

- Yasui, K., Wakita, T., Tsukiyama-Kohara, K., Funahashi, S. I., Ichikawa, M., Kajita, T., Moradpour, D., Wands, J.R., and Kohara, M. (1998) The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 72, 6048-6055.
- Yu, M.Y., Bartosch, B., Zhang, P., Guo, Z.P., Renzi, P.M., Shen, L.M., Granier, C., Feinstone, S.M., Cosset, F.L., and Purcell, R.H. (2004) Neutralizing antibodies to hepatitis C virus (HCV) in immune globulins derived from anti-HCV-positive plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 7705-7710.
- Zhao, X., Tang, Z.Y., Klumpp, B., Wolff-Vorbeck, G., Barth, H., Levy, S., von Weizsacker, F., Blum, H.E., and Baumert, T.F. (2002) Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection. *J. Clin. Invest.* 109, 221-232.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard, S., Wakita, T., and Chisari, F. V. (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 9294-9299.
- Zhu, Q., Guo, J.T., and Seeger, C. (2003) Replication of hepatitis C virus subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells. *J. Virol.* 77, 9204-9210.

6 ICPとして知っておくべきウイルス病

ウイルス性肝炎

WAKITA TAKAJI

脇田隆字

◎国立感染症研究所ウイルス第二部

1 ウイルス性肝炎と肝炎ウイルス

肝炎は古くは黄疸により診断され、「カタル性黄疸」と呼称されていた。肝炎の原因はさまざまだが、感染性肝炎にはA型とB型の2種類があることが、1940年頃に報告された。A型は経口感染して潜伏期が比較的短いタイプで、B型は血液を介して感染し、潜伏期の長いタイプであった。感染性肝炎の多くはウイルス性であり、1960年代にB型肝炎ウイルスが、1970年代になりA型肝炎ウイルスが発見された。しかし、すべてのウイルス性肝炎が、この2種類の肝炎ウイルスだけによるわけではなく、その後もウイルス探索が続けられた。現在ではA型、B型、C型、D型、E型が確認されている(表1)。F型は存在が確認されていない。G型肝炎ウイルスはGBVとも呼ばれるが、肝炎ウイルスであるかどうか確認されていない。ウイルス性肝炎には急性肝炎と慢性肝炎がある。感染したウイルスの種類や感染時期により、発症する肝炎の種類や予後が異なる。肝臓を主な標的臓器とするウイルスを肝炎ウイルスと呼び、肝炎ウイルス以外にもサイトメガロウイルスやEBウイルスなどは肝炎を引き起こすことがあるが、標的臓器が肝臓のみでなく全身臓器に感染するため、肝炎ウイルスには含まれていない。

2 A型肝炎ウイルス

ピコルナウイルス科に属するRNAウイルスである。患者の糞便中に排泄されたA型肝炎ウイルス(HAV)が、水や食材を介して経口的に伝播して、急性肝炎を引き起こす。日本では大規模な流行はなくなり、飲食店を介した感染や、海外渡航者の感染がみられる。一般的に予後は良好で、持続感染はしないため慢性肝炎にはならない。小児期には感染しても不顕性感染か、軽い症状のことが多い。成人期に感染すると急性肝炎を発症する。潜伏期は2~6週間であり、発熱、全身倦怠感に続いて、黄疸が出現する。予後は通常良好で、肝機能異常は通常1~2カ月で回復する。しかし、高齢者では劇症肝炎を発症することがあるため注意が必要である。肝外合併症としては、急性腎不全、貧血、心筋障害などが知られている。

A型肝炎ウイルスの分離には長期間が必要なため、診断目的には適さない。このため、急性肝炎患者におけるA型肝炎ウイルス感染の確定診断は血清中のA型肝炎ウイルス特異的IgM抗体の検出による。また、他の血清学的検査ではIgMの増加、チモール混濁反応(TTT値)で判定される膠質反応の上昇が特徴的である。A型肝炎ウイルスには特異的な抗ウイルス薬などはないため、症状に応じて、入院と安静、輸液や肝庇護療法が行われる。予防に関しては、組織培養由来の

表1 肝炎ウイルスの種類

ウイルス名	ウイルス科	ウイルスゲノム	感染経路	持続感染	肝臓との関連	ワクチンによる予防
A型肝炎 (HAV)	ピコルナウイルス	RNA	経口	なし	なし	可能
B型肝炎 (HBV)	ヘパドナウイルス	DNA	血液	あり	あり	可能
C型肝炎 (HCV)	フラビウイルス	RNA	血液	あり	あり	不可
D型肝炎 (HDV)	未定	RNA	血液	あり	あり* ¹	可能* ²
E型肝炎 (HEV)	ヘペウイルス	RNA	経口	なし	なし	不可

*¹: HBV 単独感染に比べると危険性が増す

*²: HBV ワクチンによる同時感染の予防のみ可能。本文参照

不活化 A 型肝炎ワクチンが実用化されている。A 型肝炎ウイルスは 4 種類の遺伝子型に分類されるが、中和に関する血清型は 1 種類である。したがって、異なる遺伝子型のウイルスにも感染予防が可能である。A 型肝炎ウイルスが流行している地域への旅行者、医療従事者などのハイリスクグループが接種対象者となる。ワクチンは 0 週、2~4 週、24 週の合計 3 回接種する。ワクチン接種による抗体獲得率はほぼ 100% であり、数年以上効果が持続する。発展途上国などの A 型肝炎ウイルスが流行している地域へ旅行する場合、ワクチン接種が勧められるが、手洗いを励行し、生水、氷、生もの（魚介類、野菜など）の摂食を避けることが感染を避けるために必要である。

3 B 型肝炎ウイルス

ヘパドナウイルス科に属する不完全二本鎖 DNA をゲノムとするウイルスである。血液および体液を介して感染する。わが国では母児感染（垂直感染）によりキャリアになることが多かったため、HBV ワクチンによる母児感染対策事業が行われて成果を上げてきた。B 型肝炎は主に血液を介して感染する疾患である。輸血、医療事故、性交渉などの水平感染と、母児感染による垂直感染が主な感染経路である。乳幼児期の感染ではキャリア化することが知られている。B 型肝炎ウイルスキャリアは多くは無症状のまま経過し、自然経過で HBe 抗原陽性から HBe 抗体陽性へとセロコンバージョンするが、慢性肝炎、肝硬変、そし

て肝臓癌へと進展する例がある。また、C 型肝炎とは異なり、無症候性キャリアや慢性肝炎からも発癌することがあるのが B 型肝炎の特徴である。肝炎などを発病しないと病院を受診しないことも多く、B 型肝炎ウイルスキャリアの正確な長期予後はわかっていない。成人期の感染では多くの場合、一過性の急性肝炎を発症した後、ウイルスが排除され治癒するが、まれに持続感染化することもある。急性肝炎の症状は A 型肝炎ウイルスの場合と同様である。慢性肝炎の場合、無症状のことが多いが、肝機能異常が強いと倦怠感を訴えることがある。肝硬変に進行しても代償期には症状は強くないが、臨床所見としてくも状血管種、手掌紅斑、脾腫、肝腫大などがある。非代償期になると浮腫、腹水、脳症、食道静脈瘤などを併発する。

B 型肝炎ウイルス感染の診断は血清中のウイルスマーカーによる。HBs、HBc、HBe の 3 種類のウイルス抗原抗体系と HBV DNA および DNA ポリメラーゼ活性を測定する。HBs 抗原陽性は、B 型肝炎ウイルスの現在の感染を示す。HBs 抗体陽性は、過去の感染歴、またはワクチン接種歴を示す。HBc 抗原は通常血中に出現しない。HBc 抗体陽性で抗体価が高い場合は、HBs 抗原が陽性のことが多く、現在の感染を示す。HBc 抗体の抗体価が低い場合は、HBs 抗体陽性のことが多く、過去の感染歴を示す。抗 HBc 抗体は最も早く出現する抗体であり、特に抗 HBc IgM 抗体が陽性の場合、B 型急性肝炎と診断する。HBe 抗原陽性の場合、血液中のウイルス量が多く、感

染性が強いことを示す。抗 HBe 抗体陽性の場合、血液中のウイルス量が少なく、感染性が弱いことを示す。HBV DNA および DNA ポリメラーゼ活性は血液中のウイルスを反映する。

B 型肝炎ウイルスによる急性肝炎の治療は A 型肝炎の場合と同様、症状に応じて入院して安静、輸液などを行うが、まれに劇症肝炎を発症することがあるので、重症例では抗ウイルス薬（インターフェロンおよび lamivudine）の早期投与が望ましい。B 型慢性肝炎の治療は抗ウイルス療法が中心となる。インターフェロン、lamivudine が使用されている。インターフェロンは当初期待されたよりも効果が低く、lamivudine は耐性ウイルス出現の問題点がある。lamivudine 耐性ウイルスに対しては他の抗ウイルス薬（adefovir, entecavir など）を使用する。B 型肝硬変の治療は、保険適応の問題はあるが、ウイルス量が多く、トランスアミナーゼの変動がある場合は抗ウイルス療法の対象となり、状態に応じて、インターフェロン、lamivudine を投与する。肝硬変が急性増悪した場合などには肝移植も考慮される。再感染率が高く、生存率が低いなどの問題点が多かったが、抗 HBV 免疫グロブリンの大量投与や lamivudine 投与により治療成績は向上してきている。

B 型肝炎に対するワクチンは、わが国では現在、酵母由来の組換え B 型ワクチンとヒト肝癌細胞株の培養上清から精製されたワクチンが使用されている。わが国の母子感染防止対策事業は 1986 年から開始され、大きな成果を上げてきた。この目的（垂直感染予防）には出生後できるだけ早期および生後 2 カ月に HB 免疫グロブリンを 2 回接種、さらに 2, 3, 5 カ月に B 型肝炎ワクチンを 3 回接種する。一般の B 型肝炎感染予防（水平感染予防）の対象は医療従事者、B 型肝炎ウイルスキャリアの家族などのハイリスクグループと海外渡航者である。標準的には 4 週間隔で 2 回、さらに初回接種から 20~24 週後に 1 回、合計 3 回接種を行う。この方法で 9 割の接種者が HBs 抗体

