

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)。

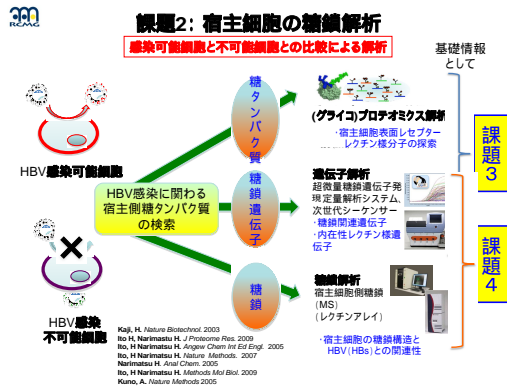


図 1

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(糖鎖変化の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)。

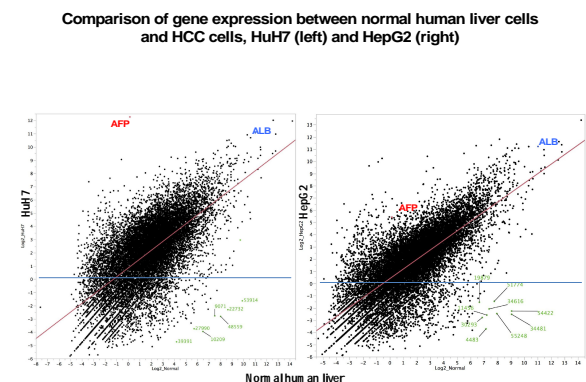


図2

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。

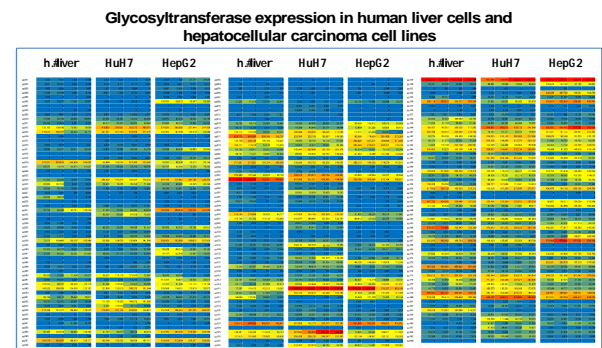


図3

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 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。次にを行った 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。

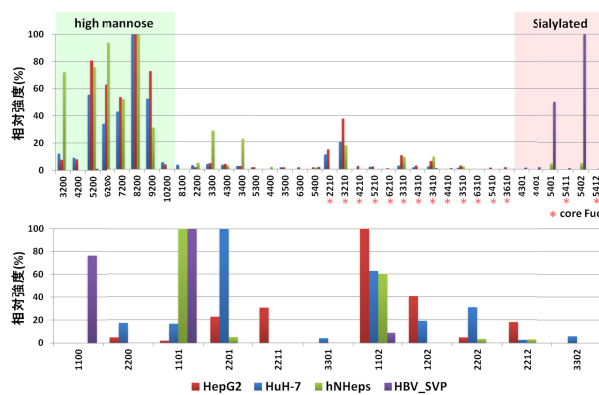


図 4

(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。

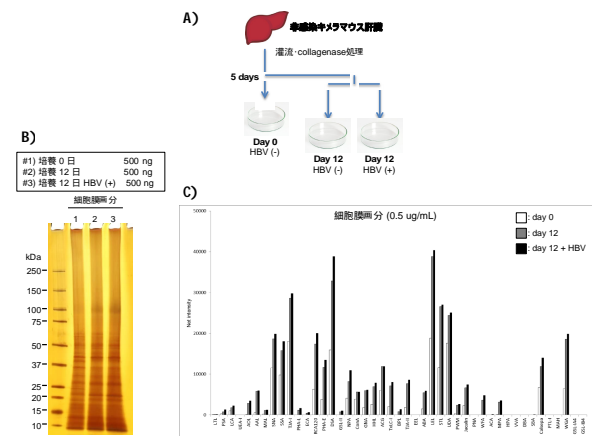


図 5

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(1 well 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）。

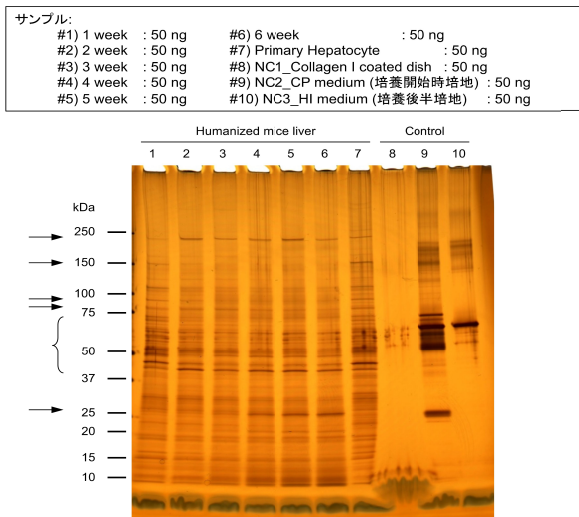


図 6

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。

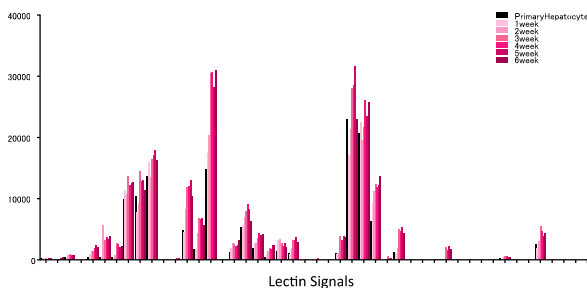


図 7

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）。

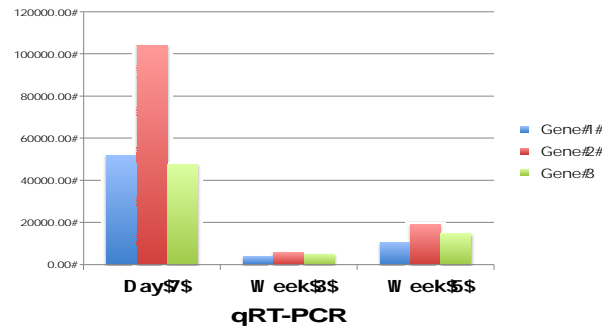


図 8

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）。

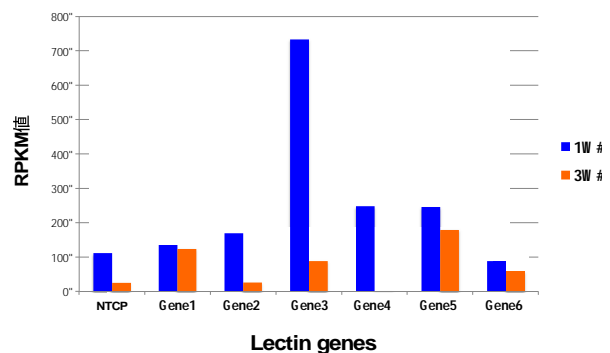


図 9

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。