

厚生労働省科学研究費補助金

B型肝炎創薬実用化等研究事業

**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**

(H24- B創-肝炎-一般-007)

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 成松 久

平成 26 (2014) 年 5 月

目 次

・ 総括研究報告	1
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	
<研究代表者> 成松 久	
(資料) 班会議開催記録	
・ 分担研究報告	
課題 1. HBV (HBs 抗原) の糖鎖解析	21
・ 溝上雅史、杉山真也	
・ 是永匡紹、杉山真也	
・ 梶裕之、久野敦、伊藤浩美、田尻和人、是永匡紹	
課題 2. HBV 感染可能細胞の糖鎖解析	33
梶裕之、伊藤浩美、安形清彦、飯島 沙幸	
課題 3. HBV-宿主細胞における糖鎖の役割	40
館野浩章、佐藤隆	
課題 4. 糖鎖改変の HBV の増殖・感染能への影響	45
・ 米田政志、伊藤清顕	
・ 安形清彦、梶裕之、佐藤隆	
課題 5. 糖鎖修飾を受けた HBs 抗原の大量精製	56
千葉靖典	
・ 研究成果の刊行に関する一覧表	61
・ 研究成果の刊行物・別刷	65

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
成松 久 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター長

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：多数の検体からHBV(HBs抗原)を調製し、レクチンアレイ技術を応用し、糖鎖解析を行う。2) HBV感染可能細胞の糖鎖解析：産総研独自のグライコプロテオミクス技術を用い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、次世代シーケンサー等を用いた糖鎖遺伝子の発現解析を行う。3) HBV-宿主細胞における糖鎖の役割：肝細胞に発現する内在性レクチンとHBV糖鎖との結合を解析し感染に関わる分子を探索する。4) 糖鎖改変のHBVの増殖・感染能への影響：HBVを産生する肝細胞の糖鎖合成系を阻害し、HBV粒子の形成・分泌能を比較する。また、分泌されたHBVの感染能を解析し、創薬開発のためのターゲットとする糖鎖を明らかにする。5) 糖鎖修飾を受けたHBs抗原の大量精製：ヒト型糖鎖を発現する酵母を用い、HBs抗原の大量精製を行う。現在ワクチン用に使用されている通常の酵母由来のHBs抗原と比較し、より有効なワクチンの開発に繋げる。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。以上の研究により、今後さらに他研究グループと連携し、糖鎖を利用した多検体検査による病態解析、B型肝炎を治療する新規治療薬の開発やHBVの感染を防ぐワクチンの実用化へ繋げる。

研究分担者

溝上雅史（国立国際医療研究センター・肝炎・免疫研究センター長）

是永匡紹（同・室長）

米田政志（愛知医科大学・教授）

伊藤清顕（同・准教授）

飯島沙幸（名古屋市立大学・研究員）

田尻和人（富山大学・助教）

伊藤浩美（福島県立医科大学・助教）

千葉靖典（産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・上級主任研究員）

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）

梶 裕之（産業技術総合研究所・糖鎖工学研究センター・研究チーム長）

久野 敦（同・上級主任研究員）

梅谷内晶（同・主任研究員）

佐藤 隆（同・主任研究員）

安形清彦（同・招聘研究員）

A. 研究目的

現在、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がつつある。ほとんどの国や地域で HBV に対するユニバーサルワクチネーションが行われているにも拘らず、我が国ではユニバーサルワクチネーションが行われていないこともあり、新規感染患者の発症を防ぐ事は難しいと考えられる。また、B 型肝炎においては IFN による治療成績が悪い場合が多く、持続感染を防ぐための核酸アナログ薬の継続投与でも薬剤耐性ウイルスの出現が問題になっている。従って、逆転写酵素に代わる創薬ターゲットの発見には HBV の感染/複製機構をより詳細に理解する必要がある。

一方、最近のウイルスの感染機構の解明により、糖鎖や糖タンパク質が様々なウイルスの受容体となっている事が明らかになりつつあり、糖鎖関連分子が HBV の接着・侵入に関わっている可能性が考えられる。また伊藤らの研究により（Ito K et al. J Virol. 2010）、HBs 抗原上の糖鎖が感染性 HBV の粒子形成・分泌に重要である事が示唆されており、糖鎖修飾や糖鎖合成系が HBV 制御に向けた創薬のターゲットと成る可能性がある。すなわち、HBV の感染過程における糖鎖研究は、抗 HBV ワクチンや抗 HBV 薬を効率的に開発する上で重要な課題である。

本研究は、HBV の糖鎖構造を解析し多検体診断への応用、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 の創薬ターゲットの同定、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探索、ヒト型糖鎖を持つ HBs 抗原を大量調製し新規ワクチンの開発など糖鎖を利用した HBV 感染の防御と治療を目指す。（図 1）

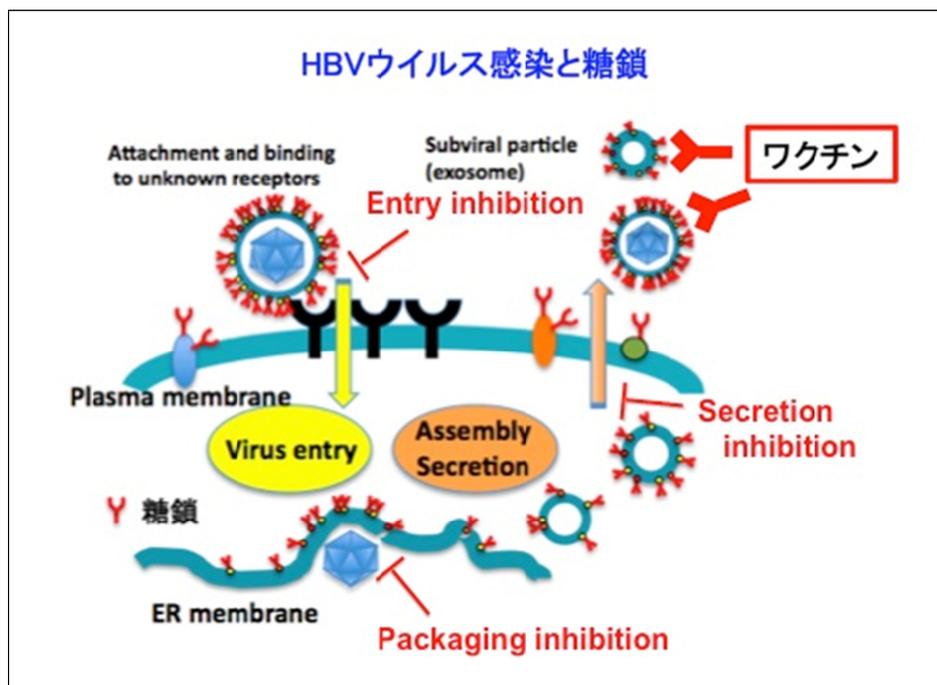


図1 HBV ウイルス感染と糖鎖 ウイルスの感染過程において、糖鎖は様々な段階に関与している。本研究では、(i)HBV ウイルスの肝細胞への接着・侵入や(ii)HBV 粒子の形成・分泌の抑制や、(iii)糖鎖付きのHBV (HBs 抗原) を認識するワクチンの開発を目的としている。

B. 研究方法

本研究班では、HBV 感染における糖鎖の機能を解析し、HBV に対する創薬実用化を図るために、最先端の糖鎖機能解析技術を開発・実用化して来た産総研・糖鎖医工学研究センター（統括：成松）と肝疾患や HBV 作製・感染実験の専門家から構成される肝臓グループ（統括：溝上）とが協力体制（医工連携体制）を構築して進めた。

(1) HBV (HBs 抗原) の糖鎖解析：精製 HBs 抗原を用いて質量分析 (MS) を用いたグライコプロテオミクス解析法を検討し、精製 HBs 抗原上の糖鎖付加位置決定を行った。さらに、糖鎖構造の決定を MS/MS 法により解析した。HBs 抗原上の糖鎖の有無と HBs 抗原の構造の関連性を調べるためにプロテアーゼ処理と SDS-PAGE や MS により検討した。

ワクチン接種により誘導された B 細胞クロー

ンに由来するヒト抗 HBs 抗原抗体のシリーズを用い、精製 HBs 抗原に対してウエスタンブロット法を行った。HBs 抗原の免疫沈降、そしてオーバーレイによる検出方法の開発のために、選抜した抗体産生細胞を培養し抗体を大量調製した。

次に、背景肝の異なる HBV 感染患者の血清を調製し、開発したレクチンアレイ解析を行い糖鎖プロファイリングによる基礎情報を収集した。

(2) HBV 感染可能細胞の糖鎖解析：肝がん細胞を形質転換し、72 時間後の培養上清を調製し糖鎖グループに供与した。ヒト肝臓キメラマウスから肝細胞を調製し、5 日後に HBV を感染させ経時ごとに培養肝細胞 (±HBV 感染) を回収し、レクチンアレイによって糖鎖プロファイリングを解析した。

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、まず HBV が感染しないヒト由来細胞株 (HuH7 細胞と HepG2 細胞) と正常ヒト肝細胞を培養し、質量分析により糖鎖構造解析 (N-glycan/ O-glycan 解析) を行った。

また HBV を作製する HuH7 細胞や HepG2 細胞及び正常ヒト肝細胞の糖鎖遺伝子の発現量を解析するために、total RNA を調製し、cDNA 合成後に qRT-PCR (糖鎖遺伝子 qPCR アレイシステム) を行った。同 RNA は次世代シーケンサーを用い、whole transcriptome 解析を行い、糖鎖関連遺伝子の発現量解析を行った。

(3) HBV-宿主細胞間相互作用機構の解明:

HBV 感染に關与する宿主細胞上糖鎖認識分子 (内在性レクチン) の探索を網羅的に進めるために、肝がん細胞株のプロテオーム解析と上述の次世代シーケンサーの結果を基に、レクチン様分子の検索を行なった。候補レクチンの cDNA をクローニングし、発現させたレクチンを回収しアレイに固定化した。精製 HBs 抗原をラベル化し、各レクチン様分子との結合を解析した。

Genotype C の HBs 抗原 cDNA をクローニングし、分泌シグナルとタグを付けた HBs 抗原を HuH7 細胞で発現し、抗タグ抗体を用いウェスタンブロッティングにて検出した。HBs 抗原 cDNA に変異を導入し、糖鎖付加部位の置換、導入、再配置、ジスルフィド結合の変異による HBs 抗原の分泌や糖鎖付加の変化を解析した。

(4) 糖鎖改変の HBV の増殖・感染能への影響: タグ付き HBs 抗原を HuH7 細胞で発現させ、糖鎖合成系阻害剤を添加する事により、HBs 抗原の分泌への影響を解析した。

上述の糖鎖遺伝子発現解析を基に、発現パターンで 2 群 (抑制目的と過剰発現目的) に分け、cDNA ライブラリーと siRNA ライブラリーを作

成した。糖鎖遺伝子 cDNA は産総研で作製された糖鎖遺伝子ライブラリーから PCR で増幅し、新規に作成した発現ベクターにクローニングした。HEK293 細胞を形質転換後に細胞融解し、共通のタグを用いて各糖転移酵素の発現量を比較した。siRNA ライブラリーは各糖鎖遺伝子に 3 つの siRNA を合成し、同量ずつを混ぜた後にウエルに加え形質転換した。qRT-PCR により siRNA の効果及び、発現量の変化を確認した。

愛知医科大学 (大臣確認の申請済み) にて、HBV を産生する Hep2.2.15 細胞を用い siRNA ライブラリーのスクリーニングを行った。形質転換後に培養上清を回収し、ELISA 法による HBs 抗原の発現量、PCR 法による HBV DNA の定量などを行い、HBV 分泌への影響を解析した。

(5) 糖鎖修飾を受けた HBs 抗原の大量精製:

L-HBs 抗原をコードする遺伝子を出芽酵母で発現するために最適なコドンに変換し全合成を行い、出芽酵母の発現ベクターに組み込んだ。酵母の形質転換を行い得られたクローンを培養し、菌体内及び培養液中のタンパク質を SDS-PAGE により展開しウエスタンブロッティング (抗 HBs 抗体 (抗 PreS1 モノクローナル抗体 (マウス)) で HBs 抗原の発現を検出した。最も良く発現するクローンを選択し、HBs 抗原の大量精製を行うために、培養条件、前処理法、濃縮方法、カラムの選択、HPLC やフィルター処理等の条件検討などを行った。精製行程の評価は SDS-PAGE を行い、銀染色により判定した。さらに大量調整を可能にするために、高発現可能な酵母を形質転換しクローンの選択を行った。

(倫理面の配慮)

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(平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号)」を遵守する。また、必要な実験承認を受けるためにインフォームド・コンセント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;国際医療研究センター:HBs抗原の精製や臨床検体収集に伴う倫理委員会申請;愛知医科大学及び名古屋市立大学:HBV作製に関する文部科学大臣確認)を行い、許可の承認を得た。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た。

C. 研究結果

本研究は、まずHBV(HBs抗原)の糖鎖構造を解析し、グライコプロテオーム解析法を確立し多検体診断への応用を目指した。また、宿主肝細胞側の糖鎖合成系はHBVの糖鎖修飾を担うこともあり、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の創薬ターゲットの同定を目指した。肝細胞表面の糖鎖関連分子がHBVの感染に深く関与している可能性を確かめるため、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探索を行った。さらに、ヒト型糖鎖を持つHBs抗原を大量調製し新規ワクチンの開発など糖鎖を利用したHBV感染の防御と治療を目指した。

(1) 昨年度の問題点であったHBs抗原の免疫沈降やオーバーレイによる検出法に必要な抗体の入手のため、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)のシリーズをテストした。確認した抗体全てにおいて、糖鎖の無い

HBs抗原のみを認識することを見いだした。これらの抗体の内の1つが免疫沈降にも有用であったので、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。

次に、背景肝の異なるHBV感染患者の血清を調製し、開発したレクチンアレイ解析を行い糖鎖プロファイリングによる基礎情報を収集した。

B型肝炎患者血清より調製されたサブウイルスパーティクル(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。また精製した糖ペプチドのLC-MS分析から、M-HBs-PreS2領域の糖鎖構造を検出した。PreS2 N4はのN-glycanではほぼ100%修飾されているが、S領域のN146は約50%の修飾であった。

(2) 感染可能なヒト肝細胞と感染不可能な肝がん細胞(HuH7細胞とHepG2細胞など)の遺伝子発現解析や糖鎖解析を行い、両者の差を比較した。qRT-PCR(糖鎖遺伝子qPCRアレイシステム)による糖鎖遺伝子発現解析の結果、約190種類の糖鎖遺伝子の発現プロファイルを得た。肝細胞の糖鎖遺伝子発現とも比較し、糖鎖遺伝子群を高発現と低発現(発現無し)の2群に分け、課題4の解析のための基礎情報とした。さらに次世代シーケンサーとパイオインフォーマティクス解析を行い、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)の発現を解析した。やレクチンアレイ解析の準備を進め、

質量分析器(MS)による宿主肝細胞、肝がん細胞ならびに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。N-結合型糖鎖については、ほとんどがハイマンノース型であり、細胞間の糖鎖構造は類似していた。一方、SVPのN-結合型糖鎖は二本差のコンプレックス型であった。O-結合型糖鎖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、その相対量は細胞間でも異なる結果となった。SVPのO-結合型糖鎖も単純な構造であった。

ヒト肝臓キメラマウス由来培養肝細胞(±HBV感染)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。

(3) グライコプロテオーム解析(IGOT解析)と次世代シーケンサーの結果を基に、内在性レクチンの検索を行い、感染能が無い肝細胞株で比較的発現量が低いことなどを考慮して、肝細胞に発現する複数種のHBV糖鎖受容体候補分子を同定した。候補分子を決定しクローニングした。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。

また、HBV Genotype AとCのHBs抗原の発現ベクター(組換えHBs)の発現系を構築した。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。培養液中にタグ付きのHBs抗原として分泌され抗タグ抗体を使って精製し、その後の実験に使用可能であることを確認した。

(4) 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を調べた。HBVを産生する細胞およびHuH7細胞に上記(3)で作製したHBs抗原cDNAを発現させ、小胞体やゴルジ体でのN型やO型糖鎖合成の阻害剤を試験し、抗HBV創薬の標的分子を選定するた

めの基礎情報を取得した。糖鎖が付いたHBs抗原の発現やHBVの分泌に差が出る事を確認しており、幾つかの阻害剤において、低濃度でもHBs抗原の分泌を抑制した。

昨年度に引き続きcDNAライブラリー(約100遺伝子)の作成を進め、糖鎖改変細胞群の準備を行った。qRT-PCR(糖鎖遺伝子qPCRアレイ)による糖鎖遺伝子発現プロファイルの結果を基に糖鎖遺伝子siRNAライブラリーを作製し、糖鎖改変細胞のスクリーニングを行った結果、86siRNAターゲットのうち16糖鎖遺伝子でHBs抗原の分泌を抑制し、HepG2.2.15細胞を用いたHBV作成実験でもHBVDNAを減少させる糖鎖遺伝子siRNAを確認した。

