

## TLR 7 選択的アゴニストの抗腫瘍作用に関する研究

山川，絵里奈

<https://doi.org/10.15017/1441334>

---

出版情報：九州大学，2013，博士（工学），論文博士  
バージョン：  
権利関係：全文ファイル公表済

九州大学大学院システム生命科学府  
システム生命科学専攻

博士論文

「TLR7 選択的アゴニストの抗腫瘍作用に関する研究」

平成 26 年 3 月

山川 絵里奈

## 目次

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| 略語表.....                                                             | 2  |
| 1 諸言.....                                                            | 4  |
| 2 本論.....                                                            | 14 |
| 2.1 TLR7 選択的アゴニストの抗腫瘍作用.....                                         | 14 |
| 2.1.1 SM-276001 および、DSR-6434 の TLR7 アゴニスト活性、選択性および、<br>免疫活性化の検討..... | 14 |
| 2.1.1.1 方法.....                                                      | 16 |
| 2.1.1.2 結果.....                                                      | 19 |
| 2.1.1.3 考察.....                                                      | 32 |
| 2.1.2 SM-276001 の抗腫瘍作用 .....                                         | 34 |
| 2.1.2.1 方法.....                                                      | 36 |
| 2.1.2.2 結果.....                                                      | 39 |
| 2.1.2.3 考察.....                                                      | 50 |
| 2.1.3 DSR-6434 の全身投与と放射線治療(IR 治療)との併用 .....                          | 53 |
| 2.1.3.1 方法.....                                                      | 55 |
| 2.1.3.2 結果.....                                                      | 59 |
| 2.1.3.3 考察.....                                                      | 74 |
| 3 総括.....                                                            | 77 |
| 4 謝辞.....                                                            | 79 |
| 5 主論文.....                                                           | 80 |
| 6 参考文献.....                                                          | 81 |

## 略語表

APCs; Antigen Presenting cell

ATCC; American Type Culture Collection

Cmax; Maximum Concentration

CPE; Cytopathogenic Effect

CTL; Cytotoxic T Lymphocyte

DAMPs; Damage-Associated Molecular Patterns

DMSO; Dimethyl sulfoxide

ELISA; Enzyme-linked Immune Sorbent Assay

FBS; Fetal Bovine Serum

FDA; Food and Drug Administration

GM-CSF; Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor

HMGB-1; High Mobility Group Box 1

HPMC; Hydroxypropylmethylcellulose

IFN; Interferon

IHC; Immuno Histo Chemistry

IL-X; Interleukin X (X=2, 6)

IP-10; Interferon- inducible Protein 10

IR; Ionizing Radiation

IRF3; Interferon Regulatory Transcription Factor3

KC; Keratinocyto-derived Cytokine

LC-MS/MS; liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LTS; Long Term Survival

Luc; Luciferase

MCP-1; Monocyte Chemotactic Protein-1

MEC; Minimum Effective Concentration

MHC; Major Histocompatibility Complex

MIG; Monokine induced by Interferon Gamma

MTT; 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

MyD88; Myeloid differentiation factor 88

NF- $\kappa$ B; Nuclear Factor-kappa B

NK; Natural Killer

PD; Pharmacodynamics

pDC; Plasmacytoid Dendritic cell

PK; Pharmacokinetics

RCC; Renal cell carcinoma

RTV4; Relative Tumor Volume to Quadruple

SEAP; Secreted Alkaline Phosphatase

SHIP-1; Src Homology 2 domain-containing Inositol Polyphosphate 1

SPF; Specific Pathogen Free

TAA; Tumor Associated Antigen

TLR7; Toll-Like Receptor7

TNF- $\alpha$ ; Tumor Necrosis Factor alpha

## 1 諸言

日本における死亡要因の年次推移をみると(図 1)、がんは一貫して上昇を続けており、1981 年以降我が国において第 1 位となっている。2011 年のがんによる死亡者数は 35 万 7,305 人(男性 21 万 3,190 人、女性 14 万 4,115 人)となり、総死亡数の 28.3%を占めるようになった<sup>1</sup>。また、欧米諸国においても、がんによる死亡は心疾患に次いで第 2 位を占めており、新興国においても死亡要因の上位を占めている。がんの診断ならびに治療はいずれも進歩しているものの、依然としてアンメット・メディカル・ニーズの高い疾患である。

がんの治療法には 3 大療法と呼ばれる、外科療法、化学療法、放射線療法がある。さらに、第 4 の治療法として期待されているのが免疫療法であり、免疫担当細胞、サイトカイン、抗体等を用いる方法や、これらを活性化する物質を用いて、免疫機能によりがんを克服する治療法である。がんに対する免疫療法は 1960 年代頃から行われており、非特異的な免疫賦活化剤による治療が試みられてきた。その後、免疫反応を調整する液性因子であるサイトカインが発見されて以降、サイトカインそのものを用いる治療が行われるようになった。さらに、細胞の培養技術の進歩に伴い、患者から採取したリンパ球を活性化させて患者に投与する細胞療法が実施されるようになった。1990 年代には、がん細胞に特異的に発現するがん抗原が同定され、その後がん抗原を用いたワクチン療法の研究が盛んになった。2010 年に入り、前立腺がんを適応とした樹状細胞療法 Sipuliucl-T (Provenge®) と、悪性黒色腫を適応とした抗 CTLA-4 抗体 Ipilimumab (Yervoy®)が FDA により承認された<sup>2</sup>。これらは第 3 相試験において有効性を示した免疫療法剤であり、特に Provenge®はがん治療ワクチンとして初めて FDA に承認されたことから話題を呼んだ。また、Yervoy®は悪性黒色腫において初めて全生存率を延長し、強力な抗腫瘍作用を有することを示した<sup>3</sup>。これら

の薬剤の成功により、現在、免疫療法に対して期待が高まりつつある。米国における抗がん剤の開発において、治療用ワクチンを含む免疫療法剤の開発は臨床試験全体の約 2 割を占めている。

1995 年、*Drosophila melanogaster* 胚の体軸の腹背極性に関わる遺伝子である Toll が成体の真菌感染防御に重要な役割(抗真菌ペプチドの分泌)を果たすことが明らかとなった。翌年、*Drosophila* の Toll と構造上の類似性を示す哺乳類の Toll ホモログが同定され、Toll-like receptor: TLR と命名された<sup>4</sup>。哺乳類において免疫反応は自然免疫と獲得免疫に大別され、獲得免疫では外来抗原に対する抗原特異的な受容体を有した B 細胞や T 細胞により外来抗原は処理されている。一方、自然免疫は主にマクロファージや白血球などによって担われ、非特異的な貪食作用によって外来抗原が処理されている。TLR は自然免疫すなわち細菌やウィルス等の病原微生物から生体を防御するシステムに関わる重要な分子であることが明らかとなっており、主にマクロファージや白血球に発現している。ヒトでは 10 種類の TLR が見いだされており、それぞれの TLR とリガンドの関係が明らかにされている(図 2)<sup>5,6</sup>。また、TLR は自然免疫に関わる細胞の活性化のみならず、サイトカインや副刺激分子の誘導により獲得免疫の誘導にも重要な役割を果たしている。

ヒトの免疫機構は絶えずがんの形成を監視し排除していると考えられている。しかし、多くの場合、がん抗原は自己抗原であることから、免疫細胞はがんを認識できないことや、免疫の賦活化シグナルが欠如していること、腫瘍自身の免疫逃避機構等により、がん細胞は免疫機構から逃れ腫瘍を形成している可能性が考えられている<sup>7</sup>。TLR 刺激による免疫機能の活性化は、より強い抗腫瘍免疫を誘導できると期待される。

抗原提示細胞である樹状細胞は、自然免疫と獲得免疫の橋渡しに重要な役割

を担う細胞である<sup>8,9</sup>。リンパ球系の形質細胞様樹状細胞(pDC)のエンドソーム内には主に Toll-like Receptor 7、 8 および、9 が発現しており、ウィルスの一本鎖 RNA (ssRNA)や非メチル化 CpG DNA を認識し(図 2)、ウィルス感染時に大量の Type I IFN を産生する<sup>10,11</sup>。さらに、TLR 刺激を受けた pDC は Type I IFN の産生に加え、IP-10、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 等の炎症性サイトカインの産生を誘導し、腫瘍細胞を直接殺傷する能力のあるナチュラルキラー細胞(NK)の活性化を誘導する<sup>12</sup>。また、pDC は Type I IFN やサイトカインのオートクライン刺激により共刺激分子(CD40、CD80、CD86 等)や主要組織適合遺伝子複合体(MHC 分子)を発現し、成熟樹状細胞となる。pDC は成熟と同時に抗原提示能を獲得し、抗原特異的な T 細胞の活性化を誘導する(図 3)<sup>13-17</sup>。成熟 pDC は腫瘍組織もしくは、所属リンパ節でがん抗原を提示し、腫瘍抗原特異的に反応する T 細胞の活性化を誘導し抗腫瘍免疫に寄与していると考えられている<sup>18</sup>。さらに、Type I IFN や炎症性サイトカインの一部はがん細胞に対し直接殺傷する能力があることから、IFN- $\alpha$  や IL-2 は腎がん(RCC)に対するサイトカイン療法として用いられてきた。このように、近年 TLR リガンドによる獲得免疫の活性化メカニズムが明らかとなるにつれ、TLR リガンドが抗腫瘍免疫を活性化することが考えられ、免疫療法として有用であると期待されている。

多くの TLR リガンドはウィルスやバクテリアの構成成分であり、その複雑な構造を有するため医薬品として開発することは難しい。一方、Type I IFN を誘導するイミダゾキノリン骨格を有する低分子化合物 (Imiquimod、Resiquimod(R-848)等)が TLR7/8 のアゴニストであることが報告され、医薬品として低分子の TLR アゴニストを開発できる可能性が示された<sup>10</sup>。抗ウィルス薬として開発された Imiquimod(ALDARA<sup>3M</sup> Cream)は、全身投与への認容性が低いため臨床での使用は限定的であるが、皮膚がんの一部に対する効能を有している<sup>19</sup>。現



在では、Imiquimod に比べ 100 倍活性の強い R-848 が TLR7/8 アゴニストとして多くの非臨床研究に使用されている。しかし、ヒトでは TLR7 および、TLR8 が機能しているが、げっ歯類では TLR7 は機能しているものの、TLR8 に関しては機能していないとの報告や TLR7 の反応を抑制的にコントロールしているとの報告もあり、その機能は十分に明らかになっていない<sup>20,21</sup>。そのため、TLR7/8 アゴニストの作用・副作用を正確にげっ歯類で評価することは難しい。著者らはこれまでに全身投与に認容性の高い TLR7 選択的な低分子アゴニストを複数見出しており、これらは固形がんに対する免疫療法剤として有用であることが期待される<sup>22,23</sup>。

一般的に既存のがん治療ではがんを克服することは難しく、多剤を併用し抗腫瘍作用を増強する治療法が臨床では行われている。腫瘍組織は腫瘍血管の形成や免疫抑制性のサイトカイン TGF- $\beta$  や IL-10<sup>24</sup> の産生、抗原提示能を低下し T 細胞から逃れる機構を有するなど<sup>25,26</sup>、がん微小環境を形成している(図 4)<sup>27,28</sup>。非臨床試験においても免疫療法剤での腫瘍の完全退縮は難しく、抗腫瘍作用を最大化することを目的として抗 CTLA-4 抗体や TLR7 などの免疫療法剤と放射線治療や化学療法剤との併用が試みられ、これらの併用は免疫反応を増強し、がん治療として有効であることが報告されている<sup>29-35</sup>。欧米諸国では約 50% のがん患者が放射線治療を受けており、放射線治療は固形がんの非外科的治療の 1 つとして有用となっている。放射線 (Ionizing Radiation; IR) 治療は、有糸分裂の崩壊、ネクローシス、アポトーシス含む致死性の DNA 損傷を誘導し<sup>36,37</sup>、これらの細胞死はがんの免疫原性や抗腫瘍免疫反応を誘導することが報告されている。IR 処理されたがん細胞は、細胞性ストレスや HMGB-1(High Mobility Group Box 1)などの DAMPs (damage-associated molecular patterns; ダメージ(傷害)関連分子パターン)を誘導し、さらに ATP を細胞外に放出するが、これらの分子は抗原提示細胞(APCs)を活性化し、がん抗原特異的 T 細胞を誘導することが報告されている

<sup>37,38</sup>。また、IR 処理によって誘導された DNA 損傷は、新規のタンパク質発現(抗原性が高いと考えられる)やがん細胞の MHC クラス I の発現を亢進する<sup>36</sup>。このように、IR 治療はがんの免疫原性を誘導するとの報告がある一方で、臨床試験・非臨床試験ともに IR 治療のみでは抗腫瘍免疫反応を長期間維持することに成功していない<sup>29,39</sup>。そのため、抗腫瘍免疫を活性化する TLR7 アゴニストと、がんの免疫原性を誘導する IR 治療を併用することは、それぞれの治療を補完し合うことが予想され、抗腫瘍効果が増強することが期待される(図 5)<sup>40</sup>。

著者らは全身投与に認容性のある新規 TLR7 選択的アゴニストをがん免疫療法剤として開発することを目的とし、これまで見出してきた経口投与可能な SM-276001 および、アゴニスト活性が高くかつ溶解性を向上し静脈内投与可能となった DSR-6434 を用いて、TLR7 アゴニストの抗腫瘍作用を評価した。本研究では、SM-276001 および、DSR-6434 の TLR7 アゴニスト活性および、その選択性を評価し、両化合物が TLR7 選択的アゴニストであることを示した。また、SM-276001 を用いて全身投与における免疫活性化および、抗腫瘍効果を評価した。さらに全身投与および、局所投与による免疫活性化および、抗腫瘍作用の違いについて明らかにした。また、免疫原性の異なる細胞株を用いて DSR-6434 と IR 治療との併用効果を評価すると共に、DSR-6434/IR 併用によるがん抗原特異的メモリーT細胞の誘導能について評価した。

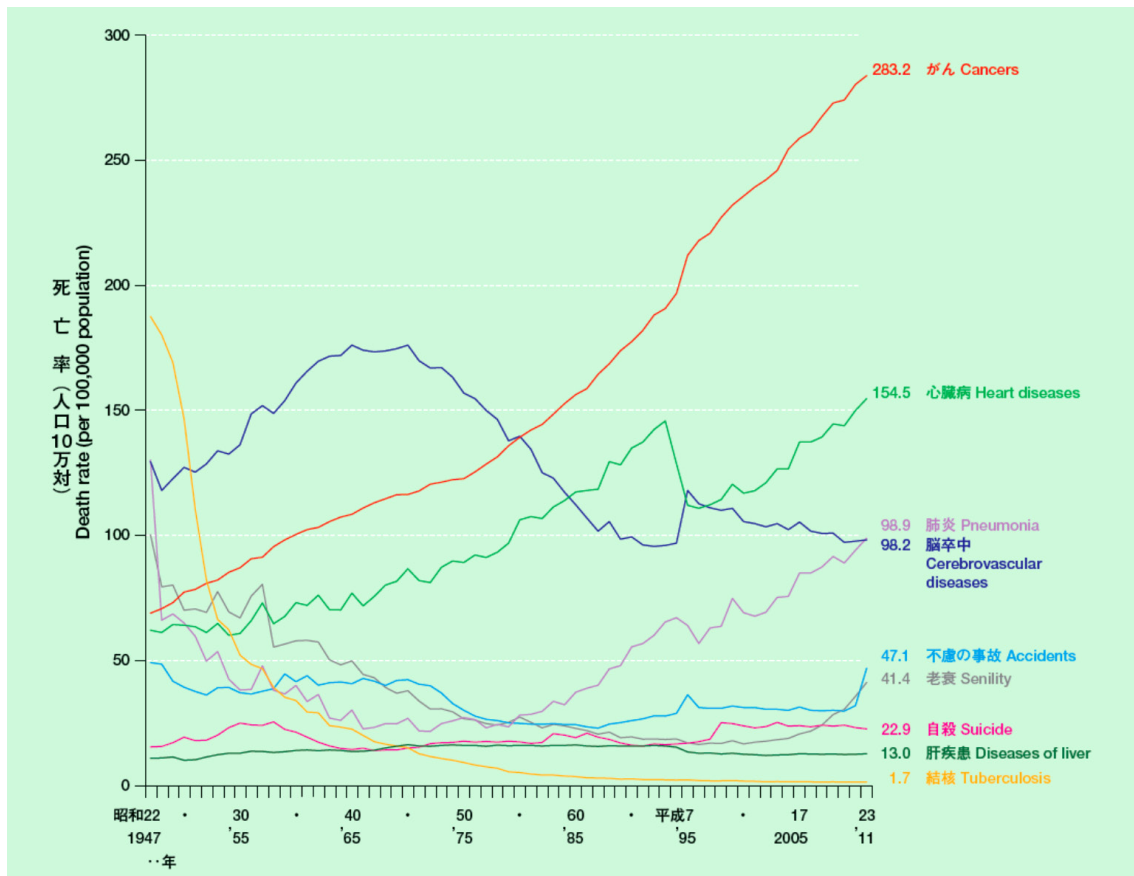


図 1. 主な死因別に見た死亡率の年次推移—昭和 22 年～平成 23 年—

死亡率の年次推移を死因別にみると、明治から昭和初期まで多かった結核や肺炎などの感染症が第 2 次世界大戦後急速に減少し、代わって生活習慣病(がん、心臓病、脳卒中)による死亡が上位を占めるようになった。がんによる死亡は一貫して増加しており、1981 年以降日本の死因の第 1 位を占め、2011 年の死亡者数は 35 万 7,305 人に上り、総死亡数の 28.5%を占めるようになった<sup>1</sup>。

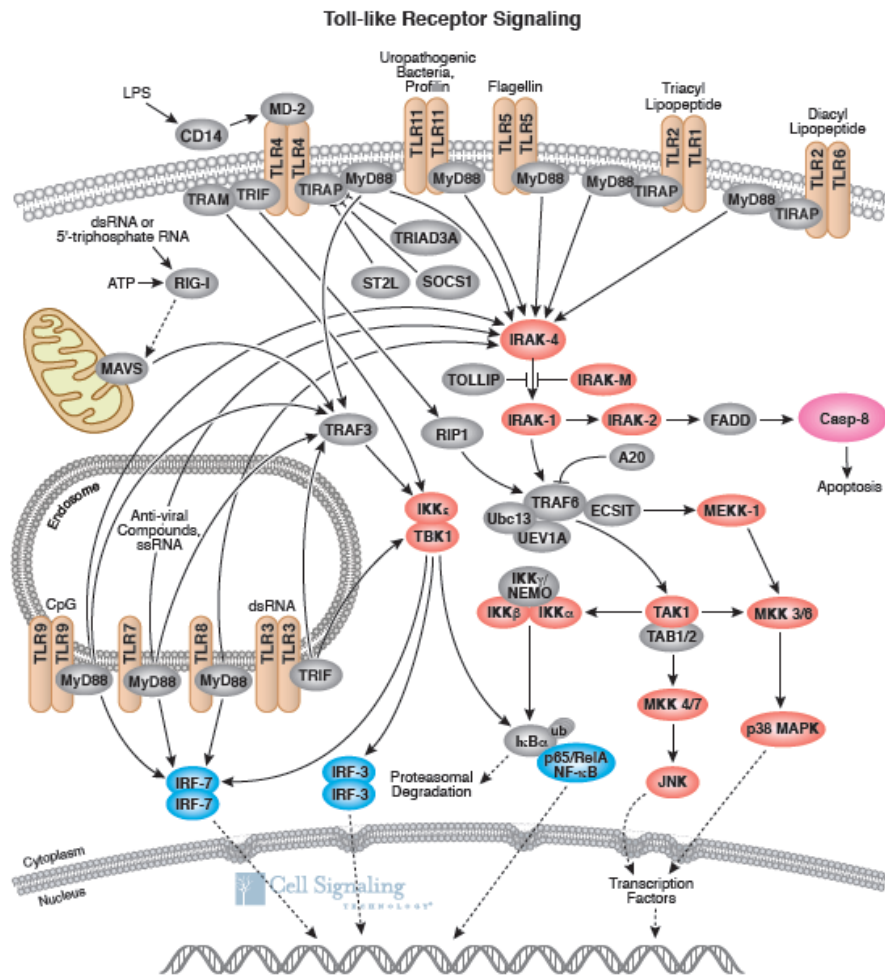


図 2. Toll-like receptor とそのリガンドによる下流のシグナル伝達

TLR1、2、4、5、6、11 は細胞膜上に発現しており、TLR2 はリポペプチドの認識に必須の受容体であり、TLR1 と会合し細菌由来のトリアシルポリペプチドを、また TLR6 と会合しマイコプラズマ由来のジアシルリポペプチドを認識する。TLR4 は LPS の認識に必須の受容体であり、TLR5 は鞭毛タンパク質(フラジェリン)を認識する。TLR11 はバクテリアのプロフィリンを認識するが、ヒトでは発現していない。TLR3、7、8、9 はエンドソームに発現しており、主にウィルスの構成成分を認識する。ウィルス由来の 2 本差 RNA は TLR3 によって、一本鎖 RNA は TLR7、TLR8 によって認識される。また、TLR9 は細菌やウィルス由来の CpG DNA を認識する。TLR のシグナルはアダプター分子である MyD88 を介する経路と TRIF を介する経路があり、それぞれ転写因子である NF- $\kappa$ B と Interferon regulatory transcription factor3 (IRF3)を介して炎症性サイトカインやインターフェロンなどの産生を誘導する<sup>6</sup>。

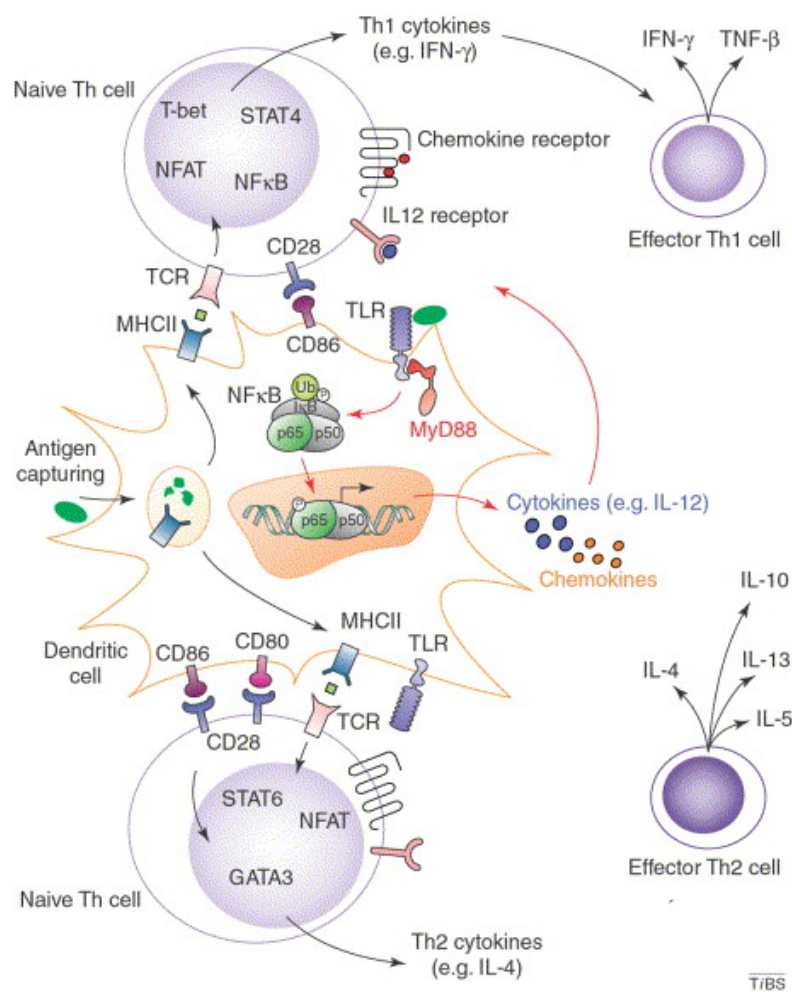


図3. 樹状細胞の活性化と獲得免疫の形成

TLR 刺激を受けた pDC は Type I IFN の産生に加え、IP-10、IL-12、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 等の炎症性サイトカインの産生を誘導する。また、サイトカインのオートクライン刺激を受け、共刺激分子(CD40、CD80、CD86 等)や主要組織適合遺伝子複合体(MHC 分子)を発現し成熟樹状細胞となる。成熟した樹状細胞は抗原提示能を獲得し抗原特異的な T 細胞の活性化を誘導する。ナイーブ Th1 細胞は、IFN- $\gamma$  を代表とする Th1 サイトカインが優位な状況では、Th1 細胞へと分化し、Th1 サイトカインを産生する<sup>13</sup>。

