

図1 TAMsのがんにおける役割と自然免疫活性化による制御

TAMsは、腫瘍内微小環境下で多くの場合M2型に偏向している。M2 TAMsは、免疫抑制因子、血管新生因子、がん細胞の成長因子を産生し、腫瘍成長を促進する。Poly I:CによるTLR3/TICAM-1 (TRIF)経路の活性化やCpG ODNによるTLR9の活性化は、TAMsの機能をM1型に変換し、腫瘍の成長を抑制する。

瘍内に多く浸潤し、腫瘍の成長と密接にかかわっている。これらは免疫抑制に加えて、免疫系を介さない機構でも腫瘍の進展を多面的にサポートする。

TAMsの機能とその調節

腫瘍内には多数のマクロファージが浸潤し、それらは腫瘍の成長と密接にかかわる(図1-左)。マクロファージの除去によりマウスモデルにおける腫瘍成長が抑制されることから、マクロファージは腫瘍の成長に必須であると考えられている⁴⁾。腫瘍内のマクロファージは特徴的な性質を持ち、TAMsと呼ばれる。がん細胞は、自身が産生するchemokine (C-C motif) ligand (CCL)2などのケモカインによって末梢血中の単球を遊走させ、腫瘍内部に浸潤させる。その過程で単球は、腫瘍内微小環境に存在するサイトカインや低酸素などの影響を受けてTAMsへと分化する。後述するように、腫瘍内に浸潤するMDSCsの一部もTAMsに分化する。

一般的に、マクロファージは遺伝子の発現パターンをもとにM1またはM2に大別される。M1マクロファージは、tumor necrosis factor (TNF)- α 、

interleukin (IL)-12などの炎症性サイトカインやインターフェロン(interferon; IFN)- β , inducible nitric oxide synthase (iNOS)などの高い発現を特徴とし、Th1型の免疫応答を誘導する。病原微生物の排除に加えて、がん細胞を傷害する活性も持つ。一方、M2マクロファージは、炎症性サイトカインの産生量が低く、代わりに免疫抑制因子を強く産生する。さらに、増殖因子や血管新生因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)の産生により創傷治癒にかかわる。M1/M2マクロファージの誘導は、Toll様受容体(Toll-like receptors; TLRs)やサイトカイン受容体のシグナルにより調節を受ける。近年、マクロファージのM1/M2制御にかかわる細胞内シグナル経路や転写因子が多数同定されている⁵⁾。“可塑性”はマクロファージの特徴的な性質であり、外部からの刺激を受けて、M1/M2形質は双方向に移行可能な点が重要である。

TAMsは、概してM2マクロファージと似た性質を持ち腫瘍の成長を促進するが、M1型の性質を持つTAMsも腫瘍内に存在する。M1/M2のバランスが腫瘍成長と患者の予後に関連し、M1優位であると予後がよいといわれている⁴⁾。しかし、

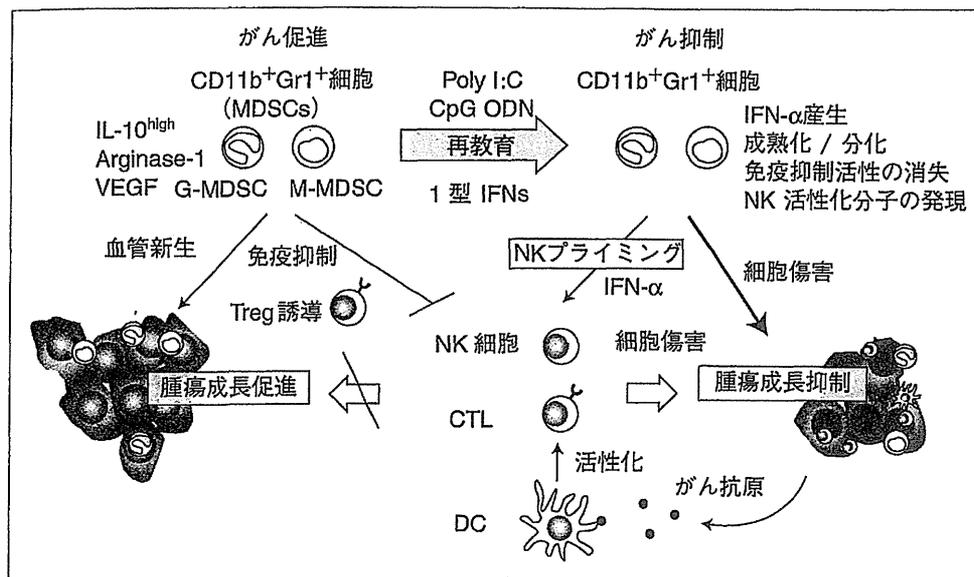


図2 MDSCsのがんにおける役割と自然免疫活性化による制御

MDSCs(CD11b+Gr1+)は、免疫抑制因子(IL-10, TGF-β, arginase-1など)の産生により、全身性の免疫抑制状態をもたらす。MDSCsは、表面マーカーの違いからG-MDSCs(CD11b+Ly6G+Ly6C^{low})とM-MDSCs(CD11b+Ly6G-Ly6C^{high})に分類され、それぞれ免疫抑制機構が異なる。一方、Poly I:CによるMAVS経路の活性化により、MDSCsはNK細胞のプライミング活性を獲得する。また、CpG ODNによるpDCsのTLR9活性化はIFN-αの産生により、MDSCsの成熟化と活性化を誘導し、T細胞の増殖抑制活性を消失させる。

腫瘍発生の初期段階においては、M1型のTAMsが炎症環境の構築により細胞のがん化を促進する²⁾。ただし、その場合の炎症とは“くすぶり型”と称される慢性的な弱い炎症であり、病原微生物の感染時に起こる“急性的”な強い炎症を誘導するM1型マクロファージと比べて、M1型TAMsの炎症性サイトカインの産生能は弱い⁶⁾。M2型のTAMsが産生するIL-10やtransforming growth factor(TGF)-βなどの免疫抑制性サイトカインやプロスタグランジンE₂, arginase-1は、抗がん免疫応答にかかわるCTLs, NK細胞, DCsの活性化を抑制する²⁾。また、M2 TAMsはVEGF, 成長因子(epidermal growth factor; EGF), マトリックス分解酵素(matrix metalloproteinase 9; MMP9)の産生により、がん細胞の増殖と浸潤・転移を促進する(図1-左)。

MDSCsの機能とその調節

MDSCsは、がんで全身性に増加する免疫抑制活性を持った未成熟なミエロイド系の細胞集団である³⁾。マウスではCD11b+Gr1+, ヒトでは、CD14⁻CD33⁺HLA-DR^{low/nega}で定義される。同一

マーカーを発現する細胞集団は健常時にも存在するが、それらは免疫抑制活性を示さない。MDSCsは、CTLs, NK細胞, DCsの機能抑制により、抗がん免疫応答を低下させることでがんの進展をサポートする(図2-左)。MDSCsが産生するarginase-1, IL-10, 活性酸素種(reactive oxygen species; ROS), 活性窒素種(reactive nitrogen species; RNS)などの多様な因子がCTLsの増殖抑制やDCsの機能抑制をもたらす³⁾。NK細胞に対しては、活性化に働くとの報告もある³⁾。また、MDSCsはTAMsと同様に、がん細胞由来のケモカインによって腫瘍に遊走し、VEGFの産生により腫瘍内血管の形成を促進する⁷⁾。

MDSCsは少なくとも2つのサブセットから構成される。マウスGr1(Ly6G)の検出に用いられるモノクローナル抗体RB6-8C5は、同Ly6ファミリーに属するLy6Cと交差反応する。Ly6GおよびLy6C特異抗体の染色性の違いに基づき、MDSCsは形態および免疫抑制活性のメカニズムが異なるCD11b+Ly6G+Ly6C^{low}顆粒球型(granulocytic-MDSCs; G-MDSCs)とCD11b+Ly6G-Ly6C^{high}単球型(monocytic-MDSCs; M-MDSCs)に分類され

る。M-MDSCsは、G-MDSCsやTAMs, DCsの前駆細胞を含んでおり、これらミエロイド系細胞の供給源ともなる⁹⁾。

MDSCsの増加や免疫抑制活性は、TLR4シグナルに代表される自然免疫シグナル経路の活性化やその結果産生されるサイトカインのシグナルにより制御を受ける⁹⁾。また、がん細胞から放出されるHsp72やS100A8/9などのdamage-associated molecular patterns (DAMPs)もTLR2やTLR4の活性化を介してMDSCsの増加、免疫抑制能の獲得、腫瘍への遊走にかかわる⁹⁾。

ミエロイド系細胞の “再教育”によるがん治療

近年、TAMsやMDSCsが持つ腫瘍成長を促進する性質から腫瘍成長を抑制する性質へと“再教育(re-education)”することによる新たな治療概念が提唱されている¹⁰⁾。がん細胞に比べて腫瘍内に浸潤する免疫細胞は遺伝的に安定であり、治療応答性も安定的にみられることが期待できる。ミエロイド系細胞は、多くのがんで腫瘍内に数多く浸潤しており、機能の可塑性を特徴とすることから治療標的として有望である。

TLRリガンドやTLRリガンドと他の製剤(抗サイトカイン抗体、ケモカイン発現ベクターなど)との併用、nuclear factor- κ B (NF- κ B)経路の制御などによりTAMsの機能をM2からM1に転換したり、MDSCsの分化を誘導することが可能である(図1, 2)¹⁰⁾。

dsRNAアジュバントによる 抗がん免疫応答の活性化

dsRNAの合成アナログpolyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C)は強力なIFN誘導能を有する免疫活性化物質として知られてきた。長らくその認識受容体は不明であったが、AlexopoulouやMatsumotoらによりTLR3のリガンドであることが明らかにされた¹¹⁾¹²⁾。TLR3の発現は、血液系ではDCsやマクロファージ、非血液系では線維芽細胞、上皮細胞、血管内皮細胞などに局限している。主な作用は、I型IFNs(IFN- α / β)やTNF- α などの炎症性サイトカインの産生と骨髄系樹状細胞(myeloid DCs; mDCs)やマクロファージの

成熟化である。Poly I:Cは、細胞表面の未知の受容体により認識され、クラスリン介在性のエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる。その過程にはRafflinが必須である¹³⁾。その後poly I:Cはエンドソームに到達し、そこに局在するTLR3に認識されて下流のシグナル伝達経路を活性化する。TLR3の細胞内ドメインへのアダプター分子TIR-containing adaptor molecule-1 (TICAM-1) [別名、TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF)]のリクルートを介してシグナル伝達経路を活性化し、転写因子IFN regulatory factor (IRF)3やNF- κ Bの活性化を誘導する¹⁴⁾¹⁵⁾。その結果、炎症性サイトカインの産生や成熟化マーカーの発現を誘導する。DCsなどの抗原提示細胞でTLR3/TICAM-1経路が活性化すると、細胞外から取り込んだ抗原のMHCクラスI分子への提示機構(クロスプレゼンテーション)が促進される(図3)¹⁶⁾。一方、細胞質でpoly I:Cはmelanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5)によって認識され、mitochondrial antiviral-signaling protein (MAVS) (別名、IPS-1, Cardif, VISA)アダプター分子を介してIRF3およびNF- κ Bの活性化に至る。全身性のI型IFNs産生は、主にこの経路に依存している(図3)。産生されたI型IFNsは、オートクラインおよびパラクラインの機構でIFN受容体を発現する細胞を刺激し、IFN応答性遺伝子群の発現を誘導する。

