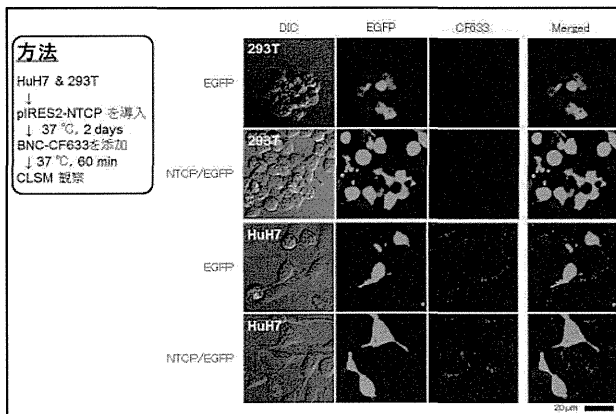
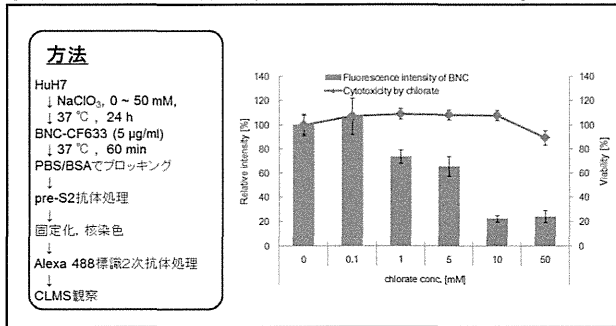


性 HBV 受容体に移行し（以降、「2段階 HBV 受容体説」と呼称）、エンドサイトーシスにより細胞内侵入する事を明らかにした（感染初期における BNC と HBV の類似性を証明）（図1）。昨年度は、低親和性 HBV 受容体の解析を生化学的に行うとともに（図2）、現在主流の NTCP だけが唯一の高親和性 HBV 受容体ではなく、酸処理耐性の非 NTCP 高親和性 HBV 受容体の存在を示した（図3）。



今年度は、酵母由来 BNC には NTCP 相互作用に必要な Myr 残基が存在しないので、化学的に Myr 化 BNC を作成し、NTCP との相互作用を検討した。また、BNC 表層の糖鎖のヒト肝臓由来細胞への感染能に対する効果も検討した。さらに、患者由来 HBV と HepG2-NTCP を用いる感染系における BNC による感染抑制効果を検討し、並びに全自動 1 細胞解析単離装置を用いてヒト肝細胞の高親和性 HBV 受容体のハイスループット機能スクリーニングを行った。

B. 研究方法

BNC のヒト肝臓細胞への感染機構を解析するために、各種蛍光標識した BNC を調製し、in vitro においてヒト肝臓由来細胞（Huh7（低親和性 HBV 受容体を多量に発現；NTCP 発現は微量）、HepG2（低親和性 HBV 受容体を微量発現；NTCP 発現は極微量）、HepG2-NTCP（感染研 脇田先生・渡士先生から供与））、又は非ヒト肝臓由来細胞（HEK293）への結合と侵入を共焦点顕微鏡や FACS により解析した。

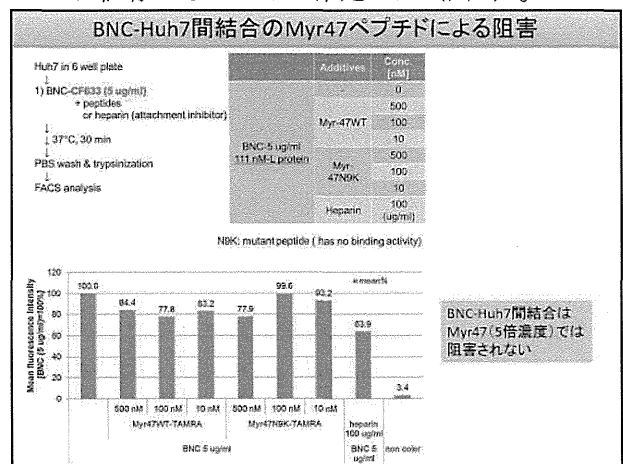
（倫理面への配慮）

本研究で行う組換え DNA 実験については、文部科学省研究開発 2 種省令に準じ、名古屋大学大学院生命農学研究科へは、「タンパク質中空ナノ粒子を用いた遺伝子導入法の開発（部局承認番号：農 09-018）」、「多様なウイルス外皮タンパク質から構成される中空ナノ粒子シリーズを用いる gene delivery system および drug delivery system に関する研究（部局承認番号：農 10-040）」、及び「中空ナノ粒子を用いる細胞への遺伝子及び薬剤導入の検討（部局承認番号：農 11-009）」として申請し、承認されている。なお、実験動物及びヒト由来試料は取り扱っていない。

C. 研究結果

①BNC と Huh7 細胞間結合における NTCP の関与：

Cf633 蛍光標識 BNC は Huh7 細胞と NTCP 過剰発現に関係なく高い結合能を示す（図3）。そこで、本結合に対する NTCP 関与の可能性を排除するため、NTCP 特異的なリガンドである Myr47 ペプチド（HBV Pre-S1 領域 47 残基の N 末端に Myr 残基を付加した合成ペプチド）を添加したが、本結合を阻害しなかったことから、BNC-Huh7 間の高度な親和性は NTCP に依存しないことが確定した（図4）。



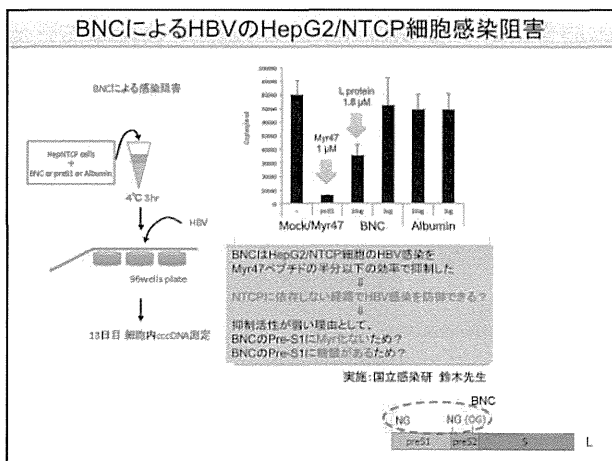
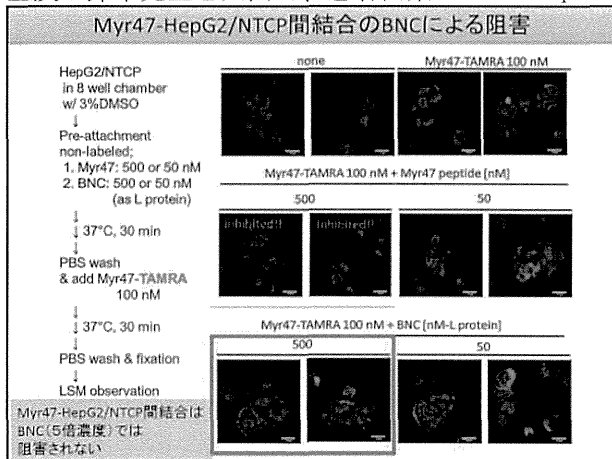
②HepG2-NTCP 細胞と Myr47 の結合に対する BNC の効果：

HepG2-NTCP 細胞に TAMRA 蛍光標識 Myr47 を結合させる条件に、BNC を添加した。Myr47 ペプチドの 5 倍量の BNC（Pre-S1 領域換算）が共存しても、Myr47 の結合には全く影響はなかった（図5）。この結果からも、NTCP-Myr47 結合（ヒト肝臓細胞への HBV 感染に必須と考えられている結合）に対し、BNC は無関係であることが判明した。

③HepG2-NTCP 細胞に対する患者由来 HBV 感染に対する BNC の効果：

BNC は HBV 同等の効率でヒト肝臓由来細胞に感染し、細胞内に進入することが示されているが、①及び②の結果から、BNC 感染機構に NTCP は関与していないことが明らかになった。そのため、BNC は

