

II. 分担研究報告

B型肝炎ウイルス(HBV)の糖鎖解析と臨床的応用

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

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

研究要旨：B型肝炎ウイルス(HBV)における慢性肝炎では、インターフェロン治療成績も十分とはいえ、核酸アナログ製剤の継続投与においても薬剤耐性ウイルスの出現が問題になっている。糖鎖はHBVの接着・侵入や粒子形成・分泌に関わっている可能性が示唆され、その感染過程における糖鎖解析は、HBワクチンや抗HBV薬を効率的に開発する上で重要である。HBVに対する糖鎖への機能を明らかにし、HBV創薬シーズを作成することが本研究の目的であり、近未来に我が国で導入されることが決まった universal vaccination に広く応用できる様、安価・安全で陽性率が高いHBワクチン作成のための臨床的なサポートを行った。更に異なる genotype でのHBワクチンの有効性や universal vaccination 導入国ではHBs抗体を獲得した症例でも、長期間観察後ではHBc抗体やHBVDNA陽性者が存在することを踏まえ、最も有効なHBワクチン導入法の確立も目指している。

A. 研究目的

現在日本では、約150万人の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。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く、持続感染を防ぐための核酸アナログ製剤の継続投与においても薬剤耐性ウイルスの出現が問題になっている。従って、逆転写酵素に代わる創薬ターゲットが必須であり、有効な薬剤の開発にはHBVの感染/複製機構をより詳細に理解する必要がある。糖鎖はHBVの接着・侵入や粒子形成・分泌に関わっている可能性が示唆され、HBVの感染過程における糖鎖解析は、抗HBVワクチンや抗HBV薬を効率的に開発する上で重要な課題である。

本研究の目的は、HBVの感染過程における糖鎖の機能を明らかにし、HBVの感染を阻害する

薬剤のシーズを探索する。HBVの糖鎖構造を解析し、ウイルス粒子の形成や分泌に関わる糖鎖構造を同定し、抗HBVの創薬のターゲットとする。また、新規「ヒト型HBs抗原」を大量精製し、新規ワクチンの開発を目指すことを目標とする。先進国では、HBVの universal vaccination が進んでいるなかで、我が国では様々な努力によって母子感染対策のみのセレクトティブワクチネーションでHBV感染を費用対効果の面を含めて、非常に安価に効率良く感染防止を行った反面、ユニバーサルワクチネーションの必要性が今日までなかったとも言える。但し、感染経路は母子感染のみならず、乳幼児期からの水平感染・controlが難しいSTD、更に慢性化しやすい genotype A の増加などHBV感染様式は多様化し、今後もユニバーサルワクチネーションについては導入が決定された。ま

た、母子感染や HBV 関連肝移植に用いられる抗 HBs 人免疫グロブリン (HBIG) の有効性は高いものの、cost は 10 倍以上ワクチンより高い。うえ、血液から作られる為、未知のウイルスやプリオンなどの感染は 100%否定できない。

2008 年まで多くの施設で使用されていたのが、ヒト肝細胞由来の huGK-14 細胞に発現させた HBs 抗原粒子をアルミニウム塩に吸着させた「沈降 B 型肝炎ワクチン『明乳』」であり、HBs 抗原のみならず preS2 抗原が含まれているとされていたが無菌性保証が担保されず自主回収となり、また開発中であった preS2 を含む米国の製薬会社のパテントの関係で市販されるに至らず、本邦で使用可能であるワクチンは、pre-S2 は含まない 2 種類 (ビームゲン、ヘプタパックス) の選択しかない。後者は本邦には少なく genotype A であり、本邦には適していない。前者は Genotype C から作製されており、ワクチンによる陽性率も若年者では 90%以上であるが、遺伝子組換え技術により酵母に産生させた HBs 抗原をアルミニウム塩に吸着させた沈降ワクチンであり、糖鎖が酵母型に置換されており、完全な感染予防は難しく、更に preS2/S1 を含むワクチンが作製されれば、更なる感染抑止につながる可能性が高い。また、本邦でも少ないながらも、Carman WF らが報告(Lancet 1990)HBs 抗原の escape mutant は存在し、これらの変異部位(抗原認識部位)に糖鎖修飾が関与する可能性が本研究班の解析からも示唆されており、middle S・large S 蛋白まで考慮した安価で安全なワクチン作製は重要である。我々は、主任研究者と共同で、特に臨床検体の提供や、抗体作成、HBV 専門知識の共有や糖鎖研究により見いだされた成果を、マウスを用いた感染実験により確認を行う。

B. 研究方法

本年度は、昨年度の引き続き、糖鎖解析に実験計画のサポートや最新の情報を提供し臨床検体の集約と総括を行った。

C. 研究結果

HBs 抗原作成を当センターで精製予定のため、その機器購入や設置を行った。

また、マウスによる感染実験を行う準備を行い、来年度から施行予定とした。

D. 考察

universal vaccination にて、HBV 感染者は更に減少すると予測される一方で、HB ワクチンのみで、完全に抑止することは不可能であり、長期観察例の一部では肝炎発症はなくても HBc 抗体や HBVDNA 陽性者が存在することは忘れてはならない。特に若年者での水平感染率の増加の有無、ワクチン接種時の合併症・副作用の詳細な検討も行き、安価・安全で抗体獲得率が高い HB ワクチン作成が必要と思われる。

E. 結論

基礎研究班からの要求に応え、HBs 抗原に対する抗体を提供することで、HBV 糖鎖解析を進ませた。また、臨床検体の回収とともに、本研究班での研究準備体制の整備とともに HB ワクチンに伴う諸問題について、基礎研究班に指示した。

