< 総 説 >

HCV レプリコン

脇田 隆字

1. はじめに

C型肝炎ウイルス(HCV)は1989年にカイロン社の研究グループにより発見された^{1, 2)}。日本では200万人、世界中で1億7000万人にのぼる感染者が存在する³⁾。HCVは血液を介して主に肝臓に感染して、高率に持続感染化し、多くの症例で慢性肝炎から肝細胞癌を発症する重大な感染症の一つである⁴⁾。輸血用血液のスクリーニングが可能となり、新たな感染者は激減したが、未だに多くのウイルスキャリアーが治療を必要としている。このため、我が国ではHCV感染者のスクリーニングなどの事業が開始されている。HCV感染症の治療は現時点ではインターフェロンおよびリバビリン以外に無く、その効果は未だ不十分である。新たな治療法の開発が望まれているが、HCVには良いウイルス培養系と実験用の感染小動物が存在しないことがHCVの基礎研究の妨げになってきた。しかし、本稿で概説するHCVレプリコンの開発からHCVの複製機構の研究は急速に進歩した。HCVレプリコンを用いた感染モデル系がどの程度生体でのウイルス感染を反映しているか、当初は疑問視する意見もあったが、ウイルスの複製機

構の解明や抗ウイルス薬の開発における有用性は明白に存在する。雑誌『肝臓』編集委員会からの求めにより、HCVレプリコン研究の現状についてまとめた。

2. HCV について

HCVはフラビウイルス科(Flaviviridae)のヘパシウイルス属(Hepacivirus)に属するRNAウイルスで、多くのウイルス株が分離されそのゲノムの多様性が報告されており、主に6種類の遺伝子型に分類されている^{5, 6)}。ウイルスの遺伝子型の地理的分布は主に先進国で良く研究されている。我が国では主に1b型、それについて2a, 2b型が多い⁷⁾。最近、興味深い知見として、異なる遺伝子型のキメラウイルスが報告された⁸⁾。また、遺伝子型と治療の関係では遺伝子型1bがインターフェロンに抵抗性で、遺伝子型2aがインターフェロンに感受性が高いことが知られている⁹⁾。HCVのRNAゲノムは約9.6 kbあり、その構造と各ウイルス蛋白質領域の機能は図1に示す。

3. HCV の生活環

ウイルスが標的細胞に感染、複製増殖、新たなウイルス放出、再感染にいたるサイクルをウイルスの生活

HCV のゲノム構造

HCVレプリコンの構築

図1 HCVのゲノム構造とHCVレプリコン構築

環(viral life cycle)と呼ぶ。HCV の主な増殖の場は肝臓と考えられているが、HCV の複製増殖の詳細に関しては不明な点が多い。近縁のフラビウイルスの情報もあわせて HCV の生活環は図 2 のように考えられている。血液中のウイルス粒子は特異的なウイルスレセプターにより肝細胞に吸着する。吸着したウイルスはエンドサイトーシスにより細胞内へ侵入し、エンドゾーム内から pH 依存的に細胞質内へさらに侵入、脱殻してウイルス内のプラス鎖のウイルスゲノム RNA が細胞質内に放出される。ウイルスレセプターの候補分子として CD81, LDL レセプター, スカベンジャーレセプターなどが報告されているが確定していない¹⁰⁻¹²⁾。細胞内に侵入したウイルス RNA はメッセンジャーRNA として機能しウイルスタンパク質が作られる。ウイルス RNA 複製に必要なウイルスの非構造タンパク質は、細胞質の小胞体膜上で細胞のタンパク質とともに複製複合体を形成し、プラス鎖からマイナス鎖、マイナス鎖からプラス鎖のウイルス RNA を転写複製する。さらに新たにできたプラス鎖の RNA からはウイルスタンパク質が翻訳される。このようないわば「ウイルスの工場」は細胞内の膜構造において形成されると考えられ、membranous web とよばれる膜構造の変化も観察される¹³⁾。ウイルスゲノム RNA の一部は構造タンパク質のコアタンパク質に結合してウイルスカプシドを形成し、さらに E1 および E2 タンパク質からなる膜構造によりウイルス粒子を形成して、小胞体からおそらくゴルジ装置を経て細胞外へ放出される。ウイルスの感染増殖過程を詳細に研究するためには、培養細胞でウイルスを感染させて増殖させることができるウイルス培養システムと、実験動物による感染動物モデルを樹立することが必要である。

4. HCV レプリコン

HCV が発見されて、ウイルスを培養細胞で増殖させる試みが数多くされてきた。培養肝癌細胞、T 細胞や B 細胞などのリンパ球系細胞、初代培養肝細胞などが使用されてきた。しかし、すべての試みにおいてウイルス複製は低いレベルでしかなく、多くは一過性の感染に終わった。非常に高感度な RT-PCR 法を用いなければウイルスゲノムの検出は困難であり、HCV の感染複製の十分な解析は不可能だった¹⁴⁾。多くの RNA ウイルスでウイルス粒子から精製したウイルスゲノム RNA あるいは試験管内で合成した RNA を、培養細胞にトランスフェクションすることによりウイルスの複製増殖を観察できることが知られている(いわゆる「infectious

図 2 HCV の生活環

RNA」)。この方法によれば感染のステップを実験系から除外することができるのでウイルス複製増殖をより多くの培養細胞で研究できる。しかし、チンパンジーの接種実験により感染性が確立された HCV の cDNA クローンをを用いても HCV の培養細胞での複製増殖は観察できなかった¹⁴⁾。

