

6. C型肝炎の克服に向けて

下遠野 邦 忠

C型肝炎ウイルスの発見とその後

非 A 非 B 型慢性肝炎の原因因子の存在が示唆され、その探索が1970年代の後半から積極的に行われるようになった。患者血液を投与されたチンパンジーで慢性肝炎と似た症状を呈すること¹⁾、ウイルス粒子を透過するフィルターを通した血清でもチンパンジーに感染し似た症状を呈することから非 A 非 B 型肝炎発症因子はウイルスであることが疑われ、非 A 非 B 型慢性肝炎ウイルスと呼ばれるようになった。また、この因子はクロロフォルム処理により感染性が失われる²⁾ことなどから膜構造を持つこと、その他の実験結果等も踏まえて1980年の頃には本ウイルスがトガウイルスの一種であると推定されている。(その後分類上トガウイルス科にあったフラビウイルスが分かれて新たにフラビウイルス科ができた。HCVは現在フラビウイルス科に属している) 病気の原因がウイルスであることを端的に示す常套手段の一つとして電子顕微鏡観察によりその因子の存在が示されることが最も説得力が高いが非 A 非 B 型肝炎ウイルスの場合にはこの方法での証明はごく最近までできなかった。一方、遺伝子工学の技術を駆使して本因子の遺伝子と考えられる RNA 断片が1989年に見いだされ³⁾、また、その遺伝子を酵母で発現させた蛋白質を抗原としてウイルス (C 型肝炎ウイルスと命名) の有無 (ウイルス蛋白質の抗体の存在を示す) を追跡できるようになると⁴⁾、堰を切ったように非 A 非 B 型慢性肝炎ウイルスの研究が展開された。まず、輸血後肝炎の非 A 非 B 型慢性肝炎患者血清の75%近くが HCV 蛋白質に対する抗体を有すること⁵⁾、非 A 非 B 型慢性肝炎に由来する肝がん患者でもほぼ同じような値を示したことから、これまで臨床疫学的に推測されていた非 A 非 B 型慢性肝炎を発症するウイルスの多くは C 型肝炎ウイルス (HCV) であることが判明

した。非 A 非 B 型慢性肝炎ウイルスという名前は、その名の通り A 型肝炎ウイルスでなく B 型肝炎ウイルスでもない新たなウイルスとして定義されていたために、当初はその因子が1種類なのか複数種あるのかさえも不明であった。事実、チンパンジーを用いた感染実験では、まず非 A 非 B 型慢性肝炎患者の血清で急性肝炎を惹起させると、その後次第に肝炎が消失する。そこに新たに別の C 型肝炎患者の血清を注射すると再び肝炎を引き起こすことから、非 A 非 B 型肝炎の因子は複数あるという考えがあった。しかし、上に述べたように HCV が輸血後非 A 非 B 型肝炎、あるいは非 A 非 B 型肝炎由来肝がん患者の多くに検出されることが分かり、輸血後非 A 非 B 型肝炎ウイルスは HCV とほぼ同義語である、と考えられる位までになっている (肝炎ウイルスとして、これまでに6種類くらい知られている。それらの中で慢性肝炎、肝がんの発症と関連する可能性のあるものとして HBV、HDV が既に知られており、1990年代になって新たに発見された HGV も肝炎発症と関連すると考えられたが⁶⁾現在では関連性が低いといわれている。また、サルコウイルスの1種である TTV も肝炎の候補に挙げられているが、はっきりした因果関係は不明である)

HCV 感染は肝疾患だけではなく、肝臓以外の病気とも関連することが疫学的に示されている。その多くは自己免疫疾患と関連するものであるが、HCV 感染と発症機構との関連は不明である。

HCV 遺伝子発見後の我が国の研究者による HCV 研究に対する寄与は多い。例えば、(1)異なる遺伝子型の存在を示した⁷⁾、(2)日本に多い HCV ゲノムのほぼ全構造を決定した⁸⁾、(3) HCV の IRES (internal ribosome entry site) 構造を発見⁹⁾、(4) HCV 粒子の電子顕微鏡による観察に成功¹⁰⁾、(5)インターフェロン感受性を規定する HCV 遺伝子の同定¹¹⁾、(6) HCV ポリメラーゼの結晶構造解析¹²⁾、(7) HCV 抗原の測定をもとにしたウイルスの定量的測定¹³⁾、(8) 遺伝子型の簡便な識別法の開発¹⁴⁾、などがありその中の一部分は臨床の場でも役に立っている。

