

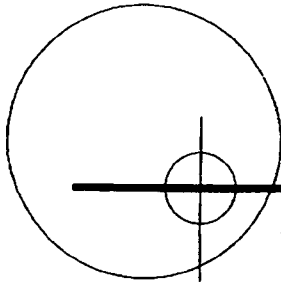
- [23] P.M. Kimball, R.H. Kerman, B.D. Kahan, Sensitivity of intracellular signals responsible for cell cycle progression to cyclosporine, *Transplantation* 49 (1990) 186–191.
- [24] P.M. Colombani, E.C. Bright, M. Wells, A.D. Hess, Drug-drug interaction between cyclosporine and agents affecting calcium-dependent lymphocyte proliferation, *Transplant. Proc.* 21 (1989) 840–841.
- [25] J. Zhong, P. Gastaminza, G. Cheng, et al., Robust hepatitis C virus infection in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 9294–9299.
- [26] H. Taniguchi, N. Kato, M. Otsuka, et al., Hepatitis C virus core protein upregulates transforming growth factor-beta 1 transcription, *J. Med. Virol.* 72 (2004) 52–59.
- [27] A. von Bubnoff, K.W. Cho, Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev. Biol.* 239 (2001) 1–14.
- [28] S. Goodbourn, L. Didcock, R.E. Randall, Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures, *J. Gen. Virol.* 81 (2000) 2341–2364.
- [29] G.C. Sen, Viruses and interferons, *Annu. Rev. Microbiol.* 55 (2001) 255–281.
- [30] R.H. Silverman, Fascination with 2-5A-dependent RNase: a unique enzyme that functions in interferon action, *J. Interferon Res.* 14 (1994) 101–104.
- [31] G.R. Stark, I.M. Kerr, B.R. Williams, R.H. Silverman, R.D. Schreiber, How cells respond to interferons, *Ann. Rev. Biochem.* 67 (1998) 227–264.
- [32] V. Chieux, D. Hober, J. Harvey, et al., The MxA protein levels in whole blood lysates of patients with various viral infections, *J. Virol. Methods* 70 (1998) 183–191.
- [33] A. Nohe, E. Keating, P. Knaus, N.O. Petersen, Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors, *Cell Signal.* 16 (2004) 291–299.
- [34] D.V. Kalvakolanu, Alternate interferon signaling pathways, *Pharmacol. Therap.* 100 (2003) 1–29.

# 分子消化器病

別刷

---

発行：株式会社 先端医学社  
〒103-0007 東京都中央区日本橋浜町 2-17-8 KDX浜町ビル



## 小胞体ストレスによるシグナル伝達

中川美奈\*\*\* 坂本直哉\*\*\* 渡辺 守\*

### はじめに

細胞で合成される蛋白質の一部は、細胞内の小胞体で合成されるが、正常に機能する蛋白質になるためには、正しく立体的に折り畳まれる必要があり、小胞体に存在する“分子シャペロン”とよばれる“介添え人”のようなはたらきをする分子がこれを助けている。しかし、細胞内外のストレスにより、“介添え人”の力をもってしても正しく折り畳まれない蛋白質が出現することがあり、このような異常な蛋白質が小胞体内に蓄積すると“小胞体ストレス”とよばれる状態となる。小胞体ストレスに対し、細胞はさまざまなシグナル伝達を介して自らの生死に深くかかわっており、このような小胞体における蛋白質の品質管理機構の破綻や細胞死が種々の疾患に関与していることが最近報告されている。

本稿では、小胞体ストレスによるシグナル伝達についてこれまでの知見を概説すると同時に、小胞体ストレスの関与が報告されている疾患についてもふれたい。

### KEY WORDS

- ◎ 小胞体ストレス
- ◎ 分子シャペロン
- ◎ 小胞体ストレス応答 (UPR)
- ◎ 小胞体関連分解 (ERAD)
- ◎ アポトーシス

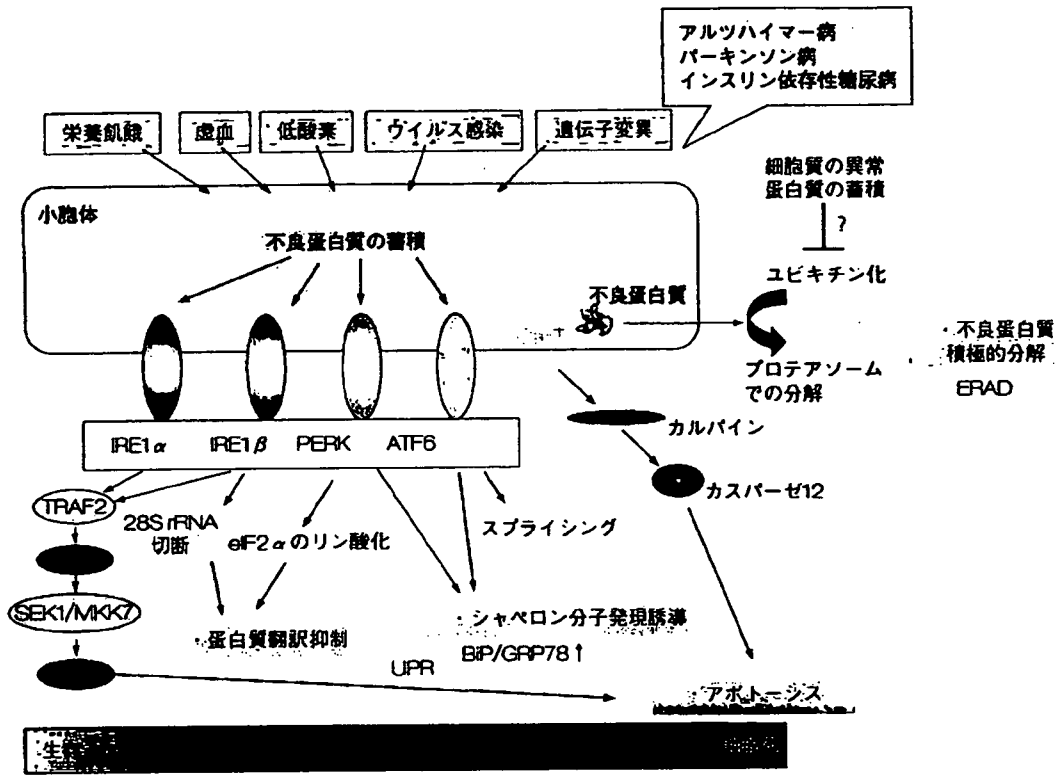
### 小胞体ストレスについて

小胞体は細胞質に広がる1枚の膜からできており、管状または扁平な袋状の構造がつらな迷路のような構造をしている。その容積は核と同じかそれ以上を占める大きなオルガネラであり、その外観から滑面小胞体と粗面小胞体に分けられる。リボソームが着いていない滑面小胞体では、ステロイドホルモン、リン脂質、不飽和脂肪酸の生合成などがおこなわれている。一方、粗面小胞体は膜面に蛋白質合成の場であるリボソームが多数附着しており、合成された蛋白質は小胞体内腔あるいは小胞体膜に輸送され、シグナル配列の切断や糖鎖付加といった種々の修飾をうける。このような蛋白質の高次構造形成は小胞体に存在する分子シャペロンによって助けられ、小胞体で正しく折り畳まれた蛋白質はゴルジ体へと運ばれて更なる修飾を受ける。しかし、正しい折り畳み構造をとれなかった不良蛋白質は、正しい立体構造をとるまで小胞体にとどめられることになる。

ところで、生命維持の基本戦略として細胞はさまざまな外界からの刺激に対して応答するはたらきをもっている。小胞体においても例外ではなく、外界からのストレス刺激に対する応答機構に関してはこれまで多くの報告がなされてきた<sup>1)~6)</sup>。

生成途中の蛋白質が、栄養飢餓や虚血、低酸素、熱、ウイルス感染、遺伝子変異などの種々のストレスにさら

\* NAKAGAWA Mina, SAKAMOTO Naoya, WATANABE Mamoru / 東京医科歯科大学消化器内科。 \*\* 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子肝炎制御学講座



図① 小胞体ストレスによるシグナル伝達  
 哺乳類において IRE 1, PERK, ATF 6 の 3 つのストレスセンサーが報告されており、細胞の恒常性維持のために 4 つの応答機構が備わっている。すなわち、①PERK による eF2 $\alpha$  のリン酸化を介した翻訳停止、②PERK, ATF 6 を介した小胞体シャペロン分子の発現誘導、③ERAD を介した不良蛋白質の積極的分解であり、不良蛋白質を修復除去し小胞体の破綻を回避しようとする。回避しきれない過度の小胞体ストレスが加わると、④転写因子 CHOP の発現誘導、カスパーゼ 12 の活性化、IRE 1 を介した JNK の活性化によりアポトーシスを誘導する。  
 (一條秀憲監修, 2002<sup>2)</sup>より改変引用)

されるとその影響を強く受け、正常に折り畳まれずに、異常な折り畳み構造をもつ蛋白質 (unfolded protein) となってしまう。先に述べたように、不良蛋白質は正しい立体構造をとるまで小胞体にとどめられるため、小胞体内には不良蛋白質が蓄積され、小胞体ストレスが惹起される。

小胞体ストレスが惹起された細胞は、多様なシグナル伝達を介したストレス応答機構により生存から細胞死に至るまで迅速かつ的確に誘導する仕組みが備わっている。つまり、不良蛋白質の蓄積という異常事態に対処するためには不良蛋白質を巻き戻して正常な形に修復するか、あるいは分解して小胞体内から除去しなければならないので、細胞は機能の再獲得をめざして不良蛋白質の修復除去作業をおこなうことになる。しかし、こうした修復除去作業をもってしても小胞体ストレスの状態回避

が不可能であると判断された場合は、個体をよりよい状態に保つため積極的な死であるアポトーシスを選択し、周囲の細胞へ被害を及ぼすことなく個体としての恒常性維持に貢献するのである (図①)<sup>2)</sup>。

