

2. C型肝炎ウイルスゲノムの複製

加藤 宣之

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

腫瘍制御学講座腫瘍ウイルス学分野

培養細胞を用いたC型肝炎ウイルス(HCV)レプリコンシステムや全長HCV RNA複製システムの開発によりHCVの複製機構についての研究が大いに進展した。さらに、これらのRNA複製システムはルシフェラーゼのようなレポーター遺伝子の導入により抗HCV剤のスクリーニングに適したシステムに改良された。HCVレプリコンや全長HCV RNAを有する細胞の年単位における長期培養により得られたHCVの遺伝子解析からHCVの遺伝的変異の蓄積や遺伝的多様性の増大が培養期間に依存して起こることが示された。HCVレプリコンや全長HCV RNAにおける適応変異の出現はHCV RNAの複製システムにおいて特徴的な現象である。ほとんどのHCV RNA複製システムではヒト肝癌HuH-7細胞株が使用されているが、適応変異の特殊な組み合わせによりHuH-7細胞以外の新しいヒト肝癌細胞株を用いたHCV RNA複製システムが開発された。

はじめに

C型肝炎ウイルス(HCV)のRNAゲノムの全容が解明された当初は¹⁷⁾、培養細胞でHCVを増殖させてRNAゲノムの複製機構を解明するのは時間的问题だと思われていた。しかしながら、ことはそう簡単ではなく、20年近く経過した現在でも、完全解明に至っていない。その大きな原因としては、培養細胞レベルでの効率のよいHCVゲノムの複製系の開発が遅れたことが挙げられる。さらに、チンパンジー以外の安価で再現性のとれる感染実験動物モデルの開発も困難であったことも一因として挙げられる。本稿では培養細胞を用いたHCVゲノムの複製系の開発がどのように進展し現在に至っているのかを概説する。なお、HCV JFH1株を用いたHCV増殖系の詳細については、本特集の鈴木らの稿を参照していただきたい。

1 HCVレプリコンシステム

1992年頃から数年間、様々な種類の培養細胞にHCV陽性血清を添加させ、HCV感染を許容する細胞のスクリーニングが筆者らも含めて盛んに行われた。その結果、20種類程の培養細胞株がHCV感染許容株として論文発表されたが、どれも細胞内でのHCVゲノムの複製レベルは1 μ g Total RNAあたり $10^1 \sim 10^4$ コピーという低レベルであり、感染性HCV粒子の産生はごくわずかであった²⁰⁾。研究者の間で落胆の声が聞こえる中、登場してきたのが、HCVレプリコンである。細胞内で自律複製できるレプリコンという概念は以前からあったが、1999年ドイツのBartenschlagerらのグループがHCVレプリコンの開発に成功した²⁷⁾。これによりHCVゲノムの高効率な複製を培養細胞で再現させることが可能になり、HCVゲノムの複製に関する研究が一気に進むこととなった。さらに、このレプリコンシステムは抗HCV剤のスクリーニングも可能にしたことから、HCV研究は一層の活気を帯びることとなった。図1に示すように、HCVレプリコンはHCVゲノムの複製に必要な非構造領域(NS)のNS3からNS5B領域とゲノムの両末端を有するHCVサブゲノムが細胞内で自己複製することができる。このHCVレプリコンはHCVの構造領域をネオマイシン耐性遺伝子(Neo^R)と、その下流に脳心筋炎ウイルス(EMCV)のinternal ribosomal entry

連絡先

〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
腫瘍制御学講座腫瘍ウイルス学分野
TEL: 086-235-7385
FAX: 086-235-7392
E-mail: nkato@md.okayama-u.ac.jp

