

C型肝炎ウイルスに関する国際情報収集

分担研究者 鈴木亮介 国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官

研究協力者 藤本陽 国立感染症研究所 ウイルス第二部 研究員

国際会議の概要

第20回C型肝炎ウイルス及び関連ウイルスに関する国際研究集会

開催日：2013年10月6日-10日

場所：オーストラリア、メルボルン

本研究集会は、世界各国の臨床および基礎のC型肝炎ウイルス（HCV）研究者が一堂に会し、最先端の研究成果の発表と討論を行うことを目的として開催されるものである。今回は約90題の口頭発表および約190題のポスター発表により構成されていた。今回は各演題が（1）Vaccine、（2）Virus-Host Interaction、（3）Antiviral and Clinical、（4）Innate immunity、（5）Virus Entry、（6）Viral Assembly and Egress、（7）Pathogenesis and HCC、（8）Adaptive immunity、（9）Viral Replication、（10）Host Genetics and Response、（11）Viral Evolution and Clinical Researchの各セッションに分類され、またMSDによるClinical Symposiumが加えられていた。開催地のオーストラリアは、研究者の多いアメリカやヨーロッパから距離的に遠い事、またアメリカ政府機関の活動停止の影響があったのか定かではないが、例年に比べると参加者が大幅に少なかった。

口頭発表

（1）Vaccineのセッションでは、J. Lawが組換えE1/E2蛋白質を抗原としたワクチンをヒトに免疫し、誘導された中和活性がウイルスの遺伝子型により異なる事を報告した。Y. Alhammadは、3ヶ所の可変領域（HVR1、HVR2、

IgVR）を欠失したE2タンパク質を抗原として75種類のモノクローナル抗体を樹立した。その中の1つであるMAb24抗体はGT1~6の異なる遺伝子型のHCVに対して中和活性を示し、エピトープは412-423aaの範囲にあることが分かった。HVR1はこの領域を覆って中和抗体の結合を回避するようである。MAb24による中和を回避するウイルスを樹立し、この抗体の認識には415番目のアミノ酸が重要であることを明らかにした。M. Sallbergは、DNAワクチンとpeg-IFNおよびribavirin治療の併用を行うフェーズ2の結果について報告し、DNAワクチンの有用性および安全性を示した。B. Grubor-Baukは慢性肝炎患者のmonocyte derived dendritic cellsにアデノウイルスベクターを用いてHCV蛋白質を発現させ、ネクロシスを誘導した細胞を患者に接種することにより、ワクチン効果を認めた。J. Hallidayはアデノウイルス/MVAベクターによる非構造蛋白質発現ワクチンで、慢性C型肝炎患者において初めてT細胞の活性化とワクチンの安全性を確認した。しかしながら十分な抗ウイルス効果は認められていない。

HCVのワクチン開発は未だ開発途上ではあるが、少なくとも複数の方法によるワクチンがすでに臨床試験に入っており、これまでのところ安全性の問題については報告がないようである。しかしながら顕著な効果は認められておらず、明確なワクチン開発の戦略は確立されていない為、今後も試行錯誤が必要であると思われる。

（2）Virus-Host Interactionのセッションでは、M. JoyceがHCVその他プラス鎖RNA

ウイルスに感染する事により、Nup98 等の核膜孔複合体(NPCs)構成蛋白質が細胞質内に検出される事を報告した。細胞質内の Nup98 は membranous web に局在する事から、細胞質内の NPCs が Membranous web 内と細胞質との物質輸送に重要である可能性が示唆された。また HCV 蛋白質中の核移行シグナルや核外移行シグナルがこれらの輸送に関わる事を示した。K. Watashi は、Cyclophilin 阻害剤の抗 HCV 効果が、これまでに知られていた複製阻害に加え、PKR のリン酸化の抑制 / ISG 蛋白質の発現の回復によって抗 HCV 効果を示す事を報告した。G. Szabo は、HCV 感染細胞の上清中から精製したエクソソーム中から +鎖および-鎖の HCV RNA を検出した。HCV RNA は Ago2-miR122-HSP90 複合体と結合しており、HCV RNA を含むエクソソームは CD81 非依存的に naïve な細胞に伝搬され、その細胞からは感染性 HCV が産生された。さらに miR122 や HSP90 の阻害剤処理によりエクソソームによる HCV の伝搬が低下する事を示した。K. Harinivas は NS5A が eIF4E と複合体を形成し、HCV IRES の活性を高める事を報告した。J. McLaughlan は HCV 感染による細胞内のユビキチン化蛋白質の局在の変化について報告した。レプリコ複製細胞においても観察され、また K48 と K63 のユビキチン鎖である事を示したが、ウイルスの複製、病原性等への関与は不明である。

