薬学的視点からのウイルス学研究—肝炎ウイルス複製阻害化合物の同定とその作用機序—

渡 士 幸 一

Antiviral Agents for Analyzing Virus Life Cycle: Chemical Genetics for Virology

Koichi Watashi

Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases; 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan.

(Received July 30, 2013)

Hepatitis C virus, which affects approximately 170 million people worldwide, is a major causative agent of hepatocellular carcinoma. Anti-HCV treatment is available with the combination of pegylated interferon and ribavirin, and newly approved protease inhibitors. However, because of the diverse anti-HCV efficacy among HCV genotypes and significant side effects, alternative anti-HCV agents are in great demand. Using cell-based systems supporting a part of or the whole HCV life cycle, we identified cyclosporin A, tamoxifen, and benzamide derivatives that inhibited the replication of HCV RNA or the production of infectious HCV particles. In this article, we summarize the mechanistic analyses of the HCV life cycle using these small molecules. Thus, chemical genetics is a powerful approach for revealing molecular mechanisms of the viral life cycle as well as for developing new antiviral agents.

Key words—hepatitis C virus (HCV); hepatitis B virus (HBV); replication; infection; cyclosporine; cyclophilin

1. はじめに

基礎ウイルス学研究の目標は、ウイルス感染増殖系というモデル系を用いて新たなウイルス学・生物学原理を明らかにすること、ウイルスをベクターなどのツールとして新たな疾患治療法や実験技術に資するテクノロジーを開発すること、など様々挙げられるが、ウイルス感染が引き起こす疾患の治療/予防法を開発することもその1つである。ウイルス学の解析によって多くの研究成果が毎年論文として発表され、例えばPubMedで「ウイルス」のキーワードを含む2012年の論文数を検索すると8万報以上が列挙される。しかしながら新規抗ウイルス剤開発例は学術雑誌掲載のそれに比べて、もちろん極端に少ないのが現状である。どのようにすれば基礎ウイルス学が効率よく新薬開発に貢献できるのだろうか？ この問いが本研究の出発点である。本稿では現在われわれが試みている、低分子化合物を利用し

たウイルス学研究に関して述べる。本手法を用いることで、ウイルス複製増殖の分子メカニズムを明らかにできるだけでなく、効率よく創薬に貢献できる可能性を考えている。本稿でその一端を簡単に紹介する。

2. HCV感染と現行の治療法

C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus; HCV) 感染は肝硬変、肝細胞がん発症の主な原因であり、特にわが国では肝がんの約80%はHCV感染を土台としていることから、肝がん発症の阻止には抗HCV療法の確立が最も有効な手段の1つであることは明らかである。¹⁾ 抗HCV療法には従来よりペグインターフェロンとリバビリンの併用療法が主な役割を果たし、また最近プロテアーゼ阻害剤が新たに認可され、これらを中心とした抗ウイルス療法が適用される。^{2,3)} しかしながらこれらはHCV遺伝子型により有効性が異なること、特にインターフェロン療法ではときに重篤な副作用がみられること、プロテアーゼ阻害剤に対しては薬剤耐性遺伝子の出現が否定できないことから、これに替わる抗HCV剤開発が重要な課題である。われわれは「HCVが宿主細胞内でどのようにして増えるのか」を明らかに

The author declares no conflict of interest.

国立感染症研究所ウイルス第二部 (〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1)

