

平成24年度 B型肝炎創薬実用化等研究事業『成果概要』

研究課題：HBVの感染初期過程を評価する系の開発とそれを用いた感染阻害低分子化合物およびレセプター探索

課題番号：H24-B創-肝炎-一般-006

予定期間：H24年度からH28年度まで

研究代表者：下遠野 邦忠

所属研究機関：(独) 国立国際医療研究センター

所属部局：肝炎免疫研究センター

職名：特任部長

年次別研究費(交付決定額)：1年目 84,000,000円

I. 研究の意義

- (1) B型肝炎ウイルスの受容体が不明のままである。
- (2) HBV感染を高感度で簡便に評価する系が無い。
- (2) 受容体探索に効率の良い *in vitro* スクリーニング系がない。
- (3) HBV感染過程を再現するために最適な肝細胞の培養系が確立されていない。
- (4) 臨床で用いられているHBV治療薬はインターフェロンとラミブジンなどの核酸アナログのみ。
- (5) 従来の治療法ではウイルスの完全駆除は難しく、再活性化や耐性株の出現が問題。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 受容体の探索を目的とし、蛍光分子を用いたHBV粒子の作製、もしくは蛍光遺伝子をキメラに持つHBVゲノムの作製により、感染感受性細胞の選別を行う。
- (2) ハイスループットスクリーニングにより効率的な細胞の選別と受容体分子の同定が期待できる。
- (3) 分担研究者(落谷)が独自に発見した4種のシグナル伝達阻害剤カクテルであるYPAC(PNAS, 2010)を応用する事で、初期感染過程を標的とした新規治療薬の開発に有用な細胞系を提供する。
- (4) 肝幹細胞の樹立を通してHBV感受性の高い細胞を開発する。
- (5) 理研天然化合物バンクの化合物ライブラリーを探索源とし、HBV感染初期過程を標的とする抗HBV剤の創出をおこなう。
- (6) ウイルス再活性化や耐性変異の出現を克服しうる新たなタイプのHBV治療薬の開発が期待される。
- (7) 感染阻害物質をプローブとしたケミカルバイオロジー研究により、HBV受容体の同定が期待される。

III. 1年間の研究成果

・研究代表者(下遠野 邦忠)

- (1) HBV複製を高感度で検出できるようにするために、GFP遺伝子を組み込んだゲノムを作成しウイルス粒子の産生を行った。
- (2) 独自に開発したHBV感染性を有する培養細胞株を用いて感染性評価を行った。

・研究分担者(杉山 真也)

- (1) HBSへGFPとmCherryを融合させた遺伝子を作製した。
- (2) 遺伝子組み換えにより、HBVゲノムとGFP遺伝子をキメラ化した。
- (3) 構造蛋白のみを産生し、感染粒子形成しないHBVコンストラクトを構築した。
- (4) (1) - (3)を組み合わせて発現させることで、一過性の感染能を有する蛍光化組換えHBV粒子の産生系を構築した。

・研究分担者(落谷 孝広)

- (1) 4種のシグナル伝達阻害剤カクテルであるYPACをラット初代培養肝細胞に添加し、その細胞増殖、肝細胞様形態の維持を観察した結果、YPAC未処理の細胞は培養14日後には97%が細胞老化用の形態を示して死滅したのに対し、YPAC処理群では、正常な染色体数を保ちながら、70%の肝細胞が正常な肝細胞様の形態と生存率を保っており、YPACの有効性が示唆された。
- (2) YPAC処理によって、成熟肝細胞の指標となるmicroRNA122の発現も、培養14日間に渡って維持されていた。

・研究分担者(長田 裕之)

- (1) スクリーニングに資する化合物を拡充するため、遺伝子改変微生物から新規代謝産物を単離。
- (2) 細胞形態変化を指標に薬剤作用を予測するモルフォベースプロファイリング法を開発。

IV. 平成25～28年度の課題

- (1) 蛍光HBV粒子の感染能と感染力価の評価。
- (2) ウイルス産生能力の向上。
- (3) ハイスループットスクリーニングへの適応。
- (4) 初年度でYPACの肝細胞形態・機能維持の能力が有る事が判明したことから、この手法をヒト初代培養肝細胞に適応し、microRNA122や肝臓特異的遺伝子発現を指標にして、肝細胞培養維持に有効かどうかを判定する。
- (5) YPACによる肝細胞機能維持と長期培養が可能になった場合、他の班員との共同研究で蛍光ラベル化HBV粒子を感染させ、その動態を解析し、初期感染過程を標的とした新規治療薬の開発に有用な細胞系を確立する。
- (6) 微生物生合成遺伝子改変技術や表現型スクリーニング基盤を利用し、微生物代謝産物を創製
- (7) 植物エキスからフラクションライブラリーを作製し、天然化合物を創製
- (8) HBV感染評価系を用いて、感染初期過程を阻害する化合物をスクリーニング
- (9) 有望な候補化合物は治療薬としての可能性を検証するとともに、バイオプローブとしてHBV受容体を探索

V. 行政施策への貢献の可能性

HBVの感染受容体探索系の樹立により、受容体探索のみならず、感染感受性細胞の取得が可能となり、*in vitro*での薬剤探索のスクリーニング系を構築できるため、ハイスループットによる新薬探索が可能になる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

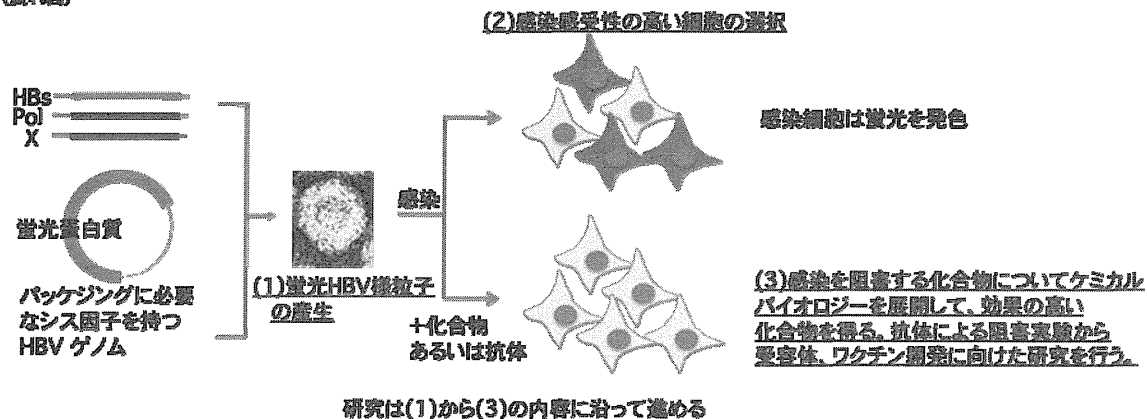
1. Weng L, Tian X, Gao Y, Watashi K, Shimotohno K, Wakita T, Kohara M, Toyoda T. Different mechanisms of hepatitis C virus RNA polymerase activation by cyclophilin A and B *in vitro*. *Biochim Biophys Acta*. 1820(12):1886-1892, 2012

