第7回C型肝炎ウイルス及び関連ウイルスに関する国際会議報告

相崎 英樹¹, 松浦 善治²

はじめに

第7回国際C型肝炎ウイルス及び関連ウイルス学会は平成12年12月3日から7日までオーストラリアクイーンズランド州ゴールドコーストで開催された。4年ごとに開催される国際ウイルス肝炎及び肝臓病シンポジウム (International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease) が臨床的な研究発表が中心なのに対し、1-2年ごとに開催される本学会は最先端の基礎的な研究が報告される。現時点はもちろん今後数年間の研究動向を把握することができる国際学会である。毎年5百から千人程度の参加者があり、学会では口頭発表は1つの会場で行われるので、全ての演題をじっくり聞くことができる。今回は65題の口頭発表と213題のポスター発表があり、以下の10のセクションに分かれ活発な議論がなされた。

- Session 1. Structural proteins
- Session 2. Non-structural proteins
- Session 3. Translation / Replication
- Session 4. Virus cell interactions
- Session 5. Model systems
- Session 6. Pathogenesis

¹国立感染症研究所 (〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1), ²大阪大学微生物病研究所 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-1)

Report on 7th International Meeting on Hepatitis C and related viruses, Gold Coast, Australia.

¹Hideki Aizaki, MD, PhD

¹Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases

¹1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku Tokyo 162-8640, Japan

¹Tel: 81-3-5285-1111 Ext. 2521

¹Fax: 81-3-5285-1161

²Yoshiharu Matsuura, DVM, PhD

²Research Center for Emerging Infectious Diseases, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

²3-1, Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan

²Tel: 81-6-6879-8340

²Fax: 81-6-6879-8269

Session 7. Immunology

Session 8. Epidemiology

Session 9. Antivirals

Session 10. Vaccines

C型肝炎ウイルス (HCV) の他には、G型肝炎ウイルス11題、D型肝炎ウイルス1題、Bovine virus diarrhea virus 8題、Tick-borne encephalitis virus 3題、Encephalic flaviviruses 2題、TT virus 1題、の発表があった。以下HCVに関する発表を分野別に報告する。

1. HCV 蛋白

1) コア蛋白

HCVは依然として効率の良い培養細胞系が存在しないため、各種発現系を用いてウイルス蛋白の解析が進められてきた。その中でもコア蛋白は最も解析が進んでいるHCV蛋白の一つである。コア蛋白を発現するトランスジェニックマウスで肝細胞癌が高率に発症したことから、現在はその研究の対象が宿主遺伝子に与える影響の解析に移っている。

本学会では、コア蛋白遺伝子のフレームシフトの可能性や、劇症肝炎患者でのprocessingの相違などの報告があったが、ほとんどが転写レベルでコア蛋白が宿主に与える影響についての研究の報告であった。その内容をコア蛋白発現に伴う遺伝子変化についてまとめると以下のようになる。

増強; p53, 2'-5' OAS, C-Jun terminal kinase (TRADD, TRAF2), Oxidative stress, アポトーシス (Bcl-xL, NF- κ B, TNF- α), ステアトーシス (LDL, Microsomal triglyceride)

抑制; p53, IL-12, Nitric oxide, PKR, T cell の分化 (gC1q receptor), Nuclear transport

その他、コア蛋白 Retinoid X receptor との結合、コア蛋白の Ubiquitin-mediated degradation, コア蛋白の凝固系に対する作用などについての報告があった。コア蛋白を発現するトランスジェニックマウスについては、IL-12の減少、Oxidative stress, TNF- α , IL-1 β , AP-1の増加な

どが報告された。p53やアポトーシスについては以前よりアッセイ系によって相反する報告があり、さらなる検討が必要と思われる。また、コア蛋白を大腸菌や酵母で発現してウイルス様粒子 (VLP) の作製に成功したという報告もあり、今後の粒子形成の解析への有用が期待される。