(3) Antiviral and Clinical のセッションでは、D. Suhy らが NS5B と 5' UTR をターゲットとした shRNA をアデノウイルスでデリバリーさせる方法で、長期間の遺伝子ノックダウンを誘導することを示した。この効果は 1a および 2b のレプリコンに加え、多くの分離 HCV に対しても認められた。肝細胞に対する細胞毒性を最小限に抑えつつ、高い shRNA 発現を誘導する事から、持続感染している HCV の排除が期待される。A. Anwar-mohamed は NS5B 阻害剤 BMS986094 の機能を報告した。マウス HL1 細胞では心肥大マーカーの発現は認められなかった。BMS986094 そのものに細胞傷害性が認められたが、中間代謝産物による影響は低かった。C. Luscombe は新規抗 HCV 阻害剤 BIT225 を用いた第二層試験結果

について報告した。BIT225 は HCV p7 のイオンチャネル活性を抑制する事により、抗 HCV 効果を示すことを明らかにした。抗ウイルス効果は HCV の近縁ウイルスである BVDV や GBVB に対しても認められた。48 週のデータでは薬剤耐性株の出現は認められず、また半減期が長いため 1 日 1 回の少量の投与によっても強い効果が期待できる。

(4) Innate immunity のセッションの Keynote では、M. Gale が HCV 感染後の自然免疫反応全般についての現在得られている知見を解説した。D. Lammarre は Wnt pathway と自然免疫の関連について、HCV 感染許容細胞と HCV (J6/JFH-1) を用いて解析した。CTNNB/Wnt 経路を阻害することにより、抗 HCV 活性の上昇が認められた。さらに HCV の複製も抑制した。本来、細胞分化や発生に関わる Wnt 経路であるが、この経路が HCV 感染によって肝細胞に起こる自然免疫応答を制御し、抗ウイルス活性を示す可能性を示唆した。E. Grabski は HCV の JC1 株と JFH1 株を用いて pDC の IFN 産生を比較した。pDC に直接 RNA を導入、あるいは感染細胞を用いた刺激でも、JFH1 株のみで IFN 産生が低下した。Core 蛋白質の JC1/JFH1 キメラを用いた pDC 刺激により、JFH1 株が IFN 産生を抑制する機構を持つことを明らかにし、さらに Core 蛋白質のドメイン 2 の配列が IFN 産生抑制に重要なことが明らかにした。K. Li は肝細胞を polyIC を用いて TLR3 刺激し、2 次元電気泳動でタンパク質発現変化を解析した結果、炎症性サイトカインと同様に HSP の一つである GRP78 が有意に発現変化していることを発見した。エンドソームにおいて GRP78 の発現上昇がみられ、GRP78 をノックダウンすると polyIC 刺激に対する ISG56 応答が無くなり、TLR3 によって誘導されるケモカイン産生も低下した。このことにより、肝細胞においては、TLR3 を介した自然免疫応答(炎症性サイトカイン産生)に分子シャペロンである GRP78 が必須であることを明らかにした。E. Meurs は HCVcc(JFH1)感染 Huh7.5/CD81 細胞の IL29 産生を経時的に解析することで肝細胞への急性 HCV

感染による IL29、IFN 誘導メカニズムを解明した。ISG の誘導は HCV の複製とは関連がなく、HCVcc の産生因子が IFN 産生に影響することを示した。さらに IRF3/IRF7 の活性化や IKK 関連酵素は TBK/IKKe キナーゼ活性に依存している可能性を示唆した。V. Cesar は IL-1 と IL-1

が細胞生存には影響を与えずに高い HCV 感染阻害効果を示す事を報告した。IL-1 は HCV の侵入・複製過程は阻害しなかった。HCV 感染後に IL-1 を添加し、細胞内外の感染性を解析したところ、内外どちらの感染性も低下したが、細胞内 RNA 量は変化しなかったことから、IL-1 は粒子形成を阻害していることが示唆された。