2. Hirata Y, Ikeda K, Sudoh M, Tokunaga Y, Suzuki A, Weng L, Ohta M, Tobita Y, Okano Ozeki K, Kawasaki K, Tsukuda T, Katsume A, Aoki Y, Umehara T, Sekiguchi S, Toyoda T, Shimotohno K, Soga T, Nishijima M, Taguchi R, Kohara M. Self-enhancement of hepatitis C virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis. *PLoS Pathog.* 8(8):e1002860, 2012
3. Weng L, Kohara M, Wakita T, Shimotohno K, Toyoda T. Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase. *Gene.* 496(2):79-87, 2012
4. Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M, Seya T. In vitro models for analysis of the hepatitis C virus life cycle. *Microbiol Immunol.* 56(1):1-9. 2012
5. Ujino S, Nishitsuji H, Sugiyama R, Suzuki H, Hishiki T, Sugiyama K, Shimotohno K, Takaku H. The interaction between human initiation factor eIF3 subunit c and heat-shock protein 90: a necessary factor for translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Virus Res.* 163(1):390-395, 2012
6. Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsushashi 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. In press
7. Kumar V, Yi Lo PH, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, Muroyama R, Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Soluble MICA and a MICA Variation as Possible Prognostic Biomarkers for HBV-Induced Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One.* 7(9):e44743, 2012.
8. Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. *PLoS One.* 7(6):e39175, 2012.
9. Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M, Tokunaga K. No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. *BMC Med Genet.* 13:47, 2012.
10. Sugiyama M, Kimura T, Naito S, Mukaide M, Shinauchi T, Ueno M, Ito K, Murata K, Mizokami M. Development of specific and quantitative real-time detection PCR and immunoassays for λ 3-interferon. *Hepatology Res.* 2012 42(11):1089-99, 2012.
11. Saito H, Ito K, Sugiyama M, Matsui T, Aoki Y, Imamura M, Murata K, Masaki N, Nomura H, Adachi H, Hige S, Enomoto N, Sakamoto N, Kurosaki M, Mizokami M, Watanabe S. Factors responsible for the discrepancy between IL28B polymorphism prediction and the viral response to peginterferon plus ribavirin therapy in Japanese chronic hepatitis C patients. *Hepatology Res.* 42(10):958-965, 2012.
12. 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.* 56(4):1448-1456, 2012.
13. T. Nogawa, S. Takahashi, Y. Sekiyama, H. Takagi, M. Uramoto, H. Koshino, M. Kawatani, T. Shimizu, and H. Osada. Creation of novel reveromycin derivatives by alcohol added fermentation. *J. Antibiot.* (2012) in press.
14. Y. Futamura, M. Kawatani, S. Kazami, K. Tanaka, M. Muroi, T. Shimizu, K. Tomita, N. Watanabe, and H. Osada. Morphobase, an encyclopedic cell morphology database, and its use for drug target identification. *Chem. Biol.* (2012) in press.

Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等

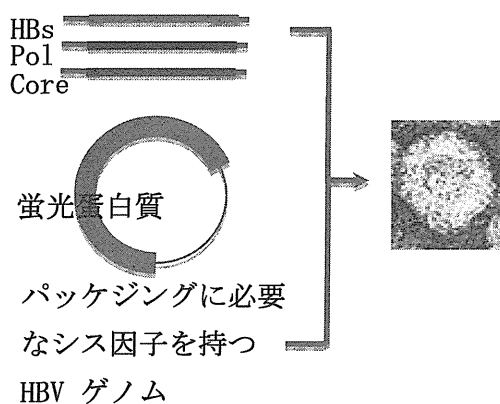
全体計画

(流れ図)

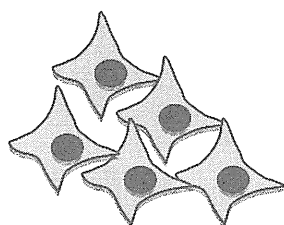


今年度の成果に関する概要 (図)

(1) 蛍光遺伝子を持つウイルス粒子の産生



(2) HBV 感染に感受性の高い細胞の樹立の試み



(3) スクリーニングのための化合物の整備

●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

昭和 47 年～昭和 58 年 国立遺伝学研究所 分子遺伝部 (研究員)
 昭和 53 年～昭和 56 年 米国 ウィスコンシン大学 McArdle 癌研究所 (博士研究員)
 昭和 58 年～平成 6 年 国立がんセンター研究所 ウイルス部 (室長・部長)
 平成 6 年～平成 19 年 京都大学 ウイルス研究所 (教授・所長)
 平成 19 年～21 年 慶應義塾大学 医学部 (特別研究教授)
 平成 21 年～24 年 千葉工業大学 附属総合研究所 (教授)
 平成 24 年～現在 (独) 国際医療研究センター 肝炎免疫研究センター (特任部長)

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

三浦 謹一郎 (国立遺伝学研究所)
 Howard M. Temin (米国 McArdle 癌研究所)
 杉村 隆 (国立がんセンター研究所)

・主な研究課題

- (1) レトロウイルスの複製機構の解析
- (2) レトロウイルスベクターに関する研究
- (3) ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV) の分子ウイルス学的研究
- (4) HCV の複製機構およびウイルス発がんに関する研究
- (5) HBV 複製の分子機構

・これまでの研究実績

Hirata Y, Ikeda K, Sudoh M, Tokunaga Y, Suzuki A, Weng L, Ohta M, Tobita Y, Okano K, Ozeki K, Kawasaki K, Tsukuda T, Katsume A, Aoki Y, Umehara T, Sekiguchi S, Toyoda T, Shimotohno K, Soga T, Nishijima M, Taguchi R, Kohara M. Self-enhancement of hepatitis C virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis. PLoS Pathog. 8:e1002860. 2012

Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M, Seya T. In vitro models for the analysis of HCV life cycle. Microbiol Immunol. 56: 1-9, 2011

Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, Wakita T, Shimotohno K, Seya T. Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV). PLoS One. 6(6):e21284, 2011

Murakami Y, Tanaka M, Toyoda H, Hayashi K, Kuroda M, Tajima A, Shimotohno K. Hepatic microRNA expression is associated with the response to interferon treatment of chronic hepatitis C. BMC Med Genomics. 3(1): 48, 2010.

Weng L, Hirata Y, Arai M, Kohara M, Wakita T, Watashi K, Shimotohno K, He Y, Zhong J, Toyoda T. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype-specific manner. J Virol. 84(22):11761-11770, 2010.

Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Wakita T, Baumert TF, Miyanari Y, Shimotohno K. Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. J Virol. 84(22): 12048-12057, 2010.

Shimizu Y, Hishiki T, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Kato A, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Shimotohno K. Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase reduce the infectivity of hepatitis C virus (HCV) through their catalytic activities on HCV-associated lipoproteins. Virology. 407(1):152-915, 2010

Arimoto K, Funami K, Saeki Y, Tanaka K, Okawa K, Takeuchi O, Akira S, Murakami Y, Shimotohno K. Polyubiquitin conjugation to NEMO by tripartite motif protein 23 (TRIM23) is critical in antiviral defense. Proc Natl Acad Sci U S A. 107(36): 15856-15861, 2010

- Ujino S, Yamaguchi S, Shimotohno K, Takaku H. Combination therapy for hepatitis C virus with heat-shock protein 90 inhibitor 17-AAG and proteasome inhibitor MG132. *Antivir Chem Chemother.* 20(4): 161-167, 2010.
- Aly HH, Qi Y, Atsuzawa K, Usuda N, Takada Y, Mizokami M, Shimotohno K, Hijikata M. Strain-dependent viral dynamics and virus-cell interactions in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood-borne hepatitis C virus. *Hepatology.* 50(3): 689-696, 2009
- Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T, Konishi H, Fujita T and Shimotohno K, Negative regulation of the RIG-I signaling by the novel ubiquitin ligase RNF125. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 : 7500-7505, 2007
- Miyinari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* 9(9):1089-1097, 2007
- Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Goto K, Aly HH, Shimotohno K. Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptor with viral RNA polymerase NS5B. *J Biol Chem.* 282(45):32765-32772, 2007
- Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyinari Y, Shimotohno K. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell.* 19 :111-122, 2005.
- Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, Yamaji M, Shimotohno K. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology.* 38 :1282-1288. 2003
- Hijikata, M, Mizushima, H., Tanji, Y., Komoda, Y., Hirowatari, Y., Akagi, T., Kato, N., Kimura, K., and Shimotohno, K., Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90: 10773-10777, 1993
- Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T. and Shimotohno, K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 9524-9528, 1990
- Kitado, H., Chen, I.S.Y., Shah, N.P., Cann, A.J., Shimotohno, K. and Fan, H. U3 sequences from HTLV-I and -II LTRs confer pX protein response to a murine leukemia virus LTR. *Science*, 235: 901-904, 1987
- Shimotohno, K., Takano, M., Teruuchi, T. and Miwa, M. Requirement of multiple copies of a 21-nucleotide sequence in the U3 regions of human T-cell leukemia virus type I and type II long terminal repeats for trans-acting activation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 8112-8116, 1986
- Shimotohno, K., Miwa, M., Slamon, D.J., Chen, I.S.Y., Hoshino, H., Takano, M., Fujino, M. and Sugimura T. Identification of new gene products coded from X regions of human T-cell leukemia viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 302-306, 1985
- Wachsman, W., Shimotohno, K., Clark, S.C., Golde, D.W. and Chen, I.S.Y. Expression of the 3' terminal region of human T-cell leukemia virus. *Science*, 266: 177-179, 1984
- Slamon, D.J., Shimotohno, K., Cline, M.J., Golde, D.W. and Chen, I.S.Y. Identification of the putative transforming protein of the human T-cell leukemia virus. HTLV-I and HTLV-II. *Science*, 266: 61-65, 1984
- Shimotohno, K. and Temin, H.M. Loss of intervening sequence in genomic mouse α -globin DNA inserted in an infectious retrovirus vector. *Nature*, 299: 265-268, 1982
- Shimotohno, K. and Temin, H.M. Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus. *Cell*, 26: 67-77, 1981
- Shimotohno, K., Mizutani, S. and Temin, H.M. Sequence of retrovirus provirus resembles that of bacterial transposable elements. *Nature*, 285: 550-554, 1980

