

1. miR-122 は C 型肝炎ウイルスの細胞指向性に関与する

福原 崇介, 松浦 善治

大阪大学微生物病研究所分子ウイルス分野

C型肝炎ウイルス (HCV) は狭い宿主域と高い臓器親和性を示す。細胞への侵入やゲノム複製を模倣する実験系や、ヒト肝癌由来細胞で増殖する実験室株 (HCVcc) の開発により、HCV の感染環の解明が大きく進展した。特に、4つの感染受容体候補分子を発現させたマウス細胞やマウス個体に HCVcc が侵入できることから、HCV の組織特異性は受容体の発現によって規定されていると考えられてきた。しかしながら、HCV 感染は肝障害のみならず、種々の肝外病変を発症することが知られており、HCV の組織指向性に関しても不明な点が多い。最近我々は、HCV ゲノムの複製を亢進する肝臓特異的な microRNA である miR-122 を非肝臓系細胞に発現させると、HCV ゲノムは効率よく複製するものの、感染性粒子は産生されないことを明らかにした。肝臓細胞と比べて非肝臓系細胞では脂質代謝系を欠いていることから、HCV のゲノム複製には miR-122 が、また、感染性粒子の産生には脂質代謝系が重要であり、これらの因子が HCV の組織特異性を規定している可能性が考えられる。本稿では、我々の成績を中心にして、HCV 感染の組織指向性に関与する宿主因子について考察したい。

1. はじめに

C型肝炎ウイルス (HCV) の慢性感染によって致死的な肝硬変や肝細胞癌を発症するが¹⁾、HCV 感染は様々な肝外病変を合併することが疫学的に知られている^{2,3)}。糖尿病やクリオグロブリン血症だけでなく、悪性リンパ腫等の致死的な疾患も高率に発症するが^{4,5)}、その発症機構は未だ不明な点が多い⁶⁾。その原因として、肝外病変を検証できる細胞培養系が存在しないことが挙げられる。HCV の *in vitro* 感染系はヒト肝癌由来 Huh7 細胞およびその派生株と、劇症 C 型肝炎由来の遺伝子型 2a の JFH1 株 (HCVcc) の組み合わせにほぼ限定されている⁷⁻⁹⁾。また、唯一の動物モデルであるチンパンジーも、倫理的な観点から使用は極めて困難である¹⁰⁾。非肝臓系細胞で HCV の感染系を樹立することは、肝外病変の発症機構の解明だけで

なく、HCV の肝細胞指向性を明らかにすることにつながる。本稿では HCV の肝細胞指向性における肝臓特異的 microRNA である miR-122 の意義について概説し、肝外病変の発症機構を筆者らの知見を中心に考察する。

2. HCV 感染と miR-122

miR-122 は肝細胞の全 microRNA の 7 割を占めるものの、非肝細胞ではほとんど発現が認められない¹¹⁻¹³⁾。miR-122 の発現は HNF4A によって転写制御されていると報告されているが、詳細は未だ不明なままである¹⁴⁾。miR-122 が翻訳を制御する標的 mRNA は多く報告されており、肝細胞癌の悪性度¹⁵⁻¹⁷⁾ や血液中の総コレステロール量¹⁸⁾、肝臓中の脂質代謝¹⁹⁾、慢性 C 型肝炎患者のインターフェロン (IFN) 治療感受性²⁰⁾、鉄代謝能²¹⁾ 等が miR-122 の組織中の発現量と相関することが報告されている。HCV 感染と miR-122 に関する最初の報告として、2005 年に Jopling らによって miR-122 の特異的な阻害剤をレプリコン細胞に処理すると、HCV ゲノム量が劇的に低下することが示された²²⁾。一般的に microRNA は mRNA の翻訳を抑制し、その効果は mRNA の発現レベルで 90% 程度に留まる^{23,24)}。一方、miR-122 の発現によって HCV ゲノムの翻訳は亢進し、感染後の HCV-RNA 量は 1000 倍程度まで上昇することから、miR-122 の HCV ゲノムへの作用には特殊なメカニズムが存在すると推測される^{7,25)}。その後、

