

FIG. 3. Effect of mutations introduced into the NS5A C terminus on the production of infectious HCV particles. (A) Intracellular levels of core protein measured at various time points after transfection. A total of 3×10^6 Huh-7 cells were transfected with $10 \mu\text{g}$ of in vitro-transcribed HCV RNAs specified in the inset and resuspended in 10 ml of culture medium, after which 2-ml aliquots were seeded into each well of a six-well culture plate. The cells were harvested at different time points between 4 h and 96 h posttransfection, and then 500 μl of cell lysate per well was prepared. After centrifugation, supernatants were processed for a core protein-specific ELISA. (B) Release of core protein from cells transfected with the HCV genomes specified in the inset. Cell culture supernatants harvested from cells given in panel A were analyzed by a core protein ELISA. (C) Efficiency of core protein release from cells transfected with the HCV genomes specified in the inset. The percent core protein release (vertical axis) indicates the percentage of released core protein in relation to total core protein (the sum of intra- and extracellular core protein) calculated for each time point. (D) Infectivity of virus particles contained in supernatants and cells after transfection with mutants specified below the graph. Culture supernatants and cells were harvested 72 h posttransfection, and extracellular (white bars) and intracellular infectivity (gray bars) levels were determined by TCID_{50} assay. The gray line and arrowhead represent the detection limit of the limiting dilution assay. Mean values and standard deviations for at least triplicates are shown in all panels.

the transfectant with the triple glutamic acid substitution, CL3B/SE, showed similar trends to that of CL3B/SA. In the coimmunoprecipitation experiments with FLAG-tagged core protein and HA-tagged NS5A constructs (Fig. 6C), S2428/2430E, but not S2428/2430A, restored the ability of NS5A to interact with the core protein up to a similar level to that of wild type. As expected, neither CL3B/SE nor CL3B/SA coimmunoprecipitated with the core protein. Taken together, these results indicate that negative charges at aa 2428 and 2430 preserve the ability of NS5A to interact with the core protein and positively regulate virus production. However, the data of the CL3B/SE mutant indicate that it is likely that negative charges alone are not sufficient to enhance either the interaction of NS5A with the core protein or virus production.

Subcellular localization of NS5A and core protein in Huh-7 cells expressing HCV genomes. The coimmunoprecipitation experiments described above indicate that the wild-type NS5A but not the CL3B/SA mutant interacts with the core protein. To evaluate the NS5A-core protein interaction in intact cells, we examined the subcellular localization of NS5A with the core protein by immunofluorescence analysis. NS5A colocalized with the core protein in cells transfected with the JFH-1 wild type (Fig. 7A), whereas their colocalization was rarely observed in cells transfected with the CL3B/SA RNA (Fig. 7B).

To further analyze the subcellular compartments for the localization of NS5A and core protein in cytoplasmic membrane structures, including the endoplasmic reticulum (ER) and LDS, we performed subcellular fractionation studies as

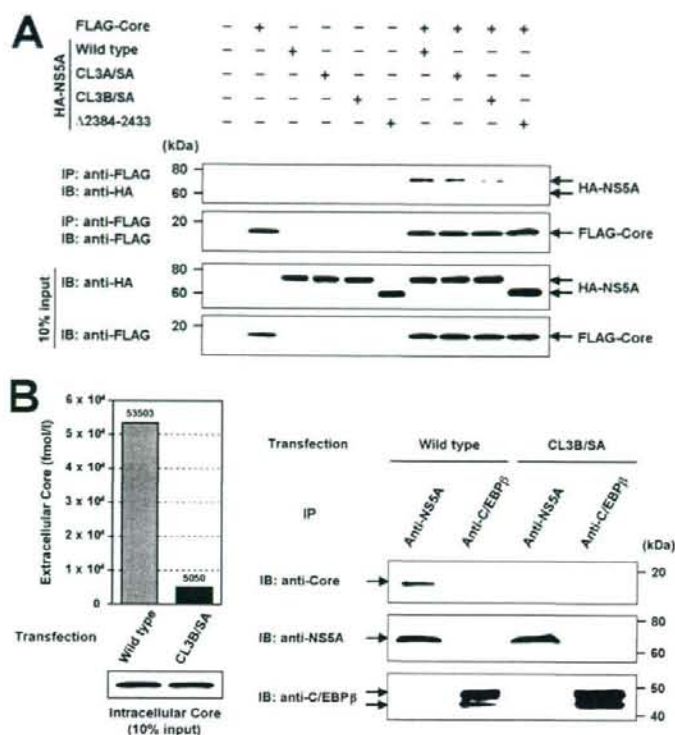


FIG. 4. aa 2428, 2430, and 2433 are essential for the interaction between NS5A and the core protein. (A) Effect of mutations at the NS5A C terminus on the interaction of NS5A with the core protein. N-terminally FLAG-tagged core protein and N-terminally HA-tagged NS5A carrying defined mutations were coexpressed in Huh-7 cells and immunoprecipitated with anti-FLAG antibody. The resulting precipitates were examined by immunoblotting using anti-HA or FLAG antibody. One-tenth of the cell lysates used in IP is shown as the 10% input. (B) Interaction between NS5A and the core protein in HCV-replicating cells. Huh-7 cells were lysed 72 h after transfection of the in vitro transcript of the HCV genome (wild type or CL3B/SA) and were immunoprecipitated with anti-NS5A antibody or anti-C/EBP β antibody as a negative control. The resulting precipitates were examined by immunoblotting using anti-core protein, NS5A, or C/EBP β antibody. One-tenth of cell lysates used in IP was immunoblotted with anti-core protein antibody (10% input). Cell culture supernatants harvested from transfected cells were analyzed by a core protein ELISA in parallel. IB, immunoblotting.

described in Materials and Methods. The iodixanol gradient was collected from the top to the bottom into 12 fractions (fractions 1 to 12). As shown in Fig. 7C, an ER marker, calnexin, was found in fractions 7 to 12 and was localized primarily in fractions 11 and 12. In contrast, ADRP, a cellular marker for LDs, was mainly observed in fractions 4 to 7. These two markers were equally distributed among cells analyzed (data not shown). The distribution of the wild-type NS5A was found in fractions 4 to 7, which was parallel to the fractionation profile of ADRP. The CL3B/SA-mutated NS5A was more broadly distributed and was also observed in heavier fractions than the wild-type NS5A, which was analogous to distribution of NS5A expressed in JFH1/4-1 cells bearing subgenomic replicons. The core protein in cells expressing the JFH1 wild type, the CL3B/SA mutant, and in Huh7c-p7 cells that express JFH1 structural proteins was distributed in a similar fashion, indicating that the distribution of core protein is not affected by NS5A mutation. The fractionation profile of the core protein, with a peak in fraction 4 or 5, was similar to that of the wild-type

NS5A or ADRP but not to that of the CL3B/SA-mutated NS5A or calnexin, suggesting that core protein interacts with the wild-type NS5A in LD fractions, which is consistent with previous reports (33, 44, 45).

NS5A-core protein interaction is important for association of the core protein with the viral genomic RNA. To further address our hypothesis regarding involvement of NS5A in recruiting viral RNA to nucleocapsid formation, we analyzed the association of the core protein with HCV RNA in wild-type- or CL3B/SA-expressing cells by IP-RT-PCR (Fig. 8). Both cell lysates were immunoprecipitated with an anti-core protein antibody or a negative control, mouse IgG. Total RNA prepared from each immunoprecipitate was subjected to RT-PCR in order to detect HCV RNA. The amounts of immunoprecipitated core protein (Fig. 8, lower panel) as well as the expression of HCV RNA (Fig. 8, upper panels, Input) were comparable in both cells. In cells expressing the wild-type JFH1 genome, the viral RNAs covering the 5' terminal 2.2-kb as well as the 3' terminal 2.2-kb regions were detected in immunopre-

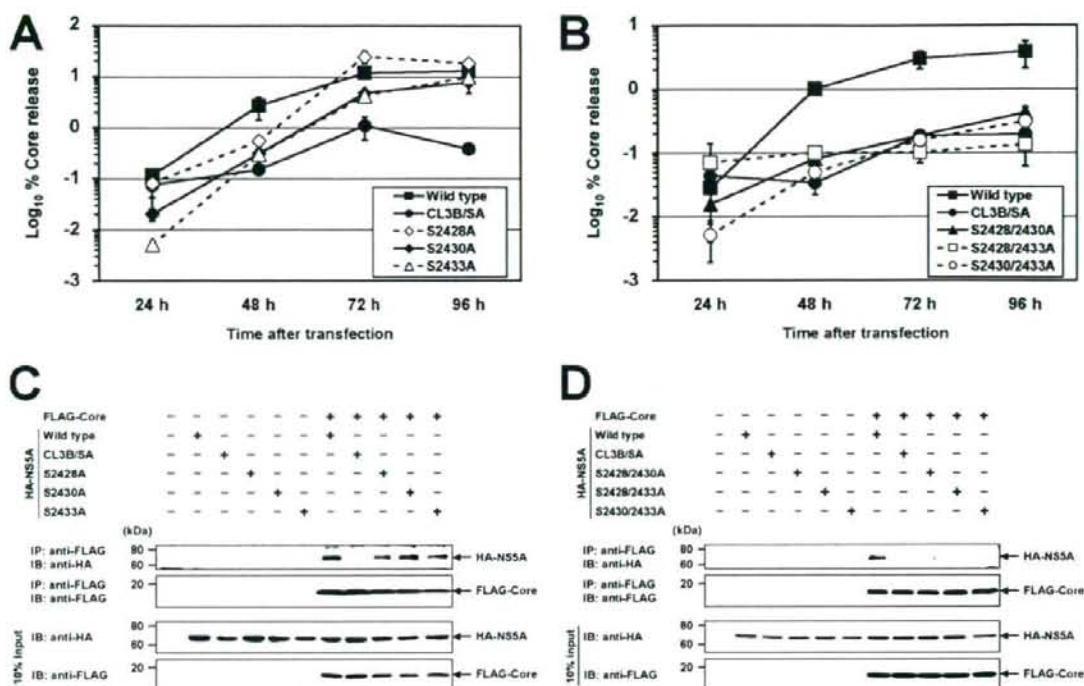


FIG. 5. Determination of critical amino acids responsible for virus production and the interaction of NSSA with the core protein. (A and B) Effect of single or double serine-to-alanine substitutions on virus production. After transfection of *in vitro* transcripts of the HCV genomes specified in the inset into Huh-7 cells, the cells and culture supernatants were harvested at the time points given, and the amounts of the core protein were determined by core protein-specific ELISA. Percent core protein release (vertical axis) indicates the percentage of released core protein in relation to total core protein (the sum of intra- and extracellular core protein) calculated for each time point. Mean values and standard deviations for at least triplicate experiments are shown. (C and D) Effect of single or double serine-to-alanine substitutions on the interaction between NSSA and the core protein. N-terminally FLAG-tagged core protein and N-terminally HA-tagged NSSA carrying defined mutations were coexpressed in Huh-7 cells and immunoprecipitated with anti-FLAG antibody. The resulting precipitates were examined by immunoblotting using anti-HA or FLAG antibody. One-tenth of the cell lysates used in IP is shown as the 10% input. IB, immunoblotting.

precipitates obtained with the anti-core protein antibody but not with the mouse IgG. In contrast, in cells expressing the CL3B/SA genome, HCV RNA was not detected in the immunoprecipitates with either antibody. These results demonstrate that HCV RNA associates with the core protein in cells where NSSA interacts with core protein (JFH-1 wild type) but not in cells where their interaction is impaired (CL3B/SA).

