

# 1. C型肝炎ウイルス培養細胞感染系の確立

加藤 孝宣<sup>1,2,3</sup>, 脇田 隆宇<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東京都神経科学総合研究所・微生物研究部門

<sup>2</sup> 名古屋市立大学大学院・臨床分子情報医学

<sup>3</sup> 現所属； Liver Diseases Branch, NIDDK, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

C型肝炎ウイルス (HCV) は、1989年カイロン社の研究グループにより発見された。日本では200万人、世界中で17000万人にのぼる感染者が存在し、インターフェロンを中心とした治療が行われているがその効果は未だ不十分である。これまでHCVには良いウイルス培養系と実験用の感染小動物が存在しないことがHCVの基礎研究の妨げになってきた。我々はHCVによる劇症肝炎患者からHCV株を分離し、その株が他の慢性肝炎患者由来の株に比べ、効率的に増殖できることを明らかにしてきた。さらにこの株を用いることにより培養細胞中での感染性HCV粒子生成に成功した。この感染性HCV粒子は培養細胞だけでなくチンパンジーにも感染可能であった。この系を用いることにより、HCVの感染から分泌まですべてのステップが培養細胞内で観察可能であり、ウイルスの複製機構の解明や抗ウイルス薬の開発に有用であると考えられる。

## 1. はじめに

1989年、カイロン社のグループにより長らく不明であった非A非B型ウイルス性肝炎の原因ウイルスとしてC型肝炎ウイルス (HCV) が同定された<sup>1)</sup>。しかしその方法は培養細胞や実験動物から直接ウイルスを分離するこれまでのオーソドックスなウイルス学的手法ではなく、ウイルスが存在すると思われるチンパンジー血漿からウイルスの遺伝子断片をクローニングした、というものであった。この遺伝子断片を手がかりにほぼ全長の遺伝子配列が明らかになり、その遺伝子構成の類似からフラビウイルス科に属するウイルスであることが判明した<sup>2,3)</sup>。その後1994年に金コロイドを用いた免疫電子顕微鏡法によりその形態が<sup>4)</sup>、1995年の3'末端の発見によりその全遺伝子配列が明らかとなった<sup>5)</sup>。そして1997年には試験管内で合成されたHCV

の全遺伝子のRNAがチンパンジーに感染可能であることが示された<sup>6)</sup>。しかし、このウイルス発見のエピソードに象徴されるかのようにHCVの培養細胞での感染増殖系の確立は依然不可能のままであった。1999年のHCVレプリコンシステムの報告から<sup>7)</sup>、HCVの細胞内での複製機構の解析が可能となり、HCV株による増殖能力の違い、またHCVの増殖に影響を与える宿主側の因子が次々と明らかにされた。我々はHCVによる劇症肝炎患者の急性期血清よりHCV株を分離し、この株が他のHCV株とは異なり、培養細胞中で適応変異を持たず強い増殖能を示すことをレプリコンシステムを用い明らかにした。そしてこの株を用いることで、長らく不可能であったHCVの感染増殖系の樹立に成功した<sup>8)</sup>。

## 2. チンパンジーでのHCV感染系

チンパンジーはHCV感染が認められる唯一の動物モデルである。患者血清の接種により急性肝炎から持続感染化し、慢性肝炎を発症する場合があることが知られている。しかし、HCVの全遺伝子を持つcDNAから試験管内で合成したRNAを感染させることは成功していなかった。Kolykhalovらは患者血清を接種したチンパンジーのプール血清からRT-PCRにより得られた多くのHCV遺伝子の塩基配列を決定し、そのコンセンサス配列をもつcDNAをつ

### 連絡先

〒183-8526 東京都府中市武蔵台2-6  
東京都神経科学総合研究所・微生物研究部門  
TEL：042-325-3881 内線4605  
FAX：042-321-8678  
E-mail：wakita@tmin.ac.jp

なぎ合わせ遺伝子型 1a の感染可能な HCV -cDNA 配列を合成した<sup>6)</sup>。その合成された RNA をチンパンジーの肝臓に直接接種することにより、HCV の増殖と肝障害を認めている。その後、同様の手法を用い、遺伝子系 1b, 2a の HCV 株でも感染性クローンが報告されている<sup>9, 10)</sup>。しかし、この方法の問題点はチンパンジーを使用するためには莫大な費用とこの動物を維持するための施設が必要であり、簡単には使用できないことである。チンパンジーで感染が確認された感染性クローンを培養細胞に遺伝子導入し感染性粒子を産生させる試みも行われているが、残念ながら HCV の増殖、感染は報告されていない<sup>11)</sup>。

### 3. HCV 細胞培養系の試み

一方、培養細胞を用い患者血清を感染させることで HCV の細胞培養系を構築する試みも多くなされている<sup>12)</sup>。ヒトの初代培養肝細胞や肝癌細胞<sup>13-17)</sup>、もしくはその両者を融合させた細胞<sup>18)</sup>、チンパンジーやツバイの初代培養肝細胞で HCV の感染、増殖が報告されているが<sup>19, 20)</sup>、いずれも複製レベルが低く、高感度な RT-PCR を用いなければウイルスゲノムの検出は困難であり、HCV の感染複製過程の解析は難しいと考えられる。しかし、チンパンジーやヒトでは HCV 感染が容易に成立することから、培養細胞での感染が困難なのは培養過程で個体では認められた何らかの宿主側因子が失われている可能性が考えられた。Aizaki らはラジアルフロー型バイオリクターという肝細胞を三次元的に培養できる装置を用い、ヒトの肝臓に近い状態で HCV の感染増殖の観察を試みた<sup>21)</sup>。その結果、HCV の感染複製をしめす培養液中での HCV RNA の再上昇が確認され、電子顕微鏡でウイルス粒子の放出も検出されたが、やはり依然として HCV の増殖は高いレベルでは観察されなかった。これらの結果から、HCV はむしろそれ自身が持続感染を成立させるため増殖を抑え、低いレベルで複製するように調整しているのではないかと考えさせられた。そして、HCV は急性感染時に高ウイルス量を示すことがあるため、この HCV の増殖を抑える性質はその分離される症例や時期、分離された株によって違うのではないかと、という仮説を持つに至った。

