

SUMMARY :

REVIEW

RIG-I and cancer immunotherapy

PRODUCTS

Nucleic acid signaling reporter cell lines

- THP1-Dual™ KO-TBK1 Cells
- THP1-Dual™ KO-IRF3 Cells

Nucleic acid-signaling inhibitors

- BX795
- MRT67307
- RU.521
- H-151

NATE™ Nucleic acid transfection enhancer

RIG-I & cancer immunotherapy

免疫チェックポイント阻害剤 (ICIs) の開発により、がん免疫療法に革命がもたらされたものの、完全寛解は依然として一部の患者に限られています。ICIs は抗腫瘍 T 細胞応答に対するチェックポイント抑制を緩和することによって作用し、免疫原性、T-cell inflamed (T 細胞浸潤性) または「Hot (熱い)」腫瘍に対して最も効果を発揮します。対照的に、T 細胞がほとんどなく、免疫抑制細胞が浸潤している「Cold (冷たい)」腫瘍の微小環境 (TMEs) では ICIs の効率性は芳しくありません。「Hot」TMEs では、アポトーシス誘導分子や T 細胞誘引ケモカインなど、I 型インターフェロン (IFN-I) およびインターフェロン誘導性遺伝子 (ISGs) の発現増加が、強力な抗腫瘍応答に寄与します。現在、「Cold」TMEs を「Hot」TMEs に変換するための多くの治療戦略が活発に検討されています。新たな戦略のひとつとして、パターン認識受容体 (PRR) アゴニストのアジュバント性の利用が挙げられます。実際、Toll-Like 受容体 9 (TLR9) のアゴニストまたはインターフェロン遺伝子の刺激因子 (STING) を ICIs と組み合わせることは、臨床的に評価されているものの、これまでの予備的結果では期待外れに終わっています¹。

ウイルス RNA センサーであるレチノイン酸誘導遺伝子 I (RIG-I) は、ICI 効力の向上が期待できる代替がん免疫療法剤となります^{2,3}。RIG-I は、RIG-I-Like ヘリカーゼ受容体 (RLR) ファミリーの代表的なメンバーであり、TLR9 や STING とは異なり、腫瘍細胞を含むほぼすべての細胞型で発現されます。前臨床試験では、合成 RIG-I アゴニストの全身送達により、ウイルス感染細胞排除の引き金となるメカニズムと同様の機序を介して、腫瘍増殖を阻害することが示されました³。RIG-I の関与は、(内在的または外在的アポトーシス、およびインフラマソーム誘発性パイロトーシスによる) 優先的な腫瘍細胞死、ならびに自然免疫系および獲得免疫系の I 型インターフェロン媒介性の活性をもたらします⁴。特異的 RIG-I アゴニストである RGT100 は、現在、進行性の固形腫瘍およびリンパ腫治療の第 I/II 相臨床試験 (NCT03065023) の段階にあります⁴。

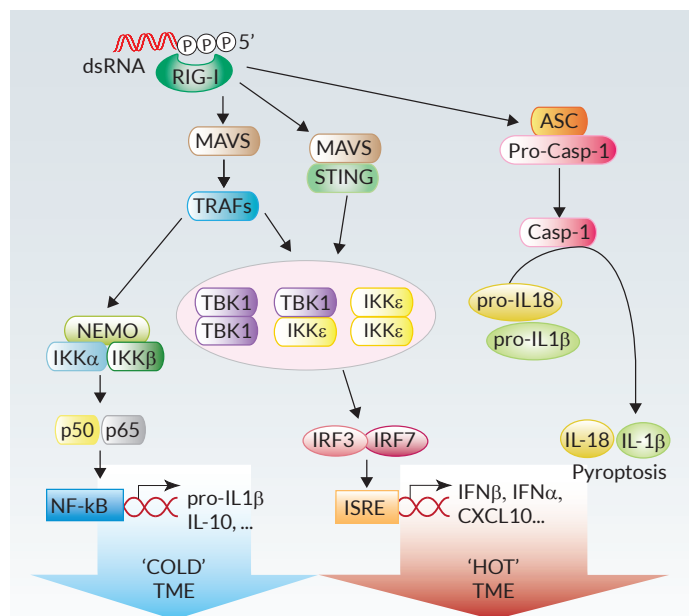
アゴニストの特性解明に端を発し、RIG-I 経路の活性化におけるマルチレベルの複雑性を解明する研究が増えてきています。RIG-I は、5'-三リン酸または三リン酸 (2p または 3pRNA) 含有サイトゾル短鎖二本鎖 RNA (dsRNA) の末端を認識することによってウイルス RNA と宿主 RNA とを区別します。高次構造、シーケンス、

