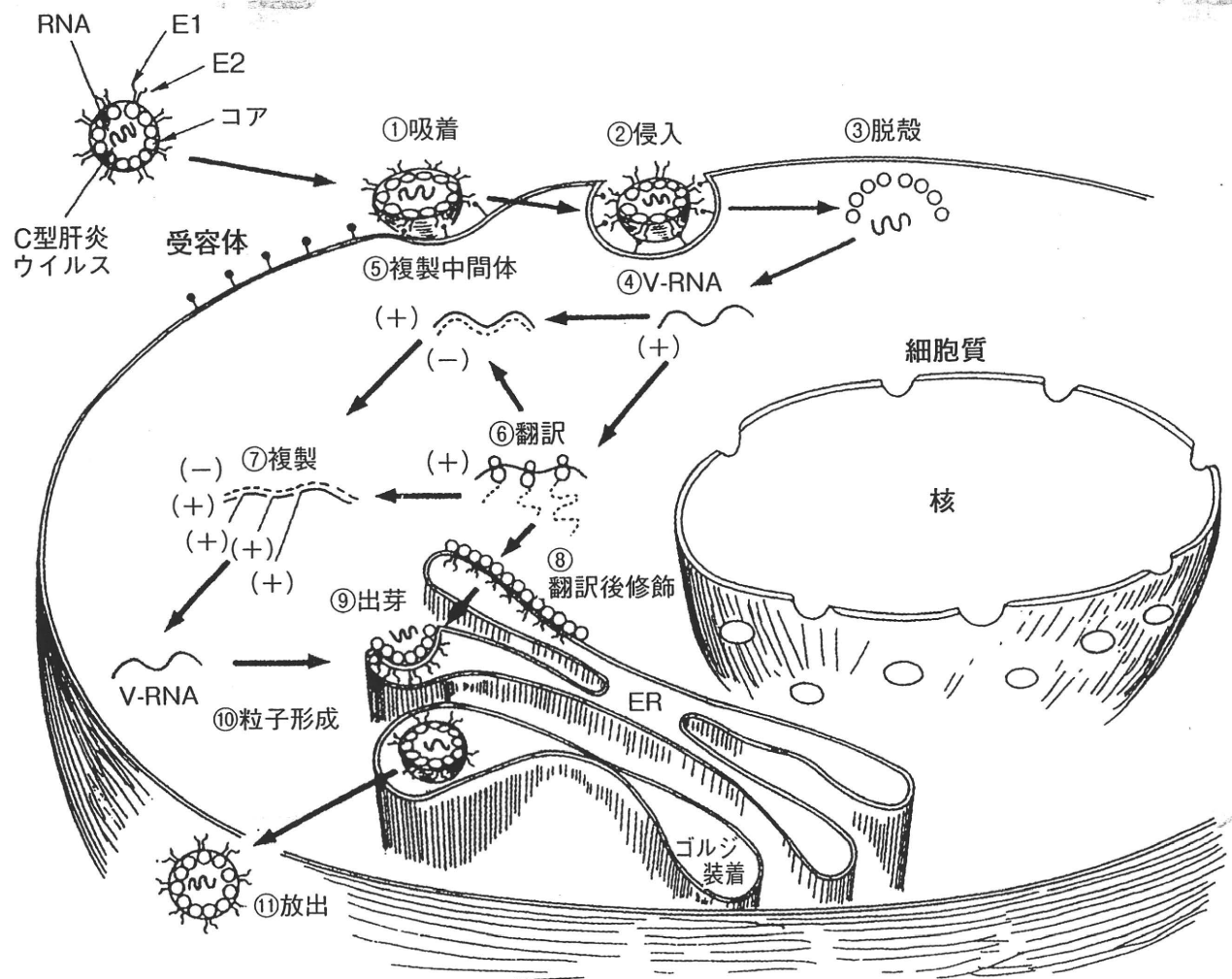


図1 HCV 生活環¹⁶⁾

(Translation) が開始され、大きな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つのエンベロープ蛋白 E1, E2 がプロセス (Processing) される。また、ウイルス自身がコードするプロテアーゼによって、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。ウイルス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。これを基にしてプラス鎖 RNA が合成され (複製 Replication)、ウイルス RNA や mRNA として働く。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 Assembly)、トランスゴルジを通り細胞膜に達して細胞外へ放出 (Release) されるものと考えられている。本稿では、これらの HCV 生活環の各ステップにおける脂質の役割について解説した。

2. HCV 粒子の構造

図2に HCV 粒子の推定されるモデルを示す。HCV ゲノムを囲むようにヌクレオカプシドが形成され、その周りにヘテロダイマーの形成した E1 と E2 蛋白が覆っている。最近、さらにこの粒子が超低比重リポ蛋白 (VLDL) や低比重リポ蛋

白 (LDL) に含まれていることを示す報告が集積してきている。E1 と E2 に HDL, LDL, VLDL と結合する性質があり, リポ蛋白に含まれる Apolipoprotein E (ApoE), ApoB, ApoC1 などが感染性に重要ということが報告されている。また, いろいろなリポ蛋白と結合することから, 患者血清由来のウイルスでは, さまざまな比重や大きさの粒子が存在しているものと考えられている。VLDL 形成や分泌を抑制すると HCV 分泌も減少することから, HCV は VLDL 分泌系を利用している可能性が考えられる⁵⁾。

3. 感染における脂質の役割

ウイルスの細胞表面への吸着および侵入はウイルス感染の最も初めのステップである。ウイルスは宿主細胞に侵入するため, ウイルスは細胞表面に存在する受容体に結合しなければならない。宿主細胞の受容体とウイルス粒子表面の蛋白の特異性結合はウイルスの組織特異性や宿主域を決定する。HCV は細胞表面に存在するヘパリンやヘパラン硫酸などの硫酸多糖類に捕捉されて濃縮された後, エンベロープ蛋白質を介して親和性の高い蛋白質性受容体に結合し, エンドサイトーシスによってエンドソームに取り込まれる。HCV の感染受容体候補分子として, 現在までに Heparansulphate proteoglycan (HSPG), C 型レクチン (DC-SIGN, L-SIGN), low-density lipoprotein (LDL) 受容体, CD81, ヒトスカベンジャー受容体クラス B-1 型 (SR-B1), Claudin-1, などが知られている。

我々はこの感染の課程において細胞表面の脂質が重要な役割を果たしていることを見出している。細胞表面を methyl-B-cyclodextrin (B-CD) で処理してコレステロールを除去した後, HCV を感染させたところ, B-CD の容量依存的に感染性が低下した。また, スフィンゴ脂質の主要分子スフィンゴミエリンを加水分解する sphingomyelinase (SMase) で細胞表面を処理することにより, 感

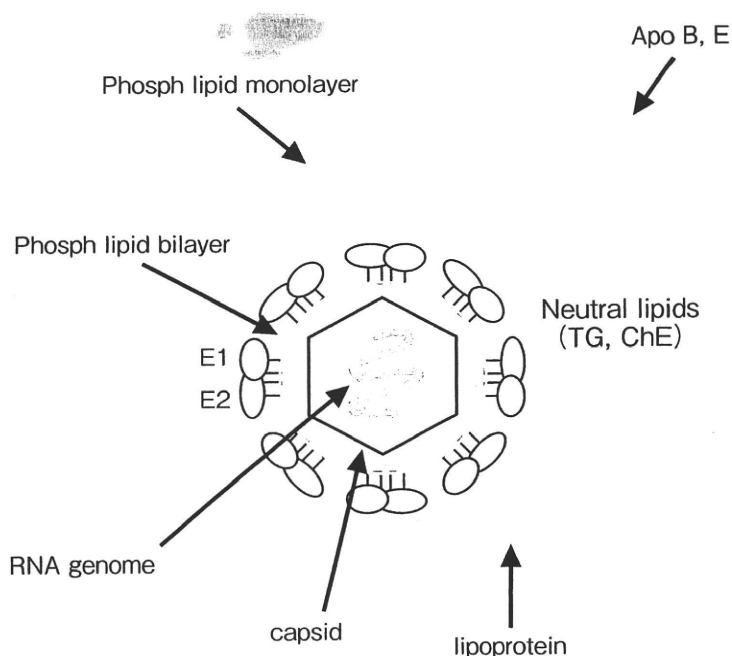


図2 HCV 粒子

染性の低下を観察した⁶⁾。Kapadia らは, 細胞表面のコレステロールは CD81 の細胞表面での安定性に関わると報告しており, Voisset らはスフィンゴミエリンの加水分解産物である ceramide が CD81 の細胞内取り込みを亢進させると説明している。

4. ウイルスゲノム複製における脂質の役割

1999 年, Bartenschlager らは, 本来 HCV ゲノムの中でウイルス粒子を形成する構造タンパク質領域を薬剤耐性遺伝子に置き換え, その下流に, より強力に HCV ゲノムの内部から翻訳させる働きを有する encepharomyocarditis virus (EMCV) の IRES を挿入した RNA レプリコンを作成した³⁾ (図3)。この RNA をトランスフェクトした細胞を薬剤存在下で培養することで, 自律複製する HCV 遺伝子配列を獲得した HCV ゲノムと, 更にこの HCV 遺伝子が複製しうる細胞を選択することを目指した。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細胞癌由来 Huh7 細胞の一部から得られ, これにより HCV で初めてタン

パク質レベルでウイルスの複製・増殖を解析できる系が確立された。

レプリコン細胞を用いて、アクチノマイシン D 処理して細胞内の DNA 依存性 RNA ポリメラーゼを抑えた上で、5-bromouridine 5'-triphosphate (BrUTP) を細胞に導入し、免疫組織染色で観察した⁷⁾。BrUTP が取り込まれた新規に合成された HCV RNA は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、これらは NS タンパク質と共局在した。レプリコン細胞を電子顕

微鏡で観察すると「membranous web」と呼ばれる小胞様構造物が認められることが報告されており⁸⁾、HCV の全ての構造、非構造蛋白を強制発現させても同様の膜変化が生じることが知られている。以上のことから、HCV の複製複合体は感染細胞の membranous web に存在しているものと思われる。

