



ヒト肝細胞における抗 RNA ウィルス  
自然免疫機構の解析

津 川 陽 司

## 目次

要旨	1
略語表	3
序論	6
材料、方法	15
結果	24
考察	46
総括	51
発表論文目録	53
謝辞	54
引用文献	55

## 要旨

【背景】 ウイルス感染に対する宿主の多様な生体防御機構の中にはインターフェロン (Interferon; IFN)産生による感染初期応答機構が存在する。しかし、本来、肝炎ウイルスが感染するヒト肝細胞における抗ウイルス性自然免疫機構は未だ解明されておらず、本研究では特にRNA ウイルス感染初期におけるIFN シグナル応答機構の解明を目的として以下の研究を進めた。

【手法】 まず、不死化ヒト肝細胞(HuS-E/2 細胞)と初代培養ヒト肝細胞(PHH)のセンダイウイルス(SeV)感染後における、抗ウイルス自然免疫関連遺伝子の発現変化を比較した。PHH とよく似た自然免疫反応を示す HuS-E/2 細胞を PHH のモデル細胞として用い、RNA ウイルス感染に対する初期自然免疫機構の解析をおこなった。IFN とその受容体それぞれに対する中和抗体による恒常発現 IFN- $\alpha$  の不活性化が抗ウイルス反応に与える影響について検討した。また、I 型およびIII型 IFN 受容体シグナル阻害によるウイルス感染後の下流シグナルの遺伝子発現変動およびウイルス感染効率の比較解析をおこなった。

【結果】 HuS-E/2 細胞は PHH の抗ウイルス自然免疫応答とよく似た遺伝子発現変動を示したことから、HuS-E/2 細胞をヒト肝細胞のウイルス感染モデル細胞として自然免疫応答機構の解析を進めた。その結果、ウイルス非存在下にも関わらず、PHH と HuS-E/2 細胞において、低レベルではあるが、IFN- $\alpha$ 1 遺伝子が恒常的に発現しているという新たな知見が得られた。一方、他の IFN- $\alpha$  サブファミリーや IFN- $\beta$ 、そして IFN- $\lambda$ s 遺伝子の恒常発現は認められなかった。このような恒常発現 IFN- $\alpha$  の抗ウイルス効果を検討するため、IFN- $\alpha$  と IFN- $\alpha/\beta$  receptor 2(IFNAR2)に対する中和抗体を用いて恒常発現 IFN- $\alpha$  シグナルを阻害することで、ウイルス感染または非感染時における恒常発現 IFN- $\alpha$  の機能解析をおこなった。その結果、恒常発現 IFN- $\alpha$  を阻害することで、ウイルス非感染細胞における IFN 誘導性遺伝子群(ISG)の発現量の減弱、ならびに C 型肝炎ウイルスやセンダイウイルス(SeV)感染後

の ISG 発現誘導効率の低下、それに伴うウイルス感染複製の増強が観察された。続いて、ウイルス感染初期における IFN- $\lambda$  の役割を解明するため、I 型および III 型 IFN 受容体シグナルの阻害後ウイルス感染による下流シグナルの遺伝子発現変動およびウイルス感染効率の比較解析をおこなった。その結果、ウイルス感染後に誘導される IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda 3$ , IRF-7 そして RIG-I 遺伝子発現誘導は各受容体を単独で阻害するよりも同時阻害することで顕著な減少が認められた。また、SeV 感染初期段階では、I 型または III 型 IFN 受容体の単独阻害によるウイルス感染複製への影響は少ない一方、同時阻害により有意なウイルス感染複製の増強が確認できた。また、ウイルス感染後誘導される因子の中には、III 型 IFN 受容体シグナル阻害時にのみ、発現誘導が抑制されるものが存在することを見出した。

【考察】肝臓は主要なフィルター臓器であり、体内に侵入する病原体の極初期の防御線であることから、肝細胞は病原体の侵入を防ぐための特異的な防御機構を備えていると考えられる。本研究で得られた結果から、ヒト肝細胞では RNA ウイルス感染に対する迅速な初期自然免疫機構として、恒常的に産生されている IFN- $\alpha$  が、感染を検出し、IFN シグナルを増幅させる ISG の発現を恒常的に誘導することで機能している可能性が示唆された。また、ヒト肝細胞が病原体に対する初期の防御線として、I 型と III 型 IFN が協調的に相互作用することで迅速、且つ効果的な初期自然免疫機構を形成していることが示唆された。

## 略語表

BSA	: Bovine serum albumin
CARD	: Caspase recruitment domain
cDNA	: complementary DNA
DAA	: Direct-acting antiviral agents
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
dsRNA	: double stranded RNA
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	: Fetal bovine serum
GAPDH	: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HCV	: Hepatitis C virus
HCVcc	: HCV from cell culture
HEPES	: N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HNF	: Hepatocyte nuclear factor
IF	: Indirect immunofluorescence assay
IFIT1	: IFN-induced protein with Tetratricopeptide 1
IFN	: Interferon
IFNAR	: IFN- $\alpha/\beta$ receptor
IFN- $\lambda$ R	: IFN- $\lambda$ receptor
I $\kappa$ B	: Inhibitor of NF- $\kappa$ B
IKK	: I $\kappa$ B kinase
IL	: Interleukin

IPS-1 : IFN- $\beta$ -promoter stimulator-1

IRF : IFN regulatory factor

ISG : IFN stimulated gene

ISGF : IFN stimulated gene factor

ISRE : IFN-stimulated response elements

JAK : Janus kinase

MyD88 : Myeloid differentiation primary-response protein 88

NEAA : Non-essential amino acid

NF- $\kappa$ B : Nuclear factor  $\kappa$  B

NS : Non-structural

PAMP : Pathogen-associated molecular patterns

PBS : phosphate-buffered saline

PCR : Polymerase chain reaction

pDC : Plasmacytoid dendritic cell

PEG-IFN: Polyethylene glycol-conjugated IFN

PHH : Primary human hepatocyte

PRR : Pattern recognition receptor

pSTAT1 : phosphorylated STAT1

PVDF : Polyvinilidene difluoride membrane

RIG-I : Retinoic acid inducible gene-I

RLR : RIG-I like receptor

RT : Reverse transcription

RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

qRT-PCR: Quantitative RT-PCR

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SeV : Sendai virus

siRNA : Small interfering RNA

STAT : Signal transducer and activator of transcription

TIR : Toll/IL-1 receptor

TLR : Toll like receptor

TRAF : Tumor necrosis factor receptor-associated factor

WCL : Whole cell lysate

## 序論

### 抗 RNA ウイルス自然免疫応答機構

ヒトは免疫機構として自然免疫と獲得免疫を備えており、自然免疫は病原体の侵入に対抗する宿主細胞の最初の防御機構として機能する。獲得免疫は後天的に形成され、病原体の刺激に応じて長期的な免疫応答をおこなう。ウイルス感染に対する宿主細胞の多様な生体防御機構の中では、抗ウイルスサイトカインであるインターフェロン(Interferon; IFN)による抗ウイルス遺伝子群の発現誘導系が、ウイルス感染初期における自然免疫において主要な役割を担っている。センダイウイルス(Sendai virus; SeV)、水疱性口炎ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、シンドビスウイルス、そして C 型肝炎ウイルス(Hepatitis C Virus; HCV)などの RNA ウイルスは宿主細胞へ感染した後、感染細胞から早期に産生される I 型 IFN(IFN- $\alpha$  と IFN- $\beta$ )によってその増殖が抑制される(1,2)。この抗ウイルス応答において、IFN は、直接ウイルスを攻撃するのではなく、ウイルス感染細胞及び周囲の非感染細胞に細胞表面にある受容体を介して作用して、その抗ウイルス遺伝子の発現を誘導することで、それらの細胞を抗ウイルス状態に変化させ、感染増殖の抑制をおこなうことが知られている。RNA ウイルスに対する IFN 応答は細胞内に侵入した非自己の RNA のウイルス RNA 特異的な構造を認識して活性化されるシステムであるとされている(3-8)。IFN は I 型、II 型および III 型に区分され、I 型と III 型はウイルス感染などによって活性化される一方、II 型は獲得免疫の応答として捉えられている。また、I 型 IFN はウイルス増殖の抑制以外にも細胞増殖の抑制や獲得免疫および炎症の調節に機能していることが報告されている(9)。III 型 IFN はその受容体が I 型や II 型 IFN (IFN- $\gamma$ ) とは異なり、ユニークな IFN- $\lambda$ R1 と IL-10R2 から構成されていることから異なる遺伝子ファミリーに分類されている(10)。IFN 遺伝子ファミリーのうち I 型は、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\omega$ 、 $\epsilon$ 、 $\kappa$  等で構成されており、 $\alpha$  には 13 のサブファミリー(1、2、4、5、6、7、8、10、13、14、16、17、21)が、III 型の IFN- $\lambda$  には 4 つのアイソフォー

ム(IFN- $\lambda$ 1、IFN- $\lambda$ 2、IFN- $\lambda$ 3、IFN- $\lambda$ 4)が存在する。I型IFNはウイルス感染に応答した免疫機構全般の制御に関わっていることから、I型IFNシステムを中心とした自然免疫が、感染したウイルスにとってその効率的な増殖のために抑制すべき重要な標的となっていることがわかっている。

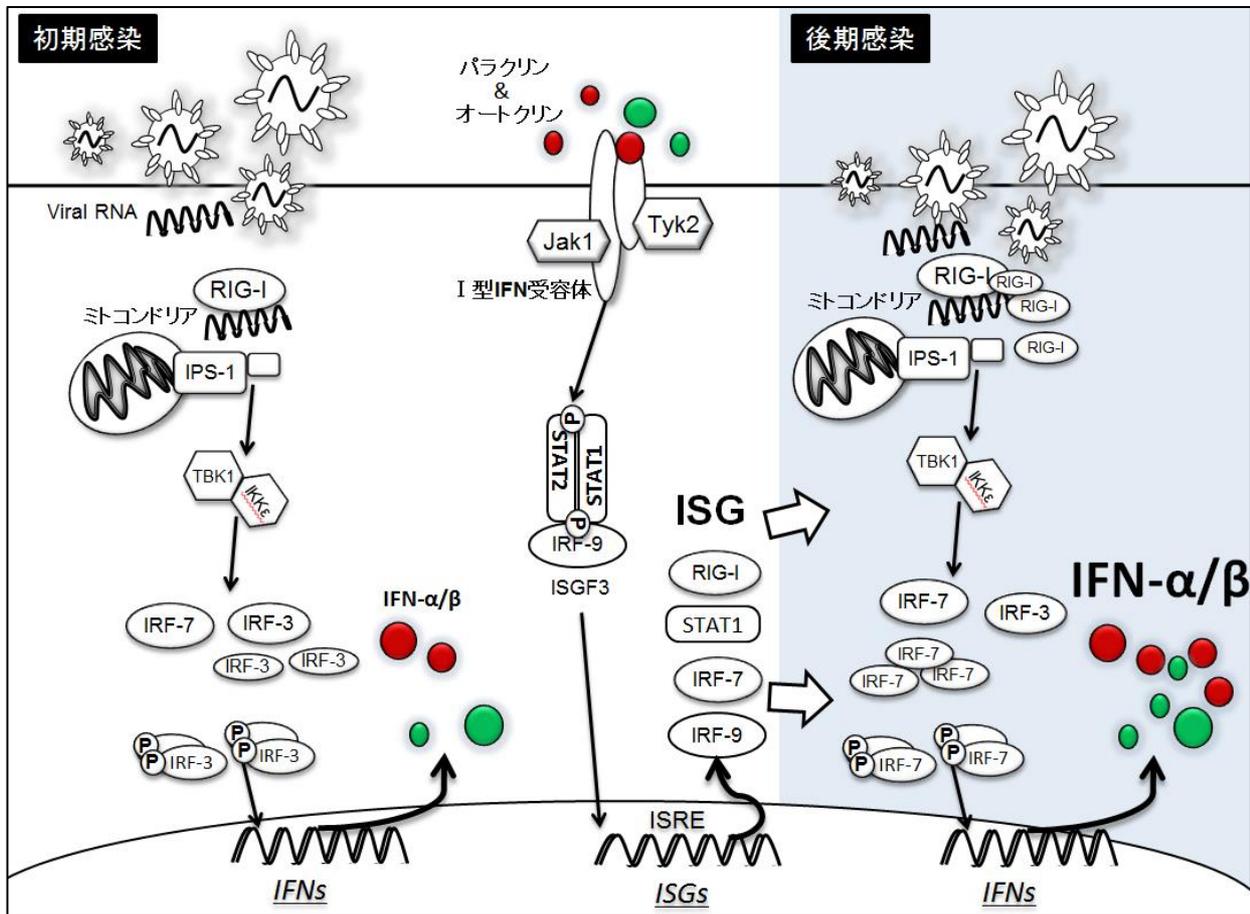
古くから非ウイルス性のIFN誘導因子として、バクテリアのエンドトキシンや二本鎖RNAが機能することが知られている。近年の研究によって、病原体にはそれぞれ固有の分子パターンが存在し、細胞にはその病原体由来分子パターン(Pathogen associated molecular patterns; PAMPs)を認識する受容体(Pattern recognition receptor; PPR)が存在することがわかった。細胞はその受容体を介してPAMPsにより刺激されることによってシグナルが活性化され、最終的に転写因子の活性化によって、IFN遺伝子発現が誘導されることが明らかとなっている(11)。RNAウイルスでは一本鎖(single-stranded; ss)RNA、二本鎖(double-stranded; ds)RNAおよびpoly-Uridine(PU)などがPAMPsとして認識されることが知られている。Toll様受容体(Toll like receptor; TLR)は細胞表面およびエンドソームにおいてバクテリア、ウイルス由来のPAMPsを認識するレセプターであり、RNAウイルス由来のPAMPsであるdsRNAはTLR3によって、ssRNAはTLR7、8によって、バクテリア由来の非メチル化DNA(CpG DNA)はTLR9によってそれぞれ認識される(12)。全てのTLRは細胞内にToll/IL-1 receptor (TIR)ドメインを保有し、TIRを持つアダプター分子との相互作用を介して下流にシグナルを伝える。TLR3は貧食細胞や一部の繊維芽細胞に発現しており、エンドサイトーシスによってエンドソームに取り込まれたdsRNAを認識し、TIRドメインの会合を誘導し、Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ (TRIF)、TNFR-associated factor-3 (TRAF3)、TRAF6などと複合体を形成することによってタンパク質リン酸化酵素であるTANK binding kinase1 (TBK1)、lipopolysaccharide inducible I $\kappa$ B kinase (IKKi)またはIKKを活性化する(13,14)。その後、転写因子であるInterferon regulatory factor 3 (IRF-3)、IRF-7、NF- $\kappa$ BあるいはMAPK経路を活性化することによってIFN遺伝子

の発現誘導を引き起こす(15)。TLR7、8、9 は特に形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell; pDC)で多く発現しており、Myeloid differentiation primary-response protein 88 (MyD88)、IL-1 receptor-associated kinase (IRAK)、TRAF6 を介して大量の IFN- $\alpha$  を産生して血液中に分泌している。上記 TLR に加えて細胞質内において RNA ウイルス由来の RNA を検出する分子が存在する。Retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) や Melanoma differentiation associated gene 5 (MDA5)、そして Laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2)は RIG-I 様受容体 (RIG-I like receptor; RLR)と呼ばれ、広範囲にわたる細胞種の細胞質に存在する PRR として認識されている(16)。RIG-I は C 末端側に RNA ヘリカーゼドメインを、N 末端側にカスパーゼ結合領域 (Caspase recruitment domain; CARD)を持つ(17)。RIG-I は dsRNA をその RNA ヘリカーゼドメインによって認識し、CARD を介してミトコンドリア外膜状に局在する IPS-1 (IFN- $\beta$  promoter stimulator-1, 別名; MAVS、VISA、Cardif) と相互作用することによって、シグナル伝達する(17)。IPS-1 に結合する分子には TRAF3、TRAF6 などのシグナル分子が多数報告されており、これらのシグナル分子が転写因子 IRF や NF- $\kappa$ B を活性化させるリン酸化酵素 TANK binding kinase 1 (TBK1)や IKK ファミリーを活性化することで、IFN や炎症性サイトカインを誘導することが分かっている(18)。

### I 型 IFN 産生機構

TLR、RLR ファミリーは RNA ウイルス感染に対する I 型 IFN 産生において必須の受容体システムである。これらの使い分けは細胞種特異的に働いており、TLR を介したシグナル伝達は主に pDC において用いられ、それ以外の自然免疫細胞において RLR を介したシグナル伝達が機能して I 型 IFN の産生を制御していると考えられている。多くの細胞種に適応される RLR を介した I 型 IFN 発現制御機構は一般的に下図のような2段階産生モデル(初期感染応答、後期感染応答)が提唱されてきた。

