

201008003A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 瀬谷 司

平成23(2011)年 5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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 瀬谷 司

平成23(2011)年 5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. 抗がん免疫活性を有する新規RNAアジュバントの開発 ----- 8
松本 美佐子
2. BCG-CWS東ロットの機能解析 ----- 11
児玉 憲
3. 抗がん免疫活性を有する新規RNAアジュバントの合成 ----- 13
ペンメッチャ・クマール
4. エフェクター選別性の抗がん免疫アジュバントの開発 ----- 15
志馬 寛明

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 17

IV. 研究成果の刊行物 ----- 19

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 北海道大学大学院医学研究科 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。昨年度はM161 Ag リポ蛋白（Pam2）とRNA duplex のNK活性化能について解析結果を報告した。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。本年度はこれらの合成変異体を増産し、（特にRNA誘導体は長いと極めて高価になる）NK のin vitro 抗腫瘍解析とCTLによる腫瘍退縮を実験的に検討し、本企画を完成させた。これにより、in vivo, in vitroのPam2, dsRNA Xの機能研究から以下の結論を得た。

H21年度にPam2誘導体のNK 活性化に必要な構造条件を定義した（H21 年度報告書）。今回、樹状細胞経由でNK活性化条件を満たすPam2Cys#6, Pam2Cys#12, Pam2CSK4, 満たさないcontrolを担がんマウスに投与してNK 依存性（B16D8）とCTL依存性（EL4）の腫瘍退縮をみた。意外なことにPam2Cys#6, Pam2Cys#12, Pam2CSK4をi. p. 投与すると腫瘍退縮はNK, CTLどちらにも依存しても起きなかった。s. c. 投与では腫瘍退縮が観察され、Pam2ペプチド配列によって抗がん活性も修飾を受けた。Pam2 のi. p. 投与で抗がん免疫が誘導されにくい原因を探索してin vivoではIL-10, TregがPam2によって高く発現誘導することが明らかになった。従って、MyD88 経路依存性の腫瘍退縮がNK, CTLで観察されにくいという旧来の知見は抑制性の免疫環境によるものであることが判明した。MyD88経路の抗がん活性はin vitro からは類推できない。

一方、H21年度に合成が成功したRNA duplex（dsRNA X）と polyI:C を用いて担がんマウスのNK 依存性とCTL依存性の腫瘍退縮をみた。結果はi. p. 投与でどちらの系も効果的に腫瘍退縮を起こした。これらの退縮はIPS-1 経路に全く依存せず、TICAM-1経路に依存した。従って、抗がんNK, CTL ともにTLR3を活性化する経路で誘導されると証明できた。抗がんNK活性化は樹状細胞にINAM分子が誘導されてNK 細胞を活性化することが原因で大部分が説明される。抗がんCTL誘導の担当分子は今後のTICAM-1経路の分子スクリーニングにより同定することを目指している。

来年度以降の予算が許せば、GLP用に剤型を確定することを目指す。

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
児玉 憲	大阪府立成人病センター・副院長
ペンメッチャ・クマール	産業技術総合研究所・主任研究員
志馬 寛明	北海道大学大学院医学研究科・助教

A. 研究目的

QOLのよい術後治療法として免疫療法は注目されてきたが、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 (Cancer Immunol Immunother 58:1175, 2009)。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, CTLをin vivo でマウスに誘導してがんを退縮に導く副作用の少ない合成品を抽出することを目的とする。

B. 研究方法

Pam2Cys合成品は阪大藤本博士、産総研西川博士に依頼して作成した。dsRNA Xはその誘導体27種とともに西川研究室 (つくば) とGene design社に依頼した。前者はT7promoter によるtranscription, 後者は化学合成の手法を用いている。遺伝子改変マウスはTICAM-1, IPS-1 KO を当研究室で作製し、MyD88 KO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。腫瘍株としてB16D8 (NK感受性)、EL4/EG7 (CTL感受性)、3LL (マクロファージ感受性)を用いた。NK活性はB16D8 細胞株を用いて⁵¹Cr 遊離アッセイで行った。CTL活性はOVA tetramer とOT-1を用いてOVA に対するCTLを査定した。他にCFSEラベルの脾細胞のin vivo 増殖アッセイ、B3Zアッセイ、テトラマーアッセイなどを併用した。siRNA, transfection はリポ

フェクチン法で行い、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

H22 年度の目標はH21 年度の結果を踏まえて Pam2誘導体 (PamCysXXXXXX), RNAduplex (dsRNA X)の抗がん活性とin vivoデータを完成させ、腫瘍退縮機能の優れた構造物を特定して合成アジュバントを創製することであった。

C-1. Pam2 誘導体

M161Agのpeptide改変誘導体とペプチド配列の異なる Pam2Cys#6, Pam2Cys#12, Pam2CSK4、活性の無いPam2CSKを合成した。樹状細胞への振りかけ実験からこれらのTLR2アゴニスト活性は予想通りの結果を得ていた。今回、網羅的に上清のサイトカインを測定した所、抗原刺激依存性にIL-10の産生が増すことが判明した。TGF-betaは上がらなかった。またIL10 産生はTLR2アゴニスト活性があると想定されるPam2の誘導体全てで上がり、樹状細胞をTLR2-/-またはMyD88-/-マウスから調整すると上がらなかった。以上からIL-10産生はTLR2-MyD88経路で誘導されると考えられた。

B16D8担がんマウスにPam2誘導体をi. p. して腫瘍退縮効果を見るとNK依存性に起きるはずの退縮が殆ど見られなかった (図1)。WT, TLR2-/-マウスにPam2投与後に脾臓、リンパ節を摘出し、Foxp3/CD4リンパ球を数えるとWT でPam2依存性に増えた。しかし、TLR2-/-のFoxp3/CD4リンパ球数は増えなかった。このFoxp3/CD4リンパ球増加はIL-10抗体を全投与することで阻害された。以上からTLR2経路で誘導されたIL-10 が抑制性リンパ球の誘導に関与することが示唆された。

次にFoxp3/CD4リンパ球の機能をCFSE 標識リンパ球の分裂パターン (FACS解析) で見た所、リンパ球増殖は阻害された。以上からPam2によって誘導されるFoxp3/CD4リンパ球は制御性 T (Treg) リンパ球と判明した。以上の知見からin vivo腫瘍退縮実験 (B16D8) を再試行した。マウスを予め抗CD25抗体で処理してTreg を枯渇させておくとPam2CSK4 依存性の腫瘍退縮は予想通り観察された (図2A)。マウスの生存率も抗CD25抗体処理群ではPam2 依存性に上昇した

