



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on hepatitis C virus infection in human B cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	中井, 正人
Description	配架番号 : 2117
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11511号
Issue Date	2014-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57204
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Masato_Nakai_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 中井 正人

	主査	教授	笠原	正典
審査担当者	副査	准教授	森松	組子
	副査	教授	瀬谷	司
	副査	教授	坂本	直哉

学 位 論 文 題 名

Studies on hepatitis C virus infection in human B cells
(ヒト B 細胞における C 型肝炎ウイルス感染に関する研究)

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は全世界で重要な健康問題であり、肝癌・肝硬変といった病態につながる主たる原因である。HCV は肝細胞指向性のウイルスである一方で HCV 慢性感染患者ではさまざまな肝外合併症、特にリンパ増殖性疾患や B 細胞性非ホジキンリンパ腫の合併の合併がみられる。これまで HCV-RNA が C 型慢性肝炎患者の末梢血単核球 (PBMC)、特に B 細胞から検出されるという報告が複数あり、リンパ球の中でも B 細胞への HCV 感染が想定されているが、*in vitro* におけるリンパ球への HCV 感染については明らかになっていない。申請者は EBV にて不死化し作成した B 細胞株 (EBV-LCLs)、初代 B 細胞の HCV 感染感受性について、感染性の高い HCVcc (J6JFH1、Jc1/GLuc2A) を用いた感染実験を *in vitro* にて行った。EBV-LCLs では感染性を証明できなかったが、初代 B 細胞における感染の成立を定量 PCR 法、strand-specific qPCR 法、免疫蛍光染色を用いて証明した。また、初代 B 細胞の感染に関して HCV エントリーレセプターの一つである CD81 の阻害抗体を用いたエントリー阻害、リコンビナント IFN α および NS3/4A プロテアーゼを用いた複製阻害を行い、それぞれで感染が阻害されることを示した。また、HCV 感染初代 B 細胞の上清とライセートを用いて、HuH7.5.1 細胞への再感染性を検討することで、HCV 感染 B 細胞における HCV 粒子の会合・放出を認めないことを示した。さらに J6JFH1 感染 B 細胞において、活性化マーカー発現細胞の増加および生存細胞の増加を示し、J6JFH1 感染が B 細胞の活性化と生存延長に寄与する結果を示した。

審査にあたり、まず副査の森松准教授より、免疫染色における B 細胞の感染細胞の割合についての質問があった。申請者は、「感染 6 日後での感染細胞の比率がおよそ 1% 以下であり、B 細胞の *in vitro* での 6 日後の生存率が 1~2% 程度であることを考慮すると、実際には感染細胞が全て生存すると仮定して 1/10000 程度となるものと考えられる」と回答した。また、同准教授より、J6JFH1 感染細胞の比率に対して、FACS で活性化している細胞が多いように思われる理由について質問があった。申請者は「B 細胞の HCV による活性化は、過去に CD81-E2 の engagement によるもの、BAFF による活性化などの報告があり、感染細胞以外にも、上記のような機序で活性化しているものがあるために比率が多く見える可能性がある。また、実際には感染初期に感染した細胞が活性化しているが、ある程度時間経過とともに死滅する可能性が考えられ、これにより比率の差が生じていると考えられる」と回答した。

次に副査の瀬谷教授より、健常人において EBV 陽性、陰性の人では HCV 感染性は異なるのか、という質問があった。申請者は、「健常人の PBMC では EBNA-LP や LMP-1 などの潜在感染マーカーは陰性を示したが、これらは 2,3 型の EBV 潜伏感染マーカーであり、陰性を示しても成人の多くが EBV に既感染であると考えられるため、今回の実験で用いた初代 B 細胞も EBV 既往感染者のものと考えられる。未感染者との比較に関しては今後の検討課題としたい」と回答した。

次に副査の坂本教授より、なぜ J6 の構造領域が感染性に寄与すると考えられるのか、との質問があった。申請者は「構造領域は複製には関与しないため、細胞の侵入の段階で J6 の構造領域が重要である可能性が考えられる。ただし今回用いた J6JFH1 は J6 構造領域を持たないその他の HCVcc(JFH1 など)よりも感染・複製効率が非常に高いため、J6 構造領域を持たない他のウイルスも実際には初代 B 細胞へ感染できるものの、その検出が困難という可能性も考えられる」と回答した。

主査の笠原教授より、HCV 患者のどれくらいがクリオグロブリン血症を生じるのかとの質問があり、申請者は「文献的報告を示し非感染患者と比較すると有意に多いとの報告が多数ある。」と回答した。また、同教授より、今回の EBV-LCLs では感染性は認められなかった一方で 1999 年 EMBO J では EBV によって感染性を認めている。この違いに関してはどのように考察するか、との質問があり、申請者は「本研究では経時的な RNA の増加がないことから感染性が証明できなかったと考えた。しかし B 細胞株においては感染の効率・複製の効率が低く、非感染細胞が経時的に増加するため、もし少数の B 細胞株が感染しても RNA の経時的な増加は認められない可能性があること、当該論文において感染実験で用いた HCV は患者血清由来であり、これまでも患者血清の中でリンパ球指向性を示すものがあるという報告が複数存在することから、実験室株と患者株のウイルスの違いが最も結果の差異に関与していると考えられる。本研究は実験室株を用いて証明した点で、意義のあるものと考えている。」と回答した。

本研究の基礎論文は *Viral Immunology* に掲載されている。また、本研究の成果は B 細胞における HCV 感染と続発する混合性クリオグロブリン血症や悪性リンパ腫発症機序の解析に寄与するものと考えられる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。