

# 1. C型肝炎ウイルスの感染指向性に関する研究

福原 崇介

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。一方、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 の組織指向性を決定する機構についても不明な点が多い。これまでに我々は、HCV ゲノムの複製を亢進する肝臓特異的な microRNA である miR-122 が HCV の効率的な複製に重要であること、HCV の感染性粒子形成に肝臓に高発現するアポリポ蛋白質が関与することから、これらの因子が HCV 感染の肝臓指向性の決定因子であることを明らかにした。さらに、非肝臓組織でも僅かに HCV が増殖していることが知られていたが、非肝臓細胞では肝細胞とは異なる宿主因子を用いて、ウイルスの増殖を可能にしていることが明らかになった。これらの結果から HCV が個体内の様々な組織で巧みに宿主因子を利用するように進化したことが予想される。

## 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<sup>1)</sup>、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<sup>2,3)</sup>。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<sup>4,5)</sup>、その発症機構は未だ不明な点が多い<sup>6)</sup>。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<sup>7-9)</sup>。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 miR-122、アポリポ蛋白質及びリポ蛋白質受容体の意義について概説し、肝外組織での HCV の増殖の可能性と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. miR-122 と HCV 感染の肝臓指向性

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<sup>10-12)</sup>。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<sup>13-15)</sup> や脂質代謝<sup>16)</sup>、鉄代謝能<sup>17)</sup> 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ブ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<sup>18)</sup>。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が詳細は不明である<sup>7,19)</sup>。

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<sup>9)</sup>。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<sup>7)</sup>。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り HCVcc の新しい感受性細胞として有用な

### 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

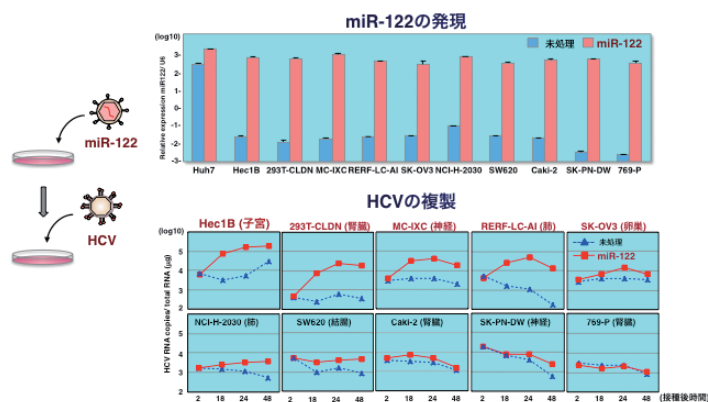


図1 miR-122発現による非肝臓細胞でのHCVゲノムの複製増強

ツールとなることが示された<sup>7)</sup>。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。

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<sup>20, 21)</sup>、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<sup>22, 23)</sup>、その詳細は明らかではない。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(図1)。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、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<sup>24)</sup>。

### 3. miR-122非依存的なHCVの増殖

非肝臓細胞ではmiR-122は全く発現していないにもかかわらずHCVの増殖が僅かに認められることから、miR-122非依存的な増殖が起きていると考えられるため、miR-122欠損Huh7.5.1細胞を作製し、HCVの増殖性を評価した。感染後、細胞の継代を続けることで、HCVがmiR-122欠

損環境に馴化し、効率良く増殖するようになった。ウイルスゲノムの配列を検討すると再現性を持ってG28AというmiR-122の結合領域近傍に適応変異が導入されていることが明らかになった。また、遺伝子型1b型のCon1/JFH1株ではC30UがmiR-122非依存的な増殖に必要であった。これらの変異はmiR-122がない環境においてのみウイルスゲノムの複製効率を増強することがわかった。実際に、遺伝子型2aのHCV陽性の患者から末梢血単核球を抽出し、HCVゲノム配列を評価したところ、G28A変異が高頻度に認められた<sup>25)</sup>。以上の結果から、HCVはmiR-122の結合領域に適応変異を導入することによって、非肝臓組織でのmiR-122非依存的な増殖を可能にしていると考えられる。今後は、非肝臓組織におけるその他のmiRNAの関与を明らかにする必要がある。

