

【第51回 小島三郎記念文化賞】

自然免疫の自己・非自己識別機構に関する研究

Self-nonself discrimination in the innate immune system

せ や つかさ
瀬 谷 司
Tsukasa SEYA

はじめに

今回伝統ある小島三郎記念文化賞を受賞させて頂きありがとうございました。私は補体の自然免疫研究からスタートし、自然免疫の理解から抗がん免疫アジュバントの開発を目指して35年を基礎研究の中で過ごさせて頂きました。補体も免疫アジュバントも地味な研究領域でしたが光が射すこともあるのです。最近漸くPD-1抗体を皮切りに「免疫でがんが治る」ことがトピックになり始め、がんのワクチンアジュバント療法も見直しが始まりました。炎症を抑えたアジュバントが認可されれば種々のワクチンが実用化し、難治性感染症や進行がんをQOLよく治せる時代に到ります。ここまで弛まず研究を続けられたことを感謝しております。

I. 序 章

私は1976年医師免許を取り、内科の臨床研修に就きました。患者さんをたくさん看取りながら、「出来合の薬を投与するだけでは治らない」という患者さんの前に医師の無力を感じました。どうして生体は細胞を増やす余力がありながらがんになると死ぬのでしょうか？子宮筋腫は5kgを超えても命に別状はありません。しかし、がんは小さくても命を奪います。生体ががん細胞に攪乱されているに違いないのです。たまたま対がん協会、札幌がんセンターの研修後に村尾誠教授（当時）から学位研究を促され、薬学部で学位研究する機会を頂きました。その場で小山次郎教授（当時）に電話されて、私の薬学

部研究生入学が決まりました。

当時、北大薬学部は東大から新進の精鋭を集めた研究の砦でした。私は恩師、長澤滋治助教授（当時）の補体研究に引かれて免疫系の蛋白化学の研究を研鑽しました。免疫系は非自己細胞を自己と弁別して排除する生体防御機構とされ、多くの学説がその上に展開されていることを知りました。補体も自己細胞を壊さずに異物を選択排除します。この免疫系の一般則、自己・非自己識別の考え方はこの時学んだものです。しかし、蛋白の精製、構造と機能、化学合成物による活性部位の阻害、というノウハウは医学生理の理解を超えたもので臨床医学と基礎生命科学には基本的な理解のギャップがあることを肌で感じました。5年かけてもマスターしきれなかったことを悔いています。薬学博士の学位取得後、行き場もなく留学しました。

セントルイスのワシントン大学で3年余、補体制御因子の研究から自己の識別機構を洞察しました。CD46の同定はこの時の仕事です。その後縁あって1987年に大阪府立成人病センター研究所で、数人の仲間と自然免疫、特に前半は補体、後半はToll-like receptor (TLR)の非自己識別の課題に取り組むことができました。

私は政治的な世相に馴染めなかったので真摯な努力と論文によって研究を訴えることだけを心掛けました。個人の研究は潮流に流れる瓦礫の破片にすぎないのですが、その個人にとっては精一杯の自己表現であったと思います。

II. 補体が自己細胞を攻撃しない分子機構

異物、微生物は補体の標的になります。しかし、自己細胞が自己補体で傷害されない機構は当時不明でした。私は自己細胞の膜に補体 C3 の沈着を阻害する因子（制御因子）があり、これが種特異的に補体の標的化を防いでいることを発見しました。同時に幾つかのグループ研究があり、別のグループが赤血球では DAF (CD55) がこの役目を果たしていることを示しました。その欠損は発作性夜間血色素尿症 (PNH) として後に同定されました。この流れはその後、木下タロウ教授 (阪大微研) の主題になります。有核細胞では DAF 欠損でも殆ど傷害を受けません。この理由の 1 つに有核細胞にはもう 1 つ別の補体制御因子があると私たちは想定しました。留学中のアトキンソン研で C3b に結合する膜分子 (MCP のちに CD46 と命名) がヒト有核細胞に広く存在することを突き止め、その蛋白精製を行いました。蛋白の機能解析から CD46 がプロテアーゼ I 因子のコファクターとして膜沈着 C3b を限定分解することを証明しました。N 末分析から特異配列を決定し、λGT11 のヒト細胞ライブラリースをクリーニングして、当時未知だった CD46 の cDNA 配列を決定しました。この 2 つの仕事は当時の補体界では極めて高い評価を得ました。

この結果、体細胞が炎症時に自己補体の C3 沈着から守られる仕組みは 2 通りあり、DAF による C3 活性化酵素の阻害と CD46 による C3b 分解の促進が協調的に働くため、と定義されました (図 1)。

III. M161 抗原：サイトカイン誘導と補体活性化のリポ蛋白

正常細胞は補体抵抗性ですが、激しい炎症時に補体の過剰活性化が起きて炎症を修飾します。例えば糸球体腎炎では内皮細胞に C3 沈着が検知されます。補体活性化のときにがん細胞に C3b 沈着が起きるとの報告もありました。実験的に CD46、CD55 を抗体で阻害すると C3b 沈着が起きることが分かりました (図 1)。このモデル系を使えば C3b 沈着したがん細胞が宿主の細胞免疫系をどのように修飾するか、即ち補体が如何に細胞性免疫に関わるか、が

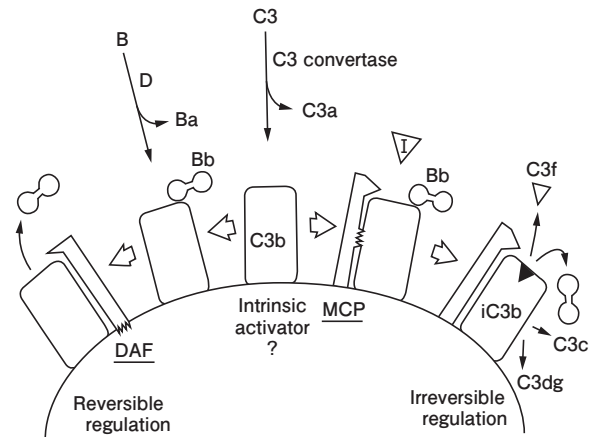


図 1 補体制御因子の発見

補体系はレクチン/プロテアーゼ複合体 (C1)、チオエステル含有標識エフェクター (C3, C4)、膜侵襲蛋白質 (C6-9) が連携して 1 つのカスケードを形成した血漿酵素系である。C3 が C3 コンバーターゼという複合体で C3b に限定分解を受けると、C3 のチオエステルが解離して異物膜上の水酸基 (糖や蛋白質) と結合能を有する中間体になる。この中間体は数秒間で膜結合能を失って 90% 以上が安定な水溶性 C3b になる。C3b 沈着は化学反応だが、一般に自己細胞膜で制限され、主に異物細胞膜で増幅的に進行する。膜に結合した C3b は標識異物を排除する種々の細胞応答を起動しうる (図 2)。C3b は C3 を増幅活性化する C3bBb コンバーターゼの核となるため、自己細胞の膜には補体制御因子が発現して、C3b の増幅的な非自己標識を防いでいる。ヒト有核細胞は DAF (CD55) と MCP (CD46) の 2 種の補体制御因子によって補体から守られる。CD55 は可逆的に C3b のコンバーターゼ形成を妨げる。一方、CD46 は不可逆的に C3b を不活性型 (iC3b) に限定分解するコファクターとして働く。両者の協調的な C3b 機能阻害によって自己細胞は標識されず炎症時でも自己であり続ける。