### 恒常性回復のための基本戦略

#### 小胞体ストレスによるシグナル伝達系

小胞体膜上にはストレスシグナル伝達に参与する膜蛋白質 (ストレスセンサー) が存在することが報告されているが、哺乳類においては IRE 1( $\alpha, \beta$ ), PERK, ATF 6 の 3 つのストレスセンサーがこれまで報告され、これらを介した 4 つの機構が細胞の恒常性維持のため中心的な役割を演じていると考えられている<sup>1)</sup>。

第 1 の機構は PERK による eF2 $\alpha$  リン酸化を介した翻訳抑制である。PERK は小胞体ストレスが惹起され

ると多量体化して活性化され、eIF2 $\alpha$ をリン酸化することが報告されており<sup>2)</sup>。mRNAから蛋白質の翻訳が開始される際に必要な分子として知られるeIF2 $\alpha$ は、リン酸化されるとその活性が大きく低下し、翻訳の開始段階が一律に阻害される。不良蛋白質がこれ以上つくれ、蓄積するのを阻止することで小胞体の負荷を軽減するのである。小胞体ストレスに応答した翻訳抑制機構において、PERK経路が主要な役割を担うことがPERKノックアウトマウスの解析から示されているが<sup>3)</sup>、IRE1 $\beta$ を介する経路も存在することが報告されている<sup>3)</sup>。

第2の機構はPERK、ATF6<sup>9)</sup>を介した小胞体シャペロン分子の発現誘導である。小胞体内に存在する分子シャペロンや、蛋白質の折り畳みに必要な酵素を転写レベルで誘導して、小胞体内の不良蛋白質の巻き戻しをはかる応答である。これにより、不良蛋白質を処理するための分子シャペロンや酵素が迅速かつ大量につくられ、小胞体の処理能力が大幅にアップすることになる。

第3の機構は小胞体関連分解(endoplasmic reticulum-associated degradation: ERAD)を介した不良蛋白質の積極的分解である。不良蛋白質は小胞体膜上の親水性チャンネルを通して小胞体の外に汲みだされ、細胞質でユビキチン化され、プロテアソーム蛋白質分解系により小さなペプチドに分解される。処理しきれない不良蛋白質はこうして細胞質に追放され排除される。

通常、翻訳停止と分子シャペロンの誘導をあわせて小胞体ストレス応答(unfolded protein response: UPR)と総括し、ERAD(分解)とは区別されるようであるが、UPRとERADは協調的かつ相互補完的に作用して、不良蛋白質蓄積による小胞体の破綻を可能な限り回避しようとしている<sup>7)</sup>。

回避しきれない過度の小胞体ストレスが加わると、第4の機構ははたらく。すなわち、転写因子CHOPの発現誘導、カスパーゼ12の活性化およびIRE1を介したc-Jun N末端キナーゼ(JNK)の活性化によるアポトーシスの誘導である<sup>9)11)</sup>。CHOPは通常時の発現レベルが低く、小胞体ストレス時にきわめて高度に誘導される遺伝子であるが、その誘導に関してはATF6とPERKの両経路が関与しており、両者は協調的に作用するとされるが、PERK経路の寄与の方が大きいことが報告されてい

る<sup>12)13)</sup>。これによりUPRからアポトーシスへのシグナルも出ていることが示され、小胞体ストレスに対する細胞の基本戦略である4つの応答機構すべてが相互に密接に関与し、細胞の恒常性維持のため機能していることが次第に明らかとなってきた。

## 小胞体ストレスと疾患

近年、蛋白質のフォールディング異常がさまざまな疾患の原因になっていることが明らかになり、それらの疾患を“蛋白質フォールディング異常病”と総称するようになった<sup>1)</sup>。代表的な疾患として、アルツハイマー病やパーキンソン病、プリオン病などの神経変性疾患、脳虚血、糖尿病、ウイルス疾患などがあり、その発症に小胞体ストレスが密接にかかわることが示唆されている。

アルツハイマー病をはじめ、神経変性疾患の共通点は、神経細胞内あるいはその周囲組織に疾患ごとに特徴的な異常蛋白質の蓄積がみられることと神経細胞死がみられることである。アルツハイマー病は最もよく知られた神経変性疾患の1つであるが、アミロイド $\beta$ 蛋白質とよばれる不溶性の蛋白質が神経細胞の間隙に蓄積してできた老人斑と、神経細胞内の神経原線維変化が特徴的な病理所見である。1997年に変異プレセニリン(PS)1が神経細胞のストレス抵抗性を弱めることが報告され<sup>14)</sup>、さらにPS1変異体によって誘導される細胞死の本態は、小胞体ストレス応答機構の障害によることが報告された<sup>15)16)</sup>。パーキンソン病もアルツハイマー病に次いで罹患率の高い神経変性疾患であるが、その主因は中脳黒質ドーパミン神経の変性による脳内ドーパミン含量の減少によることが明らかとなっている。常染色体劣性若年性パーキンソン病の原因遺伝子parkinは、細胞内蛋白質分解を担うユビキチン-プロテアソーム経路にかかわるユビキチンリガーゼであることが明らかとなり、分解すべき基質蛋白質を選択的に認識する役割を担うユビキチンリガーゼとしての活性喪失がドーパミン神経変性の原因であると推測されている<sup>17)19)</sup>。プリオン病は伝達性海綿状脳症(transmissible spongiform encephalopathy: TSE)ともいわれる致死性の神経変性疾患であり、遺伝性、自然発症に加えて伝染性があるということが知られている。プリオン病は、異常型(伝播型)のプリオン蛋

白質と接触した正常な折り畳み構造をもつプリオン蛋白質が異常型に変わってしまうことによって伝播することが報告されているが、まだまだ不明な点が多く、今後のシャペロン研究により更なる病態解明が待たれる疾患の1つである。

虚血は臓器を貫流する血管の閉塞によって引き起こされ、これにより種々のストレス環境が生じる。虚血は細胞内エネルギー代謝を障害し細胞内 ATP を枯渇させるばかりでなく、嫌気性解糖による pH の低下、活性酸素の発生などにより、さらに細胞内の蛋白質の変性を促進する。従来まで、虚血による臓器障害は虚血によって引き起こされたエネルギー代謝の崩壊による細胞死であると考えられてきたが、脳虚血における熱ショック蛋白質の発現が報告されて以来<sup>20)</sup>、心臓や腎臓における虚血に際しても熱ショック蛋白質の発現が報告され、虚血による細胞死を虚血ストレスに対して細胞が起こした負荷応答の最終像であると考えられるようになってきた。虚血に対する防御因子として熱ショック蛋白質や小胞体の分子シャペロン（ストレス蛋白質）が多量に誘導され、細胞内蛋白質の非可逆的な変性を防ぐと考えられているが、これらストレス蛋白質の総動員をもってしても対応できないような強い虚血が起こった場合は、細胞は自ら死を選ぶことになる。

糖尿病についても小胞体ストレスとの関連が報告されている。血糖値を調節するホルモンであるインスリンの合成は小胞体でおこなわれる。糖尿病は膵β細胞障害によるインスリン分泌の低下あるいは肝臓、骨格筋、脂肪などでのインスリン抵抗性により発症する疾患であるが、インスリン分泌のためにきわめて発達した小胞体をもつ膵β細胞は小胞体ストレスに脆弱で、小胞体ストレスを介した膵β細胞死が糖尿病発症に関与することが明らかになりつつある<sup>21)</sup>。また、膵β細胞死を原因とする1型糖尿病だけでなく、インスリン抵抗性が関与する2型糖尿病も小胞体ストレスとの関与が報告されており<sup>22)</sup>、小胞体ストレスシグナルがインスリンシグナルを調節してインスリン抵抗性と関連する可能性も示唆されている。小胞体ストレスを基軸とした研究は、糖尿病発症の解明のみならず、新たな診断、治療へと結びつく可能性が期待できる。

92(370)

肝炎ウイルスや白血病ウイルスなど一部のウイルス感染症が小胞体ストレスを惹起することも報告されている<sup>23)~24)</sup>。C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus : HCV) を例にとってみると、HCV は感染細胞に小胞体ストレスを惹起し細胞内のシグナル伝達を活性化することが報告されているが<sup>25)</sup>、この際 IRE1-XBP1 という翻訳抑制経路を抑えることで、ウイルス蛋白質の発現を促進して持続感染をはかっていることや<sup>26)</sup>、蛋白質の糖鎖付加を阻害して感染細胞表面の主要組織適合複合体 (major histocompatibility complex : MHC) 抗原の発現を抑制し、宿主細胞の免疫監視機構から逃れている可能性が示唆されている<sup>27)</sup>。

筆者らの検討でも、HCV 複製増殖と小胞体ストレスが密接に関与していることが示唆されている。これまでわれわれ<sup>28)29)</sup>は、HCV レプリコン増殖が免疫抑制剤であるシクロスポリン A により抑制されることを報告し、抗ウイルス効果の機序としてシクロスポリン A の細胞内レセプターであるシクロフィリンが関与していることを報告した。シクロフィリンは蛋白質の折り畳みを助けるシャペロン機能をもった酵素でシクロスポリン A と結合することで活性が阻害される。シクロフィリンの基質については十分明らかとされていないが、直接あるいは間接的に HCV 蛋白質の形成に関与していることが予想され現在検討を進めている。また、小胞体内のカルシウム枯渇作用を有するグプシガルギンと還元剤であるメルカプトエタノールによりレプリコン増殖抑制が強く認められることが確認され、ある種の小胞体ストレスが HCV の複製増殖に大きな影響を与えることが示された (図 2)<sup>29)</sup>。HCV の持続感染や炎症、発癌に関して、小胞体ストレスから病態にせまることは今後の新規薬剤の開発に大きく寄与するものと期待される。

## おわりに

小胞体ストレスに関しては、これまで多くのすばらしい知見が一流雑誌で報告され、現在もおお最先端の進歩がわが国を含めて多くの研究者の手によりもたらされている<sup>30)~32)</sup>。筆者ら<sup>7)33)</sup>は HCV の研究をしているなかで、小胞体ストレスという未知なる世界に興味を覚え、その精緻なるシステムの存在を知った。