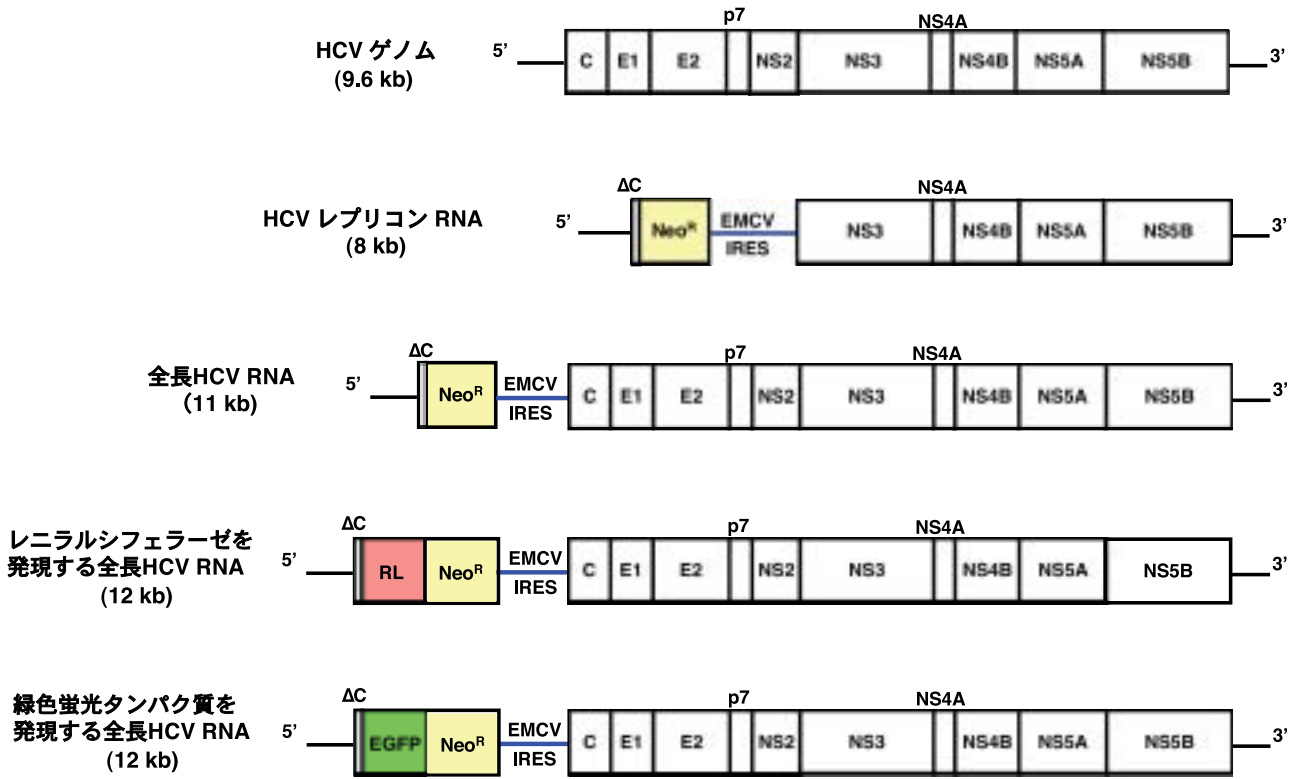


図1 複製可能な HCV RNA の構造

site (IRES) で置換した構造になっている。HCV レプリコン RNA を培養細胞にエレクトロポレーション法により強制導入して G418 存在下に培養するとレプリコン RNA が効率よく複製している細胞のみが増殖して 2-3 週間後には G418 耐性のコロニーが形成される。しかしながら、どんな培養細胞でもうまくいくわけではなく、当初はヒト肝癌細胞株である HuH-7 細胞のみでの成功であった²⁷⁾。HuH-7 は 1982 年に岡山大学医学部において樹立された細胞株であったが³⁶⁾、現在ではほとんどの論文では Huh7 という俗名で使用されている。その後、ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa、ヒト肝癌細胞株 HepG2 や HuH-6 さらにはマウス肝癌細胞株などでも HCV レプリコンの複製が可能であることが単発的に報告されたが^{2,6,8,23,45,48,52)}、これらの細胞内におけるレプリコンの複製レベルは HuH-7 細胞由来のものに比べると桁違いに低くその後の研究にあまり使用されていないようである。HCV 株については、最初に報告された Con1 株 (遺伝子型 1b) ばかりでなく、幾つか異なる HCV 株で作成されており、我々も今年度のウイルス学会学術集会での発表も加え、これまでに 1b 遺伝子型に属する 7 種類の HCV 株由来のレプリコン複製細胞株の樹立を報告している^{21,25,29)}。そのほとんどは、HuH-7 細胞株を用いたものであるが、2005 年に感染性 HCV 粒子産生システムの開発⁴⁶⁾ に大役を果たした JFH-1 株 (2a 遺伝子型) について

は、様々な細胞株においてレプリコン RNA の複製が比較的容易に起こることが報告されている^{6,45)}。その原因を解析したところ、JFH-1 株の NS5B 領域や NS3 のヘリケース領域が他の HCV 株とは異なり、HCV RNA の複製能を著しく高めていることが示された³¹⁾。後述する全長 HCV RNA 複製細胞株に関する情報も含めて現在までに細胞株として樹立されたレプリコン複製細胞株についての情報を表 1 にまとめた。

G418 耐性として得られるコロニー細胞内で複製増殖しているレプリコンの遺伝子解析の結果、それぞれのコロニーに特異的な遺伝的変異が生じていることが明らかとなった²⁶⁾。細胞株として樹立されたものではほぼ全例で 1-数個のアミノ酸置換を伴う遺伝的変異が NS3 から NS5A 領域 (NS5B 領域では C 末端部にわずかに変異部位あり) に渡って検出され、それらの大部分がレプリコンの複製効率を 2-30 倍上昇させる効果を有していることが示されている²⁶⁾。このような遺伝的変異は適応変異 (adaptive mutation) と呼ばれている。しかし、適応変異の組み合わせによっては RNA 複製の効率が 200 倍以上になったり、逆に 1/5 以下に抑制されてしまったりすることも示されており、適応変異の数を単に増やせばよいというわけではなく複雑な様相を呈している²⁶⁾。また、HCV 株が違うと適応変異の効果も異なってくることから、適応変異がどのような理由により

