

厚生労働省科学研究費補助金

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)

**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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 成松 久

平成 27 (2015) 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	17
・ 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	31
梶谷内 晶、梶 裕之、伊藤 浩美、安形 清彦、尾曲 克己、飯島 沙幸	
課題 3. HBV-宿主細胞における糖鎖の役割	39
舘野 浩章、佐藤 隆、飯島 沙幸	
課題 4. 糖鎖改変の HBV の増殖・感染能への影響	43
・ 米田 政志、伊藤 清顕 ・ 安形 清彦、梶谷内 晶、佐藤 隆	
課題 5. 糖鎖修飾を受けた HBs 抗原の大量精製	53
千葉 靖典、佐藤 隆、梶谷内 晶、安形 清彦、成松 久	
・ 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	67

「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」

平成26年度 研究参画者

(平成27年3月31日 現在)

氏名	所属	職名
成松 久	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	招聘研究員
溝上 雅史	独立行政法人国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター	センター長
是永 匡紹	独立行政法人国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター 肝疾患研修室	室長
杉山 真也	独立行政法人国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター	主任研究員
辻 美保子	独立行政法人国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター	実験補助員
米田 政志	学校法人愛知医科大学 医学部 内科学講座（消化器内科）	教授
伊藤 清顕	学校法人愛知医科大学 医学部 内科学講座（消化器内科）	准教授
奥津 佐恵子	学校法人愛知医科大学 医学部 内科学講座（消化器内科）	研究補助員
鈴木 小百合	学校法人愛知医科大学 医学部 内科学講座（消化器内科）	研究補助員
田尻 和人	国立大学法人富山大学 医学薬学研究部 第三内科 助教	助教
尾曲 克己	公立大学法人名古屋市立大学大学院 医学研究科 病態医科学（ウイルス学）	助教
飯島 沙幸	公立大学法人名古屋市立大学大学院 医学研究科 病態医科学（ウイルス学）	助教
伊藤 浩美	公立大学法人福島県立医科大学 医学部 生化学講座	助教
梶 裕之	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 標的糖鎖探索チーム	チーム長
千葉 靖典	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 標的分子評価研究チーム	チーム長
久野 敦	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 標的糖鎖探索チーム	上級主任研究員

氏名	所属	職名
梅谷内 晶	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 標的糖鎖探索チーム	主任研究員
佐藤 隆	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 標的糖鎖探索チーム	主任研究員
舘野 浩章	独立行政法人産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター 糖鎖レクチン工学研究チーム	主任研究員
安形 清彦	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 創薬技術開発チーム	招聘研究員
助川 昌子	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 標的糖鎖探索チーム	技術員
我妻 孝則	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 標的糖鎖探索チーム	技術員
辻川 紫華子	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 創薬技術開発チーム	技術員
齊藤 佐代子	独立行政法人産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター 糖鎖レクチン工学研究チーム	技術員
平野 朋子	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 標的糖鎖探索チーム	技術員
高野 慶子	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 創薬技術開発チーム	技術員（派遣）
黒須 克恵	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 標的糖鎖探索チーム	技術員
高野 等覚	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 標的分子評価研究チーム	技術員

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 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 招聘研究員

研究要旨：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。

本研究において平成26年度に以下の成果を得た。

1) HBV(HBs抗原)の糖鎖解析と応用：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抗原サンプルから、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や糖鎖構造の同定およびミリスチ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。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)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、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感染可能細胞と非感染可能細胞との比較解析：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、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。

3) HBV-宿主細胞における糖鎖の役割：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上の糖鎖が感染効率に影響することが示唆された。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。また、NTCP発現HuH7細胞を複数株作製し、感染モデルを構築した。合成ペプチド(Myrr-PreS1(long)-FAM)との結合を確認した。

4) 糖鎖改変の HBV の増殖・感染能への影響：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、糖鎖合成の阻害剤が HBs 抗原の糖鎖付加や分泌を抑制する事を確認した。糖鎖遺伝子 siRNA スクリーニング系を構築し HBV 粒子の形成・分泌能を解析した結果、HBV 作成実験でも HBV DNA を減少させる幾つかのターゲット遺伝子を選出した。siRNA-X はラミブジンやエンテカビルと同レベルで HBV 分泌 (HBs 抗原、HBV DNA) を抑制した。

5) 糖鎖修飾を受けた HBs 抗原の大量精製：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。また、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、ワクチンとしての有用性が示唆された。

以上の研究により、今後さらに他研究グループと連携し、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 肝炎患研修室長
米田 政志 愛知医科大学 医学部 内科学
講座 (消化器内科) 教授
伊藤 清顕 同 准教授
尾曲 克己 名古屋市立大学大学院 医学
研究科 病態医科学 (ウイルス
学) 助教
田尻 和人 富山大学 医学薬学研究部 第
三内科 助教
伊藤 浩美 福島県立医科大学 医学部 生
化学講座 助教
梶 裕之 産業技術総合研究所 糖鎖創
薬技術研究センター 研究チー
ム長

舘野 浩章 同 幹細胞工学研究センター
主任研究員

千葉 靖典 同 糖鎖創薬技術研究センタ
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

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 主任
研究員

飯島 沙幸 名古屋市立大学大学院 医学
研究科 病態医科学 (ウイルス
学) 助教

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。現在 B 型肝炎の治療の選択は主に IFN と核酸アナログ薬である。しかし 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おり、逆転写酵素に代わる創薬ターゲットの発見が重要な課題となっている。そこで、本研究では HBV の感染/複製機構をより詳細に理解し、これまでとは異なる視点から創薬ターゲットを探索する必要があると考える。

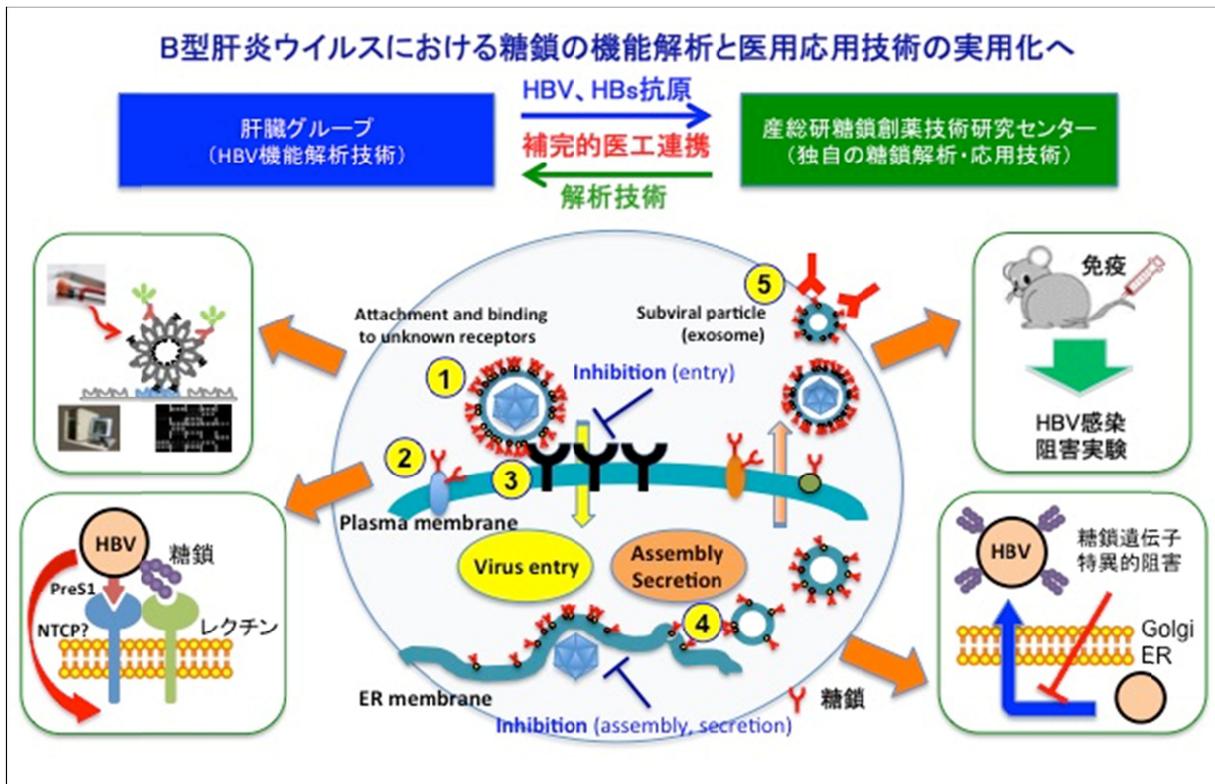
一方、最近のウイルスの感染機構の解明により、糖鎖や糖タンパク質が様々なウイルスの受容体となっている事が明らかになりつつあり、糖鎖関連分子が HBV の接着・侵入に関わっている可能性が考えられる。また伊藤らの研究により (Ito K et al. J Virol. 2010)、HBs 抗原上の糖鎖が感染性 HBV の粒子形成・分泌に重要である事が示唆されており、糖鎖修飾や糖鎖合成系が HBV 制御に向けた創薬のターゲットとなる可能性が考えられた。すなわち、HBV の感染過程における糖鎖研究は、抗 HBV 薬を効率的に開発する上で重要な課題である。

また、HBV 感染によって急性肝炎、あるいは慢性肝炎による肝硬変や肝がんの発症や自然治癒は患者により多種多様である。肝炎の進行や治療法の選択は効率的な治療と治療費削減において重要である。本研究では、肝線維化マーカーを発見した技術を基に患者血清中の HBV のスクリーニングや抗体に依る HBs 検出を逃れる変異 HBV を検出できる技術の開発を目指す。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。そして HBV 感染や治療に因る肝臓の変化を簡単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。

現在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。平成 27 年になり、HBV ワクチンの公費接種への施策変換が提言された。現行のワクチンは約 90% 近くの接種者に抗体獲得が見られる。しかし、近年の研究ではオカルトインフェクションや HBV ワクチン接種者に感染する HBV などが報告されつつあり、新世代の HBV ワクチンの開発が期待されている。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 感染防御に繋がる。さらに、現行のワクチンは 3 回接種が標準であり、公費接種の場合その費用が大きな問題となる。従って効率良い抗体獲得を誘導できるワクチン開発が期待され、ユニバーサルワクチネーション化の実施には必須である。

以上の様に本研究は、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)



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：

HBV のエンベロープタンパク質（L-, M-, S-HBs 抗原）における、糖鎖の有無や他の翻訳後修飾を解析するために、血清より得られた精製 HBs 抗原を用いて質量分析装置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、糖ペプチドを試料として、質量分析法で糖鎖構造解析を行った。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 抗原抗体の精製 HBs 抗原に対するウエスタンブロットの結果から、糖鎖を認識するレクチンと抗体の組み合わせによる新規 HBs 抗原の検出法を検討した。

次に、治療履歴や HBV DNA のコピー数、genotype の違いなど背景肝の異なる HBV 感染患者の血清の調製法を検討し、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 感染可能細胞の解析：

一次培養肝細胞は HBV 感染可能細胞であるが、継続培養すると次第に HBV が感染できなくなる。HBV 感染と糖鎖関連分子との関係を解析するために、ヒト肝臓キメラマウスから肝細胞を調製し、一週間ごとに回収し、糖タンパク質を SDS-PAGE と銀染色により解析し、また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。同時に一部の培養細胞に HBV を添加し感染効率を確認した。