しかし、HCV 感染による種々の疾患を治すとか、あるいは抗ウイルス剤を開発して感染防御および感染者からウイルスを排除するための研究が未だに進展してないのも事

京都大学 ウイルス研究所
(〒606-8507 京都市左京区聖護院)
How can we improve the system to analyze HCV replication system?
Kunitada Shimotohno
Institute for Virus Research, Kyoto University
Shogo-in, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507

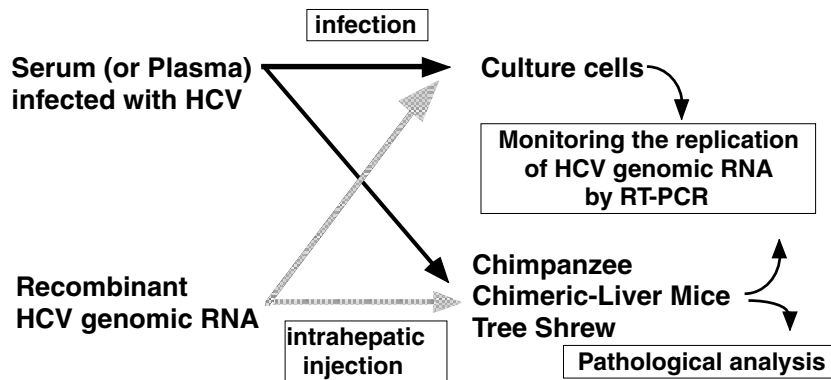


図1 HCVの感染実験系

ウイルスとして慢性肝炎患者の血漿，あるいは血清が，ウイルスゲノムRNAは試験管内で合成したものが用いられている。宿主には培養細胞，チンパンジー，マウス肝臓にヒト肝臓組織を埋め込んだキメラ肝臓マウス，ツパイ（Tree Shrew）等が用いられている。

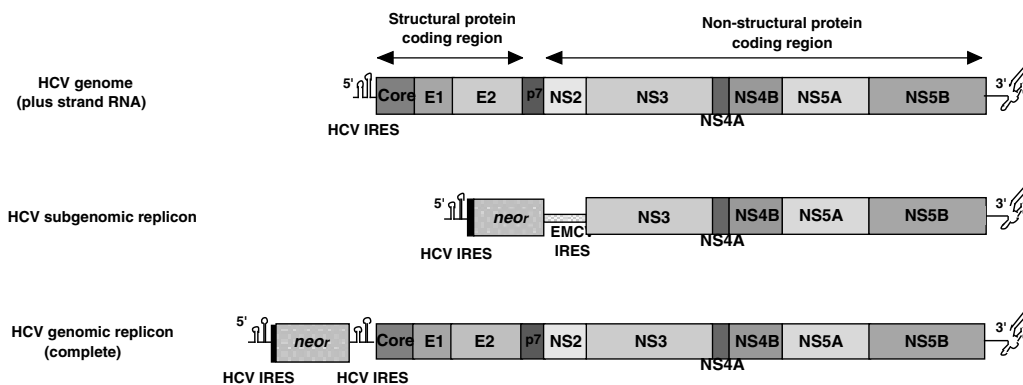


図2 HCVゲノム構造（上）と自己複製可能なHCVゲノムRNAの構造

HCVゲノムの5'側及び3'側非構造領域を保存されている二次構造の模式を含めて示した。neorはネオマイシン耐性遺伝子，EMCV IRESは脳心筋炎（encephalomyocarditis virus）のIRES（internal ribosome entry site）を示す。

実である。その理由は、一口に言うと効率よいHCVの感染・増殖系が確立されていないためであり、また、感染・病態などを解析するための適した実験動物モデル系がないためである。HCVが感染増殖する個体としては、ヒトの他にチンパンジーが知られているがチンパンジーを用いた研究には種々の制限がある。また、培養細胞を用いた感染実験もHCVの感染率および培養細胞での複製効率が思わしくないために所謂HCVのウイルス学的な研究がはかばかしく進展していない。

非A非B型慢性肝炎患者に対する治療として、インターフェロン療法がHCVの発見以来広く行われるようになった。最近ではインターフェロンとリバビリンの併用療法も行なわれている。インターフェロンが各種ウイルスの増殖を抑制することは周知の事実であり、それらの作用は培養細胞を用いた感染実験で示されている。一方、C型慢性肝炎患者に対して有効性が示されたのはHCVが発見され

