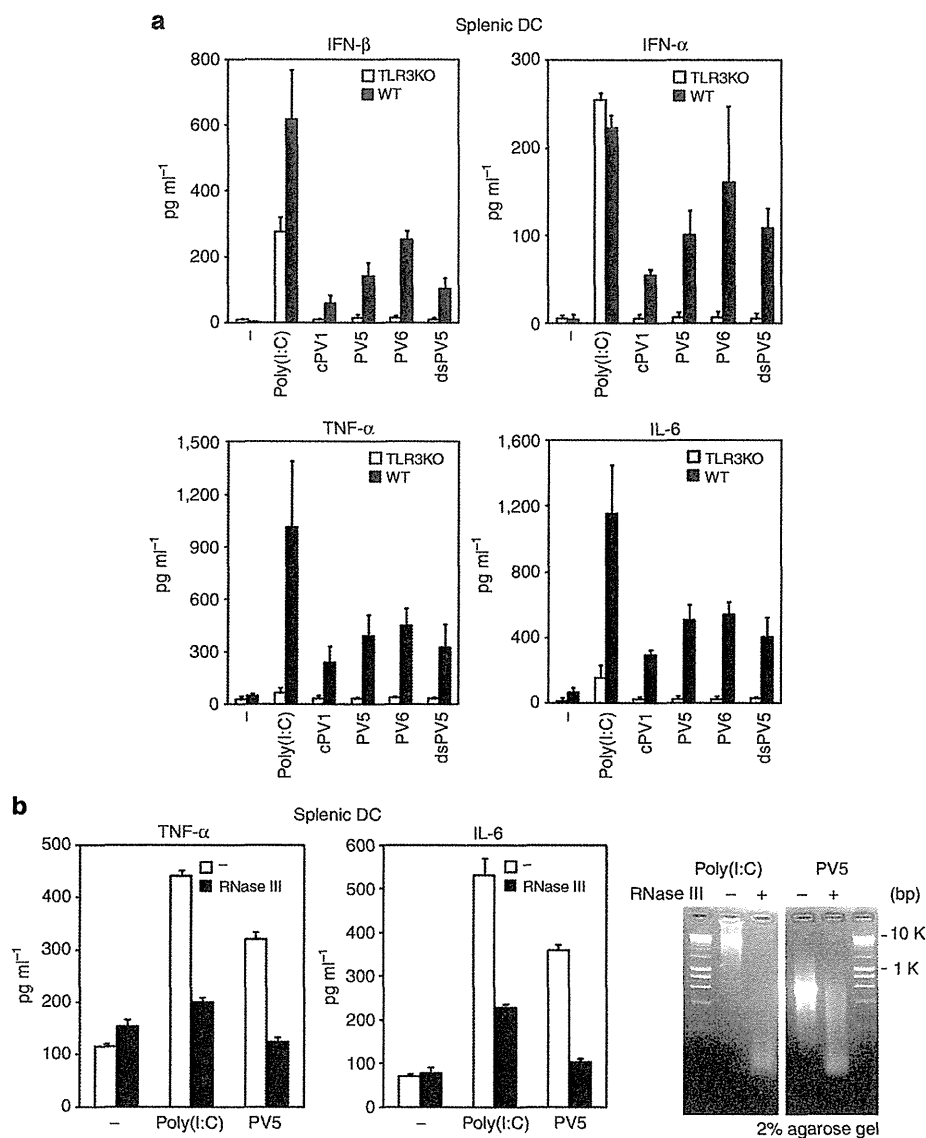


**Figure 4 | Raftlin-mediated endocytosis is essential for PV-RNA-induced IFN- $\beta$  production by human cells.** (a) Left panels: HEK293 cells were transfected with control, raftlin or TICAM-1 siRNAs (20 pmol), together with the expression vector for human TLR3 and the IFN- $\beta$  reporter plasmid. Forty-eight hours after transfection, cells were washed and stimulated with  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  poly(I:C) or PV-RNAs. After 6 h, luciferase reporter activity was measured and expressed as the fold induction relative to the activity of unstimulated cells. Representative data from three independent experiments are shown (mean  $\pm$  s.d.). Student's *t*-test was used for statistical analysis. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ . Right panels: Knockdown of raftlin or TICAM-1 was confirmed using western blotting. (b) HeLa cells were transfected with the control or raftlin siRNAs. Forty-eight hours after transfection, cells were washed and stimulated with  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  PV5 for 3 h. Total RNA was extracted, and quantitative PCR was performed using primers for the IFN- $\beta$  and raftlin genes. Expression of genes was normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase mRNA expression. Data are shown as the mean  $\pm$  s.d. Representative data from three independent experiments are shown. \* $P < 0.05$ . (c) HeLa cells were incubated with  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$  Cy3-PV5 for 30 min at 4 °C. After washing, cells were incubated for up to 60 min at 37 °C. At timed intervals, cells were fixed and permeabilized. After staining with anti-TLR3 mAb and anti-EEA1 pAb (upper panels) or anti-LAMP1 mAb (lower panels), cells were incubated with an Alexa Fluor-488- or -633-conjugated secondary Ab and then analysed using confocal microscopy. Red, Cy3-PV5; green, TLR3 or LAMP1; blue, EEA1; light blue, nuclei with 4',6-diamidino-2-phenylindole; white, merged PV5 with TLR3 and EEA1; and yellow, merged PV5 with LAMP1. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . Co-localization between PV5 and TLR3, EEA1 or LAMP1 was analysed by counting the merged PV5 spots with each molecule in 70 PV5-internalizing cells. The data are shown as % of merged PV5 with EEA1, LAMP1 or TLR3 at indicated time points.



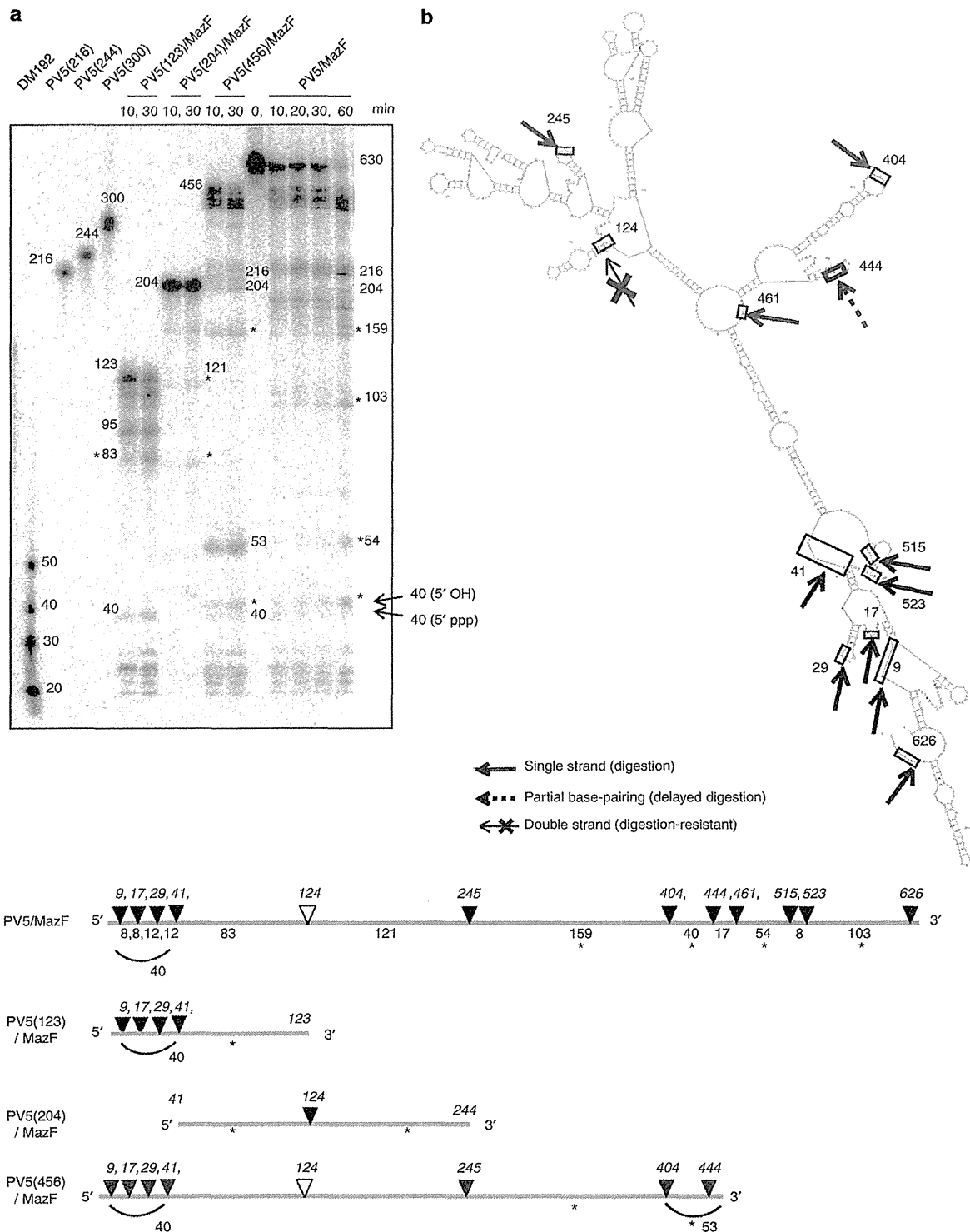
**Figure 5 | Mouse splenic DCs produce type I IFN and cytokines in response to PV-RNAs in a TLR3-dependent manner.** (a) Splenic CD11c<sup>+</sup> DCs ( $1 \times 10^6$  per ml) isolated from TLR3<sup>-/-</sup> or WT mice were stimulated with  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  poly(I:C) or PV-derived RNAs in FCS-containing medium. Twenty-four hours after stimulation, culture supernatants were collected, and IFN- $\alpha/\beta$  in the supernatants was quantified using ELISA. TNF- $\alpha$  and IL-6 levels were measured using CBA. Representative data from three independent experiments are shown (mean  $\pm$  s.d.). (b) Poly(I:C) and PV5 ( $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) were pre-treated with RNaseIII for 30 min at 37 °C or left untreated before adding to CD11<sup>+</sup> splenic DCs ( $1 \times 10^6$  per ml) isolated from WT mice. Twenty-four hours after stimulation, TNF- $\alpha$  and IL-6 levels were measured in culture supernatants using CBA (left panels). RNaseIII-treated poly(I:C) and PV5 were electrophoresed on a 2% agarose gel (right panels).

failed to induce TLR3-mediated IFN- $\beta$  promoter activation by either extracellular stimulation in FCS-free medium or direct endosomal delivery using DOTAP (Fig. 7b,c). When PV5-D2 and -D4 were added to mouse splenic DCs or bone marrow-derived macrophages in the FCS-free conditions, IFN- $\beta$  and proinflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$  and IL-6, were produced in a TLR3-dependent manner, though their levels were relatively low compared with those induced by PV5-D1, D3 or D5 (Fig. 7d). These results suggest that longer stem structure with bulge and internal loops typically shown in PV5-D5 mfold model is the core RNA structure required for TLR3 activation in PV5 and also in PV6. In addition, shorter mismatched RNA duplexes such as PV5-D2 and -D4 can be

