

C型肝炎ウイルスの新たな感染系および複製系の開発

所属 名古屋市立大学大学院医学研究科 共同研究教育センター (中央臨床検査部)
研究者 加藤 孝宣

要旨

HCV RNA 複製系を、劇症肝炎患者由来の遺伝子型 2a の株をレプリコンシステムに用いることにより確立した。また、感染系構築のためコモンツパイの初代培養肝細胞に患者血清を感染させ検討を行った。その結果、肝細胞中に HCV RNA の持続的検出が可能であり、一部の検体では経過中に RNA の再上昇が観察された。

1. 研究目的

C 型慢性肝炎に対する治療は HCV が発見され 10 年以上が経過した現在でも、未だインターフェロンを中心とした治療以外に新たな抗ウイルス療法は実用化されていない。その一つの原因として HCV に対する各種の抗ウイルス剤の効果を評価しうる簡便なウイルスの細胞増殖系や小動物モデルがこれまで存在しなかったことが挙げられる。また、HCV はその遺伝子配列に多様性を持ち、異なる遺伝子型 (genotype) や、同じ遺伝子型でも株によってインターフェロン治療に対する反応性が異なることが知られている。もしインターフェロン治療前に、その患者に感染している HCV がインターフェロンに対し抵抗性か感受性かを知ることができれば、患者にとっても医療経済上も有益であろう。これらの点を解決し、HCV に対する新たな抗ウイルス療法の確立のためには、HCV の感染、複製が可能で系が必要と考えられる。そこで我々は、以下の方法で HCV の RNA 複製系、感染系の構築を試みた。

最近、ドイツのグループから培養細胞内で HCV RNA の複製を評価しうる系として HCV レプリコンシステムが報告された。この系は HCV の非構造遺伝子を薬剤耐性遺伝子と組み合わせたもので、Huh7 細胞内で HCV 遺伝子の複製と蛋白発現が持続的に認められる。この系を用いることにより薬剤のスクリーニングや抗ウイルス作用の評価が可能であり非常にすぐれた系であるが、現在のところ、特定の細胞 (Huh7 細胞) でのみ、また特定の HCV 遺伝子型 (genotype 1b) の株でしか RNA の複製が確認されていない。そこで我々は 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をきたした患者から分離された HCV 株をこのシステムに適用した。この株は genotype 2a に属する株であるが、慢性肝炎患者から分離された同じ genotype に属する株と比較するとやや外れており、他の genotype 2a の株に比し強い増殖力が期待される。

また、HCV 感染系として昨年より行っているコモンツパイの初代培養肝細胞を用いた系の確立を引き続き試みた。分離肝細胞の感染前の状態を改善するため分離法、使用する試薬の調整を工夫し、より状態のよい初代培養肝細胞を得ることが可能となった。また感染材料として各種 C 型肝炎患者血清を用い、初代培養肝細胞への感染と細胞内での複製を評価した。

以上、HCV の培養細胞におけるウイルス複製系と感染系を確立し、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

平成 14 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 株の解析

感染材料となる劇症肝炎患者、またコントロールとなる慢性肝炎患者それぞれより分離された HCV 株を用い、そのコア領域を 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 のコア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) Genotype 2a の HCV レプリコンシステムの確立

T7 プロモーターの下流に劇症肝炎患者から分離された HCV 株 (JFH-1 株) と慢性肝炎患者から分離された HCV 株 (JCH-1 株) の 5'UTR をネオマイシン耐性遺伝子、脳心筋炎ウイルス (Encephalomyocarditis virus; EMCV) のリボソーム内部認識部位 (IRES) をつなぎ、さらにそれら HCV 株の非構造領域をつなぎ合わせることでレプリコンのコンストラクトを作成した (図1)。このコンストラクトより RNA を合成し Huh7 細胞に遺伝子導入した後、ネオマイシンで選択培養することにより HCV Genotype 2a のレプリコンシステムの構築を試みた。レプリコン RNA の複製はノーザンブロットングおよび Real-Time detection PCR (RTD-PCR) 法により確認し、蛋白発現はウエスタンブロットングにより評価した。また増殖してきたレプリコン細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法にて増幅後、全塩基配列を決定し、複製しているレプリコンに特徴的な変異の有無を評価した。