Poly I:Cの抗がん作用は、主にマウスモデルを用いて解析されてきた。がん移植マウスや自然発がんモデルマウスにpoly I:Cを投与すると、腫瘍の成長は抑制される¹⁷⁾¹⁸⁾。B16メラノーマ(MHCクラスI陰性、NK感受性)の皮下移植モデルでは、NK細胞の除去によってpoly I:Cの治療効果は消失する¹⁹⁾²⁰⁾。Poly I:Cの投与によって担がんマウスの体内では、NK細胞の細胞傷害活性とIFN- γ 産生の誘導が起こり、それらによってB16がん細胞の増殖が抑制される結果、腫瘍の成長が阻害される。NK細胞の活性化には、TLR3/TICAM-1経路によるCD8 α^+ DCsの活性化および成熟化を介した機構がドミナントに働く。TICAM-1およびIRF3依存性にDCsに発現し、NK細胞の活性化に必須な因子としてIRF3-dependent NK-activating molecule (INAM)が同定されている²¹⁾。INAM

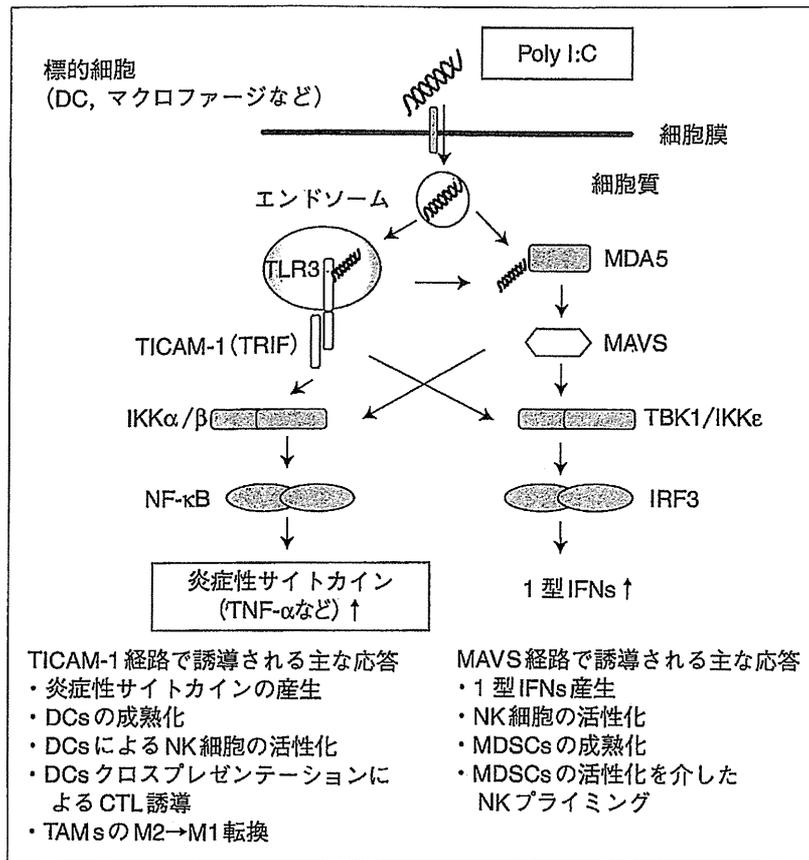


図3 Poly I:Cによる自然免疫活性化シグナルの概略図

Poly I:Cは、DCsやマクロファージなどの標的細胞表面の受容体(未同定)を介して細胞内に取り込まれ、エンドソームに移行した後、そこに局在するTLR3を活性化する。その後、TLR3の細胞質ドメインにアダプター分子TICAM-1(TRIF)がリクルートされ、下流のシグナル伝達経路の活性化が開始される。Poly I:Cは、細胞質でMDA5によって認識されるとMAVSを介したシグナル伝達経路を活性化する。両経路はともに転写因子NF-κBおよびIRF3を活性化するが、DCの成熟化やクロスプレゼンテーション誘導は主にTICAM-1経路で、IFNsの産生は主にMAVS経路で誘導されると考えられている。シグナル伝達経路の詳細は、他の文献を参照されたい。

によるNK細胞活性化の詳細なメカニズムや抗がん免疫応答における役割については、今後の解析が待たれる。また、poly I:CによるMDA5/MAVS経路の活性化もNK細胞による腫瘍成長の抑制に関与している。線維芽細胞や上皮細胞など非血球系細胞に発現するMDA5/MAVS経路の活性化によるI型IFNs産生とDCsおよびNK細胞内のIFNARを介したシグナルは、フルレンジのNK細胞活性化に寄与する²⁰⁾²²⁾。一方、poly I:Cによる獲得免疫系の誘導は、MHCクラスIを発現するがん細胞の排除を導く。EG7リンパ腫(MHCクラスI陽性、CTL感受性)の移植モデルでは、poly I:Cとがん抗原の投与によりCD8α⁺DCsの活

性が起こり、がん抗原特異的CTLsの増加と活性化が誘導される²³⁾。CD8α⁺DCsは、クロスプレゼンテーションの機能がもともと高く、さらに他のDCsサブセットに比べてTLR3を高発現する。そのためTLR3/TICAM-1経路の活性化は、IRF3を介してクロスプレゼンテーション機構を著しく高める。また、MDA5/MAVS経路もIFN産生を介してこれらの応答に補助的に作用する(図3)。

TLR3は、ある種のがん細胞にも発現している。Poly I:Cは、TLR3/TICAM-1経路の活性化によりネクロプトーシスによる直接的ながん細胞死を誘導する可能性も示唆されている²⁴⁾。

dsRNAアジュバントによる TAMs, MDSCsの機能制御と 抗がん免疫応答

TAMsやMDSCsは、他のミエロイド系細胞と同様にTLRsを発現している。TLRリガンドで刺激すると、サイトカイン産生や成熟化マーカーの発現上昇がみられる。また、TLRリガンドにより発現誘導される炎症性サイトカインもTAMsやMDSCsに作用する⁹⁾。それでは、TLRリガンドによるがん治療効果にTAMsやMDSCsはどのように影響するのであろうか？ 前述のように、内因性のリガンドによるTLR刺激はTAMsやMDSCsの分化を誘導し、腫瘍の成長を促進する。ところが、TLRリガンドによる治療モデルでは、TAMsやMDSCsの機能は、腫瘍の成長サポートから成長阻害へと転換されることが明らかとなってきた。

われわれは、3LL肺がん細胞株の移植モデルで、poly I:CによるTAMsのM2からM1への転換により治療効果が発揮されることを見出した²⁵⁾。3LLがん細胞は、MHCクラスI陰性であり、*in vitro*では活性化したNK細胞により傷害される。しかし、*in vivo*での治療効果はNK細胞に依存しないことから、別の細胞によるエフェクター機構が存在すると考えられた。われわれは、poly I:Cの投与により腫瘍に強い出血性の壊死が誘導されることと、3LLがん細胞はTNF- α に感受性があることから、TNF- α がエフェクター分子として働いているのではないかと考えた。実際に、TNF- α 欠損マウスでは治療効果は消失した。Poly I:C投与後のマウスの腫瘍ではただちにTNF- α の発現量が上昇し、それはTAMsの応答によるものであった。Poly I:C投与後に腫瘍内から単離したF4/80⁺TAMsは、3LLがん細胞に対してTNF- α 依存性の傷害活性を示した。よって、TNF- α による3LLがん細胞の傷害により、出血性の壊死を伴う腫瘍成長の抑制が起こると考えられた。Poly I:C投与後の腫瘍内TAMsでは、M2関連遺伝子の発現にはほとんど変化がなかったが、M1関連遺伝子の発現は著しく上昇していた。がんの治療効果やTAMsにおけるM1関連遺伝子の発現は、TLR3またはTICAM-1欠損マウスで消失した。すなわち、poly I:Cの投与により、TLR3/TICAM-1経路が活

性化すると担がんマウスの腫瘍内に存在するTAMsの機能はM2型からM1型となり、抗がん性を発揮することが明らかとなった(図1-右)。

前述のようにB16メラノーマ移植モデルにおいては、TLR3/TICAM-1経路によるDCsを介したNK細胞活性化とともにMAVS経路に依存したNK細胞の活性化も腫瘍成長の抑制に参与する¹⁹⁾²⁰⁾。われわれは、poly I:C投与後の担がんマウスからMDSCsの表面マーカーであるCD11b⁺Gr1⁺の細胞集団を単離したところ、MAVS経路依存的にIFN- α の強い産生と成熟化マーカーの発現上昇が起こることを見出した²⁶⁾。さらに、遺伝子の発現変化を網羅的に調べたところ、ウイルス感染などで活性化したDCsがNK細胞を活性化するときに関与する分子群の遺伝子発現が上昇していた。一方、MDSCsの免疫抑制作用を担うarginase-1の発現量には影響がなかった。さらに、細胞表面でのRAE-1, IL-15, INAMなどのNK細胞活性化分子の発現上昇もみられた。実際にpoly I:C投与後の担がんマウスから単離したCD11b⁺Gr1⁺細胞は、IFN- α の産生と細胞接触によりNK細胞からのIFN- γ 産生を誘導した。NK細胞の細胞傷害活性は誘導されなかったが、それでもpoly I:Cを投与したマウスから単離したCD11b⁺Gr1⁺細胞は、B16腫瘍の成長を抑制した。IFN- γ は、B16がん細胞に対する増殖抑制作用があることから、おそらく活性化したMDSCsはNK細胞からのIFN- γ 産生を介して腫瘍成長の抑制に参与すると考えられた(図2)。また、MDSCsの活性化にTICAM-1経路は関与していなかった。このことから、poly I:Cは、TICAM-1経路でDCsを活性化し、同時にMAVS経路でMDSCsを活性化して、それぞれがNK細胞の活性化を誘導することでB16メラノーマに対する強い抗がん作用を発揮するものと考えられた。また、poly I:Cの刺激により産生されたI型IFNsは、MDSCsの成熟化を誘導する。それによりMDSCsは、T細胞の増殖抑制作用を消失する。よって、dsRNAアジュバントの投与は、自然免疫シグナルを活性化し、担がん宿主におけるTAMsやMDSCsの再教育により抗がん作用を発揮しうると考えられる。TICAM-1とMAVS経路は、TAMsとMDSCsの機能を選択的に制御できる可能性がある。

他のTLRリガンド刺激でもTAMsやMDSCsの再教育は可能であることが報告されている。CpGオリゴヌクレオチド(CpG oligonucleotide ; CpG ODN)は、形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid DCs ; pDCs)のTLR9を活性化し、大量のIFN- α を産生させる。IFN- α は、MDSCsに作用し、成熟化を誘導する。その結果、MDSCsのT細胞に対する増殖抑制作用は消失する²⁷⁾。また、腫瘍内に投与したCpG ODNは、TLR9を介してMDSCsを直接活性化し、がん細胞を傷害する作用を獲得させる²⁸⁾。CpG ODNと抗IL-10受容体の阻害抗体、CCL16ケモカインの腫瘍部位での強制発現によりTAMsのM2からM1への転換を介した抗がん作用を誘導できることも報告されている(図1, 2)²⁹⁾。

おわりに

免疫抑制の解除は、がん治療の重要なキーワードである。dsRNAアジュバントによるがんの治療効果は、DCsを起点とした抗がんエフェクター細胞の誘導に加えて、免疫抑制にかかわるミエロイド系免疫細胞の再教育という別のエフェクター誘導機構によってももたらされることが明らかとなってきた。dsRNAによる自然免疫シグナルの活性化は、多様な抗がんエフェクター細胞の活性化を同時に誘導できることが示唆され、免疫学的見地からみたがんの多様性に対応する治療法として期待される。