課題番号(H24-B創-肝炎-一般-006)

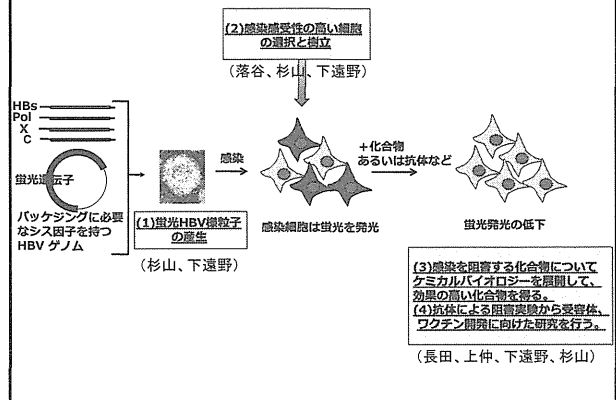
課題「HBVの感染初期過程を評価する系の開発とそれを用いた感染阻害低分子化合物およびレセプター探索」

研究組織

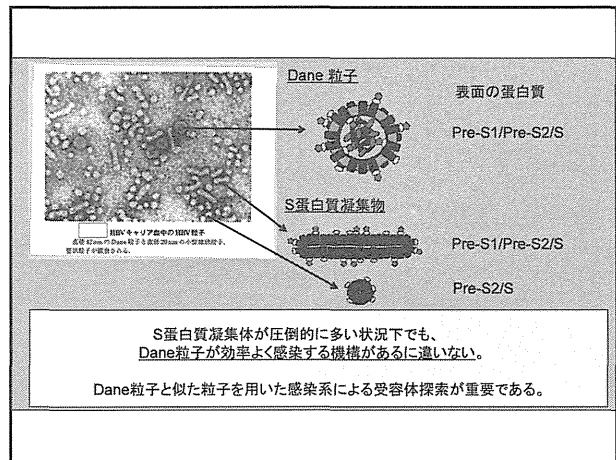
分担課題

下遠野 邦忠 (国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター)	蛍光発色遺伝子を発現するHBV様粒子の産生とそれを用いた感染初期過程の解析と阻害物質のスクリーニング。
落谷 孝広 (国立がん研究センター 研究所)	HBV感染モデル細胞系の樹立。
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)	蛍光標識HBVを用いた感染評価と受容体探索。
長田 裕之 (理研 基盤研究所)	HBV感染を阻害する低分子化合物のスクリーニング。
上仲 一義 (化学及血清療法研究所 菊池研究所) (研究協力者)	肝細胞およびHBV蛋白質モノクローナル抗体を用いた感染評価。

研究内容と班員との関係



HBV感染過程を感度よく検出する系の開発



感染初期過程を解析するための方針

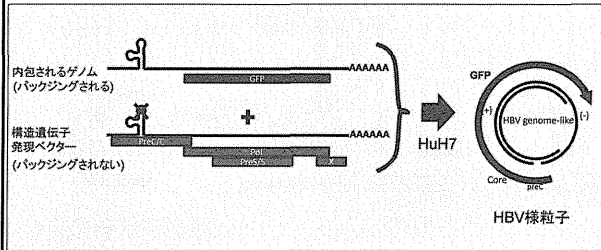
- (1) HBV様粒子を用いた感染系を利用する。
(一過性感染系)
- (2) 感染過程の検出感度を上げる工夫をする。
(蛍光発光などを用いて感染の感度を上げ識別を容易にする)
- (3) 感染しやすい細胞を得る。
(既存の細胞株に限定せず、新たな細胞も樹立する。
また、培養方法を工夫する)

開発に向けて特に留意する点

- (1) 高感度
- (2) 簡便
- (3) 定量的
- (4) 安全(感性を持たない)

蛍光遺伝子を内包するHBV様粒子を用いた感染系はこれらの条件を満たし得る

蛍光遺伝子を内包するウイルスの産生



(杉山、下遠野)

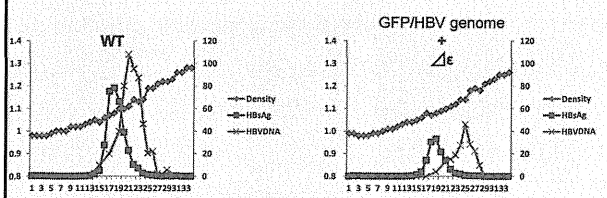
1. HBV擬粒子産生実験

遺伝子導入に用いた細胞: HuH7

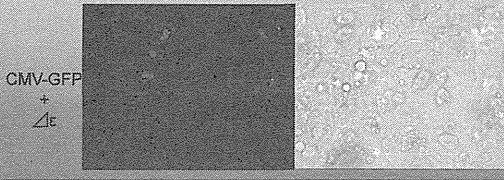
1. HBV蛋白質発現プラスミド ($\Delta\epsilon$: delta epsilon 1.2xHBV genome)
2. GFP or NanoLuc expressing HBV genome (~3kb) like plasmid

培養上清を濃縮、超遠心で部分精製
(産生されたHBV擬粒子の定量はまだ行っていない。)

蛍光内包HBV様粒子の産生



一過性感染ウイルスの感染
Primary Hepatocytes (Phenix-Bio)



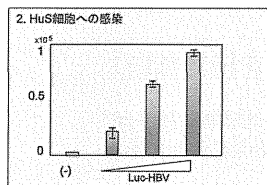
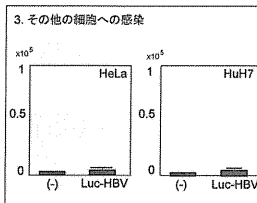
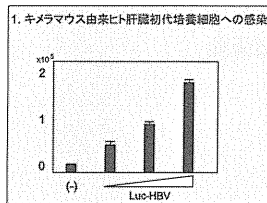
感染を定量的に評価する

2. NanoLuc遺伝子内包HBV様擬粒子を作成して感染を定量的に評価する。

感染に用いた細胞種:

- (1) ヒト型肝臓キメラマウス由来ヒト初代培養細胞 (Phoenix Bioから入手)
(HBV感染が明らかになっている細胞)
- (2) HuS細胞
(不死化ヒト肝細胞樹立株, Aty HH, Shimotohno K et al., J. Hepatol, 2007)
- (3) その他の細胞 (HeLa, HuH7)
(HBVが感染しない細胞)

HBV様粒子感染のLuc 活性による評価



我々が樹立したHuS細胞(不死化細胞)に感染が成立した!