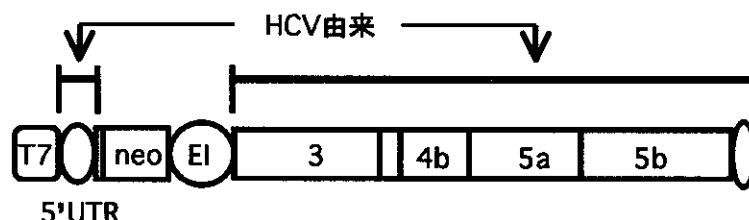


図1. HCV レプリコンの構造

T7 は T7 プロモーターを、neo はネオマイシン耐性遺伝子、EI は EMCV 由来の IRES を表す。

また 5'UTR は HCV 由来の IRES を、3、4b、5a、5b は HCV 由来の非構造領域を表す。

2) コモンツパイ初代培養肝細胞に対する感染実験

初代培養肝細胞分離は、ツパイを麻酔下で開腹し、門脈からカニューレーションを行い、培養液で灌流した後、得られた細胞群から低速遠心法により肝実質細胞を分離する。昨年に引き続き、分離肝細胞のバイアピリティの改善のためいくつかの検討を行った。まず、開腹前にヘパリンを 200U/animal で腹腔内投与することとした。この前処置により門脈からのカニューレーション時に肝内で血液が凝固しにくくなり、灌流液が肝内に十分行き渡るようになると考えられた。次に灌流液中の EGTA 濃度、CaCl₂ 濃度、投与するコラゲナーゼの量を変化させ、最適な濃度を決定した。また感染材料として、ウイルス量が多く、凍結融解を繰り返していない C 型肝炎患者の血清を数種類準備し感染実験を行った。一定期日毎に培養肝細胞の培養液、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 の検出を 5'UTR 部分のプライマーを用いた PCR で、ウイルス量測定は SYBR Green による定量 PCR 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。その株の増殖能、蛋白合成能の評価のため、その株のコア領域を含む発現ベクターを作成し、コア蛋白の成熟効率を検討した。コントロールとして同じ 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。すると、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ることがわかった。そこで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後、お互いのアミノ酸を置き換えたキメラベクターを作成し、コア領域の中で成熟コア蛋白 p21 の生成に関与する部分の同定を試みた。その結果、コア領域 C 末端の 4 カ所のアミノ酸が p21 の生成効率に関与していることが明らかになった。(研究発表; 文献1)

2) Genotype 2a の HCV レプリコンシステムの確立

次に、この株の複製効率の評価、効率のよい複製系の確立のため、劇症肝炎患者から分離された HCV 株 (JFH-1 株)

と慢性肝炎患者から分離された HCV 株 (JCH-1 株) それぞれを用い HCV レプリコンを作成した。Huh7 に遺伝子導入しネオマイシンを加え選択培養したところ、JFH-1 株由来のレプリコンを入れた細胞では多数のコロニーが生成されたのに対し、JCH-1 株由来のレプリコンを入れた細胞ではまったくコロニーの生成が認められなかった (図2)。

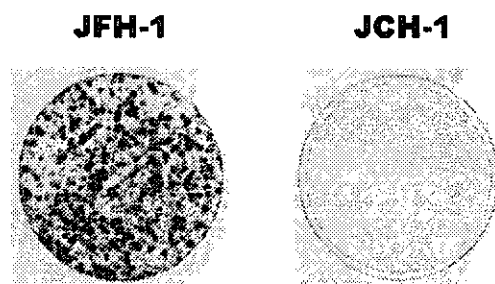


図2. JFH-1 株由来と JCH-1 株由来の HCV レプリコン細胞
JFH-1 株由来のレプリコンを導入した細胞には多数のコロニーが認められるのに対し、JCH-1 株由来のレプリコンを導入した細胞ではコロニーの生成が認められなかった。

