

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
研究分担報告書

自然免疫センサーRIG-IによるHCV増殖阻害の解明と抗HCV製剤の開発

分担研究者 藤田尚志 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨：ウイルスRNAとRIG-Iなどの宿主のセンサー分子は偶然出会うのではなく、能動的に凝集体が形成されることによって感知されることが明らかとなった。その機構は一般にストレス顆粒形成として知られるものと一部共通であると考えられるが、ウイルス感染の場合ウイルスRNAが必須であり、かつストレス応答の引き金となっている。ウイルス感染によるストレス顆粒形成は重要な自然免疫応答であり、その制御は抗HCVストラテジーとして重要と考えられる。

A. 研究目的

RNAヘリカーゼRIG-IはHCVを含む多くのウイルスRNAの感知に必須な役割を果たしていることが示されているが、細胞内のどこでウイルスの増殖、そのRNAの感知が行われているのか不明であった。本研究ではこのウイルス認識の「場」を突き止め、それを抗HCV応答の促進に結びつけることを目指した。

B. 研究方法

培養細胞を用いて種々のウイルス感染時に抗ウイルス自然免疫応答を制御している蛋白質群の細胞内局在を解析した。解析には当研究室で作製した抗RIG-I抗体を中心として各種抗体を用いた。ウイルスRNAの検出はFISH法によって行った。またウイルス抗原とRIG-Iなどの物理的な結合は免疫沈降法によって検出した。

（倫理面への配慮）

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

これまでの研究の結果、RIG-Iは各種ウイルスの感染によって顆粒状に凝集することが判明していたので、本年度はこの本態を明らかにすることを目指した。この凝集の誘導にはウイル

スのRNAが必須であるとともに共局在していること、さらに凝集を阻害すると抗ウイルスシグナルが著しく減弱することが判明した。小凝集体の構成成分をさらに詳細に検討する目的で、凝集体を形成する事が知られている蛋白質に対する抗体を用いて細胞染色を行なった。その結果、RIG-Iの凝集体は様々なストレスによって誘導される「ストレス顆粒」である事が明らかとなった。ウイルス感染以外のストレスでもストレス顆粒は形成されるが、その場合インターフェロン誘導は起きず、その原因はウイルスRNAのストレス顆粒への有無が決定している事が明らかとなった。すなわちストレス顆粒形成はRIG-IがウイルスRNAを感知する場であって、その形成が無いと効率的にウイルスRNAのセンサーとしての機能が発揮できない事が判明した。また幾つかのウイルスはストレス顆粒の形成を阻害する事によって免疫機構から逃れている事も明らかとなった。さらにはウイルス感染した細胞内ではストレス顆粒はIPS-1の凝集体と密接に接触していることが見いだされた。

D. 考察

以上の結果は細胞内の特定の場、（例えばHCVの場合は脂肪滴の周辺）で増殖するウイルスを検出してその周辺にRIG-Iをはじめとするストレス顆粒に特異的なRNA結合蛋白質が凝集し、そこでRIG-Iの活性化が起きることを強く示唆している。詳細な機構はまだ不明であるが、ウイルス感染、特にウイルス特異的な二重鎖RNAをストレスとして感知して、特異的な蛋白質を凝集させる機構が存在することが明らかとなった。

E. 結論

ウイルス感染によるストレス顆粒形成は重要な自然免疫応答であり、ウイルス側はそれを阻害することによって増殖を行なっている場合がある。ウイルスによる、ストレス顆粒形成阻害を阻止すること、ストレス顆粒形成を促進することは、抗HCVストラテジーとして重要と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kageyama M, Takahasi K, Narita R, Hirai R, Yoneyama M, Kato H, Fujita T.: 55 Amino acid linker between helicase and carboxyl terminal domains of RIG-I functions as a critical repression domain and determines inter-domain conformation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Oct 12. [Epub ahead of print]
2. Ouda, R., Onomoto, K., Takahasi, K., Edwards, M.R., Kato, H., Yoneyama, M. and Fujita, T.: Retinoic Acid-inducible Gene I-inducible miR-23b Inhibits Infections by Minor Group Rhinoviruses through Downregulation of the Very Low Density Lipoprotein Receptor. *J. Biol. Chem.* 286, 26210-219 (2011)
3. Onomoto K., Morimoto S., Kawaguchi T., Toyoda H., Tanaka M., Kuroda M., Uno K., Kumada K., Matsuda F., Shimotohno K., Fujita T. and Murakami Y.: Dysregulation of IFN System Can Lead to Poor Response to Pegylated Interferon and Ribavirin Therapy in Chronic Hepatitis C. *PLoS One* 2011 Volume 6 | Issue 5 | e19799
4. Bowzard JB, Davis WG, Jeisy-Scott V, Ranjan P, Gangappa S, Fujita T, Sambhara S.: PAMPer and tRIGer: ligand-induced activation of RIG-I. *Trends Biochem Sci.* 36, 314-9 (2011)
5. Onoguchi K, Yoneyama M, Fujita T.: Retinoic Acid-Inducible Gene-I-Like Receptors. *J Interferon Cytokine Res.* 31, 27-31 (2011)
6. Kato, H., Takahasi, K. and Fujita, T.: RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. *Immunological Reviews* 243, 91-98 (2011)
7. Yoneyama, M. and Fujita, T.: Chapter 5 Cytoplasmic Sensing of Viral Double-Stranded RNA and Activation of Innate Immunity by RIG-I-Like Receptors, in *Innate Immune Regulation and Cancer Immunotherapy*, Ed. Rong-Fu Wang (2011)
8. Yamamoto, S.P., Narita, R., Go, S., Takahasi, K., Kato, H. and Fujita, T.: Intracellular Viral RNA Sensors: RIG I Like Receptors in Nucleic Acid Sensors and Antiviral Immunity, Ed. Suryaprakash Sambhara and Takashi Fujita (2011)

2. 学会発表

1. Fujita T.: Activation of an antiviral program through the cytoplasmic recognition of non-self RNA patterns by RIG-I-Like Receptors. 9th Kyoto University and National Taiwan University Joint-Symposium "Molecular and Cell Biology Symposium" June 4, 2011 Kyoto, Japan
2. Fujita T.: Viral replication and its detection by RIG-I-Like Receptors: Formation of RIG-I granules and signal transduction through mitochondrion. The Uehara Memorial Foundation Symposium-2011 June 6-8, 2011 Tokyo
3. Fujita T.: Antiviral Innate Immunity Induced by RIG-I-Like Receptors. Inter-University Biochemistry Postgraduate Symposium in Hong Kong June 11, 2011 Hong Kong
4. Fujita T.: Non-self RNA Sensing Mechanism of RIG-I Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. CSH Asia Conferences Infection and Immunity September 8-12, 2011 Suzhou, China
5. Fujita T.: Viral replication and its detection by RIG-I-Like Receptors: Formation of RIG-I granules and signal transduction through mitochondrion. International Union of Microbiological Societies Congresses 2011 September 13, 2011 Sapporo, Japan
6. Ouda, R., Onomoto, K., Takahasi, K., Edwards, M.R., Kato, H., Yoneyama, M. and Fujita, T.: RIG-I-inducible miR-23b inhibits infections by minor group rhinoviruses through down-regulation of the receptor VLDL. The 18th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research Dec. 7-9, 2011 Shanghai, China
7. Fujita, T.: Viral replication and its detection by RIG-I-Like Receptors: Formation of RIG-I granules and signal transduction through mitochondrion. 2011 International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction November 19-20, 2011 Tainan, Taiwan

