

厚労科研（B型肝炎創薬実用化研究事業）

平成25年度 第四回班会議 議事録（報告書）

○開催日時 平成26年2月24日（月） 14:30～18:30

○場所 東京コンベンションルーム AP品川「Kルーム」（京急第2ビル・9階）

○出席者（敬称略）：溝上雅史、是永匡紹（以上、国立国際医療研究センター）、久永拓郎（厚生労働省）、伊藤清顕（愛知医科大学）、尾曲克己（名古屋市立大学）、田尻和人（富山大病院）、成松久、安形清彦、梶裕之、久野敦、千葉靖典、梅谷内晶、佐藤隆、館野浩章、雄長誠、後藤雅式、我妻孝則（以上、産総研）

（正木尚彦（PO）、米田政志@愛知医大、飯島沙幸@名市大、伊藤浩美@福島県立医科大は、都合により欠席）

○会議内容

1. 関係者あいさつ

厚生労働省久永専門官：

糖鎖を活かしたワクチンの有用性が示されれば良いと思われる。糖鎖は独創性があるので、利点を活かして創薬事業に結び付けて欲しい。

成松研究代表者：

NTCPのコリセプターには糖鎖が関与している可能性がある。

溝上先生：

日本版NIH構想の中で、HBVの研究費が28億円と非常に多いことが問題になっている。まだ糖鎖を知らない先生が多いので、理解してもらえるように成果を出すこと、説明をすることが必要である。

2. 研究進捗状況報告

(1) 課題2,4

梅谷内：

宿主細胞の糖鎖解析を実施した。遺伝子発現情報。

HBVが感染可能な細胞の糖鎖構造は何かを調べるために、宿主細胞の糖鎖解析を行った。また、肝細胞（Huh7、HepG2）のwhole transcriptome解析を実施した。これにより、糖鎖認識リセプター候補の選択を行う。

ヒト肝キメラマウス由来の幹細胞の糖鎖プロファイリングを実施する予定である。感染能が3週間で低くなるということなので、低くなった細胞の糖鎖構造を解析する。

患者血清だと毎回titerが変わるので、ウイルスを用意しておいたほうが良い（溝上先生）。

安形：

糖鎖合成阻害剤を用いて、HBs抗原の糖鎖の影響を検討している。ツニカマイシン（毒性高いN-glycan合成阻害）やBre-A（ゴルジ経路に関連）等を用いているが、思ったほどN-glycan合成阻害につながらない。

伊藤清顕先生：

86種のsiRNA固定化プレートを産総研から送ってもらった。HepG2.2.15細胞でDNA合成阻害、ウイルス粒子合成阻害を検討した。UDP-Galトランスポーターや硫酸基転移酵素のsiRNA等で70%程度の阻害活性が見られた。

(2) 課題3

舘野：

HBsを認識するレクチンの選択するため、肝細胞で発現しているレクチンをリコンビナント生産し、固定化したマイクロアレイを作製した。大阪赤十字で精製したHBsそのまま、あるいはシアリダーゼ処理したHBsを反応させたところ、hCD22-Fc, FCN1, Gal3, Gal9が反応した。

FCN1 肝臓のクッパー細胞で発現しており、Gal9は肝実質細胞全体で発現している。

レクチンが本当に感染に関係があるのかを、飯島先生とともに検討する。また、下遠野班との共同で、NTCP発現系を用いて検討を進める。

HBsと他のガレクチンとの反応性が認められないが、それは説明できるのか？（成松）

(3) 課題1

久野：

国際医療研究センターで保管している患者由来の5ulの血清を用いた糖鎖プロファイリングを実施した（Genotype C, eAg陽性、eAb陽性）。O-glycanのシグナルの高さが患者によって異なった。HBs-M上のO-glycanの量が異なるのだろう（糖鎖の数の違い、糖鎖付加の割合の違い、構造の違いが関与している可能性がある）。

今後は、線維化レベルのバラエティーをそろえて、O-glycanプロファイリングをする。また、治療前後での比較も行う予定である。

梶：

各HBsの糖鎖付加位置と構造解析を行った。その結果、現時点で構造解析ができたのはHBs-MのPreS2領域の糖鎖のみであった。Mono, di-sialyl化した2本鎖が付加している。

(4) 課題5

千葉：

Sワクチンに非応答者が存在するため、糖鎖付加ワクチンを用いることにより効率を上げることが目的である。最終的には、ヒト型糖鎖を持つワクチンが好ましいが、現状では、酵母型の糖鎖をもつHBsを生産し、精製条件を検討した。酵母で発現したHBsのワクチン効果を検討する予定である。

3. まとめ

溝上先生：

現在、1200例の生体肝移植が行われている。HBグロブリン(HBIG)を使用するが、384億円を輸入に頼っている。これを国産ワクチンに置き換えれば、輸入超過は軽減できる。

久永先生：

中間報告の審査員のコメントを参考にして事業を継続して頂きたい。

Ⅱ. 分担研究報告

B型肝炎ウイルス(HBV)の糖鎖解析と臨床的応用

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感染実験が必要なため、その基盤作りとともに、sample収集や抗体入手などを積極的に行った。

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

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する。先進国では、HBVのuniversal vaccinationが進んでいるなかで、我が国ではcostや副作用・わが国独特ともいえる国民

