



Title	C型肝炎ウイルス感染におけるウイルスRNA認識経路を介した生体応答の解析
Author(s)	岡本, 将明
Description	配架番号 : 2198
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12094号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12094
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61564
Type	doctoral thesis
File Information	Masaaki_Okamoto.pdf



学 位 論 文

C型肝炎ウイルス感染におけるウイルス RNA 認識経路を介した生体応答の解析

(Analysis of biological response via viral RNA sensing pathway in HCV infection)

2016年3月

北 海 道 大 学

岡 本 将 明

学 位 論 文

C型肝炎ウイルス感染におけるウイルス RNA 認識経路を介した生体応答の解析

(Analysis of biological response via viral RNA sensing pathway in HCV infection)

2016年3月

北 海 道 大 学

岡 本 将 明

目次

発表論文目録および学会発表目録.....	1
略語表.....	2
序章	4
第1章	
緒言	7
材料と方法.....	9
結果	16
考察	27
第2章	
緒言	28
材料と方法.....	29
結果	36
考察	45
第3章	
緒言	46
材料と方法.....	48
結果	52
考察	62
終章	64
謝辞	67
引用文献	68

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Masaaki Okamoto, Hiroyuki Oshiumi, Masahiro Azuma, Nobuyuki Kato,
Misako Matsumoto, Seya, Tsukasa
IPS-1 is essential for type III IFN production by hepatocytes and dendritic
cells in response to hepatitis C virus infection.
Journal of immunology, 192(6):2770-7 (2014)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 岡本 将明、押海 裕之、松本 美佐子、瀬谷 司
C型肝炎ウイルス RNA による I 型と III 型インターフェロン産生機構のマウス
モデル解析
第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月 14 日, 大阪
2. Masaaki Okamoto, Hiroyuki Oshiumi, Masahiro Azuma,
Misako Matsumoto, Tsukasa Seya
IPS-1 is essential for type III interferon production by hepatocytes and
dendritic cells in response to cytoplasmic hepatitis C virus RNA.
第 42 回日本免疫学会学術集会, 2013 年 12 月 12 日, 千葉
3. 岡本将明、押海裕之、松本美佐子、瀬谷司
HCV RNA に対する IPS-1 依存的な III 型 IFN 産生機構の解明
第 79 回インターフェロンサイトカイン学会学術集会, 2015 年 6 月 19 日, 北海道

関連論文

Hiroyuki Oshiumi, Masaaki Okamoto, Ken Fujii, Takashi Kawashima
Misako Matsumoto, Satoshi Koike, Tsukasa Seya
The TLR3/TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to
poliovirus infection
Journal of immunology, 187(10):5320-7(2011)

略語表

3'UTR	3 prime untranslated region
BMDC	Bone Marrow Dendritic Cell
BMMf	Bone Marrow Macrophage
CARD	Caspase Recruitment Domain
cDC	conventional dendritic cell
cDNA	complementary DNA
DC	Dendritic Cell
dsRNA	double strand RNA
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EMCV	Encephalomyocarditis Virus
FBS	Fetal Bovine Serum
HPV	Human Papillomavirus
HCV	Hepatitis C Virus
IFN	Interferon
IFNAR	type I IFN Receptor
IL	Interleukin
iPS	induced Pluripotent Stem
IPS-1	Interferon Promoter Stimulator-1
KLF4	Kruppel-like factor 4
KO	Knockout
MACS	Magnetic-Activated Cell Sorting
MCMV	Murine Cytomegalovirus
MDA-5	Melanoma Differentiation Associated gene-5
Mf	Macrophage
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NK	Natural Killer
OCT3/4	(octamer-binding transcription factor 3/4
DC	plasmacytoid dendritic cell
polyI:C	Polyribonucleosinic polyribocytidylic acid
PRR	Pattern Recognition Receptor
RIG-I	Retinoic acid-Inducible Gene-I
RLR	RIG-I-Like Receptor
rpm	round per minutes

RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SOX2	sex determining region Y-box 2
ssRNA	single strand RNA
TICAM-1	TIR-containing adopter molecule-1
TIR	Toll IL-1 Receptor
TLR	Toll-Like Receptor
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
WNV	West Nile Virus
WT	Wild Type

序章

ウイルス、細菌等の病原微生物に対する生体防御機構である免疫系は、獲得免疫と自然免疫に大別される。獲得免疫の機能は主に T 細胞、B 細胞といったリンパ球が担い、抗原特異的な免疫応答を示す。また免疫記憶能を有し、同一抗原の再感作時には迅速に応答するが、初感作時には通常、起動までに通常 1 週間ほどを要する。主に樹状細胞、マクロファージからなる自然免疫は感染に対し速やかに反応し、初期の免疫応答を担う。また自然免疫は獲得免疫に活性化に必須であり、生体防御に不可欠である。

自然免疫による微生物認識はパターン認識受容体(PRR)が担う¹。代表的な PRR である Toll-like receptor(TLR)のうち、TLR3, 7, 8, 9 はウイルス由来の核酸を認識する。TLR3 は二本鎖 RNA^{2,3}、TLR7, 8 は一本鎖 RNA^{4,5}、TLR9 は DNA を認識する⁶。TLR3 は二本鎖様の二次構造をとる一本鎖 RNA についても認識することが近年報告された⁷。これらの TLR は核酸リガンドを認識すると、TLR3 はアダプター分子 TIR-containing adapter molecule-1(TICAM-1) (別名 TRIF)を介して^{8,9}、TLR7, 8, 9 は myeloid differentiation factor 88 (MyD88)を介して¹⁰ シグナルを伝達し、I 型インターフェロン(IFN)やサイトカイン産生を誘導する。

TLR3 は古典的樹状細胞(cDC)のひとつ、CD8 陽性 DC(CD8+DC)の初期エンドソームに特に高く発現している¹¹。CD8+DC は、I 型 IFN 産生だけでなく、外来抗原を MHC class I を介して細胞障害性 T 細胞(CTL)に提示するクロスプレゼンテーション能が非常に高く¹²、ウイルス感染や、癌における CTL の活性化に重要である。これらの働きに TLR3-TICAM-1 経路が大きく関わっている¹³。

TLR はパターン分子の認識領域を細胞外に持つため、細胞質に侵入したウイルスの認識は細胞質内 PRR が担う。細胞質内 RNA センサー RIG-I-like receptor (RLR)は、RIG-1、MDA-5 と両分子の補助分子として働く LGP-2 の 3 分子で構成される^{14,15}。RIG-I、MDA-5 は活性化するとミトコンドリア外膜上のアダプター分子 IPS-1(別名 MAVS/VISA/Cardif)を介して、I 型インターフェロン、炎症性サイトカイン等の産生を誘導する¹⁶⁻¹⁹。

ノックアウトマウスを用いた解析により、センドイウイルス(SeV)、A 型インフルエンザウイルス(IAV)、C 型肝炎ウイルス(HCV)、牛水泡性口内炎ウイルス(VSV)、風疹ウイルス(RV)等の多くのウイルス RNA が生体内で RIG-I によって認識される事が明らかにされてきた^{20,21}。また MDA5 はピコルナウイルス科の脳心筋炎ウイルス(EMCV)を認識する。TLR3 はポリオウイルス(PV)に対する生体防御に特に重要であること^{22,23}、マウスサイトメガロウイルス(MCMV)

の認識に関与することが示されマウスモデルで示され、ヒト単純ヘルペス I 型ウイルス(HSV-1)によるヘルペス脳炎の患者では TLR3 遺伝子の変異が報告されている²⁴。また西ナイル熱ウイルス(WNV)の感染では、TLR3 がウイルスの増悪に働くとする報告²⁵と感染防御に働くとする報告²⁶がある。

ウイルスの認識により産生されるサイトカインの中でも、I 型 IFN は特に強い抗ウイルス作用を示す。I 型 IFN は、受容体である IFNAR を介して 2' -5' OAS、IFIT-1 等の多様な interferon-inducible gene の発現を促し、ウイルス複製の抑制、感染細胞の除去、非感染細胞の抗ウイルス化に寄与する。そのため、I 型 IFN 産生を強力に誘導する TLR、RLR はウイルス感染の生体防御において非常に重要な役割を果たしている。IFN ファミリーのひとつである III 型 IFN は、2003 年に IFN- λ 1(IL-29), IFN- λ 2(IL-28A), IFN- λ 3(IL-28B)の 3 つのアイソフォームからなる新規の IFN として発見された^{27,28}。発見当初、III 型 IFN は I 型 IFN と同様に抗ウイルス効果を示すものの活性が弱く、生体防御における重要性は定かでなかったが、2009 年に、IFN- λ 3(IL-28B)遺伝子上流の一塩基多型が HCV 感染時の自然治癒、代表的な治療法である PEG-IFN(+ リバビリン併用)療法の治療効果に大きく関わることを、立て続けに報告され²⁹⁻³²、一躍、注目を集めた。

HCV はフラビウイルス科のヘパシウイルス属に分類される、1 本鎖、プラス鎖 RNA ウイルスである。構造領域 (Core、E1、E2) および非構造領域(p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B)から構成される。HCV は慢性肝障害の主要な原因の一つであり、慢性感染により肝硬変、肝細胞癌を引き起こす。HCV は急性感染後、30%は自然排除されるが、残りの 70%は慢性化し、肝内にて持続炎症を引き起こし、肝内の線維化が進行、慢性肝炎から肝硬変へ進行する。

自然免疫系は HCV 感染制御に必須であり、HCV は RIG-I-IPS-1 経路、TLR3-TICAM-1 経路により認識される。生体内で RIG-I は HCV を認識し I 型 IFN を産生する²¹。TLR3 は polyI:C, HCV RNA に対して、樹状細胞による III 型 IFN を誘導に必須であることが報告された^{33,34}。RIG-I は I 型 IFN を産生誘導するが、III 型 IFN 産生における生体内での役割は明らかになっていない。また、III 型 IFN は I 型 IFN 同様、抗ウイルス活性を持つ。I 型 IFN は外来抗原を CTL に提示するクロスプレゼンテーションや、NK 細胞の活性化を促進することが知られているが^{35,36}、これらの機能が、III 型 IFN に備わっているかは明らかになっておらず、I 型 IFN、III 型 IFN の機能的差異は明確にされていない。

そこで、本研究では、まず、第 1 章で HCV RNA 認識による III 型 IFN 産生における TLR3-TICAM-1 経路および RIG-I-IPS-1 経路の役割について明らか

にするために、TICAM-1 KO マウス、IPS-1 KO マウスを用い、*in vivo*, *in vitro*での検討をした。

次に、第 2 章では III 型 IFN の機能について検討した。研究の中で、CD8+DC に III 型 IFN レセプターのである IL10R β 、IL-28R α の発現が認められた。CD8+DC は I 型 IFN 誘導性に高いクロスプレゼンテーション能、NK 細胞活性化能を発揮することから、III 型 IFN により、これらの機能の促進が生じるかを検討した。また、III 型 IFN による DC、肝細胞における抗ウイルス活性について検討した。

また、最終第 3 章では、現在進行中である、HCV 感染における疾患と RNA 認識経路による自然免疫を介した細胞脱分化の関係の解析について論及する。

第 1 章

HCV 感染時における HCV RNA 認識による I 型 IFN、III 型 IFN の 産生経路

緒言

HCV は、その RNA ゲノム上の 3'UTR の特に polyU/UC 領域が細胞質内 RNA センサーである RIG-I により認識されることが報告されている²¹。生体内においては、HCV RNA に対して、RIG-I 依存的に I 型 IFN 産生が誘導され、肝臓内での免疫応答を促進する²¹。RIG-I は細胞質内に存在し、細胞質中のウイルス RNA を認識することで、アダプター分子 IPS-1 を介して I 型 IFN や炎症性サイトカインの産生を誘導する。一方で、二本鎖 RNA センサーである TLR3 は、主に初期エンドソームと一部、細胞表面に発現し、細胞外領域に存在する二本鎖 RNA を認識する。TLR3 はアダプター分子 TICAM-1 を介して、I 型 IFN、炎症性サイトカインの産生を誘導する。in vitro においては、ヒト単球由来 DC が HCV 感染死肝細胞由来の HCV RNA を TLR3 依存的に認識し、I 型 IFN を産生することが報告されている³⁷。

TLR3 の発現は、マウス CD8+DC、ヒト BDCA3+DC において特に発現が高いことが知られている³⁸。また TLR ファミリーの各種リガンドを用いて研究から、これらの DC が、生体内における主要な III 型 IFN 産生細胞であり、二本鎖 RNA 合成アナログ polyI:C に対して、TLR3 依存的に III 型 IFN 産生することが明らかにされている³⁴。また、近年の報告により、HCV 感染時におけるヒト BDCA3+DC からの III 型 IFN 産生に TLR3 が重要であることが示されている³³。一方で、RIG-I は I 型 IFN を産生誘導するが、III 型 IFN 産生における生体内での役割は明らかになっていなかった。

本章では、TICAM-1 KO マウス、IPS-1 KO マウスを用い、*in vivo*, *in vitro* での HCV RNA 認識による III 型 IFN 産生における、TLR3-TICAM-1 経路および RIG-I-IPS-1 経路の役割について検討した。

HCV の自然宿主はヒト、チンパンジー、ツパイであるが、マウスには感染性を示さない。そこで本研究では、HCV レプリコンが自律的に複製増殖できる HuH-7 由来の細胞株 O cell³⁹ より抽出した HCV RNA や、in vitro 合成した HCV RNA を用いて、RNA 認識による III 型 IFN 産生経路を検討した、また、生体内における応答を観察するために、核酸を高効率に肝臓にデリバリーする手法であるハイドロダイナミックインジェクション⁴⁰を用いた。この手法を用い、HCV RNA が生体内で RIG-I により認識されることを示した Gale Jr らによる先行研究²¹に倣い、生体内における HCV RNA 認識による III 型 IFN 産

生が、いずれの経路依存적であるかを検討した。

。

材料と方法

1.材料

1-1.細胞

溶液および緩衝液の組成

PBS (-)	137 mM NaCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 2.68 mM KCl, 1.49 mM KH ₂ PO ₄
トリプシン液	0.25% Trypsin-0.02% EDTA-PBS (-)

以下の試薬を各メーカーより購入した。

FBS	BioSource Intl., Inc.
DMEM (1.0 g/l Low Glucose)	GIBCO-Invitrogen
DMEM (4.5 g/l Low Glucose)	GIBCO-Invitrogen
RPMI1640	GIBCO-Invitrogen
HEPES	GIBCO-Invitrogen
NEAA	GIBCO-Invitrogen
Sodium Pyruvate	GIBCO-Invitrogen
Insulin solution from Bovine Pancreas	Wako
EGF	Wako
L-Glutamine	GIBCO-Invitrogen
100 mU/ml PenicillinG, 100 µg/ml Streptomycin	GIBCO-Invitrogen
G418	Roche
Opti-MEM	GIBCO-Invitrogen

HEK293

ヒト胎児腎細胞株 HEK293 細胞は住友製薬より供与された。あらかじめ 56°C で 30 分間加熱し非働化した 10% (v/v)ウシ胎児血清 FBS、100mU/ml Penicillin G、100 µg/ml Streptomycin を添加した DMEM (1.0g/l Low Glucose)を用いて 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の継代は 100% confluent になり次第行なった。

O cell

ヒト肝癌細胞株 O cell は岡山大学 加藤宣之教授より供与された。あらかじめ 56°C で 30 分加熱し非動化した 10%(v/v) 牛胎児血清 FBS、100 mU/ml Penicillin G、100 µg/ml Streptomycin、6 µl/ml G418 を添加した DMEM (4.5 g/l High Glucose) を用いて 37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。二日おきに培地交換を行った。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の継代は 100% confluent になり次第行った。

Oc cell

ヒト肝癌細胞株 Oc cell は岡山大学 加藤宣之教授より供与された。あらかじめ 56°C で 30 分加熱し非動化した 10%(v/v) 牛胎児血清 FBS、100 mU/ml Penicillin G、100 µg/ml Streptomycin を添加した DMEM (4.5 g/l High Glucose) を用いて 37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の継代は 100% confluent になり次第行った。

1-2. マウス

TICAM-1 KO マウス (C57BL/6)、IPS-1 KO マウス (C57BL/6) は本研究室により作製された。野生型 (wild type : WT) として用いた C57BL/6 マウスは日本クレア社より購入した。

マウスを利用した実験は、北海道大学動物実験に関する規程に従って行った。

1-3. プラスミド

pEF-BOS/TICAM-1、pEF-BOS/IPS-1、各 TICAM-1 欠損体、IPS-1 欠損体は本研究室により作製された⁴¹。pEF-BOS は、京都大学 長田重一教授より供与された⁴²。

1-4. リガンド、サイトカイン

以下の試薬を各メーカーより購入した。

polyI:C	GE Healthcare
---------	---------------

2.方法

2-1.マウスからの細胞調整

溶液および緩衝液の組成

PBS (-)	137 mM NaCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 2.68 mM KCl, 1.49 mM KH ₂ PO ₄
CMF-HBSS	137 mM NaCl, 358 μM Na ₂ HPO ₄ , 5.33 mM KCl, 411 μM KH ₂ PO ₄
ACK lysis buffer	150 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 0.1 mM Na ₂ EDTA
MACS buffer	0.5% BSA, 2 mM EDTA – PBS (-)
pre-perfusion buffer	5.55 mM D-glucose, 525 μM EGTA, 20.9 μM Gentamicin, 10 mM HEPES – CMF-HBSS
perfusion buffer	0.05% Collagenase H, 5.4 mM CaCl ₂ , 20.9 μM Gentamicin, 10 mM HEPES – CMF-HBSS
suspension buffer	1%BSA, 20.9 μM Gentamicin, 10 mM HEPES – CMF-HBSS

以下の試薬を各メーカーより購入した。

collagenase D	Roche
collagenase H	Roche
Mercaptoethanol	GIBCO-Invitrogen
Hank`s balanced salt solution	sigmaaldrich
anti-CD4 micro beads	Miltenyi Biotec Inc
anti-CD8 micro beads	Miltenyi Biotec Inc
anti-CD11c micro beads	Miltenyi Biotec Inc

CD8 α +DC positive selection kit
CD4 +DC positive selection kit

Miltenyi Biotec Inc
Miltenyi Biotec Inc

BMMf

マウス大腿骨を摘出し、70%EtOH で2分間処理後、PBS で2回洗浄した。大腿骨の両端を切断し 26G ニードルとシリンジを使い、骨髓細胞を RPMI 中に回収し、40 μ m メッシュに通し、骨片を除去した。ACK lysis buffer 処理により赤血球を除去したのち、30%L929 細胞培養上清を含む RPMI1640 培地で培養した。3 日目に培地を交換し 6 日目の細胞を BMMf とした。

BMDC

マウス大腿骨を摘出し、70%EtOH で2分間処理後、PBS で2回洗浄した。大腿骨の両端を切断し 26G ニードルとシリンジを使い、骨髓細胞を RPMI 中に回収し、40 μ m メッシュに通し、骨片を除去した。ACK lysis buffer 処理により赤血球を除去した後、GM-CSF を含む RPMI1640 培地で培養した。2,4 日目に培地を交換し、6 日目の浮遊細胞及び軽度付着細胞を回収し、これを BMDC とした。

DNDC

マウス脾臓を摘出し、collagenase D を含む Hanks Buffer solution で 37°C25 分間処理し、EDTA で反応を止めた後、ACK lysis buffer 処理により赤血球を除去し、MACS buffer により洗浄した。anti-CD4 micro beads、anti-CD8 micro beads を用いた MACS によるネガティブセレクションした細胞をさらに、anti-CD11 micro beads 用いた MACS により回収し、CD4⁻,CD8⁻,CD11⁺細胞を DNDC とした。10%FBS, penicillin-streptomycin, 10 mM HEPES, 55 mM Mercaptoethanol を含む RPMI1640 にて 培養した。

CD8+DC

マウス脾臓を摘出し、collagenase D を含む Hanks Buffer solution で 37°C25 分間処理し、EDTA で反応を止めた後、ACK lysis buffer 処理により赤血球を除去し、MACS buffer により洗浄した。CD8 α +DC positive selection kit を用いた MACS により CD8+DC を回収した。10%FBS, penicillin-streptomycin, 10 mM HEPES, 55 mM Mercaptoethanol を含む RPMI1640 にて 培養した。

