

201320029A

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)

抗C型肝炎ウイルス活性と高いインターフェロン誘導能を併せ持つ

高機能型核酸医薬の創製に関する研究

平成25年度 研究報告書

研究代表者 山口朋子

平成26(2014)年4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 抗C型肝炎ウイルス活性と高いインターフェロン誘導能を併せ持つ高機能型核酸  
医薬の創製に関する研究 ----- 1  
山口 朋子 (独立行政法人医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト)

### II. 分担研究報告

- I型インターフェロン産生誘導を評価可能な培養細胞系の評価に関する検討  
および分岐型Small Interfering RNAによるHCV増殖抑制に関する検討  
----- 3  
山口 朋子 (独立行政法人医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト)

- miR-122aに対する阻害能とI型インターフェロン誘導能を兼ね備えたアンチ  
センスオリゴヌクレオチドの開発 ----- 10  
櫻井 文教 (大阪大学大学院 薬学研究科)

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 19

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

総括研究報告書

抗 C 型肝炎ウイルス活性と高いインターフェロン誘導能を併せ持つ

高機能型核酸医薬の創製に関する研究

研究代表者 山口 朋子

独立行政法人医薬基盤研究所 研究員

研究要旨

現在、全世界で 2 億人の HCV 感染者が存在し、さらにその数が年間 300 万人ずつ増加していることから、革新的抗 HCV 薬の開発が期待される。中でも核酸医薬には大きな期待が寄せられており、特にデンマークの Santaris ファーマ社が開発中の miR-122 を阻害する LNA (miR-122 は HCV の複製に必須) は、臨床試験で有望な結果を示している。しかし既存の核酸医薬は、副作用軽減のため自然免疫活性化能を大きく低減させており、患者自身の免疫機能を利用できていない。そこで本研究においては、抗 HCV 活性に加えて、自然免疫を活性化し I 型 IFN を誘導可能な核酸医薬を開発することとした。

これまでの研究により、細胞質において非自己 RNA を認識する RIG-I (Retinoic acid-inducible gene-1) を活性化させると高効率に IFN 産生を誘導できることが報告されている。RIG-I は、5' 末端に 3 リン酸基を持つ二本鎖 RNA と高い親和性を有することから、本研究では miR-122a のアンチセンス配列に RIG-I に結合可能な 5' 末端に三リン酸基をもつ二本鎖 RNA をつなげた新規アンチセンスオリゴヌクレオチド (Antisense oligo nucleotide; ASO) を作製し、HCV 増殖抑制効果を検討した。また、核酸医薬の I 型 IFN 産生誘導を評価するために、自然免疫活性化による I 型 IFN 産生誘導を評価可能な培養細胞系の評価を行った。

**分担研究者**

櫻井 文教 大阪大学大学院薬学研究科  
准教授

**A. 研究目的**

近年、抗 HCV 薬として Small Interfering RNA (siRNA) や Locked Nucleic Acid (LNA) などの核酸医薬が注目され、臨床試験でも優れた治療効果が得られている。しかし既存の核酸医薬は、副作用軽減のため自然免疫を活性化しないよう設計されており、患

者の免疫機能が活用されていない。優れた核酸医薬を開発するには、免疫賦活化能を付与する必要がある。そこで、本研究では、C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染を抑制可能な核酸医薬を化学修飾することで、本来の抗 HCV 活性に加えて、インターフェロン (IFN) を誘導可能な我が国独自の高機能型核酸医薬を創製することを目的とする。

**B. 研究方法**

本研究は、研究代表者 山口、分担研究者 櫻井の計 2 名で遂行した。当該年度においては、高効率に

自然免疫を活性化するとともに、複数の標的遺伝子をノックダウン可能な分岐型 Small interfering RNA (siRNA)を開発し、その効果について検討した。さらに、自然免疫活性化によるIFN誘導効率にIL28B遺伝子の一遺伝子多型(Single Nucleotide Polymorphism; SNP)が関与する可能性が示唆されている。そこで、新規HCV感染評価系として注目されるiPS細胞におけるIL28B遺伝子のSNPについて解析した(山口)。また、LNA122-DSのHCV増殖抑制効果について検討した(櫻井)。

### C. 研究結果

- (1)HCVゲノム5'非翻訳領域を標的としたsiRNA配列の選択をした。
- (2)5'末端に3リン酸基を有した分岐型 siRNA (3ptsiRNA)の作製を行った。
- (3)3ptsiRNAのノックダウン効率に関する検討を行った結果、3ptsiRNAはsiRNAが3本連結した形状であってもノックダウン効率が低下することなく、優れたノックダウン効率を示すことが明らかとなった。
- (4)3ptsiRNAによるI型IFN誘導に関する検討を行った結果、3ptsiRNAはRIG-Iのリガンドとして報告されている5'末端に3リン酸基を持つ二本鎖RNA(19塩基)よりも1000倍以上高いIFN-βの発現を誘導した。またI型IFNのみならず、III型IFNであるINF-λも極めて高効率に誘導された。
- (5)各種iPS細胞におけるIL28B遺伝子近傍のSNP解析を行った結果、ヒトiPS細胞2株がマイナーアレル(T/G)であった。その他の株についてはすべてメジャーアレル(T/T)であった。
- (6)Huh7.5.1.1b Feo細胞におけるLNA122-DSによるHCVレプリコン抑制効果に関する検討を行った結果、LNA122-DS導入群ではmockと比較して、HCVレプリコンRNAレベル(HCVレプリコンRNA由来のルシフェラーゼ活性)を22%まで抑制した。
- (7)Hec1B/miR-122 Con1細胞におけるLNA122-DSによるHCVレプリコン抑制効果に関する検討を行った結果、LNA122-DSはmiR-122を阻害可

能であるとともに、I型IFNを誘導することで高効率にHCVを抑制可能であることが示された。

- (8)Hec1B/miR-122 Con1細胞におけるLNA122-DSによるIFN-stimulated gene (ISG)の発現誘導解析した結果、LNA122-DSはHec1B/miR-122 Con1細胞においても効率よくISGの発現を誘導することが示された。
- (9)LNA122-DSによるHCVcc増殖抑制効果に関する検討した結果、LNA122-DSはHCVレプリコンのみならず、HCVccの増殖を従来のmiR-122に対するASOよりも高効率に抑制可能であることが示された。

### D. 結論

1. 5'末端に3リン酸基を持つ分岐型 siRNAである3ptsiRNAを開発した。3ptsiRNAは、高効率にI型IFNを誘導可能であるとともに、従来のsiRNAと同程度のノックダウン効率を示した。
2. 各種ヒトiPS細胞におけるIL28B遺伝子近傍のSNPを解析したところ、各細胞株で異なるSNPを有していることが明らかとなった。
3. LNA122-DSは、Hec1B/miR-122細胞においてI型IFNならびにISGの発現を誘導可能であった。
4. LNA122-DSはHec1B/miR-122細胞において、HCVレプリコンならびにHCVccの増殖を抑制可能であった。
5. LNA122-DSは、I型IFNの発現を誘導しないHuh7.5.1.1b Feo細胞においても、従来のmiR-122に対する従来のアンチセンスオリゴヌクレオチドよりも高いHCVレプリコン抑制効果を示した。

