

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591000

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルスのコア領域アミノ酸変異が関わる薬剤耐性と肝発癌メカニズムの解明

研究課題名(英文) Amino Acid Polymorphism in HCV Core Affects Infectious Virus Production and MHC Class I Molecule Expression

研究代表者

加藤 孝宣 (Kato, Takanobu)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長

研究者番号：20333370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：HCVコア領域アミノ酸70及び91の変異は、IFN治療に対する抵抗性と肝発癌に関与していることが知られている。そこでコア領域アミノ酸70/91の変異を導入したgenotype 1b/2a株のキメラウイルスを用い、HCVの増殖とIFN感受性に与える影響について検討を行った。その結果、コア領域アミノ酸70番の変異はHCV蛋白質の細胞内蓄積を誘導し、MHC Class Iによる抗原提示能を抑制することが明らかとなった。これらの結果は、この変異を有するウイルスが、抗原提示能を抑制することで宿主免疫システムを逃れ、IFN治療抵抗性を獲得していることを示していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Amino acid polymorphisms in the HCV genotype 1b core protein has been reported to be a potent predictor for poor response to IFN-based therapy and a risk factor for hepatocarcinogenesis. We investigated the effects of these polymorphisms with genotype 1b/2a chimeric viruses that contained polymorphisms of R/Q at aa 70 and L/M at aa 91. We found that the polymorphism at aa 70 was associated with efficiency of infectious virus production, and this deteriorated virus production in strains with aa70Q resulted in the intracellular accumulation of HCV proteins and attenuation of MHC class I molecule expression induced by IFN treatment through enhanced protein kinase R phosphorylation. These observations may explain the strain-associated resistance to IFN-based therapy and hepatocarcinogenesis of HCV.

研究分野：肝臓病学

キーワード：HCV インターフェロン 薬剤耐性

### 1. 研究開始当初の背景

HCV 感染は世界中に多くの感染者が存在し、高い慢性化率と強い病原性をもつことから公衆衛生上の大きな問題となっている。現在日本では肝癌により年間約3万人が死亡しており、その約75%がHCVに感染による肝癌と考えられており、このウイルスの排除と肝病態の進行阻止を目指した治療法の確立は急務と考えられている。これまでC型慢性肝炎の治療には、Peg-IFN とリバビリンが用いられていたが、genotype 1b で高ウイルス量の患者ではその著効率は十分ではなく、治療効果を規定する要因について多くの検討がなされてきた。これまでに宿主側の予測因子として IL28B 近傍の遺伝子多型、ウイルス側の因子として HCV コア領域や NS5A 領域のアミノ酸変異が報告されている。これらの中で、コア領域のアミノ酸変異は治療効果だけでなく、肝発癌やインスリン抵抗性などこのウイルスの病原性にも影響することが報告されている。しかし、これらの変異がHCVのライフサイクルに与える影響は依然不明であり、どのような機序でIFN治療感受性や病原性を変化させているかはよくわかっていない。

そこで、我々が2005年に報告したHCV JFH-1株とHuH-7細胞を用いたHCV感染増殖システムを用いて、このコア領域のアミノ酸変異がHCVのライフサイクルや薬剤感受性、病原性発現機序に与える影響を明らかにしようと考えた。しかしJFH-1株のコア領域にこれらのアミノ酸変異を導入し、培養細胞においてウイルス複製と感染性ウイルス粒子生成効率を評価したが、これらの変異の影響は観察できていない。

### 2. 研究の目的

これまで臨床的に検討が行われたコア領域のアミノ酸変異がIFN感受性に与える影響は主にgenotype 1b株で検討されたものである。しかし培養細胞で効率的な増殖複製が可能なHCVはgenotype 2a株であるJFH-1のみであり、genotype 1b株の細胞培養系は存在しない。そこで、そのJFH-1株のコア領域を含む構造領域をgenotype 1b株に入れ換えたJFH-1キメラウイルスを用い、このコア領域アミノ酸変異の影響を検討することとした。このキメラウイルスにHCVコア領域のアミノ酸変異を導入したキメラウイルス株の増殖複製能と薬剤感受性を培養細胞で比較することで、コア領域のアミノ酸変異が影響を与えるHCVライフサイクルの過程が同定でき、さらにこれらのウイルスの感染増殖が宿主細胞に与える影響を解析することで、このウイルスが関わる薬剤感受性や発癌機構の解析が可能になると考えた。

