

第17回 神澤医学賞受賞講演 要旨

「産婦人科領域における各種疾患の免疫学的病態生理の解明と それに基づく新規の予防・治療法の開発に向けた研究」

Elucidation of immunological pathophysiology of various diseases in obstetrics and gynecology and the research for the development of new prevention and therapeutics

東京大学医学部附属病院女性外科 准教授

川名 敬

はじめに

産婦人科疾患において、病変とそれを取り巻く生体側の環境によるクロストークは常に病態生理を調節、修飾している。本研究では、産婦人科疾患に対する個々の免疫反応・炎症反応の違いに注目し、産婦人科疾患に対する免疫学的病態生理を解明することと、免疫反応を利用した新たな治療法・予防法を開発することを主眼においた研究を行った。

研究の特徴は、疾患と宿主の免疫反応をキーワードとして、リプロダクティブエイジの疾患を中心に、腫瘍学、周産期医学、生殖内分泌学、感染症学と産婦人科学全般に横断的な広がりを持っていることである。

(1) HPV と抗 HPV 免疫誘導に関する 2 つの TR 研究

ライフワークとして 20 年近くヒトパピローマウイルス(以下 HPV)と免疫に関する研究を継続している。その中で予防的・治療的 HPV ワクチンに関する研究は、ウイルス学、免疫学の基礎的研究に立脚し、その延長として新規ワクチンの開発、臨床試験に至った。

【次世代型予防ワクチンの開発】

予防的 HPV ワクチンの研究では、感染実験モデルの確立が隘路となっていた時代に、人工的な HPV 感染系を世界で初めて樹立し(1)、その系を使ってワクチンの候補の探索を行った。それにより、全ての HPV タイプの感染を阻害できる型共通性の予防ワクチンの候補を見いだした(2, 3)。

世界的に普及している HPV 予防ワクチン (2 価・4 価) のワクチン抗原は、L1 キャプシド蛋白質である。L1 は抗原性が強く、抗体誘導の優れたワクチン抗原である。しかし、その反

面、同じ HPV 型しか感染予防ができないこと、副反応が強くなること、が問題点である。そのために、既存の HPV 予防ワクチンでは HPV16, 18 型感染しか予防できず、かつ予期せぬ有害事象が社会的な問題となっている。これに対して、我々が見出したワクチン抗原は、L2 キャプシド蛋白質である。L2 は、HPV ウイルス粒子が細胞内に侵入するために必須であることから、全 HPV 型に保存された共通アミノ酸領域がある。我々はまずこの共通アミノ酸領域の中から、キャプシド表面に露出している領域を特定した(3)。次に、我々が樹立した人工的な感染実験モデルを用いて、この表面露出共通領域に対するモノクローナル抗体・抗血清を準備し、それらの抗体が複数の HPV 感染を予防できることを証明した(2, 4, 5)。

これを L2 ワクチン候補領域とし、その領域の合成ペプチドワクチンを作製し、第 I 相自主臨床試験も実施した(6)。L2 ワクチンのヒトにおける抗原性、安全性を臨床試験によって証明した。この研究は、現在日本で導入されている HPV ワクチンの欠点である型特異性を克服した次世代の予防ワクチンとしての期待を抱かせるものといえる。またこの人工的な HPV 感染系を用いた研究は臨床に応用されている(7, 8)。

【粘膜免疫を介した CIN 治療薬としての HPV 治療ワクチン】

治療的 HPV ワクチンの研究では、未だに実用化された治療的 HPV ワクチンがない現状に鑑み、子宮頸部前癌病変(CIN2-3)が粘膜病変であることに着目し、粘膜免疫の機序を利用したワクチン開発に関する研究を行った。治療的 HPV ワクチン研究は、基礎研究から始まり、実地応用を視野にいたしたトランスレーショナルリサーチへと発展した。HPV 癌蛋白質 E7 を提示した乳酸菌を作製し、経口接種することによって腸管粘膜免疫を介して、子宮頸部における抗腫瘍効果を示した。

