

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 鈴木 まりこ

本研究は、効率的な *in vitro* の B 型肝炎ウイルス (HBV) ゲノム複製系の構築するため、小型の HBV ゲノム搭載アデノウイルスベクター (AdV) を用いた「HBV103-AdV システム」開発し、HBV 研究で汎用される培養細胞において本システムの HBV ゲノム複製実験系としての評価を行ったものであり、以下の結果を得ている。

1. 本システムでは全長 pregenomic RNA (pg RNA) の転写に必要な HBV ゲノム上の重複配列を、従来の pg RNA 発現単位よりも短い 1.03 コピー HBV ゲノムを CMV プロモーターと  $\beta$ -globin poly(A) 配列で構成される発現単位に応用した。HBV ゲノム由来でない外来のプロモーターと poly(A) 配列の pg RNA 発現単位への応用は本研究が初であり、HBV ゲノム内在性プロモーターと poly(A) 配列で構成される発現単位と比較すると 30-50 倍の pg RNA 量を示した。Southern blot による解析では、効率的な pg RNA の転写が培養細胞内で大量の複製 HBV ゲノムの生成を誘導したため、新規 pg RNA 発現単位を応用した本システムは効率的な *in vitro* の HBV ゲノム複製に有用であることが示された。
2. 本システムで用いた第一世代 AdV は HBV 研究で汎用される肝細胞癌由来 HepG2 細胞や、ヒト化マウスの初代肝細胞である PXB 細胞に高い感染効率を示し、搭載した pg RNA 発現単位を大量に、尚且つより多くの細胞に均一に導入可能である。そのため、リポフェクタミンによる HBV ゲノム挿入プラズミドの細胞への導入によって生成される複製 HBV ゲノム量と比べて、本システムは HepG2 細胞において 10 倍以上の複製 HBV ゲノム量を生成することを確認した。
3. pg RNA 発現単位の効率化や AdV の応用によって *in vitro* の HBV ゲノム複製効率を上昇させた本システムは、わずか 4 日間の細胞培養で複製 HBV ゲノムの検出が可能であり、抗 HBV 化合物のスクリーニングに大きな利点である。本システムを用いて独立した実験間で生成される複製 HBV ゲノム量、および複製 HBV ゲノム検出におけるシグナルとバックグラウンドの数値を用いて算出される Z' 値は 0.64 であった。この値はハイスループットなスクリーニングの系として信頼できる基準である 0.5 を上回っており、本システムのスクリーニングへの有用性が示された。

以上、本論文は新規 pg RNA 発現単位を搭載する AdV を用いた HBV ゲノム複製系を構築し、本システムが抗 HBV 化合物のハイスループットなスクリーニングにも応用可能な精度の HBV

ゲノム複製系であることを報告した。HBV 持続感染者から完全にウイルスを除去する治療法が確立されていない HBV 感染症において、本研究は新薬の開発の一つの手段として貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。