

1. RNA ウイルス感染の免疫生物応答 —HCV を中心に—

瀬谷 司, 押海 裕之, 松本 美佐子

北海道大学大学院医学研究科 免疫学分野

一般にウイルス感染は宿主免疫を回避して成立するが、回避機構はウイルスごとに差異がある。RNA ウイルスはゲノムも複製産物もパターン分子 (PAMP) として宿主のエフェクター (1 型インターフェロン (IFN)、サイトカイン、NK 細胞活性化、Th1 シフト、細胞障害性 T リンパ球 (CTL) の増殖など) を誘導する例が多い。このことは RNA 認識の自然免疫が細胞性免疫の起動原になることを示唆する。実際、この過程を阻害する因子が多くのウイルスで発見されている。また、この過程は明らかに樹状細胞の成熟化を介しており、ウイルス RNA は例外を除いて免疫細胞の機能を損なわずに感染免疫を成立させる。樹状細胞はウイルスに障害されずに RNA センサーによる非自己 RNA の検知とエフェクター誘導を行う必要がある。即ち感染細胞内で起きる RNA 認識 (内因性識別系) と非感染樹状細胞で起きる RNA 認識 (外因性識別系) は異なる目的に収束する。本総説では HCV を例にとり、この2つの系に関わる最近の知見を解説し、新規分子の機能に言及する。

はじめに

核酸・RNA は遺伝情報を織りなすとともに外因的にウイルスゲノムとして可動し、宿主細胞内で複製する。RNA 自体にリボザイム活性があり、また配列特異的に RNA 干渉 (RNAi) を惹起する。外来 RNA は宿主遺伝子の同一性を攪乱する生物活性を内包する。一般に生命は内在性 (自己) の RNA を保護し、外来性 (非自己) の RNA を識別し排除する。これは基本的に遺伝子同一性の保持機構として長い生命史から培われた反応であり、非自己 RNA 識別の仕組みは自然免疫系として確立している。ヒトを含む哺乳類ではこの自然免疫に獲得免疫が重層的に発達し広義の感染免疫を構成する。2つの免疫系はすでに不可分の連携をなすが急性応答は転写因子の活性化によるインターフェロン (type I IFN) 誘導に集約される。即ちウイルス RNA は宿主細胞に検知され、type I IFN を誘導する。

IFN- α/β は 1980 年にクローニングされ^{1,2)}、その主な転写因子 IRF-3 も 1990 年台に同定された³⁾。しかし、何が IRF-3 を活性化するのか長く不明であった。RNA 認識から IFN を誘導する経路は 21 世紀初頭になって複数発見された。その嚆矢は TLR3/TICAM-1 (TRIF) 経路であり⁴⁾、次に RIG-I/MAVS (IPS-1) 経路である⁵⁾。これらはともに転写因子 IRF3 を活性化 (燐酸化と核移行) することから IRF3 の上流でレセプターとシグナル経路を構成する⁶⁾。MAVS 経路は普遍的であるが TLR3 の発現はミエロイド系、上皮系の細胞に限られる。このこととウイルス種の検討から RNA への急性応答は RIG-I とそのパラログ MDA5 によって担われる例が多いことが判明した⁷⁾。この間、TLR3, RIG-I の RNA センサーに続いて多くの核酸認識能をもつヘリケースも同定された⁸⁾。TLR3 の RNA 認識の生理的意義は明らかでなく、再考される時期が続いた。

不急の遺伝子では中立説を引くまでもなく変異しやすい。TLR3 はこれに反して無顎類 (ヤツメウナギの仲間, LRR の獲得免疫を持つ) にも保存されており⁹⁾、6 億年以上遍く脊椎動物に高い相同性で保持されてきた。IFN 誘導のためだけに、RIG-I の副次経路として存在する訳ではない。免疫領域では TICAM-1, MAVS の欠損マウスの比較研究から、TLR3/TICAM-1 経路が樹状細胞のクロスプレゼンテーション^{10,11)}、免疫記憶の形成¹²⁾ (即ち獲得免疫の誘導) に重要であることが提示された。リンパ球 (CTL, NK) を活性化する CD8+ 樹状細胞 (DC) (ヒトでは CD11c+/BDCA3+ DC, CD141 DC) は TLR3 を高発現するが(13,14),

