

5. 抗 HCV 剤候補探索の現状とそれを用いた HCV 複製機構の解析

渡 士 幸 一, 下 遠 野 邦 忠

京都大学ウイルス研究所 ヒトがんウイルス研究分野

現在 C 型肝炎ウイルスに対する治療としては主にインターフェロン (IFN) の単独投与あるいは IFN とリバビリンの併用療法が適用されている。しかしこれらによる著効率は平均して 3-6 割というのが実状であり、これらに代わる抗 HCV 療法の開発が求められている。近年 HCV が培養細胞内で自律的に複製増殖する HCV サブゲノムレプリコンシステムが確立され、培養細胞で抗 HCV 剤候補をスクリーニングすることが可能となった。我々はこの系を用いてさまざまな化合物の HCV ゲノム複製への影響を調べることにより、免疫抑制剤シクロスポリン (CsA) が少なくとも培養細胞の系において HCV 複製を抑制することを見い出した。この CsA の抗 HCV 効果には免疫抑制作用は必要ないことがわかった。さらに CsA の抗 HCV 作用のメカニズムを解析することによって、CsA の細胞性標的因子の一つであるシクロフィリン (CyP) B が HCV のゲノム複製に重要な役割を果たすことが示唆された。このように抗 HCV 剤候補の探索は未知の HCV 複製機構を解明する手がかりとなるかもしれない。

はじめに

C 型肝炎ウイルス (HCV) は一本鎖+鎖 RNA をゲノムに有するフラビウイルス属に分類されるウイルスである¹⁾。9000 ヌクレオチド以上からなるこの RNA ゲノムは一つの読み枠をコードしており、ここから前駆体ポリプロテインが翻訳される。さらにこれはウイルスあるいは宿主細胞のプロテアーゼにより切断を受け、少なくとも 10 種類のウイルスタンパク質 core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B へと成熟する (図 1A)。後述するように NS3 はウイルス性プロテアーゼおよびヘリカーゼとして働き、一方 NS5B は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性を有し、ともにウイルス増殖には必須である。

HCV の肝臓における持続的感染は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞がんなどの慢性肝疾患の主な原因であることが知られている²⁾。本邦において約 150 万人と推定されている HCV 感染者からのこれら慢性肝疾患の発症は、現在大きな公衆

衛生問題となっており、HCV を排除する抗ウイルス療法の開発は急務を要する課題である。現行のインターフェロン (IFN) を主体とする治療法を至適化する試みの他にも、新たな抗 HCV 剤の探索がこれまで多くの研究者や製薬企業によってなされてきた。このような試みは新規抗 HCV 療法開発へ向けて望まれることは言うまでもないが、抗 HCV 剤を道具として、HCV 複製に関与する未知の細胞機能が明らかにできるという面でも重要である。そこで本稿では新規抗 HCV 剤探索の現状に焦点を当てて、後半では最近我々が研究を行っているシクロスポリンの抗 HCV 効果およびその作用点の解析について概説する。

現在の抗 HCV 療法

現在、HCV 感染患者に対してはインターフェロン (IFN) の単独投与あるいはこれとヌクレオシド類似体であるリバビリンの併用投与が広く治療法として適用される³⁾。IFN とリバビリンの併用投与による著効率は平均すると 30% から 60% である。この値は実際にはウイルスの genotype によって大きく異なり、genotype 2 および genotype 3 では 70% から 80% と高率にウイルスが除去されるのに対し、genotype 1 での著効率は 20% から 50% にすぎない。特に genotype 1b 高ウイルス量の患者においてはその作用は非常に限られたものとなる。なぜ HCV が IFN 治療にある程度抵抗性を示すかは不明であるが、その原因を示唆するい