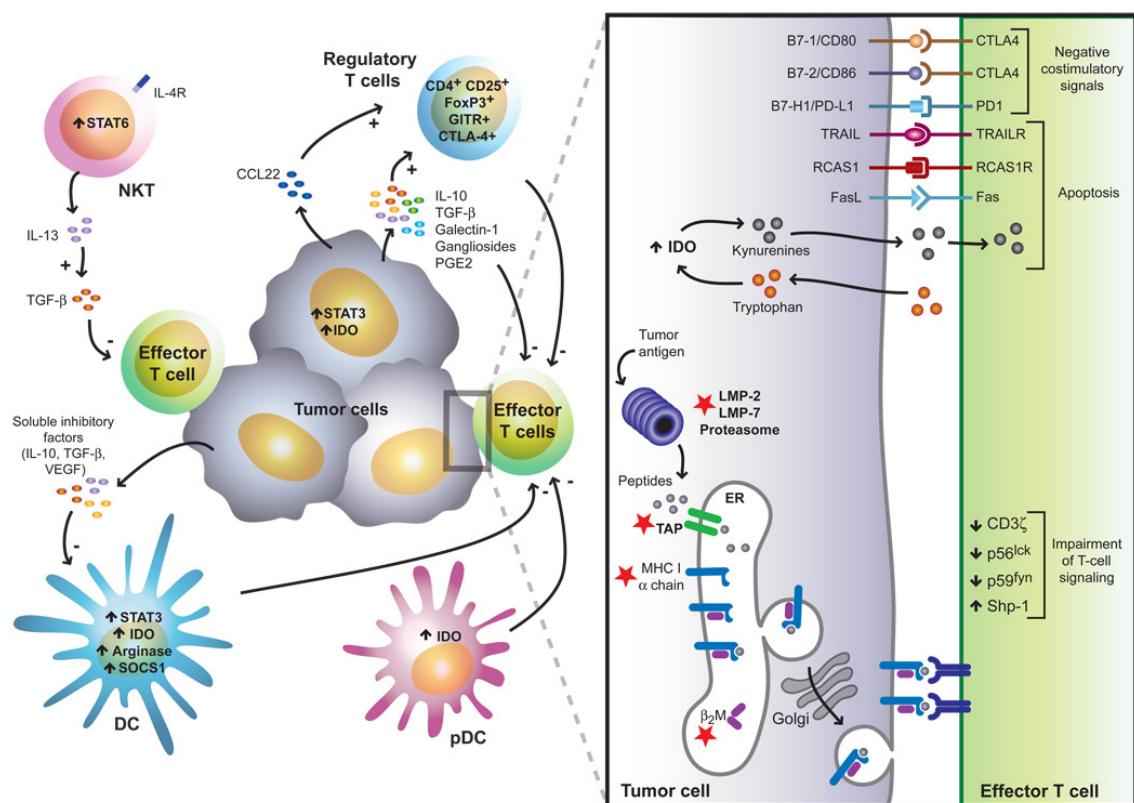


図 4. がんの免疫抑制機構および、免疫学的チェックポイント

がんは多くの免疫抑制メカニズムを駆使することで、抗腫瘍免疫反応を回避している。例えば、がん抗原の提示やそのプロセッシング機能の消失、抑制性の共刺激分子 (CTLA-4/B7, PD-1/PD-L1) の発現誘導、免疫抑制性の因子 (IL-10, TGF- $\beta$ , galectin-1, gangliosides, PGE<sub>2</sub>) の誘導、アポトーシス経路の活性化 (FasL, TRAIL, IDO, RCAS1)、NK 細胞を介した抗腫瘍作用の抑制 (MICA の発現) や樹状細胞の分化および、成熟化の抑制 (STAT3, VEGF, IL-10, SOCS1, arginase) 等、様々なメカニズムで抗腫瘍免疫を抑制している。さらには、免疫抑制性細胞 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 抑制性 T 細胞、IL-13 発現 NKT 細胞、抑制性の樹状細胞) を誘導し、がん微小環境を形成する<sup>28</sup>。



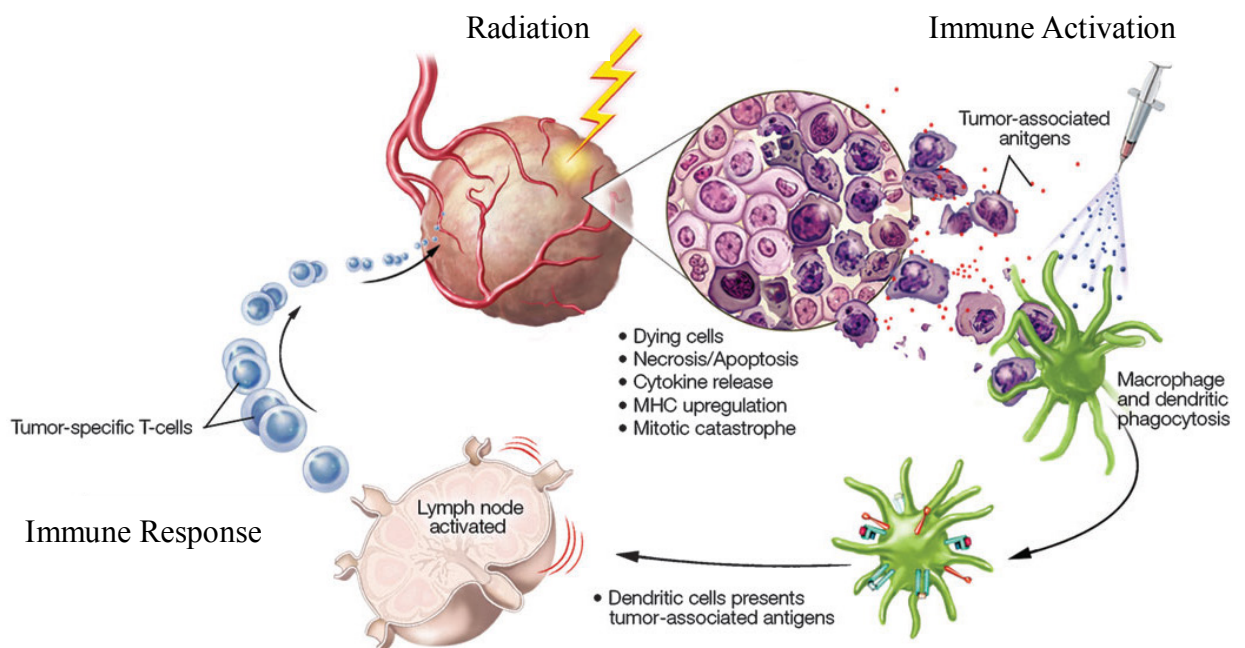


図 5. 免疫療法と放射線療法による抗腫瘍効果の増強メカニズム

放射線照射によりがんはアポトーシス、ネクロシス等の細胞死を誘導すると共に、MHC の発現誘導やサイトカイン産生を誘導する。免疫療法によりマクロファージや樹状細胞を活性化することで、死細胞はこれらの免疫細胞に貪食され、がん抗原が効率的に提示される。がん抗原を提示した樹状細胞はがんの所属リンパ節へ輸送され、がん抗原特異的 T 細胞を活性化する。その後、がん抗原特異的な T 細胞は腫瘍組織へと浸潤し、抗腫瘍免疫によりがんを排除する<sup>40</sup>。

## 2 本論

### 2.1 TLR7 選択的アゴニストの抗腫瘍作用

#### 2.1.1 SM-276001 および、DSR-6434 の TLR7 アゴニスト活性、選択性および、免疫活性化の検討

TLR7 は主に pDC のエンドソーム内に発現しており、リガンド刺激を受けると大量の IFN- $\alpha$  を産生する<sup>10,11</sup>。著者らはこれまでに Type I IFN を誘導する低分子化合物として SM-276001 を見出してきた<sup>22</sup>。そこで、ヒト TLR7 を形質移入した HEK 細胞のレポーターアッセイ系を用いて、本化合物の TLR7 アゴニスト活性を評価した。また、TLR7 に対す選択性を明らかにする目的で、TLR7 と同様に Type I IFN の発現を誘導する TLR8 および、TLR9 のアゴニスト活性の有無を評価した。TLR7 アゴニストは pDC を活性化すると Type I IFN の産生に加えて、IFN 依存的なケモカインである IP-10 や炎症性サイトカインを誘導する<sup>21</sup>。そこで、マウスの脾臓より調製した脾臓細胞を SM-276001 で刺激し、炎症性サイトカインの誘導能を評価した。

医薬品開発において、新規薬剤の薬物動態/薬力学作用(PK/PD)プロファイルを明らかにすることは、作用・副作用の観点において重要である。そこで、SM-276001 の *in vivo* 薬効評価を行うために、マウスに経口投与した際の PK/PD プロファイルを評価した。また、TLR7 アゴニストは免疫細胞の活性化を誘導することが報告されているため、PD レスponseとして脾臓細胞上の活性化マーカーである CD69 の発現を Flow cytometer により解析した。

著者らはさらに、SM-276001 に比べ溶解性が向上し、かつ hTLR7 アゴニスト活性が強い静脈内投与可能な新規化合物 DSR-6434 を見出した<sup>23</sup>。そこで、本化合物についても SM-276001 同様に TLR7 アゴニスト活性および、選択性について評価した。また、DSR-6434 の TLR7 特異性を TLR7<sup>-/-</sup>マウスを用いて評価し、PD レス



ポンスは DSR-6434 を静脈内投与し脾臓細胞上の CD69 発現を指標に解析した。

#### 2.1.1.1 方法

##### 試薬

SM-276001 および、DSR-6434 は大日本住友製薬にて合成した(図 6)<sup>22,23</sup>。SM-276001 は 0.05 M リン酸バッファー/0.5% HPMC/0.1% Tween80/0.6% NaCl (pH6) に懸濁し、*in vivo* 試験に使用した。DSR-6434 は 1% (v/v) DMSO/Saline または、Saline(pH5)に懸濁し、*in vivo* 試験に使用した。

##### 動物

Balb/c マウスおよび、TLR7<sup>-/-</sup>/Balb/c マウスは Harlan, UK、Charles river, Japan または、Oriental Yeast, Japan より購入し Specific pathogen free(SPF)下で飼育した。すべての動物実験は大日本住友製薬株式会社の実験動物取扱いまたは UK Home Office Animal (Scientific Procedure) Act 1986 のガイドラインに従って実施した。

##### TLR7、TLR8、TLR9 レポータージーンアッセイ

ヒト TLR7(pUNO 発現ベクター)と pNiFty2-SEAP レポータープラスミドまたは、ヒト TLR8 (pCMV-script 発現ベクター)と pNF-κB-Luc Cis レポータープラスミドを形質移入した HEK293 細胞を 96 well プレートに  $2 \times 10^4$  cells/well 播種し、様々な濃度の SM-276001、DSR-6434 または、R-848 を添加し 37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 6-20 時間培養した。TLR7 アゴニスト活性は細胞の SEAP 活性を測定し算出した。一方、TLR8 アゴニスト活性はルシフェラーゼの発光を測定し算出した。TLR9 安定発現 293XL-hTLR9A 細胞(Invivogen)に pNF-κB-Luc Cis レポータープラスミドを形質移入した細胞を  $5 \times 10^4$  cells/well 播種し、様々な濃度の SM-276001、

DSR-6434 または、CpG ODN 2006 (Invivogen)を添加し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 6 時間培養した。細胞のルシフェラーゼの発光を測定し TLR9 アゴニスト活性を測定した。

#### 脾臓細胞からのサイトカイン産生

Balb/c、TLR7<sup>-/-</sup>/Balb/c、C57BL/6J を安楽死後に脾臓を採取し、脾臓細胞を調製した。96 well プレートに 1×10<sup>6</sup> cells/well となるよう細胞を播種し、様々な濃度の SM-276001 または、DSR-6434 を添加し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 24 時間培養した。培養後に細胞上清を回収し、上清中の IP-10、IFN-γ、IL-6、IL-10、IL-12(p40)、IL-12(p70)、TNF-α、GM-CSF、KC を Milliplex (Millipore)を用いて測定した。

#### SM-276001 の薬物動態プロファイル

SM-276001 を Balb/c マウスに 0.1、1、10 mg/kg 経口投与した。投与 1、2、4、8 時間後にマウスを安楽死し、血液を採取し 2,486g で 20 分間、4°C で遠心した。血漿を回収し、0.1% ギ酸/メタノールおよび、0.1%ギ酸/水で処理し、化合物濃度を LC-MS/MS で測定した

#### 脾臓細胞の CD69 発現誘導

Balb/c マウスに SM-276001 を 0.1、1、10 mg/kg 経口投与し、8、24、48 時間後にマウスを安楽死し脾臓を採取した。担癌マウス(腫瘍径 180-220mm<sup>3</sup>)に DSR-6434 を 0.1 mg/kg 静脈内投与し、4 時間後にマウスを安楽死し脾臓を採取した。脾臓細胞を調製し CD49(BD Pharmingen)、CD69(BD Pharmingen)、CD3ε (BD Pharmingen)、CD19(eBioscience)で染色し、Flow cytometer を用いて解析した。

#### DSR-6434 の全身投与によるサイトカイン産生

0.1 mg/kg の DSR-6434 を TLR7<sup>wt</sup> および、TLR7<sup>-/-</sup> マウスに 0.1 mg/kg 静脈内投与し、投与 2、4、8、12、24 時間後に採血し、血漿中のサイトカインを測定した。IFN- $\alpha$ 、IP-10、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、KC は添付文書に従い ELISA 法または、Milliplex アッセイにより測定した(PBL Interferon Source, Millipore )。

#### 2.1.1.2 結果

##### TLR7 選択的アゴニスト SM-276001 によるサイトカイン産生

SM-276001 の TLR7 アゴニスト活性は、NF- $\kappa$ B レポーターアッセイを用いて評価した。ポジティブコントロールとして、TLR7/8 アゴニストである R-848、TLR9 リガンドである CpG ODN 2006 を用いた。SM-276001 および、R-848 はそれぞれ用量依存的に TLR7 依存的な NF- $\kappa$ B 活性を誘導し、SM-276001 の最少有効濃度 (MEC; minimum effective concentration) は R-848 に比べ低濃度であった(図 7a)。一方、R-848、CpG ODN 2006 は用量依存的に hTLR8、hTLR9 依存的な NF- $\kappa$ B を活性化したが、SM-276001 は最高濃度 10  $\mu$ M においても hTLR8、hTLR9 依存的な NF- $\kappa$ B の活性化を誘導しなかった (図 7b、7c)。以上の結果より、SM-276001 は TLR8 および、TLR9 には作用せず、TLR7 選択的なアゴニストであることが示された。

次に、マウスの脾臓細胞を用いて SM-276001 によるサイトカイン誘導能を評価した。マウス脾臓細胞を 3 nM～10  $\mu$ M の SM-276001 および、R-848 で刺激したところ、いずれの化合物も用量依存的に IP-10、IFN- $\gamma$ 、GM-CSF、IL-12、IL-10、IL-6、TNF- $\alpha$  等の炎症性サイトカインを産生した(図 8)。マウスでは、TLR8 は機能していないことが報告されていることから、R-848 によって誘導されたサイトカインは TLR7 依存的な作用である可能性が考えられる<sup>41</sup>。SM-276001 および、R-848 は、ともに 30 nM よりサイトカインを産生することが示され MEC は 30 nM であった(図 8)。

##### SM-276001 経口投与による免疫エフェクター細胞の活性化

SM-276001 の薬物動態プロファイルを明らかにする目的で、0.1、1、10 mg/kg

の SM-276001 をマウスに経口投与し、血漿中の SM-276001 濃度を測定した。その結果、投与 1 時間後に SM-276001 の血漿中濃度は最高濃度(Cmax)に達した(図 9a)。さらに、投与量が 0.1-10 mg/kg の範囲では、投与量と Cmax に線形性が認められた(図 9b)。また、投与量が 1 mg/kg 以上では、血漿中の SM-276001 濃度が *in vitro* の MEC である 30 nM を超えることが示された(図 9)。

次に、*in vivo* において SM-276001 が免疫エフェクター細胞を活性化することを確認するために、0.1-10 mg/kg の SM-276001 をマウスに経口投与し、8、24、48 時間後に脾臓細胞を回収し NK、NKT、B および、T 細胞上の CD69 発現を Flow Cytometry により解析した。SM-276001 はビークル群、無処置群に比べ、いずれの時間においても NK、NKT、B および、T 細胞上に有意に CD69 を発現した(図 10)。1、10 mg/kg 投与群では 60-80%の細胞が CD69 を発現し、投与 8-24 時間後に発現はもっとも高く、その後 24 時間で低下した(図 10)。投与量 1 mg/kg 以上では、血漿中濃度が MEC を超え、それに伴って免疫細胞の活性が認められ、このことは PK と PD に相関があることを示唆しており、*in vivo* 薬効評価試験は十分な免疫活性作用を有する 1 mg/kg 以上で実施する必要があることが示された。

#### DSR-6434 の TLR7 特異性および、サイトカイン産生

SM-276001 と同様に NF- $\kappa$ B レポーターアッセイを用いて DSR-6434 の TLR7 アゴニスト活性を評価した。ポジティブコントロールとして、TLR7/8 アゴニストである R-848、TLR9 リガンドである CpG ODN 2006 を用いた。DSR-6434 および、R-848 は用量依存的に TLR7 依存的な NF- $\kappa$ B 活性を誘導した(図 11a)。一方、R-848、CpG ODN 2006 はそれぞれ用量依存的に TLR8、TLR9 依存的な NF- $\kappa$ B を活性化したが、DSR-6434 は最高濃度 10  $\mu$ M においても TLR8、TLR9 依存的な NF- $\kappa$ B の活性化は認められず(図 11b, c)、TLR7 に対し特異性が高いことが示された。

TLR7<sup>wt</sup> および、TLR7<sup>-/-</sup>マウスより採取した脾臓細胞を DSR-6434(0.64-2000nM) で 24 時間刺激し、培養上清中の炎症性サイトカイン・ケモカイン(IP-10、IL-12p70、IFN- $\gamma$ 、KC、TNF- $\alpha$ )を測定した。その結果、TLR7<sup>wt</sup> マウスの脾臓細胞を DSR-6434 で刺激した場合のみ用量依存的なサイトカイン・ケモカインの産生が認められた(図 12)。一方、TLR7<sup>wt</sup> の脾臓細胞において十分サイトカインを産生する濃度 2000 nM の DSR-6434 で TLR7<sup>-/-</sup>マウスの脾臓細胞を刺激したが、サイトカイン・ケモカインの産生は認められなかった(図 12)。

さらに、TLR7<sup>wt</sup> マウスおよび、TLR7<sup>-/-</sup>マウスの静脈内に DSR-6434 を 0.1 mg/kg を単回投与し、2、4、8、12、24 時間後に採取した血漿サンプルの IFN- $\alpha$  および、炎症性サイトカインを測定した。TLR7<sup>wt</sup> マウスでは、投与 2 時間後に IFN- $\alpha$  の産生が最大となり基準値(無処置マウス)と比較して 72 倍増加したが (<6.3 pg/mL vs 455 $\pm$ 49.5 pg/mL)、TLR7<sup>-/-</sup>マウスでは IFN- $\alpha$  の産生は認められなかった(図 13)。また同様に、IFN- $\alpha$  依存性ケモカインである IP-10 の発現は DSR-6434 を投与した TLR7<sup>wt</sup> マウスでのみ認められ、その発現量は基準値の 148 倍であった(基準値;72.9 $\pm$ 7.9 pg/mL, DSR-6434; 10764 $\pm$ 708.2 pg/mL) (図 13)。その他の炎症性サイトカイン (KC、IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ )の産生も TLR7<sup>wt</sup> マウスでのみ認められ、TLR7<sup>-/-</sup>マウスではいずれのタイムポイントにおいても認められなかった(図 13)。以上の結果より DSR-6434 が TLR7 特異的アゴニストであることが示唆された。

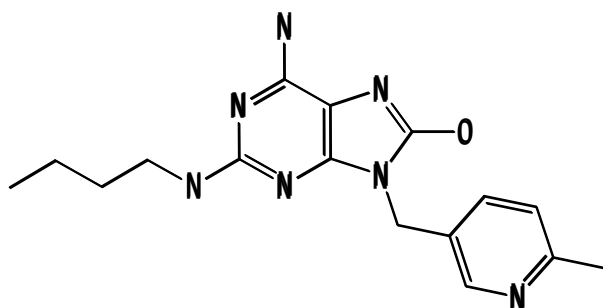
#### DSR-6434 静脈内投与による免疫エフェクター細胞の活性化

*In vivo* における DSR-6434 の免疫エフェクター細胞活性化能を各種免疫細胞の CD69 発現を指標に評価した。担癌マウスに 0.1 mg/kg の DSR-6434 を静脈内投与し 4 時間後に脾臓を回収した。脾臓細胞中の T(CD3<sup>+</sup>)細胞、NK(CD49<sup>+</sup>)細胞、

NKT(CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup>)細胞および、B(CD19<sup>+</sup>)細胞上の CD69 発現を Flow Cytometer により解析した結果、コントロールマウスと比較して、いずれの免疫エフェクター細胞も 6.5-10.2 倍の有意な CD69 発現を誘導した(図 14)。



(a)



(b)

