

論文の内容の要旨

論文題目

C 型肝炎ウイルス (HCV) の病原性及び持続感染機構の解析

氏名 安東 友美

C型肝炎ウイルス (HCV) は、1989年に同定されたフラビウイルス科ヘパシウイルス属の RNA ウイルスである。感染者は日本で約 200 万人、世界で 1 億 7000 万人にのぼる。その多くが 10-30 年という長期間を経て慢性肝炎から肝硬変へと進行し、高率に肝細胞癌を発症する。ウイルスの長期間にわたる持続感染が、HCV の病原性発現に重要と考えられているが、その分子機構は明らかになっていない。そこで、HCV の病原性及び持続感染機構を解析するために、2つのテーマで研究を行った。

以下に[背景・目的]、[方法]、[結果]及び[考察]をテーマごとに記す。

1. C型肝炎ウイルス複製複合体における ATP 制御の可視化と機能解析

[背景・目的]

近年、HCV 感染が単なる肝炎だけでなくインスリン抵抗性や脂肪肝などの代謝異常も引き起こしていることが明らかになっている。我々の研究室で行った HCV 感染細胞内の代謝物質の網羅的解析 (メタボローム解析) で、HCV 感染が糖代謝に影響を与えることが確認された。一方、HCV はゲノム RNA 複製時に ATP を利用すること (Nature 2006)、高 ATP 濃度環境下で helicase の活性および HCV 複製活性が亢進すること (J. Virol. 2009) が報告されている。糖代謝異常が ATP の代謝異常を介して HCV 複製の活性化に繋がっている可能性が考えられるが、複製細胞における ATP の機能は明らかになっていな

い。近年、FRET 技術を利用して細胞内 ATP の時間的・空間的な分布・変動を可視化するプローブ (ATeam) が開発され、細胞内小器官により ATP 濃度が異なることが初めて報告された (PNAS 2009)。そこで、ATeam を用いて HCV 複製細胞における ATP の分布を検証することを目的に研究を行った。

[方法]

ATeam を HCV 複製細胞に遺伝子導入し、細胞質の ATP レベルを検証した。また、HCV 複製複合体に含まれる NS5A 蛋白質に ATeam を融合し、複製複合体の ATP 濃度を可視化可能な HCV 複製系 (SGR-ATeam) を構築した。コントロールとして、NS5A と ATeam の融合蛋白質 (NS5A-ATeam) 単独強制発現系も構築した。これらを Huh7 細胞に遺伝子導入し、共焦点顕微鏡による観察を行った。

[結果]

ATeam を HCV 複製細胞に発現させたところ、非複製細胞と比較して細胞質の ATP 濃度が低下していた。インターフェロンを用いて複製を阻害したところ、ATP 濃度は非複製細胞同等まで回復した。HCV 複製細胞細胞質で ATP 濃度が低下していることが示された。同様の結果はメタボローム解析でも得られた。

次に複製複合体を含む膜画分を分離し、その画分の ATP 消費量を解析したところ、非複製細胞と比較して ATP の消費量が約 2 倍に亢進していた。核酸アナログを用いて複製を阻害したところ、ATP 消費量は非複製細胞と同等まで低下した。ウイルスゲノム複製による ATP 消費量亢進が、HCV 複製細胞の ATP レベル低下の一因であることが示唆された。

複製複合体の ATP 濃度を評価するために、HCV が複製可能な SGR-ATeam を発現させた。HCV が複製しない NS5A-ATeam 単独発現細胞と比較したところ、細胞質はおよそ 2 mM から 1 mM に低下している一方、複製複合体の存在を示す顆粒状の部位ではおよそ 5 mM という非常に高い ATP 濃度を観察した。生細胞で FRET 観察を行った後細胞を固定化し、抗ウイルス蛋白質抗体を用いた免疫染色を行い、顆粒状の発現部位が複製複合体であることを確認した。HCV 複製複合体において ATP 濃度が亢進していることが示された。

[考察]

本研究では FRET 技術を利用して細胞内 ATP を可視化するプローブ (ATeam) を用いて、HCV 複製細胞における ATP の分布を解析した。その結果、細胞質の ATP 濃度は半減し、複製複合体の ATP 濃度はおよそ 5 mM と亢進していた。また、HCV 複製は多量の ATP を消費しており、複製複合体の ATP 濃度の亢進が HCV 複製を活性化している可能性が示された。アポトーシスによる細胞死での ATP 濃度が 5 mM 程度と推察されており (Cell Death Differ. 2005)、複製細胞の ATP 分布の大幅な変化は、細胞内の生理活性に大きく影響していると考えられる。ATP の分布変化が、どのようなメカニズムで生じているかは本博士論文では解析していない。HCV 感染に伴う病原性発現機構に及ぼす影響と共に、今後の最重要課題と考える。また、これまでウイルス感染が ATP の分布に及ぼす影響は全く解析されていない。本解析方法は他のウイルスにも応用可能であり、他のウイルスの解析にも有用であると考えられる。

