

25. 肝炎ウイルス (2)

—ウイルスの増殖機構の解明とその制御法の開発を目指して—

加藤 宣之

今日は、短時間ではありますが、HCVに関する基礎的研究のこれまでの足跡と現状そして将来の展望についてまとめてみたいと思います。HCVの研究を数年やられている方にはあまりおもしろくないセミナーかもしれませんが、今回の趣旨が他分野の方や新たにHCVの研究に参入された方を対象にしていることを御理解していただければと思います。副題にもありますように、ウイルスの増殖という観点については少し詳しく述べたいと思っております。

まず、HCVが感染した場合、どうなるのかということを見てみたいと思います。ここに示すように(図1)、HCVに感染しますと半数程度が急性肝炎を発症し、残りは無症状のまま経過すると推定されています。厄介なことに急性肝炎の70-80%が慢性化してしまうという点が問題になります。そして、さらに問題なのは慢性肝炎の半数程度が肝硬変という病態を経て肝がんを発症するという点にあります。いったん、慢性化した肝炎からの自然回復はほとんどありませんし、無症状のグループから慢性肝炎への移行もありますので、C型肝炎は深刻な感染症であるといえます。我が国全体では200万人以上の方がHCVに感染しているものと推定されております。肝がんによる死亡者数も97年の段階で32,000人を超えており、その8割がHCVに感染しております。

また、世界的にみても、HCVの感染は年々拡大してお

りまして、特に東南アジアやアフリカ諸国では感染率が国民の10%を越えるような国もでてきており、全体では2億人に近い人々がHCVに既に感染してしまっていると推定されております。米国でも400万人を越えるHCV感染者がいることが最近になって明らかになったことから、国家をあげて対策に乗り出してきており予防・治療などに関する研究が活発化しております。

HCVは1989年に米国において発見された比較的歴史の浅いウイルスですが、ここでこれまでのHCVに関する基礎研究の概略をざっとみてみることにします。

まず、HCVの遺伝子解析が挙げられ、ウイルスゲノムの構造(9.6kbからなる1本鎖のプラス鎖RNA)やゲノムの多様性や変異性に関する研究がなされ、遺伝子型や超可変領域が見つかっています。ウイルスゲノムから産生される蛋白質(コア、NS3、NS5Bなど)の機能解析も盛んに行われています。免疫学的解析においても、HCV特異的抗体やCTLに関する多くの研究がなされ、HCV感染の診断法も確立されております。ただ、中和抗体やワクチンの開発に関しては、かなり苦戦しているというのが現状です。もう一つ苦戦している分野は後で詳しく述べますが、ウイルスを人工的に増殖させるシステムの開発であり、培養細胞や動物を用いて試みているわりには成果が得られておりません。持続感染機構については、宿主免疫からの逃避や肝外感染が重要な因子になっていることが判ってきており、肝細胞の癌化についても、単に炎症だけでなく、HCV蛋白質の関与がありそうということが判りつつあります。これから、少し個別にみていくことにしたいと思います。

まず、HCVゲノムに関してですが、この辺についてはよく判っています。

図2は私達が1990年に初めて明らかにしたHCVゲノム(HCV-J株)の全容と、そこから産生されるHCV蛋白質について示したものです。HCVゲノムは約9,600ヌクレオチドからなるプラス鎖の1本鎖RNAであり、そこから産生される約3000アミノ酸の前駆体蛋白質がHCVゲノムにコードされているプロテアーゼや細胞由来のシグナレー

岡山大学大学院医歯学総合研究科分子生物学分野(〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1)

Hepatitis virus

—The approach to clarification of the mechanisms of virus proliferation and the development of its control means—

