

平成13年度

若手研究者奨励研究報告書

創薬等ヒューマンサイエンス研究

第1分野

抗エイズウイルス薬、エイズ付随症状
に対する治療薬の開発に関する研究

C型肝炎ウイルスの新たな感染系およびRNA複製系の開発

所属 (協)東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所 微生物研究部門
研究者 加藤 孝宣

要旨

感染材料として劇症肝炎患者血清を、感染細胞としてコモンツパイ初代培養肝細胞を用い、効率的なHCV感染増殖系の構築を試みる。まず劇症肝炎患者中のHCV株の解析を行った。そのHCV株は粒子形成、増殖に関わる蛋白を効率的に発現でき、増殖に有利な株と考えられた。その血清を用い感染実験を行ったが、現在のところHCVの増殖は認められていない。その原因として肝細胞分離法が問題と考えられ、現在検討中である。

1. 研究目的

HCV感染症は輸血や血液製剤などのスクリーニングにより新たな感染者は激減したものの、未だに約200万人のキャリアが存在すると考えられている。HCV感染は高率に慢性化し、慢性肝炎から肝硬変、肝癌へ10~30年かけて移行する。肝発癌を予防するためにはこのウイルスを排除することが必要と考えられ、新たな抗ウイルス療法の開発が望まれる。しかし現在のところHCVには効率的なウイルス増殖系や感染可能な小動物モデルが存在しない。そのため、HCVの増殖複製機構や持続感染化機序は不明な点が多く、抗ウイルス剤の標的の探索や薬剤力価の評価は容易ではない。最近、ドイツのグループからHuh7細胞でウイルスの非構造遺伝子を薬剤選択とを組み合わせることにより、HCVのRNA複製に成功したという報告があり注目されている。しかし、この系においてもウイルス粒子の産生は認められず、また特定のGenotypeでしかRNAの複製が認められないことから、培養細胞でのウイルス増殖系としては不完全と考えられる。HCVのウイルス増殖系が容易に確立されない理由のひとつとしてHCV自身の増殖能力の低さがあげられる。HCVは急性感染期に比べ、持続感染がいったん成立して感染個体に適応した慢性期には血中ウイルス量は減少するものの完全には排除されないような状態となる。つまりHCVは宿主の監視機構から逃避するために、感染細胞あるいは感染個体内でウイルスが増えすぎないように自身の複製増殖を調節していると考えられる。このような状態のウイルスを感染増殖系に持ち込むと、感染可能な細胞であってもウイルスが十分に増殖しない可能性がある。

そこで我々は、培養細胞におけるウイルス感染増殖系の材料として、HCVの宿主内での強い増殖とそれに対する宿主の激しい免疫反応を特徴とする劇症肝炎患者の血清およびその血清から分離したHCV株の完全長のcDNAクローンを感染材料として使用することとした。また、感染させる細胞には、最近HCVの増殖が可能であると報告され、新たな感染実験動物として注目されているコモンツパイの初代培養肝細胞を用いる。コモンツパイは小型で比較的入手しやすく実験動物として使用が可能であり、また初代培養肝細胞に感染させることにより、細胞内での増殖と培養液中へのウイルスの放出の両者が比較的容易に評価可能と考えられる。これらの感染材料と宿主細胞を用いることにより、効率のよいHCV感染増殖系の構築が可能であると考えられる。

次に、HCVの細胞内での複製をモニターできるウイルスRNA複製検出系としてHCVの増殖に関与する蛋白(非構造領域; NS2~NS5)を発現する細胞株を樹立する。その細胞株にHCVのRNA複製開始点をもつレポーター遺伝子を導入することによりHCVの複製活性を測定する。この系を用いることによりウイルスRNAの複製能力が定量的に計測できるため、抗ウイルス薬のスクリーニングやウイルスRNAの複製に必要な宿主側因子の探索が可能になると考えられる。以上、HCVの培養細胞におけるウイルス感染系とウイルスRNA複製系を確立して抗ウイルス薬の探索に供することが本研究の目的である

2. 研究方法

本年度は以下の項目につき検討を行った。

1) 感染材料となる劇症肝炎患者から分離されたHCVの解析

我々の経験したHCVによる劇症肝炎症例ではHCVウイルス量の上昇とそれに伴い広汎な肝細胞壊死を示唆するGOT、GPTの高度上昇が認められた。その患者の急性期血清よりHCVを分離し、RT-PCRによる増

幅後、ダイレクトシーケンス法を行うことにより、その患者内における主要なHCV株の全ウイルスゲノムの塩基配列を決定した。その後、同様の方法で決定した慢性肝炎患者から分離した他のHCV株の全塩基配列と比較し、その変異を分子系統樹を用い検討した。

