

201008003B

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～22年度 総合研究報告書

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20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 瀬谷 司

平成23(2011)年 5月

## 目 次

### I. 総合研究報告

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

TLR3リガンドの細胞内取り込み機構の解明と新規RNAアジュバントの開発 --- 12

松本 美佐子

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 18

III. 研究成果の刊行物 ----- 23

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
（総合）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。これまで合成の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。3年間の成果はこれらの合成変異体をマウス実験に供し、担がん/KOマウスを用いたNK のin vivo 抗腫瘍解析とCTLによる腫瘍退縮を実験的に追加検討し、本企画を完成させた。これにより、3年間のアジュバント研究から以下の結論を得た。

1. Pam2 はin vitro で樹状細胞を成熟化し、NK活性化とCTL誘導をドライブする。CTL誘導能はTLR3/7 に比べてかなり劣る。2. Pam2 はin vivo、i.p. 投与でIL-10/Tregを誘導し、NK活性化CTL誘導が打ち消される。従って、s.c. などの投与経路を選択し、抑制環境の強くないがんだけに有効性を発揮する。3. dsRNA X はin vitro で樹状細胞を強く成熟化し、NK活性化とCTL誘導をドライブする。NK/CTL誘導能はpolyI:Cと遜色無い。4. dsRNA X はin vivo、i.p. 投与でNK依存性とCTL依存性の腫瘍を退縮する。5. PolyI:Cは毒性が強くて臨床応用に難があるが、dsRNA X はpolyI:Cと同等の腫瘍退縮活性を持ちながら副作用が殆ど無い。

当初の計画から施行できなかった点は「自然発がんのマウスモデル系を使ったアジュバントの予防効果の探索」である。発がんまでの時間経過が長く、発がん頻度が予想より低いこと、MyD88経路と異なり、TICAM-1 経路はAPCによる大腸がん頻度に影響しなかったこと（未公表）から、3年間で成果に到らなかった。この点は遺憾でありお詫び申し上げます。これ以外はほぼ当初の計画通りに資料を揃えることができました。

以上の知見を基に真に有効な抗がんアジュバントを合成で作製し、GLP用に剤型を確定することを目指す。GMP標品ができれば臨床研究を企画する。

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
矢野 郁也	株式会社MBR・顧問（平成20年度）
西川 諭	産業技術総合研究所・副研究センター長（平成20、21年度）
児玉 憲	大阪府立成人病センター・副院長（平成22年度）
ペンメッチャ・クマール	産業技術総合研究所・主任研究員（平成22年度）
志馬 寛明	北海道大学大学院医学研究科・助教（平成22年度）

※：平成20～22年度の分担研究報告書有り

## A. 研究目的

がんの術後療法は確立されていない。化学療法、放射線療法などが優位だが臨床結果は必ずしも満足できるものではない。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率は 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 and Matsumoto, Cancer Immunol Immunother, 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 を誘導してがんを退縮に導く有望な (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、(株) バイオロジカに依頼して作成した。dsRNA X はその誘導体 27 種とともに産総研・西川研究室 (つくば) と Genedesign 社に依頼した。前者は T7 promoter 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 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、FACS で視覚的に陽性細胞を判別できる。

## C. 研究結果

本企画の目標は *in vivo*, *in vitro* のマウス系において Pam2 誘導体 (PamCysXXXXXXXX), RNA duplex (dsRNA X) の NK 細胞活性化能、CTL 誘導能、抗がん免疫活性を評価し、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 誘導体を 20 種類有機化学的に合成した (Fujimoto et al., 2009) (表 1)。樹状細胞への振りかけ実験からこれらの TLR2 アゴニスト活性は炎症性サイトカイン (IL-6, IL-12p40, TNF- $\alpha$  など) を誘導し、*in vitro* NK 活性化、CTL 誘導を促進した (Azuma et al., 2010)。特に Pam2CSK4 と Pam2#6, Pam2#12 は強い活性を持ち、Pam2CSK は全く活性を持たなかった。以上から Pam2 誘導体のペプチド部分の配列と長さが TLR2 アゴニスト機能に重要であることを証明した。さらに、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 (Yamazaki et al., 2011)。また IL-10 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。以上の結果は M161Ag についても云えた (Sawahata et al., 2011)。以上は矢野郁也博士 (日本 BCG 研究所)、児玉憲副院長 (大阪府立成人病センター) との共同研究として行われた。

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。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抗体を前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。以上は当研究室の山崎特任准教授の主導で行われた。

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。このことは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。以上は当研究室の志馬助教の指導により行われた。

## C-2. RNA duplex

RNA duplexの種々の改変体はクマール博士と西川博士との共同研究でin vitro transcribed RNAとして作製した。また、合成dsRNAは高額だがジーンデザイン社に依頼した。これらのRNA duplex (表2) 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stem構造と長さ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 (Funami et al., 2004)。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 (特許申請中)。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 (Ebihara et al., 2008)。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のデータは昨年度提出した (H21年度報告書)。IPS-1経路には全く依存しなかった。以下のdsRNA Xの仕事は松本准教授の主導になる成果である (松本の報告)。

