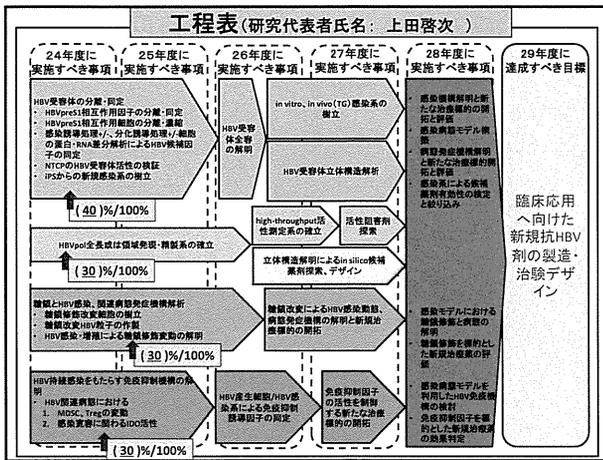


まとめ

- 培養肝癌細胞におけるNTCPの強制発現は単純にHBV感染を許容しない。
- NTCPを介したHBV感染は細胞接着面ルートを通るなど興味深い感染機構が示唆された。
 - リコンビナントHBVを有効に活用しつつ、確固とした感染方法を確立し、in vitro感染系を完成させる。
 - NTCPを含む受容体の全容を解明する。
 - NTCP-TGやNTCP立体構造解明へ向けた研究を促進する。
- HBV産生により感染宿主細胞の糖鎖修飾状態が変動する。
 - 感染系を用いた感染細胞糖鎖修飾変化を解析する。
 - NTCPの糖鎖修飾とHBV感染性について検討する。
 - 糖鎖改変HBVの作製と感染性の研究を促進する。
- HBV-DNAの複製の増加が、MDSの誘導を抑制する可能性が示唆された。
 - NK細胞、DCはHBV感染細胞を認識し、ISG、IDOなどの誘導を介してHBV複製を抑制することが示唆された。
 - HBV産生細胞(HB611細胞あるいはHepG2.2.15細胞)と末梢血リンパ球の共培養によるMDSC頻度及び機能を解析する。
 - HBV陽性切除肝組織中の肝浸潤樹状細胞(DC)、マクロファージにおけるIDO活性を測定し、IDO発現免疫細胞の肝における修飾機序を明らかにする。
- HBVpol RTの発現・活性測定は可能であると思われた。
 - 精製度を向上させ、high-throughput抗HBV探索系を完成させる。



利益相反について

利益相反の有無等(平成25年度)

ア 利益相反の有無 無

イ 利益相反がある場合には具体的内容(以下に記載)

他の研究班への参加状況

研究代表者が、「肝炎等克服緊急対策研究事業」または「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(肝炎関係研究分野)」研究班の研究代表者として参加しているか(ア又はイに記載)

ア 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加していない。

イ 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加している。
(以下①、②を記載)

①(研究班名)「〇〇〇〇研究班」(研究代表者名:〇〇〇〇)

② 他の研究班で担当している研究と、今回申請している研究の違い(研究内容が重複していないことを具体的に説明)

合同研究会議開催状況

他の研究班と合同での研究会議開催状況(平成25年度)

ア 他の研究班と合同で研究会議を開催していない。

イ 他の研究班と合同で研究会議を開催している。
(開催している場合は、①開催日、②他の研究班の名称、③他の研究班の研究代表者名を記載してください)

平成25年12月19日 B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究(越田隆宇)

〇〇〇

平成 25 年度 B型肝炎創薬実用化等研究事業『成果概要』

研究課題：HBV の感染初期過程を評価する系の開発とそれを用いた感染阻害低分子化合物およびレセプター探索

課題番号：H24-B 創-肝炎-一般-006

予定期間：H24 年度から H28 年度まで

研究代表者：下遠野 邦忠

所属研究機関：(独) 国立国際医療研究センター

所属部局：肝炎免疫研究センター

職名：特任部長

年次別研究費(交付決定額)：1年目 84,000,000 円 2年目 84,000,000 円

I. 研究の意義

- (1) B型肝炎ウイルスの受容体が十分に解明されていない。
- (2) HBV 受容体を標的とした阻害剤がない。
- (2) 受容体探索に効率の良い in vitro スクリーニング系がない。
- (3) HBV 感染を高感度で簡便に評価する系が無い。
- (4) HBV 感染過程を再現するために最適な肝細胞の培養系が確立されていない。
- (5) 臨床で用いられている HBV 治療薬はインターフェロンとラミブジンなどの核酸アナログのみ。
- (6) 従来の治療法ではウイルスの完全駆除は難しく、再活性化や耐性株の出現が問題。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 受容体の探索を目的とし、蛍光分子を用いた HBV 粒子の作製、もしくは蛍光遺伝子をキメラに持つ HBV ゲノムの作製により、感染感受性細胞の選別を行う。
- (2) ハイスループットスクリーニングにより HBV 受容体阻害因子の探索が可能になる。
- (3) HBV 感染を標的とした新規治療薬の開発に有用な細胞系を作成する。
- (4) 理研天然化合物バンクの化合物ライブラリーを探索源とし、HBV 感染初期過程を標的とする抗 HBV 剤の創出を目的とする。
- (5) ウイルス再活性化や耐性変異の出現を克服しうる新たなタイプの HBV 治療薬の開発が期待される。
- (6) 感染阻害物質をプローブとしたケミカルバイオロジー研究により、HBV 受容体の同定が期待される。

III. 2年間の研究成果

※この期間にどのような成果があったか、研究代表者、研究分担者毎に、できるだけわかりやすく具体的に記述してください。

- ・研究代表者 (下遠野 邦忠)

(1) ルシフェラーゼや蛍光発光遺伝子を組み込んだウイルス粒子の産生を行い、それらが効率よく標的細胞に感染する事を明らかにした。

(2) ルシフェラーゼ活性を指標にして HBV 感染動態を評価できる系を作成した。

(3) 培養細胞株を用いて HBV 感染性評価を行った。

・研究分担者(杉山 真也)

(1) 蛍光 HBV 粒子の感染能と感染力価の評価を行った。

(2) 蛍光遺伝子を内包するウイルス産生能力の向上を行った。

(3) 蛍光遺伝子を内包するキメラウイルスの効率的な産生にはトランスに供給する pol の量が重要である可能性を示した。

・研究分担者(落谷 孝広)

(1) HepG2 に由来する正常肝細胞様細胞株の機能改良を継続した。

(2) ヒト初代培養肝細胞からの肝幹細胞様細胞の作製に挑戦し、肝細胞モデル系の確立を試みている。

・研究分担者(長田 裕之)

(1) スクリーニングに資する化合物を拡充するため、遺伝子改変微生物から新規代謝産物を単離。

(2) 細胞形態変化を指標に薬剤作用を予測するモルフォベースプロファイリング法を開発。

(3) 理研天然化合物について、ルシフェラーゼリポーターHBV を用いてスクリーニングを開始した。

IV. 平成 26～28 年度の課題

(1) 蛍光 HBV 粒子の感染評価の継続。

(2) キメラ HBV 産生能力の向上の工夫。

(3) ハイスループットスクリーニングに向けたキメラ HBV の活用。

(4) 野生 HBV 産生を抑えたキメラ HBV 産生条件の検討。

(5) ヒト初代培養肝細胞からの易 HBV 感染系の確立。

(6) 微生物生合成遺伝子改変技術や表現型スクリーニング基盤を利用した、微生物代謝産物の創製。

(7) HBV 感染評価系を用いて、感染初期過程を阻害する化合物をスクリーニング。

(8) HBV 感染しやすい細胞株の樹立。

(9) 得られた抗 HBV 作用候補化合物の作用機序の解明とモデル動物を用いた前臨床試験。

V. 行政施策への貢献の可能性

HBV の感染受容体探索系の樹立により、受容体探索のみならず、感染感受性細胞の取得が可能となるために、in vitro での薬剤探索のスクリーニング系の構築が可能になる。その結果、ハイスループット法等の導入による新薬探索が可能になる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

