

201423034A

厚生労働省科学研究費補助金

肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）

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
(H24- B創-肝炎-一般-007)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 成松 久

平成 27 (2015) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告	1
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 〈研究代表者〉 成松 久 (資料) 班会議開催記録	
II. 分担研究報告	
課題 1. HBV (HBs 抗原) の糖鎖解析	17
・ 溝上 雅史、杉山 真也 ・ 是永 匡紹、杉山 真也 ・ 梶 裕之、久野 敦、伊藤 浩美、田尻 和人、是永 匡紹	
課題 2. HBV 感染可能細胞の糖鎖解析	31
榎谷内 晶、梶 裕之、伊藤 浩美、安形 清彦、尾曲 克己、飯島 沙幸	
課題 3. HBV-宿主細胞における糖鎖の役割	39
館野 浩章、佐藤 隆、飯島 沙幸	
課題 4. 糖鎖改変の HBV の増殖・感染能への影響	43
・ 米田 政志、伊藤 清顕 ・ 安形 清彦、榎谷内 晶、佐藤 隆	
課題 5. 糖鎖修飾を受けた HBs 抗原の大量精製	53
千葉 靖典、佐藤 隆、榎谷内 晶、安形 清彦、成松 久	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	61
IV. 研究成果の刊行物・別刷	67

「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」

平成 26 年度 研究参画者

(平成 27 年 3 月 31 日 現在)

氏名	所属	職名
成松 久	独立行政法人産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター	招聘研究員
溝上 雅史	独立行政法人国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター	センター長
是永 匡紹	独立行政法人国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター 肝疾患研修室	室長
杉山 真也	独立行政法人国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター	主任研究員
辻 美保子	独立行政法人国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター	実験補助員
米田 政志	学校法人愛知医科大学 医学部 内科学講座（消化器内科）	教授
伊藤 清顕	学校法人愛知医科大学 医学部 内科学講座（消化器内科）	准教授
奥津 佐恵子	学校法人愛知医科大学 医学部 内科学講座（消化器内科）	研究補助員
鈴木 小百合	学校法人愛知医科大学 医学部 内科学講座（消化器内科）	研究補助員
田尻 和人	国立大学法人富山大学 医学薬学研究部 第三内科 助教	助教
尾曲 克己	公立大学法人名古屋市立大学大学院 医学研究科 病態医科学（ウイルス学）	助教
飯島 沙幸	公立大学法人名古屋市立大学大学院 医学研究科 病態医科学（ウイルス学）	助教
伊藤 浩美	公立大学法人福島県立医科大学 医学部 生化学講座	助教
梶 裕之	独立行政法人産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 標的糖鎖探索チーム	チーム長
千葉 靖典	独立行政法人産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 標的分子評価研究チーム	チーム長
久野 敦	独立行政法人産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 標的糖鎖探索チーム	上級主任研究員

氏名	所属	職名
榎谷内 晶	独立行政法人産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 標的糖鎖探索チーム	主任研究員
佐藤 隆	独立行政法人産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 標的糖鎖探索チーム	主任研究員
舘野 浩章	独立行政法人産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター 糖鎖レクチン工学研究チーム	主任研究員
安形 清彦	独立行政法人産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 創薬技術開発チーム	招聘研究員
助川 昌子	独立行政法人産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 標的糖鎖探索チーム	技術員
我妻 孝則	独立行政法人産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 標的糖鎖探索チーム	技術員
辻川 紫華子	独立行政法人産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 創薬技術開発チーム	技術員
齊藤 佐代子	独立行政法人産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター 糖鎖レクチン工学研究チーム	技術員
平野 朋子	独立行政法人産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 標的糖鎖探索チーム	技術員
高野 慶子	独立行政法人産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 創薬技術開発チーム	技術員（派遣）
黒須 克恵	独立行政法人産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 標的糖鎖探索チーム	技術員
高野 等覚	独立行政法人産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 標的分子評価研究チーム	技術員

I . 総括研究報告

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

研究代表者 成松 久 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 招聘研究員

研究要旨：本研究の目的は、B型肝炎ウイルス(HBV)の感染過程における糖鎖の役割を明らかにし、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事である。B型肝炎の治療には、HBV感染や複製の研究に基づきアナログ製剤の様にHBVの制御に向けた創薬が重要である。そこで本研究では、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の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の協力体制（医工連携体制）により、HBV感染における糖鎖の機能を解析し、HBVに対する創薬実用化を図っている。

本研究において平成26年度に以下の成果を得た。

1) HBV (HBs 抗原) の糖鎖解析と応用： 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抗原サンプルから、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や糖鎖構造の同定およびミリスチル化やアセチル化も同定し、HBV感染とワクチン開発の基礎情報を取得した。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）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、背景肝の異なるHBV感染患者の血清を調製し、開発したレクチンアレイ解析を行い糖鎖プロファイリングによる基礎情報を収集した。

2) HBV感染可能細胞と非感染可能細胞との比較解析：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、感染可能な肝細胞と感染出来ない肝癌細胞について糖鎖遺伝子定量システム（qRT-PCR）や次世代シーケンサー、バイオインフォマティクス解析、質量分析器（MS）によるグライコム解析を行い、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）の発現と糖鎖構造の差を解析した。

3) HBV-宿主細胞における糖鎖の役割：HBV感染実験においてグリコシダーゼやレクチンの影響が明らかになり、HBV上の糖鎖が感染効率に影響することが示唆された。次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析から、HBV感染に関与する内在性レクチンの候補分子をリストアップした。また、NTCP発現HuH7細胞を複数株作製し、感染モデルを構築した。合成ペプチド（Myr-PreS1(long)-FAM）との結合を確認した。