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

- 1) Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M,

- Tanaka Y, Kanai Y, Kusuhara H, Mizokami M, Wakita T. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *Hepatology* 59 (5):1726-37, 2014.05
- 2) Kusumoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Ueda R. Strategy for preventing hepatitis B reactivation in patients with resolved hepatitis B virus infection after rituximab-containing chemotherapy. *Hepatology* 60 (2):765-6, 2014.08
- 3) Abe M, Miyake T, Kuno A, Imai Y, Sawai Y, Hino K, Hara Y, Hige S, Sakamoto M, Yamada G, Kage M, Korenaga M, Hiasa Y, Mizokami M, Narimatsu H. Association between *Wisteria floribunda* agglutinin-positive Mac-2 binding protein and the fibrosis stage of non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* [Epub ahead of print] 2014.10.18
- 4) Yamasaki K, Tateyama M, Abiru S, Komori A, Nagaoka S, Saeki A, Hashimoto S, Sasaki R, Bekki S, Kugiyama Y, Miyazoe Y, Kuno A, Korenaga M, Togayachi A, Ocho M, Mizokami M, Narimatsu H, Yatsushashi H. Elevated serum levels of *Wisteria floribunda* agglutinin-positive human Mac-2 binding protein predict the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients. *Hepatology* 60 (5):1563-70, 2014.11
- 5) Tamaki N, Kurosaki M, Kuno A, Korenaga M, Togayachi A, Gotoh M, Nakakuki N, Takada H, Matsuda S, Hattori N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Mizokami M, Narimatsu H, Izumi N. *Wisteria floribunda* agglutinin positive human Mac-2-binding protein as a predictor of hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* [Epub ahead of print], 2015
- 6) Takahashi H, Ikeda M, Kumada T, Osaki Y, Kondo S, Kusumoto S, Ohkawa K, Nadano S, Furuse J, Kudo M, Ito K, Yokoyama M, Okusaka T, Shimoyama M, Mizokami M. Multicenter cooperative case survey of hepatitis B virus reactivation by chemotherapeutic agents. *Hepatology* [Epub ahead of print], 2015
- 7) Fujiyoshi M, Kuno A, Gotoh M, Fukai M, Yokoo H, Kamachi H, Kamiyama T, Korenaga M, Mizokami M, Narimatsu H, Taketomi A. Clinicopathological characteristics and diagnostic performance of *Wisteria floribunda* agglutinin positive Mac-2-binding protein as a preoperative serum marker of liver fibrosis in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*, [Epub ahead of print], 2015
- 8) Totani H, Kusumoto S, Ishida T, Masuda A, Yoshida T, Ito A, Ri M, Komatsu H, Murakami S, Mizokami M, Ueda R, Niimi A, Inagaki H, Tanaka Y, Iida S. Reactivation of hepatitis B virus (HBV) infection in adult T-cell leukemia-lymphoma patients with resolved HBV infection following systemic chemotherapy. *Int J Hematol*, 101, 398-404, 2015

2. 学会発表

特記すべき情報なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

該当事項なし。

2. 実用新案登録

該当事項なし。

3. その他

該当事項なし。

HBV 糖鎖解析と臨床検体収集

研究分担者 是永 匡紹 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター 肝疾患研修室長
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

研究要旨：我が国のB型慢性肝炎では、インターフェロン治療成績が悪く、核酸アナログ(NA)製剤の継続投与においては耐性ウイルス出現が問題になっており、肝発癌発生率はこの20年変化がなく、根本的な治療な見直しが必要である。糖鎖はB型肝炎ウイルス(HBV)の感染・複製過程に関わっている可能性が報告されており、糖鎖解析を行う事は、抗HBワクチンや抗HBV薬を効率的に開発する上で重要であると考えられる。本研究は、HBVの糖鎖の機能を明らかにし、HBV創薬シーズやワクチン作成することを目的とし、HBV糖鎖解析に利用可能なHBs抗原抗体価の高い検体、NA投与前、genotype別毎の検体収集を昨年同様に継続し行い、一部では肝炎増悪に伴い変動する糖鎖関連蛋白を解析している。

A. 研究目的

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。B型肝炎(HBV)のインターフェロンによる治療成績は悪く、持続感染を防ぐための核酸アナログ製剤の継続投与は有効も、中止は難しく医療費かさみため、根本的なウイルス排除は「感染させない」ことである。糖鎖はHBVの接着・侵入や粒子形成・分泌に関わっている可能性が示唆され、HBVの感染過程における糖鎖解析は、抗HBワクチンや抗HBV薬を効率的に開発する上で重要な課題である。

本研究の目的は、HBVの感染過程における糖鎖の機能を明らかにし、HBVの感染を阻害する薬剤のシーズを探索する。HBVの糖鎖構造を解析し、ウイルス粒子の形成や分泌に関わる糖鎖構造を解析し、抗HBVの創薬のターゲットとすることを目標とする。

B. 研究方法

糖鎖解析より得られて知見をHBV感染者で確認するため、HBVDNA量別・genotype別・HBs抗原価別、NA治療経過中の血清を回収し、基礎研究班に提供した。

C. 研究結果

産業技術総合研究所で解析されるレクチンアレイによるHBV粒子上糖鎖変化の解析の為、HBs抗原価が高い(10,000 IU以上)、genotype C症例を抽出し、eAg/eAb陽性別にsampleを選択していたが、本年度は、HBs抗原が2000～4000IUでの抽出効率を上昇させるため様々な実験工夫を行った。更に再現性を高めるために同一症例で、NA製剤経過中の糖鎖変化が、検出できるかどうか確認し解析中である。

これまで産業技術総合研究所での一連の解析を、当施設でも施行できる様に準備を行い、来年度から本格的に実験を開始する。

D. 考察

HBV の糖鎖解析を行うための前処理を当センターで行うことで、解析の smooth 化が計られるとともに、ウイルス量や HBs 抗原価に左右されない糖鎖解析が可能となり、ALT 変動や発がんに伴う変動は創薬ターゲットになる可能性がある。

E. 結論

臨床検体提供や実験準備は順調に進んでおり、一部は解析を開始した。本年度は多くの検体を当施設で解析を行い、創薬シーズを導き出す。

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

- 1) Abe M, Miyake T, Kuno A, Imai Y, Sawai Y, Hino K, Hara Y, Hige S, Sakamoto M, Yamada G, Kage M, **Korenaga M**, Hiasa Y, Mizokami M, Narimatsu H. Association between *Wisteria floribunda* agglutinin-positive Mac-2 binding protein and the fibrosis stage of non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* [Epub ahead of print] 2014.10.18
- 2) Yamasaki K, Tateyama M, Abiru S, Komori A, Nagaoka S, Saeki A, Hashimoto S, Sasaki R, Bekki S, Kugiyama Y, Miyazoe Y, Kuno A, **Korenaga M**, Togayachi A, Ocho M, Mizokami M, Narimatsu H, Yatsushashi H. Elevated serum levels of *Wisteria floribunda* agglutinin-positive human Mac-2 binding protein predict the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients. *Hepatology* 60 (5):1563-70, 2014.11
- 3) Tamaki N, Kurosaki M, Kuno A, **Korenaga**

M, Togayachi A, Gotoh M, Nakakuki N, Takada H, Matsuda S, Hattori N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, **Mizokami M**, Narimatsu H, Izumi N. *Wisteria floribunda* agglutinin positive human Mac-2-binding protein as a predictor of hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res*, [Epub ahead of print], 2015

- 4) Fujiyoshi M, Kuno A, Gotoh M, Fukai M, Yokoo H, Kamachi H, Kamiyama T, **Korenaga M**, Mizokami M, Narimatsu H, Taketomi A. Clinicopathological characteristics and diagnostic performance of *Wisteria floribunda* agglutinin positive Mac-2-binding protein as a preoperative serum marker of liver fibrosis in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*, [Epub ahead of print], 2015
- 5) **Korenaga M**, Nishina S, Korenaga K, Tomiyama Y, Yoshioka N, Hara Y, Sasaki Y, Shimonaka Y, Hino K. Branched-chain amino acids reduce hepatic iron accumulation and oxidative stress in hepatitis C virus polyprotein-expressing mice. *Liver Int*, 35, 1303-14, 2015

2. 学会発表

特記すべき情報なし。

3. 総説 (分担執筆)