CD4+DC

マウス脾臓を摘出し、collagenase D を含む Hanks Buffer solution で 37°C25

分間処理し、EDTA で反応を止めた後、ACK lysis buffer 処理により赤血球を除去し、MACS buffer により洗浄した。CD4+DC positive selection kit を用いた MACS により CD4+DC を回収した。10%FBS, penicillin-streptomycin, 10mM HEPES, 55mM Mercaptoethanol を含む RPMI1640 にて 培養した。

2-2. cDNA の合成

細胞あるいは組織を Trizol により溶解した。溶解液に Trizol の 1/5 量のクロロホルムを加え混和した後、12,000 g、15 分間遠心した。遠心後、水層を回収し、等量のイソプロパノールを加え、10 分置いたのち、15000 g、10 分間遠心した。沈殿したペレットを 70%EtOH により洗浄し、RNA を抽出した。抽出した RNA をもとに、High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) を用いて逆転写して cDNA を合成した。

2-3. 定量 PCR

cDNA から Step One Real-time PCR system を用いて Ct 値を測定し、 $\Delta\Delta$ Ct 法により mRNA 量を算出した。内部標準としては ヒト GAPDH またはマウス β -actin を使用した。使用した primer を以下に示す

mouse β -actin	F	TTTGCAGCTCCTTCGTTGC
	R	TCGTCATCCATGGCGAACT
mouse IFN- β	F	CCAGCTCCAAGAAAGGACGA
	R	CGCCCTGTAGGTGAGGTTAT
mouse IFN- α 2	F	TACTCAGCAGACCTTGAACC
	R	GGTACACAGTGATCCTGTGG
mouse IFN- α 4	F	CTGCTGGCTGTGAGGACATACT
	R	AGGCACAGAGGCTGTGTTTCTT
mouse IFN- λ 2/3	F	TCCCAGTGGAAGCAAAGGATTG
	R	TCAAGCACCTCTTCTCGATGG
HCV NS5B	F	CCGAGGCCAGACAGGTCATA
	R	GGCTGCAGAGGCCTTCAAGT
human GAPDH	F	GAGTCAACGGATTTGCTCGT
	R	TTGATTTTGCAGGGATCTCG

2-4.ELISA

血清、細胞培養上清より、ELISA kit を用いて測定した。

以下の ELISA kit を各メーカーより購入した。

mouse IFN- β	PBL
mouse IFN- λ 2/3	eBioscience

2-5.ルシフェラーゼレポータージーンアッセイ

HEK293 細胞を、24 well plate に播種し、翌日、Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen Life Technology)を用いてトランスフェクションを行った。発現プラスミド量は各実験条件に従い、総量は 0.1 μ g となる様に empty/ pEF-BOS を加えた。レポータージーンとして、IFN- β プロモータの下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ IFN- β -luc (東京大学 谷口維紹教授より供与⁴³)あるいは、IFN- λ 1、IFN- λ 2/3 プロモータの下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ IFN- λ 1-luc ,IFN- λ 2/3-luc(共に National Institutes of Health 今道友純教授より供与⁴⁴)を使用した。また内部コントロールとして、Rennila luciferase (promega)を用いた。

2-6.HCV レプリコン保持細胞 O cell からの HCV RNA 抽出

培養している O cell を回収し、Trizol により、HCV RNA を含む Ocell の RNA を抽出した。HCV RNA を含まないネガティブコントロールとして Oc cell の RNA を抽出した。

2-7.in vitro HCV polyU/UC RNA の作製

本研究室が作製した、HCV genotype 1b polyU/UC RNA (9421 to 9480, Accession number: EU867431)が挿入された pGEM-T easy vector⁴⁵ より

Riboprobe combination system SP6/T7 RNA polymerase (promega)を用いて、T7 promoter あるいはSP6 promoter から転写反応を行った。DNase I で 37°C、15 分反応させて DNA を除去し、Trizol により RNA を抽出した。二本鎖 RNA の作製のため、センス鎖とアンチセンス鎖の相補的な ssRNA を等量混合し、95°C に置いた後、徐々に室温まで温度をさげてアニーリングを行った。

2-8.ハイドロダイナミックインジェクション

O cell, Oc cell より抽出した RNA, あるいは invitro 合成したセンス鎖 HCV polyU/UC ssRNA または二本鎖 HCV polyU/UC RNA を含む TransIT®-QR Delivery Solution (Mirus) 2 ml を 27G ニードルと 5 ml シリンジを用いて、約 4 秒間かけ、マウスに静脈内投与した。

2-9.細胞培養上清中の Exosome RNA の抽出

細胞培養上清を回収し、300 g,10 分間遠心した。遠心後、上清を回収し、さらに 2,000 g,20 分間遠心した。遠心後の上清を、0.22 µm フィルターに通した後、110,000 g,70 分間の超遠心を行った。超遠心後、沈殿した Exosome を PBS で洗浄した後、Trizol を用いて RNA を抽出した。

遺伝子組替え生物等を用いた実験については、北海道大学の定める規定に基づき実施した。

結果

1-1.polyI:C による III 型 IFN には TLR-3-TICAM-1 経路が必須である

先ず、先行研究により報告された polyI:C 応答時の TLR3-TICAM-1 依存的な III 型 IFN 産生³⁴について検討した。polyI:C 刺激による BM-Mφ のサイトカインの mRNA の発現を調べたところ、TICAM-1 KO BMMφ では IFN-λ2/3 が誘導されなかった(図 1.1.A)。次に、生体組織における TICAM-1 依存的な III 型 IFN 産生を調べるため、polyI:C を腹腔内投与し、各組織での IFN-β、IFN-α2、IFN-α4、IFN-λ2/3 の mRNA 発現を調べところ、TICAM-1 KO マウスにおいては、IFN-λ2/3 の mRNA がいずれの組織においても検出されなかった(図 1.1.B-E)。先行研究では、polyI:C の静脈内投与により、TLR3-KO マウスで、血中の IFN-λ2/3 が検出されなくなることを報告しているが³⁴、本実験と合わせて、生体内において、polyI:C による III 型 IFN には TLR-3-TICAM-1 経路が必須であるが確かめられた。

1-2. IPS-1 は III 型 IFN を誘導できる

IPS-1 経路は、生体内での、polyI:C や HCV RNA 応答時の I 型 IFN 産生に必須である。ここでは、IPS-1 からのシグナル伝達は、III 型 IFN 産生を誘導し得るかを検討した。TICAM-1、IPS-1 を過剰発現させた HEK293 における、IFN-β、IFN-λ のプロモータ活性をルシフェラーゼレポータージーンアッセイにより測定したところ、TICAM-1 だけでなく、IPS-1 によっても、III 型 IFN 発現が誘導されることが示された(図 1.2,A)。また、TICAM-1、IPS-1 欠損体を過剰発現させた同様の実験により、TICAM-1 では 150-556aa の領域、IPS-1 では、transmembrane 領域がそれぞれ、I 型 IFN、III 型 IFN 発現誘導いずれにも重要であることが示された(図 1.2,B,C)。

1-3.生体内では HCV RNA に対する応答で III 型 IFN 発現が誘導される

生体肝臓内での、HCV RNA 応答時における III 型 IFN 発現が TICAM-1、IPS-1、どちらに依存するかを調べた。まず HCV RNA により III 型 IFN が誘導されるかを検討するため、HCV レプリコン保持細胞 O cell³⁹ から抽出した RNA(O cell RNA)をハイドロダイナミックインジェクションにより投与した。

O cell RNA には、HCV RNA だけでなく、宿主由来の RNA も含まれるため、コントロールとして、O cell の HCV レプリコンを IFN 処理により除去することで樹立された O cured cell³⁹ (Oc cell)より抽出した RNA (Oc cell RNA) を用いた(図 1.3.A)。結果、HCV RNA を含む O cell RNA を投与した時のみ、肝臓における IFN- β 、 $\alpha 2$ 、IFN- $\lambda 2/3$ の mRNA 発現が上昇した(図 1.3.B)。このことから、生体内において、HCV RNA は I 型 IFN、III 型 IFN を、発現誘導することが示された。

1-4.生体内での HCV RNA に対する III 型 IFN 誘導には IPS-1 が必須である

次に、TICAM-1 KO マウス、IPS-1 KO マウスを用いて同様にハイドロダイナミックインジェクションによる O cell RNA の投与を行い、この III 型 IFN 誘導には、TICAM-1、IPS-1 のいずれが重要であるかを検討した。結果、IPS-1 KO マウスでは、IFN- β 、 $\alpha 2$ 、IFN- $\lambda 2/3$ の発現上昇がみられなかった(図 1.4,A)。また、RIG-I により認識される HCV polyU/UC RNA を in vitro 合成したものをハイドロダイナミックインジェクションした際も、センス一本鎖 HCV RNA (ssRNA)、二本鎖 HCV RNA(dsRNA)共に、IPS-1 KO マウスでは、IFN- β 、 $\alpha 2$ 、IFN- $\lambda 2/3$ の発現上昇がみられなかった(図 1.4,B)。このことから RIG-I-IPS-1 経路は、生体内において、HCV RNA に対して、既報の I 型 IFN 誘導のみならず、III 型 IFN 誘導にも重要であることが示された。

1-5.肝細胞は細胞質内 HCV RNA に対し IPS-1 依存的に III 型 IFN を誘導する

HCV は肝臓の肝実質細胞を感染標的としていることから、HCV RNA により肝細胞での I 型 IFN、III 型 IFN 発現が誘導されるかを調べた。マウス肝臓より、初代肝細胞を採取し、Lipofectamine 2000 を用いて、O cell RNA を lipofection により細胞質内に導入した。このとき、IFN- β 、IFN- $\lambda 2/3$ の発現は、IPS-1 依存的であった(図 1.5)。HCV は感染後、細胞質内で脱殻し、HCV RNA が細胞質内に放出される。本実験により HCV 感染時の肝細胞が、細胞質内 RNA 認識経路 RIG-I-IPS-1 を介して I 型 IFN、III 型 IFN を誘導することが示唆された。

1-6.CD8+DC は細胞質内 HCV RNA に対し、IPS-1 依存的に強く III 型 IFN を誘導する

HCV の感染標的細胞は肝実質細胞だが、HCV 感染患者の DC や Mφ で HCV のタンパク質やゲノムが検出される例が報告されている⁴⁶⁻⁴⁸。また、DC が HCV に応答して、I 型 IFN、III 型 IFN を誘導することが、これまでの研究で示されていることから、DC での HCV RNA に対する I 型 IFN、III 型 IFN 誘導での TICAM-1, IPS-1 の関与を検討した。

脾臓より CD8+DC, CD4+DC, DNDC を採取し、培養上清中に、O cell RNA、polyI:C を添加、あるいは、Lipofectamine 2000 を用いて、細胞質内に導入したところ、O cell RNA、polyI:C を細胞質内に導入した場合は、共に IFN-β, IFN-λ を誘導するが、培養上清中に添加した場合には polyI:C でのみ応答が見られた(図 1.6.A,B)。また、III 型 IFN 誘導がみられた刺激では、いずれも CD8+DC が高い III 型 IFN 誘導を示した。

上清に O cell RNA, polyI:C を添加した際の応答性の違いについては、過去に、上清中の polyI:C は効率的に DC に取り込まれ、TLR3 を活性化するのに対し、*in vitro* で転写されたウイルス由来の二本鎖 RNA を上清に加えても DC の TLR3 は殆ど活性化されないことが報告されている⁴⁹。今回の実験系においても、O cell RNA では polyI:C のような効率的な取り込みが行われなかったために、応答がみられなかった可能性がある。

また、CD8+DC における細胞質内 O cell RNA による III 型 IFN 誘導は TICAM-1 ではなく、IPS-1 に強く依存することが、KO マウス由来の CD8+DC を用いて示された(図 1.6.C,D)。

1-7.CD8+DC は HCV 感染肝細胞存在下で、TICAM-1 依存的に III 型 IFN を産生する

近年、老廃物の廃棄を担うとされてきたエクソソームが、miRNA、mRNA やタンパク質を内包し、細胞外に分泌され、細胞間情報伝達に重要であることが明らかにされた⁵⁰。HCV 感染においては、HCV 感染肝細胞から、HCV RNA を含む HCV 由来成分を内包したエクソソームが分泌され、pDC に取り込まれ I 型 IFN が誘導されることが報告されている⁵¹。O cell と Oc cell のエクソソーム RNA を回収したところ、O cell 由来エクソソーム RNA においてのみ、HCV RNA が検出された(図 1.7.A)。そこで、エクソソームを介した HCV RNA の細胞間伝達による DC の III 型 IFN 産生を検討するために、O cell あるいは

Oc cell と CD8+DC の共培養実験を行った。その結果、O cell と共培養したときのみ CD8+DC からの I 型 IFN と III 型 IFN の産生がみられた(図 1.7.B,C)。また、この I 型 IFN と III 型 IFN の産生は IPS-1 ではなく、TICAM-1 依存的であった。

このことから、CD8+DC は HCV RNA 含有エクソソームを取り組み、エンドソームに移行した HCV RNA による TLR3 の活性化を起こし、I 型、III 型 IFN を産生することが示唆された。

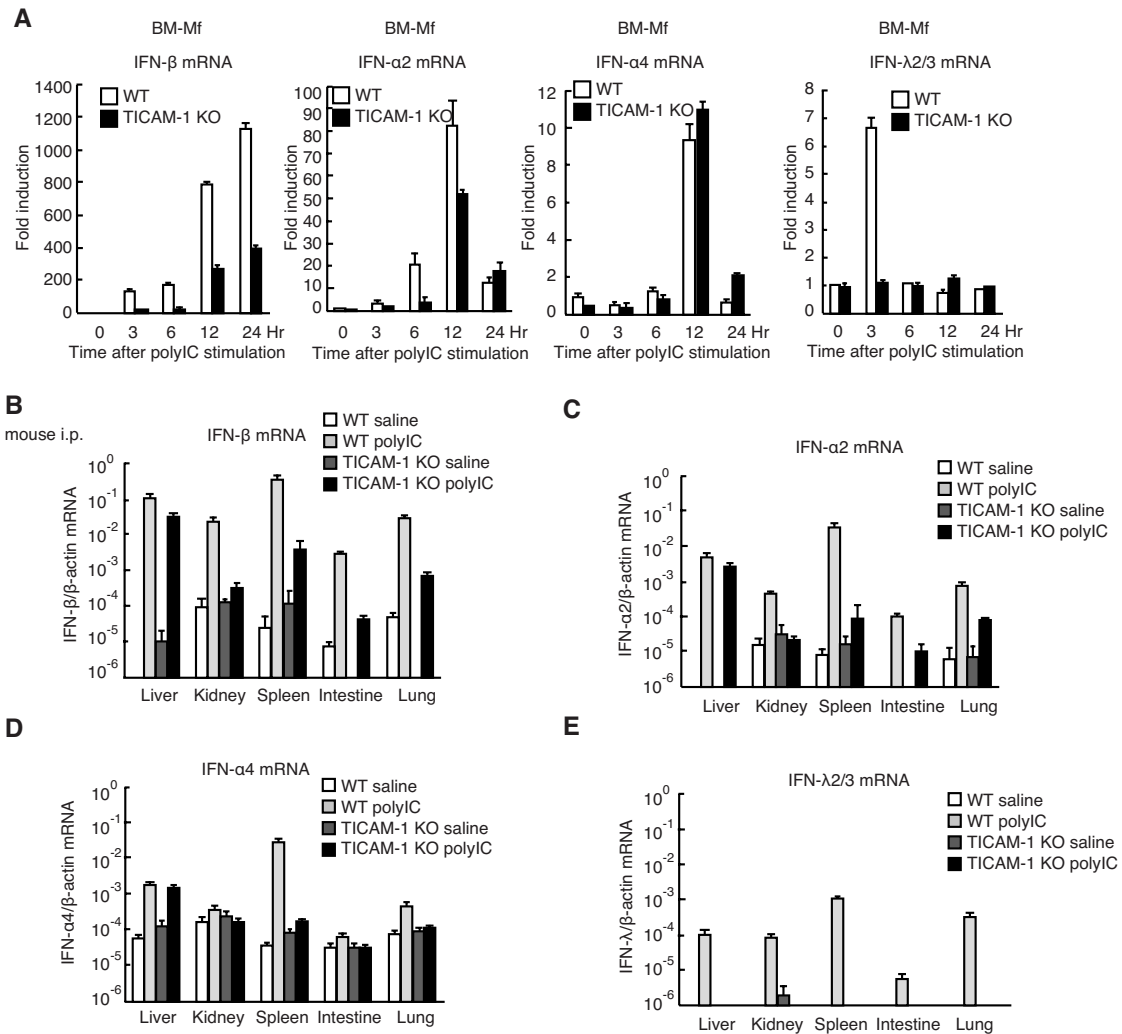


図 1.1 polyI:C 刺激による I 型 IFN、III 型 IFN 誘導

(A) WT BMMf, TICAM-1 KO BMMf を 50 μ g/ml polyI:C で刺激後、定量 PCR により IFN- β , IFN- α 2, IFN- α 4, IFN- λ 2/3 の mRNA 発現を測定した。

(B-E) 50 μ g/ml polyI:C を WT、TICAM-1 KO マウスに腹腔内投与し、6 時間後に組織を回収し、RNA を抽出した。定量 PCR により組織中の IFN- β (B), IFN- α 2(C), IFN- α 4(D), IFN- λ 2/3(E)の mRNA 発現を測定した

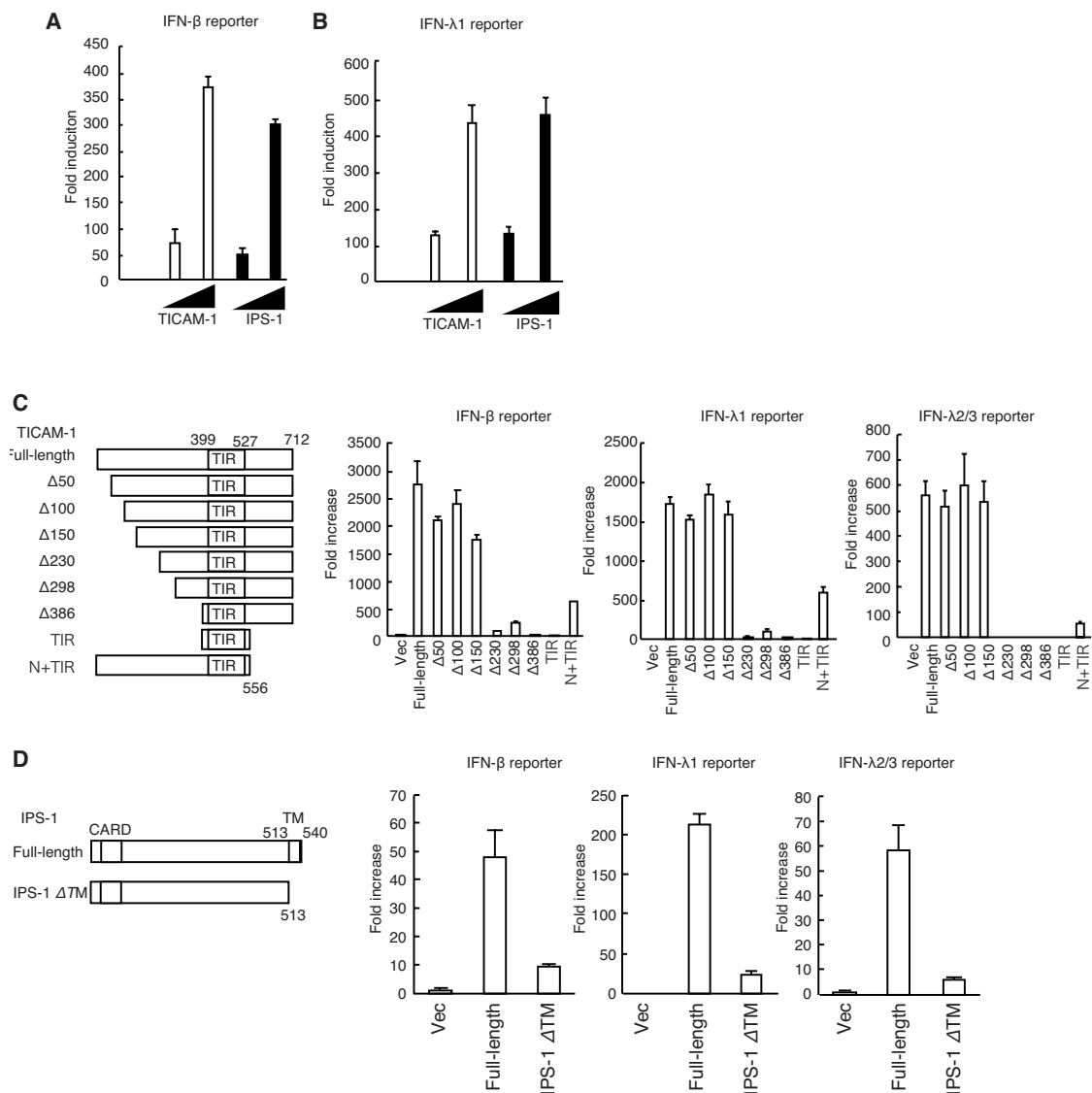


図 1.2 IPS-1 による I 型 IFN、III 型 IFN 誘導

(A,B) HEK293 に TICAM-1、IPS-1 発現ベクターを IFN β -luc(A), IFN λ 1-luc(B) レポータープラスミドとともに Lipofectamine 2000 を用いて transfection した。24 時間後ルシフェラーゼ活性を測定した。