## 抗 C 型肝炎ウイルス活性と高いインターフェロン誘導能を併せ持つ

### 高機能型核酸医薬の創製に関する研究

分担研究報告書

#### I 型インターフェロン産生誘導を評価可能な培養細胞系の評価に関する検討

#### および分岐型 Small Interfering RNA による HCV 増殖抑制に関する検討

研究代表者 山口 朋子

独立行政法人医薬基盤研究所 研究員

#### 研究要旨

C型肝炎ウイルス（HCV）のキャリアは、全世界で2億人、国内では200万人にものぼり、世界で最大のウイルス感染症の一つである。HCV感染患者は高い割合で慢性肝炎を発症し、その後、肝硬変、肝癌へと移行することから、革新的治療薬の開発は緊急的な課題であるといえる。現在、C型肝炎に対する主な治療法としては、HCVの複製を阻害するペグインターフェロンおよびリバビリンの併用療法が主流であるが、遺伝子型1bの高ウイルス量症例では奏効率が約50%にとどまっており、C型肝炎克服に向けて新たな作用点をもつC型肝炎治療薬の創製が必要不可欠となっている。近年、新たなC型肝炎治療薬として、Small interfering RNA (siRNA)や Antisense oligonucleotide (ASO)などの核酸医薬に大きな注目が集まっている。従来の核酸医薬は副作用軽減のため、自然免疫を活性化しないよう設計されている。しかし、C型肝炎治療薬としてI型インターフェロン(IFN)が用いられていること、HCVに対する免疫を誘導することでより高い治療効果が期待できることを考慮すると、核酸医薬により高い抗HCV活性を付与するには、核酸医薬本来の抗HCV活性に加えて、自然免疫活性化能を付与する必要がある。そこで本研究においては、抗HCV活性に加えて、自然免疫を活性化しI型IFNを誘導可能な核酸医薬を開発することとした。本年度は、高効率に自然免疫を活性化するとともに、複数の標的遺伝子をノックダウン可能な分岐型 Small interfering RNA (siRNA)を開発し、その効果について検討した。さらに、自然免疫活性化によるIFN誘導効率にIL28B遺伝子の一遺伝子多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) が関与する可能性が示唆されている。そこで、新規HCV感染評価系として注目されるiPS細胞におけるIL28B遺伝子のSNPについて解析した。

分担研究者  
 櫻井 文教 大阪大学大学院薬学研究科  
 准教授

協力研究者  
 川端 健二 独立行政法人医薬基盤研究所  
 プロジェクトリーダー

水口 裕之 大阪大学大学院薬学研究科  
 教授

高山 和雄 大阪大学大学院薬学研究科  
 大学院生

林 晃平 大阪大学大学院薬学研究科  
 大学院生

Ong Tyng Tyng 大阪大学大学院薬学研究科  
 大学院生

國戸 偉丸 大阪大学薬学部 学部生

坂本 直哉 北海道大学大学院医学研究科  
 教授

加藤 宣之 岡山大学大学院医歯薬総合研究科  
 教授

## A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス(HCV)は、約 9.6kb のプラス鎖 RNA をゲノムに持つ RNA ウイルスである。現在、世界には約 2 億人、本邦では 200 万人もの HCV 感染者がおり、世界では年間 200~300 万人ずつ感染者が増加していることから、その革新的治療薬の開発は世界的な緊急課題であると言える。インターフェロン療法との進展に伴い C 型肝炎の根治率は向上しているものの、依然として難治性 1b 型高ウイルス量患者に対しては奏効率が 50%にすぎず、C 型肝炎克服に向けた新たな作用点を有する抗 HCV 薬の創製が急務となっている。

近年、抗 HCV 薬として Small interfering RNA (siRNA)や Antisense oligonucleotides (ASO)などの核酸医薬が注目を集めている。たとえば、HCV の増殖に肝細胞特異的 microRNA である miR-122a が重要であることが明らかとなっており、miR-122a に対する ASO を作用させることで HCV の感染を抑制可能である。既に miR-122a に対する ASO は、欧米のベンチャ

一企業によって臨床試験が行われており、第 2 相試験においても有望な結果が得られている。これら既存の核酸医薬は副作用軽減のために自然免疫を活性化しないように設計されている。しかし、C 型肝炎治療薬として I 型インターフェロン (IFN) が使用されていることを考慮すると、もし核酸医薬により本来の抗 HCV 活性に加えて、I 型 IFN が産生誘導可能となれば、さらに高い治療効果が期待できると考えた。

そこで本研究では、核酸医薬に自然免疫活性化能を付与し I 型 IFN を産生誘導することを試みた。昨年度の検討としては、I 型 IFN 産生誘導に重要なパターン認識受容体の発現および I 型 IFN 産生能を各種肝細胞株を用いて検討した。また今後、ヒト iPS 細胞由来肝細胞は、ヒト初代肝細胞に代わる新たな HCV 感染評価系として利用されていくことが予想される。これまでにヒト iPS 細胞由来肝細胞に HCV レプリコンを導入することにより、HCV レプリコンが増殖・維持されることが報告されている。そこで、ヒト iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来肝細胞におけるパターン認識受容体の発現を検討した。本年度は、I 型 IFN を高効率に活性化するとともに、複数の標的配列を同時にノックダウンすることを目的に、5' 末端に 3 リン酸基を有する複数の siRNA を連結させた分岐型 siRNA (3ptsRNA)を開発し、その機能を評価した。また近年、自然免疫活性化による I 型 IFN 誘導に、IL28B 遺伝子近傍の一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism; SNP) が影響することが報告されている。そこで、各種 iPS 細胞における IL28B 遺伝子近傍の SNP について解析した。

## B. 研究方法

### 1. HCV ゲノム 5' 非翻訳領域を標的とした siRNA 配列の選択

HCV ゲノムのなかでも最も保存性が高く(各種遺伝子型で保存されている)、かつ変異が入りにくい領域である HCV ゲノム 5' 非翻訳領域に対して、siRNA 11 種を設計した。また 3' 非翻訳領域に対しても 1 種の siRNA を設計した。siRNA の設計に関しては、過去の文献および siDirect (<http://sidirect2.mai.jp/>) を用いて行った。HCV レプリコン発現細胞である

Huh7.5.1. 1b Feo 細胞を 48-well plate に  $2 \times 10^4$  cells/well で播種した。翌日、細胞に siRNA を最終濃度 25 nM で Lipofectamine RNAiMAX を用いて Transfection した。Transfection 48 時間後、ピッカジン LT2.0 を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。Negative Control siRNA としては、AllStars Negative Control siRNA (Qiagen) を用いた。