解析できるはずですが、私が直接解明した事象は限られますが、その後の発展を図示します (図 2)。

CD46、CD55 が存在してもある種の限られたがん細胞は C3b 沈着を起こします。このようながん細胞は形質転換で禁止の補体活性化分子を発現し、それが制御因子に打ち勝って C3b 沈着を惹起するのではないかと仮定しました。たまたま、同じ細胞株で C3b 沈着性のもの (p39+) と非沈着性のもの (p39-) があったので、39+ へのみ結合し、p39- に結合しない単クローン抗体を採ることに成功しました。この抗体が認識する抗原を M161 抗原 (Ag) と名付け、松本研究員と共に精製しました。

精製 M161Ag は補体活性化と大量の炎症性サイトカインを誘導する機能蛋白質であることが証明されました。がん細胞がこのような分子を発現するという報告は無かったので、cDNA クローニングして分子同定を行いました。当時 (1996 年) まだ NCBI のデータベースは不完全でしたが、この蛋白はヒト

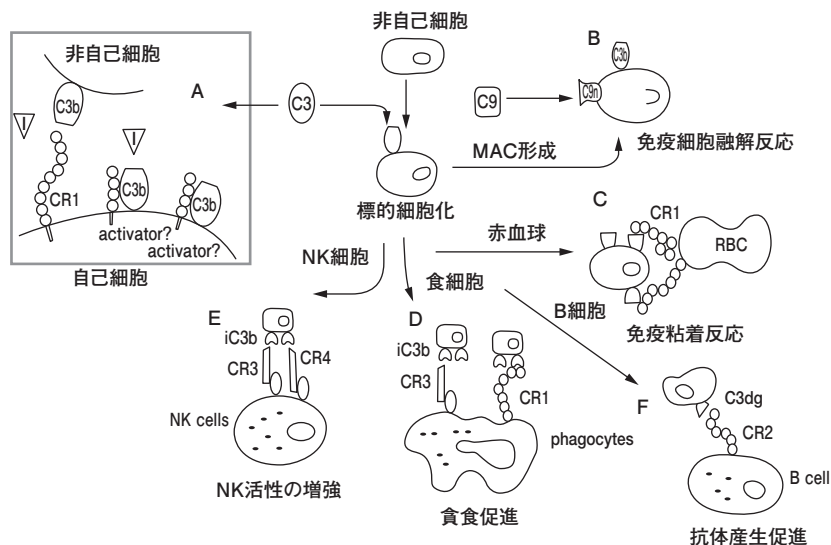


図2 C3bのリガンド変換と細胞性免疫の増幅的修飾

非自己細胞の膜沈着 C3b は CD46 を含むコファクターと I 因子 (プロテアーゼ) によって iC3b, C3dg, C3d のように限定分解を受ける (A)。C9 まで活性化すると膜複合体 (MAC) 形成して細胞融解する (B)。このリガンド変換の過程で標的細胞は C3b, iC3b, C3dg, C3d を認識する補体レセプターを持つ免疫細胞と選択結合し、異なった免疫応答を誘起する (C~F)。C3b は主に赤血球の CR1 に選択結合して免疫複合体クリアランスを促進する (C)。iC3b は CR3/CR4 という $\beta 2$ インテグリン (ミエロイド系細胞と一部のリンパ球に分布) と結合して貪食促進や NK 活性化を促す (D, E)。C3dg, C3d は CR2 (EBV レセプター) のリガンドであり、B 細胞の抗体産生を高める (F)。これらの応答を誘起するには大量の C3 沈着が必要なので、CD55 と CD46 のある自己細胞では起きない (A)。

由来ではないらしいと推定されました。最終的にマイコプラズマという寄生細菌の成分であることが判明しました。ヒト細胞は時にマイコプラズマに感染し、これはコンタミとされてきました。一方、生体がマイコプラズマ肺炎などにかかった場合、このリポ蛋白 M161Ag が遊離してサイトカイン血症を起こすという結論に達しました。がん化との関連はこの時証明できませんでした。M161Ag の補体活性化と別にサイトカイン誘導の部位が N 末にマップされ、これがリポ蛋白であることが分かりました。翌年、この脂質部位が TLR2 のリガンドであることが証明され、M161Ag のサイトカイン誘導のメカニズムが TLR のシグナルによることが判明しました。

IV. TLR の樹状細胞アジュバント効果

TLR2 はリポ蛋白とともに BCG-細胞壁 (CWS) のペプチドグリカンも認識し、樹状細胞を強く活性化しました。これが膀胱がんにも BCG の免疫療法が有効な根拠の 1 つだと分かりました。TLR2 のシグナル経路は MyD88 というアダプター分子によって媒介されることが審良研から報告されました。MyD88 はがん細胞の増殖を促進する protumor 因子として

知られていました。従って、MyD88 経路を活性化する免疫増強剤 (アジュバント) はがんの進展と免疫系の活性化の両方に働く「諸刃の剣」と定義づけられました。私たちは TLR2 アゴニストを多数デザインしてペプチド部分の改変によりサイトカイン誘導やがん進展を抑えた誘導体の合成に成功しましたが、これらは同時に免疫活性化作用も減衰しました。また、TLR2 アゴニストは 1 型インターフェロン (IFN) と IL-12 を殆ど誘導せず、免疫活性化には不利でした。

一方、polyI:C というウイルス 2 重鎖 RNA のアナログは TLR3 のリガンドとして機能することを共同研究者の松本研究員 (当時) が発見しました。松本が作製したヒト TLR3 の単クローン抗体 (TLR3.7) が線維芽細胞 (MRC5) の TLR3 の機能を阻害し、(樹状細胞 TLR3 はエンドソームに発現しているが MRC5 では細胞表面に出ている) それによって MRC5 の IFN- β 発現が阻害されることが偶然証明できました。polyI:C は非常に効率よく樹状細胞を活性化しますが、これは主に TLR3 の活性化によるものです。当時、polyI:C は免疫アジュバントとしてがん治療などに使われていました。しかし、エンドトキシン様の副作用を起こすため創薬としては棄却されました。TLR3 の KO マウスの論文が Nature に報告

されたため、われわれの論文は Nature に受理されませんでした。

TLR3 は TLR2 と異なり、1 型 IFN と IL-12 を誘導します。MyD88 と異なるアダプター分子が下流にあって IFN を誘導しているはずですが。私たちは TLR3 に特有の下流分子の同定に全力を注ぐことにしました。押海博士と松本研究員が協力して程なく TLR3 のアダプター分子 TICAM-1 を同定しました。TICAM-1 は TLR4 の IFN 誘導にも TICAM-2 を介して関与することが証明できました (図 3)。これらは世界のマンモスグループとの競合の中で僅かな研究員の連携で成し遂げられた成果として銘記するものです。TICAM の関連論文は 1,000 回を超える引用を達成しました。