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
研究分担報告書

ヒト肝細胞における自然免疫機構の解析とこの活性化による抗 HCV 戦略の開発

分担研究者 土方 誠 京都大学ウイルス研究所 准教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)はヒトに持続感染することで慢性肝炎を引き起こすが、本来 HCV が感染する肝細胞に本来備わっている自然免疫系がどのように機能しているかについては全く不明であった。その原因のひとつは HCV が感染増殖するヒト肝細胞の自然免疫の実体が良くわかっていないことにある。そこで我々がヒト初代培養細胞に類似した性質をもつ不死化肝細胞 HuS-E/2 細胞を用いてヒト肝細胞における自然免疫機構について研究をおこなった。HuS-E/2 細胞を IRF3、IRF7、あるいは RIG-I に対する siRNA または shRNA を用いて処理し、センダイウイルス(SV)を感染させ各種インターフェロン(IFN)遺伝子の発現誘導をその mRNA を RT-PCR および半定量 RT-PCR によって検出することで解析した。その結果、IRF7 はすべての IFN 遺伝子発現に関与しており、RIG-I は IFNbeta と IFNlambda の発現に必要であることがわかった。HuS-E/2 細胞に HCV NS3/4A タンパク質を恒常的に発現する細胞を作成し、HCV 感染の一部を再現するモデル細胞として樹立した。この細胞ではこれまで観察された RIG-I 依存的な自然免疫関連遺伝子発現が抑制されている事を確認できた。HuS-E/2 細胞をより肝細胞に類似した遺伝子発現プロファイルを示す立体培養下で培養し、その自然免疫応答を解析したところ、平面培養に比べてウイルス感染のない状態で RIG-I と IRF7 遺伝子恒常発現が上昇した。SV 感染後の初期 IFNalpha1, IFNbeta と IFNlambda 遺伝子の発現誘導は著しくより高くより初期におこった。このことから肝細胞におけるウイルス感染初期応答の解析により本来の肝細胞に類似している細胞を用いることの必要性が明らかになった。

A. 研究目的

本来C型肝炎ウイルスの感染標的細胞であるヒト肝細胞における自然免疫システムを解明にすることにより、その活性を強化し、効果的に HCV を排除する抗 HCV 戦略構築すること、そしてまたその自然免疫機構を抑制することで天然の HCV が効率良く感染増殖し、抗 HCV 薬剤等のインビトロでの評価を容易にする実験系を構築することを目的とした。

B. 研究方法

1. 初代培養ヒト肝細胞と類似した性質を有するヒト不死化肝細胞 HuS-E/2 細胞に、IRF3, IRF7, RIG-I の mRNA を抑制する siRNA あるいは shRNA を導入あるいは発現させて、その RNA ウイルス感染初期の自然免疫応答を解析した。感染効率の高いセンダイウイルスを感染させた。感染後の1時間後から12時間後における各種自然免疫関連遺伝子の発現を RT-PCR 法ならびに半定量リアルタイム PCR 法を用いて経時的に解析した。
2. HuS-E/2 細胞に JFH1 株由来の HCVNS3/4A

を発現させた細胞クローンを作成し、HCV 感染し RIG-I 下流のアダプター分子 IPS1 が切断され RIG-I-IRF7 の機能を低下させた後、センダイウイルスを感染させ、各種自然免疫関連遺伝子の発現に対する影響を検討した。3. 天然型 HCV の感染増殖効率が上昇し、ヒト肝細胞の性質により近似した遺伝子発現プロファイルを示ようになることがわかっている立体培養法を HuS-E/2 細胞に適用し、立体培養下における自然免疫反応を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報等を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

1. 前年度の結果からヒト初代培養肝細胞と HuS-E/2 細胞にセンダイウイルスを感染させた場合、感染後初期の自然免疫応答反応がそれぞれ類似していたことから、HuS-E/2 細胞をヒト肝細胞のモデルとしてその自然免疫機構の解析をおこなった。IRF3、IRF7、あるいは RIG-I に対する siRNA または shRNA を用いて HuS-E/2 細胞の中のそれぞれの mRNA 量を抑制させ、そのセンダイウイルス感染 v 以下のことがわかった。IRF3 の発現低下では RIG-I, IFNbeta, INFlambda3 遺伝子の発現誘導が抑制されていた。IRF7 の発現低下では RIG-I, IFNalpha1, IFNbeta, INFlambda3 遺伝子の発現誘導が抑制されていた。RIG-I の発現低下では IFNbeta, INFlambda3 遺伝子の発現誘導が抑制されていた。

2. HuS-E/2 細胞に JFH1 株由来の HCV NS3/4a を恒常的に発現させた細胞を作成し、その HCV 感染モデル細胞の一つとして使用して以下の検討をおこなった。この細胞にセンダイウイルスを感染させ、初期自然免疫応答反応を検討した結果以下のことがわかった。RIG-I, IFNbeta, INFlambda3 遺伝子発現が抑制されたが、IFNalpha1 遺伝子の発現誘導に変化はなかった。

3. HuS-E/2 細胞は立体培養することにより本来の肝細胞により類似した遺伝子発現プロフィールを示し、患者血由来 HCV の感染増殖効率も向上することがわかっているため、この立体培養下における HuS-E/2 細胞の自然免疫応答について上記同様解析した。各因子の mRNA の恒常発現量について検討したところ、平面培養時には比較的低い発現が検出された RIG-I と IRF7 mRNA の発現が高く発現されていることがわかった。またセンダイウイルスの感染では IFNbeta、IFNlambda3 mRNA の発現誘導が平面培養時に比較して早くまた高くなった。また IFNalpha1 mRNA の誘導はより顕著に高くなることがわかった。またここで特記すべきことはこの細胞では IFNlambda3 mRNA の発現誘導が最も著しいことである。

D. 考察

1. 今回の結果から肝細胞では恒常的に発現している IRF7 は、ウイルスの感染に対する自然免疫応答の中で中心的な役割を持っていて IFNalpha1、IFNbeta、IFNlambda3 そして RIG-I 遺伝子発現に関与することが示唆され

た。これらの中で IFNbeta、IFNlambda3 遺伝子の発現誘導は RIG-I に依存しており、IFNalpha1 遺伝子発現の初期誘導は RIG-I に非依存的であることがわかった。今後、肝細胞におけるウイルス感染初期の IFNalpha1 遺伝子発現が初期自然免疫応答に対してどのような役割を持つのかを明らかにする必要があると考えられた。

2. 同じ不死化肝細胞を立体培養することで平面培養で観察する自然免疫応答遺伝子発現結果とは異なる結果を示すものがあった。特にこの応答に中心的な役割をしていることが考えられる RIG-I や IRF7 mRNA の発現が上昇していることは立体培養時の方がウイルス感染後の早く高い IFNalpha1、IFNbeta、IFNlambda3 mRNA の遺伝子発現誘導を説明するものであることが考えられた。

E. 結論

肝細胞における IRF7 遺伝子の恒常的な発現はウイルス感染初期において RIG-I 非依存的な IFNalpha 遺伝子の発現誘導に関与することが考えられるがその発現誘導の機能はまだ不明である。今回立体培養により平面培養では異なる自然免疫関連遺伝子の発現パターンが観察されたことから、本来の肝細胞の自然免疫機構を解明するためには平面培養時における細胞の解析だけでは不十分であり、立体培養した細胞の動態も合わせた解析の必要性が考えられた。今後 HCV タンパク質を発現したヒト不死化肝細胞を立体培養するなどして解析を進める。このことからヒト肝細胞の自然免疫機構を効率良く活性化し、また機能を向上させる方法の開発により肝細胞を抗 HCV 状態に変化させることが可能であることが考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Yasuo Ariumi, Misao Kuroki, Yukihiro Kushima, Kanae Osugi, Makoto Hijikata, Masatoshi Maki, Masanori Ikeda, Nobuyuki Kato: Hepatitis C Virus Hijacks P-body and Stress Granule Components Around Lipid Droplets. *J. Virol.*, 85(14), 6882-6892, 2011
- 2 Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki, Matthew J.