## 2. 5' 末端に 3リン酸基を有した分岐型 siRNA (3ptsiRNA) の作製

上記 1 で選択した siRNA を連結することで、3ptsiRNA を設計した。Negative control 3ptsiRNA としては、Green fluorescence protein (GFP)、 $\beta$ -galactosidase (LacZ)、chloramphenicol acetyl transferase (CAT) に対する siRNA を連結したものを、設計した配列をコードした合成オリゴ DNA と T7 RNA polymerase enzyme kit (MEGAscript kit, Ambion) を用いて各 Strand を合成した。各 Strand は、15% denaturing PAGE で泳動後、回収した。回収した RNA は、混合後、98°C でインキュベートしたのち、室温で徐々に冷却することによってアニーリングさせた。各 Strand がアニーリングし 3ptsiRNA が形成されているか否かについては、電気泳動により確認した。

## 3. Dicer による 3ptsiRNA の切断実験

10 pmol の 3ptsiRNA を Recombinant Human Turbo Dicer Enzyme (Genlantis) と混合し、37°C で 18 時間インキュベートした。その後、電気泳動により Dicer による切断を確認した。

## 4. 3ptsiRNA のノックダウン効率に関する検討

上記 1 と同様の方法により、3ptsiRNA を Huh7.5.1 1b Feo 細胞に Lipofectamine RNAiMAX を用いて導入した。Transfection 48 時間後に、ルシフェラーゼアッセイによりノックダウン効率を検討した。

## 5. 3ptsiRNA による I 型 IFN 誘導に関する検討

ヒト不死化肝細胞株である PH5CH8 細胞(岡山大学・加藤宣之先生より供与)を 24-well plate に  $1 \times 10^5$  cells/well で播種した。翌日、3ptsiRNA を

Lipofectamine RNAiMAX を用いて最終濃度 25 nM で Transfection した。Poly I:C については、最終濃度 2.5  $\mu$ g/mL で Transfection した。Transfection 12 時間後に Isogen を用いて RNA を回収し、Real-time RT-PCR により mRNA level を解析した。

## 6. 各種 iPS 細胞における IL28B 遺伝子近傍の SNP 解析

各種ヒト iPS 細胞よりゲノム DNA を回収したのち、ABI Taqman allelic discrimination kit (ABI 社) を用いて、IL28B 遺伝子近傍の SNP である rs8099917 について解析した。

### (倫理面への配慮)

ヒト iPS 細胞における SNP 解析については、(独) 医薬基盤研究所および大阪大学における倫理審査を受け、承認されたのちに実施した。

## C. 研究結果

### 1. HCV ゲノム 5' 非翻訳領域を標的とした siRNA 配列の選択

まず 3ptsiRNA の作製にあたり、HCV ゲノムを高効率にノックダウン可能な siRNA の配列を選択することとした。標的配列としては、HCV ゲノムの 5' 非翻訳領域とした。HCV ゲノムの 5' 非翻訳領域は、miR-122a の標的配列が存在するなど、各種 Genotype で保存性が高く、また変異が生じにくい部位であることから、今回選択した。また 3ptsiRNA の作製に用いる各 Strand の合成は、in vitro transcription によって行うため、GG で始まることとなる。そこで siDirect および過去の報告から、5' 末端が GG を持つ siRNA を選択し、そのノックダウン効率を検討した。その結果、60% 以上のノックダウン効率を示す siRNA 3 種を同定した。そこで、これら 3 種の siRNA を用いて 3ptsiRNA を設計することとした。

### 2. 5' 末端に 3リン酸基を有した分岐型 siRNA (3ptsiRNA) の作製

上記 1 で選択した siRNA 3 種を連結させた 3ptsiRNA を開発した(Figure 1)。siRNA 間には、スペーサーとし

て4塩基挿入した。また、HCVゲノムに対してアンチセンス鎖がRISCに残るように、アンチセンス鎖の3'末端が2塩基突出した形状にした。その結果、3ptsRNAは1本差RNAのみ、また2本のStrandのみをアニーリングしたものよりもバンドが上昇していたことから、3本のRNA鎖が設計通りアニーリングしていることが示唆された。なお、一本鎖RNAのみを泳動した場合、また2本のStrandのみをアニーリングしたものを泳動した場合にはそれぞれStrandによってバンドの位置が異なったが、これはRNA鎖が分子内で高次構造を取ったためと推察された。

### 3. Dicerによる3ptsRNAの切断実験

3ptsRNAは細胞内において、Dicerによって切断されることでsiRNAとして機能するものと予想される。そこで、3ptsRNAがDicerによって切断されるか否かを検討した。その結果、Dicerで処理したところ、従来のsiRNAと同じ位置にバンドが確認されたことから、3ptsRNAはTransfection後、細胞内においてDicerによって切断されることが示唆された。

### 4. 3ptsRNAのノックダウン効率に関する検討

そこで次に、3ptsRNAのノックダウン効率について検討した。Huh7.5.1 1b Feo細胞に3ptsRNAをTransfectionしたところ、5nMで約50%、25nMで約85%と、従来のsiRNAと同程度のノックダウン効率が得られた(3ptsRNAは1分子にsiRNAを3分子含むことから、3ptsRNAの3倍の濃度のsiRNAと比較した)。以上の結果より、3ptsRNAはsiRNAが3本連結した形状であってもノックダウン効率が低下することなく、優れたノックダウン効率を示すことが明らかとなった。なお、Huh7.5.1細胞はRIG-I遺伝子に変異が生じているため、RIG-Iを介した自然免疫活性化を示さない。従って本結果は3ptsRNAのRNA干渉によるノックダウン効率のみを評価していると言える。

### 5. 3ptsRNAによるI型IFN誘導に関する検討

次に3ptsRNAが肝細胞に導入後、I型IFNを誘導可能かを検討した。前述のようにHuh7.5.1細胞はRIG-I遺伝子に変異が入っているために、RIG-Iリガンドに

よる自然免疫活性化を評価できない。また昨年度の検討より、HepG2やHep3BなどのCell lineもRIG-Iのリガンドに不応性であることから、PH5CH8細胞を用いて3ptsRNAによるI型IFN産生誘導について検討した。その結果、3ptsRNAはRIG-Iのリガンドとして報告されている5'末端に3リン酸基を持つ二本鎖RNA(19塩基)よりも1000倍以上高いIFN- $\beta$ の発現を誘導した。またI型IFNのみならず、III型IFNであるIFN- $\lambda$ も極めて高効率に誘導された。

### 6. 各種iPS細胞におけるIL28B遺伝子近傍のSNP解析

ヒトiPS細胞12株におけるrs8099917のSNPについて検討したところ、ヒトiPS細胞2株がマイナーアレル(T/G)であった。その他の株についてはすべてメジャーアレル(T/T)であった。