(C) HEK293 に TICAM-1 欠損体発現ベクターを IFN β -luc、IFN λ 1-luc、IFN λ 2/3-luc レポータープラスミドとともに Lipofectamine 2000 を用いて transfection した。24 時間後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

(D) HEK293 に IPS-1 欠損体発現ベクターを IFN β -luc、IFN λ 1-luc、IFN λ 2/3-luc レポータープラスミドとともに Lipofectamine 2000 を用いて transfection した。24 時間後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

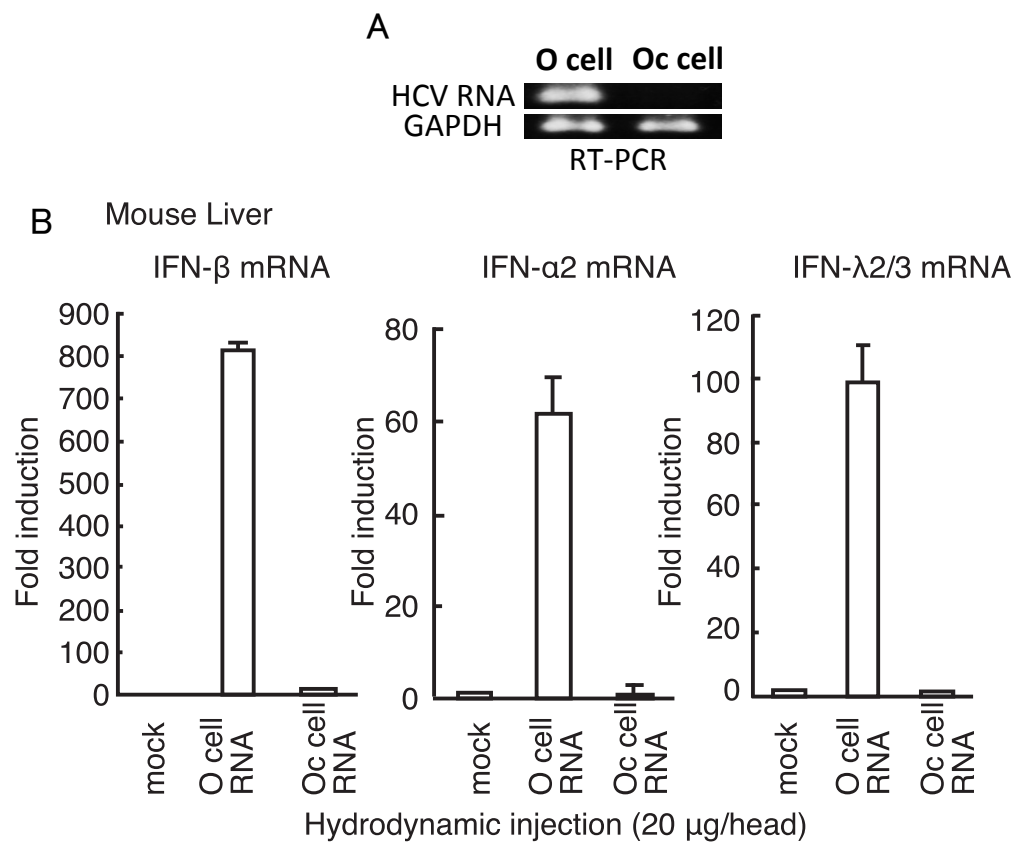


図 1.3 生体内での HCV RNA による I 型 IFN、III 型 IFN 誘導

(A) O cell RNA, Oc cell RNA 中の HCV RNA を RT-PCR により検出した。

(B) 20 μ g O cell RNA または 20 μ g Oc cell RNA をハイドロダイナミックインジェクションにより投与した。6 時間後、肝臓を採取し、RNA を抽出した。肝臓内の IFN- β , IFN- α 2, IFN- λ 2/3 の mRNA 発現を定量 PCR により測定した。

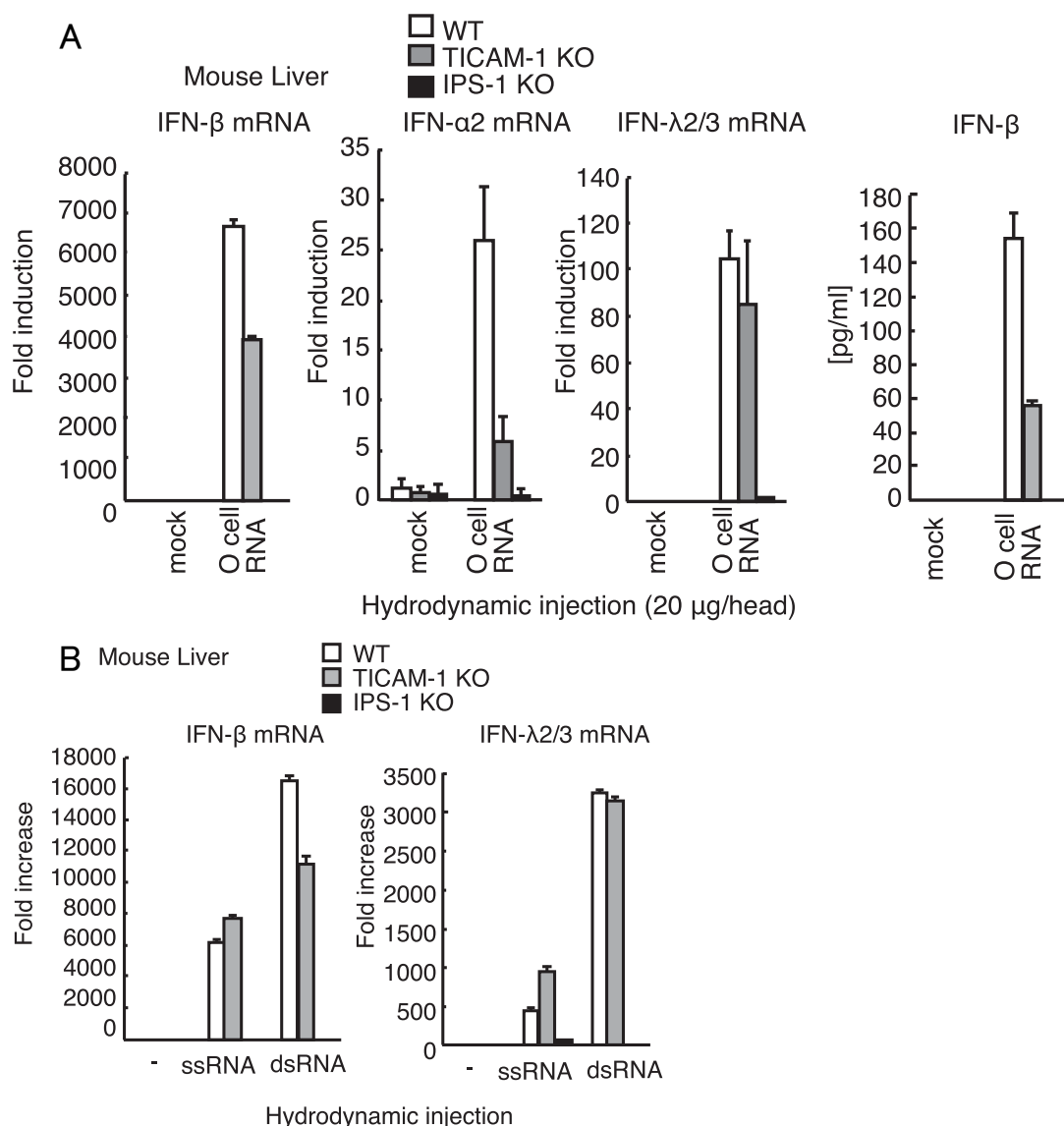


図 1.4 生体内での HCV RNA による IPS-1 依存的な、I 型 IFN、III 型 IFN 誘導

(A) 20 µg O cell RNA を WT, TICAM-1 KO, IPS-1 KO マウスにハイドロダイナミックインジェクションにより投与した。6 時間後、肝臓を採取し、RNA を抽出した。肝臓内の IFN-β、IFNα2、IFN-λ2/3 の mRNA 発現を定量 PCR により測定した。また、肝臓組織を RIPA buffer により溶解し、溶解液を用いて、ELISA により IFN-β を測定した。

(B) 5 µg HCV ssRNA または 5 µg HCV dsRNA を WT, TICAM-1 KO, IPS-1 KO マウスにハイドロダイナミックインジェクションにより投与した。6 時間後、肝臓を採取し、RNA を抽出した。肝臓内の IFN-β、IFN-λ2/3 の mRNA 発現を定量 PCR により測定した。

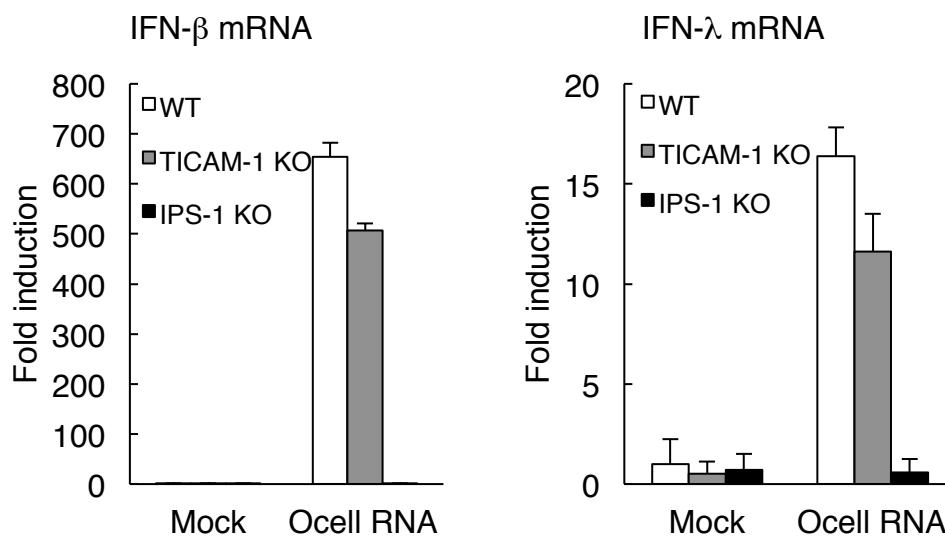


図 1.5 マウス肝細胞での HCV RNA に対する III 型 IFN 誘導

WT、TICAM-1 KO、IPS-1 KO マウスから肝細胞を単離し、1 μ g O cell RNA を Lipofectamine 2000 を用いて細胞質に導入した。6 時間後、細胞を回収し、RNA を抽出した。定量 PCR により IFN- β 、IFN- λ 2/3 の mRNA 発現を測定した。

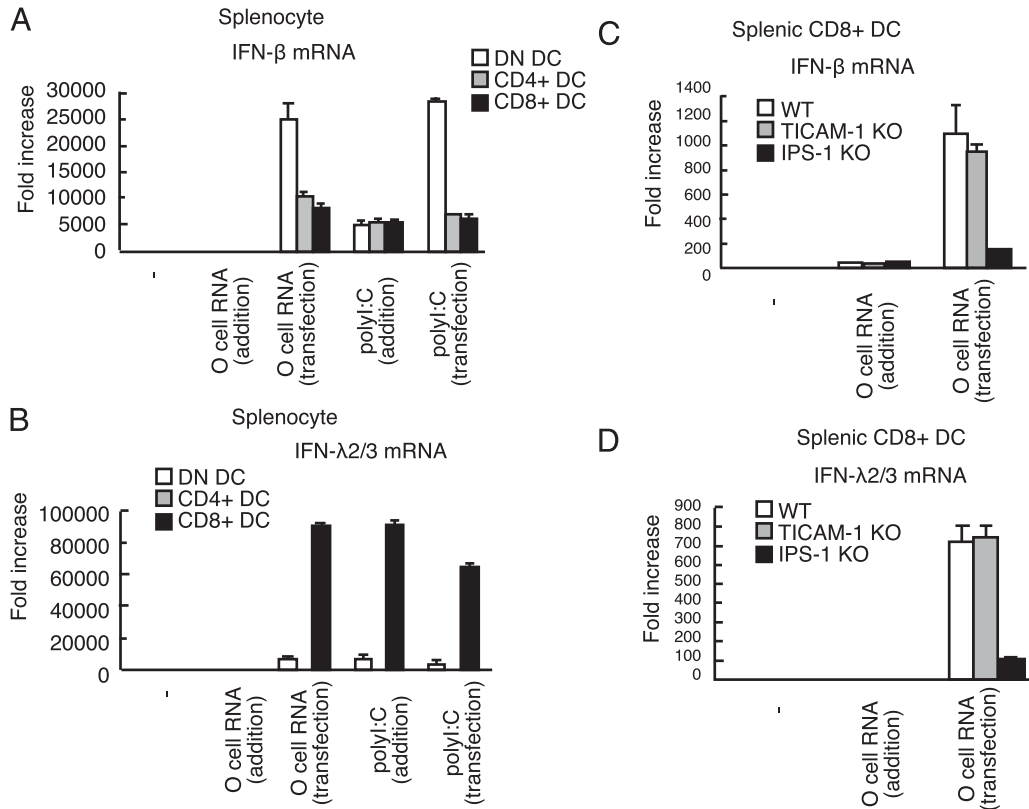


図 1.6 CD8+DC による III 型 IFN の誘導

(A,B)マウス脾臓より単離した CD8+DC、CD4+DC、DNDC の培養上清中に O cell RNA または polyI:C を 20 μ g 添加(addition)あるいは Lipofectamine 2000 により、1 μ g 導入(transfection)した。6 時間後、細胞の RNA を回収し、定量 PCR により、IFN- β (A)、IFN- λ 2/3(B)の mRNA 発現を測定した。

(C,D) WT, TICAM-1 KO, IPS-1 KO マウス脾臓より単離した CD8+DC の培養上清中に O cell RNA を 20 μ g 添加(addition)あるいは Lipofectamine2000 により、1 μ g 導入(transfection)した。6 時間後、細胞の RNA を回収し、定量 PCR により、IFN- β (C)、IFN- λ 2/3(D)の mRNA 発現を測定した。

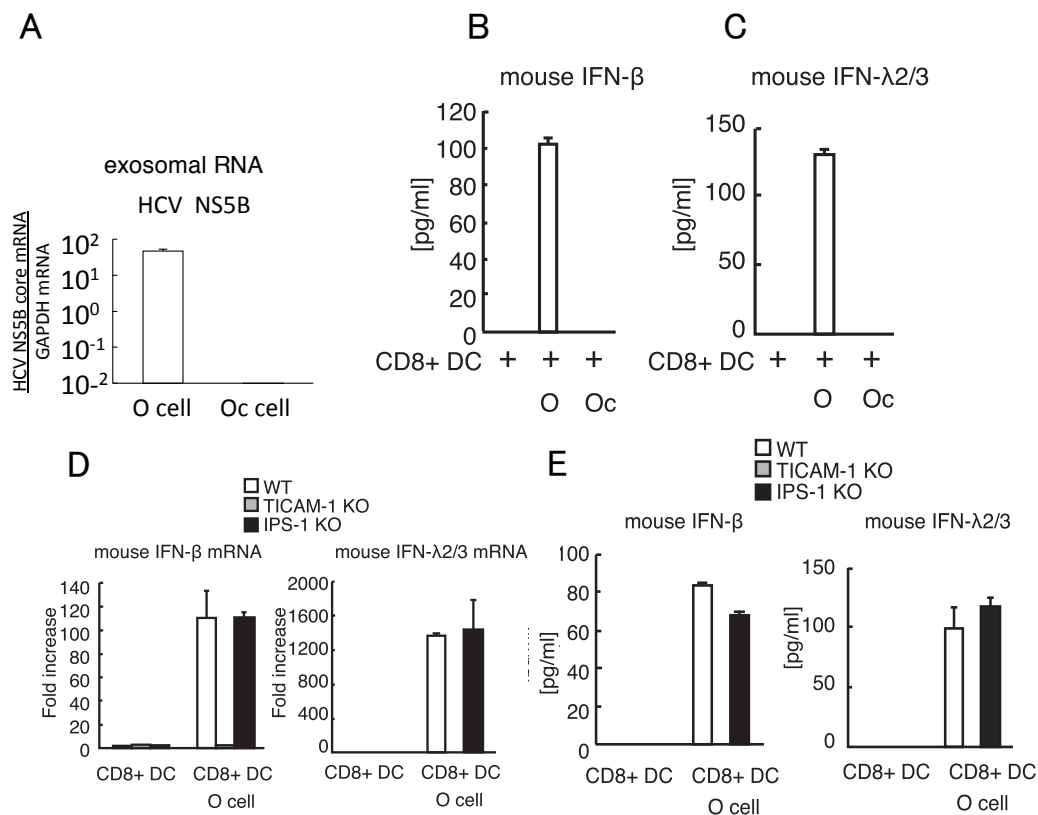


図 1.7 HCV レプリコンを保持する肝細胞存在下の CD8+DC による I 型 IFN、III 型 IFN の誘導

(A) Ocell、Oc cell の培養上清より、エクソソームを回収し、Trizol により RNA を抽出した。定量 PCR により、HCV RNA の発現量を測定した。

(B,C) CD8+DC を単独培養、あるいは O cell または Oc cell と共培養した。24 時間後、培養上清を用いて ELISA により、IFN-β(B)、IFN-λ2/3(C) のタンパク量を測定した。

(D) WT, TICAM-1 KO, IPS-1 KO マウスより単離した CD8+DC を単独培養、あるいは O cell と共培養した。24 時間後、細胞を回収し RNA を抽出した。定量 PCR により IFN-β、IFN-λ の mRNA 発現量を測定した。

(E) WT, TICAM-1 KO, IPS-1 KO マウスより単離した CD8+DC を単独培養、あるいは O cell と共培養した。24 時間後、培養上清を用いて ELISA により、IFN-β、IFN-λ2/3 のタンパク量を測定した。

考察

polyI:C や HCV による III 型 IFN 産生に TLR3-TICAM-1 経路が重要であることが、近年、報告されていたが^{33,34}、本研究では新たに生体内外おける細胞質内 HCV RNA に対する IPS-1 依存的な III 型 IFN 経路の重要性を明らかにした。このことから、生体内には TICAM-1 依存的な経路、IPS-1 依存的な経路とすくなくとも 2 つの主要な III 型 IFN 産生経路が存在することが示された。