感情（保育所感染によるパニック、感染児の疎外、非科学的なワクチン忌避）が懸念され施行されていない現実があり、大量生産可能な安全なワクチンの開発は必要である。また、母子感染やHBV関連肝移植に用いられる抗HBs人免疫グロブリン(HBIG)の有効性は高いものの、costは10倍以上ワクチンより高いうえ、血液から作られる為、未知のウイルスやプリオンなどの感染は100%否定できない。

2008年まで多くの施設で使用されていたのが、ヒト肝細胞由来のhuGK-14細胞に発現させたHBs抗原粒子をアルミニウム塩に吸着させた「沈降B型肝炎ワクチン『明乳』」であり、HBs抗原のみならずpreS2抗原が含まれているとされていたが無菌性保証が担保されず自主回収となり、また開発中であったpreS2を含む

米国の製薬会社のパテントの関係で市販されるに至らず、本邦で使用可能であるワクチンは、pre-S2 は含まない 2 種類（ピームゲン、ヘプタボックス）の選択しかない。後者は本邦には少なく genotype A であり、本邦には適していない。前者は Genotype C から作製されており、ワクチンによる陽性率も若年者では 90%以上であるが、遺伝子組換え技術により酵母に産生させた HBs 抗原をアルミニウム塩に吸着させた沈降ワクチンであり、糖鎖が酵母型に置換されており、完全な感染予防は難しく、更に preS2/S1 を含むワクチンが作製されれば、更なる感染抑止につながる可能性が高い。また、本邦でも少ないながらも、Carman WF らが報告(Lancet 1990)HBs 抗原の escape mutant は存在し、これらの変異部位(抗原認識部位)に糖鎖修飾が関与する可能性が本研究班の解析からも示唆されており、middle S・large S 蛋白まで考慮した安価で安全なワクチン作製は重要である。我々は、主任研究者と共同で、特に臨床検体の提供や、抗体作成、HBV 専門知識の共有や糖鎖研究により見いだされた成果を、マウスを用いた感染実験により確認を行う。

B. 研究方法

本年度は、昨年度の引き続き、糖鎖解析に実験計画のサポートや情報収集や臨床検体の回収を行った。

C. 研究結果

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準備を行った。

昨年度、紹介した田尻班員から提供した抗体により、HBV の糖鎖解析が進み、更なる指示を行った。

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と田尻和人先生（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

基礎研究班からの要求に応え、HBs 抗原に対する抗体を提供することで、HBV 糖鎖解析を進ませた。また、臨床検体の回収と本研究所での、研究準備体制が整い、来年度に向けて、実験を開始する。

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) Toshima T, Shirabe K, Ikegami T, Yoshizumi T, Kuno A, Togayachi A, Gotoh M, Narimatsu H, Korenaga M, Mizokami M, Nishie A, Aishima S, Maehara Y. A novel serum marker, glycosylated Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein (WFA-M2BP), for assessing liver fibrosis J Gastroenterol [Epub ahead of print]. 2014
- 2) Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, Mizokami M, Takehara T. Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+) dendritic cells are a potent producer of interferon-lambda in response to hepatitis C virus. Hepatology 57 (5): 1705-15. 2013

- 3) Ocho M, Togayachi A, Iio E, Kaji H, Kuno A, Sogabe M, Korenaga M, Gotoh M, Tanaka Y, Ikehara Y, **Mizokami M**, Narimatsu H. Application of a glycoproteomics-based biomarker development method: alteration in glycan structure on colony stimulating factor 1 receptor as a possible glycobiomarker candidate for evaluation of liver cirrhosis *J Proteome Res* 13 (3): 1428-37. 2014
- 4) Akkarathamrongsin S, Hacharoen P, Tangkijvanich P, Theamboonlers A, Tanaka Y, Mizokami M, Poovorawan Y. Molecular epidemiology and genetic history of hepatitis C virus subtype 3a infection in Thailand *Intervirology* 56 (5): 284-94. 2013
- 5) 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-alpha in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut* 62 (9): 1340-6. 2013
- 6) Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Moriya K, **Mizokami M**, Miyakawa Y, Koike K. High levels of hepatitis B virus after the onset of disease lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B. *Clin Infect Dis* 57 (7): 935-42. 2013
- 7) Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsushashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, **Mizokami M**. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology* 59 (1): 89-97. 2014
- 8) Murata K, Sugiyama M, Kimura T, Yoshio S, Kanto T, Kirikae I, Saito H, Aoki Y, Hiramane S, Matsui T, Ito K, Korenaga M, Imamura M, Masaki N, **Mizokami M**. Ex vivo induction of IFN-lambda3 by a TLR7 agonist determines response to Peg-IFN/Ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol* 49 (1): 126-37. 2014
- 9) Khudayberganova D, Sugiyama M, Masaki N, Nishida N, Mukaide M, Sekler D, Latipov R, Nataliya K, Dildora S, Sharapov S, Usmanova G, Raxmanov M, Musabaev E, **Mizokami M**. IL28B Polymorphisms and Clinical Implications for Hepatitis C Virus Infection in Uzbekistan *PLoS One* 9 (3): e93011. 2014
- 10) Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, **Mizokami M**. New Susceptibility and Resistance HLA-DP Alleles to HBV-Related Diseases Identified by a Trans-Ethnic Association Study in Asia.

