



Title	Sodium taurocholate cotransporting polypeptide inhibition efficiently blocks hepatitis B virus spread in mice with a humanized liver
Author(s)	中堀, 輔
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61557
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、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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	中堀 輔
論文題名 Title	Sodium taurocholate cotransporting polypeptide inhibition efficiently blocks hepatitis B virus spread in mice with a humanized liver (Na依存性胆汁酸トランスポーター (NTCP) の抑制はヒト肝細胞キメラマウスにおいてB型肝炎ウィルス (HBV) の感染拡大を抑制する)
論文内容の要旨 〔目 的(Purpose)〕 B型肝炎はHBVの持続感染が原因であり、肝硬変や肝発癌の危険を伴う。患者は本邦において100万人以上存在し、国内最大の感染症の一つである。既存の治療薬では肝炎の鎮静化や肝線維化進展の抑制および肝細胞癌発生の抑止に留まり、ウイルス排除によるB型肝炎の治癒という最終的な目標を達成することはできない。そのため、新たな治療が必要である。 NTCPはHBVのレセプター候補の一つであると近年報告された。しかし、効率よく感染が成立する培養細胞や小動物モデルが少なく、解析モデルに伴う制限がB型肝炎研究の障壁となり、NTCPを標的とする治療効果の検討は不十分であった。そこで本研究では、ヒト肝細胞キメラマウスおよびB型肝炎患者臨床検体を用い、ヒトNTCPのB型肝炎における治療標的の可能性について解析を行った。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 ヒト肝細胞キメラマウスから2段階コラゲナーゼ灌流法を用い、初代培養ヒト肝細胞を単離した。採取した初代培養ヒト肝細胞は1カ月以上培養することが可能であった。ヒト肝細胞キメラマウスより単離した初代培養ヒト肝細胞にHBV組み込み細胞で作成したHBV 500GEq (Genome Equivalent)/cellを接種すると、接種5日後培養上清中にHBV DNA、HBs抗原を検出した。その後、培養上清中のHBV DNAは7 log copies/ml程度にて推移し、HBs抗原は接種15日後に147.8±6.9 IU/mlに達し、1カ月以上増減なく推移した。ヒト肝細胞キメラマウスより単離した初代培養ヒト肝細胞にsiRNAを用い、ヒトNTCPの発現を抑制した後にHBV 500GEq/cellを接種すると、接種10日後の培養上清中のHBV DNA、HBs抗原、肝細胞内cccDNAはNTCP knock down群では有意に低下した。次に、ヒト肝細胞キメラマウスに患者血清由来HBV 1.0×10⁶ copiesを接種した。血清HBV DNAは接種2週後より検出され、接種10-12週後に6-8 log copies/mlにてプラトーに達し、その後もウイルス血症は持続した。肝組織内のHBs抗原陽性細胞はHBV接種後1週目からわずかに検出され (HBs抗原陽性細胞比率: 1.7±0.3%)、血清HBV DNA値の上昇に伴い、HBs抗原陽性細胞比率も増加した。血清HBV DNA値がプラトーに到達する接種10週後には、92.9±2.8%のヒト肝細胞がHBs抗原陽性となった。このin vivo感染モデルを用い、HBV接種前後にNTCP siRNAを3回投与し、NTCPの発現を抑制すると、HBV接種2週後の血清HBV DNA、HBs抗原および細胞内cccDNA、pregenomeRNA (pgRNA) は有意に低下した。また肝組織内のHBs抗原陽性細胞比率はNegative control siRNA投与マウスに比し有意に低値であった。一方で、ほとんどすべてのヒト肝細胞で感染が成立しているHBV接種13週目以降にNTCP siRNAを3回投与し、NTCPの発現を抑制しても、血清HBV DNA、HBs抗原および肝細胞内cccDNA、pgRNAは変化しなかった。未治療のB型肝炎患者肝組織 (肝生検試料 (24例) および肝細胞がん切除組織非癌部 (5例)) をHBs抗原に対する抗体を用い免疫染色を行い、HBs抗原陽性細胞比率を解析した。臨床検体ではHBs抗原が陰性となる肝細胞が存在し、HBs抗原陽性細胞比率は血清HBV DNA値 (r=0.590, p<0.01)、血清HBs抗原値 (r=0.450, p=0.01) と有意な相関関係を認め、HBe抗原陽性例ではHBe抗原陰性例と比較し、有意な高値を呈した (p=0.02)。 〔総 括(Conclusion)〕 NTCPの発現を抑制することによりHBV感染の拡大は抑制された。このNTCP抑制による抗ウイルス効果はHBs抗原陰性細胞の存在下において発揮された。臨床検体を用いた解析では生体内にはHBs抗原陰性肝細胞が存在することが示され、NTCP阻害はB型肝炎の新たな治療標的となる可能性が示唆された。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 中堀 輔			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	竹原 敏彦
	副 査	大阪大学教授	山田 隆次
	副 査	大阪大学教授	山田 隆次

論文審査の結果の要旨

B型慢性肝炎は国内最大の感染症の一つである。既存の治療薬ではウイルス排除によるB型肝炎の治癒という最終的な目標を達成することはできない。そのため、新たな治療が必要である。しかし、効率よくB型肝炎ウイルス（HBV）の感染が成立する培養細胞や小動物モデルが少なく、解析モデルに伴う制限がB型肝炎研究の障壁となっている。

本論文では、ヒト肝細胞キメラマウスを用い、*in vitro*および*in vivo*においてHBV持続感染モデルを作成した。作成した感染モデルを用い、HBVのレセプター候補の一つであると近年報告されたNTCPの発現を抑制することによりHBV感染の拡大は抑制され、その抗ウイルス効果はHBs抗原陰性細胞の存在下において発揮されることを示した。また、B型慢性肝炎臨床検体を用いた解析では、免疫組織化学染色法を用い、生体内にはHBs抗原陰性肝細胞が存在することを示した。

これらの結果からNTCP阻害がB型慢性肝炎の新たな治療となりうる可能性が示唆され、今後NTCPを標的としたB型慢性肝炎の新規治療薬の開発が期待される。本論文は学位の授与に値すると考えられる。