ウイルス感染に対して RIG-I が非自己核酸を認識し、下流転写因子 IRF-3、NF- $\kappa$ B を活性化することで IFN- $\beta$  が産生、分泌される。分泌された IFN- $\beta$  は感染細胞（オートクリン）ならびに周囲の非感染細胞（パラクリン）表面に発現している IFN- $\alpha/\beta$  receptor(IFNAR)に結合し、タンパク質チロシンキナーゼ Janus kinase(JAK) 1 および Tyk2 を活性化する。これらのキナーゼ活性により転写因子 Single-transducer and activator of transcription (STAT)1、STAT2 がリン酸化された後、二量体形成し、さらに別の転写因子である IRF-9 と会合して転写活性化複合体 IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3)を形成する。ISGF3 は標的遺伝子の転写プロモーター／エンハンサー領域に存在する IFN-stimulated response elements(ISRE)に結合することで多様な IFN stimulated gene(ISG)群の発現を誘導する(9)。IFN によって誘導される ISG は 200 以上の存在し、ウイルス感染によって誘導された ISG 産物には抗ウイルス作用、増殖抑制作用などの機能を有するものが多数報告されている(19)。代表的な ISG 産物として dsRNA dependent protein kinase(PKR)や 2'-5'オリゴ(A)合成酵素 (2'-5' Oligoadenylate synthetase; OAS)があり、それぞれタンパク質の翻訳抑制やウイルス RNA の分解に働くことでウイルスの増殖を抑制する機能を有することが知られている。同様に IRF-7 遺伝子や RIG-I 遺伝子も ISG に含まれている。IRF-7 は IFN- $\alpha$  遺伝子発現プロモーターを制御し、多くの細胞において未刺激下で恒常発現レベルが低く、IFN- $\beta$  刺激後に発現誘導されることから、ウイルス感染後の比較的後期での IFN 産生に関与すると考えられてきた。一方、pDCs においては IRF-7 が恒常的に高い発現レベルを保持しており、IRF-7 に依存した I 型 IFN の産生が確認されている。IRF-7 遺伝子の欠損したマウスの結果から、IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  の両方の転写が IRF-7 に依存していることが明らかになっていることから、I 型 IFN 産生における IRF-7 の重要性が注目されている。しかし、これら自然免疫機構の解析は関連する種々の因子のノックアウトマウスやそれに由来する培養細胞を用いておこなわれているため、特にヒト肝細胞における抗ウイルス自然免疫応答機構はほとんど明らかになっていない。



RNA ウイルスに対する I 型 IFN 応答機構概略図

### HCV の臨床と自然免疫応答機構

HCV は 1989 年にその遺伝子がクローニングされ、フラビウイルス科に属する+鎖 RNA ウイルスであることが明らかになった(20)。現在、世界中で約 1.7 億人が HCV に慢性感染していると推定されている(21)。HCV は血液を介して感染するため、輸血や注射器の連続使用、血液製剤などが主な感染経路とされている。日本においては新規感染者数が減少しているが、アメリカ合衆国においては薬物中毒者を中心としてなお一年に約 3 万人の新規感染者数の増加している(22)。また、発展途上国などの医療技術整備が十分でない地域でも

依然として HCV の感染拡大が続いている。HCV が感染し、急性肝炎を生じた患者の約 70% 以上が慢性肝炎に移行する。これらの多くの慢性肝炎患者が 20~30 年間の時間経て、その病状を肝硬変や肝がんへと進行させる(23)。現在の慢性 C 型肝炎患者に対する標準治療法は、ポリエチレングリコール結合型(PEG)-IFN- $\alpha$  と核酸誘導体であるリバビリンの併用療法である。慢性 C 型肝炎患者全体の平均治癒率は約 60%であるが、HCV の遺伝子型によって著効率が大きく異なる傾向にある。日本において、患者の約 3 割を占める遺伝子型 2 型で約 80-90%、約 7 割を占める遺伝子型 1 型では約 50%に留まる。近年、特定の HCV タンパク質分子を標的としたウイルス直接作用型薬剤(direct-acting antiviral agents; DAAs)の一つである HCV プロテアーゼ阻害剤が認可され、適応患者において高い著効率を示している(24)。しかしながら DAA 単独使用による治療はウイルスの遺伝子変異により薬剤耐性が生じやすく、生じた耐性変異株には、DAA による治療が無効になることがわかっている(25)。これに対して IFN を併用することにより、DAA 耐性変異株の増殖を抑制することで HCV 除去が可能になると考えられている(25)。IFN- $\lambda$ 3 や IFN- $\lambda$ 4 は、その遺伝子がコードされた領域の近傍および遺伝子領域に、C 型肝炎に対する PEG-IFN とリバビリン併用療法の治療効果を規定し、C 型肝炎の治療効果に強く関係する一塩基多型(Single nucleotide polymorphism; SNP)が存在することが報告されている(26-29)。IFN- $\lambda$  による治療は、最小限の副作用であることと血球減少が少ないことにより幅広い患者層に対してより安全であり、難治性 HCV に対してより高い抗ウイルス作用が確認されている(30)。それゆえ、薬剤治療による副作用を軽減し、治療期間を短縮できる IFN- $\lambda$  が IFN- $\alpha$  に置き換わる薬剤として期待されている(30)。しかし、ヒト肝臓における IFN- $\lambda$  の作用機序の全貌は未だ明らかではない。またヒト肝癌細胞株 Huh-7.5 細胞において、IFN- $\lambda$ 1 が IFN- $\alpha$  と異なる作用機序で HCV 感染複製を阻害することが報告されている(31,32)。さらに、HCV を含む多くのウイルスに対して IFN- $\alpha$  と IFN- $\lambda$  の併用療法は単独療法より効率的であると報告されている。しかしながら、in vivo または生理的条件下における IFN- $\alpha$  と IFN- $\lambda$  の抗ウイルス効果の関係は解明

されていない。

チンパンジーを動物モデルとした系以外に患者血清由来 HCV を増殖させ、分離できる細胞培養系が存在しなかったために、HCV のウイルス学的な研究は、長い間非常に困難な状況であった。しかしながら、1999 年に HCV の部分 RNA ゲノムを恒常的に維持するレプリコン細胞が開発され、HCV ゲノム複製を解析することが可能になった。さらに 2005 年に、限定されたクローンではあるが、組換え体 HCV の感染増殖が解析できる、培養細胞に馴化した HCV(HCV from cell culture; HCVcc)産生系が構築された。これらの系を用いることで、現在 HCV の生活環に関する多くの知見が得られるようになってきている。また近年、マウスの肝臓をヒト肝細胞に置換したキメラマウスが開発され、これにより患者血液由来 HCV の感染増殖を容易に再現することができるようになった。このヒト肝細胞キメラマウスにより、これまで調べることが困難であった患者血液由来 HCV に対する抗ウイルス剤の薬効を動物実験で調べることが可能になった(33)。HCV と宿主自然免疫機構の相互作用についても、上記の系を使って研究が進められてきた。その結果、HCV のゲノム RNA には TLR および RLR に認識される PAMP が存在し、HCV の RNA により宿主細胞の IFN 産生が誘導されることが明らかとなった。HCV 感染の主な宿主細胞である肝細胞において、RIG-I と TLR3 は HCV の dsRNA により誘起される PRR であると報告されている(34)。これに対して、HCV の非構造(NS; non-structural)タンパク質複合体である NS3/4A は、前駆体ポリプロテインとして産生される HCV タンパク質の切断・成熟に働くセリンプロテアーゼ活性を持つが、これは同時に RIG-I 下流の IPS-1 を切断し、その下流へのシグナル伝達を阻害する役割を持つことが報告されている(35)。IPS-1 は PRR の直近のアダプター分子で、シグナルの分岐点でもあるため、NS3/4A による IPS-1 の切断は I 型 IFN のみでなく NF- $\kappa$ B や MAPS 経路の活性化阻害も同時に達成することができ、効率的にウイルス複製環境を整えることが出来る。小胞体に局在する HCV タンパク質 NS4B は I 型 IFN 産生誘導に関与する stimulator of IFN genes(STING)と相互作用し、STING による IFN 産生を阻害するという報

告もある(36)。他に、NS5A、HCVのコアタンパク質およびエンベロープタンパク質 E2 による抗ウイルス作用の抑制などが既に報告されているが(34)、HCV は RNA ウイルスでは稀な慢性感染を成立させるウイルスであり、他にも宿主の免疫機構から逃れる優れた機構を有していると推測される。

#### 患者血清由来 HCV が複製可能な新規ヒト不死化肝細胞の樹立

抗 HCV 自然免疫応答の解析におけるこれまでの多くの知見は主に、遺伝型 2a の非常に限定された組換え体 HCV 株と、ヒト肝癌由来細胞 HuH-7 細胞をはじめとした肝癌由来細胞を用いて得られたものである。近年、本研究室において、PHH と類似した性質を保有したヒト不死化肝細胞の樹立に成功した(37)。このヒト不死化肝細胞 HuS-E/2 細胞は患者血清由来の天然型 HCV が感染増殖可能な細胞株であることが明らかとなり、この細胞株と天然型 HCV を用いて転写因子 IRF-3 および IRF-7 の抗 HCV 応答における機能解析をおこなった。その結果、肝細胞における天然型 HCV の感染増殖抑制に対してより効果的に役割を果たしているのは IRF-3 ではなく IRF-7 である可能性が示唆された(37)。これまでの先行研究ならびに当研究室が報告した結果から、ヒト肝細胞においては IRF-7 が恒常的に発現していることが示され、従来より考えられてきた I 型 IFN 産生機構とは異なる自然免疫応答機構が存在する可能性が示唆された(37)。HCV 感染によって発症する各肝疾患は HCV の持続感染が重要な原因のひとつとなっている。しかし、RNA ウイルスである HCV の持続感染機構は全く不明である。その原因のひとつはヒト肝細胞における自然免疫機構が明らかになっていないことである。そこで HCV の持続感染機構の解明のため、この研究ではヒト肝細胞における自然免疫機構を明らかにしその HCV 感染との相互作用について解明することを目的とした。

### 恒常発現 IFN の生理機能

近年、病原性因子による刺激を伴わず、様々な組織において低発現ではあるが恒常的に I 型 IFN が産生されていることが分かってきている(38)。IFN の微量産生モデルとしてレビングアップ (Reving-up) モデルと呼ばれており、従来はウイルス感染細胞でだけ産生されると考えられていた IFN が非感染細胞においても微量に産生されていることが分かり、生体防御系のシグナル伝達が常に増幅している状態だと考えられている(39,40)。また、非感染状態において恒常発現する IFN の生理的機能について抗ウイルス作用だけでなく、免疫調節、細胞増殖制御、細胞分化などの方面で解析がおこなわれている(38,41)。正常肝組織においては、IFN- $\alpha$  mRNA の発現が確認されている一方、肝臓を構築するどの細胞が IFN- $\alpha$  を産生しているのか不明であり、生理的役割についても明らかにされていない(42)。本研究において私は、正常ヒト肝細胞および不死化ヒト肝細胞において恒常発現する IFN- $\alpha$  を見出し、その機能解析を検討した。

## 材料、方法

### 細胞

ヒト肝癌由来細胞 HuH-7 細胞は脇田隆字博士(国立感染症研究所)より分与された。ヒト肝臓由来不死化細胞 HuS-E/2 細胞は本研究室で樹立した。PHH は Gibco(NY、USA)より購入した。肝臓提供者はヒトサイトメガロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ヒト B 型肝炎ウイルスならびに HCV の感染陰性であり肝臓に異常の見られない白人男性である。

### 形質転換と大腸菌培養

プラスミド DNA は Competent Quick (ToYoBo、Osaka、Japan)への形質転換により増幅させた。Competent Quick の DH5 $\alpha$  45  $\mu$ l と 0.01  $\mu$ g/ml 量のプラスミド DNA 5 $\mu$ l を混合し、氷上で 5 分間静置し、その後 42 $^{\circ}$ C の恒温槽で 30 秒間インキュベートした。200  $\mu$ l の LB 溶液 (1 L 中に Bacto trypton 10 g、乾燥酵母エキス 5 g、NaCl 5 g、グルコース 1 g を加え、pH7.2 に調整)を加え、アンピシリン添加 LB 寒天プレート(1 L 中に Bacto trypton 10 g、乾燥酵母エキス 5 g、NaCl 5 g、グルコース 1 g、アガロース粉末 15 g、アンピシリン 50  $\mu$ g/ml を加え、10 cm プラスチックシャーレ中に固定)に播種し、37 $^{\circ}$ C に一晩静置した。プレート上の形質転換体のコロニーを爪楊枝を用いて、3 ml のアンピシリン(50  $\mu$ g/ml)含有 LB 溶液に加え、37 $^{\circ}$ C で一晩震盪培養した。次にその大腸菌混合液 200  $\mu$ l を 200 ml のアンピシリン(50  $\mu$ g/ml)含有 LB 溶液中へ添加し、一晩培養した。大腸菌からのプラスミド DNA 抽出は JetStar 2.0 キット(Genomed、Löhne、Germany)を用いておこなった。

### 細胞培養

HuH-7 細胞、Huh-7.5 細胞、HepG2 細胞、293FT 細胞は 10% fetal bovine serum(FBS) (EQUITECH-BIO、Texas、USA)および 100 units/ml Antimycotic Mixed Stock Solution、Streptomycin 100 µg/ml、Amphotericin B 0.25 µg/ml、100 U/ml nonessential amino acid solution(以上 Nacalai Tesque、Kyoto、Japan)を添加したダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)(Nacalai Tesque、Kyoto、Japan)を用いて、37 °C、5%CO<sub>2</sub>、飽和水蒸気温槽中で培養した。

HuS-E/2 細胞は 5% FBS (EQUITECH-BIO、Texas、USA)、250 mg/ml insuline、50 nM Dexametazone、5 % human serum (以上 Sigma-Aldrich、Missouri、USA)、10 mM nicotinamid、44 mM NaHCO<sub>3</sub>、0.1 mM ascorbic acid、100 IU/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin、20 µg/ml selenium、8 µg/ml L-proline、5 ng/ml EGF、1% DMSO (以上 Nacalai Tesque、Kyoto、Japan)、20 mM HEPES、2 UG/ml Fungizone を添加した DMEM (以上 Nacalai Tesque、Kyoto、Japan)を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub>、飽和水蒸気温槽中で培養した。

PHH は各実験を開始する 1 週間、ヒト肝細胞無血清培地(Gibco、NY、USA)を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub>、飽和水蒸気温槽中で培養した。

#### 中和抗体処理と組換え体 IFN

組換え体 IFN 刺激または感染実験 2 日前に HuS-E/2 細胞を 12 well コラーゲンプレートに  $8 \times 10^4$  になるよう播種した。感染実験の際、前もって 12 時間の中和抗体処理をおこなった。そして中和抗体を含む培養培地を除去し、PBS(-)で細胞を洗浄後、SeV 含有または HCV cc 含有の新鮮な培地に交換した。SeV の調製はこれまでに報告している論文に準拠した(43)。組換え体 IFN-α は Merck (New Jersey、USA)より購入した。IFN-α (MMHA-2)、IFN-β (Rabbit polyclonal antibody)、IFNAR2 (MMHAR-2)を標的とした中和抗体は PBL Biomedical Laboratories (Piscataway、NJ、USA)より購入した。

## Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)と Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Total RNA は、Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)により抽出した。RT-PCR は、調製した total RNA 200 ng を鋳型として One-Step RT-PCR kit (Takara, Kyoto, Japan)を用いて細胞内 mRNA を検出した。qRT-PCR は One-Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (Takara, Kyoto, Japan)を用い、7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA)により細胞内 mRNA を検出した。操作手順は付随のプロトコールに従った。RT-PCR の条件と各プライマーの配列を表.1 に示した。Real-time quantitative RT-PCR は 42°C で 5 分間、続いて 95°C で 10 秒間、その後、95°C で 5 秒間と 60°C で 34 秒間の組み合わせを 40 サイクルという条件でおこなった。評価方法は  $\Delta\Delta Ct$  法を用いた。

## IFN プライマー設計と選択

IFN 検出用は各種 IFN 遺伝子における特異的な配列をもとに PrimerBLAST (National Center for Biotechnology Information, USA)を用いて作製した。デザインしたプライマーセットの感度と特異性は、in vitro 合成した各種 IFN RNA を鋳型として RT-PCR 法により評価した。IFN サブタイプ発現プラスミドを作製するため、IFN- $\alpha$  刺激誘導後 HuS-E/2 細胞の total RNA を回収し RT-PCR により IFN サブタイプフラグメントを増幅し、pcDNA3 のマルチクローニングサイトにサブクローニングした。IFN サブタイプの RNA フラグメントは MEGAscript T7 kit (Ambion, Austin, USA)を用いて in vitro で合成した。操作手順は付随のプロトコールに従った。合成 RNA に DNase I (Ambion, Austin, USA)処理をおこない、a

cid phenol extractionにより残存する鋳型 DNA を除去後、one-step RNA PCR kit(Takara、Kyoto、Japan)を用いてプライマーセットの評価をおこなった。RT-PCR は、94°Cで 2 分間の後に、94°Cで 10 秒間、55°Cで 30 秒間、その後 72°Cで 1 分間という組み合わせを 25 から 35 サイクルという条件でおこなった。

### センドライウイルス(SeV)

SeV (cantell 株)を含む MEM 溶液(SeV 溶液)は、藤田尚志教授(京都大学ウイルス研究所)より分与された。感染実験に用いた SeV は、あらかじめ HuS-E/2 細胞に感染させ、感染細胞数を抗 SeV 抗体による間接蛍光抗体法によって測定し、感染価を計測した後に使用した。

### HCVcc の調製

HCVcc は Jikei Fulminant Hepatitis(JFH1) E2FL RNA を試験管内転写により合成し、HuH-7 細胞または Huh-7.5 細胞に遺伝子導入することで作製した(44)。試験管内転写には MEGAscript T7 kit (Ambion、Austin、USA)を用いた。合成した JFH1 E2FL RNA 10 µg は Electroporation cuvettes (Molecular Bioproduct、Massachusetts、USA)と GenePulser X cell (BioRad、California、USA)を用いて、 $1 \times 10^7$  個の細胞に対して、250 V、950 µF の条件下でエレクトロポレーションをおこない、導入した。遺伝子導入後の細胞は 5% FBS 含有の HuH-7 細胞培地を用いて、2 枚の 140 mm ディッシュで 1 日培養をおこなった。その後、新鮮な 5% FBS 含有 DMEM に交換し、4 日間培養を続けた。遺伝子導入後 5 日目の培養上清を回収し、10 mM HEPES (Nacalai Tesque、Kyoto、Japan)を加え、ポアサイズ 20 µm のシリンジフィルター(Iwaki、Tokyo、Japan)を用いて濾過をおこなった。この培養上清は、次に Amicon Ultra-15 centrifugal filter with Ultracell 100 membranes (Millipore、