PLoS One 9 (2): e86449. 2014

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

HBV糖鎖解析とHBs抗原抗体価の臨床検体収集
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、根本的な治療な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創薬シーズやワクチン作成することを目的とし、HBV糖鎖解析に利用可能なHBs抗原抗体価の高い検体、genotype別毎の検体収集を昨年に継続し行い、一部では解析を開始した。また、ワクチンの必要性を明らかにする目的で、ワクチン投与後のHBs抗体陽性率やHBV再活性化例でのHBs抗体推移の調査を行った。

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

A. 研究目的

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(HBV)のインターフェロンによる治療成績は悪く、持続感染を防ぐための核酸アナログ製剤の継続投与は有効も、中止は難しく医療費かさみため、根本的なウイルス排除は「感染させない」ことである。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、糖鎖修飾を考慮した効率的で安価で副作用がない新規ワクチンの開発を目指すことを目標とする。

B. 研究方法

糖鎖解析より得られて知見をHBV感染者で確認するため、HBVDNA量別・genotype別・HBs抗原価別に血清を回収した。また、ワクチンの更なる必要性を調査するため、抗体陽性率とHBV再活性化例のHBs抗体価を調査した。治験を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

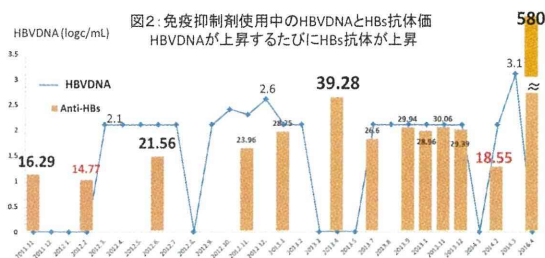
産業技術総合研究所で解析されるレクチンアレイによるHBV粒子上糖鎖変化の解析の為、HBs抗原価が高い、genotype C症例を抽出し、eAg/eAb陽性別にsampleを選択し、これまで

に産業技術総合研究所で行われた、レクチンアレイを行う前処理を、当施設でも行う様にした。また、HBs vaccination の陽性率を解析したところ、現在使用されているビームゲン、ペプタボックスより pre-S2 が含まれているとされる明乳沈降ワクチンの陽性率が高い事が明らかになった。(図1)

現在、免疫抑制剤使用する HBV 既往感染者は、HBVDNA が陽性化すると核酸アナログ製剤を使用するが、免疫抑制剤を多剤使用し、HBVDNA が 2.1~3log の間を変動する症例の HBs 抗体価の推移を観察すると、HBVDNA の上昇に併せて上昇していた。(図2)

(図1) 各種ワクチン陽性率

		対象者(名)	陰性(名)	陽性率
平成21年	ビームゲン	103	7	93.20388
平成20年	ヘプタボックス	103	38	63.1068
平成19年	明乳	92	2	97.8261
平成18年	明乳	81	4	95.0617
平成8年	ビームゲン	102	9	91.17647
平成7年	ヘプタボックス	105	54	48.57143



D. 考察

HBV の糖鎖解析を行うための前処理を当センターで行うことで、解析の smooth 化が計られるとともに、抽出効率を上昇させる方法が確認されることとなり、感度上昇にも繋がった。

先進国では、HBV の universal vaccination が進んでいるなかで、我が国では施行されていない。2008 年まで多くの施設で使用されていた「沈降 B 型肝炎ワクチン『明乳』」は、HBs 抗原のみならず preS2 抗原が含まれているとされていた(効能書に記載無し)が自主回収となり、本邦で使用可能であるワクチンは、pre-S2 は含まない 2 種類 (ビームゲン、ヘプタボックス)

の選択しかないが、その陽性率は『明乳』より低下している。Pre-S2 は糖鎖付着部位を含んでおり、これらが感染成立に重要な働きをしている可能性は高く、この部位を含むワクチン作製は、陽性率の上昇のみならず、感染予防を考えると、preS2/S1 を含むワクチン作製は重要である。また、免疫抑制下で HBVDNA が再陽性化しても、そのまま陰性化する症例が存在することが知られていたが、HBs 抗体がその際上昇する可能性が示唆され、安易に費用が高い、核酸アナログよりもワクチンによる予防も展望され、更なる安価なワクチンが求められる。

E. 結論

臨床検体提供や実験準備は順調に進んでおり、一部は解析を開始した。糖鎖解析や現状より、preS2/S1 を含むワクチンの必要性が明らかになった。

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) Toshima T, Shirabe K, Ikegami T, Yoshizumi T, Kuno A, Togayachi A, Gotoh M, Narimatsu H, **Korenaga M**, Mizokami M, Nishie A, Aishima S, Maehara Y. A novel serum marker, glycosylated Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein (WFA-M2BP), for assessing liver fibrosis J Gastroenterol 2014 in press
- 2) Ocho M, Togayachi A, Iio E, Kaji H, Kuno A, Sogabe M, **Korenaga M**, Gotoh M, Tanaka Y, Ikehara Y, Mizokami M, Narimatsu H. Application of a glycoproteomics-based biomarker development method: alteration

in glycan structure on colony stimulating factor 1 receptor as a possible glycomarker candidate for evaluation of liver cirrhosis. *J Proteome Res* 13 (3): 1428-37. 2014

3) Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, **Korenaga M**, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. New Susceptibility and Resistance HLA-DP Alleles to HBV-Related Diseases Identified by a Trans-Ethnic Association Study in Asia. *PLoS One* 9 (2): e86449. 2014