(5) L-HBs抗原の大量精製を行うために、L-HBs抗原をコードする遺伝子4種について、出芽酵母で発現するために最適なコドンに変換し全合成を行った。各遺伝子を出芽酵母の発現ベクターに組み込み、酵母の形質転換により安定発現株を樹立した。2種のcDNAに由来するクローンでL-HBs抗原の発現を検出し、少なくとも一つのN型糖鎖修飾を有することを確認した。

次にHBs抗原の大量精製を行うために、培養条件、前処理法、濃縮方法、カラムの選択、HPLCやフィルター処理等の条件検討などを行った。比較的低栄養源の培地を用い長時間培養でHBs抗原の発現の上昇が確認された。微粒子またはタンパク質複合体として存在しているHBs抗原の酵母菌体との分離にフィルター処理が有効である事を確認した。さらに大量調整を可能にするために、高発現可能な酵母を形質転換しクローンの選択を行った。以上の様に、抗体試験のために酵母で発現させた糖鎖付きHBs抗原の精製法を検討・確立した。

D. 考察

(1) これまでの主要な総説ではN末側のN型糖

鎖修飾は殆ど紹介されていないが、質量分析によるグライコプロテオミクス解析は、*N*型糖鎖修飾が L-HBs 抗原の *N* 末側 (HBV 認識領域と考えられている領域) にある事が確認された。HBs が S、M、L の 3 種あり、糖鎖の付加もほぼ 50% であり、S 領域の *N* 型糖鎖修飾の割合に依存しており、L-, M-, S-HBs 抗原のウイルス粒子における配向性と糖鎖修飾の関連は興味深い。今後 HBV 粒子 (Dane particles) の糖鎖構造および HBs 抗原の構造を解析し SVP との比較を行う必要がある。

これまでに、HBV 上の糖鎖と病体あるいは個人間の差などの解析は殆ど行われておらず、本研究では HBV および HBs 抗原の糖鎖構造を多量サンプルについて簡便に解析する方法の開発が一つの目標である。本年度に検証した抗体を用いて肝炎患者の肝臓の状態 (線維化や肝がんのステージ) HBV の遺伝子型の異なる HBs 抗原について多数サンプルの糖鎖構造を分析・比較していく事が可能になった。HBV 感染と実際の肝線維化や肝がんの発症とのマーカー開発に繋がれば治療の効率化に繋がると考えられる。

(2) 一般にウイルスの感染において宿主側の糖鎖もしくはレクチンが関与していることが多いが、HBV 感染機構における肝細胞側の糖鎖の役割は全く分かっていない。特に宿主肝細胞の糖鎖合成系は HBV 表面の糖鎖を合成しており、病態変化により糖鎖遺伝子の発現量や糖鎖構造が変化する事は明らかで、HBV 上の糖鎖構造にどのように影響を及ぼすかを調べる必要がある。

これまでに 5 種の肝がん細胞とヒト肝細胞の次世代シーケンサーによる解析を終了しており、糖鎖関連遺伝子の発現における差が明らかになった。最近 HBV の受容体として注目されている NTCP を含めて、感染可能な細胞にのみ発現が見られる分子も同定されており、HBV 感染との関係をより詳細に解析していく必要がある。

例えば、キメラマウス由来肝細胞) の経時的な培養と感染能の変動に伴う候補分子の発現プロファイルの変化についてより詳細な解析を行う。

(3) HBV の場合、肝癌細胞株を用いた持続感染系が存在しておらず、HBV の感染過程の解明が創薬開発に必要と考えられる。本研究では宿主肝細胞に発現する内在性レクチンと HBs 抗原上の糖鎖との相互作用を解析し、HBV 感染における糖鎖の役割を解明する事を一つの目的としている。(2) の解析を基に同定した HBV 糖鎖受容体候補分子と HBV 感染患者血清より精製した HBs 抗原との結合を解析した。候補分子の過剰発現細胞やノックダウン細胞を用い、HBV 粒子との結合、肝臓内局在や NTCP 分子との関連を検証中であり、HBV 感染における糖鎖の役割に繋げたい。L-HBs 抗原の *N* 末側と受容体との結合において *N* 型糖鎖修飾の影響はこれまで全く研究されておらず、NTCP 発現安定株を用いて、検証する必要がある。他班で研究される HBV 受容体との感染促進効果などの研究や糖鎖-受容体の阻害剤をスクリーニングへと繋げる必要が考えられる。

(4) これまでに、ツニカマイシン (*N* 型糖鎖の合成阻害) では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ことが報告されており、創薬のターゲットと成り得る。実際に糖鎖合成系の阻害剤を試験した所、幾つかの阻害剤で HBs 抗原の *N* 型糖鎖の付加と分泌が既報のノジリマイシンより抑制する事が確認された。糖鎖合成系の阻害剤の場合は、副作用を起こさない濃度あるいは感染細胞のみへのドラッグデリバリーなどの技術と共に開発する必要がある。

HBV 創薬のターゲットとして選定するためには、特定の糖鎖遺伝子やタンパク質の糖鎖合成を阻害する事の方が有用である。今回糖鎖遺

伝子ライブラリーや siRNA スクリーニングに依り得られた候補糖鎖遺伝子について、HBV の複製・分泌への影響および HBV の感染能への影響を詳しく解析する事が重要である。また、HBs 抗原の糖鎖付加阻害実験の結果を基に培養肝細胞を用いたスクリーニング系を開発し低分子化合物ライブラリーのスクリーニングに供する事も可能であると考えられる。

(5) 現在用いられている HBV ワクチンは、酵母で発現された糖鎖を持たない S-HBs 抗原であり、感染能を有する HBV 粒子の HBs 抗原は糖鎖の有無がほぼ半々で構成されている事が分かった。すなわち、現行のワクチンにより免疫された抗体は HBV 粒子中の糖鎖の無い HBs 抗原に作用し抗ウイルス効果を示していると考えられる。

実際にヒトに免疫して得られたクローンの抗体は糖鎖の有る HBs 抗原を認識しなかった。最近中国の臨床例として報告された例では、ワクチン接種者から発見されたエスケープ変異のうち約 22% で糖鎖の新規付加が観察された。現在のワクチンは実際に有効であるが、糖鎖を有する HBs 抗原で免疫する事によりさらに効率良く抗ウイルス効果が得られる可能性がある。PreS1 や PreS2 の抗体誘導率が高い事が示唆されており、調製中の L-HBs 抗原を免疫しエピトープの決定と HBV 粒子との反応性を検証し現行ワクチンと比較する事が必要である。HBV 感染患者の中で作られる中和抗体のエピトープ決定が興味深い。

糖鎖を使ったHBV研究と医用応用

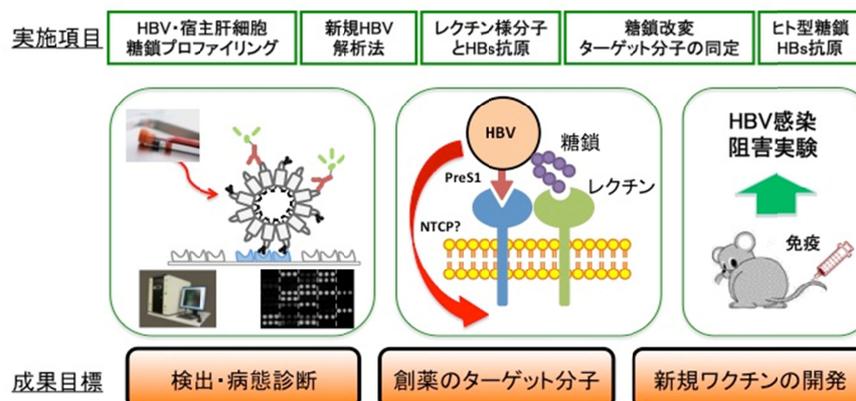


図2 本年度の研究成果の概要 5つの実施項目により3つの成果目標の達成を目指す。

E. 結論

HBV感染・複製における糖鎖の役割は殆ど解析されていなかったが、HBVあるいは宿主肝細胞の糖鎖関連分子を標的とした創薬のシーズとなる可能性が考えられ以上の研究結果を得た。

(図2)

(1) HBs抗原のグリコプロテオミクス解析からHBVの簡易検出系の開発へと進んだ。現在臨床サンプルでの基礎データを収集であり、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・臨床応用へと進展させたい。

(2) 本研究結果から、内在性レクチンがHBV上の糖鎖と結合する事が示され、HBVの感染に関与している可能性が考えられた。また糖鎖遺伝子のHBV分泌への重要性も示唆された事から、タミフルの様にHBV粒子形成や分泌を阻害する新規ターゲットとなりうるかを検討して行きたい。

(3) 糖鎖を有するL-HBs抗原の発現に成功し精製法の検討を行ったが、L-HBs抗原の大量精製を実施し現行ワクチンと免疫実験を行い比較

する必要がある。現行のワクチンに加え有効な新規ワクチンの開発やワクチン治療への応用などに繋げたい。

以上のように、HBVの感染過程における糖鎖構造解析と糖鎖機能解析を中心に医用応用のための基盤研究を行い、さらにB型肝炎を治療する新規治療薬の開発やHBVの感染を防ぐワクチンの実用化へ展開していけると考えている。

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

- (1) **Narimatsu H.** Glycosylation of HBV.
TASL-Japan Hepatitis B Workshop, April 19-20, 2014, Taipei

2. 学会発表

省略。

その他の論文発表及び学会発表は各課題の分担研究報告書を参照のこと。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

省略。

2. 実用新案登録

省略。

3. その他

省略。

特許の国際・国内の出願・登録状況についても各課題の分担研究報告書を参照。

厚生科研（B型肝炎創薬実用化研究事業）

平成 25 年度 第一回班会議 議事録

開催日時 平成 25 年 7 月 12 日（金） 14:30 ~ 18:30

場 所 東京コンベンションルーム AP 品川「P+Q ルーム」（京急第 2 ビル・9 階）

出席者（敬称略）：溝上雅史、是永匡昭（以上、国立国際医療研究センター）、米田政志、伊藤清顕（以上、愛知医科大学）、飯島沙幸（名古屋市立大学）、田尻和人（富山大病院）、成松久、安形清彦、梶裕之、久野敦、梅谷内晶、佐藤隆、千葉靖典、館野浩章、後藤雅式、雄長誠、我妻孝則（以上、産総研）

（国立国際医療研究センター・正木尚彦、愛知医科大学・森田奈央子、福島県立医大・伊藤浩美、産総研・梶裕之は、都合により欠席）

会議内容

1．成松研究代表者挨拶

今回はオブザーバーとして理研の小嶋先生が出席されていたので、HBV 研究と糖鎖の概論を説明した。

2．溝上先生挨拶

厚生科学審議会の情報を報告。日本のワクチン転換期にある。産まれてくる子供全てに HBV ワクチン接種を行うことになるだろう。

3．研究報告

(1) 課題 1（久野）

田尻先生から供与頂いた 4 種の抗体の評価を行った。抗体オーバーレイでノイズが出ず、IP 効率の良い抗体が見つかった。糖鎖が付加した HBs とは結合しにくいようである。

今後は、実サンプルを用いた解析系を立ち上げる（国際医療研究センター内で実施予定）、Genotype、背景肝の影響を検討し、Dane 粒子リッチの画分との比較も行いたい。

(2) 課題 2（梅谷内）

HepG2, Huh7 の糖鎖解析の結果、high Man 型糖鎖が多い。O-glycan としては Core1 等が多い。今回は培養の結果細胞であるが、プライマリーヘパトサイトで解析しないと意味がない。今後は、非感染キメラマウス肝 感染能の有無により細胞の糖鎖が異なるかどうかを検討したい。

(3) 課題 3（館野）

糖鎖が初期感染に関係するか（HBV-宿主における糖鎖の役割）を検討している。

6 種類の内在性レクチンのリコンビナントを作製し、HBs との相互作用を検討した結果、Gal3 のみ反応が見られた。今後は細胞レベルでの解析を行う予定である。実施には HBV-GFP を開発している下遠野班との連携が必要である。

(4) 課題4 (伊藤先生)

糖鎖合成阻害による genotypeA をトランスフェクトした Huh7 の Dane 粒子分泌阻害を検討している。ノジリマイシン濃度を上げると分泌阻害が多少見られる。変異により分泌量が低下する。146N を変異しているウイルスは血清では見られない。N-glycan の数と疾患の状態が変わる可能性もある。

(安形)

細胞側の糖鎖修飾を変えるとどうなるかを検討している。HBV 分泌に必要な糖鎖合成系の絞込みのための、cDNA ライブラリー、siRNA ライブラリーはできている。

(5) 課題5 (千葉)

台湾でワクチンを打っているが、すり抜ける例が多い。そこで、L タンパク質に糖鎖付加をしたものを免疫原としたいと考えている。

4 種類の遺伝子のうち、安定に発現する genotype Ae、C について酵母で生産を行っているが、精製が難しい。凝集により培地中でも不溶性になっているため、可溶化 透析 カラム精製を検討している。収量は数百 ml から 100 ug 程度と少ない。

Mg オーダーで精製して、マウスの免疫をする(田尻先生に依頼する)予定である。mg オーダーで準備する。糖鎖の有無で比較。Endo-M で糖鎖を付け替えも検討する。

4 . 他班との共同研究について

今後、他班と積極的に共同研究を実施する。まずは、正木先生に他班のスケジュールを送ってもらう。

厚労科研（B型肝炎創薬実用化研究事業）

平成 25 年度 第二回班会議 議事録

開催日時 平成 25 年 9 月 30 日（月） 13:30 ~ 18:30

場 所 東京コンベンションルーム AP 品川「F+G ルーム」（京急第 2 ビル・10 階）

出席者（敬称略）：溝上雅史、是永匡昭、正木尚彦（PO）（以上、国立国際医療研究センター）、米田政志、伊藤清顕（以上、愛知医科大学）、飯島沙幸（名古屋市立大学）、田尻和人（富山大病院）、成松久、安形清彦、梶裕之、久野敦、千葉靖典、梅谷内晶、佐藤隆、後藤雅式、我妻孝則（以上、産総研）

（名市大・田中靖人、産総研・館野浩章、雄長誠は、都合により欠席）

会議内容

1．研究代表者（成松）挨拶

本研究班は B 型肝炎に対する創薬を目指す本研究事業において糖鎖を中心に研究している。本研究事業をさらに推進して行くために 9 月 9 日に合同班会議を開催した事を報告した。

2．合同班会議の報告（安形）

9 月 9 日に国立感染症研究所にて開催された 4 班合同班会議について報告した。

当班は当初よりスクリーニング、ウイルス粒子形成・分泌、レセプター、新培養細胞系の評価を研究課題とする班との共同研究を計画しており、今回 3 班（小嶋班、脇田班、下遠野班）との合同班会議を開催した。各班の研究内容について紹介、各班とも最近報告された HBV のレセプター候補分子 NTCP について研究を進めており、それについては米田先生（愛知医大）よりコメントがあった。

3．各課題の進捗状況説明

課題 1（梶、久野）

これまでの MS によるグライコプロテオミクス解析から、HBs 抗原上の糖鎖の付加部位が明らかになり、およその糖鎖構造が示唆された。L-HBs 抗原の N 末の N-glycan や M-HBs 抗原の N 末 (PreS2) の N-glycan は明らかになったが、S-HBs 抗原の N-glycan の構造は明らかになっていない。約半分の S-HBs 抗原が糖鎖修飾されていない事、プロテアーゼによる切断が難しい事も、構造や糖鎖の機能を解析する上で重要な点として挙げられた。

レクチンアレイによる HBs 抗原の解析では、免疫沈降や抗体の選定が進み、特にノイズの除去に成功した。田尻先生（富山大）から頂いた抗体が、ウエスタンの検出でレクチンアレイなどの結果に比べシグナルが弱い事の原因として、還元剤による処理が原因である事を示した。非還元状態で泳動した場合、より多くの抗体で認識され、糖鎖の影響に加えジスフィルド結合がワクチンの抗体認識構造に影響していると考えられた。

課題 2 (梶谷内)

感染に必要な糖鎖・糖鎖関連分子を明らかにするために、感染可能細胞と不可能細胞を糖タンパク質解析 (グライコプロテオミクス)、糖鎖解析 (MS)、糖鎖遺伝子解析 (qRT-PCR アレイ、次世代シーケンサー) を行っている。肝臓由来の培養細胞 2 種 (Huh7、HepG2) とヒト肝細胞の解析結果から、糖鎖遺伝子と内在性レクチンの発現解析が進み、課題 3 や課題 4 で利用される。

ヒト肝キメラマウス由来の肝細胞のレクチンアレイ解析で、培養 5 日目と 17 日目の糖鎖発現パターンに大きな差があるが、HBV 感染の有無 (感染後 12 日目) による差は微小であった。

課題 3 (佐藤)

HBV の受容体結合そして細胞内への侵入に糖鎖が関わっているかを明らかにするために、分泌 HBs 抗原を利用している。糖鎖の付かない HBs 抗原と新たな N-glycan 修飾部位を導入した HBs 抗原を作成した。

