

## 教室紹介

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
腫瘍ウイルス学分野

加藤宣之

〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2-5-1

Tel:086-235-7385

Fax:086-235-7392

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

Home page: <http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/dmb/index.html>

### はじめに

私が岡山大学医学部にC型肝炎ウイルス（HCV）研究のため教室を開講してから早いもので、10年半も経ってしまいました。今回執筆のお話を頂いた際には、今更教室紹介でもないだろうという思いもありました。ただ、元気であれば、あと10年は教室を主催することになると思っていますので、この機会にHCV研究の中間地点における現状報告をさせていただくことに致しました。

私は1999年8月に、20年を過ごした国立がんセンター研究所（東京築地）から岡山大学医学部附属分子細胞医学研究施設病態分子生物学部門の第3代教授として赴任しました。その後、大学院化や法人化による組織改編などを経て、現在の教室名になっております。

現在の教室が入っている建物は大変古く、築80年程になります。当時ドイツのミュンヘンにあった生化学研究所の設計図どおりに作った建物（今風に言えばパクリ）のため、岡山を訪れたドイツの科学者が、なぜドイツの建物がここにあるのかと大変驚かれたそうです。当事の日本は、今の中国と同じような感覚でレプリカを作っていたようです。幸い、震災による焼失にも免れ現在に至っております。建物の外壁に張り巡らされている茶色のタイルは、旧首相官邸のものと同じだそうです。とても古い建物なので最初は幽霊でも出るのではと思いましたが、今ではこの建物でないとアイデアが湧かないというような住人に化しております。

### 教室のこれまでのあゆみと現状

国立がんセンターでのHCV研究（下遠野邦忠部長（現千葉工業大学教授）のもと）を大学において結実させることを夢みての赴任でした。しかしながら、実験台は傾き、唯一の培養室も蜘蛛の巣が張っているという現実は厳しく、廃墟のような部屋を実験室に変貌させなければなりません。大学からの予算処置も当然ゼロでしたので、校費



3年分の借金生活からのスタートでした。国立がんセンターから同時に移籍してくれたりサーチレジデント2名に最初に頼んだ仕事は、壁のペンキ塗りでした。彼らはこの先どうなるんだろうと思ったそうです。それでも半年後には、何とか細胞培養を始められるようになりました。その後、一人一人とHCV研究への参加者が増え、スタッフが全員揃ったのは、赴任5年目でした。さらに、2003年に設置された修士課程へ入学して博士までを目指す学生も現れ、博士として社会に巣だてて行くようになりました。

昨年は教室開講満10年ということで、内輪ではありますが、11月に卒業生も交えた10周年記念会を行いました。写真はその時に撮ったものです。時期が違っても教室活動を盛り上げてくれた方々が集まってきて、この10年は無駄ではなかったと改めて思った次第です。

現在の教室は、教授1、准教授1、助教2（うち1名は留学中）、大学院生5（うち2名はDC1）、客員研究員2、事務補佐員1、技術補佐員4の計16名の体制で昼夜、休日を問わずHCV研究に情熱を捧げております。現在在籍している教室員もそうですが、出身学部は医・薬・理・工・農と多彩であり、違った学部教育を受けて来た者達の融合が創造性の高い研究の推進に役立っているように思われます。

### 研究内容

当該分野ではHCVに関する基礎研究を行っており、HCV感染により生じる肝疾患（肝炎や肝がん）に対する新たな治療法の開発を目指しています。

C型肝炎はHCV感染により引き起こされる肝疾患であり、その感染者は国内で200万人以上、全世界では1億7,000万人以上と推定されています。

HCVは主に血液を介する非経口感染により肝炎を引き起こし、その70-80%ではHCVの持続感染が成立してしまうため慢性肝炎の状態に陥ります。従って、治療によりHCVが体内から排除されない限り、10年以上の年月を経て肝硬変そして肝がんへと病態が悪化していきます。

肝がんの発症には HCV 感染後、25-30 年を要することが分っております。国内では毎年 3 万人以上の方が肝がんの犠牲となっており、このうちの 8 割以上に HCV の感染が認められます。また、肝硬変の段階においても、毎年 2 万人程度の方が犠牲になっています。このような点からも、HCV の持続感染が、がん化に深くかかわっていることが容易に想像されます。しかしながら、様々な仮説がこれまでに出版されているにも係わらず、現時点においても HCV がどのようなメカニズムにより肝がんを引き起こすのかについての明確な答えは得られておりません。

