

200910003A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

エフェクター選別性の抗がん免疫アジュバントの開発

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 瀬谷 司

平成22(2010)年 5月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

エフェクター選別性の抗がん免疫アジュバントの開発

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 瀬谷 司

平成22(2010)年 5月

## 目 次

### I. 総括研究報告

エフェクター選別性の抗がん免疫アジュバントの開発 ----- 1

瀬谷 司

### II. 分担研究報告

1. 細胞外dsRNAの取り込み機構の解析 ----- 8

松本 美佐子

2. dsRNA誘導体のin vitro 合成 ----- 10

西川 諭

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 11

IV. 研究成果の刊行物 ----- 13

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
総括研究報告書

エフェクター選別性の抗がん免疫アジュバントの開発

研究代表者 瀬谷 司 北海道大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

本研究は安全でQOLが高いがん患者に使える抗がん免疫アジュバントを開発し、がん医療の現場に速やかに導入することを目的とする。アジュバントは我々が開発したToll様受容体（TLR）のアゴニスト・微生物成分を模したものを基盤とし、副作用が少なくCTL, NKを効果的に誘導する物質を選ぶ。本年度はNK, CTL活性化についてM161 Ag リポ蛋白とRNA duplex の機能を解析した。前者はTLR2, 後者はTLR3 を活性化して異なった経路で樹状細胞を成熟化する。これらの合成変異体を作成し、単独または併用で既知のNK活性化能を持たない免疫活性化剤（例：BCG-CWS）より優れた抗がんアジュバントをin vitro ヒト樹状細胞、in vivo マウス発がんモデル系で抽出する。

H21年度にM161 Ag誘導体の樹状細胞成熟化の機能を比較検討し、以下の知見を得た。1. 合成の16種のdiacylated lipopeptides (Pam2CysX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>)を比較検討して、TLR2活性化能を有するM161Ag誘導体はX<sub>2</sub>がSer/GlyでPro/Leu/Ileに替えると不活性となる。2. 長さはX<sub>5</sub>以上が必要であり、distalのアミノ酸は親水性残基を持つ必要がある。3. これらのTLR2 agonistsはTICAM-1 (TRIF) 経路ではなくMyD88 経路を経由して樹状細胞をNK活性化型に成熟化する。4. Pam2Cys活性化樹状細胞はIL-12を分泌し、NK活性化するが、この場合はTICAM-1 経路のドライブするNK細胞と異なりB16D8(NK感受性)移植がんを退縮しない。5. Pam2CysのNK活性化型のは樹状細胞TLR2を介しcross-priming/CTL誘導を誘起する。

一方、H21年度に合成が成功したRNA duplex (dsRNA X) と polyI:C を用いて以下の結果を得た。6. 樹状細胞による抗がんNKの活性化はTICAM-1経路とIPS-1経路で誘導された。7. TICAM-1経路の下流はIRF-7ではなくIRF-3でNK活性化型樹状細胞が成熟化する。8. IRF-3-/-樹状細胞にNK活性化の候補分子を発現スクリーニングし、樹状細胞上のNK活性化膜分子を同定した(INAMと名付けた)。9. 本分子を発現させた樹状細胞はNK感受性移植がんを強く退縮せしめた。10. CTL誘導はTICAM-1依存性に強く起き、IRF-3/7両方が必須であった、これに対しIPS-1は殆どCTL誘導に関与しなかった。

以上の知見を基に真に有効な抗がんアジュバントを合成で作製し、最終年度に剤型を確定する。GMP標品ができれば臨床研究を企画する。

分担研究者

松本美佐子 北海道大学大学院医学研究科 免疫学分野 准教授

西川 論 つくば産総研 副所長

## A. 研究目的

がんの術後療法は確立されていない。QOLのよい術後治療法として免疫療法は注目されてきたが、Rosenberg らによればがん抗原のペプチドワクチン療法の有効例は 2.6%に留まる (Nat Med 10: 909, 2004)。抗原に炎症刺激を伴う感染症の場合、多くは激しい免疫応答を起動し、治癒に向かう。抗原ペプチドに微生物成分 (アジュバント) を加えた抗がん免疫療法が確立できるならば高い有効率を期待しうる (Cancer Immunol Immunother 58:1175, 2009)。この概念は樹状細胞のToll-like receptor (TLR)に細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) の誘導機能があること (Akazawa, Cancer Res 2004)、アジュバントはTLRのアゴニストであること (Tsuji, Infect Immun 2000)、から基礎研究の支持を得た。しかし、抗がんエフェクターとしてNKを誘導する必要があること (Akazawa, PNAS 2007)、炎症はがん細胞に働けば発がんのプロモーターにもなること (Nahoum, Science 2007)、など種々の問題点も残し、これらを克服したアジュバントの開発が世界的に要望されている。ヒトに使えるTLRアゴニストは世界的な競争の中でまだ確立されていない。本年度はNK, CTLを誘導してがんを退縮に導く有望な (副作用の少ない) 合成品を抽出することを目的とする。

## B. 研究方法

Pam2Cys合成品は阪大藤本博士、産総研西川博士に依頼して作成した。dsRNA Xはその誘導体5種とともに西川研究室 (つくば) とGenedesign社に依頼した。前者はT7promoterによるtranscription, 後者は化学合成の手法を用いている。遺伝子改変マウスはTICAM-1, IPS-1 KOを当研究室で作製し、MyD88 KOを審良研より恵与を受けた。レポーターアッセイ (HEK293細胞を用いたLuciferase reporter gene assay)、ELISAは既報に準じて行った。樹状細胞 (BMDC)、NK細胞はそれぞれ骨髄、脾臓から既報に準じて調整した。腫瘍株としてB16D8 (NK感受性)、EG7 (CTL感受性)、3LL (マクロファージ感受性)を用いた。NK活性はB16D8細胞株を用いて51Cr遊離アッセイで行った。CTL活性はOVA tetramerとOT-1を用いてOVAに対するCTLを査定

した。腫瘍浸潤マクロファージの結果は今回示さない。siRNA, transfectionはリポフェクション法で行い、樹状細胞への遺伝子導入はレンチウイルスを使って行った。VectorはIRES-GFPを組み込んであり、視覚的に陽性細胞を判別できる。

## C. 研究結果

H21年度の目標は代表的なM161Ag誘導体 (PamCysXXXXXX), RNA duplex (dsRNA X)の基礎データを完成させ、in vivo腫瘍退縮機能の優れた構造物を特定して合成アジュバントを創製することであった。

### C-1. M161Ag

M161Agのpeptide改変誘導体とアミノ酸の長さの異なるPam2CysK, Pam2CysK2, Pam2CysK4を合成した。Pam2CysKには樹状細胞活性化能が検知できなかったが、Pam2CysK2は十分高い活性を有していた。HEK293細胞を用いてLuciferase reporter gene assayなどを含めて、TLR2アゴニストとしてはCysの後の2残基が重要と考えられた。16の構造物 (図1)のうち、Pam2Cys13とPam2Cys15、Pam2Cys16はIL-6, IL-12p40の誘導能、CD25, CD69の発現増強能、NKドライブと活性化能 (IFN- $\gamma$ とcytotoxic activity)を欠いた。

Pam2Cys13は第2アミノ酸がSer/GlyではなくProであり、Pam2Cys15 (or 16)はLeu-Ileであった。Pam2Cys13は第2アミノ酸をSerに替えたPam2Cys13 (P-S)は上記の喪失活性を全て回復した。また、Pam2Cys15のLeu-IleをSer-Glyに替えたPam2Cys15 (LI-SG)も喪失活性を回復した。以上からバクテリアのPam2ペプチドはNKを活性化させるものとさせない物があり、それは樹状細胞のTLR2活性化を誘導しうる構造に依存する。具体的には第2, 3アミノ酸に疎水性アミノ酸が来ないことである。CTL誘導に於いても同様の結果を得た。

しかし、活性型と判定されたいくつかのPam2誘導体を担がんマウスにi. p.しても腫瘍の退縮は見られなかった。TICAM-1活性化のアジュバントpolyI:Cは単独投与でNK, CTLを誘導して腫瘍退縮を起動するため、TLR2 (MyD88活性化)アジュバントは腫瘍退縮性に根本

的な相違がある。現在、樹状細胞分泌のIL12のNK活性化作用はMyD88依存性で、このような液性のNK活性化は腫瘍を退縮しない、と考えている。このことはM161Ag誘導体をアジュバントとして用いる場合、活性チェックが必要であり、腫瘍退縮に直結するNK細胞活性化物質を開発する必要がある

Pam2Cysの中にはBMDCのTLR2非依存的にNK細胞を活性化するものがある(図2)。NKのMyD88経路に依存することが判明した。これらの抗腫瘍効果は今後の問題である