### 3. 研究の方法

HCV JFH-1株 (genotype 2a) の構造領域をHCV genotype 1b株由来に置換したキメラウイルスを作成し、さらにコア領域に aa70 (R/Q) と aa91 (L/M) の変異を導入した株を作成した (TH/JFH1-RL, RM, QL, QM)。合成したこれらの変異株の全長RNAをHuh7.5.1細胞に導入し、1日目、2日目、3日目での培養上清及び細胞内のコア抗原を測定することでこれらの変異がウイルスの増殖に与える影響を評価した。さらにIFNを添加しコア抗原を測定することによりIFN感受性に与える影響を検討した。また、HCVのレセプターのひとつであるCD81の細胞表面での発現を欠損しているHuh7-25細胞を用いて、これらの変異がHCVのライフサイクルに与える影響について詳細な解析を行った。さらに、合成したこれらの変異株の全長RNAをHuh7.5.1細胞に導入し、HCV陽性細胞陽性率とそれぞれの細胞内のHCVコア抗原量の蓄積をFACSを用いて解析した。さらにIFNにより誘導されることが知られており、感染細胞の抗原提示に関わるMHC class I因子の発現量も同様に評価した。

### 4. 研究成果

まず、Huh7.5.1細胞を用いてコア領域のアミノ酸変異がHCVの複製増殖に与える影響の検討を行った。HCV genotype 1b株の構造領域を持ったキメラウイルスRNAをHuh7.5.1細胞に導入したところ、細胞内のコア抗原量はコア領域へ導入したアミノ酸変異により明らかな差を認めなかった。しかし、aa70に変異を導入した株であるTH/JFH1-QM, -QL株では-RL, -RM株と比較して培養上清中のコア抗原量が10分の1程度に低下していた(図1)。

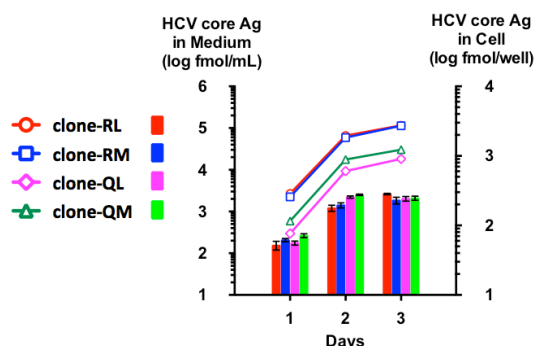


図1. コア領域 aa70/aa91 変異がHCVの増殖に与える影響

また、コア領域のアミノ酸変異がIFNの感受性に与える影響を見るために、これらのキメラウイルスRNAを導入した細胞にIFNを添加し、その抗ウイルス効果を検討したところ、培養上清中および培養細胞内のコア抗原量

の減少には差を認めず、これらの変異の導入は IFN による直接的抗ウイルス作用には影響を与えていないと考えられた ( 図 2 )。

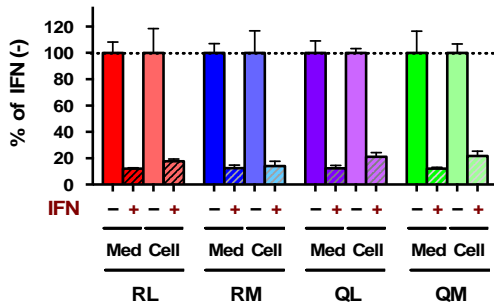


図 2 . コア領域 aa70/aa91 変異が IFN 感受性を与える影響

そこで、HCV のレセプターを欠損している Huh7-25 細胞を用いて、これらの変異が HCV のライフサイクルに与える影響の検討を行った。コア領域に変異を持つキメラウイルス RNA の導入により、培養細胞内のコア抗原量には大きな差を認めず、これらのアミノ酸変異は HCV の複製能に影響を与えていないと考えられた。しかし培養細胞内の感染力価は aa70 の変異株である TH/JFH1-QM, -QL 株では -RL, -RM 株と比較して著明に低下しており、aa70 のアミノ酸変異は細胞内での感染性ウイルス生成効率に影響を与えていると考えられた ( 図 3 )。

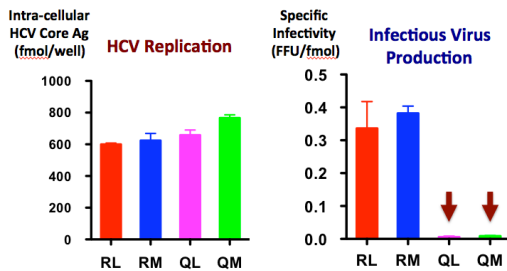


図 3 . コア領域 aa70/aa91 変異がウイルス複製と感染性粒子生成効率に与える影響

そこで、これらの変異を持つ株の感染細胞内での複製状況を FACS を用いて解析したところ、aa70 の変異を持つ TH/JFH1-QM, QL 株では HCV 陽性細胞数の割合 ( HCV positive rate; % ) は少ないが、ひとつの陽性細胞内の HCV コア蛋白質量を表す Mean Fluorescence Intensity ( MFI ) が高く、HCV 複製により生成された HCV 関連蛋白質が、粒子生成効率が低下しているために細胞内に蓄積している可能性が考えられた ( 図 4 )。