- 1) **是永匡紹** 溝上雅史 B型肝炎ウイルスに対するワクチンの現状と課題 特集 ウイルス肝炎の薬物治療 変わりゆく治療戦略 *medicina* 52 (2) 2015.2 353- 357

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

該当事項なし。

2. 実用新案登録

該当事項なし。

3. その他

該当事項なし。

HBV（HBs 抗原）の糖鎖解析

研究分担者 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
研究分担者 久野 敦 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 上級主任研究員
研究分担者 伊藤 浩美 福島県立医科大学 医学部 生化学講座 助教
研究分担者 田尻 和人 富山大学 医学薬学研究部 第三内科 助教
研究分担者 是永 匡紹 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター 肝疾患研修室長

研究要旨：HBV 感染における HBV 自身に存在する糖鎖の機能を理解するために、HBs タンパク質の糖鎖構造情報を、2つの異なるアプローチによって取得することを計画し、それぞれの分析条件を確立し、実サンプルの分析を行った。レクチンアレイでは、まず昨年度確立したプロトコルのうち、血清から HBV 粒子のエンリッチの工程をブラッシュアップし、取得物の精製度及び取得データの再現性を向上させた。その後、HBV 感染患者血清の取扱機関である国際医療研究センターへ技術移転し、HBV 感染患者 16 症例の 24 サンプルの血清よりそれぞれ HBV 粒子をエンリッチし、レクチンアレイにより比較糖鎖解析を行った。その結果、得られたアレイシグナルパターンは大きな傾向は一致しているものの、HBs 抗原量や DNA 量などに応じてシグナルが増減するレクチンがいくつか確認された。質量分析では、B 型肝炎患者プール血清より精製された HBs タンパク質の解析から、Pre-S1、Pre-S2、および S 領域にそれぞれ 1 カ所の N 型糖鎖が、また、Pre-S2 領域に 1 カ所の O 型糖鎖の付加が同定された。N 型糖鎖は二本鎖構造、O 型糖鎖はコア 1 (T 抗原) を主成分としていた。この他、M 型 HBs (Pre-S2) の N 末端 Met にアセチル化、L 型 HBs (Pre-S1) の N 末端 Gly にミリストイル化修飾を検出した。

A. 研究目的

HBV ウィルス粒子エンベロップに局在する表面抗原分子 HBs は糖タンパク質であり、この糖鎖付加部位の変異、糖鎖欠失によってパッケージ不全が生じるなど、HBV 粒子の形成や感染、増殖に糖鎖が関連している報告があるが、その詳細は不明である。B 型肝炎治療薬を開発するにあたり、HBV の糖鎖機能を理解することは重要であり、HBs タンパク質の糖鎖構造から、最終的には HBV ウィルス粒子の糖鎖集合状態

を含めた構造特性を明らかにし、創薬の基盤情報とすることを目的とする。

B. 研究方法

(1) レクチンマイクロアレイによる HBV 粒子の糖鎖プロファイリング：各患者血清中 HBV ウィルス粒子のエンリッチ、および取得 HBV 粒子の糖鎖プロファイリングは、昨年度確立した手法に従った。まず、血清中の磁気ビーズへ

非特異的に結合するタンパク質を事前に除去した。血清を予め反応バッファー(1%Triton X-100入り Tris-buffered saline (TBSTx)) で3回洗浄したストレプトアビジン固定化磁気ビーズ (SAビーズ) 溶液に加えて溶液調整し、4℃で30分間振盪反応した。反応後、磁石によりSAビーズを1カ所にトラップし、残存溶液を別の1.5 mL容チューブに回収した。回収した溶液に、ビオチン化抗体とSAビーズを加え、4℃で3時間振盪しながら抗原抗体反応を行った。なお、抗体は田尻らが樹立した抗HBs抗原抗体

(HB0116)を用いた。反応後、抗原-抗体複合体と結合した磁気ビーズを磁石で回収し、溶液を除去後、ビーズを反応バッファー 500 μ Lで3回洗浄した。トラップされたHBV粒子を溶出するために、0.2% SDSを含むTBS 10 μ Lを加え、95℃で5分加熱し、不活性化されたHBV粒子を遊離した。磁気ビーズを磁石で1カ所にトラップし、溶出画分溶液を回収した。取得液中に夾雑する不活性化HB0116抗体は、新しいSAビーズと再度反応させることで完全に除去された。得られた溶液HBV粒子-IP産物(20 μ L)とした。

HBV粒子-IP産物試料を5 μ Lとり、レクチンアレイ反応バッファーである1%Triton X-100含有Phosphate-buffered saline (PBSTx)により、60 μ Lに調整した。この溶液をレクチンマイクロアレイの各反応槽へ添加し、20℃で10時間以上相互作用反応した。反応後、ブロッキング剤を加え、30分反応させた。60 μ LのPBSTxで各反応槽を3回洗浄した後、ブロッキング剤含有PBSTx溶液を加え、若干攪拌した後に、検出用ビオチン化116抗体を100 ng加え、20℃で1時間反応させた。抗原抗体反応後、60 μ LのPBSTxで各反応槽を3回洗浄し、次いでCy3標識ストレプトアビジン200 ng含有PBSTx溶液を加え、さらに30分、20℃で反応した。反応後、60 μ LのPBSTxで各反応槽を3回洗浄した

後、レクチンアレイスキャナーGlycoStation™によりスキャンを行った。スキャンデータは画像解析ソフトで数値化され、以後の比較糖鎖解析に用いられた。

(2) HBsタンパク質Pre-S1/Pre-S2領域の糖ペプチド解析：B型肝炎患者プール血清より精製したサブバイラルパーティクル(SVP)を変性剤処理、還元アルキル化することなく、トリプシン消化し、限外濾過法で遊離ペプチドを捕集した。これをアミド80カラムに通し、糖ペプチドと非糖ペプチドに分画した。糖ペプチド画分は酸性条件下で加熱してシアル酸除去処理し、LC/MS分析した。この質量値より糖鎖組成を推定した。非糖ペプチド画分も同様にLC/MS分析し、Mascot検索により、糖鎖付加以外の翻訳後修飾の状況を分析した。Pre-S1領域における糖鎖修飾とミリスチル化の関連を分析するために、合成ミリスチル化ペプチドをトリプシンおよびV8プロテアーゼ消化し、LC/MSでの検出を行った。また、Pre-S2領域におけるO型糖鎖の状態を分析するために、SVPをトリプシン処理し、消化物をJacalinカラムに供し、O型糖ペプチドを捕集した。これをLC/MS分析し、構造解析した。

なお、上述の(1)(2)に用いた全ての血清サンプルは、インフォームドコンセントにより患者から同意の得られたものである。またすべてサンプル収集機関および研究実施機関の各倫理審査委員会で承認されたものを用いている。

