

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 臨床研究・治験推進研究事業
(英語) Project Promoting Clinical Trials for Development of New Drugs
- 研究開発課題名： (日本語) 子宮頸癌に対する粘膜免疫を介したヒトパピローマウイルス(HPV)分子標的免疫療法の臨床応用に関する研究
(英語) The development of a HPV molecule-targeting immunotherapy for treatment of CIN (Cervical Intraepithelial Neoplasia), precursor lesions of cervical cancer, through mucosal immune system.
- 研究開発担当者 (日本語) 医学部 教授 川名 敬
所属 役職 氏名： (英語) Kei Kawana, Chief Professor, Nihon University School of Medicine
- 実施期間： 平成 28 年 9 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) HPV 分子標的免疫療法の臨床試験の実施・評価と有効性の検討
開発課題名： (英語) Study on safety and efficacy of a novel HPV molecule-targeting Immunotherapy, an explorative placebo-controlled double-blind randomized clinical trial
- 研究開発分担者 (日本語) 東京大学 医学部附属病院
所属 役職 氏名： 助教 富尾賢介、教授 藤井知行、准教授 永松 健
(英語) The University of Tokyo Hospital
Tomoyuki Fujii, a Chief Professor
Takeshi Nagamatsu, an Associate Professor
Kensuke Tomio, an Assistant Professor
- 分担研究 (日本語) HPV 分子発現型乳酸菌の最適化と作製法の確立と製剤化
開発課題名： (英語) Construction of the HPV vaccine using Lactobacillus and optimization for medicine

研究開発分担者 (日本語) 東京農業大学 教授 五十君 静信
所属 役職 氏名 : (英語) Shizunobu Igimi, a Professor of Tokyo University of Agriculture

分担研究 (日本語) 子宮頸部粘膜リンパ球を用いた HPV 分子特異的免疫応答の評価
開発課題名 : (英語) Evaluation of immune response against HPV

研究開発分担者 (日本語) 国立感染症研究所 室長 立川 愛
所属 役職 氏名 : (英語) Ai Tachikawa, a Division leader, National Institute of Infectious
Diseases (NIID)

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 臨床研究・治験推進研究事業
(英語) Project Promoting Clinical Trials for Development of New Drugs
- 研究開発課題名： (日本語) 子宮頸癌に対する粘膜免疫を介したヒトパピローマウイルス(HPV)分子標的免疫療法の臨床応用に関する研究
(英語) The development of a HPV molecule-targeting immunotherapy for treatment of CIN (Cervical Intraepithelial Neoplasia), precursor lesions of cervical cancer, through mucosal immune system.
- 研究開発担当者 (日本語) 医学部附属病院 助教 富尾 賢介
所属 役職 氏名： (英語) Kensuke Tomio, Assistant Professor,
The University of Tokyo Hospital,
- 実施期間： 平成 28 年 9 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) HPV 分子標的免疫療法の臨床試験の実施・評価と有効性の検討
開発課題名： (英語) Study on safety and efficacy of a novel HPV molecule-targeting immunotherapy, an explorative placebo-controlled double-blind randomized clinical trial
- 研究開発分担者 (日本語) 東京大学 医学部附属病院
助教 富尾賢介、教授 藤井知行、准教授 永松 健
所属 役職 氏名： (英語) The University of Tokyo Hospital
Assistant Professor, Kensuke Tomio
Chief Professor, Tomoyuki Fujii
Associate Professor, Takeshi Nagamatsu

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- 研究開発代表者：日本大学医学部 産婦人科学系産婦人科分野 川名 敬

II. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 8 件)