連絡先

〒 606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53

TEL : 075-751-4034

FAX : 075-751-3998

E-mail : kwatashi@virus.kyoto-u.ac.jp

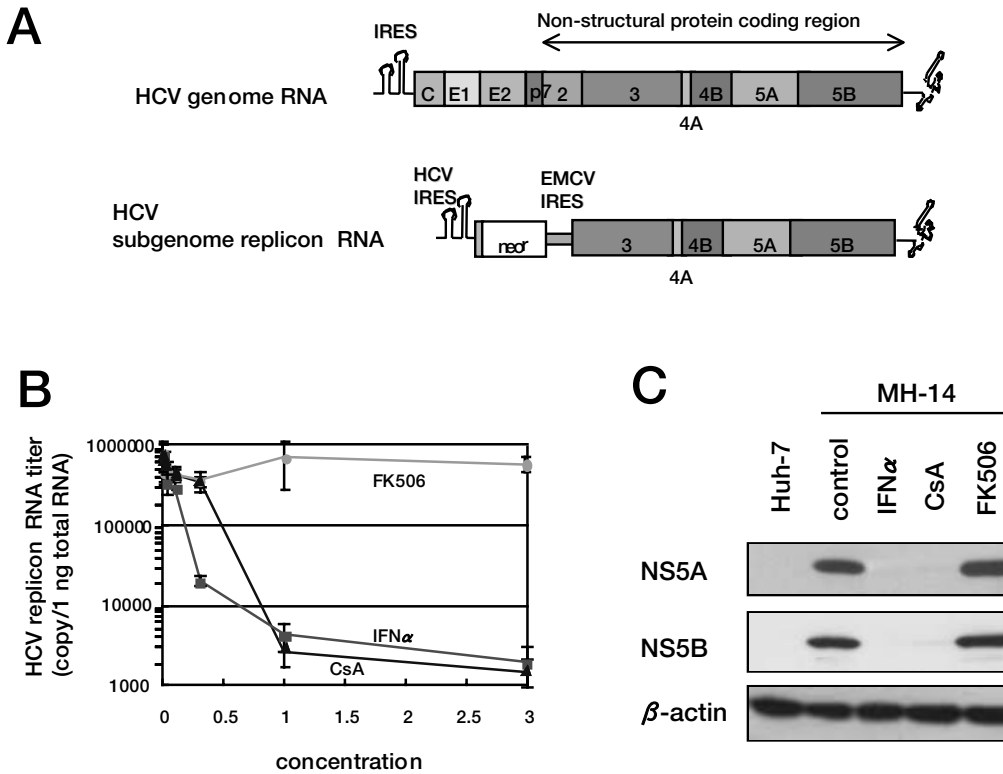


図1. (A) HCVゲノムRNA (上段) および HCV サブゲノムレプリコン RNA (下段) の構造. HCV サブゲノムレプリコン RNA は 5' 側から HCV IRES,ネオマイシン耐性遺伝子のコード領域 (Neo^r), EMCV IRES, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B の各コード領域, および HCV 3'-UTR から成る. このキメラ RNA を Huh-7 細胞にトランスフェクションし, ネオマイシン耐性遺伝子をマーカーとして薬剤選択することにより, HCV サブゲノムレプリコン RNA が持続的に自律複製する細胞クローン (レプリコン細胞) を樹立することができる. (B) シクロスポリンによる HCV サブゲノム RNA 量の減少. IFN α , CsA, FK506 をさまざまな用量 (単位は IFN α : x100 IU/ml, CsA, FK506 : μ g/ml) で処理したレプリコン細胞中の HCV サブゲノム RNA 量を real time RT-PCR 法で定量した. (C) シクロスポリンによる HCV タンパク質量の減少. 未処理(control), IFN α (100 U/ml), CsA (1 μ g/ml), FK506 (1 μ g/ml) を処理したレプリコン細胞 (MH-14 細胞) 中の HCV NS5A, NS5B, β -actin タンパク質量をイムノブロット法で検出した.

くつかの報告がある. まず genotype 1 の NS5A が, IFN の下流遺伝子の一つであり抗ウイルス効果をもつ二本鎖 RNA 依存性リン酸化酵素 (PKR) と相互作用し, この働きを抑制することが報告されている⁴⁾. また E2 も PKR 活性を抑制することが報告された⁵⁾. このように IFN の作用から回避するしくみが HCV 自身に備わっていると考えられるので, IFN はウイルスの排除を確実にできるほど完全ではない可能性がある. また実際の側面として IFN 治療には多様な副作用が認められ十分な抗ウイルス療法が行えない場合も多いこと, 経済的にも負担を強いられることなどから, これらにかわる抗 HCV 療法の確立が求められている.