### 4. HCV レプリコンシステムの確立

1997 年、Khromykh らは HCV と同じフラビウイルス科に属する Kunjin ウイルスのレプリコンシステムを報告した<sup>22)</sup>。このシステムは Kunjin ウイルスの構造領域を取り除き、3'utr を EMCV の IRES とネオマイシン耐性遺伝子に置き換えたものであり、この遺伝子構築から作られた RNA を培養細胞に導入しネオマイシンで選択培養することにより、Kunjin ウイルス RNA の持続的な複製と蛋白発現が観察されるという実験系であった。そして、1999 年、Lohmann らにより HCV のレプリコンシステムが報告された<sup>7)</sup>。このシ

ステムは HCV の構造領域と非構造領域の一部 (NS2) を取り除き、その部分に EMCV の IRES とネオマイシン耐性遺伝子を挿入したもので、この構造物を鋳型として試験管内で RNA を合成し、Huh7 細胞内に導入した後にネオマイシンで選択培養を行う。すると複製した HCV レプリコン RNA からネオマイシン耐性遺伝子が発現され、その遺伝子の働きでレプリコンが複製している細胞のみが生存可能となり増殖しコロニーを形成する。レプリコン複製細胞では HCV レプリコン RNA が非常に高レベルで複製しており、複製している RNA や発現している HCV 蛋白が持続的に安定して検出できる。このシステムを用いることで、HCV の培養細胞内での増殖複製が簡便に観察可能であり、また特殊な設備を必要としないことから、急速に世界中に普及し利用されるようになった。

このレプリコンシステムは容易に培養細胞内での HCV の増殖を再現でき、HCV に対する薬剤感受性や、このウイルスの複製に関与するウイルス側、宿主側因子の同定に非常に力を発揮したが、その一方でいくつかの制約があることが知られている。その制約の一つはレプリコンが増殖できる培養細胞の問題であり、当初 Huh7 細胞でしか増殖は認められなかった。その後いくつかの非肝細胞由来の細胞やマウスの肝癌細胞でもその増殖が報告されたが<sup>23, 24)</sup>、いずれもその増殖レベルは十分なものではなかった。またもう一つの問題点は、レプリコンとして増殖が報告された HCV 株はすべて遺伝子型 1 の株であった。さらにこれらの株は培養細胞内での増殖時にその複製効率を増強する適応変異を持ち、その適応変異の多くは患者血清から分離された HCV 株では認められない変異であった<sup>25)</sup>。またその適応変異を感染性クローンに導入し、その RNA をチンパンジーの肝臓に接種したところ、感染性が失われていることが明らかになった<sup>26)</sup>。このようなことからレプリコンの培養細胞内での増殖がどの程度生体でのウイルス感染を反映しているかを疑問視する声もあった。

### 5. HCV 劇症肝炎患者由来株

HCV レプリコンシステムが報告された当時、我々は効率の良い HCV 増殖系構築のために増殖能力の高い HCV 株を探していた。通常 HCV の研究に用いられている株やデータベースに登録されている株は圧倒的に慢性肝炎患者から分離されたものであることが多く、それらの株を使用しても増殖能力の高い HCV 株は得られないのではないかと考えていた。その時期に慈恵会医大第三病院の肝臓研究グループから HCV による劇症肝炎症例の急性期血清が持ち込まれ、この血清中に含まれる HCV 株の検討を開始した。この症例は 31 歳の男性で、強い肝障害とプロトロンビン値の低下、脳症から劇症肝炎と診断された<sup>27)</sup>。HAV, HBV, GBV-C の関連マーカーはすべて陰性であったが、HCV-RNA が検出され HCV による劇症肝炎と考えられた。感染

経路は不明であった。急性期血清中の HCV ウイルス量は 10 の 5 乗と非常に高値であった。この HCV 遺伝子型の一部を RT-PCR で増幅し、塩基配列を決定し既報の配列と比較した結果、この患者血清中の HCV 株は遺伝子型 2a であることがわかった。そこで、遺伝子型 2a の HC-J6 株の遺伝子配列を参考に HCV の全長を 14 のオーバーラップするフラグメントにわけプライマーを設定し、RT-PCR 法により全長のカバーする cDNA 断片をクローニングした。後に感染性のクローンを構築することを考え、各フラグメントのそれぞれ 5 クローンの塩基配列をシーケンスし、コンセンサス配列を決定した。さらにこの株の特徴を明らかにするために、同じ遺伝子型 2a の HCV 株に感染している 6 人の慢性肝炎患者から同様に HCV 株を分離し全塩基配列を決定した。分子系統樹による解析の結果、この劇症肝炎患者から分離された HCV 株 (JFH-1 株) は遺伝子型 2a に属するものの、他の慢性肝炎患者分離株や遺伝子型 2a のプロトタイプ株である HC-J6 株<sup>28)</sup> のクラスターとやや離れたところに位置することが判明した (図 1)。そこでさらに、この JFH-1 株のどの領域が他の株からの変異が強いかを、平均遺伝子距離の比から推定した。その結果、塩基配列の検討からは 5'utr が、アミノ酸配列の検討からはコア、NS3、NS5a が最も変異の強い部分として同定された<sup>27)</sup>。