1. Sato M, Kawana K, Adachi K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, Nishida H, Inoue T, Taguchi A, Ogishima J, Eguchi S, Yamashita A, Tomio K, Wada-Hiraike O, Oda K, Nagamatsu T, Osuga Y, Fujii T, Regeneration of cervical reserve cell-like cells from human induced pluripotent stem cells (iPSCs): A new approach to finding targets for cervical cancer stem cell treatment, *Oncotarget*, doi: 10.18632/oncotarget.16783, 2017
2. Nakamura H, Taguchi A, Kawana K, Yoshida M, Fujimoto A, Ogishima J, Sato M, Inoue T, Nishida H, Furuya H, Tomio K, Adachi K, Wada-Hiraike O, Oda K, Nagamatsu T, Osuga Y, Fujii T, STAT3 activity regulates the sensitivity of cervical cancer cells to TRAIL-induced apoptosis, *Int J Oncol*, 2016, doi: 10.3892/ijo.2016.3681
3. Inoue T, Adachi K, Kawana K, Taguchi A, Nagamatsu T, Fujimoto A, Tomio K, Yamashita A, Kojima-Eguchi S, Nishida H, Kamoto H, Sato M, Yoshida M, Takahashi J, Mori M, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Oda K, Osuga Y, Fujii T, Cancer-associated fibroblasts (CAFs) suppress killer activity of natural killer (NK) cell through downregulation of poliovirus receptor (PVR), a ligand for NK activating receptor, *Int J Oncol*, 2016, doi: 10.3892/ijo.2016.3631.
4. Fujimoto A, Kawana K, Taguchi A, Adachi K, Sato M, Nakamura H, Ogishima J, Yoshida M, Inoue T, Nishida H, Tomio K, Yamashita A, Matsumoto Y, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Oda K, Nagamatsu T, Osuga Y, Fujii T, Inhibition of endoplasmic reticulum (ER) stress sensitizes cancer stem-like cells to ER stress-mediated apoptosis, *Oncotarget*, 7: 51854-51864, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.10126.,
5. Sato M, Kawana K, Adachi K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, Nishida H, Inoue T, Taguchi A, Takahashi J, Kojima S, Yamashita A, Tomio K, Wada-Hiraike O, Oda K, Nagamatsu T, Osuga Y, Fujii T, Spheroid cancer stem cells display reprogrammed metabolism and obtain energy by actively running the tricarboxylic acid (TCA) cycle, *Oncotarget*, 7: 33297-33305, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.8947
6. Nishida H, Matsumoto Y, Kawana K, Christie RJ, Naito M, Kim BS, Toh K, Min HS, Yi Y, Matsumoto Y, Kim HJ, Miyata K, Taguchi A, Tomio K, Yamashita A, Inoue T, Nakamura H, Fujimoto A, Sato M, Yoshida M, Adachi K, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Oda K, Nagamatsu T, Nishiyama N, Kataoka K, Osuga Y, Fujii T, Systemic delivery of siRNA by actively targeted polyion complex micelles for silencing the E6 and E7 human papillomavirus oncogenes, *J Controlled Release*, Jun 10;231:29-37. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.03.016., 2016

7. Sato M, Kawana K, Adachi K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, Nishida H, Inoue T, Taguchi A, Takahashi J, Eguchi S, Yamashita A, Tomio K, Nagamatsu T, Wada-Hiraike O, Oda K, Osuga Y, Fujii T, Decreased Expression of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1(PAI-1) Is Involved in Degradation of Extracellular Matrix Surrounding Cervical Cancer Stem Cells, *Int J Oncol*, 48: 829-835, 2016, doi: 10.3892/ijo.2015.3283
8. Sato M, Kawana K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, Nishida H, Inoue T, Taguchi A, Takahashi J, Adachi K, Nagasaka K, Matsumoto Y, Wada-Hiraike O, Oda K, Osuga Y, Fujii T, Clinical significance of gremlin 1 in cervical cancer and its effects on cancer stem cells maintenance, *Oncol Reports*, 35: 391-397, 2016, doi: 10.3892/or.2015.4367

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

無し

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

無し

(4) 特許出願

無し

II. 成果の概要（総括研究報告）

（1） GLBL101c 試験：

昨年度から引き続き、HPV16 単独陽性の CIN2 に対する GLBL101c（HPV16E7 発現乳酸菌の第一世代）の有効性と安全性を検討するためのプラセボ比較による二重盲検ランダム化比較試験を探索的臨床研究として実施した。2017 年 3 月時点で 38 例の登録を終え、2017 年度上半期に試験を終了し、解析を行う。HPV の E7 分子に対する細胞性免疫誘導能を立川博士によって国立感染症研究所で評価する。これらの結果を論文化するとともに、新型 HPV16E7 発現乳酸菌（IGMKK16E7）の医師主導治験に向けた参考データとして活用する。