RNA 修飾などの付加的特徴は、RIG-I に対する親和性を高めるものの、それらの *in vivo* での影響はほとんど分かっていません⁴。RIG-I シグナル伝達カスケードは、しばしば単純化された方法で提示されます。活性 RIG-I は、ミトコンドリア抗ウイルスシグナル伝達 (MAVS) アダプターと相互作用して、TBK1 (TANK 結合キナーゼ 1)/IKK ε キナーゼならびに IKK α /IKK β キナーゼの同時活性化を促進します。その結果、これらのキナーゼが IRF-3 と IRF-7 (IRF: インターフェロン制御因子) ならびに NF-κB の活性化を誘導し、それぞれ I 型インターフェロンならびに炎症誘発性サイトカインの産生を引き起こします⁴。というのはものの、RIG-I シグナル伝達では、TRIM25 および Riplet ユビキチナーゼ、TRAF アダプター、ならびにインフラマソーム ASC タンパク質などの他の多くのタンパク質が関与しています。

最近になって、RIG-I シグナル伝達の詳細な制御が明らかにされ、今後の臨床応用のヒントを提供しています。自己 5'-三リン酸 dsRNA またはウイルス誘導性長鎖ノンコーディング RNA などの RIG-I リガンドは、拮抗作用を発揮します^{4,5}。さらに、細胞や刺激の状況に応じて、TBK1/TBK1、TBK1/IKK ε、または IKK ε /IKK α 複合体が弁別的に機能していることも示唆されています⁸。また、TBK1/IKK ε 活性化を個々に媒介する各 TRAFs の優先的細胞発現にも、別の複雑性が存在すると思われます⁹。最後に、他の PRRs は RIG-I シグナル伝達のトランスレギュレーションに寄与します。NLR (NOD-Like 受容体) メンバーである NLRP12 が、TRIM25 媒介性の RIG-I 活性化と RNF125 媒介性の RIG-I 分解⁶を制御するのに対し、RIG-I の応答は STING シグナル伝達とのクロストークによって増強されます⁷。

RIG-I は、単剤として、または ICIs との併用のいずれかにおいて、がん免疫療法の有望な標的ですが、その主な特徴は、その広範な発現およびシグナル伝達の結果、特に I 型インターフェロン産生および優先的腫瘍細胞死であり、これら 2 つは強力な T 細胞応答において鍵となる因子です。しかしながら、RIG-I ベースの治療戦略は、非常に特異的かつ安定なアゴニストを設計することや、炎症誘発性サイトカインの非制御性放出を回避しつつも効率的にアゴニストを送達する様式を開発することなど、複数の課題に直面しています。最後に、治療的成功を導くには、種々の TME 細胞型における RIG-I シグナル伝達をより深く理解することが必要とされるでしょう。