e-mail: kwatashi@nih.go.jp

本総説は、日本薬学会第133年会シンポジウム S28-302 で発表した内容を中心に記述したものである。

するとともに、「HCV 感染増殖を阻止する手段」を見つけることを目的として研究を行っている。

3. HCV 生活環

本稿では低分子化合物による HCV 生活環の解析に関して述べるので、まずはじめに HCV 生活環について理解しておく必要がある [Fig. 1(A)]. HCV は宿主細胞である肝細胞に、細胞表面の CD81, scavenger receptor class B type I (SR-BI), claudin 1, occludin を含む複数の受容体を介して「吸着」「侵入」する.⁴⁾ 侵入は主にクラスリン依存性エンドサイトーシスを介しており、輸送小胞内でウイルスと細胞との膜融合の後、キャプシド/ウイルスゲノム RNA 複合体が細胞質へと侵入する。ウイルスゲノム RNA がキャプシドから脱殻することにより、これを鋳型としてリボソームでウイルス前駆体ポリタンパク質が「翻訳」される。⁵⁾ ウイルス前駆体ポリタンパク質は宿主及び自身のプロテアーゼにより成熟型ウイルスタンパク質にプロセシングされる。産生されたウイルスタンパク質の働きにより、主に小胞体近辺に形成される複製複体内でウイルスゲノム RNA を鋳型として相補鎖のウイルスゲノム RNA が「RNA 複製」される。⁶⁾ 十分に翻訳及び RNA 複製が行われた後、ウイルスタンパク質とウイルスゲノム RNA が主に脂肪滴周辺で「粒子形成」し、これは「膜輸送」を経て細胞外へと「放出」される。⁷⁾ 本稿では便宜的に生活環を 1) 吸着, 侵入を含む HCV 感染「初期過程」、2) 翻訳, プロセシング, RNA 複製からなる「中期過程」、3) さらに粒子形成, 放出を含めた「後期過程」に分けて考える。抗ウイルス剤開発には着目する化合物がどのステップを標的とするかが重要となる。

4. HCV 研究に用いられる実験系

HCV 生活環解析に欠かせない 3 つの実験系として HCV レプリコンシステム [Fig. 1(B)],⁸⁾ HCV シュード粒子系 (HCVpp システム) [Fig. 1(C)],^{9,10)} HCV 粒子産生系 (HCVcc システム) [Fig. 1(D)],¹¹⁻¹³⁾ に関して説明する。これらはそれぞれ HCV 生活環のどのステップを解析できるかが異なっており、抗 HCV 剤の標的ステップの切り分けなどに有用である。少し専門分野的な話を含むので、大枠のみ理解されたい読者はこのまま次項へと読み進んで頂きたい。

前項で述べた HCV 生活環を再現する培養細胞系

はこのウイルスが発見された後、しばらく樹立できなかったが、1999 年にドイツの Bartenschlager らによって開発された HCV レプリコンシステムにより、まず翻訳～RNA 複製を含む HCV 生活環中期過程が解析できるようになった [Fig. 1(B)].⁸⁾ これは翻訳～RNA 複製に必要な HCV ゲノム上の領域を含むキメラ RNA がヒト肝がん由来 Huh-7 細胞内で自律複製している系であり、つまりこの細胞内に存在する HCV タンパク質あるいは HCV ゲノム RNA を定量することにより翻訳～RNA 複製の活性を調べることができる画期的な細胞系であった。このキメラ RNA にはウイルス粒子を構成する構造タンパク質領域は含まれないことから RNA 複製の後に粒子形成は行われない。一方 HCV 吸着, 侵入は 2003 年に開発された HCVpp システムで評価できる。^{9,10)} これは HCV エンベロープを外殻に、ルシフェラーゼ遺伝子をゲノムに持つレトロウイルスベクターベースのシュード粒子であり、ルシフェラーゼ活性を指標に HCV エンベロープ依存的な吸着, 侵入が解析できる [Fig. 1(C)]. また後期過程を含めた全 HCV 生活環の解析には HCVcc システムを用いる [Fig. 1(D)].¹¹⁻¹³⁾ これは 2005 年に脇田らを始めとするグループにより開発された系であり、HCV 全長 RNA を Huh-7 細胞に導入することにより、培養上清に感染性 HCV 粒子を放出させ、これを再び Huh-7 細胞垂株に処理することにより感染が成立する系である。このシステムでは全 HCV 生活環が再現されているため、後期過程も解析することができる。

5. シクロスポリン及びタモキシフェンによる HCV ゲノム複製抑制作用

ここからが本題である。われわれはこのような HCV 生活環の分子機構解明のため、及び新規抗 HCV 剤開発のため、低分子化合物を利用した解析を行っている。まず HCV 生活環の一部あるいは全

渡士 幸一

国立感染症研究所ウイルス第二部・主任研究官 博士 (薬学)。1998 年京都大学薬学部卒業。博士号取得後、京都大学ウイルス研究所助手、米国 NIH 客員研究員などを経て、2009 年より現職。2011 年より東京理科大学理工学部客員准教授併任。ささやかな研究チームを主宰。日本癌学会奨励賞、日本ウイルス学会杉浦奨励賞など受賞。

Fig. 1. HCV Life Cycle and the Experimental Systems Analyzing Each Step in the Life Cycle

