

2. ケミカルバイオロジー的手法を用いた C型肝炎ウイルス生活環の解析

渡 士 幸 一

National Institutes of Health · 京都大学ウイルス研究所

ウイルス学においてウイルス複製の分子メカニズムを明らかにすることは主要な課題のひとつである。また対象ウイルスがヒトに深刻な病態を引き起こす病原ウイルスである場合は、それとともにウイルスを排除する抗ウイルス剤、治療法の開発が望まれる。私たちの研究グループではウイルス複製の分子メカニズムを明らかにするとともに新たな抗ウイルス剤の候補を得ることを目的として、低分子化合物を用いたウイルス複製の解析をおこなってきた。その結果、C型肝炎ウイルス(HCV)複製を抑制する化合物としてシクロスポリンおよびタモキシフェンを再発見し、またHCV複製に重要な宿主細胞性因子としてシクロフィリン(CyP)およびエストロゲン受容体を同定した。さらにCyPは新しい抗HCV剤の標的となりうるということが明らかとなった。今回おこなったケミカルバイオロジー的手法を用いたウイルス学の解析は、ウイルス生活環の新たな側面を明らかにするだけでなく、効率のよい抗ウイルス剤開発法となると期待される。

はじめに

これまでウイルスの生活環は主に生化学的、分子生物学的、組織学的、遺伝学的手法等により解析され、これによりウイルスのふるまいに関してさまざまな発見がなされてきた。人に深刻な病態を引き起こすウイルスに関しては、それらの知見をもとにしてこれを排除する施策や治療薬を開発することが望まれる。しかしながらこれまでこのような病原ウイルスの複製増殖を阻害し、これが生み出すさま

ざまな病態発症を阻止する手段の開発は十分であっただろうか？ウイルス学の基礎研究がそのまま新しい抗ウイルス戦略や抗ウイルス剤の開発につながる、そのような研究手法が今まで以上に必要とされるように感じられる。私たちの研究グループは、抗ウイルス剤開発を指向したウイルス学の解析方法論を確立することを目的として、新たな手法でウイルス複製の解析をおこなってきた。詳細は後述するがバイオプローブと言われる低分子化合物をツールとして、これがウイルスに引き起こす表現系を頼りに、ウイルス生活環の分子メカニズムを明らかにするという方法である¹⁹⁾。より簡単に言うと「化合物を利用してウイルスを理解する」のである。この手法の最大の利点としては、これによって明らかになったメカニズムそのものが創薬の標的となること、そしてバイオプローブそのものが抗ウイルス剤のリード化合物となり、ここから創薬研究が容易に展開できることが挙げられる。つまりここではウイルス生活環解明の基礎研究と、抗ウイルス剤開発研究が相補し合ってそれぞれの研究を押し進めることができる。本当にそのようなことが可能なのだろうか？以下に詳述する。

連絡先

Koichi WATASHI
Laboratory of Molecular Microbiology
National Institute of Allergy and Infectious Diseases
National Institutes of Health
9000 Rockville Pike, Building 4, room#304,
Bethesda, MD 20892, USA
TEL : 301-496-3027
FAX : 301-480-3686
E-mail : watashik@niaid.nih.gov
kwatashi@virus.kyoto-u.ac.jp

