

氏名	フセイン ハッサン アリ イブラヒム Hussein Hassan Aly Ibrahim
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第3063号
学位授与の日付	平成19年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Serum derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7- suppressed human primary hepatocytes. (インターフェロン制御因子7が抑制されているヒト初代肝細胞への血清由来C型肝炎ウイルスの感染性)
論文調査委員	(主査) 教授 前川 平 教授 坂井義治 教授 千葉 勉

論 文 内 容 の 要 旨

C型肝炎ウイルス(HCV)が感染すると、その感染者は高率にC型慢性肝炎を発症する。感染後年月を経るに従いこれら患者の多くが、肝硬変、および肝臓がんを発症する。我が国ではHCV感染者が約150万人と推定されているが、WHOは人類の約3%がHCVに感染していると推定している。C型慢性肝炎患者に対して、主にインターフェロンを中心とした治療がなされているが、この治療を受けてもその約半数からはウイルスを排除することができない。そのために新たな治療方法の開発が期待されている。しかし、HCVを効率よく感染増殖させる培養細胞系が開発が遅れているために抗HCV剤の研究開発にも支障をきたしている。近年、特定の培養細胞に対して、ある種のHCVゲノムのみが特異的に複製して、感染性ウイルス粒子を放出することが明らかにされたが、本来の宿主である肝臓由来の樹立細胞に対する感染は極めて効率が悪いために、抗HCV剤開発のみならず、HCVの複製機構の解析の障害になっている。

このような問題点を克服してHCVの複製を解析することが可能な細胞を樹立する目的で、ヒト肝臓初代細胞を不死化することで継代可能な培養細胞を樹立し、得られた細胞を用いてHCV感染実験を行った。さらにHCVの増殖を制御している種々の細胞側因子の中で、自然免疫に関与する因子のHCV複製に対する役割についても解析した。

まず、生体肝移植時のドナーの肝臓組織から肝細胞を調製してSV40 Large T 抗原プラス telomerase catalytic subunit (TERT) あるいは human papilloma virus (HPV) E6/E7 プラス TERT で不死化した。この操作により、効率よく不死化細胞を樹立できたが、SV40 Large T プラス TERT で不死化した細胞は強い増殖性を示し、培養器材上で重なり合うように増えたのに対して、E6/E7 プラス TERT で不死化した細胞は、増殖に対して接触阻害を示した。また肝臓細胞に特異的な遺伝子の発現パターンの解析等により、後者は前者に比較して初代肝細胞の性質を長期にわたる培養の後にも良く保存していることを明らかにした。

次に、これらの不死化細胞を用いて、感染者血清あるいは感染性ゲノムに由来するHCVの感染性を解析した。その結果、感染効率に違いがあるものの、いずれのウイルスも感染性を示すことが示された。また、E6/E7 で不死化した細胞のほうが感染・複製効率が高かった。従って、E6/E7 で不死化した細胞を用いて、以下に自然免疫とHCV感染との関係を調べた。

インターフェロンによりHCV複製は抑制されることが知られている。そこで、インターフェロン産生のシグナルに関与するインターフェロン制御因子3および7(IRF-3, IRF-7)の中でHCV複製に関与する因子を解析した。上記細胞にIRF-3あるいはIRF-7のドミナントネガティブ変異体を産生させ、細胞内のこれらタンパク質の機能を抑制させた状態時のHCV感染複製能を調べた。その結果、IRF-3の機能を抑制しても、ウイルス複製は影響を受けず、IRF-7の機能を抑制させた細胞においてウイルス複製が高くなった。また、それぞれのタンパク質の発現を抑制するsiRNAでこの細胞を処理した時にも同様の結果が得られた。以上ことから、本細胞においては、HCV複製を抑制するインターフェロンシグナルの活性化にはIRF-7を含む経路が重要であると考えられた。

以上の結果から、今回樹立したヒト肝臓由来の不活化細胞は、HCVの複製の分子機構の解析、およびウイルス複製を制御する自然免疫機構の解析などに加え、抗HCV剤開発の目的にも適していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

感染者の血清に由来するC型肝炎ウイルス(HCV)を効率よく感染増殖させる培養細胞系が存在しないために、HCVのウイルス学的な研究や感染増殖を阻止するための新たな治療方法の開発研究が遅れている。学位申請者はHCVが感染増殖可能な新たな培養細胞を樹立し、この問題点を克服すること、また得られた細胞を用いてHCVの感染増殖機構を明らかにすることを目的とした研究を行った。高シュウ酸血症患者に対する生体肝移植手術時に摘出した患者肝臓組織から肝細胞を調製して、これにhuman papilloma virus (HPV) E6/E7およびテロメラーゼ等を導入して、初代肝細胞の性質を良く保存した不活化細胞を樹立した。得られた細胞は、感染者血清あるいは感染性ゲノムを導入した細胞から産生されるHCVに感受性を示した。次に、HCV感染複製と自然免疫との関連を調べるために、本樹立細胞をインターフェロンシグナルに関与するインターフェロン制御因子3および7(IRF-3, IRF-7)のドミナントネガティブ変異体あるいはsiRNAを用いて、これらタンパク質の機能を抑制させてHCV感染複製能を調べた。その結果、IRF-7の機能を抑制したときのみHCV複製増加がみられた。以上から、本細胞においては、IRF-7を含む経路がHCV複製の抑制に重要であることが示唆された。

以上の研究はHCVの感染増殖機構の解明に貢献し、抗HCV薬開発に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値のあるものとみとめる。

なお、本学位授与申請者は平成19年1月15日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。