(A) Scheme of the HCV life cycle. HCV attaches to target hepatocytes to enter into the cytoplasm. After uncoating, HCV genome RNA is translated to viral proteins in the ribosome. Produced viral nonstructural proteins replicate viral genome RNA in the viral replication complex formed around the endoplasmic reticulum. Viral proteins and genome RNA assemble together mainly on the surface of the lipid droplets. The formed viral particles traffic through the secretory pathway to release outside of the cells. Each step of the life cycle including attachment, entry (tentatively defined as the “early step”), translation, RNA replication (as the “middle step”), assembly, trafficking, and release (as the “late step”) can be a target of anti-HCV agents. Cyclosporin A, tamoxifen, and four additional compounds target the RNA replication, while bezamide derivatives N1C8 and N1B4 blocked the trafficking/release and assembly, respectively. Ten other compounds inhibited the late step, while one compound blocked the early step. (B) HCV replicon system. A chimeric RNA expressing the viral nonstructural protein region and the neomycin resistant gene in place of the viral structural region can produce the HCV replicon, which autonomously replicates in hepatoma Huh-7 cells. (C) HCV pseudoparticle (HCVpp) system. Transfection with the expression plasmids for HCV envelope proteins, murine leukemia virus (MLV) Gag-Pol, and the luciferase into 293T cells can produce HCVpp, which carries HCV envelope proteins outside of the MLV capsid and genome RNA encoding the luciferase. This system can evaluate HCV envelope-mediated attachment/entry by monitoring luciferase activity. (D) HCV-producing cell culture (HCVcc) system. A whole genome of HCV RNA introduced into Huh-7 cells can produce infectious HCV particles, which support the whole HCV life cycle.

部を再現する細胞培養系を用いて HCV 増殖を阻害する低分子化合物をスクリーニングする。得られた化合物をプローブに用いて HCV 増殖を制御する分子メカニズムを解析することができる。また得られた化合物は抗ウイルス剤のリード化合物になり得ることから、これを至適化することにより抗 HCV 剤開発を目指す。すなわち化学遺伝学的手法をウイルス学の解析に取り入れた方法論である。ここではまずこのような手法が最も成功した代表例の 1 つを挙げる。

われわれはまず翻訳～RNA 複製を含む HCV 生活環中期過程に着目し、これを阻害する低分子化合物のスクリーニングを行った。ライブラリーには様々な構造や生理活性を持つ市販の化合物を用いた。その結果多くの化合物の中から、HCV レプリコンシステムにおける HCV RNA 量をそれぞれ約 1/500, 1/50 に強く減少させるものが、シクロスポリン及びタモキシフェンであった。^{14,15)} 以下に述べるようにその後の解析によってシクロスポリンは RNA 複製に係わる複製複合体の機能を修飾し、一方タモキシフェンは複製複合体の形成を標的とする

ことが明らかとなった。

6. シクロフィリンによる RNA 複製制御

シクロスポリンの様々な誘導体を用いて構造活性相関を検討した。一般的にシクロスポリンには主にシクロフィリン、カルシニューリン、細胞膜トランスポーターの 3 つの標的分子が存在するが、抗 HCV 効果はシクロフィリン阻害効果プロファイルと非常によく一致していることが判明した。¹⁶⁻¹⁸⁾ つまりシクロスポリンはシクロフィリン阻害により抗 HCV 作用を発揮していると考えられた。実際に内在性シクロフィリンを siRNA でノックダウンすることにより HCV RNA 量が低下することから、シクロフィリンは HCV RNA 複製を制御していることが示唆された。ここで詳しくは述べないが分子生物学的解析によりシクロフィリンは HCV RNA ポリメラーゼである NS5B タンパク質に結合し、その基質 RNA との親和性を上昇させることが示唆された。このように低分子化合物を用いることで HCV RNA 複製に必須の宿主因子が明らかとなり、またこれは抗 HCV 剤の創薬標的となると考えられた。

7. シクロスポリンをプラットフォームとした抗 HCV 剤の開発

シクロスポリンはインターフェロンと併用することにより相乗的に抗 HCV 作用を増強させたこと、また薬剤耐性ウイルス出現頻度がプロテアーゼ阻害剤などに比較して著しく低いことより有望なリード化合物と考えられた。^{18,19)} その後欧米の製薬企業によりシクロスポリンのカルシニューリン抑制活性を欠失し、シクロフィリン阻害活性を上昇させた alisporivir (Debio 025), NIM811, SCY-635 に関してはそれぞれ慢性 C 型肝炎治療を目的とした臨床試験が行われており、現在臨床試験第 III 相、第 II 相まで進んでいる (Table 1)。^{20,21)} このように基礎ウイルス学研究から創薬に貢献できる成果を得ることが可能となった。