課題 2 による次世代シーケンサーの結果から肝臓で発現しているレクチン様分子の絞り込みを行い、発現パターンが肝臓特異的であるものが複数見つかった。今後 NTCP との共発現や HBV 感染実験に用い、糖鎖関連分子の同定を進めて行く。

課題 4 (安形)

課題 2 の結果を基に糖鎖改変細胞を作製し、ウイルス粒子形成・分泌や感染への糖鎖の影響を調べている。糖鎖遺伝子 cDNA プラスミドによる過剰発現系では、タグに対する抗体を用いて糖転移酵素の発現を確認した。siRNA による発現抑制系では、幾つかの siRNA について、qRT-PCR によって発現量の減少を確認した。タグ付き HBs 抗原を用い、siRNA の効果の解析を始めたところ、HBs 抗原の糖鎖が減少するものが確認されたので、さらに他の siRNA や cDNA についても解析を進める。今後各プレートを用いて HBV 作成実験にも使用する。

課題 5 (千葉)

HBV に対する新規ワクチンを作製するために、酵母で発現させた L-HBs 抗原の解析と精製を進めた。酵母特有の高マンノース型ではない糖鎖が付加されている事、沈殿しやすい性状が報告された。ウレアによる透析や HPLC によって精製法を確立したので、現在免疫用に L-HBs 抗原の精製している。まず、PreS1 や PreS2、糖鎖存在の抗体価の上昇への影響を調べ、田村先生 (富山大) による抗体エピトープ解析を行い、ワクチンとしての有効性を検討する。

溝上先生 (国際医療セ) より、ワクチン政策ではユニバーサルワクチンを増やしていく上で優先順位の選定に入っているので、当班での HBV ワクチンの成果は将来の厚生政策に重要であるとのこと。

4 . 他班との共同研究等について

今後の研究を進めて行く上で共同研究が重要になる。積極的に他班に働きかけて行く事が確認された。研究成果を公開して行くために、論文を投稿して行く事も確認された。

5 . PO コメント

正木 PO (国際医療セ) より本研究班の進捗状況について、新規ワクチンの開発やグライコミクスの進展についてコメントいただいた。スクリーニングによるターゲット分子の同定の加速を期待するとのコメントも頂いた。

各班間での情報交換や共同研究促進に向けて、参加研究者に本研究事業のホームページを公開する事が報告された。

厚労科研（B型肝炎創薬実用化研究事業）

平成 25 年度 第三回班会議 議事録

開催日時 平成 25 年 11 月 27 日（水） 13:30 ~ 18:30

場 所 東京コンベンションルーム AP 品川「P+Q ルーム」（京急第 2 ビル・9 階）

出席者（敬称略）：溝上雅史、是永匡紹、正木尚彦（PO）（以上、国立国際医療研究センター）、米田政志、伊藤清顕（以上、愛知医科大学）、飯島沙幸（名古屋市立大学）、田尻和人（富山大病院）、伊藤浩美（福島県立医科大学）、成松久、安形清彦、梶裕之、久野敦、千葉靖典、梅谷内晶、佐藤隆、館野浩章、後藤雅式、我妻孝則（以上、産総研）
（産総研・雄長誠は、都合により欠席）

会議内容

1．研究代表者（成松）挨拶

本研究班は B 型肝炎に対する創薬を目指す本研究事業において糖鎖を中心に研究している。中間発表会、成果概要の提出の準備や本研究事業を基礎研究から創薬かへとさらに推進して行く必要がある。溝上先生（国際医療セ）から、最近の肝炎を含めた厚生研究事業の状況をご紹介頂いた。

2．各課題の進捗状況説明

課題 1（梶、久野）

これまでの MS によるグライコプロテオミクス解析から明らかになった、HBs 抗原上の糖鎖の付加部位に加え、ワクチン作成に有用な HBs 抗原の構造に関する知見を得た。L-HBs 抗原の N 末（PreS1）や M-HBs 抗原の N 末（PreS2）はプロテアーゼ感受性だが、S-HBs では非感受性の領域が多く粒子内に含まれている部位やジスフィルド結合が示唆された。

レクチンアレイによる HBs 抗原の解析では、非破壊で測定することによってより微量なサンプル量で結果を得る事に成功した。糖鎖の無い HBs 抗原を認識する田尻先生（富山大）提供の抗体と HBs 抗原の糖鎖を認識するレクチンの組み合わせが有効であった。今後は国立国際医療研究センターにおいて、患者のサンプルの解析を進めて行く。

課題 2（梅谷内、伊藤浩）

感染可能細胞と不可能細胞を糖タンパク質解析（グライコプロテオミクス）、糖鎖解析（MS）、糖鎖遺伝子解析（qRT-PCR アレイ、次世代シーケンサー）を行っている。肝臓由来の培養細胞 2 種（Huh7、HepG2）とヒト肝細胞の解析結果から、糖鎖遺伝子と内在性レクチンの発現解析が進み、課題 3 や課題 4 で利用される。感染能と糖鎖発現パターン変化を解析するためにヒト肝キメラマウス由来の肝細胞の長期培養を行っている（名古屋市立大学）。

肝細胞の膜糖タンパク質の糖鎖構造を比較した結果、N-glycan にはあまり差が無く、O-glycan に差が見られた。一方、HBs 抗原の N-glycan や O-glycan は単純な構造が主であった（福島県立医科大学）。

課題3（館野）

HBV の肝細胞特異的な感染のメカニズムは不明な点が多く、糖鎖や糖鎖関連分子の関与は解析が進んでいない。7種の肝がん細胞のプロテオミクス解析より肝臓での発現が示唆された内在性レクチンを用いHBsとの相互作用を調べた結果、幾つかの分子で結合性が確認された。現在グリコシダーゼやレクチンを用いHBV感染実験を行い（名古屋市立大学）、糖鎖の影響を解析している。

課題2による次世代シーケンサーの結果から肝臓（感染可）で発現し肝がん細胞（感染不可）で発現の低いレクチン様分子の絞り込みを行った。発現パターンが肝臓特異的であるものが複数見つかり、現在クローニング中で、脇田班から供与されたNTCP発現細胞を用いHBV感染への影響を解析する。

課題4（安形）

課題2の結果を基に糖鎖改変細胞を作製し、ウイルス粒子形成・分泌や感染への糖鎖の影響を調べている。まずHBs抗原を糖鎖合成の阻害剤存在下や異なるがん細胞で発現させ、糖鎖が付いたHBs抗原の発現に差が出る事を確認した。次に、これまでに作製した糖鎖遺伝子cDNAライブラリとsiRNAライブラリを用いスクリーニングを行っている。タグ付きHBs抗原では、86siRNAターゲットのうち15糖鎖遺伝子でHBs抗原の糖鎖が減少する事が確認された。HBV作成実験でも40siRNAを調べた結果、HBVDNAの減少する糖鎖遺伝子が確認された（愛知医科大学）。今後セカンドスクリーニングを行いさらに検証して行く。

課題5（千葉）

HBVに対する新規ワクチンを作製するために、酵母で発現させたL-HBs抗原の解析と精製を進めた。酵母特有の高マンノース型ではない糖鎖が付加されていると考えられ、糖鎖付加部位や糖鎖の解析を行う。免疫用の大量精製のためにカラムなどHPLCによる精製法を検討した。今後、PreS1やPreS2、糖鎖存在の抗体価の上昇への影響を調べ、田村先生（富山大）による抗体エピトープ解析を行い、ワクチンとしての有効性を検討する。

3．今後の予定

成果概要・工程表の提出、中間発表会の日程を確認し、1月上旬までに中間発表会に必要な結果を中心に進めて行く事とした。

研究成果を公開して行くために、論文を投稿して行く事も確認された。

4．POコメント

正木先生（国際医療セ）より本研究班の進捗状況について、グライコミクスによるHBV（HBs）解析、新規ワクチンの開発や候補ターゲット分子の進展についてコメントいただいた。基礎研究の結果から創薬化へと見える展開を期待するとのコメントも頂いた。

本研究事業の継続申請、中間発表会、守秘義務、報告会（公開）する事が報告された。

厚生科研（B型肝炎創薬実用化研究事業）
平成25年度 第四回班会議 議事録（報告書）

開催日時 平成26年2月24日（月） 14:30 ~ 18:30

場 所 東京コンベンションルーム AP品川「Kルーム」（京急第2ビル・9階）

出席者（敬称略）：溝上雅史、是永匡紹（以上、国立国際医療研究センター）、久永拓郎（厚生労働省）、伊藤清顕（愛知医科大学）、尾曲克己（名古屋市立大学）、田尻和人（富山大病院）、成松久、安形清彦、梶裕之、久野敦、千葉靖典、梶谷内晶、佐藤隆、舘野浩章、雄長誠、後藤雅式、我妻孝則（以上、産総研）

（正木尚彦（PO）、米田政志@愛知医大、飯島沙幸@名市大、伊藤浩美@福島県立医科大は、都合により欠席）

会議内容

1. 関係者あいさつ

厚生労働省久永専門官：

糖鎖を活かしたワクチンの有用性が示されれば良いと思われる。糖鎖は独創性があるので、利点を活かして創薬事業に結び付けて欲しい。

成松研究代表者：

NTCPのコリセプターには糖鎖が関与している可能性がある。

溝上先生：

日本版NIH構想の中で、HBVの研究費が28億円と非常に多いことが問題になっている。まだ糖鎖を知らない先生が多いので、理解してもらえるように成果を出すこと、説明をすることが必要である。

2. 研究進捗状況報告

(1) 課題2,4

梶谷内：

宿主細胞の糖鎖解析を実施した。遺伝子発現情報。

HBVが感染可能な細胞の糖鎖構造は何かを調べるために、宿主細胞の糖鎖解析を行った。また、肝細胞（Huh7、HepG2）のwhole transcriptome解析を実施した。これにより、糖鎖認識リセプター候補の選択を行う。

ヒト肝キメラマウス由来の幹細胞の糖鎖プロファイリングを実施する予定である。感染能が3週間で低くなることなので、低くなった細胞の糖鎖構造を解析する。

患者血清だと毎回titerが変わるので、ウイルスを用意しておいたほうが良い（溝上先生）。

安形：

糖鎖合成阻害剤を用いて、HBs抗原の糖鎖の影響を検討している。ツニカマイシン（毒性高いN-glycan合成阻害）やBre-A（ゴルジ経路に関連）等を用いているが、思ったほどN-glycan合成阻害につながらない。

伊藤清顕先生：

86種のsiRNA固定化プレートを産総研から送ってもらった。HepG2.2.15細胞でDNA合成阻害、ウイルス粒子合成阻害を検討した。UDP-Galトランスポーターや硫酸基転移酵素のsiRNA等で70%程度の阻害活性が見られた。

(2) 課題3

舘野：

HBsを認識するレクチンの選択するため、肝細胞で発現しているレクチンをリコンビナント生産し、固定化したマイクロアレイを作製した。大阪赤十字で精製したHBsそのまま、あるいはシアリダーゼ処理したHBsを反応させたところ、hCD22-Fc, FCN1, Gal3, Gal9が反応した。

FCN1 肝臓のクッパー細胞で発現しており、Gal9は肝実質細胞全体で発現している。

レクチンが本当に感染に関係があるのかを、飯島先生とともに検討する。また、下遠野班との共同で、NTCP発現系を用いて検討を進める。

HBsと他のガレクチンとの反応性が認められないが、それは説明できるのか？（成松）

(3) 課題1

久野：

国際医療研究センターで保管している患者由来の5ulの血清を用いた糖鎖プロファイリングを実施した（Genotype C、eAg陽性、eAb陽性）。O-glycanのシグナルの高さが患者によって異なった。HBs-M上のO-glycanの量が異なるのだろう（糖鎖の数の違い、糖鎖付加の割合の違い、構造の違いが関与している可能性がある）。

今後は、線維化レベルのバラエティーをそろえて、O-glycanプロファイリングをする。また、治療前後での比較も行う予定である。

梶：

各HBsの糖鎖付加位置と構造解析を行った。その結果、現時点で構造解析ができたのはHBs-MのPreS2領域の糖鎖のみであった。Mono, di-sialyl化した2本鎖が付加している。

(4) 課題5

千葉：

Sワクチンに非応答者が存在するため、糖鎖付加ワクチンを用いることにより効率を上げることが目的である。最終的には、ヒト型糖鎖を持つワクチンが好ましいが、現状では、酵母型の糖鎖をもつHBsを生産し、精製条件を検討した。酵母で発現したHBsのワクチン効果を検討する予定である。

3.まとめ

溝上先生：

現在、1200例の生体肝移植が行われている。HBグロブリン(HBIG)を使用するが、384億円を輸入に頼っている。これを国産ワクチンに置き換えれば、輸入超過は軽減できる。

久永先生：

中間報告の審査員のコメントを参考にして事業を継続して頂きたい。

B型肝炎ウイルス(HBV)の糖鎖解析と臨床的応用

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

研究要旨：B型肝炎ウイルス(HBV)における慢性肝炎では、インターフェロン治療成績が悪く、持続感染を防ぐための核酸アナログ製剤の継続投与においても薬剤耐性ウイルスの出現が問題になっている。糖鎖はHBVの接着・侵入や粒子形成・分泌に関わっている可能性が示唆され、その感染過程における糖鎖解析は、抗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。HBVの糖鎖の機能を明らかにし、HBV創薬シーズを作成することが本研究の目的であり、HBs精製の為の純度の高い抗体作成や感染実験が必要なため、その基盤作りとともに、sample収集や抗体入手などを積極的に行った。

研究協力者

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

A. 研究目的

現在日本では、約150万人の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。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く、持続感染を防ぐための核酸アナログ製剤の継続投与においても薬剤耐性ウイルスの出現が問題になっている。従って、逆転写酵素に代わる創薬ターゲットが必須であり、有効な薬剤の開発にはHBVの感染/複製機構をより詳細に理解する必要がある。糖鎖はHBVの接着・侵入や粒子形成・分泌に関わっている可能性が示唆され、HBVの感染過程における糖鎖解析は、抗HBVワクチンや抗HBV薬を効率的に開発する上で重要な課題である。

本研究の目的は、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。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。また、新規「ヒト型HBs抗原」を大量精製し、新規ワクチンの開発を目指すことを目標とする。先進国では、HBVのuniversal vaccinationが進んでいるなかで、我が国ではcostや副作用・わが国独特ともいえる国民

感情（保育所感染によるパニック、感染児の疎外、非科学的なワクチン忌避）が懸念され施行されていない現実があり、**大量生産可能な安全なワクチンの開発**は必要である。また、母子感染やHBV関連肝移植に用いられる抗HBs人免疫グロブリン(HBIG)の有効性は高いものの、costは10倍以上ワクチンより高いうえ、血液から作られる為、未知のウイルスやプリオンなどの感染は100%否定できない。

2008年まで多くの施設で使用されていたのが、ヒト肝細胞由来のhuGK-14細胞に発現させたHBs抗原粒子をアルミニウム塩に吸着させた「沈降B型肝炎ワクチン『明乳』」であり、HBs抗原のみならずpreS2抗原が含まれているとされていたが無菌性保証が担保されず自主回収となり、また開発中であったpreS2を含む

米国の製薬会社のパテントの関係で市販されるに至らず、本邦で使用可能であるワクチンは、pre-S2 は含まない 2 種類（ビームゲン、ヘプタボックス）の選択しかない。後者は本邦には少なく genotype A であり、本邦には適していない。前者は Genotype C から作製されており、ワクチンによる陽性率も若年者では 90%以上であるが、**遺伝子組換技術により酵母に産生させた HBs 抗原をアルミニウム塩に吸着させた沈降ワクチン**であり、糖鎖が酵母型に置換されており、完全な感染予防は難しく、更に **preS2/S1 を含むワクチンが作製**されれば、更なる感染抑止につながる可能性が高い。また、本邦でも少ないながらも、Carman WF らが報告(Lancet 1990)HBs 抗原の escape mutant は存在し、これらの変異部位(抗原認識部位)に糖鎖修飾が関与する可能性が本研究班の解析からも示唆されており、middle S・large S 蛋白まで考慮した安価で安全なワクチン作製は重要である。我々は、主任研究者と共同で、特に臨床検体の提供や、抗体作成、HBV 専門知識の共有や糖鎖研究により見いだされた成果を、マウスを用いた感染実験により確認を行う。

B. 研究方法

本年度は、昨年度の引き続き、糖鎖解析に実験計画のサポートや情報収集や臨床検体の回収を行った。

C. 研究結果

HBs 抗原作成を当センターで精製予定のため、その機器購入や設置を行った。

また、ヒト肝臓置換マウスによる感染実験やその培養細胞より、非感染細胞と感染細胞のマイクロダイゼクションを行う準備を行った。

昨年度、紹介した田尻班員から提供した抗体により、HBV の糖鎖解析が進み、更なる指示を行った。

D. 考察

様々な抗体を使用も、quality に問題があることが判明しており、その研究の第一人者であると田尻和人先生（富山大学）を来年度より分担者として推薦した。マウス実験の申請も近々に承認される予定である。

