

これらはHBVの感染に関与する高親和性受容体である可能性がある。来年度以降は、このタンパク質の同定、更には感染受容体である事の検証を行っていく。

また同時に、One cell pick up 装置を使用したヒト肝臓細胞からの網羅的スクリーニングも並行して実施し、多角的なアプローチでHBV感染受容体の同定を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Nano-visualization of oriented-immobilized IgGs on immunosensors by high-speed atomic force microscopy. Iijima, M., Somiya, M., Yoshimoto, N., Niimi, T., and Kuroda, S. *Sci. Rep.* 2 (2012) 790 (5 pages).

2) An automated system for high-throughput single cell-based breeding. Yoshimoto, N., Kida, A., Jie, X., Kurokawa, M., Iijima, M., Niimi, T., Maturana, A. D., Nikaido, I., Ueda, H.R., Tatematsu, K., Tanizawa, K., Kondo, A., Fujii, I., & Kuroda, S. *Sci. Rep.* 3 (2013) 1191 (9 pages).

3) Cell surface-fluorescence immunosorbent assay for real-time detection of hybridomas with efficient antibody secretion at the single-cell

level. Kida, A., Iijima, M., Niimi, T., Maturana, A. D., Yoshimoto, N., and Kuroda, S. *Anal. Chem.* (2013) in press.

2. 学会発表

該当なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
分担研究報告書

HBV エンベロープタンパク質と相互作用する
細胞膜表面分子の網羅的探索

研究分担者：黒木 和之 金沢大学がん進展制御研究所 准教授

研究要旨：HBV 感染に関わるウイルスレセプター等の宿主分子の探索・HBV 創薬研究に適した *in vitro* 感染系に利用可能な培養細胞を探索するため、HBV の感染成立を迅速・簡便に検出できるよう、自立的な増殖能を欠損し、かつ GFP や分泌型ルシフェラーゼをマーカー遺伝子として組み込んだ組換え HBV ベクターを構築した。また、これら組換え HBV 産生用に二種類のパッケージング細胞を樹立した。うち一種は HBV 蛋白質の発現を二つのレトロウイルスベクターに分担させることにより HBV ゲノム間の組換えによる野生型 HBV の出現を強く抑制するためのものである。これまで調べたヒト肝がん由来細胞株のなかで HuH7 が、2%DMSO を含む培養条件下でわずかであるが HBV の感染成立を認めた。

A. 研究目的

本研究の目的は HBV 初期感染に関わるウイルスレセプターを含む宿主分子群の同定およびこれら分子と HBV の interaction を阻害する化合物の探索・創薬を通じて HBV の感染・増殖を阻止する方策を得ることにある。この目的のため、今年度は、HBV の感染成立を迅速・簡便に検出できるよう、自立的な増殖能を欠損しかつマーカー遺伝子を組み込んだ組換え HBV ベクターを構築し HBV *in vitro* 感染系に利用可能な培養細胞系を探索することとした。

B. 研究方法

組換え HBV ベクターの構築

HBV は genotype A を用いた。元となる HBV

発現ベクターは CMV プロモーターより野生型 HBV pregenomic RNA を発現する pCSH4 プラスミドを用いた。組換え HBV ベクターでは、HBV ゲノムサイズが変わらず同一となるよう GeneArt (ライフテクノロジーズ) を使って S 蛋白質領域とマーカー DNA を置換した。

組換え HBV パッケージング細胞の作製

HBV 全蛋白質を発現するように構築したレトロウイルスベクターを HepG2 細胞に導入し安定的に組み込んだ株を樹立した。さらに、細胞内での DNA 組換えによる野生型 HBV の出現を抑えるため、HBV エンベロープ発現ベクターとその他すべての HBV 蛋白質の発現ベクターを別に作製し共に HepG2 細胞に安定的に組み込んだパッケージング細

胞を樹立した。

組換え HBV の産生と培養細胞への感染

組換え HBV ベクタープラスミド DNA を安定に組み込んだパッケージング細胞の培養液を研究に用いる。HBV を各種培養条件のもと、4%PEG8000 存在下で感染実験を行った。感染成立はまず RT-PCR による HBV mRNA の検出により検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、HBV ベクターを用いた実験を行うことから文部科学省の定める省令「研究開発等に係わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止処置等を定める省令」(平成 16 年文部科学省・環境省令第 1 号)・組換え DNA 実験指針・金沢大学研究用微生物安全管理規程等に則り本学安全委員会等の承認を得て、その指示の下で研究は進められる。

C. 研究結果

組換え HBV ベクターの構築

HBV の感染を迅速・簡便に検出できるようマーカー遺伝子 (GFP、YFP、分泌型ルシフェラーゼ GLuc や NanoLuc) を組み込んだ組換え HBV ベクター (HBV-YFP、HBV-NanoLuc 等) を構築した。これらマーカー遺伝子は HBV エンベロープ遺伝子プロモーターの制御下にあり HepG2、HuH7 細胞での発現が確認された。

組換え HBV パッケージング細胞の作製

HBV ゲノムから replication に必要な部位と polyA シグナルを取り除くが HBV 全蛋白質は発現するように構築したレトロウイルスベクターを HepG2 細胞に安定的に組み

込んだ HepG2PCA 細胞を樹立した。この細胞へ HBV-GLuc 用プラスミド DNA を導入すると組換え HBV-GLuc が培養液中へ産生されることを確認した。HBV エンベロープ発現用とその他すべての HBV 蛋白質発現用のレトロウイルスベクターをそれぞれ構築しこれらを HepG2 細胞に安定的に組み込んだパッケージング細胞 HepG2PH を樹立した。現在、組換え HBV 産生能について評価中である。

HBV in vitro 感染系について

HuH7 細胞は 2%DMSO 存在下の培養条件下で HBV の感染が認められた。が、その割合は全細胞の 0.1% 以下で、レセプター候補 NTCP 遺伝子を強制発現させても 1% 以下であった。肝がん由来培養細胞株 HepG2、Hep3B、HLE では感染が認められなかった。