文 献

- Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime : Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* 2012 ; 21 : 309.
- Sica A, Larghi P, Mancino A, et al. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* 2008 ; 18 : 349.
- Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 2012 ; 12 : 253.
- Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2009 ; 141 : 39.
- Biswas SKS, Mantovani AA. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets : cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 2010 ; 11 : 889.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008 ; 454 : 436.
- Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008 ; 8 : 618.
- Youn J-I, Kumar V, Collazo M, et al. Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. *Nat Immunol* 2013 ; 14 : 211.
- Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Beury DW. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Semin Cancer Biol* 2012 ; 22 : 275.
- Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013 ; 19 : 1423.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001 ; 413 : 732.
- Matsumoto M, Kikkawa S, Kohase M, et al. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 ; 293 : 1364.
- Watanabe A, Tatematsu M, Saeki K, et al. Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I : C)-mediated TLR3 activation. *J Biol Chem* 2011 ; 286 : 10702.
- Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, et al. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 2003 ; 4 : 161.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003 ; 301 : 640.
- Schulz O, Diebold SS, Chen M, et al. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 2005 ; 433 : 887.
- Seya T, Shime H, Ebihara T, et al. Pattern recognition receptors of innate immunity and their appli-

- cation to tumor immunotherapy. *Cancer Sci* 2010 ; 101 : 313.
- 18) Chin AI, Miyahira AK, Covarrubias A, et al. Toll-like receptor 3-mediated suppression of TRAMP prostate cancer shows the critical role of type I interferons in tumor immune surveillance. *Cancer Res* 2010 ; 70 : 2595.
- 19) Akazawa T, Ebihara T, Okuno M, et al. Antitumor NK activation induced by the Toll-like receptor 3-TICAM-1 (TRIF) pathway in myeloid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 252.
- 20) Miyake T, Kumagai Y, Kato H, et al. Poly I : C-induced activation of NK cells by CD8 alpha⁺ dendritic cells via the IPS-1 and TRIF-dependent pathways. *J Immunol* 2009 ; 183 : 2522.
- 21) Ebihara T, Azuma M, Oshiumi H, et al. Identification of a polyI : C-inducible membrane protein that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J Exp Med* 2010 ; 207 : 2675.
- 22) McCartney S, Vermi W, Gilfillan S, et al. Distinct and complementary functions of MDA5 and TLR3 in poly(I : C)-mediated activation of mouse NK cells. *J Exp Med* 2009 ; 206 : 2967.
- 23) Azuma M, Ebihara T, Oshiumi H, et al. Cross-priming for antitumor CTL induced by soluble Ag + poly I : C depends on the TICAM-1 pathway in mouse CD11c⁺/CD8α⁺ dendritic cells. *Oncoimmunol* 2012 ; 1 : 581.
- 24) Seya T, Shime H, Takaki H, et al. TLR3/TICAM-1 signaling in tumor cell RIP3-dependent necroptosis. *Oncoimmunol* 2012 ; 1 : 917.
- 25) Shime H, Matsumoto M, Oshiumi H, et al. Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 ; 109 : 2066.
- 26) Shime H, Kojima A, Maruyama A, et al. Myeloid-derived suppressor cells confer tumor-suppressive functions on natural killer cells via polyinosinic : polycytidylic acid treatment in mouse tumor models. *J Innate Immun* 2014 ; 6 : 293.
- 27) Zoglmeier C, Bauer H, Nörenberg D, et al. CpG blocks immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Clin Cancer Res* 2011 ; 17 : 1765.
- 28) Shirota Y, Shirota H, Klinman DM. Intratumoral injection of CpG oligonucleotides induces the differentiation and reduces the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 2012 ; 188 : 1592.
- 29) Guiducci C, Vicari AP, Sangaletti S, et al. Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. *Cancer Res* 2005 ; 65 : 3437.

* * *

みにれびゅう

自然免疫受容体 TLR3 により認識される RNA 構造の解明

立松 恵, 瀬谷 司, 松本 美佐子

1. はじめに

自然免疫系においては, パターン認識受容体 (pattern recognition receptor: PRR) が非自己または傷害された自己由来の分子を認識して防御応答を惹起する. このとき認識される分子パターンは病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns: PAMPs), 傷害関連分子パターン (damage-associated molecular patterns: DAMPs) と呼ばれ, それぞれの受容体ごとに異なる. PRR はトル様受容体 (Toll-like receptor: TLR), RIG-I 様受容体 (RIG-I-like receptor: RLR), NOD 様受容体 (NOD-like receptor: NLR) などに大別され, ウイルスや細菌感染, 炎症時に生じたりガンドを認識し, さまざまな応答を引き起こして生体の恒常性を保つために機能する. ほとんどの受容体の下流では NF- κ B を活性化してサイトカイン産生を引き起こし, さらに, ウイルス成分を認識する受容体の場合には I 型インターフェロンの産生誘導経路も持つ. 本稿では, 特に, 核酸認識受容体である TLR3 による RNA 認識について紹介する.

2. TLR3 による dsRNA 認識

TLR は I 型膜貫通タンパク質であり, リガンド認識は細胞外のロイシンリッチリピート (LRR) 領域が担い, 細胞内の TIR (Toll/interleukin-1 receptor) ドメインはアダプター分子の TIR ドメインと結合することでシグナルを伝達する. TLR 下流シグナルにおいては, 炎症性サイトカインや I 型インターフェロンの産生誘導のみでなく, 樹状細胞上の共刺激分子の発現誘導などを介して獲得免疫系を活性化することも知られている. 核酸を認識する TLR は 4 種類で, TLR3 は二本鎖 RNA (double-stranded RNA:

dsRNA), TLR7, 8 は一本鎖 RNA (single-stranded RNA: ssRNA), TLR9 は非メチル化 CpG DNA により活性化される.

TLR3 の細胞外ドメインと dsRNA 複合体の結晶構造解析により, dsRNA の結合に重要な領域が明らかとなった (図 1). TLR3 の細胞外ドメインは 23 個の LRR を有し,

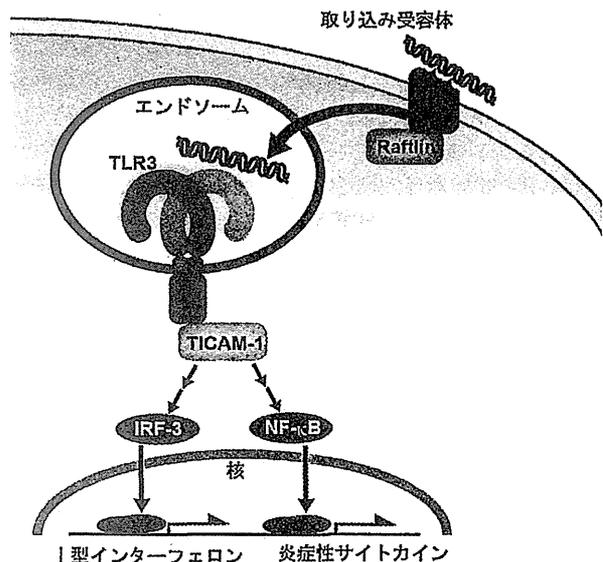
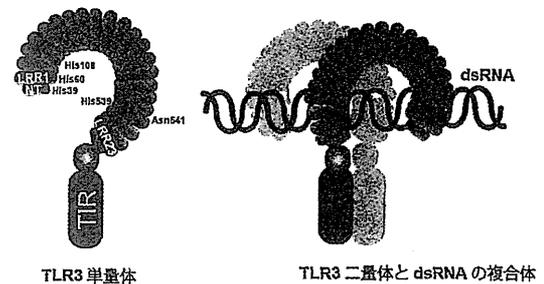


図 1 TLR3 の構造とシグナル伝達経路

細胞外の dsRNA がクラスリンおよび Rafilin 依存的にエンドサイトーシスされると, エンドソームにおいて TLR3 を活性化する. dsRNA の結合により二量体化した TLR3 は, アダプター分子 TICAM-1 を介して NF- κ B や IRF3 といった転写因子を活性化し, 炎症性サイトカイン, I 型インターフェロンの産生を引き起こす.

北海道大学大学院医学研究科 (〒060-8638 北海道札幌市北区北 15 条西 7 丁目)

RNA structure recognized by Toll-like receptor 3 in innate immunity

Megumi Tatematsu, Tsukasa Seiya and Misako Matsumoto (Graduate School of Medicine, Hokkaido University, North 15, West 7, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-8638, Japan)

N末端側とC末端側にそれぞれリガンド結合領域がある。N末端側のLRR-NT上のHis39, LRR1上のHis60, LRR3上のHis108, およびC末端側のLRR20上のHis539, Asn541がリガンド結合に必須のアミノ酸として同定された⁴⁾。pH 6.0~6.5のエンドソーム内でプロトン化したヒスチジンが、負電荷を持つdsRNAのリン酸基と結合すると考えられ、dsRNAはその配列とは無関係にリガンドとなりうる。リガンドの塩基長としては46 bpのdsRNAがTLR3二量体と安定な複合体を形成できるとされるが⁹⁾、十分なシグナル伝達には90 bp以上の長さが必要であるという報告もある⁹⁾。また、21~30 bpのdsRNAでもやや安定性が低いながらもTLR3を二量体化することができる⁹⁾。dsRNAの結合によりTLR3が二量体化してTIRドメインどうしが相互作用することで、アダプター分子であるTICAM-1へのシグナル伝達が可能となる。

TLR3は骨髄系樹状細胞ではエンドソームに、上皮系細胞の一部やマクロファージでは細胞表面とエンドソームに局在しているが、いずれの細胞でもTLR3を介したシグナルはエンドソームから伝達されるため、dsRNAが細胞内へと取り込まれるステップが必要となる。dsRNAはクラスリン依存的なエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれ、初期エンドソームでTLR3に認識される。このとき、取り込みに必須の分子としてRaftlinが機能しており、細胞表面の未知の受容体にdsRNAが結合すると、樹状細胞などでは細胞質に散在しているRaftlinが細胞表面へと集合し、dsRNAとともにエンドソームへと移行することがわかっている⁷⁾。

3. ウイルス感染におけるTLR3

(+)鎖RNAウイルスおよびdsDNAウイルスの感染時には、ウイルスゲノム複製中間体として多量のdsRNAが生じる。感染細胞がアポトーシスを起こしてdsRNAが細胞外へ流出した場合には、流出したdsRNAがTLR3を発現する樹状細胞などに取り込まれてエンドソームにおいてTLR3を活性化すると考えられる。TLR3ノックアウトマウスを用いた研究により、感染時にTLR3が感染防御に働く場合とむしろ感染病態を増悪させる場合がそれぞれ報告されている⁸⁾。(+)鎖RNAウイルスであるポリオウイルス^{9,10)}やウエストナイルウイルス、dsDNAウイルスであるマウスサイトメガロウイルスのほか、(-)鎖RNAウイルスであるインフルエンザウイルスやフレボウイルスの感染制御にもTLR3が関るとされる⁸⁾。(-)鎖RNAウイルスは複製中間体としてのdsRNA生成が少ないことから、どのような構造のRNAがTLR3に認識されているのかは不明である。

ヒトのウイルス感染におけるTLR3の役割については、

単純ヘルペスウイルスI型によるウイルス脳炎への防御応答に重要であることが報告された¹¹⁾。

また、細胞質内センサーであるRIG-IおよびMDA5もdsRNAを認識する受容体である。RIG-Iは5'末端が三リン酸化されたウイルスRNAを、MDA5はウイルス感染細胞内で生じたdsRNAを直接細胞質内で認識し、I型インターフェロン産生を介して抗ウイルス応答を誘導する。これらの二つの受容体は、免疫細胞に限らずあらゆる細胞種で発現している点でもTLR3と異なり、C型肝炎ウイルスやインフルエンザウイルス、脳筋炎ウイルス、センダイウイルスといったさまざまなRNAウイルスの感染制御に関わる¹²⁾。