DISCUSSION

In the present study, we demonstrated the involvement of NSSA in the production of HCV particles via the interaction of NSSA with the core protein and identified its C-terminal serine cluster 3-B (aa 2428, 2430, and 2433), which is implicated in basal phosphorylation, as a key element for the interaction of NSSA with the core protein and for infectious virus production. Serine-to-alanine substitutions at the cluster, which have no impact on viral RNA replication, inhibit the interaction between NSSA and the core protein, thereby indicating that there is a connection between NSSA-core protein association and virus production. Finally, CL3B mutation leads to impair-

ment of the association of the core protein with HCV RNA and, therefore, possibly RNA encapsidation.

Several reports have indicated that viral NS proteins are involved in the virion assembly of *Flaviviridae* viruses (25, 29, 30, 33). For instance, mutations in yellow fever virus NS2A block production of infectious virus, and this perturbation can be released by a suppressor mutation in NS3 (25), while the hydrophobic residues of Kunjin virus NS2A required for virus assembly have been mapped (26). Miyazaki et al. have shown that HCV core protein recruits NS proteins to the LD-associated membranes and that the NS proteins around the LDs participate in the assembly of infectious viral particles (33). Furthermore, during preparation of the current article, two studies regarding participation of NSSA in the assembly of HCV particles were published. Appel et al. have demonstrated the essential role of domain III of NSSA in the formation of infectious particles, and deletions in this domain that disrupt colocalization of NSSA and the core protein abrogate virion production (2). Tellinghuisen et al. identified a serine residue in domain III as a key determinant for viral particle production

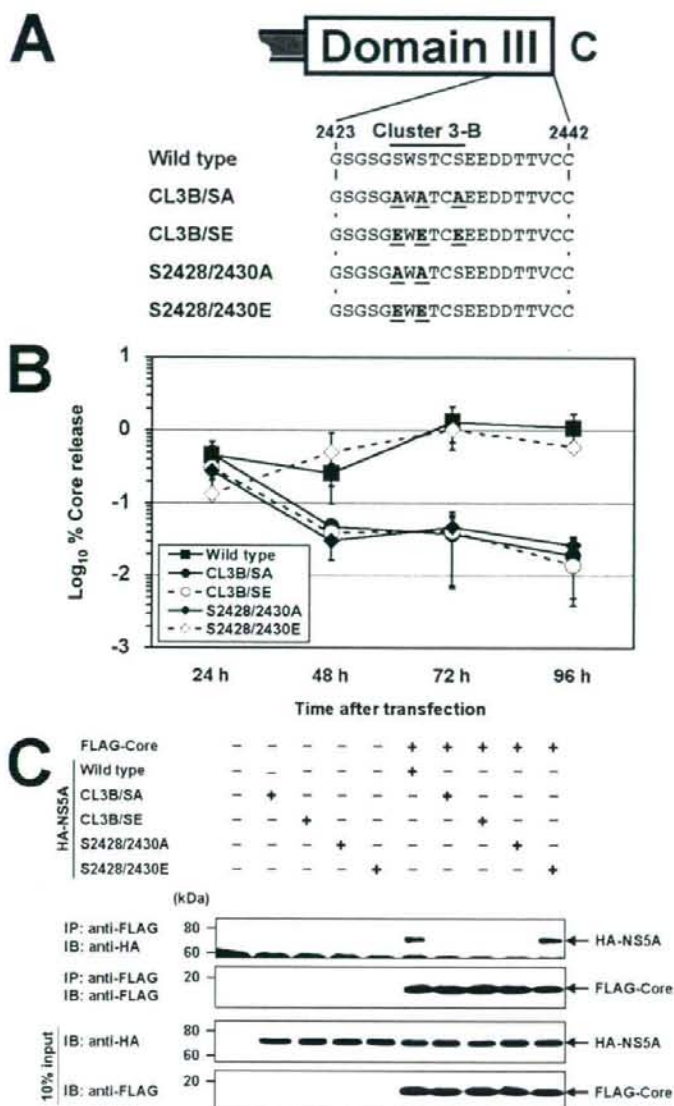


FIG. 6. Effect of glutamic acid substitutions for phosphoserines at aa 2428, 2430, and 2433 on virus production and the interaction of NS5A with the core protein. (A) Alanine or glutamic acid substitutions for serine residues at aa 2428, 2430, and 2433. The numbers indicate amino acid positions within the polyprotein of the JFH-1 isolate. The names shown on the left represent full-length HCV or N-terminally HA-tagged NS5A constructs used in this experiment. Amino acid substitutions are marked in bold and underlined. C represents the C terminus. (B) Effect of alanine or glutamic acid substitutions on virus production. After transfection of *in vitro* transcripts of the HCV genomes specified in the inset into Huh-7 cells, the cells and the culture supernatants were harvested at the time points given, and the amounts of core protein were determined by core protein-specific ELISA. Percent core protein release (vertical axis) indicates the percentage of released core protein in relation to total core protein (the sum of intra- and extracellular core protein) calculated for each time point. Mean values and standard deviations for at least triplicate experiments are shown. (C) Effect of alanine or glutamic acid substitutions on the interaction between NS5A and the core protein. N-terminally FLAG-tagged core protein and N-terminally HA-tagged NS5A carrying defined mutations were coexpressed in Huh-7 cells and immunoprecipitated with anti-FLAG antibody. The resulting precipitates were examined by immunoblotting (IB) using anti-HA or FLAG antibody. One-tenth of the cell lysates used in IP is as shown as the 10% input.

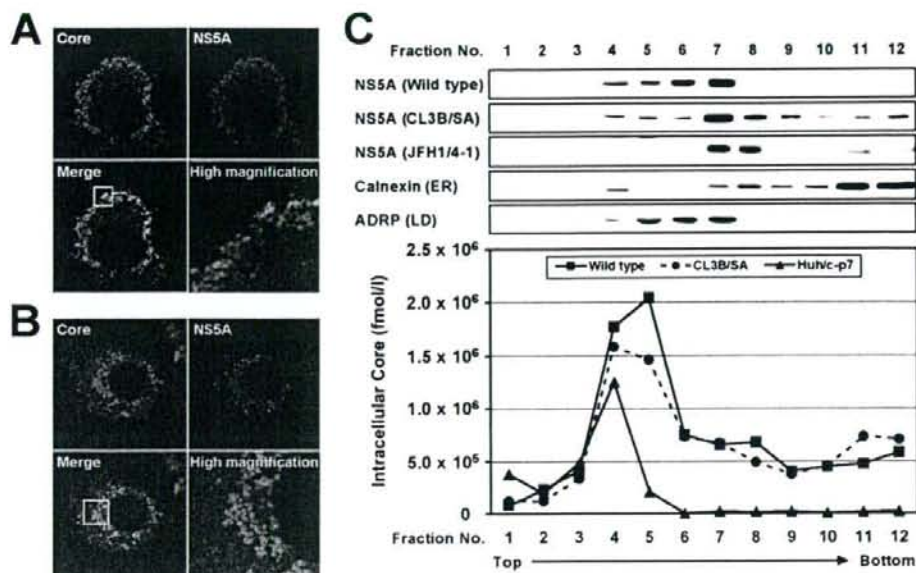


FIG. 7. Subcellular localization of NS5A and the core protein in HCV-replicating cells. Huh-7 cells were transfected with the *in vitro* transcript of the HCV genome, wild type (A) or CL3B/SA (B). Seventy-two hours after transfection, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.3% Triton X-100, and double stained with antibodies against the core protein (green) and NS5A (red), followed by staining with an Alexa Fluor 488- or Alexa Fluor 555-conjugated antibody. High-magnification panels are enlarged images of white squares in the merge panels. (C) HCV (wild type or CL3B/SA)-replicating cells, JFH1/4-1 cells harboring a subgenomic replicon of JFH1, or Huhc-p7 cells stably expressing JFH1 structural proteins were lysed by freeze-thawing, and the cell lysates were fractionated on 5 to 25% iodixanol gradients. The distributions of NS5A, calnexin (ER marker), and ADRP (LD marker) were determined by immunoblotting, and those of the core protein were examined by core protein-specific ELISA.

(50). However, the mechanism by which NS proteins participate in virus assembly or the role of the interaction between structural and NS proteins in virus life cycles has not been fully elucidated. Here, we have clearly demonstrated that HCV NS5A interacts with the core protein in coimmunoprecipitation experiments not only with coexpression of each epitope-tagged protein but also with cells expressing the viral genome; and by using immunofluorescence and subcellular fractionation analysis, we have confirmed that mutations in CL3B abolish colocalization of NS5A and the core protein, presumably around LDs. In addition, the intracellular infectivity assay and IP-RT-PCR strongly suggest that impairment of the NS5A-core protein interaction results in disruption of virus production at an early stage of virion assembly. On the basis of the present results and findings in accompanying articles, one may infer the following events: newly synthesized HCV RNAs bound to NS5A are released from the replication complex-containing membrane compartment and can be captured by the core protein via interaction with domain III of NS5A at the surface of LDs or LD-associated membranes. Consequently, the viral RNAs are encapsidated, and virion assembly proceeds in the local environment. Recruitment of newly synthesized viral RNAs to the core protein could be important for efficient nucleocapsid formation in cells, where concentrations of the viral genome and the structural proteins are typically low, and may contribute to the selection of the viral genome to be

packaged. Interaction between NS5A and the core protein has been previously reported, and the NS5A region containing an interferon sensitivity determining region and the PKR-binding sequence (aa 2212 to 2330) has been mapped to that required for binding with core protein by yeast two-hybrid and *in vitro* pull-down assays (13). However, involvement of domain III in the NS5A-core protein interaction was not analyzed in detail, and a role for the NS5A-core protein interaction in the HCV life cycle was not examined in that study.