次に、生化学的手法を用いて、複製活性を維持したままの HCV 複製複合体を粗精製し解析した⁹⁾。細胞の lysate を非イオン性界面活性剤で処

理した後、分画したところ、HCV RNA と NS タンパク質の大部分は界面活性剤不溶性膜画分 (DRM) に残った。それぞれの画分に標識化合物 (CTP) を加え、この取り込みを指標にした HCV RNA 複製活性測定を行ったところ、活性は DRM にのみ検出された。以上のことから、この DRM に複製活性を保持した HCV 複製複合体が存在することが判明した。以上のように、HCV 複製複合体が DRM に検出されたことから、HCV 複製複合体が脂質ラフト上で形成される可能性が示唆された。そこで、HMG-CoA レダクターゼ阻害剤のロバスタチンでレプリコン細胞内のコレステロール合成を抑制すると HCV RNA 複製効率も落ちたことから、脂質ラフトが HCV 複製複合体と結合し、HCV 複製において重要な役割を果たしている可能性が示唆された⁹⁾。また、各種スフィンゴ脂質合

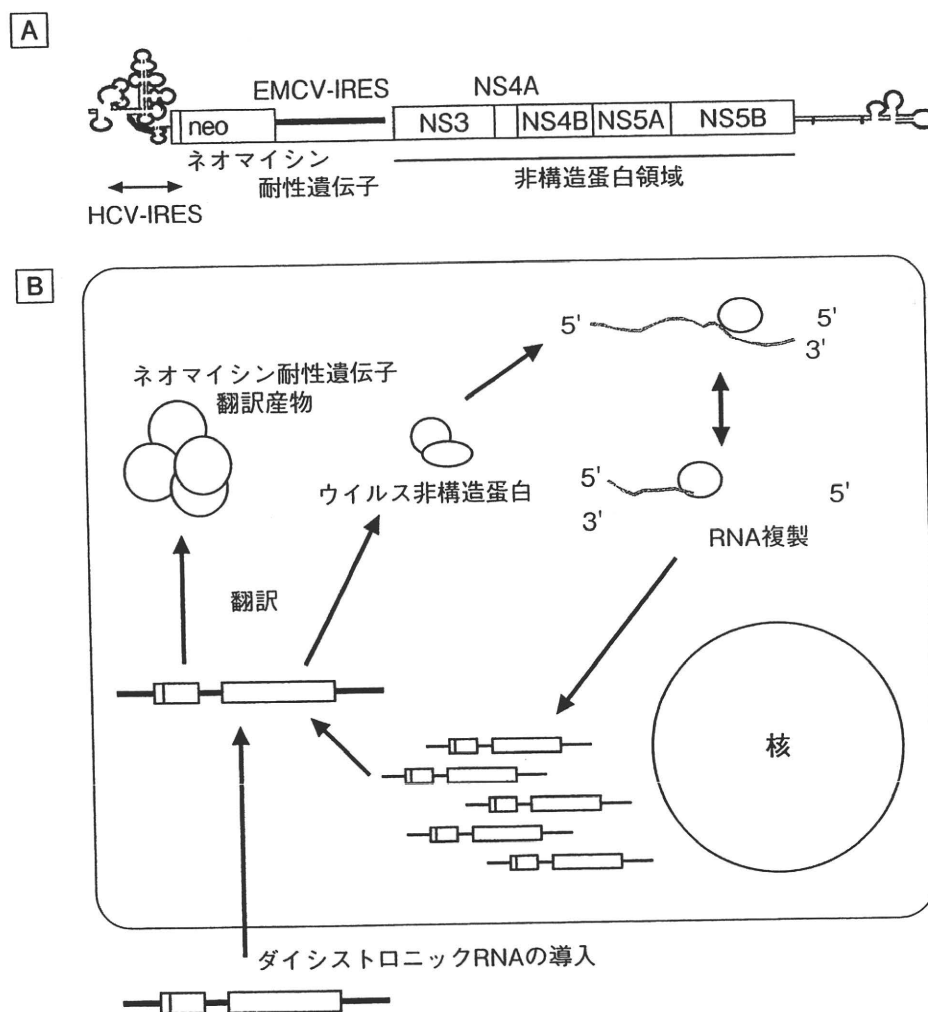


図3 レプリコン

【A】ダイシストロニック RNA レプリコンの構造、【B】ダイシストロニック RNA システム：RNA を導入すると、そこからポリメラーゼをはじめとしたウイルス非構造蛋白が翻訳される。この蛋白を利用して、RNA の複製構造蛋白領域を欠損しているため粒子形成は不可能であるが、ネオマイシン耐性遺伝子をもつため、複製している細胞を選択することが可能である。

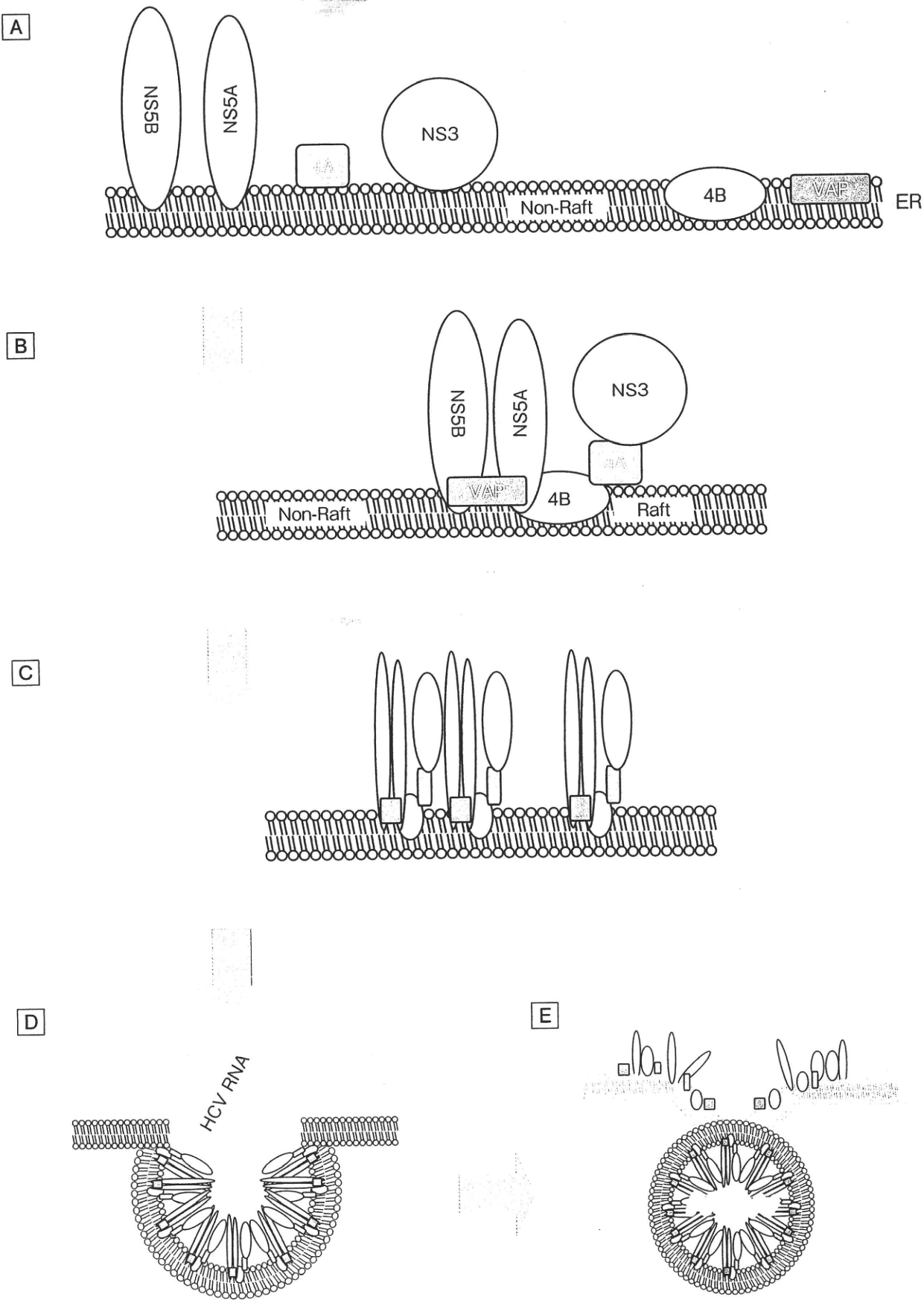


図4 脂質ラフト上での HCV 複製複合体形成モデル⁶⁾

成阻害剤が脂質ラフト形成を抑制することで、ウイルス複製を抑えるという報告があり、脂質ラフトの存在する膜上で複製が起こるという仮説が支持された¹⁰⁾。

以上のように、HCV は細胞の生体膜上の小胞内で複製複合体を形成し、複製するものと考えられている。脂質ラフトは細胞膜上にスフィンゴ脂質とコレステロールに富んだ微小領域を示す。この脂質ラフトは、膜表面上をイカダのように漂いながら、ラフト同士が結合して島状のものになったり、小胞を形成したりと、ダイナミックに変化しながら、ラフトに結合するタンパク質の濃縮や細胞内輸送、シグナルトランスダクション、脂質代謝を担っていると考えられる¹¹⁾。また、脂質ラフトはインフルエンザウイルスの集合・出芽、ヒト免疫不全ウイルスの集合・出芽や侵入、エボラウイルスの集合、コクサッキーウイルス A9 の侵入、HTLV-1 の膜融合や集合、マウス白血病ウイルスの侵入、麻疹ウイルスの集合、センダイウイルスの集合、RSウイルスの集合、マールブルグウイルス、ロタウイルスの集合、ヒト単純ヘルペスウイルスの集合や侵入、エコーウイルス 11 の侵入などの、多くのウイルスの侵入や粒子形成に重要な役割を果たしていることが報告されている。しかしながら、ウイルスゲノム複製に影響を与えることは HCV 研究で初めて示された⁹⁾。

