

C型肝炎ウイルス (HCV) : RNAゲノムの多様性と変異性

加藤 宣之

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腫瘍ウイルス学

キーワード: HCV ゲノム, レプリコン複製細胞, 長期継代培養, 遺伝子解析, 準種

Hepatitis C virus (HCV) : Diversity and variation of RNA genome

Nobuyuki Kato

Department of Tumor Virology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

はじめに

C型肝炎ウイルス (HCV) は、1989年に非A非B型肝炎の原因ウイルスとして発見されたフラビウイルス科ヘパシウイルス属に分類される RNA ウイルスである¹⁾。HCV 感染により生じるC型肝炎のうち70~80%は慢性化し、十数年後には、その半数程度が肝硬変そして肝がんを発症する。発見から10年後の1999年、HuH-7 という岡山大学医学部で樹立された肝がん細胞株²⁾を用いた HCV レプリコンシステム (後述) が開発され³⁾、培養細胞内で HCV サブゲノムを増殖させることができるようになった。そして、2005年には、JFH-1 株 (劇症肝炎患者由来) を用いた HCV の感染性粒子産生システムも開発された⁴⁾。これらの開発により HCV の生活環の理解や抗 HCV 剤の開発が飛躍的に進み、2017年には、著効率99%以上の DAAs (direct-acting antiviral agents) が登場してC型慢性肝炎に対する標準治療薬となった⁵⁾。

筆者は、HCV 発見当初から現在まで約30年間 HCV

の遺伝子解析、HCV タンパク質の機能解析、HCV の増殖系の開発、抗 HCV 剤の開発などの研究に携わって来た。本稿においては、その一部として HCV ゲノムの構造と機能、そして、HCV の大きな特徴である多様性と変異性について、現在までに得られた知見を中心に概説する。

HCV ゲノムの構造と機能

1989年の HCV 発見時においては、HCV ゲノムのほんの一部 (約350ヌクレオチド) しか明らかにならなかったことから、HCV ゲノムの全容解明を目指して国内外の研究グループによる先陣争いがあった。当時、筆者は東京築地にある国立がん研究センター (当時は国立がんセンター) に勤務しており、厚生労働省 (当時は厚生省) の要請により非A非B型肝炎の原因ウイルスを追求していた。HCV ゲノムの一部が明らかになったことが契機になり、筆者を中心にした研究グループもこの先陣争いに参入して行った。当初、我々よりも先行する国内グループもあったが、我々の素晴らしいチームワークにより1990年12月に先陣を切って HCV ゲノムのほぼ全容を報告することが出来た⁶⁾ (現時点での被引用数1,158)。その後、HCV ゲノムの報告が相次ぎ、HCV に関する研究が飛躍的に進展して行った。

令和2年3月25日受理

〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2-5-1

電話: 086-235-7385 FAX: 086-235-7392

E-mail: nkato@md.okayama-u.ac.jp

◆ プロフィール ◆



昭和52年3月 北海道大学薬学部卒業
 昭和54年3月 北海道大学大学院薬学研究科 (薬学専攻) 修士課程修了
 昭和54年4月 国立がんセンター研究所 ウイルス部 研究員
 昭和60年3月 米国メリーランド州 NCI フレデリック癌研究所 博士研究員
 平成4年4月 国立がんセンター研究所 ウイルス部 主任研究官
 平成5年5月 国立がんセンター研究所 分子遺伝学研究室 室長
 平成11年8月 岡山大学医学部 分子細胞医学研究施設 病態分子生物学 教授
 平成13年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 分子生物学 教授
 平成17年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 分子生物学 教授
 平成20年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腫瘍ウイルス学 教授
 令和2年3月 定年退職

最後の7年間、岡山医学会雑誌の編集長を務めました。肝炎ウイルス研究では最初の10年で8億、次の10年で4億、そして残りの10年で3億円ほどの研究費 (国税) を使い、200編程の論文 (被引用数1万ほど) を生産した。これで良かったのかと自問自答しながらも特命教授として研究を継続している「otaK」である。

そして、1995年、我々はHCVゲノムの3'末端部に不思議な配列（3'X、後述）が存在することを発見して⁷⁾、HCVゲノムの全容の解明に至った。以下、HCVゲノムの構造とそのゲノムにコードされたタンパク質の機能について概説する。

HCVゲノムは、約9,600ヌクレオチドからなるプラス鎖の一本鎖RNAである。両末端の非翻訳領域(UTR)を除く9,030から9,111ヌクレオチド（遺伝子型（後述）により異なる）は、1つの前駆体タンパク質の読み枠で占められている（図1A）。5'-UTRは339ヌクレオチド以上存在し、遺伝子型により若干配列の相違があるものの全体的には高度に保存されている。この領域にはリボソームの内部開始機構によるエントリー部位（IRES）が存在しており、IRES依存的に翻訳が行われる。翻訳された前駆体タンパク質は、宿主の小胞体中存在するシグナルペプチダーゼとシグナルペプチドペプチダーゼ、およびHCVゲノムにコードされる2種類のプロテアーゼ（NS2とNS3/NS4A複合体）によるプロセッシングを受け、最終的には10種類のHCVタンパク質が生成される。実際には、翻訳が終了する前にプロセッシングも同時並行的に行われる。図1Aに示したように前駆体タンパク質のN末端側からウイルス粒子を形成するコア（20kDa）、2種類のエンベロープE1