陽性となる。HBs 抗体が陽性とならない場合、6 カ月以内に 4 回目を 2 倍量で接種したり、ワクチンの種類を変更する、追加接種を 1 カ月間隔で 2 回とする、などの対策を講じる。

B 型肝炎ウイルスを含んだ血液が付着した場合を想定した消毒方法について述べる。まず、第一に流水でよく洗浄すること、洗浄により血液を除去するとともに、血液が付着したまま乾燥すると感染性が持続する可能性があるため乾燥をまず防ぐことが重要である。第二に加熱する。オートクレーブ、乾熱滅菌、煮沸消毒のいずれかで設定温度で 15 分以上加熱する。薬物消毒は、次亜塩素酸系の消毒液の場合有効塩素濃度を 1,000ppm の液に 1 時間以上浸す。非塩素系の場合、2%グルタルアルデヒド液を用いる。エチレンオキシドガス、ホルマリンガスを用いて消毒する場合には、器具などを十分に洗浄した後に水分をよくふき取ってから薫蒸する。消毒用エタノールは B 型肝炎ウイルスを十分に消毒できないので使用しないこと。

4▶ C 型肝炎ウイルス

フラビウイルス科に属し、約 9.6kb のプラス鎖 RNA をゲノムに持つ。血液を介して感染し、多くの場合、持続感染化する。感染すると急性肝炎を発症することもあるが、症状は軽度のことが多い。持続感染し、キャリアになると慢性肝炎を発症する。10 年以上の長い期間を経て、肝硬変、さらに肝臓癌に進展する。自然治癒はほとんどないと考えられている。臨床症状は B 型肝炎ウイルスの項で記述したものと差はない。慢性肝炎では多くの場合、無症状で検診の際に肝機能異常を指摘され診断されることが多い。HCV の感染は HCV 抗体検査、HCV コア抗原検査、および RT-PCR 法による HCV RNA の検出で診断される。

C 型肝炎の治療は現在、インターフェロン単独、インターフェロンと ribavirin の併用療法が行われている。インターフェロンには通常のものとは

グ化したものがある。その効果はウイルスの遺伝子型により大きく異なる。C型肝炎ウイルスは6つの遺伝子型とその亜型に分かれるが、わが国では1bが最も多く、2a、2bの順である。2a、2bはインターフェロン治療が有効であるが、1bは有効性が低い。特に1bでウイルス量が多い症例は治療が困難とされている。現在、C型肝炎ウイルスのNS3プロテアーゼ阻害剤やNS5Bポリメラーゼ阻害剤が臨床試験中であり、新たな抗ウイルス療法が導入されることが望まれている。また、C型肝炎ウイルスに有効なワクチンや免疫グロブリンは存在しない。C型肝炎は血液を介して感染するため、感染予防は血液に対する取り扱いを注意する以外にない。ウイルスの消毒法はB型肝炎ウイルスに対する消毒法と同じでよいと考えられている。

5 D型肝炎ウイルス

D型肝炎ウイルスはウイルスの表面はB型肝炎ウイルスのHBs抗原で覆われている。内部にD型肝炎ウイルスのRNAゲノムとデルタ抗原を含んでいる。B型肝炎ウイルスに感染した細胞でしか増殖できない。したがって、D型肝炎ウイルスはB型肝炎ウイルスキャリアに重感染する。わが国ではD型肝炎ウイルスの重感染者はB型肝炎ウイルスキャリアの1%以下と考えられており、特定の地域（長崎県や沖縄県の離島）を除くと、まれな感染症である。

急性肝炎および慢性肝炎を起こすが、いずれもD型肝炎ウイルスの重感染によりB型肝炎ウイルス単独感染よりも重症化すると考えられている。診断はB型肝炎ウイルス感染の診断に加えて、抗デルタ抗体（D型肝炎ウイルスに対する抗体）とD型肝炎ウイルスRNAを測定する。急性B型肝炎でデルタ抗体陽性ならば同時感染、慢性B型肝炎で抗デルタ抗体陽性の場合は重複感染が考えられる。

D型肝炎ウイルスに特異的な治療法は確立さ

れていない。D型肝炎はB型肝炎ウイルス感染に依存するため、B型肝炎に対する抗ウイルス療法が行われる。また、D型肝炎ウイルスによる劇症肝炎、亜急性肝炎、肝硬変、肝細胞癌は肝移植の適応を検討する。予防に関しても、B型肝炎との同時感染はB型肝炎に対するワクチン接種で予防できる。しかし、D型肝炎に対する特異的ワクチンはないため、B型肝炎ウイルス持続感染者へのD型肝炎ウイルスの重複感染予防は血液からの感染対策を講じるしかないのが現状である。

6 E型肝炎ウイルス

非A非B型肝炎ウイルスで経口感染するものがあることが想定されていたが、1990年にE型肝炎ウイルスが発見され、ウイルス性肝炎の大部分はA～E型の5種類の肝炎ウイルスによることが明らかとなった。E型肝炎ウイルスは一本鎖のRNAをゲノムに持ち、最近Hepeviridae科に分類された。E型肝炎ウイルスは患者の糞便中に排出され、糞口感染により感染する。E型肝炎ウイルスは熱帯および亜熱帯の発展途上国に常在し、流行を繰り返して、衛生環境のよい先進国では旅行者が持ち帰る輸入感染症と考えられていた。しかし、最近になり、わが国で家畜のブタや野生動物のシカ、イノシシなどからE型肝炎ウイルスやその抗体が検出され、ブタ肝臓や野生動物の肉、内臓の接種による肝炎発症が報告されている。したがって、E型肝炎ウイルス感染症は人畜共通感染症として注目されている。E型肝炎ウイルスは感染すると急性肝炎を発症し、慢性化はないとされている。臨床症状は他の急性肝炎と比べて特徴的な症状はないが、高齢者や妊婦に感染して劇症化したとする報告もあり、注意を要する。E型肝炎ウイルス感染の診断は、ウイルスRNAを血液中および便中に検出する方法と、E型肝炎ウイルスに対する抗体を検出する方法がある。E型肝炎ウイルスには特異的な抗ウイルス治療はないの

で、A型肝炎と同様に治療は対症療法を行う。また、ワクチンも存在しないので予防法はなく、感染対策としては、ブタ肝臓、シカ、イノシシの生肉摂食を避けることが必要である。

7 ▶ その他のウイルス

ウイルス性肝炎の大部分はこれまでに述べてきた5種類の肝炎ウイルスが原因である。しかし、これらの肝炎ウイルスが検出されない肝炎が存在し、新たな肝炎ウイルスの探索が続けられている。なかでも、TTV、GBV-C/HGV、SEN-Vなどが話題となった。TTVとSEN-Vはいずれも肝炎患者血清中から分離され、サーコウイルス科に属する、一本鎖環状DNAをゲノムに持つウイルスである。どちらのウイルスもヒトに持続感染化するが、肝臓だけでなく他の臓器にも感染し、肝疾患との関係は明らかではなく、今のところ肝炎ウ

イルスとは考えられていない。また、GBV-C/HGVも肝炎ウイルスの候補として報告されたが、やはり現在では肝炎ウイルスとは考えられていない。GBV-C/HGVはC型肝炎ウイルスと同じフラビウイルス科に属し、ヒトに持続感染化する。臨床的にGBV-C/HGVが最も注目されている点はHIVと重感染すると、HIV単独感染よりも予後がよい点である。ウイルス間の何らかの干渉現象によると思われるが、詳細なメカニズムは不明である。



肝炎ウイルス研究の進歩は、まさに医学の進歩とともにある。その時代の最先端の技術により次々と肝炎ウイルスが分離同定され、ワクチンや抗ウイルス薬が開発されてきた。いまだに予防的ワクチンや治療法のない肝炎ウイルスに対しても今後の進展が期待できる。

* * *

肝炎ウイルス研究の進歩

HCV増殖機構の解明

The mechanism of the HCV replication

Key point

- ◎レプリコンシステムは、HCV ではじめてウイルスゲノム複製について細胞レベルで解析できる実験系である。
- ◎レプリコンが細胞内で増殖するためには、特定の変異をもったウイルス遺伝子と特定の条件を備えた細胞の相性が合う必要がある。
- ◎脂質ラフトが HCV 複製複合体形成において重要な役割を果たしている。
- ◎HCV 複製の分子機構を解明し、複製を調整する宿主因子を同定することは新しい薬剤開発につながる重要な研究である。

1989年、Houghtonらカイロン社のグループがC型肝炎ウイルス(HCV)感染チンパンジー血漿からHCVの遺伝子断片のクローニングに成功した¹⁾。そして、それをもとにしたスクリーニング系の導入により、わが国では輸血による新規C型肝炎の発生は激減した。しかし、培養細胞を用いた効率のよいHCV感染・増殖系は確立されていなかったことや、感染・病態を解析できるよい実験動物モデルがなかったため、ウイルスの複製・増殖機構などウイルス学的な研究は遅れてきた。1997年Riceらは、クローニングした多くのcDNAからコンセンサス部分を抜き出すことによってチンパンジーに急性肝炎を発症させることが可能な感染性クローンの構築に成功した²⁾。これにより、感染性クローン遺伝子の一部を改変することでその遺伝子および蛋白の機能を調べるリバースジェネティックスの手法がHCV研究においても可能になった。この感染性クローンはチンパンジーでのみ増殖が可能であるが、培養細胞に感染できるウイルスは得られなかった。1999年Bartenschlagerらは、HCVの構造蛋白領域を薬剤耐性遺伝子に置き換えたHCVレプリコンを開発し、合成レプリコンRNAを導入した細胞を薬剤によ