※本研究費において行った研究に対するもののみを記載してください。

※研究代表者、研究分担者、研究協力者ごとに、発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、

知的財産権の取得及び申請状況、ガイドライン名・作成主体・策定年月日等を記載して下さい。

※執筆者全員を明記し、当該研究者名に 下線 を引いてください。

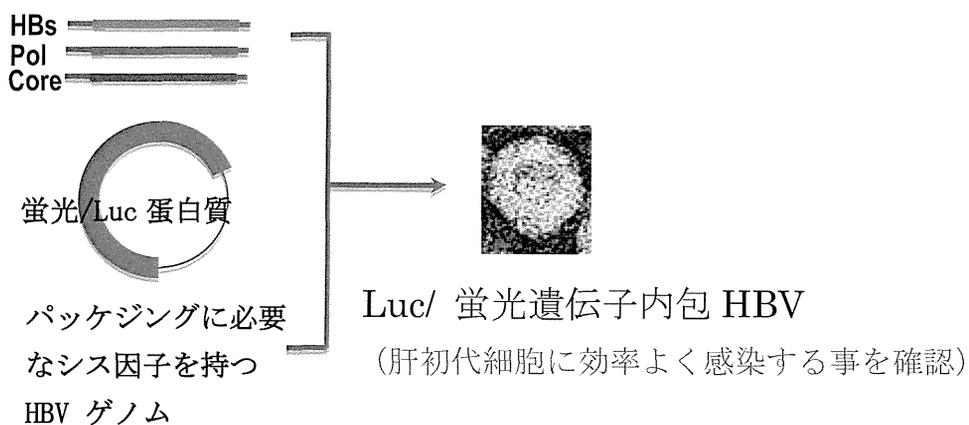
- (1) Abe Y, Aly HH, Hiraga N, Imamura M, Wakita T, Shimotohno K, Chayama K, Hijikata M. Thromboxane A2 Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice With Humanized Livers.

- Gastroenterology. 145: 658-667, 2013
- (2) Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seya T, Takaku H, Shimotohno K. Hepatitis C Virus Infection Induces Inflammatory Cytokines and Chemokines Mediated by the Cross Talk between Hepatocytes and Stellate Cells. *J. Virol* 87: 8169-8178, 2013
 - (3) Rawal RK, Singh US, Chavre SN, Wang J, Sugiyama M, Hung W, Govindarajan R, Korba B, Tanaka Y, Chu CK. 2'-Fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine phosphoramidate (FMCAP) prodrug: in vitro anti-HBV activity against the lamivudine-entecavir resistant triple mutant and its mechanism of action. *Bioorg Med Chem Lett*. 15;23(2):503-6, 2013.
 - (4) Sunbul M, Sugiyama M*, Kurbanov F, Leblebicioglu H, Khan A, Elkady A, Tanaka Y, Mizokami M. Specific mutations of basal core promoter are associated with chronic liver disease in hepatitis B virus subgenotype D1 prevalent in Turkey. *Microbiol Immunol*. 57(2):122-9, 2013. *corresponding author
 - (5) 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; the Japanese AHB Study Group. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology*. Jul 29. 2013
 - (6) Trinks J, Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Benetucci J, Giménez E, Weissenbacher MC, Mizokami M, Oubiña JR. In vitro replication competence of a hepatitis B genotype D/A recombinant virus: dissimilar biological behavior regarding its parental genotypes. *J Gen Virol*. 12:2724-8, 2013.
 - (7) Nogawa T, Kawatani M, Uramoto M, Okano A, Aono H, Futamura Y, Koshino H, Takahashi S, Osada H. Pyrrolizilactone, a new pyrrolizidinone metabolite produced by a fungus. *J Antibiot*. 66: 621-3, 2013.
 - (8) Futamura Y, Kawatani M, Muroi M, Aono H, Nogawa T, Osada H. Identification of a Molecular Target of a Novel Fungal Metabolite, Pyrrolizilactone, by Phenotypic Profiling Systems. *Chembiochem* (2013) in press.
 - (9) Thirion M, Kanda T, Murakami Y, Ochiya T, and Iizasa H. MicroRNAs and oncogenic human viruses (in press). In S. Babashah (Ed.), *MicroRNAs: Key Regulators of Oncogenesis*. Springer. ISBN 978-3-319-03724-0. 2013
 - (10) Thirion M and Ochiya T. Roles of micrnas in the Hepatitis B Virus Infection and Related Diseases. *Viruses* 5(11), 2690-703; doi:10.3390/v5112690, 2013
 - (11) Gailhouste L, Gomez-Santos L, Kitagawa N, Kawarahada K, Thirion M, Kosaka N, Takahashi R, Shibata T, Miyajima A, and Ochiya T. MiR-148a plays a pivotal role in the liver by promoting the hepatospecific phenotype and suppressing the invasiveness of transformed cells. *Hepatology*. 58(3), 1153-65, 2013.
 - (12) Thirion M and Ochiya T. Extracellular microRNAs as potential biomarkers and therapeutic tools in cancer. In *MicroRNAs in cancer* (pp. 308-332). Enfield, New Hampshire, Science Publishers. 2013
 - (13) Gailhouste L, Gomez-Santos L, Ochiya T. Potential applications of miRNAs as diagnostic and prognostic markers in liver cancer. *Front Biosci*, 18:199-223, 2013
 - (14) Gailhouste L, Ochiya T. Cancer-related microRNAs and their role as tumor suppressors and oncogenes in hepatocellular carcinoma. *Histol histopathol*, 28:437-451, 2013
 - (15) Gailhouste L, Ochiya T. MicroRNAs: new tools to tackle liver cancer progression. *Cancer Diagnostics*, pp 12-14, 2013
 - (16) Katsuda T, Teratani T, Chowdhury MM, Ochiya T, Sakai Y. Hypoxia efficiently induces differentiation of mouse embryonic stem cells into endodermal and hepatic progenitor cells. *Biochemical Engineering Journal*, 74:95-101, 2013

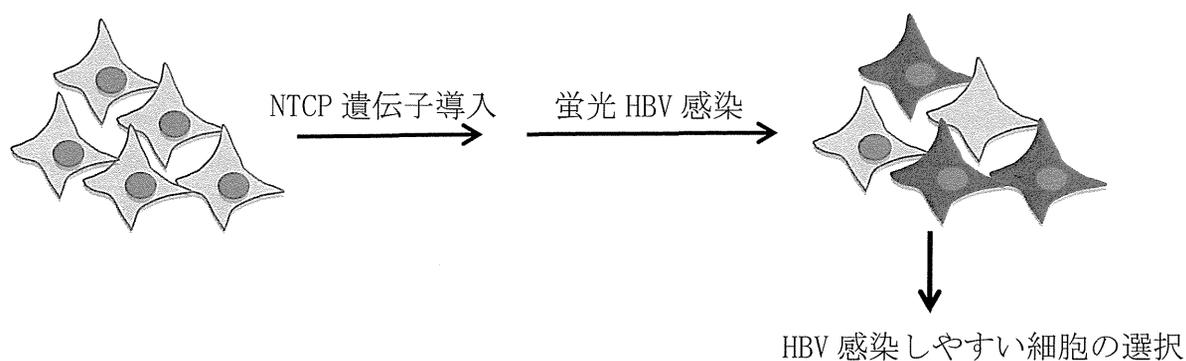
Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。