### RNA duplex

RNA duplexの種々の改変体(表1)からloop構造がないstemが最もTLR3を活性化した。ただし、樹状細胞ではTLR3は細胞表面に無く、細胞内エンドソームにある。Stem dsRNAをエンドソームに分配する誘導体を作製し、dsRNA Xと名付けた。この構造は特許取得後に公表する。dsRNA Xはヒト樹状細胞の系で検討した所、RNA duplexをエンドソームにターゲットするし、TLR3とマージした。マウスでもTICAM-1 KOではIFN誘導能を著しく下げるため、TLR3を使って生理機能を発揮することが推定された。RIG-I経路の関与を弁別するためIPS-1<sup>-/-</sup>マウスから樹状細胞を調整してRIG-I(MDA5)特有の応答を見たが、主体はIPS-1経路でないことが判明した。担がんマウスへのin vivo投与で、dsRNA XにはpolyI:Cのような毒性がなく、150 ug/head i. p. で2日後に腫瘍が退縮した。このような劇的な効果は他のアジュバントには見ない効果である。

PolyI:CでBMDCを処理すると24 h以内にNK活性化が誘導された。NK直接の作用は比較的弱かったため、dsRNAはBMDCに働くアジュバントである事が検証できた。TICAM-1<sup>-/-</sup>、IPS-1<sup>-/-</sup> BMDCを調整し、dsRNAによるNK活性化をin vitroで査定すると、両経路がNK活性化に強く関与することが判明した。MyD88経路は関与しなかった。また、BMDCとNK細胞は細胞間接着で活性化を増強し、IL-12、IL-15、IFNなどのサイトカインはBMDCのNK活性化には副次的な機能しか示さなかった。TICAM-1下流の転写因子としてIRF-3、IRF-7、NF-κB、AP-1などが同定されている。NK活性化はIRF-3<sup>-/-</sup> BMDCのみで極度に低下した。従って、

IRF-3をマスター遺伝子とする樹状細胞の膜分子がNKを活性化する事が判明した。

樹状細胞に発現してNK活性化(IFN-γとNK細胞傷害活性)を誘導する分子を同定し、INAMと名付けた。INAMを高発現したBMDC [BMDC (INAM)]を養子免疫すると強い抗がんNK活性が誘導され、NK感受性腫瘍は退縮した。

さらにTICAM-1、IPS-1 KOマウスを使ってCTL誘導を査定したところ、抗腫瘍CTLはTICAM-1によって誘導され、IPS-1は殆ど関与しないことが示唆された。このことは樹状細胞成熟化と云われた抗腫瘍活性の一端はNKの場合とCTLの場合があり、NKはINAMと云う新規分子によって担われ、CTLの場合は樹状細胞内にTICAM-1経路によって誘導される分子に担われていることが証明できた。この両反応を誘導できるpolyI:CとdsRNA Xのうち、副作用が極めて弱いdsRNA Xは抗がんアジュバントとして極めて有望である。

### D. 考察

本年度は移植がんの退縮効果を発揮する抗がんアジュバントを機能別に絞り込み、dsRNA Xという最強の合成アジュバントを確立できた。今後ヒトに抗がん効果を発揮するかを調べるのが急務となる。

RNAアジュバントは樹状細胞に働いてCTL(EL4)、NK(B16D8)両方を活性化する点でTLR2アゴニストに優る。Pam2ペプチド、M161Ag誘導体については1. 2, 3番目に疎水アミノ酸残基が来なければNK活性化能が保持されること、2. NK活性化能は樹状細胞のTLR2/6-MyD88経路によって保持されること、が判明した。3. それ以外のTLR非依存性のNK活性化経路もある事が示唆されたが、in vivoの抗がん活性が直接投与で発揮されず、このままでは仕様は極めて限られる。CTL誘導のアジュバントとしてのみ使えるであろう。M161AgリポペプチドはNK、CTL誘導についてBCG-CWSと比較においてin vitroで遜色無く、in vivoの腫瘍退縮について遜色なければこの誘導体をCTL誘導剤として実用化に向けて検討する。

一方、polyI:Cは3LLの腫瘍系では腫瘍浸潤マクロファージの善玉変換(抗がん性に変わる)に関わる事が判明した(データは示さない)。次回の報告で完結

させるが、RNA誘導体には3つの指向性があり、樹状細胞- NK, 樹状細胞- CTL, TAM-non-TAM 変換の総体が抗がん活性を指向すると云える。この3作用を併せ持って強い抗がん退縮効果を発揮するRNA誘導体が最善の候補となる。

従って、RNA duplexでは最善のdsRNA Xを合成して、CTL, NK 活性化, TAM変換アジュバントの最適標品を決める研究が残されている。さらに単にRNA を投与するのではなく、配列特異的なRNA duplex を用いて樹状細胞の成熟化とがん細胞の傷害を誘導することも視野に入れる。この背景にはがん細胞の産生するmiRNAによるがんの浸潤促進やHCV 感染抑制に働くmiRNAが同定されたことがある(Pedersen, Nature 2007)。さらに最近RNA duplex の配列特異的な抗ウイルス

(HCV) 作用やがん浸潤の促進 (Ma and Weinberg, Nature 2007) などが報告され、RNAの配列特異的な遺伝子制御がもう1つの鍵になることが判明した。即ち、RNA duplex のアジュバントが成功すれば、発展的な次世代の配列特異的なRNA duplex の開発が可能になる。この場合、dsRNA X の細胞内分配 (エンドソームから細胞質に落ちる) の方法も考案されなければならない。miRNAを模すれば RNA のセンサー (受容体) を介したIFN 応答などの抗がん活性に加えてgene silencing による抗がん活性をRNAアジュバントに付与することができる。これらを含めた総合機能で抗がん免疫とがん退縮を導く RNA創薬にも将来チャレンジしたい。

RNAアジュバントの配列特異的な遺伝子発現の抑制機能をTLR依存性免疫活性化作用に加えれば、TICAM-1, INAMに加えてDicer やmiRNAを含む機能を包括することになり、難治性のヒト固型がんに優れた効果を発揮するはずである。それにはpolyI:Cなど毒性のある2重鎖RNAでなく配列を選ぶ必要がある。多種類のRNA配列の中から抗がん免疫の成立に最も適した配列を同定し、臨床に還元できる基礎資料を整えて実用化を目指す。

#### G. 研究発表

1. Kodama, K., M. Higashiyama, K. Takami, K. Oda, J. Okami, J. Maeda, T. Akazawa, M. Matsumoto, T. Seya, M. Wada, A. Hayashi, and K. Toyoshima. 2009. Innate immune therapy with a BCG cell

wall skeleton for lung cancer: a case presentation and a case control study. *Surgery Today*. 39: 194-200.

2. Oshiumi, H., M. Matsumoto, S. Hatakeyama, and T. Seya. 2009. Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- $\beta$  induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.* 284: 807-817.
3. Wu, J. D., C. L. Atteridge, X. J. Wang, T. Seya, and S. R. Plymate. 2009. Obstructing shedding of the immune stimulatory MHC class I chain-related gene B prevents tumor formation. *Clin. Cancer Res.* 15: 632-640.
4. Akao, Y., T. Ebihara, H. Masuda, Y. Saeki, K. Hazeki, O. Hazeki, M. Matsumoto, and T. Seya. 2009. Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered Spirulina extract in mice. *Cancer Sci.* 100: 1494-1501.
5. Fujimoto, Y., M. Hashimoto, M. Furuyashiki, M. Katsumoto, T. Seya, Y. Suda, and K. Fukase. 2009. Innate Immunostimulatory lipopeptides of *Staphylococcus aureus* as TLR2 ligands; Prediction with mRNA expression, chemical synthesis and immunostimulatory activities. *ChemBioChem.* 10: 2311-2315.
6. Yasukawa, K., H. Oshiumi, M. Takeda, Y. Yanagi, T. Seya, S. Kawabata and T. Koshiba. 2009. Mitofusin 2, a mitochondrial fusion mediator, acts as a negative regulator for mitochondrial antiviral signaling. *Science Signaling.* 2(84): ra47.
7. Takaki, H., H. Oshiumi, T. Kawanishi, M. Sasai, M. Matsumoto, and T. Seya. 2009. Cytoplasmic oligomerized TICAM-1 recruits nuclear BS69 to enhance type I interferon induction. *Eur. J. Immunol.* 39: 3469-3476.
8. Iwakiri, D., L. Zhou, M. Samanta, M. Matsumoto, T. Ebihara, T. Seya, S. Imai, M. Fujieda, K. Kawa, and K. Takada. 2009. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3. *J. Exp. Med.* 206: 2091-2099.
9. Ebihara, T., M. Azuma, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Identification of INAM, a polyI:C-inducible membrane protein,

that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J. Exp. Med.* (in press).

