

3D細胞培養系を用いた患者血液由来HCV培養

土方 誠^{*1,*2} アリ・ハッサン・フセイン^{*1} 下遠野 邦 忠^{*3,*4}

索引用語：C型肝炎ウイルス，不死化肝細胞，感染，自然免疫，立体培養

1 はじめに

C型肝炎ウイルス(HCV)は1989年に輸血後非A非B型慢性肝炎の主要な原因ウイルスとして発見された。それまで長い間輸血後非A非B型慢性肝炎の原因ウイルスを同定する努力がなされてきていたが、従来の古典的なウイルス学的手法では実現されなかった。そこでこのウイルスは分子生物学的手法によってまずそのゲノムRNAに対するcDNAがクローニングされ、疫学的な検証によって疾患の原因ウイルスであることが確認された。cDNAを発現させたウイルス抗原を用いることにより輸血用血液に存在するウイルスに対する抗体の検査が可能になり、輸血による感染予防が可能になった。しかしながら、現在世界人口の約3%にも及ぶ既感染者が存在すると推定されており、感染者は慢性肝炎から肝硬変そして肝癌へと進行する可能性が高いので大きな社会問題となっている。インター

フェロンとリバビリンを用いた最新の治療法はインターフェロンによる治療が開始された初期のころに比較して格段に治療効果があがっているものの、著効率は50%程度ではないために、新たな抗HCV治療薬の開発が切望されている。抗HCV薬剤開発が期待されたほど進まなかった理由のひとつは培養細胞を用いた効率の高いHCV増殖系が存在しなかったため、ウイルス学的な研究が困難であったことにある。しかしながら、近年多くの研究者の努力によって効率の高いHCV増殖系が開発が進み、それまで得られなかったHCVの生活環に関する情報が得られ始めている。本稿では培養細胞を用いたHCV増殖系を概説し、われわれが新たに開発を進めている患者血液由来のHCVが感染増殖する細胞培養系について紹介する。

2 培養細胞を用いたHCVの増殖系

先に述べたように、HCVはウイルス遺伝

Makoto HIJIKATA *et al* : Proliferation of blood-borne HCV in the 3D cell culture system

*1 京都大学ウイルス研究所 [〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53]

*2 京都大学大学院生命科学研究所 *3 慶応義塾大学医学部総合医科学研究センター

*4 千葉工業大学附属研究所

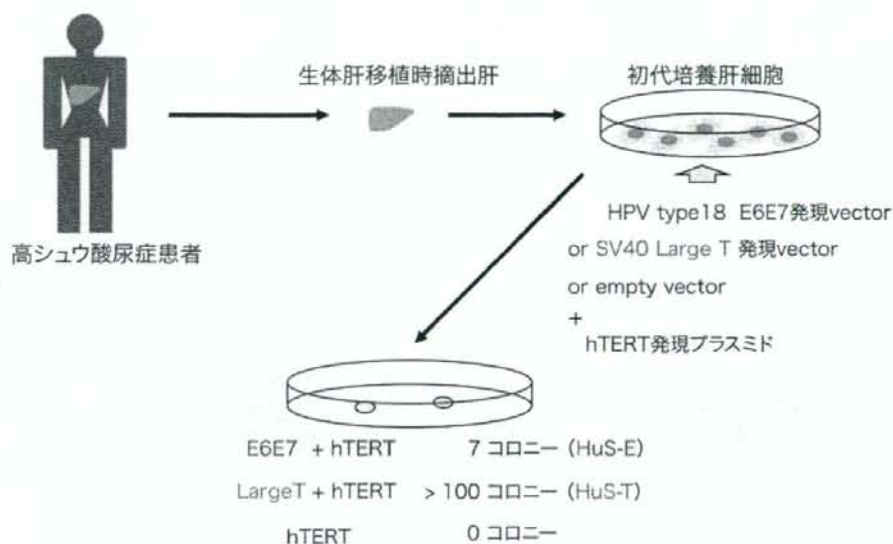


図1 新たなヒト不死化肝細胞の樹立

生体肝移植患者からの摘出肝を用いて作成した初代培養肝細胞にヒトパピローマウイルス(HPV) E6E7 遺伝子あるいはシミアンウイルス 40 (SV40) T 抗原遺伝子の発現ベクターをヒトテロメラーゼ(hTERT) 遺伝子発現ベクターと共に導入し、増殖しコロニーを形成する細胞株を得た。E6E7 あるいは SV40T 抗原導入によって得られた不死化細胞をそれぞれ HuS-E そして HuS-T と命名した。

子のクローニングからみいだされたウイルスであったため、ウイルス学の研究に必須である培養細胞を用いた効率の良い感染増殖実験系が存在しなかった。多くの研究者によって培養細胞を用いたウイルス増殖系の樹立が試みられてきたが、最近になるまで効率の良い感染増殖系は得られなかった。しかし、1999年にドイツのグループによって培養細胞内で部分RNAゲノムが複製し、維持されるといういわゆる、レプリコン複製細胞実験系が開発されたことでウイルス増殖反応の一部であるRNAゲノム複製に関する実質的な研究が可能になった¹⁾。しかしながら、この実験系にゲノム長のRNAを用いた場合でも感染性の粒子産生がみられなかった。2005年に当時東京都神経科学総合研究所の脇田らによって、劇症肝炎患者由来の血液からクローン化されたHCV遺伝子(JFH-1)を用いて感染性組

換え体HCVの産生系が開発された²⁾。この実験系ではJFH-1ゲノムRNAを試験管内で合成し、これを肝癌由来細胞であるHuH-7細胞に導入することで、感染性を有するHCV粒子が産生されるというものである。この感染性粒子をHuH-7の亜株であるHuH-7.5細胞やHuH-7.5.1細胞に感染させると、これらの細胞への感染が認められる³⁾。この組換え体HCV産生系は感染と増殖、感染性粒子産生などの基礎研究に有用な実験系である。しかし、患者血液に由来するHCVを感染源として用いてHuH-7細胞に感染させても効率良く感染、複製することはなく、また感染性粒子の産生も認められない⁴⁾。

3 新たなヒト不死化肝細胞の樹立

これまで患者血液に由来するHCVの感染増殖実験に用いられてきたのはヒト肝癌由来

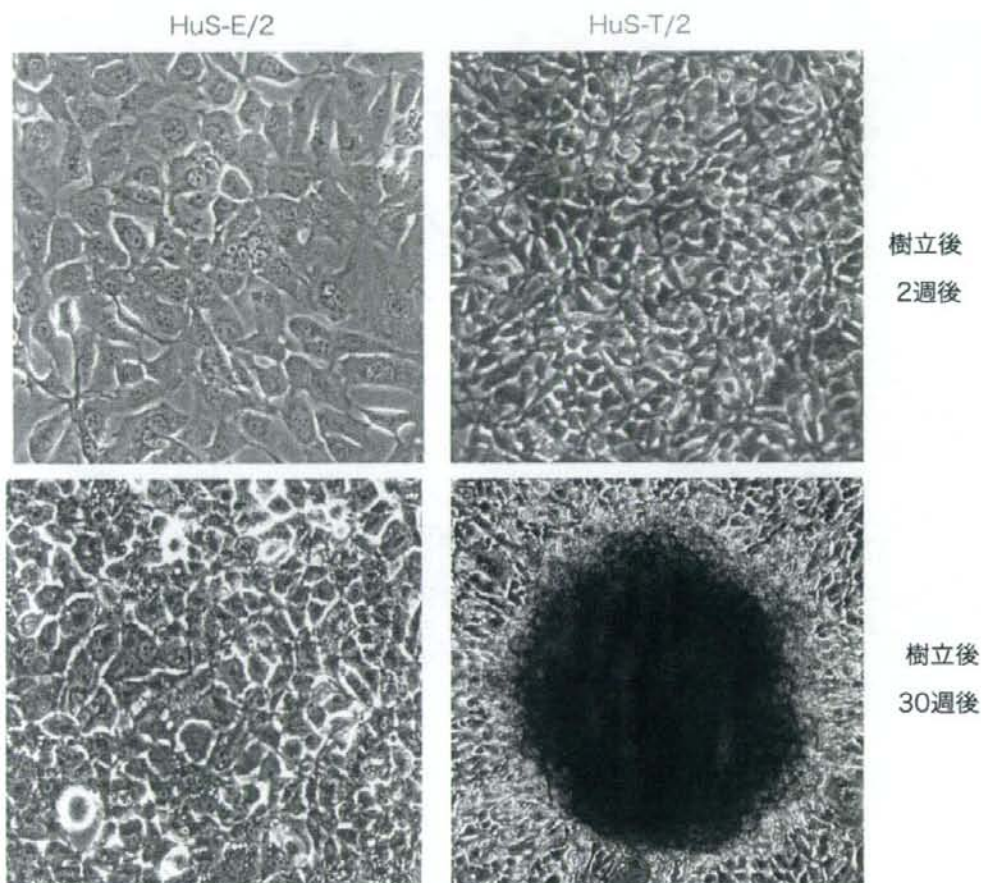


図2 新たなヒト不死化肝細胞の形態

細胞樹立2週後と30週後におけるHuS-E/2細胞とHuS-T/2細胞の形態を比較した。HuS-T/2細胞は樹立後2週間で大きさが小型になり、30週後には細胞塊を形成することがわかる。HuS-E/2細胞はHuS-T/2細胞ほど大きな変化は認められない。

細胞あるいはヒト不死化肝細胞である。上記JFH-1の感染増殖実験にはこのような細胞が用いられている。日本に広く蔓延していて、感染後慢性化する確率が高く、またインターフェロン治療に抵抗性を示すことの多い遺伝子型1bに属するHCVはどのように肝細胞に感染し増殖するのか、また感染後に細胞内でどのようなウイルスと細胞の相互作用が起こるのか、上記組換え体HCVの実験系からは確実な情報を得ることはできない。そこで本

来HCVが感染し増殖する宿主細胞であるヒト肝細胞の性質をできるだけ維持しているヒト不死化肝細胞の作成を試みた。これまで多くのヒト不死化肝細胞株が樹立されているがそのほとんどはサルのウイルスであるシミアンウイルス40 (SV40)のT抗原を細胞の不死化させるために使用している。T抗原による細胞不死化機構についてはこれまでに良く研究されていて、癌抑制遺伝子であるretinoblastoma (RB) 遺伝子産物とp53遺伝子産物

