

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
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：本研究の目的は、B型肝炎ウイルス(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。B型肝炎の治療には、HBV感染や複製の研究に基づきアナログ製剤の様にHBVの制御に向けた創薬が重要である。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(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っている。本研究は、1) HBV(HBs抗原)の糖鎖解析：多数の検体から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、次世代シーケンサー等を用いた糖鎖遺伝子の発現解析を行う。3) HBV-宿主細胞における糖鎖の役割：肝細胞に発現する内在性レクチンとHBV糖鎖との結合を解析し感染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用さ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。これまでに、精製HBs抗原の質量分析解析、グライコプロテオーム解析、細胞膜プロテオーム解析と次世代シーケンサーによる肝細胞特異的な内在性レクチンの同定、糖鎖遺伝子解析とcDNAライブラリーの調製、siRNAライブラリーを用いたHBV作製スクリーニング、酵母発現HBs抗原の精製等を行った。以上の研究により、今後さらに他研究グループと連携し、糖鎖を利用した多検体検査による病態解析、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繋げる。

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・准教授）

飯島沙幸（名古屋市立大学・研究員）

田尻和人（富山大学・助教）

伊藤浩美（福島県立医科大学・助教）

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）

舘野浩章（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・糖鎖工学研究センター・研究チーム長）

久野 敦（同・上級主任研究員）

梅谷内晶（同・主任研究員）

佐藤 隆（同・主任研究員）

安形清彦（同・招聘研究員）

A. 研究目的

現在、日本には約 110-140 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がつつある。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あり、新規感染患者の発症を防ぐ事は難しいと考えられる。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する必要がある。

一方、最近のウイルスの感染機構の解明により、糖鎖や糖タンパク質が様々なウイルスの受容体となっている事が明らかになりつつあり、糖鎖関連分子が HBV の接着・侵入に関わっている可能性が考えられる。また伊藤らの研究により（Ito K et al. J Virol. 2010）、HBs 抗原上の糖鎖が感染性 HBV の粒子形成・分泌に重要である事が示唆されており、糖鎖修飾や糖鎖合成系が HBV 制御に向けた創薬のターゲットと成る可能性がある。すなわち、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 の糖鎖構造を解析し多検体診断への応用、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 の創薬ターゲットの同定、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探索、ヒト型糖鎖を持つ HBs 抗原を大量調製し新規ワクチンの開発など糖鎖を利用した HBV 感染の防御と治療を目指す。（図 1）

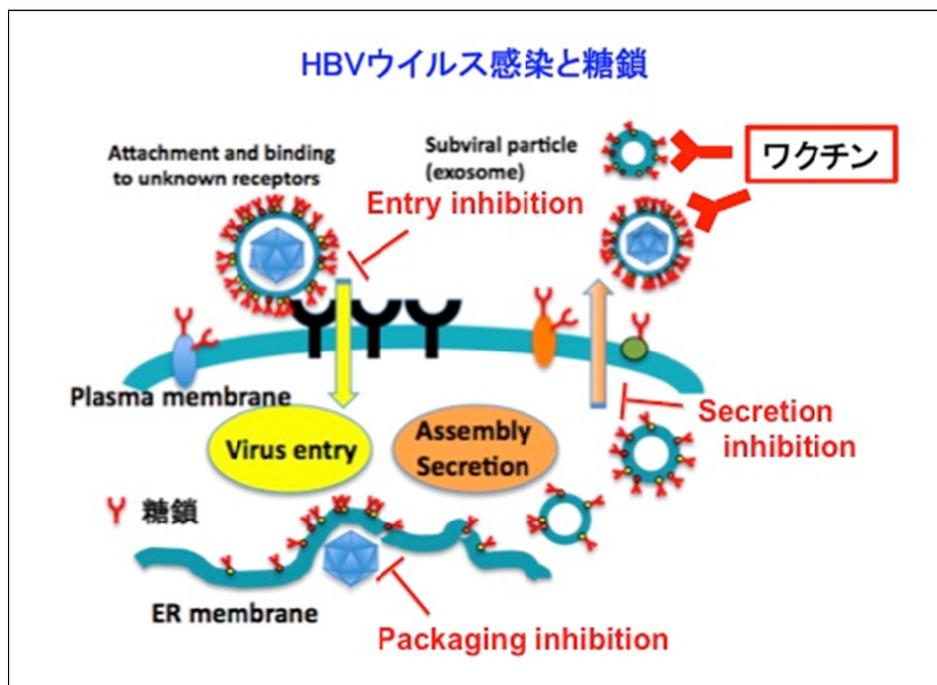


図1 HBV ウイルス感染と糖鎖 ウイルスの感染過程において、糖鎖は様々な段階に関与している。本研究では、(i)HBV ウイルスの肝細胞への接着・侵入や(ii)HBV 粒子の形成・分泌の抑制や、(iii)糖鎖付きのHBV (HBs 抗原) を認識するワクチンの開発を目的としている。