10. Sasai, M., H. Oshiumi, K. Funami, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor of the Toll-like receptor 3/4 pathway. *Molec. Immunol.* 47: 1283-1291.
11. Kubota, N., T. Ebihara, M. Matsumoto, S. Gando, and T. Seya. 2010. IL-6 and interferon- $\alpha$  induced by polyI:C-stimulated bone-marrow-derived dendritic cells regulate peripheral expansion of regulatory T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391: 1421-1426.
12. Hirata, N., Y. Yanagawa, M. Satoh, H. Ogura, T. Ebihara, M. Noguchi, M. Matsumoto, H. Togashi, T. Seya, K. Onoé, and K. Iwabuchi. 2010. Dendritic cell-derived TNF- $\alpha$  is responsible for development of IL-10-producing CD4<sup>+</sup> T cells. *Cell. Immunol.* 261: 37-41.
13. Oshiumi, H., K. Sakai, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN- $\beta$  inducing potential. *Eur. J. Immunol.* (in press).
14. Akazawa, T., N. Inoue, H. Shime, K. Sugiura, K. Kodama, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion. *Cancer Sci.* (in press).
15. Tatematsu, M., A. Ishii, M. Horiuchi, H. Oshiumi, F. Inagaki, T. Seya, and M. Matsumoto. 2010. Molecular mechanism for activation of Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 (TICAM-1). *J. Biol. Chem.* (in press).

#### Review

16. Seya, T., M. Matsumoto, T. Ebihara, and H. Oshiumi. 2009. Functional evolution of the TICAM-1 (TRIF) pathway for extrinsic RNA sensing. *Immunol. Rev.* 227: 44-53 (review).
17. Seya, T., and M. Matsumoto. 2009. The extrinsic RNA-sensing pathway for adjuvant immunotherapy for cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 58:1175-1184 (review).

18. Ebihara, T. M. Matsumoto, and T. Seya. 2009. Dendritic cell/NK cell interaction in RNA virus infection. *Curr. Immunol. Rev.* 5: 200-207 (review).

19. Seya, T., H. Shime, T. Ebihara, H. Oshiumi, and M. Matsumoto. 2010. Pattern-recognition receptors of innate immunity and their application to tumor immunotherapy. *Cancer Sci.* 101: 313-320 (review).
20. Seya, T., 2010. Innate immunity and vaccine. *Vaccine* (in press). (preface)

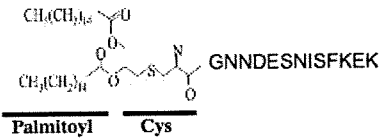
#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし



Fig. 1. M161Ag and its derivatives

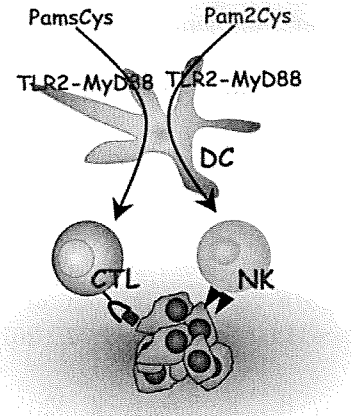
M161Ag



- 1 Pam2 C A N T R H S E S D K
- 2 Pam2 C G T G G K Q S S D K
- 3 Pam2 C G N G N K S G S D D
- 4 Pam2 C S N I E I F N A K G
- 5 Pam2 C T T D K K E I K A Y
- 6 Pam2 C S F G G N H K S S
- 7 Pam2 C G S Q N I A L E E
- 8 Pam2 C G Q D S D Q Q K D G
- 9 Pam2 C G N D D G K D K D G
- 10 Pam2 C G N N S S K D K E A
- 11 Pam2 C S L P G C G S K S T
- 12 Pam2 C S T S E I G E K I
- 13 Pam2 C A E N C I G C V N K
- 14 Pam2 C G S Q N I A L E E K
- 15 Pam2 C L I L I L I A S E I L
- 16 Pam2 C L I L I L I A S E I L F S F S H
- 17 Pam2 C S K K K K K

図1. M161Agとその誘導体

Diacyl lipoprotein でpeptide 配列を伴う (Nat Med 1997)。合成品はCys 以下の配列を種々のBLP (bacterial lipoproteins)を参考に作製した。○は疎水性残基、△はPro 残基を示す。17はPam2C SKと呼ばれる標準品である。



今後: アジュバントの免疫改変機構を包括的に理解し、感染がんの必須要因の解明を目指す

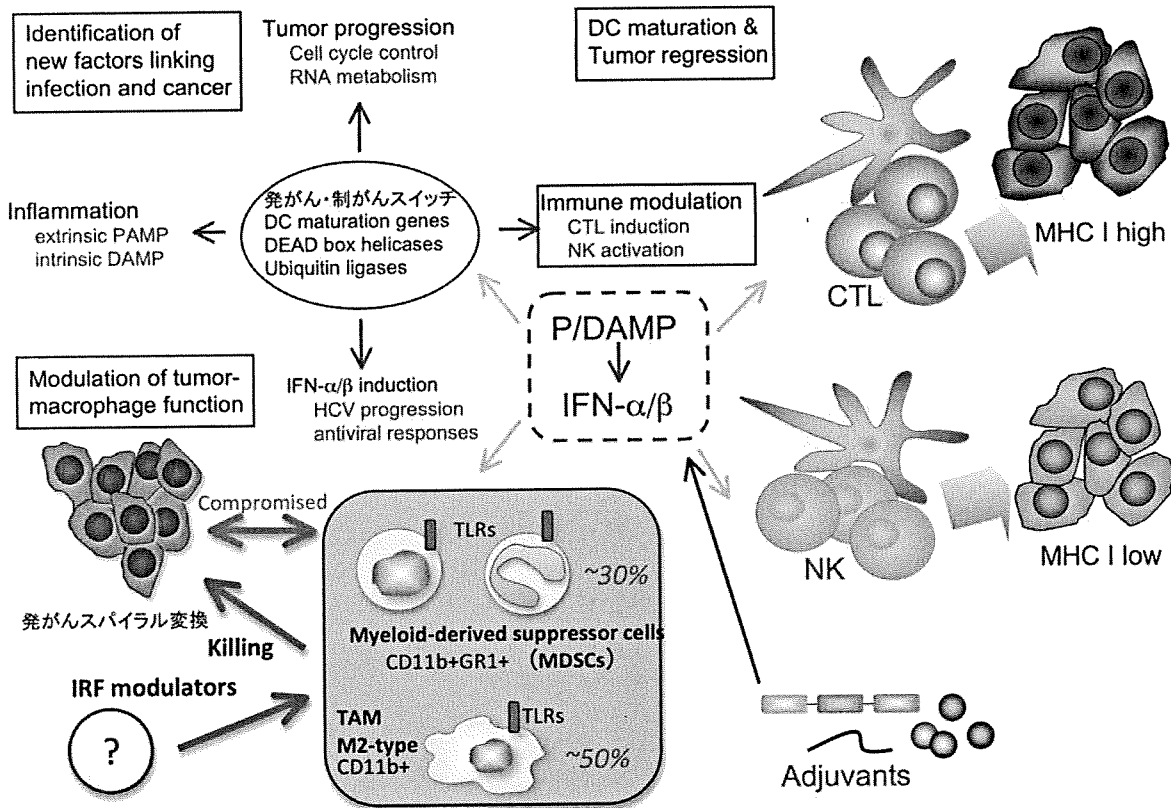


図2. RNA誘導体の樹状細胞依存性のNK, CTL活性化戦略とTAM変換。赤四角の項目がアジュバントによる標的である。

## 追記

基礎研究と一部の臨床研究に関して北海道大学医学研究科の倫理指針に則り、委員会において研究計画の承認を受けた。動物実験は北海道大学の動物実験委員会に申請して許可を得た。実験は厚生労働省の動物実験等の実施に関する基本指針に従い実施した。

## 細胞外dsRNAの取り込み機構の解析

分担研究者 松本美佐子 北海道大学大学院医学研究科 准教授

**研究要旨** Poly(I:C)は、骨髄系樹状細胞のエンドソームに局在するTLR3を活性化し、TICAM-1(別名TRIF)依存的にNK細胞や細胞傷害性T細胞の活性化を誘導する。このため、次世代アジュバントの有力な候補と考えられているが、細胞内への運搬機構は不明である。本研究では、poly(I:C)結合タンパク質のプロテオーム解析により、poly(I:C)の取り込みに必須の分子を同定した。

### A. 研究目的

ワクチン開発において、効果的な免疫応答の誘導にはアジュバントの選択が重要である。次世代アジュバントとして、Toll-like receptor (TLR)のリガンドが候補にあがっているが、その中でもTLR3リガンドのpoly(I:C)は、CTL, NK細胞活性化などの樹状細胞応答を強力に惹起する。Poly(I:C)はエンドソームのTLR3以外にも細胞質内のMDA5経路も活性化するが、その分配機構は全く不明である。本研究では、poly(I:C)の細胞内への取り込み機構を解析し、アジュバント活性との関連を明らかにすることを目的とする。