連絡先

〒 565-0871

大阪府吹田市山田丘 3-1

大阪大学微生物病研究所分子ウイルス分野

TEL: 06-6879-8343

FAX: 06-6879-8269

E-mail: fukut@biken.osaka-u.ac.jp

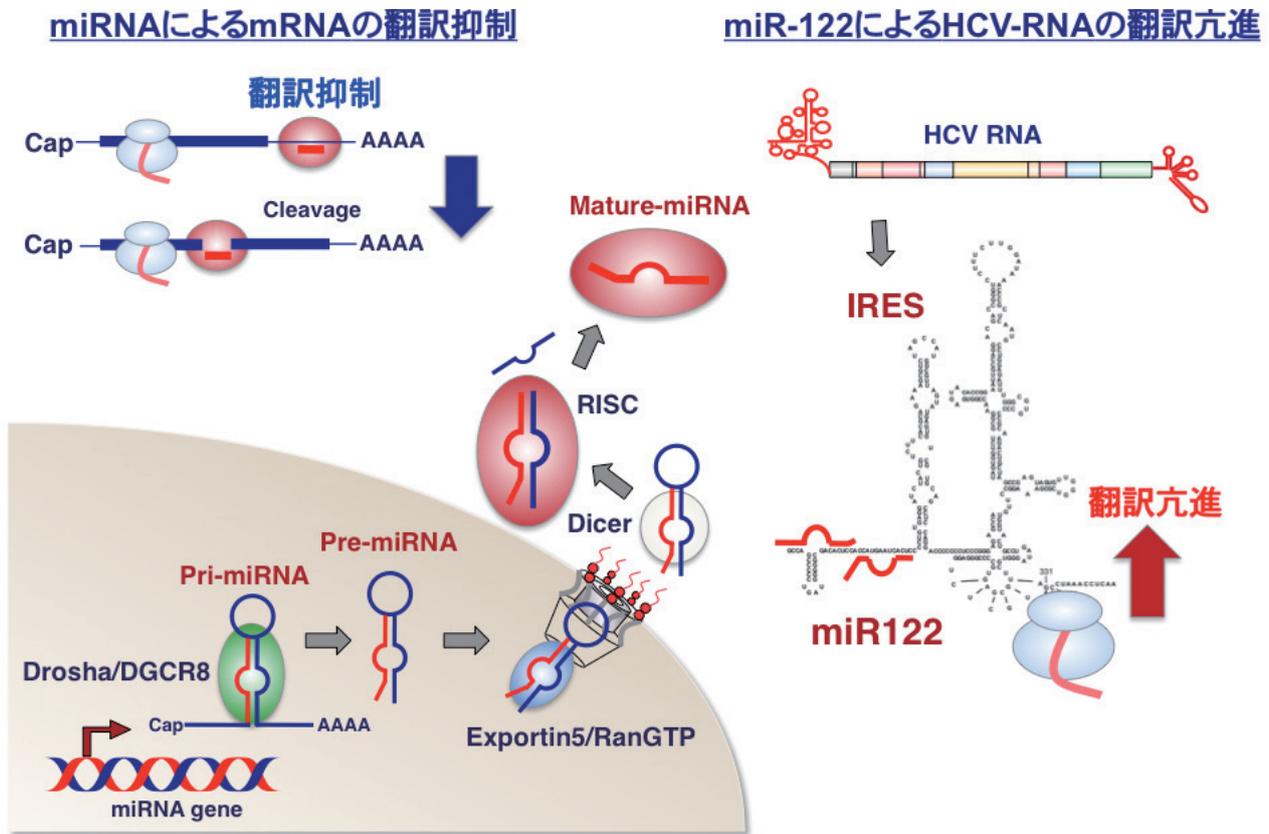


図1 miR-122によるHCV-RNAの翻訳亢進

miR-122とHCVゲノムの5'非翻訳領域(UTR)に存在する2ヶ所の相補配列に、それぞれ相補的な変異を導入することにより翻訳効率が回復することから、HCVゲノムの相補配列にmiR-122のSeed domainが結合することが、ウイルスゲノムの翻訳亢進に重要であることが明らかになってきた(図1)^{26, 27)}。また、MachlinらはmiR-122がHCVゲノムへ結合するには、Seed domainである5'側の2-8塩基だけでなく、15と16番目の塩基も重要であることを示し、miR-122はHCVの5'UTRと架橋を作るように2ヶ所で結合して、翻訳を亢進させていることが明らかにされた^{28, 29)}。これまで、miR-122がHCVゲノムに直接結合することが翻訳亢進に重要であることは明らかになってきたが²⁶⁻²⁹⁾、その分子機構は未だ不明な点が多い。最近、RNA誘導型サイレンシング複合体(RISC)の主要構成因子であるAgo2蛋白質が、miR-122によるHCVゲノムの翻訳亢進に重要であることが報告された³⁰⁾。さらに、ShimakamiらはAgo2をノックアウトしたマウス胎児線維芽細胞(MEF)を用いて、miR-122はAgo2依存的にHCVゲノムに直接結合することでゲノムRNAを安定化し、翻訳を亢進することを示した³¹⁾。しかしながら、これでmiR-122によるHCVゲノム複製の制御機構が全て解明できた訳ではなく、HCVの感染環におけるmiR-122の

生物学的意義を明らかにするにはさらなる詳細な解析が必要である。

3. C型肝炎の創薬標的としてのmiR-122

miR-122は2005年のJoplingらの報告以来、新たな創薬標的として注目されている²²⁾。慢性C型肝炎に対する抗ウイルス治療はIFNとリバビリンに加え³²⁾、HCVのプロテアーゼやポリメラーゼ等のウイルス酵素を標的とした薬剤が使用されるようになり³³⁻³⁵⁾、ウイルス排除率が急速に向上している。しかしながら、IFNやウイルス標的薬は副作用が多いだけでなく薬価も高く、世界的に普及させるのは厳しい状況である³⁶⁾。miR-122の阻害剤は核酸であり、安価に大量合成することが可能である。2009年にmiR-122を特異的に阻害する人工核酸(LNAs: Locked Nucleic Acids)を慢性C型肝炎のチンパンジーに投与し、血中のHCVを1/1000以下まで低下させることに成功した³⁷⁾。miR-122を標的としたLNAsは現在C型肝炎に対する抗ウイルス薬としてPhase IIの臨床試験が終了した。しかしながら、肝臓以外の組織にはmiR-122が発現していないにもかかわらず、HCVが感染している可能性が多くの臨床および基礎研究で報告されており³⁸⁻⁴¹⁾、臨床応用にはHCVの感染におけるmiR-122の意義をより詳細に検