C型肝炎ウイルス研究とケミカルバイオロジー

C型肝炎ウイルス(HCV)は肝臓への慢性持続感染によ

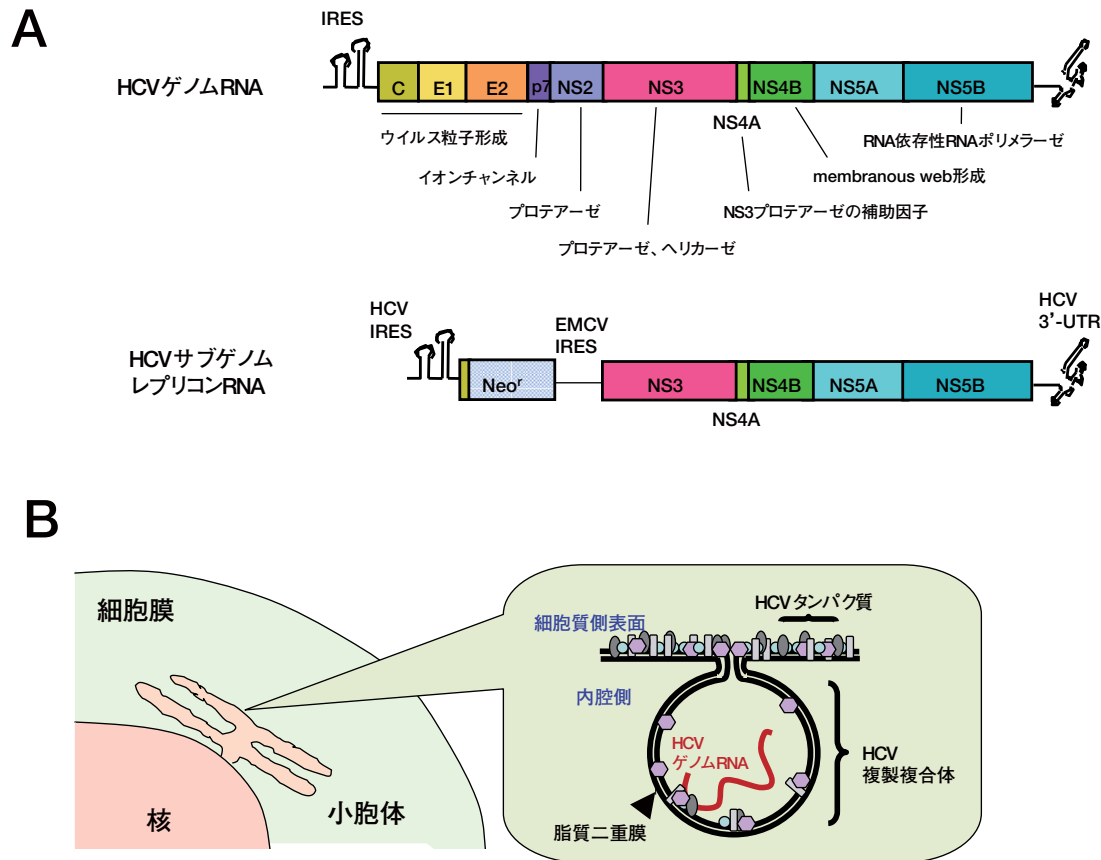


図 1 (A) HCV ゲノム RNA (上図) およびサブゲノムレプリコン RNA (下図) の構造 (上図) HCV ゲノム RNA はその読み枠内に、5' 側から core, envelope (E)-1, E2, p7, nonstructural protein (NS)-2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B の各ウイルスタンパク質をコードする。それぞれのタンパク質のウイルス生活環における機能を示した。(下図) HCV サブゲノムレプリコン RNA は 5' 側から、HCV IRES を含む 5' -UTR, ネオマイシン耐性遺伝子コード領域 (Neo^r), 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 RNA が持続的に自律複製する細胞株 (HCV レプリコン細胞) は、HCV ゲノム複製を評価するモデル系 (HCV サブゲノムレプリコンシステム) として有用である。(B) HCV 複製複合体の模式図。HCV のゲノム複製をおこなう複製複合体は、小胞体を含む細胞内膜に由来する膜構造に囲まれた構造体の中に存在すると考えられる。細胞質から隔絶されたこの構造体の中に HCV NS タンパク質の一部が存在し、ゲノム複製をおこなう。

って高率に慢性肝炎, 肝硬変, 肝細胞がんを引き起こすことが知られ, 特に本邦においては肝がんの 70-80% が HCV 感染に起因すると考えられているため, HCV 感染は大きな社会的, 公衆衛生上の問題である¹⁴⁾¹⁵⁾。その効果的治療法として現在主に用いられるのはインターフェロン (IFN) あるいはペグ IFN の単独療法あるいはこれらとリバビリンの併用療法であるが, これらの治療法によってもその著効率は 30-60% にとどまり, 特に本邦において最も多く流布する遺伝子型 1b 型 HCV に対しての効果は通常非常に低く, 数% から 40% 程度であると報告されている⁹⁾¹¹⁾¹⁵⁾。よってこれらに替わる新たな抗 HCV 剤の開発は喫緊の課題であると言える。

一方ウイルス学的観点から述べると, HCV は 1989 年に非 A 非 B 型肝炎の原因ウイルスとして報告された, フラビ

ウイルス属に属する 1 本鎖 + 鎖 RNA ウイルスである¹⁾。そのゲノムには約 9000 塩基からなる長大な読み枠がコードされており, ここからまず前駆体ポリタンパク質が翻訳され, さらに細胞およびウイルス自身がつプロテアーゼによって解裂を受け, 少なくとも 10 の機能的ウイルスタンパク質 (Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) が産生される (図 1A 上図)。このうち NS5B は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼであり, ウイルス複製に中心的な役割を果たす。1999 年にはじめて培養細胞において効率よく HCV 複製を再現する実験系 (HCV サブゲノムレプリコンシステム) が報告されて以降は, 細胞における HCV 複製メカニズムの解析が盛んに行われるに至った⁸⁾。これにより, HCV は他の + 鎖 RNA ウイルスと同様に小胞体近辺に独特の膜構造を形成し, 細胞質と隔絶された環境

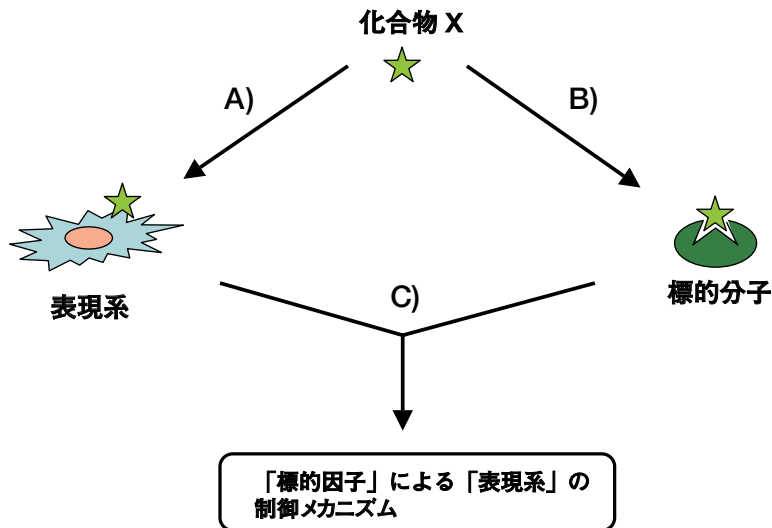


図2 ケミカルバイオロジー的手法を用いたウイルス解析の概略図. A) ウイルス複製（表現系）を変化させる化合物のスクリーニング, B) 化合物の細胞性標的因子の探索, C) 「標的因子」による「表現系」の制御機構の解析