る選択培養することで、HCV遺伝子が複製しうる細胞を樹立した³⁾。HCVレプリコンによって、ウイルスの生活環のウイルスゲノム複製を細胞レベルで解析できる系が確立された。さらに2005年、著者らは慈恵医大第三病院の劇症肝炎症例の急性期血清からHCV株JFH-1を分離し、培養細胞中で感染性HCV粒子産生に成功した⁴⁾。この系により、ウイルスの感染から分泌までのすべての過程が培養細胞内で解析可能になった。

本稿ではHCV以外のプラス鎖RNAウイルスの知見や、新しいHCV複製・増殖系の情報をもとに、HCV増殖機能について考察してみたい(「サイドメモ」参照)。

HCVの生活環(図1)

ウイルスの増殖とはウイルス粒子が細胞に感染し、その細胞からウイルスが産生し、あらたに細胞に感染するという一連の過程を示す。すなわち、HCVがレセプターを介して肝細胞に感染(吸着)し、粒子よりウイルスRNAが放出され(脱核)、このRNAの5'非翻訳領域に存在するIRESから翻訳が開始され、ウイルスの前駆体蛋白が合成される。この前駆体蛋白は、細胞のシグナラーゼによってウイルス粒子を形成する構造蛋白である、コア蛋白と2つのエンベロップ蛋白がプロセスされる。また、ウイルス自体のプロテアーゼに

サイドメモ

三次元培養系による遺伝子型1bHCV様粒子産生の試み

著者らの研究室では、ラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)¹¹⁾および温度感受性ゲルTGF¹²⁾で細胞を三次元培養すると、通常の二次元培養で失われてしまった種々の細胞機能が回復することに着目し、HCV感染増殖系への応用を試みた。遺伝子型1bの全長のHCV RNAが持続的に複製するRCYM1細胞を上記の方法で三次元培養したところ、HCV様粒子が細胞外に分泌された。この培養上清をHuh7細胞に添加したところ、3日目からHCV RNAおよびウイルス蛋白発現が検出され、感染が成立した。このHCV様粒子の感染は抗E2抗体およびNOB抗体(E2蛋白と細胞の結合を阻害する)により抑制された。さらに、免疫電子顕微鏡観察でRCYM1細胞内の小胞体膜上および小胞内に粒子様構造物を認め、これはコアおよびE1に対する抗体と反応したことから、HCV様粒子と考えられた。これら三次元培養系の産生効率はまだあまりよくないものの、わが国の感染者に多い遺伝子型1bのHCV様粒子産生系として有用と考えられた。

相崎英樹, 鈴木哲朗, 脇田隆宇 / 国立感染症研究所ウイルス第二部

Hideki AIZAKI, Tetsuro SUZUKI and Takaji WAKITA

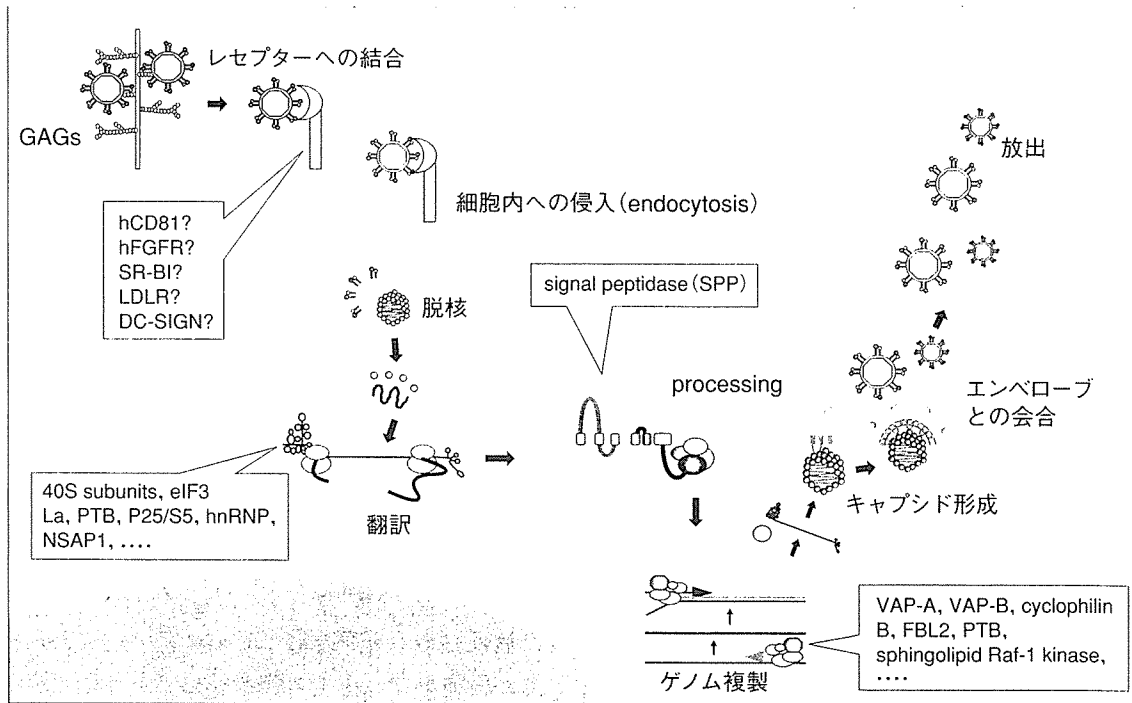


図 1 HCVの生活環

よってプロテアーゼ、ヘリカーゼ、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) などウイルスの複製に必須な非構造蛋白がプロセスされる (翻訳後修飾)。ウイルスゲノムにコードされた酵素や、宿主因子によってゲノム RNA からマイナス鎖 RNA が転写され、複製複合体が形成される。これをもとにしてプラス鎖 RNA が合成され、ウイルス RNA や蛋白合成に働く。ウイルス RNA がコア蛋白と結合してヌクレオカプシドを形成し、さらにエンベロープ蛋白が邂逅して ER でウイルス粒子が成熟し (出芽)、Golgi 体を通り細胞膜に達して細胞外へ放出されると考えられている。

本稿ではこのような HCV 生活環のうち、とくに複製の過程に注目し、RNA レプリコンの実験系で得られた知見を中心に報告する。

HCVレプリコンの開発

ポリオウイルスやフラビウイルスなどのプラス鎖 RNA ウイルスの研究から、HCV 複製は HCV ゲノムと非構造 (NS) 蛋白が細胞質内の膜構造において宿主蛋白とともに複製複合体を形成することからはじまると考えられている。HCV ゲノムは 5' 非翻訳領域の塩基配列がもつとも保存されており、ウイルスの複製に非常に重要である。さらに、リボゾームが 5' 非翻訳領域の途中に結合し蛋白合成を開始できる internal ribosome entry site (IRES) が存在し、ウイルス蛋白翻訳においても重要な働きをしている。また、HCV の 3' 非翻訳領域は、①variable region、②poly(U)配列、③3'

X とよばれる 3 つの領域から構成されており、いずれも HCV の複製に重要な役割を果たしている。HCNS 蛋白については、NS5B 遺伝子のコードする RdRp が複製において中心的な役割を担っているものと推定されている。しかし、強制発現させた RdRp を精製し解析したところ、その活性は鋳型特異性がなく、複製産物の長さは鋳型と異なった。一般的に、鋳型特異的な RNA 合成には細胞因子や他の NS 蛋白が必要と考えられている⁵⁾。

以上のことから、HCV 複製の研究には NS5B だけでなく、他の NS 蛋白や宿主因子が結合した複製複合体を維持したうえでの解析が重要ということが考えられる。したがって、HCV レプリコンは HCV ゲノムの複製機構を解析するうえで非常に有効と期待された。HCV レプリコンではレプリコン RNA を導入した細胞を薬剤による選択培養することで、自律複製する HCV 遺伝子配列を獲得した HCV ゲノムと、さらにこの HCV 遺伝子が複製しうる細胞を選択することをめざした。そして、このような HCV の RNA レプリコンの複製を許容できる細胞がトランスフェクトしたヒト肝由来 Huh7 細胞の一部 (わずか $1/10^6$) から得られた。

興味深いことに、レプリコンには細胞障害性はまったくなく、レプリコンの複製効率は細胞の増殖と相関していた。さらに、レプリコンゲノムが細胞に適応し、数百倍も複製効率がよいものへと変異しうる (adaptive mutation) ことがわかった。これらの変異は、NS3

から NS5B に至る NS 蛋白遺伝子で広範囲に認められたものの、これらの変異は培養細胞系に特徴的なものと考えられた。以上のように、レプリコンが細胞内で増殖するためには特定の変異をもったウイルス遺伝子と、特定の条件を備えた細胞の相性が合う必要があることがわかった。

HCV複製複合体の形成

5-bromouridine 5'-triphosphate (BrUTP) をレプリコン細胞に導入し、免疫組織染色で観察したところ、新規に合成された HCV RNA は、BrUTP を取り込み、NS 蛋白質と共局在し、レプリコン細胞の核周辺の細胞質に斑点状の構造物として認められた。これはレプリコン細胞を電子顕微鏡で観察するとみられる“membranous web” とよばれる小胞様構造物と考えられ、ここが HCV 複製の場と想定されている⁶⁾。つぎに、生化学的手法を用いて HCV 複製複合体を解析すると、HCV 複製複合体が脂質ラフトと結合していることが示唆された⁷⁾。ロバスタチンは、脂質ラフトの主要構成成分のコレステロールを減少させる HMG-CoA レダクターゼ阻害剤である。ロバスタチンをレプリコン細胞に添加すると、HCV RNA 複製効率が低下する。すなわち、HCV 複製において脂質ラフトが HCV 複製複合体と結合し、重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