証する必要がある。

4. miR-122 の発現による新規感受性細胞株の樹立

Wakita らによって HCVcc と Huh7 細胞株を用いた HCV の *in vitro* の感染系が樹立され、HCV の基礎研究は飛躍的に進んだ⁹⁾。しかしながら、HCV の感染機構のより詳細な解析には、複数の感受性細胞を用いた比較研究が重要であり、新たな細胞株の樹立が求められていた。これまで HCVcc は HepG2-CD81 細胞等の肝細胞由来の細胞株に感染し、複製することが報告されてきたが⁴²⁻⁴⁴⁾、その感染性は低く、Huh7 以外の細胞株でウイルスを増幅させることは不可能であった。HCV の感染環における miR-122 の重要性が明らかになるにつれ、HCVcc の増殖には miR-122 の発現が必須であると推測された。実際、様々な細胞株における miR-122 の発現量は Huh7 細胞で最も高く、Huh6 や HepG2 細胞では Huh7 細胞の 1/10 ~ 1/100 程度であり、非肝臓系細胞株では 1/10000 程度の発現量であった⁷⁾。そこで、新たな HCVcc の感受性細胞株の樹立を目指して、数種の肝臓系細胞株に miR-122 を発現して HCVcc の感染性を評価した。興味深いことに、Hep3B 細胞に miR-122 を持続発現させた Hep3B/miR-122 細胞は、Huh7 細胞と同等の感染性を示すことが明らかになった。また、Hep3B/miR-122 細胞を用いて、HCV ゲノムが自己複製するレプリコン細胞の樹立も可能であった。このレプリコン細胞から HCV ゲノムを IFN で排除した治癒細胞 (Cured 細胞) は、HCVcc の感染性が親細胞よりも上昇することが示され、Hep3B/miR-122 細胞株は HCVcc の新しい感受性細胞として有用なツールとなることが示された⁷⁾。また、Narbus らは HepCD81 細胞に miR-122 を発現させることによって HCVcc が効率よく感染することを示し⁸⁾、さらに Sainz らは PLC-PRF5 細胞でも同様の成績を報告した⁴⁵⁾。これらの成績から、HCVcc の感染がこれまで Huh7 細胞に由来する細胞株に限定されていたのは miR-122 の発現に依存していた可能性が高いことを示唆している。従って、生体内においても miR-122 の発現が肝臓特異的であることを勘案すれば、HCV の肝細胞特異性には miR-122 が極めて重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながらその一方で、慢性 C 型肝炎患者の肝外病変はどのように引き起こされているのかは不明であり、非肝臓系細胞における HCV の感受性の評価が必要である。

5. 非肝臓系細胞での HCV 感染系の樹立

臨床検体を用いた検討では、慢性 C 型肝炎患者の非肝臓細胞でマイナス鎖の HCV-RNA が検出され^{46, 47)}、非肝臓組織への HCV 感染の可能性が示唆されてきた。また、非肝臓組織における HCV の慢性感染が抗ウイルス治療後や肝移植後の再発のリザーバーになる可能性が懸念されてきたが^{48, 49)}、その詳細は明らかではない。また、これま

