

123

ウイルスベクターを用いたC型肝炎モデルの作製

一般研究（C）課題番号06670587

平成6年度—平成7年度科学研究費補助金（一般研究C）研究成果報告書



平成9年3月

研究代表者 山内 克巳
(東京女子医科大学医学部)

研究組織

研究代表者 山内 克巳 (東京女子医科大学医学部)

研究経費

平成 6 年度	1,200万円
平成 7 年度	800万円
計	2,000万円

研究発表

- 1) Identification of Major Immunodominant Epitope(s) of HCV core peptide. AASLD, 1995.
- 2) Conversion of the major immunodominant epitope within the nucleocapsid preprotein of HCV during the infection of HCV. International symposium on viral hepatitis and liver disease.
- 3) Within the Nucleocapsid Protein of Hepatitis C Virus : Possible Serological Test to Distinguish Acute and Chronic Infections of Hepatitis C Virus.
- 4) 急性肝炎より慢性化した症例におけるHCVエンベロープ蛋白質の変異とそれに対する体液性免疫応答。
第52回ウイルス学会HCVコア蛋白の主要抗原決定基の解析、第29回肝臓学会

出版物

- 1) Sekiya, H. et al., Genetic alterations of the putative envelope proteins encoding region of the hepatitis C virus in the progression to relapsed phase from acute hepatitis: humoral immune response to hypervariable region 1. Int. J. Cancer, 1994; 57: 664-670.
- 2) Sekiya H. et al., Identification of Major Immunodominant Epitope(s) Within the Nucleocapsid Protein of Hepatitis C Virus : Possible Serological Test to Distinguish Acute and Chronic Infections of Hepatitis C Virus. (submitted for publication).
- 3) Kato, N. et al., Hepatitis C virus hypervariable region may confer escape from immunosurveillance. 329-333., in viral hepatitis and liver disease ed. by Nishioka et al., 1994. 329-333

目 的

C型肝炎ウイルス (Hepatitis C virus; HCV)は、わが国における慢性肝疾患の原因として最も多く、全人口の約1%がHCVキャリアーであり、潜在的な慢性肝炎を有している可能性がある。HCVはその遺伝子解析の結果から数多くの変異が見られ、同一患者においても、その臨床経過に伴って数多くの変異株が出現することが明らかにされている。しかしながら、HCV感染者における臨床像は多彩であり、これらの病態の差をウイルスそのものの変異だけで説明することは不可能であり、感染宿主側の要因がウイルスの変異と共に重要な役割にを担っている事が推測されている。B型肝炎ウイルス(HBV)に関しては、すでに、ウイルス変異だけでなく生体の免疫反応の重要性やその特徴について数多く報告されている。最近、慢性B型肝炎でCTLの認識エピトープとして同定されたHBVコアー蛋白を認識するCTLの存在が、ある特定のHLA表現型を持つB型慢性肝炎患者において確認され、臨床像との関連において注目されている(1)。HCVに関しては、最近その関連抗原を認識するキラーT細胞(CTL)の存在が証明されたが肝炎発症との関連については明かでない(2-3)。今回の研究では、始めに、HCVに対する生体の免疫反応の特徴を解析する目的で、HCV内でも変異が極めて少ないコアー領域と逆に変異が多く認められる領域(Hypervraible 1)の遺伝子産物に対する免疫反応を解析し、併せて遺伝子導入法を用いて新しい実験系で、HCV特異的CTLの解析を行い、これらの結果に基づいて、C型慢性肝炎の新しい治療法の一つとしての可能性について検討した。