実験的に Huh7.5 に感染増殖できることが知られている遺伝子型 2a の HCV 株である JFH-1 は、*in vitro* においてヒト DC に感染できないが、この JFH-1 に対して、ヒト BDCA3+DC が TLR3 依存的に III 型 IFN を産生することが報告されている³³。ヒト BDCA3+DC のカウンターパートであるマウス CD8+DC は本研究においては、HCV レプリコンを保持する O cell 共に培養した際に、TLR3 のアダプター分子 TICAM-1 が III 型 IFN 産生に必須であることを示した。HCV 感染肝細胞は HCV RNA を含むエクソソームを放出する。本研究で用いた O cell のエクソソームにも HCV RNA が確認された。エクソソームは DC に効率的にとりこまれ、初期エンドソームに輸送されることが報告されている^{52,53}。TLR3 は主に期エンドソームに局在することから、HCV RNA を内包するエクソソームは HCV RNA による TLR3 依存的な III 型 IFN 産生を誘導すると予測される。これらのことから、TLR3-TICAM-1 経路は DC が HCV 非感染性に III 型 IFN を産生する際に必須であると考えられる。

肝細胞において、細胞質内 HCV RNA により IPS-1 依存的な III 型 IFN 誘導が見られた。HCV は非構造タンパク質 NS3/4A により IPS-1 を切断し^{19,54}、RIG-I-IPS-1 経路による免疫応答をシャットオフする機構を備えているが、RIG-I を機能欠損した HuH7.5 に対しては、HCV はより容易に感染できる。従って、すくなくとも HCV 感染初期において、IPS-1 が NS3/4A により切断されるまでは RIG-I-IPS-1 経路は機能的であると考えられる。このことから IPS-1 経路は HCV 感染初期の早い段階での III 型 IFN 産生に重要であると予測される。DC においても、細胞質内 HCV RNA にたいしては IPS-1 依存的に III 型 IFN 産生を誘導した。JFH-1 は *in vitro* で DC への感染性を持たないが、慢性 HCV 感染患者では HCV が DC に感染している症例が報告されている⁴⁶⁻⁴⁸。これらのことから、HCV 感染患者の肝細胞、DC では実際に IPS-1 が III 型 IFN 産生を担っている可能性がある。

第2章 III型IFNの機能解析とHCVに対する感染防御機構

緒言

第1章では、HCV感染におけるHCV RNA認識によるIII型IFNの産生経路を示したが、本章ではIII型IFNの機能について検討する。

I型IFNはIFNAR1/2を介して、III型IFNはIL10R β とIL28R α のヘテロ二量体レセプターを介して、シグナル伝達する。III型IFNは、I型IFN同様、IFN-inducible geneの発現を促進し、抗ウイルス活性を示すことが知られている。一方で、I型IFNは外来抗原をCTLに提示するクロスプレゼンテーションや、NK細胞の活性化を促進することが知られているが、これらの機能が、III型IFNに備わっているかは明らかになっておらず、I型IFN、III型IFNの機能的差異は明確にされていない。DCにおけるIII型IFNレセプターの発現を見たところ、CD8+DCに特異的に発現していることが明らかになった。そこで、CD8+DCへのIII型IFN刺激が与える影響について、DCの成熟化、抗ウイルス活性を検討した。また、I型IFNにより促進されるCD8+DCの特徴的な機能であるクロスプレゼンテーション、並びに、NKの活性化について、III型IFNの影響を検討した。また実際にIII型IFNがHCVを排除することが可能かについて検討を行った。

材料と方法

1.材料

1-1.細胞

溶液および緩衝液の組成

PBS (-)	137 mM NaCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 2.68 mM KCl, 1.49 mM KH ₂ PO ₄
トリプシン液	0.25% Trypsin-0.02% EDTA-PBS (-)

以下の試薬を各メーカーより購入した。

FBS	BioSource Intl., Inc.
DMEM (1.0 g/l Low Glucose)	GIBCO-Invitrogen
DMEM (4.5 g/l Low Glucose)	GIBCO-Invitrogen
RPMI1640	GIBCO-Invitrogen
HEPES	GIBCO-Invitrogen
NEAA	GIBCO-Invitrogen
Sodium Pyruvate	GIBCO-Invitrogen
Insulin solution from Bovine Pancreas	Wako
EGF	Wako
L-Glutamine	GIBCO-Invitrogen
100 mU/ml PenicillinG, 100 µg/ml Streptomycin	GIBCO-Invitrogen
G418	Roche
Opti-MEM	GIBCO-Invitrogen

O cell

ヒト肝癌細胞株 O cell は岡山大学 加藤宣之教授より供与された。あらかじめ 56℃で 30 分加熱し非動化した 10%(v/v) 牛胎児血清 FBS、100 mU/ml Penicillin G、100 µg/ml Streptomycin, 6 µl/ml G418 を添加した DMEM (4.5 g/l High Glucose)を用いて 37℃、5%CO₂ の条件下で培養した。二日おきに培地交換を行った。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の継代は 100% confluent になり次第行った。

Oc cell

ヒト肝癌細胞株 Oc cell は岡山大学 加藤宣之教授より供与された。あらかじめ 56℃で 30 分加熱し非動化した 10%(v/v) 牛胎児血清 FBS、100 mU/ml Penicillin G、100 µg/ml Streptomycin を添加した DMEM (4.5 g/l High Glucose)を用いて 37℃、5% CO₂ の条件下で培養した。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の継代は 100% confluent になり次第行った。

マウス由来肝細胞株

マウス肝臓細胞由来細胞株は Dr. Hussein Hassan Aly により樹立された⁵⁵。あらかじめ 56℃で 30 分加熱し非動化した 10%(v/v) 牛胎児血清 FBS、100 mU/ml Penicillin G、100 µg/ml Streptomycin、0.1 mM NEAA、20 mM HEPES、0.5µg/ml Insulin solution from Bovine Pancreas、44 mM 炭酸水素ナトリウム、0.2 mM L-アスコルビン酸-2-リン酸エステル、10 mM ニコチンアミド、10 ng/ml EGF、30µg/ml L-プロリン、100 pM Dexamethasone を添加した DMEM (4.5 g/l High Glucose)を用いて 37℃、5%CO₂ の条件下で培養した。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の継代は 100% confluent になり次第行った。

1-2.マウス

TICAM-1 KO マウス (C57BL/6) 、IPS-1 KO マウス(C57BL/6)は本研究室により作製された。野生型 (wild type : WT) として用いた C57BL/6 マウスは日本クレア社より購入した。

マウスを利用した実験は、北海道大学動物実験に関する規程に従って行った。

1-3.リガンド、サイトカイン

以下の試薬を各メーカーより購入した。

polyI:C	GE Healthcare
mouse IFN-α	Milteny Biotec
mouse IFN-λ3	R&D system

human IFN- α	Milteny Biotec
human IFN- λ 3	invitrogen

2.方法

2-1.マウスからの細胞調整

溶液および緩衝液の組成

PBS (-)	137 mM NaCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 2.68 mM KCl, 1.49 mM KH ₂ PO ₄
ACK lysis buffer	150 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 0.1 mM Na ₂ EDTA
MACS buffer	0.5% BSA, 2 mM EDTA – PBS (-)

以下の試薬を各メーカーより購入した。

collagenase D	Roche
Mercaptoethanol	GIBCO-Invitrogen
Hank`s balanced salt solution	sigmaaldrich
anti-CD4 micro beads	Miltenyi Biotec Inc
anti-CD8 micro beads	Miltenyi Biotec Inc
anti-CD11c micro beads	Miltenyi Biotec Inc
anti-DX5 α micro beads	Miltenyi Biotec Inc
CD8 α +DC positive selection kit	Miltenyi Biotec Inc
CD4+DC positive selection kit	Miltenyi Biotec Inc

NK 細胞

摘出したマウス脾臓を RPMI1640 培地内でシリンジのゴム部で潰した後、1500 rpm, 5 分間遠心し、細胞を回収した。ACK lysis buffer 処理により赤血球を除去し, MACS buffer により洗浄した。anti-DX5 α micro beads を用いた MACS により回収した DX5 α +細胞を NK 細胞とした。10%FBS, penicillin-streptomycin, 10 mM HEPES, 55mM Mercaptoethanol を含む RPMI1640 で培養した。

DNDC

マウス脾臓を摘出し、collagenase D を含む Hanks Buffer solution で 37℃, 25 分間処理し、EDTA で反応を止めた後、ACK lysis buffer 処理により赤血球を除去し、MACS buffer により洗浄した。anti-CD4 micro beads、anti-CD8 micro beads を用いた MACS によるネガティブセレクションした細胞をさらに、anti-CD11 micro beads 用いた MACS により回収し、CD4⁻, CD8⁻, CD11⁺細胞を DNDC とした。10%FBS, penicillin-streptomycin, 10 mM HEPES, 55 mM Mercaptoethanol を含む RPMI1640 で培養した。

CD8+DC

マウス脾臓を摘出し、collagenase D を含む Hanks Buffer solution で 37℃ 25 分間処理し、EDTA で反応を止めた後、ACK lysis buffer 処理により赤血球を除去し、MACS buffer により洗浄した。CD8 α +DC positive selection kit を用いた MACS により CD8+DC を回収した。10%FBS, penicillin-streptomycin, 10 mM HEPES, 55 mM Mercaptoethanol を含む RPMI1640 で培養した。

CD4+DC

マウス脾臓を摘出し、collagenase D を含む Hanks Buffer solution で 37℃ 25 分間処理し、EDTA で反応を止めた後、ACK lysis buffer 処理により赤血球を除去し、MACS buffer により洗浄した。CD4+DC positive selection kit を用いた MACS により CD4+DC を回収した。10%FBS, penicillin-streptomycin, 10 mM HEPES, 55 mM Mercaptoethanol を含む RPMI1640 で培養した。

2-2. cDNA の合成

細胞あるいは組織を Trizol により溶解した。溶解液に Trizol の 1/5 量のクロロホルムを加え混和した後、12,000 g、15 分間遠心した。遠心後、水層を回収し、等量のイソプロパノールを加え、10 分置いたのち、15,000 g、10 分間遠心した。沈殿したペレットを 70%EtOH により洗浄し、RNA を抽出した。抽出した RNA をもとに、High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) を用いて逆転写して cDNA を合成した。

2-3. 定量 PCR

cDNA から Step One Real-time PCR system を用いて Ct 値を測定し、 $\Delta \Delta$ Ct 法により mRNA 量を算出した。内部標準としては ヒト GAPDH またはマウス β -actin を使用した。使用した primer を以下に示す

mouse β -actin	F	TTTGCAGCTCCTTCGTTGC
	R	TCGTCATCCATGGCGAACT
mouse IFN- β	F	CCAGCTCCAAGAAAGGACGA
	R	CGCCCTGTAGGTGAGGTTAT
mouse IFN- λ 2/3	F	TCCCAGTGGAAGCAAAGGATTG
	R	TCAAGCACCTCTTCTCGATGG
mouse TLR3	F	TTGCGTTGCGAAGTGAAGAA
	R	ACTTGCCAATTGTCTGGAAACA
mouse RIG-I	F	GCCCTGTACCATGCAGGTTAC
	R	AGTCCCAACTTTCGATGGCTT
mouse Mx1	F	TCAAGCCTGGAGTGTCAAGTGCC
	R	AATCTGGAAGCCTTGCCACTGGG
mouse RNaseL	F	GCGAACACATCAATGAGGAAAA
	R	CTGCCTCTGGAACGCTGAG
mouse ISG20	F	CAATGCCCTGAAGGAGGATA
	R	TGTAGCAGGCGCTTACACAG
mouse IL10Rb	F	GTCGTGCTGTGGCTCATTTA
	R	AGCAGAAACGTGCTGTGATG
mouse IL28Ra	F	CAGGTGGAATTCTGGAAGGA
	R	CCTTGCTGGAGAGGAATCTG
HCV NS5B	F	CCGAGGCCAGACAGGTCATA
	R	GGCTGCAGAGGCCTTCAAGT
human GAPDH	F	GAGTCAACGGATTTGCTCGT
	R	TTGATTTTGCAGGGATCTCG

2-4.ELISA

血清、細胞培養上清より、ELISA kit を用いて測定した。

以下の ELISA kit を各メーカーより購入した。

mouse IFN- β	PBL
mouse IFN- λ 2/3	eBioscience
mouse IFN- γ	eBioscience

2-5.FACS 解析

溶液および緩衝液の組成

FACS buffer 10% FBS, 5 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetate) - PBS(-)

FACS Buffer に懸濁した細胞を、anti-mouse CD16/32 抗体を用いて 4°C、5 分間のブロッキングを行った。その後、各蛍光抗体を用いて 4°C、15 分間の染色を行い、FACS caliber (BD) を用いて解析を行った。

以下の抗体、tetramer を各メーカーより購入した。

anti-mouse CD16/32 (2.4G2) antibody	Biolegend
PE-anti mouse CD80 antibody	Biolegend
PE-anti mouse CD86 antibody	Biolegend
PE-anti mouse N.K1.1 antibody	Biolegend
FITC-anti mouse CD8 antibody	Biolegend
APC-anti mouse CD3e antibody	Biolegend
PE-anti mouse CD40 antibody	eBioscience
FITC-anti mouse CD69 antibody	eBioscience
APC-anti mouse CD11c antibody	eBioscience
Tetramer/PE - H-2 Kb OVA (SIINFEKL)	MBL

2-6.HCV レプリコン保持細胞 O cell からの HCV RNA 抽出

培養している O cell を回収し、Trizol により、HCV RNA を含む O cell の RNA を抽出した。HCV RNA を含まないネガティブコントロールとして Oc cell の RNA を抽出した。

2-7.生体内における抗原特異的 T 細胞誘導

1 mg OVA と 0.5 μ g IFN- λ または 1×10^5 IU IFN- α をマウスに腹腔内投与した。1, 2, 4 日後に 0.5 μ g IFN- λ または 1×10^5 IU IFN- α を追加で腹腔内投与し、7 日後に脾臓を摘出した。抗 CD8 α 抗体および H2-Kb OVA tetramer を用いて脾細胞を染色し、OVA 特異的 T 細胞の割合を FACS を用いて解析した。ポジティブコントロールとして 1 mg OVA と 100 μ g polyI:C を腹腔内投与した。

2-8.樹状細胞による NK 活性化

NK 細胞と DC を脾臓より単離し、細胞比 2 : 1 の共培養下に 0.1 μ g/ml IFN- λ または 1×10^3 IU /ml IFN- α による刺激を加えた。刺激後の 6, 12, 24 時間後の培養上清を回収し、ELISA により IFN- γ を測定した。また、抗 NK1.1 抗体、抗 CD3e 抗体、抗 CD69 抗体を用いて細胞を染色し、FACS を用いて NK 細胞の CD69 発現を測定した。

遺伝子組替え生物等を用いた実験については、北海道大学の定める規定に基づき実施した

結果

2-1.CD8+DC には III 型 IFN レセプターが発現している。

III 型 IFN レセプターである IL10R β と IL28R α の発現を RT-PCR より検討したところ、DNDC, CD4+DC, CD8+DC, NK 細胞のうち、CD8+DC が両レセプターを発現していた(図 2.1)。そのため、以降 DC の機能に対する III 型 IFN の影響を検討した。

2-2.III 型 IFN は生体内での CD8+DC の成熟化を促進しない

まず、III 型 IFN による DC の成熟化への影響を検討した。マウスに IFN- α または IFN- λ 3 を腹腔内投与した後、DC の成熟化マーカー CD40, CD80, CD86 について、CD8+DC での発現を FACS により調べたところ、IFN α 投与ではこれらの成熟化マーカーの発現が上昇していたのに対して、IFN- λ 3 投与では、ほとんど発現上昇は認められなかった(図 2.2)。そのため、CD8+DC は III 型 IFN レセプターを発現するが、III 型 IFN によるシグナルでは成熟化が亢進されないことが示唆された。

2-3.III 型 IFN はクロスプレゼンテーションの促進に寄与しない

III 型 IFN レセプターを発現している CD8+DC は、外来抗原を MHC1 分子に結合させ CTL に抗原提示する高いクロスプレゼンテーション能をもつ細胞腫であることがこれまでの研究でわかっている¹²。またクロスプレゼンテーションの促進には I 型 IFN が重要である³⁵。IFNAR を欠損したマウスや、CD8+DC を欠損したマウスではクロスプレゼンテーションによる CTL の増加が著しく減少する。ここでは、III 型 IFN が I 型 IFN 同様、クロスプレゼンテーションによる抗原特異的 CTL の増殖を促進するかを検討した。OVA とともに、IFN- α または IFN- λ 3 を投与し、7 日後の脾臓内での OVA 抗原特異的 CTL の増加を OVA tetramer を用いて FCAS により評価した。ポジティブコントロールとして OVA と polyI:C を腹腔内に投与した。その結果、IFN- α 投与でみられる抗原特異的 CTL 増殖の亢進は IFN- λ 3 では認められなかった(図 2.3)。そのため、少なくとも本実験条件下では、IFN- λ 3 はクロスプレゼンテーションの促進に寄与しないことが示唆された。

2-4.III 型 IFN は DC による NK の活性化を増強しない

DC による NK 活性化に I 型 IFN で重要であることが知られている³⁶。ここでは III 型 IFN が DC による NK 活性化を促進するかを検討した。マウス脾臓より単離した CD8+DC と NK の共培養下に IFN- α または IFN- $\lambda 3$ を加えた後の、IFN- γ の産生と NK 活性化マーカー CD69 の発現を測定したが、IFN- $\lambda 3$ では、IFN- γ 産生、CD69 発現上昇共に認められなかった(図 2.4.A,B)。

IFNAR KO マウスを用いた実験により、I 型 IFN が DC、NK 両細胞に作用することが NK の活性化に重要であることがわかっている³⁶。NK 細胞では、III 型 IFN レセプターの IL28R α の発現が認められなかった(図 2.1)。そのため、III 型 IFN は NK に作用することができないために、I 型 IFN でみられる DC による NK の活性化に関与しない可能性が考えられる。

2-5.III 型 IFN は CD8+DC の RIG-I の発現を上昇させる

CD8+DC が III 型 IFN により抗ウイルス性遺伝子を発現するか検討したところ、IFN- $\lambda 3$ による刺激では TLR3 の発現は上昇せず、RIG-I、MX1 の発現は上昇した(図 2.5.A)。

あらかじめ IFN- $\lambda 3$ で刺激した CD8+DC では細胞質内 HCV RNA に認識による III 型 IFN 誘導がより増強された(図 2.5.B)。このことから CD8+DC において、III 型 IFN、さらなる III 型 IFN の産生を助けるポジティブフィードバックループが働くことが示唆された。

2-6. III 型 IFN は肝細胞の抗ウイルス活性を上昇させる

肝細胞において III 型 IFN 抗ウイルス効果を示すかを検討した。まずマウス肝細胞株が III 型 IFN により抗ウイルス性遺伝子を発現するか検討したところ、RIG-I、TLR3、IFN-inducible-gene である Mx1、抗ウイルスヌクレアーゼである ISG20、RNaseL の発現が誘導された(図 2.6.A)。

あらかじめ IFN- $\lambda 3$ で刺激したマウス肝細胞株では、細胞質内 HCV RNA 認識による I 型 IFN、III 型 IFN 誘導がより増強された(図 2.6.B)。

また、IFN- $\lambda 3$ 刺激により O cell 中の HCV RNA 量が著しく低下することを認めた(図 2.6.C)。これらに関して、過去に、III 型 IFN により HCV RNA の複

製が阻害されるという報告⁵⁶があり、これと矛盾しない結果となった。

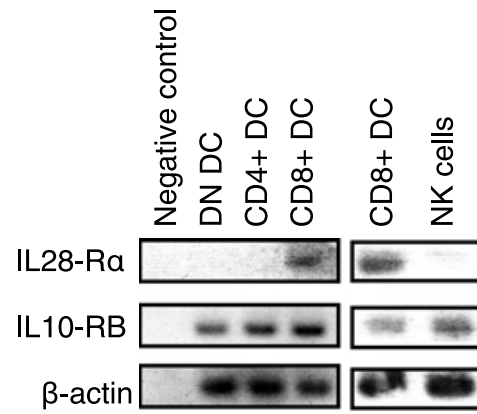


図 2.1 III 型 IFN レセプターの発現

DNDC, CD4+DC, CD8+DC, NK 細胞をマウス脾臓より単離し、RNA を抽出した。RT-PCR により、IL28R α , IL10R β の mRNA 発現を観察した。