## D. 考察

昨年度は、RIG-Iのリガンドを作用させることで自然免疫活性化によりI型IFNの発現上昇を示すヒト細胞株の探索を行った。それらの結果をふまえ、本年度は、高効率にI型IFNを誘導可能かつ高いノックダウン効率を示す新規核酸医薬3ptsRNAの開発を試みた。これまでに複数のsiRNAを連結させた分岐型siRNAについて幾つかのグループより開発されている(Nakashima *et al.*, Cehm Commun., 2011, Chang *et al.*, Nucleic Acid Ther., 2012, Lee *et al.*, Mol Cells., 2013)。これらの分岐型siRNAは、従来のsiRNAと同等のノックダウン効率を示すこと、ノックダウンが長期間にわたり持続することが報告されている。本研究では、これらの分岐型siRNAの5'末端に、3リン酸基を付与することにより、高効率なノックダウンに加えて、RIG-Iを介した高いI型IFN誘導能を付与できるのではないかと考えた。これまでにCpGオリゴDNAを同様の分岐型の形状にすることで、高効率に自然免疫を活性化可能であることが報告されている(Mohri *et al.*, J.Control.Release, 2012)。実際に、3ptsRNAは従来のsiRNAの5'末端に3リン酸基を付与したものと比較して、高効率にI型IFN発現を誘導した。



3ptsRNA が高効率に I 型 IFN を誘導したメカニズムとしては 2 つ考えられる。一つは、siRNA を連結して分岐型にすることで遺伝子導入試薬 (Lipofectamine RNAiMAX) と複合体を形成しやすくなり、細胞内に取り込まれる量が増加したために I 型 IFN 産生量が増加したと考えられる。もう一つは、RIG-I はリガンドが結合したのち、二量体もしくは多量体を形成してシグナルを下流に伝える。3ptsRNA では、RIG-I のリガンドとなりうる 5' 末端の 3 リン酸基がお互いに近傍に存在するため、RIG-I の多量体化が速やかに起こるものと予想される。

今回、3ptsRNA は I 型 IFN のみならず、III 型 IFN も高効率に誘導することが示された。III 型 IFN も I 型 IFN と同様、抗 HCV 活性を有することが報告されている。これまでに III 型 IFN も RIG-I の下流分子である IPS-1 を介して発現誘導されることが報告されていることから、本検討においても 3ptsRNA が RIG-I を介して III 型 IFN の発現を誘導したものと考えられる。

siRNA の末端構造 (平滑末端か突出末端か) は、RISC において siRNA のどちらの Strand が RISC に残るかを左右する重要な要因である (Sano *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2008)。すなわち、siRNA のアンチセンス鎖 (RISC に残るべき Strand) の 3' 末端が 2 塩基突出した末端構造を取る必要がある。また、HCV の RNA ゲノムはプラス鎖であり、複製の際にマイナス鎖も形成されるが、マイナス鎖には RISC がアクセスできないため、siRNA の標的にはなりえないことが報告されている (Lisowski *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2013)。そこで本検討では、HCV ゲノムのプラス鎖を効率よくノックダウンできるよう、3ptsRNA のアンチセンス鎖の 3' 末端が 2 塩基突出した構造になるように設計した。実際に予備検討では、アンチセンス鎖の 3' 末端を 2 塩基突出した構造にしたものは、平滑末端にしたものよりも高いノックダウン効率を示した。一方で、RIG-I を介した I 型 IFN 誘導については、突出末端よりも平滑末端の方が高効率に I 型 IFN を誘導することが報告されている (Schlee *et al.*, *Immunity*, 2009)。今後、3ptsRNA において平滑末端と突出末端で、I 型 IFN 誘導効率に違いがみられるか検討する予定である。

近年、iPS 細胞由来肝細胞 (iPS-Hepa) は新たな HCV 感染評価系として注目を集めている。iPS-Hepa では自然免疫が機能していることから、HCV が高効率に感染することは困難かもしれないが、逆に HCV による自然免疫活性化評価系として利用可能であると期待される。特に種々の遺伝的バックグラウンドを有するヒト由来細胞より調製可能な iPS 細胞は、遺伝的バックグラウンドの影響を評価するのに適していると言える。IL28B 遺伝子近傍の SNP は、IFN およびリハビリ療法の治療効果の予測因子として臨床応用されているが、rs8099917 がマイナーの患者では治療開始前より肝臓での ISG の発現が高いことが知られている。すなわち、rs8099917 が肝細胞における自然免疫活性化に影響している可能性が示唆される。そこで、本年度はまず各種 iPS 細胞における IL28B 遺伝子近傍の SNP について検討した。その結果、メジャーアリルおよびマイナーアリルをもつ iPS 細胞が判明したことから、今度これらの SNP が核酸医薬による自然免疫活性化に及ぼす影響について検討する予定である。

## E. 結論

1. 5' 末端に 3 リン酸基を持つ分岐型 siRNA である 3ptsRNA を開発した。3ptsRNA は、高効率に I 型 IFN を誘導可能であるとともに、従来の siRNA と同程度のノックダウン効率を示した。
2. 各種ヒト iPS 細胞における IL28B 遺伝子近傍の SNP を解析したところ、各細胞株で異なる SNP を有していることが明らかとなった。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

G-1 論文発表

- (1) Machitani M., Sakurai F., Katayama K., Tachimana M., Suzuki T., Matsui H., Yamaguchi T., Mizguchi H.

① Improving **the** the adenovirus vector-mediated RNAi efficiency by **lacking** the expression of virus-associated RNAs., *Virus Res.*, in press.

(2) **Yamaguchi T.**, Tashiro K., Tanaka S., Katayama S., Ishida W., Fukuda K., Fukushima A., Araki R., Abe M., Mizuguchi H., Kawabata K. Two-step differentiation of mast cells from induced pluripotent stem cells., *Stem Cells Dev.*, 22, 726-734 (2013)