さらに、培養開始後 1 週間と 3 週間のキメラマウス由来のヒト肝細胞や感染できない肝がん細胞から total RNA を調製し、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行った。NTCP を含め、糖鎖関連遺伝子の発現量解析を行った。また HBV 感染に関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、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。

(3) HBV-宿主細胞間相互作用機構の解明：

HBV 上の糖鎖が如何に HBV 感染に関与するかを明らかにするために、患者由来の調製 HBV を用いた感染実験を行った。感染量は HBs 抗原に対する ELISA と HBV DNA に対する qPCR によって定量した。上述の候補レクチンの cDNA をクローニングし、発現させたレクチンを用い HBV と同時にキメラマウス由来のヒト肝細胞に添加し、その影響を解析した。また精製したレクチンをアレイに固定化し、ラベル化した HBs 抗原と各レクチン様分子との結合を解析した。

さらに、患者由来の調製 HBV をグリコシダーゼ処理し、同様に HBV 感染実験を行った。グリコシダーゼの効果は血清由来の精製 HBs 抗原を用い、レクチンアレイにより判別した。

NTCP を発現する HepG2+NTCP-C4 細胞を感染症研究所（渡士先生）から取得し、HBs 抗原の結合実験を行った。蛍光ラベルした Myr-PreS1 を HepG2+NTCP 細胞に添加し FACS により結合率を測定した。細胞による違いを解析するために、HuH7 細胞にタグ化した NTCP cDNA を発現する安定株を作成し、Myr-PreS1 との結合実験を行った。

(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ウエスタンブロッティングにより解析した。

肝臓細胞の次世代シーケンサーの結果を基に糖鎖遺伝子発現解析を行い、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。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。愛知医科大学（大臣確認の申請済み）にて、HBV を産生する Hep2.2.15.7 細胞（感染症研究所より入手）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。

効果の確認された siRNA について、一つずつの siRNA を用いて 2 次スクリーニングを行った。候補 siRNA の細胞への影響は MTT アッセイ、レクチンブロッティング、トランスクリプトーム解析などを実施して解析した。

(5) 糖鎖修飾を受けた HBs 抗原の大量精製：現在 S-HBs 抗原がワクチンとして用いられており、糖鎖修飾はされていない。ワクチンとして適したペプチドあるいは HBs 抗原を決定するために、市販の L-HBs, HuH7 細胞に形質転換した M-HBs, PreS1, PreS2 を 8 週齢のマウスに摂取し、1 週間ごとに採血した。抗体価の上昇は ELISA 法により確認した。コントロールとして市販のワクチンを免疫した。N 型糖鎖付きのペプチドはトランスグリコシレーションにより付加した。

ヒト型糖鎖付き L-HBs 抗原を出芽酵母で発

現する目的で、L-HBs 抗原をコードする遺伝子を出芽酵母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。酵母の形質転換で得られたクローンを培養し、菌体内から超遠心や透析により L-HBs 抗原を分離精製した。L-HBs 抗原は SDS-PAGE により展開し Oriole 染色やウエスタンブロッティングで確認した。

(倫理面への配慮)

本研究課題を進めるにあたり、文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成25年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)」、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)」を遵守している。また、必要な実験承認を受けるために研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意(インフォームド・コンセント)また厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)を含めた各種手続き(産総研:遺伝子組換え実験、微生物実験、ヒト由来試料実験倫理審査;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、許可の承認を得ている。実験に関わる研究者及び技術者にワクチン接種と血液検査HBV取り扱いにおける諸注意を周知するなど実施体制を整えている。

C. 研究結果

(1)HBV(HBs抗原)の糖鎖解析とその応用:
これまでに質量分析装置を用いてHBs抗原の

糖鎖付加位置と構造解析を行った結果、L-HBs抗原のPre-S1領域のN型糖鎖、M-HBs抗原のPreS2領域のN型糖鎖、S-HBs抗原のN型糖鎖が特定され、Mono, di-sialyl化した2本鎖が付加していた。これ以外のN型糖鎖構造が検出されておらず、HBs抗原上の糖鎖構造はほぼ類似の構造であることが示唆された。また、Genotype Dや一部のHBs抗原を除きL-HBs抗原のN末には開始メチオニンが2箇所あり、1番目のメチオニン後のグリシンがミリストイル化されていることが確認された。ミリストイル化と糖鎖付加が同一分子に存在しているかを解析中である。さらにM-HBsのN末端メチオニンは部分的にアセチル化および酸化されていた。また、PreS2領域にO型糖鎖の存在が確認されたが、これがM-HBs、L-HBsのいずれに存在するか、質量分析では確認されなかった。

HBV検出のために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)とレクチンを比較した結果、抗体は糖鎖を有するHBs抗原を認識しないが、抗体で免疫沈降したHBV由来粒子は糖鎖を有するHBs抗原のみを認識するレクチンによって検出されることが明らかになった。そこで、患者血清からのHBs抗原の糖鎖プロファイリングを進めた結果、ヒトのクローン抗体とレクチンを組み合わせ、ナノグラムオーダーのHBVを破壊せず糖鎖構造情報を取得する方法を確立した。

次に背景肝の異なる患者サンプル(HBV DNAコピー数、抗原量、治療、HBV genotypeなど)を用いて解析した結果、抗体に比べて糖鎖を認識するレクチンとHBV量との相関性が観察された。

(2)HBV感染可能細胞の解析:

ヒト肝臓由来の一次培養細胞は感染可能だが、肝がん細胞にはほとんどHBVが感染しない。そこで、ヒト肝細胞と5種の肝がん細胞から

RNA を抽出しトランスクリプトーム解析を行った。約 250 種の糖鎖関連遺伝子と薬 550 種のレクチン様遺伝子のリストを用いて発現プロファイルを解析し、有意に発現量の異なる遺伝子をリストアップすることに成功した。

ヒト肝キメラマウス由来の肝細胞を培養し、感染能の変化と糖鎖プロファイリングとタンパク質の定量を行った。HBV 感染能は培養時間に伴い減少していくことが確認された。肝細胞サンプルを SDS-PAGE 後に銀染色した結果、3 週間くらいを境に有意にタンパク質のパターンに変化が見られた。レクチンアレイで解析した結果糖鎖プロファイリングは徐々に変化し、5 週間後では培養開始後とは大きく異なることが明らかになった。

培養開始後と感染能が低くなった 3 週間後の細胞から RNA を回収し qRT-PCR や RNA-seq によりトランスクリプトーム解析を行い、HBV 受容体候補として報告されているタンパク質の発現量を比較した結果、NTCP や ASGR2 などの発現量は有意に低下していることが明らかになった。

(3) HBV-宿主細胞間相互作用機構の解明：HBV 上の糖鎖が感染において如何に関与しているかを解析するために、HBV をグリコシダーゼ処理して HBV 感染実験を行った。感染に用いた HBV は genotype C でヒト肝細胞に感染・増幅させ、タイターを測定して使用した。一種のグリコシダーゼ処理によって HBV 感染が上昇することが示された。

HBs 抗原を認識するレクチンの選択するため、上述の解析結果を基に肝細胞で発現しているレクチンをリストアップした。リコンビナントを発現し HBs 抗原との結合能の解析を進めた結果、HBV 上の糖鎖特異的にレクチンと結合することが確認された。そこでリコンビナントレクチン存在下で HBV 感染実験を行った結果、

HBV 結合性レクチンは HBV の感染を低下させることが示された。さらに約 20 種のレクチン様分子を取得しており、siRNA などの用い HBV 感染実験を行っている。

Huh7 細胞に NTCP cDNA を導入し Myr-Pre-S1 に結合する Huh7+NTCP クローンを得た。ASGR などの内在性レクチンの発現量が異なるクローンを取得することに成功し、HBV 感染実験を行った。また合成ペプチド Myr-PreS1(long)や Myr-PreS1(+N-Gly)を作成し HuH7+NTCP 細胞に結合することを確認した。

(4) 糖鎖改変の HBV の増殖・感染能への影響：

M-HBs, S-HBs 抗原を分泌する系を開発し、まず糖鎖合成阻害剤を用い HBV の分泌への影響を解析した。ツニカマイシンなど幾つかの糖鎖合成阻害剤は効率よく HBs 抗原分泌を抑制したが、HBV 阻害活性が報告されている幾つかの薬剤については、我々の実験では阻害活性は低かった。

課題 2 より得られた糖鎖遺伝子発現量の解析結果を基に、86 種の siRNA 固定化プレートを作製し、HBs 抗原の分泌への影響や HepG2.2.15 細胞を用い HBV 粒子合成阻害を検討した。幾つかの siRNA で 70% 程度の阻害活性が見られており、HBs 抗原上の糖鎖修飾を阻害する事や、HBV DNA を含む感染可能な HBV 粒子を減少させる事が明らかになった。さらに二次スクリーニングを行い最も良く HBV 粒子合成を阻害する siRNA をリストアップした。そのうちの一つの siRNA で顕著に HBV DNA を有する HBV 粒子を減少させる事が出来たので特許申請を行った。

siRNA の効果を糖鎖合成阻害剤と比較した結果、アポトーシス、細胞毒性、AFP 分泌への影響、レクチンプロッティングへの影響などはほ

とんど確認されなかった。HuH7 細胞を siRNA で形質転換し、RNA 調製後にトランスクリプトーム解析し siRNA の影響の解析を行った。

(5) 糖鎖修飾を受けた HBs 抗原の大量精製：現行の HBV ワクチンには酵母由来の S-HBs 抗原が用いられているが、ワクチン接種に最良の HBs 抗原を使用するために、免疫実験を行い抗体価の測定を行った。まず PreS1 や PreS2 などのペプチドのみでは抗体誘導効果が見られなかった。Myr 化した Myr-PreS1 でも機能しない事から、L-HBs や M-HBs 抗原を免疫源とした。現行のワクチンをコントロールとして用い、酵母由来の L-HBs 抗原と比較した場合、L-HBs 抗原の抗体価の上昇が早いことが確認された。ヒト型糖鎖の影響を解析するために、HuH7 細胞で発現させた M-HBs 抗原を免疫した結果、糖鎖の影響が L-HBs 抗原程ではないが S-HBs 抗原より良好な抗体価の上昇が見られた。血清を用いてウエスタンブロッティングを行った結果、L-HBs 抗原接種後の抗体は S 領域よりも PreS1 や PreS2 領域を認識する抗体が多いことがわかり、PreS1 や PreS2 領域のワクチンとしての有用性が明らかになった。

免疫後に得られた脾臓細胞は富山大に送られ抗原を認識する抗体を産生する細胞から迅速スクリーニングを行っており、HBIG に代わる中和抗体の取得を目指している。まず L-HBs 抗原接種マウスの脾臓細胞から約 100 個ほどの PreS1 ペプチド認識抗体がクローンされた。現在詳しく解析中である。また他の HBs 抗原接種マウスの脾臓細胞からもクローニングを進めている。

ワクチンとしての効率を上げること、またエスケープミュータントへの対応、治療への応用を目的として、糖鎖付加 HBs 抗原の大量発現系の開発を行っている。酵母で L-HBs 抗原を生産し、菌体内からの精製を試みており、超遠心

を用いて単一のバンドにまで精製が進んでおり、今後免疫実験を行う予定である。酵母由来の L-HBs 抗原に比べて、糖鎖の付加が複数あることが確認された。他の方法として酵素学的に二本差糖鎖を転移させ、ワクチンとしての効果を検討する予定である。