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polyI:Cに匹敵し (Akazawa et al., 2007)、他のアジュバントには見ない効果である。dsRNA X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 (Akazawa et al., 2007)。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 (Ebihara et al., 2010)。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 (Ebihara et al., 2010)。

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 (Azuma et al., submitted)。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

本研究ではマウス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。一般にRNAアジ

ユ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最強のアジュバントと云える。代表格のpolyI:Cが治療投与に使えないのはアジュバント活性が弱いだけでなく、毒性の問題を克服できないためである。今後dsRNAの毒性を落とし、ヒトに抗がん効果を発揮させるかを調べるのが急務となる。本研究の開発になるdsRNA Xはその際の極めてよい候補になる。

これまでのアジュバント開発史を振り返ると、BCG-CWS(peptidoglycan, TLR2), Tan33 (Pam3, TLR2), MALP-2 (Pam2, TLR2), OM174 (triacylated lipid A, TLR4), MPLA (monophospholipid A, TLR4) など多数のTLR2/4 アゴニストが開発されてきた。これらは樹状細胞の表面でTLRリガンドとして認識されて(MPLA以外は)MyD88を活性化する。Pam2ペプチド、M161Ag誘導体について本研究では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エンドソーム局在のTLR (TLR3/7/9)より弱いことは指摘されてきた。MyD88経路が一般にIL-10誘導性なら、この原因は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、IL-10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(MALP-2)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であり、抑制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。dsRNAの毒性は急性期のサイトカインの産生過剰による致死的なショック、低血圧が代表であり、慢性期にも筋肉痛、関節痛などが持続する。この副

作用緩和のために工夫がなされてきた。PolyI:CにLC(poly-L-Lysine, methylcellulose)を混合したpolyI:CLC, polyA:Uのアジュバント活性、さらにミスマッチを入れて分解を促進させたpoly(I:C12U)などが工夫されてきた。しかし、どれも臨床に導入されていない。この背景にはRNA配列を変えるとsiRNAとして特定の遺伝子発現を抑制する可能性があること、RIG-I/MDA5, PKR, NLRなど細胞質のRNAセンサーを活性化して副作用を強めること、体内投与で分解されやすく効果が出にくいこと、など問題点が判ってきたことがある。dsRNA Xはこれらの問題を克服した創薬として製薬会社の注目を浴びている。今後はヒト(がん患者)に投与して効果があるか、が最大のポイントになる。

もう一つのポイントはdsRNA XがpolyI:Cと比較してtype I IFNの誘導効果が弱いことである。IFNは抗がん抑制にも働くが、一方で多くのmiRNAを発現誘導する。これまで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が報告されてきた(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一つの鍵になることが判明した。これらのことは、RNA duplexのアジュバントが成功する鍵は、エンドソームのTLR3へのデリバリーを工夫することの他に、IFNを介した副作用の減弱、有害なRNAi効果の抑制が大切なことを示唆する。一方、抗がんアジュバント効果がRNA配列に拘束されないなら、発展的な次世代の配列特異的なRNA duplexの開発も視野に入れてよいことを物語る。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。

がん免疫の領域では多くのペプチドワクチンが開発されてきた。これらはがんを標的とした格好のツールである。しかし、残念なことにその有効性を証明できないに到っていない。ペプチドワクチンにdsRNA Xをアジュバントとして併用できれば、難治性のヒト固型がんにも優れた効果を発揮するはずである。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したい。

## E. 結論

TLR2アゴニスト、TLR3アゴニストを化学合成し、最も免疫療法にふさわしいアジュバント効果を有する物質をマウス移植がんの系で選別した。TLR3アゴニストについて dsRNA X (新規RNA誘導體) が最善のNK、CTL誘導活性を保持し、副作用(サイトカインストーム)が問題にならないことを証明した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表(すべて査読有り)

#### 2008

1. Higuchi, M., A. Matsuo, M. Shingai, A. Ishii, K. Funami, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2008. Combinational recognition of bacterial lipoproteins and peptidoglycan by chicken Toll-like receptor 2 subfamily. *Dev. Comp. Immunol.* 32: 147-155.
2. Bas, S., L. Neff, M. Vuillet, U. Spenato, T. Seya, M. Matsumoto, and C. Gabay. 2008. The proinflammatory 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.
3. 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.
4. Matsuo, A., H. Oshiumi, T. Tsujita, H. Mitani, H. Kasai, M. Yoshimizu, M. Matsumoto, and T. Seya. 2008. Teleost TLR22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from birnaviruses. *J. Immunol.* 181: 3474-3485.
5. Shingai, M., M. Azuma, T. Ebihara, M. Sasai, K. Funami, M. Ayata, H. Ogura, H. Tsutsumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2008. Soluble G protein of respiratory syncytial virus inhibits Toll-like receptor 3/4-mediated IFN-beta induction. *Int. Immunol.* 20: 1169-1180.
6. 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. Yatsushashi, M. Matsumoto, H. Ishibashi, and T. Seya. 2008. Increased expression of Toll-like receptor3 in intrahepatic biliary epithelial cells at sites of ductular reaction in diseased livers. *Hepatology Int.* 2: 222-230.
7. Ebihara, T., M. Shingai, M. Matsumoto, T. Wakita, and T. Seya. 2008. Hepatitis C virus (HCV)-infected hepatocytes extrinsically modulate dendritic cell maturation to activate T cells and natural killer cells. *Hepatology.* 48 48-58.
8. Funami K., M. Sasai, H. Oshiumi, T. Seya, and M. Matsumoto. 2008. 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.* 283: 18283-18291.



