

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

エフェクター選別性の抗がん免疫アジュバントの開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 瀬谷 司

平成21(2009)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

エフェクター選別性の抗がん免疫アジュバントの開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 瀬谷 司

平成21(2009)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- エフェクター選別性の抗がん免疫アジュバントの開発 ----- 1
瀬谷 司

II. 分担研究報告

1. 細胞外dsRNAの取り込み機構の解析 ----- 8
松本 美佐子
2. RNAアジュバント：合成RNAの構造と機能 ----- 10
西川 諭

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 12

IV. 研究成果の刊行物 ----- 15

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

エフェクター選別性の抗がん免疫アジュバントの開発

研究代表者 瀬谷 司 北海道大学大学院先端生命科学研究院 教授

研究要旨

本研究は安全でQOLが高いがん患者に使える抗がん免疫アジュバントを開発し、がん医療の現場に速やかに導入することを目的とする。アジュバントは我々が開発したToll様受容体（TLR）のアゴニスト・微生物成分を模したものを基盤とし、副作用が少なくCTL, NKを効果的に誘導する物質を選ぶ。本年度はNK活性化についてM161 Ag リポ蛋白とRNA duplex の機能を解析した。前者はTLR2, 後者はTLR3 を活性化して異なった経路で樹状細胞を成熟化する。これらの合成誘導体を作成し、単独または併用で既知のNK活性化能を持たない免疫活性化剤（例：BCG-CWS）より優れた抗がんアジュバントをin vitro ヒト樹状細胞、in vivo マウス発がんモデル系で抽出する。

H20年度にM161 Ag誘導体と既知のBCG-CWSなどを機能的に比較検討し、以下の知見を得た。1. 合成のdiacylated lipopeptides (M161Ag誘導体)の中からNK活性化能を有するM161Ag誘導体を抽出する事に成功した。2. これらのTLR2 agonists はpeptide配列に依存してTICAM-1 (TRIF) 経路ではなくMyD88 経路を経由して樹状細胞をNK活性化型に成熟化すること、TLR以外の樹状細胞経路も関与すること、を検証した。3. NK活性化型樹状細胞はB16D8 (NK感受性) 移植がんを退縮させる能力を有していた。また、RNA duplex を合成してdsRNAと polyI:C を用いた結果以下の事が判明した。4. poly(I:C)による樹状細胞活性化にはクラスリン依存的エンドサイトーシスが重要である。5. 樹状細胞による抗がんNKの活性化は TICAM-1 経路で誘導された。6. TICAM-1 経路の下流はIRF-7ではなくIRF-3でNK活性化型樹状細胞が成熟化する。7. 本経路に於けるNK活性化機構は樹状細胞がNK活性化膜分子を発現し、NKとの結合によって活性化する事が判明した。8. 本分子を発現させた樹状細胞は移植がんを強く退縮せしめた。

分担研究者

松本美佐子 北海道大学大学院医学研究科 免疫学分野 准教授

矢野 郁也 株式会社MBR 顧問

西川 諭 つくば産総研 副所長

A. 研究目的

Rosenberg らによればがん抗原のペプチドワクチン療法の有効例は 2.6%に留まる (Nat Med 10: 909, 2004)。抗原に炎症刺激を伴う感染症の場合、多くは激しい免疫応答を起動し、治癒に向かう。抗原ペプチドに微生物成分 (アジュバント) を加えた抗がん免疫療法が確立できるならば高い有効率を期待しうる (Seya, et al, Cancer Immunol. Immunother.)。この概念は樹状細胞のToll-like receptor (TLR)に細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) の誘導機能があること (Akazawa, Cancer Res 2004)、アジュバントはTLRのアゴニストであること (Tsuji, Infect Immun 2000)、から基礎研究の支持を得た。しかし、抗がんエフェクターとしてNK を誘導する必要があること (Akazawa, PNAS 2007)、炎症はがん細胞に働けば発がんのプロモーターにもなること (Nahoum, Science 2007)、など種々の問題点も残し、これらを克服したアジュバントの開発が世界的に要望されている。ヒトに使えるTLR アゴニストは世界的な競争の中でまだ確立されていない。本年度は NK 活性化能をもつアジュバントの開発を試みて、有望な合成産物を候補として抽出した。

B. 研究方法

合成産物は阪大藤本博士、産総研西川博士に依頼して作成した。遺伝子改変マウスはTICAM-1 KO マウスを当研究室で作製し、MyD88 KOマウスを審良研より恵受を受けた。レポーターアッセイ (HEK293 細胞を用いたLuciferase reporter gene assay)、ELISA は既報に準じて行った。樹状細胞 (BMDC)、NK細胞はそれぞれ骨髄、脾臓から既報に準じて調整した。NK活性はB16D8 細胞株を用いて51Cr 遊離アッセイで行った。siRNA, transfection はリポソーム法で行い、樹状細胞への遺伝子導入はレンチウイルスを使って行った。Vector はIRES-GFPを組み込んであり、視覚的に陽性細胞を判別できる。

C. 研究結果

H20 年度の目標はM161Ag 誘導体, RNA duplex の基礎データをとり、アジュバント機能の優れた構造物

を特定して合成を目指すことであった。

C-1. M161Ag

M161Agはpeptide部分を改変した17種の構造物 (図1) を合成した。HEK293 細胞を用いて Luciferase reporter gene assay により測定した結果、17種類全てのlipopeptide において活性がみられたが、なかでも Pam 13 とPam 15、Pam 16 による活性は著しく低かった。同様にIL-6, IL-12p40 などサイトカイン誘導能が十分高いものともそうでないものがpeptide構造によって規定される事が判明した。

M161Ag誘導体のNK 細胞活性化能を調べた。In vitro において、NK細胞を単独刺激したが、IFN- γ 産生の増大は認められなかった。BMDCをM161Ag存在下でspleen NK細胞と共培養を行ったところ、初めてIFN- γ 産生の増大が確認された。故にM161AgはNK直接でなく、BMDCを介してNK細胞を活性化する事が確認できた。NK細胞によるIFN- γ 産生能が高かったPam 12 /17、中等度のPam15、低かったPam 13/16に関して、NK細胞のB16D8 に対する細胞傷害活性を評価したところ、NK細胞によるIFN- γ 産生と同様な結果が得られた。各種TLRの発現細胞でレポーターアッセイを行い、Pam15 はTLR2/6 の複合体によってBMDCのNK活性化を促進することが判明した。NK活性化能が高いPam12/17はBMDCのTLR2をKOしてもNK活性化能は喪失しなかった (図2A)。Pam12/17はBMDCのTLR非依存性にNKを活性化する事が判明した。