4) Murata K, Sugiyama M, Kimura T, Yoshio S, Kanto T, Kirikae I, Saito H, Aoki Y, Hiramine S, Matsui T, Ito K, **Korenaga M**, Imamura M, Masaki N, Mizokami M. Ex vivo induction of IFN- λ 3 by a TLR7 agonist determines response to Peg-IFN/Ribavirin therapy in chronic

hepatitis C patients. *J Gastroenterol* 49 (1): 126-37. 2014

5) **Korenaga K**, **Korenaga M**, Teramoto F, Suzuki T, Nishina S, Sasaki K, Nakashima Y, Tomiyama Y, Yoshioka N, Hara Y, Moriya T, Hino K. Clinical usefulness of non-protein respiratory quotient measurement in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res.*43(12):1284-94.2013

2. 学会発表

(1) 是永匡紹、杉山真也、溝上雅史. シンポジウム 1B 型肝炎ウイルス再活性化の予防・治療の現状と課題「高感度 HBVDNA 測定系の開発と B 型肝炎ウイルス再活性化例への応用」JDDW2013(第 17 回日本肝臓学会大会/第 55 回日本消化器病大会) 2013.10.東京

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

HBV（HBs 抗原）の糖鎖解析

梶 裕之	産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター
久野 敦	産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター
伊藤浩美	福島県立医科大学・医学部・生化学講座
田尻和人	富山大学附属病院・第三内科診療部門
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情報を、2つの異なるアプローチによって取得することを計画し、それぞれの分析条件を確立した。ひとつは、富山大学から提供いただいた抗 HBs モノクローナル抗体を用いることで、血清から HBV ウィルス粒子を効率よくエンリッチし、レクチンアレイ解析するまでのプロトコルを確立した。微量患者血清中 HBV 粒子の解析が可能となり、質量分析による解析結果と一致する糖鎖プロファイルを得た。質量分析では、B 型肝炎患者プール血清より精製されたサブバイラルパーティクル(SVP)を構成する HBs タンパク質の解析から、Pre-S1、Pre-S2、および S 領域にそれぞれ 1 カ所の N 型糖鎖付加部位が同定された。このうち、M 型 HBs (Pre-S2)、S 型 HBs (S)にはシアリル化 2 本鎖複合型糖鎖が結合していることを同定した。

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、HBs タンパク質の糖鎖構造から、最終的には未変性 HBV ウィルス粒子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 HBV 粒子の

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。昨年度有用な抗体を入手することができなかったため、抗体の検討を継続した。本年度は富山大学医学部田尻和人博士が作成した複数の抗 HBs モノクローナル抗体を対象に、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。一次評価実験においては、大阪赤十字病院より提供いただいた HBV 患者プール血清から超遠心により分離分離画した HBV 粒子（加熱不活性化済み）、および健常者血清に一定量の本 HBV 粒子を混入し

た溶液を用いた。二次評価実験では、HBsAgのカウントが10,000 IU/mLを超えるジェノタイプCのHBV感染患者血清を用いた。なお、本患者血清は国立国際医療研究センター肝炎情報研究センターより提供され、同施設にて前処理およびウイルスの不活性化が行われたのちに処々の分析に使用した。

2. HBsタンパク質の質量分析による糖鎖構造解析：はじめに、B型肝炎患者プール血清より精製したサブバイラルパーティクル(SVP)からPNGase、およびアルカリ性β脱離反応によって、N型及びO型糖鎖を順次遊離し、質量分析で構造解析した。ついで、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)によって分析した。はじめにN型糖鎖付加部位を同定するため、SVPタンパク質(ヒト血清由来)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。糖ペプチド画分を糖鎖切除処理(IGOT標識)後、LC/MS分析により、糖鎖付加部位を決定した。さらに糖ペプチドのままLC/MS分析し、糖鎖構造情報を収集した。S-HBsでは、S領域にN型糖鎖は一カ所結合しているため、ゲル電気泳動によってS-HBsを精製し、糖鎖分析を行った。また、Pre-S1/S2領域における糖鎖構造解析のためには、SVPを還元、変性することなく糖ペプチド部分をプロテアーゼにより遊離させ、構造解析を行った。

C. 研究結果

1. 提供いただいたモノクローナル抗体6種から、WB, IP, LAを用いた抗体の一次評価により最適な抗体を1つ選抜した。抗体を固定し、各工程の条件を最適化した。前処理工程では、プレクリアの導入などにより、以後のWBやLA

解析に耐えうるだけの純度のウイルス粒子をエンリッチする条件を見出した。LAでは、今回の抗体の変更により、検出感度が向上し、そのLOQは5 ngであり、LODは1.25ngであった。その糖鎖プロファイルは、既報や本プロジェクトにて得られた質量分析による構造解析結果と一致するものであった。以上によりプロトコルが確立したため、二次評価実験として、患者血清由来のHBV粒子の解析を行った。その結果、HBsAgカウントに依存してレクチンシグナルの強度が変動した。現時点ではHBsAgカウントが10000 IU/mLの血清では、IPからLA, WBまでに15 μLが必要であった。