(1) 蛍光遺伝子を持つウイルス粒子の産生



(2) 各種ヒト肝細胞株への HBV 感染実験と感受性の高い細胞の樹立の試み



(3) スクリーニングのための化合物の整備

●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

昭和47年～昭和58年 国立遺伝学研究所 分子遺伝部 (研究員)

昭和53年～昭和56年 米国 ウィスコンシン大学 McArdle 癌研究所 (博士研究員)

昭和58年～平成6年 国立がんセンター研究所 ウイルス部 (室長・部長)

平成6年～平成19年 京都大学 ウイルス研究所 (教授・所長)

平成19年～21年 慶應義塾大学 医学部 (特別研究教授)

平成21年～24年 千葉工業大学 附属総合研究所 (教授)

平成24年～現在 (独) 国際医療研究センター 肝炎免疫研究センター (特任部長)

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

三浦 謹一郎 (国立遺伝学研究所)

Howard M. Temin (米国 McArdle 癌研究所)

杉村 隆 (国立がんセンター研究所)

・主な研究課題

(1) レトロウイルスの複製機構の解析

(2) レトロウイルスベクターに関する研究

(3) ヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV) の分子ウイルス学的研究

(4) HCV の複製機構およびウイルス発がんに関する研究

(5) HBV 複製の分子機構

・これまでの研究実績

Abe Y, Aly HH, Hiraga N, Imamura M, Wakita T, Shimotohno K, Chayama K, Hijikata M. Thromboxane A2 Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice With Humanized Livers. *Gastroenterology*. 145: 658-667, 2013

Hirata Y, Ikeda K, Sudoh M, Tokunaga Y, Suzuki A, Weng L, Ohta M, Tobita Y, Okano K, Ozeki K, Kawasaki K, Tsukuda T, Katsume A, Aoki Y, Umehara T, Sekiguchi S, Toyoda T, Shimotohno K, Soga T, Nishijima M, Taguchi R, Kohara M. Self-enhancement of hepatitis C virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis. *PLoS Pathog*. 8:e1002860. 2012

Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M, Seya T. In vitro models for the analysis of HCV life cycle. *Microbiol Immunol*. 56: 1-9, 2011

Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, Wakita T, Shimotohno K, Seya T. Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV). *PLoS One*. 6(6):e21284, 2011

Murakami Y, Tanaka M, Toyoda H, Hayashi K, Kuroda M, Tajima A, Shimotohno K. Hepatic microRNA expression is associated with the response to interferon treatment of chronic hepatitis C. *BMC Med Genomics*. 3(1): 48, 2010.

Weng L, Hirata Y, Arai M, Kohara M, Wakita T, Watashi K, Shimotohno K, He Y, Zhong J, Toyoda T. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype-specific manner. *J Virol*. 84(22):11761-11770, 2010.

Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Wakita T, Baumert TF, Miyanari Y, Shimotohno K. Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. *J Virol*. 84(22): 12048-12057, 2010.

Shimizu Y, Hishiki T, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Kato A, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Shimotohno K. Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase reduce the infectivity of hepatitis C virus (HCV) through their catalytic activities on HCV-associated lipoproteins. *Virology*. 407(1):152-915, 2010

- Arimoto K, Funami K, Saeki Y, Tanaka K, Okawa K, Takeuchi O, Akira S, Murakami Y, Shimotohno K. Polyubiquitin conjugation to NEMO by tripartite motif protein 23 (TRIM23) is critical in antiviral defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(36): 15856-15861, 2010
- Ujino S, Yamaguchi S, Shimotohno K, Takaku H. Combination therapy for hepatitis C virus with heat-shock protein 90 inhibitor 17-AAG and proteasome inhibitor MG132. Antivir Chem Chemother. 20(4): 161-167, 2010.*
- Aly HH, Qi Y, Atsuzawa K, Usuda N, Takada Y, Mizokami M, Shimotohno K, Hijikata M. Strain-dependent viral dynamics and virus-cell interactions in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood-borne hepatitis C virus. Hepatology. 50(3): 689-696, 2009*
- Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T, Konishi H, Fujita T and Shimotohno K., Negative regulation of the RIG-I signaling by the novel ubiquitin ligase RNF125. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 : 7500-7505, 2007
- Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. Nat Cell Biol. 9(9):1089-1097, 2007*
- Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Goto K, Aly HH, Shimotohno K. Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptor with viral RNA polymerase NS5B. J Biol Chem. 282(45):32765-32772, 2007*
- Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell*. 19 :111-122, 2005.
- Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, Yamaji M, Shimotohno K. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology*. 38 :1282-1288. 2003
- Hijikata, M, Mizushima, H., Tanji, Y., Komoda, Y., Hirowatari, Y., Akagi, T., Kato, N., Kimura, K., and Shimotohno, K., Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 90: 10773-10777, 1993
- Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T. and Shimotohno, K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 9524-9528, 1990
- Kitado, H., Chen, I.S.Y., Shah, N.P., Cann, A.J., Shimotohno, K. and Fan, H. U3 sequences from HTLV-I and -II LTRs confer pX protein response to a murine leukemia virus LTR. *Science*, 235: 901-904, 1987
- Shimotohno, K., Takano, M., Teruuchi, T. and Miwa, M. Requirement of multiple copies of a 21-nucleotide sequence in the U3 regions of human T-cell leukemia virus type I and type II long terminal repeats for trans-acting activation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 8112-8116, 1986
- Shimotohno, K., Miwa, M., Slamon, D.J., Chen, I.S.Y., Hoshino, H., Takano, M., Fujino, M. and Sugimura T. Identification of new gene products coded from X regions of human T-cell leukemia viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 302-306, 1985
- Wachsman, W., Shimotohno, K., Clark, S.C., Golde, D.W. and Chen, I.S.Y. Expression of the 3' terminal region of human T-cell leukemia virus. *Science*, 266: 177-179, 1984
- Slamon, D.J., Shimotohno, K., Cline, M.J., Golde, D.W. and Chen, I.S.Y. Identification of the putative transforming protein of the human T-cell leukemia virus. HTLV-I and HTLV-II. *Science*, 266: 61-65, 1984
- Shimotohno, K. and Temin, H.M. Loss of intervening sequence in genomic mouse α -globin DNA inserted in an infectious retrovirus vector. *Nature*, 299: 265-268, 1982
- Shimotohno, K. and Temin, H.M. Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus. *Cell*, 26: 67-77, 1981
- Shimotohno, K., Mizutani, S. and Temin, H.M. Sequence of retrovirus provirus resembles that of bacterial transposable elements. *Nature*, 285: 550-554, 1980

課題番号(H24-B創-肝炎-一般-006)

課題「HBVの感染初期過程を評価する系の開発とそれを用いた感染阻害低分子化合物およびレセプター探索」(2年目)

研究組織

分担課題

下達野 邦忠 (国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター)	蛍光発色遺伝子を発現するHBV様粒子の産生とそれを用いた感染初期過程の解析と阻害物質のスクリーニング。
落谷 孝広 (国立がん研究センター 研究所)	HBV感染モデル細胞系の樹立。
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)	蛍光標識HBVを用いた感染評価と受容体探索。
長田 裕之 (理研 基盤研究所)	HBV感染を阻害する低分子化合物のスクリーニング。
上仲 一義 (化学及血清療法研究所 菊池研究所) (研究協力者)	肝細胞およびHBV蛋白質モノクローナル抗体を用いた感染評価。