A growing body of evidence points to phosphorylation of NS5A as being important in controlling HCV RNA replication. Although the degree and the requirement for its hyperphosphorylation diverge between different HCV isolates, mutations that are associated with increased replicative fitness of HCV replicons frequently lead to a reduced level of NS5A hyperphosphorylation (1, 5, 36). Inhibitors of serine/threonine protein kinases that block NS5A hyperphosphorylation facilitate replication of a non-culture-adapted replicon (3, 36). One model that has been proposed suggests that NS5A hyperphosphorylation negatively regulates HCV RNA replication by disrupting the interaction between NS5A and the vesicle-associated membrane protein-associated protein subtype A, a cellular factor considered necessary for efficient RNA replication (5). However, the regulatory role of the basal phosphorylation of NS5A in the viral life cycle is poorly understood. It has been reported that the C-terminal region of NS5A (aa 2350 to 2419)

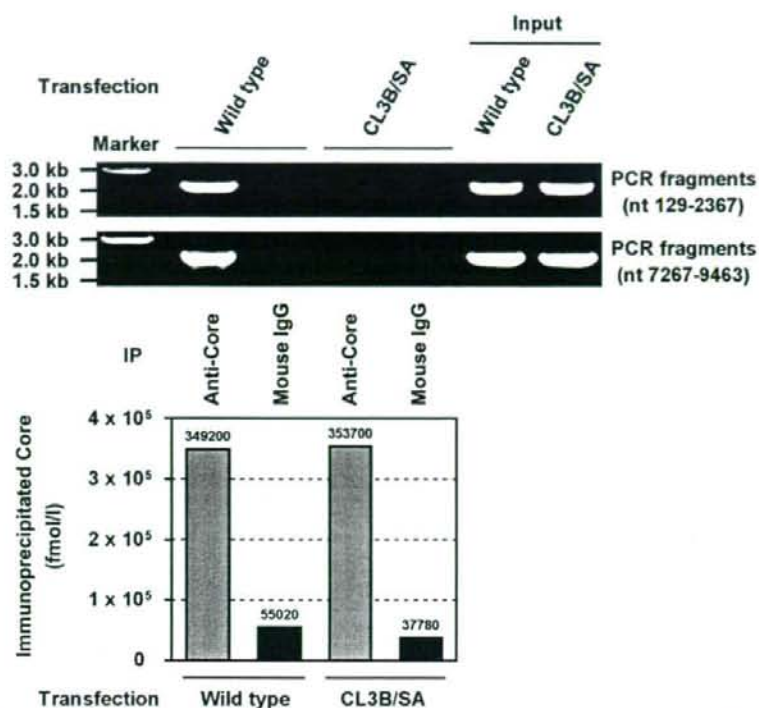


FIG. 8. IP-RT-PCR of HCV-replicating cells performed to examine the association between the core protein and the HCV genome RNA. Huh-7 cells were transfected with the *in vitro* transcript of the HCV genome (wild type or CL3B/SA) and lysed in 500 μ l of hypotonic buffer at 72 h posttransfection. After IP with an anti-core protein antibody or mouse IgG, immunoprecipitates were eluted in 100 μ l of elution buffer. RNAs in immunocomplexes were isolated by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. PCR was carried out as described in Materials and Methods with primer sets amplifying the fragments of nt 129 to 2367 and nt 7267 to 9463 of the JFH-1 genome. One-tenth (10 μ l) of each eluted immunoprecipitate was used for assays of the core protein amounts to ensure IP efficiency (lower panel). RNA extracted from a small aliquot of each cell lysate used in IP-RT-PCR is shown as the input.

is involved in basal phosphorylation (23). There are highly conserved serine residues in this region, and alanine substitutions or in-frame deletion of the serine residues has been shown to impair basal phosphorylation but not to affect RNA replication in the genotype 1b isolate (1). Consistently, a metabolic 32 P labeling experiment in the present study demonstrated that NS5A mutants of the JFH-1 isolate in the region impair the basal phosphorylation. Nevertheless, Tellinghuisen et al. noted that the serine at aa 2433 of JFH-1 is involved in generating hyperphosphorylated NS5A, as shown by Western blotting (50). The basis for this difference is uncertain. To date, there is no clear evidence to determine which serine residues located in domain III are phosphoacceptor sites or whether these residues influence NS5A phosphorylation in an indirect fashion. Future study to map phosphoacceptor sites in the NS5A domain III by biochemical approaches is needed.

We found that two of the three serine residues at CL3B are responsible for regulating the interaction of NS5A with the core protein as well as for infectious virus production. To further evaluate the effect of constitutive serine phosphorylation at the cluster, we replaced the serine residues with glu-

tamic acid, which mimics the presence of phosphoserines. The S2428/2430E mutant led to restoration of the interaction of NS5A with the core protein and virus production up to levels similar to the wild type. Somewhat unexpectedly, the triple glutamic acid substitution (CL3B/SE) exhibited only a slight restoration effect or none at all. It is considered that the degree of negative charge on the glutamic acid residue is not completely equivalent to that of phosphoserine. It is likely that the range of acidity at the local environment of the NS5A domain III that will allow interaction with the core protein is rather narrow. Induction of a conformational change in NS5A by the incorporation of phosphate may also be important for its interaction with the core protein. Tellinghuisen et al. reported that a single serine-to-alanine substitution at aa 2433 blocks the production of infectious virus and that casein kinase II likely phosphorylates the residue (50). Although this seems inconsistent with our results, these investigators also showed that deletions producing a lack of all three serine residues in the cluster inhibited virus production more severely than a single mutation. We observed that a single substitution of S2428A, S2430A, or S2433A resulted in a moderate decrease

in the virus released from the transfected cells; however, more evident perturbation was obtained from double or triple substitutions (Fig. 5A and B). Tellinghuisen et al. determined the HCV production at 48 h after RNA transfection and found a marked inhibition by the single substitution S2433A. In our study, as indicated in Fig. 5A, the reduction caused by the S2433A mutant was approximately 90% at 48 h after transfection; however, the virus production from the mutant reached a similar level to that of the wild type at 96 h posttransfection.

Several previous studies have found that apolipoproteins B (apoB) and E (apoE), microsomal triglyceride transfer protein, and HCV p7 protein are key factors for production of the infectious HCV particles (4, 11, 16, 22, 47). Assembly and maturation of the viral particles appear to depend on the formation of very-low-density lipoprotein, a large particle containing apoB, apoE, and large amounts of neutral lipids in hepatic cells. p7 protein is primarily involved in a late step of virus particle production, and the findings support the idea that p7 acts as viroporin, which has the capacity to compromise cell membrane integrity and thus favors the release of viral progeny. How the early step in virion production regulated by the NS5A-core protein interaction links with the later step(s) involved in the very-low-density lipoprotein assembly or p7 function remains an interesting question to be addressed.

In summary, we demonstrated that the C-terminal serine cluster of NS5A (aa 2428, 2430, and 2433), which is involved in generating the basal phosphorylated form, is a determinant of NS5A interaction with the core protein and the subcellular localization of NS5A. Mutation of this cluster blocks the NS5A-core protein interaction, resulting in perturbation of association between the core protein and HCV RNA. It is thus tempting to consider that NS5A plays a key role in transporting the viral genome RNA synthesized by the replication complex to the surface of LDs or LD-associated membranes, where the core protein localizes, leading to facilitation of nucleocapsid formation. Structural analysis of the NS5A domain III-core protein complex should provide greater insight into the mode of interaction between these viral proteins. Identification of residues at the interface that are involved in important interactions will be of significant value in designing novel structure-based inhibitors to block the early step of HCV particle formation.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Francis V. Chisari (The Scripps Research Institute) for providing Huh-7 cells. We thank M. Matsuda, S. Yoshizaki, T. Shimoi, M. Kaga, and M. Sasaki for technical assistance and T. Mizoguchi for secretarial work.

This work was supported by Grants-in-Aid from the Ministry of Health, Labor and Welfare; by the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the Organization for Drug ADR Relief, R&D Promotion and Product Review of Japan (grant ID:01-3); by the Japan Society for the Promotion of Science; and by Research on Health Sciences focusing on Drug Innovation from the Japan Health Sciences Foundation, Japan. T.M. is the recipient of a Research Resident Fellowship from the Foundation for Promotion of Cancer Research in Japan.

REFERENCES

- Appel, N., T. Pietschmann, and R. Bartenschlager. 2005. Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J. Virol.* 79:3187-3194.

- Appel, N., M. Zayas, S. Miller, J. Krijnse-Lucker, T. Schaller, P. Friebe, S. Kallis, U. Engel, and R. Bartenschlager. 2008. Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog.* 4:e1000035.
- Bürckstümmer, T., M. Kriegs, J. Lupberger, E. K. Pauli, S. Schmittl, and E. Hildt. 2006. Raf-1 kinase associates with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *FEBS Lett.* 580:575-580.
- Chang, K. S., J. Jiang, Z. Cai, and G. Luo. 2007. Human apolipoprotein E is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J. Virol.* 81:13783-13793.
- Evans, M. J., C. M. Rice, and S. P. Goff. 2004. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:13038-13043.
- Gale, M., Jr., C. M. Blakely, B. Kwieciszewski, S. L. Tan, M. Dossett, N. M. Tang, M. J. Korth, S. J. Polyak, D. R. Gretch, and M. G. Katze. 1998. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol. Cell. Biol.* 18:5208-5218.
- Gale, M., Jr., and M. G. Katze. 1998. Molecular mechanisms of interferon resistance mediated by viral-directed inhibition of PKR, the interferon-induced protein kinase. *Pharmacol. Ther.* 78:29-46.
- Gale, M., Jr., B. Kwieciszewski, M. Dossett, H. Nakao, and M. G. Katze. 1999. Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase. *J. Virol.* 73:6506-6516.
- Gale, M. J., Jr., M. J. Korth, and M. G. Katze. 1998. Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. *Clin. Diagn. Virol.* 10:157-162.
- Gale, M. J., Jr., M. J. Korth, N. M. Tang, S. L. Tan, D. A. Hopkins, T. E. Dever, S. J. Polyak, D. R. Gretch, and M. G. Katze. 1997. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 230:217-227.
- Gastaminza, P., G. Cheng, S. Wieland, J. Zhong, W. Liao, and F. V. Chisari. 2008. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J. Virol.* 82:2120-2129.
- Gastaminza, P., S. B. Kapadia, and F. V. Chisari. 2006. Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *J. Virol.* 80:11074-11081.
- Goh, P. Y., Y. J. Tan, S. P. Lim, S. G. Lim, Y. H. Tan, and W. J. Hong. 2001. The hepatitis C virus core protein interacts with NS5A and activates its caspase-mediated proteolytic cleavage. *Virology* 290:224-236.
- Hicke, L., B. Zanolari, and H. Riezman. 1998. Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J. Cell Biol.* 141:349-358.
- Hoodnagle, J. H. 2002. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 36:821-829.
- Huang, H., F. Sun, D. M. Owen, W. Li, Y. Chen, M. Gale, Jr., and J. Ye. 2007. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:5848-5853.
- Huang, L., J. Huang, S. D. Sharma, M. R. Hargittai, Y. Chen, J. J. Arnold, K. D. Raney, and C. E. Cameron. 2005. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* 280:36417-36428.
- Ishii, K., K. Murakami, S. S. Imwe, B. Zhang, J. Li, M. Shirakura, K. Morikawa, R. Suzuki, T. Miyamura, T. Wakita, and T. Suzuki. 2008. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371:446-450.
- Ishii, K., Y. Ueda, K. Matsuo, Y. Matsura, T. Kitamura, K. Kato, Y. Izumi, K. Someya, T. Ohno, M. Honda, and T. Miyamura. 2002. Structural analysis of vaccinia virus Dls strain: application as a new replication-deficient viral vector. *Virology* 302:433-444.
- Jesch, S. A., A. J. Mehta, M. Velliste, R. F. Murphy, and A. D. Linstedt. 2001. Mitotic Golgi is in a dynamic equilibrium between clustered and free vesicles independent of the ER. *Traffic* 2:873-884.
- Johnson, R. F., S. E. McCarthy, P. J. Godlewski, and R. N. Harty. 2006. Ebola virus VP30-VP40 interaction is sufficient for packaging 3'-5' mini-genome RNA into virus-like particles. *J. Virol.* 80:5135-5144.
- Jones, C. T., C. L. Murray, D. K. Eastman, J. Tassello, and C. M. Rice. 2007. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J. Virol.* 81:5374-5383.
- Kaneko, T., Y. Tanji, S. Satoh, M. Hijikata, S. Asabe, K. Kimura, and K. Shimotohno. 1994. Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C virus genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205:320-326.
- Kato, T., T. Date, M. Miyamoto, M. Sugiyama, Y. Tanaka, E. Orito, T. Ohno, K. Sugihara, I. Hasegawa, K. Fujiwara, K. Ito, A. Ozasa, M. Mizokami, and T. Wakita. 2005. Detection of anti-hepatitis C virus effects of interferon and ribavirin by a sensitive replicon system. *J. Clin. Microbiol.* 43:5679-5684.
- Kümmerer, B. M., and C. M. Rice. 2002. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J. Virol.* 76:4773-4784.