Nobuyuki Kato

Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry

Department of Molecular Biology

Shikata-cho, 2-5-1, Okayama 700-8558

TEL: 086-235-7385

FAX: 086-235-7392

E-mail: nkato@md.okayama-u.ac.jp

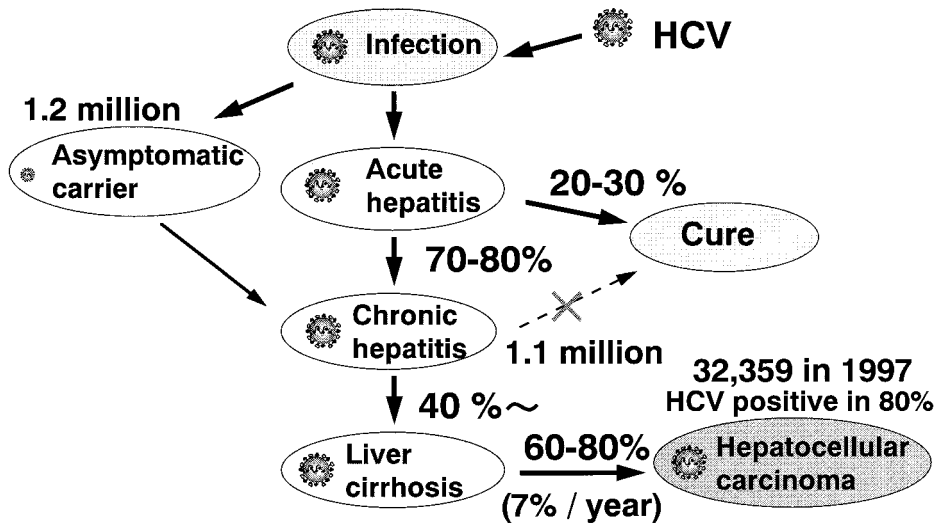


図1 HCV 感染による肝発癌

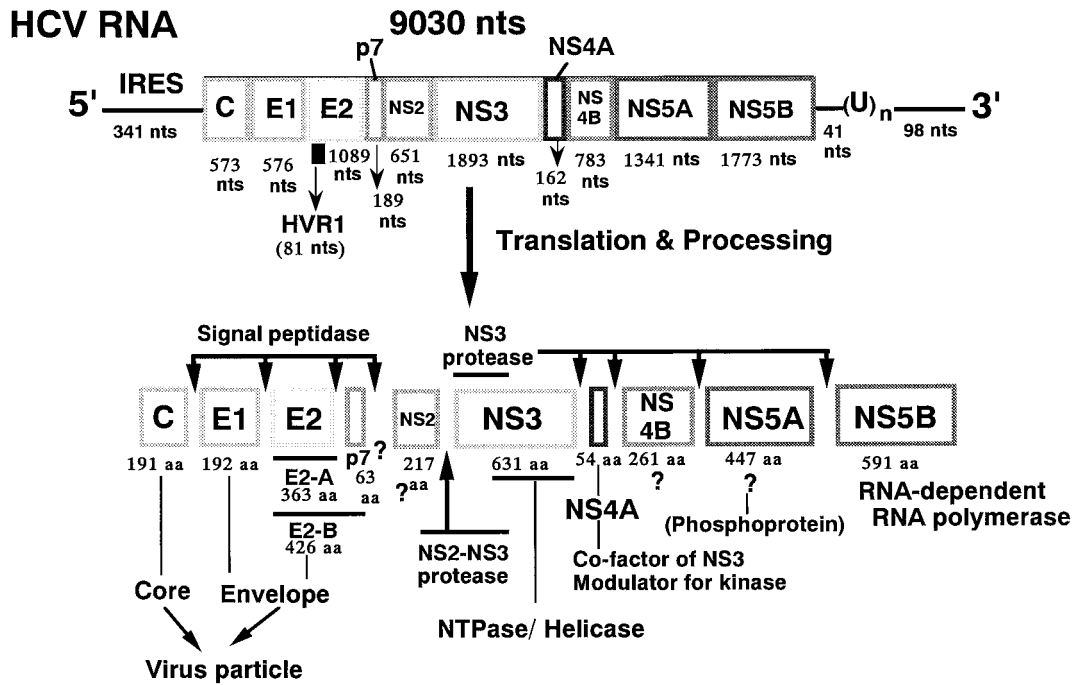


図2 HCV ゲノム (HCV-J 株) の構造とそこから産生される HCV 蛋白質

スにより正確にプロセッシングされ、10種類程度のウイルス蛋白質ができて上がることが判っています。前半部からはウイルス粒子の形成に必要なコアや2種類のエンベロープ蛋白質 (E1とE2) が産生され、後半部からはHCVゲノムの複製に必要な幾つかのNS蛋白質が産生されるようになっています。前駆体蛋白質からのプロセッシングの細かいところは図2をみていただければと思います。ただ、p7, NS2, NS4BおよびNS5Aについての機能はまだよく判っておりません。P7がウイルス粒子に含まれてい

るかどうかについても判っていません。しかし、このようなウイルス蛋白質の機能解析の過程において、これらのHCV蛋白質はウイルスの複製過程において機能するばかりでなく、細胞のさまざまな機能に影響を与えていることが判ってきております。図3は、HCV蛋白質の機能としてこれまでに報告された主なものを示しています。上段にはウイルスの複製に必要な機能を示し、下段には細胞に対する機能を示しています。細かく一つ一つみている時間はありませんので、大まかに言いますと、HCV蛋白質は細

C	E1 E2 (E2-A/E2B)	p7	NS 2	NS3	NS4A	NS 4B	NS5A	NS5B
Core nucleocapsid	Envelope Bind of cellular receptor(CD81 or LDLR?)	?	Metallproteinase ?	Proteinase NTPase Helicase	Co-factor of NS3 protease Modulator for kinase	?	? (phospho-protein)	RNA dependent RNA polymerase