1) HCV変異の臨床的意義：

すでに述べたように、HCVはゲノムの多様性が特徴的で、日本で初めて決定された塩基配列は、Chiron社が同定した塩基配列と約20%異なっていた(4)。特に、エンベロープ蛋白質をコードする領域(gp35 とgp70)で、その多様性は顕著であるが、この多様性の生物学的意義は不明である。一方、HCVと若干の類似性を持つペスチウイルスは、HCVのgp70に相当するgp53に中和抗体が存在することが知られている(5)。また、ヒトHIVでもエンベロープ蛋白内に中和抗体が存在する可能性が指摘されている。以上の研究結果から、エンベロープ領域遺伝子の多様性は、ウイルス自体がエンベロープ蛋白に対する中和抗体から巧みに逃れるという可能性を考えられる。本研究ではエンベロープ領域内でも特に多様性に富む遺伝子領域、Hypervraible 1,2 (HVR1 ; gp70、HVR2 ; gp35)の核酸配列とそれに対する免疫反応を解析した。具体的には、まず、C型急性肝炎から慢性肝炎へと移行した患者血清中のHCVの遺伝的变化を検討した(6)。その結果、検討した症例において、時間的な差はあるものの、いずれにおいても、gp70をコードするHVR1に連続的にアミノ酸変異と伴う遺伝的変異が出現することが明らかになった。次いで、エンベロープ蛋白で変異していくHVR1領域遺伝子産物に対する特異的免疫反応を検討した結果、変異前のHVR1に対する抗体は検出で

きたものの、変異後のHVR 1に対する特異抗体は認められなかった（図－1）。この事実は、以下の2つの点から重要である。すなわち、HVR 1は、それ自体十分な特異抗体の産生を誘導できる、しかしながら、この産生された特異抗体は、次に現われた変異型HVR 1を認識できない。すなわち、HVR 1はそれに対する特異抗体による免疫反応からエスケープするためのに変異を繰り返していく様に思える。しかしながら、これらの症例では、抗原と抗体の共存が認められることから、現時点では、HVR 1が中和抗体を含むとは断定できない。この点をより詳細に検討する目的で、gp 70内のエピトープ解析を行った。その結果、gp 70のN末端11ー24番目に2箇所のエピトープが存在し、経時的にシフトすることが分かった。このようなエピトープシフトは、アミノ酸配列の変異が、それまで存在していた抗体からの逃避に必要である可能性を示唆している。もちろん、ここで示した結果だけで完全な結論をまとめる事は不可能であるが、今回の結果は、HCV感染後の持続感染状態を誘導する機構を考える上で興味深い事実と考えられる。