4) 糖鎖改変の HBV の増殖・感染能への影響：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、糖鎖合成の阻害剤が HBs 抗原の糖鎖付加や分泌を抑制する事を確認した。糖鎖遺伝子 siRNA スクリーニング系を構築し HBV 粒子の形成・分泌能を解析した結果、HBV 作成実験でも HBV DNA を減少させる幾つかのターゲット遺伝子を選出した。siRNA-X はラミブジンやエンテカビルと同レベルで HBV 分泌 (HBs 抗原、HBV DNA) を抑制した。

5) 糖鎖修飾を受けた HBs 抗原の大量精製：出芽酵母を用いた HBs 抗原の生産を試み、N-型糖鎖が付加された HBs 抗原を培地中に分泌する酵母の育種を行った。培地中から3種のカラムを用いた精製を行うとともに、菌体内からの抽出法の確立と超遠心法による糖鎖付加型 HBs 抗原の調製を行い、糖鎖付き HBs 抗原の精製法を確立した。また、糖鎖付き PreS1 ペプチド及び L-HBs や M-HBs 免疫マウス血清を用い、各種抗原(L-HBs, S-HBs, PreS1, PreS2)に対する反応性を S-HBs 抗原と比較解析した。L-HBs 免疫血清はどの抗原に対しても反応性が亢進し、特に PreS1 の反応が比較的良く、ワクチンとしての有用性が示唆された。

以上の研究により、今後さらに他研究グループと連携し、糖鎖を利用した多検体検査による病態解析、B型肝炎を治療する新規治療薬の開発や HBV の感染を防ぐワクチンの実用化へ繋げる。

研究分担者

溝上 雅史 国立国際医療研究センター
肝炎・免疫研究センター長
是永 匡紹 同 肝疾患研修室長
米田 政志 愛知医科大学 医学部 内科学
講座 (消化器内科) 教授
伊藤 清顕 同 准教授
尾曲 克己 名古屋市立大学大学院 医学
研究科 病態医科学 (ウイルス
学) 助教
田尻 和人 富山大学 医学薬学研究部 第
三内科 助教
伊藤 浩美 福島県立医科大学 医学部 生
化学講座 助教
梶 裕之 産業技術総合研究所 糖鎖創
薬技術研究センター 研究チー
ム長

舘野 浩章 同 幹細胞工学研究センター
主任研究員

千葉 靖典 同 糖鎖創薬技術研究センタ
ー 研究チーム長

久野 敦 同 上級主任研究員

榎谷内 晶 同 主任研究員

佐藤 隆 同 主任研究員

安形 清彦 同 招聘研究員

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 主任
研究員

飯島 沙幸 名古屋市立大学大学院 医学
研究科 病態医科学 (ウイルス
学) 助教

A. 研究目的

現在、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。現在 B 型肝炎の治療の選択は主に IFN と核酸アナログ薬である。しかし B 型肝炎においては IFN による治療成績が悪い場合が多く、持続感染を防ぐための核酸アナログ薬の継続投与でも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の発見が重要な課題となっている。そこで、本研究では HBV の感染/複製機構をより詳細に理解し、これまでとは異なる視点から創薬ターゲットを探求する必要があると考える。

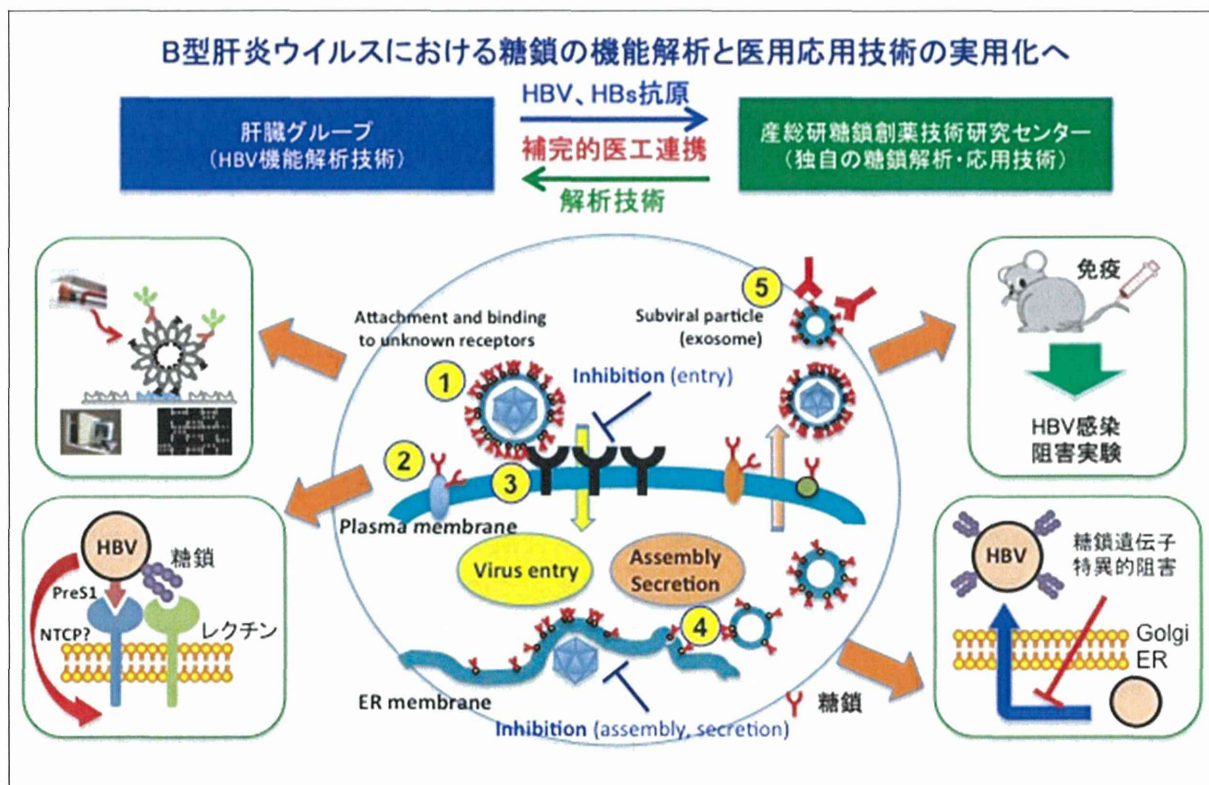
一方、最近のウイルスの感染機構の解明により、糖鎖や糖タンパク質が様々なウイルスの受容体となっている事が明らかになりつつあり、糖鎖関連分子が HBV の接着・侵入に関わっている可能性が考えられる。また伊藤らの研究により (Ito K et al. J Virol. 2010)、HBs 抗原上の糖鎖が感染性 HBV の粒子形成・分泌に重要である事が示唆されており、糖鎖修飾や糖鎖合成系が HBV 制御に向けた創薬のターゲットとなる可能性が考えられた。すなわち、HBV の感染過程における糖鎖研究は、抗 HBV 薬を効率的に開発する上で重要な課題である。