連絡先

〒060-8638

北海道札幌市北区北 15 条西 7 丁目

北海道大学大学院医学研究科 免疫学分野

TEL: 011-706-5056

FAX: 011-706-7866

E-mail: seya-tu@pop.med.hokudai.ac.jp

図1 外因性RNAの認識応答

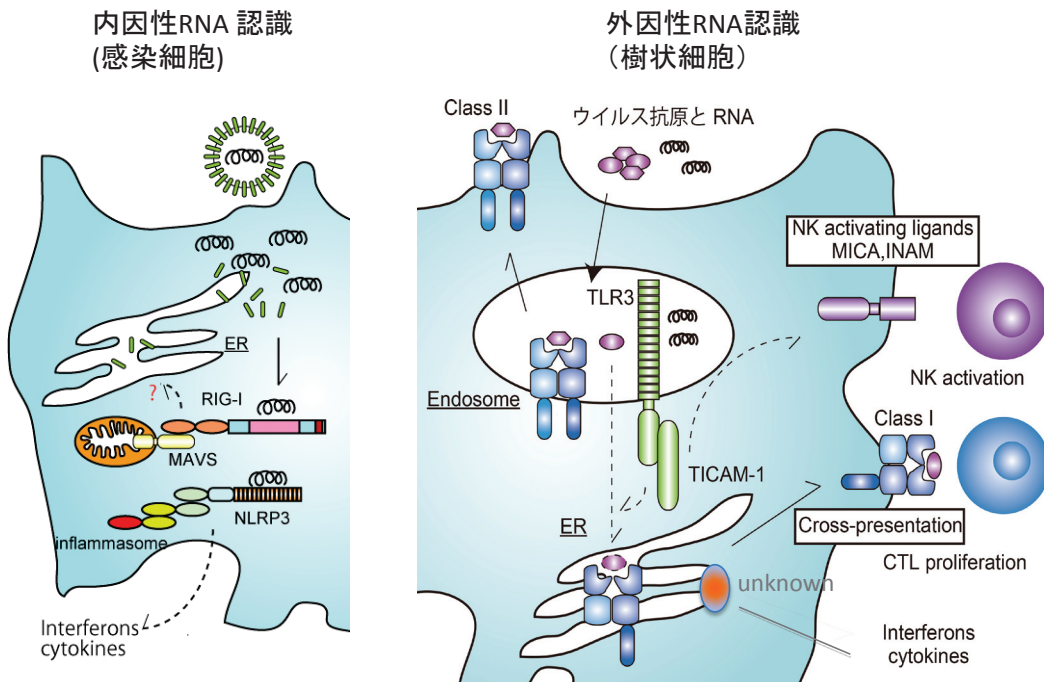


図1 RNAの内因性認識と外因性認識

図1A. 内因性認識. ウイルスRNAは直接あるいは複製後、細胞質のRIG-I, MDA5ヘリケースによって認識され、ミトコンドリアのMAVS (IPS-1)アダプターにシグナルを伝える. これ以外にも多数のRNAセンサーが細胞質に存在する. NLRファミリーのNALP3もRNAセンサーの1つである.

図1B. 外因性認識. RNAは一旦、感染細胞外に出て別の細胞に取り込まれる. 樹状細胞がRNAを取り込むと図のようなTLR3経路の活性化が起動する. 取り込みに関与するレセプターはヒト樹状細胞以外でCD14, Dec205などが候補として挙げられているが、RNAが樹状細胞に取り込まれる機構は不明である. 最終的に特定のIRF3依存性経路でNK細胞活性化とCTL誘導 (cross-presentation) が発動する.

CD4+DC, DN DCはTLR3を殆ど発現しない. このことはin vivoで免疫メモリーがその排除に重要なウイルスはTLR3に依存し、急性感染に対するIFN誘導が排除要因のウイルスはRIG-I/MDA5に強く依存することを示唆する. メモリーの成立にはTLR3陽性樹状細胞が感染によって障害されずに活性化するような非感染的なRNA配送が必要であろう. このような視点から我々は種々のRNAウイルスと宿主TLR3応答をRIG-I/MDA5と対照してマウスモデルを用いて調べた.

RNAの外因性・内因性認識様式

ウイルスRNAは内因性・外因性2つの異なった様式で宿主免疫を起動する. 感染とは内因性認識であり、感染細胞の細胞質内のRNAシグナル応答である (図1A). RNA認識の担当分子はRIG-I, MDA5を中心に多数の細胞質内ヘリケースがRNAセンサーとして関与する¹⁵⁾. これらは「宿主RNAに無くウイルスRNAに特徴的な」パターンを検知する^{16,17)}. 多くはIRF3/7を活性化し, type I IFNと

IFN-inducible genesを誘導する. 感染細胞は形質転換や損傷 (cytopathic effect) を受けるが, IFNは他細胞 (非感染) のウイルス抵抗性を高める. アポトーシスは内因性ウイルス感染の1つの帰結で, ウイルス粒子を放散しない方策の細胞死である. まとめて感染細胞でウイルスRNAを検知してIFNへのシグナル応答するのが内因性のMAVS経路である.

これに対し感染せずにRNAを取り込む様式を外因性認識と言ひ, 非感染細胞の細胞膜上のRNAセンサーがウイルスRNAを検知するシグナルイベントを指す (図1B). 細胞は感染を伴わずに機能変調を起こすのが一般的であり, 樹状細胞がその典型である. RNAは貪食されてエンドソームのTLR (TLR3, TLR 7/8) を活性化する¹⁸⁾. TLRはエンドソームに分布する1型膜蛋白質で, TLR3, 8は抗原提示細胞やマクロファージに, TLR7は形質細胞様樹状細胞 (pDC) に高発現する¹⁹⁾. 細胞質内センサーは外因性認識には殆ど関与しない. TLR3シグナルは細胞種によってネクロプトーシスを誘起し, 炎症を助長する²⁰⁾.

