

論文審査の結果の要旨

氏名 ^{チェン}陳 ^{シン}欣 ^{ウェイ}蔚

CHEN SHIN-WEI

本論文は5つの章からなる。第一章での序論に続き、第二章では材料と方法、第三章では研究結果、第四章では考察、第五章では結論が記述されている。

B型肝炎ウイルス（HBV）は肝細胞に感染し、肝炎、肝硬変、さらに肝がんを引き起こす。世界で4億人、日本で100~140万人がHBVに持続感染していると推定されており、大きな社会問題になっている。HBVはDNAウイルスであり、肝細胞に発現するNa依存性胆汁酸トランスポーター（NTCP）を介して細胞内に侵入し、核内にて環状二重鎖cccDNAを形成、転写、細胞質における翻訳、コア粒子形成、逆転写、ウイルス粒子の形成という複雑な生活環を示す。この複雑な生活環はB型肝炎治療法の開発を困難にしており、それを忠実に再現する*in vitro*の実験系が必要とされている。HBV感染実験系としては、一般に初代培養肝細胞や肝がん細胞株などが使われているが、HBVには多数の遺伝子型があり、感染には宿主の遺伝背景が大きく影響する。入手可能な初代培養肝細胞や肝がん細胞株には限りがあり、そうした課題への対応は困難である。一方、iPS細胞は不特定多数のドナーから作製可能であり、iPS由来の肝細胞は、そうした課題にも対応可能である。しかし、iPS由来の肝細胞は一般に未成熟であり、HBVの感染効率も低い。

本論文において、申請者はヒトiPS由来肝細胞を使ったHBV感染系の樹立を目指して研究を開始した。肝臓の発生過程では、肝細胞の分化成熟には肝非実質細胞である類洞内皮細胞（LSEC）や星細胞（HSC）が関与することから、申請者は、iPS由来肝細胞とこれらとの共培養系を構築し、LSECがHBVの感染を促進することを見出した。さらに、NTCPを過剰発現する肝癌細胞株においてもLSECがHBVの感染を促進することを確認した。そこで、サイトカインアレーにてLSECの培養液を解析したところ、EGFが高発現しており、それがHBVの感染を促進することを明らかにした。すでにEGF受容体（EGFR）はNTCPを介するHBVの細胞内への取り込みのco-receptorであるとの報告はあったが、申請者の結果は2 ng/ml EGFはHBV感染を促進したが、50 ng/ml EGFはむしろHBVの感染を阻害するという興味深いものであり、申請者はこの現象を深く掘り下げて検討した。

EGF は細胞表面の EGFR の dimerization とチロシンリン酸化を誘導して、それにより EGFR は細胞内へ取り込まれる。EGFR の internalization には clathrin-mediated endocytosis (CME) と clathrin independent endocytosis (CIE) 経路がある。さらに、この反応は EGF の濃度依存性がある。低濃度の刺激では CME クラスリン依存性 endosome に取り込まれた EGFR は細胞膜にリサイクルされる。一方、高濃度 EGF による刺激ではクラスリン非依存性経路で取り込まれた EGFR は endosome から lysosome に移行し分解される。そこで、EGF による HBV 感染制御において、これらの経路の関与を解析した。CME の阻害剤により低濃度 EGF による HBV の取り込み促進は阻害された。CIE 阻害剤は、低濃度 EGF による HBV の取り込み促進に影響を与えなかったが、高濃度 EGF による HBV の取り込み抑制は解除された。さらに、lysosome の阻害剤であるクロロキンにより高濃度 EGF による HBV の取り込み阻害が解除された。すなわち、高濃度 EGF による HBV 感染阻害は CIE 経路により取り込まれた HBV が lysosome に送られて分解されると考えられる。さらに HBV の細胞への結合を詳細に解析した結果、NTCP を過剰発現してない HepG2 細胞にも HBV は EGFR と EGF に依存的に結合することを見出した。すなわち、HBV は NTCP を介さずに EGFR を介して細胞内に取り込まれる新たな経路の存在が示唆された。

LSEC は肝臓特有の血管壁である類洞壁を構成する細胞であり、血中の HBV は類洞壁を通過して肝細胞に感染する。したがって、LSEC が EGF を分泌し、さらに EGF が HBV の肝細胞への感染効率に影響するという in vitro での実験結果は、in vivo においても LSEC が HBV の肝細胞への感染に関与するという新たな可能性を示唆するものである。

なお、本論文は、姫野美沙緒、木戸丈友、宮島篤、杉山真也、溝上雅史、西辻裕紀、下遠野邦忠との共同研究であるが、申請者が主体となって実験および考察を行ったものであり、申請者の寄与が十分であると判断する。したがって、博士（理学）の学位を授与出来ると認める。