26. Leung, J. Y., G. P. Pijlman, N. Kondratieva, J. Hyde, J. M. Mackenzie, and A. A. Khromykh. 2008. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *J. Virol.* **82**:4731–4741.
27. Liang, T. J., B. Rehmann, L. B. Seeff, and J. H. Hoofnagle. 2000. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann. Intern. Med.* **132**:296–305.
28. Lindensch, B. D., M. J. Evans, A. J. Syder, B. Wolk, T. L. Tellinghuisen, C. C. Liu, T. Maruyama, R. O. Hynes, D. R. Burton, J. A. McKeating, and C. M. Rice. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**:623–626.
29. Liu, W. J., H. B. Chen, and A. A. Khromykh. 2003. Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. *J. Virol.* **77**:7804–7813.
30. Liu, W. J., P. L. Sedlak, N. Kondratieva, and A. A. Khromykh. 2002. Complementation analysis of the flavivirus Kunjin NS3 and NS5 proteins defines the minimal regions essential for formation of a replication complex and shows a requirement of NS3 *in cis* for virus assembly. *J. Virol.* **76**:10766–10775.
31. Manns, M. P., H. Wedemeyer, and M. Cornberg. 2006. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut* **55**:1350–1359.
32. Miyamoto, M., T. Kato, T. Date, M. Mizokami, and T. Wakita. 2006. Comparison between subgenomic replicons of hepatitis C virus genotypes 2a (JFH-1) and 1b (Con1 NK5.1). *Intervirology* **49**:37–43.
33. Miyazaki, Y., K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watahi, T. Hishiki, M. Zayas, R. Bartenschlager, T. Wakita, M. Hijikata, and K. Shimotohno. 2007. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* **9**:1089–1097.
34. Moradpour, D., M. J. Evans, R. Gosert, Z. Yuan, H. E. Blum, S. P. Goff, B. D. Lindenbach, and C. M. Rice. 2004. Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes. *J. Virol.* **78**:7406–7409.
35. Murakami, K., T. Kimura, M. Osaki, K. Ishii, T. Miyamura, T. Suzuki, T. Wakita, and I. Shoji. 2008. Virological characterization of the hepatitis C virus JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J. Gen. Virol.* **89**:1587–1592.
36. National Institutes of Health. 2002. NIH consensus statement on management of hepatitis C. *NIH Consens. State. Sci. Statements* **19**:1–46.
37. Neddermann, P., M. Quintavalle, C. Di Pietro, A. Clementi, M. Cerretani, S. Altamura, L. Bartholomew, and R. De Francesco. 2004. Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture. *J. Virol.* **78**:13306–13314.
38. Niwa, H., K. Yamamura, and J. Miyazaki. 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**:193–199.
39. Pawlotsky, J. M. 1999. Hepatitis C virus (HCV) NS5A protein: role in HCV replication and resistance to interferon- α . *J. Viral Hepat.* **6**(Suppl. 1): 47–48.
40. Pawlotsky, J. M., G. Germanidis, A. U. Neumann, M. Pellerin, P. O. Fraissin, and D. Dhumeaux. 1998. Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J. Virol.* **72**:2795–2805.
41. Poyard, T., M. F. Yuen, V. Ratzin, and C. L. Lai. 2003. Viral hepatitis C. *Lancet* **362**:2095–2100.
42. Schaller, T., N. Appel, G. Kontosidakis, S. Kallis, V. Lohmann, T. Pietschmann, and R. Bartenschlager. 2007. Analysis of hepatitis C virus superinfection exclusion by using novel fluorochrome gene-tagged viral genomes. *J. Virol.* **81**:4591–4603.
43. Seeff, L. B., and J. H. Hoofnagle. 2003. Appendix: The National Institutes of Health Consensus Development Conference: management of hepatitis C 2002. *Clin. Liver Dis.* **7**:261–287.
44. Seeff, L. B., and J. H. Hoofnagle. 2002. National Institutes of Health Consensus Development Conference: management of hepatitis C: 2002. *Hepatology* **36**:S1–S2.
45. Shavinskaya, A., S. Boulant, F. Penin, J. McLauchlan, and R. Bartenschlager. 2007. The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J. Biol. Chem.* **282**:37159–37169.
46. Shi, S. T., S. J. Polyak, H. Tu, D. R. Taylor, D. R. Gretch, and M. M. Lai. 2002. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology* **292**:198–210.
47. Shirakura, M., K. Murakami, T. Ichimura, R. Suzuki, T. Shimoji, K. Fukuda, K. Abe, S. Sato, M. Fukasawa, Y. Yamakawa, M. Nishijima, K. Moriishi, Y. Matsunaga, T. Wakita, T. Suzuki, P. M. Howley, T. Miyamura, and I. Shoji. 2007. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitination and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* **81**:1174–1185.
48. Steinmann, E., F. Penin, S. Kallis, A. H. Patel, R. Bartenschlager, and T. Pietschmann. 2007. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog.* **3**:e103.
49. Tan, S. L., and M. G. Katze. 2001. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology* **284**:1–12.
50. Tanji, Y., T. Kaneko, S. Satoh, and K. Shimotohno. 1995. Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A. *J. Virol.* **69**:3980–3986.
51. Tellinghuisen, T. L., K. L. Foss, and J. Treadaway. 2008. Regulation of hepatitis C virus production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog.* **4**:e1000032.
52. Tellinghuisen, T. L., K. L. Foss, J. C. Treadaway, and C. M. Rice. 2008. Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein. *J. Virol.* **82**:1073–1083.
53. Tellinghuisen, T. L., J. Marcotrigiano, A. E. Gorbalenya, and C. M. Rice. 2004. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J. Biol. Chem.* **279**:48576–48587.
54. Tellinghuisen, T. L., J. Marcotrigiano, and C. M. Rice. 2005. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* **435**:374–379.
55. van den Hoff, M. J., A. F. Moorman, and W. H. Lamers. 1992. Electroporation in "intracellular" buffer increases cell survival. *Nucleic Acids Res.* **20**:2902.
56. van Regenmortel, M. H. V., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner (eds.). 2000. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, CA.
57. Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H. G. Krausslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and T. J. Liang. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* **11**:791–796.
58. Watanabe, K., M. Hijikata, A. Tagawa, T. Doi, H. Marusawa, and K. Shimotohno. 2003. Modulation of retinoid signaling by a cytoplasmic viral protein via sequestration of Sp110b, a potent transcriptional corepressor of retinoic acid receptor, from the nucleus. *Mol. Cell Biol.* **23**:7498–7509.
59. Zhong, J., P. Gastaminza, G. Cheng, S. Kapatia, T. Kato, D. R. Burton, S. F. Wieland, S. L. Uprichard, T. Wakita, and F. V. Chisari. 2005. Robust hepatitis C virus infection *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:9294–9299.

特集2 C型肝炎ウイルスによる
発症機構とその治療

3. C型肝炎ウイルスの感染粒子形成機構

鈴木 哲朗, 政木 隆博, 相崎 英樹

国立感染症研究所ウイルス第二部

効率のよいウイルス産生細胞系が確立されていなかったため、C型肝炎ウイルス (HCV) の生活環研究の中で感染粒子の形成機構に関する解析は最も遅れていた。JFH-1株の出現により、感染から分泌までウイルス生活環全体に亘る解析が可能となり、粒子形成の分子機構研究が大きな展開を見せている。細胞内の脂肪滴及びその周辺の膜構造が粒子形成の場として働くことが示された。我々は、ゲノム複製調節に関与することが知られていた HCV 非構造蛋白 NS5A が粒子形成にも関与することを示し、粒子形成の初期過程において、新たに作られたウイルス RNA が NS5A 蛋白によって捕捉され、更にこの NS5A-HCV RNA 複合体が Core 蛋白と会合することが RNA パッケージングの引き金になるというモデルを提唱した。また、感染性粒子表面のコレステロール、スフィンゴ脂質が粒子構造の維持、感染性に重要であることを示す知見を得た。ウイルス非構造蛋白、脂質、脂質結合因子が HCV 粒子のアセンブリー、輸送などにどのように関与しているかを明らかにすることが粒子形成機構研究の鍵になるものと思われる。