抗 HCV 剤探索の現状

このような背景を踏まえて, これまでに HCV 複製を抑制する化合物あるいは物質を同定するさまざまな試みがな

されてきた. ウイルス性プロテアーゼである NS3 および RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである NS5B はウイルスの増殖に必須な酵素であり, 格好の抗 HCV 剤スクリーニングの標的となる⁶⁾. 阻害剤同定のハイスループットスクリーニングは, 主には大腸菌あるいは昆虫細胞から精製したリコンビナントタンパク質を用いた in vitro における生化学的解析により可能である⁷⁾⁸⁾. また NS3 および NS5B の三次元構造の情報は阻害剤の作用メカニズムの決定や活性の至適化に有用である⁹⁾¹³⁾. このような解析により現在までに開発されている阻害剤の代表的なものは, NS3 阻害剤として BILN2061 が知られており, これは臨床試験においても強い抗 HCV 効果が報告されている¹⁴⁾. また NS5B 阻害剤は大きくヌクレオシド類似体, 非ヌクレオシド阻害剤, ピロリン酸模倣体に分類され, JTK-003 などの化合物について臨床試験が行われている¹⁵⁾¹⁶⁾. 以上のようなウイルス

性酵素阻害剤の他に, HCV ゲノム RNA 自体に anneal し, これを切断するようなものも抗 HCV 剤として働かせる. HCV ゲノム RNA を標的とするリボザイム (hepatozyme)¹⁷⁾, アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド (ISIS-14803)¹⁸⁾ もそれぞれ臨床試験に入っているが, HCV 患者における抗 HCV 効果が十分なものであるかどうかはまだ結論が出ていない. HCV ゲノム RNA に対する siRNA は少なくとも培養細胞の系においてその効果が確認された段階である¹⁹⁾⁻²¹⁾.

一方, これら以外にも近年開発された HCV サブゲノムレプリコンシステムを用いることによって, さまざまなタイプの化合物が HCV 複製抑制能をもつことが報告されるようになった. HCV を培養細胞で効率良く複製増殖させる実験系 (HCV サブゲノムレプリコンシステム) は 1999 年にドイツのグループが初めて報告した²²⁾. これは肝がん細胞株 Huh-7 細胞内で HCV ゲノム様 RNA (HCV サブゲノム RNA) とともに, これにコードされる NS3 から NS5B の各ウイルスタンパク質が発現し, これらが HCV サブゲノム RNA の新たな合成を持続的に行っている系である (図 1A). 現在の HCV 複製解析に関する研究のほとんどはこの系を用いて行われている. この細胞 (レプリコン細胞) を用いることにより, HCV 複製を抑制する化合物をスクリーニングすることができる. このような手法によって HCV 複製を抑制するものとして, 臨床で治療に用いられている IFN α ²³⁾ の他にも, サイトカイン類として IFN γ ²⁴⁾, IL-1²⁵⁾, TGF β ²⁶⁾, 低分子化合物として三酸化ヒ素²⁷⁾, ビンブラスチンなどの微小管重合阻害剤²⁸⁾, ロバスタチンなどのゲラニルゲラニル化阻害剤²⁹⁾ などが報告されている. これらの抗 HCV 作用の中には比較的強力なものや IFN と比較して非常に弱いものもあり, また細胞毒性を発揮するものも存在する. それぞれを抗 HCV 療法へ応用することを考えれば, さらなる化合物の至適化あるいは IFN との併用を考える必要があるかもしれない. これらについての今後の研究が待たれる.

これとともに, 上記サイトカインあるいは化合物がどのように HCV 複製を抑制するかを解析することは, HCV 複製を制御する細胞機能を知る上で重要である. IL-1²⁵⁾ はレプリコン細胞の HCV RNA を減少させるが, これは ERK1/2 阻害剤である PD98059 の共処理によって回復した. これより IL-1 は ERK1/2 経路を介して HCV 複製を抑制すると考えられた. TGF β ²⁶⁾ は細胞増殖の抑制と相関して HCV 複製を抑制する. これには TGF β 情報伝達系の中で Smad2/3/4 が重要な役割を担うことが明らかとなった. またビンブラスチンや cytochalasin D などの微小管重合阻害剤やアクチン重合阻害剤²⁸⁾ は, レプリコン細胞の HCV RNA の安定性を変化させることなく, その量を減少させたことから, 微小管重合およびアクチン重合が HCV 複製に重要であると結論づけられた. ロバスタチンなどのゲラニルゲラニル化阻害剤²⁹⁾ をレプリコン細胞に処理すること

により, HCV 複製が阻害された. これよりなんらかのゲラニルゲラニル化をうける宿主タンパク質が HCV 複製を制御していることが示唆された. 以上の研究に関して宿主のどのような因子がどのように HCV ゲノム複製を制御しているのかについてはいずれもまだ詳細が明らかではなく, 今後の解析が重要と思われる.