（2） IGMKK16E7 の開発：

昨年度までに新型 HPV16E7 発現乳酸菌としてコード名：IGMKK16E7 の作製に成功し、特許出願を終えている（名称：乳酸菌含有組成物、HPV 感染症及び HPV 関連腫瘍の少なくともいずれかの治療用経口医薬組成物、及び粘膜免疫誘導剤、国際出願日：2016/1/28）。本年度は、GMP 製造した製剤に基準値を超える細菌混入があることが判明したため、2016 年 12 月に予定していた臨床研究（POC 試験）は実施しなかった。製造所・製造工程を旭硝子社に変更し、治験薬の GMP 製造（GILSP 大臣確認申請後）を行った。GMP 製造された IGMKK16E7 の薬理効果を動物実験で再確認したところ、GMP 製造された IGMKK16E7 の抗 E7 細胞性免疫誘導能（薬理効果）が GLBL101c と比べて 3-5 倍高いことをマウス実験によって確認した。GLBL101c よりも薬理効果が明らかに高いことから本研究では、IGMKK16E7 に一本化して医師主導治験を実施する方針とした。PMDA との事前面談、対面助言（2017 年 2 月 22 日）を経て、現在非臨床試験を実施中である。2017 年秋の治験申請をめざしている。

（3） E7 に対する細胞性免疫誘導性能検査の開発：

立川博士によって E7 に対する細胞性免疫誘導能の評価系を確立した。これらを用いて臨床試験の免疫誘導能を多角的に評価することが可能となった。従前の子宮頸部単核球（CMC）中の E7 特異的 T 細胞検出のための ELISPOT 法に加え、末梢血（PBMC）を用いた抗 E7 細胞性免疫誘導能の評価法の樹立を検討した。CMC, PBMC いずれも E7 を認識するリンパ球数が微量であるため、CMC を用いた ELISpot 法に加え、PBMC を用いた E7 による刺激培養を行う手法を検討し、ELISPOT 法、サイトカインアッセイ法を含む、抗 E7 特異的免疫応答を評価した。これより従前の CMC 評価に PBMC 評価も加わったことで免疫学的評価の精度が高くなることが期待される。先行研究である GLBL101c（POC）試験の臨床検体を用いてバリデーションを行う。この検査法の確立により、現在実施中の GLBL101c 試験および来年度の医師主導治験の薬理薬効評価が用いる。

（4） 子宮頸癌の癌幹細胞と免疫排除機構に関する研究：

E7 発現乳酸菌製剤の薬理効果を阻害する因子を検討するために、CIN が発症する子宮頸部の組織幹細胞（リザーブ細胞）とそこから発生する子宮頸癌の癌幹細胞の特徴を明らかにした。アポトーシス回避機構、癌幹細胞に特徴的なエネルギー代謝の変化を見出し、その阻害剤の探索を行った。これらによって IGMKK16E7 の有効性を相乗的に高める薬剤候補を見出した。

(1) Exploratory clinical trial (phase IIb) of GLBL101c :

The exploratory clinical trial of GLBL101c, that is the first generation of HPV16 E7-expressing *Lactobacillus*, is currently under way. We conduct placebo-controlled double-blind randomized study to investigate the safety and efficacy of GLBL101c for treatment of HPV16-positive CIN2. In this trial, 40 cases with CIN2 will be enrolled and 38 cases have been enrolled at March 2017. We plan to finish the trial and analyze the clinical and immunological efficacy of GLBL101c until September 2017. Dr. Tachikawa in NIID Japan has established advanced methodology for evaluation of cellular immune responses to the agent and will utilize it for the current trial. The clinical and laboratory data obtained from the current trial will be available for application of next clinical of IGMKK16E7.

