

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム セットアップスキーム (ACT-MS)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) カチオン化ナノゲルを用いた HPV 経鼻治療ワクチン開発研究
(英語) Development of cationic nanogel-based nasal therapeutic HPV vaccine

研究開発実施期間: 令和元年7月26日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 清野 宏
(英語) Hiroshi Kiyono

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人 東京大学・医科学研究所 特任教授部門 粘膜免疫学部門・特任教授
(英語) Project professor, Division of Mucosal Immunology, IMSUT Distinguished Professor Units,
The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

II 研究開発の概要

■ 研究の目的

ヒトパピローマウイルス (HPV) は子宮頸がんの原因ウイルスで、癌関連蛋白質E7の発現が子宮頸がんの進展に関連している。現行では、HPV感染に対する効果的な予防ワクチンが臨床使用されているが、初期感染には有効であるものの、既感染者には無効で、また発癌に対する予納効果もない。そこで、我々は、新規経粘膜ドラッグデリバリーシステムであるカチオン化ナノゲルと、子宮頸がん発症に関連するHPV型由来の発癌性を排除したE7変異抗原および細胞性免疫誘導性の粘膜アジュバントを組み合わせた子宮頸がんのための新規免疫療法として経鼻治療ワクチンの開発を目指す。本子宮頸がん経鼻治療ワクチンは、E7特異的な細胞性免疫応答を生殖器粘および全身に誘導し、細胞傷害性T細胞により子宮頸がんを攻撃・排除することをコンセプトとする。現在開発中の子宮頸がん免疫療法のひとつが注射型で、全身における免疫誘導には優れている反面、発癌局所である子宮頸部を含む粘膜面での免疫誘導には非効率的である。一方、カチオン化ナノゲルに基づく経鼻治療ワクチンは、リンパ球の粘膜帰巢経路を介して生殖器粘膜と全身に抗原特異的な免疫応答を誘導する特徴を持つことから、子宮頸部での効率良い治療効果が期待できると考えている。

■ 成果の概要

本研究開発は、ナノゲル HPV 経鼻治療ワクチン開発に向けたワクチン抗原の設計および調製、ワクチン抗原とカチオン化ナノゲルおよび粘膜アジュバントを組み合わせたマウス経鼻免疫試験による HPV 特異的免疫応答の解析、および、HPV 治療ワクチン効果評価系の構築とその評価を中心に実施した。なかでも、HPV 感染モデルや子宮頸がんモデルが無いことから、子宮頸がん特異的な E7 タンパク質を過剰に発現する細胞株を用いた腫瘍移植モデルを構築し、ワクチン治療効果を子宮頸部で評価することを目標とした。

はじめに、ナノゲルを基盤とした HPV 経鼻治療ワクチンのためのワクチン抗原を設計し、その発現精製を実施した。本ワクチン開発では、発がん過程に深く関与している E7 を標的とするが、ワクチン抗原としては、E7 蛋白質中のがん抑制遺伝子産物 pRB に結合する活性を欠損させることで潜在的な E7 の発がん性を排除した E7 変異体を用いた。疫学的に子宮頸がんの発症に関連する HPV 型由来 E7 変異配列を用いて発現ベクターを構築後、組換えタンパク質を作製精製しワクチン抗原とした。

ナノゲル化したワクチン抗原は粘膜アジュバントと組み合わせてマウスに経鼻免疫し、免疫誘導組織や粘膜組織から細胞を単離し、抗原特異的 IFN γ 産生細胞やグランザイム産生細胞を ELISPOT アッセイで計測した。その結果、未免疫群に比し、HPV 経鼻治療ワクチン群において E7 抗原特異的 CTL や Th1 などが誘導されてくることを確認した。