(5) Virus Entry のセッションでは、J. Liang が E-cadherin をノックダウンすると、CLDN1 および OGDN の局在が変化(細胞表面から消失)し、HCV の感染を抑制する事を報告した。H. Tang はかつて NS2 と相互作用を示す事が報告されている CIDEB が、HCV の entry に重要である事を報告した。CIDEB はエンドソームマーカーである Rab5 や EEA1 と共局在し、fusion の過程に関わると考えられた。HCVpp の entry には関与しなかった。M. Law は E2 タンパク質の機能領域と E2 抗体の共結晶化を報告した。その構造は Kreyらが提唱した 3 domain の構造とは大きく異なる結果であった。E2 タンパク質中の E2 抗体(AR1、AR2、AR3)や CD81 の LEL 領域との結合を解析して最小限の機能領域(E2f1r2a、412-645)を決定した。E2f1r2a はそれ自体でウイルス感染阻害活性を有することから感染性粒子上の E2 タンパク質の機能を再現できる正常な立体構造であると考えられる。結晶化には、ここから更に 2ヶ所の N 型糖鎖(4 番目と 9 番目)を欠失させた E2c を用いており、AR3C 抗体と結合させた状態での共結晶化を行った。構造が決定できなかった領域もあったが大まかなドメイン構造は予想が出来たようである。ワクチン作製やドラッグデザインに有用な研究発表であり今後の進展に期待する。

(6) Viral Assembly and Egress のセッションでは、H. Stewart が SELEX で core の domain I に結合する RNA を selection し、次世代シーク

エンスにより HCV ゲノム中の相同配列を探索した。packaging signal を同定する試みとして興味深かった。S. Einav は Core、p7、NS2、NS3、NS5A が ESCRT III 複合体に直接リクルートされることを示し、HCV のアセンブリに ESCRT システムが必要であることを報告した。

(7) Pathogenesis and HCC のセッションでは、Keynote で S. Lemon が Lipid peroxidation 阻害剤が JFH1 株と H77 株に対して逆の効果を示したことから、Peroxidation と HCV 複製の関わりについての解析結果を報告した。Peroxidation の関与は HCV 特異的で、Flavi、Alpha、Hepato 等その他のプラス鎖 RNA ウィルスには関与していなかった。

(8) Adaptive immunity のセッションでは、L. Barrett が HCV による慢性的な免疫刺激により自然免疫抑制が起きている可能性を調べ、DAA セラピーを行っている最中の自然免疫低下と同時に適応免疫の低下が起きている事を報告した。B. Saha は HCV が CD14 モノサイトから M への分化を TLR8 刺激依存に誘導する事を報告した。HCV 感染患者血清中の単球の表面マーカーを解析したところ、CD206、CD163 などの抗炎症性マクロファージ用のマーカー発現が上昇していた。さらに健常人由来の単球と HCV 感染 Huh 細胞を共培養することで、単球の分化を解析したところ、CD14・68 の発現上昇とともに、M2 マーカーが特異的に上昇した。M1 マーカー発現は変化しなかった。これらの M

分化には細胞間接触は必要なく、cell free HCV や TLR8 刺激によって同様にマーカー発現が上昇し、TLR8 KD により HCV 感染による分化が抑えられることから、HCV 感染による TLR8 依存的刺激が M1 マクロファージ分化を誘導していることが明らかとなった。E.-C. Shin は HCV 感染によって、IFN による MHC-I 発現上昇が抑制される事を報告した。各ウイルス蛋白質の発現ではこれらの効果が認められなかった。MHC の低下は、ウイルス複製による PKR-eIF2a の活性化が翻訳を抑制する為である事を示した。

(9) Viral Replication のセッションでは、

S. Kim ら genotype3a の感染性クローンの樹立を報告した。

ポスターセッション

E. Beaumont は HBV の L 蛋白質と HCV E1 および E2 の融合蛋白質でウイルス粒子抗原を発現させ、免疫を行った。抗体価は高くないものの、中和抗体の誘導が認められた。

第 21 回の本学会は来年 10 月にカナダのバンフで開催される。

謝辞

本報告書の作製にあたり、国立感染症研究所ウイルス第二部 渡邊則幸博士、杉山隆一博士、の 2 氏にご協力を頂きました。ここに、心より感謝の意を表します。