V. がんワクチンと免疫アジュバント

TLR2, TLR3 のリガンドはどちらも樹状細胞を介した細胞性免疫を増強しますが、同時に他細胞にも働いて大量のサイトカインを誘導します。急性の応答はサイトカインに代表され、慢性の応答は樹状細胞を介した細胞性免疫に依存します。がんの免疫療法に細胞性免疫の増強は必須ですが、サイトカイン血症は感染とは異なるのでむしろ有害事象のほずで

す。高齢者の治療には炎症を抑えた免疫療法が必要になります。リポ蛋白と polyI:C の構造からサイトカイン血症を起こさないアジュバントのデザインを創案しました。TLR3 アジュバントの開発が結果的に成功しました。

実は polyI:C を含む 2 重鎖 RNA は TLR3 以外に細胞質内の MAVS 経路 (RIG-I/MDA5 のアダプター) も活性化して IFN/サイトカインを産生します。ウイルス防御の為に全身の細胞の MAVS 経路が polyI:C に応答してサイトカイン血症が惹起します。TLR3 はミエロイドと上皮系細胞に発現が限られるため、局所のサイトカインに留まります。これまで polyI:C のアジュバント療法が成功しなかった理由は全身性の MAVS 応答による副作用であったと推定されました。そこで、TLR3 のみを選択的に活性化する構造体を試行錯誤で多数 in vitro 合成し、サイトカイン誘導と抗がん活性をマウスで比較する作業を行いました。50 種類以上作製しましたが、2 重鎖 RNA 140mer に GpC DNA をキャップした構造体が血中サイトカインを上げずに樹状細胞を活性化し抗がん効果を発揮することが証明されました。これを GMP 用にアミダイドを繋いで化学合成することにチャレンジし、5 年をかけて漸く成功しました (図 4)。

この TLR3 アジュバント、ARNAX は非炎症性の

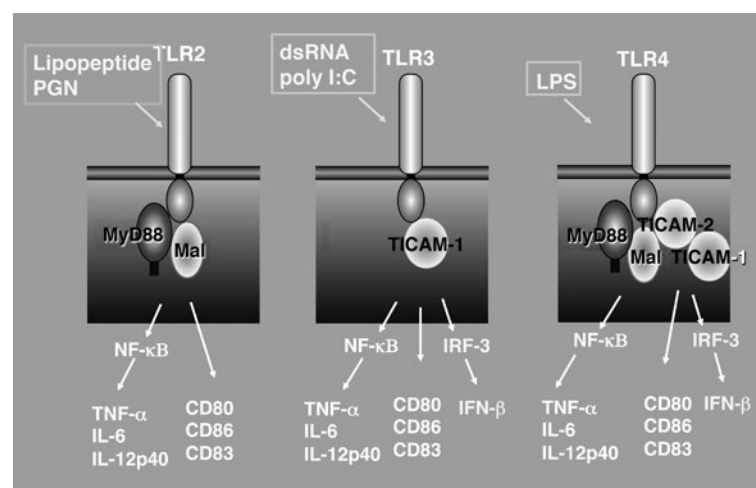


図 3 TLR2, 3, 4 のアダプター分子の相違と下流シグナル

TLR は多様な微生物パターン分子を認識する自然免疫受容体群である。アダプター分子の選択により、TLR2 は MyD88 経路 (左)、TLR3 は TICAM-1 経路のみを (中央) 原則的に活性化する。TLR4 は MyD88 経路、TICAM-1 経路両方を活性化しうる (右)。TLR3 は TICAM-1 と直接結合するが、TLR4 は TICAM-2 を介して TICAM-1 と結合する。TICAM-1 は 1 型 IFN 誘導の転写因子 IRF3 を活性化するアダプターの 1 つである。多くの体細胞で MAVS が IRF3 を活性化して抗ウイルス環境を誘導するが、樹状細胞は TLR3/TICAM-1 経路を持つため細胞性免疫を効率よく起動できる。