HCV ゲノムの複製効率に影響を与えているかの詳細は分かっていない。2a 遺伝子型の JFH-1 株レプリコンには適応変異が生じていないことはその点で興味深く、1b 遺伝子型のものとは対比することによりその原因を探ることができるのかもしれない。

C 型肝炎患者の半数はインターフェロン (IFN) 治療に抵抗性を示すことから、レプリコン複製細胞も IFN に抵抗性を示すものと当初予想されていたが、意外にもどの HCV 株由来のレプリコンの複製も IFN (α , β , および γ) に高感受性であった^{9,10,11,21}。ただ、このようなレプリコン複製細胞に対して IFN 処理を繰り返し行うと次第に IFN 抵抗性を獲得したレプリコン複製細胞が生じてくることも明らかになっている³⁷。ただ、この場合の原因としてはレプリコンの遺伝的変異により IFN 抵抗性になるというよりもむしろ宿主細胞側の変化 (IFN 受容体の変異や IFN 誘導遺伝子のメチル化など) によるものであることが示されている^{33,35,38}。

レプリコンの複製が IFN に高感受性を示したことから、高濃度 (> 500 IU/ml) の IFN 処理を数回連続して行うことにより細胞内のレプリコン RNA を完全に除くことができる。このようにして得られた細胞をレプリコン RNA が薬剤により排除されたという意味合いで「Cured cell」或は「治癒細胞」と呼んでいる。この治癒細胞に別の HCV 株由来のレプリコン RNA を導入すると比較的容易に G418 耐性のコロニーが得られることから、新たなレプリコン複製細胞の樹立のためによく使われている^{5,21}。従って、治癒細胞は HCV ゲノムの複製に必要な因子を豊富に有していると考えられ、HCV ゲノムの複製環境が整っている細胞と言える。

レプリコンの Neo^R 遺伝子をルシフェラーゼ遺伝子に置き換えたレプリコンは一過性の RNA 複製ではあるものの、レポーターアッセイにより RNA の複製レベルを比較的容易に定量できることから抗 HCV 剤のスクリーニングには威力を発揮した^{32,50,51}。現在では、Neo^R 遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子を融合させたレプリコン複製細胞も樹立されており¹²、抗 HCV 剤の評価に使用されている。

2 全長 HCV RNA 複製システム

レプリコン複製細胞の普及により、HCV ゲノムの複製機構についての研究が大いに進展したが、レプリコンには HCV ゲノムのコア～NS2 領域が含まれていない。特に、コア蛋白質は細胞に多彩な機能変化をもたらすことがこれ迄に報告されている^{16,47} ので、レプリコン複製細胞で観察される現象 (特に細胞機能に与える影響) は HCV ゲノム全体が複製している場合とはかなり異なっている可能性がある。最初のレプリコン複製細胞が報告されてから 3 年後の 2002 年、HCV ゲノム全体が効率よく複製している全長 HCV RNA 複製細胞株 (1b 遺伝子型の N 株と Con1 株)

が米独の 2 つの研究室から相次いで報告された^{15,42}。図 1 に示すように、全長 HCV RNA は Neo^R 遺伝子や EMCV-IRES を含むため、本来のゲノムサイズ (9.6 kb) より長い 11 kb であるが、ノーザンブロットやウェスタンブロット解析により HCV RNA や HCV 蛋白質が容易に検出され細胞内での複製増殖レベルはレプリコンと同程度であることが示されている。ただ、このような細胞系においてはいくらかのウイルス様粒子の産生はあるものの残念なことに感染性 HCV 粒子の産生は見られない^{15,42}。

最初の報告から少し遅れをとったが、我々の研究室でも、O 株 (ヘルシーキャリアー由来) と AH1 株 (急性肝炎患者由来) の HCV ゲノムがそれぞれ効率良く複製している全長 HCV RNA 複製細胞株の樹立に成功し、O 細胞と AH1 細胞と命名した^{15,29}。これらの細胞では 1 μ g の Total RNA 当たり少なくとも 10⁷ コピー以上の HCV RNA を含んでいることから RNA 複製は高いレベルにあることが示唆される。これらの細胞における HCV RNA の複製レベルは年単位の長期継代培養においても維持されることが分かっている。O 細胞と AH1 細胞を用いた比較実験から、O 株と AH1 株の RNA 複製が IFN- γ やシクロスポリンに対して異なる感受性を示すことを見出し、その原因は細胞側因子よりもむしろ HCV 株の違いによることを示した²⁹。表 1 に現在までに安定的な細胞株として樹立され報告されている全長 HCV RNA 複製細胞の情報をまとめて示した。複製効率が高い JFH-1 株を除くとどの HCV 株についても HuH-7 細胞株以外の細胞株を用いて全長 HCV RNA の複製を安定的に維持できるシステムの構築に成功していない。