さらに感染細胞の排除に関わり、IFN により細胞表面への発現が誘導されることが知

られている MHC Class I 因子の発現についても検討を行った。その結果、HCV のコア蛋白質の蓄積を認めた TH/JFH1-QM, QL 株では -RL, -RM 株と比較して細胞表面での MHC Class I の発現が強く抑制されていた ( 図 5 )。

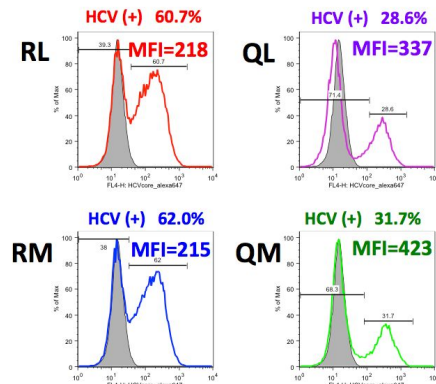


図 4 . コア領域 aa70/aa91 変異株陽性細胞率と細胞内コア蛋白質の蓄積

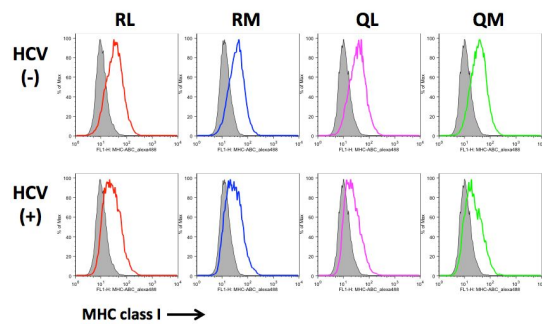


図 5 . コア領域 aa70/aa91 変異株が MHC class I 発現に与える影響

以上の結果から、HCV コア領域アミノ酸 70 及び 91 の変異は IFN による直接的な抗ウイルス活性には影響を与えないが、70 番の変異により細胞内での感染性ウイルス粒子の生成能が低下し、さらにその結果として HCV が細胞内に蓄積するようになると考えられた。さらに HCV 蛋白質の細胞内への蓄積は、IFN により誘導される MHC Class I が関わる感染細胞の抗原提示能を強く抑制することが明らかとなった。これらの結果は、コア領域 70 番アミノ酸に変異を有するウイルスが、宿主細胞内に蓄積し抗原提示能を抑制することで宿主リンパ球による細胞障害を逃れ、IFN 治療に対して抵抗性を獲得していることを示していると考えられた。さらにこの MHC Class I 発現に与える影響は、感染細胞排除の意味から、HCV が関わる肝発癌に関与している可能性も考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0件)

現在投稿中

[学会発表](計 3件)

1) 藤田めぐみ, 脇田隆字, 加藤孝宣. HCV genotype 1b 株キメラウイルスを用いた HCV core 領域アミノ酸 70/91 変異株の解析. ワークショップ 18:C 型肝炎ウイルスの制御を目指した基礎戦略, 第 48 回日本肝臓学会総会, 金沢, 2012.6.7-8.

2) 藤田めぐみ, 加藤孝宣, 村山麻子, 山田典栄, 脇田隆字, 朝比奈靖浩, 坂本直哉. HCV Core 領域アミノ酸 70/91 変異株を用いた反応機序の解析. 第 49 回日本肝臓学会総会, 東京, 2013.6.6-7.

3) Tasaka-Fujita M, Sugiyama N, Kang W, Murayama A, Asahina Y, Sakamoto N, Wakita T, Shin EC, Kato T. Substitution of amino acid 70/91 in the hepatitis C virus core region affects infectious virus production and cell surface expression of MHC class I. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Washington DC, USA. 2013. 11. 2-5.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 孝宣 (KATO, Takanobu)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長  
研究者番号:

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)連携協力者

藤田 めぐみ (TASAKA-FUJITA, Megumi)

杉山 奈央 (SUGIYAMA, Nao)

村山 麻子 (MURAYAMA, Asako)

政木 隆博 (MASAKI, Takahiro)