

HBV-宿主細胞における糖鎖の役割

研究分担者 舘野 浩章 産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター 主任研究員
研究分担者 佐藤 隆 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：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。本課題では、宿主細胞上におけるHBV糖鎖と相互作用する糖鎖認識分子（内在性レクチン）の探索を進めることにより、HBV-宿主細胞間相互作用機構を糖鎖という視点から理解することを目的とする。本年度は、グリコシダーゼ処理のHBV感染における影響、NTCP-Huh7細胞の構築と、本モデルを用いたPreS1ペプチドの結合やHBVの感染、次世代シーケンサーによる内在性レクチン候補分子の探索を行った。今後、HBV感染におけるグリコシダーゼの影響、内在性レクチン候補探索を行い、HBV糖鎖の感染における影響と、HBV糖鎖を認識する内在性レクチンの同定を行い、HBV糖鎖のHBV感染における役割について明らかにする。

A. 研究目的

課題3では、HBV糖鎖のHBV感染における影響について調べるとともに、宿主細胞上におけるHBV糖鎖の認識分子（内在性レクチン）の探索を行うことを目的とする。最終的には、HBVの感染機構への理解を深めるとともに、感染阻害剤を開発することを視野に研究を進める。

B. 研究方法

(1) グリコシダーゼ処理のHBV感染における影響：ヒト肝臓キメラマウスであるPXBマウスから分離されたprimary human hepatocyte：PHH細胞を用いてHBV感染感染実験を行い、感染時におけるウイルス粒子糖鎖修飾の影響を検証した。

PHH細胞は、感染宿主域が狭いHBVにおいて感染可能でウイルス複製効率の良い細胞であ

りin vitroで頻用されている。その細胞に対し、あらかじめ6種類のグリコシダーゼ処理を加えたHBVを感染させ、継時的に細胞上清中のHBV-DNA量(qPCR法)、HBs抗原量(ELISA法)測定を行った。

(2) NTCP-Huh7細胞の構築、結合アッセイ、感染実験：NTCPをHuh7細胞にトランスフェクションして、安定発現細胞株の構築を行った。PreS1の結合をフローサイトメトリーで解析した。感染研から導入したHBVの感染実験を行った。

(3) 内在性レクチン候補分子の探索：次世代シーケンサーで内在性レクチン候補分子の探索を行った。

(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）」、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；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) グリコシダーゼ処理のHBV感染における影響：無処理の感染源(positive control)では感染約2週間でHBV-DNA量 6.0×10^4 copies/ml、HBsAg量 5000mIU/ml に達し感染が成立したことが確認された。一方、①PNgase処理したサンプルではポジコンと比較してウイルス複製の低下が認められた②sialidase処理したサンプルでは逆にポジコンと比較してHBs抗原量、HBV-DNA量の増加が認められた。①、②の結果は再現性が確認された。

(2) NTCP-Huh7細胞の構築、結合アッセイ、感染実験：NTCPをHuh7細胞にトランスフェクションして、安定発現細胞株の構築を行ったところ、3種のクローンの構築に至った。PreS1ペプチド、及びPreS1 longの結合をフローサイトメトリーで解析したところ、結合を確認することができた。更に、HBVの感染の感染も確認することができた。現在は糖鎖修飾PreS1を作製中であり、NTCPとの相互作用における糖鎖修飾の意義について検討する予定である。

(3) 内在性レクチン候補分子の探索：次世代シーケンサーを用いて、感染細胞（ヒト肝細胞、NTCP-Huh7）と非感染細胞（Huh7、HepG2）に発現するmRNAの配列解読を行った。得られた全遺伝子情報から内在性レクチン様ドメインをもつ遺伝子群を計20種類抽出した。更に、非感染細胞と比べて感染細胞でmRNAの発現が高い内在性レクチンを探索した。

D. 考察

(1) グリコシダーゼ処理のHBV感染における影響：グリコシダーゼ処理によりHBV感染に影響が見られた。グリコシダーゼ処理によるタンパク質などへの影響はないと考えられることから、HBV糖鎖の構造がHBVの感染に関係すると考えられる。

(2) NTCP-Huh7細胞の構築、結合アッセイ、感染実験：感染実験に使用可能なNTCP-Huh7細胞株を構築することができた。PreS1 longとの顕著な結合力の違いは認められなかったため、PreS1ペプチドの長さを長くしたことによるNTCPとの親和力の向上は認められなかったと考えられる。

(3) 内在性レクチン候補分子の探索：

(1) のグリコシダーゼ処理の結果から、どのような糖鎖結合特異性をもつ内在性レクチンがHBV感染に関係するのかが明らかとなった。今後、実際にこれら内在性レクチン候補がHBVの受容体として機能するかどうかについて検証していく。

E. 結論

(1) グリコシダーゼ処理のHBV感染における影響：HBV糖鎖が感染に関係することが明らかになった。

(2) NTCP-Huh7 細胞の構築、結合アッセイ、感染実験：感染実験に使用可能な NTCP-Huh7 細胞株を構築することができた。

(3) 内在性レクチン候補分子の探索：HBV 糖鎖を認識する内在性レクチン候補を抽出することができた。

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

特記すべき情報なし。

2. 学会発表

- 1) **Sato T**, **Tateno H**, Shikanai T, Kaji H, Angata K, Narimatsu H. Endogenous Lectins as Co-receptors for HBV Infection. 2014 TASL-Japan Hepatitis B Workshop (Second) Apr.19-20, 2014. Taipei.
- 2) Takaoka A, Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, **Iijima S**, Rice C, Harashima H, Kohara M, Tanaka Y. Host sensing mechanism for the activation of antiviral innate responses to HBV infection. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep.3-6, 2014. Los Angeles.
- 3) Hayashi S, Khan A, Simons B, Jones C, Homan C, McMahon B, Murakami S, **Iijima S**, Isogawa M, Watanabe T, Tanaka Y. Carcinogenic potential of hepatitis B virus genotype F is associated with accumulation of novel core mutations. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep.3-6, 2014. Los Angeles.

- 4) Tsutsumi S, Watanabe T, Murakami S, **Iijima S**, Hayashi S, Omagari K, Isogawa M, Tanaka Y. Evaluating hepatitis B virus lifecycle and screening anti-viral drugs using primary human hepatocytes isolated from chimeric mice. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep.3-6, 2014. Los Angeles.
- 5) Inoue T, Ohne K, Ochi N, Shinkai N, Murakami S, **Iijima S**, Ogawa S, Watanabe T, Tanaka Y. A Newly Developed High-Sensitive HBsAg Chemiluminescent Enzyme Immunoassay is a Precise Application as a pre-Transfusion Screening Test to Detect Occult HBV. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov.7-11, 2014. Boston.
- 6) Watanabe T, Hamada-Tsutsumi S, Shinkai N, Iio E, Matsunami K, **Iijima S**, Murakami S, Omagari K, Isogawa M, Sugiura W, Tanaka Y. Pre- and Post-Exposure Prophylaxis against Hepatitis B Virus Infection by HBV-active Antiretroviral Therapy. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov.7-11, 2014. Boston.
- 7) Hamada-Tsutsumi S, Watanabe T, Murakami S, Iio E, Matsunami K, **Iijima S**, Omagari K, Shinkai N, Sugiura W, Tanaka Y. Post-exposure prophylactic effect of nucleot(s)ide analogues demonstrated using primary human hepatocytes isolated from chimeric mice. The 11th JSH Single Topic Conference. Nov.20-21, 2014. Hiroshima.
- 8) Hayashi S, Khan A, Simons BC, Jones CL, Homan C, McMahon BJ, Murakami S,

Iijima S, Isogawa M, Watanabe T, Tanaka Y. Association between Hepatocellular Carcinoma and Accumulation of Novel Core Mutations in Hepatitis B Virus Genotype F. The 11th JSH Single Topic Conference. Nov.20-21, 2014. Hiroshima.