る前のことである¹⁵⁾。HCVの発見後、インターフェロン投与した患者に肝炎の改善が認められたり、HCV量の減少が認められたり、チンパンジー感染実験においてインターフェロン投与がC型慢性肝炎の改善に有効であることが示された。それらの結果、インターフェロン投与がC型肝炎患者に適用になった。培養細胞を用いた実験でHCVにインターフェロンが有効である事を示した報告もあるが阻害機構などさらに踏み込んだ精力的な研究は後に述べるレプリコン細胞が樹立されてからのことである。一方、リバビリンも抗ウイルス作用があることが示されているが¹⁶⁾、その作用としては（1）免疫系に働くTh1を優位にする、（2）ウイルスポリメラーゼの活性を抑制する、（3）ウイルス核酸に取り込まれて変異率を上げる、（4）細胞内のGTPプールを下げる、等が示されているが、これらのうち、どの機構がC型慢性肝炎患者のHCV量を下げるのに作用しているかについては、はっきりしたことが

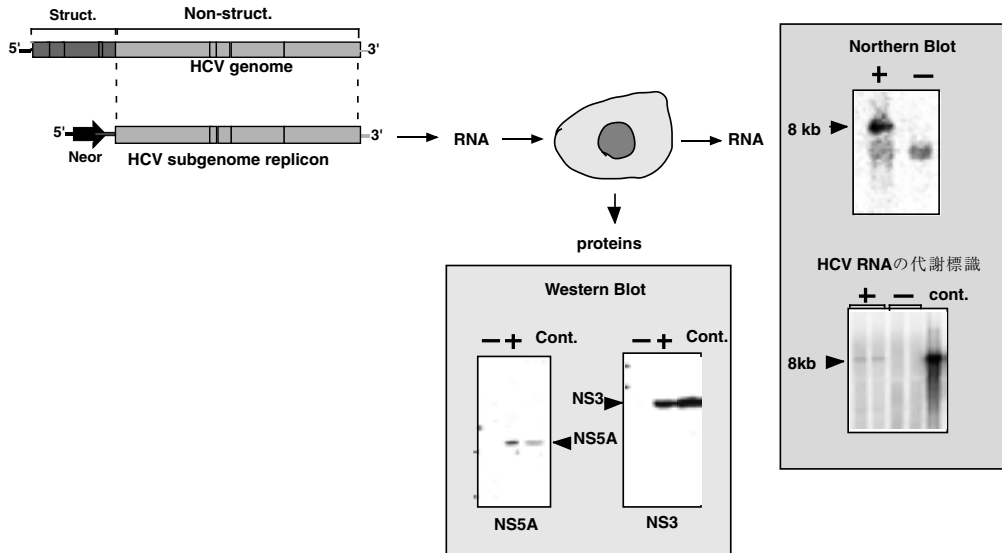


図3 HCV サブゲノムレプリコンが自己複製する細胞内における HCV RNA およびウイルス蛋白質の検出
HCV RNA の検出には Northern blot, RNA の代謝標識実験により行った。ウイルス蛋白質のうち NS 3, NS 5 A の検出例を示した。

明らかではない。これらの薬剤はウイルスに直接作用して機能すると考えるよりは、個体の免疫機構を変化させウイルス排除に寄与しているとの考えも成り立つ。インターフェロン単独投与において、治療した患者の約30%近くがウイルスを完全に排除できているし、インターフェロンとリバビリンの併用療法においてはさらに高い割合の患者でウイルス排除がみられる。今後 HCV に対してこれらの薬剤がどのような機構で作用するかがはっきり分かれば、治療成績を格段に上げるための投与方法等が明らかにされると期待される。従って、HCV の増殖複製系の開発は今後の HCV の基礎的な研究のみならず、HCV 感染により苦しんでいる患者の救済のために極めて重要である。

HCV 感染増殖系の現状

これまでの研究から個体内では HCV 感染の標的は主に肝実質細胞であるとされている。また、単核球においても感染複製しているという報告もある。単核球における感染増殖は、免疫機構を変化させ得る。一方、培養細胞における感染は、チンパンジー初代肝細胞を初めとして¹⁷⁾、ヒトリンパ球^{18,19)}、その他の細胞にもみられることが報告されている。さらに、肝臓由来細胞とリンパ球由来細胞とでは HCV ゲノムの配列に違いが見いだされるので、同じ HCV でも細胞により増殖嗜好性の異なる HCV グループが存在する可能性がある²⁰⁾。例えばヒトリンパ球由来樹立培養細胞、Daudi、において増殖する HCV をチンパンジーに感染させ経時的にウイルスゲノムの配列の変化を観察すると当初はリンパ球 (Daudi 細胞) に適応したと考えられる HCV の配列が検出されるが、次第に肝臓細胞に適応した

