慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	C型ウイルス肝炎における臨床分子生物学
Sub Title	
Author	熊谷, 直樹(Kumagai, Naoki)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.1 (2005. 3) ,p.21- 27
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	講座
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050300-0021

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

慶應医学・82(1)：21～27，2005

講　座

C型ウイルス肝炎における臨床分子生物学

北里研究所病院内科
熊谷直樹

Key Words：C型肝炎ウイルス，分子生物学，インターフェロン，リバビリン，レプリコン

はじめに

C型ウイルス肝炎の臨床は，C型肝炎ウイルス（Hepatitis C Virus, 以下HCV）の発見の契機[1, 2]から現在の様々な抗ウイルス療法の開発に至るまであらゆる場面で分子生物学の進歩が多大な貢献をしている分野である．その意味で我々臨床医にとっても分子生物学は避けては通れない領域であり，今回特にC型肝炎の診療という観点からその意義を解説したいと思う．

HCVゲノム（HCVRNA）の構造と機能

C型肝炎の診断と治療はHCVゲノムの構造と機能を解析することから発展してきた．

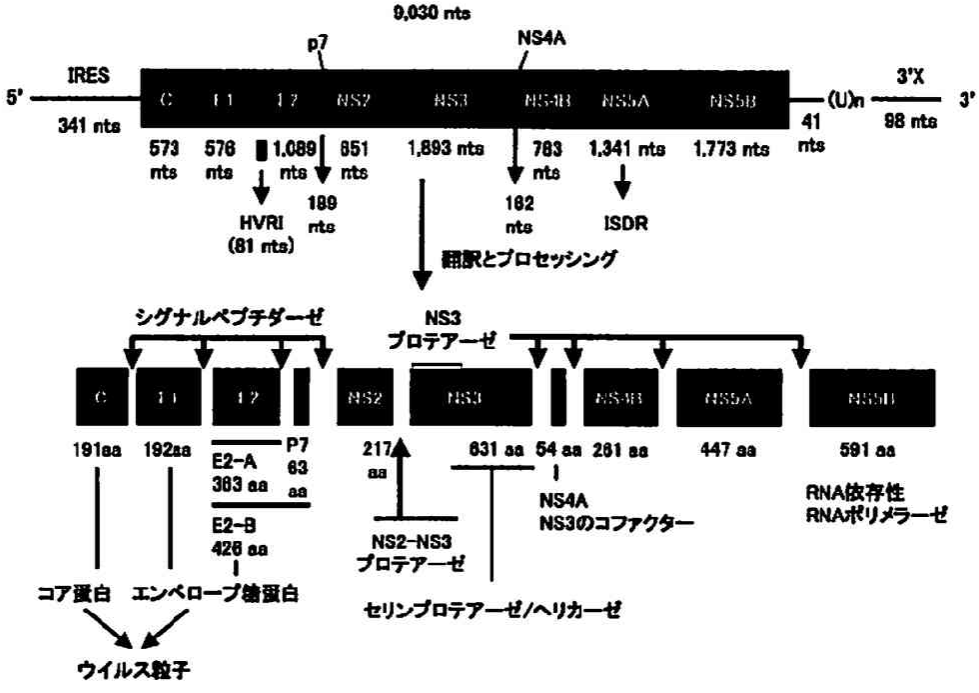
HCVは9500-9600塩基からなるプラス鎖RNAをウイルスのゲノムとしてもち，その遺伝子構造からフラビウイルス科ヘパシウイルス属に分類されている（第1図）．HCVゲノムから前駆体蛋白質が産生されこれが宿主細胞由来のシグナルペプチターゼとHCVゲノムにコードされている2種類のプロテアーゼにより切断され各種蛋白質が産生される．アミノ末端側にはウイルス粒子を構成する構造蛋白が位置し，コア蛋白質（C），エンベロープ蛋白質（E1, E2）の順に配置されている．この後には一連の非構造（Non-structural region, NS）蛋白質が配置されている．