1. Iurescia S. *et al.*, 2018. Nucleic acid sensing machinery: targeting innate immune system for cancer therapy. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* 13:2. 2. Heidegger S. *et al.*, 2019. RIG-I activating immunostimulatory RNA boosts the efficacy of anticancer vaccines and synergizes with immune checkpoint blockade. *EBioMedicine*. 41:146. 3. Poeck H. *et al.*, 2008. 5'-triphosphate-siRNA: turning gene silencing and RIG-I activation against melanoma. *Nat. Med.* 14:1256. 4. Elion DL. *et al.*, 2018. Harnessing RIG-I and intrinsic immunity in the tumor microenvironment for therapeutic cancer treatment. *Oncotarget*. 9:29007. 5. Ren X. *et al.*, 2019. RIG-I selectively discriminates against 5'-monophosphate RNA. *Cell Reports*. 26:2019. 6. Chen ST. *et al.*, 2019. NLRP12 regulates anti-viral RIG-I activation via interaction with TRIM25. *Cell Host Microbe*. 25:602. 7. Zevini A. *et al.*, 2017. Crosstalk between cytoplasmic RIG-I and STING sensing pathways. *Trends Immunol.* 38:194. 8. Perry AK. *et al.*, 2004. Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to Toll-like receptor activation and viral infection. *J. Exp. Med.* 199:1651. 9. Fang R. *et al.*, 2017. MAVS activates TBK1 and IKKε through TRAFs in NEMO dependent and independent manner. *PLoS Pathog.* 13(11):e1006720.



InvivoGen

ASIA

Unit 106, 1F,

15W Phase 3, Hong Kong Science Park,
Pak Shek Kok,
Hong Kong

T: +852 3622 3480
F: +852 3622 3483

info.hk@invivogen.com
www.invivogen.com

Nucleic acid signaling reporter cell lines

InvivoGen 社は、核酸誘導のシグナル伝達経路の研究に利用できるヒト (THP-1 由来) およびマウス (RAW 264.7 由来) レポーター細胞を幅広く提供しています。これらの細胞は、DNA センサー cGAS、RNA センサー RIG-I、あるいは CDN (サイクリックジヌクレオチド) センサー STING などの必須遺伝子がノックアウト (KO) されています。THP1-Dual™ 細胞株から作製された細胞は、IRF (インターフェロン制御因子) 誘導性 Lucia ルシフェラーゼおよび NF- κ B 誘導性 SEAP (分泌型胎盤アルカリホスファターゼ) という 2 つのレポーターシステムを備え、RAW-Lucia™ ISG 細胞株から作製された細胞は、IRF 誘導性 Lucia ルシフェラーゼレポーター遺伝子を有します。この包括的なコレクションに 2 つの新しい細胞株が追加されました。

- THP-1 Dual™ KO-TBK1 Cells **NEW**
- THP-1 Dual™ KO-IRF3 Cells **NEW**

THP1-Dual™ KO-TBK1 および THP1-Dual™ KO-IRF3 細胞株は、それぞれ TBK1 (TANK 結合キナーゼ 1) および IRF3 遺伝子がノックアウトされています。ノックアウトは PCR、シーケンシング、ウエスタンブロット、および機能アッセイによって確認済みです。STING アゴニスト 2'3'-cGAMP で刺激すると、両細胞株の IRF 応答は親株である THP1-Dual™ 細胞株と比較して、有意に低下します (図 1)。しかしながら、異なる RIG-I アゴニストおよびトランスフェクション手法を使用した場合、予期しない逸脱した応答が観察されました (下記の図 2)。

Validation of KO-TBK1 and KO-IRF3 Cells

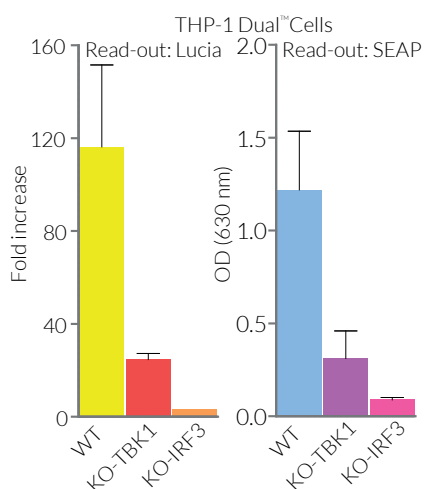


Figure 1: 2'3'-cGAMP-induced IRF or NF- κ B responses in THP-1 Dual™ derived cells. 2×10^5 THP1-Dual™ (WT), KO-TBK1 or KO-IRF3 cells were incubated with 30 μ g/ml 2'3'-cGAMP (STING agonist). After overnight incubation, ISG and NF- κ B induction were assessed by measuring the activity of Lucia luciferase and SEAP in the cell supernatant using QUANTI-Luc™ and QUANTI-Blue™ Solution, respectively. Activity fold increase over non-induced cells (Lucia luciferase readout) or reading of optical density (OD) at 630 nm (SEAP readout) are shown.