1990 年代から HPV を標的とした免疫療法（HPV 治療ワクチンと呼ぶ）の研究は世界中で行われ、数多くのワクチン候補の臨床試験が実施されてきた(9, 10)。しかし未だに製剤化され世に出た治療薬はない。癌腫の腫瘍内では微小免疫学的環境が崩壊していることが危惧されるため、すべての臨床試験は上皮内腫瘍である CIN2-3 を対象疾患とされてきた。先行研究はすべて筋注・皮下注であり、全身性免疫を誘導する戦略であった。標的とする HPV 分子は、E7 癌蛋白質であることは先行研究でも共通している。それは、E7 がヒトにおける抗原性が強く、かつ CIN2-3 から子宮頸癌に至るまで、恒常的に発現し抗原提示されているためである。

我々は生殖器粘膜(CIN2-3 が存在する組織)の免疫システムを調べなおすことから始めた。すなわち、子宮頸部の CIN 病変から採取した CD3+T 細胞のうち、約 30%は integrin b7+ T 細胞であることを見出した(11, 12)。integrin b7 は腸管粘膜下組織であるパイエル板か腸間膜リンパ節で教育された T 細胞にのみ発現するホーミングレセプターであり、これを持つ T 細胞は“mucosal T cell”として粘膜免疫を司っていることが知られている。そこで我々は、CIN2-3 病変内に存在する細胞傷害性 T 細胞等のキラー細胞は腸管粘膜で教育されていると考えた。

次に、腸管粘膜に E7 癌蛋白質を標的とする細胞性免疫（キラー細胞）を誘導するための戦

略として、経口ワクチンを考えた。ワクチンキャリアーとして、我々は乳酸菌 *Lactobacillus casei* 株を選択した。*Casei* 株は乳酸菌の中でもキラー細胞の誘導に優れていること、ヒトでの食経験があり安全性が担保されていることからである。我々は、子宮頸癌の約半分の起因ウイルスである HPV16 型の E7 を発現させた乳酸菌 GLBL101c を製剤化した。マウスでの前臨床試験(13)を経て、E7 発現乳酸菌経口ワクチン(GLBL101c)の CIN3 に対する第 I/IIa 相自主臨床試験を実施し、薬物療法による CIN3 治療の可能性を示した(14)。この独創性と創薬化への期待から、2013 年から研究代表者として厚生労働省科学研究費補助金（医療技術実用化総合事業）を交付され、その研究資金のもと、同経口ワクチンの CIN2 に対する第 IIb 相二重盲検ランダム化比較自主臨床試験を実施中である。現行の子宮頸癌やその前癌病変に対する外科的治療は、妊娠時の早産率上昇などリプロダクティブヘルスに対する問題を抱えているが、本研究で開発した 2 つの HPV ワクチンはこれらの問題を克服した予防法や治療法になりうると期待される。

（２） 周産期異常に対する新しい分子・生理活性物質の関与

周産期学分野では、習慣性流産の原因である抗リン脂質症候群の病態の 1 つとして、リン脂質を抗原提示する CD1d に注目し、母体 NKT 細胞と絨毛 CD1d の相互作用による炎症反応が、母体抗リン脂質抗体によって惹起されることを見いだした(15, 16)。CD1d は extravillous trophoblast に高発現しており母体血を接触することを見出した(15)。また CD1d は Phosphatidylserine(PS)を抗原提示し、その PS は b2-GP1 と生体内で結合している。抗リン脂質抗体の代表である抗 b2-GP1 抗体が母体血中に存在すると、PS を介して CD1d が活性化され、サイトカイン細胞内シグナルが作動し、炎症反応が惹起されることを示した(16)。これが習慣性流産につながると考えている。