の中で各ウイルスタンパク質およびウイルスゲノム RNA が複製複合体を形成し、ここで NS5B の働きによりウイルス複製がおこなわれることが明らかとなった (図 1B)²⁾¹⁰⁾. しかしながら HCV 複製の全貌はいまだに明らかではなく、特にどのような細胞性因子がどのようにしてウイルス複製に利用されているのかに関しては今もってまだまだ知見が少なく、私たちが本研究を始めた当時に至ってはほとんど報告が見られなかった。

私たちの研究グループは今回 HCV 複製の分子メカニズムを明らかにすること、ならびに新たな抗 HCV 剤を開発することを目的として、HCV をケミカルバイオロジーの視点から解析してみた。ケミカルバイオロジーは近年急速に発展してきた学問領域であり、化学的手法を持って生物学を明らかにすることにその意義が存在する¹²⁾。今回私たちが取った戦略は図 2 に示すように、主に 3 段階の解析から成る¹⁹⁾。1) まずウイルス複製（「表現系」）に影響を与える化合物をスクリーニングする (図 2A)。ここで得られる化合物はその後生物学（ここではウイルス学）を解析するツールとして用いることができるのでバイオプローブと呼ばれる。2) 次にバイオプローブがどのタンパク質に作用することによりウイルス複製を変化させるのか（「標的分子」）を同定する (図 2B)。3) さらに、この「表現系」と「標的分子」との関連を分子生物学的に解析することにより、宿主細胞性因子によるウイルス複製の制御メカニズムを明らかにする (図 2C)。またさらに 1) で抗ウイルス効果の高いバイオプローブが得られた場合、これをリード化合物としてさらに至適な抗ウイルス剤を開発することも可能である。このように、低分子化合物を利用してウイル

ス複製を明らかにしようと考えた。

結果的には、今回シクロスポリン (CsA) とタモキシフェン (TAM) が HCV 複製を抑制することを見だし、これらを用いた解析により HCV 複製に関わる宿主細胞性因子としてシクロフィリン (CyP) およびエストロゲン受容体 (ER) を同定した⁴⁾⁶⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。また CyP 阻害剤が実際に新たな抗 HCV 剤候補となると考えられた⁴⁾。以下その詳細について述べる。

HCV 複製を阻害する化合物の探索 —シクロスポリンの抗 HCV 効果

まず、HCV 複製を抑制する化合物のスクリーニングをおこなった。用いた実験系は HCV 複製を培養細胞で簡便に評価できる HCV サブゲノムレプリコンシステムである⁸⁾¹⁵⁾。このシステムで用いる細胞 (HCV レプリコン細胞) 内では、ウイルス様 RNA (サブゲノムレプリコン RNA) から NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B タンパク質が発現し、これらの働きによりサブゲノムレプリコン RNA が持続的に自律複製している (図 1A 下図)。つまり実際の HCV RNA 複製を模倣した系であると考えられ、この細胞の HCV RNA 量、タンパク質量を定量することにより HCV 複製活性を評価することができる。このような HCV レプリコン細胞にさまざまな化合物を処理した後に細胞内 HCV RNA を定量することによって、各化合物が HCV 複製活性に与える効果を評価した。ポジティブコントロールとした IFN α を 100 IU/ml, 1 週間処理した場合、HCV RNA 量は約 1/400 に減少することが確認された (図 3A)。一方処理し