(2) Development of IGMKK16E7, a next generation type of E7-expressing *Lactobacillus*-based agent

We succeeded the development of a new type of HPV16E7-expressing *Lactobacillus* (IGMKK16E7) and applied international patent of the agent at January 2016. We generated the new agent by good-manufacturing practice (GMP) for clinical trial. Our former load map suggested POC study had been conducted at December 2016, however, the GMP agent was not available at that time. Then we changed the load map as well as industry for GMP production of the agent. The GMP product of IGMKK16E7 was available and we confirm the inducible effect of anti-E7 cellular immune responses (CMI) in mice (3-5 times higher induction of anti-E7 CMI than that of GLBL101c). Then, we will conduct a Phase I/II clinical trial of IGMKK16E7 GLBL101c at December 2017.

(3) Development of advanced evaluation system for anti-E7 cellular immune responses in patients administered with E7-expressing *Lactobacillus*-based agent

Dr. Tachikawa established advanced evaluation system for anti-E7 cellular immune responses against the E7-expressing *Lactobacillus*. The former system utilized cervical mononuclear cells (CMC) which were obtained too little to be used for reproducible assay. Then Dr. Tachikawa developed a new system using PBMC for E7-specific CMI. The PBMC is enough to be used stably for ELISPOT as well as cytokine release assay. She will evaluate (mucosal) immunological responses elicited by GLBL101c and IGMKK16E7 using both CMC and PBMC obtained from the enrolled patients. The advanced assay system will be validated by using samples from the current GLBL101c clinical trial before the clinical trial of IGMKK16E7.

(4) Study on new target for immune-clearance of cervical cancer stem cell

We investigated any inhibitory factors to suppress anti-tumor immune responses in the vaccinated patients focusing on cervical cancer stem cell which provides immunoevasive effects on immunotherapy. We demonstrated several features of cervical cancer stem cells, including metabolism, anti-apoptosis, immunoevasion, and metastasis, and inhibition of cancer stem cell functions using several inhibitors.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 2 件、国際誌 8 件)

1. Sato M, Kawana K, Adachi K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, Nishida H, Inoue T, Taguchi A, Ogishima J, Eguchi S, Yamashita A, Tomio K, Wada-Hiraike O, Oda K, Nagamatsu T, Osuga Y, Fujii T, Regeneration of cervical reserve cell-like cells from human induced pluripotent stem cells (iPSCs): A new approach to finding targets for cervical cancer stem cell treatment, *Oncotarget*, doi: 10.18632/oncotarget.16783, 2017
2. Nakamura H, Taguchi A, Kawana K, Yoshida M, Fujimoto A, Ogishima J, Sato M, Inoue T, Nishida H, Furuya H, Tomio K, Adachi K, Wada-Hiraike O, Oda K, Nagamatsu T, Osuga Y, Fujii T, STAT3 activity regulates the sensitivity of cervical cancer cells to TRAIL-induced apoptosis, *Int J Oncol*, 2016, doi: 10.3892/ijo.2016.3681
3. Inoue T, Adachi K, Kawana K, Taguchi A, Nagamatsu T, Fujimoto A, Tomio K, Yamashita A, Kojima-Eguchi S, Nishida H, Kamoto H, Sato M, Yoshida M, Takahashi J, Mori M, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Oda K, Osuga Y, Fujii T, Cancer-associated fibroblast suppresses killing activity of natural killer cells through downregulation of poliovirus receptor (PVR/CD155), a ligand of activating NK receptor., *Int J Oncol*. 2016 Oct;49(4):1297-304. doi: 10.3892/ijo.2016.3631.
4. Fujimoto A, Kawana K, Taguchi A, Adachi K, Sato M, Nakamura H, Ogishima J, Yoshida M, Inoue T, Nishida H, Tomio K, Yamashita A, Matsumoto Y, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Oda K, Nagamatsu T, Osuga Y, Fujii T, Inhibition of endoplasmic reticulum (ER) stress sensors sensitizes cancer stem-like cells to ER stress-mediated apoptosis, *Oncotarget*, 7: 51854-51864, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.10126.,
5. Sato M, Kawana K, Adachi K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, Nishida H, Inoue T, Taguchi A, Takahashi J, Kojima S, Yamashita A, Tomio K, Wada-Hiraike O, Oda K, Nagamatsu T, Osuga Y, Fujii T, Spheroid cancer stem cells display reprogrammed metabolism and obtain energy by actively running the tricarboxylic acid (TCA) cycle, *Oncotarget*, 7: 33297-33305, doi: 10.18632/oncotarget.8947,2016
6. Nishida H, Matsumoto Y, Kawana K, Christie RJ, Naito M, Kim BS, Toh K, Min HS, Yi Y, Matsumoto Y, Kim HJ, Miyata K, Taguchi A, Tomio K, Yamashita A, Inoue T, Nakamura H, Fujimoto A, Sato M, Yoshida M, Adachi K, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Oda K, Nagamatsu T, Nishiyama N, Kataoka K, Osuga Y, Fujii T, Systemic delivery of siRNA by actively targeted polyion complex micelles for silencing the E6 and E7 human papillomavirus oncogenes, *J Controlled Release*, Jun 10;231:29-37. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.03.016., 2016
7. Sato M, Kawana K, Adachi K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, Nishida H, Inoue T, Taguchi A, Takahashi J, Eguchi S, Yamashita A, Tomio K, Nagamatsu T, Wada-Hiraike O, Oda K, Osuga Y, Fujii T, Decreased Expression of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1(PAI-1) Is Involved in Degradation of Extracellular Matrix Surrounding Cervical Cancer Stem Cells, *Int J Oncol*, 48: 829-835, 2016, doi: 10.3892/ijo.2015.3283