9) Hamada-Tsutsumi S, Watanabe T, Murakami S, Iio E, Matsunami K, Iijima S, Omagari K, Shinkai N, Sugiura W, Tanaka Y. Post-exposure prophylactic effect of nucleot(s)ide analogues demonstrated using primary human hepatocytes isolated from chimeric mice. The 11th JSH Single Topic Conference. Nov.20-21, 2014. Hiroshima.

10) Hayashi S, Khan A, Simons BC, Jones CL, Homan C, McMahon BJ, Murakami S, Iijima S, Isogawa M, Watanabe T, Tanaka Y. Association between Hepatocellular Carcinoma and Accumulation of Novel Core Mutations in Hepatitis B Virus Genotype F. The 11th JSH Single Topic Conference. Nov.20-21, 2014. Hiroshima.

11) 飯島沙幸, 松浦健太郎, 渡邊綱正, 飯尾悦子, 村上周子, 林佐奈衣, 五十川正記, 田中靖人. C型慢性肝炎に対する3剤併用療法における薬剤投与直後のPBMC内ISG発現動態. 第24回抗ウイルス療法研究会総会. 平成26年5月7日～9日. 山梨.

12) 堤進, 渡邊綱正, 村上周子, 飯島沙幸, 飯尾悦子, 松波加代子, 新海登, 松浦健太郎, 五十川正記, 田中靖人. 大量調整可能なヒト肝細胞を用いたHBV in vitro 感染培養系を利用した創薬探索の可能性. 第50回日本肝臓学会総会. 平成26年5月29日～30日. 東京.

13) 渡邊綱正, 堤進, 飯島沙幸, 村上周子, 尾曲克己, 五十川正記, 田中靖人. C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン応答を規定するIL28B遺伝子多型の解析. 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会. 平成26年6月19日～20日. 札幌

14) 松浦健太郎, 飯島沙幸, 田中靖人. 3剤併用療法における末梢血単核球中のインターフェロン誘導遺伝子群の応答性とIL28B遺伝子多型・治療反応性との関連. 第18回日本肝臓学会大会. 平成26年10月23日～24日. 神戸.

15) 林佐奈衣, 五十川正記, 村上周子, 飯島沙幸, 堤進, 尾曲克己, 渡邊綱正, 田中靖人. B型肝炎ウイルス Genotype F における肝細胞癌関連因子の検討. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 平成26年11月10日～12日. 横浜.

16) 堤進, 渡邊綱正, 村上周子, 飯島沙幸, 林佐奈衣, 尾曲克己, 五十川正記, 田中靖人. 初代ヒト肝細胞を用いたB型肝炎ウイルス感染初期の宿主免疫応答とウイルス生活環の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 平成26年11月10日～12日. 横浜.

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。

糖鎖変異のHBVの増殖・感染能への影響-I

研究分担者 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
研究分担者 伊藤 清顕 愛知医科大学 医学部 内科学講座（消化器内科）准教授

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。本研究は、1) HBV (HBs抗原)の糖鎖解析 2) HBV感染可能細胞の糖鎖解析 3) HBV-宿主細胞における糖鎖の役割 4) 糖鎖改変のHBVの増殖・感染能への影響 5) 糖鎖修飾を受けたHBs抗原の大量精製の5課題に取り組んでいる。これまでに、精製HBs抗原の質量分析解析、グライコプロテオーム解析、細胞膜プロテオーム解析と次世代シーケンサーによる肝細胞特異的な内在性レクチンの同定、糖鎖遺伝子解析とcDNAライブラリーの調製、siRNAライブラリーを用いたHBV作製スクリーニング、酵母発現HBs抗原の精製等を行った。本研究課題は、siRNAライブラリーを用いてHBV産生細胞（HepG2.2.15細胞）をスクリーニングし糖鎖合成系をターゲットとしたHBV増殖を阻害する創薬の可能性が示された。以上の研究により、今後さらに他研究グループと連携し、B型肝炎を治療する新規治療薬の開発へと繋げる。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）に対するこれまでの治療に加えて、副作用や薬剤耐性の問題から新規機序での創薬研究が進められている。本研究では、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。さらには、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。

我々はこれまでにHBVのエンベロープ蛋白上の146番目のアスパラギンへのN結合型糖鎖がHBVの細胞外への放出に必須であることを報告してきた（Ito K et al. J Virol. 2010）。この146番目のアスパラギンを異なるアミノ酸に変異させるとHBV粒子が細胞外に全く分泌されなくなるため、蛋白自体のfolding不良による粒子形成不全もしくは小胞体からゴルジ装置への細胞内輸送不全によりHBVの分泌が阻害されるものと考えられる。これに対して、本研究の

第一段階のステップとして、各種糖鎖プロセッシング阻害剤を用いることにより、どの過程の糖転移酵素が分泌に重要か、また分泌がどの程度ブロックされるかに関して実験を行った。その結果、糖プロセッシング阻害剤による HBV に対する抑制効果は、エンベロープ蛋白とコア粒子との assembly の障害、もしくは粒子の細胞内輸送での障害によると考えられた。しかし、糖プロセッシング阻害剤による HBV の抑制効果は比較的弱く、抗ウイルス剤として使用することは難しいと推察された。そこで次のステップとして、in vitro 実験系を用いて各種糖鎖遺伝子に対する siRNA ライブラリーを用いた網羅的解析により HBV の増殖能、分泌能に対する影響を解析し、糖鎖合成系をターゲットとした創薬シーズ探索を試みた。

B. 研究方法

産業技術総合研究所・糖鎖創薬技術研究センターにより作成された肝細胞内の各種糖鎖遺伝子を標的とした siRNA スクリーニングパネルを使用し、HBV 持続産生系である HepG2.2.15 細胞を一定量培養して各種糖鎖遺伝子が HBV の増殖や分泌に与える影響を解析した。培養上清中に分泌された HBV-DNA および HBs 抗原は、real-time PCR 法および ELISA 法により測定した。抗 HBV 作用を持つ siRNA に関して二次スクリーニングを行い、将来の臨床応用を視野に入れ MTT assay や LDH cytotoxicity detection kit による細胞障害性の評価や BiP や CHOP の定量による小胞体ストレスの検出を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、現在のところ cell line を用いた in vitro 実験のみであり、倫理面の問題はない。HBV 作製に関する文部科学大臣確認を行い、許可の承認を得ており、研究員の安全面に注意し

ている。

C. 研究結果

siRNA による網羅的解析の結果、数種類の糖鎖遺伝子を標的とした siRNA により培養上清中への HBV-DNA の分泌抑制を認めた。特に糖鎖関連遺伝子の一つに対する siRNA-X は、HBV DNA および HBs 抗原の培養上清中への分泌を著明に抑制した。糖鎖関連遺伝子 X は小胞体やゴルジ体の膜状に存在するタンパク質と考えられている。これまでの解析で siRNA-X は、細胞障害性は認めていないが BiP や CHOP といった小胞体ストレスに関連する遺伝子の mRNA レベルの上昇を認めた。また、小胞体ストレスの蛋白レベルでの解析を行ったところ、Western blotting で蛋白レベルでも小胞体ストレスマーカーの上昇を認めた。siRNA の容量を低用量から段階的に投与すると、HBV に対して効果を認める容量では同時に小胞体ストレスを認めており、小胞体ストレスを介しての効果もしくは必須の副反応であると考えられた。また、小胞体ストレスの inhibitor である Chemical chaperon を同時に投与したところ小胞体ストレスマーカーの減少を認めたが、同時に HBV DNA の培養上清中への分泌を増加させた。