8. エストロゲン受容体による複製複合体形成制御

一方タモキシフェンの標的タンパク質としてはエストロゲン受容体が知られるが、これが HCV

RNA ポリメラーゼ NS5B と結合していること、エストロゲン受容体が HCV RNA 複製を増強させていることが、タンパク質結合アッセイ及び RNAi 法により示された。¹⁵⁾ またシクロフィリンとは異なり、エストロゲン受容体は NS5B の RNA 結合能ではなく、その複製複合体へのリクルートを促進させることが示唆された。なお深澤らにより、タモキシフェンは RNA 複製に加えて HCV 侵入も阻害することが報告された。²²⁾ ただしタモキシフェンはシクロスポリンに比較して抗 HCV 効果がマイルドであり、また細胞毒性もより高いことから、いまだ臨床開発へは至っていない。

9. 臨床開発中の抗 HCV 剤の現状

以上のように HCV レプリコンシステムを用いることにより、HCV 翻訳/RNA 複製を阻害する低分子化合物をスクリーニングすることができ、またその分子メカニズムを明らかにすることもできた。Table 1 に現在臨床開発中の薬剤の概要を示した。²⁰⁾ ウイルスタンパク質を直接阻害するプロテアーゼ阻

Table 1. Anti-HCV Agents under Clinical Development

	Direct Acting Antivirals (DAA)				Host Targeting Antivirals (HTA)		Immunomodulators	
	NS3 プロテアーゼ 阻害剤	NS5A 阻害剤	NS5B ポリメラーゼ阻害剤		シクロフィリン 阻害剤	miR-122 阻害剤	免疫賦活剤	治療ワクチン
			核酸系	非核酸系				
承認済	telaprevir boceprevir						PEGylated Interferon- α Interferon- β	
第 III 相 試験	Simeprevir (TMC435) Faldaprevir (BI201335) ABT-450/r Asunaprevir (BMS-650032) Vaniprevir (MK-7009)	Daclatasvir (BMS-790052) ABT-267 Leidipasvir (GS-5885)	Sofosbuvir (GS-7977) Mericitabine (RG7128)	ABT-333	Alisporivir (Debio 025)		PEGylated Interferon- λ	
第 II 相 試験	Danoprevir (RG7227) GS-9451 GS-9256 Sovaprevir (ACH-1625) ACH-2684 MK-5172 MK-8742	GS-5816 IDX-719 PPI-688	IDX184 VX-135	Setrobuvir (ANA598) TMC647055	NIM811 SCY-635	miravirsin	Oral Interferon	CT-011 ChronVac-C GI-5005 IC41 TG4040
標的 ステップ	中 期	中 期	中 期	中 期	中 期	中 期	—	—

Anti-HCV agents can be classified as direct acting antivirals (DAA), host targeting antivirals (HTA), and immunomodulators. This table shows the agents under clinical trial phase II and III as well as approved agents.

害剤, ポリメラーゼ阻害剤 (核酸型, 非核酸型), NS5A 阻害剤は直接標的型抗ウイルス剤 **direct acting antivirals (DAA)** と総称され, 現在 30 剤以上の薬剤が臨床試験で評価を受けている. 一方シクロフィリン阻害剤を含めたマイクロ RNA-122 阻害剤などは宿主標的型抗ウイルス剤 **host targeting antivirals (HTA)** として, HCV 遺伝子型により効果が左右され, また薬剤耐性ウイルス出現が高頻度な傾向にある DAA の性質を補完する薬剤群として開発が期待されている.

ここで着目すべき点として, これまでの DAA 及び HTA はほぼすべて HCV のプロセッシングや RNA 複製などの HCV 生活環中期過程を阻害するものであり, 臨床開発初期段階にある侵入阻害剤を除いては, HCV 生活環中の薬剤標的ステップはごく限られたものとなっている (Table 1). 抗 HCV 剤開発において, HCV 生活環中期過程以外, 特にこれまでここを阻害する薬剤が開発されていない後期過程は創薬の標的となり得るのだろうか? われわれはこの点に着目してさらに解析を行った.