9. Fukuda, K., T. Watanabe, T. Tokisue, T. Tsujita, S. Nishikawa, T. Hasegawa, T. Seya, and M. Matsumoto. 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: 22787-22794.
  10. Hirata, N., Y. Yanagawa, T. Ebihara, T. Seya, S. Uematsu, S. Akira, F. Hayashi, K. Iwabuchi, and K. Onoe. 2008. Selective synergy in anti-inflammatory cytokine production upon cooperated signaling via TLR4 and TLR2 in murine conventional dendritic cells. *Mol. Immunol.* 45: 2734-2742.
  11. Itoh, K., A. Watanabe, K. Funami, T. Seya, and M. Matsumoto, 2008. The clathrin-mediated endocytic pathway participates in dsRNA-induced IFN-beta production. *J. Immunol.* 181: 5522-5529.
  12. Seya, T. 2008. Preface: Toll-like receptor and pattern sensing fore voking immune response. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 779-781.
  13. Oshiumi, H., A. Matsuo, M. Matsumoto, and T. Seya. 2008. Pan-vertebrate Toll-like receptors during evolution. *Curr. Genomics* 9: 488-493 (Review).
- 2009**
14. Oshiumi, H., M. Matsumoto, S. Hatakeyama, and T. Seya. 2009. Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- $\beta$  induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.* 284: 807-817.
  15. Wu, J. D., C. L. Atteridge, X. J. Wang, T. Seya, and S. R. Plymate. 2009. Obstructing shedding of the immunostimulatory MHC class I chain-related gene B prevents tumor formation. *Clin. Cancer Res.* 15: 632-640.
  16. Oshiumi, H., Y. Suzuki, M. Matsumoto, and T. Seya. 2009. Regulator of Complement Activation (RCA) gene cluster in *Xenopus tropicalis*. *Immunogenetics* 61: 371-384.
  17. Akao, Y., T. Ebihara, H. Masuda, Y. Saeki, K. Hazeki, O. Hazeki, M. Matsumoto, and T. Seya. 2009. Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered Spirulina extract in mice. *Cancer Sci.* 100: 1494-1501.
  18. Fujimoto, Y., M. Hashimoto, M. Furuyashiki, M. Katsumoto, T. Seya, Y. Suda, and K. Fukase. 2009. Lipopeptides from *Staphylococcus aureus* as Tlr2 Ligands: prediction with mrna expression, chemical synthesis, and immunostimulatory activities. *ChemBioChem.* 10: 2311-2315.
  19. Yasukawa, K., H. Oshiumi, M. Takeda, Y. Yanagi, T. Seya, S. Kawabata and T. Koshiba. 2009. Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling. *Science Signaling.* 2(84): ra47.
  20. Takaki, H., H. Oshiumi, T. Kawanishi, M. Sasai, M. Matsumoto, and T. Seya. 2009. Oligomerized TICAM-1 (TRIF) in the cytoplasm recruits nuclear BS69 to enhance NF- $\kappa$ B activation and type I IFN induction. *Eur. J. Immunol.* 39: 3469-3476.
  21. Watanabe, T., K. Ito, M. Matsumoto, T. Seya, K. Hatakeyama, S. Nishikawa, T. Hasegawa, and K. Fukuda. 2009. Isolation and Characterization of RNA aptamers specific for the human Toll-like receptor 3 ectodomain. *Viva Origino.* 37: 10-18.
  22. Iwakiri, D., L. Zhou, M. Samanta, M. Matsumoto, T. Ebihara, T. Seya, S. Imai, M. Fujieda, K. Kawa, and K. Takada. 2009. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3. *J. Exp. Med.* 206: 2091-2099.
  23. 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 after radical surgery for non-small cell lung cancer: a case presentation and a case control study. *Surgery Today.* 39: 194-200.
  24. Seya T., and K. Miyake. 2009. Toll-like receptor. *Encyclopedia of Life Sciences* Ed. by T. E. Creighton. John Wiley & Sons, Inc. New York, NY pp 1-12.
  25. Seya, T., M. Matsumoto, T. Ebihara, and H. Oshiumi. 2009. Functional evolution of the TICAM-1 (TRIF) pathway for extrinsic RNA sensing. *Immunol. Rev.* 227: 44-53 (review).
  26. Seya, T., and M. Matsumoto. 2009. The extrinsic RNA-sensing pathway for adjuvant immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 58:1175-1184 (review).
  27. Ebihara, T. M. Matsumoto, and T. Seya. 2009. Dendritic cell/NK cell interaction in RNA virus infection. *Curr. Immunol. Rev.* 5: 200-207 (review).
- 2010**
28. Sasai, M., H. Oshiumi, K. Funami, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor participates in activation of the Toll-like receptor 3/4 pathway. *Molec. Immunol.* 47: 1283-1291.