果たして HBV 感染機構研究の代替となるか早急に決める必要が出てきた。そこで、感染研の脇田先生及び鈴木先生と共同で、患者由来 HBV の HepG2-



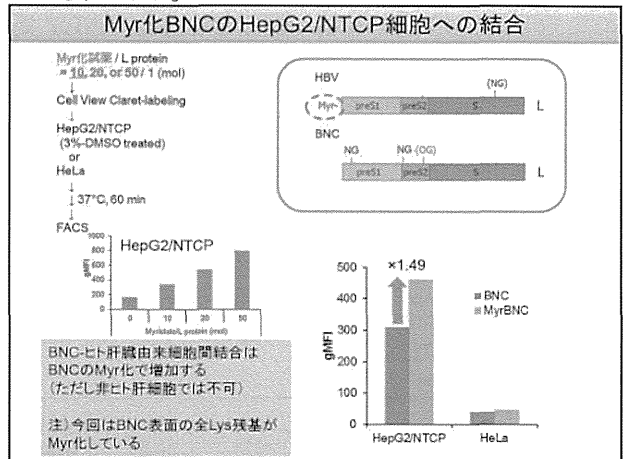
NTCP に対する *in vitro* 感染モデルにおける BNC の添加効果を検討した。

その結果、BNC は HBV 感染を抑制することが判明した。Myr47 の場合は $1 \mu\text{M}$ で 90% 以上抑制されたが、BNC の場合は Pre-S1 換算 $1.6 \mu\text{M}$ で約 50% の抑制であった (図 6)。BNC はナノ粒子表面に Pre-S1 が整列提示されていることから、Myr47 ペプチド単体よりも抑制効果が高いと考えられたが、今回の結果は予想に反していた。そこで、BNC の Pre-S1 と HBV の Pre-S1 の間に構造的な差 (具体的には Myr 残基、糖鎖) が影響していると想定した。

④ Myr 化 BNC の HepG2-NTCP に対する感染能：

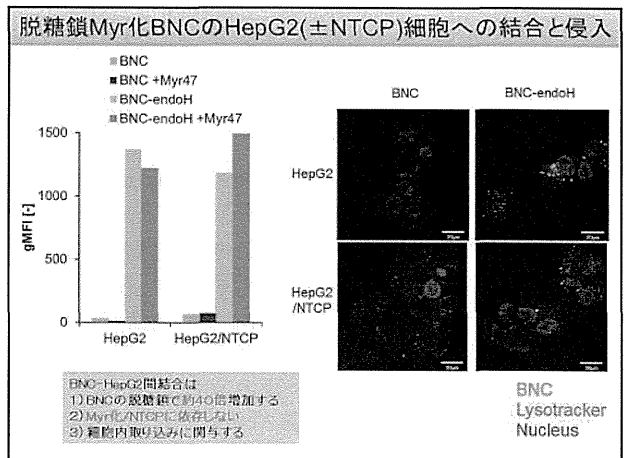
HBV・Pre-S1 領域の Gly-2 残基には Myr 残基が付加しており、HBV のヒト肝臓特異的感染及び NTCP との相互作用に必要であることが示されている。一方、出芽酵母で調製した BNC には同様な Myr 残基は付加されていない。そこで、遊離のアミノ残基と反応できる NHS-Myr を用いて化学的に BNC 表面に Myr 残基を付加し、HepG2-NTCP への結合を評価したところ、細胞結合量は 1.5 倍に増加し、Myr 基修飾量が増えるに従い、その結合量はさらに増加した (図 7)。一方、陰性対照細胞 (HeLa) へ

の結合には影響はなかった。以上から、BNC の Myr 化を行うことで、HBV と同様な NTCP 依存的な結合を BNC に付与できると考えられた。しかし、今回の化学修飾は Pre-S1 のアミノ基末端側特異的ではないので、今後、同特異的な化学修飾法を開発する必要がある。



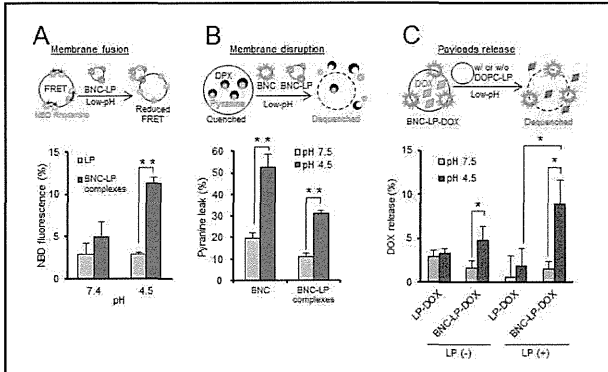
⑤ 脱糖鎖 BNC の HepG2 に対する感染能：

酵母で調製した BNC において、Pre-S1 領域の N 末端側には N 結合型糖鎖、Pre-S2 領域の N 末端側には N 結合型糖鎖及び O 結合型糖鎖が付加しており、HBV とは大きく異なる。そこで、Endo H を用いて BNC から N 結合型糖鎖を除去して、その HepG2 及び HepG2-NTCP に対する感染能を検討した (図 8)。その結果、脱糖鎖 BNC は NTCP の発現に関係なく、HepG2 に対する感染能 (細胞内取り込み量 + 結合量で判断) が約 40 倍亢進した。この結果は驚くべきものであるが、糖鎖除去により BNC が凝集しやすくなっており、その為、巨大化 (100 nm 以下のサイズから数百 nm へ) が HepG2 細胞への感染能を押し上げた可能性は排除できない。なお、Myr 化による相乗効果も同時に検討したが、現時点では断定的なことは言えない。今後は、脱糖鎖による BNC の粒子特性の変化を抑制し、Myr 化を N 末端特異的に行う必要がある。

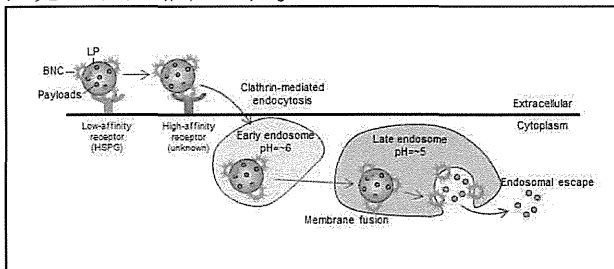


⑥ BNC を用いたヒト肝臓細胞内動態の解析：

HBV がヒト肝臓細胞内に侵入した後、どのような機構でエンベロープを外して（脱殻）、細胞質内に移行するか不明な点が多かった。我々は、Pre-S1 領域の N 末端側（論文投稿中）に酸性依存的膜透過ドメインを見出し、その膜透過活性が他の領域に位置する同ドメインよりも優位であることを示していたので、BNC 及び BNC 融合リポソーム（BNC-LP）を HBV にリポソーム（LP）を細胞膜と見立てて、酸性条件下での動態を解析した。

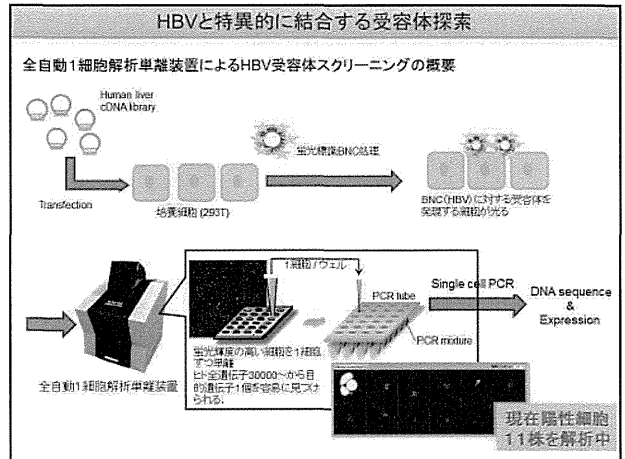


まず、ローダミンと NBD の 2 種類の蛍光色素を FRET 状態で提示した LP に、BNC 及び BNC-LP を接触させたところ、酸性条件依存的に FRET が緩和されたことから（図 9 A）、BNC 及び BNC-LP に膜融合能が存在することが判明した。次に、蛍光色素ピラニンと消光剤 DPX を包含した LP に、BNC 及び BNC-LP を接触させたところ、酸性条件依存的に内包物が放出され（図 9 B）、BNC 及び BNC-LP に外来 LP（エンドソーム膜と想定）を破壊する能力があることが判明した。最後に、蛍光を有する抗がん剤ドキシソルピシン（DOX）を包含した BNC-LP に、未標識・未包含の LP（細胞と想定）を接触させたところ、酸性条件依存的に DOX が放出され（図 9 C）、BNC-LP（おそらく BNC も）は外来 LP により破壊される能力があることが判明した。以上から、BNC 及び BNC-LP（おそらく HBV も同様）は、酸性条件下（後期エンドソームまたはライソソーム）において、エンドソーム膜と接触し、自身並びにエンドソーム膜が同時に破壊され、その結果、BNC 及び BNC-LP（おそらく HBV も同様）内部の物質を細胞質内に移行できると考えられた。これは、HBV の細胞質内侵入過程を解析する上で非常に重要な知見である（図 10）。