2. ヒト血清由来SVPをトリプシン、Lys-Cエンドペプチダーゼ、V8プロテアーゼ、キモトリプシンなどで消化し、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、M-HBsのPre-S2領域には末端Met残基のアセチル化と酸化、と糖鎖付加が共存していることが判明し、翻訳後膜透過が生じていることが明らかとなった。またこの領域には2本鎖構造のみが検出され、他の骨格構造の糖鎖は見出されなかった。同様に、S-HBsのS領域にも2本鎖構造のみが検出された。

D. 考察

1. 昨年度より懸案事項となっていた本課題に有用な抗体を入手できた。興味深いことに今回WBによる検証に用いた抗体はいずれも、2つのS型HBsのうちp25にのみ反応を示した。一方、レクチンはP25には反応せず、gp28に反応することが判った。つまり、ウイルス粒子

の構成タンパク質が複合体形成してはじめてレクチンアレイ解析ができる、言い換えれば粒子からタンパク質分子を解離したのちにはアレイ解析ができないことになる。また複合体形成状態での解析は、クラスター効果により WB および LA におけるシグナル検出の感度を 100 倍近く高めることが判明した。

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 領域がウィ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。糖鎖構造解析からは 2 カ所から 2 本鎖のみが検出された。SVP から遊離された糖鎖全体の構造バラエティーから、他の部位に 2 本鎖以外の糖鎖がついている確率は低いと予想される。

E. 結論

1. レクチンアレイによる糖鎖解析に使用する抗体を入手し、患者血清を対象とした解析プロトコルを確立できた。次年度はより多くの患者血液中の HBV 粒子の比較糖鎖解析を行い、HBV 粒子上の糖鎖に臨床パラメータと相関のある構造変化が生じるかを検証する。
2. HBs 糖鎖付加部位の同定と一部、糖鎖構造を解析し、同定した。今後、ワクチンの抗原とする HBs には 2 本鎖糖鎖 (ただしシアリル化された構造) を付加させたものを用意し、現在使われている糖鎖無しの抗原と抗原性や産生される抗体の性状などを比較することが重要と考える。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (2) **Kuno A**, Sato T, Shimazaki H, Unno S, Saitou K, Kiyohara K, Sogabe M, Tsuruno C, Takahama Y, Ikehara Y, Narimatsu H. Reconstruction of a robust glycodiagnostic agent supported by multiple lectin-assisted glycan profiling. *Proteomics Clin Appl.* 7, 642-647 (2013).
- (3) **Kaji H**, Ocho M, Togayachi A, **Kuno A**, Sogabe M, Okura T, Nozaki H, Angata T, Chiba Y, Ozaki H, Hirabayashi J, Tanaka Y, Mizokami M, Ikehara Y, Narimatsu H. Glycoproteomic Discovery of Serological Biomarker Candidates for HCV/HBV Infection-associated Liver Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma. *J. Proteome Res.* 12, 2630-2640 (2013).
- (4) Tan B, Matsuda A, Zhang Y, **Kuno A**, Narimatsu H. Multilectin-assisted fractionation for improved single-dot tissue glycome profiling toward clinical glycoproteomics. *Mol. Biosys.* 10-2, 201-205 (2014).
- (5) Ocho M, Togayachi A, Iio E, **Kaji H**, **Kuno A**, Sogabe M, Gotoh M, Tanaka Y, Ikehara Y, Mizokami M, Narimatsu H. Application of a glycoproteomics-based biomarker development method: alteration in glycan structure on colony stimulating factor 1 receptor is a glyco-biomarker candidate for evaluation of liver cirrhosis. *J Proteome Res.* 13-3, 1428-1437 (2014).
- (6) Toshima T, Shirabe K, Ikegami T, Yoshizumi T, **Kuno A**, Togayachi A, Gotoh M, Narimatsu H, **Korenaga M**, Mizokami M, Nishie A, Aishima S,

Maehara Y. A novel serum marker, glycosylated Wisteria floribunda-positive Mac-2 binding protein (WFA⁺-M2BP), for assessing liver fibrosis. *J Gastroenterol.* Accepted (2014).