HCV と思われる配列が検出されるようになる²¹⁾。同様のことはヒトリンパ球由来細胞株、MT-2、を用いた感染実験でも見られる。また、MT-2、細胞を用いた実験からインターフェロンで処理した細胞においては速やかに HCV ゲノムが消失すること、HCV のアンチセンスオリゴヌクレオチド処理により、HCV の複製が抑制されることが示されている¹⁹⁾。これらの事実は、培養細胞における HCV の増殖複製を示すものであるが、他の多くのウイルスの場合と異なり、複製効率は極めて低い。RT-PCR の技術のみでしか感染を追跡できないのが現状であるために、これら培養細胞を用いた系で、ウイルス学的な研究あるいは抗ウイルス剤の開発は困難である。

最近になり、HCV ゲノムの一部分を効率よく培養細胞中で複製させる系²²⁾が開発された。この系に働く HCV ゲノムの基本構造は、HCV の非構造領域と 5' および 3' の非翻訳領域からなる。5' 非翻訳領域とウイルス蛋白質を産生する領域の間に、選択マーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子を挿入してある。これまでに HCV 複製を効率よく維持する細胞が得られてなかったのが、この成果は画期的である。さらに構造領域を含む完全な形の HCV ゲノム自己複製細胞 (HCV レプリコン細胞) も樹立された。興味深いことにこの様にして樹立された細胞は今までのところ全てヒト肝がん由来する Huh 7 細胞だけである。しかし、この増殖細胞系からのウイルス粒子の産生はみられていない。従って報告されている HCV ゲノム自己細胞の樹立は HCV のウイルス学の進展のための一里塚であり、今後一層の研究の進展が待たれる。

C 型慢性肝炎患者に対する治療として、インターフェロ

ン単独あるいはリバビリンとの併用療法が行われていることは前に述べた。これまでの臨床成績からインターフェロンに対して感受性を示すものと示さないウイルスが存在するといわれている。この違いが、ウイルスゲノムの何処に起因するかは大変興味ある。しかし、これまでに樹立されたHCVレプリコン細胞の種類は限られており、ウイルス変異とインターフェロン感受性の研究をHCVレプリコン細胞を用いて行うには、ウイルス遺伝子配列の異なる種々のレプリコン細胞（特にインターフェロン感受性の異なるウイルスゲノムに由来する）を樹立し、それらを比較しながら解析するのが重要であると考えられる。筆者らは既にHCVの増殖が明らかなヒトリンパ球に感染し増殖するウイルスゲノムを単離してそれに由来するHCVレプリコン細胞を樹立した²³⁾。このレプリコン細胞のHCVゲノムの配列は既に報告されているレプリコン細胞のHCVのゲノム配列に比べ約5%近い変異がある。本樹立細胞と既に報告されている細胞においてインターフェロン感受性を調べると、いずれの場合も臨床的にインターフェロン抵抗性を示すと考えられたウイルスゲノムであるにも拘わらず、高い感受性を示した。この食い違いが何に起因するかについては今後の課題であるが、インターフェロン感受性に関して *in vivo* と *in vitro* における評価に質的な違いがあるのかも知れない。一方、リバビリンがウイルス複製に及ぼす効果については、レプリコン細胞にリバビリンを投与して1週間後にHCVゲノム量を測定してもほとんど変化がみられなかったという予備的なデータがある。このデータによればHCVポリメラーゼに対して複製阻害作用を示すとは考えにくい。