Regulation of cell growth Transcriptional regulator (multifunction)	Activation of GRP 78, 94 genes Block PKR Bind lactoferrin			Block PKA function Oncogenic potential ?		Oncogenic potential ?	Block PKR function Transcriptional activator Repress p21 ^{WAF1} Bind p53 & SRCAP Oncogenic potential ? Bind karyoprotein-beta Bind Grb2 & hYAP-33	Bind hVAP-33 Bind ribosome
Crystal structure								
	x	x	x	○	x	x	x	○

図3 HCV 蛋白質の機能

胞の増殖に変化を与えたり、遺伝子の転写調節を行ったり或いは癌化を促進する効果があるということです。この中でも最も注目されているのは、コア蛋白質であります。コア蛋白質は21kDaよりなる塩基性蛋白質であり、オリゴマーを形成してヌクレオキャプシドとして機能すること、5'非翻訳領域やE1エンベロープ蛋白質に結合することが示されていますが、細胞に対しても多彩な影響を与えることが報告されています。コア蛋白質には宿主の遺伝子プロモーター (p53, p21^{waf1/cip1}, 2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素など) を活性化したり抑制したりすることや、宿主の蛋白質 (TNFR1, p53, RNA helicase, 14-3-3 など) と結合してそれらの蛋白質の働きに影響を与えたり、H-ras とともに発現させると細胞をトランスフォームさせる能力があるというようなことが判っています。また、ある種の strain を用いたトランスジェニックマウスでは肝がんを発症させる能力があることが判っています。さらに、幾つかのシグナル伝達経路 (NF-κB, AP-1, SRE など) にも影響を与えて、細胞増殖やアポトーシスの調節にも関与していることが示されています。しかし、報告されているようなさまざまな細胞機能に対する影響が宿主内で本当に起こっているのかどうかという点になると、はっきりしないというのも事実です。例えば、各種遺伝子プロモーターに対するコア蛋白質の転写調節能に関する報告を集めてみると、ヒト以外の細胞や肝臓以外の細胞を用いた実験、或いはすでに癌化してしまっている肝細胞だけを用いた実験から結論を導き出しているのが大部分です。さらに、一過性に細胞内で過剰発現させたり、特殊な環境下で樹立された細胞クローンを用いた実験から結論を導きだしており、現実とはほど遠い結論になってしまっている危険性も抱えています。現在、HCV をヒトの正常肝細胞或いはヒトの肝組織内で十分に増殖させる手段が開発されていないことから、このような変則的な実験系に頼らざるを得ないという事情もあります。

