

第 41 回日本小児感染症学会教育講演

C 型肝炎ウイルスの病原性発現機構*

定 清 直**

要旨 C型肝炎ウイルス(HCV)は肝臓に慢性の炎症を引き起こし、高率に肝細胞癌や2型糖尿病を引き起こすが、詳細な分子機序は不明の点が多い。HCVゲノム由来の蛋白質は、本来の機能に加え宿主の内因性蛋白質と相互作用し、病理作用を発現する。現在われわれは新たに開発されたHCVレプリコンシステムや感染実験系を用いて解析を進めており、本稿では最新の知見について紹介する。

I. HCV研究のマイルストーン

HCVは従来の培養細胞や実験動物から直接ウイルスを分離する方法ではなく、分子生物学的な手法によりその遺伝子断片がクローニングされた。1989年、Chooらは輸血後非A非B型肝炎患者の血漿を接種されたチンパンジーの血漿中から、ウイルス遺伝子の一部を見出し、それにコードされる配列(C100-3抗原)を用いて血清中の抗体検査を行った。その結果、新たに発見された遺伝子断片が輸血後非A非B型肝炎の主要な病原ウイルスであることが明らかとなり、C型肝炎ウイルス(hepatitis C virus: HCV)と命名された¹⁾。その後、全長の遺伝子配列が解明され、ウイルス蛋白質のゲノム構造やスプライシング機構が明らかになった。HCVは通常ヒトのみを宿主とし、培養細胞での感染増殖系が確立できなかった。そのため研究の進展に支障をきたしていたが、1999年にHCVレプリコンシステムが報告され、HCVの細胞内複製機構の解析が可能となった²⁾。さらに2005年には劇症肝炎患者の急性期血清より分離されたHCV株を用いて、ついにHCV感染

増殖実験系が確立された^{3,4)}。

II. HCVの性状

HCVはフラビウイルス科 *Flaviviridae* ヘブシウイルス属 *Hepacivirus* に分類され、遺伝子は全長約9,600塩基よりなるプラス鎖1本鎖RNAで、IRES(internal ribosome entry site)を含む5'非翻訳領域、3'非翻訳領域の間に一つのopen reading frame(ORF)をもつ(図1)。ORFからIRESの働きにより翻訳された大きな前駆体蛋白質は、宿主とウイルスの蛋白質分解酵素により切断され、3種類のウイルス構造蛋白質(コア蛋白質、E1およびE2エンベロープ蛋白質)と7種類の非構造蛋白質を生じる(P7を構造蛋白質に分類する成書もある)。ウイルス粒子は直径55~65nmの球状粒子で、内部にコア粒子が存在する。コア蛋白質は強い免疫原性を有し、感染者のほとんどが抗コア蛋白質抗体を産生するので、C型肝炎ウイルスによる肝炎の診断に用いられている。その他のHCV蛋白質の性質は図1に示す。