異なるシーズ候補として、siRNA-Y の一つに対する siRNA も HBV DNA の分泌を抑制しており、現在さらに解析を進めているところである。

D. 考察

糖鎖遺伝子を標的とした siRNA のうち数種類が HBV の分泌もしくは増殖を抑制することが明らかとなり、HBV に対して糖鎖合成系をターゲットとした創薬の可能性が示唆された。特に糖鎖関連遺伝子の一つを抑制することにより HBV-DNA と HBs 抗原の分泌が著明に抑制されており、小胞体ストレスや細胞障害性に関して

確認中であるが創薬シーズとなる可能性が示唆された。各種糖鎖遺伝子を knock down することによる HBV に与える影響を詳細に確認することにより、これまで不明であった肝細胞の糖鎖合成系と HBV 複製系との関連が徐々に明らかになっている。

E. 結論

(1) 糖鎖合成系と HBV の生活環との関連が明らかになりつつある。

(2) 糖鎖合成系をターゲットとした創薬の可能性が示された。

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

特記すべき情報なし。

2. 学会発表

- 1) Ito K, Yoneda M, Angata K, Tong S, Mizokami M, Narimatsu H. Development of New Anti-Viral Agent Targeting Sugar Chain Synthesis System Associated with Life cycle of Hepatitis B Virus. 2014

International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles, USA, September, 2014.

- 2) 伊藤清顕, 米田政志, 安形清彦, 溝上雅史, 成松久. 糖鎖合成系を標的とした B 型肝炎ウイルスに対する創薬研究の試み. 第 50 回日本肝臓学会総会, ワークショップ, 東京, 2014 年 5 月
- 3) Angata K, Ito K, Togayachi A, Sato T, Ito H, Ocho M, Yoneda M, Narimatsu H. Analysis and targeting of glycosylation in HBV secretion. The 6th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology (ACGG) held in Hyderabad, India, Dec. 9-12, 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。

糖鎖改変のHBVの増殖・感染能への影響 – II

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 梶谷内 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 佐藤 隆 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

研究要旨：インターフェロンや核酸アナログ製剤に代わる新たなB型肝炎患者の治療薬が必要となっている。これまでに幾つかの糖鎖合成阻害剤のHBV阻害剤としての報告はあるが、本格的な治療薬としては使用されていない。本研究班では、B型肝炎ウイルス(HBV)の感染や複製における糖鎖の役割を明らかにし、B型肝炎の新規治療薬の開発を目指す事を目的としている。そこで本研究課題では、糖鎖遺伝子の機能解析技術を開発・実用化してきた糖鎖生物学者と肝疾患やHBV作製・感染実験の専門家との協力体制により、HBVの増殖・分泌に必要な糖鎖合成系・糖鎖関連遺伝子を解析し、HBVに対する創薬ターゲットを探求している。これまでに、HBs抗原上の糖鎖の有無とHBVの増殖・分泌との関係を解明するために、タグ付きのHBs抗原を構築し肝がん細胞で発現させる系を開発した。まず糖鎖合成の阻害剤を用い、ウイルス粒子形成・分泌や感染への糖鎖の影響が現れる事を確認した。肝がん細胞や肝細胞の糖鎖遺伝子発現の解析を基に作製したsiRNAプレートを用いて糖鎖改変細胞を作製しスクリーニングを行った結果、86siRNAターゲットのうち約15糖鎖遺伝子でHBs抗原の糖鎖が減少した。HBVを産生する肝細胞(HepG2.2.15.7細胞)を用いたスクリーニングから、HBV粒子の形成・分泌能を抑制する創薬ターゲット候補をリストアップした。二次スクリーニングの結果から最もHBV抑制活性が認められたsiRNAの効果を糖鎖合成阻害剤と比較した結果、AFP分泌への影響やレクチンプロテイングへの影響などはほとんど確認されなかった。またHuH7細胞をsiRNAで形質転換した後にトランスクリプトーム解析し、ターゲット遺伝子の発現量の低下とともに主な遺伝子発現の変化情報を得た。

A. 研究目的

日本には約110-140万人のB型肝炎ウイルス(HBV)保有者がいると考えられ、従来型の母子感染に加え水平感染によっても広がりつつある。HBV感染患者の約10%が慢性肝炎や肝硬変、さらにその内の数%の患者が肝細胞癌を発

症するとされ、長期にわたる治療と経過観測が必要となっている。現在HBVの治療法としてインターフェロンが用いられるが、B型肝炎においてはインターフェロンによる治療成績が悪い場合が多く、特にgenotype間での治療効果に差がある事が報告されている。次に核酸アナロ

グ剤の継続投与が実施されているが、HBV DNA 中の変異による薬剤耐性ウイルスの出現が問題になっている。また、日本では HBV ワクチンはユニバーサルワクチンとして実施されておらず、公費接種が広がるまで輸血・移植における感染事故や水平感染を防ぐ事は難しい。実際に HIV や HCV より微量のウイルス混入で感染が成立することから、HBV にとっては輸血による感染事故が未だに報告されている。従って、HBV の感染/複製機構のより詳細な理解を進め、逆転写酵素に代わる新規の創薬ターゲットを開発する事が重要である。

ウイルスの形成・分泌において糖鎖が重要であることが明らかになりつつあるが、HBV における糖鎖の機能は未だに不明なままである。実際に HBs 抗原上に糖鎖が付加されている事が知られているが、糖鎖の無い HBs 抗原も存在し両者が一つの HBV 粒子内に含まれている可能性が高い。しかし伊藤らは、糖鎖付加の阻害は感染性を有する HBV の粒子形成や分泌を減少させる事を示唆しており、糖鎖付加を制御する事により HBV の放出を阻害する事が考えられる。本研究では、HBV 作製細胞の糖鎖合成系を阻害する事により、ウイルス粒子の形成や分泌に関わる糖鎖構造を同定し、抗 HBV の創薬のターゲットを探索する。

B. 研究方法

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

(1) 糖鎖合成阻害剤の HBs 抗原粒子形成・分泌への影響解析：

HBV のエンベロープタンパク質である S-HBs 抗原 cDNA (genotype C、名古屋市立大学より

供与頂いた) を PCR で増幅サブクローニングし、分泌シグナルとタグを導入し、S-HBs 抗原発現ベクターを構築した。塩基配列を確認した後に、プラスミド DNA をエンドトキシンフリーで調製した。

HuH7 細胞に S-HBs 抗原の発現ベクターを導入し、24 時間後にツニカマイシンなどの糖鎖合成阻害剤を含む培地と交換した。48 時間後に培養上清から S-HBs 抗原を抗体ビーズで回収し、SDS-PAGE とウエスタンブロットングを行い HBs 抗原の発現量と糖鎖の有無を確認した。

(2) 糖鎖遺伝子の発現解析とライブラリーの調整：

肝細胞の一次培養、HuH7 細胞や HepG2 細胞などの肝がん細胞から total RNA を調製し、cDNA を合成した後に糖鎖遺伝子の発現量を qRT-PCR 解析(糖鎖遺伝子 qPCR アレイシステム) やトランスクリプトーム解析(次世代シーケンサー) を実施した。この結果を基に糖鎖遺伝子をその発現パターンで 2 群(抑制目的と過剰発現目的)に分け、それぞれ cDNA ライブラリーと siRNA ライブラリーの作成を進めた。siRNA ライブラリーの作製は 86 個の糖鎖遺伝子にそれぞれ 3 種類の合成 siRNA を用いた。今年度は特に siRNA によるスクリーニングを行った。