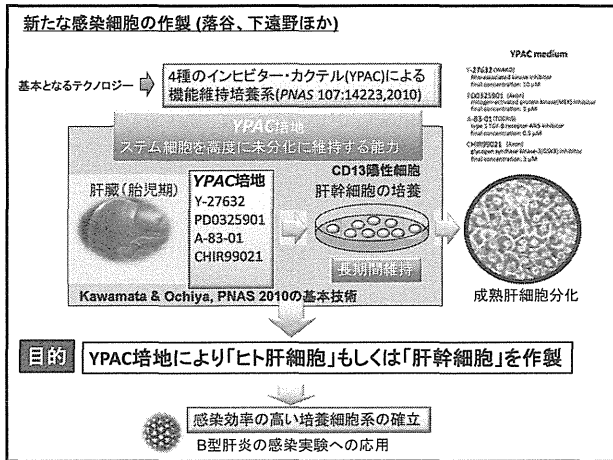
この細胞を用いて感染条件等が検証可能であり、また、感染初期の解析実験も可能である。

蛍光遺伝子を発現するHBV様粒子を構築した。

これを用いて感染初期過程を、
(1)感度よく、(2)簡便に、(3)定量的に、(4)安全に
評価できる道が拓けた。

次年度以降の課題:

- (1) この感染系が生理的に意味がある感染を反映しているかどうかの検証。
(HBV抗体での感染阻害、既知のHBV感染阻害剤による検証実験。
ヒト肝臓キメラマウスへの感染実験)
- (2) 感染初期過程を検出する感度をさらに上げる。
- (3) 感染性の高い培養細胞側の開発を行う。
- (4) スクリーニングを開始する条件を整える



現在までの進行状況

研究成果1:
 低分子化合物の組み合わせの最適化により成体ラット肝細胞から胆管細胞と肝細胞に分化可能な「肝幹細胞」と思われる細胞を増殖させることに成功した。

研究成果2:
 ラット肝細胞の結果をもとに、凍結のヒト成体肝細胞を低分子化合物(4種の混合:YPAC)を含む培養液で培養した結果、肝細胞の形態を長期間維持したまま培養することに成功した。

増殖したラット肝幹細胞様のコロニーの形態

Control YPAC (+)

培養21日後のヒト肝細胞の形態比較

長田グループ: H24年度研究課題進捗状況

2012 → 2014

化合物ライブラリーの整備・拡充

- 天然化合物の系統的収集
 放線菌・糸状菌・植物フラクションライブラリー作製
 NPPlotを利用した化合物の単離同定
 ・植物エキスのフラクションライブラリー構築を開始
 ・NPPlotを利用し、新規化合物を単離精製中
- 生合成機構を利用した微生物代謝産物の創製
 バスウェイ工学による新規化合物の創出
 休眠遺伝子覚醒による未知代謝産物の発掘
 ・Reveromycin類縁体を創製(Nogawa et al, JA)
 ・休眠遺伝子覚醒による未知代謝産物を探索中
- 表現型スクリーニング基盤の整備
 ・細胞形態変化データベースを用いた薬剤作用予測システムを構築(Futamura et al, Chem Biol)

収集化合物の実例 NPDepto

(1) 新規二糖ミックスライブラリー

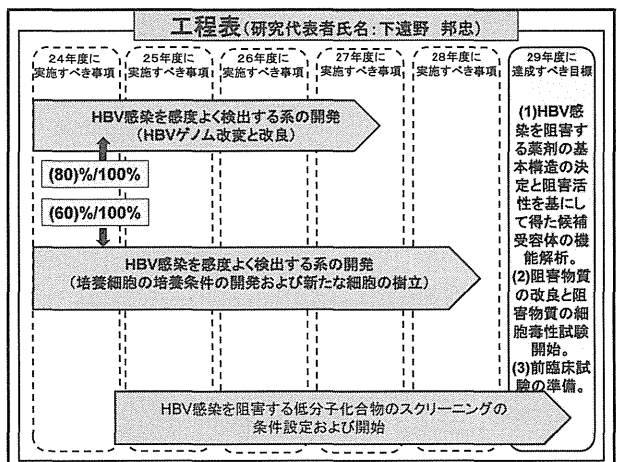
化合物名	構造	化合物名	構造
SP-101	<chem>C1=CC=C(C=C1)O[C@H]2[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]2O</chem>	SP-107	<chem>C1=CC=C(C=C1)O[C@H]2[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]2O</chem>
SP-102	<chem>C1=CC=C(C=C1)O[C@H]2[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]2O</chem>	SP-108	<chem>C1=CC=C(C=C1)O[C@H]2[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]2O</chem>
SP-103	<chem>C1=CC=C(C=C1)O[C@H]2[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]2O</chem>	SP-109	<chem>C1=CC=C(C=C1)O[C@H]2[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]2O</chem>
SP-104	<chem>C1=CC=C(C=C1)O[C@H]2[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]2O</chem>	SP-110	<chem>C1=CC=C(C=C1)O[C@H]2[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]2O</chem>
SP-105	<chem>C1=CC=C(C=C1)O[C@H]2[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]2O</chem>	SP-111	<chem>C1=CC=C(C=C1)O[C@H]2[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]2O</chem>
SP-106	<chem>C1=CC=C(C=C1)O[C@H]2[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]2O</chem>	SP-112	<chem>C1=CC=C(C=C1)O[C@H]2[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]2O</chem>

→ ウイルス侵入を標的とした薬剤

(2) 新規抗ウイルス物質

化合物名	構造	化合物名	構造
SP-1441A	<chem>C1=CC=C(C=C1)O[C@H]2[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]2O</chem>	SP-1441B	<chem>C1=CC=C(C=C1)O[C@H]2[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]2O</chem>

→ DNA複製を標的とした薬剤



利益相反について

利益相反の有無等

ア 利益相反の有無 無

イ 利益相反がある場合には具体的な内容(以下に記載)

別添3

他の研究班への参加状況

研究代表者が、「肝炎等克服緊急対策研究事業」または「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(肝炎関係研究分野)」研究班の研究代表者として参加しているが(ア又はイに記載)

ア 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加していない。
 イ 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加している。(以下①、②を記載)

① (研究班名)「肝炎ウイルスによる肝疾患発症の宿主要因と発症予防に関する研究」(研究代表者名: 下遠野 邦忠)

② 他の研究班で担当している研究と、今回申請している研究の違い(研究内容が重複していないことを具体的に説明)

今回申請した研究内容はHBVの感染初期過程を評価する系の開発とそれを用いた、感染初期過程を阻害する薬剤の開発および受容体の解明であります。一方、「肝炎ウイルスによる肝疾患発症の宿主要因と発症予防に関する研究」においてはHCV感染による宿主の疾患発症とその予防に関する研究であり、両研究は明らかに異なる内容です。

別添3

合同研究会議開催状況

他の研究班と合同での研究会議開催状況(平成24年度)

イ 他の研究班と合同で研究会議を開催した。
(開催している場合は、①開催日、②他の研究班の名称、③他の研究班の研究代表者名を記載してください)

平成25年1月16日
3班合同班会議を国立感染症研究所で開催。
各班の研究代表者名は以下④通り

脇田 隆宇、上田 啓次、下遠野 邦忠

平成24年度 B型肝炎創薬実用化等研究事業『成果概要』

研究課題：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

課題番号：H24-B創-肝炎-一般-007

予定期間：H24年度からH28年度まで

研究代表者：成松 久

所属研究機関：独立行政法人 産業技術総合研究所

所属部局：糖鎖医工学研究センター

職名：研究センター長

年次別研究費(交付決定額)：1年目 118,867,000 円

I. 研究の意義

(1) 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欧米タイプの感染も広がりつつある。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い場合が多く、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。

(2) 糖鎖が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、HBVの感染過程における糖鎖解析は、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。

(3) 我が国で使用されている主なHBVワクチン(HBs抗原)は酵母由来であり、ヒト感染抗原とは異なり糖鎖構造を持たないHBs抗原が用いられており問題点が指摘されている。有効性が高い新規HBVワクチンの開発が感染防御の上で重要である。

II. 研究の目的、期待される成果

(1) 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。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。