（35kDa）とE2（70kDa）が産生され、続いてウイルス粒子の成熟に必要なカチオンチャンネルであるp7、そして6種類の非構造タンパク質（NS2からNS5B）が産生される。NS2（23kDa）は、それ自身のC末端部を切断するシステインプロテアーゼでウイルス粒子の形成にも必要である。NS3（67kDa）は、NS3のC末端部以降の切断を担うセリンプロテアーゼとRNAヘリケースおよびNTPase活性を有し、コファクターであるNS4A（7kDa）と複合体を形成することで、より高い活性を示す。NS4B（27kDa）は、疎水性に富み小胞体膜の再構成を起こしHCVゲノムの複製の足場となるmembranous webと呼ばれる小胞様構造を誘導する。NS5Aは、リン酸化タンパク質（低リン酸化型（56kDa）と高リン酸化型（58kDa）が共存している）で、NS5Bとの相互作用によりHCVゲノムの複製効率を制御する役割を持つ。さらに、コアと会合して脂肪滴に集積することによりウイルス粒子の形成にも関与している。NS5B（68kDa）は、RNA依存性RNAポリメラーゼ（RdRp）活性を有し、RNAゲノムの複製を行う活性中心体である。3'-UTRは終始コドンから数十ヌクレオチド下流でUが数十から長い場合には200個も連なる配列（時々Cが混在する）が存在する。このU配列の長さはウイルス株ごとに異なるので、当

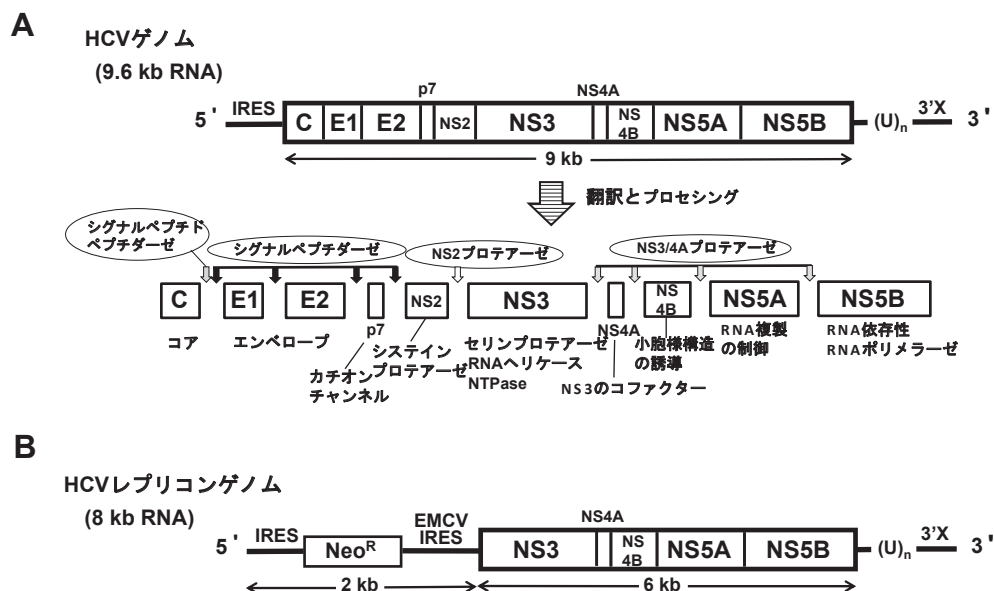


図1 HCVの遺伝子構造

(A) HCVゲノムの構造とそこから産生されるタンパク質の機能：上部にHCVゲノムの全体像を示し、下部に前駆体タンパク質の切断に係わるプロテアーゼと産生されるそれぞれのタンパク質のHCVのライフサイクルにおける主な機能について記載した。(B)HCVレプリコンの構造：HCVゲノムのCからNS2領域を除いて外来性のNeo^R遺伝子とEMCV由来のIRES構造を挿入したゲノム構造のため、8 kbと本来のゲノム（9.6kb）より短くなっている。

初はこれが HCV ゲノムの 3' 末端であると思われていたが⁶⁾、後にさらに下流に高度に保存された 98ヌクレオチドからなる 3'X が存在し、HCV ゲノムの複製に必須であることが明らかにされた⁷⁾。さらに詳しく知りたい場合は、別の総説^{8,9)}を参照していただきたい。