D. 考察

HBV ベクターの改良について

組換え HBV のマーカー遺伝子の発現量を上げることは HBV 感染成立の検出感度をさらに高める上で重要である。マーカー遺伝子で利用した S 遺伝子プロモーターをより強力な CMV プロモーターなどと置き換えることによりマーカーの発現を高め HBV 感染をより容易に高感度に検出できると考えている。また、ベクターとしてより安全性を高めるため全 HBV 遺伝子に変異を導入した組換え HBV を構築し現在評価中であるが、更に core などの HBV 遺伝子のプロモーターを不活化についても検討している。

HBV in vitro 感染系について

HuH7 細胞は分化誘導により HBV に感染可能となるが、現在唯一の HBV in vitro

感染系である HepaRG 細胞と比べると効率は低い。レセプター候補 NTCP の強制発現によっても期待したほど感染効率が上がらないことから HBV 感染の分子メカニズムは複雑であることが予想される。現在、iPS 細胞の分化誘導によって得られるより均質な肝細胞が HBV in vitro 感染系として有用であると考え研究を始めている。

E. 結論

マーカー遺伝子として GFP、YFP、または分泌型ルシフェラーゼ (GLuc や NanoLuc) をもつ組換え HBV ベクターを構築した。

組換え HBV 産生のためのパッケージング細胞を二種樹立した。

HuH7 細胞は、2%DMSO 存在下で効率は低いですが HBV 感染する。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

HBV感染におけるリン酸化タンパク質の機能解析

研究分担者：岡本 徹 大阪大学微生物病研究所 助教

研究要旨：リン酸化酵素は、細胞内の様々なシグナル伝達に関与し、恒常性の維持に重要な役割を演じている。本研究では、HBV感染におけるリン酸化酵素の役割を検討するため、培養細胞を用いたスクリーニング系の構築を目的とした。近年、HBVの感染受容体候補として同定された、Na⁺依存的胆汁酸胆汁酸トランスポーターを発現するヒト肝細胞株を樹立し、HBVの感受性を評価したところ、感受性を確認できた。また、HBVの粒子産生の阻害活性を示すリン酸化酵素阻害剤を同定した。

A. 研究目的

HBVは肝癌を発症するウイルスであり、世界では4億人もの感染者が存在する。治療薬として逆転写阻害剤が用いられているが、著効率は低く、継続して服用しなくてはならない。ウイルスは宿主細胞への感染に、様々なリン酸化酵素の働きを利用している。HCVの感染にはEGFRからのリン酸化シグナルが、また、その複製にはフォスファチジルイノシトール-4-リン酸化酵素(PI4K)が重要であることが報告されている。本研究では、リン酸化酵素阻害剤を用いたスクリーニングにより、HBVの感染や複製に関与するリン酸化酵素の同定を目的とした。

B. 研究方法

HBVの*in vitro*感染モデルの構築を目指して、HBVの感染受容体候補分子として同定された、Na⁺依存的胆汁酸胆汁酸トランスポーター (NTCP)を過剰発現するHepG2細胞を作製し、HBVの感受性を検討した。また、130種類のリン酸化酵素阻害剤をHBVの感染性粒子を定常的に産生するHepG2.2.15細胞に作用させ、細胞の生存率、産生されたHBs抗原量を指標にしてHBVの増殖抑制効果を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、

利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

NTCPを過剰発現するHepG2細胞は、コントロール細胞に比べて、細胞内のウイルス量が10倍増加しており、HBVの複製が確認できた。また、顕著にHBV粒子の産生を阻害するリン酸化酵素阻害剤が認められた。それら阻害剤はある特定のリン酸化酵素をターゲットとする阻害剤であった。

D. 考察

NTCP発現HepG2細胞で有意なHBVの感染と複製が見られたことから、これらの細胞株を用いて感染阻害剤のスクリーニングが可能となると思われる。また、HBV粒子産生の阻害剤を同定できたことから、その作用機序を解明することによって、新しい抗HBV阻害剤の標的因子を提案できると考えられる。

E. 結論

NTCPをHepG2細胞に発現させることにより、HBVの*in vitro*アッセイ系が構築でき

た。また、HBV の粒子産生を阻害できるリ
ン酸化酵素阻害剤を同定できた。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Moujalled DM, Cook WD, Okamoto T,
Murphy J, Lawlor KE, Vince JE, Vaux
DL. TNF can activate RIPK3 and cause
programmed necrosis in the absence of
RIPK1. *Cell Death Dis*, 2013, Jan
17:4:e465
2. Okamoto T, Zobel K, Fedorova A, Quan C,
Yang H, Fairbrother WJ, Huang DC,
Smith BJ, Deshayes K, Czabotar PE.
Stabilizing the Pro-Apoptotic BimBH3
Helix (BimSAHB) Does Not Necessarily
Enhance Affinity or Biological Activity.
ACS Chem Biol, 2012, Dec 10. [Epub
ahead of print]
3. Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T,
Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani
W, Matsuura Y. Japanese Encephalitis
Virus Core Protein Inhibits Stress
Granule Formation through an
Interaction with Caprin-1 and Facilitates
Viral Propagation. *J Virol*, 2012, 87,
489-502.
4. Giam M, Okamoto T, Mintern JD,
Strasser A, Bouillet P. Bcl-2 family

member Bcl-G is not a proapoptotic
protein. *Cell Death Dis*, 2012, Oct
11:3:e404.