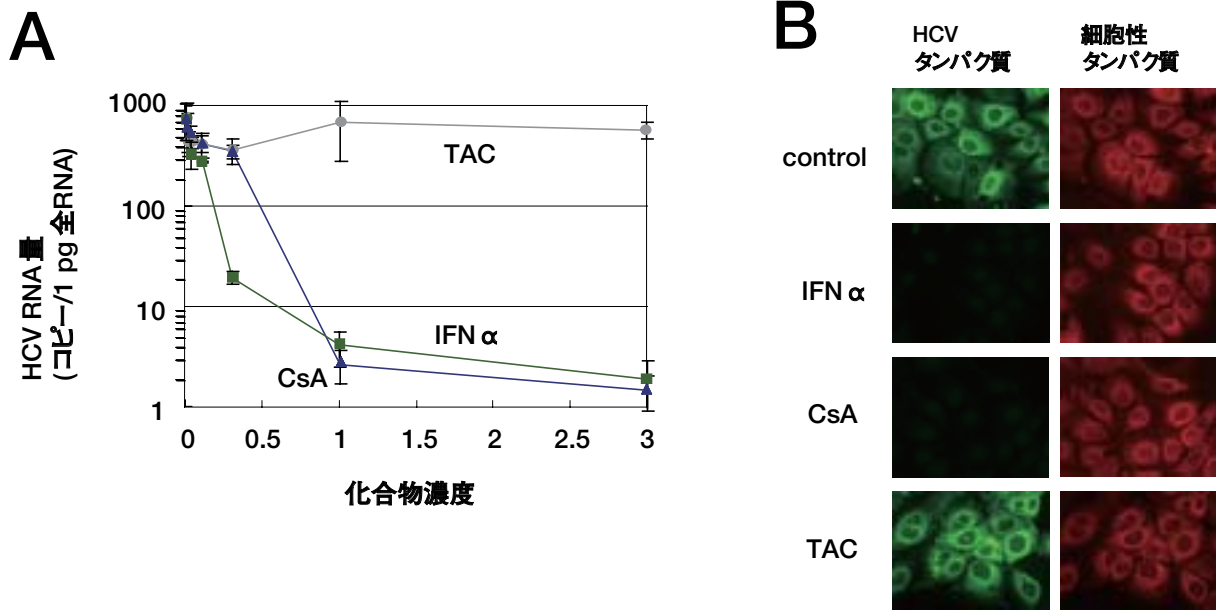


図3 シクロスポリン (CsA) による HCV ゲノム複製の抑制. (A) インターフェロン (IFN) α (x 100 IU/ml), CsA ($\mu\text{g/ml}$), タクロリムス (TAC) ($\mu\text{g/ml}$) をさまざまな用量で1週間処理した細胞中の HCV RNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により定量した. (B) IFN α (100 IU/ml), CsA (1 $\mu\text{g/ml}$), TAC (1 $\mu\text{g/ml}$) を1週間処理した, あるいは未処理 (control) の細胞中の HCV NS5A タンパク質 (緑色), 細胞性 PDI タンパク質 (赤色) を免疫蛍光法で検出した. CsA は HCV RNA, タンパク質発現を強く抑制した.

たほとんどの化合物は効果を示すことがなかったが, その中でも免疫抑制剤として知られる CsA を 1 $\mu\text{g/ml}$, 1 週間処理することによっては驚くべきことに HCV RNA 量が約 1/500 にまで劇的に減少した (図 3A)¹⁶⁾. 同様に CsA は HCV タンパク質の発現を特異的に低下させ (図 3B), HCV RNA 合成活性も低下させた. これらの効果は細胞毒性をほとんど示すことなく観察された. 一方別の免疫抑制剤であるタクロリムス (FK506) の処理によってはこのような効果は認められなかった (図 3A, B). さらにレプリコン以外の別の系で確認するために HCV 患者由来の血漿を用いた in vitro 感染実験をおこなったところ, やはり CsA 処理によってウイルス感染細胞内での HCV ゲノムの増幅は消失した. 以上のことより CsA は培養細胞において HCV ゲノム複製を顕著に抑制することが示された¹⁶⁾.

シクロフィリン B による HCV 複製制御

ではどのようなしくみによって CsA は HCV を排除するのであろうか? 第二段階として, HCV 複製に関連する CsA の標的因子の同定をおこなった (図 2B). CsA は主に 1) CyP, 2) カルシニューリン (CN) / NF-AT 経路, 3) P-糖タンパク質 (P-gp), の 3 つの標的を持つことが知られている¹⁸⁾. まず CsA はプロリン異性化酵素である CyP と直接結合し, この酵素活性を失わせる. またこの CsA/CyP

複合体はさらに脱リン酸化酵素である CN に結合し, これを不活化させる. これは結果的に CN の脱リン酸化酵素活性に依存して機能する転写因子 NF-AT を不活性状態にし, 下流遺伝子の発現を抑制する. CsA の免疫抑制作用はこの 2) の CN/ NF-AT 経路阻害によるものである. さらに CsA は細胞膜トランスポーターである P-gp の機能を阻害する. ではこれらのどの標的因子への阻害を介して HCV 複製が抑制されるのか, が次の問題となる. これを解決するために, CsA に化学修飾を施したさまざまな誘導体を用いた. ここで用いた誘導体は, 化学修飾により上記 3 標的への作用が変化しており, その阻害作用の一部が欠失したものである. 各誘導体が 3 標的のうちどれを阻害してどれを阻害できなくなっているのかはすでに明らかとなっている. そしてこれら複数の誘導体の HCV 複製に対する効果を調べ, 各標的分子阻害との相関性を調べた. その結果, 抗 HCV 効果は CyP 阻害活性とほぼ完全に相関していることが示された¹⁸⁾. つまり CsA は CyP を阻害するために HCV 複製を抑制すると考えられた. さらに, CsA とは異なる系統の CyP 阻害剤サングリフェリンを処理することによっても HCV 複製は抑制された. 以上より, CyP を阻害すれば HCV 複製が低下することが証明された.