2) エンベロープ蛋白

エンベロープ蛋白 (E1, E2) については、E2 蛋白に結合することが報告されている CD81 についての解析や、IFN 抵抗性に関与すると推定されている E2 の PKR-elF 2 α phosphorylation homology domain (PePHD) についての報告があった。ウイルス膜蛋白を本来の形に近い状態で大量に産生できれば、それをを用いて感染におけるウイルスと細胞の相互作用の研究などに利用できるものと考えられ、既に HCV 構造蛋白領域の組換えバキュロウイルスで、また、本年度は Semliki forest virus replicon システムで VLP を産生することに成功したという報告があり、その VLP が Molt 4 や Huh-7 と強く結合するという報告や VLP の超可変領域 (HVR) 1 を認識するモノクローナル抗体の作製に成功したグループもあった。CD81 については、発現 E2 蛋白が CD81 に結合するというだけでなく、VLP が CD81 に結合するという報告や Group 3 の E1, E2 ヘテロダイマーも弱いながらも CD81 に結合するという報告があった。一方で VLP が CD81 には結合しないで、Asialoglycoprotein receptor に結合し、また、糖鎖付加していない E2 も結合し、CD81 との結合性は種特異的でないと言った相矛盾する報告もあった。CD81 は精製した E2 に結合するのは間違いないが、HCV のレセプターであるか否かの確証はない。他にも HCV のレセプターと考えられている LDL receptor についての報告があり、E1 と E2 のヘテロダイマーが結合し、Lactoferrin がこの結合を阻止するという報告もあった。PePHD についての報告は、臨床的見地から 2 つのグループの報告があったものの、インターフェロン (IFN) 感受性に影響があるというものとなないというものがあり、今後さらに多くの症例での検討が必要と思われる。

3) NS2 蛋白および NS3 蛋白

HCV の非構造蛋白のうち NS3 蛋白や 5B 蛋白など酵素活性を持つウイルス蛋白については、抗 HCV 薬のターゲットとしての重要性もあり、多くの情報の蓄積があるものの、その他の蛋白、特に NS2 蛋白や 4B 蛋白についてはほとんど解析が進んでいない。本学会では、NS2 蛋白については membrane topology の報告があった。NS2 プロテアーゼ活性については *in vitro* アッセイ系、NS3 プロテアーゼについては NS3 と NS4A との結合体、プロテアーゼ活性の Cell-based アッセイ系、ヘリカーゼや NTPase については変異体を用いた解析や 2 本鎖 DNA との結合の

報告があった。

4) NS4 蛋白

NS4A については、主に NS3 プロテアーゼの co-factor としての活性が知られているが、NS4B の細胞内局在について 2 題の演題があった。また NS4A と 4B 蛋白による翻訳抑制を示唆する発表もあった。

5) NS5 蛋白

NS5A 蛋白については、細胞特異的切断を受けることや、細胞内局在が核に移行する場合についての報告があった。このように NS5A は核移行シグナルを持つことから、現在は NS5A の研究の対象は宿主遺伝子に与える影響の解析が中心になっている。それらをまとめると以下のようなになる。

増強；NF- κ B, IFN 抵抗性 (IL-8 増加による), Growth factor, La antigen, ステアトーシス

抑制；TNF- β , Karyopherin B3

NS5B 蛋白に関しては、細胞内局在が 1 題、結晶構造などを含めて複製酵素としての解析が 4 題報告されている。NS5B が宿主遺伝子に影響を与える事例として MHC class I の発現を抑制することが報告された。さらに、NS3 蛋白と結合することによりポリメラーゼ活性を抑制すること、また NS5B 蛋白に対するモノクロー抗体がポリメラーゼ活性を押さえることなど、抗 HCV 薬のターゲットとしての NS5B 蛋白についての研究が報告された。

以上のように HCV 蛋白の機能は少しずつ解明されてきているものの、実際にウイルスが複製する際の本当の機能は明らかにされていない。これらの問題の解決には、やはり培養細胞を用いた効率の良いウイルス複製系の構築が必須である。

2. 複製・翻訳

1) 複製

複製は今回の学会で最も注目された分野であり、今後の HCV 研究の中心をなすであろう発表が続いた。前回の学会でドイツの Bartenschlager は、HCV の構造蛋白領域を抗生剤耐性遺伝子に置き換えた RNA Replicon を合成し、この RNA をトランスフェクトした細胞を抗生剤存在下で培養することで、この遺伝子を複製させる機能のある細胞を選択する方法を発表した。これにより HCV で初めて蛋白レベルでウイルスの複製増殖を解析できる系が確立された。この発表は効率の良い HCV の細胞培養系を模索してきた多くの研究者にとって衝撃的な報告であった。本年は、早速その系を取り入れ、改良した報告が相次いだのには驚かされた。それらの発表をまとめると、Replicon は細胞傷害性はなく、細胞周期がウイルス増殖に影響を与え、さらにウイルス遺伝子が細胞に適応し、数百倍も複製