図 2 に、HCV 複製複合体形成モデルを示す。HCVNS 蛋白は ER で合成され、NS4B は膜に、NS5A はその 5 末端で、NS5B はその 3 末端で膜にアンカーしている(図 2-A)。HCVNS 蛋白は Golgi 体に輸送され、HCVNS 蛋白どうしで結合する。また、細胞内膜蛋白質のひとつで、細胞内膜輸送にかかわっていると考えられている the human homologue of the 33kDa vesicle-associated membrane protein-associated protein (hVAP-33) は、その N 末端で NS5B と中央部のコイルドコイル領域で NS5A と結合する。NS5A は脂質ラフトと弱く結合し、NS4B は強く結合する。以上から、NS4B が中心となつて、hVAP-33 や NS5A とともに、他の NS 蛋白を脂質ラフト上に誘導・固定する役割を担っているものと思われる(図 2-B)⁸⁾。

一般的に、脂質ラフトは自由に膜上を移動し、集散を繰り返しているものと考えられている。しかし、NS4B のようにたがいに結合する蛋白が乗っている場合、一度結合した脂質ラフトどうしは安定化し、島状にしだいに大きくなり、その過程で特定の蛋白を集積させる性格がある(図 2-C)。さらに、膜上の蛋白どうしが結合するエネルギーにより、膜は小胞を形成するようになる(図 2-D)。すでに、NS4B 蛋白単独でもこ

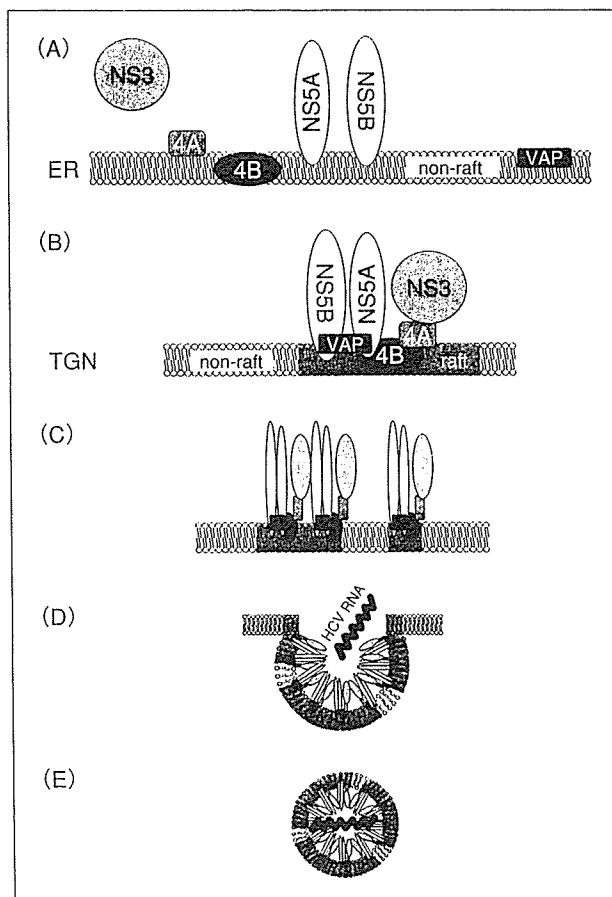


図 2 HCV複製複合体の形成⁷⁾

の膜構造をとることが報告されている。ここに HCV RNA が取り込まれることにより、複製複合体をつくり複製がはじまるものと考えられる(図 2-E)。以上のように、脂質ラフトは NS 蛋白を集積させ、複合体を形成させるだけでなく、小胞構造を取り、膜に包まれた HCV 複製の場を提供する役割があるものと想定されている。

HCV複製複合体の解析

HCV 複製複合体は脂質ラフトを含む膜小胞構造内に存在し、内部の HCV RNA や NS 蛋白は外部からの RNA 分解酵素やプロテアーゼに対して保護されている。HCV 複製複合体は膜小胞構造内に保護されているため、外部から投与した HCV RNA は複製複合体に到達できず、すでに内部に取り込まれている HCV RNA がテンプレートとなってマイナス鎖 RNA が合成され、それをもとに複数のプラス鎖 RNA が合成される。その比はマイナス鎖 1 に対してプラス鎖 10 である。複製に必要な NS 蛋白は継続的に供給される必要はなく、一度 HCV 複製複合体を形成し RNA 複製が開始されると、継続的に RNA が産生されるものと推定できる。膜小胞内には、HCV ゲノムの量に対して NS 蛋白

の量は 1,000 倍以上と大量に存在しているものの、実際複製にかかわっているのはほんのわずかにすぎず、NS 蛋白の大部分は膜小胞形成の役割を果たしているものと思われる。

複製に関する宿主因子

HCV RNA 複製に関する宿主蛋白としては、① HCV RNA に結合する蛋白：polyrimidine tract-binding protein (PTB)⁹⁾、② HCV NS 蛋白に結合する蛋白：hVAP-33 (hVAP-A)、hVAP-B、Cyclophilin B、Raf-1 キナーゼなどが報告されている。このうち hVAP-33 については“adaptive mutation”によりレプリコンゲノムが複製しやすくなる現象が報告されているが、NS5A 遺伝子のリン酸化部位に変異が起こり、それによって NS5A と hVAP-33 が結合しやすくなることから、複製効率が上がることが証明されている。

チンパンジーへの HCV 感染実験で遺伝子発現変化を網羅的に解析すると、脂質代謝に関与する多くの遺伝子に変化が認められている。逆に、脂質代謝の変化が HCV 複製に影響を与えることも、ロバスタチンの実験などから明らかである⁷⁾。また、蛋白の脂質による修飾作用のひとつにゲラニルゲラニル化があるが、この修飾を受ける宿主蛋白のうち、FLB2 が NS5A と結合することがウイルス複製に重要であることが報告されている。ゲラニルゲラニル化は蛋白質を膜上に集め、蛋白質間の相互作用や情報伝達効率を調整する制御因子として知られている。最近、Sakamoto らは微生物や真菌の代謝産物からなる化合物ライブラリーから抗 HCV 薬をスクリーニングしたところ、NA255 という候補をみつけ出した¹⁰⁾。この薬剤はスフィンゴ脂質の産生を抑制し、Golgi 体での NS5B の脂質ラフトへの結合を抑え、HCV 複製複合体の形成を抑制する作用

があることを示した。このことは、著者らが提示してきたモデル、すなわち“脂質ラフト上での HCV 複製複合体形成”を強く支持している。

おわりに

HCV はゲノム配列が多様で、変異しやすいウイルスであることが知られており、あらたな抗 HCV 薬としてウイルスプロテアーゼやポリメラーゼといったウイルス複製に関する酵素を標的とした薬剤の開発研究が盛んに行われているが、HIV と同様にこれらの薬剤についても、HCV は耐性変異を獲得することが報告されている。そこで、宿主のコレステロール産生系やスフィンゴ脂質の産生系をターゲットとし、感染した細胞側の働きを抑えてウイルス増殖を抑制する抗 HCV 薬の開発は、耐性ウイルスが出現しにくい薬剤につながる期待がある。そのためにも、HCV 複製の分子機構を解明し複製を調整する宿主因子を同定することは、新しい薬剤開発につながる重要な研究であると思われる。

文献

- 1) Choo, Q. L. et al. : *Science*, **244** : 359-362, 1989.
- 2) Kolykhalov, A. A. et al. : *Science*, **277** : 570-574, 1997.
- 3) Lohmann, V. et al. : *Science*, **285** : 110-113, 1999.
- 4) Wakita, T. et al. : *Nat. Med.*, **11** : 791-796, 2005.
- 5) Lai, M. M. : *Virology*, **244** : 1-12, 1998.
- 6) Shi, S. T. et al. : *J. Virol.*, **77** : 4160-4168, 2003.
- 7) Aizaki, H. et al. : *Virology*, **324** : 450-461, 2004.
- 8) Gao, L. et al. : *J. Virol.*, **78** : 3480-3488, 2004.
- 9) Aizaki, H. et al. : *J. Biomed. Sci.* (in press)
- 10) Sakamoto, H. et al. : *Nat. Chem. Biol.*, **1** : 333-337, 2005.
- 11) Aizaki, H. et al. : *Virology*, **314** : 16-25, 2003.
- 12) Murakami, K. et al. : *Virology*. (in press)

* * *

肝炎ウイルス研究の進歩

HCV発現細胞系の確立

Development of HCV replication systems

Key point

- ◎C型肝炎ウイルス(HCV)は発見以来ウイルス培養系が存在しなかったため、ウイルス複製機構の解析や抗ウイルス薬の開発が遅れていた。
- ◎HCVレプリコンシステムやシュードタイプウイルスなどの開発により、ウイルス生活環の一部が解析可能となった。
- ◎HCVではまれな劇症肝炎症例から分離したウイルス株とCured細胞を組み合わせることにより、効率のよいウイルス培養が可能となった。

C型肝炎ウイルス(HCV)は、いわゆる非A非B型肝炎の原因ウイルスとして1989年にはじめて報告された¹⁾。しかし、HCVのゲノム遺伝子はクローニングされたが、実験室内でウイルス培養が可能になったわけではなかった。HCVは感染すると多くの場合、持続感染化して慢性肝炎、肝硬変、肝癌といった病気を引き起こすことが知られている。したがって、HCV感染症に対する治療法の確立が重要であるが、そのためにはHCVのウイルス学的解析が必要である。ウイルスの解析にはウイルス培養系の樹立が重要であり、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の場合はウイルスが発見されたから比較的早期にウイルス培養系が確立されたため、抗ウイルス薬の開発も早かった。しかし、HCVは多くの研究者の努力にもかかわらず、培養細胞に感染させることは困難であった。さまざまな培養細胞、たとえば肝癌細胞、リンパ球系細胞を用いてHCV感染が試みられたが、その感染増殖はウイルスゲノム遺伝子をRT-PCRでようやく検出できるレベルであり、増殖したウイルス粒子の詳細な解析は難しかった。

1995年にHCVウイルスゲノムの3'末端の構造が報告されて、全ゲノムの遺伝子配列が明らかとなった²⁾。HCVはチンパンジーに感染性があることはわかっていたため、試験管内で合成された全長のウイルスRNAがチンパンジーに感染性があることが1997