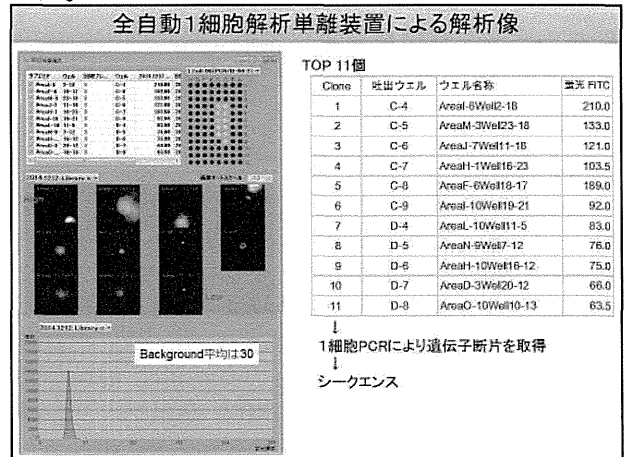


⑦全自動 1 細胞解析単離装置による HBV 受容体のクローニング:

我々が開発し、製品化した全自動 1 細胞解析単離装置を用いて、HBV 受容体の単離を行った。本機は、ヒト肝臓由来 cDNA を発現する 293T 細胞等をセルアレイ化して、蛍光標識 BNC とコンタクトさせ、蛍光ラベルされた細胞を自動的に回収するものである。FACS などとは異なり、陽性細胞含有率が 0.01% 以下（数万細胞中数個）でも確実に単離できるのが特長である（図 11）。



具体的には、約 50 万細胞の 293T 細胞に、ヒト肝臓由来 cDNA ライブラリ（pAP3-neo ベクター型）を 3 μg を形質転換し、2 日間培養して得られた約 250 万細胞を蛍光標識 BNC（約 3 μg）と混合し、37 度で 1 時間静置した後、FACS を用いて BNC 陽性細胞（0.1%）を濃縮した。得られた 2433 個の細胞を、全自動 1 細胞解析単離装置にかけて、強い蛍光を発する BNC 陽性細胞 11 個を単離し、1 細胞 PCR を行った（図 12）。

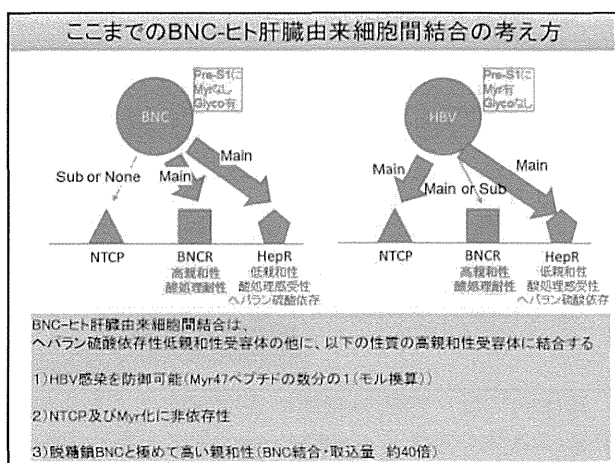


その結果、特許性確保の観点から公表できないが、主に肝臓に発現する糖鎖関連の膜タンパク質遺伝子が単離できた。その他にも、肝臓特異的に発現する膜タンパク質遺伝子が複数見出されている。現在、各遺伝子を非ヒト肝臓細胞に発現し、BNC 及び HBV を用いて感染可能細胞として機能するか検討している。

D. 考察

今年度は、BNC をプローブとして用いることで NTCP 非依存的な HBV の感染機構の存在が確定的に

なった。最近、Myr 化及び脱糖鎖 BNC (元来、HBV 由来 L タンパク質は Myr 化、糖鎖なし) が、未処理 BNC と比較して非常に効率よく、ヒト肝臓由来細胞に結合して細胞内に進入することが判明した。そこで、他の研究者により進められている NTCP に関する研究成果も含めて、現時点では図 1 2 に示すようなモデルを考えている。BNC は NTCP 非依存的な HBV 受容体探索プローブとして有用であることは明らかであり、何とか来年度には新規受容体の同定を行いたいと考えている。



現在、同 BNC プローブを駆使して以下の案件を進めている。①NTCP 非依存的 HBV 感染機構の全容解明、②ヒト肝臓由来結合タンパク質の同定、③HBV 感染防御能の検討 (脇田・鈴木先生、小嶋先生、上田先生とそれぞれ共同)、④HBV 感染抑制化合物のスクリーニング (小嶋先生と共同)、及び⑤BNC 表層・ヒト肝臓細胞表層の糖鎖と感染性の関係解明 (三善先生・三崎先生と共同) を行っている。

E. 結論

これまでのデータは「2段階 HBV 受容体説」を支持している。低親和性 HBV 受容体はヘパラン硫酸依存性であり、高親和性 HBV 受容体は NTCP と酸性処理耐性の少なくとも 2 種類が存在する。基本的に HBV は NTCP を優先的に利用するが、NTCP の発現が不足している場合は、他方の高親和性 HBV 受容体を利用する可能性がある (NTCP 発現パターンと HBV 感染が完全に一致しない事象を説明可能)。しかし、創薬の標的として、どちらの高親和性 HBV 受容体が有効かは不明である。いずれにせよ、BNC は NTCP 非依存的な高親和性 HBV 受容体を単離できるユニークなプローブであるので、急ぎスクリーニングを完了する予定である。最後に、HBV が脱殻するのは後期エンドソーム内であり、HBV のエンベロープ構造及びエンドソーム膜を同時に破壊することにより、HBV 内部が細胞質に移行する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) A bio-nanocapsule containing envelope (E) protein domain III of Japanese encephalitis virus (JEV) protects mice against lethal JEV infection.

Miyata T, Tafuku S, Harakuni T, Tadano M, Yoshimoto N, Iijima M, Matsuo H, Kuroda S, and Arakawa T.

Microbiol. Immunol. 57(2013) 470-477.

2) Enhanced OH radical generation by dual-frequency ultrasound with TiO2 nanoparticles: Its application to targeted sonodynamic therapy.

Ninomiya K, Noda K, Ogino C, Kuroda S, and Shimizu N.

Ultrason Sonochem 21 (2014) 289-294.

3) High-throughput de novo screening of receptor agonists with an automated single-cell analysis and isolation system

Yoshimoto N, Tatematsu K, Iijima M, Niimi T, Maturana AD, Fujii I, Kondo A, Tanizawa K, and Kuroda S.

Scientific Reports 4 (2014) 4242 (9 pages).

4) Oligomerization-induced conformational change in the C-terminal region of NELL1 is necessary for the efficient mediation of murine MC3T3-E1 cell adhesion and spreading

Nakamura Y, Hasebe A, Takahashi K, Iijima M, Yoshimoto N, Maturana AD, Ting K, Kuroda S, and Niimi T.

J. Biol. Chem. 289 (2014) 9781-9794.

5) Specific delivery of microRNA93 into HBV-replicating hepatocytes downregulates protein expression of liver cancer susceptible gene MICA

Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Shibata C, Yoshikawa T, Takata A, Muroyama R, Kowatari N, Sato M, Kato N, Kuroda S, and Koike K.