しばらくの間、HCV のウイルス培養実験系開発には手詰まり感があったが、HCV レプリコンを 1999 年に Bartenschlager 博士(現ハイデルベルグ大学)のグループが初めて開発に成功した¹⁵⁾。HCV レプリコンは、長年待ち望まれていた HCV ウイルスゲノムの細胞内複製実験系であり、画期的であった。HCV の全長 cDNA は約 9600 塩基長あるが、5' 側に存在する構造領域遺伝子と NS2 遺伝子を欠失させ、その部位に薬剤耐性遺伝子であるネオマイシン耐性遺伝子とその下流に EMCV の IRES 遺伝子を挿入した(図 1, HCV レプリコンの構築)。HCV レプリコン実験系の概略を図 3 に示す。レプリコン構築を鋳型として試験管内でレプリコン RNA を合成する。合成レプリコン RNA を導入した Huh7 細胞を G418 存在下に、2 から 4 週間培養する。HCV レプリコン RNA が自律複製するとネオマイシン耐性遺伝子が発現し、細胞は生存することができ、コロニーを形成し増殖する。レプリコンが複製していない細胞は G418 の作用により死滅する。培養終了後、細胞を固定してクリスタルバイオレットなどの色素で染色するとコロニーが容易に可視化できる。また、コロニーを形成したレプリコン複製細胞をクローニングして増殖させることが可能である。レプリコン複製細胞では HCV RNA が効率よく複製しており(1,000-5,000 コピー/細胞)、複製している RNA やウイルスタンパク質を容易に検出できる。レプリコン RNA が自律的に複製していることは、DNA 依存的 RNA 合成を阻害するアクチノ

HCVレプリコン実験系

図3 HCVレプリコン実験系の概略

マイシン D 存在下でも ^3H ウリジンの取り込みが起る (即ち RNA 依存的 RNA 合成が起きている) ことを証明することによって確認された¹⁵⁾。レプリコン複製細胞内で HCV の蛋白質は細胞質内の ER を中心とした膜構造で検出された¹⁶⁾。HCVレプリコンは再現が容易な実験系であり、その研究は世界中に急速に普及した。

5. adaptive mutation

遺伝子型 1b の Con 1 株により最初に樹立されたレプリコンはコロニー形成の効率が非常に低く、 $15\text{ }\mu\text{g}$ の RNA を 8×10^6 個の Huh7 細胞にトランスフェクションして、1 個から 60 個程度のコロニーを形成するに過ぎなかった。つまりコロニー形成率では $4-0.07\text{ cfu}/\mu\text{g}$ RNA 程度と低かった¹⁵⁾。コロニー形成率が低い原因として、二つの要因が考えられた。第一にはレプリコン RNA の効率のよい複製には変異が必要である可能性。第二にはトランスフェクションに用いた Huh7 細胞が、ヘテロな細胞集団でごく一部の細胞内のみでしかレプリコン RNA が複製できない可能性である (この第二の可能性については『8. HCVレプリコンが複製可能な細胞』で後述する)。

第一の可能性を検討するためにレプリコン細胞からレプリコン RNA を抽出して、その塩基配列が検討された。その結果、Con 1 株のレプリコン細胞内で複製している RNA ゲノムの 5' および 3' 末端の非翻訳領域は非常に安定しており変異が無いが、NS3 から NS5B の非構造領域遺伝子領域に変異が見出された¹⁷⁻²²⁾。レプリコンのコロニー形成率やレプリコン RNA の複製効率そのものを向上させる変異を adaptive mutation と呼んだ。Blight らによる最初の adaptive mutation の報告

では、NS5A 領域の 2004 番目のアミノ酸の S から I への変異 (S2004I) でコロニー形成率を 10,000 倍以上向上させた¹⁷⁾。NS5A 領域で見出された adaptive mutation の多くは榎本らにより同定されたインターフェロン感受性決定領域 (ISDR) の近傍に存在した¹⁷⁻²⁴⁾。ISDR 全体を含む領域を欠失したレプリコンも Huh7 細胞でレプリコンの複製を向上させることが明らかとなった¹⁷⁾。さらに adaptive mutation の中には複数を組み合わせるとレプリコンゲノムに導入することにより相乗的にレプリコンの複製効率を向上させる場合があった^{18, 19)}。複製効率を非常に向上させる mutation の組み合わせとして E1202G, T1209I (NS3) および S2197P (NS5A) が報告され¹⁹⁾、さらに E1202G, T1209I (NS3) および K1846T (NS4B) が最も効率の良い組み合わせとして報告された²²⁾。しかし、mutation の組み合わせによっては、複製が全く抑制されてしまう場合もあった²²⁾。

これらの adaptive mutation がレプリコンの複製を増幅する機構は今のところはっきりしていない。しかし、NS3 や NS5B の酵素活性に関与するアミノ酸配列に変異がないことから、adaptive mutation はウイルス蛋白質の活性を変化させるのではなく、ウイルス蛋白質同士または宿主の蛋白質との相互作用に関わっている可能性が高い。各ウイルス蛋白質の構造解析が進むことによりこの機構が明らかになることが期待される。また、レプリコンで検出された adaptive mutation は患者から分離されるウイルスのゲノムには見出されない。このことから、これらの adaptive mutation は Huh7 細胞の細胞内環境に特に適合 (adapt) した変異である

表 ウイルス株, adaptive mutation, レプリコン複製の関係

遺伝子型	ウイルス株	Adaptive mutation	NS5A のリン酸化	レプリコン複製	In vivo 感染性
1b	Con 1	なし	p56/p58	低	あり, 肝炎
	Con 1	あり	p56	高	なし
1b	N	なし, NS5A に insertion	?	高	あり, 一過性
2a	JFH 1	なし	p56/p58	高	あり, 一過性