(図2B)。これらの結果はPam2の抗がん効果はTregによってキャンセルされていることを強く示唆した。

同様の腫瘍退縮実験をEL4で行った。担がんマウスを予め抗CD25抗体で処理した群でPam2のCTL依存性腫瘍退縮が顕在化した。此のことはCTL抑制もTregが担当し、TregはPam2の抗がん活性を阻害していることが判明した。従来、M161Ag誘導体をアジュバントとして用いた場合膵臓がんなどで効果があると報告されてきた。臓器特有のTreg活性の活性チェックが必要であり、腫瘍退縮に直結するがん微小環境を誘導する必要がある。

C-2. RNA duplex

RNA duplexの種々の改変体(表1)から特定の構造をとるstemが最もTLR3を活性化した。RNA配列より全体構造が重要であると判明した。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。Stem dsRNAをエンドソームに分配する誘導体を作製し、dsRNA Xと名付けた。この構造は特許取得後に公表する。dsRNA Xはヒト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し、TLR3とマージした。マウスでもTICAM-1 KOではIFN誘導能を著しく下げたため、TLR3を使って生理機能を発揮するというin vitroのデータは昨年度に提出した。IPS-1経路には全く依存しなかった。

B16D8担がんマウスへのin vivo投与で、dsRNA XにはpolyI:Cのような毒性がなく、サイトカイン誘導も極めて弱かったが150 ug/head i.p.で2日後に腫瘍が退縮した。このような劇的な効果は他のアジュバントには見ない効果である。dsRNAXの各種誘導体から最も抗がん効果の強いものをスクリーニングし、NK活性化効果と平行することとtype I IFN誘導活性とは平行しないことが明らかになった。

PolyI:Cでin vitro BMDCを処理すると早いサイトカイン誘導のあと、24 h以内にNK活性化が誘導された。同様の系で、dsRNAXはBMDCに働くアジュバントである事が検証できた。ただし、サイトカイン誘導能は弱く、NK活性化のみが検証できた。TICAM-1^{-/-}、IPS-1^{-/-} BMDCを調整し、dsRNAXによるNK活性化をin vitroで査定すると、TICAM-1経路がNK活性化に強く、IPS-1経路は弱く関与することが判明した。MyD88経路

は関与しなかった。TICAM-1依存性にINAM分子が誘導されることも検証した。

さらにTICAM-1、IPS-1 KOマウスを使ってEG7の担がん状態でCTL誘導を査定したところ、抗腫瘍CTLはTICAM-1によって誘導され、IPS-1は殆ど関与しないことが示唆された。このことは樹状細胞成熟化と云われた抗腫瘍活性の一端はNKの場合とCTLの場合があり、NKはINAMと云う新規分子によって担われ、CTLの場合は樹状細胞内にTICAM-1経路によって誘導される分子に担われていることが証明できた。この両反応を誘導できるdsRNA Xのうち、副作用が極めて弱いdsRNA Xは抗がんアジュバントとして極めて有望である。

D. 考察

本年度は移植がんの退縮効果を発揮する抗がんアジュバントを機能別に絞り込み、dsRNA Xという最強の合成アジュバントを確立できた。今後ヒトに抗がん効果を発揮するかを調べるのが急務となる。

RNAアジュバントは樹状細胞に働いてCTL(EL4)、NK(B16D8)両方を活性化する点でTLR2アゴニストに優る。Pam2ペプチド、M161Ag誘導体についてはIL-10/Tregを誘導すると云う問題点が明らかになった。一般にTLR2アゴニストが抗がん活性において弱いことは指摘されてきた。此の原因はMyD88経路がIL-10を強く誘導することに起因すると云える。In vitroではPam2は十分なNK活性化能を樹状細胞に付与する。しかし、in vivoでこの効果は消失し、IL10またはTregの枯渇後に活性は顕在化する。CTL誘導のアジュバントとしてもIL-10、Tregは強い阻害に働く。がん治療の治験に最も使われてきたBCG-CWSとM161AgリポペプチドはNK、CTL誘導についてin vitroでpolyI:Cに遜色無いが、in vivoの腫瘍退縮において極めて劣るのは免疫制御環境を起動するためだり、それが強い臓器ではアジュバントとして使えないであろう。BCG-CWSやPam2誘導体をCTL誘導剤として実用化に向けて検討する場合、この問題の解決は必須となる。

一方、RNA duplexでは最善のdsRNA Xを合成して、CTL、NK活性化、TAM変換アジュバントの最適標品を決める研究が残されている。さらに単に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。この場合、dsRNA Xの細胞内分配(エンドソームから細胞質に落ちる)の方法も考案されなければならない。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創薬にも将来チャレンジしたい。

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、TICAM-1, INAMに加えて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でなく毒性のない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. 論文発表 (すべて査読有り)

1. Oshiumi, H., K. Sakai, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN-beta inducing potential. *Eur. J. Immunol.* 40: 940-948.
2. Akazawa, T., N. Inoue, H. Shime, K. Sugiura, K. Kodama, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion. *Cancer Sci.* 101: 1596-1603.
3. Kasamatsu, J., H. Oshiumi, M. Matsumoto, Kasahara, and T. Seya. 2010. Phylogenetic and expression analysis of Lamprey Toll-like receptors. *Dev. Comp. Immunol.* 34: 855-865.
4. Azuma, M., R. Sawahata, Y. Akao, T. Ebihara, S. Yamazaki, M. Matsumoto, M. Hashimoto, K. Fukase, Y. Fujimoto, and T. Seya. 2010. The peptide sequence of diacyl lipopeptides determines dendritic cell TLR2-mediated NK activation. *PLoS ONE* 5: e12550.
5. Tatematsu, M., A. Ishii, H. Oshiumi, M. Horiuchi, F. Inagaki, T. Seya, and M. Matsumoto. 2010. A molecular mechanism for Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 (TICAM-1)-mediated IRF-3 activation. *J. Biol. Chem.* 285: 20128-20136.
6. Ebihara, T., M. Azuma, H. Oshiumi, J. Kasamatsu, K. Iwabuchi, K. Matsumoto, H. Saito, T. Taniguchi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Identification of a polyI:C-inducible membrane protein, that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J. Exp. Med.* 207: 2675-2687.
7. Ehira, N., H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Kondo, M. Asaka and T. Seya. 2010. An embryo-specific expressing TGF-beta family protein, growth-differentiation factor 3 (GDF3), augments progression of B16 melanoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 29: 135.
8. Oshiumi, H., H. Mori, M. Ikeda, N. Kato, M. Matsumoto, O. Takeuchi, S. Akira, K. Shimotohno, and T. Seya. 2010. Hepatitis C virus core protein abrogates the DDX3 function that enhances IPS-1-mediated IFN-beta induction. *PLoS ONE.* 5: e14258.
9. Oshiumi, H., M. Miyashita, N. Inoue, M. Okabe, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell host microbe.* 8: 496-509.

