

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、PNgase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。sialidase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。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(Hit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。