次に、その劇症肝炎患者、慢性肝炎患者それぞれより分離されたHCV株の全ゲノムを14のフラグメントに分け再度PCRを行い、そのフラグメントをつなぎ合わせることで、それらHCV株の全塩基配列を持ったcDNAクローンを作成した。また、そのHCV株cDNAクローンの全体もしくはその一部分をT7およびEFプロモーターの下流に挿入することにより、HCVの全ウイルスゲノムやその一部のウイルス蛋白を発現できるベクターを作成し、*in vitro*もしくは細胞内での発現を比較検討した。

2) コモンツパイ初代培養肝細胞の分離法の確立

初代培養肝細胞分離は、動物を麻酔下で開腹し、門脈からカニューレーション後、まずEGTA含有、Ca²⁺-freeの培養液 (Hanks balanced salt solution) で10min、次にコラゲナーゼを含んだ培養液で20min灌流することにより行う。その後、とろけたようになった肝臓をシャーレに取り、培養液中 (Gey's balanced salt solution) でメスで細分し、金属メッシュを通した後、低速遠心法により重い実質細胞を軽い非実質細胞より分離する。コモンツパイは比較的高価であるため、まずラットを用い、使用する培養液の組成やコラゲナーゼの種類、灌流速度などを変えて肝細胞分離を行い、分離した肝細胞のバイアビリティをトリパンブルー染色により評価し、最適と思われる分離条件を確立した。分離した肝細胞はコラーゲンコートした6ウェルプレートに4~8 x 10⁵/wellの密度で播き、どれだけ期間維持可能かを評価観察した。次に、コモンツパイでも同様の条件で初代培養肝細胞の分離、維持を行い、その条件でコモンツパイの肝細胞の培養が可能であることを確認した。

3) コモンツパイ初代培養肝細胞に対する感染実験

分離されたコモンツパイの初代培養肝細胞がシャーレに定着したことを確認した後、患者血清を用いHCVを感染させる。その後、一定期日毎にその培養液、肝細胞を回収し、HCVウイルス量を測定することによりHCVの初代培養肝細胞中の増殖および培養液中のウイルスの放出を評価した。HCVのウイルス量測定は5'UTR部分のプライマーとプローブによるReal-Time detection PCR (RTD-PCR) 法により行った。

3. 研究成果

1) 感染材料となる劇症肝炎患者から分離されたHCVの解析

我々の経験したHCVによる劇症肝炎症例から分離されたHCV株 (JFH-1) は、Genotype 2aであった。そこで同じGenotypeに感染している慢性肝炎患者5人より分離されたHCV株 (JCH-1~5) と比較したところ、その塩基配列を比較した系統樹上、JFH-1はJCH-1~5からやや離れたところに位置し、Genotype 2aのなかでもやや特殊な株である可能性が考えられた。そこでHCVウイルスゲノムの遺伝子領域毎にJFH-1の変異を検討したところ、コア、NS3、NS5の各領域でJCH-1~5からの変異が強いことが明らかになった。

そこでJFH-1とJCH-1~5それぞれのコア領域を含む発現ベクターを用い、*in vitro*もしくは細胞内でのコア蛋白の発現を比較検討した。HCVコア蛋白は、ウイルスゲノムのORFから転写される前駆蛋白が生成された後、宿主のシグナルペプチダーゼにより切り出されコア蛋白 (p23) となり、さらにC末端がシグナルペプチドペプチダーゼによりプロセッシングをうけp21となり、それがウイルス粒子の材料となると考えられている。そのコア蛋白成熟過程、C末端のプロセッシングによるp21の生成が、JFH-1ではJCH-1~5に比しより速く効率的に認められた (図1)。そこで次にp21の生成効率の異なる株間でHCV株のコア領域のアミノ酸配列を比較し、コア領域の中でp21の生成に関与する部分の同定を試みた。まず、劇症肝炎患者から分離された株 (JFH-1) と、慢性肝炎患者より分離された代表的な株 (JCH-1) のコア領域のアミノ酸配列を比較したところ、16カ所のアミノ酸が異なっていることが判明した (図2)。そこで、その2つの株間で、コア蛋白のN末端のアミノ酸 aa 1~60まで、aa 1~90まで、aa 1~160までを、それぞれお互いの配列と入れ替えたキメラベクターを作成し、コア蛋白を発現させp21の生成効率を評価した。すると、aa 1~60まで、aa 1~90まで、aa 1~160までのアミノ酸を置き換えたキメラベクターのp21生成効率は、置き換える前の発現ベクターを用いた場合と変わらないことが明らかになった (図3)。すなわちp21生成効率はコア蛋白のC末端のアミノ酸 aa 161~191により影響を受けることが判明した。JFH-1とJCH-1のC末端のアミノ酸 aa 161~191では4カ所のアミノ酸が異なっており、これらのアミノ酸がp21の生成効率に関与していると考えられた。