10. Seya, T., 2010. Innate immunity and vaccine. *Vaccine* 28: 8041-8042. (preface)
11. Yabu, M., H. Shime, H. Hara, T. Saito, M. Matsumoto, T. Seya, T. Akazawa, and N. Inoue. 2010. IL-23-dependent and -independent enhancement pathways of IL-17A production by lactic acid. *Int. Immunol.* 23: 29-41.
12. Takaki, H., Y. Watanabe, M. Shingai, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Strain-to-strain difference of V protein of measles virus affects MDA5-mediated IFN- β -inducing potential. *Molec. Immunol.* 48: 497-504.
13. T. Seya. 2011. Addendum to "Strain-to-strain difference of V protein of measles virus affects MDA5-mediated IFN- β -inducing potential" *Molec. Immunol.* 48: 497-504.
14. Watanabe, A., M. Tatematsu, K. Saeki, S. Shibata, H. Shime, A. Yoshimura, C. Obuse, T. Seya, and M. Matsumoto. 2011. Raflin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I:C)-mediated TLR3 activation. *J. Biol. Chem.* 86: 10702-10711.
15. Sawahata, R., H. Shime, S. Yamazaki, Y. Fujimoto, K. Fukase, T. Akazawa, N. Inoue, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Failure of mycoplasmal lipoprotein MALP-2 to induce NK cells activation through dendritic cell TLR2. *Microbes Infect.* 13: 350-358.
16. Miyashita, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. The SKI2-related helicase DDX60 is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling. *Molec. Cell Biol.* (in press)
17. Wakasa, K., H. Shime, M. Kurita-Taniguchi, M. Matsumoto, M. Imamura, and T. Seya. 2011. Development of monoclonal antibodies that specifically interact with necrotic lymphoma cells. *Microbiol. Immunol.* 55: 373-377.
18. Ogawa, T., S. Tsuji-Kawahara, T. Yuasa, S. Kinoshita, T. Chikaishi, S. Takamura, H. Matsumura, T. Seya, T. Saga, and M. Miyazawa. 2011. Natural killer cells recognize Friend retrovirus infected erythroid progenitor cells through NKG2D-RAE-1 interactions *in vivo*. *J. Virol.* (in press).
19. Yamazaki, S., K. Okada, A. Maruyama, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. TLR2-dependent induction of IL-10 and Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells prevents effective anti-tumor immunity induced by Pam2 lipopeptides *in vivo*. *PLoS ONE* 6: (4). 18833.
20. Matsumoto, M., H. Oshiumi, and T. Seya. 2011. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. *Rev. Med. Virol.* 21: 67-77 (review).
21. Seya T., J. Kasamatsu, M. Azuma, H. Shime, and M. Matsumoto. 2011. Natural killer cell activation secondary to innate pattern sensing. *J. Innate Immunity.* 3: 264-273.

2. 学会発表
省略

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- ・産業財産権の名称：
アジュバント活性を有する新規核酸およびその利用
- ・発明者：瀬谷司、松本美佐子
- ・出願者：北海道大学
- ・産業財産権種類、番号：特願2010-169407
- ・出願年月日：2010. 7. 28
- ・国内・外国の別：国内外

[特許の概略]

polyI:Cなど2重鎖(ds)RNAはウイルス産物の代表として強力なtype I interferon (IFN) 誘導能と細胞性免疫の活性化を誘導することが分かり、ワクチン・抗がん免疫などに使用が試みられてきた。しかし、副作用が強く、全身性のサイトカインストームによるショックや関節・筋肉痛などがその汎用性を妨げてきた。2重鎖(ds)RNAの生理活性はその後の研究で主にTICAM-1 経路・IPS-1 経路の2つで誘導され、この副作用は主にIPS-1の細胞内サイトカイン経路(全身細胞に付与する)の活性化によることが判明した。TICAM-1 経路はミエロイド系と上皮系の一部にしか発現せず、免疫活性化を主たる役目にする。本特許はTICAM-1 のみを活性化する合成核酸誘導体を作製して、それを抗がん免疫活性化に適用して成功した物質に対する特許である。副作用の少ない普遍的なRNAアジュバントを開発して難治性疾患患者に適用することが目的である。

【追記】

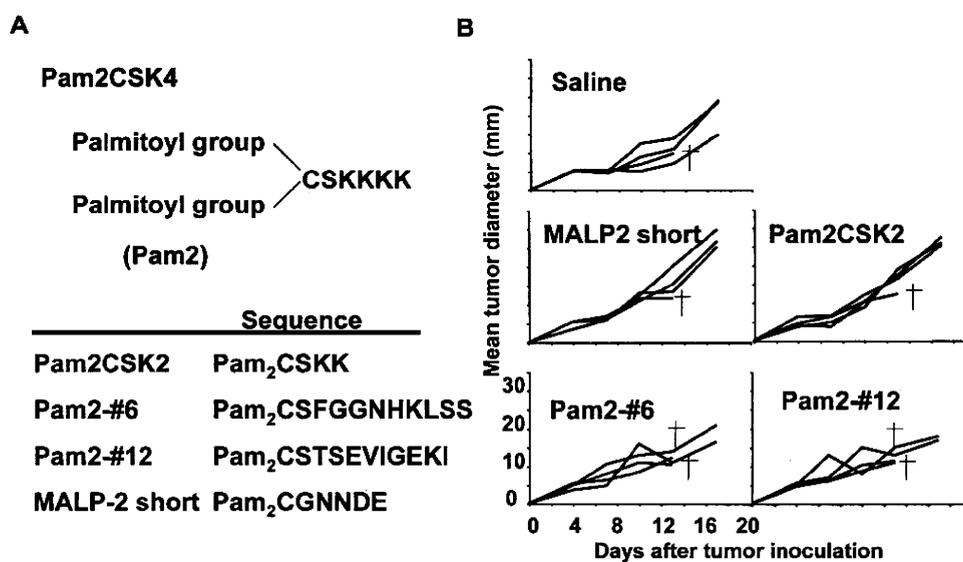
基礎研究と一部の臨床研究に関して北海道大学医学研究科の倫理指針に則り、委員会において研究計画の承認を受けた。動物実験は北海道大学の動物実験委員会に申請して許可を得た。実験は厚生労働省の動物実験等の実施に関する基本指針に従い実施した。宣告すべき利益相反は無い。

