

residues on target cells (Lee *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004). Furthermore, cell-adapted TBE virus infection of BHK-21 cells is inhibited by GAGs, whereas this is not the case for the parental virus (Mandl *et al.*, 2001). Mutation at residue E-138 in both JEV and *West Nile virus* shows clearly that this residue is a strong determinant of viral binding to GAG residues on target cells (see Supplementary Table S2, available in JGV Online). In our study, binding by rAT-E138K was inhibited significantly by heparin, whereas the rAT strain was unaffected. Cells digested with heparinase III displayed specifically reduced binding activity to rAT-E138K (Fig. 3). This indicates that rAT-E138K virus binding to cell surfaces is more dependent on heparan sulphate B residues than rAT virus. The better interaction of heparin with rAT-E138K virus in comparison with rAT virus is explained by the fact that heparin is negatively charged and the substitution of negatively charged Glu for positively charged Lys provides a more highly charge-mediated interaction, based on the consideration that residue 138 of the E protein is exposed on the surface (Lee *et al.*, 2004); alternatively, this mutation may expose other positively charged residues on the surface of the virion. Residue E-138 is negatively charged and conserved among the JEV serocomplex, but not among other flaviviruses (See Supplementary Fig. S2, available in JGV Online). Furthermore, a Glu-to-Lys mutation was found not only in JEV, but also in *West Nile virus*. Taken together, the E-138 residue is suggested to be an important determinant of GAG binding and virulence of the JEV serocomplex.

Flaviviruses generally bud into the lumen of the endoplasmic reticulum in infected cells and are subsequently secreted through the vesicle-transport pathway. A recent study has indicated that a single Pro-to-Ser point mutation at position 63 in the prM protein of TBE virus may induce a reduction in virus-particle secretion from RNA-transfected BHK-21 cells (Yoshii *et al.*, 2004). Interestingly, the Glu-to-Lys mutation at E-138 also affects the efficiency of viral release from infected cells. Changes in not only infection efficiency, but also viral secretion efficiency, may play important roles in virus attenuation. Some studies have reported that about 180 glycoprotein E monomers are present on the surface of a mature flavivirus particle with the (pre)M-E heterodimer (Lescar *et al.*, 2001; Kuhn *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003a, b). The Glu-to-Lys mutation changes the charge of the side chain from negative to positive. About 180 positively charged side chains at E-138 residues would change to 180 negative charges in each rAT-E138K virus particle. Clearly, this would affect both the binding of rAT-E138K virus to target cells and intracellular transport of viral particles. Furthermore, the E-138 residue exists near the hinge region between domains I and II, and the three-dimensional structure of the E protein might therefore change due to mutation of this residue. Taken together, these mechanisms may attenuate JEV virulence cooperatively *in vivo*, but further study is needed to clarify this point.

Neuroinvasiveness of both at222 and rAT-E138K viruses

was attenuated (Table 1). The blood-brain barrier (BBB) can inhibit viral invasion into mouse brains, and both rAT-E138K and at222 viruses proved unable to enter the brain. A recent publication demonstrated that *West Nile virus* replication in peripheral tissues triggers a Toll-like receptor inflammatory response that alters the permeability of the BBB (Wang *et al.*, 2004). Increased BBB permeability allows *West Nile virus* to cross the BBB. *West Nile virus* is a flavivirus that is genetically related very closely to JEV. Similar mechanisms might thus be important for the neuroinvasiveness of JEV. The data in Table 2 demonstrate clearly that rAT-E138K virus does not cause viraemia and, thus, inflammatory responses might be insufficient to replace BBB permeability. This issue warrants further analysis in future.

Previous investigators of the JEV SA14-14-2 strain have demonstrated that change of residue E-279 from methionine to lysine in domain II affects viral neurovirulence significantly (Monath *et al.*, 2002). Our studies indicate that residue E-138, which is located at the link region between domains I and II, is an important determinant of neurovirulence and neuroinvasiveness in JEV. However, the at222 virus contains additional mutations besides E-138 and demonstrated characteristics of further attenuation, compared with rAT-E138K with the single mutation at E-138. The function of point mutations at other residues in the JEV E protein should thus be examined by using full-length cDNA clones in future studies.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr J. Nakamura of the Nippon Institute for Biological Science, Japan, for providing the JEV AT31 strain. We also wish to thank Dr Satoshi Koike for his helpful advice. This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science, by a Grant from Toray Industries, Inc., by the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) and by the Research on Health Sciences focusing on Drug Innovation from the Japan Health Sciences Foundation.

## REFERENCES

- Aihara, S., Rao, C. M., Yu, Y. X., Lee, T., Watanabe, K., Komiya, T., Sumiyoshi, H., Hashimoto, H. & Nomoto, A. (1991). Identification of mutations that occurred on the genome of Japanese encephalitis virus during the attenuation process. *Virus Genes* 5, 95–109.
- Allison, S. L., Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C. W., Kunz, C. & Heinz, F. X. (1995). Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J Virol* 69, 695–700.
- Arroyo, J., Guirakhoo, F., Fenner, S., Zhang, Z.-X., Monath, T. P. & Chambers, T. J. (2001). Molecular basis for attenuation of neurovirulence of a yellow fever virus/Japanese encephalitis virus chimera vaccine (ChimeriVax-JE). *J Virol* 75, 934–942.
- Chen, L.-K., Lin, Y.-L., Liao, C.-L., Lin, C.-G., Huang, Y.-L., Yeh, C.-T., Lai, S.-C., Jan, J.-T. & Chin, C. (1996). Generation and