次に、ナノゲル HPV 経鼻治療ワクチンの抗腫瘍効果を解析するための評価系の構築を進めた。HPV 感染モデルや子宮頸がんマウスモデルが存在しないことから、E7 を発現する細胞株 TC-1 をジョーンズホプキンス大学の T. C. Wu 教授より分与いただき、IVIS イメージングシステムで腫瘍形成を可視化するために外来性にルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞株 TC-1-Luc を樹立した。次に、TC-1-Luc をマウス鼠径部または子宮頸部に移植して腫瘍が肥大化する移植条件を設定し、腫瘍移植マウスに、ナノゲル HPV 経鼻治療ワクチンを投与すると、未治療群と比較して、明らかな腫瘍退縮を認める個体や腫瘍の肥大化が抑制傾向にある個体が観察された。この抗腫瘍効果は個体差が認められ、その原因を追究するために腫瘍塊から細胞を単離し、抗原特異的 CTL や制御性 T 細胞などの割合をフローサイトメトリーなどで解析した。

一方、臨床応用を視野に、ヒト末梢血単核球を刺激して誘導される I 型インターフェロンを指標にして、本ナノゲル HPV 経鼻治療ワクチンと組み合わせる有効な粘膜アジュバントの選定を達成した。

■ 研究成果の意義と今後の課題

子宮頸部における効果的な免疫誘導という観点から、経鼻ルートは極めて効率的な手段と考えられる。実際、経鼻ワクチンの効果的なデリバリーシステムであるカチオン化ナノゲルを用いた HPV 治療ワクチンの経鼻免疫により、子宮頸部における抗原特異的免疫応答の増強のみならず、抗腫瘍効果という観点においても効果的であることがマウス腫瘍移植モデルを用いて実証され、治療ワクチンとしての潜在的可能性を提示するに至った。ワクチン有効性のさらなる理解のために、分子メカニズムの解明も進めていきたいと考えている。一方、安全性の観点では、先行して開発中のカチオン化ナノゲルデリバリーシステムを用いた肺炎球菌ワクチン開発において、アカゲザルを用いた解析によりナノゲルと組み合わせて経鼻免疫した標識抗原がサルの嗅球や脳には移行しないことを明らかにし、カチオン化ナノゲルデリバリーシステムの高い安全性が実証されている。経鼻免疫ルートによる HPV 治療ワクチン開発は他にはなく、新規ドラッグデリバリーシステムに基づく本ナノゲル HPV 経鼻治療ワクチンは、(1) カチオン化ナノゲルを用いた抗原デリバリーシステムによる効率的な免疫応答誘導、(2) 経鼻免疫応答の特性を活用した子宮頸部局所への免疫効果の誘導、および (3) 副作用の少ない安全性の高いワクチン、という特徴を備えた他には類を見ない画期的な新規治療ワクチン候補と捉えられる。将来的な臨床応用に向けて、本治療ワクチンの有効性の向上に向けたワクチンドーズや投与タイミングなどの最適化、標的とする病期によっては免疫チェックポイント阻害剤との併用療法の可能性なども含めて継続的に開発に取り組んでいきたいと考えている。

■ Background and Aim

Human papillomavirus (HPV) is a causative virus for cervical cancer and HPV oncoprotein E7 play a critical role in the development of HPV-associated cancers through reacting with the tumor suppressor gene product pRb. Currently, commercially available prophylactic HPV vaccines are clinically used for the preventing HPV infections. However, these prophylactic HPV vaccines do not have therapeutic effects against pre-existing HPV infections and HPV-associated cancers. Therefore, therapeutic vaccine that can directly target and kill the infected cells is urgently and clinically required. Based on the above background, our proposal aims to the development of an HPV therapeutic nasal vaccine with inactive E7 mutant antigen. To construct the inactive E7 proteins for vaccination, vaccine antigen is designed to inhibit their oncogenic functions of pRb binding site in E7 protein. We will adopt a cationic cholesterol pullulan (cCHP) nanogel which was originally developed by our laboratory as a nasal vaccine antigen delivery vehicle to combine with E7 mutant protein and a mucosal adjuvant to induce cellular immunity. Many of HPV therapeutic vaccines under development are injection-type vaccines. Although the injection-type of vaccine efficiently elicit systemic immunity, it is inefficient for the induction of immune responses at the mucosal surfaces including those of reproductive tissues. On the other hand, mucosal vaccines including cCHP nanogel system are specialized for effectively inducing both systemic and mucosal immunity. Especially nasal vaccines can induce antigen-specific immune responses at mucosal surfaces of reproductive tissues via the nasal-reproductive homing system of immune cells. Thus, our cCHP nanogel-based HPV therapeutic vaccine could be an effective vaccine candidate for cervical cancer. On the other hand, we performed the selection of effective mucosal adjuvant to be combined with the cCHP nanogel HPV nasal therapeutic vaccine by measuring type I interferon produced by adjuvant stimulated human peripheral blood mononuclear cells for a clinical application of the vaccine.