2. 学会発表

- (2) 久野 敦ら. Lectin microarray assists development of the glycodiagnostic systems for direct measurement. The 22nd International Symposium on Glycoconjugates. 大連. 2013/06/25
- (3) 久野 敦ら. Glycome mapping of mouse tissue samples by means of lectin microarray. 日本・オーストリア二国間セミナー. 理研鈴木梅太郎ホール (和光). 2013/07/02
- (4) 久野 敦. Development of quantitative glyco-indices for hepatic diseases. 12th HUPO World Congress. 横浜. 2013/09/17
- (5) 久野 敦ら. Application of the lectin microarray system to glycome mapping of mouse FFPE tissue sections. 12th HUPO World Congress. 横浜. 2013/09/17
- (6) 譚 斌斌ら. Improvement of lectin microarray-based tissue glycan profiling with lectin-assisted fractionation for glyco-biomarker discovery. 12th HUPO World Congress. 横浜. 2013/09/17
- (7) 久野 敦ら. It's coming to the end: Development of glyco-diagnostic kit for evaluating liver fibrosis. 5th ACGG Thailand. Khon Kaen. 2013/10/16
- (8) Yamasaki K ら. WFA(+)-M2BP is a new and unique glycobiomarker to predict the development of HCC in patients with chronic HCV infection. 64th Meeting of AASLD. Washington. 2013/11/01
- (9) 雄長 誠、梅谷内 晶、梶 裕之、久野 敦、飯尾 悦子、曾我部 万紀、田中 靖人、池原 譲、溝上 雅史、成松 久. Development of glyco-biomarker for liver disease. 22nd International Symposium on Glycoconjugates. 大連. 2013/06/25
- (10) 雄長 誠、梅谷内 晶、梶 裕之、久野 敦、飯尾 悦子、曾我部 万紀、田中 靖人、池原 譲、溝上 雅史、成松 久. Application of glycoproteomics for development of serum biomarker of liver disease. HUPO 12th. 横浜. 2013/09/15
- (11) 藤田 弥佳、梶 裕之、久野 敦、鹿内 俊秀、鈴木 芳典、澤木 弘道、成松 久. Large-scale identification of mouse and human N-glycoproteins and data sharing through an experimental-based glycoprotein database, GlycoProtDB. HUPO World Congress. 横浜. 2013/09/17
- (12) 雄長 誠、梅谷内 晶、梶 裕之、久野 敦、飯尾 悦子、曾我部 万紀、田中 靖人、池原 譲、溝上 雅史、成松 久. Development of serum glycobiomarker of liver cirrhosis. 5th ACGG Conference. タイ王国. 2013/10/17
- (13) 雄長 誠、梅谷内 晶、梶 裕之、久野 敦、飯尾 悦子、曾我部 万紀、田中 靖人、池原 譲、溝上 雅史、成松 久. Application of the glycoproteomics-based strategy for development of serum biomarkers. 糖鎖プロテオミクスを基盤とした血清バイオマーカー開発戦略の応用. 日本生化学会. 横浜. 2013/09/13

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

[国内特許 登録]

- (1) 糖タンパク質の測定方法、肝疾患の検査方法
および糖タンパク質定量用試薬. 成松 久ら.
特 5441280. 2013/12/27

[国外特許 出願]

- (1) 糖鎖アイソフォーム検出方法及び糖鎖アイ
ソフォーム検出装置. 成松 久ら.
PCT/JP2013/071653 (WIPO) . 2013/08/09
- (2) 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
標糖鎖マーカー糖タンパク質. 成松 久ら.
14/051729 (米国) . 2013/10/11

[国外特許 登録]

- (1) 糖鎖あるいは複合糖質の解析装置, 久野 敦
ら, 8597576 (米国)、2013/12/03
- (2) 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
標糖鎖マーカー糖タンパク質. 成松 久ら.
8623608 (米国) . 2014/01/07

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業））
分担研究報告書（平成25年度）

HBV感染可能細胞の糖鎖解析

梅谷内 晶	産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター
梶 裕之	産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター
伊藤 浩美	福島県立医科大学・医学部・生化学講座
安形 清彦	産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター
飯島 沙幸	名古屋市立大学大学院・医学研究科・病態医科学

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。肝細胞株をグライコプロテオミクス解析・糖鎖構造解析し、さらに肝細胞株と初代肝細胞（肝臓）での糖鎖遺伝子発現についてqRT-PCRアレイ及び次世代シーケンサを用いて解析した。さらに得られたデータからバイオインフォマティクス技術により内在性レクチンの検索などを行った。また、ヒト肝臓化キメラマウスの肝細胞における糖鎖プロファイルの変化について解析を行った。

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、初代培養肝細胞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

(qRT-PCR 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も行い、この両者の比較を行うなどした。

(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。

(4) HBV 感染と宿主肝細胞の糖鎖発現との関連について解析を行う。ヒト肝臓化キメラマウス (PXB マウス) より初代培養肝細胞を調製・培養し、これに患者血清由来の HBV を感染させ、その前後での糖鎖プロファイルの変化を解析した。また同様に、キメラマウス由来肝細胞を経時的 (1 週～6 週まで) に培養し、宿主肝細胞の経時的な糖鎖糖鎖プロファイルの変化を解析した。

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。また、市販のヒト肝臓細胞 (初代培養) を培養し、同様の解析をするための試料調製を行った。

(項目 2) qRT-PCR (糖鎖遺伝子 qRT-PCR 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 (糖鎖改変の 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 qRT-PCR 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。

また、HepG2 および HuH7 の RNA とともに、市販のヒト肝臓由来 RNA あるいは培養したヒト肝臓細胞 (初代培養) から抽出された RNA よりそれぞれ cDNA を合成し、これを用いて次世代シーケンサによる遺伝子発現解析を行った。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た。糖鎖遺伝子の発現プロファイルの結果については、図 1 に示した。次世代シーケンサから得られる遺

伝子発現情報（例：全体で約 400 万 Read、そのうち 240 万 Read が約 4.7 万個の遺伝子にマップされる）は非常に膨大なため、そのデータをそのまま使用するのには非常に困難である。そこで、バイオインフォマティクス技術により、従来我々が構築してきた糖鎖遺伝子のデータベース（GGDB）などのデータを有効利用し、これらデータベースとの比較抽出などの作業によって糖鎖遺伝子のみを抽出・解析を行った。前述のデータとの比較なども行ったが、次世代シーケンサのデータと糖鎖遺伝子発現定量システム（リアルタイム qRT-PCR）のデータには基本的に相関性があると思われ、課題 4 に向けて抽出された糖鎖遺伝子プロフィールには問題無いことを確認した。また、内在性レクチンについては宿主細胞における HBV 受容体として機能している可能性が考えられるため、同様に次世代シーケンサの遺伝子発現情報から、内在性レクチンの発現情報を抽出した。方法は糖鎖遺伝子の時とほぼ同様に、従来我々が構築してきた内在性レクチンのデータベースを有効利用し、これらデータベースとの比較抽出などの作業によって内在性のレクチン様ドメインを有するタンパク質（約 240 種類）のみを抽出し、解析を行った。ここから得られた発現情報は課題 3 へ利用された。

