

糖鎖改変のHBVの増殖・感染能への影響 - II

安形清彦 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター
梅谷内晶 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター
佐藤 隆 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター

研究要旨：日本人の約1%に相当するB型肝炎患者の治療に、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、根治することが難しく新規創薬が望まれている。本研究班では、B型肝炎ウイルス(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を目的としている。そこで本研究課題では、糖鎖遺伝子ライブラリーを保持し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肝疾患やHBV作製・感染実験の専門家との協力体制により、糖鎖改変のHBVの増殖・感染能への影響を解析し、HBVに対する創薬ターゲットを探索する。まず、qRT-PCRアレイや次世代シーケンサーを用いHBVを作製する肝癌細胞と肝細胞の糖鎖遺伝子発現を解析し（梅谷内らの課題を参照）糖鎖改変細胞を作製するためのcDNAプレートやsiRNAプレートを作製した。次にタグ付きのHBs抗原を構築し肝癌細胞で発現させ、細胞培養液中に分泌されるHBs抗原上の糖鎖の有無を解析する系を開発した。ウイルス粒子形成・分泌や感染への糖鎖の影響を調べるために、糖鎖合成の阻害剤を用い、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た。さらにsiRNAライブラリーを用いて糖鎖改変細胞を作製しスクリーニングを行った結果、86siRNAターゲットのうち15糖鎖遺伝子でHBs抗原の糖鎖が減少した。HBVを産生する肝細胞の糖鎖合成系を改変することによって、HBV粒子の形成・分泌能を抑制する創薬ターゲットとなる可能性を見いだした。

A. 研究目的

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つつある。HBV感染患者の約10%が慢性肝炎や肝硬変、さらにその内の数%の方が肝細胞癌を発症するとされ、長期にわたる治療と経過観測が必要となっている。現在HBVの治療法として、核酸アナログ剤の継続投与が実施されているが、HBV DNA中の変異による薬剤耐性ウイルスの

出現が問題になっている。また、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い場合が多く、特にgenotype間での治療効果に差がある事が報告されている。日本ではHBVワクチンはユニバーサルワクチンではないために、今後も輸血・移植における感染事故や水平感染を防ぐ事は難しい。従って、HBVの感染/複製機構のより詳細な理解を進め、逆転写酵素に代わる新規の創薬ターゲットを開発する事が重要である。

これまでに HBV においては HBs 抗原上に糖鎖が付加されている事が知られているが、機能についてはあまり研究が進んでいない。伊藤らの報告によれば、糖鎖付加が感染性を有する HBV の粒子形成や分泌に重要である事が示唆されており、糖鎖付加を制御する事により HBV の放出を阻害する事が考えられる。本研究では、HBV 作製細胞の糖鎖合成系を阻害する事により、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 の創薬のターゲットを探索する。

B. 研究方法

本研究では、HBV 感染における糖鎖の機能を解析し、HBV に対する創薬ターゲット分子を探索するために、HBs 抗原上の糖鎖の有無を解析する系の開発、糖鎖改変細胞の作製、siRNA ライブラリーなどを用いてスクリーニングを進めた。

(1) HBs 抗原 cDNA ライブラリー用発現ベクター：

HBV のエンベロープタンパク質である HBs 抗原 (S-HBs, M-HBs, L-HBs) cDNA (genotype C、名古屋市立大学より供与頂いた) を PCR で増幅しサブクローニングした。分泌シグナルとタグを導入し、HBs 抗原発現ベクターを構築した。塩基配列を決定し確認した後に、プラスミド DNA をエンドトキシフリーで調製した。HuH7 細胞を調製したプラスミド DNA で形質転換後に抗体ビーズで回収し、SDS-PAGE とウエスタンブロッティングを行い HBs 抗原の発現を確認した。