ことが考えられる。さらに多くの adaptive mutation は NS5A の過リン酸化型と考えられている p58 を減らすことが知られている。HCV の NS5A は培養細胞で発現させると通常 p58 と p56 の二つの分子量で検出できる。これはリン酸化の状態の異なる, 過リン酸化型および通常リン酸化型の NS5A タンパク質である²⁵⁻²⁷。この二つの異なるリン酸化状態の NS5A が存在する意義は不明だったが, レプリコンによる解析の結果, NS5A のリン酸化状態が HCV の複製に密接に関係していることが示された。すなわち, adaptive mutation により複製効率が高くなったレプリコンの NS5A は p56 が主体となり, p58 が相対的に減少した¹⁷。さらにリン酸化される NS5A 領域のセリン残基を変異させることにより, 人工的に p58 を減らすとレプリコンの複製が増強した²⁸。つまり adaptive mutation は NS5A のリン酸化状態を変化することにより, HCV の複製効率を制御している可能性がある。

ところが, さらに興味深い知見が in vivo の実験で示された。前述のレプリコンの複製を高度に増強する adaptive mutation の組み合わせ, E1202G, T1209I (NS3) および S2197P (NS5A) を Con 1 株の全長遺伝子 cDNA に挿入して, 全長ウイルス RNA を合成してチンパンジーに接種すると, 培養細胞において非常に複製能力が高いこの変異株はチンパンジーで全く感染性がないことが明らかになったのである²⁹。一方, 変異のない野生型の Con 1 株の全長 RNA はチンパンジーに感染性を示した。さらに S2197P の一つだけの変異を導入した全長 RNA では感染性を示したが, 回収されたウイルスのゲノムを解析すると変異はなくなり元の野生型の配列に復帰していた²⁹。つまり Huh7 細胞においてレプリコンの複製を増強する変異は必ずしも in vivo における感染性を高めないことが示された。これは HCV の全長遺伝子を含むレプリコンは adaptive mutation により培養細胞で複製することが可能となるが, 感染性ウイルス粒子が分泌されないことと一致する結果であ

る^{30, 31}。Con 1 株のレプリコンにおける複製能力と in vivo での感染性および病原性, adaptive mutation などから, レプリコンの複製能力と in vivo の感染性および病原性は逆相関関係にあるように思える(表)。Con 1 株では, adaptive mutation は NS5A のリン酸化状態を変化させ, レプリコンの複製を増強する一方で, in vivo の感染性を低下させる。

6. Con 1 株以外の遺伝子型 1 の HCV 株によるレプリコン

最初の HCV レプリコンは, HCV 肝炎患者の肝臓から抽出されたウイルスゲノム RNA からコンセンサス配列をもとに作製された Con 1 株を使用した。従来の HCV の研究にはすでにチンパンジーで感染性が確認された H77 株の cDNA が広く使用されてきた^{32, 33}。しかし, H77 株のレプリコンは初期の研究では複製を観察できなかった^{17, 20}。我々も Yanagi らによりチンパンジーで感染性が観察されている遺伝子型 2a の J6CF 株³⁴を用いてレプリコンの作製を試みたがコロニーの形成はみられなかった(未発表データ)。さらに, やはり遺伝子型 1b の N 株のレプリコンが効率よく増殖することが報告された^{20, 35}。N 株は日本で分離された HCV 株で³⁶、米国で全長の cDNA が再構築されてチンパンジーに感染性があることが証明された株である³⁷。N 株には興味深い特徴がある。NS5A の ISDR 領域に“SSYN”の4アミノ酸残基の挿入があり, また, チンパンジーへの RNA の接種では血清 ALT 値の上昇はなく, 血清中へのウイルスの一過性の出現と HCV 抗体が検出されたとどまった³⁷。H77 株のウイルス RNA 接種では肝障害が発生するのと比較すると, N 株は in vivo における病原性が低いことが示唆された。この N 株のレプリコンの Huh7 細胞における複製効率は, Con 1 株の野生株と比較すると 1,000 倍以上高いことが証明された^{20, 35}。さらに, この N 株レプリコンに Con 1 株で見つかった adaptive mutation を挿入しても複製はあまり増強されず, NS5A の ISDR 領域に“SSYN”

の4アミノ酸を欠失させるとその複製効率が非常に低下した³⁵⁾。前述のCon 1株におけるレプリコンの複製能力とin vivoの感染性および病原性の逆相関から考えると、N株は自然に培養細胞に適合している株と考えられる(表)。

Huh7細胞で複製できなかったH77株のレプリコンは、Con 1株のレプリコンで見出されたadaptive mutationの導入と、後述するインターフェロンでレスキューした細胞³⁸⁾を用いることにより複製が可能となった³¹⁾。さらにその後も、複数の研究室からH77株によるレプリコンの複製が報告された^{39~42)}。その中で、最近報告されたピューロマイシン耐性遺伝子(PAC)によるレプリコンではadaptive mutationがないレプリコンでも複製可能であることが示された。その他にも遺伝子型1bのレプリコンとしてHCV-BK³⁹⁾、1B-1⁴³⁾、1B-2⁴⁴⁾、HC-J4⁴⁵⁾などが報告されている。やはり効率の良い複製にはadaptive mutationの導入が必要である。

7. 遺伝子型1以外のHCV株によるレプリコン

遺伝子型1以外のHCV株で培養細胞で複製可能なレプリコンは、我々のグループが報告してきている遺伝子型2aのJFH-1株のみである。JFH-1株のレプリコンは遺伝子型1のレプリコンと比較して効率の良い複製が可能であり、adaptive mutationが必要でなく、複製可能な細胞種が多いなどの性質を持つ。JFH-1株の由来と特徴、そしてJFH-1株のレプリコンについて記載する。