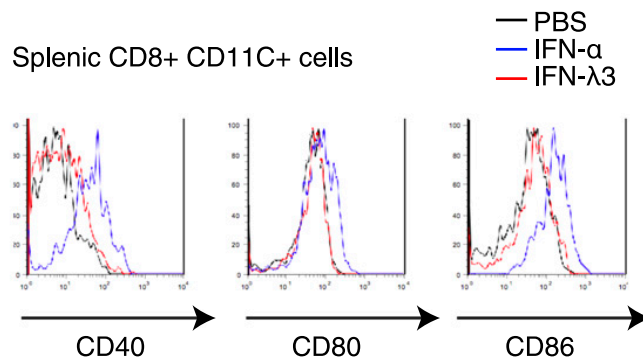


図 2.2 CD8+DC の成熟化マーカーの発現

マウスに 1×10^5 IU IFN- α または $0.5 \mu\text{g}$ IFN- λ 3 を腹腔内投与した。6 時間後、脾臓を摘出した。CD11c、CD8、CD40、CD80、CD86 に対する抗体で単細胞を染色し、FACS によって CD8+DC (CD11c⁺, CD8 α ⁺) の CD40, CD80, CD86 発現を測定した。

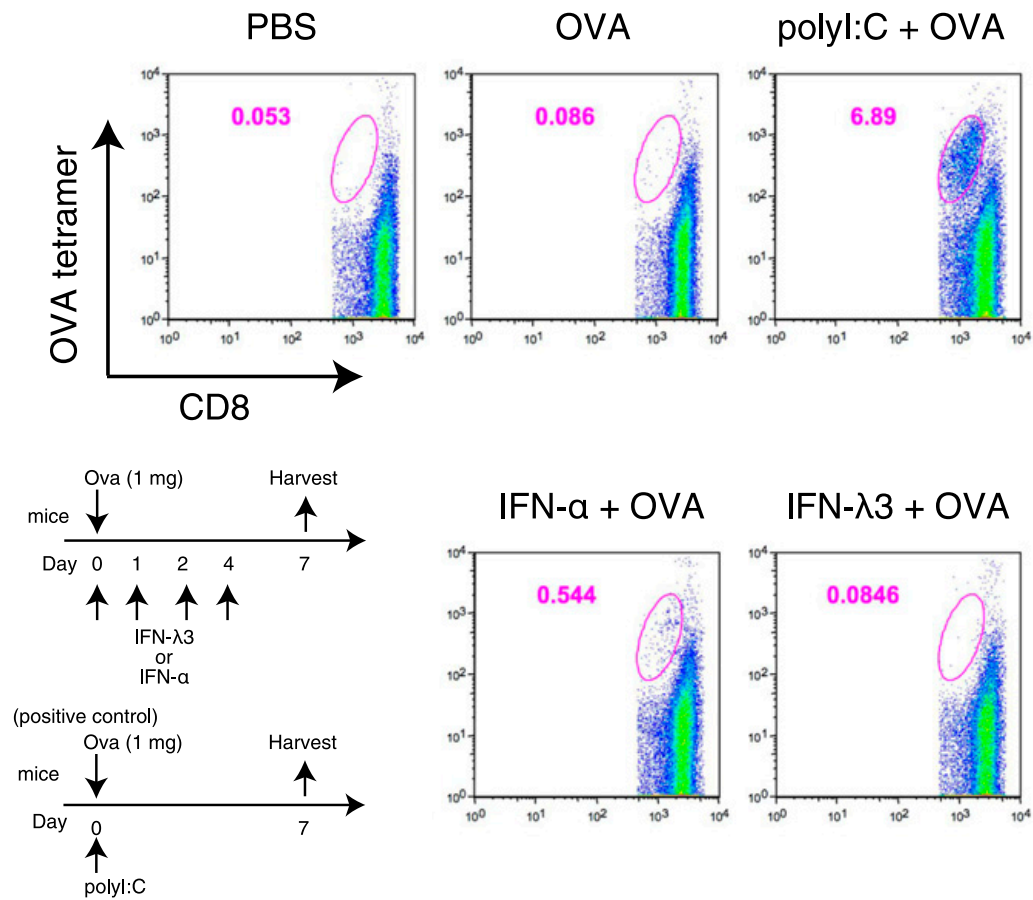


図 2.3 生体内における抗原特異的 T 細胞誘導

1 mg OVA と 0.5 μ g IFN- λ または 1×10^5 IU IFN- α をマウスに腹腔内投与した。1, 2, 4 日後に 0.5 μ g IFN- λ または 1×10^5 IU IFN- α を追加で腹腔内投与し、7 日後に脾臓を摘出した。抗 CD8a 抗体および H2-Kb OVA tetramer を用いて脾細胞を染色し、OVA 特異的 T 細胞の割合を FACS を用いて解析した。ポジティブコントロールとして 1 mg OVA と 100 μ g polyI:C を腹腔内投与した。ネガティブコントロールとして 0, 1, 2, 4 日目に PBS を腹腔内投与した。

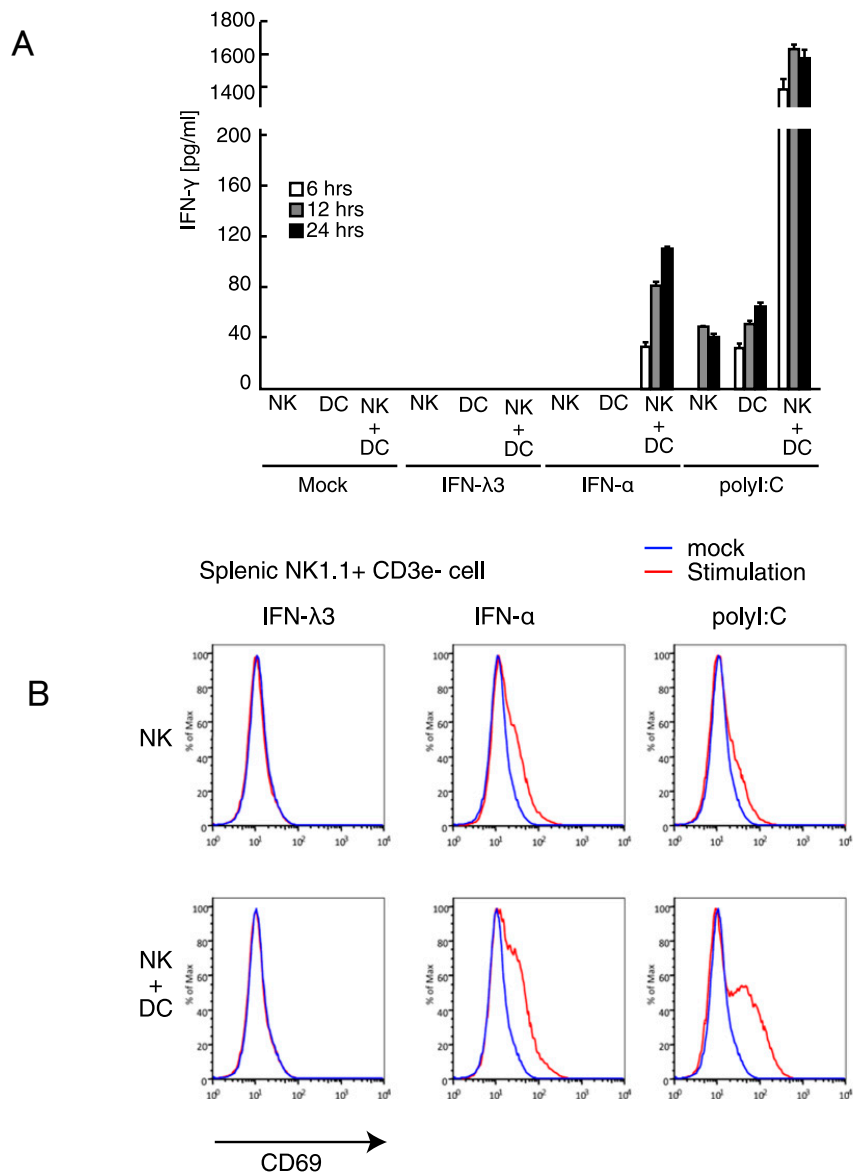
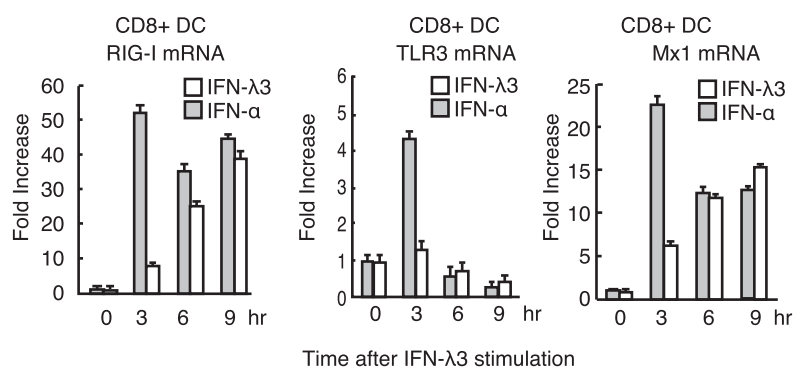


図 2.4 DC による NK の活性化における III 型 IFN の影響

(A,B) NK 細胞と DC を脾臓より単離し、細胞比 2 : 1 の共培養下に 0.1 $\mu\text{g/ml}$ IFN- λ または 1×10^3 IU/ml IFN- α による刺激を加えた。刺激後 6, 12, 24 時間の培養上清を回収し、ELISA により IFN- γ を測定した(A)。また、24 時間刺激後の細胞を回収し、抗 NK1.1 抗体、抗 CD3e 抗体、抗 CD69 抗体を用いて細胞を染色し、FACS により NK 細胞(NK1.1+, CD3e-)の CD69 発現を測定した(B)。ポジティブコントロールとして polyI:C による刺激を行った。

A



B

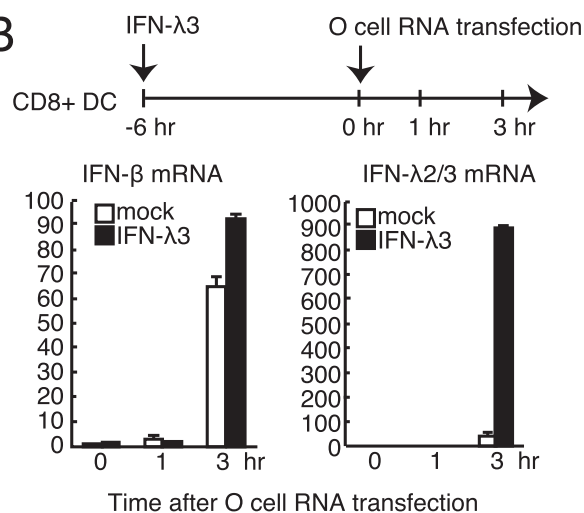


図 2.5 CD8+DC における III 型 IFN による抗ウイルス応答

(A) CD8+DC に 0.1 $\mu\text{g/ml}$ IFN- λ または 1×10^3 IU/ml IFN- α による刺激を加えた後、細胞を回収し、RNA を抽出した。定量 PCR により、RIG-I、TLR3、Mx1 の mRNA 発現を測定した。

(B) CD8+DC に前もって 0.1 $\mu\text{g/ml}$ IFN- λ による刺激を 6 時間加えた後、O cell RNA 1 μg を Lipofectaimine 2000 を用いて、transfection した。transfection による刺激後、細胞を回収し、RNA を抽出した。定量 PCR により IFN- β 、IFN- $\lambda 2/3$ の mRNA 発現を測定した。

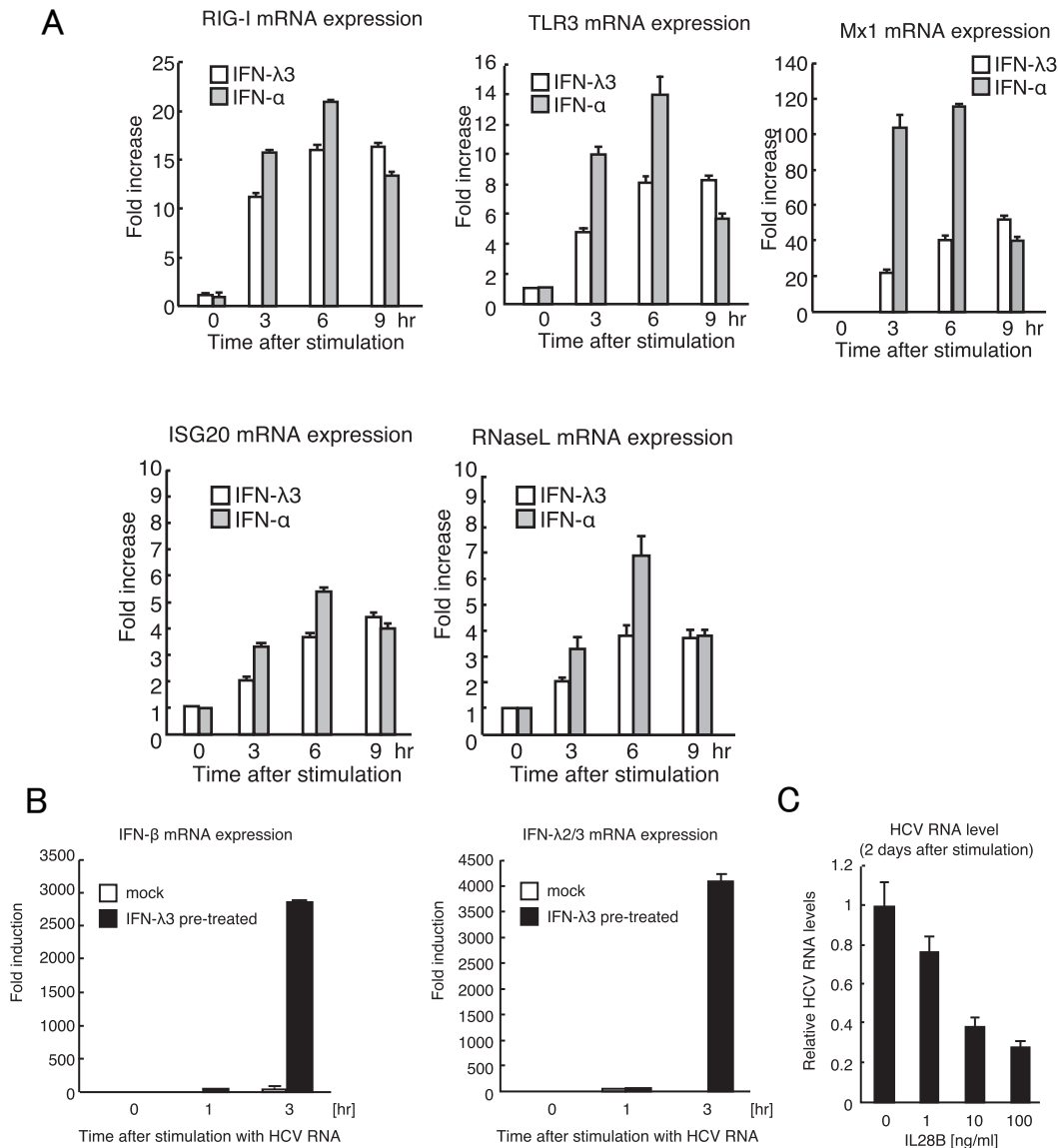


図 2.6 肝細胞における III 型 IFN による抗ウイルス応答

(A) マウス由来肝細胞株に $0.1 \mu\text{g/ml}$ IFN- λ または $1 \times 10^3 \text{ IU/ml}$ IFN- α による刺激を加えた後、細胞を回収し、RNA を抽出した。定量 PCR により、RIG-I、TLR3、Mx1、RNaseL、ISG20 の mRNA 発現を測定した。

(B) マウス由来肝細胞株に前もって $0.1 \mu\text{g/ml}$ IFN- λ による刺激を 6 時間加えた後、O cell RNA $1 \mu\text{g}$ を Lipofectaimine 2000 を用いて、transfection した。transfection による刺激後、細胞を回収し、RNA を抽出した。定量 PCR により IFN- β 、IFN- λ 2/3 の mRNA 発現を測定した。

(C) HCV レプリコン保持肝細胞 O cell の培養上清にヒト IL28B(IFN- λ 3)を加え、2 日後、細胞を回収し RNA を抽出した。定量 PCR により HCV RNA の程度を測定した。

考察

I 型 IFN と III 型 IFN はいずれも、JAK-STAT シグナルを活性化させ IFN-inducible gene の発現を誘導するが、I 型 IFN は IFNAR1/2、III 型 IFN は IL10R β 、IL28R α と異なる受容体によって認識される。I 型 IFN の受容体が多く、多くの細胞に広範囲に発現しているのに対して、III 型 IFN の受容体の発現は限定的であり、この違いが、I 型 IFN と III 型 IFN の生理作用を差別化していることが予想される。本研究での、DC と III 型 IFN 受容体を持たない NK の共培養実験で、I 型 IFN により生じる NK の IFN- γ 産生が III 型 IFN 刺激では起きなかったことも、それぞれの IFN 受容体の発現の違いに由来していると考えられることができる。また、生体内応答においては、生体内の様々な場所で働く I 型 IFN に対して、組織特異的、細胞特異的な III 型 IFN 応答が生体局所での免疫応答を担い、特に HCV 感染時には、例えば肝臓局所での III 型 IFN の働きが重要なものかもしれない。

また、III 型 IFN による刺激は CD8+DC の TLR3 の発現を誘導せず、RIG-I の発現のみ誘導した。CD8+DC は細胞質内 HCV RNA 刺激による III 型 IFN 産生に IPS-1 を必要とすることから、III 型 IFN が、細胞質内 HCV RNA 刺激の III 型 IFN 産生を促進していたのは、RIG-I の発現が上昇することで、RIG-I-IPS-1 経路からのシグナルが増強された結果と考えられる。これらより、CD8+DC 内で IPS-1 依存的に産生された III 型 IFN がさらに CD8+DC の III 型 IFN 産生性を高める、ポジティブフィードバックループを形成していることが示された。肝細胞を用いた結果から、肝細胞においてもこのループは形成されているものと考えられる。肝細胞では III 型 IFN 刺激は HCV RNA 刺激時の I 型 IFN の発現上昇も促進したが、CD8+DC では I 型 IFN 発現の促進は見られなかった。この機序については不明だが、III 型 IFN による細胞特異的な働きである可能性がある。

本研究における実験条件下では、III 型 IFN 刺激での、DC を介した NK の活性化やクロスプレゼンテーションによる CTL 増加の促進は見られない一方で、ISG20 や RNaseL のような、抗ウイルスヌクレアーゼが効率的に誘導された。また、*in vitro* での実験であるが、III 型 IFN が DC を介して、制御性 T 細胞の増殖を促進するとの報告もあり⁵⁷、III 型 IFN は抗ウイルス性タンパクの発現誘導をする一方で、細胞性免疫を起動せず、あるいはさらに制御し、自然免疫系のみを活性化するという、他の IFN ファミリーにはない特徴的な役割を持つ IFN であることが示唆される。

第 3 章

HCV RNA による繊維芽細胞の脱分化誘導

緒言

HCV 感染は進行性であり、感染者の約 7 割が慢性肝炎（C 型肝炎）を患い、その後、肝硬変、肝癌を発症する。HCV 感染は肝癌の主要な原因であり、本邦において、その割合は 7 割～8 割を占める。しかしながら、HCV による肝発癌機構は未だ明らかになっていない。一般に慢性的な炎症は遺伝子変異の増加をもたらすことから、肝発癌においても重要な要因であると考えられるが、一方で、自己免疫性の慢性肝炎ではウイルス性肝炎に比べ肝発癌を起こす割合が著しく低いことが知られており⁵⁸、炎症反応だけでなく HCV 側の何らかの因子が発癌に重要な役割を担っていると考えられている。

HCV による肝発癌は肝硬変の進行度との関連が示されており、肝臓の線維化の程度が重い程、発癌率が高まる。同じくウイルス性の肝発癌の原因となる HBV 感染では肝発癌が必ずしも肝臓の線維化の進行とは相関しないとされており、HCV 特異的な発癌機構に肝臓の線維化が関わっていることが示唆される⁵⁸。この肝線維化には、肝星細胞（ステラツテ細胞/伊東細胞）が重要な働きをする。静止期肝の星細胞は脂肪滴を多く含みビタミン A を貯蔵する機能を有するが、炎症等で活性化すると、活発なコラーゲン線維産生、筋繊維芽細胞への分化転換が起こり、肝線維化を引き起こす。また、肝炎の進行過程では、上皮系細胞が間葉系細胞に脱分化する上皮間葉転換が促進されており、これが肝発癌に関与していると考えられている⁵⁹。