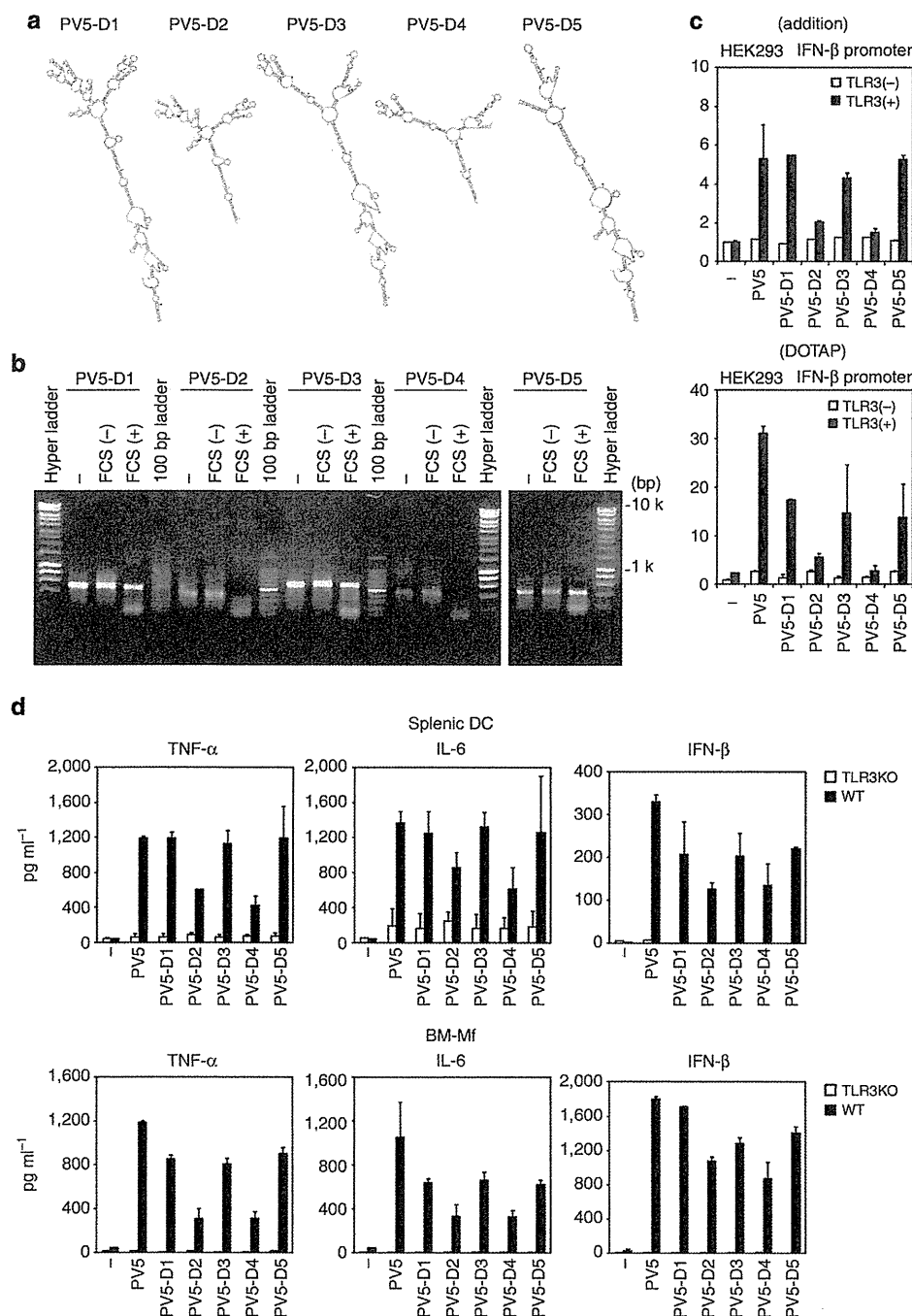
recognized by TLR3 with less activity in mouse DCs/macrophages if they hold the structure, which differs from TLR3 response in HEK293 cells. Given that RNA molecules have an appropriate tertiary interactions, the stability and TLR3-binding ability of these RNA molecules must be influenced by RNA tertiary structure.

## Discussion

In the current study, we demonstrated, for the first time, that mouse/human TLR3 detects extracellular virus-derived RNA with stable stem structures to induce innate immune signalling. Functional PV-RNAs were degradation-resistant, and their ability



**Figure 6 | Partial digestion of PV5 with MazF.** (a) MazF-induced cleavage pattern of PV5 and the deletion mutants visualized on a denaturing 5% PAGE. PV5 was digested with MazF at room temperature, and other RNAs were digested at 37 °C. The cleavage pattern is schematically drawn at the bottom of the figure. MazF recognized ACA-cleavage sites are indicated by triangles. Black triangles indicate the observed cleavage sites and white triangles indicate sites not detected on the gel. Asterisks indicate the fragments produced by MazF-mediated ACA-specific digestion. Italic letters show the position numbers of the first A residues in ACA sequences of PV5. RNA size markers: DM192 (20-, 30-, 40- or 50-mer, Bio Dynamics Laboratory Inc.), PV5(216)(216-mer), PV5(244)(244-mer) and PV5(300)(300-mer). (b) Secondary structure of PV5 predicted by the mfold software. Rectangles show the ACA sites of PV5. The position numbers of the first A residues in ACA sequences of PV5 are shown. Solid arrows indicate the MazF-digestion sites. Broken arrow indicates the delayed digestion site.



**Figure 7 | Mapping of TLR3-activating RNA structure in PV5.** (a) Secondary structure of PV5-derived RNAs (PV5-D1–PV5-D5) predicted by the mfold software. (b) RNAs were incubated in FCS-free or -containing medium at 37°C. Non-treated RNA or RNA incubated for 30 min were loaded onto a 1% agarose gel. (c) TLR3-mediated IFN-β promoter activation induced by PV5 or PV5-derived RNAs in HEK293 cells transiently expressing TLR3. Cells were stimulated with indicated RNAs ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) (upper panel) or RNAs complexed with DOTAP ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) (lower panel). After 6 h, luciferase reporter activity was measured and expressed as the fold induction relative to the activity of unstimulated cells. Data are shown as the mean  $\pm$  s.d. Representative data from three independent experiments are shown. (d) Splenic CD11c<sup>+</sup> DCs (upper panels) or bone marrow-derived macrophages (lower panels) ( $2 \times 10^6$  per ml) isolated from TLR3<sup>-/-</sup> or WT mice were stimulated with  $100 \text{ pmol ml}^{-1}$  PV5 or PV5-derived RNAs in FCS-free AIM medium. Twenty-four hours after stimulation, culture supernatants were collected, and IFN-β in the supernatants was quantified using ELISA. TNF-α and IL-6 levels were measured using CBA. Representative data from three independent experiments are shown (mean  $\pm$  s.d.).

to activate TLR3 was dependent on the dsRNA region within the RNA molecule, which is required for interaction with the N- and C-terminal dsRNA-binding sites of the TLR3 ECD. Based on the

structural analysis of the TLR3–dsRNA complex, it has been proposed that 40–50 bp dsRNA was the minimum signalling unit with two TLR3 molecules<sup>31</sup>. Jelinek *et al.*<sup>11</sup> reported that dsRNAs,

>90 bp in length, triggered TLR3 oligomerization and efficiently induced IFN- $\beta$  and TNF- $\alpha$  production in conventional murine DCs. Functional PV-RNAs, such as PV5 and PV6, induced TLR3-dependent IFN- $\alpha/\beta$  and proinflammatory cytokines from mouse CD11c<sup>+</sup> DCs (Fig. 5); these RNAs appeared to oligomerize TLR3 molecules even though they harbour bulges and internal loops in their duplex structures. If this is the case, TLR3 recognizes not only perfect duplex of ~90 bp dsRNA but also the mismatched RNA duplex within ~600-nt PV-RNA. We identified the core RNA structure required for TLR3 activation in PV5, which is relatively long stem structure with bulge and internal loops typically shown in PV5-D5 mfold secondary structure. The fascinating model for TLR3 dimer formation has been proposed, in which shorter RNA duplexes of between 21 and 30 bp can form less stable complexes with two TLR3 molecules<sup>32</sup>. Thus, TLR3 appears to have flexibility to recognize RNA molecules.

Interestingly, PV5 segments (approximately 200 nts in length; PV5 a, b and c) lost the ability to activate TLR3 in HEK293 cells despite their degradation-resistant structure (Supplementary Fig. S3c), suggesting that an appropriate topology of multiple RNA duplexes are required for TLR3 activation. In addition, PV5-D2 and -D4 failed to activate IFN- $\beta$  promoter in HEK293 cells expressing TLR3, but efficiently induced type I IFN and proinflammatory cytokine production from mouse splenic DCs and bone marrow-derived macrophages in a TLR3-dependent manner (Fig. 7). Recently, it has been reported that TLR3 undergoes cathepsin-mediated proteolytic processing, and both full-length and C-terminal cleaved form of TLR3 molecules reside in human retinal epithelial cell line and monocyte-derived DCs<sup>38</sup>. It is interesting if shorter RNAs with mismatched duplex, such as PV5-D2 and -D4, are recognized by protease-processed TLR3 in mouse DCs or bone marrow-derived macrophages with different binding modes from intact TLR3<sup>38</sup>. Indeed, the cleaved form of TLR3 is predominant in mouse macrophages<sup>39</sup>, but less present in HEK293 cells<sup>40</sup>, which may explain the different TLR3 responses to these RNAs between mouse DCs/macrophages and human HEK293 cells (Fig. 7).

There have been many reports indicating that TLR3-dependent inflammatory cytokine and chemokine production affects virus-induced pathology and host survival in RNA virus infections such as respiratory syncytial virus, influenza A virus and phlebovirus, a negative-strand RNA virus that produces minimal dsRNA as an intermediate product<sup>8</sup>. Furthermore, TLR3 functions as an endogenous sensor of necrosis and is required for chemokine production by peritoneal macrophages after co-culture with necrotic neutrophils<sup>24</sup>. However, these biological studies have suffered from the lack of information about the actual molecules sensed by TLR3 in such infection/inflammatory states. More recently, Bernard *et al.*<sup>41</sup> demonstrated that UV-damaged self-noncoding RNA is detected by TLR3. We suppose that viral/host RNAs with stable stem structures derived from infection- or inflammation-damaged cells activate TLR3 to induce cytokine and chemokine production.

In the case of PV infection, TLR3-mediated type I IFN production is important for viral clearance *in vivo*<sup>15,16</sup>. *In vitro* PV infection of splenic DCs promotes type I IFN production in a TLR3-dependent manner. The positive-stranded ssRNAs and the replicative form are robustly present in PV-infected cells, which might be segmented into functional ssRNAs similar to PV5 and PV6 extracellularly due to necrosis. Hence, in the local environment, segmented virus-derived structured RNAs can function as a TLR3 ligand. The flexible RNA-recognition mode of TLR3 may have some advantage to protect host against wide spectrum of virus infection.

Notably, RNA uptake is required for TLR3 signalling. Functional PV-RNAs possess the essential structural elements required for both cellular uptake and TLR3 oligomerization. We found that raftlin, a cytoplasmic lipid raft protein, is a molecule that participates in uptake of PV-RNAs and delivery to TLR3-positive early endosomes (Fig. 4). The features of the TLR3-recognizing PV-RNAs are consistent with our previous results that raftlin mediates poly(I:C) cellular uptake through interaction with the clathrin-AP-2 complex in human myeloid DCs and epithelial cells<sup>35</sup>. In addition, uptake of B/C-type CpG ODNs that share their uptake receptor with poly(I:C) was also mediated by raftlin<sup>33,35</sup>. Given that PV5-induced TLR3 activation in HEK293 cells was inhibited by pre-treatment with the B-type CpG ODN (Supplementary Fig. S5), PV5 likely utilizes the poly(I:C)/ODN-uptake receptor for endocytosis. Although CD14 and the scavenger receptor class A were reported to act as a poly(I:C)-uptake receptor in mouse macrophages and human bronchial epithelial cells, respectively<sup>42,43</sup>, they did not participate in poly(I:C)/ODN cellular uptake in human DCs because of their absence on the cell surface<sup>12</sup>. There must be an additional uptake receptor for poly(I:C)/ODN. Identification of the uptake receptor for virus RNAs is important for improving our understanding of the innate immune response to viral infection and sterile inflammation.