効率が良いものへと変異をしていたことがわかった。また、この Replicon に IFN, Ribavirin などの抗ウイルス薬を作用させ、その感受性や作用機序を調べたり、NS5A 蛋白のインターフェロン感受性決定領域 (ISDR) の塩基配列はインターフェロンに対する感受性に影響しないなどの報告もあった。しかしながら、この Replicon は培養上清中に HCVRNA が検出されるにもかかわらず、その存在様式については不明な点が多い。また、全長の HCVRNA に同様に薬剤耐性遺伝子を付けて、より本来の形に近い複製系の構築を目指す試みも報告されてが、複製効率と言う点では前述の Replicon よりも劣るようであった。

この他、HCV 遺伝子について、その RNA の立体構造、3' X と Human ribosomal protein の関係についての報告があった。

2) 翻訳

IRES の機能に影響を与える因子については、コア蛋白や quasispecies が IRES 活性を抑制するという報告が3題、逆にコア蛋白や DEAD box protein が IRES 活性を上げると報告もあった。IRES の2カ所に HeLa 40S ribosomal subunits が結合することや IRES の pseudoknot 構造についての報告もあった。このように5'末の IRES についてはアッセイ系が確立しているため多くの報告があったが、3'については、その polyprimidine tract の機能について、5'と3'末に結合する PTB が IRES 活性を上げポリメラーゼ活性を抑制するという報告ぐらいであった。現在のところ IRES 活性については相反する報告もあり、今後は Replicon を用いた解析が進むものと考えられる。

3) モデルシステム

HCV の研究にはウイルスが感染増殖できる培養細胞系の開発が不可欠である。このためには、感染性クローンの作製とそれを用いた効率の良いウイルス産生系の確立が必要であり、本学会でも培養細胞と感染性クローンの両面から多くの試みが報告されている。培養細胞については Molt 4, HepG 2, FLC 4 などの従来の肝細胞やリンパ系細胞だけでなく、Monocyte-derived dendritic cells などを用いて患者血清の感染実験が報告された。3次元高密度培養法で培養した高い肝機能を有する培養系での感染実験の試みも紹介された。また、悪性リンパ種とC型肝炎合併患者のリンパ節から B cell lymphoma 細胞株を樹立したところ、HCV の持続感染と HCV に対する抗体の産生を認めたという新たな試みも報告された。感染性クローンについては、IMY 細胞に *in vitro* 合成 RNA や cDNA をトランスフェクトしたり、CV-1 細胞で T7 ワクシニアシステムを用いたり、Cre-loxp システムを用いた研究が報告された。

チンパンジー以外の小動物では、Trimera mouse 3 題、Tupaia 2 題の報告があり、HCV 感染の可能性が示唆され

た。放射線処置したマウスにC型肝炎患者組織を移植し感染状態を作る Trimera mouse については短期に HCV が感染し、NOB 抗体の上昇は認められないものの、E2 に対するモノクロー抗体が HCV を排除できる可能性を示唆する報告があった。

HCV 感染を模倣するものとして、Ecdysome やテトラサイクリンでコア蛋白や非構造蛋白の発現をコントロールできる培養細胞系の報告があった。トランスジェニックマウスでは、HCV 全翻訳領域を発現するマウスで Jak-STAT 活性低下、構造蛋白を発現するマウスでチトクローム C や Caspase 系を介した Fas 依存性アポトーシスや T cell activated アポトーシスの増加を認め、Differential gene expression アッセイで多くの遺伝子の変化が見られた。

3. Pathogenesis

HCV 感染チンパンジーの DNA マイクロアレーを用いた解析で、HCV 感染に伴う遺伝子発現の変化を試みた報告があったが、トランスジェニックマウスでの報告と同様に、非常に多くの変化が認められその評価という点で今後の検討が必要と思われた。

