

201228006A

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

B型肝炎ウイルスにおける糖鎖の機能解析と
医用応用技術の実用化へ
(H24- B創-肝炎-一般-007)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 成松 久

平成 25 (2013) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告	1
B型肝炎ウイルスにおける糖鎖の機能解析と医用応用技術の実用化へ <研究代表者> 成松 久 (資料) 班会議開催記録	
II. 分担研究報告	
1. HBV (HBs 抗原) の糖鎖解析	9
1-1. B型肝炎ウイルス (HBV) の糖鎖解析と臨床的応用 溝上 雅史、杉山 真也	
1-2. Genotype 別の HBs 作成と臨床検体収集 是永 匡紹、杉山 真也	
1-3. HBs 抗原の糖鎖解析 梶 裕之、久野 敦	
2. HBV 感染可能細胞の糖鎖解析	16
梶 裕之、伊藤 浩美、安形 清彦	
3. HBV-宿主細胞における糖鎖の役割	20
館野 浩章、佐藤 隆、飯島 沙幸	
4. 糖鎖改変の HBV の増殖・感染能への影響	22
4-1. 糖鎖合成阻害剤の HBV の増殖・感染能への影響 米田 政志、伊藤 清顕	
4-2. 糖鎖改変肝細胞における HBV の形成・分泌への影響 安形 清彦、梶 裕之、澤木 弘道	
5. 糖鎖修飾を受けた HBs 抗原の大量精製	28
千葉 靖典	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	32
IV. 研究成果の刊行物・別刷	34

I .総括研究報告

B型肝炎ウイルスにおける糖鎖の機能解析と医用応用技術の実用化へ

研究代表者：成松 久 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター長

研究要旨：

B型肝炎の治療にはインターフェロンや核酸アナログ製剤が用いられているが根治することが難しく、創薬に向けたB型肝炎ウイルス（HBV）の感染や複製の研究が重要である。本研究の目的は、HBVの感染過程における糖鎖の役割を明らかにし、他研究課題と連携しB型肝炎の新規治療薬の開発を目指す事である。そこで本研究では、肝疾患やHBV作製・感染実験の専門家とグライコプロテオミクス技術など最先端の糖鎖機能解析技術を開発・実用化して来た糖鎖生物学者との協力体制（補完的医工連携体制）により、HBV感染における糖鎖の機能を解析し、HBVに対する創薬実用化を図る。本研究は、1）HBV（HBs抗原）の糖鎖解析：多数の検体から種々のGenotypeのHBV（HBs抗原）を調製し、レクチンアレイ技術を応用し、糖鎖解析を行う。2）HBV感染可能細胞の糖鎖解析：産総研独自のグライコプロテオミクス技術を用いHBV感染可能細胞と非感染可能細胞の糖鎖プロファイリングを行う。3）HBV-宿主細胞における糖鎖の役割：HBVの感染機構を明らかにするために、新たにHBs抗原アレイを作製し、肝細胞結合に関わる分子を探索する。4）糖鎖改変のHBVの増殖・感染能への影響：HBVを産生する肝細胞の糖鎖合成系を阻害し、HBV粒子の形成・分泌能を比較する。また、分泌されたHBVの感染能を解析する事により、HBV上の糖鎖の機能を明らかにし、創薬開発のためのターゲットとする糖鎖を明らかにする。5）糖鎖修飾を受けたHBs抗原の大量精製：ヒト型糖鎖を発現する酵母を用い、HBs抗原の大量精製を行う。現在ワクチン用に使われている通常の酵母由来のHBs抗原と比較し、より有効なワクチンの開発に繋げる。1年次である平成24年度には精製HBs抗原のグライコプロテオミクス解析、肝癌細胞の細胞膜プロテオミクス解析、糖鎖遺伝子解析とcDNAライブラリーの調製、酵母発現用HBs抗原ベクターの開発等を行った。

研究分担者：

溝上雅史（国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター長）、是永匡紹（同 室長）、米田政志（愛知医科大学 教授）、伊藤清顕（同 講師）、飯島沙幸（名古屋市立大学 研究員）、伊藤浩美（福島県立医科大学）、館野浩章（産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター 主任研究員）、梶裕之（産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター 研究チーム長）、千葉靖典（産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門 上級主任研究員）、久野敦（産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター 主任研究員）、梶谷内晶（同 主任研究員）、佐藤隆（同 研究員）、安形清彦（同 招聘研究員）

A. 研究目的

日本には約150万人のB型肝炎ウイルス（HBV）保有者がいると考えられ、従来型の母子感染に加え水平感染によっても広がりつつある。しかしながら、ほとんどの国や地域でHBV

に対するユニバーサルワクチネーションが行われているにも拘らず、我が国ではユニバーサルワクチネーションが行われていないことも新規感染患者の増加に繋がっていると考えられている。また、B型肝炎においてはIFNによる治療成績が悪い場合が多く、持続感染を防ぐための核酸アナログ薬の継続投与でも薬剤耐性ウイルスの出現が問題になっている。従って、逆転写酵素に代わる創薬ターゲットの発見にはHBVの感染/複製機構をより詳細に理解が必須である。一方、糖鎖はHBVの接着・侵入や粒子形成・分泌に関わっている可能性が示唆され、HBVの感染過程における糖鎖研究は、抗HBVワクチンや抗HBV薬を効率的に開発する上で重要な課題である。

本研究は、HBVの感染過程における糖鎖の機能を明らかにし、HBVの感染を阻害する薬剤のシーズを探索する。HBVの糖鎖構造を解析し、ウイルス粒子の形成や分泌に関わる糖鎖構造を同定し、抗HBVの創薬の標的とする。ヒト型糖

ター：HBs 抗原の精製や臨床検体収集に伴う倫理委員会申請；愛知医科大学及び名古屋市立大学：HBV 作製に関する文部科学大臣確認）を行い、許可の承認を得るとともに、実施体制を整えた。