CsA の抗 HCV 作用

我々も同様の手法により, HCV 複製抑制作用をもついくつかの化合物を同定することができた. その中で現在免疫抑制剤として広く臨床で用いられているシクロスポリン (CsA) は, 我々が調べたものの中でもっとも強い HCV RNA 低下作用をもっていた³⁰⁾. CsA の HCV RNA 量減少作用は用量依存的なものであり, 1 μ g/ml でほぼ最大効果を示した (図 1B). この時 1 週間処理により HCV RNA 量が約 1/500 にまで減少した. これは IFN α での最大効果 (100 IU/ml 1 週間処理により約 1/400) とほぼ同等であった. 同様にレプリコン細胞において CsA は NS5A や NS5B といった HCV タンパク質量も検出限界以下にまで強く減少させた (図 1C). またこの時 CsA は細胞傷害作用をほとんど有していなかった. また肝細胞株である PH5CH8 細胞に HCV 感染血漿を処理することにより行った *in vitro* ウイルス感染実験においても, CsA を持続的に処理した細胞群ではウイルスゲノム RNA の増殖が有意に抑えられていた. これにより少なくとも *in vitro* において CsA は HCV 複製抑制作用をもつと考えられた. 興味深いことに, FK506 (タクロリムス) やラバマイシンなどの別種類の免疫抑制剤ではこのような抗 HCV 効果は観察されなかった. 同様の結果は東京医科歯科大のグループによっても報告された³¹⁾. CsA が *in vivo* においても強い抗 HCV 作用をもつかどうかははまだ証明はされていないが, 慢性 C 型肝炎患者に対する CsA の効果に関する臨床報告がある. 昭和大のグループは HCV 患者において IFN α 単独投与群に比べて, IFN α , CsA 共投与群では HCV 著効率が有意に上昇することを報告している³²⁾. *In vivo* における CsA の作用についてはこれからのさらなる解析が必要である.

CsA の抗 HCV 効果に関わる細胞性因子の同定

CsA の *in vivo* における作用を明らかにすることとともに重要なことは, CsA の抗 HCV 作用メカニズムを明らかにすることである. これによって新たな抗 HCV 剤の創薬の標的が明らかになることが期待される. では CsA はどのようにして抗 HCV 作用を発揮するのか? これを解析するためにまず我々は CsA のさまざまな誘導体を用いて解析を行った. 一般的に CsA は細胞内に主な標的を 3 つ有している. 異性化酵素であるシクロフィリン (CyP), 免疫応答に重要なカルシニューリン (CN) /NF-AT 経路および細胞膜トランスポーターである P-glycoprotein (P-gp) である (図