以上より、M161AgによるNK細胞の活性化はペプチド部位によって異なる経路で誘導され、一部のM161AgはBMDCのTLR2認識により活性化するが、BMDCのTLR2非依存的にNK細胞が活性化される機序も存在することが示された (図2B)。この結果は予想外であり、現在CTL誘導活性がPam12/17, Pam 15 で相違があるかを検討している。最強の誘導体を選別してTLR2アジュバントを確立し、BCG-CWSの抗がん効果と比較する予定である。

RNA duplex

RNA duplexの種々の改変体 (表1) からloop構造が

ないstemが最もTLR3を活性化した。ただし、樹状細胞ではTLR3は細胞表面に無く、細胞内エンドソームにある。樹状細胞の系で検討した所、RNA duplexをエンドソームにターゲットすることがTLR3の活性化に必須と判明した。RIG-I経路の関与を弁別するため、1. MAVS^{-/-}, TICAM-1^{-/-} マウスから樹状細胞を調整してTLR3, RIG-I (MDA5) に特有の応答を見る、2. エンドソーム標的に適したリポソームを開発する、の2点を実施中である。1. についてはMAVS^{-/-} mice をバッククロスの最中であり、間もなく試行できる。2. については cationic liposome (日本新薬)、DOTAP (lipofection試薬) などを用いて樹状細胞TLR3を標的化することに成功した。これを用いてpolyI:Cを使った基礎実験を行った。

PolyI:CでBMDC を処理するとNK活性化が誘導された。NK直接の作用は比較的弱かったので、dsRNAはBMDCに働くアジュバントである事が検証できた。TICAM-1^{-/-}, MyD88^{-/-} などのBMDCを調整し、dsRNAによるNK活性化をin vitro で査定すると、TICAM-1 経路がNK活性化に必須であることが判明した。また、BMDCとNK 細胞は細胞間接着で活性化を増強し、IL-12, IL-15, IFN などのサイトカインはBMDCのNK活性化には副次的な機能しか示さなかった。TICAM-1 下流の転写因子として IRF-3, IRF-7, NF- κ B, AP-1などが同定されている。NK活性化はIRF-3^{-/-} BMDC のみで極度に低下した。従って、IRF-3をマスター遺伝子とする樹状細胞の膜分子がNKを活性化する事が判明した。

Genechip 解析でTICAM-1, IRF-3で特異的に誘導される遺伝子群を収集した。9個の予想膜分子が5倍以上の発現上昇を示した(図3)。これらをレンチウイルスvector に組み込んで樹状細胞に遺伝子導入を行った。GFPをマーカーにすると50%程度の効率で樹状細胞を形質転換できた。実験によってバックグラウンドを消すためにIRF-3^{-/-} BMDC に遺伝子導入を行った。この系でNK 活性化を誘導する膜分子が2種同定できた。1つはClec 4e, もう1つは4回膜貫通型蛋白をコードする未同定遺伝子であった(図4)。これをINAMと名付けて機能同定を行った。INAMは樹状細胞の他、脾細胞 (myeloid, NK, T リンパ球を含む) にも高発現してお

り、がん細胞株には殆ど発現していなかった。NK target として著名なYAC-1 細胞のみが例外的にINAMを高発現していた。がん細胞にINAMを高発現してもNK活性化もNK 細胞傷害も誘導されなかった。このことと発現分布からINAMはRae-1 のようなNK活性化リガンドとは異なると推定された。一方、NKにINAMを発現誘導するとBMDCのINAM と同様DC-NKの相互活性化に携わるので、INAM は樹状細胞側、NK側に発現して細胞接着に関わる4回膜貫通型分子と機能同定された。

以上から、INAMを高発現したBMDC [BMDC (INAM)] を養子免疫すれば (NKにはINAMを一定量発現しているので) 強い抗がんNK活性が期待できるはずである。このことを検証するためにマウス移植がん (C57BL/6 vs. NK 感受性B16D8) の系にBMDC (INAM) を既成腫瘍の周辺に皮内投与した。期待通り腫瘍はきれいに退縮した。さらにNK1.1 抗体でこの腫瘍退縮はキャンセルされた。このことはDC-NK相互活性化と云われた抗がんNK誘導の一端はINAM と云う新規分子によって担われていることが証明できた。

D. 考察

本年度は移植がんの退縮効果を発揮する抗がんNK誘導アジュバントを2つを選定した。TLR2アゴニスト、M161Ag誘導体については1. 2番目に疎水アミノ酸残基が来なければNK活性化能が保持されること、2. NK活性化能は樹状細胞のTLR2/6-MyD88 経路によって保持されること、が判明した。3. それ以外のTLR非依存性のNK 活性化経路もある事が示唆された。RNA duplex については4. DC-NK相互活性化における抗がんNK誘導の責任分子を同定した。5. IRF-3 誘導性の4回膜貫通型分子である。6. BMDC (INAM)を用いて腫瘍退縮を証明した。今後ヒトの抗がんNK活性とこの分子の関与を早急に調べる必要がある。

M161Ag については、次年度内にM161Ag誘導体の樹状細胞成熟化、cross-primingとCTL誘導の効果を判定する。系はEL4や3LL などのMHC発現がん細胞株とC57BL/6のsyngeneic の系を使い、抗原 (WT1など) と併用する。TICAM-1, MyD88, IPS-1欠損マウスで同様のがん退縮を見る。現在diacylation-Cys の後にアミノ酸以外の残基を付けた改変体を作成依頼し、機能検

討を予定している。BCG-CWSは合成ができないが、M161Ag リポペプチドは合成が可能である。CTL 誘導性アジュバントのベースとしてリポ蛋白M161Ag がBCG-CWSとの比較において遜色無ければこの誘導体を実用化に向けて検討する。この点は矢野らの研究を参照されたい。