で様々な非肝臓系細胞で HCV のレプリコン細胞が樹立され、HCV ゲノムが複製できることが示されてきた。Kato らは子宮由来の HeLa 細胞および胎児腎由来の HEK-293T 細胞で HCV ゲノムが効率よく複製するレプリコン細胞を樹立し、非肝臓細胞株でも HCV が複製することを示した⁵⁰⁾。しかしながら、レプリコン細胞は薬剤選択による強制的な複製系であり、非肝臓組織で本当に HCV が複製できるかは不明であった。Chang らは 293T 細胞に miR-122 を強制発現することで、レプリコン RNA の複製が上昇することを報告した⁵¹⁾。さらに、Lin らは自然免疫応答を欠損した MEF に miR-122 を強制発現させると HCV ゲノムの翻訳効率が上昇することを示した⁵²⁾。これらの成績から、非肝臓系細胞でも HCV ゲノムの複製は可能であり、miR-122 の発現によってその複製は亢進することが示唆された。最近、Fletcher らは HCVcc が神経腫瘍由来細胞株へ侵入し、低レベルではあるが HCV ゲノムが複製することを報告したが^{40, 53)}、miR-122 を発現させた Hep3B 細胞における HCVcc の感染性も考慮すると⁷⁾、非肝臓系細胞においても miR-122 を強制発現することにより、新しい HCVcc の感受性細胞株を樹立できる可能性がある。そこで、非肝臓系細胞における HCVcc の感染性を評価する前に、HCV のエンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプウイルス (HCVpv) を用いて、非肝臓系細胞へ HCV が侵入できるかを評価した。調査した非肝臓系細胞株の多くは HCV の受容体候補分子を発現しており、HCVpv の感染を許容したことから、HCV の組織指向性は、受容体以外の因子が規定している可能性が示唆された。そこで、HCVpv の侵入を許容する 10 種類の非肝臓系細胞株で HCVcc の感染性を検討した結果、miR-122 の発現によって 6 種類の細胞株で HCV ゲノムの複製が確認された。特に、子宮由来の Hec1B 細胞は miR-122 をほとんど発現していないにもかかわらず、50 倍程度に HCV ゲノムが複製し、miR-122 を強制発現させた細胞株 (Hec1B/miR-122) では顕著な複製亢進が観察された。Hec1B 細胞における HCV ゲノムの複製は miR-122 の阻害剤の処理にも抵抗性であることから、miR-122 非依存的に HCV ゲノムが複製している可能性が考えられる。以上の成績から、HCV は肝細胞だけでなく非肝臓細胞にも感染して複製できる可能性が考えられるが、miR-122 の発現量がウイルスゲノムの複製効率を規定しており、これが肝病変と肝外病変の違いに反映している可能性が示唆された⁵⁴⁾。

6. HCV の粒子産生における脂質代謝系の関与

これまでに siRNA スクリーニング等の解析から、VLDL (Very Low-Density Lipoprotein) の産生に参与する ApoB (Apolipoprotein B) や ApoE (Apolipoprotein E)、そして MTTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein) が HCVcc の粒子産生に重要であることが明らかにされてい