Massachusetts, USA)を用いて、3500 rpm 4°C 2時間遠心して限外濾過することで濃縮した。濃縮培養上清は-80°Cで保存し、感染実験の際には室温で凍結融解して使用した。

### I型IFN定量用レポーターアッセイ

細胞培養上清中の活性型I型IFNの定量はHEK-Blue IFN- $\alpha/\beta$  cells (InvivoGen, San Diego, USA)を用いて付随のプロトコールに従い、分泌型アルカリホスファターゼ(Secreted Alkaline Phosphatase; SEAP)レポーターアッセイによりおこなった。96 wellプレートにHEK-Blue IFN- $\alpha/\beta$  cells  $5 \times 10^4$  個/wellを播種した。培地交換1日後の培養上清または中和抗体処理後の培養上清80  $\mu$ lをレポーター細胞の培地中へ添加し、37°Cで24時間インキュベートした。その培養上清20  $\mu$ lを180  $\mu$ l Quanti-Blue reagent (InvivoGen, San Diego, USA)を混合し、620 nmの波長を検出後、比色法により解析をおこなった。I型IFN濃度(U/ml)は濃度既知の組換え体IFN- $\alpha$  (Merck, New Jersey, USA)を使用し、検量線から算出した。

### タンパク質の調整

60 mmプレートに播種した細胞を2回PBS(-)で洗浄し、200  $\mu$ l lysis buffer(50 mM Tris-HCl(pH8.8)、0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS)、0.5% sodium deoxycholate、150 mM NaCl、5 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、1 mM Orth vanadate (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)、10 mM sodium fluoride (NaF)、Protease Inhibitor Cocktail(Sigma-Aldrich, Missouri, USA))を添加した後、セルスクレイパー(Sumilon, Tokyo, Japan)を用いて細胞を回収した。超音波破碎装置 Biorupter (Cosmo Bio, Tokyo, Japan)を用いて核酸を断片化した後、15,000 x g、4°Cで20分間遠心した。遠心後、回収した上清をwh

ole cell lysate(WCL)とした。タンパク質の定量は bovine serum albumin (BSA)(ThermoFisher Scientific、Massachusetts、USA)を標準として用いて BCA protein assay(ThermoFisher Scientific、Massachusetts、USA)によりおこなった。

### イムノブロット法

調製した WCL(30 µg)を 2× sample buffer (BioRad、California、USA)と混合し、100°Cで 5 分間加熱処理後、SDS-PAGE によりタンパク質を分画した。SDS-PAGE により分画したタンパク質はタンパク質転写装置 Mini protean II (BioRad、California、USA)を用いて polyvinylidene difluoride membrane (PVDF 膜)(Perkin Elmer、Boston、USA)に転写した。この PVDF 膜をブロッキング溶液(2% ECL Advance blocking agent (GE Healthcare、Buckinghamshire、England)/ 0.05% TBS-T(TBS、0.05% Tween-20(Nacalai Tesque、Kyoto、Japan))またはリン酸化タンパク質 pSTAT1 検出時には 3% BSA (Nacalai Tesque、Kyoto、Japan) / 0.05% TBS-T(TBS、0.05% Tween-20(Nacalai Tesque、Kyoto、Japan)))に浸し、室温にて 1 時間穏やかに振盪した。ブロッキング溶液に 1000 倍希釈した抗 RIG-I 抗体、抗 IRF-7 抗体、抗 STAT1 抗体、あるいは抗 phosphorylated (p) STAT1 抗体(以上 Cell Signaling technology、Danvers、USA)を 1 次抗体として添加し、4°Cでオーバーナイトインキュベートした。PVDF 膜を 0.1% TBS-T で 3 回洗浄後、ブロッキング溶液で 1000 倍に希釈した horseradish peroxidase(HRP) (GE Healthcare、Buckinghamshire、England)標識抗体を 2 次抗体として室温にて 1 時間反応させ、免疫複合体を形成させた。続いて PVDF 膜を 0.1%TBS-T で 3 回洗浄後、Western Lightning (Perkin Elmer、Boston、USA)を用いて、化学発光により目的タンパク質の検出をおこなった。化学発光検出器は LAS-4000 mini(Fujifilm、Tokyo、Japan)を用いた。

### IFN- $\alpha$ タンパク質 ELISA

SeV 感染後 3、12 時間の HuS-E/2 細胞の培養培地を回収後、ヒト IFN- $\alpha$  enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (PBL Biomedical Laboratories NJ、USA)を用いて付随のプロトコールに従い測定をおこなった。ELISA による IFN- $\alpha$  濃度の測定には 1420AR VO.SX(Perkin Elmer、Boston、USA)を使用した。

### 間接蛍光抗体法(indirect immunofluorescence assay; IF)

感染実験後の HuS-E/2 細胞を PBS(-)で 2 回洗浄し、4% Paraformaldehyde(PFA) /PBS(-) (Nacalai Tesque、Kyoto、Japan)を用いて室温で 20 分間固定した。PBS(-)で 2 回洗浄し、0.05% TritonX-10/PBS(-)を添加後、室温で 15 分間膜透過処理をおこなった。その後、PBS(-)で 3 回洗浄し、抗体希釈液(10% FBS、1% BSA/ PBS(-))で 1000 倍希釈した 1 次抗体を添加し、室温で 1 時間反応させた。PBS(-)で 3 回洗浄後、抗体希釈液で 1000 倍希釈した 2 次抗体を添加して、室温で 30 分間反応させた。PBS(-)で 3 回洗浄後、封入剤(0.1% *p*-phenyldiamine、50 mM Tris-HCl(pH8.0)、10% polyvinylalcohol、10% glycerol)をスライドに添加し、カバーガラスで封入した後、蛍光顕微鏡(BioZero、Keyence、Osaka、Japan)による観察をおこなった。1 次抗体には抗 SeV 抗体(MBL、Nagoya、Japan)、2 次抗体には Alexa-546 標識抗 Rabbit 抗体(Molecular Probes、invitrogen、California、USA)および核染色用に 4',6'-diamidino-2-phenylindole(DAPI)(Sigma-Aldrich、St.Louis、USA)を用いた。

### 細胞内 HCV ゲノム数の絶対定量

Total RNA は、Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH、Hilden、Germany)により抽出

した。200 ng 量の total RNA を用いて HCV ゲノム量の絶対定量をおこなった。RevTra Ace (ToYoBo、Osaka、Japan)により、HCV ゲノムの 5'- untranslated region(UTR)に対する特異的なプライマーを用いて下記条件下で鋳型 RNA の逆転写反応をおこなった。逆転写反応は、37°C 15 分間おこない、その後 98°C 5 分間の処理をおこなった。逆転写後の cDNA を鋳型として、Thunderbird Probe qPCR Mix (ToYoBo、Osaka、Japan)を用いて下記条件のもと、7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems、Carlsbad、CA)による HCV ゲノム量の定量をおこなった。逆転写反応の条件を以下に示した。条件; 37°C 15 分、98°C 5 分、4°C∞。Realtime-PCR 反応の条件を以下に示した。条件; 95°C 1 分、(95°C 1 5 秒、62°C 30 秒)×40 サイクル

#### siRNA の培養細胞へのトランスフェクション

Stealth RNAi™ Pre-designed siRNA(IRF-7(20 nM)、IFNAR2(20 nM)、IL28RA(20 nM)) は Life technologies (Massachusetts、USA)より購入した。HuS-E/2 細胞への siRNA のトランスフェクションは Lipofectamine RNAi MAX(invitrogen、Massachusetts、USA)を用いておこなった。操作は付随の推奨プロトコールに従った。12 well コラーゲンコート培養プレートに HuS-E/2 細胞  $8 \times 10^4$  細胞を播種し、培養 2 日後に Lipofectamine RNAi MAX による遺伝子導入をおこなった。12 時間後、新鮮な HuS-E/2 細胞培養培地に置換後、48 時間 37°C CO<sub>2</sub> インキュベータで培養を続けた。

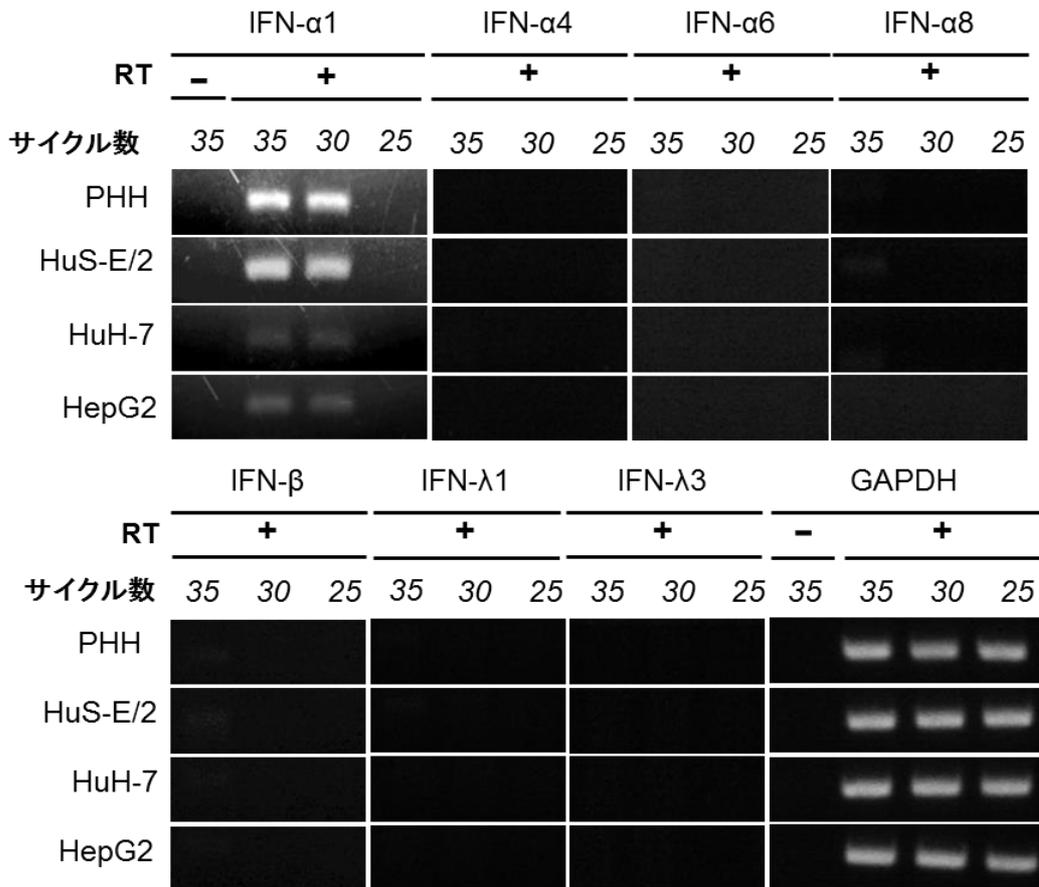
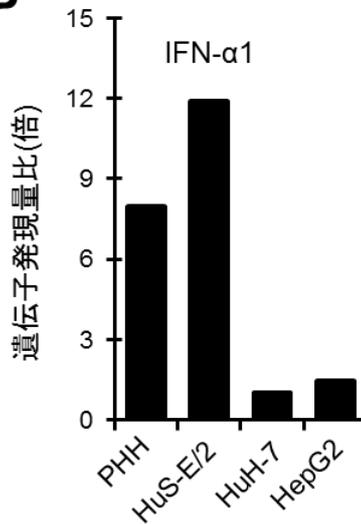
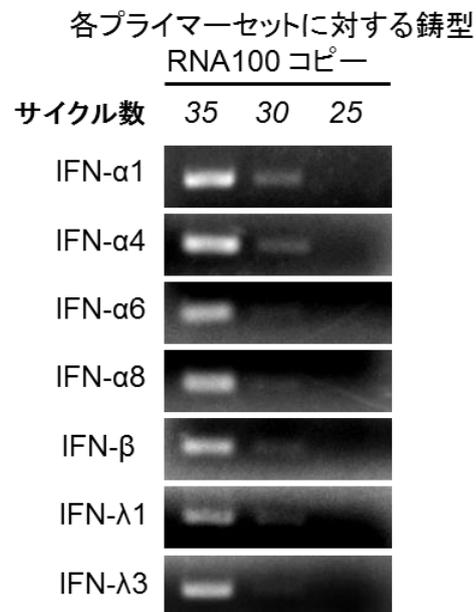
目的遺伝子	プライマー配列 5'-3'		PCR 産物 大きさ(bp)
IFN- $\alpha$ 1	sense	CTGAATGACTTGGAAGCCTG	167
	antisense	ATTTCTGCTCTGACAACCTC	
IFN- $\alpha$ 4	sense	ATGGCCACCAGTTCCAGAAG	197
	antisense	AGTCTCTTCCACCCCAACCT	
IFN- $\alpha$ 6	sense	TTTCCCAGGAGGAGTTTGATG	152
	antisense	TCAGTATAGAGTTTGTCTAGAAGCC	
IFN- $\alpha$ 8	sense	GCAGCTGAATGACCTGGAGT	152
	antisense	CCCAGGCACAAGAGCTGTAT	
IFN- $\beta$	sense	CATTACCTGAAGGCCAAGGA	178
	antisense	CAGCATCTGCTGGTTGAAGA	
IFN- $\lambda$ 1	sense	GTGACTTTGGTGCTAGGCTTG	214
	antisense	GCCTCAGGTCCCAATTCCC	
IFN- $\lambda$ 3	sense	TAAGAGGGCCAAAGATGCCTT	205
	antisense	CTGGTCCAAGACATCCCCC	
RIG-I	sense	GCTCCTACAGGTTGTGAAA	417
	antisense	CAGTGGCCTGAAGATCCTC	
IRF-7	sense	GAGCCGTACCTGTCACCCT	146
	antisense	GGGCCGTATAGGAACGTGC	
IRF-9	sense	GTGCTGGGATGATACAGCTAAG	169
	antisense	CAGGCGAGTCTTCCAGACAG	
STAT1	sense	AGGAAAAGCAAGCGTAATCTTCA	139
	antisense	TATCCCCGACTGAGCCTGAT	
IFIT1	sense	TCTCAGAGGAGCCTGGCTAA	283
	antisense	AAGCTCTTCAGGGCTTCCTC	
IFNAR2	sense	TCATGGTGTATATCAGCCTCGT	208
	antisense	GCACAGTTCTTAACCACCTTC	
IL28RA	sense	CCTGGGTGGAGTCCGAATAC	239
	antisense	AGCTGGCTGGAGAGTGATCT	
GAPDH	sense	ATGGGGAAGGTGAAGTCGG	250
	antisense	TGGAGGGATCTCGCTCCTGG	

表.1 RT-PCR および qRT-PCR に使用したプライマー配列、PCR 産物の大きさを示した。

## 結果

### PHH と HuS-E/2 細胞における IFN- $\alpha$ 遺伝子の恒常発現

IRF-3 や RIG-I 遺伝子は恒常発現レベルで多くの細胞で発現を確認されている(45)。これまでの報告から、IRF-7 遺伝子の高い恒常発現は PHH や HuS-E/2 細胞において確認されていたが、HuH-7 細胞ではその発現が認められなかった(43)。そこで、これらの細胞について、Table 1 に示したプライマーセットを用いて、各種インターフェロン遺伝子(IFN- $\alpha$ 1、IFN- $\alpha$ 4、IFN- $\alpha$ 6、IFN- $\alpha$ 8、IFN- $\beta$ 、IFN- $\lambda$ 1、IFN- $\lambda$ 3 遺伝子)の発現について解析したところ、今回新たに、PHH と HuS-E/2 細胞において IFN- $\alpha$ 1 遺伝子が低いレベルではあるが恒常的に発現誘導されていることを見出した(図 1A)。一方、RT-PCR 法による IFN- $\alpha$ 1 遺伝子の検出において HuH-7 細胞や HepG2 細胞では、PHH や HuS-E/2 細胞と比較してさらに低い発現量を示したが、不明瞭なものであった(図 1A)。また、これらの結果は、定量的 RT-PCR 法によっても、確認することができた(図 1B)。しかしながら、他の IFN サブタイプの恒常発現を測定したが、全ての細胞種において、これらの遺伝子発現を確認することはできなかった(図 1A)。これら各種 IFN サブタイプの mRNA 検出用プライマーセットを用いた RT-PCR の感度と特異性は、事前に in vitro 転写により合成した各 IFN サブタイプの合成 RNA 100 コピーを鋳型とした RT-PCR 法により評価した(図 1C)。その結果、各 mRNA は 100 コピー存在すれば、RT-PCR において 35 サイクルの反応により容易に検出することが可能であった(図 1C)。これらの結果から、IFN- $\beta$  や IFN- $\lambda$  ではなく、IFN- $\alpha$ 1 がウイルス非感染時においてヒト肝細胞で恒常的に低発現していることが示唆された。