RNA duplexでは、各種RNA duplexを合成して、NK 活性化アジュバントの最適標品を決める研究が残されている。単にRNA を投与するのではなく、配列特異的なRNA duplex を用いて樹状細胞の成熟化とがん細胞の傷害を誘導することも視野に入れる。この背景にはがん細胞の産生するmiRNAによるがんの浸潤促進やHCV 感染抑制に働くmiRNAが同定されたことがある

(Pedersen, Nature 2007)。さらに最近RNA duplex の配列特異的な抗ウイルス (HCV) 作用やがん浸潤の促進 (Ma and Weinberg, Nature 2007) などが報告され、RNAの配列特異的な遺伝子制御がもう1つの鍵になることが判明した。即ち、RNA duplex のアジュバントが成功すれば、発展的な次世代の配列特異的なRNA duplex の開発が可能になる。

miRNAを模すれば RNA のセンサー (受容体) を介したIFN 応答などの抗がん活性に加えてgene silencing による抗がん活性をRNAアジュバントに付与することができる。これらを含めた総合機能で抗がん免疫とがん退縮を導く RNA創薬にもチャレンジする。

RNAアジュバントの配列特異的な遺伝子発現の抑制機能をTLR依存性免疫活性化作用に加えれば、INAMに加えDicer やmiRNAを含む機能を包括することになり、難治性のヒト固型がんに優れた効果を発揮するはずである。それにはpolyI:Cなど毒性のある2重鎖RNAでなく配列を選ぶ必要がある。多種類のRNA配列の中から抗がん免疫の成立に最も適した配列を同定し、臨床に還元できる基礎資料を整えて実用化を目指す。

G. 研究発表

1. Akao, Y., H. Masuda, T. Ebihara, Y. Saeki, K. Hazeki, O. Hazeki, M. Matsumoto, and T. Seya Antitumor natural killer cell induction by orally administered Spirulina extract in mice. Cancer Sci. submitted

2. Ebihara, T. M. Matsumoto, and T. Seya NK cell licensing by dendritic cell in RNA virus infection. (review) Curr. Immunol. Rev. in press
3. Seya, T., and M. Matsumoto The extrinsic RNA-sensing pathway for adjuvant immunotherapy of cancer. (review) Cancer Immunol. Immunother. in press
4. Kodama, K., M. Higashiyama, K. Takami, K. Oda, J. Okami, J. Maeda, T. Akazawa, M. Matsumoto, T. Seya, M. Wada, A. Hayashi, and K. Toyoshima Innate immune therapy with a BCG cell wall skeleton after radical surgery for non-small cell lung cancer: a case-control study. Surgery Today. 194-200 2009
5. Seya, T., M. Matsumoto, T. Ebihara, and H. Oshiumi Functional evolution of the TICAM-1 (TRIF) pathway for extrinsic RNA sensing. (review) Immunol. Rev. 44-53 2009
6. Wu, J. D., C. L. Atteridge, X. J. Wang, T. Seya, and S. R. Plymate. Obstructing shedding of the immune stimulatory MHC class I chain-related gene B prevents tumor formation. Clin. Cancer Res. 632-640 2009
7. Oshiumi, H., M. Matsumoto, S. Hatakeyama, and T. Seya Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- β induction during the early phase of viral infection. J. Biol. Chem. 807-817 2009
8. Itoh, K., A. Watanabe, K. Funami, T. Seya, and M. Matsumoto The clathrin-mediated endocytic pathway participates in dsRNA-induced IFN- β production. J. Immunol. 5522-5529 2008
9. Shingai, M., M. Azuma, T. Ebihara, M. Sasai, K. Funami, M. Ayata, H. Ogura, H. Tsutsumi, M. Matsumoto, and T. Seya Soluble G protein of respiratory syncytial virus inhibits Toll-like receptor 3/4-mediated IFN-beta induction. Int. Immunol. 1169-1180 2008
10. Ebihara, T., M. Shingai, M. Matsumoto, T. Wakita, and T. Seya Hepatitis C virus (HCV)-infected hepatocytes extrinsically modulate dendritic cell maturation to activate T cells and NK cells. Hepatology. 48-58 2008

11. Funami K., M. Sasai, H. Oshiumi, T. Seya, and M. Matsumoto Homo-oligomerization is essential for Toll/IL-1 receptor domain containing adaptor molecule-1-mediated NF-kappaB and interferon regulatory factor-3 activation. *J. Biol. Chem.* 18283-18291 2008

12. Nakamura, M., K. Funami, A. Komori, T. Yokoyama, Y. Aiba, A. Araki, Y. Takii, M. Ito, M. Matsuyama, M. Koyabu, K. Migita, K. Taniguchi, H. Fujioka, H. Yatsuhashi, M. Matsumoto, H. Ishibashi, and T. Seya Increased expression of Toll-like receptor3 in intrahepatic biliary epithelial cells at sites of ductular reaction in diseased livers. *Hepatology International.* 222-230 2008

13. Shime, H., M. Yabu, T. Akazawa, K. Kodama, M. Matsumoto, T. Seya, and N. Inoue Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23-IL-17 proinflammatory pathway. *J. Immunol.* 7175-7183 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

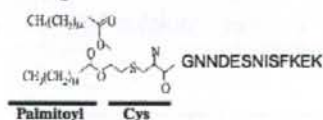
表 1. 麻疹ウイルス由来の各種DI RNA

Strains	DI genome size (nt)	Stem size (nt)	loop (nt)
ED	1152	142	868
NV	726	121	474
ICV	1385	120	1145
Shwarz	1098	177	744
Tanabe*	642	103	436
	618	98	422
	474	98	278

* At least, three patterns were found in 12 clones.