(1)5'非翻訳領域（5'UTR）：5'UTRは339塩基以上存在し，全体的には高度に保存されており，ウイルスゲノムの複製やウイルス蛋白質の翻訳などに重要な機能を果たしている．この領域の重要な点はHCV蛋白翻訳のためのリボゾームの内部開始機構によるエントリー部位（internal ribosomal entry site, IRES）が存在することである．また5'UTRはHCV株間で塩基配列が最もよく保存されている領域なので，後述するRT-PCRにおけるプライマーに用いられる．

(2)コア領域（C）：分子量20kDa前後のコア蛋白質がコードされている．コア蛋白質はHCVゲノムを包むカプシドを形成する．

(3)エンベロープ領域（E1, E2）：この領域からはウイルスの外被を形成するE1（分子量35kDa前後）とE2（分子量70kDa前後）と呼ばれる糖蛋白質が産生される．E2蛋白質のアミノ末端部にはHCV株間で著しく配列の異なる領域が存在し，超可変領域1（HVR1）と呼ばれている[3, 4]．HVR1は高度な変異性を示すことから後述するようにHCVの持続感染の成立に関与していると考えられている．

(4)非構造領域（NS）：この領域からはHCVゲノムのプロセッシングと複製に必要な一連の機能的蛋白質（NS蛋白質）が産生される．ウイルス自身のmetaloproteaseとserine proteaseによる切断の結果NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5Bの6種類の非構造蛋白質が産生される．NS2蛋白は膜蛋白であること以外その働きについては明確ではない．NS2からNS3の一部にかけてmetaloprotease活性が存在しNS2-NS3間を自己切断する．NS3は70kDaの蛋白でそのN末端側1/3にserine protease活性があり，NS3-NS4A間をシス切断する．切断されたNS3はそのserine protease活性によって残りのNS蛋白を切断する．NS3C末端側1/2にはhelicase活性が認められ二重鎖RNAを解いて一本鎖RNAにする機能をもち，ウイルス由来RNAの生成に関与している．これらHCV遺伝子にコードされているproteaseやhelicaseなどの酵素は抗ウイルス療法の標的として現在研究や薬剤の開発が進められている領域でもある．NS4AはNS3蛋白と強固な複合体を形成して，proteaseの補酵素として働く．NS4Bの機能は十分に分かっていないがNS4A/B蛋白は宿主の総合的な蛋白合成機能を抑制し，ウイル



第1図　HCV ゲノムの遺伝子構造と産生蛋白

ス蛋白合成を優先させる機能を持つ可能性が示唆されている．NS5A 蛋白は約 450 アミノ酸残基からなるリン酸化蛋白で，その作用が注目されたのはわずか 40 アミノ酸残基の変異がインターフェロン（Interferon, 以下 IFN）の治療効果に関与すると報告されたことである[5]．同部位は interferon sensitivity determining region, ISDR とよばれ，double strand RNA-activated protein kinase (PKR)-binding domain の N 末端側に位置することから，NS5A はＩＦＮによって誘導され抗ウイルス作用を起こす酵素の一つである PKR を抑制すると考えられている．NS5B には RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ（RNA-dependent RNA polymerase, 以下 RdRp）活性があり，ウイルス RNA 複製において中心的に働く．他の polymerase と同様に 'finger-palm-thumb' 様の蛋白立体構造をとる．最近 C 型肝炎の治療に IFN と併用で用いられるようになった Ribavirin という nucleoside analogue の作用機序の一つとして，RdRp に対する直接の阻害作用が考えられている[6, 7]．

(5)3'非翻訳領域（3'UTR）：ウイルスゲノムの 3'末端領域と考えられていた U ストレッチの下流に 98 塩基からなる配列が確認され，3'X と命名された．後述する細胞内で自立複製ができる HCV レプリコン細胞[8]の登場で，3'X が 5'UTR とともに HCV ゲノムの複製に必須であることが証明された．

HCV ゲノムの多様性

一般に RNA ウイルスの RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)には DNA polymerase がもつような修復機構がなく，polymerase によるゲノムの読み間違いが受け継がれていってしまう．これが原因となって RNA ウイルスでは DNA ウイルスと比べてゲノムに多様性が生じると考えられている．また生体内では宿主の免疫学的圧力（immune pressure）やウイルスの生存能力などによってもゲノムの選択が起こりウイルスは経時的に変化していく．このようにして生じた多様性を quasispecies と呼んでいる．