次に、抗炎症作用を有する ω 3 脂肪酸（EPA 等）が炎症誘発型（LPS 誘導型）早産を予防できることをトランスジェニックマウス実験によって示した(17)。Fat-1 マウスは、アラキドン酸等の ω 6 脂肪酸を ω 3 脂肪酸に変換できる酵素であり、fat-1 トランスジェニックマウスが LPS 誘導型早産を抑えることを発見した。次に、fat-1 マウスの胎盤のメタボローム解析によって、fat-1 マウスでは EPA の代謝産物である 18-HEPE が上昇し、PGE2, PGF2a が低下していた。そこで、18-HEPE の最終活性代謝産物であるレゾルビン(RV)E3 を正常マウスに投与すると、LPS 誘導型早産が予防できた(17)。RVE3 は数年前に発見された EPA 代謝産物であり、強い抗炎症作用を有することが知られている。本研究では、これらの ω 3 脂肪酸代謝産物が早産治療薬になりうることを示した。さらに、必須脂肪酸が経口摂取によってのみ体内に貯蓄する栄養素であることから、早産リスクのある妊婦に対する ω 3 脂肪酸を豊富に含む食事が早産予防の食事療法になることも期待される。

(3) 生殖内分泌と感染症における免疫学的病態の解明

生殖内分泌学の分野では、性ホルモンによる生殖粘膜の免疫調節機序の1つを探索した。T-betというタイプ1細胞性免疫(Th1細胞)を司る転写因子について、生殖器粘膜上皮におけるエストロゲン、プロゲステロン、プロラクチンによる発現調節メカニズムを解明し(18, 19)、また生殖器粘膜上皮の部位別の免疫反応の違いを自然免疫の免疫分子CD1dについて発現と反応性を調べ、子宮頸部上皮ではCD1dの発現が弱く、NKT細胞をはじめとする自然免疫の活性化しにくいことを示唆している(20)。このことは、リプロダクティブエイジの女性において最も問題となる性感染症の病原体にとって、子宮頸部が標的組織になっていることにつながる。さらに、クラミジア感染とHPV感染について、その感染部位となる子宮頸部粘膜上皮のCD1dが病原体の蛋白質によって消化されていることを見出した。これらの病原体による新たな免疫エスケープ機構と考えられた(21, 22)。

子宮内膜症が慢性炎症性疾患であることに注目し、トランスジェニックマウス実験等から、 ω 3脂肪酸の抗炎症作用によって子宮内膜症が制御されることを見いだした(23)。炎症誘導型の ω 6脂肪酸(アラキドン酸等)の摂取機会が増えている昨今、子宮内膜症発生・進展の予防法として ω 3脂肪酸摂取の重要性を示唆した。

今後の展望

婦人科疾患と宿主のクロストークは、病態の解明に大きな役割を果たしている。我々の研究は、細胞内の生物学だけでなく、細胞—細胞間の微小環境を紐解く研究に移行してきた(24)。特に、癌研究においては、癌遺伝子の細胞内の機能を見る時代から、癌細胞とその周辺の環境のクロストークがこれからの研究の柱の一つとなっている。そして、そのクロストークを解明することが、癌腫を越えた普遍的な治療法の開発につながると信じている。

個々の遺伝子異常に合わせて分子標的治療薬を次々と併用する「個の治療」ではなく、癌腫を越えた、または疾患カテゴリーを越えた、普遍的な“疾患と宿主の悪循環”を断ち切るチェックポイント分子を標的とした分子標的治療剤を探索していきたい。