また、HBV 感染によって急性肝炎、あるいは慢性肝炎による肝硬変や肝がんの発症や自然治癒は患者により多種多様である。肝炎の進行や治療法の選択は効率的な治療と治療費削減において重要である。本研究では、肝線維化マーカーを発見した技術を基に患者血清中の HBV のスクリーニングや抗体に依る HBs 検出を逃れる変異 HBV を検出できる技術の開発を目指す。新規の測定法により、HBV の自然治癒と発症との関連性が明らかになれば、HBV 感染患者の治

療方針を決める資料となることが期待される。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。

現在ほとんどの国や地域で HBV に対するユニバーサルワクチネーションが行われているにも拘らず、我が国ではユニバーサルワクチネーションが行われていないこともあり、新規感染患者の発症を防ぐ事は難しいと考えられる。平成 27 年になり、HBV ワクチンの公費接種への施策変換が提言された。現行のワクチンは約 90% 近くの接種者に抗体獲得が見られる。しかし、近年の研究ではオカルトインフェクションや HBV ワクチン接種者に感染する HBV などが報告されつつあり、新世代の HBV ワクチンの開発が期待されている。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 感染防御に繋がる。さらに、現行のワクチンは 3 回接種が標準であり、公費接種の場合その費用が大きな問題となる。従って効率良い抗体獲得を誘導できるワクチン開発が期待され、ユニバーサルワクチネーション化の実施には必須である。

以上の様に本研究は、HBV の糖鎖構造を解析し多検体診断への応用、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 の創薬ターゲットの同定、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探索、ヒト型糖鎖を持つ HBs 抗原を大量調製し新規ワクチンの開発など糖鎖を利用した HBV 感染の防御と治療を目指す。(図 1)



B. 研究方法

本研究班では、HBV 感染における糖鎖の機能を解析し、HBV に対する創薬実用化を図るために、最先端の糖鎖機能解析技術を開発・実用化して来た産総研・糖鎖医工学研究センター（統括：成松）と肝疾患や HBV 作製・感染実験の専門家から構成される肝臓グループ（統括：溝上）とが協力体制（医工連携体制）を構築して進めた。

(1) HBV (HBs 抗原) の糖鎖解析：

HBV のエンベロープタンパク質 (L-, M-, S-HBs 抗原) における、糖鎖の有無や他の翻訳後修飾を解析するために、血清より得られた精製 HBs 抗原を用いて質量分析装置を用いたグライコプロテオミクス解析法を検討し、精製 HBs 抗原上の糖鎖付加位置決定を行った。さらに、糖ペプチドを試料として、質量分析法で糖鎖構造解析を行った。HBs 抗原上の糖鎖の有無と HBs 抗原の構造の関連性を調べるためにプロテアーゼ

処理と SDS-PAGE や MS により検討した。

ワクチン接種により誘導された B 細胞クローンに由来するヒト抗 HBs 抗原抗体の精製 HBs 抗原に対するウエスタンブロットの結果から、糖鎖を認識するレクチンと抗体の組み合わせによる新規 HBs 抗原の検出法を検討した。

次に、治療履歴や HBV DNA のコピー数、genotype の違いなど背景肝の異なる HBV 感染患者の血清の調製法を検討し、開発したレクチンアレイ解析を行い糖鎖プロファイリングによる基礎情報を収集した。

(2) HBV 感染可能細胞の解析：

一次培養肝細胞は HBV 感染可能細胞であるが、継続培養すると次第に HBV が感染できなくなる。HBV 感染と糖鎖関連分子との関係を解析するために、ヒト肝臓キメラマウスから肝細胞を調製し、一週間ごとに回収し、糖タンパク質を SDS-PAGE と銀染色により解析し、またレクチンアレイによって糖鎖プロファイリングを解析

した。同時に一部の培養細胞に HBV を添加し感染効率を確認した。

さらに、培養開始後 1 週間と 3 週間のキメラマウス由来のヒト肝細胞や感染できない肝がん細胞から total RNA を調製し、次世代シーケンサーを用いトランスクリプトーム解析を行った。NTCP を含め、糖鎖関連遺伝子の発現量解析を行った。また HBV 感染に関与する宿主細胞上糖鎖認識分子（内在性レクチン）の探索を網羅的に進めるために、次世代シーケンサーの結果を基に、レクチン様分子の検索を行なった。

(3) HBV-宿主細胞間相互作用機構の解明：

HBV 上の糖鎖が如何に HBV 感染に関与するかを明らかにするために、患者由来の調製 HBV を用いた感染実験を行った。感染量は HBs 抗原に対する ELISA と HBV DNA に対する qPCR によって定量した。上述の候補レクチンの cDNA をクローニングし、発現させたレクチンを用い HBV と同時にキメラマウス由来のヒト肝細胞に添加し、その影響を解析した。また精製したレクチンをアレイに固定化し、ラベル化した HBs 抗原と各レクチン様分子との結合を解析した。