(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。こ

れらの一部の試料については既に糖鎖遺伝子解析 (qRT-PCR)、および質量分析による糖鎖構造解析 (*N*結合型/*O*結合型糖鎖解析) を行った。

[質量分析装置を用いた糖鎖構造解析]

現在までに実施した、質量分析装置を用いた HepG2 細胞および HuH7 細胞、初代肝細胞、HBV 粒子 : SVP (subviral particles) の糖鎖構造解析については以下の通りである。

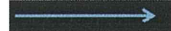
平成 24 年度は 2 種類の細胞株 (HepG2 と HuH-7)、平成 25 年度は肝細胞 (hNHeps) および HBV SVP 試料について質量分析計を用いた *N* 結合型および *O* 結合型糖鎖構造解析を行った。解析手順は以下の通りである。培養細胞 (HepG2、HuH-7、hNHeps) については、それぞれ細胞ペレットから疎水性画分を抽出し、還元アルキル化・透析・トリプシン消化を、SVP 試料については、還元アルキル化・エタノール沈殿・トリプシン消化を行ったのち糖鎖の切り出しを行った。*N* 結合型糖鎖についてはエンドペプチダーゼ F により酵素学的に、*O* 結合型糖鎖については還元 β 脱離により化学的に処理し、*N* と *O* 結合型糖鎖の遊離を行った。次に、*N* ならびに *O* 結合型糖鎖は、MALDI 測定の際のイオン化の感度および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シグナル強度にて比較解析を行い、それぞれの糖鎖構造解析結果については図 2 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) で記載し、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した。平成24年度に行った2種類の細胞株の結果では、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2(HepG2:赤とHuH-7:青)に示した通り異なる結果となった。平成25年度に行った2種類の試料(図2 hNHeps:緑とSVP:紫)の結果では、hNHepsのN結合型糖鎖については、HepG2やHuH-7と同じくほとんどがハイマンノース型であったのに対し、SVPではほとんどがコンプレックス型という結果であった。HepG2やHuH-7では観測されなかったSVPのおもな糖鎖構造(図2上段の5401や5402)についてhNHepsでは微量だが確認された。O結合型糖鎖については、HepG2やHuH-7では糖鎖構造のバリエーションが10種類と多かったのに対し、hNHepsでは5種類、SVPでは3種類と構造のバリエーションは減っており、詳細な糖鎖構造についてもHepG2やHuH-7に比べhNHepsではシアリルT構造(図2下段の1101)が主成分となっている点でSVPの構造に近い結果であった。

(項目4) HBV感染と宿主肝細胞の糖鎖発現との関連について解析を行った。ヒト肝臓化キメラマウス(PXBマウス)より初代培養肝細胞を調製した。具体的には非感染ヒト肝臓キメラマ

ウスの肝臓をコラゲナーゼ灌流して肝細胞を分離後に10cm dishにまいた(1枚につき約 1×10^7 cells)。これをDay0とした。これらの細胞(dish一枚)に、患者血清由来のHBV(genotypeC)を感染させ、その後12日間の培養を行ったのちに回収した(図3A)。陰性コントロールとしてはHBV非感染のものを同様に培養して、感染開始時と感染後12日目で回収した。それらの細胞を用いて膜糖タンパク質を抽出し(図3B)、同量ずつレクチンアレイ解析に供した。HBV感染前後での糖鎖プロファイルの変化を解析した結果(図3C)、(1)培養環境(経時的)の変化で糖鎖プロファイリングが変化した、及び(2)HBV感染によって大部分のシグナルが増加傾向にあった、ことが明らかとなった。しかしながら、感染の前後の比較では幾つかのレクチンシグナルは増減が認められたが、これらに大幅な変動は見られなかった。そこで現在、キメラマウス由来肝細胞を経時的(1週~6週まで)に培養し、宿主肝細胞の経時的な糖鎖糖鎖プロファイルの変化を解析しているところである。2~3週にかけて宿主細胞への感染能が大幅に落ちてくるということから、感染能の変動に伴う(経時的な)糖鎖発現のプロファイルの変化が認められるのかについて解析を進めている(感染・非感染での差も見られるか同様に解析する予定である)。

遺伝子発現データ
(Normal Liver,
Huh7, HepG2細胞)



糖鎖遺伝子データ
ベースによる抽出作業
(ヒートマップ化)