ここで、話題を少し変え、HCV による肝発癌機構につ

いて少し考えてみたいと思います。図4は肝発癌機構に関する現在の考え方を示したものです。発癌にはウイルスに感染してから、約25年の年月を要するわけですが、一つの考え方として、肝炎という炎症による肝細胞の破壊と再生が繰り返されるために、複製エラーによる遺伝子の変異が促進され蓄積することにより肝発癌に至るといったことがあります。この考え方ではHCVは単に間接的に発癌に関わっているというものでありますが、自己免疫性肝炎にみられるように、単に肝炎だけではほとんど癌化しませんので、HCVそれ自体が、直接的に関与しているのではないかと考えられています。また、HCVのコア蛋白質を発現するある系統のトランスジェニックマウスにおいて肝癌が発生するという事実もこの考え方を支持しているものと思われる。個々に細かくは述べませんが、図4に示したようなHCV蛋白質の様々な機能が発癌に有利に作用しているのではないかと推測されています。そして、この中でのもう一つの重要なファクターとしては、HCVが感染から発癌までの間、常に持続感染の状態になっているということが挙げられます。

そこで、次に持続感染の成立機序に関する現在までの考え方を整理してみます。まず、第一に挙げられるのは、ウイルスの変異による免疫監視機構からの逃避であり、超可変領域などを介した体液性免疫応答や細胞性免疫応答からの逃避現象が指摘されています。しかし、これだけでは説明できないところが多分にあり、それをカバーするものとして、最近、ウイルス蛋白質を介した免疫からの逃避や免疫監視機構への侵入という考え方がとられるようになってきています。例えば、コア蛋白質の発現により免疫応答が抑制されるとか、ウイルス増殖に対する自己抑制が起こる、或いはHCV蛋白質自体の発現を抑制し、免疫の標的にならないようにしているというのではないかと仮説が出されています。さらに、もう一つの重要なファクターとして、HCVは肝臓ばかりでなくリンパ系の細胞 (B細胞、樹状細胞など) にも感染し増殖することが挙げられま