Evans, Kunitada Shimotohno, Kazuaki Chayama, Yoshiharu Matsuura, Makoto Hijikata, Kohji Moriishi, Tsukasa Seya, Nobuyuki Enomoto, Kazuhiko Koike, Nobuyuki Kato, Tatsuya Kanto, Hak Hotta: Will there be an HCV meeting in 2020? Summary of the 17th International Meeting in Hepatitis C Virus and Related Viruses, Gastroenterology, 141(1), E1-E5, 2011

2. 学会発表

- 1 Yukihiro Kushima, Yuichi Abe, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Novel targets for anti HCV drugs preventing infectious virus particle production. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference, The Latest Advances in Liver Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics, Chiba, Japan, March 1-3, 2011.
- 2 Yuichi Abe, Hussein H. Aly, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus (HCV) particle production. The 6th International symposium of institute network. Tokyo, Japan, June 9-10, 2011
- 3 Yuichi Abe, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus particle production. 18th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Seattle, USA, Sept 8-12, 2011

- 4 Yuichi Abe, Hussein Aly, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus (HCV) particle production. 平成 23 年 12 月 12-15 日、横浜、2011 年
- 5 阿部雄一、下遠野邦忠、脇田隆字、土方 誠: HCV粒子の感染性獲得に関する肝細胞内シグナルの解析、第7回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、平成23年7月1日、広島、2011年6) 土方 誠: プロスタノイドによる HCV の感染性粒子産生制御、平成 23 年度 北海道大学 遺伝子病制御研究所 研究集会『感染、免疫、炎症、発癌』、平成 23 年 12 月 4-5 日、札幌 2011

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
 - 1 上皮性体性肝細胞の製造方法、発明者 土方 誠、アリ ハサン フセイン、山口達哉、出願日 2011 年 3 月 25 日、出願番号 特願 2011-67112
 - 2 C型肝炎ウイルスの感染抑制剤、発明者 土方 誠、阿部雄一、脇田隆字、茶山一彰、出願日2011年9月30日、出願番号 PCT/JP2011/072682
2. 実用新案登録 特になし。
3. その他 特になし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
研究分担報告書

制限酵素を用いた IL28B SNP の判定

分担研究者 池田正徳 岡山大学 准教授

研究要旨：C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン／リバビリン療法における宿主側の予測因子として、IL28B近傍の一塩基多型（SNP）が重要であることが知られている。しかしながら、IL28B SNPの違いがどのように治療効果に影響を及ぼすかについては明らかにされていない。その理由の一つとして良い実験モデルがないことが挙げられる。今年度は、C型肝炎ウイルス（HCV）の複製が可能なヒト肝細胞株であるHuH-7、Li23細胞以外に11種類の肝細胞株（Li21、Li22、Li24、PLC、OUMS29、PH5CH8、HepG2、NKNT3、HuH-6、HLE、HLF）のIL28B SNPs（rs8099917とrs12979860）について検討した。また、rs8099917については制限酵素を用いた簡便な判定法を開発した。

A. 研究目的

IL28B領域の一塩基多型(SNPs)がC型慢性肝炎に対するペグインターフェロン／リバビリン(PEG-IFN/RBV)療法の重要な予測因子であることが国内外のグループにより報告された。しかしながら、IL28B SNPsが治療に及ぼす効果については明らかとなっていない。本研究はIL28B SNPsが治療に及ぼす効果を研究するための肝細胞を用いた実験モデルを開発することを目的とする。

B. 研究方法

昨年度、C型肝炎ウイルス(HCV)の複製増殖が可能なHuH-7、Li23細胞を用いて、Tanakaら(Nat Genet. 2009)により報告されたIL28 SNP(rs8099917)を決定した。HuH-7細胞ではPEG-IFN/RBV療法抵抗性(T/G)の遺伝子型であり、Li23細胞ではPEG-IFN/RBV療法感受性(T/T)の遺伝子型であった。HuH-7細胞を用いた全長HCV RNA複製系(OR6)ではIFN-λに対して抵抗性であったのに対して、Li23細胞を用いた全長HCV RNA複製系(ORL8)ではIFN-λに対して感受性であった。また、両細胞におけるIFN-α、IFN-λ処理におけるIFN誘導遺伝子の発現プロファイルも異なることを報告した。

本年度は、HuH-7、Li23細胞以外の11種類の肝細胞株のIL28B SNPsについて検討した。研究に用いた11種類の細胞株のうち、9種類はヒト肝癌細胞株由来(Li21、Li22、Li24、PLC、OUMS29、HepG2、HuH-6、HLE、及びHLF)で、2種類は不死化ヒト肝細胞株(PH5CH8とNKNT3細胞)由来である。

HuH-7細胞とLi23細胞を含む計13種類の肝細胞株を用いて、はじめにrs8099917の遺伝子型について、ダイレクトシーケンス法にて検討した。次に、Geら(Nature,2009)により報告されたrs12979860の遺伝子型を、ダイレクトシーケンス法にて検討した。rs8099917の遺伝子型はメジャー、ヘテロ、及びマイナータイプではそれぞれ、T/T、T/G、およびG/Gとなる。また、rs12979860の遺伝子型はメジャー、ヘテロ、及びマイナータイプではそれぞれ、C/C、C/T、およびT/Tとなる。

rs8099917の遺伝子型判定については制限酵素 *BsrDI* を用いて遺伝子型を判定することが可能であったので、PCR産物(461 bp)を *BsrDI* 処理して電気泳動を行い、DNA断片サイズのパターンを検討した。メジャータイプ(T/T)では制限酵素で切断されないため461 bpのバンドが、ヘテロタイプ(T/G)では461、230、および229 bpのバンドが、そしてマイナータイプ(G/G)では230と229 bpのバンドが検出できた。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

C. 研究結果

はじめに、13種類の肝細胞株に対してIL28B SNP (rs8099917)の遺伝子型をダイレクトシーケンス法で検討した。Li21、Li22、Li23、Li24、PLC、OUMS29、PH5CH8、及びHepG2細胞ではメジャー(T/T)タイプを、NKNT3、HuH-6、およびHuH-7ではヘテロタイプ(T/G)を、HLEとHLF細胞ではマイナータイプ(G/G)を示した。次に、13種類の肝細胞株に対してIL28B SNP (rs12979860)の遺伝子型をダイレクトシーケンス法で検討した。Li21、Li22、Li23、Li24、PLC、OUMS29、及びPH5CH8細胞ではメジャー(C/C)タイプを、HepG2、NKNT3、HuH-6、およびHuH-7ではヘテロタイプ(C/T)を、HLEとHLF細胞ではマイナータイプ(C/C)を示した。以上の結果をまとめると、Li21、Li22、Li23、Li24、PLC、OUMS29、およびPH5CH8細胞ではrs8099917とrs12979860のいずれにおいても遺伝子型はメジャータイプを示し、HLEとHLF細胞ではマイナータイプを示した。しかしながら、HepG2細胞ではrs8099917ではメジャータイプの遺伝子型であったのに対して、rs12979860ではヘテロタイプとなり、両SNPs間で遺伝子型が乖離する結果となった。

rs8099917では遺伝子型の違いを、制限酵素*BsrDI*の切断パターンにより判定することが可能であることがわかった。Li21、Li22、Li23、Li24、PLC、OUMS29、PH5CH8、及びHepG2細胞ではメジャー(T/T: 461bp)タイプを、NKNT3、HuH-6、およびHuH-7ではヘテロタイプ(T/G: 461、230、および229 bp)を、HLEとHLF細胞ではマイナータイプ(G/G: 230と229 bp)を示した。このように、制限酵素法によるrs8099917の遺伝子型の判定はダイレクトシーケンス法の結果と完全に一致した。rs12979860に対しては適当な制限酵素が存在しないため制限酵素法による遺伝子型の判定はできなかった。

D. 考察

13種類のヒト肝細胞株に対してPEG-IFN/RBV療法の予測因子であるIL28B SNPs (rs8099917とrs12979860)をダイレクトシーケンス法で検討した。HepG2を除く11種類のヒト肝細胞株では両SNPsの遺伝子型は一致した。一方、HepG2細胞においてはrs8099917では治療感受性のメジャータイプ(T/T)であったのに対して、rs12979860では治療抵抗性のヘテロタイプ(C/T)となり両

SNPs間で遺伝子型が乖離する結果となった。rs8099917とrs12979860の遺伝子型が乖離するケースは臨床でも報告されているため、HepG2細胞は、このようなケースにおけるIFN応答を検討するよい実験モデルとなることが期待される。また、HepG2細胞はHuH-7細胞よりは低いレベルながらもHCV RNA複製が可能であり、CD81を強制発現することでHCV感染も可能であるため、HCVが複製増殖しているときのIFN応答についても検討が可能である。

rs8099917については制限酵素*BsrDI*の切断モチーフを含むため、制限酵素による切断により遺伝子型の判定が可能であることがわかった。13種類のヒト肝細胞株における制限酵素法によるrs8099917の遺伝子型判定の結果は、ダイレクトシーケンス法の結果と完全に一致した。このことから、ダイレクトシーケンス法によるrs8099917の遺伝子型判定は、簡便な制限酵素法に置き換えることができることがわかった。

以上、13種類のヒト肝細胞株のIL28B SNPs (rs8099917とrs12979860)を検討し、7種類 (Li21、Li22、Li23、Li24、PLC、OUMS29、およびPH5CH8)の治療感受性のメジャータイプ、3種類 (NKNT3、HuH-6、およびHuH-7)の治療抵抗性のヘテロタイプ、2種類 (HLEとHLF細胞)の治療抵抗性マイナータイプを同定した。興味深いことにHepG2ではrs8099917とrs12979860の遺伝子型が一致しない結果となった。来年度はこれらのIFN応答に関するIL28B SNPの異なる肝細胞株を用いてIL28B SNPの違いによるIFN応答について検討する。また、制限酵素法による簡便なrs8099917の遺伝子型判定法を用いて臨床材料を検討したい。