Oncotarget 5 (2014) 5581-5590.

6) ウイルス表面抗原タンパク質提示によるリポソームへの標的化能、細胞内侵入能、およびストレス能の付与

黒田俊一

膜 (2014), Vol. 39. 283-289

7) Single-cell-based breeding: Rational strategy for the establishment of cell lines from a single cell with the most favorable properties.

Yoshimoto N., and Kuroda, S.

J. Biosci. Bioeng. 117 (2014) 394-400.

8) DDSナノキャリア・バイオナノカプセルによるバイオイメージング

良元伸男、黒田俊一

ナノ・マイクロカプセル(状粒子)の調製・評価・応用《検討例集》(2014) 株式会社 技術情報協会

第3章 ナノ・マイクロカプセルの応用例 第15節 診断

9) A cisplatin- incorporated liposome that targets the epidermal growth factor receptor enhances radiotherapeutic efficacy without nephrotoxicity

Jung J, Jeong SY, Park SS, Shin SH, Ju EJ, Choi J, Park J, Lee JH, Kim I, Suh YA, Hwang JJ, Kuroda S, Lee JS, Song SY and Choi EK

Int J Oncology 46 (2014) 1268-1274

10) Chapter 15: Bio-nanocapsules: Nanocarriers Harboring Virus-Derived Transfection Machinery for Use as Pinpoint Drug Delivery Systems

Kuroda S.

Nanoparticles: Drug Inhalation Therapy - Events at Air-Blood Tissue Barrier

Akira Tsuda & Peter Gehr, editors Francis & Taylor, publisher CRC (2014) pp.235-246

2. 学会発表

該当なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

1) センシング基板及びそれを用いたリガンドの測定方法 発明者：黒田俊一、飯嶋益巳(出願人：名古屋大学) 出願番号：2014-064090(平成26年3月26日)

2) 核酸を内封してなる中性又はアニオン性リポソーム及びその製造方法 発明者：黒田俊一、曾宮正晴(出願人：名古屋大学) 出願番号：2014-170680(平成26年8月25日)

3) リポソーム複合体、その製造方法、及びその使用 発明者：黒田俊一、大江田綾子(出願人：名古屋大学) 特願2010-214303に関して日本国特許成立(平成27年2月2日)

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

HBVエンベロープタンパク質と相互作用する
細胞膜表面分子の網羅的探索

研究分担者 黒木 和之

金沢大学がん進展制御研究所 准教授

研究要旨：HBV感染に関わるウイルスレセプター等の宿主分子の探索・HBV創薬研究に適したシステムを構築するため、HBVの感染成立を迅速・簡便に検出できるようマーカー遺伝子を組み込んだ組換えHBVベクター系の更なる改良を行った。また、iPS細胞より分化誘導した肝細胞では組換えHBVの感染が認められin vitro感染系として有用であることがわかったので、各種ヒト正常細胞からiPS細胞株を多数樹立し、本研究に有用な効率の良いHBV in vitro 感染系の確立を試みている。

A. 研究目的

本研究の目的はHBV 初期感染に関わるウイルスレセプターを含む宿主分子群の同定およびこれら分子とHBVのinteractionを阻害する化合物の探索・創薬を通じてHBVの感染・増殖を阻止する方策を得ることにある。この目的のため昨年度に続き、HBVの感染成立を迅速・簡便に検出できるよう、マーカー遺伝子を組み込み自立的な増殖能を欠損した組換えHBVベクターを構築するとともにHBV in vitro 感染系に利用可能な細胞系を探索することとした。

B. 研究方法

組換えHBVベクターの構築

HBVはgenotype Aを用いた。HBV発現ベクターはCMV IEプロモーターよりHBV pregenomic RNAを合成するpCSH4プラスミ

ドを用いた。HBVベクターでは、3.2kbのHBVゲノムサイズが変化することのないようGeneArt（ライフテクノロジーズ）を使ってマーカー遺伝子（新たに核内局在シグナルを導入したGFPおよびRFP）をHBVベクターのHBV S遺伝子およびその近傍の部位へ塩基数を合わせて置換した。感染成立の検出感度を高めるためマーカー遺伝子の発現プロモーターをHBV S遺伝子プロモーターからCMV IEプロモーターに置き換えたものも作製した。

組換えHBVパッケージング細胞の作製

細胞内でのHBVゲノム間の相同組換えによる野生型HBVの出現の可能性をより低く抑えるため、HBV複製ドメイン及びpolyAシグナルを欠いたHBV core、polymerase、X遺伝子発現用とHBV envelope遺伝子発現用のコンストラクトをそれぞれレトロウイル

スベクターを介してHepG2細胞やHEK293細胞の他、新たにB型肝炎ウイルス研究によく用いられるニワトリ肝癌由来LMH細胞に導入しHBVパッケージング細胞を樹立した。更にpreS2およびS蛋白質の発現量を増強するためこれら遺伝子の発現用レトロウイルスベクターを構築しパッケージング細胞に導入した。

組換えHBVベクタープラスミドDNAを安定に組み込んだパッケージング細胞より産生されたHBV粒子を含む培養上清を用いて4%PEG8000存在下で感染実験を行った。感染成立はRT-PCRによるHBV mRNAの検出、およびマーカー遺伝子の発現により検討した。iPS細胞株の樹立

iPS細胞より分化誘導した肝細胞を用いた新たなHBV in vitro感染系を確立するためヒト成人および新生児皮膚繊維芽細胞、また、単核細胞からセンダイウイルスベクターを使って山中4因子を導入するCytoTune-iPS2.0（ディナベック）法を用いてiPS細胞株を樹立した。iPS細胞はrBC2LCN-FITC（和光純薬）を使った生細胞染色により選択、単離した。

iPS細胞から肝細胞への分化誘導はアルブミン等の発現をRT-PCRで測定することにより検討した。

（倫理面への配慮）

本研究では、ウイルスベクターを用いた実験を行うことから文部科学省の定める省令「研究開発等に係わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止処置等を定める省令」（平成16年文部科学省・環境省令第1号）・組換えDNA実験指針・金沢大学研究用微生物安全管理

規程等に則り本学安全委員会等の承認を得て、その指示の下で研究は進められる。

C. 研究結果

組換えHBVベクターの構築

HBV感染実験に用いているHepG2細胞や肝細胞では自家蛍光が強く細胞全体がひかりマーカー遺伝子GFPの蛍光を区別することが困難なことが多い。この問題を解決するため核内に局在する蛍光蛋白質をHBV感染のマーカー遺伝子としたHBVベクター（HBV-GFPNuc、HBV-RFPNuc）を作製した。パッケージング細胞から $10^5 \sim 10^6$ /mlのHBV-GFPNuc粒子を含む培養上清が得られた。これらの細胞ではGFPの核内局在が確認されたが、NTCP発現HepG2細胞への感染実験では感染成立を示す明確なGFPの核内局在を確認することができず、さらに他の細胞を用いた検討が必要である。

組換えHBVパッケージング細胞の作製

HBV core、polymerase、X遺伝子発現用とHBV envelope遺伝子発現用のコンストラクトをそれぞれレトロウイルスベクターを介して導入したパッケージング細胞では成熟HBV粒子と同程度あるいはそれ以上の不完全HBV粒子が産生されていることが抗HBs抗体および抗HBc抗体を用いた免疫沈降法による解析から示された。これらパッケージング細胞ではpreS1蛋白質の過剰発現が認められたので、新たにpreS2およびS蛋白質の発現量を増強した。その結果より多くの成熟HBV粒子を得ることができた。