1) JFH-1株の由来

我々はJFH-1株を劇症肝炎患者の急性期血清から分離して2001年に報告した⁴⁶⁾。この研究を開始した当時、HCVを培養細胞で増やすことはできなかった。我々はより増殖能力の高いウイルスを分離することが必要と考えた。そこで、慢性肝炎患者からではなく、感染急性期の患者からのウイルス分離を試みた。感染急性期の方がウイルス増殖が盛んであると想定したためである。しかし、通常の急性肝炎患者血清では多くの場合すでにウイルス量が非常に低い場合が多く、全長ウイルス遺伝子の分離が困難であった。その時期に、慈恵医大第三病院の田中照二教授および永山和男教授の研究グループから、HCV感染による劇症肝炎患者の血清を分与していただく機会があった。HCVと劇症肝炎の関係ははっきりしておらず、劇症肝炎患者からはHCVは検出されないという報告や^{47~49)}、HCVも劇症肝炎の原因となるとの報告がされていた^{50~53)}。Farciらは劇症肝炎患者の血清をチンパンジーに接種して通常よ

りも激しい肝障害を観察した⁵⁴⁾。しかし、劇症肝炎や重症の肝炎には至らなかった。さらにFarciらはHCVによる劇症肝炎患者から分離されるウイルスの遺伝子を解析すると、変異が少なくmonoclonalityが高いことを指摘した⁵³⁾。

我々もJFH-1株のウイルス全長遺伝子cDNAをRT-PCR法で回収し、その塩基配列を決定し解析した。まずこのウイルス株は遺伝子型2aに属することがわかり、遺伝子型2aのウイルスに感染している慢性肝炎患者6名からも同様にウイルス遺伝子を分離して解析した。JFH-1株のE2遺伝子のhypervariable regionのPCR産物をクローニングしてその塩基配列を決定すると、40クローン中37クローンはアミノ酸配列が同一であった⁴⁶⁾。つまり、劇症肝炎患者から得られたウイルス遺伝子は慢性肝炎患者からのウイルスよりも遺伝子の多様性が低いことが示された。さらにJFH-1株の遺伝子領域ごとに慢性肝炎から分離したHCV株と遺伝子距離を計算した。5' UTR、コア、NS3、NS5Aの各領域がより変異が多かった⁴⁶⁾。

これら変異の多い領域の中でJFH-1株のコア領域C末端に特徴的な変異が存在した。遺伝子型に共通してコアタンパクの172番目のアミノ酸がC、173番目がS(172C/173S)の配列が良く保存されている。しかしJFH-1株では172F/173Pという配列であった。コアタンパク質はまず191/192においてシグナルペプチダーゼによる切断をうけp23となる^{55, 56)}、さらに179/180または182/183においてシグナルペプチドペプチダーゼにより切断されて成熟型のp21になると考えられている^{57~64)}。172および173のアミノ酸残基はシグナルペプチドペプチダーゼの切断に重要な領域と考えられている⁵⁹⁾。そこで慢性肝炎から分離したJCH-1からJCH-5の5株とJFH-1株のコアタンパク質のプロセッシングを比較した。するとJFH-1株のコアタンパク質のプロセッシングの効率が慢性肝炎株よりも良いことがわかった⁶⁵⁾。このプロセッシングの効率の差の生物学的意義、ウイルスの感染複製過程や病原性にいかに関わっているかという点は今後の課題である。

2) JFH-1のレプリコン

JFH-1株の複製能力の解析をサブジェノミックレプリコンにより試みた。Con 1株の野生株、およびE1202G、T1209I(NS3)およびS2197P(NS5A)のadaptive mutationをもつCon 1 NK 5.1と比較したところ、コロニー形成率はJFH-1株がCon 1 NK 5.1よりも約90倍良いことが判明した⁶⁶⁾。さらにJFH-1株のレプリコ

ンは Huh7 細胞だけでなく、これまで他のレプリコンが複製することのできなかった HepG2 細胞および IMY-N9 細胞といった肝細胞や、HeLa 細胞や HEK293 細胞といった肝細胞以外の細胞でも複製が可能であった^{67, 68)}。これらのレプリコン細胞をクローニングし、そこで複製しているレプリコンゲノムの塩基配列を決定した。多くのレプリコン細胞では一箇所以上の変異があったが、共通の変異はなく、また、変異のないレプリコン細胞も多く、JFH-1 株のレプリコンの複製には adaptive mutation は必要ないことが示された^{66~68)}。さらに Con 1 株のレプリコン細胞と JFH-1 株のレプリコン細胞を比較した。JFH-1 株のレプリコン細胞は、親細胞の Huh7 細胞よりも細胞増殖が抑制される⁶⁹⁾。また JFH-1 レプリコン細胞の細胞飽和密度は、Huh7 細胞および Con 1 レプリコン細胞よりも低い⁶⁹⁾。さらにインターフェロンに対する IC50 は、JFH-1 レプリコン細胞が 30.6 U/ml, Con 1 レプリコン細胞で 2.9 U/ml である⁶⁹⁾。JFH-1 レプリコンのもう一つの特徴は、Huh7 細胞における一過性複製能力が高いことである⁶⁶⁾。この特徴を生かしてネオマイシン耐性遺伝子のかわりにレポーター遺伝子を挿入したレプリコンを作成して、そのレポーター発現をレプリコンの複製のマーカーとすることができた⁷⁰⁾。

現在 JFH-1 株が他の HCV 株に比較して培養細胞での感染効率が良い理由を解析中である。また、劇症肝炎患者から分離した HCV 株がレプリコンとしてなぜ複製しやすいかという問題は未だに解決していない。今後の研究で是非解明していかなければならない。