B. 研究方法

本研究班では、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ために、最先端の糖鎖機能解析技術を開発・実用化して来た産総研・糖鎖医工学研究センター（統括：成松）と肝疾患やHBV 作製・感染実験の専門家から構成される肝臓グループ（統括：溝上）とが協力体制（医工連携体制）を構築して進めた。

(1) HBV (HBs 抗原) の糖鎖解析：精製 HBs 抗原を用いて質量分析 (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った。さらに、糖鎖構造の決定を MS/MS 法により解析した。HBs 抗原上の糖鎖の有無と HBs 抗原の構造の関連性を調べるためにプロテアーゼ処理と SDS-PAGE や MS により検討した。

ワクチン接種により誘導された B 細胞クロー

ンに由来するヒト抗 HBs 抗原抗体のシリーズを用い、精製 HBs 抗原に対してウエスタンブロット法を行った。HBs 抗原の免疫沈降、そしてオーバーレイによる検出方法の開発のために、選抜した抗体産生細胞を培養し抗体を大量調製した。

次に、背景肝の異なる HBV 感染患者の血清を調製し、開発したレクチンアレイ解析を行い糖鎖プロファイリングによる基礎情報を収集した。

(2) HBV 感染可能細胞の糖鎖解析：肝がん細胞を形質転換し、72 時間後の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から肝細胞を調製し、5 日後に HBV を感染させ経時ごとに培養肝細胞 (±HBV 感染) を回収し、レクチンアレイによって糖鎖プロファイリングを解析した。

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、まず HBV が感染しないヒト由来細胞株 (HuH7 細胞と HepG2 細胞) と正常ヒト肝細胞を培養し、質量分析により糖鎖構造解析 (N-glycan/ O-glycan 解析) を行った。

また HBV を作製する HuH7 細胞や HepG2 細胞及び正常ヒト肝細胞の糖鎖遺伝子の発現量を解析するために、total RNA を調製し、cDNA 合成後に qRT-PCR (糖鎖遺伝子 qPCR アレイシステム) を行った。同 RNA は次世代シーケンサーを用い、whole transcriptome 解析を行い、糖鎖関連遺伝子の発現量解析を行った。

(3) HBV-宿主細胞間相互作用機構の解明:

HBV 感染に關与する宿主細胞上糖鎖認識分子 (内在性レクチン) の探索を網羅的に進めるために、肝がん細胞株のプロテオーム解析と上述の次世代シーケンサーの結果を基に、レクチン様分子の検索を行なった。候補レクチンの cDNA をクローニングし、発現させたレクチンを回収しアレイに固定化した。精製 HBs 抗原をラベル化し、各レクチン様分子との結合を解析した。

Genotype C の HBs 抗原 cDNA をクローニングし、分泌シグナルとタグを付けた HBs 抗原を HuH7 細胞で発現し、抗タグ抗体を用いウェスタンブロッティングにて検出した。HBs 抗原 cDNA に変異を導入し、糖鎖付加部位の置換、導入、再配置、ジスルフィド結合の変異による HBs 抗原の分泌や糖鎖付加の変化を解析した。

(4) 糖鎖改変の HBV の増殖・感染能への影響: タグ付き HBs 抗原を HuH7 細胞で発現させ、糖鎖合成系阻害剤を添加する事により、HBs 抗原の分泌への影響を解析した。

上述の糖鎖遺伝子発現解析を基に、発現パターンで 2 群(抑制目的と過剰発現目的)に分け、cDNA ライブラリーと siRNA ライブラリーを作

成した。糖鎖遺伝子 cDNA は産総研で作製された糖鎖遺伝子ライブラリーから PCR で増幅し、新規に作成した発現ベクターにクローニングした。HEK293 細胞を形質転換後に細胞融解し、共通のタグを用いて各糖転移酵素の発現量を比較した。siRNA ライブラリーは各糖鎖遺伝子に 3 つの siRNA を合成し、同量ずつを混ぜた後にウエルに加え形質転換した。qRT-PCR により siRNA の効果及び、発現量の変化を確認した。

愛知医科大学 (大臣確認の申請済み) にて、HBV を産生する Hep2.2.15 細胞を用い siRNA ライブラリーのスクリーニングを行った。形質転換後に培養上清を回収し、ELISA 法による HBs 抗原の発現量、PCR 法による HBV DNA の定量などを行い、HBV 分泌への影響を解析した。

(5) 糖鎖修飾を受けた HBs 抗原の大量精製:

L-HBs 抗原をコードする遺伝子を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い、出芽酵母の発現ベクターに組み込んだ。酵母の形質転換を行い得られたクローンを培養し、菌体内及び培養液中のタンパク質を SDS-PAGE により展開しウエスタンブロッティング (抗 HBs 抗体 (抗 PreS1 モノクローナル抗体 (マウス)) で HBs 抗原の発現を検出した。最も良く発現するクローンを選択し、HBs 抗原の大量精製を行うために、培養条件、前処理法、濃縮方法、カラムの選択、HPLC やフィルター処理等の条件検討などを行った。精製行程の評価は SDS-PAGE を行い、銀染色により判定した。さらに大量調整を可能にするために、高発現可能な酵母を形質転換しクローンの選択を行った。