図 4 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 (A)。HCVNS 蛋白はゴルジ体に輸送され、HCVNS 蛋白同士で結合する。また、細胞内膜タンパク質の一つで、細胞内膜輸送に関わっていると考えられている the human homologue of the 33-kDa vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP-A) 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¹²⁾。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 が中心となって、hVAP-33 や NS5A と共に、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 (B)。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。しかしながら、NS4B のように互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同士は安定化し、島状に次第に大きくなり、その過程で特定の蛋白を集積させる性格がある (C)。さらに、膜上の蛋白同士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 (D)。既に、NS4B 蛋白単独でもこの小胞構造を取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、複製複合体を作り、複製が始まるものと考えられる (E)。以上のように、脂質ラフトは NS 蛋白を集積させ、結合体を形成させるだけでなく、小胞構造をとり、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 複製複合体は脂質ラフトを含む膜小胞構造内に存在し、内部に存在する HCV RNA や NS タンパク質は外部からの RNA 分解酵素やプロテアーゼに対して保護されているものと考えられた。

5. 粒子形成における脂肪滴の役割

HCV 粒子の形成、分泌過程の解析もウイルス培養系の開発により可能となり、最近、脂肪滴の役割が注目されている。脂肪滴は ER の脂質二重膜の二葉間に脂質が蓄積して成長する。したがって成熟した脂肪滴は 1 枚の膜構造を持つ。さらに、脂肪滴は他のオルガネラと機能的に相互作用しており、細胞内を移動する。粒子形成に重要な役割を果たしている HCV 蛋白質はコア、エンベロープ、NS2、NS5A などである。コアの遺伝子には RNA 結合領域、コア同士が重合する領域、脂肪滴相互作用領域、などがコードされている。E1、E2 エンベロープ蛋白はその膜貫通領域でヘテロダイマーを形成し、ER 停留シグナルを持つ。コア蛋白質と E1 の間はず signal peptidase で切断される。コア蛋白質 C 末端の膜貫通領域は ER 膜に貫通しているが、さらに膜貫通領域が ER 膜内で signal peptide peptidase に切断されて成熟

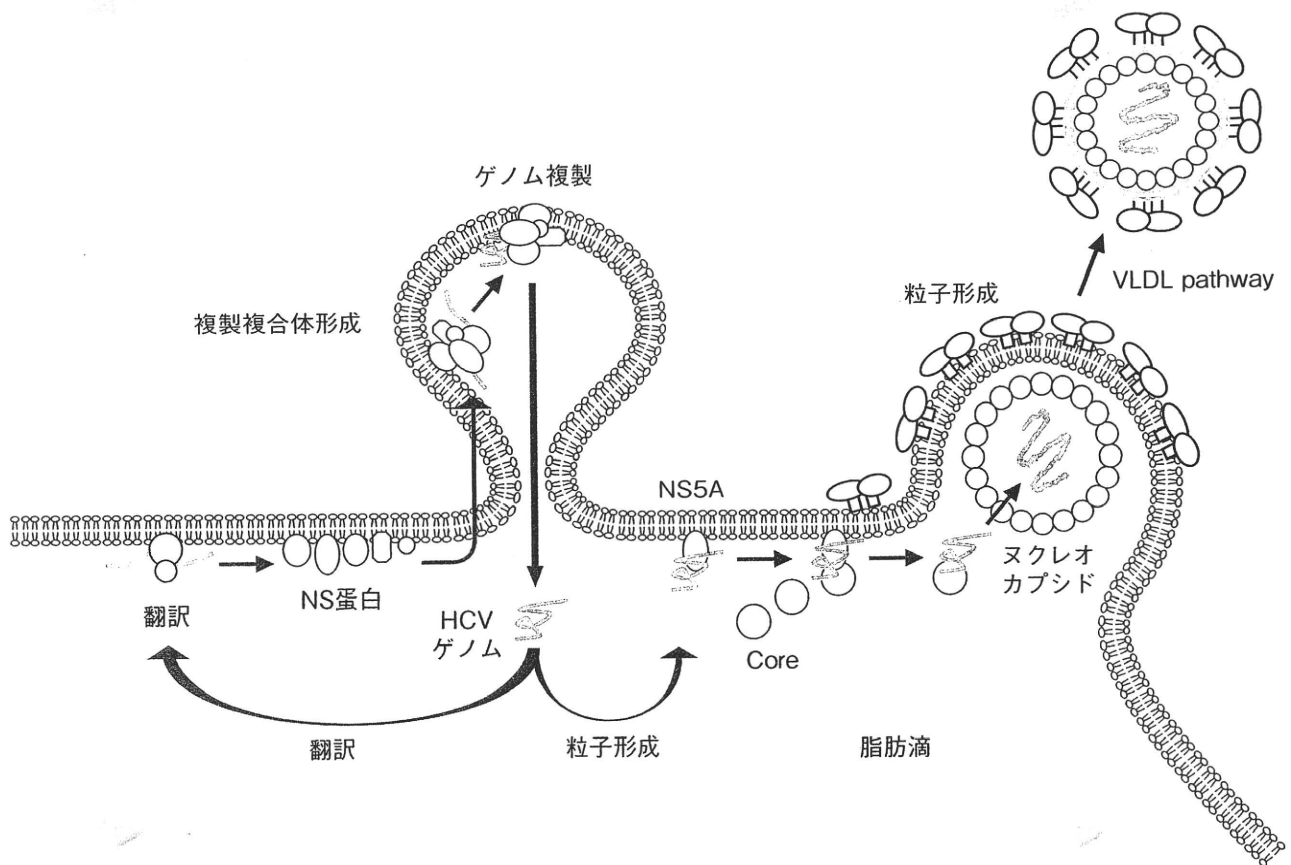


図5 HCV 粒子形成初期過程における NS5A 蛋白の役割のモデル

前駆体蛋白からプロセシングされた HCV 蛋白のうち、非構造蛋白 (NS3, 4A, 4B, 5A, 5B) は宿主因子とともに複製複合体を形成しゲノム RNA 複製を行う。新生された HCV RNA は翻訳に用いられるものと粒子形成に用いられるものに分かれる。粒子形成に用いられる HCV RNA は NS5A 蛋白と結合し、その複合体が脂肪滴上の Core 蛋白と会合することがヌクレオカプシド形成の引き金になる。

コア蛋白質になると考えられている。膜貫通領域がこの切断により短くなり、脂肪滴の1枚の膜上に自由に移動できる。さらにコア蛋白質の疎水性領域が脂質に親和性があり、脂肪滴上に蓄積する。興味深いことに脂肪滴へのコア蛋白質の蓄積は、脂肪肝および肝臓癌の発症に関与しているだけでなく、ウイルス粒子形成に重要な役割があることが明らかにされた¹³⁾。Shimotohono らはウイルス感染細胞内で脂肪滴をコア蛋白質が被い、さらにそのコア蛋白質を NS5A 蛋白質が被っていることを発見した。NS5A 蛋白質は ER 膜上の複製

複合体由来と考えられ、脂肪滴上のコア蛋白質と、脂肪滴に近接する ER 膜上の NS5A 蛋白質が結合していた。HCV のリバーシジェネティクス実験系により、コアと NS5A 蛋白質が結合できない変異をウイルスゲノムに導入すると、感染性ウイルス粒子の形成がなくなる。つまり、感染性ウイルス粒子の形成には脂肪滴上でのコア蛋白質と NS5A 蛋白質の結合が重要である。Masaki らは、NS5A の domain III の変異体では Core 蛋白と結合できなくなることを、またこの変異によって NS5A 蛋白は脂肪滴周辺膜に局在できなくなるこ

と、を見出した¹⁴⁾。さらに、新たに合成された HCV ゲノムは NS5A の domain I 部位と結合し、NS5A の domain III と Core 蛋白と会合することで、HCV ゲノムへの Core の会合が起こり、ヌクレオカプシドが形成される可能性を見出した(図 5)。

6. HCV 粒子形成、感染における生体膜脂質の役割

エンベロープウイルスは小胞体、ゴルジ体、形質膜などの細胞の生体膜を被って出芽するため、細胞の膜脂質はウイルス粒子形成に重要な役割を果たしているものと考えられる。さらに、ウイルス粒子の膜脂質が宿主細胞への感染過程に関与する例も報告されている。しかし、HCV 粒子に含まれる脂質成分については解析が進んでおらず、その生理学的役割も不明であった。そこで筆者らは、培養細胞で産生させた HCV JFH-1 粒子を、培養上清から、限外濾過、ショ糖密度勾配超遠心、ヘパリンアフィニティクロマトグラフィーを組み合わせて、濃縮、粗精製し、この HCV 粒子に含まれる脂質を生化学的に解析した。その結果、コレステロール／リン脂質モル比が細胞の膜分画に比べて有意に高値を示したことから、コレステロールに富んだ生体膜からの出芽、または粒子形成、分泌過程でのコレステロールとの会合の可能性が考えられた⁶⁾。次にこの HCV 粒子上の膜脂質がどのような役割を果たしているかを調べるため、HCV 粒子表面を B-CD で処理してコレステロールを除去した後感染させたところ、B-CD の容量依存的に感染性が低下し、B-CD 処理した粒子にコレステロールを添加したところ、その感染性は回復した⁶⁾。また、SMase で HCV 粒子を処理することにより感染性の低下を観察した。これらのことは HCV genotype 1b のエンベロープを持つシュードタイプウイルスやキメラウイルスでも確認できた。以上から、ウイルス粒子表面のコレステロールとスフィンゴ脂質はウイルスの遺伝子型に依らず感染に重要な役割を果たしていることが示された。次に、HCV 粒子上のコレステロール