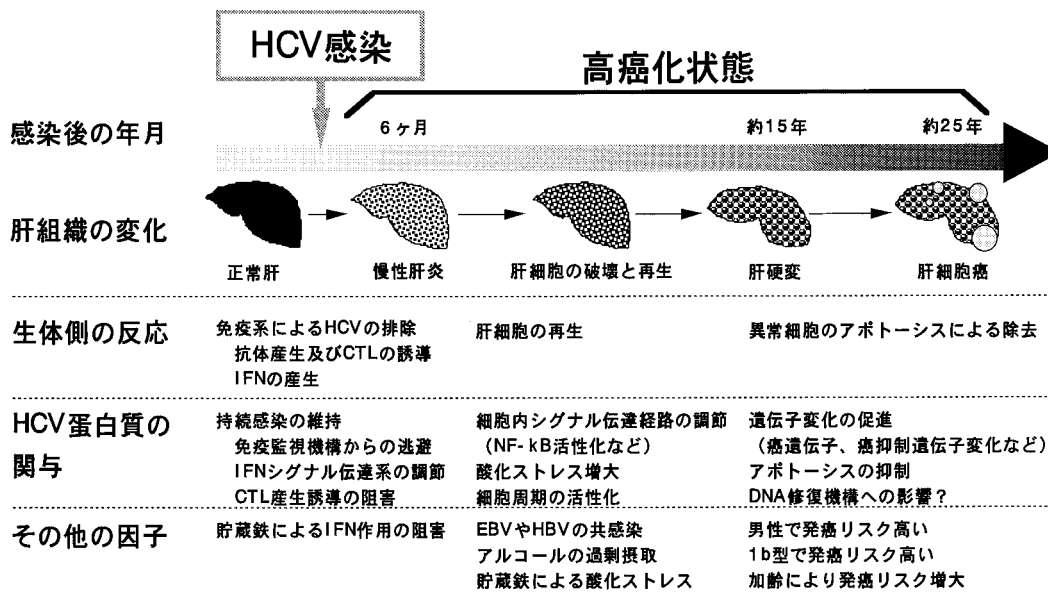


図4 推定されるHCVによる肝発癌機構

す。そして、肝炎ばかりでなく、B-cell non-Hodgkin's lymphoma や Cryoglobulinemia などのリンパ系疾患の発症への関与も指摘されております。

これまでに、HCV 蛋白質の機能とか肝発癌への関与及び持続感染機構についての研究の現状について示してきましたが、HCV の持続感染機構や HCV による癌化機構の解明或いは抗 HCV 剤の開発のためには HCV のライフサイクル、つまりは生活環を正確に理解する必要があります。けれども、HCV の生活環というものが実はまだあまりよく判っていないという問題があります。HCV の生活環はフラビウイルスの生活環と類似しているものと予想されてはいますが、本当にそうなのかについては HCV を実験室レベルで増殖させることができないため証明されていません。従って、どのような因子が HCV の増殖を制御しているのかについてもほとんど判っていません。しかし、だからといって、だまって手をこまねいていたわけではなく、かなり以前から HCV の人工増殖系の開発も試みられています。92年ごろから、HCV に感受性を示す培養細胞株を見つけたという報告がなされるようになり、私達も95年から96年にかけて不死化 T 細胞株である MT-2 細胞や不死化肝細胞株である PH 5 CH 細胞が HCV に感受性を示し、ある程度の増殖を示すことを報告しました。しかし、細胞内の HCV ゲノムの量は μ g RNA 当たり 10^3 コピー程度と低く、RT-nested PCR を用いないと検出できないというレベルであり、HCV の生活環を解析するには実用的ではありません。現在まで、15種類ほどの培養細胞株が HCV に感受性を示すものとして報告されてはいますが、どの細胞株においても HCV の増殖レベルは非常に低く、実用的な実験に使える細胞株は未だ見つかっていないのが

現状です。

このような困難な問題をクリアしようとする試みの一つとして、HCV の感染性 cDNA クローンを得ようとする努力がなされました。チンパンジーの肝臓に直接 HCV cDNA クローンを注入すると HCV が産生されチンパンジーの肝臓で増殖するという報告が97年頃より相次ぎ非常に期待されましたが、この cDNA を培養細胞に導入してやっても、うまく増殖させることができないという結果に終わっています。次に、動物モデルの方はどういう状況にあるのかについてお示しします。これまでに報告されているほとんどの論文はチンパンジーを使ったものであります。チンパンジーは高価であることやワシントン条約などの様々な制約により私達が簡単に実験系として用いることができないものでもあります。ただ、最近では原猿類のツバイという小動物が HCV にかなり感受性があるという報告がなされたことや、ヒトの肝臓を移植した SCID マウスで HCV の増殖を行わせる方法が開発されたことから、近い将来、ある程度使いこなせるようになるのではないかと期待もありますが、技術的な面も含めて現時点ですぐに実験系として導入できるという状況にはなっていません。このような事情の下で、'99年にドイツのグループにより開発された HCV 産生を伴わない HCV ゲノムの培養細胞での増殖系が非常に注目を集めております。この HCV ゲノムの複製増殖系は、HCV サブゲノムレプリコンと呼ばれています。このサブゲノムレプリコンというのは、図5に示すように、HCV ゲノムの複製に必要な NS 3 から NS 5 B までと 5' および 3' 非翻訳領域を含み、自ら複製できるような構造になっています。NeoR 遺伝子は HCV の IRES に依存して翻訳され、NS 3 から NS 5 B までは