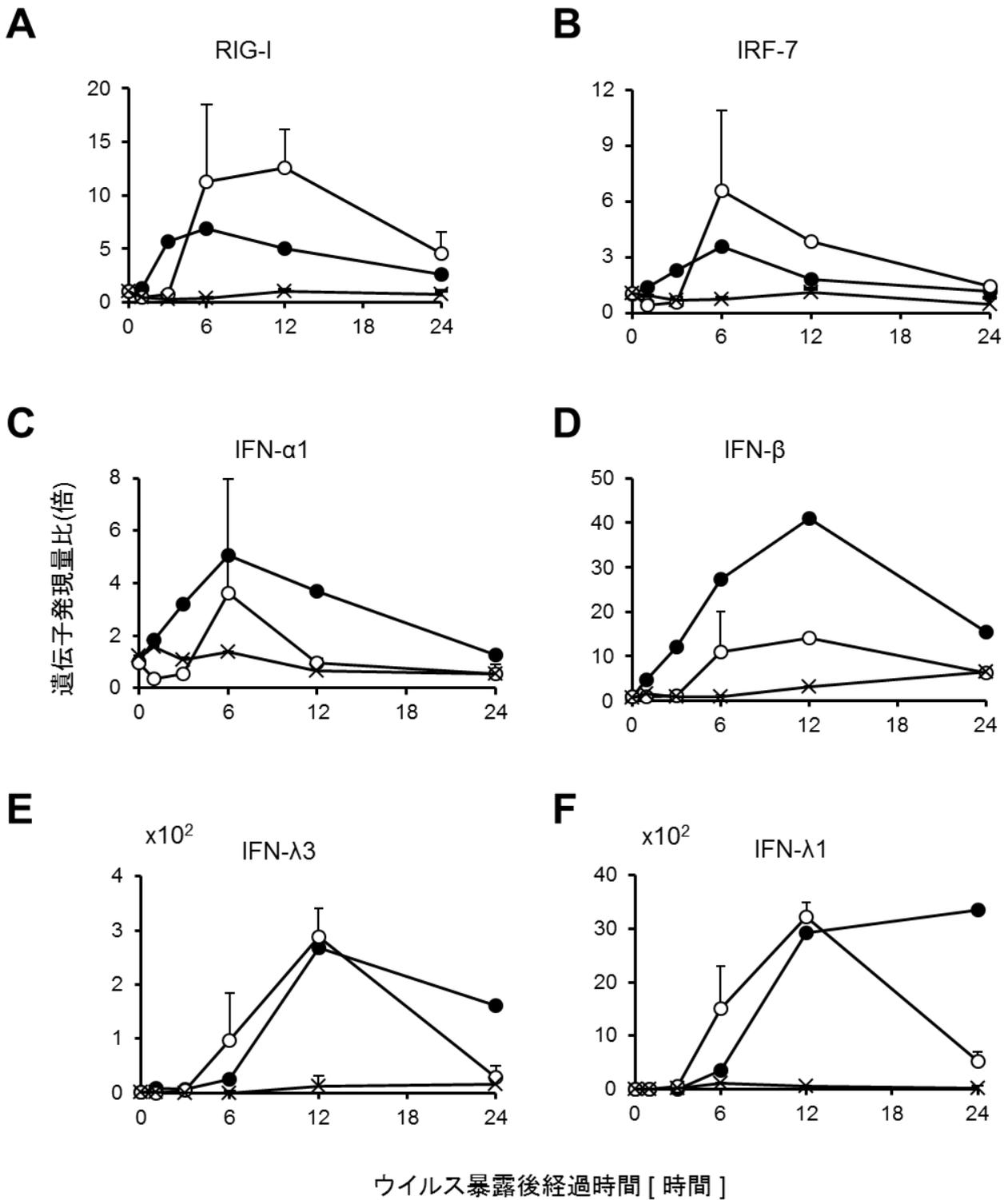
**A****B****C**

**図1. ウイルス非感染状態における各種肝細胞内IFN遺伝子発現解析。**(A) ウイルス非感染下のPHHとHuS-E/2、HuH-7.5、HepG2細胞間において幾つかのIFN遺伝子(IFN- $\alpha$ 1、IFN- $\alpha$ 4、IFN- $\alpha$ 6、IFN- $\alpha$ 8、IFN- $\beta$ 、IFN- $\lambda$ 1、IFN- $\lambda$ 3)発現量をRT-PCR法を用いて比較した。RT-PCRの増幅回数は25、30、35サイクルであり、逆転写酵素(RT)の有無(+/-)を示した。PCR産物は異なるアガロースゲルに分け、電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色を行った。GAPDH mRNAは内部標準として示した。(B) IFN- $\alpha$ 1遺伝子についてqRT-PCR法を用いて相対定量化した。(C) *in vitro*転写によって細胞外で合成したRNAを鋳型として、IFN遺伝子に対するプライマーのRT-PCR法における増幅効率を評価した。全ての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している。

### PHH と HuS-E/2 細胞における SeV 感染後 IFN 遺伝子および ISG 発現変動

まずヒト肝細胞における自然免疫反応を解明するため、ヒト肝臓由来細胞における抗ウイルス反応を比較した。モデルウイルスとしてマイナス鎖 RNA ウイルスである SeV を用い、SeV 感染後の PHH、HuS-E/2 細胞ならびにヒト肝癌由来細胞 HuH-7 細胞における抗ウイルス自然免疫関連遺伝子の発現誘導について解析した。IFN- $\alpha$ 1 とその刺激によるシグナルの標的遺伝子である IRF-7 遺伝子の mRNA 発現量は、PHH と HuS-E/2 細胞において SeV 感染後 6 時間をピークに一過性に誘導された(図 2B、2C)。また、IFN- $\beta$  と IFN- $\lambda$ 3 遺伝子発現誘導も、SeV 感染後 12 時間をピークに同様の変化が確認できた(図 2D、2E)。IFN- $\lambda$ 1 mRNA は、PHH と HuS-E/2 細胞において SeV 感染後 12 時間まで上記同様の増加を確認することができた。しかしこの遺伝子発現の変化は、SeV 感染後 12 時間以降において、PHH では感染後 24 時間まで増加傾向が見られる一方、HuS-E/2 細胞では 24 時間後まで減少し続けているという相違があることが分かった(図 2F)。多くの細胞において RNA ウイルス感染に対する自然免疫反応の要となる RIG-I も同様に検討をおこなった(46,47)。PHH において、RIG-I mRNA 量の変化は、SeV 感染後 1 時間から 6 時間において増加が認められた。一方、HuS-E/2 細胞においても、感染後 3 時間から 12 時間において増加が見られるものの、PHH と同等の遺伝子発現変動パターンを示すことがわかった(図 2A)。同様の解析を組換え体 HCV の感染や増殖を再現することが可能である HuH-7 細胞を用いておこなった。しかしながら、HuH-7 細胞において RIG-I、IRF-7、そして IFN 遺伝子の SeV 感染後経時的な発現変動は、少なくともその感染初期においては、全く検出されなかった(図 2)。これらの結果から、RNA ウイルス感染後初期自然免疫反応が惹起されないことが、HuH-7 細胞における組換え体 HCV の高率な感染複製に寄与している可能性が示唆された。また、HuS-E/2 細胞における SeV ウイルス感染初期自然免疫反応が PHH のものと類似していることから、HuS-E/2 細胞が PHH の抗ウイルス自然免疫機構を良く保存していると考えられた。このことから以降、HuS-E/2 細胞をヒト肝細胞のモデル細胞として用いて、その抗ウイルス自然

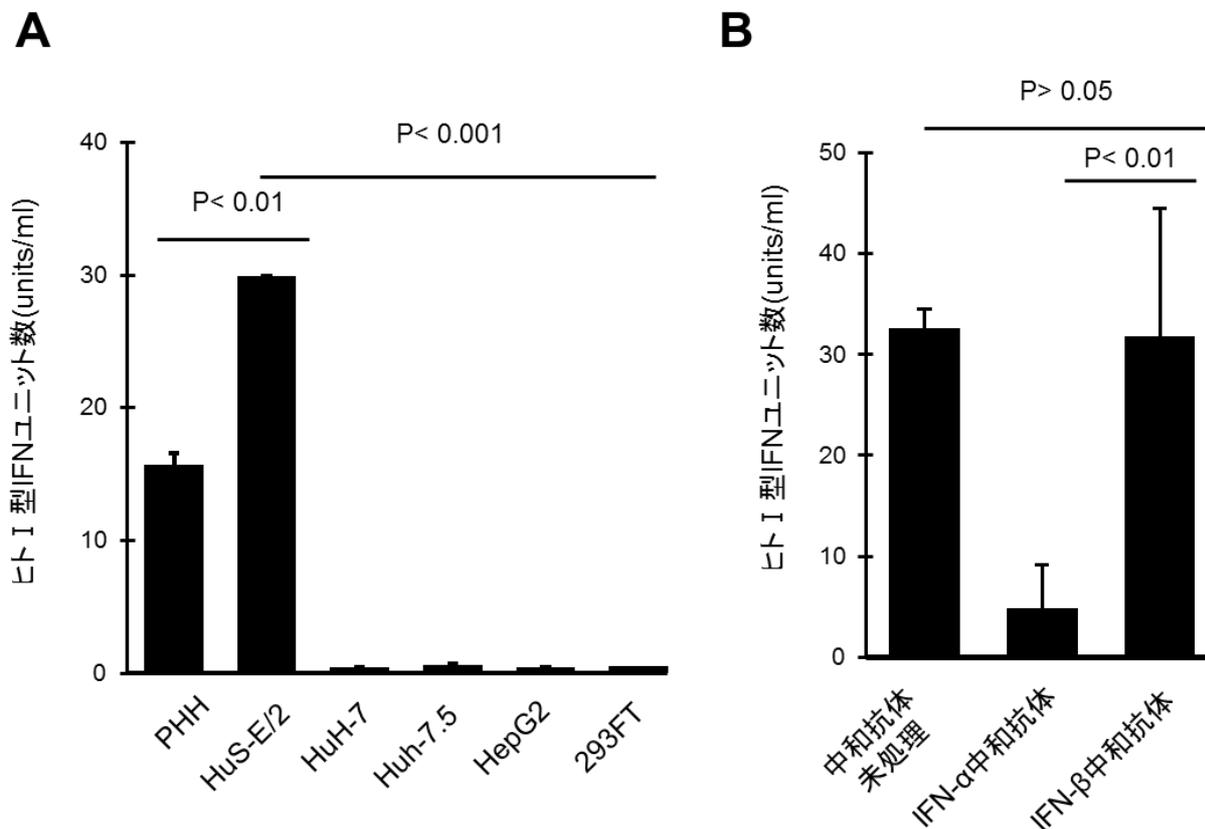
免疫機構の解析を進めた。



**図2.** PHH、HuS-E/2細胞、HuH-7細胞に対するSeV感染後初期段階におけるIFN、ISGの発現プロファイル解析。ウイルス感染後各経過時間(0、6、12、18、24時間)においてPHH(●)、HuS-E/2細胞(○)、HuH-7細胞(×)からtotal RNAを回収後、RIG-I (A)、IRF-7 (B)、IFN-α1 (C)、IFN-β (D)、IFN-λ3 (E)、そして IFN-λ1(F) mRNAの経時的な変化をqRT-PCR法を用いて相対定量化した。各RNAサンプルはGAPDH mRNAによって標準化し、遺伝子発現量比はウイルス非感染時の検出値によって補正した値を示した。グラフ中の統計解析結果は、3サンプルの平均値、および標準偏差を示している。全ての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している。

### ウイルス非感染 HuS-E/2 細胞における活性型 IFN- $\alpha$ の低レベル産生

上述のように、私は、PHH と HuS-E/2 細胞において IFN- $\alpha$ 1 遺伝子が恒常的に発現していることを見出した。先行研究において、健常者の肝組織 RNA を用いたノーザンブロット解析の結果、IFN- $\alpha$ 1 mRNA の発現が検出されているが、その機能は未だ明らかになっていない(42)。まず、タンパク質レベルで HuS-E/2 細胞の培地中に恒常的に IFN- $\alpha$  が分泌されているのか検討をおこなった。最初に抗 IFN- $\alpha$  抗体による ELISA 法で検出を試みたが、ELISA 法では十分な感度を得られず検出に至らなかった。そこで、上清中に分泌された I 型 IFN を高感度に検出できる系として HEK-Blue type I IFN assay system を導入した。この検出系では、培養上清中に含まれる I 型 IFN により、I 型 IFN 受容体が活性化され、そのシグナルに依存して分泌型アルカリホルファターゼを産生するように設計されたレポーター細胞を用いている。この検出系を用いて各種細胞株による I 型 IFN 産生量を測定したところ、PHH および HuS-E/2 細胞の培養液中に含まれる I 型 IFN タンパク質量は Huh-7.5 細胞、HuH-7 細胞、HepG2 細胞、そしてヒト胎児腎臓由来細胞の 293FT 細胞のそれと比較して著しく高い値を示した(図 3A)。このことから PHH 培養液と同様に、HuS-E/2 細胞の培養液中には活性を有する I 型 IFN が産生されていることがわかった。次に、この HuS-E/2 細胞から産生される I 型 IFN が IFN- $\alpha$  であるか否かを検討するため、以下のように IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  に対する中和抗体を利用した。HuS-E/2 細胞から得られた培養液に抗 IFN- $\alpha$  または抗 IFN- $\beta$  中和抗体を添加し前処理を施し、レポーター細胞でそれぞれの培養液中の I 型 IFN 活性を測定した。その結果、図 3B に示すように、抗 IFN- $\beta$  中和抗体処理では大きな変化は観察されず、抗 IFN- $\alpha$  中和抗体処理時にのみ IFN 受容体シグナル活性化の効果的な抑制が観察された。これらのことから、HuS-E/2 細胞の培養培地中に含まれる I 型 IFN は IFN 受容体シグナルを活性化する能力を持っており、その I 型 IFN の多くは IFN- $\alpha$  であることがわかった。以上の結果と mRNA 発現解析結果から、HuS-E/2 細胞はウイルス非感染状態にも関わらず培養液中に生理活性をもつ IFN- $\alpha$ 1 を産生していることが示唆された。

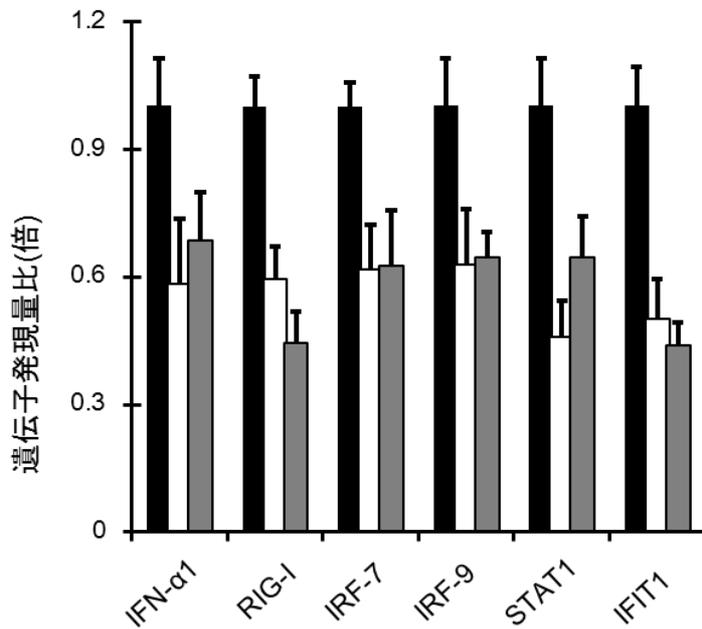
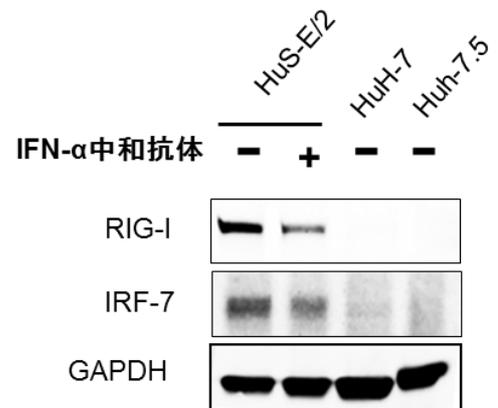
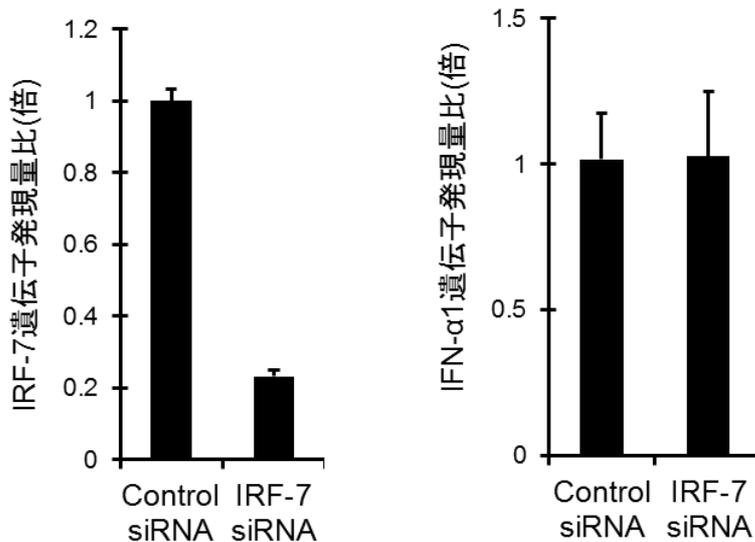


**図3. 恒常的に発現する I 型IFNはIFN受容体シグナルを活性化する。**(A) ウイルス非感染時における培地交換後1日経過したPHH、HuS-E/2細胞、HuH-7細胞、Huh-7.5細胞、HepG2細胞および293FT細胞の培養上清中に分泌された I 型IFNタンパク質量をHEK Blue™ IFN- $\alpha/\beta$  cellsより定量化した。(B) ウイルス非存在下においてHuS-E/2細胞から得られた培養上清を回収し、IFN- $\alpha$ (5  $\mu$ g/ml)またはIFN- $\beta$ (5  $\mu$ g/ml)中和抗体を前処理した後、(A)と同様の手法によりIFNタンパク質量を測定した。グラフ中の統計解析結果は、3サンプルの平均値、および標準偏差を示している。P値はStudent's T検定により算出した。全ての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している。