E. 結論

13種類の肝細胞株に対して、PEG-IFN/RBV療法の予測因子であるIL28B SNPの遺伝子型を、制限酵素法で決定した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1.論文発表

1 Mori K, Ueda Y, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda

- M, Kato N. Development of a drug assay system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Virus Genes*, in press, 2012.
- 2 Iikura M, Furihata T, Mizuguchi M, Nagai M, Ikeda M, Kato N, Tsubota A, Chiba K. ENT1, a ribavirin transporter, plays a pivotal role in antiviral efficacy of ribavirin in a hepatitis C virus replication cell system. *Antimicrob. Agents Chemother.*, in press, 2012.
 - 3 Takeshita S, Ichikawa T, Taura N, Miyaaki H, Matsuzaki T, Otani M, Muraoka T, Akiyama M, Miura S, Ozawa E, Ikeda M, Kato N, Isomoto H, Tkashima F, Nakao K. Geranylgeranylacetone has anti-hepatitis C virus activity via activation of mTOR in human hepatoma cells. *J Gastroenterol*, in press, 2011.
 - 4 Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The ESCRT System Is Required for Hepatitis C Virus Production. *PLoS ONE*, 6:e14517, 2011.
 - 5 Ikeda M, Kawai Y, Mori K, Yano M, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, Kato N. Anti-ulcer agent teprenone inhibits hepatitis C virus replication: potential treatment for hepatitis C. *Liver Int*, 31:871-880, 2011.
 - 6 Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Mechanism of action of ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system. *Virus Res*, 157: 61-70, 2011.
 - 7 Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M, Ikeda M, Kato N. Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. *J. Virol.*, 85:6882-6892, 2011.
 - 8 Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Plural assay systems derived from different cell lines and hepatitis C virus strains are required for the objective evaluation of anti-hepatitis C virus reagents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 409:663-668, 2011.
2. 学会発表
- 1 上田 優輝, 森 京子, 池田 正徳, 有海 康雄, 加藤 宣之. 抗HCV剤の活性評価には複数の細胞株由来のアッセイ系が必要である. 第47回日本肝臓学会総会, 2011年6月, 東京.
 - 2 上田 優輝, 森 京子, 池田 正徳, 有海 康雄, 加藤 宣之. 抗HCV活性の客観的な評価には複数の細胞株と複数のHCV株由来のアッセイ系が必要である. 第26回中国四国ウイルス研究会, 2011年6月, 徳島.
 - 3 瀬島 寛恵, 森 京子, 有海 康雄, 池田 正徳, 加藤 宣之. 長期にわたるC型肝炎ウイルスのゲノム複製によって発現が変動した遺伝子群の同定. 第26回中国四国ウイルス研究会, 2011年6月, 徳島.
 - 4 池田 正徳, 武田 緑, 加藤 宣之. メバロン酸経路を標的とした新しい抗HCV剤開発の基礎. 第47回日本肝臓学会総会, 東京, 2011年6月.
 - 5 武田 緑, 池田 正徳, 有海 康雄, 脇田 隆宇, 加藤 宣之. 異なるヒト肝細胞株(HuH-7とLi23)を用いたHCV感染レポーターアッセイ系の開発. 第26回中国四国ウイルス研究会, 2011年6月, 徳島.
 - 6 Mori K, Hiraoka O, Ikeda M, Ariumi Y, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. A host factor determining the anti-HCV activity of ribavirin. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2011. Oct, Nagoya.
 - 7 Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles in cell-based long-term HCV RNA replication. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2011. Oct. Nagoya.
 - 8 Ikeda M, Takeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. The role of geranylgeranyl transferase II in hepatitis C virus life cycle. The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society in Japan, 2011. Dec., Yokohama.
 - 9 Ikeda M, Takeda M, Ariumi Y, Waikita T, Kato N. Geranylgeranyl transferase is essential for HCV RNA replication. 18th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, 2011 Sep., Seattle, USA.
 - 10 Takeda M, Ikeda M, Ariumi Y, Waikita T, Kato N. Development of HCV JFH-1 reporter assay systems using different human hepatoma cell lines. Meetings of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2011, 2011 Sep., Sapporo, Japan.
 - 11 Mori K, Hiraoka O, Ikeda M, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. Identification of a host factor determining the anti-HCV activity of ribavirin. 18th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, 2011 Sep., Seattle, USA.
 - 12 Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Plural assay systems derived from different cell lines and HCV strains are required for the objective evaluation of anti-HCV reagents. 18th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, 2011 Sep., Seattle, USA.
 - 13 Sejima S, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N.

Identification of host genes showing differential expression profiles in cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. Meetings of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2011, 2011 Sep., Sapporo, Japan.

- 14 Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. HCV production requires the PML tumor suppressor protein. 18th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, 2011 Sep., Seattle, USA.
- 15 Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijilata M, Maki M, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Hepatitis C virus hijacks P-Body and stress

granule components around lipid droplets. 18th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, 2011 Sep., Seattle, USA.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
特願 2011-099087 号、HCV 治療効果予測マーカー
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
研究分担報告書

polyIC リポソーム製剤による肝炎ウイルス排除機構の解析

分担研究者 小原道法 東京都医学総合研究所 プロジェクトリーダー

研究要旨：自然免疫は非自己 RNA を認識し、IFN を産生する。我々は、二本鎖 RNA である polyIC と肝臓特異的 DDS であるカチオニックリポソームの複合体 (polyIC-LIC) が、ヒト肝臓において IFN β でなく IFN λ を誘導し、強力な抗 HCV 効果を示すことを見いだした。これにより、IFN- λ を強力に誘導する核酸/リポソーム製剤を同定した。さらにインターフェロン治療抵抗性とされている IL28B minor allele のヒト肝臓を移植したキメラマウスに HCV を感染させ、本製剤を投与し抗 HCV 効果を評価したところ、IL28B major allele と同等な阻害活性を示した。

A. 研究目的

自然免疫は非自己 RNA を認識し、IFN を産生する。我々は、二本鎖 RNA である polyIC と肝臓特異的 DDS であるカチオニックリポソームの複合体 (polyIC-LIC) が、ヒト肝臓において IFN β でなく IFN λ を強力に誘導し抗 HCV 効果を示すことを報告した。しかし、IFN λ と IFN β が自然免疫においてどのような役割を果たしているかは明らかでない。そこで、自然免疫応答における IFN λ 及び IFN β の役割を明らかにするため、ウイルス感染及び pIC-LIC 投与時の IFN λ 、IFN β の応答を *in vivo*, *in vitro* において評価した。さらに、*in vitro* の実験系によりその誘導メカニズムを明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

polyI:C及び肝臓特異的なDDSであるカチオニックリポソーム(LIC101)の複合体 (polyIC/LIC)を作製し、まず、HCV感染およびpIC-LICの投与によるヒト肝臓型キメラマウスでの肝臓内IFN λ 、IFN β の発現量の変化を評価した。次に、各種細胞株（肝臓由来のHepG2、肺由来のMRC5、及び腎臓由来のHEK293T）でのpIC-LIC投与時のIFN λ 、IFN β の応答を評価するとともに、siRNAを使用した遺伝子ノックダウンを行いその誘導メカニズムを調べた。

(倫理面への配慮)

動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に従う。また、東京都臨床医学総合研究所動物実験委員会の承認

を得ている。

C. 研究結果

HCV感染及びpolyIC-LIC投与により、ヒト肝臓キメラマウスの肝臓内ではIFN λ がIFN β に比べ著明に誘導されていることを見出した。*in vitro*の実験では、pIC-LIC投与により、HepG2ではIFN λ がIFN β に比べ誘導されるのに対し、MRC5、HEK293TではIFN β がIFN λ に比べ優位に誘導された。さらに、RNAの認識に必須の受容体であるTLR3のアダプター分子(TICAM-1)、及びRetinoic Acid-Inducible Gene-I(RIG-I)-like receptor(RLR)の下流分子であるIPS-1をノックダウンしたところ、いずれにおいてもIFN λ の誘導が抑制された。

