

肝炎慢性化に関わる HLA と HCV の相互作用の解析

三浦直人 遠藤俊徳

北海道大学院 情報科学研究科 生命人間情報科学専攻 情報生物学研究室

背景

C型肝炎とは、C型肝炎ウイルス(Hepatitis C Virus; HCV)の感染によって引き起こされる病気で、HCV キャリアは世界で1.7億人と推定されている[1]。HCVは血液を介して感染し、急性及び慢性の感染症を引き起こす。急性HCV感染は通常無症候性であり、約30%程度の感染者では、治療を受けなくても感染後6か月以内に自然にウイルスが排除される。残りの約70%は持続感染して慢性肝炎となり、そのうち約30%は20年以内に肝硬変、さらにその内の約70%は肝がんへと進行する[2]。最近の報告によると、慢性化確率は、ヒト白血球型抗原(Human Leukocyte Antigen; HLA)の型との関連が示されている[3]。HLAはウイルスペプチド(エピトープ)と結合し、細胞表面に提示し、この複合体をCD4⁺ヘルパーT細胞またはCD8⁺細胞傷害性T細胞が認識することで免疫応答に結びつく。HLAの抗原認識部位は多様性が高いため、HLA型によって免疫応答性に違いが生じ得る。

研究の目的

HCVのウイルス抗原と結合するHLAの抗原認識部位に着目し、HCV感染による肝疾患の重症度をHLA遺伝子から予測することを目的として慢性化に関わるアミノ酸変異の特定を行った。

材料・方法

1. HLA型毎のC型肝炎慢性化のオッズ比

HLA型毎のC型肝炎慢性化患者数と健常者数によってオッズ比(OR)は求められ、10報の論文からHLA型毎のC型肝炎慢性化のORを得た。論文毎にOR値が異なるため、アレル毎に検体数を考慮した加重平均により、OR値を再計算した。これに基づき健常群に多いアレル19種(OR>1.6)の健常配列と慢性化群に多いアレル14種(OR<0.75)の慢性化配列を取得した。HLAの配列はHLAのデータベースであるIMGT(The International ImMunoGeneTics Information System)から取得した。

2. 慢性化群のアミノ酸サイトの置換位置

配列の特徴を明らかにするため、HMMER[4]を用いてプロファイルHMMを健常配列に対して作成し、慢性化配列の各配列のアミノ酸サイト毎に比較した。

3. HLAのホモロジーモデリング

健常配列より作成したプロファイルHMMを用いて、ホモロジーモデリングにより立体構造を作成した。また、プ

ロファイルHMMから作成した配列と比較して慢性化配列によく見られる特定のアミノ酸サイトを置換させてモデリングを行った。ホモロジーモデリングにはSWISS-MODELを用いた。

4. ドッキングシミュレーションによるエピトープとの結合力の評価

慢性化配列のHLAのアミノ酸の置換がエピトープとの結合力にどの程度影響するか評価するために、まずエピトープデータベースであるThe Immune Epitope DatabaseでHCVのNS3領域にあるものとして報告されているエピトープを7種取得した。取得したエピトープとホモロジーモデリングで作成した立体構造とドッキングシミュレーションを行いエピトープとHLAの相互作用エネルギーを評価した。ドッキングシミュレーションにはAutoDock Vina[5]を用いた。

結果と考察

1. アレル毎のオッズ比

アレル毎のORを再計算した結果、HLA Class1において73種のORが得られ、健常群に多いとされるアレル19種(OR>1.6)を健常配列とし、慢性患者に多いとされるアレル14種(OR<0.75)を慢性化配列とした。

2. 慢性化群に多いアミノ酸サイトの置換

プロファイルHMMと慢性化配列を比較した結果、慢性化配列の抗原認識部位において保守的置換ではない箇所が5ヶ所確認でき、L180W(5/14)、T187L(5/14)、E70A(3/14)、R103G(3/14)、E69G(2/14)において置換が存在した。



図1 抗原認識部位において置換がよく見られた箇所置換した箇所を黄緑で色付けして示した

3. 立体構造とエピトープの相互作用エネルギーの評価

プロファイル HMM の 1 種とその配列から特定のアミノ酸サイトのみ置換した立体構造 5 種の計 6 種の立体構造を作成し、NS3 タンパク質のエピトープとの結合エネルギーを計算した。

