

2. 宿主侵入因子 Claudin-1 を標的とした抗 C 型肝炎ウイルス戦略

深澤 征義

国立感染症研究所 細胞化学部

抗 C 型肝炎ウイルス (HCV) 戦略として、近年、ウイルス因子を標的とした薬剤 (Direct-acting antiviral agents; DAA 剤) による治療法が大きな成功を収めつつある。しかし、耐性ウイルス等の問題も考えられ、宿主因子を含めた新たな標的に対する薬剤開発も推進すべきと思われる。宿主肝細胞内への HCV の侵入には、CD81, SRBI, Claudin-1, Occludin 等の宿主分子が関与することがわかってきている。本稿では、これまで我々が取り組んできた Claudin-1 を標的とした抗 HCV 戦略について紹介したい。また、HCV 侵入過程に関わる宿主因子を標的とした薬剤開発研究についても概括する。宿主侵入因子を標的とする抗 HCV 戦略は、特に、移植時の感染阻止や DAA 剤との併用において有用であると考えられる。

1. はじめに

C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus; HCV) 感染に対する治療法が大きな転換期を迎えている。これまでペグインターフェロン α + リバビリン併用療法が 10 年以上にわたり行われ、日本で患者の多い遺伝子型 1b の高ウイルスタイプには効果が顕著ではなかったものの、一定の成果を上げてきた。その後、ここ数年の間に、ウイルス因子を標的とした薬剤 (NS3 プロテアーゼ阻害剤, NS5A 阻害剤, NS5B ポリメラーゼ阻害剤; いわゆる direct-acting antiviral agents; DAA 剤) が次々と承認され、臨床できわめて高いウイルス学的著効 (sustained virological response; SVR) を示すことが明らかとなってきた¹⁾。その延長として、副作用が問題であったインターフェロンを用いない経口剤のみの治療 (インターフェロンフリー療法) も可能になってきている。しかし、ウイルス因子を標的とする DAA 剤では耐性ウイルスが生じる可能性があり、実際に各薬剤に対する耐性ウイルスが多数分離されている²⁻⁴⁾。

そのため、薬剤耐性が生じにくい次世代の抗 HCV 薬、すなわち HCV ライフサイクルに必須の宿主因子を標的とした薬剤の開発^{5,6)} も続けていくべきであろう。本稿ではこのような観点に立った、我々の取り組み⁷⁾ についてまず紹介したい。

2. Claudin-1 を標的とした抗 HCV 戦略に向けて

2-1. HCV ライフサイクルに必須の宿主因子の探索～HCV 非感染肝細胞変異株の分離

HCV の感染・増殖サイクルには、HCV の肝細胞表面への接着、特異的受容体を介したエンドサイトーシスによる HCV の細胞内への取り込み、ウイルス粒子の脱殻、小胞体におけるウイルスタンパク質の翻訳、脂肪滴近傍でのウイルスゲノム RNA の複製およびウイルス粒子形成、ゴルジ体を経由する小胞輸送 (いわゆる分泌経路) を利用したウイルス粒子の放出、といった複雑で巧妙なステップが存在し、各段階で宿主因子が大きな役割を果たしている⁴⁻⁶⁾。この HCV ライフサイクルに必須の“宿主因子”を同定するために、我々は得意としている遺伝学的手法によるアプローチを試みた。すなわち、HCV に全く感染しない (非感染) ヒト肝細胞変異株を分離することを目指した。つまり、HCV に非感染の肝細胞変異株は HCV ライフサイクルに必須の宿主因子が欠損しているはずであり、変異株の解析からその欠損因子を明らかにできるだろうということである。

一般的に、特定の形質を示す変異株を効率的に分離するためには、簡便かつ特異性の高いスクリーニング系の構築

連絡先

〒162-8640

東京都新宿区戸山 1-23-1

国立感染症研究所 細胞化学部

TEL: 03-4582-2733 (直通)

FAX: 03-5285-1157

E-mail: fuka@nih.go.jp

がきわめて重要である。HCV 非感染肝細胞変異株を分離するためには、非常に感染効率のよい細胞培養系が必要と考えた。つまり、HCV に高感受性の宿主細胞に感染能の非常に高い HCV 株を感染させられれば、感染細胞は細胞変性効果により効率的に細胞死するため、生き残った細胞をクローニングすれば HCV に非感染の肝細胞変異株が分離できるだろうという戦略である。きわめて簡便なスクリーニング系である。研究開始当時は、細胞培養系における HCV ライフサイクルを効率よく再現できる系がようやく普及し始めた頃であり、HCV 複製能が非常に高いヒト肝由来 Huh7.5.1 細胞株⁸⁾と、脇田らにより劇症肝炎患者から分離された HCV-JFH1 株⁹⁾が利用可能であった。そこで、これらを用い感染実験を行ったが、感染は見られるものの、細胞変性効果（細胞死の誘導）は十分とはいえなかった。そこで、HCV-JFH1 野生株より高感染増殖能を示す適応変異株の分離を試みた。HCV-JFH1 野生株を Huh7.5.1 細胞に繰り返し感染させた結果、感染増殖能が 1,000 倍近く高い適応変異株が分離できた（論文執筆中）。この高感染性適応変異株は Huh7.5.1 細胞に対し非常に強い細胞変性効果を示したことから、簡便かつ切れ味のよいスクリーニングが可能となった。Huh7.5.1 細胞を親株としてスクリーニングを行った結果、約 20 株の生き残る（HCV 耐性の）細胞クローンが分離できた¹⁰⁾。その中には、懸念された持続感染細胞株は 1 株のみであり、その他はすべて HCV 非感染細胞株だった。詳細な解析の結果、これら非感染細胞株はすべて CD81 欠損株であることが判明した。これら非感染細胞株に CD81 タンパク質を強制発現すると HCV 感受性が回復したことから、これら細胞株は CD81 欠損が原因で HCV に感染できないことがわかった。CD81 は 4 回膜貫通型の細胞膜タンパク質（tetraspanin）であり、HCV エンベローブ糖タンパク質（E2）と結合し、HCV 感染に必須の因子であることがすでに報告されていた^{11, 12)}。以上の変異株の結果からも CD81 が HCV 感染に必須の宿主因子であることが再確認された。この結果は我々のスクリーニング系によって、目的とする宿主因子の欠損株が分離可能であることも示している。