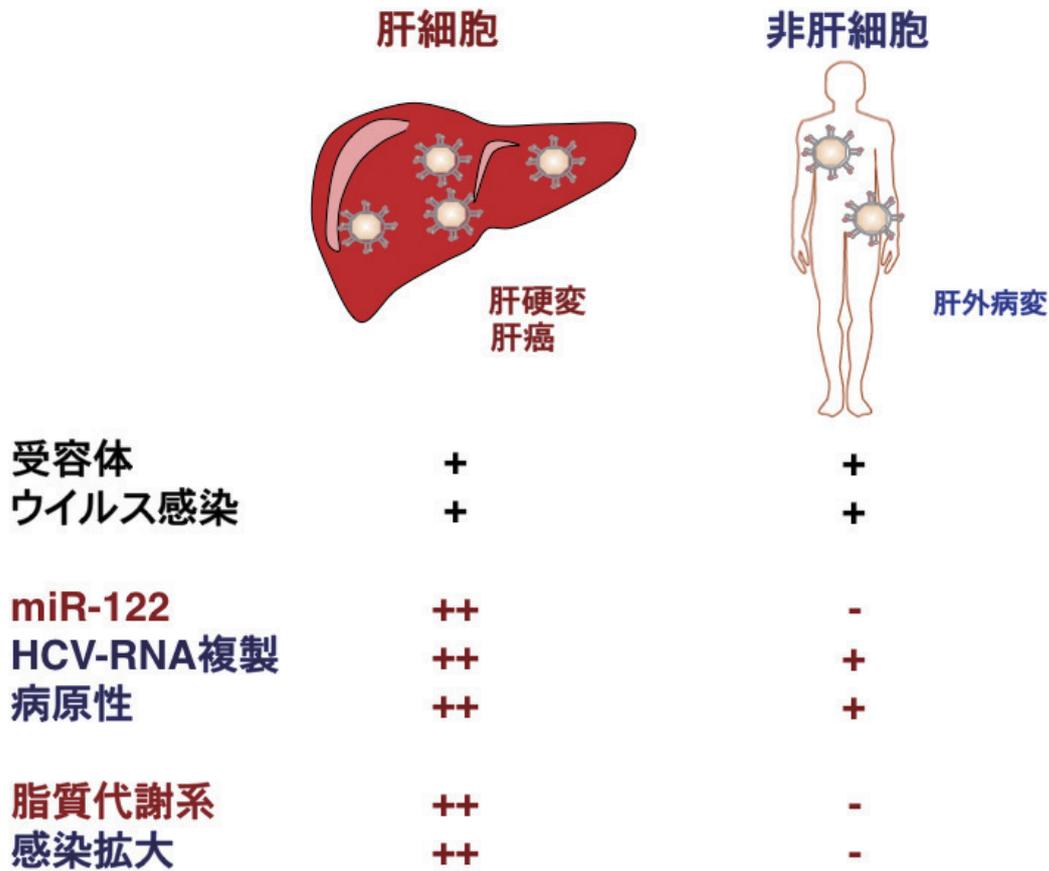


図2 HCV感染の肝臓指向性と非肝細胞へのHCVの感染

る^{55,56)}。GastaminzaらはApoBやMTTPの阻害によってVLDLの産生が低下するだけでなく、HCVccの感染性粒子量が減少することを示した⁵⁵⁾。一方Jiangらは、ApoBは粒子産生には関与せず、ApoEだけが粒子産生に重要な因子であると報告している⁵⁷⁾。さらにHishikiらはApoEの中のApoE3が粒子産生に重要で、LDLRを介した細胞侵入にも関与すると報告している⁵⁸⁾。これらの成績から、リポ蛋白質がHCVccの粒子産生に重要な役割を演じていることが示唆される。miR-122を強制発現させて樹立した肝臓系および非肝臓系の細胞株でHCVccの粒子産生を評価したところ、興味深いことに粒子産生は肝臓系の細胞でのみ観察され、Hec1Bや293T-CLDN細胞など非肝臓系細胞にmiR-122を発現させた場合、肝臓由来のHep3BやHepG2細胞にmiR-122を発現させた時よりも効率よくHCVゲノムが複製しているにも関わらず、培養上清中には全く感染性粒子が検出されなかった。Hec1B細胞等の非肝臓系細胞株はApoB、ApoEやMTTPを発現しておらず、VLDLを産生できないことが、感染性粒子を産生ができない要因の一つであると推測される。また、Miyinariらは細胞質内の脂肪滴がウイルス粒子産生に重要であることを報告しているが⁵⁹⁾、確かに非肝臓系細胞

株における脂肪滴は肝臓系細胞株に比べ有意に低かったが、オレイン酸の添加によりHec1B/miR-122細胞に脂肪的を高発現させても感染性粒子の産生は観察されなかった⁵⁴⁾。肝臓系の機能的な脂質代謝系を非肝臓系細胞で再構築できれば、HCV粒子を非肝臓系細胞でも産生できるかも知れない。

7. HCVの組織指向性を規定する宿主因子 (図2)

これまでの解析から、HCVの肝臓指向性を規定する宿主因子と肝外組織でのウイルス増殖の可能性が臆気ながら明らかになってきた。一般的にウイルスの組織指向性に関しては、細胞に侵入できるかどうか、即ちウイルス特異的な受容体の発現によって規定されることが多い。HCVはこれまでに多くの接着因子や受容体候補分子が報告されてきたが、現在CD81、SR-BI、Claudin1およびOccludinの受容体候補分子は細胞侵入に必須であると考えられている⁶⁰⁻⁶³⁾。ヒト由来の受容体候補分子をマウス肝臓細胞に発現させるとHCVccが侵入することが、in vitroとin vivoの実験で報告されている^{64,65)}。しかしながら、これら受容体候補分子は多くの臓器で十分に発現しており、様々な非肝臓細胞株にもHCVpvは侵入できることから^{53,66)}、HCVの臓器

特異性を規定しているのは受容体ではないと考えられる。実際、慢性 C 型肝炎患者の非肝臓組織においても HCV の複製を示唆する報告がある^{46, 47)}。また、HCV ゲノムの複製に関与する宿主因子として、VAP-A、VAP-B、Cyclophilin A や FKBP8 など様々な分子が報告されているが⁶⁹⁻⁷⁰⁾、多くの因子は広範な組織に発現しており、肝臓特異性に寄与している可能性は低い。最近、iPS 細胞から肝細胞への分化の各段階で HCVcc の感受性が検討され、細胞内への侵入は未分化な段階から可能であったのに対し、HCV ゲノムの複製と粒子産生は肝細胞への分化が起きた段階で起こり始め、miR-122 の発現量と相関していることが示された⁷¹⁾。以上の成績から、HCV の組織特異性は侵入過程よりも、感染後期の複製や粒子産生に関与する宿主因子が規定している可能性が考えられる。特に、miR-122 は肝臓特異的に大量に発現しており、HCV の肝臓特異性の主要な決定因子である可能性が高い¹¹⁾。また、VLDL 関連蛋白質である ApoB、ApoE や MTP は粒子産生に重要であり^{55, 57)}、これらも肝細胞で高発現していることから、肝臓特異性の決定に関与していると考えられる。

以上の成績から、HCV は様々な細胞に受容体を介して侵入するものの、種々の宿主因子の発現パターンによって増殖効率が制御されていると考えられる。肝細胞には miR-122 と VLDL 関連蛋白質が高発現しており、ゲノム複製と粒子産生が効率よく行われ、HCV の産生臓器となっている。一方、非肝細胞では感染性粒子を産生することなく、miR-122 非依存的に僅かなゲノム複製が潜行している可能性がある。この様な大きく異なった 2 つの増殖様式によって、肝硬変や肝癌等の肝病変と肝外病変が誘発されているのかも知れない。

8. おわりに

HCV の組織指向性は受容体候補分子の発現よりも、肝臓特異的な miR-122 や VLDL 関連蛋白質等の発現によって規定されていることが明らかになってきた。しかしながら、miR-122 による HCV ゲノムの翻訳と複製亢進の分子機構や VLDL 関連蛋白質が粒子産生にどのように関与しているのかは未だ不明のままである。HCV の肝臓親和性を解明することは、肝外病変の発症機構の解明の糸口となると考えられ、今後更に研究を推進したい。