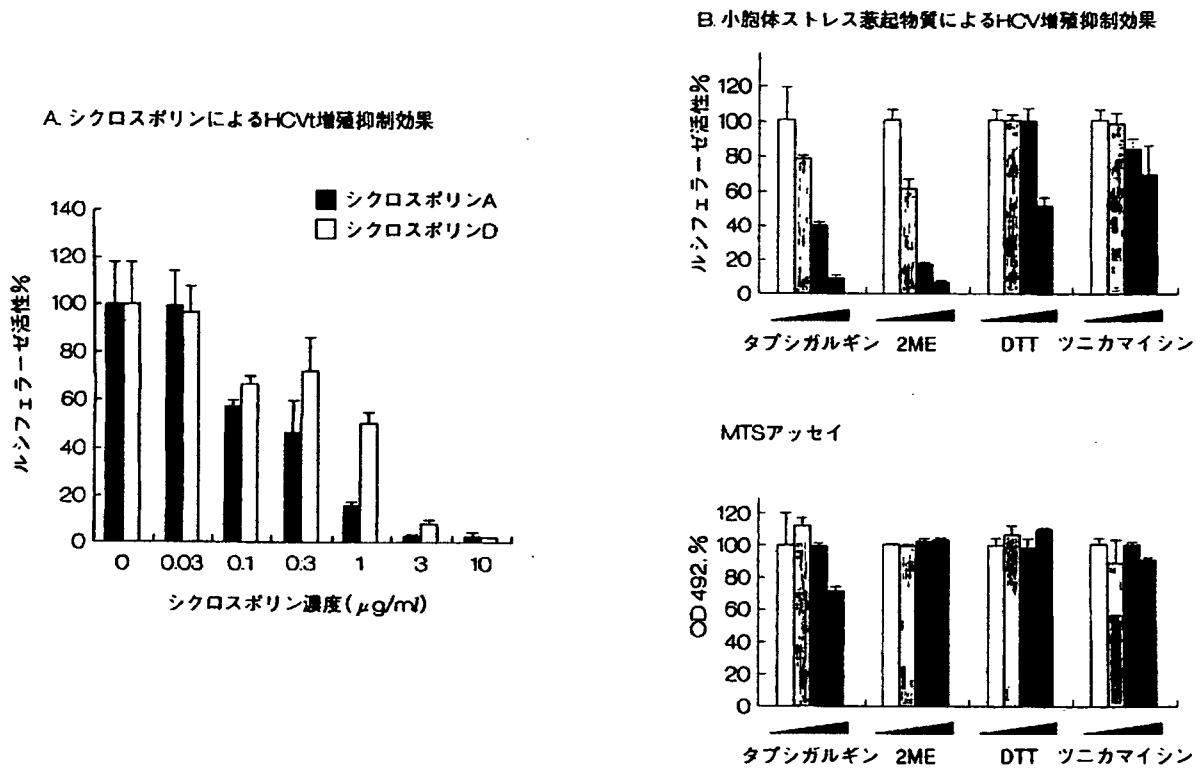


図2 HCV複製増殖と小胞体ストレス (A) シクロスポリンDは免疫抑制系であるカルシニューリンの阻害作用は弱いながらもシクロフィリン結合能が保たれている化合物だが、シクロスポリンA同様の抗ウイルス効果を示す。(B) 小胞体ストレス惹起物質である、タブシガルギン、メルカプトエタノール(2ME)、DTTおよびツニカマイシンのレプリコン増殖への影響を検討したところ、小胞体内のカルシウム枯渇作用を有するタブシガルギンと還元剤である2MEにより濃度依存性にレプリコンの特異的な増殖抑制効果が認められた。

(Nakagawa M *et al.* 2005<sup>20)</sup>より改変引用)

本稿のテーマである小胞体ストレスによるシグナル伝達とは、恒常性維持のために細胞がとるべき基本戦略の1つであり、相互に協調する4つの応答機構により機能の再獲得から細胞死まで、細胞の運命そのものを左右するものである。その病態から“蛋白質フォールディング異常病”と判断される疾患に対しては、蛋白質の品質管理機構そのものを修復補助するような化合物の発見をめざすことで治療法への道がひらける可能性があり、今後ますますの発展が期待される。



文献

1) Yoshida H : ER stress and disease. *FEBS J* 274 : 630-658. 2007  
 2) Harding HP, Zhang Y, Ron D : Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resi-

dent kinase. *Nature* 397 : 271-274, 1999

3) Travers KJ, Patil CK, Walter P *et al* : Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101 : 249-258. 2000  
 4) Mori K : Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 101 : 451-454. 2000  
 5) Ma Y, Hendershot LM : The Unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell* 107 : 827-830. 2001  
 6) Yoshida H, Matsui T, Mori K *et al* : XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107 : 881-891. 2001  
 7) 一條秀憲監修 : 小胞体ストレスとアポトーシス. *細胞工學* 21 : 360-394. 2002  
 8) Harding HP, Zhang Y, Ron D *et al* : Perk is essential for translational regulation and cell survival during the un-

- folded protein response. *Mol Cell* 5 : 897-904, 2000
- 9) Iwawaki T, Hosoda A, Kohno K *et al* : Translational control by the IER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nat Cell Biol* 3 : 158-164, 2001
  - 10) Haze K, Yoshida H, Mori K *et al* : Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 10 : 3787-3799, 1999
  - 11) Breckenridge DG, Germain M, Shore GC *et al* : Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22 : 8608-8618, 2003
  - 12) Yoshida H, Okada T, Mori K *et al* : ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the *cis*-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 20 : 6755-6767, 2000
  - 13) Okada T, Yoshida H, Mori K *et al* : Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J* 366 : 585-594, 2002
  - 14) Guo Q, Sopher BL, Mattson MP *et al* : Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid  $\beta$ -peptide : involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci* 17 : 4212-4222, 1997
  - 15) Katayama T, Imaizumi K, Tohyama M *et al* : Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 1 : 479-485, 1999
  - 16) Katayama T, Imaizumi K, Tohyama M *et al* : Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutations. *J Biol Chem* 276 : 43446-43454, 2001
  - 17) Shimura H, Hattori N, Suzuki T *et al* : Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet.* 25 : 302-305, 2000
  - 18) Imai Y, Soda M, Takahashi R : Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J Biol Chem* 275 : 35661-35664, 2000
  - 19) Zhang Y, Gao J, Dawson TM *et al* : Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 : 13354-13359, 2000
  - 20) Nowak TS Jr : Synthesis of a stress protein following transient ischemia in the gerbil. *J Neurochem* 45 : 1635-1641, 1985
  - 21) Ozcan U, Cao Q, Hotamisligil GS *et al* : Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306 : 457-461, 2004
  - 22) Wang HC, Chang WT, Su JJ *et al* : Hepatitis B virus pre-S2 mutant upregulates cyclin A expression and induces nodular proliferation of hepatocytes. *Hepatology* 41 : 761-770, 2005
  - 23) Yu CY, Hsu YW, Lin YL *et al* : Flavivirus infection activates XBP1 pathway of the unfolded protein response to cope with endoplasmic reticulum stress. *J Virol* 80 : 11868-11880, 2006
  - 24) Dimcheff DE, Volkert LG, Lynch WP *et al* : Gene expression profiling of microglia infected by a highly neurovirulent murine leukemia virus : implications for neuropathogenesis. *Retrovirology* 3 : 26, 2006
  - 25) Tardif KD, Mori K, Siddiqui A : Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway. *J Virol* 76 : 7453-7459, 2002
  - 26) Tardif KD, Mori K, Siddiqui A *et al* : Hepatitis C virus suppresses the IRE1-XBP1 pathway of the unfolded protein response. *J Biol Chem* 279 : 17158-17164, 2004
  - 27) Tardif KD, Siddiqui A : Cell surface expression of major histocompatibility complex class I molecules is reduced in hepatitis C virus subgenomic replicon-expressing cells. *J Virol* 77 : 11644-11650, 2003
  - 28) Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M *et al* : Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun* 313 : 42-47, 2004
  - 29) Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M *et al* : Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin A is mediated by blockade of cyclophilins. *Gastroenterology* 129 : 1031-1041, 2005
  - 30) Puthalakath H, Akira S, Strasser A *et al* : ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129 : 1337-1349, 2007
  - 31) Ozcan U, Yilmaz E, Hotamisligil GS *et al* : Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 313 : 1137-1140, 2006
  - 32) Oyadomari S, Yun C, Ron D *et al* : Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload. *Cell* 126 : 727-739, 2006
  - 33) 永田和宏, 森 正敬, 吉田賢右共編 : 分子シャペロンによる細胞機能制御. シュプリンガー・フェアラーク東京 2001



---

---

ウイルス性慢性肝炎：診断と治療の進歩

---

---

IV. C型慢性肝炎の抗ウイルス療法  
2. C型慢性肝炎の進展と治療抵抗性  
1) ウイルス変異の観点から

坂本 直哉

日本内科学会雑誌 第97巻 第1号別刷

2008年1月10日

## トピックス

#### IV. C型慢性肝炎の抗ウイルス療法

### 2. C型慢性肝炎の進展と治療抵抗性

## 1) ウイルス変異の観点から

坂本 直哉

## 要 旨

C型肝炎ウイルス (HCV) は変位速度が速く、慢性持続感染の機構のひとつと考えられる。日本に多いゲノタイプ1型は2型に比べインターフェロン治療抵抗性である。ウイルスゲノムのコア領域・NS5A領域にインターフェロン治療の感受性を規定する部位が存在する。今後ウイルス蛋白を標的とした治療薬が登場するがウイルス耐性変異の克服が課題となる。