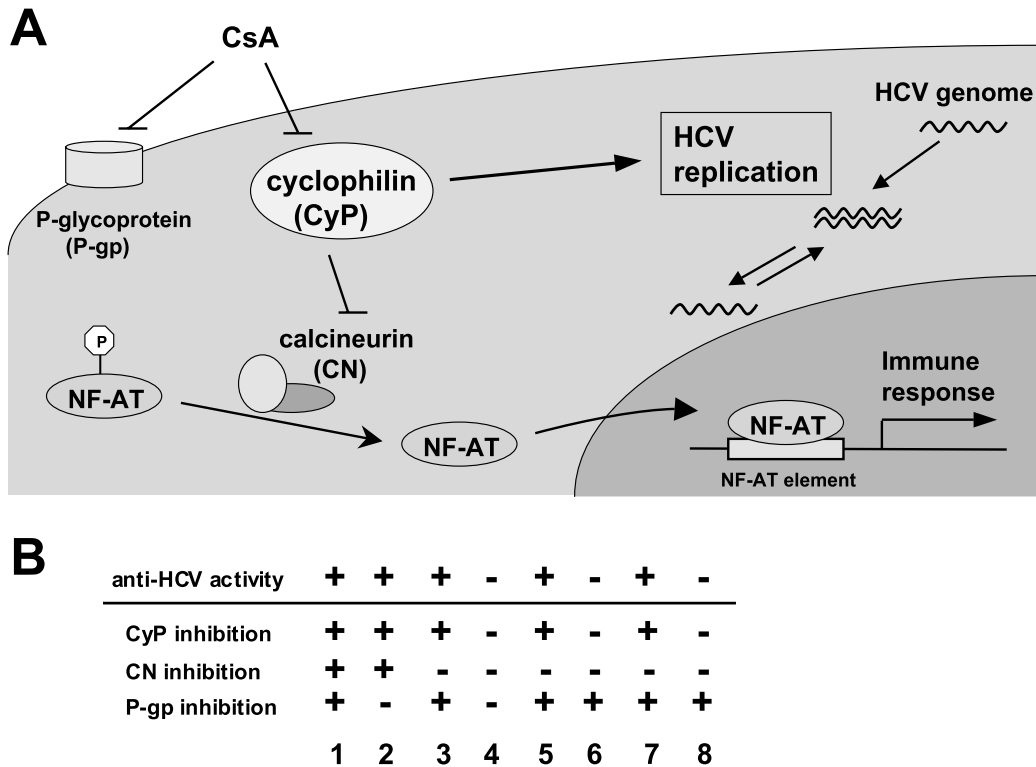


図 2. (A) CsA の細胞性標的因子としてのシクロフィリン (CyP), カルシニューリン (CN), P 糖タンパク質 (P-gp). CyP は peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 活性を有する酵素, CN は転写因子 NF-AT の脱リン酸化を触媒する脱リン酸化酵素, P-gp は細胞膜トランスポーターである. NF-AT は CN の働きにより転写活性化し, 免疫応答に重要なサイトカイン類などを産生する. CsA は CyP に直接結合し, その酵素活性を失わせる. CsA/CyP 複合体は CN と結合し, 脱リン酸化酵素活性を阻害する. また CsA は P-gp の機能をも阻害する. 今回の研究により, HCV ゲノム複製には, CyP が重要な役割を果たしていることが示唆された. (B) CsA (1) および 7 種類の CsA 誘導体 8'-OH-MeBmt¹-Cs (2), MeAla⁶-Cs (3), D-lys⁸-Cs (4), MeVal⁴-Cs (5), cyclosporin H (6), NIM811 (7), PSC833 (8) の抗 HCV 効果および CyP, CN, P-gp への阻害効果の有無. CyP 阻害作用と抗 HCV 効果に相関関係が見られた.

2A)³³⁾³⁴⁾. CsA はこれらの標的の活性をいずれも阻害することが知られている. そこでこれらの作用点に対する効果の一部を欠失した CsA 誘導体が HCV 複製に影響を与えるかどうかをレプリコン細胞を用いて検討した (図 2B). その結果, CyP に対する阻害作用をもった誘導体は抗 HCV 効果を有していたが, CyP に対しての作用を欠失した誘導体は HCV 複製を抑制しなかった (図 2B). 一方 CN/NF-AT 経路や P-gp に対する作用と抗 HCV 効果との間には相関関係は見られなかった. CsA とは別の分子骨格をもった CyP 阻害剤であるサングリフェリンも同様に HCV 複製抑制能をもつことが判明した. このことから CyP が HCV 複製に関連している可能性が考えられた. CyP は peptidyl prolyl cis-trans isomerase 活性をもつ酵素であり, 一般的にタンパク質の立体構造変換を触媒する酵素である³⁴⁾. CyP はファミリーを形成し, 哺乳類において 10 種類以上のサブタイプからなることが知られている. これまでにウイルスとの関連に関しては, CyP サブタイプの一つである

CyPA が HIV-1 の生活環に重要な役割を果たしていることが知られている³⁵⁾. そこで HCV 複製において CyP が重要であるかどうかを調べるために, レプリコン細胞において, RNAi 法によって各 CyP ファミリーをノックダウンした. その結果, CyPA, CyPC, CyPE あるいは CyPH の発現量をそれぞれ低下させた時, いずれの場合も HCV RNA 量に変化はなかったが, CyPB を特異的にノックダウンすることにより, HCV 複製は抑制された. 同様の結果は HCV 複製を一過性にモニターできる系²⁶⁾ によっても得られた. このことより CyPB が HCV 複製に重要な役割を果たしていると考えられた.