TLRs recognize pathogen- or damage-associated molecular patterns and promote the activation of the innate and adaptive immune responses through ligand-induced oligomerization<sup>44,45</sup>. Structural analyses of TLR3, TLR4, TLR5, TLR2/1 and TLR2/6 ECDs, and their complexes with typical ligands, demonstrated that each TLR possessed ligand-binding sites or pockets and a dimerizing interface, which allowed for ligand-induced receptor dimerization<sup>46,47</sup>. Although there are multiple ligands for each TLR, it remains unknown whether they share common structural features. The current study is the first to characterize the RNA structure capable of triggering TLR3 activation and demonstrate that viral RNAs with intermittent stem structure are recognized by an uptake receptor and by TLR3, inducing innate immune signalling. Precise analyses of the mechanisms underlying pattern recognition by TLRs using different ligands might be important for engineering synthetic TLR-activating ligands.

## Methods

**Cell culture and reagents.** HEK293 and Vero cells were maintained in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Invitrogen) and antibiotics. HeLa cells were kindly provided by Dr T. Fujita (Kyoto University) and maintained in Eagle's minimal essential medium (Nissui, Tokyo, Japan) supplemented with 1% L-glutamine and 5% heat-inactivated FCS. Normal embryonic lung fibroblasts, MRC5 cells, were maintained in MEM-alpha (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated FCS and antibiotics. The anti-human TLR3 monoclonal antibody (mAb) (clone TLR3.7) was generated in our laboratory<sup>5</sup>. The anti-human raftlin polyclonal Ab (pAb) and anti-mouse TLR3 mAb were kindly provided by Dr K. Saeki (Kyushu University) and Dr D. M. Segal (National Institutes of Health, MD), respectively.<sup>34,41</sup> Anti-EEA1 pAb (PA1-063) was purchased from Affinity Bioreagents; anti- $\beta$ -actin mAb (A2228) was purchased from Sigma; the anti-LAMP1 mAb (328601) was purchased from Biolegend; the anti-TICAM-1 pAb (4596) was purchased from Cell Signaling; and Alexa Fluor-488 and -633-conjugated secondary antibodies were purchased from Invitrogen. Poly(I:C) was purchased from Amersham Biosciences. RNase A and RNase III were purchased from Ambion.

**Mice.** Inbred C57BL/6 WT mice were purchased from CLEA Japan (Tokyo, Japan). TLR3<sup>-/-</sup> mice were provided by Dr S. Akira (Osaka University). Mice were maintained under specific pathogen-free conditions in the animal facility of the Hokkaido University Graduate School of Medicine. Female mice of 6–10 week of age were used in all experiments that were performed according to the guidelines established by the Hokkaido University Animal Care and Use Committee.

**Plasmids.** The cDNA fragments encoding the open-reading frame of human TLR3 was amplified using RT-PCR with total RNA prepared from monocyte-derived DCs and was ligated into the cloning site of the expression vector, pEF-BOS, which was a gift from Dr S. Nagata (Kyoto University)<sup>48</sup>. Mahoney PV complementary

DNA was provided by Dr S. Koike (Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo). TLR3-mutant plasmids were gifts from Dr K. Fukuda (Yamagata University)<sup>29</sup>.

**RNA extraction from PV-infected cells.** Vero cells were infected with PV or not infected. Forty-eight hours later, cells and culture supernatants were divided by centrifugation (2,000 r.p.m., 10 min). TRIzol reagent (Invitrogen) was added to cell pellets for extraction of RNA. Obtained RNAs were purified by ethanol precipitation, and concentration was determined by measuring the absorbance at 260 nm in a spectrophotometer.

**Preparation of RNA.** DNA fragments containing the PV gene segment and the T7 promoter sequence were amplified using PCR with specific primers and the PV-cDNA as a template (Supplementary Table S2). The PV sense and antisense RNAs from the PCR products were transcribed *in vitro* using an AmpliScribe T7 transcription kit (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol. The transcribed products were separated on a 1% agarose gel, and the band corresponding to PV RNA was excised using RECOCHIP (Takara). Then, eluted RNAs were ethanol precipitated and resuspended in RNase-free water. To generate dsRNA, sense and antisense RNAs were annealed. PV-ss/dsRNAs were pre-treated with polymyxin B ( $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) for 1 h before being added to mouse macrophages and DCs. RNA was labelled with Cy3 maleimide mono-reactive dye (GE Healthcare) using the 5' EndTag Nucleic Acid Labeling System (Vector Laboratories, Inc.). Cy3-PV5 showed a full activity.

**Reporter gene assay.** HEK293 cells ( $8 \times 10^5$  cells per well) were cultured in six-well plates and transfected with the TLR3-expression vector or an empty vector (400 ng per well), together with the reporter plasmid (400 ng per well) and an internal control vector pRL-TK (Promega, Madison, WI, USA) (20 ng per well) using FuGENE HD (Roche). The p-125 luciferase reporter containing the human IFN- $\beta$  promoter region (-125 to +19) was provided by Dr T. Taniguchi (University of Tokyo). After 24 h, cells were collected and resuspended with FCS-free or -containing medium. Then, cells were seeded on 96-well plates and stimulated with the indicated RNAs. Six hours later, cells were lysed using the passive lysis buffer (Promega), and Firefly and *Renilla* luciferase activities were determined using a dual-luciferase reporter assay kit (Promega). The Firefly luciferase activity was normalized by *Renilla* luciferase activity and was expressed as the fold stimulation relative to activity in non-stimulated cells.

**Filter binding assay.** Radioisotope labelling of PV-RNAs by *in vitro* transcription with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP] was carried out as previously described<sup>49</sup>. Labelled PV-RNAs (2 nM) were mixed with varying concentrations (none or 6.25, 12.5, 25, 50, 100 or 200 nM) of human TLR3 (amino acid 27–711; R&D Systems) and adjusted to a total volume of 25  $\mu\text{l}$  using binding buffer (pH 5.0–7.0) containing 100 mM NaCl (20 mM AcONa (pH 5.0–6.0) or 20 mM Tris-HCl (pH 6.5–7.0)). After 30 min incubation, the mixtures were passed through a nitrocellulose filter and washed twice with 500  $\mu\text{l}$  reaction buffer. The amount of bound RNA was measured using BAS 2500 (Fujifilm), and binding activities were calculated as the percentage of input RNA.

**Quantitative PCR.** Total RNA was extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA) and reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) and random primers according to the manufacturer's instructions. qPCR was performed using the indicated primers (Supplementary Table S3) and the Step One Real-time PCR system (Applied Biosystems).

**RNA interference and immunoblotting.** siRNA duplexes (Raftlin, catalogue number s23219; negative control, catalogue number AM4635) were purchased from Ambion-Applied Biosystems. siRNA for TICAM-1 was purchased from Xeragon Inc. (Birmingham, AL, USA). HEK293 cells were cultured in 24-well plates and transfected with 20 pmol each siRNA, together with the expression vector for human TLR3 (200 ng), IFN- $\beta$  promoter plasmid (100 ng) and an internal control vector (1.5 ng) using Lipofectamine 2000. Forty-eight hours after transfection, cells were stimulated with  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  ligands for 6 h. Cells were lysed and dual-luciferase activities were measured according to the manufacturer's instructions (Promega). Cell lysates were clarified by centrifugation and mixed with denaturing buffer. Samples were analysed using 10% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-raftlin pAb (1/1,000), anti- $\beta$ -actin mAb (1/1,000) or anti-TICAM-1 pAb (1/500). In the case of HeLa cells, cells cultured in 12-well plates were transfected with 40 pmol each siRNA using Lipofectamine 2000.

**Confocal microscopy.** HeLa cells ( $1.0 \times 10^5$  cells per well) were plated onto microcover glasses (Matsunami, Tokyo, Japan) in a 12-well plate. The following day, cells were incubated with  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$  Cy3-labelled PV5 for 30 min at 4°C. Cells were washed twice and further incubated for 5–60 min at 37°C. At timed intervals, cells

were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min and permeabilized using PBS containing 0.2% Triton and 1% BSA for 15 min. Fixed cells were labelled with anti-EEA1 pAb (1/200), anti-LAMP1 mAb (1/300) or anti-human TLR3 mAb (1/50) overnight at 4°C. Then, Alexa Fluor-488- or -633-conjugated secondary Abs (1/400) were used to visualize the primary Abs. Prolong Gold was used for staining the nuclei. Cells were visualized at a  $\times 63$  magnification using an LSM510 META microscope (Zeiss, Jena, Germany).

**Purification of mouse DCs from spleen.** Splenocytes from WT or TLR3<sup>-/-</sup> mice were treated with 400 IU MandleU per ml collagenase D (Roche) at 37°C for 25 min in HBSS (Sigma-Aldrich). EDTA was added to the cell suspensions and incubated for an additional 5 min at 37°C. After lysis of red blood cells using the ACK lysis buffer, splenocytes were incubated with magnetic-activated cell sorting anti-CD11c-conjugated microbeads, and DCs were purified using magnetic separation columns as indicated by the manufacturer (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). Positively selected cells were isolated and suspended in RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated FCS and antibiotics. For isolation of CD8 $\alpha^+$  DCs, the magnetic-activated cell sorting CD8 $\alpha^+$  DC-positive selection kit was used according to the manufacturer's instructions. Purity was checked routinely by FACS and was found to be >80% (CD11c<sup>+</sup>) or >90% (CD8 $\alpha^+$ ), respectively.

**Enzyme-linked immunosorbent assay and cytometric bead array.** Cells were stimulated with the indicated RNAs in FCS-containing medium or FCS-free AIM-V medium (Invitrogen). Twenty-four hours after stimulation, culture supernatants were collected and analysed for cytokine levels with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or cytometric bead array (CBA). ELISA kits for IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  were purchased from PBL Biomedical Laboratories and were performed according to the manufacturer's instructions. CBA flex sets for mouse IL-6 and TNF- $\alpha$  were purchased from BD Bioscience. Experiments were performed according to the manufacturer's instructions, and samples were analysed using the FACS Aria (BD Bioscience).

**Statistical analysis.** Statistical significance of differences between groups was determined by the Student's *t*-test.

**Prediction of RNA secondary structure.** The secondary structure of RNAs was modelled using mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>), RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) and centroidfold program (<http://www.ncrna.org/software/centroidfold/>).

## References

- Stetson, D. B. & Medzhitov, R. Type I interferons in host defense. *Immunity* **25**, 373–381 (2006).
- Vilcek, J. Fifty years of interferon research: aiming at a moving target. *Immunity* **25**, 343–348 (2006).
- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783–801 (2006).
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732–738 (2001).
- Matsumoto, M., Kikkawa, S., Kohase, M., Miyake, K. & Seya, T. Establishment of monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 1364–1369 (2002).
- Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T. & Seya, T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon- $\beta$  induction. *Nat. Immunol.* **4**, 161–167 (2003).
- Yamamoto, M. *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640–643 (2003).
- Weber, F., Wagner, V., Rasmussen, S. B., Hartmann, R. & Paludan, S. R. Double-stranded RNA is produced by positive-stranded RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-stranded RNA viruses. *J. Virol.* **80**, 5059–5064 (2006).
- Matsumoto, M. *et al.* Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol.* **171**, 3154–3162 (2003).
- Jongbloed, S. L. *et al.* Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med.* **207**, 1247–1260 (2010).
- Jelinek, I. *et al.* TLR3-specific double-stranded RNA oligonucleotide adjuvants induce dendritic cell cross-presentation, CTL responses, and antiviral protection. *J. Immunol.* **186**, 2422–2429 (2011).
- Matsumoto, M. & Seya, T. TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **60**, 805–812 (2008).
- Hardarson, H. S. *et al.* Toll-like receptor 3 is an essential component of the innate stress response in virus-induced cardiac injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292**, 251–258 (2007).

