

Title	Novel permissive cell lines for a complete propagation of hepatitis C virus
Author(s)	塩川, 舞
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/34582">https://doi.org/10.18910/34582</a>
rights	
Note	

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 論文内容の要旨

〔 題 名 〕

**Novel permissive cell lines for a complete propagation of hepatitis C virus  
(C型肝炎ウイルスに感受性を示す新規細胞株の同定)**

学位申請者 塩川舞

C型肝炎ウイルス(HCV)は、肝細胞癌の主要な原因ウイルスである。HCVは血液を介して感染し、感染すると高率に慢性化し、炎症と繊維化を繰り返すことによって肝硬変に至り、肝癌を合併する。全世界には約2億人、我が国だけでも200万人ものHCV感染者が存在すると推測されている。我が国における新規感染者数は大幅に減少しているが、諸外国では、薬物の乱用等によりHCV感染者は増え続けている。現在、HCV患者に対しては、インターフェロンとリバビリンの併用療法が施行されているが、その著効率は約40-50%程度にとどまり、治療による副作用や高額な治療費等の様々な問題がある。多様な遺伝子型を有するHCVの全ての遺伝子型に効果を示し、しかも副作用の少ない治療薬やワクチンの開発が望まれている。

HCVに感受性を示す小型実験動物がいないことや、患者血清中のHCVを増殖できる細胞培養系がないことが、HCV研究の大きな障害となっている。これまで、劇症C型肝炎患者から分離された実験室株のJFH-1ウイルス (cell- culture-derived HCV : HCVcc)とヒト肝癌由来のHuh7細胞株がHCVの感染系として用いられてきた。また、肝臓特異的に発現しているmicroRNA-122 (miR-122)を発現させると、HCVccに対して感受性を示すようになる肝癌由来の細胞株が存在することが明らかになってきた。さらに、miR-122の導入によって非肝臓由来の細胞株でもHCVゲノムが複製できることが明らかになってきた。しかしながら、miR-122の発現によって非肝臓由来の細胞株でウイルスゲノムは複製するものの、感染性粒子は産生されなかった。これらの成績から、HCVの完全な生活環には、何らかの肝臓特異的因子が必要であることが示唆された。

そこで、肝臓特異的な因子を発現する細胞株であれば、HCVの完全な生活環が成立するのではないかと考え、新規HCV感受性細胞株の同定を目的として、 $\alpha$ -fetoprotein (AFP)を指標に癌細胞株をスクリーニングした。AFPは高分化型肝細胞癌で発現が高く、腫瘍マーカーであるため、ほとんどの癌細胞株で発現レベルが調べられており、肝機能を保持した癌細胞株のスクリーニングには最適なマーカーであると考えられた。cDNA array databaseを用いて、AFPの発現レベルを指標に癌細胞株をスクリーニングし、肝癌由来のHepG2細胞とHep3B細胞、胃癌由来のTakigawa細胞とFU97細胞、結腸癌由来のCaco-2細胞、卵巣癌由来のOV-90細胞を同定した。過去にHCVが感染することが報告されている細胞株や、HCVの細胞への侵入を評価するシュードタイプウイルスが感染しない細胞株は候補から除外し、FU97細胞を新規HCV感受性細胞株候補としてさらに解析を進めた。また、AFPを高発現している肝癌由来のJHH-4細胞も検討に加えることにした。まず、これらAFP高発現細胞株の肝機能を評価するために、肝臓特異因子[Albumin、Apolipoprotein B, E (ApoB, ApoE)、Microsomal Triglyceride Transfer Protein、miR-122]のmRNAの発現を定量した結果、これらが高く発現していることが示された。次に、これらの細胞株のHCV感受性を評価するため、HCVcc接種後の細胞内のウイルスRNAと、培養上清中の感染価を定量した。両細胞株とも、細胞内のHCV RNAの経時的な上昇が認められ、上清中の感染価も高い値を示したことから、HCVの完全な生活環を許容できることが明らかになった。また、両細胞株のHCV感受性は、ApoBやApoEの発現抑制で顕著に低下した。HCV阻害剤によって誘導される抗ウイルス作用は、FU97細胞とHuh7細胞では異なっており、さらに、新しいHCVの実験室株であるJFH-2ウイルスに対する感受性は、FU97細胞がHuh7細胞よりも高いことが明らかになった。