C. 結果

HBV は培養細胞などにはほとんど感染せず持続感染系が無いにも拘らず、ヒトへの感染効率が高く、HBV の作製には大臣確認などの承認が必要である。まず初年度は、非感染である HBs 抗原を調製し、糖鎖の解析を進めた。また、宿主肝細胞側の糖鎖合成系はそのまま HBV の糖鎖修飾を担うこともあり、肝細胞表面の糖鎖関連分子と共に HBV の感染に深く関与している可能性から解析を行った。さらに新規 HBV ワクチンの開発を目指して、酵母による HBs 抗原作製実験を行った。

(1) 肝臓グループは種々の HBs 抗原の cDNA と HBs 抗原を含む培養上清を調製し糖鎖グループに供与した。ヒト肝臓キメラマウス（±HBV 感染）調製の準備を進めた。HBV 感染患者の血清収集のための準備を進めた。精製 HBs 抗原を用いてレクチンアレイ解析を行い血中の HBs 抗原検出の条件検討を行った。HBs 抗原を免疫沈降し、オーバーレイによる検出する方法の開発を進め、候補レクチンを選定し、微量検出系の開発に繋がる結果を得た。グライコプロテオミクス解析法により糖鎖付加位置決定を検討した結果、精製 HBs 抗原中の L-HBs 抗原の N 末側（HBV 認識領域と考えられている領域）にも N 型糖鎖修飾を確認した。

(2) HuH7 細胞と HepG2 細胞の糖鎖遺伝子発現解析（qRT-PCR、次世代シーケンサー）やレクチンアレイ解析の準備を進め、一部の試料については質量分析による糖鎖構造解析（N-glycan/ O-glycan 解析）を行った。N-結合型糖鎖については、ほとんどがハイマンノース型であり、両細胞間の糖鎖構造は類似していた。一方、O-結合型糖鎖は両細胞間で観測された糖鎖構造のほとんどがシアリル化糖鎖であったが、その相対量は HuH7 細胞と HepG2 細胞で異なる結果となった。

qRT-PCR（糖鎖遺伝子 qPCR アレイシステム）による糖鎖遺伝子発現解析の結果、約 190 種類の糖鎖遺伝子の発現プロファイルを得た。肝細胞の糖鎖遺伝子発現とも比較し、糖鎖遺伝子群を高発現と低発現（発現無し）の 2 群に分け、課題 4 の解析のための基礎情報とした。

(3) グライコプロテオーム解析（IGOT 解析）の結果を基に、内在性レクチンの検索を行い、肝臓に発現していることや感染能が無い肝細胞株で比較的発現量が低いことなどを考慮して、候補分子を決定しクローニングした。

また、HBV Genotype A と C の HBs 抗原の発現ベクター（組換え HBs）の発現系を構築した。タグ付きの HBs 抗原が培養液中に分泌され抗タグ抗体を使って精製可能であることを確認した。HBs 抗原と肝癌細胞株との相互作用解析系の構築検討を行った。

(4) qRT-PCR（糖鎖遺伝子 qPCR アレイ）による糖鎖遺伝子発現プロファイルをおこない、糖鎖遺伝子とその発現パターンで 2 群（抑制目的と過剰発現目的）に分け、cDNA ライブラリー（約 100 遺伝子）と siRNA ライブラリー（約 80 遺伝子 x3 本）の作成を進め、糖鎖改変細胞群の準備を行った。HuH7 細胞と GFPcDNA を用いて、幾つかの形質転換法を試した結果、リバーストランスフェクションにより HuH7 細胞の形質転換効率を改善した。

糖鎖合成系の HBV 増殖への影響を解析するために、糖鎖合成阻害剤存在下で HBV を作製し HBV 分泌を評価した。これまでのところ、小胞体やゴルジ体での N 型糖鎖合成の阻害剤を試験し、抗 HBV 創薬の標的分子を選定するための基礎情報を取得した。

(5) ヒト型糖鎖を有する HBs 抗原の大量精製を行うために、HBs 抗原をコードする遺伝子 4 種について、出芽酵母の最適コドンに変換し発現させた。4 種の cDNA 酵母用のベクターに導入し、形質転換後にクローンを得た。2 種の cDNA に由来するクローンで L-HBs 抗原の発現に成功し、少なくとも一つの N 型糖鎖修飾を有することを確認した。

D. 考察

(1) これまでに、HBV 上の糖鎖と病体あるいは個人間の差などの解析は殆ど行われておらず、本研究では HBV および HBs 抗原の糖鎖構造を多量サンプルについて簡便に解析する方法の開発が一つの目標である。本年度に明らかになった精製 HBs 抗原のレクチンアレイ解析による糖鎖プロファイリングの結果を基に候補レクチンが決まった。問題点として市販の抗 HBV 抗体では良好な免疫沈降が出来てはいないが、スパイク実験によって比較的少量の血液サンプルで解析出来る結果が得られた。年次度は上述の系の改良と解析を進展させ、HBV 感染患者の血清サンプルを用いて HBs 抗原の糖

ットの選定に重要である。HBs 抗原の酵母での多量発現においては、酵母で L-HBs 抗原を発現する第一ステップは進んだので、抗体試験において糖鎖の影響を確認することが重要である。

以上のように、HBV の感染過程における糖鎖構造解析と糖鎖機能解析を中心に医用応用のた

めの基盤研究を行い、さらに B 型肝炎を治療する新規治療薬の開発や HBV の感染を防ぐワクチンの実用化へ展開していきたい。

F. 健康危険情報

特記すべき情報なし。

- 課題 2 (梅谷内)
- 課題 3 (館野)
- 課題 4 (安形)
- 課題 5 (千葉)
- 4. 肝臓グループの説明と討論
 - 国立国際医療研究センター (是永)
 - 愛知医科大学 (伊藤清)
 - 名古屋市立大学 (飯島)
- 5. 分担内容の決定事項の確認 (久野)
- 6. サンプル譲渡等手続き確認事項 (梅谷内)
- 7. 次回ミーティングについて