14. Negishi, H. *et al.* A critical link between Toll-like receptor 3 and type II interferon signaling pathways in antiviral innate immunity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 20446–20451 (2008).
15. Oshiumi, H. *et al.* The TLR3-TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection. *J. Immunol.* **187**, 5320–5327 (2011).
16. Abe, Y. *et al.* The Toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. *J. Virol.* **86**, 185–194 (2012).
17. Zhang, S.-Y. *et al.* TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* **317**, 1522–1527 (2007).
18. Guo, Y. *et al.* Herpes simplex virus encephalitis in a patient with complete TLR3 deficiency: TLR3 is otherwise redundant in protective immunity. *J. Exp. Med.* **208**, 2083–2098 (2011).
19. Sancho-Shimizu, V. *et al.* Herpes simplex encephalitis in children with autosomal recessive and dominant TRIF deficiency. *J. Clin. Invest.* **121**, 4889–4902 (2011).
20. Wang, T. *et al.* Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat. Med.* **10**, 1366–1373 (2004).
21. Goffic, R. L. *et al.* Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR) 3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. *PLoS Pathog.* **2**, 526–535 (2006).
22. Gowen, B. B. *et al.* TLR3 deletion limits mortality and disease severity due to phlebovirus infection. *J. Immunol.* **177**, 6301–6307 (2006).
23. Karikó, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M. & Weissman, D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J. Biol. Chem.* **279**, 12542–12550 (2004).
24. Cavassani, K. A. *et al.* TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *J. Exp. Med.* **205**, 2609–2621 (2008).
25. Kato, H. *et al.* Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**, 101–105 (2006).
26. Racaniello, V. R. Picornaviridae: the viruses and their replication. In *Section II: Specific Virus Families: Fields Virology* 5th edn (eds Knipe, D. M. & Howley, P. M.) 795–838 (Lippincott Williams & Wilkins, 2007).
27. Leonard, J. N. *et al.* The TLR3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 258–263 (2008).
28. Hofacker, I. *et al.* Fast folding and comparison of RNA secondary structures. *Monatsh. Chem.* **125**, 167–188 (1994).
29. Fukuda, K. *et al.* 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).
30. Bell, J. K. *et al.* Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol.* **24**, 528–533 (2003).
31. Liu, L. *et al.* Structural basis of Toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science* **320**, 379–381 (2008).
32. Pirher, N., Ivicak, K., Pohar, J., Bencina, M. & Jerala, R. A second binding site for double-stranded RNA in TLR3 and consequences for interferon activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 761–763 (2008).
33. Itoh, K., Watanabe, A., Funami, K., Seya, T. & Matsumoto, M. The clathrin-mediated endocytic pathway participates in dsRNA-induced IFN- $\beta$  production. *J. Immunol.* **181**, 5522–5529 (2008).
34. Saeki, K., Miura, Y., Aki, D., Kurosaki, T. & Yoshimura, A. The B cell-specific major raft protein, Raftlin, is necessary for the integrity of lipid raft and BCR signal transduction. *EMBO J.* **22**, 3015–3026 (2003).
35. Watanabe, A. *et al.* Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I:C)-mediated TLR3 activation. *J. Biol. Chem.* **286**, 10702–10711 (2011).
36. Zhang, Y. *et al.* MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* **12**, 913–923 (2003).
37. Yamaguchi, Y. & Inouye, M. mRNA interferases, sequence-specific endoribonucleases from the toxin-antitoxin systems. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **85**, 467–500 (2009).
38. Garcia-Cattaneo, A. *et al.* Cleavage of Toll-like receptor 3 by cathepsins B and H is essential for signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 9053–9058 (2012).
39. Ewald, S. E. *et al.* Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J. Exp. Med.* **208**, 643–651 (2011).
40. Toscano, F. *et al.* Cleaved/associated TLR3 represents the primary form of the signaling receptor. *J. Immunol.* **190**, 764–773 (2013).
41. Bernard, J. J. *et al.* Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat. Med.* **18**, 1286–1291 (2012).
42. Lee, H. K. S., Dunzendorfer, K., Soldau, K. & Tobias, P. S. Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14. *Immunity* **24**, 153–163 (2006).
43. Limmon, G. V. *et al.* Scavenger receptor class-A is a novel cell surface receptor for double-stranded RNA. *FASEB J.* **22**, 159–167 (2008).
44. Medzhitov, R. & Janeway, Jr C. A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295–298 (1997).
45. Kono, H. & Rock, K. L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 279–289 (2008).
46. Kang, J. Y. & Lee, J.-O. Structural biology of the Toll-like receptor family. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 917–941 (2011).
47. Yoon, S. I. *et al.* Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science* **335**, 859–864 (2012).
48. Mizushima, S. & Nagata, S. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acid Res.* **18**, 5322–5323 (1990).
49. Fukuda, K. *et al.* Isolation and characterization of RNA aptamers specific for the hepatitis C virus nonstructural protein 3 protease. *Eur. J. Biochem.* **267**, 3685–3694 (2000).

### Acknowledgements

We are grateful to our laboratory members for their invaluable discussions. We also thank Dr S. Akira (Osaka University) for providing TLR3<sup>-/-</sup> mice, Dr S. Koike (Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science) for PV-cDNA, Dr D. M. Segal (National Institutes of Health) for anti-mouse TLR3 mAb, Dr K. Saeki (Kyushu University) for anti-raftlin antibody, Dr T. Taniguchi (University of Tokyo) for p-125 luc reporter plasmid, Dr S. Nagata (Kyoto University) for pEF-BOS expression vector and Dr K. Fukuda (Yamagata University) for TLR3-mutant plasmids. This work was supported in part by Grants-in-Aid from the Ministry of Education, Science, and Culture, the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan, and by the Akiyama Life Science Foundation.

### Author contributions

M.T. and M.M. conceived and designed the experiments. M.T. and F.N. performed the experiments. M.T., F.N., T.S. and M.M. analysed the data. M.T. and M.M. wrote the paper.

### Additional information

**Supplementary Information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**Reprints and permission** information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

**How to cite this article:** Tatematsu, M. *et al.* Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA. *Nat. Commun.* **4**:1833 doi: 10.1038/ncomms2857 (2013).

## 第 45 回日本小児感染症学会特別講演

## 癌免疫

## —癌医療での現在と、そして将来的考察—

佐藤 昇 志<sup>1)</sup>

## はじめに

身体にもともと備わっている免疫の力で、病気の治療や予防ができればこんなに素晴らしいことはない。実際、インフルエンザ、ポリオなど多くの感染症では日本や世界の多くの人々がワクチンという形で免疫による恩恵を受けており、小児科感染症領域専門の皆さんが一番よくそのことを周知されていることと思う。

一方、癌はそもそも自分の身体のなかにできた細胞の塊だが、そのような癌と同じ自分の免疫システムで治療や予防ができるのだろうか。たいへん難しい問題であったが、この夢のような医学の実現に向かって今日まで世界中で多くの研究がなされてきた。実際、ヒト癌免疫研究は、免疫応答の存在すら疑われていた長い困難な時代をへて、1990年代以降、分子レベルで着実な進展をとげ、2000年代に入り、癌患者で臨床試験、治療も盛んに行われ、癌免疫治療・予防が日常臨床で具現化するところまでできているといえる。

特に、抗 CD20 抗体に始まった抗体治療が癌治療のあらたな標準として大きく貢献し、ここ 1～2 年はさらに、T 細胞の免疫制御性分子 CTLA-4 や PD-1 に対する抗体治療が 50～80% の腫瘍退縮など驚くべき効果を上げつつある。現在、これらは大変なトピックスになっていて、2013 年末に Science 誌は、同年の科学的進展の 10 大ニュースのトップに癌免疫の進展を選んでいる。新聞紙

上でも大きく報道された。

## I. 癌特異的免疫応答

免疫による治療の究極の哲学は、癌に対する特異性である。上記の CTLA-4 や PD-1 などの免疫制御性分子の抗体治療は素晴らしい成果を上げつつあるが、癌特異性という観点からは厳密ではなく、副作用の心配が必ずしも解決されているとはいえない。

癌特異性は理論的には、癌細胞や癌組織にのみ発現する蛋白分子であり、これが基本と考えられる。これらは細胞内でプロテアソームなどにより分解され、ペプチド断片になり、そして HLA A24 とか A2 などの HLA クラス I 分子と細胞内で会合、HLA クラス I 分子-ペプチド断片複合体となり、ゴルジ装置を経由して細胞表面に発現する。これら複合体が cytotoxic T lymphocyte (CTL: 細胞障害性 T リンパ球) により認識され、癌細胞の特異的排除につながるわけである。すなわち、癌特異的な遺伝子発現とその蛋白、ペプチド断片が免疫による癌特異応答を規定するわけである。癌ペプチドはこのように癌特異性という意味では最も優れている。

今日的には癌治療は化学療法がまずは先行しているが、将来的には癌患者が免疫治療を化学療法などで免疫系の抑制がきたされる前に、最初の癌の治療法として選択する可能性も出ると考えられる。

1) 札幌医科大学医学部病理学第 1 講座  
〔〒 060-8556 札幌市中央区南 1 条西 17 丁目〕



## II. 癌特異的ペプチドワクチン

われわれは一貫してヒト癌抗原を研究してきたが、これまでの研究で発見した癌抗原の一つがアポトーシス抑制分子でサバイビン 2B という物質である。この分子は機能的には代表的な inhibitor of apoptosis proteins であり、癌の分裂、増殖を維持させている。われわれはまずこの分子が多くの癌腫で発現し、正常組織で発現がなく、癌特異的であることを確認した。さらに多くの癌患者 T 細胞が本分子由来ペプチドを認識し、優れた癌特異的抗原として癌の免疫学的標的になることを明らかにしてきた。

これらの基礎的成果を基に約 10 年前から大腸癌、膵臓癌、乳癌、肺癌、膀胱癌、口腔癌など、さまざまな癌腫を対象としてこの癌特異的抗原ペプチドの癌ワクチンとしての副作用や、有効性の臨床成績、あるいはワクチン投与による免疫反応の詳細につき臨床教室と共同で行ってきた。その結果、臨床的にも免疫学的にも一定程度の有効性は認められ、大きい希望を抱かせてくれている。この研究も平成 23 年からは第 I 相の臨床試験が厚生労働省の支援の下開始され、さらに平成 25 年秋からは第 II 相の臨床試験が進行膵臓癌を対象に全国規模で行われている。

## III. 癌幹細胞 (cancer stem cells : CSC)/癌起始細胞 (cancer-initiating cells : CIC) の存在と免疫標的研究

それでも癌は癌であり、その効率的な治療は当然困難が予想される。一つの癌の抗原ワクチンで癌の大きな制御は難しいことも予想される。

一方、多くの研究により基本的な課題も浮き彫りになってきている。これらの主たるものは、①癌抗原であろうとウイルス抗原であろうと、抗原特異的リンパ球は体内で無限には増えない。これはゆるぎない生体のホメオスタシスでもあり、このことを理解して、よりすぐれたワクチンを開発することが重要と考えられる。すなわち、患者体内での限りあるリンパ球が標的とする、適切な癌抗原の選択をすることが大変重要と考えられる。

このことに最も合目的な抗原は、その存在が実

証されてきている、いわゆる CSC/CIC に発現する癌抗原と考えることができる。CSC/CIC の研究はここ数年飛躍的に進んできた。われわれはすでに 20 年前からこの研究にとりくんできた。

その結果、根元細胞としての特徴を有する CSC/CIC は、T リンパ球の免疫学的なターゲットとして極めて魅力的であることがわかった。特に CSC/CIC 表面の HLA 分子上に提示される特異的癌抗原ペプチドが細胞障害性 T 細胞 (CTL) のターゲットになり得るか否か、に大きな焦点があった。

われわれはまず、Hoechst33342 の排泄を指標とした side population (SP) 法、ALDH 法、sphere formation 法などにより、CSC/CIC の分離同定をさまざまな癌で行った。続いて CSC/CIC と非 CSC/CIC を比較することにより、CSC/CIC に特異的、選択的に発現する興味ある分子を次々と同定した。しかも正常の幹細胞に発現をみない分子として、以下の興味深い分子を発見した。