が粒子の物性に与える影響を調べた。HCV 産生細胞の培養上清をショ糖密度勾配遠心分画すると Core 蛋白および HCV RNA のピークは 1.17 g/ml 分画、感染性のピークは 1.13 g/ml 分画となり、感染性のピークがウイルス遺伝子のそれに比べ低密度側に存在した。濃縮したこの培養上清を B-CD 処理しコレステロール除去後に同様に遠心分画を行うと、Core 蛋白のピークは 1.20 g/ml 分画に移行し、感染性はいずれの分画も検出限界以下であった。さらに、B-CD 処理後の培養上清にコレステロールを添加すると Core 蛋白のピークは低密度側へシフトし感染性も回復した。このようなコレステロールの除去、および、その後の添加による感染性の回復は 5 mg/ml B-CD 処理で観察されるが、B-CD 濃度を 10 mg/ml へ上げた場合は、コレステロール添加によって感染性の回復は見られない。これらのことから、HCV 粒子表面のコレステロールは粒子構造の維持に役立っており、コレステロールを完全に除去してしまうと粒子構造は致命的なダメージを受ける。これに対し、部分的に除去した場合の構造変化は感染性を低下させるものの、その変化は再生可能なレベルである、と考えられた。次に、HCV 粒子上のコレステロールおよびスフィンゴ脂質が感染過程のどのステップに関与するのかを解析した。あらかじめコレステロール除去または SMase 処理を行った HCV 粒子の宿主細胞への吸着性は、未処理ウイルスと同等であったのに対し、吸着後の細胞内への取り込みは、これらの前処理を施した HCV で顕著な低下が認められた。レセプター蛋白分子とともに標的細胞内へウイルスが侵入する過程に粒子コレステロール、スフィンゴ脂質が関与する可能性が示された。

7. おわりに

これまでの研究から、(i) ウイルス粒子膜は脂質に富んでおり感染に重要⁶⁾、(ii) 細胞の形質膜の脂質も感染に重要⁶⁾、(iii) 細胞の生体膜脂質はウイルスゲノム複製に重要⁹⁾、(iv) 脂肪滴周辺の膜構造が粒子形成に重要¹³⁾、(v) ウイルス粒子は

リポタンパク分泌系を利用して放出され⁵⁾, (vi) ウイルス粒子の被るリポタンパクは感染性に重要など, HCV はその生活環の多くのステップに脂質を必要としていることが分かってきた。そこで, 筆者らはスタチン製剤でウイルス増殖を抑えることが可能かどうか調べた。ロバスタチンを HCV 持続感染細胞に投与したところウイルス粒子産生量が強く抑制された。スタチン製剤は既に臨床の現場で広く使われており, 安全性が確立している薬剤であり, 既に C 型肝炎患者の治療も試みられている。スタチン製剤単独療法では HCV 治療に有効と無効の報告があり, 意見が割れるところであるが, IFN との併用の場合には HCV 治療に有効¹⁵⁾ という報告がある。

HCV はゲノム配列が多様で, 大変変異しやすいウイルスである。そのエンベロープのアミノ酸配列を変えて宿主の免疫系から逃れ慢性持続感染を起こしていると考えられているだけでなく, IFN やリバビリンと言った薬剤に対しても耐性を持つウイルスが出現しやすいことが知られている。新たな抗 HCV 薬として, ウイルスプロテアーゼやポリメラーゼと言ったウイルス複製に関与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。上記で報告した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。

謝 辞

本研究は下記の多くの研究者のご協力を得て遂行できたものであり, ここに謝意を表す: 松浦善治(大阪大学微生物病研究所・分子ウイルス分野), 深澤征義, 花田賢太郎(国立感染症研究所・細胞化学部), 西島正弘(国立医薬品食品衛生研究所), マイケル・ライ(南加大・微生物学免疫学研究室), 脇田隆字, 鈴木哲朗, 宮村達男(国立感染症研究所・ウイルス第二部)。

参 考 文 献

- 1) Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; **244**: 359-362.
- 2) Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikuchi S, Watanabe Y, Koi S, Onji M, Ohta Y *et al.*: Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl Acad Sci USA*. 1990; **87** (17): 6547-6549.
- 3) Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R: Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999; **285**: 110-113.
- 4) Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 2005; **11**(7): 791-796.
- 5) Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M Jr, Ye J: Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 2007; **104** (14): 5848-53.
- 6) Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2008; **82**: 5715-24.
- 7) Shi ST, Lee KJ, Aizaki H, Hwang SB, Lai MM: Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2. *J. Virol*. 2003; **77** (7): 4160-4168.
- 8) Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K: Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol*. 2002; **76** (12): 5974-5984.
- 9) Aizaki H, Lee KJ, Sung VM, Ishiko H, Lai MM: Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology* 2004; **324** (2): 450-461.
- 10) Sakamoto H, Okamoto K, Aoki M, Kato H, Katsume A, Ohta A, Tsukuda T, Shimma N, Aoki Y, Arisawa M, Kohara M, Sudoh M: Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nat Chem Biol* 2005; **1** (6): 333-

337.

- 11) Simons K, Ikonen E: Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; 387 (6633): 569-72.
- 12) Gao L, Aizaki H, He JW, Lai MM: Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol* 2004; 78 (7): 3480-3488.
- 13) Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K: The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 2007; 9 (9): 1089-97.
- 14) Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol* 2008; 82 (16): 7964-76.
- 15) Sezaki H, Suzuki F, Akuta N, Yatsuji H, Hosaka T, Kobayashi M, Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, Miyakawa Y, Kumada H: An open pilot study exploring the efficacy of fluvastatin, pegylated interferon and ribavirin in patients with hepatitis C virus genotype 1b in high viral loads. *Intervirology* 2009; 52: 43-8.
- 16) Aizaki H, Nagomori S, Aoki Y, Ishii K, Suzuki T, Matsuura Y, Miyamura T: The utilization of human hepatocyte in the study of hepatitis C virus; establishment of the efficient replication system of hepatitis C virus. *Tiss Cult Res Commun* 1999; 18: 265-278.

著者紹介



相崎英樹 (あいざき ひでき)

1990 年 東京慈恵会医科大学医学部卒業
1992 年 同大研修修了, 同大第一内科入局, 国立
感染症研究所 (旧国立予防衛生研究所)
ウイルス第二部協力研究員
1993 年 ウイルス肝炎研究財団流動研究員
1996 年 科学技術振興事業団科学技術特別研究員
1999 年 ヒューマンサイエンス振興財団リサーチ
レジデント
2000 年 国立感染症研究所主任研究官
2002-04 年 ハワードヒューズ医学研究所, 南カル
フォルニア大学微生物免疫学教室リサー
チアソシエイト

国立感染症研究所 ウイルス第二部
〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1
TEL: 03-5285-1111 (内線 2521)
E-mail: aizaki@nih.go.jp

5. C型肝炎ウイルスの複製と粒子形成

鈴木 哲朗*, 原 弘道, 相崎 英樹, 鈴木 亮介, 政木 隆博

国立感染症研究所ウイルス第二部

*現住所: 浜松医科大学医学部感染症学講座

輸血による新たな感染は激減したものの, C型肝炎ウイルス (HCV) キャリアは我が国だけで約 200 万人とされ, キャリアからの発症予防, 慢性肝炎からの肝硬変化, 発がん阻止は, 高齢化社会を迎え非常に重要な課題である. HCV 生活環の各過程の調節機構を分子レベルで明らかにすることにより, 治療薬開発のための新たな分子標的が見出される. HCV ゲノム複製機構については, 近年, 複製複体の性状解析が進み, 複製調節に関与する様々な宿主因子が同定されている. 筆者らは, ATP 産生に重要な creatine kinase B (CKB) が HCV 複製に関与することを見出した. CKB は NS4A と相互作用して複製の場へリクルートされエネルギー供給に寄与する可能性を示した. この他, 粒子形成過程と宿主脂質代謝系との関連など最近のトピックスを紹介する.

はじめに

肝炎, 肝硬変, 肝がんの主要な原因因子である C型肝炎ウイルス (HCV) は, 約 9.6 kb の一本鎖のプラス鎖 RNA をゲノムとし, フラビウイルス科 (*Flaviviridae*) のヘパシウイルス属 (*Hepacivirus*) に分類されている. 約 3010 アミノ酸からなる前駆体蛋白質が, 小胞体に存在するシグナルペプチダーゼとシグナルペプチドペプチダーゼ, 及びウイルス自身がコードする 2 種類のプロテアーゼによってプロセッシングをうけ, ウイルス粒子を形成する構造蛋白質 (Core, E1, E2) とウイルス粒子に含まれない非構造蛋白質 (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) が作られる. E2 の C 末端側には p7 と呼ばれる小分子が存在するが, ウイルス粒子に含まれるかは不明である³⁵⁾.

1999 年, 培養細胞で HCV サブゲノム RNA が自律複製するレプリコンシステムが開発され, ゲノム複製機構の研究は進展を見せ, さらに, 2005 年, 劇症肝炎患者から単離

された JFH-1 株のゲノム RNA から感染性粒子が効率よく産生されることが見出され, HCV の生活環全般に関する分子生物学的研究が可能となった.

HCV ゲノム複製

この 10 年の間にレプリコンシステムを使った解析から HCV のゲノム複製機構について多くの知見が得られた. HCV レプリコン RNA が複製する細胞の電顕観察から, Membranous web と呼ばれる小胞様構造が HCV ゲノム複製の場と推定されている¹¹⁾. 一方, 生化学的解析から, NP-40 や Triton X-100 などの非イオン性界面活性剤処理で不溶性となる膜分画 (DRM 分画) に HCV 複製活性が保持されることが示され^{1, 33)}, コレステロール合成阻害剤やスフィンゴ脂質合成阻害剤を用いた解析などから, HCV のゲノム複製には脂質ラフト様膜構造が関与することを示唆する知見が蓄積されている^{1, 32, 39)}. 一般には, Membranous web は小胞体由来と考えられ, 脂質ラフトは小胞体に存在しないとされることから, HCV 複製の足場となる膜構造の性状を明らかにするためには, 更に詳細な解析が必要である. いずれにしても, DRM 分画にはウイルスゲノム RNA が鋳型となってマイナス鎖が作られ, さらにそれからプラス鎖 RNA が合成される活性が存在する. そしてこの膜分画には, NS3 ~ NS5B の 5 種類の HCV 非構造蛋白及び宿主細胞由来因子からなる複製複体が存在することが示されている^{3, 22, 28)} (図 1).