HCV ゲノムの複製に必要な NS3 から NS5B までのタンパク質は、宿主細胞の多くのタンパク質とともに小胞体膜上で複製複合体を形成し、NS5B により複製中間体であるマイナス鎖 RNA が生成され、これを鋳型にして大量のプラス鎖 RNA が複製される。プラス鎖 RNA は翻訳によるウイルスタンパク質の生成に利用される一方で、ウイルス粒子に取り込まれて細胞外に放出される。この翻訳と粒子産生の割合は巧妙に調節制御されている。現在までに、HCV タンパク質と相互作用を示す数多くの宿主因子が同定されており、それらが HCV の複製にどのように関与しているのか、また宿主細胞をどのように変化させる（がん化など）のかについても追究がなされている。これらについては、優れた総説があるので、そちらを参照していただきたい^{8,10-12)}。

これまで述べたように HCV ゲノムの複製増殖機構の理解が進んだのは、培養細胞を用いた HCV 産生系の開発が困難を極めていたところに登場してきた HCV レプリコンシステム³⁾という実験手段を手にしたことが大きい¹³⁾。HCV レプリコンは、HCV ゲノムの前半部の C から NS2 領域をネオマイシン耐性遺伝子 (Neo^R) とマウス由来の脳心筋炎ウイルス (EMCV) 由来の IRES に置換したサブゲノム (図 1B) であり、肝がん細胞株である HuH-7 細胞内に人為的に導入し、ネオマイシン (G418) 存在下で培養することによりレプリコンゲノムが自律的に複製増殖した細胞のみが増えるように設計されている。ただ、誰でもすぐに成功したわけではなく、様々な条件下での試行錯誤が必要でそこには、職人的なある種の感や技量も必要であった。レプリコンゲノムが恒常的に複製している細胞株として樹立できた細胞内では、レプリコンゲノムが自律的に複製増殖しており（細胞あたり $1 \sim 5 \times 10^3$ コピー）、HCV ゲノムの複製増殖が再現されている。HCV レプリコンシステムは、HCV の複製増殖機構の解明ばかりでなく抗 HCV 剤の開発にも大きく貢献することとなった。詳細については、優れた総説があるので、そちらを参照していただきたい^{14,15)}。

HCV ゲノムの多様性

一般に RNA ウイルスのゲノム複製には、ウイルスゲノムにコードされている RdRp が主役として作用する。しかし、この RdRp には校正機能がないために読み間違いがそのまま子孫のウイルスに引き継がれる。ウイルスゲノムの複製が持続的に続くと、結果として多様な遺伝的変異を有するウイルスが出現し宿主内においてこれらの変異ウイルスが混在した準種状態となる。HCV の準種状態は、他の RNA ウイルスと比べても高度であることが分かっているので、以下に、現在までの知見を概説する。

1. 遺伝子型

筆者は、HCV ゲノムの構造解析を始めて程なくして遺伝子型が存在していることに気づきいち早く報告した¹⁶⁾。その後、HCV ゲノム全体の解析と並行して遺伝子型の解析も国内外のグループにより精力的に行れた。明確な定義はないが、塩基配列の相同性が 60% 程度の場合には遺伝子型として、80% 程度の相同性の場合にはサブタイプとしての分類がなされている。当初、遺伝子型は 1～11 まで、サブタイプ (a/b/c などと表記される) を含めると 80 以上も報告された。しかし、最終的には分子系統樹解析などにより遺伝子型は 1～6 までの分類に落ち着いている¹⁷⁾。世界中に分布しているのは、1～3 型で、その中で 1a と 1b 型は、感染者数の約 60% を占める。1a 型は北欧や北米に、1b 型は南東欧州や日本などの東アジアに多い。2 型は 1 型と同じ分布を示すが、感染者数は 1 型より少ない。3 型は南東アジアやオーストラリアなどに多く認められる。残りの 4～6 型は特定の地域で認められる (4 型：中近東・エジプト；5 型：南アフリカ；6 型：タイなどの東南アジア)^{8,18)}。日本では 1b 型が約 70%、2a 型が約 20%、2b 型が約 10% で、それ以外の型は 1% 以下である⁸⁾。

同じサブタイプに属する HCV ゲノム間においても、塩基配列レベルで 5～8%、アミノ酸配列レベルで 4～5% 程度異なる。このような配列の違いは、HCV ゲノム全体を通して均一になっているわけではなく、コアや NS5B をコードする領域では比較的相同性が高く、エンベロープ (E1 や E2) をコードする領域、特に E2 領域で顕著で、10% 以上アミノ酸配列が異なっている場合が多い⁸⁾。

インターフェロンや最近の DAA 製剤などの抗

HCV 剤の効果が遺伝子型の違いにより異なることが知られている（詳細は次稿にて紹介したい）。しかし、慢性肝炎から肝硬変や肝がんを発症させやすい遺伝子型が存在するか否かについては一定の見解は得られていない⁹⁾。

