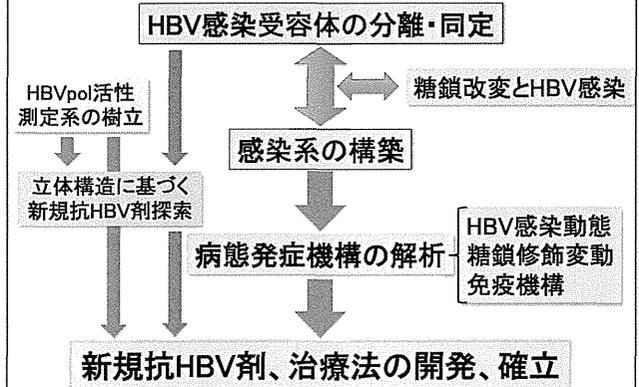


**B型肝炎ウイルス感染受容体の分離・同定と
感染系の樹立、及び感染系による
病態機構の解析と新規抗HBV剤の開発**

上田 啓次
大阪大学大学院
医学系研究科

目的・目標



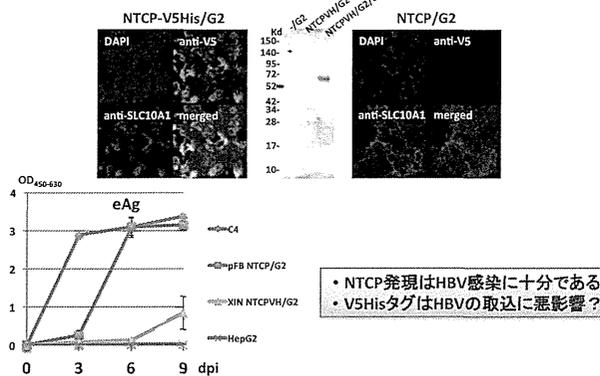
**B型肝炎ウイルス感染受容体の分離・同定と
感染系の樹立、及び感染系による
病態機構の解析と新規抗HBV剤の開発**

- 上田 啓次 大阪大学大学院医学系研究科
- 森石 恒司 山梨大学大学院医学工学総合研究院
 - 黒田 俊一 名古屋大学大学院生命農学研究科
 - 黒木 和之 金沢大学がん進展制御研究所
 - 岡本 徹 大阪大学微生物病研究所
 - 吉山 裕規 島根大学医学部
 - 斎藤 伸一 大阪大学大学院医学系研究科
 - 三善 英知 大阪大学大学院医学系研究科
 - 三崎 亮 大阪大学生物工学国際交流センター
 - 竹原 徹郎 大阪大学大学院医学系研究科
 - 考藤 達哉 大阪大学大学院医学系研究科
 - 大崎恵理子 大阪大学大学院医学系研究科

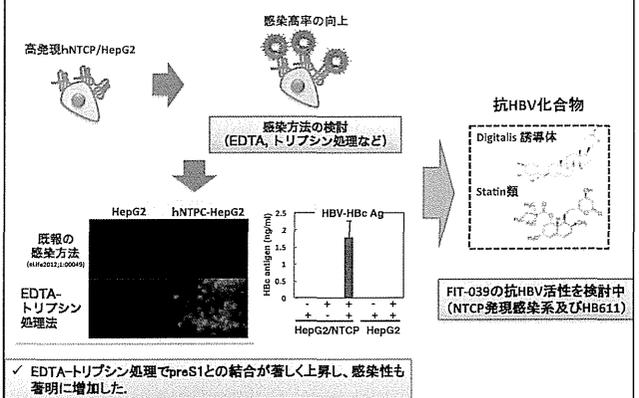
**B型肝炎ウイルス感染受容体の分離・同定と
感染系の樹立、及び感染系による
病態機構の解析と新規抗HBV剤の開発**

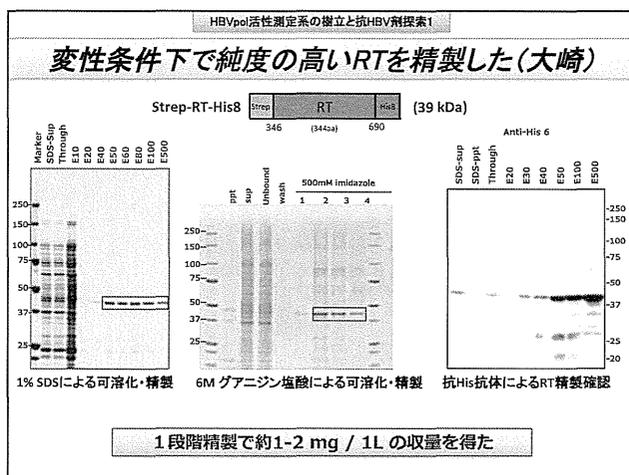
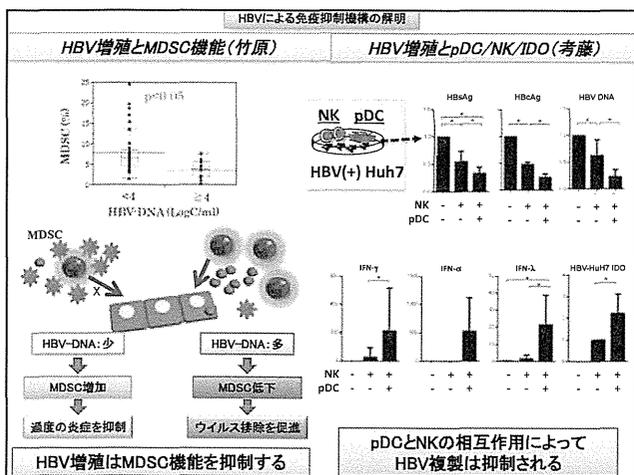
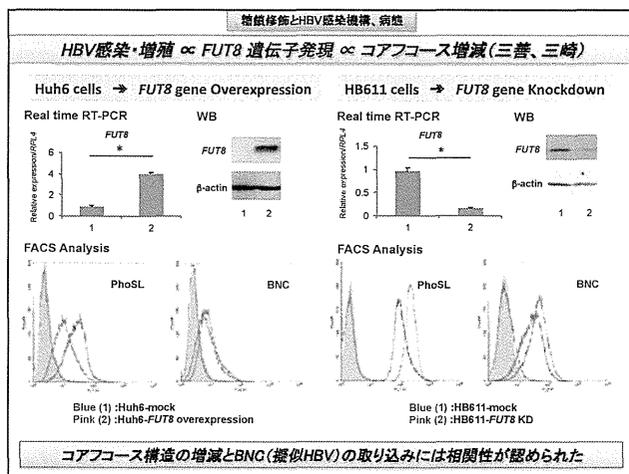
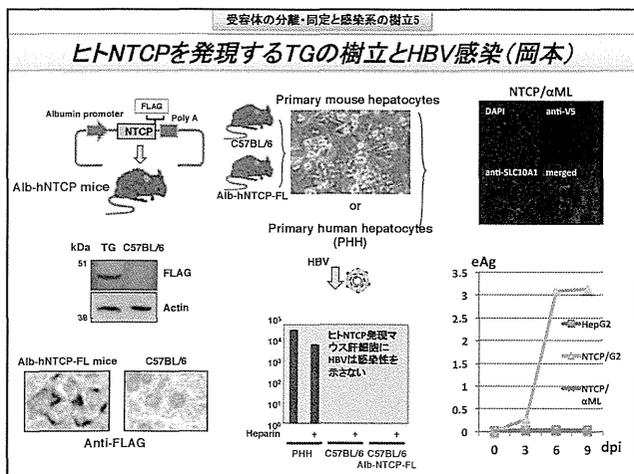
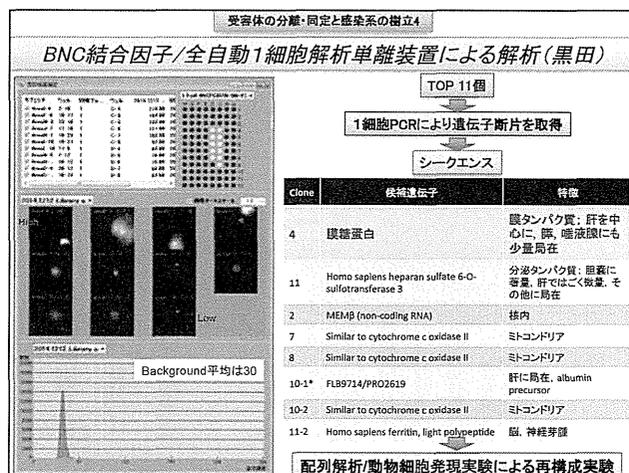
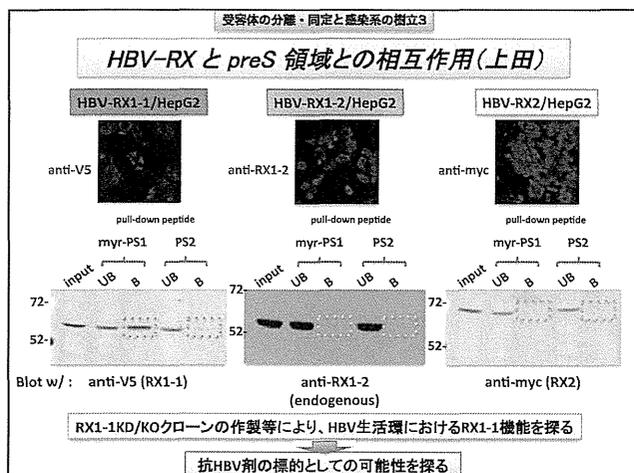
- 受容体の分離・同定と感染系の樹立
- 糖鎖修飾とHBV感染機構、病態
- HBVによる免疫抑制機構の解明
- HBVpol活性測定系の確立と抗HBV剤探索