(倫理面の配慮)

本研究課題を進めるにあたり、文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子

解析研究に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)」、遺伝医学関連10学会より提案された「遺伝学的検査に関するガイドライン」、厚生労働省・文部科学省「疫学研究に関する倫理指針(平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号)」を遵守する。また、必要な実験承認を受けるためにインフォームド・コンセントを含めた各種手続き(産総研:遺伝子組換え実験、微生物実験、ヒト由来試料実験倫理審査;国際医療研究センター: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、許可の承認を得た。実験に関わる研究者及び技術者にワクチン接種と血液検査HBV取り扱いにおける諸注意を周知するなど実施体制を整えた。

C. 研究結果

本研究は、まずHBV(HBs抗原)の糖鎖構造を解析し、グライコプロテオーム解析法を確立し多検体診断への応用を目指した。また、宿主肝細胞側の糖鎖合成系はHBVの糖鎖修飾を担うこともあり、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の創薬ターゲットの同定を目指した。肝細胞表面の糖鎖関連分子がHBVの感染に深く関与している可能性を確かめるため、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探索を行った。さらに、ヒト型糖鎖を持つHBs抗原を大量調製し新規ワクチンの開発など糖鎖を利用したHBV感染の防御と治療を目指した。

(1) 昨年度の問題点であったHBs抗原の免疫沈降やオーバーレイによる検出法に必要な抗体の入手のため、ワクチン接種後に獲得されたヒトのクローン抗体(富山大)のシリーズをテストした。確認した抗体全てにおいて、糖鎖の無い

HBs抗原のみを認識することを見いだした。これらの抗体の内の1つが免疫沈降にも有用であったので、レクチンアレイを組み合わせることで、ナノグラムオーダーのウイルス粒子を破壊せず糖鎖構造情報を取得する方法の確立に成功した。

次に、背景肝の異なるHBV感染患者の血清を調製し、開発したレクチンアレイ解析を行い糖鎖プロファイリングによる基礎情報を収集した。

B型肝炎患者血清より調製されたサブパイラルパーティクル(SVP)中のHBs抗原を試料に、糖鎖付加部位、および各付加部位上の糖鎖解析(IGOT後LC-MS分析)で糖ペプチドを同定し、L-HBsのPreS1およびPreS2領域、M-HBsのPreS2領域、S領域における糖鎖付加部位の同定に成功した。また精製した糖ペプチドのLC-MS分析から、M-HBs-PreS2領域の糖鎖構造を検出した。PreS2 N4はのN-glycanではほぼ100%修飾されているが、S領域のN146は約50%の修飾であった。

(2) 感染可能なヒト肝細胞と感染不可能な肝がん細胞(HuH7細胞とHepG2細胞など)の遺伝子発現解析や糖鎖解析を行い、両者の差を比較した。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。さらに次世代シーケンサーとパイオインフォーマティクス解析を行い、肝細胞特異的に発現する糖鎖関連遺伝子(糖転移酵素と内在性レクチン)の発現を解析した。やレクチンアレイ解析の準備を進め、

質量分析器(MS)による宿主肝細胞、肝がん細胞ならびにSVPのN-結合型ならびにO-結合

型糖鎖の構造解析を行い、3者間での糖鎖構造を比較することで共通性や差異を見出した。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、細胞間の糖鎖構造は類似していた。一方、SVPのN-結合型糖鎖は二本差のコンプレックス型であった。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、その相対量は細胞間でも異なる結果となった。SVPのO-結合型糖鎖も単純な構造であった。

ヒト肝臓キメラマウス由来培養肝細胞(±HBV感染)の糖鎖をレクチンアレイによって解析し、経時的・感染後の宿主肝細胞の糖鎖プロファイルの変化を見出した。

(3) グライコプロテオーム解析(IGOT解析)と次世代シーケンサーの結果を基に、内在性レクチンの検索を行い、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、肝細胞に発現する複数種のHBV糖鎖受容体候補分子を同定した。候補分子を決定しクローニングした。精製HBs抗原との結合性を解析し、HBV糖鎖受容体候補分子の絞り込みを行った。

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。プレプロ配列の導入により、従来法より10倍効率的にリコンビナントHBs抗原をHuH7細胞培養上清中に発現させる系を構築した。培養液中にタグ付きのHBs抗原として分泌され抗タグ抗体を使って精製し、その後の実験に使用可能であることを確認した。

(4) 糖鎖合成の阻害剤を用い、ウイルス粒子形成・分泌や感染への糖鎖の影響を調べた。HBVを産生する細胞およびHuH7細胞に上記(3)で作製したHBs抗原cDNAを発現させ、小胞体やゴルジ体でのN型やO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。糖鎖が付いたHBs抗原の発現やHBVの分泌に差が出る事を確認しており、幾つかの阻害剤において、低濃度でもHBs抗原の分泌を抑制した。