29. Kubota, N., T. Ebihara, M. Matsumoto, S. Gando, and T. Seya. 2010. IL-6 and interferon-alpha from dsRNA-stimulated dendritic cells control expansion of regulatory T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391: 1421-1426.
30. Hirata, N., Y. Yanagawa, M. Satoh, H. Ogura, T. Ebihara, M. Noguchi, M. Matsumoto, H. Togashi, T. Seya, K. Onoé, and K. Iwabuchi. 2010. Dendritic cell-derived TNF- $\alpha$  is responsible for development of IL-10-producing CD4<sup>+</sup> T cells. *Cell. Immunol.* 261: 37-41.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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).
41. Seya, T., 2010. Innate immunity and vaccine. *Vaccine* 28: 8041-8042. (preface)
- 2011**
42. 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.
43. 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- $\beta$ -inducing potential. *Molec. Immunol.* 48: 497-504.
44. 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.* 86: 10702-10711.
45. 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.
46. 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)
47. 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.

48. 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).
49. 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.
50. Matsumoto, M., H. Oshiumi, and T. Seya. 2011. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. *Rev. Med. Virol.* 21:67-77 (review).
51. 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.

邦文(査読なし)

1. 海老原敬、松本美佐子、瀬谷 司、HCVと自然免疫「自然免疫とウイルス感染」ウイルス学会誌、58: .19-26, 2008.
2. 瀬谷 司、Pathogen-recognition molecule と生体制御 炎症と免疫、先端医学社、17 (3): 249-255, 2009
3. 瀬谷 司、自然免疫機構、Biotherapy癌と化学療法社、23: 273-280, 2009
4. 瀬谷 司、松本美佐子、アジュバントによる樹状細胞制御と抗腫瘍免疫誘導の分子機構、実験医学、羊土社、27(14): 2194-2200, 2009
5. 瀬谷 司、癌を「非自己化」する「自然免疫」の探求(セルテックアラカルト)細胞工学、秀潤社、28(11): 1135-1136, 2009
6. 瀬谷 司、松本美佐子、樹状細胞パターン認識と関連分子のがんワクチンへの応用、最新医学、最新医学社 64(11): 44-51, 2009
7. 瀬谷 司、食の健康と自然免疫、医事新報、(日本医事新報社)4493: 39-41, 2010
8. 瀬谷 司、押海裕之、志馬寛明、松本美佐子、自然免疫とがん治療、実験医学別冊(羊土社) 29: 111-118, 2010.
9. 瀬谷 司、ワクチン増強剤としての抗がんRNAアジュバントの展望、特集: がんペプチドワクチンの実用化に向けて、細胞(ニューサイエンス社) 43: 20-23, 2011.

## 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1A

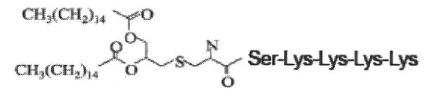
Table.1 Pam2 lipopeptides used for this study

No.	Lipid	Amino acid sequence	TNF-α*
Pam2Cys1	Pam2	CANTRHSESDK	++
Pam2Cys2	Pam2	CGTGGKQSSDK	++
Pam2Cys3	Pam2	CGNGNKSGSDD	++
Pam2Cys4	Pam2	CSNIEIFNAKG	+/-
Pam2Cys5	Pam2	CTTDKKEIKAY	+++
Pam2Cys6	Pam2	CSFGGNHKLSS	++
Pam2Cys7	Pam2	CGSQNLAPLEE	+++
Pam2Cys8	Pam2	CGQDSDQQKDG	+++
Pam2Cys9	Pam2	CGNDDGKDKDG	+++
Pam2Cys10	Pam2	CGNNSKDKEA	+++
Pam2Cys11	Pam2	CSLPGLGSKST	+++
Pam2Cys12	Pam2	CSTSEVIGEKI	++
Pam2Cys13	Pam2	CPFNCVGCYNK	+/-
Pam2Cys14	Pam2	CGSQNLAPLEEK	+/-
Pam2Cys15	Pam2	CLILIIASETL	+/-
Pam2Cys16	Pam2	CLILIIASETLFSFSLTDVK	+/-
Pam2Cys17	Pam2	CSK	n.d.
Pam2Cys18	Pam2	CSKK	n.d.
Pam2Cys19	Pam2	CSKKKK	++

\* 100 pg/ml of Pam2 peptides were used for stimulation with PBMC.  
 TNF-α levels: +/-; <200, ++; 2,000-4,000, +++; 4,000-7,000 pg/ml.  
 n.d., not determined.