はじめに

「レプリコンシステム」「シュードタイプウイルス」[JFH-1株] これらはこの10年間のHCV研究の進展に大きく寄与した実験手法、研究材料である。HCVの生活環に関する基礎研究は、効率のよい培養細胞系が確立されていなかったため必ずしも順調には進んでいなかった。1999年にはじめてHCV RNA複製実験系としてレプリコンシステムが導入され、ゲノム複製機構に関する研究が大きな進展をみせた。また、レトロウイルスまたは水疱性口内炎ウイルスのエンベロープ蛋白質を欠損させ、代わりにHCVのエンベロープ蛋白質を持ったシュードタイプウイルスは感染モデルとして有用であることがわかった。そして2005年、HCV JFH-1株を用いた効率のよい感染増殖細胞系が確立されるに至り、長らく困難を極めた感染から分泌まで

の全ステップの分子機構の研究が可能となった。

HCV 培養細胞系の試みと感染増殖細胞系の樹立

C型肝炎患者血清中のHCVを培養細胞に感染させウイルス増殖細胞系を作製する方法はHCVゲノム発見当初から試みられてきた。生体内での標的細胞である肝細胞を由来とする細胞株、またリンパ球系細胞で数多く感染、複製が調べられたが、観察できるウイルス量は低いレベルであり、詳細なウイルス研究への応用は難しい状況であった。我々は、三次元化細胞培養システムであるラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) 及び温度感受性ハイドルゲル (TGP) を利用してHCV培養細胞系の構築を行った。単層培養系に比べより本来の肝組織に近い立体的な培養環境化の方が肝炎ウイルスの感染増殖に適しているのではないかとこの発想であった。実際に、これらの三次元培養系では細胞あたりのアルブミン産生、分泌能や肝特異的薬物代謝酵素の発現が亢進していること、極性細胞の特徴である細胞間ジャンクション構造が形成されることが示されている^{12, 17, 20, 24}。RFB培養肝細胞株に患者血清感染、またHCVゲノムcDNAをトランスフェクションし高密度培養を行うことでウイルスの複製増殖を確認した¹⁾。さらに、遺伝子型1bのダイシストロニックゲノム (全長レプリコン) を保持した細胞株をTGP培養することで単層培養系では認め

連絡先

〒 東京都新宿区戸山 1-23-1
国立感染症研究所ウイルス第二部
TEL: 03-5285-1111
FAX: 03-5285-1161
E-mail: tesuzuki@nih.go.jp

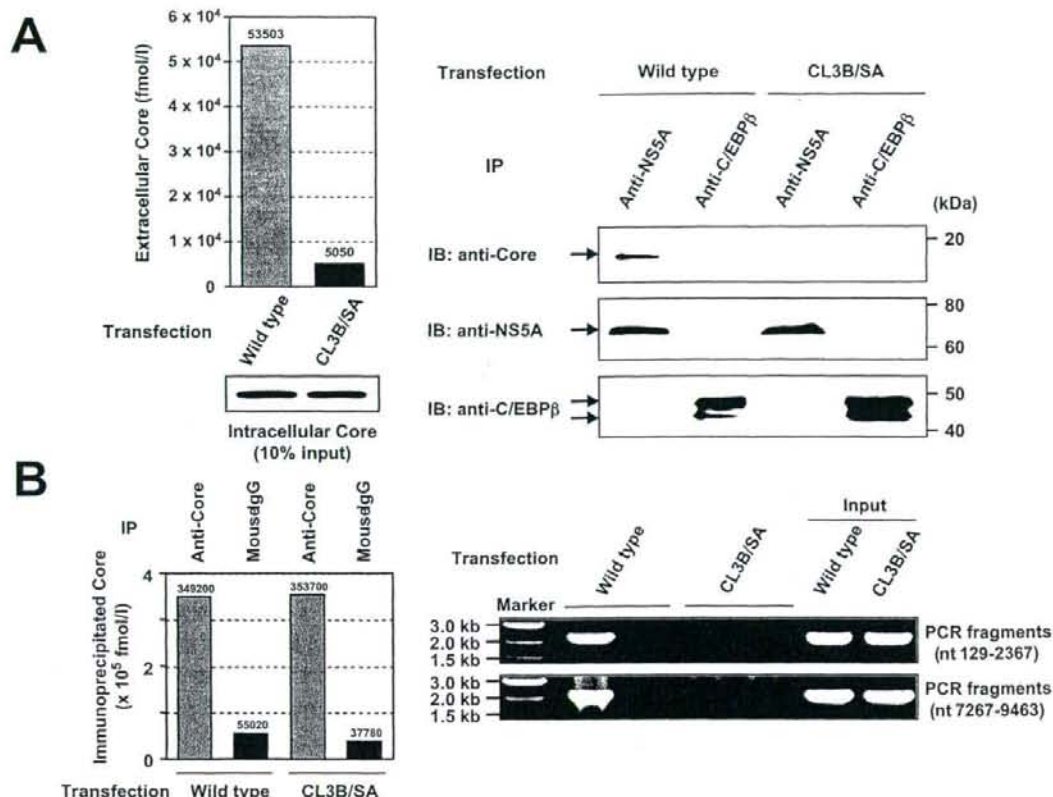


図1 NS5A domain III 変異が HCV 産生, Core-NS5A 相互作用, Core-associated viral RNA へ及ぼす影響

(A) NS5A domain III cluster 3-B のセリン/アラニン置換変異を持つ JFH-1 ゲノム (CL3B/SA) または野生型ゲノムを導入した Huh-7 細胞の細胞内ウイルス蛋白レベル (Intracellular Core) と細胞外分泌ウイルスレベル (Extracellular Core) を調べた (左図)。これらの HCV 発現細胞ライセートを抗 NS5A 抗体で免疫沈降し抗 Core または抗 NS5A 抗体でウエスタンブロッティングを行った (右図)。(B) 免疫沈降-RT-PCR 法による Core-associated HCV RNA の検出。

られなかったウイルス粒子の産生を観察した²⁴⁾。しかしながら、依然としてその HCV 増殖レベルは必ずしも高いものではなく、よりウイルス産生効率にすぐれ、汎用性の高い培養系の登場が待望されていた。

JFH-1 株は、遺伝子型 2a の劇症患者の急性期血清から単離された HCV クローンで、レプリコンシステムによる解析から、他の多くのクローンで見られるような適応変異を伴わずに高いゲノム複製効率を有することが示された^{15,16)}。次に、JFH-1 株の全長 cDNA から合成された RNA をヒト肝癌細胞株 Huh-7 (通常の単層培養) へ導入することで、感染性粒子の産生、分泌が観察され、この HCV 粒子はチンパンジーにも感染性を有することも示された³²⁾。さらに、感染実験に HCV 複製感受性の高い Huh-7 由来細胞株 (Huh7.5, Huh-7.5.1) を用いることで、感染力価 10^4 - 10^5 の培養上清が得られること、感染後 2-3 週間ではほぼ 100% の

細胞が HCV 陽性となること、が明らかとなった^{18,33)}。

HCV 粒子形成における非構造蛋白 NS5A の役割

現在、このようにして確立された JFH-1 株による HCV 感染増殖細胞系を用いて、HCV 生活環の研究が活発に行われている。粒子形成の分子機構に関するこれまでの研究成果の中で最もインパクトを与えたものは、HCV の粒子形成には細胞内脂肪滴が重要な役割を果たすという発見である²²⁾。かねてから、構造蛋白 Core の一部が細胞の脂肪滴に存在することが知られていたが、非構造蛋白の細胞内局在を詳細に調べた結果、NS5A 蛋白などが小胞体の他に脂肪滴近傍にも存在すること、脂肪滴周辺で Core 蛋白を取り巻くようにして非構造蛋白が存在することが見出された。さらに、脂肪滴と会合できないような変異ゲノムを発現させたところ、感染性 HCV 粒子は産生されなくなることが示さ

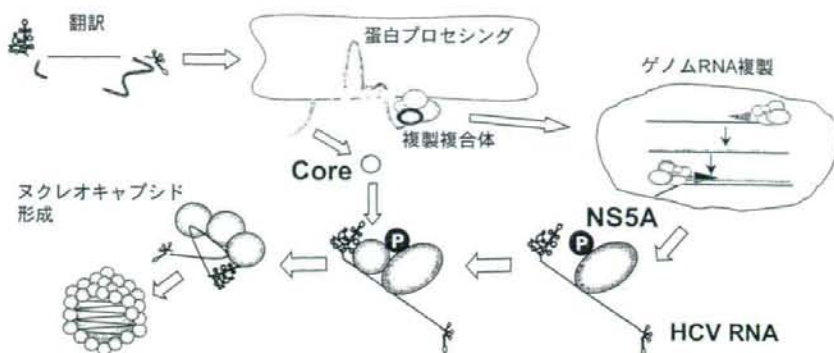


図2 HCV粒子形成初期過程におけるNS5A蛋白の役割のモデル

前駆体蛋白からプロセッシングされたHCV蛋白のうち、非構造蛋白(NS3, 4A, 4B, 5A, 5B)は宿主因子とともに複製複合体を形成しゲノムRNA複製を行う。新生されたHCV RNAとNS5A蛋白との複合体がCore蛋白と会合することがヌクレオキャプシド形成の引き金になる。

れた。

一方、HCVゲノム複製を可視化する試みから、NS5A蛋白のC末端領域(domain III; 後述)にIn-frameでGFPを挿入することにより、ゲノム複製細胞が簡単にモニターできることがレプリコンシステムで示された^{4,23)}。同様の解析は全長ゲノム発現系でも行われ、確かにこのような変異体からウイルスの産生は観察されるものの、その産生効率は野生型に比べ明らかに低下しているようであり²⁶⁾、我々もそれを確認した。そこでこれらの知見から、NS5A蛋白、特にそのC末端領域はHCV粒子形成になんらかの役割を担っているのではないかと考えた。

NS5Aはリン酸化蛋白で、低リン酸化型(56 kDa)と高リン酸化型(58 kDa)が存在し、HCVゲノム複製に必須であることが示されている。3種類のドメイン構造を有し、N末端側のdomain Iは立体構造が解かれRNA結合能を有する。Domain IIにはインターフェロン感受性に関係するISDR(Interferon sensitivity determining region)が含まれているが、domain II, IIIとも構造、機能について十分に解析されていない。NS5A domain IIIには、リン酸化に関与するセリン残基のクラスターが2ヶ所(cluster 3-A, 3-B)存在し、これらはHCVクローン間でよく保存されている。我々はdomain IIIのリン酸化がウイルス産生に及ぼす影響を調べるため、種々の部分欠損または置換変異体を構築し、ゲノム複製、粒子産生能を解析した。その結果、cluster 3-Bの3セリン残基のうち、任意の2残基または3残基をアラニンへ置換することにより、ゲノム複製は野生型と同等であるものの、産生されるウイルス量が顕著に低下することを見出した。また、このような変異に伴ってNS5A蛋白のリン酸化レベルが低下することも確認した¹⁹⁾。