192 glycosenes

FUT1, FUT2, FUT3, FUT4, FUT5, FUT6, FUT7, FUT8, POFUT1, POFUT2, B3GAT1, B3GAT2, B3GAT3, CSGIIAT, (A)BO, GBOT1, B3GALNT1, B3GALNT2, B4GALNT1, B4GALNT2, B4GALNT3, B4GALNT4, GALNT1, GALNT2, GALNT3, GALNT4, GALNT5, GALNT6, GALNT7, GALNT8, GALNT9, GALNT10, GALNT11, GALNT12, GALNT13, GALNT14, GALNT15, *GALNTL0, (GALNT17)*, (A)BO, A4GALT, B3GALT1, B3GALT2, B3GALT4, B3GALT5, B3GALT6, B4GALT1, B4GALT2, B4GALT3, B4GALT4, B4GALT5, B4GALT6, B4GALT7, COT, C1GALT1, C1GALT1C1, B3GALT1, UGGC1, UGGC2, LARGE, OYLTL1B, FCMD, FKRP, H4S1, H4S2, H4S3, POFUT1, POFUT2, A4GNT, B3GNT1, B3GNT2, B3GNT3, B3GNT4, B3GNT5, B3GNT6, B3GNT7, B3GNT8, GONT1, GONT3, GONT4, GONT2, IGT2, IGT3, MGAT1, MGAT2, MGAT3, MGAT4, MGAT4A, MGAT4B, MGAT5, *MGAT6B, (MGAT9)*, MFNG, FPNB, RPNB, POMGN1, COT, CHSY1, CHPF, CSS3, CHG, GALNACT-2, EXT2, EXT1, EXT2, EXT1.1, EXT1.3, DPM1, DPM2, DPM3, DPM3T1, ALG1, ALG2, ALG11, GLT2D1, ALG14, ALG3, ALG9, ALG12, ALG5, ALG6, ALG8, ALG10, ST3GAL1, ST3GAL2, ST3GAL3, ST3GAL4, ST3GAL5, ST3GAL6, ST6GAL1, ST6GAL2, ST6GALNAC1, ST6GALNAC2, ST6GALNAC3, ST6GALNAC4, ST6GALNAC5, ST6GALNAC6, ST6SIA1, ST6SIA2, ST6SIA3, ST6SIA4, ST6SIA5, ST6SIA6, NDST1, NDST2, NDST3, NDST4, HS2ST1, HS6ST1, HS6ST3, HS3ST1, HS3ST2, HS3ST3A1, HS3ST3B1, HS3ST4, HS3ST5, HS3ST6, CHST10, CHST11, CHST12, CHST13, D4ST1, CHST8, CHST9, CHST3, CHST7, CHST1, CHST6, CHST2, CHST4, CHST5, UST, GALNAc4S-6T, GAL3ST1, GAL3ST2, GAL3ST3, GAL3ST4, XYL1, XYL2, SLC35A1, SLC35A2, SLC35A3, SLC35B1, SLC35B2, SLC35B3, SLC35B4, SLC35C1, SLC35D1, SLC35D2

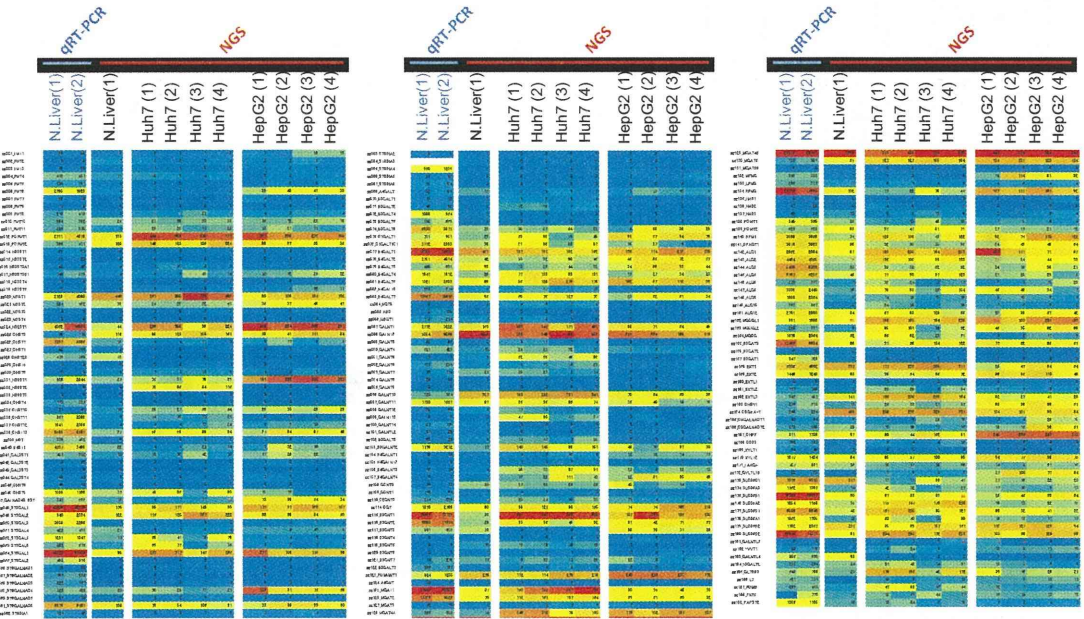


図 1

次世代シーケンサによる糖鎖遺伝子発現解析

Normal Liver (ヒト肝臓)、Huh7 細胞、HepG2 細胞における遺伝子発現を次世代シーケンサ(NGS)にて解析し、その膨大なデータからバイオインフォマティクス (データベースとの比較) によって糖鎖遺伝子の抽出作業を行った。遺伝子発現量に合わせてヒートマップ化して表示。リアルタイムPCR(qRT-PCR)での糖鎖遺伝子の発現解析のデータとの比較を行った。