上述の様に、ワクチン接種者から取得された抗体は糖鎖の有る HBs 抗原を検出できない場合が多い。抗原性の高い a 領域中のループ 2 の N146 に糖鎖を付加したペプチドや G145A の変異ペプチドを調製した。現在ワクチン接種者から取得された抗体を用いて結合実験を実施し糖鎖の影響を解析中である。

D. 考察

(1) これまでの HBs 抗原の糖鎖付加位置と構造解析を行った結果、L-HBs 抗原の PreS1 領域の N 型糖鎖、M-HBs 抗原の PreS2 領域の N 型と O 型糖鎖、S-HBs 抗原の N 型糖鎖が特定された。今後、L-HBs, M-HBs, S-HBs 抗原に共通する領域の N 型糖鎖や O 型糖鎖の有無や L-HBs の N 末のミリスチル化と糖鎖付加が同一分子に存在するかなど明らかにすればほぼ全容が判明し、HBV ワクチンが模すべき HBs 抗原の構造が明らかになる。

PreS2 抗体を用いた M-HBs 抗原の検出よりレクチンを用いた方が感度よく検出できており、PreS2 抗体は L-HBs 抗原も認識してしまうのに対しレクチンが M-HBs 抗原のみを検出できる場合があり、感染性 HBV (Dane 粒子) を測定する技術として期待される。すなわちレクチンを用いた新規検出系によって、病態との関連性を診断できる可能性が考えられる。今後さらに肝線維化や肝がんの患者サンプルを増やし、Dane 粒子の新規検出法の開発へ繋げる。

(2) 肝がん細胞への HBV 感染が成立しないことから、HBV の持続感染系の確立が重要な課

題となっている。当班ではヒト肝細胞の長期培養によって HBV 感染効率が低下することに着目し、糖鎖関連遺伝子とレクチン様遺伝子を中心にトランスクリプトーム解析を行った。糖タンパク質や糖鎖のプロファイルも3週間後くらいを境に大きく変化することは興味深く、同時期に HBV 感染に必要な遺伝子の発現も変動していると考えられる。

(3) HBV 上の糖鎖を解析した結果は単純な糖鎖構造が付加されていることを示していたが、グリコシダーゼ処理によって HBV 感染効率が変化することは、HBV 上の糖鎖の役割を示唆している。例えば、肝臓への特異性よりも HBV の取り込みに関与している可能性を示唆する。実際に NTCP の安定発現細胞はヒト肝細胞より多く発現しているにも関わらず感染効率は発現量に比例していないことから、HBV の共受容体が存在している可能性が考えられる。1-3 週間の PHH 細胞や国立感染研より入手した HepG2+NTCP 細胞の次世代シーケンサーのトランスクリプトーム解析から、NTCP 以外で発現量が大きく変化するレクチン様分子をリストアップした。今後 HepG2+NTCP 細胞でレクチン様分子を発現し HBs 抗原との結合能の解析や HBV 感染実験を行うと共に、PHH 細胞を siRNA 処理し HBV 感染への影響を解析し、HBV の共受容体の発見に繋げたい。

(4) HBs 抗原上の糖鎖は HBV の分泌や抗体からの保護に関与している事が示唆されている。実際にツニカマイシンなどの糖鎖合成阻害剤を用いると低濃度でも SVP の分泌が抑制されたが、創薬を考えた場合、毒性や濃度の基準化や肝臓への DDS などを考える必要がある。本研究により明らかになった糖鎖遺伝子の機能と siRNA の肝細胞に対する影響を明らかにするとともに、DDS の改変などを含め創薬に向け

て検討していく必要がある。

(5) 現行のワクチンは、年齢にもよるがほぼ 90% の接種者で抗体獲得が見られる。しかしながら、これまで HBV ワクチン行政で常識でないことが起きている。例えば、ワクチン接種者が HBV に感染する事例、感染しているパートナーからの感染、ワクチンとは異なる genotype の HBV 感染などがすでに報告されている。今年の初めに HBV ワクチンを全員公費接種への提言がなされたことを考えると、最も変異が起きやすい S 領域のワクチンだけでは新たな HBV を防げない可能性を考える必要があり、新規のワクチン開発を進め将来に備える意義は高い。また、十分な免疫獲得までに半年間で3回接種することが推奨されており、新生児にユニバーサルワクチネーションする場合の費用が問題になる可能性がある。L-HBs や M-HBs 抗原の免疫では S-HBs 抗原の免疫より抗体価の上昇が早かったことから、免疫回数が減少されれば公費接種の費用削減に繋がる可能性がある。

E. 結論

(1) B 型肝炎患者血清より調製されたサブヴァイラルパーティクル (SVP) における 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。質量分析による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。

(2) 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) とレクチン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。

(3) 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。

(4) 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。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

(5) 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。

(6) 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 (long) との結合を確認し、糖鎖及びレクチンの発現を次世代シーケンサーで解析した。

(7) 糖鎖遺伝子の発現結果を基に siRNA を用い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 siRNA をターゲット候補とした。

(8) 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、L-HBs の有用性を確認した。

(9) 酵母で L-HBs 抗原を生産し、菌体内からの精製法を確立した。市販の酵母由来の L-HBs 抗原に比べて、糖鎖の付加が複数あることが確

認され、糖鎖の抗原への影響を解析するのに有効と考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべき情報なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

各課題の分担研究報告書へ記載する為、本稿では割愛する。

2. 学会発表

1) **Narimatsu H.** Glycosylation of HBV.

TASL-Japan Hepatitis B Workshop, April 19-20, 2014, Taipei

その他の学会発表は、各課題の分担研究報告書へ記載する為、本稿では割愛する。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

B型肝炎ウイルス分泌阻害剤に関する特許
審査請求：1件(特願 2015-084520)

2. 実用新案登録

該当事項なし。

3. その他

該当事項なし。

(班会議資料)

平成 24 年度より採択された厚生労働科学研究費補助金 (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」を円滑に実行するために、以下の合同班会議に参加し、班会議を開催した。

NTCP 関連合同班会議

開催日時： 平成 26 年 10 月 29 日 (水) 13 : 00 ~ 18 : 00

場 所： 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター

出席者 (敬称略) : (多数のため当班参加者のみ記載) 溝上雅史、是永匡紹 (以上、国立国際医療研究センター)、成松久、佐藤隆、安形清彦 (以上、産総研)

会議内容

1 . 開会挨拶 (世話人 : 溝上先生)

2 . 各課題の発表と討論

・ 下遠野班

・ 脇田班

・ 田中班

・ 上田班

・ 藤田班

・ 成松班 (成松、安形)

グリコシダーゼの HBV 感染への影響、RNA-seq による内在性レクチンのリストアップ、PreS1 における Myr 化とグリコシレーション、HepG2+NTCP 細胞の作成と Myr-PreS1 の結合実験

・ 小嶋班

3 . 総合討論

宮村先生 : 各ステップで成果が出ており、科学的に国民に発信していく必要がある。

溝上先生 : NTCP を研究する班が多数あるので、効率化を図り戦略的に進める必要がある。

概要 : 平成 24 年度より採択された厚生労働科学研究費補助金 (B 型肝炎創薬実用化等研究事業) の中で近年 HBV 受容体として注目されている NTCP を基礎研究と創薬研究に関わる 7 班が合同班会議を開催し、お互いの研究課題の理解を進めた。当研究班からは、成松研究代表と安形が発表した。

平成 26 年度第一回班会議

開催日時： 平成 26 年 5 月 9 日（金） 14:00 ~ 18:00

場 所： TKP 品川カンファレンスセンター「カンファレンスルーム 6E」(京急第 10 ビル・6 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)、久永拓郎、大座紀子（厚生労働省）、米田政志、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）、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、佐藤隆、竹原淳一、雄長誠、我妻孝則（以上、産総研）

会議内容

1. 研究代表者挨拶（成松）
2. 最近の HBV 研究の動向（日台 HBV ワークショップ）(溝上先生)
3. 各課題の進捗状況（説明と討論）
 - ・ HBV 上の糖鎖の解析と利用（課題 1：久野、梶）
 - ・ 宿主側の糖鎖合成系とターゲット（課題 2 と 4：安形、伊藤先生）
 - ・ 肝細胞への感染に関する候補分子（課題 3：佐藤）
 - ・ 新規ワクチンの開発（課題 5：千葉）
4. 班会議総括
5. PO コメント
正木先生（国立国際医療研究センター）
久永専門官（厚生労働省）
6. 次回ミ - ティングについて

概要：本研究課題の進捗状況について班員が理解し討論するために第一回班会議を開催した。

これまで精製 HBs 抗原や肝がん細胞を用いて、レクチンアレイ、プロテオミクス解析、糖鎖解析、遺伝子発現解析（qRT-PCR, 次世代シーケンサー）を実施してきたが、今年度は国際医療研究センターで保管している患者由来の血清サンプルの解析すること、NTCP を発現する細胞と Pre-S1 結合実験系（国立感染研から導入）を用い Pre-S1 上の糖鎖の結合への影響を解析すること、siRNA スクリーニング系で得られた HBV 分泌阻害の候補遺伝子の解析を進めること、酵母で糖鎖付き L-HBs 抗原を生産することに加え、抗原の違いによる抗体価の上昇率への影響を解析することなど、本年度の研究方針と計画を確認した。

平成 26 年度第二回班会議

開催日時： 平成 26 年 9 月 11 日（木） 15：15 ～ 18：00

場 所： 東京コンベンションルーム AP 品川「F+G ルーム」

出席者（敬称略）： 溝上雅史、是永匡紹、正木尚彦（P.O.）（以上、国立国際医療研究センター）、久永拓郎（厚生労働省・肝炎対策専門官）、米田政志、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）、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、梅谷内晶、佐藤隆、竹原淳一、我妻孝則（以上、産総研）

会議内容

1．研究代表者挨拶（成松）

2．最近の HBV 研究の動向（溝上先生）

3．各課題の進捗状況（説明と討論）

- ・ 宿主側の糖鎖合成系とターゲット（課題 2 と 4：安形、伊藤先生）
- ・ 肝細胞への感染に関する候補分子（課題 3：佐藤）
- ・ HBV 上の糖鎖の解析と利用（課題 1：梶、久野）
- ・ 新規ワクチンの開発（課題 5：梅谷内）

4．班会議総括

5．PO コメント

正木先生（国立国際医療研究センター）
厚生労働省久永専門官

6．次回ミ - ティングについて

概要：本研究課題の進捗状況について班員が理解し討論するために第二回班会議を開催した。

前回の班会議からの成果として、HBV 分泌阻害の候補遺伝子の一つの siRNA で顕著に HBV DNA を有する HBV 粒子を減少させる事を確認、ミリスチル化や糖鎖の HBV 結合への影響を解析するために HBV と結合する NTCP を発現する HuH7+NTCP クローンを得、国際医療研究センターで保管している患者由来の血清サンプルの解析の進捗、抗体価を試験するための糖ペプチドや糖タンパク質の抗原の調製法、および抗体価測定の前回の進捗状況についての報告があり、討論を行った。

平成 26 年度第三回班会議

開催日時： 平成 26 年 12 月 22 日（月） 14：30 ～ 18：30

場 所： 東京コンベンションルーム AP 品川「F+G ルーム」

出席者（敬称略）： 溝上雅史、是永匡紹、正木尚彦（P.O）（以上、国立国際医療研究センター）、大座紀子（厚生労働省・肝炎対策推進室長補佐）、米田政志、伊藤清顕（愛知医科大学）、尾曲克己、飯島沙幸（名古屋市立大学）、伊藤浩美（福島県立医科大学）、安形清彦、梶裕之、千葉靖典、梅谷内晶、館野浩章、佐藤隆、我妻孝則、竹原淳一（以上、産総研）