E. 結論

基礎研究班からの要求に応え、HBs 抗原に対する抗体を提供することで、HBV 糖鎖解析を進ませた。また、臨床検体の回収と本研究所での、研究準備体制が整い、来年度に向けて、実験を開始する。

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

- 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 [Epub ahead of print]. 2014
- 2) Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, **M Mizokami M**, Takehara T. Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+) dendritic cells are a potent producer of interferon-lambda in response to hepatitis C virus. Hepatology 57 (5): 1705-15. 2013

- 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. Application of a glycoproteomics-based biomarker development method: alteration in glycan structure on colony stimulating factor 1 receptor as a possible glyco-biomarker candidate for evaluation of liver cirrhosis *J Proteome Res* 13 (3): 1428-37. 2014
- 4) Akkarathamrongsin S, Hacharoen P, Tangkijvanich P, Theamboonlers A, Tanaka Y, Mizokami M, Poovorawan Y. Molecular epidemiology and genetic history of hepatitis C virus subtype 3a infection in Thailand *Intervirology* 56 (5): 284-94. 2013
- 5) Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsushashi H, Murakami S, Iijima S, Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, **Mizokami M**. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon-alpha in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut* 62 (9): 1340-6. 2013
- 6) Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Moriya K, **Mizokami M**, Miyakawa Y, Koike K. High levels of hepatitis B virus after the onset of disease lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B. *Clin Infect Dis* 57 (7): 935-42. 2013
- 7) 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**. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology* 59 (1): 89-97. 2014
- 8) Murata K, Sugiyama M, Kimura T, Yoshio S, Kanto T, Kirikae I, Saito H, Aoki Y, Hiramine S, Matsui T, Ito K, Korenaga M, Imamura M, Masaki N, **Mizokami M**. Ex vivo induction of IFN-lambda3 by a TLR7 agonist determines response to Peg-IFN/Ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol* 49 (1): 126-37. 2014
- 9) Khudayberganova D, Sugiyama M, Masaki N, Nishida N, Mukaide M, Sekler D, Latipov R, Nataliya K, Dildora S, Sharapov S, Usmanova G, Raxmanov M, Musabaev E, Mizokami M. IL28B Polymorphisms and Clinical Implications for Hepatitis C Virus Infection in Uzbekistan *PLoS One* 9 (3): e93011. 2014
- 10) 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 9 (2): e86449. 2014

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

HBV 糖鎖解析と HBs 抗原抗体価の臨床検体収集
是永匡紹 国立国際医療研究センター・肝炎・免疫研究センター

研究要旨：我が国の B 型慢性肝炎では、インターフェロン治療成績が悪く、核酸アナログ製剤の継続投与においては耐性ウイルス出現が問題になっており、肝発癌発生率はこの 20 年変化がなく、根本的な治療な見直しが必要である。糖鎖は B 型肝炎ウイルス(HBV)の感染・複製過程に関わっている可能性が報告されており、糖鎖解析を行う事は、抗 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と考えられる。本研究は、HBV の糖鎖の機能を明らかにし、HBV 創薬シーズやワクチン作成することを目的とし、HBV 糖鎖解析に利用可能な HBs 抗原抗体価の高い検体、genotype 別毎の検体収集を昨年に継続し行い、一部では解析を開始した。また、ワクチンの必要性を明らかにする目的で、ワクチン投与後の HBs 抗体陽性率や HBV 再活性化例での HBs 抗体推移の調査を行った。

研究協力者

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

A. 研究目的

従来型の母子感染に加え水平感染によっても広がりがつある。B 型肝炎(HBV)のインターフェロンによる治療成績は悪く、持続感染を防ぐための核酸アナログ製剤の継続投与は有効も、中止は難しく医療費かさみため、根本的なウイルス排除は「**感染させない**」ことである。糖鎖は HBV の接着・侵入や粒子形成・分泌に関わっている可能性が示唆され、HBV の感染過程における糖鎖解析は、抗 HBV ワクチンや抗 HBV 薬を効率的に開発する上で重要な課題である。

本研究の目的は、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。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。また、新規「ヒト型 HBs 抗原」を大量精製し、糖鎖修飾を考慮した**効率的で安価で副作用がない新規ワクチン**の開発を目指すことを目標とする。

B. 研究方法

糖鎖解析より得られて知見を HBV 感染者で確認するため、HBVDNA 量別・genotype 別・HBs 抗原価別に血清を回収した。また、ワクチンの更なる必要性を調査するため、抗体陽性率と HBV 再活性化例の HBs 抗体価を調査した。治験を臨床検体収集に伴う倫理委員会申請を行い、次年度からの研究に備えた。

C. 研究結果

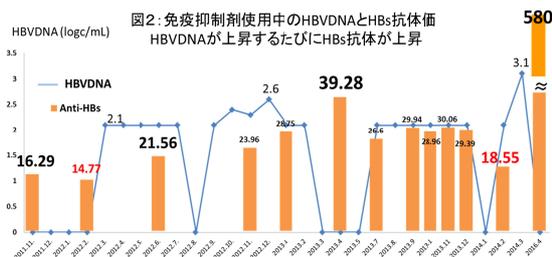
産業技術総合研究所で解析されるレクチンアレイによる HBV 粒子上糖鎖変化の解析の為、HBs 抗原価が高い、genotype C 症例を抽出し、eAg/eAb 陽性別に sample を選択し、これまで

に産業技術総合研究所で行われた、レクチンアレイを行う前処理を、当施設でも行う様にした。また、HBs vaccination の陽性率を解析したところ、現在使用されているビームゲン、ペプタボックスより pre-S2 が含まれているとされる明乳沈降ワクチンの陽性率が高い事が明らかになった。(図1)

現在、免疫抑制剤使用する HBV 既往感染者は、HBVDNA が陽性化すると核酸アナログ製剤を使用するが、免疫抑制剤を多剤使用し、HBVDNA が 2.1 ~ 3log の間を変動する症例の HBs 抗体価の推移を観察すると、HBVDNA の上昇に併せて上昇していた。(図2)

(図1) 各種ワクチン陽性率

		対象者(名)	陰性(名)	陽性率
平成21年	ビームゲン	103	7	93.20388
平成20年	ヘプタボックス	103	38	63.1068
平成19年	明乳	92	2	97.8261
平成18年	明乳	81	4	95.0617
平成8年	ビームゲン	102	9	91.17647
平成7年	ヘプタボックス	105	54	48.57143



D. 考察

HBV の糖鎖解析を行うための前処理を当センターで行うことで、解析の smooth 化が計られるとともに、抽出効率を上昇させる方法が確認されることとなり、感度上昇にも繋がった。

先進国では、HBV の universal vaccination が進んでいるなかで、我が国では施行されていない。2008 年まで多くの施設で使用されていた「沈降 B 型肝炎ワクチン『明乳』」は、HBs 抗原のみならず preS2 抗原が含まれているとされていた(効能書に記載無し)が自主回収となり、本邦で使用可能であるワクチンは、pre-S2 は含まない 2 種類 (ビームゲン、ヘプタボックス)

の選択しかないが、その陽性率は『明乳』より低下している。**Pre-S2 は糖鎖付着部位を含んでおり、これらが感染成立に重要な働きをしている**可能性は高く、この部位を含むワクチン作製は、陽性率の上昇のみならず、**感染予防を考えると、preS2/S1 を含むワクチン作製は重要**である。また、免疫抑制下で HBVDNA が再陽性化しても、そのまま陰性化する症例が存在することが知られていたが、HBs 抗体がその際上昇する可能性が示唆され、安易に費用が高い、核酸アナログよりもワクチンによる予防も展望され、更なる安価なワクチンが求められる。

E. 結論

臨床検体提供や実験準備は順調に進んでおり、一部は解析を開始した。糖鎖解析や現状より、preS2/S1 を含むワクチンの必要性が明らかになった。

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

- 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) 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 glycomarker candidate for evaluation of liver cirrhosis. J Proteome Res 13 (3): 1428-37. 2014

- 3) 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 9 (2): e86449. 2014
- 4) Murata K, Sugiyama M, Kimura T, Yoshio S, Kanto T, Kirikae I, Saito H, Aoki Y, Hiramine S, Matsui T, Ito K, **Korenaga M**, Imamura M, Masaki N, Mizokami M. Ex vivo induction of IFN-lambda3 by a TLR7 agonist determines response to Peg-IFN/Ribavirin therapy in chronic

hepatitis C patients. J Gastroenterol 49 (1): 126-37. 2014

- 5) Korenaga K, **Korenaga M**, Teramoto F, Suzuki T, Nishina S, Sasaki K, Nakashima Y, Tomiyama Y, Yoshioka N, Hara Y, Moriya T, Hino K. Clinical usefulness of non-protein respiratory quotient measurement in non-alcoholic fatty liver disease. Hepatol Res.43(12):1284-94.2013

2. 学会発表

- (1) **是永匡紹**、杉山真也、溝上雅史. シンポジウム 1B 型肝炎ウイルス再活性化の予防・治療の現状と課題「高感度 HBVDNA 測定系の開発と B 型肝炎ウイルス再活性化例への応用」JDDW2013(第 17 回日本肝臓学会大会/第 55 回日本消化器病大会) 2013.10.東京

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（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））
分担研究報告書（平成25年度）

HBV（HBs抗原）の糖鎖解析

梶 裕之	産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター
久野 敦	産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター
伊藤浩美	福島県立医科大学・医学部・生化学講座
田尻和人	富山大学附属病院・第三内科診療部門
是永匡紹	国立国際医療研究センター・肝炎免疫研究センター

研究要旨：HBV感染におけるHBV自身に存在する糖鎖の機能を理解するために、HBsタンパク質の糖鎖構造情報を、2つの異なるアプローチによって取得することを計画し、それぞれの分析条件を確立した。ひとつは、富山大学から提供いただいた抗HBsモノクローナル抗体を用いることで、血清からHBVウイルス粒子を効率よくエンリッチし、レクチンアレイ解析するまでのプロトコルを確立した。微量患者血清中HBV粒子の解析が可能となり、質量分析による解析結果と一致する糖鎖プロファイルを得た。質量分析では、B型肝炎患者プール血清より精製されたサブバイラルパーティクル(SVP)を構成するHBsタンパク質の解析から、Pre-S1、Pre-S2、およびS領域にそれぞれ1カ所のN型糖鎖付加部位が同定された。このうち、M型HBs(Pre-S2)、S型HBs(S)にはシアリル化2本鎖複合型糖鎖が結合していることを同定した。

A. 研究目的

HBVウイルス粒子エンベロープに局在する表面抗原分子HBsは糖タンパク質であり、この糖鎖付加部位の変異、糖鎖欠失によってパッケージ不全が生じるなど、HBV粒子の形成や感染、増殖に糖鎖が関連している報告があるが、その詳細は不明である。B型肝炎治療薬を開発するにあたり、HBVにおける糖鎖の機能を理解することは重要であり、HBsタンパク質の糖鎖構造から、最終的には未変性HBVウイルス粒子における糖鎖集合状態を含めた構造特性を明らかにし、創薬の基盤情報とすることを目的とする。

B. 研究方法

1. レクチンマイクロアレイによるHBV粒子の

糖鎖プロファイリング：患者血液中のHBVウイルス粒子上の糖鎖構造を迅速かつ簡易に解析するためには、(1)超遠心器などに頼らない簡便な前処理手法、(2)ナノグラムオーダーで糖鎖構造情報を入手可能な解析手法が必須となる。昨年度有用な抗体を入手することができなかったため、抗体の検討を継続した。本年度は富山大学医学部田尻和人博士が作成した複数の抗HBsモノクローナル抗体を対象に、ウェスタンブロット(WB)、免疫沈降(IP)、および抗体オーバーレイ・レクチンアレイ法(LA)に利用可能な抗体を精査した。一次評価実験においては、大阪赤十字病院より提供いただいたHBV患者プール血清から超遠心により分離分画したHBV粒子(加熱不活性化済み)および健常者血清に一定量の本HBV粒子を混入し

た溶液を用いた。二次評価実験では、HBsAgのカウントが10,000 IU/mLを超えるジェノタイプCのHBV感染患者血清を用いた。なお、本患者血清は国立国際医療研究センター肝炎情報研究センターより提供され、同施設にて前処理およびウイルスの不活性化が行われたのちに処々の分析に使用した。

2. HBs タンパク質の質量分析による糖鎖構造解析：はじめに、B型肝炎患者プール血清より精製したサブバイラルパーティクル(SVP)からPNGase、およびアルカリ性脱離反応によって、N型及びO型糖鎖を順次遊離し、質量分析で構造解析した。ついで、HBs タンパク質における糖鎖構造を明確に規定するため、HBs ペプチドと糖鎖が結合した状態で構造解析し、どの部位にどのような糖鎖が結合しているかをLC/MS(質量分析法)によって分析した。はじめにN型糖鎖付加部位を同定するため、SVPタンパク質(ヒト血清由来)を還元アルキル化の後、プロテアーゼ消化し、糖ペプチドを親水性クロマトグラフィーにより精製した。糖ペプチド画分を糖鎖切除処理(IGOT標識)後、LC/MS分析により、糖鎖付加部位を決定した。さらに糖ペプチドのままLC/MS分析し、糖鎖構造情報を収集した。S-HBsでは、S領域にN型糖鎖は一カ所結合しているため、ゲル電気泳動によってS-HBsを精製し、糖鎖分析を行った。また、Pre-S1/S2領域における糖鎖構造解析のためには、SVPを還元、変性することなく糖ペプチド部分をプロテアーゼにより遊離させ、構造解析を行った。

C. 研究結果

1. 提供いただいたモノクローナル抗体6種から、WB, IP, LAを用いた抗体の一次評価により最適な抗体を1つ選抜した。抗体を固定し、各工程の条件を最適化した。前処理工程では、プレクリアの導入などにより、以後のWBやLA

解析に耐えうるだけの純度のウイルス粒子をエンリッチする条件を見出した。LAでは、今回の抗体の変更により、検出感度が向上し、そのLOQは5 ngであり、LODは1.25ngであった。その糖鎖プロファイルは、既報や本プロジェクトにて得られた質量分析による構造解析結果と一致するものであった。以上によりプロトコルが確立したため、二次評価実験として、患者血清由来のHBV粒子の解析を行った。その結果、HBsAgカウントに依存してレクチンシグナルの強度が変動した。現時点ではHBsAgカウントが10000 IU/mLの血清では、IPからLA, WBまでに15 µLが必要であった。

2. ヒト血清由来SVPをトリプシン、Lys-Cエンドペプチダーゼ、V8プロテアーゼ、キモトリプシンなどで消化し、生じた糖ペプチドの配列をIGOT-LC/MS法で分析した。電気泳動像ではS型HBsが主要成分であったが、S型だけでなく、LおよびM型HBsのPre-S1およびPre-S2領域に由来する糖ペプチドが同定され、S型では1箇所、M型では最大2箇所、L型では最大3箇所のN結合型糖鎖付加が認められた。糖ペプチド画分のLC/MS分析で、M-HBsのPre-S2領域には末端Met残基のアセチル化と酸化、と糖鎖付加が共存していることが判明し、翻訳後膜透過が生じていることが明らかとなった。またこの領域には2本鎖構造のみが検出され、他の骨格構造の糖鎖は見出されなかった。同様に、S-HBsのS領域にも2本鎖構造のみが検出された。

D. 考察

1. 昨年度より懸案事項となっていた本課題に有用な抗体を入手できた。興味深いことに今回WBによる検証に用いた抗体はいずれも、2つのS型HBsのうちp25にのみ反応を示した。一方、レクチンはP25には反応せず、gp28に反応することが判った。つまり、ウイルス粒子

の構成タンパク質が複合体形成してはじめてレクチンアレイ解析ができる、言い換えれば粒子からタンパク質分子を解離したのちにはアレイ解析ができないことになる。また複合体形成状態での解析は、クラスター効果により WB および LA におけるシグナル検出の感度を 100 倍近く高めることが判明した。

2. ヒト血清由来 HBs タンパク質には長さ(タイプ)に従い、1 ないし 3 箇所の糖鎖付加部位が同定された。S 型における電気泳動パターンより S 型 HBs に存在する糖鎖付加部位 1 箇所に於ける糖鎖占有率はおよそ半分であった。L 型 Pre-S1 領域に糖鎖付加が観察されたことから、Pre-S1 領域がウイルス粒子の外側に向けた配向の L-HBs の存在が示唆された。糖鎖構造解析からは 2 カ所から 2 本鎖のみが検出された。SVP から遊離された糖鎖全体の構造パラエティから、他の部位に 2 本鎖以外の糖鎖がついている確率は低いと予想される。

E. 結論

1. レクチンアレイによる糖鎖解析に使用する抗体を入手し、患者血清を対象とした解析プロトコルを確立できた。次年度はより多くの患者血液中の HBV 粒子の比較糖鎖解析を行い、HBV 粒子上の糖鎖に臨床パラメータと関連のある構造変化が生じるかを検証する。
2. HBs 糖鎖付加部位の同定と一部、糖鎖構造を解析し、同定した。今後、ワクチンの抗原とする HBs には 2 本鎖糖鎖(ただしシアリル化された構造)を付加させたものを用意し、現在使われている糖鎖無しの抗原と抗原性や産生される抗体の性状などを比較することが重要と考える。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) **Kuno A**, Sato T, Shimazaki H, Unno S, Saitou K, Kiyohara K, Sogabe M, Tsuruno C, Takahama Y, Ikehara Y, Narimatsu H. Reconstruction of a robust glycodiagnostic agent supported by multiple lectin-assisted glycan profiling. *Proteomics Clin Appl.* 7, 642-647 (2013).
- (2) **Kaji H**, Ocho M, Togayachi A, **Kuno A**, Sogabe M, Okura 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.* 12, 2630-2640 (2013).
- (3) Tan B, Matsuda A, Zhang Y, **Kuno A**, Narimatsu H. Multilectin-assisted fractionation for improved single-dot tissue glycome profiling toward clinical glycoproteomics. *Mol. Biosys.* 10-2, 201-205 (2014).
- (4) Ocho M, Togayachi A, Iio E, **Kaji H**, **Kuno A**, Sogabe 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 is a glyco-biomarker candidate for evaluation of liver cirrhosis. *J Proteome Res.* 13-3, 1428-1437 (2014).
- (5) 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-positive Mac-2 binding protein (WFA⁺-M2BP), for assessing liver fibrosis. J Gastroenterol. Accepted (2014).