10. HCV 粒子産生系を用いた HCV 産生阻害剤の同定

前述のように 2005 年になって HCVcc システムが開発されたが, これはそれまで不可能であった HCV 生活環すべての解析を可能とするものである. ウイルスを Huh-7 細胞及びその亜株に感染することにより, 細胞内で増殖, 子孫ウイルスが培養上清に放出され, これが新たな非感染細胞に感染し HCV 感染細胞が経時的に増加していくという, いわゆるウイルス感染培養実験を HCV でも可能にする発見であった. これにより HCV 生活環すべてを標的として細胞ベースの抗ウイルス剤のスクリーニング及びその機能解析を行うことができる. われわれはこの HCVcc システムを用いて, HCV 粒子産生を阻害する低分子化合物の同定を行った.

市販化合物ライブラリーより, HCV 粒子の感染性を 1/3 以下に減少させるものとして 20 化合物が得られた. これらのうち GW6471, z-guggulsterone, fulvestrant はそれぞれ核内ホルモン受容体 PPAR α , FXR, ER 阻害活性を有することが知られているが, 一方でこれまでに HCV RNA 複製にはこれらの核内ホルモン受容体が重要であることが報告されている.^{15,23,24)} つまり既報の HCV 複製機構を阻害

する化合物が確かに得られており, 今回用いた HCVcc 実験系が抗 HCV 剤同様に機能していることを示唆している. 残りの 17 化合物に関して次に, HCV 生活環のどのステップを阻害しているのかを解析した. そのために HCVpp システム及びレプリコンシステムを用い, それぞれの化合物が中期及び初期過程に影響を与えるかどうかを調べた. その結果, 1 化合物が HCVpp 感染により発現するルシフェラーゼ活性を有意に低下させ, 4 化合物が HCV レプリコン複製に伴うルシフェラーゼ活性を低下させ [Fig. 1(A)], これらはそれぞれ HCV 生活環初期過程及び中期過程を標的のと考えられた. つまり残りの 12 化合物は HCV 後期過程を阻害するのと考えられた.

11. HCV 放出阻害剤, 粒子形成阻害剤の同定

得られた 12 化合物のうちの 1 つでベンズアミド骨格を有する N1C8 化合物に関して解析した. HCV 感染細胞に N1C8 を処理した場合, 培養上清中の HCV 感染力価は用量依存的に 1/10 以下まで低下したが, このとき細胞内で粒子形成された HCV の感染力価には影響を与えなかった. また感染性 HCV の放出効率も N1C8 処理により 1/10 以下に低下していた. また分泌された宿主アルブミン及びアポリポタンパク質には大きな影響を与えなかったことより, N1C8 は HCV 膜輸送/放出を特異的に阻害するのと考えられた. また N1C8 処理により HCV core がゴルジに蓄積したことから, これは形成された HCV 粒子がゴルジを経る分泌経路過程を阻害しているのと考えられた. この化合物を HCV 感染細胞に持続的に処理した場合, HCV 感染細胞の経時的な広がりが阻害されることが判明した. これまで特に慢性疾患を引き起こすウイルスに対する抗ウイルス剤において放出阻害剤を開発した例はほぼ存在しなかったが, 本研究結果よりウイルス放出が一般的に抗ウイルス剤の創薬の標的となり得る可能性が考えられた.

また得られた後期過程阻害剤 12 化合物のうち別のベンズアミド誘導体である N1B4 化合物に関して解析を行った. 興味深いことに, この化合物は培養上清中だけではなく細胞内で粒子形成された HCV 感染力価も有意に低下させたことより, N1B4 は N1C8 とは異なり粒子形成を阻害するのと考えられた. このように HCVcc を用いたスクリーニングよ

り、異なる作用点を持つ後期過程阻害剤が得られた。今後これらの化合物の作用点をさらに検討することにより、HCV 生活環後期過程の分子機構の一端が明らかになると期待される。

12. おわりに

以上のように HCV レプリコンシステム及び HCVcc システムを用いて HCV 複製増殖を阻害する低分子化合物を同定することができた。またこれら低分子化合物をプローブに用いて HCV 複製増殖の分子メカニズムを同定することが可能となった。このようにいわゆる化学遺伝学的手法をウイルス学の解析に用いることによって、ウイルス複製の分子機構だけでなく、新たな抗ウイルス剤の開発が期待でき、アカデミアからの創薬という観点において魅力的な解析法であると考えられる。

またこのような解析は HCV だけでなく、原理的には様々なウイルスに対して応用することができそうである。われわれは B 型肝炎ウイルスに関して同様の解析を行っており、新たな抗ウイルス剤の標的ステップが明らかになりつつある。