## 6. JFH-1 株のコア領域の検討

JFH-1 株の変異の強い部分として同定された領域の中で、我々はまず最初にコア領域に着目した。コア領域はウイルスの RNA ゲノムを包むキャプシドを形成する蛋白をコードする領域である。このコア蛋白は翻訳されたポリプロテインから E1 領域との接合部での切断により p23 が生成され、さらに 179 番目もしくは 182 番目のアミノ酸でさらに切断を受け p21 が生成されることが知られている<sup>29-32)</sup>。そこでこの切断の効率を劇症肝炎由来の JFH-1 株と慢性肝炎由来株と比較してみた。コア領域から E1 領域まで含む発現ベクターとコア領域のみを含む発現ベクターを JFH-1 株と慢性肝炎由来株でそれぞれ作成し、p21 の生成効率を検討した<sup>33)</sup>。その結果、JFH-1 株では慢性肝炎由来株に比べ効率的に p21 が生成されることが判明した。さらに、JFH-1 株と慢性肝炎由来株のキメラ発現ベクターによる検討の結果、JFH-1 株コア領域の C 末端の 4 つのアミノ酸がこの効率的な p21 の生成に関与していることが明らかになった。患者血清中の HCV に含まれるコア蛋白は主に p21 であることが解っており<sup>34)</sup>、この p21 の効率的な生成はウイルス粒子生成に有利に働くと考えられる。従ってこれらの結果から、劇症肝炎由来の JFH-1 株は他の慢性肝炎患者由来株