HCV ゲノム複製に関与する宿主因子としては, これまで

連絡先

〒431-3192

浜松市東区半田山 1-20-1

浜松医科大学医学部感染症学講座

TEL: 053-435-2336

FAX: 053-435-2337

E-mail: tesuzuki@hama-med.ac.jp

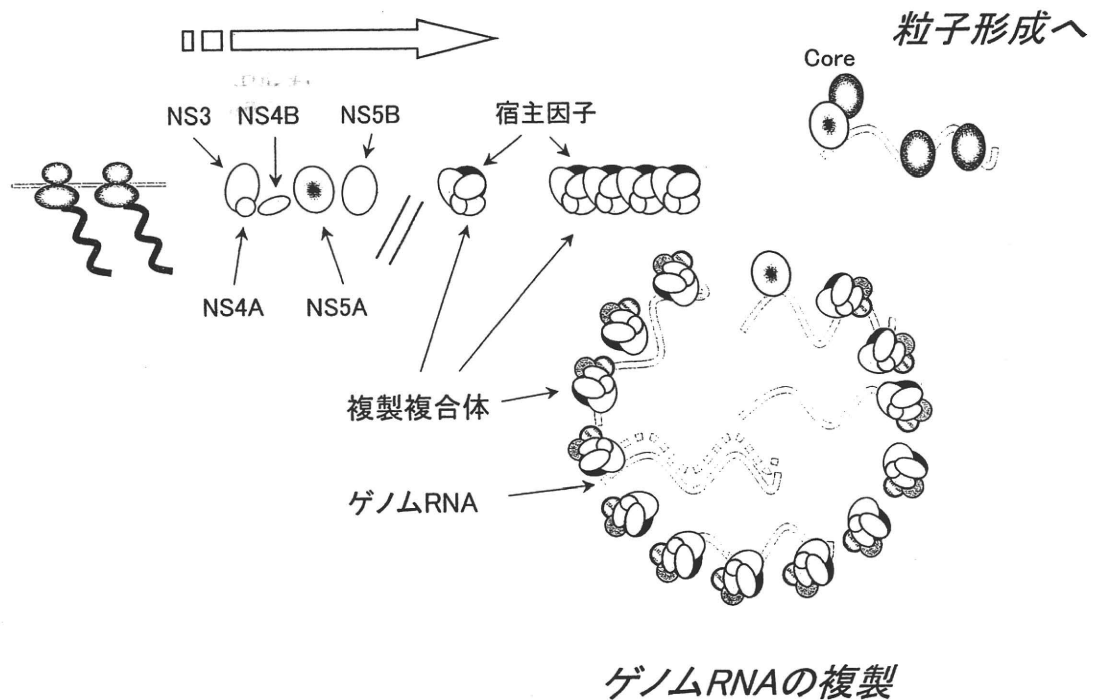


図1 HCV ゲノム複製複合体の形成

翻訳された前駆体蛋白は宿主細胞のシグナルペプチダーゼ、シグナルペプチドペプチダーゼ及び2種類のHCVプロテアーゼによって切断される。NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B蛋白は相互に会合、また宿主蛋白を取り込んだ形で複製複合体を形成する。複製複合体が膜上で高密度化すると、ウイルス蛋白間の相互作用等により膜構造の変化がおり、小胞構造体が形成される。その際、取り込まれたプラス鎖ゲノムRNAからマイナス鎖(点線で記載)が作られさらにプラス鎖RNAが合成される。新生されたゲノムRNAとNS5A蛋白との複合体がCore蛋白と会合しヌcleoキャプシド形成が進む。

にVAP, FKBP3, Hsp90, hBind-1, FBL2, Cyclophilin Bなど10数種類の蛋白が同定されている。VAP-A/B及びSNARE様蛋白はNS5A, NS5Bと結合し、複製複合体形成に働くと考えられる^{9, 12)}。最近、VAP-BのスプライシングバリエーションであるVAP-Cが、VAP-A/BとNS5Bとの結合を競合的に阻害することによってHCV複製を抑制しうることも報告された²¹⁾。また、NS5Aと相互作用するFKBP8やhBind-1などのコシャペロンがHsp90を複製複合体へ運ぶことがHCV複製に重要であることが示された^{30, 31, 36, 37)}。Cyclophilin Bの関与については、免疫抑制剤シクロスポリンの持つ抗HCV活性の作用機序解析を端緒として明らかとなった⁴¹⁾。FBL2はゲラニルゲラニル化されてNS5Aと結合し複製複合体に取り込まれる⁴⁰⁾。しかしながら、HCV複製複合体の形成過程、機能などについて未だ十分に解明されているとは言えない。

CKB：新たに見出されたHCV複製関連因子

そこで我々は、比較プロテオーム解析によって、HCV複製複合体を構成し複製調節に働く新規宿主因子の探索を行った。すなわち、前述のようにHCVゲノムが複製する細胞中のDRM分画では複製活性が保持されることから、サ

ブゲノムレプリコンを有するHuh-7細胞及び親株細胞からそれぞれDRM分画を調製し、各蛋白レベルを両分画間で比較し、レプリコン細胞のDRMで存在量が顕著に高かった蛋白27種類を同定した¹³⁾。その中には、分子シャペロンなど蛋白ホールディングに関わるもの、代謝、生合成系の酵素、細胞骨格形成蛋白などが含まれていた。これらの蛋白が実際にHCVの複製に関与するかどうかを調べるため、各分子に対するsiRNAをレプリコン細胞へ導入し細胞内HCV RNAレベルの変化を解析した結果、HCVゲノム複製を正に制御しうる因子としてcreatine kinase B (CKB)などを同定した。CKBについては、遺伝子ノックダウンの他、阻害剤cyclocreatineの添加、ドミナントネガティブ体の強制発現によってもHCV複製、感染性ウイルス産生が抑制されることを示した¹³⁾。creatine kinaseは、エネルギーを多く必要とする、あるいはエネルギーを急速に必要とする組織でのATPの供給、ATPレベルの維持に重要な酵素であり、高エネルギーリン酸結合を持つクレアチンリン酸からADPへリン酸基を転移しATP生成に働く。ATPのエネルギーを必要とする生化学反応系において、クレアチンリン酸と共にATPの再生系として利用される。CKBはcreatine kinaseのアイソフォームの一種であり肝

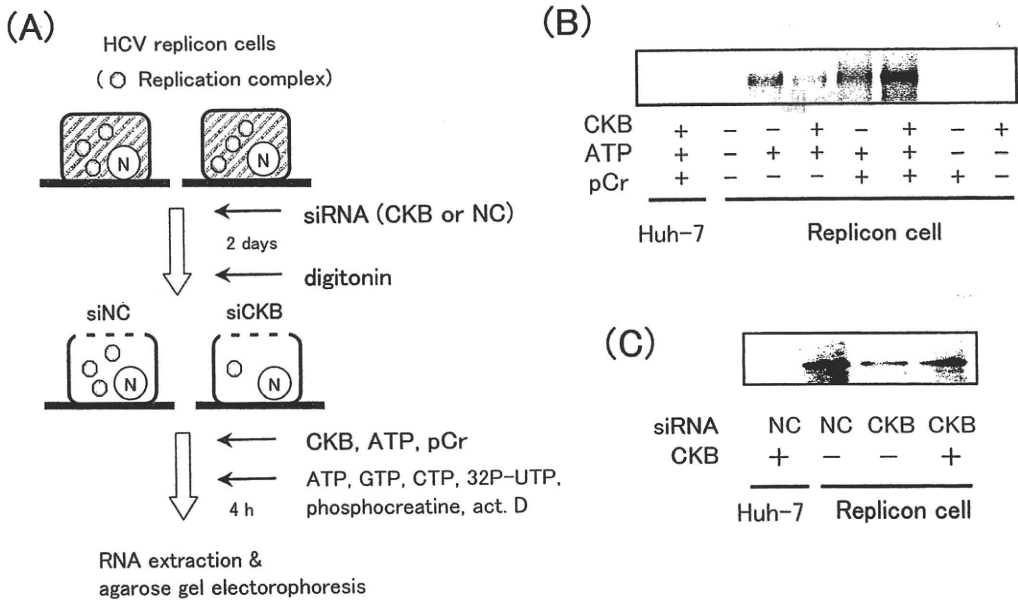


図2 CKBはHCV replicase 活性を亢進させる¹³⁾
(A) セミインタクトレプリコン細胞を用いたHCV replicase assay. (B) 作製したセミインタクト細胞 (Huh7 または Replicon cell) に精製 CKB, ATP, クレアチンリン酸 (pCr) を図のように添加し複製活性を調べた. (C) レプリコン細胞に CKB に対する siRNA または陰性コントロール siRNA (NC) を導入した後セミインタクト化した. それぞれに CKB を添加 (または未添加) し複製活性を解析した.

臓を含む多様な組織で発現している. 興味深いことに, CKB は HCV の感染や複製によってその発現が亢進する訳ではないが, HCV レプリコン細胞では DRM 分画に enrich されることが示された¹³⁾. すなわち, HCV ゲノムが複製している細胞においては, CKB が特定の細胞内分画に集積する現象が起こりうると考えられたため, 次に, CKB が HCV 蛋白と相互作用し, それによって CKB が DRM ヘリクルートされるという作業仮説を立て検証を行った. 免疫沈降解析の結果, CKB は, HCV 非構造蛋白のうち NS4A と相互作用すること, その相互作用には CKB の C 末端側と NS4A の中央領域が重要であることが明らかとなった¹³⁾. NS4A は 54 アミノ酸残基からなるポリペプチドで, その中央部を介して NS3 と結合し NS3 セリンプロテアーゼ活性の cofactor として機能している. また, N 末端側は膜貫通領域⁷⁾, C 末端側は NS5A の高リン酸化に関わる領域²³⁾と報告されている. CKB との相互作用に重要な NS4A 領域は NS3 との結合に関わる領域に近接すると考えられたが, 免疫沈降法の結果, CKB は NS3-4A 結合を阻害する訳ではなく, CKB-NS4A-NS3 三者の複合体が形成されることが示された. また, NS4A との結合部位を欠損した CKB では, DRM 分画局在性が低下し, HCV 複製への関与がキャンセルされた¹³⁾.