4. TLR3によるstructured RNA認識

TLR3のリガンドとしては、ウイルスのdsRNAやpoly(I:C)のほかに、mRNAやネクロシスに陥った細胞由来のRNAが報告されている。さらに近年、small nuclear RNAが紫外線照射により傷害を受けて構造が変化することでTLR3を活性化できるようになることが見いだされた¹³⁾。

我々の研究では、ポリオウイルスゲノム配列から*in vitro*転写により作製したRNAを用い、ssRNAがその二次構造依存的にTLR3を活性化することを示した¹⁴⁾。ポリオウイルスゲノム由来の500~900塩基長程度の各種RNA断片によりTLR3発現HEK293細胞を刺激したところ、IFN- β プロモーター活性のみられるいくつかのRNA断片があった。中でも、630塩基のssRNA(PV5)が最もTLR3活性化能が高く、さらに血清培地での分解耐性も高かった。また、PV5はマウスの脾臓由来の樹状細胞においてもTLR3依存的にIFN- β やIL-6, TNF- α の産生を誘導し、HEK293細胞と同様に、細胞内へ取り込まれてTLR3を活性化できることがわかった。PV5の取り込みもpoly(I:C)同様にクラスリンおよびRaftlin依存であった。さらに、TLR3細胞外ドメインのN末端側とC末端側の両方のリガンド結合領域にPV5が結合することでTLR3が活性化する点でも従来のTLR3リガンドと同様であった。

ssRNAは、分子内で部分的に相補鎖を形成することで、ステム、ループ、バルジなどの二次構造をとることが知られている。二次構造解析ソフトによりPV5の構造を予測したところ、部分的なdsRNA構造であるステムが連続して存在する領域があり、この領域がTLR3に認識されると推定された(図2)。この領域の前後の塩基配列を欠く欠損体を作製したところ、この領域(図2a)のみではTLR3を活性化できず、両側の領域により立体的に安定な構造をとることが必要であることがわかった。完全なdsRNAで

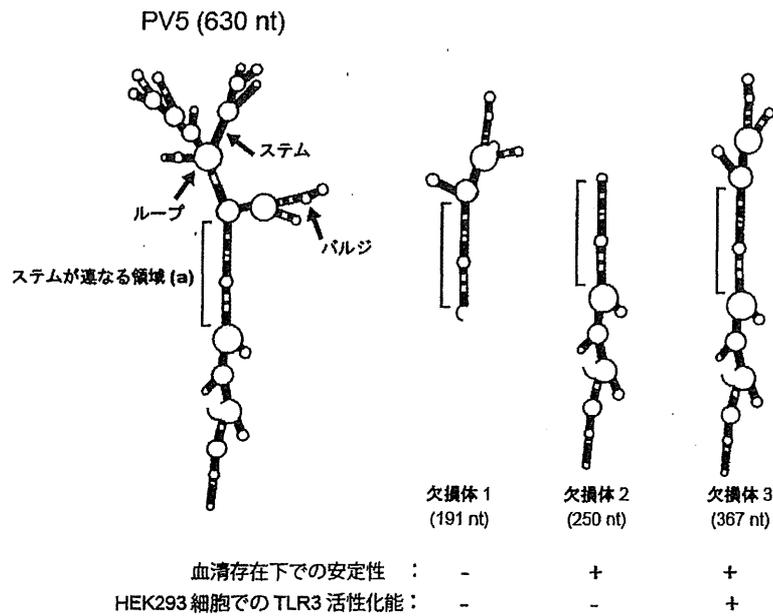


図2 PV5 とその欠損体の二次構造

なくとも、TLR3 のリガンド結合領域と相互作用する部分が二本鎖であれば TLR3 と結合することができると考えられる。したがって、二本鎖領域を含むある程度の長さの不完全なステムを持つ安定な構造の RNA (structured RNA) は、TLR3 二量体を形成してシグナル伝達を開始させることが可能となると考えられる。

5. 核酸認識 TLR の切断活性化

近年、TLR7 および TLR9 はエンドリソソーム内で切断を受けて活性化することが報告された。さらに、TLR3 も TLR7、9 と同様にカテプシンにより切断され、切断された TLR3 はエンドソームへ積極的に輸送されることがわかった¹⁵⁾。TLR3 の切断がシグナル伝達に必須であるかについては複数の報告があり詳細は未解明であるが、マウスのマクロファージ細胞である RAW264.7 細胞においては、poly(I:C) 刺激に対する応答性は切断の有無に関わらず変化しないのに対し、poly(A:U) への応答はカテプシン阻害剤処理により減弱し、レオウイルス由来の dsRNA への応答は増大した。一方でこれらのリガンドに対するヒト気道上皮細胞 BEAS-2B 細胞での応答はカテプシン阻害剤の影響を受けなかった¹⁵⁾。したがって、TLR3 のプロセシングにより認識できるリガンドの範囲が変化する可能性があると同時に、その応答性の変化は細胞の種類や動物種により異なることも考えられる。ステム構造を持つ ssRNA の場合も TLR3 の切断状態により活性が変化することは十分に考えられ、ヒトとマウスの細胞、免疫細胞と非免疫担当細胞の間で活性の差について検討の余地がある。

TLR3 の切断は、TLR3 の構造を変化させることでリガンド認識の多様性を生じることや、カテプシンの発現量による細胞内での TLR3 の活性制御といった意味を持つことが考えられる。

6. おわりに

これまで、TLR3 はウイルス感染時においてウイルス複製中間体として生じる dsRNA により活性化すると考えられ、実験的には主に poly(I:C) がリガンドとして用いられてきた。しかし、構造によっては ssRNA による活性化も起こることが明らかとなり、生体内において TLR3 が幅広い機能を有する可能性が示された。TLR3 は、ウイルス感染細胞だけでなく非感染性のネクロシス細胞から遊離されるウイルスや自己由来の RNA に応答し、I 型インターフェロンや炎症性サイトカイン産生を通して生体の恒常性維持に深く関与すると考えられる (図 3)。一方、TLR3 が認識することのできる RNA 構造の詳細なルールや、リガンド取り込みの分子機構、細胞種やリガンドの種類による切断活性化の必要性など、いまだ不明な点は多い。TLR3 経路はウイルス感染防御のみでなく、樹状細胞の活性化を介してナチュラルキラー細胞や細胞傷害性 T 細胞の活性化を誘導することから、抗がん免疫におけるアジュバントのターゲットとして注目されており¹⁶⁾、今後、リガンドの開発や取り込み機構の解明が期待される。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は、西川富美子先生 (産業技術

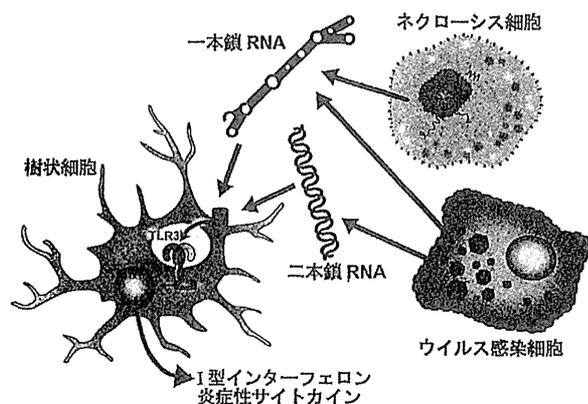


図3 ウイルス感染および炎症時に引き起こされるTLR3依存的な応答

ネクロシスに陥った細胞やウイルス感染細胞から自己由来またはウイルス由来の structured RNA や dsRNA が流出し、樹状細胞にエンドサイトーシスされると、TLR3 を活性化して炎症性サイトカインや I 型インターフェロンの産生を誘導する。

総合研究所) との共同研究により得られたものであり、RNA 作製および分析において多大なご協力を賜りましたことを深く感謝いたします。

- Choe, J., Kelker, M.S., & Wilson, I.A. (2005) *Science*, 309, 581-585.
- Bell, J.K., Askins, J., Hall, P.R., Davies, D.R., & Segal, D.M. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 8792-8797.
- Fukuda, K., Watanabe, T., Tokisue, T., Tsujita, T., Nishikawa, S., Hasegawa, T., Seya, T., & Matsumoto, M. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 22787-22794.
- Pirher, N., Ivicak, K., Pohar, J., Bencina, M., & Jerala, R. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15, 761-763.
- Liu, L., Botos, I., Wang, Y., Leonard, J.N., Shiloach, J., Segal, D.M., & Davies, D.R. (2008) *Science*, 320, 379-381.
- Jelinek, I., Leonard, J.N., Price, G.E., Brown, K.N., Meyer-Manlapat, A., Goldsmith, P.K., Wang, Y., Venzon, D., Epstein, S.L., & Segal, D.M. (2011) *J. Immunol.*, 186, 2422-2429.
- Watanabe, A., Tatematsu, M., Saeki, K., Shibata, S., Shime, H., Yoshimura, A., Obuse, C., Seya, T., & Matsumoto, M. (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 10702-10711.
- Matsumoto, M., Oshiumi, H., & Seya, T. (2011) *Rev. Med. Virol.*, doi: 10.1002/rmv.680.
- Oshiumi, H., Okamoto, M., Fujii, K., Kawanishi, T., Matsumoto, M., Koike, S., & Seya, T. (2011) *J. Immunol.*, 187, 5320-5327.
- Abe, Y., Fujii, K., Nagata, N., Takeuchi, O., Akira, S., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Seya, T., & Koike, S. (2012) *J. Virol.*, 86, 185-194.
- Sancho-Shimizu, V., Pérez de Diego, R., Lorenzo, L., Halwani, R., Alangari, A., Israelsson, E., Fabrega, S., Cardon, A., Maluenda, J., Tatematsu, M., Mahvelati, F., Herman, M., Ciancanello, M., Guo, Y., AlSum, Z., Alkhamis, N., Al-Makadma, A. S., Ghadiri, A., Boucherit, S., Plancoulaine, S., Picard, C., Rozenberg, F., Tardieu, M., Lebon, P., Jouanguy, E., Rezaei, N., Seya, T., Matsumoto, M., Chaussabel, D., Puel, A., Zhang, S.Y., Abel, L., Al-Muhsen, S., & Casanova, J.L. (2011) *J. Clin. Invest.*, 121, 4889-4902.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y., Gale, M.J., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A., & Fujita, T. (2005) *J. Immunol.*, 175, 2851-2858.
- Tatematsu, M., Seya, T., & Matsumoto, M. (2014) *Biochem. J.*, 458, 195-201.
- Tatematsu, M., Nishikawa, F., Seya, T., & Matsumoto, M. (2013) *Nat. Commun.*, 4, 1833.
- Qi, R., Singh, D., & Kao, C.C. (2012) *J. Biol. Chem.*, 287, 32617-32629.
- Seya, T., Azuma, M., & Matsumoto, M. (2013) *Expert Opin. Ther. Targets*, 17, 533-544.