- characterization of organ-tropism mutants of Japanese encephalitis virus *in vivo* and *in vitro*. *Virology* 223, 79–88.
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhardt, R. J. & Marks, R. M. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* 3, 866–871.
- Gritsun, T. S. & Gould, E. A. (1998). Development and analysis of a tick-borne encephalitis virus infectious clone using a novel and rapid strategy. *J Virol Methods* 76, 109–120.
- Gualano, R. C., Pryor, M. J., Cauchi, M. R., Wright, P. J. & Davidson, A. D. (1998). Identification of a major determinant of mouse neurovirulence of dengue virus type 2 using stably cloned genomic-length cDNA. *J Gen Virol* 79, 437–446.
- Hasegawa, H., Yoshida, M., Shiosaka, T., Fujita, S. & Kobayashi, Y. (1992). Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. *Virology* 191, 158–165.
- Hayasaka, D., Gritsun, T. S., Yoshii, K. & 7 other authors (2004). Amino acid changes responsible for attenuation of virus neurovirulence in an infectious cDNA clone of the Oshima strain of *Tick-borne encephalitis virus*. *J Gen Virol* 85, 1007–1018.
- Heinz, F. X. (1986). Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Adv Virus Res* 31, 103–168.
- Hung, S.-L., Lee, P.-L., Chen, H.-W., Chen, L.-K., Kao, C.-L. & King, C.-C. (1999). Analysis of the steps involved in dengue virus entry into host cells. *Virology* 257, 156–167.
- Hung, J.-J., Hsieh, M.-T., Young, M.-J., Kao, C.-L., King, C.-C. & Chang, W. (2004). An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J Virol* 78, 378–388.
- Hurrelbrink, R. J. & McMinn, P. C. (2001). Attenuation of Murray Valley encephalitis virus by site-directed mutagenesis of the hinge and putative receptor-binding regions of the envelope protein. *J Virol* 75, 7692–7702.
- Hurrelbrink, R. J., Nestorowicz, A. & McMinn, P. C. (1999). Characterization of infectious Murray Valley encephalitis virus derived from a stably cloned genome-length cDNA. *J Gen Virol* 80, 3115–3125.
- Kato, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Date, T., Yasui, K., Kato, J., Matsushima, S., Komatsu, T. & Wakita, T. (2003a). Processing of hepatitis C virus core protein is regulated by its C-terminal sequence. *J Med Virol* 69, 357–366.
- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M. & Wakita, T. (2003b). Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 125, 1808–1817.
- Khromykh, A. A. & Westaway, E. G. (1994). Completion of Kunjin virus RNA sequence and recovery of an infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA. *J Virol* 68, 4580–4588.
- Kimura-Kuroda, J. & Yasui, K. (1983). Topographical analysis of antigenic determinants on envelope glycoprotein V3 (E) of Japanese encephalitis virus, using monoclonal antibodies. *J Virol* 45, 124–132.
- Kimura-Kuroda, J., Ichikawa, M., Ogata, A., Nagashima, K. & Yasui, K. (1993). Specific tropism of Japanese encephalitis virus for developing neurons in primary rat brain culture. *Arch Virol* 130, 477–484.
- Kinney, R. M., Butrapet, S., Chang, G.-J. J., Tsuchiya, K. R., Roehrig, J. T., Bhamarapravati, N. & Gubler, D. J. (1997). Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology* 230, 300–308.
- Kolaskar, A. S. & Kulkarni-Kale, U. (1999). Prediction of three-dimensional structure and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus. *Virology* 261, 31–42.
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G. & 9 other authors (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108, 717–725.
- Lai, C.-J., Zhao, B., Hori, H. & Bray, M. (1991). Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5139–5143.
- Lee, E. & Lobigs, M. (2002). Mechanism of virulence attenuation of glycosaminoglycan-binding variants of Japanese encephalitis virus and Murray Valley encephalitis virus. *J Virol* 76, 4901–4911.
- Lee, E., Hall, R. A. & Lobigs, M. (2004). Common E protein determinants for attenuation of glycosaminoglycan-binding variants of Japanese encephalitis and West Nile viruses. *J Virol* 78, 8271–8280.
- Lescar, J., Roussel, A., Wien, M. W., Navaza, J., Fuller, S. D., Wengler, G., Wengler, G. & Rey, F. A. (2001). The fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell* 105, 137–148.
- Liu, H., Chiou, S.-S. & Chen, W.-J. (2004). Differential binding efficiency between the envelope protein of Japanese encephalitis virus variants and heparan sulfate on the cell surface. *J Med Virol* 72, 618–624.
- Mandl, C. W., Guirakhoo, F., Holzmann, H., Heinz, F. X. & Kunz, C. (1989). Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model. *J Virol* 63, 564–571.
- Mandl, C. W., Kroschewski, H., Allison, S. L., Kofler, R., Holzmann, H., Meixner, T. & Heinz, F. X. (2001). Adaptation of tick-borne encephalitis virus to BHK-21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation *in vivo*. *J Virol* 75, 5627–5637.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D. & Harrison, S. C. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427, 313–319.
- Monath, T. P. & Heinz, F. X. (1996). Flaviviruses. In *Fields Virology*, 3rd edn, pp. 961–1034. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven.
- Monath, T. P., Arroyo, J., Levenbook, I., Zhang, Z.-X., Catalan, J., Draper, K. & Guirakhoo, F. (2002). Single mutation in the flavivirus envelope protein hinge region increases neurovirulence for mice and monkeys but decreases viscerotropism for monkeys: relevance to development and safety testing of live, attenuated vaccines. *J Virol* 76, 1932–1943.
- Ni, H. & Barrett, A. D. T. (1998). Attenuation of Japanese encephalitis virus by selection of its mouse brain membrane receptor preparation escape variants. *Virology* 241, 30–36.
- Nitayaphan, S., Grant, J. A., Chang, G.-J. J. & Trent, D. W. (1990). Nucleotide sequence of the virulent SA-14 strain of Japanese encephalitis virus and its attenuated vaccine derivative, SA-14-14-2. *Virology* 177, 541–552.
- Polo, S., Ketner, G., Levis, R. & Falgout, B. (1997). Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast. *J Virol* 71, 5366–5374.
- Reed, L. J. & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 27, 493–497.
- Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C. & Harrison, S. C. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375, 291–298.
- Rice, C. M., Grakoui, A., Galler, R. & Chambers, T. J. (1989). Transcription of infectious yellow fever virus RNA from full-length cDNA templates produced by *in vitro* ligation. *New Biol* 1, 285–296.