そこで、CD81 欠損細胞株以外の変異株を分離するために、CD81 を一過的に強制発現させた Huh7.5.1 細胞を親株として再度スクリーニングを行った。その結果、今回も約 20 株の HCV 非感染株が分離された¹⁰⁾。解析の結果、CD81 欠損株が依然として複数含まれていたが、それ以外の変異株も多数存在していた。いくつかの変異株について DNA チップによる遺伝発現解析を行ったところ、タイトジャンクションタンパク質である Claudin-1 (CLDN1) の欠損株が含まれることがわかった。分離したすべての HCV 非感染株を調べた結果、CLDN1 欠損株が 3 株含まれることが判明した。これら細胞株に CLDN1 タンパク質を強制発現すると HCV 感受性が回復したことから、以上の

非感染株は CLDN1 欠損が原因で HCV に感染できないことも示された。CLDN1 についても HCV 感染の侵入過程に重要なことがすでに報告されていた分子であったが¹³⁾、以上の変異株を用いた解析からも CLDN1 が肝細胞における HCV 感染に必須の宿主因子であることが再確認された。

我々の遺伝学的アプローチによって、CD81 と CLDN1 という 2 つの HCV 侵入に関わる宿主細胞表面分子が HCV 感染に「必須」であることが改めて浮き彫りとなった。そこで、両分子の抗 HCV 薬標としての有用性について、変異株を用いさらに検討することにした。

2.2. 創薬標としての CLDN1 の有用性

CD81 と CLDN1 は創薬標として本当にふさわしいだろうか？ HCV の感染様式には、細胞外液からの感染（「セルフリー感染」）と隣接する細胞同士の接触面でウイルスが伝播する「細胞—細胞間感染」が知られている¹⁴⁻¹⁶⁾。生体内の持続感染状態では細胞—細胞間感染がより重要であるとも言われている。前項で述べたように、CD81 および CLDN1 欠損細胞株は培養液中の HCV には非感受性であり、セルフリー感染には両分子は必須の因子である。それでは、細胞—細胞間感染についてはどうだろうか。そこで、両分子の関与について、各欠損細胞株を用いて検討した。

細胞核を GFP で標識した Huh7.5.1 細胞を予め HCV に感染させておき、その感染細胞のごく少数を CD81 欠損細胞株あるいは CLDN1 欠損細胞株と共培養した。この系において、核が標識された細胞に接している細胞（核が標識されていない細胞）が感染していれば細胞—細胞間感染が起こったと判断される。HCV コアタンパク質の細胞免疫染色にて感染細胞を検出した結果、CD81 欠損細胞株では感染が（弱いながらも明らかに）見られたのに対して、CLDN1 欠損細胞株では感染が全く見られなかった¹⁰⁾。CD81 についてはこれまで、細胞—細胞間感染に重要ではないかもしれないとの報告^{14, 16)}があったが、我々の結果からも細胞間感染の促進には関わっていると考えられるものの「必須ではない」ことが示された。CLDN1 については、細胞—細胞間感染における重要性が指摘されていたが¹⁴⁾、以上の結果から必須の因子であることがわかった。これらの結果を総合すると、CLDN1 はセルフリー感染・細胞—細胞間感染双方に必須であり、有望な HCV 侵入阻害薬標となることが考えられた。

2.3. HCV 感染を阻止可能な CLDN1 結合プローブの取得

CLDN1 は、細胞膜上のタイトジャンクション（tight junction; TJ）に局在し、TJ のバリア機能の本体を担うタンパク質として、1998 年、月田らにより発見された¹⁷⁾。分子量約 2 万 3 千の 4 回膜貫通タンパク質であり、27 種類が知られる CLDN ファミリーに属する¹⁸⁾。

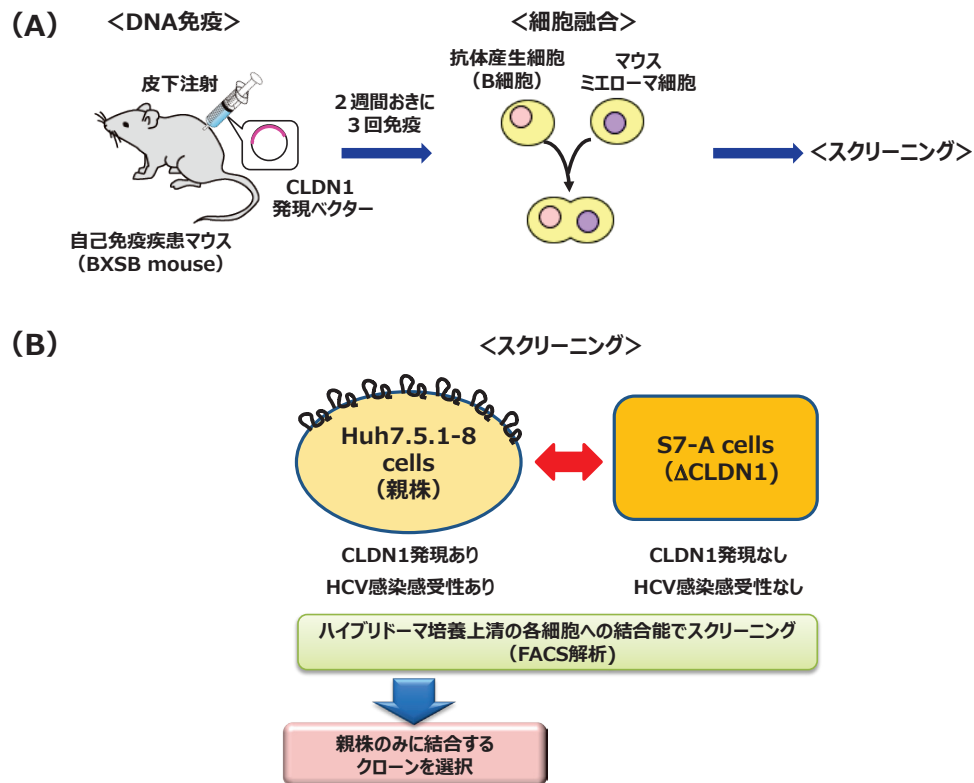


図1 機能的抗 Claudin-1 (CLDN1) モノクローナル抗体の樹立法

(A) 複数膜貫通タンパク質に対する機能的抗体作製に有用な DNA 免疫法
 (B) インタクト CLDN1 細胞外ドメインを認識する抗体のスクリーニング法
 (J.Virol. 89, 4866-4879, 2015 より改変して引用)