概要：

本研究課題を遂行する研究者が一堂に会して、研究の目的や方向性を理解するためにキックオフミーティングを開催した。成松研究代表と溝上肝臓グループ統括が本研究課題の必要性を概説し、5つの課題の担当者がそれぞれの課題を説明した。研究を進めていく上で必要な材料・方法を説明した上で、肝臓グループの研究内容を検討し、サンプル譲渡・各種申請など必要な手続きを確認した。

平成 24 年度第二回班会議

日時：平成 24 年 11 月 26 日 (月) 12:30～16:30

場所：東京コンベンションルーム AP 品川 P+Q ルーム (京急第 2 ビル・9 階)

出席者：

溝上雅史、是永匡昭、正木尚彦(PO) (以上、国立国際医療研究センター)、米田政志、森田奈央子 (以上、愛知医科大学)、飯島沙幸 (名古屋市立大学)、伊藤浩美 (福島県立医科大学) 成松久、安形清彦、梶裕之、久野敦、梅谷内晶、佐藤隆、館野浩章、後藤雅式 (以上、産業技術総合研究所)

会議内容：

- 1. 研究代表者挨拶 (成松)
- 2. 肝臓グループ統括 (溝上)
- 3. 各課題の進捗状況
 - 課題 1 (梶、久野)
 - 課題 2 (梅谷内)
 - 課題 3 (館野)
 - 課題 4 (安形)
 - 課題 5 (安形)
- 4. 分担内容の決定事項の確認 (久野)
- 5. 成果概要作成について
- 6. 次回ミーティングについて

概要：

本研究課題の進捗状況について班員が理解し討論するために第二回班会議を開催した。成松研究代表と溝上肝臓グループ統括が本研究事業の環境と最近の B 型肝炎研究の話題などを概説し、次に 5つの課題の担当者がそれぞれの課題の進捗状況を説明した。それぞれの課題での問題点についての討論と次に必要なサンプルの調製などを確認した。

Ⅱ. 分担研究報告

1. HBV (HBs 抗原) の糖鎖解析

1-1. B型肝炎ウイルス (HBV) の糖鎖解析と臨床的応用

研究分担者：溝上 雅史 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター
研究協力者：杉山 真也 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター

研究要旨：

B型肝炎ウイルス (HBV) における慢性肝炎では、インターフェロン治療成績が悪く、持続感染を防ぐための核酸アナログ製剤の継続投与においても薬剤耐性ウイルスの出現が問題になっている。糖鎖はHBVの接着・侵入や粒子形成・分泌に関わっている可能性が示唆され、その感染過程における糖鎖解析は、抗HBVワクチンや抗HBV薬を効率的に開発する上で重要である。HBVの糖鎖の機能を明らかにし、HBV創薬シーズを作成することが本研究の目的であり、HBs精製の為の純度の高い抗体作成やヒト肝臓置換マウスにおける感染実験が必要なため、その基盤作りを行った。

A. 研究目的

現在日本では、約150万人のHBV保有者がいると考えられ、従来型の母子感染に加え水平感染によっても広がりつつある。B型肝炎においては、インターフェロンによる治療成績が悪く、持続感染を防ぐための核酸アナログ製剤の継続投与においても薬剤耐性ウイルスの出現が問題になっている。従って、逆転写酵素に代わる創薬ターゲットが必須であり、有効な薬剤の開発にはHBVの感染/複製機構をより詳細に理解する必要がある。糖鎖はHBVの接着・侵入や粒子形成・分泌に関わっている可能性が示唆され、HBVの感染過程における糖鎖解析は、抗HBVワクチンや抗HBV薬を効率的に開発する上で重要な課題である。

本研究の目的は、HBVの感染過程における糖鎖の機能を明らかにし、HBVの感染を阻害する薬剤のシーズを探索する。HBVの糖鎖構造を解析し、ウイルス粒子の形成や分泌に関わる糖鎖構造を同定し、抗HBVの創薬のターゲットとする。また、新規「ヒト型HBs抗原」を大量精製し、新規ワクチンの開発を目指すこ

とを目標とし、主任研究者と共同で、特に臨床検体の提供や、抗体作成、専門知識の共有や糖鎖研究により見いだされた成果を、キメラマウスを用いた感染実験により確認等を行う。

B. 研究方法

本年度は糖鎖解析に必要な抗体や実験計画のサポートを行った。

C. 研究結果

HBs精製のための抗体について、情報提供を行うと同時に、ヒト型糖鎖含有HBs糖タンパク質の合成の為に、現在あるワクチン製造所を紹介した。

更に、HBs抗原作成を当センターで精製予定のため、その機器購入や設置を行った。

また、ヒト肝臓置換マウスによる感染実験やその培養細胞より、非感染細胞と感染細胞のマイクロダイゼクションを行うため、マウス実験申請を行っている。

D. 考察

様々な抗体を使用も、qualityに問題があることが判明しており、その研究の第一人者である田尻和人先生（富山大学）を来年度より分担者として推薦した。マウス実験の申請も近々に承認される予定である。

E. 結論

研究期間が短く、具体的な成果に乏しいが、臨床検体提供や実験準備は順調に進んでおり、糖鎖研究の進展に併せ、臨床検体でも再解析や、ヒト肝臓置換マウスの研究を開始予定である。