さらに、患者由来の調製 HBV をグリコシダーゼ処理し、同様に HBV 感染実験を行った。グリコシダーゼの効果は血清由来の精製 HBs 抗原を用い、レクチンアレイにより判別した。

NTCP を発現する HepG2+NTCP-C4 細胞を感染症研究所（渡士先生）から取得し、HBs 抗原の結合実験を行った。蛍光ラベルした Myr-PreS1 を HepG2+NTCP 細胞に添加し FACS により結合率を測定した。細胞による違いを解析するために、HuH7 細胞にタグ化した NTCP cDNA を発現する安定株を作成し、Myr-PreS1 との結合実験を行った。

(4) 糖鎖改変の HBV の増殖・感染能への影響：

タグ付き HBs 抗原を HuH7 細胞で発現させ、糖鎖合成系阻害剤を添加する事により、HBs 抗原の分泌への影響をウエスタンブロットティングにより解析した。

肝臓細胞の次世代シーケンサーの結果を基に糖鎖遺伝子発現解析を行い、発現パターンで 2 群（抑制目的と過剰発現目的）に分け、cDNA ライブラリーと siRNA ライブラリーを作成した。糖鎖遺伝子 cDNA は産総研で作製された糖鎖遺伝子ライブラリーから PCR で増幅し、新規に作成した発現ベクターにクローニングした。siRNA ライブラリーは各糖鎖遺伝子に 3 つの siRNA を合成し、同量ずつを混ぜた後にウエルに加え形質転換した。愛知医科大学（大臣確認の申請済み）にて、HBV を産生する Hep2.2.15.7 細胞（感染症研究所より入手）を用い siRNA ライブラリーのスクリーニングを行った。形質転換後に培養上清を回収し、ELISA 法による HBs 抗原の発現量、PCR 法による HBV DNA の定量などを行い、HBV 分泌への影響を解析した。

効果の確認された siRNA について、一つずつの siRNA を用いて 2 次スクリーニングを行った。候補 siRNA の細胞への影響は MTT アッセイ、レクチンブロットティング、トランスクリプトーム解析などを実施して解析した。

(5) 糖鎖修飾を受けた HBs 抗原の大量精製：現在 S-HBs 抗原がワクチンとして用いられており、糖鎖修飾はされていない。ワクチンとして適したペプチドあるいは HBs 抗原を決定するために、市販の L-HBs, HuH7 細胞に形質転換した M-HBs, PreS1, PreS2 を 8 週齢のマウスに摂取し、1 週間ごとに採血した。抗体価の上昇は ELISA 法により確認した。コントロールとして市販のワクチンを免疫した。N 型糖鎖付きのペプチドはトランスグリコシレーションにより付加した。

ヒト型糖鎖付き L-HBs 抗原を出芽酵母で発

現する目的で、L-HBs 抗原をコードする遺伝子を出芽酵母に最適なコドンに変換し全合成を行い、出芽酵母の発現ベクターに組み込んだ。酵母の形質転換で得られたクローンを培養し、菌体内から超遠心や透析により L-HBs 抗原を分離精製した。L-HBs 抗原は SDS-PAGE により展開し Oriole 染色やウエスタンブロッティングで確認した。

(倫理面への配慮)

本研究課題を進めるにあたり、文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成25年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）」、遺伝医学関連10学会より提案された「遺伝学的検査に関するガイドライン」、厚生労働省・文部科学省「疫学研究に関する倫理指針（平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号）」を遵守している。また、必要な実験承認を受けるために研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意（インフォームド・コンセント）また厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）を含めた各種手続き（産総研：遺伝子組換え実験、微生物実験、ヒト由来試料実験倫理審査；国際医療研究センター：HBs 抗原の精製や臨床検体収集に伴う倫理委員会申請；愛知医科大学及び名古屋市立大学：HBV 作製に関する文部科学大臣確認）を行い、許可の承認を得ている。実験に関わる研究者及び技術者にワクチン接種と血液検査 HBV 取り扱いにおける諸注意を周知するなど実施体制を整えている。

C. 研究結果

(1) HBV (HBs 抗原) の糖鎖解析とその応用：
これまでに質量分析装置を用いて HBs 抗原の

糖鎖付加位置と構造解析を行った結果、L-HBs 抗原の Pre-S1 領域の N 型糖鎖、M-HBs 抗原の PreS2 領域の N 型糖鎖、S-HBs 抗原の N 型糖鎖が特定され、Mono, di-sialyl 化した 2 本鎖が付加していた。これ以外の N 型糖鎖構造が検出されておらず、HBs 抗原上の糖鎖構造はほぼ類似の構造であることが示唆された。また、Genotype D や一部の HBs 抗原を除き L-HBs 抗原の N 末には開始メチオニンが 2 箇所あり、1 番目のメチオニン後のグリシンがミリスチル化されていることが確認された。ミリスチル化と糖鎖付加が同一分子に存在しているかを解析中である。さらに M-HBs の N 末端メチオニンは部分的にアセチル化および酸化されていた。また、PreS2 領域に O 型糖鎖の存在が確認されたが、これが M-HBs、L-HBs のいずれに存在するか、質量分析では確認されなかった。

HBV 検出のために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）とレクチンを比較した結果、抗体は糖鎖を有する HBs 抗原を認識しないが、抗体で免疫沈降した HBV 由来粒子は糖鎖を有する HBs 抗原のみを認識するレクチンによって検出されることが明らかになった。そこで、患者血清からの HBs 抗原の糖鎖プロファイリングを進めた結果、ヒトのクローン抗体とレクチンを組み合わせ、ナノグラムオーダーの HBV を破壊せず糖鎖構造情報を取得する方法を確立した。