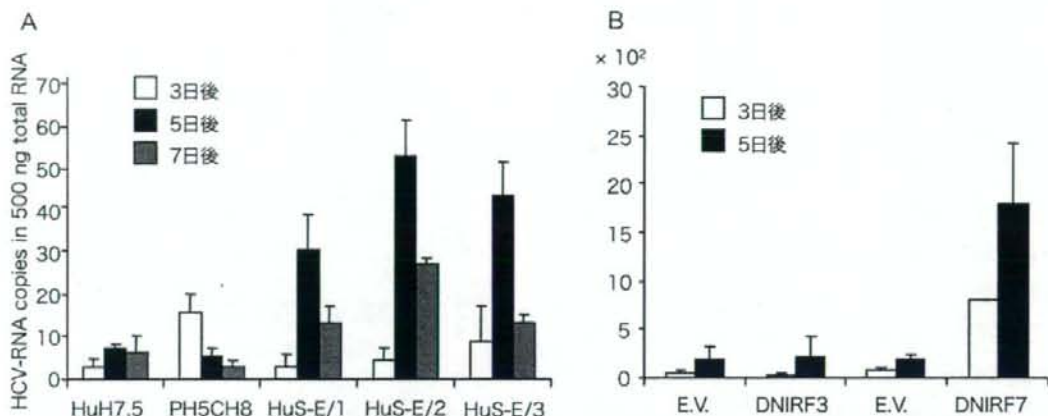


図3 HuS-E細胞の血清由来HCV (遺伝子型1b)の感染増殖性

HuS-E細胞の3種の細胞株と他の肝由来細胞PH5CH8細胞そしてHuH7.5細胞における血清由来HCVの感染増殖性と比較した(A)。またHuS-E/2細胞にドミナントネガティブ変異体IRF3(DNIRF3)あるいはIRF7(DNIRF7)発現プラスミドを導入したものにおける血清由来HCVの感染増殖性を比較した(B)。E.V.は空の発現ベクター導入細胞を示す。感染実験は細胞数 1×10^6 に対してHCVゲノムRNAコピー数が 1×10^8 コピーを含む量の血清を培地に加えて行った。血清添加後、細胞を良く洗浄し、経時的に細胞から全RNAを単離し、HCV-RNAをリアルタイムRT-PCR法で定量した。

の機能抑制を引き起こすことが知られている。ただ染色体への結合による染色体不安定化の機能も報告されていることからこのT抗原によって不死化された細胞はその形質が不安定になる可能性が考えられた。そこでわれわれはT抗原の代わりにヒトパピローマウイルスのE6E7遺伝子をヒト肝細胞の不死化のために用いることにした。このE6E7遺伝子はT抗原同様にそれぞれp53とRBの機能を抑制するが、各種組織由来の細胞で比較的良く元の組織の形質を保存したまま不死化することが可能であると報告されていたからである^{5,6)}。そこでまず京都大学医学部付属病院の移植外科との共同研究を行い、生体肝移植患者からの摘出肝から初代培養肝細胞を得て、これにE6E7発現プラスミドならびにヒトテロメラーゼ遺伝子発現プラスミドを導入し、その不死化を試みた⁴⁾。図1に示すよう

に同時T抗原発現ベクターを用いた不死化実験も同時に行ったが、得られた不死化細胞のコロニー数はT抗原の100コロニー以上に比べて、E6E7では7コロニーとその効率は著しく低かった。しかしながら、1カ月ほど培養を続けるとT抗原で不死化した細胞は形態が一定でなく大きさも小さくなり、明らかに初代培養肝細胞とは異なり、形態の変化が明らかになった(図2)。一方、E6E7で不死化した細胞(HuS-E細胞と命名)は30日後でも初代培養肝細胞と同様の形態を示した。このことは肝細胞特異的発現を示すことが知られている遺伝子群に関してその発現を検証した場合でも同様だった。E6E7で不死化した細胞はT抗原で不死化した細胞(HuS-T細胞と命名)に比べて長期間の培養後にも初代培養肝細胞と同様の発現パターンを示していることが分かった⁴⁾。そこでこの細胞と患者血清

を用いたHCV感染実験を行い、そのHCV感染増殖性について検討した。図3Aに示すように血清を細胞の培養液に加えて1日後、細胞を洗浄後新たな培地で3日、5日、7日間培養した。その後、細胞から全RNAを回収してその中のHCV-RNA定量し、その経時変化を検討した。HuS-E細胞は株間で多少の相違はあるが、他の肝由来細胞株と比較して数倍から5倍程度安定した感染増殖が認められた⁴⁾。その中でも一番感染増殖能が高かったHuS-E/2細胞株をそれ以降主にHCV感染増殖研究のために使用することにした。

4 自然免疫系修飾によるHCVの感染増殖効率の改良

上記のようにHuS-E/2細胞は初代培養肝細胞に比較的類似した形質をもつ細胞であることから、この細胞は自然免疫機能も正常に機能していると考えられる。そこで細胞内のインターフェロン(IFN)シグナリング経路の中で重要な機能を持つ転写因子であるインターフェロン調節因子(interferon regulatory factor, IRF) 3と7の機能を抑制した時にHCVの増殖が亢進するかどうかを検討した⁴⁾。そのためにまずそれぞれの転写因子に対するドミナント・ネガティブ型(DN)分子を作成し、これをHuS-E/2細胞中で一過性に発現させてから血清由来HCVを感染させた。各DN分子はそれぞれの分子の転写活性化領域を欠失させたものを用いた。この分子を発現する細胞では内在性の野生型分子と二量体を形成し、その転写活性化能を抑制すると考えられる。図3Bに結果を示すようにIRF3のDN分子はHCV感染に対して期待した効果を示さなかったが、IRF7のDN分子を発現させると著しくHCVの感染増殖が亢進した。IRF7に対するsiRNAを用いて本タン

パク質の発現を抑制した場合にも、IRF7のDN分子を用いた時と同様の効果が観察された。以上から血清由来HCVの培養細胞への感染は自然免疫系を誘導し、それによってHCVの増殖が抑制されることがわかった。またその抑制機能にはIRF7が重要な役割を担っていることが示唆された。

5 3D細胞培養系によるHCV感染性粒子産生

HuS-E/2細胞は別の細胞を用いて解析された血清由来HCVの感染増殖系に比べて、その効率は安定して高いことがわかった。しかしながら、培養上清中にはHCV RNAが全く検出されず、上清中に感染性HCVは認められなかった。HCVのヒトにおける主たる感染標的細胞はもちろん肝細胞であると考えられる。肝臓は他の組織と同様に極めて機能的に構成された組織であり、肝細胞は其中で立体的に整然と配置されている。したがって、そのように立体的に配置された肝細胞が本来の形質を持ち、そのことがHCVの感染、特に感染性粒子産生に極めて重要な役割を果たしていることが想像される。実際にRadial-Flow Bioreactor (RFB)と呼ばれる人口肝臓のモデルシステムに肝癌由来細胞であるFLC4細胞を充填し、これを3次元(3D)培養することで血しょう由来のHCVが感染増殖し、システムを循環する培養液中にHCV RNAが検出されることが報告されている⁷⁾。また、既にチンパンジーを用いて感染性HCV産生能が確認されている遺伝子型1aのHCV RNAゲノムをこのRFB培養した培養細胞に導入することによってその培養液中に、別に準備したRFB培養細胞へ2次感染することが可能な感染性粒子が産生されることが示されている⁷⁾。またRFBを用いた3D培養で

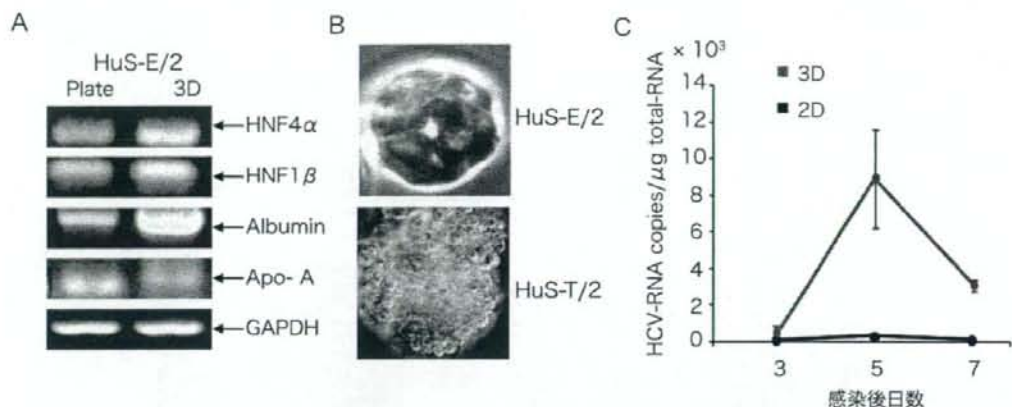


図4 TGPを用いた3D培養HuS-E/2細胞の血清由来HCV（遺伝子型1b）の感染増殖性 TGPを用いて3D培養したHuS-E/2細胞における肝臓特異的発現遺伝子の発現を通常の2D培養したものと同様にRT-PCR法によって比較した(A)。TGPを用いて3D培養したHuS-E/2細胞とHuS-T/2細胞の形態を比較した(B)。TGPを用いて3D培養したHuS-E/2細胞と2D培養したものにおける血清由来HCVの感染増殖性と比較した(C)。感染の解析は図3と同様に行った。

は感染性粒子産生が認められなかった上記ゲノム長のレプリコン複製細胞を培養することで感染性HCVの産生が認められるようになってくる⁸⁾。同様の現象はRFBだけでなく温度可逆性ゲル化ポリマー（Thermoreversible gelation polymer; TGP）を用いてポリマーゲル中で細胞培養をした場合にも観察されている⁸⁾。これらの結果は3D培養が培養細胞からのHCV粒子産生に非常に有用であることを示している。

6 簡便な3D細胞培養系を用いた血清由来HCV感染増殖系の構築

われわれは上記のように通常の培養ディッシュを用いた2次元(2D)培養においても比較的効率良い血清由来HCVの感染増殖が観察されたHuS-E/2細胞を3D培養することで感染性粒子の産生が可能になると考えた。まず特殊な装置を必要とせず、小規模の細胞培養系であり、ウイルスが感染した細胞の解析にも使用可能と考えられた上記TGP培養系

を用いて3D培養を行った。図4Aに示すように肝臓特異的に発現しているアルブミン遺伝子などの発現をRT-PCR法を用いて解析したところ、3D培養した場合に2D培養した時に比較して著しくその発現が誘導されることがわかった。また、HuS-E/2細胞はTGP培養系で培養していくと図4Bで示すようにシスト様の構造を形成し、ランダムに細胞増殖をして細胞塊を形成しているHuS-T/2細胞(同じ初代培養肝細胞をSV40-T抗原で不死化して得た細胞)とは全くことなる形態を示した。そこでこの3D培養しているHuS-E2細胞に患者血清を加えて、その細胞内のHCV-RNA量の変化を経時的に追うことでその感染と増殖を検討した。図4Cに示すように同じ細胞を2D培養した場合に比較して感染5日後ではHCV-RNA量が100倍近く増加することがわかった。このことは3D培養によってこの細胞が血清由来HCVの感染増殖に適した状態に変化していることを示している。しかしながら、TGP培養系では以下の理由により