〔J内会誌 97: 64~68, 2008〕

**Key words** : ISDR (インターフェロン感受性決定領域), ゲノタイプ, リバビリン, インターフェロン, コア遺伝子変異

## はじめに

C型肝炎ウイルス (HCV) は感染後高率で慢性化し、数十年の経過で肝硬変、肝癌を引き起こす。これらの発症を防ぐためには感染早期にHCVを体内から完全排除する必要がある。HCVに対する抗ウイルス治療としてinterferon- $\alpha$  (IFN)投与が行われ、ある程度の効果を上げてきたが、C型肝炎治療の現場にリバビリンが登場しその治療成績は格段に向上した。さらに最近は作用持続時間が大幅に延長したPEG (polyethylene glycol) インターフェロン (PEG-IFN) 製剤との併用により、全体の治療成功率は約50%に向上している。現在PEG-IFN・リバビリンは、どのIFNとの組み合わせにおいても、単独投与にくらべリバビリン併用療法の方がはるかに効果的であ

ることが無作為比較試験により示され、PEG-IFN製剤とリバビリンの併用療法が現在日本および世界の標準治療となっている。

## 1. HCVの遺伝子構造 (図1)

HCVはFlavivirus科のHepacivirus属に属する約9,600塩基の一本鎖(プラス鎖)RNAウイルスである。ウイルスゲノム、HCV-RNAは3,000アミノ酸からなる前駆体蛋白をコードする単一のreading frameからなり、その5'および3'端にはそれぞれ非翻訳が存在する。5'非翻訳領域(5'-untranslated region, 5'UTR)の配列はウイルス株間で高度に保存されており強固な二次構造を形成する。同部位には蛋白翻訳開始を担うinternal ribosome entry siteが存在する。3'非翻訳領域(3'UTR)も同様に二次構造を形成し、ウイルス複製の鋳型となるマイナス鎖の複製開始起点となる。HCV-RNAから翻訳された前駆体蛋白の

さかもと なおや：東京医科歯科大学消化器内科

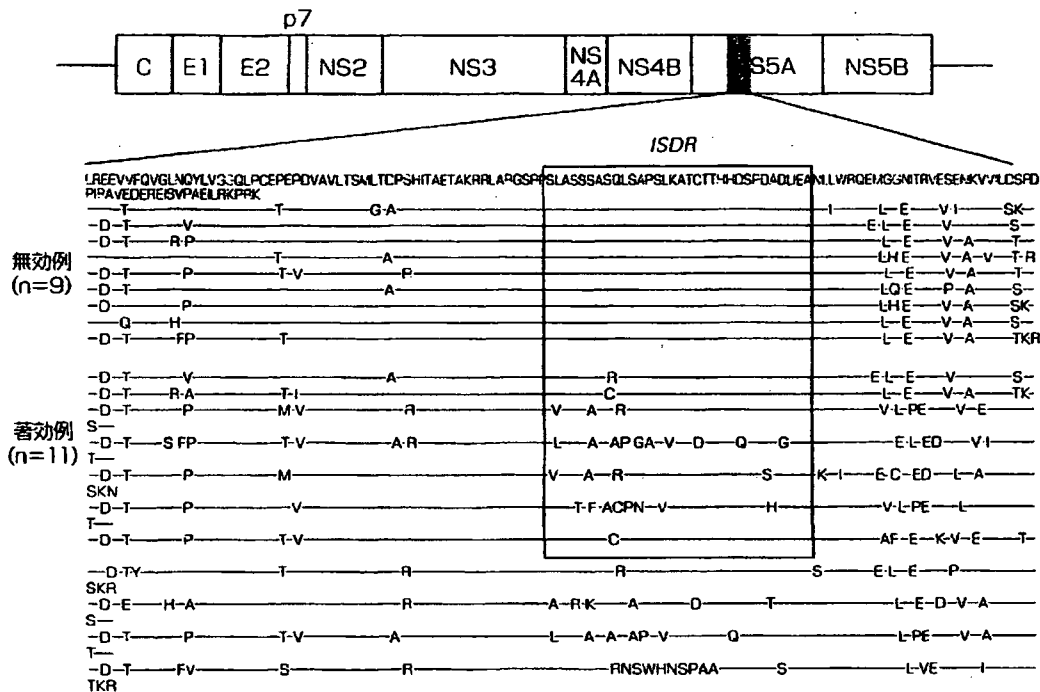


図1. インターフェロン感受性決定領域 (ISDR)

N末端側 1/3 は小胞体膜のシグナルペプチダーゼによりCore, E1, E2の3個の構造蛋白が切り出される。一方C末端側 2/3はウイルスゲノムの複製に必要な非構造蛋白がコードされNS2, NS3の2個のプロテアーゼにより切断・処理される。HCVゲノムの複製増殖を司るNS5B RNA依存性RNAポリメラーゼは複製塩基の誤りを訂正する3'-5'エクソスクレアーゼ活性(proofreading機構)を有しないため、ウイルス増殖の過程で高頻度にウイルス遺伝子の変異を生じる。さらに、一個体の中でも遺伝子配列のわずかに異なる様々なcloneが混在する状態(quasispecies)となっている。

## 2. HCVゲノタイプ

HCVゲノムは上記の理由により株間での変異が大きく、相動性は核酸配列で約70%、アミノ酸配列で約90%である。HCVはその核酸配列の

比較解析から大きく6個の遺伝子型(ゲノタイプ1~6)に分けられ、さらにそれが2ないし3種類のサブタイプ(a, b, cなど)に細分される。これらの遺伝子型は各国・地域ごとに分布が大きく異なっている。本邦においてはgenotype 1bが約70%、2aが約20%、2bが約10%の構成となっている。HCVによる肝炎発症の病態機構は主にウイルス感染細胞を排除しようとする宿主の免疫応答である一方、ウイルスによる直接の細胞傷害性に起因する病態も存在し、それらの病態はそれぞれのgenotype間で差異が存在する。genotype 3では肝の脂肪沈着が高度な傾向にあり、肝酵素の強い上昇を認める。これらの病理像は血中ウイルス量に相関し、interferonによるウイルス排除で速やかに軽快する。一方genotype 2では比較的肝炎が軽い傾向にある。また、IFNおよびリバビリン併用治療の効果はゲノタイプ間で異なり、一般にgenotype 1, 4. で悪くgenotype 2, 3, 5, 6で良好である。

### 3. NS5A-interferon-sensitivity-determining region (ISDR)の変異とインターフェロン治療感受性 (図2)

日本において主要な genotype であり, IFN 抵抗性とされる 1b 型の中でも IFN 治療効果の良好な症例が存在することが確認されていたが, 感受性の異なる 2 種類の前 HCV 遺伝子配列の比較によって, その違いが非構造遺伝子の NS5A の中央部に位置する 40 アミノ酸配列の違いに集約されていることが明らかとなり, 同領域は interferon sensitivity determining region (ISDR) と命名された. すなわち ISDR 内に アミノ酸変異を多数認める HCV 株は interferon に感受性であり, 治療効果の予測に有用であったり, ISDR は血中のウイルス量とも強く関連し, 変異数の多いものは血中ウイルス量が低い. 一方, 肝炎の病態との関連では, ISDR 変異数が多い HCV による肝炎活動性は高いことも多く, 無治療では相当数の症例が肝硬変・肝癌にまで進展していることが報告されている.

PEG-IFN/リバビリン併用療法においても, ISDR 変異は治療効果の予測に有用であった. 難治とされる HCV genotype 1b かつ高ウイルス量の患者 113 例について, ISDR 変異を解析し, ISDR 変異を含む各種臨床パラメータと治療効果との関連を解析したところ, ISDR 野生型(変異なし), 中間型(変異数 1~4), および変異型(変異数 >5) で著効率はそれぞれ 34%, 47%, 80% であり, 変異型は野生型・中間型に比べ有意に奏効率が高かった.

NS5A 蛋白は N 末端側のドメインにより小胞体膜上に局在しており, この局在は培養細胞におけるウイルス増殖に必須である. 細胞培養・増殖モデルにおいても ISDR を含む NS5A 領域は HCV 増殖に密接に影響するアミノ酸変異 (adaptive mutations) の集積部位の一つである. NS5A 蛋白は種々の tyrosine kinase の SH3 domain と結

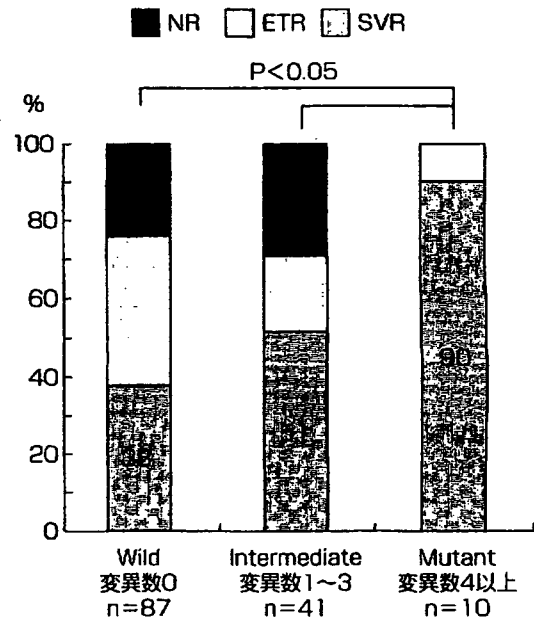


図2. ISDR 変異数と治療効果: PEG インターフェロン・リバビリン 48 週療法

合し, その活性を調節していることが報告され, また NS5A は PI3 kinase の SH3 domain に結合して apoptosis 拮抗作用を有する. 以上のごとく NS5A とその変異はウイルス増殖および細胞のインターフェロン感受性に密接に関連するが, 臨床的には HCV 増殖を減弱させる NS5A 変異が, 培養細胞では逆に増殖を促進しており, NS5A 蛋白の機能, ウイルス増殖における役割の全貌は未だ十分に明らかにされていない.