F. 健康危険情報

特記すべき情報なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Sakamoto T, Tanaka Y, Watanabe T, Iijima S, Kani S, Sugiyama M, Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, Mizokami M. Mechanism of the dependence of hepatitis B virus genotype G on co-infection with other genotypes for viral replication. *J Viral Hepat*. 2013 Apr;20(4):e27-36
- (2) Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Ito K, Matsuda A, Sekiya S, Hige S, Sakamoto M, Kage M, Mizokami M, Narimatsu H. A serum “sweet-doughnut” protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis. *Sci Rep*. 2013;3:1065
- (3) Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsunashi H, Murakami S, Iijima S, Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, Mizokami M. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- α

in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut*. 2012 Nov 7. [Epub ahead of print]

- (4) Ito K, Kuno A, Ikehara Y, Sugiyama M, Saito H, Aoki Y, Matsui T, Imamura M, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Tanaka Y, Hige S, Izumi N, Kurosaki M, Nishiguchi S, Sakamoto M, Kage M, Narimatsu H, Mizokami M. LecT-Hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology*. 2012 Oct;56(4):1448-56

2. 学会発表

- (1) 伊藤清顕、溝上雅史、Cohort 研究からみたウイルス性肝炎の解明 B 型慢性肝炎に関する全国調査結果、第 16 回日本肝臓学会大会、第 54 回日本消化器病学会大会、第 50 回日本消化器がん検診学会大会(JDDW)、神戸、2012/10/10-11
- (2) 西田奈央、田中靖人、溝上雅史 他、日本人および韓国人における B 型肝炎慢性化、B 型肝炎ウイルス排除を規定する HLA-DP 遺伝子の同定、第 16 回日本肝臓学会大会 (JDDW)、神戸、2012/10/10-11
- (3) 澤井裕美、溝上雅史、徳永勝士 他、中国集団における B 型肝炎由来肝癌感受性 SNP の東アジア集団での検証、第 16 回日本肝臓学会大会(JDDW)、神戸、2012/10/10-11
- (4) 西田奈央、徳永勝士、溝上雅史 他、東アジア集団における B 型肝炎慢性化、HBV 排除を規定する HLA-DP 遺伝子の同定、第 35 回日本分子生物学会、福岡、2012/12/11-14

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

1. HBV (HBs 抗原) の糖鎖解析

1-2. Genotype 別の HBs 作成と臨床検体収集

研究分担者：是永 匡紹 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター
研究協力者：杉山 真也 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター

研究要旨：

我が国の B 型慢性肝炎では、インターフェロン治療成績が悪く、核酸アナログ製剤の継続投与においては耐性ウイルス出現が問題になっており、肝発癌発生率はこの 20 年変化がなく、根本的な治療の見直しが必要である。糖鎖は B 型肝炎ウイルス (HBV) の感染・複製過程に関わっている可能性が報告されており、糖鎖解析を行う事は、抗 HBV ワクチンや抗 HBV 薬を効率的に開発する上で重要であると考えられる。本研究は、HBV の糖鎖の機能を明らかにし、HBV 創薬シーズを作成することを目的とし、糖鎖付着=レセプター部位の同定のため、3 種類の HBs 抗原 (L, M, S) を genotype A,B,C 毎に培養細胞から作成し、提供する準備を整えるとともに、臨床検体による糖鎖解析の為に、倫理委員会に申請している。

A. 研究目的

現在日本では、約 150 万人の B 型肝炎ウイルス (HBV) 保有者がいると考えられ、従来型の母子感染に加え水平感染によっても広がりつつある。B 型肝炎においては、インターフェロンによる治療成績が悪く、持続感染を防ぐための核酸アナログ製剤の継続投与においても耐性ウイルスの出現が問題になっている。従って、核酸アナログ製剤に代わる創薬ターゲットが必須であり、有効な薬剤の開発には HBV の感染/複製機構をより詳細に理解する必要がある。

糖鎖は HBV の感染・複製過程に関わっている可能性が示唆され、抗 HBV ワクチンや抗 HBV 薬を効率的に開発する上で重要な課題である。

本研究は、HBV の糖鎖機能を明らかにすることで、HBV 薬物シーズを探索することを目的とする。HBV の糖鎖構造を解析し、ウイルス粒子の形成や分泌に関わる糖鎖構造を同定し、抗 HBV の創薬のターゲットとする。

B. 研究方法

本年度は糖鎖解析に必要な HBs 抗原の精製や臨床検体収集に伴う倫理委員会申請を行い、次年度からの研究に備えた。

C. 研究結果

糖鎖付着=レセプター部位の同定のため、3 種類の HBs 抗原 (L, M, S) を genotype A,B,C 毎に培養細胞から作成し、提供する準備を整えるとともに、臨床検体による糖鎖解析の為に、倫理委員会に申請し、現在審議中で、近々に承認される予定である。

D. 考察

倫理委員会通過後、HBVDNA 量が多い症例を中心に収集し、また肝生検組織の一部を凍結保存する予定である。

E. 結論

研究期間が短く、具体的な成果に乏しいが、臨床検体提供や実験準備は順調に進んでおり、

糖鎖研究の進展に併せ、臨床検体にて、その整合性を確認する。

F. 健康危険情報

特記すべき情報なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Ito K, Kuno A, Ikehara Y, Sugiyama M, Saito H, Aoki Y, Matsui T, Imamura M, Korenaga M, Murata K, Masaki N,

Tanaka Y, Hige S, Izumi N, Kurosaki M, Nishiguchi S, Sakamoto M, Kage M, Narimatsu H, Mizokami M. LecT-Hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology*. 2012 Oct;56(4):1448-56

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

1. HBV (HBs 抗原) の糖鎖解析

1-3. HBs 抗原の糖鎖解析

研究分担者：梶 裕之 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター
研究分担者：久野 敦 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター

研究要旨：

HBV 感染における HBV 自身に存在する糖鎖の機能を理解するために、HBs タンパク質の糖鎖構造及び付加位置情報を取得するための 2 つの異なる技術からなるそれぞれの方法を確立した。レクチンマイクロアレイ解析では、ナノグラムオーダーの HBs タンパク質の比較糖鎖解析が可能になり、市販 HBs タンパク質の解析から *N*-および *O*-glycan に特徴的なシグナルをそれぞれ得た。質量分析では、市販 HBs タンパク質の解析から、1 ないし 3 箇所の糖鎖付加部位が同定された。また、L 型 Pre-S1 領域においても糖鎖付加が観察されたことから、Pre-S1 領域がウイルス粒子の外側に向けた配向の L-HBs の存在が示唆された。

A. 研究目的

HBV ウィルス粒子エンベロープに局在する表面抗原分子 HBs は糖タンパク質であり、この糖鎖付加部位の変異、糖鎖欠失によってパッケージ不全が生じるなど、HBV 粒子の形成や感染、増殖に糖鎖が関連している報告があるが、その詳細は不明である。B 型肝炎治療薬を開発するにあたり、HBV における糖鎖の機能を理解することは重要であり、まずは HBs タンパク質の糖鎖構造、最終的には HBV ウィルスにおける糖鎖集合状態を含めた構造特性を明らかにし、創薬の基盤情報とすることを目的とする。

B. 研究方法

(1) レクチンマイクロアレイによる HBs タンパク質の糖鎖プロファイリング：患者血液中の HBV ウィルス粒子上の糖鎖構造を迅速かつ簡易に解析するためには、①超遠心器などに頼らない簡便な前処理手法、②ナノグラムオーダーで糖鎖構造情報を入手可能な解析手法が必須となる。そこで本年度は抗 HBs 抗体

を利用した前処理方法および比較糖鎖プロファイリング手法の確立を目指した。市販抗 HBs モノクローナル抗体 3 種、ポリクローナル抗体 1 種を対象に、ウエスタンブロット (WB)、免疫沈降 (IP)、および抗体オーバーレイ・レクチンアレイ法 (LA) に利用可能な抗体を精査した。市販 HBs 精製タンパク質、および健常者血清に一定量市販 HBs を混入した溶液を評価に用いた。

(2) HBs タンパク質の質量分析による糖鎖構造解析：HBs タンパク質における糖鎖構造を明確に規定するため、HBs ペプチドと糖鎖が結合した状態で構造解析し、どの部位にどのような糖鎖が結合しているかを LC/MS(質量分析法)で分析する。はじめに、市販の HBs タンパク質(ヒト血清および酵母由来)を還元アルキル化の後、プロテアーゼ消化し、糖ペプチドを親水性クロマトグラフィーにより精製した。糖ペプチド画分は糖鎖切除処理 (IGOT 標識) 後、LC/MS 分析により、糖鎖付加部位を決定した。ついで糖ペプチドのまま LC/MS 分析し、糖鎖構造情報を収集した。

非糖ペプチド画分も LC/MS 分析し、消化条件の検討に利用した。

C. 研究結果

(1) 抗体の検討を速やかに進めるための、WB, IP, LA 評価系を確立した。その後、対象抗体について評価を試みたが、残念ながらすべての実験で利用可能な抗体を見出すまでに至らなかった。特に IP に関しては血清成分への抗 HBs 抗体の非特異的な結合があり、満足のいくものではなかった。一方、LA は特に蛍光プローブ検出部分に改良を加え、5 ng 程度の HBs で糖鎖プロファイリングする方法を確立することができた。

(2) ヒト血清由来市販 HBs をトリプシン、Lys-C エンドペプチダーゼ、V8 プロテアーゼ混合状態で消化し、生じた糖ペプチドの配列を IGOT-LC/MS 法で分析した。電気泳動像では S 型 HBs が主要成分であったが、S 型だけでなく、L および M 型 HBs の Pre-S1 および Pre-S2 領域に由来する糖ペプチドが同定され、S 型では 1 箇所、M 型では最大 2 箇所、L 型では最大 3 箇所の N 結合型糖鎖付加が認められた。糖ペプチド画分の LC/MS 分析で、糖ペプチドシグナルは微弱で、各糖ペプチド上に存在する糖鎖として、2 本鎖構造のみがわずかに検出されたのみであった。

D. 考察

(1) 抗体の評価は多面的に実施する必要がある。今回は 3 つの用途に利用可能なものを選抜するために、5 つ程度の迅速評価実験を構築した。現時点では市販抗体に限定しての評価であったためか、糖鎖プロファイリングに必須となる抗体の選抜にまでは至っていない。LA による糖鎖プロファイリングは当初予定していた程度の感度を得ることができた。これにより数十 μ L 程度の血液を対象とした比較糖鎖プロファイリングが可能になると予想している。

(2) ヒト血清由来 HBs タンパク質には長さ(タイプ)に従い、1 ないし 3 箇所の糖鎖付加部位

が同定された。S 型における電気泳動パターンより S 型 HBs に存在する糖鎖付加部位 1 箇所における糖鎖占有率はおよそ半分であった。L 型 Pre-S1 領域に糖鎖付加が観察されたことから、Pre-S1 領域がウイルス粒子の外側に向けた配向の L-HBs の存在が示唆された。糖鎖構造についてはシグナルが微弱であったため、試料調製手順の改善および測定法の改善が必要である。

E. 結論

(1) 解析に使用する抗体を選抜するための評価系、および LA による比較糖鎖プロファイリング手法を確立した。次年度はより多くの前処理用抗体を評価し、早い段階で有効な抗体を獲得し、実際患者血液中の HBs 抗原の比較糖鎖解析を行う。

(2) HBs 糖鎖付加部位の同定と糖鎖構造解析の条件を検討した。来年度はこれを最適化し、ヒト患者由来および糖鎖改変モデル HBV の実態解明を進め、HBV と糖鎖の関係を明確にしてゆく。

F. 健康危険情報

特記すべき情報なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Hirabayashi J, Yamada M, Kuno A, Tateno H. Lectin microarrays: concept, principle and applications. *Chem Soc Rev* 2013 Apr 29;42(10):4443-58
- (2) Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Ito K, Matsuda A, Sekiya S, Hige S, Sakamoto M, Kage M, Mizokami M, Narimatsu H. A serum "sweet-doughnut" protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis. *Sci Rep*. 2013;3:1065
- (3) Du D, Zhu X, Kuno A, Matsuda A, Tsuruno C, Yu D, Zhang Y, Ikehara Y, Tanaka Y, Zhang X, Narimatsu H.