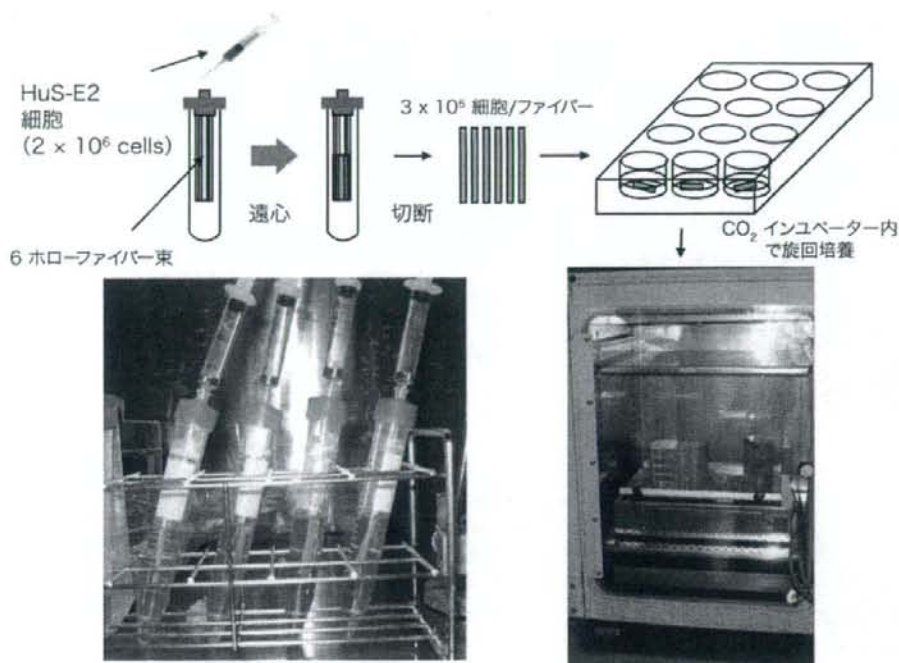


図5 ホローファイバーモジュール(東洋紡)を用いたHuS-E/2細胞の3D培養系

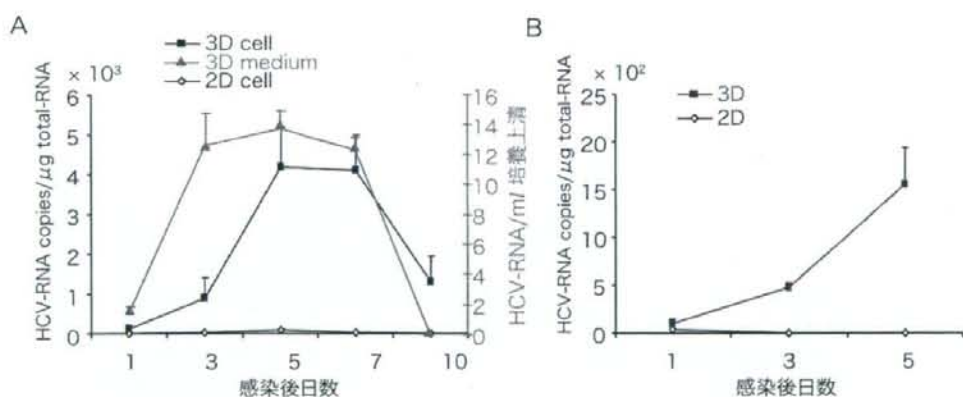


図6 HFを用いた3D培養HuS-E/2細胞の血清由来HCV(遺伝子型1b)の感染増殖性
HFを用いて3D培養したHuS-E/2細胞と2D培養したものにおける血清由来HCVの感染増殖性と比較した(A)。HCV感染後、経時的に細胞内(cell)と培養上清中(medium)のHCV RNAを定量した。2D培養した細胞の培養上清にはHCV RNAは全く検出されなかった。(A)において2Dおよび3D培養したHuS-E/2細胞に感染後5日と7日におけるそれぞれの培養上清を回収し濃縮して、別にHFを用いて3D培養したHuS-E/2細胞の培地に添加し、その2次感染能を解析した(B)。

感染性粒子の解析が容易ではないためにこの系を用いたさらなる解析は困難であった。

TGPは培養状態ではゲル化していて4度以下の低温化ではゾル化する。しかしながらその

ゾルは粘稠であるため、細胞や培養液の回収は低温条件下でTGPを氷冷した緩衝液などで大幅に希釈してから行う必要がある。このように取り扱いがなかなか難しいため、感染性粒子が培地中に産生されているか否かを検討しようと試みたが単純な方法では再現性のある結果が得られなかったのである。

次に中空糸ホローファイバー (HF) による3D培養法をHuS-E/2細胞に応用した。このシステムは人工肝臓作成のため、開発されたシステムのひとつである⁹⁾。遠心チューブの中にセルロースアセテート製のHF束がセットされたモジュール構造をしており、培養細胞は懸濁液として遠心チューブ上部からモジュールへ注入する。そのうち、遠心力によりHF中に培養細胞を詰めることでHF内腔にオルガノイドを形成させる(図5)。そのうちHFを切断し、その断片を12ウェル培養用マルチプレートのウェル内でヒト肝細胞用無血清培地を用いて回転させながら培養する(図5)。通常一つのウェルに2本で一束のHFが培養でき、細胞数は培養開始時には 3×10 の5乗程度である。そこでこの系で培養したHuS-E/2細胞を用いて血清由来HCVの感染増殖を検討した。図6Aに示してあるように血清で処理したのち、3日、5日、7日と細胞内のHCV-RNA量は著しく増加し、この細胞では効率良く血清由来HCVが感染し増殖することが明らかとなった。またHF培養系は無血清培地と細胞を含むHFが簡単に分離できるため、細胞のみならず培養上清の単離や解析が容易である。そこで培養液中に存在するHCV-RNA量を測定したところ、ほぼ細胞内のHCV RNAと同様のパターンで経時的に増加していることがわかった(図6A)。このことからこの培養系では患者血清由来の感染性HCV粒子が培養液中に産生されているこ

とが推定されたため、このHCV-RNAを含む培養上清を回収し濃縮したのち、新たに用意したHF培養HuS-E/2細胞の培地に加え、その感染性を検討した。上記同様に経時的に細胞内のHCV-RNA量を定量すると処理後3日、5日後に明らかな増加が認められた(図6B)。このことは用いた培養上清に感染性粒子が産生されていたことを強く示唆するものである。以上の結果からHFを用いたHuS-E/2細胞の3D培養系は患者血清由来のHCVが感染し、増殖し、感染性粒子を放出するというHCVの生活環を再現する簡便な3D細胞培養系として利用することが可能であると考えられた。

7 おわりに

現在、種々の条件で血清由来のHCVの感染増殖、そして感染性ウイルスの産生についてさらなる解析を進めている。この系が種々の患者血清由来のHCVの感染増殖を再現することができれば、これまで明らかになっていなかった多様な患者由来のHCVと細胞の相互作用に関する研究を進めることが可能になり、また、新たな抗HCV薬開発にも有用であることは間違いない。また将来的に出現が予想されている薬剤耐性株や異なるHCV株毎に適した治療法の選択などに利用されることが期待できる。

文 献

- 1) Lohmann V, Korner F, Koch J et al: Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285: 110-113, 1999
- 2) Wakita T, Pietschmann T, Kato T et al: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11: 791-796, 2005
- 3) Zhong J, Gastaminza P, Cheng G et al: Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad*

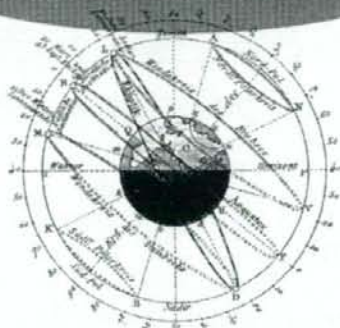
Sci USA 102 : 9294-9299 2005

- 4) Aly HH, Watashi K, Hijikata M et al : Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J Hepatol* 46 : 26-36, 2007
- 5) Harms W, Rothamel T, Miller K et al : Characterization of human myocardial fibroblasts immortalized by HPV16 E6/E7 genes. *Exp. Cell Res* 268 : 252-261 2001
- 6) Hung SC, Yang DM, Chang CF et al : Immortalization without neoplastic transformation of human mesenchymal stem cells by transduction with HPV16 E6/E7 genes. *Int J Cancer* 110 : 313-319, 2004
- 7) Aizaki H, Nagamori S, Matsuda M et al : Production and release of infectious hepatitis C virus from human liver cell cultures in the three-dimensional radial-flow bioreactor. *Virology* 314 : 16-25, 2003
- 8) Murakami K, Ishii K, Ishihara Y et al : Production and infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* 351 : 381-392, 2006
- 9) Funatsu K, Ijima H, Nakazawa K et al : Hybrid artificial liver using hepatocyte organoid culture. *Artif Organs* 25 : 194-200, 2001

*

*

*



C型肝炎ウイルスの生活環と発がん

宮成悠介*1, 臼田信光*2, 土方 誠*3, 下遠野邦忠*4,5

C型肝炎ウイルス (HCV) は、持続感染して慢性肝炎を発症する。慢性肝炎から肝硬変を発症、肝がんに至る場合が多い。病態の進展にはウイルスが持続的に感染していることが重要である。つまり、ウイルス複製そのものが何らかの形で病態進行に関与していると考えられる。ウイルス複製の分子機構を理解することは、病気の発症の原因を理解するために重要である。さらには持続感染を遮断して、HCV 感染を除去することによる病気の発症予防にもウイルス複製機構の解明は重要である。ここでは、HCV 複製の生活環について最近明らかにされた点を中心に概説し、最後に肝発がんとうウイルス複製との関連について述べる。

C型肝炎ウイルス (HCV) に感染すると最初急性肝炎を発症するが、そのうちの約2割がウイルスを排除して回復するものの、8割の感染者ではウイルスが持続感染する結果慢性肝炎状態になる。慢性肝炎患者の約4分の1が肝硬変へと病態が進み、その半数が肝臓がんを発症する。HCV 感染により肝硬変を患う患者の約4分の1が本疾患のために命を落とすので、全体的ではHCV 感染者の15~20% が肝疾患の犠牲になると推定される。

HCV Life Cycle and Its Pathogenesis

Yusuke MIYANARI, Nobuteru USUDA, Makoto HIJIKATA, Kunitada SHIMOTOHNO, *1国立遺伝学研究所, *2藤田保健衛生大学医学部, *3京都大学ウイルス研究所, *4慶應義塾大学医学部総合医科学研究センター, *5千葉工業大学総合研究所