### I 型 IFN 受容体シグナル依存的な IFN- $\alpha$ 1 と ISG 遺伝子の恒常発現レベル

ウイルス非感染時において恒常発現 IFN- $\alpha$  がオートクラインまたはパラクラインシグナルを介して細胞に与える影響について以下のように検討した。HuS-E/2 細胞を、I 型 IFN の受容体の構成因子である IFN- $\alpha/\beta$  受容体 2(IFNAR2)に対する中和抗体によって処理した時のこの細胞内における IFN- $\alpha$ 1 と ISG(RIG-I、IRF-7、IRF-9、STAT1、IFN-induced protein with Tetratricopeptide(IFIT) 1 遺伝子)の mRNA 発現量を qRT-PCR 法により解析した。その結果、図 4A に示すように IFN- $\alpha$ 1、RIG-I、IRF-7、IRF-9、STAT1、IFIT1 の各 mRNA 発現量はコントロールと比較して 40-60%に低下した。また抗 IFN- $\alpha$  中和抗体処理によっても同様の減少が確認できた(図 4A)。次に、タンパク質産生レベルにおいて同様検討をおこなった。HuS-E/2 細胞に対して抗 IFN- $\alpha$  中和抗体処理をおこない、その細胞内における RIG-I と IRF-7 のタンパク質発現量をウエスタンブロット法によって解析した。図 4B に示すように、HuH-7 細胞、Huh-7.5 細胞では、抗 IFN- $\alpha$  中和抗体未処理の状態でも両タンパク質は検出限界以下であったが、HuS-E/2 細胞においては、未処理の状態では両タンパク質は検出可能なレベルの産生が確認された。しかし、抗 IFN- $\alpha$  中和抗体で処理した HuS-E/2 細胞では両タンパク質量が明らかに低下していることが認められた(図 4B)。以上の結果から、HuS-E/2 細胞における IFN- $\alpha$ 1 遺伝子、ISG の恒常発現は I 型 IFN 受容体シグナルを介して制御されていることが示唆された。そこで、次に恒常発現している IFN- $\alpha$  遺伝子の転写制御について以下の検討をおこなった。これまでに、ヒト肝細胞においては IRF-7 が恒常的に発現していることが示されている(37)。そのため、ヒト肝細胞の恒常発現 IFN- $\alpha$  が IRF-7 によって転写制御されている可能性を考え、IRF-7 に対する siRNA を用いて HuS-E/2 細胞の IRF-7 を一過性にノックダウンし、これを解析に用いた。siRNA 処理後 2 日目の HuS-E/2 細胞における IRF-7 および IFN- $\alpha$ 1 mRNA 発現量を qRT-PCR 法によって比較した。その結果、IRF-7 によって自己制御されることが知られる IRF-7 遺伝子発現は顕著に低下したが、IRF-7 ノックダウンによる IFN- $\alpha$ 1 遺伝子の発現低下は認められなかった(図 4C)。このこと

から、ヒト肝細胞において高発現する IRF-7 は恒常発現レベルでの IFN- $\alpha$  転写制御に関わっていないと考えられた。

**A****B****C**

**図4. 恒常発現IFN-α誘導性細胞内シグナルの抑制によってIFN-α1とISGの恒常発現レベルが減弱した。**  
 (A) HuS-E/2細胞に対してIFNAR2(5 μg/ml)(白色)およびIFN-α(5 μg/ml)(灰色)をターゲットにした中和抗体を12時間処理後のtotal RNAを使用し、IFNシグナルに関わるRIG-I、IRF-7、IRF-9、STAT1、IFIT1、そしてIFN-α1遺伝子発現量をqRT-PCRによって相対定量化した。サンプル間のタンパク質量はGAPDH発現量により標準化している。グラフ中の統計解析結果は、3サンプルの平均値、および標準偏差を示している。(B) (A)の実験条件と同様にIFN-α中和抗体処理(+)または未処理(-)のHuS-E/2細胞からtotal cell lysateを回収し、RIG-IおよびIRF-7抗体を用いてウェスタンブロット法によりタンパク質を検出した。(C) HuS-E/2細胞を用いてIRF-7 siRNA処理後2日目のIRF-7、IFN-α1 mRNA発現量をqRT-PCRによって比較した。左図は、IRF-7 siRNA処理HuS-E/2細胞におけるsiRNAターゲット遺伝子の抑制効率を示した。グラフ中の統計解析結果は、3サンプルの平均値、および標準偏差を示している。全ての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している。

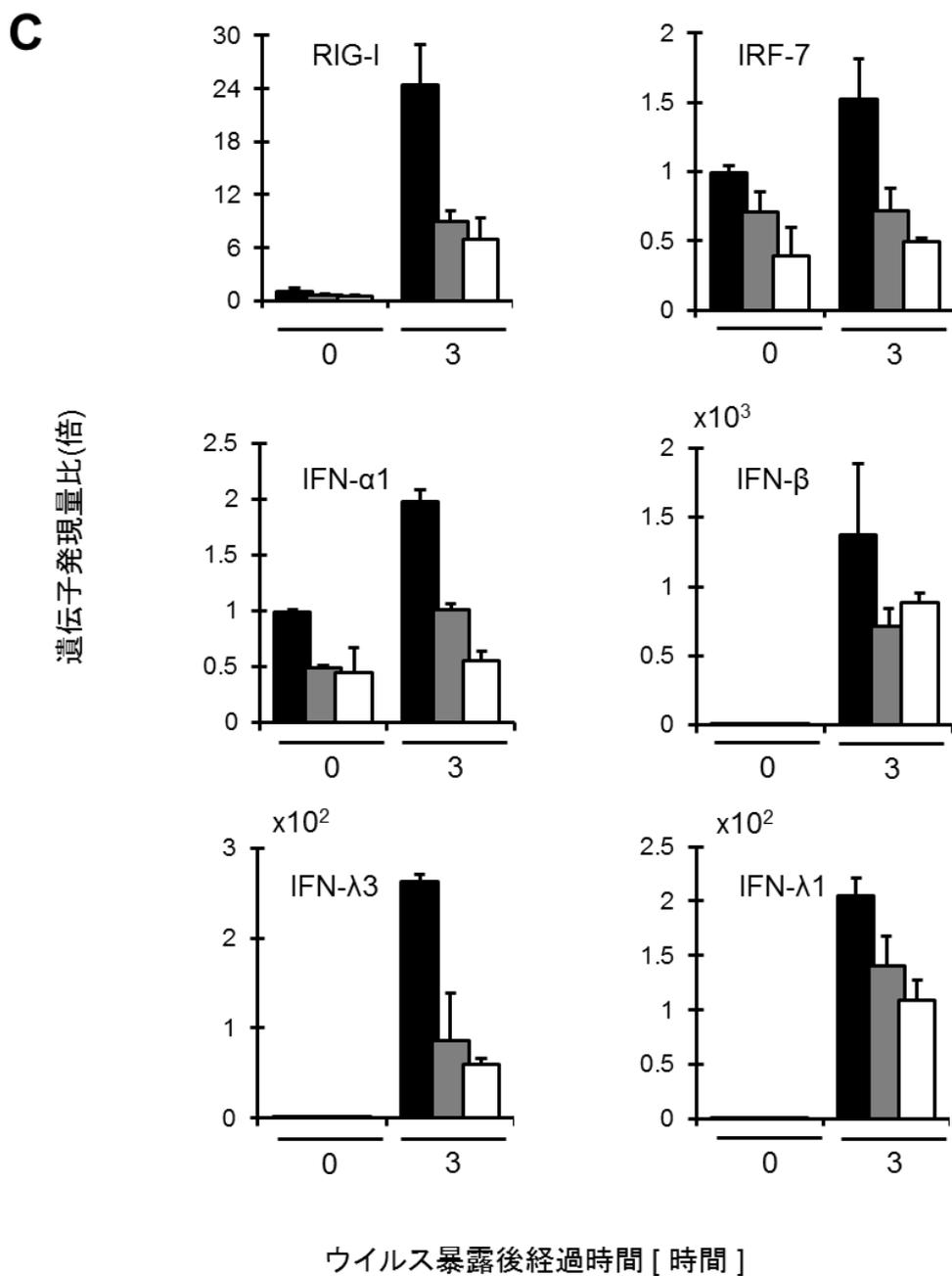
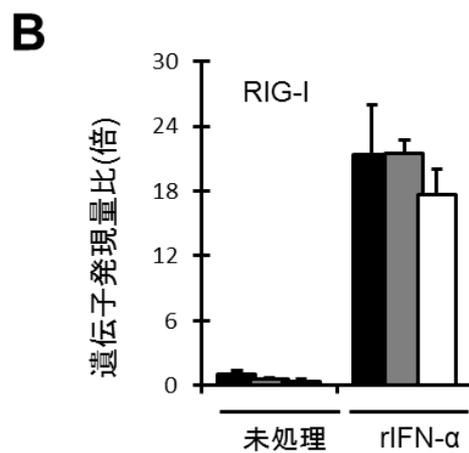
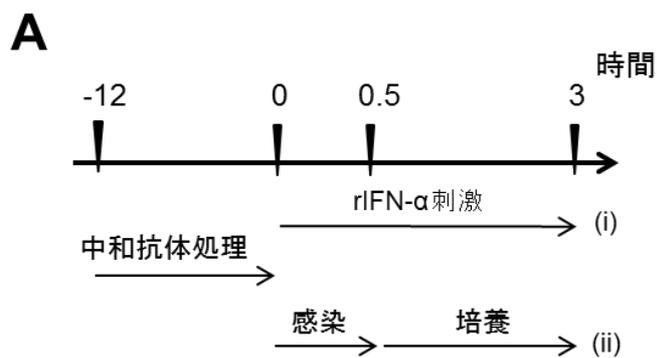
### 恒常発現 IFN- $\alpha$ によるウイルス初期感染時の迅速な抗ウイルス反応

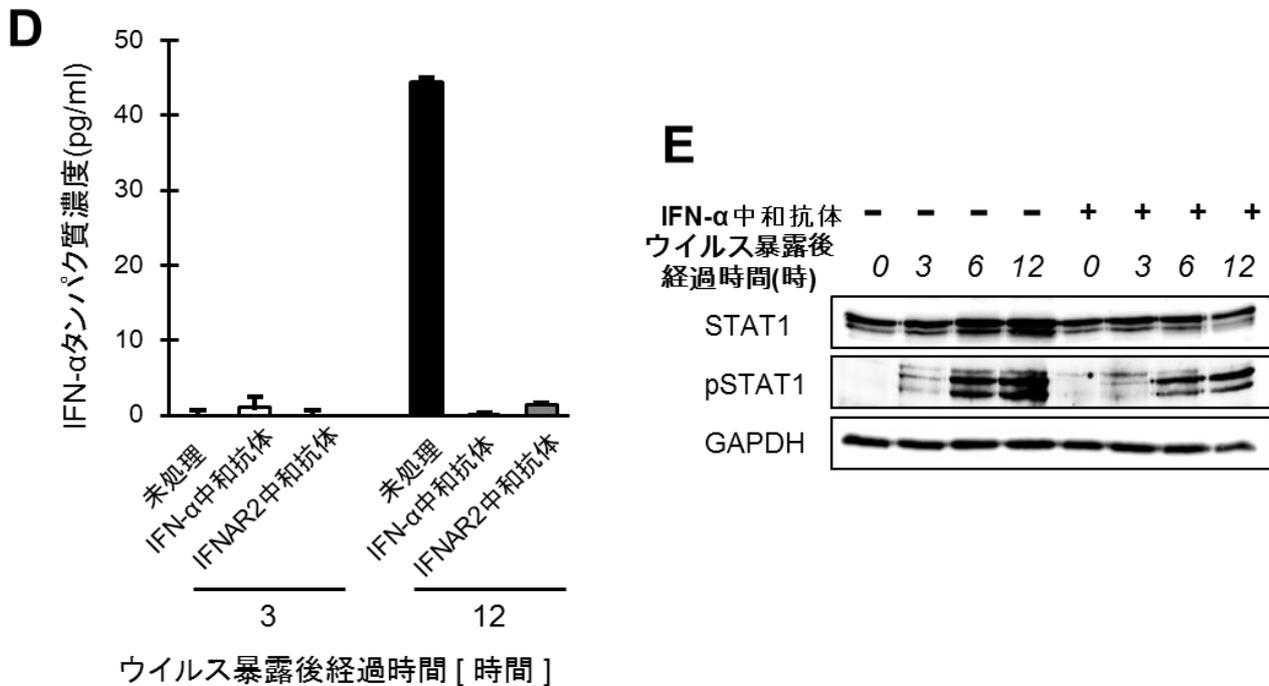
次に HuS-E/2 細胞における恒常発現 IFN- $\alpha$ 1 の機能的な役割を明らかにするため、RNA ウイルス感染に対する抗 IFN- $\alpha$  中和抗体ならび抗 IFNAR2 中和抗体処理 HuS-E/2 細胞の自然免疫反応を解析した。実験手順を図 5A に示した。まず、あらかじめ感染実験開始 12 時間前に HuS-E/2 細胞に対して中和抗体処理をおこない、恒常発現 IFN シグナリングを阻害した。次に中和抗体を除去し、洗浄後、30 分間 SeV に暴露した。それから新鮮な培地に交換して、3 時間培養をおこなった後、続く実験操作をおこなった(図 5A)。また、SeV 感染前における IFN- $\alpha$  シグナルの活性化のみが中和抗体処理により抑制されていることを確認するため、RIG-I 遺伝子を ISG の指標として用いて、組換え体 IFN- $\alpha$  添加後のその発現誘導の確認をおこなった。図 5B に示すように、中和抗体前処理 HuS-E/2 細胞においても、中和抗体未処理細胞と同程度に、組換え体 IFN- $\alpha$  の添加により RIG-I 遺伝子が発現誘導されていたことから、中和抗体前処理によって、培養液中の I 型 IFN による IFN 受容体シグナル活性化への影響は実質的に認められず、恒常発現 IFN- $\alpha$  によるシグナル活性化のみが抑制されていることが確認された。まず、SeV 非感染（感染後 0 時間）または感染後 3 時間時の中和抗体前処理細胞における RIG-I、IRF-7、IFN- $\alpha$ 1、IFN- $\beta$ 、IFN- $\lambda$ 1、そして IFN- $\lambda$ 3 の mRNA 発現量の変化を qRT-PCR 法によって解析した。中和抗体未処理細胞において、SeV 感染後の IRF-7、IFN- $\alpha$  遺伝子発現変化は非感染時と比較して大きなものではなかったが、ウイルス感染後の RIG-I、IFN- $\beta$ 、IFN- $\lambda$ 1、IFN- $\lambda$ 3 の遺伝子発現は全て顕著に誘導されていた(図 5C)。しかしながら、中和抗体処理細胞においては、比較的 IFN- $\lambda$ 1 遺伝子発現に対する効果は低いものの、検討したすべての遺伝子の発現誘導が抑制されていることがわかった。また ELISA 法によって、SeV 感染後 12 時間の中和抗体処理細胞においては、分泌型 IFN- $\alpha$  タンパク質産生量が低下していることが確認できた(図 5D)。

次に、恒常発現 IFN- $\alpha$  シグナル抑制細胞におけるウイルス感染後の STAT1 活性化を評価するため、SeV 感染後の中和抗体処理細胞内のリン酸化 STAT1 タンパク質の経時的な観察

をおこなった。中和抗体未処理細胞と比較して、SeV 感染後 3、6、12 時間における STAT1 タンパク質レベルは変化していないが、リン酸化 STAT1 は明らかに減少していた(図 5E)。このことから、ウイルス感染後の IFN 受容体シグナル活性化は恒常発現 IFN- $\alpha$  シグナルの抑制によって阻害されることが明らかとなった。

