

ヒトパピローマウイルス(HPV) E7
標的免疫療法における
コンパニオン診断についての研究
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系産婦人科学専攻

安藤 花野

修了年 2023年

指導教員 川名 敬

【背景】

子宮頸部上皮内腫瘍（CIN：Cervical Intraepithelial Neoplasia）は子宮頸癌の前癌病変である。これらはヒトパピローマウイルス（HPV：Human papilloma virus）の持続感染により引き起こされる。HPVは多くのウイルス型があるが、生殖器に感染する HPV は粘膜型 HPV とよばれ、コンジローマなどの皮膚病変に関連し悪性病変になりにくい低リスク型と、子宮頸癌などの粘膜病変に関連する高リスク型に分かれる。子宮頸癌の 90%以上から高リスク HPV DNA が検出され、そのうち 55%を 16 型、15%を 18 型が占めるとされている。HPV16 型は子宮頸癌の発症する最多のウイルス型である [1]。HPV 遺伝子は 9 つのタンパク質をコードしているが、特に、E6 は p53、E7 は Rb のそれぞれ癌抑制遺伝子の機能を不活化させる癌遺伝子としての働きがあることが報告されている [2]。通常多くの HPV 感染は一過性で、多くが宿主免疫により数ヶ月から数年の間をもつて排除される。CIN 1 の 70%、CIN2 の 50–60%が自然退縮し、CIN 3 であっても 2 年で 10–20%が自然退縮するとされている。一方、一部のウイルスは宿主免疫を回避し持続感染することで、最終的に癌形態となることが知られている [3]。CIN2/3 は数年から数十年の間をかけて一部が子宮頸癌に進展するため、治療対象となる。日本では、CIN2/3 の罹患者が 30 歳前後で急増しており、治療目的の外科的手術による早産率の上昇など周産期リスクが問題となる。他の治療法として、HPV の持続感染に免疫機序に関連することを利用した治療ワクチンの開発が検討されており、多くが HPV 腫瘍性タンパクを抗原とした全身性細胞性免疫の誘導を目的としたが、臨床応用されているものはない。これまでの研究で、HPV16 E7 発現乳酸菌製剤（IGM KK 16 E7）の研究開発を進めてきた。本薬剤は、HPV16E7 タンパクを抗原とした、E7 特異的 Th1 免疫応答を誘導するが、粘膜免疫システムを利用している点が他と異なる。IGM KK16E7 の安全性と有効性を評価するため、第 I/II 相 医師主導治験（Mucosal Immunotherapy using Lactobacillus-based vaccine for treatment of high-grade squamous intraepithelial Lesion）:MILACLE 試験を平成 31 年 7 月から令和 4 年 6 月にかけて行なった。本医師主導治験は日本大学医学部附属板橋病院が代表施設であり、PMDA の治験承認日本大学医学部附属板橋病院治験審査委員会の承認を得ている（承認番号 RK-201208-4）。本治験は、165 例の HPV16 型陽性 CIN2-3 を対象としたランダム化二重盲検多施設共同プラセボ対照並行群間比較試験である。IGM KK16E7 内服群は低用量、中用量、高容量内服の三群に分け、1、2、4、8 で 4 回の経口投与を行い、投与前、16 週、24 週で子宮頸部組織診による頸部病変の評価を行なった。免疫学的評価では、末梢血単核球（PBMC）中の HPV16E7 特異的 IFN- γ 産生細胞数を ELISPOT 法により測定した。その奏効性の評価を行うと共に HPV 免疫機序の解明の一助となることが期待される。

【目的】

IGM KK16 E7 の第 I/II 相 医師主導治験（Mucosal Immunotherapy using Lactobacillus-based vaccine for treatment of high-grade squamous intraepithelial Lesion）:MILACLE 試

験に関連して、様々な免疫学的なバイオマーカーを評価し、IGM KK16 E7 について、最善の臨床効果を発揮できる患者選別を可能するコンパニオン診断を探索する。

【対象と方法】

本研究では、上記医師主導治験の付随研究として、治験 I R B 審査とは別に、日本大学医学部附属板橋病院の研究倫理審査委員会に申請を行い、研究倫理審査会の承認を得て実施された（承認番号 RK-201208-4）。