### 4. Core 遺伝子変異と IFN 治療抵抗性

芥田らは HCV 1b 症例に対する PEG-IFN・リバビリン併用療法症例のウイルス遺伝子解析により, 治療無効例においては Core 蛋白領域 191 アミノ酸のうち 70 (R-to-Q) および 91 (L-to-M) の置換が有意に多発することを報告している. 多変量解析においてもこの Core 70/91 変異は LDL (low density lipoprotein) コレステロール, 性別, ICG (indocyanine green) 15 分値, AST (aspartate aminotransferase) などと共に有意に IFN/

リバビリン治療効果に寄与する因子であった<sup>2)</sup>。これらの特定の変異がIFN治療効果に関連する機構は不明である。HCV-Core蛋白は培養細胞での強制発現により脂質代謝関連遺伝子の発現変化と共に脂肪化を来すこと、またそのアミノ酸の一次構造が脂肪化の程度に強く関連していること、また臨床においても肝脂肪化の程度とIFN治療抵抗性に正の相関が見られることが報告されている。さらにCore蛋白は細胞内IFNシグナル伝達を担うSTAT(signal transducer and activators of transcription)に結合しその活性化を抑制することが報告されている。以上の知見から、Core蛋白変異が細胞内脂質代謝経路・IFN作動経路等への作用を介してIFN治療効果に影響を与えている可能性が考えられる。

## 5. リバビリンとウイルス遺伝子変異

現在HCV感染に対しインターフェロンと共に広く使用されているリバビリン(ribavirin, 1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-1H-1, 2, 4-triazole-3-carboxamide)は、核酸guanosinの誘導体である。in-vitroにおいてインフルエンザやポリオウイルス、RSウイルス等を含む広汎なDNA、およびRNAウイルスに対し効果があるとされ、海外において呼吸器感染症、ラッサ熱などに対し、以前から使われていた。HCVに対するリバビリンの作用機序はまだ十分に明らかにされていないが、ウイルスに対する直接作用と免疫を介した間接作用が想定されている。免疫系に対する作用として、(1) Th1, Th2 shift: Th1 サイトカイン(IFN- $\gamma$ )、Th2 サイトカイン(IL-4, IL-10)のバランスをTh1 優位にし、ウイルス感染に対する宿主のT-細胞誘導免疫賦活作用を有する。ウイルス増殖に対する直接作用としては、(2) 細胞内GMP(guanosine monophosphate)合成阻害による細胞内のGTP(guanosine triphosphate)プールを枯渇させて、間接的にウイルスの核酸合成を抑制する。(3) ウイルスRNAポリメラー

ゼのRNA鎖反応を阻害する。(4) ウイルスのRNA mutagenとして働き、ウイルスRNA合成のエラーを促進し、HCV遺伝子変異を増加させて増殖を抑制する(error catastrophe)。などが考えられている<sup>3)</sup>。

筆者らは、in-vitroウイルスゲノム増殖系であるHCVレプリコンシステム(後述)を用いて、リバビリン、及びIFNの細胞内ウイルス増殖に対する効果、さらに、リバビリン、IFN併用投与の抗ウイルス効果を解析した<sup>4)</sup>。リバビリンは臨床的血中濃度域である約10 $\mu$ M付近ではわずかな抗ウイルス効果を認めるのみであり、高濃度では非特異的RNA合成抑制が起こり細胞毒性を呈する。しかし、IFNとリバビリンを併用すると、添加したリバビリンの濃度依存性にIFNによる濃度-抑制曲線を左方に変位させ、リバビリンがIFNの抗ウイルス効果を相乗的に高めることが明らかとなった。リバビリンのHCVに対する抗ウイルス効果を検討するため、リバビリン投与前後での遺伝子変異を定量的に解析したところ、リバビリンにより遺伝子変異を有為に増加させることが見いだされ、リバビリンの作用機序の一つとしてウイルスのmutagenとして働き変異率を上昇させることにより増殖を抑制している可能性(mutation catastrophe)が考えられた。

## 6. HCV感染モデルを用いた抗ウイルス効果のin-vitro解析・reverse genetics

近年までHCVには安定して増殖する有用な培養細胞・小動物モデルが存在せず、上述の遺伝子変異によって現れる臨床像の差異をより詳細に解析することは困難であった。1999年Bartenschlagerらにより、細胞内で増殖可能なHCVミニゲノムであるHCVレプリコンシステムが報告され、ウイルス増殖・複製機構の解析、抗ウイルス療法開発のブレイクスルーとなった。さらに2005年脇川らによりHCV-2a細胞培養系が報告され遂に生ウイルスを実験室で扱うことが可

表. HCVに対する現在開発中の薬剤 (文献5より)

クラス	薬剤	開発段階
□ HCV エントリー阻害	ワクチン	pre-clinical
	HCig	Phase II
	HCV-Ab68	Phase II
□ 蛋白翻訳阻害	IRES inhibitor, VGX-410C	Phase II
	アンチセンス・オリゴ	Phase II
	siRNA (TTO33)	pre-clinical
□ ウイルス蛋白機能阻害	NS3 プロテアーゼ阻害薬	
	VX950	Phase II
	SCH503034	Phase II
	ITMN 191	Phase II
	NS5B RNA ポリメラーゼ阻害薬	
	R1626	Phase II
	NM-283 (Valopicitabine)	Phase II
	HCV796	Phase II
	NS3 ヘリカーゼ阻害薬	pre-clinical
	NS5A 阻害薬 A-831, A-689	pre-clinical
	グルコシダーゼ阻害薬, Celsivir	Phase II
□ 宿主細胞を標的とした薬剤	シクロフィリン阻害薬	
	DEBIO-025	Phase I
	NIM 811	Phase I
	リバビリン誘導体, Virmidine	Phase II

能となった。一方HCV感染宿主はヒトと一部の霊長類に限られていたが、近年ヒト肝細胞移植 SCID (severe combined immunodeficient) マウスが開発され薬剤の*in-vivo*効果の解析などに応用されている。

## 7. ウイルス蛋白を標的とした治療薬の開発状況

現在、上述のHCV感染モデルを用いた薬剤開発が各国で盛んに展開されており、一部の薬剤は臨床試験が進行中である<sup>5)</sup>(表)。現在最も開発が進展しているのはNS3 プロテアーゼ阻害薬とNS5Bポリメラーゼ阻害薬である。両薬剤はインターフェロンとの併用投与による強力な血中ウイルス減少効果が報告されており、これらが臨床の現場に登場する日も近い。一方、これらの薬剤はそれぞれに特有のウイルス蛋白の耐性変異が存在することが知られている。NS3 プロテ

アーゼ阻害薬であるVX-950 (telaprevir)の臨床試験では、薬剤投与わずか14日目においてすでに血中の30~50%のウイルスに薬剤耐性変異を生じ、急速に薬剤耐性化を獲得することが報告されている。今後、インターフェロンやその他の薬剤の組み合わせによりこの耐性化をいかに克服するかが今後の課題である。

## 文 献

- 1) Enomoto N, et al: Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 334: 77-81, 1996.
- 2) Akuta N, et al: Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology* 48: 372-380, 2005.
- 3) 坂本直哉, 榎本信幸: リバビリンによるC型肝炎ウイルス病態制御. *医学のあゆみ* 208: 417-422, 2004.
- 4) Tanabe Y: Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon-alpha. *J Infect Dis* 189: 1129-1139, 2004.
- 5) Pawlotsky JM, et al: The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* 132: 1979-1998, 2007.

# Limited suppression of the interferon- $\beta$ production by hepatitis C virus serine protease in cultured human hepatocytes

Hiro-michi Dansako, Masanori Ikedā and Nobuyuki Kato

Department of Molecular Biology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, Japan

## Keywords

antiviral response; hepatitis C virus; innate immune response; interferon- $\beta$ ; serine protease

## Correspondence

N. Kato, Department of Molecular Biology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700-8558, Japan  
Fax: +81 86 2357392  
Tel: +81 86 2357385  
E-mail: nkato@md.okayama-u.ac.jp

(Received 14 February 2007, revised 10 June 2007, accepted 15 June 2007)

doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05942.x

Toll-like receptors and RNA helicase family members [retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) and melanoma differentiation associated gene-5 (MDA5)] play important roles in the induction of interferon- $\beta$  as a major event in innate immune responses after virus infection. TRIF (adaptor protein of Toll-like receptor 3)-mediated and Cardif (adaptor protein of RIG-I or MDA5)-mediated signaling pathways contribute rapid induction of interferon- $\beta$  through the activation of interferon regulatory factor-3 (IRF-3). Previously, it has been reported that the hepatitis C virus NS3-4A serine protease blocks virus-induced activation of IRF-3 in the human hepatoma cell line HuH-7, and that NS3-4A cleaves TRIF and Cardif molecules, resulting in the interruption of antiviral signaling pathways. On the other hand, it has recently been reported that non-neoplastic human hepatocyte PH5CH8 cells retain robust TRIF- and Cardif-mediated pathways, unlike HuH-7 cells, which lack a TRIF-mediated pathway. In the present study, we further investigated the effect of NS3-4A on antiviral signaling pathways. Although we confirmed that PH5CH8 cells were much more effective than HuH-7 cells for the induction of interferon- $\beta$ , we obtained the unexpected result that NS3-4A could not suppress the interferon- $\beta$  production induced by the TRIF-mediated pathway, although it suppressed the Cardif-mediated pathway by cleaving Cardif at the Cys508 residue. Using PH5CH8, HeLa, and HuH-7-derived cells, we further showed that NS3-4A could not cleave TRIF, in disagreement with a previous report describing the cleavage of TRIF by NS3-4A. Taken together, our findings suggest that the blocking of the interferon production by NS3-4A is not sufficient in HCV-infected hepatocyte cells.

Persistent infection by hepatitis C virus (HCV) frequently causes chronic hepatitis [1,2], which progresses to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [3,4]. This is a serious health problem because approximately 170 million people are currently infected with HCV worldwide [5]. To resolve the mechanism of persistent HCV infection, it will be necessary to better under-

stand the virus life cycle and then to develop more effective anti-HCV reagents. HCV is an enveloped positive ssRNA (9.6 kb) virus belonging to the *Flaviviridae* family [6,7]. The HCV genome encodes a large poly-protein precursor of approximately 3000 amino acid residues, which is cleaved co- and post-translationally into at least ten proteins in the order: core, envelope 1

## Abbreviations

CARD, caspase recruitment domain; E1, envelope 1; EGFP, enhanced green fluorescent protein; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HCV, hepatitis C virus; HEK293, human embryonic kidney 293; IFN, interferon; IRF-3, interferon regulatory factor 3; IKK- $\epsilon$ , inhibitor of  $\kappa$ B kinase  $\epsilon$ ; MDA5, melanoma differentiation associated gene-5; MyD88, myeloid differentiation factor 88; NS2, nonstructural protein 2; RIG-I, retinoic acid-inducible gene I; siRNA, small interfering RNA; TBK, Tank-binding kinase 1; TLR, Toll-like receptor; TRIF, Toll-IL1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ .

(E1), E2, p7, nonstructural protein 2 (NS2), NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B. These cleavages are mediated by the host and virally encoded serine protease located in the amino-terminal domain of NS3. Serine protease activity of NS3 requires NS4A, a protein consisting of 54 amino acid residues, to form a stable complex with the NS3 [8–10].

Virus-infected cells trigger the innate immune response by recognizing viral components, including DNA, ssRNA, dsRNA and glycoproteins. This response initiates signaling pathways leading to the induction of protective cellular genes, including type-I interferons [initially interferon (IFN)- $\beta$ , and then IFN- $\alpha$ ] and proinflammatory cytokines that directly limit viral replication. Within these signaling pathways, Toll-like receptors (TLRs) and RNA helicase family members play very important roles in the recognition of the viral components [11,12].

IFN- $\beta$  is induced by dsRNA, a common intermediate in many RNA virus infections, including HCV. The viral dsRNA as well as the synthetic dsRNA analogue poly(I-C) are recognized by TLR3, which is expressed on the cell surface or in endosome vesicles [13,14]. On the other hand, it has been shown that retinoic acid-induced gene I (RIG-I) and melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) also recognize dsRNA molecules [15–17]. A recent study showed that MDA5 and RIG-I recognize different types of dsRNA: MDA5 recognizes poly(I-C), and RIG-I recognizes *in vitro* transcribed dsRNA [18]. Very recently, it was discovered that viral 5'-triphosphate RNA is the ligand for RIG-I [19,20]. Both MDA5 and RIG-I contain DexD/H-box helicase domains that serve as intracellular cytoplasmic dsRNA and 5'-triphosphate RNA receptors, respectively [15–20]. After dsRNA is recognized, the cytoplasmic domain of TLR3 recruits TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$  (TRIF) through a myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-independent pathway (TRIF-mediated pathway) [21–23]. In contrast, the caspase recruitment domains (CARDs) of MDA5 or RIG-I recruit the CARD adaptor inducing IFN- $\beta$ , Cardif (also known as IPS-1, MAVS, or VISA), which was recently identified as an adaptor protein located in the outer membrane of mitochondria (this recruitment is known as the Cardif-mediated pathway) [24–27].

The TRIF- and Cardif-mediated signaling pathways rapidly induce IFN- $\beta$  through the phosphorylation of multiple cellular factors, including IFN regulatory factor-3 (IRF-3) and kinases, including the Tank-binding kinase 1 (TBK-1) and inhibitor of  $\kappa$ B kinase  $\epsilon$  (IKK- $\epsilon$ ) [28–31]. Although IRF-3 is located in the cytoplasm in an inactive state [28,29], phosphorylation (Ser385, 386,

396, 398, 402, 405, and Thr404) of IRF-3 by TBK-1 and IKK- $\epsilon$  induces dimerization and nuclear translocation of IRF-3, leading to transcriptional activation of IFN- $\beta$  [28–31].

Recent studies have found that several RNA virus proteins could inhibit the early signaling activation (TRIF- and Cardif-mediated pathways) leading to IFN- $\beta$  production [32,33]. Regarding HCV, Foy *et al.* [33] found that NS3-4A serine protease blocked HCV-induced activation of IRF-3 in the human hepatoma cell line HuH-7. Additional studies regarding this finding have shown that NS3-4A blocks the Cardif-mediated signaling pathway by cleaving the Cardif molecule and blocking downstream IFN- $\beta$  activation [24,34,35], and that TBK-1, IKK- $\epsilon$ , and TRIF may also be targeted for cleaving by NS3-4A [36–38]. With respect to TRIF, NS3-4A was reported to cleave this molecule in both an *in vitro* experiment using a reticulocyte lysate system and an *in vivo* experiment using human embryonic kidney 293 (HEK293) and UNS3-4A-24 osteosarcoma cells [36]. These studies suggest that NS3-4A has the ability to inhibit both TRIF- and Cardif-mediated signaling pathways.

On the other hand, we recently demonstrated that HCV proteins exhibited conflicting effects on the IFN- $\beta$  production in non-neoplastic human hepatocyte PH5CH8 cells [39,40]: Core and NS5B synergistically enhanced IFN- $\beta$  expression and this enhancement was dependent on the RNA-dependent RNA polymerase activity of NS5B, but NS3-4A significantly inhibited the production of IFN- $\beta$  induced by the combination of Core and NS5B. Furthermore, Li *et al.* [41] recently reported that PH5CH8 cells retained robust and functionally active TRIF- and Cardif-mediated signaling pathways, unlike HuH-7 cells, which lacked the TRIF-mediated pathway [41,42]. Therefore, using poly(I-C) as an inducer of IFN- $\beta$ , we investigated the effects of NS3-4A on antiviral signaling pathways in PH5CH8 cells. Our results showed that the extracellular TLR3/TRIF signaling pathway was not blocked by NS3-4A because NS3-4A did not cleave TRIF, unlike in the previous study [36].

## Results

### Human hepatocyte PH5CH8 cells more readily activate IFN- $\beta$ transcription in response to dsRNA compared to HuH-7 cells and their sublines

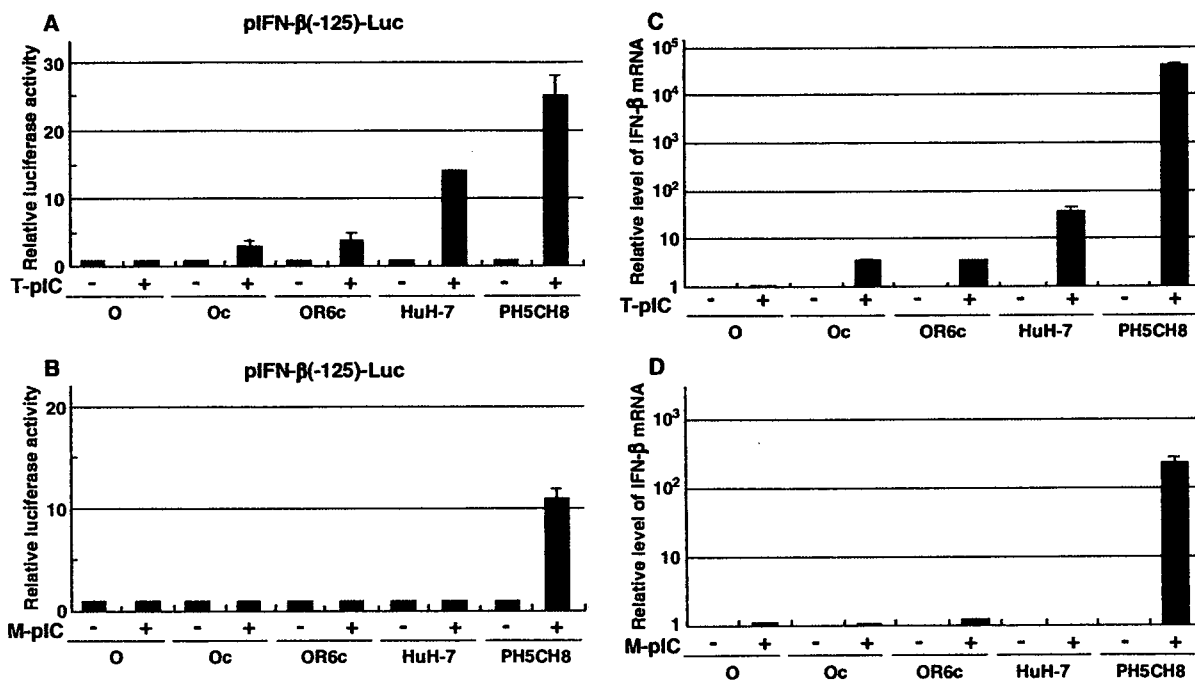
Recently, Li *et al.* [41] reported that PH5CH8 cells showed a better response to dsRNA, including IFN- $\beta$  induction, than other human hepatoma cell lines (HuH-7, HepG2, and Hep3B). Therefore, using a dual



luciferase reporter assay, we first confirmed that PH5CH8 cells were much more effective at inducing IFN- $\beta$  than HuH-7 cells and HuH-7-derived cell sublines (O [43], Oc [43], and OR6c [44]) that can support HCV RNA replication.