おわりに

細胞における HCV ゲノム複製の機構は現在に至るまで不明な点が数多く残されている. 特に HCV ゲノム複製に関わる宿主因子はほとんどがわかっていないのが現状である. 今回我々は HCV サブゲノムレプリコンシステムを用

いることによって、抗HCV剤の候補としてCsAを同定した。またその抗HCV作用を解析する過程で、HCVゲノム複製にCyPBが重要な役割を果たしていることを見出した。このように新たな抗HCV剤候補を探索することは、臨床で使用可能な新規抗HCV剤開発へ向けての意義はもとより、これまで明らかでないHCV複製に関与する分子を同定する一手法としても重要なものである。今後もこれらの手法によってHCV複製の新たな側面が明らかになることが期待される。

文 献

- 1) Bartenschlager R, Lohmann V.: Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res* 52: 1-17, 2001
- 2) Liang TJ, Jeffers LJ, Reddy KR, De Medina M, Parker IT, Cheinquer H, Idrovo V.: Viral pathogenesis of hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 18: 1326-1333, 1993
- 3) McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK.: Interferon alpha-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 339: 1485-1492, 1998
- 4) Gale MJ, Korth MJ, Tang NM, Tan SL, Hopkins DA, Dever TE, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG.: 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, 1997
- 5) Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MMC.: Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285: 107-110, 1999
- 6) Di Bisceglie AM, McHutchison J, Rice CM.: New therapeutic strategies for hepatitis C. *Hepatology* 35: 224-231, 2002
- 7) Wu JZ, Hong Z.: Targeting NS5B RNA-dependent RNA polymerase for anti-HCV chemotherapy. *Curr Drug Target Infect Dis* 3: 207-219, 2003
- 8) Bartenschlager R.: The NS3/4A proteinase of the hepatitis C virus: unravelling structure and function of an unusual enzyme and a prime target for antiviral therapy. *J Viral Hepat* 6: 165-181, 1999
- 9) Kim JL, Morgenstern KA, Lin C, Fox T, Dwyer MD, Landro JA, Chambers SP, Markland W, Lepre CA, O'Malley ET, Harbeson SL, Rice CM, Murcko MA, Caron PR, Thomson JA.: Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* 87: 343-355, 1996
- 10) Love RA, Parge HE, Wickersham JA, Hostomsky Z, Habuka N, Moomaw EW, Adachi T, Hostomska Z.: The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. *Cell* 87: 331-342, 1996
- 11) Lesburg CA, Cable MB, Ferrari E, Hong Z, Mannarino AF, Weber PC.: Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol.* 6: 937-943, 1999
- 12) Bressanelli S, Tomei L, Roussel A, Incitti I, Vitale RL, Mathieu M, De Francesco R, Rey FA.: Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13034-13039, 1999
- 13) Ago H, Adachi T, Yoshida A, Yamamoto M, Habuka N, Yatsunami K, Miyano M.: Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Structure Fold Des.* 7: 1417-1426, 1999
- 14) Lamarre D, Anderson PC, Bailey M, Beaulieu P, Bolger G, Bonneau P, Bos M, Cameron DR, Cartier M, Cordingley MG, Faucher AM, Goudreau N, Kawai SH, Kukolj G, Lagace L, LaPlante SR, Narjes H, Poupert MA, Rancourt J, Sentjens RE, St George R, Simoneau B, Steinmann G, Thibeault D, Tsantrizos YS, Weldon SM, Yong CL, Llinas-Brunet M.: An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 426: 186-189, 2003.
- 15) De Francesco R, Tomei L, Altamura S, Summa V, Migliaccio G.: Approaching a new era for hepatitis C virus therapy: inhibitors of the NS3-4A serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res* 58: 1-16, 2003
- 16) Hogle T, Cerny A.: Current therapy and new molecular approaches to antiviral treatment and prevention of hepatitis C. *Rev Med Virol* 13: 361-371, 2003
- 17) Tong M, Schiff E, Jensen D, Jacobson I, Eversen G, McHutchison J.: Preliminary analysis of a phase II study of HEPATOZYME, a nuclease resistant ribozyme targeting hepatitis C virus (HCV) RNA. *Hepatology* 36: 788A, 2002
- 18) Gordon S, Bacon B, Jacobson I.: A phase II, 12 week study of ISIS 14803, an antisense inhibitor of HCV for the treatment of chronic hepatitis C.: *Hepatology* 36: 795A, 2002
- 19) Glenn R, Arash G, Rice CM.: Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 235-240, 2003
- 20) Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV.: Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2014-2018, 2003
- 21) Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, Sabatino S, Rodrigue-Gervais IG, Arya S, Sarangi F, Harris-Brandts M, Beaulieu S, Richardson CD.: RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2783-2788, 2003
- 22) Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R.: Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science.* 285: 110-113, 1999
- 23) Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM.: Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science.* 290: 1972-1974, 2000.