全治験登録患者のうち、日本大学医学部附属板橋病院で採取された、79 例の子宮頸部擦過細胞検体、うち当院に組織検体の保存があった 44 例の子宮頸部組織検体を対象とした。

子宮頸部擦過細胞は薬剤内服前の患者から、サーベックスブラシを用いて液状化検体として採取した。この検体から、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて cDNA 合成を行った。作製した cDNA をテンプレートとして、THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (TOYOBO)を用いて real-time PCR を行った。サンプルと β -actin の Ct 値の差を Δ Ct 値とし、相対定量値は $2^{-\Delta Ct}$ で算出した。HPV16E7、Foxp3、PDL-1、PD-1、CD8、CD4、CD80、CD86、CTLA-4、CD103、 β -actin の primer と probe は、Applied Biosystems 社で購入した。

子宮頸部組織検体も薬剤内服前の患者から採取した。腫拡大鏡を用いて子宮頸部を確認し、3%酢酸加工を行なったのち肉眼的に最強病変を選択し生検した子宮頸部擦過細胞を検体とした。染色は、PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (DA KO) を用いて、日本大学医学部附属病院 病理学教室にて行われた。細胞膜に陽性を示す細胞数の、全上皮細胞数に対する割合を求めるため、標本中の上皮細胞の全数を Image J 1.53a (National Institute of Health, USA) の Analyze Particles を用いて、核のカウントにより計測した。PD-L1 発現の評価は病理医と共に、CPS (Combined Positive Score) を評価した。

【結果】

まず、本薬剤高用量内服群で、他の内服群よりも有意に高い奏効率が得られた。このことから、本薬剤により腸管での有効な免疫誘導が惹起される用量は高用量である可能性が示唆された。さらに、この高用量内服群で、高い治療効果が得られる局所環境のバイオマーカーとなり得る因子を検討した。高用量群における各バイオマーカーは Mann Whitney 検定を用いて解析した。E7-CMI-pre ($p=0.20$)、E7-CMI-Post ($p=0.049$)、HPV16E7 ($p=0.97$)、Fox 3 ($p=0.60$)、PDL-1 ($p=0.80$)、PD-1 ($p=0.34$)、CD8 ($p=0.38$)、CD4 ($p=0.55$)、CD80 ($p=0.60$)、CD86 ($p=0.022$)、CTLA-4 ($p=0.65$)、CD103 ($p=0.24$)、CPS ($p=0.42$) であり、E7-CMI-Post ($p=0.049$) と CD86 ($p=0.022$) で有意差が見られた。CD86 について、ROC 曲線を用いて得られたカットオフ値で二分したところ、CD86^{low} 群で 73%の奏効率（高用量全体では 43%）であった。CD86^{high} 群ではいずれの例でも臨床的病変退縮を得られなかった。

【結論】

今回の臨床治験を通して、本薬剤及び、子宮頸部の免疫学的環境についていくつかの知見が得られた。

まず、いずれの薬剤を内服したかに関わらず、局所の病理組織学的な病変の退縮と血中の E7 特異的 IFN- γ 産生細胞数、つまり末梢血中の E7 特異的 Th 1 免疫反応には相関を認めたとのことである。これは、IGMCK16E7 による腸管での免疫誘導が十分でなくても、局所において生理的に E7 特異的 Th1 免疫反応が獲得されたものと考えられ、自己免疫で退縮する CIN 病変の臨床的経過に矛盾がないものと思われた。