図2A

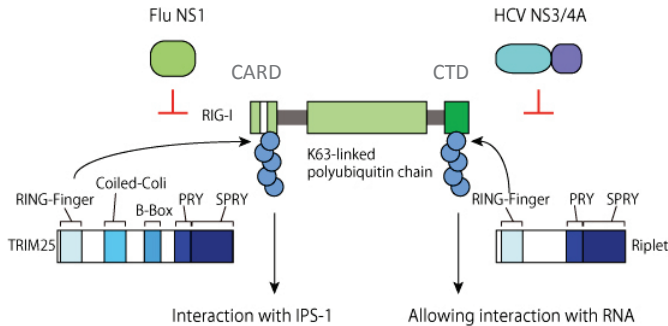


図2B

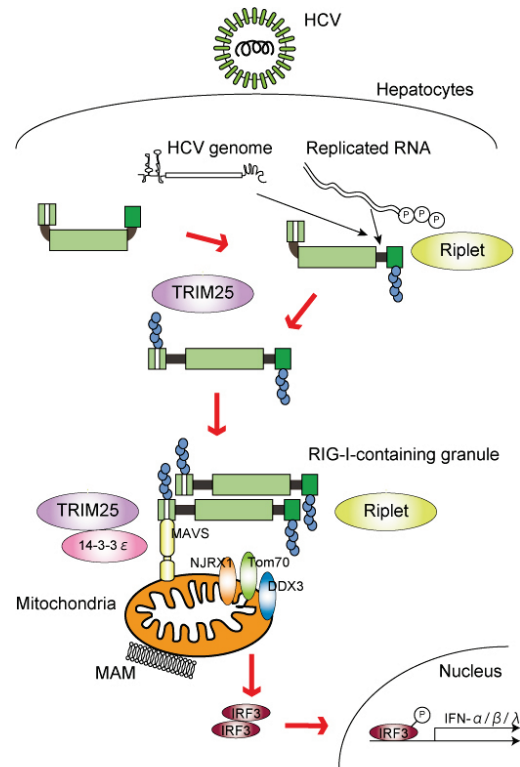


図2 RIG-Iの活性化とIFN誘導経路

図2A. RIG-Iの活性化. RIG-I CARDのみを強制発現させると高いIFNプロモーターの活性化が見られるが, RIG-I全長を発現させても高いIFN誘導は見られない. Riplet, Trim25を共発現させるとRIG-Iはフルに活性化する. RipletはHCVのNS3/4Aで, Trim25はインフルエンザウイルスのNS1で阻害されることが知られている.

図2B. RIG-IのK63ユビキチン化による活性化. RIG-IへのRNA結合はRipletによるC末のK63ユビキチン化とそれに伴う構造変化が必須となる. RIG-IのMAVSへの結合はTrim25によるN末側のK63ユビキチン化とそれに伴う構造変化によって起きる. 引き続き下流のIKK ϵ , TBK1がIRF3のリン酸化を誘起し, IRF3ダイマーがIFNの転写を誘導する.

即ち, 非感染の樹状細胞にRNA刺激による獲得免疫を起動させるのがTLR3である.

このことは非感染細胞に感染シグナルを伝える戦略に液性メディエーター(サイトカイン, IFNなど)の他にRNAそのもの(又はそれを含むエクソソームなど)がメディエーターとなる様式があることを示唆する. RIG-I, MDA5は全身性のIFN応答を誘起して血中IFNを上げるが, TLR3は局所のみで血中IFNを殆ど上げない. 感染は往々にして感染細胞を死に至らしめる. 一方, 樹状細胞TLR3は*vivo*応答を見るとIL-12誘導⁷⁾, NK細胞やCTL誘導を効果的に促進する^{11,21)}. この機能はRIG-I, MDA5, MAVSの欠損マウスでも保持される^{22,23)}. 樹状細胞に直接感染するウイルスでは複雑な例もあるが²⁴⁾, 外因性RNA認識は非障碍細胞の宿主免疫応答の促進を企図した系と言える.

外因性RNAはどのように感染細胞から樹状細胞などの

エンドソームに移動するのか? 共培養の系では感染細胞が破壊された場合, ウイルスRNAはdebris(細胞断片)やexosomeなどに乗って取り込み細胞に移動しうることが知られている^{25,26)}. また, 細胞外でウイルスRNAが検知できる. これらのことから*in vivo*でもウイルスRNAは破壊を免れて樹状細胞に到達すると想定されている. 少なくともウイルス感染はNK, CTLを含めた宿主細胞性免疫を活性化し, その免疫効果は外因性RNA認識系を遮断した場合大きく減じる²⁷⁾. ただし, メカニズムについて最初にRNAを捕獲する細胞表面レセプターが(TLR3はエンドソームに居て細胞表面に居ない)必要なはずである²⁸⁾. 如何なるレセプターが外来RNAを細胞膜でキャッチするのか? RNA単独か膜成分, 蛋白複合体などとの複合体RNAが取り込みに好都合か? は分かっていない. CD14, Dec205など候補レセプターは挙げられているがヒト樹状細胞のRNA認識の担当レセプターは同定されていない²⁹⁾.