HVR 欠損完全長 HCV クローンがチンパンジーに感染し、その血清が新たなチンパンジーにも感染したという報告があった。HVR のアミノ酸配列が感染の経過とともに変異して既存の抗体と反応しなくなるためC型肝炎は高率に慢性化するものと考えられていたため、HVR 欠損感染性クローンの報告はこの仮説を真っ向から否定するものであった。HCV の持続感染の機構についての解明が急がれる。今後、感染性クローンが培養細胞で効率よく(蛋白レベルでその複製を検出できるくらいに)複製できる系の確率が望まれている。

4. Epidemiology

疫学については以下の項目について報告があった。

地域；オーストラリア、ホンコン、ベルギー、台湾、エジプト、ヨーロッパ。

病態；ウインドウ期、無症候性キャリアー、劇症肝炎、肝炎の既往

感染経路；輸血、透析、針事故

検査；ALT、塩基配列 (HVR)、ウイルス量、コア蛋白量、グループ分類、肝組織、HCV 粒子密度、E2 抗体、バラホルム標本の HCVRNA

合併疾患；B型肝炎、Cholangiocarcinoma、Non-Hodgkin's lymphoma、Cryoglobulinemic syndrome

その他、アポトーシス、肝繊維化などについての報告があった。また、ウイルス RNA 量に比べてコア蛋白量多い症例が報告され、コア粒子の存在の可能性が示唆されている。

5. Immunology

HCV の細胞傷害性は非常に弱いものと考えられており、肝障害はウイルス感染細胞を特異的に認識し排除する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) によるものと考えられている。本学会では、C 型肝炎患者や感染チンパンジーの CTL 活性について報告があった。また、Inflammatory mononuclear cell, Peripheral blood dendritic cell, CTL の活性化・増殖 (Th 1), 抗体産生 (Th 2) に関与する helper T cell についてやウイルス抗原を感染細胞の表面に提示する HLA class II についての報告があった。これらの研究は HCV 持続感染者に対する HCV 排除の治療目的ワクチン、あるいは肝炎の制御法など新たな HCV 感染治療法開発に貢献するものと期待される。

6. Antivirals

C 型慢性肝炎の治療としてはまず IFN が第一選択であるが、この量、投与方法などについて、また Ribavirin, Histamin Dihydrochloride との併用療法の効果について多くの報告があった。この際、E2 の PePHD や NS5A の ISDR の塩基配列や、CD26, CD30 が治療効果の目安になるなどの報告があった。E2 蛋白に対するヒト抗体が HCV-Trimera mouse の感染系や、慢性 C 型肝炎のチンパンジーである程度効果が認められたとの報告があり、抗 HCV エンベロープ蛋白に対するヒト型モノクローナル抗体の慢性 C 型肝炎患者の応用が期待される。その他、インターフェロン遺伝子を組み込んだ組換えアデノウイルスでの治療を目指した報告もあった。

7. Vaccines

C 型慢性肝炎患者の血液中には HCV 蛋白に対する様々な抗体が産生され、T 細胞応答も惹起される。しかしながら、HCV の多様性 (quasispecies) やアミノ酸が変異しやすいため HCV は宿主の免疫監視機構から逃れ、持続感染が成立するものと考えられており、C 型肝炎のワクチン開発は難航している。また、効率のよい培養系がなくウイルスの複製機構や感染のメカニズムが解明できないこともあり、ワクチンの開発をいっそう困難にしている。コア蛋白から NS3 蛋白あるいは NS5B 蛋白まで、さらに HVR-mimotope などを用いた DNA ワクチンの報告や、HBV とのキメラ分子を用いた報告などがあった。

C 型肝炎ワクチンの開発動向は、これまでのワクチンの概念とは違って、感染は防御できないものの、慢性化への移行率を低下できるワクチン、あるいは、治療用のポストインフェクションワクチンの開発に重点が置かれるものと思われる。

終わりに

次回の本学会は今年の 9 月 2 日から 5 日までパリで開催される。当初次回は 2 年後の 2002 年の予定であったが、「この数年の急激な HCV 研究の進歩に対応するため 2 年も待ってられない」という声があがり、急遽本年 9 月に開催される運びとなった。今年度の学会の演題締め切りは 6 月 1 日、詳細は下記のホームページを参照していただきたい。

<http://www.b-c-a.fr/hcv2001>