CLDN1 の細胞外ドメインを認識する様々なプローブが取得できれば、HCV の感染を阻止できるものも見つかるだろうという考えのもとに、CLDN1 細胞外領域に対するモノクローナル抗体の作製を試みた。CLDN1 タンパク質は種間で相同性が高く、また、インタクトの複数膜貫通タンパク質を認識できる機能的抗体の取得は大変難しいことが一般的に知られている。そこで我々は、1) 免疫動物に自己免疫疾患マウス (BXSB マウス) を用い、2) 免疫法には本来の高次構造をより反映した形で抗原発現可能な DNA 免疫法を用いることにした (図 1A)。目的の抗体を効率的に分離するためにはスクリーニング系も非常に重要であり、CLDN1 欠損細胞株を有効に利用した以下の方法を考案した。HCV 感染感受性を有しインタクトの CLDN1 を発現する Huh7.5.1-8 細胞と HCV 非感染感受性で CLDN1 のみが特異的に欠損した Huh7.5.1 由来の変異株 (S7-A 細胞) を用い、フローサイトメーターにて親株のみに結合する抗体 (産生ハイブリドーマ) を選択した (図 1B)。その結果、インタクトの CLDN1 細胞外領域を認識する 4 種類のマウスモノクローナル抗体 (クローン 2C1, 3A2, 5F2, 7A5) の樹立に成功した¹⁰⁾。これらのモノクローナル抗体

はヒト CLDN1 を特異的に認識し、見かけの Kd 値がすべて 1nM 以下と、CLDN1 に対して非常に高い親和性を有することも明らかとなった。各抗体クローンについて、想定される CLDN1 認識部位と利用できるアプリケーションを表 1 にまとめた。4 種の抗体のうち、3 種 (2C1, 3A2, 5F2) はインタクトの CLDN1 のみを認識する高次構造認識抗体であり、1 種 (7A5) はイムノプロットにも使えることから変性 CLDN1 にも結合できる第 2 細胞外ループ認識抗体である。

次に、培養細胞系を用いて HCV 感染に対する各モノクローナル抗体の阻害効果を検討した。Huh7.5.1-8 細胞¹⁹⁾ を各抗体で前処理した後、HCV-JFH1 株を感染させ、4 日後に培養上清中のウイルスコアタンパク質量を定量した。図 2A にはクローン 3A2 と 7A5 の結果を示したが、すべてのクローンで、HCV 感染を容量依存的に阻害することがわかった (感染阻止の強さは、2C1 = 3A2 > 7A5 > 5F2)¹⁰⁾。特に 2 種 (2C1, 3A2) は極めて強い感染阻止能を示し、HCV 感染阻止能を示すことが最近報告された CLDN1 抗体^{20, 21)} よりも遙かに低濃度で有効だった。HCV-JFH1 株 (遺伝子型 2a) 以外の HCV 侵入活性につい

表1 樹立したマウス抗ヒト Claudin-1 (CLDN1) モノクローナル抗体の性状, アプリケーションの一覧

| アプリケーション | マウス抗ヒトCLDN1モノクローナル抗体 | | | |
|------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| | 2C1 (IgG2b) 第1,2ループ認識 | 3A2 (IgG2b) 第1,2ループ認識 | 5F2 (IgG2a) 主に第2ループ認識 | 7A5 (IgG1) 第2ループ認識 |
| FACS | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 免疫細胞染色 | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Cell ELISA | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 免疫沈降 | ○ | ○ | ○ | ○ |
| イムノブロット | × | × | × | ○ |

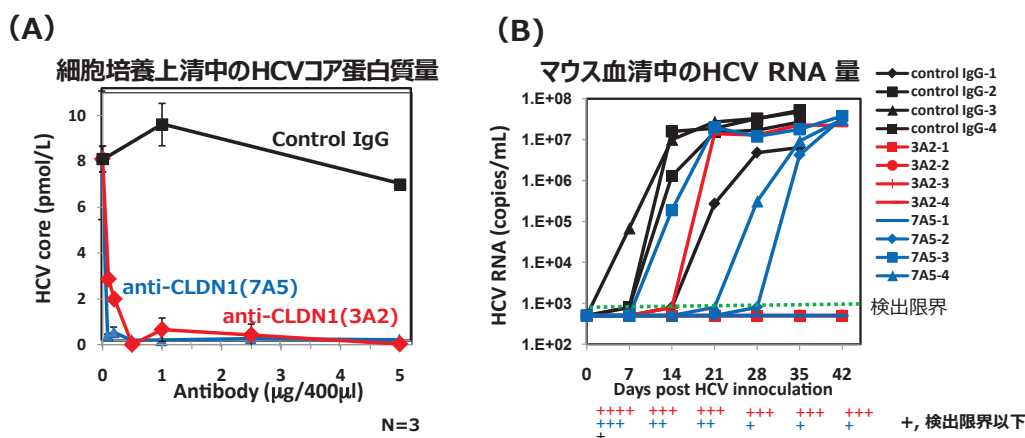


図2 抗 Claudin-1 (CLDN1) モノクローナル抗体による HCV 感染阻止

(A) *in vitro* 細胞培養感染系(B) *in vivo* ヒト肝キメラマウス感染系

(J.Virol. 89, 4866-4879, 2015 より改変して引用)

ては, HCV のエンベロープタンパク質を有する偽ウイルス (HCV pseudoparticles; HCVpp) を用いた系²²⁾ で検討した. その結果, 遺伝子型 1b を含む他のウイルス株でも用量依存的な阻害効果が見られ, 広く HCV 感染を阻止できることが強く示唆された. そこでさらに, *in vivo* での抗 CLDN1 抗体の効果を検討するために, ヒト肝キメラマウス²³⁾ を用いた感染阻止試験を行った¹⁰⁾. 抗 CLDN1 抗体はエピトープの異なる 2 種類 (3A2, 7A5) を用い, 感染は遺伝子型 1b のウイルス (10^4 HCV RNA copies/mouse) で行った. 抗体は感染の 8 時間前, および 3, 7, 10 日後に 30, 20, 10, 10 mg/kg で腹腔投与を行った. その結果, コントロール抗体に比べて, 抗 CLDN1 抗体では明らかに血中ウイルス RNA 量の上昇が遅れることがわかり, 感染成立が阻害されていることがわかった (図 2B). 特に, 培養細胞系で感染阻止能が強かったクローン 3A2 では, 4 匹中 3 匹で感染が完全に阻止された (図 2B). また, 本試験において, 動物には体重, 肝機能 (AST, ALT), 血中ヒトア

ルブミン量には特に変化がなく, 抗体の毒性は見られなかった. 培養細胞レベルでも, 細胞毒性や TJ 機能への影響も見られていない¹⁰⁾. 以上の結果から, 動物レベルでも CLDN1 が感染に必須であることが明らかとなり, CLDN1 が抗 HCV 薬標となることの Proof of Concept (POC) が確立されたものと考えている. 本抗体は創薬に向けた非常に有用なシーズになるとと思われる.