次に背景肝の異なる患者サンプル（HBV DNA コピー数、抗原量、治療、HBV genotype など）を用いて解析した結果、抗体に比べて糖鎖を認識するレクチンと HBV 量との相関性が観察された。

(2) HBV 感染可能細胞の解析：

ヒト肝臓由来の一次培養細胞は感染可能だが、肝がん細胞にはほとんど HBV が感染しない。そこで、ヒト肝細胞と 5 種の肝がん細胞から

RNA を抽出しトランスクリプトーム解析を行った。約 250 種の糖鎖関連遺伝子と薬 550 種のレクチン様遺伝子のリストを用いて発現プロファイルを解析し、有意に発現量の異なる遺伝子をリストアップすることに成功した。

ヒト肝キメラマウス由来の肝細胞を培養し、感染能の変化と糖鎖プロファイリングとタンパク質の定量を行った。HBV 感染能は培養時間に伴い減少していくことが確認された。肝細胞サンプルを SDS-PAGE 後に銀染色した結果、3 週間くらいを境に有意にタンパク質のパターンに変化が見られた。レクチンアレイで解析した結果糖鎖プロファイリングは徐々に変化し、5 週間後では培養開始後とは大きく異なることが明らかにになった。

培養開始後と感染能が低くなった 3 週間後の細胞から RNA を回収し qRT-PCR や RNA-seq によりトランスクリプトーム解析を行い、HBV 受容体候補として報告されているタンパク質の発現量を比較した結果、NTCP や ASGR2 などの発現量は有意に低下していることが明らかになった。

(3) HBV-宿主細胞間相互作用機構の解明：HBV 上の糖鎖が感染において如何に関与しているかを解析するために、HBV をグリコシダーゼ処理して HBV 感染実験を行った。感染に用いた HBV は genotype C でヒト肝細胞に感染・増幅させ、タイターを測定して使用した。一種のグリコシダーゼ処理によって HBV 感染が上昇することが示された。

HBs 抗原を認識するレクチンの選択するため、上述の解析結果を基に肝細胞で発現しているレクチンをリストアップした。リコンビナントを発現し HBs 抗原との結合能の解析を進めた結果、HBV 上の糖鎖特異的にレクチンと結合することが確認された。そこでリコンビナントレクチン存在下で HBV 感染実験を行った結果、

HBV 結合性レクチンは HBV の感染を低下させることが示された。さらに約 20 種のレクチン様分子を取得しており、siRNA などの用い HBV 感染実験を行っている。

Huh7 細胞に NTCP cDNA を導入し Myr-Pre-S1 に結合する Huh7+NTCP クローンを得た。ASGR などの内在性レクチンの発現量が異なるクローンを取得することに成功し、HBV 感染実験を行った。また合成ペプチド Myr-PreS1(long)や Myr-PreS1(+N-Gly)を作成し HuH7+NTCP 細胞に結合することを確認した。

(4) 糖鎖改変の HBV の増殖・感染能への影響：

M-HBs, S-HBs 抗原を分泌する系を開発し、まず糖鎖合成阻害剤を用い HBV の分泌への影響を解析した。ツニカマイシンなど幾つかの糖鎖合成阻害剤は効率よく HBs 抗原分泌を抑制したが、HBV 阻害活性が報告されている幾つかの薬剤については、我々の実験では阻害活性は低かった。

課題 2 より得られた糖鎖遺伝子発現量の解析結果を基に、86 種の siRNA 固定化プレートを作製し、HBs 抗原の分泌への影響や HepG2.2.15 細胞を用い HBV 粒子合成阻害を検討した。幾つかの siRNA で 70% 程度の阻害活性が見られており、HBs 抗原上の糖鎖修飾を阻害する事や、HBV DNA を含む感染可能な HBV 粒子を減少させる事が明らかになった。さらに二次スクリーニングを行い最も良く HBV 粒子合成を阻害する siRNA をリストアップした。そのうちの一つの siRNA で顕著に HBV DNA を有する HBV 粒子を減少させる事が出来たので特許申請を行った。

siRNA の効果を糖鎖合成阻害剤と比較した結果、アポトーシス、細胞毒性、AFP 分泌への影響、レクチンプロッティングへの影響などはほ

とんど確認されなかった。HuH7細胞を siRNA で形質転換し、RNA 調製後にトランスクリプトーム解析し siRNA の影響の解析を行った。

(5) 糖鎖修飾を受けた HBs 抗原の大量精製：現行の HBV ワクチンには酵母由来の S-HBs 抗原が用いられているが、ワクチン接種に最良の HBs 抗原を使用するために、免疫実験を行い抗体価の測定を行った。まず PreS1 や PreS2 などのペプチドのみでは抗体誘導効果が見られなかった。Myr 化した Myr-PreS1 でも機能しない事から、L-HBs や M-HBs 抗原を免疫源とした。現行のワクチンをコントロールとして用い、酵母由来の L-HBs 抗原と比較した場合、L-HBs 抗原の抗体価の上昇が早いことが確認された。ヒト型糖鎖の影響を解析するために、HuH7 細胞で発現させた M-HBs 抗原を免疫した結果、糖鎖の影響が L-HBs 抗原程ではないが S-HBs 抗原より良好な抗体価の上昇が見られた。血清を用いてウエスタンブロッティングを行った結果、L-HBs 抗原接種後の抗体は S 領域よりも PreS1 や PreS2 領域を認識する抗体が多いことがわかり、PreS1 や PreS2 領域のワクチンとしての有用性が明らかになった。

免疫後に得られた脾臓細胞は富山大に送られ抗原を認識する抗体を産生する細胞から迅速スクリーニングを行っており、HBIG に代わる中和抗体の取得を目指している。まず L-HBs 抗原接種マウスの脾臓細胞から約 100 個ほどの PreS1 ペプチド認識抗体がクローンされた。現在詳しく解析中である。また他の HBs 抗原接種マウスの脾臓細胞からもクローニングを進めている。