2. 同一個体における多様性

同一個体に存在する HCV ゲノムの多様性についても早い段階で明らかにされており、個々の HCV ゲノムは、塩基配列レベルで 1 % 程度、アミノ酸配列レベルで 0.7 % 程度異なる²⁰⁾。この場合でも多様性がゲノム全体に均一になっているわけではなく、コアや NS5B をコードする領域での多様性と比較してエンベロープをコードしている E1 や E2 領域での多様性が顕著に認められている²⁰⁾。つまり、同一個体内においても良く似ている HCV ゲノムが多数混在した準種状態になっていることが示されている。

3. 超可変領域

E2 のアミノ末端部 21~27 アミノ酸は、HCV ゲノムの中で最も顕著な多様性を示し、超可変領域 1 (HVR1) と呼ばれており²¹⁾、どの遺伝子型にも存在する。E2 のアミノ末端から 91~97 番目にも多様性に富む HVR2 が 1b 遺伝子型のみが存在している。ウイルス株間における HVR1 のアミノ酸配列の違いは最大 80 % に及ぶことから HVR1 は指紋認証のごとくウイルス株の特定にも利用できる。このような特徴から容易に予想できるように、その変異速度も非常に高く、免疫監視機構からの逃避に関与していると考えられている（次項参照）。HVR1 や HVR2 についても、同一個体内においてアミノ酸配列が少しずつ異なるものが多数存在する準種状態になっている。

HCV ゲノムの変異性

一般に RNA ウイルスの変異速度は 10^{-3} 塩基置換/ヌクレオチド/年のオーダーとされており、宿主 DNA の変異速度と比較して 100 万倍高い。上述したように、HCV ゲノムの多様性が顕著であることから、変異速度も高いと予想される。この点について、最近我々が得た知見も含めて以下に概説する。

1. 変異速度

HCV ゲノムの変異速度を明らかにするために、当初は C 型肝炎患者や HCV を感染させたチンパンジーから採取した血液検体を用いて解析が行われ HCV ゲノムの変異速度は前者で 1.92×10^{-3} 、後者で 1.44×10^{-3} 塩

基置換/ヌクレオチド/年と算定された^{22,23)}。また、HCV の感染性 cDNA クローンから作成した HCV RNA (HCV ゲノム) を 2 頭のチンパンジーの肝内に注入し 60 週間後に HCV の遺伝子解析を行った結果、 1.57×10^{-3} と 1.48×10^{-3} 塩基置換/ヌクレオチド/年という変異速度であったと報告されている²⁴⁾。さらに、C 型肝炎患者から経時的に採取した臨床材料を用いた解析により HVR1 の変異速度は、予想通り 1×10^{-1} 塩基配列/ヌクレオチド/年と非常に速いことも明らかになった²⁵⁾。その理由として、HVR1 内には B 細胞エпитープが存在しており、産生される中和抗体から逃避するために次々と変異が繰り返されているためであると考えられた²⁵⁾。そして実験的にも立証された²⁶⁾。しかしながら、臨床材料を用いる限り研究開始時点で既に HCV が高度な準種状態になっているために真の変異速度の算定が困難であると考えられたことや希少動物であるチンパンジーを用いる実験に厳しい制約が課せられたことから、このような検体を用いた研究はその後下火となった。

真の変異速度を明らかにしたいと我々の気運が再び高まったのは、上述した 1999 年の HCV レプリコンの登場である³⁾。我々も国産 1 号 (2002 年) と 2 号 (2003 年) の HCV レプリコンの開発に携わった。どちらも 1b 遺伝子型に属する HCV 株 (無症候性キャリア由来の 1B-1 株と HCV-O 株) で 1B-1 株由来のレプリコンゲノムが複製増殖している細胞株として 50-1 細胞²⁷⁾、同様に HCV-O 株由来の細胞株として sO 細胞²⁸⁾ が得られた。これらの細胞内では、HCV 粒子の産生はないもののクローン化された HCV レプリコンゲノムの複製が自律的にそして持続的に起こっていることから、まさしく 1 種類のレプリコンゲノムが経時的に変異していく様子 (変異速度や変異様式) や準種状態になっていく様子 (遺伝的多様性の獲得様式) を正確に捉えることができると考えられた。そこで、筆者は、2003 年から 50-1 細胞と sO 細胞の継代培養を開始した。週 1 回の細胞継代により 2020 年 3 月で開始から 12 年 (途中何度か中断しているため) を経過している。

継代培養開始後 1.5 年 (50-1 細胞) と 1 年 (sO 細胞) において予備的な遺伝子解析を行い、HCV レプリコンゲノムは予想どおり変異が蓄積してくることや、ある程度の多様性を獲得していることを確認した²⁹⁾。この時点においては、それぞれランダムに選択した 3 クローンの HCV レプリコンゲノムを解析した。その結果、