② G-2 学会発表 該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
H-1 特許取得 該当なし

H-2 実用新案登録 該当なし

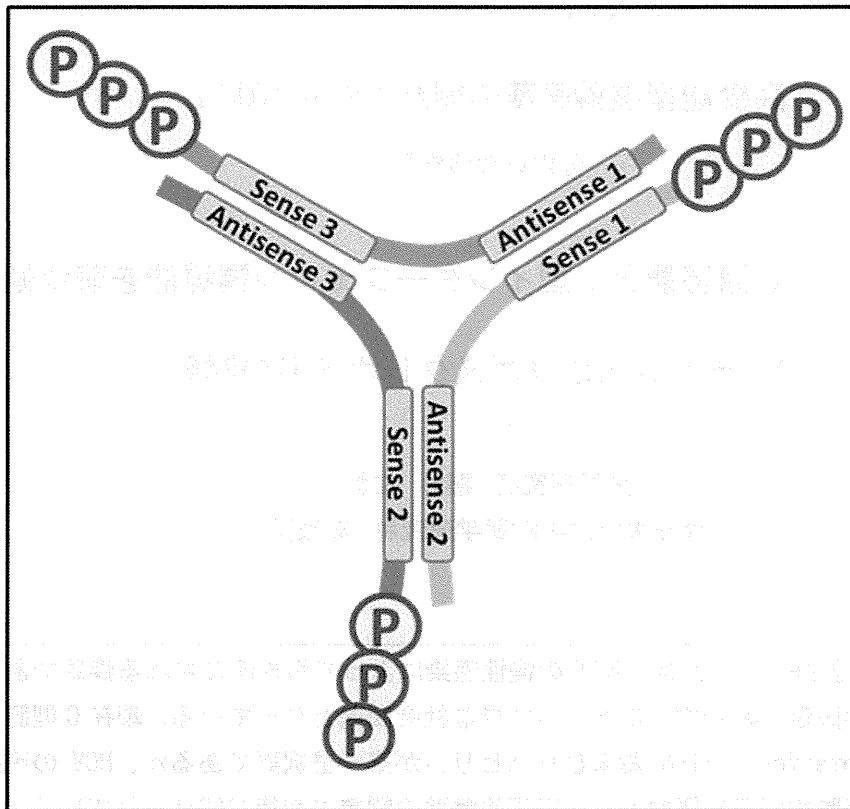
H-3 その他 該当なし

① 特許 ② 実用新案 ③ 著作権  
① 特許 ② 実用新案 ③ 著作権

① 特許 ② 実用新案 ③ 著作権  
① 特許 ② 実用新案 ③ 著作権

① 特許 ② 実用新案 ③ 著作権  
① 特許 ② 実用新案 ③ 著作権

① 特許 ② 実用新案 ③ 著作権  
① 特許 ② 実用新案 ③ 著作権



**Figure 1 Model structure of trimeric triphosphate siRNA (3pt-siRNA)**

## 抗 C 型肝炎ウイルス活性と高いインターフェロン誘導能を併せ持つ

### 高機能型核酸医薬の創製に関する研究

分担研究報告書

miR-122a に対する阻害能と I 型インターフェロン誘導能を兼ね備えた

### アンチセンスオリゴヌクレオチドの開発

分担研究者 櫻井 文教

大阪大学大学院薬学研究科 准教授

#### 研究要旨

C型肝炎はC型肝炎ウイルス（HCV）の慢性感染によって引き起こされる疾患であり、高効率に肝硬変や肝癌に移行することから大きな社会問題となっている。現在C型肝炎治療薬としては、Interferon（IFN）およびリバビリンが第一選択薬であるが、HCVの感染・増殖を規定する細胞側因子を標的とした新規治療薬の開発に期待が寄せられている。最近、肝臓特異的microRNA（miRNA）であるmiR-122aがHCVの感染・増殖を規定する新たな細胞側因子であることが報告された。miR-122aはHCVゲノムの5'非翻訳領域に存在する部分的相補配列に結合することにより、HCVゲノムの安定化および翻訳を促進し、HCVの感染を正に制御している。従って、miR-122aを高効率かつ特異的に阻害できれば、HCVの感染を阻害できると考えられる。実際に、miR-122aのアンチセンスオリゴヌクレオチド（Antisense oligonucleotide; ASO）が抗HCV薬として開発され、臨床試験が行われている。一方でASOなどの核酸医薬は、副作用軽減のため自然免疫を活性化しないように設計されており、患者自身の免疫能を十分に活用できていない。核酸医薬品においても、自然免疫活性化能を付与しIFN産生を誘導可能になれば、ASO本来のHCV感染抑制機構に加えて、IFNによる抗HCV活性を誘導することが可能となり、さらに高い治療効果を誘導できるのではないかと考えた。これまでの研究により、細胞質において非自己RNAを認識するRIG-I（Retinoic acid-inducible gene-I）を活性化させると高効率にIFN産生を誘導できることが報告されている。RIG-Iは、5'末端に3リン酸基を持つ二本鎖RNAと高い親和性を有することから、本研究ではmiR-122aのアンチセンス配列にRIG-Iに結合可能な5'末端に三リン酸基をもつ二本鎖RNAをつなげた新規ASOであるLNA122-DSを開発し、昨年度はmiR-122a阻害能およびI型IFN誘導能を検討した。本年度は、LNA122-DSのHCV増殖抑制効果について検討した。

研究代表者  
 山口 朋子 独立行政法人医薬基盤研究所  
 研究員  
 協力研究者  
 水口 裕之 大阪大学大学院薬学研究科  
 教授  
 立花 雅史 大阪大学大学院薬学研究科  
 助教  
 林 晃平 大阪大学大学院薬学研究科  
 大学院生  
 Ong Tyng Tyng 大阪大学大学院薬学研究科  
 大学院生  
 坂本 直哉 北海道大学大学院医学研究科  
 教授  
 福原 崇介 大阪大学微生物病研究所  
 助教  
 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所  
 教授  
 加藤 宣之 岡山大学大学院医歯薬総合研究科  
 教授

## A. 研究目的

C型肝炎ウイルス (Hepatitis C virus; HCV) は、1989年に米国の Choo らによって発見された一本鎖 RNA をゲノムに持つエンベロープウイルスである。HCV は現在では我が国において 200 万人、全世界では 1 億 7 千万人の C 型肝炎患者がいるとされており、C 型肝炎は現在世界最大のウイルス感染症の一つである。HCV は肝細胞に感染後、30%は急性肝炎として治癒するものの、残り 70%は慢性肝炎となり 20-30 年の歳月をかけて肝硬変、肝臓へ移行する。現在、C 型肝炎治療薬の標準治療薬はペグ化 1 型インターフェロン (PEGylated interferon; PEG-IFN) とリバビリンの併用療法である。両薬剤併用により著効率 (Sustained virological response (SVR) 率; 治療終了後 6 ヶ月の時点まで HCV の RNA ゲノムが検出されない状態が持続している割合) は飛躍的に向上したが、難治性とされる遺伝子型 1b・高ウイルス量症例では、PEG-IFN と

リバビリンの併用でも SVR 率は 50%であり、半数の症例で HCV ゲノムを排除できないことから、新規 C 型肝炎治療薬の開発は急務である。

近年になり HCV の増殖に関与する新規細胞内因子として、肝臓特異的な microRNA (miRNA) である miR-122a が同定された。miR-122a は、肝細胞において 50000 コピー/cell も発現しており、肝細胞中の全 miRNA の約 70%を占めている。この miR-122a は HCV ゲノムの 5'非翻訳領域に存在する部分的相補配列に結合し、HCV の感染・増殖を正に制御することが報告されている。HCV ゲノムの 5'非翻訳領域にある miR-122a の部分的相補配列は、全ての HCV 遺伝子型で保存されているため、日本人の約 7 割を占める遺伝子型 1b でも、miR-122a を阻害すれば HCV に対して抑制的に働くことが期待される。このような背景の中で、デンマークのサンタリス社により、C 型肝炎治療薬として miR-122a のアンチセンスオリゴヌクレオチド (Antisense oligonucleotide; ASO) が開発され、現在第二相臨床試験まで進んでいる。この miR-122a に対する ASO は、世界初の microRNA を標的とした治療薬として注目されている。