2. 学会発表

- (1) **久野 敦**ら. Lectin microarray assists development of the glycodiagnostic systems for direct measurement. The 22nd International Symposium on Glycoconjugates. 大連. 2013/06/25
- (2) **久野 敦**ら. Glycome mapping of mouse tissue samples by means of lectin microarray. 日本・オーストリア二国間セミナー. 理研鈴木梅太郎ホール (和光). 2013/07/02
- (3) **久野 敦**. Development of quantitative glyco-indices for hepatic diseases. 12th HUPO World Congress. 横浜. 2013/09/17
- (4) **久野 敦**ら. Application of the lectin microarray system to glycome mapping of mouse FFPE tissue sections. 12th HUPO World Congress. 横浜. 2013/09/17
- (5) 譚 斌斌ら. Improvement of lectin microarray-based tissue glycan profiling with lectin-assisted fractionation for glyco-biomarker discovery. 12th HUPO World Congress. 横浜. 2013/09/17
- (6) **久野 敦**ら. It's coming to the end: Development of glyco-diagnostic kit for evaluating liver fibrosis. 5th ACGG Thailand. Khon Kaen. 2013/10/16
- (7) Yamasaki K ら. WFA⁽⁺⁾-M2BP is a new and unique glycobiomarker to predict the development of HCC in patients with chronic HCV infection. 64th Meeting of AASLD. Washington. 2013/11/01
- (8) 雄長 誠、梅谷内 晶、**梶 裕之**、**久野 敦**、飯尾 悦子、曾我部 万紀、田中 靖人、池原 讓、溝上 雅史、成松 久. Development of glyco-biomarker for liver disease. 22nd International Symposium on Glycoconjugates. 大連. 2013/06/25
- (9) 雄長 誠、梅谷内 晶、**梶 裕之**、**久野 敦**、飯尾 悦子、曾我部 万紀、田中 靖人、池原 讓、溝上 雅史、成松 久. Application of glycoproteomics for development of serum biomarker of liver disease. HUPO 12th. 横浜. 2013/09/15
- (10) 藤田 弥佳、**梶 裕之**、**久野 敦**、鹿内 俊秀、鈴木 芳典、澤木 弘道、成松 久. Large-scale identification of mouse and human N-glycoproteins and data sharing through an experimental-based glycoprotein database, GlycoProtDB. HUPO World Congress. 横浜. 2013/09/17
- (11) 雄長 誠、梅谷内 晶、**梶 裕之**、**久野 敦**、飯尾 悦子、曾我部 万紀、田中 靖人、池原 讓、溝上 雅史、成松 久. Development of serum glycobiomarker of liver cirrhosis. 5th ACGG Conference. タイ王国. 2013/10/17
- (12) 雄長 誠、梅谷内 晶、**梶 裕之**、**久野 敦**、飯尾 悦子、曾我部 万紀、田中 靖人、池原 讓、溝上 雅史、成松 久. Application of the glycoproteomics-based strategy for development of serum biomarkers. 糖鎖プロテオミクスを基盤とした血清バイオマーカー開発戦略の応用. 日本生化学会. 横浜. 2013/09/13

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

[国内特許 登録]

- (1) 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定量用試薬. 成松 久ら.
特 5441280. 2013/12/27

[国外特許 出願]

- (1) 糖鎖アイソフォーム検出方法及び糖鎖アイ
ソフォーム検出装置. 成松 久ら.
PCT/JP2013/071653 (WIPO) . 2013/08/09
- (2) 糖タンパク質の測定方法、肝疾患の検査方法、
糖タンパク質定量用試薬および肝疾患病態指
標糖鎖マーカー糖タンパク質. 成松 久ら.
14/051729 (米国) . 2013/10/11

[国外特許 登録]

- (1) 糖鎖あるいは複合糖質の解析装置, **久野 敦**
ら, 8597576 (米国) . 2013/12/03
- (2) 糖タンパク質の測定方法、肝疾患の検査方法、
糖タンパク質定量用試薬および肝疾患病態指
標糖鎖マーカー糖タンパク質. 成松 久ら.
8623608 (米国) . 2014/01/07

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（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））
分担研究報告書（平成25年度）

HBV感染可能細胞の糖鎖解析

梅谷内 晶	産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター
梶 裕之	産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター
伊藤 浩美	福島県立医科大学・医学部・生化学講座
安形 清彦	産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター
飯島 沙幸	名古屋市立大学大学院・医学研究科・病態医科学

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。

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。

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。

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（糖鎖改変の 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。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 1 に示した。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に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 年度は 2 種類の細胞株（HepG2 と HuH-7）、平成 25 年度は肝細胞（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 2 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。平成 24 年度に行った 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 2 (HepG2 : 赤と HuH-7 : 青) に示した通り異なる結果となった。平成 25 年度に行った 2 種類の試料(図 2 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 2 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 2 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。

(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 3A)。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(図 3B)、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 3C)、(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。そこで現在、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ているところである。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ことから、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ている(感染・非感染での差も見られるか同様に解析する予定である)。

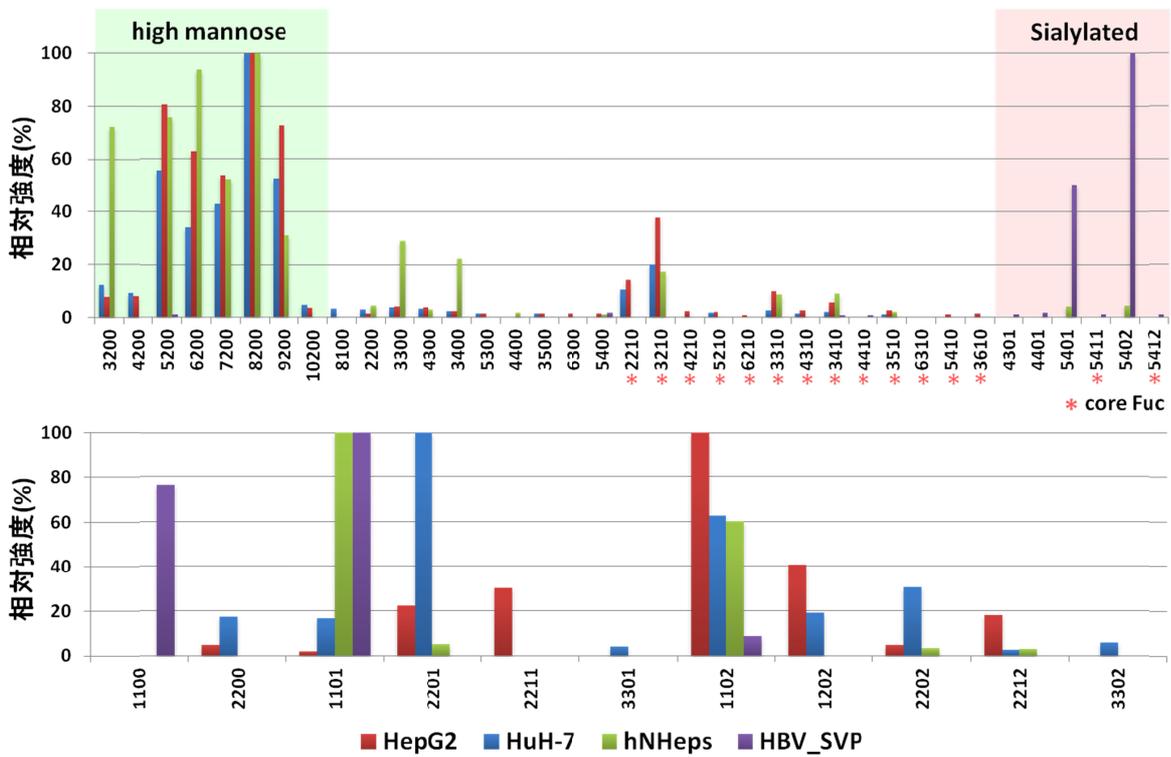


図 2

N-およびO-結合型糖鎖構造のMSシグナルの相対強度による比較解析（上段：N-結合型糖鎖構造、下段：O-結合型糖鎖構造）

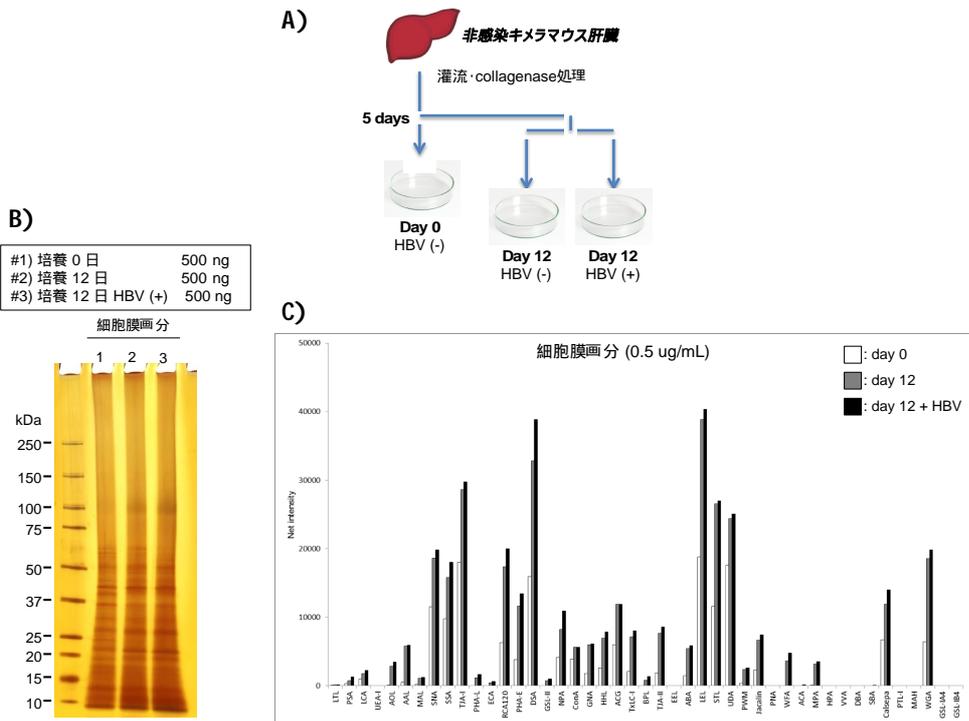


図 3

HBV(genotype C)感染前後の宿主側糖鎖解析。(A)ヒト肝臓化キメラマウスからの初代培養肝細胞ならびに、HBV非感染・感染細胞の調製、(B)解析に使用した肝細胞（宿主細胞）の膜タンパク質のSDS-PAGE（銀染色）結果、(C)レクチンアレイ解析による糖鎖プロファイル。

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。今後はさらに試料を拡充して、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同様の解析をすることで、HBV 感染と宿主細胞側の糖鎖発現との関連性がより詳細に検討できると考えられる。

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。

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。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、今後行う予定にしている、（感染有無での）ヒト肝臓化マウス組織・細胞を対象としたより詳細な解析と比較しながら検討を行うことで、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. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

HBV-宿主細胞における糖鎖の役割

館野浩章 産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター
佐藤 隆 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター

研究要旨：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 HBV 側の糖鎖に着目し、糖タンパク質である HBs-S の発現系の構築および、N 型糖鎖付加機能の解明を行った。また内在性レクチンの探索も継続して行い、正常ヒト肝細胞と培養肝がん細胞の遺伝子発現解析より正常ヒト肝細胞でのみ発現するレクチン候補分子を複数個見出し、組換え体を作製し HBs との結合を検討した。

A. 研究目的

HBsAg は翻訳開始メチオニンが異なる 3 種類のアイソフォーム HBs-L, HBs-M, HBs-S が知られており (Figure 1A)、HBV 粒子中ではそれぞれ異なる割合で混在する事が示唆されている。3 種類のアイソフォームの共通部分である HBs-S は、4 カ所の膜貫通領域が予想され、ループ領域に 1 カ所の N 型糖鎖付加部位を有している (Figure 2A 矢印)。B 型肝炎ウイルス感染患者血清より粗精製したウイルスでは、N 型糖鎖付加されたものとされないものが 1:1 の割合で生成されることが報告されている。我々は HBsAg の糖鎖構造解析を行う目的でリコンビナント HBsAg の発現を行い、リコンビナント HBs-S でも N 型糖鎖付加が同様の割合で起こる事を見出した。ループ領域の N 結合型糖鎖は、ウイルス粒子の分泌や DNA の取り込み等に関与していることが示唆されており、N 型糖鎖付加の起こり方を解析することは、HBV ウイルス粒子形成のメカニズムを理解し、創薬ターゲットを絞り込む上で重要であると考えられる。そこで、リコンビナント HBs-S を用いてウイルス

粒子形成と N 型糖鎖付加の関係を解析した。

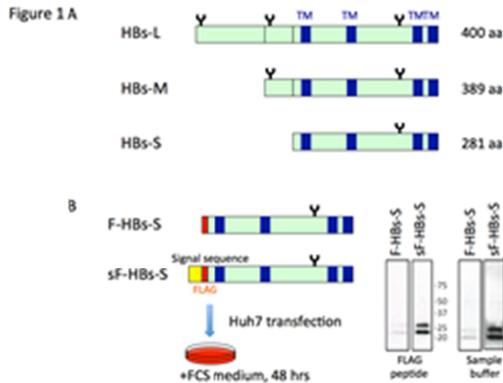
B. 研究方法

第 1 にリコンビナント HBs-S を糖鎖付加のインディケーターとして、培養細胞を用いた高効率な HBs-S 発現系を構築する。第 2 に N 型糖鎖付加に影響する因子として、分子内ジスルフィド結合、膜タンパク質の配向性などに焦点を当て、分子生物学的手法により改変した HBs-S を発現させ、N 型糖鎖付加への影響を調べる。

C. 研究結果

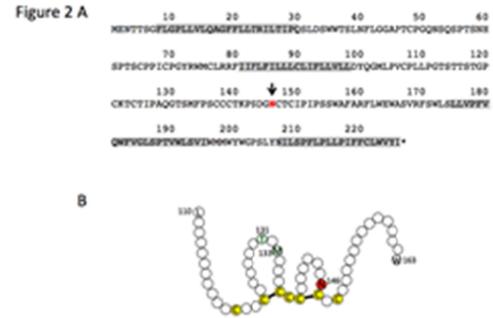
(1) **リコンビナント HBs-S の高効率発現**：最初に分子生物学的手法を用いて、リコンビナント HBsAg の高発現系の精製法の検討を行った。HBsAg を B 型肝炎ウイルス感染患者血清中や遺伝子工学的手法で発現させた培養上清中より高収率に精製可能な抗体を検索したが、市販の抗体では精製は不可能であったことから、HBs-S の N 末端と C 末端に精製用の FLAG Tag を導入したリコンビナント HBs-S の発現を行った。テンプレート HBs-S DNA は名古屋

市立大学より供与頂いた genotype-C を用い、PCR で FLAG 配列を付加したものを発現ベクター-pcDNA3.1(Invitogen)に組換えた。作製し