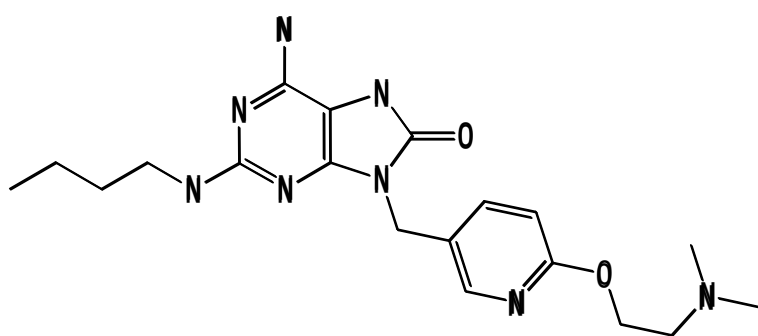


図 6. SM-276001(a)および、DSR-6434(b)の構造式

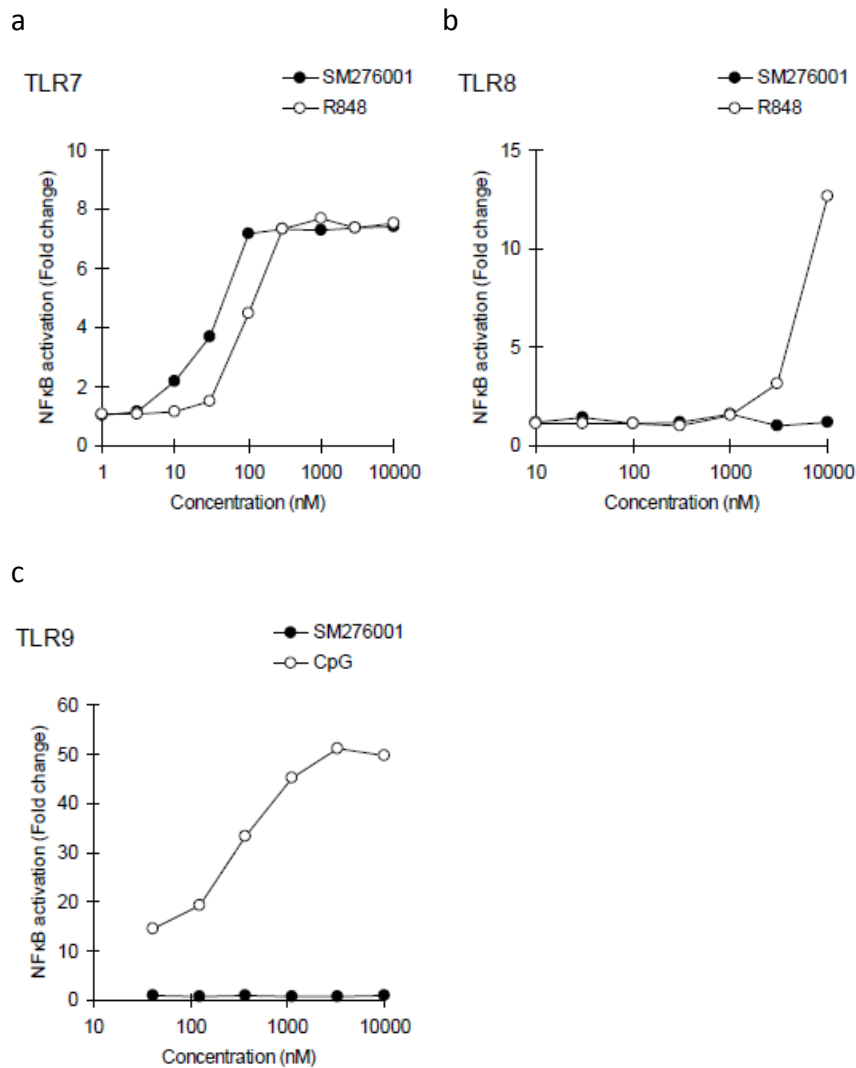


図 7. *In vitro* における SM-276001 の TLR7 アゴニスト活性および、選択性

- (a) ヒトTLR7(pUNO発現ベクター)とpNiFty2-SEAPレポータープラスミドを形質移入したHEK293細胞をSM-276001または、R848で刺激し、NF- $\kappa$ Bの活性化をSEAP活性により検出した。
- (b) ヒトTLR8(pCMV-script発現ベクター)とpNF- $\kappa$ B-Luc Cisレポータープラスミドを形質移入したHEK293細胞をSM-276001または、R848で刺激し、NF- $\kappa$ Bの活性化をルシフェラーゼの発光により検出した。
- (c) ヒトTLR9を発現する293XL-hTLR9A細胞にpNF- $\kappa$ B-Luc Cisレポータープラスミドを形質移入し、SM-276001または、CpG ODN 2006で刺激し、NF- $\kappa$ Bの活性化をルシフェラーゼの発光により検出した。

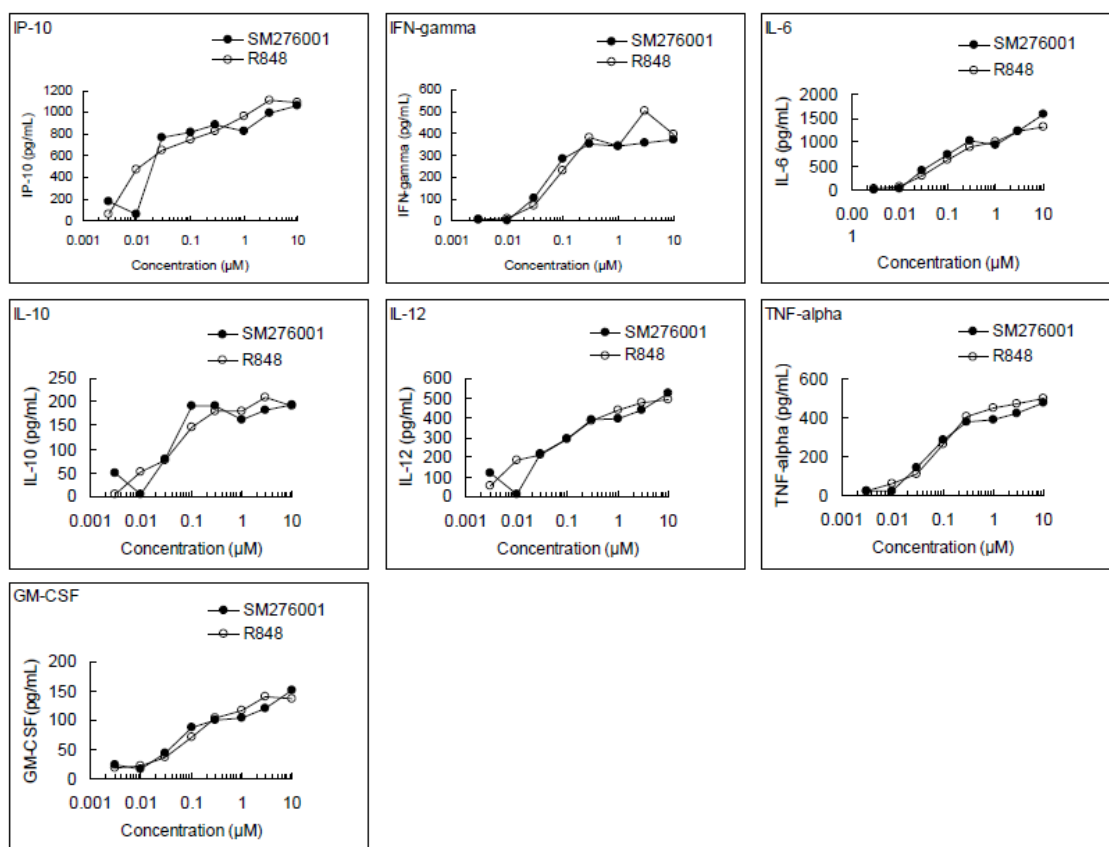
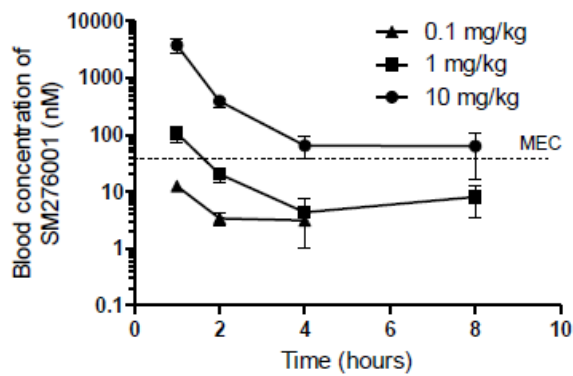


図 8. SM-276001 刺激による脾臓細胞からのサイトカイン産生

Balb/c マウスの脾臓細胞を調製し、SM-276001 または、R848 で 24 時間刺激した。培養上清を回収し、サイトカイン・ケモカイン産生量を、Milliplex アッセイ (Millipore) を用いて測定した。

a



b

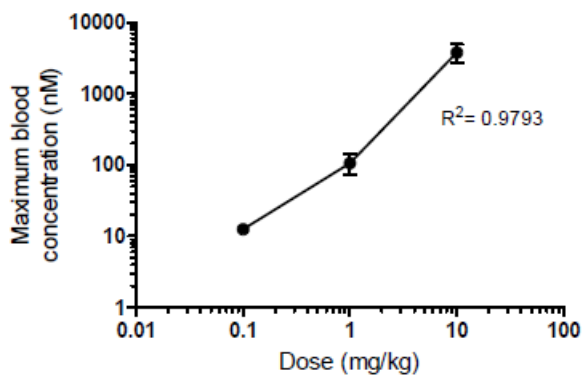


図 9. SM-276001 の薬物動態(PK)プロファイル

- (a) SM-276001 を Balb/c マウスに経口投与し、1、2、4 および、8 時間後に採血した(n=3)。血液中の化合物濃度を LC-MS/MS により測定した。
- (b) 各投与量とその際の血中最高濃度(Cmax)の相関をプロットした。

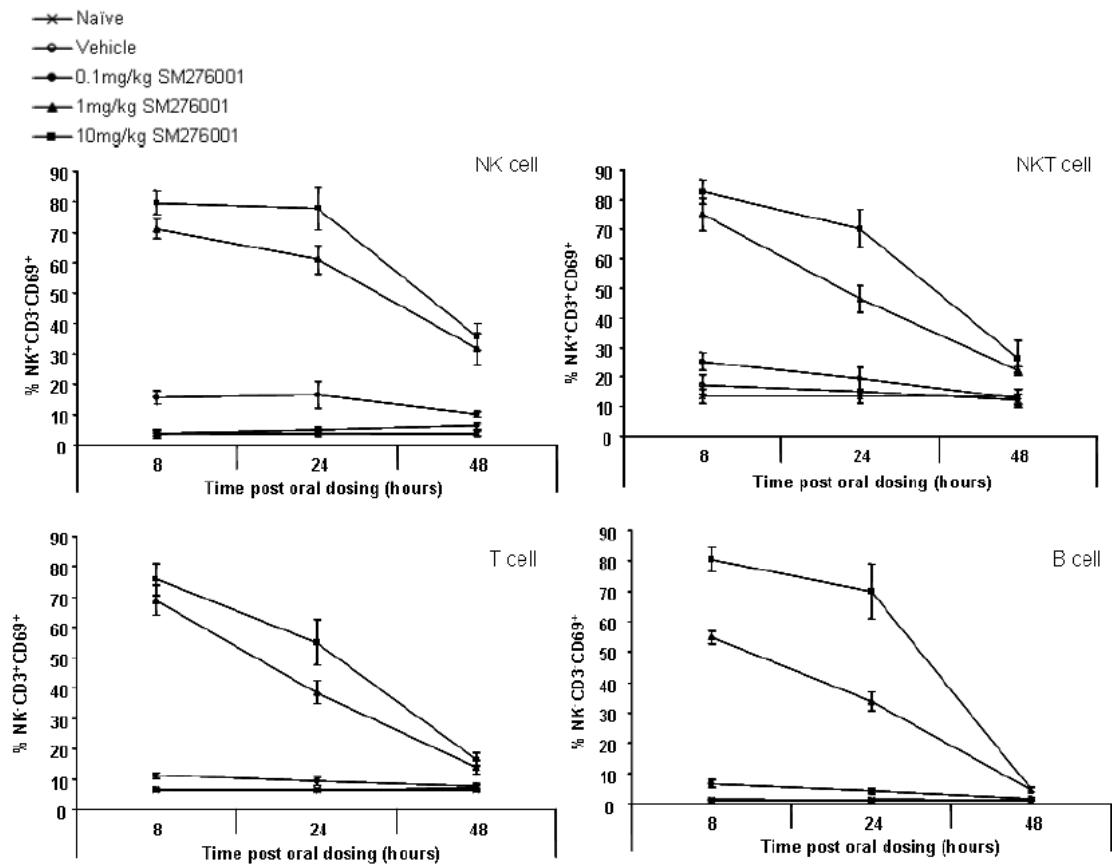


図 10. SM-276001 経口投与による免疫エフェクター細胞の活性化

Balb/c マウスに SM-276001 を経口投与し、8、24 および、48 時間後に安楽死させた (n=3)。脾臓細胞を調製し、表面マーカーの発現と CD69 発現を Flow cytometer により解析した。

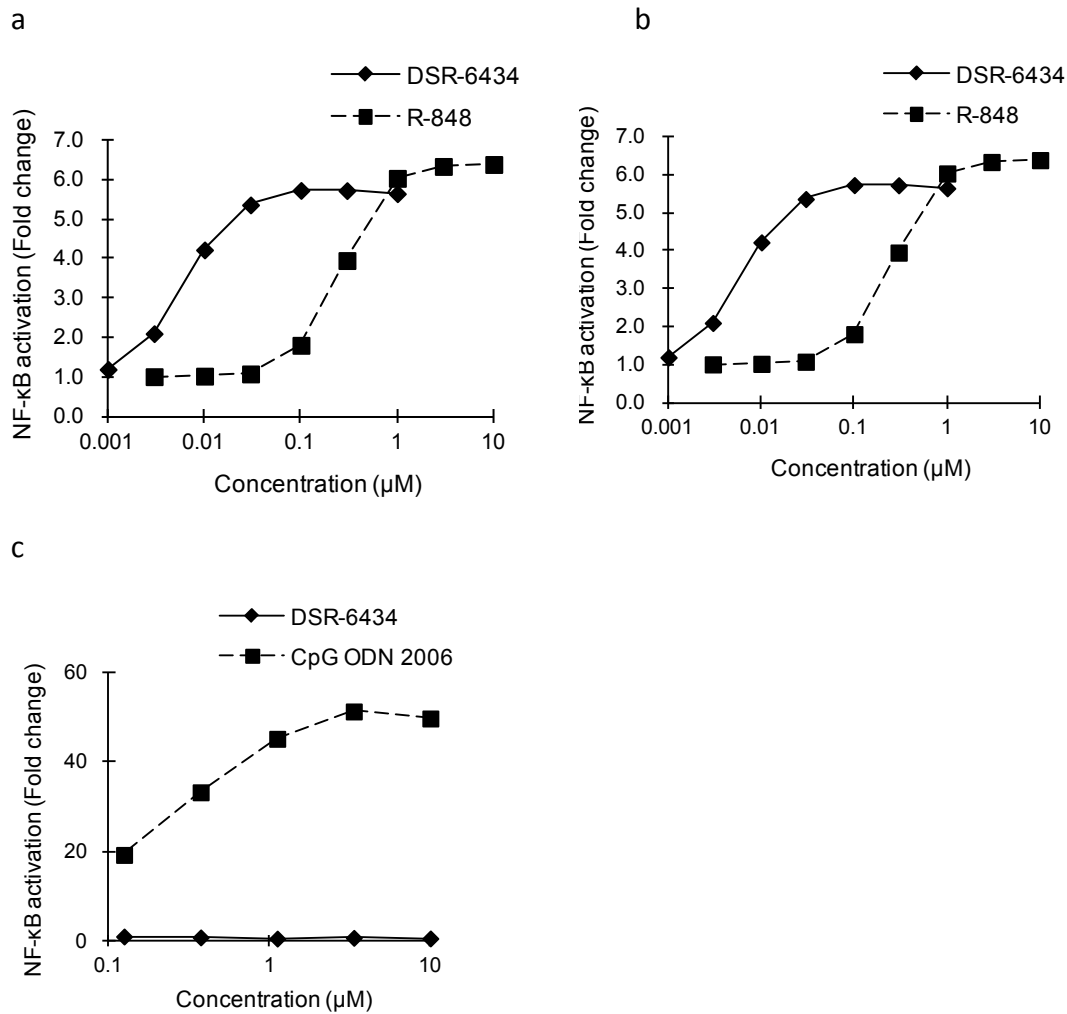


図 11. *In vitro* における DSR-6434 の TLR7 アゴニスト活性化および、選択性

- (a) ヒトTLR7(pUNO発現ベクター)とpNiFty2-SEAPレポータープラスミドを形質移入した HEK293細胞をDSR-6434または、R848で刺激し、NF-κBの活性化をSEAP活性により検出した。
- (b) ヒトTLR8(pCMV-script発現ベクター)とpNF-κB-Luc Cis-Reporterプラスミドを形質移入したHEK293細胞をDSR-6434または、R848で刺激し、NF-κBの活性化をルシフェラーゼの発光により検出した。
- (c) ヒトTLR9を発現する293XL-hTLR9A細胞にpNF-κB-Luc Cisレポータープラスミドを形質移入し、DSR-6434または、CpG ODN 2006で刺激し、NF-κBの活性化をルシフェラーゼの発光により検出した。

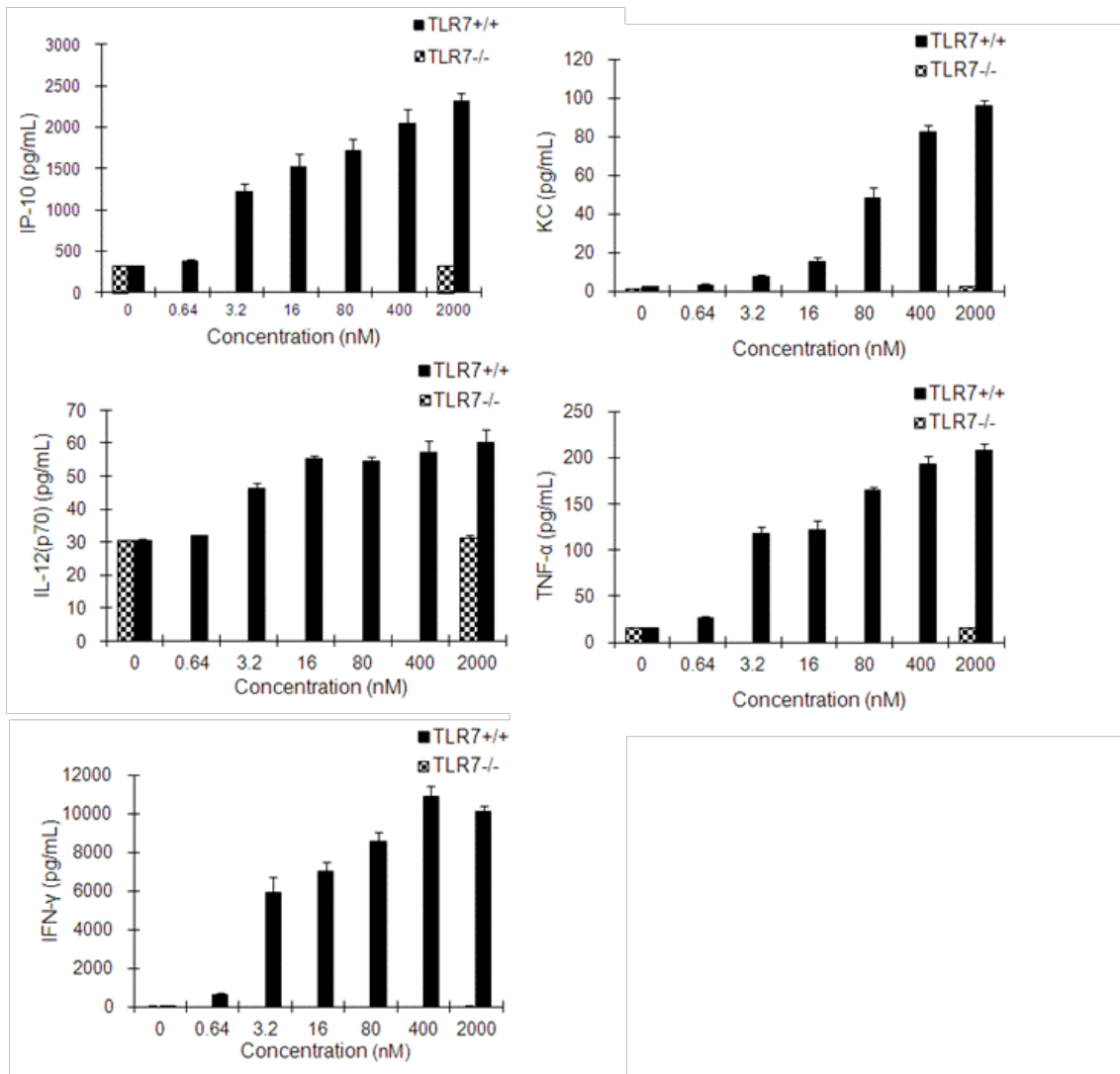


図 12. DSR-6434 刺激による脾臓細胞からのサイトカイン産生

Balb/c TLR7<sup>wt</sup> または、Balb/c TLR7<sup>-/-</sup> マウスより脾臓細胞を調製し、DSR-6434 で 24 時間刺激した。培養上清を回収し、サイトカイン・ケモカイン産生量を Milliplex アッセイ (Millipore) を用いて測定した。