以上の結果から、HuS-E/2 細胞から分泌される恒常発現 IFN- $\alpha$  は IFN システムの初期応答を増強している可能性が示唆された。



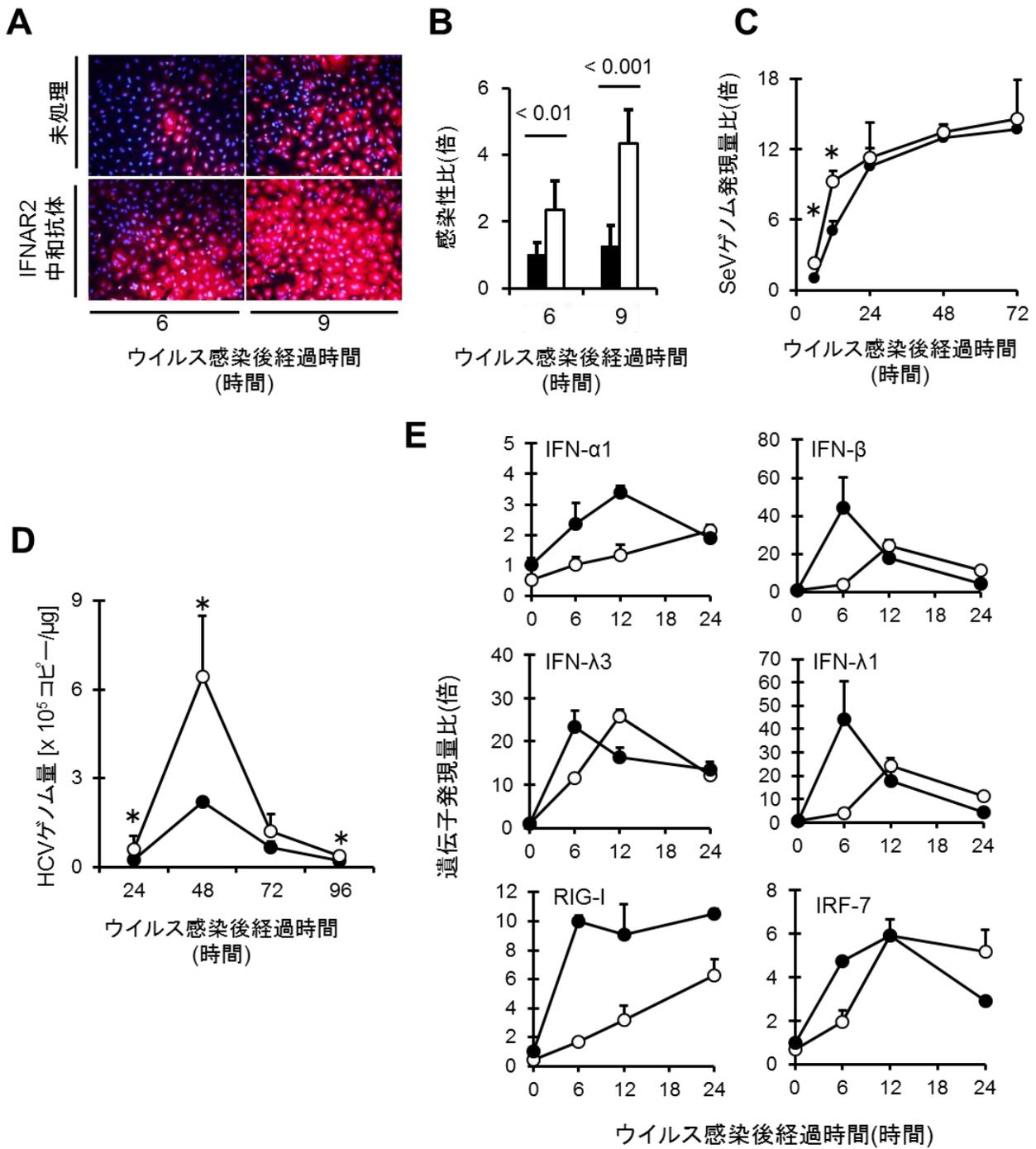


**図5. 恒常発現 IFN-αはウイルス初期感染時の迅速な抗ウイルス応答を誘導するために重要。**(A) ウイルス感染実験概略図。中和抗体(IFNAR2; 灰色、IFN-α; 白色)処理また未処理(黒色)後に組換え体(r) IFN-αを添加し、IFN受容体シグナル活性を測定(i)、またはSeV感染実験(ii) (B) 恒常発現IFN-αの抗ウイルス応答への重要性を検討する際、中和抗体前処理により恒常発現IFN-αシグナル応答のみを抑制していることを示すため、中和抗体処理後にrIFN-α(2.5 unitis/ml)で刺激を行ない、I型IFN受容体シグナルが機能していることを示した。RIG-I遺伝子はrIFN-α刺激3時間後のtotal RNAを用いてqRT-PCRにより相対定量化した。(C) HuS-E/2細胞に対してIFNAR2(5 μg/ml)、IFN-α中和抗体(5 μg/ml)を12時間前処理することで恒常発現IFN-αシグナル応答を阻害した後、SeV感染3時間後のIFN-α1、IFN-β、IFN-λ1、IFN-λ3、そしてIRF-7 mRNAs発現量をqRT-PCRによって比較した。(D) SeV感染後3、12時間に発現誘導される培養上清中のIFN-αタンパク質濃度をELISA法を用いて測定した。細胞はCの実験条件と同様の処理を行った。(B、C、D)のグラフ中の統計解析結果は、3サンプルの平均値、および標準偏差を示している。(E) IFN-α中和抗体処理HuS-E/2細胞に対するSeV感染後の細胞内STAT1リン酸化状態を解析した。Cの実験条件に従い、SeV感染後経時的にtotal cell lysateを回収した。抗STAT1抗体(STAT1)および抗リン酸化STAT1抗体(pSTAT1)を用いて、中和抗体処理(+)または未処理(-)における各タンパク質発現量をウェスタンブロット法により比較した。サンプル間のタンパク質量はGAPDH発現量により標準化している。全ての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している。

### ヒト肝細胞における恒常発現 IFN- $\alpha$ による効率的な RNA ウイルス感染複製の抑制

次に、恒常発現 IFN- $\alpha$  のヒト肝細胞に対するウイルス感染抑制効果について検討した。これまでに HuS-E/2 細胞に対するウイルス感染複製が確認できている SeV と HCV を用い、抗 IFN- $\alpha$  または抗 IFNAR2 中和抗体処理後のウイルス感染複製効率を IF または qRT-PCR 法によって解析した。図 5A で示した実験方法を用いて恒常発現 IFN- $\alpha$  を阻害し、SeV 感染後 6、9 時間における SeV 陽性細胞を IF によって解析した。その結果、コントロールと比較して、IFNAR2 中和抗体処理 HuS-E/2 細胞では、SeV 陽性細胞が感染後 6 時間から 9 時間において、時間経過とともに増加していた(図 6A、B)。また、IFN- $\alpha$  中和抗体処理または未処理時の HuS-E/2 細胞における SeV 感染複製を評価するため、qRT-PCR 法により細胞内 SeV ゲノム RNA 量を経時的に定量した。その結果、図 6C に示すように、未処理細胞に対する中和抗体処理細胞では、SeV 感染後 12 時間まで明らかな SeV ゲノム量の増加が認められた(図 6C、白丸)。以上の結果から、恒常発現 IFN- $\alpha$  が感染初期における SeV 増殖効率を抑制する役割を担っている可能性が考えられた。さらに、このヒト肝細胞における恒常発現 IFN- $\alpha$  の生理的な意義を見出すため、肝指向性ウイルスである HCV を用い、上記同様に qRT-PCR 法によって感染後の HCV ゲノム量の経時変化を解析した。中和抗体未処理 HuS-E/2 細胞では、これまでに報告されているように、一過性の HCVcc 感染増殖を確認することができた(43)。一方、抗 IFN- $\alpha$  中和抗体処理 HuS-E/2 細胞においては HCVcc 感染後 24 時間、48 時間において HCV 感染複製効率の有意な増強を確認することができた(図 6D、白丸)。ここで、抗 IFN- $\alpha$  中和抗体処理そして未処理の HuS-E/2 細胞において、IFN シグナル関連遺伝子の HCV 感染後における発現の経時変化を解析した。図 6E に示すように、中和抗体未処理細胞と比較して、中和抗体処理細胞では、HCV 感染後の IFN- $\alpha$ 1、IFN- $\beta$ 、IFN- $\lambda$ 1、IFN- $\lambda$ 3、RIG-I、そして IRF-7 mRNA 発現量増加は有意に遅延していることが観察された。これらの結果から、ウイルス非感染時に HuS-E/2 細胞が産生する恒常発現 IFN- $\alpha$  には、迅

速かつ効率的に抗ウイルス自然免疫反応を惹起し、HCV 初期感染複製を抑制する効果があると考えられた。



**図6. 恒常発現 IFN- $\alpha$ はヒト肝細胞に対するウイルス感染複製を効率的に抑制する。**(A) HuS-E/2細胞を用いてIFNAR2中和抗体(5  $\mu\text{g/ml}$ )処理および未処理細胞に対するSeV感染性をウイルス暴露後6、9時間において比較した。SeV陽性細胞は赤色、DAPI染色は青色で示した。(B) ウイルス感染性の比較は、2ウェル間のランダムに選択された10箇所中に存在する染色細胞をカウントし、コントロール細胞(黒色)とIFNAR2中和抗体処理細胞(白色)間で比較した。ウイルス感染後6時間での陽性細胞数の平均値で相対値を示した。(C) SeV感染後12、24、48、72時間のIFN- $\alpha$ 中和抗体(5  $\mu\text{g/ml}$ )処理(O)または未処理(●)細胞からtotal RNAを抽出し、SeV RNA量をqRT-PCR法によって測定した。(D) HCVcc感染後24、48、72、96時間のIFN- $\alpha$ 中和抗体処理(O)または未処理(●)細胞からtotal RNAを抽出し、HCVゲノム量をqRT-PCR法によって測定した。(E) IFN- $\alpha$ 中和抗体処理(O)または未処理(●)のHuS-E/2細胞に対して、HCV感染6、12、18、24時間後のIFN- $\alpha$ 1、IFN- $\beta$ 、IFN- $\lambda$ 1、IFN- $\lambda$ 3、RIG-IそしてIRF-7 mRNA発現量をqRT-PCRによって比較した。(A, B, C, D, E) HuS-E/2細胞の基本的な中和抗体前処理方法は図5.Cに準拠している。(B, C, D)のグラフ中の統計解析結果は、3サンプルの平均値、および標準偏差を示している。(C, D) P値はStudent's T検定により算出した。\*: $p < 0.01$ 。全ての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している。

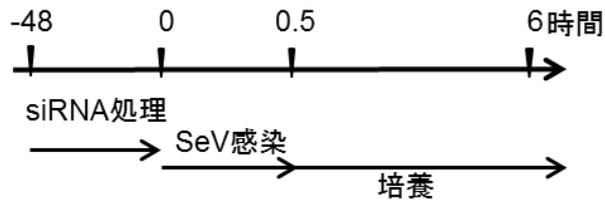
## ヒト肝細胞における I 型、および III 型 IFN 受容体による IFN 遺伝子および ISG 発現制

### 御機構

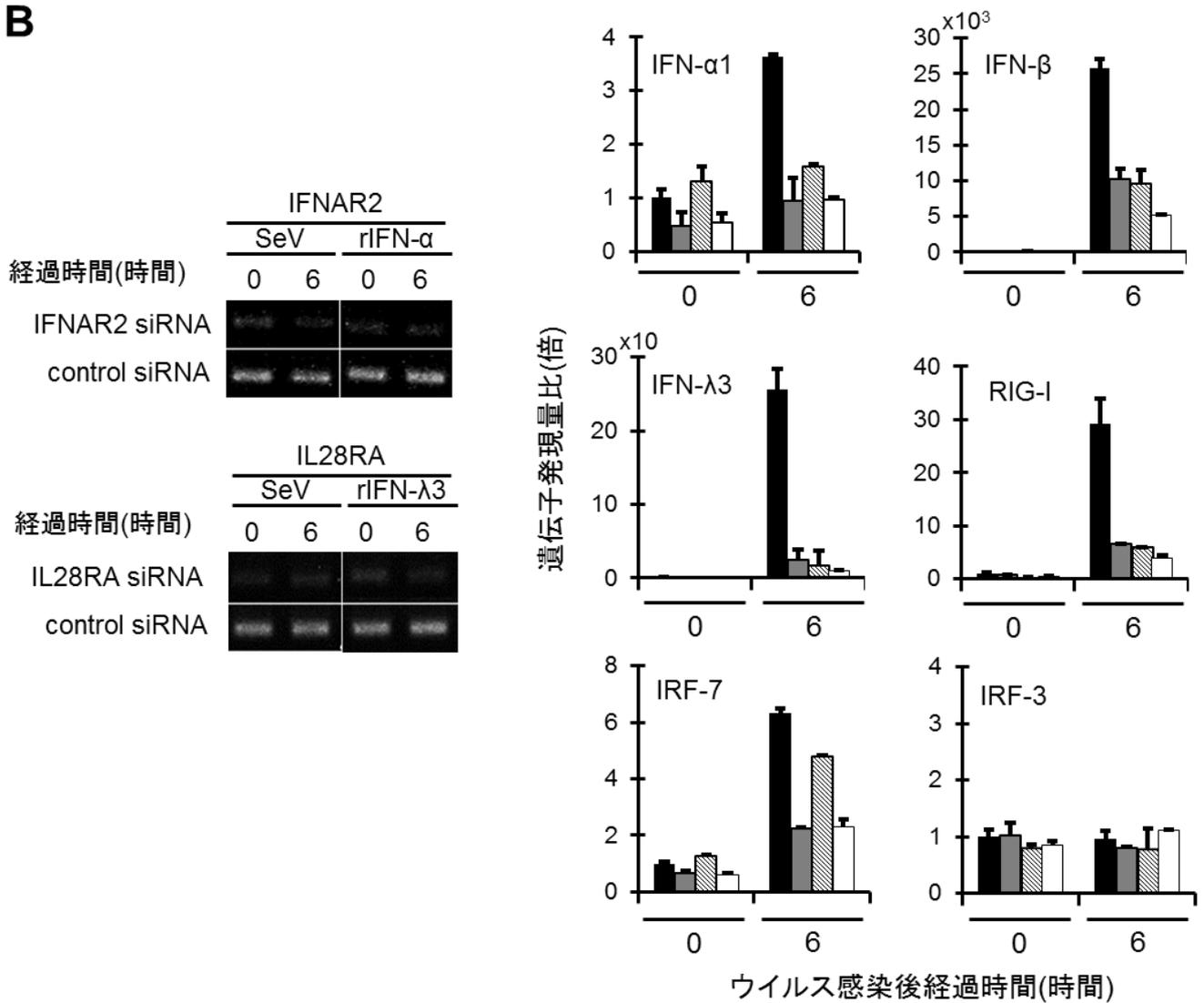
これまでの結果から、ヒト肝細胞で恒常発現している IFN- $\alpha$  が RNA ウイルス感染後の迅速な I 型および III 型 IFN 産生に寄与していること、また感染初期におけるウイルス増殖の抑制に機能することを見出している。しかし、ヒト肝細胞において迅速に産生される I 型と III 型 IFN がそれぞれどのように相関して、抗ウイルス効果をもたらしているのかは明らかでなかった。そこで、この点を明らかにするために以下の解析をおこなった。IFNAR2 siRNA、そして IL28RA siRNA を用いた RNAi 法により、それぞれ I 型そして III 型 IFN 受容体の産生を一過性に低下させた HuS-E/2 細胞を用いて、各細胞における、ウイルス感染後の自然免疫関連遺伝子の発現変動およびウイルス増殖効率の解析をおこなった。図 7A にウイルス感染実験の手順を示した。ウイルス感染 2 日前にそれぞれの siRNA 単独処理または併用処理をおこない、SeV 感染後、各細胞における IFN- $\alpha$ 1、IFN- $\beta$ 、IFN- $\lambda$ 3、RIG-I、IRF-7、IRF-3 遺伝子発現の経時変化を qRT-PCR 法によって解析した。その結果を図 7B に示した。siRNA による IFNAR2 および IL28RA 遺伝子のノックダウン効率をそれぞれ rIFN- $\alpha$  と rIFN- $\lambda$ 3 による刺激誘導をおこない確認した(図 7B)。IFNAR2 siRNA 処理細胞および IFNAR2 と IL28RA siRNA の併用処理細胞において、SeV 非感染時における IFN- $\alpha$ 1、IRF-7 遺伝子の発現低下を確認することができた。このことは、図 4A ならびに図 5B で示した結果と同様に、これらの遺伝子の定常レベルの発現が I 型 IFN 受容体シグナルに依存していることを再び示している。また、SeV 非感染時における IFN- $\beta$ 、IFN- $\lambda$ 3、RIG-I 遺伝子発現誘導に関しては、各 siRNA 単独処理細胞においてはそれぞれ同程度の抑制が認められ、併用処理細胞においてはさらに強い発現抑制が観察された。一方、IFN- $\alpha$ 1 と IRF-7 遺伝子発現誘導に関しては、IFNAR2 siRNA 処理細胞において、高い発現抑制効果が認められたが、IL28RA siRNA との併用処理細胞では IFN- $\beta$ 、IFN- $\lambda$ 3、RIG-I 遺伝子発現で見られた相乗的な効果は認められなかった(図 7B)。これらの結果から、HuS-E/2 細胞において、ウイルス感染による IFN- $\beta$ 、IFN- $\lambda$ 3、そし

て RIG-I 遺伝子の発現誘導は、その感染後初期段階において I 型および III 型、両 IFN 受容体シグナリングに協調的に発現制御されており、一方、IFN- $\alpha$ 1 や IRF-7 遺伝子の発現は主として I 型 IFN 受容体シグナリング制御されていることが考えられた。