参考文献

- 1) Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S35-46.
- 2) Galossi A, Guarisco R, Bellis L, Puoti C. Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. *J Gastrointest Liver Dis* 2007;16:65-73.
- 3) Gumber SC, Chopra S. Hepatitis C: a multifaceted disease. Review of extrahepatic manifestations. *Ann Intern Med* 1995;123:615-20.
- 4) Calleja JL, Albillos A, Moreno-Otero R, Rossi I, Cacho G, Domper F, Yebra M, Escartin P. Sustained response to interferon-alpha or to interferon-alpha plus ribavirin in hepatitis C virus-associated symptomatic mixed cryoglobulinaemia. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 1179-86.
- 5) Hartridge-Lambert SK, Stein EM, Markowitz AJ, Portlock CS. Hepatitis C and non-Hodgkin lymphoma: the clinical perspective. *Hepatology* 2012;55:634-41.
- 6) Kasama Y, Sekiguchi S, Saito M, Tanaka K, Satoh M, Kuwahara K, Sakaguchi N, Takeya M, Hiasa Y, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas in vivo. *Blood* 2010;116:4926-33.
- 7) Kambara H, Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Ohara Y, Kamitani W, Matsuura Y. Establishment of a novel permissive cell line for propagation of hepatitis C virus by the expression of microRNA122. *J Virol* 2011.
- 8) Narbus CM, Israelow B, Sourisseau M, Michta ML, Hopcraft SE, Zeiner GM, Evans MJ. HepG2 cells expressing microRNA miR-122 support the entire hepatitis C virus life cycle. *J Virol* 2011;85:12087-92.
- 9) 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* 2005;11:791-6.
- 10) Bukh J. A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. *Hepatology* 2004;39:1469-75.
- 11) Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 2002; 12: 735-9.
- 12) Chang J, Provost P, Taylor JM. Resistance of human hepatitis delta virus RNAs to dicer activity. *J Virol* 2003;77:11910-7.
- 13) Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, Xu C, Mason WS, Moloshok T, Bort R, Zaret KS, Taylor JM. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol* 2004;1:106-13.
- 14) Li ZY, Xi Y, Zhu WN, Zeng C, Zhang ZQ, Guo ZC, Hao DL, Liu G, Feng L, Chen HZ, Chen F, Lv X, Liu DP, Liang CC. Positive regulation of hepatic miR-122 expression by HNF4alpha. *J Hepatol* 2011;55:602-11.
- 15) Burns DM, D'Ambrogio A, Nottrott S, Richter JD. CPEB and two poly(A) polymerases control miR-122 stability and p53 mRNA translation. *Nature* 2011;473:105-8.
- 16) Coulouarn C, Factor VM, Andersen JB, Durkin ME, Thorgeirsson SS. Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene* 2009;28:3526-36.
- 17) Fornari F, Gramantieri L, Giovannini C, Veronese A, Ferracin M, Sabbioni S, Calin GA, Grazi GL, Croce CM, Tavolari S, Chieco P, Negrini M, Bolondi L. MiR-122/cyclin G1 interaction modulates p53 activity and affects doxorubicin sensitivity of human hepatocarci-