さらに最近, 我々の報告と同様にフランスのグループが, ヒト肝キメラマウスを用いた *in vivo* での抗 CLDN1 抗体の効果を報告した²⁴⁾. 彼らの抗体でも, 毒性を示さずに HCV 感染を強く阻止できることが示された. ただし, 彼らの抗体では, 感染細胞に細胞死を誘導できることから, 持続感染からの HCV の排除も可能だとしている. 非常に興味深い結果だが, CLDN1 以外の分子に作用している可能性や, (ヒト肝キメラマウスではない) 免疫系を有する個体に投与した場合には, 強い炎症応答等の副作用が出ないかが懸念される. メカニズムの詳細が明らかにされるこ

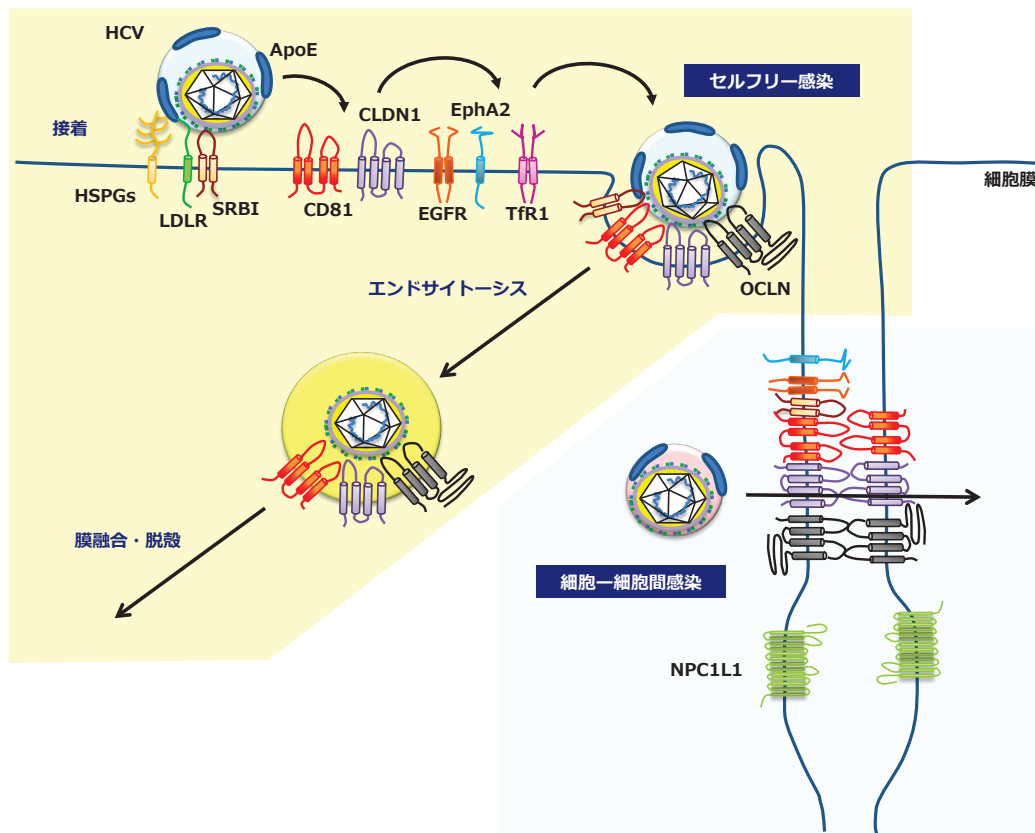


図3 HCVの侵入過程に関わる主要な宿主因子 (略号は本文中参照)

とも待たれる。我々の抗体は、持続感染に対する阻止効果は見られないことから (未発表), HCV 侵入過程のみを標的にしているものと考えている。

3. 他の宿主侵入因子阻害剤開発に向けた研究

HCVの侵入にかかわる主要な宿主因子²⁵⁻²⁷⁾について図3に示した。まずは、セルフリー感染から見ていく。HCVの侵入過程は、宿主肝細胞へのウイルス粒子の接着から始まる。初期の接着に重要とされているのが、syndecan 1²⁸⁾やsyndecan 4²⁹⁾などのヘパラン硫酸プロテオグリカン (heparan sulfate proteoglycans; HSPGs)³⁰⁾、低密度リポタンパク質受容体 (low-density lipoprotein receptor; LDLR)^{31,32)}、スカベンジャー受容体クラスBタイプI (scavenger receptor class B type I; SRBI)³³⁾である。HCVはリポタンパク質様粒子と会合していると言われているが、ウイルス粒子側に結合している宿主因子としては、アポリポタンパク質E (apolipoprotein E; ApoE)が宿主細胞への接着^{29,34)}および粒子の感染性^{35,36)}に重要であることが知られている。実際に、HSPGsに結合する合成ペプチド³⁷⁾、抗LDLR抗体³⁸⁾や可溶性LDLR³⁹⁾、抗SRBI抗体^{38,40)}、抗ApoE抗体³⁴⁾やApoE結合能を有するシイタケ菌糸由来の低分子化リグニン³⁹⁾等がHCVの感染を阻害すること

が示されている。また、リポタンパク質リパーゼ (lipoprotein lipase; LPL)がHCV粒子と宿主細胞の橋渡し役となりその接着を強め、その接着力ゆえに、逆にHCVの細胞内への侵入を阻害してしまうとの報告もある⁴¹⁾。超低密度リポタンパク質 (very low-density lipoprotein; VLDL)がHCVの宿主細胞への接着を阻害することも最近示されている⁴²⁾。

