

2. C型肝炎ウイルス研究のこれまでと今後の課題

渡 士 幸 一

国立感染症研究所ウイルス第二部

2020年のノーベル医学生理学賞はC型肝炎とその原因ウイルス発見、病態解明に貢献のあった3研究者に送られた。これら受賞対象研究を経て、C型肝炎ウイルス(HCV)のウイルス学的技術や実験手法は大きく改善され、その後効果的な抗ウイルス治療も確立され、まさにHCV研究は円熟期を迎えている。本総説では、これまでのHCV研究の流れをおさらいし、今後のHCV研究の課題に触れながら、私たちがおこなっているHCV培養系を利用した生理活性天然物探索研究を紹介する。

はじめに

～2020年10月5日：ノーベル医学生理学賞の発表～

2020年10月5日に今年のノーベル医学生理学賞が発表された。このたび、C型肝炎の概念提唱と、その原因ウイルスであるC型肝炎ウイルス(HCV)の発見、またHCVによる病態形成の証明を含む、HCV研究の黎明期に多大な貢献のあったHarvey J. Alter博士、Michael Houghton博士、Charles M. Rice博士にノーベル医学生理学賞が授与されたことは大変喜ばしいことである。肝炎ウイルスとともに研究生活の多くを過ごしてきた者として、心よりお慶び申し上げたい。HCV感染細胞に浮かぶ巨大脂肪滴も今宵は一層誇らしい光を放つように見え、それを取り囲むcoreタンパク質も輪になって(図3参照)この快挙を祝福するがごとくである。そしてこれを機にHCVに関する総説執筆の機会を得、ここにご紹介させていただく次第である。

C型肝炎研究の歴史と治療の進化

日本ウイルス学会の諸先輩方の中で、私のような若輩者がここに執筆するは極めて失礼かつ気が引けるものである

連絡先

〒162-8640

東京都新宿区戸山1-23-1

国立感染症研究所ウイルス第二部

TEL: 03-5285-1111

FAX: 03-5285-1161

E-mail: kwatashi@nih.go.jp

が、せっかくのこの契機にHCV研究の歴史を簡単に振り返りたい。肝炎は古くは古代ギリシャ時代にも流布しており、医学の祖と知られるヒポクラテスが黄疸の流行を記述している(らしい)。そこから一気に2000年以上を経て、第二次世界大戦後になると、この疾患が伝染性であること、また経口性の感染と血液を介しての感染があることが示された。1960年代にはまずB型肝炎が、その後1970年代にA型肝炎ウイルスの存在が明らかになるも、同時に肝炎の多くはこのA型でもB型でもないウイルスによるものであることが明るみになってきた。これが非A非B型肝炎であり、Alter博士はB型肝炎ウイルスの発見から非A非B型肝炎の提唱に至る研究などで多大な貢献があった(図1)。このウイルスの実態が初めて解明されたのは1989年であり、当時カイロン社のMichael Houghton博士のグループがウイルスの部分配列を同定した。彼らはウイルスを電子顕微鏡で観察して発見したわけではなく、非A非B型肝炎患者の血液を感染させたチンパンジーの血液にウイルス核酸が存在すると仮定し、これに非A非B型肝炎患者由来血液(ここに抗体が存在する)を反応させ、1つのクローンを同定した。この核酸は新たなウイルス由来の配列であることがわかり、これをC型肝炎ウイルス(HCV)と命名した¹⁾(図1)。HCVを検出するための診断系がすぐに関与され、当時問題となっていた輸血後肝炎を大幅に減らすことが可能となった。また非A非B型肝炎の多くはHCV感染によるものであることも判明した²⁾。間もなくHCVの全open reading frame領域を含むcDNAがクローニングされたが、中でも最後に残された、複製に必須なHCV配列が3'末端領域に存在しており(3'-X)、これを発見したグループの一つがCharles M. Rice博士らである^{3,4)}。彼らはさらに1997年に、この全長HCV RNAをチンパン