NTCP発現とHBVの感染性 (上田)



NTCP発現/HepG2-HBV感染系による抗HBV剤探索 (森石)





平成 26 年度 肝炎等克服実用化研究事業 B型肝炎創薬実用化等研究事業『成果概要』

研究課題：HBV の感染初期過程を評価する系の開発とそれを用いた感染阻害低分子化合物およびレセプター探索

課題番号 : H24-B 創-肝炎-一般-006

予定期間 : H24 年度から H28 年度まで

研究代表者 : 下遠野 邦忠

所属研究機関、部局: (独)国立国際医療研究センター 肝炎免疫研究センター

職名 : 特任部長

年次別研究費(交付決定額): 1 年目 84,000,000 円 2 年目 84,000,000 円 3 年目 84,000,000 円
計 252,000,000 円

I. 研究の意義

- (1)臨床で用いられている HBV 治療薬はインターフェロンと核酸アナログのみ
- (2)従来の治療法ではウイルスの完全駆除は難しく、再活性化や耐性株の出現が問題。
- (3)HBV 受容体を標的とした阻害剤がない。
- (4)受容体探索に効率の良い in vitro スクリーニング系がない。
- (5)HBV 感染を高感度で簡便に評価する系が無い。
- (6)HBV 感染過程を再現するために最適な肝細胞の培養系が確立されていない。
- (7)従来の治療法ではウイルスの完全駆除は難しく、再活性化や耐性株の出現が問題。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1)受容体の探索を目的とし、蛍光分子を用いた HBV 粒子の作製, もしくは蛍光遺伝子をキメラに持つ HBV ゲノムの作製により, 感染感受性細胞の選別を行う。
- (2)ハイスループットスクリーニングにより HBV 受容体阻害因子の探索が可能になる。
- (3)HBV 感染を標的とした新規治療薬の開発に有用な細胞系を作成する。
- (4)理研天然化合物バンクの化合物ライブラリーを探索源とし、HBV 感染初期過程を標的とする抗 HBV 剤の創出を目的とする。
- (5)ウイルス再活性化や耐性変異の出現を克服しうる新たなタイプの HBV 治療薬の開発が期待される。
- (6)感染初期と後期で肝細胞内の遺伝子変動が異なる可能性が考えられる。時間変化を捉えることで、病態進行しやすい患者の特徴を抽出することで、新たな治療標的を同定できるといえる。

III. 3 年間の研究成果

※この期間にどのような成果があったか、研究代表者、研究分担者毎に、できるだけわかりやすく具体的に記述してください。

・研究代表者(下遠野 邦忠)

- (1)NanoLuc ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだウイルス粒子(HBV/NL)の作成に成功し、それを用いて HBV 感染

動態を評価できる系を作成した。

(2)HBV/NL を用いて化合物ライブラリー(1,800 化合物)のスクリーニングを行った。

(3)HBV/NL を用いて siRNA ライブラリー(18,000 遺伝子)のスクリーニングを行い、HBV 複製を制御する遺伝子を明らかにした。

・研究分担者(杉山 真也)

(1)蛍光遺伝子を内包するウイルス産生能力の向上を行った。

(2)1 細胞での RNA-seq を利用して、野生型の HBV を感染させた肝細胞を解析した。これによって、感染後の細胞内での遺伝子発現の変化を追うことが出来る。特に、感染初期での感染応答を 1 細胞レベルで追うことが出来るため、感染の有無で群分けし、比較解析を進めている。

・研究分担者(落谷 孝広)

(1)伝達阻害剤カクテルの組み合わせによって、ラット初代培養肝細胞、つまり adult hepatocyte から、旺盛な増殖能力を有する小型の細胞を誘導する事に成功した。

(2)これらの小型の新規細胞は、未分化マーカーの発現は RT-PCR および免疫染色法によって確認された事から、幼若な肝幹細胞としての性質を有していると判断された。

(3)ヒト初代培養肝細胞からの肝幹細胞様細胞の作製、肝細胞モデル系の確立を試みている。

・研究分担者(長田 裕之)

(1)スクリーニングに資する化合物を拡充するため、遺伝子改変微生物から新規代謝産物を単離。

(2) HBV/NL を用いたスクリーニングを実施し、約 6000 化合物の中から候補化合物を複数取得。

(3) 細胞形態変化を指標に薬剤作用を予測するモルフォベースプロファイリング法を開発。

IV. 今後考えられる新たな課題

(1)HBV/NL を用いた大規模スクリーニングの継続

(2)HBV 生活環全てを簡便に表すレポーターウイルスの開発。

(3)HBV/NL を用いた HBV 感染し易い細胞の網羅的解析。

(4)HBV/NL を用いた感染を阻止するモノクローナル抗体の作成。

(5)HBV の受容体解析(NTCP 以外に吸着侵入に役割を果たす細胞側因子)。

(6)HBV/NL を用いた iPS 細胞の分化段階における HBV 感染能獲得の分子基盤の解析。

(7)HBV 感染評価系を用いて、感染初期過程を阻害する化合物のスクリーニング。

(8) 得られた候補化合物の治療薬としての可能性検証(薬物動態や in vivo 抗 HBV 活性)。

V. 実用化(ワクチン、診断薬、治療薬の開発等)への貢献の可能性

レポーターHBV を樹立し、ウイルス受容体探索を容易にした。この系は受容体探索のみならず、感染細胞内での HBV 複製を阻害する物質(例えば cccDNA 合成を阻害する因子など)の探索なども可能である。また、HBV に感染感受性の高い細胞の取得が可能であるために、in vitro での薬剤探索のスクリーニング系が容易である。その結果、ハイスループット法等の導入による新薬の探索が可能となり創薬に道を拓く。