それらは、いわゆる癌精巢抗原 [cancer-testis (CT) antigens] としての特徴を有する① Or7c1 (Olfactory receptor family 7 subfamily c member 1)、② DNAJB8 (DnaJ homolog subfamily, member 8)、③ SMCP (sperm mitochondria-associated cysteine-rich protein) などであった。

## IV. CSC/CIC と精巢特異抗原

CSC/CIC に精巢特異抗原のいくつかが選択的、特異的に発現する事実は、CSC/CIC の生物学的特徴を考えるうえで大変興味深いものといえる。少なくとも spermatogenesis のある特定の分子機構が CSC/CIC の特徴と明らかにリンクしていることを示唆している。その意味、意義はまだわからないが、癌を考えるうえでとても重要な課題となってきた。

これらの分子は、正常では睾丸組織に発現するのみであり、他方多くの癌細胞で高い発現をみる分子である。しかも CSC/CIC のステムネス特質と直接関連する。これらの遺伝子を高発現させると NOD SCID マウスで高い *in vivo* 造腫瘍性を示す。一方、siRNA 処理によりそれらの特徴を大きく失う。すなわち、CSC/CIC のステムネスの特質

に直接関与する分子であると考えられる。

これらの分子は癌ワクチンとして活性も鮮やかに示す。特に、Or7c1 と DNAJB8 分子は CTL の強い誘導性を示し、腫瘍の免疫学的抑制を *in vivo* でもたらず。

ここで正常精巣への副作用が気になる。しかし、癌精巣特異抗原は癌と男性正常精巣に発現しているわけだが、正常精巣は HLA 分子発現がエピジェネティカルに制御されており、通常、発現がない。そのため、CTL は正常精巣を攻撃しないと考えられており、この意味でも理想的な癌ワクチンと考えられる。

この成果を受けて、前者 Or7c1 の抗原ペプチドは臨床試験を始めている。これは世界で最初のヒト癌幹細胞/癌起始細胞 (CSC/CIC) ワクチンであり、その臨床的、免疫学的成果が大変注目されている。

#### おわりに

われわれが探求しているヒト癌幹細胞/癌起始細胞 (CSC/CIC) の特異抗原、すなわちある特定の癌精巣抗原だが、これらは恐らく最も根元的あるいは原始的な腫瘍抗原として生体の免疫監視機構に抗癌制御として機能していると推測している。なぜなら多くの臨床的腫瘍は単発癌で推移する。これら癌精巣抗原が根元的あるいは原始的腫瘍抗原として機能していればこそ、このような疫学的事実に通じるものと考えられる。

また、これは全くの筆者の個人的考えだが、疫学的に先進国のほとんどで男性の癌死が女性のそれに比し優っている。例えば、日本では人口 10 万人比では男性が癌死 300 人前後、女性が 200 人前後/年である。イタリア、フランスなどもそのような傾向がある。この差は謎だが、男性がより激しい環境因子に曝されているというような社会的、職業的側面だけでは説明できないと筆者は推測している。もしかして、女性の正常組織には全く存在しない、癌精巣抗原が根元的あるいは原始的腫瘍抗原として女性で癌免疫監視機構に機能しているのでは、と思うのである。Wild だが、しかし大変魅力ある作業仮説と考える。

いずれにしても癌の免疫治療と予防は次世代に

は具現化すると筆者は予測している。その根拠をこの総説で皆様に理解していただくことができれば大変幸いと思う。

#### 文 献

(2013 以降の論文のみを下記に紹介する。それ以前の詳細は、PubMed で Sato N and Sapporo Medical のキーワード挿入で論文検索できる)

- 1) 廣橋良彦, 鳥越俊彦, 佐藤昇志: 免疫療法の標的としてのがん細胞亜集団. 実験医学 31 : 1904-1907, 2013
- 2) Tanaka T, Torigoe T, Hirohashi Y, et al : Hypoxia-inducible factor (HIF)-independent expression mechanism and novel function of HIF prolyl hydroxylase-3 in renal cell carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol 140 : 503-513, 2014
- 3) Morita R, Nishizawa S, Torigoe T, et al : Heat shock protein DNAJB8 is a novel target for immunotherapy of colon cancer-initiating cells. Cancer Sci 105 : 389-395, 2014
- 4) Takahashi A, Hirohashi Y, Torigoe T, et al : Ectopically expressed variant form of sperm mitochondria-associated cysteine-rich protein augments tumorigenicity of the stem cell population of lung adenocarcinoma cells. PLoS One 8 (11) : e69095, 2013
- 5) Emori M, Tsukahara T, Murase M, et al : High Expression of CD109 Antigen Regulates the Phenotype of Cancer Stem-Like Cells/Cancer-Initiating Cells in the Novel Epithelioid Sarcoma Cell Line ESX and Is Related to Poor Prognosis of Soft Tissue Sarcoma. PLoS One 8 (12) : e84187, 2013 doi : 10.1371/journal.pone.0084187. eCollection 2013.
- 6) Tanaka T, Kitamura H, Inoue R, et al : Potential survival benefit of anti-apoptosis protein : survivin-derived peptide vaccine with and without interferon alpha therapy for patients with advanced or recurrent urothelial cancer—results from phase I clinical trials. Clin Dev Immunol 2013 : 262967, 2013 doi : 10.1155/2013/262967. [Epub Nov 20, 2013]
- 7) Yasuda K, Torigoe T, Morita R, et al : Ovarian cancer stem cells are enriched in side population and aldehyde dehydrogenase bright overlapping population. PLoS One 8 (8) : e68187, 2013 doi :

- 10.1371/journal.pone.0068187.
- 8) Matsuzaki J, Torigoe T, Hirohashi Y, et al : Expression of ECRG4 is associated with lower proliferative potential of esophageal cancer cells. *Pathol Int.* 63 (8) : 391-397, 2013 doi : 10.1111/pin.12079.
  - 9) Michifuri Y, Hirohashi Y, Torigoe T, et al : Small proline-rich protein-1B is overexpressed in human oral squamous cell cancer stem-like cells and is related to their growth through activation of MAP kinase signal. *Biochem Biophys Res Commun* 439 : 96-102, 2013
  - 10) Yamamoto T, Tamura Y, Kobayashi JI, et al : Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-1 plays a role for in vivo tumor growth via intercellular communication. *Exp Cell Res* 319 : 2617-2626, 2013
  - 11) Torigoe T, Hirohashi Y, Yasuda K, et al : Constitutive expression and activation of stress response genes in cancer stem-like cells/tumour initiating cells : Potent targets for cancer stem cell therapy. *Int J Hyperthermia* 29 (5) : 436-441, 2013
  - 12) Ikeda K, Torigoe T, Matsumoto Y, et al : Resveratrol inhibits fibrogenesis and induces apoptosis in keloid fibroblasts. *Wound Repair Regen* 21 (4) : 616-623, 2013 doi : 10.1111/wrr.12062.
  - 13) Kuroda T, Hirohashi Y, Torigoe T, et al : ALDH1-high ovarian cancer stem-like cells can be isolated from serous and clear cell adenocarcinoma cells, and ALDH1 high expression is associated with poor prognosis. *PLoS One* 8 (6) : e65158, 2013
  - 14) Kutomi G, Tamura Y, Tanaka T, et al : Human Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin 1- $\alpha$  (hERO1- $\alpha$ ) is a Novel Predictor for Poor Prognosis of Breast Cancer. *Cancer Sci* 104 : 1091-1096, 2013
  - 15) Yamada R, Takahashi A, Torigoe T, et al : Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells : proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene. *Tissue Antigens* 81 : 428-434, 2013
  - 16) Nishida S, Hirohashi Y, Torigoe T, et al : Prostate cancer stem-like cells/cancer-initiating cells have an autocrine system of hepatocyte growth factor. *Cancer Sci* 104 : 431-436, 2013 Selected paper in "In this issue" of the Journal
  - 17) Kiriyama K, Hirohashi Y, Torigoe T, et al : Expression and function of FERMT genes in colon carcinoma cells. *Anticancer Res* 33 : 167-173, 2013
  - 18) Kitamura H, Torigoe T, Hirohashi Y, et al : Nuclear, but not cytoplasmic, localization of survivin as a negative prognostic factor for survival in upper urinary tract urothelial carcinoma. *Virchows Arch* 462 : 101-107, 2013
  - 19) Kameshima H, Tsuruma T, Kutomi G, et al : Immunotherapeutic benefit of  $\alpha$ -interferon (IFN $\alpha$ ) in survivin2B-derived peptide vaccination for advanced pancreatic cancer patients. *Cancer Sci* 104 : 124-129, 2013
  - 20) Morita R, Hirohashi Y, Suzuki H, et al : DNA methyltransferase 1 is essential for initiation of the colon cancers. *Exp Mol Pathol* 94 : 322-327, 2013
  - 21) Kitamura H, Torigoe T, Hirohashi Y, et al : Prognostic impact of the expression of ALDH1 and SOX2 in urothelial cancer of the upper urinary tract. *Mod Pathol* 26 : 117-124, 2013

\* \* \*

特集：Human Immunology：疾患理解から治療へ  
総 説

がんワクチン創薬への道程  
—がん抗原の同定から臨床試験まで—

鳥越俊彦, 廣橋良彦, 塚原智英, 金関貴幸, Vitaly Kochin, 佐藤昇志

The path to innovative drug development of cancer vaccine:  
From discovery of tumor antigens to clinical trials

Toshihiko TORIGOE, Yoshihiko HIROHASHI, Tomohide TSUKAHARA, Takayuki KANASEKI,  
Vitaly KOCHIN, and Noriyuki SATO

Department of Pathology 1, Sapporo Medical University School of Medicine

(Accepted February 17, 2014)

summary

Tumor immunology has been advancing after the great discovery of tumor-specific antigen MAGE in 1991, and a number of tumor antigens have been reported to date. We have also found novel tumor antigens through various methodologies such as gene expression cloning, bioinformatics, reverse immunology, transcriptome analysis and peptidome analysis. Recently, we made a success of defining cancer stem cell-specific antigens. The fruits of our basic research have been applied to clinical trials of cancer vaccine. The long path and future perspectives of innovative immunotherapeutic drug development are described.

**Key words**—tumor antigen; cancer stem cell; peptide vaccine; CTL; immunotherapy

抄 録

1991年のMAGE抗原の発見以来、腫瘍免疫学は急速に発展し、数多くのヒト腫瘍特異抗原が報告されている。著者らも、遺伝子発現クローニング法、バイオインフォマティクス、Reverse immunology、Transcriptome解析、網羅的ペプチド解析などの方法を駆使して、多くのヒト腫瘍抗原を同定してきた。近年、ヒト固形腫瘍の根幹をなすがん幹細胞の分離によって、がん幹細胞特異抗原も明らかにしてきた。一方で、これら基礎研究成果を創薬につなげるために、T細胞エピトープペプチドを用いたがんワクチン臨床試験も推進している。臨床試験ではワクチンの安全性、腫瘍抑制効果、免疫効果を検証し、最適プロトコルとバイオマーカーを見出さなければならない。臨床試験の結果を基礎研究にフィードバックし、より効果の高いがんワクチンの実用化をめざす創薬の道程と展望について概説する。

はじめに

著者らは過去30年以上にわたり、ヒトがん免疫について基礎研究および臨床研究を進めてきた。近年、大学発の研究成果を創薬につなげるトランスレーショナルリサーチが積極的に推進され、医師主導治験が実施できる環境が整ってきた。本レビューでは、これまでどのようながん抗原が同定され、どのように分類され、どのような臨床試験が行われているのか、基礎研究から臨床試験まで、これまでの道程を概説し今後の展望を述べる。

1. がん抗原遺伝子と抗原ペプチドの同定

(1) 自家腫瘍細胞・CTLクローンペアの樹立と遺伝子発現クローニング

著者らはまず、がん患者さんの腫瘍組織からがん細胞株を樹立し、同じ患者さんの末梢血リンパ球と混合培養することによって、自家腫瘍細胞と細胞障害性T細胞(CTL)クローンのペアを樹立した<sup>1)</sup>。この腫瘍細胞に発現する遺伝子のライブラリーを293T細胞にトランスフェクションし、CTLクローンの活性化を指標とした発現クローニング法によって、HLA-B\*5502拘束性に提示される腫瘍抗原遺伝子をスクリーニングした(表1A)<sup>2)</sup>。

