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）

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（ビームゲン、ヘプタパックス）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, M **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, Yatsuhashi 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, Yatsuhashi 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, Hiramine 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