

## 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ず、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タイプワクチンで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ン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 (ピームゲン、ヘプタボックス) 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い、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, 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, 2014.11
- 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。