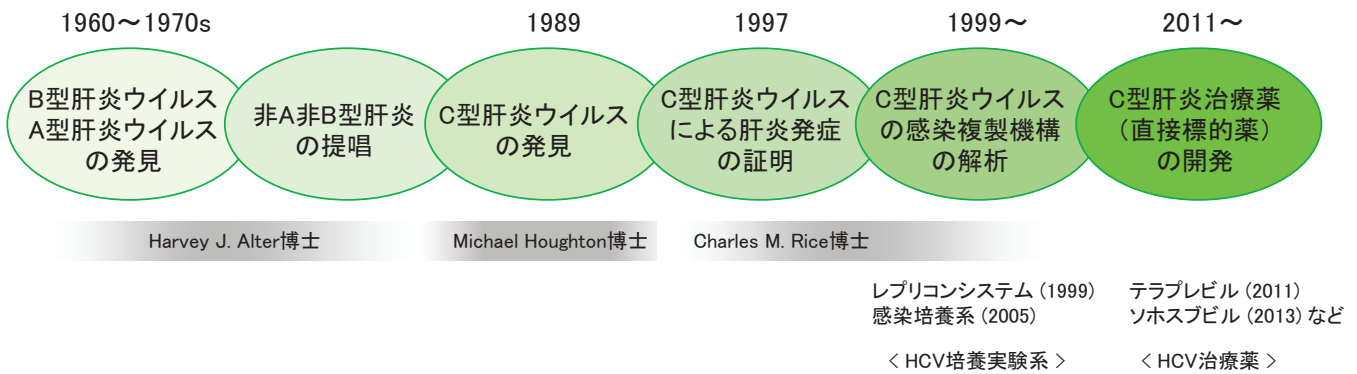


図1 C型肝炎およびC型肝炎ウイルス研究の流れ

ノーベル賞受賞の3氏が関わった主な研究段階もあわせて示した。

ギーに導入することによりHCVが産生され肝炎を発症することを示した⁵⁾(図1)。HCVが単独で肝炎の原因となることの証明であり、これによってHCVによる肝炎発症の概念が完成する。

HCV研究は1990年代後半から、感染増殖系の樹立および治療薬開発研究が主課題となっていく。その当時HCVは調べられた限りほとんどすべての細胞株に感染せず、そのため感染複製機構を効率的に解析する術がなかった。ブレイクスルーの一つとして、まずHCVの複製過程を再現するレプリコンシステムが1999年に報告された。ドイツのBartenschlager博士のグループは、ウイルスゲノム複製に必要と考えられていたHCV非構造タンパク質領域を残し、構造タンパク質および周辺領域をネオマイシン耐性遺伝子に置換したキメラRNA(サブゲノムレプリコンRNA)をヒト肝細胞由来Huh-7細胞に導入することにより、初めてHCVサブゲノムRNAの自律複製に成功した⁶⁾(図2)。その後、当時東京都神経科学総合研究所の脇田隆宇博士のグループらが、劇症肝炎由来HCV JFH-1株の極めて高い複製能を利用して、全長ウイルスRNAの導入によるHCV産生系の確立を2005年に発表した⁷⁾(図2)。これらの技術的革新によって、HCV増殖過程のすべてを培養細胞株とウイルスRNAから評価、解析することが可能となった。

C型肝炎治療は2010年まで、非A非B型肝炎時代からのインターフェロンをベースとした治療が主であったが、リコンビナントHCVタンパク質精製技術の向上と上記培養実験系の開発によって、2000年代に新規治療薬開発が一気に進むことになる。その結果、まず2011年に初めてのウイルス直接作用薬(DAA)であるプロテアーゼ阻害薬テラプレビルが、2014年にはNS5A阻害薬ダクラタスビル、ポリメラーゼ阻害薬ソホスブビルをはじめ抗HCV薬の開発ラッシュが始まり、現在までに15ほどのDAAが開発された⁸⁾。現在はプロテアーゼ阻害薬、NS5A阻害薬、ポリメラーゼ阻害薬から2剤あるいは3剤を組み合わせた

インターフェロンなしの多剤併用療法が実用化され、先進国で95%以上の患者でHCV排除が達成される時代となった。古代ギリシャ時代から続く疾患の(一部)原因解明と克服が達成されつつある。

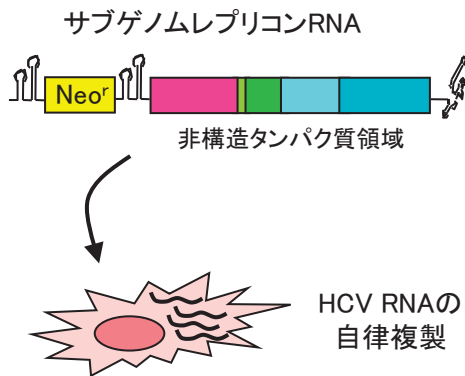
これからの課題

以上のように、ノーベル賞受賞対象となったHCV研究黎明期からウイルスの性状解析および感染複製系開発期、DAA開発および治療改善期と経てきた。これら一連の研究によって、治療効果が飛躍的に改善され、ともすれば臨床的にはC型肝炎は終わった病気である、地球から絶滅だ、1000倍返した、と喧伝される風潮さえある。確かにこれまでの多くの研究成果は臨床治療に反映され、それを享受している状況は大変素晴らしいものである。ではこの辺りで、全てをDAAに任せC型肝炎研究から引き上げる？はたしてそれで大丈夫でしょうか？