従って、自然免疫のカテゴリズにおいて RIG-I などの細胞質内 RNA センサーと TLR3 などの細胞膜センサーは本質的な機能標的が異なる。IFN による急性の一過性応答は主に全身細胞の RIG-I によって担われ、長期記憶と特異性を伴う細胞性免疫の起動は TLR3 によって担われる。原則に例外はつきものだが、オートファジーは感染樹状細胞の細胞質の複製 RNA をエンドソーム内腔に輸送しうる³⁰⁾。逆にエンドソームの取り込み RNA を抗原とともに細胞質に落とす仕組みもある (クロスプレゼンテーション)³¹⁾。注目すべきはこれらの例外応答も TLR3 シグナルで促進されることであり、その意味ではこれらの例外応答も自然免疫の管轄下にある。RIG-I と TLR3 は宿主防御の免疫機能分担といえるが、どちらに排除されやすいかはウイルス種ごとの戦略を反映した問題である。リダグダントの系ではないのでウイルス防御に優劣を議論するのは無意味である。この原則を踏まえて当研究室から発信した HCV の内因性・外因性認識のトピックをハイライトする。

RNA の認識分子と構造

RIG-I は 5'-triphosphate RNA を認識するが cap された RNA を認識しない^{16,17)}。RNA 鎖の構造的特徴として、IFN の効果的な誘導には短鎖の 2 重鎖 RNA 部分が必要である。MDA5 は数珠状に繋がった 2 重鎖 RNA を認識するらしい³²⁾。この機能は遺伝情報や配列に依存しない。これらの細胞質内の RNA 認識は完全 2 重鎖 RNA でなければならず、これは RNA 複製産物の性質を反映している。TLR7/8 は 1 本鎖 RNA を認識するとされるが、これらを活性化する RNA の必須構造は分かっていない。

一方、TLR3 によって認識される RNA の構造情報は最近明らかになった³³⁾。TLR3 は完全 2 重鎖 RNA も不完全な (ミスマッチのある) 2 重鎖 RNA も認識する。5', 3' の RNA 修飾も認識に影響しない。従って、ウイルス RNA 複製産物としての dsRNA だけでなくゲノム RNA もリガンドになりうる³³⁾。また、RNA がエンドソームに輸送される場合、細胞外 RNA を捕獲してエンドソームに搬送する核酸レセプター (未同定) を経由する²⁸⁾。そのレセプターが認識する RNA の特徴を含めて外来 RNA 応答が起きる。

TLR3 は線維芽細胞や一部の上皮細胞では細胞表面にある³⁴⁾。ヒト・マウスなど哺乳類はこのような局在の異なる TLR3 が 1 つの遺伝子産物として存在するが、両生類や魚類などの水棲動物は TLR3 に加えて上皮系細胞に TLR22 という RNA センサーを高発現して細胞外 RNA 認識を効率化している³⁵⁾。哺乳類は陸棲の際に TLR3, TLR22 の機能オルソログを 1 つの TLR3 のみで代償するように発達したと考えられる。海に多い Birna 属ウイルスなどはサカナの TLR22 によって防御されるので³⁵⁾、ウイルスごとの RNA の特徴、認識経路と IFN 起動系は異なるのであろう。TLR22 の認識 RNA の特徴は分かっていない。

内因性 HCV 感染認識のトピック

HCV の細胞質内 RNA 認識は RIG-I が主体である。RIG-I 蛋白は肝実質細胞で少量が恒常的に発現しており、IFN 刺激で産生増加する。HCV 感染の初期応答は RIG-I による HCV ゲノム (特に 3' の polyU/UC 領域) 認識と IRF3-IFN 誘導と良い^{36,37)}。間質細胞には後述の別の原理が働き、両者の相互反応が HCV の後期応答を決める。

RIG-I の N 末 CARD ドメインを強制発現させると MAVS 依存性の I 型 IFN 誘導が起きるが、RIG-I の全分子を発現させると IFN 誘導は著しく弱い³⁸⁾。RIG-I は前駆型 (proform) で存在し、構造を変えて活性型に変わる³⁹⁾。RIG-I は RNA 結合と MAVS へのシグナル伝達を行う 2 つの構造変化を惹起する必要がある⁴⁰⁾。

Gack らは Trim25 (E3 ligase) による CARD ドメインの K63 ユビキチン化が RIG-I の MAVS へのシグナル伝達に必要なことを示した (図 2A)³⁸⁾。しかし、MAVS 全分子の活性化は CARD ドメインのみの発現と異なり、この N 末ユビキチン化のみでは殆ど上がらなかった^{38,40)}。この N 末修飾の vivo の重要性はインフルエンザウイルスが NS1 蛋白によってこのユビキチン化を阻害することでエスケープを果たしていることから示唆された⁴¹⁾。しかし、RIG-I の N 末ドメイン以外で起こる活性化イベントは不明であった。