HCVの遺伝子型は60種類以上あり、地理的分布や肝病原性、インターフェロン感受性が異なる。

* Pathogenic mechanism of hepatitis C virus

Key words : C型肝炎ウイルス, 肝細胞, NS5A, Syk, GLUT2

** 福井大学医学部医学科病態医学講座微生物学領域 Kiyonao Sada
〔〒910-1193 福井県吉田郡永平寺町松岡下合月23-3〕

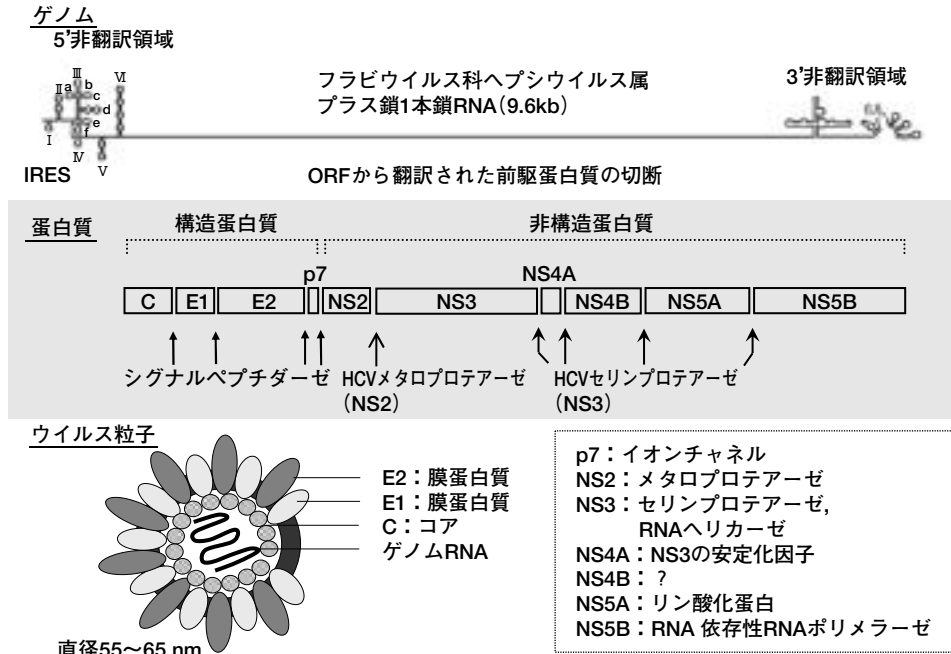


図 1 HCV の構造

1a 型は血友病患者に多いが（血液凝固因子製剤の汚染による）それ以外はまれであり，米国やヨーロッパに多い。1b 型はわが国において 70~85% の頻度で見られ，インターフェロンの治療効果は無効であることが多く，肝病原性も強い傾向にある。2a 型はわが国において 10~15% の頻度で，インターフェロンの治療効果は概ね有効である。わが国に関連が深いものとしては，他に 2b, 3a, 3b 型がある。インターフェロンの治療成績に影響を与える因子としては遺伝子型に加え，血中ウイルス量，感染後の罹病期間，さらにウイルスの NS5A の特定領域（インターフェロン感受性決定領域：ISDR）のアミノ酸配列の差異も重要であると考えられている。

HCV のライフサイクルについては次のように考えられている⁵⁾。感染した HCV はリポ蛋白質と結合して血液中を移動する。肝細胞に感染する際にはエンベロープ蛋白質の E2 が CD81 と SR-B1 に結合し，claudin-1 と occludin を介して細胞内に侵入する。侵入したウイルスは細胞質に放出されて脱核される。HCV の RNA ゲノムは IRES を介して翻訳され，HCV 蛋白質のプロセッシング

が行われる。同時に HCV の非構造蛋白質 NS5B にコードされた RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの働きにより HCV のゲノム RNA が複製される。感染した細胞には membranous web という現象が観察される。HCV の複製には脂肪滴 (lipid droplet) との密接な関係が明らかとなっている⁶⁾。複製した RNA と HCV 蛋白質により子ウイルスがパッケージングされ，成熟したウイルス粒子は細胞外へ放出される。

III. HCV の病原性発現機構

ウイルスの標的細胞は肝細胞と B リンパ球である。肝細胞障害の機序として，ウイルスによる CPE の関与は不明であるが，リンパ球を介する肝細胞障害機構やアポトーシスの関与が考えられる。感染後 1~3 カ月の潜伏期を経て急性肝炎を発症するが，免疫力の正常な成人が罹患した場合でも慢性肝炎になりやすく，慢性化率は 50~80% に達する。慢性化の要因としては次の点が考えられている（図 2）。第 1 に HCV が RNA ウィルスであり，変異しやすいことがあげられる。特にエンベロープ蛋白質のアミノ末端は非常に変異しや