ニワトリ肝癌由来LMH細胞より樹立したHBVパッケージング細胞ではcoreなどHBV蛋白質の発現はHepG2細胞と比べ高く、組換

えHBV粒子は $\sim 10^7$ /ml分泌される。

iPS細胞株の樹立とHBV in vitro感染系

センダイウイルスベクターを使って山中4因子を導入する CytoTune-iPS2.0 (ディナベック) を用いてヒト成人および新生児皮膚繊維芽細胞、単核細胞から iPS 細胞株を樹立した。CytoTune-iPS2.0 の導入による0.1%程度の頻度で iPS 細胞が出現する。iPS 細胞は rBC2LCN-FITC (和光純薬) を使った生細胞染色により確認し単離した。各導入実験からそれぞれ 24 クローンを単離し、分化等不安定なものを除き現在それぞれ 5 クローンを継代している。これら iPS 細胞より分化誘導した細胞ではアルブミンの発現に差が認められるが、HBV 感受性について検討を進めている。

D. 考察

組換えHBVベクターの構築とパッケージング細胞について

これまでに樹立したHepG2細胞やHEK293由来のHBVパッケージング細胞、特にHEK293由来のもの、では抗HBs抗体、抗HBc抗体を用いた免疫沈降法による解析から成熟HBV粒子に比べ多くの不完全HBV粒子の存在が示されていた。不完全HBV粒子の産生はpreS2およびS蛋白質の発現増強により抑制されることからこれまでのパッケージング細胞ではpreS1蛋白質過多によるアンバランスなHBVエンベロップ蛋白質の供給が組換えHBVベクター産生系のクオリティを損なっていたと考えられる。

組換えHBVベクターはHBV感染メカニズムやHBV感染に関与する宿主因子の網羅的探

索、HBV感染を阻止する化合物の探索に有用なツールになると考えている。

iPS細胞株の樹立とHBV in vitro感染系について

iPS 細胞 (Dotcom) から分化誘導した肝細胞はHBV感受性であることをすでに示している。nativeに近い系として、また、よりHBV感受性の高いHBV in vitro感染系を確立するため、元となるiPS細胞を多数樹立した。それぞれのヒト正常細胞から各24クローンを単離し、最終的にそれぞれ5クローンを継代している。これらiPS細胞から分化誘導により得られた肝細胞ではアルブミンの発現量にクローン間の差が認められ異質であることから、HBV感受性も異なるものと予想される。iPS細胞から肝細胞への分化過程とHBV感受性、各種iPS細胞から得られた肝細胞のHBV感受性の違いを元にした肝細胞遺伝子発現の差分解析からHBV感染関連因子の同定が進むものと期待される。

E. 結論

不完全HBV粒子の出現を抑え、成熟HBV粒子の産生を高めたHBVパッケージング細胞を構築した。また、ニワトリ肝癌由来LMH細胞より得られたHBVパッケージング細胞は組換えHBV粒子の産生に有用であった。

各種ヒト正常細胞からiPS細胞株を多数樹立したので、それらの分化誘導により得られる肝細胞から本研究に有用な効率の良いHBV in vitro感染系の確立を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

黒木和之：B型肝炎ウイルス感染の分子基盤
平成26年度遺伝子病制御研究所研究集会「感染、免疫、炎症、発癌」 2014年7月3-4日（札幌、北海道大学学友会館）

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
分担研究報告書

HBV感染におけるリン酸化タンパク質の機能解析

研究分担者 岡本 徹
大阪大学微生物病研究所 助教

研究要旨：HBVの感染受容体として同定された胆汁酸トランスポーター(NTCP)をヒト肝細胞に発現させるとHBVの感染を許容するが、マウスのNTCPにはその活性がないことが報告されていた。そこで、ヒト型のNTCPを発現するトランスジェニックマウス(hsNTCP-TG)を作製し、その肝細胞がHBV感染を許容するかを検討した。hsNTCP-TGは細胞膜表面にhsNTCPを発現していたが、HBVに感受性を示さなかった。さらに、HepG2細胞はNTCPを発現していないが、HepG2細胞の膜表面タンパク質を精製し、マウスに免疫した血清IgG画分にHBVに対する中和活性が見出されたことから、NTCP以外にもHBVの感染に関与する宿主因子の存在が示唆された。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)は肝癌を発症するウイルスであり、世界でも2億人もの感染者が報告されている。治療薬としては逆転写阻害剤が用いられているが、その著効率は低く、また一生服用せねばならず、有効な治療法とは言い難い。近年、HBVの感染受容体として同定されたNa⁺依存的胆汁酸胆汁酸トランスポーター(NTCP)は、ヒト型NTCPはHBVの受容体として機能するが、マウスのものは機能しないことから、HBVが感染できる動物種をNTCPが規定している可能性が示唆されている。そこで、ヒトのNTCPを発現するトランスジェニックマウス(hsNTCP-TG)を作製し、HBV感染を許容できるマウスができるかを検討した。また、NTCP以外のHBV感染に関与する膜タンパク質の存在を検討するため、NTCPを発現していないHepG2細胞の膜画分をマウスに免疫し、血清由来のIgG画分にHBVに対する中和活性があるかを検討した。

B. 研究方法

近年HBVの受容体として同定されたヒトNTCPを発現するトランスジェニックマウス(hsNTCP-TG)を作製し、HBV感染に感受性を持つマウスの作出を試みた。樹立したhsNTCP-TGでのヒトNTCPの発現をウエスタ

ンブロット、免疫染色により確認した。

hsNTCP-TGから初代肝細胞を取得してHBVを接種した。また、NTCP以外にHBV感染に関わる膜タンパク質がないかを検討するため、NTCPを発現していないHepG2細胞から膜画分を精製し、マウスに免疫することで、血清、ならびにハイブリドーマを作製した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

HBVの受容体候補であるヒト型NTCPを発現するマウスを作製するため、肝臓特異的なプロモーターである、アルブミンプロモーターの下流にヒトNTCPのcDNAを挿入し、マウス胚へ導入し、ヒトNTCP発現マウスを得た。このマウスの肝臓でのhsNTCPの発現をウエスタンブロットで確認し、肝組織の免疫染色でhsNTCPの局在を検討した。その結果、hsNTCPは肝細胞膜表面に発現してい

ることが確認できた。次に、hsNTCP-TG マウスから環流法によって初代肝細胞を取得してHBVを接種したところ、ヒト初代肝細胞は効率よくHBVに感染したが、hsNTCP-TG由来の初代肝細胞は全く感受性を示さなかった。そこで、NTCP以外のHBV感染に関与する膜タンパク質を検索するため、NTCPを発現していないHepG2細胞から、膜画分を精製し、マウスに免疫して抗体を作製した。免疫したマウス血清から精製したIgG画分に、HBVの感染中和活性が認められた。そこで、HepG2細胞膜画分を免疫したマウスからリンパ節を採取し、ハイブリドーマを作製し、そこに中和活性のあるモノクローナル抗体の作製を開始した。

D. 考察

ヒトNTCP発現トランスジェニックマウスの初代肝細胞にHBVは感染しなかったことから、HBV感染にはNTCP以外の膜タンパク質の関与が示唆された。また、NTCPが発現していないHepG2細胞の膜画分で免疫したマウスのIgG画分に、HBVに対する中和活性が検出されたことから、NTCP以外のHBV感染に関わる宿主因子の存在が示唆された。

E. 結論

ヒトNTCPを発現するトランスジェニックマウスを作製したが、このマウスから調整した初代肝細胞にはHBV感染は成立しなかった。NTCP以外にもHBV感染に関わる膜タンパク質の存在が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike K, and Matsuura Y. Amphipathic α -Helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathogens* 2014; DOI: 10.1371/journal.ppat.1004534
2. Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Yamamoto S, Okamoto T, Watanabe N,

Wakita T, and Matsuura Y. Novel permissive cell lines for a complete propagation of hepatitis C virus. *J. Virol.* 2014; 88: 5578-5594

2. 学会発表

1. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Exchangeable apolipoproteins participate in the particle formation of hepatitis C virus. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
2. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV Propagation in miR-122 Knockout Cells. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
3. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV propagation in miR-122 knockout cells, 第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
4. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic α -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of HCV. 第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
5. Sayaka Aizawa, Toru Okamoto, Takahisa Kouwaki, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, and Yoshiharu Matsuura, Processing of core protein by signal peptide peptidase participates in propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. 第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014
6. Yoshiharu Matsuura, Toru Okamoto, Takasuke Fukuhara, Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
7. 山本聡美、福原崇介、小野慎子、和田真