■ Achievement

We incorporated a recombinant E7 mutant protein into cCHP nanogel together with a mucosal adjuvant and administered nasally to mice. After the vaccination, several tissues were isolated for the preparation of lymphocytes and IFN γ -producing cells or granzyme-producing cells were analyzed by ELISPOT assay. The results showed that the E7-specific CTLs and Th1 were induced both in systemic compartment and mucosal tissue such a cervicovaginal tissue of the cCHP nanogel HPV nasal therapeutic vaccinated mice, compared to the unimmunized mice. In the next step, we established an in vivo imaging system to visualize and monitor the tumor in the transplantation mouse model. E7-expressed TC-1 cell line which kindly gifted by Prof. T.C. Wu from Johns Hopkins University was transduced a luciferase gene (TC-1-Luc). The TC-1-Luc was transplanted in the mouse cervix, then the mice were nasally vaccinated with the cCHP nanogel nasal therapeutic vaccine. There were some individual differences, but some mice showed clear tumor regression and others showed a tendency to suppress tumor enlargement when compared to the unimmunized group. We also isolated lymphocytes from tumor and analyzed antigen-specific CTL or regulatory T cells by Flow Cytometry to determine the cause of the differences in anti-tumor effects. Furthermore, we performed a selection of effective mucosal adjuvant to be combined with the cCHP nanogel HPV nasal therapeutic vaccine by measuring type I interferon induced by stimulating human peripheral blood mononuclear cells for a clinical application of the vaccine.

■ Significance and Future direction

We demonstrated that the cCHP nanogel HPV nasal therapeutic vaccine induces antigen-specific cellular immune responses following to provide anti-tumor effect in the cervicovaginal tissue indicating its potential as a therapeutic vaccine. To understand our vaccine efficacy, we will elucidate the molecular mechanisms. Regarding safety concern of the vaccine, a pneumococcal antigen administrated with the cCHP nanogel in rhesus monkeys did not migrate olfactory bulbs and brain, demonstrating that the high safety of the cCHP nanogel delivery system.

For future clinical application, we continuously proceed the development of the cCHP nanogel HPV nasal therapeutic vaccine, including optimization of the vaccine dose and timing of administration to improve its efficacy, as well as the possibility of combination therapy with immune checkpoint inhibitors.

III 事後評価総合所見

本課題では、抗原の設計および調製、粘膜アジュバントの選定、それらを用いたナノゲル型経鼻ワクチンの *in vitro*, *in vivo* における発がん予防効果および抗腫瘍活性の確認など、当初設定した実施項目において良好な結果を得ており、当初目標を概ね達成したことが高く評価された。

一方、腫瘍移植マウスにおける本ワクチンの抗腫瘍効果に個体差があり、この結果の解析とその解決が必要である。また、ヒトへの適用を念頭に、アジュバントの検討を追加予算で実施しているが、更にヒト子宮頸がん細胞を使った PDX モデル系による評価も必要となる。

今後、セットアップ企業である株式会社 HanaVax との連携のもと、事業会社との提携も含め、臨床試験に向けた更なるステージアップを期待する。