会議内容

1. 開会挨拶（肝臓グループ統括：溝上先生）
2. 各課題の進捗状況（説明と討論）
 - ・ 肝細胞への感染に関する候補分子（課題 3：飯島先生、佐藤）
 - ・ 宿主側の糖鎖合成系とターゲット（課題 2 と 4：安形、伊藤先生）
 - ・ HBV 上の糖鎖の解析と利用（課題 1：安形、梶）
 - ・ 新規ワクチンの開発（課題 5：梅谷内、千葉）
3. 班会議総括
4. PO コメント
正木先生（国立国際医療研究センター）
大座室長補佐（厚生労働省）
5. 次回ミ - ティングについて

概要：本研究課題の進捗状況について班員が理解し討論するために第三回班会議を開催した。

前回の班会議からの成果として、HBV 感染実験において一種のグリコシダーゼ処理によって HBV 感染が上昇することが示され、HBV 上の糖鎖が感染に関与している可能性が示唆された。阻害活性が見られている幾つかの siRNA の効果をエンテカビルなどの HBV 阻害薬と比較した。患者サンプルを解析した結果から、感染性 HBV（Dane 粒子）を測定する技術開発の可能性が示唆された。ワクチン接種のために最良の HBs 抗原を使用するために、免疫実験を行い抗体価を測定した結果が報告された。

平成 26 年度第四回班会議

開催日時： 平成 27 年 3 月 6 日（金） 14：30 ～ 18：30

場 所： 東京コンベンションルーム AP 品川「E ルーム」

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）、大座紀子、横山 雄一郎（厚生労働省・肝炎対策推進室）、伊藤清顕（愛知医科大学）、尾曲克己、飯島沙幸（以上、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、梶裕之、千葉靖典、久野敦、梅谷内晶、佐藤隆、舘野浩章、安形清彦、竹原淳一、我妻孝則（以上、産総研）

会議内容

1．研究代表者挨拶（成松）

2．最近の HBV 研究の動向

溝上先生（国立国際医療研究センター）

横山先生（厚生労働省）

3．各課題の進捗状況（説明と討論）

- ・ HBV 上の糖鎖の解析と利用（課題 1：久野）
- ・ 肝細胞への感染に関する候補分子（課題 2 と 3：舘野）
- ・ 宿主側の糖鎖合成系とターゲット（課題 2 と 4：安形、伊藤先生）
- ・ 新規ワクチンの開発（課題 5：千葉、田尻先生）

4．班会議総括

5．PO コメント

大座室長補佐（厚生労働省）

6．次回ミ - ティングについて

概要：本研究課題の進捗状況について班員が理解するため、および今年度の成果と次年度の計画について討論するために第四回班会議を開催した。背景肝の異なる患者サンプルを解析した結果から、HBs 抗原の検出において抗体よりレクチンの方が感度よく検出できることが確認された。産総研で作成された HuH7+NTCP 細胞に合成ペプチド（Myr-PreS1(long)-FAM）が結合すること HBV が感染可能なヒトの一次培養肝細胞や HuH7+NTCP 細胞と感染不可能な HuH7 細胞の次世代シーケンサーのトランスクリプトーム解析から、肝細胞で発現しているレクチンのリストアップ、siRNA の効果を確認するためのトランスクリプトーム解析、抗原接種後に得られる抗体の迅速スクリーニング等の結果が報告された。

B型肝炎ウイルス(HBV)の糖鎖解析と臨床的応用

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
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 主任研究員

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も十分とはいえず、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、HB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に対する糖鎖へ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、近未来に我が国で導入されることが決まった universal vaccination に広く応用できる様、安価・安全で陽性率が高いHBワクチン作成のための臨床的なサポートを行った。更に異なる genotype でのHBワクチンの有効性や universal vaccination 導入国ではHBs抗体を獲得した症例でも、長期間観察後ではHBc抗体やHBVDNA陽性者が存在することを踏まえ、最も有効なHBワクチン導入法の確立も目指している。

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、我が国では様々な努力によって母子感染対策のみのセレクトタイプワクチンでHBV感染を費用対効果の面を含めて、非常に安価に効率良く感染防止を行った反面、ユニバーサルワクチン必要性が今日までなかったとも言える。但し、感染経路は母子感染のみならず、乳幼児期からの水平感染・controlが難しいSTD、更に慢性化しやすい genotype A の増加などHBV感染様式は多様化し、今後もユニバーサルワクチンについては導入が決定された。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 (ピームゲン、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、遺伝子組換え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最新の情報を提供し臨床検体の集約と総括を行った。

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、マウスによる感染実験を行う準備を行い、来年度から施行予定とした。

D. 考察

universal vaccination にて、HBV 感染者は更に減少すると予測される一方で、HB ワクチンのみで、完全に抑止することは不可能であり、長期観察例の一部では肝炎発症はなくても HBc 抗体や HBVDNA 陽性者が存在することは忘れてはならない。特に若年者での水平感染率の増加の有無、ワクチン接種時の合併症・副作用の詳細な検討も行い、安価・安全で抗体獲得率が高い HB ワクチン作成が必要と思われる。

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、臨床検体の回収とともに、本研究班での研究準備体制の整備とともに HB ワクチンに伴う諸問題について、基礎研究班に指示した。

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) 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, Kusuvara 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* 59 (5):1726-37, 2014.05
- 2) Kusumoto S, Tanaka Y, **Mizokami M**, Ueda R. Strategy for preventing hepatitis B reactivation in patients with resolved hepatitis B virus infection after rituximab-containing chemotherapy. *Hepatology* 60 (2):765-6, 2014.08
- 3) Abe M, Miyake T, Kuno A, Imai Y, Sawai Y, Hino K, Hara Y, Hige S, Sakamoto M, Yamada G, Kage M, Korenaga M, Hiasa Y, **Mizokami M**, Narimatsu H. Association between *Wisteria floribunda* agglutinin-positive Mac-2 binding protein and the fibrosis stage of non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* [Epub ahead of print] 2014.10.18
- 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, Yatsushashi 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, 2014.11
- 5) Tamaki N, Kurosaki M, Kuno A, Korenaga M, Togayachi A, Gotoh M, Nakakuki N, Takada H, Matsuda S, Hattori N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, **Mizokami M**, Narimatsu H, Izumi N. *Wisteria floribunda* agglutinin positive human Mac-2-binding protein as a predictor of hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* [Epub ahead of print], 2015
- 6) Takahashi H, Ikeda M, Kumada T, Osaki Y, Kondo S, Kusumoto S, Ohkawa K, Nadano S, Furuse J, Kudo M, Ito K, Yokoyama M, Okusaka T, Shimoyama M, **Mizokami M**. Multicenter cooperative case survey of hepatitis B virus reactivation by chemotherapeutic agents. *Hepatology* [Epub ahead of print], 2015
- 7) Fujiyoshi M, Kuno A, Gotoh M, Fukai M, Yokoo H, Kamachi H, Kamiyama T, Korenaga M, **Mizokami M**, Narimatsu H, Taketomi A. Clinicopathological characteristics and diagnostic performance of *Wisteria floribunda* agglutinin positive Mac-2-binding protein as a preoperative serum marker of liver fibrosis in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*, [Epub ahead of print], 2015
- 8) Totani H, Kusumoto S, Ishida T, Masuda A, Yoshida T, Ito A, Ri M, Komatsu H, Murakami S, **Mizokami M**, Ueda R, Niimi A, Inagaki H, Tanaka Y, Iida S. Reactivation of hepatitis B virus (HBV) infection in adult T-cell leukemia-lymphoma patients with resolved HBV infection following systemic chemotherapy. *Int J Hematol*, 101, 398-404, 2015

2. 学会発表

特記すべき情報なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

該当事項なし。

2. 実用新案登録

該当事項なし。

3. その他

該当事項なし。

HBV 糖鎖解析と臨床検体収集

研究分担者 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 肝疾患研修室長
研究協力者 杉山 真也 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター主任研究員

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(NA)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HB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、NA投与前、genotype別毎の検体収集を昨年同様に継続し行い、一部では肝炎増悪に伴い変動する糖鎖関連蛋白を解析している。

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つつある。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HB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解析し、抗HBVの創薬のターゲットとすることを目標とする。

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、NA治療経過中の血清を回収し、基礎研究班に提供した。

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(10,000IU以上)、genotype C症例を抽出し、eAg/eAb陽性別にsampleを選択していたが、本年度は、HBs抗原が2000~4000IUでの抽出効率を上昇させるため様々な実験工夫を行った。更に再現性を高めるために同一症例で、NA製剤経過中の糖鎖変化が、検出できるかどうか確認し解析中である。

これまで産業技術総合研究所での一連の解析を、当施設でも施行できる様に準備を行い、来年度から本格的に実験を開始する。

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、ウイルス量や HBs 抗原価に左右されない糖鎖解析が可能となり、ALT 変動や発がんに伴う変動は創薬ターゲットになる可能性がある。

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。本年度は多くの検体を当施設で解析を行い、創薬シーズを導き出す。

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) Abe M, Miyake T, Kuno A, Imai Y, Sawai Y, Hino K, Hara Y, Hige S, Sakamoto M, Yamada G, Kage M, **Korenaga M**, Hiasa Y, Mizokami M, Narimatsu H. Association between *Wisteria floribunda* agglutinin-positive Mac-2 binding protein and the fibrosis stage of non-alcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol [Epub ahead of print] 2014.10.18
- 2) 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, 2014.11
- 3) Tamaki N, Kurosaki M, Kuno A, **Korenaga**

M, Togayachi A, Gotoh M, Nakakuki N, Takada H, Matsuda S, Hattori N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Mizokami M, Narimatsu H, Izumi N. *Wisteria floribunda* agglutinin positive human Mac-2-binding protein as a predictor of hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. Hepatol Res, [Epub ahead of print], 2015

- 4) Fujiyoshi M, Kuno A, Gotoh M, Fukai M, Yokoo H, Kamachi H, Kamiyama T, **Korenaga M**, Mizokami M, Narimatsu H, Taketomi A Clinicopathological characteristics and diagnostic performance of *Wisteria floribunda* agglutinin positive Mac-2-binding protein as a preoperative serum marker of liver fibrosis in hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol, [Epub ahead of print], 2015
- 5) **Korenaga M**, Nishina S, Korenaga K, Tomiyama Y, Yoshioka N, Hara Y, Sasaki Y, Shimonaka Y, Hino K. Branched-chain amino acids reduce hepatic iron accumulation and oxidative stress in hepatitis C virus polyprotein-expressing mice. Liver Int, 35, 1303-14, 2015

2. 学会発表

特記すべき情報なし。

3. 総説（分担執筆）

- 1) **是永匡紹** 溝上雅史 B型肝炎ウイルスに対するワクチンの現状と課題 特集 ウイルス肝炎の薬物治療 変わりゆく治療戦略 medicina 52 (2) 2015.2 353- 357