(1)遺伝子型：HCV ウイルス間の相同性をもとに現在までに 11 種類の大きなグループ（genotype）の中に 30 以上の遺伝子型が同定されている[9]．それぞれの遺伝子型間では塩基配列レベルで 20%以上，アミノ酸配列レベルで 15%以上の違いがある．領域別にみると 5' UTR，コア領域，3'X では 90%以上の相同性があるが，エンベロープ領域や NS2 領域では塩基配列で 40%程度も異なっている．わが国では 1b が主要な遺伝子型（約 70%）で，そのほかに 2a（約 20%），2b（約 10%）

第1表　HCV持続感染者におけるHVR1領域の変異の解析

	無症候性キャリア	慢性活動性肝炎	有意差検定
ALT平均値（IU/l）	21.6±7.0	62.4±16.0	p=0.00001
◆クローン数			
開始期	6.2±3.5	4.5±2.5	NS
終了期	7.9±2.0	6.8±3.1	NS
年平均変化率	0.52±1.40	0.91±1.82	NS
◆塩基多様度			
開始期	8.9±7.6	8.1±7.6	NS
終了期	11.1±8.1	9.6±7.5	NS
年平均変化率	0.86±3.5	0.51±2.56	NS

平均観察期間：約3年間　　NS=not significant

が存在する．この遺伝子型によってIFN治療に対する反応性が大きく異なることは周知の事実である．すなわち一般にgenotype 2, 3, 6はIFN感受性があり，genotype1, 4はIFN抵抗性である．

(2)同一宿主内での多様性：同一宿主内に存在するHCVゲノム全体の多様性についても検討が行なわれ，全体としては，塩基配列で1%程度，アミノ酸配列で0.7%程度異なっている．すなわちHCVは生体内で変異しながらpolyclonalに存在していると考えられる．

(3)超可変領域（HVR）：HCVゲノムの中でもっとも多様性の富む部分がE2蛋白質のアミノ末端部に存在するHVRである[3), 4)]．一般にウイルスの外被を形成するエンベロープ領域には中和抗体のエピトープが存在すると考えられる．宿主の免疫監視機構から逃避（escape）するためHCVが変異を繰り返す結果，HVRの多様性が生じると考えられている．HVRの多様性はHCVに対するワクチンの開発が困難な原因にもなっている．肝炎の活動性とHVR1の変異の速さとの関係も注目されてきたが，筆者らのC型慢性活動性肝炎と無症候性C型肝炎ウイルスキャリアーを対象とした自然経過の中での検討からは，血清ALT値の変動とHVR1のquasispeciesの進展との間には明らかな相関関係は認められなかった[10)]（第1表）．

HCV関連検査法の進歩

(1)HCV抗体検査法：現在日常の診療で最も汎用されているのは第3世代HCV抗体測定系である．これはコア抗原エピトープとしてc22-3抗原，NS抗原エピトープとしてc200抗原および遺伝子組み換え発現蛋白であるNS5エピトープ（aa2054-2995）を用いている．この測定系によりHCV感染をより確実に診断できるようになった．高力価陽性の場合はHCVキャリアと判定して良いが，低力価陽性の場合，ウイルス血症があるのか過去の既感染を示しているのかの鑑別が必要になる．感染の直接的な証明には次項の血清HCVRNA測定が必要になるが，抗体測定系としてはHCVコア抗体測定系（コア領域の遺伝子組み換え発現蛋白または合成ペプチドを抗原エピトープとして用いている）が有用である．コア抗体はHCVの構造蛋白に対する抗体であるためHCVの感染を確実に診断できる利点がある．コア抗体が陰性または低力価の場合は過去の感染の既往を示唆する．コア抗体価は血中からウイルス消失後漸減していくのでIFN治療後の経過観察にも適している．