### 4. HCVの粒子産生におけるアポリポ蛋白質の関与

C型肝炎患者の血清中でリポ蛋白質がHCV粒子と直接結合していることが知られている<sup>26)</sup>。最近では、リポ蛋白質と相互作用しているHCV粒子のことはLipovirions (LVPs)と称され、LDLやVLDLと近い比重のHCV粒子は感染性が高いことから、リポ蛋白質との相互作用はHCVの高い感染性に関与することが示唆されている<sup>27-29)</sup>。さらに、精製したウイルス粒子の脂質組成を解析したところ、他のウイルス粒子と異なり、HCV粒子はVLDLやLDLと組成が似ていることが明らかになった<sup>30)</sup>。また、C型肝炎患者における血中のLDLコレステロール値は、HCV量と相関する事も知られている<sup>31)</sup>。また、これまでにsiRNAスクリーニング等の解析から、VLDL (Very Low-Density Lipoprotein)の産生に関与する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る<sup>32, 33)</sup>。そこで我々は、アポリポ蛋白質の関与をより

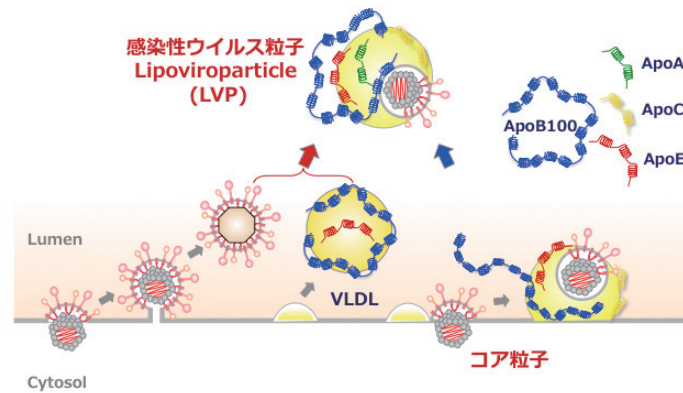


図2 HCV 粒子産生におけるアポリポ蛋白質の関与

詳細に解析するため、ApoB および ApoE のダブルノックアウト Huh7 細胞を作製し、感染性 HCV 粒子の産生効率を比較検討した<sup>34)</sup>。その結果、ApoB および ApoE が小胞体内腔での感染性粒子産生を相補的に正に制御していることが明らかになった。また、検討に用いた Huh7 細胞では実際の肝細胞と比較し、ApoA および ApoC の発現量が顕著に低かったことから、それらも同様な機能を持つかどうかを明らかにするために、ApoB および ApoE のダブルノックアウト細胞に ApoA および ApoC を発現させ、HCV の粒子産生を検討したところ、ApoA や ApoC も同様に HCV の粒子産生を正に制御することが判明した。次に我々は、どのような機構でアポリポ蛋白質が HCV 粒子に結合しているかの検討を行った<sup>34)</sup>。ApoA, ApoC, および ApoE は、Exchangeable Apolipoproteins と呼ばれ、リポ蛋白質の密度やサイズによってその親和性が変化し、それぞれが入れ替わることが知られている。Exchangeable Apolipoproteins は連続した両親媒性のヘリックス構造を持ち、ヘリックスの疎水性面がリポ蛋白質表面と結合することでリポ蛋白質に親水性と安定性を付与している。ApoC や ApoE の欠損変異体を作製することによって、HCV 粒子の成熟においてもアポリポ蛋白質の両親媒性ヘリックスが重要な役割を演じていることが示された(図2)。以上の成績から、アポリポ蛋白質は両親媒性アルファヘリックスを介してウイルス粒子の脂質膜表面に結合することで、HCV 粒子は感染性を獲得すると考えられる。miR-122 は肝臓特異的に発現するマイクロ RNA であり、HCV ゲノムの複製効率を増強することから肝臓指向性を規定する因子の1つである<sup>24)</sup>。一方、Exchangeable Apolipoproteins も肝臓で発現が高く、肝臓での効率的な粒子形成に寄与している<sup>35)</sup>。しかしながら、小腸等の肝外組織の中にもいずれかのアポリポ蛋白質の発現が高い組織もあり、HCV 感染を許容しうる組織が肝臓以外にもある可能性があるが、その詳細は明らかではない。