C型肝炎の治療にインターフェロンとリバビリン (核酸類似体) の併用療法が功を奏している。治療を完了した約半数の患者からウイルスが消えており、それらのヒトではその後の肝障害も見られない。一般に、ヒトにがんをひき起こすウイルスは排除するのが困難であることを考えると、半数近くの患者からHCVを排除できるというこれまでの成績は、今後抗HCV剤の開発が進めばさらに効果的にウイルスを排除できる可能性を示唆する。また、ウイルス複製の持続性が疾患の維持および悪性化に関わるので、複製そのものが細胞の増殖に影響を及ぼしており、そのことが疾患と関連すると考えられる。したがって、HCV複製の分子機構およびその過程に宿主がどのように関係してくるのかを理解することは、病気発症の分子機構解明の一助になると期待できる。そのような期待を抱いて、以下にHCVの複製の分子機構を中心に概説し、最後に疾患との関連を推測したい。

HCV ゲノムとタンパク質

HCVはフラビウイルス科に属する。本科のウイルスはプラス鎖からなるRNAをゲノムにもち、ウイルス粒子はエンベロープに覆われている。ゲノム内にある最も大きいタンパク質の読み枠からすべてのウイルスタンパ

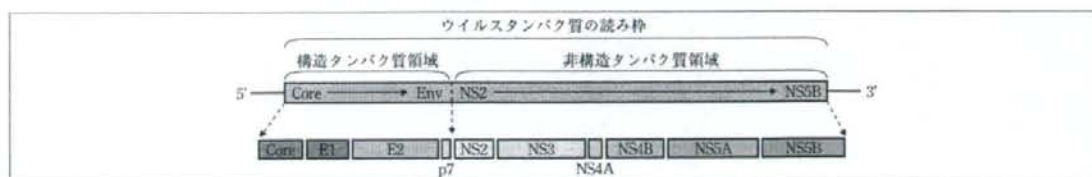


図1 ■ HCV ゲノムの構造 (上) と産生されるタンパク質 (下)

ゲノムは約 10,000 ヌクレオチドからなるプラス鎖 RNA である。ゲノム全体の 9 割を占めるタンパク質読み枠の N 端から前駆体ウイルスタンパク質が翻訳され、それが切断されて個々のタンパク質になる。Core:コア, Env:外膜タンパク質, NS:非構造タンパク質 (non-structural proteins の略)

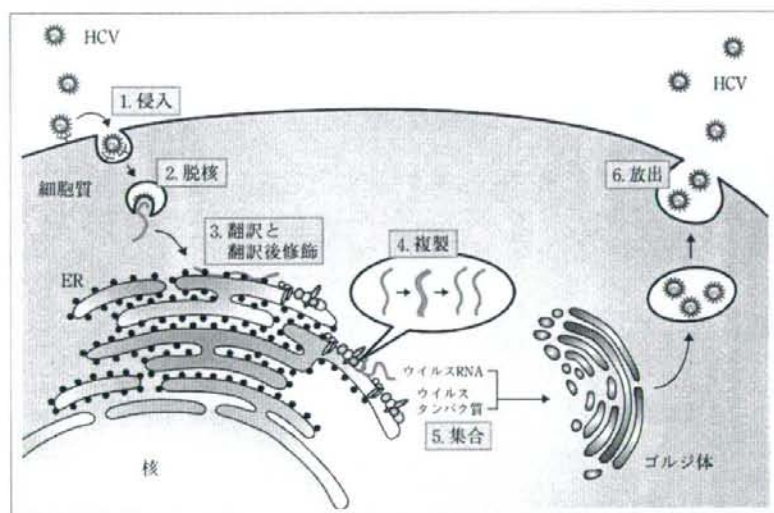


図2 ■ HCV の複製サイクル

HCV は細胞表面の受容体を介して細胞に取り込まれると考えられる。それらの細胞タンパク質のうち、侵入の後期には、Claudin1 や CD81 が関与すると考えられる。細胞内に入ったウイルス核様体内のゲノム RNA が mRNA として働き、図1に示したタンパク質が産生される。ウイルスゲノム複製は本文で述べるように、小胞体膜内の複製複合体内で行なわれる。ER:小胞体

ク質が産生される。ウイルスタンパク質は、ウイルス自身のペプチダーゼによる切断あるいは宿主のシグナルペプチダーゼによる切断、糖鎖付加などの翻訳後修飾を経て最終的に機能する成熟タンパク質になる (図1)。

HCV は感染細胞内の細胞質で複製する (図2)。感染に際しては細胞表面に存在する受容体を介すと考えられる。これまでのところ、複数の候補遺伝子が報告されているが、それらが細胞に接触し感染が成立する過程でどのように機能しているかについては、十分に理解されているとはいいがたい。しかし、それらの中で、CD81, Claudin 1 などは、ウイルス侵入後期に関わる重要な細胞側因子であると考えられる⁽¹⁾。

ウイルスタンパク質としては約 10 種類産生されるが、それらを 2 つのグループに分けることができる。1 つは粒子構成タンパク質 (構造タンパク質) であり、もう 1 つは感染細胞内でウイルス複製に関与するタンパク質 (非構造タンパク質) である。構造タンパク質は、コア、外被膜タンパク質 (E1, E2) などがある (もう 1 つのタ

ンパク質、p7 についてもウイルス粒子構成タンパク質であると示唆されるが、まだ決定的ではない)。非構造タンパク質は約 5~6 種類からなり、それぞれのタンパク質は独立した機能をもつが、非構造タンパク質全体としての最も重要な機能は、それらが複合体を形成してウイルスゲノムの複製および mRNA を合成する場 (複製複合体) を構築することである。

■ ウイルスゲノム複製は小胞体周辺に感染して新たに構築される特殊な構造体の中で行なわれる⁽²⁻⁴⁾

ウイルス粒子産生にまでは至らないがゲノム自身は細胞内で自立的に複製できる欠失ウイルスゲノムの存在が知られている⁽⁵⁾。そのゲノムを導入した細胞においては常時ウイルスゲノムの複製が見られ、細胞が分裂すると同時にウイルスゲノムも娘細胞に分配され、そこで複製を繰り返すようになる。このような細胞の切片を電子顕微鏡で観察すると、小胞体膜の一部の膜構造が著しく変形した像が見られる⁽⁶⁾。正常細胞にはこのような像は観

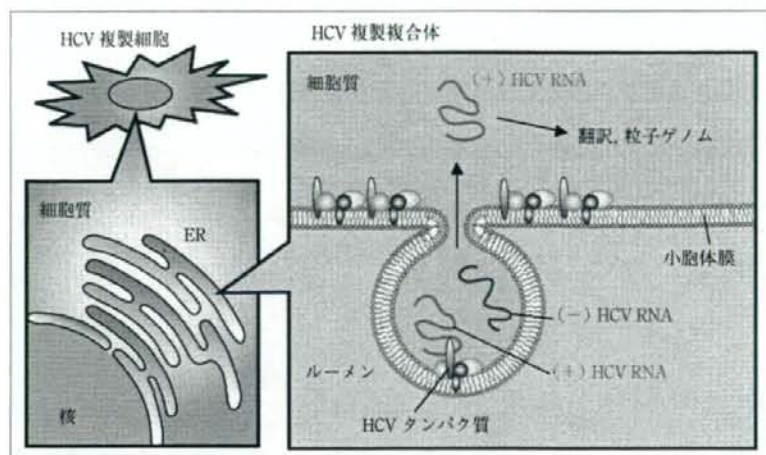


図3 ■ HCV複製複合体の模式図

HCV複製細胞（左図）の小胞体膜部分を拡大（右図）し、その中に存在するHCV複製複合体のイメージを記載した。小胞体ルーメン内突き出した形の膜構造体（図で円形の形で示した）内でウイルスの核酸合成が行なわれる。核酸合成に関与するウイルスタンパク質は細胞内の全ウイルスタンパク質のうちわずかの量である。ほかのウイルスタンパク質は細胞質側に露出していると考えられる。合成されたウイルスRNAは細胞質に放出され、mRNAやゲノムRNAとして機能する。

察されない。生化学的な手法を用いた解析から、膜構造が変化したこの本体は、その中でHCVゲノムが複製する活性をもった膜様構造体（ゲノム複製複合体）であると考えられる⁽⁴⁾。ゲノム複製複合体の特徴として次のようなことがあげられる。

- ①細胞質内の不溶性画分として存在する。
- ②NP40などの界面活性剤で処理すると複製能が失われるので、膜様構造が機能的に重要である。
- ③細胞膜を部分的に破壊したあとでスクレーパー液の入った緩衝液で処理すると、リボソームRNAが破壊される条件下でもHCV RNAは壊れない。しかし、このとき、界面活性剤を共存させると速やかに壊れるので、HCV RNAは膜成分に保護された状態として存在している。
- ④細胞質に外来的にプロテアーゼを導入し、細胞質内の多くのタンパク質が加水分解を受ける条件下で処理しても、わずかのウイルスタンパク質は分解されずに残る。しかし、界面活性剤共存下ではすべてのウイルスタンパク質が消える。つまり、一部のタンパク質は膜成分に覆われた中に存在していると考えられる。
- ⑤界面活性剤を加えないで、大部分のウイルスタンパク質がプロテアーゼで加水分解された環境下でも、ウイルスRNAの合成には影響を受けない。

これらのことから、HCV RNA合成は小胞体膜構造に覆われてつくられた複製複合体の中で行なわれると考えられる⁽⁴⁾（図3）。ウイルスタンパク質の中で、NS4Bが小胞体膜に作用して膜の構造を変化させることが知られている⁽⁷⁾。

HCVのウイルス粒子産生には細胞質に存在する油滴が重要な役割を果たす⁽⁸⁾

HCVタンパク質の多くは、細胞内の小胞体膜タンパク質マーカーと局在が一致することから、小胞体膜周辺に局在するといえる。一方、HCV構造タンパク質コアを単独に発現させると、細胞質に浮遊して存在する油滴の周りに局在する^(9,10)。ウイルスタンパク質の細胞内局在とウイルス増殖との関連については不明である。感染性ウイルスを産生させる培養細胞系で個々のウイルスタンパク質の局在を調べ、その局在を人為的に変化させたときにウイルス産生にどのような影響を与えるかを調べることで、ウイルスタンパク質の細胞内局在がウイルス複製能に与える影響を調べるのが可能である。

2年ほど前に樹立された感染性HCVゲノム（JFH1と呼ばれる）RNAを培養細胞（HuH7：ヒト肝臓がん由来細胞株）に導入すると、ウイルス粒子が産生される⁽¹¹⁾。これまで、培養細胞を用いたHCV感染・増殖系がなかったため、この系の樹立はウイルスの増殖を解析するうえで大変重要である。HCVゲノムRNAを導入した細胞内でのコアタンパク質の細胞内局在を調べると、これまでの報告通りに、油滴の周りに局在が見られる。また、非構造タンパク質（NS3-NS5B）の多くは小胞体に局在している。しかし、詳細に調べると、小胞体近辺の油滴の周りにもNSタンパク質の局在が観察される⁽⁸⁾。この細胞培養液からウイルス粒子を回収して、ショ糖密度勾配遠心により浮遊密度を調べると、密度1.15 (g/ml)の画分に大部分のウイルスが検出される。しかし、この画分のウイルスには感染性がない。一方、密度1.12 (g/ml)の画分には、わずかな粒子しか検出され