表1B

### Properties of synthetic Pam2 peptides



	Pam 1	2	3	4	5	6	7	8	9
CD80 maturation	Δ	Δ	○	○	○	○	○	○	○
CD86 maturation	○	Δ	Δ	Δ	Δ	○	○	○	○
IL-12p40 ELISA	++	++	++	+++	++	+++	++	++	++
IL-6 ELISA	++	++	++	+++	++	+++	++	++	++
DC-NK IFN-γ ELISA	+	+	++	+	+	+	+	+	++
DC-CTL 3H									
TLR2-NF-kB	21	22	25	18	25	8.5	22	23	26
NK(IFN) TLR2-dep	○	×	○	○	×	○	○	×	×
	10	11	12	13	14	15	16	17	LPS
CD80 maturation	○	○	○	Δ	○	○	○	○	○
CD86 maturation	○	○	○	×	○	○	○	○	○
IL-12p40 ELISA	++	++	++	+	++	++	+	++	25000
IL-6 ELISA	++	++	++	+	++	++	+	++	22000
DC-NK IFN-γ ELISA	+	+	+++	-	+	+-	-	+++	+++
DC-CTL 3H									
TLR2-NF-kB	22	18	1.6	1.6	23	3.6	2.5	20	PGN: 16
NK(IFN) TLR2-dep	Δ	Δ	×	-	×	○	-	Δ	

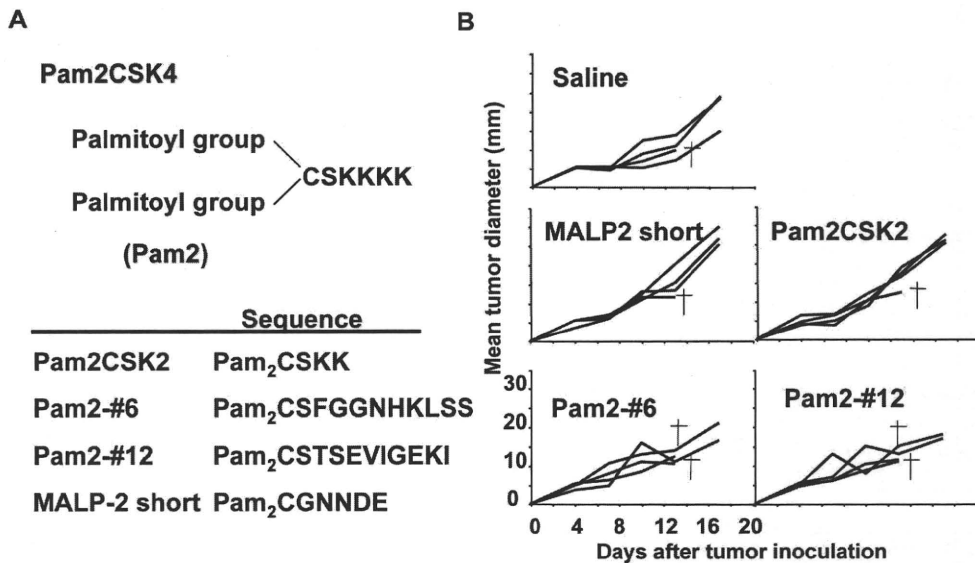
IL-12p40 ELISA	+: 4000~5000 pg/ml ++: 9000~13000 pg/ml +++: 18000~19000 pg/ml
IL-6 ELISA	+: 1000~3000 pg/ml ++: 4000~6000 pg/ml +++: 8000~8500 pg/ml
DC-NK IFN-γ ELISA	-: 0~50 pg/ml +: 200~400 pg/ml ++: 400~500 pg/ml +++: 600~700 pg/ml

表2. dsRNAX のまとめ

RNA 誘導体	TLR3-IFN $\beta$ (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 :