## 5. CAMP は HCV の粒子産生に関与する

非肝臓組織で miR-122 非依存的な HCV ゲノムの複製が起きた後に、感染性粒子が産生されるのかを検討するために、アポリポ蛋白質と同様の機能を持つ宿主因子を探索した。アポリポ蛋白質と同様に両親媒性ヘリックスを持つ因子を発現できるレンチウイルスライブラリーを作製し、HCV の粒子産生に関与する因子をアポリポ蛋白質欠損 Huh7 細胞を用いてスクリーニングし、Cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) を同定した。CAMP は主に単核球系細胞に発現し肝臓では認められず、抗細菌活性を持つ自然免疫因子であるが、アポリポ蛋白質と同様に両親媒性ヘリックスを持つ<sup>36-38)</sup>。先述のダブルノックアウト細胞を用いて、CAMP がアポリポ蛋白質と同様のメカニズムで感染性 HCV 粒子の形成を正に制御していることが明らかになった<sup>39)</sup>。このことから、非肝臓組織でもこのような膜結合性蛋白質を用いることで、ウイルス粒子形成が起こる可能性が示唆された。

## 6. HCV の細胞侵入におけるリポ蛋白質受容体の関与(図3)

SR-B1 や LDLR といったリポ蛋白質受容体は HDL や LDL を肝細胞へ取り込むための受容体である一方で、HCV の細胞侵入にも関与することが報告されているが、その詳細なメカニズムは明らかではない<sup>40, 41)</sup>。リポ蛋白質受容体の意義を詳細に解析するために、SR-B1 及び LDLR のノックアウト細胞を樹立し、HCV の感染性における役割を解析した。SR-B1 または LDLR の単独の欠損はわずかに HCV の侵入を抑制したが、共欠損は強く HCV の侵入を抑制し、さらに共欠損細胞に SR-B1 または LDLR の単独の発現でその感染性が回復したことから、SR-B1 と LDLR は HCV の細胞侵入に相補的に関わっていることが明らかになった。さらに、非肝臓細胞に主に発現している VLDLR もまた、HCV の細胞侵入において同様の機能を持つことから、非肝臓組織への HCV の感染には



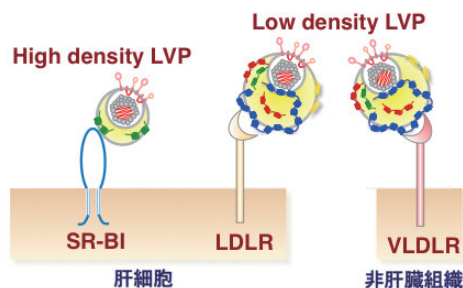


図3 Lipovirionsの侵入におけるリポ蛋白質受容体の利用

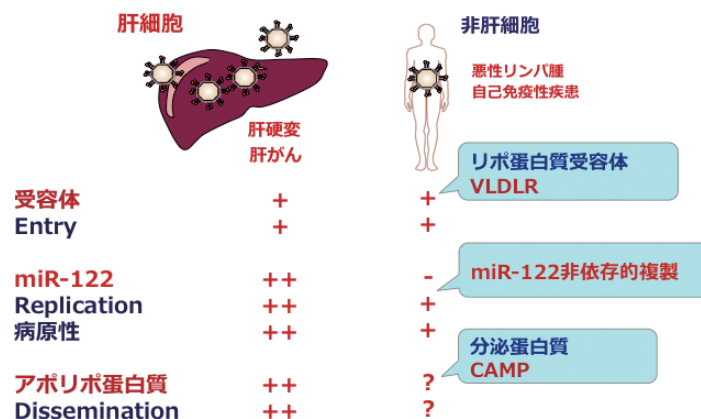


図4 HCVの肝臓指向性と非肝臓組織での増殖

VLDLRが関与していることが示唆された<sup>42)</sup>。また、感染性HCV粒子の産生にアポリポタンパク質が重要な役割を果たし、ウイルス粒子表面にアポリポ蛋白質が結合しているが、このウイルス粒子の細胞への侵入にリポ蛋白質受容体とアポリポ蛋白質の結合が関与していることも示した。