- Shi, P.-Y., Tilgner, M., Lo, M. K., Kent, K. A. & Bernard, K. A. (2002). Infectious cDNA clone of the epidemic West Nile virus from New York City. *J Virol* **76**, 5847–5856.
- Stiasny, K., Allison, S. L., Marchler-Bauer, A., Kunz, C. & Heinz, F. X. (1996). Structural requirements for low-pH-induced rearrangements in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus. *J Virol* **70**, 8142–8147.
- Stiasny, K., Allison, S. L., Schalich, J. & Heinz, F. X. (2002). Membrane interactions of the tick-borne encephalitis virus fusion protein E at low pH. *J Virol* **76**, 3784–3790.
- Sumiyoshi, H., Mori, C., Fuke, I., Morita, K., Kuhara, S., Kondou, J., Kikuchi, Y., Nagamatsu, H. & Igarashi, A. (1987). Complete nucleotide sequence of the Japanese encephalitis virus genome RNA. *Virology* **161**, 497–510.
- Sumiyoshi, H., Hoke, C. H. & Trent, D. W. (1992). Infectious Japanese encephalitis virus RNA can be synthesized from in vitro-ligated cDNA templates. *J Virol* **66**, 5425–5431.
- Sumiyoshi, H., Tignor, G. H. & Shope, R. E. (1995). Characterization of a highly attenuated Japanese encephalitis virus generated from molecularly cloned cDNA. *J Infect Dis* **171**, 1144–1151.
- Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J. F., Fikrig, E. & Flavell, R. A. (2004). Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* **10**, 1366–1373.
- Whitehead, S. S., Falgout, B., Hanley, K. A., Blaney, J. E., Jr, Markoff, L. & Murphy, B. R. (2003). A live, attenuated dengue virus type 1 vaccine candidate with a 30-nucleotide deletion in the 3' untranslated region is highly attenuated and immunogenic in monkeys. *J Virol* **77**, 1653–1657.
- Wilcox, C. L., Smith, R. L., Freed, C. R. & Johnson, E. M., Jr (1990). Nerve growth factor-dependence of herpes simplex virus latency in peripheral sympathetic and sensory neurons *in vitro*. *J Neurosci* **10**, 1268–1275.
- Yamshchikov, V., Mishin, V. & Cominelli, F. (2001). A new strategy in design of (+)RNA virus infectious clones enabling their stable propagation in *E. coli*. *Virology* **281**, 272–280.
- Yasui, K. (2002). Neuropathogenesis of Japanese encephalitis virus. *J Neurovirol* **8** (Suppl. 2), 112–114.
- Yoshii, K., Konno, A., Goto, A. & 7 other authors (2004). Single point mutation in tick-borne encephalitis virus prM protein induces a reduction of virus particle secretion. *J Gen Virol* **85**, 3049–3058.
- Yu, Y. X., Wu, P. F., Ao, J., Liu, L. H. & Li, H. M. (1981). Selection of a better immunogenic and highly attenuated live vaccine virus strain of JE. I. Some biological characteristics of SA14-14-2 mutant. *Chin J Microbiol Immunol* **1**, 77–84.
- Yun, S.-I., Kim, S.-Y., Rice, C. M. & Lee, Y.-M. (2003). Development and application of a reverse genetics system for Japanese encephalitis virus. *J Virol* **77**, 6450–6465.
- Zhang, W., Chipman, P. R., Corver, J. & 7 other authors (2003a). Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol* **10**, 907–912.
- Zhang, Y., Corver, J., Chipman, P. R. & 7 other authors (2003b). Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J* **22**, 2604–2613.
- Zhao, Z., Wakita, T. & Yasui, K. (2003). Inoculation of plasmids encoding Japanese encephalitis virus PrM-E proteins with colloidal gold elicits a protective immune response in BALB/c mice. *J Virol* **77**, 4248–4260.

# BIOLOGY TOPICS

## 培養細胞で効率よく増殖する C型肝炎ウイルス株

わきた たかじ  
脇田 隆字

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経化学総合研究所



脇田隆字  
1983年名古屋大学医学部卒業。  
92年同大学大学院修了。医学博士。  
92年から95年ハーバード大学医学部留学。95年～98年東京都臨床医学総合研究所。98年より東京都神経科学総合研究所。研究テーマは肝炎ウイルスの分子生物学的解析。趣味は読書、昼寝、ゴルフ、スキー。

Key words : virus culture, replicon, replication

### Abstract

C型肝炎ウイルス(HCV)は培養細胞によるウイルス培養が困難で、ウイルス学的な研究が進んでこなかった。このためHCVに対する特効薬の開発は遅れてきた。我々の研究グループはHCV感染による劇症肝炎患者から分離したJFH-1株を用いることにより、HCVのウイルス培養に成功した。この実験系を用いて、新たな抗ウイルス薬や、ワクチンの開発が期待できる。さらに、これまで困難だったHCVのウイルス学的解析も進むと考えられる。

このためHCVに対する特効薬の開発は遅れてきた。我々の研究グループはHCV感染による劇症肝炎患者から分離したウイルス株を用いることにより、HCVのウイルス培養を初めて報告した。本稿ではこのHCV株とウイルス培養系について述べる。