細胞表面に接着したHCV粒子が肝細胞内へ取り込まれるためには、さらに他の宿主侵入因子 (いわゆるHCV受容体)と相互作用する必要があると言われている。すなわち、初期接着にも重要とされているSRBI³³⁾に加えて、CD81¹¹⁾、CLDN1¹³⁾、Occludin (OCLN)⁴³⁾がウイルス粒子上のエンベロープタンパク質 (E1, E2)と直接・間接的に相互作用するステップである。CD63がE2タンパク質と直接結合してHCV受容体として働くとの報告もある⁴⁴⁾。HCV受容体との相互作用からエンドサイトーシスに至るまでの過程には、コファクターとして働く宿主因子も多数報告されている。上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor; EGFR)、Ephrin receptor A2 (EphA2)などのリン酸化酵素群⁴⁵⁾、Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1)⁴⁶⁾、トランスフェリン受容体1 (transferrin receptor 1; TfR1)⁴⁷⁾等が、細胞内シグナル経路やエンドサイトーシス系への機

能制御を通じて HCV 侵入に関与している。これらの HCV 受容体やコファクターに対する抗体や結合する分子が、HCV 感染を強く阻害することも分かってきている⁵⁾。特に、臨床試験まで進んでいるものとしては、フェーズ 1/2 の EGFR 阻害剤エルロチニブ erlotinib (NCT01835938, 抗がん剤としては承認済)、フェーズ 1 の SRBI 結合分子 ITX-5061^{48,49)} がある。動物試験まで行われているものは、すでに述べた抗 CLDN1 抗体^{10,24)} 以外では、抗 CD81 抗体^{50,51)}、抗 SRBI 抗体⁵¹⁻⁵³⁾、NPC1L1 結合分子エゼチミブ ezetimibe (コレステロール低下薬としては承認済)⁴⁶⁾ がある。

次に、細胞—細胞間感染について見ていく。すでに述べたように、HCV 持続感染時において細胞—細胞間感染が感染の維持に重要な役割を果たしていると考えられている。治療を考える上では、細胞—細胞間感染も阻止できるかが重要なポイントになると思われる。これまでに細胞—細胞間感染に関与すると報告された宿主分子は、CD81, SRBI, CLDN1, OCLN, EGFR, EphA2, NPC1L1, ApoE などがある^{14-16, 24, 45, 46, 52, 55-59)}。CLDN1 は細胞—細胞間感染に必須の因子であることが上述のとおり示されたが¹⁰⁾、CD81^{10,14,16)} や SRBI⁶⁰⁾ などでは、必須ではないとされる報告も存在し、他の因子を含め⁵⁶⁾ 今後の詳細な解析が待たれる。

宿主の侵入因子に対する阻害剤については、精力的な総説が多く出ているので、詳細についてはそれらを参照していただきたい^{5, 6, 25, 61-63)}。クラスリン依存性のエンドサイトーシスから膜融合・脱核の過程を標的とした侵入阻害剤^{64, 65)} についても、HCV 特異的とはいえないものの、臨床試験が行われているものがある (NCT02058173)^{66, 67)}。

4. おわりに

本稿ではまず、我々の遺伝学的な取り組みから CLDN1 に注目した経緯を紹介し、宿主侵入因子 CLDN1 が抗 HCV 薬標的となることの POC を提示した。CLDN1 を標的とした創薬研究を進めるためには、抗 CLDN1 抗体の個体レベルでの安全性のさらなる検証と広範なウイルス株を用いた抗 HCV 活性の検討が必要だろう⁶⁸⁾。経口投与可能な低分子 CLDN1 binder 開発へのシフトも考えるべきかもしれない。最近、培養細胞系での研究ではあるが、CLDN1 依存性が変化し、CLDN6 や CLDN9 を細胞内への侵入に利用できる HCV 感染クローンが報告された⁶⁹⁾。臨床レベルで同様の現象は報告されていないが、今後実際に起こりうるかは注視すべきだろう。ただし、用いられた Huh7 系の培養細胞はがん細胞であり、正常肝細胞では CLDN6, CLDN 9 の発現が (ほとんど) ないことが知られているので、現実的には生体では問題にならないのかもしれない。

後半では、HCV 侵入過程に関わる宿主因子を標的とした抗 HCV 戦略についても簡単に概説した。CLDN1 阻害

剤を含めた侵入阻害剤は、肝移植時の移植片への感染阻止や針刺しなどの医療事故の応急処置に有効と考えられる。また、臨床で使用されている DAA 剤とは標的が異なることから、DAA 剤との併用で相乗的な効果が期待される⁵¹⁾。体内では、主に細胞—細胞間感染サイクルが回っていることで持続感染が維持されていると考えられているが、侵入阻害剤により細胞—細胞間感染が効率的に阻止されれば、DAA 剤との併用時に耐性ウイルスの発生頻度が大きく抑えられることも期待される。宿主侵入因子阻害剤を含めた宿主因子を標的とした抗 HCV 戦略は、今後さらに問題となるかもしれない耐性ウイルスに対抗し、C 型肝炎治療の選択肢を広げられるはずである^{5, 6)}。HCV ライフサイクルに必須の宿主因子の解明、そして宿主因子を標的とした薬剤の安全性の検討について、今後も地道な研究を続けていくべきであろう。

最後に一つ触れておきたい。CLDN1 はデングウイルスの侵入過程を促進することも報告されている^{70, 71)}。他のウイルス感染時における CLDNs や OCLN の関与も示唆されており⁷²⁻⁷⁶⁾、TJ タンパク質とウイルス感染について今後の研究の進展も大いに期待される。

謝 辞

本稿で紹介した我々の研究は、国立感染症研究細胞化学部、大阪大学大学院薬学研究所 (八木清仁先生、近藤昌夫先生の研究室)、浜松医科大学 (鈴木哲朗先生)、国立感染症研究所ウイルス第二部 (脇田隆字先生の研究室) との共同研究の成果であり、共同研究者の先生方には謹んで深謝申し上げます。本研究の一部は、日本医療研究開発機構、厚生労働省、文部科学省の研究費援助を受けて行ったものであり、御支援に深謝致します。また、本稿執筆の機会を与えていただいた浜松医科大学 鈴木哲朗先生に深謝致します。

