-93, 2003.
4. Sasagawa T., Tani M. et al, A human papillomavirus type16 vaccine by oral delivery of L1 protein, *Virus Res*. 101, 81-90, 2005.
5. Sasagawa T, Yasuda H, et al. Sexual behavior and cervical high-risk human papillomavirus (HPV) infections in Japanese women. *Sexually Transmitted Infection*. 81, 2005.
6. Kim SJ, Lee C, Lee SY et al., Enhanced immunogenicity of human papillomavirus 16 L1 genetic vaccines fused to an ER-targeting secretory signal peptide and RANTES. *Gene Therapy* 10, 1268-1273, 2003.
7. Minemoto Y, Uchida S. et al. Loss of p53 induces M-phase retardation following G2 DNA damage checkpoint abrogation. *Arch. Biochem. and Biophysics* 412, 13-19, 2003.
8. Qi B, Qi Y, Watari A, et al, Pro-apoptotic ASY/Nogo-B protein associates with ASYIP. *J Cell Physiol.*, 196, 312-318, 2003.
9. Shimakage M, Kawahara K. et al. Expression of Epstein-Barr virus in thyroid carcinoma correlated with tumor progression. *Human pathology* 34, 1170-1177, 2003.
10. Sasagawa T, Human papillomavirus infection and cervical cancer, *Biomedical Reviews*, 14, 75-93, 2003.
11. 笹川寿之(金沢大学 医学部保健学科), 安田英代, 宮澤貴磨呂, 石古博昭, 保科眞二性風俗従事者の咽頭ヒトパピローマウイルス(HPV)感染、日本性感染症学会誌(0917-0324)15巻, 154-160, 2004.
12. Azar KK, H. Yasuda, M. et al., Increased secretion patterns of Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions, *Human Pathol*. 35, 1376-1384, 2004.