Comparison of LecT-Hepa and FibroScan for assessment of liver fibrosis in hepatitis B virus infected patients with different ALT levels. *Clin Chim Acta*. 2012 Nov;413(21-22):1796-99

- (4) Ito K, Kuno A, Ikehara Y, Sugiyama M, Saito H, Aoki Y, Matsui T, Imamura M, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Tanaka Y, Hige S, Izumi N, Kurosaki M, Nishiguchi S, Sakamoto M, Kage M, Narimatsu H, Mizokami M. LecT-Hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology*. 2012

Oct;56(4):1448-56

2. 学会発表

- (1) Development of a rapid and simple glycan-based immunoassay toward “on-site” estimation of liver fibrosis progression. Kuno A (Invited Speaker), Ikehara Y, Tanaka Y, Sogabe M, Du D, Matsuda A, Ito K, Hirabayashi J, Mizokami M and Narimatsu H. GlycoT2012 Hannover, Germany. 2012/6/7

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

2. HBV 感染可能細胞の糖鎖解析

研究分担者：梅谷内 晶 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター
研究分担者：梶 裕之 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター
研究分担者：伊藤 浩美 福島県立医科大学 生化学講座
研究分担者：安形 清彦 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター

研究要旨：

B型肝炎ウイルス(HBV)の感染機構は受容体も含めて不明であり、現在の所 HBV の持続感染系は構築されていない。宿主肝細胞側の糖鎖合成系はそのまま HBV の糖鎖修飾を担うこともあり、肝細胞表面の糖鎖関連分子と共に HBV の感染に深く関与していると考えられる。本研究の目的は、HBV の感染や複製における糖鎖の役割を明らかにし、B型肝炎の新規治療薬の開発を目指す事である。そこで本研究では、HBV 感染可能細胞である肝細胞と感染出来ない肝癌細胞株との糖鎖合成系の違いまた細胞表面に発現する内在性レクチンなどの糖鎖関連分子の違いを明らかにすることを第一の課題としている。まず、肝細胞株のグライコプロテオーム解析、糖鎖構造解析、HBV 作製細胞と肝細胞の糖鎖遺伝子発現を qRT-PCR アレイで解析、内在性レクチンの検索などを行った。

A. 研究目的

糖鎖はインフルエンザウイルスなど様々なウイルスの接着・侵入や粒子形成・分泌に関わっている事が示唆されている。現在日本には約 150 万人の B型肝炎ウイルス (HBV) 保有者がいると考えられ、従来型の母子感染に加え水平感染によっても広がりつつある。同様に肝炎を起こす C型肝炎ウイルスでも糖鎖-レクチンを介した接着や侵入するシステムが示されている。ところが、HBV は持続感染系が構築されていないこともあり、肝細胞表面上の受容体は不明なままである。また、HBV 感染における宿主肝細胞側の糖鎖の役割や感染後の糖鎖合成系の変化なども研究されていない。HBV 上の糖鎖合成は宿主である肝細胞が担っていることもあり、HBV の感染過程における宿主側肝細胞の糖鎖を解析することは、HBV ワクチンや抗 HBV 薬を効率的に開発する上でも重要な課題である。

本研究では、糖鎖遺伝子解析技術・グライコプロテオミクス技術・レクチンアレイ技術などの糖鎖機能解析技術により、HBV 感染可能細胞と非感染可能細胞の糖鎖プロファイリングを行う。

B. 研究方法

HBV 感染機構における肝細胞側の糖鎖の役割を明らかにするために、以下の解析を進めている。解析対象の試料としては、各種の肝臓細胞株を始めに実施し、次いでヒト肝化マウス組織・細胞 (±HBV 感染) を対象とした、より詳細な糖鎖解析を進めていく。

- (1) 解析に必要な試料の準備と調製を行う。特に同一の試料にて各種解析を平行して行うために、肝細胞株なども大量に培養し、同一ロットによる試料を調製するなどした。
- (2) 産総研保有の糖鎖遺伝子定量システム (qPCR アレイ) や次世代シーケンサを用い

て、糖鎖遺伝子と、内在性レクチンを含む糖鎖関連遺伝子に特化して発現解析し、HBV 感染に必要な糖鎖関連分子の発現と HBV 感染に伴う宿主細胞の変化を解明する。今年度は肝細胞株での糖鎖遺伝子の発現を qPCR アレイにより解析するとともに、次世代シーケンサによる解析方法の準備を行った。

(3) 産総研独自のグライコプロテオミクス技術、糖鎖構造解析技術により糖鎖プロファイリングを行う。具体的には、質量分析器 (MS) による糖鎖構造解析およびレクチンアレイによる高感度糖鎖プロファイルを進め、宿主細胞の糖鎖発現を解析する。また、種々の試料でプロテオーム解析とグライコプロテオーム解析を行う。今年度は肝細胞株の糖鎖構造を MS により解析した。また、同細胞株における (グライコ) プロテオーム解析のデータを基にして、糖タンパク質あるいはレクチン様タンパク質の発現の調査を実施した。