Fig. 1. M161Ag and its derivatives

M161Ag



- 1 Pam2 **C** A N T R H S E S D K
- 2 Pam2 **C** G T G G K Q S S D K
- 3 Pam2 **C** G N G N K S G S D D
- 4 Pam2 **C** S N T E I E N A K G
- 5 Pam2 **C** T T D K K E L K A Y
- 6 Pam2 **C** S P G G N H K S S
- 7 Pam2 **C** G S Q N **C** P L E E
- 8 Pam2 **C** G Q D S D Q Q K D G
- 9 Pam2 **C** G N D D G K D K D G
- 10 Pam2 **C** G N N S S K D K E A
- 11 Pam2 **C** S L P G **C** G S K S T
- 12 Pam2 **C** S T S E **C** G E K I
- 13 Pam2 **C** P E N C **C** G C V N K
- 14 Pam2 **C** G S Q N **C** P L E E K
- 15 Pam2 **C** L I L I L I A S E I
- 16 Pam2 **C** L I L I L I A S E I **C** F S F S H L T D V
- 17 Pam2 C S K K K K

図 1. M161Agとその誘導体

Diacyl lipoprotein で peptide 配列を伴う (Nat Med 1997)。合成品はCys以下の配列を種々のBLP (bacterial lipoproteins)を参考に作製した。○は疎水性残基、△はPro 残基を示す。17はPam2 CSKと呼ばれる標準品である。

図2. M161Agの機能的多様性

A. TLR2非依存経路によるNK活性化

BMDC (Wild-TypeとTLR KO) をNK細胞と共培養し、IFN- γ の産生量をELISAで測定した。M161Agのペプチド部分の相違に応じてTLR2非依存性にNKを活性化するもの (Pam12、Pam17) とTLR2依存性に活性化するもの (Pam15) が存在することがわかった。

B. 模式図の説明

NK活性化BMDCはM161Agの種類ごとに異なった経路でNKを活性化する。

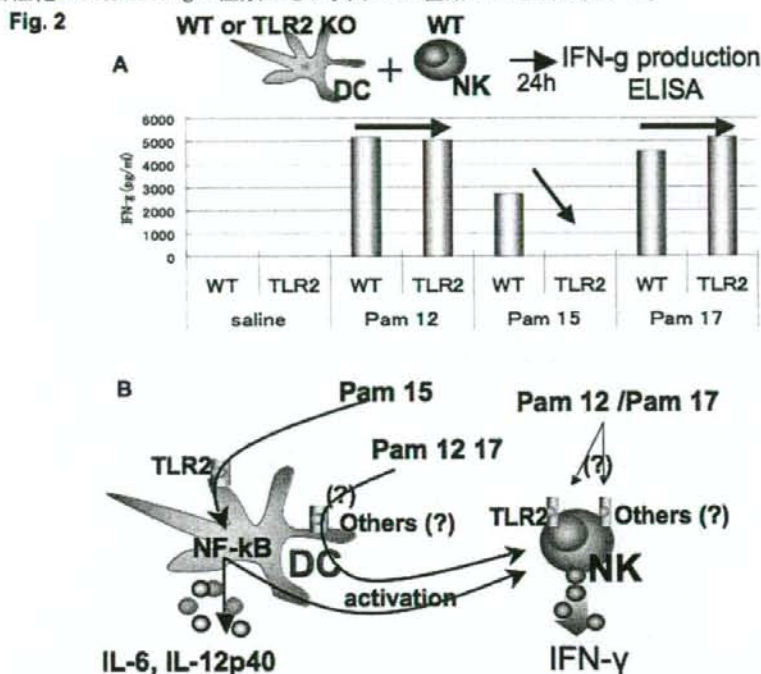


図3. 樹状細胞のNK活性化遺伝子の同定戦略

ベン図はマウスBMDC からTICAM-1 依存性に誘導される遺伝子群を示す。膜蛋白である、IRF-3依存性であるという制限をかけて9つの遺伝子を絞り出した。このうち、候補となりうる分子を図3に示した。

Fig. 3 . strategy to determine the molecule that regulates NK-activating activity in BMDC

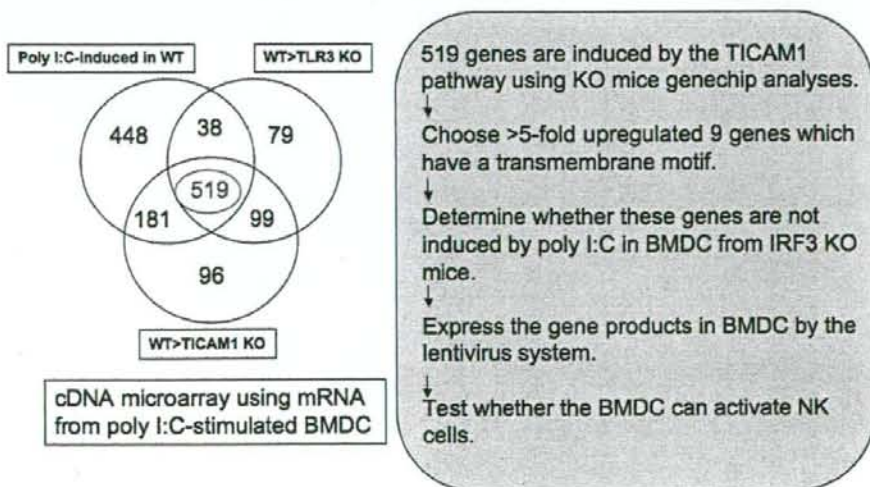
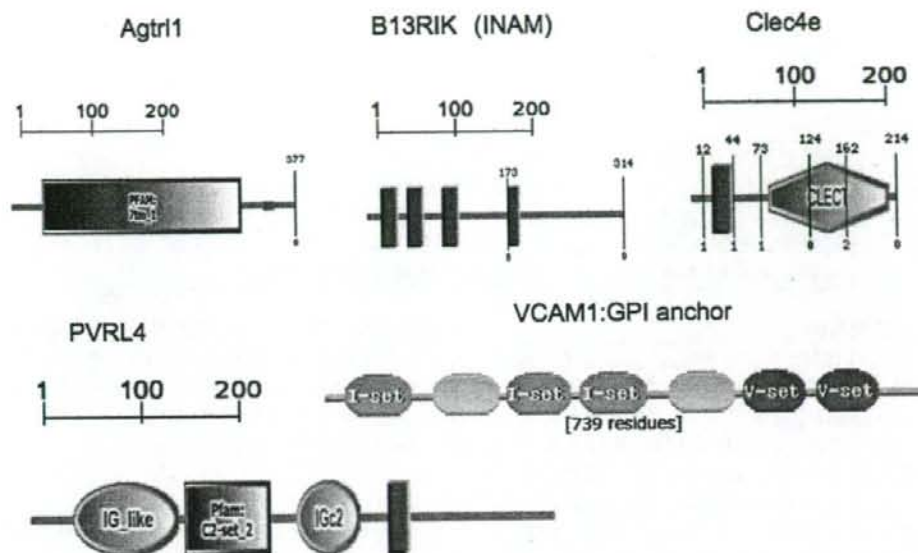