ないが、それは感染性を示す(図4)。油滴の周りに非構造タンパク質が集まってくるのは、この周りにウイルスRNAの複製複合体が構築されていることを示唆しており、膜成分も油滴の周りに集合しているのが観察される。

油滴と会合できないHCV コアタンパク質を産生する

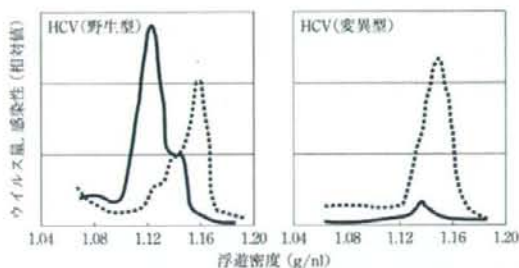


図4 ■ 細胞上清に産生されるウイルス粒子の性状と感染性
HCVが複製する細胞から放出されるウイルス粒子の性状を、ショ糖密度勾配遠心で調べた(左)。また、ウイルスタンパク質が油滴に会合できない変異ウイルスが複製している細胞から産生されるウイルスの性状を右図に示した。破線はウイルス粒子の量をウイルスコアタンパク質で測定した値。実線は感染性を示す。

変異ゲノムを作製して、それを細胞に導入した場合、油滴周辺にコアの局在が見られなくなるが、同時に非構造タンパク質の油滴への局在も観察されなくなる⁽⁸⁾。この条件では細胞培養上清にはウイルス粒子の産生が見られない。このことは、コアが他のウイルスタンパク質を油滴周辺に引き寄せる働きをしていることを示している。さらに、ウイルス粒子が産生されない理由としては、粒子産生に油滴周辺の環境が必要である可能性、あるいは変異コアでは粒子の形態形成が起こらない可能性が考えられる。

上の2つの可能性のいずれが正しいかを調べるために、非構造タンパク質(特にNS5Aに注目した)に変異を入れて、コアが油滴と会合できても非構造タンパク質が会合できない状態にした場合にウイルス粒子産生がどうなるかを調べた。その結果、この状態ではウイルス粒子の産生は見られたが、粒子の浮遊密度は1.15であり、感染性を示さなかった⁽⁸⁾(図4)。

これら一連の実験から、油滴は感染性HCVウイルス粒子産生に重要な働きをしているといえる。それでは、油滴は感染性ウイルス粒子産生にどのような役割を担っているのだろうか? 考えられることとして、①感染性

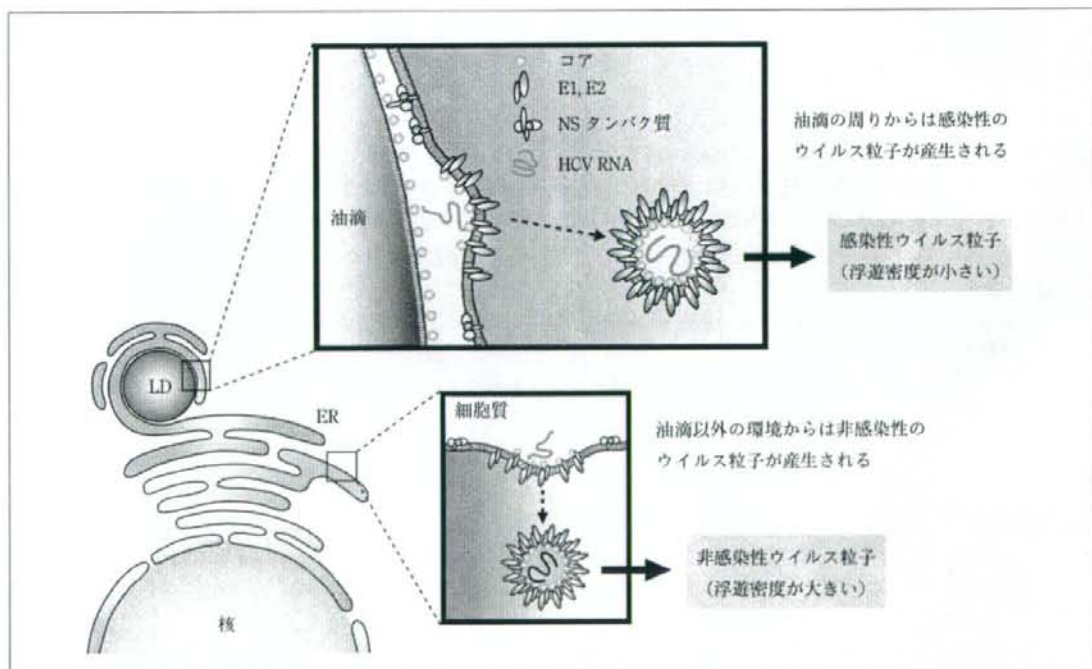


図5 ■ HCVは油滴とその周辺的环境を利用して感染性ウイルス粒子を産生する(モデル)

上の図は油滴環境から産生される粒子で、この場合、感染性を示し浮遊密度は小さい。一方、油滴との接触がない環境からもウイルス粒子の産生は見られる(下の図)が、この場合には感染性はなく、密度が大きい。

ウイルス粒子が構築される「場」を提供する、②ウイルス粒子に感染に必要な「付加的要因」を賦与する、③形成された感染性ウイルスに対して細胞内の運搬の役割を果たす、などが考えられる。これらの可能性の中で、①については、油滴の周りにウイルス様粒子が電顕的に観察されるので、粒子形成に油滴とその周辺環境が重要な働きをしている可能性がある。しかし、図5のモデルに示したように、筆者らは非感染性ウイルス粒子は油滴周辺以外からも放出されると考えているので、粒子形成自身には油滴が必須ではない可能性を考えている。②については、感染性粒子の浮遊密度は非感染性粒子に比べ0.03小さいので、油滴の周りから産生される粒子は、何か油性に富む成分を取り込んでいる可能性が考えられよう。もちろん、ウイルス粒子中のタンパク質と核酸の含有割合に差があり、それが浮遊密度の違いに反映されている可能性も考えられる。あるいは、感染性粒子の包装状態が非感染性粒子に比べ緩いために、浮遊密度が小さくなる可能性も考えられる。③の可能性については、油滴がマイクロチューブルと会合し細胞質内でダイナミックな運動をすることが知られているので、ウイルス粒子の輸送に油滴が積極的に関与している可能性は十分考えられるが、その詳細は不明である。

感染性 HCV が産生されるモデル

患者血流中の HCV を密度勾配遠心により解析すると、密度が異なるヘテロな集団として観察される。その原因としてはウイルスを構成するタンパク質あるいは核酸の組成の違いも考えられるが、むしろリポタンパク質やその他の血液成分と HCV が会合するためだろうと考

えられる。事実、HCV が VLDL (very low density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein), HDL (high density lipoprotein) などのリポタンパク質と会合して複合体として血流中に存在することが知られている。そのほかにも、ウイルス自身の抗体、リウマチ因子あるいは異常血漿タンパク質などと会合した粒子の存在が示されている。これらの血液成分との会合が HCV の複製サイクルにとってどれほど意味があるかについては、解明されなければならない点が多いが、最近になり VLDL との会合はウイルス粒子産生において粒子の分泌や感染性の賦与などに重要な働きをもつことが示されている⁽¹²⁻¹⁴⁾。

VLDL は脂質として主にトリグリセリドを脂質構成成分とし、それがアポリポタンパク質 A および B (ApoA, ApoB) に保持された形で存在する。VLDL の合成は、MTP (microsomal triglyceride transfer protein) により油滴からトリグリセリドが取り出され、小胞体ルーメン内で ApoB と会合し、まず VLDL 前駆体が形成される。その後、さらにトリグリセリドが追加され、同時に ApoE も取り込まれて成熟した VLDL がつくられる。HCV を産生する細胞では、この VLDL が同じく小胞体ルーメン内に存在する HCV と会合して細胞の外に放出されると考えられる。VLDL 合成に重要な MTP の阻害剤で HCV 感染細胞を処理すると感染性ウイルス粒子の産生が見られなくなることから、VLDL 産生が HCV の産生に重要であることが示された⁽¹³⁾。

油滴と小胞体膜との会合が感染性ウイルス粒子に重要であるという筆者らの観察結果を VLDL 産生と結びつけてみると、図6に示すモデルが考えられる。油滴が小胞体と会合することにより VLDL の産生の効率が増え

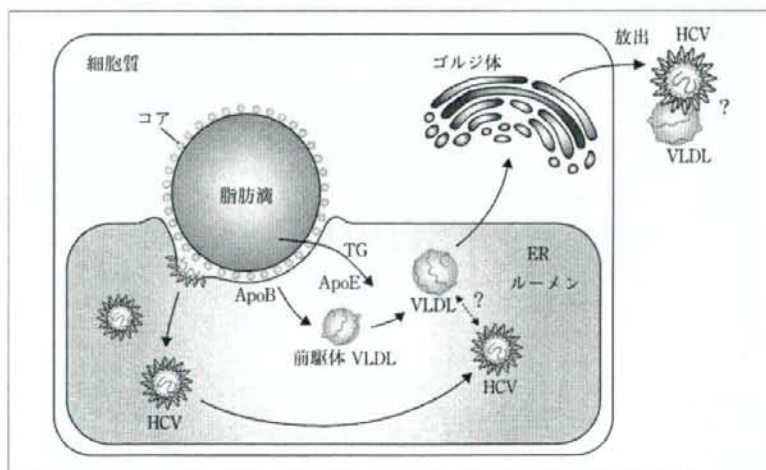


図6 ■ 感染性ウイルス粒子産生における油滴の役割 (モデル)
脂肪滴 (油滴) と接触している小胞体ルーメン内では VLDL が産生されやすくなっていると考えられる。前駆体 VLDL あるいは VLDL が小胞体内に出芽した HCV 粒子と会合して、複合状態で細胞の外に産生されると考えられる。

ると考えられる。おそらく油滴と会合している小胞体ルーメン内では、局所的にVLDLの密度が高くなっており、HCVとVLDLが出会う機会が増え、その結果LDL-HCV複合体を形成して細胞の外に放出されると考えられる。

HCVの感染はLDL受容体(LDLR)を介して行なわれるという報告がある⁽¹⁵⁾。LDL-HCV複合体が細胞表面のLDLRと会合して感染が成立する機構は、少なくともHCV感染機構のひとつであると考えられる。