参考文献

1. Kawana K, Yoshikawa H, Taketani Y, Yoshiike K, Kanda T.: In vitro construction of pseudovirions of human papillomavirus type 16: incorporation of plasmid DNA into reassembled L1/L2 capsids. *J Virol* 72: 10298-10300, 1998
2. Kawana K, Yoshikawa H, Taketani Y, Yoshiike K, Kanda T: Common neutralization epitope in minor capsid protein L2 of human papillomavirus types 16 and 6. *J Virol* 73: 6188-6190, 1999
3. Kawana K, Matsumoto K, Yoshikawa H, Taketani Y, Kawana T, Yoshiike K, Kanda T.: A surface immunodeterminant of human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2. *Virology* 245(2): 353-359, 1998
4. Kawana K, Kawana Y, Yoshikawa H, Taketani Y, Yoshiike K, Kanda T.: Nasal immunization of mice with peptide having a cross-neutralization epitope on minor capsid protein L2 of human papillomavirus type 16 elicit systemic and mucosal antibodies. *Vaccine* 19(11-12): 1496-1502, 2001
5. Kawana Y, Kawana K, Yoshikawa H, Taketani Y, Yoshiike K, Kanda T.: Human papillomavirus 16 minor capsid protein L2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. *J Virol* 75(5), 2331-2336, 2001
6. Kawana K, Yasugi T, Kanda T, Kino N, Oda K, Okada S, Kawana Y, Nei T, Takada T, Toyoshima S, Tsuchiya A, Kondo K, Yoshikawa H, Tsutsumi O, Taketani Y: Safety and immunogenicity of a peptide containing the cross-neutralization epitope of HPV16 L2 administered nasally in healthy volunteers. *Vaccine* 21: 4256-4260, 2003
7. Kawana K, Yasugi T, Kanda T, Kawana Y, Hirai Y, Yoshikawa H, Taketani Y: Neutralizing antibodies against oncogenic human papillomavirus (HPV) as a possible determinant of the fate of low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Biochem Biophys Res Commun* 296(1): 102-105, 2002
8. Kawana K, Yasugi T, Yoshikawa H, Kawana Y, Matsumoto K, Nakagawa S, Onda T, Kikuchi A, Fujii T, Kanda T, Taketani Y: Evidence for the presence of neutralizing antibodies against human papillomavirus type 6 in infants born to mothers with condyloma acuminata. *Am J Perinatol*, 20(1): 11-15, 2003
9. Kawana K, Yasugi T, Taketani Y: Human papillomavirus vaccines: current issues and future: Review. *Indian J Med Res*, 130: 341-347, 2009

10. Kawana K, Adachi K, Kojima S, Kozuma S, Fujii T, Therapeutic human papillomavirus (HPV) vaccines: a novel approach, *Open Virol J*, 6: 264-269, 2012
11. Kojima S, Kawana K, Fujii T, Yokoyama T, Miura S, Tomio K, Tomio A, Yamashita A, Adachi K, Sato H, Nagamatsu T, Schust DJ, Kozuma S, Taketani Y; Characterization of gut-derived intraepithelial lymphocyte (IEL) residing in human papillomavirus (HPV)-infected intraepithelial neoplastic lesions. *Am J Reprod Immunol*, 66: 435-443, 2011
12. Kojima S, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Taguchi A, Miura S, Adachi K, Nagamatsu T, Nagasaka K, Matsumoto Y, Arimoto T, Oda K, Wada-Hiraike O, Yano T, Taketani Y, Fujii T, Schust DJ, Kozuma S, The prevalence of cervical regulatory T cells in HPV-related cervical intraepithelial neoplasia (CIN) correlates inversely with spontaneous regression of CIN, *Am J Reprod Immunol*, 69(2): 134-141, 2013
13. Adachi K, Kawana K, Yokoyama T, Fujii T, Tomio A, Miura S, Tomio K, Kojima S, Oda K, Sewaki T, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y: Oral immunization with *Lactobacillus casei* vaccine expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 is an effective strategy to induce mucosal cytotoxic lymphocyte against HPV16 E7. *Vaccine*, 28: 2810-2817, 2010
14. Kawana K, Adachi K, Kojima S, Taguchi A, Tomio K, Yamashita A, Nishida H, Nagasaka K, Arimoto T, Yokoyama T, Wada-Hiraike O, Oda K, Sewaki T, Osuga Y, Fujii T, Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients, *Vaccine*, 32: 6233-6239, 2014
15. Matsumoto J, Kawana K, Nagamatsu T, Schust DJ, Fujii T, Sato H, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y: Expression of surface CD1d in the extra-villous trophoblast cells of early gestation placenta is downregulated through TGF- β 1 in a manner dependent on trophoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 371(2): 236-241, 2008
16. Iwasawa Y, Kawana K, Fujii T, Schust DJ, Nagamatsu T, Kawana Y, Sayama S, Miura S, Matsumoto J, Adachi K, Hyodo H, Yamashita T, Kozuma S, Taketani Y: A possible coagulation-independent mechanism for pregnancy loss involving β 2glycoprotein 1-dependent antiphospholipid antibodies and CD1d. *Am J Reprod Immunol*, 67: 54-65, 2012
17. Yamashita A, Kawana K, Tomio K, Taguchi A, Isobe Y, Iwamoto R, Masuda K, Furuya H, Nagamatsu T, Nagasaka K, Arimoto T, Oda K, Wada-Hiraike O, Yamashita T, Taketani Y, Kang JX, Kozuma S, Arai H, Arita M, Osuga Y, Fujii T, Increased tissue levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids prevents pathological preterm birth, *Scientific Rep*, Nov 13: 3113, 2013