年に報告された³⁾。そして培養細胞においては、1999年にドイツのグループがレプリコンシステムによってHCVのゲノム複製を培養細胞ではじめて可能とした⁴⁾。著者らはHCVによる劇症肝炎症例からHCV株を分離して解析してきた⁵⁾。このHCV株が培養細胞における増殖能力が高いことを利用して、困難であったHCV培養に成功した⁶⁾。

感染性cDNAクローン

HCVの最初の感染性cDNAクローンは1997年に報告された³⁾。試験管内で合成された遺伝子型1aのH77株の全長ウイルスRNAをチンパンジーの肝に直接接種して、HCVの増殖と肝障害を観察した。この実験により、チンパンジーに感染性の証明された単一配列のウイルスゲノム配列がはじめて明らかとなった。このcDNAクローンを用いることによりHCVのリバースジェティクスが可能となるが、大量のチンパンジーを感染実験に用いることは倫理的および金銭的問題により困難である。さらに、この感染性cDNAクローンから合成したウイルスRNAを培養細胞に導入しても、感染性のウイルスは回収されなかった。

HCVウイルスの細胞培養系

患者血清中のHCVを培養細胞に感染させる試みは、ヒト初代培養肝細胞、肝癌細胞、リンパ球系の培養細胞などを用いて試みられてきた。しかし、いずれの場合においてもHCVの感染増殖効率は低く、感度の高いRT-PCRなどを用いなければ増殖したウイルスゲノムの検出は不可能であった。HCVの培養細胞における低い感染増殖効率がウイルス自体の性質によるものか、あるいはHCVは肝臓という本来高度に分化した臓器に感染するが、培養細胞においてはHCV感染増殖に必要な宿主因子がすでに失われている可能性が考えられた。

レプリコンシステムの確立

ウイルスの培養実験が行き詰まるなか、1999年に世界中のHCV研究者が注目する報告がなされた⁴⁾。ドイツのLohmannらによりHCVのサブジェノミックレプリコンが構築され、『*Science*』誌にその論文が掲載された。HCVのウイルスゲノム複製を増幅して観察するために、HCVゲノムの構造領域を取り除き、代わりにネオマイシン耐性遺伝子を挿入したcDNAを構築した。この構築からレプリコンRNAを試験管内で合成し、肝癌細胞であるHuh7細胞にエレクトロポレーション法で導入した。トランスフェクションした細胞をG418存在下で数週間培養し、生存した細胞内で

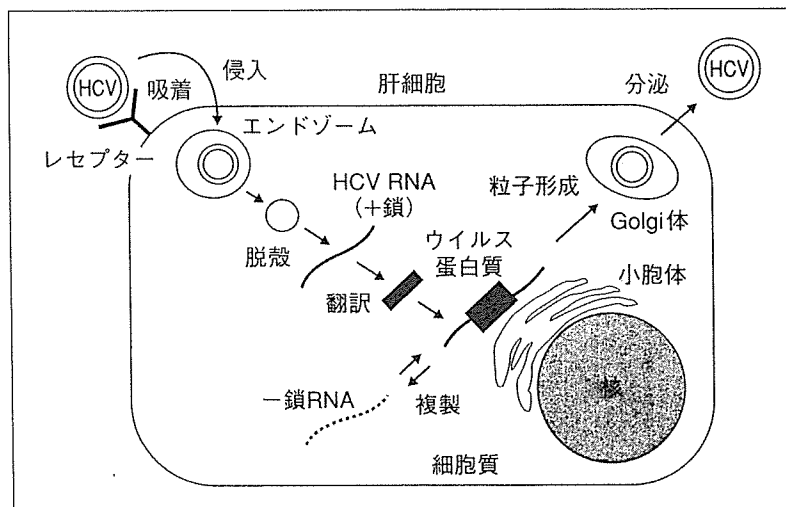


図 1 HCVの生活環¹²⁾

HCV レプリコンゲノムが複製していた。レプリコン細胞内のウイルス RNA の複製は $10^7 \sim 10^9$ コピー/ μg RNA 程度で、Northern blot で十分に検出できるだけのウイルス RNA が複製していた。このレプリコンを用いることにより、HCV ゲノム複製を容易に培養細胞で解析できるようになった。HCV 複製に対する薬剤感受性や、関与する宿主因子の同定が可能となった。しかし、レプリコンシステムによってウイルスの生活環の一部が解析可能であるが、ウイルスの感染過程やウイルス粒子の形成過程などは解析ができなかった(図 1)。

シュードタイプウイルス

一方、ウイルス感染の初期過程を解析する目的で、シュードタイプウイルスによる実験系が開発された^{7,8)}。レプリコンは細胞内でのウイルスゲノム複製に関する実験系であるが、ウイルス粒子の形成および分泌は観察できず、感染過程の解析はできなかった。そこで、ウイルスの感染初期過程においてウイルスと標的細胞の結合を解析するために、HCV の表面蛋白質をもつシュードタイプウイルスが開発された。HCV の表面蛋白質は ER retention signal をもつため、細胞表面には発現しない。このため VSV によるシュードタイプウイルスを作製する際には、E1, E2 蛋白が細胞表面に発現するようにした。この結果、感染には E1, E2 両方の表面蛋白質が必要であることが判明したが、CD81 の発現していない HepG2 細胞で感染可能であったため、CD81 非依存性の感染と考えられた。さらに、E1, E2 蛋白質を修飾せずに native なまま発現させ、レトロウイルスを用いてシュードウイルスが作製された。HCV の E1, E2 蛋白質をもつシュードウイルスは CD81 依存性の感染性を示した。CD81 を発現する Huh7 細胞には感染性があったが、CD81 を発現

しない HepG2 細胞には感染性を示さなかった。さらに、HepG2 細胞に CD81 を強制発現させた細胞は感染性を獲得した。さらに、スカベンジャーレセプターである SR-B1 が感染に重要であることが示された。

劇症肝炎患者由来のHCV株の解析

HCV が発見されてから分離されたウイルス株は、おもに慢性感染患者から得られた株であった。著者らは性質の異なるウイルス株を得る目的で、C 型肝炎ではまれな劇症肝炎患者から HCV の分離を試みた⁵⁾。B 型肝炎ウイルスにおいては劇症肝炎の集団発生があり、変異ウイルス株がその原因となる。C 型肝炎の場合は劇症肝炎の集団発生の報告はなく、劇症肝炎の発症にはウイルス側の要因よりも宿主側の要因による可能性が高い。しかし、急性肝炎や慢性肝炎とは異なる宿主環境において性質の異なるウイルス株が得られる可能性を考えた。実際に分離を試みた症例は 32 歳男性で既往歴はなく、急性肝障害により入院した。入院後血清 GPT 値は最高 6,970 IU/l に上昇し、プロトロンビン時間は 16% まで低下、II 度の肝性昏睡の症状を呈し、劇症肝炎と診断された。入院時の血清中のウイルスマーカーは HAV と HBV は陰性、HCV-RNA が陽性、HCV 抗体は陰性であった。入院後は安静と保存的治療のみで経過は順調であり、回復し退院した。HCV-RNA は陰性化し、HCV 抗体が陽性化したため、HCV 感染による劇症肝炎と診断された。

この患者の急性期の血清から RNA を抽出して RT-PCR 法により HCV 遺伝子を検出し、その一部の遺伝子配列を解析すると、この HCV 株は遺伝子型 2a に属していた(図 2)。遺伝子型 2a の既報配列をもとにして作成したプライマーで全長ゲノムを増幅した。PCR 産物は精製してクローニングし、塩基配列を決定した。

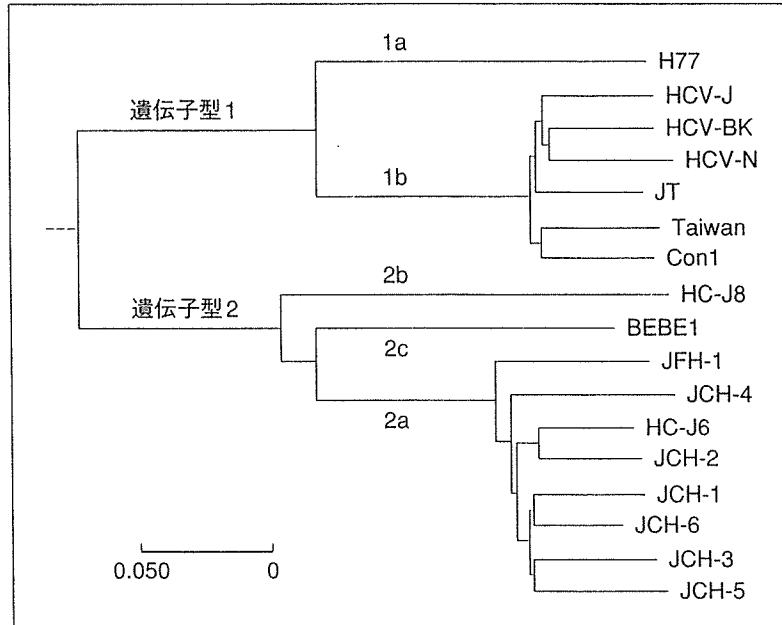


図 2 JFH-1株の分子系統樹(文献⁵⁾より改変)

このウイルス株を JFH-1 株と命名した。系統樹解析によって JFH-1 株の配列は慢性肝炎患者から分離した他の遺伝子型 2a のウイルス株の遺伝子配列のクラスターからやや離れたところに位置することがわかった(図 2)。また、JFH-1 株の特徴として遺伝子配列に変異が少なくモノクローナルであること、NS5A 領域の ISDR が変異型であった。