ワクチンとしての効率を上げること、またエスケープミュータントへの対応、治療への応用を目的として、糖鎖付加 HBs 抗原の大量発現系の開発を行っている。酵母で L-HBs 抗原を生産し、菌体内からの精製を試みており、超遠心

を用いて単一のバンドにまで精製が進んでおり、今後免疫実験を行う予定である。酵母由来の L-HBs 抗原に比べて、糖鎖の付加が複数あることが確認された。他の方法として酵素学的に二本差糖鎖を転移させ、ワクチンとしての効果を検討する予定である。

上述の様に、ワクチン接種者から取得された抗体は糖鎖の有る HBs 抗原を検出できない場合が多い。抗原性の高い a 領域中のループ 2 の N146 に糖鎖を付加したペプチドや G145A の変異ペプチドを調製した。現在ワクチン接種者から取得された抗体を用いて結合実験を実施し糖鎖の影響を解析中である。

D. 考察

(1) これまでの HBs 抗原の糖鎖付加位置と構造解析を行った結果、L-HBs 抗原の PreS1 領域の N 型糖鎖、M-HBs 抗原の PreS2 領域の N 型と O 型糖鎖、S-HBs 抗原の N 型糖鎖が特定された。今後、L-HBs, M-HBs, S-HBs 抗原に共通する領域の N 型糖鎖や O 型糖鎖の有無や L-HBs の N 末のミリスチル化と糖鎖付加が同一分子に存在するかなど明らかにすればほぼ全容が判明し、HBV ワクチンが模すべき HBs 抗原の構造が明らかになる。

PreS2 抗体を用いた M-HBs 抗原の検出よりレクチンを用いた方が感度よく検出できており、PreS2 抗体は L-HBs 抗原も認識してしまうのに対しレクチンが M-HBs 抗原のみを検出できる場合があり、感染性 HBV (Dane 粒子) を測定する技術として期待される。すなわちレクチンを用いた新規検出系によって、病態との関連性を診断できる可能性が考えられる。今後さらに肝線維化や肝がんの患者サンプルを増やし、Dane 粒子の新規検出法の開発へ繋げる。

(2) 肝がん細胞への HBV 感染が成立しないことから、HBV の持続感染系の確立が重要な課

題となっている。当班ではヒト肝細胞の長期培養によって HBV 感染効率が低下することに着目し、糖鎖関連遺伝子とレクチン様遺伝子を中心にトランスクリプトーム解析を行った。糖タンパク質や糖鎖のプロファイルも3週間後くらいを境に大きく変化することは興味深く、同時期に HBV 感染に必要な遺伝子の発現も変動していると考えられる。

(3) HBV 上の糖鎖を解析した結果は単純な糖鎖構造が付加されていることを示していたが、グリコシダーゼ処理によって HBV 感染効率が変化することは、HBV 上の糖鎖の役割を示唆している。例えば、肝臓への特異性よりも HBV の取り込みに関与している可能性を示唆する。実際に NTCP の安定発現細胞はヒト肝細胞より多く発現しているにも関わらず感染効率は発現量に比例していないことから、HBV の共受容体が存在している可能性が考えられる。1-3 週間の PHH 細胞や国立感染研より入手した HepG2+NTCP 細胞の次世代シーケンサーのトランスクリプトーム解析から、NTCP 以外で発現量が大きく変化するレクチン様分子をリストアップした。今後 HepG2+NTCP 細胞でレクチン様分子を発現し HBs 抗原との結合能の解析や HBV 感染実験を行うと共に、PHH 細胞を siRNA 処理し HBV 感染への影響を解析し、HBV の共受容体の発見に繋げたい。

(4) HBs 抗原上の糖鎖は HBV の分泌や抗体からの保護に関与している事が示唆されている。実際にツニカマイシンなどの糖鎖合成阻害剤を用いると低濃度でも SVP の分泌が抑制されたが、創薬を考えた場合、毒性や濃度の基準化や肝臓への DDS などを考える必要がある。本研究により明らかになった糖鎖遺伝子の機能と siRNA の肝細胞に対する影響を明らかにするとともに、DDS の改変などを含め創薬に向け

て検討していく必要がある。

(5) 現行のワクチンは、年齢にもよるがほぼ 90% の接種者で抗体獲得が見られる。しかしながら、これまで HBV ワクチン行政で常識でないことが起きている。例えば、ワクチン接種者が HBV に感染する事例、感染しているパートナーからの感染、ワクチンとは異なる genotype の HBV 感染などがすでに報告されている。今年の初めに HBV ワクチンを全員公費接種への提言がなされたことを考えると、最も変異が起きやすい S 領域のワクチンだけでは新たな HBV を防げない可能性を考える必要がある。新規のワクチン開発を進め将来に備える意義は高い。また、十分な免疫獲得までに半年間で3回接種することが推奨されており、新生児にユニバーサルワクチネーションする場合の費用が問題になる可能性がある。L-HBs や M-HBs 抗原の免疫では S-HBs 抗原の免疫より抗体価の上昇が早かったことから、免疫回数が減少されれば公費接種の費用削減に繋がる可能性がある。

E. 結論

(1) B 型肝炎患者血清より調製されたサブヴァイラルパーティクル (SVP) における 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。質量分析によるミリストイル化やアセチル化も同定し、HBV 感染とワクチン開発の基礎情報を取得した。

(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) とレクチン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。

(3) HBV 感染患者の血清収集を準備し新規解析方法で測定した結果、HBV DNA 量と相関性

があるレクチンが明らかになり、新規解析法により疾患の進行状態を示唆できる可能性がある。

(4) HBV 感染実験においてグリコシダーゼやレクチンの影響が明らかになり、HBV 糖鎖が感染効率に影響することが示唆された。次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析から、HBV 感染に関与する内在性レクチンの候補分子をリストアップした