昨年度に引き続きcDNAライブラリー(約100遺伝子)の作成を進め、糖鎖改変細胞群の準備を行った。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の結果を基に糖鎖遺伝子siRNAライブラリーを作製し、糖鎖改変細胞のスクリーニングを行った結果、86siRNAターゲットのうち16糖鎖遺伝子でHBs抗原の分泌を抑制し、HepG2.2.15細胞を用いたHBV作成実験でもHBVDNAを減少させる糖鎖遺伝子siRNAを確認した。

(5) L-HBs抗原の大量精製を行うために、L-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。各遺伝子を出芽酵母の発現ベクターに組み込み、酵母の形質転換により安定発現株を樹立した。2種のcDNAに由来するクローンでL-HBs抗原の発現を検出し、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。

次にHBs抗原の大量精製を行うために、培養条件、前処理法、濃縮方法、カラムの選択、HPLCやフィルター処理等の条件検討などを行った。比較的低栄養源の培地を用い長時間培養でHBs抗原の発現の上昇が確認された。微粒子またはタンパク質複合体として存在しているHBs抗原の酵母菌体との分離にフィルター処理が有効である事を確認した。さらに大量調整を可能にするために、高発現可能な酵母を形質転換しクローンの選択を行った。以上の様に、抗体試験のために酵母で発現させた糖鎖付きHBs抗原の精製法を検討・確立した。

D. 考察

(1) これまでの主要な総説ではN末側のN型糖

鎖修飾は殆ど紹介されていないが、質量分析によるグライコプロテオミクス解析は、*N*型糖鎖修飾が L-HBs 抗原の *N* 末側 (HBV 認識領域と考えられている領域) にある事が確認された。HBs が S、M、L の 3 種あり、糖鎖の付加もほぼ 50% であり、S 領域の *N* 型糖鎖修飾の割合に依存しており、L-, M-, S-HBs 抗原のウイルス粒子における配向性と糖鎖修飾の関連は興味深い。今後 HBV 粒子 (Dane particles) の糖鎖構造および HBs 抗原の構造を解析し SVP との比較を行う必要がある。

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。本年度に検証した抗体を用いて肝炎患者の肝臓の状態 (線維化や肝がんのステージ) HBV の遺伝子型の異なる HBs 抗原について多数サンプルの糖鎖構造を分析・比較していく事が可能になった。HBV 感染と実際の肝線維化や肝がんの発症とのマーカー開発に繋がれば治療の効率化に繋がると考えられる。

(2) 一般にウイルスの感染において宿主側の糖鎖もしくはレクチンが関与していることが多いが、HBV 感染機構における肝細胞側の糖鎖の役割は全く分かっていない。特に宿主肝細胞の糖鎖合成系は HBV 表面の糖鎖を合成しており、病態変化により糖鎖遺伝子の発現量や糖鎖構造が変化する事は明らかで、HBV 上の糖鎖構造にどのように影響を及ぼすかを調べる必要がある。

これまでに 5 種の肝がん細胞とヒト肝細胞の次世代シーケンサーによる解析を終了しており、糖鎖関連遺伝子の発現における差が明らかになった。最近 HBV の受容体として注目されている NTCP を含めて、感染可能な細胞にのみ発現が見られる分子も同定されており、HBV 感染との関係をより詳細に解析していく必要がある。

例えば、キメラマウス由来肝細胞) の経時的な培養と感染能の変動に伴う候補分子の発現プロファイルの変化についてより詳細な解析を行う。

(3) HBV の場合、肝癌細胞株を用いた持続感染系が存在しておらず、HBV の感染過程の解明が創薬開発に必要と考えられる。本研究では宿主肝細胞に発現する内在性レクチンと HBs 抗原上の糖鎖との相互作用を解析し、HBV 感染における糖鎖の役割を解明する事を一つの目的としている。(2) の解析を基に同定した HBV 糖鎖受容体候補分子と HBV 感染患者血清より精製した HBs 抗原との結合を解析した。候補分子の過剰発現細胞やノックダウン細胞を用い、HBV 粒子との結合、肝臓内局在や NTCP 分子との関連を検証中であり、HBV 感染における糖鎖の役割に繋げたい。L-HBs 抗原の *N* 末側と受容体との結合において *N* 型糖鎖修飾の影響はこれまで全く研究されておらず、NTCP 発現安定株を用いて、検証する必要がある。他班で研究される HBV 受容体との感染促進効果などの研究や糖鎖-受容体の阻害剤をスクリーニングへと繋げる必要が考えられる。

(4) これまでに、ツニカマイシン (*N* 型糖鎖の合成阻害) ではウイルス様粒子が放出されるものの、感染能を有する HBV 粒子は分泌されないことが報告されており、創薬のターゲットと成り得る。実際に糖鎖合成系の阻害剤を試験した所、幾つかの阻害剤で HBs 抗原の *N* 型糖鎖の付加と分泌が既報のノジリマイシンより抑制する事が確認された。糖鎖合成系の阻害剤の場合は、副作用を起こさない濃度あるいは感染細胞のみへのドラッグデリバリーなどの技術と共に開発する必要がある。