細胞のリプログラミングに関しては、近年、自然免疫系の関与を示す興味深い報告がなされている。ES 細胞特異的に発現する未分化マーカー 24 遺伝子のうち、山中因子と称される OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC の 4 分子を発現させることで脱分化し、誘導される多能性幹細胞である iPS 細胞^{60,61}は、その作製過程において山中因子を、ベクターを用いた遺伝子導入ではなく、タンパク質のかたちで導入した場合には著しく作製効率が下がることが知られていた⁶²。この理由について、John P. Cooke のグループは、iPS 細胞作製に汎用されるヒト繊維芽細胞 BJ cell を用い、iPS 細胞作製過程でベクターとして用いられたレンチウイルスベクターが自然免疫で働く TLR3-TICAM-1 分子の活性化を介して iPS 細胞化を促進させることを報告した⁶³。また、本研究室では当時、修士学生として所属していた麦倉により、BJ cell を用い、合成 RNA アナログで

ある polyI:C が細胞内の RLR を活性化し、IPS-1 分子を介して山中因子を含む未分化マーカー遺伝子の発現上昇を誘導する知見を得ている(投稿準備中)。

現在では、HCV は、例えばエクソソームを介した細胞間輸送経路等により、肝実質細胞だけでなく、様々な細胞に伝搬されることが示唆されていることから、これらの点を踏まえて、HCV 感染時に生じる脱分化現象に HCV RNA を認識する自然免疫経路が関与するかを明らかにするため、BJ cell を用いて、HCV RNA により OCT3/4 等の未分化マーカーの発現が誘導されるか検討した。

材料と方法

1.材料

溶液および緩衝液の組成

PBS (-)	137 mM NaCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 2.68 mM KCl, 1.49 mM KH ₂ PO ₄
トリプシン液	0.25% Trypsin-0.02% EDTA-PBS (-)

以下の試薬を各メーカーより購入した。

FBS	BioSource Intl., Inc.
DMEM (4.5 g/l Glucose)	GIBCO-Invitrogen
100 mU/ml PenicillinG, 100 µg/ml Streptomycin	GIBCO-Invitrogen
G418	Roche
Opti-MEM	GIBCO-Invitrogen

1-1.細胞

BJ cell

ヒト繊維芽細胞 BJ 細胞は STEMAGENT 社の Stemgent® BJ Human Fibroblasts(early passage, P6)を購入した。あらかじめ 56℃で 30 分加熱し非動化した 10%(v/v) 牛胎児血清 FBS、100 mU/ml Penicillin G、100 µg/ml Streptomycin を添加した DMEM (4.5 g/l High Glucose)を用いて 37℃、5%CO₂ の条件下で培養した。二日おきに培地交換を行った。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の継代は 100% confluent になり次第行った。

O cell

ヒト肝癌細胞株 O cell は岡山大学 加藤宣之教授より供与された。あらかじめ 56℃で 30 分加熱し非動化した 10%(v/v) 牛胎児血清 FBS、100 mU/ml Penicillin G、100 µg/ml Streptomycin, 6 µl/ml G418 を添加した DMEM (4.5 g/l High Glucose)を用いて 37℃、5%CO₂ の条件下で培養した。二日おきに培地交換を行った。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の継代は 100% confluent になり次第行った。

Oc cell

ヒト肝癌細胞株 Oc cell は岡山大学 加藤宣之教授より供与された。あらかじめ 56°C で 30 分加熱し非動化した 10%(v/v) 牛胎児血清 FBS、100 mU/ml Penicillin G、100 µg/ml Streptomycin を添加した DMEM (4.5 g/l High Glucose)を用いて 37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の継代は 100% confluent になり次第行った。

1-2.リガンド、サイトカイン

以下の試薬を各メーカーより購入した。

polyI:C
human IFN-α

GE Healthcare
Milteny Biotec

2.方法

2-1.HCV レプリコン保持細胞 O cell からの HCV RNA 抽出

培養している O cell を回収し、Trizol により、HCV RNA を含む Ocell の RNA を抽出した。HCV RNA を含まないネガティブコントロールとして Oc cell の RNA を抽出した。

2-2.in vitro HCV polyU/UC RNA の作製

本研究室が作製した、HCV genotype 1b polyU/UC RNA (9421 to 9480, Accession number: EU867431)が挿入された pGEM-T easy vector⁴⁵ より Riboprobe combination system SP6/T7 RNA polymerase (promega)を用いて、T7 promoter あるいは SP6 promoter から転写反応を行った。DNase I で 37°C、15 分反応させて DNA を除去し、Trizol により RNA を抽出した。二本鎖 RNA の作製のため、センス鎖とアンチセンス鎖の相補的な ssRNA を等量混合し、95°C に置いた後、徐々に室温まで温度をさげてアニーリングを行った。

2-3.Lipofectamine2000、DOTAP を用いた細胞への RNA 刺激

BJ cell を 24well plate に播種し、実験に応じて Lipofectamine2000 あるいは DOTAP を用いて各種 RNA を細胞に導入し刺激を加えた。

2-4. cDNA の合成

細胞あるいは組織を Trizol により溶解した。溶解液に Trizol の 1/5 量のクロロホルムを加え混和した後、12,000g、15 分間遠心した。遠心後、水層を回収し、等量のイソプロパノールを加え、10 分置いたのち、15000g、10 分間遠心した。沈殿したペレットを 70%EtOH により洗浄し、RNA を抽出した。抽出した RNA をもとに、High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) を用いて逆転写して cDNA を合成した。

2-5. 定量 PCR

cDNA から Step One Real-time PCR system を用いて Ct 値を測定し、 $\Delta\Delta$ Ct 法により mRNA 量を算出した。内部標準としては ヒト GAPDH を使用した。使用した primer を以下に示す。

human GAPDH	F	GAGTCAACGGATTTGCTCGT
	R	TTGATTTTGCAGGGATCTCG
human IFN- β	F	CAACTTGCTTGGATTCCTACAAAG
	R	TATTCAAGCCTCCCATTCAATTG
human OCT3/4	F	CCGTGAAGCTGGAGAAGGAG
	R	GCAGATGGTCGTTTGGCTGA
human SOX2	F	CCCCTTTATTTTCCGTAGTTGTATTT
	R	TGGATTCTCGGCAGACTGATT
human KLF4	F	TACCAAGAGCTCATGCCACC
	R	GCGAATTTCCATCCACAGCC
human c-MYC	F	GCCACGTCTCCACACATCAG
	R	TCTTGGCAGCAGGATAGTCCTT
human TLR3	F	TCCCAAGCCTTCAACGACTG
	R	TGGTGAAGGAGAGCTATGCACA
human TLR7	F	TTACCTGGATGGAAACCAGCTAC
	R	TCAAGGGCTGAGAAGCTGTAAGCTA
human TLR8	F	ATGAAGGAGTCATCTTTGC

	R	TTAGTATTGCTTAATGGAATCG
human TLR9	F	TGGTGTGAAGGACAGTTCTCTC
	R	CACTCGGAGGTTTCCCAGC

2-6.顕微鏡観察

カバーガラスを敷いた 24 well plate に BJ cell を播種し、接着後に実験に応じて各種 RNA による刺激を行い、12 時間後に免疫染色を行った。PBS での洗浄後、3%ホルマリン/PBS による細胞の固定 0.2%Triton X/PBS による細胞膜透過処理、1% BSA/PBS によるブロッキングを行った後、OCT3/4 monoclonal antibody(Cell Singnaling)を用いて、4℃で一晩、一次抗体反応を行った。翌日、Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody(Invitrogen)を用いて、室温、遮光下で二次抗体反応を行った後、カバーガラスを、Prolong Gold (Invitrogen) によりスライドガラスにマウントし、マニキュアで固定した。各工程間で PBS による洗浄を行った。各サンプルは、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss) にて 63 倍対物レンズを用いて観察した。

遺伝子組替え生物等を用いた実験については、北海道大学の定める規定に基づき実施した

結果

3-1. BJ cell において、Lipofectamine 2000 を用いた細胞質内への HCV RNA 刺激により未分化マーカー遺伝子発現が誘導される。

本研究室では、Lipofectamine 2000 を用いて polyI:C を BJ cell の細胞質内に導入すると、RLR-IPS-1 依存的に山中因子 OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC を含む複数の未分化マーカー遺伝子発現が誘導される知見を得ている(投稿準備中)。そこで、HCV RNA が polyI:C 同様、未分化マーカー遺伝子発現を誘導するかについて、BJ cell を用いて検討した。BJ cell に Lipofectamine 2000 を用いて O cell RNA, Oc cell RNA, 合成 HCV RNA, polyI:C による細胞質内への刺激を加えたところ、合成 HCV RNA, polyI:C による刺激により、OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC の遺伝子発現の誘導が見られた。RLR-IPS-1 経路により誘導される IFN- β の発現は O cell RNA、合成 HCV RNA、polyI:C において観察されたが、未分化マーカー遺伝子発現が誘導された合成 HCV RNA, polyI:C 刺激では特に高い IFN- β の発現上昇が見られた。

3-2. Lipofectamine 2000 を用いた HCV RNA 刺激により OCT3/4 タンパク質が発現する。

BJ cell に Lipofectamine 2000 を用いて、HCV RNA を導入すると、OCT3/4 の mRNA の発現が上昇したことから、このとき実際に OCT3/4 タンパク質が発現しているかどうかを、免疫染色により調べた。刺激から 12 時間後の BJ cell を、抗 OCT3/4 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、OCT3/4 タンパク質が発現していることが観察された(図 3.2)。また、このとき、OCT3/4 の発現が観察された BJ cell は全体の 1-2% 程度であった。

3-3. BJ cell において、DOTAP を用いた TLR3 への HCV RNA 刺激では未分化マーカー遺伝子発現は誘導されない。

山中因子の遺伝子導入による iPS 細胞作製において TLR3 の刺激により作製効率が上昇することから、HCV RNA による TLR3 の刺激により、未分化マーカー発現が誘導されるかどうかを検討した。DOTAP 試薬を用いた細胞への

RNA 導入はエンドソームに発現する TLR3 の活性化に利用される⁶⁴。そこで、DOTAP を用い、BJ cell を O cell RNA, Oc cell RNA, 合成 HCV RNA, polyI:C で刺激したところ、合成 HCV RNA、polyI:C では IFN- β の発現が誘導されていることから刺激に対して応答していることが確認されたが、OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC の遺伝子発現は誘導されなかった (図 3.3)。

3-4. BJ cell は HCV 感染肝細胞存在下で未分化マーカー遺伝子を発現しない。

第 1 章において CD8+DC が HCV 感染肝細胞存在下で RNA 認識経路のうち、TLR3-TICAM-1 経路により IFN を産生することを示したが、ここでは、BJ cell が HCV 感染肝細胞存在下で 未分化マーカー遺伝子を発現するか検討した。BJ 細胞を O cell あるいは Oc cell と共培養したときの OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC の遺伝子発現について調べたが、いずれの場合でも発現誘導は観察されなかった(図 3.4)。また、このとき、IFN- β の発現上昇も確認されなかったことから、本実験条件下では RNA 認識経路の活性化が生じていない可能性が考えられる。

3-5. I 型 IFN 刺激を受けた BJ cell では、HCV 感染肝細胞存在下で IFN- β 発現が誘導されるが、OCT3/4 発現は誘導されない。

BJ cell を IFN- α で刺激すると TLR3 の発現が上昇する(図 3.5.A)。このことから、予め BJ 細胞に IFN 刺激をすることで、BJ 細胞と HCV 感染肝細胞の共培養下での RNA 認識経路の活性化が見られるのではないかと考え、予め IFN- α で刺激した BJ cell を O cell と共培養した。すると、この場合ではわずかながら IFN- β 発現が上昇し、RNA 認識経路の活性化が確認された(図 3.5B)。しかしながら、OCT3/4 の発現誘導については依然、観察されなかった。

3-6. Lipofectamine2000、DOTAP を用いた併用刺激により OCT3/4 遺伝子発現が誘導される。

BJ cell に対して、DOTAP ではなく Lipofectaine 2000 を用いて合成 HCV RNA、polyI:C で細胞質内刺激することで OCT3/4 発現が誘導される。(図 3.1, 3.2) 一方で、BJ cell に対して Lipofectaine 2000 を用いて O cell RNA で刺激を加えても、IFN- β 発現は誘導されるが OCT3/4 発現は誘導されない(図 3.1)。

これについて、iPS 細胞作製においては TLR3 の刺激により作製効率が上昇することから、Lipofectaine 2000 を用いた O cell RNA による刺激時に、DOTAP を併用し、TLR3 経路を活性化することで、OCT3/4 発現が誘導されるようになるかを検討した。BJ cell に Lipofectamine2000 を用いた O cell RNA による刺激と、DOTAP を用いた O cell RNA, 合成 HCV RNA, polyI:C のいずれかの RNA による刺激を同時に加えたところ、それぞれ単独刺激では OCT3/4 の発現誘導が見られない O cell RNA / Lipofectaine2000 と合成 HCV RNA / DOTAP あるいは、O cell RNA / Lipofectaine2000 と polyI:C / DOTAP の併用刺激では、OCT3/4 の発現誘導が観察された(図 3.6)。また、OCT3/4 発現が誘導された刺激では、OCT3/4 発現が誘導されなかった刺激に比べ、IFN- β の発現も著しく上昇していることを認めた。

3-7. Lipofectamine2000、DOTAP を用いた併用刺激により OCT3/4 タンパク質が発現する。

Lipofectamine2000、DOTAP を用いた併用刺激により誘導される OCT3/4 発現について、実際に OCT3/4 タンパク質レベルで発現しているかどうかを、免疫染色により調べた。刺激から 12 時間後の BJ cell を、抗 OCT3/4 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、Ocell RNA / Lipofectaine2000 と合成 HCV RNA / DOTAP 、Ocell RNA / Lipofectaine2000 polyI:C / DOTAP の併用刺激において、OCT3/4 タンパク質が発現していることが観察された(図 3.7)。

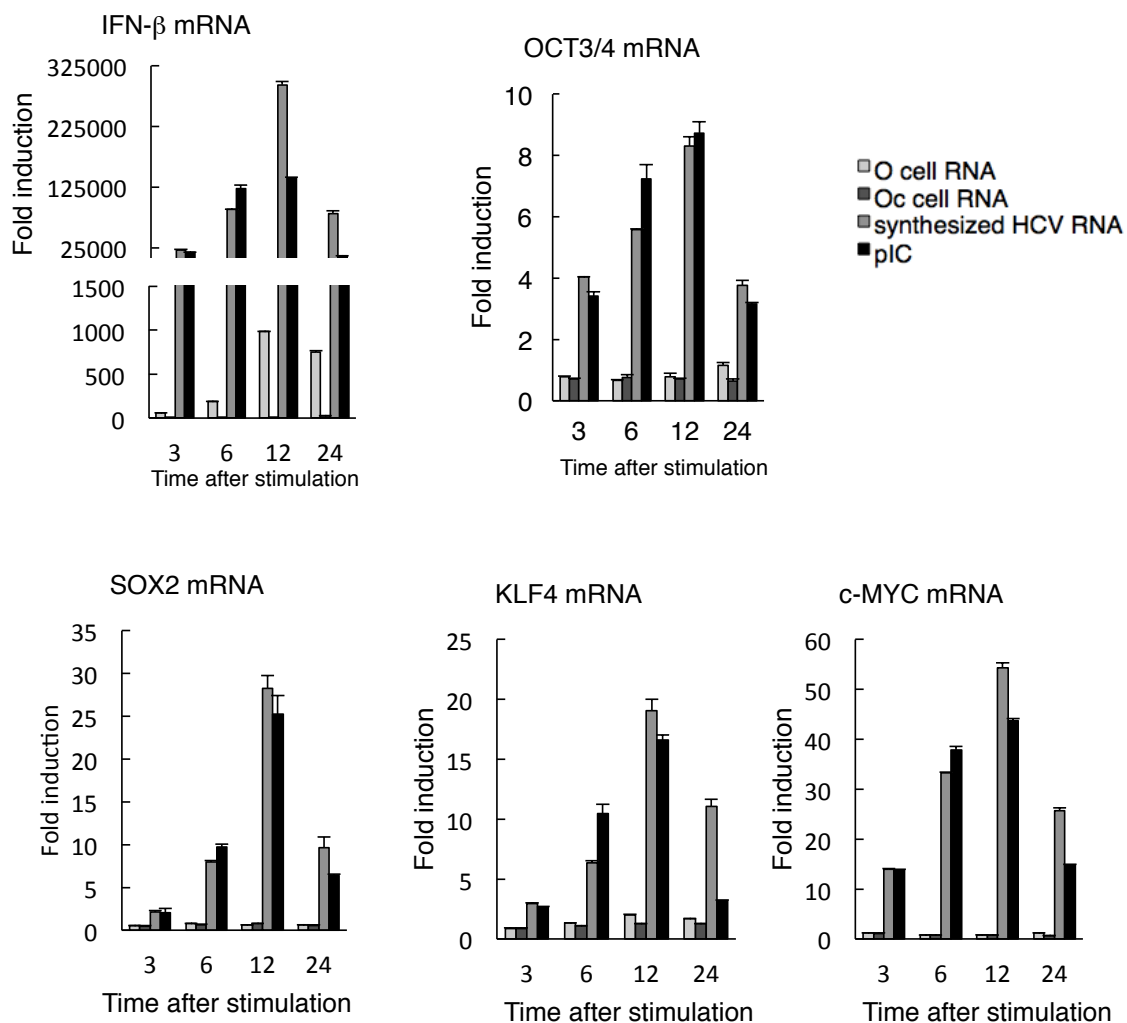


図 3.1 Lipofectamine2000 を用いた RNA 刺激による未分化マーカーの発現

BJ cell に対して、Lipofectamine 2000 を用いて O cell RNA, Oc cell RNA, 合成 HCV RNA, polyI:C のいずれか 0.05 μg で刺激後、定量 PCR により IFN- β , OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC の mRNA 発現を測定した。