図4. 9個の候補遺伝子から樹状細胞で発現したものを記載した。NK活性化はINAM とClec4e いずれかをBMDCに発現させると誘導された。

Fig.4. NK活性化分子の候補



追記

基礎研究と一部の臨床研究に関して北海道大学医学研究科の倫理指針に則り、委員会において研究計画の承認を受けた。動物実験は北海道大学の動物実験委員会に申請して許可を得た。実験は厚生労働省の動物実験等の実施に関する基本指針に従い実施した。

細胞外dsRNAの取り込み機構の解析

研究分担者 松本美佐子 北海道大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨 NK細胞や細胞傷害性T細胞を活性化しうるTLR3リガンドは次世代免疫アジュバントの有力な候補である。本研究では、TLR3リガンドであるdsRNAの細胞内への取り込み機構を解析し、細胞表面レセプターを介したクラスリン依存的エンドサイトーシスによるエンドソームへのターゲティング機構を明らかにした。

A. 研究目的

Poly(I:C)は、古くからタイプI IFN誘導剤、NK細胞活性化剤として知られるウイルスdsRNAの合成アナログである。我々はこれまでに、poly(I:C)が1型膜タンパク質のToll-like receptor 3 (TLR3)に認識され、アダプター分子TICAM-1を介して炎症性サイトカインやIFN- α/β 産生、樹状細胞成熟化などの免疫応答を誘導することを明らかにしてきた。更に、poly(I:C)は骨髄系樹状細胞においてTLR3-TICAM-1依存的に新規細胞膜分子の発現を誘導することによりNK細胞を活性化することを明らかにした。骨髄系樹状細胞ではTLR3依存的に抗原のクロスプライミングが誘導されることが報告されており、TLR3リガンドは免疫アジュバントの候補になりうると考えられる。リンパ球活性化に重要なシグナルはTLR3が局在するエンドソームを起点とすることから、TLR3リガンドの取り込みとエンドソームへのターゲティングが細胞応答を左右する。本研究は、ヒト骨髄系樹状細胞におけるTLR3リガンドの取り込み機構を解析し、アジュバン活性におけるエンドソームの機能を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ヒト未成熟樹状細胞(iDC)は、末梢血のPBMCからCD14マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) で分離した単球をGM-CSFとIL-4で6日間培養して得た。TLR3発現HEK293細胞は、HEK293細胞にpEFBOS/hTLR3 発現プラスミドをLipofectamine2000でトランスフェクションし24時間培養したものをを用いた。エンドサイトーシス阻害剤として、cytochalasin D (ミクروفイラメント系阻害剤)、methyl- β -cyclodextrin (カベオラ依存的エンドサイトーシス阻害剤)、chlorpromazine (クラスリン

依存的エンドサイトーシス阻害剤)、chloroquine (エンドソーム酸性化阻害剤)を用いた。種々の長さのdsRNAは、麻疹ウイルスHおよびNP蛋白cDNAをテンプレートにMEGAscript RNAi kit (Ambion)を用いて作製した。

C. 研究結果

1. 骨髄系樹状細胞はTLR3リガンドの中でpoly(I:C)をクラスリン依存的エンドサイトーシスで選択的に取り込み、TLR3シグナルを誘導するが、in vitro transcribed dsRNAは取り込まなかった。取り込みは5'末端のリン酸基の存在に依存しなかった。
2. poly(I:C)によるIFN- β 産生誘導は、B-, C-type oligodeoxynucleotide (ODN)で濃度依存的に阻害された。阻害効果にCpGモチーフは必須ではなくヌクレオチド配列に依存した。
3. poly(I:C)はB-, C-type ODNと共通の取り込みレセプターを介して細胞内にとりこまれ、TLR3が局在するエンドソームに運ばれた。

D. 考察

今回の研究より、poly(I:C)にはTLR3、RIG-I、MDA5以外に細胞表面の取り込みレセプターが存在することが明らかとなった。In vitro transcribed dsRNAは取り込まれず、B-, C-type ODNは拮抗して取り込まれることから、取り込みレセプターは二本鎖構造以外の核酸構造を認識すると考えられる。TLR3が局在する初期エンドソームへのターゲティングがTLR3シグナル開始に必須であり、今後、レセプターの同定と機能解析が重要課題となる。骨髄系樹状細胞において、エンドソームは抗原提示に重要なオルガネラであり、そこからのシグナルがクロスプライミングを含めたリンパ球活性化に関与すると思われる。我々が最初に明らかにしたTLR3の局在様式は獲得免疫活性化機能と合致しており、今後、取り込みレセプターの同定をはじめエンドソームからのTLR3シグナルについて研究を進める予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Seya, T., and M. Matsumoto. 2009. The extrinsic RNA-sensing pathway for adjuvant immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* DOI 10.1007/s00262-008-0652-9
2. Seya, T., M. Matsumoto, T. Ebihara, and H. Oshiumi. 2009. Functional evolution of the TICAM-1 pathway for extrinsic RNA sensing. *Immunol. Reviews* 227: 44-53.
3. Oshiumi, H., M. Matsumoto, S. Hatakeyama, and T. Seya. 2009. Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- β induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.* 284: 807-817.
4. Itoh K., A. Watanabe, K. Funami, T. Seya, and M. Matsumoto. 2008. The clathrin-mediated endocytic pathway participates in dsRNA-induced IFN- β production. *J. Immunol.* 181:5522-5529.
5. Matsuo A., H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Seya et al., 2008. Teleost Toll-like receptor 22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from Birnaviruses. *J. Immunol.* 181: 3474-3485.
6. Shingai, M., T. Ebihara, M. Matsumoto, T. Seya et al., 2008. Soluble G protein of respiratory syncytial virus inhibits Toll-like receptor 3/4-mediated interferon-beta induction. *Int. Immunol.* 20:1169-118
7. Oshiumi, H., A. Matsuo, M. Matsumoto, and T. Seya. 2008. Pan-Vertebrate Toll-like receptors during evolution. *Current Genomics* 9:488-493.
8. Fukuda, K., T. Watanabe, T. Seya, M. Matsumoto et al., 2008. Modulation of double-stranded RNA recognition by the N-terminal histidine-rich region of the human Toll-like Receptor 3. *J. Biol. Chem.* 283: 22784-22794.
9. Funami, K., M. Sasai, H. Oshiumi, T. Seya, and M. Matsumoto. 2008. Homooligomerization is essential for Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 mediated NF- κ B and IRF-3 activation. *J. Biol. Chem.* 283: 18283-18291.
10. Nakamura, M., K. Funami, M. Matsumoto, T. Seya et al., 2008. Increased expression of Toll-like receptor 3 in intrahepatic biliary epithelial cells at sites of ductular reaction in diseased livers. *Hepatology* 47: 222-230.
11. Shime, H., M. Yabu, T. Akazawa, K. Kodama, M. Matsumoto, T. Seya and N. Inoue. 2008. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23-IL-17 proinflammatory pathway. *J. Immunol.* 180: 7175-7183.
12. Matsumoto M., and T. Seya. 2008. TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *ADDR* 60: 805-812.
13. Ebihara, T., M. Shingai, M. Matsumoto, T. Wakita, and T. Seya. 2008. Hepatitis C virus (HCV)-infected apoptotic cells extrinsically modulate dendritic cell function to activate T cells and NK cells. *Hepatology*. 48: 48-58.
14. Bas, S., T. Seya, M. Matsumoto et al., 2008. The pro-inflammatory cytokine response to *Chlamydia trachomatis* elementary bodies in human macrophages is partly mediated by a lipoprotein, the macrophage infectivity potentiator, through TLR2/TLR1/TLR6 and CD14. *J. Immunol.* 180: 1158-1168.