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

該当事項なし。

2. 実用新案登録

該当事項なし。

3. その他

該当事項なし。

HBV（HBs 抗原）の糖鎖解析

研究分担者 梶 裕之 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 研究チーム長
研究分担者 久野 敦 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 上級主任研究員
研究分担者 伊藤 浩美 福島県立医科大学 医学部 生化学講座 助教
研究分担者 田尻 和人 富山大学 医学薬学研究部 第三内科 助教
研究分担者 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 肝疾患研修室長

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、実サンプルの分析を行った。レクチンアレイでは、まず昨年度確立したプロトコルのうち、血清から HBV 粒子のエンリッチの工程をブラッシュアップし、取得物の精製度及び取得データの再現性を向上させた。その後、HBV 感染患者血清の取扱機関である国際医療研究センターへ技術移転し、HBV 感染患者 16 症例の 24 サンプルの血清よりそれぞれ HBV 粒子をエンリッチし、レクチンアレイにより比較糖鎖解析を行った。その結果、得られたアレイシグナルパターンは大きな傾向は一致しているものの、HBs 抗原量や DNA 量などに応じてシグナルが増減するレクチンがいくつか確認された。質量分析では、B型肝炎患者プール血清より精製された 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 型糖鎖が、また、Pre-S2 領域に 1 カ所の O 型糖鎖の付加が同定された。N 型糖鎖は二本鎖構造、O 型糖鎖はコア 1 (T 抗原) を主成分としていた。この他、M 型 HBs (Pre-S2) の N 末端 Met にアセチル化、L 型 HBs (Pre-S1) の N 末端 Gly にミリスチル化修飾を検出した。

A. 研究目的

HBV ウィ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ング不全が生じるなど、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 の糖鎖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 HBV ウィルス粒子の糖鎖集合状態

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：各患者血清中 HBV ウィルス粒子のエンリッチ、および取得 HBV 粒子の糖鎖プロファイリングは、昨年度確立した手法に従った。まず、血清中の磁気ビーズへ

非特異的に結合するタンパク質を事前に除去した。血清を予め反応バッファー(1%Triton X-100入り Tris-buffered saline (TBSTx))で3回洗浄したストレプトアビジン固定化磁気ビーズ(SAビーズ)溶液に加えて溶液調整し、4で30分間振盪反応した。反応後、磁石によりSAビーズを1カ所にトラップし、残存溶液を別の1.5 mL容チューブに回収した。回収した溶液に、ビオチン化抗体とSAビーズを加え、4で3時間振盪しながら抗原体反応を行った。なお、抗体は田尻らが樹立した抗HBs抗原抗体(HB0116)を用いた。反応後、抗原-抗体複合体と結合した磁気ビーズを磁石で回収し、溶液を除去後、ビーズを反応バッファー500 μ Lで3回洗浄した。トラップされたHBV粒子を溶出するために、0.2% SDSを含むTBS10 μ Lを加え、95で5分加熱し、不活性化されたHBV粒子を遊離した。磁気ビーズを磁石で1カ所にトラップし、溶出画分溶液を回収した。取得液中に夾雑する不活性化HB0116抗体は、新しいSAビーズと再度反応させることで完全に除去された。得られた溶液HBV粒子-IP産物(20 μ L)とした。

HBV粒子-IP産物試料を5 μ Lとり、レクチンアレイ反応バッファーである1%Triton X-100含有Phosphate-buffered saline (PBSTx)により、60 μ Lに調整した。この溶液をレクチンマイクロアレイの各反応槽へ添加し、20で10時間以上相互作用反応した。反応後、ブロッキング剤を加え、30分反応させた。60 μ LのPBSTxで各反応槽を3回洗浄した後、ブロッキング剤含有PBSTx溶液を加え、若干攪拌した後に、検出用ビオチン化116抗体を100 ng加え、20で1時間反応させた。抗原抗体反応後、60 μ LのPBSTxで各反応槽を3回洗浄し、次いでCy3標識ストレプトアビジン200 ng含有PBSTx溶液を加え、さらに30分、20で反応した。反応後、60 μ LのPBSTxで各反応槽を3回洗浄した

後、レクチンアレイスキャナーGlycoStation™によりスキャンを行った。スキャンデータは画像解析ソフトで数値化され、以後の比較糖鎖解析に用いられた。

(2)HBsタンパク質Pre-S1/Pre-S2領域の糖ペプチド解析：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)を変性剤処理、還元アルキル化することなく、トリプシン消化し、限外濾過法で遊離ペプチドを捕集した。これをアミド80カラムに通し、糖ペプチドと非糖ペプチドに分画した。糖ペプチド画分は酸性条件下で加熱してシアル酸除去処理し、LC/MS分析した。この質量値より糖鎖組成を推定した。非糖ペプチド画分も同様にLC/MS分析し、Mascot検索により、糖鎖付加以外の翻訳後修飾の状況を分析した。Pre-S1領域における糖鎖修飾とミリスチル化の関連を分析するために、合成ミリスチル化ペプチドをトリプシンおよびV8プロテアーゼ消化し、LC/MSでの検出を行った。また、Pre-S2領域におけるO型糖鎖の状態を分析するために、SVPをトリプシン処理し、消化物をJacalinカラムに供し、O型糖ペプチドを捕集した。これをLC/MS分析し、構造解析した。

なお、上述の(1)(2)に用いた全ての血清サンプルは、インフォームドコンセントにより患者から同意の得られたものである。またすべてサンプル収集機関および研究実施機関の各倫理審査委員会で承認されたものを用いている。

C. 研究結果

(1)HBV患者血清中HBV粒子の比較糖鎖解析：Genotype C HBV感染患者15症例(急性肝炎2例、慢性肝炎8例、無症候性キャリア5例)の血清(HBsAg:3000 IU/mL以上、HBV DNA:100コピー以上)よりHBV粒子をエンリッチし、レクチンアレイ解析を行った。その結果、2,6シアル酸修飾を末端に有する複合型N

型糖鎖に特徴的なレクチンシグナル(I群:SSA, SNA, TJA1, RCA120, DSA, PHAEなど)を得たと同時に、シアリルT抗原構造O型糖鎖に特徴的なシグナル(II群:Jacalin, MPA, ABA)も得た。II群のシグナルはGenotype C HBVのMタンパク質のPre-S2領域にあるとされる1つのO型糖鎖付加に由来すると予想される。実際、O型糖鎖付加位置が欠損しているGenotype A HBV感染慢性肝炎患者(1例)血清について検討した場合、N結合型糖鎖の特徴はGenotype Cのそれと同様であったが、O結合型糖鎖に由来するシグナルは全く得られなかった。つまり、I群レクチンシグナルとII群レクチンシグナルの割合を調べると、血清HBV粒子中のMタンパク質の割合が間接的に得られると考えた。そこで上述の15例の結果について、I群/II群シグナル比を調べたところ、その比は患者ごとに異なっており、Mタンパク質に特徴的なII群の割合がDNA量に応じて増減している傾向を示した。この割合の違いを、レクチンアレイ以外の手法でも確認するために、取得HBV粒子をSDS-PAGEし、メンブレントランスファー後に、I群のSSA及びII群のJacalinを用いたレクチンプロットを行った。その結果、Jacalinは、おもにMタンパク質(gp36およびgp33)を染色し、そのバンド強度はレクチンアレイの傾向に一致していた。

また、HBsAg量の下限を調べるために、先述のGenotype C HBV感染患者のうち3症例について、治療開始前、3か月後、12か月後の血清を用いて同様の実験を行った。結果、HBsAg量>2000 IU/mLの場合にHBV粒子に特徴的なレクチンシグナルパターンを得ることが確認できた。

(2)HBsタンパク質Pre-S1/Pre-S2領域の糖ペプチド解析:ヒト患者血清由来SVPを変性剤非存在下、トリプシン、Lys-Cエンドペプチダーゼ、およびV8プロテアーゼで消化し、生じ

た消化物を限外濾過して、遊離ペプチド画分を得た。これをアミド80カラムに供し、糖ペプチド画分を得、LC/MS法で分析した。以前に同定したPre-S1およびL-Pre-S2糖ペプチドのコアペプチド質量に2本鎖糖鎖質量を足したシグナルを探索した結果、それに該当するシグナルが検出され、L-HBsのPre-S1/S2領域には2本鎖糖鎖が主成分として結合していることが推定された。また、アミド80カラム分離の非糖ペプチド画分の分析では、ミリスチル化されたN末端ペプチド(GGWSSKPR)が同定された。これはオランウータン型ではなく、ヒト型のロングフォームのN末端Glyがミリスチル化されていることを示している。V8プロテアーゼのみで消化し、ミリスチル化Gly-2と糖鎖付加Asn-15の両方を含む糖ペプチドの検出を試みたが、検出できなかった。非糖鎖付加型のミリスチル化ペプチドも検出されていないので、これらの修飾の関連は未解決である。合成ミリスチル化ペプチドの分析から、消化位置、ミリスチル化ペプチドの溶出位置が決定できたので、これを今後の参考に探索を進める。同様に調製したトリプシン消化遊離ペプチド画分を酸処理の後、Jacalinカラムに供し、結合した糖ペプチド画分をLC/MS分析した結果、PreS2領域の既報の位置にT抗原と思われる(Hex(1)HexNAc(1))糖鎖が検出された。このペプチドがL-HBs、M-HBsのいずれか(あるいは両方)に由来するのかは不明であった。

D. 考察

レクチンアレイと質量分析による糖鎖解析の結果、ヒト患者血清由来HBsタンパク質には長さ(LMS)に応じ、1ないし3箇所のN型糖鎖付加部位が同定され、L-PreS1、L-PreS2、M-PreS2、およびSのS領域には2,6シアル酸を末端に有する2本鎖糖鎖が主要であることが判明し、残るLおよびMのS領域にも同様の糖鎖が付加

しているものと推定される。また PreS2 領域に 1 カ所の O 型糖鎖が存在し、その糖鎖構造はシアリル T 抗原と予想される。これらの情報を元に考察すると、新型ワクチンとして準備すべき抗原はこれらの糖鎖が付加したものであると思われる。

E. 結論

HBs 糖鎖付加部位の同定とそれらに結合している糖鎖構造から、今後、ワクチンの抗原とする HBs にはシアリル化された 2 本鎖糖鎖あるいはシアリル化 T 抗原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

特記すべき情報なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **久野敦**、「肝線維化の進展を定量的に判断するための糖鎖バイオマーカーの実用化」、医学のあゆみ特集「グライコプロテオミクス技術開発と医療への応用」、249 巻 8 号 pp.666-70, 医歯薬出版(株)(2014)
- 2) 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, Yatsushashi 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 (2014).
- 3) **Kuno A**, Matsuda A, Unno S, Tan B, Hirabayashi J, Narimatsu H. Differential

Glycan Analysis of an Endogenous Glycoprotein: Toward Clinical Implementation-From Sample Pretreatment to Data Standardization. *Methods in Mol Biol* 1200, 265-85 (2014).