- 実、塩川舞、岡本徹、松浦善治, C 型肝炎ウイルスの感染におけるアポリポタンパク質受容体の役割、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
8. 和田真実、福原崇介、中村昇太、小野慎子、山本聡美、塩川舞、岡本徹、小池和彦、松浦善治, アポリポ蛋白質の両親媒性 α ヘリックスは HCV の感染性粒子産生に寄与する、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
 9. 岡本徹、相澤清香、杉山由加理、幸脇貴久、福原崇介、森石恆司、小池和彦、松浦善治, C 型肝炎ウイルスの病原性発現におけるシグナルペプチドペプチダーゼの役割、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
 10. 福原崇介、山本聡美、小野慎子、和田真実、岡本徹、茶山一彰、松浦善治、HCV の Quasispecies は増殖性に関与する、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
 11. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic α -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014
 12. Toru Okamoto, Sayaka Aizawa, Takahisa Kouwaki, Tatsuya Suzuki, Francesc Puig-Basagoiti, Shinya Watanabe, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Processing of Core Protein by Signal Peptide Peptidase Participates in Propagation and Pathogenesis of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014
 13. Toru Okamoto, Sayaka Aizawa, Takahisa Kouwaki, Tatsuya Suzuki, Francesc Puig-Basagoiti, Shinya Watanabe, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Processing of Core Protein by Signal Peptide Peptidase Participates in Propagation and Pathogenesis of Hepatitis C Virus. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、2014
 14. Toru Okamoto, Takahisa Kouwaki, Ayano Ito, Takasuke Fukuhara, Yoshiharu Matsuura, Host factors involved in HBV propagation and pathogenesis. The 11th JSH Single Topic Conference. Hiroshima, 2014

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

厚生労働科学研究委託費（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
分担研究報告書

細胞表面の糖鎖変化とHBV感染に関する研究

研究分担者 三善 英知

大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学 教授

研究要旨 肝がん細胞 Huh6 と HB611 に対する HBV の疑似ウイルスである BNC(Bionanocapsule)の感染効率と糖鎖の関係をグライコプロテオミクス的手法を用いて解析した結果、コアフコースが最も重要な糖鎖であることがわかり、NTCP と結合するタンパク X の関与が示唆された。

A. 研究目的

細胞表面の糖鎖変化と HBV の感染性を検討するため、HBV の疑似ウイルスである BNC(Bionanocapsule)の感染効率と糖鎖の関係を、ヒト肝がん細胞株 Huh6 と HB611 を用いて検討した。

B. 研究方法

ヒト肝がん細胞株 Huh6 と HB611 を通常の条件で培養し、BNC を添加後 3 時間の BNC の取り込みを FACS と共焦点顕微鏡で観察した。最も変化の見られたフコース転移酵素 Fut8 の過剰発現とノックダウンによる BNC の取り込み変化を検討した。コアフコースを認識するレクチン PhoSL の添加やインターフェロンによる BNC の取り込みの違いも検討した。それぞれのケースでの NTCP の発現の変化を観察し、BNC の取り込みとの関係を考察した。また、糖鎖の違いによる NTCP との結合性の違いをグライコプロテオミクスの方法によって解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は細胞実験によるものであり、倫理面での問題はないものとする。

C. 研究結果

HB611 では、Huh6 よりも著明な BNC の取り込み亢進を認め、糖鎖解析の結果からコアフコースの著しい増加を認めた。コアフコースを生合成する糖転移酵素 FUT8 のノックダウンにより HB611 の BNC 取り込みが抑制され、Huh6 への FUT8 の過剰発現により BNC の取り込み亢進が見られた。コアフコースを特異的に認識するレクチン(PhoSL)の添加実験でも同様の効果を認めた。しかし HBV のレセプターと考えられている NTCP の発現量は Huh6 の方が高く、糖鎖を介した複雑な HBV の細胞内取り込み機構が存在すると考えられる。さらに NTCP を免疫沈降し、共沈するタンパクをマススペクトロメトリーで解析した結果、タンパク X が同定された。こ

のタンパク X を活性化し NTCP と結合させるシグナルにコアフコースが関与する可能性が示唆された。

D. 考察

HB611 は Huh6 に HBV genome を導入して作られた細胞株である。HBV が自らの増殖や感染に有利な方向に細胞の形質を変化させる可能性がある。2つの細胞の糖鎖解析の結果、コアフコースとシアル酸の増加を HB611 細胞で確認した。実際に HB611 細胞にインターフェロン処理を行い HBV の複製を抑制すると、糖鎖構造が Huh6 に近づく。特にコアフコースの過剰発現とロックダウンによって、BNC の感染と細胞表面のコアフコースの重要性が明らかになったことから、今後はコアフコースを研究の焦点を絞って、進めてゆきたい。

E. 結論

肝がん細胞に HBV が感染する時に、コアフコースという細胞表面の糖鎖が重要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sato M, Kamada Y, Takeda Y, Kida S, Ohara Y, Fujii H, Akita M, Mizutani K, Yoshida Y, Yamada M, Hogaku K, Takehara T, **Miyoshi E.** (2014)

Fetuin A negatively correlates with liver and vascular fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease subjects. *Liver International* in press.

2) **Asazawa H**, Kamada Y, Takeda Y, Takamatsu S, Shinzaki S, Kim Y, Nezu R, Kuzushita N, Mita E, Kato M, **Miyoshi E.** (2014) Serum fucosylated haptoglobin in chronic liver diseases as a potential biomarker of hepatocellular carcinoma development. *Clin Chem Lab Med.* 53(1), 95-102.

3) Kamada Y, Sato M, Kida S, Akita M, Mizutani K, Fujii H, Sobajima T, Yoshida Y, Shinzaki S, Takamatsu S, Takehara T, **Miyoshi E.** (2014) N-Acetylglucosaminyltransferase V exacerbates concanavalin A-induced mouse hepatitis. *Molecular Medicine Reports* Aug 14, in press.

4) Azuma K, Shinzaki S, Asazawa H, Kuroki E, Kawamoto S, Kamada Y, Hayakawa K, **Miyoshi E.** (2014) Twin studies on the influence of genetic factors on serum agalactosyl immunoglobulin G level. *Biomedical Reports* 2: 213-216

5) Onuki K, Sugiyama H, Ishige K, Kawamoto T, Ota T, Ariizumi S,

- Yamato M, Kadota S, Takeuchi K, Ishikawa A, Onodera M, Onizawa K, Yamamoto M, Miyoshi E, Shoda J. (2014) Expression of *N*-acetylglucosaminyltransferase V in the subserosal layer correlates with postsurgical survival of pathological tumor stage 2 carcinoma of the gallbladder. *J Gastroenterol.* **49**(4), 702-714.
- 6) Tomita Y, Azuma K, Nonaka Y, Kamada Y, Tomoeda M, Kishida M, Tanemura M, Miyoshi E. (2014) Pancreatic Fatty Degeneration and Fibrosis as Predisposing Factors for Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas* July 2, in press
- 7) Fujita K, Shimomura M, Umemura M, Nakata W, Sato M, Nagahara A, Nakai Y, Takamatsu S, Miyoshi E, Nonomura N. (2014) Serum fucosylated haptoglobin as a novel prognostic biomarker predicting a high Gleason score of prostate cancer. *The Prostate* **74**(10), 1052-58.
- 8) Furukawa K, Kawamoto K, Eguchi H, Tanemura M, Tomimaru Y, Akita H, Hama N, Wada H, Kobayashi S, Nonaka Y, Takamatsu S, Shinzaki S, Kumada T, Satomura S, Ito T, Serada S, Naka T, Mori M, Doki Y, Miyoshi E, Nagano N. (2014) Clinico-pathological significance of leucine-Rich alpha-2-glycoprotein-1 in sera of patients with pancreatic cancer *Pancreas* Jul 23, in press.
- 9) Azuma K, Serada S, Takamatsu S, Terao N, Takeishi S, Kamada Y, Naka T, Miyoshi E. (2014) Identification of sialylated glycoproteins in doxorubicin-treated hepatoma cells with glycoproteomic analyses. *Journal of Proteome Research* **13**(11), 4869-77.
- 10) Ohkura T, Fujioka Y, Nakanishi R, Shiochi H, Sumi K, Yamamoto N, Matsuzawa K, Izawa S, Ohlura H, Ueta E, Kato M, Miyoshi E, Taniguchi S, Yamamoto K. (2014) Low level galectin-3 concentrations are associated with insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetology & Metabolic syndrome* Sep 23 in press.
- 11) Tanida T, Tanemura M, Miyoshi E, Nagano H, Furukawa K, Nonaka Y, Akita H, Hama N, Wada H, Kawamoto K, Kobayashi S, Eguchi H, Mori M, Doki Y.