3 レポーター遺伝子を発現する全長 HCV RNA 複製システム

全長 HCV RNA 複製細胞株は HCV ゲノムの複製増殖機構についての解析には適していたが、抗ウイルス剤の定量評価や薬剤のスクリーニングには操作の煩雑さやそれに要する時間そして経費などの面であまり適していない。そこで、我々は全長 HCV RNA の複製系を改良し、HCV RNA の複製レベルを細胞内で発現しているルシフェラーゼ活性を測定するだけで正確かつ簡便に定量モニターできるアッセイ系の開発を行った。

ルシフェラーゼ遺伝子を全長 HCV RNA の Neo^R 遺伝子部分に組み込んで Neo^R との融合蛋白質の形で発現させるようにしてルシフェラーゼ活性と HCV RNA の複製レベルが直接リンクするように設計した (図 1 参照)。当初はホタルルシフェラーゼ遺伝子を用いたが、それではまったくうまく行かなかった。この場合、全長が 12.6 kb となってしまう RNA ゲノムの安定性に欠けるのが原因ではないかと考えられた。そこで、ウミシイタケ由来のルシフェラーゼ遺伝子を用いて全長を 12 kb に抑えたところ功を奏し、培養継代によっても 12 kb の RNA が欠落したり欠損

表1 現在までに報告されている HCV レプリコン或は全長 HCV RNA を有する細胞株

HCV 株 (遺伝子型)	宿主細胞	HCV レプリコン	全長 HCV RNA
Con-1 (1b)	HuH-7	Lohmann V et al. (27)	Pietschmann T et al. (42)
	HEK293	Ali S et al. (2)	
	HuH-6	Windisch MP et al. (48)	
	HeLa, Hepal-6	Zhu Q et al. (52)	
N (1b)	HuH-7	Guo JT et al. (11)	Ikeda M et al. (15)
H77 (1a)	HuH-7	Blight KJ et al. (4)	Blight KJ et al. (5)
1B-1 (1b)	HuH-7	Kishine H et al. (25)	
O(1b)	HuH-7	Kato N et al. (21)	Ikeda M et al. (12)
HC-J4 (1b)	HuH-7	Maekawa S et al. (28)	
AH1 (1b)	HuH-7	Mori K et al. (29)	Mori K et al. (29)
1B-4 (1b)	HuH-7	Nishimura G et al. (*)	Ikeda M et al. (*)
1B-5 (1b)	HuH-7	Nishimura G et al. (*)	Ikeda M et al. (*)
KAH4 (1b)	HuH-7	Nishimura G et al. (*)	
KAH5 (1b)	HuH-7	Nishimura G et al. (*)	Ikeda M et al. (*)
JFH-1 (2a)	HuH-7	Kato T et al. (22)	
	HeLa, 293	Kato T et al. (23)	
	HepG2, IMY-N9	Date T et al. (8)	
	HuH-6	Windisch MP et al. (48)	
	MMH1-1 (mouse)	Uprichard SL et al. (45)	Uprichard SL et al. (45)
	MEFs (mouse)	Chang KS et al. (6)	

* 第56回日本ウイルス学会学術集会

したりすることなく安定的に複製維持されるクローン化細胞株 OR6 の樹立に成功した^{12,34)}。実際、RT-PCR 法により定量した 12 kb の RNA 量とルシフェラーゼ活性の値は非常に良い相関関係を示し、抗 HCV 剤の活性を容易にかつ定量的に測定出来るものであることを示した³⁴⁾。OR6 細胞をベースにしたアッセイ系 (OR6 アッセイ系) を用いることにより、抗 HCV 活性を有することが分かっていた IFN- α 、 β 、 γ やシクロスポリン A の抗 HCV 活性の強さを EC₅₀ 値 (HCV RNA レベルを 50% に低下させる濃度) として容易に示すことが出来るようになった。リバビリンやその誘導体であるミゾリピンにも弱いながらも抗 HCV 活性が認められた³⁴⁾。また、高脂血症の治療薬として広く普及しているスタチン剤の抗 HCV 活性についても定量化することができ、その中でも特にフルバスタチンが比較的強い抗 HCV 活性 (EC₅₀=0.9 μ M) を有することを見出した¹³⁾。フルバスタチンは 1 回の投与で血中濃度が 0.6 μ M まで上昇するというデータが出されているので³⁹⁾、血中濃度があまり上昇しない他のスタチン剤より臨床応用の可能性が高いと考えられた。事実、今年に入って、IFN とリバビリンの併用療法にフルバスタチンの有無を評価した臨床試験結果やフルバスタチン投与による効果や安全性について日米のグループより相次いで報告され^{3,43)}、フルバスタチンは臨床治療においても有効であることが示された。近頃の健康食品ブームの中で肝炎患者も様々な栄養成分を摂取している