VI. 行政施策への貢献の可能性

簡便な HBV 感染評価系ができた事による感染予防試薬や治療薬等の開発に拍車がかかると期待できる点。

VII. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

※本研究費において行った研究に対するもののみを記載してください。

※研究代表者、研究分担者、研究協力者ごとに、発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、

知的財産権の取得及び申請状況、ガイドライン名・作成主体・策定年月日等を記載して下さい。

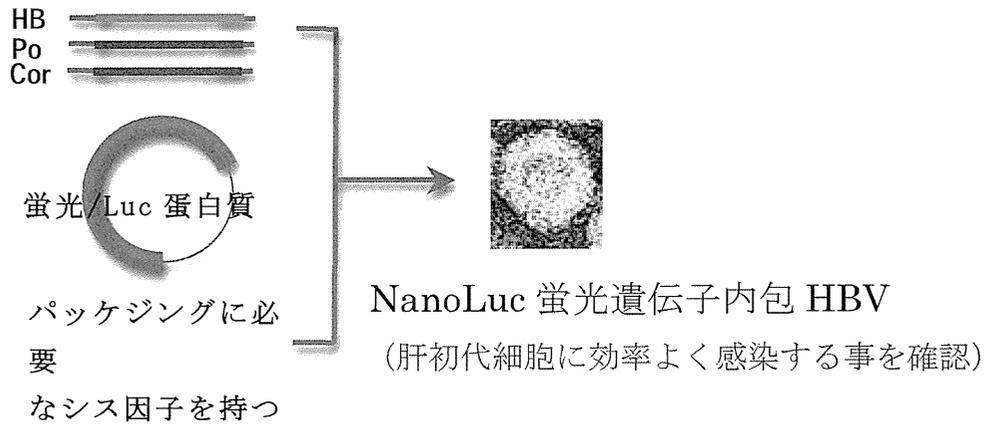
※ 執筆者全員を明記し、当該研究者名に下線を引いてください。

- (1) Shimizu Y, Nishitsuji H, Marusawa H, Ujino S, Takaku H, Shimotohno K. The RNA-editing enzyme APOBEC1 requires heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q isoform 6 for efficient interaction with interleukin-8 mRNA. *J Biol Chem*. 289(38): 26226-26238, 2014
- (2) Abe Y, Aly HH, Hiraga N, Imamura M, Wakita T, Shimotohno K, Chayama K, Hijikata M. Thromboxane A2 Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice With Humanized Livers. *Gastroenterology*. 145: 658-667, 2013
- (3) Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seya T, Takaku H, Shimotohno K. Hepatitis C Virus Infection Induces Inflammatory Cytokines and Chemokines Mediated by the Cross Talk between Hepatocytes and Stellate Cells. *J. Virol* 87: 8169-8178, 2013
- (4) Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia. *PLoS One*. 2014 Feb 10;9(2):e86449.
- (5) 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*. 2014 May;59(5):1726-37.
- (6) Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsushashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M; the Japanese AHB Study Group. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology*. Jul 29. 2013
- (7) Trinks J, Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Benetucci J, Giménez E, Weissenbacher MC, Mizokami M, Oubiña JR. In vitro replication competence of a hepatitis B genotype D/A recombinant virus: dissimilar biological behavior regarding its parental genotypes. *J Gen Virol*. 12:2724-8, 2013.
- (8) Jang JP, Nogawa T, Uramoto M, Okano A, Futamura Y, Shimizu T, Takahashi S, Jang JH, Ahn JS, Osada H. RK-270A-C, new oxindole derivatives isolated from a microbial metabolites fraction library of *Streptomyces* sp. RK85-270. *J Antibiot*. (2014) in press. doi: 10.1038/ja.2014.141.
- (9) Nogawa T, Kawatani M, Uramoto M, Okano A, Aono H, Futamura Y, Koshino H, Takahashi S, Osada H. Pyrrolizilactone, a new pyrrolizidinone metabolite produced by a fungus. *J Antibiot*. 66: 621-3, 2013.
- (10) Futamura Y, Kawatani M, Muroi M, Aono H, Nogawa T, Osada H. Identification of a Molecular Target of a Novel Fungal Metabolite, Pyrrolizilactone, by Phenotypic Profiling Systems. *Chembiochem* (2013) in press.
- (11) Katsuda T, Kurata H, Tamai R, Banas A, Ishii T, Ishikawa S, Ochiya T. The in vivo evaluation of the therapeutic potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for acute liver disease. *Methods Mol Biol*, 1213:57-67, 2014
- (12) Thirion M, Kanda T, Murakami Y, Ochiya T, Iizasa H. MicroRNAs and oncogenic human viruses. In: Babashah S (ed), *MicroRNAs: Key Regulators of Oncogenesis*. Switzerland, Springer, pp 155-182, 2014
- (13) Gailhouste L, Gomez-Santos L, Kitagawa N, Kawarahada K, Thirion M, Kosaka N, Takahashi R, Shibata T, Miyajima A, and Ochiya T. MiR-148a plays a pivotal role in the liver by promoting the hepatospecific phenotype and suppressing the invasiveness of transformed cells. *Hepatology*. 58(3), 1153-65, 2013.

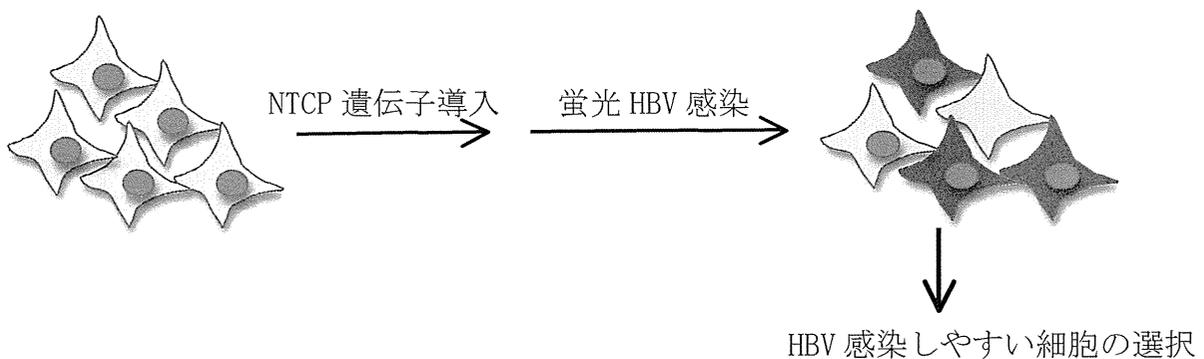
Ⅷ. Ⅲ(3年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。

(1) 蛍光遺伝子を持つウイルス粒子の産生



(2) 各種ヒト肝細胞株への HBV 感染実験と感受性の高い細胞の樹立の試み



(3) スクリーニングの実施

- (i) siRNA ライブラリー (18,000 遺伝子) のスクリーニングを行い、HBV 複製を変化させる 200 遺伝子を明らかにした。
- (ii) 低分子化合物 1,800 検体をスクリーニングして、抗 HBV 作用を持つものを同定した。

●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

昭和47年～昭和58年 国立遺伝学研究所 分子遺伝部 (研究員)
昭和53年～昭和56年 米国 ウィスコンシン大学 McArdle 癌研究所 (博士研究員)
昭和58年～平成6年 国立がんセンター研究所 ウイルス部 (室長・部長)
平成6年～平成19年 京都大学 ウイルス研究所 (教授・所長)
平成19年～21年 慶應義塾大学 医学部 (特別研究教授)
平成21年～24年 千葉工業大学 附属総合研究所 (教授)
平成24年～現在 (独) 国際医療研究センター 肝炎免疫研究センター (特任部長)

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

三浦 謹一郎 (国立遺伝学研究所)
Howard M. Temin (米国 McArdle 癌研究所)
杉村 隆 (国立がんセンター研究所)

・主な研究課題

- (1) レトロウイルスの複製機構の解析
- (2) レトロウイルスベクターに関する研究
- (3) ヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV) の分子ウイルス学的研究
- (4) HCVの複製機構およびウイルス発がんに関する研究
- (5) HBV複製の分子機構

・これまでの研究実績

Shimizu Y, Nishitsuji H, Marusawa H, Ujino S, Takaku H, Shimotohno K. The RNA-editing enzyme APOBEC1 requires heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q isoform 6 for efficient interaction with interleukin-8 mRNA. J Biol Chem. 289(38): 26226-26238, 2014

Abe Y, Aly HH, Hiraga N, Imamura M, Wakita T, Shimotohno K, Chayama K, Hijikata M. Thromboxane A2 Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice With Humanized Livers. Gastroenterology. 145: 658-667, 2013

Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seya T, Takaku H, Shimotohno K. Hepatitis C Virus Infection Induces Inflammatory Cytokines and Chemokines Mediated by the Cross Talk between Hepatocytes and Stellate Cells. J. Virol 87: 8169-8178, 2013

Hirata Y, Ikeda K, Sudoh M, Tokunaga Y, Suzuki A, Weng L, Ohta M, Tobita Y, Okano K, Ozeki K, Kawasaki K, Tsukuda T, Katsume A, Aoki Y, Umehara T, Sekiguchi S, Toyoda T, Shimotohno K, Soga T, Nishijima M, Taguchi R, Kohara M. Self-enhancement of hepatitis C virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis. *PLoS Pathog.* 8:e1002860. 2012

Weng L, Hirata Y, Arai M, Kohara M, Wakita T, Watashi K, Shimotohno K, He Y, Zhong J, Toyoda T. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype-specific manner. *J Virol.* 84(22):11761-11770, 2010.

Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Wakita T, Baumert TF, Miyanari Y, Shimotohno K. Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. *J Virol.* 84(22): 12048-12057, 2010.