(5) ヒト肝臓キメラマウス由来培養肝細胞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。

(6) NTCP 発現 HuH7 細胞を複数株作製し、感染モデルを構築した。Myr-PreS1 (long) との結合を確認し、糖鎖及びレクチンの発現を次世代シーケンサーで解析した。

(7) 糖鎖遺伝子の発現結果を基に siRNA を用いた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 siRNA をターゲット候補とした。

(8) 糖鎖付き PreS1 ペプチド及び L-HBs や M-HBs 免疫マウス血清を用い、各種抗原 (L-HBs, S-HBs, PreS1, PreS2) に対する反応性を S-HBs 抗原と比較解析し、L-HBs の有用性を確認した。

(9) 酵母で L-HBs 抗原を生産し、菌体内からの精製法を確立した。市販の酵母由来の L-HBs 抗原に比べて、糖鎖の付加が複数あることが確

認され、糖鎖の抗原への影響を解析するのに有効と考えられた。

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

各課題の分担研究報告書へ記載する為、本稿では割愛する。

2. 学会発表

1) Narimatsu H. Glycosylation of HBV.

TASL-Japan Hepatitis B Workshop, April 19-20, 2014, Taipei

その他の学会発表は、各課題の分担研究報告書へ記載する為、本稿では割愛する。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

B型肝炎ウイルス分泌阻害剤に関する特許
審査請求：1件(特願 2015-084520)

2. 実用新案登録

該当事項なし。

3. その他

該当事項なし。

(班会議資料)

平成 24 年度より採択された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）「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」を円滑に実行するために、以下の合同班会議に参加し、班会議を開催した。

○ NTCP 関連合同班会議

開催日時： 平成 26 年 10 月 29 日（水） 13:00 ～ 18:00

場 所： 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター

出席者（敬称略）：（多数のため当班参加者のみ記載）溝上雅史、是永匡紹（以上、国立国際医療研究センター）、成松久、佐藤隆、安形清彦（以上、産総研）

○会議内容

1. 開会挨拶（世話人：溝上先生）

2. 各課題の発表と討論

- ・ 下遠野班
- ・ 脇田班
- ・ 田中班
- ・ 上田班
- ・ 藤田班
- ・ 成松班（成松、安形）

グリコシダーゼの HBV 感染への影響、RNA-seq による内在性レクチンのリストアップ、PreS1 における Myr 化とグリコシレーション、HepG2+NTCP 細胞の作成と Myr-PreS1 の結合実験

- ・ 小嶋班

3. 総合討論

宮村先生：各ステップで成果が出ており、科学的に国民に発信していく必要がある。

溝上先生：NTCP を研究する班が多数あるので、効率化を図り戦略的に進める必要がある。

概要：平成 24 年度より採択された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）の中で近年 HBV 受容体として注目されている NTCP を基礎研究と創薬研究に関わる 7 班が合同班会議を開催し、お互いの研究課題の理解を進めた。当研究班からは、成松研究代表と安形が発表した。

○ 平成 26 年度第一回班会議

開催日時： 平成 26 年 5 月 9 日（金） 14:00 ～ 18:00

場 所： TKP 品川カンファレンスセンター「カンファレンスルーム 6E」（京急第 10 ビル・6 階）

出席者（敬称略）： 溝上雅史、是永匡紹、正木尚彦（PO）（以上、国立国際医療研究センター）、久永拓郎、大座紀子（厚生労働省）、米田政志、伊藤清顕（愛知医科大学）、尾曲克己（名古屋市立大学）、田尻和人（富山大病院）、伊藤浩美（福島県立医科大学）、成松久、安形清彦、梶裕之、久野敦、千葉靖典、佐藤隆、竹原淳一、雄長誠、我妻孝則（以上、産総研）

○会議内容

1. 研究代表者挨拶（成松）
2. 最近の HBV 研究の動向（日台 HBV ワークショップ）（溝上先生）
3. 各課題の進捗状況（説明と討論）
 - ・ HBV 上の糖鎖の解析と利用（課題 1：久野、梶）
 - ・ 宿主側の糖鎖合成系とターゲット（課題 2 と 4：安形、伊藤先生）
 - ・ 肝細胞への感染に関する候補分子（課題 3：佐藤）
 - ・ 新規ワクチンの開発（課題 5：千葉）
4. 班会議総括
5. PO コメント
正木先生（国立国際医療研究センター）
久永専門官（厚生労働省）
6. 次回ミーティングについて

概要：本研究課題の進捗状況について班員が理解し討論するために第一回班会議を開催した。

これまで精製 HBs 抗原や肝がん細胞を用いて、レクチンアレイ、プロテオミクス解析、糖鎖解析、遺伝子発現解析（qRT-PCR, 次世代シーケンサー）を実施してきたが、今年度は国際医療研究センターで保管している患者由来の血清サンプルの解析すること、NTCP を発現する細胞と Pre-S1 結合実験系（国立感染研から導入）を用い Pre-S1 上の糖鎖の結合への影響を解析すること、siRNA スクリーニング系で得られた HBV 分泌阻害の候補遺伝子の解析を進めること、酵母で糖鎖付き L-HBs 抗原を生産することに加え、抗原の違いによる抗体価の上昇率への影響を解析することなど、本年度の研究方針と計画を確認した。

○ 平成 26 年度第二回班会議

開催日時： 平成 26 年 9 月 11 日（木） 15：15 ～ 18：00

場 所： 東京コンベンションルーム AP 品川「F+G ルーム」

出席者（敬称略）：溝上雅史、是永匡紹、正木尚彦（P.O）（以上、国立国際医療研究センター）、久永拓郎（厚生労働省・肝炎対策専門官）、米田政志、伊藤清顕（愛知医科大学）、尾曲克己（名古屋市立大学）、田尻和人（富山大病院）、伊藤浩美（福島県立医科大学）、成松久、安形清彦、梶裕之、久野敦、梅谷内晶、佐藤隆、竹原淳一、我妻孝則（以上、産総研）