表1. dsRNAX のまとめ

RNA 誘導体	TLR3-IFN β (HEK293 reporter)	RIG-I/MDA5 (HEK293 reporter)	DC-NK activation	<i>In vivo</i> mouse cytokine	Anti-tumor activity (B16D8)
Poly(I:C)	○	○	○	high	effective
1	×	×	N.D.		
2	×	×	N.D.		
3	○	×	N.D.		
4	○	×	N.D.		
5	○	×	N.D.		
6	○	×	N.D.		
7	○	×	N.D.		
8	×	×	○		effective(weak)
9	×	×	○		effective(weak)
10	○	×	○		
11	○	×	○		
12	○	×	○		
13	○	×	○	medium	effective
14	×	○	N.D.		
15	×	○	○	medium	mice died
16	×	○	×		
17	×	×	○		effective(weak)
18	×	×	○	Not detected	effective
19	×	×	○	Not detected	effective

図1 :

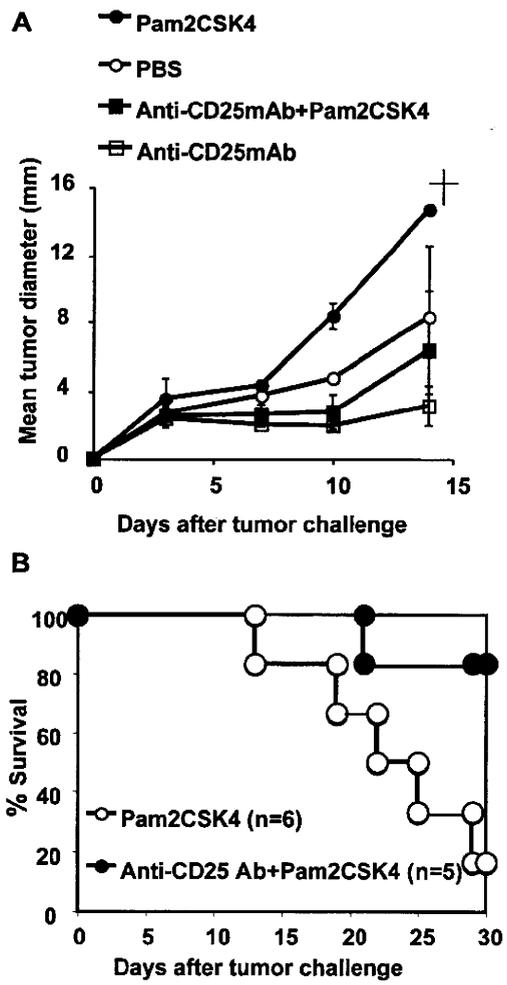
Figure 1



B16D8の担がんマウスに各Pam2誘導体（左図）をi. p. し、腫瘍径の変化を追跡した（右図）。
In vivo投与で有意差をもって腫瘍退縮を促進した合成物はなかった。

図2 :

- A. B16D8担がんマウスをあらかじめCD25抗体で処理してから、Pam2CSK4を投与した。Tregがないと、Pam2の腫瘍退縮効果が見られた。
- B. CD25抗体処理群 (●) と非処理群 (○) のPam2投与効果を、担がんマウスの生存率で調べた。



抗がん免疫活性を有する新規RNAアジュバントの開発

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 合成dsRNAのpoly(I:C)は、骨髄系樹状細胞のTLR3を活性化し、TICAM-1(別名TRIF)依存的にNK細胞やCTLを誘導し抗がん免疫活性を示す。しかし、poly(I:C)はTLR3のみでなく細胞質のMDA5も活性化し、炎症性サイトカインやタイプI IFN産生を誘導し強い副作用をもたらす。本研究では、TLR3のみ活性化するRNAアジュバントの開発を行い、抗がん免疫活性を有する新規合成RNA誘導体を得た。

A. 研究目的

合成二重鎖RNAのpoly(I:C)は骨髄系樹状細胞を活性化し、エンドソームに局在するTLR3とそのアダプター分子TICAM-1(別名TRIF)を介して樹状細胞にNK細胞活性化能、CTL誘導能を与え、抗がん免疫活性を示す。しかし、poly(I:C)は細胞外からエンドソームTLR3のみでなく細胞質のMDA5も活性化し、アダプター分子IPS-1(別名MAVS)を介して炎症性サイトカインやタイプI IFN産生を誘導することから、両経路の活性化が強い副作用をもたらすと考えられる。我々はこれまでに、RNA duplexの種々の改変体から、TLR3の効率的な活性化には一定以上の長さのRNA duplexが必要であるが配列には依存しないこと、リボースの2位の修飾やstem-loop構造は活性を低下させることを明らかにしてきた。また、細胞外から骨髄系樹状細胞TLR3を活性化する場合、RNA duplexの取り込みの有無が細胞応答を決定づけ、取り込みはdsRNA構造に依存することを明らかにし、poly(I:C)の取り込みに必須の分子を同定してきた。本研究では、骨髄系樹状細胞TLR3のみを活性化するRNAアジュバントの開発を行い、抗がん免疫効果を有する新規合成RNA誘導体を得ることを目的とした。

B. 研究方法

TLR3のリガンド認識機構を考慮し、21種類のRNA誘導体を合成した。*In vitro assay*として、1. TLR3を介したIFN- β promoterの活性化、2. 細胞質内MDA5経路の活性化、3. マウス骨髄系樹状細胞(BMDC)活性化によるNK細胞活性化、4. BMDC活性化によるサイトカイン産生について検討した。また、*in vivo assay*とし

