

Title	Establishment of an indicator cell system for hepatitis C virus
Author(s)	田中, 佳典
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/54088">https://hdl.handle.net/11094/54088</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

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

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

Osaka University

【49】

氏名	田中佳典
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 23618 号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学位論文名	Establishment of an indicator cell system for hepatitis C virus (C型肝炎ウイルスの感染・複製を検出可能な指示細胞株の樹立)
論文審査委員	(主査) 教授 松浦 善治 (副査) 教授 塩田 達雄 教授 生田 和良

#### 論文内容の要旨

##### [ 目 的 ]

C型肝炎ウイルス (HCV) は感染すると、高確率で慢性化し、慢性肝炎、肝硬変を経て肝臓癌を引き起こす。しかしながら、現在の治療法でも著効率50%程度しか示さず、より効果的な治療薬の開発が期待されている。

HCV の研究における最も深刻な問題点は、ヒト肝細胞移植マウスやチンパンジー以外に感染が成立する動物がないことと、劇症肝炎患者血清中の RNA から分離された特殊な実験株 JFH-1 しか培養細胞に感染することのできるウイルスは存在せず、慢性肝炎患者血清より直接分離された感染性ウイルス株がないことである。これらのことが、世界に蔓延している慢性肝炎患者本来の病態に迫ることを困難にし、著効率の高い治療薬の開発に大きな歯止めをかけていると考えられる。したがって、HCV 感染慢性肝炎患者から本来のウイルスを分離することは上記の問題点を克服するため必須であると思われる。そこで、我々は患者検体由来の HCV の分離を目指し、ウイルス感染を簡便に検出できる細胞株の作製に取り組むことにした。

##### [ 方法ならびに成績 ]

HCV NS3/4A 蛋白質は、セリンプロテアーゼ活性を持ち自己複製に必須である。そのウイルスプロテアーゼ活性を利用することで、レポーター遺伝子の発現を調節するシステムを考案した。すなわち、2種類

の転写活性化因子 Tat、Gal4-TBP に NS3/4A ウイルスプロテアーゼにより切断される領域と膜に局在する領域を融合させたキメラ転写活性化因子を作製し、唯一 HCV の感染が認められているヒト肝癌細胞である Huh7 細胞に導入することで、HCV 感染時のみ目的のレポーター遺伝子を活性化するというレポーターシステムを構築した。その結果、現在使用可能である感染性ウイルスである JFH-1 株を作製した細胞株に接種したところ、HCV 感染時のみ切断を受けたキメラ転写因子は核に移行し、目的のレポーター遺伝子（ルシフェラーゼ遺伝子）を誘導することが確認された。このレポーター遺伝子の発現は現在の治療で用いられているインターフェロンや、患者血清および感染受容体である CD81 に対する抗体などで細胞を処理することで、濃度依存的に減少することが確認された。この細胞株を HCV 阻害剤のハイスループットスクリーニングに応用したところ、約 1300 種類の化合物の中から、数種類の HCV 阻害剤候補分子を同定することができ、このシステムは新規薬剤の発見にも有用であることが示された。また、レポーター遺伝子として細胞表面マーカー因子である LNGFR 遺伝子を用いることで、HCV 感染細胞のみを細胞表面マーカーを指標に磁気分離することができた。

#### 〔 総 括 〕

本研究で樹立した HCV 感染指示細胞株は、HCV の感染・複製を高感度かつ簡便に検出および定量できるだけでなく、薬剤スクリーニングや感染細胞の単離への応用が可能であることが示された。

#### 論文審査の結果の要旨

我が国には200万人ものC型肝炎ウイルス(HCV)の感染者が存在している。新規治療法の導入によりC型肝炎の著効率は大きく改善したが、より有効な治療法の開発が急務である。特定の細胞株で増殖可能なHCVの実験室株が樹立されたが、C型肝炎患者血清からHCVを分離培養するシステムは未だ確立されていないことが、有効な治療法の開発の大きな障害となっている。そこで、申請者はHCVの感染により転写因子が特異的に活性化させて、感染を簡便に検出できる指示細胞株を樹立した。この細胞株を用いた化合物ライブラリーのスクリーニングにより、複数のHCV感染阻害活性を示す候補の化合物を見出しており、治療薬の開発にも寄与できるものと考えられる。以上のことから、申請者の研究は医学領域において価値あるものであり、本医学系研究科からの学位授与に相当すると考えられる。