2. 学会発表

1. 海老原敬、松本美佐子、脇田隆字、瀬谷 司：抗 HCV 樹状細胞応答の解析、第 73 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会・第 19 回日本生体防御学会・第 45 回補体シンポジウム合同大会（札幌）2008.7.10-12
2. 松本美佐子：TLR3-TICAM-1 による dsRNA 認識とシグナル伝達、(同上)
3. 東正大、海老原敬、松本美佐子、瀬谷 司：TICAM1 依存性クロスプレゼンテーションの解析、(同上)
4. 海老原敬、松本美佐子、脇田隆字、瀬谷 司：HCV 感染アポトーシス細胞を介した抗 HCV 樹状細胞応答、日本ウイルス学会北海道支部第 42 回夏季シンポジウム（ニセコ町）、2008.7.26-27
5. 東正大、海老原敬、久保田信彦、赤澤 隆、松本美佐子、瀬谷 司：樹状細胞における TLR3/TICAM-1 経路を介したクロスプレゼンテーションの制御 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会（京都）、2008.12.1-3
6. 海老原敬、松本美佐子、瀬谷 司：樹状細胞における新規 NK 活性化分子の解析、(同上)
7. 時末高至、渡部智也、辻田志志、西川諭、長谷川典巳、瀬谷 司、松本美佐子、福田宏太郎：ヒト Toll-like receptor3 の N 末端に存在するヒステジン残基による二本鎖 RNA 認識の調節機構、第 31 回分生年会、第 81 回生大会の合同開催（神戸）、2008.12.9-12

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：I型インターフェロンの発現調節剤、PCT/JP2008/001648、発明者：瀬谷 司、松本美佐子、押海裕之、出願日：2008年6月25日、出願人：北海道大学

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

RNAアジュバント：合成RNAの構造と機能

研究分担者 西川諭 産業技術総合研究所 年齢軸生命工学研究センター 副研究センター長

研究要旨

RNAアジュバントという人工RNA分子のデザインのために、TLR3とPoly(I:C)の相互作用様式に関する知見を得た。またインビトロ選択法により獲得した新機能RNA分子の作るGの4本鎖構造を明らかにした。

A. 研究目的

RNAアジュバントに適したRNA分子の合成を目指す。そのために先ず、1) 既存のTLRとRNA分子の相互作用様式を解析しその認識能を探る。同時に2) インビトロ選択法を駆使し、特定蛋白質に結合するような新しい機能を持ったRNA分子を探索しその構造の特徴を解析する。

B. 研究方法

1) TLR3とウイルス二本鎖RNAのモデルとしてPoly(I:C)の相互作用の様式を明らかにするため、TLR3の種々人工変異体を作成しPoly(I:C)との相互作用を解析する。
2) プリオン蛋白質をモデルに特異的に結合する新規RNA分子をインビトロ選択法により創出しその機能構造を解析する。

C. 研究結果

1) TLR3の細胞外ドメインのN末端領域にあるヒスチジン残基(H39, H60, H108)が二本鎖RNAモデルであるPoly(I:C)との結合に重要であることを見いだした。さらにその結合に際してはpH依存的に変化することを見出した。これらを通じて上記のヒスチジン残基がリガンドの結合ならびにそれに続くシグナル伝達に重要であることを明らかにした。
2) プリオン蛋白質に対してインビトロ選択法で特異的に結合するRNA分子を選択した結果、GGA配列を4回繰り返した構造を持つRNA分子を得た。結合にはこのGGA配列が必須であった。CD、NMR測定の結果、GGAの4回繰り返しの配列は特にK⁺イオン存在下にGの平行型4本鎖構造を形成することを明らかにした。

D. 考察

TLR3と二本鎖RNAの相互作用様式は人工RNAアジュバントをデザインする上で重要な情報を与えてくれる。実際にTLR3が存在するエンドソーム内は酸性で、その条件下で正電荷を持つようになるヒスチジン残基は二本鎖RNAとより相互作用しやすくなり、認識に重要な役割をはたしていると考えられた。
Gの4本鎖構造は生体内では遺伝子(DNA)の末端、テロメア構造に見られることが知られている。しかしRNAでのGの4本鎖構造は非常に珍しく、遺伝子発現の調節に係わっている可能性がある。また今回の平行型の4本鎖はG塩基の成す平面がテトラッド：ヘキサッド型のユニークなもの可能性があり非常に興味深い。次のステップとしてこれらの相互作用、機能構造の知見を生かしRNAアジュバントをデザインする予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Modulation of double-stranded RNA recognition by the N-terminal histidine-rich region of the human Toll-like receptor 3.