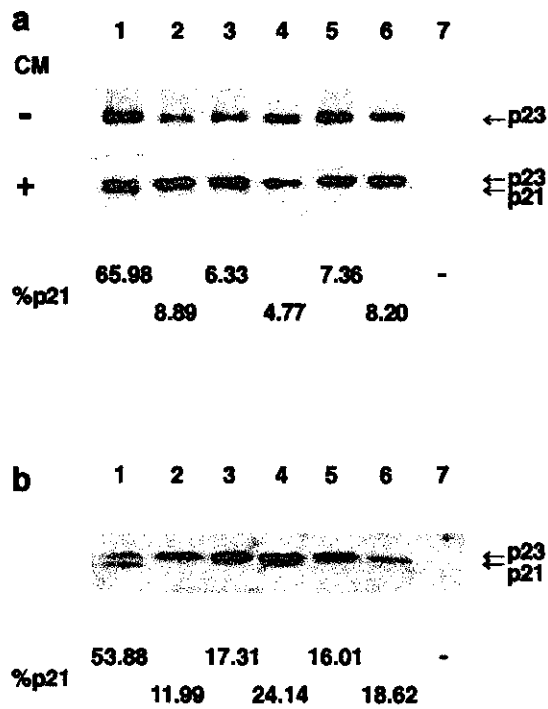


図 1；劇症肝炎症例から分離されたHCV株（JFH-1）と慢性肝炎患者5人より分離されたHCV株（JCH-1～5）の発現ベクターを用いたin vitro（a）および細胞内（b）でのHCVコア蛋白の発現。CMはin vitro transcription and translation反応時のcanine pancreatic microsomal membrane使用の有無を、%p21はコア蛋白p21の生成率を表す。

```

1                               60 ←|
JFH-1 MSTNPKPQRKTKRNTNRRPEDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRITRKTSEERSQPRG
JCH-1 .....Q.....A...A.....
JCH-2 ...T.....Q.....A.....
JCH-3 .....Q.....S...Q..R.....A.....
JCH-4 .....Q.....A.....
JCH-5 .....Q.....A.....
**** ***** ** ** *****

61                               90 ←|
JFH-1 RRQPIPKDRRSTGKAWGKPCRWPPLYGNEGLGWAGWLLSPRGSRPSWGPDPHRSRNVG
JCH-1 .....H.....S.....Y.....N.....
JCH-2 .....S.....Y.....N.....
JCH-3 .....S..R..Y.....N.....
JCH-4 .....S.....Y.....N.....
JCH-5 .....S.....Y.....
***** ***** ** ** *****

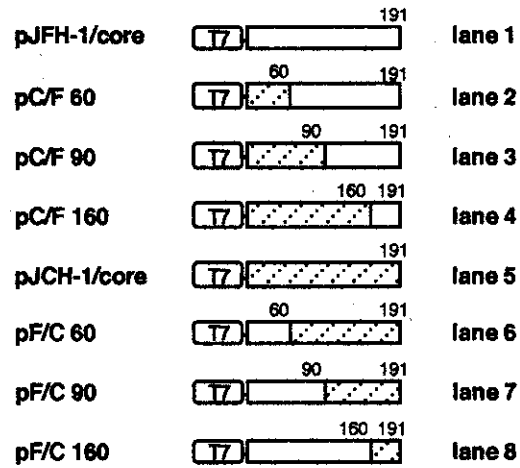
121                               160 ←| 164 172 173
JFH-1 KVIDTLTCGFADLMGYIPVVGAPLSGAARAVAHGVRVLEDGVNYATGNLPGFPFSIFLLA
JCH-1 .....L..V.....V.S.L.....F.....CS.....
JCH-2 .....G.V...L.....F.....CS.....
JCH-3 .....G.V...L.....CS.....
JCH-4 .....L.....G.V...L.....C.....CS.....
JCH-5 .....I.....G.V...L.....F.....CS.....
***** ** ** ** ***** * * * ***** * *****

187
181 ▽ 191
JFH-1 LLSCITVPVSA
JCH-1 .....T....
JCH-2 .....I....
JCH-3 .....
JCH-4 .....
JCH-5 .....I....
***** ** **

```

図 2 ; JFH-1とJCH-1～5のコア領域のアミノ酸配列。点は同じアミノ酸であることを示し、矢印はキメラベクターを作成したときの切り替え点を表す。三角形で表す164番、172番、173番、187番の4つのアミノ酸がコア蛋白のp21生成に影響していると考えられた。

a



b

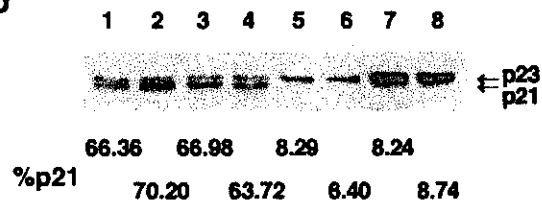


図3 ; コア領域の中でp21の生成に関与する部分の同定のため作成したキメラベクターの構造 (a) とそれらのベクターを用いたコア蛋白の発現 (b) 。pC/Fはキメラベクターの前半がJCH-1由来であり、後半がJFH-1由来のキメラであることを表す。