Shimizu Y, Hishiki T, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Kato A, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Shimotohno K. Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase reduce the infectivity of hepatitis C virus (HCV) through their catalytic activities on HCV-associated lipoproteins. *Virology.* 407(1):152-915, 2010

Arimoto K, Funami K, Saeki Y, Tanaka K, Okawa K, Takeuchi O, Akira S, Murakami Y, Shimotohno K. Polyubiquitin conjugation to NEMO by tripartite motif protein 23 (TRIM23) is critical in antiviral defense. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(36): 15856-15861, 2010

- Ujino S, Yamaguchi S, Shimotohno K, Takaku H. Combination therapy for hepatitis C virus with heat-shock protein 90 inhibitor 17-AAG and proteasome inhibitor MG132. **Antivir Chem Chemother.** 20(4): 161-167, 2010.
- Aly HH, Qi Y, Atsuzawa K, Usuda N, Takada Y, Mizokami M, Shimotohno K, Hijikata M. Strain-dependent viral dynamics and virus-cell interactions in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood-borne hepatitis C virus. **Hepatology.** 50(3): 689-696, 2009
- Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T, Konishi H, Fujita T and Shimotohno K., Negative regulation of the RIG-I signaling by the novel ubiquitin ligase RNF125. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 104 : 7500-7505, 2007
- Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. **Nat Cell Biol.** 9(9):1089-1097, 2007
- Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Goto K, Aly HH, Shimotohno K. Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptor with viral RNA polymerase NS5B. **J Biol Chem.** 282(45):32765-32772, 2007
- Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. **Mol Cell.** 19 :111-122, 2005.
- Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, Yamaji M, Shimotohno K. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. **Hepatology.** 38 :1282-1288. 2003
- Hijikata, M, Mizushima, H., Tanji, Y., Komoda, Y., Hirowatari, Y., Akagi, T., Kato, N., Kimura, K., and Shimotohno, K., Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus., **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 90: 10773-10777, 1993
- Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T. and Shimotohno, K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 87: 9524-9528, 1990
- Kitado, H., Chen, I.S.Y., Shah, N.P., Cann, A.J., Shimotohno, K. and Fan, H. U3 sequences from HTLV-I and -II LTRs confer pX protein response to a murine leukemia virus LTR. **Science**, 235: 901-904, 1987
- Shimotohno, K., Takano, M., Teruuchi, T. and Miwa, M. Requirement of multiple copies of a 21-nucleotide sequence in the U3 regions of human T-cell leukemia virus type I and type II long terminal repeats for trans-acting activation of transcription. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 83: 8112-8116, 1986
- Shimotohno, K., Miwa, M., Slamon, D.J., Chen, I.S.Y., Hoshino, H., Takano, M., Fujino, M. and Sugimura T. Identification of new gene products coded from X regions of human T-cell leukemia viruses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 82: 302-306, 1985
- Wachsman, W., Shimotohno, K., Clark, S.C., Golde, D.W. and Chen, I.S.Y. Expression of the 3' terminal region of human T-cell leukemia virus. **Science**, 266: 177-179, 1984
- Slamon, D.J., Shimotohno, K., Cline, M.J., Golde, D.W. and Chen, I.S.Y. Identification of the putative transforming protein of the human T-cell leukemia virus. HTLV-I and HTLV-II. **Science**, 266: 61-65, 1984
- Shimotohno, K. and Temin, H.M. Loss of intervening sequence in genomic mouse α -globin DNA inserted in an infectious retrovirus vector. **Nature**, 299: 265-268, 1982
- Shimotohno, K. and Temin, H.M. Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus. **Cell**, 26: 67-77, 1981
- Shimotohno, K., Mizutani, S. and Temin, H.M. Sequence of retrovirus provirus resembles that of bacterial transposable elements. **Nature**, 285: 550-554, 1980

課題番号 (H24-B創・肝炎一般_006)

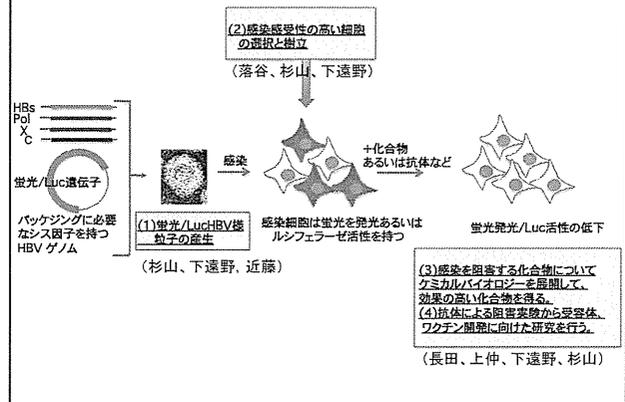
課題 「HBVの感染初期過程を評価する系の開発とそれを用いた感染阻害低分子化合物およびレセプター探索」 (3年目)

研究組織

分担課題

下遠野 邦忠 (国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター)	蛍光発色遺伝子を発現するHBV様粒子の産生とそれを用いた感染初期過程の解析と阻害物質のスクリーニング。
落谷 孝広 (国立がん研究センター 研究所)	HBV感染モデル細胞系の樹立。
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)	蛍光標識HBVを用いた感染評価と受容体探索。
長田 裕之 (理研 基盤研究所)	HBV感染を阻害する低分子化合物のスクリーニング。
近藤 小貴 (東京大学・医科学研究所)	HBV感染、複製機構解析のためのアデノウイルスベクターの開発

研究内容と班員との関係



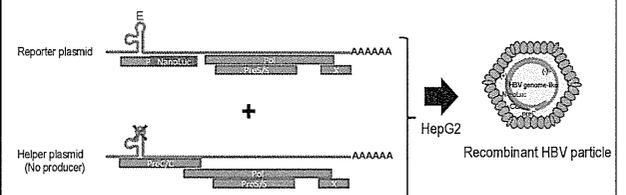
研究期間内での目的

- (1) HBV感染を簡便、迅速、廉価で評価する系を作成する。
- (2) HBV感染初期過程の解析をおこなう。
- (3) 受容体の研究を行い、感染阻害物質を探索する。

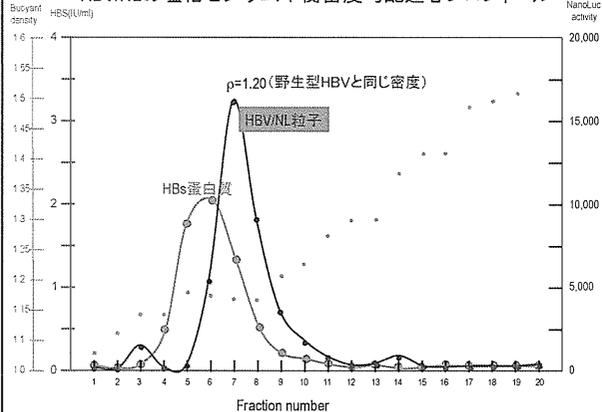
これまでの成果

- (1) HBV感染を簡便、迅速、廉価で評価する系を作成した。
- (2) HBV感染初期過程に関与する宿主因子の解析を行った。
- (3) HBV感染初期過程を阻害する低分子化合物の評価を行った。
- (4) 肝細胞への分化誘導を効率よく行う系を開発した。

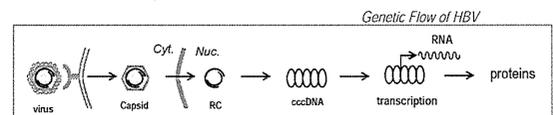
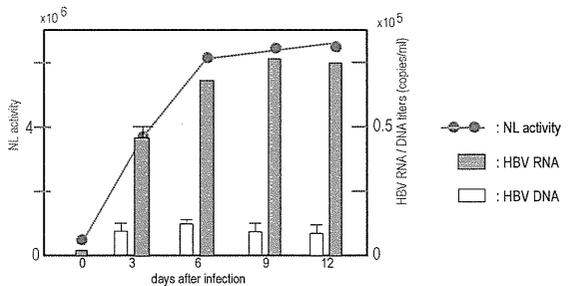
NanoLuc 遺伝子を持つレポーターHBV(HBV/NL)の作成



HBV/NLの塩化セシウム平衡密度勾配遠心プロフィール



HBV/NL感染細胞のNL活性はHBV RNA量を反映している



(1) HBV複製を制御する宿主因子の解析

Thermo Scientific siRNA (18,000 遺伝子library)の網羅的解析

1次スクリーニング：感染効率75%以下、200%以上



1971遺伝子

2次スクリーニング：感染効率60%以下、200%以上



60%以下：93遺伝子
200%以上：<10 遺伝子

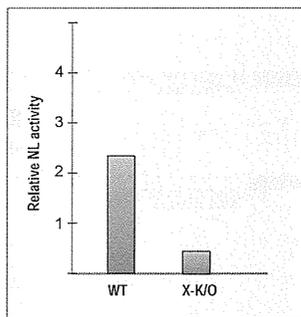
候補遺伝子の機能内訳

apoptosis	4 (1)	ATPase	1
kinase	2	ZINC finger	2
ubiquitin	3	G protein	8
transcription	6 (3)	membrane protein	9 (1)
chromatin	8 (1)	RNA binding	4
helicase	1	DNA binding	3
transport	5 (1)	phosphatase	2
biosynthesis	6	autophagy	2
innate immunity	1	ion channel	3
nuclear receptor	1	others	31

(括弧の数字は既に報告されている遺伝子)