8. Sato M, Kawana K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, Nishida H, Inoue T, Taguchi A, Takahashi J, Adachi K, Nagasaka K, Matsumoto Y, Wada-Hiraike O, Oda K, Osuga Y, Fujii T, Clinical significance of gremlin 1 in cervical cancer and its effects on cancer stem cells maintenance, *Oncol Reports*, 35: 391-397, 2016, doi: 10.3892/or.2015.4367
9. 足立克之・川名 敬、HPV 感染細胞を標的とした免疫療法の開発、*医学のあゆみ*、258: 165-169, 2016
10. 川名 敬、ヒトパピローマウイルス（HPV）ワクチンの現状、*感染症・炎症・免疫*、46: 2-9, 2016

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Development of a novel HPV E7-expressing Lactobacillus-based vaccine for induction of mucosal immune responses to HPV-related neoplasia. ポスター, Kawana K, Hara A, Taguchi A, Igimi S, Society for Reproductive Investigation 64th Annual Scientific Meeting, (Florida, USA) , 2017/3/18, 国外
2. HPV 感染に対する免疫制御～予防と治療の将来展望～, 口頭, 川名 敬, 第 29 回日本性感染症学会（岡山）, 教育講演、2016/12/3, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. HPV ワクチンの必要性和今後の行方、川名 敬、市民公開講座 NPO 法人 医師と団塊シニアの会主催「ワクチンを考える講演会：定期接種化に向けて、いま何をしなければいけないか」、2017/1/21, 国内

(4) 特許出願

無し

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金 (臨床研究・治験推進研究事業) 成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 臨床研究・治験推進研究事業
(英語) Project Promoting Clinical Trials for Development of New Drugs

補助事業課題名 : (日本語) 子宮頸癌に対する粘膜免疫を介したヒトパピローマウイルス(HPV)
分子標的免疫療法の臨床応用に関する研究
(英語) The explorative clinical trial of a medicine for treatment of CIN
(Cervical Intraepithelial Neoplasia) using lactobacillus to HPV16
positive CIN 2.

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所 室長 立川 愛
所属 役職 氏名 : (英語) National Institute of Infectious Diseases, Division leader,
Ai Tachikawa

実施期間 : 平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月 31日

分担研究 (日本語) 子宮頸部粘膜リンパ球を用いた HPV 分子特異的免疫応答の評価
分担課題名 : (英語) Evaluation of immune response against HPV

補助事業分担者 (日本語) 国立感染症研究所 室長 立川 愛
所属 役職 氏名 : (英語) National Institute of Infectious Diseases Division leader
Ai Tachikawa

II. 成果の概要（総括研究報告）

補助事業代表者：日本大学医学部・産婦人科学系産婦人科分野・川名 敬
総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）
該当なし
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
該当なし
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
- (4) 特許出願
該当なし