#### 7. まとめ (HCVの肝臓指向性と非肝臓組織での増殖: 図4)

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明らかになってきた。リポ蛋白質受容体であるSR-B1やLDLRさらにmiR-122及びアポリポ蛋白質は他の組織と比べて肝細胞で高発現しており、これらの因子はHCVの肝臓特異性に関わっている可能性が高い<sup>11)</sup>。一方で、非肝臓組織へのHCVの感染と粒子形成にそれぞれVLDLRとCAMPが関与し、G28AのようなmiR-122結合領域に適応変異を得ることによってウイルスゲノムの複製を増強している可能性がある。このような大きく異なった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. 謝辞

私は消化器外科医の道からウイルス学者への道に乗り換えて8年になりますが、その研究内容を本稿で紹介させて

いただきました。2009年から現在に至るまで現所属の大阪大学微生物病研究所の松浦善治先生にご指導いただきました。この場を借りて御礼申し上げます。また、苦言を呈する私に付き合い本研究と一緒に進めてくれた、小野慎子博士(miR-122に関する研究)、和田真実博士(アポリポ蛋白質に関する研究)、山本聡美博士(リポ蛋白質受容体に関する研究)、Puig-Basagoiti Francesc博士(CAMPに関する研究)、塩川舞博士(HCVの感染指向性に関する研究)と寒原裕登博士(miR-122に関する研究)に心よりお礼申し上げます。最後に、私を杉浦奨励賞に推挙くださいました松浦善治教授に深謝致します。

#### 利益相反事項の開示

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

#### 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) 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.
  - 11) Chang J, Provost P, Taylor JM. Resistance of human hepatitis delta virus RNAs to dicer activity. *J Virol* 2003;77:11910-7.
  - 12) 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.
  - 13) 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.
  - 14) 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.
  - 15) 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 hepatocarcinoma cells. *Cancer Res* 2009;69:5761-7.
  - 16) 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.
  - 17) Castoldi M, Vujic Spasic M, Altamura S, Elmen J, Lindow M, Kiss J, Stolte J, Sparla R, D'Alessandro LA, Klingmuller U, Fleming RE, Longerich 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.
  - 18) 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.
  - 19) 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.
  - 20) Laskus T, Operskalski EA, Radkowski M, Wilkinson J, Mack WJ, deGiacomo M, Al-Harathi 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.
  - 21) 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.
  - 22) 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.
  - 23) 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.
  - 24) Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ono C, Katoh H, Morita E, Okuzaki D, Maehara Y, Koike K, Matsuura Y. Expression of microRNA miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with hepatitis C virus. *J Virol* 2012;86:7918-33.
  - 25) Ono C, Fukuhara T, Motooka D, Nakamura S, Okuzaki D, Yamamoto S, Tamura T, Mori H, Sato A, Uemura K, Fauzyah Y, Kurihara T, Suda T, Nishio A, Hmwe SS, Okamoto T, Tatsumi T, Takehara T, Chayama K, Wakita T, Koike K, Matsuura Y. Characterization of miR-122-independent propagation of HCV. *PLoS Pathog* 2016;13:e1006374.
  - 26) Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Kochel HG, Uy A.: Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med. Microbiol. Immunol.* 181, 293-300, 1992.
  - 27) Andre P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, Pol S, Brechot C, Paranhos-Baccala G, Lotteau V.: Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J. Virol.* 76, 6919-6928, 2002.
  - 28) Gastaminza P, Kapadia SB, Chisari FV.: Differential biophysical properties of infectious intracellular and