(2) 糖鎖合成阻害剤の HBs 抗原粒子形成・分泌への影響：

N 型-および O 型-糖鎖の合成阻害剤約 10 種を購入した。HuH7 細胞に S-HBs 抗原の発現ベクターを導入し、24 時間後にツニカマイシシな

どの糖鎖合成阻害剤を含む培地と交換した。48 時間後に培養上清から S-HBs 抗原を抗体ビーズで回収し、上述の様に S-HBs 抗原の発現を検出した。

(3) 糖鎖遺伝子の発現解析：

肝細胞の一次培養、HuH7 細胞や HepG2 細胞などの肝がん細胞から total RNA を調製し、cDNA を合成した後に糖鎖遺伝子の発現量を qRT-PCR 解析 (糖鎖遺伝子 qPCR アレイシステム) や whole transcriptome 解析 (次世代シーケンサー) を実施した。この結果を基に糖鎖遺伝子をその発現パターンで 2 群 (抑制目的と過剰発現目的) に分け、それぞれ cDNA ライブラリーと siRNA ライブラリーの作成を進めた。

(4) ライブラリーの調整：

昨年同様に cDNA ライブラリー用発現ベクター (共通の Kozak 配列を開始コドン前に C'末に Flag タグ) をもちいて、糖鎖遺伝子 cDNA をクローニングした。cDNA ライブラリーは産総研で集積された糖鎖遺伝子ライブラリーを基に PCR で増幅した。各クローンは塩基配列を決定し選別した後に、プラスミド DNA をエンドトキシフリーで調製した。タグを付加する事によって、形質転換後に共通のタグを用いて各糖鎖遺伝子の発現量を比較出来る様にした。HuH7 細胞を調製したプラスミド DNA で形質転換後に回収し、SDS-PAGE とウエスタンブロッティングを行い糖転移酵素の発現を確認した。siRNA ライブラリーの作製は 86 個の糖鎖遺伝子にそれぞれ 3 種類の siRNA を合成した。遺伝子発現の定量は遺伝子特異的なプライマーを作製し、qRT-PCR によって測定した。

(5) スクリーニング：

1 つの遺伝子につき 3 種の siRNA を等量ずつ混ぜ、12-well プレートに固定した。形質転換前

に試薬と混ぜ、HuH7細胞をトリプシン処理し細胞を調製し、リバーストランスフェクションを行った。24時間後にS-HBs抗原の発現ベクターを導入し、48時間後に上述の様にS-HBs抗原を回収し、ウエスタンブロッティングによりS-HBs抗原の発現と糖鎖の有無を検出した。

C. 研究結果

(1) HBV表面上の糖鎖はHBs抗原への糖鎖修飾であり、糖鎖合成系のHBs抗原の形成・分泌への影響を調べるために、まず**リコンビナント**HBs抗原の高発現系と精製法の検討を行った(館野・佐藤らの課題を参照)。genotype CのHBs抗原cDNAから作製したHBs抗原発現ベクター(S-HBs, M-HBs, L-HBs)をHuH7細胞にトランスフェクションして、48時間後にサンプルを回収した。培養上清を回収し、PBSで洗浄後に細胞を溶解し遠心後にライセートを得て、抗体ビーズを用いてリコンビナントHBs抗原を回収した。

細胞ライセートから回収したリコンビナントHBs抗原をSDS-PAGEで展開し、抗FLAG抗体でウエスタンブロットした結果、S-HBs, M-HBsそしてL-HBsそれぞれ糖鎖有無の2本のバンドが検出された(図1)。培養上清から回収したリコンビナントHBs抗原の場合、S-HBsとM-HBsのみが検出され、L-HBsが検出されないことからタグを付加したN'末側が切断されていると考えられる。興味深い事に、N型糖鎖有無の割合はほぼ1:1に維持されていた。

(2) 糖鎖合成に関わる遺伝子(糖転移酵素やグリコシダーゼ)は主に小胞体とゴルジ体に局在している(図2)。12-well, 24-well及び48-wellのプレートにHuH7細胞を播種し、S-HBs抗原の発現ベクターを導入24時間後に糖鎖合成阻害剤を含む培地と交換し、48時間後に培養上清から抗体ビーズで回収した。S-HBs抗原の発

現は抗FLAG抗体を用いて検出した(図3)。一部の糖鎖合成阻害剤によってS-HBs抗原の分泌が有意に減少する事が確認された。

(3) HBV上の糖鎖はHBs抗原の糖鎖であり、宿主肝細胞の糖鎖合成系を用いて行われる。糖鎖修飾のHBV粒子形成や分泌への影響を効率良く解析するために、HBVやHBs抗原を発現させる細胞の糖鎖遺伝子の発現を解析した。