HCV レプリコンゲノムの変異速度は、前半部 2 kb (5' 末端から EMCV IRES 領域まで) と後半部 6 kb (NS3 から NS5 領域まで) (図 1B 参照) とともに約 3×10^{-3} 塩基置換/ヌクレオチド/年であった。

我々は、さらにこの研究を継続させ、継代培養開始後 9 年までの HCV の変異動態を詳細に解析し最近報告した³⁰⁾。培養開始後 1 年、3 年、5 年、7 年および 9 年経過した 50-1 細胞と sO 細胞由来の HCV レプリコンゲノムをそれぞれランダムに 10 クローン選択して、それらの遺伝子解析を行った。その結果、図 2 に示したように、50-1 細胞および sO 細胞由来の HCV レプリコンゲノム (NS3 から NS5B 領域までの 6 kb) は、ある程度の遺伝的多様性 (塩基配列レベルで 0.3~1.2% の違い) を伴いながら、同程度の変異速度 (2.3×10^{-3} (50-1), 2.9×10^{-3} (sO) 塩基置換/ヌクレオチド/年) で変異が蓄積されていることが明らかになった³⁰⁾。HCV レプリコンゲノムの前半部 2 kb (図 1B) においても同様の変異速度 (3.1×10^{-3} (50-1), 2.8×10^{-3} (sO) 塩基置換/ヌクレオチド/年) と遺伝的多様性 (塩基配列レベルで 0.4~1.8% の違い) を示した。解析した全クローン間で最も相同性が高いクローン間でも塩基配列レベルで 0.3% の違いがあった。従って、HCV レプリコンゲノムは長期に渡る複製により高度な準種状態になっていることが明らかになった³⁰⁾。

変異速度に関しては、我々は別の HCV ゲノムの複製系を用いても同様の解析 (2 年あるいは 4 年間継代培養後ランダムに得たそれぞれ 3 クローンを解析) 結果を報告している^{31,32)}。これらの解析による後半部 6 kb における変異速度も $2.8 \sim 3.8 \times 10^{-3}$ 塩基置換/ヌクレオチド/年³¹⁾ と $2.7 \sim 4.0 \times 10^{-3}$ 塩基置換/ヌクレオチド/年³²⁾ と算定され 50-1 細胞や sO 細胞を用いた解析から得られた変異速度に近い。我々が用いた HCV ゲノムの増殖系は、感染性 HCV 粒子が産生されない実験系であるが、興味深いことに、感染性 HCV 粒子が産生される実験系 (2a 遺伝子型の JFH-1 株) で継代感染を長期間 (2 年) 行っても我々が得た変異速度と近い値 (2.9×10^{-3} (1 年目) と 5.1×10^{-3} (2 年目) 塩基置換/ヌクレオチド/年) が得られている³³⁾。これらの結果から、感染性 HCV 粒子の産生がないレプリコン細胞を継代する方法と細胞から産生された感染性 HCV 粒子を感染させながら継代する方法の違いに係わらず、HCV ゲノムの変異速度は同じようなレベルであることが示唆された。 3×10^{-3} 塩基置換/ヌクレオチド/年というのがど

の程度のレベルかということをつかりやすく別の数値で示すと、HCV ゲノム (約 9,600 塩基) が細胞内で 1 年間複製を繰り返すと 29 塩基に変異が生じ、10 年間複製したとすると 290 塩基が元の配列と違ってくるということを意味している。C 型慢性肝炎患者の多くは、感染後 10 年、20 年と経過していることが多いので、感染時の HCV ゲノムの塩基配列とは相当異なる姿になっているということが容易に想像される。

我々の研究により得られた HCV の変異速度は、上述したような臨床材料やチンパンジーから得られた値より約 2~3 倍高い。この結果は、ヒトなどの体内においては、HCV に対する免疫監視機構 (HCV により抑制されているので不十分ではあるが) が作動しているために、準種状態にある HCV 集団に対する選択圧が働いて、集団の一部が排除されているという考え³⁴⁾ を支持するものである。つまり、免疫学的な選択圧のない培養細胞モデルにおいて得られた変異速度は HCV の変異能力の上限を示しているものと思われる。

2. 変異様式

HCV ゲノムの高い変異速度について述べて来たが、それは、複製可能な HCV ゲノムとして生き残った HCV 集団の解析から算出された値である。実際のゲノム複製時には、ゲノム全体にランダムに変異が入るものと考えられ、ゲノムの複製に差し障りのある変異 (HCV タンパク質の機能に差し障りのあるアミノ酸置換を伴う変異など) は子孫として生き残らず脱落する。そのため、差し障りのない変異 (ゲノム複製に有利に働く変異も含む) のみが子孫に引き継がれることになる。そのため、ゲノムの複製が長期間に及んでも変異が入っていないゲノム領域が存在するはずである。つまり、このような領域は多くの変異が蓄積した後においてゲノムの複製に必須の領域として浮かび上がってくるはずである。