(2) HBV上の糖鎖の解析から、HBVの早期検出法の開発と医療現場での実用化が期待される。

(3) ヒト型糖鎖を有するHBs抗原が現行のワクチンより効率よく中和HBV抗体を誘導する場合、新規ワクチンの開発に繋がる。

III. 1年間の研究成果

・研究代表者(成松 久)

(1) 本研究に係る、ヒト由来試料を用いた研究について、各参画機関の倫理承認の手続きを進めた。

(2) 本研究に係る、HBVを用いた研究について、微生物実験、組換え実験承認および大臣確認の手続きを進めるとともに、実施体制を整えた。

・ 研究分担者(梶 裕之・久野 敦)

(1) 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た。

(2) 質量分析 (MS) を用いたグライコプロテオミクス解析法を検討し、精製 HBs 抗原上の糖鎖付加位置決定を行い精製 HBs 中 L-HBs 抗原の N 末側にも N-glycan 修飾を確認した。

・ 研究分担者(梅谷内 晶・梶 裕之・伊藤 浩美・安形 清彦)

(1) 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 (RNA 解析、糖鎖解析) に適した調製を行った。

(2) 糖鎖遺伝子発現解析 (qRT-PCR、次世代シーケンサ) 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。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。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) の結果を基に、内在性レクチンの検索を行った。

・ 研究分担者(館野 浩章・佐藤 隆)

(1) HBV ジェノタイプ (A-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。

(2) HBs と肝癌細胞株との相互作用解析系の構築検討を行った。

・ 研究分担者(安形 清彦・梅谷内 晶・米田 政志・伊藤 清顕)

(1) 課題 2 の解析で見出された糖鎖遺伝子を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 ライブラリの作成を進めた。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。

(2) HBV 作製実験を行う愛知医科大学での大臣確認の申請を行い、糖鎖合成系の阻害実験の準備を進めた。

・ 研究分担者(千葉 靖典)

(1) 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、出芽酵母で発現するために最適なコドンに変換し全合成を行った。

(2) 合成した遺伝子を出芽酵母の発現ベクターに組み込み、酵母の形質転換を行った。

・ 研究分担者(溝上 雅史・是永 匡紹・飯島 沙幸)

(1) HBs 抗原の cDNA と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。

(2) HBV 感染患者の血清収集のための準備を進めた。

IV. 平成 25～28 年度の課題

- (1) 細胞培養及び血清中から調製された HBs 抗原を精製し、レクチンアレイ解析と MS 法で糖鎖プロファイルや詳細な構造を分析し相互に比較する。糖鎖解析の結果を基に、3 年次以降は肝臓グループにて収集された患者血清中毎の HBV についてレクチンアレイを用いて比較糖鎖解析を行う。
- (2) 肝臓細胞株やヒト肝化マウス組織・細胞（±HBV 感染）を対象とし、より詳細な糖鎖解析を進めていく。次世代シーケンサや産総研保有の糖鎖遺伝子発現解析システム（qPCR アレイ）による解析を行い、糖鎖遺伝子と内在性レクチンなどの発現解析を行う。レクチンアレイによる高感度糖鎖プロファイルおよび MS による糖鎖構造解析を進め、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継続して行う。これらの解析結果により、統合的に HBV 感染の糖鎖合成への影響を精査する。
- (3) HBs 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。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み、アレイ化し HBV との相互作用を解析し、HBV 感染における糖鎖-受容体を創薬ターゲットとして捉える。
- (4) 産総研で作製された糖鎖遺伝子ライブラリや siRNA を用いて、数多くの糖鎖改変宿主細胞を作製し HBV 作成を試み、糖鎖改変 HBs 抗原のウイルス機能（複製・分泌）への影響を解析する。肝細胞においてターゲットとする糖鎖合成系を阻害し、HBV の感染実験を行い、HBV の感染・増殖を試験し、創薬シーズの可能性を検討する。
- (5) 形質転換酵母で生産した HBs 抗原の発現確認を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を利用して行うとともに、その性状解析を行う。また異なる糖鎖構造を持つ精製 HBs 抗原の調製を行う予備実験として、糖鎖付加 HBs 部分断片の作製を行い、免疫源として供給を検討する。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 患者血清中の HBV のスクリーニングと抗体に依る HBs 検出を逃れる変異 HBV を検出できる技術の開発そして HBV 感染や治療に因る肝臓の変化を簡便に診断できる技術の開発・臨床応用は、肝生検など侵襲性のある検査と比較して、安全性が高く安価であり、社会福祉に大きく貢献できる。
- (2) 現行のワクチンより有効な新規ワクチンの開発は、現在でも一定の割合で新しい感染者が増える HBV 感染防御に向けたスタンダード ワクチネーション化などの施策に繋がる。
- (3) HBV 感染の治療法の開発において糖鎖がターゲットとなれば、インフルエンザ治療におけるタミフルに次ぐものになり、他感染症の治療法研究に発展する可能性がある。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

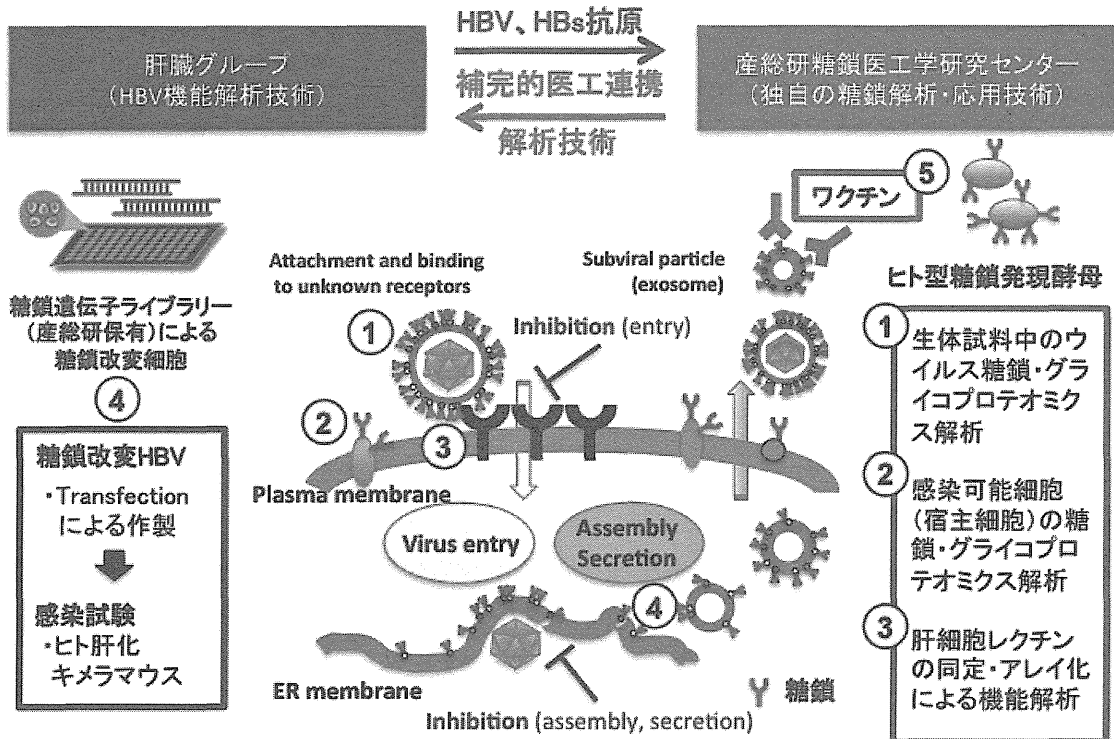
特になし

Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。

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

HBVにおける糖鎖の機能解明には、「ウイルス上機能分子と宿主上機能分子のインタクトでの相互作用解析」が重要

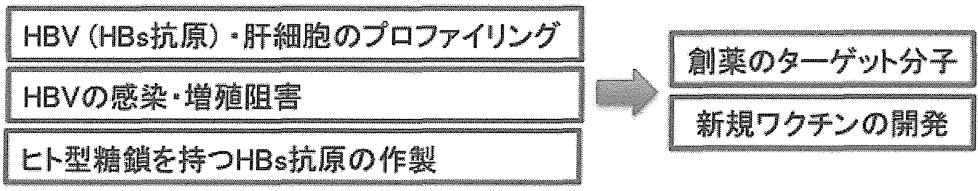


主要テーマと1年次の成果

- ① HBs抗原の糖鎖解析方法の検討と糖鎖付加位置の決定
- ② 肝臓細胞の解析用サンプルの調製とプロテオミクス解析
- ③ HBs発現系と相互作用解析系の開発検討
- ④ 糖鎖遺伝子ライブラリーの構築と糖鎖改変細胞の作成条件の最適化
- ⑤ HBs cDNAの酵母発現最適化と酵母での発現