When the dsRNA analog, poly(I-C), was transfected into cells using a liposome-mediated procedure (intracellular dsRNA, T-pIC), PH5CH8 cells showed a more potent (> 25-fold) activation of the IFN- $\beta$  gene promoter than HuH-7 and HuH-7-derived cell lines (Fig. 1A). Furthermore, when poly(I-C) was added to the culture medium (extracellular dsRNA; M-pIC), a

significant elevation (12-fold) of the IFN- $\beta$  gene promoter was observed in PH5CH8 cells only (Fig. 1B). These results were confirmed by quantitative RT-PCR analysis of endogenous IFN- $\beta$  mRNA induction in cells treated with poly(I-C) (T-pIC, Fig. 1C; M-pIC, Fig. 1D). In both T-pIC and M-pIC treatments, the induction level of IFN- $\beta$  mRNA was markedly higher in PH5CH8 cells than in O, Oc, OR6c, and HuH-7 cells (Fig. 1C,D). Next, we carried out quantitative RT-PCR analysis of TLR3, TRIF, RIG-I, MDA5, Cardif, and IRF-3 mRNAs to clarify their expression levels in the steady state and the effects of poly(I-C)



**Fig. 1.** PH5CH8 cells show high-level IFN- $\beta$  production in response to dsRNA. (A) Dual luciferase reporter assay of the IFN- $\beta$  gene promoter using the various cells treated with T-pIC. The following HuH-7-derived cell sublines were used: O, cloned cells [43] replicating genome-length HCV RNA; Oc, cured cells which were created by eliminating genome-length HCV RNA from the O cells by IFN treatment; and OR6c, cured cells which were created by eliminating genome-length HCV RNA from the cloned OR6 cells [44] by IFN treatment. Cells grown in 24-well plates were cotransfected with pIFN- $\beta$ (-125)-Luc and pRL-CMV (internal control reporter) and cultured for 42 h, and then poly(I-C) (1  $\mu$ g) was transfected into the cells for 6 h before the reporter assay as described in the Experimental procedures. The relative luciferase activity was normalized to the activity of *Renilla* luciferase (internal control). The lysate of cells without poly(I-C) treatment was used as a control. Data are the means  $\pm$  SD from three independent experiments, each performed in triplicate. (B) Dual luciferase reporter assay of the IFN- $\beta$  gene promoter using the various cells treated with M-pIC. The dual luciferase reporter assay was performed as described in (A) except that poly(I-C) was added to the medium (50  $\mu$ g mL $^{-1}$ ) for 6 h before the reporter assay. (C) Quantitative RT-PCR analysis of IFN- $\beta$  mRNA in various cells treated with T-pIC. Poly(I-C) (1  $\mu$ g) was transfected into the cells for 6 h before the sampling for RNA preparation. Total RNA extracted from the cells was subjected to real-time LightCycler PCR analysis using the primer set of IFN- $\beta$  (202 bp). Data are the means  $\pm$  SD from three independent experiments. To correct the differences in RNA quality and quantity between the samples, data were normalized using the ratio of IFN- $\beta$  mRNA concentration to that of GAPDH. The IFN- $\beta$  mRNA levels were calculated relative to the level in the O cells treated with T-pIC, which was set at 1.0. (D) Quantitative RT-PCR analysis of IFN- $\beta$  mRNA in various cells treated with M-pIC. Poly(I-C) was added to the medium (50  $\mu$ g mL $^{-1}$ ) for 6 h before the sampling for RNA preparation. Quantitative RT-PCR analysis for IFN- $\beta$  mRNA was performed as described in (C). The IFN- $\beta$  mRNA level was calculated relative to the level in the O cells treated with M-pIC, which was set at 1.0.

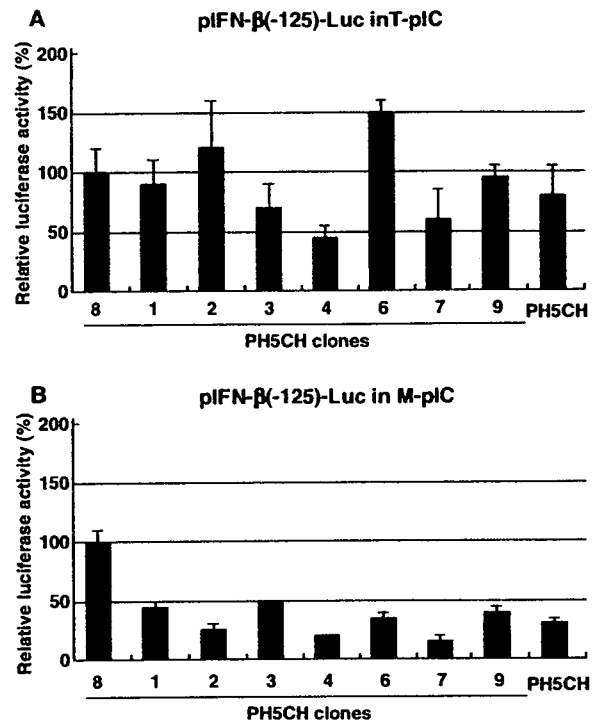
treatment (T-pIC and M-pIC). In T-pIC treatment, RIG-I and MDA5 mRNAs were clearly induced in PH5CH8 and HuH-7 cells, and TLR3 mRNA was induced only in PH5CH8 cells. Moreover, there was no such induction in the other cell lines examined (supplementary Table S1). In M-pIC treatment, TLR3, RIG-I, and MDA5 were induced only in PH5CH8 cells (supplementary Table S1). The fact that these mRNAs were induced at substantial levels only in PH5CH8 cells treated with T-pIC or M-pIC suggests that the elevation of these mRNAs is mediated by the IFN- $\beta$  induced by poly(I-C) treatment. In summary, these results revealed that PH5CH8 cells retain both the Cardif- and TRIF-mediated pathways for IFN- $\beta$  production, whereas HuH-7 cells retain only the Cardif-mediated pathway, and that the HuH-7-derived cell lines used are lacking in both pathways for IFN- $\beta$  production.

#### Parental PH5CH and PH5CH clones other than PH5CH8 also exhibit IFN- $\beta$ response toward poly(I-C) treatment

PH5CH8 is one of eight cell lines that were previously cloned from parental PH5CH cells to examine HCV susceptibility *in vitro* [45]. Therefore, we used a dual luciferase assay to examine the effects of poly(I-C) treatment on the IFN- $\beta$  gene promoter in PH5CH cells and these cloned cell lines. When T-pIC treatment was employed, the parental cells and all the cloned cell lines exhibited good IFN- $\beta$  response, and the activation level in PH5CH2 and PH5CH6 cells was higher than that in PH5CH8 cells (Fig. 2A). However, when M-pIC treatment was used, the IFN- $\beta$  response in the cloned cells and the parental cells was less than 50% of that in PH5CH8 cells (Fig. 2B). From these results, we concluded that PH5CH8 is the best cell line for the study of the dsRNA-induced antiviral signaling pathways.

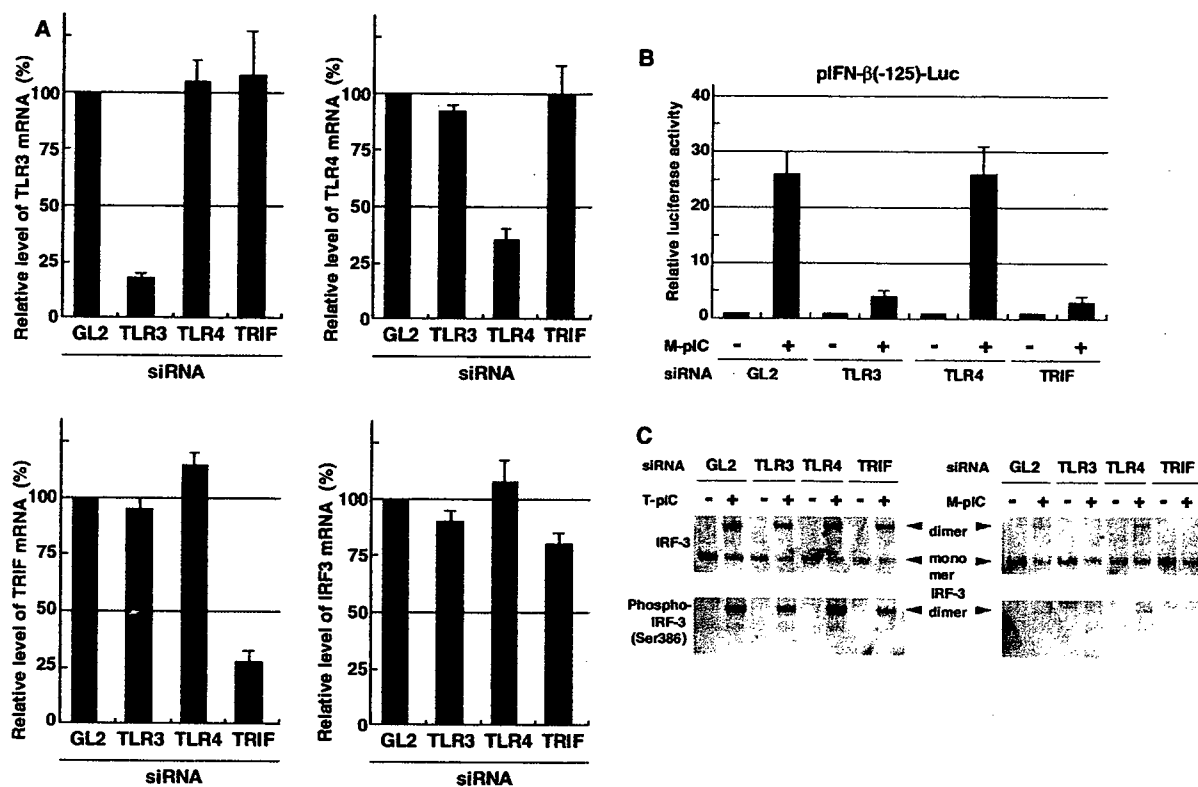
#### M-pIC treatment activates IRF-3 through the TLR3/TRIF signaling pathway

To confirm that the TRIF-mediated pathway is activated in M-pIC treatment, and to determine if its activation is mediated by the TLR3 but not the TLR4 signaling pathway, we examined whether or not activation of IRF-3 by M-pIC treatment is specifically mediated by the TLR3 signaling pathway using TLR3-, TLR4-, and TRIF-specific small interfering RNA (siRNAs) [46,47]. Quantitative RT-PCR analysis revealed that the TLR3, TLR4, and TRIF mRNAs were drastically decreased (more than 70% reduction) in the



**Fig. 2.** IFN- $\beta$  responses of parental PH5CH and PH5CH cloned cells by dsRNA treatment. (A) Dual luciferase reporter assay of the IFN- $\beta$  gene promoter using parental PH5CH and PH5CH cloned cells treated with T-pIC. The T-pIC treatment and the dual luciferase reporter assay were performed as described in Fig. 1A. The IFN- $\beta$  gene promoter activity level was calculated relative to the level in the PH5CH8 cells, which was set at 100. (B) Dual luciferase reporter assay of the IFN- $\beta$  gene promoter using parental PH5CH and PH5CH cloned cells treated with M-pIC. The M-pIC treatment and the dual luciferase reporter assay were performed as described in Fig. 1B. The relative level of the IFN- $\beta$  gene promoter activity was calculated as described in (A).