5. Okamoto T, Campbell S, Mehta N,
Thibault J, Colman PM, Barry M, Huang
DC, Kvensakul M. Sheeppox Virus
SPPV14 Encodes a Bcl-2-Like Cell Death
Inhibitor That Counters a Distinct Set of
Mammalian Proapoptotic Proteins. *J
Virol*, 2012, 86, 11501-11511.
6. Yamamoto M, Okuyama M, Ma JS,
Kimura T, Kamiyama N, Saiga H,
Ohshima J, Sasai M, Kayama H,
Okamoto T, Huang DC, Soldati-Favre D,
Horie K, Takeda J, Takeda K. A cluster of
interferon- γ -inducible p65 GTPases plays
a critical role in host defense against
Toxoplasma gondii. *Immunity*. 2012, 37,
302-12.

2. 学会発表

Kowaki T, Ngoc PH, Fukuhara T,
Okamoto T, Matsuura Y,
Identification of host factors interact
with hepatitis B virus X protein. 第
35 回日本分子生物学会年会、福岡、12
月 11 日-14 日, 2012

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

厚生労働科学研究費補助金 (B 型肝炎創薬実用化等研究事業)
分担研究報告書

細胞表面の糖鎖変化と HBV 感染に関する研究

研究分担者：三善 英知 大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学 教授

研究要旨：糖鎖は細胞表面の多くのタンパク質に結合し、その構造は炎症やがんに伴って変化することが知られている。特に肝臓では、肝疾患の進展とともに糖鎖遺伝子の発現が著変し、膜表面の多くの受容体タンパクの機能を調節している可能性がある。本研究では、N 型糖鎖の分岐構造を決定する糖転移酵素の遺伝子 (GnT-III, GnT-V, Fut8) を肝がん細胞 (Hep3B, Huh7, HepG2 など) に過剰発現させ、その細胞表面の糖鎖構造を解析するとともに、HBV の感染性の変化について BNC (Bionanocapsule) を用いて検討した。

A. 研究目的

HBV(B 型肝炎ウイルス)には肝細胞特異的な受容体の存在が示唆されるが、今日まで確実なものは同定されていない。恐らく、C 型肝炎ウイルス受容体のように複数のタンパクの複合体と想定される。一般的に、多くの膜表面のタンパク質には糖鎖が存在し、その機能を制御することが知られてきた。本研究では、細胞表面の糖鎖構造を変化させることによって、HBV の感染性がどのように変化するかを検討する。

B. 研究方法

GnT-V は N 型糖鎖の $\beta\beta 1-6\text{GlcNAc}$ 構造の生合成に関与し、GnT-III は bisecting GlcNAc という構造の形成に関与する。また、Fut8 は根元の GlcNAc にフコースを付ける機能を持ち、この構造をコアフコースと呼ぶ。これらの 3 つの糖転移酵素は正常の肝臓でほとんど発現せず、肝炎、肝臓に

なると発現が上昇する。これらの糖鎖遺伝子の cDNA を β アクチンをプロモータにもつ pCAGGS (大阪大学 宮崎純一教授から供与) に組み込み、発現ベクターとした。肝がん細胞 Huh7, Hep3B に、これらの発現ベクターを transfection し、G418 で selection の後、恒久的に目的の糖鎖遺伝子を高発現するクローンを樹立した。糖鎖遺伝子の発現は Western blot で確認し、細胞表面の糖鎖構造は各々の糖鎖遺伝子が作る糖鎖構造を認識する L4-PHA, E4-PHA, AAL などを用いた FACS で解析した。また肝芽腫細胞 Huh6 とこれに HBV genome を組み込んだ HB611 細胞も検討対象に加えた。HBV の疑似感染モデルとしては、名古屋大学の黒田教授が作成した Cy3 標識の Bionanocapsule(BNC)を用いた。BNC は HBs 抗原 (L 抗原) を表面に持ち、肝細胞、肝がん細胞特異的に感染することが知られて

いる。様々な糖鎖改変細胞に接着もしくはとりこまれた Cy3 標識の BNC を蛍光顕微鏡オールインワンで観察した。

(倫理面への配慮) 本研究は、細胞レベルの研究なので、臨床サンプルなどの倫理面での問題はない。遺伝子組み換え実験の承認は得ている。

C. 研究結果

3 種類の糖鎖遺伝子を高発現する肝がん細胞株を複数個得られた。これらのクローン化された細胞では、想定される糖鎖構造を認識するレクチンとの結合性の増加を FACS によって確認した。また、レトロウイルス感染系で、細胞全体のフコシル化が増強することを発見した。これらの細胞に BNC の感染実験を複数回行った。BNC の感染時間、濃度などの基礎的な条件検討を繰り返す中で、特に糖鎖改変細胞では細胞の密度により感染効率に差があるような傾向を見た。Huh6 に HBV を組み込むことで (HB611 細胞で)、劇的に糖鎖が変化していることを見出した。

D. 考察

24 年度は、以前に作成した糖鎖改変細胞に加えて、新たに何種類かの糖鎖改変肝がん細胞を作製した。また、Huh6 と HB611 の糖鎖構造と糖鎖遺伝子の発現パターンに違いがあることは、先行研究でわかっていたが、今回更にシアル酸やコアフコース構造の増加を確認した。また、いくつかの条件で BNC が感染することは確認できたが、

オールインワンの条件によってカウント数が一定しなかった。そこで、次年度は FACS を用いて、より定量的な方法での評価を検討してゆきたい。また、糖鎖構造に関してもレクチンでおおよそのパターンは判明したが、三崎先生との共同研究でより詳細な糖鎖構造を解析する予定である。やはり、将来的に HBV 受容体が明らかになれば、その糖鎖構造に絞って機能解析をしてゆきたい。また、私たちの研究室では難しいが、HBV の糖鎖構造を変えた時の感染性の違いも、共同研究により検討したいと思う。

E. 結論

N 型糖鎖の分岐構造を決定する糖転移酵素の遺伝子 (GnT-III, GnT-V, Fut8) の過剰発現肝がん細胞を作成し、それらの細胞表面の糖鎖構造を解析するとともに、BNC の感染実験ができることを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Korekana H, Hasagawa T, Matsumoto A, Kinoshita N, Miyoshi E, Taniguchi N. (2011) Development of an antibody lectin enzyme immunoassay for fucosylated alpha-fetoprotein. *Biochim Biophys Acta* **1820(9)**, 1405-1411.
2. Inoue T, Iijima H, Tajiri M, Shinzaki S, Shiraiishi E, Hiyama S, Mukai A, Nakajima S, Yasui T, Iwatani H, Nishida T, Mizushima T, Isaka Y, Kanto T, Tsujii M, Miyoshi E, Wada Y, Takehara T.

