

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。