- 4) Zou X, Chi X, Pan Y, Du D, Sun H, Matsuda A, Li W, **Kuno A**, Zhang X, Narimatsu H, Niu J, Zhang Y. LecT-Hepa facilitates estimating treatment outcome during interferon therapy in chronic hepatitis C patients. *Clin Proteomics* **11**(1), 44 (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* agglutinin-positive Mac-2 binding protein (WFA+-M2BP), for assessing liver fibrosis. *J Gastroenterol.* 50(1), 76-84 (2015).
- 6) Tamaki N, Kurosaki M, **Kuno A**, **Korenaga M**, Togayachi A, Gotoh M, Nakakuki N, Takada H, Matsuda S, Hattori N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Mizokami M, Narimatsu H, Izumi N. *Wisteria floribunda* agglutinin positive human Mac-2-binding protein as a predictor of hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. *Hepatology Research* in press.
- 7) Abe M, et al. *Wisteria floribunda* agglutinin-positive Mac-2 binding protein as a predictor of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* in press.
- 8) Fujiyoshi M, **Kuno A**, Gotoh M, Fukai M, Yokoo H, Kamachi H, Kamiyama T, **Korenaga M**, Mizokami M, Narimatsu H,

Taketomi A. Clinicopathological characteristics and diagnostic performance of *Westeria floribunda* agglutinin positive Mac-2 binding protein as a preoperative serum marker of liver fibrosis in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* in press

- 9) Hirabayashi J, **Kuno A**, Tateno H. Development and application of the lectin microarray. *Top Curr Chem.* in press.
- 10) Sugahara D, Tomioka A, Sato T, Narimatsu H, **Kaji H**. Large-scale identification of secretome glycoproteins recognized by *Wisteria floribunda* agglutinin: a glycoproteomic approach to biomarker discovery. *Proteomics* in press.

2. 学会発表

- 1) **久野 敦**「Ultra-sensitive glycan profiling of circulating HBV particles in patient 's serum」, TAsL-Japan Hepatitis B Workshop (2nd) ,(2014/04/20、台北)
- 2) **梶裕之**「糖タンパク質の大規模同定と糖鎖バイオマーカー開発への応用」第 14 回日本蛋白質科学会年会 (2014.6.25、横浜)
- 3) **梶裕之**ら「糖鎖付加位置選択的グライコム解析技術の開発と応用」日本プロテオーム学会 2014 年会 (2014.7.17、つくば)
- 4) 雄長誠ら「グライコプロテオミクスを基盤とした肝硬変血清バイオマーカー

“ WFA(+)-CSF1R ” の開発」日本プロテオーム学会 2014 年会 (2015.7.17、つくば)

- 5) 雄長誠ら「血清糖鎖バイオマーカー WFA(+)-CSF1R の開発」日本糖質学会年会 (2014.8.10、名古屋)
- 6) 梶谷内晶ら「Alteration in glycan structure on colony stimulating factor 1 receptor as a glycomarker for evaluation of liver cirrhosis.」第 73 回日本癌学会学術総会 (2015.9.25、横浜)
- 7) **梶裕之**ら「Development and application of a method for the glycopeptide-based site-specific glycomic analysis」HUPO 13th World Congress (2014.10.7、マドリッド)
- 8) 我妻孝則ら「モノクローナル HBs 抗体を用いた B 型肝炎ウイルス粒子高感度糖鎖プロファイリング」第 87 回日本生化学会大会 (2014/10/17、京都)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
該当事項なし。
2. 実用新案登録
該当事項なし。
3. その他
該当事項なし。

HBV 感染可能細胞の糖鎖解析

研究分担者 梅谷内 晶 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 主任研究員
研究分担者 梶 裕之 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 研究チーム長
研究分担者 伊藤 浩美 福島県立医科大学 医学部 生化学講座 助教
研究分担者 安形 清彦 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 招聘研究員
研究分担者 尾曲 克己 名古屋市立大学大学院 医学研究科 病態医科学（ウイルス学）助教
研究協力者 飯島 沙幸 名古屋市立大学大学院 医学研究科 病態医科学（ウイルス学）助教

研究要旨：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。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。

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(図1)。

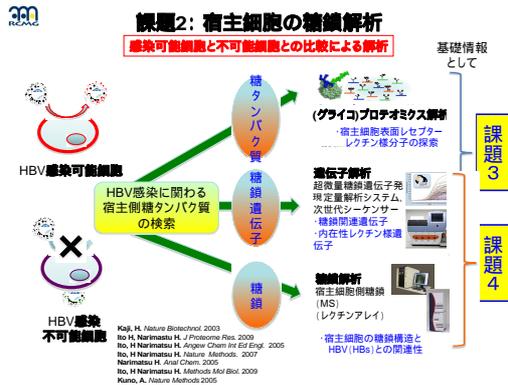


図 1

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。また、次世代シーケンサによる網羅的な遺伝子発現解析を行い、糖鎖関連遺伝子の変動について解析した。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験および動物実験を行う場合には、カルタヘナ条約などの法令・規定を遵守し、また、産業技術総合研究所ライフサイエンス実験に関する倫理及び安全管理規程に従って実施している。

動物を使用する実験については日本省庁の指針や法律を遵守する。使用する動物個体数に関しては、動物愛護のため、極力最少になるように努めている。

ヒト由来試料の提供・使用に関しては、産業技術総合研究所をはじめ、各機関で倫理審査を受け、その承認のもとに行っている。また、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」を遵守して研究を行っている。

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(糖鎖変化の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(図2)。

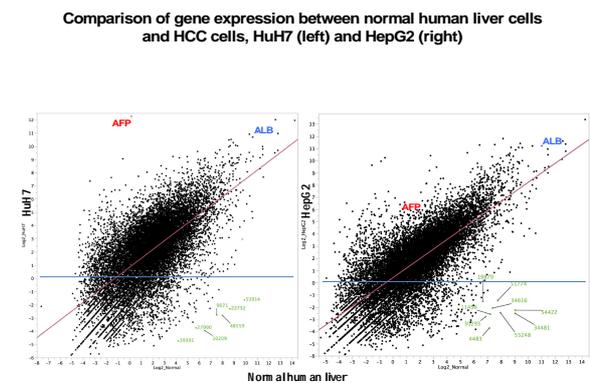


図2

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3に示した。

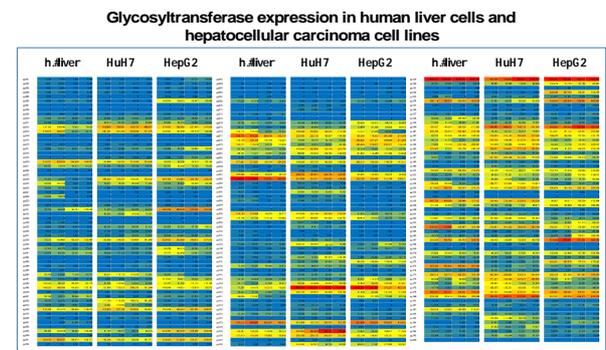


図3

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 年度に 2 種類の細胞株(HepG2 と HuH-7)、平成 25 年度に肝細胞(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 4 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。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 4 (HepG2 : 赤と HuH-7 : 青)に示した通り異なる結果となった。次に行った 2 種類の試料(図 4 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 4 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 4 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。

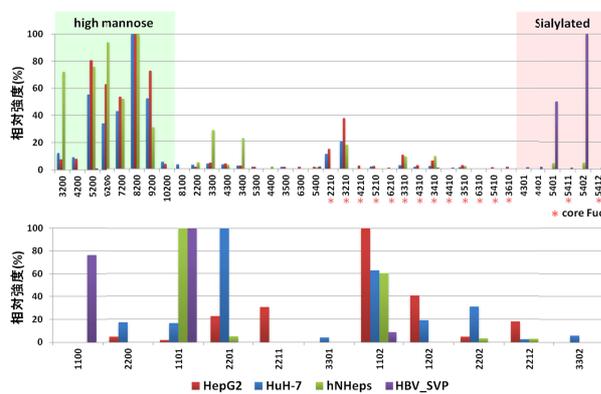


図 4

(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 5A)。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て(図 5B)、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 5C)、(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。

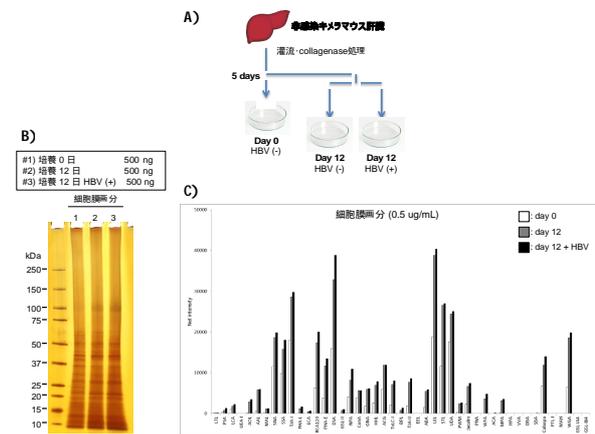


図 5

そこで、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することとした。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知見から、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た。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 6 well dish にまいた(1 well につき約 5×10^5 cells)。これを Day 0 とした。これらの細胞に、患者血清由来の HBV (genotypeC)を感染させ、その後 6 週間後までの培養を行い、その経過として 1 週間ごとにサンプルを回収した。陰性コントロールとしては HBV 非感染のもの(primary hepatocyte)を同様に培養して回収した。それらの細胞を用いて膜糖タンパク質を抽出して SDS-PAGE お

よび銀染色法にて解析するとともに（図 6）、同量ずつレクチンアレイ解析に供した。SDS-PAGE の結果では、タンパク質の発現の変動に大きな差は特に認められなかった（一部のバンドには多少の変動は認められた）。

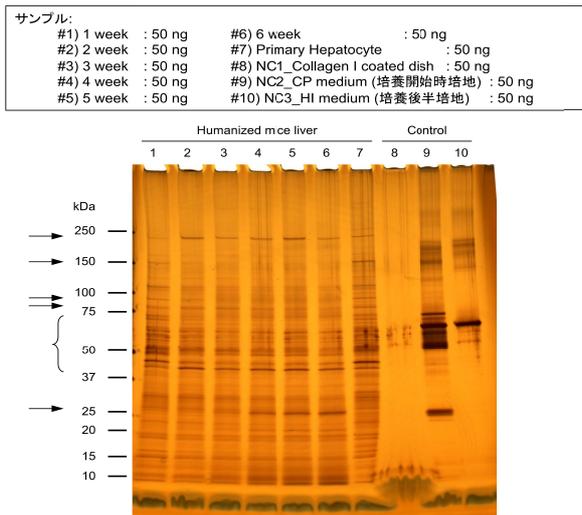


図 6

HBV 感染後の経時的な糖鎖プロファイルの変化を解析した結果(図 7)、培養環境（経時的）の変化で幾つかのレクチンによる糖鎖プロファイリングが変化することが明らかとなった。

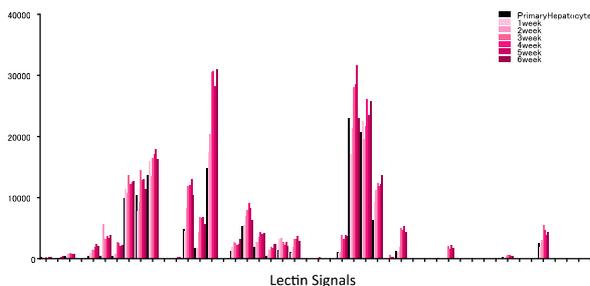


図 7

また、経時的な感染細胞における遺伝子の発現の変化について、次世代シーケンサによる網羅的な発現解析を行った。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結果、特に一部のレクチン（様）タンパク質の遺伝子において、発現プロファイルの減少が認められるものが存在していた（図 8）。