肝硬変や肝がんの発症を予防するためには、慢性肝炎の段階で HCV を体内から排除することが重要であると考えられています。現在、慢性肝炎に対する標準的な治療法として用いられているペグインターフェロンとリバビリンとの併用療法によっても、その治癒率は 50% を少し上回る程度であり、貧血などの副作用も高齢者、特に女性に多いことから、HCV 特異的抗ウイルス剤の開発が囑望されている。最近になって、標準的な併用療法に HCV セリンプロテアーゼ阻害剤を追加した臨床試験の結果が報告され、治癒率も今後 10-20% 上積されそうである。しかしながら、貧血の程度がさらに悪化するというマイナス面も明らかになっていることから、更なる新規抗 HCV 剤の開発が必要になっています。

このような社会的要請に応えるためには、一見遠回りのようにも、HCV がどのようにして複製増殖するのか、そして宿主細胞にどのような影響を与えるのかといった HCV の生活環や病原性を把握理解することが重要と考えています。そのような点の解明を目指した研究を推進するための実験系として、HCV 研究を進める国内外の多くの研究室では、HCV レプリコンが自律的に複製増殖できる HuH-7 (ヒト肝がん由来の細胞株) 由来の細胞 (1999 年に遺伝子型 1b に属する Con1 株でまず開発され、その後幾つかの HCV 株由来のものが作成されている) や感染性 HCV 粒子 (遺伝子型 2a に属する JFH1 株) を産生する HuH-7 由来の細胞 (2005 年に開発) が使用されております。

当該分野では、HCV を体内から排除する方法や発がん抑制法の開発を目指して、現在、以下の 5 項目を柱とした基礎的研究に取り組んでおります。

### 1. C 型肝炎ウイルスの複製増殖機構の解析

2003 年、HCV ゲノム (約 9,600 ヌクレオチドからなるプラス鎖の一本鎖 RNA) の複製に必要な領域と HCV ゲノムの両末端などからなる HCV レプリコン (約 8,000 ヌクレオチド) が自律的に複製増殖する細胞株を独自に樹立しました。また、2005 年には、RNA 複製の効率を亢進させる適応変異を組み込んだ全長 HCV RNA (約 11,000 ヌクレオチド) が自律的に複製増殖する細胞株も樹立しました。これらの細胞株を用いて、HCV ゲノムの複製増殖に必要な

宿主因子の探索を行っています。これまでに、RNA ヘリケースの一種である DDX3 や DNA 損傷センサーである ATM や Chk2 を新たに見出しております。

HCV の複製が効率よく再現される細胞はこれまでヒト肝がん細胞株 HuH-7 に限られておりましたが、最近 HCV の複製を許容する新規ヒト肝がん細胞株 Li23 を見出し、HCV の生活環を再現させることに成功しています (国際特許出願中)。このような新しい細胞システムを基盤として、1b 遺伝子型の感染性 HCV 粒子を産生させることを目指しています。

培養細胞における HCV の持続的 RNA 複製によって生じる遺伝的変異性や多様性についても解析しています。培養期間に依存して変異が蓄積していくことやその変異速度が約  $3 \times 10^{-3}$  塩基置換/ヌクレオチド/年であることをこれまでに明らかにしています。現在、5 年間培養後の結果を解析中で、C 型肝炎患者から得られる HCV の遺伝的多様性について免疫回避機構以外の獲得機序からも説明できる可能性があります。

### 2. C 型肝炎ウイルスによる肝発がんの分子機構の解析

HCV に感受性を示すヒト不死化肝 PH5CH8 細胞 (非がん細胞) や全長 HCV RNA 複製細胞を用いて、HCV の感染や増殖が細胞機能にどのような影響を与えるのかについて分子生物学手法 (ウイルスベクターによる遺伝子導入、マイクロアレイ、定量的 RT-PCR、レポーターアッセイなど) により解析しています。特に、HCV 蛋白質によるインターフェロンなどのシグナル伝達異常、細胞周期異常、DNA 修復異常などに焦点をあてて研究を進めています。