### B. 研究方法

TLR3発現ヒト培養細胞の可溶化物を出発材料とし、poly(I:C)の取り込みに関与する分子をpoly(I:C)-Sepharoseを用いて精製し、プロテオーム解析を行った。同定した分子はHEK293細胞でsiRNAによるノックダウンを行い、TLR3を介したIFN- $\beta$  promoterの活性化をレポータージーンアッセイで調べた。また、HeLa細胞でもノックダウンし、poly(I:C)の取り込みへの関与を査定した。

### C. 研究結果

質量分析により、poly(I:C)-Sepharoseに特異的に結合する122個の蛋白を同定した。その中から、膜蛋白ならびに膜に結合する性質を有する蛋白質3個を選択し、siRNAによるノックダウンで機能査定を行った。HEK293細胞を用いたレポータージーンアッセイで、TLR3を介したIFN- $\beta$  promoterの活性化に関与する新規分子を同定した。HeLa細胞やヒト単球由来樹状

細胞でノックダウンを行うと、poly(I:C)刺激によるIFN- $\beta$ 産生は非常に減弱することが判明した。更にこの分子をノックダウンしたHeLa細胞では、FITC標識したpoly(I:C)の細胞内への取り込みが起きないことが共焦点レーザー顕微鏡での観察より明らかとなった。一方、poly(I:C)同様、クラスリン依存的経路でエンドサイトーシスされるトランスフェリンの運搬には関与していなかった。強制発現系では、poly(I:C)刺激により細胞質から細胞膜へリクルートされることから、poly(I:C)の取り込みレセプターと協調して細胞内への運搬に関わっていることが明らかとなった。

### D. 考察

Poly(I:C)の取り込みに関して、これまでに①マウスマクロファージではCD14、②ヒト上皮細胞では、Scavenger receptor class Aが取り込みに関与することが報告されている。しかし、樹状細胞はCD14を発現していないこと、Scavenger receptorの阻害剤でpoly(I:C)刺激によるIFN- $\beta$ 産生が変化しないことから、樹状細胞においてはこれらと異なる取り込みレセプターが存在すると考えられる。今回同定した分子は取り込みレセプターそのものではなく、取り込みレセプターと協調して取り込みに関与すると考えられる。Poly(I:C)がアジュバント活性を示すには、骨髄系樹状細胞に取り込まれエンドソームTLR3を活性化することが重要である。今後、樹状細胞に発現する取り込みレセプターを同定し、poly(I:C)の細胞内分配とエフェクター活性の関連を明らかにする予定である。

### E. 結論

Poly(I:C)の取り込みに必須の分子を同定した。

## G. 研究発表

- 論文発表
    - Seya, T., and M. Matsumoto. 2009. The extrinsic RNA-sensing pathway for adjuvant immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 58:1175-1184 (review).
    - Seya, T., M. Matsumoto, T. Ebihara, and H. Oshiumi. 2009. Functional evolution of the TICAM-1 pathway for extrinsic RNA sensing. *Immunol. Reviews* 227: 44-53 (review).
    - Oshiumi, H., M. Matsumoto, S. Hatakeyama, and T. Seya. 2009. Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- $\beta$  induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.* 284: 807-817.
    - Akao Y., T. Ebihara, H. Masuda, Y. Saeki, T. Akazawa, K. Hazeki, O. Hazeki, M. Matsumoto, and T. Seya. 2009. Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered Spirulina extract in mice. *Cancer Science* 100: 1494-1501.
    - Iwakiri, D., L. Zhou, M Samanta, M. Matsumoto, T. Ebihara, T. Seya, S. Imai, M. Fujieda, K. Kawa, and K. Takada. 2009. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from toll-like receptor 3. *J. Exp. Med.* 206: 2091-2099.
    - Takaki, H., H. Oshiumi, M. Sasai, T. Kawanishi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2009. Oligomerized Toll-interleukin 1 receptor domain (TIR)-containing adaptor molecule-1 in the cytoplasm recruits nuclear adenovirus 5 E1A-binding protein to enhance NF- $\kappa$ B activation and type I IFN induction. *Eur. J. Immunol.* 39: 3469-3476.
    - Kubota, N., T. Ebihara, M. Matsumoto, S. Gando, and T. Seya. 2010. IL-6 and IFN- $\alpha$  from dsRNA-stimulated dendritic cells control expansion of regulatory T cells. *BBRC* 391: 1421-1426.
    - Sasai, M., M. Tatematsu, H. Oshiumi, K. Funami, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor participates in activation of the Toll-like receptor 3/4 pathway. *Molec. Immunol.* (in press)
    - Seya, T., H. Shime, T. Ebihara, H. Oshiumi, and M. Matsumoto. 2010. Pattern recognition receptors of innate immunity and their application to tumor immunotherapy. *Cancer Sci.* 101: 313-320 (review).
    - Oshiumi, H., K. Sakai, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN- $\beta$  inducing potential *Eur. J. Immunol.* Online: Feb 1 2010
    - Akazawa, T., N. Inoue, H. Shime, K. Sugiura, K. Kodama, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion. *Cancer Science* (in press)
    - Tatematsu M., A. Ishii, H. Oshiumi, M. Horiuchi, F. Inagaki, T. Seya, and M. Matsumoto. 2010. A molecular mechanism for Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1-mediated IRF-3 activation. *J. Biol. Chem.* Online April. 23.
  - 学会発表
    - Matsumoto M., Itoh H, and Seya T., : The TIR domain determines cellular localization of human Toll-like receptor 8, (Osaka) Immune Regulation: Present and Future, 2009.5.25-27
    - 押海裕之、松本美佐子、瀬谷司：自然免疫系で働く DDX3 分子を C 型肝炎ウイルスのコア蛋白質が阻害し、I 型インターフェロン産生を抑制する新たな仕組み、第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）、2009. 10. 25-27（口頭）
    - 海老原敬、松本美佐子、瀬谷司：HCV 感染による TLR3 経路の活性化と NK 細胞の誘導、第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）、2009. 10. 25-27（ワークショップ）
    - Azuma M., Ebihara T., Kubota N., Matsumoto M., and Seya T.: Regulation of crosspresentation through the TLR3/TICAM-1 pathway in mDC, 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会（大阪）、2009. 12. 2-4
    - Tatematsu M., Watanabe A., Oshiumi H., Seya T., Matsumoto M.: Structural and functional analysis of TICAM-1, 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会（大阪）、2009. 12. 2-4（口頭）
    - 渡部綾子、瀬谷司、松本美佐子：Analysis of the uptake protein for double-stranded RNA、第 39 回日本免疫学会総会・学術集会（大阪）、2009. 12. 2-4（口頭）
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況
- 特許取得  
発明の名称：M161Agからなるサイトカイン誘発剤、登録番号：2,320,656、発明者：瀬谷司、松本美佐子、登録日：2009年8月4日
  - 実用新案登録  
なし
  - その他  
なし

## dsRNA誘導体のin vitro 合成

分担研究者 西川 諭  
産業技術総合研究所 年齢軸生命工学研究センター 副センター長

研究要旨 Poly(I:C)は強いアジュバント（免疫賦活化）能を持つが、毒性も強くがん免疫治療に用いられるに到っていない。効率よく樹状細胞のエンドソームにターゲットするdsRNA誘導体を合成すれば副作用の問題はクリアーしうる。本研究は抗がん活性化の高い、低副作用のRNAアジュバントを創成し、将来的に免疫治療の現場に導入することを目的とする。

### A. 研究目的

がん特異ペプチドはたくさん同定されたが、ワクチン治療の効果は上がっていない。その原因の1つは至適なアジュバントが無いためである。ペプチド抗原にPAMP（アジュバント）を加えることで高いNK、CTLの誘導活性が得られることが判明している。PAMPの問題点は微生物由来のコンタミが常にあり、生物製剤としてのGMP基準に合致しないことである。合成で純度の高い標品が量産できればこの問題をクリアーできる。本研究の目的は効果的な免疫応答を誘導できるRNAアジュバントを開発することである。

### B. 研究方法・結果

T7プロモーターを含むベクターに各種配列をもつDNA配列を組み込んでin vitro transcribed dsRNAを合成した。配列は麻疹ウイルスワクチンとして小児に投与されて害のないウイルスRNAの配列50~110 bpとした。これにリンカーとエンドソームの標的配列（北大で特許取得後に公表）を付加して1 mg 程度を合成した。アニーリング後にアガロースゲルでdsRNAの状態をチェックした。長さの違う複数のdsRNAを作製し、最適な長さのdsRNAをdsRNA Xと名付けた。これをエンドソームへの標的化と以下の機能解析に用いた。

共同研究で確認されたことは、これらの合成RNAを活性を150 ug（通常のpolyI:Cに比べて半分量）マウスにi.pし、毒性が無いこと、500 ug を越えると明らかな活動低下あること。今後供与先で150 ug投与後の担がんマウスの腫瘍退縮効果を査定し、多くの血中サイトカインを測定して、早期応答の分子機構を確認する予定である。データは次年度に共同研究として公表の予定である。