**A**



**B**

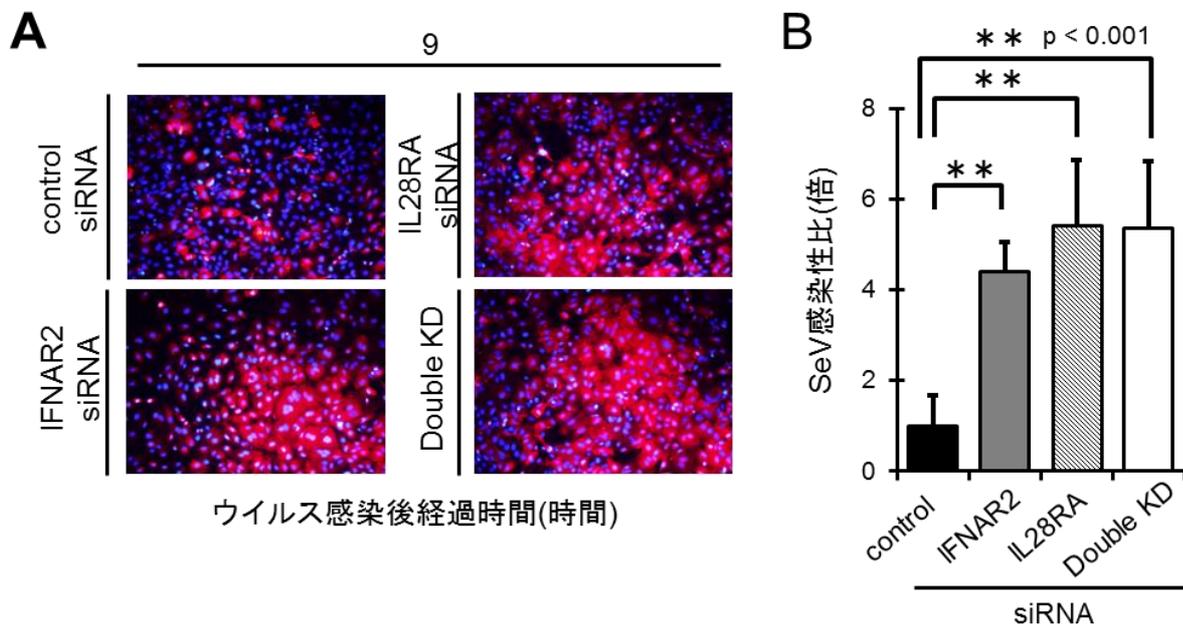


**図7. 恒常発現 IFN-αはヒト肝細胞に対するウイルス感染複製を効率的に抑制する。**(A) ウイルス感染実験概略図。ウイルス感染2日前にIFNAR2 およびIL28RAに対してsiRNA単独処理または併用しておき、感染後のウイルス応答性を比較した。(B) HuS-E/2細胞を用いてIFNAR2 siRNA(灰色)、IL28RA siRNA(斜線)処理または併用(白色)後、SeV暴露6時間におけるIFN-α1、IFN-β、IFN-λ3、RIG-I、IRF-7、そしてIRF-3 mRNA発現量をqRT-PCRによって比較した。左図は、これらノックダウン処理HuS-E/2細胞におけるsiRNAターゲット遺伝子の抑制効率を示した。rIFN-α、rIFN-λ3、またはSeV感染6時間後におけるIFNAR2、IL28RA遺伝子は発現量をRT-PCR法により検出を行った。グラフ中の統計解析結果は、3サンプルの平均値、および標準偏差を示している。全ての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している。

## ヒト肝細胞における I 型および III 型 IFN 受容体シグナルによる協調的抗 RNA ウイルス応

### 答

次に、HuS-E/2 細胞における、I 型、および III 型 IFN 受容体シグナルのウイルス感染増殖に対する抑制に関するそれぞれの役割について検討した。図 7A と同様の実験方法を用いて、IFNAR2 siRNA および IL28RA siRNA で処理した HuS-E/2 細胞に対して SeV を感染させ、感染 9 時間後におけるウイルス感染複製効率を IFN によって解析した。その結果、コントロールと比較して各 siRNA の単独処理または併用処理細胞において SeV 陽性細胞数の増加が観察された(図 8A、B)。この結果から、ヒト肝細胞における RNA ウイルス感染初期応答において I 型および III 型 IFN が各 IFN 受容体シグナルを介して協調的に作用し、効率的にウイルス感染複製を抑制する可能性が示唆された。



**図8.** 不死化ヒト肝細胞ではI型およびIII型IFN受容体シグナリングは抗RNAウイルス応答において相乗的に作用する。(A) I型、III型IFN受容体シグナリングのSeV感染性に対する影響を検討。図7.Bと同様の操作で、HuS-E/2細胞に対してIFNAR2およびIL28RA siRNAを前処理し、その後SeV感染9時間後におけるSeV感染複製効率を比較した。SeV陽性細胞は赤色、DAPI染色は青色で示した。(B) HuS-E/2細胞を用いてIFNAR2 siRNA(灰色)、IL28RA siRNA(斜線)処理または併用(白色)後、SeV感染性をウイルス暴露後9時間において比較した。SeV感染性の比較は、2ウェル間のランダムに選択された10箇所中に存在する染色細胞をカウントし、コントロール細胞と処理細胞間で比較を行った。control siRNA処理細胞に対するSeV陽性細胞数の平均値で相対値を示した。統計解析結果は、平均値および標準偏差を示した。P値はStudent's T検定により算出した。[\* \*]: $p < 0.001$ 。全ての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している。

## 考察

### 恒常発現 IFN- $\alpha$ の発現制御機構について

所属研究室のこれまでの研究から、ウイルス非感染時における HuS-E/2 細胞の自然免疫関連遺伝子を解析したところ、PHH のそれと似た発現パターンを示すことが報告されている(43)。今回、私の研究により、RNA ウイルスの感染に対する PHH と HuS-E/2 細胞の自然免疫反応が類似していることまたウイルス非感染時において、両者に共通して IFN- $\alpha$ 1 遺伝子の低レベルでの発現が見出された。これらの結果から HuS-E/2 細胞が PHH と極めて類似した自然免疫機構を保持していることが考えられた。これまで既に、正常肝組織において IFN- $\alpha$ 1 遺伝子の発現が確認されているが、肝臓を構築するどの細胞が IFN- $\alpha$ 1 を産生しているのか不明であった(42)。本研究の結果から、正常な肝組織に認められる IFN- $\alpha$ 1 遺伝子の恒常発現は、少なくともその一部は、ヒト肝実質細胞が担っていると考えられた。これまでに、様々な組織において I 型 IFN の恒常的な産生が確認されており、その多くは IFN- $\beta$  であった(48-51)。恒常発現 IFN- $\beta$  の発現制御機構の解析は IFN- $\alpha$  と比較してより進んでおり、c-Jun や RelA などの複数の転写因子が IFN- $\beta$  遺伝子の転写プロモータ領域に複雑に関与していることが報告されている(38)。しかし、恒常発現 IFN- $\alpha$  の発現制御機構の多くは未だ不明であった。先行研究において、病原因子感染後の IFN- $\alpha$ 1 発現制御機構が解析されており、転写プロモータ領域の 2 つの制御領域がこれに関与していることが報告されている。一つは IFN- $\beta$  の positive regulatory domain I (PRDI) と相同性の高い領域(52-54)、二つ目は TG-like domain である(55,56)。私の所属研究室では以前、HuS-E/2 細胞において IRF-7 遺伝子が他の肝細胞株よりも比較的高発現していることを見出している(43)。IRF-7 は IRF-3 と共に IFN- $\alpha$  あるいは IFN- $\beta$  遺伝子の発現制御に関わっており、ウイルス感染時には PRDI に結合すること発現誘導を促すことが知られている(57,58)。また、IRF-7 は IRF-3 よりも HuS-E/2 細胞における HCV 初期感染複製抑制に重要であることが示唆されている

(43)。しかしながら、定常発現レベルにおいて、IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  遺伝子発現はこれら転写因子に依存しないという先行報告も存在する(59)。私は、HuS-E/2 細胞における IFN- $\alpha$ 1 遺伝子の恒常発現が IRF-7 に依存しているのか否かを検討するため、RNAi 法を用いて IRF-7 のノックダウン HuS-E/2 細胞を作製した。その結果、IRF-7 ノックダウン細胞においては、IFN- $\alpha$ 1 遺伝子の恒常発現の影響低下は認められなかった。次に、ウェブツールである JASPAR を用いて IFN- $\alpha$ 1 の転写開始点-5000~0 の領域を対象に転写制御プロモーター予測解析をおこなった。予測解析結果の上位には、肝細胞で比較的特異的な転写因子として知られる hepatocyte nuclear factor(HNF) 1 $\alpha$ 、HNF1 $\beta$ 、HNF4 $\alpha$ 、HNF4 $\gamma$ 、C/EBP が含まれていた。以下に予測スコアの高いものを2つ例として挙げた。代表転写開始点から-4698ヌクレオチドに HNF4 $\alpha$  結合配列と相同性の高い“TTAAACTTTGTACTT”という配列が存在し、-508ヌクレオチドには HNF1 $\alpha$  結合配列と相同性の高い“GGTTTATGAATACA”という配列が存在している。このことから、ヒトの肝細胞では肝細胞特異的に機能する転写制御因子が恒常発現 IFN- $\alpha$ 1 の転写制御を担っている可能性が考えられた。

#### ヒト肝細胞における恒常産生 IFN- $\alpha$ の抗ウイルス応答機構について

本研究において、ヒト肝細胞における IFN- $\alpha$  の恒常産生が非ウイルス感染下において幾つかの ISG を低レベルに発現誘導しておくことで、ウイルス感染時の IFN および ISG の産生を増強し、抗 HCV 応答に寄与することを明らかにした。迅速に IFN システムを惹起することはウイルス感染抑制において非常に重要な役割を果たす。これまでに、恒常発現 IFN- $\beta$  が様々な組織においてウイルス感染に対する IFN 応答の増強を促していると報告されており、この効果を“rewing-up モデル”と称している(40,60)。通常の細胞と比較して、このモデルが成立している細胞ではウイルス感染に対する免疫応答が速く効率的なウイルス感染抑制がおこなわれる。この IFN 応答の増強メカニズムとして、ウイルス非感染時における

IRF-7 遺伝子の弱い発現誘導などが述べられている(40)。ヒト心筋細胞ではウイルス非感染状態において恒常発現する IFN- $\beta$  が Jak-STAT 経路を介して IRF-7 遺伝子を高いレベルで発現誘導しており、迅速な抗ウイルス状態の形成に貢献している(51)。また近年、pDC において IRF-7 が恒常的高いレベルで発現しており、TLR7、9 の認識シグナルを介して IRF-3 非依存的で MyD88-IRF-7 依存的な IFN の産生をおこなっていることが報告された(61-64)。さらに IRF-7 KO マウス由来胎児線維芽細胞(MEF)解析結果から I 型 IFN の産生において IRF-7 がマスターレギュレーターとして関与していることが明らかとなったことで自然免疫応答機構における IRF-7 の重要性が再認識された(64)。しかし、PHH や HuS-E/2 細胞は IFN の発現に重要な役割を担う IRF-7 の恒常発現が高いことが分かっている一方(37)、IRF-7 ノックダウン細胞において IFN- $\alpha$ 1 遺伝子の発現低下が認められなかった。このことから、従来の pDC の結果をもとに構築された revving-up モデル系とは異なる肝細胞特異的な自然免疫応答機構の存在が示唆された(65)。pDC ではウイルス感染に対する強力な初期応答機構として恒常的に高い発現量の IRF-7 を介した多量の I 型 IFN の産生機構を有している。肝臓は身体で最も大きな固形臓器で、病原因子の豊富な門脈から流れ着く血液に対するフィルター臓器である。肝臓指向性 RNA ウイルスである A 型肝炎ウイルス(Hepatitis A virus; HAV)、E 型肝炎ウイルス(Hepatitis E virus; HEV)など体内に侵入する病原体の最初の防御線であることから肝細胞は病原体の侵入を防ぐために pDC のような迅速な IFN の産生をおこなえる特異的な防御機構を備えている可能性が高いと思われる。しかし、HBV や HCV などの肝炎ウイルスはそのような宿主の免疫応答機構を巧みに回避して持続感染を成立させる機能を保有していると考えられている(66-70)。例えば、培養細胞モデルの検討では、HCV 感染後 48 時間までに IPS-1 は完全に失活されることがわかっている(71)。それゆえ、持続感染化を防ぐためにはウイルス感染後初期段階における効果的なシグナル伝達経路を活性化する必要がある。このことから、本研究において見出したヒト肝細胞恒常産生 IFN- $\alpha$  は HCV の初期感染と密接な関係にあり、HCV との相互作用を明らかにすることで肝指向性ウ

ウイルスの持続感染機構の解明に向けた新たな可能性を示すものと考えている。また、これまでの IFN- $\beta$  の恒常産生の生理機能として、免疫恒常性(72-74)、骨密度の維持(75)、自己免疫疾患(76)などに関与していることが報告されている。このことから、肝臓における恒常発現 IFN- $\alpha$  においても IFN- $\beta$  と同様に抗ウイルス効果以外の生理機能が備わっている可能性が考えられた。

#### ヒト肝細胞において RNA ウイルス感染後の I 型 IFN および III 型 IFN の協調作用について

私は、in vitro において I 型 IFN と III 型 IFN 受容体シグナルによる協調的な抗 RNA ウイルス応答の可能性を見出した。PHH や HuS-E/2 細胞における抗ウイルス自然免疫応答因子 RIG-I、IRF-7、IFN- $\alpha$ 1、IFN- $\beta$ 、IFN- $\lambda$ 1、IFN- $\lambda$ 3 はウイルス感染後数時間の段階で上昇してくることから、ヒト肝細胞に対する RNA ウイルスの初期感染において I 型だけでなく III 型 IFN の初期誘導もウイルス感染複製の抑制に重要な役割を果たしていることが考えられた。肝臓においても pDC と類似した機構が備わっていると想定すると、特に IFN- $\alpha$ 1、IFN- $\beta$  および IFN- $\lambda$ 3 のウイルス感染後の迅速な産生が生体内における後期 IFN 応答または抗ウイルス状態の形成に寄与するものと思われる。別の報告では、IFN- $\alpha$  と IFN- $\lambda$ 3 の併用処理による培養細胞における ISRE 活性化効率が比較されたが、協調的な活性化効率の増強は認められなかった(77)。また近年、IFN- $\lambda$  遺伝子は IFN- $\alpha$  とは異なり、IRF-3 や IRF-7 だけでなく Mediator complex subunit 23 (Med23)などの IFN- $\lambda$  特異的な転写制御因子の関与が報告されている(78)。これらのことから、IFN- $\lambda$ 3 には IFN- $\alpha$  とは異なる独立に制御される因子が存在する可能性が示唆された。IFN- $\lambda$  はヒト肝細胞においてウイルス感染を抑制する働きをもつ主要なサイトカインの一つであるが、この遺伝子の早期レスポンスと HCV 治療との関係性について未だ不明な点が多い。これまで、IFN- $\lambda$ 3 による抗 HCV 応答の役割について、IFN- $\alpha$  と共通する制御因子のみを標的に研究がおこなわれてきた。しかし、

IFN- $\lambda$  が IFN- $\alpha$  よりも多くの遺伝子を制御していることが報告されている(79)。しかしながら、それらの遺伝子が抗ウイルス効果を有するものであるのかについてでさえ不明である。そのため、今後は、IFN- $\lambda$  による新たな抗ウイルス自然免疫機構の検討が必要であると思われる。IFN- $\lambda$  による HCV 治療は、これまでの IFN- $\alpha$  治療よりも多くの患者に適応し、患者の負担を軽減できる治療法として期待されている。IFN- $\lambda$  による抗ウイルス応答機構の解明は、これら薬剤効果の違いを理解する上で必要不可欠だけでなく、抗 HCV 薬剤新規ターゲットとして創薬研究開発への貢献、そして慢性感染化の原因を解明するための新しい手掛かりなる発展性の高い研究と考えられる。

## 総括

HuS-E/2 細胞を初代培養ヒト肝細胞のモデル細胞として用い、RNA ウイルス感染に対する初期自然免疫機構の解析をおこなった。本研究における発見は、以下の2点である。

- 1) ヒト肝細胞ではウイルス非感染状態において IFN- $\alpha$  が恒常的に産生されており、下流の I 型 IFN 受容体シグナルを介して抗 RNA ウイルス感染初期応答に寄与している。
- 2) ヒト肝細胞において RNA ウイルス感染後に誘導される迅速な I 型 IFN および III 型 IFN が受容体シグナルを介して協調的に作用し、効果的に RNA ウイルス感染複製を抑制している。