C. 研究結果

(1) HBV患者血清中HBV粒子の比較糖鎖解析：Genotype C HBV感染患者15症例(急性肝炎2例、慢性肝炎8例、無症候性キャリア5例)の血清(HBsAg: 3000 IU/mL以上、HBV DNA: 100コピー以上)よりHBV粒子をエンリッチし、レクチンアレイ解析を行った。その結果、 α 2,6シアル酸修飾を末端に有する複合型N

型糖鎖に特徴的なレクチンシグナル (I 群: SSA, SNA, TJAI, RCA120, DSA, PHAE など) を得たと同時に、シアリル T 抗原構造 O 型糖鎖に特徴的なシグナル (II 群: Jacalin, MPA, ABA) も得た。II 群のシグナルは Genotype C HBV の M タンパク質の Pre-S2 領域にあるとされる 1 つの O 型糖鎖付加に由来すると予想される。実際、O 型糖鎖付加位置が欠損している Genotype A HBV 感染慢性肝炎患者 (1 例) 血清について検討した場合、N 結合型糖鎖の特徴は Genotype C のそれと同様であったが、O 結合型糖鎖に由来するシグナルは全く得られなかった。つまり、I 群レクチンシグナルと II 群レクチンシグナルの割合を調べると、血清 HBV 粒子中の M タンパク質の割合が間接的に得られると考えた。そこで上述の 15 例の結果について、I 群/II 群シグナル比を調べたところ、その比は患者ごとに異なっており、M タンパク質に特徴的な II 群の割合が DNA 量に応じて増減している傾向を示した。この割合の違いを、レクチンアレイ以外の手法でも確認するために、取得 HBV 粒子を SDS-PAGE し、メンブレントランスファー後に、I 群の SSA 及び II 群の Jacalin を用いたレクチンプロットを行った。その結果、Jacalin は、おもに M タンパク質 (gp36 および gp33) を染色し、そのバンド強度はレクチンアレイの傾向に一致していた。

また、HBsAg 量の下限を調べるために、先述の Genotype C HBV 感染患者のうち 3 症例について、治療開始前、3 か月後、12 か月後の血清を用いて同様の実験を行った。結果、HBsAg 量 >2000 IU/mL の場合に HBV 粒子に特徴的なレクチンシグナルパターンを得ることが確認できた。

(2) HBs タンパク質 Pre-S1/Pre-S2 領域の糖ペプチド解析: ヒト患者血清由来 SVP を変性剤非存在下、トリプシン、Lys-C エンドペプチダーゼ、および V8 プロテアーゼで消化し、生じ

た消化物を限外濾過して、遊離ペプチド画分を得た。これをアミド 80 カラムに供し、糖ペプチド画分を得、LC/MS 法で分析した。以前に同定した Pre-S1 および L-Pre-S2 糖ペプチドのコアペプチド質量に 2 本鎖糖鎖質量を足したシグナルを探索した結果、それに該当するシグナルが検出され、L-HBs の Pre-S1/S2 領域には 2 本鎖糖鎖が主成分として結合していることが推定された。また、アミド 80 カラム分離の非糖ペプチド画分の分析では、ミリストイル化された N 末端ペプチド (GGWSSKPR) が同定された。これはオランウータン型ではなく、ヒト型のロングフォームの N 末端 Gly がミリストイル化されていることを示している。V8 プロテアーゼのみで消化し、ミリストイル化 Gly-2 と糖鎖付加 Asn-15 の両方を含む糖ペプチドの検出を試みたが、検出できなかった。非糖鎖付加型のミリストイル化ペプチドも検出されていないので、これらの修飾の関連は未解決である。合成ミリストイル化ペプチドの分析から、消化位置、ミリストイル化ペプチドの溶出位置が決定できたので、これを今後の参考に探索を進める。

同様に調製したトリプシン消化遊離ペプチド画分を酸処理の後、Jacalin カラムに供し、結合した糖ペプチド画分を LC/MS 分析した結果、PreS2 領域の既報の位置に T 抗原と思われる

(Hex(1)HexNAc(1)) 糖鎖が検出された。このペプチドが L-HBs、M-HBs のいずれか (あるいは両方) に由来するのかは不明であった。

D. 考察

レクチンアレイと質量分析による糖鎖解析の結果、ヒト患者血清由来 HBs タンパク質には長さ (LMS) に応じ、1 ないし 3 箇所 of N 型糖鎖付加部位が同定され、L-PreS1、L-PreS2、M-PreS2、および S の S 領域には α 2,6 シアル酸を末端に有する 2 本鎖糖鎖が主要であることが判明し、残る L および M の S 領域にも同様の糖鎖が付加

しているものと推定される。また PreS2 領域に 1 カ所の O 型糖鎖が存在し、その糖鎖構造はシアリル T 抗原と予想される。これらの情報を元に考察すると、新型ワクチンとして準備すべき抗原はこれらの糖鎖が付加したものであると思われる。

E. 結論

HBs 糖鎖付加部位の同定とそれらに結合している糖鎖構造から、今後、ワクチンの抗原とする HBs にはシアリル化された 2 本鎖糖鎖あるいはシアリル化 T 抗原を付加させたものを用意し、現在使われている糖鎖無しの抗原と抗原性や産生される抗体の性状などを比較することが重要と考える。

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

- 1) 久野敦、「肝線維化の進展を定量的に判断するための糖鎖バイオマーカーの実用化」、医学のあゆみ特集「グライコプロテオミクス技術開発と医療への応用」、249 巻 8 号 pp.666-70, 医歯薬出版 (株) (2014)
- 2) Yamasaki K, Tateyama M, Abiru S, Komori A, Nagaoka S, Saeki A, Hashimoto S, Sasaki R, Bekki S, Kugiyama Y, Miyazoe Y, Kuno A, Korenaga M, Togayachi A, Ocho M, Mizokami M, Narimatsu H, Yatsuhashi H. Elevated serum levels of *Wisteria floribunda* agglutinin-positive human Mac-2 binding protein predict the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients. *Hepatology* 60(5), 1563-70 (2014).
- 3) Kuno A, Matsuda A, Unno S, Tan B, Hirabayashi J, Narimatsu H. Differential

Glycan Analysis of an Endogenous Glycoprotein: Toward Clinical Implementation-From Sample Pretreatment to Data Standardization. *Methods in Mol Biol* 1200, 265-85 (2014).