- (2014) Pancreatic cancer immunotherapy using a tumor lysate vaccine, engineered to express α -gal epitopes, targets pancreatic cancer stem cells. *Int. J. Oncology* Sep 24 in press.
- 12) Honma R, Kinoshita I, Miyoshi E, Tomaru U, Matsuno Y, Shimizu Y, Takeuchi S, Kobayashi Y, Kaga K, Taniguchi N, Akita DH. (2014) Expression of α 1,6-fucosyltransferase is associated with prognosis and histology in non-small cell lung cancers. *Oncology* Oct31 in press.
- 13) Sobajima T, Yoshimura S, Iwano T, Kunii M, Watanabe M, Atik N, Mushiake S, Morii E, Koyama Y, Miyoshi E, Harada A (2014). Rab11a is required for apical protein localisation in the intestine. *Biol Open*. 2014 Dec 19. pii: BIO20148532. doi: 10.1242/bio.20148532
- 14) Wang Y, Fukuda T, Isaji T, Lu J, Gu W, Lee HH, Ohkubo Y, Kamada Y, Taniguchi N, Miyoshi E, Gu J. (2015) Loss of α 1,6-fucosyltransferase suppressed liver regeneration: implication of core fucose in the regulation of growth factor receptor-mediated cellular signaling. *Scientific Reports* 5, 8264 | DOI: 10.1038/srep08264
- 15) Kenta Moriwaki and Eiji Miyoshi Leitins Methods and Protocols ; Edited by Jun Hirabayashi 613 ページ、2014/9/1 発刊 Human Press
- 16) Eiji Miyoshi and Yoshihiro Kamada, 2015/1/1, LXII, 1568 p. Springer Glycobiology: Biology and Medicine Hepatosteatosis and Primary Hepatoma
- 17) 鎌田佳宏、三善英知、竹原徹郎 NAFLD の診断と検査法の update 日本消化器病学会雑誌 111 (1) : 25-34, 2014
- 18) 鎌田佳宏、三善英知、吉田雄一、竹原徹郎 サイトカインと NASH 最新醫學 69(9), 35-41, 2014
- 19) 三善英知、鎌田佳宏 肝疾患 2014-2015 Review 2014年6月2日発行. 日本メデイカルセンター (総ページ 203). 肝癌の診断・治療におけるバイオマーカーの有用性 p.45-50
- 20) 三善英知、鎌田佳宏 HEPATOLOGY PRACTICE Vol.5 肝癌の診療を極める～基本から最前線まで～ 文光堂 (総 338 ページ) 編者 金子周一、竹原徹郎、持田 智. Topics 肝癌の新しいバイオマーカー p.46-53
2. 学会発表
1) 第 104 回アメリカ癌学会 (AACR) April 5-9 in San Diego, USA

2014年4月6日ポスター発表.

Kamada Y, Mizutani K, Fujii H, Akita M, Ohara Y, Takamatsu S, **Miyoshi E**. Serum Mac-2 binding protein levels as a novel diagnostic biomarker for prediction of disease severity and nonalcoholic steatohepatitis.

2) The AASLD LIVER MEETING November 7-11, Boston, USA. 2014年11月9日ポスター発表.

Kamada Y, Sato M, Takeda Y, Kida S, Ohara Y, Fujii H, Akita M, Mizutani K, Yoshida Y, Ymada M, Hougaku H, Takehara T, **Miyoshi E**. Fetuin-A negatively correlates with liver and vascular fibrosis in NAFLD subjects.

3) 2014 Joint Meeting of The Society for Glycobiology and The Japanese Society of Carbohydrate Research November 16-19 Honolulu Hawaii. 2014年11月19日ポスター発表. **Miyoshi E**, Akita M, Mizutani K, Fujii H, Takamatsu S, Kamada Y.

Combination of two glycol-biomarkers could make a noninvasive diagnosis for nonalcoholic steatohepatitis.

5) 2014年11月19日ポスター発表

Minehira T, Uozumi N, Asazawa H, Sawanobori A, Takamatsu S, Kamada Y, Tanaka K, Fukasa K, **Miyoshi E**. Functional analysis of a novel type of CA19-9 carrier molecules in micro lipid membrane.

6) 2014年11月19日ポスター発表. Takamatsu S, Azuma K, Serada S, Terao N, Takeishi S, Kamada Y, Naka T, **Miyoshi E**. Identification of sialylated glycoproteins in doxorubicin-treated hepatoma cells with glycoproteomic analyses.

7) 2014年11月19日ポスター発表 Terao N, Takamatsu S, Minehira T, Kamada Y, **Miyoshi E**. Fucosylation is a common type of glycosylation in the cancer stem cell-like phenotype of pancreatic cancer under various condition.

GlycoT 2014 – 9th International

Symposium on Glycosyltransferases.
8) 2014年6月20日 Porto, Portugal

Carvalho S, Yamaguchi Y, Catarino TA, Seruca R, Carneiro F, **Miyoshi E**, Pierce M, Taniguchi N, Reis C A, Pinho S. Identification of a site-specific modification of E-cadherin N-glycans by GnT-V with key roles in functional regulation in gastric cancer.

9) 第10回欧州クローン病・大腸炎会議 (ECCO-IBD)

2015年3月ポスター発表

Araki M, Shinzaki S, Iijima H, Yamaguchi T, Kawai S, Hiyama S, Inoue T, Hayashi Y, Watabe K, Tsujii M, **Miyoshi E**, Takehara T Agalactosyl IgG predicts therapeutic effect of anti-TNF agents in patients with Crohn's disease

10) 第100回日本消化器病学会総会 Research Forum. 2014年4月25日 東京国際フォーラム

鎌田佳宏、竹原徹郎、三善英知 血中フコシル化タンパクは肝臓 ballooning hepatocyte のバイオマーカーである

11) 第50回日本肝臓学会総会 ワークショップ 11. 2014年5月30日 ホテルニューオオタニ(東京). 鎌田佳宏、竹原徹郎、三善英知 血清糖鎖バイオマーカーを用いた非侵襲的 Mattenoi 分類による NASH 診断法の開発

12) 第33回日本糖質学会年会 一般口頭発表 A 2014年8月12日 発表(名古屋大学 豊田講堂) 三善英知、寺尾美香、新崎信一郎 GnT-V トランスジェニックマウスからわかったこと

13) 第73回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(神奈川). 水谷佳代、鎌田佳宏、藤井宏修、秋田真彩、佐藤元哉、木田幸穂、高松真二、三善英知 2014年9月25日 口頭発表

Mac-2bp は非アルコール性脂肪性肝炎の新たな血液診断バイオマーカーである. 藤井宏修、石井真悠子、新崎信一郎、飯島英樹、高松真二、鎌田佳宏、辻井正彦、森井英一、竹原徹郎、三善英知. 2014年9月26日 ポス

ター発表. 糖転移酵素 GnT-V はマクロファージの機能異常を介して腸炎を悪化させる. 寺尾尚子、高松真二、峰平朋実、鎌田佳宏、種村匡弘、三善英知.

14) 2014年9月27日 口頭発表
フコシル化は膵がんの様々ながん幹細胞様の表現型に共通した糖鎖修飾である. 下村真由香、佐々木夢香、前田晴香、寺尾尚子、高松真二、鎌田佳宏、飯島益巳、疋田隼人、竹原徹郎、黒田俊一、三善英知.

