

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 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 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、86 siRNA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の効果含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ティングを行い 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

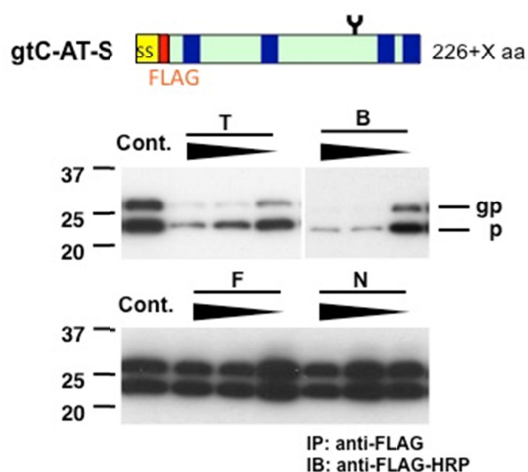


図1 糖鎖合成阻害剤のHBs抗原粒子形成・分泌への影響 S-HBsをHuH7細胞で発現させると糖鎖有り(gp)と糖鎖の付いていない(p)HBs抗原の2種の(糖)タンパク質が検出される。糖鎖合成阻害剤を添加した場合、HBs抗原上の糖鎖修飾が抑制されHBs抗原の分泌量が減少した。

(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%前後のものも見られ、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パーソ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

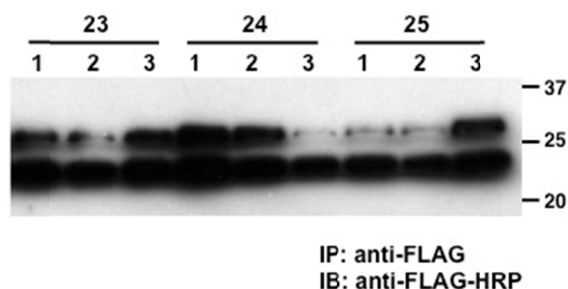


図2 siRNAプレートの二次スクリーニングの実験例 HBs抗原cDNAで形質転換後に、HuH7細胞の培養上清より回収したHBs抗原を検出した。糖鎖遺伝子siRNAの添加により糖鎖を有するHBs抗原の減少が確認された。

(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プロットイ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

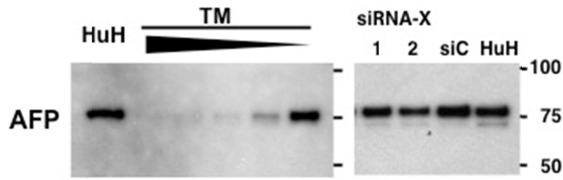


図3 肝細胞で分泌される糖タンパク質 AFP の発現への影響 HuH7 細胞をツニカマイシンで処理すると AFP の分泌は阻害されるが、siRNA 処理では AFP の発現に変化は見られなかった。

(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

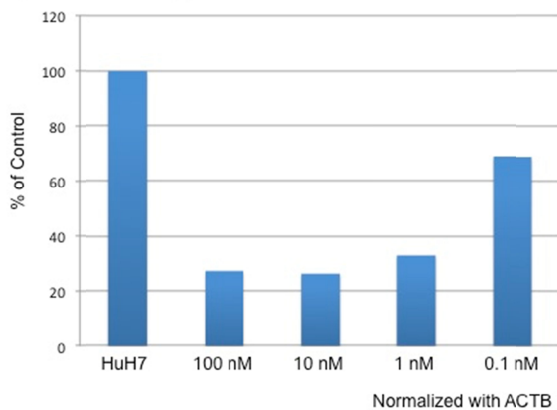


図4 siRNA の至適濃度の検討 siRNA 処理後にトータル RNA を調製しターゲット mRNA 量を qRT-PCR 法で定量した。

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。