JFH-1 株を用いたレプリコンではノーザンブロットングにより RNA の複製が (図3)、ウエスタンブロットングにより HCV 蛋白の生成が確認された (図4)。次に、この JFH-1 株を用いたレプリコンが HCV のポリメラーゼに依存して複製が行われていることを明らかにするため、HCV NS5b 領域にあるポリメラーゼの活性モチーフを破壊したレプリコンを同様に作成し、通常の JFH-1 株を用いたレプリコンと同時に Huh7 細胞に遺伝子導入した後ネオマイシン選択培養を行った。その結果、ポリメラーゼの活性モチーフを破壊したレプリコンではコロニーの生成が認められず、このレプリコンの複製は HCV 由来のポリメラーゼに依存していることが明らかになった。

また細胞内のレプリコン RNA のコピー数を定量するため、RTD-PCR による定量を行った。その結果、レプリコン細胞から抽出された RNA 1 μ g あたり 10^5 から 10^6 のレプリコンが含まれていると考えられ、十分な複製が起こっていると考えられた。また Huh7 細胞内で複製したレプリコンの、その細胞への適応変異の評価のため、細胞から抽出された RNA を RT-PCR にて増幅後、レプリコンの全塩基配列を決定した。すると多くのクローンでは HCV 由来の領域にいくつかの非同義置換を認めたが、一つのクローンでは同義置換をひとつ認めたのみであった (表1)。従ってこの JFH-1 株由来のレプリコンは、その HCV 由来領域に変異がなくても Huh7 細胞内で複製可能であると考えられた。

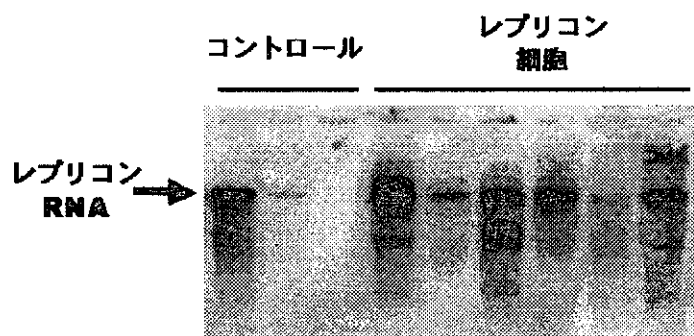


図3. レプリコン細胞内でのレプリコン RNA の検出。
Huh7 細胞中で十分量のレプリコン RNA の複製が起こっていると考えられた。

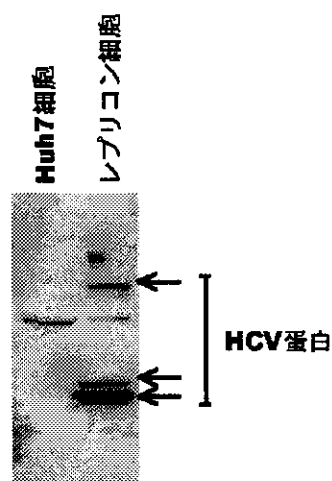


図4. レプリコン細胞内でのHCV蛋白の発現。
発現が確認された蛋白は上よりNS3、コア、NS4bと考えられた。

表1. JFH-1株レプリコンに認められた塩基配列の変異数

領域	NS3	NS4a	NS4b	NS5a	NS5b
クローン1	0	0	0	0	1/2
クローン2	0	0	0	1/	0
クローン3	0	0	0	2/2	1/2
クローン4	0	0	0	1/1	1/1
クローン5	1/1	0	0	0	0
クローン6	0	0	0	0	0/1

非同義置換数/総置換数で表す。

3) コモンツパイ初代培養肝細胞に対する感染実験

肝細胞の採取法の改善で、80%以上のバイアビリティで採取が可能であった。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ウェルプレートに播いた後、肝細胞の定着を確認し、劇症肝炎、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 1、day 2、day 4、day 5、day 6、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、急性肝炎患者血清を感染させた一例では、細胞中のHCV RNAが4日には消失したものの、5日目以後に再上昇が認められ、コモンツパイの初代培養肝細胞へのHCVの感染の可能性が示唆された(図5)。