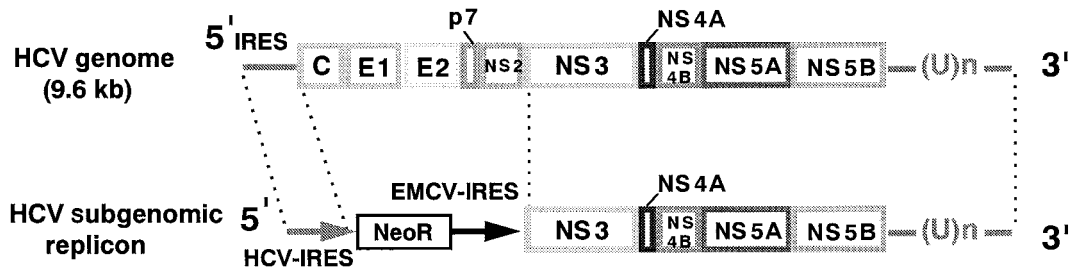


図5 HCV サブゲノムレプリコンの構造

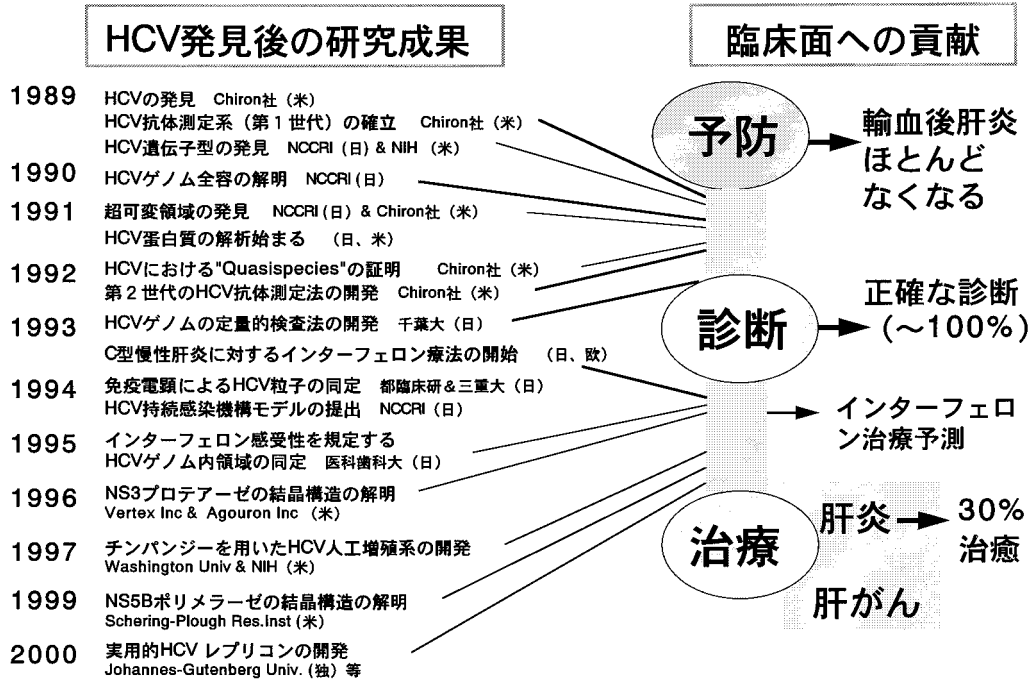


図6 HCV 発見後の主な研究成果と臨床面への貢献

EMCV 由来の IRES に依存して翻訳されるような構造になっています。また、NeoR 遺伝子を含むことから、G418 で HCV ゲノムの自己複製細胞だけを選択できる系になっています。このようなシステムを用いて、99年、ドイツの Bartenschlager らのグループが HCV サブゲノムをノーザンブロットで検出できる程度に複製増殖させることに初めて成功したわけです。その後、米国のグループによるレプリコンも報告されております。京都大学ウイルス研の下達野らも私達との共同研究によりこのようなサブゲノムレプリコンの作成に成功しております。将来的には HCV ゲノムの完全長レプリコンが作成され、感染性ウイルスの産生を伴うような細胞株が得られるのではないかと期待もあります。ただ、奇妙なことに、どのグループも Huh-7 という肝癌細胞でしかうまくいかないという問題もあり、研究がどんどん進展していくかどうかについては、まだ、予断を許さないという側面もあります。このようなレプリコン細胞を用いて、抗 HCV 剤の探索や評価が製薬会社や

ベンチャー企業を中心に水面下でなされており、幾つか有望なものも公表されるようになってきております。最近では、リバビリンの誘導体である VX497 (IC₅₀ 0.5 μM) や NS 3 プロテアーゼ阻害剤である compound A (IC₅₀ 1.4 μM) が HCV ゲノムの複製を阻害することが示されていますが、Phase II の clinical trial では VX497 は効果がなかったという結果になっていることから、HCV レプリコンを用いたアッセイ系で得られた結果と臨床レベルでの治療効果の間にはまだ、相当の解離がみられるのではないかと気がかりな点もあります。