C. 研究結果

本研究における結果については以下の通りである。今後は詳細な遺伝子解析やヒト肝化マウスを使用した様々な条件下での解析を平行して進めていく予定である。

(項目 1) 肝臓細胞株、ならびにヒト肝化マウス組織・細胞を対象とした糖鎖遺伝子の発現解析、糖タンパク質の (グライコ) プロテオーム解析、糖鎖構造解析を行うための試料調製を進め、一部解析を行ってきた。始めに、ヒト肝臓細胞株である Huh7 細胞と HepG2 細胞などの試料を採取し、実験毎に適した調製を行った。

(項目 2) qRT-PCR (糖鎖遺伝子 qPCR アレイシステム) による糖鎖遺伝子発現解析の結果、肝細胞株 2 種 (HuH7 細胞、HepG2 細胞) における約 190 種類の糖鎖遺伝子の発現プロファイルを得た。それらの糖鎖遺伝子群を高発現 (約 80 遺伝子) と低発現あるいは発現無し (約 100 遺伝子) の 2 群に分け、他課題 (糖鎖変位の HBV の増殖・感染能への影響) の解析のための基礎情報とした。HepG2 および HuH7 の qPCR アレイ解析の結果、感染可能である肝細

胞と同様な発現レベルの遺伝子もあれば、異なる遺伝子もあり、糖鎖構造の結果同様細胞に依る差が明らかになった。

(項目 3) 肝臓細胞株 7 種類について、膜画分や可溶性画分を用いたプロテオーム解析とグライコプロテオーム解析 (IGOT 解析) のデータを保有していたことから、これを用いて内在性レクチンの検索を行った。プロテオームのデータでは、平均して約 2000~3000 種類のタンパク質、グライコプロテオーム解析では平均して約 600~850 種類の糖ペプチドが登録されており、これを検索した結果、候補レクチン様タンパク質を見出し、これを他課題 (HBV-宿主細胞における糖鎖の役割) の基礎情報とした。

現在、肝細胞株 2 種 (HuH7 細胞、HepG2 細胞) の試料を使用する糖鎖遺伝子発現解析やレクチンアレイ解析の準備を進めている。一部の試料については既に糖鎖遺伝子解析 (qPCR)、および質量分析による糖鎖構造解析 (*N*-glycan/*O*-glycan 解析) を行った。また、糖鎖遺伝子発現解析や内在性レクチンの探索のために、次世代シーケンサに依る同サンプルの解析を進めており、より詳細な解析が可能になりつつある。

今年度を実施した、質量分析装置を用いた HepG2 細胞および HuH7 細胞の糖鎖構造解析については以下の通りである。

二種類の細胞株 (HepG2 と HuH7) について、質量分析計を用いて *N*-結合型および *O*-結合型糖鎖構造解析を行うため以下の実験を行った。各培養細胞ペレットから疎水性画分を抽出した後、*N*-結合型糖鎖についてはエンドペプチダーゼ F により酵素学的に、*O*-結合型糖鎖については還元 β 脱離により化学的に処理し、*N*-と *O*-結合型糖鎖をそれぞれ切り出した。次に、二種類の培養細胞から調製した *N*-ならびに *O*-結合型糖鎖は、MALDI イオン化の際の感度と安定性を向上させるため、完全メチル化処理にてすべての水酸基ならびにカルボン酸をメチル化した (ただし、*N*-結合型糖鎖については酵素にて切り出された糖鎖を還元し、糖アルコールにしてから完全メチル化処理を行った)。得られた *N*-および *O*-結合型糖鎖の完全メチル化体は、

MALDI-多段階タンデム型質量分析計を用いてそれぞれの糖鎖構造について比較解析を行った。それぞれの解析結果については図1にまとめた。横軸は糖組成（Hexの数-HexNAcの数-Fucの数-NeuAcの数の順）で記載。縦軸はそれぞれのMS結果で最も強度のある糖鎖シグナル強度を100%とした相対強度で表示。今回の結果で

は、*N*-結合型糖鎖については、両細胞間の糖鎖構造は類似しており、ほとんどがハイマンノース型であった。一方、*O*-結合型糖鎖については両細胞間で観測された糖鎖構造のほとんどがシアリル化糖鎖であったが、その相対量は図に示した通り異なる結果となった。

