

Title	The Hepatitis B Virus Genotype Affects the Persistence of Viral Replication in Immunodeficient NOG Mice
Author(s)	横山, 恵信
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/55828
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	横山 恵信
論文題名 Title	The Hepatitis B Virus Genotype Affects the Persistence of Viral Replication in Immunodeficient NOG Mice (免疫不全であるNOGマウスにおいて、B型肝炎ウイルスゲノタイプはウイルス複製の持続性に影響を与える。)
論文内容の要旨	
[目的 (purpose)]	
B型肝炎ウイルス (HBV) には少なくとも8種類のゲノタイプが報告され、その分布には地域差がある。従来、日本ではゲノタイプCが主な感染源であったが、近年、主に性交渉を介し、外来種であるゲノタイプAの急性感染例が増加、HBV慢性感染患者におけるゲノタイプAの割合も増加している。ゲノタイプAの急性感染例は他のゲノタイプ感染例よりも慢性感染に至りやすい。また、ゲノタイプAの急性感染では、ゲノタイプCに比べ、感染後の血清ALTの上昇が小さく、血清中HBV-DNAのピークが高いと報告されている。これらの報告から、ゲノタイプAでは肝障害が生じにくくHBVが排除されにくいと、慢性化しやすい可能性が示唆される。HBV感染によるウイルス排除には、宿主免疫の関与が報告されているが、ゲノタイプAは他のゲノタイプより、宿主の免疫寛容を誘導しやすいと報告されている。このゲノタイプによる宿主免疫反応の差が、HBV発現量や慢性化率の違いに関与することが示唆されている。しかし、HBVゲノタイプによるウイルス発現量の差について、免疫非依存的な機構の検討は十分になされていない。そこで本研究ではHBVのゲノタイプによるウイルス発現の差に対する免疫機構以外の関与について検討した。	
[方法ならびに成績 (Methods/Results)]	
HBVゲノタイプAを発現するプラスミドpA及びHBVゲノタイプCを発現するプラスミドpCを作成し、肝癌由来細胞であるHuh7に強制発現し、比較検討した。プラスミドの発現効率の同等性はpCMV-SEAPを共発現させることで確認した。プラスミド強制発現後4日目と7日目の比較にて、ゲノタイプCではAに比べ、ウイルスマーカーがより減少する変動を示し、ウイルスがより排除される結果であった。Z-VAD-FMKによるアポトーシス抑制実験において、Z-VAD-FMK非添加群では上清中のHBV-DNA量が、発現後7日目においてゲノタイプAでCよりも高い結果となったが、添加群ではその差が消失する結果となった。この結果からゲノタイプC発現細胞ではゲノタイプA発現細胞に比べ、アポトーシスが生じている可能性があると考えた。培養細胞での検討では長期培養によるウイルス動態の観察が難しく、またプラスミドが導入されていない細胞の増殖による影響が大きいことから、これ以上アポトーシスの差を明瞭に検出することは難しいと考えられた。そこで、導入肝細胞での長期の検討が可能で肝細胞の無制限な増殖がないと考えられるマウスの肝臓で検討することとした。免疫不全マウスであるNOGマウス肝に急速静注法を用いて各プラスミドを強制発現させた。強制発現後1日で採取した肝組織をHBc抗原により免疫染色すると、ゲノタイプA、C共にその発現を確認できたが、その発現肝細胞数に両群間で差を認めなかった。このことから、各プラスミドは同等に投与できていると判断した。ゲノタイプAにおいて血清中のHBV-DNA及びHBs抗原、HBe抗原は強制発現後5ヶ月でも検出し得たのに対し、ゲノタイプCでは3ヶ月で検出感度未満となった。強制発現後5ヶ月におけるHBc抗原陽性肝細胞については、ゲノタイプAでは検出し得たが、ゲノタイプCでは検出されなかった。これらHBVゲノタイプの差に、1型IFNの関与を疑い、強制発現後3日における肝組織での1型IFN発現及び、IFN誘導遺伝子発現について検討を行ったが、ゲノタイプ間に明らかな差は認めなかった。一方、強制発現後3日における肝組織を用いたCleaved caspase 3の免疫染色ではゲノタイプCでAよりも陽性細胞が多く検出され、ゲノタイプCを投与した肝組織でよりアポトーシスが生じていることが考えられた。また、HBc抗原とcleaved caspase 3により蛍光二重免疫を行うと、ゲノタイプCにてより多くの肝細胞が共染色された。これらの結果から、ゲノタイプCを発現した肝細胞ではゲノタイプAに比べ、よりアポトーシスを生じやすいことが示唆された。	
[総括 (conclusion)]	
免疫細胞非存在下においても、HBVゲノタイプC発現肝細胞はゲノタイプA発現肝細胞よりアポトーシスがより多く誘導され、HBV発現は持続しなかった。HBVゲノタイプによるウイルス発現の差に対する、免疫細胞非依存的な肝細胞アポトーシスの関与が示唆された。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 横山 恵信			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	竹原 敏一郎
	副 査	大阪大学教授	工田 裕次
	副 査	大阪大学教授	松浦 善次
論文審査の結果の要旨			
B型肝炎ウイルス（HBV）ゲノタイプAの急性肝炎患者ではゲノタイプCに比べ、慢性肝炎に至りやすいことが知られている。これまで、免疫細胞によるウイルス排除の違いが原因であると報告されてきたが、免疫細胞非依存的な機構の関与については不明であった。本論文では、肝癌由来細胞Huh7及び免疫不全マウスであるNOGマウスの肝臓に対するHBV発現プラスミドの強制発現実験を通して、免疫細胞非存在下でもHBVゲノタイプAがゲノタイプCよりも感染が持続することを示すと共に、ゲノタイプCの感染肝細胞ではゲノタイプAに比べアポトーシスが多く誘導されることを示した。これらの結果は、HBV複製の持続性に免疫細胞に依存しない肝細胞アポトーシスが関与することを示唆する。本論文はB型急性肝炎が慢性肝炎に至る機序の解明に貢献し、B型急性肝炎の慢性化を抑制する治療の開発につながることを期待され、学位の授与に値すると考えられる。			