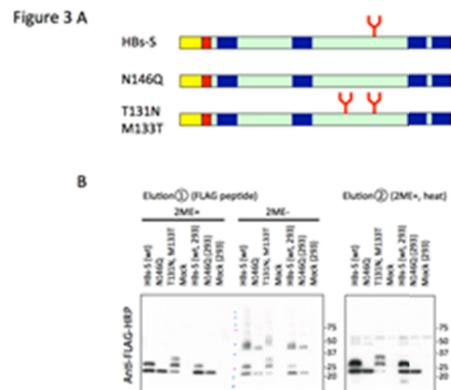


た発現ベクターを Huh7 細胞にトランスフェクションして、48 時間後に培養上清を回収し、抗 FLAG 抗体-agarose(Sigma-aldrich)を用いてリコンビナント HBs-S を吸着した。抗 FLAG 抗体からの溶出は 2 段階で行い、最初に FLAG ペプチドで競合溶出、その後、SDS-PAGE サンプルバッファを加え、100 加熱により溶出回収した。回収したリコンビナント HBs-S を SDS-PAGE で展開し、抗 FLAG 抗体でウエスタンブロットした結果、N 型糖鎖付きの gp28 と N 型糖鎖のない p25 の 2 本のバンドが検出された(Figure 1B, F-HBs-S)。しかしながら、バンド強度は検出限界ぎりぎりであった。糖鎖構造解析のためにはより多くの HBs-S を発現させる必要があるため、FLAG 付きの HBs-S コンストラクトの N 末端にシグナル配列を導入し、強制的に培養上清に分泌させる発現系を作製した。具体的には、HBs-S 全長をコードする遺伝子を分泌発現用ベクター pFLAG-CMV3(Sigma-aldrich)に組換え、同様に Huh7 を用いて発現、精製を行った。その結果、強制分泌の系では、分泌シグナルのない発現系に比較しておよそ 10 倍量の精製 HBs-S を回収できることがわかった(Figure 1B, sF-HBs-S)。また、強制分泌の系を用いた場合でも、N 型糖鎖付加の割合は 1:1 に維持さ

れることも確認された。これらの結果より、リコンビナント HBs-S の高発現系を構築できたと判断し、強制分泌の系を用いて以後の実験を行った。



(2) **N 型糖鎖付加部位変更のウイルス産生への影響**: N 型糖鎖のウイルス産生に対する影響を調べるために、ループ領域に存在する N 型糖鎖付加部位 (146N) にアスパラギンをグルタミンに置換する変異を導入した (N146Q) (Figure 2A, B)。また、伊藤らが genotype-A で報告している N 型糖鎖付加部位が 2 箇所に増える変異も導入するために、T131 を N、133M を T に改変した HBs-S 発現ベクター (T131N, M133T) を構築し、Huh7 と HEK293T 細胞にて発現させ、培養上清中より精製後ウエスタンブロットを行った。その結果、Huh7 と HEK293 細胞において、N146Q は予想通り N 型糖鎖付加のない p25 のバンドのみが検出され(Figure 3A, B)、改めて gp28 は p25 に N 型糖鎖が付加したものである事が明らか



となった。続いて、T131N, M133T 変異体では、gp28 よりも大きな分子量の位置に新たなバンドが検出され、これは 2 本の N 型糖鎖が付加した HBs-S であると予想される。一方、変異を導入しない HBs-S で確認された N 型糖鎖付加体と糖鎖なしの 1:1 の割合は変化し、糖鎖なしの割合が大きく減少した(Figure 3B)。これらの結果は、T131N, M133T 変異により新たに導入した N 型糖鎖付加配列により、本来の HBs-S で確認された N 型糖鎖付加体と糖鎖なしの両方に新たな N 型糖鎖を付加させることができた可能性が考えられた。また、HBs-S はループ領域に 7 つのシステイン(C)残基を有しており、分子内や分子間で複雑にジスルフィド結合を形成している可能性が考えられたため、-メルカプトエタノール(2ME)処理の有無でウエスタンブロットのシグナルを比較した。その結果、2ME 処理なしの場合は、糖鎖なし、1 本の N 型糖鎖を持つもの、2 本の N 型糖鎖を持つもの、それぞれにおいて 2 量体の位置にバンドが確認された。以上の結果より、HBs-S は分子間で 2 量体を形成している可能性が考えられた(Figure 3B)。

(3) ジスルフィド結合の糖鎖付加への影響：

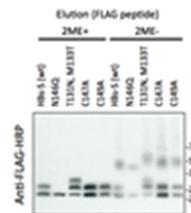
HBs-S のループ領域のシステイン残基は、124C-137C、139C-147C の 2 箇所分子内ジスルフィド結合を形成することが知られている(Figure 2B)。この中で 147C は N 型糖鎖付加部位 146N の直後に存在することから、小胞体におけるジスルフィド結合の形成とオリゴ糖転移酵素による N 型糖鎖前駆体付加が競合している可能性が考えられた。そこで C147 および C149 をアラニンへ変換した変異体を作製し、HBs-S の糖鎖付加への影響について検討した。もし、ジスルフィド結合と糖鎖付加が競合していれば、システイン残基を改変した C147A では、より効率的に糖鎖付加が起こる

事が期待される。上記と同様に PCR で変異を導入した遺伝子を作製し、Huh7 にトランスフェクションして培養上清に分泌される変異 HBs-S をウエスタンブロットにより解析した。その結果、C147A であっても N 型糖鎖付き HBs-S と糖鎖なしのものが 1:1 の割合で精製された(Figure 4)。この結果は、147C の分子内ジスルフィド結合は糖鎖付加には影響していないことを示唆するものである。同様に 147C のジスルフィド結合のパートナーである 139C や 147C に隣接する 149C に変異を導入したが、結果は 147C と同じ結果であった(Figure 4B, 5B)。

Figure 4 A



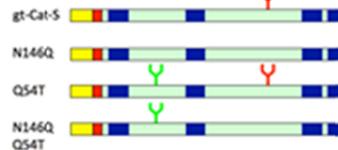
B



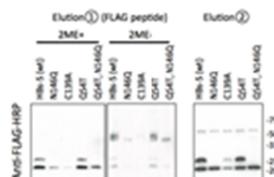
(4) 膜タンパク質配向性の糖鎖付加への影響：

小胞体の膜タンパク質であると考えられている HBs-S で、N 型糖鎖付加体と糖鎖なしの分子が 1:1 の割合で生じる理由として、膜タンパク質の配向性との関係を検討した。HBs-S の翻訳過程で配向性の異なる 2 種類の分子がラ

Figure 5 A



B



ンダムに生成していると仮定すると、一方は *N* 型糖鎖付加部位 146N が小胞体内腔側に存在するため糖鎖修飾が起こり、もう一方では 146N が細胞質側にあるため糖鎖修飾が起こらない可能性が考えられる。そこで、146N が細胞質側にある場合に、小胞体内腔に存在するループに *N* 結合型糖鎖付加のコンセンサス配列を導入し、新たに導入した部位に糖鎖が結合するかどうかを調べた。具体的には、54Q を 54T になる変異を導入し、新たな *N* 結合型糖鎖付加部位 NST を導入した。同様に Huh7 に発現させた結果、54T を導入し、本来の *N* 型糖鎖付加部位を欠失した Q54T, N146Q では、糖鎖付加なしの p25 のバンドのみ検出され、新たに導入した *N* 結合型糖鎖付加部位には糖鎖修飾されなかった(Figure 5B)。このことは、HBs-S 産生において、配向性の異なる分子が生成される可能性を否定する結果である。

D. 考察

HBs-Ag はウイルス粒子表面の膜タンパク質であり、その由来は細胞質でアッセンブルされたコア構造が小胞体に取り込まれる際に小胞体膜を表面にまとったものであると考えられている。今回、我々は HBs-S の培養細胞での効率的な発現系構築と、tag を活用した培養上清からの精製法の確立に成功した。培養上清中の HBs-S の分子動態は明らかになっていないが、HBs-S が 4 回膜貫通領域を持った膜タンパク質であること、限外ろ過で 250 KDa 以上の高分子量画分に存在することなどから、膜に会合し粒子を形成しており、tag 精製は粒子の状態で行われている可能性が考えられる。また、分子は単量体もしくは 2 量体で存在し、*N* 型糖鎖が付加したものと糖鎖がないものが 1:1 の割合で含まれていることも特徴として挙げられる。HBs-S の翻訳と協調した膜への会合、ジスルフィド結合による 2 量体の形成および *N* 型糖鎖付加は小胞体で

起こる事が予想されるが、今回の解析からジスルフィド結合による糖鎖付加への影響は確認されなかった。ウイルス粒子表面で HBs-S 分子がどのような状態で存在しているのかは未だ未解明である。特に *N* 型糖鎖が付加したものと糖鎖がないものが 1:1 の割合で生じることにに関して、*N* 型糖鎖が付加したものと糖鎖がないものが会合して 2 量体を形成しているのか、糖鎖付きのもの同士の 2 量体と糖鎖がないものの 2 量体が等量発現しているのかは大変興味深いところである。今後はこれらのウイルス粒子の生成過程における糖鎖付加のメカニズムを詳細に解析し、ウイルス形成を阻害する薬剤の開発に繋げたい。

E. 結論

リコンビナント HBs-S の高収率の発現系を確立した。HBs-S の *N* 型糖鎖付加について、分子内ジスルフィド結合、膜タンパク質の配向性について検討し、どちらも影響のない事がわかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- (1) **Sato T, Tateno H**, Angata K, Kaji H, Narimatsu H. Endogenous Lectins as Co-receptors for HBV Infection
TASL-Japan Hepatitis B Workshop.
Taipei. 2014/04/19-20

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

糖鎖変異のHBVの増殖・感染能への影響

米田政志 愛知医科大学・消化器内科

伊藤清顕 愛知医科大学・消化器内科

研究要旨：本研究は、B型肝炎ウイルス(HBV)の感染過程における糖鎖の役割を解明し、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。B型肝炎の治療にはインターフェロンや核酸アナログ製剤が用いられているが治療効果が不十分で根治することが出来ない。一方、創薬のターゲットとしてHBVの感染や複製の過程が研究され、糖鎖の関与が示唆されている。しかし、糖鎖の機能解析をより生体内に近い条件で研究する事は難しく、新しい糖鎖解析技術を用いて網羅的に解析する事が必須である。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最先端の糖鎖機能解析技術を開発・実用化してきた糖鎖生物学者との協力体制により、HBV感染における糖鎖の機能を理解し、HBVに対する創薬実用化を図る。1) HBV (HBs抗原)の糖鎖解析：多数の検体から種々のGenotypeのHBV (HBs抗原)を調製し、自ら開発したレクチンアレイ技術を応用し、糖鎖解析を行う。2) HBV感染可能細胞の糖鎖解析：産総研独自のグライコプロテオミクス技術を用い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。3) HBV-宿主細胞における糖鎖の役割：HBVの感染機構を明らかにするために、新たにHBs抗原アレイを作製し、肝細胞結合に関わる分子を探索する。4) 糖鎖変異のHBVの増殖・感染能への影響：HBVを産生する肝細胞の糖鎖合成系を阻害し、HBV粒子の形成・分泌能を比較する。また、分泌されたHBVの感染能を解析する事により、HBV上の糖鎖の機能を明らかにし、創薬開発のためのターゲットとする糖鎖を明らかにする。5) 糖鎖修飾を受けたHBs抗原の大量精製：ヒト型糖鎖を発現する酵母を用い、HBs抗原の大量精製を行う。現在ワクチン用に使用されている通常の酵母由来のHBs抗原と比較し、より有効なワクチンの開発に繋げる。1-3年次は、糖鎖構造解析とグライコプロテオミクス技術により、HBVの感染過程における糖鎖の機能を明らかにし、医用応用のための基盤研究を行う。4-5年次は解析した肝細胞側の糖鎖および糖鎖合成系の役割をもとに、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やワクチンの実用化へ繋げる。

A. 研究目的

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。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。次のステップとしては糖鎖合成系に関連する糖鎖遺伝子を阻害する各種 siRNA を用いて、細胞内の糖鎖合成系の各機能を阻害することにより、HBV の複製から分泌にかけて重要なファクターを模索し、新たな阻害剤開発に向けた情報を得た。

B. 研究方法

これまでの in vitro 実験では、transfection 試薬を用いた transient の系で各種糖プロセッシング阻害剤の HBV 複製および分泌に対する影響を解析してきた。しかし、これまでのデータをもとに解析を行うと、試薬を用いた transfection 効率に各 well 間で差があり、次の siRNA を用いた実験系では測定誤差の原因となると考えられた。このため、siRNA を用いた糖鎖合成系を標的とした HBV 複製および分泌に関するスクリーニングでは、HBV DNA が細胞に組み込まれている HBV 持続産生系 HepG2.2.15 細胞を用いて実験を行った。産業技術総合研究所糖鎖医工学センターより提供された siRNA 固相化済み 12 well plate を用いて、それぞれの糖鎖遺伝子に対する siRNA の HBV に対する影響を観察した。本プレートは各 well

にそれぞれの標的とする糖鎖遺伝子に対して、3 種類の siRNA の mixture が固相化されている。各 well 間で等量の HepG2.2.15 細胞を専用の培養液を用いて培養し、翌日に培養液を洗浄、新しい培養液と交換した。その後 4 日目に培養液および細胞を harvest した。Harvest した培養上清を用いた HBsAg は ELISA 法により、HBV DNA は real-time PCR 法により定量を行った。

C. 研究結果

86 種類の糖鎖遺伝子を標的とした siRNA による一次スクリーニングの結果、分泌される HBV に対して 60%以上の阻害が認められた siRNA を 5 種類、40%~60%の阻害が認められた siRNA を 11 種類認めた。これらの siRNA を二次スクリーニングの対象とした。また、逆に HBV の分泌が 200~300%と増加した siRNA を 2 種類、300%以上の増加が認められた siRNA を 2 種類認めた。これらの増加した siRNA に関しても、HBV を何らかの形で阻害していた物質を抑制した可能性があり、創薬シーズにつながる可能性が残るため、二次スクリーニングの対象とした。

D. 考察および結論

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。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。しかし、糖鎖遺伝子を標的とした siRNA が HBV 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。糖鎖合成系を標的とした HBV に対する抗ウイルス剤としての創薬シーズの発見が可能であり、今後の創薬研究に貢献できる可能性が示唆された。

E. 研究発表（本研究に関わるもの）

1. 論文発表

- 1) **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. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology* 59 (1): 89-97. 2014

2. 学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

糖鎖改変のHBVの増殖・感染能への影響 - II

安形清彦 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター
梅谷内晶 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター
佐藤 隆 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター

研究要旨：日本人の約1%に相当するB型肝炎患者の治療に、インターフェロンや核酸アナログ製剤が用いられているが、根治することが難しく新規創薬が望まれている。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、糖鎖遺伝子ライブラリーを保持し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肝疾患やHBV作製・感染実験の専門家との協力体制により、糖鎖改変のHBVの増殖・感染能への影響を解析し、HBVに対する創薬ターゲットを探求する。まず、qRT-PCRアレイや次世代シーケンサーを用いHBVを作製する肝癌細胞と肝細胞の糖鎖遺伝子発現を解析し（梅谷内らの課題を参照）糖鎖改変細胞を作製するためのcDNAプレートやsiRNAプレートを作製した。次にタグ付きのHBs抗原を構築し肝癌細胞で発現させ、細胞培養液中に分泌されるHBs抗原上の糖鎖の有無を解析する系を開発した。ウイルス粒子形成・分泌や感染への糖鎖の影響を調べるために、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の分泌に差が出る事を確認した。さらにsiRNAライブラリー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、86siRNA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た。HBVを産生する肝細胞の糖鎖合成系を改変することによって、HBV粒子の形成・分泌能を抑制する創薬ターゲットとなる可能性を見いだした。

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%の方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、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、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。日本ではHBVワクチンはユニバーサルワクチンではないために、今後も輸血・移植における感染事故や水平感染を防ぐ事は難しい。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。

これまでに HBV においては HBs 抗原上に糖鎖が付加されている事が知られているが、機能についてはあまり研究が進んでいない。伊藤らの報告によれば、糖鎖付加が感染性を有する HBV の粒子形成や分泌に重要である事が示唆されており、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) HBs 抗原 cDNA ライブラリー用発現ベクター：

HBV のエンベロープタンパク質である HBs 抗原 (S-HBs, M-HBs, L-HBs) cDNA (genotype C、名古屋市立大学より供与頂いた) を PCR で増幅しサブクローニングした。分泌シグナルとタグを導入し、HBs 抗原発現ベクターを構築した。塩基配列を決定し確認した後に、プラスミド DNA をエンドトキシムフリーで調製した。HuH7 細胞を調製したプラスミド DNA で形質転換後に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 抗原の発現を確認した。

(2) 糖鎖合成阻害剤の HBs 抗原粒子形成・分泌への影響：

N 型-および O 型-糖鎖の合成阻害剤約 10 種を購入した。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シな

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、上述の様に S-HBs 抗原の発現を検出した。

(3) 糖鎖遺伝子の発現解析：

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 whole transcriptome 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。

(4) ライブラリーの調整：

昨年同様に cDNA ライブラリー用発現ベクター (共通の Kozak 配列を開始コドン前に C'末に Flag タグ) をもちいて、糖鎖遺伝子 cDNA をクローニングした。cDNA ライブラリーは産総研で集積された糖鎖遺伝子ライブラリーを基に PCR で増幅した。各クローンは塩基配列を決定し選別した後に、プラスミド DNA をエンドトキシムフリーで調製した。タグを付加する事によって、形質転換後に共通のタグを用いて各糖鎖遺伝子の発現量を比較出来る様にした。