- (2012) Deficiency of *N*-acetylgalactosamine in *O*-linked oligosaccharides of IgA is a novel biologic marker for inflammatory bowel diseases. *IBD Journal* **18**(9), 1723-34.
3. Kamada Y, Mori K, Matsumoto H, Kiso S, Yoshida Y, Shinzaki S, Hiramatsu N, Ishii M, Moriwaki K, Kawada N, Takehara T, **Miyoshi E.** (2012) *N*-Acetylglucosaminyltransferase V regulates TGF- β response in hepatic stellate cells and the progression of steatohepatitis. *Glycobiology* **22**(6), 778-87.
 4. Shinzaki S, Iijima H, Fujii H, Kuroki E, Tatsunaka N, Inoue T, Nakajima S, Egawa S, Kanto T, Tsujii M, Morii E, Takeishi S, Asano M, Takehara T, Hayashi N, **Miyoshi E.** (2012) Altered oligosaccharide structures contribute to ameliorate murine colitis defective in beta 1,4 galactosyltransferase I. *Gastroenterology* **142** (5), 1172-82.
 5. Shinzaki S, Kuroki E, Iijima H, Tatsunaka N, Ishii M, Fujii H, Kamada Y, Kobayashi T, Shibukawa N, Inoue T, Tsujii M, Takeishi S, Mizushima T, Ogata A, Naka T, Plevy S, Takehara T, **Miyoshi E.** (2012) Lectin-based immunoassay for aberrant IgG glycosylation as the biomarker for Crohn's disease. *IBD Journal* in press.
 6. Nakagawa T, Moriwaki K, Terao N, Nakagawa T, Miyamoto Y, **Miyoshi E.** (2012) Analysis of polarized secretion of fucosylated alpha-fetoprotein in HepG2 cells. *J. Proteome Res* **11**(5), 2798-806
 7. Kimura A, Terao M, Kato A, Hanafusa T, Murota H, Katayama I, **Miyoshi E.** (2012) Upregulation of *N*-acetylglucosaminyltransferase-V by heparin-binding EGF-like growth factor induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia. *Experimental Dermatology* **21**(7), 515-519.
 8. Mehta AS, Norton P, Liang H, Comunale MA, Wang M, Rodemich-Betesh L, Koszycki A, Noda K, **Miyoshi E,** Block T. (2012) Increased levels of tetra-antennary *N*-linked glycan but not core fucosylation are associated with hepatocellular carcinoma tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **21**(5), 925-933.
 9. Kobayashi Y, Tateno H, Dohra H, Moriwaki K, **Miyoshi E,** Hirabayashi J, Kawagishi H. (2012) A novel core fucose-specific lectin from the mushroom *Pholiota squarrosa*. *J Biol Chem.* **287**(41), 33973-82.
 10. Kamada Y, Kinoshita N, Tsuchiya Y,

Kobayashi K, Fujii H, Terao N, Kamihagi K, Koyama K, Yamada S, Daigo Y, Nakamura N, Taniguchi N, Miyoshi E. (2012) Reevaluation of a lectin antibody ELISA kit for measuring fucosylated haptoglobin in various conditions. *Clin. Chim. Acta* in press.

11. Miyoshi E, Terao M, Kamada Y. (2012) Physiological roles of N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) in mice. *BMB report* 45(10), 554-9.
12. Tanemura M, Miyoshi E, Nagano H, Eguchi H, Taniyama K, Kamiike W, Mori M, Doki Y. (2013) Role of α -gal epitope/anti-Gal antibody reaction in immunotherapy and its clinical application in pancreatic cancer. *Cancer Science* in press.

2.学会発表

103rd Annual meeting of American Association of Cancer Research March 31-April 4

Shinzaki S, Takeda Y, Moriwaki K, Murata K, Miyoshi E. Fucosylated haptoglobin is a novel type of cancer biomarker linked to the prognosis after an operation in colorectal cancer (April 3 発表)

Tanida T, Tanemura M, Miyoshi E, Nagano H, Eguchi H, Iwagami Y, Nonaka Y, Wada H, Kawamoto K, Kobayashi S, Marubashi S,

Taniyama K, Kamiike W, Mori M, Doki Y. Immune-based therapy with tumor lysate, remodeled to express α -gal epitopes induce significant B and T cell responses against pancreatic cancer. (April 2 発表)

Tanemura M, Tanida T, Miyoshi E, Nagano H, Eguchi H, Iwagami Y, Kawamoto K, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Yoshikawa Y, Taniyama K, Kamiike W, Mori M, Doki Y. Tumor vaccine of pancreatic cancer cell lysate, processed to express α -gal epitopes effectively prevent *in vivo* tumor growth toward both differentiated cancer cells and pancreatic cancer stem cells. (April 2 発表)

International Carbohydrate Symposium (ICS) July 22-27, Madrid.

Tanaka K, Moriwaki K, Nakagawa T, Yokoi S, Koyama K, Miyoshi E, Fukase K. Noninvasive imaging of glycans-dependent tumor metastasis through live cell labeling by azaelectrocyclization.

アメリカ消化器病学会関連週間 May 19-22

Fujii H, Shinzaki S, Tatsunaka N, Iijima H, Ishii M, Shiraishi E, Hiyama S, Mukai A, Inoue T, Nakajima S, Kamada Y, Tsujii M, Takehara T, Miyoshi E.