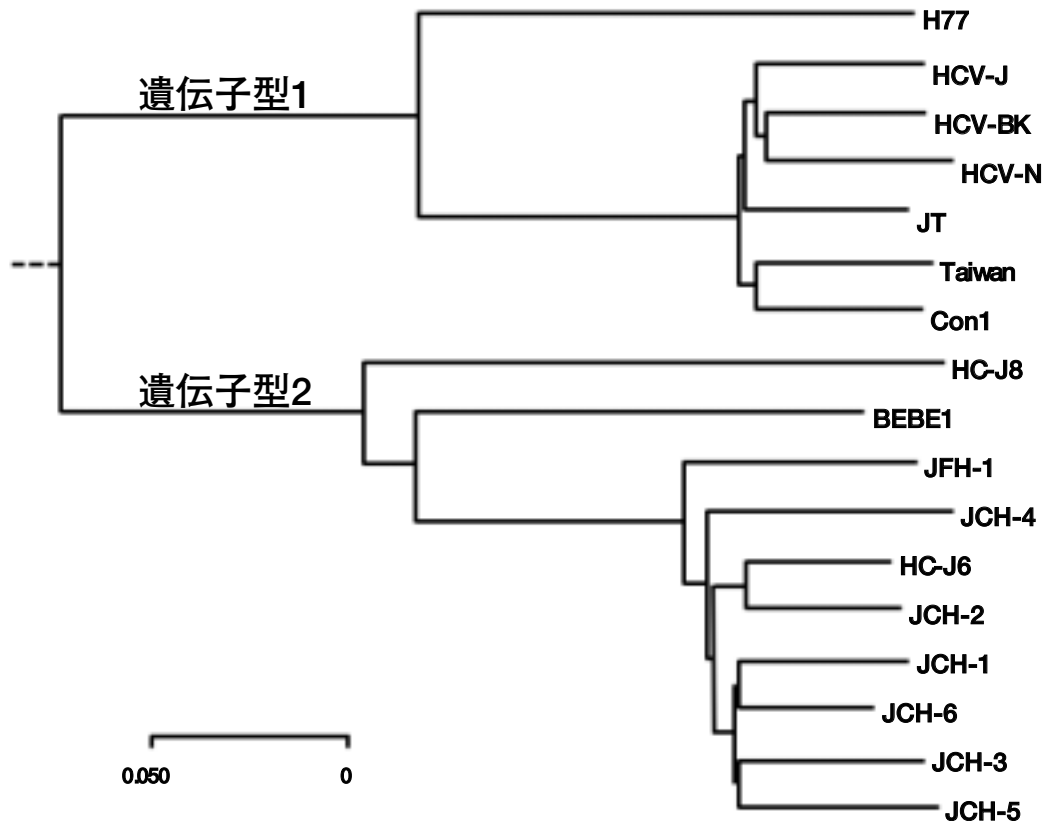


図 1 JFH-1 株の分子系統樹

に比べ効率的なウイルス粒子生成が期待された。

## 7. 遺伝子型 2a の HCV レプリコンシステムの開発

JFH-1 株の変異の強い部分として同定された領域の中で、残る部分は 5'utr, NS3, NS5a である。これらの領域はいずれもウイルスの増殖や薬剤感受性に関わる部分である。そこで我々はレプリコンシステムを用い、この JFH-1 株の増殖能を検討してみた<sup>35)</sup>。既に報告されていたレプリコンの構造にならない JFH-1 株の 5'utr の下流にネオマイシン耐性遺伝子を、そして EMCV の IRES の下流に JFH-1 株の非構造領域を持つレプリコンを作成し、最初に報告された遺伝子型 1b のレプリコンである Con1 株の野生型のもの (Con1/wt), および Con1 株が Huh7 細胞の中でよく増えるよう NS3-NS5a 領域に合計 3 つの適応変異を持った NK5.1 株 (Con1/NK5.1) と比較し、その増殖能力について検討してみた。遺伝子型 1b のレプリコンでは、1  $\mu$ g の RNA を導入することで、Con1/wt 株では約 100 個のコロニーを作り、適応変異を持つ Con1/NK5.1 株ではその約 10 倍のコロニーを作る。ところが、驚くべきことに遺伝子型 2a の JFH-1 株では、Con1/NK5.1 株のさらに 50 倍強いコロニー生成効率を示した。さらに、この JFH-1 株のレプリコンを持つ細胞をクローニングし、そのレプリコン細胞中に含まれるレプリコンの塩基配列を解析したところ、6 つのクローン中 5 つでは、それぞれ HCV 由来領域にいくつかの変異を認めたものそれらの変異の中に共通な変異は認められなかった。また 1 つのクローンは、アミノ酸の変異が起こらないような変異を認めたのみであった。従ってこの JFH-1 株は、Huh7 細胞の中で、適応変異が無くとも増殖可能な株であると考えられた<sup>35)</sup>。

Huh7 細胞での解析の結果から JFH-1 株のレプリコンは強い増殖能を持つと考えられたため、他の細胞での増殖についても検討してみた。肝細胞由来の HepG2 細胞と IMY-N9 細胞 (HepG2 とヒト初代培養肝細胞とのフュージョン細胞)<sup>36)</sup>、非肝細胞由来の HeLa 細胞 (子宮頸癌由来) と 293 細胞 (胎児腎細胞由来)<sup>37)</sup> を用いて検討したところ、いずれの細胞でも Huh7 細胞ほど効率は高くないもののコロニー生成が認められた。Huh7 細胞と同様に、これらのコロニーから細胞を樹立し適応変異の有無を検討したところ、HepG2 細胞では NS5b に比較的多くの変異が集中していたが、9 つのクローン中 2 つで変異を持たない株、あるいはアミノ酸の変化しない変異を 1 つ持つ株を認めた。IMY-N9 細胞では 9 つ中 3 つの株で、HeLa 細胞では 2 つの株で、293 細胞では驚くべきことにほとんどのクローンで変異を持たないことが判明した。以上のように、劇症肝炎由来の JFH-1 株を用いることで、我々は遺伝子型 2a のレプリコンを樹立すると同時に、これまで不可能であった Huh7 細胞以外の多くの細胞で増殖可能な、さらにそれらの培養細胞に特異的な適応変異が無くとも複製能の高いレプリコンを

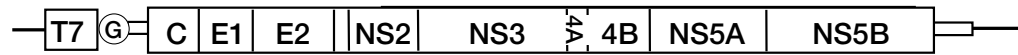
手に入れたのである。

さらに詳しい解析により、この JFH-1 株レプリコンの様々な特徴が明らかとなった。臨床症例の検討では遺伝子型 2a の HCV 株は遺伝子型 1b の株に比しインターフェロン感受性が高いことが知られている。しかし遺伝子型 2a の JFH-1 株レプリコンは遺伝子型 1b の Con1 株レプリコンに比しインターフェロン抵抗性であることがわかった<sup>38)</sup>。これはおそらく培養細胞内での増殖能力の差を反映していると考えられる。さらにこの JFH-1 株レプリコンの特徴として、一過性の細胞内複製能が高いことが解った。レプリコンのネオマイシン耐性遺伝子をルシフェラーゼの遺伝子に置換したレプリコンを作成し、ルシフェラーゼ活性を測定することで一過性のレプリコンの増殖を簡便に高感度に評価する系を構築し、Huh7 細胞内でのレプリコンの増殖を遺伝子導入後経時的に観察した<sup>39)</sup>。その結果、遺伝子導入後 3 日目までルシフェラーゼ活性の強い増殖を認め、この JFH-1 株レプリコンはネオマイシン選択に依存しない高い複製能力を持つと考えられた。当時、既に遺伝子型 1b の株で HCV の全遺伝子領域を持つレプリコンが報告され、これらのレプリコンでは非構造領域のみのレプリコンに比べ増殖能が低いこと、また感染性の粒子が形成されないことなどが解っていたが、JFH-1 株レプリコンで観察された強い増殖能力は、全遺伝子領域を持つレプリコンもしくは感染性クローンを用いることで自立的な増殖と感染性粒子の産生する系の構築が可能なのではないかという期待を抱かせるのに十分であった。