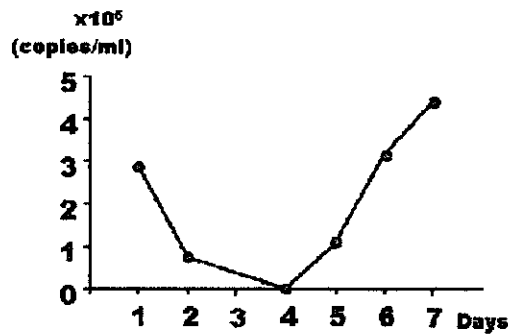


図5. コモンツパイの初代培養肝細胞中での HCVRNA の推移。

SYBR Green による定量では4日目には陰性化したものの5日目から再上昇が認められた。

4. 考察・まとめ

我々は劇症肝炎患者から分離された HCV 株を用い、複製効率のよい genotype 2a のレプリコンシステムを確立した。実際にこのレプリコンは、過去に報告された genotype 1b のレプリコンと比較してコロニーの生成効率、細胞内のレプリコン RNA のコピー数ともに上回っている (Kato et al. 投稿準備中)。このシステムの構築は新たな genotype のレプリコンを作成し評価が可能になったという意味において HCV の複製機構の解析や新たな抗ウイルス薬の開発に有用と考えられる。非構造蛋白の NS3 や NS5b 蛋白は抗ウイルス剤の主要な標的となると考えられており、この系を用いた genotype ごとの薬剤スクリーニングの進展が期待される。また genotype 1b のレプリコンと比較により、genotype 間の抗ウイルス療法に対する感受性の差が明らかにできる。一般に HCV genotype 1b はインターフェロン治療に抵抗性であるのに対し、genotype 2a は感受性であるといわれている。genotype 1b と 2a のレプリコンにインターフェロンを投与し、その抗ウイルス作用を評価することにより、各 genotype 間の反応性の差と適正な投与量の推定が可能になる。また別のアプローチとして、複製効率の悪い慢性肝炎患者から分離された HCV 株のレプリコンと、一部のフラグメントを入れ替え、キメラのレプリコンを作成することにより、複製効率に関与する部分の同定が可能になる。複製効率に関与する部分が同定されれば、治療前に感染しているウイルスを調べることにより治療効果の指標になる可能性が考えられる。また、最近、HCV の構造蛋白を含む全塩基配列を持ったレプリコンの細胞内の複製も報告されており、このシステムに劇症肝炎患者由来株を用いることにより、HCV のゲノムすべてを持った効率のよい細胞内複製系の構築も可能であると考えられる。この全塩基配列を持ったレプリコンをコモンツパイ初代培養肝細胞感染系と組み合わせることにより、感染複製系の構築も期待できる。

コモンツパイの初代培養肝細胞を用いた感染系は、各種 C 型肝炎患者の検体を用いた感染実験で培養 7 日目の HCVRNA の検出および HCVRNA の再上昇が認められているが、現在の時点では確実に HCV 複製が可能な系の確立までには至っていない。感染させる初代培養肝細胞は、分離方法の改良によりその状態がかなり改善されており、それが一部の検体の感染および肝細胞内での HCV RNA の維持・複製に寄与していると考えられる。しかし今後さらにこの系を確立していくためには感染材料の状態が問題となる。臨床検体、患者血清を用いた感染実験の場合、血清の一回の凍結・融解で 10³ 程度感染力価が低下するとの報告もあり、通常の方法で保存された血清を何度も感染実験に使用するのは難しく、安定した結果が期待できない可能性がある。従って今後は患者血清より、むしろ HCV の全塩基配列と薬剤耐性遺伝子を持ったレプリコン、もしくは HCV の感染性 cDNA クローンなど、人工的に作成したコンストラクトによる感染実験も視野に入れなければならないと思われる。そこで我々が分離した劇症肝炎患者由来株を用いこれらのコンストラクトを作成することで、ウイルス粒子生成と再感染が可能な細胞培養系の確立を目指したいと考えている。Huh7 細胞中でのレプリコンの複製効率から考えて、全塩基配列を持ったレプリコンも十分複製可能であると思われ、感染・複製が可能な系の構築が期待される。

6. 研究発表

- 1) Kato T., Miyamoto M. Furusaka A. Date T. Yasui K. Kato J. Matsushima S.
Komatsu T. Wakita T. Processing of hepatitis C virus core protein is regulated by its
C-terminal sequence. Journal of Medical Virology 69: 357-366 2003.

7. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得
特許取得の可能性について検討中
- 2) 実用新案登録
なし
- 3) その他