一方、供与先でin vitro の樹状細胞投与でサイトカインプロファイルを調べ

、確かにdsRNA Xがエンドソームに運ばれてTLR3依存性の経路でIFN-β 誘導することを確認している。IPS-1 KO, TLR3 KOマウスを用いて抗がん効果かの経路を明らかにする。

### D. 考察

Poly(I:C)の抗がん活性は報告があるが、毒性（筋肉痛、関節痛、ショック性低血圧）のために患者に使われていない。これらの結果はパターン認識レセプター（TLR）などが発見される前のことであり、現在の科学では樹状細胞の特異成熟化が達成できる可能性が高い。特にdsRNA の剤型を全身性（IPS-1 経路）でなく、樹状細胞のTLR3の活性化に特化すればショックなどの深刻な副作用は回避できると推定される。本研究で開発したdsRNA Xに予期した機能が確認できればpoly(I:C)の効果を損なわず優れたアジュバントを物質として確立できる。今後、マウスin vivo 成果、樹状細胞を用いた機能評価によって、サイトカイン、エフェクター誘導などの基本活性を同定して抗がん効果のメカニズムを解明し、腫瘍退縮がヒトのがんでも起きることを証明する予定である。

### E. 結論

新規のdsRNA、樹状細胞標的分子をin vitro transcription で合成し、抗がん効果が見込める剤型dsRNA X をin vivo マウス実験に供与した。

### G. 論文

なし

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍  
無し

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Oshiumi, H., K. Sakai, M. Matsumoto, and T. Seya	DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN-beta inducing potential.	Eur. J. Immunol.			in press
Akazawa, T., N. Inoue, H. Shime, K. Sugiura, K. Kodama, M. Matsumoto, and T. Seya	Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion.	Cancer Sci.			in press
Tatematsu, M., A. Ishii, M. Horiuchi, H. Oshiumi, F. Inagaki, T. Seya, and M. Matsumoto	Molecular mechanism for activation of Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 (TICAM-1).	J. Biol. Chem.			in press
Ebihara, T., M. Azuma, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya	Identification of INAM, a polyI:C-inducible membrane protein, that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation.	J. Exp. Med.			in press
Seya, T.	Innate immunity and vaccine.(preface)	Vaccine			in press
Seya, T., H. Shime, T. Ebihara, H. Oshiumi, and M. Matsumoto	Pattern-recognition receptors of innate immunity and their application to tumor immunotherapy.(review)	Cancer Sci.	101	313-320	2010
Hirata, N., Y. Yanagawa, M. Satoh, H. Ogura, T. Ebihara, M. Noguchi, M. Matsumoto, H. Togashi, T. Seya, K. Onoé, and K.	Dendritic cell-derived TNF-a is responsible for development of IL-10-producing CD4+ T cells.	Cell. Immunol.	261	37-41	2010
Kubota, N., T. Ebihara, M. Matsumoto, S. Gando, and T. Seya	IL-6 and interferon-alpha induced by polyI:C-stimulated bone-marrow-derived dendritic cells regulate peripheral expansion of regulatory T cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	391	1421-1426	2010
Sasai, M., H. Oshiumi, K. Funami, M. Matsumoto, and T. Seya	Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor of the Toll-like receptor 3/4 pathway.	Molec. Immunol.	47	1283-1291	2010
Takaki, H., H. Oshiumi, T. Kawanishi, M. Sasai, M. Matsumoto, and T. Seya	Cytoplasmic oligomerized TICAM-1 recruits nuclear BS69 to enhance type I interferon induction.	Eur. J. Immunol.	39	3469-3476	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujimoto, Y., M. Hashimoto, M. Furuyashiki, M. Katsumoto, T. Seya, Y. Suda, and K. Fukase	Innate Immunostimulatory lipopeptides of <i>Staphylococcus aureus</i> as TLR2 ligands; Prediction with mRNA expression, chemical synthesis and immunostimulatory activities.	ChemBioChem.	10	2311-2315	2009
Yasukawa, K., H. Oshiumi, M. Takeda, Y. Yanagi, T. Seya, S. Kawabata and T. Koshiba	Mitofusin 2, a mitochondrial fusion mediator, acts as a negative regulator for mitochondrial antiviral signaling.	Science Signaling.	2(84)	ra47	2009
Iwakiri, D., L. Zhou, M. Samanta, M. Matsumoto, T. Ebihara, T. Seya, S. Imai, M. Fujieda, K. Kawa, and K.	Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3.	J. Exp. Med.	206	2091-2099	2009
Akao, Y., T. Ebihara, H. Masuda, Y. Saeki, K. Hazeki, O. Hazeki, M. Matsumoto, and T.	Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered <i>Spirulina</i> extract in mice.	Cancer Sci.	100	1494-1501	2009
Wu, J. D., C. L. Atteridge, X. J. Wang, T. Seya, and S. R. Plymate	Obstructing shedding of the immune stimulatory MHC class I chain-related gene B prevents tumor formation.	Clin. Cancer Res.	15	632-640	2009
Oshiumi, H., M. Matsumoto, S. Hatakeyama, and T. Seya	Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- $\beta$ induction during the early phase of viral infection.	J. Biol. Chem.	284	807-817	2009
Kodama, K., M. Higashiyama, K. Takami, K. Oda, J. Okami, J. Maeda, T. Akazawa, M. Matsumoto, T. Seya, M. Wada, A. Hayashi, and K.	Innate immune therapy with a BCG cell wall skeleton for lung cancer: a case presentation and a case control study.	Surgery Today	39	194-200	2009
Seya, T., M. Matsumoto, T. Ebihara, and H. Oshiumi	Functional evolution of the TICAM-1 (TRIF) pathway for extrinsic RNA sensing.(review).	Immunol. Rev.	227	44-53	2009
Seya, T., and M. Matsumoto	The extrinsic RNA-sensing pathway for adjuvant immunotherapy for cancer.(review).	Cancer Immunol. Immunother.	58	1175-1184	2009
Ebihara, T. M. Matsumoto, and T. Seya	Dendritic cell/NK cell interaction in RNA virus infection.(review)	Curr. Immunol. Rev	5	200-207	2009

# DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN- $\beta$ -inducing potential

Hiroyuki Oshiumi, Keisuke Sakai, Misako Matsumoto and Tsukasa Seya

Department of Microbiology and Immunology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Kita-ku, Sapporo, Japan

Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors (RLR) are members of the DEAD box helicases, and recognize viral RNA in the cytoplasm, leading to IFN- $\beta$  induction through the adaptor IFN- $\beta$  promoter stimulator-1 (IPS-1) (also known as Cardif, mitochondrial antiviral signaling protein or virus-induced signaling adaptor). Since uninfected cells usually harbor a trace of RIG-I, other RNA-binding proteins may participate in assembling viral RNA into the IPS-1 pathway during the initial response to infection. We searched for proteins coupling with human IPS-1 by yeast two-hybrid and identified another DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase, DDX3 (DEAD/H BOX 3). DDX3 can bind viral RNA to join it in the IPS-1 complex. Unlike RIG-I, DDX3 was constitutively expressed in cells, and some fraction of DDX3 is colocalized with IPS-1 around mitochondria. The 622-662 a.a DDX3 C-terminal region (DDX3-C) directly bound to the IPS-1 CARD-like domain, and the whole DDX3 protein also associated with RLR. By reporter assay, DDX3 helped IPS-1 up-regulate IFN- $\beta$  promoter activation and knockdown of DDX3 by siRNA resulted in reduced IFN- $\beta$  induction. This activity was conserved on the DDX3-C fragment. DDX3 only marginally enhanced IFN- $\beta$  promoter activation induced by transfected TANK-binding kinase 1 (TBK1) or I-kappa-B kinase- $\epsilon$  (IKK $\epsilon$ ). Forced expression of DDX3 augmented virus-mediated IFN- $\beta$  induction and host cell protection against virus infection. Hence, DDX3 is an antiviral IPS-1 enhancer.

**Key words:** DDX3 · IFN- $\beta$  · IPS-1 · RIG-I-like receptors · Viral infection



See accompanying Commentary by Mulhern and Bowie

## Introduction

Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) and melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) are cytoplasmic RNA helicases [1–3], which signal the presence of viral RNA through the adaptor, IFN- $\beta$  promoter stimulator-1 (IPS-1) (also known as mitochondrial antiviral signaling protein/caspase recruitment domain (CARD) adaptor inducing IFN- $\beta$  (Cardif)/virus-induced signaling adaptor) to produce IFN- $\beta$  [4–7]. IPS-1 localizes on the outer membrane of the mitochondria *via* its C-terminus [6]. Its N-terminus consists of a CARD domain, which interacts with the

CARD domains of RIG-I and MDA5. Viral RNA resulting from penetration or replication are believed to assemble in the CARD-interacting helicase complex to activate the cytoplasmic IFN-inducing pathway. Although non-infected cells usually express minimal amounts of RIG-I/MDA5, the final output of type I IFN is efficiently induced at an early stage of infection to protect host cells from viral spreading.