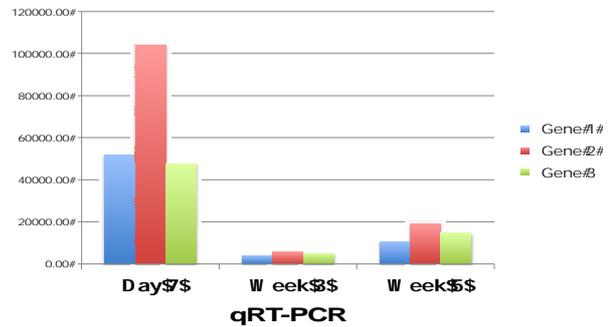


図 8

また、NTCP でも 3 週間経過後から遺伝子発現の減少が認められるほか、レクチン（様）タンパク質の遺伝子においても、同様に 3 週間経過後から発現プロファイルの減少が認められるものが幾つか存在していた（図 9）。

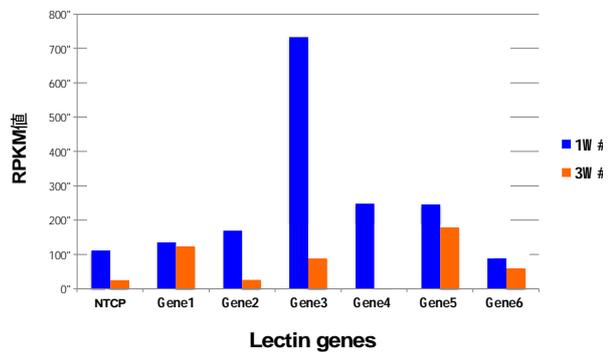


図 9

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。また、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、糖鎖の発現プロファイルの変化を解析した結果、HBV 感染と宿主細胞側の経時的な糖鎖発現の変化との関連性が認められた。さらに多くの糖鎖関連遺伝子・内在性レクチン（様）遺伝子の発現の変化（特に経時的な遺伝

子発現の減少)が明らかとなった。

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。今後、上記の観察された糖鎖変化が機能的にどのようにHBV感染と関連するののかについて、課題3あるいは課題4と連携して解析を進めていく予定である。

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。また、感染前後および経過とともに、宿主細胞の糖鎖構造(糖鎖プロファイル)が変化していることが観察された。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、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. 健康危険情報

特記すべき情報なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

特記すべき情報なし。

2. 学会発表

- 1) **Togayachi A**, Ocho M, **Kaji H**, Kuno A, Iio E, Sogabe M, Tanaka Y, Ikehara Y, Mizokami M, Narimatsu H. Glycoproteomic Discovery of Serological Biomarker for Hepatitis Virus Infection-associated Chronic Liver Disease. 2014 TAsL-Japan Hepatitis B Workshop (Second). Taipei (Academia Sinica), 19-20 Apr. 2014.
- 2) **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. 2014 TAsL-Japan Hepatitis B Workshop (Second). Taipei (Academia Sinica), 19-20 Apr. 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

B型肝炎ウイルス分泌阻害剤

出願:1件(特願2015-83726)

2. 実用新案登録

該当事項なし。

3. その他

該当事項なし。

HBV-宿主細胞における糖鎖の役割

研究分担者 舘野 浩章 産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター 主任研究員
研究分担者 佐藤 隆 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 主任研究員
研究協力者 飯島 沙幸 名古屋市立大学大学院 医学研究科 病態医科学（ウイルス学）助教

研究要旨：本研究の目的は、B型肝炎ウイルス(HBV)の感染過程における糖鎖の役割を明らかにし、他研究課題と連携しB型肝炎の新規治療薬の開発を目指す事である。本課題では、宿主細胞上におけるHBV糖鎖と相互作用する糖鎖認識分子（内在性レクチン）の探索を進めることにより、HBV-宿主細胞間相互作用機構を糖鎖という視点から理解することを目的とする。本年度は、グリコシダーゼ処理のHBV感染における影響、NTCP-Huh7細胞の構築と、本モデルを用いたPreS1ペプチドの結合やHBVの感染、次世代シーケンサーによる内在性レクチン候補分子の探索を行った。今後、HBV感染におけるグリコシダーゼの影響、内在性レクチン候補探索を行い、HBV糖鎖の感染における影響と、HBV糖鎖を認識する内在性レクチンの同定を行い、HBV糖鎖のHBV感染における役割について明らかにする。

A. 研究目的

課題3では、HBV糖鎖のHBV感染における影響について調べるとともに、宿主細胞上におけるHBV糖鎖の認識分子（内在性レクチン）の探索を行うことを目的とする。最終的には、HBVの感染機構への理解を深めるとともに、感染阻害剤を開発することを視野に研究を進める。

B. 研究方法

(1) グリコシダーゼ処理のHBV感染における影響：ヒト肝臓キメラマウスであるPXBマウスから分離されたprimary human hepatocyte：PHH細胞を用いてHBV感染感染実験を行い、感染時におけるウイルス粒子糖鎖修飾の影響を検証した。

PHH細胞は、感染宿主域が狭いHBVにおいて感染可能でウイルス複製効率の良い細胞であ

りin vitroで頻用されている。その細胞に対し、あらかじめ6種類のグリコシダーゼ処理を加えたHBVを感染させ、継時的に細胞上清中のHBV-DNA量(qPCR法)、HBs抗原量(ELISA法)測定を行った。

(2) NTCP-Huh7細胞の構築、結合アッセイ、感染実験：NTCPをHuh7細胞にトランスフェクションして、安定発現細胞株の構築を行った。PreS1の結合をフローサイトメトリーで解析した。感染研から導入したHBVの感染実験を行った。

(3) 内在性レクチン候補分子の探索：次世代シーケンサーで内在性レクチン候補分子の探索を行った。

(倫理面への配慮)

本研究課題を進めるにあたり、文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成25年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)」、また厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)を含めた各種手続き(産総研:遺伝子組換え実験、微生物実験、ヒト由来試料実験倫理審査;名古屋市立大学:HBV作製に関する文部科学大臣確認)を行い、許可の承認を得ている。実験に関わる研究者及び技術者にワクチン接種と血液検査HBV取り扱いにおける諸注意を周知するなど実施体制を整えている。

C. 研究結果

(1) グリコシダーゼ処理のHBV感染における影響: 無処理の感染源(positive control)では感染約2週間でHBV-DNA量 6.0×10^4 copies/ml、HBsAg量 5000mIU/ml に達し感染が成立したことが確認された。一方、PNgase処理したサンプルではポジコンと比較してウイルス複製の低下が認められた。sialidase処理したサンプルでは逆にポジコンと比較してHBs抗原量、HBV-DNA量の増加が認められた。の結果は再現性が確認された。

(2) NTCP-Huh7細胞の構築、結合アッセイ、感染実験: NTCPをHuh7細胞にトランスフェクションして、安定発現細胞株の構築を行ったところ、3種のクローンの構築に至った。PreS1ペプチド、及びPreS1 longの結合をフローサイトメトリーで解析したところ、結合を確認することができた。更に、HBVの感染の感染も確認することができた。現在は糖鎖修飾PreS1を作製中であり、NTCPとの相互作用における糖鎖修飾の意義について検討する予定である。

(3) 内在性レクチン候補分子の探索: 次世代シーケンサーを用いて、感染細胞(Hit肝細胞、NTCP-Huh7)と非感染細胞(Huh7、HepG2)に発現するmRNAの配列解読を行った。得られた全遺伝子情報から内在性レクチン様ドメインをもつ遺伝子群を計20種類抽出した。更に、非感染細胞と比べて感染細胞でmRNAの発現が高い内在性レクチンを探索した。

D. 考察

(1) グリコシダーゼ処理のHBV感染における影響: グリコシダーゼ処理によりHBV感染に影響が見られた。グリコシダーゼ処理によるタンパク質などへの影響はないと考えられることから、HBV糖鎖の構造がHBVの感染に関係すると考えられる。

(2) NTCP-Huh7細胞の構築、結合アッセイ、感染実験: 感染実験に使用可能なNTCP-Huh7細胞株を構築することができた。PreS1 longとの顕著な結合力の違いは認められなかったため、PreS1ペプチドの長さを長くしたことによるNTCPとの親和力の向上は認められなかったと考えられる。

(3) 内在性レクチン候補分子の探索:

(1)のグリコシダーゼ処理の結果から、どのような糖鎖結合特異性をもつ内在性レクチンがHBV感染に関係するのかが明らかとなった。今後、実際にこれら内在性レクチン候補がHBVの受容体として機能するかどうかについて検証していく。

E. 結論

(1) グリコシダーゼ処理のHBV感染における影響: HBV糖鎖が感染に関係することが明らかになった。

(2) NTCP-Huh7 細胞の構築、結合アッセイ、感染実験：感染実験に使用可能な NTCP-Huh7 細胞株を構築することができた。

(3) 内在性レクチン候補分子の探索：HBV 糖鎖を認識する内在性レクチン候補を抽出することができた。

F. 健康危険情報

特記すべき情報なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

特記すべき情報なし。

2. 学会発表

- 1) **Sato T, Tateno H**, Shikanai T, Kaji H, Angata K, Narimatsu H. Endogenous Lectins as Co-receptors for HBV Infection. 2014 TASL-Japan Hepatitis B Workshop (Second) Apr.19-20, 2014. Taipei.
- 2) Takaoka A, Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, **Iijima S**, Rice C, Harashima H, Kohara M, Tanaka Y. Host sensing mechanism for the activation of antiviral innate responses to HBV infection. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep.3-6, 2014. Los Angeles.
- 3) Hayashi S, Khan A, Simons B, Jones C, Homan C, McMahon B, Murakami S, **Iijima S**, Isogawa M, Watanabe T, Tanaka Y. Carcinogenic potential of hepatitis B virus genotype F is associated with accumulation of novel core mutations. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep.3-6, 2014. Los Angeles.

- 4) Tsutsumi S, Watanabe T, Murakami S, **Iijima S**, Hayashi S, Omagari K, Isogawa M, Tanaka Y. Evaluating hepatitis B virus lifecycle and screening anti-viral drugs using primary human hepatocytes isolated from chimeric mice. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep.3-6, 2014. Los Angeles.
- 5) Inoue T, Ohne K, Ochi N, Shinkai N, Murakami S, **Iijima S**, Ogawa S, Watanabe T, Tanaka Y. A Newly Developed High-Sensitive HBsAg Chemiluminescent Enzyme Immunoassay is a Precise Application as a pre-Transfusion Screening Test to Detect Occult HBV. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov.7-11, 2014. Boston.
- 6) Watanabe T, Hamada-Tsutsumi S, Shinkai N, Iio E, Matsunami K, **Iijima S**, Murakami S, Omagari K, Isogawa M, Sugiura W, Tanaka Y. Pre- and Post-Exposure Prophylaxis against Hepatitis B Virus Infection by HBV-active Antiretroviral Therapy. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov.7-11, 2014. Boston.
- 7) Hamada-Tsutsumi S, Watanabe T, Murakami S, Iio E, Matsunami K, **Iijima S**, Omagari K, Shinkai N, Sugiura W, Tanaka Y. Post-exposure prophylactic effect of nucleot(s)ide analogues demonstrated using primary human hepatocytes isolated from chimeric mice. The 11th JSH Single Topic Conference. Nov.20-21, 2014. Hiroshima.
- 8) Hayashi S, Khan A, Simons BC, Jones CL, Homan C, McMahon BJ, Murakami S,

- Iijima S**, Isogawa M, Watanabe T, Tanaka Y. Association between Hepatocellular Carcinoma and Accumulation of Novel Core Mutations in Hepatitis B Virus Genotype F. The 11th JSH Single Topic Conference. Nov.20-21, 2014. Hiroshima.
- 9) Hamada-Tsutsumi S, Watanabe T, Murakami S, Iio E, Matsunami K, **Iijima S**, Omagari K, Shinkai N, Sugiura W, Tanaka Y. Post-exposure prophylactic effect of nucleot(s)ide analogues demonstrated using primary human hepatocytes isolated from chimeric mice. The 11th JSH Single Topic Conference. Nov.20-21, 2014. Hiroshima.
- 10) Hayashi S, Khan A, Simons BC, Jones CL, Homan C, McMahon BJ, Murakami S, **Iijima S**, Isogawa M, Watanabe T, Tanaka Y. Association between Hepatocellular Carcinoma and Accumulation of Novel Core Mutations in Hepatitis B Virus Genotype F. The 11th JSH Single Topic Conference. Nov.20-21, 2014. Hiroshima.
- 11) **飯島沙幸**, 松浦健太郎, 渡邊綱正, 飯尾悦子, 村上周子, 林佐奈衣, 五十川正記, 田中靖人 .C 型慢性肝炎に対する 3 剤併用療法における薬剤投与直後の PBMC 内 ISG 発現動態 . 第 24 回抗ウイルス療法研究会総会 . 平成 26 年 5 月 7 日 ~ 9 日 . 山梨 .
- 12) 堤進, 渡邊綱正, 村上周子, **飯島沙幸**, 飯尾悦子, 松波加代子, 新海登, 松浦健太郎, 五十川正記, 田中靖人 . 大量調整可能なヒト肝細胞を用いた HBV in vitro 感染培養系を利用した創薬探索の可能性 . 第 50 回日本肝臓学会総会 . 平成 26 年 5 月 29 日 ~ 30 日 . 東京 .