(3) 二次スクリーニング：

愛知医科大学において HBV 産生細胞である HepG2.2.15.7 細胞を用いて、HBV 分泌抑制効果のある siRNA のリストアップを行った(伊藤、米田の分担報告書を参照)。1 つの遺伝子につき 3 種の siRNA をそれぞれ 12-well プレートに固定した。形質転換前にトランスフェクション試薬と混ぜ、HuH7 細胞をトリプシン処理した細胞を調製し、リバーストランスフェクションを

行った。24時間後に S-HBs 抗原の発現ベクターを導入し、48時間後に上述の様に S-HBs 抗原を回収し、ウエスタンブロッティングにより S-HBs 抗原の発現と糖鎖の有無を検出した。

(4) siRNA の糖タンパク質合成への影響：

siRNA 処理の肝細胞への影響を解析するために、まず糖タンパク質である AFP の発現量を測定した。コントロールとしてツニカマイシン処理を施した HuH7 細胞と siRNA 処理後の HuH7 細胞を用意し、さらにウシ血清不在下で培養し培養上清を回収した。サンプルは SDS-PAGE で展開し PVDF 膜に転写後に抗 AFP 抗体で検出した。

次に糖鎖合成への影響を見るために、コントロール siRNA 同様に HuH7 細胞をトランスフェクションし、48時間後に PBS で洗浄後、細胞を溶解し遠心後にライセートを得た。サンプルは SDS-PAGE で展開し PVDF 膜に転写後に E-PHA などでレクチンブロッティングを行った。

(5) siRNA の効果の検証：

siRNA がターゲット mRNA 量を減少させていることを確認するために、siRNA 処理後の HuH7 細胞からトータル RNA を調製し、cDNA を合成後に遺伝子特異的プライマーを用いて qRT-PCR により発現量を測定した。サンプル間の調整には ACTB 遺伝子を測定して用いた。

次にターゲット遺伝子 mRNA をノックダウンするために必要な siRNA 濃度を決定するために、HuH7 細胞を 100, 10, 1, 0.1 nM siRNA で処理し、ターゲット遺伝子の mRNA 量を qRT-PCR によって測定した。siRNA 処理後の HuH7 細胞からトータル RNA を調製し、トランスクリプトーム解析を実施し、ターゲット遺伝子を含む mRNA 発現量の変化情報を収集した。

(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）」を遵守している。また各種手続き（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；愛知医科大学：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して実施した。

C. 研究結果

(1) HBV 表面上の糖鎖は HBs 抗原への糖鎖修飾であり、糖鎖合成系の HBs 抗原の形成・分泌への影響を調べるために、これまでに genotype C のリコンビナント S-HBs 抗原の高発現系と精製法を確立した。HuH7 細胞に cDNA をトランスフェクションし、48時間後に培養上清から抗体ビーズを用いてリコンビナント S-HBs 抗原を回収した。SDS-PAGE で展開し、抗 FLAG 抗体でウエスタンブロットした結果、糖鎖有無の2本のバンド（N型糖鎖有の p28 と N型糖鎖無しの p25）が検出され、N型糖鎖有無の割合はほぼ 1:1 に維持されていた。

この系を用い HuH7 細胞に S-HBs 抗原の発現ベクターを導入24時間後に糖鎖合成阻害剤を含む培地と交換し、S-HBs 抗原の発現と糖鎖の付加を確認した。一部の糖鎖合成阻害剤によって S-HBs 抗原の分泌が有意に減少する事が確認されたが、HBV 阻害活性が報告されている糖鎖合成阻害剤の効果は少なかった（図1）。

HBsAg-protein expression in HuH7 cells
Effect of inhibitors for glycosylation pathways

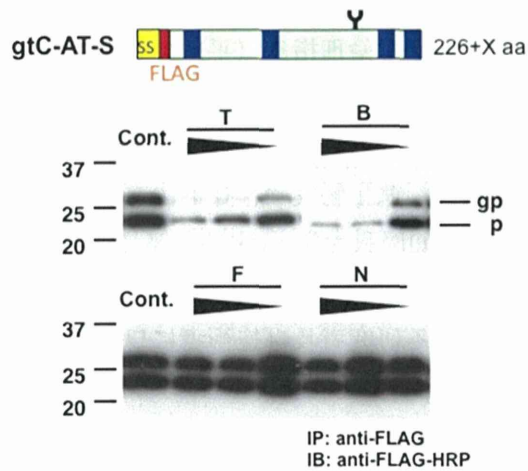


図1 糖鎖合成阻害剤のHBs抗原粒子形成・分泌への影響 S-HBsをHuH7細胞で発現させると糖鎖有り(gp)と糖鎖の付いていない(p)HBs抗原の2種の(糖)タンパク質が検出される。糖鎖合成阻害剤を添加した場合、HBs抗原上の糖鎖修飾が抑制されHBs抗原の分泌量が減少した。

(2) これまでに肝細胞や肝がん細胞のトランスクリプトーム解析から糖鎖関連遺伝子の発現プロファイルを作成した。その結果を基にHBV上の糖鎖合成に関与する遺伝子として86遺伝子に対するsiRNAライブラリーを作成した。

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

次にsiRNAをプレートにコーティングしリバーストランスフェクションにより3種のsiRNA/wellをHuH7細胞に導入し、24時間後にS-HBs抗原の発現ベクターで形質転換し、

S-HBs抗原の発現を解析した。スクリーニングの結果、10種以上の遺伝子について、コントロールsiRNAと比較して、S-HBs抗原の発現の低下あるいは糖鎖付加の減少を確認した(図2)。

2nd screening of siRNAs

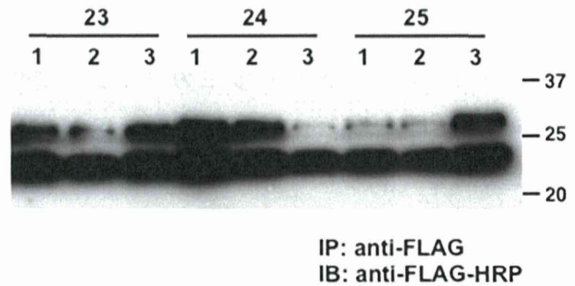


図2 siRNAプレートの二次スクリーニングの実験例 HBs抗原cDNAで形質転換後に、HuH7細胞の培養上清より回収したHBs抗原を検出した。糖鎖遺伝子siRNAの添加により糖鎖を有するHBs抗原の減少が確認された。

(3) これらの実験と並行して、HBV産生細胞であるHepG2.2.15細胞を用いてHBV粒子の分泌への影響を解析しており、幾つかのsiRNAにHBVの分泌を低下させる効果が認められた(伊藤と米田の課題を参照)。そこで、siRNAの肝細胞における糖タンパク質合成への影響を解析する実験を行った。HuH7細胞にターゲットsiRNAでトランスフェクションし、代表的な肝臓の分泌糖タンパク質であるAFPの発現量に有意な変化は見られなかった(図3)。同様にライセート中の糖タンパク質のレクチンブロッキングも調べた限りでは差が見られなかった。

Effect of siRNAs on expression of AFP

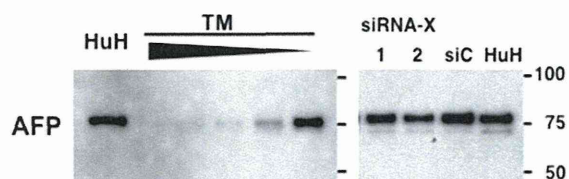


図3 肝細胞で分泌される糖タンパク質 AFP の発現への影響 HuH7 細胞をツニカマイシンで処理すると AFP の分泌は阻害されるが、siRNA 処理では AFP の発現に変化は見られなかった。

(4) siRNA の効果的な濃度を確認するために、HuH7 細胞を 100, 10, 1, 0.1 nM siRNA で処理し、ターゲット遺伝子の mRNA 量を qRT-PCR によって測定した結果、0.1 nM では効果が低いが 1 nM 以上であれば 70% 程度以上減少させる効果が認められた (図 4)。