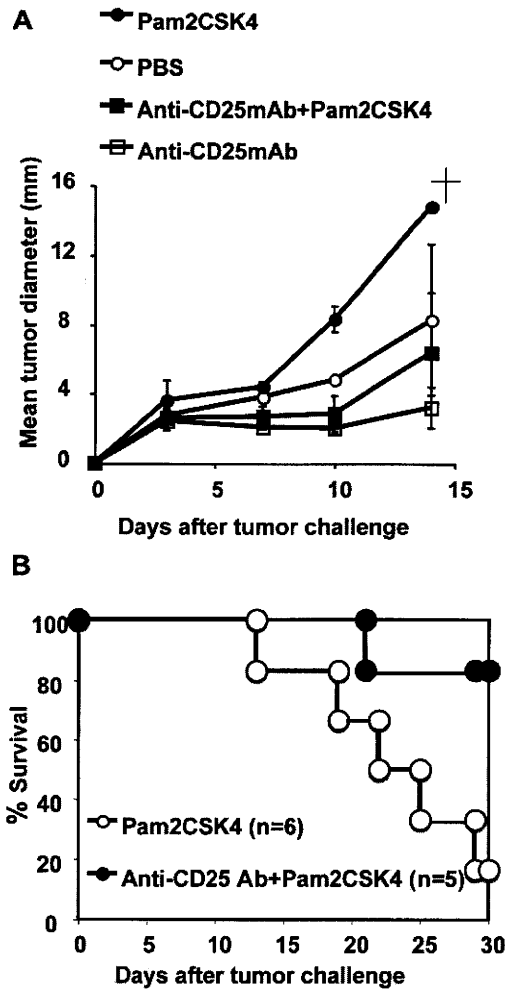
Figure 1



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。



TLR3リガンドの細胞内取り込み機構の解明と新規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 poly(I:C)は骨髄系樹状細胞のエンドソームに局在するTLR3を活性化し、TICAM-1(別名TRIF)依存的にNK細胞やCTLの活性化を誘導し抗がん免疫活性を示す。しかしながら、TLR3以外に細胞質のMDA5も活性化し、炎症性サイトカインやタイプI IFN産生を誘導することで強い副作用をもたらす。本研究では、poly(I:C)の細胞内取り込み機構を解析し、TLR3のみ活性化する新規RNAアジュバントの開発を行った。

A. 研究目的

がんのワクチン開発において効果的な免疫応答の誘導にはアジュバントの選択が重要である。Toll-like receptor (TLR) 3のリガンドである合成dsRNAのpoly(I:C)は、CTL, NK細胞活性化などの樹状細胞応答を強力に惹起し有力な次世代アジュバントとして有望視されているが、副作用の強さから臨床応用には至っていない。Poly(I:C)はエンドソームのTLR3以外に細胞質内RNAヘリケースの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。しかしながら、細胞外dsRNAがどのようにエンドソームTLR3と細胞質MDA5へ運ばれるか不明である。本研究では、dsRNAの細胞内取り込み機構を解析し（平成20-21年度）、TLR3経路のみ活性化し過度の炎症性サイトカインやType I IFN産生を誘導しない新規RNAアジュバントの開発を目的とした（平成22年度）。

B. 研究方法

[平成20年度]

骨髄系樹状細胞におけるpoly(I:C)の取り込み経路を阻害剤等により解析した。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- $\beta$ -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。また、種々の核酸によるpoly(I:C)の取り込み阻害を検討した。

[平成21年度]

Poly(I:C)結合活性を有するヒト培養細胞株の可溶化物を出発材料とし、poly(I:C)の取り込みに関与する分子をpoly(I:C)-Sepharoseを用いて精製し、北海道大学大学院先端生命科学研究院小布施教授と共同でプロテオーム解析を行った。同定した分子はHEK 293細胞でsiRNAによるノックダウンを行い、TLR3を介したIFN- $\beta$  promoterの活性化をレポーター遺伝子アッセイで調べた。また、HeLa細胞とヒト単球由来樹状細胞でノックダウンし、poly(I:C)刺激によるIFN- $\beta$ 産生とpoly(I:C)の取り込みへの関与を査定した。

[平成22年度]

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- $\beta$  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

[平成20年度]

種々のエンドサイトーシス阻害剤とdsRNAを用いた実験より、ヒト骨髄系樹状細胞のTLR3活性化はpoly(I:C)で誘導されるが、*in vitro* transcribed dsRNAでは誘導されないこと、両者は取り込み段階で選別されること、poly(I:C)は受容体を介してクラスリン依存的エンドサイトーシスで取り込まれることが判明した。更に、poly(I:C)の取り込みはB/C-type CpG ODN 及びそれぞれのcontrol ODNで阻害されること、両者は共通の取り込み受容体を介してTLR3エンドソームへ運搬されることが明らかとなった。(Itoh et al., J. Immunol. 181, 2008).

[平成21年度]

質量分析により、poly(I:C)-Sepahroseに特異的に結合する127個の蛋白を同定した。その中から、膜蛋白ならびに膜に結合する性質を有する蛋白3個を選択し、siRNAによるノックダウンで機能査定を行った。HEK293細胞を用いたレポータージーンアッセイで、TLR3を介したIFN- $\beta$  promoterの活性化に必要な新規分子Raftlinを同定した。HeLa細胞やヒト単球由来樹状細胞でRaftlinをノックダウンすると、poly(I:C)刺激によるIFN- $\beta$ 産生は非常に減弱することが判明した。

