

生 命 科 学 研 究 科

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	赤堀 祐一
論文題目	不死化ヒト肝細胞を用いた B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染培養系の開発と、これを用いた HBV 生活環の解析		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>B型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus; HBV) は、B型肝炎の原因ウイルスであり、病態が進行すると肝硬変、肝がんなどを引き起こすことが知られている。</p> <p>近年、ヒトナトリウム・タウロコール酸共役輸送体 (Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide; NTCP) が HBV 感染受容体として同定され、これを肝がん由来細胞に産生させることにより、新たな HBV 感染培養系が確立された。しかしながら、これらの HBV 培養系は、HBV 生活環をよく再現するが汎用性に乏しいヒト初代培養肝細胞と比較すると、血清由来の HBV の感染を許容しないことや組換え体 HBV を感染させても、感染性粒子を産生しないなど、いくつかの問題点が存在している。そこで、本研究は、上記の問題を解決するために、新たな HBV 培養法を開発することを目的とした。用いた細胞は不死化ヒト肝細胞、HuS-E/2 細胞であり、これに NTCP 発現プラスミドを恒常的に導入し、最終的に E/NtG8 細胞を得た。さらにこの細胞を Cellbed 担体を用いて立体培養した培養実験系を構築した。この立体培養細胞は、肝がん由来培養細胞に産生させた組換え体 HBV (Cell culture HBV; HBVcc) だけでなく、これまでの肝がん由来細胞を用いた HBV 感染培養系ではみとめられなかった血清由来の HBV (Blood-borne HBV; HBVbb) に対する感染感受性が認められ、さらに、HBVbb と同様の浮遊密度分画パターンを示し、高い感染性を持つ HBV 粒子の産生が、約 1 ヶ月間観察された。これらの結果は、立体培養 E/NtG8 細胞が正常ヒト肝細胞に類似した条件で、HBV 生活環の全てのステップを再現することが可能であることを示している。遺伝子発現解析からも、この立体培養 E/NtG8 細胞では、平面培養に比較して、肝細胞の成熟化に関連し、HBV ゲノムからの転写に関わる Hepatocyte nuclear factor (HNF) 1α や HNF4α の発現や、HBV 粒子産生に関与する脂肪酸合成系酵素の遺伝子発現の上昇が確認された。また、HBV に対する宿主制限因子として報告された Structural maintenance of chromosomes 6 (SMC6) の発現は平面培養に比較して著しく低下しており、これらの遺伝子発現の変化によって HBV の増殖が支持されていると考えられた。また、この SMC6 mRNA が低発現であった観察結果から、ヒト肝細胞などにおけるこの遺伝子の発現を解析したところ、やはりその発現は低レベルであった。このことから、これまでの報告されていた HBV 制限因子としての SMC6 の機能について、肝組織内の生理的な条件で発揮されるものであるのか再検討する必要があると考えられた。</p> <p>本研究によって開発された HBV 感染培養系を用いることによって、感染者肝細胞に近似した HBV 感染増殖機構の解析が可能になったと考えられた。このことから HBV と宿主細胞因子間の相互作用に関する新たな発見や、がん化などの HBV 感染による病原性発現メカニズムの解明に貢献することが期待された。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、不死化ヒト肝細胞を用いて、新たな B 型肝炎ウイルス(HBV)培養系を開発し、HBV の生活環を再現することで、HBV と細胞の相互作用を解析した論文である。

これまで HBV 感染増殖の研究は、初代培養ヒト肝細胞と HBV 受容体分子ヒトナトリウム・タウロコール酸共役輸送体 (Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide; NTCP) を発現させたがん由来細胞を用いて行われてきた。双方に利点と欠点があるが、HBV の感染増殖を再現するという点では、後者には血清由来の HBV が感染しないことや組換え体 HBV が感染しても感染性粒子を産生しないという欠点があった。そこで不死化肝細胞 HuS-E/2 に NTCP を発現させた E/NtG8 細胞を樹立し、これを立体培養することで、従来のがん由来細胞では再現できなかった HBV 生活環の過程を簡便に再現することに成功した。

近年、HBV 感染受容体として同定された NTCP を肝がん細胞に恒常的に産生させることで、新たな HBV 感染培養系が開発された。しかしながら、この HBV 培養系は、がん細胞が強制的に産生させた組換え体 HBV の感染は許容するが、血清由来の HBV の感染は許容しなかった。また、組換え体 HBV を感染させても感染性粒子の産生が観察されないなどの問題点が存在していた。そこで、本研究は、これらの問題を解決するために、不死化ヒト肝細胞を用いて新たな HBV 培養法の開発を目的とした。まず、不死化ヒト肝細胞、HuS-E/2 細胞に NTCP を恒常的に産生させた E/NtG8 細胞を得た後に、Cellbed 担体を用いた簡便な方法でこの細胞を立体培養した。この立体培養系では、NTCP 産生肝がん細胞では認められなかった血清由来 HBV の効率の良い感染やその増殖の長期的な継続、そして感染細胞からの感染性 HBV の産生が可能になった。この立体培養系で産生された HBV は血清由来の HBV と同等の高い感染性を示したため、感染性の著しく低い組換え体 HBV との違いを検討するために、それぞれを浮遊密度勾配超遠心法により分画し、相互の比較を行った。その結果、立体培養系で産生された HBV は感染性粒子の画分が単一の HBV DNA 量のピークを示すなど、血清由来の HBV とほぼ同様の分画パターンを示した。しかしながら、組換え体 HBV の分画パターンには、これらと若干異なるピークが見られ、質的な違いがあると思われた。このことから、この立体培養系は肝組織中の肝細胞で行われる感染性 HBV 粒子産生の解析に用いることができるものと考えられた。立体培養 E/NtG8 細胞の遺伝子発現プロファイルも解析され、効率の良い感染が認められなかった平面培養に比較して、HBV ゲノムからの転写に関わる転写因子や粒子産生に関わるものが想定されている宿主因子の遺伝子発現が亢進しており、逆に転写抑制に関わる SMC6 や粒子産生抑制に関与することが想定されている Bst2 遺伝子の発現は抑制されていることが確認され、立体培養の有用性が確認された。

以上のように本論文は生命科学に関する高度で幅広い学識、ウイルス学分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見もしくは概念等が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって、博士(生命科学)の学位論文としての価値あるものと認めた。更に、令和3年1月25日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 平成 年 月 日