謝辞 本研究を遂行するにあたりご協力頂いた京都大学ウイルス研究所ヒトがんウイルス研究分野(下遠野研究室)、国立感染症研究所ウイルス第二部のみなさまを始め、様々な共同研究者、研究協力者の先生方に深謝いたします。また本研究は科学研究費補助金、厚生労働科学研究費補助金のサポートにより実施されたものです。

REFERENCES

- 1) Alter M. J., Kruszon-Moran D., Nainan O. V., McQuillan G. M., Gao F., Moyer L. A., Kaslow R. A., Margolis H. S., *N. Engl. J. Med.*, **341**, 556–562 (1999).
- 2) McHutchison J. G., Gordon S. C., Schiff E. R., Shiffman M. L., Lee W. M., Rustgi V. K., Goodman Z. D., Ling M. H., Cort S., Albrecht J. K., *N. Engl. J. Med.*, **339**, 1485–1492 (1998).
- 3) Pawlotsky J. M., *Hepatology*, **53**, 1742–1751 (2011).
- 4) Ploss A., Evans M. J., *Curr. Opin. Virol.*, **2**, 14–19 (2012).
- 5) Pineiro D., Martinez-Salas E., *Viruses*, **4**, 2233–2250 (2012).
- 6) Rai R., Deval J., *Antiviral Res.*, **90**, 93–101 (2011).
- 7) Popescu C. I., Rouille Y., Dubuisson J., *Viruses*, **3**, 2238–2254 (2011).
- 8) Lohmann V., Korner F., Koch J., Herian U., Theilmann L., Bartenschlager R., *Science*, **285**, 110–113 (1999).
- 9) Bartosch B., Dubuisson J., Cosset F. L., *J. Exp. Med.*, **197**, 633–642 (2003).
- 10) Hsu M., Zhang J., Flint M., Logvinoff C., Cheng-Mayer C., Rice C. M., McKeating J. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 7271–7276 (2003).
- 11) Zhong J., Gastaminza P., Cheng G., Kapadia S., Kato T., Burton D. R., Wieland S. F., Uprichard S. L., Wakita T., Chisari F. V., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 9294–9299 (2005).
- 12) Wakita T., Pietschmann T., Kato T., Date T., Miyamoto M., Zhao Z., Murthy K., Habermann A., Krausslich H. G., Mizokami M., Bartenschlager R., Liang T. J., *Nat. Med.*, **11**, 791–796 (2005).
- 13) Lindenbach B. D., Evans M. J., Syder A. J., Wolk B., Tellinghuisen T. L., Liu C. C., Maruyama T., Hynes R. O., Burton D. R., McKeating J. A., Rice C. M., *Science*, **309**, 623–626 (2005).
- 14) Watashi K., Hijikata M., Hosaka M., Yamaji M., Shimotohno K., *Hepatology*, **38**, 1282–1288 (2003).
- 15) Watashi K., Inoue D., Hijikata M., Goto K., Aly H. H., Shimotohno K., *J. Biol. Chem.*, **282**, 32765–32772 (2007).
- 16) Watashi K., Ishii N., Hijikata M., Inoue D., Murata T., Miyanari Y., Shimotohno K., *Mol. Cell*, **19**, 111–122 (2005).
- 17) Ishii N., Watashi K., Hishiki T., Goto K., Inoue D., Hijikata M., Wakita T., Kato N., Shimotohno K., *J. Virol.*, **80**, 4510–4520 (2006).
- 18) Goto K., Watashi K., Murata T., Hishiki T., Hijikata M., Shimotohno K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **343**, 879–884 (2006).
- 19) Goto K., Watashi K., Inoue D., Hijikata M., Shimotohno K., *Cancer Sci.*, **100**, 1943–1950 (2009).
- 20) Schlutter J., *Nature*, **474**, S5–S7 (2011).
- 21) Watashi K., *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **11**, 2233–2250 (2012).

-
- 213–224 (2010).
- 22) Murakami Y., Fukasawa M., Kaneko Y., Suzuki T., Wakita T., Fukazawa H., *Microbes Infect.*, **15**, 45–55 (2012).
- 23) Chang K. O., George D. W., *J. Virol.*, **81**, 9633–9640 (2007).
- 24) Rakic B., Sagan S. M., Noestheden M., Belanger S., Nan X., Evans C. L., Xie X. S., Pezacki J. P., *Chem. Biol.*, **13**, 23–30 (2006).