押海は HCV の肝細胞への感染応答を調べる過程で、Trim25 以外の E3 ligase が RIG-I C 末の RNA 結合ドメイン (CTD) に結合することを発見し、この酵素を Riplet と命名した⁴¹⁾。Riplet は RIG-I の N 末 CARD ではなく C 末 CTD を K63 ユビキチン化する (図 2B)。これによって RIG-I は RNA 結合活性を獲得し、RIG-I CARD の強制発現と同様の MAVS 活性化を含む生物活性を発揮できる⁴²⁾。しかし、HCV 感染肝細胞は IFN 誘導能が極めて弱く、これは MAVS が HCV のプロテアーゼ NS3/4A によって分解を受けるためと説明されてきた⁴³⁾。NS3/4A を肝細胞に発現させると MAVS が分解を受けるがそれより上流で Riplet が分解され⁴⁰⁾、結果として RIG-I による RNA トラップは阻害されて IFN 誘導が強力に抑制されることが判明した (図 2B)。つまり、RIG-I は N 末、C 末の 2 か所でユビキチン化を受けて活性型となる。HCV の蛋白産生が起きる限り NS3/4A はプロテアーゼ活性を発揮するので IFN 誘導は持続的に抑制される。それは MAVS だけでなく Riplet が NS3/4A によって不活化されて RIG-I の活性型変換を進めないためである⁴⁰⁾。感染肝細胞が細胞死に陥らない原因は他にあるであろうが、HCV のライフサイクルは IFN 非誘導の感染細胞で回りやすくなる。押海は HCV が持続感染を維持する 1 つのメカニズムを解明したと言える。

図3A

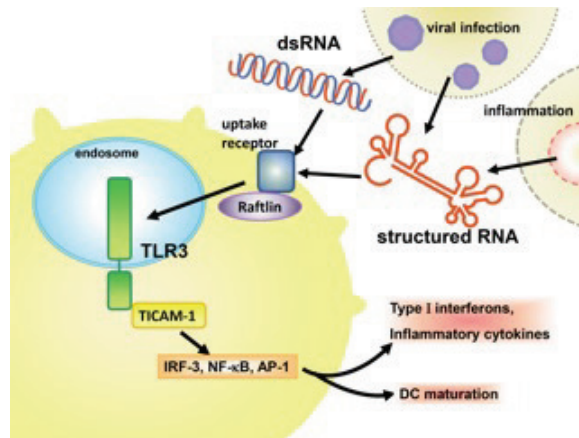
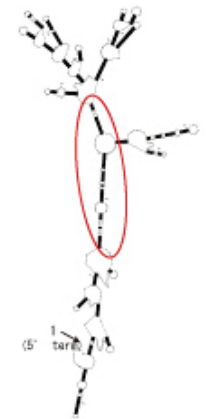


図3B



TLR3-activating PV-RNA (630 nts)

図3 ウイルス RNA の細胞外メディエーター機能

図 3A. ウイルス RNA による非感染樹状細胞の成熟化. PV での例証. PV 感染した細胞は構造 RNA (本文参照) を遊離して液相で樹状細胞に取り込まれエンドソームに局在する TLR3 と遭遇する. この樹状細胞に感染は及ばないが TLR3 を介した成熟化は起きる. この経路に Raftlin, TICAM-1 が関与することが KO マウスで確認された. ウイルス RNA は完全 2 重鎖の複製産物を作らなくても TLR3 活性化を起こせる. また, TLR3 は cap 構造に関わり無く構造 RNA を認識するため, 自己細胞由来の RNA (DAMP) でも認識できると推測される.

図 3B. PV の構造 RNA. RNase 抵抗性のセグメントは不完全 (bulged or looped) 部分を含んでも良いことが判明した. このような構造が細胞間のメッセンジャーとして機能する. 赤サークルは RNA の構造部分を示す.

外因性 HCV 感染認識のトピック

肝臓の間質細胞には Kupffer 細胞, Ito 細胞, 樹状細胞などがある. 樹状細胞はミエロイド系で抗原提示するが制御的な環境にあるとされる⁴⁴⁾. これらは TLR3 を恒常的に発現し, IFN 刺激に応じてさらに高発現する⁴⁵⁾. 肝実質細胞で RIG-I/MDA5 の発現がベースにあり RNA 応答が進むのと対照的に, 間質細胞では TLR3 の外因性 RNA 応答が IFN で更に高められる. 肝細胞は総数が多いので血中 IFN のソースになりうるが, 肝細胞に TLR3 は通常殆ど発現していない^{23,45)}. 慢性肝炎やがん化肝細胞の場合, TLR3 は肝実質細胞の小胞体に発現誘導されるが, RNA 応答としての血中 IFN は殆ど TLR3 由来ではない²³⁾.

肝臓の間質細胞に HCV の RNA が作用するプロセスは不明である. 間質細胞は TLR3 依存性に RNA 応答を起こすので, HCV のゲノム RNA, 複製産物の 2 重鎖 RNA は TLR3 を活性化する構造を有すると推測しうる^{46,47)}.