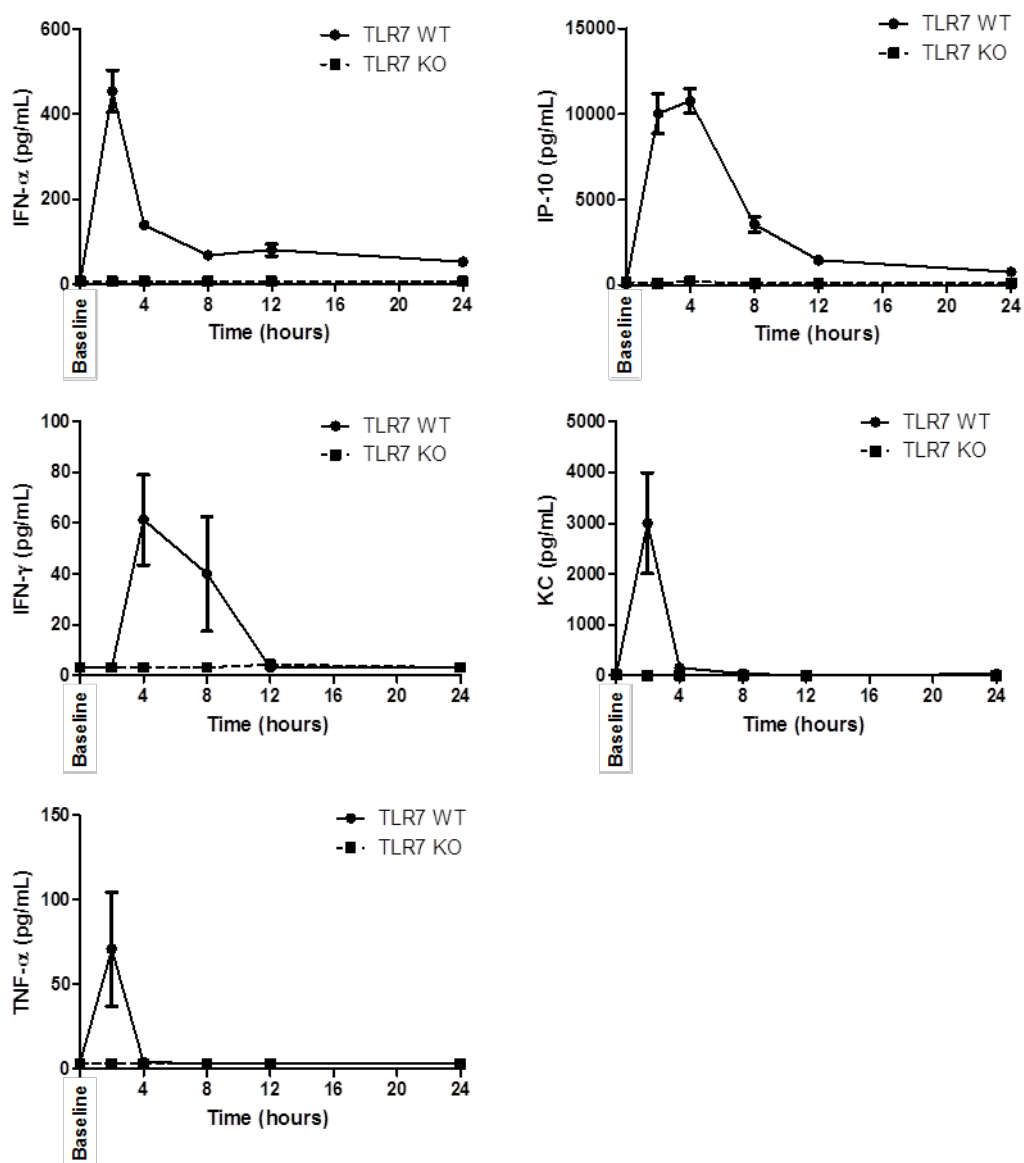


図 13. DSR-6434 静脈内投与によるサイトカイン産生

Balb/c TLR7<sup>wt</sup>または、Balb/c TLR7<sup>-/-</sup>マウスに DSR-6434 を 0.1 mg/kg 静脈内投与し、2、4、8、12、24 時間後に全採血し血漿を回収した(n=3)。IFN-α、サイトカインおよび、サイトカイン産生量は ELISA 法(PBL interferon)または、Milliplex Assay(Millipore)を用いて測定した。



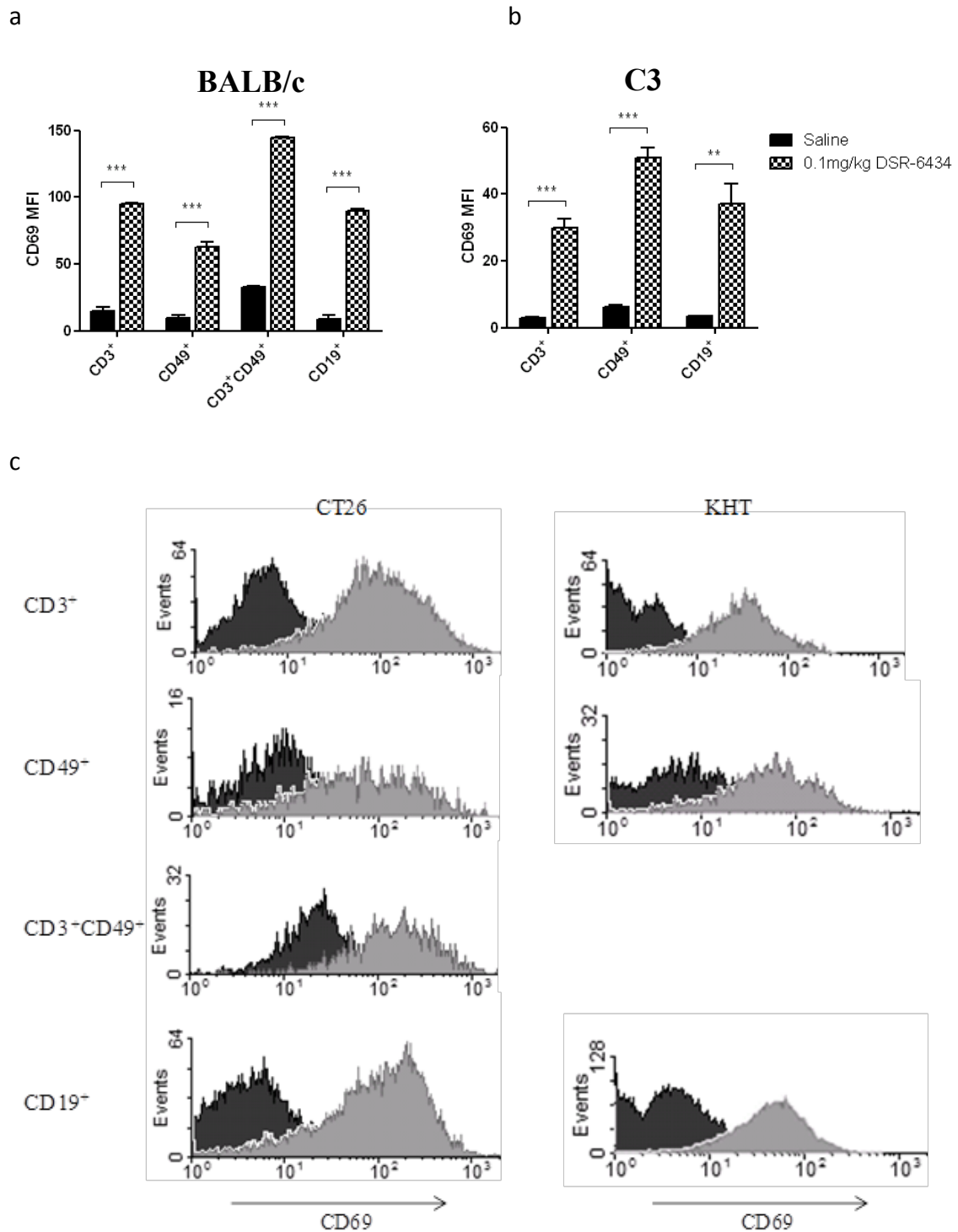


図 14. DSR-6434 静脈内投与による免疫細胞の活性化

CT-26 担癌 Balb/c マウス(a,c)または、KHT 担癌 C3H マウス(b,c)に DSR-6434 を静脈内投与し、4 時間後に安楽死させた(n=3)。脾臓細胞を調製し、表面マーカーの発現と CD69 発現を Flow cytometer により解析した。

### 2.1.1.3 考察

免疫アジュバントは、これまで持続的でブロードな免疫反応を活性化することから、がんの臨床試験が行われてきた。一方、選択的な TLR リガンドが効果的に免疫細胞を活性化することが近年明らかとなり、ブロードな免疫アジュバント療法に比べ有用であることが報告された<sup>42</sup>。本試験では、SM-276001 および、DSR-6434 が TLR7 依存的な NF- $\kappa$ B の活性化を誘導し、TLR7 選択的なアゴニストであることを明らかとした。さらに、DSR-6434 は TLR7<sup>-/-</sup>マウスを用いた検討において、サイトカイン産生および、各種免疫細胞の活性化を誘導せず、TLR7 に対し特異性が高いことを示した。またこのことは、DSR-6434 が直接的な TLR7 アゴニストであることを示唆している。

がん免疫療法では、がん抗原の提示と腫瘍をターゲットとした免疫反応の活性化が重要となる。一方、がんは免疫機構からの排除を回避するため、がん微小環境を形成し、あらゆる手段によって抗腫瘍免疫の活性化を抑制していることが知られている。がん免疫療法はこのがん微小環境を打破することができる<sup>43</sup>。TLR7 アゴニストは炎症性サイトカイン環境を作り出すことが報告されており、本研究結果においても SM-276001、DSR-6434 とともに、IL-1 $\beta$ 、IL-12、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IP-10、MIG 等の Th1 サイトカイン/ケモカインを誘導することを示した。これらのサイトカインは樹状細胞の活性化を誘導し、また NK 細胞の活性化や CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T 細胞のクローン性増殖や分化の誘導に重要な働きをする。著者らも同様に TLR7 アゴニストの全身投与が、NK、NKT、T および、B 細胞上に CD69 を発現することを確認し、免疫エフェクター細胞が活性化することを示した。さらに、MIG、IP-10、MCP-1(CCL2)、KC(CXCL1)などのケモカインは免疫エフェクター細胞の移動や輸送に必須の因子であり、TLR7 アゴニストによっ

て活性化した免疫エフェクター細胞を腫瘍組織へと移行するのに重要な働きを担っていると考えられる。

医薬品開発において薬物動態/薬力学作用(PK/PD)の関係を明らかにすることは、薬効を予測する上で重要である。SM-276001 の PK プロファイルを評価した結果、0.1 -10 mg/kg の投与量において線形成が認められた。さらに、0.1 mg/kg を経口投与した際の血中濃度は、TLR7 活性化に必要な最低有効濃度(MEC) 30 nM に達しておらず、十分な CD69 発現は認められなかった。一方、1、10 mg/kg を経口投与した際の血中濃度は、MEC をそれぞれ 2 時間、8 時間超えており、十分な CD69 の発現を誘導した。これらの結果より、SM-276001 の血中濃度が *in vitro* の最低有効濃度(MEC)を超えると、免疫細胞の活性化(PD レスポンス)が認められることが示された。この結果は、ヒトでの PK/PD レスポンスの予想に有効である可能性が考えられ、*in vitro* の検討結果からヒトの有効血中濃度を見積もることが可能であることが示唆された。

### 2.1.2 SM-276001 の抗腫瘍作用

*In vitro* および、*in vivo* の検討により、SM-276001 が免疫細胞を活性化することを示した。がん免疫療法剤の研究において、このような薬剤はがん細胞を直接殺傷する能力がないため、薬剤の抗腫瘍作用を *in vitro* の試験系で評価することは困難であり、*in vivo* モデルにて評価する必要がある。さらに、抗がん剤の薬効評価は一般的にヒトでの臨床効果をより正確に見積もるために、免疫不全マウスにヒトがん細胞を移植した異種移植モデル(Xenograft model)を用いて評価される。しかし、免疫療法剤の評価には免疫系が正常であるマウスを使用する必要があり、またマウスの免疫細胞はそもそも垂種のヒトがん細胞を拒絶することから、異種移植モデルは適当ではない。そのため、免疫療法剤の抗腫瘍作用は一般的にマウスがん細胞をマウスに移植する同種移植モデル(Syngeneic model)により評価される。そこで、マウス腎がん細胞株(Renca)および、マウス大腸がん細胞株(CT-26)を皮下に移植し作製した担癌マウスモデルを用いて SM-276001 の抗腫瘍作用を評価した。Renca 細胞は IFN- $\alpha$  感受性細胞であることが報告されており<sup>44</sup>、本モデルでは SM-276001 によって誘導される IFN- $\alpha$  の直接作用および、細胞性免疫による抗腫瘍作用が期待される。一方、CT-26 は IFN- $\alpha$  非感受性モデルであることから、細胞性免疫による抗腫瘍作用が期待される。

次に、マウス卵巣がん細胞株(OV2944-HM-1)を用いて作製したマウス自然転移モデルにより SM-276001 の転移抑制作用を評価した。HM-1 は転移細胞株として樹立され、皮下に腫瘍を形成するとリンパ節や肺へ高頻度に自然転移することから<sup>45</sup>、実験的転移モデルに比べ、臨床に近い転移モデル系であると考えられる。臨床において、転移に対する有効な治療法は確立しておらず、リンパ節や遠隔臓器への転移が認められると、多くの場合予後が悪く死に至ることから、転移

は最もアンメット・メディカル・ニーズの高い領域である。そこで、転移に対する作用を明らかにする目的で、**SM-276001** の全身投与と局所投与の異なる 2 つの投与ルートによる免疫活性化および、転移抑制作用の違いを比較した。

### 2.1.2.1 方法

#### 細胞

マウス腎がん細胞株(Renca)は岩手医科大学の藤岡知昭先生より恵与頂いた。本細胞は、10% FBS、2mM L-glutamine、100 U/mL Penicillin、100 U/mL Streptomycin を添加した RPMI-1640 培地により維持した。マウス大腸がん細胞株(CT-26)は ATCC (American Type Culture Collection) より購入し、10% FBS、2mM L-glutamine を添加した DMEM 培地で維持した。マウス卵巣がん株(OV2944-HM-1、以下 HM-1)は広島大学の丹羽太貫先生より恵与頂いた。本細胞は、10% FBS、2mM L-glutamine、100 U/mL Penicillin、100 U/mL Streptomycin を添加した  $\alpha$ -MEM 培地により維持した。

#### *In vitro* 細胞増殖アッセイ

96 well プレートに  $1 \times 10^3$  cells/well の Renca、CT-26、HM-1 をそれぞれ播種し、一晩 37 °C 、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。細胞が接着していることを確認し、2 nM-10  $\mu$ M の SM-276001 または、vehicle を添加し、さらに 2-5 日間培養した。細胞増殖は添付文書に従いアラマブルーアッセイにより評価した (Invitrogen)。

#### 動物

Balb/c マウスは Harlan, UK または、Charles river, Japan より購入し、B6C3F1 マウスは Charles river, Japan より購入した。マウスは Specific pathogen free(SPF) 下で飼育し、すべての動物実験は大日本住友製薬株式会社の実験動物取扱いまたは、UK Home Office Animal (Scientific Procedure) Act 1986 のガイドラインに従い実施し

た。

#### 皮下移植モデルの作製

Day0 に Balb/c マウスの腹部皮下に Renca または CT-26 をそれぞれ  $1 \times 10^5$  cells または、 $5 \times 10^4$  cells 移植した。SM-276001 は 10% DMSO/90%生理食塩水に懸濁し、3 mg/kg を経口投与した。Renca 移植モデルでは Day1 より、CT-26 移植モデルでは Day7 より投与を開始し、週 2 回、最大 7-5 回投与した。マウスは毎日観察し、腫瘍径および体重は週 2 回測定した。腫瘍容積は以下の計算式により算出した。

$$\text{腫瘍容積(mm}^3\text{)} = (\text{短径}^2 \times \text{長径}) / 2$$

全身性のサイトカイン産生を評価する目的で SM-276001 投与 2 時間後に採血し、血漿中のサイトカインを測定した。IFN の力価は細胞変性効果(CPE)バイオアッセイにより測定した。IL-12(p40)および、TNF- $\alpha$  は添付文書に従い ELISA 法により測定した(BioSource and genzymeTECHNE)。

#### 自然転移モデルの作製

B6C3F1マウスの背部皮下に $1 \times 10^6$  cellsのHM-1細胞を移植した(Day0)。移植10日後(Day10)にイソフルラン麻酔下で原発腫瘍を切除し、切開部をa-Cyanoacrylateで接着しクリップで縫合した。次の日より、SM-276001を3 mg/kg経口投与または、0.06 mg/head 気管内投与を開始し、週2回、最大3週間投与した。原発巣を切除してから25日後にマウスを安楽死させ、鼠蹊リンパ節、腋下リンパ節、上腕リンパ節、肺を摘出し転移を評価した(図19a)。リンパ節への転移はリンパ節重量をもとに、肺への転移は肺の結節数をもとに解析した。肺の結節数が100個

以上の場合は、 $>100$ とした。局所および全身性のサイトカイン産生は、SM-276001を投与し2時間後の気管支肺胞洗浄液(BALF)を回収または、血漿を回収し、IP-10、IL-12(p40)、TNF- $\alpha$ 、KC、MIG、MIP、IL-6、MCP-1を、Milliplexアッセイ(Millipore)を用いて測定した。

#### 統計解析

*In vivo* 試験の有意差検定は、Mann-Whitney 検定を用いて実施した。*In vitro* 試験の有意差検定は Student's untailed *t* 検定を用いて実施した。 $P<0.05$  を統計学的に有意であるとした。



### 2.1.2.2 結果

#### SM-276001 のマウスがん細胞株に対する直接作用

SM-276001 の抗腫瘍作用を評価するにあたり、使用するマウス腎がん細胞株 (Renca)、マウス大腸がん細胞株(CT-26)および、マウス卵巣がん細胞株(HM-1)に対する SM-276001 の直接作用を評価した。3 細胞株を SM-276001 存在下で 2-5 日間培養したが、最高濃度 10  $\mu$ M で処理した場合においても細胞の増殖抑制は認められず、SM-276001 はこれら 3 細胞株に対し直接的に細胞増殖抑制作用を示さなかった(図 15)。

#### SM-276001 の皮下移植モデルに対する抗腫瘍作用

マウス腎がん細胞株 Renca 移植モデルを用いて SM-276001 の抗腫瘍作用を評価した。SM-276001 を 3 mg/kg の投与量で週 2 回、計 7 回を経口投与したところ、SM-276001 はビークル群と比較して有意に腫瘍の増殖を抑制し、Renca モデルに対して抗腫瘍作用を示した(図 16a)。さらに、Renca を移植したマウスに、3 mg/kg SM-276001 を経口投与し、2 時間後の血漿中サイトカインを ELISA 法または、Milliplex アッセイにより測定した結果、Vehicle 群に比べ有意な IFN- $\alpha$ 、IL-12 p40、TNF- $\alpha$  の産生が認められた(図 16b)。

同様に、腫瘍の生着を認めた後に投与を開始したマウス大腸がん細胞株 CT-26 移植モデルにおいても、SM-276001 は有意な抗腫瘍作用を示した(図 16c)。さらに、両試験期間中、SM-276001 の投与によるマウスの有意な体重変化は認められず(図 17)、SM-276001 の経口投与は認容性が高く、Renca 移植モデルおよび、CT-26 移植モデルに対し有意に抗腫瘍作用を示すことが明らかとなった。

## SM-276001 の転移モデルに対する抗腫瘍作用

次に、HM-1自然転移モデルにてSM-276001の抗腫瘍作用を評価した。本モデルは背部皮下に形成させた原発腫瘍を除去し、その後リンパ節、肺への転移を評価するモデルであり、術後アジュバント療法を模倣したモデルに近いと考えられる。まず、本モデルを用いて、SM-276001の全身投与(経口投与; PO)および、局所投与(気管内投与; IT)によるサイトカイン誘導作用について比較した。原発腫瘍を除去後に図18aのスケジュールに従いSM-276001を経口投与または、気管内投与し、血漿中または、肺胞洗浄液(BALF)中のサイトカイン産生について評価した。気管内投与では、BALF中にTNF- $\alpha$ 、IL-6、KC、MIP-1の有意な産生が認められた(図18b)。一方、経口投与群ではBALF中に有意なTNF- $\alpha$ の産生を認めたが、気管内投与によって誘導されるTNF- $\alpha$ 産生量に比べ6.3倍低かった(図18b)。経口、気管内の両ルートで投与した場合においても、BALF中にIP-10、IL-12p40、MIG、MCP-1の発現は認められなかった。一方、経口投与および、気管内投与後の血漿中では、IP-10、IL-6、IL-12p40、KC、MIG、MCP-1の発現が認められた(図18c)。これらのサイトカイン発現量を投与ルート間で比較すると、経口投与群においてIP-10 (4.1倍)、IL-12p40 (7.5倍)、MIG (3.2倍)、MCP-1 (3.2倍)高いことが示された(図18c)。

次に、自然転移モデルを用いて、2つの投与ルートによる転移抑制作用を比較した。SM-276001の経口投与群はVehicle群と比較して肺への転移を完全に抑制した(図19b, c)、さらに鼠蹊(Inguinal)、腋下(Axillary)、上腕(Brachial)リンパ節への転移も有意に抑制した(図19d)。一方、SM-276001の気管内投与では肺への転移を有意に抑制し(図19b)、近傍の腋下リンパ節への転移も同様に有意に抑制した(図19e)。しかし、鼠蹊および上腕リンパ節への有意な転移抑制は認められなかった(図19e)。以上より、局所投与では投与部位近傍の免疫反応を活性化するとともに局所の転移抑制作用を誘導し、全身投与では、全身性の免疫反応を活性化し全身

の転移抑制作用を示した。肺転移に着目した場合、いずれの投与ルートにおいても転移抑制作用を示すことが明らかとなった。

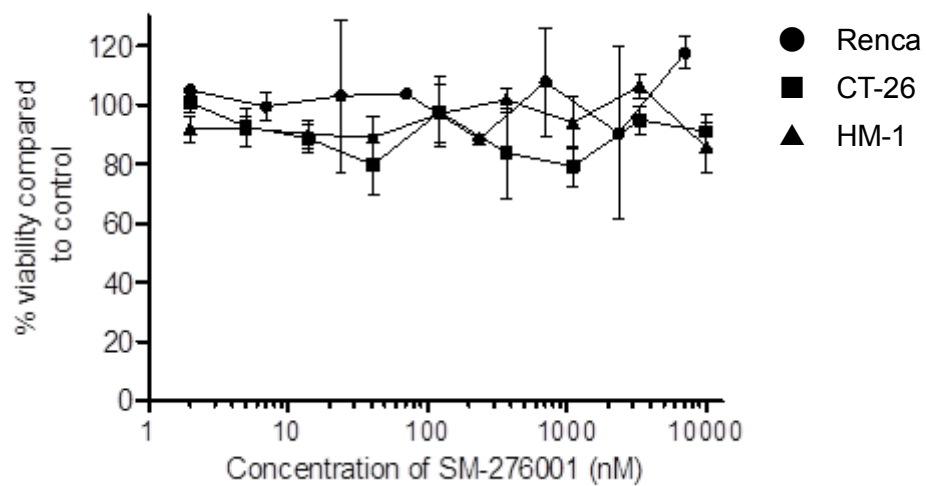
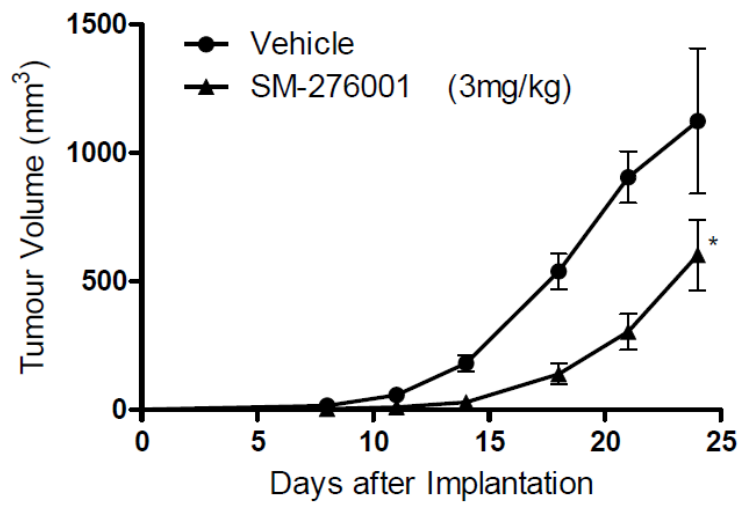