- 4) Zou X, Chi X, Pan Y, Du D, Sun H, Matsuda A, Li W, Kuno A, Zhang X, Narimatsu H, Niu J, Zhang Y. LecT-Hepa facilitates estimating treatment outcome during interferon therapy in chronic hepatitis C patients. *Clin Proteomics* 11(1), 44 (2014).
- 5) Toshima T, Shirabe K, Ikegami T, Yoshizumi T, Kuno A, Togayachi A, Gotoh M, Narimatsu H, Korenaga M, Mizokami M, Nishie A, Aishima S, Maehara Y. A novel serum marker, glycosylated *Wisteria floribunda* agglutinin-positive Mac-2 binding protein (WFA+-M2BP), for assessing liver fibrosis. *J Gastroenterol.* 50(1), 76-84 (2015).
- 6) Tamaki N, Kurosaki M, Kuno A, Korenaga M, Togayachi A, Gotoh M, Nakakuki N, Takada H, Matsuda S, Hattori N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Mizokami M, Narimatsu H, Izumi N. *Wisteria floribunda* agglutinin positive human Mac-2-binding protein as a predictor of hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. *Hepatology Research* in press.
- 7) Abe M, et al. *Wisteria floribunda* agglutinin-positive Mac-2 binding protein as a predictor of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* in press.
- 8) Fujiyoshi M, Kuno A, Gotoh M, Fukai M, Yokoo H, Kamachi H, Kamiyama T, Korenaga M, Mizokami M, Narimatsu H,

Taketomi A. Clinicopathological characteristics and diagnostic performance of *Westeria floribunda* agglutinin positive Mac-2 binding protein as a preoperative serum marker of liver fibrosis in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* in press

- 9) Hirabayashi J, **Kuno A**, Tateno H. Development and application of the lectin microarray. *Top Curr Chem.* in press.
- 10) Sugahara D, Tomioka A, Sato T, Narimatsu H, **Kaji H**. Large-scale identification of secretome glycoproteins recognized by *Wisteria floribunda* agglutinin: a glycoproteomic approach to biomarker discovery. *Proteomics* in press.

2. 学会発表

- 1) **久野 敦** 「Ultra-sensitive glycan profiling of circulating HBV particles in patient's serum」, TASL-Japan Hepatitis B Workshop (2nd), (2014/04/20、台北)
- 2) **梶裕之** 「糖タンパク質の大規模同定と糖鎖バイオマーカー開発への応用」第14回日本蛋白質科学会年会 (2014.6.25、横浜)
- 3) **梶裕之** ら 「糖鎖付加位置選択的グライコム解析技術の開発と応用」日本プロテオーム学会 2014 年会 (2014.7.17、つくば)
- 4) 雄長誠ら 「グライコプロテオミクスを基盤とした肝硬変血清バイオマーカー

「WFA(+)-CSF1R」の開発」日本プロテオーム学会 2014 年会 (2015.7.17、つくば)

- 5) 雄長誠ら 「血清糖鎖バイオマーカー WFA(+)-CSF1R の開発」日本糖質学会年会 (2014.8.10、名古屋)
- 6) 梶谷内晶ら 「Alteration in glycan structure on colony stimulating factor 1 receptor as a glycobiomarker for evaluation of liver cirrhosis.」第73回日本癌学会学術総会 (2015.9.25、横浜)
- 7) **梶裕之** ら 「Development and application of a method for the glycopeptide-based site-specific glycomic analysis」HUPO 13th World Congress (2014.10.7、マドリッド)
- 8) 我妻孝則ら 「モノクローナル HBs 抗体を用いた B 型肝炎ウイルス粒子高感度糖鎖プロファイリング」第87回日本生化学会大会 (2014/10/17、京都)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
該当事項なし。
2. 実用新案登録
該当事項なし。
3. その他
該当事項なし。

HBV 感染可能細胞の糖鎖解析

研究分担者 梅谷内 晶 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 主任研究員
研究分担者 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
研究分担者 伊藤 浩美 福島県立医科大学 医学部 生化学講座 助教
研究分担者 安形 清彦 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
研究分担者 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
研究協力者 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

研究要旨：B型肝炎ウイルス(HBV)の感染機構は受容体も含めて不明であり、現在の所 HBV の持続感染系は構築されていない。宿主肝細胞側の糖鎖合成系はそのまま HBV の糖鎖修飾を担うこともあり、肝細胞表面の糖鎖関連分子と共に HBV の感染に深く関与していると考えられる。本研究の目的は、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である。そこで本研究では、HBV 感染可能細胞である肝細胞と感染出来ない肝癌細胞株との糖鎖合成系の違いまた細胞表面に発現する内在性レクチンなどの糖鎖関連分子の違いを明らかにすることを第一の課題としている。肝細胞株をグライコプロテオミクス解析・糖鎖構造解析し、さらに肝細胞株と初代肝細胞（肝臓）での糖鎖遺伝子発現について qRT-PCR アレイ及び次世代シーケンサを用いて解析した。さらに得られたデータからバイオインフォマティクス技術により内在性レクチンの検索などを行った。また、ヒト肝臓化キメラマウスの肝細胞における糖鎖プロファイルの変化について解析を行った。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。次世代シーケンサ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。

A. 研究目的

糖鎖はインフルエンザウイルスなど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ている。現在日本には約150万人の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。同様に肝炎を起こすC型肝炎ウイルスでも糖鎖-レクチンを

介した接着や侵入するシステムが示されている。ところが、HBVは持続感染系が構築されていないこともあり、肝細胞表面上の受容体は不明なままである。また、HBV感染における宿主肝細胞側の糖鎖の役割や感染後の糖鎖合成系の変化なども研究されていない。HBV上の糖鎖合成は宿主である肝細胞が担っていることもあり、HBVの感染過程における宿主側肝細胞の糖鎖

を解析することは、HBV ワクチンや抗 HBV 薬を効率的に開発する上でも重要な課題である。

本研究では、糖鎖遺伝子解析技術・グライコプロテオミクス技術・レクチンアレイ技術などの糖鎖機能解析技術により、HBV 感染可能細胞と非感染可能細胞の糖鎖プロファイリングを行う(図 1)。

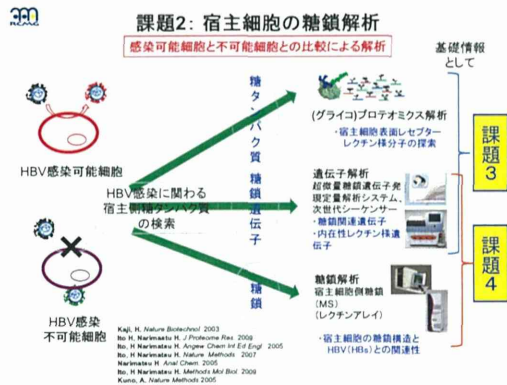


図 1

B. 研究方法

HBV 感染機構における肝細胞側の糖鎖の役割を明らかにするために、以下の解析を進めている。解析対象の試料としては、各種の肝臓細胞株を始めに実施し、次いでヒト肝化マウス組織・細胞(±HBV 感染)を対象とした、より詳細な糖鎖解析を進めていく。

(1) 解析に必要な試料の準備と調製を行う。特に同一の試料にて各種解析を平行して行うために、肝細胞株、初代培養肝細胞なども大量に培養し、同一ロットによる試料を調製するなどした。

(2) 産総研保有の糖鎖遺伝子定量システム

(qRT-PCR アレイ) や次世代シーケンサを用いて、糖鎖遺伝子と、内在性レクチンを含む糖鎖関連遺伝子に特化して発現解析し、HBV 感染に必要な糖鎖関連分子の発現と HBV 感染に伴う宿主細胞の変化を解明する。今年度は肝細胞株での糖鎖遺伝子の発現を qPCR アレイにより解析するとともに、次世代シーケンサによる解析も行い、この両者の比較を行うなどした。