HBV 創薬のターゲットとして選定するためには、特定の糖鎖遺伝子やタンパク質の糖鎖合成を阻害する事の方が有用である。今回糖鎖遺

伝子ライブラリーや siRNA スクリーニングに依り得られた候補糖鎖遺伝子について、HBV の複製・分泌への影響および HBV の感染能への影響を詳しく解析する事が重要である。また、HBs 抗原の糖鎖付加阻害実験の結果を基に培養肝細胞を用いたスクリーニング系を開発し低分子化合物ライブラリーのスクリーニングに供する事も可能であると考えられる。

(5) 現在用いられている HBV ワクチンは、酵母で発現された糖鎖を持たない S-HBs 抗原であり、感染能を有する HBV 粒子の HBs 抗原は糖鎖の有無がほぼ半々で構成されている事が分かった。すなわち、現行のワクチンにより免疫された抗体は HBV 粒子中の糖鎖の無い HBs 抗原に作用し抗ウイルス効果を示していると考えられる。

実際にヒトに免疫して得られたクローンの抗体は糖鎖の有る HBs 抗原を認識しなかった。最近中国の臨床例として報告された例では、ワクチン接種者から発見されたエスケープ変異のうち約 22% で糖鎖の新規付加が観察された。現在のワクチンは実際に有効であるが、糖鎖を有する HBs 抗原で免疫する事によりさらに効率良く抗ウイルス効果が得られる可能性がある。PreS1 や PreS2 の抗体誘導率が高い事が示唆されており、調製中の L-HBs 抗原を免疫しエピトープの決定と HBV 粒子との反応性を検証し現行ワクチンと比較する事が必要である。HBV 感染患者の中で作られる中和抗体のエピトープ決定が興味深い。

糖鎖を使ったHBV研究と医用応用

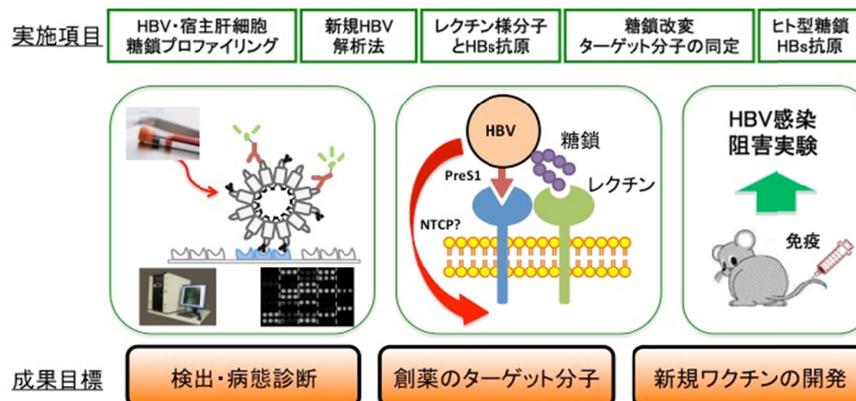


図2 本年度の研究成果の概要 5つの実施項目により3つの成果目標の達成を目指す。

E. 結論

HBV感染・複製における糖鎖の役割は殆ど解析されていなかったが、HBVあるいは宿主肝細胞の糖鎖関連分子を標的とした創薬のシーズとなる可能性が考えられ以上の研究結果を得た。

(図2)

(1) HBs抗原のグライコプロテオミクス解析からHBVの簡易検出系の開発へと進んだ。現在臨床サンプルでの基礎データを収集であり、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・臨床応用へと進展させたい。

(2) 本研究結果から、内在性レクチンがHBV上の糖鎖と結合する事が示され、HBVの感染に関与している可能性が考えられた。また糖鎖遺伝子のHBV分泌への重要性も示唆された事から、タミフルの様にHBV粒子形成や分泌を阻害する新規ターゲットとなりうるかを検討して行きたい。

(3) 糖鎖を有するL-HBs抗原の発現に成功し精製法の検討を行ったが、L-HBs抗原の大量精製を実施し現行ワクチンと免疫実験を行い比較

する必要がある。現行のワクチンに加え有効な新規ワクチンの開発やワクチン治療への応用などに繋げたい。

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けると考えている。

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) **Narimatsu H.** Glycosylation of HBV.
TASL-Japan Hepatitis B Workshop, April 19-20, 2014, Taipei

2. 学会発表

省略。

その他の論文発表及び学会発表は各課題の分担研究報告書を参照のこと。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

省略。

2. 実用新案登録

省略。

3. その他

省略。

特許の国際・国内の出願・登録状況についても各課題の分担研究報告書を参照。

厚生科研（B型肝炎創薬実用化研究事業）

平成 25 年度 第一回班会議 議事録

開催日時 平成 25 年 7 月 12 日（金） 14:30 ~ 18:30

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（敬称略）：溝上雅史、是永匡昭（以上、国立国際医療研究センター）、米田政志、伊藤清顕（以上、愛知医科大学）、飯島沙幸（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、梅谷内晶、佐藤隆、千葉靖典、館野浩章、後藤雅式、雄長誠、我妻孝則（以上、産総研）