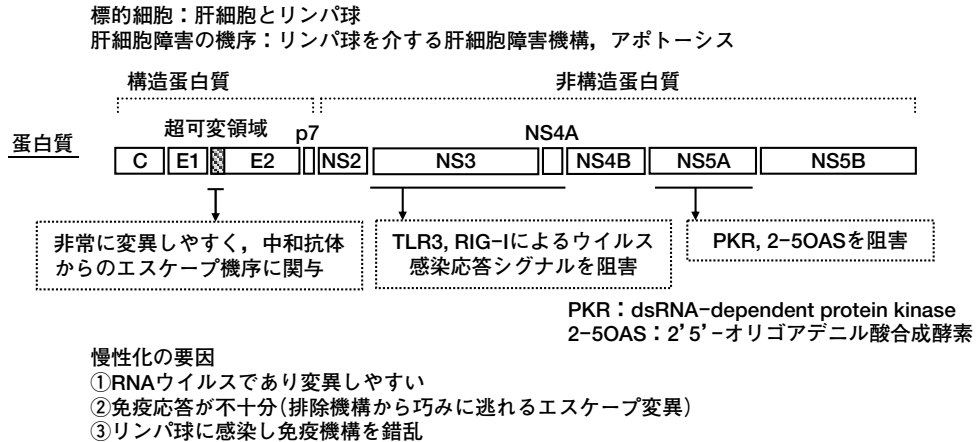


図 2 HCV による慢性肝炎発症機序

すく，超可変領域 (hypervariable region : HVR) と呼ばれ，中和抗体からのエスケープ機序に関与していると考えられている。第 2 に HCV が正常のウイルス排除機構から巧みに逃れるエスケープ変異を有することが考えられる。HCV 蛋白質はさまざまな宿主因子と相互作用することが報告され，複製に関与する宿主因子と病原性に関与するものとに大別される。非構造蛋白質の NS3 と NS4A の複合体は TLR3 や RIG-I によるウイルス感染応答シグナルを阻害することが近年明らかになっている⁷⁾。また非構造蛋白質の NS5A はインターフェロン応答にかかわる PKR (2 本鎖 RNA 依存性プロテインキナーゼ) や 2-5OAS (2'5'-オリゴアデニル酸合成酵素) を阻害する働きを有する。第 3 の要因としては HCV がリンパ球に感染することにより免疫機構を錯乱することが考えられているが，詳細なメカニズムは明らかとなっていない。

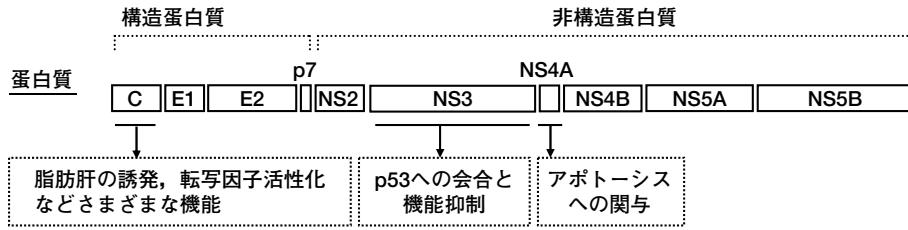
慢性の C 型肝炎は 10~20 年を経て肝硬変に進展し，やがて高率に原発性肝癌を発生する。わが国では毎年 2 万数千人が HCV による原発性肝癌で死亡しているが，これは原発性肝癌の約 80% にあたる。HCV 自体は逆転写酵素をもたないため，肝細胞染色体 DNA への組込みは認められない。HCV による肝細胞の癌化の要因としては次の点と考えられる (図 3)。前述のように，感染に伴って産生される HCV 蛋白質はさまざまな宿主因子と相互作用するために，肝細胞機能への影響が考

えられる。特にコア蛋白質は強い免疫原性を有するほか，脂肪肝の誘発や転写因子活性化などさまざまな機能を有することが報告されている。癌原蛋白質の活性化や癌抑制蛋白質の機能阻害も考えられ，NS3 は癌抑制蛋白質の p53 に会合して活性を抑制していることが報告されている。NS4A はアポトーシスへの関与が明らかになっている。NS5A は Src 型のチロシンキナーゼやその会合蛋白質と相互作用し，その活性を調節する。これらの要因に加えて，慢性 C 型肝炎となった後に，長期にわたり持続的な炎症と肝再生を繰り返すことにより，細胞内の遺伝子変異が蓄積することも大きな要因となると考えられる。

IV. 研究ツールの開発

HCV の発見以来，ウイルスの培養実験系が存在しないことが HCV の基礎研究の妨げになってきた。1999 年になって，ハイデルベルグ大学の Bartenschlager 博士らのグループにより画期的な HCV レプリコンシステムが報告された (図 4)²⁾。このシステムは HCV (Con 1 株) の構造蛋白質領域と非構造蛋白質領域の一部を取り除き，代わりにネオマイシン耐性遺伝子に置き換えたプラスミドを作製し，それを鋳型として試験管内で合成された RNA を培養細胞 (Huh-7 細胞など) にトランスフェクションし，ネオマイシンで選択培養を行う。生き残った細胞では HCV レプリコン RNA が複製し，同時に HCV 蛋白質も持続的に発現し

わが国では、約150万～200万人のHCV慢性感染者が存在し、毎年2万数千人がHCVによる原発性肝癌で死亡している(原発性肝癌の約80%)



癌化の要因(可能性)