(3) 産総研独自のグライコプロテオミクス技術、糖鎖構造解析技術により糖鎖プロファイリングを行う。具体的には、質量分析器 (MS) による糖鎖構造解析およびレクチンアレイによる高感度糖鎖プロファイルを進め、宿主細胞の糖鎖発現を解析する。また、種々の試料でプロテオーム解析とグライコプロテオーム解析を行う。今年度は肝細胞株の糖鎖構造を MS により解析した。また、同細胞株における (グライコ) プロテオーム解析のデータを基にして、糖タンパク質あるいはレクチン様タンパク質の発現の調査を実施した。

(4) HBV 感染と宿主肝細胞の糖鎖発現との関連について解析を行う。ヒト肝臓化キメラマウス (PXB マウス) より初代培養肝細胞を調製・培養し、これに患者血清由来の HBV を感染させ、その前後での糖鎖プロファイルの変化を解析した。また同様に、キメラマウス由来肝細胞を経時的 (1 週~6 週まで) に培養し、宿主肝細胞の経時的な糖鎖糖鎖プロファイルの変化を解析した。また、次世代シーケンサによる網羅的な遺伝子発現解析を行い、糖鎖関連遺伝子の変動について解析した。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験および動物実験を行う場合には、カルタヘナ条約などの法令・規定を遵守し、また、産業技術総合研究所ライフサイエンス実験に関する倫理及び安全管理規程に従って実施している。

動物を使用する実験については日本省庁の指針や法律を遵守する。使用する動物個体数に関しては、動物愛護のため、極力最少になるように努めている。

ヒト由来試料の提供・使用に関しては、産業技術総合研究所をはじめ、各機関で倫理審査を受け、その承認のもとに行っている。また、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16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」を遵守して研究を行っている。

C. 研究結果

本研究における結果については以下の通りである。今後は詳細な遺伝子解析やヒト肝化マウスを使用した様々な条件下での解析を平行して進めていく予定である。

(項目1) 肝臓細胞株、ならびにヒト肝化マウス組織・細胞を対象とした糖鎖遺伝子の発現解析、糖タンパク質の(グライコ)プロテオーム解析、糖鎖構造解析を行うための試料調製を進め、一部解析を行ってきた。始めに、ヒト肝臓細胞株である Huh7 細胞と HepG2 細胞などの試料を採取し、実験毎に適した調製を行った。また、市販のヒト肝臓細胞(初代培養)を培養し、同様の解析をするための試料調製を行った。

(項目2) qRT-PCR(糖鎖遺伝子 qRT-PCR アレイシステム)による糖鎖遺伝子発現解析の結果、肝細胞株2種(HuH7細胞、HepG2細胞)における約190種類の糖鎖遺伝子の発現プロファイルを得た。それらの糖鎖遺伝子群を高発現(約80遺伝子)と低発現あるいは発現無し(約100遺伝子)の2群に分け、他課題(糖鎖改変のHBVの増殖・感染能への影響)の解析のための基礎情報とした。HepG2およびHuH7のqRT-PCRアレイ解析の結果、感染可能である肝細胞と同様な発現レベルの遺伝子もあれば、異なる遺伝子もあり、糖鎖構造の結果同様細胞に依る差が明らかになった。

また、HepG2およびHuH7のRNAとともに、市販のヒト肝臓由来RNAあるいは培養したヒト肝臓細胞(初代培養)から抽出されたRNAよりそれぞれcDNAを合成し、これを用いて次

世代シーケンサによる遺伝子発現解析を行った(図2)。

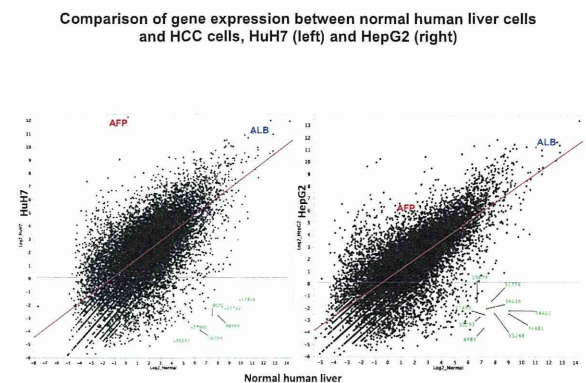


図2

糖鎖遺伝子と、内在性レクチンを含む糖鎖関連遺伝子に特化して発現解析した。糖鎖遺伝子の発現プロファイルの結果については、図3に示した。

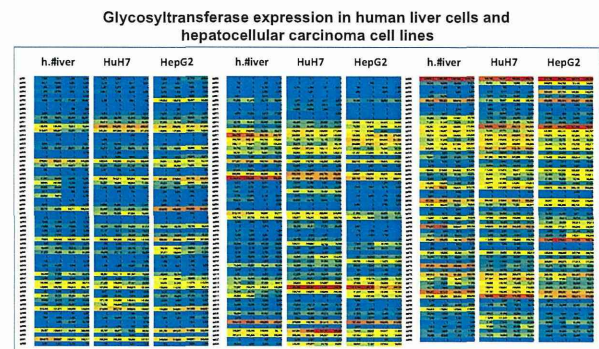


図3

次世代シーケンサから得られる遺伝子発現情報(例:全体で約400万Read、そのうち240万Readが約4.7万個の遺伝子にマップされる)は非常に膨大なため、そのデータをそのまま使用するのは非常に困難である。そこで、バイオインフォマティクス技術により、従来我々が構築してきた糖鎖遺伝子のデータベース(GGDB)などのデータを有効利用し、これらデータベースとの比較抽出などの作業によって糖鎖遺伝子のみを抽出・解析を行った。

前述のデータとの比較なども行ったが、次世代シーケンサのデータと糖鎖遺伝子発現定量システム(リアルタイム qRT-PCR)のデータには基本的に相関性があると思われ、課題4に向けて抽出された糖鎖遺伝子プロファイルには問題無いことを確認した。また、内在性レクチンについては宿主細胞におけるHBV受容体として機能している可能性が考えられるため、同様に次世代シーケンサの遺伝子発現情報から、内在性レクチンの発現情報を抽出した。方法は糖鎖遺伝子の時とほぼ同様に、従来我々が構築してきた内在性レクチンのデータベースを有効利用し、これらデータベースとの比較抽出などの作業によって内在性のレクチン様ドメインを有するタンパク質(約240種類)のみを抽出し、解析を行った。ここから得られた発現情報は課題3へ利用された。