研究方針

- (1) HBV感染初期過程を感度よく検出する系の開発。
- (2) それを用いた抗HBV作用物質のスクリーニングと機能解析。

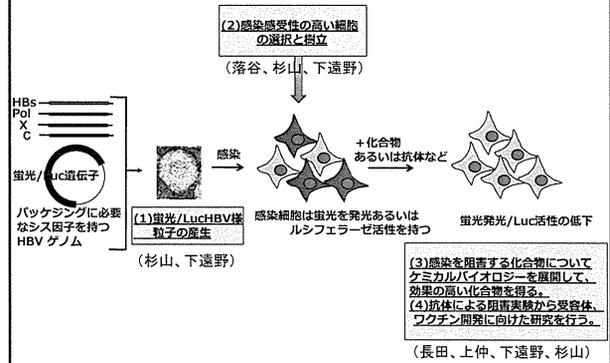
レポーターウイルスの構築とアッセイ系の確立

- (1) HBV様粒子を用いた感染系を作成する。
- (2) 蛍光遺伝子あるいは蛍光発光遺伝子を組み込んだHBVを作り検出感度、検出方法を簡便化する。
- (3) 感染しやすい細胞を樹立する。

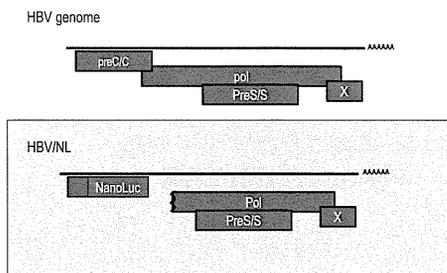
抗HBV剤のスクリーニング

- (1) 理研天然化合物バンクNPDeпоを用いてスクリーニングを行う
- (2) 他のグループとスクリーニングの共同研究をおこなう。

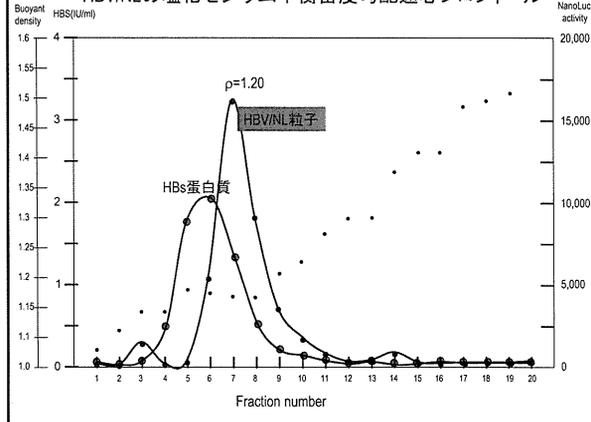
研究内容と班員との関係

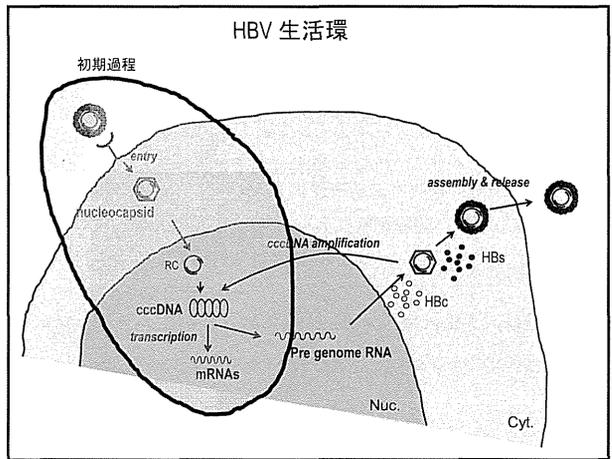
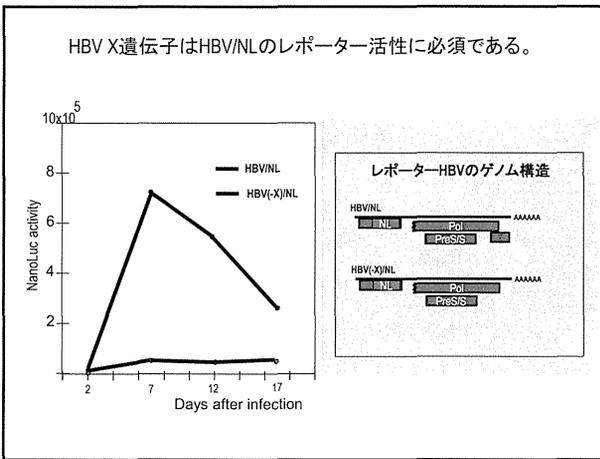
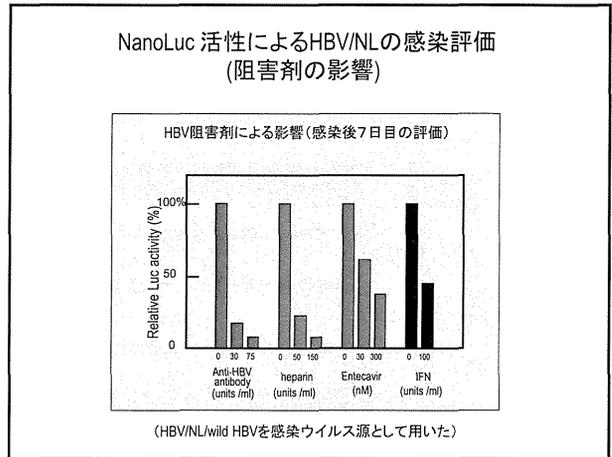
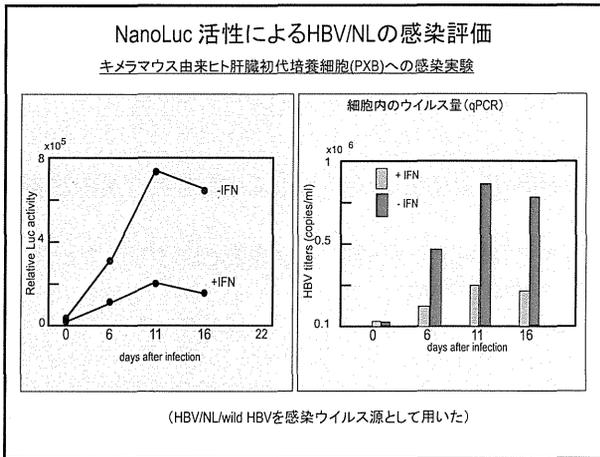


レポーター遺伝子を持つHBVゲノムの構築



HBV/NLの塩化セシウム平衡密度勾配遠心プロフィール





蛍光発光遺伝子(NanoLuc)を持つ組み換え体HBVを用いて感染から複製初期過程の解析を簡便かつ容易に行う事ができるようになった。

NanoLuc以外に、GFP, DsRED発現HBV, SEAP発現HBV等を構築し、それらもHBV感染をモニターするのに有用である事が分かった。

(初代肝細胞への感染)

