

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がつある。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

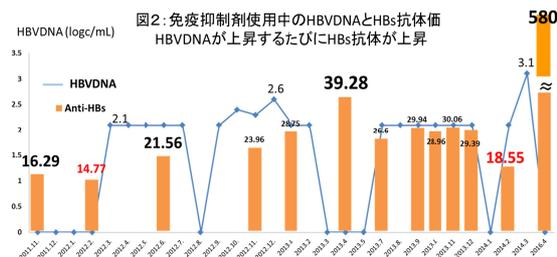
産業技術総合研究所で解析されるレクチンアレイによる HBV 粒子上糖鎖変化の解析の為、HBs 抗原価が高い、genotype C 症例を抽出し、eAg/eAb 陽性別に sample を選択し、これまで

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, 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

- 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