

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 黄 瑛

C型肝炎ウイルス (Hepatitis type C Virus; 以下HCVと略す) は世界で1億7千万人以上が感染していると推定され、医療上もっとも重要な感染症の一つである。C型肝炎治療薬開発の最大の問題となっているのは、培養細胞での効率よい感染系がないことである。HCVはヒトまたはチンパンジーなどにしか感染せず、しかも培養肝臓由来細胞でも増殖効率は極めて低い。

本論文で黄は、C型肝炎の新たな治療薬開発のための基盤技術として、C型肝炎の増殖にかかわる非構造領域蛋白 (non-structural proteins; 以下NSと略す) のヒト肝臓癌由来細胞での包括的発現を試みた。NS蛋白にはNS2、3、4A、4B、5A、5Bの6種類があるが、これら全部を発現すると細胞の生育が悪くなり長期維持が困難なことが報告されている。そこで黄は、遺伝子を特定の薬物不在下でのみ誘導できるシステムの開発を試みた。ヒト肝臓癌由来HepG2細胞に、テトラサイクリン誘導システムの遺伝子を導入し、極めて効率よくテトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリン濃度を減少させると遺伝子が発現させる細胞株を樹立した。今回樹立したHY-Toff細胞はドキシサイクリンの非存在下で存在下に比べ300倍の誘導倍率がみられた。HY-Ton細胞は、逆に存在下で50倍の誘導を示した。これらの細胞は、目的遺伝子発現を正確に調節することができる、特に細胞毒性遺伝子の発現に有効な、安定的細胞系であることを示している。

この細胞に、双方向ベクターを用いてNS構造配列と蛍光標識発現マーカーであるEGFPを共発現させ、EGFP蛍光をマーカーに抗生物質で選択した48クローンから選択されたHY-Toff-NSは、NS全長のmRNAを多量の誘導できることを認めた。HY-Toff-NSは、特異的抗体を用いて検討したNS3、4A、4B、5A、5B蛋白も多量に発現することがわかった。この細胞は現在まで8ヶ月をこえて安定的に培養でき、NS蛋白を誘導でき、細胞の形は正常のままである。

HCVのNS蛋白誘導にともなう細胞の変化の検索ため、DNAマイクロアレイ法により、6000個以上のRNA量の変動を、NS蛋白誘導前後において検索した。その結果10種類以上の変動する遺伝子がプロファイリングされ、その中の数種の遺伝子については誘導がノーザン解析でも確認された。

本研究による、HCVのNS蛋白群を包括的にテトラサイクリン誘導で発現するヒト培養肝臓癌由来細胞系の樹立は、HCV蛋白の発現、プロセッシングや成熟機構、複製機構の解明という基礎研究と、治療薬の開発、スクリーニングの両面に大きな寄与が期待される。

よって本論文は、博士(学術)の学位請求論文として合格と認められる。