Nucleic acid signaling reporter cell collection

- RAW-Lucia ISG™ KO-cGAS
- RAW-Lucia ISG™ KO-IFI16
- RAW-Lucia ISG™ KO-IRF3
- RAW-Lucia ISG™ KO-IRF5
- RAW-Lucia ISG™ KO-IRF7
- RAW-Lucia ISG™ KO-MAVS
- RAW-Lucia ISG™ KO-MDA5
- RAW-Lucia ISG™ KO-RIG-I
- RAW-Lucia ISG™ KO-TBK1
- RAW-Lucia ISG™ KO-TREX1
- THP-1 Dual™ KO-cGAS
- THP-1 Dual™ KO-IFI16
- THP-1 Dual™ KO-MyD
- THP-1 Dual™ KO-STING
- THP-1 Dual™ KO-TREX1

Lucia ルシフェラーゼおよび SEAP レポーター活性は、それぞれ QUANTI-Luc™ 検出薬および QUANTI-Blue™ 検出溶剤を用いて細胞上清中で容易に測定できます。

RAW-Lucia ISG™ KO 細胞は Zeocin™ に耐性があり、THP1-Dual™ KO 細胞は Zeocin™ およびプラストサイジンに耐性があります。

詳細は InvivoGen 社ウェブサイトをご参照ください。

PRODUCT	QUANTITY	CAT. CODE
THP-1 Dual™ KO-IRF3 cells	3-7 $\times 10^6$ cells	thpd-koirf3
THP-1 Dual™ KO-TBK1 cells	3-7 $\times 10^6$ cells	thpd-kotbk

RELATED PRODUCTS

PRODUCT	DESCRIPTION	CAT. CODE
2'3'-cGAMP	mammalian cyclic dinucleotide	tlrl-nacga23-02
3p-hpRNA	5' triphosphate hairpin RNA	tlrl-hprna
5'ppp-dsRNA	5' triphosphate double stranded RNA	tlrl-3prna



www.invivogen.com/ko-cell-lines

Differential responses depending on the RIG-I agonist and transfection reagent

IRF 応答における RIG-I アゴニストの影響

3p-hpRNA および 5'ppp-dsRNA は構造的に異なる RIG-I アゴニストです。3p-hpRNA はパンハンドル型二次構造を有し、RAW-Lucia™ ISG および THP-1 Dual™ 細胞での IRF 応答の大きさから示されるように、5'ppp-dsRNA と比べてはるかに強力な RIG-I アゴニストです (図 2a-d)。

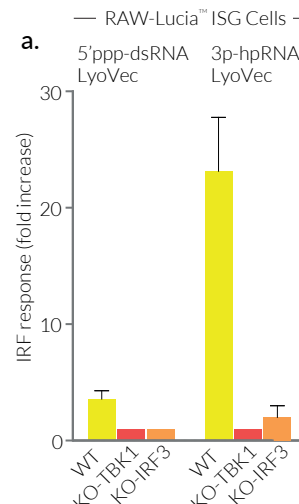
IRF 応答におけるトランスフェクション試薬の影響

5'ppp-dsRNA および 3p-hpRNA は、細胞質に入り RIG-I を活性化させるためには、トランスフェクション試薬と複合体を形成する必要があります。TBK1-KO または IRF3-KO 細胞株では、予想どおり、5'ppp-dsRNA は LyoVec™ (InvivoGen 社製) または LTX と複合体を形成すると、Lucia ルシフェラーゼの誘導能を著しく失います (図 2a-c)。3p-hpRNA が LyoVec™ と複合体を形成した場合も同様の結果が観察されます (図 2a)、LTX と複合体を形成した