JFH-1株によるサブジェノミックレプリコン

この JFH-1 株を用いてサブジェノミックレプリコンを作成した⁹⁾。Lohmann らの方法をもとにしてレプリコン構築を作成し、試験管内でレプリコン RNA を合成した。合成した RNA を Huh7 細胞にエレクトロポレーション法で導入した。トランスフェクションした細胞を G418 存在下に数週間培養すると、コロニーが効率よく形成された。JFH-1 株のレプリコンは Lohmann らの報告した遺伝子型 1b の Con1 株のアダプト株よりも約 60 倍コロニー形成率が高いことがわかった。形成されたコロニーをクローニングしてレプリコン細胞として樹立して、G418 存在下で継代培養することができた。このレプリコン細胞中にはレプリコン RNA が持続的に複製し、ウイルス蛋白質が細胞内で発現していた。レプリコン細胞から RNA を抽出して、RT-PCR 法でレプリコン RNA を増幅してその塩基配列を解析した。複数のレプリコン細胞を解析したが、共通の変異はなく、一部の変異をレプリコンゲノムに導入するとコロニー形成効率が数倍に向上したが、Con1 株のレプリコンで見出された適合変異ほど劇的な向上ではなかった。また、JFH-1 株のレプリコン

の特徴として、合成したレプリコン RNA を細胞に導入すると G418 の選択培養なしでレプリコン RNA の自律複製が観察できた。

JFH-1株によるHCV RNA複製と感染性ウイルス粒子の産生

レプリコンの実験で、JFH-1 株は Huh7 細胞内で効率よく複製することがわかった。この性質を利用して全長ウイルスゲノムの複製を試みた⁶⁾。レプリコンの実験と同様に、全長の JFH-1 株のウイルスゲノムを試験管内で合成した。合成した RNA を Huh7 細胞にエレクトロポレーション法で導入した。トランスフェクションした細胞から RNA を抽出して Northern blot 法により HCV RNA の複製を検出した。トランスフェクション後、24 時間後より HCV RNA は効率よく細胞内で複製していた。同時に、トランスフェクションした細胞内でウイルス蛋白質が発現していることを Western blot 法や、免疫染色法により検出した。ウイルス蛋白質のなかでコア蛋白質はウイルス粒子のヌcleoキャプシドを形成すると考えられている。コア蛋白質の培養液中への分泌を高感度 ELISA 法で解析すると、コア蛋白質は HCV RNA が複製している Huh7 細胞から分泌されていることがわかった。ウイルス粒子が分泌されていることを確認するために、トランスフェクションした細胞の培養上清をショ糖密度勾配法で解析した。超速心後、分画中の HCV コア蛋白質量、HCV RNA 量を定量するとどちらも密度が約 1.15 g/ml の分画にピークがあった。さらに分画を濃縮して Western blot で解析すると、1.15 g/ml の分画に HCV

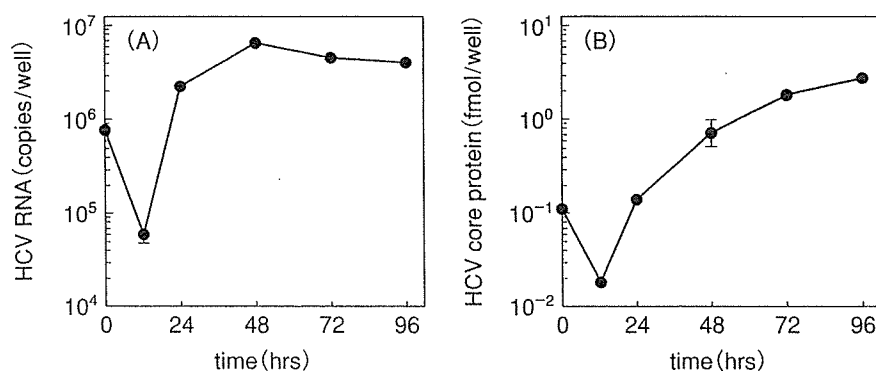


図3 ウイルス感染後の細胞内ウイルス量の変化(文献¹³⁾より改変)

RNA とコア, E1, E2 蛋白質が存在した. つまり, ウイルス粒子は培養液中に分泌されていたのである.

分泌ウイルス粒子の感染性

つぎに培養液中に分泌されたウイルス粒子の感染性を検討した. トランスフェクションした細胞の培養上清を遠心およびフィルターで濾過して細胞の断片などを取り除き, naïve な Huh7 細胞に接種した. 接種後 48 時間後に細胞を固定し, 抗 HCV 抗体で免疫染色を行った. するとごくわずかではあるが, HCV 抗原が細胞内に染色される細胞を認めた. 感染が成立した可能性があるが, 効率が非常に低いと考えられたため, ウイルスを含んでいる培養上清を限外濾過膜で濃縮して接種した. 濃縮したウイルス液を接種すると感染効率は向上し, 感染細胞が容易に検出できるようになったが, まだ 0.5% 程度の感染効率であった. また, 感染細胞内の HCV RNA と HCV コア蛋白質の変化を定量すると, 感染後いったん減少するが, 24 時間から 48 時間後に RNA も蛋白質も増加することが明らかとなった(図 3). この感染が HCV 特異的な感染経路によることを証明するために, HCV のレセプター候補分子である CD81 と HCV の表面抗原 E2 蛋白質の関与を検討した. CD81 の抗体と E2 に対する抗体はそれぞれ独立に感染を阻止することができた.

この結果から, 培養細胞から上清中に分泌されたウイルス粒子はウイルス特異的な感染経路で感染できることがわかった. 分泌されたウイルス粒子が“本物”であることを確認するために, チンパンジーを用いて感染実験を行った. トランスフェクションした細胞の培養上清を 1,000 倍希釈してチンパンジーに投与すると感染が成立した. このため, もとの培養上清中には少なくとも 1,000 chimpanzee infectious unit (CID) の感染性をもつウイルスが存在することがわかった. しかし, 感染は成立したが, 一過性のウイルス血清を認めたのみで, 組織的な肝炎や血清トランスアミナーゼ

値の上昇は認めなかった. また, 抗体反応も検出できなかった. したがって, JFH-1 株の本来の病原性についてはさらに検討する必要がある.

より感染効率のよい細胞による HCV 培養系

著者らの研究室で維持されている Huh7 細胞を用いると, 感染効率は 0.5% 程度であることを述べた. この感染細胞を継代培養しても感染が全体に広がることはなかった. より効率のよいウイルス培養系を樹立するために, レプリコン細胞の実験から樹立された Cured 細胞を用いた¹⁰⁾. Scripps 研究所の Dr. Chisari から分与された Huh7.5.1 細胞を用いると, 感染効率ははるかに向上し, ほぼ 100% の細胞に感染が広がり, また, 継代培養してウイルス感染が維持できることがわかった. 結局, 培養細胞において効率よく複製できる JFH-1 株と Cured 細胞を組み合わせることによって, HCV の培養系を樹立することができた^{10,11)}.

おわりに

HCV のウイルス培養ができなかったために困難だったウイルスの生活環の詳細な解析が可能となり(図 1), 分子レベルでの解明が進むことが期待できる. これはあらたな治療法やワクチンの開発に有用であるだけでなく, HCV の病原性や持続感染機構の解明にもつながることが期待できる.

文献

- 1) Choo, Q. L. et al. : *Science*, **244** : 359-362, 1989.
- 2) Tanaka, T. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **215** : 744-749, 1995.
- 3) Kolykhalov, A. A. et al. : *Science*, **277** : 570-574, 1997.
- 4) Lohmann, V. et al. : *Science*, **285** : 110-113, 1999.
- 5) Kato, T. et al. : *J. Med. Virol.*, **64** : 334-339, 2001.
- 6) Wakita, T. et al. : *Nat. Med.*, **11** : 791-796, 2005.
- 7) Matsuura, Y. et al. : *Virology*, **286** : 263-275, 2001.
- 8) Bartosch, B. et al. : *J. Exp. Med.*, **197** : 633-642,

- 2003.
- 9) Kato, T. et al. : *Gastroenterology*, **125** : 1808-1817, 2003.
- 10) Zhong, J. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102** : 9294-9299, 2005.
- 11) Lindenbach, B. D. et al. : *Science*, **309** : 623-626, 2005.
- 12) 脇田隆字 : 肝臓, **46** : 691-702, 2005.
- 13) Kato, T. and Wakita, T. : *Hepatitis C Viruses Genomes and Molecular Biology* (ed. by Tan, S.-L.). Horizon Bioscience, Norfolk, 2006, pp.451-464.

* * *

〔肝炎ウイルス〕

JFH-1株を用いたC型肝炎ウイルス研究の進歩

Recent advance in HCV research using JFH-1 clone



脇田隆字

Takaji WAKITA

国立感染症研究所ウイルス第二部

◎C型肝炎ウイルス(HCV)は慢性肝疾患の原因ウイルスであり、わが国には多くのウイルスキャリアが存在する。インターフェロンとリバビリンによる治療の効果は限定的で、あらたな治療法、予防法の開発が望まれている。培養細胞におけるウイルス培養系がないため、長い間、HCVの研究は困難であった。HCVレプリコンの開発はHCV研究進展に大きく寄与した。さらに、著者らが劇症肝炎患者から分離したJFH-1株を用いたウイルス培養系の開発により、HCV研究はあらたな段階を迎えている。HCVのウイルス学的研究が可能となりさまざまな研究が進行している。本稿ではJFH-1株の分離からその解析、JFH-1株を利用したHCVの研究について網羅的に記述する。




C型肝炎ウイルス, JFH-1, ウイルス培養, レプリコン

C型肝炎ウイルス(HCV)が1989年に発見され、輸血のスクリーニングが可能となった¹⁾。このためあらたなHCV感染者は激減した。しかし、HCVは感染者の多くに持続感染化するために、わが国にはいまだに100~200万人のHCVキャリアが存在すると考えられている。ヒト免疫不全ウイルス(HIV)は1983年に発見されて以来、多くの抗ウイルス薬が開発されその治療法も進歩してきている。しかし、HCVにはインターフェロンとリバビリンのみが抗ウイルス療法として使用されている。HCVに対する抗ウイルス薬の開発が遅れてきたのはHCVのウイルス培養系がないことが大きな原因であった。1999年にドイツのバーテンシュレージャー教授のグループがHCVレプリコン(「サイドメモ」参照)の実験系を報告して以来、HCVの基礎的研究は急速な進展を遂げてきている²⁾。著者らの研究グループは、C型肝炎患者ではまれな病態である劇症肝炎患者から遺伝子型2aのJFH-1株を分離して解析を続けてきた³⁾。JFH-1株は他の慢性肝炎から分離されたウイルス株と比べ、培養細胞における複製能力が非常に高い⁴⁾。JFH-1株