Regulation of oligosaccharide-associated enzymes by TNF- α in B cells of Crohn's disease

Ishii M, Shinzaki S, Fujii H, Kamada Y, Iijima H, Takehara T, Miyoshi E.

Overexpression of *N*-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) exacerbates murine colitis with dysfunction of macrophages

Shinzaki S, Kuroki E, Iijima H, Tatsunaka N, Ishii M, Fujii H, Kobayashi T, Inoue T, Tsujii M, Plevy SH, Takehara T, Miyoshi E.

Lectin-based immunoassay for aberrant IgG glycosylation as the biomarker for Crohn's disease

An AACR special conference Pancreatic cancer: Progress and Challenges June 18-21 (発表 June 20), Hyatt Regency Lake Tahoe, NV, USA

Miyoshi E, Tanemura M, Tanida T, Nonaka Y, Nagano H, Mori M, Doki Y.

High efficacy of α -gal epitopes immune-based therapy against pancreatic cancer, using tumor cell lysates

HUPO2012 Boston, USA September 9-13
Site-specific analyses of N-glycans on haptoglobin in sera of patients with various kinds of gastroenterological cancer.

Takahashi S, Amimoto T, Kawamoto S, Ono K, Miyoshi E, Nakano M.

International Symposium on Pancreas Cancer 2012 Kyoto October 4-6

Sasaki Y, Nonaka Y, Asazawa H, Terao N,

Takamatsu S, Shinzaki S, Kamada Y, Miyoshi E. Fucosylated haptoglobin is a novel type of biomarker for pancreatic cancer. (10/5 と 10/6 発表)

The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases November 9~13, (11/9 に口頭発表) Clinical Research Workshop, Break Out Session IX Biomarker

Miyoshi E, Kamada Y, Asazawa H, Sasaki Y, Takamatsu S, Shinzaki S, Kim Y, Nezu R, Mita E, Kato M. Fucosylated haptoglobin is a novel type of cancer biomarker for hepatocellular carcinoma.

国内学会／研究会

第 13 回関西グライコサイエンスフォーラム 平成 24 年 5 月 19 日 大阪市大杉本キャンパス

N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V) トランスジェニックマウス皮膚組織において EMT 様変化と創傷治癒の促進が見られた

加藤亜里沙、寺尾美香、石川章子、木村明寛、鎌田佳宏、三善英知

第 48 回日本肝臓学会総会 平成 24 年 6 月 7-8 日 金沢

肝臓癌におけるフコシル化ハプトグロビンのバイオマーカーとしての有用性に関する検討 6/7

鎌田佳宏、浅澤瞳美、佐々木夢香、三田英治、加藤道夫、金 鏞国、根津理一郎、竹

原徹郎、三善英知

Concanavalin A 誘導性肝炎における N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V) の役割 6/7

佐藤元哉、鎌田佳宏、木田祥穂、藤井宏修、石井真悠子、吉田雄一、木曾真一、竹原徹郎、三善英知

第 22 回 日本サイトメトリー学会学術集会 6/29-6/30 (6/30 発表) 千里ライフサイエンスセンター、大阪

糖鎖を標的にしたがん幹細胞の単離と治療法開発のための基礎的検討

寺尾尚子、奥戸久美子、山谷恵里佳、森脇健太、鎌田佳宏、武石俊作、黒田俊一、三善英知

第 23 回日本分子腫瘍マーカー研究会 9 月 18 日 札幌

肝がんの腫瘍マーカーフコシル化 AFP (AFP-L3) の産生機序と肝細胞の糖タンパク極性輸送について

中川 勉、森脇健太、寺尾尚子、中川孝俊、宮本泰豪、鎌田佳宏、三善英知

第 31 回 日本糖質学会年会 9 月 19 日 鹿児島

新規フコース α 1-6 特異的レクチンの探索とその応用

小林夕香、舘野浩章、道羅英夫、三善英知、平林 淳、河岸洋和

第 71 回 日本癌学会総会 9 月 19-21 日

札幌

Identification of characteristic oligosaccharides and their target glycoproteins for anti-cancer drug treatment

Kanako Azuma, Naoko Terao, Yumeka Sasaki, Shinji Takamatsu, Yoshihiro Kamada, **Eiji Miyoshi** 9/21 口頭発表

GMDS gene mutations and loss of fucosylation detected in metastatic lesion of human colon cancer

Kotarosumitomo Nakayama, Kenta Moriwaki, Taku Imai, Mayuka Shimomura, Shinichiro Shinzaki, Yoshihiro Kamada, Kohei Murata, and **Eiji Miyoshi** 9/21 口頭発表

Involvement of cellular fucosylation in anti-cancer drug resistance of pancreatic cancer

Naoko Terao, Erika Yamatani, Tomomi Minehira, Kenta Moriwaki, Shinji Takamatsu, Yoshihiro Kamada, Masahiro Tanemura, **Eiji Miyoshi** 9/21 口頭発表

Fucosylated haptoglobin is a novel biomarker kinked to the prognosis after operation in colorectal cancer

Shinichiro Shinzaki, Yuri Takeda, Kumiko Okudo, Kenta Moriwaki, Kohei Murata, **Eiji Miyoshi** 9/21 ポスター発表

第 37 回 日本研究皮膚科学会 12/7-12/11 那覇

Oligosaccharide modification by GnT-V promotes skin sclerosis by modulating the recruitment/activation of macrophage.