NS5A domain IIIの変異がHCV生活環のどのステップ

に影響を及ぼすのかを調べることによって、粒子形成機構におけるNS5A蛋白の機能解明につながるものと思われる。前述のように、NS5A蛋白とCore蛋白は脂肪滴周辺領域での近接して存在することが観察されていることから、NS5A蛋白はCore蛋白と結合しうるのではないかと考えた。そして実際にNS5AはCore蛋白と相互作用すること、ウイルス産生が低下するcluster 3-B変異体ではCore蛋白と結合できなくなること(図1A)、またこの変異によってNS5A蛋白は脂肪滴周辺膜に局在できなくなることを見出した¹⁹⁾。

NS5A蛋白はゲノム複製複合体を構成し、RNA結合能を有している^{9,29)}。そこで、NS5A蛋白が粒子形成に関与する分子機構として、複製複合体で新生されたウイルスゲノムがNS5A蛋白に捕捉され、さらにNS5A-Core蛋白相互作用によってゲノムRNAがヌクレオキャプシドの場へクルートされる、という作業仮説を考えた。これを検証するため、HCVゲノム発現細胞のライセートを抗Core抗体で免疫沈降しさらにこの沈降物中のHCV RNAをlong RT-PCR法で検出した。その結果、野生型ゲノムの場合Core蛋白アソシエートHCV RNAが検出されたのに対し、cluster 3-B変異ゲノムでは検出されなかった(図1B)¹⁹⁾。この結果は、NS5A蛋白のcluster 3-Bの変異によってCore-HCV RNAの会合が影響を受けることを示しており、NS5A-HCV RNA複合体がCore蛋白と会合することがCore蛋白によるゲノムパッケージングの引き金になることを示唆している(図2)。

HCV NS5A蛋白のdomain IIIが粒子形成にとって重要であるという知見は、最近、米国とドイツのグループからも報告された^{5,30)}。粒子形成を左右するセリン残基(の一つ)がcasein kinase IIでリン酸化される可能性が示されているが、今後、NS5A蛋白のリン酸化制御とウイルス粒

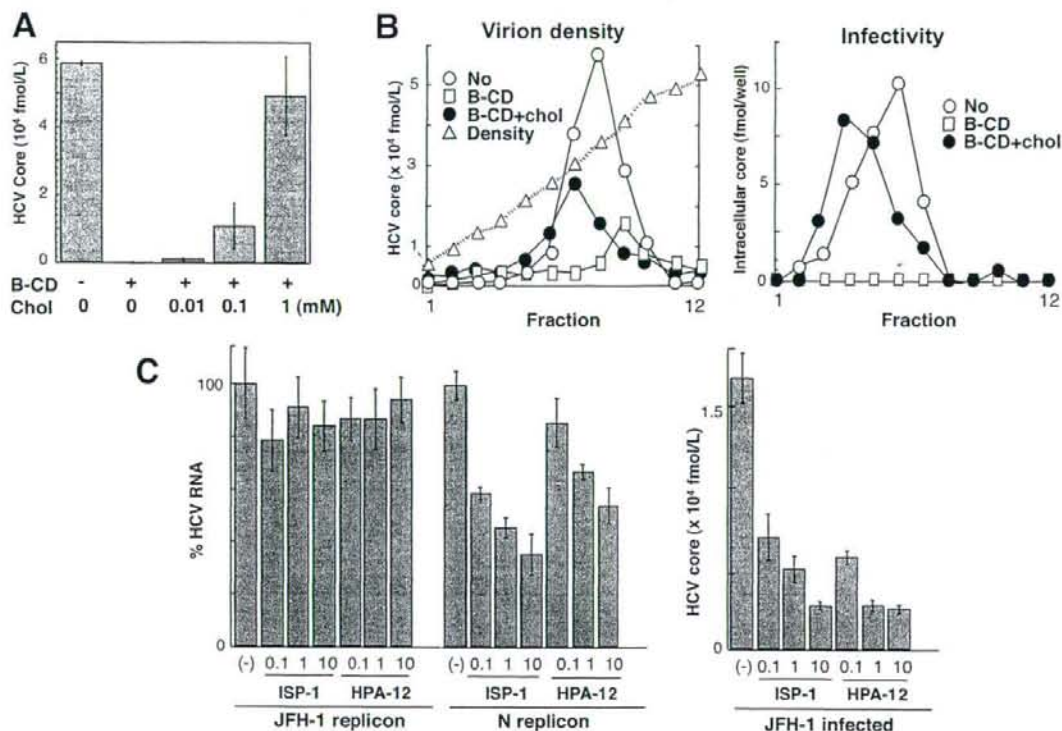


図3 HCV 粒子表面コレステロールが粒子構造、感染性へ及ぼす影響 (A, B) 及びスフィンゴ脂質合成阻害剤による HCV 産生阻害 (C) (A) 培養上清 HCV を 5 mg/ml B-CD 処理した後、コレステロール (Chol) を添加した。超速心操作により薬剤を除去し Huh-7 細胞に感染させ、3 日後の細胞内 Core 量を測定した。(B) 培養上清 HCV を B-CD 未処理、処理、または処理後 Chol を添加し、シヨ糖密度勾配遠心分画した。各分画中の Core 量を測定した (左図)、また、各分画サンプルを Huh7 細胞に感染させ 3 日後の細胞内 Core 量を測定した (右側)。(C) HCV レプリコン細胞 (JFH-1 replicon, N replicon), JFH-1 感染細胞に myriocin /ISP-1 または (1R,3R)-N-(3-hydroxy-1-hydroxymethyl-3-phenylpropyl) dodecanamide (HPA-12) を加え 3 日間培養した。細胞内の HCV RNA または Core 量を測定した。

子形成との関連を明らかにしていくことが重要になると思われる。また、NS5A-Core 相互作用様式の詳細を解明することによって、HCV 粒子形成を選択的に阻害する新たな治療薬の開発へ道が拓かれるものと期待される。

HCV 粒子構造、感染性における粒子脂質成分の役割

エンベロープウイルスは小胞体、ゴルジ体、形質膜などの細胞の生体膜を被って出芽するため、細胞の膜脂質はウイルス粒子形成に重要な役割を果たしているものと考えられる。さらに、ウイルス粒子の膜脂質が宿主細胞への感染過程に関与する例も報告されている⁷⁾。しかし、HCV 粒子に含まれる脂質成分については解析が進んでおらず、その生理学的役割も不明であった。そこで我々は、培養細胞で産生させた HCV JFH-1 粒子を、培養上清から、限外濾過、シヨ糖密度勾配超速心、ヘパリンアフィニティクロマトグ

ラフィを組み合わせて、濃縮、粗精製し、この HCV 粒子に含まれる脂質を生化学的に解析した。その結果、コレステロール/リン脂質モル比が細胞の膜分画に比べて有意に高値を示したことから、コレステロールに富んだ生体膜からの出芽、または粒子形成、分泌過程でのコレステロールとの会合の可能性が考えられた³⁾。

次にこの HCV 粒子上の膜脂質がどのような役割を果たしているかを調べるため、HCV 粒子表面を methyl- β -cyclodextrin (B-CD) で処理してコレステロールを除去した後感染させたところ、B-CD の容量依存的に感染性が低下し、B-CD 処理した粒子にコレステロールを添加したところその感染性は回復した (図 3A)³⁾。また、コレステロールと親和性が高いスフィンゴ脂質の主要分子スフィンゴミエリンを加水分解する sphingomyelinase (SMase) で HCV 粒子を処理することにより感染性の低下を観察した³⁾。こ

これらのことは HCV genotype 1b のエンベロープを持つシールドタイプウイルスやキメラウイルスでも確認できた。以上から、ウイルス粒子表面のコレステロールとスフィンゴ脂質はウイルスの遺伝子型によらず感染に重要な役割を果たしていることが示された。

次に、HCV 粒子上のコレステロールが粒子の物性に与える影響を調べた (図 3B, C)。HCV 産生細胞の培養上清をシロ糖密度勾配遠心分画すると Core 蛋白及び HCV RNA のピークは 1.17 g/ml 分画、感染性のピークは 1.13 g/ml 分画となる。このように、感染性のピークがウイルス遺伝子のそれに比べ低密度側に存在することは培養細胞系で作製した HCV の特徴の一つであるが、濃縮したこの培養上清を B-CD 処理しコレステロール除去後に同様に遠心分画を行うと、Core 蛋白のピークは 1.20 g/ml 分画に移行し、感染性はいずれの分画も検出限界以下であった。さらに、B-CD 処理後の培養上清にコレステロールを添加すると Core 蛋白のピークは低密度側へシフトし感染性も回復した³⁾。このようなコレステロールの除去と添加による loss- and gain-of-function は 5 mg/ml B-CD 処理で観察されるが、B-CD 濃度を 10 mg/ml へ上げた場合はコレステロール添加によって感染性の回復は見られない。これらのことから、HCV 粒子表面のコレステロールは粒子構造の維持に役立っており、コレステロールを完全に除去してしまうと粒子構造は致命的なダメージを受ける。これに対し、部分的に除去した場合の構造変化は感染性を低下させるものの、その変化は再生可能なレベルである、と考えられた。

次に、HCV 粒子上のコレステロールまたスフィンゴ脂質が感染過程のどのステップに関与するのかを解析した。あらかじめコレステロール除去または SMase 処理を行った HCV 粒子の宿主細胞への吸着性は未処理ウイルスと同等であったのに対し、吸着後の細胞内への取り込みは、これらの前処理を施した HCV で顕著な低下が認められた³⁾。レセプター蛋白分子とともに標的細胞内へウイルスが侵入する過程に粒子コレステロール、スフィンゴ脂質が関与する可能性が示された。

HCV ゲノムは、脂質ラフトの特徴である界面活性剤不溶性の膜分画で複製することが示され^{2, 27)}、HCV genotype 1 のゲノム複製細胞また HCV が増殖するヒト肝細胞キメラマウスに脂質ラフト構成成分であるスフィンゴミエリンの合成阻害剤 myriocin/ISP-1 を添加、投与することによって、HCV 複製効率は顕著に低下することが報告されている^{25, 31)}。この myriocin/ISP-1 またはセラミド輸送阻害剤 HPA-12 を HCV N 株 (genotype 1b) また JFH-1 株のサブゲノムレプリコン細胞に加えることによって、N 株では HCV ゲノム複製は阻害されるものの、JFH-1 株では予想に反して複製の低下はほとんど認められなかった。しかしながら、興味深いことに、JFH-1 のウイルス産生系では両薬剤の容量依存的に HCV 産生は抑制された (図 3C)³⁾。スフ