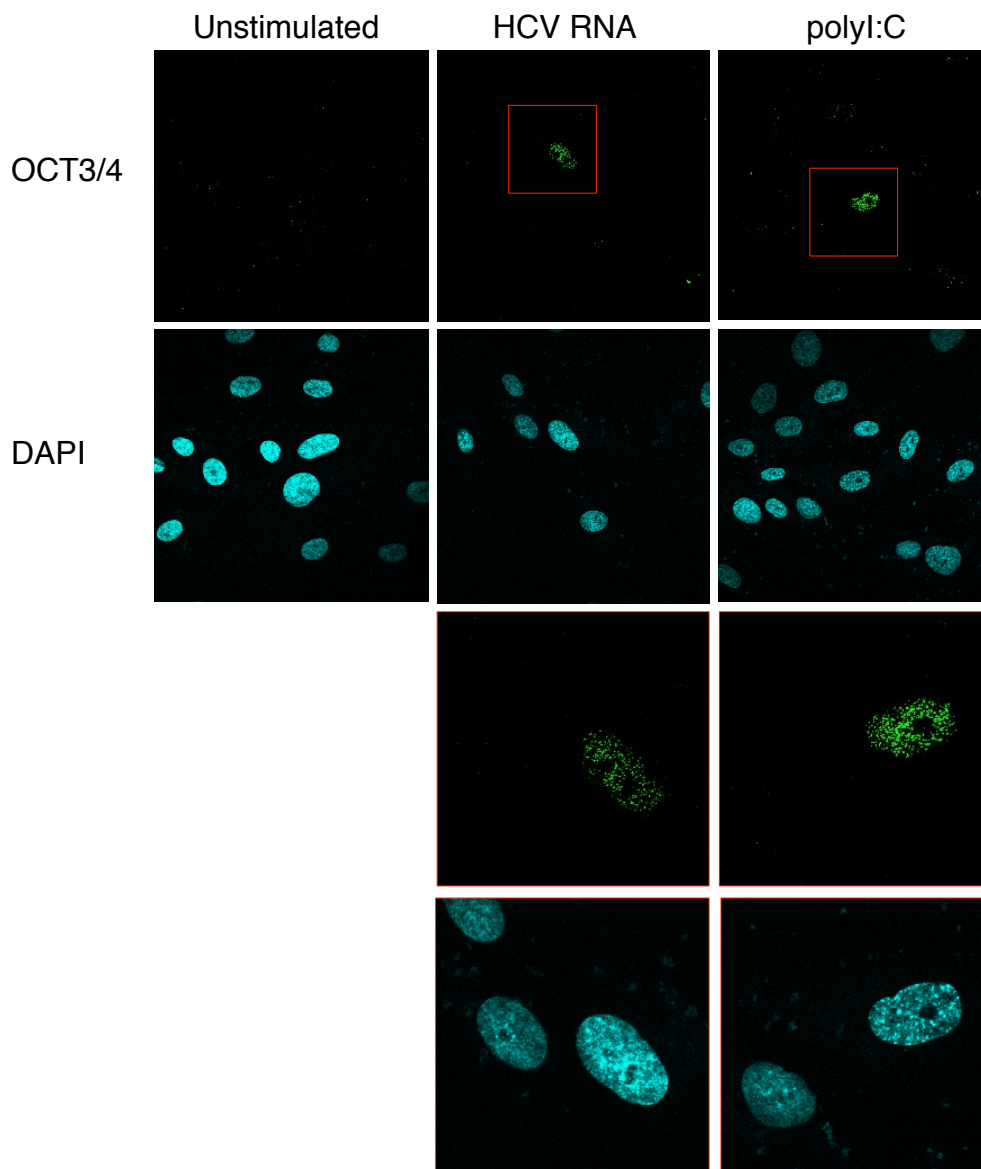


図 3.2 Lipofectamine2000 を用いた RNA 刺激による OCT3/4 タンパク質の発現

BJ cell に対して、Lipofectamine 2000 を用いて合成 HCV RNA, polyI:C のいずれか $0.05 \mu\text{g}$ で刺激した。12 時間後、細胞の固定、膜透過処理をし、抗 OCT3/4 ウサギ抗体を 1 次抗体に、Alexa488 標識抗ウサギ抗体を 2 次抗体として用いた免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により OCT3/4 のタンパク質の発現について解析した。

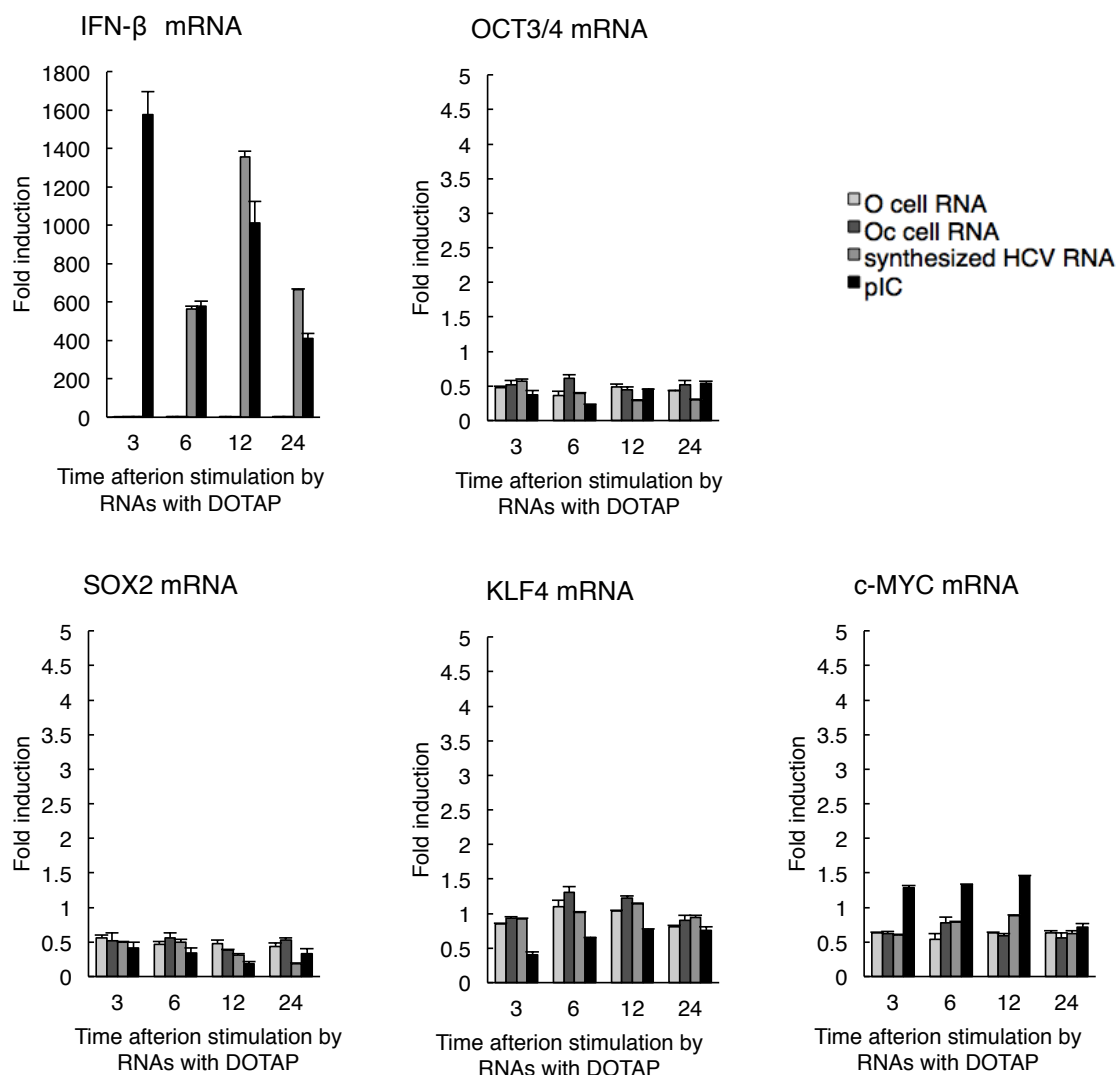


図 3.3 DOTAP を用いた RNA 刺激による未分化マーカーの発現

BJ cell に対して、DOTAP を用いて O cell RNA, Oc cell RNA, 合成 HCV RNA, polyI:C のいずれか $0.05 \mu\text{g}$ で刺激後、定量 PCR により IFN- β , OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC の mRNA 発現を測定した。

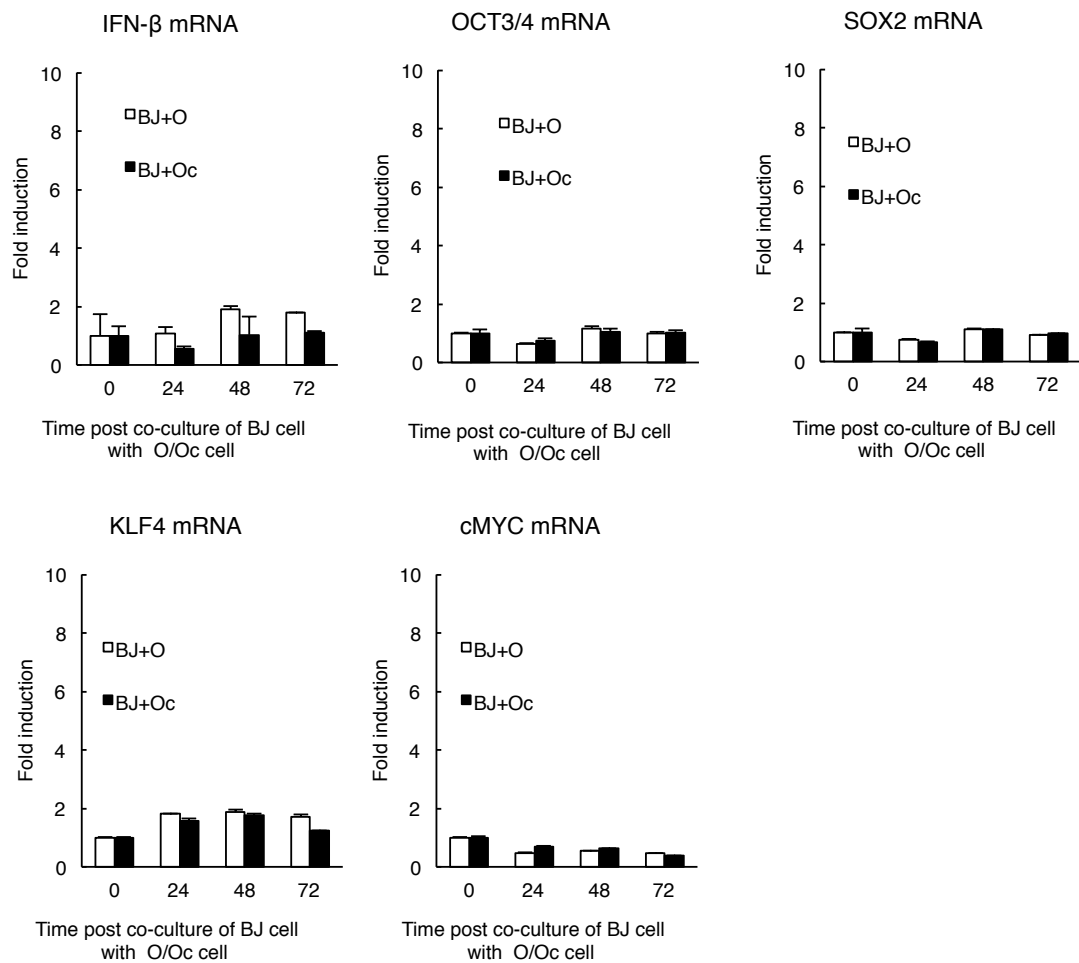


図 3.4 BJ 細胞と HCV 感染肝細胞の共培養下における未分化マーカーの発現

BJ cell を O cell あるいは Oc cell と共培養した後、定量 PCR により IFN-β, OCT3/4, SOX2, KLF3, c-MYC の mRNA 発現を測定した。

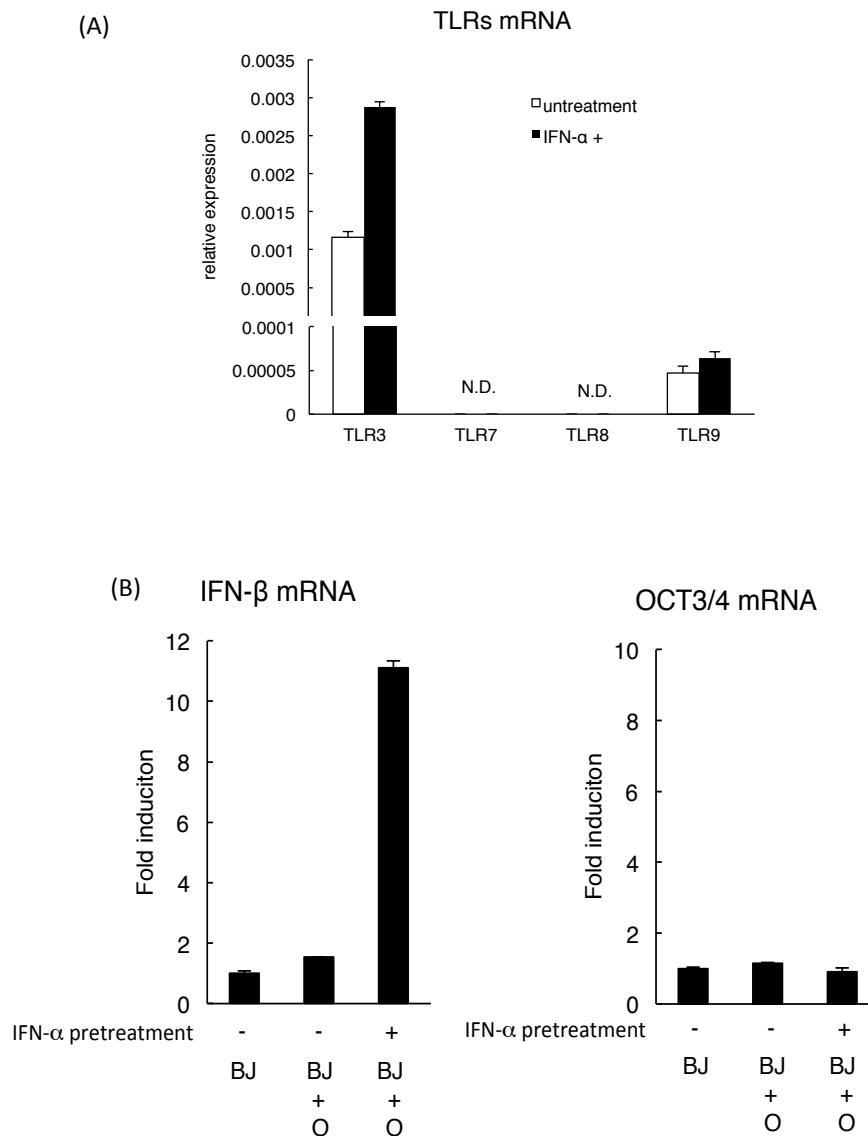


図 3.5 IFN 前刺激後の BJ 細胞と HCV 感染肝細胞の共培養下における OCT3/4 の発現

(A)BJ cell に 100 IU/ml IFN- α による刺激を加えた。6 時間後、細胞を回収し定量 PCR により TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 の mRNA 発現を測定した

(B)前もって 100 IU/ml IFN- α による 6 時間の刺激を加えた BJ cell、あるいは無刺激の BJ cell を O cell と共培養した。24 時間後、細胞を回収し定量 PCR により IFN- β , OCT3/4 の mRNA 発現を測定した。

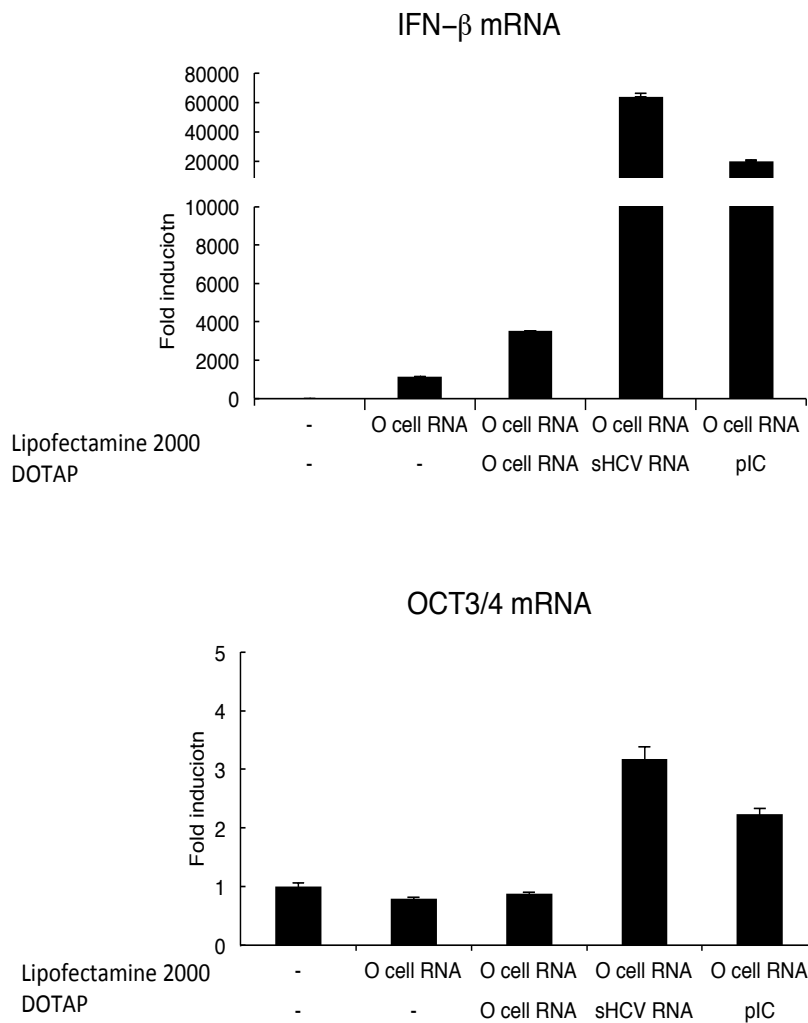


図 3.6 Lipofectamine2000、DOTAP を併用した RNA 刺激による OCT3/4 遺伝子の発現

BJ cell に対して、Lipofectamine2000 を用いて 0.05 μg O cell RNA で刺激する際に、DOTAP を用いて O cell RNA, 合成 HCV RNA, polyI:C のいずれか 0.05 μg での共刺激を加えた。12 時間後、細胞を回収し、定量 PCR により IFN- β , OCT3/4 の mRNA 発現を測定した。

Lipofectamine2000 /
DOTAP

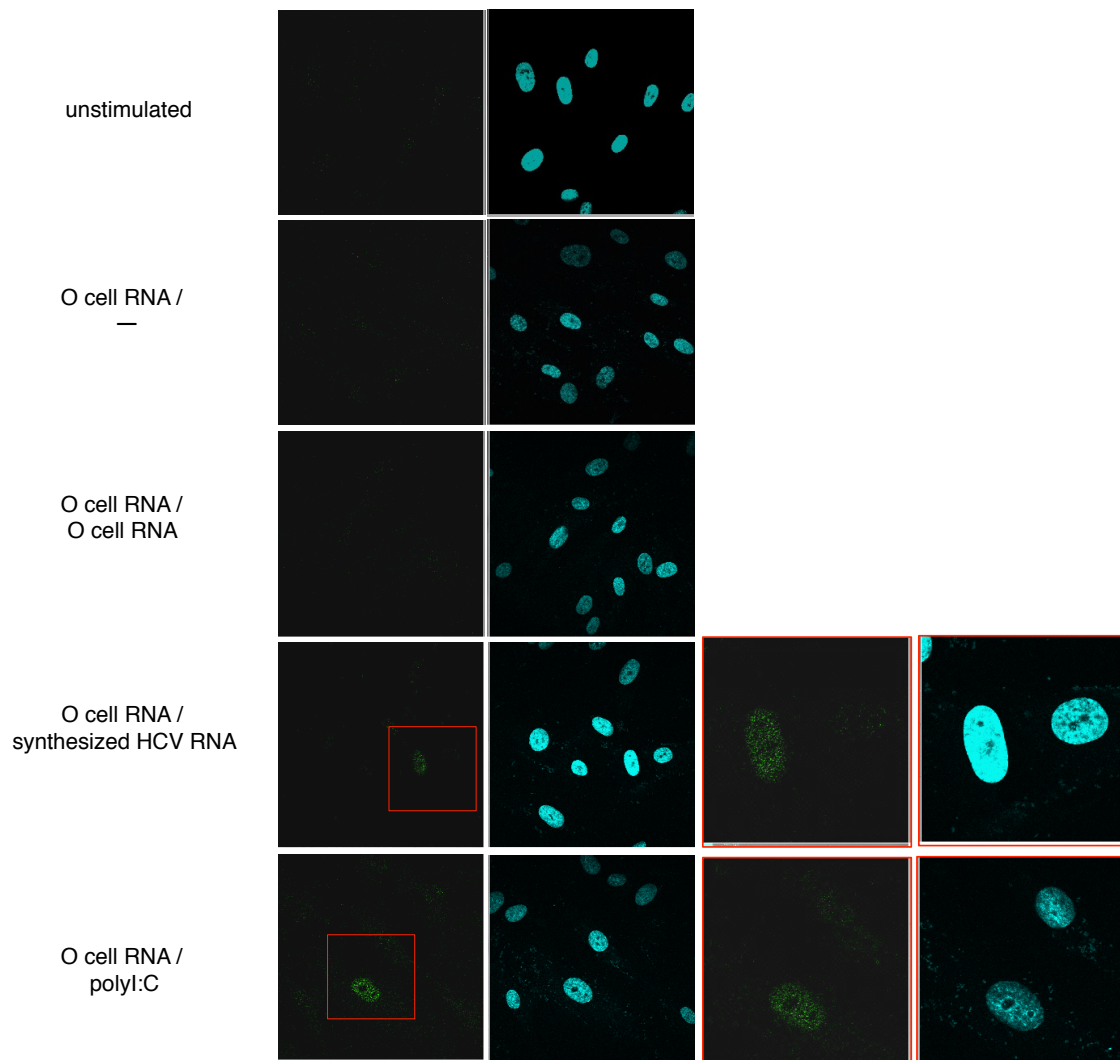


図 3.7 Lipofectamine 2000、DOTAP を併用した RNA 刺激による OCT3/4 タンパク質の発現

BJ cell に対して、Lipofectamine 2000 を用いて 0.05 μg O cell RNA で刺激する際に、DOTAP を用いて O cell RNA, 合成 HCV RNA, polyI:C のいずれか 0.05 μg での共刺激を加えた。12 時間後、細胞の固定、膜透過処理をし、抗 OCT3/4 ウサギ抗体を 1 次抗体に、Alexa488 標識抗ウサギ抗体を 2 次抗体として用いた免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により OCT3/4 のタンパク質の発現について解析した。