Once IPS-1 is activated, the kinase complex consisting of TANK-homologous proteins and virus-activated kinases induce nuclear translocation of IFN regulatory factor-3 (IRF-3) to activate the IFN promoter [8]. NAK-associated protein 1, TANK-binding kinase 1 (TBK1) and I-kappa-B kinase- $\epsilon$  (IKK $\epsilon$ ) are components of the kinase complex that phosphorylates IRF-3 to induce type I IFN [9, 10]. RIG-I recognizes products of various RNA viruses, while MDA5 recognizes products of picornaviruses

Correspondence: Dr. Tsukasa Seya  
e-mail: seya-tu@pop.med.hokudai.ac.jp



[1, 11]. RIG-I and MDA5 share the helicase domain, which is classified into the DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase family, and the domain can bind to various RNA structures. 5'-triphosphate RNA or short dsRNA is a ligand of RIG-I, whereas long dsRNA is a ligand of MDA5 [1, 12]. However, these RIG-I-like receptors (RLR) are usually up-regulated to a sufficient level secondary to IFN stimulation, suggesting that other molecular mechanisms are responsible for the initial sensing of viral RNA.

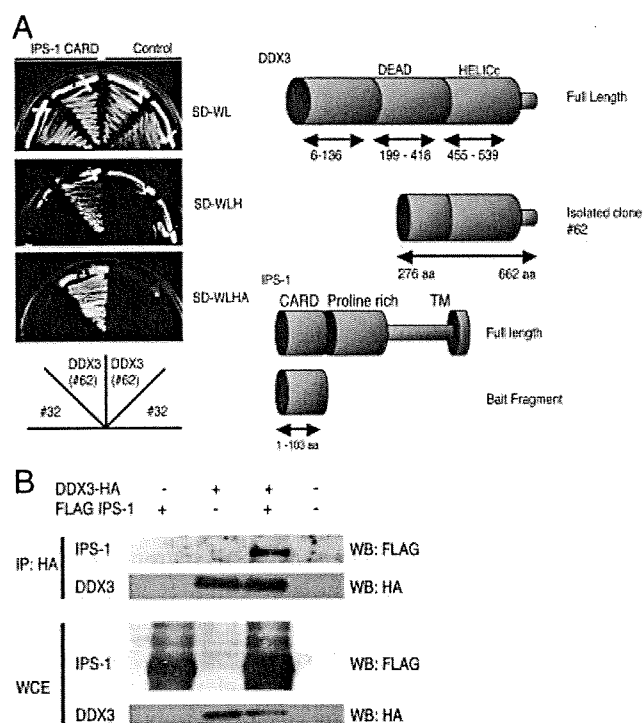
Here, we looked for molecules that bind IPS-1 by yeast two-hybrid, and found a DEAD box helicase, DDX3 (DEAD/H BOX 3), as a component of the complex of IPS-1. DDX3 facilitated IPS-1-mediated IFN- $\beta$  induction to confer high antiviral potential on early infection phase of host cells. This is the first report showing that DDX3 is an IPS-1 complement factor for antiviral IFN- $\beta$  induction in host infectious cells.

## Results

### Involvement of DDX3 in the IPS-1 complex

IPS-1 is constitutively present on the mitochondrial membrane and plays a central role in the cytoplasmic IFN-inducing pathway. We searched for proteins that bind IPS-1 in yeast. Using bait plasmids with the IPS-1 CARD region (aa 6–136), we screened a human lung cDNA library to isolate IPS-1 CARD-interacting proteins. We identified one clone, #62 that encodes the DDX3 C-terminal region (aa 276–662), which included partial DEAD box and helicase superfamily C-terminal regions (Fig. 1A). Their interaction was confirmed in HEK293FT cells by immunoprecipitation (IP), where DDX3 and IPS-1 were coupled (Fig. 1B). We confirmed that the C-terminal fragments of DDX3, at least 622–662 a.a, bound IPS-1 (data not shown). Taken together with the results of the yeast two-hybrid assay, the C-terminal portions of DDX3 directly bind the CARD-like region of IPS-1.

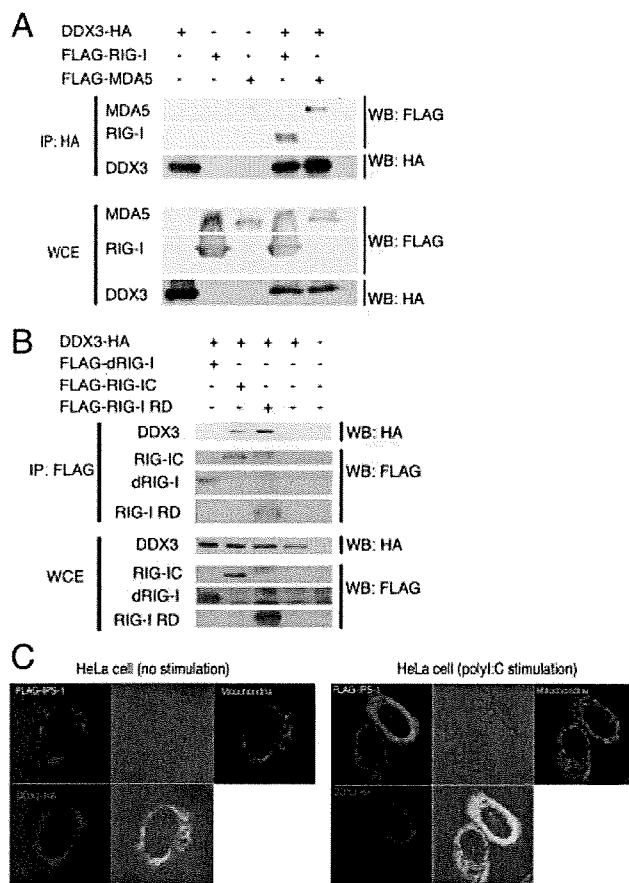
RIG-I and MDA5 helicases also bind the IPS-1 CARD domain [4]. In general, RNA helicases make a large molecular complex, and sometimes form homo- or hetero-oligomers. RIG-I binds to LGP2 helicase, and forms homo-oligomers during Sendai virus infection [11]. Hence, we examined whether DDX3 was associated with the RLR proteins by i.p. RIG-I and MDA5 co-precipitated with DDX3 (Fig. 2A), suggesting that DDX3 is involved in the complex of IPS-1 that interacts with RIG-I and/or MDA5. DDX3 bound the C-terminal helicase domain including the RD region of RIG-I (Fig. 2B). Thus, additional interaction may occur between DDX3 and RIG-I/MDA5. IPS-1 localizes to the membrane of mitochondria [6]. Three-color imaging analysis indicated that DDX3 in part co-localized to the IPS-1-mitochondria complex in non-stimulated resting HeLa cells, which express undetectable amounts of RLR (Fig. 2C and data not shown). These results together with accumulating evidence infer that non-infected cells harbor the complex of DDX3 and IPS-1 with minimal amounts of RIG-I/MDA5.



**Figure 1.** DDX3 binds IPS-1. (A) DDX3 partial cDNA fragment (aa 276–662) isolated by the yeast two-hybrid screening interacted with the IPS-1 CARD region (aa 1–103) in yeast. Tryptophan- and leucine-depleted synthetic dextrose medium plate (SD-WL) is non-selective, and tryptophan-, leucine- and histidine-depleted synthetic dextrose medium plate (SD-WLH) and tryptophan-, leucine- and alanine-depleted synthetic dextrose medium (SD-WLHA) plates are selective plates. Empty bait plasmid (pGBKT7) was used for a negative control. (B) FLAG-tagged IPS-1 and HA-tagged DDX3 expression vectors were transiently transfected into HEK293FT cells by FuGeneHD reagent. 24 h after transfection, cell lysates were prepared, and IP was carried out using anti-HA Ab. The immunoprecipitates were analyzed by western blot using anti-HA or FLAG Ab. Data are representative of three independent experiments.

### DDX3 promotes IPS-1-mediated IFN- $\beta$ promoter activation

Forced expression of IPS-1 causes the activation of transcription from the IFN- $\beta$  promoter. To ascertain the role of DDX3 in IFN- $\beta$  production, we carried out reporter gene analysis to see the enhancing effect of DDX3 on IPS-1-mediated IFN- $\beta$  promoter activation. Overexpression of DDX3 alone caused little activation of the promoter; however, the promoter activation was more augmented by minimal addition of DDX3 to IPS-1 than by overexpressed IPS-1 alone (Fig. 3A). This suggested that DDX3 enhanced IPS-1-mediated signaling despite the lack of RIG-I overexpression. To establish which region of DDX3 is important for IFN- $\beta$  enhancer activity, partial DDX3 fragments were overexpressed with IPS-1, and IFN- $\beta$  promoter activation was examined. The N-terminal region (aa 1–224, aa 224–487, aa 488–621) barely enhanced promoter activation (data not shown), but the C-terminal region (622–662) activated the promoter (Fig. 3B). These data indicated that the C-terminal region of DDX3 is important for the binding to IPS-1 and potentiation of the IPS-1 pathway.