RaftlinをノックダウンしたHeLa細胞やヒト単球由来樹状細胞では、Texas Red標識したpoly(I:C)の細胞内への取り込みが起きないことが共焦点レーザー顕微鏡での観察より明らかとなった。一方、poly(I:C)同様、クラスリン依存的経路でエンドサイトーシスされるトランスフェリンの運搬には関与していなかった。Raftlinはpoly(I:C)刺激により細胞質から細胞膜へリクルートされクラスリンと相互作用し、その後エンドソームのTLR3と共局在することから、クラスリン複合体と協調してpoly(I:C)取り込みレセプターの細胞内への運搬に関わっていることが明らかとなった。

また、Raftlinの生理的機能を明らかにするため、Raftlin欠損マウス(慶応大学 吉村教授より供与)のBMDCでpoly(I:C)刺激によるIFN- $\beta$ 産生とpoly(I:C)の取り込みを調べた結果、wild-typeマウスと同様のIFN- $\beta$ 産生と取り込みが見られた。ヒト骨髄系樹状細胞と異なり、マウスBMDCはファミリー分子のRaftlin-2を発現しているため、

Raftlin-2 shRNA-expressing lentivirusを感染させてRaftlin-2をノックダウンしたところ、poly(I:C)によるIFN- $\beta$ 産生が減弱し、poly(I:C)の取り込みが起きなかった。従って、マウスBMDCではRaftlinとRaftlin-2がpoly(I:C)の取り込みに関与すると考えられた。(Watanabe et al., J. Biol. Chem. 286, 2011).

[平成22年度]

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- $\alpha$ , 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- $\alpha$ 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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\alpha$ , 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

近年poly(I:C)が誘導する樹状細胞応答の解析が進み、シグナル伝達経路が明らかになってきたが、poly(I:C)がどのように細胞外から細胞内のセンサー分子を活性化するかは不明であった。

本研究ではpoly(I:C)の運搬経路を明らかにし、取り込みに必須の分子Raftlinを同定した。これにより、poly(I:C)の機能発現において、センサー分子やシグナル伝達分子だけでなく取り込みに関与する分子群が重要であることが初めて明らかになった。しかし、poly(I:C)の取り込み受容体やMDA5への配送機構は未解明であり、今後解決すべき点として残っている。

これまでのpoly(I:C)に関する我々も含めた多くの研究者の一連の研究から、骨髄系



樹状細胞のTLR3シグナルの重要性が明らかとなり、副作用の少ないTLR3リガンドの開発が課題となっている。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、本研究で開発した化合物がはじめてである。新規RNA誘導体の特徴をまとめると以下の通りである。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。④B16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。

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ことが必要である。

#### E. 結論

1. 骨髄系樹状細胞におけるpoly(I:C)の取り込み経路を同定した。
2. Poly(I:C)の取り込みに必須の分子Raftlinを同定した。
3. TLR3-TICAM-1経路のみ活性化し、過度のサイトカイン産生を誘起せずアジュバント効果を示す新規RNA誘導体を得た。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表 (すべて査読有り)

1. Itoh, K., A. Watanabe, K. Funami, T. Seya, and M. Matsumoto. 2008. The clathrin-mediated endocytic pathway participates in dsRNA-induced IFN- $\beta$  production. *J. Immunol.* 181:5522-5529.
2. 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.
3. 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
4. Oshiumi, H., A. Matsuo, M. Matsumoto, and T. Seya. 2008. Pan-Vertebrate Toll-like receptors during evolution. *Current Genomics* 9:488-493.

5. 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.
6. 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- $\kappa$ B and IRF-3 activation. *J. Biol. Chem.* 283: 18283-18291.
7. 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. *Hepatol. Int.* 2: 222-230.
8. 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.
9. Matsumoto M., and T. Seya. 2008. TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *ADDR* 60: 805-812. (Review)
10. 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.
11. 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.
12. Seya, T., and M. Matsumoto. 2009. The extrinsic RNA-sensing pathway for adjuvant immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 58:1175-1184 (review).
13. 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 (review).

14. Oshiumi, H., M. Matsumoto, S. Hatakeyama, and T. Seya. 2009. Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- $\beta$  induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.* 284: 807-817.
15. Akao, Y., T. Ebihara, H. Masuda, Y. Saeki, T. Akazawa, K. Hazeki, O. Hazeki, M. Matsumoto, and T. Seya. 2009. Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered Spirulina extract in mice. *Cancer Science* 100: 1494-1501.
16. Iwakiri, D., L. Zhou, M. Samanta, M. Matsumoto, T. Ebihara, T. Seya, S. Imai, M. Fujieda, K. Kawa, and K. Takada. 2009. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from toll-like receptor 3. *J. Exp. Med.* 206: 2091-2099.
17. Kodama, K., M. Higashiyama, K. Takami, K. Oda, J. Okami, J. Maeda, T. Akazawa, M. Matsumoto, T. Seya, M. Wada, and K. Toyoshima. 2009. Innate immune therapy with a Bacillus Calmette-Guerin cell wall skeleton after radical surgery for non-small cell lung cancer: a case-control study. *Surgery Today* 39:194-200.
18. Ebihara, T., M. Matsumoto, and T. Seya. 2009. Dendritic cell/NK cell interaction in RNA virus infection. *Current Immunol. Reviews* 5: 200-207.
19. Takaki, H., H. Oshiumi, M. Sasai, T. Kawanishi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2009. Oligomerized Toll-interleukin 1 receptor domain (TIR)-containing adaptor molecule-1 in the cytoplasm recruits nuclear adenovirus 5 E1A-binding protein to enhance NF- $\kappa$ B activation and type I IFN induction. *Eur. J. Immunol.* 39: 3469-3476.
20. Kubota, N., T. Ebihara, M. Matsumoto, S. Gando, and T. Seya. 2010. IL-6 and IFN-alpha from dsRNA-stimulated dendritic cells control expansion of regulatory T cells. *BBRC* 391: 1421-1426.
21. Sasai, M., M. Tatematsu, H. Oshiumi, K. Funami, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor participates in activation of the Toll-like receptor 3/4 pathway. *Molec. Immunol.* 47: 1283-1291.
22. 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).
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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- $\beta$  induction. *Plos ONE* Dec. 8; 5(12):e14258.
29. 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.