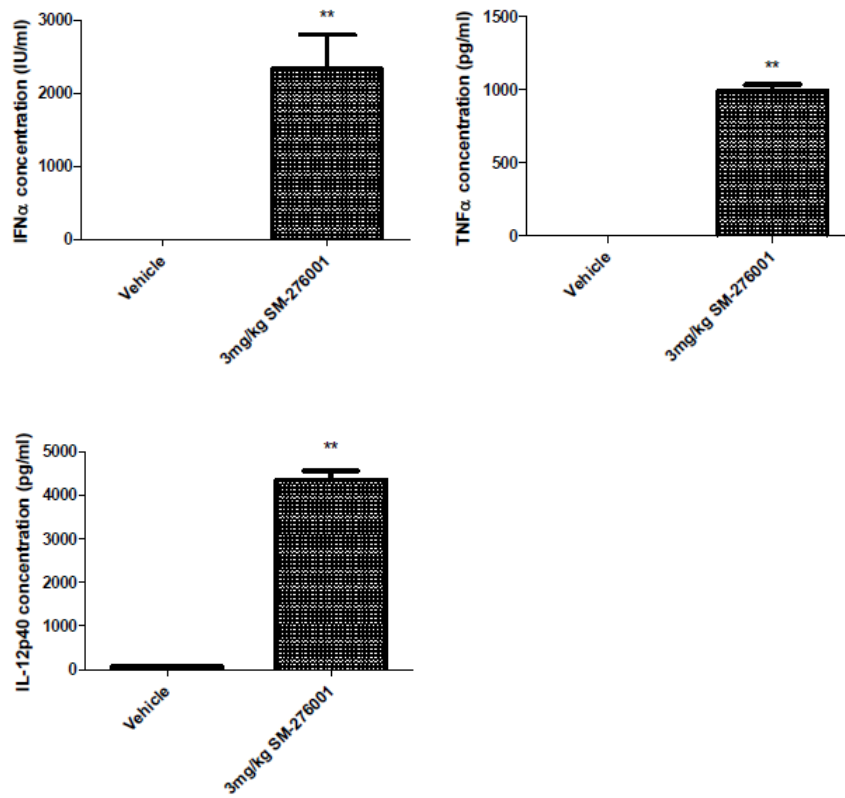
図 15. SM-276001 の各種がん細胞の増殖に対する影響

Renca、CT-26、HM-1 細胞を SM-276001 存在下にて 2-5 日間培養し、培養後の細胞の生存率をアラマブルーアッセイにて評価した。化合物非添加群の生存率を 100%とし、各添加群の生存率を算出した。

a



b



c

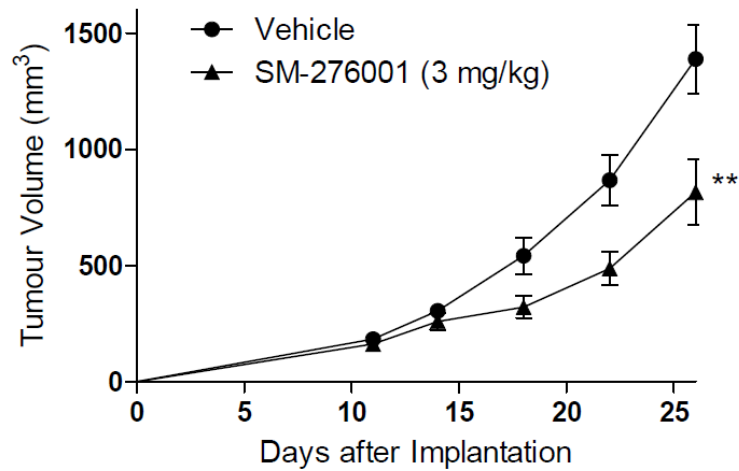
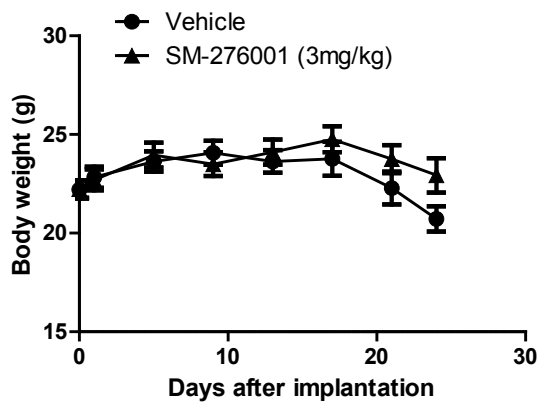


図 16. SM-276001 経口投与による抗腫瘍作用

- (a) マウス腎がん細胞株 Renca 細胞をマウスに皮下移植し、移植 1 日後より 3 mg/kg の SM-276001 または、Vehicle を週 2 回、最大 7 回、経口投与した。腫瘍径を週 2 回計測し、腫瘍容積を算出した。●; Vehicle 群(n=6)、▲; SM-276001 群(n=6)
- (b) Renca 移植マウスに SM-276001(n=3)または Vehicle(n=3)を経口投与し、投与 2 時間後に採血した。血漿中の IFN- $\alpha$  または、サイトカインをそれぞれ CPE バイオアッセイまたは、ELISA 法により測定した。
- (c) マウス大腸がん細胞株 CT-26 細胞をマウスに皮下移植し腫瘍を形成させた。移植 7 日目より、3 mg/kg の SM-276001 または、Vehicle を週 2 回、最大 5 回、経口投与した。腫瘍径を週 2 回計測し、腫瘍容積を算出した。●; Vehicle 群(n=6)、▲; SM-276001 群(n=6)

a



b

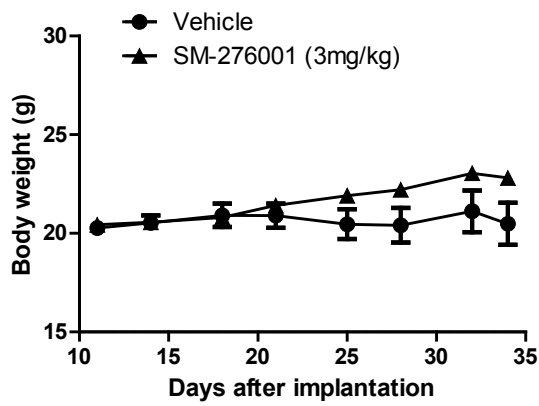
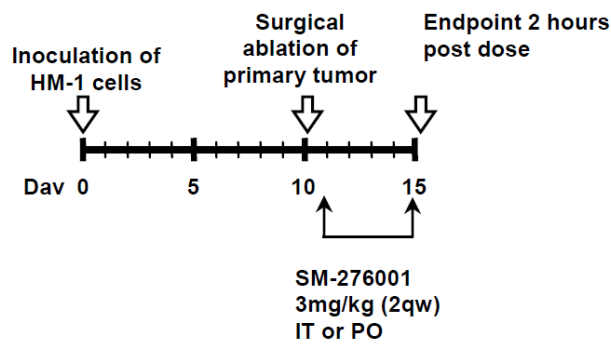


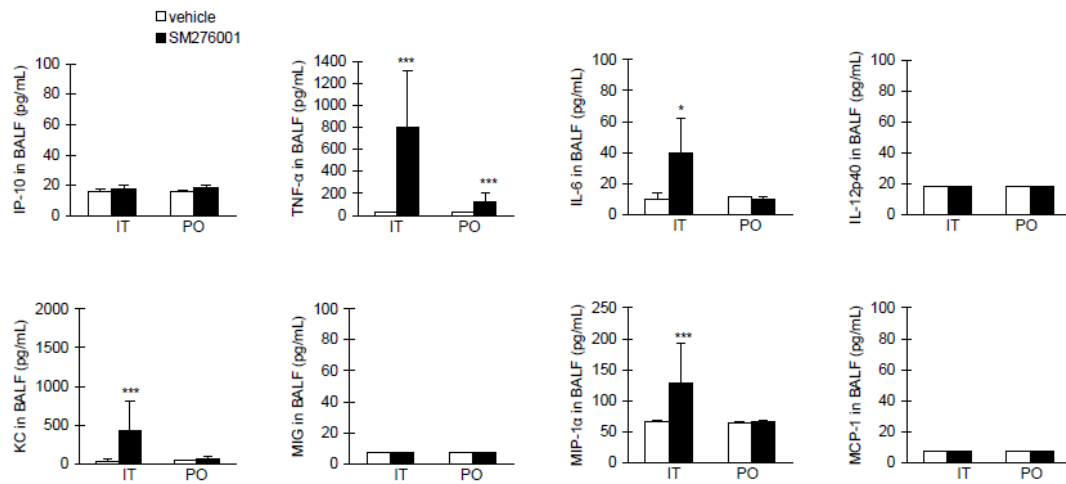
図 17. *In vivo* 試験中の体重変化

Renca モデル(a)、CT-26 モデル(b)の抗腫瘍試験中(図 16a,c)のマウスの体重変化を示した。マウスの体重は試験期間中、週 2 回計測した。●; Vehicle 群(n=6)、▲;SM-276001 群(n=6)

a



b



c

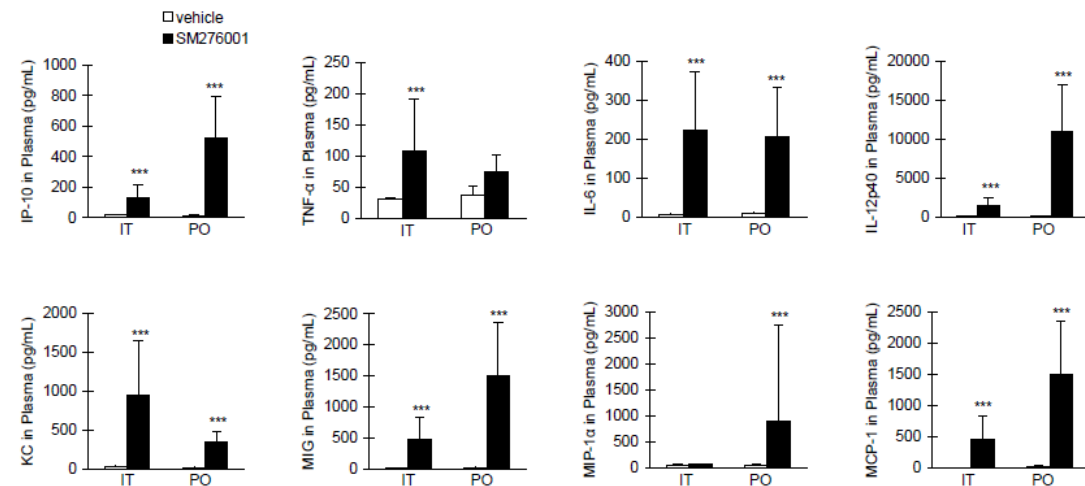


図 18. HM-1 自然転移モデルを用いた、SM-276001 の経口・気管内投与によるサイトカイン誘導の比較

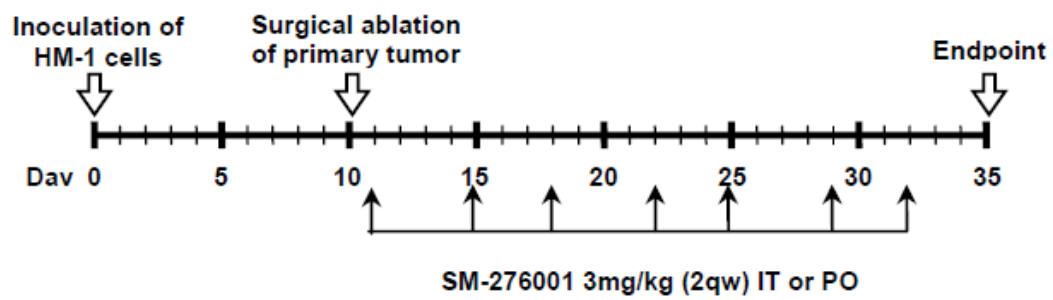
(a) 試験スケジュール; マウス卵巣がん細胞株 HM-1 をマウスの背部皮下に移植し



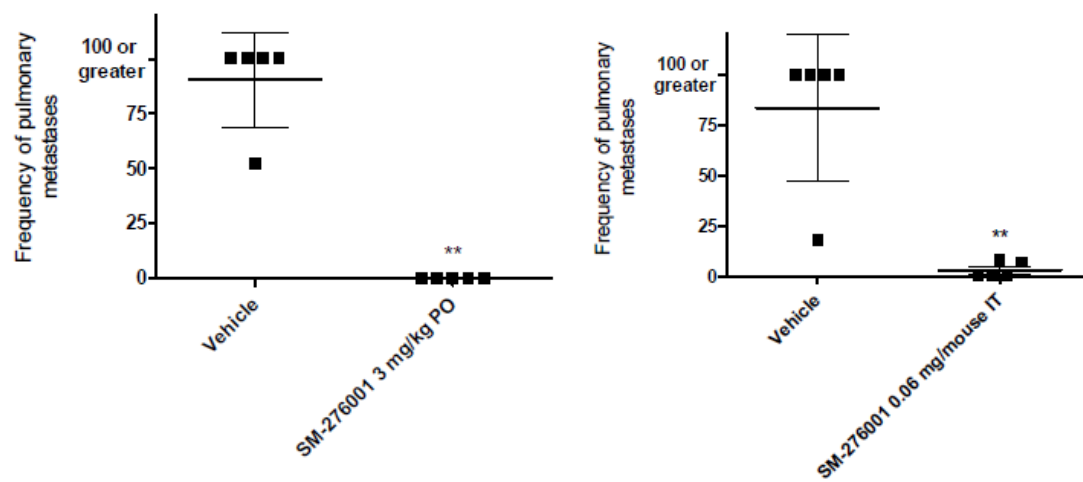
(Day0)、移植 10 日後に摘出した(Day10)。Day11 および、Day15 に SM-276001 を 3 mg/kg 経口投与(n=3)または 0.06 mg を気管内(n=3)に投与し、2 回目の投与 2 時間後に BALF の回収および採血を実施した

- (b) BALF 中サイトカインを Milliplex アッセイにより測定した。
- (c) 血漿中サイトカインを Milliplex アッセイにより測定した。

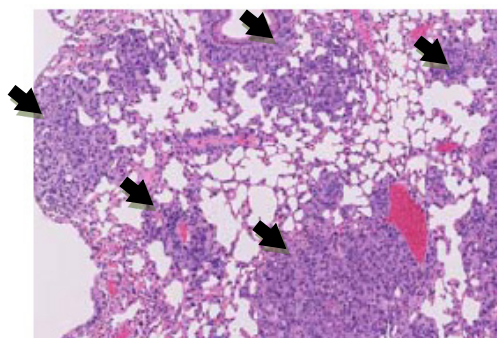
a



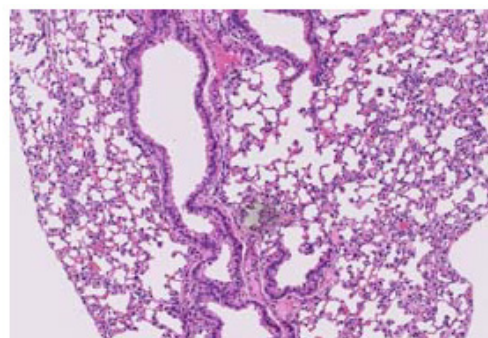
b



C

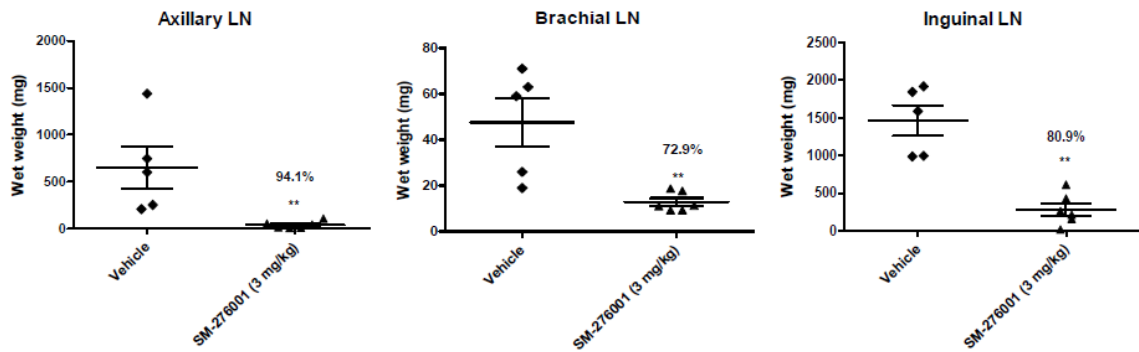


Vehicle



3mg/kg SM-276001 PO

d



e

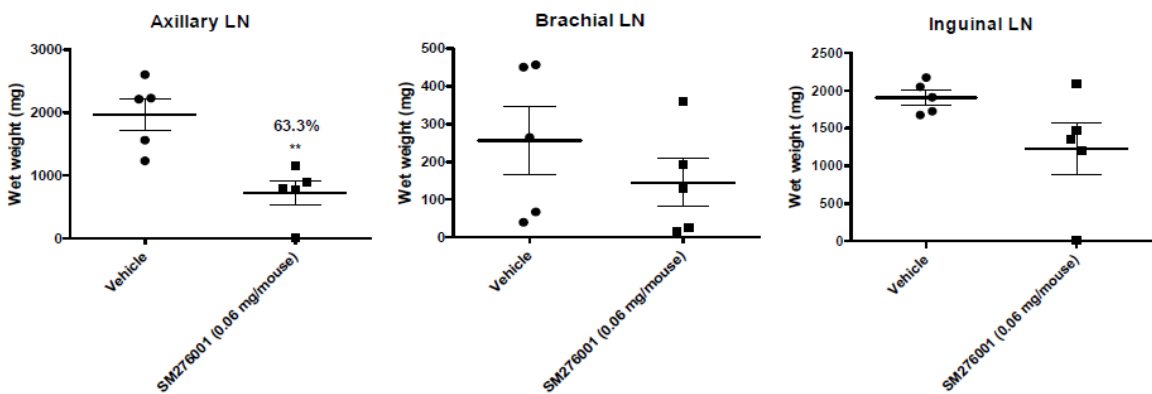


図 19. HM-1 自然転移モデルを用いた、SM-276001 の経口(PO)・気管内(IT)投与ルートによる抗腫瘍作用の比較

- 試験スケジュール; マウス卵巣がん細胞株 HM-1 をマウスの背部皮下に移植し (Day0)、移植 10 日後に摘出した (Day10)。Day11 より SM-276001 を 3 mg/kg 経口投与 (n=6) または 0.06 mg を気管内 (n=6) に週 2 回のスケジュールで最大 7 回投与した。最終日 (Day35) にマウスを安楽死させ、肺およびリンパ節を採取した。
- 最終日 (Day35) の肺の結節数を計測した。結節数が 100 以上のものは、>100 とした。
- Vehicle 群および、SM-276001 投与群の肺切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (H/E) 染色を行った。腫瘍部分を(→)で示した。
- Vehicle 群および、SM-276001 経口投与群の鼠蹊(Inguinal)、腋下(Axillary)、上腕(Brachial)リンパ節重量を測定し、リンパ節転移を評価した。
- Vehicle 群および、SM-276001 気管内投与群の鼠蹊、腋下、上腕リンパ節重量を測定し、リンパ節転移を評価した。

### 2.1.2.3 考察

Imiquimod の局所投与は一部の皮膚性悪性腫瘍に対する治療法として臨床で使用されている。Imiquimod の局所投与は全身性の T 細胞を活性化する報告があるものの、治療効果は投与部位に限定され、全身性の抗腫瘍作用は認められていない<sup>46</sup>。非臨床研究では、TLR7 アゴニストである SM-360320 の全身投与がマウス大腸がん(MC-28)を移植した遺伝子組み換えマウス(がん抗原に対する免疫反応を有するマウス)に対し、抗腫瘍作用を示すことが報告された<sup>47</sup>。さらに、TLR7 アゴニスト(ANA773;プロドラッグ TLR7 アゴニスト)の経口投与は C 型肝炎ウイルス治療として非臨床・臨床研究が実施されている<sup>48,49</sup>。このように、TLR7 アゴニストの全身投与は各種疾患に有効であることが期待されている。そこで、本研究では、SM-276001 の経口投与(全身投与)による抗腫瘍作用と気管内投与(局所投与)による抗腫瘍作用を比較した。

マウス腎がん細胞株(Renca)皮下移植モデルおよび、マウス大腸がん細胞株(CT-26)皮下移植モデルを用いた抗腫瘍作用の検討において、SM-276001 の全身投与は有意な抗腫瘍作用を示した(図 16)。SM-276001 は Renca、CT-26 細胞株に対して直接的に腫瘍増殖抑制作用を示さないことから、*in vivo* モデルにおける腫瘍縮小効果は免疫系を介した作用であると考えられる。これまでの研究において、腎細胞がん(RCC)は IFN- $\alpha$  に感受性が高いことが報告されており<sup>50</sup>、臨床においても recombinant human IFN- $\alpha$  治療は転移性の RCC 治療に使用とされてきた<sup>51</sup>。また、IL-2 サイトカイン療法も RCC 治療法として有用であることが報告されている<sup>52</sup>。本研究において、SM-276001 は、IFN- $\alpha$  産生に加え Th1 サイトカインである IL-12、IFN- $\gamma$  等を誘導することを示した。以上のことから、各種 Th1 サイトカインを誘導する TLR7 治療は、各サイトカイン療法と比べ、転移性の RCC 治療に有

用であることが期待される。

CT-26 細胞は Renca 細胞とは異なり IFN- $\alpha$  非感受性であるが、SM-276001 投与による腫瘍増殖を有意に抑制した(図 16c)。これまでの研究において、TLR7 アゴニストの腫瘍中投与や局所投与では NK 細胞の活性化、樹状細胞(DC)の活性化、活性化 DC による抗腫瘍活性を有する CD8<sup>+</sup> T 細胞の活性化など、複数の免疫細胞集団を活性化することが報告されている<sup>46,53</sup>。SM-276001 の全身投与では Th1 サイトカインの産生に加えて、細胞性免疫を介した抗腫瘍作用を誘導することが示唆された。

SM-276001 の経口投与と気管内投与によるサイトカイン産生を比較すると、SM-276001 の気管内投与では BALF 中に TNF- $\alpha$ 、IL-6、KC、MIP-1 $\alpha$  を誘導した。一方、SM-276001 経口投与では、BALF 中に TNF- $\alpha$  のみ誘導され、その発現量は気管内投与後のそれと比べ 6.3 倍低い値であった。全身性のサイトカイン誘導について比較すると、気管内投与では有意に IL-12 を誘導するが、その産生量は経口投与に比べ 7.5 倍低く、同様に IP-10 についても 4.1 倍低かった。2 つの投与ルートによる転移抑制作用を比較すると、興味深いことに、気管内投与および経口投与のいずれの投与ルートにおいても肺への転移を有意に抑制したが、経口投与のみが鼠蹊・腋下・上腕リンパ節への転移を抑制した(図 19)。実験的喘息モデルに R848 を鼻腔投与すると、肺局所で Type I IFN の発現が誘導され、自然免疫系の細胞や CD8<sup>+</sup> T 細胞の肺への浸潤が報告されている<sup>54</sup>。また、他の報告では、TLR9 選択的アゴニストである IMO-2055 (Idera Pharmaceuticals)の皮下投与と鼻腔投与の抗腫瘍作用の比較では、いずれの投与ルートにおいても実験的肺転移モデルにおける肺転移を抑制した<sup>55</sup>。その際、TLR9 アゴニストの鼻腔投与では肺中に IL-12 発現を誘導することが示されたが、全身性の発現については明らかではない。以上の報告を踏まえると、肺をターゲットとした局所の TLR 治療