場合はそのような結果は示されません (図 2b,c)。TBK1-KO および IRF3-KO 細胞における IRF (Lucia) 応答は、減少するのではなく、予想外に増加しているのです。驚くべきことに、NF- κ B 応答においても、わずかに増加はあるものの、ほとんど影響を受けていません (図 2d)。これらのデータから、トランスフェクション試薬が細胞内の利用能および/またはアゴニストの局在化に影響を与え、下流のシグナル伝達に影響を及ぼしていることが示唆されます。

興味深いことに、別のアゴニストとトランスフェクション試薬を使用すると、RNA センシングまたは制御メカニズムの重複が顕著に現れます^{1,2}。

1. Perry AK. *et al.*, 2004. Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to Toll-like receptor activation and viral infection. *J. Exp. Med.* 199:1651.
2. Deng W. *et al.*, 2008. Negative regulation of virus-triggered IFN- β signaling pathway by alternative splicing of TBK1. *J. Biol. Chem.* 283:35590.



Nucleic acid signaling inhibitors

InvivoGen 社は、核酸誘導シグナル伝達の標的分子など、高品質の合成阻害剤を幅広く提供しています。InvivoGen 社の阻害剤は、細胞アッセイを用いて機能的に検証済みです。

- BX795
- RU.521
- MRT67307 **NEW**
- H-151 **NEW**

TBK1/IKKε inhibitors

BX795 は、IKK 関連キナーゼ TBK1 および IKKε の強力な阻害剤であり、さらなる IRF 活性および ISG (インターフェロン誘導性遺伝子) 発現を阻害します¹ (図 3)。重要なことに、BX795 は標準的な IKKα/IKKβ キナーゼの活性も間接的に阻害するため、それによって NF-κB 転写因子の活性が妨げられます² (図 3)。

MRT67307 は、IKK 関連キナーゼ TBK1 および IKKε の強力かつ可逆的な阻害剤であり、さらなる IRF 活性および ISG 発現を妨げます (図 3)。MRT67307 は、それが由来する BX795 とは異なり、標準的な IKKα/IKKβ キナーゼには影響を与えないため、NF-κB の活性には影響を及ぼしません² (図 3)。

cGAS/STING inhibitors

RU.521 はサイトゾル DNA センサー cGAS の低分子阻害剤です。この薬剤は、cGAS の触媒ポケットを標的とし、ATP および GTP に対するその親和性を低下させることによって、STING アゴニストであるセカンドメッセンジャー 2'3'-cGAMP の合成を阻害します³ (図 4)。RU.521 は、ヒト cGAS よりもマウス cGAS に対してより高い阻害能を示します⁴。

H-151 は、ヒトおよびマウスの STING 活性に対する選択的阻害剤です (図 4)。この合成インドール誘導体は、STING シグナル伝達に必須の 2 つのステップである STING のパルミトイル化とクラスティングを遮断します⁵。H-151 処理により、ヒト細胞内および *in vivo* で炎症誘発性サイトカインの産生を減少させることが示されました。

1. Clark K. *et al.*, 2009. Use of the pharmacological inhibitor BX795 to study the regulation and physiological roles of TBK1 and IκB kinase ε. *J. Biol. Chem.* 284:21. 2. Clark K. *et al.*, 2011. Novel cross-talk within the IKK family controls innate immunity. *Biochem. J.* 434:93. 3. Vincent J. *et al.*, 2017. Small molecule inhibition of cGAS reduces interferon expression in primary macrophages from autoimmune mice. *Nat. Commun.* 28:750. 4. Zhou W. *et al.*, 2018. Structure of the human cGAS-DNA complex reveals enhanced control of immune surveillance. *Cell.* 174:300. 5. Haag S.M. *et al.*, 2018. Targeting STING with covalent small-molecule inhibitors. *Nature.* 559:269.