1) DAA低感受性HCV遺伝子型と薬剤耐性

現在のDAAは効果が非常に高く、抗ウイルス療法で常に問題となる薬剤耐性出現をも基本的には乗り越えられる、と考えられている。したがって、市場縮小が見込まれることもあり、今後DAAの開発はほとんど打ち止めとなる。しかしながら注意しなければならないのは、以上は主に先進国での治療成績と状況を鑑みてのことである。HCVは一般に、国や地域によって流行する遺伝子型が異なり、日本や欧米では主に遺伝子型1のHCVが広く流行している。一方最近、DAAに低感受性のウイルスが存在することが知られつつあり、例えばルワンダや中国に流布するHCV遺伝子型3,4に対する治療で、先進国での著効率95%以上のDAAが50%程度しか奏功しない例が報告された⁹⁾。すなわちこれまで想像されていた以上に、HCV遺伝子型間でDAA感受性の多様性が見られる可能性がある。この「ウイルス」誌読者諸氏には、ウイルス遺伝子型・株によって薬剤感受性が異なるという現象は、特に驚くべき話ではないと思われる。現代社会において、他国でのウ

< レプリコンシステム (1999~) >



< 感染培養系 (2005~) >

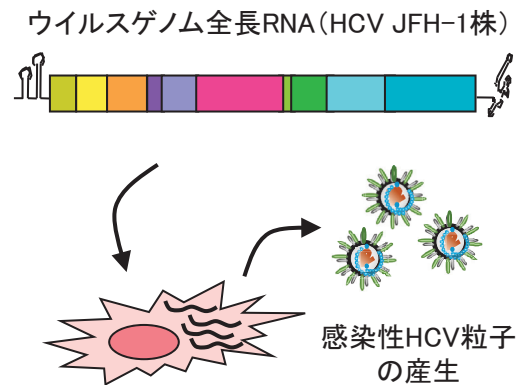


図2 C型肝炎ウイルス実験系の開発

(左) レプリコンシステムには当初、HCVゲノム複製に必要な非構造タンパク質コード領域を含む部分長HCV RNAにネオマイシン耐性遺伝子コード領域 (Neo^r) を組み込んだキメラ RNA (サブゲノムレプリコン RNA) を用いた。これを肝がん由来 Huh-7 細胞に導入することにより、このサブゲノムレプリコン RNA が自律複製する細胞が樹立された。この細胞では HCV ゲノム複製と同様の機構でサブゲノムレプリコン RNA が複製維持される。

(右) 感染培養系には基本的に、HCV JFH-1 株由来全長 RNA あるいはそのキメラ RNA を用い、これを Huh-7 細胞あるいは垂株に導入する。RNA が複製し、感染性 HCV 粒子が産生される。これを再度別の細胞に処理することにより、HCV 感染過程の全てを評価することが可能となった。

ウイルス感染症が他人事ではなく、期を経ず身近なところへ来たるストーリーは、新型コロナウイルス感染症の例を出すまでもなく想定すべきところである。そして製薬会社によって新たな DAA がもはや開発されないとすれば、どのように対処していけば良いだろうか、

2) がん発症は解決したか

現在臨床では、HCV 排除後の肝がん進展をどのように防ぐかが大きな関心事となっている。すなわち現状の DAA では HCV を高率に排除でき、それによって肝がんは減少するものの、ある一定の無視できない頻度で依然として肝がん発症へ至ることが明らかになってきている。つまり現在の DAA 治療ではがん化進展を完全には抑えられない。このがん化進展要因はおそらく複合要因であるが、その一因はウイルスが宿主に引き起こす (おそらく不可逆的ないしは極めて可逆性の低い) 機能変化であると想定される。したがって HCV 感染によって宿主にどのような機能変化が引き起こされるか、ウイルスと宿主の相互作用およびそのメカニズムの理解が求められる。