次に、効果を転写レベルで網羅的に解析するために siRNA 処理した HuH7 細胞からトータル RNA を調製し、トランスクリプトーム解析を行った結果、ターゲット遺伝子の発現が約八分の一まで減少していることと糖鎖関連遺伝子では数個の発現変化を除きほとんど発現量に変化が認められなかった。

qRT-PCR of target mRNA after siRNA transfection

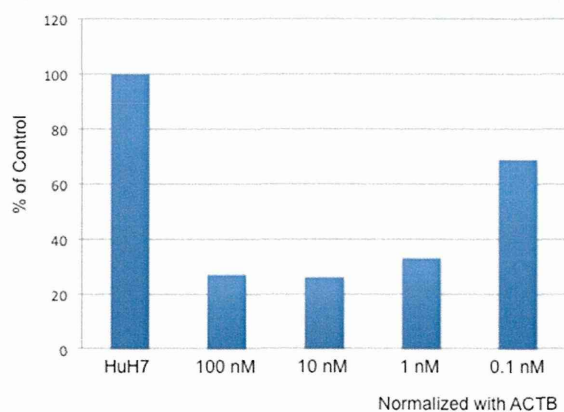


図4 siRNA の至適濃度の検討 siRNA 処理後にトータル RNA を調製しターゲット mRNA 量を qRT-PCR 法で定量した。

D. 考察

本研究では糖鎖から見た HBV 感染における創薬ターゲットを選定することを目的としている。これまでの当研究班の成果から、1) HBV 上の糖鎖構造は HBV を産生する肝細胞上の糖鎖構造に比べ単純であること、2) その HBV 上の糖鎖が感染効率に関与している可能性、3) HBs 抗原上の糖鎖が抗体による認識を阻害する可能性が考えられた。本研究課題から HBs 抗原上の糖鎖が感染性のある HBV の形成・分泌に関与している可能性が示された。すなわち宿主肝細胞側の糖鎖合成系は HBV の糖鎖修飾も担うので、宿主肝細胞の糖鎖合成系を阻害することにより、HBV の感染に関わる糖鎖の改変、HBV 形成や HBs 抗原の構造に重要な糖鎖や糖鎖関連分子を抑制出来ると考えられる。

伊藤らの研究により、感染能の有る HBV の分泌には HBs 抗原上の N 型糖鎖の付加が必要である事が明らかになっている。実際に、ツニカマイシンなどの N 型糖鎖の合成阻害では、HBV DNA を含まないウイルス様粒子が放出されるものの感染能を有する HBV 粒子は分泌されない。本研究ではツニカマイシンやプレフェルディン A などの糖鎖合成阻害剤が有意に S-HBs 抗原の発現を抑制する事が示されたが、ノジリマイシンでは抑制効果が少なかった。

糖鎖の重要性が確認されたので、糖鎖遺伝子の siRNA ライブラリーにより糖鎖改変細胞を作成し、HBV の分泌や感染にどのような影響を及ぼす糖鎖遺伝子をスクリーニングした。既に 10 種以上の糖鎖遺伝子 siRNA が S-HBs 抗原上の糖鎖の発現を抑制する事や HBV 形成・分泌を阻害する事が明らかになった (米田・伊藤の分担報告書も参照)。 siRNA 処理によってアポトーシスなどは見られず細胞増殖への影響は観察されていない。AFP などの糖タンパク質の分泌への影響も見られておらず、ツニカマイシンなどの効果と異なるメカニズムによって

HBV 抑制が起きていると考えられる。今後創薬の可能性を含め、HBV 阻害のメカニズムを明らかにする必要がある。また今後、生体内肝細胞の活動に影響を及ぼさない濃度の決定や（感染）肝細胞だけを選択的に輸送する技術開発が重要である。

E. 結論

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

本研究課題では、まず幾つかの糖鎖合成阻害剤が有意に S-HBs 抗原の発現を抑制する事を見出したが、細胞毒性などの問題が大きい。糖鎖遺伝子の siRNA ライブラリーにより糖鎖改変細胞作製を可能にし、10 種以上の糖鎖遺伝子 siRNA を創薬ターゲット候補としてリストアップする事に成功した。特に細胞増殖への毒性も見られず、HBs 抗原の分泌や HBV DNA 量を抑制する siRNA について特許出願した。

以上のように、HBV の感染過程（粒子形成・分泌）における糖鎖合成の重要性と糖鎖機能解析を中心に医用応用のための基盤研究を進めた。さらに搭載遺伝子をターゲットとした B 型肝炎を治療する新規治療薬の開発へ進める。

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) Angata K, Ito K, Togayachi A, Sato T, Ito H, Ocho M, Yoneda M, Narimatsu H.

Glycosylation of HBsAg and its role in secretion pathway. TASL-Japan Hepatitis B Workshop held in Taipei, Apr. 19-20, 2014.

2) Angata K, Ito K, Togayachi A, Sato T, Ito H, Ocho M, Yoneda M, Narimatsu H. Analysis and targeting of glycosylation in HBV secretion. The 6th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology (ACGG) held in Hyderabad, India, Dec. 9-12, 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。

糖鎖修飾を受けた HBs 抗原の大量精製

研究分担者 千葉 靖典 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 佐藤 隆 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 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 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:本分担課題ではヒト型糖鎖を発現する酵母を用い HBs 抗原の大量精製を進めるとともに、現在ワクチン用に使用されている通常の酵母由来の HBs 抗原と比較しより有効なワクチンの開発に繋げることを目的としている。本年度は、酵母での HBs 抗原 L-タンパク質 (L-HBs) の調製、動物培養細胞を用いた HBs 抗原 M-タンパク質 (M-HBs) の調製を行なった。また化学-酵素ハイブリッド合成法を用いて、Pre-S1 領域、S-領域の糖鎖付加部位を含む部分領域について糖鎖構造を均一化した糖ペプチドの合成法を確立し、調製を行なった。これらの糖タンパク質、糖ペプチドを用いてマウスへの免疫実験を行い、抗体生産能の評価を行なった。糖鎖付き PreS1 ペプチド及び市販の糖鎖なし 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。糖鎖なし 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、中和抗体であればワクチンとしての有用性が示唆された。

A. 研究目的

B型肝炎はC型肝炎と比較して治療成績が低く、画期的な新規治療薬の開発が望まれている。国民のニーズの高いB型肝炎の画期的な新規治療薬の開発等を目指し、基盤技術の開発を含む創薬研究や、治療薬としての実用化に向けた臨床研究等を総合的に推進するためには、治療用も含め新たなワクチン開発が重要である。

我が国で使用されている主なHBVワクチン(HBs抗原)は酵母由来である。その製品としてはヘプタボックス(Merck社、GenotypeAを認識)、ピームゲン(化血研、GenotypeCを認識)があげられる。これらはHBs抗原のS領域

を酵母で発現させており、糖鎖は付加されていない。近年、これらのワクチンを接種したにも関わらず、B型肝炎に罹患する例が増えてきている。その原因としてはHBVエスケープミュータントの発生の可能性や、Genotypeの異なるウイルスの水平感染が指摘されている。また免疫源としたHBs抗原のS領域に対してできた抗体が感染したB型肝炎ウイルスを十分に認識していない可能性がある。実際にボランティアにピームゲンを免疫して得られた抗体のエピトープ解析の結果では、糖鎖が付加されるS領域のループ構造に対して抗体ができているが、これらの抗体は糖鎖を持ったHBs抗原に対して反

応性を示さないことが当研究班の研究結果より明らかになった。このことは天然の B 型肝炎ウイルスに対し抗体が結合できない可能性がある事を示唆している。従って、より天然に近い HBs 抗原をワクチンとして利用する事により有効性が高くなる可能性がある。