さらに, 複製複合体への CKB の介入が HCV replicase 活性に重要かどうかを明らかにするため, セミインタクトレプリコン細胞を使った replicase assay を行った. これ

は Miyanari らによって開発された方法で, レプリコン細胞をジギトニン処理したセミインタクト状態で HCV RNA 複製をモニターし, 複製活性に対するプロテアーゼ, 界面活性剤処理などの影響を解析することができる²⁸⁾ (図 2A). セミインタクトレプリコン細胞に ATP を加えると replicase 活性の上昇が認められるが, ここへさらに精製 CKB 及び クレアチンリン酸 (pCr) を添加すると同活性が顕著に上昇することがわかった (図 2B). また, レプリコン細胞から CKB をノックダウンしておいたセミインタクト細胞では replicase 活性は低下するが, そこへ CKB を添加すると活性の回復が観察された (図 2C). replicase 活性のうち, NS3-4A が関与する ATP 依存的反応は RNA helicase 活性であるが, 実際にこの活性が CKB, pCr 添加によって亢進することを in vitro helicase assay で確認した¹³⁾.

以上の成績より, CKB を介した HCV 複製分画への ATP 供給が同ウイルスのゲノム複製調節に寄与していると結論づけた. CKB は NS4A との結合を通じて HCV 複製複合体ヘリクルートされ, HCV ゲノム複製調節に役割を果たすと考えられた.

HCV 粒子形成機構に関する最近の知見

細胞内中性脂肪に蓄積に用いられる脂肪滴が HCV の感染性粒子形成に重要な役割を果たすことが 2007 年に報告²⁷⁾されて以来, HCV 粒子形成の分子機構に関する研究は, 脂肪滴のバイオロジー, リポ蛋白産生などの脂質代謝と関連

づけながら進められている。脂肪滴は小胞体由来膜構造等の小器官と相互作用しながら細胞質内で動的な振舞いを見せる。HCV増殖細胞の中では、脂肪滴膜上にHCVヌcleoキャプシド形成を担うCore蛋白が局在しており、膜構造に随伴したE1、E2蛋白また非構造蛋白も、膜間またはCore蛋白との相互作用によって脂肪滴周辺へ集合する。このようにして感染性HCV粒子の形成は脂肪滴周辺環境で効率よく進行すると考えられる^{27, 29)}。筆者らは、非構造蛋白NS5Aが脂肪滴の周囲で粒子形成の初期過程に関与することを報告した²⁶⁾。複製複合体で新生されたウイルスゲノムRNAをNS5Aが捕捉した後、NS5AのC末端領域とCoreとの相互作用を介して、ゲノムRNA-NS5A-Core複合体が作られる。これによりCoreによるRNAパッケージングが開始される、というモデルを提唱した(図1)。HCV粒子形成におけるNS5Aの役割は他の研究グループからも報告されている^{4, 38)}。

HCV感染患者の血中ウイルスは多様な密度(約1.05から1.25g/mL)を示すことが知られている。低密度域のHCV粒子は、アポリポ蛋白を含みトリグリセリドに富んだ超低比重リポ蛋白VLDLが会合したかたちで存在するものと推定され、このような低密度粒子は高い感染性を有することがチンパンジー、培養細胞での感染実験で示されている^{6, 14, 24)}。また筆者らはHCV粒子表面のコレステロール、スフィンゴ脂質が感染性に重要であることを示した²⁾。VLDLの構成因子であるアポリポ蛋白B(apoB)及びアポリポ蛋白E(apoE)がHCV粒子形成に関与すると報告されており^{5, 8, 10, 15, 18)}、HCVエンベロップ蛋白の細胞外への分泌はapoB陽性リポ蛋白のアセンブリーに依存している¹⁶⁾。apoEについては遺伝子ノックダウンによってHCVの細胞への侵入過程、ゲノム複製は影響をうけないものの感染性HCVの産生は顕著に低下すること¹⁸⁾、NS5Aと相互作用することなどが見出されている⁵⁾。また、VLDLの産生を低下させるミクロソームトリグリセリド転移蛋白阻害剤によって感染性HCV産生は有意に抑制される¹⁸⁾。

最近、HCV非構造蛋白についてNS5A以外にNS3、NS2も感染性粒子の形成に関与することが報告されている。NS3のC末端側helicase領域が粒子形成に係わっているとされている²⁵⁾。NS2についてもmutagenesis解析から膜貫通領域、C末端領域など粒子形成に重要な領域が見出されている^{17, 19, 20, 34)}(鈴木ら未発表)。

おわりに

インターフェロンを基軸とした化学療法の進歩により、最近テレビで流れているように「C型肝炎は治る病気になりました」と言っても過言でないのかもしれない。しかしながら、現行の治療法に対する無効例、治療終了後に肝炎が再燃するケースも依然として多い。化学療法の治療効果をより高め、症状、体質などの異なる様々な症例に対応す

るためには、作用標的の異なる種々の抗HCV剤の創薬化が重要である。現在、HCVプロテアーゼ、ポリメラーゼ、NS5Aをそれぞれ標的とした化合物あるいはシクロスポリン誘導体などによるHCV複製阻害剤の開発が進んでいる。本稿で紹介したように、HCVゲノム複製調節に働く種々の宿主因子が同定され、感染性粒子形成の分子機構も明らかにされつつある。これらは次世代抗HCV薬開発のための新たな標的になるものと期待される。

文 献

- 1) Aizaki H, Lee KJ, Sung VM, Ishiko H, Lai MM.: Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology* 324: 450-461, 2004.
- 2) Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T.: A Critical Role of Virion-Associated Cholesterol and Sphingolipid in Hepatitis C Virus Infection. *J Virol.* 82: 5715-5724, 2008.
- 3) Ali N, Tardif KD, Siddiqui A.: Cell-free replication of the hepatitis C virus subgenomic replicon. *J Virol.* 76: 12001-12007, 2002.
- 4) Appel N, Zayas M, Miller S, Krijnse-Locker J, Schaller T, Friebe P, Kallis S, Engel U, Bartenschlager R.: Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog.* 4: e1000035, 2008.
- 5) Benga WJ, Krieger SE, Dimitrova M, Zeisel MB, Parnot M, Lupberger J, Hildt E, Luo G, McLauchlan J, Baumert TF, Schuster C.: Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* 51: 43-53, 2010.
- 6) Bradley D, McCaustland K, Krawczynski K, Spelbring J, Humphrey C, Cook EH.: Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII-derived isolate in sucrose. *J Med Virol.* 34: 206-208, 1991.
- 7) Brass V, Berke JM, Montserret R, Blum HE, Penin F, Moradpour D.: Structural determinants for membrane association and dynamic organization of the hepatitis C virus NS3-4A complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 14545-14550, 2008.
- 8) Chang KS, Jiang J, Cai Z, Luo G.: Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol.* 81: 13783-13793, 2007.
- 9) Gao L, Aizaki H, He JW, Lai MM.: Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol.* 78: 3480-3488, 2004.
- 10) Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV.: Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol.* 82: 2120-2129, 2007.
- 11) Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R,

- Blum HE, Bienz K, Moradpour D. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol.* 77: 5487-5492, 2003.
- 12) Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe T, Suzuki T, Lai MM, Miyamura T, Moriishi K, Matsuura Y.: Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J Virol.* 79: 13473-13482, 2005.
 - 13) Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T.: Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J Virol.* 83: 5137-5147, 2009.
 - 14) Hijikata M, Shimizu YK, Kato H, Iwamoto A, Shih JW, Alter HJ, Purcell RH, Yoshikura H.: Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *J Virol.* 67: 1953-1958, 1993.
 - 15) Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M, Ye J.: Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 5848-53, 2007.
 - 16) Icard V, Diaz O, Scholtes C, Perrin-Cocon L, Ramière C, Bartenschlager R, Penin F, Lotteau V, Andr P.: Secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins depends on assembly of apolipoprotein B positive lipoproteins. *PLoS One.* 4: e4233, 2009.
 - 17) Ishii K, Murakami K, Hmwe SS, Bin Z, Li J, Shirakura M, Morikawa K, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T.: Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 371: 446-450, 2008
 - 18) Jiang J, Luo G. Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *J Virol.* 83: 12680-12691, 2009.
 - 19) Jirasko V, Montserrent R, Appel N, Janvier A, Eustachi I, Brohm C, Steinmann E, Pietschmann T, Penin F, Bartenschlager R.: Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *J Biol Chem.* 283: 28546-28562, 2008.
 - 20) Jones CT, Murray CL, Eastmann DK, Tassello J, Rice CM.: Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol.* 81: 8374-8383, 2007.
 - 21) Kukiwara H, Moriishi K, Tagawa S, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Fukuhara T, Taketomi A, Maehara Y, Matsuura Y.: Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. *J Virol.* 83: 7959-7969, 2009.
 - 22) Lai VC, Dempsey S, Lau JY, Hong Z, Zhong W.: In vitro RNA replication directed by replicase complexes isolated from the subgenomic replicon cells of hepatitis C virus. *J Virol.* 77: 2295-2300, 2003.
 - 23) Lindenbach BD, Prágai BM, Montserret R, Beran RK, Pyle AM, Penin F, Rice CM.: The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *J Virol.* 81: 8905-8918, 2007.
 - 24) Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, Vanwolleghem T, Syder AJ, McKeating JA, Lanford RE, Feinstone SM, Major ME, Leroux-Roels G, Rice CM.: Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 3805-3809, 2006.
 - 25) Ma Y, Yates J, Liang Y, Lemon SM, Yi M.: NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. *J Virol.* 82: 7624-7639, 2008.
 - 26) Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, and Suzuki T.: Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol.* 82: 7964-76, 2008.
 - 27) Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K.: The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* 9: 1089-1097, 2007.
 - 28) Miyanari Y, Hijikata M, Yamaji M, Hosaka M, Takahashi H, Shimotohno K.: Hepatitis C virus non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral genome replication. *J Biol Chem* 278: 50301-50308, 2003.
 - 29) Ogawa K, Hishiki T, Shimizu Y, Funami K, Sugiyama K, Miyanari Y, Shimotohno K.: Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 85: 217-228, 2009.
 - 30) Okamoto T, Omori H, Kaname Y, Abe T, Nishimura Y, Suzuki T, Miyamura T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y.: A single-amino-acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. *J Virol.* 82: 3480-3489, 2008.
 - 31) Okamoto T, Nishimura Y, Ichimura T, Suzuki K, Miyamura T, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y.: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J.* 25: 5015-5025, 2006.
 - 32) Sakamoto H, Okamoto K, Aoki M, Kato H, Katsume A, Ohta A, Tsukuda T, Shimma N, Aoki Y, Arisawa M, Kohara M, Sudoh M.: Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nat Chem Biol.* 1: 333-337, 2005.
 - 33) Shi ST, Lee KJ, Aizaki H, Hwang SB, Lai MM.: Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2. *J Virol.* 77: 4160-4168, 2003.
 - 34) Steinmann E, Brohm C, Kallis S, Bartenschlager R, Pietschmann T.: Efficient trans-encapsidation of hepatitis C virus RNAs into infectious virus-like particles. *J Virol.* 82: 7034-7046, 2008.
 - 35) Suzuki T, Ishii K, Aizaki H, Wakita T.: Hepatitis C viral life cycle. *Adv Drug Deliv Rev.* 59: 1200-1212, 2007.