受容体探索の絡みで膜蛋白質を解析

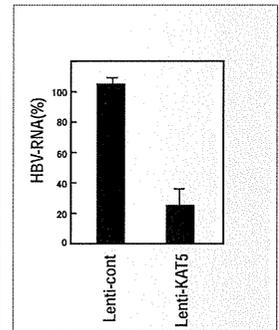
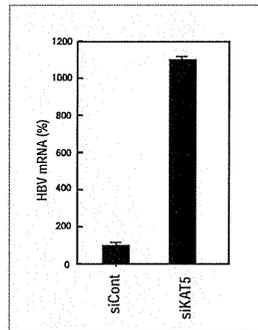
7回膜貫通ドメインを持つ膜蛋白質(Xと仮称)をCRISPRでノックアウトした細胞ではHBV感染が阻害された。



膜蛋白質以外の遺伝子でHBV複製を制御する遺伝子の一例

KAT5 ノックダウンはwild HBV複製を上げる

KAT5 過剰発現はHBV複製を抑制する



(KAT5: Lysine acetyl transferase 5)

(2) 感染を阻害する因子(低分子化合物)の探索

市販の 1,800 Bioactive compounds を探索

一次スクリーニング： 1 microM 濃度で >30 % 以上 阻害

(途中経過：~1,200 compounds の一次評価終了, 約50 compounds がヒット)

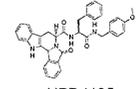
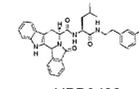
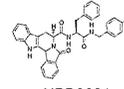
ヒットした化合物の内訳(作用が似ていて複数個ヒットしたもの)：

- mTOR inhibitors
- HIF関連
- Tyr kinase inhibitors
- MAP kinase inhibitors
- IGF-1R inhibitors
- コレステロール 合成阻害剤
- PI3K inhibitors

HBVを阻害するものとして既に報告されているのが多くヒットしてきた。さらに化合物を探索中。

理研天然物化合物ライブラリー(NPDepo)のHBV/NLによる評価

● 終濃度 1 μg/ml で活性評価 (5,600化合物)



(カルボリン系化合物)

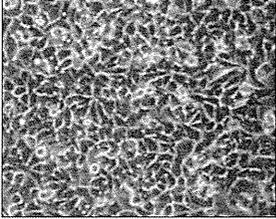
◆ IC₅₀ values [μg/ml] against HBV/NL

Cmpd	IC ₅₀	CC ₅₀
NPD3991	0.14	>10
NPD3432	0.99	>10
NPD4135	0.58	>10

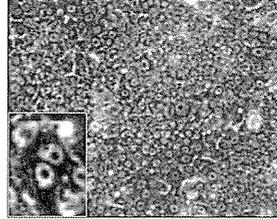
(理研:長田班)

HepG2細胞を形態、遺伝子発現が初代肝細胞に極めてよく似た細胞に変換できた。

▶ After a few days of treatment, HepG2 proliferation slightly decreases and radical morphological changes occur with: polygonal shape morphology, granulated cytoplasm, and large/round nucleus



HepG2 control culture at high density

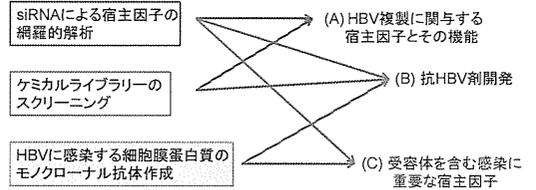


HepG2 culture after a 2 week-treatment

(落谷班員)

HBV/NLを活用した今後の研究展開

(1) HBV感染並びに複製初期過程に関する宿主因子および感染阻害因子の大規模スクリーニング

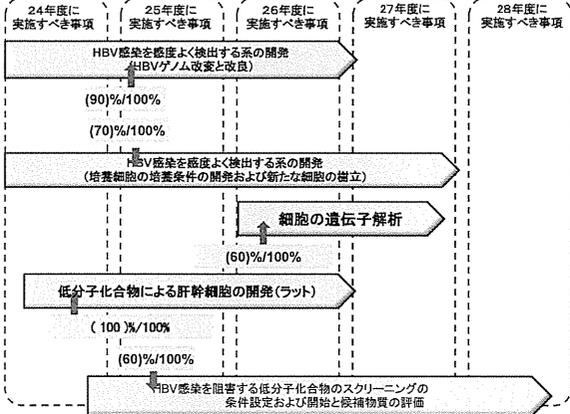


(2) HBV複製の後期過程も評価できるレポーター系の開発

本スクリーニング系は国内の研究者に提供中

工程表 (研究代表者氏名: 下遠野 邦忠)

(3年目)



利益相反について

【別添4】

利益相反の有無等 (平成26年度)

ア 利益相反の有無 無

他の研究班への参加状況

【別添5】

研究代表者が、「肝炎等克服政策研究事業」または「肝炎等克服実用化研究事業」研究班の研究代表者として参加しているか (ア又はイに記載)

ア 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加していない。

合同研究会議開催状況

【別添6】

他の研究班と合同での研究会議開催状況 (平成26年度)

イ 他の研究班と合同で研究会議を開催している。

平成26年10月29日 NTCP関連研究者による7班の合同班会議
下遠野班、脇田班、田中班、上田班、藤田班、成松班、小嶋班

平成26年11月26日 3班の合同班会議
村上班、落谷班、下遠野班

平成26年12月19日 3班の合同班会議
脇田班、上田班、下遠野班、

平成 26 年度 肝炎等克服実用化研究事業 B型肝炎創薬実用化等研究事業『成果概要』

研究課題：B型肝炎ウイルスにおける糖鎖の機能解析と医用応用技術の実用化へ

課題番号：H24-B創-肝炎-一般-007

予定期間：H24年度からH28年度まで

研究代表者：成松 久

所属研究機関、部局：独立行政法人 産業技術総合研究所、糖鎖創薬技術研究センター

職名：招聘研究員

委託費(決定額)：1年目 118,472,000 円 2年目 99,919,000 円 3年目 89,000,000 円
計 307,391,000 円

I. 研究の意義

- (1) 現在日本では約 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、さらに欧米タイプの感染も広がりつつある。インターフェロンによる低治療成績や核酸アナログ製剤に対する薬剤耐性ウイルスの出現が問題になっており、逆転写酵素に代わる創薬ターゲットが必須である。
- (2) 糖鎖や内在性レクチンが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、HBV の感染過程における糖鎖解析は、HBV ワクチンや抗 HBV 薬を効率的に開発する上で重要である。
- (3) 我が国で使用されている HBV ワクチン (S-HBs 抗原、酵母由来) は、HBV とは異なり糖鎖構造を持たない HBs 抗原が用いられている。抗体価の獲得に比較的時間がかかる事や糖鎖付加によるエスケープミュータントの出現、ワクチン接種者の HBV 感染など、ユニバーサルワクチン化への解決すべき課題が指摘されている。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) HBV の感染過程における糖鎖や内在性レクチンの機能・役割を明らかにし、HBV の感染を阻害する薬剤のシーズを探索する。ウイルス粒子の形成や分泌に関わる分子を同定し、抗 HBV 創薬のターゲットとする。
- (2) HBV 上の糖鎖の解析から、HBV の早期検出法の開発と医療現場での実用化が期待される。
- (3) ヒト型糖鎖を有する L-HBs 抗原が現行のワクチン (糖鎖の無い S-HBs 抗原) より効率良く中和 HBV 抗体を誘導する場合、新規ワクチンの開発に繋がる。

III. 3年間の研究成果

・研究代表者 (成松 久)

- (1) 本研究に係る、ヒト由来試料を用いた研究について、各参画機関の倫理承認の手続きを進めた。さらに、HBV を用いた研究を実施するにあたり、微生物実験、組換え実験承認および大臣確認の手続きを進め実施体制を整えた。
- (2) 班会議及び合同班会議を開催・参加し、他班との相互理解・連携を深めた。HBV や NTCP 発現細胞など研究試料の収集のため MTA を交わすと共に共同研究を開始した。

・研究分担者 (溝上 雅史・是永 匡紹・久野 敦・田尻 和人)

- (1) ワクチン接種後に獲得されたヒトのクローン抗体 (富山大) は糖鎖の無い HBs 抗原のみを認識することを見いだした。この抗体とレクチンアレイを組み合わせることで、ナノグラムオーダーのウイルス粒子を破壊せず糖

鎖構造情報を取得する方法の確立に成功した。

(2) HBV 感染患者の血清収集を準備し新規解析方法で測定した結果、HBV DNA 量と相関性があるレクチンが明らかになり、新規解析法により疾患の進行状態を示唆できる可能性がある。

・研究分担者 (梶 裕之・梶谷内 晶・伊藤 浩美)