D. 考察

ヒト肝細胞での自然免疫応答においてIFN- λ が重要な役割を果たしていることが *in vivo*, *in vitro* で示された。また細胞株を使用した実験から、臓器によりIFN 応答が異なることが示された。さらに、RNAがToll like receptor およびRLRの両経路に認識されIFN- λ を誘導していることが明らかとなった。これらの結果は、ヒト肝細胞に感染するHCVに対する治療法に重要な示唆を与えるものであると考えられた。

E. 結論

以上のことから、polyIC/LICが、難治性のHCV感染者に対して有望な抗HCV治療薬となることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kayo Yoshikawa, Aya Ogata, Chiho Matsuda, Michinori Kohara, Hideo Iba, Yukio Kitade, Yoshihito Ueno. Incorporation of biaryl units into the 5' and 3' ends of sense and antisense strands of siRNA duplexes improves strand selectivity and nuclease resistance. *Bioconjugate Chemistry* 22:42-49 (2011).
2. Masaaki Arai, Hidenori Suzuki, Yoshimi Tobita, Asako Takagi, Koichi Okamoto, Atsunori Ohta, Masayuki Sudoh, Kunitada Shimotohno, Michinori Kohara. Establishment of infectious HCV virion-producing cells with newly designed full-genome replicon RNA. *Arch. Virol.* 156:295-304 (2011).
3. Kiminori Kimura, Satoshi Sekiguchi, Seishu Hayashi, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Masahito Nagaki, and Michinori Kohara. Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury. *Journal of Leukocyte Biology* 89:433-442 (2011).
4. Takashi Takano, Michinori Kohara, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Makoto Saito, Chieko Kai, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response. *J. Med. Virol.* 83:801-809 (2011).
5. Kiminori Kimura, Michinori Kohara. *Frontiers of Model Animals for Human Diseases. Experimental Animals* 60(2), 93-100 (2011).
6. Takashi Takano, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Masahiro Hayashi, Yuichi Hirata, Masaaki Satoh, Chise Tateno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Masayuki Sudo, and Michinori Kohara. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. *J. Hepatology* 55(3):512-521 (2011)
7. Tomoko Chiyo, Satoshi Sekiguchi, Masahiro Hayashi, Yoshimi Tobita, Yumi Kanegae, Izumu Saito, and Michinori Kohara. Conditional hepatitis C virus gene expression without induction of severe inflammatory responses through the use of a Cre-expressing recombinant adenovirus in mice. *Virus Res.* 160(1-2):89-97 (2011).
8. Masaaki Satoh, Makoto Saito, Takashi Takano, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Yasumasa Nishito, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, Masayuki Sudo, Chieko Kai, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Monoclonal antibody 2-152a suppresses hepatitis C virus infection through betaine/GABA transporter-1. *J Infect Dis.* 204(8):1172-80 (2011).
9. Yuri Kasama, Makoto Saito, Takashi Takano, Tomohiro Nishimura, Masaaki Satoh, Zhongzhi Wang, Nagla Elwy, Shinji Harada, Michinori Kohara, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3. *Virus Res.* 163:405-409 (2012).
10. Makoto Saito, Michinori Kohara, Yuri Kasama and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus induces overexpression of 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase through Sp1. *J. Med. Virol.* (2012) in press.
11. Leiyun Weng, Michinori Kohara, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Tetsuya Toyoda. Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase. *Gene* (2012) in press.
12. Hideyuki Konishi, Koichi Okamoto, Yusuke Ohmori, Hitoshi Yoshino, Hiroshi Ohmori, Motooki Ashiara, Yuichi Hirata, Atsunori Ohta, Hiroshi Sakamoto, Natsuko Hada, Asao Katsume, Michinori Kohara, Kazumi Morikawa, Takuo Tsukuda, Nobuo Shimma, Graham Foster, William Alazawi, Yuko Aoki, Mikio Arisawa, and Masayuki Sudoh. An orally available, small-molecule interferon inhibits hepatitis C virus replication. *Sci. Comm* (2012) in press.

2. 学会発表

- 1 Yasui F., Munekata K., Sakoda Y., Kida H., Shibata S., Murakami T., Kohara M.: Immunization with recombinant vaccinia virus expressing hemagglutination protein of H5N1 HPAIV protect mice from lethal H5N1 HPIV infection via the neutralizing antibody-independent mechanism. *Keystone Symposia-Pathogenesis of Influenza 2011.5.23-28 Kowloon (Hong Kong)*
- 2 大槻貴博、関口 敏、飛田良美、木村公則、小原道法 : 新規 C 型慢性肝炎モデルマウスを用いた C 型慢性肝炎の病

- 態解析 第 58 回日本実験動物学会総会
2011.5.25-27 東京
- 3 木村公則、小原道法 : HCV 感染による慢性肝炎の病態形成と炎症性サイトカインの関与 第 47 回日本肝臓学会総会 2011.6.2-3 東京
 - 4 井上和明、塗谷秀子、小原道法 : PCR と in situ hybridization を組み合わせた HCV と HBV のウイルスゲノム存在様式可視化の試み 第 47 回日本肝臓学会総会 2011.6.2-3 東京
 - 5 小原道法 : C 型肝炎ウイルス研究の最前線 ウイルス学イブニングセミナー 2011.6.21 京都
 - 6 小原道法 : HCV 持続発現マウスを用いた HCV 治療ワクチンの開発, 第 10 回 CBSM2011, 2011.6.24-26, 軽井沢
 - 7 Tsukiyama-Kohara K., Kohara M. : Spontaneous development of B-cell lymphomas by persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells in mice. 2011 ASBMB Special Symposia Series 2011.7.24-26 Guangzhou China
 - 8 Tokunaga Y., Arai M., Nakaya A., Tobita Y., Tateno C., Kohara M. : Novel infectious clone of HCV 1a strain HCV-RMT efficiently replicate in vitro and in vivo using adaptive mutations. 18th International Symposium Hepatitis C Virus and Related Viruses 2011.9.8-12. Seattle
 - 9 Munakata T., Nomoto A., Kohara M. : Regulation of HCV replication by fatty acid synthase. 18th International Symposium Hepatitis C Virus and Related Viruses 2011.9.8-12. Seattle
 - 10 Takano T., Tsukiyama-Kohara K., Hirata Y., Tokunaga Y., Tateno C., Sudo M., Kohara M. : Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. 18th International Symposium Hepatitis C Virus and Related Viruses 2011.9.8-12. Seattle
 - 11 Kasama Y., Sekiguchi S., Kohara M., Tsukiyama-Kohara K. : Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas in mice. 18th International Symposium Hepatitis C Virus and Related Viruses 2011.9.8-12. Seattle
 - 12 Fumihiko Y., Kai C., Morita K., Kohara M. : Clearance of SARS-CoV by cooperation of antibodies and phagocytes. International Union of Microbiological Societies (IUMS)2011 2011.9.11-16 Sapporo
 - 13 Hirata Y., Ikeda K., Sudo M., Tokunaga Y., Tobita Y., Taguchi R., Kohara M. : Suppression of sphingomyelin augmented by hepatitis C virus has robust anti-viral effects in human livers. International Union of Microbiological Societies (IUMS)2011 2011.9.11-16 Sapporo
 - 14 Gomi S., Naganawa S., Yasui F., Munekata K., Ishii K., Sakoda Y., Kida H., Kohara M. : A single immunization with highly attenuated vaccinia virus DIs-based vaccines induce protective immunity against H5N1 avian influenza virus in mice. International Union of Microbiological Societies (IUMS)2011 2011.9.11-16 Sapporo
 - 15 Munekata K., Yasui F., Sakoda Y., Kida H., Kohara M. : Protection of mice from lethal H5N1 HPAIV infection via the neutralizing antibody-independent mechanism. International Union of Microbiological Societies (IUMS)2011 2011.9.11-16 Sapporo
 - 16 小原道法、木村公則、小原恭子 : C 型肝炎発症におけるウイルス蛋白質と炎症性サイトカイン 第 70 回日本癌学会学術総会 2001.10.3-5. 名古屋
 - 17 高野貴士、小原道法、小原恭子 : C 型肝炎ウイルスの複製における DHCR24 の役割 第 70 回日本癌学会学術総会 2001.10.3-5. 名古屋
 - 18 平田雄一、小原道法 : ヒト肝細胞での自然免疫応答における IFN-λ の重要性和その誘導メカニズム 第 15 回日本肝臓学会大会 2011.10.20-21. 福岡
 - 19 木村公則、小原道法 : HCV 持続発現マウスを用いた HCV ワクチンの開発 第 15 回日本肝臓学会大会 2011.10.20-21. 福岡
 - 20 Kimura K., Otsuki T., Kohara M. : Recombinant vaccinia virus encoding hepatitis C virus nonstructural protein modulates host immune response and ameliorates chronic hepatitis in mouse model. The American Association for the Study of Liver Diseases 2011.11.4-8. San Francisco
 - 21 Hirata Y., Ikeda K., Sudo M., Tokunaga Y., Tobita Y., Taguchi R., Kohara M. :