表1 札幌医科大学において同定された抗原分子とペプチド

がん種	抗原ペプチド (提示分子)	抗原タンパク質	文献
A) 自家腫瘍・CTL ペア			
胃がん	F4.2 (A31)	c98	32)
骨肉腫	PBF-B55 (B55)	PBF	2)
骨肉腫	PBF-A24 (A24)	PBF	33)
骨肉腫	PBF-A2 (A02)	PBF	34)
B) バイオインフォマティクス			
種々	HIFPH3-8 (A24)	HIFPH3	7)
種々	CEP55-193 (A24)	CEP55 (C10orf3)	3)
前立腺がん	AMACR2 (A24)	AMACR	6)
前立腺がん	STEAP-B (A24)	STEAPI	5)
肺がん	Lengsin-A02, A24 (A02, A24)	Lengsin	4)
C) Reverse Immunology			
1) アポトーシス関連			
種々	SVN-2B (A24)	Survivin 2B	11)
種々	C58 (A24)	Survivin	35)
種々	L7 (A24)	Livin	12)
2) 染色体転座			
滑膜肉腫	A (A24)	SYT-SSX1	9)
滑膜肉腫	B (A24)	SYT-SSX1	9)
滑膜肉腫	K9I (A24)	SYT-SSX1	10)
D) がん幹細胞			
種々	SOX2-109 (A24)	SOX2	36)
大腸がん	OR7C1-93 (A24)	OR7C1	
腎・大腸がん	DNAJB8-A24 (A24)	DNAJB8	25)
大腸がん	SF9 (A24)	FAM83B	

## (2) 網羅的遺伝子発現解析と Reverse Immunology

2000年代にDNA microarray解析法や遺伝子発現データベースが発達したおかげで、網羅的な遺伝子発現解析が可能となった。著者らは正常組織と腫瘍組織にそれぞれ発現する遺伝子を比較し、正常組織には発現がほとんどなく、腫瘍組織に高発現する遺伝子群をスクリーニングすることによって、数種類の腫瘍抗原遺伝子を同定した(表1B)<sup>3-8)</sup>。

また滑膜肉腫には、遺伝子転座によって融合遺伝子産物 SYT-SSX1 が発現していることから、HLA 結合モチーフ検索によって HLA-A\*2402 拘束性に提示される抗原ペプチドを同定した<sup>9,10)</sup>。同様に、腫瘍特異的に発現する Inhibitor of apoptosis protein family 分子 Survivin, Livin から HLA-A\*2402 拘束性抗原ペプチドを同定した(表1C)<sup>11,12)</sup>。このように、既知のがん抗原から HLA 結合モチーフ検索によって抗原ペプチドをスクリーニングする方法は Reverse Immunology 法とよばれる<sup>13,14)</sup>。

## (3) 網羅的 HLA 結合ペプチド解析

さらに近年著者らは、腫瘍細胞表面の HLA/ペ

プチド complex を免疫沈降し、マスペクトル解析によって HLA 結合ペプチドのアミノ酸配列を網羅的に分析する手法を確立した。ペプチドのアミノ酸配列情報から、親抗原タンパク質を推測することができる。推測された抗原遺伝子のなかから、腫瘍細胞に特異的な発現を示す遺伝子を選別することによって、新たながん抗原遺伝子と抗原ペプチドを同定することに成功した(表1 SF9/FAM83B)。Reverse Immunology 法によって同定される抗原ペプチドは、HLA 結合モチーフによって予測された仮想抗原ペプチド (Virtual Antigenic Peptide) であるのに対し、本方法によって同定されるペプチドは、実際に腫瘍細胞表面に提示されているナチュラル抗原ペプチド (Natural Antigenic Peptide, NAP) であることが特徴である。

## 2. がん抗原の種類とワクチン療法

### (1) がん抗原の種類

このようにして多くのがん抗原遺伝子・ペプチドを同定してみると、がん抗原は大きく3種類に分類できることが判明した<sup>15,16)</sup>。1つは SYT-SSX1 融合

遺伝子産物に代表されるような腫瘍細胞特異的な遺伝子変異・染色体転座に由来する抗原である。がん特異性という点では極めて理想的な抗原であるが、多くのヒト固形腫瘍では未知のままである。2つめは腫瘍細胞において過剰発現している抗原で、がん細胞の悪性形質と関連した機能をもつ分子が多く、アポトーシスを阻害する IAP family 抗原や、シグナル伝達分子、細胞増殖・細胞周期関連分子が含まれる。これらの抗原は低レベルではあるが正常組織にも発現しており、免疫寛容のために抗原性が低いという欠点がある。3つめのグループは、Cancer-Testis (CT) antigens で、1991年に Thierry Boon らによって発見された MAGE-A1 がその代表である<sup>17)</sup>。正常組織では精巣にしか発現していない抗原で、現在までに CT1.1~CT136 まで 150 種類以上の CT antigens が登録されている (GeneCards V3)。

近年著者は、CT antigens の一部がヒト固形腫瘍のがん幹細胞に高発現しており、がん幹細胞標的の抗原として免疫治療に有用であるばかりでなく、機能的にもがん幹細胞の造腫瘍性に重要な役割を果たしていることを見出している (表 1 D)<sup>18, 19)</sup>。著者らは、がん幹細胞特異的発現を示す CT antigens を、がん・精巣・幹細胞抗原 (Cancer-Testis-Stem, CTS antigens) と呼び、現在がん幹細胞標的ワクチンを開発中である。

## (2) がんワクチン療法の治療標的

がん幹細胞は、幹細胞様形質と高い造腫瘍能をもつ少数のがん細胞亜集団で、がんの治療抵抗性や再発・転移の主犯細胞であると考えられており、がん幹細胞を標的とした治療法の開発が現在世界中で進められている<sup>16, 20)</sup>。がん抗原をがん幹細胞の観点から分類すると、がん幹細胞・非幹細胞共通抗原とそれぞれに特異的ながん抗原、正常幹細胞にも発現する抗原とに分類される (図 1)<sup>21, 22)</sup>。どのような抗原を標的としたワクチンが最も効果的であろうか？著者らは動物モデルを用いてがん予防モデル実験とがん治療モデル実験とを行った。その結果、いずれのモデルにおいてもがん幹細胞特異抗原を標的とする免疫治療でより高い腫瘍抑制効果が得られた (図 2)<sup>23)</sup>。抗がん剤に耐性をもつがん幹細胞も、細胞障害性 T 細胞 (CTL) によって細胞障害を受けることが確認されており<sup>21, 24, 25)</sup>、進行がんの治療および再発予防ワクチンとしての臨床効果が期待される。

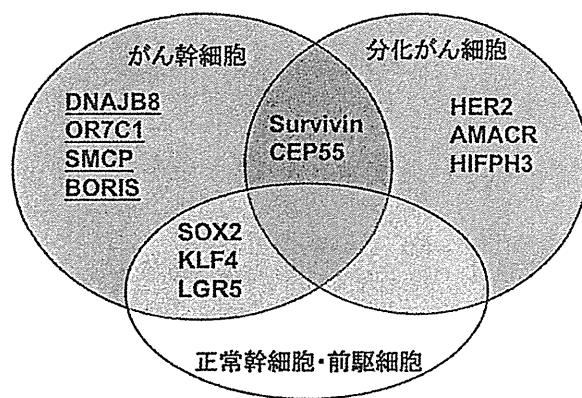


図 1 がん幹細胞の観点から分類したがん抗原の種類  
がん幹細胞、分化がん細胞および正常幹細胞における発現パターンから、がん抗原は大きく 3 種類に分類される。このうちアンダーラインをつけた抗原分子は、がん・精巣抗原である。

## 3. がんワクチン療法臨床試験

### (1) 臨床試験の概要と結果

著者らは、これまでの基礎研究成果を創薬につなげるために、2004 年からペプチドワクチンの臨床試験を開始した (図 3)。Survivin 由来の HLA-A\*2402 拘束性 CTL エピトープ SVN-2B ペプチドを 2 週間毎に 4 回皮下注射するワクチン試験では、RECIST 判定によって腫瘍抑制効果を検証し、HLA/ペプチドテトラマー解析と ELISPOT 解析によって免疫効果を検証した<sup>26)</sup>。免疫補助剤には、不完全フロイドアジュバンドと Interferon- $\alpha$  (IFN) を使用した<sup>27-30)</sup>。

進行大腸がん (主に腺がん) と進行口腔がん (主に扁平上皮がん) のいずれを対象とした試験においても、IFN を併用した場合において、有意に高い腫瘍抑制効果と免疫効果 (テトラマー解析) が得られることが判明した (表 2)。IFN 併用ワクチンを受けた術後再発進行膵臓がんの患者は 8 年間経過した現在も試験を継続中である。2012 年より厚労省補助金を受けて医師主導治験を実施。「有効な治療法のない進行消化器がんを対象とした SVN-2B 単独投与の第 1 相臨床試験」の結果、病勢コントロール率は 53% (15 例) で、そのうち進行膵臓がん 10 例を追跡調査した結果、全生存期間中央値は 8.8 ヶ月と延長が認められた。2013 年より、「有効な治療法のない進行膵臓がんを対象としたプラセボ、SVN-2B 単独投与、SVN-2B/IFN 併用投与の二重盲検群間比較試験」を実施中である。

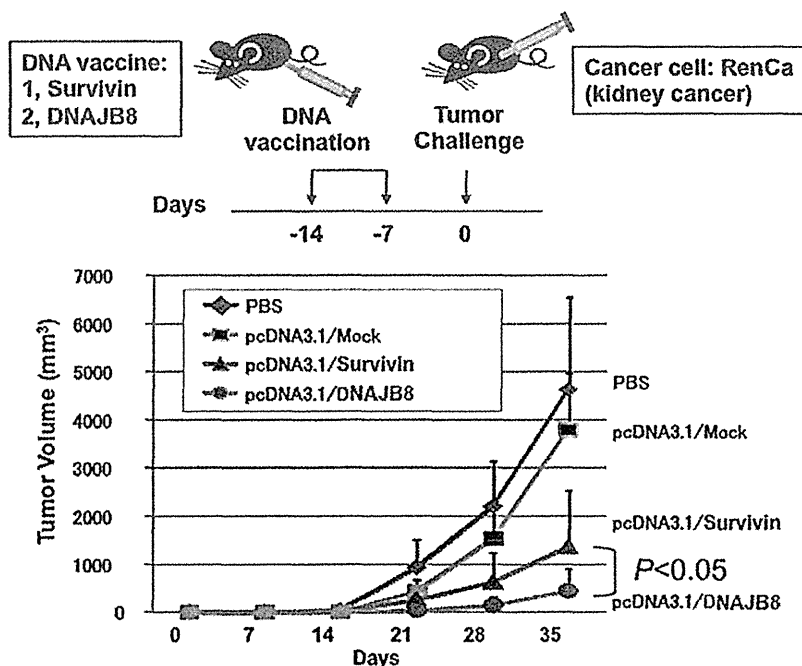


図2 がんワクチンのがん予防モデル実験

Survivin または DNAJB8 をコードする発現 Plasmid DNA を BALB/c マウスに 2 回免疫した後、同系腎がん細胞株 RenCa を移植した。がん幹細胞特異抗原 DNAJB8 を免疫した群で、有意に高い腫瘍抑制効果が認められた<sup>18)</sup>。