**Figure 2.** DDX3 joins the complex of RIG-I, MDA5 and IPS-1. (A) RIG-I and MDA5 co-precipitate with DDX3. HA-tagged DDX3 was expressed in HEK293FT cells, together with FLAG-tagged MDA5 or RIG-I, and 24 h after transfection, IP was performed using anti-HA Ab and analyzed by western blotting. (B) The C-terminal region of RIG-I participates in complex formation with DDX3. FLAG-tagged RIG-I fragments and HA-tagged DDX3 were expressed in HEK293 cells, and 24 h after transfection, IP was performed using anti-HA Ab and analyzed by western blotting. (C) DDX3 colocalizes with IPS-1. Flag-tagged IPS-1 and HA-tagged DDX3 were transfected into HeLa cells together with or without polyI:C. After 24 h, cells were fixed with formaldehyde and stained with anti-HA polyclonal and anti-FLAG monoclonal Ab. Alexa488 (DDX3-HA) or Alexa633 Ab was used for second Ab. Mitochondria was stained with Mitotracker Red. DDX-3 partially colocalized with IPS-1. Data are representative of three independent experiments.

### DDX3 as a component of initial RNA sensor

RIG-I and MDA5 are IFN-inducible proteins, only traces of which exist in an early phase (<2 h) in the cytoplasm where viral RNA replicate. Previous reports showed that DDX3 binds RNA of poly rA or duplexed RNA [13, 14], and our protein analysis solidified this issue: DDX3 efficiently bound polyI:C and stem-loop RNA of viral origin in a solution (data not shown). DDX3 as well as IPS-1 were expressed even without any stimulation (Fig. 2C and 4A and B) and bound each other in the cytoplasm (Fig. 2C). Hence, DDX3 is a cytoplasmic molecule that can detect viral RNA produced in infected cells.

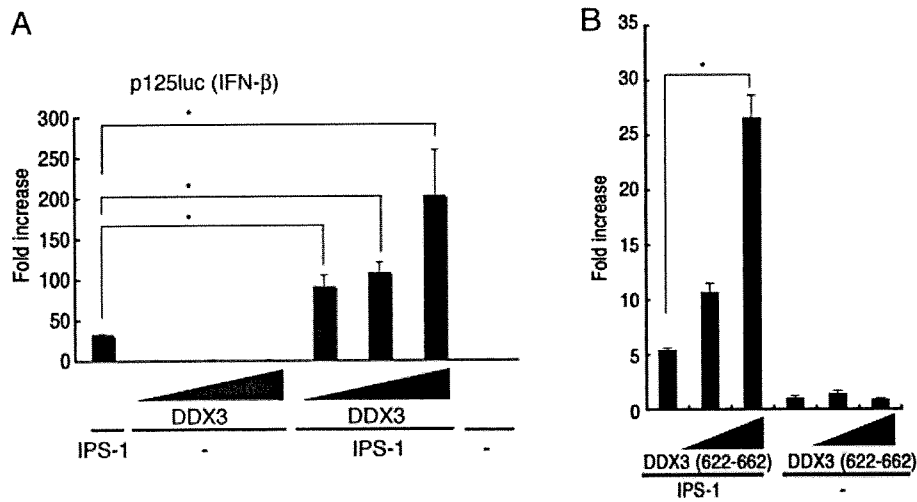
Knockdown studies suggested that polyI:C-mediated IFN promoter activation was abrogated in DDX3-deficient cells even in the presence of overexpressed RIG-I or MDA5 (Fig. 5). DDX3 silencing happened with two different siRNA. Thus, DDX3 may enable RIG-I and IPS-1 to confer activation of the cytoplasmic RNA-sensing pathway on virus-infected cells.

The IFN- $\beta$ -inducing pathway involves IRF-3 kinases TBK1 and IKK $\epsilon$ , which may be targets of DDX3 [15, 16]. By *in vitro* reporter analysis, increasing amounts of DDX3 barely affected IFN- $\beta$  promoter activation by TBK1 and IKK $\epsilon$  (Fig. 6A and B). Slight TBK1-enhancing activity could manage to be detected with DDX3 when decreasing amounts of TBK1 was used in the assay (Fig. 6C and D).

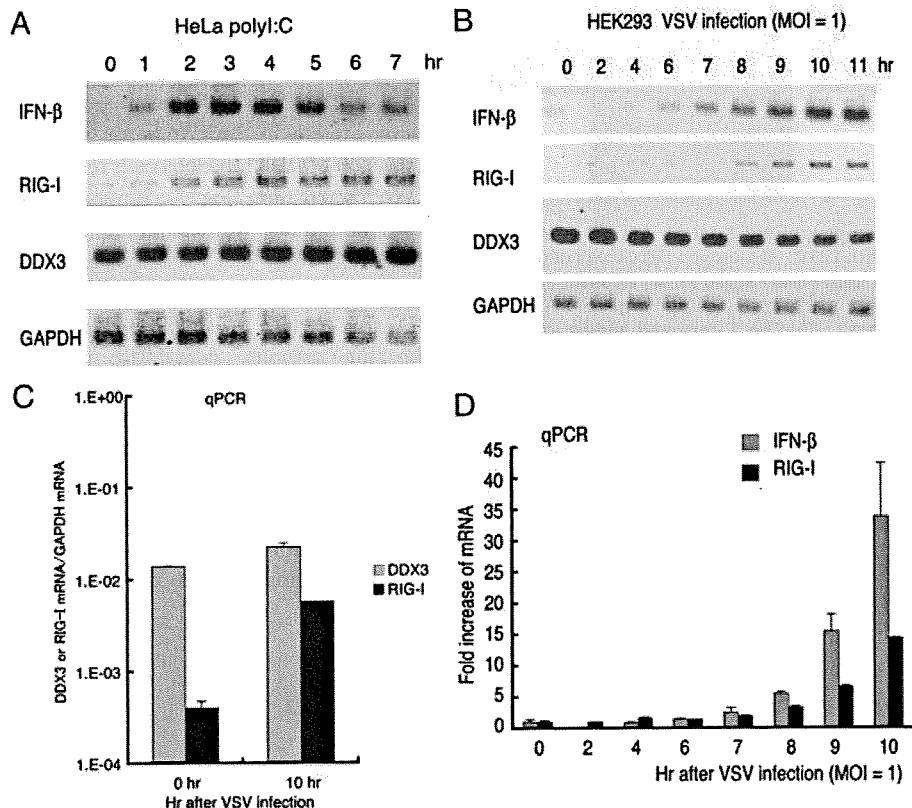
HeLa cells induced the mRNA of RIG-I and IFN- $\beta$  in response to polyI:C stimulation within 1 h (Fig. 4A). More exactly, IFN- $\beta$  induction was ~30 min faster than RIG-I induction in response to polyI:C. IFN- $\beta$  mRNA induction was peaked around 3 h post stimulation, while RIG-I induction continued to increase >3 h (Fig. 4A). When HEK293 cells were infected with vesicular stomatitis virus (VSV) (a RIG-I-stimulating virus), the IFN- $\beta$  mRNA was induced from 6 h, and by that time no RIG-I message was generated (Fig. 4B–D). The RIG-I message began to appear >8 h and was markedly increased (Fig. 4B and D). In either case, no up-regulation was observed with DDX3 but sufficiently present in the cytoplasm (Fig. 4C). Furthermore, overexpression of DDX3 in HeLa cells resulted in potential prevention of VSV propagation (Fig. 7). However, the distribution profiles of DDX3 and IPS-1 were barely altered in response to polyI:C stimulation (Fig. 2C). The results allow us to interpret that when viral RNA enter the cytoplasm of infected cells, the RNA first induce a small amount of IFN- $\beta$  in conjunction with the complex containing trace RIG-I and then the induced IFN- $\beta$  fosters intensive RIG-I/MDA5 induction. The complex is reconstituted together with upcoming RIG-I/MDA5 to amplify the cytoplasmic IFN-inducing pathway. Although the molecular reconstitution was not visible with overexpressed proteins by confocal analysis, DDX3 may act as an enhancing factor for initial RNA-sensing by the IPS-1 complex and conducts the rapid response to viral RNA to facilitate the IPS-1 signaling.