ことが予想されることから、OR6 アッセイシステムを用いて様々な栄養成分が HCV ゲノムの複製にどのような影響を与えるかを詳細に検討した。その結果、HCV ゲノムの複製を阻害する活性を有する成分として β -カロテン (EC₅₀=6.3 μ M)、ビタミン D2 (EC₅₀=3.8 μ M)、リノール酸 (EC₅₀=20 μ M) 等を見出した⁴⁹⁾。逆に HCV ゲノムの複製レベルを上昇させてしまう成分としてビタミン E を見出した⁴⁹⁾。日常の使用量でどこまで影響が出るかは分からないが、少なくとも IFN などでの治療中においてはビタミン E の過剰摂取は控えた方がよいのではないと思われる。OR6 アッセイシステムは他の研究室においても使用され、幾つか成果も出始めている^{24,41)}。OR6 アッセイシステムは従来の RNA 定量系に比べると格段に簡便化されたが、多数の検体を一度に調べるには時間や労力の面でなお難点がある。そこで、我々はルシフェラーゼ遺伝子の代わりに緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子を導入した全長 HCV RNA を作成し、これが細胞内で効率的に複製しているクローン化細胞株として OGF7 の樹立に成功した⁷⁾。OGF7 細胞をベースにしたアッセイ系 (OGF7 アッセイシステム) を用いると、生きたままの細胞の蛍光強度を測定するだけで薬剤の抗 HCV 活性を簡便に定量評価でき、時間やコストの面においても優れたアッセイ系となった。実際に幾つかの抗 HCV 剤の評価を行ったところ、OR6 アッセイ系と遜色ない結果が得られ今後有用なアッセイ系としての使用が期

待される。

4 RNA複製に伴い生じるHCVの遺伝的多様性

HCVが持続感染した状態ではHCVは遺伝的多様性を獲得しており、いわゆる Quasispecies (準種) の状態になっていることが以前から明らかになっている。HCVの複製に伴うエラーの蓄積と免疫監視機構からの逃避による結果が合わさった状態とも言える。しかし、両者がどの程度の割合なのかは分かっていない。その点において、HCVレプリコン複製細胞や全長HCV RNA複製細胞はHCVの複製に伴うエラーの蓄積速度をある程度把握できる実験系であると考えられた。そこで、我々は、1b 遺伝子型に属する 1B-1 株由来の 50-1 レプリコン複製細胞と O 株由来の sO レプリコン複製細胞を長期に継代培養してレプリコンの複製に伴う変異速度の算出を試みた。それぞれ1年以上の培養期間において数ヶ月ごとに細胞内のレプリコン RNA の塩基配列を決定し、培養開始前の配列との比較を行った。その結果、両レプリコンとも培養時間に依存して 3.0×10^{-3} 塩基置換/ヌクレオチド/年の変異速度を示すことが分かった。このような遺伝的変異に伴って、レプリコンの遺伝的多様性も培養時間に依存して増大していくことが観察された¹⁸⁾。両レプリコンにおける塩基置換の様式をみると A から G と U から C への置換頻度は G から A や C から U への置換頻度より2倍以上多いことが分かった。さらに、我々は O 株由来の5種類の全長 HCV RNA 複製細胞 (O, OA, OB, OD および OE 細胞) を2年間長期培養し同様の解析を行った。その結果、HCV RNA の変異速度として、 $3.5 \sim 4.8 \times 10^{-3}$ 塩基置換/ヌクレオチド/年という数値を得た。レプリコンの場合と比較すると若干高い値が得られたが、これは、HCV RNA の複製に必須である NS3-NS5B 領域以外の領域の変異速度が NS3-NS5B 領域の変異速度より高いことによる。塩基置換の様式はレプリコンで得られた結果と同様、A から G と U から C への置換が多いという結果が得られた。ただ、興味深いことに、2年間の培養により5種類全例で HCV RNA の GC 組成が培養時間に依存した形でわずかながらではあるが、増していくことが観察された。最初の1年で平均0.14%増加し、次の1年で平均0.24%の増加が観察された。このような現象の意味するところは不明であるが、さらに GC 組成が増加するかどうかに興味を持たれる。他の研究室からの類似の解析結果の報告が待たれるところである。HCV RNA の遺伝的多様性も2年の培養により平均1.62%となり、実際の HCV 持続感染者における状態に近づきつつあることから、薬剤感受性の評価や薬剤抵抗性の出現などについての実験モデルとしての使用も期待される。