考察

本研究において、ヒト繊維芽細胞である BJ cell で、HCV RNA が polyI:C 同様に自然免疫を活性化し、OCT3/4 を含む未分化マーカー遺伝子の発現上昇を誘導することが明らかになった。Lipofectamine 2000 あるいは DOTAP を用いた細胞への核酸導入では Lipofectamine 2000 は細胞質内への核酸輸送、DOTAP はエンドソーム内への核酸輸送に用いられ^{64,65}、本研究では Lipofectamine を用いた RNA 刺激では細胞質内センサー RLR-IPS-1 経路、DOTAP を用いた RNA 刺激ではエンドソーム上の TLR3-TICAM-1 経路により認識、惹起される応答を評価している。Lipofectamine 2000 を用いて RLR により HCV RNA が認識されたときに、OCT3/4 を含む未分化マーカーの発現誘導が観察された。しかし、DOTAP を用いての TLR3 シグナル活性化では、いずれの刺激においても、未分化マーカー発現の誘導は見られなかった。一方で、Lipofectamine 2000 による RLR への O cell RNA 単独刺激では発現誘導されない未分化マーカー遺伝子が、DOTAP を用いて合成 HCV RNA または polyI:C により TLR3 も併せて刺激すると、発現誘導された。このとき IFN- β の発現上昇も著しく促進されていた。本研究において、RNA による未分化マーカー発現が誘導される際にはいずれも IFN- β の著しい発現上昇を伴っていた。

RLR 経路、TLR3 経路、I 型 IFN、これらの要因が未分化マーカー発現にどう作用するかは明らかとなっていない。これについて考えられることとして、未分化マーカー発現誘導自体は RLR-IPS-1 経路が専属的に担う一方で、これらの遺伝子発現の増強因子が TLR3-TICAM-1 経路で誘導されている可能性がある。あるいは未分化マーカー発現誘導には RLR, TLR3 両経路下で共通に動く因子が関わっており、これが過剰に働くことが未分化マーカー発現の引き金となっているのかもしれない。どちらの場合についても、IFN に依存적であるとも、非依存적であるとも考えられる。先の報告にあった TLR3 による iPS 細胞作成効率の上昇についても、その詳細な分子メカニズムは分かっていない⁶³。これらについて明らかにするために、現在検討中である OCT3/4 を含む未分化マーカーの発現への IFN シグナルの影響の有無を含め、今後、RNA を認識する自然免疫経路による細胞の脱分化メカニズムを解析していく。

HCV 感染での肝硬変、肝臓の線維化において、肝星細胞がコラーゲンを過剰分泌し、筋繊維芽細胞化する。BJ 細胞で観察された HCV RNA 刺激による未分化マーカーの発現誘導、OCT3/4 タンパク質の発現が、実際に細胞の脱分化を引き起こすか、あるいは肝星細胞においても同様に誘導されるかは現在未検討だが、ヒト肝星細胞は実験細胞株がいくつか樹立されていることから、今

後、肝星細胞由来細胞株を用いて検討を行う予定である。また、HCV が実際に肝星細胞内に侵入、感染するかは、現在明確にはなっていないが、浜松医科大学や国立感染症研究所にて、HCV の肝星細胞への感染の可能性が検討されている。

終章

本研究において、以下の知見が得られた。

1. マウス肝臓では HCV RNA に対して、IPS-1 依存的に III 型 IFN を産生する
2. 細胞質内の HCV RNA に対して、肝細胞、CD8+DC は IPS-1 依存的に III 型 IFN を産生する
3. CD8+DC は HCV 非感染性に TICAM-1 依存的に III 型 IFN を産生する
4. III 型 IFN レセプターである IL28R α は DC のなかでも CD8+DC 特異的に発現している
5. すくなくとも本研究での実験系では III 型 IFN は細胞性免疫の活性化を誘導しない
6. CD8+DC において、III 型 IFN 発現は III 型 IFN 自身によるポジティブフィードバック機構を持つ。
7. III 型 IFN は肝細胞において抗 HCV 活性を示す。
8. 繊維芽細胞 BJ cell において、HCV RNA 刺激に応答して、OCT3/4 を含む山中因子の遺伝子発現が誘導される。
9. BJ cell において、HCV RNA 刺激に応答して OCT3/4 の発現が誘導されるときには、著しい IFN- β の発現上昇が伴って観察される。

HCV 感染に対する III 型 IFN 産生には IPS-1 と TICAM-1 の 2 つの主要な経路が存在することが明らかとなった。IPS-1 は HCV 感染細胞の早い段階での細胞質内 RNA 認識による III 型 IFN 産生に重要である一方、TICAM-1 は、主にマウス CD8+DC またはヒト BDCA3+DC が非感染性に細胞外領域で HCV を認識し、III 型 IFN 産生をする際に重要であることが示唆され、二つに経路

が時空間的に異なる領域で重要な働きをしていることが予測される。また、I 型 IFN が、NK 細胞や CTL の活性化を担う一方で、III 型 IFN は自身のポジティブフィードバックループにより感染初期の局所で効率的に抗ウイルス因子を誘導し、HCV 排除に寄与する可能性が考えられる。

ところで、HCV 感染時の自然治癒、代表的な治療法である PEG-IFN(+リビリン併用)療法の治療効果に大きく関わるとされる、IFN- λ 3(IL-28B)遺伝子上流の一塩基多型をコードする領域は、現在では、新規の III 型 IFN ファミリーである IFN- λ 4 がコードされていることが明らかとなっている⁶⁶。IFN- λ 4 は III 型 IFN に共通するレセプターにより認識されることから III 型 IFN ファミリーに位置付けられているが、相同性が他の III 型 IFN に比べ低く、既知の III 型 IFN と同様の機能を持つかは不明である。前出の一塩基多型により、IFN- λ 4 が正常に転写翻訳されるかが規定されるが、PEG-IFN(+リビリン併用)療法との関連では、IFN- λ 4 が正常に転写翻訳される場合に、むしろ治療効果が見込めなくなるが、そのメカニズムは分かっていない。

マウスには IFN- λ 4 の遺伝子がコードされていないため、KO マウスを用いての IFN- λ 4 の産生経路や機能については未検討である。

HCV は感染の際、CD81、SRB-I、Claudin-1、Occludin 等のエントリーレセプターを介して肝細胞へ侵入するが⁶⁷⁻⁷⁰、HCV 感染患者や HCV 感染 Huh7 細胞株から単離した HCV RNA 含有エクソソームが、エントリーレセプター非依存的に、新たに肝細胞への HCV 感染を引き起こすと報告されている⁷¹。これにより、HCV はエントリーレセプターによる拘束を受けず、過去に報告された DC や B 細胞⁷²⁻⁷⁴を含め、様々な細胞へ侵入、作用することが示唆される。これらに関して、自然免疫応答の観点から、第 1 章では DC の HCV RNA による IFN 産生を検証したが、第 3 章では RNA 認識経路を介して HCV RNA が引き起こす細胞の脱分化の可能性について検討し、繊維芽細胞 BJ cell において、OCT3/4 を含む未分化マーカーの発現が誘導されることを見いだした。

HCV 感染でみられる悪性リンパ腫、自己免疫疾患、皮膚炎、腎炎、糖尿病などの様々な肝外疾患についても、HCV が直接働きかけている可能性があり、このとき、自然免疫の活性化が生体防御だけでなく、疾患の増悪因子となることも考えられる。また HCV を含め、HPV 等のウイルスは細胞の癌化を誘導するが近年、癌におけるがん幹細胞の存在が注目されている⁷⁵。ウイルス性発癌におけるがん幹細胞生成機構は不明であるが、本研究より示唆されるウイルス核酸認識による自然免疫経路を介した脱分化が、ウイルス性発癌の過程でがん幹細胞を生じさせる一因となっている可能性も考えられる。本研究をさらに発展させることで、今後、ウイルス発がんのメカニズムの解明に繋がることが期

待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始適切なご指導、御討論を賜りました北海道大学 大学院医学研究科 免疫学分野 瀬谷司特任教授、北海道大学 大学院医学研究科 免疫学分野 松本美佐子客員教授に深く感謝いたします。

本研究は熊本大学 大学院生命科学研究部 免疫学分野、押海裕之教授の御指導なしには成し得ませんでした。実験手技・研究の進め方を基礎から教えていただき、多くのことをご指導くださいました押海裕之教授に心から感謝いたします。

本論文を審査していただきました、北海道大学 大学院医学研究科 分子神経免疫学分野 村上正晃教授、北海道大学 大学院医学研究科 小児科分野 有賀正教授、北海道大学 大学院医学研究科 病原微生物分野 森松組子准教授に深く感謝いたします。

研究および様々な面で大変お世話になりました北海道大学 大学院医学研究科 免疫学分野の皆様には深く感謝いたします。

最後に、長い学生生活を見守り、精神的に支え続けてくれた両親に深く感謝します。

引用文献

1. Akira, S. & Takeda, K. Functions of Toll-like receptors: lessons from KO mice. *C. R. Biol.* **327**, 581–589 (2004).
2. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. a. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732–738 (2001).
3. Matsumoto, M. *et al.* Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 1364–1369 (2002).
4. Hemmi, H. *et al.* Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* **3**, 196–200 (2002).
5. Heil, F. Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science*. **303**, 1526–1529 (2004).
6. Hemmi, H., Kaisho, T., Takeda, K. & Akira, S. The Roles of Toll-Like Receptor 9, MyD88, and DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit in the Effects of Two Distinct CpG DNAs on Dendritic Cell Subsets. *J. Immunol.* **170**, 3059–3064 (2003).
7. Tatematsu, M., Nishikawa, F., Seya, T. & Matsumoto, M. Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA. *Nat. Commun.* **4**, 1833 (2013).
8. Oshiumi, H. *et al.* TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon- β induction. *Nat. Immunol.* **4**, 161–167 (2003).
9. Yamamoto, M. Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway. *Science*. **301**, 640–643 (2003).

10. Kawai, T. *et al.* Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin. *Immunity* **11**, 115–122 (1999).
11. Edwards, A. D. *et al.* Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 α ⁺ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur. J. Immunol.* **33**, 827–833 (2003).
12. Den Haan, J. M. M., Lehar, S. M. & Bevan, M. J. Cd8⁺ but Not Cd8⁻ Dendritic Cells Cross-Prime Cytotoxic T Cells in Vivo. *J. Exp. Med.* **192**, 1685–1696 (2000).
13. Schulz, O. *et al.* Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* **433**, 887–892 (2005).
14. Yoneyama, M. *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* **5**, 730–737 (2004).
15. Yoneyama, M. *et al.* Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. *J. Immunol.* **175**, 2851–2858 (2005).
16. Kawai, T. *et al.* IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* **6**, 981–988 (2005).
17. Seth, R. B., Sun, L., Ea, C.-K. & Chen, Z. J. Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein that Activates NF- κ B and IRF3. *Cell* **122**, 669–682 (2005).
18. Xu, L.-G. *et al.* VISA Is an Adapter Protein Required for Virus-Triggered IFN- β Signaling. *Mol. Cell* **19**, 727–740 (2005).
19. Meylan, E. *et al.* Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167–1172 (2005).

20. Kato, H. *et al.* Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**, 101–105 (2006).
21. Saito, T. *et al.* Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* **454**, 523–527 (2008).
22. Abe, Y. *et al.* The Toll-Like Receptor 3-Mediated Antiviral Response Is Important for Protection against Poliovirus Infection in Poliovirus Receptor Transgenic Mice. *J. Virol.* **86**, 185–194 (2012).
23. Oshiumi, H. *et al.* The TLR3/TICAM-1 Pathway Is Mandatory for Innate Immune Responses to Poliovirus Infection. *J. Immunol.* **187**, 5320–5327 (2011).
24. Zhang, S.-Y. *et al.* TLR3 Deficiency in Patients with Herpes Simplex Encephalitis. *Science*. **317**, 1522–1527 (2007).
25. Wang, T. *et al.* Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat. Med.* **10**, 1366–1373 (2004).
26. Daffis, S. *et al.* Toll-Like Receptor 3 Has a Protective Role against West Nile Virus Infection. *J. Virol.* **82**, 10349–10358 (2008).
27. Kotenko, S. V *et al.* IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* **4**, 69–77 (2003).
28. Sheppard, P. *et al.* IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.* **4**, 63–68 (2003).
29. Ge, D. *et al.* Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* **461**, 399–401 (2009).
30. Thomas, D. L. *et al.* Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* **461**, 798–801 (2009).

31. Tanaka, Y. *et al.* Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat. Genet.* **41**, 1105–1109 (2009).
32. Suppiah, V. *et al.* IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy. *Nat. Genet.* **41**, 1100–1104 (2009).
33. Yoshio, S. *et al.* Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3) + dendritic cells are a potent producer of interferon- λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology* **57**, 1705–1715 (2013).
34. Lauterbach, H. *et al.* Mouse CD8 + DCs and human BDCA3+ DCs are major producers of IFN- γ in response to poly IC. *J. Exp. Med.* **207**, 2703–2717 (2010).
35. Le Bon, A. *et al.* Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat. Immunol.* **4**, 1009–1015 (2003).
36. McCartney, S. *et al.* Distinct and complementary functions of MDA5 and TLR3 in poly(I:C)-mediated activation of mouse NK cells. *J. Exp. Med.* **206**, 2967–2976 (2009).
37. Ebihara, T. *et al.* Hepatitis C virus-infected hepatocytes extrinsically modulate dendritic cell maturation to activate T cells and natural killer cells. *Hepatology* **48**, 48–58 (2008).
38. Jongbloed, S. L. *et al.* Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med.* **207**, 1247–1260 (2010).
39. Ikeda, M. *et al.* Efficient replication of a full-length hepatitis C virus genome, strain O, in cell culture, and development of a luciferase reporter system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 1350–1359 (2005).

40. Liu, F., Song, Y. K. & Liu, D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* **6**, 1258–1266 (1999).
41. Tatematsu, M. *et al.* A Molecular Mechanism for Toll-IL-1 Receptor Domain-containing Adaptor Molecule-1-mediated IRF-3 Activation. *J. Biol. Chem.* **285**, 20128–20136 (2010).
42. Mizushima, S. & Nagata, S. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res.* **18**, 5322–5322 (1990).
43. Fujita, T., Sakakibara, J. & Sudo, Y. Evidence for a nuclear factor(s), IRF-1, mediating induction and silencing properties to human IFN- β gene regulatory elements. *EMBO ...* **7**, 3397–3405 (1988).
44. Zhang, X. *et al.* Cutting Edge: Ku70 Is a Novel Cytosolic DNA Sensor That Induces Type III Rather Than Type I IFN. *J. Immunol.* **186**, 4541–4545 (2011).
45. Oshiumi, H. *et al.* Hepatitis C Virus Core Protein Abrogates the DDX3 Function That Enhances IPS-1-Mediated IFN- β Induction. *PLoS One* **5**, e14258 (2010).
46. Goutagny, N. *et al.* Evidence of Viral Replication in Circulating Dendritic Cells during Hepatitis C Virus Infection. *J. Infect. Dis.* **187**, 1951–1958 (2003).
47. SANSONNO, D. *et al.* Detection of hepatitis C virus (HCV) proteins by immunofluorescence and HCV RNA genomic sequences by non-isotopic in situ hybridization in bone marrow and peripheral blood mononuclear cells of chronically HCV-infected patients. *Clin. Exp. Immunol.* **103**, 414–422 (2007).
48. Pham, T. N. Q. *et al.* Hepatitis C Virus Persistence after Spontaneous or Treatment-Induced Resolution of Hepatitis C. *J. Virol.* **78**, 5867–5874 (2004).

49. Itoh, K. *et al.* The Clathrin-Mediated Endocytic Pathway Participates in dsRNA-Induced IFN- Production. *J. Immunol.* **181**, 5522–5529 (2008).
50. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 654–659 (2007).
51. Dreux, M. *et al.* Short-Range Exosomal Transfer of Viral RNA from Infected Cells to Plasmacytoid Dendritic Cells Triggers Innate Immunity. *Cell Host Microbe* **12**, 558–570 (2012).
52. Morelli, A. E. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* **104**, 3257–3266 (2004).
53. Matsumoto, M. *et al.* Subcellular Localization of Toll-Like Receptor 3 in Human Dendritic Cells. *J. Immunol.* **171**, 3154–3162 (2003).
54. Li, X.-D. *et al.* Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 17717–17722 (2005).
55. Aly, H. H. *et al.* Development of Mouse Hepatocyte Lines Permissive for Hepatitis C Virus (HCV). *PLoS One* **6**, e21284 (2011).
56. Marcello, T. *et al.* Interferons α and λ Inhibit Hepatitis C Virus Replication With Distinct Signal Transduction and Gene Regulation Kinetics. *Gastroenterology* **131**, 1887–1898 (2006).
57. Mennechet, F. J. D. Interferon- γ -treated dendritic cells specifically induce proliferation of FOXP3-expressing suppressor T cells. *Blood* **107**, 4417–4423 (2006).
58. 大塚基之 他. HCV と発癌. ウイルス **52**, 295–300 (2015).

59. Arzumanyan, A., Reis, H. M. G. P. V. & Feitelson, M. a. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 123–135 (2013).
60. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
61. Takahashi, K. *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
62. Kim, D. *et al.* Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins. *Cell Stem Cell* **4**, 472–476 (2009).
63. Lee, J. *et al.* Activation of Innate Immunity Is Required for Efficient Nuclear Reprogramming. *Cell* **151**, 547–558 (2012).
64. Matsumoto, M. *et al.* Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and CTL activation without significant cytokine production in vivo. *Nat. Commun.* **6**, 6280 (2015).
65. Coch, C. *et al.* A Human In Vitro Whole Blood Assay to Predict the Systemic Cytokine Response to Therapeutic Oligonucleotides Including siRNA. *PLoS One* **8**, e71057 (2013).
66. Prokunina-Olsson, L. *et al.* A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat. Genet.* **45**, 164–171 (2013).
67. Bartosch, B. *et al.* Cell Entry of Hepatitis C Virus Requires a Set of Co-receptors That Include the CD81 Tetraspanin and the SR-B1 Scavenger Receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 41624–41630 (2003).
68. Hsu, M. *et al.* Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 7271–7276 (2003).

69. Evans, M. J. *et al.* Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**, 801–805 (2007).
70. Ploss, A. *et al.* Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **457**, 882–886 (2009).
71. Bukong, T. N. *et al.* Exosomes from Hepatitis C Infected Patients Transmit HCV Infection and Contain Replication Competent Viral RNA in Complex with Ago2-miR122-HSP90. *PLoS Pathog.* **10**, e1004424 (2014).
72. Sung, V. M.-H. *et al.* Establishment of B-Cell Lymphoma Cell Lines Persistently Infected with Hepatitis C Virus In Vivo and In Vitro: the Apoptotic Effects of Virus Infection. *J. Virol.* **77**, 2134–2146 (2003).
73. Garry, PhD, R. F. *et al.* Detection of Hepatitis C Virus RNA Sequences in B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **113**, 391–398 (2000).
74. Ito, M. *et al.* Peripheral B Cells May Serve as a Reservoir for Persistent Hepatitis C Virus Infection. *J. Innate Immun.* **2**, 607–617 (2010).
75. Chiocca, E. A., Blair, D. & Mufson, R. A. Oncolytic Viruses Targeting Tumor Stem Cells. *Cancer Res.* **74**, 3396–3398 (2014).