 著者寸描

●立松 恵 (たてまつ めぐみ)



北海道大学大学院医学研究科微生物学講座免疫学分野特任助教。博士（医学）。

■略歴 2008年北海道大学薬学部卒業，10年同大学院生命科学院博士前期課程修了，13年同大学院医学研究科博士後期課程修了，14年より現職。

■研究テーマと抱負 Toll-like receptorによるリガンド認識とシグナル伝達の分子機構について，特にTLR3とTLR4の下流シグナル分子に関する研究をしています。

■趣味 写真，読書。

●瀬谷 司 (せや つかさ)

北海道大学大学院医学研究科微生物学講座免疫学分野特任教授。薬学博士（1984年），医学博士（1987年）

■略歴 1976年北海道大学医学部卒業，4年間の内科研修後に5年間北海道大学薬学部研究生，84～87年ワシントン大学（セントルイス），帰国後16年間大阪府立成人病センター研究所，2004年より北海道大学医学部免疫学教授，今年から現職。

■研究テーマ 免疫生化学，進化医学。

■抱負 社会通念に囚われない自由な発想が好きです。発想が突飛すぎて失敗するのも振幅があっていい人生かと。

■ウェブサイト <http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~e20536/>

■趣味 古代史，人類学。

●松本美佐子 (まつもと みさこ)

北海道大学大学院医学研究科微生物学講座免疫学分野特任准教授。薬学博士。

■略歴 1972年大阪大学薬学部卒業，同年大阪府立成人病センター研究所研究員，2001年免疫学部門主任研究員，03年同部長，05年北海道大学大学院医学研究科免疫学分野准教授，13年より現職。

■研究テーマと抱負 自然免疫のパターン認識受容体による自己・非自己識別機構，細胞外RNAの取り込みやエンドソームからのシグナル伝達など，免疫応答の時空間的制御機構に関心をもっている。

■趣味 園芸，アート鑑賞。

腫瘍浸潤マクロファージのRNA応答

RNA Response in Tumor-infiltrating Macrophages

瀬谷 司, 志馬寛明, 松本美佐子

Tsukasa Seya, Hiroaki Shime, Misako Matsumoto

マクロファージは樹状細胞とともに骨髄系前駆細胞に由来する。近年、腫瘍浸潤性のマクロファージは、由来、性質、機能、マーカーなど多くの点で従来の組織マクロファージと異なることがわかってきた。本稿では、骨髄系細胞のRNA認識と細胞応答を焦点とし、RNA投与による骨髄系細胞の腫瘍支持からその破綻の分子機構、生存と細胞死シグナルの機構と意義、抗がん免疫療法への適用を解説する。



パターン認識レセプター, RNAセンサー, 腫瘍浸潤マクロファージ, がん免疫, TLR3

はじめに

生命はRNAを遺伝情報として転写から翻訳を行う仕組みを発展させた。mRNAがスプライシング、編集を受けて核外に運ばれ、リボソームでタンパク質に翻訳される過程は酵母からヒトまで保存されている。リボソームでは基本活性の発現をRNA (rRNA, tRNA) が担い、それをタンパク質が酵素的に補完する。さらに、アンチセンスRNA活性、リボソームに残るリボザイム活性やmiRNA, siRNAによるRNAi (RNA interference) 修飾、転写調節、さらに核内、細胞質内に見いだされる大量のnon-coding RNA、環状RNAの機能など、RNAは生命現象に密接な連携を持つ。

自然免疫は基本的に微生物を非自己と見なし、排除する。微生物に特有の分子をパターン分子と呼び、ヒトは自然免疫系によってパターン認識を行う¹⁾。マクロファージ、樹状細胞はこの自然免疫の主要な担当細胞で、自身が発現しているパターン認識受容体によって担われる。微生物RNAは非自己と認識されうる重要なパターン分子である。ヒトのマクロファージ、樹状細胞によるパターン認識の最終応答はインターフェロン(IFN)誘導や免疫活性化で、ヒトが多くの感染症を克服できるのは、生来の自然免疫応答による¹⁾。

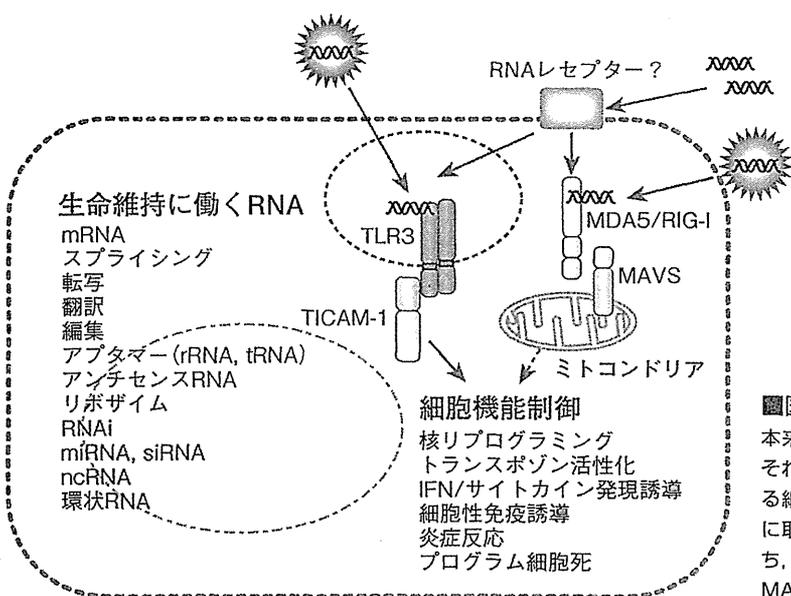
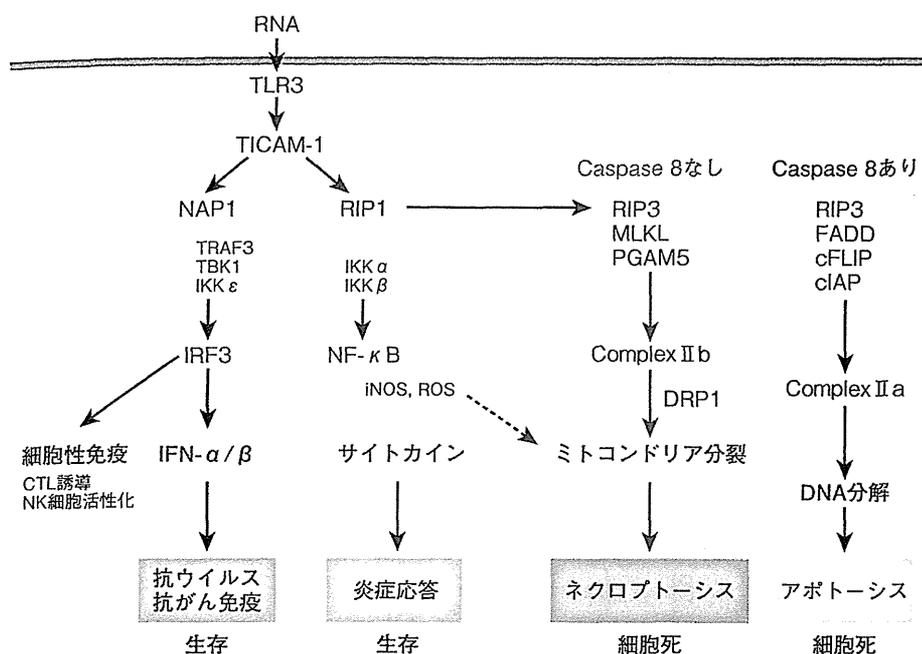


図1 外来性RNAセンサーと細胞変調機能

本来、RNAは核と細胞質で生命維持に必須の機能を果たす(左)。それに対し、外来性RNAによって後天的に骨髄系細胞に誘導される細胞応答を右に示した。しかし、RNAをエンドソーム、細胞質に取り込む分子機構は明らかでない。細胞内のRNAセンサーのうち、機能がわかっているのはTLR3, MDA5/RIG-Iで、TICAM-1, MAVSはそれぞれのアダプター分子である。



■図2 マクロファージ系TLR3の自然免疫応答とシグナル

細胞内のエンドソームに取り込まれたRNAが活性化するTLR3のRNA応答とシグナルを示す。細胞環境および細胞タイプ依存性の応答が多いが、マクロファージではすべてのシグナルが起動しうる。生存シグナルについては他誌を参照⁹⁾、¹²⁾。最近解明されたRNA/TLR3の細胞死シグナル経路については図3を参照。

パターン認識は細胞質内と細胞質外のパターン認識分子によって行われ、マクロファージや樹状細胞などの骨髄系細胞は精緻な細胞質外の認識機構を特徴的に保有する(図1)。本稿では、すべてのパターン認識を網羅できないので、骨髄系細胞のRNA識別と感染・腫瘍の微小環境・全身免疫応答について最近の知見をまとめる。

I 細胞外RNAの誘起する免疫応答

核・細胞質の自己RNAは免疫細胞応答を起こさない。一方、細胞に外から二重鎖RNA(dsRNA)を作用させると外因性に核のリプログラム(初期化)、トランスポゾンの活性化が起こることが報告された^{2), 3)}。RNAは細胞外から(おそらくレセプターを介して)細胞機能を変調する⁴⁾。すなわちRNAは細胞外でメディエーターとして細胞間機能調節も行う(図1)。この外来性RNA応答は多くがTLR3(Toll-like receptor 3)というエンドソームの膜型RNAセンサーによって起動する。TLR3はマクロファージ、一部の樹状細胞サブセットに高発現する⁴⁾。これらの現象はヒトTLR3抗体を世界に先駆けて作製した当研究室の松本の発見を端緒とする^{5), 6)}。

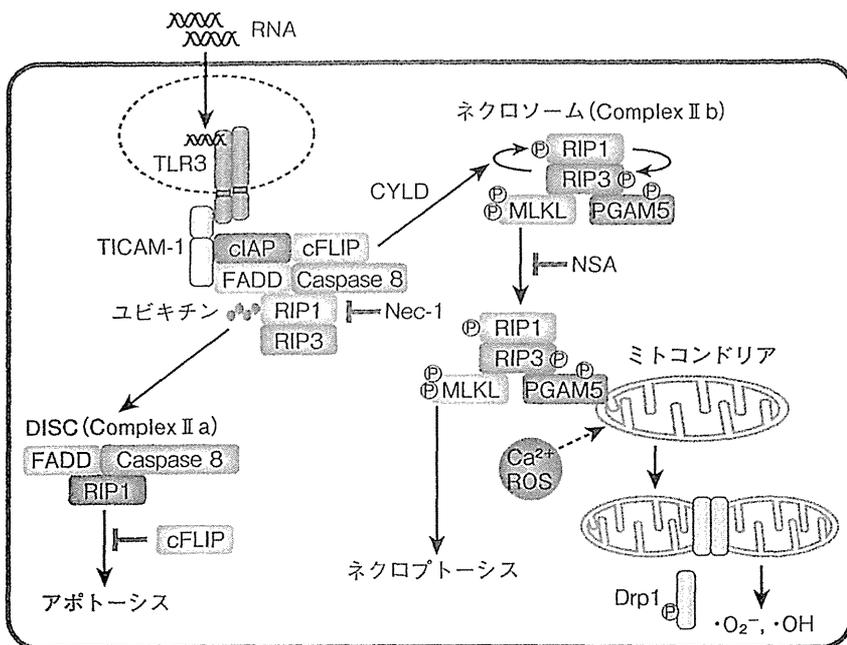
TLR3はTICAM-1というアダプター分子によってシグナルを伝える⁷⁾。シグナルはTICAM-1のN末端、C末端のセ