## 8. HCV 複製の感受性が高い細胞

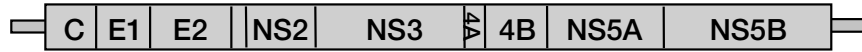
レプリコンを用いた研究の大きな成果の一つが HCV 複製の感受性が高い細胞が樹立されたことである。Blight らはレプリコンを遺伝子導入した後に樹立されたレプリコン細胞を、インターフェロン処理でレプリコンを排除することにより HCV 複製の感受性が高い細胞が作製されることを報告した (cured cell)<sup>40)</sup>。これらの細胞ではレプリコンを遺伝子導入した後のコロニー生成効率が高くなり、Huh7 細胞に比し早期にレプリコン RNA の増殖や HCV 蛋白の発現が認められることが報告されている。またこれらの細胞を使用することにより、それまで難しかった遺伝子型 1a の H77 株でレプリコンを作製することが可能となった<sup>41)</sup>。この cured cell で HCV 複製の感受性が高くなる理由については、以下のように考えられている。そもそも Huh7 細胞は均一な細胞ではなく、HCV 複製の感受性が低い細胞から高い細胞まで様々な細胞が混在している。その細胞集団にレプリコン RNA を遺伝子導入することにより樹立されるレプリコン細胞は、多くの細胞集団の中から HCV 複製の感受性が高い細胞が選択されている可能性がある。実際、このようにして作製された cured cell の中で、HCV 複製の感受性が非常に高い細胞 (Huh7.5 細胞) の中で増殖して

## JFH-1株感染性クローン構築



## JFH-1株感染性クローンRNA

↓ 試験管内RNA合成



↓ RNAトランスフェクション

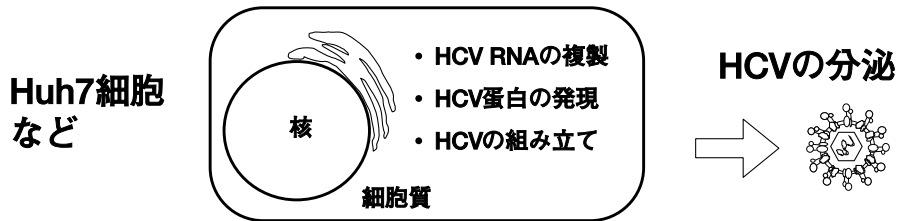


図2 HCV感染実験系の概略

いた Con1 株のレプリコンは適応変異を持っていなかったことが報告されている<sup>40)</sup>。すなわち Con1 株に適応変異が無くとも増殖可能な細胞が、Huh7 細胞の細胞集団の中から選択されてきたと考えられている。また最近、この Huh7.5 細胞は細胞質内の二重鎖 RNA を検知して IRF (interferon regulatory factor)-3 と NF-κB を活性化し IFN を誘導する RIG-I (retinoic acid inducible gene -I) に変異があり、そのため HCV 複製の感受性が高くなっていることが明らかにされている<sup>42)</sup>。この HCV が非常に増殖しやすくなっている細胞が、レプリコンを用いた研究により同定されたことが、後の HCV 感染培養系の樹立において重要な意味を持つてくる。

### 9. HCV 感染培養系の樹立

JFH-1 株を用いた HCV 感染培養系の樹立に向け、JFH-1 株の全長 cDNA クローンを準備した。その時に気をつけたのは以下の二つである。一つ目は、患者血清中で増殖していた HCV のコンセンサス配列を用いることである。前述のように、この JFH-1 株の全塩基配列を決定したときに、全体を 14 のフラグメントにわけ RT-PCR を行い、各フラグメントそれぞれを 5 クローンずつシークエンスし、コンセンサス配列を決定しているが、さらに正確を期すため異なるプライマーセットを用い再度 RT-PCR を行い、ダイレクトシークエンスによりコンセンサス配列を確認している。もう一つは遺伝子型 2a の HCV 株は 1b と異なり 5'utr の末端がグアニン (G) ではなくアデニン (A) から始まっている。感染性クローンの RNA は T7 RNA ポリメラーゼ

を用い合成するが、T7 プロモータの下流が G から始まる方が RNA の収量が良いことが知られている。そこで JFH-1 株の 5'utr 末端に余剰の G を一塩基挿入した。準備した JFH-1 株の感染性クローンをコードする cDNA コンストラクトは、3'utr 末端を制限酵素 XbaI で切断し Mung bean スクレアーゼで平滑化した後、T7 RNA ポリメラーゼで全長 RNA を合成した<sup>8)</sup>。HCV 感染実験系の概略を図 2 に示す。

合成された JFH-1 株の全長 RNA を Huh7 細胞に導入し、HCV の増殖を観察した。HCV RNA はノザンプロットとリアルタイム RT-PCR 法で、培養細胞内の HCV 蛋白の発現はサザンプロットと免疫蛍光染色法で、培養上清中への HCV コア抗原の分泌を高感度コア ELISA 法でそれぞれ確認した。遺伝子導入後、培養細胞内では HCV RNA の増加と HCV 蛋白の持続的な発現を認め、免疫蛍光染色法では HCV のコア、NS3 蛋白の細胞質への局在が認められた。また、培養上清中には遺伝子導入後約 10 日目をピークに HCV RNA 及びコア抗原の分泌が継続的に認められた。感染性粒子の確認のため培養上清をショ糖密度勾配遠心法にて分画し、それぞれの分画で HCV RNA 量及びコア抗原量を定量したところ、比重が 1.17 g/mL の分画に両者の一致したピークを認め、これは過去に報告されている患者血清中のウイルス粒子を含む分画の比重と一致していた。さらにこの HCV RNA 及びコア抗原のピークは RNase には抵抗性であり、NP-40 の様な界面活性剤で処理することにより比重の重い方の分画 (1.25 g/mL) にシフトした。これはウイルスの外被を形成する軽いエンベロープが、界面

活性剤の働きで除去されたためと考えられる。また、界面活性剤処理をしていない検体のピークの分画中では免疫電子顕微鏡にてウイルス様粒子の存在が確認された<sup>8)</sup>。