一方で ASO や small interfering RNA (siRNA) などの従来用いられてきた核酸医薬品は、副作用をさけるために IFN 産生を誘導しないように設計されている。しかしながら、C 型肝炎治療薬として IFN 製剤が使用されていることを考慮すると、核酸医薬品においても自然免疫活性化能を付与し 1 型 IFN 産生を誘導可能になれば、miR-122a による HCV 感染抑制機構に加えて、1 型 IFN による抗 HCV 活性を誘導することが可能となり、さらに高い治療効果を誘導することが期待される。これまでの研究により、細胞質において非自己 RNA を認識する RIG-I (Retinoic acid-inducible gene-I) を活性化させると高効率に 1 型 IFN 産生を誘導できることが報告されている。また RIG-I は、5'末端に 3 リン酸基を持つ二本鎖 RNA と高い親和性を有することが知られている。さらに近年になり、RIG-I に認識

された RNA はストレス顆粒に蓄積されることが報告され、HCV ゲノムも RIG-I に認識されストレス顆粒に移行することが報告された。また miR-122a も Argonaute2 と複合体 (RNA induced silencing complex; RISC) を形成し、ストレス応答時にはストレス顆粒に移行することが知られている。以上の報告から、HCV ゲノムは細胞内でストレス顆粒に於いて miR-122a と結合し、安定化及び翻訳を促進していると考えられる。従って miR-122a に対する ASO を効率良くストレス顆粒に送達することが可能であれば、従来の miR-122a 阻害剤よりも高効率に HCV ゲノムに結合する miR-122a を阻害可能であることが推察される。

そこで我々は、従来の miR-122 に対する ASO よりも高い抗 HCV 活性を付与するために、miR-122a のアンチセンス配列に RIG-I に結合可能な 5'末端に三リン酸基をもつ二本鎖 RNA をつなげた新規 ASO である LNA122-DS を開発した。昨年度、LNA122-DS の miR-122a 阻害能および 1 型 IFN 産生誘導能を検討したところ、高効率に miR-122a を阻害するとともに、1 型 IFN の産生を誘導した。そこで本年度は、LNA122-DS が実際に HCV 感染を高効率に抑制可能か検討した。

## B. 研究方法

### 1. LNA122-DS の作製

5'末端に三リン酸基をもつ一本鎖 RNA (3pssRNA) を合成するために、*in vitro* 転写をする際の Template となる T7 プロモーターを有した合成オリゴ DNA を作製した。作製した合成オリゴ DNA および MEGAshortscript kit (ambion) を用いて 3pssRNA の合成を行った。合成に用いたオリゴ DNA の配列を Table 1 に示す。合成した 3pssRNA を 15%ポリアクリルアミドゲルを用いて Native-PAGE を行ったのち目的のバンド位置の RNA を切り出し、ポリアクリルアミドゲルから RNA を回収した。回収した 3pssRNA と miR-122a に対する相補配列を有した ASO を等

量で混合した後、アニーリングし LNA122-DS を作製した。miR-122a に対する相補配列は、サンタリス社が臨床試験を進めている ASO と同一の配列を用いた。Locked nucleic acid (LNA) による修飾部位 (塩基) についてもサンタリス社の ASO を同じ部位を LNA とした。目的の二本鎖 RNA が形成されていることを確認するために、上記の同じ条件で Native-PAGE を行った。

### 2. Huh7.5.1 1b Feo 細胞における LNA122-DS による HCV レプリコン抑制効果に関する検討

Huh7.5.1 1b Feo 細胞 (北海道大学・坂本直哉先生より供与) を 96 well-plate に  $1 \times 10^4$  cells/well で播種した。24 時間後、LNA122-DS を含む ASO を 100 nM で Transfection した。Transfection48 時間後、PBS で細胞を Wash したのち、ピッカジーン LT2.0 を 100  $\mu$ l/well で加え、室温で 10min インキュベートした。その後、ホタルルシフェラーゼ活性を測定した。

### 3. Hec1B/miR-122 Con1 細胞における LNA122-DS による HCV レプリコン抑制効果に関する検討

Hec1B/miR-122 Con1 細胞を 12 well plate に  $5 \times 10^5$  cells/well で播種し、24 時間後に LNA122-DS を含む各種 ASO を 100 nM で Transfection した。Transfection24 時間後に Total RNA を Isogen を用いて回収し、定量的 RT-PCR により HCV replicon genome 量を定量した。用いたプライマーの配列を Table 2 に示す。

### 4. Hec1B/miR-122 細胞における LNA122-DS による 1 型 IFN ならびに IFN-stimulated gene (ISG) の発現解析

Hec1B/miR-122 細胞 (大阪大学・松浦善治先生、福原崇介先生より供与) を 12 well plate に  $5 \times 10^5$  cells/well で播種し、24 時間後に LNA122-DS を含む各種 ASO を 100 nM で Transfection した。Transfection24 時間後に Total RNA を Isogen を用いて回収し、定量的 RT-PCR により IFN および各種 ISG mRNA 量を定

量した。用いたプライマーの配列を Table 2 に示す。

#### 5. LNA122-DS による HCVcc 増殖抑制効果に関する検討

Hec1B/miR-122 細胞を 24 well plate に  $1 \times 10^5$  cells/well で播種し、24 時間後、LNA122-DS を含む各種 ASO を 100 nM で Transfection した。Transfection 4 時間後に培地交換とともに、HCV in cell culture (HCVcc; JFH-1 株) を Multiplicity of infection (MOI) 0.5 で感染させた。Transfection 24 時間後に、Total RNA を回収し、HCV genome copy 数を定量的 RT-PCR により定量した。

### C. 研究結果

#### 1. Huh7.5.1 1b Feo 細胞における LNA122-DS による HCV レプリコン抑制効果に関する検討

まず HCV レプリコン RNA 発現細胞として Huh7.5.1 1b Feo 細胞を用いて LNA122-DS の HCV レプリコン抑制効果を検討した。Huh7.5.1 1b Feo 細胞は、RIG-I 遺伝子の変異を有しているため RIG-I を介した 1 型 IFN 産生誘導経路が機能しないことが報告されている。この細胞に各種 ASO を Transfection したところ、LNA122-DS 導入群では mock と比較して、HCV レプリコン RNA レベル (HCV レプリコン RNA 由来のルシフェラーゼ活性) を 22% まで抑制した。一方、LNA control-DS 導入群あるいは LNA122 導入群では 47% まで HCV レプリコン RNA レベルが抑制されていた。また Huh7.5.1 1b Feo 細胞における IFN- $\beta$  誘導を検討したところ、各種 ASO による有意な IFN- $\beta$  発現は見られなかった (data not shown)。Huh7.5.1 1b Feo 細胞では RIG-I 経路が機能していないことを考慮すると、LNA122-DS は miR-122a 阻害に加えて、1 型 IFN 産生以外のメカニズムを介してより高い抗 HCV 活性を示したものと考察された。