このような観点から、9 年間継代培養した 50-1 細胞と sO 細胞由来のレプリコンゲノムの変異がどの部分で起こったかを経時的に得たデータを基に詳細に解析してみた。その結果、図 3 (50-1 細胞) と図 4 (sO 細胞) に示すように、どちらの場合も、NS3 から NS5B 領域に多数の変異が認められるもののランダムではなく、NS5A 領域の後半部に変異が集中しており、その一方で、NS4B や NS5B 領域での変異は少ないことが分った。さらに、50-1 細胞と sO 細胞で認められた多くの変異の中で共通する変異は 10% 程度しかないこと

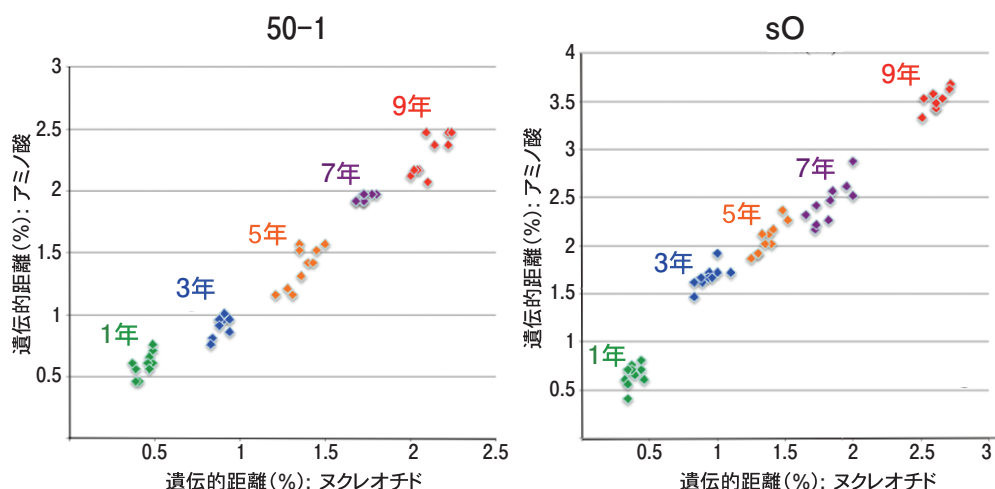


図2 長期継代培養した50-1細胞とsO細胞におけるHCVレプリコンゲノムの経時的変異の蓄積状況
各時期に得られたそれぞれのHCVクローンのNS3からNS5B領域(6 kb)の塩基配列とアミノ酸配列が培養開始時の元のHCVクローンとどの程度異なるかを計算してそれぞれ図中にプロットすることにより作成した。それぞれの点は1クローンを示す。

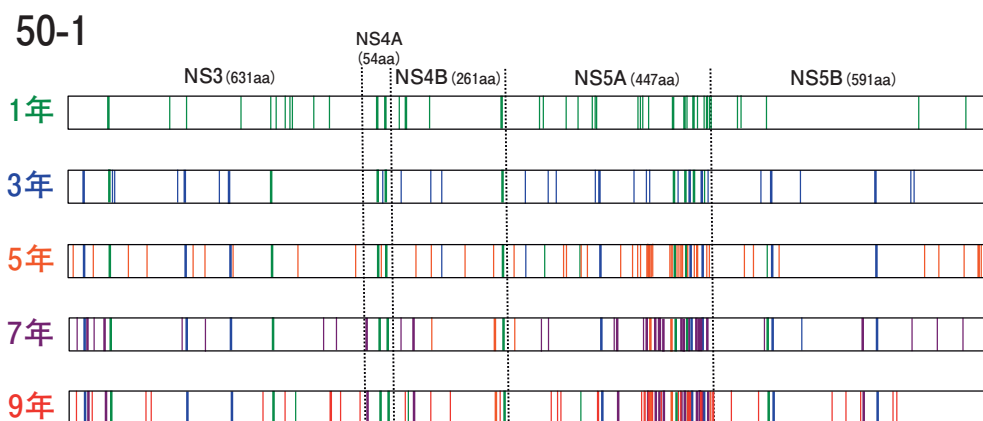


図3 50-1細胞由来のHCVレプリコンゲノム(NS3からNS5B領域)におけるアミノ酸置換を伴う変異の経時的蓄積状況
太い縦線は各時期において解析した10クローン中5クローン以上に認められたメジャーな変異を示す。細い縦線は10クローン中4クローン以下で認められたマイナーな変異を示す。それぞれの縦線の色は、変異が最初に出現した継代年数を示す。例えば、9年における緑の縦線は、継代1年目に出現した変異がその後8年経っても維持されていることを示す。