では、肺局所の抗腫瘍免疫は活性化できるものの、全身性の抗腫瘍免疫の活性化には限界があると考えられる。一方、SM-276001の全身投与では、全身の抗腫瘍免疫を活性化することから、広い範囲への転移を抑制することが出来た可能性が考えられる。SM-276001は全身(経口)、局所(気管内)投与の両投与ルートが、原発摘出後の肺転移を有意に抑制することから、術後アジュバント治療として応用できることが期待された。しかし、投与ルートにより免疫の活性化部位が異なることから、治療に応用する際は十分に考慮する必要があると考えられる。

### 2.1.3 DSR-6434 の全身投与と放射線治療(IR 治療)との併用

臨床においてがんの治療は多剤併用による治療が一般的であり、複数の薬剤や治療法を組み合わせた治療が行われている。そのため、免疫療法においてもがんの完治を目指すべく、抗腫瘍効果を増強するための併用剤が求められる。非臨床研究では、化学療法剤や放射線治療、冷凍アブレーション治療等が、がんの免疫原性を亢進し、これらの治療と免疫療法を併用することで抗腫瘍作用が増強することが報告されている<sup>37,56,57</sup>。そこで、著者らは DSR-6434 と IR 治療を併用することで、抗腫瘍効果を増強することが可能であるか検討した。局所の IR 治療はホストの免疫を低下させることなく免疫原性の高い細胞死を誘導することが報告されている。また、TLR7 は樹状細胞(pDC)の成熟化を誘導するが、その際 IR 照射を受けネクロシスしたがん細胞が存在すると、樹状細胞は死んだがん細胞を貪食し、効率的にがん抗原を提示しがん抗原特異的 T 細胞を誘導することが期待される。また、免疫細胞は炎症部位へ集積することから、IR 照射によって腫瘍局所に炎症が生じ、免疫細胞がより腫瘍部位に浸潤することも期待される。

マウス大腸がん細胞株(CT-26)は内在性レトロウィルスの遺伝子産物である gp70 由来の H2-Ld 拘束性エピトープである AH-1 を発現している<sup>58</sup>。そのため、マウス大腸がん細胞株 CT-26 は免疫原性が高く、このペプチドに対するがん抗原特異的 T 細胞(CTL)を誘導し易いことが示唆される。そこで、CT-26 移植モデルを用いて DSR-6434 全身投与と IR 治療の併用を評価した。また、DSR-6434/IR 併用によるメモリーCTLの誘導能を評価すると共に、そのメモリーCTLが AH-1 ペプチドに反応する細胞であるか評価した。

KHT 細胞はがん抗原が特定されておらず、CT-26 と比較して免疫原性の低い

ん細胞である。そこで、この細胞を用いて DSR-6434 と IR 治療の併用効果を評価した。KHT は HM-1 同様に皮下移植した原発腫瘍から肺へ自然転移し、腫瘍結節を形成する<sup>59</sup>。IR 治療は KHT を免疫原性の高い細胞死へと誘導し、その際 DSR-6434 による免疫反応の活性化を伴うことで、効率的にがん抗原特異的免疫反応を惹起できることが期待される。本モデルにおいても、DSR-6434 と IR 治療の併用による抗腫瘍作用および、転移抑制作用について評価した。



### 2.1.3.1 方法

#### 細胞

マウス大腸がん細胞株(CT-26)は ATCC (American Type Culture Collection)より購入し、10% FBS、2mM L-glutamine を添加した DMEM 培地で維持した。マウス肉腫細胞株(KHT)は、10% (v/v) FBS、1% (v/v) L-glutamine を添加した RPMI-1640 培地で維持した<sup>59</sup>。

#### 動物

C3H マウスはマンチェスター大学にて繁殖し、Balb/c マウスは Harlan, UK、より購入し Specific pathogen free(SPF)下で飼育した。すべての動物実験は UK Home Office Animal (Scientific Procedure) Act 1986 または、The University of Manchester Ethics Committee のガイドラインに従い実施した。

#### クローン形成法

CT-26 または KHT 細胞  $1 \times 10^2$ - $2.4 \times 10^3$  cells/well をプレートに播種した。24 時間後に、0-5  $\mu$ M の DSR-6434 で処理し、2 時間後に 4 Gy の放射線を照射した。DSR-6434 を添加後、24 時間後に培地を交換し、7 日後または、コントロールウェルでコロニー数が 50 個程度認められるまで培養した。コロニーを 0.5% (w/v)メンチレンブルー染色液で染め、コロニー数をカウントした。

#### 細胞増殖アッセイ

CT-26 または、KHT 細胞  $1 \times 10^3$ - $1.5 \times 10^3$  cells/well をプレートにそれぞれ播種した。

次の日に、0-20 ng/mL の IFN- $\alpha$  で細胞を処理し 24 時間または、48 時間後に培地交換を行った。72 時間後に 5 mg/mL の MTT 溶液を 50  $\mu$ L 加え、4 時間後に培地を DMSO に交換し 540 nm の吸収を  $\mu$ Quant Microplate Spectrophotometer(Bio Tek, UK)にて測定した。

#### 担癌モデルの作製

マウス大腸がん細胞株(CT-26)は Balb/c マウスの腹部皮下に  $1 \times 10^5$  cells を移植し、マウス肉腫細胞株 (KHT) は C3H マウスの背部皮下に  $5 \times 10^5$  cells を移植した。腫瘍はノギスで計測し、腫瘍容積は以下の計算式により算出した。

$$\text{腫瘍容積(mm}^3\text{)} = \text{長径} \times \text{短径} \times \text{深さ}$$

腫瘍容積が 180-220 mm<sup>3</sup> となったところで、群分けを実施し Saline 群(コントロール)、DSR-6434 群、IR 治療群(IR; ionized radiation)または、DSR-6434/IR 併用群とし、治療を開始した。DSR-6434 は IR 治療の 4 時間前に尾静脈内投与し、週 1 回、計 4 回を投与した。実験のエンドポイントは腫瘍容積が治療開始時の 4 倍に増大した時点とし (RTV4; tumor volume to quadruple)、腫瘍が RTV4 に達したマウスは人道的エンドポイントにより安楽死した。KHT または、CT-26 担癌マウスへの IR 治療は、25Gy $\times$ 1 回 (KHT)、15Gy $\times$ 1 回(KHT)または、2Gy $\times$ 5 日(CT-26)を実施し、無麻酔下でマウスを保定し腫瘍局所に 200 kV X-rays 放射線装置(MXR-320/36 X-ray tube, comet AG, Switzerland)を用いて照射した。90 日以上腫瘍を拒絶し続けたマウスは、長期生存マウス(LTS; Long-term survivors)とした。

#### 細胞内 IFN- $\gamma$ 産生の解析

LTS マウスまたは、コントロールマウス(同週齢、非担癌)より調製した脾臓細胞( $3.5 \times 10^6$ /well)を RPMI-1640 培地(10% FBS、100U/mL ペニシリン、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン、1% L-glutamine、50  $\mu$ M 2-ME、10 IU/mL rh IL-2) で懸濁し、50Gy で放射線処理した CT-26 細胞( $1 \times 10^6$  cells)、1  $\mu$ M AH-1 ペプチド(SPSYVYHGF; Anaspe, UK)または、1  $\mu$ M コントロールペプチド(SIINFEKL; Anaspe, UK)と 5 日間 共培養した。その後、1  $\mu$ L/mL Brefeldin A(BD Pharmingen, UK)と 100 IU/mL rh IL-2 (Chiron, NL) 存在下で、上記のいずれかの脾臓細胞と 50Gy の放射線で処理した CT-26 細胞を 1:1 で混合し 16 時間共培養した。脾臓細胞を FITC-anti-CD8 $\alpha$  抗体で標識し、その後固定化および、細胞膜を透過させ細胞内の IFN- $\gamma$  を APC-anti-IFN- $\gamma$  抗体で標識し、Flow Cytometer を用いて解析した。

#### 肺転移評価

KHT を皮下に移植したマウスより肺を採取し固定化したのちに、転移の程度を Lunt らによって報告された手法を用いて 0-5 にスコア化した<sup>58,59</sup>。具体的には以下の要領で、独立した 2 名の研究員によってスコア化した。

グレード 0; 明らかな転移が認められない

グレード 1; 1mm<sup>3</sup> 以下の病変が 1 つ

グレード 2; 肺転移が肺表面の 10-20%

グレード 3; 肺転移が肺表面の 20-40%

グレード 4; 肺転移が肺表面の 40-80%

グレード 5; 肺転移が肺表面の>80%

DSR-6434/15Gy IR 併用群は腫瘍が RTV4 に達した時点で、安楽死させ転移をス

コア化した。25GyIR 群は、併用群(DSR-6434/15Gy IR)と同日に安楽死し転移をスコア化した。

#### 統計解析

*In vivo* 試験の有意差検定は Mann-Whitney 検定を用いて実施した。*In vitro*、*ex vivo* 試験は Student's two-tailed *t* 検定を用いて実施した。*In vivo* での生存曲線の比較は Kaplan-Meier plots を用いて、Log-Rank Mantel Cox 検定にて実施した。 $P < 0.05$  を統計学的に有意であるとした。

### 2.1.3.2 結果

#### CT-26 および、KHT 細胞株に対する DSR-6434 の直接作用

マウス大腸がん細胞株 CT-26 および、マウス肉腫細胞株 KHT に対する DSR-6434 の直接作用を、コロニー形成法を用いて評価した。*In vitro* において両細胞株を DSR-6434 (5 nM-5  $\mu$ M) で処理したところ、放射線照射との併用に関わらず、DSR-6434 による細胞増殖抑制作用は認められなかった(図 20a,b)。IFN- $\alpha$  は一部のがん細胞に対して直接作用を示すことが報告されていることから、CT-26 および KHT 細胞株の IFN- $\alpha$  感受性について評価した。その結果、IFN- $\alpha$  処理による細胞障害性は認められず(図 20c)、DSR-6434 および、IFN- $\alpha$  はこれらの細胞株に対して直接作用がないことが示された。

#### 大腸がんモデルにおける DSR-6434 と IR 治療の併用効果

DSR-6434 および、DSR-6434/IR 併用による抗腫瘍作用を CT-26 移植マウスにて評価した。DSR-6434 は 0.1 mg/kg を週 1 回静脈内投与し、IR 治療は 2Gy/日 $\times$ 5 日 (10Gy) のレジメンで照射した。併用群はそれぞれ上記のレジメンで DSR-6434 と IR 治療を併用した。0.1 mg/kg の DSR-6434 全身投与は認容性が高く、全身投与による状態悪化や体重減少は認められなかった(図 21c)。DSR-6434 群は、Saline 群と比較して有意な腫瘍縮小効果が認められ(517.9 $\pm$ 45.8 mm<sup>3</sup>, 736.7 $\pm$ 70 mm<sup>3</sup>) (図 21a)、また、RTV4 に達する期間にわずかな延長が認められた (RTV4= 9.55 $\pm$ 1.3(DSR-6434) vs 6 $\pm$ 0.42(Saline),  $P$ < 0.001)(図 21b, d)。5 $\times$ 2Gy IR 群では、Saline 群と比較して RTV4 に達する期間が 17.9 $\pm$ 3.8 日延長した(IR RTV4 23.9 $\pm$ 3.8 日,  $P$ <0.001)(図 21b, d)。DSR-6434/IR 併用群では、55% (12/22) のマウスで腫瘍の完全

退縮が認められ、これらのマウスはその後 90 日間経っても腫瘍の再発は認められなかった。また、併用群のうち腫瘍を退縮しなかったマウスのみの RTV4 に達する期間の平均は、5×2Gy IR 群と比較して  $16 \pm 3.4$  日延長した(DSR-6434/IR 併用 RTV4;  $40.7 \pm 3.4$  日,  $P < 0.001$ ) (図 21b, d)。これらの結果より、DSR-6434 と IR 治療の併用は、それぞれの単剤と比べ相乗的な作用がある可能性が示唆された。腫瘍組織の免疫組織染色(IHC)の結果、IR 群および、DSR-6434/IR 併用群は、ビークル群に比べ有意な CD8<sup>+</sup> T 細胞の浸潤が認められたが( $P < 0.05$ , 図 21e, f)、5×2Gy IR 群と DSR-6434/IR 群の比較では、両群に統計学的有意差は認められなかった。

#### DSR-6434 と IR 治療併用によるがん抗原特異的メモリーT細胞の誘導

前述の通り、DSR-6434/IR 併用群では 55%(12/22)のマウスが腫瘍を拒絶し、長期生存した。この長期生存(LTS)マウスにおいて免疫メモリー細胞が誘導されているか検討した。LTS マウスより調製した CD8<sup>+</sup> T 細胞と放射線処理した CT-26 細胞を共培養し、CD8<sup>+</sup> T 細胞の IFN- $\gamma$  発現を解析した。その結果、コントロールマウス(同週齢・非担癌)と比較して LTS マウスでは IFN- $\gamma$  を産生する CD8<sup>+</sup> T 細胞の割合が有意に増加した ( $18.1 \pm 2\%$  (LTS) vs  $0.8 \pm 0.1\%$  (コントロール),  $P < 0.001$ ) (図 22a)。次に、この免疫反応が AH-1 拘束性の反応であるかを評価するために、脾臓細胞を AH-1 ペプチドまたは、コントロールペプチド存在下で 5 日間培養し、その後放射線処理した CT-26 細胞と 16 時間共培養した。AH-1 ペプチドで活性化した LTS マウスの脾臓細胞は、有意に IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞の割合が増加した( $19.9 \pm 3.7\%$  (LTS) vs  $1.3 \pm 0.1\%$  (コントロール),  $P < 0.001$ ) (図 22b)。一方、コントロールペプチドを用いた評価では、LTS マウス、コントロールマウスともに IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞の割合に差は認められず、コントロールペプチドに対する免疫反応は認められなかった( $3.7 \pm 1.1\%$  (LTS) vs  $1.1 \pm 0.1\%$  (コントロール),  $P > 0.05$ ) (図 22c)。以上の結果より、

LTS マウスは CT-26 のがん抗原に対する CD8<sup>+</sup>メモリーT 細胞を誘導していることが示唆され、また、AH-1 ペプチドを認識する CD8<sup>+</sup>メモリーT 細胞が存在していることが示された。このことから、DSR-6434 と IR 治療の併用では、がん抗原特異的な免疫メモリー反応を長期間維持できる可能性が示された。

#### DSR-6434 と局所放射線治療併用による肺転移抑制および、生存期間の延長

次に、DSR-6434 の抗腫瘍効果を免疫原性の低い KHT 肉腫転移モデルで評価した<sup>60</sup>。DSR-6434 群は Saline 群と比較して、腫瘍縮小効果および生存の延長は認められず、両群の平均 RTV4 期間は 4.7 日であった(図 23d)。15Gy IR 群では有意な抗腫瘍作用が認められ、Saline 群に比べ RTV4 を  $11.7 \pm 0.7$  日延長した ( $P < 0.001$ , 図 23d)。一方、DSR-6434 を IR 治療に併用すると、投与開始 3 日目より抗腫瘍作用が認められ、その時点の腫瘍容積はそれぞれ  $485.7 \pm 41.8 \text{ mm}^3$  (15Gy IR) vs  $340.8 \pm 17.3 \text{ mm}^3$  (DSR-6434/15Gy IR 併用)と有意な差を認めた( $P < 0.05$ , 図 23a)。15Gy IR 群は、放射線照射 14 日後に RTV4 に達し、その時の腫瘍容積は  $555.1 \pm 86.4 \text{ mm}^3$  であった。一方、治療開始 14 日後の DSR-6434/15Gy IR 併用群の腫瘍容積は  $196.2 \pm 41.8 \text{ mm}^3$  となり、15Gy IR 群と比較して有意な腫瘍縮小効果を示した ( $P < 0.01$ , 図 23a)。DSR-6434 は IR 治療による KHT 腫瘍増殖抑制効果を高め、併用群の RTV4 は  $23.9 \pm 1.5$  日となり、15Gy IR 群に比べ 7.5 日延長した( $P < 0.001$ , 図 23d)。DSR-6434 と IR 治療の併用は、それぞれの治療に比べ有意に生存を延長した ( $P < 0.001$ , 図 23b, d)。

KHT 肉腫モデルは自然肺転移の評価系としても有用なモデルである<sup>59</sup>。そこで、本モデルを用いて DSR-6434/IR 併用の転移抑制作用を評価した。抗腫瘍作用の評価に用いた 15Gy の IR 治療は抗腫瘍作用が弱く生存期間が短いため対照群として適当ではない。そこで、原発腫瘍の増殖をコントロールし十分な生存期間(20-24

日間)を確保するため、対照群には 25Gy の IR 治療を実施した。DSR-6434/15Gy IR 併用群および、25Gy IR 群の肺をマウスより摘出し、肺転移をその程度により 0-5 にスコア化した。25Gy IR 群および、DSR-6434/15Gy IR 併用群の転移スコアはそれぞれ  $4\pm0.5$  および、 $1.2\pm0.2$  となり、DSR-6434/15Gy IR 併用群で有意に肺転移を抑制した。( $P < 0.01$ , 図 23e)



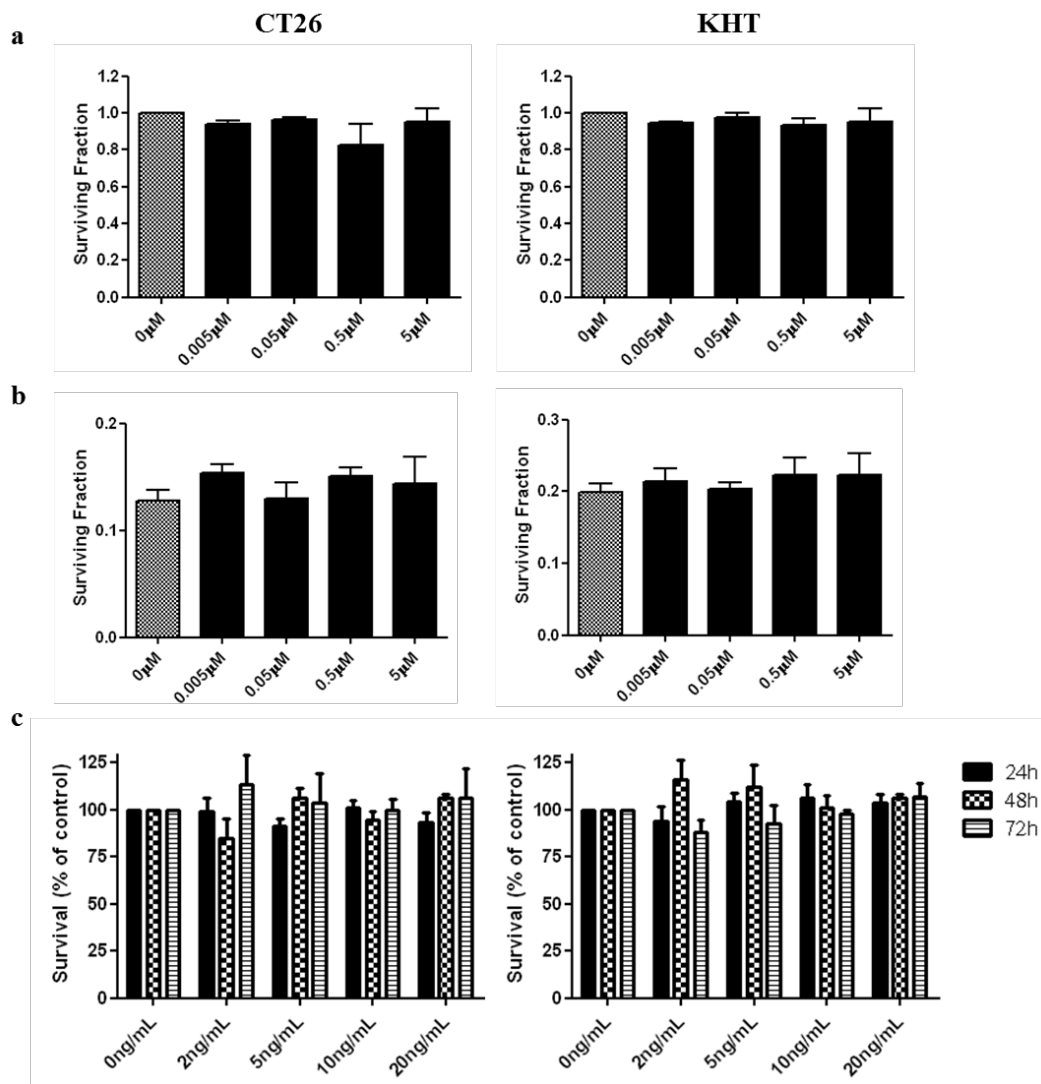
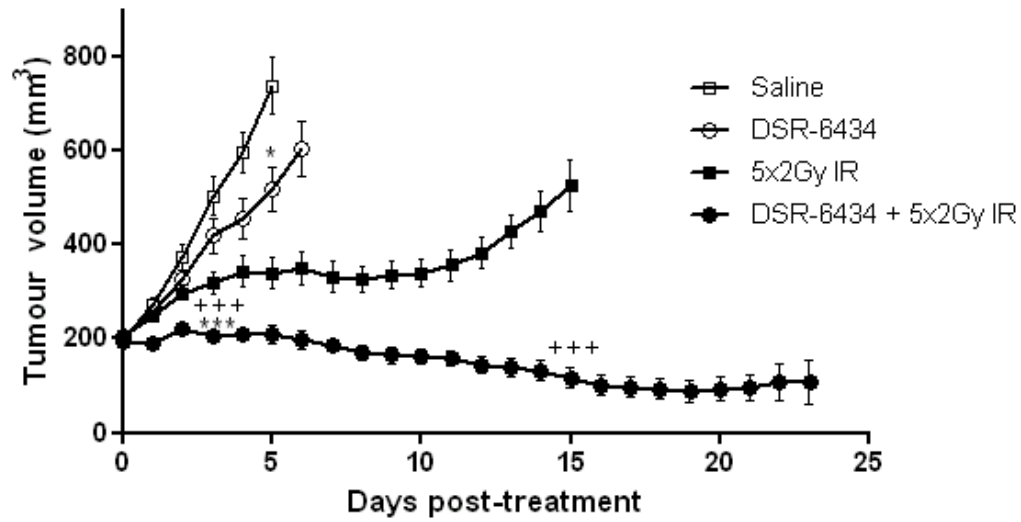


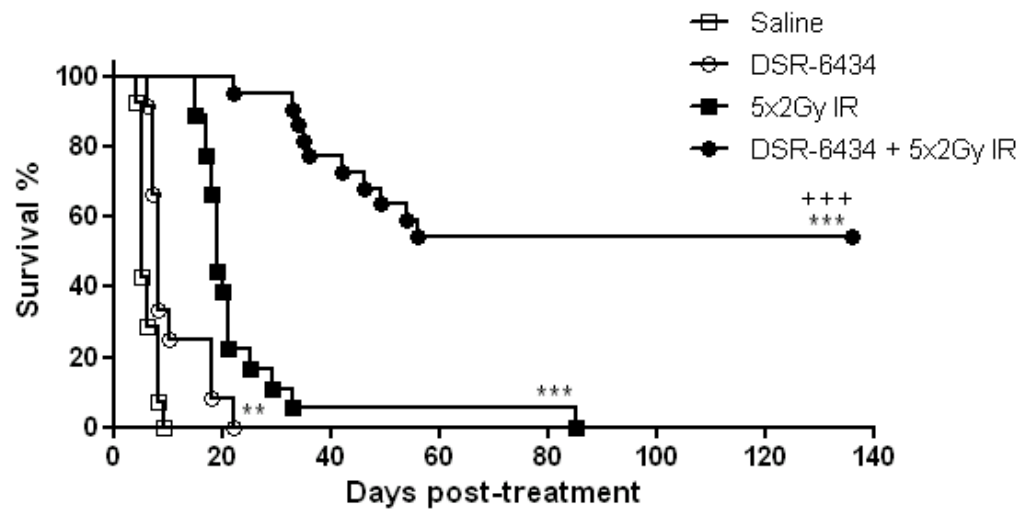
図 20. DSR-6434 の各種がん細胞のコロニー形成に対する影響および、IFN- $\alpha$  の各種がん細胞の増殖に対する影響