次にJFH-1とJCH-1の全遺伝子領域を持つ発現ベクターを用いウイルス蛋白の発現を比較した。それらの株の全遺伝子領域を細胞内で発現させるとJFH-1ではJCH-1に比べNS5b (RNAポリメラーゼ) の発現がかなり強く、これはNS3 (ヘリカーゼ/プロテアーゼ) の変異に依存していることが明らかになった

2) コモンツパイ初代培養肝細胞の分離法の確立

ラットおよびコモンツパイを用いた検討で、65-75%のバイアピリティで肝細胞の採取が可能であった。また隔日で培養液を交換することにより2週間の維持培養が可能であった。

3) コモンツパイ初代培養肝細胞に対する感染実験

コモンツパイの肝細胞を 6×10^5 /wellでコラーゲンコートした12ウエルプレートに播いた後、肝細胞の定着を確認し、劇症肝炎患者およびHCVによる急性肝炎、慢性肝炎患者などを含む11検体の患者血清0.8%を加え、16時間37°Cでインキュベートすることにより感染実験を行った。感染後、day 0、day 1、day 3、day 5、day 7で肝細胞と培養液をハーベストし、RNAを抽出後RTD-PCR法にてHCVウイルス量の測定を行った。その結果、劇症肝炎患者より得られた血清を含む多くの血清でHCVの増殖は認められなかった。しかし、一部の急性肝炎患者より得られた血清を感染させたウエルでは、肝細胞中にHCVが継続的に検出され、HCVの肝細胞中での増殖が示唆された。

4. 考 察

HCVは成人での初感染であっても、多くは急性肝炎後ウイルスの排除がおこらずに慢性化の経過をたどる。その一つのメカニズムとしてウイルスが感染宿主内で自身の増殖を抑制し、ウイルス排除を担うCTLによる攻撃から逃れている可能性が考えられている。我々の検討により、劇症肝炎患者から分離されたHCV株、JFH-1は、慢性肝炎患者から分離された同じGenotypeのHCV株に比べ、ウイルス粒子の材料となる蛋白の発現やウイルスの増殖に関わる蛋白が、より速く効率的に発現しうることが判明した。すなわち、このHCV株、JFH-1は他の慢性肝炎患者より分離された株と比べウイルス増殖に有利な株であると考えられる。HCVは慢性肝炎の活動期のように一定の病態の患者から分離してくると、ほとんどその性質はかわらないが、劇症肝炎あるいは急性肝炎急性期やインターフェロン治療後にウイルスが再増加するときには、ウイルス複製増殖に関与するウイルス遺伝子に変異してその増殖を高めている、あるいは増殖能の強いクローンが増えている可能性が示された。そこで、このHCV株を用い、コモンツパイから得られた初代培養肝細胞に感染させ、効率的なHCV培養系の構築を試みた。

現在のところその試みは成功していないが、その原因としていくつかのファクターが考えられる。まず第一に、感染させる肝細胞の性質の維持が上げられる。初代培養肝細胞は分離後24時間経過すると、数個の肝細胞が互いに接合し毛細胆管が肝細胞間に形成されてくるが、その頃には肝細胞特有の性質のいくつか (cytochrome P450活性等の酵素活性など) が失われてしまうことが知られている。このような状況を避けるために、肝細胞の機能を維持したまま、分離、培養する方法がいくつか報告されている。またもう一つの原因として得られた肝細胞のバイアピリティーの低さが考えられる。今後、分離法、培養液などをさらに工夫し、肝細胞の機能維持とバイアピリティーの改善をはかりたい。さらに、感染させる血清の状態も問題になると考えられる。感染実験に用いる血清はその中に含まれるHCVが分解されない様に保存されてなければならない。今後、HCVが増殖期にあると考えられる患者から新たに血清を採取し、感染検体に加えたいて考えている。いずれにせよ、一部の検体で肝細胞中でのHCVの増殖が期待されることから、このコモンツパイを用いたHCV感染増殖系は十分実現可能であると考えられ、今後のHCV研究の大きな武器となりうると思われる。

5. まとめ

HCVの培養細胞における効率的なウイルス感染系の構築のため、感染材料となる劇症肝炎患者から得られたHCV株の解析と、感染細胞となるコモンツパイの初代培養肝細胞培養について検討を行った。現在のところ一部の感染材料でしか初代培養肝細胞中でのHCVの増殖は確認されていない。今後さらに検討を加え、HCV感染増殖系の構築を行いたい。

平成13年度

創業等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社