（国立国際医療研究センター・正木尚彦、愛知医科大学・森田奈央子、福島県立医大・伊藤浩美、産総研・梶裕之は、都合により欠席）

会議内容

1．成松研究代表者挨拶

今回はオブザーバーとして理研の小嶋先生が出席されていたので、HBV 研究と糖鎖の概論を説明した。

2．溝上先生挨拶

厚生科学審議会の情報を報告。日本のワクチン転換期にある。産まれてくる子供全てに HBV ワクチン接種を行うことになるだろう。

3．研究報告

(1) 課題 1（久野）

田尻先生から供与頂いた 4 種の抗体の評価を行った。抗体オーバーレイでノイズが出ず、IP 効率の良い抗体が見つかった。糖鎖が付加した HBs とは結合しにくいようである。

今後は、実サンプルを用いた解析系を立ち上げる（国際医療研究センター内で実施予定）、Genotype、背景肝の影響を検討し、Dane 粒子リッチの画分との比較も行いたい。

(2) 課題 2（梅谷内）

HepG2, Huh7 の糖鎖解析の結果、high Man 型糖鎖が多い。O-glycan としては Core1 等が多い。今回は培養の結果細胞であるが、プライマリーヘパトサイトで解析しないと意味がない。今後は、非感染キメラマウス肝 感染能の有無により細胞の糖鎖が異なるかどうかを検討したい。

(3) 課題 3（館野）

糖鎖が初期感染に関係するか（HBV-宿主における糖鎖の役割）を検討している。

6 種類の内在性レクチンのリコンビナントを作製し、HBs との相互作用を検討した結果、Gal3 のみ反応が見られた。今後は細胞レベルでの解析を行う予定である。実施には HBV-GFP を開発している下遠野班との連携が必要である。

(4) 課題4 (伊藤先生)

糖鎖合成阻害による genotypeA をトランスフェクトした Huh7 の Dane 粒子分泌阻害を検討している。ノジリマイシン濃度を上げると分泌阻害が多少見られる。変異により分泌量が低下する。146N を変異しているウイルスは血清では見られない。N-glycan の数と疾患の状態が変わる可能性もある。

(安形)

細胞側の糖鎖修飾を変えるとどうなるかを検討している。HBV 分泌に必要な糖鎖合成系の絞込みのための、cDNA ライブラリー、siRNA ライブラリーはできている。

(5) 課題5 (千葉)

台湾でワクチンを打っているが、すり抜ける例が多い。そこで、L タンパク質に糖鎖付加をしたものを免疫原としたいと考えている。

4 種類の遺伝子のうち、安定に発現する genotype Ae、C について酵母で生産を行っているが、精製が難しい。凝集により培地中でも不溶性になっているため、可溶化 透析 カラム精製を検討している。収量は数百 ml から 100 ug 程度と少ない。

Mg オーダーで精製して、マウスの免疫をする(田尻先生に依頼する)予定である。mg オーダーで準備する。糖鎖の有無で比較。Endo-M で糖鎖を付け替えも検討する。

4 . 他班との共同研究について

今後、他班と積極的に共同研究を実施する。まずは、正木先生に他班のスケジュールを送ってもらう。

厚労科研（B型肝炎創薬実用化研究事業）

平成 25 年度 第二回班会議 議事録

開催日時 平成 25 年 9 月 30 日（月） 13:30 ~ 18:30

場 所 東京コンベンションルーム AP 品川「F+G ルーム」（京急第 2 ビル・10 階）

出席者（敬称略）：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、伊藤清顕（以上、愛知医科大学）、飯島沙幸（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、後藤雅式、我妻孝則（以上、産総研）

（名市大・田中靖人、産総研・館野浩章、雄長誠は、都合により欠席）

会議内容

1．研究代表者（成松）挨拶

本研究班は B 型肝炎に対する創薬を目指す本研究事業において糖鎖を中心に研究している。本研究事業をさらに推進して行くために 9 月 9 日に合同班会議を開催した事を報告した。

2．合同班会議の報告（安形）

9 月 9 日に国立感染症研究所にて開催された 4 班合同班会議について報告した。

当班は当初よりスクリーニング、ウイルス粒子形成・分泌、レセプター、新培養細胞系の評価を研究課題とする班との共同研究を計画しており、今回 3 班（小嶋班、脇田班、下遠野班）との合同班会議を開催した。各班の研究内容について紹介、各班とも最近報告された HBV のレセプター候補分子 NTCP について研究を進めており、それについては米田先生（愛知医大）よりコメントがあった。