て、1. マウス腹腔内投与後の炎症性サイトカイン産生の経時的測定、2. B16メラノーマ細胞を用いたマウス移植がんモデルにおけるアジュバント効果の査定を行った。

C. 研究結果

21種類のRNA誘導体のうち、9種類の誘導体について*in vivo*におけるアジュバント効果を調べた結果、3種類のRNA誘導体(#13, #18, #19)がB16メラノーマ細胞を用いたマウス移植がんモデルにおいて、poly(I:C)とほぼ同等のがん退縮効果を示した。マウス腹腔内投与後のIL-6, TNF- α , IL-10産生は、#18, #19では全く検出されず(10 pg/ml以下)、#13ではIL-6, TNF- α 産生はpoly(I:C)投与の50%、IL-10は10%程度であった。各RNA誘導体をHEK293細胞の細胞質に直接導入し、RIG-I, MDA5を介したIFN- β promoterの活性化を測定したところ、いずれの誘導体においても活性化は見られなかった。一方、HEK293細胞でのTLR3を介したIFN- β promoter 活性化は、#13でpoly(I:C)と同等の活性化が見られたが、#18, #19は殆ど活性化しなかった。#18, #19はBMDC刺激で、TLR3-TICAM-1依存的にIL-6, TNF- α , IL-12産生を誘導することがTICAM-1ノックアウトマウスを用いた実験で明らかになった。また、BMDC活性化によるNK細胞活性化は、3種のRNA誘導体いずれにおいても誘導された。

D. 考察

細胞外からTLR3のみを活性化できるRNA誘導体はこれまで報告がなく、今回の化合物がはじめてである。RNA誘導体の抗がん活性はタイプI IFNやサイトカイン産生能とパラ

レルではないことから、異なるシグナル伝達系路もしくはシグナル伝達の間を介して誘導されると考えられる。今後、新規RNA誘導体によるCTL活性化能、in vivoデリバリー、担当細胞群および抗がん免疫シグナルの同定を行い、次世代アジュバントとして確立する予定である。

E. 結論

以下の特徴を有する新規RNAアジュバントを得た。

1. poly(I:C)同様細胞外からエンドソームTLR3にターゲットされる。
2. TLR3を活性化しTICAM-1を介してシグナルを伝達する。
3. 細胞質RIG-I, MDA5経路を活性化しない
4. B16メラノーマ細胞を用いたマウス移植がんモデルにおいて、poly(I:C)と同等の抗がん活性を示す。
5. マウス生体内投与での炎症性サイトカイン産生量はpoly(I:C)投与より少ない。

G. 研究発表

1. 論文発表 (英語論文は査読あり)

1. Yamazaki S., K. Okada, A. Maruyama, M. Matsumoto, H. Yagita, and T. Seya. TLR2-dependent induction of IL-10 and Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells prevents effective anti-tumor immunity induced by Pam2 lipopeptides in vivo. *Plos ONE* 6 (4): e18833.
2. Seya T. J. Kasamatsu, M. Azuma, H. Shime, and M. Matsumoto. 2011. Natural killer cell activation secondary to innate pattern sensing. *J. Innate Immun.* Review. DOI: 10.1159/000326891.
3. Watanabe, A. M. Tatematsu, K. Saeki, S. Shibata, H. Shime, A. Yoshimura, C. Obuse, T. Seya, and M. Matsumoto. 2011. Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I:C)-mediated TLR3 activation. *J. Biol. Chem.* 286: 10702-10711.
4. Matsumoto, M., H. Oshiumi, and T. Seya. 2011. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. *Rev. Med. Virol.* 21: 67-77.
5. Sawahata, R., H. Shime, S. Yamazaki, N. Inoue, T. Akazawa, Y. Fujimoto, K. Fukase, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Failure of mycoplasma lipoprotein MALP-2 to induce NK cell activation through dendritic cell TLR2. *Microbes Infect.* 13: 350-358.

6. Yabu, M., H. Shime, H. Hara, T. Saito, M. Matsumoto, T. Seya, A. Akazawa, and N. Inoue. 2011. IL-23-dependent and -independent enhancement pathways of IL-17A production by lactic acid. *Int. Immunol.* 23: 29-41.
7. Takaki, H., Y. Watanabe, M. Shingai, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Strain-to-strain difference of V protein of measles virus affects MDA5-mediated IFN- β -inducing potential. *Mol. Immunol.* 48: 497-504.
8. Oshiumi, H. M. Miyashita, N. Inoue, M. Okabe, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell Host & Microbe* 8: 496-509.
9. Oshiumi, H., M. Ikeda, K. Mori, M. Matsumoto, O. Takeuchi, S. Akira, N. Kato, K. Shimotohno, and T. Seya. 2010. Hepatitis C virus core protein abrogates the DDX3 function that enhances IPS-1-mediated IFN- β induction. *Plos ONE* Dec. 8; 5(12):e14258.
10. Ebihara, T., M. Azuma, H. Oshiumi, J. Kasamatsu, K. Iwabuchi, K. Matsumoto, H. Saito, T. Taniguchi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Identification of a poly I:C-inducible membrane protein that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J. Exp. Med.* 207:2675-2687.
11. Azuma M., R. Sawahata, Y. Akao, T. Ebihara, S. Yamazaki, M. Matsumoto, M. Hashimoto, K. Fukase, Y. Fujimoto, and T. Seya. 2010. The peptide sequence of diacyl lipopeptides determines dendritic cell TLR2-mediated NK activation. *Plos ONE* 5, issue 9, e12550:1-12.
12. Tatematsu M., A. Ishii, H. Oshiumi, M. Horiuchi, F. Inagaki, T. Seya, and M. Matsumoto. 2010. A molecular mechanism for Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1-mediated IRF-3 activation. *J. Biol. Chem.* 285:20128-20136.
13. Akazawa, T., N. Inoue, H. Shime, K. Sugiura, K. Kodama, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion. *Cancer Science* 101: 1596-1603.
14. 瀬谷司、押海裕之、志馬寛明、松本美佐子、自然免疫と癌治療 実験医学 (増刊) 29 (2): 111-118, 2011.