HBVを作製するHuH7細胞やHepG2細胞の糖鎖遺伝子の発現量を解析するために、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(発現無しを含む)の2群に分けた。

同様にtotal RNAよりcDNAを合成後に次世代シーケンサーを用いwhole transcriptome解析を行った。基本的にqPCRアレイシステムと同様な結果が得られたが、whole transcriptome解析からは課題3にも繋がるような糖転移酵素以外の情報が得られた。

(詳しくは梅谷内らの課題を参照。)

(4) 上述の糖鎖遺伝子qRT-PCRアレイの結果を基に、糖鎖遺伝子をその発現レベルで2群(過剰発現目的と抑制目的)に分け、それぞれcDNAライブラリー(約100遺伝子)とsiRNAライブラリー(約80遺伝子x3本)の作製を進め、糖鎖改変細胞群を調製した。

昨年度の報告に引き続きcDNAライブラリー作製を行いほぼ終了した。糖転移酵素の発現量を確認するためには形質転換後に細胞を回収し、SDS-PAGEで分離後にウエスタンブロッティングを行い、クローニングされた糖鎖遺伝子がHuH7細胞で発現することを確認した。

siRNAライブラリーによる糖鎖遺伝子のノック

クダウンは一部の糖鎖遺伝子については qRT-PCR によって確認した。HuH7 細胞あるいは HepG2 細胞を siRNA で形質転換後に RNA を調製し、qRT-PCR によって確認した。調べた限り、おおむね 70-90% 発現量を低下させることに成功しているが、50% 前後の物も見られ、効果に差がある siRNA も認められた。

(4) 糖鎖修飾の HBV 粒子形成や分泌への影響を解析するための 1 つとして、投資電子の改変細胞を作製した。上述の様に siRNA は比較的用意にプレート上の殆どの細胞を形質転換可能である。まずリバーストランスフェクションにより

3 種の siRNA / well を HuH7 細胞に導入し、24 時間後に S-HBs 抗原の発現ベクターで形質転換し、S-HBs 抗原の発現を解析した (図 4)。

86 糖鎖遺伝子に対するスクリーニングを行った所、10 種以上の遺伝子について、コントロール siRNA と比較して、S-HBs 抗原の発現が低下した物あるいは糖鎖の付加が減少したものが確認された (図 5)。これらの実験と並行して、HBV 産生細胞である HepG2.2.15 細胞を用いて HBV 粒子の分泌への影響を解析した (伊藤と米田の課題を参照)。

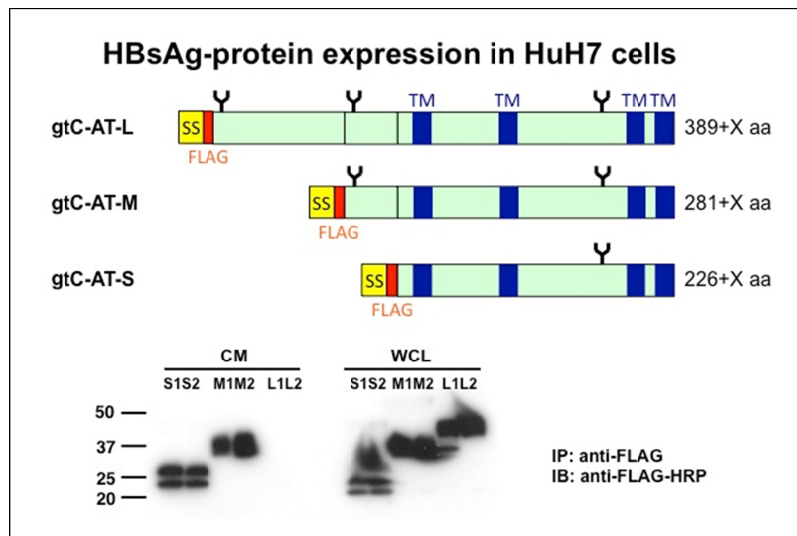


図1 HBs 抗原 cDNA 発現ベクター の構築 HBs 抗原(S-HBs, M-HBs, L-HBs)cDNA(genotype C)に、分泌シグナルと FLAG タグを導入し、HBs 抗原発現ベクターを構築した。4つの膜貫通領域(TM)が想定されており、N型糖鎖付加部位も3カ所示唆されている。(下段)HuH7細胞で発現させた結果、L-HBsは細胞ライセート(WCL)でのみ確認され、培養上清(CM)では検出されなかった。