### 1. HCVについて

HCVはフラビウイルス科に属するRNAウイルスである。フラビウイルスの仲間には日本脳炎ウイルス、デングウイルスや黄熱病ウイルスなどが属している。我が国では100万200万人のウイルスキャリアーが存在すると言われている。また、WHOの報告によれば1億7000万人ものウイルスキャリアーがいるとされている。HCVの感染は血液を介する場合が多い。輸血や不適切な医療行為(例えば注射針の使い回しなど)、あるいは観血的な非医療行為(たとえば入れ墨など)により感染

### はじめに

C型肝炎ウイルス(HCV)は非A非B型肝炎の原因ウイルスとして1989年に米国のカイロングループがそのウイルス遺伝子cDNAをクローニングしたことによりその存在が確認された。以来、臨床的および基礎的な研究が進み、HCVの実態は徐々に明らかになってきた。HCVは培養細胞によるウイルス培養が困難で、ウイルス学的な研究が進んでこなかった。

*Efficient replication of hepatitis C virus strain in cultured cells: Takaji Wakita, Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience*

する可能性があるが、輸血以外に関しては不明な点も多い。HCVに感染すると多くの場合持続感染化し、10年から30年という長い時間をかけて、慢性肝炎、肝硬変を経て肝臓癌を引き起こす。肝硬変に至ると肝臓癌以外にも食道静脈瘤、肝機能不全などの合併症を併発するため早期の治療が望ましい。非A非B型肝炎と呼ばれていた時代からウイルス性疾患であることが考えられ、インターフェロンによる治療が行われてきた。

最近ではペグ化インターフェロン及びリバビリンの併用療法によって治療効果が向上し、50%程度の感染者でウイルス排除が可能となったが、未だに無効例も多く存在する。従って、HCVに対する新たな治療法の開発が望まれてきている。しかし、HCVは培養細胞によるウイルスの培養ができず、また、感染実験が可能な実験動物も霊長類のチンパンジーに限られているためウイルスの感染複製機構や病原性の解析が遅れ、そのため抗ウイルス薬の開発も遅れてきた。

## 2. 劇症肝炎から分離したHCV株

HCVに感染すると、多くの場合持続感染化して慢性肝炎を発症する。これまでに分離されてきたHCV株の遺伝子の多くは慢性肝炎患者から分離されてきた。HCVの感染の場合、感染当初一過性に良く増殖するものの、その後宿主の免疫反応によりウイルス量は減少し、ウイルスと宿主の反応は何らかの共存状態になり、持続感染が成立すると考えた(図1)。持続感染がすでに成立した時点でのウイルスはすでに複製能力が低くなっている可能性がある。このため実験室内で効率よく複製できるウイルス株を得るためにはウイルス

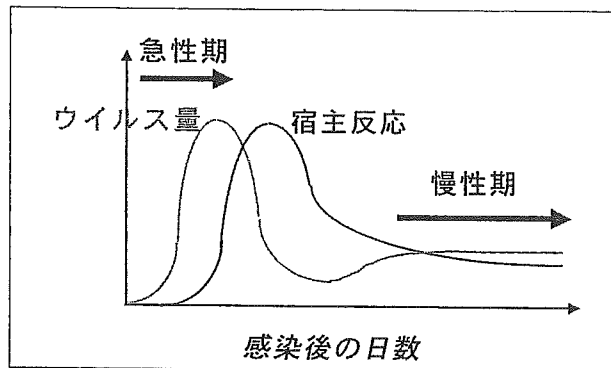


図1 持続感染におけるウイルス量と宿主反応

感染の急性期からウイルス株を分離する必要があると考えた。

しかし、実際にはHCVの急性肝炎では多くの場合すでにウイルス量が低い場合が多く、ウイルス遺伝子の分離が困難であった。HCVの急性肝炎では、他のウイルス性急性肝炎と比較して肝機能異常が低値を示す症例が多い。これはウイルスの増殖能が低いために宿主の反応性が弱いのか、あるいはHCV自体に宿主の反応を回避する能力があるためかも知れない。急性肝炎症例で短期間に肝機能不全に至り、肝性昏睡に至る場合があり、劇症肝炎と診断されることがある。HCV感染では劇症肝炎に至る例は非常に稀だが、慈恵医大第三病院 永山和男教授らのグループとの協力により32歳の男性で肝疾患の既往のないHCVによる劇症肝炎症例からHCV株を分離する機会を得た。

この症例では入院直後に高度の肝機能異常を認めた(図2)。急性期の血清から分離したHCV株はJFH-1と名付けられた。JFH-1株の遺伝子配列を決定して解析したところ、HCVの6つある遺伝子型のうち遺伝子型2aに属することが判明した。さらに慢性肝炎から分離された同じ遺伝子型2aに属するHCV株と比較するとコア、NS3およびNS5A領域に変異が多い