最近松本らに依って提出されたポリオウイルス (PV) RNA を用いた外因性認識の仕組みを紹介する³³⁾. PV は宿主細胞をハイジャックして PV RNA のみを複製し, 細

胞破壊に際して一本鎖 RNA (PV-RNA) を放出する. PV-RNA はそれ自体がゲノムでありメッセージだが, さらに細胞外で分解されると RNA メディエーターとして働き, 一本鎖であるにも拘わらず TLR3 を活性化する. In vitro 転写 RNA を用いた実験より, TLR3 を活性化できる PV-RNA は RNA 分解酵素に抵抗性の安定な構造をとっており, ヒト繊維芽細胞, 上皮細胞, マクロファージや樹状細胞から TLR3 を介して type I IFN/cytokines 産生を誘導する. PV-RNA は dsRNA 同様にラフトリンという分子に依存した経路でエンドソームに取り込まれ, TLR3 と結合することが示された²⁸⁾. RNA 二次構造予測解析と dsRNA 領域のマッピングから, PV-RNA は不完全な dsRNA 領域を有することがわかり TLR3 はこの領域を認識することが判明した. TLR3 はウイルスの複製過程で生じる完全な 2 重鎖 RNA だけでなく不完全な 2 重鎖を含む安定な構造の一本鎖 RNA (structured RNA) も認識することが証明された. この structured RNA の概念はウイルス感染だけでなく炎症などで細胞外に放出された自己由来の RNA に対する免疫応答を説明する概念となる (図 3)²⁹⁾.

HCV の RNA は (naked か wrapped は分からないが)

ヒト感染肝細胞から放出されて樹状細胞をNK, CTL誘導型に成熟化する²⁵⁾。この応答はTLR3-/-樹状細胞で阻止されるので、TLR3がRNA認識レセプターである。2重鎖RNAのみでなく、HCVのゲノムRNAにその活性があるか、妥当性を検討する必要がある。このことが線維化やがん化と如何に連携するかは今後の問題である。

HCV持続感染、微小環境と発がん

発がんウイルスは持続感染とともに特有の感染微小環境を構築する。Damage-associated molecular patterns (DAMP)と呼ばれる内因性のTLRリガンドが発がんの炎症素地の構築に関与すると云われる⁴⁸⁾。RNAが完全2重鎖しかメディエーターにならないなら、RNA-dependent RNA polymerase (即ちウイルス)依存性にしかRNAメディエーターは起きず、ウイルス感染を通したTLR3依存性の微小環境構築は限定された特殊現象となる。しかし、structured RNAの概念が正しければ、non-coding RNA, circular RNA, miRNAなど宿主由来のRNAは全て細胞間応答のメディエーターでありうる。

一般にTLR3応答は樹状細胞に起これば免疫増強を誘導する「良い炎症」である。実際、polyI:C療法ががん患者に試行された歴史もある⁴⁹⁾。これらは毒性故に棄却されたが、「良い炎症」を起動する部分を抽出すれば高い治療効果が見込める。がん細胞は頻繁にTLR3発現性に変換し、その生理的意義は不明であるがRNA依存性にネクロプトーシスを起こす例も知られている²⁰⁾。dsRNAはiPS細胞のリプログラミングの促進因子であり、幹細胞化(stemness)を促進する⁵⁰⁾。レトロトランスポゾンの遊離も促すらしい、ウイルス発がんとがん幹細胞の関係をここで論議する余裕はないが、HCVのRNAが持続感染の場で細胞間メディエーターとして肝再生、肝がんに至るプロセスに関わる可能性は重要な免疫生物学的な研究課題に見える。

謝辞

本研究は新学術領域「発がんスパイラル」(T.S)、課題提案型「細胞外核酸による免疫応答惹起の分子機構」(M.M)、特定領域研究「免疫系自己形成・識別とその異常」(M.M)の一環として見出された知見をまとめた。立松恵、東正大、志馬寛明、笠松純、高木宏美、舟見健児の諸博士の貢献に感謝する。小池智先生(都臨床機構)のご指導に深謝する。

文献

- 1) Taniguchi T, Mantei N, Schwarzstein M, Nagata S, Muramatsu M, Weissmann C. Human leukocyte and fibroblast interferons are structurally related. *Nature*. 285(5766):547-9. 1980.
- 2) Nagata S, Mantei N, Weissmann C. The structure of one of the eight or more distinct chromosomal genes for human interferon-alpha. *Nature*. 287(5781):401-8. 1980.
- 3) Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Fukuda M, Nishida E, Fujita T. Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J*. 17(4):1087-95. 1998.
- 4) Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol*. 4(2):161-7. 2003.
- 5) Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol*. 6(10):981-8. 2005.
- 6) Sasai M, Shingai M, Funami K, Yoneyama M, Fujita T, Matsumoto M, Seya T. NAK-associated protein 1 participates in both the TLR3 and the cytoplasmic pathways in type I IFN induction. *J Immunol*. 177(12):8676-83. 2006.
- 7) Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*. 441(7089):101-5. 2006.
- 8) Zhang Z, Kim T, Bao M, Facchinetti V, Jung SY, Ghafari AA, Qin J, Cheng G, Liu YJ, DDX1, DDX21, and DHX36 helicases form a complex with the adaptor molecule TRIF to sense dsRNA in dendritic cells. *Immunity*. 34(6):866-78. 2011.
- 9) Kasamatsu J, Oshiumi H, Matsumoto M, Kasahara M, Seya T. Phylogenetic and expression analysis of lamprey toll-like receptors. *Dev Comp Immunol*. 34(8):855-65. 2010.
- 10) Schulz O, Diebold SS, Chen M, Näslund TI, Nolte MA, Alexopoulou L, Azuma YT, Flavell RA, Liljestrom P, Reis e Sousa C. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature*. 433(7028):887-92. 2005.
- 11) Azuma M, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. Cross-priming for antitumor CTL induced by soluble Ag + polyI:C depends on the TICAM-1 pathway in mouse CD11c(+)/CD8 α (+) dendritic cells. *Oncoimmunol*. 1(5):581-592. 2012.
- 12) Smyth K, Garcia K, Sun Z, Tuo W, Xiao Z. TLR agonists are highly effective at eliciting functional memory CTLs of effector memory phenotype in peptide immunization. *Int Immunopharmacol*. 15(1): 67-72. 2013.
- 13) Belz GT, Smith CM, Eichner D, Shortman K, Karupiah G, Carbone FR, Heath WR. Cutting edge: conventional CD8 α + dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses. *J Immunol*. 172(4):1996-2000. 2004.
- 14) Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, Clark GJ, Ju X, Angel CE, Chen CJ, Dunbar PR, Wadley RB, Jeet