2) HCVコア蛋白に対する免疫反応とその臨床的意義

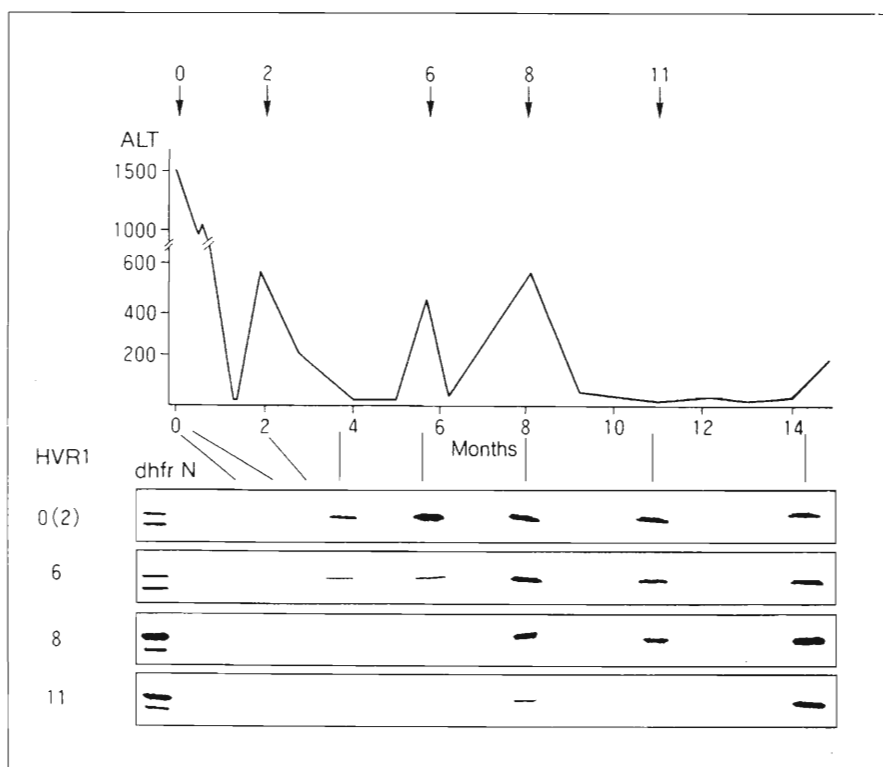


図-1 症例1におけるHVR 1に対する特異抗体の経時的変化

方法) 感染宿主のHCVに対する免疫反応の解析のために、我々はコアー蛋白のアミノ酸配列に従い13-20のアミノ酸からなるペプチドを合成した。次いで、これらのペプチドをPlastic dishに結合させ、それぞれのペプチドと結合する抗体をELISA法を用いて同定した(7)。患者検体は、11例の急性C型肝炎(C-AH)と21例の慢性C型肝炎(C-CH)患者血清であり、他に対照としてB型AH, B型CHの同時に検討を加えた。また、陽性者は、HBVやHCVの感染既往のない健常者血清を標準として、同様のELISA法を行い、以下の式でCut off (Cut off=実験群のOD/標準OD)を算出し、標準値の2倍のODを示した値を陽性と判定した。

結果) 10種類の合成ペプチド(それぞれSCP-1から10)に対する血清中IgG抗体の有無を検討した結果、AH,CHのいずれの患者群においてもいくつか異なったペプチドと結合することが明かとなった。即ち、患者血清中におけるHCVコアー抗体は、単一のものではなく、何種類かの異なったエピトープを認識する抗体群の集合である事があきらかになった。それぞれの陽性率を表-1に示したが、興味深い点は、AH,CHにおいてそれぞれのペプチドに対する陽性率の頻度が異なる事で、SCP-4と5に対するIgG抗体は、AH患者群における陽性率がCHにおける陽性率が高く、逆にSCP-1、2、3、6に対するIgG抗体の陽性率は、CH患者群が高い事が明かとなった(表-1)。B型AHの診断はHBVコアー抗原に対するIgM抗体の有無がその診断に重要である。一方、C-AHを診断する血清学的な適当なマーカーがないといわれている。そのため、我々は、上記の合成ペプチドに対するIgG抗体を測定する事の臨床的意義について検討した。表-1の結果からAHとCHの患者群において抗体陽性率の最も高かったanti-SCP3, anti-

表-1 : Prevalence of IgG anti-SCP in Hepatitic C patients

IgG antibody to	Cut-off (OD)	Prevalence (%)		
		AH(n=11)	CH(n=21)	P-value
SCP -1	1.69	2 (18)	11 (52)	n.s
-2	1.89	5 (45)	16 (76)	0.08
-3	2.19	4 (36)	18 (86)	0.04
-4	2.16	8 (73)	12 (57)	n.s.
-5	2.37	5 (45)	4 (19)	n.s.
-6	1.77	0 (0)	5 (24)	0.08
-7	2.21	1 (9)	0 (0)	n.s.
-8	1.90	0 (0)	2 (9)	n.s.
-9	2.04	0 (0)	0 (0)	n.s.
-10	2.45	2 (18)	9 (43)	n.s.

SCP4について陰性が陽性かにより 4 種類のグループにわけ検討した。結果は表－2 に示したが、anti-SCP3とanti-SCP4の両方が陽性者（表－2 のグループ 1）は 14 例あり、うち AH3 例 CH11 例であり、Diagnostic probabilityは AH21.4%、CH78.6%であった。同様に、anti-SCP3と anti-SCP4陰性のグループは、AH3 例 CH2 例。anti-SCP3陽性、anti-SCP4陰性のグループは 7 例全例が CH であり、逆に anti-SCP3陰性、anti-SCP4陽性者は 6 例中 5 例が AH であった。すなわち、すなわち CH の 85.7%（21 例中 18 例）がグループ 1 または 3 に属しており、逆に AH の 11 例中 5 例がグループ 4 に属していた。これらの結果は、従来、血清学的に鑑別が困難であった、HCV の急性感染と慢性感染が、このように HCV コア蛋白のアミノ酸配列に基づいた合成ペプチドに対する抗体値を測定することである程度可能となる事を示している。