(1) B 型肝炎患者血清より調製されたサブバイラルパーティクル(SVP)中の HBs 抗原を試料に、糖鎖付加部位、および各付加部位上の糖鎖解析(IGOT 後 LC-MS 分析)で糖ペプチドを同定し、L-HBs の PreS1 および PreS2 領域、M-HBs の PreS2 領域、S 領域における糖鎖付加部位の同定に成功した。

(2) MS による SVP の N-結合型ならびに O-結合型糖鎖の構造解析を行い、3 者間での糖鎖構造を比較することで共通性や差異を見出した。HBs 抗原上の糖鎖は比較的単純な構造であることが明らかになった。ミリストイル化やアセチル化も同定し、HBV 感染とワクチン開発の基礎情報を取得した。

・研究分担者 (梶谷内 晶・梶 裕之・飯島 沙幸・久野 敦・安形 清彦)

(1) 感染可能な肝細胞と感染出来ない肝癌細胞について糖鎖遺伝子定量システム(qRT-PCR)や次世代シーケンサー、バイオインフォマティクス解析、質量分析器(MS)によるグライコーム解析を行い、肝細胞特異的に発現する糖鎖関連遺伝子(糖転移酵素と内在性レクチン)の発現と糖鎖構造の差を解析した。

(2) 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。次世代シーケンサー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。

・研究分担者 (館野 浩章・佐藤 隆・飯島 沙幸・尾曲 克己・安形 清彦)

(1) HBV 感染実験においてグリコシダーゼやレクチンの影響が明らかになり、HBV 糖鎖が感染効率に影響することが示唆された。同定された肝細胞に発現する複数種の HBV 糖鎖受容体候補分子について精製 HBs 抗原との結合性を解析し、HBV 糖鎖受容体候補分子の絞り込みを行った。

(2) NTCP 発現 HuH7 細胞を複数株作製し、感染モデルを構築した。Myr-PreS1 との結合を確認し、糖鎖及びレクチンの HBV 感染の影響解析を行っている。

・研究分担者 (安形 清彦・佐藤 隆・米田 政志・伊藤 清顕)

(1) プレプロ配列の導入により、従来法より 10 倍効率的にリコンビナント HBs 抗原を HuH7 細胞培養上清中に発現させる系を構築した。小胞体やゴルジ体での糖鎖合成の阻害剤を用い、糖鎖が付いた HBs 抗原の発現や HBV の分泌が抑制される事を確認した。

(2) 上記の糖鎖遺伝子の発現結果を基に糖鎖遺伝子 cDNA ライブラリーと siRNA ライブラリーを作成した。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 15 糖鎖遺伝子で HBs 抗原の糖鎖が減少し、HBV 作成実験でも HBV DNA を減少させる糖鎖遺伝子を確認した。siRNA#79 (100 nM)はラミブジンやエンテカビル(10-100 μ M)と同レベルで HBV 分泌(HBs 抗原、HBV DNA)を抑制した。

・研究分担者 (千葉 靖典・梶谷内 晶)

(1) 出芽酵母を用いた HBs 抗原の生産を試み、N-型糖鎖が付加された HBs 抗原を培地中に分泌する酵母の育種を行った。培地中から 3 種のカラムを用いた精製を行うとともに、菌体内からの抽出法の確立と超遠心法による糖鎖付加型 HBs 抗原の調製を行い、糖鎖付き HBs 抗原の精製法を確立した。

(2) 糖鎖付き PreS1 ペプチド及び L-HBs や M-HBs 免疫マウス血清を用い、各種抗原(L-HBs, S-HBs, PreS1, PreS2)に対する反応性を S-HBs 抗原と比較解析した。L-HBs 免疫血清はどの抗原に対しても反応性が亢進し、特に PreS1 の反応が比較的良く、中和抗体であればワクチンとしての有用性が示唆された。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) 新規 HBV 解析法を用いた患者血清による多検体測定を行い実用化に向けた検査結果の収集し、治療・線維化・癌化との関連を解析する。
- (2) 糖鎖遺伝子やレクチンをターゲットとした HBV 感染及び増殖阻害因子の解析が進んでおり、肝臓あるいは感染肝細胞へのデリバリーシステムの開発を進める。

V. 実用化(ワクチン、診断薬、治療薬の開発等)への貢献の可能性

- (1) 患者血清中の HBV のスクリーニングと抗体に依る HBs 検出を逃れる変異 HBV を検出できる技術の開発そして HBV 感染や治療に因る肝臓の変化を簡便に診断できる技術の開発・臨床応用は、肝生検など侵襲性のある検査と比較して、安全性が高く安価であり、社会福祉に大きく貢献できる。
- (2) L-HBs 抗原の免疫性の高さが確認されたが、S 抗原部分の反応性が現行のワクチンと異なることも示唆され、両者の併用や混合ワクチンの開発などへと進める必要が考えられる
- (3) 糖鎖や糖鎖遺伝子により HBV 感染及び増殖を阻害することが明らかになりつつあるので、同定された糖鎖遺伝子やレクチンをターゲットとした創薬の開発が考えられる。糖鎖関連ではインフルエンザ治療におけるタミフルに次ぐものになり、他感染症の治療法研究に発展する可能性がある。

VI. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 現行のワクチンに加え有効な新規ワクチンを開発すれば、non-responder への対応や現在でも一定の割合で新しい感染者が増える HBV 感染防御に向けた、ユニバーサルワクチネーション化などの施策に繋がる。
- (2) 新規の測定法により、HBV の自然治癒と発症との関連性が明らかになれば、HBV 感染患者の治療方針を決める資料となることが期待される。

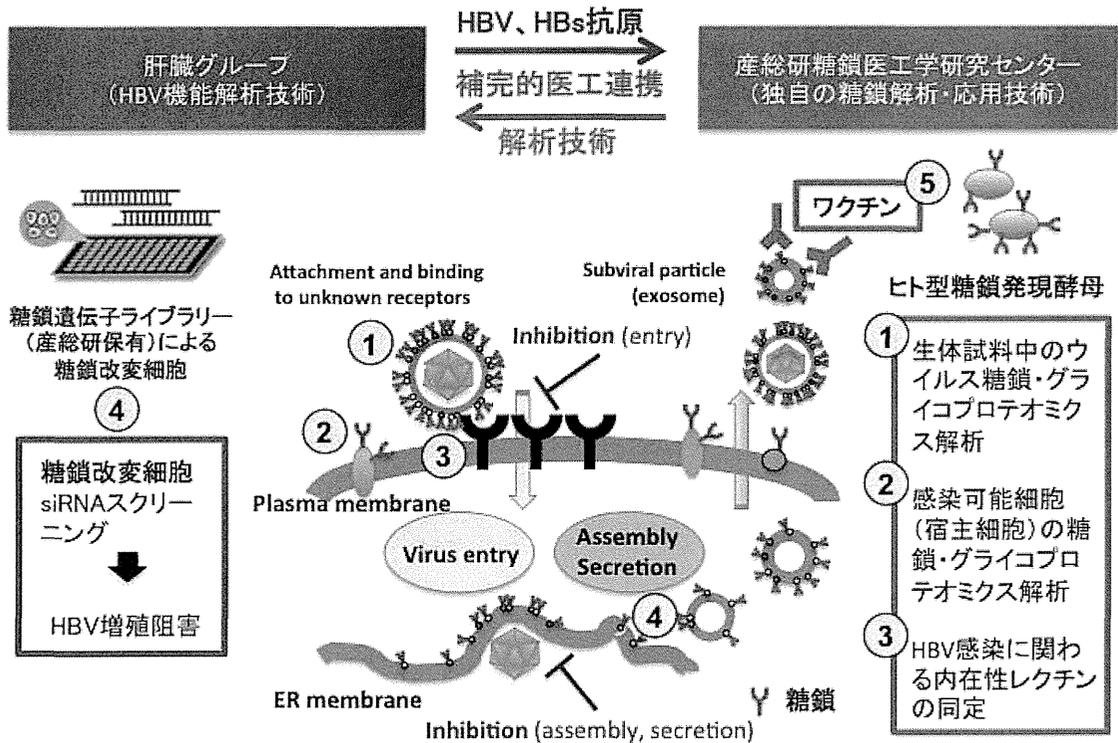
VII. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- (1) Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Ito K, Matsuda A, Sekiya S, Hige S, Sakamoto M, Kage M, Mizokami M, Narimatsu H. A serum "sweet-doughnut" protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis. *Sci Rep.* 2013, 3:1065.
- (2) Kaji H, Ocho M, Togayachi A, Kuno A, Sogabe M, Ohkura T, Nozaki H, Angata T, Chiba Y, Ozaki H, Hirabayashi J, Tanaka Y, Mizokami M, Ikehara Y, Narimatsu H. Glycoproteomic Discovery of Serological Biomarker Candidates for HCV/HBV Infection-Associated Liver Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma. *J Proteome Res.* 2013, 12(6):2630-40.
- (3) Ocho M, Togayachi A, Iio E, Kaji H, Kuno A, Sogabe M, Korenaga M, Gotoh M, Tanaka Y, Ikehara Y, Mizokami M, Narimatsu H. Glycoproteomics-based biomarker development method: alteration in glycan structure of colony stimulating factor 1 receptor as a possible glycobiomarker candidate for evaluation of liver cirrhosis. *J Proteome Res.* 2014, 13(3):1428-37.