8. HCV レプリコンが複製可能な細胞

肝炎ウイルスである HCV の主な複製部位は肝臓と考えられており、実際感染患者の病変の主体は肝臓で起こる。しかし、肝臓以外の部位での HCV の検出が報告されている。単球や、Dendritic cell など血球系の細胞が多いが、神経組織での検出の報告もある^{71~73)}。HCV は肝炎ウイルスであるという認識によって忘れられがちだが、分類学的にはフラビウイルスの仲間なのだから、血球系や神経系の細胞が HCV に感染感受性を示す可能性は十分ある。実際 HCV が実験的に単球や Dendritic cell に感染可能であることが報告されている^{74, 75)}。Con 1 株による HCV レプリコンは当初、肝癌細胞である Huh7 細胞のみで複製可能であった¹⁵⁾。さらに adaptive mutation の存在がレプリコンの複製に重要であることは前述の通りで、通常の Huh7 細胞でレプリコンの複製効率が必ずしも良いわけではなかつ

た。レプリコン複製の感受性がより高い細胞を作製するために、すでにレプリコン細胞として樹立された細胞をインターフェロンで処理してレプリコンを排除して、Huh7 細胞の新たな亜細胞株が樹立された^{38, 76)}。これを cured 細胞と呼んだ。この方法がとられた理由は以下の通りである。Huh7 細胞がヘテロな細胞集団で、何らかの理由でレプリコンが増殖しやすい細胞とそうでない細胞が混在している。従って、トランスフェクション後にレプリコン細胞として樹立できる細胞は、もとの親細胞株よりもレプリコンの感受性が高い可能性がある。また、レプリコン細胞として樹立後、G418 による選択培養により、レプリコン複製により適した細胞内環境に変化した可能性があることによる。実際 Blight らが樹立した Huh7.5 細胞は、サブジェノミックレプリコンのトランスフェクションで 75%の細胞がレプリコン複製し生存すると報告している³⁸⁾。

さらに Huh7 細胞以外の細胞でもレプリコン複製が試みられてきている。Con 1 株のレプリコンは HeLa 細胞およびマウスの肝癌細胞で複製が報告された⁷⁷⁾。次いで HEK293 細胞でも複製が報告された⁷⁸⁾。しかし、両者ともレプリコン細胞中の Total RNA を抽出してトランスフェクションに用いている。これはレプリコン細胞中で、レプリコンゲノムは HCV の NS5B により RNA 複製しているため、より多くの変異が蓄積していると考えられる。試験管内で合成した RNA ではレプリコン細胞の樹立はできなかった。一方、遺伝子型 2a の JFH-1 株では、前述の通りより多くの細胞で複製が可能であった^{67, 68)}。肝臓系の細胞以外でも複製可能であることから、HCV の複製には必ずしも肝細胞特異的な因子が必要でないことが示された。生体における HCV の臓器特異性は、ウイルスに対するレセプター発現により決められているかもしれない。また、すでに Con 1 株ではマウスの細胞でも複製が可能であり、臓器特異性や種特異性を超えて将来の HCV の実験動物モデル開発につながる可能性がある。

9. 抗ウイルス薬および新たな治療法の開発

HCV レプリコンの開発により、様々な抗ウイルス薬やその他の方法で HCV の複製を抑制可能かどうか、培養細胞を用いて実験可能となった。C 型慢性肝炎の治療にはすでにインターフェロン (IFN) が広く使用されている^{9, 79, 80)}。多くの研究者がまず IFN- α がレプリコンの複製を効果的に抑制することを報告した^{17, 20, 21, 40, 44, 76, 81~83)}。さらに IFN- β や IFN- γ もレプリコンの複製を抑制することが報告された^{21, 44, 84, 85)}。

臨床において、リバビリンが IFN と併用されるようになり治療効果が IFN 単独療法よりも改善した⁸⁶⁻⁸⁸⁾。リバビリンの抗ウイルス効果は、ウイルス遺伝子の変異を促進することでウイルス複製を抑制する error catastrophe theory^{89, 90)} や、免疫反応の調節作用⁹¹⁾、宿主の GTP 合成酵素 (IMPDH) の阻害など⁹²⁾ によると考えられている。HCV レプリコン細胞においてはインターフェロンとリバビリンの相乗的作用を観察された^{82, 83)}。JFH-1 のレプリコンでは相加的作用を観察した⁷⁰⁾。リバビリンの作用機序としてはウイルスゲノムの変異の増加が報告されているが^{82, 83, 92)}、JFH-1 のレプリコンでは変異の増加は認められなかった⁷⁰⁾。またレプリコンによる解析から、IMPDH による細胞内の GTP プールの減少もその作用機序と考えられる⁹²⁾。さらにレプリコン細胞をリバビリン存在下で培養し続けてリバビリンに抵抗性の変異が同定された⁹³⁾。

サイクロスポリンも HCV 感染に効果があることが臨床的に示されてきた⁹⁴⁾。日本の二つの研究グループからサイクロスポリンが HCV レプリコンの複製を抑制することが報告された^{95, 96)}。さらに、その作用機序には免疫抑制作用ではなくサイクロフィリンが重要であることが明らかとなった^{97, 98)}。免疫抑制作用のないサイクロスポリンの誘導体 (NIM811) が HCV レプリコンの複製抑制効果をもつことから、サイクロスポリンよりも臨床で使いやすい新たな抗 HCV 薬として期待される。

さらに、既存の薬剤としては Lovastatin や Mizoribine に抗 HCV 作用があることがレプリコンで確認された^{99, 100)}。HCV の NS3 および NS5B を標的とした新規化合物もレプリコンで続々とその抗 HCV 作用が確認され始め、臨床試験も開始されている。中でも NS3 プロテアーゼ阻害剤として開発された BILN2061 は、患者に投与されてその抗ウイルス作用が確認された¹⁰¹⁾。今後も多くの化合物が開発されることが期待できる。

siRNA が臨床に応用されるためにはまだ克服しなければならない技術的問題点があるが、siRNA による HCV レプリコンの複製阻害も多く報告されている^{103, 104)}。また、マイクロ RNA が HCV の複製制御に関与していることが報告された¹⁰⁵⁾。肝細胞特異的なマイクロ RNA が HCV の複製を増強していることが示された。新たな治療の標的となるかもしれない。IFN、リバビリンに続く第3の抗 HCV 薬が一日も早く臨床に投入されることが望まれる。それほど先の話ではないと考えられる。