カンドアダプターNAP1、RIP1によってそれぞれIRF3の活性化⁸⁾とRIP3経路の活性化⁹⁾へと続く(図2)。これらの経路は細胞種に特有なかたちで発現し、NAP1は生存シグナル、RIP1は生存と細胞死シグナルを細胞内環境依存的に発揮する。骨髄系細胞の場合、IRF3はタイプI IFN誘導の主要転写因子であり、側副経路からNK細胞の活性化分子(INAM)の発現誘導やcross-presentation(外来抗原を取り込んでクラスI提示を行う仕組み)^{10), 11)}を促進する^{10), 11)}。すなわち、骨髄系細胞のRNA応答は急性のIFN/サイトカイン応答のみならず、リンパ球の細胞性免疫の活性化までを効率的に担う(図2)。

RIP1/RIP3経路も骨髄系細胞のRNA応答の一環である¹²⁾。骨髄系細胞はRNAをTLR3で感知するとTICAM-1-RIP1経路によってNF-κBを活性化し、生存へ向かうが、RIP3経路が優位になるとプログラム細胞死に陥る。

注1 cross-presentation

細胞傷害性T細胞(CTL)誘導に必要なクラスI提示は内在抗原に対して起こる。一方、外来抗原が抗原提示細胞に外から取り込まれながらもクラスI提示される現象をcross-presentationという。ウイルスなどの内在性抗原は細胞質から小胞体(ER)に移され、TAP(transporters associated with antigen processing)依存性にクラスI提示されるが、エンドソームや食胞内の抗原がどのようにして細胞質内抗原のようにERのクラスIに届くのか、その分子機構は不明である。これによりCTLが増殖するが、この現象を“cross-priming”と言う。



■図3 マクロファージ、腫瘍細胞での RNA/TLR3を介した細胞死シグナルシステム構造を持つRNAがエンドソームに取り込まれると、多くは生存シグナルを介して免疫活性化(腫瘍や微生物の排除)へと向かうが、マクロファージや腫瘍細胞では、図のような概略反応が進むと考えられる。Caspase 8の機能の有無によってアポトーシスか、ネクロプトーシスかの選択がなされる。後者ではミトコンドリアの分裂を伴う。NSA: necrosulfonamide.

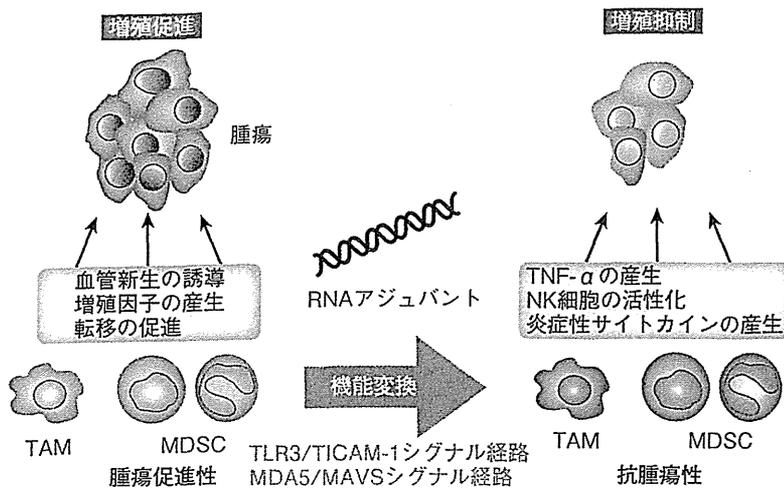
Caspase 8が働けばアポトーシス、Caspase 8が働かない(ウイルス感染やがん細胞で遺伝子発現が阻害される)場合にはネクロプトーシスとなる(図3)。RIP3経路はMLKLやPGAM5、活性酸素種(ROS)によって、Drp1によるミトコンドリアの分裂を促す(図3)。ミトコンドリアの促す炎症(スーパーオキシドの産生)がインフラマソームとは別に起こり、ネクロプトーシス形成に関与する^{13), 14)}。RIP3シグナルは感染、発がん時に細胞のタイプ、状況と場合に応じて発現するが¹²⁾、骨髄系細胞は常にRNAによるTLR3活性化の待機状態にあり、生体の恒常性維持に貢献している⁴⁾。

II RNAセンサーとマクロファージ・樹状細胞の活性化シグナル変換

RNA認識は複数のRNAセンサーが分担し、異なる応答を惹起する^{15), 16)}。一般に、細胞内に侵入したRNAウイルス(モノネガウイルス)はマイナス鎖ゲノムRNAからプラス鎖を転写複製し、プラス鎖がmRNAとしてタンパク質に翻訳される。つまりRNAウイルス感染はRNAからRNAを作るというヒトにはないステップを必要とする。このためウイルスは独自のRNAポリメラーゼを宿主細胞に持ち込む。宿主(ヒト)はDNAの校正機構が精緻なため、滅多に誤読せず、ヒトであり続ける(あるいはがんになりにくい)が、RNAは使い捨てのためか、それをチェックする機構を持た

ない。さらにウイルスのRNAポリメラーゼは100塩基を越えると必ず誤読するという代物である。ウイルスRNAがヒト細胞内で変異(ウイルス的には進化)し続けるのは必然と言える。自然免疫はこの細胞質内のウイルス複製をRIG-I, MDA5というRNAヘリカーゼで感知する¹⁶⁾。自己細胞のDNA依存性RNAポリメラーゼ(Pol II)でないRNAポリメラーゼの産物(ウイルスのmRNA)はCap(m7GTP)化されず、5'-三リン酸修飾のまま、細胞質に遊離する。このmRNAはCap非依存性のeIF(eukaryotic initiation factor)複合体によってタンパク質に翻訳される。同時に、RIG-Iはこの5'RNAの相違を非自己と識別し⁶⁾、MDA5は細胞質内の長いdsRNAを非自己と識別する¹⁶⁾。これらはTLR3の細胞質外RNA認識とは対照的に、細胞質のRNA認識機構を構成する。したがって、骨髄系細胞は細胞質外と細胞質内で異なるRNA認識機構でRNAに対応する(図1)。RIG-I/MDA5は共通のアダプター分子MAVSによってシグナルを伝える¹⁶⁾。一方、TLR3は細胞外に放出されたRNAを認識する(図1)。TLR3はRNAの由来に関わりなく、ステム構造があれば認識し¹⁷⁾、エクソソームのようなかたちでもRNA構造を認識する^{18), 19)}。また、シグナルはTICAM-1が伝える⁷⁾。TICAM-1とMAVSは一部のIFN誘導シグナルを共有するが、それぞれ特有のアウトプットがある。

マクロファージ・樹状細胞はRNAにさらされるとTLR3/TICAM-1またはMAVSシグナルによって“活性化”する。



■図4 腫瘍浸潤マクロファージのRNAによる機能転換

腫瘍浸潤マクロファージ(TAM, MDSC)は基本的に腫瘍増殖・浸潤をサポートし、抗がん免疫の形成を妨げる。すなわち“悪い”微小環境に貢献する。RNA(この例ではpolyI:C)は腫瘍内でこのTAM, MDSCの機能変換を促進し、腫瘍退縮(すなわち“良い”微小環境の形成)に貢献する。

RNA刺激により骨髄系細胞はサイトカイン, IFN, 貪食亢進, DAMP^{注2}放出, 細胞死など, 多彩な自然免疫応答を見せる²⁰⁾。樹状細胞ではこれを成熟化と呼び, 抗原提示とNK活性化能を付与する。TLR3の発現は骨髄系細胞と上皮・間質系細胞に限られるが, MAVS経路は全身に発現し, 大量のサイトカイン/IFNを誘導する²¹⁾。

Ⅲ RNAによる腫瘍の微小環境修飾

腫瘍浸潤マクロファージは多くの正常レジデント(組織常在型)マクロファージと起源を異にする。マクロファージは基本的に造血幹細胞に由来し, 造血幹細胞は個体発生とともに卵黄嚢(yolk sac)-胎児肝-骨髄へと移動する²²⁾。組織マクロファージは卵黄嚢幹細胞に由来し, 臓器形成をバックアップする。同様に, 皮膚の前駆型樹状細胞(ランゲルハンス細胞)は胎児肝時代の幹細胞に由来する。このようにマクロファージは臓器・組織の発生と機能的発展, さらに免疫監視に必須と言える。

マクロファージが腫瘍に大量に浸潤し, 腫瘍の増殖を助けるのは, この文脈で言えば, マクロファージの本質的な機能として当然である。だが, 腫瘍は後成的な臓器で, 腫瘍浸潤マクロファージの起源は卵黄嚢由来ではなく, 骨髄由来の単球となる。このため, パターン認識機構は組織マクロファージや樹状細胞と本質的に違い, RNA応答も大きく異なる。polyI:Cを担がんマウスに投与すると, 3LL肺がんの腫瘍浸潤マクロファージ(TAM)は大量のTNF- α を放出し, 本来TAMが守るべき腫瘍塊を出血性壊死させる(図4)。このよ

うに組織マクロファージではありえない応答が起こり, 腫瘍浸潤マクロファージはRNAのTLR3応答によって腫瘍支持から腫瘍破壊へと逆しうる²³⁾。これはRNAによる治療戦略につながる可能性がある。

担がん患者は骨髄の造血系に異常を来し, 特殊な性質を持つ未分化な骨髄系細胞群が脾臓などにプールされる。TAMがGr-1(Ly6G)陰性であるのに対し, これらはGr-1陽性で, MDSC(myeloid-derived suppressor cells)と呼ばれる。MDSCは腫瘍に蓄積し, 免疫系を抑制して腫瘍増殖を助ける(図4)。また, 腫瘍の場にTAM, MDSC, 制御性T細胞(Treg)や他の間質細胞が加わって腫瘍増殖に有利な悪性微小環境を形成すると考えられている(図4)。TAM, MDSCの機能は腫瘍別, さらに進行ステージによっても複雑になるが, RNAに反応して機能変換が誘起されることは共通である^{24), 25)}。TLR3/TICAM-1シグナルは基本的に微小環境を悪性から良性(抗腫瘍性)に変換する(図4), これが一プログラミングや組織再生に寄与すると考えられるが, TLR3/TICAM-1シグナルが発がん・悪性転換, 細胞増殖においてがん細胞にどのように反映されるかは今後の課題である^{25), 26)}。

注2 DAMP (damage-associated molecular pattern)

パターン分子はPAMPと呼ばれ, 一般に微生物由来である。これに対し, 腫瘍など自己細胞の破壊産物がPAMPと同様の自然免疫応答を誘導する例が知られている²⁹⁾。HMGB1, HSP, S100タンパク質, 尿酸結晶などが例として知られている。これら分子として同定されたものがDAMPと総称される。腫瘍細胞から遊出するDAMPをTAMPと呼ぶ場合もある。

IV 腫瘍浸潤マクロファージとRNAアジュバント免疫療法

マクロファージと樹状細胞がRNAによって免疫応答を起すことから、RNAを免疫増強剤としてがん抗原とともに用いる免疫療法が志向されてきた。まだ免疫系もリンパ球も知られていない1960年代にpolyI:C(dsRNAアナログ)を用いた免疫療法によってがん患者の腫瘍退縮が確認された。これが端緒となり、polyI:Cはがん、難治性ウイルス疾患の夢の治療薬として期待された。その有効性と相まって、後に登場する自然免疫の概念からも支持される治療であった。上述のようなマクロファージ系の応答に限らず、樹状細胞はRNAによって細胞性免疫も活性化する²⁷⁾。しかし、ほぼすべての開発品が臨床試験で棄却(drop down)されたのは、十分な薬効が得られなかったためではない。副作用が有効性を大きく上回ったためで、副作用の原因はサイトカイン血症によるものと現在は推測されている(当時サイトカインは同定されておらず、“エンドトキシン様ショック”と記載された)。