その他、学会発表、投稿準備中と投稿中については記載しない。

VIII. (3年間の研究成果の)概要図等

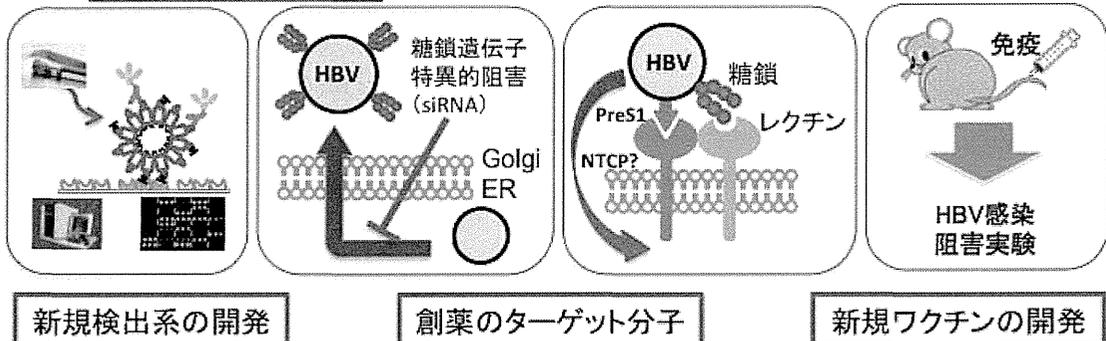
B型肝炎ウイルスにおける糖鎖の機能解析と医用応用技術の実用化へ



これまでの主な成果

- ① HBs抗原の糖鎖解析法の確立と修飾の詳細な情報の取得
糖鎖を用いた新規HBV解析法の確立 → 患者血清による多検体測定
- ② 肝がん・肝臓細胞の糖鎖解析・糖鎖遺伝子発現解析 → 感染性による比較
- ③ HBV糖鎖の感染への影響の確認
肝臓特異的レクチン様分子の選定 → 感染実験によるスクリーニング
- ④ 糖鎖遺伝子ライブラリーを構築し、HBV分泌阻害のスクリーニング
→ 候補遺伝子の同定とHBV分泌阻害のメカニズムの解析
- ⑤ L-HBs cDNAを酵母で発現・精製及びS-HBsやM-HBsとの抗体価比較試験
→ 感染中和抗体のスクリーニング

今後期待される成果



●研究代表者の研究歴等

※研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

・過去に所属した研究機関の履歴

- 1974.3 慶應義塾大学医学部卒業
- 1979.3 慶應義塾大学医学研究科大学院修了(医学博士)
- 1979.4 慶應義塾大学医学部微生物学教室・助手
- 1983.4 米国 NIH 留学
- 1986.10 慶應義塾大学医学部微生物学教室・講師
- 1991.1 同上・助教授
- 1991.4 創価大学生命科学研究所・教授
- 2000.10 工業技術院・主任研究官
- 2001.4 産業技術総合研究所・分子細胞工学研究部門・総括研究員
筑波大学医学医療系連携大学院・教授、現在に至る。
- 2002.6 産業技術総合研究所・糖鎖工学研究センター・副センター長
- 2006.12 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター・センター長
- 2011.4 慶應義塾大学医学部・客員教授、現在に至る。
- 2011.7 中国・上海交通大学・顧問教授、現在に至る。
- 2014.4 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、現在に至る。

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

下記の主な共同研究者のうち、過去の肝疾患関連の共同研究での研究者を太字にて明記した。

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)、**田中 靖人**(名古屋市立大学)、山元 弘(神戸学院大学)、橋本 康弘(福島県立医科大学)、野口 雅之(筑波大学)入村 達郎(東京大学)、三善 英知(大阪大)、中西 速夫(愛知県がんセンター)、田岡 万悟(首都大学東京)、尾野 雅哉(国立がんセンター)、伊東 信(九州大学院)、正田 純一(筑波大学)、高橋 智(筑波大学)、山元 弘(大阪大院)、梅澤 明弘(国立成育医療センター研究所)、谷口 直之(理化学研究所・大阪大学)、本家 孝一(高知医科大学)、古川 鋼一(名古屋大学)、木全 弘治(愛知医科大学)、渡辺 秀人(愛知医科大学)、西原 祥子(創価大学)、山村 研一(熊本大学)、掛樋 一晃(近畿大学)、山下 克子(東京工業大学)、中森 正二(大阪医療センター)、渡邊 昌彦(北里大学)、野村 将春(東京医科大学)、ほか 多数。

・主な研究課題

糖タンパク質や糖脂質の糖鎖部分の生合成機構、構造解析、生理機能解析、疾患との関連解析

H12.4月～H15.3月:NEDO 受託研究「ヒト糖鎖合成関連遺伝子ライブラリーの構築」

H14.4月～H17.2月:NEDO 受託研究「糖鎖エンジニアリングプロジェクト/糖鎖構造解析技術開発」

H17.4月～H23.2月:NEDO 受託研究「糖鎖機能活用技術開発」

H23.4月～:独立行政法人科学技術振興機構「糖鎖統合データベースと研究支援ツールの開発」

・これまでの研究実績

論文(査読有) 225 報より主なもの 30 報を選択し、直近年度から順に記載。以下は昨年度データ

- 1 Toshima T, Shirabe K, Ikegami T, Yoshizumi T, Kuno A, Togayachi A, Gotoh M, **Narimatsu H**, Korenaga M, Mizokami M, Nishie A, Aishima S, Maehara Y. A novel serum marker, glycosylated *Wisteria floribunda* agglutinin-positive Mac-2 binding protein (WFA+-M2BP), for assessing liver fibrosis. *J Gastroenterol.* (2014.in press)
- 2 Hirao Y, Matsuzaki H, Iwaki J, Kuno A, Kaji H, Ohkura T, Togayachi A, Abe M, Nomura M, Noguchi M, Ikehara Y, **Narimatsu H**. Glycoproteomics Approach for Identifying Glycobiomarker Candidate Molecules for Tissue Type Classification of Non-small Cell Lung Carcinoma. *J Proteome Res.* 13(11):4705-16. doi: 10.1021/pr5006668. (2014 Nov)
- 3 **Narimatsu H**. Strategy for development of clinically useful glycol-biomarkers. *Glycoconj J.* 31(6-7):403-7. doi: 10.1007/s10719-014-9544-8. (2014.Oct)
- 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. doi: 10.1002/hep.27305. (2014 Nov)
- 5 Narimatsu Y, Kuno A, Ito H, Kaji H, Kaneko S, Usui J, Yamagata K, **Narimatsu H**. IgA nephropathy caused by unusual polymerization of IgA1 with aberrant N-glycosylation in a patient with monoclonal immunoglobulin deposition disease. *PLoS One.* 9(3):e91079.(2014 Mar).
- 6 Sogabe M, Nozaki H, Tanaka N, Kubota T, Kaji H, Kuno A, Togayachi A, Gotoh M, Nakanishi H, Nakanishi T, Mikami M, Suzuki N, Kiguchi K, Ikehara Y, **Narimatsu H**. A Novel Glyco-biomarker for Ovarian Cancer That Detects Clear Cell Carcinoma. *J Proteome Res.* 13(3):1624-35. (2014 Mar).
- 7 **Ocho M, Togayachi A, Iio E, Kaji H, Kuno A, Sogabe M, Korenaga M, Gotoh M, Tanaka Y, Ikehara Y, Mizokami M, Narimatsu H.** **Application of a Glycoproteomics-Based Biomarker Development Method: Alteration in Glycan Structure on Colony Stimulating Factor 1 Receptor as a Possible Glycobiomarker Candidate for Evaluation of Liver Cirrhosis.** *J Proteome Res.* 13(3):1428-37. (2014Mar).
- 8 Takasaki N, Tachibana K, Ogasawara S, Matsuzaki H, Hagiuda J, Ishikawa H, Mochida K, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Noce T, Ito C, Toshimori K, **Narimatsu H**. A heterozygous mutation of GALNTL5 affects male infertility with impairment of sperm motility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014, 111(3): 1120-1125.
- 9 Silsirivanit A, Araki N, Wongkham C, Vaeteewoottacharn K, Pairojkul C, Kuwahara K, Narimatsu Y, Sawaki H, **Narimatsu H**, Okada S, Sakaguchi N, Wongkham S. CA-S27: a novel Lewis a associated carbohydrate epitope is diagnostic and prognostic for cholangiocarcinoma. *Cancer Sci.* 2013, 104(10):1278-1284.
- 10 Kudo T, Sato T, Hagiwara K, Kozuma Y, Yamaguchi T, Ikehara Y, Hamada M, Matsumoto K, Ema M, Murata S, Ohkohchi N, **Narimatsu H**, Takahashi S. C1galt1-deficient mice exhibit thrombocytopenia due to abnormal terminal differentiation of megakaryocytes. *Blood.* 2013, 122(9):1649-1657.

