

糖鎖変異のHBVの増殖・感染能への影響

米田政志 愛知医科大学・消化器内科

伊藤清顕 愛知医科大学・消化器内科

研究要旨：本研究は、B型肝炎ウイルス(HBV)の感染過程における糖鎖の役割を解明し、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。B型肝炎の治療にはインターフェロンや核酸アナログ製剤が用いられているが治療効果が不十分で根治することが出来ない。一方、創薬のターゲットとしてHBVの感染や複製の過程が研究され、糖鎖の関与が示唆されている。しかし、糖鎖の機能解析をより生体内に近い条件で研究する事は難しく、新しい糖鎖解析技術を用いて網羅的に解析する事が必須である。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最先端の糖鎖機能解析技術を開発・実用化してきた糖鎖生物学者との協力体制により、HBV感染における糖鎖の機能を理解し、HBVに対する創薬実用化を図る。1) HBV(HBs抗原)の糖鎖解析：多数の検体から種々のGenotypeのHBV(HBs抗原)を調製し、自ら開発した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を行う。3) HBV-宿主細胞における糖鎖の役割：HBVの感染機構を明らかにするために、新たにHBs抗原アレイを作製し、肝細胞結合に関わる分子を探索する。4) 糖鎖変異の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の感染能を解析する事により、HBV上の糖鎖の機能を明らかにし、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。1-3年次は、糖鎖構造解析とグライコプロテオミクス技術により、HBVの感染過程における糖鎖の機能を明らかにし、医用応用のための基盤研究を行う。4-5年次は解析した肝細胞側の糖鎖および糖鎖合成系の役割をもとに、他研究グループと連携し、B型肝炎を治療する新規治療薬の開発やワクチンの実用化へ繋げる。

A. 研究目的

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。

我々はこれまでに HBV のエンベロープ蛋白上の 146 番目のアスパラギンへの N 結合型糖鎖が HBV の細胞外への放出に必須であることを報告してきた (Ito K, et al. J Virol. 2010)。この 146 番目のアスパラギンを異なるアミノ酸に変異させると HBV 粒子が細胞外に全く分泌されなくなるため、蛋白自体の folding 不良による粒子形成不全もしくは小胞体からゴルジ装置への細胞内輸送不全により HBV の分泌が阻害されるものと考えられる。これに対して、本研究の第一段階のステップとして、各種糖鎖プロセッシング阻害剤を用いることにより、どの過程の糖転移酵素が分泌に重要か、また分泌がどの程度ブロックされるかに関して実験を行った。次のステップとしては糖鎖合成系に関連する糖鎖遺伝子を阻害する各種 siRNA を用いて、細胞内の糖鎖合成系の各機能を阻害することにより、HBV の複製から分泌にかけて重要なファクターを模索し、新たな阻害剤開発に向けた情報を得た。

B. 研究方法

これまでの in vitro 実験では、transfection 試薬を用いた transient の系で各種糖プロセッシング阻害剤の HBV 複製および分泌に対する影響を解析してきた。しかし、これまでのデータをもとに解析を行うと、試薬を用いた transfection 効率に各 well 間で差があり、次の siRNA を用いた実験系では測定誤差の原因となると考えられた。このため、siRNA を用いた糖鎖合成系を標的とした HBV 複製および分泌に関するスクリーニングでは、HBV DNA が細胞に組み込まれている HBV 持続産生系 HepG2.2.15 細胞を用いて実験を行った。産業技術総合研究所糖鎖医工学センターより提供された siRNA 固相化済み 12 well plate を用いて、それぞれの糖鎖遺伝子に対する siRNA の HBV に対する影響を観察した。本プレートは各 well

にそれぞれの標的とする糖鎖遺伝子に対して、3 種類の siRNA の mixture が固相化されている。各 well 間で等量の HepG2.2.15 細胞を専用の培養液を用いて培養し、翌日に培養液を洗浄、新しい培養液と交換した。その後 4 日目に培養液および細胞を harvest した。Harvest した培養上清を用いた HBsAg は ELISA 法により、HBV DNA は real-time PCR 法により定量を行った。

C. 研究結果

86 種類の糖鎖遺伝子を標的とした siRNA による一次スクリーニングの結果、分泌される HBV に対して 60%以上の阻害が認められた siRNA を 5 種類、40%~60%の阻害が認められた siRNA を 11 種類認めた。これらの siRNA を二次スクリーニングの対象とした。また、逆に HBV の分泌が 200~300%と増加した siRNA を 2 種類、300%以上の増加が認められた siRNA を 2 種類認めた。これらの増加した siRNA に関しても、HBV を何らかの形で阻害していた物質を抑制した可能性があり、創薬シーズにつながる可能性が残るため、二次スクリーニングの対象とした。

D. 考察および結論

糖プロセッシング阻害剤による HBV に対する抑制効果は、エンベロープ蛋白とコア粒子との assembly の障害、もしくは粒子の細胞内輸送での障害によると考えられた。糖プロセッシング阻害剤による HBV の抑制効果は比較的弱く、抗ウイルス剤として使用することは難しいと推察された。しかし、糖鎖遺伝子を標的とした siRNA が HBV を抑制することが明らかとなり、HBV に対して糖鎖合成系をターゲットとした創薬の可能性が示唆された。糖鎖合成系を標的とした HBV に対する抗ウイルス剤としての創薬シーズの発見が可能であり、今後の創薬研究に貢献できる可能性が示唆された。

E. 研究発表（本研究に関わるもの）

1. 論文発表

- 1) **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

2. 学会発表

なし

F. 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