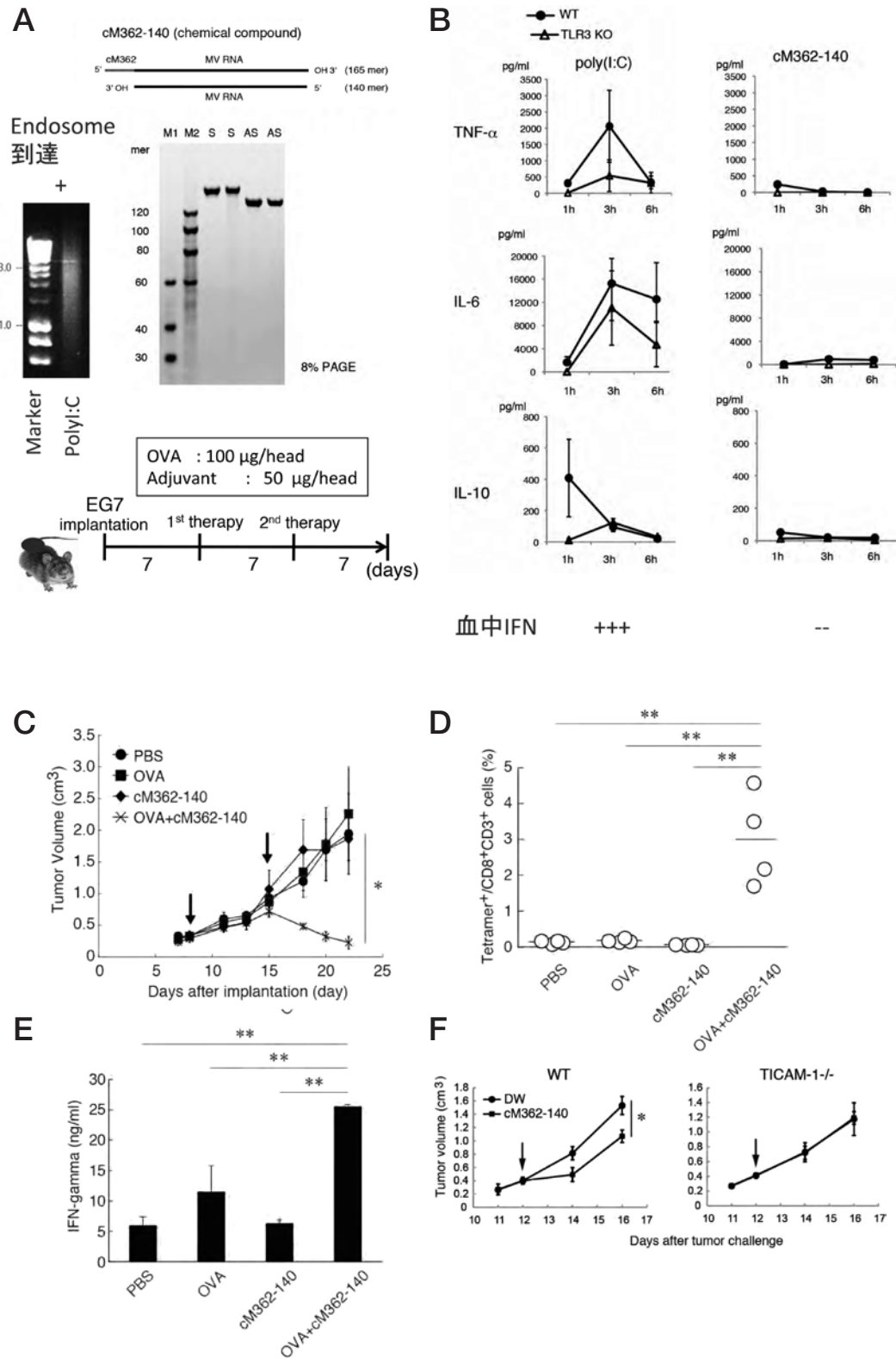


図4 TLR3特異アジュバントARNAXの性質

これまで2重鎖RNAミックスpolyI:Cは優れた樹状細胞活性化能を評価されていたが、TLR3とMDA5/MAVS経路を同時活性化するため副作用を免れず、ワクチン増強剤としては棄却されていた。われわれがデザインしたTLR3特異的アジュバントARNAXの構造を図示する(A)。ARNAXはpolyI:Cと異なり、均一のシングルバンド化合物である(A)。ARNAXをマウスに投与するとpolyI:Cと異なり殆ど血中に炎症性サイトカイン、I型IFNを上げない(B)。しかしローカルにIL-12をpolyI:Cよりよく誘導し、がん抗原ペプチドと併用のワクチン療法で移植がんを効果的に退縮させる(C)。脾臓で樹状細胞は効率よくNKとCTLを活性化する(D~F)。がんの抗原ペプチドと併用すると大量の抗原特異的CTL誘導が確認できる。

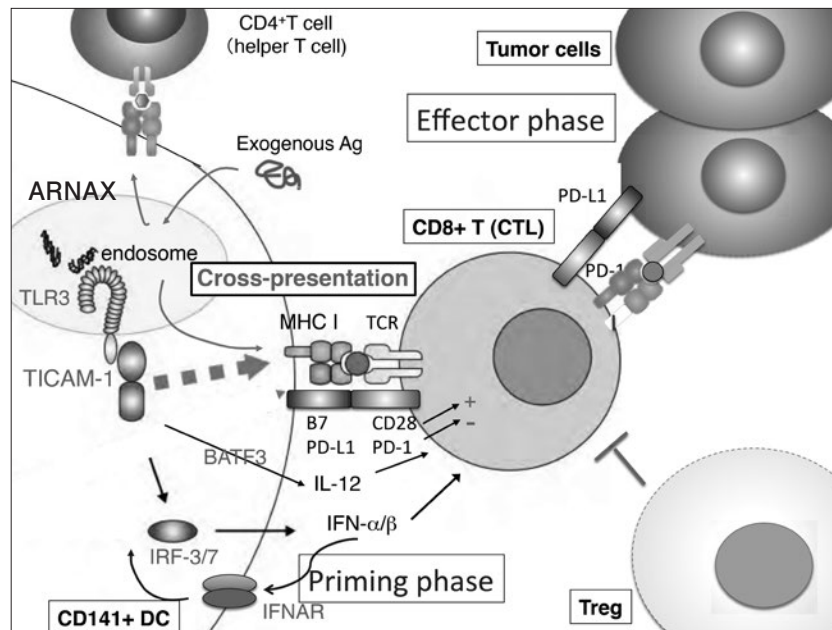


図5 ARNAXのワクチンアジュバントとしての作用機序

ARNAXは樹状細胞TLR3に選択的に働き、IL-12、IFN- β を局所産生させる。体細胞は殆どTLR3陰性のため炎症性サイトカインを血中で上げない。このような炎症制御の状況でもARNAXは樹状細胞のNK、CTL活性化を十分高く誘導する。ARNAXはがんの微小環境改善にも有効と予測されている。

免疫アジュバントとして、世界の期待するワクチン補助剤になりつつあります。紙面に限られますのでその作用機序をここで精緻に述べませんが、担がんマウスで解析した結果を纏めて図示します(図5)。

し解明し、特にヒトの疾患、慢性炎症を抑えた免疫増強剤の開発に些々かに貢献できたと思えるところで研究を纏めさせて頂けたことを感謝しております。

おわりに

研究の本質は自由性にあります。免疫の非自己識別とは免疫でのみ見える変異遺伝子産物の検知と自己の遺伝子の均一性を保持することにあります。獲得免疫(リンパ球)の識別機構に関する研究は長い歴史と反芻から精緻な認識と分子間応答の仕組みが解明されてきましたが、このことを理解する文脈になっていないからがんや感染症が不治なままなのだと思います。獲得免疫は脊椎動物に特化したリンパ球に備わる生体防御の一型です。しかし、地球型生命に普遍的な生体防御系(=自然免疫)の警鐘なくして、起動しないプログラムになっています。個体の生存応答は凝固系、補体系、RNAi系、パターン認識系(TLRを含む)、など深く広義の生体防御であり、免疫です。私は太古の多細胞生物と微生物の共存の歴史に思い至ります。私の研究が補体系、TLRについて非自己識別のメカニズムをほんの少

謝辞

この度、第51回の小島三郎記念文化賞の栄誉の端に加えて頂き、感謝申し上げます。ご推薦頂きました北海道大学医学研究科長笠原正典先生および選考委員の諸先生、黒住医学研究振興財団の皆様にご感謝申し上げます。本受賞研究は恩師、豊島久真男先生のご指導の成果であり、大阪府立成人病センターと北海道大学のスタッフ陣、特に松本美佐子准教授、押海裕之講師、西川富美子氏、佐藤治子氏の協力によって実現しました。ここに深く謝辞を申し述べます。

文献

- 1) Seya, T., V. M. Holers, and J. P. Atkinson. 1985. Purification and functional analysis of the polymorphic variants of the C3b/C4b receptor (CR1), and comparison to H, C4b-binding protein (C4bp), and decay-accelerating factor (DAF). *J. Immunol.* 135 : 2661-2667.
- 2) Seya, T., S. Nagasawa, and J. P. Atkinson. 1986. Location