- secreted hepatitis C virus particles. *J. Virol.* 80, 11074-11081, 2006.
- 29) Gastaminza P, Dryden KA, Boyd B, Wood MR, Law M, Yeager M, Chisari FV.: Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *J. Virol.* 84, 10999-11009, 2010.
- 30) Merz A, Long G, Hiet MS, Brugger B, Chlanda P, Andre P, Wieland F, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R.: Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipi-dome. *J. Biol. Chem.* 286, 3018-3032, 2011.
- 31) Felmler DJ, Sheridan DA, Bridge SH, Nielsen SU, Milne RW, Packard CJ, Caslake MJ, Mclauchlan J, Toms GL, Neely RD, Bassendine MF.: Intravascular transfer contributes to postprandial increase in numbers of very-low-density hepatitis C virus particles. *Gastroenterology* 139, 1774-1783, 2010.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike K, Matsuura Y.: Amphipathic  $\alpha$ -helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathog.* 10, e1004534, 2014.
- 35) Fukuhara T, Ono C, Puig-Basagoiti F, Matsuura Y.: Roles of lipoproteins and apolipoproteins in particle formation of hepatitis C virus. *Trend Microbiol.* 23, 618-629, 2015.
- 36) Durr UH, Sudheendra US, Ramsmoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 2006;1758:1408-25.
- 37) Wang G. Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals (Basel)* 7:545-94.
- 38) Wimley WC. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with interfacial activity model. *ACS Chem Biol* 5:905-17.
- 39) Puig-Basagoiti F, Fukuhara T, Tamura T, Ono C, Uemura K, Kawachi Y, Yamamoto S, Mori H, Kurihara T, Okamoto T, Aizaki H, Matsuura Y. Human cathelicidin compensates for the role of apolipoproteins in hepatitis C virus infectious particle formation. *J Virol* 2016;90:8464-77.
- 40) Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G. The human scavenger receptor class B type 1 is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002;21:5017-25.
- 41) Owen DM, Huang H, Ye J, Gale M. Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology* 2009;394:99-108.
- 42) Yamamoto S, Fukuhara T, Ono C, Uemura K, Kawachi Y, Shiokawa M, Mori H, Wada M, Shima R, Okamoto T, Hiraga N, Suzuki R, Chayama K, Wakita T, Matsuura Y. Lipoprotein receptors redundantly participate in entry of hepatitis C virus. *PLoS Pathog* 2016;12: e1005610.

# Hepatic tropism of hepatitis C virus infection

**Takasuke FUKUHARA**

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

Hepatitis C virus (HCV) infects over 170 million people worldwide and is a major cause of life-threatening liver diseases such as liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. In current research, we aimed to clarify the mechanism of hepatic tropism of HCV infection. Although non-hepatic cells could not permit replication of HCV RNA, exogenous expression of liver specific miRNA, miR-122 facilitated efficient replication of viral RNA through direct interaction with 5'UTR of viral genome, indicating that miR-122 is one of the key determinants for hepatic tropism of HCV infection. In spite of efficient replication of viral RNA, formation of infectious particles was not observed in non-hepatic cells exogenously expressing miR-122. We found that expression of apolipoprotein E (ApoE) facilitated the formation of infectious HCV particles in non-hepatic cells, indicating that not only miR-122 but also ApoE participate in tissue tropism of HCV infection. To understand the exact roles of miR-122 and apolipoproteins in hepatic tropism of HCV, we established miR-122 and ApoB/ApoE knockout (KO) Huh7 cells, respectively. Although slight increase of intracellular HCV RNA and infectious titers in the culture supernatants was observed, propagation of HCV was impaired in miR-122 KO Huh7 cells. After serial passages of HCV in miR-122 KO cells, we obtained an adaptive mutant that possessed G28A substitutions in the 5' UTR of the HCV genome and exhibited efficient translation and replication in both miR-122 KO Huh7 and non-hepatic cells without exogenous expression of miR-122. These results suggest that HCV mutants replicating in non-hepatic cells in an miR-122-independent manner participate in the induction of extrahepatic manifestations in chronic hepatitis C patients. Deficiency of both ApoB and ApoE strongly inhibited the formation of infectious HCV particles. Interestingly, expression not only of ApoE but also of ApoA or ApoC could rescue the production of infectious HCV particles in ApoB/ApoE KO cells, suggesting that exchangeable apolipoproteins redundantly participate in the formation of infectious HCV particles.