BX795 and MRT67307 inhibition of TBK1/IKKε signaling

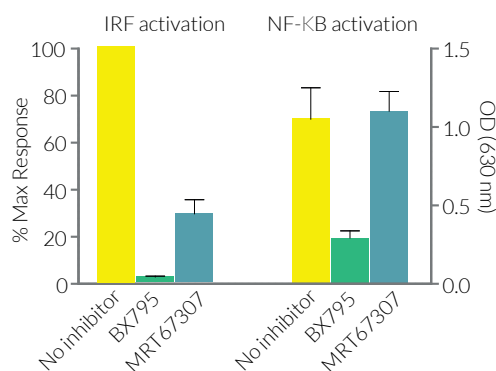


Figure 3: Inhibition of 3p-hpRNA-induced responses in THP1-Dual™ Cells: 2x10⁵ THP1-Dual™ cells were transfected with 1 μg/ml 3p-hpRNA/Lyovec™ with or without 1 μg/ml BX795 or 3 μg/ml MRT67307. After overnight incubation, activation of IRF or NF-κB was assessed by measuring Lucia luciferase or SEAP activity in the supernatant.

RU.521 and H-151 inhibition of cGAS and STING signaling

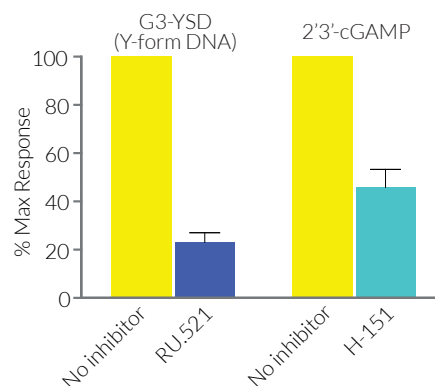


Figure 4: Inhibition of DNA-induced responses in RAW-Lucia™ ISG Cells: 10⁵ RAW-Lucia™ ISG cells were transfected with 1 μg/ml G3-YSD/LTX or incubated with 20 μg/ml 2'3'-cGAMP in the presence or absence of 2.5 μg/ml RU.521 or 130 ng/ml H-151, respectively. After overnight incubation, IRF activation was assessed by measuring Lucia luciferase activity in the supernatant.

PRODUCT	TARGET	QUANTITY	CAT. CODE
BX795	TBK1/IKKε	5mg	tlrl-bx7
H-151	STING	10 mg	inh-h151
MRT67307	TBK1/IKKε	10 mg	inh-mrt
RU.521	cGAS	2 mg	inh-ru521