15. 瀬谷 司、松本美佐子、ワクチン増強剤としての抗がんRNAアジュバントの展望 細胞 43 (3): 20-23, 2011

2. 学会発表

1. Matsumoto M, Watanabe A, Seya T.: Raftlin is essential for poly(I:C) cellular uptake in human myeloid dendritic cells. **Keystone symposia**, 2011. 2.13-16.
2. Seya T, Shime H, Azuma M, Matsumoto M.: RNA adjuvants that induce multiple effectors by dendritic cells for facilitating antitumor immunity. **Keystone symposia**, 2011. 2.13-16.
3. Watanabe A, Seya T, Matsumoto M.: Identification of a novel protein that participates in poly(I:C) cellular uptake. **14th International Congress of Immunology**. 2010. 8.22-27.
4. Tatematsu M, Seya T, Matsumoto M.: Identification of Leu194 as a key residue of Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1-mediated IRF-3 activation. **14th International Congress of Immunology**. 2010. 8.22-27.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願

1. 発明の名称：アジュバント活性を有する新規核酸及びその利用、特願2010-169407、発明者：松本美佐子、瀬谷司、出願日：平成22年7月28日、出願人 国立大学法人北海道大学

BCG-CWS東ロットの機能解析

研究分担者 児玉 憲 大阪府立成人病センター 副院長

研究要旨

東京株BCG-CWS（東ロット）の樹状細胞応答とエフェクター誘導能について以下の項目を検討した。1. 樹状細胞TLR2/4活性化、2. 樹状細胞 CD83/86発現上昇、3. 抗原提示能亢進、4. IL-6, IL-12, TNF- α 誘導能、5. NK 誘導能。6. 抗がん免疫依存性の移植がん退縮。これらの項目をPam2リポペプチドと比較し、BCG-CWSがアジュバントとして耐えうる優れた活性を有するかを検討した。結果はBCG-CWSは抗がん活性を持つが、Pam2とは異なる機能性を持つ事が判明した。

A. 研究目的

BCG-CWS（東ロット）はがん患者に用いて支障ないことが経験的に認められてきた。Pam2リポペプチドのうち合成MALP-2 は物性においてアミノ酸などを含まずBCG-CWS（東ロット）より純度の高い標品であることが成分解析により判明している。しかし、両者の機能的相違は不明である。Pam2の臨床導入の前にこの点を解析しておく事は必須である。本研究の目的はPam2の抗がん活性とその機能をBCG-CWS（東ロット）との比較に於いて検討することである。

B. 研究方法

BCG-CWS は東市郎北大名誉教授より供与された。遺伝子改変マウスはTICAM-1 KOを当研究室で作製し、MyD88 KOと各種TLRのKOマウスは審良研より恵与を受けた。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。

C. 研究結果

TLR2, TLR4 発現 HEK293 細胞を使ってPam2（MALP-2）とBCG-CWS（東ロット）のTLR依存性を調べた。BCG-CWSは既報のとおりTLR2/4を同程度に經由してNF- κ B reporter を活性化したが、SMP-105はTLR2のみを經由してNF- κ B

reporter を活性化した。従って、TLR4はMALP-2 の樹状細胞活性化には関与しないと判明した。

CD83, CD86 のco-stimulator とMHCの発現をMALP-2 刺激マウス樹状細胞（BMDC）で調べた。MHC class I, CD83, CD86ともにBMDC上に誘導され、BCG-CWS（東ロット）と遜色無かった。ELISA でどちらのBMDCもIL-6, TNF- α を同程度誘導したが、IL-12p40はBCG-CWS（東ロット）がPam2の約10倍強く誘導した。In vivo で担がんマウス（B16D8 vs. C57BL/6, EL4 vs. C57BL/6）への皮内投与ではどちらのロットでも抗がん効果が見られたが、同量の投与（林らの報告に則り drakeol にけん濁）では有為にBCG-CWS（東ロット）> MALP-2であった。なお、i. v., i. p. はPam2のみで行ったが抗がん退縮効果は皮内投与より減弱した。NK細胞活性化を脾臓採取のNK細胞で見たが、BCG-CWS, Pam2ともにin vitroでNK活性化が強く誘導された。それに対し、in vivo投与のBCG-CWS, Pam2はNKを活性化しなかった。In vitroでBMDCを刺激してNK細胞を加える系でNK活性化を再現できたが、この活性は大部分がTLR2に依存した。

以上から、SMP-105は物性においてBCG-CWS（東ロット）より高純度で類似するにも拘らず、その抗がん効果はBCG-CWS（東ロット）に及ばないことが判明した。NK活性化能もin vivoでは検知できなかった。

D. 考察

Pam2 (MALP-2)の特徴はIL-12p40 を極めて非効率にしか誘導しない点と、抗がん免疫活性化が東ロットより低い点の特徴である。CTL誘導の定量判定はしていないので今後に残された問題はあがるが、安全性はクリアしても抗がん効果の劣性をいかにカバーして臨床誘導するか、が問題になろう。BCG-CWSは併用療法で高い抗がん効果が得られると判明しているのでNK 活性化を含めてより有効な製剤化を検討する余地がある。

BCG-CWS (東ロット) がTLR2/4 のアゴニストとして機能同定されたが、TLR4の活性化はロットごとに差があるため、内因性のTLR4アゴニストの関与を疑っている。Polymixin B処理してもTLR4活性化は保持されるので外因性にLPSがコンタミしたとは考えにくい。BCG-CWS (東ロット)、Pam2ともに抗がん活性はある程度認められるのでTLR4 が抗がん効果を担うものではない。最近の報告 (Murata 2008) ではTLR2非依存的に抗がん活性が発現するとされており、今後何がBCG-CWS の抗がん効果の責任物質であり、如何なる細胞・経路が関与するのかを検討する必要がある。

投与方法も林らのプロトコール (Hayashi 1998) のドラキオール以外にスクアレンなどを用いて来たがevidence に基づいた最良の調整法を確立する必要がある。BCG-CWSにはNK活性化能が無く、膀胱がんなどではがん細胞にも傷害的に働くことが示された。最近の報告によればRNA duplexが樹状細胞を介したNK 活性化を効果的に誘導し、BCG-CWSと相乗的な抗がん効果を発揮する。RNA duplexは樹状細胞のTLR3を標的とし、BCG-PGN (TLR2/4) とは異なったレセプター、シグナル経路を活性化して独自の免疫活性化を行なうため、併用療法の候補になると思われる。BCG-CWSについてはNK活性化 (in vitro)、CTL誘導性以外にTh1/2, TH17, Treg などCD4+ リンパ球への機能変調があると予想される。抗体産生能は強い。これらを比較検討する研究が残されている。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

1. 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. 2009. Innate immune therapy with a BCG cell wall skeleton for lung cancer: a case presentation and a case control study. *Surgery Today*. 39: 194-200.