これを言い換えれば, CyP は HCV 複製に重要な役割を果たしているということである. CyP はプロリン異性化酵

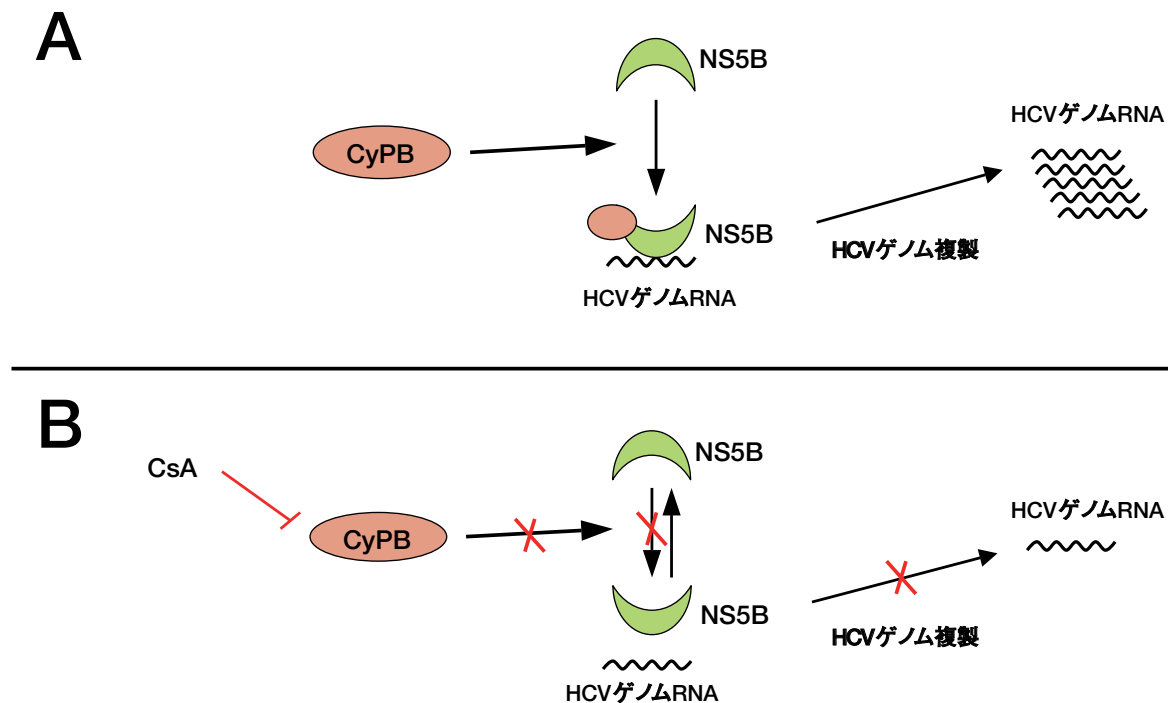


図4 シクロフィリン B (CyPB) による HCV ゲノム複製制御の模式図。(A) 細胞内において HCV RNA ポリメラーゼである NS5B は、細胞性 CyPB と相互作用し、HCV ゲノム RNA との親和性を高める。これによって効率のよい HCV ゲノム複製が可能となる。(B) しかしながらシクロスポリン (CsA) 存在下では、NS5B と CyPB の結合が解離する。CyPB による機能的補助が失われた NS5B は HCV ゲノム RNA との親和性が低下し、HCV ゲノム複製効率が低下する。これによって HCV ゲノム複製が抑制されると考えられる。

素活性をもつタンパク質であり、その酵素活性によりさまざまなタンパク質の立体構造変換を促進する。CyP はほ乳類細胞においては CyPA, CyPB, CyPC 以下少なくとも 15 種類のサブタイプからなるファミリータンパク質である。各 CyP サブタイプを特異的に認識する siRNA を用いた我々の RNAi 解析の結果によると、これら CyP ファミリー間には HCV 複製への役割に対して特異性があり、少なくとも CyPB は HCV 複製に重要であることが示唆された¹⁸⁾。

シクロフィリン B による NS5B の機能制御

以上 CsA をバイオプローブに用いた解析によって、細胞性因子 CyPB が HCV 複製に関与していることが明らかとなった。以下は最終段階として、CyPB がどうやって HCV 複製を制御しているか解析をおこなった (図 2C)。まず結合実験によって、HCV タンパク質のうち、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである NS5B が特異的に CyPB と相互作用していることが示された。この相互作用は CsA 処理によって解離した。NS5B および HCV ゲノム RNA は主にウイルス複製複合体を含む小胞体の細胞質側表面に局在することが知られるが (図 1B)、CyPB の一部も小胞体の細胞質側表面に局在し、NS5B と相互作用していた。今回この相

互作用によって CyPB は NS5B の RNA 結合を促進させていることが明らかとなった。つまり NS5B はもともと HCV の RNA ポリメラーゼであり HCV ゲノム RNA と結合することによって HCV ゲノムを複製するが、細胞性 CyPB の助けを借りて RNA 結合活性を上昇させ、これによってはじめて効率の良い HCV ゲノム複製が可能になると考えられた (図 4A)。CsA はこの CyPB と NS5B の相互作用を解離させ、NS5B が CyPB を利用できなくすることで HCV ゲノム複製を抑制することが示唆された (図 4B)¹⁸⁾。