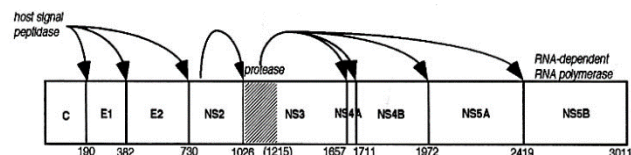
表 1 結合エネルギー

エピトープ	サイト番号	置換型					
		HMMclass1	L180W	T187L	E70A	R103G	E69G
CINGVCWTV	1073-1081	-8.5	-7.3	-8.2	-7.9	-8.3	-7.3
YLVTRHADV	1131-1139	-8.1	-7.6	-7.9	-8.2	-8.3	-7.9
LLCPAGHAV	1169-1176	-7.7	-7.4	-7.1	-7.7	-7.8	-7.8
ITYSTYGKF	1291-1299	-8.7	-8.7	-8.5	-8.3	-8.5	-7.3
IPFYGKAI	1373-1380	-8.3	-8.3	-8.1	-8.2	-8.2	-7.9
KLVALGINAV	1406-1416	-7.3	-7.5	-7.3	-7.6	-7.1	-7.4
YLVAYQATV	1585-1593	-7.6	-9.5	-8.4	-8.6	-8	-8.5

HMMclass1:プロファイル HMM の配列より作成した立体構造。

結合エネルギーが HMMclass1 の構造より低いものを赤字で示した。

アミノ酸置換により多くのエピトープとの結合が弱くなった。特にエピトープ CINGVCWTV はどの置換型も結合エネルギーが低くなった。ウイルスタンパク質はポリプロテインとして翻訳合成される。自己複製に必須な非構造蛋白質 NS5B にコードされた RNA 依存性 RNA ポリメラーゼは、NS3 の N 端三分の一 (1056-1204) にコードされている。セリンプロテアーゼ活性により切り出され活性化する[6]。そのため、NS3 が抑制されることでウイルスは発現できなくなる。



(<http://www.sbsp.jp/sbsp/Sb/sb33/016.html> より)

図 2 HCV ゲノムのプロセッシング

翻訳された HCV ゲノムのポリプロテインは、宿主細胞由来、またはウイルスによってもプロセスを受ける。

慢性化群に多い HLA 型に共通するどの置換も、NS3 領域に含まれる CINGVCWTV エピトープとの結合エネルギーを低下させてしまうことがドッキングシミュレーションにより示された。この置換によりウイルス増殖抑制効果が弱まり、慢性化に結びつくと考えられる。

また、慢性化配列によく見られた 180 番目のアミノ酸残基がリシンからトリプトファンへの置換が起きると、他の置換型より結合力が小さくなる傾向が、CINGVCWTV, LLCPAGHAV, YLVTRHADV エピトープのセリンプロテアーゼ領域に存在する 3 種類のみで見られた。このことから慢

性化において重要な NS3 に関わる L180W が慢性化につながる可能性が示唆された。

結論

HMMER を用いて健常群のアリルからプロファイル HMM を作製し、そこから特定のアミノ酸サイトのみ置換させた構造とエピトープとの結合エネルギーを比較した。その結果、NS3 領域の CINGVCWTV エピトープは、どの置換した構造においても結合力が小さくなり、また L180W の立体構造とセリンプロテアーゼ領域のエピトープの結合力より、L180W が慢性化につながる可能性のある HLA の置換として同定した。

参考文献

- 1) C 型肝炎治療ガイドライン (第 3.2 版)
http://www.jsh.or.jp/files/uploads/HCV_GL_ver3.2_Dec17_final.pdf
- 2) WHO
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>
- 3) Fanning et al.: Hum Immunol 65:745-51(2004)
- 4) HMMER
<http://hmmer.janelia.org/>
- 5) O. Trott, A. J. Olson.: Journal of Computational Chemistry 31 (2010) 455-461
- 6) Kolykhalov et al.: J Virol 74(2000)