○会議内容

1. 研究代表者挨拶（成松）
2. 最近の HBV 研究の動向（溝上先生）
3. 各課題の進捗状況（説明と討論）
 - ・ 宿主側の糖鎖合成系とターゲット（課題 2 と 4：安形、伊藤先生）
 - ・ 肝細胞への感染に関する候補分子（課題 3：佐藤）
 - ・ HBV 上の糖鎖の解析と利用（課題 1：梶、久野）
 - ・ 新規ワクチンの開発（課題 5：梅谷内）
4. 班会議総括
5. PO コメント
正木先生（国立国際医療研究センター）
厚生労働省久永専門官
6. 次回ミーティングについて

概要：本研究課題の進捗状況について班員が理解し討論するために第二回班会議を開催した。

前回の班会議からの成果として、HBV 分泌阻害の候補遺伝子の一つの siRNA で顕著に HBV DNA を有する HBV 粒子を減少させる事を確認、ミリストイル化や糖鎖の HBV 結合への影響を解析するために HBV と結合する NTCP を発現する HuH7+NTCP クローンを得、国際医療研究センターで保管している患者由来の血清サンプルの解析の進捗、抗体価を試験するための糖ペプチドや糖タンパク質の抗原の調製法、および抗体価測定の前進状況についての報告があり、討論を行った。

○ 平成 26 年度第三回班会議

開催日時： 平成 26 年 12 月 22 日（月） 14：30 ～ 18：30

場 所： 東京コンベンションルーム AP 品川「F+G ルーム」

出席者（敬称略）：溝上雅史、是永匡紹、正木尚彦（P.O）（以上、国立国際医療研究センター）、大座紀子（厚生労働省・肝炎対策推進室長補佐）、米田政志、伊藤清顕（愛知医科大学）、尾曲克己、飯島沙幸（名古屋市立大学）、伊藤浩美（福島県立医科大学）、安形清彦、梶裕之、千葉靖典、梶谷内晶、館野浩章、佐藤隆、我妻孝則、竹原淳一（以上、産総研）

○会議内容

1. 開会挨拶（肝臓グループ統括：溝上先生）
2. 各課題の進捗状況（説明と討論）
 - ・ 肝細胞への感染に関する候補分子（課題 3：飯島先生、佐藤）
 - ・ 宿主側の糖鎖合成系とターゲット（課題 2 と 4：安形、伊藤先生）
 - ・ HBV 上の糖鎖の解析と利用（課題 1：安形、梶）
 - ・ 新規ワクチンの開発（課題 5：梶谷内、千葉）
3. 班会議総括
4. PO コメント
正木先生（国立国際医療研究センター）
大座室長補佐（厚生労働省）
5. 次回ミーティングについて

概要：本研究課題の進捗状況について班員が理解し討論するために第三回班会議を開催した。

前回の班会議からの成果として、HBV 感染実験において一種のグリコシダーゼ処理によって HBV 感染が上昇することが示され、HBV 上の糖鎖が感染に関与している可能性が示唆された。阻害活性が見られている幾つかの siRNA の効果をエンテカビルなどの HBV 阻害薬と比較した。患者サンプルを解析した結果から、感染性 HBV（Dane 粒子）を測定する技術開発の可能性が示唆された。ワクチン接種のために最良の HBs 抗原を使用するために、免疫実験を行い抗体価を測定した結果が報告された。

○ 平成 26 年度第四回班会議

開催日時： 平成 27 年 3 月 6 日（金） 14：30 ～ 18：30

場 所： 東京コンベンションルーム AP 品川「E ルーム」

出席者（敬称略）：溝上雅史、是永匡紹（以上、国立国際医療研究センター）、大座紀子、横山 雄一郎（厚生労働省・肝炎対策推進室）、伊藤清顕（愛知医科大学）、尾曲克己、飯島沙幸（以上、名古屋市立大学）、田尻和人（富山大病院）、伊藤浩美（福島県立医科大学）、成松久、梶裕之、千葉靖典、久野敦、梶谷内晶、佐藤隆、舘野浩章、安形清彦、竹原淳一、我妻孝則（以上、産総研）

○会議内容

1. 研究代表者挨拶（成松）

2. 最近の HBV 研究の動向

溝上先生（国立国際医療研究センター）

横山先生（厚生労働省）

3. 各課題の進捗状況（説明と討論）

- ・ HBV 上の糖鎖の解析と利用（課題 1：久野）
- ・ 肝細胞への感染に関する候補分子（課題 2 と 3：舘野）
- ・ 宿主側の糖鎖合成系とターゲット（課題 2 と 4：安形、伊藤先生）
- ・ 新規ワクチンの開発（課題 5：千葉、田尻先生）

4. 班会議総括

5. PO コメント

大座室長補佐（厚生労働省）

6. 次回ミーティングについて

概要：本研究課題の進捗状況について班員が理解するため、および今年度の成果と次年度の計画について討論するために第四回班会議を開催した。背景肝の異なる患者サンプルを解析した結果から、HBs 抗原の検出において抗体よりレクチンの方が感度よく検出できることが確認された。産総研で作成された HuH7+NTCP 細胞に合成ペプチド（Myr-PreS1(long)-FAM）が結合すること HBV が感染可能なヒトの一次培養肝細胞や HuH7+NTCP 細胞と感染不可能な HuH7 細胞の次世代シーケンサーのトランスクリプトーム解析から、肝細胞で発現しているレクチンのリストアップ、siRNA の効果を確認するためのトランスクリプトーム解析、抗原接種後に得られる抗体の迅速スクリーニング等の結果が報告された。