3) 感染への備えは万全か

DAA があるとはいえ、先進医療を受けられるのはごく一部の国や限られた人々であり、治療薬のみで感染症を世界レベルで制御できると考えるのは早計である。これまでの感染症制圧の歴史から学ぶに、感染症への対応の基本としてワクチンの開発が強く求められる。しかしながら HCV は遺伝的多様性を有し配列安定性が低いこと、抗体

がどの程度普遍的な活性を認めるのかなどの問題点があり、現在のところ有効なワクチンの開発はまだ途上である。

4) ウイルスモデルとして

HCV は + 鎖 RNA ウイルスのフラビウイルス科に属するウイルスである。感染により、細胞質環境から隔離された膜構造体 (二重膜小胞と呼ばれる) を構築しその内部でゲノム複製し、また宿主シグナル伝達や代謝に高度に依存して複製増殖するという、RNA ウイルスに保存されたメカニズムを利用する一方で、3,4 種類の受容体を連続的に利用して侵入し、宿主脂肪滴を子孫ウイルス粒子の構築に利用するなどこのウイルスに特徴的な生活環も併せ持つ。さらに遺伝子変異導入や再感染によるウイルス選択などある程度ウイルス学的解析が可能な実験系があり、さらに複数の系統の抗ウイルス薬と臨床的薬剤耐性の報告から、様々な薬理学的研究もおこなえる。すなわちウイルス感染を解析するモデルとしての一定の優位性がある。他にもいくつかの観点が挙げられるが、臨床だけでなく学術的意味においても、今後の持続的な HCV 研究が求められる。

HCV 研究を利用した天然物研究

これまで我々は HCV 研究を、ウイルス学的観点からはウイルス感染や病態形成の理解を目的に進めてきた。一方で上述したような HCV 研究の積み重ねを経て成熟したウイルス感染実験系を、別の学問領域の進展に利用すること

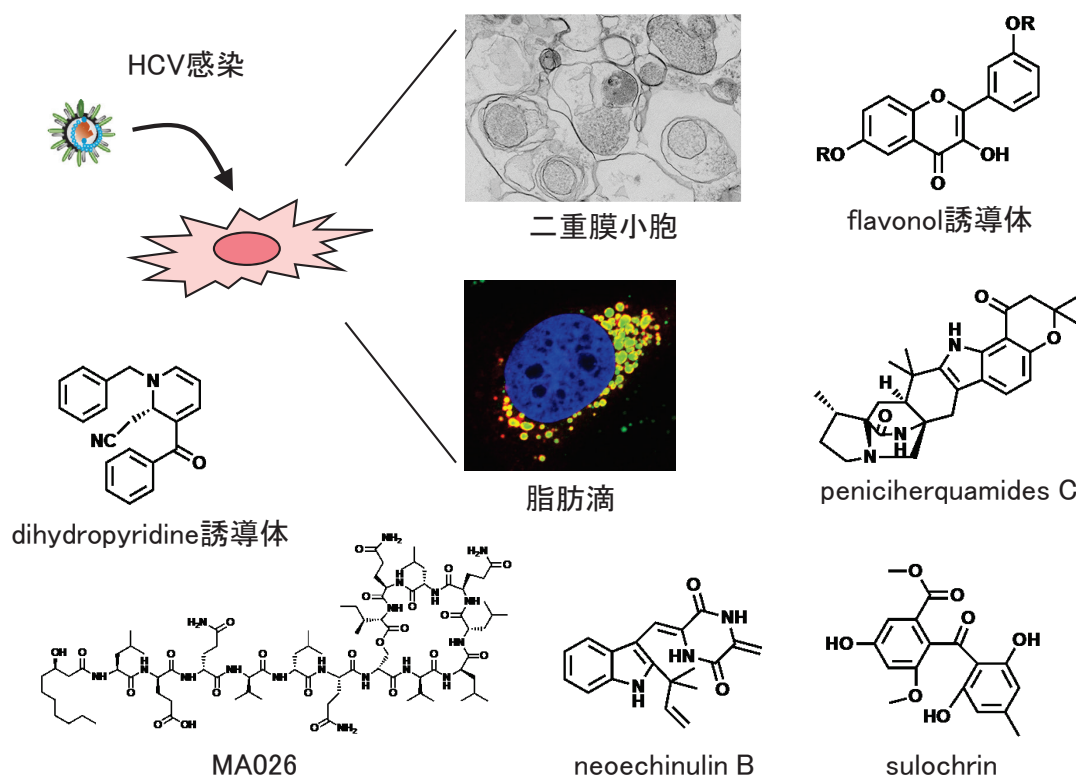


図3 C型肝炎ウイルス感染培養系を用いた新規天然有機化合物の同定

HCV感染培養系を生物学的評価系として得られた天然物およびその誘導体を示す。写真は感染により誘導される二重膜小胞（電子顕微鏡）および脂肪滴（免疫蛍光法：緑が脂肪滴、赤がHCVコアタンパク質、黄色がその重なり、青が核を示す）。得られた新規天然物はそれぞれ多様なメカニズムでHCV産生を抑制するだけでなく、ウイルス感染症以外への適用が期待できるシーズとなる。