- Suppression of sphingomyelin augmented by hepatitis C virus has robust anti-viral effects in human livers. The American Association for the Study of Liver Diseases 2011.11.4-8. San Francisco
- 22 Kimura K., Otsuki T., Kohara M. : Recombinant vaccinia virus encoding hepatitis C virus nonstructural protein modulates host immune response and ameliorates chronic hepatitis in mouse model. 第40回日本免疫学会学術集会 2011.11.27-29. 千葉
- 23 Wada T., Kohara M., Yasutomi Y. Evaluation of the therapeutic effect of DNA vaccines in the mouse model of chronic HCV infection. 第40回日本免疫学会学術集会 2011.11.27-29. 千葉
- 24 宗片圭祐、安井文彦、迫田義博、喜田宏、柴田伸一、村上利夫、小原道法 : H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス HA 発現組換えワクシニアウイルスワクチンによる発症防御機序の解析
- 第15回日本ワクチン学会
2011.12.10-11. 東京
- 25 Hirata Y., Kameyama T., Tokunaga Y., Nakagawa S., Hayashi Y., Takaoka A., Kohara M. : Interferon-lambda plays a critical role in antiviral response in human hepatocytes. 第34回日本分子生物学会 2011.12.13-16. 横浜
- 26 Nishimura T., Kohara M., Kino Y. Tsukiyama-Kohara K.,: French marine bark extract pycnogenol is a new candidate of Hepatitis C virus therapeutic material. 第34回日本分子生物学会 2011.12.13-16. 横浜

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
研究分担報告書

ウイルス肝炎感染における自然免疫の解析と新たな治療標的の探索に関する研究

分担研究者 瀬谷 司 北海道大学大学院医学研究科免疫学分野 教授

研究要旨: RNA ウイルスは2重鎖(ds)RNA の認識経路を活性化して type I IFN を誘導する。細胞内 IPS-1 経路の抗ウイルス作用は良く知られるが RIG-I, MDA5 が dsRNA センサーとして働く際の dsRNA 認識機構は分かっていない。本研究では新規 IPS-1 経路の増幅因子、DDX60 を同定した。RNA ウイルスと dsRNA (polyI:C) を使ってヒト細胞における DDX60 の dsRNA 結合と IPS-1 経路の増幅修飾の分子機構を査定する。

A. 研究目的

RNA ウイルスの感染防御は一般に細胞内の IPS-1 経路によって達成される。dsRNA の細胞内センサー RIG-I, MDA5 が如何なる機構で dsRNA を認識するかを調べる目的で、1. ウイルス感染で発現上昇し、2. dsRNA, RIG-I と結合する遺伝子産物を抽出した。結果、候補遺伝子として DDX60 を得た。DDX60 は酵母の SKI2 分子と相同性のある DExD/H box 型ヘリケースであり、SKI2 は exosome とも結合する。本研究の目的は DDX60 の抗ウイルス機能を解析し、RIG-I, MDA5 の dsRNA 認識機構について言及する。HCV 感染において、肝実質細胞の傷害と細胞断片 (debris) が樹状細胞を成熟させることが *in vitro* で証明されている (Ebihara Hepatology 2008)。本研究では HCV 感染時に最初の複製 RNA が肝実質細胞で認識される過程が如何に type I IFN の起動に関与し、DDX60 がどのように抗ウイルス防御に寄与するかを解明する。

B. 研究方法

マイクロアレイは麻疹ウイルス感染8時間後に樹状細胞で発現誘導される遺伝子の抽出のために用いた。VSV (Indiana strain)、poliovirus (Mahoney strain)、SeV (HVJ strain)、HSV-1 (K strain) を Vero 細胞に MOI=0.1 で感染させて培養した。ゲルシフトアッセイ、プルダウンアッセイ、免疫沈降、ウエスタンブロットは常法により行った。DDX60 の蛋白は大腸菌で作製し、His Trap HP カラムで精製を行った。感染は主に HeLa 細胞を用いたが、HCV replicon 発現細胞として O cell, Huh7.5 cell を用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学の実験動物指針に基

づいて行った。ヒト試料は使用していない。

C. 研究結果

HeLa 細胞に DDX60 を強制発現させて VSV 又は PV を感染させたところ、コントロールと比較して VSV, PV のウイルス力価は 10 分の 1 程度に低下した。また、DDX60 ノックダウン HeLa 細胞に VSV を感染させるとウイルスの力価は 10 倍程度上昇した。DDX60 は RNA ウイルスに対する増殖抑制効果を持っていることが示唆された。

DDX60 ノックダウン stable clone に RNA ウイルス (VSV、SeV、ポリオウイルス) を感染させると IFN- β および IFN 誘導性遺伝子の発現量は有意に低下した。従って、DDX60 はウイルス感染時の I 型インターフェロンの誘導に働いている。

DDX60 のヘリケースドメインを精製し、*in vitro* で ssRNA、dsRNA、dsDNA と混ぜると結合が観察された。dsRNA に結合する DDX60 または RIG-I のタンパク量は、それぞれ単独発現のときより、共発現させたときに多く観察されることがわかった。また、免疫沈降実験から DDX60 は RIG-I, MDA5 とも結合性を有することが示された。

DDX60 単独の IFN- β プロモーターの活性化は起こらなかったのに対し、RIG-I と共発現で RIG-I 単独より強い IFN- β 誘導活性が見られた。DDX60 の作用点は RIG-I より上流と推定された。

DDX60 の酵母 SKI2 との類似性から DDX60 とヒトの exosome の構成成分と結合を調べたところ、exosome 構成成分、EXOSC1、EXOSC4 は DDX60 と結合することが判明した。しかし、これらを siRNA しても RNA ウイルスの感染効率に影響しなかった。DDX60 は exosome 非依

存的にウイルス抑制を行うことが示された。

D. 考察

本研究では自然免疫系でこれまで明らかにされていなかった新規ヘリケース DDX60 を同定した。DDX60 は RIG-I 様受容体と共通する DExD/H box RNA helicase ドメインを持っていて、ウイルス感染で発現が上昇する。DDX60 は RLR と同じく細胞質に局在していて、ウイルス感染時の I 型インターフェロンの誘導に必要な分子の一つであることがわかった。作用点が RIG-I より上流で dsRNA と直接結合することが判明したので、dsRNA 認識の増幅分子である可能性が高い。なお、SKI2 の機能から類推した exosome による抗ウイルス関連活性はヒト DDX60 には証明できなかった。

HCV 感染は polyU/UC や dsRNA を介した type I IFN の誘導を誘起するが、NS3/4A プロテアーゼは RIG-I 下流の IPS-1 分子を切断することでこのシグナルを阻害する。HCV のコア蛋白質は DDX3 分子と IPS-1 との結合を阻害することで、IFN 誘導シグナルを阻害するので、DExD/H box ヘリケースは HCV 感染において様々な作用を持つことが推測される。

E. 結論

本研究は IPS-1 経路の type I IFN 誘導において、RIG-I の dsRNA 認識を補助し、活性化を高める新規の自然免疫分子 DDX60 を機能同定した。自然免疫系でこれまで明らかにされていなかった新規因子 DExD/H box RNA ヘリケースの DDX60 を同定した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sawahata, R., H. Shime, S. Yamazaki, Y. Fujimoto, K. Fukase, T. Akazawa, N. Inoue, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Failure of mycoplasmal lipoprotein MALP-2 to induce NK cell activation through dendritic cell TLR2. *Microbes Infect.* 13: 350-358.
2. Miyashita, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. The SKI2-related helicase DDX60 is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling. *Molec. Cell. Biol.* 31: 3802-3819.
3. Wakasa, K., H. Shime, M. Kurita-Taniguchi, M.

Matsumoto, M. Imamura, and T. Seya. 2011. Development of monoclonal antibodies that specifically interact with necrotic lymphoma cells. *Microbiol. Immunol.* 55: 373-377.