### Discussion

We identified DDX3 as a protein that bound to the IPS-1 CARD region, duplexed RNA and RLR. Although the DDX3 helicase domain is a DEAD box type similar to those of RIG-I and MDA5, DDX3 does not have a signaling domain corresponding to the CARD domain. Therefore, DDX3 may not act as a signal sensor of RNA viruses, as RIG-I and MDA5 do. Considering the role of DDX3 in host RNA metabolism, it is more likely that DDX3 acts as a scaffold for RIG-I (even under the presence of low copy numbers of RIG-I) and intensifies IPS-1 signaling similar to LGP2 [11, 17]. RNA molecules usually form a complex with various



**Figure 3.** The C-terminal region of DDX3 participates in enhancing IPS-1-mediated IFN- $\beta$  promoter activation. (A) Activation of IFN- $\beta$  promoter was examined by reporter gene assay. HEK293 cells were transfected with DDX3- (100, 200 or 300 ng) and/or IPS-1 (100 ng)-encoding plasmids, together with reporter (p125luc) and control plasmids (Renilla luciferase) into 24-well plates. (B) The plasmids for expression of DDX3 (622-662 aa) and IPS-1 or the former only were transfected into HEK293 cells in 24-well plates together with p125luc reporter plasmid. After 24 h, the activation of reporter was measured. Data show mean fold induction+SD of three independent assays. \* $p < 0.05$ , Student's t-test.



**Figure 4.** Earlier induction of IFN- $\beta$  than RIG-I in virus-infected cells. (A) Early induction of IFN- $\beta$  in response to polyI:C. HeLa cells were stimulated with 50  $\mu$ g/mL of polyI:C for indicated hours. Total RNA was extracted with TRIZOL and RT-PCR was carried out to examine the kinetics of expressions of DDX3, IFN- $\beta$ , RIG-I and GAPDH (control). (B) IFN- $\beta$  mRNA induction by VSV infection. HEK293 cell were infected with VSV at MOI = 1, and then total RNA was extracted with TRIZOL reagents at indicated times. The reverse transcription with random primers and PCR at 33 cycle were performed to detect RIG-I, DDX3 or IFN- $\beta$  expression. Data are representative of three independent experiments. (C) Marked induction of RIG-I in VSV-infected cells. HEK293 cells were infected with VSV at MOI = 1, and then the total RNA was extracted with TRIZOL reagent at indicated times. The relative amounts of RIG-I or DDX3 mRNA were quantified by RT-qPCR, in which the mRNA of GAPDH was used for endogenous internal control. (D) Fold increase of IFN- $\beta$  or RIG-I mRNA by VSV infection. The amount of IFN- $\beta$  or RIG-I cDNA was determined by quantitative PCR. The fold increases were calculated by dividing the values of each time point by that of 0 h sample of IFN- $\beta$  or RIG-I. Data show mean+SD pooled from three independent experiments.

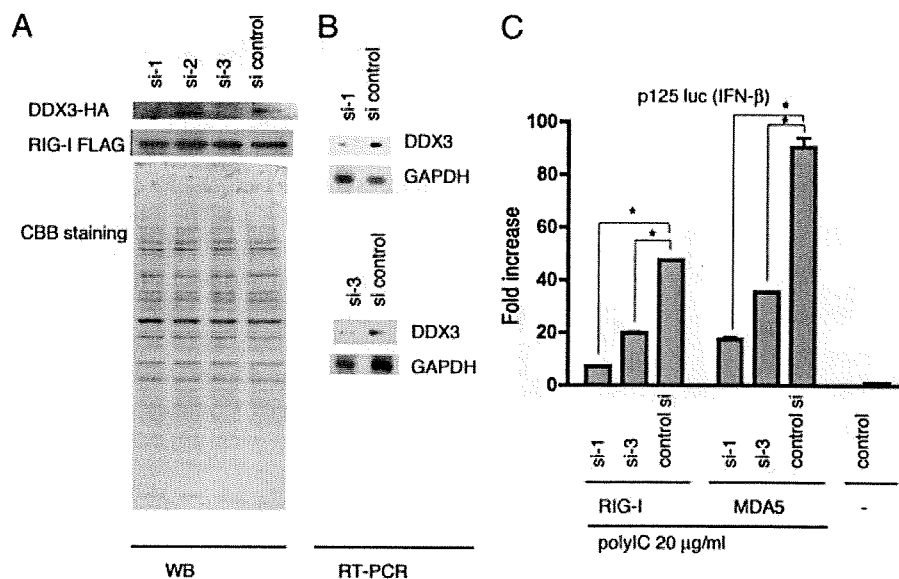
proteins, such as 5'-end capping enzymes or translation initiation factors. Viral RNA also tends to couple with host proteins to replicate and translate RNA. DDX3 capturing RNA may function either in the molecular complex of RIG-I/MDA5/IPS-1 or in the complex of the translation machinery.

Recently, DDX3 was reported to up-regulate IFN- $\beta$  induction by interacting with IKK $\epsilon$  in the kinase complex [18]. IKK $\epsilon$  is an NF- $\kappa$ B-inducible gene, whereas the DDX3-IPS-1 complex is constitutively present prior to infection. DDX3 may bind IKK $\epsilon$  after IKK $\epsilon$  is generated secondary to NF- $\kappa$ B activation [15]. Another report suggested that DDX3 interacts with TBK1 to synergistically stimulate the IFN- $\beta$  promoter [16]. The report further suggested that DDX3 is recruited to the IFN promoter and acts like a transcription factor [16]. These reports also show that not C-terminal but N-terminal region of DDX3 is required for enhancing the IKK $\epsilon$ - or TBK1-mediated IFN promoter activation. We showed that unlike these previous reports, the C-terminal region of DDX3 is important for the IPS-1 activation. These observations indicate that DDX3 is involved in RIG-I signaling at multiple steps. The involvement of DDX3 at several steps is not surprising, because DDX3 plays several roles in RNA metabolisms, such as RNA translocation or mRNA translation.

In cytoplasm, there are large amounts of DDX3 and only trace amounts of RIG-I in resting cells. Therefore, when the virus initially infects human cells, the viral RNA would encounter DDX3 before RIG-I capture the viral RNA. We demonstrated that the initial IPS-1 complex for RNA-sensing involves DDX3 in

addition to trace RIG-I to cope with the early phase of infection. This IPS-1 complex activates downstream signal by involving a minute amount of viral RNA. What happens in actual viral infection is to first induce IFN- $\beta$  and then RIG-I (Fig. 4B), suggesting that the initial IFN- $\beta$  mRNA arises independent of the virus-induced RIG-I. Once IFN- $\beta$  and RIG-I mRNA are up-regulated by viral RNA, the IPS-1 complex turns constitutionally different: the complex contains high amounts of RIG-I, which may directly capture viral RNA without DDX3. Our results indicate that the early IPS-1 complex formed in the early stages of virus-infected cells induce minute IFN- $\beta$  with a mode different from the conventional IPS-1 pathway that RIG-I solely capture viral RNA and activates IPS-1. By retracting DDX3 from the complex by siRNA, only a minimal IFN- $\beta$  response emerges merely with preexisting RIG-I and IPS-1, suggesting DDX3 to be a critical signal enhancer in the early IPS-1 complex. Development of a method to chase endogenous DDX3 will be required to test our interpretation.

The RIG-I generation occurring >8 h post RNA virus challenge makes the complex direct the conventional IFN-inducing pathway harboring sufficient RIG-I/MDA5. Previous reports [13, 14] and our RNA-binding analysis also speculated that one of the RNA-capture proteins is DDX3 since DDX3 tightly binds polyI:C and dsRNA in fluid phase. These RNA-capture proteins may have a role in the IPS-1-involving molecular platform in cells with early virus infection when only a trace RIG-I protein is expressed. This interpretation fits the result that DDX3 acts predominantly on an early phase of virus infection (Fig. 4B and 7).



**Figure 5.** Knockdown of DDX3. (A) Negative control or DDX3 targeting siRNA (20 pmol), DDX3 si-1, -2 or -3, were transfected into HEK293 cells in 24-well plates, together with HA-tagged DDX3 or FLAG-tagged RIG-I expression plasmids, and after 48 h, cell lysates were prepared and analyzed by western blotting with anti-HA or anti-FLAG Ab, and the same membrane was stained with CBB. (B) DDX3 si-1, -3 or control siRNA was transfected into HEK293 cells, and after 48 h, expression of endogenous DDX3 mRNA was examined by RT-PCR. (C) DDX3 si-1, -3 or control siRNA was transfected into HEK293 cells with reporter plasmids and RIG-I- or MDA5 expression plasmid (100 ng). Forty-eight hours after transfection, cells were stimulated with polyI:C (20  $\mu$ g/mL) with dextran for 4 h, and activation of the reporter was measured. siRNA for DDX3 reduced RIG-I- or MDA5-mediated p125luc activation. Data are representative of three independent experiments (A,B). Data show mean fold increase+SD pooled from three independent experiments (C). \* $p$ <0.05, Student's  $t$ -test.