- ①肝細胞染色体DNAへのHCV遺伝子の組込みは認められない
- ②感染に伴って産生されるHCV蛋白質が宿主細胞機能に影響を及ぼす可能性
- ③癌原遺伝子産物の活性化や癌抑制遺伝子産物の機能阻害
- ④持続的な炎症、継続的な肝再生による遺伝子変異の蓄積

図 3 HCV による肝癌発症機序

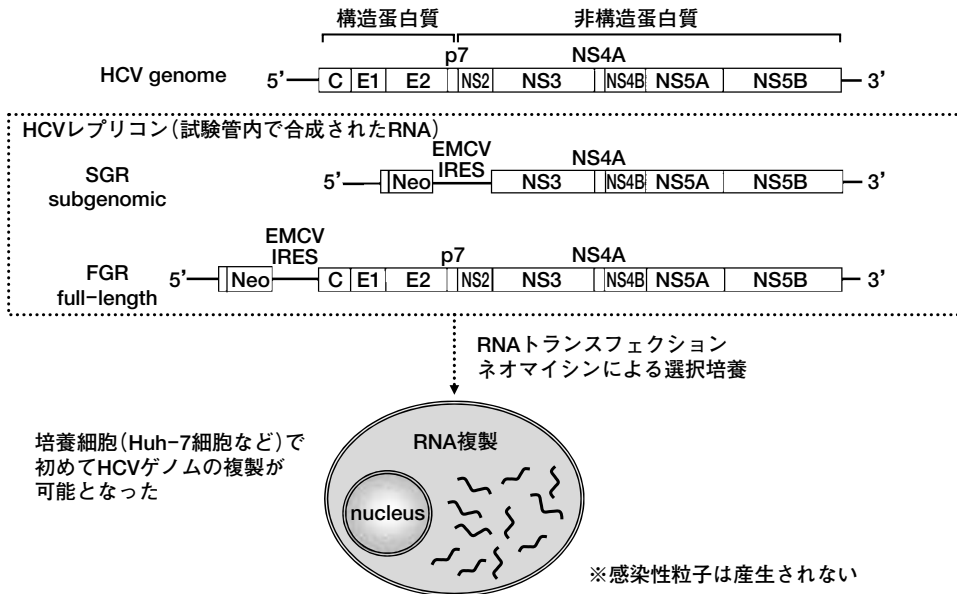


図 4 HCV レプリコンシステム

ている。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観察可能となった。このシステムは HCV のゲノムの一部であるということから subgenomic replicon (SGR) と呼ばれている。さらに、全長の HCV ゲノム (O 株) を用いて、構造蛋白質と非構造蛋白質を発現する full genomic replicon (FGR) も開発されている⁸⁾。レプリコン細胞では HCV RNA が効率よく複製されており、要因として複製効率を非常に向上させるような適応変異 (adaptive mutation) が考えら

れるが、これらは感染性の増強との因果関係はないと考えられている。なお、レプリコン細胞からは感染性粒子は産生されない。

これに対し、劇症肝炎患者から分離された HCV (JFH-1 株, 2a 型) は培養細胞より感染性ウイルス粒子を産生し、チンパンジーにも感染可能であった³⁾。さらにレプリコン研究から同定された HCV 複製の感受性の高い細胞 (Huh7.5 細胞) においては、細胞質内の 2 本鎖 RNA を検知してインターフェロン応答を誘導する RIG-I (retinoic

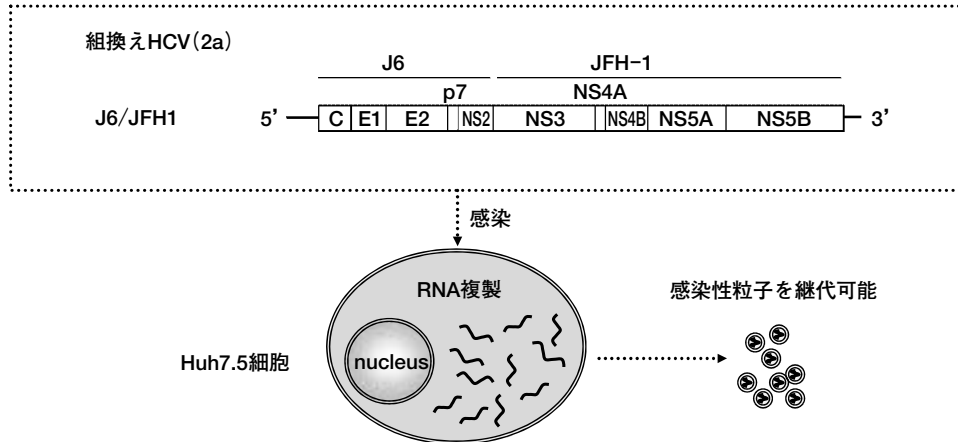
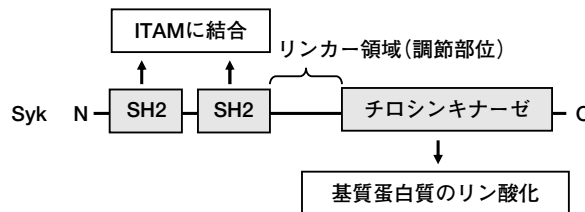