- 36) Taguwa S, Kambara H, Omori H, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y.: Cochaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. *J Virol.* 83: 10427-10436, 2009.
- 37) Taguwa S, Okamoto T, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y.: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J Virol.* 82: 2631-2641, 2008.
- 38) Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway J.: Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog* 4: e1000032, 2008.
- 39) Umehara T, Sudoh M, Yasui F, Matsuda C, Hayashi Y, Chayama K, Kohara M.: Serine palmitoyltransferase inhibitor suppresses HCV replication in a mouse model. *Biochem Biophys Res Commun.* 346: 67-73, 2006.
- 40) Wang C, Gale M Jr, Keller BC, Huang H, Brown MS, Goldstein JL, Ye J.: Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication. *Mol Cell.* 18: 425-434, 2004.
- 41) Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K.: Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell.* 19: 111-122, 2005.

Advances in research on HCV replication and virion formation

**Tetsuro SUZUKI*, Hiromichi HARA, Hideki AIZAKI,
Ryosuke SUZUKI, Takahiro MASAKI**

Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases.

*Present address: Department of Infectious Diseases,

Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu 431-3192, Japan

tesuzuki@hama-med.ac.jp

Hepatitis C virus (HCV) establishes a persistent infection and is recognized as a major cause of chronic liver diseases worldwide. Although much work remains to be done regarding the viral life cycle, significant progress has been made with respect to the molecular biology of HCV, especially the viral genome replication and virion formation. A variety of host cell factors, which play roles in replication of the viral genome RNA, have been identified. Involvement of lipid droplet, lipid metabolism and the viral nonstructural proteins in the production of the infectious particles has also been revealed.

+2 biliary infection 胆道感染症

2.1 概念

主な炎症の部位によって胆嚢炎 (cholecystitis) と胆管炎 (cholangitis) に分けられる。頻回の胆石発作などによって胆嚢粘膜の萎縮と胆嚢壁の線維化が起こり、慢性胆嚢炎の診断が下されることもあるが、臨床的に問題となるのは、細菌感染を主とした胆道系の急性炎症である急性胆嚢炎と急性胆管炎である。

2.2 病態

胆汁は通常無菌である。胆道系への細菌の侵入経路としては、血行性の場合もあるが、多くは腸内常在菌の逆行性感染である。したがって胆道感染症が起こる前には、肝臓から胆嚢を経て十二指腸へ向かう正常な胆汁の流れが、何らかの原因によって障害されていることが多い。

胆道感染症の起因菌としては、大腸菌、クレブシエラ、エンテロコッカス、エンテロバクターなどの好気性菌が高頻度に分離される。また、嫌気性菌としてバクテロイデスやクロストリジウムなども分離されることがあるが、多くは好気性菌との複合感染であり、重症例での検出が多いとされる。

◆ 2.2.1 急性胆嚢炎

急性胆嚢炎患者の90%以上は胆嚢結石を保有し、胆石による胆嚢管の閉塞が最大の原因と考えられる。これによって胆嚢胆汁のうっ滞が起こり、胆汁中の胆汁酸や過酸化脂質などによる化学的な炎症に加えて細菌感染を合併すると、典型的な急性胆嚢炎の病態となる。また、胃切除術後や長期中心静脈栄養患者では、胆嚢収縮の抑制によって機能的な胆汁うっ滞が起こり、そこに細菌感染が加わると無石胆嚢炎を起こすことがある。さらに、内視鏡的逆行性胆道膵管造影 (endoscopic retro-

grade cholangiopancreatography: ERCP) が原因となる場合もある。

◆ 2.2.2 急性胆管炎

急性胆管炎の背景因子となる胆汁うっ滞の原因としては、胆管結石によるものが最も多いが、ほかに炎症性胆管狭窄、寄生虫、悪性腫瘍によるものなどがある。また急性胆嚢炎と同様に ERCP も原因の1つである。胆管炎では胆管内圧の上昇により肝内の細胆管が破綻し、胆汁内容物が類洞へ逆流する。そのため容易に菌血症となり、一般に胆嚢炎よりも重症化しやすい。特に総胆管結石の十二指腸乳頭部への嵌頓などによって急性閉塞性化膿性胆管炎 (acute obstructive suppurative cholangitis) を起こすと、敗血症性ショック、播種性血管内凝固 (DIC) などを併発し、重篤かつ致死的な病態に進展しやすい。

2.3 症状

◆ 2.3.1 急性胆嚢炎

発熱とともに心窩部から右季肋部にかけての持続痛を認める。右肋骨弓下を圧迫しながら患者に深吸気させると痛みで吸気が中断し (Murphy 徴候)、さらに感染が進展すると右上腹部に筋性防御を認める。

◆ 2.3.2 急性胆管炎

胆嚢炎と胆管炎を臨床症状から見分けることはしばしば困難であるが、黄疸を認める場合には胆管炎の可能性が高い。悪寒・戦慄を伴う発熱、右季肋部痛、黄疸は Charcot 三徴といわれ、胆管炎を強く疑う症状である。しかし、実際に急性胆管炎症例のうち三徴を満たすのは70%程度である。また Charcot 三徴に意識障害とショックが加わったものを Reynolds 五徴といい、急性閉塞性化膿

性胆管炎の所見とされるが、五徴すべてを満たすのは急性閉塞性化膿性胆管炎の数%にすぎない。

2.4 検査

◆ 2.4.1 急性胆嚢炎

血液検査では白血球数増加、CRP 値上昇などの炎症所見を認める。肝・胆道系酵素やビリルビン値の上昇もしばしば認められるが、重症例以外は軽度にとどまる。画像診断では腹部超音波検査(図 9.5)や CT 検査(図 9.6)が最もよく用いられ、胆嚢の腫大や胆嚢壁の肥厚(典型例では 3 層構造)を認めるほか、炎症が胆嚢外に波及すると胆嚢周囲に浸出液の貯留を認める。また、胆嚢内には胆泥や胆石を認めることが多い。

◆ 2.4.2 急性胆管炎

胆嚢炎と同様に白血球数増加、CRP 値上昇などの炎症所見を認めるほか、胆嚢炎よりもはっきりと肝・胆道系酵素やビリルビン値の上昇を認める。腹部超音波検査では、胆汁うっ滞部位より上流の胆管の拡張や胆嚢の腫大が認められ、診断に有用である。しかし、胆管結石の存在など胆汁うっ

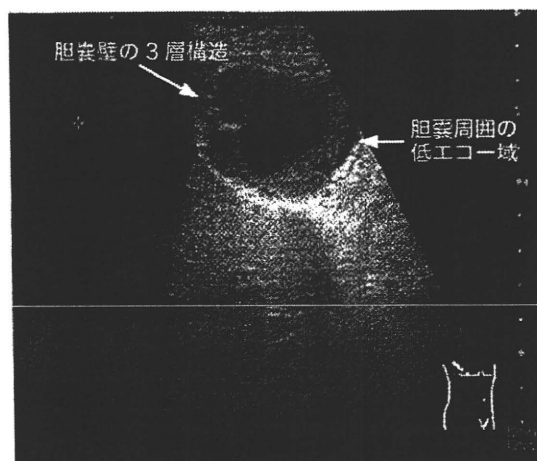


図 9.5 急性胆嚢炎の腹部超音波像。胆嚢の腫大と胆嚢壁の著明な肥厚を認める。胆嚢壁の一部は 3 層構造となっており、中央部の低エコー領域は膿瘍形成によるものと考えられる。また胆嚢周囲の低エコーを認め、炎症に伴う浸出液の貯留と考えられる。

滞部位の特定は容易ではないことがある。その場合に内視鏡や造影剤を用いることなく最も非侵襲的に胆管像を描出できるのが、磁気共鳴胆管膵管撮影(MR cholangiopancreatography: MRCP)である。しかし緊急時には、引き続き治療に移行できる ERCP や経皮経肝胆道造影(percutaneous transhepatic cholangiography: PTC)が選択されることも多い。

2.5 治療

◆ 2.5.1 急性胆嚢炎

入院治療が原則である。安静、絶食として十分な補液と鎮痛薬、抗菌薬の投与を開始する。胆汁移行の良好な第 3～4 世代セフェム系、広域ペニシリン系、カルバペネム系、ニューキノロン系の抗菌薬が用いられるが、血液および胆汁の培養検査を行い、起因菌の同定に努める。炎症所見の強くない軽症例では抗菌薬治療により寛解することもあるが、急性胆嚢炎の 90% 以上が胆嚢結石を合併し、半年から数年の間に 10～50% が再発するため、最終的に胆嚢摘出術を行うことが望ましい。軽症でも初期治療に反応しないものや、炎症の強い症例は、早期の腹腔鏡下または開腹下胆嚢摘出術の適応である。しかし、何らかの理由により手術が行えない場合には、経皮経肝胆嚢