 www.invivogen.com/prr-signaling-inhibitors

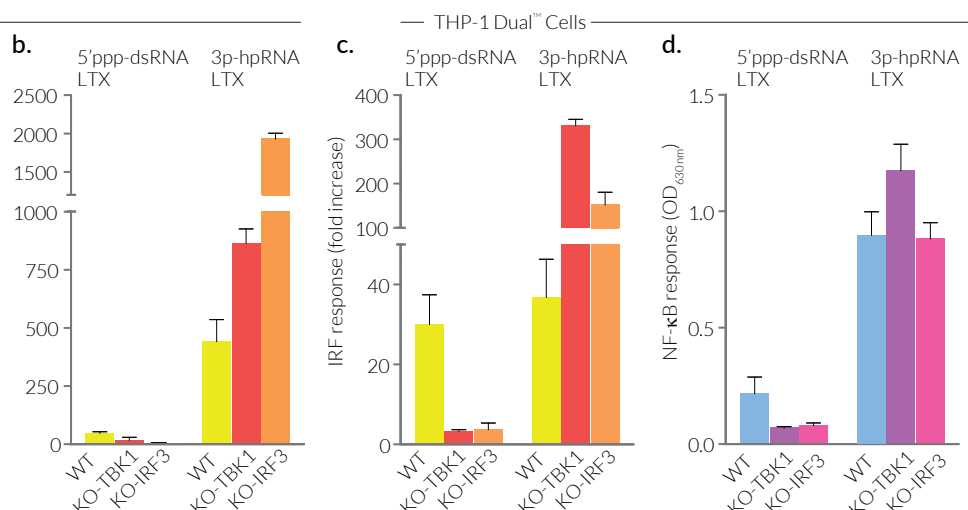


Figure 2: RNA induction of ISG or NF-κB in RAW-Lucia™ ISG or THP1-Dual™-derived cells. 10⁵ RAW-Lucia™ ISG, KO-TBK1 or KO-IRF3 cells (a, b) or 2x10⁵ THP1-Dual™, KO-TBK1 or KO-IRF3 cells (c-d) were transfected with 1 μg/ml 3p-hpRNA or 5'ppp-dsRNA complexed with Lyovec™ (a) or LTX (b-d). After overnight incubation, ISG induction was assessed by measuring bioluminescent activity of the Lucia luciferase in the supernatant using QUANTI-Luc™. Activity fold increase over non-transfected cells is shown (a-c). The NF-κB activity in THP1-Dual™-derived cells was assessed by measuring the SEAP activity in the supernatant using QUANTI-Blue™ Solution. Reading of optical density (OD) at 630 nm is shown (d).

詳細なデータについては InvivoGen 社ウェブサイトをご覧ください

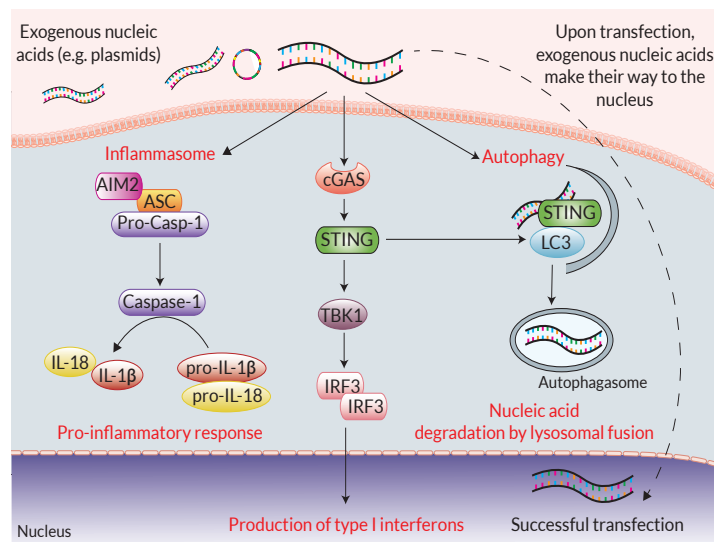
NATE™ Nucleic Acid Transfection Enhancer NEW

InvivoGen 社では、単球細胞やマクロファージなど、トランスフェクションしにくい細胞株での一過性かつ安定なトランスフェクション効率を高めるための、核酸トランスフェクションエンハンサー試薬 NATE™ の提供を始めました。InvivoGen 社がどのようにしてこれを成し遂げたか？ THP-1 や RAW 264.7 レポーター細胞株の改変に精通した専門家として、この答えに興味をお持ちのことでしょう。その解こそ NATE™ 試薬なのです。

- ❖ **柔軟性** : 各種の一般的なトランスフェクション手法と併用可能
- ❖ **簡便性** : トランスフェクション前に細胞に添加するだけ
- ❖ **効率性** : トランスフェクションしにくい細胞でのトランスフェクション効率を向上

Obstacles to successful nucleic acid transfection

真核細胞ではトランスフェクションの間、cGAS/STING、AIM2 インフラマソーム、および LC3 媒介オートファジーなどのサイトソルセンサーによって外因性核酸が検出されます。このような防御的シグナル伝達カスケードの活性化は、しばしばトランスフェクション効率の低下や細胞生存率の低下に加えて、特にトランスフェクションしにくい細胞（例えば免疫細胞）では一貫性のない結果を導きます。



What is NATE™ ?