- of the interchain disulfide bonds of the fourth component of human complement (C4); Evidence based on the liberation of fragments secondary to thiol-disulfide interchange reactions. *J. Immunol.* **136** : 4152-4156.
- 3) Seya, T. J. R. Turner, and J. P. Atkinson. 1986. Purification and characterization of a membrane protein (gp 45-70) which is a cofactor for cleavage of C3b and C4b. *J. Exp. Med.* **163** : 837-855.
 - 4) Seya, T., M. W. Nickells, T. C. Farries, and J. P. Atkinson. 1987. Additional forms of human decay accelerating factor (DAF). *J. Immunol.* **139** : 1260-1267.
 - 5) Lublin, D. M., M. K. Linzesky, T. W. Post, M. A. Arce, M. M. Le Bearu, M. B. Rebutisch, R. S. Lemons, T. Seya, and J. P. Atkinson. 1988. Molecular cloning and chromosomal localization of human membrane cofactor protein (MCP) : evidence for inclusion in multi-gene family of complement-regulatory proteins. *J. Exp. Med.* **168** : 181-194.
 - 6) Miyagawa, S., H. Hirose, R. Shirakura, Y. Naka, S. Nakata, Y. Kawashima, T. Seya, M. Matsumoto, A. Uenaka, and H. Kitamura. 1988. The mechanism of discordant xenograft rejection. *Transplantation* **46** : 825-830.
 - 7) Seya, T., and J. P. Atkinson. 1989. Functional properties of membrane cofactor protein of complement. *Biochem. J.* **264** : 581-588.
 - 8) Matsumoto, M., K. Nagaki, H. Kitamura, S. Kuramitsu, S. Nagasawa, and T. Seya. 1989. Probing the C4-binding site on C1s with monoclonal antibodies : evidence for a C4/C4b-binding site on the g domain. *J. Immunol.* **142** : 2743-2750.
 - 9) Seya, T., T. Hara, M. Matsumoto, and H. Akedo. 1990. Quantitative analysis of membrane cofactor protein (MCP) of complement : High expression of MCP on human leukemia cell lines, which is down-regulated during cell-differentiation. *J. Immunol.* **145** : 238-245.
 - 10) Seya, T., T. Hara, M. Matsumoto, Y. Sugita, and H. Akedo. 1990. Complement-mediated tumor cell damage induced by antibodies against membrane cofactor protein (MCP, CD46). *J. Exp. Med.* **172** : 1673-1680.
 - 11) Matsumoto, M., T. Seya, and S. Nagasawa. 1992. Polymorphism and proteolytic fragments of granulocyte membrane cofactor protein (MCP, CD46) of complement. *Biochem. J.* **281** : 493-499.
 - 12) Hara, T., A. Kojima, H. Fukuda, T. Masaoka, Y. Fukumori, M. Matsumoto, and T. Seya. 1992. Levels of complement regulatory proteins, CD35 (CR1), CD46 (MCP) and CD55 (DAF) in human hematological malignancies. *Brit. J. Haematol.* **82** : 368-373.
 - 13) Matsumoto, M., and T. Seya. 1993. Homologous C3 deposition and homotypic cell adhesion in a human myeloid cell line, p39. *Eur. J. Immunol.* **23** : 2270-2278
 - 14) Kojima, A., K. Iwata, T. Seya, M. Matsumoto, H. Ariga, J. P. Atkinson, and S. Nagasawa. 1993. Membrane cofactor protein (CD46) protects cells predominantly from alternative complement pathway-mediated C3 fragment deposition and cytolysis. *J. Immunol.* **151** : 1519-1527.
 - 15) Iwata, K., T. Seya, H. Ariga, and S. Nagasawa. 1994. Expression of a hybrid complement regulatory protein, membrane cofactor protein (MCP)-decay-accelerating factor (DAF) on chinese hamster ovary cells ; comparison of its regulatory effect with those of DAF and MCP. *J. Immunol.* **152** : 3436-3444.
 - 16) Hatanaka, M., T. Seya, S. Inai, and A. Shimizu. 1994. The effects of mild reduction on the structure and function of the ninth component of complement (C9). *Biochim. Biophys. Acta* **1209** : 117-122.
 - 17) Kim, Y. U., T. Kinoshita, H. Molina, D. Hourcade, T. Seya, L. M. Wagner, and V. M. Holers. 1995. Mouse complement regulatory protein CRRY/P65 utilizes the specific mechanisms of both human decay-accelerating factor (DAF) and membrane cofactor protein (MCP). *J. Exp. Med.* **181** : 151-159.
 - 18) Matsumoto, M., F. Yamashita, K. Iida, M. Tomita, and T. Seya. 1995. Purification and characterization of a human membrane protein that activates the alternative complement pathway and allows the deposition of homologous C3. *J. Exp. Med.* **181** : 115-125.
 - 19) Iwata, K., T. Seya, Y. Yanagi, J. M. Pesando, P. M. Johnson, M. Okabe, S. Ueda, H. Ariga, and S. Nagasawa. 1995. Diversity of the sites for measles virus infection and for inactivation of complement C3b and C4b on membrane cofactor protein (MCP, CD46). *J. Biol. Chem.* **270** : 15148-15152.
 - 20) Hatanaka, M., T. Seya, T. Hara, M. Matsumoto, M. Nonaka, J. Takeda, and A. Shimizu. 1996. Mechanisms involved in loss of glycan phosphatidyl inositol-anchored complement regulatory proteins, decay-accelerating factor (DAF, CD55) and CD59, in human leukemia cell lines. *Biochem. J.* **314** : 969-976.
 - 21) Hirano, A., S. Yant, K. Iwata, J. Korte-Sarfarty, M. Okabe, T. Seya, S. Nagasawa, and T. C. Wong. 1996. Cellular receptor CD46 is down-regulated through recognition of its transmembrane-cytoplasmic domains rather than hemagglutinin-binding domain in cells persistently infected by measles virus. *J. Virol.* **70** : 6929-6936.
 - 22) Matsumoto, M., J. Takeda, N. Inoue, T. Hara, M. Hatanaka, K. Takahashi, S. Nagasawa, H. Akedo, and T. Seya. 1997. A novel protein which participates in nonself discrimination of malignant cells by homologous complement. *Nature Med.* **3** : 1266-1270.
 - 23) Tsujimura, A., K. Shida, K. Kitamura, M. Nomura, J. Takeda, H. Tanaka, M. Matsumoto, K. Matsumiya, A. Okuyama, Y. Nishimune, M. Okabe, and T. Seya. 1998. Molecular cloning of murine homologue of membrane cofactor protein (MCP, CD46) : preferential expression in testicular germ cells. *Biochem. J.* **330** : 163-168.
 - 24) Doi, Y., M. Kurita, M. Matsumoto, T. Kondo, T. Noda, Sa. Tsukita, Sh. Tsukita, and T. Seya. 1998. Moesin is not a receptor for measles virus entry into mouse embryonic stem cells. *J. Virol.* **72** : 1586-1592.