5 RNA複製を亢進させる適応変異の組み合わせとその利用により得た新しいヒト肝癌細胞株 Li23 を

用いた HCV 生活環再現システム

O 株由来の HCV レプリコン複製細胞 (sO) 内で増殖しているレプリコンには RNA の複製効率を亢進させる適応変異 (S2200R) が検出されていたが²¹⁾、O 株由来の全長 HCV RNA 複製細胞を樹立して調べてみると、S2200R の他に、さらにもう1個の適応変異が NS3 領域に生じていることが分かった。この適応変異は得られた細胞クローンごとに異なり、Q1112R, P1115L, E1202G および K1609E であった。このような事実から S2200R の他にこれらの適応変異を組み合わせると、HCV RNA の複製レベルをさらに上げることができるのではないかと考えた。2200 番目については R から S に戻すと HCV RNA の複製がまったくいなくなることから必須と考え、S2200R をベースにして3種類の適応変異の組み合わせを有する全長 HCV RNA をいくつか作成して、それらの複製効率を一過性の複製アッセイシステムにより測定した。その結果、O 株については、Q1112R, K1609E および S2200R を導入すると複製効率が著しく高まることが分かった¹⁾。これら3種類の適応変異を有する HCV RNA を人工的に作成して細胞内に導入すれば HCV RNA の複製レベルが亢進し HuH-7 由来の細胞とは異なる細胞株由来の全長 HCV RNA 複製細胞株の樹立も可能になるのではないかと考えた。また、HCV RNA の複製環境の整った新しい細胞株を樹立できれば、感染性 HCV 粒子の新規産生システムの開発にもつながるものと期待された。O 細胞などを樹立した際のこれまでの経験からいきなり全長 HCV RNA 複製細胞の樹立は難しいと予想し、まず3種類の適応変異 (Q1112R, K1609E および S2200R) を有するレプリコン RNA を人工的に作成して、様々なヒト肝細胞株に導入して G418 耐性コロニーが得られる細胞株の選択作業を行った。しかし、この作業は意外と苦戦し、G418 耐性の細胞コロニーがわずかながら得られそうな細胞株もあったが、細胞増殖の面でほとんどの場合不安定であった。このような試行錯誤は1年以上続いたが、ついに Li23 というヒト肝癌細胞株に行き着いた。この細胞株は1987年国立がんセンター研究所病理部の石川博士により樹立されたもので、過去に HCV の感染実験に使用した経緯があるが¹⁹⁾、細胞株樹立についての論文は出されていない。患者血清を用いた HCV の感染実験では Li23 細胞の場合感染後6日 (HuH-7 細胞の場合は3日) まで HCV RNA が細胞内に検出されたという結果になっている。Li23 細胞からは多くの G418 耐性のコロニーが得られ、ポリクローナルな細胞集団として sOL 細胞と名付けた。sOL 細胞から IFN 処理によりレプリコンを排除して治癒細胞 (sOLc) を作成した。この治癒細胞に全長 HCV RNA (3種類の適応変異を有する) を導入したところ、G418 耐性コロニーが多数出現した。これらのコロニーから14クローンを細胞株化し (OL1 ~ OL14)、細胞内の HCV RNA 量の多い細胞

株としてOL8とOL11を選択した。さらにこれらの細胞から作成した治療細胞を用いて、先に述べたHuH-7細胞由来のOR6アッセイシステムに相当する抗HCV活性の評価システムとしてORL8とORL11アッセイシステムの構築にも成功し、既知の抗HCV剤についてOR6アッセイシステムとの比較実験を行った。その結果、これらの新しいアッセイシステムはOR6と同等以上の感度を示したことから、今後の抗HCV剤の評価システムとしての活躍が期待される。さらに、ORL8やORL11細胞から作成した治療細胞(ORL8cとORL11c)に感染性JFH-1株HCVを感染させたところ、少なくともORL8c細胞から相当量の感染性HCVの産生が観察された(第56回日本ウイルス学会学術集会シンポジウム)。今後、産生されたHCV粒子の性状解析をする必要があるが、Li23由来の細胞を用いたHCVの生活環再現システムの構築に成功したと思われる。

おわりに

HCVゲノムの複製システムが開発されてからほぼ10年を経過して、HCVの複製機構や抗HCV剤の開発などにおいて著しい進歩が認められた。今回は、ゲノム複製に必要な宿主因子についてはほとんど触れなかったが、多くの因子が発見されている^{30,44)}。そして、多くの抗HCV剤候補も発見され臨床試験が進められている^{14,40)}。これらの多くはHuH-7細胞由来のシステムにより見いだされたものであることから、最後の項目で述べたLi23細胞由来のHCVゲノム複製系はHuH-7細胞系で得られた成果の検証の意味合いも含めて、さらに新たな発見のため今後多いに活用されるものと期待される。