- (a) CT-26(左)、KHT(右)細胞を DSR-6434(0-5  $\mu$ M)存在下で 24 時間培養し、その後培養液を培地に換え、最大 10 日間培養した後に、形成したコロニー数を測定した。
- (b) CT-26(左)、KHT(右)細胞を DSR-6434(0-5  $\mu$ M)存在下で 2 時間培養し、4Gy の放射線を照射し、さらに 22 時間培養した。24 時間後に培養液を培地に換え、最大 10 日間培養した後に、形成したコロニー数を測定した。
- (c) CT-26(左)、KHT(右)細胞を IFN- $\alpha$ (0-20 ng/mL)で 24、48 または、72 時間培養し、細胞の生存率を、MTT アッセイを用いて評価した。

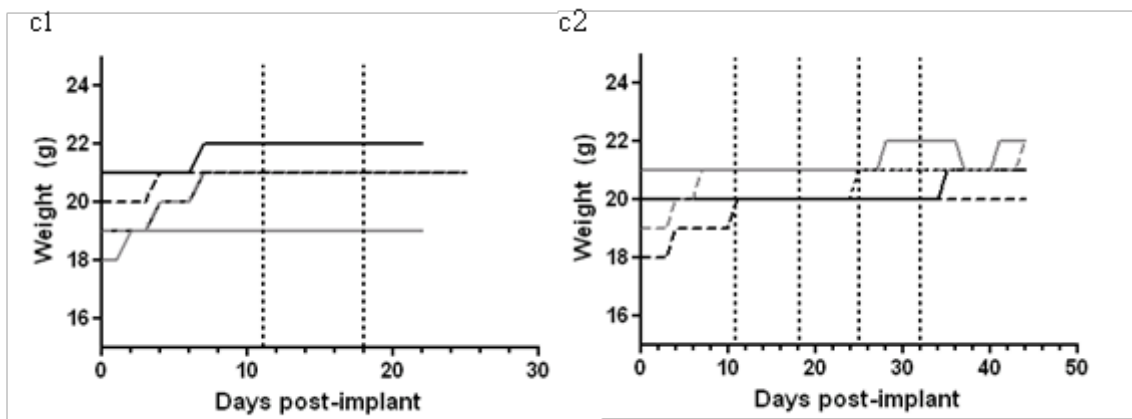
a



b



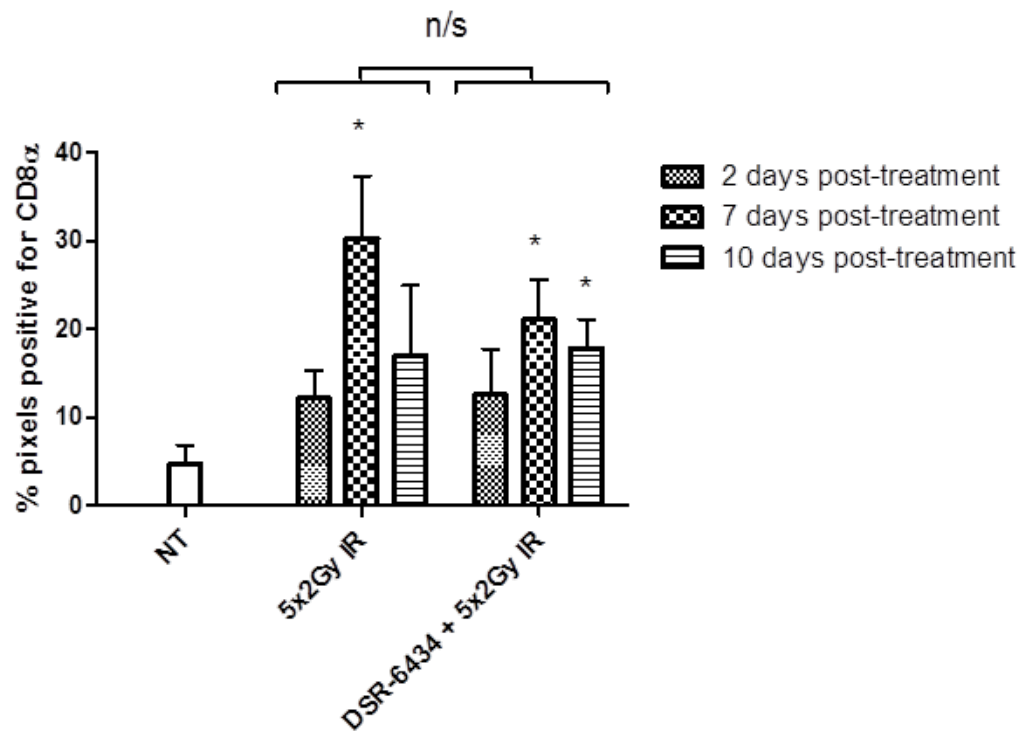
c



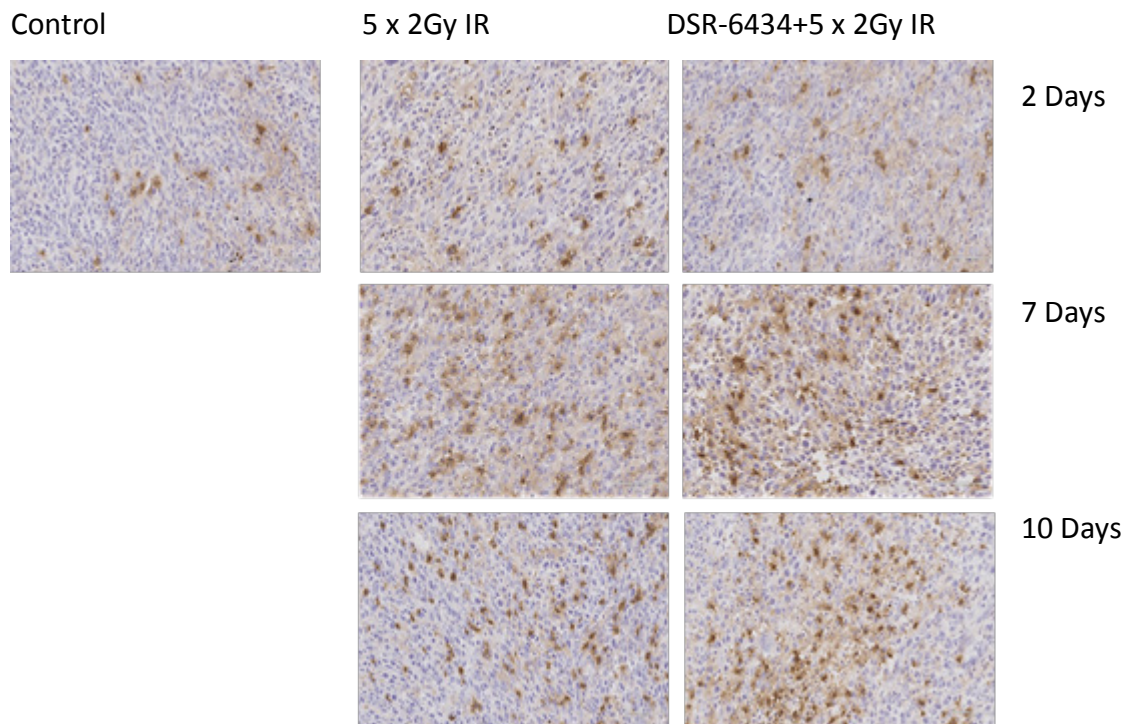
d

| Treatment           | Days to reach RTV4<br>(mean $\pm$ SEM) |
|---------------------|----------------------------------------|
| Saline              | 6 $\pm$ 0.42                           |
| DSR-6434            | 9.55 $\pm$ 1.3 **                      |
| 5x2Gy IR            | 23.94 $\pm$ 3.75 ***                   |
| DSR-6434 + 5x2Gy IR | 40.7 $\pm$ 3.36 *** +++                |

e

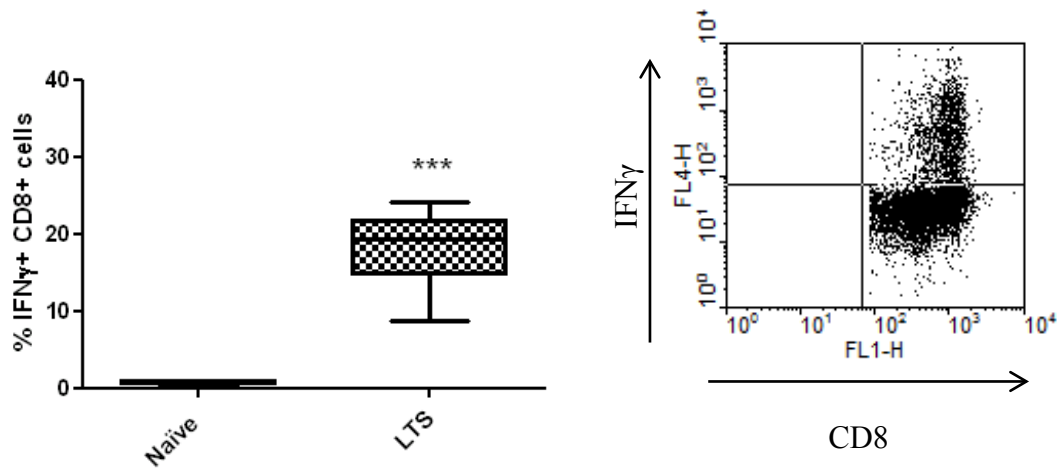


f

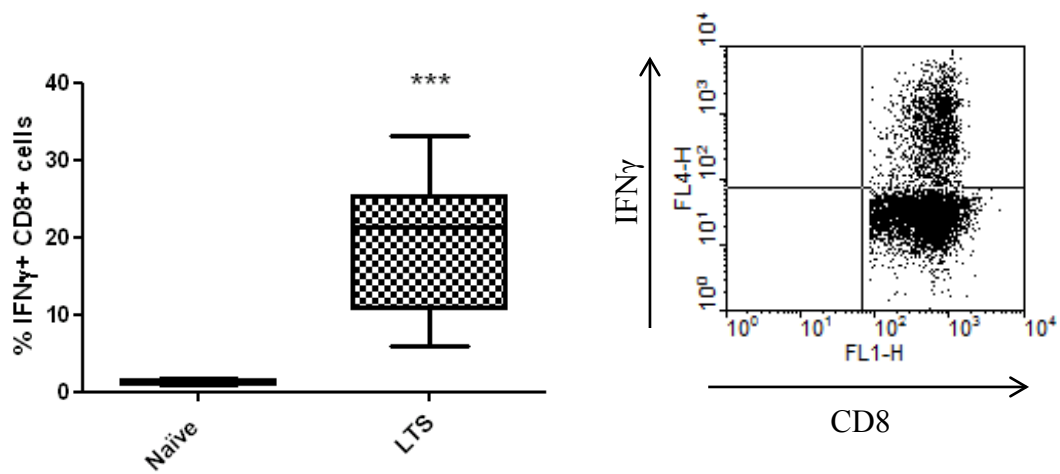


- 図 21. マウス大腸がん細胞株(CT-26)モデルにおける DSR-6434 と放射線療法の併用効果
- (a)  $1 \times 10^5$  個の CT-26 細胞をマウスの腹側皮下に移植し、腫瘍容積が  $180\text{--}220 \text{ mm}^3$  になった時点より治療を開始した(治療開始日を Day0)。治療開始後の腫瘍容積の変化を示し、各群のマウス 1 匹が RTV4(腫瘍開始時に比べ、腫瘍容積が 4 倍となった時点)に達するまで腫瘍容積を計測した。□; Saline 群(生理食塩水 週 1 回 計 4 回,  $n=14$ )、○; DSR-6434 群 ( $0.1 \text{ mg/kg}$  週 1 回 計 4 回,  $n=12$ )、■;  $5 \times 2\text{Gy}$  IR 群(5 日  $\times 2\text{Gy}$ ,  $n=18$ )、●; DSR-6434/IR 併用群 ( $0.1 \text{ mg/kg}$  週 1 回 計 4 回 + 5 日  $\times 2\text{Gy}$ ,  $n=22$ )
- (b) (a)の生存曲線を示した。腫瘍容積が RTV4 に達したマウスは人道的エンドポイントにより安楽死した。
- (c) DSR-6434 群(c1)および、DSR-6434/IR 併用群(c2)の体重変化を示した。Y 軸に平行な点線は DSR-6434 の投与日を示した。
- (d) (a)の腫瘍容積が RTV4 に達するまでに要した平均期間を示した。Saline 群に対する統計解析を実施し、結果を\*で示した(\*\*  $P<0.01$ 、\*\*\*  $P<0.001$ )。DSR-6434 群および、 $5 \times 2\text{Gy}$  IR 群に対する統計解析を実施し、結果を+で示した(+++  $P<0.001$ )。
- (e)  $5 \times 2\text{Gy}$  IR 群および、DSR-6434/IR 併用群の腫瘍への  $\text{CD8}^+$  T 細胞の浸潤割合を示した。切片の全視野を Definiens Tissue Studio を用いて解析した。未治療(NT; Non Treat)群に対する統計解析を実施した(\*  $P<0.05$ )。NT( $n=3$ )、 $5 \times 2\text{Gy}$  IR 群( $n=5$ )、DSR-6434/IR 併用群( $n=5$ )
- (f) (e)の解析に使用した免疫組織染色(IHC; Immune Histo Chemistry)の画像を示した。

a



b



C

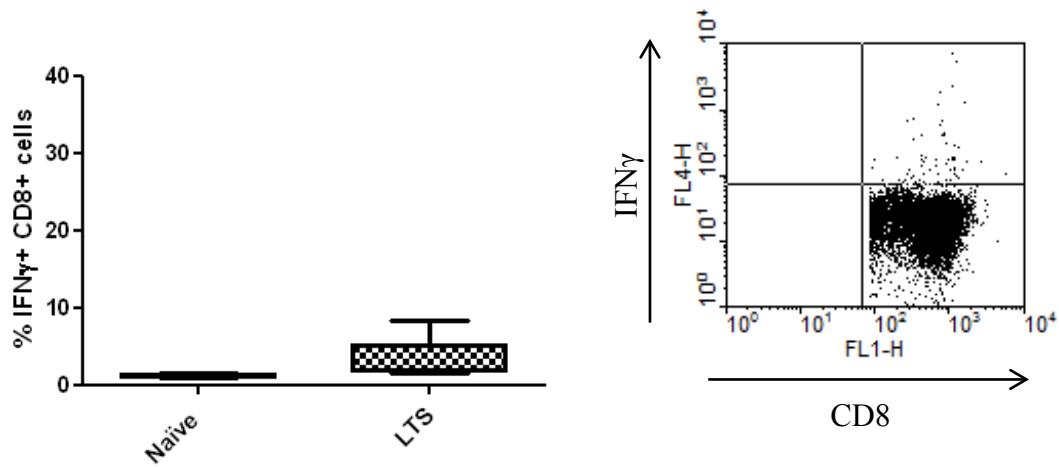
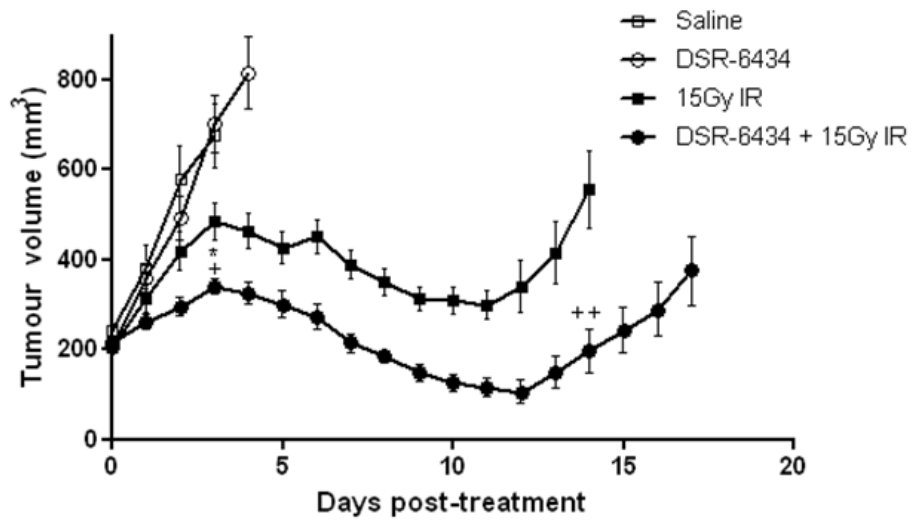


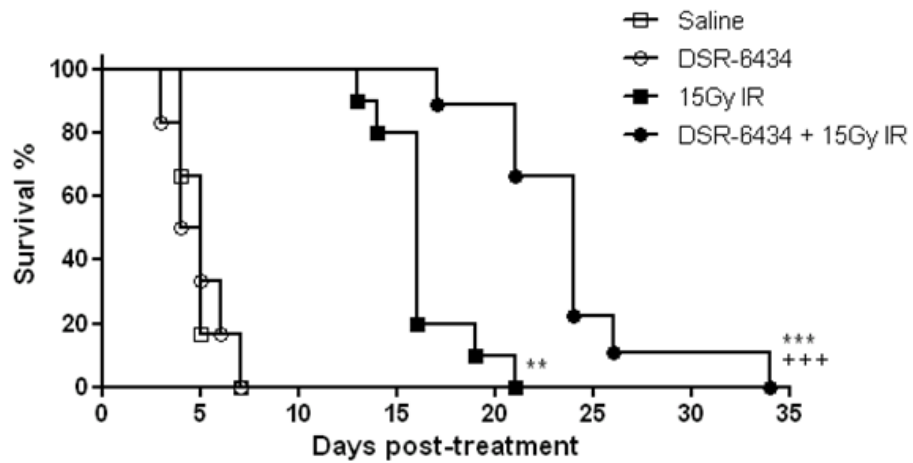
図 22. 長期生存(LTS)マウス(DSR-6434/IR 併用群)のがん抗原特異的 CD8<sup>+</sup>メモリーT 細胞の誘導

コントロールマウス(同週齢、非担癌; naïve)(n=3)または、LTS マウス(DSR-6434/IR 併用群のうち 90 日以上生存したマウス)(n=5)の脾臓細胞を調製し、50Gy の放射線を照射した CT-26(a)、AH-1 ペプチド(b)または、コントロールペプチド(c)と 6 日間培養した。その後、50Gy の放射線を照射した CT-26 で 16 時間再刺激し、CD8<sup>+</sup>T 細胞の IFN-γ 産生を Flow cytometry により解析した。Naïve 群に対して統計解析を実施した(\*\*\*) $P<0.001$ 。

a.

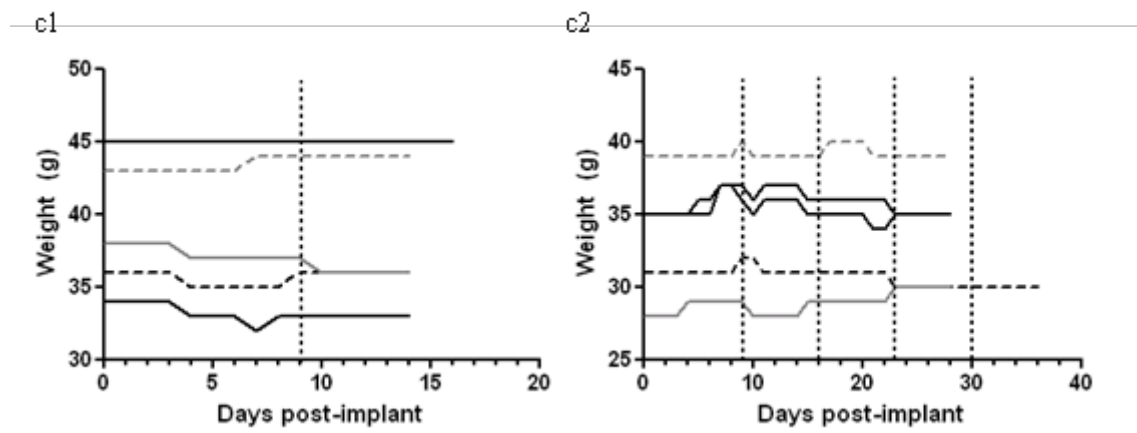


b.





c



d

| Treatment          | Days to reach RTV4<br>(mean $\pm$ SEM) |
|--------------------|----------------------------------------|
| Saline             | 4.67 $\pm$ 0.33                        |
| DSR-6434           | 4.67 $\pm$ 0.87                        |
| 15Gy IR            | 16.4 $\pm$ 0.67 **                     |
| DSR-6434 + 15Gy IR | 23.89 $\pm$ 1.54 *** +++               |



法は 2.1.3.1 参照) (n=9)。それぞれの肺の画像をグラフの上部に添付した(左; 25Gy IR、右 DSR-6434/15Gy IR)。

### 2.1.3.3 考察

TLR7 アゴニストにより活性化される抗腫瘍免疫の詳細なメカニズムは未だ明らかになっていない。TLR7 アゴニストは、樹状細胞(pDC)を成熟化すると共に、がん抗原(TAA; Tumor associated antigen)の提示を誘導し、T 細胞の活性化を促進すると考えられている<sup>61,62</sup>。また、一方で TLR7 は IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  や IL-12 等の Th1 サイトカインを介してがん特異的な T 細胞を活性化している可能性も考えられる<sup>63</sup>。マウス同種移植モデルでは、移植する細胞によって免疫原性が異なっており、CT-26 は内在性レトロウィルスの遺伝子産物である gp70 由来の AH-1 ペプチドを産生しており、このペプチドは外来抗原であることから自己抗原に比べ免疫反応が惹起されやすい。一方、KHT 細胞は外来抗原の発現に関する報告はなく、CT-26 に比べ免疫原性が低い細胞であることが考えられる。著者らの研究では、DSR-6434 治療は、CT-26 モデルに対し単剤で抗腫瘍効果を示したが、KHT 細胞に対しては効果が認められなかった。このことは、TLR7 アゴニストによる抗腫瘍作用が細胞免疫を介したメカニズムである可能性を示唆している。しかし、抗原性の高い CT-26 モデルに対しても腫瘍の完全な退縮は認められず、DSR-6434 治療のみでは長期にわたり有効な CD8<sup>+</sup>メモリーT 細胞の誘導は難しいことが示唆された。