- 24) Frese M, Schwarzle V, Barth K, Krieger N, Lohmann V, Mihm S, Haller O, Bartenschlager R.: Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology*. 35: 694-703, 2002.
- 25) Zhu H, Liu C.: Interleukin-1 inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by activation of extracellular regulated kinase pathway. *J Virol*. 77: 5493-5498, 2003.
- 26) Murata T, Ohshima T, Yamaji M, Hosaka M, Miyanari Y, Hijikata M, Shimotohno K.: Suppression of hepatitis C virus replicon by TGF-beta. *Virology*. 331: 407-417, 2005.
- 27) Hwang DR, Tsai YC, Lee JC, Huang KK, Lin RK, Ho CH, Chiou JM, Lin YT, Hsu JT, Yeh CT.: Inhibition of hepatitis C virus replication by arsenic trioxide. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 2876-2882, 2004
- 28) Bost AG, Venable D, Liu L, Heinz BA. Cytoskeletal requirements for hepatitis C virus (HCV) RNA synthesis in the HCV replicon cell culture system.: *J Virol*. 77: 4401-4408, 2003
- 29) Ye J, Wang C, Sumpter R Jr, Brown MS, Goldstein JL, Gale M Jr.: Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15865-15870, 2003
- 30) Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, Yamaji M, Shimotohno K.: Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* 38: 1282-1288, 2003
- 31) Nakagawa M, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Kanazawa N, Koyama T, Kurosaki M, Maekawa S, Yamashiro T, Chen CH, Itsui Y, Kakinuma S, Watanabe M. Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 42-47, 2004
- 32) Inoue K, Sekiyama K, Yamada M, Watanabe T, Yasuda H, Yoshihara M.: Combined interferon alpha2b and cyclosporin A in the treatment of chronic hepatitis C: controlled trial. *J Gastroenterol*. 38: 567-572, 2003
- 33) Loor F, Tiberghien F, Wenangy T, Didier A, Traber R.: Cyclosporins: structure-activity relationships for the inhibition of the human MDR1 P-glycoprotein ABC transporter. *J Med Chem* 45: 4598-4612, 2002
- 34) Takahashi N.: The mechanisms of action of cyclosporin A: implications for its side effects. *J Toxicol Sci* 20: 480-482, 1995
- 35) Braaten D, Luban J.: Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells. *EMBO J* 20: 1300-1309, 2001

Current approaches for developing new anti-HCV agents and analyses of HCV replication using anti-HCV agents

Koichi Watashi, Kunitada Shimotohno

Department of Viral Oncology, Institute for Virus Research, Kyoto University
53 Kawaharacho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8507, Japan
kwatashi@virus.kyoto-u.ac.jp

Currently, patients with hepatitis C virus (HCV) are mainly treated with interferon alone or in combination with ribavirin. However, because the virus is not eliminated from approximately one half of the patients by this treatment, alternative approaches to the treatment of HCV infection are needed. Recently, an HCV subgenomic replicon system has been established in which an HCV subgenomic replicon autonomously replicated in cultured cells. It enables us to screen for anti-HCV agents in cell culture system. Taking advantage of this system, we examined the effects of various types of compounds on the replication of HCV. Consequently, we found that a well-known immunosuppressant, cyclosporin A (CsA), had a strong suppressive activity on HCV replication, at least in cell culture system. This anti-HCV activity did not require the immunosuppressive feature of CsA. Through the investigation into the mechanism of anti-HCV effect of CsA, it was suggested that cyclophilin B, one of the cellular target molecules of CsA, played a significant role in HCV replication. Thus, searching for anti-HCV agents may lead to the elucidation of one of the mechanisms of HCV replication.