そこで本課題では、天然の HBs 抗原と同様に糖鎖を有する HBs 抗原の大量精製を行うことを目的とする。現在ワクチン用に使用されている通常の酵母由来の HBs 抗原と比較し、より有効なワクチンの開発に繋げる。

B. 研究方法

(1) 酵母による HBs 抗原の調製 : H25 年度までに開発した L-HBs 抗原発現酵母を培養し、菌体内から抽出する条件 (抽出バッファー、溶解温度、遠心分離条件) を検討した。次に KBr 密度勾配超遠心法、およびシュクロース密度勾配超遠心法による精製条件を検討し、精製法を確立した。計 2.4 L の培養を行ない、52 g の菌体から確立した方法で L-HBs を精製した。

(2) リコンビナント M-HBs の発現 : 免疫抗原に用いるリコンビナント M-HBs を、培養細胞系を用いて作製した。H25 年度に開発した S-HBs の高効率発現法に倣い、genotype C の M-HBs をコードする遺伝子を分泌発現用ベクター pFLAG-CMV3(Sigma-aldrich) に導入した。作製した発現ベクターを Huh7 細胞にトランスフェクションして、48 時間後に培養上清を回収し、抗 FLAG 抗体-agarose(Sigma-aldrich) を用いてリコンビナント M-HBs をアフィニティ精製した。抗 FLAG 抗体からの溶出は、FLAG ペプチド用いて競合溶出した。

(3) ハイブリッド合成法による糖鎖付加 HBs 抗原部分ペプチドの調製 : Pre-S1 の糖鎖付加部位を含む 46AA のペプチド

(GTNLSVNPPLGFFPDHQLDPAFGANSNN PDWDFNPNKDHWPANQV)、および 3 番目の N に GlcNAc を付加した糖ペプチドを化学合成した。また S 領域の糖鎖付加部位を含む領域 (CTKPSDG(A)NCTK-Biotin) についてジスルフィド結合を利用して環状化したペプチド、および 8 番目の N に GlcNAc を付加した糖ペプチドも作製した。一方、市販の Sialyl Glycopeptide から ENGase を用いて糖鎖を切断、精製し、オキサゾリン化反応を行って糖鎖ドナーを調製した。この糖鎖ドナーと化学合成した糖ペプチドを混合し、Glycosynthase を添加してトランスグリコシレーション反応を行った。得られた糖鎖転移産物を逆相カラムで分離することで均一な糖鎖を有する HBs 抗原の部分糖ペプチドを調製した。

(4) HBs 抗原免疫マウスにおける抗体価上昇の確認 : マウスに対する免疫手法ならびに抗体価の測定方法を確立するために、ピームゲン (リコンビナント S-HBs タンパク質) を Balb/c マウスに免疫し、その免疫マウス血清を用いて抗 HBs 抗原抗体の ELISA 測定系の構築を行った。市販の各種抗 HBs 抗体のうち、陽性コントロールとして使用可能なものがあるかどうかを検討した。次に、L-HBs 抗原、M-HBs 抗原をマウスに免疫し、その抗体価の上昇を観察した。さらに免疫マウス血清を用いて、HBs 抗原における領域ごとの反応性を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、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) 及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守し、あらかじめ産総研の組換え DNA 実験委員会、および動物実験委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

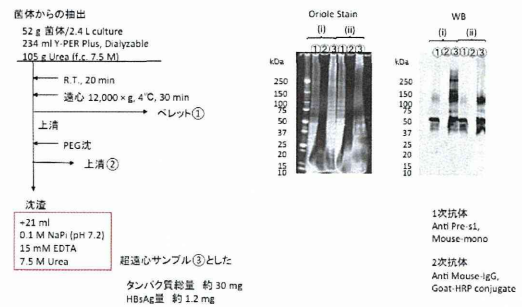
(1) 酵母による HBs 抗原の調製：

昨年度までに、4 種類の HBs 抗原をコードする遺伝子を全合成し、酵母のプラスミドベクターに挿入し、野生型酵母の形質転換を行なった。現在上市されている B 型肝炎ワクチンは、HBs 抗原の S 領域を酵母細胞内で発現している。これまでワクチンとして L 領域を発現させた例があまりないことから、pre-S1、pre-S2 を含む全長を発現させた。さらに糖鎖構造がより天然に近いワクチンの方がエスケープミュータントの抑制に効果があると考えられたため、糖鎖付加が起こるようにシグナルを付加して、分泌経路を通過させて培地中に分泌させるようにした。その結果、Genotype A 1 種類、Genotype C 1 種類の HBs 抗原を糖鎖が付加された形で発現させることに成功した。この培養上清に発現した HBs 抗原は抗 pre-S1 抗体でも検出されたことから、L 領域の N 末端を含む形で発現していることが確認された。

昨年度までは、培養上清中から糖鎖付加型の L-HBs 精製を試みていたが、除ききれないタンパク質の混在があり、また生産量もごく微量で使いにくいと判断した。そこで今年度は培養した酵母菌体からの HBs 抗原の精製を検討した。培地は 1x カザミノ酸培地を用い、昨年度と同様の条件で培養した。培養した菌体から容易に L-HBs を調製するため、市販の菌体溶解液

(Y-PER Plus, Dialyzable ; Pierce 社) を用い、抽出できるかどうか、またその抽出条件 (抽出バッファー、溶解温度、遠心分離条件) を検討した。その結果、7.5 M の尿素を含め Y-PER Plus を抽出バッファーとし、室温、20 分で抽出を行うのがよいことが示された。この抽出を行った後に 12,000 x g で遠心、上清を PEG 沈した沈殿物に L-HBs が多量に含まれていることが確認された (図 1)。この沈殿物を 7.5 M 尿素、15 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸バッファー (pH

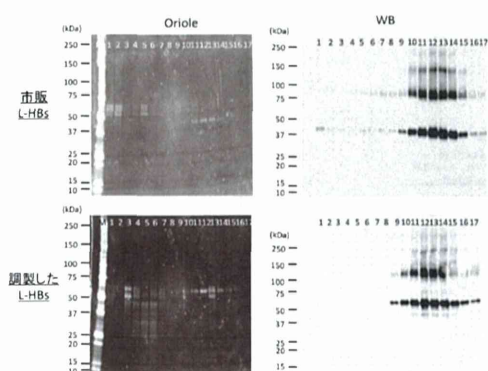
7.2) で溶解し、粗抽出液とした。



(図 1) 酵母からの抽出条件の検討

次に超遠心による精製条件を検討した。既報に従い、10-40%の臭化カリウム (KBr) による密度勾配を設定し、Beckman SW 55 Ti ローターで $m73,000 \times g$ 、4°C、16 時間超遠心を行なった。チューブの上層から溶液を 0.3 ml ずつ回収し、各フラクションについて抗 PreS1 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。夾雑タンパク質が比較的多い (KBr 密度の軽い) 画分を除き、抗体反応陽性のフラクションを回収した。この溶液を PEG 沈し、この沈殿物を 7.5 M 尿素、15 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.2) で溶解して次の超遠心に供した。