PH5CH8 cells transfected with TLR3, TLR4, and TRIF siRNAs, respectively, but not in the PH5CH8 cells transfected with the GL2 siRNA used as a control (Fig. 3A). We also confirmed that IRF-3 mRNA was not decreased in PH5CH8 cells transfected with any of these siRNAs (Fig. 3A). Under this condition, we performed a luciferase reporter assay using an IFN- $\beta$  gene promoter in PH5CH8 cells treated with M-pIC. The activation of the IFN- $\beta$  gene promoter was greatly suppressed (by more than 80%) in PH5CH8 cells transfected with TLR3 or TRIF siRNA, but not in the PH5CH8 cells transfected with GL2 or TLR4 siRNA (Fig. 3B). This result suggests that the activation of IRF-3 by M-pIC treatment is mediated by the TLR3/TRIF signaling pathway. We obtained further evidence by examining the status of the phosphorylation and dimerization of IRF-3. The results



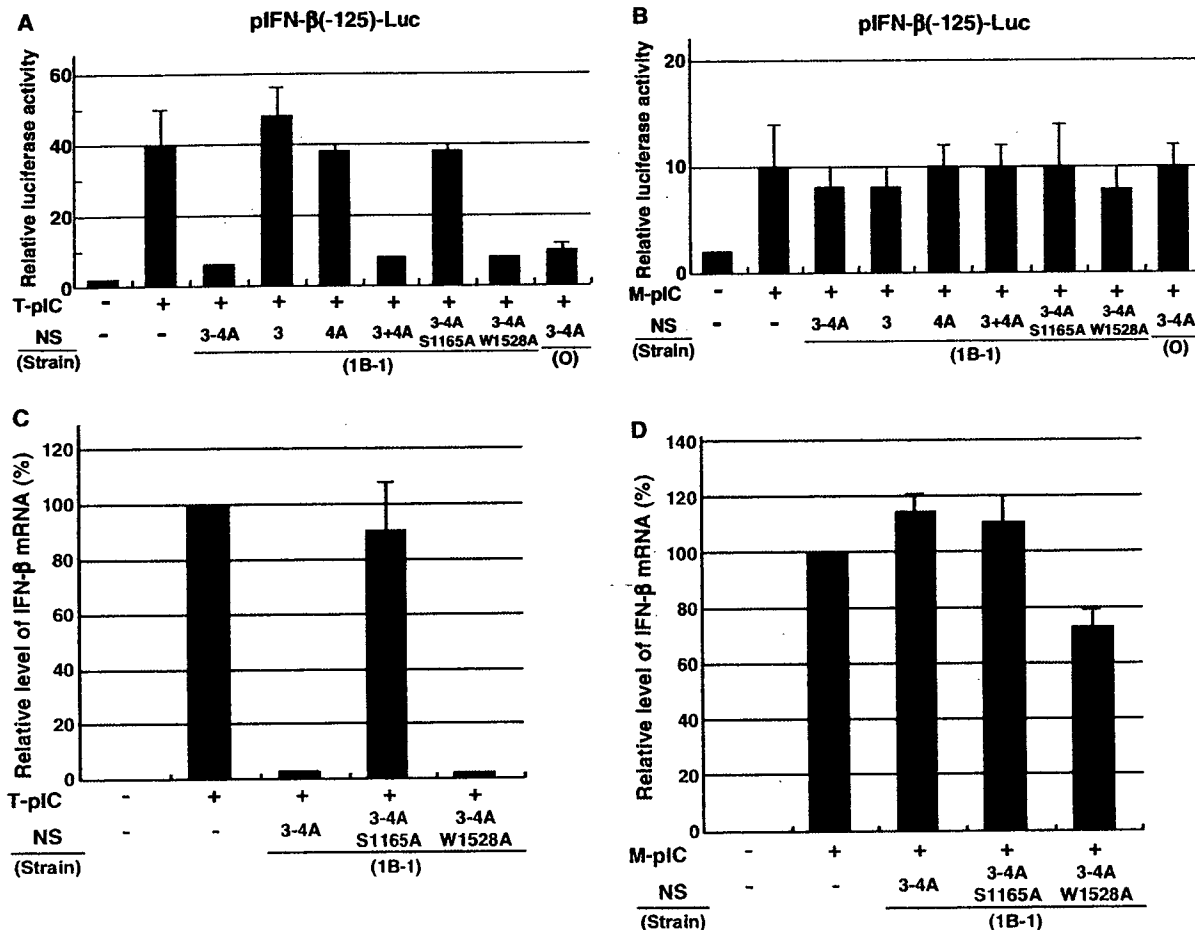
**Fig. 3.** Extracellular dsRNA treatment activates IRF-3 through the TLR3/TRIF signaling pathway in PH5CH8 cells. (A) Down-regulation of TLR3, TLR4, and TRIF mRNAs by transfection of TLR3, TLR4, and TRIF siRNAs, respectively. PH5CH8 cells were transfected with dsRNA duplexes targeting TLR3, TLR4, TRIF or luciferase GL2. After 3 days, the expression levels of TLR3, TLR4, TRIF, and IRF-3 mRNAs were determined by the quantitative RT-PCR as described previously [67]. (B) Dual luciferase reporter assay of the IFN- $\beta$  gene promoter using siRNA-transfected PH5CH8 cells treated with M-pIC. The poly(I-C) treatment and the dual luciferase reporter assay were performed as described in Fig. 1. (C) Phosphorylation and dimerization analyses of IRF-3 in the siRNA-transfected PH5CH8 cells treated with poly(I-C). The poly(I-C) treatment was performed as described in Fig. 1. The lysate of cells transfected with GL2, TLR3, TLR4, or TRIF siRNA was prepared, and subjected to Native-PAGE as described in the Experimental procedures. The phosphorylation and dimerization of IRF-3 were analyzed by immunoblotting using anti-phospho-IRF-3 (Ser386) serum and anti-IRF-3 serum, respectively.

obtained by M-pIC treatment revealed that both the phosphorylation and dimerization of IRF-3 were almost completely abrogated in the cells transfected with TLR3 or TRIF siRNA, but not in those transfected with the GL2 and TLR4 siRNAs (Fig. 3C, right panel). Such a suppression of IRF-3 activation was not observed by T-pIC treatment (Fig. 3C, left panel), suggesting that the activation of IRF-3 by T-pIC treatment is mainly mediated by the Cardif-mediated signaling pathway [16].

#### HCV NS3-4A blocks the Cardif-mediated signaling pathway, but not the TRIF-mediated signaling pathway

Several studies [24,33,36,48–50] have demonstrated that NS3-4A blocks IFN- $\beta$  induction by inhibiting the

nuclear translocation of IRF-3 in HuH-7 cells harboring HCV replicons and HCV (JFH1 strain of genotype 2a)-infected HuH-7 cells. However, it has also been reported that HuH-7 cells possess weak or defective dsRNA-induced antiviral signaling pathways [41,42] (Fig. 1). Therefore, we examined whether or not NS3-4A can block the induction of IFN- $\beta$  by poly(I-C) in PH5CH8 cells that retain dsRNA-induced signaling pathways. The results were quite different between T-pIC treatment and M-pIC treatment. First, in T-pIC treatment, the results showed that NS3-4As (the 1B-1 and HCV-O strains of genotype 1b) could drastically inhibit the enhancement of the IFN- $\beta$  gene promoter activity, and that this suppressive effect of NS3-4A was dependent on its serine protease activity, because the NS3-4A/S1165A mutant lacking the serine protease activity did not exhibit the suppressive effect,



**Fig. 4.** NS3-4A blocked the Cardif-mediated signaling pathway, but not the TRIF-mediated signaling pathway. The poly(I-C) treatment, dual luciferase reporter assay, and quantitative RT-PCR analysis were performed as described in Fig. 1. The pCX4bsr expression vectors encoding NS3-4A, NS3, or NS4A from the 1B-1 strain and NS3-4A from the HCV-O strain were used for the transfection. The pCX4bsr expression vector encoding the NS3-4A/S1165A mutant (1B-1 strain) lacking serine protease activity or the NS3-4A/W1528A mutant (1B-1 strain) lacking RNA helicase activity was also used for the transfection. The lysate of PH5CH8 cells transfected with the pCX4bsr vector was used as a control (NS-). (A) Effect of NS3-4A on the IFN-β gene promoter activated by T-pIC treatment. (B) Effect of NS3-4A on the IFN-β gene promoter activated by M-pIC treatment. (C) Effect of NS3-4A on the IFN-β mRNA induction by T-pIC treatment. PH5CH8 cells stably expressing the NS3-4A or NS3-4A mutant (S1165A or W1528A) from the 1B-1 strain were subjected to T-pIC treatment. PH5CH8 cells infected with pCX4bsr retrovirus were used as a control (NS-). The IFN-β mRNA level was calculated relative to the level in the control PH5CH8 cells treated with T-pIC, which was set at 100. (D) Effect of NS3-4A on the IFN-β mRNA induction by M-pIC treatment. PH5CH8 cells that were the same as in (C) were subjected to M-pIC treatment. The IFN-β mRNA level was calculated relative to the level in the control PH5CH8 cells treated with M-pIC, which was set at 100.

although the NS3-4A/W1528A mutant lacking RNA helicase activity did (Fig. 4A). In addition, we confirmed that NS3 alone or NS4A alone did not exhibit the suppressive effect, but coexpression of NS3 and NS4A did, suggesting that the NS3/4A complex in *trans* [51] also can block IFN-β induction. In M-pIC treatment, however, we found that NS3-4As (strains 1B-1 and O) could not suppress the induction of the IFN-β gene promoter (Fig. 4B). Similar results

were also obtained in the other cloned cell lines, PH5CH3 and PH5CH6 (data not shown), and in HeLa cells (supplementary Fig. S1). The results of the reporter assay were confirmed by quantitative RT-PCR analysis of endogenous IFN-β mRNA induced by T-pIC or M-pIC treatment in PH5CH8 cells. We found that the NS3-4A and NS3-4A/W1528A mutants, but not the NS3-4A/S1165A mutant, could suppress the induction of IFN-β mRNA following