謝辞

本稿で紹介した研究は、これまでの多くの共同研究者によるものであり、特に腫瘍ウイルス学分野の皆様には心より深謝致します。

引用文献

- 1) Abe K, Ikeda M, Dansako H, Naka K, Kato N.: Cell culture-adaptive NS3 mutations required for the robust replication of genome-length hepatitis C virus RNA. *Virus Res* 125: 88-97, 2007.
- 2) Ali S, Pellerin C, Lamarre D, Kukolj G.: Hepatitis C virus subgenomic replicons in the human embryonic kidney 293 cell line. *J Virol* 78: 491-501, 2004.
- 3) Bader T, Fazili J, Madhoun M, Aston C, Hughes D, Rizvi S, Seres K, Hasan M.: Fluvastatin inhibits hepatitis C replication in humans. *Am J Gastroenterol* 103:1383-1389, 2008.
- 4) Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM.: Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 290: 1972-1974, 2000.
- 5) Blight KJ, McKeating JA, Marcotrigiano J, Rice CM.: Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol* 77: 3181-3190, 2003.
- 6) Chang KS, Cai Z, Zhang C, Sen GC, Williams BR, Luo G.: Replication of hepatitis C virus (HCV) RNA in mouse embryonic fibroblasts: protein kinase R (PKR)-dependent and PKR-independent mechanisms for controlling HCV RNA replication and mediating interferon activities. *J Virol* 80: 7364-7374, 2006.
- 7) Dansako H, Ikeda M, Abe K, Mori K, Takemoto K, Arimi Y, Kato N.: A new living cell-based assay system for monitoring genome-length hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res* 137: 72-79, 2008.
- 8) Date T, Kato T, Miyamoto M, Zhao Z, Yasui K, Mizokami M, Wakita T.: Genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon can replicate in HepG2 and IMY-N9 cells. *J Biol Chem* 279: 22371-22376, 2004.
- 9) Frese M, Pietschmann T, Moradpour D, Haller O, Bartenschlager R.: Interferon-alpha inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by an MxA-independent pathway. *J Gen Virol* 82: 723-733, 2001.
- 10) Frese M, Schwärzle 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.
- 11) Guo JT, Bichko VV, Seeger C.: Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *J Virol* 75: 8516-8523, 2001.
- 12) Ikeda M, Abe K, Dansako H, Nakamura T, Naka K, Kato N.: Efficient replication of a full-length hepatitis C virus genome, strain O, in cell culture, and development of a luciferase reporter system. *Biochem Biophys Res Commun* 329:1350-1359, 2005.
- 13) Ikeda M, Abe K, Yamada M, Dansako H, Naka, Kato N.: Different Anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology* 44: 117-125, 2006.
- 14) Ikeda M, Kato N.: Modulation of host metabolism as a target of new antivirals. *Adv Drug Deliv Rev* 59: 1277-1289, 2007.
- 15) Ikeda M, Yi M, Li K, Lemon SM.: Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *J Virol* 76: 2997-3006, 2002.
- 16) Kato N.: Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 55: 133-159, 2001.
- 17) Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T, Shimotohno K.: Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9524-9528, 1990.
- 18) Kato N, Nakamura T, Dansako H, Namba K, Abe K, Nozaki A, Naka K, Ikeda M, Shimotohno K.: Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture. *J Gen Virol* 86: 645-656, 2005.
- 19) Kato N, Nakazawa T, Mizutani T, Shimotohno K.: Susceptibility of human T-lymphotropic virus type I infected cell line MT-2 to hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* 206: 863-869, 1995.

- 20) Kato N, Shimotohno K.: Systems to culture hepatitis C virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 242: 261-278, 2000.
- 21) Kato N, Sugiyama K, Namba K, Dansako H, Nakamura T, Takami M, Naka K, Nozaki A, Shimotohno K.: Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 306: 756-766, 2003.
- 22) 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.
- 23) Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Mizokami M, Wakita T.: Nonhepatic cell lines HeLa and 293 support efficient replication of the hepatitis C virus genotype 2a subgenomic replicon. *J Virol* 79: 592-596, 2005.
- 24) Kim SS, Peng LF, Lin W, Choe WH, Sakamoto N, Kato N, Ikeda M, Schreiber SL, Chung RT.: A cell-based, high-throughput screen for small molecule regulators of hepatitis C virus replication. *Gastroenterology* 132: 311-320 (2007).
- 25) Kishine H, Sugiyama K, Hijikata M, Kato N, Takahashi H, Noshi T, Nio Y, Hosaka M, Miyanari Y, Shimotohno K.: Subgenomic replicon derived from a cell line infected with the hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 993-999, 2002.
- 26) Lohmann V, Hoffmann S, Herian U, Penin F, Bartenschlager R.: Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *J Virol* 77: 3007-3019, 2003.
- 27) 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.
- 28) Maekawa S, Enomoto N, Sakamoto N, Kurosaki M, Ueda E, Kohashi T, Watanabe H, Chen CH, Yamashiro T, Tanabe Y, Kanazawa N, Nakagawa M, Sato C, Watanabe M.: Introduction of NS5A mutations enables subgenomic HCV replicon derived from chimpanzee-infectious HC-J4 isolate to replicate efficiently in Huh-7 cells. *J Viral Hepat* 11: 394-403, 2004.
- 29) Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N.: New efficient replication system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun* 371: 104-109, 2008.
- 30) Moriishi K, Matsuura Y.: Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. *Rev Med Virol* 17: 343-354, 2007.
- 31) Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Miyamoto M, Kaga M, Ishii K, Suzuki T, Kato T, Mizokami M, Wakita T.: The NS3 helicase and NS5B-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. *J Virol* 81: 8030-8040, 2007.
- 32) Murray EM, Grobler JA, Markel EJ, Pagnoni MF, Paonessa G, Simon AJ, Flores OA.: Persistent replication of hepatitis C virus replicons expressing the beta-lactamase reporter in subpopulations of highly permissive Huh7 cells. *J Virol* 77: 2928-2935, 2003.
- 33) Naka K, Abe K, Takemoto K, Dansako H, Ikeda M, Shimotohno K, Kato N.: Epigenetic silencing of interferon-inducible genes is implicated in interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells. *J Hepatol* 44: 869-878, 2006.
- 34) Naka K, Ikeda M, Abe K, Dansako H, Kato N.: Mizoribine inhibits hepatitis C virus RNA replication: effect of combination with interferon- α . *Biochem Biophys Res Commun* 330: 871-879, 2005.
- 35) Naka K, Takemoto K, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Shimotohno K, Kato N.: Interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells is caused by functional disruption of type I interferon receptors. *J Gen Virol* 86: 2787-2792, 2005.
- 36) Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J.: Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42: 3858-3863, 1982.
- 37) Namba K, Naka K, Dansako H, Nozaki A, Ikeda M, Shiratori Y, Shimotohno K, Kato N. Establishment of hepatitis C virus replicon cell lines possessing interferon-resistant phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 323: 299-309, 2004.
- 38) Noguchi T, Otsubaki T, Ando I, Ogura N, Ikeda S, Shimotohno K.: Isolation and gene analysis of interferon alpha-resistant cell clones of the hepatitis C virus subgenome. *Virology* 375: 424-432, 2008.
- 39) Park JW, Siekmeier R, Lattke P, Merz M, Mix C, Schüier S, Jaross W.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluvastatin in heart transplant recipients taking cyclosporine A. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 6: 351-361, 2001.
- 40) Pawlotsky JM, Chevaliez S, McHutchison JG.: The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* 132: 1979-1998, 2007.
- 41) Peng F, Kim SS, Matchacheep S, Lei X, Su S, Lin W, Runguphan W, Choe WH, Sakamoto N, Ikeda M, Kato N, Beeler AB, Porco Jr JA, Schreiber SL, Chung RT.: Identification of novel epoxide inhibitors of HCV replication using a high-throughput screen. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 3756-3759, 2007.
- 42) Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, Krieger N, Rinck G, Rutter G, Strand D, Bartenschlager R.: Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol* 76: 4008-402, 2002.
- 43) Sezaki H, Suzuki F, Akuta N, Kawamura Y, Yatsuji H, Hosaka T, Kobayashi M, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H.: Influence of HMG-CoA reductase inhibitor to virological response of peginterferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *Acta Hepatologica Japonica* 49: 22-24, 2008.
- 44) Suzuki T, Ishii K, Aizaki H, Wakita T.: Hepatitis C viral life cycle. *Adv Drug Deliv Rev* 59:1200-1212, 2007.
- 45) Uprichard SL, Chung J, Chisari FV, Wakita T.: Replication of a hepatitis C virus replicon clone in mouse