ィンゴ脂質合成阻害剤の抗 HCV 効果の作用機序として HCV ゲノム複製阻害だけでなく粒子形成あるいは感染過程へも介入しうることが示唆された。

おわりに

「ウイルス非構造蛋白」「脂質」は HCV の粒子形成制御に関する代表的なキーワードとなった。本稿では NS5A 蛋白が粒子形成過程にどのように働くかを紹介したが、最近、別の非構造蛋白で前駆体蛋白のプロセッシングを担っている NS2 がやはり粒子形成にも関与することが報告された^{11, 13, 14, 28)}。しかしながらその分子機構は現在まったくと言ってよいほど不明である。一方、脂質成分、脂質代謝と HCV 生活環の関連についての興味深い知見として、ウイルス産生におけるアポリポ蛋白、VLDL/LDL の重要性が示されている^{6, 8, 10, 21)}。脂肪滴周辺膜構造を起点とする HCV の粒子形成過程に介在する宿主蛋白の輸送・分泌経路—おそらく脂質関連分子が含まれる—を明らかにすることは、HCV のアセンブリー、出芽から細胞外への放出までの過程を制御する分子機構の解明に直結するものと思われる。

文 献

- 1) Aizaki H, Lee KJ, Sung VM, Ishiko H, Lai MM.: Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology* 324: 450-461, 2004.
- 2) Aizaki H, Nagamori S, Matsuda M, Kawakami H, Hashimoto O, Ishiko H, Kawada M, Matsuura T, Hasumura S, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T.: Production and release of infectious hepatitis C virus from human liver cell cultures in the three-dimensional radial-flow bioreactor. *Virology* 314: 16-25, 2003.
- 3) Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T.: A Critical Role of Virion-Associated Cholesterol and Sphingolipid in Hepatitis C Virus Infection. *J Virol*. 82: 5715-5724, 2008.
- 4) Appel N, Pietschmann T, Bartenschlager R.: Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol*. 79: 3187-94, 2005.
- 5) Appel N, Zayas M, Miller S, Krijnse-Locker J, Schaller T, Friebe P, Kallis S, Engel U, Bartenschlager R.: Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog*. 4: e1000035, 2008.
- 6) Chang KS, Jiang J, Cai Z, Luo G.: Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol*. 81: 13783-13793, 2007.
- 7) Chazal N, Gerlier D.: Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev*. 67: 226-37, 2003.

- 8) Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV.: Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol.* 82: 2120-2129, 2007.
- 9) Huang L, Hwang J, Sharma SD, Hargittai MR, Chen Y, Arnold JJ, Raney KD, Cameron CE.: Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem.* 280: 36417-28, 2005.
- 10) Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M, Ye J.: Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 5848-53, 2007.
- 11) Ishii K, Murakami K, Hmwe SS, Bin Z, Li J, Shirakura M, Morikawa K, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T.: Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 371: 446-450, 2008
- 12) Iwahori T, Matsuura T, Maehashi H, Sugo K, Saito M, Hosokawa M, Chiba K, Masaki T, Aizaki H, Ohkawa K, Suzuki T.: CYP3A4 inducible model for in vitro analysis of human drug metabolism using a bioartificial liver. *Hepatology* 37: 665-673, 2003.
- 13) Jirasko V, Montserrent R, Appel N, Janvier A, Eustachi I, Brohm C, Steinmann E, Pietschmann T, Penin F, Bartenschlager R.: Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *J Biol Chem.* 283: 28546-28562, 2008.
- 14) Jones CT, Murray CL, Eastmann DK, Tassello J, Rice CM. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol.* 81: 8374-8383, 2007.
- 15) Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, Wakita T.: Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 125: 1808-1817, 2003.
- 16) Kato T, Furusaka A, Miyamoto M, Date T, Yasui K, Hiramoto J, Nagayama K, Tanaka T, Wakita T.: Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J Med Virol.* 64: 334-339, 2001.
- 17) Kawada M, Nagamori S, Aizaki H, Fukaya K, Niiya M, Matsuura T, Sujino H, Hasumura S, Yashida H, Mizutani S, Ikenaga H.: Massive culture of human liver cancer cells in a newly developed radial flow bioreactor system: ultrafine structure of functionally enhanced hepatocarcinoma cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 34: 109-115, 1998.
- 18) Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM.: Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309: 623-626, 2005.
- 19) Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, and Suzuki T.: Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol.* 82:7964-76, 2008.
- 20) Matsuura T, Kawada M, Hasumura S, Nagamori S, Obata T, Yamaguchi M, Hataba Y, Tanaka H, Shimizu H, Unemura Y, Nonaka K, Iwaki T, Kojima S, Aizaki H, Mizutani S, Ikenaga H.: High density culture of immortalized liver endothelial cells in the radial-flow bioreactor in the development of an artificial liver. *Int J Artif Organs* 21: 229-234, 1998.
- 21) Meunier JC, Russell RS, Engle RE, Faulk KN, Purcell RH, Emerson SU.: Apolipoprotein cI association with hepatitis C virus. *J Virol.* 82: 9647-9656, 2008.
- 22) Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K.: The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* 9: 1089-1097, 2007.
- 23) Moradpour D, Evans MJ, Gosert R, Yuan Z, Blum HE, Goff SP, Lindenbach BD, Rice CM.: Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes. *J Virol.* 78: 7400-7409, 2004.
- 24) Murakami K, Ishii K, Ishihara Y, Yoshizaki S, Tanaka K, Gotoh Y, Aizaki H, Kohara M, Yoshioka H, Mori Y, Manabe N, Shoji I, Sata T, Bartenschlager R, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T.: Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* 351:381-392, 2006.
- 25) Sakamoto H, Okamoto K, Aoki M, Kato H, Katsume A, Ohta A, Tsukuda T, Shimma N, Aoki Y, Arisawa M, Kohara M, Sudoh M.: Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nat Chem Biol.* 1: 333-337, 2005.
- 26) Schaller T, Appel N, Koutsoudakis G, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, Bartenschlager R.: Analysis of hepatitis C virus superinfection exclusion by using novel fluorochrome gene-tagged viral genomes. *J Virol.* 81: 4591-603, 2007.
- 27) Shi, S. T., K. J. Lee, H. Aizaki, S. B. Hwang, and M. M. Lai. Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2. *J Virol.* 77:4160-8, 2003.
- 28) Steinmann E, Brohm C, Kallis S, Bartenschlager R, Pietschmann T.: Efficient trans-encapsidation of hepatitis C virus RNAs into infectious virus-like particles. *J Virol.* 82: 7034-7046, 2008.
- 29) Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Rice CM.: Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* 435: 374-9, 2005.
- 30) Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway J.: Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog* 4: e1000032, 2008.
- 31) Umehara T, Sudoh M, Yasui F, Matsuda C, Hayashi Y, Chayama K, Kohara M.: Serine palmitoyltransferase inhibitor suppresses HCV replication in a mouse mod-

- el. *Biochem Biophys Res Commun.* 346: 67-73, 2006.
- 32) Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ.: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med.* 11: 791-796, 2005.
- 33) Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV.: Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 9294-9299, 2005.

Involvement of nonstructural protein 5A and lipids on production of hepatitis C virus particles

Tetsuro SUZUKI, Takahiro MASAKI, Hideki AIZAKI

National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama,
Shinjuku-ku, Tokyo, 162-8640
tesuzuki@nih.go.jp

A robust system for production of recombinant infectious hepatitis C virus (HCV) has been established in 2005 and classical virological techniques are now able to be applied to the HCV research, especially regarding molecular mechanisms on virion assembly and maturation. We recently demonstrated that the C-terminal serine cluster of NS5A is a determinant of NS5A interaction with Core and the subcellular localization of NS5A. Mutation of this cluster blocks the NS5A-Core interaction, resulting in perturbation of association between Core and HCV RNA. It is thus tempting to consider that NS5A plays a key role in transporting the viral genome RNA synthesized by the replication complex to the surface of lipid droplets (LDs) or LD-associated membranes, where Core localizes, leading to facilitation of nucleocapsid formation. We also demonstrated an important role of cholesterol and sphingolipid in HCV infection and virion maturation. Specifically, mature HCV particles are rich in cholesterol. Depletion of cholesterol from HCV or hydrolysis of virion-associated sphingomyelin results in a loss of infectivity, and the addition of exogenous cholesterol restores infectivity. In addition, cholesterol and sphingolipid on the HCV membrane play a key role in virus internalization. Finally, inhibitors of the sphingolipid biosynthetic pathway efficiently block virion production.

Genotype1b高ウイルス量の高齢C型慢性肝炎患者に対するPeg-IFN α -2b + リバビリン併用療法適応の検討

岩手医科大学医学部第一内科
公立福生病院内科*

宮坂昭生・及川隆喜・葛西幸穂
熊谷一郎・遠藤龍人・阿部弘一
滝川康裕・鈴木一幸・妻神重彦*

日本高齢消化器医学会誌

Journal of the Japanese Conference of Geriatric Gastroenterology

Vol.10号 No.2 2008-4発行別刷

Genotype1b 高ウイルス量の高齢C型慢性肝炎患者に対する Peg-IFN α -2b + リバビリン併用療法適応の検討

岩手医科大学医学部第一内科
公立福生病院内科*

宮坂 昭生 ・ 及川 隆喜 ・ 葛西 幸穂
熊谷 一郎 ・ 遠藤 龍人 ・ 阿部 弘一
滝川 康裕 ・ 鈴木 一幸 ・ 妻神 重彦*

【目的】

本邦におけるC型慢性肝炎患者は欧米に比べ高齢化が先行しているために高齢者に対する抗ウイルス療法が課題となっている。しかし、治療効果が最も期待できるペグインターフェロン (Peg-IFN) α -2b + リバビリン併用療法は副作用の観点から高齢者には慎重に適応を決めることが望まれている。

今回、我々は60歳以上のGenotype 1bかつ高ウイルス量患者に対するPeg-IFN α -2b + リバビリン併用療法を行い、60歳未満の若年患者と比較してその有用性と問題点について検討した。

【対象と方法】

当科および関連病院において2002年2月から2005年11月までにPeg-IFN α -2b, リバビリン併用療法投与を開始したGenotype 1bでHCV RNA量が100KIU/ml以上のC型慢性肝炎42例 (平均年齢 52.6 ± 11.6 歳 (範囲18-71歳), 男女比26:16) を対象とし、60歳未満の若年者群 (A群) と60歳以上の高齢者群 (B群) の2群に分け、各群のウイルス学的治療効果および副作用による減量・中止、ウイルス学的効果について検討を行った。

統計学的解析：成績は平均値 \pm SD および比率で示し、平均値の差はStudent's t test,

表 1. 背景因子の比較

	A群	B群	p
症例数	30	12	
年齢 (歳)	48.2 ± 10.3	64.4 ± 4.0	
(範囲)	(18-58)	(60-71)	
男女比 (男:女)	20:10	6:6	0.255
治療歴 (初:再)	16:14	11:1	0.019
投与前検査値			
ヘモグロビン (g/dl)	14.5 ± 1.3	14.0 ± 1.1	0.214
血小板数 ($\times 10^4/\mu l$)	16.5 ± 4.2	15.8 ± 2.8	0.582
アルブミン (g/dl)	4.1 ± 0.3	3.9 ± 0.3	0.071
ALT (IU/l)	85.9 ± 52.2	64.8 ± 35.4	0.301
HCV-RNA量 (KIU/ml)	1900 ± 1329	2386 ± 1776	0.433