創薬の標的としてのシクロフィリン

このように CyPB による NS5B の機能制御メカニズムが明らかとなった。そこでわれわれはこのメカニズムが抗 HCV 剤の新たな創薬の標的になり得るかどうかをさらに検証した⁴⁾。CsA 自身は肝細胞株において確かに強い抗 HCV 効果を持っていたが、それとともに本来 T 細胞への作用を介する強力な免疫抑制効果をもつため、生体内における HCV 制御を考えた場合、諸刃の剣となる可能性がある。抗ウイルス薬としては免疫抑制作用のない化合物が望ましく、また肝細胞においては CsA よりもさらにできるだけ強く HCV 複製を阻害する化合物があれば理想的である。結果的

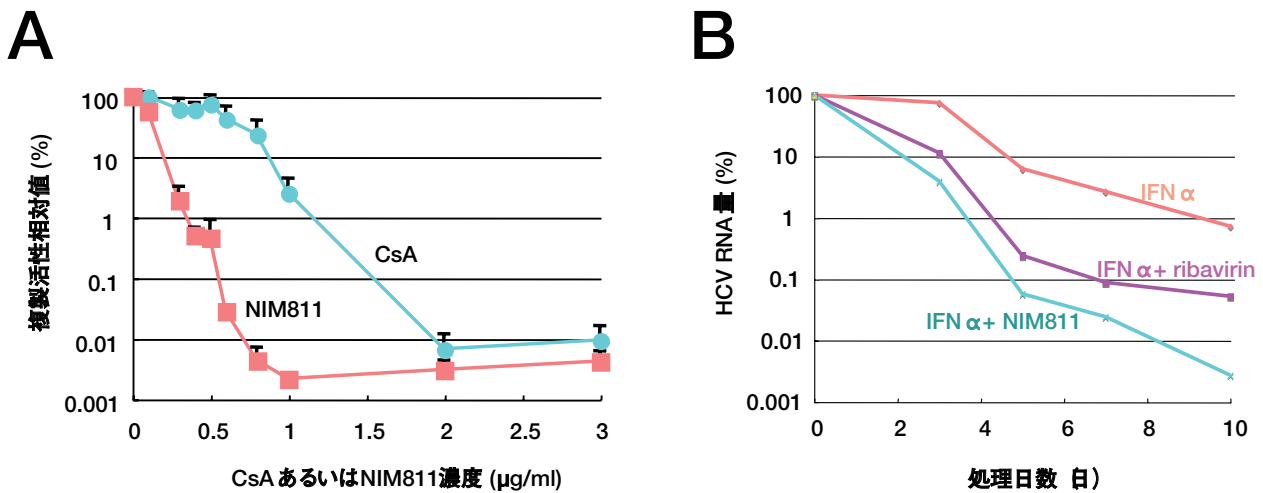


図5 シクロフィリン阻害剤NIM811によるHCV複製抑制。(A) CsAあるいはNIM811をさまざまな用量(μg/ml)で1週間処理した後の、細胞中のHCV複製活性を調べた。(B) IFN α 10 IU/ml, IFN α 10 IU/ml+200 μMリバビリン, IFN α 10 IU/ml+NIM811 1 μg/mlを3, 5, 7, 10日間処理した後の細胞内HCV RNA量を定量した。NIM811はCsAよりもより低用量でHCV複製を抑制し、またIFN α との併用処理により、IFN α とリバビリン併用処理よりも強くHCVを排除した。

に、CsA誘導体のうちNIM811はこのような条件を満たす化合物であると考えられた。これはCN/NF-AT経路を阻害できないため免疫抑制活性が欠失したCsA誘導体であり、さらにCsAよりもCyP阻害活性が強い⁴⁾。レプリコンシステムによりNIM811の抗HCV効果を検討したところ、特に低用量処理においてCsAよりもさらに強い抗HCV作用を発揮した(図5A)⁴⁾。またIFN α と1週間併用することによって、IFN α 単独に比べてさらに1/100以上細胞内のHCV RNA量を減少させ、これはIFN α とリバビリンの併用処理よりも効果が高いものであった(図5B)。またNIM811を3週間単独処理することによって、レプリコン細胞中のHCV RNAが検出限界以下にまで完全に除去された。このようにNIM811をはじめとするCyP阻害剤は新しいタイプの抗HCV剤として有望である可能性が考えられた⁴⁾。

シクロフィリン阻害剤の開発と臨床応用への意義

今回の基礎研究によって、CyP阻害剤が強力な抗HCV効果を持つことが判明したが、実際のHCV患者における効果はどうか、現在の状況を記述しておきたい。現在、私たちが実験に用いたNIM811とさらにこれ以外にもDEBIO-025, SCY-635と少なくとも3つのCsA誘導体がアメリカ合衆国やヨーロッパの製薬会社により臨床試験中である。すべて免疫抑制活性を欠失させたCsA誘導体であり、HCVへの作用メカニズムは基本的に同様であると想像される。ごく最近DEBIO-025は慢性HCV感染患者14日投与により血中ウイルス量を平均3.6log減少させると報告され³⁾、実際のHCV感染患者においてもCyP阻害剤が