(項目3) 肝臓細胞株7種類について、膜画分や可溶性画分を用いたプロテオーム解析とグライコプロテオーム解析(IGOT解析)のデータを保有していたことから、これを用いて内在性レクチンの検索を行った。プロテオームのデータでは、平均して約2000~3000種類のタンパク質、グライコプロテオーム解析では平均して約600~850種類の糖ペプチドが登録されており、これを検索した結果、候補レクチン様タンパク質を見出し、これを他課題(HBV-宿主細胞における糖鎖の役割)の基礎情報とした。これらの一部の試料については既に糖鎖遺伝子解析(qRT-PCR)、および質量分析による糖鎖構造解析(N-結合型/O-結合型糖鎖解析)を行った。

[質量分析装置を用いた糖鎖構造解析]

現在までに実施した、質量分析装置を用いたHepG2細胞およびHuH7細胞、初代肝細胞、HBV粒子:SVP(subviral particles)の糖鎖構造解析については以下の通りである。

平成24年度に2種類の細胞株(HepG2とHuH-7)、平成25年度に肝細胞(hNHeps)およびHBV SVP試料について質量分析計を用いたN-結合型およびO-結合型糖鎖構造解析を行った。解析手順は以下の通りである。培養細胞(HepG2、HuH-7、hNHeps)については、それぞれ細胞ペレットから疎水性画分を抽出し、還元アルキル化・透析・トリプシン消化を、SVP試料については、還元アルキル化・エタノール沈殿・トリプシン消化を行ったのち糖鎖の切り出しを行った。N-結合型糖鎖についてはエンドペプチダーゼFにより酵素学的に、O-結合型糖鎖については還元β脱離により化学的に処理し、N-とO-結合型糖鎖の遊離を行った。次に、N-ならびにO-結合型糖鎖は、MALDI測定の際のイオン化の感度および安定性を向上させるため、完全メチル化処理にてすべての水酸基ならびにカルボン酸をメチル化した(ただし、N-結合型糖鎖については酵素にて切り出された糖鎖を還元し、糖アルコールにしてから完全メチル化処理を行った)。得られたN-およびO-結合型糖鎖の完全メチル化体は、MALDI-多段階タンデム型質量分析計を用いてそれぞれの糖鎖構造についてシグナル強度にて比較解析を行い、それぞれの糖鎖構造解析結果については図4にまとめた。横軸は糖組成(Hexの数-HexNAcの数-Fucの数-NeuAcの数の順)で記載し、縦軸はそれぞれのMS結果で最も強度のある糖鎖シグナル強度を100%とした相対強度で表示した。行った2種類の細胞株の結果では、N-結合型糖鎖については、両細胞間の糖鎖構造は類似しており、ほとんどがハイマンノース型であった。一方、O-結合型糖鎖については両細胞間で観測された糖鎖構造のほとんどがシアリル化糖鎖であったが、その相対量は図4(HepG2:赤とHuH-7:青)に示した通り異なる結果となった。次に行った2種類の試料(図4 hNHeps:緑とSVP:紫)の結果では、hNHepsのN-結合型糖

鎖については、HepG2 や HuH-7 と同じくほとんどがハイマンノース型であったのに対し、SVP ではほとんどがコンプレックス型という結果であった。HepG2 や HuH-7 では観測されなかった SVP のおもな糖鎖構造(図 4 上段の 5401 や 5402)について hNHeps では微量だが確認された。O-結合型糖鎖については、HepG2 や HuH-7 では糖鎖構造のバリエーションが 10 種類と多かったのに対し、hNHeps では 5 種類、SVP では 3 種類と構造のバリエーションは減っており、詳細な糖鎖構造についても HepG2 や HuH-7 に比べ hNHeps ではシアリル T 構造(図 4 下段の 1101)が主成分となっている点で SVP の構造に近い結果であった。

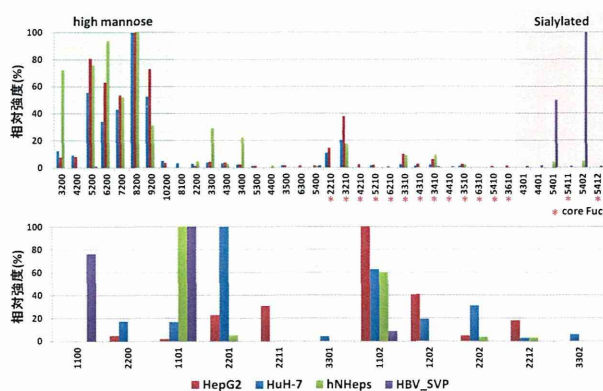


図 4

(項目 4) HBV 感染と宿主肝細胞の糖鎖発現との関連について解析を行った。ヒト肝臓化キメラマウス (PXB マウス) より初代培養肝細胞を調製した。具体的には非感染ヒト肝臓キメラマウスの肝臓をコラゲナーゼ灌流して肝細胞を分離後に 10cm dish にまいた(1枚につき約 1×10^7 cells)。これを Day0 とした。これらの細胞(dish 一枚)に、患者血清由来の HBV (genotypeC) を感染させ、その後 12 日間の培養を行ったのちに回収した(図 5A)。陰性コントロールとしては HBV 非感染のものを同様に培養して、感染開始時と感染後 12 日目で回収した。それらの細胞を用いて膜糖タンパク質を抽出して(図 5B)、同

量ずつレクチンアレイ解析に供した。HBV 感染前後での糖鎖プロファイルの変化を解析した結果(図 5C)、(1) 培養環境(経時的)の変化で糖鎖プロファイリングが変化した、及び(2) HBV 感染によって大部分のシグナルが増加傾向にあった、ことが明らかとなった。しかしながら、感染の前後の比較では幾つかのレクチンシグナルは増減が認められたが、これらに大幅な変動は見られなかった。

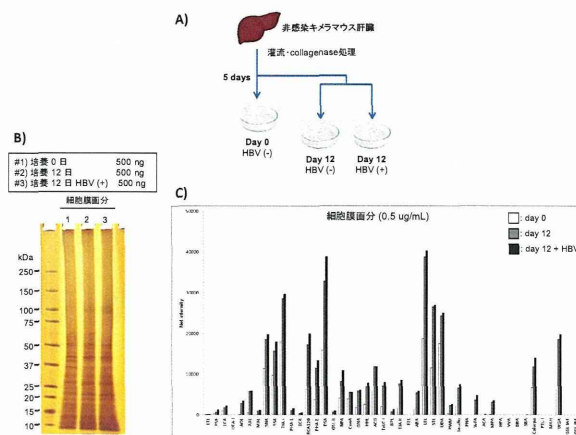


図 5

そこで、キメラマウス由来肝細胞を経時的(1週~6週まで)に培養し、宿主肝細胞の経時的な糖鎖糖鎖プロファイルの変化を解析することとした。2~3週にかけて宿主細胞への感染能が大幅に落ちてくるという知見から、感染能の変動に伴う(経時的な)糖鎖発現のプロファイルの変化が認められるのかについて解析を進めた。非感染ヒト肝臓キメラマウスの肝臓をコラゲナーゼ灌流して肝細胞を分離後に 6 well dish にまいた(1wellにつき約 5×10^5 cells)。これを Day 0 とした。これらの細胞に、患者血清由来の HBV (genotypeC) を感染させ、その後 6 週間後までの培養を行い、その経過として 1 週間ごとにサンプルを回収した。陰性コントロールとしては HBV 非感染のもの(primary hepatocyte)を同様に培養して回収した。それらの細胞を用いて膜糖タンパク質を抽出して SDS-PAGE お