以上のように、JFH-1 株の全長 RNA を Huh7 細胞に導入することで、培養上清中へのウイルス粒子の分泌が期待されたため、この培養上清を用いた新たな Huh7 細胞への感染実験を行った。JFH-1 株の全長 RNA を遺伝子導入した Huh7 細胞の培養上清を 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターで残渣を取り除き、新たな Huh7 細胞に接種した。遺伝子導入した Huh7 細胞の培養上清を UV 処理したもの、また JFH-1 株の全長 RNA を混ぜたのみで遺伝子導入を行わなかった Huh7 細胞の培養上清を同様に準備し、感染実験を行った。培養上清接種後三時間で培養液を交換し、さらに 48 時間培養後 anti-コア抗体、anti-NS5a 抗体を用いた免疫蛍光染色法で HCV 感染細胞を検出した。その結果、JFH-1 株の全長 RNA を遺伝子導入した Huh7 細胞の培養上清を感染させた Huh7 細胞では感染細胞が検出され ( $394.0 \pm 26.5/\text{cover slip}$ )、その感染細胞数は UV 処理により著明に減少した ( $13.3 \pm 3.8/\text{cover slip}$ )。JFH-1 株の全長 RNA を混ぜたのみで遺伝子導入を行わなかった培養上清では感染細胞が検出されなかった。また、JFH-1 株の全長 RNA を遺伝子導入した Huh7 細胞の培養上清の感染を、JFH-1 株の複製がレプリコンで確認されている HepG2 細胞、IMY-N9、HeLa 細胞で試みたが、感染細胞は認めなかった。(表 1)。以上のような結果から、JFH-1 株の全長 RNA を Huh7 細胞に遺伝子導入することにより、感染性の HCV 粒子が生成されることが確認された。さらに HCV レセプター候補の一つである CD81 に対する抗体や C 型慢性肝炎患者の血清でこの感染がブロックされるかどうかを確認した。感染させる Huh7 細胞をあらかじめ anti-CD81 抗体 (JS81) もしくは C 型慢性肝炎患者血清で処理し、PBS で洗浄した後に感染性 HCV 粒子を含む培養上清を感染させてみたところ、感染細胞数の低下が認められた。従って、anti-CD81 抗体や C 型慢性肝炎患者血清は培養細胞中で作られた HCV の感染をある程度阻止することが可能と考えられた。

これらの培養細胞中で観察される HCV の感染が、はたしてヒトでの感染と同じ事象を見ているのか？培養細胞中で生成された感染性 HCV 粒子ははたしてヒトにも感染可能なのか？これらの疑問に答えるべく、JFH-1 株の感染性 HCV 粒子を含む培養上清を用いたチンパンジーへの感染実験を行った<sup>8)</sup>。感染に用いた培養上清ストックは約  $8 \times 10^6$  コピー/mL の RNA 量であり、このストックを希釈しチンパンジーに接種することとした。まず、培養細胞での感染実験と同様にコントロールとして、JFH-1 株の全長 RNA を混ぜたのみで遺伝子導入を行わなかった Huh7 細胞の培養上清を接種したが、当然のごとく感染は認められなかった。次に  $10^4$  倍に希釈した培養上清ストックを接種したが、こちらも感染は認められなかった。さらに  $10^3$  倍に希釈したストックを接種したところ、接種二週間後にチンパンジー血清中で HCV RNA が陽性となり接種後五週目までウイルス血症が持続した。しかし血中の HCV RNA 量は  $2 \times 10^3$  コピー/mL とさほど高くなく、また肝障害も認められなかった。JFH-1 株の感染が起きていることを確認するため、血中の HCV RNA を RT-PCR 法で分離し 5'utr, E2, NS5b の各領域で塩基配列を確認したが、得られた配列は Huh7 細胞への遺伝子導入に用いた JFH-1 株と全く同じ配列であった。レプリコンで得られた適応変異を持つ感染性クローンがチンパンジーには感染できなかった結果とは異なり、適応変異を持たずに強い増殖能力を示す JFH-1 株から生成された感染性 HCV 粒子は、はたしてチンパンジーにも感染可能であった<sup>8)</sup>。

#### 10. HCV 複製の感受性が高い細胞を用いた感染系

この様に JFH-1 株を用いることで培養細胞にも、またチンパンジーにも感染可能な HCV の生成が可能になったのであるが、この方法の大きな問題点は感染力価が著しく低いことであった。しかし Lindenbach らはレプリコンを用いた研究により同定された HCV 複製の感受性が高い細胞、Huh7.5 細胞を用いることで高い感染力価を可能にした<sup>43)</sup>。彼らは遺伝子型 2a の J6 株の構造領域と JFH-1 株の非構造

表 1 JFH-1 株全長 RNA の遺伝子導入による感染性 HCV 粒子生成の確認<sup>8)</sup>

| 感染性<br>クローン | 遺伝子<br>導入 | 紫外線<br>照射 | 被感染<br>細胞 | 感染細胞数<br>(No./cover slip) |
|-------------|-----------|-----------|-----------|---------------------------|
| JFH-1       | +         | -         | Huh7      | $394.0 \pm 26.5$          |
| 〃           | +         | +         | 〃         | $13.3 \pm 3.8$            |
| 〃           | -         | -         | 〃         | 0                         |
| 〃           | +         | -         | HepG2     | 0                         |
| 〃           | +         | -         | IMY-N9    | 0                         |
| 〃           | +         | -         | HeLa      | 0                         |