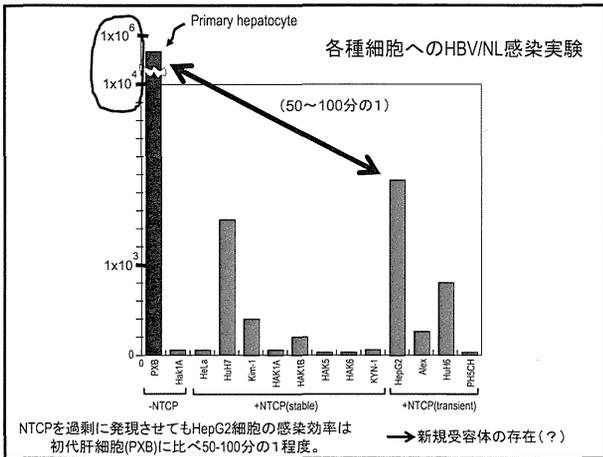
pUC19

CMV-GFP

(杉山班員)

HBV/NLを用いたHBV感染初期反応の解析 および複製を制御解析の有用性

- (1) HBVが感染し易い細胞の探索と評価。
- (2) HBV複製に及ぼす因子解析。
(例としてDMSOの効果)



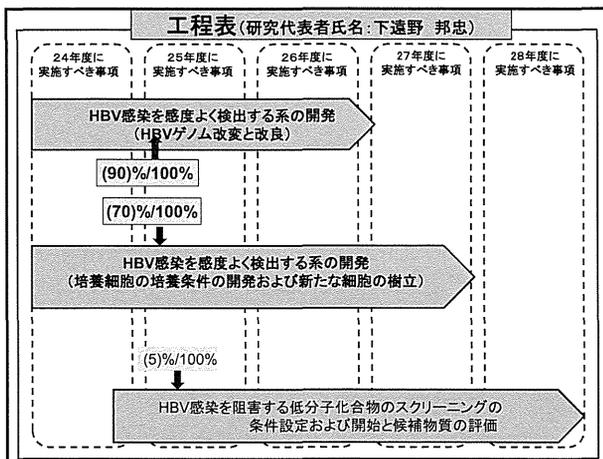
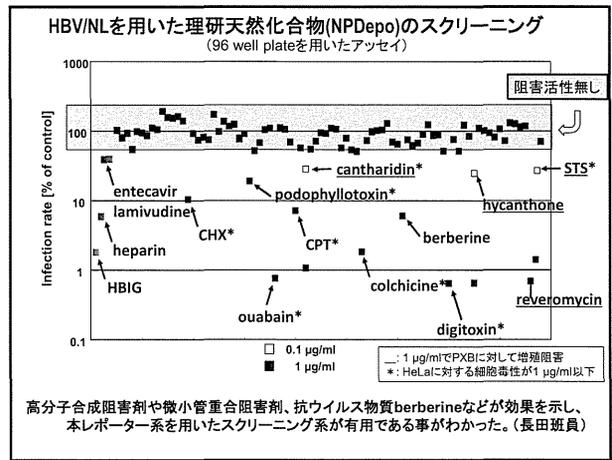
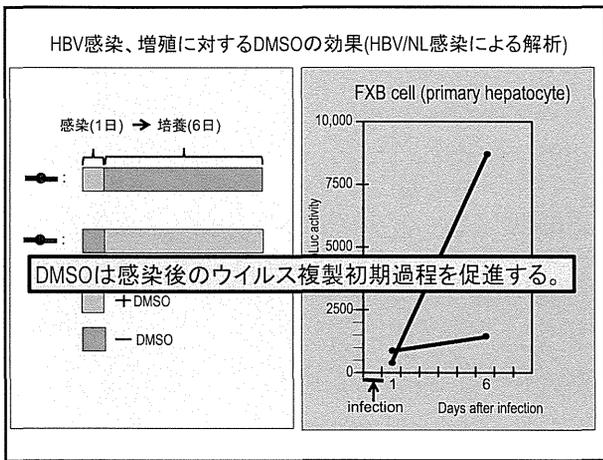
HBV感染細胞の作製(trial)

エピジェネティクス制御因子Xを導入する事で、肝細胞がんHepG2から肝細胞を誘導

形態的、機能的にも肝細胞様の細胞を分化誘導する事に成功HBVの受容体とされるNTCPも分化誘導前に比較して40倍以上、mRNA発現量が増大していた

肝細胞特異的遺伝子の発現誘導を認めた

(落谷班員)



利益相反について

利益相反の有無等(平成25年度)

ア 利益相反の有無 無

他の研究班への参加状況

研究代表者が、「肝炎等克服緊急対策研究事業」または「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（肝炎関係研究分野）」研究班の研究代表者として参加しているか（ア又はイに記載）

ア 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加していない。

合同研究会議開催状況

他の研究班と合同での研究会議開催状況（平成25年度）

イ 他の研究班と合同で研究会議を開催している。
（開催している場合は、①開催日、②他の研究班の名称、③他研究班の研究代表者名を記載してください）

平成25年9月9日 4班合同班会議を開催

研究代表者名 下遠野 邦忠
脇田 隆宇
小嶋 颯①①
成松 久

平成26年1月9日 独自の班会議を開催

平成 25 年度 B型肝炎創薬実用化等研究事業『成果概要』

研究課題：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

課題番号：H24-B創-肝炎-一般-007

予定期間：H24年度からH28年度まで

研究代表者：成松 久

所属研究機関：独立行政法人 産業技術総合研究所

所属部局：糖鎖医工学研究センター

職名：研究センター長

年次別研究費(交付決定額)：1年目 118,472,000円 2年目 100,000,000円

I. 研究の意義

- (1) 現在日本では約 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、さらに欧米タイプの感染も広がりつつある。インターフェロンによる低治療成績や核酸アナログ製剤に対する薬剤耐性ウイルスの出現が問題になっており、逆転写酵素に代わる創薬ターゲットが必須である。
- (2) 糖鎖が様々なウイルスの接着・侵入や粒子形成・分泌に関わっている事が示唆され、HBV の感染過程における糖鎖解析は、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。
- (3) 我が国で使用されている HBV ワクチン (HBs 抗原) は酵母由来であり、ヒト感染抗原とは異なり糖鎖構造を持たない HBs 抗原が用いられている。抗体価の獲得に比較的時間がかかる事や糖鎖付加によるエスケープミュータントの出現、ワクチン接種者の HBV 感染などの課題が指摘されている。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 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。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。
- (2) HBV 上の糖鎖の解析から、HBV の早期検出法の開発と医療現場での実用化が期待される。
- (3) ヒト型糖鎖を有する HBs 抗原が現行のワクチンより効率よく中和 HBV 抗体を誘導する場合、新規ワクチンの開発に繋がる。

III. 2年間の研究成果

・研究代表者 (成松 久)

- (1) 本研究に係る、ヒト由来試料を用いた研究について、各参画機関の倫理承認の手続きを進めた。さらに、HBV を用いた研究について、微生物実験、組換え実験承認および大臣確認の手続きを進めるとともに、実施体制を整えた。
- (2) 合同班会議を開催し、他班との相互理解・連携を深め、一部共同研究を開始した。

・研究分担者 (溝上 雅史・是永 匡紹・飯島 沙幸)

- (1) HBs 抗原の cDNA と肝がん細胞形質転換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培養肝細胞 (±HBV 感染) を調製した。糖鎖グループから提供された試料存在化で HBV 感染実験を行った。

(2) HBV 感染患者の血清収集を準備し、糖鎖グループによる糖鎖解析を進めた。

・研究分担者（梶 裕之・久野 敦・田尻 和人）

(1) B 型肝炎患者血清より調製されたサブバ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。

(2) 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) は糖鎖の無い HBs 抗原のみを認識することを見いだした。この抗体と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。