- 11 Kaji H, Ocho M, Togayachi A, Kuno A, Sogabe M, Ohkura T, Nozaki H, Angata T, Chiba Y, Ozaki H, Hirabayashi J, Tanaka Y, Mizokami M, Ikehara Y, Narimatsu H. Glycoproteomic discovery of serological biomarker candidates for HCV/HBV infection-associated liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res.* 2013, 12(6):2630–2640.
- 12 Murakami S, Takaoka Y, Ashida H, Yamamoto K, Narimatsu H, Chiba Y. Identification and characterization of endo- β -N-acetylglucosaminidase from methylotrophic yeast *Ogataea minuta*. *Glycobiology.* 2013, 23(6):736–744.
- 13 Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Ito K, Matsuda A, Sekiya S, Hige S, Sakamoto M, Kage M, Mizokami M, Narimatsu H. A serum “sweet-doughnut” protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis. *Sci Rep.* 2013, 3:1065.
- 14 Du D, Zhu X, Kuno A, Matsuda A, Tsuruno C, Yu D, Zhang Y, Ikehara Y, Tanaka Y, Zhang X, Narimatsu H. Comparison of LecT-Hepa and FibroScan for assessment of liver fibrosis in hepatitis B virus infected patients with different ALT levels. *Clin Chim Acta.* 2012, 413(21–22):1796–1799.
- 15 Sugahara D, Kaji H, Sugihara K, Asano M, Narimatsu H. Large-scale identification of target proteins of a glycosyltransferase isozyme by Lectin-IGOT-LC/MS, an LC/MS-based glycoproteomic approach. *Sci Rep.* 2012, 2:680.
- 16 Kubota T, Kumagai A, Ito H, Furukawa S, Someya Y, Takeda N, Ishii K, Wakita T, Narimatsu H, Shirato H. Structural Basis for the Recognition of Lewis Antigens by Genogroup I Norovirus. *J. Virol.* 2012, 86(20):11138–11150.
- 17 Ito K, Kuno A, Ikehara Y, Sugiyama M, Saito H, Aoki Y, Matsui T, Imamura M, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Tanaka Y, Hige S, Izumi N, Kurosaki M, Nishiguchi S, Sakamoto M, Kage M, Narimatsu H, Mizokami M. LecT-Hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology.* 2012, 56(4):1448–1456.
- 18 Kaji H, Shikanai T, Sasaki-Sawa A, Wen H, Fujita M, Suzuki Y, Sugahara D, Sawaki H, Yamauchi Y, Shinkawa T, Taoka M, Takahashi N, Isobe T, Narimatsu H. Large-scale identification of N-glycosylated proteins of mouse tissues and construction of a glycoprotein database, GlycoProtDB. *J Proteome Res.* 2012, 11(9):4553–4566.
- 19 Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Saito K, Ito K, Tsuruno C, Nagai S, Takahama Y, Mizokami M, Hirabayashi J, Narimatsu H. LecT-Hepa: A triplex lectin-antibody sandwich immunoassay for estimating the progression dynamics of liver fibrosis assisted by a bedside clinical chemistry analyzer and an automated pretreatment machine. *Clin Chim Acta.* 2011, 412(19–20):1767–1772.
- 20 Sato T, Kudo T, Ikehara Y, Ogawa H, Hirano T, Kiyohara K, Hagiwara K, Togayachi A, Ema M, Takahashi S, Kimata K, Watanabe H, Narimatsu H. Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1 is necessary for normal endochondral ossification and aggrecan metabolism. *J Biol Chem.* 2011, 286(7):5803–5812.
- 21 Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Angata T, Unno S, Sogabe M, Ozaki H, Ito K, Hirabayashi J, Mizokami M, Narimatsu H. Multilectin Assay for Detecting Fibrosis-Specific Glyco-Alteration by Means of Lectin Microarray. *Clin Chem.* 2011, 57(1):48–56.

- 22 Matsuda A, Kuno A, Kawamoto T, Matsuzaki H, Irimura T, Ikehara Y, Zen Y, Nakanuma Y, Yamamoto M, Ohkohchi N, Shoda J, Hirabayashi J, Narimatsu H. Wisteria floribunda agglutinin-positive mucin 1 is a sensitive biliary marker for human cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 2010, 52(1):174-182.
- 23 Togayachi A, Kozono Y, Ikehara Y, Ito H, Suzuki N, Tsunoda Y, Abe S, Sato T, Nakamura K, Suzuki M, Goda HM, Ito M, Kudo T, Takahashi S, Narimatsu H. Lack of lacto/neolacto-glycolipids enhances the formation of glycolipid-enriched microdomains, facilitating B cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010, 107(26):11900-11905.
- 24 Wada Y, Dell A, Haslam SM, Tissot B, Canis K, Azadi P, Backstrom M, Costello CE, Hansson GC, Hiki Y, Ishihara M, Ito H, Kakehi K, Karlsson N, Hayes CE, Kato K, Kawasaki N, Khoo KH, Kobayashi K, Kolarich D, Kondo A, Lebrilla C, Nakano M, Narimatsu H, Novak J, Novotny MV, Ohno E, Packer NH, Palaima E, Renfrow MB, Tajiri M, Thomsson KA, Yagi H, Yu SY, Taniguchi N. Comparison of methods for profiling O-glycosylation: Human Proteome Organisation Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study of IgA1. *Mol Cell Proteomics*. 2010, 9(4):719-727.
- 25 Ito H, Kuno A, Sawaki H, Sogabe M, Ozaki H, Tanaka Y, Mizokami M, Shoda J, Angata T, Sato T, Hirabayashi J, Ikehara Y, Narimatsu H. Strategy for Glycoproteomics: Identification of Glyco-Alteration Using Multiple Glycan Profiling Tools. *J Proteome Res*. 2009, 8(3):1358-1367.
- 26 Amano K, Chiba Y, Kasahara Y, Kato Y, Kaneko MK, Kuno A, Ito H, Kobayashi K, Hirabayashi J, Jigami Y, Narimatsu H. Engineering of mucin-type human glycoproteins in yeast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 105(9):3232-3237.
- 27 Togayachi A, Kozono Y, Ishida H, Abe S, Suzuki N, Tsunoda Y, Hagiwara K, Kuno A, Ohkura T, Sato N, Sato T, Hirabayashi J, Ikehara Y, Tachibana K, Narimatsu H. Polylactosamine on glycoproteins influences basal levels of lymphocyte and macrophage activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007, 104(40):15829-15834.
- 28 Ito H, Kameyama A, Sato T, Sukegawa M, Ishida HK, Narimatsu H. Strategy for the fine characterization of glycosyltransferase specificity using isotopomer assembly. *Nat Methods*. 2007, 4(7):577-582.
- 29 Iwai T, Kudo T, Kawamoto R, Kubota T, Togayachi A, Hiruma T, Okada T, Kawamoto T, Morozumi K, Narimatsu H. Core 3 synthase is down-regulated in colon carcinoma and profoundly suppresses the metastatic potential of carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005, 102(12):4572-4577.
- 30 Kudo T, Kaneko M, Iwasaki H, Togayachi A, Nishihara S, Abe K, Narimatsu H. Normal embryonic and germ cell development in mice lacking alpha 1,3-fucosyltransferase IX (Fut9) which show disappearance of stage-specific embryonic antigen 1. *Mol Cell Biol*. 2004, 24(10):4221-4228.

特許(出願中を含め)計 71 件(登録済み特許は計 45 件)。下記に関連のある 4 件を記載する。

1. 特許第 5031928 号「糖タンパク質の測定方法、肝疾患の検査方法、糖タンパク質量用試薬および肝疾患病態指標糖鎖マーカータンパク質」
2. WO11/007764「肝疾患病態指標糖鎖マーカー」
3. 特願 2014-149270「肝細胞がんマーカー」
4. 特許第 5441280 号「糖タンパク質の測定方法、肝疾患の検査方法および糖タンパク質量用試薬」