



Title	Characterization of HCV-like particles produced in a human hepatoma cell line by a recombinant baculovirus
Author(s)	松尾, 栄子
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46258
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名 松 尾 栄 子
 博士の専攻分野の名称 博士(医学)
 学位記番号 第 20115 号
 学位授与年月日 平成 18 年 3 月 24 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
 医学系研究科分子病態医学専攻
 学位論文名 Characterization of HCV-like particles produced in a human hepatoma cell line by a recombinant baculovirus
 (組換えバキュロウイルスを用いてヒト肝癌由来細胞株で作製した C 型肝炎ウイルス様粒子の性状)
 論文審査委員 (主査)
 教授 松浦 善治
 (副査)
 教授 生田 和良 教授 松田 道行

論文内容の要旨

【目的】

C 型肝炎ウイルス (HCV) に感染すると、肝硬変を経て高率に肝細胞癌を発症する。我が国には 2 百万人もの HCV 感染者が存在すると推定され、既感染者に対する有効な肝癌進展阻止法の開発が急務である。しかしながら、HCV を効率よく複製できる細胞培養系を欠くため、HCV の感染・複製機構は依然として謎に包まれたままである。HCV の粒子形成の解析は、*in vitro* 合成系、大腸菌、酵母、そして組換えウイルスなどを用いて解析されてきたが、HCV の主要な標的細胞であるヒト肝臓細胞を用いた解析はこれまでに報告されていない。本研究は、組換えバキュロウイルスを用いて、ヒト肝臓由来細胞で HCV 様粒子 (HCV-LP) を作製し、その性状を解析することとした。

【方法ならびに成績】

1. HCV クローンの選抜 : HCV-LP を効率よく発現できる HCV 遺伝子と細胞種を決定するため、HCV J1 株 (遺伝子型 1b) の完全長 ORF の C 末端側から欠損を加えた cDNA クローンを各種哺乳動物細胞へ導入し、HCV 蛋白質の発現を免疫プロット法と定量 ELISA で解析した。その結果、コア蛋白質、二つのエンベロープ蛋白質 (E1 と E2)、p7、および非構造蛋白質 2 (NS2) をコードするクローンをヒト肝癌由来 FLC4 細胞に導入した場合に、発現量と培養上清中に放出されるコア蛋白質の割合が最も高かった。
2. 組換えバキュロウイルスの作製と発現 : FLC4 細胞へ効率よく遺伝子を導入するため、コア蛋白質から NS2 までをカバーする HCV 遺伝子を CAG プロモータ下に組み込んだバキュロウイルスを作製した。この組換えウイルスを FLC4 細胞に感染させたところ、細胞内の発現と培養上清中へのコア蛋白の放出は、それぞれ感染後 24 時間と 96 時間でピークに達した。
3. HCV-LP の精製と性状 : 組換えバキュロウイルスを感染させた FLC4 の細胞から、密度勾配超遠心法にて HCV-LP を精製した。HCV-LP は CsCl の密度平衡遠心で 1.17 g/ml の密度を示し、抗 E1 および抗 E2 抗体と特異的に反応する 40–50 nm の粒子が免疫電子顕微鏡観察で確認され、粒子中には HCV RNA が検出された。精製 HCV-LP は糖鎖切断酵素である Peptide-N-glycosidase F、および Endoglycosidase H 処理に感受性を示したことから、HCV-LP は高マンノース型の糖鎖を持つことが示された。

4. HCV-LP の結合活性：HCV-LP をヒト肝癌由来の HepG2 および Huh7 細胞に接種後、細胞から回収されたコア蛋白質を定量 ELISA で測定して結合活性を解析した。十万個の HepG2 細胞と Huh7 細胞に対し、コア量換算で、それぞれ 500 ng/ml と 4 μg/ml の HCV-LP で結合が飽和したことから、HepG2 細胞よりも Huh7 細胞の方が、HCV-LP に対して高い親和性を持つことが示された。
5. HCV-LP の結合に関与する細胞表面分子：HCV-LP の結合に関与する細胞表面分子を解析するため、Huh7 細胞をプロナーゼ、ホスホリパーゼ C、あるいは、過ヨウ素酸ナトリウムで処理し、HCV-LP の結合における、蛋白性因子、リン脂質、および糖鎖の関与を検討した。プロナーゼ処理で HCV-LP の結合が阻害されたことから、Huh7 細胞表面の蛋白性因子が HCV-LP の結合に関与していることが示唆された。
6. HCV-LP の結合におけるヒト CD81 の関与：HCV の受容体候補として報告されているヒト CD81 の HCV-LP の結合への関与を調べるため、HCV-LP を可溶型ヒト CD81 蛋白質と反応後、ヒト CD81 隣性の HepG2 細胞とヒト CD81 陽性の Huh7 細胞に接種したところ、両細胞への結合活性がともに低下した。一方、抗ヒト CD81 抗体は Huh7 細胞への HCV-LP の結合を低下させたが、HepG2 細胞への結合には影響しなかった。可溶性ヒト CD81 や抗ヒト CD81 抗体では HCV-LP の Huh7 細胞への結合を完全に阻害できなかったことから、HCV-LP の結合にはヒト CD81 以外の因子の関与が示唆された。また、抗 E2 抗体で HCV-LP を前処理すると、両細胞への HCV-LP の結合が低下した。

【総括】

本研究により、組換えバキュロウイルスを用いてヒト肝癌細胞で作製した HCV-LP は、HepG2 よりも Huh7 に高い親和性を示し、その結合は、可溶型ヒト CD81 や抗ヒト CD81 抗体により部分的に阻害されることが分かった。これまで報告されている昆虫細胞で作製した HCV-LP はヒト CD81 非依存性に結合することから、HCV-LP のヒト CD81 への結合には哺乳動物細胞における何らかの翻訳後修飾の関与が示唆された。また、可溶性ヒト CD81 や抗ヒト CD81 抗体では HCV-LP の Huh7 細胞への結合を完全に阻害できないことから、HCV-LP の結合にはヒト CD81 以外の分子の関与が示唆された。ヒト肝臓由来細胞での HCV-LP の作製系は、HCV の感染初期過程や粒子形成の解析に有用なツールになると思われる。

論文審査の結果の要旨

C 型肝炎ウイルス (HCV) 研究の最大の障害は効率のよい細胞培養系を欠くことである。HCV の感染初期過程を解析するために、HCV 様粒子 (HCV-LP) が昆虫細胞で作製されてきたが、HCV の主要な標的細胞であるヒト肝臓細胞で HCV-LP を作製した報告はない。本論文ではバキュロウイルスベクターを用いて、ヒト肝臓由来細胞で HCV-LP を作製しその性状を解析した。昆虫細胞で作製された HCV-LP の結合は、HCV の受容体候補分子であるヒト CD81 との相関は認められないが、ヒト肝臓細胞で作製した HCV-LP の結合には部分的ではあるが、ヒト CD81 が関与することが示された。この成績は、HCV-LP がヒト CD81 への結合能を獲得するには、哺乳動物細胞で何らかの翻訳後修飾が必要であること、また、ヒト CD81 以外の分子が HCV-LP の結合に関与していることが示唆している。本論文は HCV の感染機構や粒子形成機構を理解する上でも重要な知見を与えるものであり、学位の授与に値すると考えられる。