・研究分担者（梅谷内 晶・久野 敦・伊藤 浩美・安形 清彦）

(1) 糖鎖遺伝子定量システム (qPCR) や次世代シーケンサー、バイオインフォ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。

(2) 質量分析器 (MS) による宿主肝細胞ならびに 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。

(3) 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。

・研究分担者（館野 浩章・佐藤 隆）

(1) プロテオミクス解析と次世代シーケンサーを用いて、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。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。

(2) 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。

・研究分担者（安形 清彦・梅谷内 晶・米田 政志・伊藤 清顕）

(1) 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。

(2) 糖鎖遺伝子の発現結果を基に糖鎖遺伝子 cDNA ライブラリーを作成した。siRNA ライブラリーを用い糖鎖改変細胞を作製しスクリーニングを行った結果、86 siRNA 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、HBV 作成実験でも HBV DNA を減少させる糖鎖遺伝子を確認した。

・研究分担者（千葉 靖典）

(1) HBs 抗原の大量精製を行うために、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。合成した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) 糖鎖付加などの性状を確認し、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。

IV. 平成 26~28 年度の課題

(1) HBV 粒子 (Dane particles) の糖鎖構造および HBs 抗原の構造解析を行う。肝炎患者の肝臓の状態 (線維化や肝がんのステージ)、糖鎖遺伝子の発現を変えた肝がん細胞や 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、感染能等との関連性を解析する。
- (2) 糖鎖遺伝子定量システムや次世代シーケンサー、グライコプロテオミクス、バイオインフォマティクス解析を用いて、宿主肝細胞の経時的な遺伝子発現変化、HBV 感染前後での糖鎖発現変化について解析を行う。宿主肝細胞（キメラマウス由来肝細胞）の経時的な培養と、宿主細胞への感染能の変動に伴う糖鎖発現のプロファイルの変化についてより詳細な解析を行う。
- (3) 同定した HBV 糖鎖受容体候補分子を発現・精製・固定化した HBV 糖鎖受容体アレイを作製して、HBV 感染患者血清より精製した HBs 抗原やリコンビナント HBs 抗原との結合を定量的に解析する。また、候補分子の過剰発現細胞やノックダウン細胞を作製し、HBV 粒子の結合と感染能を検証し HBV 感染における糖鎖の役割を解明する。糖鎖-受容体の阻害剤をスクリーニングする。
- (4) 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。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ターゲット分子の同定を行う。
- (5) 酵母より精製した糖鎖付 HBs 抗原をマウスに免疫し抗体価試験を行なう。B 細胞から PCR によりクローン化（迅速スクリーニング）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。培養肝細胞を用い HBV の感染実験を行い、中和抗体としての性能を検査する。さらに大量調製系を開発し、免疫源としての供給を検討する。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 患者血清中の HBV のスクリーニングと抗体に依る HBs 検出を逃れる変異 HBV を検出できる技術の開発そして 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・臨床応用は、肝生検など侵襲性のある検査と比較して、安全性が高く安価であり、社会福祉に大きく貢献できる。
- (2) 現行のワクチンに加え有効な新規ワクチンを開発すれば、non-responder への対応や現在でも一定の割合で新しい感染者が増える HBV 感染防御に向けた、ユニバーサルワクチネーション化などの施策に繋がる。
- (3) HBV 感染の治療法の開発において糖鎖がターゲットとなれば、インフルエンザ治療におけるタミフルに次ぐものになり、他感染症の治療法研究に発展する可能性がある。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

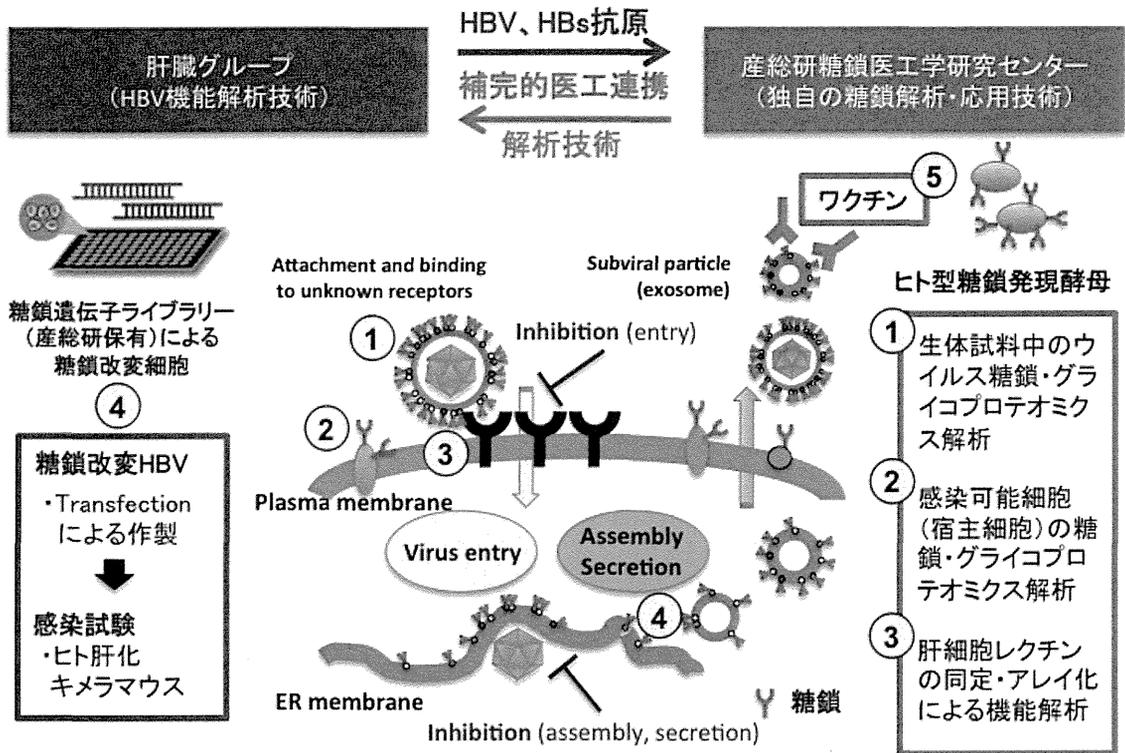
- (1) Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Ito K, Matsuda A, Sekiya S, Hige S, Sakamoto M, Kage M, Mizokami M, Narimatsu H. A serum "sweet-doughnut" protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis. *Sci Rep.* 2013, 3:1065.
- (2) Kaji H, Ocho M, Togayachi A, Kuno A, Sogabe M, Ohkura T, Nozaki H, Angata T, Chiba Y, Ozaki H, Hirabayashi J, Tanaka Y, Mizokami M, Ikehara Y, Narimatsu H. Glycoproteomic Discovery of Serological Biomarker Candidates for HCV/HBV Infection-Associated Liver Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma. *J Proteome Res.* 2013, 12(6):2630-40.
- (3) Kuno A, Sato T, Shimazaki H, Unno S, Saitou K, Kiyohara K, Sogabe M, Tsuruno C, Takahama Y, Ikehara Y, Narimatsu H. Reconstruction of a robust glycodiagnostic agent supported by multiple lectin-assisted glycan profiling. *Proteomics Clin Appl.* 2013, 7:642-7.

Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。

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

HBVにおける糖鎖の機能解明には、「ウイルス上機能分子と宿主上機能分子のインタクトでの相互作用解析」が重要

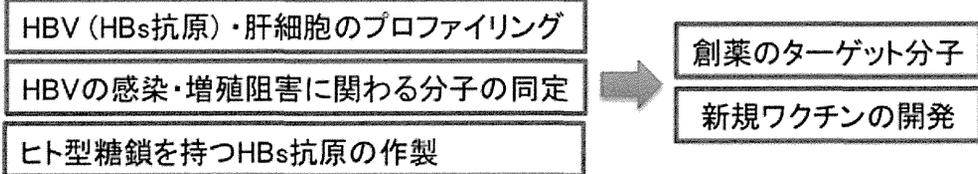


主要テーマと2年次の成果

- ① HBs抗原の糖鎖解析と糖鎖を用いた新規HBV解析法の確立
- ② 肝がん・肝臓細胞の糖鎖解析・糖鎖遺伝子発現解析
- ③ 肝臓特異的レクチン様分子の選定→感染実験
- ④ 糖鎖遺伝子ライブラリーを構築し、HBV分泌阻害のスクリーニング→候補遺伝子の同定
- ⑤ HBs cDNAを酵母で発現・精製→抗体価試験

HBs抗原上の糖鎖の解析と応用

HBV-宿主細胞の相互作用



今後の計画と期待される成果

● 研究代表者の研究歴等

・ 過去に所属した研究機関の履歴

- 1974. 3 慶應義塾大学医学部卒業
- 1979. 3 慶應義塾大学医学研究科大学院修了（医学博士）
- 1979. 4 慶應義塾大学医学部微生物学教室・助手
- 1983. 4 米国 NIH 留学
- 1986. 10 慶應義塾大学医学部微生物学教室・講師
- 1991. 1 同上・助教授
- 1991. 4 創価大学生命科学研究所・教授
- 2000. 10 工業技術院・主任研究官
- 2001. 4 産業技術総合研究所・分子細胞工学研究部門・総括研究員
筑波大学医学医療系連携大学院・教授、現在に至る。
- 2002. 6 産業技術総合研究所・糖鎖工学研究センター・副センター長
- 2006. 12 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター・センター長、現在に至る。
- 2011. 4 慶應義塾大学医学部・客員教授、現在に至る。
- 2011. 7 中国・上海交通大学・顧問教授、現在に至る。

・ 主な共同研究者（又は指導を受けた研究者）

下記の主な共同研究者のうち、過去の肝疾患関連の共同研究での研究者を太字にて明記した。

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）、田中 靖人（名古屋市立大学）、山元 弘（神戸学院大学）、橋本 康弘（福島県立医科大学）、野口 雅之（筑波大学）入村 達郎（東京大学）、三善 英知（大阪大）、中西 速夫（愛知県がんセンター）、田岡 万悟（首都大学東京）、尾野 雅哉（国立がんセンター）、伊東 信（九州大学院）、正田 純一（筑波大学）、高橋 智（筑波大学）、山元 弘（大阪大院）、梅澤 明弘（国立成育医療センター研究所）、谷口 直之（理化学研究所・大阪大学）、本家 孝一（高知医科大学）、古川 鋼一（名古屋大学）、木全 弘治（愛知医科大学）、渡辺 秀人（愛知医科大学）、西原 祥子（創価大学）、山村 研一（熊本大学）、掛樋 一晃（近畿大学）、山下 克子（東京工業大学）、中森 正二（大阪医療センター）、渡邊 昌彦（北里大学）、野村 将春（東京医科大学）、ほか 多数。

・ 主な研究課題

- 糖タンパク質や糖脂質の糖鎖部分の生合成機構、構造解析、生理機能解析、疾患との関連解析
- H12. 4月～H15. 3月：NEDO 受託研究「ヒト糖鎖合成関連遺伝子ライブラリーの構築」
- H14. 4月～H17. 2月：NEDO 受託研究「糖鎖エンジニアリングプロジェクト/糖鎖構造解析技術開発」
- H17. 4月～H23. 2月：NEDO 受託研究「糖鎖機能活用技術開発」
- H23. 4月～：独立行政法人科学技術振興機構「糖鎖統合データベースと研究支援ツールの開発」

・ これまでの研究実績

論文(査読有)214 報より主なもの 30 報を選択し、直近年度から順に記載。

- 1 Takasaki N, Tachibana K, Ogasawara S, Matsuzaki H, Hagiuda J, Ishikawa H, Mochida K, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Noce T, Ito C, Toshimori K, **Narimatsu H**. A heterozygous mutation of GALNTL5 affects male infertility with impairment of sperm motility. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013. In press.
- 2 Silsirivanit A, Araki N, Wongkham C, Vaeteewoottacharn K, Pairojkul C, Kuwahara K, Narimatsu Y, Sawaki H, **Narimatsu H**, Okada S, Sakaguchi N, Wongkham S. CA-S27: a novel Lewis a associated carbohydrate epitope is diagnostic and prognostic for cholangiocarcinoma. Cancer Sci. 2013, 104(10):1278-1284.
- 3 Kudo T, Sato T, Hagiwara K, Kozuma Y, Yamaguchi T, Ikehara Y, Hamada M, Matsumoto K, Ema M, Murata S, Ohkohchi N, **Narimatsu H**, Takahashi S. C1galt1-deficient mice exhibit thrombocytopenia due to abnormal terminal differentiation of megakaryocytes. Blood. 2013, 122(9):1649-1657.
- 4 *Kaji H, Ocho M, Togayachi A, Kuno A, Sogabe M, Ohkura T, Nozaki H, Angata T, Chiba Y, Ozaki H, Hirabayashi J, Tanaka Y, Mizokami M, Ikehara Y, **Narimatsu H**. Glycoproteomic discovery of serological biomarker candidates for HCV/HBV infection-associated liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. J Proteome Res. 2013, 12(6):2630-2640.*
- 5 Murakami S, Takaoka Y, Ashida H, Yamamoto K, **Narimatsu H**, Chiba Y. Identification and characterization of endo- β -N-acetylglucosaminidase from methylotrophic yeast *Ogataea minuta*. Glycobiology. 2013, 23(6):736-744.
- 6 *Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Ito K, Matsuda A, Sekiya S, Hige S, Sakamoto M, Kage M, Mizokami M, **Narimatsu H**. A serum "sweet-doughnut" protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis. Sci Rep. 2013, 3:1065.*
- 7 Du D, Zhu X, Kuno A, Matsuda A, Tsuruno C, Yu D, Zhang Y, Ikehara Y, Tanaka Y, Zhang X, **Narimatsu H**. Comparison of LecT-Hepa and FibroScan for assessment of liver fibrosis in hepatitis B virus infected patients with different ALT levels. Clin Chim Acta. 2012, 413(21-22):1796-1799.
- 8 Sugahara D, Kaji H, Sugihara K, Asano M, **Narimatsu H**. Large-scale identification of target proteins of a glycosyltransferase isozyme by Lectin-IGOT-LC/MS, an LC/MS-based glycoproteomic approach. Sci Rep. 2012, 2:680.
- 9 Kubota T, Kumagai A, Ito H, Furukawa S, Someya Y, Takeda N, Ishii K, Wakita T, **Narimatsu H**, Shirato H. Structural Basis for the Recognition of Lewis Antigens by Genogroup I Norovirus. J. Virol. 2012, 86(20):11138-11150.
- 10 Ito K, Kuno A, Ikehara Y, Sugiyama M, Saito H, Aoki Y, Matsui T, Imamura M, Korenaga