18. Kawana K, Kawana Y, Schust DJ: Female steroid hormones use signal transducers and activators of transcription protein-mediated pathways to modulate the expression of T-bet in epithelial cells: a mechanism for local immune regulation in the human reproductive tract. *Mol Endocrinol*, 19: 2047-2059, 2005
19. Tomio A, Schust DJ, Kawana K, Yasugi T, Kawana Y, Mahalingaiah S, Fujii T, Taketani Y: Prolactin can modulate CD4⁺ T cell response through receptor-mediated alterations in the expression of T-bet. *Immunol Cell Biol*, 86(7): 616-621, 2008
20. Kawana K, Matsumoto J, Miura S, Shen L, Kawana Y, Nagamatsu T, Yasugi T, Fujii T, Yang H, Quayle AJ, Taketani Y, Schust DJ: Expression of CD1d and ligand-induced cytokine production are tissue-specific in mucosal epithelia of the human lower reproductive tract. *Infect Immun*, 76(7): 3011-3018, 2008
21. Kawana K, Quayle AJ, Ficarra M, Ibana JA, Shen L, Kawana Y, Greene S, Yang H, Yavagal S, Marrero L, Zhang YX, Pyles RB, Blumberg RS, Schust DJ: CD1d degradation in Chlamydia trachomatis-infected epithelial cells is the result of both cellular and chlamydial proteasomal activity. *J Biol Chem*, 282: 7368-7375, 2007
22. Miura S, Kawana K, Schust DJ, Fujii T, Yokoyama T, Iwasawa Y, Nagamatsu T, Adachi K, Tomio A, Tomio K, Kojima S, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y: CD1d, a sentinel molecule bridging innate and adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV. *J Virol*, 84: 11614-11623, 2011
23. Tomio K, Kawana K, Taguchi A, Isobe Y, Iwamoto R, Yamashita A, Kojima S, Mori M, Nagamatsu T, Arimoto T, Oda K, Osuga Y, Taketani Y, Kang JX, Arai H, Arita M, Kozuma S, Fujii T. Omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress the cystic lesion formation of peritoneal endometriosis in transgenic mouse models, *PLOS One*, 10;8(9): e73085, 2013
24. Taguchi A, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Isobe Y, Nagasaka K, Adachi K, Matsumoto Y, Arimoto T, Koga K, Wada-Hiraike O, Oda K, Kang JX, Arai H, Arita M, Osuga Y, Fujii T, Matrix metalloproteinase (MMP)-9 in the cancer-associated fibroblasts (CAFs) is suppressed by omega-3 polyunsaturated fatty acid in vitro and in vivo, *PLOS One*, 9(2):e89605, 2014