次に、全体では奏効率における CD86 に有意差がなく、高用量群で有意差が見られたことである。本薬剤の高用量内服により免疫誘導が行われた上で、さらに実行組織である子宮頸部において CD86^{low} の免疫学的背景の条件が整うことで最終的に病理組織学的な病変退縮が得られるものと考えられた。CD86^{high} の局所免疫環境では高用量内服でも病変退縮を来した例はなかった。獲得免疫は自己寛容を維持しながら、外来異物を認識し特異的に排除、破壊するシステムとして以下のような機序がある。第一のシグナルとして、抗原提示を受けると APC に発現する MHC- I / II は TCR を介してナイーブ T 細胞を活性化する。MHC- I 反応性の T 細胞は CD8+T 細胞へ、MHC- II 反応性の T 細胞は CD4+T 細胞へそれぞれ分化する。さらに、サイトカインなどの影響を受けて、CD4 陽性 T 細胞はエフェクター T 細胞 (Th 1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞) や Treg 細胞等に分化していく。第二のシグナルは、T 細胞機能の正の調節因子で共刺激と呼ばれる。ヘルパー T 細胞では CD28、誘導性 T 細胞共刺激因子 (ICOS: Inducible costimulatory molecule) などを発現するが、特に CD28 は CD4+T 細胞の 80%、CD8+T 細胞の 50%程度で発現が見られる一般的な共刺激分子である。CD28 が APC 上のリガンドである CD80/CD86 に結合することで、T 細胞の増殖や IL-2 産生などを促すことにより免疫応答を維持し、十分な活性となる。この共刺激が起これないと、T 細胞の活性化は起きず結果として免疫寛容が誘導される[4]。最後に第三のシグナルは免疫チェックポイントと呼ばれ、CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte associated Antigen 4)、PD-1 (Programmed death receptor-1) などの負の調節である。CTLA-4 は CD28 同様 T 細胞に発現し、CD28 と競合して CD80/CD86 と結合することで共刺激を阻害する。CTLA-4 は CD28 よりも CD80/86 に対し高い親和性を持つため[4]、CD28 との競合が可能となる。特に、弱い抗原刺激では CD28 との結合が優先され、強い抗原刺激では CTLA-4 と結合して免疫抑制系の機序が働くことが分かっている[5]。T 細胞上の CTLA-4 は CD28 の共刺激により発現量が増加するが、Treg では構成的に高レベルの CTLA-4 が発現することが分かっており、特に Treg では CD86 の共刺激によって有意に増殖、生存率が向上したとの報告もある[6]。つまり、Treg を活性化させる鍵となる因子は、CD86 であると考えられる[7]。本薬剤の高用量内服及び CD86^{high} の局所免疫環境において、CD28/CD86 の共刺激により Treg が活性化するとともに、強い抗原刺激が惹起されたことにより最終的に CTLA-4 と CD80/CD86 の親和性が上昇し免疫抑制系が働きやすい環境にあったことが想

定される。CD86^{low} 局所の病理組織学的な病変退縮には Treg に関連する免疫抑制系の背景が重要であると考えられた。

【今後の展望】

HPV16 E7 発現乳酸菌製剤のコンパニオン診断のバイオマーカーとして CD86^{low} が有効である可能性が示唆された。特に CD86^{low} 群で高い奏効率が得られたことから、子宮頸部局所で病理組織学的な臨床効果が得られるためには、局所の Treg に関連する免疫抑制系の要素が重要であると推測された。一方、CD86^{high} 症例に対しては、CD86 によって活性化される CTLA4 陽性 Treg を免疫チェックポイント阻害剤で抑制する併用療法が期待される。

【参考文献】

1. Zheng hu, Ding Ma: The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications. *Cancer Med.* 2018 Oct;7(10):5217-5236.
2. McBride AA: Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. *Biol Chem* 2017, 398(8):919-927.
3. Graham SV: The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clin Sci (Lond)* 2017, 131(17):2201-2221.
4. Arlene H.sharpe, Gordon J.Freeman:The B7-CD28 superfamily.Narural.Reviews Immunology volume2, pages116-126 (2002)
5. Buchbinder EI, Desai A: CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol* 2016, 39(1):98-106.
6. Halliday N, Williams C, Kennedy A, :CD86 Is a Selective CD28 Ligand Supporting FoxP3+ Regulatory T Cell Homeostasis in the Presence of High Levels of CTLA-4. *Front Immunol.* 2020 Dec 8;11:600000.
7. Schweitzer AN, Borriello F, Wong RC, Abbas AK, Sharpe AH: Role of costimulators in T cell differentiation: studies using antigen-presenting cells lacking expression of CD80 or CD86. *J Immunol* 1997, 158(6):2713-2722.