の、この性質を利用して培養細胞によるウイルス培養がはじめて可能となった⁵⁻⁷⁾。

本稿ではこのJFH-1株によるHCVに関する研究の進展を述べてみたい(表1)。

 JFH-1株の分離

32歳、男性の患者が急性肝機能障害で入院した³⁾。入院時より血清トランスアミナーゼ値は6,000~

 サイドメモ

レプリコン

HCVはRNAウイルスであり、感染細胞内で複製する場合、プラス鎖のRNAゲノムを鋳型としてマイナス鎖のRNAがつくられる。さらに、マイナス鎖のRNAを鋳型としてプラス鎖のRNAがつくられる。このサイクルをウイルスRNA複製とよび、またこの複製単位のことをレプリコンとよぶ。HCVの場合、全長ゲノムの複製が困難であったため、ウイルスゲノムの一部を取り除いた「サブジェノミックレプリコン」による複製の解析がドイツのグループにより開発され、HCVの研究に大きく寄与した。

表 1 JFH-1株を用いたHCV研究

研究内容	文献
1. ウイルス分離, 解析	3, 8)
2. レプリコンによる研究	4, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15)
3. ウイルス培養系の樹立	5, 6, 7, 16, 17, 18, 19)
4. 感染中和実験	5, 6, 7, 20)
5. キメラウイルスなど	6, 21, 22)
6. 感染初期過程の解析	23, 24, 25, 26, 27)
7. インターフェロンシグナル	28, 30, 31, 32)
8. 新規治療	15, 33)

7,000 IU/l と高値で、プロトロンビン時間は低値であった。入院後Ⅱ度の肝性昏睡を発症して劇症肝炎と診断された。この患者には肝疾患の既往症はなく、輸血歴もなかった。A型、B型肝炎ウイルスマーカーは陰性であった。入院時の血清で、HCVに関しては抗体陰性であるが、HCV RNAが陽性であった。保存的治療により病態は改善し、ウイルスは陰性化し、HCVに対する抗体は陽性となった。この経過からHCVによる劇症肝炎と診断された。この患者の急性期の血清からRNAを抽出してウイルスRNAをRT-PCR法により増幅し、クローニングしてウイルスゲノムの全塩基配列を決定した。このウイルス株をJFH-1株と命名した。ウイルスゲノムの解析からJFH-1株は遺伝子型2aに属することが明らかとなったが、慢性肝炎から分離された他の遺伝子型2aのウイルス株の遺伝子配列とすこし異なっていた。この変異を詳細に検討すると、5'UTR、コア、NS3、NS5A領域の遺伝子がとくに変異が多いことが明らかとなった。また、JFH-1株の特徴としてはE2遺伝子にある超過変域領域(HVR1)の変異が少なく、モノクローンであることや、NS5A遺伝子にあるインターフェロン感受性決定領域(ISDR)が変異型であることであった³⁾。

JFH-1株のコア蛋白質発現

JFH-1株の遺伝子解析からさまざまなウイルス遺伝子領域の変異が明らかとなったが、その当時はウイルス培養系がなく、またウイルス遺伝子解析の方法も限られていた。そこで、HCVコア蛋白質に注目した。HCVコア蛋白質はウイルスのヌクレオキャプシドを形成すると考えられており、さらに、感染細胞内でさまざまな機能を発揮して発

癌などにも関与することが示唆されていた。JFH-1株のコア領域遺伝子をよく解析してみるとC末端領域に変異が多いことがわかる。この領域はコア蛋白質のプロセッシングに重要であることが報告されていた。そこで、試験管内翻訳系と培養細胞でのトランスフェクション実験系を用いて、JFH-1株とその他の慢性肝炎患者から分離した遺伝子型2aのHCV株を用いてコア蛋白質のプロセッシングについて解析した⁸⁾。その結果、JFH-1株は他のウイルス株に比べて効率よくコア蛋白質のp21を発現した。p21はコア蛋白質の成熟型と考えられている。この効率のよいp21の発現にはJFH-1株のコア蛋白質領域のアミノ酸配列が重要であることがわかった⁸⁾。

サブジェノミックレプリコン

前述のとおりHCVレプリコンが1999年に報告された²⁾。この発表はHCV研究の大きな転換点となった。この研究により、これまで困難だった培養細胞でのHCV RNAの複製が可能となった。HCV複製機構の解析などが一気に進行した。しかし、HCVレプリコンで解析可能なウイルス株は遺伝子型1の一部のウイルス株に限られていた。そこで著者らは遺伝子型2aのJFH-1株のサブジェノミックレプリコンの作成を試みた⁴⁾。ウイルスcDNAの構造領域を取り除き、ネオマイシン耐性遺伝子とEMCV IRESを挿入した。この構築から試験管内でレプリコンRNAを合成し、そのRNAをHuh7細胞にエレクトロポレーション法によって導入した。RNA導入後にG418による選択培養を行った。導入したRNAが自律的に複製している細胞のみが生存してコロニーを形成する。コロニー形成能はレプリコンRNAの複製効率に依存する

と考えられている。この実験より JFH-1 株のレプリコンはこれまで報告されたレプリコンよりもコロニー形成能が高いことがわかった。さらに、これまでの HCV レプリコンは Huh7 細胞内で効率よく複製するためには適合変異が必要であることが報告されていたが、JFH-1 株のレプリコンでは適合変異は必要でなかった⁴⁾。興味深いことに JFH-1 株は Huh7 細胞だけでなく、HuH-6、HepG2、IMY、HeLa、293 細胞などさまざまな培養細胞で複製可能であり、肝由来以外の細胞でも複製可能である⁹⁻¹¹⁾。したがって、すくなくとも JFH-1 株では肝特異的な宿主因子はウイルス RNA 複製に必須ではないと考えられた。

サブジェノミックレプリコンの実験系は抗ウイルス薬のスクリーニングに有用であると考えられる。G418 の選択培養により樹立されたレプリコン細胞を用いて薬剤感受性試験を試みた。インターフェロンの作用はウイルス株によって異なるようであるが、ウイルス RNA の複製効率によってもインターフェロンの効果は異なる可能性があると考えられた¹²⁾。クローニングによるバイアスやレプリコン細胞樹立に必要な時間などを考慮すると一過性複製系による試験がより適している。JFH-1 レプリコンのネオマイシン耐性遺伝子をルシフェラーゼ耐性遺伝子に置き換えたレプリコンを作成した^{13,14)}。このレプリコンから合成した RNA を Huh7 細胞に導入すると、24~48 時間後にレプリコン RNA の複製が起こり、ルシフェラーゼ活性の上昇が観察できる。この実験系を利用してインターフェロンとリバビリンの抗ウイルス効果を解析した。インターフェロンおよびリバビリンはともに単独で抗ウイルス作用を示したが、リバビリンは臨床的濃度ではその作用は弱かった。しかし、インターフェロンとリバビリンを同時に投与するとリバビリンの臨床的濃度においても抗ウイルス作用の増強がみられた。したがって、リバビリンは弱いながらもウイルス複製を直接抑制する作用があると考えられた¹³⁾。また最近、シクロスポリンの抗 HCV 作用が報告されている。JFH-1 のサブジェノミックレプリコンによってシクロスポリンが遺伝子型 2a の HCV にも抗ウイルス作用をもつことが報告された。しかし、その作用機序が遺

伝子型によって異なることが報告された¹⁵⁾。

ウイルス培養系の樹立

はじめに述べたように、HCV のウイルス培養系がないことが HCV 研究の大きな問題点であった。サブジェノミックレプリコンの研究から JFH-1 株の複製効率が高いことが判明し、この JFH-1 株の全長遺伝子または JFH-1 株と J6CF 株とのキメラ遺伝子を用いて感染性ウイルスの作製が試みられた⁵⁻⁷⁾。試験管内で合成したウイルス全長 RNA を Huh7 細胞にエレクトロポレーション法で導入すると、ウイルスゲノムが自律的に複製して細胞外へ感染性のウイルス粒子を分泌した。ウイルス粒子は、比重が 1.15~1.17 g/ml、直径が 55~60 nm であった。Huh7 細胞に CD81 分子および E2 蛋白質依存的に感染した。さらに、培養細胞から分泌されたウイルス粒子はチンパンジーに感染性があることが確認できた⁵⁾。JFH-1 株が劇症肝炎患者から分離されたウイルス株であることから、チンパンジーにおける病原性が注目されたが、JFH-1 株ではほとんど病原性を示さず、一過性のウイルス血症を示したのみであった。また、J6/JFH-1 のキメラウイルスの感染でも JFH-1 に比べウイルス血症はやや長期に及ぶものの、やはり肝障害はほとんど示さなかった¹⁶⁾。培養細胞から得られたウイルス粒子はヒト肝細胞を移植されたキメラマウスに対しても感染性を示した。興味深いことに培養細胞から得られるウイルス粒子とチンパンジーやキメラマウス感染後に血液中に分泌されたウイルス粒子は、その密度が変化することが報告された¹⁶⁾。JFH-1 株の病原性と培養細胞における複製能力の関係は今後もさらに検討する必要がある。また、培養細胞で得られた感染性 HCV 粒子の Huh7 細胞に対する感染性は使用する Huh7 細胞により大きく異なり、なかでも Huh7.5 細胞や Huh7.5.1 細胞などの、レプリコン複製の感受性が高い細胞で非常によく感染増殖した^{6,7)}。これらの細胞においては RIG-I 分子の変異があり、インターフェロニンシグナルの一部が欠損していることが報告されていて¹⁷⁾、ウイルス複製の感受性には細胞内インターフェロニンシグナル伝達系が重要であることを示唆している。また、感染性ウイルス