HCVゲノムがHuh7細胞で効率よく複製する事が分かった。Huh7以外の細胞における複製の可能性を調べるために、同じHCVゲノムを種々の細胞に導入しても複製効率の高いレプリコン複製細胞は得られていない。以下、その理由について考えてみる。HCVゲノムレプリコンHuh7細胞を継代しながら定期的にゲノムを解析すると、時と共に遺伝子に変化が起こり（HCVゲノムの変異率は部位あたり毎年0.001%と推定されている²⁴⁾）、それがゲノムに蓄積してゆく。それらの中から効率よく複製するHCVゲノムが生じる場合がある。これらの変異HCV RNAをもとのHuh7にトランスフェクトすると以前のレプリコン細胞よりも10倍あるいはそれ以上の効率で複製する。最初にこの系を確立したドイツのグループはこれを adaptive mutant と呼んだ。一方、Huh7で複製増殖するHCVレプリコンをチンパンジーにトランスフェクトするとチンパンジーの肝臓の中でHuh7程ではないがゲノムの複製が見られる。逆にHuh7細胞に対して効率よく複製するようになったHCV adaptive mutant はチンパンジーの中で複製しない²⁵⁾。これらのことから、HCVが増殖複製するには細胞側の要因とウイルス側の要因がきちんとかみ合う

ことが必要で、僅かな違いが生じると複製効率が極端に変化すると推察される。従ってHuh7で複製が見られるにもかかわらず他の細胞で複製が見られないのは、ウイルス側の違い（逆に言えば細胞側の違い）が原因であるとも考えられる。このウイルスと細胞の相性がウイルスの遺伝子型の違いによるものでないことは脇田らにより示された（脇田、私信）。これまでに独立に樹立されたレプリコン細胞はHCVゲノムの源が異なるが、細胞は全てHuh7由来である。従ってHuh7では特に他の細胞と異なる性質を獲得しておりそれがHCVゲノムを効率よく複製させるように働くと考えられる。

HCVレプリコン細胞の樹立法は、HCVゲノムにネオマイシン耐性遺伝子を入れておき、ゲノムが自己複製するとネオマイシンが産生される結果G418選択過程で耐性の細胞が現れるのを単離するという方法である。この方法では複製効率がある程度高くなければ目的の細胞を得にくいという難点があるように思える。筆者は複製効率が低くても選択できる様にHCVゲノムを改良することで、Huh7以外の細胞でもHCVゲノムが自己複製する細胞が樹立できるのではないかと考えている。

HCV 研究の今後の期待

ウイルス複製系を構築することは抗ウイルス剤の開発に大変重要である。例えばHBVゲノムを培養細胞を用いて増殖複製させることは長い間実現できなかったが、環状のHBVゲノムを連結して二量体にして細胞に導入することによりウイルスゲノムの複製をおこなわせる事に成功した。この系をスクリーニング系に用いてHBVの新たな抗ウイルス剤が開発されたことは記憶に新しい。HCVは発見されてから14年経つ。これまでにウイルスの遺伝子、蛋白質の解析などが進み、少しずつHCVの全容が見え始めているが、ウイルス学的な側面からの研究はこれからである。ゲノムが効率よく複製されるようになったので、ウイルス粒子の産生系の開発も急速に進むと期待されるし、その結果抗ウイルス剤の開発、ワクチン開発、ウイルス感染の初期反応の解析などが急速に進展すると期待される。

文 献

- 1) Hollinger FB, Gitnick GL, Aach RD, Szmunness W, Mosley JW, Stevens CE, Peters RL, Weiner JM, Werch JB, Lander JJ. (1978) Non-A, non-B hepatitis transmission in chimpanzees: a project of the transfusion-transmitted viruses study group. *Intervirology* **10**: 60-68, 1978
- 2) Feinstone SM, Mihalik KB, Kamimura T, Alter HJ, London WT, Purcell RH. (1983) Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infect Immun.* **41**: 816-821, 1983
- 3) Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. (1989) Isolation of a cDNA clone derived