- 25) Seya, T., N. A. Begum, and M. Masumoto. 1998. Mycoplasma origin of tumor cell protein. *Nature Med.* **4** : 133.
- 26) Matsumoto, M., M. Nishiguchi, S. Kikkawa, H. Nishimura, S. Nagasawa, and T. Seya. 1998. Structural and functional properties of complement-activating protein M161Ag, a *Mycoplasma fermentans* gene product that induces cytokine production by human monocytes. *J. Biol. Chem.* **273** : 12407-12414.
- 27) Hazeki, K., O. Hazeki, T. Matsuo, T. Seya, T. Yamashita, S. Nagasawa, H. Band, and M. Ui. 1999. Role of Syk in Fcγ receptor-coupled tyrosine phosphorylation of Cbl in a manner susceptible to inhibition by protein kinase C. *Eur. J. Immunol.* **29** : 3302-3312.
- 28) Shida, K., M. Nomura, M. Kurita-Taniguchi, M. Matsumoto, K. Toyoshima, and T. Seya. 1999. The 3'-UT of the ubiquitous message of human CD46 confers selective suppression of protein production in murine cells. *Eur. J. Immunol.* **29** : 3603-3608.
- 29) Kurita-Taniguchi, M., A. Fukui, K. Hazeki, A. Hirano, S. Tsuji, M. Watanabe, M. Matsumoto, S. Ueda, and T. Seya. 2000. Activation of human macrophages through CD46 (measles virus receptor) : Production of IL-12 p40 and nitric oxide in association with recruitment of SHP-1 to CD46. *J. Immunol.* **165** : 5143-5152.
- 30) Tsuji, S., M. Matsumoto, O. Takeuchi, S. Akira, I. Azuma, A. Hayashi, K. Toyoshima, and T. Seya. 2000. Maturation of human dendritic cells by cell-wall skeleton of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin : involvement of Toll-like receptors. *Infect. Immun.* **68** : 6883-6890.
- 31) Kikkawa, S., M. Matsumoto, T. Sasaki, M. Nishiguchi, K. Tanaka, K. Toyoshima, and T. Seya. 2000. Complement activation on *Mycoplasma fermentans* induced mycoplasma clearance from infected cells : Probing the organism with mAbs against M161Ag. *Infect. Immun.* **68** : 1672-1680.
- 32) Nomura, M., A. Tsujimura, N. A. Begum, M. Matsumoto, K. Toyoshima, and T. Seya. 2000. Mechanism of gene regulation of membrane cofactor protein (CD46) in mice : Identification and characterization of a silencer regulatory element in the 3'-flanking region of the murine CD46 gene. *Biochem. J.* **351** : 353-365.
- 33) Fukui, A., N. Inoue, M. Matsumoto, M. Nomura, Y. Matsuda, K. Toyoshima, and T. Seya. 2001. Molecular cloning and functional characterization of chicken Toll-like receptors. *J. Biol. Chem.* **276** : 47143-47149.
- 34) Tsuji, S., J. Uehori, M. Matsumoto, Y. Suzuki, A. Matsuhisa, K. Toyoshima, and T. Seya. 2001. Human intelectin is a novel soluble lectin that recognizes galactofuranose in carbohydrate chains of bacterial cell wall. *J. Biol. Chem.* **276** : 23456-23463.
- 35) Seya T. (one of the 96 authors). 2001. Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. The RIKEN Genome Exploration Research Group Phase II Team and the FANTOM Consortium. Functional annotation meeting. *Nature* **409** : 685-690.
- 36) Nishiguchi, M., M. Matsumoto, T. Takao, M. Hoshino, Y. Shimonishi, S. Tsuji, O. Takeuchi, S. Akira, K. Toyoshima, and T. Seya. 2001. *Mycoplasma fermentans* lipoprotein M161Ag-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2 : Role of N-terminal hydrophobic portion in its multiple functions. *J. Immunol.* **166** : 2610-2616.
- 37) Begum, N. A., M. Kobayashi, Y. Moriwaki, M. Matsumoto, K. Toyoshima, and T. Seya. 2002. *Mycobacterium bovis* BCG cell wall and LPS induce a novel gene, *BIGM103*, whose main frame encodes a 7-TM protein : identification of a new protein family having Zn-transporter and Zn-metalloprotease signatures. *Genomics* **80** : 630-645.
- 38) Inoue, N., M. Ikawa, T. Nakanishi, M. Matsumoto, M. Nomura, T. Seya, and M. Okabe. 2003. Disruption of the mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Molec. Cell. Biol.* **23** : 2614-2622.
- 39) Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, and T. Seya. 2003. TICAM-1, an adapter molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nature Immunol.* **4** : 161-167.
- 40) Uehori, J., M. Matsumoto, S. Tsuji, S. Akazawa, O. Takeuchi, S. Akira, T. Kawata, I. Azuma, K. Toyoshima, and T. Seya. 2003. Simultaneous blocking of human Toll-like receptor 2 and 4 suppresses myeloid dendritic cell activation induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG)-peptidoglycan (PGN). *Infect. Immun.* **71** : 4238-4249.
- 41) Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, and T. Seya. 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol.* **171** : 3154-3162.
- 42) Oshiumi, H., K. Shida, M. Sasai, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya. 2003. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to Toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J. Biol. Chem.* **278** : 49751-49762.
- 43) Akazawa T., H. Masuda, Y. Saeki, M. Matsumoto, K. Takeda, S. Akira, K. Tsujimura, K. Kuzushima, T. Takahashi, I. Azuma, S. Akira, K. Toyoshima, and T. Seya. 2004. Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice. *Cancer Res.* **64** : 757-764.
- 44) Tsujita, T., H. Tsukada, M. Nakao, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2004. Sensing Bacterial Flagellin by Membrane and Soluble Orthologs of Toll-like Receptor 5 in Rainbow Trout (*Onchorhynchus mikiss*). *J. Biol. Chem.* **279** : 487588-48597.
- 45) Sasai, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto, N. Inoue, F. Fujita, M. Nakanishi, and T. Seya. 2005. Cutting Edge : NF-κB-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN Regulatory Factor 3 activation. *J. Immunol.* **174** : 27-30.
- 46) Nakao, Y., K. Funami, S. Kikkawa, M. Taniguchi, M. Ni-