- V, Vulink AJ, Hart DN, Radford KJ. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med.* 207(6):1247-60. 2010.
- 15) Rathinam VA, Fitzgerald KA. Cytosolic surveillance and antiviral immunity. *Curr Opin Virol.* 1(6):455-62. 2011.
 - 16) Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzózka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science.* 314(5801):994-7. 2006.
 - 17) Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Näslund TI, Liljeström P, Weber F, Reis e Sousa C. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science.* 314(5801):997-1001. 2006.
 - 18) Matsumoto, M., H. Oshiumi, T. Seya. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. *Rev. Med. Virol.* 21: 67-77. 2011.
 - 19) Seya, T., K. Funami, M. Taniguchi, M. Matsumoto. Antibodies against human Toll-like receptors (TLRs): TLR distribution and localization in human dendritic cells. *J. Innate Immun.* 11: 369-374. 2005.
 - 20) Seya, T., H. Shime, H. Takaki, H. Oshiumi, M. Matsumoto. TLR3/TICAM-1 signaling in RIP3 tumor necroptosis. *OncImmunity.* 1: 917-923. 2012.
 - 21) Akazawa T., M. Okuno, Y. Okuda, K. Tsujimura, T. Takahashi, M. Ikawa, M. Okabe, T. Ebihara, M. Shingai, N. Inoue, M. Tanaka-Okamoto, H. Ishizaki, J. Miyoshi, M. Matsumoto, T. Seya. Antitumor NK activation induced by the Toll-like receptor3-TICAM-1 (TRIF) pathway in myeloid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 252-257. 2007.
 - 22) Ebihara, T., M. Azuma, H. Oshiumi, J. Kasamatsu, K. Iwabuchi, K. Matsumoto, H. Saito, T. Taniguchi, M. Matsumoto, T. Seya. Identification of a polyI:C-inducible membrane protein, that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J. Exp. Med.* 207: 2675-2687. 2010.
 - 23) McCartney S, Vermi W, Gilfillan S, Cella M, Murphy TL, Schreiber RD, Murphy KM, Colonna M. Distinct and complementary functions of MDA5 and TLR3 in poly(I:C)-mediated activation of mouse NK cells. *J Exp Med.* 206(13):2967-76. 2009.
 - 24) Takaki H., M. Takeda M. Tahara, M. Shingai, H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Seya. MyD88 pathway in murine CD4+ and plasmacytoid dendritic cells triggers interferon- β production leading to protection against measles in a murine model. *J. Immunol.* 191(9): 4740-7. 2013.
 - 25) Ebihara, T., M. Shingai, M. Matsumoto, T. Wakita, T. Seya. Hepatitis C virus (HCV)-infected hepatocytes extrinsically modulate dendritic cell maturation to activate T cells and natural killer cells. *Hepatology.* 48: 48-58. 2008.
 - 26) Li J, Liu K, Liu Y, Xu Y, Zhang F, Yang H, Liu J, Pan T, Chen J, Wu M, Zhou X, Yuan Z. Exosomes mediate the cell-to-cell transmission of IFN- β -induced antiviral activity. *Nat. Immunol.* 14: 793-805, 2013.
 - 27) Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabeta K, Kim SO, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J, Beutler B. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature.* 424(6950):743-8. 2003.
 - 28) Watanabe, A., M. Tatematsu, K. Saeki, S. Shibata, H. Shime, A. Yoshimura, C. Obuse, T. Seya, M. Matsumoto. Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I:C)-mediated TLR3 activation. *J. Biol. Chem.* 86: 10702-10711. 2011.
 - 29) Tatematsu M, Seya T, Matsumoto M. Beyond double-stranded RNA: TLR3 signaling in RNA-induced immune responses. *Biochem. J.* (in press).
 - 30) Lee HK, Lund JM, Ramanathan B, Mizushima N, Iwasaki A. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science.* 315(5817):1398-401. 2007.
 - 31) Azuma M., T. Ebihara, H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Seya. Cross-presentation and antitumor CTL induced by soluble Ag + polyI:C largely depend on the TICAM-1 pathway in mouse CD11c+/CD8a+ dendritic cells. *OncImmunity.* 1: 581-594. 2012.
 - 32) Yoneyama M, Onomoto K, Fujita T. Cytoplasmic recognition of RNA. *Adv Drug Deliv Rev.* 60(7):841-6. 2008.
 - 33) Tatematsu, M., F. Nishikawa, T. Seya, M. Matsumoto. Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA. *Nat Commun.* 4: 1833. 2013.
 - 34) Matsumoto, M., S. Kikkawa, M. Kohase, K. Miyake, T. Seya. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293: 1364-1369. 2002.
 - 35) Matsuo, A., H. Oshiumi, T. Tsujita, H. Mitani, H. Kasai, M. Yoshimizu, M. Matsumoto, T. Seya. Teleost TLR22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from birnaviruses. *J. Immunol.* 181: 3474-3485. 2008.
 - 36) Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R, Hiscott J. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science.* 300(5622):1148-51. 2003.
 - 37) Saito T, Owen DM, Jiang F, Marcotrigiano J, Gale M Jr. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature.* 454(7203): 523-7. 2008.
 - 38) Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature.* 446(7138): 916-920. 2007.
 - 39) Kato H, Takahashi K, Fujita T. RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. *Immunol Rev.* 243(1):91-8. 2011.
 - 40) Oshiumi, H., M. Miyashita, M. Matsumoto, T. Seya. A distinct role of Riplet-mediated K63-linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses. *PLoS Pathog.* 9 (8): e1003533. 2013.