10. レプリコンを超えて

HCV レプリコンの樹立は HCV 研究に画期的な発見であった。この実験系により HCV の複製増殖機構に関して多くの知見が得られ、新たな抗ウイルス薬の開発も加速された。次は HCV のウイルス培養系である。Con 1 株、N 株、H77 株、O(1B-2) 株の全長遺伝子を含むレプリコンが開発され、adaptive mutation を導入し、cured 細胞を使用することにより効率の良い複製が可能となった^{30, 35, 38, 76)}。しかし、これまでに感染性のウイルス粒子が産生されたという報告はない。我々は JFH-1 株の全長 cDNA からウイルス RNA を合成し、Huh7 細胞に導入することにより、初めて感染性ウイルス粒子を培養細胞で作製することに成功した^{106, 107)}。HCV の研究はさらに加速することが期待できる。

文 献

- 1) Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-62
- 2) Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-4
- 3) WHO. Hepatitis C-global prevalence (update). *Wkly. Epidemiol. Rec* 2000; 75: 18-9
- 4) Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, et al. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 1990; 12: 671-5
- 5) Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993; 74: 2391-9
- 6) Robertson B, Myers G, Howard C, et al. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch Virol* 1998; 143: 2493-503
- 7) Ohno T, Mizokami M, Yamauchi M, et al. Genotype distribution in Nagoya and new genotype (genotype 3a) in Japanese patients

- with hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 1995 ; 30 : 209-14
- 8) Kalinina O, Norder H, Mukomolov S, et al. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J Virol* 2002 ; 76 : 4034-43
- 9) Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, et al. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon-alpha therapy : relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 1992 ; 16 : 293-9
- 10) Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, et al. Binding of hepatitis C virus to CD 81. *Science* 1998 ; 282 : 938-41
- 11) Monazahian M, Bohme I, Bonk S, et al. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J Med Virol* 1999 ; 57 : 223-9
- 12) Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002 ; 21 : 5017-25
- 13) Egger D, Wolk B, Gosert R, et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002 ; 76 : 5974-84
- 14) Bartenschlager R, Lohmann V. Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res* 2001 ; 52 : 1-17
- 15) Lohmann V, Korner F, Koch J, et al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999 ; 285 : 110-13
- 16) Pietschmann T, Lohmann V, Rutter G, et al. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol* 2001 ; 75 : 1252-64
- 17) Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000 ; 290 : 1972-4
- 18) Lohmann V, Korner F, Dobierzewska A, et al. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* 2001 ; 75 : 1437-49
- 19) Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol* 2001 ; 75 : 4614-24
- 20) Guo JT, Bichko VV, Seeger C. Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *J Virol* 2001 ; 75 : 8516-23
- 21) Lanford RE, Guerra B, Lee H, et al. Antiviral effect and virus-host interactions in response to alpha interferon, gamma interferon, poly(i)-poly(c), tumor necrosis factor alpha, and ribavirin in hepatitis C virus subgenomic replicons. *J Virol* 2003 ; 77 : 1092-104
- 22) Lohmann V, Hoffmann S, Herian U, et al. Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *J Virol* 2003 ; 77 : 3007-19
- 23) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* 1995 ; 96 : 224-30
- 24) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996 ; 334 : 77-81
- 25) Kaneko T, Tanji Y, Satoh S, et al. Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 ; 205 : 320-6
- 26) Tanji Y, Kaneko T, Satoh S, et al. Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded non-structural protein NS5A. *J Virol* 1995 ; 69 : 3980-6
- 27) Reed KE, Xu J, Rice CM. Phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein in vitro and in vivo : properties of the NS5A-associated kinase. *J Virol* 1997 ; 71 : 7187-97
- 28) Appel N, Pietschmann T, Bartenschlager R. Mutational analysis of hepatitis C virus non-structural protein 5A : potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol* 2005 ; 79 : 3187-94
- 29) Bukh J, Pietschmann T, Lohmann V, et al. Mutations that permit efficient replication of

- hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells prevent productive replication in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 14416-21
- 30) Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, et al. Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol* 2002 ; 76 : 4008-21
- 31) Blight KJ, McKeating JA, Marcotrigiano J, et al. Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol* 2003 ; 77 : 3181-90
- 32) Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ, et al. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 1997 ; 277 : 570-4
- 33) Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, et al. Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 8738-43
- 34) Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, et al. Hepatitis C virus : an infectious molecular clone of a second major genotype (2a) and lack of viability of intertypic 1a and 2a chimeras. *Virology* 1999 ; 262 : 250-63
- 35) Ikeda M, Yi M, Li K, Lemon SM. Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh 7 cells. *J Virol* 2002 ; 76 : 2997-3006
- 36) Hayashi N, Higashi H, Kaminaka K, et al. Molecular cloning and heterogeneity of the human hepatitis C virus (HCV) genome. *J Hepatol* 1993 ; 17(Suppl 3) : S 94-107
- 37) Beard MR, Abell G, Honda M, et al. An infectious molecular clone of a Japanese genotype 1b hepatitis C virus. *Hepatology* 1999 ; 30 : 316-24
- 38) Blight KJ, McKeating JA, Rice CM. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2002 ; 76 : 13001-14
- 39) Grobler JA, Markel EJ, Fay JF, et al. Identification of a key determinant of hepatitis C virus cell culture adaptation in domain II of NS3 helicase. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 16741-6
- 40) Gu B, Gates AT, Isken O, et al. Replication studies using genotype 1a subgenomic hepatitis C virus replicons. *J Virol* 2003 ; 77 : 5352-9
- 41) Yi M, Lemon SM. Adaptive mutations producing efficient replication of genotype 1a hepatitis C virus RNA in normal Huh 7 cells. *J Virol* 2004 ; 78 : 7904-15
- 42) Liang C, Rieder E, Hahm B, et al. Replication of a novel subgenomic HCV genotype 1a replicon expressing a puromycin resistance gene in Huh-7 cells. *Virology* 2005 ; 333 : 41-53
- 43) Kishine H, Sugiyama K, Hijikata M, et al. Subgenomic replicon derived from a cell line infected with the hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 ; 293 : 993-9
- 44) Kato N, Sugiyama K, Namba K, et al. Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 ; 306 : 756-66
- 45) Maekawa S, Enomoto N, Sakamoto N, et al. Introduction of NS5A mutations enables subgenomic HCV replicon derived from chimpanzee-infectious HC-J4 isolate to replicate efficiently in Huh-7 cells. *J Viral Hepat* 2004 ; 11 : 394-403
- 46) Kato T, Furusaka A, Miyamoto M, et al. Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J Med Virol* 2001 ; 64 : 334-9
- 47) Wright TL, Hsu H, Donegan E, et al. Hepatitis C virus not found in fulminant non-A, non-B hepatitis. *Ann Intern Med* 1991 ; 115 : 111-2
- 48) Liang TJ, Jeffers L, Reddy RK, et al. Fulminant or subfulminant non-A, non-B viral hepatitis : the role of hepatitis C and E viruses. *Gastroenterology* 1993 ; 104 : 556-62
- 49) Fukai K, Yokosuka O, Fujiwara K, et al. Etiologic considerations of fulminant non-A, non-B viral hepatitis in Japan : analyses by nucleic acid amplification method. *J Infect Dis* 1998 ; 178 : 325-33
- 50) Yoshida M, Dehara K, Inoue K, et al. Contribution of hepatitis C virus to non-A, non-B ful-

- minant hepatitis in Japan. *Hepatology* 1994 ; 19 : 829—35
- 51) Gordon FD, Anastopoulos H, Khettry U, et al. Hepatitis C infection : a rare cause of fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol* 1995 ; 90 : 117—20
- 52) Villamil FG, Hu KQ, Yu CH, et al. Detection of hepatitis C virus with RNA polymerase chain reaction in fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1995 ; 22 : 1379—86
- 53) Farci P, Alter HJ, Shimoda A, et al. Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* 1996 ; 335 : 631—4
- 54) Farci P, Munoz SJ, Shimoda A, et al. Experimental transmission of hepatitis C virus-associated fulminant hepatitis to a chimpanzee. *J Infect Dis* 1999 ; 179 : 1007—11
- 55) Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, et al. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 5547—51
- 56) Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, et al. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1998 ; 72 : 6048—55
- 57) Lyko F, Martoglio B, Jungnickel B, et al. Signal sequence processing in rough microsomes. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 19873—8
- 58) Hussy P, Langen H, Mous J, et al. Hepatitis C virus core protein: carboxy-terminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase. *Virology* 1996 ; 224 : 93—104
- 59) Liu Q, Tackney C, Bhat RA, et al. Regulated processing of hepatitis C virus core protein is linked to subcellular localization. *J Virol* 1997 ; 71 : 657—62
- 60) Buratti E, Baralle FE, Tisminetzky SG. Localization of the different hepatitis C virus core gene products expressed in COS-1 cells. *Cell Mol Biol* 1998 ; 44 : 505—12
- 61) McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, et al. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* 2002 ; 21 : 3980—8
- 62) Weihofen A, Binns K, Lemberg MK, et al. Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science* 2002 ; 296 : 2215—8
- 63) Okamoto K, Moriishi K, Miyamura T, et al. Intramembrane proteolysis and endoplasmic reticulum retention of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 2004 ; 78 : 6370—80
- 64) Ogino T, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, et al. Membrane binding properties and terminal residues of the mature hepatitis C virus capsid protein in insect cells. *J Virol* 2004 ; 78 : 11766—77
- 65) Kato T, Miyamoto M, Furusaka A, et al. Processing of Hepatitis C Virus Core Protein is regulated by its C-terminal Sequence. *J Med Virol* 2003 ; 69 : 357—66
- 66) Kato T, Date T, Miyamoto M, et al. Efficient Replication of the Genotype 2a Hepatitis C Virus Subgenomic Replicon. *Gastroenterology* 2003 ; 125 : 1808—17
- 67) Date T, Kato T, Miyamoto M, et al. Genotype 2a Hepatitis C Virus Subgenomic Replicon Can Replicate in HepG2 and IMY-N9 cells. *Journal of Biological Chemistry* 2004 ; 279 : 22371—76
- 68) T Kato, T Date, M Miyamoto, et al. Non-Hepatic Cell Lines HeLa and 293 Cells Support Efficient Replication of Hepatitis C Virus Genotype 2a Subgenomic Replicon. *J Virol* 2005 ; 79 : 592—6
- 69) Miyamoto M, Kato T, Date T, et al. Characterization of Genotype 2a Hepatitis C Virus Subgenomic Replicon in Comparison with Genotype 1b Replicon. *Intervirology* 2006 ; 49 : 37—43
- 70) Kato T, Date T, Miyamoto M, et al. Detection of Anti-Hepatitis C Virus Effects of Interferon and Ribavirin by a Sensitive Replicon System. *Journal of Clinical Microbiology* 2005 (in press)
- 71) Laskus T, Radkowski M, Piasek A, et al. Hepatitis C virus in lymphoid cells of patients coinfectd with human immunodeficiency virus type 1 : evidence of active replication in monocytes/macrophages and lymphocytes. *J Infect Dis* 2000 ; 181 : 442—8
- 72) Goutagny N, Fatmi A, De Ledinghen V, et al.

- Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2003 ; 187 : 1951-8
- 73) Radkowski M, Wilkinson J, Nowicki M, et al. Search for hepatitis C virus negative-strand RNA sequences and analysis of viral sequences in the central nervous system : evidence of replication. *J Virol* 2002 ; 76 : 600-8
- 74) Radkowski M, Bednarska A, Horban A, et al. Infection of primary human macrophages with hepatitis C virus in vitro : induction of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 8. *J Gen Virol* 2004 ; 85 : 47-59
- 75) Kaimori A, Kanto T, Kwang Limn C, et al. Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin. *Virology* 2004 ; 324 : 74-83
- 76) Ikeda M, Abe K, Dansako H, et al. Efficient replication of a full-length hepatitis C virus genome, strain O, in cell culture, and development of a luciferase reporter system. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 ; 329 : 1350-9
- 77) Zhu Q, Guo JT, Seeger C. Replication of hepatitis C virus subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells. *J Virol* 2003 ; 77 : 9204-10
- 78) Ali S, Pellerin C, Lamarre D, et al. Hepatitis C virus subgenomic replicons in the human embryonic kidney 293 cell line. *J Virol* 2004 ; 78 : 491-501
- 79) Poynard T, Bedossa P, Chevallier M, et al. A comparison of three interferon alfa-2b regimens for the long-term treatment of chronic non-A, non-B hepatitis. Multicenter Study Group. *N Engl J Med* 1995 ; 332 : 1457-62
- 80) Hoofnagle JH, di Bisceglie AM. The treatment of chronic viral hepatitis. *N Engl J Med* 1997 ; 336 : 347-56
- 81) Frese M, Pietschmann T, Moradpour D, et al. Interferon-alpha inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by an MxA-independent pathway. *J Gen Virol* 2001 ; 82 : 723-33
- 82) Tanabe Y, Sakamoto N, Enomoto N, et al. Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon-alpha. *J Infect Dis* 2004 ; 189 : 1129-39
- 83) Kanda T, Yokosuka O, Imazeki F, et al. Inhibition of subgenomic hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells : ribavirin induces mutagenesis in HCV RNA. *J Viral Hepat* 2004 ; 11 : 479-87
- 84) Larkin J, Jin L, Farmen M, et al. Synergistic antiviral activity of human interferon combinations in the hepatitis C virus replicon system. *J Interferon Cytokine Res* 2003 ; 23 : 247-57
- 85) Frese M, Schwarzle V, Barth K, et al. Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology* 2002 ; 35 : 694-703
- 86) Kakumu S, Yoshioka K, Wakita T, et al. A pilot study of ribavirin and interferon beta for the treatment of chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1993 ; 105 : 507-12
- 87) McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998 ; 339 : 1485-92
- 88) Davis GL, Esteban-Mur R, Rustgi V, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998 ; 339 : 1493-9
- 89) Crotty S, Maag D, Arnold JJ, et al. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med* 2000 ; 6 : 1375-9
- 90) Crotty S, Cameron CE, Andino R. RNA virus error catastrophe : direct molecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 6895-900
- 91) Hultgren C, Milich DR, Weiland O, et al. The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th)1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses. *J Gen Virol* 1998 ; 79 : 2381-91
- 92) Zhou S, Liu R, Baroudy BM, et al. The effect of ribavirin and IMPDH inhibitors on hepatitis C virus subgenomic replicon RNA. *Virology* 2003 ; 310 : 333-42

- 93) Pfeiffer JK, Kirkegaard K. Ribavirin resistance in hepatitis C virus replicon-containing cell lines conferred by changes in the cell line or mutations in the replicon RNA. *J Virol* 2005 ; 79 : 2346-55
- 94) Inoue K, Sekiyama K, Yamada M, et al. Combined interferon alpha 2b and cyclosporin A in the treatment of chronic hepatitis C : controlled trial. *J Gastroenterol* 2003 ; 38 : 567-72
- 95) Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, et al. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* 2003 ; 38 : 1282-8
- 96) Nakagawa M, Sakamoto N, Enomoto N, et al. Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 ; 313 : 42-7
- 97) Watashi K, Ishii N, Hijikata M, et al. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* 2005 ; 19 : 111-22
- 98) Nakagawa M, Sakamoto N, Tanabe Y, et al. Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin a is mediated by blockade of cyclophilins. *Gastroenterology* 2005 ; 129 : 1031-41
- 99) Ye J, Wang C, Sumpter R Jr, et al. Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 15865-70
- 100) Naka K, Ikeda M, Abe K, et al. Mizoribine inhibits hepatitis C virus RNA replication : effect of combination with interferon-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 ; 330 : 871-9
- 101) Lamarre D, Anderson PC, Bailey M, et al. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 2003 ; 426 : 186-9
- 102) Randall G, Grakoui A, Rice CM. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 235-40
- 103) Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, et al. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 2003 ; 4 : 602-8
- 104) Kronke J, Kittler R, Buchholz F, et al. Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs. *J Virol* 2004 ; 78 : 3436-46
- 105) Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 2005 ; 309 : 1577-81
- 106) Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, et al. Robust Hepatitis C Virus Infection in Vitro. *PNAS* 2005 ; 102 : 9294-9
- 107) Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. Production of Infectious Hepatitis C Virus in Tissue Culture from a Cloned Viral Genome. *Nat Med* 2005 ; 11 : 791-6
-