- shiguchi, Y. Fukumori, T. Seya, and M. Matsumoto. 2005. Surface-expressed TLR 6 Participates in the Recognition of Diacylated Lipopeptide and Peptidoglycan in Human Cells. *J. Immunol.* **174** : 1566-1573.
- 47) Oshiumi, H., K. Shida, R. Goitsuka, Y. Kimura, J. Katoh, S. Ohba, Y. Tamaki, T. Hattori, N. Yamada, N. Inoue, M. Matsumoto, S. Mizuno, and T. Seya. 2005. Regulator of complement activation (RCA) locus in chicken : Identification of chicken RCA gene cluster and functional RCA proteins. *J. Immunol.* **175**:1724-1734.
- 48) Uehori, J., K. Fukase, T. Akazawa, T. Uematsu, S. Akira, S. Funami, K. Shingai, M. Matsumoto, I. Azuma, K. Toyoshima, S. Kusumoto, and T. Seya. 2005. Dendritic cell maturation Induced by Muramyl Dipeptide (MDP) Derivatives : Monoacylated MDP confers TLR2/TLR4 activation. *J. Immunol.* **174** : 7096-7103.
- 49) Shingai, M., N. Inoue, M. Okabe, T. Akazawa, Y. Miyamoto, M. Ayata, K. Honda, M. Kurita-Taniguchi, M. Matsumoto, H. Ogura, T. Taniguchi, and T. Seya. 2005. Wild-type measles virus infection in human CD46/CD150-transgenic mice : CD11c-positive dendritic establish systemic viral infection. *J. Immunol.* **175** : 3252-3261.
- 50) Sasai, M., M. Shingai, K. Funami, M. Yoneyama, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya. 2006. NAPI (NAK-associated protein 1) participates in both the TLR3 and the cytoplasmic pathways in type I interferon induction. *J. Immunol.* **177** : 8676-8683.
- 51) Ishii, A., A. Matsuo, H. Sawa, T. Tsujita, K. Shida, M. Matsumoto, and T. Seya. 2007. Lamprey Toll-like receptors with properties distinct from those of variable lymphocyte receptors. *J. Immunol.* **178** : 397-406.
- 52) Akazawa T., M. Okuno, Y. Okuda, K. Tsujimura, T. Takahashi, M. Ikawa, M. Okabe, T. Ebihara, M. Shingai, N. Inoue, M. Tanaka-Okamoto, H. Ishizaki, J. Miyoshi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2007. Antitumor NK activation induced by the Toll-like receptor3-TICAM-1 (TRIF) pathway in myeloid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104** : 252-257.
- 53) Shingai, M., T. Ebihara, N. A. Begum, A. Kato, , T. Honma, K. Matsumoto, H. Saito, H. Ogura, M. Matsumoto, and T. Seya. 2007. Differential type I interferon (IFN) inducing abilities of wild-type vs. vaccine strains of measles virus. *J. Immunol.* **179** : 6123-6133.
- 54) Funami K., M. Sasai, Y. Ohba, H. Oshiumi, T. Seya, and M. Matsumoto. 2007. Spatiotemporal mobilization of Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 in response to dsRNA. *J. Immunol.* **179** : 6867-6872.
- 55) Shime, H., M. Yabu, T. Akazawa, K. Kodama, M. Matsumoto, T. Seya and N. Inoue. 2008. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23-IL-17 proinflammatory pathway. *J. Immunol.* **180** : 7175-7183.
- 56) Matsuo, A., H. Oshiumi, T. Tsujita, H. Mitani, H. Kasai, M. Yoshimizu, M. Matsumoto, and T. Seya. 2008. Teleost TLR22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from birnaviruses. *J. Immunol.* **181** : 3474-3485.
- 57) Ebihara, T., M. Shingai, M. Matsumoto, T. Wakita, and T. Seya. 2008. Hepatitis C virus (HCV)-infected hepatocytes extrinsically modulate dendritic cell maturation to activate T cells and natural killer cells. *Hepatology.* **48** : 48-58.
- 58) Funami K., M. Sasai, H. Oshiumi, T. Seya, and M. Matsumoto. 2008. Homo-oligomerization is essential for Toll/IL-1 receptor domain containing adaptor molecule-1-mediated NF-kappaB and interferon regulatory factor-3 activation. *J. Biol. Chem.* **283** : 18283-18291.
- 59) Fukuda, K., T. Watanabe, T. Tokisue, T. Tsujita, S. Nishikawa, T. Hasegawa, T. Seya, and M. Matsumoto. 2008. Modulation of Double-stranded RNA Recognition by the N-terminal Histidine-rich Region of the Human Toll-like Receptor 3. *J. Biol. Chem.* **283** : 22787-22794.
- 60) Itoh, K., A. Watanabe, K. Funami, T. Seya, and M. Matsumoto, 2008. The clathrin-mediated endocytic pathway participates in dsRNA-induced IFN-beta production. *J. Immunol.* **181** : 5522-5529.
- 61) Oshiumi, H., M. Matsumoto, S. Hatakeyama, and T. Seya. 2009. Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-b induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.* **284** : 807-817.
- 62) Iwakiri, D., L. Zhou, M. Samanta, M. Matsumoto, T. Ebihara, T. Seya, S. Imai, M. Fujieda, K. Kawa, and K. Takada. 2009. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3. *J. Exp. Med.* **206** : 2091-2099.
- 63) Tatematsu, M., A. Ishii, H. Oshiumi, M. Horiuchi, F. Inagaki, T. Seya, and M. Matsumoto. 2010. A molecular mechanism for Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 (TICAM-1)-mediated IRF-3 activation. *J. Biol. Chem.* **285** : 20128-20136.
- 64) Ebihara, T., M. Azuma, H. Oshiumi, J. Kasamatsu, K. Iwabuchi, K. Matsumoto, H. Saito, T. Taniguchi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Identification of a poly(I:C)-inducible membrane protein, that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J. Exp. Med.* **207** : 2675-2687.
- 65) Oshiumi, H., M. Miyashita, N. Inoue, M. Okabe, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Essential role of Riplet in RIG-I-dependent antiviral innate immune responses. *Cell Host Microbe.* **8** : 496-509.
- 66) Watanabe, A., M. Tatematsu, K. Saeki, S. Shibata, H. Shime, A. Yoshimura, C. Obuse, T. Seya, and M. Matsumoto. 2011. Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I:C)-mediated TLR3 activation. *J. Biol. Chem.* **86** : 10702-10711.
- 67) Miyashita, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. The SKI2-related helicase DDX60 is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling. *Molec. Cell. Biol.* **31** : 3802-3819.
- 68) Oshiumi, H., M. Okamoto, K. Fujii, T. Kawanishi, M. Matsumoto, S. Koike, and T. Seya. 2011. The TLR3-TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to