HCV感染細胞における細胞の代謝異常と肝疾患との関連

HCV感染と慢性肝炎および肝硬変・肝がんの発症の関係について、その分子基盤には不明な点が多い。慢性肝炎は肝細胞の持続的な破壊と再生の結果であると考えられている。持続的な破壊に中心的に働くのは免疫監視に働く細胞障害性T細胞であると考えられる。一方、HCV感染者にはインシュリン伝達シグナルが阻害される結果、糖尿病を合併したり、脂肪が異常に蓄積しその結果脂肪肝などを呈するなど、代謝異常がよく見られ、これらの異常が肝疾患を増悪させるともいわれている⁽¹⁶⁾。HCVは自らが増殖するために宿主の脂質代謝を活性化させるが、そのことが宿主に代謝異常をもたらす肝疾患を誘発していると考えられる。

抗HCV剤の創薬研究に向けて

C型慢性肝炎患者にインターフェロンとリバビリンの併用療法を行なうと、約半数の患者からウイルスを除くことができる。ヒトにがんをひき起こすウイルスを効率よく排除するのは困難であるが、HCVは例外的であるといえる。ウイルスタンパク質の酵素活性を標的とした薬剤が開発されているので、近い将来その中から効果の高い薬が出てくることが期待される。一方、HCVは複製するとき変異しやすいことを考えると、ウイルスタンパク質を標的とした薬では耐性ウイルスの出現が危惧され、事実そのような報告が出ている。その点、ウイルス複製に必須の宿主因子を標的とした薬は、耐性の問題は克服できる可能性が高い。

おわりに

HCVは持続感染して数十年にわたり慢性肝炎をひき起こし、その後、肝硬変、肝がんを発症させる。感染および疾患の進行を予防することは大変重要である。その

ためにはウイルス複製の分子機構を解明して、そこから得られる知見を予防策の確立に生かしてゆくことが大切である。

本稿ではHCVの生活環の中でどのようにして感染性粒子が産生されるかについて特に脂肪滴との関連で述べた。ウイルスは細胞内を自分が複製しやすい環境に変化させる。自然免疫機構を変化させ宿主からの攻撃を防ぐ機構もそのひとつである。また、RNAウイルスの多くはゲノムの複製を宿主の膜環境を利用して行なう。HCVの場合も同様で、ウイルスタンパク質による自然免疫からの逃避機構や、本稿で触れたようにHCVゲノム複製複合体の存在を生化学的に示した。さらに、HCVが油滴を利用して感染性ウイルスを産生するという、これまで知られていなかった新しいウイルス産生の機構を明らかにした。今後、さらに詳細な複製機構を明らかにすることにより、ウイルスと宿主の相互作用が浮かび上がってくると同時に、これまで不明であった細胞の仕組みが明らかにされるものと期待される。また、効果的な抗ウイルス薬の開発にも貢献すると思う。

文献

- 1) L. Cocquerel, C. Voisset & J. Dubuisson: *J. Gen. Virol.*, **87**, 1075 (2006).
- 2) H. Aizaki, K. J. Lee, V. M. Sung, H. Ishiko & M. M. Lai: *Virology*, **324**, 450 (2004).
- 3) D. Moradpour, M. J. Evans, R. Gosert, Z. Yuan, H. E. Blum, S. P. Goff, B. D. Lindenbach & C. M. Rice: *J. Virol.*, **78**, 7400 (2004).
- 4) Y. Miyanari, M. Hijikata, M. Yamaji, M. Hosaka, H. Takahashi & K. Shimotohno: *J. Biol. Chem.*, **278**, 50301 (2003).
- 5) V. Lohman, F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilann & R. Bartenschlager: *Science*, **285**, 110 (1999).
- 6) R. Gosert, D. Egger, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H. E. Blum, K. Bienz & D. Moradpour: *J. Virol.*, **77**, 5487 (2003).
- 7) D. Egger, B. Wölk, R. Gosert, L. Bianchi, H. E. Blum, D. Moradpour & K. Bienz: *J. Virol.*, **76**, 5974 (2002).
- 8) Y. Miyanari, K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, R. Bartenschlager, T. Wakita, M. Hijikata & K. Shimotohno: *Nature Cell Biol.*, **9**, 1089 (2007).
- 9) G. Barba *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1200 (1997).
- 10) R. G. Hope & J. McLauchlan: *J. Gen. Virol.*, **81**, 1913 (2000).
- 11) T. Wakita *et al.*: *Nature Med.*, **11**, 791 (2005).
- 12) S. U. Nielsen, M. F. Bassendine, A. D. Burt, C. Martin, W. Pumechockchai & G. L. Toms: *J. Virol.*, **80**, 2418 (2006).
- 13) H. Huang, F. Sun, D. M. Owen, W. Li, Y. Chen, M. Gale, Jr. & J. Ye: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5848 (2007).
- 14) P. Gastaminza, G. Cheng, S. Wieland, J. Zhong, W. Liao & F. V. Chisari: *J. Virol.*, **82**, 2120 (2008).
- 15) S. Molina *et al.*: *J. Hepatol.*, **46**, 411 (2007).
- 16) V. Agnello, G. Åbel, M. Elfahal, G. B. Knight & Q.-X. Zhang: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **196**, 12766 (1999).



Characteristics of hepatitis B virus genotype G coinfecting with genotype H in chimeric mice carrying human hepatocytes[☆]

Yasuhito Tanaka^a, Laura V. Sanchez^b, Masaya Sugiyama^a, Tomoyuki Sakamoto^a,
Fuat Kurbanov^a, Kanako Tatematsu^a, Sonia Roman^b, Satoru Takahashi^c, Tomoyuki Shirai^c,
Arturo Panduro^b, Masashi Mizokami^{a,*}

^a Department of Clinical Molecular Informative Medicine, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, 467-8601 Japan

^b Department of Molecular Biology in Medicine, Old Civil Hospital of Belen, University of Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, Mexico

^c Department of Experimental Pathology and Tumor Biology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 February 2008

Returned to author for revision

18 March 2008

Accepted 1 April 2008

Available online 13 May 2008

Keywords:

HBV genotype G

HBV genotype H

Chimeric mice

MSM

Replication

Fibrosis

ABSTRACT

Accumulated evidence indicated that hepatitis B virus genotype G (HBV/G) is present exclusively in coinfection with other HBV genotypes. In Mexico, HBV/G from 6 men who had sex with men were coinfecting with HBV/H. Phylogenetically complete genomes of the 6 Mexican HBV/G strains were closely related to previous ones from the US/Europe. Using uPA/SCID mice with human hepatocytes, monoinfection with HBV/G did not result in detectable HBV DNA in serum, whereas superinfection with HBV/G at week 10 inoculated HBV/H when HBV/H DNA was elevated to $>10^7$ copies/mL has enhanced the replication of HBV/G. The HBV/G was enhanced in another 3 inoculated with a serum passage containing HBV/G with a trace of HBV/H. Coinfection of mice with HBV/G and H induced fibrosis in the liver. In conclusion, the replication of HBV/G can be enhanced remarkably when it is coinfecting with HBV/H. Coinfection with HBV/G may be directly cytopathic in immunosuppressive conditions.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

On the basis of the nucleotide sequence divergence exceeding 8% throughout the complete genome sequence, hepatitis B virus (HBV) has been classified into eight genotypes designated by capital letters A (HBV/A) through H (HBV/H) (Arauz-Ruiz et al., 2002; Norder et al., 1994; Okamoto et al., 1988; Stuyver et al., 2000). The genotypes have different geographical distributions, virological characteristics and clinical manifestations (Magnius and Norder, 1995; Miyakawa and Mizokami, 2003).

One of the less studied genotypes is the HBV/G. It was first described in 2000, among inhabitants of France and Georgia, USA (Stuyver et al., 2000). The isolated strains had 36 base-pairs' insertion

in the core gene and two stop codons in the precore region depriving ability of the virus to translate HBeAg. Nevertheless, some of the carriers were HBeAg positive (Stuyver et al., 2000) that was shortly after explained by the coexistence of the "HBeAg-potent" HBV/A strains in coinfection (Kato et al., 2002a,b). Further studies reported circulation of the genotype in Thailand (Suwannakarn et al., 2005), Japan (Ozasa et al., 2006) and Mexico (Sanchez et al., 2007) indicating global distribution and association of the infection with specific risk groups, such as injection drug users (IDU) and men who had sex with men (MSM). The studies also demonstrated that throughout the world HBV/G strains possess unprecedented genetic homology and are mainly presented in coinfection with another endemic genotype. However, little is known about peculiarities of interaction of the HBV/G with various genotypes as well as about virological and clinical concerns of the coinfection.

Produced by genetic engineering, a mouse with severe combined immunodeficiency, carrying urokinase-type plasminogen activator transgenes controlled by albumin promoter (uPA/SCID) with transplanted human hepatocytes (Heckel et al., 1990; Rhim et al., 1994) was recently shown as an appropriate animal model for studying HBV (Dandri et al., 2001; Tsuge et al., 2005). Using this model it was demonstrated that during monoinfection, HBV/G might be able to replicate in hepatocytes at low level; but its replication was

Abbreviations: HBV, hepatitis B virus; HBeAg, hepatitis B e antigen; HBsAg, hepatitis B surface antigen; HBcrAg, antigens related to HBV core; uPA/SCID, severe combined immunodeficiency transgenic with urokinase-type plasminogen activator.

[☆] Supported by a grant-in-aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, and a grant-in-aid from the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan.

* Corresponding author. Fax: +81 52 842 0021.

E-mail address: mizokami@med.nagoya-cu.ac.jp (M. Mizokami).

significantly enhanced by coinfection with HBV/A or C (Sugiyama et al., 2007).

Our purpose is to determine the complete sequences of HBV/G coinfecting with HBV/H in sera obtained from MSM in Mexico and to elucidate the characteristics of HBV/G in coinfection with HBV/H using recently developed *in vivo* model.

Results

Phylogenetic relatedness of HBV complete genome sequences in Mexico

Six HBV/G strains in coinfection with HBV/H among MSM in Mexico were described in our previous study (Sanchez et al., 2007). In the present study, the complete genome sequences of not only 6 HBV/G strains but also 6 HBV/H strains from the same patients were determined by each specific PCR. The phylogenetic analyses indicated that the 6 HBV/G strains were close to those previously reported from the United States (US), France and Germany, and the 6 HBV/H strains were related to the previously reported ones in the US (Fig. 1). All 6 coinfecting patients were positive for HBeAg, and asymptomatic carriers of chronic HBV infection at the time of sample collection (the details unknown).

Characteristics of HBV/G strains in Mexico

Sequence analyses revealed unique insertion of 36 nt in the core gene, two stop codons in the precore region and double mutation in the core promoter (CP) in all Mexican HBV/G strains, whereas no related mutations were found in the corresponding HBV/H strains (Fig. 2a and b). These data suggest that the HBeAg detected in serum of those patients had been produced by HBV/H. Additionally, several mutations, which might have affected the replication of the virus genome and amino acid substitutions of HBx, were found in the first half of the CP region, including the above double mutation (nt 1701–1765) (Fig. 2a).