15) 2014年9月27日 ポスター発表. HBV感染における細胞表面上の糖鎖の関与. 第2回 看護理工学学会学術集会 大阪大学 大阪会館(豊中キャンパス). 清水咲希、丁憲勇、渡辺宗一郎、林雅信、鳥飼一男、木戸倫子、野村泰伸、三善英知、山田憲嗣、大野ゆう子.

16) 2014年10月4日ポスター発表. 身体バランスの視点から見た、腰部サポートウェア有効性の検証
第61回日本臨床検査医学会学術集会 福岡国際会議場. 若松可奈、藤井宏修、新崎信一郎、飯島英樹、岩本ちづる、片岡直也、鎌田佳宏、竹原徹郎、三善英知.

17) 2014年11月24日 口頭発表
フコシル化の低下は炎症性腸疾患における免疫抑制シグナルを増強する. 秋田真彩、鎌田佳宏、水谷佳代、藤井宏修、戎谷友佑、山本晃子、佐藤元哉、木田祥穂、浅澤瞳美、中山小太郎純友、高松真二、三善英知.

18) 2014年11月24日 口頭発表
非アルコール性脂肪性肝炎の鑑別診断における血中フコシル化ハプトグロビン測定の有用性について. 上田真樹子、高松真二、寺尾尚子、傍嶋智明、鎌田佳宏、三善英知.

19) 2014年11月24日 口頭発表
糖鎖改変肝がん細胞におけるHBVの発現の変化. 第95回日本化学会年会 日本大学理学部船橋キャンパス/薬学部. 李 昊晟、真鍋良幸、徳永健斗、野中祐二、寺尾尚子、高松真二、種村匡弘、三善英知、深瀬浩一.

20) 2015年3月27日ポスター発表. Development of novel tumor immunotherapy using synthetic α -Gal epitope as an adjuvant
楊 瀟瀟、真鍋良幸、笠原里実、高松真二、三善英知、深瀬浩一.

21) 2015年3月28日ポスター発表. High-throughput screening of fucosyltransferase 8 inhibitors and study for inhibitory mechanism of the hit compound

22) 第40回日本肝臓学会東部会シンポジウム. 2014年11月27日 京王プラザ(東京). 鎌田佳宏、竹原徹郎、三善英知.

NAFLD患者の血中フェチュインAは肝臓線維と動脈硬化の程度に逆相関する.

23) 第9回 日本ケミカルバイオロジー学会 . 2014年6月11-13日 大阪大学会館(大阪大学豊中キャンパス) ポスター発表. 笠原里実、真鍋良幸、高松真二、三善英知、深瀬浩一.
蛍光偏光法を用いた High Throughput Screening による Fut8 阻害剤の探索

知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

該当なし

実用新案登録

該当なし

その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
分担研究報告書

HBV感染機構に寄与するHBV表面抗原由来糖鎖構造の解析

研究分担者 三崎 亮

大阪大学 生物工学国際交流センター 講師

研究要旨：これまでに、糖鎖はタンパク質の分解からの保護や生理活性に寄与するだけでなく、癌の悪性化など病態とも密接に関わることが分かってきた。いくつかのウイルス感染とも密接な関係にあることが指摘されており、HBVに関してもその感染に糖鎖が必要であることが報告されている。しかし、実際にウイルスもしくは宿主細胞由来のどのような糖鎖構造がウイルス感染や病態発症機構に寄与するのかについては明らかにされていない。本研究課題では、「*in vitro*糖鎖改変技術」「糖鎖構造解析技術」「タンパク質細胞内輸送経路解析技術」の3技術を駆使することで、ウイルスおよび宿主細胞由来糖鎖構造とHBV病態発症機構との関係解明に迫り、「糖鎖を標的とした治療戦略の開発」を目指す。

A. 研究目的

本研究では、HBV 表面抗原糖鎖の改変とHBV 感染細胞の糖鎖修飾変動からHBV 病態発症機序の解明を行い、糖鎖を標的とした創薬を目指す。

HBV 表面抗原の糖鎖改変については、他研究分担者（黒田チーム）が作成した bio-nanocapsule (BNC) を受容体基質として利用する。糖転移活性を持つエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼM

(EndoM) のうち、加水分解活性を低下させた変異型 EndoM-N175Q を用いた酵素学的反応により、BNC の糖鎖を *in vitro* にて改変するシステムの構築を目指す。一方で、糖鎖改変にはウイルス粒子をはじめ受容体基質となるタンパク質量の確保が重要課題である。このため、受容体基質としての

HBV 様粒子については、当研究分担者サイドでも、昆虫細胞・バキュロウイルス発現系等を利用しHBV 膜タンパク質を持つウイルス様粒子の作成を進める。

また、HBV 感染が宿主細胞の糖鎖分布にどのような影響を及ぼすのか、HBV ゲノム遺伝子発現細胞 HB611（三善チームより提供）の糖鎖プロファイルを作成し解析する。特に、ウイルス感染は標的細胞の細胞膜タンパク質との相互作用が重要であると考えられることから、本年度ではHB611 細胞の膜タンパク質糖鎖構造のプロファイリングを行う。また、昨年度までの研究成果からHBV 関連遺伝子を発現する細胞ではフコース結合型糖鎖の存在比が増加していることが示されているため、当該フコース結合を触媒するフコース転移酵素の遺伝子をノックダ

ウンした HB611（三善チームより提供）の糖鎖構造についても解析を行う。

B. 研究方法

○EndoM-N175Q を利用した糖鎖改変

まず、実験系を確立するため、モデルタンパク質としてウシ由来リボヌクレアーゼ B (RNaseB) を受容体基質とし糖鎖改変を行った。RNaseB に付加されている高マンノース型糖鎖をエンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ H (EndoH) で加水分解し、高温条件下で EndoH を失活した。次に、供与体基質としてシアル酸 (Sia) 2 残基、ガラクトース (Gal) 2 残基、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 2 残基、マンノース (Man) 3 残基、GlcNAc が 2 残基から成る糖鎖 Sia₂Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ (シアリルバイアンテナ型) を持つシアリルグリコペプチドを添加し、EndoM-N175Q を用いて 30°C で 12 時間インキュベートした。酵素反応産物に対して電気泳動し染色することで糖転移効率を確認した。また、糖転移効率を上げるためグリコペプチドの代替供与体基質としてオキサゾリン化シアリルバイアンテナ型糖鎖を用いて同様の糖転移を行った。

○昆虫細胞を利用した HBV 様粒子の作成

昆虫培養細胞 Sf9 株を宿主として、バキュロウイルスタンパク質発現系を用いて HBV 様粒子の生産を試みた。L タンパク質に加え、S および C タンパク質発現用ベクターを作成し、全てのベクターをコトランスフェクションすることで HBV 様粒子の生産および培養液中への分泌を試みた。最適

な生産効率を得るために培養期間を適宜振り分け、培養液については培養終了後にアセトン沈殿することでタンパク質を回収し、ウエスタンブロットニングにより目的タンパク質の生産・分泌を確認した。

○糖鎖プロファイルの作成

培養後の細胞を PBS で入念に洗浄し、グルタルアルデヒドで固定した。メタノール・クロロホルム処理した固定化細胞試料に対し、グリコペプチダーゼ F を添加し膜タンパク質由来の糖鎖を切り出した。調製した糖鎖に対して 2-アミノピリジンを付加し還元することで糖鎖のピリジルアミノ (PA) 化蛍光標識を行った。次に、試料をフェノール・クロロホルム抽出し、未反応 2-アミノピリジンを除去した。

糖鎖構造の分析には、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) および液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) を用いた。上記において調製した PA 化糖鎖について、まず酸性糖の分離・精製を行うために陰イオン交換カラムを用いた HPLC に供した。得られたピークを回収し乾燥後、続いてオクタデシルシリル基を有するカラムを用いた逆相 HPLC に供した (中性糖の分離・精製)。同様に得られたピークを回収し、アミノカラムを用いた液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) に供して糖鎖の分子量を決定した。更に、MS/MS を行うことで糖鎖構造を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究課題で使用する研究材料については、培養細胞等について一般的なものであ