- poliovirus infection. *J. Immunol.* **187** : 5320-5327.
- 69) Sancho-Shimizu, V., R. Pérez de Diego, L. Lorenzo, R. Halwani, A. Alangari, S. Fabrega, A. Cardon, J. Maluenda, M. Tatematsu, F. Mahvelati, M. Herman, M. Ciancanelli, Y. Guo, A. Ghadiri, S. Boucheriti, S. Plancoulaine, C. Picard, F. Rosenberg, M. Tardieu, P. Lebon, E. Jouanguy, T. Seya, M. Matsumoto, N. Rezeai, D. Chaussabel, A. Puel, L. Abel, S-Y. Zhang, S. Al-Muhsen, and J-L. Casanova. 2011. Human TRIF deficiency in otherwise healthy patients with herpes simplex encephalitis. *J. Clin. Invest.* **121** : 4889-4902.
 - 70) Shime H, M. Matsumoto, H. Oshiumi, S. Tanaka, A. Nakane, Y. Iwakura, H. Tahara, N. Inoue, and T. Seya. 2012. Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proc Natl Acad Sci USA.* **109** : 2066-2071.
 - 71) Azuma M., T. Ebihara, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2012. Cross-priming for antitumor CTL induced by soluble Ag + polyI:C depends on the TICAM-1 pathway in mouse CD11c(+)/CD8 α (+) dendritic cells. *Oncoimmunol.* **1** : 581-594.
 - 72) Tatematsu, M., F. Nishikawa, T. Seya, and M. Matsumoto. 2013. Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA. *Nat Commun.* **4** : 1833.
 - 73) Enokizono, Y., H. Kumeta, K. Funami, M. Horiuchi, J. Sarmiento, K. Yamashita, D. Standley, M. Matsumoto, T. Seya, F. Inagaki. 2013. Structures and interface mapping of the TIR domain-containing adaptor molecules involved in interferon signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* **110** : 19908-19913.
 - 74) Oshiumi, H., M. Miyashita, M. Matsumoto, and T. Seya. 2013. A distinct role of Riplet-mediated K63-Linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses. *PLoS Pathog.* **9**(8) : e1003533.
 - 75) Nishitsuji, H., K. Funami, Y. Shimizu, S. Ujino, K. Sugiyama, T. Seya, H. Takaku, and K. Shimotohno. 2013. Hepatitis C virus infection induces inflammatory cytokines and chemokines mediated by the cross talk between hepatocytes and stellate cells. *J Virol.* **87** : 8169-8178.
 - 76) Takaki, H., M. Takeda M. Tahara, M. Shingai, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2013. The MyD88 pathway in plasmacytoid and CD4+ dendritic cells primarily triggers type I IFN production against measles virus in a mouse infection model. *J. Immunol.* **191** : 4740-4747.
 - 77) Shime, H., A. Kojima, A. Maruyama, Y. Saito, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. Myeloid-derived suppressor cells confer tumor-suppressive functions on natural killer cells via polyinosinic:polycytidylic acid treatment in mouse tumor models. *J. Innate Immun.* **6** : 293-305.
 - 78) Okamoto, M., H. Oshiumi, M. Azuma, N. Kato, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. IPS-1 is essential for type III IFN production by hepatocytes and dendritic cells in response to hepatitis C virus infection. *J. Immunol.* **192** : 2770-2777.
 - 79) Kasamatsu, J., M. Azuma, H. Oshiumi, Y. Morioka, M. Okabe, T. Ebihara, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. INAM Plays a Critical Role in IFN- γ Production by NK Cells Interacting with Polyinosinic-Polycytidylic Acid-Stimulated Accessory Cells. *J. Immunol.* **193** : 5199-5207.
 - 80) Ishii, N., K. Funami, M. Tatematsu, T. Seya, and M. Matsumoto. 2014. Endosomal Localization of TLR8 Confers Distinctive Proteolytic Processing on Human Myeloid Cells. *J. Immunol.* **193** : 5118-5128.
 - 81) Leong, C. R., H. Oshiumi, M. Okamoto, M. Azuma, H. Takaki, M. Matsumoto, K. Chayama, and T. Seya. 2015. A MAVS/TICAM-1-Independent Interferon-Inducing Pathway Contributes to Regulation of Hepatitis B Virus Replication in the Mouse Hydrodynamic Injection Model. *J. Innate Immun.* **7** : 47-58.
 - 82) Matsumoto, M., M. Tatematsu, F. Nishikawa, M. Azuma, N. Ishii, A. Morii-Sakai, H. Shime, and T. Seya. 2015. Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and cytotoxic T cell activation without significant cytokine production in vivo. *Nat Commun.* **6** : e6280.
 - 83) Funami, K., M. Matsumoto, N. Ishii, M. Tatematsu, Y. Enokizono, F. Inagaki, H. Oshiumi, and T. Seya. 2015. A determinant for inner membrane localization in the TIR domain of TICAM-2 : A regulator for TLR4-mediated TICAM-1 signaling. *J. Immunol.* **195** : 4456-4465.
 - 84) Takemura, R., H. Takaki, S. Okada, H. Shime, H. Oshiumi, T. Akazawa, M. Matsumoto, T. Tejima, and T. Seya. 2015. PolyI:C-induced, TLR3/RIP3-dependent necroptosis backs up immune effector-mediated tumor elimination in vivo. *Cancer Immunol Res.* **3** : 902-914.
 - 85) Takashima, K., H. Oshiumi, H. Takaki, M. Matsumoto, and T. Seya. 2015. RIOK-mediated phosphorylation of the MDA5 C-terminal region interferes with MDA5 assembly and attenuates MDA5-mediated antiviral innate immune response. *Cell Reports.* S2211-1247.
 - 86) Oshiumi, H., M. Miyashita, M. Okamoto, Y. Morioka, M. Okabe, M. Matsumoto, and T. Seya. 2015. Dual roles of DDX60 in antiviral innate immunity and regulation of DDX60 functions by epidermal growth factor. *Cell Reports.* **11** : 1193-1207.
 - 87) Romanets, O., L. M. Kovalevska, T. Seya, S. P. Sidorenko, and B. Horvat. 2015. Interaction of Measles virus hemagglutinin with CD150-expressing dendritic cells is sufficient to induce immunosuppression. *Cell Molec Immunol.* 2015 Jun 15. doi : 10.1038/cmi.2015.55.
 - 88) Tatematsu, M., K. Funami, N. Ishii, T. Seya, C. Obuse, M. Matsumoto. 2015. LRRC59 is involved in trafficking of nucleic acid-sensing TLRs from the ER. *J Immunol.* **195** : 4933-4942.
 - 89) Azuma, M., Y. Takeda, H. Nakajima, H. Sugiyama, T. Ebihara, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2015. BATF3 fundamentally supports TLR3-derived IL-12 induction in CD8⁺ dendritic cells, which promotes antitumor T cell responses by Poly(I:C). *Oncoimmunol.* (in press).

- 90) Tatematsu, M., R. Yoshida, Y. Morioka, A. Watanabe, K. Saeki, T. Seya, and M. Matsumoto. 2016. Raftlin controls LPS-induced TLR4 internalization and TICAM-1-dependent signalling. *J Immunol.* (in press).
- 91) Kataoka, K., Y. Shiraishi, Y. Takeda, S. Sakata, M. Matsumoto, S. Nagano, Y. Nagata, A. Kitanaka, S. Mizuno, H. Tanaka, K. Chiba, Y. Watatani, H. Suzuki, T. Yoshizato, K. Yoshida, M. Sanada, H. Itonaga, Y. Imaizumi, Y. Totoki, W. Munakata, H. Nakamura, N. Hama, K. Shide, Y. Kubuki, T. Hidaka, T. Kameda, K. Masuda, N. Minato, K. Kashiwase, K. Izutsu, A. Takaori-Kondo, Y. Miyazaki, S. Takahashi, T. Shibata, H. Kawamoto, Y. Akatsuka, K. Shimoda, K. Takeuchi, T. Seya, S. Miyano, and S. Ogawa. 2016. Aberrant PD-L1 expression via 3'-UTR disruption in multiple cancers. *Nature.* (in press).
- 92) Takeda, Y., M. Azuma, M. Matsumoto, T. Seya. 2016. Tumor killing efficacy coincides with CD11c up-regulation in antigen-specific CD8⁺ T cells during poly(I:C) vaccine immunotherapy. *Oncoimmunol.* (submitted).