Arisa Kato, Mika Terao, Mizuki Yutani, Hiroyuki Murota, Eiji Miyoshi, Ichiro Katayama

第 85 回日本生化学会 12/14-12/16 福岡
膵がんのゲムシタビン耐性化におけるフコシル化の関与 12/15 口頭

寺尾尚子、高松真二、山谷恵里佳、峰平朋実、森脇健太、鎌田佳宏、三善英知

CA19-9 を含む膜複合体の輸送に関わるタンパクの機能解析 12/14 ポスター

浅澤 瞳、魚住尚史 高松真二 傍島智明 鎌田佳宏 田辺 誠 三善英知

単糖による salvage 経路を介したフコシル化調節機構 12/15 口頭

中山 小太郎純友、森脇 健太、下村 真由香、高松 真二、何森 健、三善 英知

Concanavalin A 誘導性肝炎における *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V) の役割 12/15 ポスター

佐藤元哉、鎌田佳宏、木田祥穂、藤井宏修、石井真悠子、傍嶋智明、吉田雄一、木曾真一、竹原徹郎、三善英知

N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V) の HDL 新生に及ぼす作用

木田祥穂、鎌田佳宏、佐藤元哉、石井真悠子、藤井宏修、傍嶋智明、吉田雄一、木曾

真一、竹原徹郎、三善英知 12/15 ポスター

N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V) は、マクロファージの機能不全を介して腸管炎症を増悪させる 12/15 ポスター

石井真悠子、新崎信一郎、藤井宏修、竜中法佳、鎌田佳宏、飯島英樹、竹原徹郎、三善英知

ポリラクトサミンを介した B 細胞とマクロファージによる腸炎抑制機構

藤井修修、新崎信一郎、飯島英樹、石井真悠子、鎌田佳宏、高松真二、傍嶋智明、竹原徹郎、三善英知 12/15 口頭

招待講演

The 4th Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology 平成 24 年 10 月 28 日～11 月 1 日 (発表 10/31)

N-Acetylglucosaminyltransferase (GnT-V) regulates TGF β signaling in hepatic stellate cells and the progression of steatohepatitis. Yoshihiro Kamada, Kanako Mori, Eiji Miyoshi

G.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

第 13 回関西グライコサイエンスフォーラム 最優秀発表賞

平成 24 年 5 月 19 日

N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V)トランスジェニックマウス皮膚組織において EMT 様変化と創傷治癒の促進が見られた

加藤亜里沙、寺尾美香、石川章子、木村明寛、鎌田佳宏、三善英知

アメリカ消化器学会議 優秀演題ポスター賞

Ishii M, Shinzaki S, Fujii H, Kamada Y, Iijima H, Takehara T, **Miyoshi E.**

Overexpression of *N*-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) exacerbates murine colitis with dysfunction of macrophages

高松宮妃癌研究基金研究助成金：糖鎖を使った膵がんに対する新しい診断・治療法開発のための基礎的検討 三善英知

International Symposium on Pancreas Cancer
2012 Kyoto October 4-6

Sasaki Y, **Miyoshi E** et al. Fucosylated haptoglobin is a novel type of biomarker for pancreatic cancer. Young Investigator Award

社会貢献

第 39 回 日本消化器病学会近畿支部会教育講演

6/30 (土) 大阪国際交流センター
膵臓がんの診断 三善英知

厚生労働科学研究費補助金（B 型肝炎創薬実用化等研究事業）
分担研究報告書

HBV 感染機構に寄与する HBV 表面抗原由来糖鎖構造の解析

研究分担者：三崎 亮

大阪大学・生物学国際交流センター・講師

研究要旨：これまでに、糖鎖はタンパク質の分解からの保護や生理活性に寄与するだけでなく、癌の悪性化など病態とも密接に関わることが分かってきた。いくつかのウイルス感染とも密接な関係にあることが指摘されており、HBV に関してもその感染に糖鎖が必要であることが報告されている。しかし、実際にウイルスもしくは宿主細胞由来のどのような糖鎖構造がウイルス感染や病態発症機構に寄与するのかについては明らかにされていない。本研究課題では、「*in vitro* 糖鎖改変技術」「糖鎖構造解析技術」「タンパク質細胞内輸送経路解析技術」の 3 技術を駆使することで、ウイルスおよび宿主細胞由来糖鎖構造と HBV 病態発症機構との関係解明に迫り、「糖鎖を標的とした治療戦略の開発」を目指す。

A. 研究目的

本研究では、HBV 表面抗原糖鎖の改変と HBV 感染細胞の糖鎖修飾変動から HBV 病態発症機構の解明を行い、糖鎖を標的とした創薬を目指す。

これまで簡便な *in vitro* HBV 感染系の構築が困難であったが、研究代表者が開発した HBV 膜粒子を被覆したレトロウイルス (HBV pseudotype particle: HBVpp) が感染を容易に観察できる有効な材料となる。HBVpp 発現細胞の培養液中より HBVpp を大量精製し、*in vitro* にて糖鎖改変を行う。また、当研究分担者の方でも、昆虫細胞・バキュロウイルス発現系等を利用し HBV 膜タンパク質を持つウイルス粒子の作成を手掛ける。

最終的に改変した各糖鎖構造を保持する HBVpp の感染能力と細胞内での動態を解析する。平成 24 年度は、糖鎖改変に必要な HBVpp 量を確保するための精製系を構築し大量精製を行う。

また、HBV 感染が宿主細胞の糖鎖分布にどのような影響を及ぼすのか、HBVpp 発現細胞、非発現細胞の糖鎖プロファイルを作成し解析する。一方で、他研究分担者より調製された HBV 感染細胞についても同様に糖鎖プロファイルを作成し、ウイルス感染による糖鎖修飾の変動を追跡する。

B. 研究方法

○HBVpp の精製

HBVpp 発現用ベクターを 10 cm ディッシュ

ユ 10 mL の培地にて培養したヒト肝癌細胞由来ウイルスパッケージング細胞に形質導入した。形質導入 2 日後に、細胞を 500 mL 培養へとスケールアップし、更に 7 日間培養を行った。得られた培養液と HBVpp 発現細胞を遠心分離し、培養液から HBVpp の精製を試みた。細胞については、糖鎖プロファイル作成のための試料とした。