AFPの発現を指標にして癌細胞株をスクリーニングして、2種類の新規HCV感受性細胞株、JHH-4細胞とFU97細胞を同定した。これら細胞株は何も手を加えずにHCVの完全な生活環を許容できるため、これまでHuh7細胞だけであった、HCV感受性細胞株の選択肢を広げることが可能となった。また、これら新規感受性細胞株においても、ApoBやApoEの発現抑制によってHCVの感受性が有意に低下したことから、肝臓特異因子がHCVの増殖に重要な役割を演じていることが示された。特に、FU97細胞は胃癌由来であるにも関わらずHCVに対して高い感受性を示し、HCV阻害剤によって誘導される抗ウイルス作用や、JFH-2ウイルスに対する感受性がHuh7細胞とは異なることから、これまでになく特性を保持したHCV感受性細胞株であると考えられる。本研究で同定したHCV感受性細胞株は、HCVの基礎研究はもとより、新規抗HCV薬の探索に有用なツールになると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 塩 川 舞 )		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 目加田英輔
	副 査	教授 菊谷 仁
	副 査	教授 山本 雅裕

  

**論文審査の結果の要旨**

平成26年3月4日に公聴会及び本審査を開催した。申請者が論文内容について説明を行い、その後、論文内容および専門知識に関する質疑応答を行った。

本論文は、C型肝炎ウイルス(HCV)に感受性を示す新規細胞株を同定しており、HCV研究に新たな培養細胞モデルを提供できるものである。HCVはヒトとチンパンジーにしか感染しないため、有用な動物実験モデルが存在しない。それゆえ、主にin vitroの実験系で研究が進められてきた。しかしながら、確立されている培養細胞モデルは、HCVの実験室株であるJFH-1ウイルスと、ヒト肝細胞癌由来のHuh7細胞の組み合わせのみであり、得られる知見が限定されているのが現状である。本論文では、HCVの増殖を許容する細胞株の条件として、肝臓の性質や機能の重要性に着目し、 $\alpha$ -fetoproteinを指標として癌細胞株をスクリーニングし、肝臓の特徴を保持した癌細胞株の中から、肝細胞癌由来のJHH-4細胞と胃癌由来のFU97細胞が、JFH-1ウイルスに感受性を示すことを見いだしている。近年、肝臓特異的に発現しているmicroRNAであるmiR-122を発現させると、HCVに感受性を示す癌細胞株がいくつか報告されているが、本論文で同定した2つの細胞株は、何も手を加えなくてもHCVに感受性を示すことから、培養細胞モデルとしての汎用性も高いと考えられる。特に、感受性を増強したFU97細胞(Cured細胞)は、JFH-1ウイルスに対してHuh7細胞に匹敵する感受性を示し、さらに、新たに樹立されたJFH-2ウイルスに対してはHuh7細胞より高い感受性を示すことから、新たなHCVの実験室株の樹立にも応用できる可能性が示唆された。

本論文は、HCV感染における肝臓の機能の重要性を示すとともに、HCVに対して感受性を示す二つの新規細胞株を同定することに成功している。特に、本論文によって同定されたFU97細胞は、HCVの新たな培養細胞系としてHCVの基礎研究だけでなく、新規抗HCV薬の探索にも活用されるものと思われる。さらに、本研究成果は、ウイルス学のコアジャーナルであるJournal of Virologyに掲載されることが決定しており、本論文を総合的に評価した結果、博士学位論文審査は合格と判定した。