HuH7 細胞を調製したプラスミド DNA で形質転換後に回収し、SDS-PAGE とウエスタンブロッティングを行い糖転移酵素の発現を確認した。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 siRNA を合成した。遺伝子発現の定量は遺伝子特異的なプライマーを作製し、qRT-PCR によって測定した。

(5) スクリーニング：

1 つの遺伝子につき 3 種の siRNA を等量ずつ混ぜ、12-well プレートに固定した。形質転換前

に試薬と混ぜ、HuH7細胞をトリプシン処理し細胞を調製し、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。

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、まず**リコンビナント**HBs抗原の高発現系と精製法の検討を行った(館野・佐藤らの課題を参照)。genotype CのHBs抗原cDNAから作製したHBs抗原発現ベクター(S-HBs, M-HBs, L-HBs)をHuH7細胞にトランスフェクションして、48時間後にサンプルを回収した。培養上清を回収し、PBSで洗浄後に細胞を溶解し遠心後にライセートを得て、抗体ビーズを用いてリコンビナントHBs抗原を回収した。

細胞ライセートから回収したリコンビナントHBs抗原をSDS-PAGEで展開し、抗FLAG抗体でウエスタンブロットした結果、S-HBs, M-HBsそしてL-HBsそれぞれ糖鎖有無の2本のバンドが検出された(図1)。培養上清から回収したリコンビナントHBs抗原の場合、S-HBsとM-HBsのみが検出され、L-HBsが検出されないことからタグを付加したN'末側が切断されていると考えられる。興味深い事に、N型糖鎖有無の割合はほぼ1:1に維持されていた。

(2) 糖鎖合成に関わる遺伝子(糖転移酵素やグリコシダーゼ)は主に小胞体とゴルジ体に局在している(図2)。12-well, 24-well及び48-wellのプレートにHuH7細胞を播種し、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、48時間後に培養上清から抗体ビーズで回収した。S-HBs抗原の発

現は抗FLAG抗体を用いて検出した(図3)。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。

(3) HBV上の糖鎖はHBs抗原の糖鎖であり、宿主肝細胞の糖鎖合成系を用いて行われる。糖鎖修飾のHBV粒子形成や分泌への影響を効率良く解析するために、HBVやHBs抗原を発現させる細胞の糖鎖遺伝子の発現を解析した。

HBVを作製するHuH7細胞やHepG2細胞の糖鎖遺伝子の発現量を解析するために、qRT-PCR(糖鎖遺伝子qPCRアレイシステム)による糖鎖遺伝子発現解析の結果、約190種類の糖鎖遺伝子の発現プロファイルを得た。肝細胞の糖鎖遺伝子発現とも比較し、糖鎖遺伝子群を高発現と低発現(発現無しを含む)の2群に分けた。

同様にtotal RNAよりcDNAを合成後に次世代シーケンサーを用いwhole transcriptome解析を行った。基本的にqPCRアレイシステムと同様な結果が得られたが、whole transcriptome解析からは課題3にも繋がるような糖転移酵素以外の情報が得られた。

(詳しくは梅谷内らの課題を参照。)

(4) 上述の糖鎖遺伝子qRT-PCRアレイの結果を基に、糖鎖遺伝子をその発現レベルで2群(過剰発現目的と抑制目的)に分け、それぞれcDNAライブラリー(約100遺伝子)とsiRNAライブラリー(約80遺伝子x3本)の作製を進め、糖鎖改変細胞群を調製した。

昨年度の報告に引き続きcDNAライブラリー作製を行いほぼ終了した。糖転移酵素の発現量を確認するためには形質転換後に細胞を回収し、SDS-PAGEで分離後にウエスタンブロッティングを行い、クローニングされた糖鎖遺伝子がHuH7細胞で発現することを確認した。

siRNAライブラリーによる糖鎖遺伝子のノック

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% 前後の物も見られ、効果に差がある siRNA も認められた。

(4) 糖鎖修飾の HBV 粒子形成や分泌への影響を解析するための 1 つとして、投資電子の改変細胞を作製した。上述の様に siRNA は比較的用意にプレート上の殆どの細胞を形質転換可能である。まずリバース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 (図 4)。

86 糖鎖遺伝子に対するスクリーニングを行った所、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 抗原の発現が低下した物あるいは糖鎖の付加が減少したものが確認された (図 5)。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た (伊藤と米田の課題を参照)。

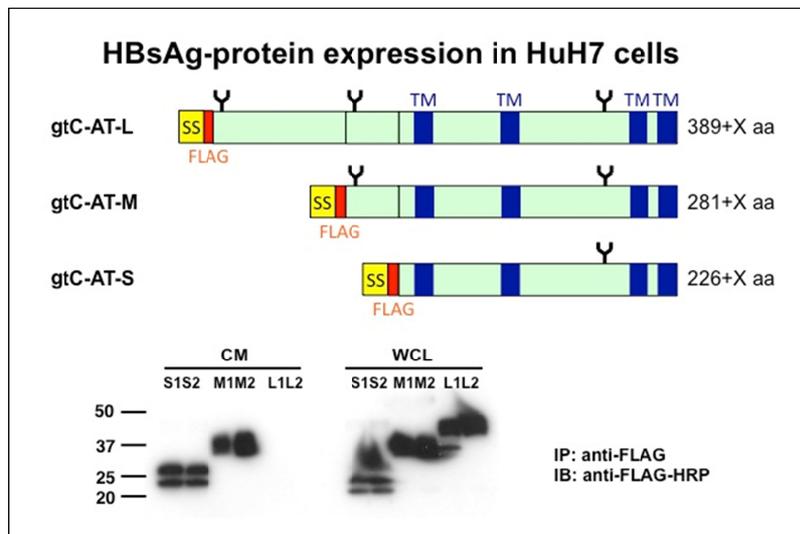


図1 HBs 抗原 cDNA 発現ベクター の構築 HBs 抗原(S-HBs, M-HBs, L-HBs)cDNA(genotype C)に、分泌シグナルと FLAG タグを導入し、HBs 抗原発現ベクターを構築した。4つの膜貫通領域(TM)が想定されており、N型糖鎖付加部位も3カ所示唆されている。(下段)HuH7細胞で発現させた結果、L-HBsは細胞ライセート(WCL)でのみ確認され、培養上清(CM)では検出されなかった。

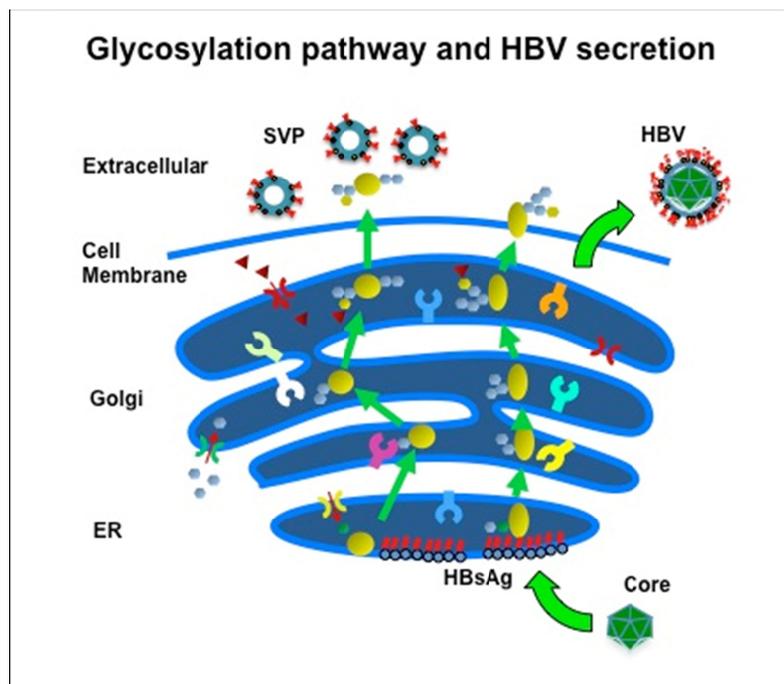


図2 糖鎖修飾経路とHBV分泌 糖鎖合成に関わる遺伝子は主に小胞体(ER)とゴルジ体(Golgi)に局在している。小胞体でHBs抗原にコアが内包された場合、感染性を有するHBVとなる。一方コアを含まないHBs抗原はウイルス様粒子(SVP)となる。ともにゴルジ体を通過する際に糖鎖修飾を受けると考えられている。HBVとSVPが同一の経路をたどるかは分かっていない。

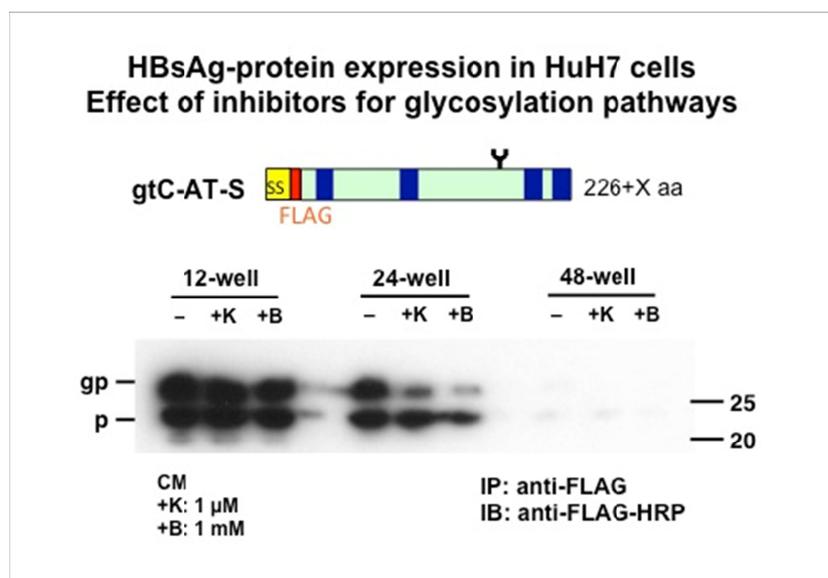


図3 糖鎖合成阻害剤のHBs抗原粒子形成・分泌への影響 S-HBsをHuH7細胞で発現させると糖鎖有り(gp)と糖鎖の付いていない(p)HBs抗原の2種の(糖)タンパク質が検出される。糖鎖合成阻害剤(K, B)を添加した場合、HBs抗原上の糖鎖修飾が抑制されHBs抗原の分泌量が減少した。

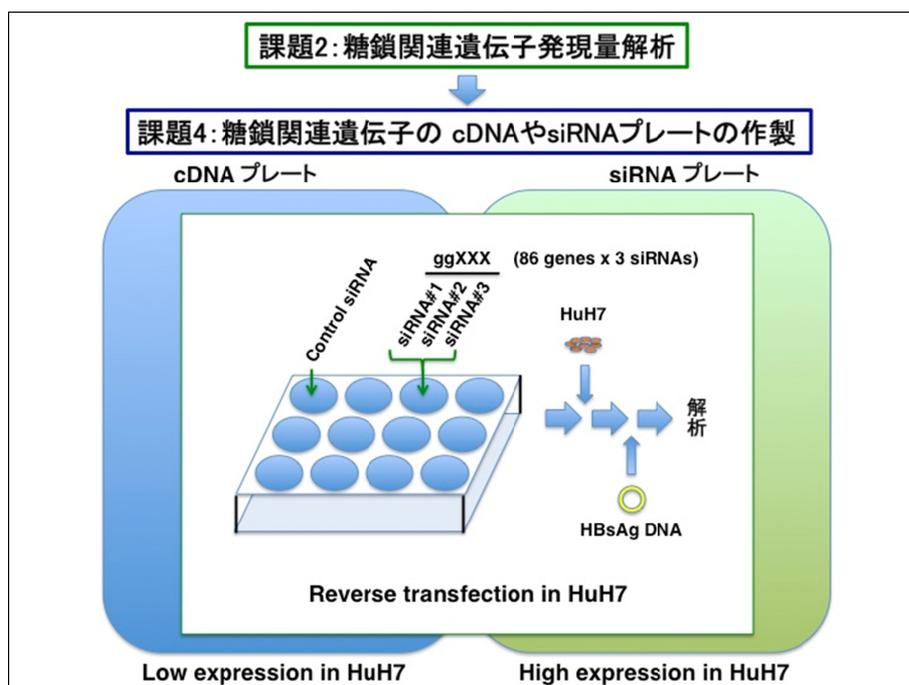


図4 糖鎖改変細胞によるHBs抗原形成・分泌への影響 課題2で糖鎖遺伝子の発現量を解析し、肝細胞における糖鎖遺伝子群を高発現と低発現(発現無しを含む)の2群に分けた。本課題では、高発現している糖鎖遺伝子に対しsiRNAプレートを作製し、低発現している遺伝子にはcDNAプレートを作製した。siRNAプレートでは3つのsiRNAをwellに固定し、HuH7細胞を形質転換、HBs抗原cDNAで形質転換、そして上清よりHBs抗原を回収して解析に用いた。

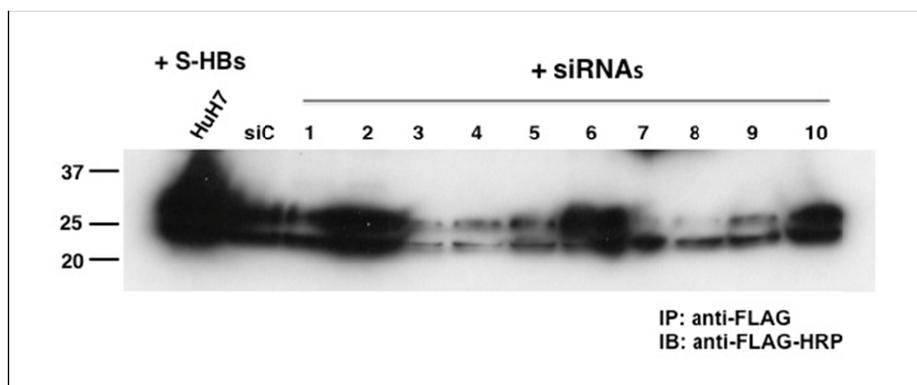


図5 siRNA プレートの実験例 HBs 抗原 cDNA で形質転換後に、HuH7 細胞の培養上清より回収した HBs 抗原は糖鎖有り無しの 2 種の (糖) タンパク質が検出される。同様にコントロール siRNA でも糖鎖有り無しの 2 種のバンドが 1 : 1 で検出される。siRNA の添加により HBs 抗原の発現に差が見られた。例えば、8 番の siRNA では、糖鎖を有する HBs 抗原の減少が顕著である。

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。これまでの研究から、1) HBV 感染に関わる肝細胞表面の糖鎖及び糖鎖関連分子 (受容体とコファクター) 2) 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、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ている。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 感染に関わるこれらの糖鎖や糖鎖関連分子に影響を及ぼす事が出来ると考えられる。

最近の研究により、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。例えば、ツニカマイシンやノジリマイシンなどの 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ことが報告されている (伊藤ら、2010)。我々の実験結果でも、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が示されており、糖鎖の重要性が確

認された。肝細胞の活動に影響を及ぼさない濃度の決定などが難しいが、感染細胞だけを選択的に処置するなどの技術開発とともに検討する必要がある。

今回調製した糖鎖遺伝子の cDNA ライブラリーや siRNA ライブラリーは 200 種以上有る糖鎖遺伝子の 90% 以上をカバーしており、現在、糖鎖改変細胞を用い、HBV の分泌や感染にどのような影響を及ぼすかをスクリーニングしている。既に 10 種以上の糖鎖遺伝子 siRNA が S-HBs 抗原の発現を抑制する事を確認しており、同時に愛知医科大学で検討している HepG2.2.15 細胞を用いた siRNA のスクリーニングと合わせて、どの糖鎖遺伝子が重要なのかを明らかにする必要がある (米田・伊東の分担報告書を参照)。

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、まず糖鎖合成阻害剤の効果を S-HBs 抗原の形成・分泌で確認した所、幾つ

かの阻害剤が有意に S-HBs 抗原の発現を抑制する事を見出した。そこで糖転移酵素の発現解析結果を基に、過剰発現用に約 100 種の cDNA、抑制用に約 80 x 3 種の siRNA ライブラリーを用意し、肝細胞あるいは肝がん細胞で糖鎖改変細胞作製を可能にした。cDNA の発現、siRNA によるノックダウンも調べた限りでは、期待通りの結果が得られた。次に siRNA ライブラリーをスクリーニングした所、10 種以上の糖鎖遺伝子 siRNA が S-HBs 抗原の発現を抑制する事を確認した。2 次スクリーニングでさらに有効な siRNA の特定を行い、創薬ターゲット候補の同定を進める予定である。

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行い、さらに B 型肝炎を治療する新規治療薬の開発へ展開していきたい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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. 2014/04/19-20. Taipei