回収した培養液に対して、PEG8000 を 6% となるように加え 4°C で 16 時間静置した。遠心分離により沈殿を回収し、5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8) 中に沈殿を再懸濁した。再懸濁液を遠心分離し、得られた上清をフィルター濾過した。上記リン酸ナトリウム緩衝液で平衡化したヒドロキシアパタイトカラムに濾液を供し、同緩衝液でカラムを洗浄した。続いて、緩衝液濃度を 50 mM ずつ段階的に上げた溶出液を供し、目的 HBVpp の溶出を行った。

○糖鎖プロファイルの作成

培養後の細胞を PBS で入念に洗浄し、アセトンを追加することで脱脂、脱水を行い糖タンパク質試料とした。乾燥後、糖タンパク質に無水ヒドラジンを添加、100°C で 10 時間インキュベートすることで糖鎖の切り出しを行った。過剰量のアセトンを添加し、遠心分離により得られた沈殿に対し、飽和炭酸水溶液および無水酢酸を添加することで、糖鎖の *N*-アセチル化を行った。陽イオン交換カラムクロマトグラフィーおよびセルロースカートリッジを利用して糖鎖を精製後、糖鎖に 2-アミノピリジンを付加し還元することで糖鎖のピリジルアミノ

(PA) 化蛍光標識を行った。次に、試料をフェノール・クロロホルム抽出し、未反応 2-アミノピリジンを除去後、再度セルロースカートリッジに供し PA 化糖鎖を精製した。

糖鎖構造の分析には、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) および液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) を用いた。上記において調製した PA 化糖鎖を陰イオン交換カラムを用いた HPLC に供した (酸性糖の分離・精製)。得られたピークを回収し乾燥後、続いてオクタデシルシリルカラムを用いた逆相 HPLC に供した (中性糖の分離・精製)。同様に得られたピークを回収し、アミノカラムを用いた LC/MS に供して糖鎖の分子量を決定した。更に、MS/MS を行うことで糖鎖構造を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究課題で使用する研究材料については、培養細胞等について一般的なものであり個人情報を含むものは無い。また、遺伝子組換え実験の対象となるが、事前に大阪大学に組換え実験計画書を提出、承認を得ている。よって、倫理面での問題は無いと判断した。

C. 研究結果

○HBVpp の精製

500 mL×6 (3 L) の培養スケールで HBVpp 生産を行い、培養液中からの精製を試みた。タンパク質の回収は確認できたが、濃度が低く現在 HBVpp の正確な回収量を確認中である。

○糖鎖プロファイルの作成

HBVpp 発現細胞と非発現細胞について、糖鎖構造解析を行った。この結果、HBVpp 非発現細胞由来全糖タンパク質からは、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、マンノース (Man)、ガラクトース (Gal) から成る以下の糖鎖 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (31.2%)、 $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (5.6%)、 $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ (39.1%)、 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (17.1%)、 $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ (1.5%)、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (1.5%)、 $\text{GalGlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ (4.0%) が得られた。マンノース残基 5~9 個から成る高マンノース型糖鎖は全体の 93%を占めた。これに対し、HBVpp 発現細胞では上記糖鎖構造に加えフコース (Fuc) の付加した分岐型の糖鎖が顕著に認められた。すなわち、HBVpp 発現細胞由来の糖鎖構造は $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (9.0%)、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (19.1%)、 $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (14.3%)、 $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ (8.5%)、 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (28.3%)、 $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ (1.8%)、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (2.0%)、 $\text{GalGlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ (4.0%)、 $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ (1.2%)、 $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{FucGlcNAc}_2$ (1.3%)、 $\text{Man}_3\text{FucGlcNAc}_2$ (8.7%)、 $\text{Man}_2\text{FucGlcNAc}_2$ (2.0%) となった。高マンノース型糖鎖は全体の 79.2%であり、 $\alpha 1, 6$ -フコース転移酵素 (FUT8) フコースの付加した糖鎖は 12.0%であった。加えて *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT-III) の働きによると考えられる bisecting GlcNAc を持つ分岐型糖鎖も確認できた。

D. 考察

in vitro 糖鎖改変には mg オーダーの

HBVpp 量が必要であると現状では判断しており、本年度の段階では必要量の確保までには至っていない。現在、HBVpp 発現細胞の培養液をスケールアップし回収すると共に、培養条件等を再検討し発現効率の上昇を試みている。また、HBVpp を安定的に発現する組換え細胞の構築を検討する。

HBVpp 発現細胞の糖鎖プロファイル解析から、細胞が HBVpp を生産することで、少なくともフコースの付加した糖鎖構造の割合が顕著に増加することが分かった。それに伴い高マンノース型糖鎖の占める割合が減少した。これまでに、癌細胞では転移を促進したり腫瘍マーカーとなるなど、いくつかの病態発症細胞ではフコース結合糖鎖が上昇することが知られている。今回得られた成果を踏まえ、実際に HBV 感染によってフコース結合糖鎖をはじめとする分岐型糖鎖の分布増加が起きるかどうかが検証するため、他研究分担者が調製した HBV 感染細胞由来の糖鎖構造解析に着手している。また、今回のデータから HBVpp 発現細胞では FUT8 および GnT-III という分岐型糖鎖を合成する糖鎖修飾酵素の遺伝子発現量が増加していることが示唆されたため、HBVpp 発現細胞より mRNA を調製し、分岐型糖鎖合成に関わる糖鎖修飾酵素遺伝子の発現量を調査する。

E. 結論

HBVpp 感染系を利用することで、HBVpp を発現する細胞では対照となる非発現細胞と比較して、フコース残基を保持する分岐型糖鎖が顕著に増加することが分かった。

今後、糖鎖修飾酵素遺伝子の発現量を調査し、実際に HBV を感染させた細胞由来の糖鎖構造解析を行う。病態発症と糖鎖構造変動の関係を突き止め、治療薬開発の切り口とする。