Examining the genetic diversity and recombination of HBV/G

Comparing the complete sequences, both overall genetic distance among the HBV/G strains (0.0037 ± 0.0005 per site) and percent nucleotide homology ($0.30 \pm 0.24\%$) were much lower than those among the other intra-genotype groups. In consideration of previously reported recombination between HBV/A and HBV/G strains (i.e. AB056516) (Kato et al., 2002a), we have examined the Mexican HBV/G strains for possible event of intergenotypic recombination. Complete sequences of 3 to 5 clones isolated from each of the 6 HBV/G carriers revealed; no evidence of recombination by similarity and bootstrap scan (data not shown).

Intracellular expression of HBV DNA and antigens

Huh7 cells were transfected with a pUC19 vector carrying 1.24-fold the HBV genome. Three days post-transfection, they were harvested, lysed with NP-40 and tested for HBV DNA and antigens. The density of single-stranded (ss) HBV DNA was compared between HBV/G and H by Southern blotting. The expression of HBV DNA was higher for HBV/H than G, indicating that HBV/G had very low replication *in vitro* (Fig. 3a). As well, HBsAg, HBeAg and HBcAg levels were much higher in HBV/H (Fig. 3b).

Superinfection with HBV/G on mice infected with HBV/H

Chimeric mice were infected with HBV/G and H particles propagated in Huh7 cells in order to confirm the infective efficiency. Mono-infection with HBV/G from the Huh7 cells culture medium did not result in detectable HBV DNA in mice serum (data not shown).

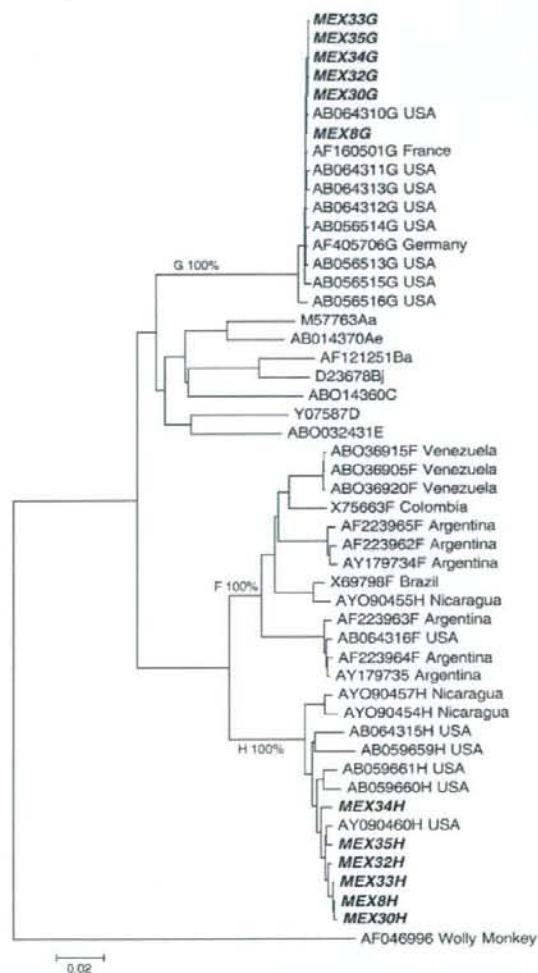
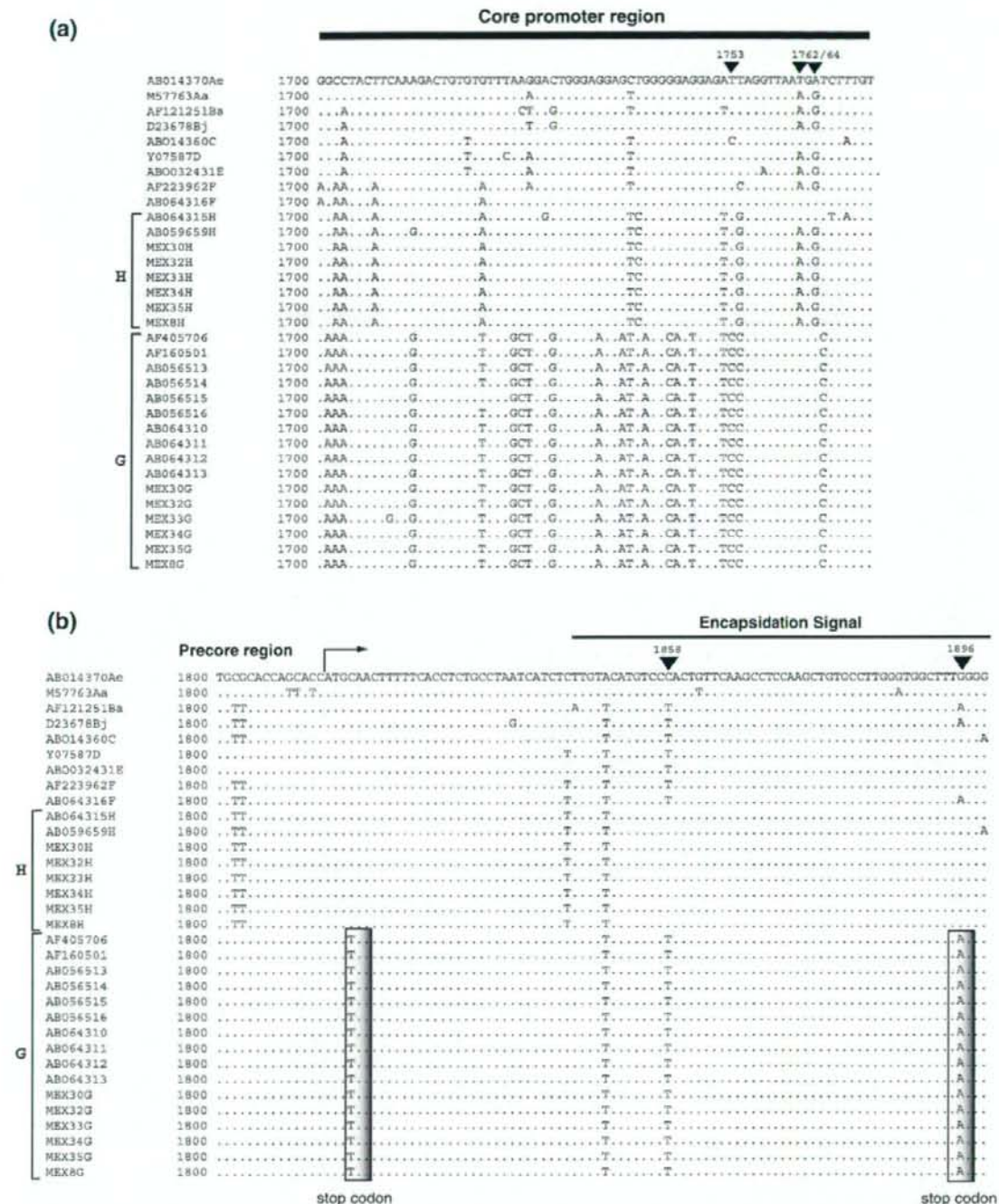


Fig. 1. A phylogenetic tree constructed using the complete nucleotide sequences of 50 HBV strains. The 6 HBV/G strains coinfecting with HBV/H in Mexico (MEX), shown in bold italic, were compared with reference sequences recruited from GenBank/DBJ/EMBL databases; 10 HBV/G, 7 HBV/H, 13 HBV/F, 7 representing genotypes A–E and 1 outgroup (Wolly Monkey). Aa and Ae are subgenotypes of HBV/A (Sugauchi et al., 2004). Ba and Bb are subgenotypes of HBV/B (Sugauchi et al., 2002). The country of origin is indicated after the accession number for each HBV/F, HBV/H and HBV/G strain. Bootstrap values are shown at the nodes of the main branches.

Then, according to our previous method (Sugiyama et al., 2007), the dynamics of HBV DNA, HBsAg and HBeAg assessed in 3 chimeric mice (ChiM_H1–H3) with HBV/G on H superinfection, are shown in Fig. 4 (a–c). Initially each of the mice received inoculation of around 10^5 copies of HBV/H recovered from the Huh7 cells culture supernatants, and the dynamics of HBV/H DNA indicated approximately 2 logs elevation within the following 5 weeks. At week 10 when HBV/H DNA level exceeded concentration of $>10^7$ copies/mL, the chimeric mice were superinfected by inoculation of HBV/G. The HBV/G DNA level increased within 5 weeks after the superinfection and plateaued around 10^7 copies/mL. Two HBV antigens (HBsAg and HBeAg) waxed and waned in profiles similar to that of HBV DNA.



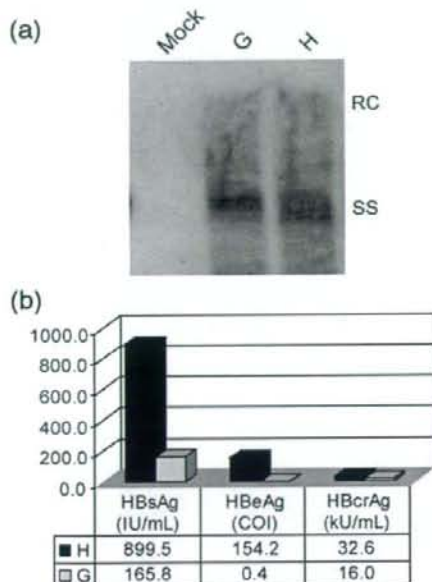


Fig. 3. Intracellular expression of HBV DNA and antigens. (a) The density of single-stranded (ss) HBV DNA was compared between HBV/G and H by Southern blotting. RC, relaxed circular double stranded DNA forms. (b) HBsAg, HBeAg and HBcrAg levels were also compared.

Coinfection of mice with HBV/H and G by inoculation with a mouse passage of G-on-H superinfection

Another 3 chimeric mice (ChiM202-17, ChiM212-22 and ChiM314-12) received serum from sacrificed ChiM_H2 with G-on-H superinfection taken at week 34 when the HBV/G and H DNA was around 5×10^6 , 10^8 copies/mL, respectively (Fig. 4b). Profiles of HBV/H and G, after inoculation with 10^6 copies of HBV DNA, were similar among the 3 chimeric mice. Despite receiving the inoculation with a mouse passage supposedly containing HBV/G strain, the HBV/G DNA was not detectable until week 4 after the passage. At the week 4 when HBV/H DNA level exceeded concentration of $>10^7$ copies/mL, HBV/G started to increase and plateaued around 10^8 copies/mL at week 16 (Fig. 4d).