領域をもつキメラ感染性クローンを用い、Huh7.5細胞に遺伝子導入することで、 $10^4 \sim 10^5$  感染力価を示す培養上清を手に入れたのである。ほぼ同時期に Zhong らも、Huh7.5細胞から作成されたレプリコン細胞をさらにインターフェロンガンマで処理しレプリコンを排除することにより得られた Huh7.5.1 細胞を用い、効率の良いウイルス培養系を確立した<sup>44)</sup>。この細胞に JFH-1 株の全長 RNA を導入することにより、培養 24 日目にはほぼ 100% の細胞が HCV 陽性となり、その培養上清は  $10^4 \sim 10^5$  の感染力価を示すことを見いだした。これらの効率の良いウイルス培養系の登場により HCV の感染から増殖複製までのこのウイルスのライフサイクルの観察がより容易になった。

## 11. おわりに

HCV のレプリコンシステムの確立は HCV 研究にとって画期的な出来事であった。このレプリコンシステムを足がかりに、HCV の増殖に関する多くのウイルス側の因子、宿主側の因子が明らかとなり、さらに JFH-1 株を手に入れたことで我々は HCV を解析し撲滅するための大きな武器を得た。しかし、その一方で JFH 株に関する大きな謎がいくつか残されている。なぜ JFH-1 株は適応変異も持たずに強い増殖が可能なのか？他の HCV 株とどこが違うのだろうか？また劇症肝炎患者から分離された株がなぜチンパンジーで強い肝障害を起こさないのか？これらの問題を明らかにすることで、今のところ JFH-1 株でしか観察されない培養細胞内での感染性ウイルス粒子の生成や感染過程の観察が他の HCV 株でも可能になると期待される。そして、この感染増殖が可能なシステムを用いることで、増殖過程のみでなくウイルスの感染から分泌までのすべてのステップをターゲットとした抗ウイルス薬の探索が可能となり、いずれ HCV を完全に排除しうる薬剤が開発されるかもしれない。また、長い間謎であった HCV のレセプターが同定されるのもそう遠い日の事ではないであろう

## 文 献

- 1) Choo QL, 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*. 244: 359-62, 1989.
- 2) Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ, Weiner AJ, Bradley DW, Kuo G, Houghton M: Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88: 2451-5, 1991.
- 3) Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T, Shimotohno K: Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87: 9524-8, 1990.
- 4) Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Suzuki S, Kohara M: Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol*. 75: 1755-60, 1994.
- 5) Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Shimotohno K: A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem Biophys Res Commun*. 215: 744-9, 1995.
- 6) Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM: Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science*. 277: 570-4, 1997.
- 7) 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*. 285: 110-3, 1999.
- 8) 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*. 11: 791-6, 2005.
- 9) Beard MR, Abell G, Honda M, Carroll A, Gartland M, Clarke B, Suzuki K, Lanford R, Sangar DV, Lemon SM: An infectious molecular clone of a Japanese genotype 1b hepatitis C virus. *Hepatology*. 30: 316-24, 1999.
- 10) Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, Bukh J: Hepatitis C virus: an infectious molecular clone of a second major genotype (2a) and lack of viability of intertypic 1a and 2a chimeras. *Virology*. 262: 250-63, 1999.
- 11) Bartenschlager R, Lohmann V: Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res*. 52: 1-17, 2001.
- 12) Bartenschlager R, Lohmann V: Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 81: 1631-48, 2000.
- 13) Carloni G, Iacovacci S, Sargiacomo M, Ravagnan G, Ponzetto A, Peschle C, Battaglia M: Susceptibility of human liver cell cultures to hepatitis C virus infection. *Arch Virol Suppl*. 8: 31-9, 1993.
- 14) Iacovacci S, Manzin A, Barca S, Sargiacomo M, Serafino A, Valli MB, Macioce G, Hassan HJ, Ponzetto A, Clementi M, Peschle C, Carloni G: Molecular characterization and dynamics of hepatitis C virus replication in human fetal hepatocytes infected in vitro. *Hepatology*. 26: 1328-37, 1997.
- 15) Fournier C, Sureau C, Coste J, Ducos J, Pageaux G, Larrey D, Domergue J, Maurel P: In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 79: 2367-74, 1998.
- 16) Rumin S, Berthillon P, Tanaka E, Kiyosawa K, Traubaud MA, Bizollon T, Guillaud C, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Inchauspe G, Trepo C: Dynamic analysis of hepatitis C virus replication and quasispecies selection in long-term cultures of adult human hepatocytes infected in vitro. *J Gen Virol*. 80: 3007-18, 1999.
- 17) Seipp S, Mueller HM, Pfaff E, Stremmel W, Theilmann L, Goeser T: Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication in vitro. *J Gen Virol*. 78: 2467-76, 1997.
- 18) Ito T, Yasui K, Mukaigawa J, Katsume A, Kohara M, Mitamura K: Acquisition of susceptibility to hepatitis