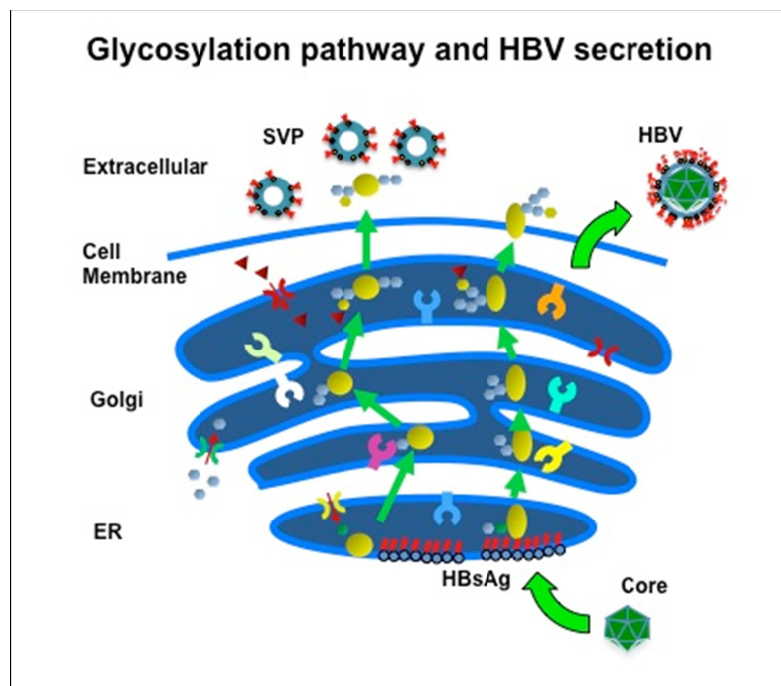


図2 糖鎖修飾経路とHBV分泌 糖鎖合成に関わる遺伝子は主に小胞体(ER)とゴルジ体(Golgi)に局在している。小胞体でHBs抗原にコアが内包された場合、感染性を有するHBVとなる。一方コアを含まないHBs抗原はウイルス様粒子(SVP)となる。ともにゴルジ体を通ずる際に糖鎖修飾を受けると考えられている。HBVとSVPが同一の経路をたどるかは分かっていない。

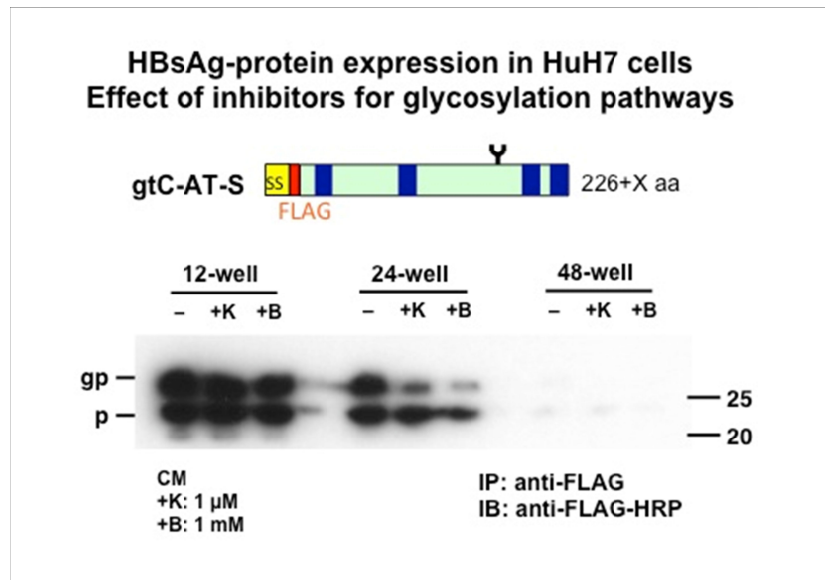


図3 糖鎖合成阻害剤のHBs抗原粒子形成・分泌への影響 S-HBsをHuH7細胞で発現させると糖鎖有り(gp)と糖鎖の付いていない(p)HBs抗原の2種の(糖)タンパク質が検出される。糖鎖合成阻害剤(K, B)を添加した場合、HBs抗原上の糖鎖修飾が抑制されHBs抗原の分泌量が減少した。