4. Ogawa, T., S. Tsuji-Kawahara, T. Yuasa, S. Kinoshita, T. Chikaishi, S. Takamura, H. Matsumura, T. Seya, T. Saga, and M. Miyazawa. 2011. Natural killer cells recognize Friend retrovirus infected erythroid progenitor cells through NKG2D-RAE-1 interactions *in vivo*. *J. Virol.* 85: 5423-5435.
5. Yamazaki, S., K. Okada, A. Maruyama, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. TLR2-dependent induction of IL-10 and Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells prevents effective anti-tumor immunity induced by Pam2 lipopeptides *in vivo*. *PLoS ONE.* 6 (4): e18833.
6. Aly, H. H., H. Oshiumi, M. Matsumoto, K. Shimotohno, T. Wakita, and T. Seya. 2011. Establishing mouse hepatoma cell lines permissive to human hepatitis C virus. *PLoS ONE.* 6 (6): e21284.
7. Seya, T. 2011. ADDENDUM to the paper published in MIMM by Takaki et al. *Molec. Immunol.* 48: 1589-1590.
8. Oshiumi, H., M. Okamoto, K. Fujii, T. Kawanishi, M. Matsumoto, S. Koike, and T. Seya. 2011. The TLR3-TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection. *J. Immunol.* 187: 5320-5327.
9. Abe, Y., K. Fujii, N. Nagata, O. Takeuchi, S. Akira, H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Seya, and S. Koike. 2012. Toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. *J. Virol.* 86: 185-194.
10. Shime H, M. Matsumoto, H. Oshiumi, S. Tanaka, A. Nakane, Y. Iwakura, H. Tahara, N. Inoue, and T. Seya. 2011. TLR3/TICAM-1 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proc Natl Acad Sci USA.* (in press).
11. Sancho-Shimizu, V., R. Pérez de Diego, L. Lorenzo, R. Halwani, A. Alangari, S. Fabrega, A. Cardon, J. Maluenda, M. Tatematsu, F. Mahvelati, M. Herman, M. Ciancanelli, Y. Guo, A. Ghadiri, S. Boucheriti, S. Plancoulaine, C. Picard, F. Rosenberg, M. Tardieu, P. Lebon, E. Jouanguy, T. Seya, M. Matsumoto, N. Rezeai, D. Chaussabel, A. Puel, L. Abel, S-Y. Zhang, S. Al-Muhsen, and J-L. Casanova. 2011. Human TRIF deficiency in otherwise healthy patients

with herpes simplex encephalitis. *J. Clin. Invest.* 121: 4889-4902.

12. Itoh, H., A. Watanabe, K. Iwano, K. Funami, T. Seya, and M. Matsumoto. 2011. UNC93B1 physically associates with human TLR8 and regulates TLR8-mediated signaling. *PLoS ONE*. 6(12): e28500.
13. Hazeki, K., Y. Kametani, H. Murakami, M. Uehara, K. Nigorokawa, S. Takasuga, T. Sasaki, M. Matsumoto, T. Seya, and O. Hazeki. 2011. Phosphoinositide 3-kinaseγ controls the intracellular localization of CpG to limit DNA-PKcs-dependent IL-10 production in macrophages. *PLoS ONE*. 6(10): e26836.

Review

1. Matsumoto, M., H. Oshiumi, and T. Seya. 2011. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. *Rev. Med. Virol.* 21: 67-77 (review).
2. Seya T., J. Kasamatsu, M. Azuma, H. Shime, and M. Matsumoto. 2011. Natural killer cell activation secondary to innate pattern sensing. *J. Innate Immunity*. 3: 264-273.
3. Wakita, T., T. Suzuki, M. J. Evans, K. Shimotohno, K. Chayama, Y. Matsuura, M. Hijikata, K. Moriishi, T. Seya, N. Enomoto, K. Koike, N. Kato, T. Kanto, and H. Hotta. 2011. Will there be an HCV meeting in 2020?: Summary of the 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. *Gastroenterology* 141: 1-5.

2. 学会発表

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

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
Kambara H, Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Ohara Y, Kamitani W, and <u>Matsuura Y.</u>	Establishment of a novel permissive cell line for propagation of hepatitis C virus by the expression of microRNA122.	J.Virol.	86	1382-1393	2012
Taguwa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Koike K, Moriishi K, and <u>Matsuura Y.</u>	Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus.	J.Virol.	85	13185-13194	2011
Wen X, Abe T, Kukihara H, Taguwa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, Moriishi M, and <u>Matsuura Y.</u>	Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules.	PLoS ONE	6	e15967	2011
Fukuhara T, Tani H, Shiokawa M, Goto Y, Abe T, Taketomi A, Shirabe K, Maehara Y, and <u>Matsuura Y.</u>	Intracellular delivery of serum-derived hepatitis C virus.	Microbes Infect.	13	405-412	2011
Iwasaki H, <u>Takeuchi O,</u> Teraguchi S, Matsushita K, Uehata T, Kuniyoshi K, Satoh T, Saitoh T, Matsushita M, Standley DM, and Akira S.	The I κ B kinase complex regulates the stability of cytokine-encoding mRNA induced by TLR-IL-1R by controlling degradation of regnase-1.	Nat.Immunol.	12	1167-1175	2011
Clark K, <u>Takeuchi O,</u> Akira S, and Cohen P.	The TRAF-associated protein TANK facilitates cross-talk within the IkappaB kinase family during Toll-like receptor signaling.	Proc Natl Acad Sci USA.	108	17093-17098	2011
Saitoh T, Satoh T, Yamamoto N, Uematsu S, <u>Takeuchi O,</u> Kawai T, and Akira S.	Antiviral protein Viperin promotes Toll-like receptor 7- and Toll-like receptor 9-mediated type I interferon production in plasmacytoid dendritic cells.	Immunity	34	352-363.	2011
Lee PY, Kumagai Y, Xu Y, Li Y, Barker T, Liu C, Sobel ES, <u>Takeuchi O,</u> Akira S, Satoh M, and Reeves WH.	IL-1 α modulates neutrophil recruitment in chronic inflammation induced by hydrocarbon oil.	J. Immunol.	186	1747-1754.	2011

<u>Kanto T.</u>	Dendritic cells in hepatitis virus infection: a legatus within.	Current Immunology Reviews	8	12-22	2012
Sakakibara M, <u>Kanto T*</u> , Hayakawa M, Kuroda S, Miyatake H, Itose I, Miyazaki M, Kakita N, Higashitani K, Matsubara T, Hiramatsu N, Kasahara A, Takehara T, and Hayashi N.	Comprehensive immunological analyses of colorectal cancer patients in the phase I/II study of quickly matured dendritic cell vaccine pulsed with carcinoembryonic antigen peptide..	Cancer Immunol. Immunother.	60	1565-1575	2011
Tatsumi T, Takehara T, Miyagi T, Nakazuru S, Mita E, <u>Kanto T</u> , Hiramatsu N, and Hayashi N.	Hepatitis C virus-specific CD8+ T cell frequencies are associated with the responses of pegylated interferon-alpha and ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection.	Hepatol. Res.	41	30-38	2011
Kageyama M, Takahasi K, Narita R, Hirai R, Yoneyama M, Kato H, and <u>Fujita T.</u>	55 Amino acid linker between helicase and carboxyl terminal domains of RIG-I functions as a critical repression domain and determines inter-domain conformation.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	415	75-81	2011
Ouda R, Onomoto K, Takahasi K, Edwards MR, Kato H, Yoneyama M, and <u>Fujita T.</u>	Retinoic Acid-inducible Gene I-inducible miR-23b Inhibits Infections by Minor Group Rhinoviruses through Downregulation.	J. Biol. Chem.	286	26210-219	2011
Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada K, Matsuda F, Shimotohno K, <u>Fujita T.</u> and Murakami Y.	Dysregulation of IFN System Can Lead to Poor Response to Pegylated Interferon and Ribavirin Therapy in Chronic Hepatitis C.	PLoS ONE	6	e19799	2011
Onoguchi K, Yoneyama M, and <u>Fujita T.</u>	Retinoic Acid-Inducible Gene-I-Like Receptors.	J. Interferon Cytokine Res.	31	27-31	2011
Kato H, Takahasi K, and <u>Fujita T.</u>	RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA.	Immunological Reviews.	243	91-98	2011
Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M, <u>Ikeda M.</u> and Kato N.	Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets.	J. Virol.	85	6882-6892	2011
Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, <u>Ikeda M.</u> , Dansako H, Wakita T, and Kato N.	The ESCRT System Is Required for Hepatitis C Virus Production.	PLoS ONE	6	e14517	2011
<u>Ikeda M.</u> , Kawai Y, Mori K, Yano M, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, and Kato	Anti-ulcer agent teprenone inhibits hepatitis C virus replication: potential treatment for hepatitis C.	Liver Int.	31	871-880	2011