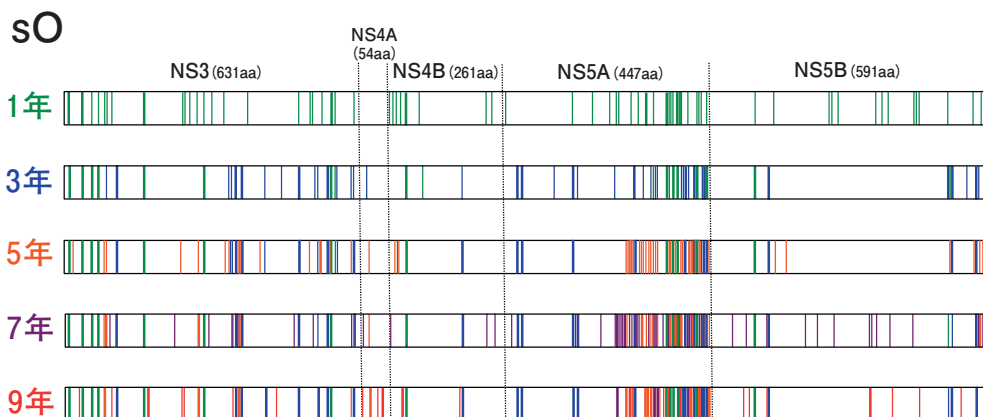


図4 sO細胞由来のHCVレプリコンゲノム(NS3からNS5B領域)におけるアミノ酸置換を伴う変異の経時的蓄積状況
縦線の説明は図3と同じ。

から、それぞれ独自に変異の蓄積が進行していることが分かった。両レプリコンゲノムの NS3 から NS5B 領域の塩基配列は、培養開始時には 7.9% の違いがあったが、経時的にその値が大きくなり 9 年後には 10.5% と遺伝的に離れた状態になっていることも分かり、それぞれの細胞環境で独自の変異の蓄積が進行していることが示唆された³⁰⁾。

塩基置換の様式については、我々の当初の研究^{29,31,32)}において A→G と U→C が G→A や C→U より多いこと、つまりレプリコンゲノムの GC 含量が高くなることが示唆されていた。9 年間培養した 50-1 細胞と sO 細胞から得た多くのデータから、この点についても明確な答えを得ることができた。解析の結果、培養 9 年後における塩基置換で最も高頻度なパターンは A→G (50-1 で 26.7%, sO で 35.1%) であり、U→C (50-1 で 26.2%, sO で 23.9%) がそれに続いていた。G→A や C→U は両者を併せても両レプリコンとも 24% ほどに留まっていることから、全体としてレプリコンゲノムの GC 含量が高くなっていることが分かった。経時的にもレプリコンゲノムの GC 含量が徐々に高まってくることが確認された。9 年培養後には、両レプリコンとも GC 含量が 0.8~0.9% 高まっており、レプリコンゲノムはエネルギー的に安定化の方向に変化していることが示された³⁰⁾。また、図には示さなかったが、系統樹解析によっても、50-1 や sO レプリコンが一定の遺伝的多様性を保ちながら、つまり系統樹上クラスターを形成しながら経時的に変化していく様子が捉えられている³⁰⁾。50-1 細胞と sO 細胞については、現在も継代培養を継続していることから、今後も上述した変異動態が続いていくのかどうかについて興味を持たれるところである。

おわりに

本稿においては、主に HCV の遺伝的多様性と変異性について概説した。特に変異性については、長年かって我々が最近得たデータを中心に紹介した。長期継代培養した 50-1 細胞と sO 細胞については、deep sequencing による解析も進めており、さらに詳細な解析結果が得られるはずである。HCV の多様性と変異性について、さらに詳しく知りたい場合は、他に優れた総説があるので、そちらを参照していただきたい^{35,36)}。インターフェロンや DAA 製剤などの抗 HCV 剤の開発やそれに対する耐性変異などについては、次稿にお