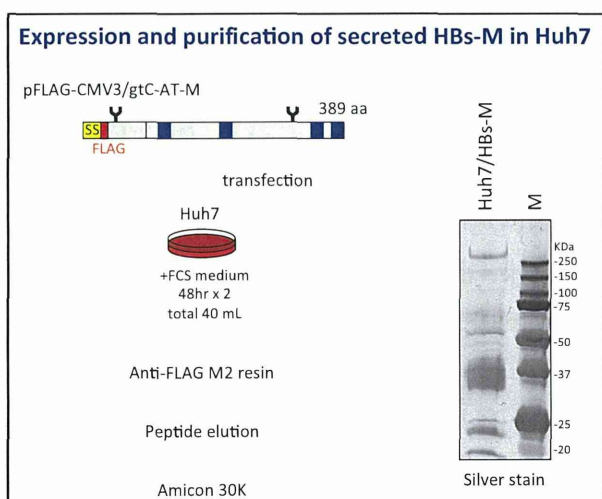
次のステップとして、5-50%のシュクロース密度勾配を設定し、上記と同条件で超遠心を行なった。チューブの上層から溶液を 0.3 ml ずつ回収し、各フラクションについて SDS-PAGE を行い、Oriole 染色 (Bio-Rad 社) と抗 PreS1 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、密度の高いフラクションにモノマー、ダイマーのシグナルが確認された。また Oriole 染色によりほぼ均一に精製されていると考えられた (図 2)。



(図2) シュクロース密度勾配遠心後の各フラクションの SDS-PAGE (Oriole 染色) とウエスタンブロット解析

(2) リコンビナント M-HBs の発現 :

免疫抗原に用いるリコンビナント M-HBs について培養細胞系を用いて作製した。genotype C の M-HBs をコードする遺伝子を分泌発現用ベクターに導入、作製した発現ベクターを Huh7 細胞にトランスフェクションして、48 時間後に培養上清を回収し、リコンビナント M-HBs をアフィニティ精製した。およそ 40 mL の培養上清を用いて 18.6 μg のタンパク質が精製できた。精製した M-HBs を SDS-PAGE で展開し、銀染色した結果、37 kDa 付近にメインのバンドが観察され、さらに複数のタンパク質バンドも含まれていることがわかった (図3)。



(図3) M-HBs の調製方法と精製した M-HBs の銀染色

(3) ハイブリッド合成法による糖鎖付加 HBs 抗原部分ペプチドの調製 :

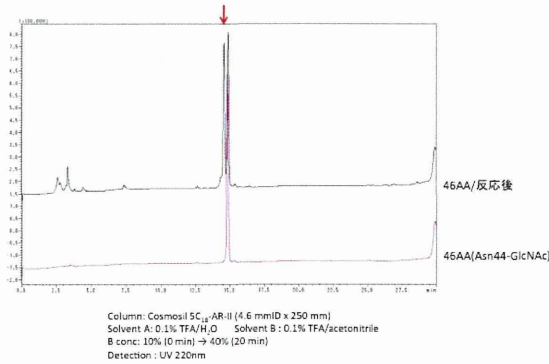
免疫原やスクリーニングで必要となる、HBs の各領域のペプチド、糖ペプチドについて合成を検討した。ペプチド部分は化学的合成法、糖鎖部分の転移は酵素を利用する、いわゆるハイブリッド合成により目的物の調製を検討した。

Pre-S1 の糖鎖付加部位を含む 46AA のペプチド (GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANS NNPDWDFNPNKDHWEANQV)、および 3 番目の N に GlcNAc を付加した糖ペプチドはペプチドシンセサイザーにより化学合成した。ペプチドシンセサイザーによるペプチドの合成は 40 残基程度が一般的であり、それ以上は収率が落ちることが予想された。また GlcNAc を含む糖ペプチドの調製には Thr-GlcNAc-Fmoc が必要となる。これらのことから糖ペプチドの合成経験を有する産総研北海道センターの清水に協力を依頼し、合成を進めた。清水らが開発したマイクロ波を利用した合成法により 46 残基のペプチドの合成に成功した。一方、S 領域の糖鎖付加部位を含む領域

(CTKPSDG(A)NCTK-Biotin) についてジスルフィド結合を利用して環状化したペプチド、および 8 番目の N に GlcNAc を付加した糖ペプチドについては、外部委託により作製した。

次に糖ペプチドに転移する糖鎖の調製を検討した。既に当研究班の梶らにより、HBs が有する N-型糖鎖の構造は、α2,6 結合のシアル酸を還元末端に持つ二分岐複合型糖鎖であることが示されている。そこで同じ構造の糖鎖であり、大量に入手可能な市販の Sialyl Glycopeptide から ENGase を用いて糖鎖を切断し、グラファイトカーボンカラムを用いて精製した。さらに既報に従い、還元末端のオキサゾリン化を行うとともに、千葉らが開発したオキサゾリン化糖鎖の大量精製法を用いて糖鎖ドナーを調製した。この糖鎖ドナーと化学合成した糖ペプチドを混合

し、Glycosynthase を添加してトランスグリコシレーション反応を行った。得られた糖鎖転移産物を逆相カラムで分離することで均一な糖鎖を有する HBs 抗原の部分糖ペプチドを調製した (図 4)。

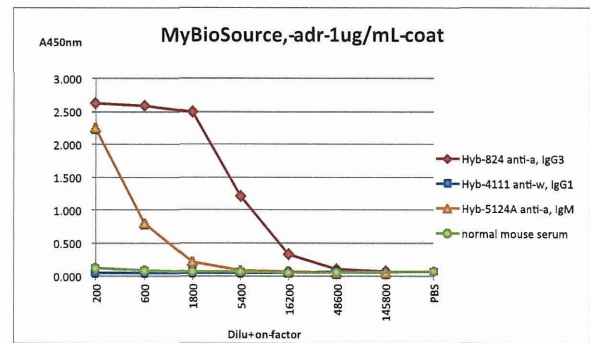
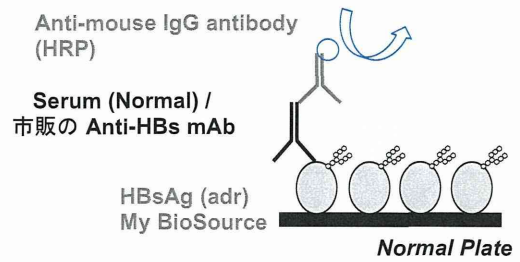


(図 4) α 2,6 シアル酸付加二分岐複合型 Pre-S1 糖ペプチドの精製

(4) HBs 抗原免疫マウスにおける抗体価上昇の確認:

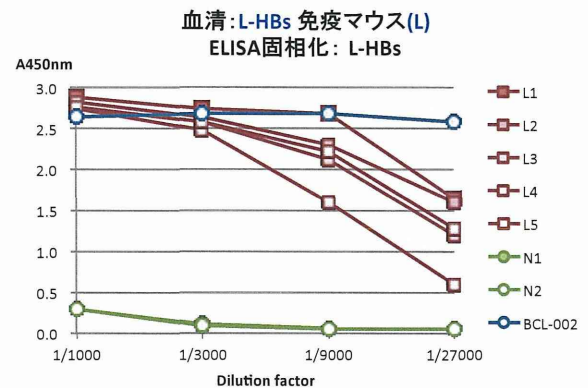
まず、マウスに対する免疫手法ならびに抗体価の測定方法を確認するために、ビームゲン (リコンビナント S-HBs タンパク質) を Balb/c マウスに免疫し、その免疫マウス血清を用いて抗 HBs 抗原抗体の ELISA 測定系の構築を行った。市販の各種抗 HBs 抗体 (特殊免疫研究所・anti-HBs mAb: Hyb-824, Hyb-4111, Hyb-5124A, 特殊免疫研究所・anti-Pre-S1 mAb: Hyb-T0606, Beacle・anti-Pre-S1 mAb-2: BCL-AB-002, など) のうち、陽性コントロールとして使用可能なものがあるかどうかを検討した結果、anti-HBs mAb (Hyb-824) や Pre-S1 mAb-2 (BCL-AB-002) などが十分な反応性を示し、陽性コントロールとして使用可能であることが分かった (図 5)。またビームゲンに対する抗体価が上昇していることも観察された。これは従来の知見通りであった。