Cloning and sequencing HBV DNA in chimeric mice coinfecting with HBV/H and G

HBV DNA clones from sera of the ChiM_H1 and ChiM_H2 sampled at 26 and 34 weeks, respectively (Fig. 4a and b) included those of HBV/H and G invariably. At least 5 clones were propagated and completely sequenced in each serum; but no mutation was observed when the clones were compared to the original inoculum of either genotype. No evidence of recombinations was detected between HBV/H and G on the basis of complete genome analyses.

Pathology in the liver of chimeric mouse infected with HBV/G and H

Fig. 5a shows histology of liver of a chimeric mouse 26 weeks after superinfection with HBV/G on H (ChiM_H1). The mouse coinfecting with HBV/G and H revealed fibrosis of stage 1 (F1) and inflammation of grade 2 (A2) with Hematoxylin-Eosin and Masson's trichrome stain (Fig. 5a), whereas the mouse monoinfected with HBV/H had no fibrosis (Fig. 5b). ChiM_H2 also had F1A1 at week 34, but ChiM_H3 was not available for histological examination due to sudden death.

Interestingly, a chimeric mouse (ChiM202-17) received serum from ChiM_H2 with G-on-H superinfection revealed F2A2 at week 24 (Fig. 5c). It might be difficult to evaluate its statistical significance due to small number.

Discussion

The HBV/G was initially reported in the US, Canada and Europe in coinfection with HBV/A (Kato et al., 2002a,b; Osiowy and Giles, 2003; Stuyver et al., 2000), which is the one of the prevalent genotypes in both of the regions. Recently, coinfection of HBV/G with H as well as G/C recombinant were reported in Mexico and Thailand, respectively (Sanchez et al., 2002, 2007; Suwannakarn et al., 2005), and accumulated data indicated trend to preferential occurrence of the HBV/G coinfection in population of MSM and IDU, possibly via particular infectious routes of transmission. A phylogenetic analysis of the complete genome of HBV/G strains isolated in the present study indicated their close relationship with those previously reported, despite the fact that they were all isolated from HBV carriers infected with different genotypes that were prevalent in the respective area. These suggest that the HBV/G is genetically homologous and has no specific preference for HBV genotype to be coinfecting. Thus, the HBV/G may be found among HBV carriers in any part of the world regardless of the prevalent genotype.

Invariably coinfecting with other genotypes, HBV/G was once deemed a defective virus that cannot replicate by itself. Recently, however, Chudy and his associates reported plasmapheresis and platelet donor who was infected with HBV/G alone and had transmitted it to two recipients in look-back studies (Chudy et al., 2006). Since the donor and two recipients were not coinfecting with HBV of the other genotypes by the reversed hybridization assay (Hussain et al., 2003), capable of detecting HBV infection of any genotype in low titers, the authors concluded that HBV/G can mono-infect human beings without help from coinfecting HBV of other genotypes (Chudy et al., 2006).

The uPA/SCID mouse with the liver replaced for human hepatocytes (Heckel et al., 1990) is a very useful model for studies on hepatitis virus infection and replication *in vivo* (Dandri et al., 2001; Tsuge et al., 2005). Using this model we have previously demonstrated that despite of apparent dependence on other genotype strain (HBV/A or HBV/C) in replication, the viral load of the HBV/G eventually outgrows and takes over the coinfecting strain in the chimeric mice (Sugiyama et al., 2007).

In the present study, the chimeric mice had undetectable HBV DNA in the serum when monoinfected with HBV/G, whereas superinfection on HBV/H enhanced replication of the HBV/G. This observation is concordant with previous experimental study which indicated a rapid takeover in mice initially infected with HBV/A or C and superinfected with HBV/G (Sugiyama et al., 2007). The takeover was significantly enhanced in mice infected with HBV/G on HBV/A when compared to HBV/G on HBV/C; with the mean time required for a 10-fold increase (log time) in the HBV/DNA level 1.6 vs. 3.3 weeks, respectively (Sugiyama et al., 2007). Interestingly, the present study demonstrates that pattern of the genotypic interaction between HBV/G and H was similar to that described for HBV/G on C; with the HBV DNA log time 3.0 weeks, suggesting that HBV/G is better sustained in human population by its association with HBV/A than with other HBV genotypes. These experimental results were also supported by clinical observations of the takeover which was demonstrated in a patient coinfecting with HBV/G and A by cloning and sequencing (Kato et al., 2002a). However, such a heavy dependence of HBV/G on other genotype strain does not seem to require intergenotypic recombination between them, as no recombination event was observed in chimeric mice coinfecting with HBV/G and any other genotype strain. The mechanism how HBV/G depends on other genotypes for replication had been pursued in cotransfection experiments in Huh7 cells; our previous *in vitro* study showed that trans-complementation with core protein of HBV/A would be required for HBV/G to replicate

When Should “I” Consider a New Hepatitis B Virus Genotype?

Recently, Huy et al. described a new hepatitis B virus (HBV) strain isolated in Vietnam (3) and claimed it to be a “new genotype,” “HBV genotype I,” with a complex recombination involving genotypes C, A, and G. We refute both claims.

Using complete genome sequence analysis of their single isolate, VH24 (AB231908), the authors documented an over 98% similarity with three other Vietnamese strains (2). Earlier, Hannoun et al. provided comprehensive information regarding those strains, showing recombination between genotype C and an unknown genotype in the pre-S/S region (2). Mean genetic divergence from genotype C of <8% in the entire genome and evidence of recombination had prevented the authors from assigning the strains to a new genotype. The same conclusion for the strains was reached by a later study using a new methodological approach (10). By providing neither additional information nor a new analytical approach, Huy et al. (3) surprisingly conclude that their strain, with those previously reported, represent a new genotype.

First, phylogenetic analysis of the complete genome of the four Vietnamese HBV isolates shows them to cluster with subgenotypes of C (C1 to C5) and to differ from genotype C by a mean nucleotide distance of only $7.0\% \pm 0.4\%$, which falls within the range of intragenotype and not intergenotype divergence (4). Furthermore, their conclusion of a “complex A/G/C recombination” arose from the use of Simplot software that has methodological limitations, which can be overcome by using GroupScanning (10). Reanalyzing AB231908 by using GroupScanning provides no strong evidence for recombination with known human or ape HBV genotypes in the pre-S/S regions (apart from two restricted regions, with association values of >0.5), in contrast to its consistent penetration into the genotype C clade from position 1600 (Fig. 1). In the pre-S/S regions, AB231908 formed variable, inconsistent outgroup associations with a range of geno-

types, including A and G (originally identified as recombination partners by Huy et al. [3], using SimPlot) and with chimpanzee variants (Fig. 1, gray line; not included in the original analysis), a recombination partner even more improbable geographically than genotype A or G.

Finally, Huy et al. (3) “justified” assigning the four Vietnamese strains into a new genotype on the basis of seven “unique” conserved amino acids: His⁵⁶, Ala⁶⁰, Asn⁸⁷, Val⁹⁰, Val⁹¹, Ile¹³⁶, and Lys¹⁹⁸. From the databases, it is evident that His⁵⁶ is present in subgenotype B1 and genotype C; Ala⁶⁰ is the consensus for genotype D and present in subgenotypes C2 to C4; Val⁹⁰, found in only three of the four Vietnamese sequences, is present in subgenotype C2; Val⁹¹ is common in genotype A; and Lys¹⁹⁸ is found in subgenotypes B1 to B4, C3, F1, and F2 and genotypes E and H. Ile¹³⁶ and Asn⁸⁷ are therefore the only amino acids unique to the four Vietnamese strains, a far-from-recognized criterion of HBV genotyping.

Since 1988, when nucleotide diversity of >8% in the entire genome was first proposed for genotyping (9), eight genotypes have been described and named A to H (1, 7, 8, 11), and their geographical distribution and clinical relevance have been extensively reported (5, 6). In addition to the eight currently recognized genotypes, intergenotype recombination generates novel HBV variants, with over 24 phylogenetically independent recombinant variants described (10, 13). These recombinants can spread in humans and develop specific distributions and epidemiology as shown for the B/C recombinant, which accounts for the majority of genotype B strains in mainland Asia (12). Since sequencing and phylogenetic analyses are widely available, numerous further reports on HBV variation can be expected. If every new recombinant is assigned to a new genotype, we would soon be running out of alphabet letters. Principles of HBV classification must be established and accepted by the international community of experts in the field in order to ensure that genotyping is consistent, relevant, and significant.

REFERENCES

1. Arauz-Ruiz, P., H. Norder, B. H. Robertson, and L. O. Magnius. 2002. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J. Gen. Virol.* 83:2059–2073.
2. Hannoun, C., H. Norder, and M. Lindh. 2000. An aberrant genotype revealed in recombinant hepatitis B virus strains from Vietnam. *J. Gen. Virol.* 81:2267–2272.
3. Huy, T. T. T., T. T. Ngoc, and K. Abe. 2008. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J. Virol.* 82:5657–5663.
4. Kramvis, A., K. Arakawa, M. C. Yu, R. Nogueira, D. O. Stram, and M. C. Kew. 2008. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J. Med. Virol.* 80:27–46.
5. Kramvis, A., M. Kew, and G. Francois. 2005. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine* 23:2409–2423.
6. Miyakawa, Y., and M. Mizokami. 2003. Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology* 46:329–338.
7. Norder, H., A. M. Courouce, and L. O. Magnius. 1994. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 198:489–503.
8. Norder, H., A. M. Courouce, and L. O. Magnius. 1992. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J. Gen. Virol.* 73:3141–3145.
9. Okamoto, H., F. Tsuda, H. Sakugawa, R. I. Sastrosoewignjo, M. Imai, Y. Miyakawa, and M. Mayumi. 1988. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J. Gen. Virol.* 69:2575–2583.

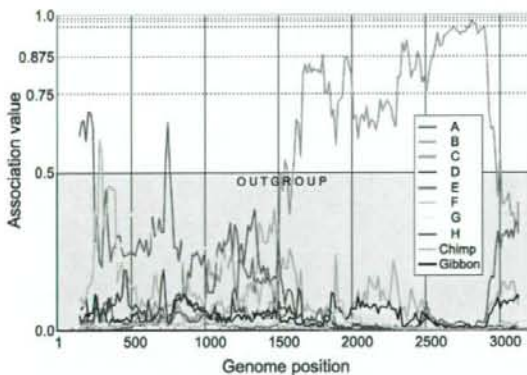


FIG. 1. GroupScanning analysis (10) of VH24 against reference groups of nonrecombinant HBV sequences of human genotypes A to H and nonhuman ape-derived variants (chimpanzee/gibbon) ($n = 288$), incorporating all HBV sequences used for recombination detection in the Huy et al. study (3). Association values of approximately 0.5 or lower indicate an outgroup position or no phylogenetic clustering with a reference group. Analysis of previously described Vietnamese variants (AF241407 to AF241409) produced almost identical results (data not shown).