いて紹介したい。

HCV の遺伝情報は、C 型慢性肝炎患者における肝発がんなどへの病態の変化の理解にも役立つのではないかと考えられることから、さらに研究を進めているところである。

文 献

- 1) Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, et al.: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* (1989) 244, 359-362.
- 2) Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J: Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* (1982) 42, 3858-3863.
- 3) Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, et al.: Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* (1999) 285, 110-113.
- 4) Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, et al.: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* (2005) 11, 791-796.
- 5) Zeuzem S, Foster GR, Wang S, Asatryan A, Gane E, et al.: Glecaprevir-Pibrentasvir for 8 or 12 weeks in HCV genotype 1 or 3 infection. *N Engl J Med* (2018) 378, 354-369.
- 6) Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, 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.
- 7) Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Shimotohno K: A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem Biophys Res Commun* (1995) 215, 744-749.
- 8) Kato N: Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* (2001) 55, 133-159.
- 9) 森 京子, 加藤宣之: HCV の構造とその機能. *日臨* (2011) 69 (Suppl 4), 41-46.
- 10) Lindenbach BD, Rice CM: Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* (2005) 436, 933-938.
- 11) Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T: Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol* (2007) 42, 411-423.
- 12) 佐藤伸哉, 加藤宣之: C 型肝炎ウイルスの複製増殖機構. *日臨* (2011) 73 (Suppl 9), 116-120.
- 13) Kato N, Shimotohno K: Systems to culture hepatitis C virus. *Curr Top Microbiol Immunol* (2000) 242, 261-278.
- 14) Ikeda M, Kato N: Life style-related diseases of the digestive system: cell culture system for the screening of anti-hepatitis C virus (HCV) reagents: suppression of HCV replication by statins and synergistic action with interferon.

- J Pharmacol Sci (2007) 105, 145–150.
- 15) Lohmann V, Bartenschlager R : On the history of hepatitis C virus cell culture systems. *J Med Chem* (2014) 57, 1627–1642.
 - 16) Kato N, Ohkoshi S, Shimotohno K : Japanese isolates of non-A, non-B hepatitis viral genome show the sequence variations from the original isolate in the U.S.A. *Proc Japan Acad* (1989) 65B, 219–223.
 - 17) Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, et al. : Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses : proposals for standardization. *International Committee on Virus Taxonomy. Arch Virol* (1998) 143, 2493–2503.
 - 18) Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, et al. : Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* (2015) 61, 77–87.
 - 19) 是永匡紹, 溝上雅史 : HCV 遺伝子型と病態. *臨消内科* (2014) 29, 814–820.
 - 20) Tanaka T, Kato N, Nakagawa M, Ootsuyama Y, Cho MJ, et al. : Molecular cloning of hepatitis C virus genome from a single Japanese carrier : sequence variation within the same individual and among infected individuals. *Virus Res* (1992) 23, 39–53.
 - 21) Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, et al. : Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* (1991) 175, 220–228.
 - 22) Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH : Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* (1991) 88, 3392–3396.
 - 23) Okamoto H, Kojima M, Okada S, Yoshizawa H, Iizuka H, et al. : Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee : variability and stability. *Virology* (1992) 190, 894–899.
 - 24) Major ME, Mihalik K, Fernandez J, Seidman J, Kleiner D, et al. : Long-term follow-up of chimpanzees inoculated with the first infectious clone for hepatitis C virus. *J Virol* (1999) 73, 3317–3325.
 - 25) Kato N, Sekiya H, Ootsuyama Y, Nakazawa T, Hijikata M, et al. : Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J Virol* (1993) 67, 3923–3930.
 - 26) Kato N, Ootsuyama Y, Sekiya H, Ohkoshi S, Nakazawa T, et al. : Genetic drift in hypervariable region 1 of the viral genome in persistent hepatitis C virus infection. *J Virol* (1994) 68, 4776–4784.
 - 27) Kishine H, Sugiyama K, Hijikata M, Kato N, Takahashi H, et al. : Subgenomic replicon derived from a cell line infected with the hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* (2002) 293, 993–999.
 - 28) Kato N, Sugiyama K, Namba K, Dansako H, Nakamura T, et al. : Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* (2003) 306, 756–766.
 - 29) Kato N, Nakamura T, Dansako H, Namba K, Abe K, et al. : Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture. *J Gen Virol* (2005) 86, 645–656.
 - 30) Kato N, Ueda Y, Sejima H, Gu W, Satoh S, et al. : Study of multiple genetic variations caused by persistent hepatitis C virus replication in long-term cell culture. *Arch Virol* (2020) 165, 331–343.
 - 31) Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, et al. : Genetic variability and diversity of intracellular genome-length hepatitis C virus RNA in long-term cell culture. *Arch Virol* (2009) 154, 77–85.
 - 32) Kato N, Sejima H, Ueda Y, Mori K, Satoh S, et al. : Genetic characterization of hepatitis C virus in long-term RNA replication using Li23 cell culture systems. *PLoS One* (2014) 9, e91156.
 - 33) Moreno E, Gallego I, Gregori J, Lucia-Sanz A, Soria ME, et al. : Internal disequilibria and phenotypic diversification during replication of hepatitis C virus in a noncoevolving cellular environment. *J Virol* (2017) 91, e02505–02516.
 - 34) Weiner A, Erickson AL, Kansopon J, Crawford K, Muchmore E, et al. : Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) 92, 2755–2759.
 - 35) Echeverría N, Moratorio G, Cristina J, Moreno P : Hepatitis C virus genetic variability and evolution. *World J Hepatol* (2015) 7, 831–845.
 - 36) Lapa D, Garbuglia AR, Capobianchi MR, Del Porto P : Hepatitis C virus genetic variability, human immune response, and genome polymorphisms : Which is the interplay? *Cells* (2019) 8, 305.