以上、問題点も含めて HCV 研究の過去と現状について述べてきましたが、ここでもう一度、歴史的なところに戻ってみたいと思います。図6には、HCV 発見後の主な研究成果とそれがどのように臨床面に貢献したかを示してあります。個々に説明している時間はありませんが、一口にいうと、これまでの主に基礎的な研究の成果により予防診断というところはほぼ完全にクリアーできたことから、

極めて大きな社会的貢献がなされたと言えます。しかし、現在までの研究成果が治療の向上や新しい治療法に結びついたかという点、必ずしもそうとは言えないのが現状で

HCVの基礎研究（主な未解決問題）

- HCVゲノム —— 現在の情報は正しいか？ <解析エラーの問題>
(5'末端？、感染性？)
- HCV蛋白質 —— 複製の場での役割？
- HCV感染 —— ウイルス受容体？ (LDLR？、CD81？)
- 持続感染 —— どれが重要な機序？
- 肝発がん —— 感染細胞は死ぬか？ 傷害を与えるか？
HCV蛋白質の関与？ 遺伝子型の関与？
- 抗HCV剤 —— HCV特異的な薬剤ができるか？
中和抗体？ 実用的ワクチンはあるか？

HCVが増殖するヒト培養細胞系の開発 (Reverse genetics)
 実験小動物による疾患発症モデル系の開発 (HCVの増殖)

図7 HCVの基礎研究における主な未解決問題

す。この点をクリアーするためには、HCVの生活環、つまり宿主細胞とHCVとの相互作用を正確に理解することが今後、非常に重要になってくると思われ、この方面の研究が活発化してくるのではないかと予想されます。

最後に今後の研究の展望として、図7にHCVの基礎研究における主な未解決問題を列挙してみました。これらの問題にアプローチするためには、図7の下に示した2つの実験系の確立が必須ではないかと思えます。一つはHCVが増殖するヒト培養細胞系の開発でReverse geneticsができることが条件です。もう一つは小動物による疾患発症モデル系の開発であり、これもHCVの増殖を伴うというのが条件です。これらの実験系の開発については、現在、外国勢にかなり先行を許している状況にありますが、我が国においても独自のアイデアに基づいた実験系の開発に力を注ぐべきであり、そうでないと、図7にあるような未解決問題の解決にはつながらないということを言いたいところで、このOverviewを閉めさせていただきたいと思います。