

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 中井 正人

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)

【背景】 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。近年、ペグインターフェロン+リバビリン+NS3/4A プロテアーゼインヒビター併用療法が用いられるようになり、難治例といわれる Genotype1b 高ウイルス量症例においても、80%程度以上のウイルス排除が得られるような治療が臨床において用いることができるようになってきている。HCV は肝細胞指向性のウイルスであり、臨床医療においては肝疾患の進展が問題となるが、一方で HCV 慢性感染患者ではさまざまな肝外合併症を生じることがある。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は、疫学的に HCV 感染者に多く認められることが報告されており、主たる肝外合併症である。しかし、この発症機序はいまだ不明であり、その解明は重要な課題である。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 感染が考えられている。中でもリンパ球指向性を示す特殊な HCV が B 細胞株 (Raji 細胞) へ感染したことが報告されており、B 細胞への HCV 感染を示唆するものと考えられる。しかし、*in vitro* におけるリンパ球への HCV 感染については、肯定的なものだけではなく、否定的な報告も複数認められている。そのため、リンパ球における HCV の感染性に関しては長く議論されてきたが、一定の結論は出されていない。また、EBV が HCV 感染のヘルパーウイルスとして働くという報告もあり、EBV により不死化したリンパ芽球様細胞株 (EBV-LCLs) は B 細胞への HCV 感染性を示す候補となる可能性が考えられる。

【目的】 本研究では、EBV にて不死化し作成した B 細胞株、初代 B 細胞の HCV 感染感受性について *in vitro* にて検討した。また感染後に生じる B 細胞の変化について検討することを目的とした。

【方法】 健常人より比重遠心法・MACS 法にて初代 B 細胞を分離した。また、初代 B 細胞から EBV を用いて不死化し、EBV-LCLs を作成した。感染性の高い HCVcc (J6JFH1、Jc1/GLuc2A) を作成し、これらを用いて EBV-LCLs および初代 B 細胞への感染実験を行った。感染の成立に関して、定量 PCR 法、strand-specific qPCR 法、免疫蛍光染色を用いて検討した。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、阻害の有無を検討した。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・放出の有無を検討した。さらに、HCV感染の有無が、初代B細胞の活性化と生存延長に及ぼす影響を検討した。

【結果】EBV-LCLsに対し、J6JFH1を感染させた場合、HCV-RNAは経時的に減少し、有意な感染複製を示唆するデータを得ることはできなかった。一方、初代B細胞に対し、MOI=1にてJ6JFH1を感染させると、HCV-RNAはDay6まで経時的にわずかながら増加を認めた。これは非B細胞や単球系細胞では認められなかった。また、複製中間産物であるマイナス鎖HCV-RNAの増加が確認され、実際にB細胞においてHCV複製が行われていることを示唆する結果を得た。また免疫蛍光染色法にて、HCVの非構造領域蛋白であるNS5Aが弱いながらも発現していることを確認した。阻害実験において、このHCV-RNAの経時的増加は抗CD81阻害抗体によるHCVエントリー阻害、Type IインターフェロンおよびNS3/4Aプロテアーゼによる複製阻害にて増加が抑制された。この所見からは、B細胞においても、HCVはCD81依存的に細胞へエントリーし、IFN α 依存的に複製が抑制されることを示唆する結果であった。ただし、肝細胞株であるHuH7.5.1細胞と比較すると、その効率は非常に低いものであった。他のHCVccを用いた感染実験においては、分泌型ルシフェラーゼをコードしたJc1/Gluc2A株を用いた場合に、HCV複製を示唆する所見を認めた。さらに、J6JFH1感染B細胞において、非感染細胞と比較した場合、CD80/CD86の活性化マーカーの発現上昇、7AAD/AnnexinV陰性細胞の増加、ATPの増加を認め、J6JFH1感染がB細胞の活性化と生存延長に寄与する結果が得られた。

【結語】本研究の所見から初代B細胞がHCVcc感染を示すことが示唆された。また、初代B細胞におけるHCV感染がその活性化と生存延長に寄与する可能性が示唆された。