- cells. *Virology* 28: 3: 89, 2006.
- 46) Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Kräusslich 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.
- 47) Watashi K, Shimotohno K.: The roles of hepatitis C virus proteins in modulation of cellular functions: a novel action mechanism of the HCV core protein on gene regulation by nuclear hormone receptors. *Cancer Sci* 94: 937-943, 2003.
- 48) Windisch MP, Frese M, Kaul A, Trippler M, Lohmann V, Bartenschlager R.: Dissecting the interferon-induced inhibition of hepatitis C virus replication by using a novel host cell line. *J Virol* 79: 13778-13793, 2005.
- 49) Yano M, Ikeda M, Abe K, Dansako H, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Kato N.: Comprehensive Analysis of the Effects of Ordinary Nutrients on Hepatitis C Virus RNA Replication in Cell Culture. *Antimicrob. Agents Chemother* 51: 2016-2027, 2007.
- 50) Yi M, Bodola F, Lemon SM.: Subgenomic hepatitis C virus replicons inducing expression of a secreted enzymatic reporter protein. *Virology* 304: 197-210, 2002.
- 51) Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Miyagishi M, Maekawa S, Yi L, Kurosaki M, Taira K, Watanabe M, Mizusawa H.: Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 4: 602-608, 2003.
- 52) Zhu Q, Guo JT, Seeger C.: Replication of hepatitis C virus subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells. *J Virol* 77: 9204-9210, 2003.

Replication of hepatitis C virus genome

Nobuyuki KATO

Department of Tumor Virology, Okayama University Graduate School of Medicine,
Dentistry, and Pharmaceutical Sciences
E-mail: nkato@md.okayama-u.ac.jp

The studies on the mechanism of HCV replication proliferated after the development of cell culture based-subgenomic HCV replicon system and genome-length HCV RNA replication system. Furthermore, these RNA replication systems have been improved to be suitable systems for the screening of anti-HCV reagents by the introduction of reporter genes such as luciferase. Genetic analysis of HCV RNAs obtained in long-term cell culture of HCV replicon or genome-length HCV RNA-harboring cells revealed that genetic mutations in HCV RNAs accumulated in a time-dependent manner. The genetic diversity of HCVs was also enlarged in a time-dependent manner. The appearance of adaptive mutation in HCV replicon or genome-length HCV RNA is one of characteristic features of HCV RNA replication system. Although human hepatoma-derived HuH-7 cell line was mainly used for HCV RNA replication systems, a specific combination of adaptive mutations led to develop the HCV RNA replication systems using a new human hepatoma cell line other than HuH-7.