

論文内容要旨

※ 整理番号		(ふりがな) 氏名(自署)	印
論文題目	Establishment of HepG2-derived cell lines permissive for coinfection with hepatitis B and C viruses (B型およびC型肝炎ウイルス共感染許容細胞系の樹立)		
<p>【研究の目的】B型肝炎ウイルス (HBV) やC型肝炎ウイルス (HCV) はヒトの肝細胞に感染し、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌といった重篤な肝疾患を引き起こす。また、C型肝炎患者の約10-15%は、HBVに重複感染していると推定される。このようなHBV/HCV共感染患者では、HBVまたはHCVの単独感染患者と比較して肝炎の状態が悪化しやすく、肝硬変や肝細胞癌の発症リスクも高いことが知られている。このことから、HBV-HCV間に何らかのウイルス学的相互作用が存在すると考えられるが、これらウイルスの共感染を許容する信頼性・汎用性の高い培養細胞系が無い場合、HBV/HCV共感染による肝疾患進展機序へのウイルス学的な影響はよく分かっていない。本研究の目的は、HBV/HCV共感染を許容する新規培養細胞系を樹立し、両者の各々に対する干渉作用と共感染による宿主細胞への影響を明らかにすることである。</p> <p>【方法】ヒト肝細胞がん由来細胞株HepG2またはその由来細胞への発現プラスミドの導入はリポフェクション法により、microRNA-122 (miR-122) の導入はレンチウイルスベクターシステムにより行った。また、培養細胞のHCVゲノム複製許容能を調べるため、HCVレプリコンRNAをエレクトロポレーション法により導入した。細胞内で複製するHCVレプリコンRNAは抗HCV剤 (ダクラタスビルおよびテラプレビル) を用いて除去した。HCVに対する感染性の評価は、HCVシュードウイルスまたは感染性HCV (JFH1株) を用いて解析し、HBV粒子産生Tet-off 誘導細胞株Hep38.7-Tetにより調整した感染性HBVを用いてHBV感染性を解析した。ウイルスRNAおよびmRNAはqRT-PCR法で定量した。培養上清中の感染性HCV粒子量はフォーカス形成法にて測定した。DNA、RNAおよび蛋白質は、それぞれサザン、ノーザンおよびウェスタンブロット法によりそれぞれ測定した。また、HBVおよびHCV陽性細胞は免疫蛍光染色法とフローサイトメトリー法で解析した。</p>			

備考

- ※印の欄には記入しないこと。
- 論文題目が外国語の場合は、カッコを付し和訳を付記すること。
- 論文題目が日本語の場合は、カッコを付し英訳を付記すること。
- 論文内容要旨は、(研究の目的)、(方法)、(結果)、(考察)、(結論)の順に日本語(2,000字程度)もしくは英語(半角5,000字程度)でまとめ、タイプ等で印字すること。(文字数を記載してください。)

論文内容要旨 (続紙)

(ふりがな)
氏名(自署)

印

【結果】 HepG2細胞はHBVおよびHCV感染（ただし、HBVの複製から粒子産生を許容する）を許容しないため、HBVレセプターである胆汁酸輸送体蛋白質 (NTCP) を発現するHepG2細胞 [HepG2/NTCP (G2/NT) 18-A、-B、-C] を樹立した。これら細胞株にHBVを接種したところ、G2/NT18-B細胞が最も高いHBV感染性を示した。次に、HCV複製の必須因子であるmiR-122遺伝子をG2/NT18-B細胞に導入し、G2/NT/122細胞を調整した。G2/NT/122細胞にHCVレプリコンRNAを導入し、細胞内でHCVレプリコンRNAの自律的複製を許容する細胞株 (G2/NT/SGR1) を樹立した。同細胞内の持続的に複製しているHCVレプリコンRNAを抗HCV剤により排除し、HCV複製を許容する細胞株 (G2/NT/SGR^{cure}) を樹立した。次に、適切なHBV/HCV共感染の培養条件を検討するために、四種の培養条件でG2/NT/SGR1およびG2/NT/SGR^{cure}細胞にHBVを接種した。その結果、ヒト初代肝細胞用培地はHBV感染効率を上昇させる一方、HCV複製を阻害することが分かった。一方、DMEM由来の培養液による培養条件では、HBV、HCV共に比較的高い複製レベルが維持されることが分かった。次に、HBV/HCV共感染を許容する細胞を樹立するために、G2/NT/SGR^{cure}細胞にHCVレセプターCD81を導入し、クローニングによりG2BC-C2および-D5細胞株を樹立した。これら細胞はHCV感受性を示し、感染性HBVおよびHCVの感染を許容した。また、HCV感染G2BC-C2細胞ではインターフェロン誘導遺伝子の発現がみられ、汎JAK阻害剤処理によってHCV増殖が亢進した。HBVとHCVを接種したG2BC-C2細胞では両ウイルス量とも経時的に増加し、約35%の共感染が見られた。また、本実験条件において各ウイルス複製に干渉作用は見られなかった。各々の単独感染と比較して、共感染下ではCOX-2やVEGFなどの宿主因子の発現量が相乗的に増加した。

【考察】 本研究において、新規HBV/HCV共感染許容細胞株を樹立した (G2BC-C2および-D5)。また、共感染培養条件としてDMEMを用いた培養条件が適していることが分かり、汎JAK阻害剤により同細胞のHCV増殖能が亢進した。しかしながら、これら共感染許容細胞株のHCV感受性は、汎用されているHuh7.5.1やHuh7OK1細胞より低く、培養条件の改善が必要と思われる。また、本研究の条件下ではHBV-HCV間のウイルス干渉は見られなかったが、関連疾患に關与する宿主遺伝子の発現がHBV/HCV共感染によって相乗的に亢進していたため、共感染による宿主遺伝子の発現誘導が共感染患者の病態に影響することが示唆された。

【結論】 本研究によって、HBV/HCV共感染を許容する培養細胞系が確立された。この系によって、今後HBV/HCV共感染のウイルス学が進展するものと思われる。

(2,171字)