#### 2. Hec1B/miR-122 Con1 細胞における LNA122-DS による HCV レプリコン抑制効果に関する検討

次に HCV レプリコン RNA 発現細胞として、Hec1B Con1 細胞を用いて実験を行った。予備検討において、HCVcc が感染可能な各種培養細胞に LNA122-DS を作用させたところ、Hec1B/miR-122 細胞でのみ 1 型 IFN の産生が認められたことから、本細胞を用いた LNA122-DS の HCV レプリコン抑制効果について検討した。この細胞において LNA122-DS が miR-122a 抑制能があるかどうかを検討したところ、LNA122-DS によって、ウミシイタケルシフェラーゼ発現量が psicheck-control 導入群と同程度まで回復したことから、LNA122-DS は Hec1B Con1 細胞においても miR-122a を阻害可能であることを確認した。また LNA122-DS を Transfection したところ、mock と比較して IFN- $\beta$  発現量が約 15 倍上昇した。

次に、各種 ASO の抗 HCV 活性 (HCV レプリコン抑制能) を Hec1B Con1 細胞を用いて検討した。LNA122 および LNA control-DS 導入群では、HCV レプリコン RNA 量が mock 群と比較してそれぞれ 47% および 50% に抑制されていた。それに対し、LNA122-DS 導入群では HCV レプリコン RNA 量が 26% まで抑制されていた。

以上の結果より、LNA122-DS は miR-122 を阻害可能であるとともに、1 型 IFN を誘導することで高効率に HCV を抑制可能であることが示された。

#### 3. Hec1B/miR-122 Con1 細胞における LNA122-DS による IFN-stimulated gene (ISG) の発現誘導解析

さらに、各種 ASO 導入後の抗 HCV 活性を持つ ISG の発現変動を定量的 RT-PCR により検討した。Hec1B 細胞は 1 型 IFN 受容体を発現していないことが知られている。一方で、ISG は RIG-I/IPS-1 経路によるシグナルにより、各種 IFN regulatory factor (IRF) を介して直接的に発現が誘導されることが報告されている。その結果、IFI6、OAS、ISG56、ISG15 は mock 群と比

較して、LNA122-DS 導入群において 5~15 倍発現上昇していた。しかし、IRF9、GBP1、IFI27、IRF1 においては有意な発現上昇は見られなかった。以上の結果より、LNA122-DS は Hec1B/miR-122 Con1 細胞においても効率よく ISG の発現を誘導することが示された。

#### 4. LNA122-DS による HCVcc 増殖抑制効果に関する検討

次に LNA122-DS が HCVcc の感染を抑制可能か検討した。LNA122-DS を Transfection した細胞に HCVcc を作用させたところ、LNA122 では約 40%、LNAcont-DS では約 80%まで HCVcc の増殖を抑制したのに対し、LNA122-DS 作用群では約 90% HCVcc の増殖を抑制していた。以上の結果より、LNA122-DS は HCV レプリコンのみならず、HCVcc の増殖を従来の miR-122 に対する ASO よりも高効率に抑制可能であることが示された。

#### D. 考察

本研究では、より高い抗HCV活性を有する核酸医薬を開発することを目的に、miR-122aに対するASOIに、RIG-Iを介して1型IFNの発現を誘導可能な二本鎖RNA領域を付与した新規核酸医薬LNA122-DSを開発した。LNA122-DSは、miR-122aを阻害するだけでなく、1型IFNを誘導することで高効率にHCVの増殖を阻害するものと考えた (Figure 1)。

昨年度は、LNA122-DSのmiR-122a阻害能ならびに1型IFN誘導能について検討し、LNA122-DSが優れたmiR-122a阻害能および1型IFN誘導能を有することを明らかにした。そこで本年度は、実際にHCVの増殖を抑制可能か、HCVレプリコン発現細胞ならびにHCVcc感染細胞を用いて検討した。まず従来よりHCVレプリコン発現細胞として広く用いられているHuh7.5.1細胞を基盤したHCVレプリコン発現細胞であるHuh7.5.1 1b Feo細胞を用いて、LNA122-DSの有用性について検討した。Huh7.5.1細胞は、RIG-I遺伝子に変異を有

しているため、RIG-Iリガンドを介した1型IFN誘導が起こらない。実際に我々がHuh7.5.1 1b Feo細胞にLNA122-DSを作用させたところ、有意なIFN-βの発現上昇は観察されなかった。しかしながら、LNA122-DSならびにLNAcont-DSは、LNAcontと比較して有意にHCVレプリコンを抑制した。この理由は現在不明であるが、レポーターアッセイによりmiR-122aの阻害能は、LNA122-DSとLNA122で同程度であることから、その他の要因が考えられる。その他の要因としては、二つを考察している。まず一つは、LNA122-DSがProtein kinase R (PKR)を活性化させる経路が考えられる。PKRは二本鎖RNAを認識することで活性化すること、またPKRが抗HCV活性を有することが知られている。従って、LNA122-DSあるいはLNA control-DSの二本鎖RNA部分がPKRを活性化し、HCVレプリコンRNAを抑制したと考えられる。二つ目は、RIG-IによるLNA122-DSのストレス顆粒への蓄積である。ストレス顆粒とは、細胞が何らかのストレスを受けた際にmRNAおよびRNA結合タンパク質が蓄積して形成される顆粒である。近年RIG-Iにより認識されたRNAがストレス顆粒に蓄積することが明らかとなった。またHCVゲノムもストレス顆粒に留まることが知られている。さらにmiR-122aは、Argonaute 2 (Ago2)に取り込まれたのち、RNA-induced silencing complex (RISC)を形成し、ストレス応答時にストレス顆粒に移行する。従って、RIG-Iに認識されたLNA122-DSがストレス顆粒に移行し、HCVゲノム、miR-122a、LNA122-DSが高濃度にストレス顆粒に集積することで、LNA122導入群よりも有意にmiR-122aを阻害することが可能となり、より高い抗HCV効果をもたらしたものと推察された。上記の可能性については、今後詳細に検討する予定である。

次に、miR-122a阻害と1型IFN誘導によるHCV増殖抑制が同時に評価可能な細胞を探索するため、Huh7細胞以外でHCVccが感染可能な各種細胞株にLNA122-DSを作用させ、1型IFN産生を検討した。その結果、Hec1B/miR-122a細胞 (miR-122a



を安定発現するHec1B細胞)が唯一1型IFNの発現上昇を示したことから、以後の検討ではHec1B/miR-122a細胞を用いて検討することとした。Hec1B細胞は、1型IFNに対する受容体を発現していないものの、LNA122-DS作用後、IFN-βならびに各種ISGの発現上昇が観察された。これは、RIG-Iを介したシグナルより、IRFが直接的にISGの発現を誘導したものと考えられる。今回発現誘導されたISGは、すべて抗HCV活性を有することが報告されていることから、これらISGの発現誘導が抗HCV活性につながったものと考えられる。