2. 実用新案登録

3. その他

F. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

厚生労働科学研究費補助金 (B 型肝炎創薬実用化等研究事業)
分担研究報告書

HBV 感染による病態発症機構の解析

研究分担者：竹原 徹郎 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 教授

研究要旨：B 型肝炎の病態の形成における骨髄由来抑制性免疫細胞 (Myeloid derived suppressor cell, MDSC) の意義を明らかにする目的で、B 型慢性肝炎患者 9 例及び健康成人 11 例より末梢血単核球を採取し、CD33⁺CD11b⁺ CD14⁺HLA-DR⁻分画を MDSC と定義しフローサイトメトリーにて MDSC の頻度解析を行った。MDSC 頻度は B 型慢性肝炎患者で 6.0 ± 3.6%、健康成人で 4.7 ± 2.1%であった。B 型慢性肝炎患者の方が高い傾向にあったが、有意差はなかった。HBe 抗体陰性の患者の方が陽性の患者に比して MDSC 頻度が高い傾向があった (p=0.051)。また、HBV DNA 4 log copy/ml 以上の患者の方が、4 log copy/ml 未満の患者に比して MDSC 頻度が有意に低かった。3 log copy/ml 未満の患者は全例核酸アナログ製剤使用中の B 型肝炎患者であった。以上より MDSC が B 型慢性肝炎の病態形成に関与している可能性が示唆された。今後対象症例数を増やして層別解析を行いかつ機能解析も行う。

共同研究者

巽 智秀 大阪大学消化器内科学、助教

青野悟志 大阪大学消化器内科学

A. 研究目的

我国の B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染患者は約 150 万人存在すると推定され、HBV 感染症の制御・克服は重要な課題である。B 型肝炎に対しては、エンテカビルなどの核酸アナログ製剤による HBV DNA の複製を阻害する治療が出現し、B 型肝炎の制御が可能となってきたが、肝内における cccDNA の残存があり、根治は難しい。また IFN による治療成績はセロコンバージョンが 30%程度にとどまっている。HBV による

慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌などの病態の形成には宿主免疫応答が重要である。これまで、HBV に対する CTL や抗体産生等の獲得免疫や NK 細胞などの自然免疫については数多くの研究がなされてきており、B 型肝炎の病態への関与が明らかになりつつある。これら免疫応答の活性化は HBV の排除や、病態進展の制御、発癌コントロールに重要である。一方で宿主免疫の抑制により、B 型肝炎の病態が進展することが考えられる。近年、制御性 T 細胞や骨髄由来抑制性免疫細胞 (Myeloid derived suppressor cell, MDSC) が、免疫システムを抑制する免疫細胞として注目されている。制御性 T 細胞についてはすでに B 型肝炎において報告

が散見されるが、MDSC については、未だ不明なままである。MDSC は、myeloid 前駆細胞および未熟 myeloid 細胞 (immature myeloid cells; iMCs) から構成されるヘテロな細胞集団である。通常、造血幹細胞から分化した myeloid 前駆細胞は iMC を経て、成熟好中球、マクロファージまたは樹状細胞に分化する。MDSC は癌における増加で見出された細胞であるが、現在では細菌感染、寄生虫感染、急性および慢性炎症、外傷ストレス、敗血症、移植など様々な局面で自然免疫系および獲得免疫系を抑制し、免疫応答を制御することが明らかにされている。MDSC は Arginase-1 や NO、ROS を介して T 細胞の増殖抑制・機能抑制をしたり、NK 細胞機能抑制、樹状細胞の分化の阻害や機能抑制をおこすことが報告されている。また最近 B 細胞機能も抑制することがマウスの系で示されており、各種免疫応答を統合的に阻害することが示されている。また制御性 T 細胞の誘導も促進する。肝 MDSC については、肝細胞癌マウスモデルで NK 細胞機能の抑制がしめされ、ヒト肝細胞癌患者でも MDSC による制御性 T 細胞の誘導や NK 細胞機能の抑制が示されている。MDSC の B 型肝炎における意義についての報告は現在までないが、B 型肝炎の病態を形成する一因となっている可能性がある。本研究では、B 型肝炎の病態における MDSC の意義を明らかにすることで、新たな治療戦略の構築を目指すことを目的としている。

B. 研究方法

MDSC はフローサイトメトリーを用いて細

胞表面マーカーで同定した。マウスでは CD11b⁺Gr-1⁺細胞を MDSC としているが、ヒト MDSC では定まったマーカーは確立していない。ヒト MDSC では、CD33、HLA-DR、CD11b、CD14 を組み合わせて同定した報告が多く、本研究では、CD33⁺CD11b⁺CD14⁺HLA-DR⁻分画を MDSC と定義した(図 1)。

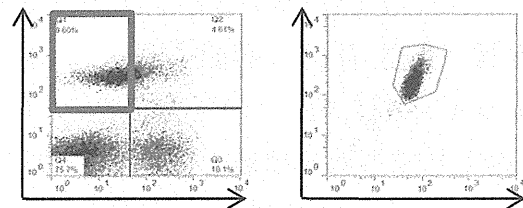


図 1 B 型肝炎患者における MDSC 同定

(倫理面への配慮)

本研究遂行にあたっては、事前に施設倫理委員会にて実験内容が承認され、B 型肝炎患者及び健康者に文書を用いて説明の上、署名による同意を得た上で、採血し解析を行った。

C. 研究結果

対象は B 型慢性肝炎患者 9 例、健康成人 11 例である。各群年齢はそれぞれ平均 47 ± 14 歳、35 歳 ± 5 歳であった。全対象者の年齢と MDSC の頻度の間には弱い相関があり、加齢により MDSC 頻度が増加傾向にあった。性別では差はなかった。MDSC 頻度は B 型慢性肝炎患者で 6.0 ± 3.6%、健康成人で 4.7 ± 2.1%であった(図 2)。B 型慢性肝炎患者の方が平均 MDSC 頻度は高い傾向にあったが、有意差はなかった。B 型慢性肝炎患者では様々な病態が含まれているためか、MDSC 頻度のばらつきが大きかった。HBs 抗