(2)HCVRNA検出検査法：定性的測定法と定量的測定法がある．(a)定性法は定量法より感度が良く1．HCV抗体低力価の場合の既感染とHCVキャリアの鑑別，2．急性C型肝炎の早期診断，3．IFN治療の効果判定などに適している．現在臨床で測定可能な定性法は「アンプリコア定性法」で，10^2 copies/mlの感度がある．実験室レベルでは10 copies/ml以下の感度をもつnested RT-PCR法も用いられている．(b)定量法にはCRT-PCR法，bDNA法，アンプリコア-M法などがあるが詳細はここでは省略する．これまでの検討からは血清中のHCVRNA量とC型肝炎の臨床像や予後との間には一定の関係は見出されていない．従って定量法の臨床的意義はIFN治療の効果予測といえる．C型肝炎に対して様々な抗ウイルス療法が開発されてきたが，多くのレジメにおいて永続的なウイルス排除（sustained viral response，以下SVR）が得られるか否かはHCVのgenotypeと血清HCVRNA量に大きく依存している．現在臨床で汎用されているアンプリコア-M法は高濃度領域の定量性が不十分であったが，最近高HCVRNA量測定に適した「ハイレンジ法」が開発され，

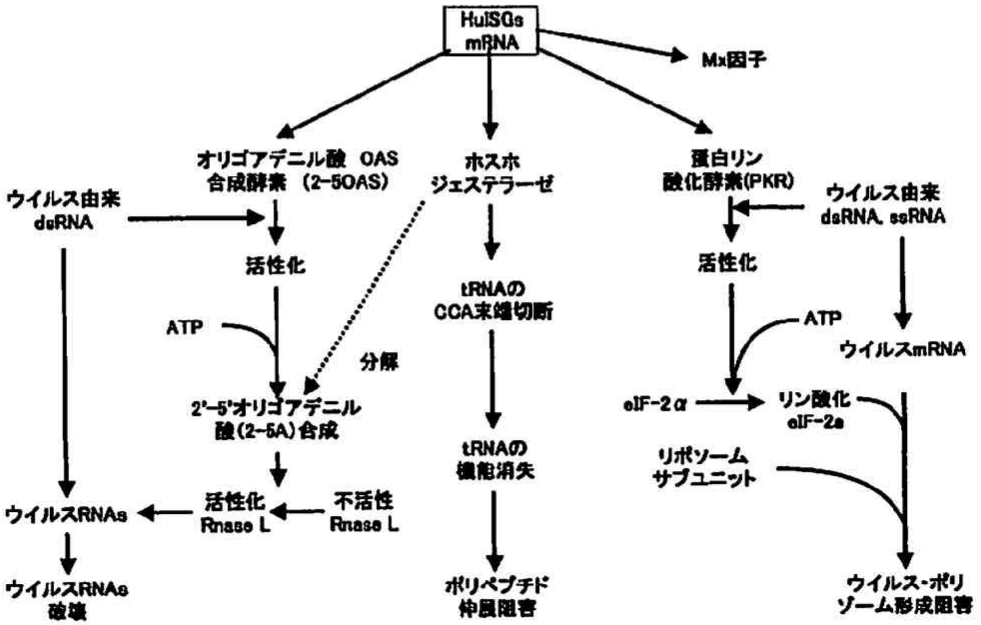
5000KIU/ml まで測定が可能となり，治療前の血清 HCVRNA 量のより正確な層別化が可能となった．HCV の定量法としては以上の RNA 遺伝子検出法の他に抗 HCV コアモノクローナル抗体を固相化したサンドウイッチ EIA 法による「HCV コア抗原測定法」がある．これは PCR 法と較べて簡便で安価な点が利点であるが詳細は割愛する．

(3)HCV のタイピング：HCV の遺伝子型の判定は臨床的に IFN 治療に対する反応性を予測する上で必要不可欠であるが，現在臨床の場では血清反応を用いた HCV 郡別判定（HCV グルーピング）が汎用されている．これは genotype 1 と genotype 2 間で塩基配列の大きな差が存在する NS4 領域の合成ペプチドを各々作成し，microplate に固相化し ELISA 法で抗体を検出する方法で，同方法での遺伝子型判別可能例は約 80% といわれている．PCR 法を用いた HCV genotyping は NS5 領域の配列をもとに判別が行なわれ，当然精度は高いがまだ保険収載はされていない．