HCVゲノムから翻訳されるタンパク質の一つであるNS3/4Aはプロテアーゼ活性を有し、RIG-Iの下流にあるアダプター分子であるInterferon-β promoter stimulator-1 (IPS-1)を分解する。従って、HCV感染細胞ではIPS-1が分解されることにより、RIG-I経路が非感染細胞よりも効率良く機能しないことが報告されている。しかし、そのような報告では実際の感染細胞と比較してHCVゲノム量が非常に多いこと、また分解されていないIPS-1も検出されていることから、我々はHCV感染細胞においてもRIG-I経路を介して1型IFNを誘導可能であると考えた。HCVレプリコン細胞では一般的に約 $10^4$ コピーのHCVレプリコンRNAが存在するのに対し、実際のHCV感染細胞では、臨床検体のHCV感染細胞では10コピー前後であると報告されていることから、実際のHCV感染細胞ではレプリコンRNA発現細胞であるHec1b Con1細胞の結果よりも高いIFN-β誘導を得られるものと期待される。またLNA122-DSがmiR-122a阻害活性によりHCVゲノム量を抑制すれば、NS3/4Aの発現低下、ひいてはIPS-1の分解が抑制され、RIG-I経路も機能を取り戻すと推察される。

一方で、miR-122aに対するアンチセンス領域と、1型IFNの発現誘導活性を有する二本鎖RNA領域を別々にTransfectionした場合のHCVレプリコン抑制効率と、LNA122-DSのHCVレプリコン抑制効率は同程度であった (data not shown)。

またmiR-122aに対するアンチセンス領域がmiR-122aを阻害する効率と、二本鎖RNA領域の1型IFN誘導効率が異なることから、二つの領域を結合させた形にすることで、どちらかを過剰量細胞内に導入することになる。しかし、二つの領域を結合させた領域にすることで、同一の細胞でmiR-122a阻害と1型IFNならびにISGの発現を誘導することができる。またmiR-122aに対するASOは、リポソームなどのキャリアーを使用せずに単独投与により肝細胞にデリバリー可能である。従って、LNA122-DSもキャリアーなしに単独で肝細胞にデリバリーできるかもしれない。

## E. 結論

1. LNA122-DSは、Hec1B/miR-122細胞において1型IFNならびにISGの発現を誘導可能であった。
2. LNA122-DSはHec1B/miR-122細胞において、HCVレプリコンならびにHCVccの増殖を抑制可能であった。
3. LNA122-DSは、1型IFNの発現を誘導しないHuh7.5.1 1b Feo細胞においても、従来のmiR-122に対する従来のアンチセンスオリゴヌクレオチドよりも高いHCVレプリコン抑制効果を示した。

## F. 健康危険情報

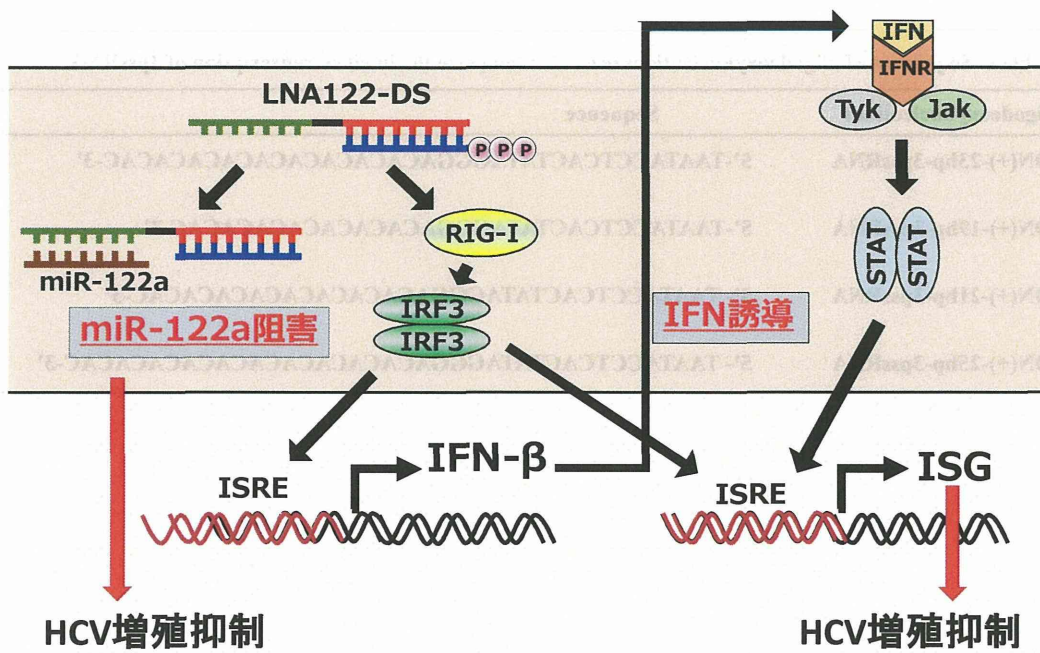
該当なし

## G-研究発表

### G-1 論文発表

1. Machitani M., Sakurai F., Katayama K., Tachimana M., Suzuki T., Matsui H., Yamaguchi T., Mizguchi H. Improving the adenovirus vector-mediated RNAi efficiency by lacking the expression of virus-associated RNAs., *Virus Res.*, in press.
2. (序論) 櫻井文教、近藤昌夫 「ウイルスを利用した医療・創薬研究の新展開・ウイルスは





**Figure 1. LNA122-DS-mediated suppression of HCV replication.** IRF; IFN regulatory factor, ISRE; IFN-sensitive response element, ISG; IFN-stimulated gene, IFNR; IFN receptor, STAT; signal transducer and activator of transcription.

**Table 1. Sequences of oligodeoxynucleotides used as a template for *in vitro* transcription of 3pssRNA.**

Oligodeoxynucleotides	Sequence
ODN(+)-23bp-3pssRNA	5'-TAATACCTCACTATAGGGACACACACACACACACACAC-3'
ODN(+)-19bp-3pssRNA	5'-TAATACCTCACTATAGGGACACACACACACACAC-3'
ODN(+)-21bp-3pssRNA	5'-TAATACCTCACTATAGGGACACACACACACACACAC-3'
ODN(+)-25bp-3pssRNA	5'-TAATACCTCACTATAGGGACACACACACACACACACAC-3'

**Table 2. Sequences of primers for real-time RT-PCR.**

Primers	Sequence
GAPDH-F	5'-GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA-3'
GAPDH-R	5'-GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT-3'
IFN-B-F	5'-ATGACCAACAAGTGTCTCCTCC-3'
IFN-B-R	5'-GCTCATGGAAAGAGCTGTAGTG-3'
HCV-5'UTR-F	5'-GAGTGTCGTGCAGCCTCCA-3'
HCV-5'UTR-R	5'-CACTCGCAAGCACCCCTATCA-3'
IFI6-F	5'-GGTCTGCGATCCTGAATGGG-3'
IFI6-R	5'-TCACTATCGAGATACTTGTGGGT-3'
ISG15-F	5'-GAACAAATGCGACGAACCTCT-3'
ISG15-R	5'-CCCTCGAAGGTCAGCCAGA-3'
ISG56-F	5'-CTTGAGCCTCCTTGGGTTCG-3'
ISG56-R	5'-GCTGATATCTGGGTGCCTAAGG-3'
OAS-F	5'-TGTCCAAGGTGGTAAAGGGTG-3'
OAS-R	5'-CCGGCGATTAACTGATCCTG-3'