

## 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臓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-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、肝癌へと移行する。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の増殖に関する新規細胞内因子として、肝臓特異的なmicroRNA (miRNA) であるmiRNA-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-1) 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。Transfection 48 時間後、PBS で細胞を Wash したのち、ピッカジーン LT2.0 を  $100 \mu\text{l/well}$  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。Transfection 24 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。Transfection 24 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-誘導を検討したところ、各種 ASO による有意な IFN- 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 psicontrol 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- 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ASO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ISGI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 E.**, 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

## G-2 学会発表

1. 林 晃平, 櫻井 文教, オン ティン ティン, 加藤 宣之, 福原 崇介, 松浦 善治, 坂本直哉、立花 雅史, 水口 裕之. miR-122a 阻害と1型インターフェロン産生を同時誘導可能な新規核酸医薬品によるC型肝炎治療に関する研究. 第29回日本DDS学会 2013年7月4,5日 京都.
2. オン ティン ティン、櫻井文教、林晃平、福原崇介、松浦善治、加藤宣之、坂本直哉、立花雅史、水口裕之. 高いインターフェロン誘導能とノックダウン効率を併せ持つ分岐型 siRNA を用いたC型肝炎ウイルス増殖抑制に関する検討. 第63回日本薬学会近畿支部総会・大会 2013年10月12日 京都.
3. オン ティン ティン、櫻井文教、林晃平、福原崇介、松浦善治、加藤宣之、坂本直哉、立花雅史、水口裕之. 高いインターフェロン誘導能とノックダウン効率を併せ持つ分岐型 siRNA によるC型肝炎ウイルスの増殖抑制. 第23回アンチセンスシンポジウム、2013年11月28-29日、徳島.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### H-1 特許取得

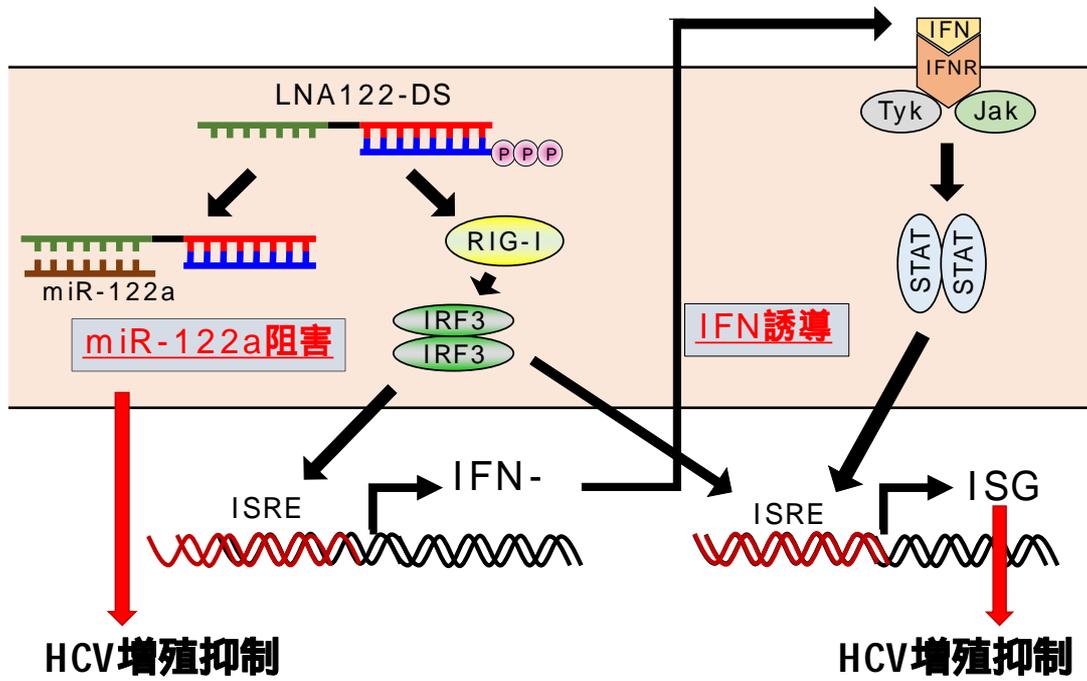
該当なし

### H-2 実用新案登録

該当なし

### H-3 その他

該当なし



**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'