インターフエロンの抗ウイルス作用

IFN が C 型肝炎に対する抗ウイルス療法の主役として汎用されて久しい．IFN の抗ウイルス作用発現の分子機構も詳細に検討され，臨床にフイードバックされている部分も多い．IFN レセプターとシグナル伝達に関しては割愛し，ここでは IFN により誘導される抗ウイルス因子について触れることにする[11]（第2図）．ヒト・インターフエロン（HuIFN）によって発現が誘導・増強されるヒト遺伝子（IFN stimulated genes, HuISGs）は多種多様で 2001 年現在その数は 335 個と報告されており，その遺伝子産物の機能は多岐にわたっている．C 型肝炎治療に用いられる IFN は IFN α または IFN β でこれらは I 型 IFN と総称されるが，I 型 IFN で誘導される HuISGs の中で主要な抗ウイルス因子としては，2'5'-oligoadenylate synthetase (2-5OAS), RNA dependent protein kinase (PKR), Mx 因子などがあげられる．

(1)2-5OAS：ウイルス由来の高分子量 2 重鎖 RNA (dsRNA) と結合することにより活性化されてオリゴアデニール酸（2-5A）を産生する．2-5A は細胞内に不活性化型で存在する RNAase L を活性化しこれがウイルス RNA（mRNA およびゲノム RNA）を分解することによりウイルスの増殖を阻害する．ウイルス感染細胞内では広範囲での 2-5OAS の活性化が起こり，細胞側の mRNA などの分解とそれに続く蛋白合成の停止からアポトーシスの誘導も起こる．臨床の場での血清 2-5OAS の測定は IFN の効果発現のモニターとしての意義があり，治療途中の 2-5OAS 活性の低下は IFN 中和抗体の



第2図　I 型 IFN のよる抗ウイルス作用発現機構

出現等による効果失活を示唆する．

(2)PKRはリボソームと結合して存在する蛋白リン酸化酵素であり，dsRNAあるいは特定の高次構造を有するssRNAと結合することにより活性化される．活性化されたPKRはリボソームを構成するeukaryotic initiation factor-2 (eIF-2)のα subunitをリン酸化してそのGTP結合能を消失させ，ウイルス蛋白の合成を阻害する．ウイルス感染細胞内では2-5OASと同様にPKRによるアポトーシスも誘導される．

前述のようにHCVのNS5A領域のISDRを含む領域（PKR *binding domain*）はPKRと直接結合することによりPKRの抗ウイルス作用を阻害する[12]．したがってISDRの変異がHCVのIFN感受性に影響をもたらすと考えられている．

リバビリンの抗ウイルス作用

リバビリン（ribavirin, 以下RBV）は，1972年にWitkowskiらによって合成されたプリンヌクレオシッドアナログで，イノシン，アデノシンとグアノシンの構造に類似することが可能である[13]．RBVはIn vitroで種々のDNAおよびRNAウイルスに対して抗ウイルス効果を示すが，その正確な抗ウイルス作用機序は判明していない．臨床上RBV単独ではC型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス効果は明らかではないが，IFNと併用することによりIFN単独療法では得られない優れたウイルス排除効果が期待できる薬剤である．現時点で想定されるRBVの作用機序としては以下の分子機構がある．

(1)エラーカタストロフの誘導：HCVのRNA polymeraseがproof-reading機構を有さないため高頻度でゲノム変異を来たしその結果quasispeciesとよばれる多様な遺伝子変異を有する変異株が混在した状態を形成していることは既に述べた．このような変異は宿主の免疫監視機構からの逃避や抗ウイルス療法に対する抵抗性の獲得などには有利に働くが，変異によりウイルスの遺伝子情報を保持できなくなるとウイルスは死滅することになる．RdRpにより二重鎖RNAが合成される際，RBVが誤って取り込まれることでウイルス変異を加速させるという考え方がerror catastrophe仮説である．

(2)RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)の阻害：RBVは組織細胞中でリン酸化され代謝物として3種類のリン酸化体（mono-, di-, tri-phosphate）を生じる．RdRpを用いた実験系でRBV三リン酸（RTP）が誤ってRNAに取り込まれ，このRTPが取り込まれたRNAを基質とした場合，新たなRNAの合成が阻害されることが示されRBVのHCVのRdRpに対する直接的な阻害作用の存在が考えられた[6,7]．C型慢性肝炎のIFN-RBV併用療法における治療効果予測の観点から，RdRpが存在するNS5B蛋白の変異がRBVの抗ウイルス効果にどのような影響をもたらすかが注目されたが，筆者らはIFNとRBVの併用療法を行なったgenotype 1bのC型慢性肝炎で治療前にNS5B領域の遺伝子解析を行ない，そのearly viral responseの有無に関与するNS5B蛋白の変異点を見出した[14]（第2表）．