表－2：Diagnostic Probability of Anti-SCPs

	Antibody to		Prevalence(%)		Diagnostic probability	
	SCP-3	SCP-4	AH(n=11)	CH(n=21)	AH	CH
Gr.1	+	+	3(18)	11(52)	21.4	78.6
Gr.2	-	-	3(18)	2(9)	60	40
Gr.3	+	-	0(0)	7(33)	0	100
Gr.4	-	+	5(45)	1(5)	83.3	16.7

3) HCV コアー蛋白を認識するキラーT細胞の解析

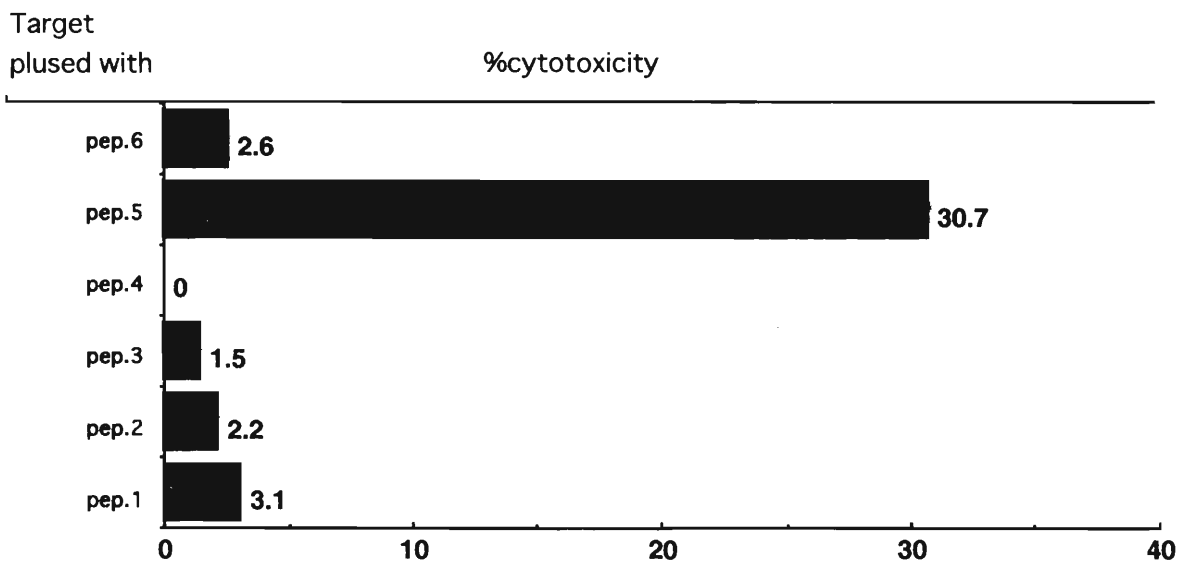
ウイルス感染による病的状態の発現には、キラーT細胞（CTL）の役割が重要と考えられている。C型肝炎についても同様で、HCVを認識するCTLの存在はすでにいくつか証明されている（2－3）。今回の研究では、HCV特異的CTLの存在は確認するため、組織学的に慢性肝炎が証明されたC型CH患者のリンパ球の細胞障害活性を、HLAクラスI抗原（A24）を共有するアロのEVBtransformant細胞にHCVコアー蛋白由来の合成ペプチドを表面に結合した細胞を標的細胞として用いて検討した。その結果は表－3 に示したが、合成ペプチド（SCP－5）を結合した細胞にたいしてのみ細胞障害活性を示していた。この結果は、細胞障害活性をもつ細胞の特徴、あるいは臨床症状との関連等について目下検討中である。