NATE™ は、免疫細胞のトランスフェクション改善を目指し、InvivoGen 社が特にデザインした核酸トランスフェクションエンハンサーです。NATE™ 試薬は多様な核酸感知経路を阻害するため、外因性の DNA を保護し、その発現を促進します。NATE™ 試薬の使用によって、DNA の発現とトランスフェクションした細胞の割合が共に向上します。

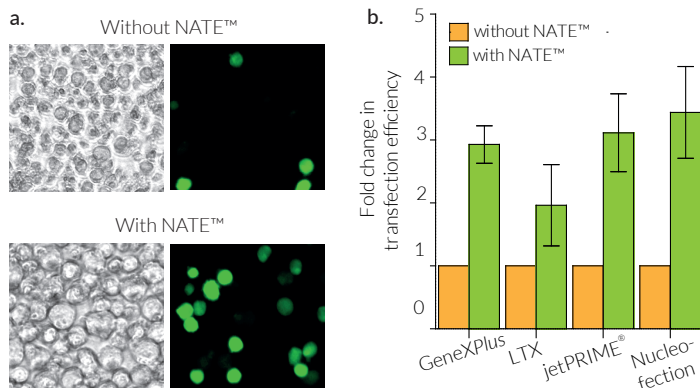
NATE™ 試薬の主な特長 :

- 一般的に使用されるトランスフェクション試薬 (GeneXplus, Lipofectamine® LTX, jetPRIME® など) および物理的手法 (ヌクレオフェクション) との適合性あり
- サイズの大きなプラスミド (>10 kb) を使用しても高いトランスフェクション効率
- 検証されたすべてのトランスフェクションプロトコルにおいて細胞生存率が向上

PRODUCT	QUANTITY	CAT. CODE
NATE™	1 ml (~100 reactions)	lyec-nate

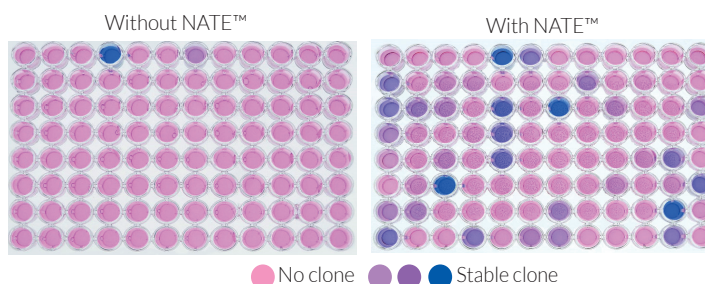
www.invivogen.com/nate

Increased DNA expression in NATE™ treated cells



NATE™ enhances transient DNA expression in human THP-1 monocytes: Transfection of a ~3 kb GFP-expressing plasmid into THP-1 cells was performed using GeneXplus without (a; top; b; yellow) or with (a; bottom; b; green) the NATE™ reagent. After 48 hours, cells were visualized by fluorescence microscopy (a), and transfection efficiency was measured using flow cytometry (b). Data are presented as a fold change normalized to the transfection efficiency without NATE™ reagent.

Increased rate of stably transfected cells with NATE™



NATE™ increases the number of stable SEAP-expressing clones in murine RAW 264.7 macrophages: Transfection of a ~10 kb SEAP-expressing plasmid into RAW 264.7 cells was performed using Lipofectamine® LTX, without (left) or with (right) the NATE™ reagent. After 10 days in selection with Blasticidin, the number of stables clones expressing SEAP (blue wells) was readily visualized using QUANTI-Blue™ Solution detection reagent.

Examples of transfections with NATE™

	THP-1	RAW 264.7
Plate size	12-well	24-well
Seeding Cell Density	5 x 10 ⁵ c/w/ml	2 x 10 ⁵ c/w/ml
Transfection reagent used	GeneXplus	Lipofectamine® LTX
Volume of 100x NATE™	10 µl	10 µl

注 : NATE™ 試薬の使用量は、細胞培養プレートサイズ (6、12、24 ウェルプレート) およびトランスフェクション手法によって若干異なります。

www.invivogen.com/nate

InvivoGen

Europe Tel: +33 562 71 69 39
USA Tel: +1 888 457 5873
Asia Tel: +852 3622 3480

Fax: +33 562 71 69 30
Fax: +1 858 457 5843
Fax: +852 3622 3483

info.eu@invivogen.com
info@invivogen.com
info.hk@invivogen.com