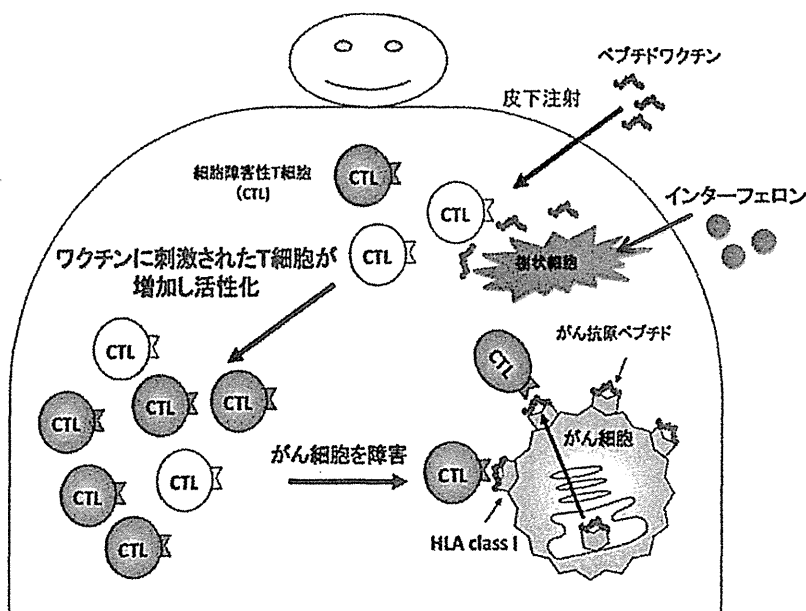


図3 がんワクチンの腫瘍抑制効果メカニズム

ペプチドワクチンを皮下注射すると、局所および所属リンパ節の樹状細胞の働きによってペプチド特異的 CTL が誘導され、体内で増殖する。CTL は抗原ペプチドを発現している腫瘍細胞を認識し、細胞障害活性を発揮する。インターフェロンは樹状細胞の活性化と腫瘍細胞の HLA class I 発現を促進する。

(2) がんワクチン療法のバイオマーカー

CTL エピトープペプチドを用いたワクチンの特質の一つとして、ELISPOT 解析やテトラマー解析によってワクチン特異的 CTL 応答をモニタリングできるという特徴があげられる。実際に、SVN-2B

ペプチドワクチン試験を受けた被験者のテトラマー解析結果と腫瘍抑制効果とを比較したところ、ワクチン投与前のテトラマー陽性 T 細胞が低い被験者に、比較的高い免疫効果と腫瘍抑制効果が認められることが判明した。

表2 SVN-2B 臨床試験の結果 (自主臨床研究)

がん種とプロトコール	副作用	評価 症例数	腫瘍抑制効果 (PR, SD割合)	テトラマー解析 特異的CTL増加%
大腸がん	SVN-2Bのみ	無	27% (4/15)	13% (2/15)
	SVN-2B + IFA	無	20% (1/5)	0% (0/5)
	SVN-2B + IFA + IFN $\alpha$	発熱	50% (4/8)	75% (6/8)
	IFN $\alpha$ のみ	発熱	0% (0/3)	0% (0/3)
膵臓がん	SVN-2B + IFA + IFN $\alpha$	発熱	66% (4/6)	66% (4/6)
	口腔がん			
SVN-2Bのみ	無	8	12% (1/8)	75% (6/8)
	SVN-2B + IFA + IFN $\alpha$	発熱	50% (3/6)	100% (6/6)
膀胱がん	SVN-2B + IFA	発熱	22% (2/9)	56% (5/9)

腫瘍抑制効果はCT画像をRECISTに基づいて評価した。テトラマー解析は、ワクチン前と比較してワクチン後のテトラマー陽性CTL数が1.5倍以上増加した症例をCTL増加症例とした。IFA: 不完全フロイドアジュバンド、IFN $\alpha$ : Interferon- $\alpha$

また、ホルマリン固定組織標本の HLA class I 発現を免疫染色によって検出できる単クローン抗体 EMR8-5 を樹立し<sup>31)</sup>、原発腫瘍組織の発現レベルと腫瘍抑制効果とを比較したところ、HLA class I 陰性と判定された被験者は、癌種にかかわらず全例で腫瘍抑制効果が認められなかった<sup>14)</sup>。がんワクチン療法の効果予測マーカーとして、テトラマー解析法と HLA class I 免疫組織染色法は極めて有用であると考えられた。

#### 4. 今後の展望

臨床試験の先行しているがん抗原 Survivin はがん幹細胞・非幹細胞共通抗原であり、一方でがん幹細胞特異抗原 (CTS antigens) の1つ OR7C1 を標的とするワクチンの臨床試験を現在準備中である。ヒトの臨床試験においても動物モデル試験と同様の結果が認められるのかどうか、大変興味深い。CTL エピトープだけでなく、ヘルパーペプチドの有用性を検証する臨床試験も重要である。また、不完全フロイドアジュバンドや IFN よりも有効性の高い免疫補助剤を開発することも今後の重要な課題である。

第1世代がんワクチンの安全性と有効性を治験によって正確かつ客観的に実証することが求められているが、どのような抗原を標的として、何をモニタリングしながら、どのような投与方法・投与間隔で、どのような構造のペプチドを投与すれば良いのか、課題が多く残されている。臨床試験の結果を基礎研究にフィードバックしながら、次世代がんワクチンの開発を急ぎたい。

#### 文 献

- 1) Nabeta, Y., et al.: Recognition by cellular and humoral autologous immunity in a human osteosarcoma cell line. *J Orthop Sci.* 8: 554-559, 2003.
- 2) Tsukahara, T., et al.: Identification of human autologous cytotoxic T-lymphocyte-defined osteosarcoma gene that encodes a transcriptional regulator, papillomavirus binding factor. *Cancer Res.* 64: 5442-5448, 2004.
- 3) Inoda, S., et al.: Cep55/c10orf3, a tumor antigen derived from a centrosome residing protein in breast carcinoma. *J Immunother.* 32: 474-485, 2009.
- 4) Nakatsugawa, M., et al.: Novel spliced form of a lens protein as a novel lung cancer antigen, Lengsin splicing variant 4. *Cancer Sci.* 100: 1485-1493, 2009.
- 5) Yamamoto, T., et al.: Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-1 plays a role for in vivo tumor growth via intercellular communication. *Experimental cell research.* 17: 2617-2626, 2013.
- 6) Honma, I., et al.: Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of alpha-methylacyl-coenzyme A racemase in prostate cancer. *J Transl Med.* 7: 103, 2009.
- 7) Sato, E., et al.: Identification of an immunogenic CTL epitope of HIFPH3 for immunotherapy of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 14: 6916-6923, 2008.
- 8) Nakatsugawa, M., et al.: Identification of an HLA-A\*0201-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from the lung carcinoma antigen, Lengsin. *Int J Oncol.* 39: 1041-1049, 2011.
- 9) Sato, Y., et al.: Detection and induction of CTLs specific for SYT-SSX-derived peptides in HLA-A24(+) patients with synovial sarcoma. *J Immunol.* 169: 1611-1618, 2002.
- 10) Ida, K., et al.: Crisscross CTL induction by SYT-SSX junction peptide and its HLA-A\*2402 anchor substitute. *J Immunol.* 173: 1436-1443, 2004.
- 11) Hirohashi, Y., et al.: An HLA-A24-restricted Cytotoxic T Lymphocyte Epitope of a Tumor-associated Protein, Survivin. *Clin Cancer Res.* 8: 1731-1739, 2002.
- 12) Hariu, H., et al.: Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of inhibitor of apoptosis protein family, Livin/ML-IAP in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 11: 1000-1009, 2005.
- 13) Hirohashi, Y., et al.: The functioning antigens: beyond just as the immunological targets. *Cancer*



- Sci.* **100**: 798–806, 2009.
- 14) Sato, N., et al.: Molecular pathological approaches to human tumor immunology. *Pathol Int.* **59**: 205–217, 2009.
  - 15) Hirohashi, Y., et al.: Cytotoxic T lymphocytes: Sniping cancer stem cells. *Oncoimmunology.* **1**: 123–125, 2012.
  - 16) Hirohashi, Y., et al.: Immune response against tumor antigens expressed on human cancer stem-like cells/tumor-initiating cells. *Immunotherapy.* **2**: 201–211, 2010.
  - 17) van der Bruggen, P., et al.: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science (New York, NY).* **254**: 1643–1647, 1991.
  - 18) Nishizawa, S., et al.: HSP DNAJB8 controls tumor-initiating ability in renal cancer stem-like cells. *Cancer Res.* **72**: 2844–2854, 2012.
  - 19) Yamada, R., et al.: Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene. *Tissue antigens.* **81**: 428–434, 2013.
  - 20) Saijo, H., et al.: Cytotoxic T lymphocytes: the future of cancer stem cell eradication? *Immunotherapy.* **5**: 549–551, 2013.
  - 21) Inoda, S., et al.: Cytotoxic T lymphocytes efficiently recognize human colon cancer stem-like cells. *The American journal of pathology.* **178**: 1805–1813, 2011.
  - 22) Mori, T., et al.: Efficiency of G2/M-related tumor-associated antigen-targeting cancer immunotherapy depends on antigen expression in the cancer stem-like population. *Exp Mol Pathol.* **92**: 27–32, 2012.
  - 23) Nishizawa, S., et al.: Heat shock protein DNAJB8 controls tumor-initiating ability in renal cancer stem-like cells. *Cancer Res.* **2012**.
  - 24) Kano, M., et al.: Autologous CTL response against cancer stem-like cells/cancer-initiating cells of bone malignant fibrous histiocytoma. *Cancer Sci.* **102**: 1443–1447, 2011.
  - 25) Morita, R., et al.: Heat shock protein DNAJB8 is a novel target for immunotherapy of colon cancer-initiating cells. *Cancer Sci.* **2014** (in press).
  - 26) Tsuruma, T., et al.: Clinical and immunological evaluation of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine in phase I clinical study for patients with advanced or recurrent breast cancer. *J Transl Med.* **6**: 24, 2008.
  - 27) Honma, I., et al.: Phase I clinical study of anti-apoptosis protein survivin-derived peptide vaccination for patients with advanced or recurrent urothelial cancer. *Cancer Immunol Immunother.* **58**: 1801–1807, 2009.
  - 28) Miyazaki, A., et al.: Phase I clinical trial of survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent oral cancer. *Cancer Sci.* **102**: 324–329, 2011.
  - 29) Kameshima, H., et al.: Immunogenic enhancement and clinical effect by type-I interferon of anti-apoptotic protein, survivin-derived peptide vaccine, in advanced colorectal cancer patients. *Cancer Sci.* **102**: 1181–1187, 2011.
  - 30) Kameshima, H., et al.: Immunotherapeutic benefit of alpha-interferon (IFN $\alpha$ ) in survivin2B-derived peptide vaccination for advanced pancreatic cancer patients. *Cancer Sci.* **104**: 124–129, 2013.
  - 31) Torigoe, T., et al.: Establishment of a monoclonal anti-pan HLA class I antibody suitable for immunostaining of formalin-fixed tissue: Unusually high frequency of down-regulation in breast cancer tissues. *Pathol Int.* **62**: 303–308, 2012.
  - 32) Sahara, H., et al.: A Gene Encoding Human Gastric Signet Ring Cell Carcinoma Antigen Recognized by HLA-A31-Restricted Cytotoxic T Lymphocytes. *J Immunother.* **25**: 235–242, 2002.
  - 33) Tsukahara, T., et al.: Prognostic impact and immunogenicity of a novel osteosarcoma antigen, papillomavirus binding factor, in patients with osteosarcoma. *Cancer Sci.* **99**: 368–375, 2008.
  - 34) Tsukahara, T., et al.: HLA-A\*0201-restricted CTL epitope of a novel osteosarcoma antigen, papillomavirus binding factor. *J Transl Med.* **7**: 44, 2009.
  - 35) Kobayashi, J., et al.: Comparative study on the immunogenicity between an HLA-A24-restricted cytotoxic T-cell epitope derived from survivin and that from its splice variant survivin-2B in oral cancer patients. *J Transl Med.* **7**: 1, 2009.
  - 36) Nakatsugawa M, et al.: SOX2 is overexpressed in stem-like cells of human lung adenocarcinoma and augments the tumorigenicity. *Laboratory investigation.* **91**: 1796–1804, 2011.