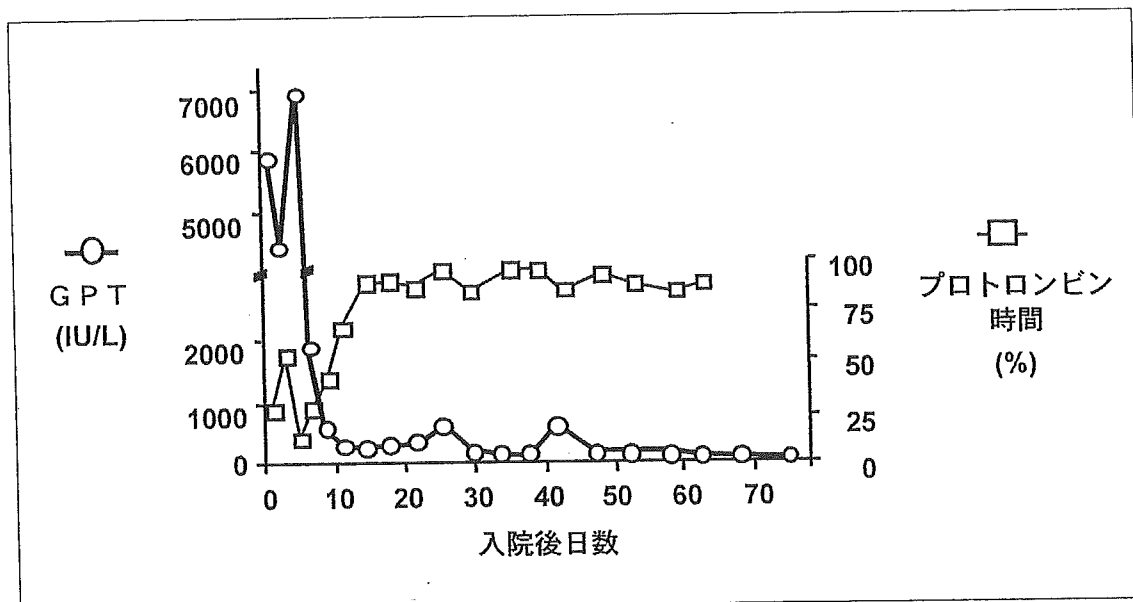


図2 HCVによる劇症肝炎患者の経過

ことが判明した。さらに、E2領域の Hypervaluable 領域遺伝子をクローニングして遺伝し配列を決定すると多様性が非常に低いことがわかった。HCVの場合、ウイルス遺伝子の多様性が高いことが報告されている。

また、NS5Aのインターフェロンの感受性に関係すると報告されている ISDR 領域は変異型でインターフェロンに対して感受性のあるウイルスであることが示唆された。これらの特徴から慢性肝炎のウイルス株とは異なる性質を持っていることが示されたが、遺伝子配列の解析だけではその複製能力や病原性の解析は不可能である。そこでこのウイルス株の機能解析をおこなった。

### 3. JFH-1株の コア蛋白質プロセッシング

JFH-1株のコア領域アミノ酸配列にはC末

端のプロセッシングに關与する領域に特異的な配列があった。このためJFH-1株のコア蛋白質のプロセッシングの解析をおこなった。試験管内蛋白合成系によりコア蛋白質のプロセッシングを比較すると慢性肝炎株に比較してJFH-1株ではコア蛋白質がより効率よくプロセッシングされることが判明した。コア蛋白質はウイルス粒子を形成することから、この性質はJFH-1株がよりウイルス粒子を産生しやすい株である可能性を示唆した。

### 4. レプリコンによるJ FH-1株の複製能の検討

1999年ドイツのLohmannらによりHCVレプリコンが報告された。HCVの全長cDNA(Con1株)の構造領域遺伝子を取り除きその部分にネオマイシン耐性遺伝子とEMCV IRESを挿入した構築を作製した(図3)。この構築からレプリコンRNAを合成し、Huh7

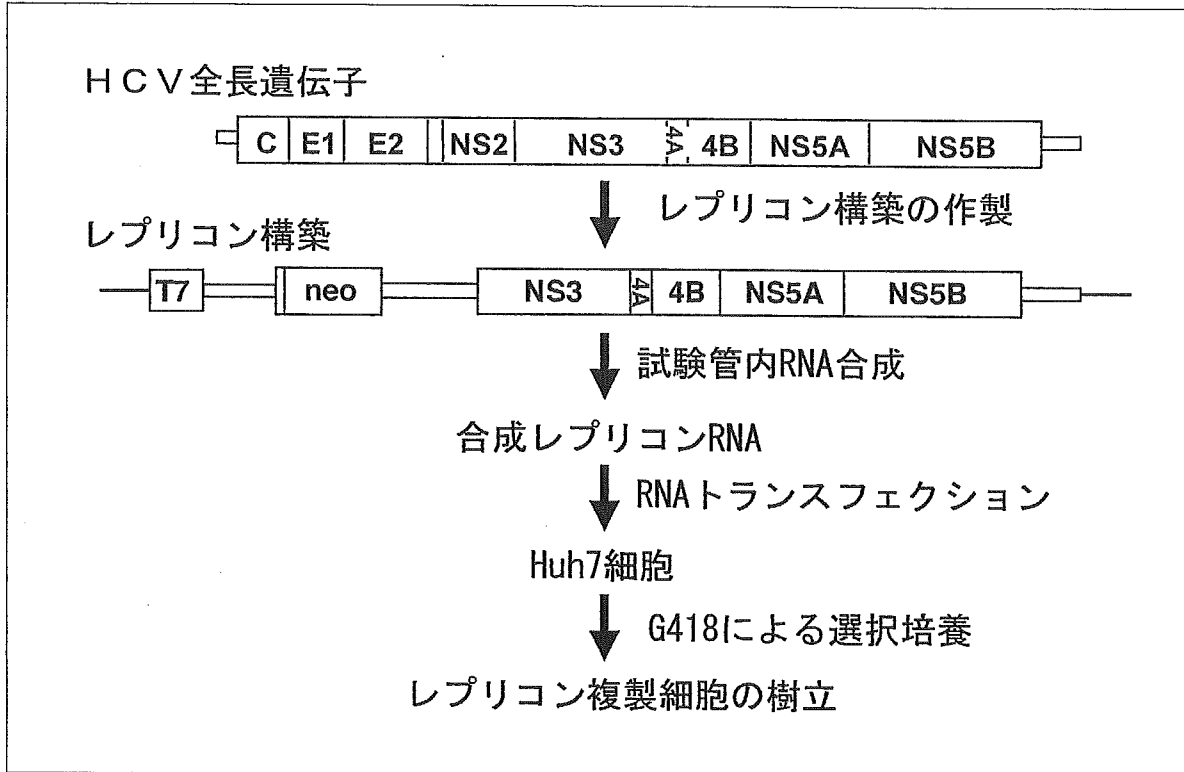


図3 HCVレプリコン実験系

細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞をG418存在下に培養することによりレプリコンが自律複製している細胞を選択培養できる実験系である。選択培養した細胞内ではHCVのレプリコンが効率よく複製し、ウイルス蛋白質が発現する。この実験系によりJFH-1株の複製能力を解析した。Lohmannらの報告に基づきレプリコンの構築を作製した。この構築から合成したRNAをHuh7細胞にトランスフェクションしてG418による選択培養をおこない3週間後にコロニー形成を確認した。するとLohmannらが使用60倍多いコロニーが形成された。