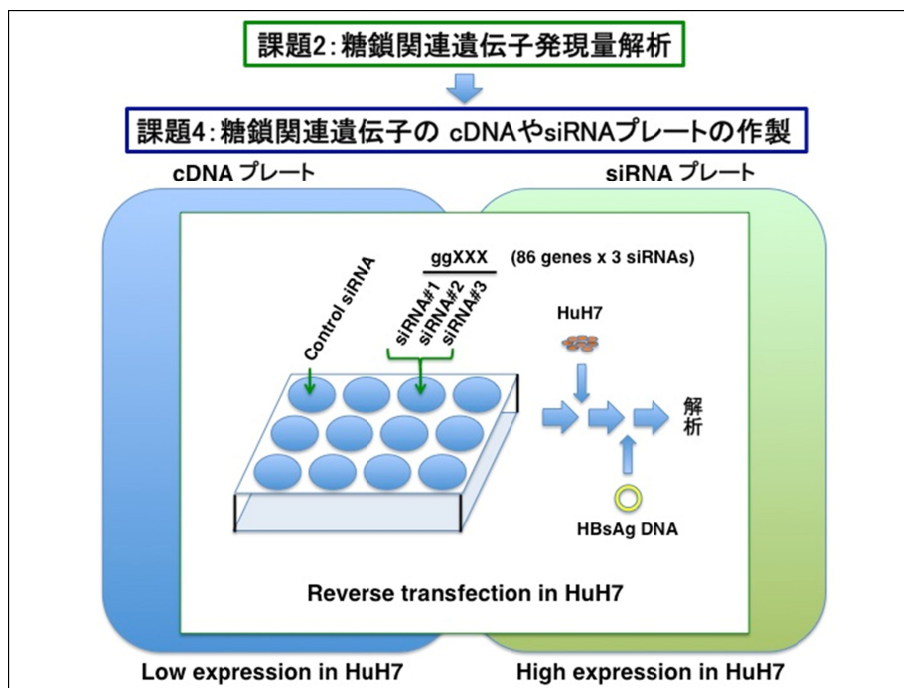


図4 糖鎖改変細胞によるHBs抗原形成・分泌への影響 課題2で糖鎖遺伝子の発現量を解析し、肝細胞における糖鎖遺伝子群を高発現と低発現(発現無しを含む)の2群に分けた。本課題では、高発現している糖鎖遺伝子に対しsiRNAプレートを作製し、低発現している遺伝子にはcDNAプレートを作製した。siRNAプレートでは3つのsiRNAをwellに固定し、HuH7細胞を形質転換、HBs抗原cDNAで形質転換、そして上清よりHBs抗原を回収して解析に用いた。