を持続的安定的に産生する細胞を作製するための試みとして、ウイルス cDNA を哺乳細胞用のプロモーターの下流に挿入して、ウイルスゲノム末端はリボザイムでトリミングするように設計された構築を作製した。この構築を Huh7 細胞にトランスフェクションして薬剤耐性マーカーにより安定的にウイルス RNA が培養細胞内で転写、複製する系が構築された¹⁸⁾。HCV は RNA ウイルスなので、感染を継続していく間にゲノムに変異が蓄積していくが、cDNA からウイルスゲノムが転写されるためにウイルスゲノムに変異が入りにくい特徴がある¹⁸⁾。また、不死化した肝細胞に JFH-1 株の全長 RNA をトランスフェクションすることにより感染性ウイルス粒子を回収できた¹⁹⁾。

ウイルス感染の中和

HCV の感染中和実験は JFH-1 株による感染実験系ではじめて可能となった。HCV のレセプター分子候補のひとつである CD81 に対する抗体で感染が中和できた⁵⁻⁷⁾。さらに、HCV の E2 蛋白質に対するモノクローナル抗体で感染中和が可能であった^{6,7)}。とくに E2 のモノクローナル抗体の AP33 と 3/11 に関してはそのエピトープも解析された²⁰⁾。感染中和実験においては異なるウイルス株や異なる遺伝子型のウイルスに対する中和活性の解析が重要である。次項でその詳細について記述する。

異なるウイルス株の構造領域遺伝子によるキメラウイルスと H77 株による感染性ウイルス粒子作製の試み

Lindenbach らは J6CF 株および H77c 株のコアから NS2 領域遺伝子と JFH-1 株の NS3 から 3' 末端までによるキメラウイルス遺伝子を作製した (FL-J6/JFH および FL-H77/JFH)。H77/JFH では感染性のウイルスが得られなかったが、J6/JFH では感染性のウイルスが得られた⁶⁾。Pietschmann らはキメラウイルス遺伝子を作製するときに NS2 の途中に至適のつなぎ目があることを見出して、H77 株 (遺伝子型 1a)、Con1 株 (遺伝子型 1b)、J6 株 (遺伝子型 2a)、452 株 (遺伝子型 3a) と JFH-1 株とのキメラウイルス遺伝子を作製して、それぞれから感染性ウイルスを回収した²¹⁾。さらに、これまで

レプリコンとしては複製可能だった Con1 株や H77 株は全長ウイルス遺伝子を複製させても感染性ウイルス粒子が分泌されなかった。しかし、Yi らは、H77 株のレプリコン細胞を解析して得た適合変異を全長遺伝子に挿入することにより JFH-1 株と比べると効率が悪いものの、感染性ウイルス粒子が分泌されることを見出した²²⁾。これらのキメラウイルスや H77 株の感染性ウイルス粒子は感染中和に共通のエピトープが存在するかどうかが重要であり、Yi らは患者血清の解析から JFH-1 と H77 は異なる血清型である可能性を示唆した²²⁾。しかし、Pietschmann らはウイルスの E1 蛋白質に対する抗体がすべてのキメラウイルスに対して感染中和活性をもつことを示した²¹⁾。すべてのウイルス株に対して共通の血清型がみつければ、ワクチン開発に大きな希望をもつことができる。今後の解析が待たれるところである。

ウイルスの感染初期過程の解析

HCV の感染初期過程の解析はこれまでシュードタイプウイルスを用いて解析されてきた。しかし、感染性ウイルス実験系が樹立されてその解析が進行し、あらたな知見が得られている。同じフラビウイルス科に属するデングウイルスなどの解析から、HCV は細胞表面に吸着後エンドサイトーシスで細胞内のエンドソームに取り込まれ、pH 依存性に細胞質へ脱核すると考えられていた。Tscherne らは実際に感染性ウイルスが低 pH 依存的に細胞内へ侵入することを明らかにした²³⁾。Blanchard らは HCV のエンドサイトーシスがクラスリン依存性であることと pH 依存性であることを示した²⁴⁾。また、Koutsoudakis らはウイルス粒子の細胞表面への吸着と感染には glycosaminoglycan および CD81 分子が重要であることを報告している²⁵⁾。また、high density lipoprotein (HDL) のレセプターである scavenger receptor BI (SR-BI) は HCV 感染のコファクターと考えられており、E2 に対する抗体の感染中和活性が HDL と SR-BI の結合により阻害されることが報告されている²⁶⁾。また、SR-BI のリガンドのひとつである oxidized low-density lipoprotein が感染性ウイルス粒子の感染を阻害することが報告された²⁷⁾。しかし、oxidized low-den-

sity lipoprotein は E2 蛋白質の SR-BI および CD81 への結合を直接阻害しているわけではなく, HCV 感染における SR-BI の役割に関しても今後の解析が重要である。

ウイルス感染と細胞内インターフェロンシグナル

サブジェノミックレプリコン細胞による解析では interferon regulatory factor 1 (IRF-1) の発現により JFH-1 の複製が制御されることが報告された²⁸⁾。持続感染するウイルスは感染細胞の抗ウイルス作用から逃れる必要がある。HCV のような一本鎖 RNA ウイルスの場合, 二本鎖 RNA が複製中間体となる。宿主細胞には二本鎖 RNA を感知するシステムがある²⁹⁾。細胞内の二本鎖 RNA センサーである RIG-I の発見以降この分野は急速に進展しているが, RIG-I から IRF-3 に至るシグナルが HCV 感染細胞では阻害されていることが報告された。RIG-I の下流の分子として MAVS/IPS-1/Cardif が発見され, HCV 感染細胞内で, この MAVS/IPS-1/Cardif が HCV の NS3 プロテアーゼにより切断, 不活性化されることが報告された³⁰⁻³²⁾。つまり HCV が感染細胞内で持続感染を成立させている機構が解明されつつある。この研究は HCV に対する治療法を考慮するうえでも重要と考えられる。NS3 プロテアーゼに対する阻害剤はウイルス複製を抑制するだけでなく, 感染細胞のインターフェロンシグナルを正常に戻すことも期待できるのである。

HCV新規治療に関する研究

JFH-1 株を用いた, 新規治療法の開発に関しては, サブジェノミックレプリコンの項で述べたシクロスポリンについて感染性ウイルスに対してもシクロスポリンの誘導体が有効であることの報告があるが³³⁾, まだその他の薬剤については報告されていない。現在, NS3 プロテアーゼ阻害剤, NS5b ポリメラーゼ阻害剤など多くの新規抗ウイルス薬が開発中なので, それらの薬剤を用いた研究も近く報告されることが期待される。また, これまで薬剤の開発の標的とすることが困難であった, ウイルスの感染過程やウイルス粒子の分泌過程などに対するあらたな治療法の開発もおおいに期待で

きる。

おわりに

JFH-1 株によるレプリコンおよびウイルス培養系の確立により, HCV 研究はあらたな段階に進むことができた。これまで困難であった HCV のウイルス学的研究が可能となった。ウイルスの生活環を分子レベルで解析して, HCV が持続感染化して慢性肝炎から肝硬変, 肝癌を引き起こすメカニズムを明らかにしていくことが重要である。HCV の基礎研究の進展により C 型肝炎キャリアに対するより有効な治療法が一日も早く開発されることを望んでいる。

文献

- 1) Choo, Q. L. et al. : *Science*, **244** : 359-362, 1989.
- 2) Lohmann, V. et al. : *Science*, **285** : 110-113, 1999.
- 3) Kato, T. et al. : *J. Med. Virol.*, **64** : 334-339, 2001.
- 4) Kato, T. et al. : *Gastroenterology*, **125** : 1808-1817, 2003.
- 5) Wakita, T. et al. : *Nat. Med.*, **11** : 791-796, 2005.
- 6) Lindenbach, B. D. et al. : *Science*, **309** : 623-626, 2005.
- 7) Zhong, J. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102** : 9294-9299, 2005.
- 8) Kato, T. et al. : *J. Med. Virol.*, **69** : 357-366, 2003.
- 9) Windisch, M. P. et al. : *J. Virol.*, **79** : 13778-13793, 2005.
- 10) Date, T. et al. : *J. Biol. Chem.*, **279** : 22371-22376, 2004.
- 11) Kato, T. et al. : *J. Virol.*, **79** : 592-596, 2005.
- 12) Miyamoto, M. et al. : *Intervirology*, **49** : 37-43, 2006.
- 13) Kato, T. et al. : *J. Clin. Microbiol.*, **43** : 5679-5684, 2005.
- 14) Targett-Adams, P. et al. : *J. Gen. Virol.*, **86** : 3075-3080, 2005.
- 15) Ishii, N. et al. : *J. Virol.*, **80** : 4510-4520, 2006.
- 16) Lindenbach, B. D. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103** : 3805-3809, 2006.
- 17) Sumpter, R. Jr. et al. : *J. Virol.*, **79** : 2689-2699, 2005.
- 18) Cai, Z. et al. : *J. Virol.*, **79** : 13963-13973, 2005.
- 19) Kanda, T. et al. : *J. Virol.*, **80** : 4633-4639, 2006.
- 20) Tarr, A. W. et al. : *Hepatology*, **43** : 592-601, 2006.
- 21) Pietschmann, T. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103** : 7408-7413, 2006.
- 22) Yi, M. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103** : 2310-2315, 2006.
- 23) Tscherne, D. M. et al. : *J. Virol.*, **80** : 1734-1741, 2006.
- 24) Blanchard, E. et al. : *J. Virol.*, 2006. (in press)
- 25) Koutsoudakis, G. et al. : *J. Virol.*, **80** : 5308-5320, 2006.
- 26) Dreux, M. et al. : *J. Biol. Chem.*, 2006, May 4. (Epub ahead of print)
- 27) von Hahn T. et al. : *Hepatology*, **43** : 932-942, 2006.
- 28) Kanazawa, N. et al. : *J. Virol.*, **78** : 9713-9720, 2004.
- 29) Yoneyama, M. et al. : *Nat. Immunol.*, **5** : 730-737,