一方、マウスリンパ腫モデルにおいて、TLR7 アゴニストの全身投与と局所 IR 治療の併用が CD8<sup>+</sup> T 細胞を長期に維持し、抗腫瘍作用および、生存を延長することが示された<sup>32</sup>。IR 治療で誘導された細胞死は、がん細胞上の MHC クラス I 分子の誘導や APCs を活性化する DAMPs 分子の誘導を介し、がんの免疫原性を亢進するとともに T 細胞を活性化することが報告されている<sup>36,37,64</sup>。また、放射線

処理したがん細胞を免疫すると全身の抗腫瘍免疫を活性化し、細胞の再移植に対し非常に有効である<sup>37</sup>。しかし、同種移植担癌マウスの腫瘍に対し IR 治療のみをおこなっても、抗原特異的な免疫反応の活性化を十分に誘導することが出来ないことも報告されている<sup>29,39</sup>。実際のところ、臨床において緩和ケア (best supportive care) に比べ、放射線治療がどの程度免疫反応を亢進しているかは明らかになっていない。

腫瘍局所はがん微小環境(血管新生や細胞増殖が盛んな免疫抑制性の環境)を形成していることが明らかとなっており、がん微小環境をターゲットとした免疫療法剤の開発が盛んに行われている。IR 治療は、免疫アネルギー環境の形成を担当する免疫細胞やその環境下のがん細胞の細胞死を誘導し、がんの免疫原性を高めることが期待される。しかし、本研究において IR 治療のみでは CD8<sup>+</sup> T 細胞の浸潤が認められたにも関わらず、がんを完全に退縮することはできなかった。このことは、IR 治療のみでは腫瘍局所のがん微小環境を完全に変化できず、また活性化する免疫反応が限定的であることが示唆された。そのため、IR 治療によって免疫原性の高い細胞死を誘導するとともに、免疫アジュバント作用のある薬剤を併用することで、がん抗原に対する抗腫瘍免疫が十分に活性化することが期待される。本研究結果において DSR-6434 と IR 治療の併用はそれぞれの治療に比べ強い抗腫瘍作用を示し、免疫原性の高い CT-26 モデルに対しては 55% のマウスが腫瘍を完全に拒絶し長期間生存した。DSR-6434 は、*in vitro* において細胞増殖抑制作用を示さないことから、がん細胞への直接作用はなく、がん抗原特異的免疫反応を介した抗腫瘍作用を示していると考えられる。また、CT-26 モデルにおいて DSR-6434/IR 併用群の長期生存(LTS)マウスは、CD8<sup>+</sup> メモリー T 細胞を誘導していることが示唆された。さらに、IR 治療群および、DSR-6434/IR 併用群では有意に抗腫瘍作用が異なるものの、腫瘍中への CD8<sup>+</sup> T 細胞の浸潤の

割合に差は認められないことから、両治療では誘導した CD8<sup>+</sup>T 細胞に質的な違いがあり、併用群ではより抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞が誘導された可能性が考えられた。

KHT 肉腫モデルでは、DSR-6434/IR 併用治療は原発腫瘍を抑制すると共に、肺への転移も有意に抑制した。以前、局所の IR 治療が遠隔の転移腫瘍にも有効であることが報告された<sup>65</sup>。この結果は、IR 治療が全身性の免疫反応を活性化していることが考えられ、免疫活性化剤との併用により遠隔転移へのさらなる治療効果の増強が期待された<sup>39,66</sup>。DSR-6434/IR 併用治療は、腫瘍部位にのみ IR 治療を行っていることから、併用群の転移抑制作用は IR による直接作用ではないことは明らかである。DSR-6434/IR 併用治療は、がん抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞を誘導し、原発腫瘍と肺の転移をともに抑制したと考えられる。このことから誘導された CD8<sup>+</sup>T 細胞は原発腫瘍および、肺の転移腫瘍を同様に認識していることが考えられ、どちらのがん抗原も共通した内因性のがん抗原に対する免疫反応が活性化したことが示唆される。IR 治療では DNA 損傷や異常タンパク質の発現から新規のペプチドが誘導されることが報告されているものの、ここで得られた結果からはこのような反応が誘導された可能性は低いと考えられる。

欧米では 50%のがん患者は、がん治療の一部として放射線治療を受けているが、多くの患者が転移等の再発に苦しんでいる。腫瘍縮小効果のある治療法 (放射線治療や化学療法) と免疫療法 (免疫活性化剤や免疫チェックポイントの阻害剤) の併用は予後の改善に繋がることが期待され、新しい治療法として確立することが望まれている。本研究結果は、固形がんの原発腫瘍や転移がんの治療に TLR7 アゴニストの全身投与と放射線治療の併用が有効かつ合理的であることを示唆し、将来、臨床研究されることを期待する。

### 3 総括

TLR7 アゴニストである SM-276001 および、DSR-6434 を用いた研究により、以下のことを明らかにした。

- I. TLR7、8 または、9 を発現する細胞を用いて、SM-276001 および、DSR-6434 が選択的な TLR7 アゴニストであることを示した。また、マウス脾臓細胞を用いた検討において SM-276001 および、DSR-6434 は炎症性サイトカイン、ケモカインを誘導し、また、各種免疫細胞を活性化することを明らかにした。さらに、マウスを用いた PK/PD プロファイル解析の結果、SM-276001 の経口投与は投与量依存的に血中濃度が増加し、血中濃度が *in vitro* における最低有効濃度を超えると免疫反応が活性化することを示し、良好な PK/PD プロファイルを示すことを明らかにした。
- II. マウス腎がん細胞株 Renca 移植モデルおよび、マウス大腸がん細胞株 CT-26 移植モデルにおいて、SM-276001 は Vehicle 群に比べ有意な抗腫瘍を示すことを明らかにした。SM-276001 は Renca、CT-26 細胞に対して直接的な細胞障害活性を有していないことから、これらの作用は免疫を介した作用であることが示唆された。また、マウス卵巣がん細胞株(HM-1)を用いた自然転移モデルにおいて、SM-276001 の経口投与および、気管内投与は有意に肺転移を抑制した。気管内投与では全身性のサイトカイン産生を誘導するものの、経口投与時のサイトカイン産生に比べ産生量が低く、肺局所で主にサイトカインを誘導した。そのため、投与部位の所属リンパ節である腋下リンパ節への転移は有意に抑制したが、鼠蹊・上腕リンパ節への有意な転移抑制作用は認

められなかった。一方、経口投与では全身性のサイトカインを誘導することから、鼠蹊・腋下・上腕リンパ節への転移を有意に抑制した。このように投与ルート(全身または、局所)の違いにより免疫活性化および、それに伴い誘導される抗腫瘍作用に違いがあることを明らかにした。

- III. マウス大腸がん細胞株 CT-26 移植モデルおよび、マウス肉腫細胞株モデル KHT 自然転移モデルを用いて、DSR-6434 と IR 治療の併用効果を評価した。免疫原性の高い CT-26 モデルでは、DSR-6434 全身投与で有意な抗腫瘍を示した。また、DSR-6434/IR 併用治療はそれぞれの単独の治療に比べ、有意に抗腫瘍作用を示し、併用群の約 55%のマウスが完全に腫瘍を退縮した。これらのマウスでは CT-26 細胞に対するがん抗原特異的 CD8<sup>+</sup>メモリーT細胞が誘導されていることが示唆された。一方、免疫原性の低い KHT 自然転移モデルでは、DSR-6434 治療では原発腫瘍に対し抗腫瘍作用を認めなかった。しかし、DSR-6434/IR 併用治療では、IR 治療に比べ原発腫瘍に対し有意に抗腫瘍作用を示し、DSR-6434 が IR 治療の抗腫瘍効果を増強することを明らかにした。さらに、DSR-6434/IR 併用治療では、IR 治療に比べ有意に肺転移を抑制した。以上の結果より DSR-6434 と IR 治療の併用が有効な治療法となる可能性を示した。

今後、TLR7アゴニストを医薬品として開発するためには、TLRアゴニストによって誘導される抗腫瘍メカニズムの更なる解析やTLR7アゴニストによって誘導される生体内の免疫反応について解析する必要があると考えられる。本論文が今後の研究に役立てば幸いである。



#### 4 謝辞

本論文提出の機会を与えていただくと共に、本論文の作成に当たりご指導を賜りました恩師、九州大学大学院 システム生命科学府 片山佳樹教授に心より感謝いたします。本論文の作成に当たり、ご指導を賜りました九州大学大学院 工学研究院 後藤雅宏教授、九州大学大学院 システム生命科学府 水本博准教授、九州大学大学院 システム生命科学府 森健准教授に心より感謝いたします。

本研究にあたり研究の議論や研究の方向性の決定、また多くの実験をいただきました大日本住友製薬株式会社 村田 眞志博士、山本 節子博士、原田 秀幸博士、高久 春雄博士、富澤 秀行博士、大木 俊広氏、石坪ゆかり氏、AstraZeneca 社 Simon J. Dovedi 博士、Robert W. Wilkinson 博士、Philip J Jewsbury 博士、David Robinson 博士、Andrew J. Leishman 博士、John Bell 博士、Douglas Ferguson 博士、Simon P. Heaton 博士、Ash Bahl 博士、マンチェスター大学 Ian J. Stratford 教授、Timothy M. Illidge 教授、Amy L. Adlard 博士、Brian A. Telfer 博士、Charlotte Pollard 博士、Jamie Honeychurch 博士に心より感謝いたします。

最後に、本論文をまとめるにあたり見守り支えてくれた家族に心から感謝します。

## 5 主論文

Koga-Yamakawa E, Dovedi SJ, Murata M, Matsui H, Leishman AJ, Bell J, et al. Intratracheal and oral administration of SM-276001: A selective TLR7 agonist, leads to antitumor efficacy in primary and metastatic models of cancer. *Int J Cancer*. 2013 Feb 1;132(3):580-90.

Adlard A, Dovedi S, Telfer BA, Koga-Yamakawa E, Pollard C, Honeychurch J, Illidge TM, Murata M, Robinson D, Jewsbury PJ, Wilkinson RW, Stratford IJ. A novel systemically-administered Toll-like receptor 7 agonist potentiates the effect of ionizing radiation in murine solid tumor models. *Int J Cancer*. 2013 Accepted

## 6 参考文献

- 1 平成 25 年我が国の人口動態(平成 23 年までの動向). (厚生労働省).
- 2 Sharma, P., Wagner, K., Wolchok, J. D. & Allison, J. P. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nature reviews. Cancer* **11**, 805-812, doi:10.1038/nrc3153 (2011).
- 3 Hodi, F. S. *et al.* Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* **363**, 711-723, doi:10.1056/NEJMoa1003466 (2010).
- 4 Hardiman, G. *et al.* Genetic structure and chromosomal mapping of MyD88. *Genomics* **45**, 332-339, doi:10.1006/geno.1997.4940 (1997).
- 5 Underhill, D. M. & Ozinsky, A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Current opinion in immunology* **14**, 103-110 (2002).
- 6 *Toll-like Receptor Signaling*,  
<[http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Toll\\_Like.html](http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Toll_Like.html)>
- 7 MacLeod, H. & Wetzler, L. M. T cell activation by TLRs: a role for TLRs in the adaptive immune response. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2007**, pe48, doi:10.1126/stke.4022007pe48 (2007).
- 8 Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252, doi:10.1038/32588 (1998).
- 9 Austyn, J. M. Dendritic cells. *Current opinion in hematology* **5**, 3-15 (1998).
- 10 Hemmi, H. *et al.* Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature immunology* **3**, 196-200, doi:10.1038/ni758 (2002).
- 11 Magnusson, M., Magnusson, S., Vallin, H., Ronnblom, L. & Alm, G. V. Importance of CpG dinucleotides in activation of natural IFN-alpha-producing cells by a lupus-related oligodeoxynucleotide. *Scandinavian journal of immunology* **54**, 543-550 (2001).
- 12 Hart, O. M., Athie-Morales, V., O'Connor, G. M. & Gardiner, C. M. TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **175**, 1636-1642 (2005).
- 13 Janssens, S. & Beyaert, R. A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends in biochemical sciences* **27**,

- 474-482 (2002).
- 14 Schlecht, G. *et al.* Murine plasmacytoid dendritic cells induce effector/memory CD8<sup>+</sup> T-cell responses in vivo after viral stimulation. *Blood* **104**, 1808-1815, doi:10.1182/blood-2004-02-0426 (2004).
  - 15 Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A. & Colonna, M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nature immunology* **1**, 305-310, doi:10.1038/79747 (2000).
  - 16 Brimnes, M. K., Bonifaz, L., Steinman, R. M. & Moran, T. M. Influenza virus-induced dendritic cell maturation is associated with the induction of strong T cell immunity to a coadministered, normally nonimmunogenic protein. *The Journal of experimental medicine* **198**, 133-144, doi:10.1084/jem.20030266 (2003).
  - 17 Asselin-Paturel, C. *et al.* Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *The Journal of experimental medicine* **201**, 1157-1167, doi:10.1084/jem.20041930 (2005).
  - 18 Le Mercier, I. *et al.* Tumor promotion by intratumoral plasmacytoid dendritic cells is reversed by TLR7 ligand treatment. *Cancer research*, doi:10.1158/0008-5472.can-12-3058 (2013).
  - 19 Beutner, K. R. *et al.* Therapeutic response of basal cell carcinoma to the immune response modifier imiquimod 5% cream. *Journal of the American Academy of Dermatology* **41**, 1002-1007 (1999).
  - 20 Jurk, M. *et al.* Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nature immunology* **3**, 499, doi:10.1038/ni0602-499 (2002).
  - 21 Gorden, K. K., Qiu, X. X., Binsfeld, C. C., Vasilakos, J. P. & Alkan, S. S. Cutting edge: activation of murine TLR8 by a combination of imidazoquinoline immune response modifiers and polyT oligodeoxynucleotides. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **177**, 6584-6587 (2006).
  - 22 Isobe, Y. *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel 9-substituted-8-hydroxyadenine derivatives as potent interferon inducers. *Journal of medicinal chemistry* **49**, 2088-2095, doi:10.1021/jm051089s (2006).
  - 23 Nakamura, T. *et al.* Synthesis and evaluation of 8-oxoadenine derivatives as potent Toll-like receptor 7 agonists with high water solubility. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **23**, 669-672,

- doi:10.1016/j.bmcl.2012.11.114 (2013).
- 24 Whiteside, T. L. Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Seminars in cancer biology* **16**, 3-15, doi:10.1016/j.semcancer.2005.07.008 (2006).
  - 25 Korkolopoulou, P., Kaklamanis, L., Pezzella, F., Harris, A. L. & Gatter, K. C. Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *British journal of cancer* **73**, 148-153 (1996).
  - 26 Chen, H. L. *et al.* A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nature genetics* **13**, 210-213, doi:10.1038/ng0696-210 (1996).
  - 27 Jarnicki, A. G., Lysaght, J., Todryk, S. & Mills, K. H. Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **177**, 896-904 (2006).
  - 28 Rabinovich, G. A., Gabrilovich, D. & Sotomayor, E. M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annual review of immunology* **25**, 267-296, doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141609 (2007).
  - 29 Dewan, M. Z. *et al.* Fractionated but not single-dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**, 5379-5388, doi:10.1158/1078-0432.ccr-09-0265 (2009).
  - 30 Honeychurch, J., Glennie, M. J., Johnson, P. W. & Illidge, T. M. Anti-CD40 monoclonal antibody therapy in combination with irradiation results in a CD8 T-cell-dependent immunity to B-cell lymphoma. *Blood* **102**, 1449-1457, doi:10.1182/blood-2002-12-3717 (2003).
  - 31 Mason, K. A. *et al.* Targeting toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides enhances tumor response to fractionated radiotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**, 361-369 (2005).
  - 32 Dovedi, S. J. *et al.* Systemic delivery of a TLR7 agonist in combination with radiation primes durable antitumor immune responses in mouse models of lymphoma. *Blood* **121**, 251-259, doi:10.1182/blood-2012-05-432393 (2013).

- 33 Lesterhuis, W. J. *et al.* Synergistic effect of CTLA-4 blockade and cancer chemotherapy in the induction of anti-tumor immunity. *PloS one* **8**, e61895, doi:10.1371/journal.pone.0061895 (2013).
- 34 Jure-Kunkel, M. *et al.* Synergy between chemotherapeutic agents and CTLA-4 blockade in preclinical tumor models. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **62**, 1533-1545, doi:10.1007/s00262-013-1451-5 (2013).
- 35 Dewan, M. Z. *et al.* Synergy of topical toll-like receptor 7 agonist with radiation and low-dose cyclophosphamide in a mouse model of cutaneous breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**, 6668-6678, doi:10.1158/1078-0432.ccr-12-0984 (2012).
- 36 Reits, E. A. *et al.* Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *The Journal of experimental medicine* **203**, 1259-1271, doi:10.1084/jem.20052494 (2006).
- 37 Apetoh, L. *et al.* Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature medicine* **13**, 1050-1059, doi:10.1038/nm1622 (2007).
- 38 Ghiringhelli, F. *et al.* Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nature medicine* **15**, 1170-1178, doi:10.1038/nm.2028 (2009).
- 39 Lee, Y. *et al.* Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8+ T cells: changing strategies for cancer treatment. *Blood* **114**, 589-595, doi:10.1182/blood-2009-02-206870 (2009).
- 40 Kamrava, M., Bernstein, M. B., Camphausen, K. & Hodge, J. W. Combining radiation, immunotherapy, and antiangiogenesis agents in the management of cancer: the Three Musketeers or just another quixotic combination? *Molecular bioSystems* **5**, 1262-1270, doi:10.1039/b911313b (2009).
- 41 Wang, D. *et al.* Antitumor activity and immune response induction of a dual agonist of Toll-like receptors 7 and 8. *Molecular cancer therapeutics* **9**, 1788-1797, doi:10.1158/1535-7163.mct-09-1198 (2010).
- 42 Mangsbo, S. M., Ninalga, C., Essand, M., Loskog, A. & Totterman, T. H. CpG therapy is superior to BCG in an orthotopic bladder cancer model and generates CD4+ T-cell immunity. *Journal of immunotherapy*

- (Hagerstown, Md. : 1997) **31**, 34-42, doi:10.1097/CJI.0b013e3181587d29 (2008).
- 43 Zou, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature reviews. Cancer* **5**, 263-274, doi:10.1038/nrc1586 (2005).
  - 44 Sayers, T. J., Wilttrout, T. A., McCormick, K., Husted, C. & Wilttrout, R. H. Antitumor effects of alpha-interferon and gamma-interferon on a murine renal cancer (Renca) in vitro and in vivo. *Cancer research* **50**, 5414-5420 (1990).
  - 45 Hashimoto, M., Niwa, O., Nitta, Y., Takeichi, M. & Yokoro, K. Unstable expression of E-cadherin adhesion molecules in metastatic ovarian tumor cells. *Japanese journal of cancer research : Gann* **80**, 459-463 (1989).
  - 46 Broomfield, S. A. *et al.* Locally administered TLR7 agonists drive systemic antitumor immune responses that are enhanced by anti-CD40 immunotherapy. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **182**, 5217-5224, doi:10.4049/jimmunol.0803826 (2009).
  - 47 Dharmapuri, S. *et al.* An oral TLR7 agonist is a potent adjuvant of DNA vaccination in transgenic mouse tumor models. *Cancer gene therapy* **16**, 462-472, doi:10.1038/cgt.2008.91 (2009).
  - 48 Bergmann, J. F. *et al.* Randomised clinical trial: anti-viral activity of ANA773, an oral inducer of endogenous interferons acting via TLR7, in chronic HCV. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **34**, 443-453, doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04745.x (2011).
  - 49 Tran, T. D. *et al.* Design and optimisation of orally active TLR7 agonists for the treatment of hepatitis C virus infection. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **21**, 2389-2393, doi:10.1016/j.bmcl.2011.02.092 (2011).
  - 50 Reeves, D. J. & Liu, C. Y. Treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **64**, 11-25, doi:10.1007/s00280-009-0983-z (2009).
  - 51 Interferon-alpha and survival in metastatic renal carcinoma: early results of a randomised controlled trial. Medical Research Council Renal Cancer Collaborators. *Lancet* **353**, 14-17 (1999).
  - 52 Gollob, J. A. *et al.* Phase I trial of twice-weekly intravenous interleukin 12 in patients with metastatic renal cell cancer or malignant melanoma: ability to maintain IFN-gamma induction is associated with clinical response. *Clinical cancer research : an official journal of the American*

- Association for Cancer Research* **6**, 1678-1692 (2000).
- 53 Oh, J. Z., Kurche, J. S., Burchill, M. A. & Kedl, R. M. TLR7 enables cross-presentation by multiple dendritic cell subsets through a type I IFN-dependent pathway. *Blood* **118**, 3028-3038, doi:10.1182/blood-2011-04-348839 (2011).
  - 54 Xirakia, C. *et al.* Toll-like receptor 7-triggered immune response in the lung mediates acute and long-lasting suppression of experimental asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* **181**, 1207-1216, doi:10.1164/rccm.200908-1255OC (2010).
  - 55 Daqing Wang, E. R. K., Dong Yu, Sudhir Agrawal. Antitumor activity of a synthetic agonist of TLR9 administered via intranasal route. *AACR Meet Abstract* **3458** (2007).
  - 56 Brody, J. D. *et al.* In situ vaccination with a TLR9 agonist induces systemic lymphoma regression: a phase I/II study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**, 4324-4332, doi:10.1200/jco.2010.28.9793 (2010).
  - 57 Waitz, R. *et al.* Potent induction of tumor immunity by combining tumor cryoablation with anti-CTLA-4 therapy. *Cancer research* **72**, 430-439, doi:10.1158/0008-5472.can-11-1782 (2012).
  - 58 Huang, A. Y. *et al.* The immunodominant major histocompatibility complex class I-restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 9730-9735 (1996).
  - 59 Lunt, S. J., Telfer, B. A., Fitzmaurice, R. J., Stratford, I. J. & Williams, K. J. Tirapazamine administered as a neoadjuvant to radiotherapy reduces metastatic dissemination. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**, 4212-4216, doi:10.1158/1078-0432.ccr-04-2162 (2005).
  - 60 Brown, J. M. & Parker, E. T. Host treatments affecting artificial pulmonary metastases: interpretation of loss of radioactively labelled cells from lungs. *British journal of cancer* **40**, 677-688 (1979).
  - 61 Wille-Reece, U. *et al.* Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates. *The Journal of experimental medicine* **203**, 1249-1258, doi:10.1084/jem.20052433 (2006).



- 62 Weck, M. M. *et al.* TLR ligands differentially affect uptake and presentation of cellular antigens. *Blood* **109**, 3890-3894, doi:10.1182/blood-2006-04-015719 (2007).
- 63 Koga-Yamakawa, E. *et al.* Intratracheal and oral administration of SM-276001: a selective TLR7 agonist, leads to antitumor efficacy in primary and metastatic models of cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **132**, 580-590, doi:10.1002/ijc.27691 (2013).
- 64 Gupta, A. *et al.* Radiotherapy promotes tumor-specific effector CD8+ T cells via dendritic cell activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **189**, 558-566, doi:10.4049/jimmunol.1200563 (2012).
- 65 Mole, R. H. Whole body irradiation; radiobiology or medicine? *The British journal of radiology* **26**, 234-241 (1953).
- 66 Demaria, S. *et al.* Immune-mediated inhibition of metastases after treatment with local radiation and CTLA-4 blockade in a mouse model of breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**, 728-734 (2005).