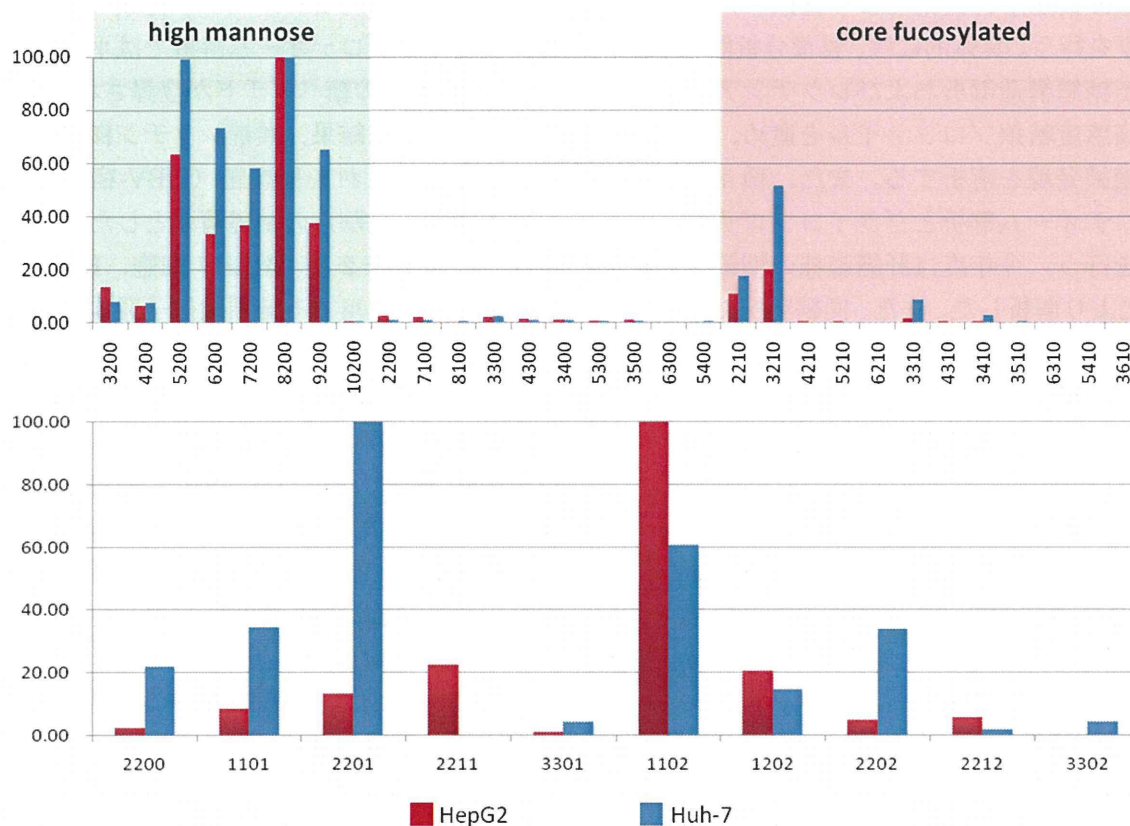


図1 HepG2 および HuH-7 における *N*-および *O*-結合型糖鎖構造の解析（上段：*N*-結合型糖鎖構造、下段：*O*-結合型糖鎖構造）

D. 考察

現在までに、基本的な情報を取得するための下地が整い、一部の遺伝子情報や糖鎖構造情報が得られている。今後はさらに試料を拡充して同様の解析をすることで、HBV 感染と宿主細胞側の糖鎖発現との関連性が検討できると考えられる。

また、本研究で得られる宿主細胞における糖鎖遺伝子/糖鎖関連遺伝子の発現解析の結果は、他課題（HBV-宿主細胞における糖鎖の役割や糖鎖改変の HBV の増殖・感染能への影響）研

究の基礎知見となると考えられる。今後は種々の条件下（HBV 感染有無、経時変化）での解析が必要であると考えられる。

E. 結論

肝臓細胞株における遺伝子解析、糖鎖構造解析、ならびにグライコプロテオーム解析データを利用したレセプター候補探索などを行った。基本的な糖鎖の構造情報、糖鎖関連遺伝子および細胞表面タンパク質の発現情報などを得ることが出来た。これらの知見を基に、今後行う予

定にしている、（感染有無での）ヒト肝化マウス組織・細胞を対象としたより詳細な解析と比較しながら検討を行うことで、統合的に HBV 感染の糖鎖合成への影響を捉えていきたいと考えている。

F. 研究発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

3. HBV-宿主細胞における糖鎖の役割

研究分担者： 舘野 浩章 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター
研究分担者： 佐藤 隆 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター
研究分担者： 飯島 沙幸 名古屋市立大学 医学研究科

研究要旨：

本課題では、宿主細胞上における HBV 糖鎖と相互作用する糖鎖認識分子（内在性レクチン）の探索を進めることにより、HBV-宿主細胞間相互作用機構を糖鎖という視点から理解することを目的とする。本年度はプロテオミクス手法を用いて肝癌細胞株に発現する内在性レクチン候補の同定を行った。2種の内在性レクチン候補に絞り研究を進め、組み換え体や発現細胞株の調製を行った。一方、相互作用解析に用いる組み換え HBs の調製も検討した。今後、内在性レクチン候補と HBV の相互作用解析を行い、HBV 糖鎖を認識する内在性レクチンの同定を行い、HBV 糖鎖の役割について明らかにする。

A. 研究目的

本研究では、HBV と宿主細胞の相互作用における糖鎖の役割について調べ、宿主細胞上における HBV 糖鎖と相互作用する糖鎖認識分子（内在性レクチン）の探索を進めることにより、HBV-宿主細胞間相互作用機構を糖鎖という視点から理解することを目的とする。

解明：まず①HBs 抗原と宿主細胞の相互作用を定量的に解析できる技術を開発する。②糖鎖認識分子の候補を選出し、HBV の宿主細胞への結合に関与する内在性レクチン候補分子を絞り込む。最終的には HBV と宿主細胞間相互作用における糖鎖の役割についての知見を深める。

B. 研究方法

(1) 組換え HBs の調製：L、M、S タンパク質に FLAG タグありなしの発現ベクターを構築し、HEK293T と Huh7 細胞株にトランスフェクトし、培養上清を回収して、発現をウエスタンブロット法で解析した。また、L、M、S タンパク質に N 末端側にシグナルペプチドを付加したものを調製し、同様に発現を確認

した。

(2) HBs-肝細胞相互作用解析系の構築：フローサイトメトリーを用いた方法で、HBs の Huh7、HepG2、HEK293T への吸着を定量化する方法を検討した。

(3) 受容体候補の選出：7種の肝癌細胞株（Huh7、KYN2、PCL/PLF、HAK1A、HepG2、KYN1、HAK1B）の培地、可溶性、膜画分のプロテオームとグライコプロテオーム（Am80-IGOT）解析の結果を基に、レクチン様タンパク質を探索した。

(4) 受容体候補発現及び抑制細胞調製：受容体候補の1種である ASGR1 を CHO 細胞に発現させた ASGR1-CHO を調製した。

C. 研究結果

(1) HBs の調製：シグナルペプチドを付加しない場合には S タンパク質のみの発現を観察できたが、シグナルペプチドを付加することで、L、M タンパク質の発現も観察することができた。

(2) HBs-肝細胞相互作用解析系の構築：フロ