JFH-1株のレプリコンRNAをトランスフェクションした細胞からできたコロニーをクローニングして調べるとJFH-1のレプリコン

RNAが複製していることが確認できた。さらにウイルス蛋白質の発現をウエスタンブロット解析や免疫染色法で確認することができた。また、レプリコンが複製している細胞からレプリコンRNAを抽出してその遺伝子配列を解析したところほとんど変異がないことがわかった。Con1株のレプリコンではHuh7細胞で複製するためには適合変異が必要とされていたが、JFH-1株は適合変異なしで患者から分離された配列のまま高い複製能を保持していると考えられた。

### 5. JFH-1株による ウイルス培養系の構築

Con1株のレプリコンによる解析では、適合

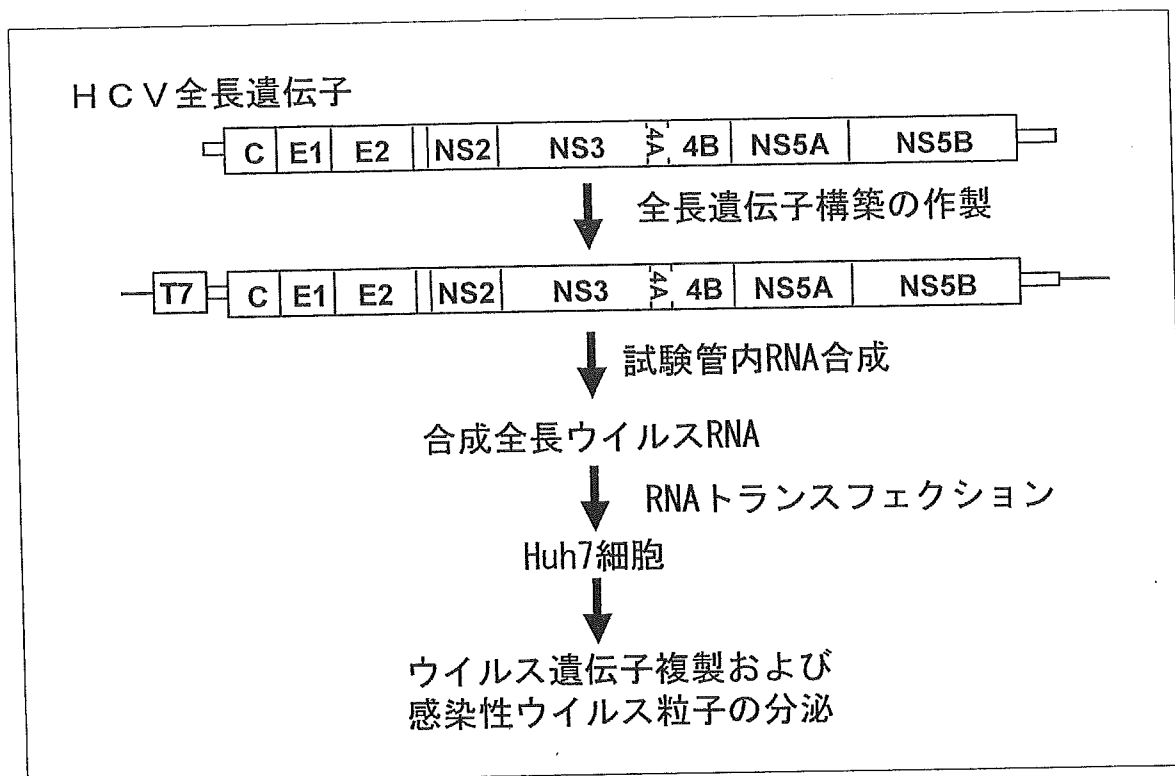


図4 全長ウイルス遺伝子によるウイルス複製系

変異を挿入したウイルス株はHuh7細胞内で効率よく複製するようになる。しかし、同じ適合変異を挿入した全長ウイルス遺伝子をHuh7細胞で複製増殖させてもウイルス粒子は形成されなかった。また、適合変異を挿入した全長ウイルスRNAをチンパンジーに接種したところ感染性が無いことが判明した。従って、Huh7細胞で複製増殖が可能になる適合変異は感染性を失わせることが示された。そこでJFH-1株の全長遺伝子を用いてウイルス粒子形成を試みた。JFH-1株の全長cDNAをT7プロモーターを挿入した構築を作製した(図4)。T7RNAポリメラーゼにより全長ウイルスRNAを合成した。合成したウイルスRNAをエレクトロポレーション法によりHuh7細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞とその培養上清を経時的に

回収して解析した。

まず細胞中のウイルスRNAの複製をノーザンブロット法で解析すると、トランスフェクション後24時間から48時間後にウイルスRNAが増殖していることがわかった。ウイルスの蛋白質もウイルスRNAの複製と同時に発現していることが明らかとなった。さらに培養上清中にもウイルス蛋白質がトランスフェクション後24時間以降に分泌されていた。培養液中のウイルス蛋白質がウイルス粒子の一部であることを確認するためにしょ糖密度勾配法により解析した。