表 2. 治療前の合併症の比較

	A群 (n=30)	B群 (n=12)	p
合併症のある症例	23.3% (7/30)	58.3% (7/12)	0.037
合併症 (重複あり)			
糖尿病	10.0% (3/30)	8.3% (1/12)	0.680
高血圧症	10.0% (3/30)	33.3% (4/12)	0.088
不整脈	0% (0/30)	8.3% (1/12)	0.113
甲状腺機能障害	3.3% (1/30)	16.6% (2/12)	0.134
自律神経失調症	3.3% (1/30)	0% (0/12)	0.527
胃潰瘍	0% (0/30)	8.3% (1/12)	0.113
脳外傷後遺症	0% (0/30)	8.3% (1/12)	0.113
血小板低下で脾摘後	3.3% (1/30)	8.3% (1/12)	0.497
心内膜床欠損症術後	3.3% (1/30)	0% (0/12)	0.527

表 3. 薬剤の減量と中止

	A群 (n=30)	B群 (n=12)	P
●Peg-IFNの減量	6.6% (2/30)	8.3% (1/12)	0.646
理由:	体重減少 1例	食欲不振、体重減少 1例	
●リバビリンの減量	26.6% (8/30)	50.0% (6/12)	0.139
理由:	Hbの低下 8例 息切れ 2例	Hbの低下 6例 息切れ 2例	
●両薬剤の減量	3.3% (1/30)	8.3% (1/12)	0.495
理由:	体重減少・Hbの低下	食欲不振、体重減少 Hbの低下	
●両薬剤の中止	6.6% (2/30)	16.6% (2/12)	0.320
理由:	血小板3万以下の低下 1例 間質性肺炎 1例	肝臓の発生 検査障害	

Mann-Whitney's *U* test, 比率の差は chi-square test, Fisher's exact testにて検定し, $p < 0.05$ を有意差とした。

【成績】

1. 背景因子の比較

患者背景因子の比較を表1に示した。症例数はA群30例 (平均年齢 48.2 ± 10.3 (範囲18-58歳), 男女比20:10), B群12例 (平均年齢B群 64.4 ± 4.0 歳 (範囲60-71歳), 男女比6:6)であったが, 初回治療は, B群で有意に多かった。ヘモグロビン値, 血小板数, 血清アルブミン値, 血清ALT値, HCV-RNA量は両群で有意差を認めなかった。

2. 治療前合併症の比較

治療前合併症を比較検討した (表2)。合併症を有す例はA群, B群ともに7例であ

たが, 合併症を有する率はA群23.3%, B群58.3%で, 有意にB群で高かった ($P=0.037$)。主な合併症の内訳は糖尿病がA群10.0%, B群8.3%, 高血圧がA群10.0%, B群33.3%であった。

3. 薬剤の減量と中止

Peg-IFNとリバビリンの減量と中止について表3に示した。Peg-IFNの減量はA群6.6% (2例), B群8.3% (1例)であった。Peg-IFNの減量理由は両群とも体重減少であった。リバビリンの減量はA群26.6% (6例), B群50.0% (8例)であった。リバビリンの減量は両群ともリバビリンの副作用であるヘモグロビンの低下であった。Peg-IFN・リバビリンの両剤減量はA群3.3%, B群8.3%で, 減量理由はPeg-IFNおよびリバビリンの減量理由を合わせたものであった。Peg-IFN・リバビリンの両剤中止はA

表 4. 薬剤の減量と中止の時期

	A群 (n=30)	B群 (n=12)
● Peg-IFNの減量		
0~4週	-	-
5~12週	1例	-
13~24週	1例	-
25~48週	-	1例
● リバビリンの減量		
0~4週	-	2例
5~12週	6例	3例
13~24週	2例	1例
25~48週	-	-
● 両薬剤の減量		
0~4週	-	-
5~12週	1例 (リバビリン減量)	1例 (リバビリン減量)
13~24週	1例 (Peg-IFN減量)	-
25~48週	-	1例 (Peg-IFN減量)
● 両薬剤の中止		
0~4週	-	-
5~12週	-	1例
13~24週	1例	-
25~48週	1例	1例

□ 同一症例

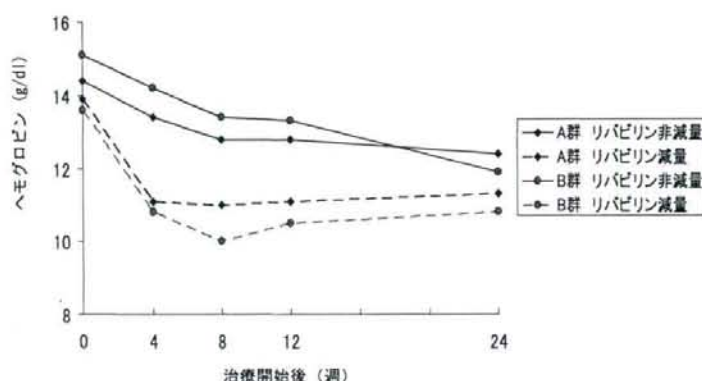


図 1. ヘモグロビンの推移

群, B群ともに2例で, A群6.6%, B群16.6%であった。中止率はB群で高かったが, 有意差は認めなかった。中止理由は, A群で血小板3万以下の低下および間質性肺炎の出現, B群で摂食障害および肝癌の発生であった。Peg-IFNの減量, リバビリンの減量, Peg-IFN・リバビリンの両剤減量, Peg-IFN・リバビリンの両剤中止はB群で高い傾向にあったが, 有意差は認めなかった。

4. 薬剤の減量と中止の時期

Peg-IFNとリバビリンの減量と中止の時期を表4に示した。減量および中止時期を投与開始後0~4週, 5~12週, 13~24週, 25~48週に分けて検討した。Peg-IFNの減量時期はA群で5~12週に1例, 13~24週に1例, B群で25~48週に1例であった。リバビリンの減量時期はA群で5~12週に6例, 13~24週に2例, B群では0~4週に2

例, 5~12週に3例, 13~24週に1例で, B群で0~4週の早期にリバビリンの減量を要する例が多かった。Peg-IFNとリバビリンの両剤減量は両群で各々1例あり, リバビリンの減量後にPeg-IFNを減量していた。Peg-IFNとリバビリンの両剤中止時期はA群で13~24週に1例, 25~48週に1例, B群で5~12週に1例, 25~48週に1例であった。

5. ヘモグロビンの推移

リバビリンの減量が両群とも多く治療開始後24週までに減量していることより, 治療開始後24週までの両群のヘモグロビンの推移をリバビリン減量例, 非減量例に分けて検討を行った(図1)。治療開始時の平均ヘモグロビン値はA群の非減量例で14.4g/dl, 減量例13.9g/dl, B群の非減量例で15.1g/dl, 減量例13.6g/dlであり, 治療開始時の平均ヘモグロビン値が14.0g/dl以上

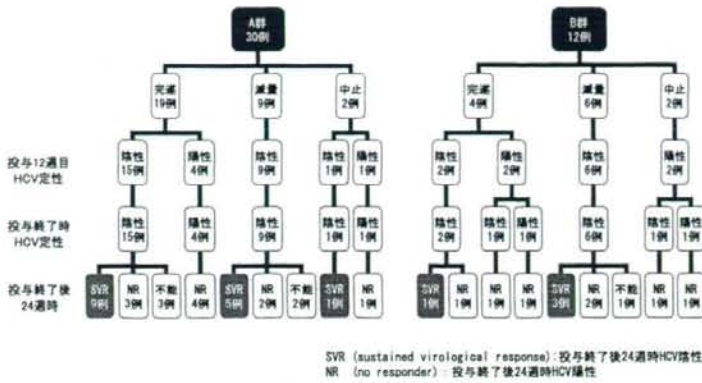


図2. 治療成績

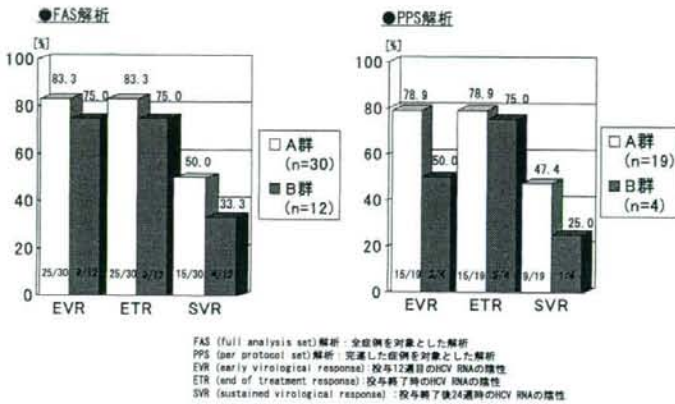


図3. 治療成績

の症例では減量を要しなかった。また、治療開始後、平均ヘモグロビン値の推移はA群、B群の非減量例では0～8週の間で徐々に減少してゆくものに対して、A群、B群の減量例は、0～4週の間で急激に減少していた。

6. 治療成績

治療成績を図2、図3に示した。全症例を対象としたFull analysis set (FAS) 解析では投与12週目までにHCV RNAが陰性化したearly virological response (EVR) はA群83.3%、B群75.0%、投与終了時にHCV RNAが陰性であったEnd of treatment response (ETR) はA群83.3%、B群75.0%であった。投与終了後24週時にHCV RNAが陰性であったsustained virological response (SVR) はA群50.0%、B群33.3%で有意差を認めなかった ($P=0.327$)。Peg-IFNもしくはリバビリンの減量、Peg-IFN

とリバビリンの両剤減量・中止することなく完遂した例はA群19例、B群4例で、完遂率はA群63.3%、B群33.3%あった。完遂した症例を対象としたPer protocol set (PPS) 解析ではEVRはA群78.9%、B群50.0%、ETRはA群78.9%、B群75.0%、SVRはA群47.4%、B群25.0%であった。FAS解析、PPS解析において、EVR、ETR、SVRはいずれもB群で低率であったが、有意差を認めなかった。

【考案】

本邦は米国より20年先にC型慢性肝炎が広がったと推定されており¹⁾、本邦におけるC型慢性肝炎患者は欧米に比べ高齢化が先行している。また、近年、本邦における新規HCV感染者の減少に伴い、HCV感染者の高齢化が進んできている²⁾。それに伴い、高齢者C型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法が課題と