図 5 感染性組換え HCV

Syk : **Spleen Tyrosine Kinase**, 1991年福井医科大学で単離マスト細胞やマクロファージの機能, B細胞の分化に不可欠感染免疫応答に重要な分子



癌抑制蛋白質としての働き：乳癌やメラノーマなど

新規Syk阻害剤の開発：アレルギー性鼻炎，慢性関節リウマチ，ITP, 他に対する臨床応用の可能性が現在注目されている

図 6 非受容体型チロシンキナーゼ Syk

acid inducible gene-1) に変異があることが明らかとなった。この細胞に、2a 型の J6 株の構造領域と JFH-1 株の非構造領域との感染性キメラウイルス (J6/JFH1) を導入すると、非常に高い感染力価 ($10^4 \sim 10^5$) を示す培養上清が調整可能となった (図 5)⁴⁾。こうして効率のよいウイルス培養系が誕生し、HCV のライフサイクルの観察が容易になった。

V. C 型肝炎ウイルスの病原性発現機構

1. 発癌機構

肝組織の免疫組織染色の結果、HCV 感染によりシグナル伝達分子 Syk (spleen tyrosine kinase) の細胞内局在パターンがびまん性から斑状に変化する

ことが明らかとなった⁹⁾。Syk はその名の通り脾臓から単離された非受容体型チロシンキナーゼで、マスト細胞やマクロファージの機能、B 細胞の分化に不可欠であることから、感染免疫応答に重要な分子であると考えられている (図 6)¹⁰⁾。構造はアミノ末端から免疫系の受容体の細胞内共通モチーフ配列 (ITAM) に結合する SH2 ドメイン、基質蛋白質をリン酸化するチロシンキナーゼドメイン、さらに両者をつなぐリンカー領域 (調節部位) からなり、乳癌やメラノーマでは癌抑制蛋白質としての働きが報告されている¹¹⁾。最近では新規 Syk 阻害剤の開発がトピックスとなっており、アレルギー性鼻炎、慢性関節リウマチ、ITP、他に対する臨床応用の可能性が注目されている。