この方法では培養液をしょ糖密度により分画してウイルス蛋白質やウイルスのゲノムRNAが同じ密度にあればウイルス粒子を形成していることを示すことができる。その結果、ウイルスのコア、E1、E2といったウイルス粒



子を形成する蛋白質と、ウイルスのゲノムRNAが密度1.15から1.17g/mlの分画に検出できた。この密度はこれまでに感染患者血液中のウイルス粒子の密度と非常に近い値であった。さらに培養液中のウイルス粒子を超速心法により濃縮して免疫電子顕微鏡法で確認できた。ウイルス粒子の直径は50から60nm程度でこれもこれまでの報告と一致する結果であった。以上の結果から全長ウイルス遺伝子をトランスフェクションすることにより培養上清中にウイルス粒子が分泌されることが明らかとなった。

## 6. ウイルス粒子の感染性

培養液中に分泌されたウイルスがまさにHCVのウイルス粒子そのものであることをさらに確認するために培養細胞とチンパンジーへの感染性を検証した。最初にHuh7細胞への感染性を確認した。トランスフェクションした培養上清を遠心して細胞の断片などを取り除き、フィルターで濾過して、新たなHuh7細胞へ感染させた。感染48時間後に細胞を固定してウイルスに対する特異的な抗体を用いて免疫染色したところ、約0.5%の細胞に感染が確認できた。同じ培養上清をチンパンジーに接種したところ一過性のウイルス血症を検出し、感染を確認することができた。この実験結果からトランスフェクションした培養上清中に分泌されたウイルス粒子は感染性を保持していることが明らかとなった。また、この培養細胞における感染実験系によって慢性肝炎患者血清中に感染中和抗体が存在している

ことも明らかとなった。問題は感染効率が低いことであった。

## 7. HCVウイルス培養系の完成

感染効率が低いのは我々の研究室で使用しているHuh7細胞が原因であった。他の研究室で維持されているHuh7細胞やレプリコン研究の過程で作製されたCured細胞（レプリコン複製効率の向上した細胞）などの中に感染効率の非常に良い細胞があり、感染効率はほぼ100%である。これらの細胞を用いることによりHCVの継代培養が可能となった。さらにウイルス感染による感染フォーカスを算定することによりウイルスの感染力価を決定することができるようになった。この実験系によりHCVの感染、複製増殖、ウイルス粒子形成および分泌というウイルスの生活環を培養細胞で解析が可能となった。

## おわりに

レプリコン実験系によりHCV研究は加速した。現在NS3やNS5Aに対する抗ウイルス薬の開発が急ピッチである。今後はJFH-1株によるウイルス培養系を用いた新たな抗ウイルス薬の開発、ワクチンの開発に拍車がかかることを期待している。またウイルスの基礎研究の面からもこれまで不可能であった、ウイルスの感染複製過程の解析が可能となった。さらに慢性肝炎株と劇症肝炎株の違いについても解析を進めなければならない。

☆ ☆ ☆ ☆

< 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<sup>1,2)</sup>。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<sup>3)</sup>。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<sup>4)</sup>。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てみた。

## 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<sup>5,6)</sup>。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<sup>7)</sup>。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<sup>8)</sup>。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<sup>9)</sup>。HCVのRNAゲノムは約9.6kb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

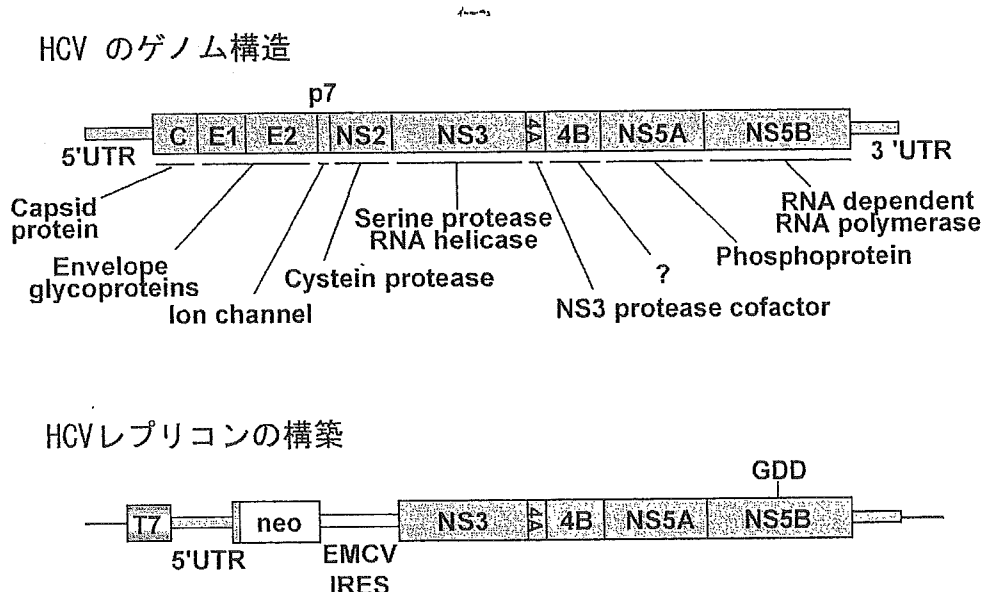


図1 HCVのゲノム構造とHCVレプリコン構築

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<sup>10-12)</sup>。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<sup>13)</sup>。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<sup>14)</sup>。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