このようなHCVのコアー蛋白を認識するCTLの今後の展開に関しては、我々の研究グループのTokushigeとMGHの共同研究により行われた（8）。

彼等は、HCVのコアー領域遺伝子を組み込んだ遺伝子を作成し、この遺伝子をヒトやマウスの肝癌細胞に導入し、この遺伝子導入細胞において導入された遺伝子が

十分な蛋白合成能をもつことを証明した後、この合成遺伝子（DNA）を用いて Balb/cマウスを免疫し、引き起こされる免疫反応を検討した。その結果、これらのDNA免疫マウスには、HCVのコアー蛋白に対する抗体の産生が認められたが、より特徴的な事は、HCVコアー蛋白を認識するCTLが誘導されるた。この事は、In vitroにおける細胞障害試験だけでなく、HCVコアー蛋白を細胞表面に持つマウスmyeloma細胞の増殖を抑制する事からも証明できた。この結果は、DNAワクチンはHCV感染細胞を除去除去できる可能性を示唆している。すなわち、このDNAワクチンは、遺伝子出レベルでの多様性のため、ワクチン開発が困難といわれているHCV感染に対する新しい治療の可能性を秘めている。

図－ 3 Killing acitivity of PBMC to HCV core peptide plused EBV-transformant



今回の研究で明らかにできた事は以下の点に要約できる。

- 1) HCV感染後に見られるHCV遺伝子の変異が、肝炎の臨床病態と密接に関連している。
- 2) HCVの遺伝子だけでなく、HCVに対する免疫反応もまた極めて多様性に富んでおり、これらの免疫反応の特徴を解析することで、従来の方法に加え、HCV感染における新しい血清診断が可能である。
- 3) 他の領域の遺伝子に比して多様性の少ないHCVコアー蛋白を認識するCTLが存在すること。
- 4) このCTL誘導能を利用した、新しいDNAワクチンの開発が可能である。
今後は、以上の結果に基づいて、HCVの対する生体の免疫反応の解析とそれを利用したC型肝炎の新しい治療法の開発に向かう方向性が明らかになったと思われる。

引用文献：

- 1)Sun-Lung T., Ming-Huei C., CHau-Ting Y., CHia-Ming C., Ae-Ning L., Fu-Horng C., Tong-Hsuan C. and L.Yun-Fan. 1996. Purification and characterization of a naturally processed hepatitis B virus peptide recognized by CD8+ cytotoxic T cells. J.Clin.Inv., 97:577-584.
- 2)Kozier MJ. et al., Hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes recognize epitopes in the core and envelope protein in HCV. J.Virol., 67:7522-7532., 1992.
- 3)Kita H. et al., HLA B44 restricted cytotoxic T lymphocytes recognizing an epitope on HCVnucleocapsid protein. Hepatology, 18:1039-1044.1993
- 4)Kato,N.,Hijikata,M.,Ootsuyama,Y. et al. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1990;87:9524-9528.
- 5)Weiland E. et al., Pestivirus glycoprotein which induced neutralizing antibodies form part of a disulfide-linked heterodimer. J.Virol., 64;3353-3596, 1990.
- 6)Sekiya,H.,Kato,N.,Ootsuyama,Y.,Nakazawa,T.,Yamauchi,K. & Shimotohno,K., Genetic alterations of the putative envelope proteins encoding region of the hepatitis C virus in the progression to relapsed phase from acute hepatitis:humoral immune response to hypervariable region 1. Int.J.Cancer,1994;57:664-670.
- 7)Sekiya H., et al., Identification of Major Immunodominant Epitope(s) Within the Nucleocapsid Protein of Hepatitis C Virus : Possible Serological Test to Distinguish Acute and Chronic Infections of Hepatitis C Virus. (submitted for publication).
- 8)Tokushige K. et al., Expression and immune response to hepatitis C virus core DNA-based vaccine construct. Hepatology, 24, 14-20, 1996.