### 3. 肝炎の治療法及び肝発がん抑制法の開発

2005 年に、全長 HCV RNA (1b 遺伝子型) の複製レベルを短時間にかつ簡便に定量評価できる HuH-7 由来の細胞アッセイシステム (OR6) の開発に成功しました (2007 年、国内特許取得)。OR6 の使用により、これまでにリウマチの治療薬として使われている「ミゾリビン」と高脂血症の治療薬である「スタチン剤」に抗 HCV 活性があることを見出しています。スタチン剤の中でも、特にフルバスタチンについては、現在の併用療法に追加する形での臨床試験が全国的に行われており、先行試験においてよい成績が出始めております。また、食品成分のうち、リノール酸、 $\beta$  カロテンおよびビタミン D2 に抗 HCV 活性があることを見出し、それらは酸化ストレスを誘導することにより抗 HCV 活性を示すことを明らかにしています。さらに最近、オンコスタチン M に強力な抗 HCV 活性があることを見出し報告しました。

昨年 Li23 由来の全長 HCV RNA 複製細胞株を樹立したことから、これらの細胞株をベースにして OR6 に相当する Li23 系の新たな細胞アッセイシステム (ORL8 と ORL11) を

開発しました(国際特許出願中)。抗 HCV 剤の種類によっては、HuH-7 と Li23 系の細胞アッセイシステムにより得られる結果にかなりの違いが見られることから、HCV RNA の複製阻害を引き起こす薬剤の探索・評価には両アッセイシステムを併用して総合的に判断する必要があることが分かりました。さらに、HCV 株についても複数揃えることが必要と考え、現在、新規 HCV 株について両細胞系でのアッセイシステムの構築を行っております。これらが完成すると、2 種類以上の HCV 株を使った 2 種類の細胞株由来のアッセイ系(計 4 種類以上となる)となりますので、今後の抗 HCV 剤の探索や客観的評価に大いに役立つものと期待されます。

#### 4. インターフェロンなどの抗ウイルス作用機序の解析

現在行われているペグインターフェロンとリバビリンによる併用療法に対して患者の半数程度が抵抗性を示すことから、その原因を求めてウイルス側や宿主側因子の解析が集中的に行われています。最近では、HCV コアの 70 番目のアミノ酸の違いや IL28B (インターフェロン  $\lambda 3$  とも呼ばれている) 遺伝子近傍の一塩基多型によりある程度治療予測が可能になりそうだという報告がなされています。しかしながら、依然としてなぜ患者により治療効果に差が出るのかは明らかにされていません。その原因を明らかにすることを目的として、当該分野では HCV レプリコンや全長 HCV RNA が自律的に複製増殖する細胞株を用いて、インターフェロン抵抗性になる分子機構(宿主側要因とウイルス側要因)やリバビリンの作用機序の解析を行っています。これまでに、インターフェロンを長期的に投与すると、インターフェロン受容体の変異体が出現したり、インターフェロンで誘導される遺伝子群(一部)の発現調節領域がメチル化されインターフェロンによる発現誘導が起こりにくくなることを明らかにしております。

#### 5. HCV の自然免疫攪乱機構の解析

ウイルス感染に対する非特異的防御機構(自然免疫)の中核となっているインターフェロン産生システムを HCV がどのようにして攪乱しながら無能化していくのかを解析しています。当該分野ではインターフェロン産生システムが機能しているヒト不死化肝 PH5CH8 細胞を用いて解析を進めております。これまでに、HCV コアと NS5B (RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ) がインターフェロン産生システムを活性化することを見出しており、その分子機構の解析を行っています。その一方で、既に報告されているように、HCV セリンプロテアーゼ (NS3/4A) がインターフェロン産生に重要な役割を担っている IPS-1 分子を切断することでこのシステムに対して抑制的に働くことも確認しています。このような相反的効果が HCV の持続感染とどのような関係にあるのかを明らかにしようとしています。

#### おわりに

医学部における基礎研究は、他の学部とは異なり純然たる基礎科学に邁進するよりも社会が求めている医学の進歩を成し遂げるための礎となるべきものと考えております。現在進めている HCV 研究という単一のテーマで教室を開講している時間は現実的にも限りがある(最長であと 10 年)わけで、今回の教室紹介が「単なる興味に基づいた研究による自己満足よりも、自分たちの研究成果を医学の進歩に役立てたい」という私達の強いモチベーションのもとで研究を進めている姿のいくらかでも伝われば幸いです。教室を開講した当時の C 型肝炎の治癒率は 20% 程度、現在は 50% を超えるほどになっており、NS3 や NS5B 特異的阻害剤の登場によりさらなる治癒率の向上が期待されております。私達は C 型肝炎の治癒率を 100% に限りなく近づけるための HCV 攻略法の開発を最終目標にしております。我こそはという方が現れるのを期待しております。