30. 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- $\beta$ -inducing potential. *Mol. Immunol.* 48: 497-504.
31. 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.
32. 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.
33. Matsumoto, M., H. Oshiumi, and T. Seya. 2011. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. *Rev. Med. Virol.* 21: 67-77.
34. 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.
35. Seya T. J. Kasamatsu, M. Azuma, H. shime, and M. Matsumoto. 2011. Natural killer cell activation secondary to innate pattern sensing. *J. Innate Immun.* 3: 264-273
36. Yamazaki S., K. Okada, A. Maruyama, M. Matsumoto, H. Yagita, and T. Seya. TLR2-dependent induction of IL-10 and Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells prevents effective anti-tumor immunity induced by Pam2 lipopeptides in vivo. *Plos ONE* 6 (4): e18833.
- 邦文 (査読無し)
- 舟見健児、松本美佐子、瀬谷司、2重鎖RNA刺激に伴うTICAM-1 / TRIFの細胞内動態 臨床免疫 50 (2):141-146, 2008.
  - 松本美佐子、瀬谷司、Toll様受容体の機能 生化学 Vol.81 No. 3, pp.156-164, 2009.
  - 志馬寛明、井上徳光、松本美佐子、瀬谷司 TLR刺激によるTh17細胞の増加 臨床免疫 51 (5): 479-486, 2009.
  - 瀬谷司、志馬寛明、松本美佐子、アジュバントによる樹状細胞制御の分子機構と抗腫瘍免疫 実験医学 2009 Vol. 27 No.14 (9月号) p. 2194-2200.
  - 瀬谷 司、松本美佐子、樹状細胞パターン認識と関連分子のがんワクチンへの応用、最新医学 61(11): 2378-2385, 2009.
  - 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.
  - 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
- 松本美佐子: TLR3-TICAM-1 によるdsRNA 認識とシグナル伝達、Workshop、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
  - 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)
  - 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
  - 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)
  - Matsumoto M., Itoh H, and Seya T.: The TIR domain determines cellular localization of human Toll-like receptor 8, (Osaka) Immune Regulation: Present and Future, 2009.5.25-27
  - Azuma M., Ebihara T., Kubota N., Matsumoto M., and Seya T.: Regulation of crosspresentation through the TLR3/TICAM-1 pathway in mDC, 第39回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪) 、2009. 12. 2-4
  - Shime H, Matsumoto M., Seya T. Possible contribution of tumor-infiltrating myeloid cells to anti-tumor response in poly I:C-treated mouse. (同上)
  - Tatematsu M., Watanabe A., Oshiumi H., Seya T., Matsumoto M.: Structural and functional analysis of TICAM-1, (同上) (口頭)

9. 渡部綾子、瀬谷司、松本美佐子：  
Analysis of the uptake protein for double-stranded RNA、(同上) (口頭)
10. 志馬寛明、松本美佐子、瀬谷司、樹状細胞と腫瘍浸潤マクロファージのアジュバント応答、第 14 回日本がん免疫学会総会 2010. 7. 22-23. (熊本)
11. Shime H, Matsumoto M, Seya T. Tumor-infiltrating myeloid cells evoke in vivo tumoricidal activity by RNA adjuvant therapy. 第 69 回日本がん学会学術総会 2010.9.22-24. (大阪)
12. Watanabe A, Seya T, Matsumoto M.: Identification of a novel protein that participates in poly(I:C) cellular uptake. **14<sup>th</sup> International Congress of Immunology**. 2010.8.22-27. (Workshop)
13. 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. **14<sup>th</sup> International Congress of Immunology**. 2010.8.22-27.
14. 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. (Workshop)
15. 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.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
1. 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. 発明の名称：M161Agからなるサイトカイン誘発剤、登録番号：2,320,656、発明者：瀬谷司、松本美佐子、登録日：2009年8月4日、出願人：JST
3. 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
2. 実用新案登録 なし