(3)宿主免疫能に及ぼす影響：*in vivo*, *in vitro*の研究よりRBVがtype 1 cytokine (IL-2, IFNγなど）の発現を亢進させ，type 2 cytokine (IL-4, IL-6など）の発現を抑制することが報告され，RBVの抗ウイルス作用機序の一つとして注目されている[15]．

今後の治療戦略（分子生物学的アプローチ）

HCVのゲノム解析に伴い抗ウイルス療法の研究は飛躍的な進歩を続けている．臨床応用にはまだ年数を有す

第2表　Amino acid residues at position 85 and 124 and early clearance of HCV by interferon plus ribavirin（文献14より改変）

Patient No.	Viral Clearance in serum at 8 weeks Tx	NS5B Position 85	NS5B Position 124
1	Yes	V (valine)	K (lysine)
2	Yes	V	K
3	Yes	V	K
4	Yes	V	K
5	Yes	V	K
6	No	I (isoleucin)	E (glutamic acid)
7	No	I	E
8	No	I	E

るが，現在進行中の新たな治療へのアプローチについて触れてみる．

(1)ウイルス酵素阻害剤：既述のようにHCVの非構造蛋白はHCVRNAの複製に関与している．特にNS3蛋白は抗ウイルス療法の格好の標的となってきた．現在protease inhibitorが臨床応用に向けて開発中である．helicase inhibitorなども検討されている．RdRpであるNS5B蛋白はHCVの遺伝子型を超えて高度に保存され，ウイルス特異的でもあるので，これを標的としたRdRp inhibitorの開発も進められている．

(2)nucleoside analogues：RBVに続く各種nucleoside analogueの臨床試験も進行中である．

(3)antisense oligonucleotides：標的となるmRNAに特異的に結合して蛋白合成を抑制する15～40塩基の合成nucleotideで，5'UTR領域のHCV蛋白翻訳のためのIRESのinitiation codon　をターゲットとしてデザインされたものが検討中である．

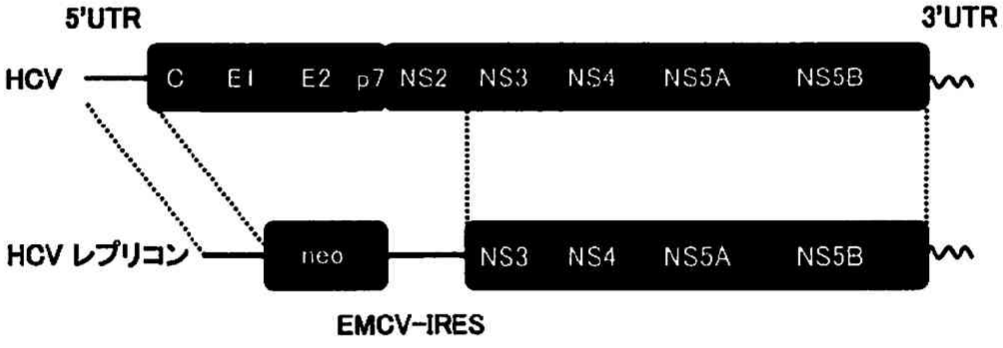
(4)short interfering RNA (siRNA)：RNA interference (RNAi) とは二本鎖RNA (dsRNA) を細胞に導入することにより相同なmRNAが特異的に分解され，遺伝子産物の合成が抑制される現象を指す[16]．これまで哺乳動物細胞に長鎖のdsRNAを導入するとIFNによって誘導されたPKRによって蛋白翻訳が停止されるため有意な効果が観察されなかったが，21塩基前後のshort iRNA (siRNA) として導入すればPKRによる反応を起こさずにRNAiとしての特異的な効果が発現することが分かった．その分解機構としてはsiRNAに特異的な蛋白が結合してRISC (RNA-induced silencing complex) を形成し，このRICSが同じ配列をもつmRNAを認識して結合し，siRNAの中央部でmRNAを切断するといわれている．臨床応用に向けて後述するレプリコンシステムを用いたHCVゲノムのコア遺伝子領域に対するsiRNAの導入効果などが検討されている[17]．