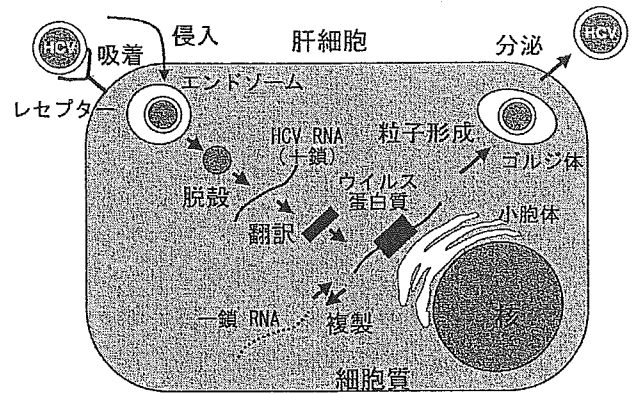


図2 HCVの生活環

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<sup>14)</sup>。

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<sup>15)</sup>。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

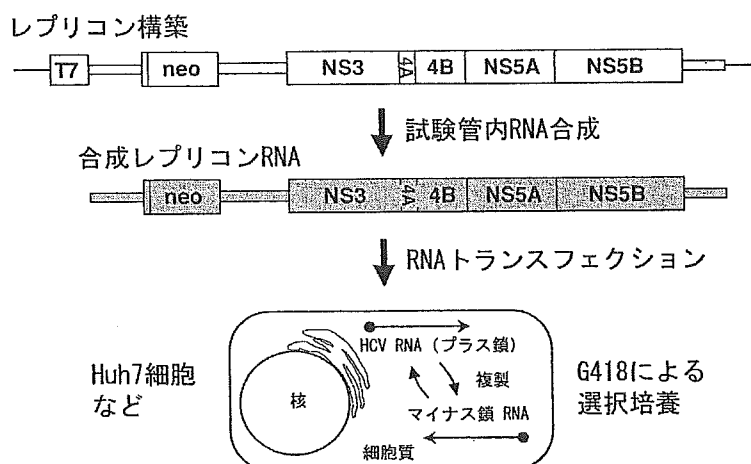


図3 HCVレプリコン実験系の概略

マイシンD存在下でも<sup>3</sup>Hウリジンの取り込みが起こる(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<sup>15)</sup>。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<sup>16)</sup>。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Con1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 $\mu$ gのRNAを $8 \times 10^6$ 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 $4-0.07$  cfu/ $\mu$ g RNA程度と低かった<sup>15)</sup>。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、Con1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<sup>17-22)</sup>。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<sup>17)</sup>。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<sup>17-24)</sup>。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<sup>17)</sup>。さらにadaptive mutationの中には複数を組み合わせることで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<sup>18, 19)</sup>。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<sup>19)</sup>、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<sup>22)</sup>。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<sup>22)</sup>。

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<sup>25-27</sup>)。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<sup>17</sup>)。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<sup>28</sup>)。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<sup>29</sup>)。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<sup>29</sup>)。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<sup>30, 31</sup>)。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<sup>32, 33</sup>)。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<sup>17, 20</sup>)。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<sup>34</sup>)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<sup>20, 35</sup>)。N 株は日本で分離された HCV 株で<sup>36</sup>)、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<sup>37</sup>)。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 抗体が検出されたにとどまった<sup>37</sup>)。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<sup>20, 35</sup>)。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<sup>35)</sup>。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<sup>38)</sup>を用いることにより複製が可能となった<sup>31)</sup>。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<sup>39~42)</sup>。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-BK<sup>39)</sup>、1B-1<sup>43)</sup>、1B-2<sup>44)</sup>、HC-J4<sup>45)</sup>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<sup>46)</sup>。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<sup>47~49)</sup>、HCVも劇症肝炎の原因となるとの報告がされていた<sup>50~53)</sup>。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<sup>54)</sup>。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<sup>53)</sup>。

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hypervaluable 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<sup>46)</sup>。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<sup>46)</sup>。

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<sup>55, 56)</sup>、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<sup>57~64)</sup>。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<sup>59)</sup>。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<sup>65)</sup>。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 1NK 5.1と比較したところ、コロニー形成率はJFH-1株がCon 1NK 5.1よりも約90倍良いことが判明した<sup>66)</sup>。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<sup>67, 68</sup>). 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<sup>66~68</sup>). 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<sup>69</sup>). 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<sup>69</sup>). 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<sup>69</sup>). 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<sup>66</sup>). 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<sup>70</sup>).

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<sup>71~73</sup>). 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<sup>74, 75</sup>). 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<sup>15</sup>). 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<sup>38, 76</sup>). 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<sup>38</sup>).

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<sup>77</sup>). 次いで HEK293 細胞でも複製が報告された<sup>78</sup>). 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<sup>67, 68</sup>). 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<sup>9, 79, 80</sup>). 多くの研究者がまず IFN- $\alpha$  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<sup>17, 20, 21, 40, 44, 76, 81~83</sup>). さらに IFN- $\beta$  や IFN- $\gamma$  もレプリコンの複製を抑制することが報告された<sup>21, 44, 84, 85</sup>).

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<sup>86~88)</sup>。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<sup>89, 90)</sup>や、免疫反応の調節作用<sup>91)</sup>、宿主の GTP 合成酵素 (IMPDH) の阻害など<sup>92)</sup>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<sup>82, 83)</sup>。JFH-1 のレプリコンでは相加的作用を観察した<sup>70)</sup>。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<sup>82, 83, 92)</sup>、JFH-1 のレプリコンでは変異の増加は認められなかった<sup>70)</sup>。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<sup>92)</sup>。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<sup>93)</sup>。

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<sup>94)</sup>。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<sup>95, 96)</sup>。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<sup>97, 98)</sup>。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<sup>99, 100)</sup>。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<sup>101)</sup>。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<sup>103, 104)</sup>。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<sup>105)</sup>。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。Con1 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<sup>30, 35, 38, 76)</sup>。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<sup>106, 107)</sup>。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, Hahn 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) Yoshiba 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 coinfecting 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