2. Akazawa, T., N. Inoue, H. Shime, K. Sugiura, K. Kodama, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion. *Cancer Sci*. 101: 1596-1603.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

抗がん免疫活性を有する新規RNAアジュバントの合成

研究分担者 ペンメッチャ・クマール 産業技術総合研究所 主任研究員

研究要旨 抗がん免疫活性化とがん退縮を誘導する機能性dsRNAをスクリーニングするために、in vitro 合成法でdsRNAを作製し、バイオロジー解析に供する。有効なdsRNAの物性などを定義する。

A. 研究目的

RNAの抗がん免疫アジュバント効果を解析するためにin vitro transcription法を用いて種々のRNA誘導体・改変体を作製し、樹状細胞に導入してサイトカイン、NK細胞活性化、CTL誘導に最適な合成物を抽出する。活性は最終的に担がんマウスモデルで解析する。

B. 研究方法

C57BL/6 のNK感受性腫瘍としてB16D8メラノーマ株を、CTL 感受性腫瘍としてEL4を選んだ。KOマウスはTICAM-1^{-/-}、IPS-1^{-/-}を用いた。合成核酸は2重鎖RNA (dsRNA) としてアニールさせ、アゴニスト活性測定に用いた。また、S化、リボース2' OH位のF化、deoxy化、など修飾核酸を開発し、TLR3 との結合活性をfilter binding assayで確認した。

(倫理面への配慮)

本実験は、つくば産総研が定める遺伝子組み換え実験などの安全管理規定に基づいて行っている。動物実験は北海道大学の動物実験等の実施に関する基本指針に従い、北海道大学で行われた。

C. 研究結果

25種類のdsRNA誘導体を作製した。HEK293細胞を用いたレポーター遺伝子アクセスの結果、TLR3経路のみ活性化するものが2種類、TLR3、RLR両経路を活性化するものが3種類であった。TLR3依存的なIFN-beta promoterの活性化は、dsRNAの長さに依存することが判明した。TLR3、RLR両経路を活性化するRNA誘導体を50µg/head でマウスにi.p.すると3日以内に死亡したが、TLR3経路のみ活性化するRNA誘導体では全く変化なく、両経路の活性化が強い副作用を生じさせる事が判明した。TLR3経路のみ活性化するRNA誘導体からdsRNAXを選択し、in vivoマウス実験を行うと、dsRNAXは、NK依存のあるいはCTL依存のあるin vivo腫瘍退縮を効率よく起動した。NKについてはINAM分子を樹状細胞に誘導すること、CTLについてはcross-primingを樹状細胞に誘導するためと判明した。修飾核酸のTLR3アゴニスト活性は今後検討する予定である。

D. 考察

細胞内でIFNを誘導するdsRNAは基本的に有害事象を起こすことが判明した。TLR3アゴニスト、dsRNAX についてはさらに修飾を入れて剤形が最善かどうか検討しているが、基本的な剤形は確定した。それを使用したin vivoマウス腫瘍退縮実験で明らかな有効性と副作用（サイトカインストーム）の回避が認められた。合成経費を下げることで、最適投与法（デリバリー）を含めた検討の必要性、毒性試験などを企画するが、最終的に化学合成による安定なRNA標品の支給を目指した研究を継続する。

E. 結論

TLR3アゴニスト, dsRNAXのアジュバントを確立し、その活性をマウス移植がんの系で証明した。最善のアジュバントのin vivo機能同定に成功した。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Nishikawa F, Murakami K, Matsugami A, Katahira M, Nishikawa S. Structural studies of an RNA aptamer containing GGA repeats under ionic conditions using microchip electrophoresis, circular dichroism, and 1D-NMR. *Oligonucleotides*. 2009 Jun;19(2):179-90.

2: Kikuchi K, Umehara T, Nishikawa F, Fukuda K, Hasegawa T, Nishikawa S. Increased inhibitory ability of conjugated RNA aptamers against the HCV IRES. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Aug 14;386(1):118-23.

3: Mashima T, Matsugami A, Nishikawa F, Nishikawa S, Katahira M. Unique quadruplex structure and interaction of an RNA aptamer against bovine prion protein. *Nucleic Acids Res*. 2009 Oct;37(18):6249-58.

2. 学会発表

Mashima T, Koshida T, Saimura M, Nishikawa F, Nishikawa S, Katahira M. Structure and interaction of RNA aptamer against prion protein in complex with the partial binding peptide, The 37th International symposium on Nucleic Acids chemistry (Yokohama), 2010.11.10-12

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

エフェクター選別性の抗がん免疫アジュバントの開発

研究分担者 志馬 寛明 北海道大学大学院医学研究科 助教

研究要旨

NK 活性化型、CTL誘導型それぞれのアジュバントをTLR2 agonist, TLR3 agonist から開発した。遺伝子改変マウスと担がんマウスモデルを使ってNK依存性、CTL依存性の抗がん効果を査定した。TLR3 agonist から最善のアジュバントの抽出に成功した。

A. 研究目的

安全性とQOLの高い抗がん免疫アジュバントを開発し、癌医療の現場に導入することを目的とする。NK細胞活性化、CTL誘導に最適な合成物を作製し、担がんマウスモデルで最善のものを抽出する。

B. 研究方法

C57BL/6 のNK感受性腫瘍としてB16D8メラノーマ株を、CTL 感受性腫瘍としてEG7を選んだ。KOマウスはTLR2^{-/-}, TLR3^{-/-}の他、MyD88^{-/-}, TICAM-1^{-/-}, IPS-1^{-/-}を用いた。合成リポペプチド(Pam2)は阪大理学部(深瀬研)と、合成核酸はジーンデザイン社と共同で開発した。それぞれTLR2, TLR3アゴニスト活性を確認した。

(倫理面への配慮)

北海道大学医学研究科の倫理委員会において研究計画の承認を受けている。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所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に従い実施する。

C. 研究結果

Pam2 について昨年度報告したアジュバント活性のある合成物はin vitro で樹状細胞に働き、NK, CTLをとともに活性化した。しかし、in vivoで腫瘍退縮活性はNK, CTLどちらも弱かった。その原因を探索してPam2 によるIL-10, Treg の活性化が原因であると判明した。