福田宏太郎、渡部智也、時末高至、辻田忠志、西川 諭、長谷川典巳、瀬谷 司、松本美佐子、Journal of Biological Chemistry, 283, 22787-22794, (2008)

2) Anti-bovine prion protein aptamer containing GGA repeat interacts both with recombinant bovine prion protein and its beta-isoform with high affinity.

村上和由、西川富美子、能田 健、横山 隆、西川 諭、Prion, 2, 73-80, (2008)

2. 学会発表

1) Significance of the N-terminal histidine-rich region for the function of the human Toll-like receptor 3 ectodomain.

時末高至、渡部智也、辻田忠志、西川 諭、長谷川典巳、瀬谷 司、松本美佐子、福田宏太郎、

Joint Symposium of the 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids and the 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (京都、2008/09)

2) ヒトToll-like receptor 3のN末端に存在するヒスチジン残基による二本鎖RNA認識の調節機構。

時末高至、渡部智也、辻田忠志、西川 諭、長谷川典巳、瀬谷 司、松本美佐子、福田宏太郎、第31回日本分子生物学会年会、(神戸、2008/12)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍
無し

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Akao, Y., H. Masuda, T. Ebihara, Y. Saeki, K. Hazeki, O. Hazeki, <u>M.</u> <u>Matsumoto.</u> and <u>I.</u>	Antitumor natural killer cell induction by orally administered Spirulina extract in mice.	Cancer Sci.			submitted
Ebihara, T. <u>M.</u> <u>Matsumoto.</u> and <u>I.</u> <u>Seva</u>	NK cell licensing by dendritic cell in RNA virus infection.(review)	Curr. Immunol. Rev.			in press
<u>Seva, T.,</u> and <u>M.</u> <u>Matsumoto</u>	The extrinsic RNA-sensing pathway for adjuvant immunotherapy of cancer.(review)	Cancer Immunol. Immunother.			in press
Kodama, K., M. Higashiyama, K. Takami, K. Oda, J. Okami, J. Maeda, T. Akazawa, <u>M.</u> <u>Matsumoto.</u> <u>I.</u> <u>Seva,</u> M. Wada, A. Hayashi, and K.	Innate immune therapy with a BCG cell wall skeleton after radical surgery for non-small cell lung cancer: a case-control study.	Surgery Today.	39	194-200	2009
Seki M, Honda I, Fujita I, <u>Yano I.</u> Yamamoto S, Koyama A.	Whole genome sequence analysis of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) Tokyo 172: A comparative study of BCG vaccine substrains.	Vaccine.	27	1710-1716	2009
Joraku A, Homhuan A, Kawai K, Yamamoto T, Miyazaki J, Kogure K, <u>Yano I.</u> Harashima H, Akaza	Immunoprotection against murine bladder carcinoma by octaarginine-modified liposomes incorporating cell wall of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin.	BJU Int.	103	686-693	2009
<u>Seva, T., M.</u> <u>Matsumoto,</u> T. Ebihara, and H. Oshiumi	Functional evolution of the TICAM-1 (TRIF) pathway for extrinsic RNA sensing.(review)	Immunol. Rev.	227	44-53	2009
Wu, J. D., C. L. Atteridge, X. J. Wang, <u>T. Seva,</u> and S. R. Plymate.	Obstructing shedding of the immune stimulatory MHC class I chain-related gene B prevents tumor formation.	Clin. Cancer Res.	15	632-640	2009
Oshiumi, H., <u>M.</u> <u>Matsumoto.</u> S. Hatakeyama, and <u>I.</u> <u>Seva</u>	Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- β induction during the early phase of viral infection.	J. Biol. Chem.	284	807-817	2009
Miyamoto Y, Mukai T, Maeda Y, Kai M, Naka T, <u>Yano I.</u> Makino M.	The Mycobacterium avium complex gtfTB gene encodes a glucosyltransferase required for the biosynthesis of serovar 8-specific	J Bacteriol.	190	7918-7924	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Itoh, K., A. Watanabe, K. Funami, <u>T. Seva</u> , and <u>M. Matsumoto</u>	The clathrin-mediated endocytic pathway participates in dsRNA-induced IFN- β production.	J. Immunol.	181	5522-5529	2008
Matsunaga I, Naka T, Talekar RS, McConnell MJ, Katoh K, Nakao H, Otsuka A, Behar SM, <u>Yano I</u> , Moody DB, Sugita M.	Mycolytransferase-mediated glycolipid exchange in Mycobacteria.	J Biol Chem.	283	28835-28841	2008
Shingai, M., M. Azuma, T. Ebihara, M. Sasai, K. Funami, M. Ayata, H. Ogura, H. Tsutsumi, <u>M. Matsumoto</u> , and <u>T. Seva</u>	Soluble G protein of respiratory syncytial virus inhibits Toll-like receptor 3/4-mediated IFN-beta induction.	Int. Immunol.	20	1169-1180	2008
Fukuda K, Watanabe T, Tokisue T, Tsujita T, <u>Nishikawa S</u> , Hasegawa T, <u>Seva</u>	Modulation of double-stranded RNA recognition by the N-terminal histidine-rich region of the human Toll-like receptor 3.	J. Biol. Chem.	283	22787-22794	2008
Ebihara, T., M. Shingai, <u>M. Matsumoto</u> , T. Wakita, and T. Seva	Hepatitis C virus (HCV)-infected hepatocytes extrinsically modulate dendritic cell maturation to activate T cells and NK cells.	Hepatology.	48	48-58	2008
Ito T, Hasegawa A, Hosokawa H, Yamashita M, Motohashi S, Naka T, Okamoto Y, Fujita Y, Ishii Y, Taniguchi M, <u>Yano I</u> , Nakayama T.	Human Th1 differentiation induced by lipoarabinomannan/lipomannan from Mycobacterium bovis BCG Tokyo-172.	Int Immunol.	20	849-860	2008
Funami K., M. Sasai, H. Oshiumi, <u>T. Seva</u> , and <u>M. Matsumoto</u>	Homo-oligomerization is essential for Toll/IL-1 receptor domain containing adaptor molecule-1-mediated NF-kappaB and interferon regulatory factor-3	J. Biol. Chem.	283	18283-18291	2008
Nakamura, M., K. Funami, A. Komori, T. Yokoyama, Y. Aiba, A. Araki, Y. Takii, M. Ito, M. Matsuyama, M. Koyabu, K. Migita, K. Taniguchi, H. Fujioka, H. Yatsuhashi, <u>M. Matsumoto</u> , H. Ishibashi, and <u>T. Seva</u>	Increased expression of Toll-like receptor3 in intrahepatic biliary epithelial cells at sites of ductular reaction in diseased livers.	Hepatology International.	2	222-230	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shime, H., M. Yabu, T. Akazawa, K. Kodama, <u>M.</u> <u>Matsumoto, T.</u> Seva, and N. Inoue	Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23-IL-17 proinflammatory pathway.	J. Immunol.	180	7175-7183	2008
Fujiwara N, Nakata N, Naka T, <u>Yano I.</u> Doe M, Chatterjee D, McNeil M, Brennan PJ, Kobayashi K, Makino M, Matsumoto S,	Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from Mycobacterium intracellulare.	J Bacteriol.	190	3613-3621	2008
Murakami K, Nishikawa F, Noda K, Yokoyama T, <u>Nishikawa S.</u>	Anti-bovine prion protein aptamer containing GGA repeat interacts both with recombinant bovine prion protein and its beta-isoform with high affinity.	Prion	2	73-80	2008



Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered Spirulina extract in mice

Journal:	<i>Cancer Science</i>
Manuscript ID:	CAS-OA-0834-2008.R1
Manuscript Categories:	Original Article
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Akao, Yuusuke; Hokkaido University, Graduate School of Medicine, Microbiology and Immunology Ebihara, Takashi; Hokkaido University, Graduate School of Medicine, Microbiology and Immunology Masuda, Hisayo; Osaka Medical Center for Cancer, Immunology Saeki, Yoshiko; Osaka Medical Center for Cancer, Immunology Akazawa, Takashi; Osaka Medical Center for Cancer, Immunology Hazeki, Kaoru; Hiroshima University, Graduate School of Biomedical Sciences, Molecular Medical Science Hazeki, Osamu; Hiroshima University, Graduate School of Biomedical Sciences, Molecular Medical Science Matsumoto, Misako; Hokkaido University Graduate School of Medicine, Microbiology and Immunology Seya, Tsukasa; Hokkaido University, Microbiology and Immunology
Keyword:	(12-1) Innate immunity < (12) Basic and clinical studies of cancer immunity



1
2
3
4
5
6 **Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally**
7 **administered Spirulina extract in mice**
8
9

10
11 Yuusuke Akao¹, Takashi Ebihara¹, Hisayo Masuda^{2,4}, Yoshiko Saeki²,
12 Takashi Akazawa², Kaoru Hazeki³, Osamu Hazeki³, Misako Matsumoto^{1,2},
13 and Tsukasa Seya^{1,2}
14
15

16
17 ¹Department of Microbiology and Immunology, Hokkaido University
18 Graduate School of Medicine, Kita-15, Nishi-7, Kita-ku Sapporo 060-8638
19 Japan
20

21
22 ²Department of Immunology, Osaka Medical Center for Cancer, Nakamichi
23 1-3-2, Higashinari-ku, Osaka 537-8511 Japan
24

25
26 ³The Division of Molecular Medical Science, Graduate School of
27 Biomedical Sciences, Hiroshima University, Minami-ku, Hiroshima
28 734-8551, Japan
29
30

31
32 ⁴Present address: Research and Education Center for Genetic Information,
33 Nara Institute for Science and Technology, Ikoma, Nara 631-0101, Japan
34
35

36
37 First three authors equally contributed to this work
38
39

40
41 Running title: **Spirulina for NK activation**
42
43

44
45 Word count (excluding references and legends): 4,161
46
47

48
49 Address correspondence to: Tsukasa Seya, Department of Microbiology and
50 Immunology, Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Kita-ku,
51 Sapporo 060-8638 Japan. Tel, 81 11 706 5073; FAX: 81 11 706 7866;
52 E-mail: seya-tu@pop.med.hokudai.ac.jp
53
54
55
56
57
58
59
60

Summary

Oral administration of hot water-extract of *Spirulina* (The cyanobacterium *Spirulina platensis*) leads to augmentation of NK cytotoxicity in human. Here, we applied to syngeneic tumor-implant mice (C57BL/6 vs B16 melanoma) *Spirulina* to elucidate the mechanism of raising antitumor NK activation. A B16D8 sub-cell line barely expressed MHC class I but ~50% expressed Rae-1, a ligand for NK activation receptor NKG2D. The Rae-1-positive population of implant B16 melanoma was effectively eliminated in the tumor mass progressed in mice. This antitumor activity was induced in parallel with IFN- γ and abolished in mice by treatment with asialo-GM-1 but not CD8 β Ab, suggesting the effector is NK cell. In fact, NK cell activation occurred in the spleen of wild-type mice having *Spirulina*. This *Spirulina*-mediated enhanced NK activation was abrogated in MyD88 $-/-$ mice but not in TICAM-1 $-/-$ mice. The NK activating properties of *Spirulina* depending on MyD88 were confirmed with in vitro bone marrow-derived dendritic cells expressing TLR2/4. In D16D8 tumor challenge studies, *Spirulina* antitumor effect was abolished in MyD88 $-/-$ mice. Hence, orally administered *Spirulina* enhances tumoricidal NK activation through the MyD88 pathway. *Spirulina* exerted a synergistic antitumor activity with BCG-cell wall skeleton (CWS), which is known to activate the MyD88 pathway via TLR2/4 with no NK enhancing activity. *Spirulina* and BCG-CWS synergistically augmented IFN- γ production and antitumor potential in the B16D8 vs. C57BL/6 system. We infer from these results that NK activation by *Spirulina* has some advantage in combinational use with BCG-CWS for developing adjuvant-based antitumor immunotherapy.