2. C型肝炎ウイルスゲノムの quasispecies 解析

[背景・目的]

HCV は、自身のゲノムにコードされた RNA ポリメラーゼの fidelity が低いためにウイルスゲノムに変異が起りやすい。その結果、ウイルスゲノムが多種性(quasispecies)を保有し、感染中和抗体や抗ウイルス薬投与に適合していくと考えられる。これまでの HCV 研究では、各塩基について優位に存在する塩基をつなげたコンセンサス配列が一般的に用いられており、ウイルスゲノムの変異も多くはコンセンサス配列に対する変化と理解されてきた。従来の PCR およびクローニング技術では HCV の多種性に対応しきれないために、quasispecies についてはほとんど解析されていない。特に個々のウイルスゲノム全長にわたる網羅的な解析は、全く行われていない。そこで次世代シーケンス技術を用い、HCV ゲノムの多種性をウイルスゲノム全長にわたり解析することを目的に研究を行った。本研究により、HCV ウイルスゲノムの持つ多種性が病態や薬剤耐性獲得にどのように寄与するかの理解つなると期待できる。

[方法]

次世代シーケンスはこれまで主として動物や細菌などの大きなゲノム解析に用いられており、ウイルスのようにサイズは小さいが、変異が多いゲノムに対する解析技術開発が十分ではない。そこで、従来の PCR 法と組み合わせた技術開発を試みた。以下にその解析手順をまとめる。

- 1) HCV 陽性血清からの RNA 抽出と illumina 解析用ライブラリーの作製
- 2) illumine GAIIX による解析結果からウイルスゲノムのコンセンサス配列を決定
- 3) コンセンサス配列に対する変異の同定
- 4) 変異をさけたプライマーで 454 GS FLX 解析用ライブラリーの作製
- 5) ウイルスゲノム上の変異とその組み合わせの決定
- 6) 変異を含むプライマーを用いた PCR
- 7) direct sequence による全長ウイルスゲノムを決定

[結果]

これまでに HCV 陽性血清 1 検体を解析した。既知の HCV ゲノム配列を参照配列としたマッピングと、de novo アセンブル、blast を利用した近縁配列比較を利用し、コンセンサス配列を決定した。続いてコンセンサス配列を参照配列としたマッピングを行い、約 9.6 kb のゲノム上に変異が混在する箇所を 200 数カ所同定した。GS FLX で解析し、長いリード長を利用して変異の組み合わせを推定した。GAIIX では検出されなかった変異が新たに検出された。続いて変異を含むプライマーを設計し PCR で増幅した。オーバーラップさせた 6 つの amplicon のダイレクトシーケンスを行い変異の組み合わせを全長

にわたり確定した。患者血清中に少なくとも3種類の独立したウイルスゲノム RNA 配列が存在することが示された。

[考察]

ヒトゲノム 30 億塩基対が持つ SNPs は数百万箇所報告されており、およそ 1000bp に 1~3 箇所程度である。一方今回同定した HCV ゲノムでは 9.6 kbp におよそ 300 箇所の変異が同定された。数十倍にもおよぶ変異の多さのために、既存の解析技術の単純利用が困難であった。そこで、新旧様々な手法を組み合わせることで、全長のゲノム RNA 配列を決定することに成功した。

これまで PCR を伴うダイレクトシーケンスで得られたコンセンサス配列を HCV の代表的な配列とし、様々な研究に用いてきた。しかし、本研究では少なくとも 3 種類の代表的な配列を決定した。quasispecies の存在様式は、あるコンセンサス配列のウイルスゲノム中心に広がるのではなく、数種類のウイルスゲノムを中心に広がっている可能性が考えられた。さらに興味深いことに、3 種類の配列は、治療感受性に関わるとされているウイルスゲノム配列が異なっていた。C 型慢性肝炎患者の標準治療法であるインターフェロン/リバビリン併用療法の感受性を決定する因子は複数報告されているが、その相関関係は明らかになっていない。今回、全長にわたってゲノム RNA 配列を決定した結果、感受性因子が一種類の配列上に共存していた。以上の結果から HCV ゲノム RNA が持つ複数の代表配列が、病原性、薬剤感受性、宿主の免疫反応などさまざまな淘汰圧力に対する回避メカニズムとして機能していることが想定できる。

本研究手法を用いて HCV ウイルスゲノムの quasispecies が病態にどのような意義があるのかを理解することにより、新たな治療法の開発につながる可能性がある。また、テーラーメイド治療への応用や、他のウイルスへの応用も期待できる。