も可能である。ここではそのような一例として、HCV感染実験系を用いた天然物研究・新規生理活性化合物探索研究を紹介する。

天然物探索領域は、大村智博士の2015年ノーベル医学生理学賞受賞をはじめ、従来より日本が先導してきた研究領域の一つである。天然物は、合成低分子化合物に比較して構造・生物活性の多様性が高く、分子量500を越えるいわゆる中分子の範疇に入る化合物を多く含んでいる。このような化合物は、一般に合成低分子化合物には難しい、凹凸が少なく面が広いタンパク質間相互作用の阻害に適している。特に近年は新たな可能性を持つ創薬シーズの充実化と整備のため、新規天然物・誘導体の同定およびその生理活性の探索が着目されている。

新規天然物は一般に、何らかの生物学的アッセイ系で活性を認めることにより同定される。これまでがん細胞や細菌・真菌増殖、受容体や酵素などに対する評価が典型的に行われてきたが、新たな生物学的アッセイ系を拡充することが天然物発見を加速することにつながる。我々はこれまで必ずしも広くは行われてこなかった、ウイルス感染培養系を利用した天然物探索をおこない、その目的にHCV感

染実験系を用いてきた。ウイルス増殖は宿主依存性が高いため、ウイルス感染評価系で得られた化合物は抗ウイルス薬のリードとしてのみならず、その標的分子への作用を利用した別の適用へ広げることができる。以下に、HCV感染実験系を用いた天然物探索研究の一例を紹介する（図3）。

1) MA026

シュードモナスの二次代謝産物から、HCVの細胞侵入を阻害するものとして、分子量1000を越える環状直鎖状ペプチドが得られた¹⁰。このMA026は新規ペプチドでありその生理作用は当然全く不明であったが、標的分子をファージディスプレイ法によりスクリーニングした。その結果、結合アミノ酸配列候補として濃縮されたもののうち一つにVFDSLLが挙げられた。興味深いことに、この配列はHCV侵入受容体の一つであるclaudin-1の第一細胞外ループに存在し、実際にMA026はリコンビナントclaudin-1に結合することが示された。claudinは様々な組織に発現しているタイトジャンクションタンパク質であり、上皮のバリア機能を担っている。その後、私たちの共同研究グループより、MA026処理によって単層培養MDCKII細胞のタイトジャンクションを開口させること

が示された¹¹⁾。このように MA026 は claudin-1 リガンドとして、HCV 感染を阻害するだけでなく細胞間透過性を誘導することが明らかとなった。この生理活性を利用して、MA026 は抗 HCV シーズとしてだけでなく、例えば経皮吸収薬のデリバリー改善への有用性が期待される。

2) ネオエキヌリン B

真菌二次代謝産物のスクリーニングから、ネオエキヌリン B を HCV 複製を阻害する化合物として同定した¹²⁾。ネオエキヌリン B は 1977 年にアスペルギルスより抽出された化合物であるが、生理機能は全く不明であった。今回、ネオエキヌリン B 処理/非処理細胞間での遺伝子発現比較解析およびレポーターアッセイより、この化合物が liver X receptor (LXR) 依存的転写を抑制すること、また表面プラズモン共鳴法よりネオエキヌリン B が LXR に直接相互作用することから、ネオエキヌリン B が新規 LXR アンタゴニストであることが示された。ネオエキヌリン B は LXR 下流遺伝子の sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) および stearoyl-CoA desaturase (SCD) 1 の発現を低下させ、これにより脂肪滴および二重膜小胞の産生を抑制し、HCV 粒子構築およびゲノム複製を阻害することが示唆された。ネオエキヌリン B は、二重膜小胞依存的に複製する他のウイルス（ポリオウイルス）の複製も阻害された。また一方で、この化合物は肝細胞内の脂肪滴退縮能を示したことより、非アルコール性脂肪性肝炎など肝脂質代謝異常疾患の改善にも有用である可能性が示され、現在さらに解析を進めている。このように、HCV 複製阻害活性を通して天然物の新たな生理活性を同定した。