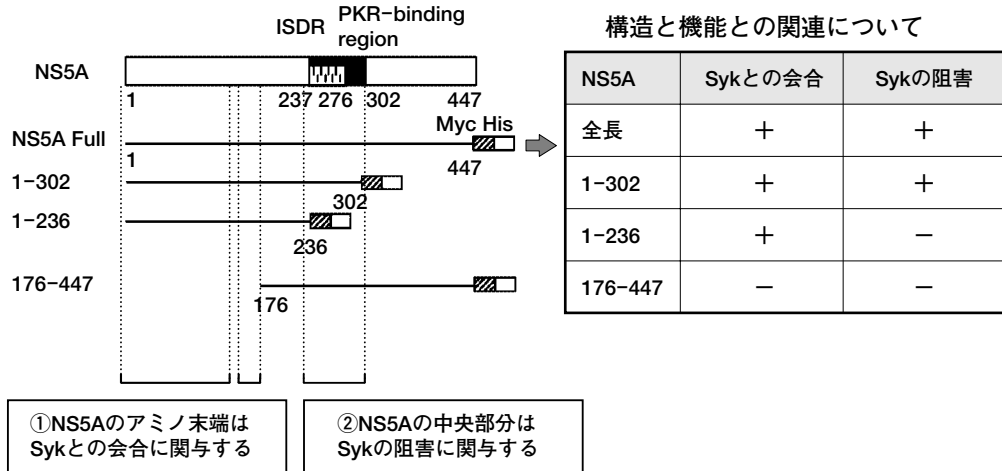


図 7 NS5A と Syk の相互作用

肝細胞において Syk は HCV 蛋白質の一つである NS5A と特異的に会合する。両者の会合様式を詳細に検討したところ、NS5A のアミノ末端部分が Syk との会合に関与することが明らかとなった (図 7)。さらに、NS5A との会合により Syk のチロシンキナーゼ活性が抑制されるが、その際 NS5A との会合に加え、NS5A の中央部分が Syk の阻害に関与することも明らかとなった。NS5A との会合は Syk による肝細胞内蛋白質のチロシンリン酸化も同様に抑制し、浸透圧ストレスを介するホスホリパーゼ C- γ 1 のチロシンリン酸化も抑制した。以上より、HCV 蛋白質の発現により肝細胞癌が発症するメカニズムの一つとして、Syk を介する癌抑制シグナル伝達機構の阻害が考えられた⁹⁾。

2. 合併症

HCV 感染症は脂質代謝異常症や 2 型糖尿病との関連が指摘されている。HCV 感染実験系を用いて解析を行ったところ、HCV 感染細胞では、細胞内へのグルコースの取り込みが有意に低下し、細胞をインターフェロン処理して HCV を消失させると、その現象がみられなくなった (図 8)¹²⁾。その原因について調べたところ、肝細胞に発現するグルコーストランスポーター (GLUT) のうち、GLUT2 の細胞表面への発現が特異的に抑制されていることが明らかとなった。細胞をインターフェロン処理すると抑制効果は消失した。また

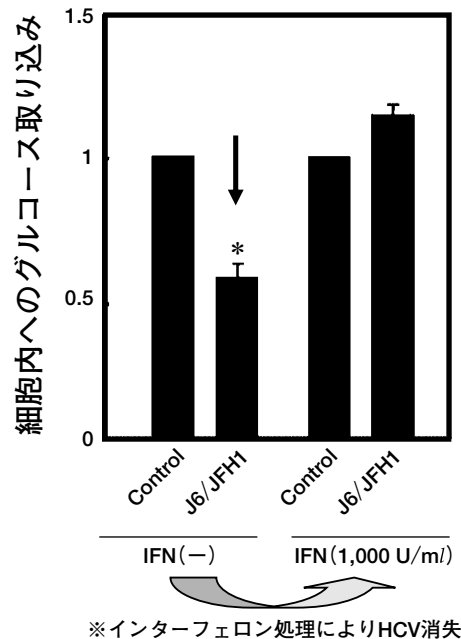


図 8 HCV 複製による細胞内グルコース取り込み抑制

GLUT2 の mRNA 産生量や、プロモーターの活性も低下していることが明らかとなった。プロテアソーム阻害剤の前処理により抑制効果が影響されないことから GLUT2 の蛋白質分解が促進した結果ではないと考えられる。HCV 患者由来の肝組織を免疫染色で調べた結果、GLUT2 の発現低下が

確認された。以上より、HCV 蛋白質の発現により GLUT2 の発現が抑制され、肝細胞へのグルコース取り込みの低下と、それによる高血糖が引き起こされていることが示唆された¹²⁾。

おわりに

本稿では、HCV の性状、病原性発現機構、研究ツールの開発について概説し、さらにわれわれの最新の知見について紹介した。なお本研究は神戸大学大学院医学系研究科堀田博教授との共同研究である。

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* 244 : 359-362, 1989
- 2) Lohmann V, Korner F, Koch J, et al : Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285 : 110-113, 1999
- 3) Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al : Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11 : 791-796, 2005
- 4) Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, et al : Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309 : 623-626, 2005
- 5) Moradpour D, Penin F, Rice CM : Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5 : 453-463, 2007
- 6) Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, et al : The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9 : 1089-1097, 2007
- 7) Gale M Jr, Foy EM : Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 436 : 939-945, 2005
- 8) Ikeda M, Abe K, Dansako H, et al : Efficient replication of a full-length hepatitis C virus genome, strain O, in cell culture, and development of a luciferase reporter system. *Biochem Biophys Res Commun* 329 : 1350-1359, 2005
- 9) Inubushi S, Nagano-Fujii M, Kitayama K, et al : Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein tyrosine kinase Syk. *J Gen Virol* 89 : 1231-1242, 2008
- 10) Sada K, Takano T, Yanagi S, et al : Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J Biochem* 130 : 177-186, 2001
- 11) Coopman PJ, Do MT, Barth M, et al : The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature* 406 : 742-747, 2000
- 12) Kasai D, Adachi T, Deng L, et al : HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *J Hepatol* 50 : 883-894, 2009

* * *