- C virus replication in HepG2 cells by fusion with primary human hepatocytes: establishment of a quantitative assay for hepatitis C virus infectivity in a cell culture system. *Hepatology*. 34: 566-72, 2001.
- 19) Lanford RE, Sureau C, Jacob JR, White R, Fuerst TR: Demonstration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR. *Virology*. 202: 606-14, 1994.
  - 20) Zhao X, Tang ZY, Klumpp B, Wolff-Vorbeck G, Barth H, Levy S, von Weizsacker F, Blum HE, Baumert TF: Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection. *J Clin Invest*. 109: 221-32, 2002.
  - 21) Aizaki H, Nagamori S, Matsuda M, Kawakami H, Hashimoto O, Ishiko H, Kawada M, Matsuura T, Hasumura S, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T: 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.
  - 22) Khromykh AA, Westaway EG: Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. *J Virol*. 71: 1497-505, 1997.
  - 23) Zhu Q, Guo JT, Seeger C: Replication of hepatitis C virus subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells. *J Virol*. 77: 9204-10, 2003.
  - 24) Ali S, Pellerin C, Lamarre D, Kukolj G: Hepatitis C virus subgenomic replicons in the human embryonic kidney 293 cell line. *J Virol*. 78: 491-501, 2004.
  - 25) Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R: Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol*. 75: 4614-24, 2001.
  - 26) Bukh J, Pietschmann T, Lohmann V, Krieger N, Faulk K, Engle RE, Govindarajan S, Shapiro M, St Claire M, Bartenschlager R: 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: 14416-21, 2002.
  - 27) Kato T, Furusaka A, Miyamoto M, Date T, Yasui K, Hiramoto J, Nagayama K, Tanaka T, Wakita T: Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J Med Virol*. 64: 334-9, 2001.
  - 28) Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Kurai K, Iizuka H, Machida A, Miyakawa Y, Mayumi M: Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J Gen Virol*. 72: 2697-704, 1991.
  - 29) Hussy P, Langen H, Mous J, Jacobsen H: Hepatitis C virus core protein: carboxy-terminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase. *Virology*. 224: 93-104, 1996.
  - 30) Buratti E, Baralle FE, Tisminetzky SG: Localization of the different hepatitis C virus core gene products expressed in COS-1 cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 44: 505-12, 1998.
  - 31) Liu Q, Tackney C, Bhat RA, Prince AM, Zhang P: Regulated processing of hepatitis C virus core protein is linked to subcellular localization. *J Virol*. 71: 657-62, 1997.
  - 32) McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B: Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J*. 21: 3980-8, 2002.
  - 33) Kato T, Miyamoto M, Furusaka A, Date T, Yasui K, Kato J, Matsushima S, Komatsu T, Wakita T: Processing of hepatitis C virus core protein is regulated by its C-terminal sequence. *J Med Virol*. 69: 357-66, 2003.
  - 34) Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kajita T, Moradpour D, Wands JR, Kohara M: The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol*. 72: 6048-55, 1998.
  - 35) Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, Wakita T: Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*. 125: 1808-17, 2003.
  - 36) Date T, Kato T, Miyamoto M, Zhao Z, Yasui K, Mizokami M, Wakita T: Genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon can replicate in HepG2 and IMY-N9 cells. *J Biol Chem*. 279: 22371-6, 2004.
  - 37) Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Mizokami M, Wakita T: Nonhepatic cell lines HeLa and 293 support efficient replication of the hepatitis C virus genotype 2a subgenomic replicon. *J Virol*. 79: 592-6, 2005.
  - 38) Miyamoto M, Kato T, Date T, Mizokami M, Wakita T: Comparison between subgenomic replicons of hepatitis C virus genotypes 2a (JFH-1) and 1b (Con1 NK5.1). *Intervirology*. 49: 37-43, 2006.
  - 39) Kato T, Date T, Miyamoto M, Sugiyama M, Tanaka Y, Orito E, Ohno T, Sugihara K, Hasegawa I, Fujiwara K, Ito K, Ozasa A, Mizokami M, Wakita T: Detection of Anti-Hepatitis C Virus Effects of Interferon and Ribavirin by a Sensitive Replicon System. *J Clin Microbiol*. in press.
  - 40) Blight KJ, McKeating JA, Rice CM: Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*. 76: 13001-14, 2002.
  - 41) Blight KJ, McKeating JA, Marcotrigiano J, Rice CM: Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol*. 77: 3181-90, 2003.
  - 42) Sumpter R Jr, Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M Jr: Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol*. 79: 2689-99, 2005.
  - 43) Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM: Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*. 309: 623-6, 2005.
  - 44) Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV: Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 9294-9, 2005.



# Production of infectious hepatitis C virus in cell culture

**Takanobu KATO<sup>1,2,3</sup> and Takaji WAKITA<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, Tokyo,

<sup>2</sup>Department of Clinical Molecular Informative Medicine, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya

(<sup>3</sup> Current address ; Liver Diseases Branch, NIDDK, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)

Hepatitis C virus (HCV) is a major public health problem, infecting an estimated 170 million people worldwide. Current therapy for HCV-related chronic hepatitis is based on the use of interferon. However, virus clearance rates are insufficient. Investigations to develop the anti-viral therapy or to understand the life cycle of this virus have been hampered by the lack of viral culture systems. We isolated the JFH-1 strain from a patient with fulminant hepatitis, and the JFH-1 subgenomic replicon could replicate efficiently in culture cell without adaptive mutation. Recently, we developed the HCV infection system in culture cells with this JFH-1 strain. The full-length JFH-1 RNA was transfected into Huh7 cells. Subsequently, viral RNA efficiently replicated in transfected cells and viral particles were secreted. Furthermore, secreted virus displayed infectivity for naive Huh7 cells. This system provides a powerful tool for studying the viral life cycle and constructing anti-viral strategies.