- M, Murata K, Masaki N, Tanaka Y, Hige S, Izumi N, Kurosaki M, Nishiguchi S, Sakamoto M, Kage M, Narimatsu H, Mizokami M. LecT-Hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology*. 2012, 56(4):1448-1456.
- 11 Kaji H, Shikanai T, Sasaki-Sawa A, Wen H, Fujita M, Suzuki Y, Sugahara D, Sawaki H, Yamauchi Y, Shinkawa T, Taoka M, Takahashi N, Isobe T, Narimatsu H. Large-scale identification of N-glycosylated proteins of mouse tissues and construction of a glycoprotein database, GlycoProtDB. *J Proteome Res*. 2012, 11(9):4553-4566.
- 12 Togayachi A, Narimatsu H. Functional Analysis of β 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferases and Regulation of Immunological Function by Poly lactosamine. *Trends Glycosci Glycotechnol*. 2012, 24(137):95-111.
- 13 Liu TW, Kaji H, Togayachi A, Ito H, Sato T, Narimatsu H. A chemoenzymatic approach toward the identification of fucosylated glycoproteins and mapping of N-glycan sites. *Glycobiology*. 2012, 22(5):630-637.
- 14 Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Saito K, Ito K, Tsuruno C, Nagai S, Takahama Y, Mizokami M, Hirabayashi J, Narimatsu H. LecT-Hepa: A triplex lectin-antibody sandwich immunoassay for estimating the progression dynamics of liver fibrosis assisted by a bedside clinical chemistry analyzer and an automated pretreatment machine. *Clin Chim Acta*. 2011, 412(19-20):1767-1772.
- 15 Sato T, Kudo T, Ikehara Y, Ogawa H, Hirano T, Kiyohara K, Hagiwara K, Togayachi A, Ema M, Takahashi S, Kimata K, Watanabe H, Narimatsu H. Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1 is necessary for normal endochondral ossification and aggrecan metabolism. *J Biol Chem*. 2011, 286(7):5803-5812.
- 16 Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Itakura Y, Kuno A, Ogawa T, Yamada M, Akutsu H, Takahashi Y, Kanzaki S, Narimatsu H, Hirabayashi J, Umezawa A. Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells. *Genes Cells*. 2011, 16(1):1-11.
- 17 Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Angata T, Unno S, Sogabe M, Ozaki H, Ito K, Hirabayashi J, Mizokami M, Narimatsu H. Multilectin Assay for Detecting Fibrosis-Specific Glyco-Alteration by Means of Lectin Microarray. *Clin Chem*. 2011, 57(1):48-56.
- 18 Matsuda A, Kuno A, Kawamoto T, Matsuzaki H, Irimura T, Ikehara Y, Zen Y, Nakanuma Y, Yamamoto M, Ohkohchi N, Shoda J, Hirabayashi J, Narimatsu H. Wisteria floribunda agglutinin-positive mucin 1 is a sensitive biliary marker for human cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 2010, 52(1):174-182.
- 19 Togayachi A, Kozono Y, Ikehara Y, Ito H, Suzuki N, Tsunoda Y, Abe S, Sato T, Nakamura K, Suzuki M, Goda HM, Ito M, Kudo T, Takahashi S, Narimatsu H. Lack of lacto/neolacto-glycolipids enhances the formation of glycolipid-enriched microdomains, facilitating B cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010, 107(26):11900-11905.
- 20 Wada Y, Dell A, Haslam SM, Tissot B, Canis K, Azadi P, Backstrom M, Costello CE,

- Hansson GC, Hiki Y, Ishihara M, Ito H, Kakehi K, Karlsson N, Hayes CE, Kato K, Kawasaki N, Khoo KH, Kobayashi K, Kolarich D, Kondo A, Lebrilla C, Nakano M, Narimatsu H, Novak J, Novotny MV, Ohno E, Packer NH, Palaima E, Renfrow MB, Tajiri M, Thomsson KA, Yagi H, Yu SY, Taniguchi N. Comparison of methods for profiling O-glycosylation: Human Proteome Organisation Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study of IgA1. *Mol Cell Proteomics*. 2010, 9(4):719-727.
- 21 Ito H, Kuno A, Sawaki H, Sogabe M, Ozaki H, Tanaka Y, Mizokami M, Shoda J, Angata T, Sato T, Hirabayashi J, Ikehara Y, Narimatsu H. Strategy for Glycoproteomics: Identification of Glyco-Alteration Using Multiple Glycan Profiling Tools. *J Proteome Res*. 2009, 8(3):1358-1367.
- 22 Amano K, Chiba Y, Kasahara Y, Kato Y, Kaneko MK, Kuno A, Ito H, Kobayashi K, Hirabayashi J, Jigami Y, Narimatsu H Engineering of mucin-type human glycoproteins in yeast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 105(9):3232-3237.
- 23 Kato Y, Kaneko MK, Kunita A, Ito H, Kameyama A, Ogasawara S, Matsuura N, Hasegawa Y, Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ozaki Y, Narimatsu H. Molecular analysis of the pathophysiological binding of the platelet aggregation-inducing factor podoplanin to the C-type lectin-like receptor CLEC-2. *Cancer Sci*. 2008, 99(1):54-61.
- 24 Togayachi A, Kozono Y, Ishida H, Abe S, Suzuki N, Tsunoda Y, Hagiwara K, Kuno A, Ohkura T, Sato N, Sato T, Hirabayashi J, Ikehara Y, Tachibana K, Narimatsu H. Polylactosamine on glycoproteins influences basal levels of lymphocyte and macrophage activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007, 104(40):15829-15834.
- 25 Tateno H, Uchiyama N, Kuno A, Togayachi A, Sato T, Narimatsu H, Hirabayashi J. A novel strategy for mammalian cell surface glycome profiling using lectin microarray. *Glycobiology*. 2007, 17(10):1138-1146.
- 26 Ito H, Kameyama A, Sato T, Sukegawa M, Ishida HK, Narimatsu H. Strategy for the fine characterization of glycosyltransferase specificity using isotopomer assembly. *Nat Methods*. 2007, 4(7):577-582.
- 27 Kimura S, Kameyama A, Nakaya S, Ito H, Narimatsu H. Direct On-Membrane Glycoproteomic Approach Using MALDI-TOF Mass Spectrometry Coupled with Microdispensing of Multiple Enzymes. *J Proteome Res*. 2007, 6(7):2488-2494.
- 28 Kubota T, Shiba T, Sugioka S, Furukawa S, Sawaki H, Kato R, Wakatsuki S, Narimatsu H. Structural basis of carbohydrate transfer activity by human UDP-GalNAc: polypeptide alpha-N-acetylgalactosaminyltransferase (pp-GalNAc-T10). *J Mol Biol*. 2006, 359(3):708-727.
- 29 Iwai T, Kudo T, Kawamoto R, Kubota T, Togayachi A, Hiruma T, Okada T, Kawamoto T, Morozumi K, Narimatsu H. Core 3 synthase is down-regulated in colon carcinoma and profoundly suppresses the metastatic potential of carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005, 102(12):4572-4577.

- 30 Kudo T, Kaneko M, Iwasaki H, Togayachi A, Nishihara S, Abe K, Narimatsu H. Normal embryonic and germ cell development in mice lacking alpha 1,3-fucosyltransferase IX (Fut9) which show disappearance of stage-specific embryonic antigen 1. Mol Cell Biol. 2004, 24(10):4221-4228.

特許（出願中を含め）計 70 件（登録済み特許は計 44 件）。下記に関連のある 2 件を記載する。

1. 特許第 5031928 号「糖タンパク質の測定方法、肝疾患の検査方法、糖タンパク質定量用試薬および肝疾患病態指標糖鎖マーカータンパク質」
2. W011/007764 「肝疾患病態指標糖鎖マーカー」