## 膵癌に対するサバイビン免疫療法の研究

釣田義一郎, 谷澤健太郎, 篠崎 大

東京大学医科学研究所附属病院外科

安井 寛, 今井 浩三

東京大学医科学研究所附属病院抗体・ワクチンセンター

石井 浩, 尾阪 将人

東京大学医科学研究所附属病院抗体・ワクチンセンター／がん研究会有明病院消化器内科

島 宏彰, 水口 徹

札幌医科大学医学部消化器・総合、乳腺・内分泌外科学講座

林 宏至

北海道臨床開発機構

鳥越 俊彦, 佐藤 昇志

札幌医科大学医学部病理学第一講座

ペプチドワクチン療法は、癌免疫療法の中でも、最近、脚光を浴びている治療法の1つである。我々は現在、進行膵癌に対する、サバイビタンパクを標的とした癌ペプチドワクチン療法の第II相試験を、医師主導治験で行っている。本稿では、本治験の科学的根拠、治験の実際、および本治験の問題点と展望を概説する。

### 本治験の科学的根拠

#### 1) 背景

サバイビン遺伝子は、胎生期の組織において強い発現をみるが、精巣、胸腺、胎盤以外では発現しないことが知られる。一方、サバイビン遺伝子は消化器癌や乳癌など様々な癌腫において高頻度に発現しており、サバイビン遺伝子産物が癌抗原となった場合、正常組織に対する副作用が低く、癌細胞に特異的な免疫療法

が樹立できる可能性が考えられた<sup>1)</sup>。そこで次に、大腸癌、乳癌、食道癌、胃癌などの末梢血を用いて、サバイビン遺伝子産物を認識するTリンパ球の存在およびCTLの細胞傷害活性を検討した。サバイビンのアミノ酸配列より、日本人に最も多いHLA-A24と結合親和性の高いSVN-2B(Ala-Tyr-Ala-Cys-Asn-Thr-Ser-Thr-Leu; AYACNTSTL)ペプチドを合成し、HLA-A24陽性の癌患者末梢血を*in vitro*で刺激した結果、22例中17例(78%)においてHLA-A24/SVN-2B特異的CTLが誘導された<sup>1)-3)</sup>(図1)。また、これらのCTLはサバイビンを発現している癌細胞に対し細胞傷害活

性を発揮した。さらにHLA-A24/SVN-2Bテトラマーを作成し、癌患者末梢血におけるHLA-A24/SVN-2B特異的CTLの数を検討した結果、高頻度に特異的CTLを検出することができた<sup>3)</sup>。こうして、サバイピン蛋白が癌細胞内で分解され、ヒト白血球抗原HLA class I分子とともに細胞表面に提示されてSVN-2B特異的なCTLにより認識されることが証明された<sup>4)</sup>。

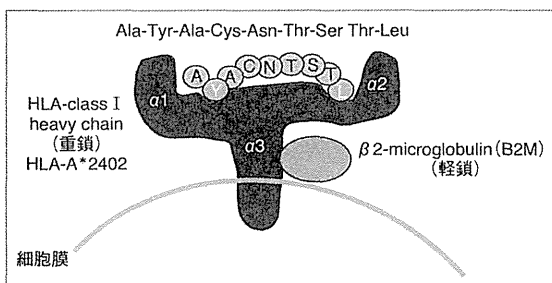
一般に8~11アミノ酸からなる癌抗原ペプチドを皮内または皮下に投与することで、樹状細胞やランゲルハンス細胞表面のHLA class I分子にペプチドが直接

結合し<sup>5)</sup>、もしくはペプチドが樹状細胞などの抗原提示細胞に貪食されHLA class I分子と複合体を形成して細胞表面に提示されることで<sup>6)</sup>、所属リンパ節においてこれら複合体がCTLに認識されるものと考えられている。ペプチド/HLA複合体を認識し種々のシグナルにより活性化したT細胞は、抗原ペプチド特異的CTLとして生体内を巡回し、癌局所において細胞表面に同一のペプチド/HLA複合体をもつ癌細胞を認識・攻撃し、抗腫瘍作用を発揮することが期待される<sup>4)</sup>(図2)。一方、樹状細胞やランゲルハンス細胞のような抗原提示細胞(APC)が抗原を捕捉し、CTLに認識されるためには、APCの活性化が重要であることが知られており<sup>7)8)</sup>、IFN- $\alpha$ およびIFN- $\beta$ (Type Iインターフェロン)は、細胞表面に発現している受容体IFNAR1/2を介してAPCを活性化する作用を持つ。したがって、抗原ペプチドとともにIFN- $\beta$ を投与することによって、高い抗原ペプチド特異的CTL誘導効果が期待できる。

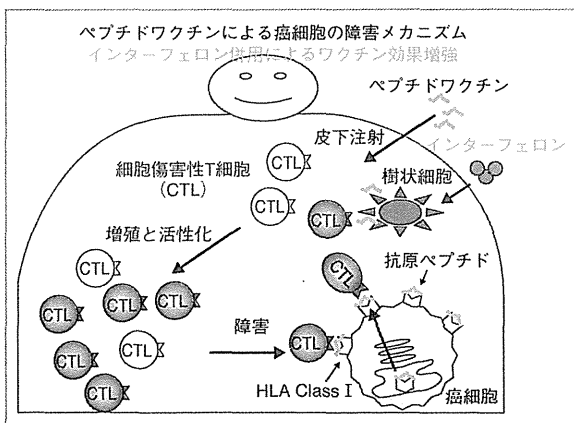
## 2) 治験前臨床試験

十分な非臨床試験により安全を確認した後に、HLA-A2402遺伝子陽性でサバイピンを発現している進行癌患者を対象として、平成14年度から平成19年度にかけて、SVN-2B単独投与および、IFN- $\alpha$ 併用プロトコルの自主臨床研究を行い、SVN-2Bの免疫効果をもつためにはIFNを併用することの有用性を確認してきた。大腸癌を対象に本剤単独および本剤をIFAエマルジョンとして投与した症例では、約20%程度の症例で腫瘍抑制効果が確認されたが、IFN- $\alpha$ 併用により50%まで上昇した。膵臓癌に対してIFN- $\alpha$ 併用投与した症例では、腫瘍抑制効果は67%であった。また、IFN- $\alpha$ 併用によりSVN-2Bペプチド特異的CTL数の上昇が認められた(表1)。

また本治験の前相の第I相臨床試験では、HLA-



**図1** Survivin-2B ペプチド(SVN-2B)の構造  
Ala: アラニン, Tyr: チロシン, Cys: シスチン, Asn: アスパラギン, Thr: スレオニン, Ser: セリン, Leu: ロイシン



**図2** 癌ワクチンの作用メカニズム

**表1** SVN-2Bペプチドの自主臨床研究成績

癌種	プロトコル	評価症例数	腫瘍抑制症例数 <sup>*1</sup>	評価症例数	CTL数増加症例数 <sup>*2</sup>
膵臓癌	SVN-2B+IFA+IFN- $\alpha$ 併用	6	4(67%)	6	3(50%)
	SVN-2B+IFA	5	1(20%)	5	0(0%)
大腸癌	SVN-2B+IFA+IFN- $\alpha$ 併用	8	4(50%)	8	2(25%)

\*1: 腫瘍抑制症例数: RECISTに基づく評価でSD以上の症例数

\*2: CTL数増加症例数: テトラマー対数差が1.00を超えた症例数

A2402遺伝子陽性でサバイビンを発現している進行消化器癌患者(大腸癌, 膵臓癌, 胃癌)を対象として, 平成24年度から平成25年度にかけて, SVN-2B単独(0.3mg群, 1.0mg群, 3.0mg群)の皮下投与を行った。その結果, SVN-2Bと因果関係がありと判断された副作用は4例6件(0.3mg群:2例3件, 1.0mg群:1例1件, 3.0mg群:1例2件)認められた。内訳は, SVN-2Bの投与に伴う皮膚硬結(Grade 1), 注入に伴う反応(Grade 1), 注射部位の血管外漏出(Grade 2)の他, 発熱(Grade 1)であり, いずれも軽度であった。また, 重篤な有害事象は10例12件(0.3mg群:3例3件, 1.0mg群:4例5件, 3.0mg群:3例4件)認められたが, いずれもSVN-2Bとの因果関係は否定された。有効性としてSVN-2B特異的CTL数(テトラマー解析)の評価を行った結果, 1.0mg群が有意に高値を示した。また, 治療開始前と4回目終了後の画像診断による病巣の評価をRECISTガイドラインに準拠して行った結果, 50%がSDであった。

以上の臨床試験の結果から, SVN-2BにIFNを併用した場合, 膵臓癌と大腸癌で最も腫瘍抑制効果が期待できると考えられた。特に進行膵臓癌は, 現在有効とされている治療法がBest Supportive Careに比べ, 生命予後を少しだけしか改善できないことより, SVN-2BとIFNの併用療法は新たな作用機序を有し全身の副作用が少ない新規膵臓癌治療薬となりうると考えられた。SVN-2B単独投与の第II相臨床試験の結果, 1回あたりの投与量として1.0mgが至適用量と推定された。以上の科学的根拠をもとに, 今回, SVN-2BにIFN- $\beta$ を併用した際の有効性および安全性を検討するため, 進行膵臓癌患者を対象として国内での第II相臨床試験を医師主導治療として計画するに至った。

## 治療の実際

### 1) 治療課題名: SVN-2B(第II相臨床試験)

有効な治療法のない進行膵臓癌患者におけるプラセボ, SVN-2B単独投与を対照SVN-2B/STI-01併用療法の無作為化二重盲検群間比較試験。

### 2) 目的

本治療は, 有効な治療法のない進行膵臓癌患者を対象としてプラセボ投与群, SVN-2B単独投与群あるいはSVN-2B/STI-01併用投与群のいずれかに無作為化割付し, 無増悪生存期間を比較する。副次的に免疫学的評価, RECISTガイドラインに基づく腫瘍縮小効果, 安全性プロファイルを検討する。探索的にirRC(Immune-related Response Criteria)に基づく無増悪生存期間を検討する。

### 3) デザイン

本治療は多施設で二重盲検下にて実施する中央登録方式による無作為化群間比較試験である。被験者をプラセボ群, SVN-2B群, SVN-2B/STI-01群に1:2:2の割合で無作為に割り付ける。

本治療は, ゲムシタピンまたはS-1が無効もしくは不耐となった進行膵臓癌の患者を対象として, SVN-2B/STI-01併用群, SVN-2B単独群, プラセボ群の有効性および安全性をと比較する。本治療は, STEP 1とSTEP 2の二段階の構成になっている(図3)。STEP 1は, RECISTガイドラインに基づきPDと判定されるまで投与を継続する。STEP 1においてRECISTガイドラインに基づきPDと判定された場合, STEP 1を終了する。STEP 1において32週以内にPDと判定された場合, さらなる投与継続を希望する被験者には同意取得後にSTEP 2に移行し, irRC<sup>3)8)</sup>に基づくPDと判定されるまで, もしくは最大7ヵ月(30週目)まで投与を継続する。ただし, STEP 2で全例がirRCに基づく評価でirPD(Immune-related Progressive Disease)となるかSTEP 2の最終評価被験者の評価が終了した際, STEP 1で投与を継続している被験者は, 次回投与と予定の投与を行わず, 来院予定日に最終評価を行い, 治療を終了する。

本治療は, プラセボ群の救済として, PDと判定された被験者には盲検性を担保したままSVN-2B/STI-01の併用投与を受ける機会を設けることとした(STEP 2)。これは本治療の大きな特徴の1つである。また, 癌ワクチンのような免疫系の活性化に基づく悪性腫瘍に対する治療では, 腫瘍抑制効果が遅れて発現することが知られている。したがって, 従来のRECIST基準では免疫学的腫瘍抑制効果を正確に判断