治療に有効である可能性が示唆されてきているのは注目に値する。また、慢性HCV感染患者においてIFN単独療法に比較してCsAを併用することによりその著効率が上昇するという臨床成績が従来より報告されている(55.3% vs. 31.8%)⁵⁾。一方HCV持続感染患者における肝移植適応において、移植後早期にHCV再活性化、再感染がおこることが大きな問題となっている。ここで今回の知見を鑑みて、移植後免疫抑制剤としてCsAを用いることで、移植片拒絶反応抑止だけでなく同時にHCV再感染を防ぐという二重の効果の期待できるのかという問題が、最近この分野でのトピックの一つとなっている。この問題に関しては現在さまざまな施設から互いにcontroversialな結果があいついで報告されており、多くは今後の課題として残されている⁷⁾。しかし肝移植後のIFN、リバビリン抵抗性HCV感染患者において、IFN、リバビリンとともに免疫抑制剤としてCsAを用い始めることにより、8例中5例でその血中ウイルス量が完全に陰性化するという報告も見られており¹³⁾、今後さらなるトライアルが重要だと思われる。今回の結果が、多くのウイルス性疾患患者に福音をもたらす治療法開発の一助となることを願っている。

タモキシフェンの抗HCV作用とそのメカニズム

さて、この研究のはじめのHCVサブゲノムレプリコンシステムを用いたスクリーニングでは、乳がんに対する抗がん剤として知られるタモキシフェン(TAM)も抗HCV作用を持つことが明らかとなった¹⁷⁾。こちらに関しては誌面の都合上簡単に記載する。レプリコン細胞にTAMを1 μM, 1週間処理することによって、HCV RNA量は約

1/50 にまで減少した。同様に TAM は HCV タンパク質量を低下させ、HCV 複製活性を抑制すると考えられた。TAM も CsA と同様に細胞内に複数の標的分子を持つことが知られているが、これらをそれぞれ阻害する化合物や siRNA を用いた解析により、標的分子の一つであるエストロゲン受容体 (ER) が HCV 複製に関与していることが示唆された。ER には ER α と ER β の 2 種類のサブタイプが存在し、女性ホルモンであるエストロゲンの標的分子として働く。よく知られた機能としてはエストロゲン依存的に核内で下流遺伝子の発現を直接上昇させる核内受容体としての働きであるが、それとは別に細胞膜などの膜成分にも局在し細胞内情報伝達や脂質ラフトが関与するイベントにも役割を果たす。RNAi および過剰発現解析により、少なくとも ER α は HCV 複製に重要な役割を果たすと考えられた。そこで ER α と各 HCV タンパク質を用いて結合実験をおこなったところ、ER α と NS5B との特異的相互作用が認められた。NS5B との親和性をほとんど欠失した ER α 点変異体の過剰発現では野生型 ER α に比べて、HCV 複製活性の上昇が大きく減弱したことから、ER α による HCV 複製制御には NS5B との相互作用が重要であることが示唆された。さらに、TAM あるいは ER α に対する siRNA を処理した細胞では、複製複合体中の NS5B 量が有意に減少することが認められた。以上より、ER α は NS5B の複製複合体への局在/会合を制御していると考えられた¹⁷⁾。

まとめ

HCV NS5B は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性を持ち、その性状や阻害剤に関しては *in vitro* での酵素アッセイによって広く解析、スクリーニングがなされてきたが、細胞内での実際の挙動に関しては決して報告が多くはなく、特にどのような宿主因子に制御をうけて HCV ゲノムを複製するかについてはほとんど明らかでなかった。本研究により NS5B は少なくとも複製複合体への局在/会合、RNA との結合という少なくとも 2 つのステップで宿主細胞性因子により制御を受けていることが明らかとなった。ER α は NS5B と相互作用し NS5B の複製複合体への局在/会合を促進する、さらに CyPB は NS5B と相互作用することにより NS5B の RNA への親和性を高める、という 2 つのメカニズムが存在すると考えられた。一般に多くのウイルス複製メカニズムが明らかとなってもそれぞれが本当にすべて抗ウイルス剤の標的となるわけではない。今回の研究で重要なことは、これら 2 つのメカニズムは抗 HCV 剤を開発するうえでの創薬の標的となりうる点である。TAM および CsA はそれぞれこれらのメカニズムを阻害するわけであるが、これら化合物は確かに HCV 複製を阻害することがわかった。そもそもはそれぞれが本研究の発端であったわけである。前述したように、CyP 阻害剤に関しては臨床試験が進行中であり、また臨床での現行の治療法に関しても

ある一定の問題を提起するものとなった。

現在さまざまな研究者によってさまざまに魅力的なウイルス研究が展開されているが、筆者はこのような低分子化合物を用いてウイルスを解析し、また抗ウイルス剤開発まで視野に入れて研究をおこなうことは、また一つ重要でかつ「おもしろい」方法であると考えている。今回私たちがおこなった解析法はまだ改良の余地があり今後さらに発展させていく必要があると感じているが、同時に多くの可能性を秘めているのではないかと期待している。さまざまなウイルス分野内外の研究者の先生方と共同研究できる機会や、また議論や批判いただく機会、さらに一緒になって研究を楽しんでいただく機会があれば筆者としては大変有り難いと考える次第である。