HBs抗原上の糖鎖の解析と応用

HBV-宿主細胞の相互作用



今後の計画と期待される成果

●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

- 1974.3 慶應義塾大学医学部卒業
- 1979.3 慶應義塾大学医学研究科大学院修了（医学博士）
- 1979.4 慶應義塾大学医学部微生物学教室・助手
- 1983.4 米国 NIH 留学
- 1986.10 慶應義塾大学医学部微生物学教室・講師
- 1991.1 同上・助教授
- 1991.4 創価大学生命科学研究所・教授
- 2000.10 工業技術院・主任研究官
- 2001.4 産業技術総合研究所・分子細胞工学研究部門・総括研究員
筑波大学医学医療系連携大学院・教授、現在に至る。
- 2002.6 産業技術総合研究所・糖鎖工学研究センター・副センター長
- 2006.12 産業技術総合研究所・糖鎖工学研究センター・センター長、現在に至る。
- 2011.4 慶應義塾大学医学部・客員教授、現在に至る。
- 2011.7 中国・上海交通大学・顧問教授、現在に至る。

・主な共同研究者（又は指導を受けた研究者）

下記の主な共同研究者のうち、過去の肝疾患関連の共同研究での研究者を太字にて明記した。

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）、田中 靖人（名古屋市立大学）、山元 弘（神戸学院大学）、橋本 康弘（福島県立医科大学）、野口 雅之（筑波大学）
入村 達郎（東京大学）、三善 英知（大阪大）、中西 速夫（愛知県がんセンター）、田岡 万悟（首都大学東京）、尾野 雅哉（国立がんセンター）、伊東 信（九州大学院）、正田 純一（筑波大学）、高橋 智（筑波大学）、山元 弘（大阪大院）、梅澤 明弘（国立成育医療センター研究所）、谷口 直之（理化学研究所・大阪大学）、本家 孝一（高知医科大学）、古川 鋼一（名古屋大学）、木全 弘治（愛知医科大学）、渡辺 秀人（愛知医科大学）、西原 祥子（創価大学）、山村 研一（熊本大学）、掛樋 一晃（近畿大学）、山下 克子（東京工業大学）、中森 正二（大阪医療センター）、渡邊 昌彦（北里大学）、野村 将春（東京医科大学）、ほか 多数。

・主な研究課題

- 糖タンパク質や糖脂質の糖鎖部分の生合成機構、構造解析、生理機能解析、疾患との関連解析
- H12.4月～H15.3月：NEDO 受託研究「ヒト糖鎖合成関連遺伝子ライブラリーの構築」
- H14.4月～H17.2月：NEDO 受託研究「糖鎖エンジニアリングプロジェクト/糖鎖構造解析技術開発」
- H17.4月～H23.2月：NEDO 受託研究「糖鎖機能活用技術開発」
- H23.4月～：独立行政法人科学技術振興機構「糖鎖統合データベースと研究支援ツールの開発」

・ これまでの研究実績

論文(査読有)198報より主なものを選択し、直近年度から順に記載。

- 1 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, 413(21-22):1796-1799
- 2 Sugahara D, Kaji H, Sugihara K, Asano M, Narimatsu H Large-scale identification of target proteins of a glycosyltransferase isozyme by Lectin-IGOT-LC/MS, an LC/MS-based glycoproteomic approach. Sci Rep. 2012, 2:680
- 3 Kubota T, Kumagai A, Ito H, Furukawa S, Someya Y, Takeda N, Ishii K, Wakita T, Narimatsu H, Shirato H Structural Basis for the Recognition of Lewis Antigens by Genogroup I Norovirus. J. Virol. 2012, 86(20):11138-11150
- 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, 56(4):1448-56
- 5 Kaji H, Shikanai T, Sasaki-Sawa A, Wen H, Fujita M, Suzuki Y, Sugahara D, Sawaki H, Yamauchi Y, Shinkawa T, Taoka M, Takahashi N, Isobe T, Narimatsu H, Large-scale identification of N-glycosylated proteins of mouse tissues and construction of a glycoprotein database, GlycoProtDB. J Proteome Res. 2012, 11(9):4553-66
- 6 Togayachi A, Narimatsu H Functional Analysis of β 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferases and Regulation of Immunological Function by Polylactosamine. Trends Glycosci. Glycotechnol. 2012, 24(137):95-111
- 7 Liu TW, Kaji H, Togayachi A, Ito H, Sato T, Narimatsu H A chemoenzymatic approach toward the identification of fucosylated glycoproteins and mapping of N-glycan sites. Glycobiology. 2012, 22(5):630-7
- 8 Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Saito K, Ito K, Tsuruno C, Nagai S, Takahama Y, Mizokami M, Hirabayashi J, Narimatsu H LecT-Hepa: A triplex lectin-antibody sandwich immunoassay for estimating the progression dynamics of liver fibrosis assisted by a bedside clinical chemistry analyzer and an automated pretreatment machine. Clin Chim Acta. 2011, 412(19-20):1767-72
- 9 Liu TW, Ito H, Chiba Y, Kubota T, Sato T, Narimatsu H Functional expression of L-fucokinase/GDP-L-fucose pyrophosphorylase from *Bacteroides fragilis* in *Saccharomyces cerevisiae* for the production of nucleotide sugars from exogenous monosaccharides. Glycobiology. 2011, 21(9):1228-36
- 10 Narimatsu H, Kubota T, Furukawa S, Shimojima M, Iwasaki H, Tozawa Y, Tachibana K, Narimatsu H Co-translational function of Cosmc, core 1 synthase specific molecular