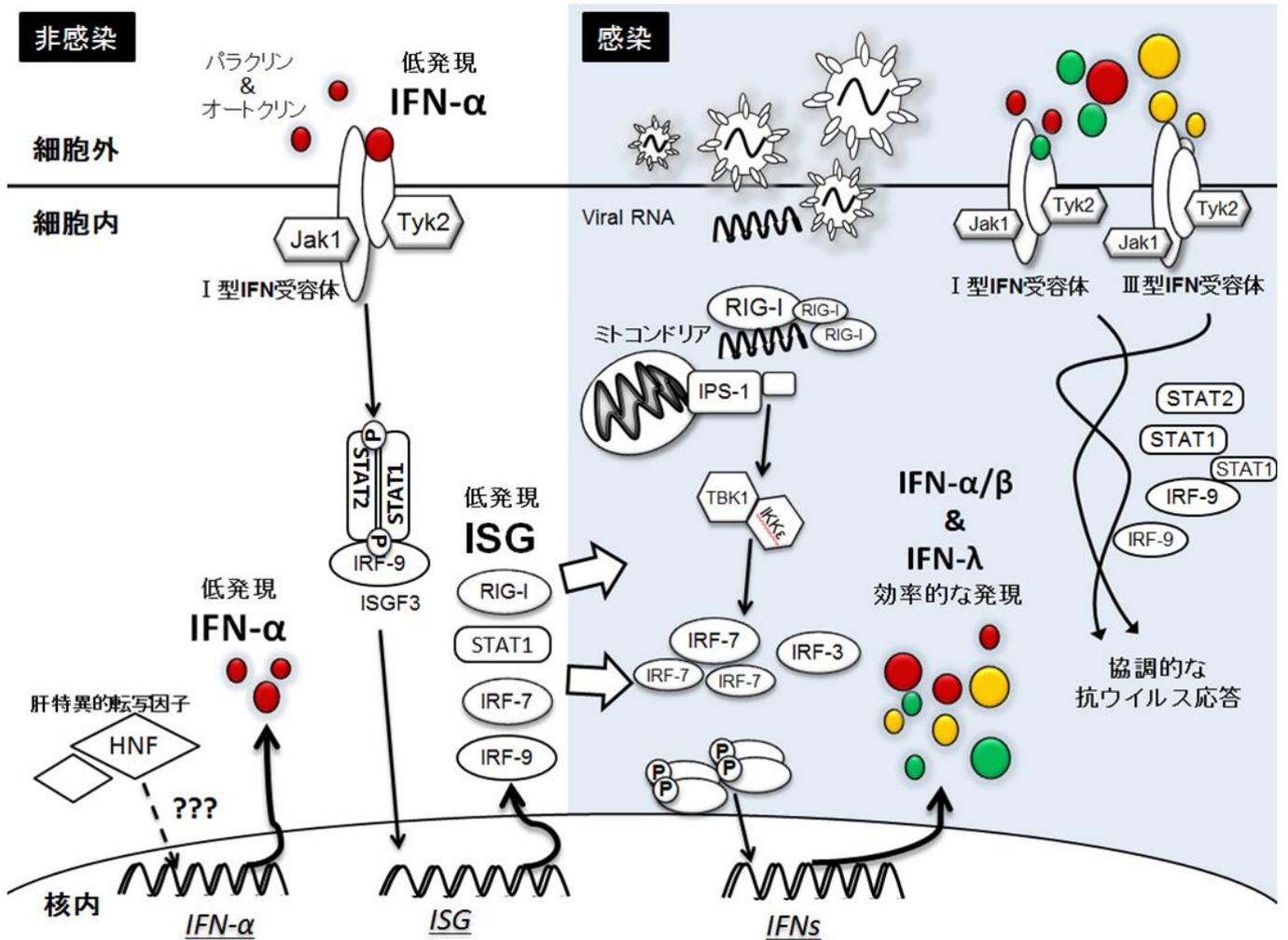


図9. ヒト肝細胞における抗RNAウイルス感染初期応答のモデル図

ウイルス非感染状態においてIFN-αは未知の転写制御機構によって恒常的に低発現している。恒常発現IFN-αは隣接する細胞または自身の細胞表面に存在するI型IFN受容体を介してISG(IFN応答システムに関連する遺伝子群)の定常発現レベルを制御している。ウイルス感染時には、IFNが恒常発現していない細胞と比較して、より迅速で強力に抗ウイルス状態を形成する。またヒト肝細胞ではI型IFNおよびⅢ型IFNがウイルス感染極初期に発現誘導される。各IFNに対する受容体シグナリングは下流の遺伝子群を制御し、ウイルス感染後期において協調的に抗ウイルス応答を行う。

## 発表論文目録

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Yoji Tsugawa , Hiroki Kato, Takashi Fujita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata  
(2014) Critical role of Interferon alpha constitutively produced in human hepatocytes in  
response to RNA virus infection, *PLoS One* 9(2):e89869

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、終始ご懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました京都大学ウイルス研究所准教授土方誠先生、教授朝長啓造先生に衷心より感謝の意を表します。

また、論文の作成から実験の細部に至るまで御指導、御助言を頂きました藤田尚志先生、加藤博紀先生(京都大学ウイルス研究所)、下遠野邦忠先生(国立国際医療研究センター)に心より感謝申し上げます。

そして、日常の議論を通じて指摘や示唆を頂き、本研究を支えてくださった京都大学ウイルス研究所ヒトがんウイルス研究分野の皆様、さらには研究活動を支えて下さった多くの方々に感謝の気持ちと御礼を申し上げたく、謝辞にかえさせていただきます。

## 引用文献

1. Samuel, C. E. (2001) *Clin Microbiol Rev* **14**, 778-809, table of contents
2. Randall, R. E., and Goodbourn, S. (2008) *J Gen Virol* **89**, 1-47
3. Schlee, M., Roth, A., Hornung, V., Hagmann, C. A., Wimmenauer, V., Barchet, W., Coch, C., Janke, M., Mihailovic, A., Wardle, G., Juranek, S., Kato, H., Kawai, T., Poeck, H., Fitzgerald, K. A., Takeuchi, O., Akira, S., Tuschl, T., Latz, E., Ludwig, J., and Hartmann, G. (2009) *Immunity* **31**, 25-34
4. Saito, T., Owen, D. M., Jiang, F., Marcotrigiano, J., and Gale, M., Jr. (2008) *Nature* **454**, 523-527
5. Rehwinkel, J., Tan, C. P., Goubau, D., Schulz, O., Pichlmair, A., Bier, K., Robb, N., Vreede, F., Barclay, W., Fodor, E., and Reis e Sousa, C. (2010) *Cell* **140**, 397-408
6. Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Rehwinkel, J., Kato, H., Takeuchi, O., Akira, S., Way, M., Schiavo, G., and Reis e Sousa, C. (2009) *Journal of virology* **83**, 10761-10769
7. Malathi, K., Dong, B., Gale, M., Jr., and Silverman, R. H. (2007) *Nature* **448**, 816-819
8. Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T. S., Fujita, T., and Akira, S. (2008) *The Journal of experimental medicine* **205**, 1601-1610
9. Honda, K., Yanai, H., Takaoka, A., and Taniguchi, T. (2005) *International immunology* **17**, 1367-1378
10. Kotenko, S. V., Gallagher, G., Baurin, V. V., Lewis-Antes, A., Shen, M. L., Shah, N. K., Langer, J. A., Sheikh, F., Dickensheets, H., and Donnelly, R. P. (2003) *Nature immunology* **4**, 69-77
11. Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (2002) *Science* **296**, 298-300
12. Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003) *Annual review of immunology* **21**, 335-376
13. Sharma, S., tenOever, B. R., Grandvaux, N., Zhou, G. P., Lin, R., and Hiscott, J. (2003) *Science* **300**, 1148-1151
14. Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., Coyle, A. J., Liao, S. M., and Maniatis, T. (2003) *Nature immunology* **4**, 491-496
15. Akira, S., and Takeda, K. (2004) *Nature reviews. Immunology* **4**, 499-511
16. Wilkins, C., and Gale, M., Jr. (2010) *Current opinion in immunology* **22**, 41-47
17. Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J.,

- Takeuchi, O., and Akira, S. (2005) *Nature immunology* **6**, 981-988
18. Honda, K., and Taniguchi, T. (2006) *Nature reviews. Immunology* **6**, 644-658
  19. Borden, E. C., Sen, G. C., Uze, G., Silverman, R. H., Ransohoff, R. M., Foster, G. R., and Stark, G. R. (2007) *Nat Rev Drug Discov* **6**, 975-990
  20. Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., and Houghton, M. (1989) *Science* **244**, 359-362
  21. Lavanchy, D. (2009) *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **29 Suppl 1**, 74-81
  22. Edlin, B. R., and Carden, M. R. (2006) *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **42**, 673-676
  23. Chisari, F. V. (2005) *Nature* **436**, 930-932
  24. Asselah, T., and Marcellin, P. (2012) *Liver Int* **32 Suppl 1**, 88-102
  25. Sarrazin, C., and Zeuzem, S. (2010) *Gastroenterology* **138**, 447-462
  26. Suppiah, V., Moldovan, M., Ahlenstiel, G., Berg, T., Weltman, M., Abate, M. L., Bassendine, M., Spengler, U., Dore, G. J., Powell, E., Riordan, S., Sheridan, D., Smedile, A., Fragomeli, V., Muller, T., Bahlo, M., Stewart, G. J., Booth, D. R., and George, J. (2009) *Nat Genet* **41**, 1100-1104
  27. Ge, D., Fellay, J., Thompson, A. J., Simon, J. S., Shianna, K. V., Urban, T. J., Heinzen, E. L., Qiu, P., Bertelsen, A. H., Muir, A. J., Sulkowski, M., McHutchison, J. G., and Goldstein, D. B. (2009) *Nature* **461**, 399-401
  28. Tanaka, Y., Nishida, N., Sugiyama, M., Kurosaki, M., Matsuura, K., Sakamoto, N., Nakagawa, M., Korenaga, M., Hino, K., Hige, S., Ito, Y., Mita, E., Tanaka, E., Mochida, S., Murawaki, Y., Honda, M., Sakai, A., Hiasa, Y., Nishiguchi, S., Koike, A., Sakaida, I., Imamura, M., Ito, K., Yano, K., Masaki, N., Sugauchi, F., Izumi, N., Tokunaga, K., and Mizokami, M. (2009) *Nat Genet* **41**, 1105-1109
  29. Terczynska-Dyla, E., Bibert, S., Duong, F. H., Krol, I., Jorgensen, S., Collinet, E., Kutalik, Z., Aubert, V., Cerny, A., Kaiser, L., Malinverni, R., Mangia, A., Moradpour, D., Mullhaupt, B., Negro, F., Santoro, R., Semela, D., Semmo, N., Heim, M. H., Bochud, P. Y., and Hartmann, R. (2014) *Nat Commun* **5**, 5699
  30. Muir, A. J., Shiffman, M. L., Zaman, A., Yoffe, B., de la Torre, A., Flamm, S., Gordon, S. C., Marotta, P., Vierling, J. M., Lopez-Talavera, J. C., Byrnes-Blake, K., Fontana, D., Freeman, J., Gray, T., Hausman, D., Hunder, N. N., and Lawitz, E. (2010) *Hepatology* **52**, 822-832
  31. Marcello, T., Grakoui, A., Barba-Spaeth, G., Machlin, E. S., Kotenko, S. V., MacDonald, M. R., and Rice, C. M. (2006) *Gastroenterology* **131**, 1887-1898
  32. Jilg, N., Lin, W., Hong, J., Schaefer, E. A., Wolski, D., Meixong, J., Goto, K., Brisac,

- C., Chusri, P., Fusco, D. N., Chevaliez, S., Luther, J., Kumthip, K., Urban, T. J., Peng, L. F., Lauer, G. M., and Chung, R. T. (2014) *Hepatology* **59**, 1250-1261
33. Tateno, C., Yoshizane, Y., Saito, N., Kataoka, M., Utoh, R., Yamasaki, C., Tachibana, A., Soeno, Y., Asahina, K., Hino, H., Asahara, T., Yokoi, T., Furukawa, T., and Yoshizato, K. (2004) *Am J Pathol* **165**, 901-912
  34. Horner, S. M., and Gale, M., Jr. (2014) *Nat Med* **19**, 879-888
  35. Morikawa, K., Lange, C. M., Gouttenoire, J., Meylan, E., Brass, V., Penin, F., and Moradpour, D. (2011) *J Viral Hepat* **18**, 305-315
  36. Nitta, S., Sakamoto, N., Nakagawa, M., Kakinuma, S., Mishima, K., Kusano-Kitazume, A., Kiyohashi, K., Murakawa, M., Nishimura-Sakurai, Y., Azuma, S., Tasaka-Fujita, M., Asahina, Y., Yoneyama, M., Fujita, T., and Watanabe, M. (2013) *Hepatology* **57**, 46-58
  37. Aly, H. H., Watashi, K., Hijikata, M., Kaneko, H., Takada, Y., Egawa, H., Uemoto, S., and Shimotohno, K. (2007) *Journal of hepatology* **46**, 26-36
  38. Gough, D. J., Messina, N. L., Clarke, C. J., Johnstone, R. W., and Levy, D. E. (2012) *Immunity* **36**, 166-174
  39. Takaoka, A., Mitani, Y., Suemori, H., Sato, M., Yokochi, T., Noguchi, S., Tanaka, N., and Taniguchi, T. (2000) *Science* **288**, 2357-2360
  40. Taniguchi, T., and Takaoka, A. (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 378-386
  41. Pestka, S., Krause, C. D., and Walter, M. R. (2004) *Immunol Rev* **202**, 8-32
  42. Tovey, M. G., Streuli, M., Gresser, I., Gugenheim, J., Blanchard, B., Guymarho, J., Vignaux, F., and Gigou, M. (1987) *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 5038-5042
  43. Aly, H. H., Watashi, K., Hijikata, M., Kaneko, H., Takada, Y., Egawa, H., Uemoto, S., and Shimotohno, K. (2007) *J Hepatol* **46**, 26-36
  44. Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2007) *Nat Cell Biol* **9**, 1089-1097
  45. Maeno, K., Yoshii, S., Nagata, I., and Matsumoto, T. (1966) *Virology* **29**, 255-263
  46. Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C. S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T., and Akira, S. (2006) *Nature* **441**, 101-105
  47. Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005) *Immunity* **23**, 19-28
  48. Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N., and Taniguchi, T. (2000) *Immunity* **13**,

539-548

49. Lienenklaus, S., Cornitescu, M., Zietara, N., Lyszkiewicz, M., Gekara, N., Jablonska, J., Edenhofer, F., Rajewsky, K., Bruder, D., Hafner, M., Staeheli, P., and Weiss, S. (2009) *J Immunol* **183**, 3229-3236
50. Hsu, A. C., Parsons, K., Barr, I., Lowther, S., Middleton, D., Hansbro, P. M., and Wark, P. A. (2012) *PLoS One* **7**, e32947
51. Zurney, J., Howard, K. E., and Sherry, B. (2007) *J Virol* **81**, 13668-13680
52. Keller, A. D., and Maniatis, T. (1988) *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 3309-3313
53. Braganca, J., and Civas, A. (1998) *Biochimie* **80**, 673-687
54. Goodbourn, S., and Maniatis, T. (1988) *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 1447-1451
55. Genin, P., Braganca, J., Darracq, N., Doly, J., and Civas, A. (1995) *Nucleic Acids Res* **23**, 5055-5063
56. MacDonald, N. J., Kuhl, D., Maguire, D., Naf, D., Gallant, P., Goswamy, A., Hug, H., Bueler, H., Chaturvedi, M., de la Fuente, J., and et al. (1990) *Cell* **60**, 767-779
57. Yoneyama, M., and Fujita, T. *Rev Med Virol* **20**, 4-22
58. Matsumiya, T., Imaizumi, T., Yoshida, H., and Satoh, K. (2011) *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **59**, 41-48
59. Hata, N., Sato, M., Takaoka, A., Asagiri, M., Tanaka, N., and Taniguchi, T. (2001) *Biochem Biophys Res Commun* **285**, 518-525
60. Takaoka, A., Mitani, Y., Suemori, H., Sato, M., Yokochi, T., Noguchi, S., Tanaka, N., and Taniguchi, T. (2000) *Science* **288**, 2357-2360
61. Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y. J. (2004) *Nature immunology* **5**, 1219-1226
62. Wagner, H. (2004) *Trends in immunology* **25**, 381-386
63. Takeda, K., and Akira, S. (2005) *International immunology* **17**, 1-14
64. Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., and Taniguchi, T. (2005) *Nature* **434**, 772-777
65. Dai, J., Megjugorac, N. J., Amrute, S. B., and Fitzgerald-Bocarsly, P. (2004) *Journal of immunology* **173**, 1535-1548
66. von Hahn, T., Yoon, J. C., Alter, H., Rice, C. M., Rehermann, B., Balfe, P., and McKeating, J. A. (2007) *Gastroenterology* **132**, 667-678
67. Gale, M., Jr., and Foy, E. M. (2005) *Nature* **436**, 939-945
68. Li, X. D., Sun, L., Seth, R. B., Pineda, G., and Chen, Z. J. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17717-17722
69. Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschopp, J. (2005) *Nature* **437**, 1167-1172
70. Foy, E., Li, K., Wang, C., Sumpter, R., Jr., Ikeda, M., Lemon, S. M., and Gale, M., Jr.

- (2003) *Science* **300**, 1145-1148
71. Loo, Y. M., Owen, D. M., Li, K., Erickson, A. K., Johnson, C. L., Fish, P. M., Carney, D. S., Wang, T., Ishida, H., Yoneyama, M., Fujita, T., Saito, T., Lee, W. M., Hagedorn, C. H., Lau, D. T., Weinman, S. A., Lemon, S. M., and Gale, M., Jr. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6001-6006
  72. Swann, J. B., Hayakawa, Y., Zerafa, N., Sheehan, K. C., Scott, B., Schreiber, R. D., Hertzog, P., and Smyth, M. J. (2007) *J Immunol* **178**, 7540-7549
  73. Honda, K., Sakaguchi, S., Nakajima, C., Watanabe, A., Yanai, H., Matsumoto, M., Ohteki, T., Kaisho, T., Takaoka, A., Akira, S., Seya, T., and Taniguchi, T. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10872-10877
  74. Musso, G., Gambino, R., and Cassader, M. (2011) *Annu Rev Med* **62**, 361-380
  75. Takayanagi, H., Kim, S., Matsuo, K., Suzuki, H., Suzuki, T., Sato, K., Yokochi, T., Oda, H., Nakamura, K., Ida, N., Wagner, E. F., and Taniguchi, T. (2002) *Nature* **416**, 744-749
  76. Jablonska, J., Leschner, S., Westphal, K., Lienenklaus, S., and Weiss, S. (2010) *J Clin Invest* **120**, 1151-1164
  77. Shindo, H., Maekawa, S., Komase, K., Miura, M., Kadokura, M., Sueki, R., Komatsu, N., Shindo, K., Amemiya, F., Nakayama, Y., Inoue, T., Sakamoto, M., Yamashita, A., Moriishi, K., and Enomoto, N. (2014) *J Viral Hepat* **20**, 281-289
  78. Griffiths, S. J., Koegl, M., Boutell, C., Zenner, H. L., Crump, C. M., Pica, F., Gonzalez, O., Friedel, C. C., Barry, G., Martin, K., Craigon, M. H., Chen, R., Kaza, L. N., Fossum, E., Fazakerley, J. K., Efstathiou, S., Volpi, A., Zimmer, R., Ghazal, P., and Haas, J. (2013) *PLoS Pathog* **9**, e1003514
  79. Donnelly, R. P., Dickensheets, H., and O'Brien, T. R. (2011) *Trends Immunol* **32**, 443-450