3) フラボノール誘導体

植物由来フラボノイドおよびその誘導体のスクリーニングにより、HCV 産生を抑制するフラボノール誘導体を見出した。これは aryl hydrocarbon receptor (AhR) を阻害し、下流遺伝子チトクロム P450 1A1 (CYP1A1) の誘導抑制によって脂肪滴産生を低下させることが示唆された。この化合物は HCV 感染による脂肪滴過剰蓄積だけではなく、遊離脂肪酸誘導性および外来薬剤誘導性脂質蓄積も阻害できることが示された。すなわちこれも現在世界的に問題となっている非アルコール性脂肪性肝炎への広い応用性が期待される。

これ以外にも抗 HCV 活性を指標として、新規のジアザビシクロオクタン誘導体、ジヒドロピリジン誘導体などを同定した¹³⁻¹⁵⁾ (図 3)。これらの研究を通して、HCV 感染培養系が新規天然物の同定に有用なだけでなく、その標的分子および薬理作用、適応疾患までを提案できることを示した。これらの天然物が今後の新規抗 HCV 戦略の一助となれば幸いであるが、同時にウイルス学から他分野領域へ展開する研究の一例として紹介した。

まとめ

以上、HCV 研究のこれまでの歴史とともに、今後の課題、また私たちの研究例を交えて紹介した。HCV 研究は置かれている状況も技術も 10-15 年前とは大きく変わり、研究者の姿勢も大きく変化した。しかしながら今後ともこのウイルスの感染増殖を理解し利用することによって、学術的、臨床的に重要な新知見が得られると思われる。今後の研究進展が期待される。

謝辞

本総説執筆の機会をお与えいただきました荊和宏明先生はじめ編集委員の先生方に深謝いたします。

利益相反の開示

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

参考文献

- 1) Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
- 2) Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-500.
- 3) Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice CM. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 1996;70:3363-71.
- 4) Tanaka T, Kato N, Cho MJ, et al. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* 1996;70:3307-12.
- 5) Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ, et al. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 1997;277:570-4.
- 6) Lohmann V, Korner F, Koch J, et al. Replication of sub-genomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999;285:110-3.
- 7) Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11:791-6.
- 8) Pawlotsky JM. Interferon-Free Hepatitis C Virus Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2020;10.
- 9) Shin EC, Han JW, Kang W, et al. The Beginning of Ending Hepatitis C Virus: A Summary of the 26th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. *Viruses* 2020;12.
- 10) Shimura S, Ishima M, Nakajima S, et al. Total synthesis and anti-hepatitis C virus activity of MA026. *J Am Chem Soc* 2013;135:18949-56.
- 11) Kanda Y, Yamasaki Y, Shimura S, et al. MA026, an anti-hepatitis C virus compound, opens tight junctions of the epithelial cell membrane. *J Antibiot (Tokyo)* 2017;70:691-694.

- 12) Nakajima S, Watashi K, Ohashi H, et al. Fungus-Derived Neoechinulin B as a Novel Antagonist of Liver X Receptor, Identified by Chemical Genetics Using a Hepatitis C Virus Cell Culture System. *J Virol* 2016;90:9058-74.
- 13) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, et al. Specific inhibition of hepatitis C virus entry into host hepatocytes by fungi-derived sulochrin and its derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;440:515-20.
- 14) Nishikori S, Takemoto K, Kamisuki S, et al. Anti-hepatitis C Virus Natural Product from a Fungus, *Penicillium herquei*. *J Nat Prod* 2016;79:442-6.
- 15) Watanabe R, Mizoguchi H, Oikawa H, et al. Stereocontrolled synthesis of functionalized tetrahydropyridines based on the cyanomethylation of 1,6-dihydropyridines and generation of anti-hepatitis C virus agents. *Bioorg Med Chem* 2017;25:2851-2855.

Hepatitis C virus research so far and in the future

Koichi WATASHI

Department of Virology II, National Institute of Infectious diseases

The 2020 Nobel Prize in Physiology or Medicine was awarded to three researchers who contributed to the development of the disease concept "non-A, non-B hepatitis" and the isolation of its causative agent, hepatitis C virus (HCV). Technologies and experimental systems to analyze HCV have been greatly improved for these three decades, and the antiviral treatments against HCV have been developed. This review summarizes the effort to elucidate the HCV biology so far and the remaining subject to be solved in the future. I also introduce the studies to identify bioactive natural products by taking advantage of the HCV infection cell culture system.