- chaperone, revealed by a cell-free translation system. *FEBS Lett.* 2011, 585(9):1276-1280
- 11 Sato T, Kudo T, Ikehara Y, Ogawa H, Hirano T, Kiyohara K, Hagiwara K, Togayachi A, Ema M, Takahashi S, Kimata K, Watanabe H, Narimatsu H Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1 is necessary for normal endochondral ossification and aggrecan metabolism. *Biol Chem.* 2011, 286(7):5803-12
- 12 Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Itakura Y, Kuno A, Ogawa T, Yamada M, Akutsu H, Takahashi Y, Kanzaki S, Narimatsu H, Hirabayashi J, Umezawa A. Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells. *Genes Cells.* 2011, 16(1):1-11
- 13 Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Angata T, Unno S, Sogabe M, Ozaki H, Ito K, Hirabayashi J, Mizokami M, Narimatsu H Multilectin Assay for Detecting Fibrosis-Specific Glyco-Alteration by Means of Lectin Microarray. *Clin Chem.* 2011, 57(1):48-56
- 14 Matsuda A, Kuno A, Kawamoto T, Matsuzaki H, Irimura T, Ikehara Y, Zen Y, Nakanuma Y, Yamamoto M, Ohkohchi N, Shoda J, Hirabayashi J, Narimatsu H Wisteria floribunda agglutinin-positive mucin 1 is a sensitive biliary marker for human cholangiocarcinoma. *Hepatology.* 2010, 52(1):174-82
- 15 Togayachi A, Kozono Y, Ikehara Y, Ito H, Suzuki N, Tsunoda Y, Abe S, Sato T, Nakamura K, Suzuki M, Goda HM, Ito M, Kudo T, Takahashi S, Narimatsu H Lack of lacto/neolacto-glycolipids enhances the formation of glycolipid-enriched microdomains, facilitating B cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010, 107(26):11900-5.
- 16 Wada Y, Dell A, Haslam SM, Tissot B, Canis K, Azadi P, Backstrom M, Costello CE, Hansson GC, Hiki Y, Ishihara M, Ito H, Kakehi K, Karlsson N, Hayes CE, Kato K, Kawasaki N, Khoo KH, Kobayashi K, Kolarich D, Kondo A, Lebrilla C, Nakano M, Narimatsu H Novak J, Novotny MV, Ohno E, Packer NH, Palaima E, Renfrow MB, Tajiri M, Thomsson KA, Yagi H, Yu SY, Taniguchi N Comparison of methods for profiling O-glycosylation: Human Proteome Organisation Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study of IgA1. *Mol Cell Proteomics.* 2010, 9(4):719-27
- 17 Ito H, Kuno A, Sawaki H, Sogabe M, Ozaki H, Tanaka Y, Mizokami M, Shoda J, Angata T, Sato T, Hirabayashi J, Ikehara Y, Narimatsu H Strategy for Glycoproteomics: Identification of Glyco-Alteration Using Multiple Glycan Profiling Tools. *J Proteome Res.* 2009, 8(3):1358-67
- 18 Amano K, Chiba Y, Kasahara Y, Kato Y, Kaneko MK, Kuno A, Ito H, Kobayashi K, Hirabayashi J, Jigami Y, Narimatsu H Engineering of mucin-type human glycoproteins in yeast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008, 105(9):3232-7
- 19 Kato Y, Kaneko MK, Kunita A, Ito H, Kameyama A, Ogasawara S, Matsuura N, Hasegawa Y, Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ozaki Y, Narimatsu H Molecular analysis of the pathophysiological binding of the platelet aggregation-inducing factor podoplanin to the C-type lectin-like receptor CLEC-2. *Cancer Sci.* 2008, 99(1):54-61
- 20 Togayachi A, Kozono Y, Ishida H, Abe S, Suzuki N, Tsunoda Y, Hagiwara K, Kuno A,

- Ohkura T, Sato N, Sato T, Hirabayashi J, Ikehara Y, Tachibana K, Narimatsu H Polylactosamine on glycoproteins influences basal levels of lymphocyte and macrophage activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007, 104(40):15829-34
- 21 Tateno H, Uchiyama N, Kuno A, Togayachi A, Sato T, Narimatsu H, Hirabayashi J A novel strategy for mammalian cell surface glycome profiling using lectin microarray. *Glycobiology*. 2007, 17(10):1138-46
- 22 Ito H, Kameyama A, Sato T, Sukegawa M, Ishida HK, Narimatsu H Strategy for the fine characterization of glycosyltransferase specificity using isotopomer assembly. *Nat Methods*. 2007, 4(7):577-82
- 23 Kimura S, Kameyama A, Nakaya S, Ito H, Narimatsu H Direct On-Membrane Glycoproteomic Approach Using MALDI-TOF Mass Spectrometry Coupled with Microdispensing of Multiple Enzymes. *J Proteome Res*. 2007, 6(7):2488-94
- 24 Wada Y, Azadi P, Costello CE, Dell A, Dwek RA, Geyer H, Geyer R, Kakehi K, Karlsson NG, Kato K, Kawasaki N, Khoo KH, Kim S, Kondo A, Lattova E, Mechref Y, Miyoshi E, Nakamura K, Narimatsu H, Novotny MV, Packer NH, Perreault H, Peter-Katalinic J, Pohlentz G, Reinhold VN, Rudd PM, Suzuki A, Taniguchi N Comparison of the methods for profiling glycoprotein glycans-HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study. *Glycobiology*. 2007, 17(4):411-22
- 25 Kubota T, Shiba T, Sugioka S, Furukawa S, Sawaki H, Kato R, Wakatsuki S, Narimatsu H Structural basis of carbohydrate transfer activity by human UDP-GalNAc: polypeptide alpha-N-acetylgalactosaminyltransferase (pp-GalNAc-T10). *J Mol Biol*. 2006, 359(3):708-27
- 26 Iwai T, Kudo T, Kawamoto R, Kubota T, Togayachi A, Hiruma T, Okada T, Kawamoto T, Morozumi K, Narimatsu H Core 3 synthase is down-regulated in colon carcinoma and profoundly suppresses the metastatic potential of carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005, 102(12):4572-7
- 27 Kudo T, Kaneko M, Iwasaki H, Togayachi A, Nishihara S, Abe K, Narimatsu H Normal embryonic and germ cell development in mice lacking alpha 1,3-fucosyltransferase IX (Fut9) which show disappearance of stage-specific embryonic antigen 1. *Mol Cell Biol*. 2004, 24(10):4221-8

特許（出願中を含め）計 70 件（登録済み特許は計 44 件）。下記に関連のある 2 件を記載する。

1. 特許第 5031928 号「糖タンパク質の測定方法、肝疾患の検査方法、糖タンパク質定量用試薬および肝疾患病態指標糖鎖マーカータンパク質」
2. W011/007764 「肝疾患病態指標糖鎖マーカー」

AIIST

「産業技術総合研究所」の研究成果を社会に還元するためのウイルスの糖鎖解析に関する研究

慢性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

産業技術総合研究所
糖鎖医工学研究センター
成松 久

AIIST

HBV感染における糖鎖研究の重要性

ウイルス	宿主(レセプター)	ウイルス・宿主
ヒロリ番 インフルエンザウイルス ノロウイルス	糖鎖(血液型抗原) 糖鎖(シアル酸) 糖鎖(血液型抗原)	レクチン レクチン レクチン
ヒト免疫不全ウイルス(HIV) B型肝炎ウイルス(HBV) B型肝炎ウイルス(HBV)	レクチン(DC-SIGN) レクチン(DC-SIGN/LSIGN) レクチン 糖鎖?	糖鎖 糖鎖? レクチン?

ウイルス感染と糖鎖
Attachment and binding to unknown receptors
Entry inhibition
Plasma membrane
Virus entry
Assembly Secretion
ER membrane
Packaging inhibition

ワクチン
タミフルなど(シアラゲーゼ阻害剤)
HBs抗原上の糖鎖の変化が宿主感染に影響を与える(伊藤ら J. Virol 2010)

AIIST

糖鎖医工学研究センターと肝臓グループの研究体制

肝臓グループ 統括: 溝上 雅史	糖鎖医工学研究センター 統括: 成松 久
<ul style="list-style-type: none"> HBV複製 / HBV解析 国立自然疫病学センター 橋本 雅夫 越水 博幸 名石原市立大学 筑紫 尚平 糖鎖改変HBV作製 京都府立大学 末田 政志 伊藤 清輝 HBV抗体スクリーニング 	<ul style="list-style-type: none"> グリコプロテオミクス解析 糖鎖構造解析 鹿谷之、伊藤 浩美 レクチンアレイ解析 久野 敏 新規アレイ開発 P2在性レクチン 館野 浩幸、佐藤 隆 糖鎖遺伝子解析 糖鎖改変技術 樋谷 内島、安形 清輝 酵母(Hi7)型糖鎖 大量発現系 千葉 謙典

ウイルスと宿主上の機能分子を生きたまま相互作用解析

1. HBVの糖鎖解析
2. 宿主肝細胞の糖鎖解析
3. 宿主-HBVの相互作用
4. 糖鎖改変HBV
5. ヒト型糖鎖HBs抗原

創薬のターゲット分子
新規ワクチンの開発

AIIST

糖鎖医工学研究センター: HBVの糖鎖解析

レクチンアレイ解析による立体構造を考慮した糖鎖プロファイリング

本年度はプロトコルの確立が主目的

市販ヒト血清HBsのレクチンアレイ解析
従来法
改良法

問題点: ① 試行抗体に満足するものはなかった
② 血中HBsのエンリッチにはレクチンと抗体の併用が必要【要簡便化】
予定: 自作抗体も視野に入れ検索する

AIIST

糖鎖医工学研究センター: HBVの糖鎖解析

質量分析(MS)によるHBVの糖鎖構造解析

目的: 遺伝子型、糖鎖構造などの異なるHBVあるいはSVPの糖鎖構造を分析し、感染能や結合能との相関を解析する。

方法の概略:

HBV → HBsAg (L, M, S) → HILIC → IGOT → LC-MS → キャリアタンパク質固定糖鎖付加部位決定糖鎖パラエーラー解析

糖鎖付加:
S pre-S3に加え、LのPre-S1領域でも部分的に糖鎖が付加されている

糖ペプチド
ER lumen
Cytosol
glycosylated
non-glycosylated
S (Sの糖鎖付加 -SC3)

AIIST

糖鎖医工学研究センター: HBV-宿主細胞における糖鎖の役割

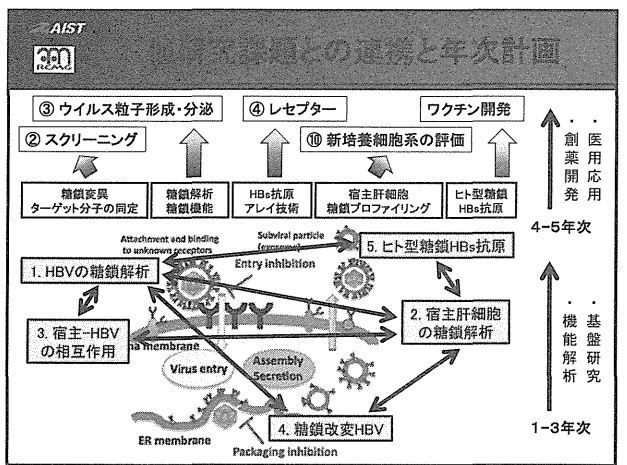
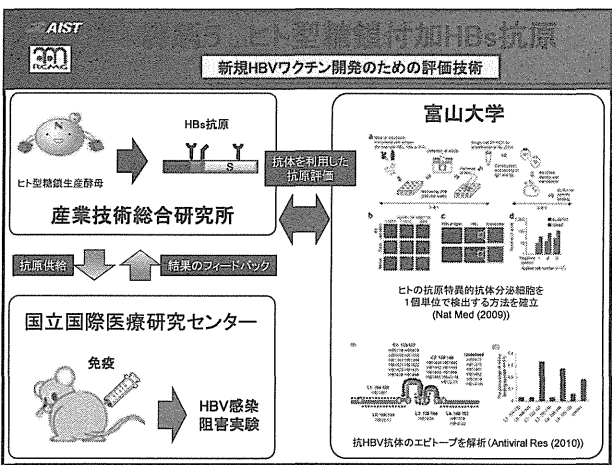
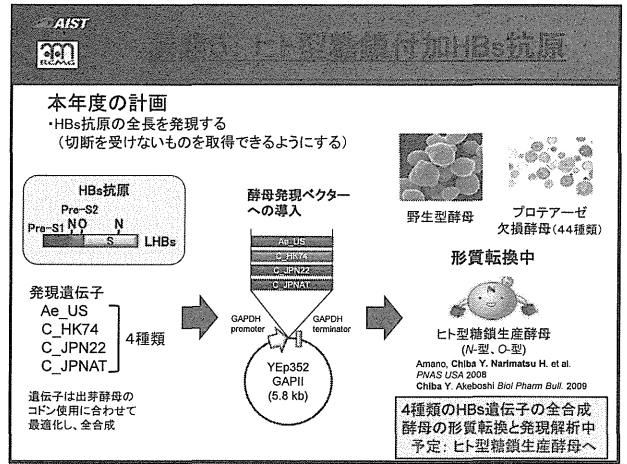
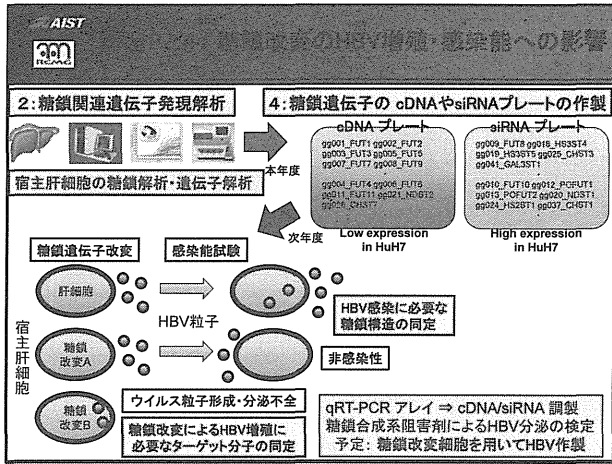
糖鎖の発現を制御する肝細胞発現レクチン分子の探索

2. 糖鎖関連遺伝子発現解析
宿主肝細胞のグリコプロテオーム解析・遺伝子解析
糖鎖-レクチン間の相互作用はHBV感染に関連するのかを検証する。

3. 宿主-HBVの相互作用における糖鎖
HBsは糖鎖に覆われている
宿主細胞にはレクチンが発現

糖鎖改変細胞
糖鎖付加細胞
糖鎖除去細胞

次年度予定
・遺伝子発現解析からのレクチンの探索。
・HBV粒子と宿主肝細胞とのインタクナ結合を定量的にモニターする検出系の開発。



工程表 (研究代表者氏名: 成松 久)

24年度に実施すべき事項	25年度に実施すべき事項	26年度に実施すべき事項	27年度に実施すべき事項	28年度に実施すべき事項	29年度に達成すべき目標
HBV (HBs抗原) の糖鎖解析	HBV感染可能細胞の糖鎖解析	HBV-宿主細胞における糖鎖の役割	糖鎖改変のHBVの増殖・感染能への影響	糖鎖修飾を受けたHBs抗原の大量調製	測定技術の民間への橋渡し 創薬ターゲットの選定 新規ワクチンの開発
(30)%/100%	糖鎖修飾を受けたHBs抗原の大量調製	糖鎖改変宿主細胞の作製・HBV作製とスクリーニング	糖鎖改変HBVの感染実験	酵母でのHBs抗原の発現・ヒト型糖鎖の付加と抗体価試験	
糖鎖解析技術の開発 ・血清中HBVの糖鎖解析	糖鎖遺伝子の発現比較 ・糖鎖構造の比較	相互作用の測定技術の開発 ・候補レクチンの選定	糖鎖改変HBVの感染実験	酵母でのHBs抗原の発現 ・ヒト型糖鎖の付加と抗体価試験	
糖鎖改変のHBVの増殖・感染能への影響	糖鎖改変宿主細胞の作製 ・HBV作製とスクリーニング	糖鎖改変HBVの感染実験	糖鎖改変HBVの感染実験	酵母でのHBs抗原の発現 ・ヒト型糖鎖の付加と抗体価試験	
糖鎖修飾を受けたHBs抗原の大量調製	糖鎖改変宿主細胞の作製 ・HBV作製とスクリーニング	糖鎖改変HBVの感染実験	糖鎖改変HBVの感染実験	酵母でのHBs抗原の発現 ・ヒト型糖鎖の付加と抗体価試験	
血清HBVの比較糖鎖解析	HBV感染と比較糖鎖解析	HBVに相互作用する分子の解析	糖鎖改変HBVの感染実験	糖鎖改変HBVの感染実験	
糖鎖改変のHBVの増殖・感染能への影響	糖鎖改変宿主細胞の作製 ・HBV作製とスクリーニング	糖鎖改変HBVの感染実験	糖鎖改変HBVの感染実験	糖鎖改変HBVの感染実験	
糖鎖修飾を受けたHBs抗原の大量調製	糖鎖改変宿主細胞の作製 ・HBV作製とスクリーニング	糖鎖改変HBVの感染実験	糖鎖改変HBVの感染実験	糖鎖改変HBVの感染実験	

利益相反について

利益相反の有無等 (平成24年度)

ア 利益相反の有無 有(無)いずれかを記載)

イ 利益相反がある場合には具体的内容(以下に記載)