謝 辞

本稿は第 66 回日本ウイルス学会杉浦奨励賞受賞研究をまとめたものです。本研究は主に京都大学ウイルス研究所ヒトがんウイルス研究分野 (下遠野邦忠研究室) でおこなわれたものです。本研究を着想し行うにあたっては下遠野邦忠教授、土方誠准教授をはじめ多くの先生方、同僚、その他関係者の方々にご助言、ご協力いただきました。今回の研究はこれまで出会い、議論していただいたすべての皆様との関わりから生まれたものであり、ここに熱く感謝申し上げます。また杉浦奨励賞にご推挙いただきました下遠野邦忠教授、東京大学医学系研究科野本明男教授、国立感染症研究所宮村達男所長に深謝いたします。

引用論文

- 1) Bartenschlager R, Lohmann V.: Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res* 52: 1-17, 2001.
- 2) Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K.: Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76: 5974-5984, 2002.
- 3) Flisiak R, Horban A, Gally P, Bobardt M, Selvarajah S, Wiercinska-Drapalo A, Siwak E, Cielniak I, Higersberger J, Kierkus J, Aeschlimann C, Groscurin P, Nicolas-Metral V, Dumont JM, Porchet H, Crabbe R, Scalfaro P.: The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfecting with hepatitis C and human immunodeficiency virus. *Hepatology*, 47: 817-826, 2008
- 4) Goto K, Watashi K, Murata T, Hishiki T, Hijikata M, Shimotohno K.: Evaluation of the anti-hepatitis C virus effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporin A, and NIM811. *Biochem Biophys Res Commun*. 343: 879-884, 2006.
- 5) Inoue K, Sekiyama K, Yamada M, Watanabe T, Yasuda H, Yoshida M.: Combined interferon alpha2b and cyclosporin A in the treatment of chronic hepatitis C: controlled trial. *J Gastroenterol*. 38: 567-572, 2003.

- 6) Ishii N, Watashi K, Hishiki T, Goto K, Inoue D, Hijikata M, Wakita T, Kato N, Shimotohno K.: Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication. *J Virol.* 80: 4510-20, 2006.
- 7) Levy G, Grazi GL, Sanjuan F, Wu Y, Muhlbacher F, Samuel D, Friman S, Jones R, Cantisani G, Villamil F, Cillo U, Clavien PA, Klintmalm G, Otto G, Pollard S, McCormick PA.: 12-month follow-up analysis of a multicenter, randomized, prospective trial in de novo liver transplant recipients (LIS2T) comparing cyclosporine microemulsion (C2 monitoring) and tacrolimus. *Liver Transpl* 12: 1464-1472, 2006.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Moradpour D, Gosert R, Egger D, Penin F, Blum HE, Bienz K.: Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. *Antiviral Res* 60: 103-109, 2003.
- 11) Pawlotsky JM.: Therapy of hepatitis C: from empiricism to eradication. *Hepatology* 43: S207-S220, 2006.
- 12) Schreiber SL.: Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry. *Bioorg Med Chem* 6: 1127-1152, 1998.
- 13) Sugawara Y, Kaneko J, Makuuchi M.: Cyclosporin A for treatment of hepatitis C virus after liver transplantation. *Transplantation*, 82: 579-580, 2006.
- 14) Takikawa K.: Pathogenesis and treatment of hepatitis C virus-related liver diseases. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 3: 17-20, 2004.
- 15) 渡士幸一, 下遠野邦忠: 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 *ウイルス* 55: 105-110, 2005.
- 16) 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.
- 17) Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Goto K, Aly HH, Shimotohno K.: Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptor with viral RNA polymerase NS5B. *J Biol Chem* 282: 32765-32772, 2007.
- 18) Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K.: Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* 19: 111-122, 2005.
- 19) Watashi K, Shimotohno K.: Chemical genetics approach to hepatitis C virus replication: cyclophilin as a target for anti-hepatitis C virus strategy. *Rev Med Virol* 17: 245-252, 2007.

Chemical biology for revealing a life cycle of hepatitis C virus

Koichi WATASHI

(National Institutes of Health, USA, Institute for Virus Research, Kyoto University, Japan)
9000 Rockville Pike, Building 4, room#304, Bethesda, MD 20892, USA
e-mail: watashik@niaid.nih.gov, kwatashi@virus.kyoto-u.ac.jp

It is one of the major subjects in the virology field to develop novel anti-viral strategies as well as to reveal the mechanism of viral replication. We have developed a method of chemical compound-directed analysis on viral replication. Until now, we rediscovered cyclosporin A and tamoxifen as anti-hepatitis C virus (HCV) compounds. Through analysis using these compounds, it was revealed that host cell factors cyclophilin (CyP) and estrogen receptor were important for HCV replication. CyP was demonstrated to serve as a new target of the development for anti-HCV agents and CyP inhibitors are now under clinical trials. Thus, an application of chemical biology to virology would provide not only mechanistic aspects of viral life cycles but also new anti-viral strategies.