参考文献

- 1) Chung RT and Baumert TF: Curing chronic hepatitis C—the arc of a medical triumph. *N Engl J Med* 370: 1576-1578, 2014.
- 2) Sarrazin C: The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice. *J Hepatol*, 2015.
- 3) Soriano V, Vispo E, Poveda E, Labarga P and Barreiro P: Treatment failure with new hepatitis C drugs. *Expert Opin Pharmacother* 13: 313-323, 2012.
- 4) Donaldson EF, Harrington PR, O'Rear JJ and Naeger LK: Clinical evidence and bioinformatics characterization of potential hepatitis C virus resistance pathways for sofosbuvir. *Hepatology* 61: 56-65, 2015.
- 5) Zeisel MB, Crouch E, Baumert TF and Schuster C: Host-Targeting Agents to Prevent and Cure Hepatitis C Virus Infection. *Viruses* 7: 5659-5685, 2015.
- 6) Baugh JM, Garcia-Rivera JA and Gallay PA: Host-tar-

- getting agents in the treatment of hepatitis C: a beginning and an end? *Antiviral Res* 100: 555-561, 2013.
- 7) Fukasawa M: Claudin 1 as a target for anti-hepatitis C virus strategy. *Yakugaku Zasshi* 134: 635-640, 2014.
 - 8) Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T and Chisari FV: Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9294-9299, 2005.
 - 9) Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R and Liang TJ: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11: 791-796, 2005.
 - 10) Fukasawa M, Nagase S, Shirasago Y, Iida M, Yamashita M, Endo K, Yagi K, Suzuki T, Wakita T, Hanada K, Kuniyasu H and Kondoh M: Monoclonal antibodies against extracellular domains of claudin-1 block hepatitis C virus infection in a mouse model. *J Virol* 89: 4866-4879, 2015.
 - 11) Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G and Abrignani S: Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282: 938-941, 1998.
 - 12) Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Miyamoto M, Kaga M, Barth H, Baumert TF, Dubuisson J and Wakita T: CD81 expression is important for the permissiveness of Huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection. *J Virol* 81: 5036-5045, 2007.
 - 13) Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD and Rice CM: Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446: 801-805, 2007.
 - 14) Timpe JM, Stamatakis Z, Jennings A, Hu K, Farquhar MJ, Harris HJ, Schwarz A, Desombere I, Roels GL, Balfe P and McKeating JA: Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* 47: 17-24, 2008.
 - 15) Brimacombe CL, Grove J, Meredith LW, Hu K, Syder AJ, Flores MV, Timpe JM, Krieger SE, Baumert TF, Tellinghuisen TL, Wong-Staal F, Balfe P and McKeating JA: Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J Virol* 85: 596-605, 2011.
 - 16) Witteveldt J, Evans MJ, Bitzegeio J, Koutsoudakis G, Owsianka AM, Angus AG, Keck ZY, Fong SK, Pietschmann T, Rice CM and Patel AH: CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *J Gen Virol* 90: 48-58, 2009.
 - 17) Furuse M, Fujita K, Hiiiragi T, Fujimoto K and Tsukita S: Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141: 1539-1550, 1998.
 - 18) Gunzel D and Fromm M: Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol* 2: 1819-1852, 2012.
 - 19) Shirasago Y, Sekizuka T, Saito K, Suzuki T, Wakita T, Hanada K, Kuroda M, Abe R and Fukasawa M: Isolation and characterization of an Huh.7.5.1-derived cell clone highly permissive to hepatitis C virus. *Jpn J Infect Dis* 68: 81-88, 2015.
 - 20) Krieger SE, Zeisel MB, Davis C, Thumann C, Harris HJ, Schnober EK, Mee C, Soulier E, Royer C, Lambotin M, Grunert F, Dao Thi VL, Dreux M, Cosset FL, McKeating JA, Schuster C and Baumert TF: Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology* 51: 1144-1157, 2010.
 - 21) Fofana I, Krieger SE, Grunert F, Glaubens S, Xiao F, Fafi-Kremer S, Soulier E, Royer C, Thumann C, Mee CJ, McKeating JA, Dragic T, Pessaux P, Stoll-Keller F, Schuster C, Thompson J and Baumert TF: Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes. *Gastroenterology* 139: 953-964, e4, 2010.
 - 22) Bartosch B, Dubuisson J and Cosset FL: Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197: 633-642, 2003.
 - 23) Kikuchi R, McCown M, Olson P, Tateno C, Morikawa Y, Katoh Y, Bourdet DL, Monshouwer M and Fretland AJ: Effect of hepatitis C virus infection on the mRNA expression of drug transporters and cytochrome p450 enzymes in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos* 38: 1954-1961, 2010.
 - 24) Mailly L, Xiao F, Lupberger J, Wilson GK, Aubert P, Duong FH, Calabrese D, Leboeuf C, Fofana I, Thumann C, Bandiera S, Lutgehetmann M, Volz T, Davis C, Harris HJ, Mee CJ, Girardi E, Chane-Woon-Ming B, Ericsson M, Fletcher N, Bartenschlager R, Pessaux P, Vercauteren K, Meuleman P, Villa P, Kaderali L, Pfeffer S, Heim MH, Neunlist M, Zeisel MB, Dandri M, McKeating JA, Robinet E and Baumert TF: Clearance of persistent hepatitis C virus infection in humanized mice using a claudin-1-targeting monoclonal antibody. *Nat Biotechnol* 33: 549-554, 2015.
 - 25) Zeisel MB, Felmlee DJ and Baumert TF: Hepatitis C virus entry. *Curr Top Microbiol Immunol* 369: 87-112, 2013.
 - 26) Lindenbach BD and Rice CM: The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nat Rev Microbiol* 11: 688-700, 2013.
 - 27) Douam F, Lavillette D and Cosset FL: The mechanism of HCV entry into host cells. *Prog Mol Biol Transl Sci* 129: 63-107, 2015.
 - 28) Shi Q, Jiang J and Luo G: Syndecan-1 serves as the major receptor for attachment of hepatitis C virus to the surfaces of hepatocytes. *J Virol* 87: 6866-6875, 2013.
 - 29) Lefevre M, Felmlee DJ, Parnot M, Baumert TF and Schuster C: Syndecan 4 is involved in mediating HCV entry through interaction with lipoviral particle-associated apolipoprotein E. *PLoS One* 9: e95550, 2014.
 - 30) Barth H, Schafer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, Kinoshita-Toyoda A, Toida T, Van Kuppevelt TH, Depla E, Von Weizsacker F, Blum HE and Baumert TF: Cellular binding of hepatitis C virus

- envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 278: 41003-41012, 2003.
- 31) Monazahian M, Bohme I, Bonk S, Koch A, Scholz C, Grethe S and Thomssen R: Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J Med Virol* 57: 223-229, 1999.
 - 32) Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB and Zhang QX: Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12766-12771, 1999.
 - 33) Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R and Vitelli A: The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 21: 5017-5025, 2002.
 - 34) Jiang J, Wu X, Tang H and Luo G: Apolipoprotein E mediates attachment of clinical hepatitis C virus to hepatocytes by binding to cell surface heparan sulfate proteoglycan receptors. *PLoS One* 8: e67982, 2013.
 - 35) Chang KS, Jiang J, Cai Z and Luo G: Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol* 81: 13783-13793, 2007.
 - 36) Jiang J and Luo G: Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *J Virol* 83: 12680-12691, 2009.
 - 37) Krepstakies M, Lucifora J, Nagel CH, Zeisel MB, Holstermann B, Hohenberg H, Kowalski I, Gutschmann T, Baumert TF, Brandenburg K, Hauber J and Protzer U: A new class of synthetic peptide inhibitors blocks attachment and entry of human pathogenic viruses. *J Infect Dis* 205: 1654-1664, 2012.
 - 38) Prentoe J, Serre SB, Ramirez S, Nicosia A, Gottwein JM and Bukh J: Hypervariable region 1 deletion and required adaptive envelope mutations confer decreased dependency on scavenger receptor class B type I and low-density lipoprotein receptor for hepatitis C virus. *J Virol* 88: 1725-1739, 2014.
 - 39) Albecka A, Belouzard S, Op de Beeck A, Descamps V, Goueslain L, Bertrand-Michel J, Terce F, Duverlie G, Rouille Y and Dubuisson J: Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* 55: 998-1007, 2012.
 - 40) Dao Thi VL, Granier C, Zeisel MB, Guerin M, Mancip J, Granio O, Penin F, Lavillette D, Bartenschlager R, Baumert TF, Cosset FL and Dreux M: Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps. *J Biol Chem* 287: 31242-31257, 2012.
 - 41) Andreo U, Maillard P, Kalinina O, Walic M, Meurs E, Martinot M, Marcellin P and Budkowska A: Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection. *Cell Microbiol* 9: 2445-2456, 2007.
 - 42) Tao J, Kang KD, Hall SD, Laube AH, Liu J, Renfrow MB, Novak J and Luo G: The serum very-low-density lipoprotein serves as a restriction factor against hepatitis C virus infection. *J Virol* 89: 6782-6791, 2015.
 - 43) Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB and Wang T: Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 83: 2011-2014, 2009.
 - 44) Park JH, Park S, Yang JS, Kwon OS, Kim S and Jang SK: Discovery of cellular proteins required for the early steps of HCV infection using integrative genomics. *PLoS One* 8: e60333, 2013.
 - 45) Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L, Davis C, Mee CJ, Turek M, Gorke S, Royer C, Fischer B, Zahid MN, Lavillette D, Fresquet J, Cosset FL, Rothenberg SM, Pietschmann T, Patel AH, Pessaux P, Doffoel M, Raffelsberger W, Poch O, McKeating JA, Brino L and Baumert TF: EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* 17: 589-595, 2011.
 - 46) Sainz B, Jr., Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA, Yu X, Chayama K, Alrefai WA and Uprichard SL: Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med* 18: 281-285, 2012.
 - 47) Martin DN and Uprichard SL: Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 10777-10782, 2013.
 - 48) Masson D, Koseki M, Ishibashi M, Larson CJ, Miller SG, King BD and Tall AR: Increased HDL cholesterol and apoA-I in humans and mice treated with a novel SR-BI inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 2054-2060, 2009.
 - 49) Sulkowski MS, Kang M, Matining R, Wyles D, Johnson VA, Morse GD, Amorosa V, Bhattacharya D, Coughlin K, Wong-Staal F, Glesby MJ and Team ACTGAP: Safety and antiviral activity of the HCV entry inhibitor ITX5061 in treatment-naive HCV-infected adults: a randomized, double-blind, phase 1b study. *J Infect Dis* 209: 658-667, 2014.
 - 50) Meuleman P, Hesselgesser J, Paulson M, Vanwolleghem T, Desombere I, Reiser H and Leroux-Roels G: Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology* 48: 1761-1768, 2008.
 - 51) Xiao F, Fofana I, Thumann C, Mailly L, Alles R, Robinet E, Meyer N, Schaeffer M, Habersetzer F, Doffoel M, Leyssen P, Neyts J, Zeisel MB and Baumert TF: Synergy of entry inhibitors with direct-acting antivirals uncovers novel combinations for prevention and treatment of hepatitis C. *Gut* 64: 483-494, 2015.
 - 52) Lacek K, Vercauteren K, Grzyb K, Naddeo M, Verhoye L, Slowikowski MP, Fafi-Kremer S, Patel AH, Baumert TF, Folgari A, Leroux-Roels G, Cortese R, Meuleman P and Nicosia A: Novel human SR-BI antibodies prevent infection and dissemination of HCV in vitro and in humanized mice. *J Hepatol* 57: 17-23, 2012.
 - 53) Vercauteren K, Van Den Eede N, Mesalam AA, Belouzard S, Catanese MT, Bankwitz D, Wong-Staal F, Cortese R, Dubuisson J, Rice CM, Pietschmann T, Leroux-Roels G, Nicosia A and Meuleman P: Successful anti-scavenger receptor class B type I (SR-BI) monoclonal