RNAのサイトカイン誘導活性は後にRIG-I/MDA5を介したMAVS経路に依存すること、TLR3/TICAM-1経路は

主に細胞性免疫の活性化に働くことが判明した²⁸⁾。このことは、TLR3/TICAM-1経路を選択的に活性化するRNAを化学合成すれば、がん免疫に画期的な治療薬を提供しうることを示唆する。筆者らは、このようなTLR3の認識パターンに合致し、RIG-I/MDA5を刺激しないRNAのデザインを完成させた(松本ら、投稿中)。この外来性RNA投与が樹状細胞、腫瘍浸潤マクロファージを活性化し、副作用の少ない腫瘍退縮と抗がん免疫の起動をもたらすかを担がんマウスモデルで検証中である。

PROFILE 瀬谷 司

■ 北海道大学大学院医学研究科 免疫学分野
 ■ E-mail: seya-tu@pop.med.hokudai.ac.jp
 1976年北海道大学医学部卒業。4年の内科研修の後、北大薬学部研究生、5年後に学位取得。ワシントン大学(セントルイス)にてCD46の発見と機能同定。1987年から大阪府立成人病センター研究所にて自然免疫の非自己識別機構の研究。2001年より同研究所所長、2004年から現職。

PROFILE 志馬寛明

■ 北海道大学大学院医学研究科 免疫学分野

PROFILE 松本美佐子

■ 北海道大学大学院医学研究科 免疫学分野

文献

- 1) Iwasaki A, et al: Nat Immunol (2004) 5: 987-995
- 2) Lee J, et al: Cell (2012) 151: 547-558
- 3) Yu P, et al: Immunity (2012) 37: 867-879
- 4) Tatematsu M, et al: Biochem J (2014) 458: 195-201
- 5) Matsumoto M, et al: Biochem Biophys Res Commun (2002) 293: 1364-1369
- 6) Matsumoto M, et al: J Immunol (2003) 171: 3154-3162
- 7) Oshiumi H, et al: Nat Immunol (2003) 4: 161-167
- 8) Honda K, et al: IUBMB Life (2006) 58: 290-295
- 9) Hitomi J, et al: Cell (2008) 135: 1311-1323
- 10) Akazawa T, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2007) 104: 252-257
- 11) Azuma M, et al: Oncoimmunology (2012) 1: 581-592
- 12) Seya T, et al: Oncoimmunology (2012) 1: 917-923
- 13) Sun L, et al: Cell (2012) 148: 213-227
- 14) Wang Z, et al: Cell (2012) 148: 228-243
- 15) Akira S: J Biol Chem (2003) 278: 38105-38108
- 16) Yoneyama M, et al: Adv Drug Deliv Rev (2008) 60: 841-846
- 17) Tatematsu M, et al: Nat Commun (2013) 4: 1833
- 18) Ebihara T, et al: Hepatology (2008) 48: 48-58
- 19) Li J, et al: Nat Immunol (2013) 14: 793-803
- 20) Kono H, et al: Nat Rev Immunol (2008) 8: 279-289
- 21) McCartney S, et al: J Exp Med (2009) 206: 2967-2976
- 22) Wynn TA, et al: Nature (2013) 496: 445-455
- 23) Shime H, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2012) 109: 2066-2071
- 24) Shime H, et al: Regulation of tumor-associated myeloid cells by innate immune signaling (Springer Publisher): 2014, in press
- 25) Galluzzi L, et al: Oncoimmunology (2012) 1: 699-716
- 26) Quail DF, et al: Nat Med (2013) 19: 1423-1437
- 27) Caskey M, et al: J Exp Med (2011) 208: 2357-2366



PolyI:C and mouse survivin artificially embedding human 2B peptide induce a CD4⁺ T cell response to autologous survivin in HLA-A*2402 transgenic mice



Jun Kasamatsu^{a,1}, Shojiro Takahashi^{a,b,1}, Masahiro Azuma^{a,1,2}, Misako Matsumoto^a, Akiko Morii-Sakai^a, Masahiro Imamura^b, Takanori Teshima^b, Akari Takahashi^c, Yoshihiko Hirohashi^c, Toshihiko Torigoe^c, Noriyuki Sato^c, Tsukasa Seya^{a,*}

^a Department of Microbiology and Immunology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Kita-ku, Sapporo, Japan

^b Department of Hematology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Kita-ku, Sapporo, Japan

^c Department of Pathology, Sapporo Medical University School of Medicine, Chuoh-ku, Sapporo, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 March 2014

Received in revised form 4 August 2014

Accepted 6 August 2014

Available online 23 August 2014

Keywords:

Survivin

PolyI:C

CD4 epitope

Peptide vaccine

Th1 response

Interferon- γ

Tumor immunity

ABSTRACT

CD4⁺ T cell effectors are crucial for establishing antitumor immunity. Dendritic cell maturation by immune adjuvants appears to facilitate subset-specific CD4⁺ T cell proliferation, but the adjuvant effect for CD4 T on induction of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) is largely unknown. Self-antigenic determinants with low avidity are usually CD4 epitopes in mutated proteins with tumor-associated class I-antigens (TAAs). In this study, we made a chimeric version of survivin, a target of human CTLs. The chimeric survivin, where human survivin-2B containing a TAA was embedded in the mouse survivin frame (MmSVN2B), was used to immunize HLA-A-2402/K^b-transgenic (HLA24^b-Tg) mice. Subcutaneous administration of MmSVN2B or xenogeneic human survivin (control HsSNV2B) to HLA24^b-Tg mice failed to induce an immune response without co-administration of an RNA adjuvant polyI:C, which was required for effector induction *in vivo*. Although HLA-A-2402/K^b presented the survivin-2B peptide in C57BL/6 mice, 2B-specific tetramer assays showed that no CD8⁺ T CTLs specific to survivin-2B proliferated above the detection limit in immunized mice, even with polyI:C treatment. However, the CD4⁺ T cell response, as monitored by IFN- γ , was significantly increased in mice given polyI:C + MmSVN2B. The Th1 response and antibody production were enhanced in the mice with polyI:C. The CD4 epitope responsible for effector function was not Hs/MmSNV₁₃₋₂₇, a nonconserved region between human and mouse survivin, but region 53–67, which was identical between human and mouse survivin. These results suggest that activated, self-reactive CD4⁺ helper T cells proliferate in MmSVN2B + polyI:C immunization and contribute to Th1 polarization followed by antibody production, but hardly participate in CTL induction.

© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Dendritic cells (DCs) present exogenous antigens (Ags) to cells in the major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted Ag-presentation pathway and cause the proliferation of CD8⁺ T

cells specific to the extrinsic Ag. When tumor cells have soluble and insoluble exogenous Ags, MHC class I Ag presentation is mainly transporter associated with antigen processing (TAP)- and proteasome-dependent, suggesting the pathway is partly shared with the pathway for endogenous Ag presentation. The delivery of exogenous Ag by DCs to the pathway for MHC class I-restricted Ag presentation is called cross-presentation (Bevan 1976).

PolyI:C is a double-stranded RNA analog that activates RNA-sensing pattern-recognition receptor pathways (Matsumoto and Seya 2008; Seya and Matsumoto 2009). PolyI:C is an efficient trigger of cross-presentation, and facilitates cross-priming of CD8⁺ T cells in the presence of Ag. Tumor-associated antigens (TAAs) usually expressed in low levels are thought to need support from pattern-recognition receptor activation to induce TAA-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) (Seya et al. 2013).

* Corresponding author at: Department of Microbiology and Immunology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Kita 15, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan. Tel.: +81 11 706 7866; fax: +81 11 706 7866.

E-mail address: seya-tu@pop.med.hokudai.ac.jp (T. Seya).

¹ These authors equally contributed.

² Present address: University of Montreal, 2900 Edouard-Montpetit, Faculty of Medicine/Pavillon Roger Gaudry, Department of Pathology and Cellular Biology, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada.

Many TAAs have been identified and tested for tolerability to patients and for ability to suppress tumor progression. Peptide vaccine immunotherapy against cancer has been studied clinically (Rosenberg et al. 2004). Survivin (SVN) is a TAA that generates CTLs in cancer patients (Schmitz et al. 2000; Andersen et al. 2001). Human survivin (HsSVN) is a 16.5 kDa cytoplasmic protein that inhibits caspase 3 and 7 in cells stimulated to undergo apoptosis (Altieri 2001). SVN is a member of the inhibitor of apoptosis protein family associated with fetal development. Therefore, except for testis, thymus and placenta, normal tissues express little SVN (Ambrosini et al. 1997; Altieri 2001). SVN is required in early thymocyte development from CD4/CD8-double-negative cells to CD4/CD8-double-positive lymphocytes (Okada et al. 2004). SVN is expressed in a wide variety of malignant cells (Altieri 2001; Fukuda and Pelus 2006). There are several splicing variants including a variant HsSVN2B with a cryptic epitope for MHC class I in humans. An HsSVN2B peptide (AYACNTSTL: 80–88) is an HLA-A*2402-restricted peptide recognized by CD8+ CTLs (Hirohashi et al. 2002). Some cancer cells have higher mRNA levels of the HsSVN splice variant 2B, but whether this splice variant functions in tumorigenesis is unknown (Li 2005).

Several trials have studied the SVN2B peptide in cancer patients (Tsuruma et al. 2008; Honma et al. 2009; Kameshima et al. 2013). Although CTLs specific for SVN were detected in peripheral blood mononuclear cells of most cancer patients, as determined by HLA-A*2402/SVN2B tetramer assays, no substantial therapeutic effect on cancer is seen in most clinical studies. A phase I clinical study found that vaccination with SVN2B peptide combined with IFN- α had significant therapeutic benefits in advanced pancreatic cancer patients, in spite of IFN-mediated side effects. Thus, an IFN-inducing adjuvant, that simultaneously up-regulates Ag-presentation and IFN-inducible genes, might more efficiently contribute to the clinical benefits of SVN for cancer patients.

PolyI:C is an analog of virus double-stranded RNA with IFN-inducing adjuvant properties. To test the effect of polyI:C on survivin-derived CTLs, we used a mouse model expressing human HLA-A24 that presents the SVN2B peptide (Gotoh et al. 2002). Mice have no splice counterpart for HsSVN2B and therefore mouse survivin (MmSVN) lacks the 2B portion of HsSVN, although the mouse ortholog is 84% homologous to HsSVN (Kobayashi et al. 1999). When BALB/c mice are injected intraperitoneally with HsSVN2B+RNA adjuvant, high levels of CD4⁺ T cells are induced in splenic T cells, as determined by IFN- γ , TNF- α , and IL-2 production, as well as development of lytic MHC class II-restricted T cells and memory (Charalambous et al. 2006).

The N-terminal sequence of HsSVN, which includes amino acids 13–27 (FLKDHRISTFKNWPF), differs from that of MmSVN (YLKNIYRIATFKNWPF) (Charalambous et al. 2006). Therefore, high frequencies of self-reactive CD4⁺ T cells specific for a tumorigenic protein might be elicited in mice with xenogeneic HsSVN. However, self-reactive CD4⁺ T cells can be induced toward syngeneic or nonmutated CD4 epitopes in cancer patients (Topalian et al. 1996; Osen et al. 2010). To test the possibility that sub-derived self-CD4 epitopes participate in CD8⁺ CTL proliferation, we made a chimeric survivin protein (MmSVN2B), where the human 2B exon sequence was embedded into MmSVN. We immunized HLA-A-2402/K^b-transgenic (HLA24^b-Tg) B6 mice with MmSVN2B. The results indicated that the CD8⁺ CTL response to a self-tumor Ag (2B peptide) was barely enhanced by treatment of HLA24^b-Tg mice with MmSVN2B in the presence of polyI:C. However, CD4⁺ T cell immune responses to the CD4 epitope of MmSVN2B and HsSVN2B were significantly enhanced in HLA24^b-Tg mice with SVN2B proteins + polyI:C. The CD4 epitopes were not the N-terminal HsSVN_{13–27} and MmSVN_{13–27} sequences, but the Hs/MmSVN_{53–67} (DLAQCFKFKLEGW) sequence, which is identical in HsSVN2B and MmSVN2B and thus a nonmutated CD4 epitope.