一方、RNAアジュバント(dsRNAX)はin vitro で樹状細胞のTLR3 に作用して強いNK 活性化とCTL誘導をもたらした。dsRNAXを細胞内にlipofectionなどで導入してもtype I IFNの誘導は殆ど起きなかった。従って、dsRNAXはRIG-I経路を活性化しないと解釈した。dsRNAXはin vivo腫瘍退縮も効率よく起動した。NKについてはINAM分子を樹状細胞に誘導すること、CTLについてはcross-priming を樹状細胞に誘導するためと判明した。

D. 考察

Pam2リポペプチドはin vitroで樹状細胞TLR2を介して成熟化とNK活性化、CTL誘導を起動することが判明した。この効果がin vivoで発揮されない原因の1つとしてIL-10産生と制御性T細胞(Treg)の誘導があることが本研究で明らかになった。TLR2アゴニストを抗がん免疫に適用するには免疫の抑制環境を解除する必要があり、その問題を克服しなければPam2のアジュバント適用は局所投与に陰られる。

TLR3アゴニスト, dsRNAX についてはさらに長さや配列の改変体を作製して剤形が最善かどうか検討しているが、基本的な剤形は確定した。それを使用したin vivoマウス腫瘍退縮実験で明らかな有効性と副作用(サイトカインストーム)の回避が認められた。合成経費を下げること、最適投与法(デリバリー)を含めた検討の必要性、毒性試験などを企画するが、基本的なdsRNA Xの性質は樹状細胞に働いてNK, CTLを効果的に誘導する。

結果として抗がん退縮を強く促進する。IFN誘導に付随した副作用もMyD88を介したサイトカインストームも起きないことは本合成物の臨床適用を強く期待させる。がん患者への投与が目標でそれを目指した研究を継続する。

E. 結論

TLR3アゴニスト、dsRNAXのアジュバントを確立し、その活性をマウス移植がんの系で証明した。最善のアジュバントのin vivo機能同定に成功した。

F. 健康危険情報 特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Akazawa, T., N. Inoue, H. Shime, K. Sugiura, K. Kodama, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion. *Cancer Sci.* 101: 1596-1603.
2. Seya, T., H. Shime, T. Ebihara, H. Oshiumi, and M. Matsumoto. 2010. Pattern-recognition receptors of innate immunity and their application to tumor immunotherapy. *Cancer Sci.* 101: 313-320 (review).
3. Yabu, M., H. Shime, H. Hara, T. Saito, M. Matsumoto, T. Seya, T. Akazawa, and N. Inoue. 2010. Lactic acid acts on macrophages to induce antigen-dependent IL-17 production from effector/memory helper T cells. *Int. Immunol.* 23: 29-41.
4. Sawahata, R., H. Shime, S. Yamazaki, Y. Fujimoto, K. Fukase, T. Akazawa, N. Inoue, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Failure of mycoplasmal lipoprotein MALP-2 to activate NK cells through dendritic cell TLR2. *Microbes Infect.* 13: 350-358.
5. Wakasa, K., H. Shime, M. Kurita-Taniguchi, M. Matsumoto, M. Imamura, and T. Seya. 2011. Development of monoclonal antibodies specifically interacting with necrotic lymphoma cells. *Microbiol. Immunol.* 55: 373-377.
6. Seya T., J. Kasamatsu, M. Azuma, H. Shime, and M. Matsumoto. 2011. Natural killer cell activation secondary to pattern sensing by dendritic cells. *Innate Immunity.* 3: 264-273.

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
Ogawa, T., S. Tsuji-Kawahara, T. Yuasa, S. Kinoshita, T. Chikaishi, S. Takamura, H. Matsumura, <u>T. Seya</u> , Saga, and M. Miyazawa	Natural killer cells recognize Friend retrovirus infected erythroid progenitor cells through NKG2D-RAE-1 interactions in vivo	J. Virol.			in press
<u>Matsumoto, M.</u> , H. Oshiumi, and <u>T. Seya</u>	Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. (review)	Rev. Med. Virol.	21	67-77	2011
<u>Seya, T.</u> , J. Kasamatsu, M. Azuma, <u>H. Shime</u> , and <u>M. Matsumoto</u>	Natural killer cell activation secondary to innate pattern sensing.	Innate Immunity	3	264-273	2011
Yamazaki, S., K. Okada, A. Maruyama, <u>M. Matsumoto</u> , and <u>T. Seya</u> .	TLR2-dependent induction of IL-10 and Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells prevents effective anti-tumor immunity induced by Pam2 lipopeptides in vivo	PLoS ONE	6(4)	18833	2011
Wakasa, K., <u>H. Shime</u> , M. Kurita-Taniguchi, <u>M. Matsumoto</u> , M. Imamura, and <u>T. Seya</u> .	Development of monoclonal antibodies that specifically interact with necrotic lymphoma cells.	Microbiol. Immunol.	55	373-377.	2011
Sawahata, R., <u>H. Shime</u> , S. Yamazaki, Y. Fujimoto, K. Fukase, T. Akazawa, N. Inoue, <u>M. Matsumoto</u> , and <u>T. Seya</u> .	Failure of mycoplasmal lipoprotein MALP-2 to induce NK cells activation through dendritic cell TLR2.	Microbes Infect.	13	350-358	2011
Watanabe, A., M. Tatematsu, K. Saeki, S. Shibata, <u>H. Shime</u> , A. Yoshimura, C. Obuse, <u>T. Seya</u> , and <u>M. Matsumoto</u> .	Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I:C)-mediated TLR3 activation.	J. Biol. Chem.	86	10702-10711	2011
<u>Seya, T.</u>	Addendum to "Strain-to-strain difference of V protein of measles virus affects MDA5-mediated IFN- β -inducing potential"	Molec. Immunol.	48	497-504	2011
Takaki, H., Y. Watanabe, M. Shingai, H. Oshiumi, <u>M. Matsumoto</u> , and <u>T. Seya</u> .	Strain-to-strain difference of V protein of measles virus affects MDA5-mediated IFN- β -inducing potential.	Molec. Immunol.	48	497-504	2011
Yabu, M., <u>Shime, H.</u> , Hara, T. Saito, <u>M. Matsumoto</u> , <u>T. Seya</u> , Akazawa, and N. Inoue	IL-23-dependent and -independent enhancement pathways of IL-17A production by lactic acid.	Int. Immunol.	23	29-41	2011