- antibody therapy in humanized mice after challenge with HCV variants with in vitro resistance to SR-BI-targeting agents. *Hepatology* 60: 1508-1518, 2014.
- 54) Meyer K, Kwon YC, Liu S, Hagedorn CH, Ray RB and Ray R: Interferon-alpha inducible protein 6 impairs EGFR activation by CD81 and inhibits hepatitis C virus infection. *Sci Rep* 5: 9012, 2015.
 - 55) Zahid MN, Turek M, Xiao F, Thi VL, Guerin M, Fofana I, Bachellier P, Thompson J, Delang L, Neyts J, Bankwitz D, Pietschmann T, Dreux M, Cosset FL, Grunert F, Baumert TF and Zeisel MB: The postbinding activity of scavenger receptor class B type I mediates initiation of hepatitis C virus infection and viral dissemination. *Hepatology* 57: 492-504, 2013.
 - 56) Gondar V, Molina-Jimenez F, Hishiki T, Garcia-Buey L, Koutsoudakis G, Shimotohno K, Benedicto I and Majano PL: Apolipoprotein E, but not apolipoprotein b, is essential for efficient cell-to-cell transmission of hepatitis C virus. *J Virol* 89: 9962-9973, 2015.
 - 57) Hueging K, Doepke M, Vieyres G, Bankwitz D, Frentzen A, Doerrbecker J, Gumz F, Haid S, Wolk B, Kaderali L and Pietschmann T: Apolipoprotein E codetermines tissue tropism of hepatitis C virus and is crucial for viral cell-to-cell transmission by contributing to a postenvelopment step of assembly. *J Virol* 88: 1433-1446, 2014.
 - 58) Barretto N, Sainz B, Jr., Hussain S and Uprichard SL: Determining the involvement and therapeutic implications of host cellular factors in hepatitis C virus cell-to-cell spread. *J Virol* 88: 5050-5061, 2014.
 - 59) Graw F, Martin DN, Perelson AS, Uprichard SL and Dahari H: Quantification of hepatitis C virus cell-to-cell spread using a stochastic modeling approach. *J Virol* 89: 6551-6561, 2015.
 - 60) Catanese MT, Loureiro J, Jones CT, Dorner M, von Hahn T and Rice CM: Different requirements for scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus cell-free versus cell-to-cell transmission. *J Virol* 87: 8282-8293, 2013.
 - 61) Fofana I, Jilg N, Chung RT and Baumert TF: Entry inhibitors and future treatment of hepatitis C. *Antiviral Res* 104: 136-142, 2014.
 - 62) Zona L, Tawar RG, Zeisel MB, Xiao F, Schuster C, Lupberger J and Baumert TF: CD81-receptor associations--impact for hepatitis C virus entry and antiviral therapies. *Viruses* 6: 875-892, 2014.
 - 63) Pombourios P and Drummer HE: Recent advances in our understanding of receptor binding, viral fusion and cell entry of hepatitis C virus: new targets for the design of antiviral agents. *Antivir Chem Chemother* 18: 169-189, 2007.
 - 64) Blaising J, Levy PL, Gondeau C, Phelip C, Varbanov M, Teissier E, Ruggiero F, Polyak SJ, Oberlies NH, Ivanovic T, Boulant S and Pecheur EI: Silibinin inhibits hepatitis C virus entry into hepatocytes by hindering clathrin-dependent trafficking. *Cell Microbiol* 15: 1866-1882, 2013.
 - 65) Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C and Rouille Y: Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 80: 6964-6972, 2006.
 - 66) Marino Z, Crespo G, D'Amato M, Brambilla N, Giacobelli G, Rovati L, Costa J, Navasa M and Fornis X: Intravenous silibinin monotherapy shows significant antiviral activity in HCV-infected patients in the peri-transplantation period. *J Hepatol* 58: 415-420, 2013.
 - 67) Fried MW, Navarro VJ, Afdhal N, Belle SH, Wahed AS, Hawke RL, Doo E, Meyers CM, Reddy KR, Silymarin in N and Group CHS: Effect of silymarin (milk thistle) on liver disease in patients with chronic hepatitis C unsuccessfully treated with interferon therapy: a randomized controlled trial. *JAMA* 308: 274-282, 2012.
 - 68) Yamashita M, Iida M, Tada M, Shirasago Y, Fukasawa M, Nagase S, Watari A, Ishii-Watabe A, Yagi K and Kondoh M: Discovery of anti-claudin-1 antibodies as candidate therapeutics against hepatitis C virus. *J Pharmacol Exp Ther* 353: 112-118, 2015.
 - 69) Hopcraft SE and Evans MJ: Selection of a hepatitis C virus with altered entry factor requirements reveals a genetic interaction between the E1 glycoprotein and claudins. *Hepatology* 62: 1059-1069, 2015.
 - 70) Che P, Tang H and Li Q: The interaction between claudin-1 and dengue viral prM/M protein for its entry. *Virology* 446: 303-313, 2013.
 - 71) Gao F, Duan X, Lu X, Liu Y, Zheng L, Ding Z and Li J: Novel binding between pre-membrane protein and claudin-1 is required for efficient dengue virus entry. *Biochem Biophys Res Commun* 391: 952-957, 2010.
 - 72) Tawar RG, Colpitts CC, Lupberger J, El-Saghire H, Zeisel MB and Baumert TF: Claudins and pathogenesis of viral infection. *Semin Cell Dev Biol* 42: 39-46, 2015.
 - 73) Torres-Flores JM and Arias CF: Tight junctions go viral! *Viruses* 7: 5145-5154, 2015.
 - 74) Torres-Flores JM, Silva-Ayala D, Espinoza MA, Lopez S and Arias CF: The tight junction protein JAM-A functions as coreceptor for rotavirus entry into MA104 cells. *Virology* 475: 172-178, 2015.
 - 75) Coyne CB, Shen L, Turner JR and Bergelson JM: Coxsackievirus entry across epithelial tight junctions requires occludin and the small GTPases Rab34 and Rab5. *Cell Host Microbe* 2: 181-192, 2007.
 - 76) Greber UF and Gastaldelli M: Junctional gating: the achilles' heel of epithelial cells in pathogen infection. *Cell Host Microbe* 2: 143-146, 2007.

Anti-hepatitis C virus strategy targeting host entry factor claudin-1

Masayoshi FUKASAWA

Department of Biochemistry and Cell Biology,
National Institute of Infectious Diseases, Japan

Chronic hepatitis C virus (HCV) infection is a major threat to global public health, because it is significantly correlated with the development of severe liver diseases including cirrhosis and hepatocellular carcinomas. Host molecules as well as viral factors are promising targets for anti-HCV preventive and therapeutic strategies. Multiple host factors such as CD81, SRBI, claudin-1, and occludin are involved in HCV entry into hepatocytes. In this paper, I first introduce our anti-HCV strategy targeting for host tight junction protein claudin-1. And this review also summarizes developments of other entry inhibitors to prevent initiation of HCV infection and spread. Entry inhibitors might be useful in blocking primary infections, such those as after liver transplantation, and in combination therapies with other anti-HCV agents such as direct-acting antivirals.