- 41) Gack MU, Albrecht RA, Urano T, Inn KS, Huang IC, Carnero E, Farzan M, Inoue S, Jung JU, García-Sastre A. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe*. 5(5):439-49. 2009.
- 42) Oshiumi, H., M. Matsumoto, S. Hatakeyama, T. Seya. Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- β induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.* 284: 807-817. 2009.
- 43) Li XD, Sun L, Seth RB, Pineda G, Chen ZJ. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(49): 17717-22. 2005.
- 44) Tu Z, Bozorgzadeh A, Pierce RH, Kurtis J, Crispe IN, Orloff MS. TLR-dependent cross talk between human Kupffer cells and NK cells. *J Exp Med*. 205(1):233-44. 2008.
- 45) Nakamura, M., K. Funami, A. Komori, T. Yokoyama, Y. Aiba, A. Araki, Y. Takii, M. Ito, M. Matsuyama, M. Koyabu, K. Migita, K. Taniguchi, H. Fujioka, H. Yatsushashi, M. Matsumoto, H. Ishibashi, T. Seya. Increased expression of Toll-like receptor3 in intrahepatic biliary epithelial cells at sites of ductular reaction in diseased livers. *Hepatology Int*. 2: 222-230. 2008.
- 46) Wang B, Trippler M, Pei R, Lu M, Broering R, Gerken G, Schlaak JF. Toll-like receptor activated human and murine hepatic stellate cells are potent regulators of hepatitis C virus replication. *J Hepatol*. 51(6):1037-45. 2009.
- 47) Wang N, Liang Y, Devaraj S, Wang J, Lemon SM, Li K. Toll-like receptor 3 mediates establishment of an antiviral state against hepatitis C virus in hepatoma cells. *J Virol*. 83(19): 9824-34. 2009.
- 48) Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*. 8(4):279-89. 2008.
- 49) Seya, T., M. Azuma, M. Matsumoto. Targeting TLR3 with no RIG-I/MDA5 activation is effective in immunotherapy for cancer. *Exp Opin Ther Targets*. 17: 533-544. 2013.
- 50) Lee J, Sayed N, Hunter A, Au KF, Wong WH, Mocarski ES, Pera RR, Yakubov E, Cooke JP. Activation of innate immunity is required for efficient nuclear reprogramming. *Cell*. 151(3): 547-58. 2012.

Immunobiological response against RNA virus infection

Tsukasa SEYA, Hiroyuki OSHIUMI, Misako MATSUMOTO

Department of Microbiology and Immunology, Graduate School of Medicine, Hokkaido University
Kita-ku, Kita-15, Nishi-7, Sapporo 060-8638 Japan

Viruses infect host circumventing the host immune system; a variety of strategies for establishment of viral infection have been found in a virus-specific fashion. Infection with RNA viruses allows host dendritic cells to present antigens and a typical pattern (PAMP) of virus products, including the RNA genomes and replication intermediates such as double-stranded RNA (dsRNA), which induce antiviral effectors: type I interferons (IFN), cytokines, NK cell activation, Th1 polarization, CD8 T cell proliferation, etc. These findings revealed that RNA-sensing innate system closely links to a trigger of cellular immunity. This process unequivocally involves the maturation of antigen-presenting dendritic cell (mDC), and virus products frequently block this step. According to these findings, mDC have to sense non-self RNA to establish antiviral immunity without spoiling their functions via infection, except several exceptional cases. The notion infers that the RNA recognition in cytosol of infected cells (intrinsic sensing) functions as virocidal whereas that in mDC (extrinsic sensing) differentially converges on another antiviral strategy, activation of the immune system. In this review, we focus on the potential role of hepatitis C virus (HCV) RNA in modulating the inflammatory milieu around mDCs and evoking antiviral immunity to drive specific cellular effectors against the virus.