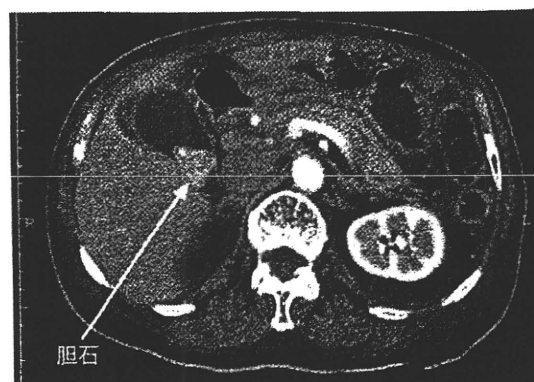


図 9.6 急性胆嚢炎(図 9.5 と同症例)の腹部 CT 像。胆嚢の腫大と胆嚢底部に膿瘍形成を伴う壁肥厚のほか、胆嚢頸部には胆石を認める。

ドレナージ (percutaneous transhepatic gallbladder drainage: PTGBD) や経皮経肝胆嚢吸引穿刺法 (percutaneous transhepatic gallbladder aspiration: PTGBA) によって胆嚢胆汁のドレナージを行う。さらに重篤な局所合併症 (胆汁性腹膜炎、胆嚢周囲膿瘍、肝膿瘍) を伴った症例、あるいは、胆嚢捻転症、気腫性胆嚢炎、壊疽性胆嚢炎、化膿性胆嚢炎では、全身状態の管理を十分にしつつ緊急手術を行う必要がある。

◆ 2.5.2 急性胆管炎

入院治療が必要である。安静、絶食として補液と抗菌薬の投与を開始する。血圧低下や意識障害を伴うような重症急性胆管炎では、呼吸循環管理などショックの治療とともに緊急の胆管ドレナージが必須である。また、中等症～軽症の胆管炎であっても、抗菌薬投与などによる保存的治療が奏功せず状態の改善が認められなければ、可及的速やかに胆管ドレナージを行うべきである。胆汁うっ滞が存在すると菌血症を促進するのみならず、胆汁移行性の高い抗菌薬であっても胆汁中の濃度が十分に上昇せず、その効果が減弱する。特に高齢者では、発症後容易に重症化する傾向があ

るため、胆管非拡張例でも積極的に胆管ドレナージを行うことが肝要である。胆管ドレナージ法には内視鏡的ドレナージ、経皮経肝的ドレナージ、開腹ドレナージがある。総胆管結石が原因の場合には ERCP とともに内視鏡的乳頭括約筋切開術 (endoscopic sphincterotomy: EST) を行うことによって、結石と感染胆汁の十二指腸への排出を行う。また、肝内胆管の拡張が高度な例では、経皮経肝胆汁ドレナージ (percutaneous transhepatic biliary drainage: PTBD) による減圧も行われる。

＋臨床のポイント

胆道感染症は胆石を保有する高齢者に多く、適切な治療が行われないと重篤かつ致死的な病態に進展しやすい疾患である。抗菌薬による初期治療の開始とともに重症度を判定し、中等症以上では胆嚢摘出術や胆汁ドレナージを緊急で行える態勢の確保にも努める必要がある。

— 本多 彰, 松崎靖司

＋3 primary sclerosing cholangitis (PSC) 原発性硬化性胆管炎

3.1 概念

胆管壁に線維性の肥厚が生じ、胆管が潰されて消失する疾患である。肝外胆管と比較的太めの肝内胆管を中心としてすべての胆管が侵される。このうち2次性のものを除いた原因不明のものを原発性硬化性胆管炎とよぶ。男性の発症がやや多く (59～61%)、20歳代と60歳代に発症のピークが見られる。

3.2 病態

自己免疫性疾患と考えられているが、その発症機序は不明である。潰瘍性大腸炎を合併する症例が多く見られることで知られているが、我が国では全症例の33%の合併頻度とされており、外国の報告に比べるとやや少ない。病理像としては肝内外の大型胆管を囲むようにタマネギ様の輪状の線維化 (onion-skin fibrosis) をきたし、この結果胆管が管に輪ゴムを巻きつけたように細くなり、

+4 adenomyomatosis of the gallbladder, polyp of the gallbladder 胆嚢腺筋腫症、胆嚢ポリープ

4.1 胆嚢腺筋腫症

◆ 4.1.1 病態

胆嚢粘膜が過形成を起こし、筋層が肥厚し、さらに Rokitansky-Aschoff 洞 (Rokitansky-Aschoff sinus: RAS) が増殖した疾患である。胆嚢壁の肥厚、壁内の嚢胞状変化、上皮の増殖を特徴とし、肉眼的所見からびまん型、輪状型、限局型の3つのタイプに分類される。

◆ 4.1.2 症状

原則として無症状であるが、ときに上腹部不快感や鈍痛を訴えることがある。RASを基盤として胆石や胆嚢炎を併発することがあり、これらの症状がしばしば出現する。

◆ 4.1.3 検査

本症の診断には腹部超音波検査が最も有用であり、胆嚢壁の限局性の肥厚を認め、その壁の中に埋もれるように存在する小嚢胞像 (= RAS) が得られれば典型的な所見といえる。肥厚した胆嚢壁が超音波を多重反射させるため、しばしば流れ星

のようなエコーを作り出し、comet sign とよばれる (図 9.8)。磁気共鳴胆管膵管造影 (MR cholangiopancreatography: MRCP) でも RAS 内に貯留した胆汁が高信号として捉えられるために、内腔周囲の小嚢胞像が病出される。

◆ 4.1.4 治療

自覚症状がない限り経過観察のみで十分であるが、胆嚢癌との鑑別が困難な例では、無症状でも手術になるケースがある。本症と胆嚢癌発生との関連は否定的である。

4.2 胆嚢ポリープ

◆ 4.2.1 病態

胆嚢腔内に隆起する病変を総称してよぶ。胆嚢壁にコレステロールの沈着した胆嚢コレステローシスに起因するコレステロールポリープが95%以上を占める。

◆ 4.2.2 症状

ポリープは結石と異なり移動性がないため、基

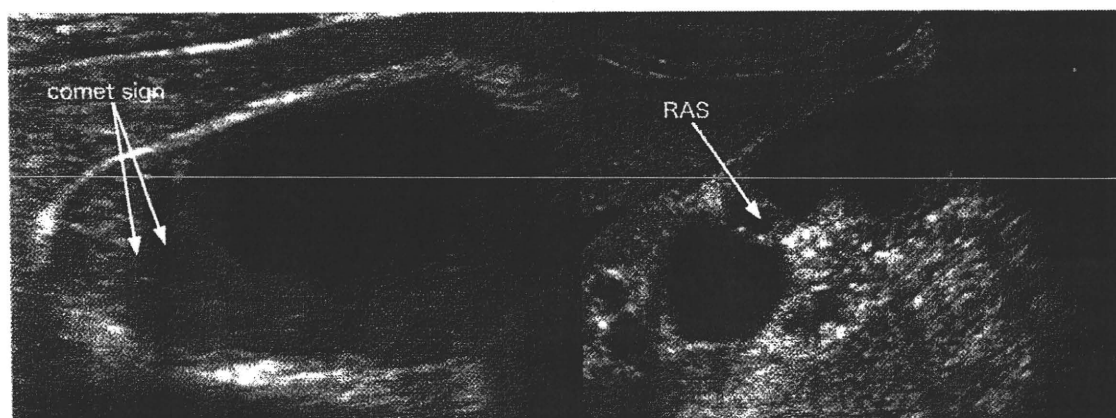


図 9.8 胆嚢腺筋腫症の超音波像。(左) 壁肥厚による comet sign。(右) 分節型の腺筋症。肥厚した部位に嚢胞状に RAS を認める。

本的には無症状であり、健康診断などで偶然発見されることが多い。

◆ 4.2.3 検査

本症の診断もまた腹部超音波検査が最も有用である。コレステロールポリープは点状の高エコーが集合した不均一な金平糖状の隆起を多数認めることが多く、腹部超音波検査での判断が十分可能であるが、やや大きめのものや、単発性のものについては、他のポリープとの鑑別が困難な場合がある。胆嚢ポリープを発見したときに最も注意すべきは早期胆嚢癌の検出であるが、生検による病理学的な検討が困難なため、原則的には発見時のサイズや形状、または定期的な経過観察によって増大傾向を示すか否か、などの検討によって手術

適応を決定している。

◆ 4.2.4 治療

10 mm以上のもの、単発または広基性、ドップラー超音波で豊富な血流を認めるなどの所見がある場合、腺腫や腺癌を考慮し、胆嚢摘出術の適応となる。

+ 臨床のポイント

胆嚢ポリープ、胆嚢腺筋腫症とも臨床上最も問題となるのは胆嚢癌との鑑別である。

池上 正、松嶋靖司

+ 5 biliary tract neoplasm 胆道腫瘍

5.1 定義

胆道腫瘍は肝外胆管に発生する腫瘍と定義されている（日本胆道外科研究会による「外科・病理胆道癌取扱規約」）。肝内胆管癌は日本肝癌研究会による「原発性肝癌取扱規約」で別に定義されている。胆道腫瘍は胆嚢、胆管および乳頭部腫瘍に分類され、ほとんどの腫瘍は癌で、癌以外の悪性腫瘍と良性腫瘍は稀である。

5.2 胆道の区分（「外科・病理胆道癌取扱規約」による）（図9.9）

肝外胆道系は肝外胆管、胆嚢、乳頭部に区分する。

肝外胆管は肝門部胆管（Bp）、上部胆管（Bs）、中部胆管（Bm）、および下部胆管（Bi）に区分する。肝門部胆管は、左側は外側枝と内側枝の合流部から、右側は前枝と後枝の合流部から左右肝管合流

部下縁までとし、さらに右肝管（Br）、左肝管（Bl）、上部胆管で囲まれる部位を肝管合流部（Bc）とする。上部胆管と中部胆管は肝門部胆管の下縁から臍上縁までの部分を2等分して区分し、下部胆管は臍上縁から十二指腸を貫通するまでの部分とする。

胆嚢は底部から頸部までを3等分して底部（Gf）、体部（Gb）、頸部（Gn）とし、胆嚢管はGと略記する（解剖学的には左右肝管合流部から胆嚢管合流部までを総肝管、総肝管と胆嚢管合流部を三管合流部、胆嚢管合流部から十二指腸壁を貫通する部分を総胆管とよぶ）。

乳頭部とは胆管が十二指腸壁に入ってから、十二指腸乳頭部に開口するまでの部分をいう。乳頭部（A）は乳頭部胆管（Ab）、乳頭部膵管（Ap）、共通管部（Ac）、大十二指腸乳頭（Ad）の総称である（図9.10）。