- noma cells. *Cancer Res* 2009;69:5761-7.
- 18) Elmen J, Lindow M, Schutz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjarn M, Hansen HF, Berger U, Gullans S, Kearney P, Sarnow P, Straarup EM, Kauppinen S. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 2008;452:896-9.
 - 19) Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 2006;3:87-98.
 - 20) Sarasin-Filipowicz M, Krol J, Markiewicz I, Heim MH, Filipowicz W. Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy. *Nat Med* 2009;15:31-3.
 - 21) Castoldi M, Vujic Spasic M, Altamura S, Elmen J, Lindow M, Kiss J, Stolte J, Sparla R, D'Alessandro LA, Klingmuller U, Fleming RE, Longrich T, Grone HJ, Benes V, Kauppinen S, Hentze MW, Muckenthaler MU. The liver-specific microRNA miR-122 controls systemic iron homeostasis in mice. *J Clin Invest* 2011;121:1386-96.
 - 22) Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 2005;309:1577-81.
 - 23) Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136:215-33.
 - 24) Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 2011;12:99-110.
 - 25) Jangra RK, Yi M, Lemon SM. Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *J Virol* 2010;84:6615-25.
 - 26) Jopling CL, Schutz S, Sarnow P. Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe* 2008;4:77-85.
 - 27) Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schuttler CG, Fehr C, Junemann C, Niepmann M. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *Embo J* 2008;27:3300-10.
 - 28) Machlin ES, Sarnow P, Sagan SM. Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:3193-8.
 - 29) Roberts AP, Lewis AP, Jopling CL. miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components. *Nucleic Acids Res* 2011;39:7716-29.
 - 30) Wilson JA, Zhang C, Huys A, Richardson CD. Human Ago2 is required for efficient microRNA 122 regulation of hepatitis C virus RNA accumulation and translation. *J Virol* 2011;85:2342-50.
 - 31) Shimakami T, Yamane D, Jangra RK, Kempf BJ, Spaniel C, Barton DJ, Lemon SM. Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:941-6.
 - 32) Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:958-65.
 - 33) Pawlotsky JM, Chevaliez S, McHutchison JG. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* 2007;132:1979-98.
 - 34) Lok AS, Gardiner DF, Lawitz E, Martorell C, Everson GT, Ghalib R, Reindollar R, Rustgi V, McPhee F, Wind-Rotolo M, Persson A, Zhu K, Dimitrova DI, Eley T, Guo T, Grasela DM, Pasquinelli C. Preliminary study of two antiviral agents for hepatitis C genotype 1. *N Engl J Med* 2012;366:216-24.
 - 35) Zeuzem S, Andreone P, Pol S, Lawitz E, Diago M, Roberts S, Focaccia R, Younossi Z, Foster GR, Horban A, Ferenci P, Nevens F, Mullhaupt B, Pockros P, Terg R, Shouval D, van Hoek B, Weiland O, Van Heeswijk R, De Meyer S, Luo D, Boogaerts G, Polo R, Picchio G, Beumont M. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med* 2011;364:2417-28.
 - 36) Rein DB, Smith BD, Wittenborn JS, Lesesne SB, Wagner LD, Roblin DW, Patel N, Ward JW, Weinbaum CM. The cost-effectiveness of birth-cohort screening for hepatitis C antibody in U.S. primary care settings. *Ann Intern Med* 2012;156:263-70.
 - 37) Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, Kauppinen S, Orum H. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 2010;327:198-201.
 - 38) Roque-Afonso AM, Ducoulombier D, Di Liberto G, Kara R, Gigou M, Dussaix E, Samuel D, Feray C. Compartmentalization of hepatitis C virus genotypes between plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 2005;79:6349-57.
 - 39) Zehender G, De Maddalena C, Bernini F, Ebranati E, Monti G, Pioltelli P, Galli M. Compartmentalization of hepatitis C virus quasispecies in blood mononuclear cells of patients with mixed cryoglobulinemic syndrome. *J Virol* 2005;79:9145-56.
 - 40) Fletcher NF, Wilson GK, Murray J, Hu K, Lewis A, Reynolds GM, Stamataki Z, Meredith LW, Rowe IA, Luo G, Lopez-Ramirez MA, Baumert TF, Weksler B, Couraud PO, Kim KS, Romero IA, Jopling C, Morgello S, Balfe P, McKeating JA. Hepatitis C virus infects the endothelial cells of the blood-brain barrier. *Gastroenterology* 2012;142:634-643 e6.
 - 41) Blackard JT, Kemmer N, Sherman KE. Extrahepatic replication of HCV: insights into clinical manifestations and biological consequences. *Hepatology* 2006;44:15-22.
 - 42) Mee CJ, Farquhar MJ, Harris HJ, Hu K, Ramma W, Ahmed A, Maurel P, Bicknell R, Balfe P, McKeating JA. Hepatitis C virus infection reduces hepatocellular polarity in a vascular endothelial growth factor-dependent manner. *Gastroenterology* 2010;138:1134-42.
 - 43) Kato N, Mori K, Abe K, Dansako H, Kuroki M, Ariumi