ELISA & HBs 抗原抗体の ELISA 測定系の構築



(図 5) HBs 抗原抗体の ELISA 測定系の構築

次に、L-HBs 抗原 (Beacle 社製) を 5 匹のマウスに免疫し、その抗体価の上昇を観察した。L-HBs 抗原に対する抗体価を測定したところ (図 6)、いずれのマウスにおいても抗体価上昇を観察した。

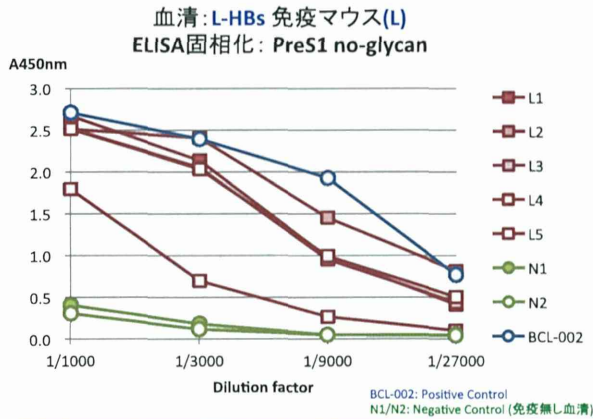


↑ (L) 群: Lの免疫で、L-HBs(免疫原)への反応を示す

(図 6) L-HBs 抗原に対する抗体価測定

また、同免疫マウス血清を使用して、Pre-S1 ペプチドに対する反応を確認したところ、やはり同様にいずれのマウスにおいても抗体の反応を

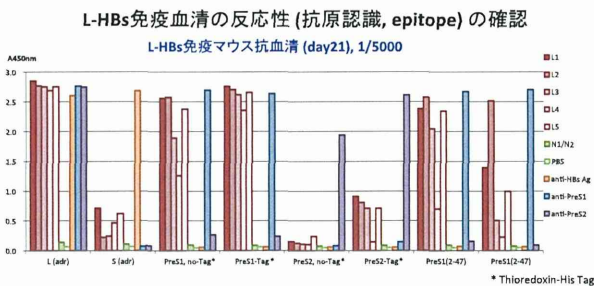
認めた（多少の個体差があった）（図7）。



↑ (L) 群: L-HBsの免疫で、Pre-S1への反応性も良い

(図7) Pre-S1 ペプチドに対する反応性

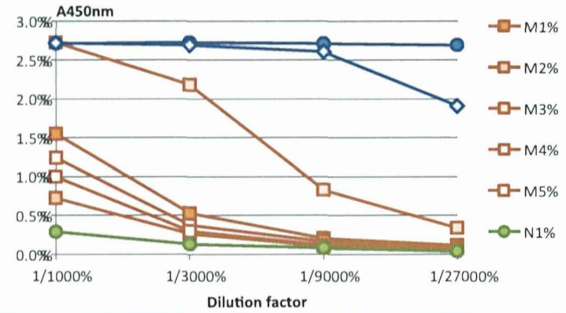
この L-HBs 免疫マウス血清を用いて、HBs 抗原における領域ごとの反応性を検討した (図8)。その結果、L-HBs 免疫マウス抗血清での傾向としては、L-HBs (免疫原) は反応性良いこと、Pre-S1 領域が特に強く反応していること (つまり抗原性が高いことを意味すると考えられる)、Pre-S1 領域に比べると弱い S 抗原や Pre-S2 領域でもちゃんと反応性が有ること、が明らかとなった。全ての領域で反応性が見られたことは、L-HBs 抗原のワクチンへの応用が有用であることを示していると考えられた。



(図8) L-HBs 免疫血清の反応性の確認

次に、M-HBs 抗原(前述)を5匹のマウスに免疫し、その抗体価の上昇を観察した。M-HBs 抗原に対する抗体価を測定したところ (図9)、いずれのマウスにおいても抗体価上昇を観察した。

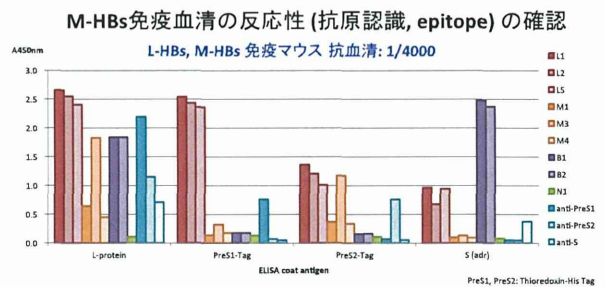
血清: M-HBs免疫マウス (M), day21
ELISA固相化: L-protein



↑ (M) 群: M&HBsの免疫で、L-proteinへの弱い反応有り

(図9) M-HBs 抗原に対する抗体価測定

この M-HBs 免疫マウス血清を用いて、HBs 抗原における領域ごとの反応性を検討した (図10)。その結果、M-HBs 免疫マウス抗血清での傾向として、M-HBs は前述の L-HBs と比較して抗体価が上がりやすく、マウスによってばらつきあるようであった。また、M-HBs は L-HBs 免疫に比べると、PreS2 に対する抗体価も低めであり、且つ、S-HBs に対する抗体価も L-HBs よりも低いことが明らかとなった。



(図10) M-HBs 免疫血清の反応性の確認

現在、得られた L-HBs 免疫マウス血清あるいは M-HBs 免疫マウス血清を使用して、各種抗原に対する反応性について生化学的な解析を進めているところである。

D. 考察

(1) 今回の結果では、酵母の菌体内から L-HBs 抗原が調製できることが確認された。超遠心の

条件等についてはほぼ確定したものの、一方で各工程後の PEG 沈で回収率を下げていることが示唆された。加えて超遠心後のサンプルの濃縮も重要であり、この工程でもロスが見られるため、今後クロスフローによる限外ろ過や透析、凍結乾燥の条件等も検討する必要がある。また大量調製のためには、培養条件と抽出条件の再検討が必要であるため、免疫実験の結果を見ながら今後改良を進めていく必要がある。なお得られた L-HBs については、H27 年度に免疫を行ない、抗原としての有効性を評価する予定である。

(2) 今回の結果から、37 KDa 付近にメインのバンドが観察され、さらに複数のタンパク質バンドも含まれていることがわかった。M-HBs は粒子状の構造を保持していることが考えられるが、免疫抗原としては問題ないと思われた。

(3) 糖転移反応後の精製において、産物の溶出時間がわからないのがひとつの課題である。すなわち HPLC 上で見られるピークの内、産物に対応するものがどれかを MS 解析して確認後、ピークの回収を行わなければならない。LC-MS などの活用も今後重要になると思われる。なお得られた糖ペプチドは免疫実験での抗体価の上昇の確認や、エピトープ決定、目的の抗体のスクリーニングなどにより利用される予定である。

(4) 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、中和抗体であればワクチンとしての有用性が示唆された。

E. 結論

(1) 酵母での HBs 抗原 L-タンパク質(L-HBs)の調製法を検討し、L-HBs の調製を行なった。得られた L-HBs は電気泳動場で均一であった。

(2) 動物培養細胞を用いた HBs 抗原 M-タンパク質 (M-HBs) の調製を行なった。精製した M-HBs はメインのバンドと、さらに複数のタンパク質バンドも含まれていることが示唆されたが、免疫抗原としては問題ないと判断した。

(3) 化学-酵素ハイブリッド合成法を用いて、Pre-S1 領域、S-領域の糖鎖付加部位を含む部分領域について糖鎖構造を均一化した糖ペプチドの合成法を確立し、調製を行なった。

(4) (2) ~ (3) の糖タンパク質、糖ペプチドを用いてマウスへの免疫実験を行い、抗体生産能の評価を行なった。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 の反応が比較的良好であった。

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

特記すべき情報なし。

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。