N.					
Mori K, <u>Ikeda M</u> , Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, and Kato N.	Mechanism of action of ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system.	Virus Res.	157	61-70	2011
Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, <u>Ikeda M</u> , and Kato N.	Plural assay systems derived from different cell lines and hepatitis C virus strains are required for the objective evaluation of anti-hepatitis C virus reagents.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	409	663-668	2011
Arai M, Suzuki H, Tobita Y, Takagi A, Okamoto K, Ohta A, Sudoh M, Shimotohno K, and <u>Kohara M</u> .	Establishment of infectious HCV virion-producing cells with newly designed full-genome replicon RNA.	Arch. Virol.	156	295-304	2011
Takano T, <u>Kohara M</u> , Kasama Y, Nishimura T, Saito M, Kai C, and Tsukiyama-Kohara K.	Translocase of outer mitochondrial membrane 70 is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response.	J. Med. Virol.	83	801-809	2011
Takano T, Tsukiyama-Kohara K, Hayashi M, Hirata Y, Satoh M, Tateno C, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Sudo M, and <u>Kohara M</u> .	Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes.	J. Hepatology	55	512-521	2011
Chiyo T, Sekiguchi S, Hayashi M, Tobita Y, Kanegae Y, Saito I, and <u>Kohara M</u> .	Conditional hepatitis C virus gene expression without induction of severe inflammatory responses through the use of a Cre-expressing recombinant adenovirus in mice.	Virus Res.	160	89-97	2011
Itoh H, Watanabe K, Iwano K, Funami, <u>Seiya T</u> , and Matsumoto M.	UNC93B1 physically associates with human TLR8 and regulates TLR8-mediated signaling.	PLoS ONE	6	e28500	2011
Oshiumi H, Okamoto M, K. Fujii K, Kawanishi T, Matsumoto M, Koike S, and <u>Seiya T</u> .	The TLR3-TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection.	J. Immunol.	187	5320-5327	2011
Miyashita M, Oshiumi H, Matsumoto M, and <u>Seiya T</u> .	DDX60, a DEXD/H Box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling.	Mol. Cell Biol.	31	3802-3819	2011
Aly H H, Oshiumi H, Matsumoto M, Shimotohno K, Wakita T, and <u>Seiya T</u> .	Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus.(HCV)	PLoS ONE	6	e21284	2011
<u>Seiya T</u> , Kasamatsu J, Azuma M, Shime H, and Matsumoto M.	Natural killer cell activation secondary to innate pattern sensing.	J. Innate Immunity	3	264-273	2011
Matsumoto M, Oshiumi H, and <u>Seiya T</u> .	Antiviral responses induced by the TLR3 pathway.	Rev. Med. Virol.	21	67-77	2011

Establishment of a Novel Permissive Cell Line for the Propagation of Hepatitis C Virus by Expression of MicroRNA miR122

Hiroto Kambara,^a Takasuke Fukuhara,^a Mai Shiokawa,^a Chikako Ono,^a Yuri Ohara,^a Wataru Kamitani,^b and Yoshiharu Matsuura^a

Department of Molecular Virology^a and Global COE Program,^b Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan

The robust cell culture systems for hepatitis C virus (HCV) are limited to those using cell culture-adapted clones (HCV in cell culture [HCVcc]) and cells derived from the human hepatoma cell line Huh7. However, accumulating data suggest that host factors, including innate immunity and gene polymorphisms, contribute to the variation in host response to HCV infection. Therefore, the existing *in vitro* systems for HCV propagation are not sufficient to elucidate the life cycle of HCV. A liver-specific microRNA, miR122, has been shown to participate in the efficient replication of HCV. In this study, we examined the possibility of establishing a new permissive cell line for HCV propagation by the expression of miR122. A high level of miR122 was expressed by a lentiviral vector placed into human liver cell lines at a level comparable to the endogenous level in Huh7 cells. Among the cell lines that we examined, Hep3B cells stably expressing miR122 (Hep3B/miR122) exhibited a significant enhancement of HCVcc propagation. Surprisingly, the levels of production of infectious particles in Hep3B/miR122 cells upon infection with HCVcc were comparable to those in Huh7 cells. Furthermore, a line of “cured” cells, established by elimination of HCV RNA from the Hep3B/miR122 replicon cells, exhibited an enhanced expression of miR122 and a continuous increase of infectious titers of HCVcc in every passage. The establishment of the new permissive cell line for HCVcc will have significant implications not only for basic HCV research but also for the development of new therapeutics.

Hepatitis C virus (HCV) infects over 170 million people worldwide and frequently leads to persistent infection, which in turn can lead to chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (34). HCV belongs to the *Flaviviridae* family and has a single-stranded positive RNA genome of approximately 9.6 kb. The genome of HCV is translated into a single polyprotein at the endoplasmic reticulum (ER) membrane and is then cleaved by host- and virus-encoded proteases, resulting in 10 structural and nonstructural proteins (41, 44). Due to the lack of a small-animal model and an efficient cell culture system, efforts to understand the HCV life cycle as well as development of anti-HCV drugs have been hampered (42). In a major breakthrough, HCV replicon cells, in which HCV RNA autonomously replicates, were established by Lohmann et al. (37). Afterwards, the infectious HCV in cell culture (HCVcc), based on the genotype 2a JFH1 strain in combination with the human hepatocellular carcinoma cell line Huh7, was developed (36, 64, 70). On the basis of the results obtained with these *in vitro* systems, the life cycle of HCV was clarified, and substantial progress has been made in screening host factors involved in HCV propagation as well as anti-HCV drug candidates (20, 51). Among them, a liver-specific microRNA (miRNA), miR122, has been shown to be one of the most important host factors for HCV replication.

miRNAs are small noncoding RNAs that consist of 20 to 25 nucleotides and modulate gene expression in plants and animals (3, 26). Most miRNAs negatively regulate translation through interaction with the 3' untranslated region (UTR) of mRNA in a sequence-specific manner. Some of them have been shown to play important roles in the viral life cycle (56). Interestingly, miR122 has been shown to bind to HCV 5' UTRs and to enhance translation and replication of HCV RNA (23, 28, 29, 38, 52). In addition, enhancement of HCVcc propagation through the direct interaction of miR122 with HCV 5' UTR has been demonstrated (27). Recently, intravenous administration of the locked nucleic acid (LNA) complementary to miR122 was shown to suppress the

propagation of HCV in chimpanzees chronically infected with HCV, suggesting that miR122 is a promising therapeutic target for chronic hepatitis C (31).

It has been shown that HCV exploits various host factors to form a replication complex for efficient replication (43). *In vitro* propagation of HCV is limited to Huh7 cells and their derivatives, and thus, it is important to confirm the data obtained in Huh7 cells by using other human liver cell lines, because the patterns of gene expression vary among cell lines. Although establishment of an HCV replicon system based on liver cell lines has been reported (11, 66), robust propagation of HCVcc in well-characterized human liver cell lines other than Huh7 cells has not succeeded yet. The gene expression profile of mice xenotransplanted with human hepatocytes from different donors inoculated with a single source of HCV revealed that host factors contributed to the variation in host response to HCV infection, including the activation of innate antiviral signaling pathways (65). Furthermore, gene polymorphism in interleukin 28B (IL-28B) was shown to be associated with natural clearance (62) and response to combination therapy with interferon (IFN) and ribavirin (19, 58, 59). Therefore, the solely available *in vitro* propagation system for HCVcc, employing Huh7-derived cells, is not sufficient. The establishment of alternative HCV strains and permissive cell lines is needed to elucidate molecular mechanisms of propagation and pathogenesis of HCV in more detail.

Although there have been several attempts to generate chime-

Received 18 September 2011 Accepted 11 November 2011

Published ahead of print 23 November 2011

Address correspondence to Yoshiharu Matsuura, matsuura@biken.osaka-u.ac.jp.

H. Kambara and T. Fukuhara contributed equally to this article.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.06242-11