3．各課題の進捗状況説明

課題 1（梶、久野）

これまでの MS によるグライコプロテオミクス解析から、HBs 抗原上の糖鎖の付加部位が明らかになり、およその糖鎖構造が示唆された。L-HBs 抗原の N 末の N-glycan や M-HBs 抗原の N 末 (PreS2) の N-glycan は明らかになったが、S-HBs 抗原の N-glycan の構造は明らかになっていない。約半分の S-HBs 抗原が糖鎖修飾されていない事、プロテアーゼによる切断が難しい事も、構造や糖鎖の機能を解析する上で重要な点として挙げられた。

レクチンアレイによる HBs 抗原の解析では、免疫沈降や抗体の選定が進み、特にノイズの除去に成功した。田尻先生（富山大）から頂いた抗体が、ウエスタンの検出でレクチンアレイなどの結果に比べシグナルが弱い事の原因として、還元剤による処理が原因である事を示した。非還元状態で泳動した場合、より多くの抗体で認識され、糖鎖の影響に加えジスフィルド結合がワクチンの抗体認識構造に影響していると考えられた。

課題 2 (梶谷内)

感染に必要な糖鎖・糖鎖関連分子を明らかにするために、感染可能細胞と不可能細胞を糖タンパク質解析 (グライコプロテオミクス)、糖鎖解析 (MS)、糖鎖遺伝子解析 (qRT-PCR アレイ、次世代シーケンサー) を行っている。肝臓由来の培養細胞 2 種 (Huh7、HepG2) とヒト肝細胞の解析結果から、糖鎖遺伝子と内在性レクチンの発現解析が進み、課題 3 や課題 4 で利用される。

ヒト肝キメラマウス由来の肝細胞のレクチンアレイ解析で、培養 5 日目と 17 日目の糖鎖発現パターンに大きな差があるが、HBV 感染の有無 (感染後 12 日目) による差は微小であった。

課題 3 (佐藤)

HBV の受容体結合そして細胞内への侵入に糖鎖が関わっているかを明らかにするために、分泌 HBs 抗原を利用している。糖鎖の付かない HBs 抗原と新たな N-glycan 修飾部位を導入した HBs 抗原を作成した。

課題 2 による次世代シーケンサーの結果から肝臓で発現しているレクチン様分子の絞り込みを行い、発現パターンが肝臓特異的であるものが複数見つかった。今後 NTCP との共発現や HBV 感染実験に用い、糖鎖関連分子の同定を進めて行く。

課題 4 (安形)

課題 2 の結果を基に糖鎖改変細胞を作製し、ウイルス粒子形成・分泌や感染への糖鎖の影響を調べている。糖鎖遺伝子 cDNA プラスミドによる過剰発現系では、タグに対する抗体を用いて糖転移酵素の発現を確認した。siRNA による発現抑制系では、幾つかの siRNA について、qRT-PCR によって発現量の減少を確認した。タグ付き HBs 抗原を用い、siRNA の効果の解析を始めたところ、HBs 抗原の糖鎖が減少するものが確認されたので、さらに他の siRNA や cDNA についても解析を進める。今後各プレートを用いて HBV 作成実験にも使用する。

課題 5 (千葉)

HBV に対する新規ワクチンを作製するために、酵母で発現させた L-HBs 抗原の解析と精製を進めた。酵母特有の高マンノース型ではない糖鎖が付加されている事、沈殿しやすい性状が報告された。ウレアによる透析や HPLC によって精製法を確立したので、現在免疫用に L-HBs 抗原の精製している。まず、PreS1 や PreS2、糖鎖存在の抗体価の上昇への影響を調べ、田村先生 (富山大) による抗体エピトープ解析を行い、ワクチンとしての有効性を検討する。

溝上先生 (国際医療セ) より、ワクチン政策ではユニバーサルワクチンを増やしていく上で優先順位の選定に入っているので、当班での HBV ワクチンの成果は将来の厚生政策に重要であるとのこと。

4 . 他班との共同研究等について

今後の研究を進めて行く上で共同研究が重要になる。積極的に他班に働きかけて行く事が確認された。研究成果を公開して行くために、論文を投稿して行く事も確認された。

5 . PO コメント

正木 PO (国際医療セ) より本研究班の進捗状況について、新規ワクチンの開発やグライコミクスの進展についてコメントいただいた。スクリーニングによるターゲット分子の同定の加速を期待するとのコメントも頂いた。

各班間での情報交換や共同研究促進に向けて、参加研究者に本研究事業のホームページを公開する事が報告された。

厚労科研（B型肝炎創薬実用化研究事業）

平成 25 年度 第三回班会議 議事録

開催日時 平成 25 年 11 月 27 日（水） 13:30 ~ 18:30

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（敬称略）：溝上雅史、是永匡紹、正木尚彦（PO）（以上、国立国際医療研究センター）、米田政志、伊藤清顕（以上、愛知医科大学）、飯島沙幸（名古屋市立大学）、田尻和人（富山大病院）、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、千葉靖典、梅谷内晶、佐藤隆、館野浩章、後藤雅式、我妻孝則（以上、産総研）
（産総研・雄長誠は、都合により欠席）