その他，RNAを塩基配列特異的に切断するRNA (ribozyme) がIRESの切断を目的に研究されたが，臨床応用にまでは至っていない．

HCVレプリコンシステムについて

最後にHCVの複製，増殖機構の解明に大きな進展をもたらした実験系であるHCVレプリコンについて触れる．

1999年Lohmannらによって，HCVRNA複製に必須と思われるウイルス遺伝子領域をもち自己複製できるHCVレプリコンが作成された[8]．このレプリコンはHCVRNAの複製に必要な蛋白をコードする非構造領域，および非翻訳領域（5'UTR, 3'UTR）に存在する機能ドメインを含み，さらにネオマイシン薬剤耐性遺伝子を組み込んだ組み替えサブゲノムRNAで，導入細胞においてウイルスゲノムの持続的な自己増殖を得ることができる．（第3図）．このシステムにより従来解析が困難であった細胞内ウイルス複製増殖機構を培養細胞にて再現することが可能となり，感染機序の解明や，抗ウイルス療法における感受性や抵抗性の解明のための重要なツールとなりつつある．



第3図　HCVレプリコンの遺伝子構造

おわりに

これまで概説したように，C型ウイルス肝炎の臨床は分子生物学と深く関わって進歩してきた．分子生物学的アプローチの結果新たな抗ウイルス療法が開発され，結果としてわれわれ臨床医は治療のための様々な modality を得ることができた．その意味でC型ウイルス肝炎の診療はまさに translational research の賜物といえるかもしれない．基礎的研究の臨床応用に際してその臨床的意義を検証するとともに，臨床の場から生じた疑問やアイデアを再度基礎研究へフィードバックしていくこともわれわれ臨床医の使命であると考える次第である．

文　献

1) Choo Q-L, et al：Isolation of a cDNA derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science 244：359-362, 1989
2) Kuo G,et al：An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A ,non-B hepatitis. Science 244：362-364, 1989
3) Hijikata M et al： Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. Biochem Biophys Res Commun 175：220-228 1991
4) Weiner AJ et al：Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestvirus envelope glycoproteins. Virology 180：842-848, 1991
5) Enomoto N, et al：Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. J Clin Invest 96：224-230, 1995
6) Maag D, et al：Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. J Biol Chem 276：46094-46098, 2001
7) Vo NV, et al：Mutagenic and inhibitory effects of ribavirin on hepatitis C virus RNA polymerase. Biochemistry 42：10462-10471, 2003
8) Lohmann V, et al：Replication of subjenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. Science 285：110-113, 1999
9) Robertson B, et al：Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses：proposals for standardization. Arch Virol 143：2493-2503, 1998
10) Kumagai N, et al：Changes in complexity of HVR-1 quasispecies and its relation to disease activity in chronic hepatitis C. Gastroenterology 123(suppl)：51-52,2002
11) 吉田逸郎：ヒト・インターフェロンの抗ウイルス作用発現の分子機構．日本臨床，62（増刊：ウイルス性肝炎（上））：448-458, 2004
12) Gale MJ Jr, et al：Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. Hepatology 28：1147-1153, 1998
13) Wu JZ, et al：Ribavirin, viramidine and adenosine-deaminase-catalysed drug activation：implication for nucleoside prodrug design. J Antimicrob Chemother 52：543-546 ,2003
14) Kumagai N, et al：Polymorphism of NS5B protein relates to early clearance of hepatitis C virus by interferon plus ribavirin：a pilot study. J Viral Hepatitis 11：225-235, 2004
15) Tam RC, et al：Contact hypersensitivity responses following ribavirin treatment *in vivo* are influenced by type 1 cytokine polarization, regulation of IL-10 expression, and costimmulatory signaling. J Immunol 163：3709-3717, 1999
16) Hannon GJ, et al：RNA interference. Nature 418：244-251, 2002
17) Randall G, et al：Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs Proc Natl Acad Sci USA 100：235-240, 2003