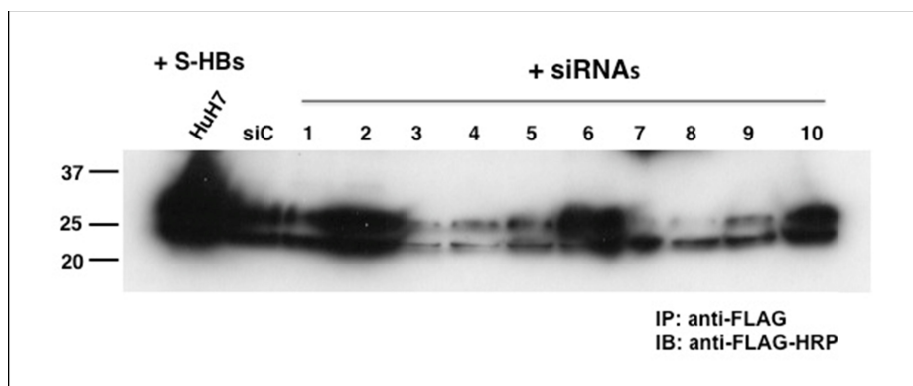


図5 siRNA プレートの実験例 HBs 抗原 cDNA で形質転換後に、HuH7 細胞の培養上清より回収した HBs 抗原は糖鎖有り無しの 2 種の (糖) タンパク質が検出される。同様にコントロール siRNA でも糖鎖有り無しの 2 種のバンドが 1 : 1 で検出される。siRNA の添加により HBs 抗原の発現に差が見られた。例えば、8 番の siRNA では、糖鎖を有する HBs 抗原の減少が顕著である。

D. 考察

本研究では糖鎖から見た HBV 感染における創薬ターゲットを選定することを目的としている。これまでの研究から、1) HBV 感染に関わる肝細胞表面の糖鎖及び糖鎖関連分子 (受容体とコファクター) 2) HBs 抗原上の糖鎖が感染性のある HBV の形成・分泌に関与している可能性、3) HBs 抗原上の糖鎖が抗体による認識を阻害する可能性が考えられている。すなわち宿主肝細胞側の糖鎖合成系は HBV の糖鎖修飾も担うので、宿主肝細胞の糖鎖合成系を阻害することにより、HBV 感染に関わるこれらの糖鎖や糖鎖関連分子に影響を及ぼす事が出来ると考えられる。

最近の研究により、感染能の有る HBV の分泌には HBs 抗原上の N 型糖鎖の付加が必要である事が明らかになっている。例えば、ツニカマイシンやノジリマイシンなどの N 型糖鎖の合成阻害では、HBV DNA を含まない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いる (伊藤ら、2010)。我々の実験結果でも、幾つかの糖鎖合成阻害剤が有意に S-HBs 抗原の発現を抑制する事が示されており、糖鎖の重要性が確

認された。肝細胞の活動に影響を及ぼさない濃度の決定などが難しいが、感染細胞だけを選択的に処置するなどの技術開発とともに検討する必要がある。

今回調製した糖鎖遺伝子の cDNA ライブラリーや siRNA ライブラリーは 200 種以上有る糖鎖遺伝子の 90% 以上をカバーしており、現在、糖鎖改変細胞を用い、HBV の分泌や感染にどのような影響を及ぼすかをスクリーニングしている。既に 10 種以上の糖鎖遺伝子 siRNA が S-HBs 抗原の発現を抑制する事を確認しており、同時に愛知医科大学で検討している HepG2.2.15 細胞を用いた siRNA のスクリーニングと合わせて、どの糖鎖遺伝子が重要なのかを明らかにする必要がある (米田・伊東の分担報告書を参照)。

E. 結論

これまで HBV 感染・複製における糖鎖の役割は殆ど解析されておらず、当研究班では HBV あるいは宿主肝細胞の糖鎖及び糖鎖関連分子をターゲットとした創薬の可能性を研究している。

本研究課題では、まず糖鎖合成阻害剤の効果を S-HBs 抗原の形成・分泌で確認した所、幾つ

かの阻害剤が有意に S-HBs 抗原の発現を抑制する事を見出した。そこで糖転移酵素の発現解析結果を基に、過剰発現用に約 100 種の cDNA、抑制用に約 80 x 3 種の siRNA ライブラリーを用意し、肝細胞あるいは肝がん細胞で糖鎖改変細胞作製を可能にした。cDNA の発現、siRNA によるノックダウンも調べた限りでは、期待通りの結果が得られた。次に siRNA ライブラリーをスクリーニングした所、10 種以上の糖鎖遺伝子 siRNA が S-HBs 抗原の発現を抑制する事を確認した。2 次スクリーニングでさらに有効な siRNA の特定を行い、創薬ターゲット候補の同定を進める予定である。

以上のように、HBV の感染過程（粒子形成・分泌）における糖鎖合成の重要性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へ展開していきたい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- (1) **Angata K**, Ito K, **Togayachi A**, **Sato T**, Ito H, Ocho M, Yoneda M, Narimatsu H. Glycosylation of HBsAg and its role in secretion pathway. TASL-Japan Hepatitis B Workshop. 2014/04/19-20. Taipei

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