会議内容

1．研究代表者（成松）挨拶

本研究班は B 型肝炎に対する創薬を目指す本研究事業において糖鎖を中心に研究している。中間発表会、成果概要の提出の準備や本研究事業を基礎研究から創薬かへとさらに推進して行く必要がある。溝上先生（国際医療セ）から、最近の肝炎を含めた厚生研究事業の状況をご紹介頂いた。

2．各課題の進捗状況説明

課題 1（梶、久野）

これまでの MS によるグライコプロテオミクス解析から明らかになった、HBs 抗原上の糖鎖の付加部位に加え、ワクチン作成に有用な HBs 抗原の構造に関する知見を得た。L-HBs 抗原の N 末（PreS1）や M-HBs 抗原の N 末（PreS2）はプロテアーゼ感受性だが、S-HBs では非感受性の領域が多く粒子内に含まれている部位やジスフィルド結合が示唆された。

レクチンアレイによる HBs 抗原の解析では、非破壊で測定することによってより微量なサンプル量で結果を得る事に成功した。糖鎖の無い HBs 抗原を認識する田尻先生（富山大）提供の抗体と HBs 抗原の糖鎖を認識するレクチンの組み合わせが有効であった。今後は国立国際医療研究センターにおいて、患者のサンプルの解析を進めて行く。

課題 2（梅谷内、伊藤浩）

感染可能細胞と不可能細胞を糖タンパク質解析（グライコプロテオミクス）、糖鎖解析（MS）、糖鎖遺伝子解析（qRT-PCR アレイ、次世代シーケンサー）を行っている。肝臓由来の培養細胞 2 種（Huh7、HepG2）とヒト肝細胞の解析結果から、糖鎖遺伝子と内在性レクチンの発現解析が進み、課題 3 や課題 4 で利用される。感染能と糖鎖発現パターン変化を解析するためにヒト肝キメラマウス由来の肝細胞の長期培養を行っている（名古屋市立大学）。

肝細胞の膜糖タンパク質の糖鎖構造を比較した結果、N-glycan にはあまり差が無く、O-glycan に差が見られた。一方、HBs 抗原の N-glycan や O-glycan は単純な構造が主であった（福島県立医科大学）。

課題3（館野）

HBV の肝細胞特異的な感染のメカニズムは不明な点が多く、糖鎖や糖鎖関連分子の関与は解析が進んでいない。7種の肝がん細胞のプロテオミクス解析より肝臓での発現が示唆された内在性レクチンを用いHBsとの相互作用を調べた結果、幾つかの分子で結合性が確認された。現在グリコシダーゼやレクチンを用いHBV感染実験を行い（名古屋市立大学）、糖鎖の影響を解析している。

課題2による次世代シーケンサーの結果から肝臓（感染可）で発現し肝がん細胞（感染不可）で発現の低いレクチン様分子の絞り込みを行った。発現パターンが肝臓特異的であるものが複数見つかり、現在クローニング中で、脇田班から供与されたNTCP発現細胞を用いHBV感染への影響を解析する。

課題4（安形）

課題2の結果を基に糖鎖改変細胞を作製し、ウイルス粒子形成・分泌や感染への糖鎖の影響を調べている。まずHBs抗原を糖鎖合成の阻害剤存在下や異なるがん細胞で発現させ、糖鎖が付いたHBs抗原の発現に差が出る事を確認した。次に、これまでに作製した糖鎖遺伝子cDNAライブラリとsiRNAライブラリを用いスクリーニングを行っている。タグ付きHBs抗原では、86siRNAターゲットのうち15糖鎖遺伝子でHBs抗原の糖鎖が減少する事が確認された。HBV作成実験でも40siRNAを調べた結果、HBVDNAの減少する糖鎖遺伝子が確認された（愛知医科大学）。今後セカンドスクリーニングを行いさらに検証して行く。

課題5（千葉）

HBVに対する新規ワクチンを作製するために、酵母で発現させたL-HBs抗原の解析と精製を進めた。酵母特有の高マンノース型ではない糖鎖が付加されていると考えられ、糖鎖付加部位や糖鎖の解析を行う。免疫用の大量精製のためにカラムなどHPLCによる精製法を検討した。今後、PreS1やPreS2、糖鎖存在の抗体価の上昇への影響を調べ、田村先生（富山大）による抗体エピトープ解析を行い、ワクチンとしての有効性を検討する。

3．今後の予定

成果概要・工程表の提出、中間発表会の日程を確認し、1月上旬までに中間発表会に必要な結果を中心に進めて行く事とした。

研究成果を公開して行くために、論文を投稿して行く事も確認された。

4．POコメント

正木先生（国際医療セ）より本研究班の進捗状況について、グライコミクスによるHBV（HBs）解析、新規ワクチンの開発や候補ターゲット分子の進展についてコメントいただいた。基礎研究の結果から創薬化へと見える展開を期待するとのコメントも頂いた。

本研究事業の継続申請、中間発表会、守秘義務、報告会（公開）する事が報告された。

厚生科研（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、梶谷内晶、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

梶谷内：

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週間ですぐ低くなることなので、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。