- Y, Wakita T, Ikeda M. Efficient replication systems for hepatitis C virus using a new human hepatoma cell line. *Virus Res* 2009;146:41-50.
- 44) Zhu H, Dong H, Eksioğlu E, Hemming A, Cao M, Crawford JM, Nelson DR, Liu C. Hepatitis C virus triggers apoptosis of a newly developed hepatoma cell line through antiviral defense system. *Gastroenterology* 2007;133:1649-59.
 - 45) Sainz B, Jr., Barretto N, Yu X, Corcoran P, Uprichard SL. Permissiveness of human hepatoma cell lines for HCV infection. *Viol J* 2012;9:30.
 - 46) Laskus T, Operskalski EA, Radkowski M, Wilkinson J, Mack WJ, deGiacomo M, Al-Harhi L, Chen Z, Xu J, Kovacs A. Negative-strand hepatitis C virus (HCV) RNA in peripheral blood mononuclear cells from anti-HCV-positive/HIV-infected women. *J Infect Dis* 2007;195:124-33.
 - 47) Castillo I, Rodriguez-Inigo E, Bartolome J, de Lucas S, Ortiz-Movilla N, Lopez-Alcorocho JM, Pardo M, Carreno V. Hepatitis C virus replicates in peripheral blood mononuclear cells of patients with occult hepatitis C virus infection. *Gut* 2005;54:682-5.
 - 48) Ito M, Masumi A, Mochida K, Kukihara H, Moriishi K, Matsuura Y, Yamaguchi K, Mizuochi T. Peripheral B cells may serve as a reservoir for persistent hepatitis C virus infection. *J Innate Immun* 2010;2:607-17.
 - 49) Ramirez S, Perez-Del-Pulgar S, Carrion JA, Costa J, Gonzalez P, Massaguer A, Fondevila C, Garcia-Valdecasas JC, Navasa M, Forns X. Hepatitis C virus compartmentalization and infection recurrence after liver transplantation. *Am J Transplant* 2009;9:1591-601.
 - 50) 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* 2005;79:592-6.
 - 51) Chang J, Guo JT, Jiang D, Guo H, Taylor JM, Block TM. Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells. *J Virol* 2008;82:8215-23.
 - 52) Lin LT, Noyce RS, Pham TN, Wilson JA, Sisson GR, Michalak TI, Mossman KL, Richardson CD. Replication of subgenomic hepatitis C virus replicons in mouse fibroblasts is facilitated by deletion of interferon regulatory factor 3 and expression of liver-specific microRNA 122. *J Virol* 2010;84:9170-80.
 - 53) Fletcher NF, Yang JP, Farquhar MJ, Hu K, Davis C, He Q, Dowd K, Ray SC, Krieger SE, Neyts J, Baumert TF, Balfe P, McKeating JA, Wong-Staal F. Hepatitis C virus infection of neuroepithelioma cell lines. *Gastroenterology* 2010;139:1365-74.
 - 54) Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ono C, Katoh H, Morita E, Okuzaki D, Maehara Y, Koike K, Matsuura Y. Expression of miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with HCV. *J Virol*. 2012.
 - 55) 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* 2008;82:2120-9.
 - 56) Cun W, Jiang J, Luo G. The C-terminal alpha-helix domain of apolipoprotein E is required for interaction with nonstructural protein 5A and assembly of hepatitis C virus. *J Virol* 2010;84:11532-41.
 - 57) Jiang J, Luo G. Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *J Virol* 2009;83:12680-91.
 - 58) Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Wakita T, Baumert TF, Miyanari Y, Shimotohno K. Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. *J Virol* 2010;84:12048-57.
 - 59) 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* 2007;9:1089-97.
 - 60) Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938-41.
 - 61) Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J* 2002;21:5017-25.
 - 62) Evans MJ, von Hahn T, Tschernie DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 2007;446:801-5.
 - 63) Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 2009;457:882-6.
 - 64) Michta ML, Hopcraft SE, Narbus CM, Kratovac Z, Israelow B, Sourisseau M, Evans MJ. Species-specific regions of occludin required by hepatitis C virus for cell entry. *J Virol* 2010;84:11696-708.
 - 65) Dorner M, Horwitz JA, Robbins JB, Barry WT, Feng Q, Mu K, Jones CT, Schoggins JW, Catanese MT, Burton DR, Law M, Rice CM, Ploss A. A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* 2011;474:208-11.
 - 66) Tani H, Komoda Y, Matsuo E, Suzuki K, Hamamoto I, Yamashita T, Moriishi K, Fujiyama K, Kanto T, Hayashi N, Owsianka A, Patel AH, Whitt MA, Matsuura Y. Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. *J Virol* 2007;81:8601-12.
 - 67) Moriishi K, Matsuura Y. Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. *Rev Med Virol* 2007;17:343-54.
 - 68) Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe T, Suzuki T, Lai MM, Miyamura T, Moriishi K, Matsuura Y. Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J Virol* 2005;79:13473-82.
 - 69) Foster TL, Galloway P, Stonehouse NJ, Harris M. Cyclo-

- philin A interacts with domain II of hepatitis C virus NS5A and stimulates RNA binding in an isomerase-dependent manner. *J Virol* 2011;85:7460-4.
- 70) Okamoto T, Nishimura Y, Ichimura T, Suzuki K, Miyamura T, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *Embo J* 2006;25:5015-25.
- 71) Wu X, Robotham JM, Lee E, Dalton S, Kneteman NM, Gilbert DM, Tang H. Productive Hepatitis C Virus Infection of Stem Cell-Derived Hepatocytes Reveals a Critical Transition to Viral Permissiveness during Differentiation. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002617.

miR-122 participates in the cell tropism of hepatitis C virus

Takasuke FUKUHARA, and Yoshiharu MATSUURA

Department of Molecular Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

Hepatitis C virus (HCV) exhibits a narrow host range and a specific tissue tropism. Studies on HCV life cycle have been progressed by the developments of *in vitro* replication and infection systems and an HCV laboratory strain (HCVcc) capable of propagating in human hepatoma cell line, Huh7 cells. Mice expressing four human entry receptor candidates for HCV permit entry of HCVcc, therefore tissue tropism of HCV was believed to be rely on the expression of the entry receptors. However, HCV infection is often associated with extra-hepatic manifestations and the determinants for cell tropism of HCV remain elusive. Recently, we have shown that several nonhepatic cell lines permit HCV-RNA replication through an expression of a liver-specific microRNA, miR-122, upon infection with HCVcc, while no infectious particle was produced. In the nonhepatic cells, only small numbers of lipid droplets and low levels of VLDL-associated proteins were observed in compared with Huh7 cells, suggesting that expression of miR-122 and functional lipid metabolism participates in the replication and assembly of HCVcc, respectively. In this review, we would like to discuss about involvement of miR-122 and functional lipid metabolism in the determination of HCV cell tropism.