- from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, **244** : 359–362, 1989
- 4) Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, et al. (1989) An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*. **244** : 362–364, 1989
 - 5) Chiba J, Ohba H, Matsuura Y, Watanabe Y, Katayama T, Kikuchi S, Saito I, Miyamura T. (1991) Serodiagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection with an HCV core protein molecularly expressed by a recombinant baculovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88** : 4641–4645, 1991
 - 6) Linnen J, Wages J Jr, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, Koonin E, Gallagher M, Alter M, Hadziyannis S, Karayiannis P, Fung K, Nakatsuji Y, Shih JW, Young L, Piatak M Jr, Hoover C, Fernandez J, Chen S, Zou JC, Morris T, Hyams KC, Ismay S, Lifson JD, Kim JP, et al., (1996) Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus : a transfusion-transmissible agent. *Science*. **271** : 505–508, 1996
 - 7) Kato, N., Ohkoshi, S. and Shimotohno, K. (1989) Japanese isolates of Non-A, Non-B hepatitis viral genome show the sequence variations from the original isolate in the U. S. A. *Proc. Jpn. Academy*, **65B** : 219–223, 1989
 - 8) Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T. and Shimotohno, K. (1990) Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87** : 9524–9528, 1990
 - 9) Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. (1992) Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol*. **66** : 1476–1483, 1992
 - 10) Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Suzuki S, Kohara M., (1994) Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol*. **75** : 1755–1760, 1994.
 - 11) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Izumi N, Marumo F, Sato C. (1995) Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1 b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS 5 A region. *J Clin Invest.*, **96** : 224–230, 1995
 - 12) Ago H, Adachi T., Yoshida A., Yamamoto M., Habuka N., Yatsunami K. and Miyano M., (1999) Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Struct. Fold. Des.* **7** : 1417–1426, 1999.
 - 13) Kashiwakuma T, Hasegawa A, Kajita T, Takata A, Mori H, Ohta Y, Tanaka E, Kiyosawa K, Tanaka T, Tanaka S, Hattori N, Kohara M., (1996) Detection of hepatitis C virus specific core protein in serum of patients by a sensitive fluorescence enzyme immunoassay (FEIA)., *J Immunol Methods*. **190** : 79–89, 1996.
 - 14) Okamoto H, Kobata S, Tokita H, Inoue T, Woodfield GD, Holland PV, Al-Knawy BA, Uzunalimoglu O, Miyakawa Y, Mayumi M. (1996) A second-generation method of genotyping hepatitis C virus by the polymerase chain reaction with sense and antisense primers deduced from the core gene. *J Virol Methods.*, **57** : 31–45, 1996
 - 15) Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, Rustgi V, Di Bisceglie A, Peters M, Waggoner JG, Park Y, Jones EA., (1986) Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med*. **315** : 1575–1578, 1986.
 - 16) Johnson Y. N. Lau, Robert C. Tam, T. Jake Liang, Zhi Hong., (2002) Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection, *Hepatology*, **35** : 1002–1009, 2002
 - 17) Lanford RE, Sureau C, Jacob JR, White R, Fuerst TR. (1994) Demonstration of *in vitro* infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR. *Virology*. **202** : 606–614, 1994.
 - 18) Shimizu YK, Iwamoto A, Hijikata M, Purcell RH, Yoshikura H. (1992) Evidence for *in vitro* replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **89** : 5477–5481, 1992.
 - 19) Mizutani T, Kato N, Saito S, Ikeda M, Sugiyama K, Shimotohno K. (1996) Characterization of hepatitis C virus replication in cloned cells obtained from a human T-cell leukemia virus type 1-infected cell line, MT-2. *J Virol*. **70** : 7219–7223, 1996.
 - 20) Ikeda M, Kato N, Mizutani T, Sugiyama K, Tanaka K, Shimotohno K. (1997) Analysis of the cell tropism of HCV by using *in vitro* HCV-infected human lymphocytes and hepatocytes. *J Hepatol*. **27** : 445–454, 1997.
 - 21) Shimizu YK, Igarashi H, Kanematu T, Fujiwara K, Wong DC, Purcell RH, Yoshikura H. (1997) Sequence analysis of the hepatitis C virus genome recovered from serum, liver, and peripheral blood mononuclear cells of infected chimpanzees. *J Virol*. **71** : 5769–5773, 1997.
 - 22) Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*. **285** : 110–113, 1999.
 - 23) Kishine H, Sugiyama K, Hijikata M, Kato N, Takahashi H, Noshi T, Nio Y, Hosaka M, Miyanari Y, Shimotohno K. (2002) Subgenomic replicon derived from a cell line infected with the hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun.* ; **293** : 993–999, 2002.
 - 24) Tanaka Y, Hanada K, Mizokami M, Yeo AE, Shih JW, Gojobori T, Alter HJ. (2002) Inaugural Article : A comparison of the molecular clock of hepatitis C virus in the United States and Japan predicts that hepatocellular carcinoma incidence in the United States will increase over the next two decades. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **99** : 15584–15589, 2002.
 - 25) Bukh J, Pietschmann T, Lohmann V, Krieger N, Faulk K, Engle RE, Govindarajan S, Shapiro M, St Claire M, Bartenschlager R. (2002) Mutations that permit efficient replication of hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells prevent productive replication in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99** : 14416–14421, 2002.