よび銀染色法にて解析するとともに（図 6）、同量ずつレクチンアレイ解析に供した。

SDS-PAGE の結果では、タンパク質の発現の変動に大きな差は特に認められなかった（一部のバンドには多少の変動は認められた）。

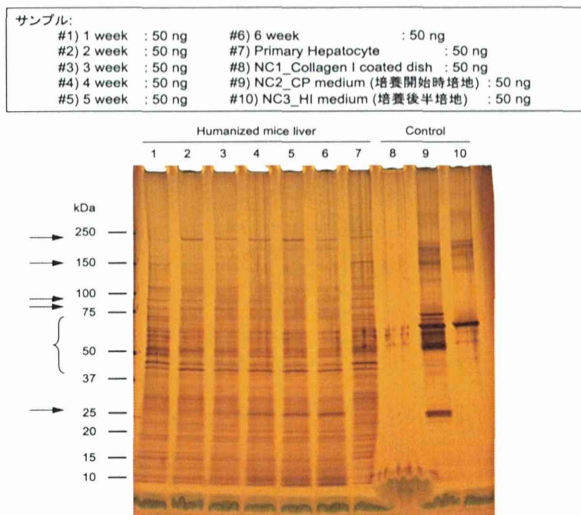


図 6

HBV 感染後の経時的な糖鎖プロファイルの変化を解析した結果(図 7)、培養環境（経時的）の変化で幾つかのレクチンによる糖鎖プロファイルリングが変化することが明らかとなった。

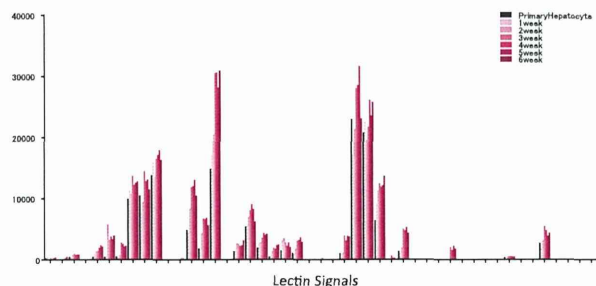


図 7

また、経時的な感染細胞における遺伝子の発現の変化について、次世代シーケンサによる網羅的な発現解析を行った。糖鎖遺伝子と、内在性レクチンを含む糖鎖関連遺伝子に特化して発現解析した結果、特に一部のレクチン（様）タンパク質の遺伝子において、発現プロファイルの減少が認められるものが存在していた（図 8）。

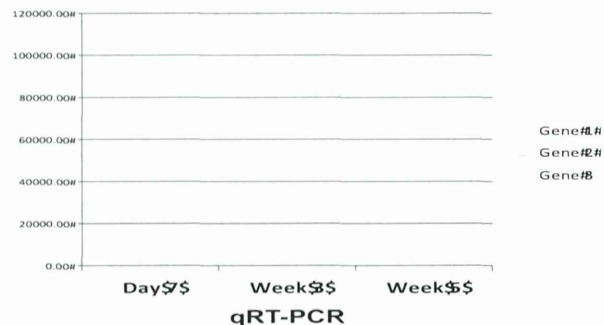


図 8

また、NTCP でも 3 週間経過後から遺伝子発現の減少が認められるほか、レクチン（様）タンパク質の遺伝子においても、同様に 3 週間経過後から発現プロファイルの減少が認められるものが幾つか存在していた（図 9）。

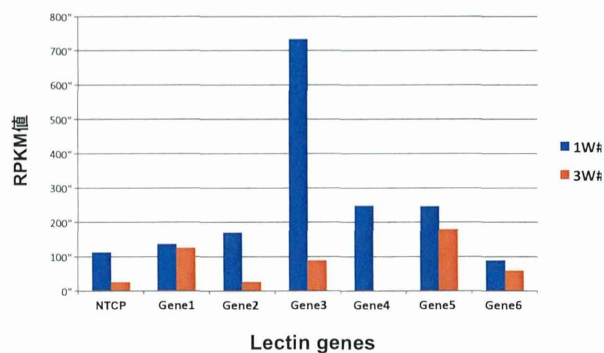


図 9

D. 考察

現在までに、基本的な情報を取得するための下地が整い、肝細胞および培養細胞株の遺伝子発現や糖鎖構造、内在性レクチン様ドメイン含有タンパク質などの情報が得られている。宿主細胞との関連を見るために、一部 SVP（課題 1 とも関連）なども糖鎖構造解析を行っている。また、感染前後あるいは経時的な宿主細胞の変化などにおいて、糖鎖の発現プロファイルの変化を解析した結果、HBV 感染と宿主細胞側の経時的な糖鎖発現の変化との関連性が認められた。さらに多くの糖鎖関連遺伝子・内在性レクチン（様）遺伝子の発現の変化（特に経時的な遺伝

子発現の減少)が明らかとなった。

また、本研究で得られる宿主細胞における糖鎖遺伝子/糖鎖関連遺伝子の発現解析の結果は、他課題(課題1や課題3:HBV-宿主細胞における糖鎖の役割、課題4:糖鎖改変のHBVの増殖・感染能への影響)研究の基礎知見となると考えられる。今後、上記の観察された糖鎖変化が機能的にどのようにHBV感染と関連するのかについて、課題3あるいは課題4と連携して解析を進めていく予定である。

E. 結論

肝臓細胞株における遺伝子解析、糖鎖構造解析(糖鎖プロファイル解析)、ならびにグライコプロテオーム解析データを利用したレセプター候補探索などを行った。また、感染前後および経過とともに、宿主細胞の糖鎖構造(糖鎖プロファイル)が変化していることが観察された。基本的な糖鎖の構造情報、糖鎖関連遺伝子の発現情報および細胞表面タンパク質の発現情報などを得ることが出来た。これらの知見を基に、統合的にHBV感染の糖鎖合成への影響を捉えていきたいと考えている。

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

特記すべき情報なし。

2. 学会発表

- 1) **Togayachi A**, Ocho M, **Kaji H**, Kuno A, Iio E, Sogabe M, Tanaka Y, Ikehara Y, Mizokami M, Narimatsu H. Glycoproteomic Discovery of Serological Biomarker for Hepatitis Virus Infection-associated Chronic Liver Disease. 2014 TASL-Japan Hepatitis B Workshop (Second). Taipei (Academia Sinica), 19-20 Apr. 2014.
- 2) **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. 2014 TASL-Japan Hepatitis B Workshop (Second). Taipei (Academia Sinica), 19-20 Apr. 2014.

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

出願:1件(特願2015-83726)

2. 実用新案登録

該当事項なし。

3. その他

該当事項なし。