PolyI:C was required for proliferation of self-reactive CD4⁺ Th1 cells that recognized the syngeneic epitope. We discuss how RNA adjuvant might induce CD4⁺ Th1 cells and act in the antitumor immune response.

Materials and methods

Bioinformatics analysis

Ensembl databases (<http://asia.ensembl.org/index.html>) were used to investigate human and mouse SVN genomic structure. Primate and rodent short interspersed nuclear elements (SINEs) were predicted using the Repeat Masker program (<http://www.repeatmasker.org/>). Results from databases were confirmed by comparison to previous reports (Mahotka et al. 1999).

Expression analysis

Total RNA was extracted from tissues from C57BL/6 mice and murine cell lines using RNeasy Mini Kits (Qiagen) following the manufacturer's instructions. RT-PCR used High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Primer pairs were designed to span separate exons to avoid amplifying other genomic DNA. Primers were 5'-ACTACCGCATCGCCACCT-3' (forward) and 5'-GCTTGTTGTTGGTCTCCTTTG-3' (reverse) for detection of the murine SVN gene (MmSVN) and 5'-TGTAACCAACTGGGACGATAT-3' (forward) and 5'-CTTTTCACGGTTGGCCTTAG-3' (reverse) for murine *Gapdh*. PCR conditions for mSVN were 94°C 3 min; 35 cycles of 94°C 30 s, 65°C 30 s, 72°C for 30 s; and 7 min 72°C. *Gapdh* PCR conditions were 94°C 3 min; 30 cycles of 94°C 30 s, 65°C 30 s, and 72°C 30 s; and 7 min at 72°C.

Antigens

The HsSVN2B-coding sequence was amplified using primers 5'-CGGGATCCATGGGTGCCCGGACG-3' (underline: *Bam*HI site) and 5'-GGAATTCTCAATCCATGGCAGC-3' (underline: *Eco*RI site). To construct the mSVN 2B gene (MmSVN2B), we used two-step PCR to make a chimeric gene of the mSVN gene and the human 2B exon (Fig. 2). In the first PCR, two fragments containing exon 1–2 and exon 3–4 were amplified using primers 5'-CCGCTCGAGATGGGAGCTCCGGCGCT-3' (underline: *Xho*I site) and 5'-ACCGTGCCCGGCCAATCGGGTTGTC-3' (italics: 5'-end of exon 2B of the HsSVN2B gene) for exon 1 and exon 2 and 5'-GGCGGATCACGAGAGAGGAGCATAGAAAGCA-3' (italics: 3'-end of exon 2B) and 5'-CGGGATCCTTAGGCAGCCAGCTGCTCAAT-3' (underline: *Bam*HI site) for exon 3 and exon 4. The exon 2B fragment was amplified using primers 5'-CGATGACAACCCGATTGGGCGGGCAGCG-3' (italics: 3'-end of exon 1 and exon 2 of MmSVN) and 5'-TTTCTATGCTCTCTCTCGTGATCCGCC-3' (italics: 5'-end of exon 3 and exon 4 of MmSVN). In the second PCR, the three templates from the first PCR were mixed in equal amounts and amplified using primers 5'-CCGCTCGAGATGGGAGCTCCGGCGCT-3' (underline: *Xho*I site) and 5'-CGGGATCCTTAGGCAGCCAGCTGCTCAAT-3' (underline: *Bam*HI site). The pCold vector II (TaKaRa) and SVN fragments were restriction digested and ligated overnight with T4 ligase (Promega) at 4°C. Ligation mixtures were transformed into competent *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) cells. After preculturing for 2 h at 37°C, cells were cooled on ice. Recombinant protein expression was induced with isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside at a final concentration of 1 mM and cultured for 24 h at 16°C. N-His-tagged survivin proteins were purified using a Profinia protein purification system (Biorad). Buffer of

purified SVN proteins was sequentially exchanged with PBS containing 2 M urea. To rule out lipopolysaccharide contamination, we treated survivin proteins with 200 µg/ml of polymyxin B (Sigma) for 30 min at 37°C before use. OVA (ovalbumin) (Sigma) was similarly treated with polymyxin B as an Ag.

Mice

C57BL/6 (H-2b) mice were from Clea Japan (Tokyo). HLA24^b-Tg was from SLC Japan (Gotoh et al. 2002). Mice were maintained in the Hokkaido University Animal Facility (Sapporo, Japan) in specific pathogen-free conditions. All experiments used mice that were 8–12 weeks old at the time of first procedure. All mice were used according to the guidelines of the institutional animal care and use committee of Hokkaido University, which approved this study (ID number: 08-0243, “Analysis of immune modulation by toll-like receptors”).

Reagents, antibodies and cells

PolyI:C and OVA_{323–339} peptide (ISQAVHAHAHAEINEAGR) were from Sigma. OVA_{257–264} peptide (SIINFEKL: SL8), OVA (H2K^b-SL8), HLA-A*2402 survivin-2B and HIV tetramer were from MBL. SVN2B peptide (AYACNTSTL) and HLA-A*2402/2B peptide-restricted human T cell clones (Idenoue et al. 2005) were kindly provided by Dr. Noriyuki Sato (Department of Pathology, School of Medicine, Sapporo Medical University). Human and murine-specific helper peptides (Charalambous et al. 2006) MmSVN_{13–27} (YLKNYRIATFKNWPF) and Hs SVN_{13–27} (FLKDHRISTFKNWPF) and the common helper peptide Hs/Mm SVN_{53–67} (DLAQCFFCFKELEGW), were synthesized by Biologica Co. Ltd (Nagoya). Peptide purity was >95%. To eliminate lipopolysaccharide contamination, all peptides were treated with 200 µg/ml polymyxin B (Sigma) for 30 min at 37°C before use (Nishiguchi et al. 2001). Anti-CD3ε (145-2C11), anti-CD8α (53-6.7) and anti-IFNγ (XMG1.2) antibodies (Abs) were from BioLegend. Anti-CD4 Ab (L3T4) was from eBiosciences and ViaProbe was from BD Biosciences. Dendritic cells were prepared from spleens of mice as described previously (Azuma et al. 2012).

Antigen-specific T cell expansion in vivo

HLA24^b Tg mice (Gotoh et al. 2002) were subcutaneously immunized with 100 µg of each antigen and 100 µg poly I:C once a week for 4 weeks. After 7 days from the last immunization, spleens were extracted, homogenized and stained with FITC-CD8α and PE-OVA (Azuma et al. 2012) or PE-SVN2B tetramer for detecting antigen-specific CD8⁺ T cells (Tsuruma et al. 2008). For intracellular cytokine detection, splenocytes were cultured with 100 nM SL8 or survivin 2B peptide for 6 h with 10 µg/ml brefeldin A (Sigma–Aldrich) added in the last 4 h. For intracellular cytokine detection of antigen-specific CD4⁺ T cells, splenocytes were cultured with 100 nM OVA_{323–339} peptide or SVN helper peptide for 6 h with 10 µg/ml brefeldin A (Sigma–Aldrich) added in the last 5 h. Cells were stained with PE-anti-CD8α/FITC-anti-CD3ε for CD8⁺ T cells or PE-anti-CD4/FITC-anti-CD3ε for CD4⁺ T cells. After cell-surface staining, cells were fixed and permeabilized with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) according to the manufacturer's instruction. Fixed and permeabilized cells were stained with APC-anti-IFN-γ. Stained cells were analyzed with FACSCalibur (BD Biosciences) and FlowJo software (Tree Star) (Azuma et al. 2012).

ELISA

Sera were collected from immunized mice once a week for 4 weeks and 96-well plates were coated with 10 µg/ml OVA,

MmSVN2B and HsSVN2B in ELISA/ELISPOT coating buffer (eBioscience) and incubated overnight at 4°C. ELISA diluent solution (eBioscience) was used for blocking and antibody dilution. PBS with 0.05% Tween 20 was used for washes. Anti-OVA or anti-SVN in sera was assessed by ELISA using antiserum for IgG2a/b and IgG1 diluted 1000-fold and 10,000-fold and incubated for 2 h at room temperature. After washing, isotype IgGs were detected using goat anti-mouse total IgG, IgG1, or IgG2a conjugated to HRP (Southern Biotechnology Associates). After washing, plates were stained with 1XTMB ELISA substrate solution (eBioscience) and reactions stopped with 2 N H₂SO₄ before measuring absorbance.

Statistical analyses

For comparison of two groups, *P*-values were calculated with a Student's *t*-test. For comparison of multiple groups, *P*-values were calculated with one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's test. Error bars are SD or SEM between samples.

Results

Origin of human SVN exon 2B

The HsSVN gene has four conserved and two cryptic exons (Mahotka et al. 1999). The authentic HsSVN gene encode 142 amino acids in exons 1–4. On the other hand, the HsSVN2B product is 165 amino acids encoded by exons 1, 2, 2B, 3 and 4. Exon 2B is hidden within intron 2, which is spliced into mature HsSVN2B mRNA in-frame between exons 2 and 3 (Mahotka et al. 1999). Exon 2B is followed by the GT-AG rule and expressed in many tumor cells and tumor cell lines, suggesting that splicing predominantly occurs in malignantly transformed cells (Mahotka et al. 2002). According to the Ensembl database, HsSVN intron 2 had two Alu sequences (Fig. 1A), and exon 2B resulted from the second Alu. In contrast, the MmSVN gene had four exons separated by three introns with no Alu sequence in intron 2; instead, MmSVN had several SINE sequences characteristic of rodents in intron 2 (Fig. 1A). Although the exon sequences were conserved in human and mouse SVNs, two intron sequences diverged between human and mouse (Fig. 1A). These results suggested that integration of exon 2B was evolutionarily new and formed after an Alu insertion. Although the SVN gene is conserved in yeast and humans, exon 2B was established after the divergence of human and mouse.

We used RT-PCR to investigate transcripts resulting from splicing other exons around exon 2 into the MmSVN mRNA. Results of mRNAs from mouse organs and cell lines are in Fig. 2B. The results suggested that no alternative exons around exon 2 in the MmSVN gene. We detected a ~200 bp product in most organs and cell lines tested (Fig. 2B), but this was not an MmSVN transcript.

Generation of a mmSVN2B construct

A SVN2B peptide derived from the HsSVN2B gene that contained the exon 2B sequence was recognized by CTLs in cancer patients (Hirohashi et al. 2002; Tsuruma et al. 2008; Honma et al. 2009) and a CTL clone was established from patients (Idenoue et al. 2005). We artificially constructed an MmSVN2B with a xenogeneic human exon 2B inserted into the boundary between exon 2 and 3 of SVN (Fig. 2A and B). Prominent amino acid substitutions between MmSVN2B and HsSVN2B were concentrated in the N-terminal region encoded by exon 1 (Fig. 2B), and a CD4 epitope is in this region (Li 2005; Mahotka et al. 2002). In an earlier paper, this HsSVN_{13–27} region, but not MmSVN_{13–27}, was an effective CD4 epitope that promoted HsSVN_{13–27}-specific CD4⁺ T cell proliferation