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

糖鎖修飾を受けた HBs 抗原の大量精製

千葉靖典 産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門

A. 研究目的

B型肝炎はC型肝炎と比較して治療成績が低く、画期的な新規治療薬の開発が望まれている。国民のニーズの高いB型肝炎の画期的な新規治療薬の開発等を目指し、基盤技術の開発を含む創薬研究や、治療薬としての実用化に向けた臨床研究等を総合的に推進するためには、治療用も含め新たなワクチン開発が重要である。

我が国で使用されている主なHBVワクチン（HBs抗原）は酵母由来である。その製品としてはヘプタックス（Merck社、GenotypeAを認識）、ビーメゲン（化血研、GenotypeCを認識）があげられる。これらはHBs抗原のS領域を酵母で発現させており、糖鎖は付加されていない。近年、これらのワクチンを接種したにも関わらず、B型肝炎に罹患する例が増えてきている。その原因としてはHBVエスケープミュータントの発生の可能性もあるが、免疫源としたHBs抗原のS領域に対してできた抗体が、感染したB型肝炎ウイルスを十分に認識していない可能性が指摘されている。実際に免疫してできた抗体のエピトープ解析の結果では、糖鎖が付加されるS領域のループ構造に対して抗体ができていない。このことは、糖鎖を持ったB型肝炎ウイルスでは立体障害により抗体が結合できない可能性がある事を示唆している。従って、より天然に近いHBs抗原をワクチンとして利用する事により有効性が高くなる可能性がある。

研究分担者の千葉は、これまでに酵母によるタンパク質発現に関する研究を行ってきた。さらにヒトと同じ形の糖鎖を付加できる「ヒト型糖鎖含有タンパク質生産酵母」(天野、千葉、成

松ら PNAS 2008) を保有しており、これらの技術とツールを活用し、より効果の高いHBVワクチンの開発を検討する事を目的とする。

B. 研究方法

(1) HBs 抗原の発現

出芽酵母にHBs抗原の遺伝子を導入したクローンを前培養後、5Lの1xカザミノ酸-Ura培地（0.67%酵母ニトロゲンベース w/o アミノ酸、1%カザミノ酸、2%グルコース、40 μg/ml トリプトファン、40 μg/ml アデニン 1/2 硫酸塩）に植菌し、30、120時間培養を行なった。遠心により菌体を分離後、その上清の一部をSDS-PAGEに供し、PVDF膜に転写後、ウエスタンブロット解析により発現の確認を行なった。一次抗体としては市販の抗HBs抗体(抗PreS1モノクローナル抗体(マウス); 特殊免疫研究所、またはHepatitis B surface Antigen A, Goat Antibody; PROSPEC)を用い、二次抗体は抗マウスIgG抗体-ペルオキシダーゼ、または抗ヤギIg抗体-ペルオキシダーゼを使用した。検出はECL Western Blotting Detection Reagents (GE)を用いイメージアナライザー (GE LAS-1000)で行なった。

(2) HBs 抗原の精製

HBs抗原の精製については、従来報告のあるButyl-Sカラム、DEAEカラム、ゲルろ過カラム (GE)などを用いて検討した。また前処理の方法として、塩溶、尿素やグアニジン塩酸による変性と透析による精製、フィルター (Millipore) 処理などを検討した。

(3) 倫理面への配慮

本課題は産総研の組換え DNA 実験委員会の承認を得ている。本分担課題では、患者さんの遺伝子情報、細胞等には取り扱わない。また本年度実験動物は取り扱わないことから、倫理面の問題は無いと判断した。

C. 研究結果

昨年度までに、4種類のHBs抗原をコードする遺伝子を全合成し、酵母のプラスミドベクターに挿入し、野生型酵母の形質転換を行なった。現在上市されているB型肝炎ワクチンは、HBs抗原のS領域を酵母細胞内で発現している。これまでワクチンとしてL領域を発現させた例があまりないことから、pre-S1、pre-S2を含む全長を発現させた。さらに糖鎖構造がより天然に近いワクチンの方がエスケープミュータントの抑制に効果があると考えられたため、糖鎖付加が起こるようにシグナルを付加して、分泌経路を通過させて培地中に分泌させるようにした。その結果、Genotype A 1種類、Genotype C 1種類のHBs抗原を糖鎖が付加された形で発現させることに成功した。この培養上清に発現したHBs抗原は抗pre-S1抗体でも検出されたことから、L領域のN末端を含む形で発現していることが確認された。

今年度は、まず酵母の培養上清からのHBs抗原の精製を検討した。培地の条件検討を行ったところ、YPAD培地や2xカザミノ酸培地に比較し、比較的低栄養源である1xカザミノ酸培地が適していると考えられた。一方、過去に報告のあったスクロースと無機塩を含む合成培地では生産が確認されなかった。次に1xカザミノ酸培地でHBsAg発現酵母を培養し、培養上清を透析した後、硫酸塩析の条件検討を行った。10%飽和硫酸の条件でもHBsAgは沈殿してくることが判明したため、培養上清に10%飽和となるように硫酸を添加し、遠心により得られた沈殿

を10mMリン酸ナトリウムバッファー(pH 7.0)に溶解して-20℃で保存することとした。以後はこの溶液から適宜HBsAgを精製することとした。

次に培養時間の検討を行った。24時間毎、120時間まで培養を行ない、経時的にサンプリングして、ウエスタンブロット解析を行なった。その結果、120時間まで発現が増加し、またポリクローナル抗体を用いた分析でも分解も見られなかったことから、120時間培養を行なうこととした。また15000rpmで遠心を行なうとHBsAgは沈殿することから、微粒子またはタンパク質複合体として存在していることが示唆された。そこで、遠心機の回転数を変化させて沈殿する条件を検討したところ、3000rpmでも沈殿することがわかった。このHBsAgを含む沈殿物はsonicationでは可溶化しないことが示されたため、尿素やグアニジン塩酸を用いていったん変性させ、その後徐々に透析することでHBsAgを回収することを検討した。その結果、8M尿素、6Mグアニジン塩酸で処理することによりHBsAgは可溶化することがわかった。一方、0.5M NaClでは可溶化されなかった。このサンプルを透析後、0.45µmのフィルター処理を行なったが、HBsAgはフィルターを通過することが確認された。以上の結果から、培養上清を遠心後、8M尿素による変性、透析、フィルター処理という、HBsAgをカラム精製するための前処理法を確立した。またSDS-PAGE後の染色はCBBにより行なっていたが、より感度よく検出するため、Oriole Gel染色法を用いることとし、その染色条件を確定した。

前処理したサンプルをまず陰イオン交換カラムであるHitrap DEAEに供し、NaClによるグラジエントによりHBsAgを溶出した。ウエスタンブロットの結果から、HBsAgは0.2-0.45M NaCl溶出画分に溶出されていることが示唆された。しかしながら、Oriole染色では多

数のバンドが確認されたため、次に 1 M 尿素を添加したバッファーで精製を試みた。尿素を添加しないときと比較し、ピークがシャープになり、またクロマトパターンもシンプルになった。そこで DEAE 樹脂を初期精製用のカラムとして選択し、シグナルが確認されたフラクションを集めて、0.86 M の硫酸を添加し、Butyl-S カラムに供した。

疎水性カラムである HiTrap Butyl-S カラムによる精製のため、まず硫酸アンモニウム（硫酸）での塩溶限界を調べた。その結果、20%飽和硫酸では沈殿しないものの、30%飽和硫酸では沈殿することが確認された。次に 20%飽和硫酸（0.86 M）にしたサンプルをカラムにかけ、0%硫酸のバッファーでグラジエント溶出を行なったが、HBsAg の溶出は確認されなかった。そこで、1 M 尿素、0.86 M 硫酸を含むバッファーを用い、0%硫酸のバッファーでグラジエント溶出を行なったが、残念ながら HBsAg の溶出は確認されなかった。カラムを洗浄する目的で H₂O による溶出を行なったところ、ポリクローナル抗体（ANT-163）を用いたウエスタンブロットでのみ HBsAg のシグナルを確認することが出来た。条件検討をさらにに行い、初期バッファー：1 M 尿素、1 M 硫酸、0.2% Tween-20 を含む 10 mM リン酸ナトリウムバッファー（pH 7.0）溶出を H₂O とすることにより、Butyl-S カラムでの HBsAg 精製が可能となることを確認した。

次にゲルろ過を検討するため、分子量マーカー（フェリチン、チログロブリン、ブルーデキストラン）を HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR カラムに供し、それぞれの溶出位置を確認した。次に HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR カラムに Butyl-S の溶出画分を供した。クロマトパターンはブロードなシングルピークであったが、SDS-PAGE による純度確認を行なったところ、残念ながら全てのフラクションにシグナルが出

ており、また原因不明のタンパク質の混入が観察されたため、ゲルろ過での精製については再検討が必要である。

次にスケールを 5 倍とし、カラムサイズも 5 倍量で検討した。培養液から沈殿させた HBsAg 溶液 80 ml 分を用いて、前処理、DEAE カラム、Butyl-S カラムでの精製を連続して行なってみた。最終的に得られた画分はタンパク質濃度が低く、初期の処理量を増やすことが必要であることが示唆された。そこで、再度サンプルを調製し、同様の精製を行なったところ、最終的に Butyl-S 溶出画分にシグナルが観察されたものの、それ以外の夾雑タンパク質も以前残っており、この方法では精製が難しいと考えられた。

次に 5L のジャー培養を行ない、硫酸添加により粗 HBsAg を回収した。その際、大量調製に合わせて条件の改変を加えた。まず粗 HBsAg の溶解に必要なバッファー量を増加させることで、回収量の向上が可能となった。また培養ロット間によって、酵母の色が変化することがあり、特に赤色を示すと HBsAg の生産量が増加することが示唆された。酵母が赤色を呈する場合、培地中のアデニンが不足している場合が多い。以前にも貧栄養培地で HBsAg の生産が多く見られたが、一方無機塩では酵母が生育しなかったため、培地の条件検討も今後の課題であると考えられた。

これらを並行して複数ロットで進め、HBsAg の大量調製を試みた。得られた HBsAg について電気泳動を行ない、その純度を確認したが、まだまだ複数のタンパク質のバンドが見られたため、初期カラムを Butyl-S とし、次に DEAE カラムの順番で精製を行なうことにより精製度は高くなった。しかし 50kDa 付近のタンパク質が依然残っており、現在の方法では除くことは困難であると考えられた。次に非還元条件でのウエスタンブロット解析を行なったところ、HBsAg のシグナルが 250 kDa 以上の高分子側

に現れたことから、100 kDa cut off のフィルターを用いて濃縮することを検討した。膜へ吸着が見られたため、膜を濃縮液でよく洗い流して回収することで回収率を向上させられた。また依然 50kDa 付近のタンパク質が残っているものの、目的の HBsAg 以外の多くの 100 kDa 以下のタンパク質が除去できたため、フィルター処理が有効であることが示唆された。

D. 考察

今年度は HBs 抗原の精製について様々な条件検討を行った。当初考えていたよりも HBs 抗原の培養液中での挙動が不明な点が多く、精製も困難を極めた。

培養条件については、比較的低栄養源の 1x カザミノ酸-Ura 培地が適していると考えられた。また 120 時間培養まで HBs 抗原の発現の上昇が確認された。さらに長期間の培養についても今後の検討が必要であると考えられた。

培養液中では、HBs 抗原は微粒子またはタンパク質複合体として存在していることが示唆された。通常固液分離を行なう場合は、遠心法またはフィルターを用いる場合が多い。遠心法の場合、酵母菌体自体も 3000 rpm では沈殿するため、効率よい回収のためにはより回転を遅くして菌体との分離を行なうか、あるいは別の分離条件が望ましいと考えられた。またポアサイズ 1 μm のフィルターやグラスフィルター等の処理などを試みたが、酵母菌体と HBs 抗原をきれいに分離することが出来なかった。この点については今後更なる検討が必要である。

次に前処理の方法であるが、過去に報告された pre-S2 を含む HBs 抗原の精製方法として尿素による変性が報告されており、本研究でも尿素やグアニジン塩酸による変性と、その後の透析で HBs 抗原のフィルター処理を可能とした。これによりカラムによる精製が可能となった。

カラム処理では、当初安価な DEAE カラムを

初期精製に用い、次に Butyl-S カラム、ゲルろ過の精製行程を検討したが、前処理から脱塩操作なしで精製行程へ持ち込むことが出来る Butyl-S カラムを初期精製に用い、その後 DEAE カラムとフィルター処理を行なうことで HBs 抗原を精製することとした。ゲルろ過については大量精製には不向きであることに加え、今回の精製においては新たな不純物の混入もあったため、使用を中断した。最後にフィルター処理であるが、非還元条件で SDS-PAGE を行なったところほとんどゲルに入らず、泳動されなかったため、かなり高分子の複合体あるいは粒子状になっていると考えられた。従って 100 kDa cut off のフィルターはかなり効果的であった。しかし依然 50 kDa の分子量を有するタンパク質が混入しているため、前処理の段階でもう少し効率よく除く方法を検討することが必要である。またこのタンパク質を同定し、可能であれば遺伝子破壊を行なって混入を抑制することも検討したい。

E. 結論

2 種類の HBs 抗原を酵母で発現し、その培養上清から糖鎖付加された HBs 抗原の精製を試みた。培養条件、前処理法、カラムによる精製、フィルター処理等を行ない、HBs 抗原の精製方法を構築した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kuno A, Sato T, Shimazaki H, Unno S, Saitou K, Kiyohara K, Sogabe M, Tsuruno C, Takahama Y, Ikehara Y, Narimatsu H.	Reconstruction of a robust glycodiagnostic agent supported by multiple lectin-assisted glycan profiling.	Proteomics Clin Appl	7(9-1 0)	642-6 47	2013
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	12(6)	2630- 2640	2013
Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, M Mizokami M, Takehara T.	Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+) dendritic cells are a potent producer of interferon-lambda in response to hepatitis C virus.	Hepatology	57(5)	1705- 1715	2013
Korenaga K, Korenaga M, Teramoto F, Suzuki T, Nishina S, Sasaki K, Nakashima Y, Tomiyama Y, Yoshioka N, Hara Y, Moriya T, Hino K	Clinical usefulness of non-protein respiratory quotient measurement in non-alcoholic fatty liver disease.	Hepatol Res	43(12)	1284- 1294	2013
Murakami S, Takaoka Y, Ashida H, Yamamoto K, Narimatsu H, Chiba Y.	Identification and characterization of endo- β -N-acetylglucosaminidase from methylotrophic yeast <i>Ogataea minuta</i> .	Glycobiolog y	23(6)	736-7 44	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tomimoto K, Fujita Y, Iwaki T, Chiba Y , Jigami Y, Nakayama K, Nakajima Y, Abe H.	Protease-deficient <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains for the synthesis of human-compatible glycoproteins.	Biosci Biotechnol Biochem	77(12)	2461-2466	2013
Akkarathamrongsin S, Hacharoen P, Tangkijvanich P, Theamboonlers A, Tanaka Y, Mizokami M , Poovorawan Y.	Molecular epidemiology and genetic history of hepatitis C virus subtype 3a infection in Thailand.	Intervirology	56(5)	284-294	2013
Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsushashi H, Murakami S, Iijima S, Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, Mizokami M .	Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon-alpha in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene.	Gut	62(9)	1340-1346	2013
Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Moriya K, Mizokami M , Miyakawa Y, Koike K.	High levels of hepatitis B virus after the onset of disease lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B.	Clin Infect Dis	57(7)	935-942	2013
Tan B, Matsuda A, Zhang Y, Kuno A , Narimatsu H .	Multilectin-assisted fractionation for improved single-dot tissue glycome profiling in clinical glycoproteomics.	Mol Biosyst	10(2)	201-205	2014
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)	1428-1437	2014
Ito K , Yotsuyanagi H, Yatsushashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T,	Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute	Hepatology	59(1)	89-97	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 .	hepatitis B virus infection in Japanese adults.				
Murata K, Sugiyama M, Kimura T, Yoshio S, Kanto T, Kirikae I, Saito H, Aoki Y, Hiramine S, Matsui T, Ito K, Korenaga M , Imamura M, Masaki N, Mizokami M .	Ex vivo induction of IFN-lambda3 by a TLR7 agonist determines response to Peg-IFN/Ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients.	J Gastroenterol	49(1)	126-137	2014
Khudayberganova D, Sugiyama M, Masaki N, Nishida N, Mukaide M, Sekler D, Latipov R, Nataliya K, Dildora S, Sharapov S, Usmanova G, Raxmanov M, Musabaev E, Mizokami M .	IL28B Polymorphisms and Clinical Implications for Hepatitis C Virus Infection in Uzbekistan.	PLoS One	9(3)	e93011	2014
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,	New Susceptibility and Resistance HLA-DP Alleles to HBV-Related Diseases Identified by a Trans-Ethnic Association Study in Asia.	PLoS One	9(2)	e86449	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.					
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 Gastroente rol			2014 (In Press)