- 13) 渡邊綱正, 堤進, **飯島沙幸**, 村上周子, 尾曲克己, 五十川正記, 田中靖人 . C 型肝炎ウイルスに対するインターフェロン応答を規定する IL28B 遺伝子多型の解析 . 第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 . 平成 26 年 6 月 19 日 ~ 20 日 . 札幌
- 14) 松浦健太郎, **飯島沙幸**, 田中靖人 . 3 剤併用療法における末梢血単核球中のインターフェロン誘導遺伝子群の応答性と IL28B 遺伝子多型・治療反応性との関連 . 第 18 回日本肝臓学会大会 . 平成 26 年 10 月 23 日 ~ 24 日 . 神戸 .
- 15) 林佐奈衣, 五十川正記, 村上周子, **飯島沙幸**, 堤進, 尾曲克己, 渡邊綱正, 田中靖人 . B 型肝炎ウイルス Genotype F における肝細胞癌関連因子の検討 . 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 . 平成 26 年 11 月 10 日 ~ 12 日 . 横浜 .
- 16) 堤進, 渡邊綱正, 村上周子, **飯島沙幸**, 林佐奈衣, 尾曲克己, 五十川正記, 田中靖人 . 初代ヒト肝細胞を用いた B 型肝炎ウイルス感染初期の宿主免疫応答とウイルス生活環の解析 . 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 . 平成 26 年 11 月 10 日 ~ 12 日 . 横浜 .

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
該当事項なし。
2. 実用新案登録
該当事項なし。
3. その他
該当事項なし。

糖鎖変異のHBVの増殖・感染能への影響-I

研究分担者 米田 政志 愛知医科大学 医学部 内科学講座（消化器内科）教授
研究分担者 伊藤 清顕 愛知医科大学 医学部 内科学講座（消化器内科）准教授

研究要旨：本研究の目的は、B型肝炎ウイルス(HBV)の感染過程における糖鎖の役割を明らかにし、他研究課題と連携しB型肝炎の新規治療薬の開発を目指す事である。B型肝炎の治療には、HBV感染や複製の研究に基づきアナログ製剤の様にHBVの制御に向けた創薬が重要である。そこで本研究では、肝疾患やHBV作製・感染実験の専門家とグライコプロテオミクス技術などの糖鎖機能解析技術を開発・実用化して来た糖鎖生物学者との協力体制(医工連携体制)により、HBV感染における糖鎖の機能を解析し、HBVに対する創薬実用化を図っている。本研究は、1)HBV(HBs抗原)の糖鎖解析 2)HBV感染可能細胞の糖鎖解析 3)HBV-宿主細胞における糖鎖の役割 4)糖鎖改変のHBVの増殖・感染能への影響 5)糖鎖修飾を受けたHBs抗原の大量精製の5課題に取り組んでいる。これまでに、精製HBs抗原の質量分析解析、グライコプロテオーム解析、細胞膜プロテオーム解析と次世代シーケンサーによる肝細胞特異的な内在性レクチンの同定、糖鎖遺伝子解析とcDNAライブラリーの調製、siRNAライブラリーを用いたHBV作製スクリーニング、酵母発現HBs抗原の精製等を行った。本研究課題は、siRNAライブラリーを用いてHBV産生細胞(HepG2.2.15細胞)をスクリーニングし糖鎖合成系をターゲットとしたHBV増殖を阻害する創薬の可能性が示された。以上の研究により、今後さらに他研究グループと連携し、B型肝炎を治療する新規治療薬の開発へと繋げる。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)に対するこれまでの治療に加えて、副作用や薬剤耐性の問題から新規機序での創薬研究が進められている。本研究では、HBVの感染過程における糖鎖の機能を明らかにし、HBVの感染を阻害する薬剤のシーズを探索する。さらには、HBVの糖鎖構造を解析しウイルス粒子の形成や分泌に関わる糖鎖構造を同定し、抗HBVの創薬のターゲットとする。

我々はこれまでにHBVのエンベロープ蛋白上の146番目のアスパラギンへのN結合型糖鎖がHBVの細胞外への放出に必須であることを報告してきた(Ito K et al. J Virol. 2010)。この146番目のアスパラギンを異なるアミノ酸に変異させるとHBV粒子が細胞外に全く分泌されなくなるため、蛋白自体のfolding不良による粒子形成不全もしくは小胞体からゴルジ装置への細胞内輸送不全によりHBVの分泌が阻害されるものと考えられる。これに対して、本研究の

第一段階のステップとして、各種糖鎖プロセッシング阻害剤を用いることにより、どの過程の糖転移酵素が分泌に重要か、また分泌がどの程度ブロックされるかに関して実験を行った。その結果、糖プロセッシング阻害剤による HBV に対する抑制効果は、エンベロープ蛋白とコア粒子との assembly の障害、もしくは粒子の細胞内輸送での障害によると考えられた。しかし、糖プロセッシング阻害剤による HBV の抑制効果は比較的弱く、抗ウイルス剤として使用することは難しいと推察された。そこで次のステップとして、in vitro 実験系を用いて各種糖鎖遺伝子に対する siRNA ライブラリーを用いた網羅的解析により HBV の増殖能、分泌能に対する影響を解析し、糖鎖合成系をターゲットとした創薬シーズ探索を試みた。

B. 研究方法

産業技術総合研究所・糖鎖創薬技術研究センターにより作成された肝細胞内の各種糖鎖遺伝子を標的とした siRNA スクリーニングパネルを使用し、HBV 持続産生系である HepG2.2.15 細胞を一定量培養して各種糖鎖遺伝子が HBV の増殖や分泌に与える影響を解析した。培養上清中に分泌された HBV-DNA および HBs 抗原は、real-time PCR 法および ELISA 法により測定した。抗 HBV 作用を持つ siRNA に関して二次スクリーニングを行い、将来の臨床応用を視野に入れ MTT assay や LDH cytotoxicity detection kit による細胞障害性の評価や BiP や CHOP の定量による小胞体ストレスの検出を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、現在のところ cell line を用いた in vitro 実験のみであり、倫理面の問題はない。HBV 作製に関する文部科学大臣確認を行い、許可の承認を得ており、研究員の安全面に注意し

ている。

C. 研究結果

siRNA による網羅的解析の結果、数種類の糖鎖遺伝子を標的とした siRNA により培養上清中への HBV-DNA の分泌抑制を認めた。特に糖鎖関連遺伝子の一つに対する siRNA-X は、HBV DNA および HBs 抗原の培養上清中への分泌を著明に抑制した。糖鎖関連遺伝子 X は小胞体やゴルジ体の膜状に存在するタンパク質と考えられている。これまでの解析で siRNA-X は、細胞障害性は認めていないが BiP や CHOP といった小胞体ストレスに関連する遺伝子の mRNA レベルの上昇を認めた。また、小胞体ストレスの蛋白レベルでの解析を行ったところ、Western blotting で蛋白レベルでも小胞体ストレスマーカーの上昇を認めた。siRNA の容量を低用量から段階的に投与すると、HBV に対して効果を認める容量では同時に小胞体ストレスを認めており、小胞体ストレスを介しての効果もしくは必須の副反応であると考えられた。また、小胞体ストレスの inhibitor である Chemical chaperon を同時に投与したところ小胞体ストレスマーカーの減少を認めたが、同時に HBV DNA の培養上清中への分泌を増加させた。

異なるシーズ候補として、siRNA-Y の一つに対する siRNA も HBV DNA の分泌を抑制しており、現在さらに解析を進めているところである。

D. 考察

糖鎖遺伝子を標的とした siRNA のうち数種類が HBV の分泌もしくは増殖を抑制することが明らかとなり、HBV に対して糖鎖合成系をターゲットとした創薬の可能性が示唆された。特に糖鎖関連遺伝子の一つを抑制することにより HBV-DNA と HBs 抗原の分泌が著明に抑制されており、小胞体ストレスや細胞障害性に関して

確認中であるが創薬シーズとなる可能性が示唆された。各種糖鎖遺伝子を knock down することによる HBV に与える影響を詳細に確認することにより、これまで不明であった肝細胞の糖鎖合成系と HBV 複製系との関連が徐々に明らかになっている。

E. 結論

(1) 糖鎖合成系と HBV の生活環との関連が明らかになりつつある。

(2) 糖鎖合成系をターゲットとした創薬の可能性が示された。

F. 健康危険情報

特記すべき情報なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

特記すべき情報なし。

2. 学会発表

1) Ito K, Yoneda M, Angata K, Tong S, Mizokami M, Narimatsu H. Development of New Anti-Viral Agent Targeting Sugar Chain Synthesis System Associated with Life cycle of Hepatitis B Virus. 2014

International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles, USA, September, 2014.

2) 伊藤清顕、米田政志、安形清彦、溝上雅史、成松久. 糖鎖合成系を標的とした B 型肝炎ウイルスに対する創薬研究の試み. 第 50 回日本肝臓学会総会, ワークショップ, 東京, 2014 年 5 月

3) Angata K, Ito K, Togayachi A, Sato T, Ito H, Ocho M, Yoneda M, Narimatsu H. Analysis and targeting of glycosylation in HBV secretion. The 6th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology (ACGG) held in Hyderabad, India, Dec. 9-12, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

B 型肝炎ウイルス分泌阻害剤に関する特許
審査請求：1 件 (特願 2015-084520)

2. 実用新案登録

該当事項なし。

3. その他

該当事項なし。

糖鎖改変のHBVの増殖・感染能への影響 – II

研究分担者 安形 清彦 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 招聘研究員
研究分担者 梅谷内 晶 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 主任研究員
研究分担者 佐藤 隆 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 主任研究員

研究要旨：インターフェロンや核酸アナログ製剤に代わる新たなB型肝炎患者の治療薬が必要となっている。これまでに幾つかの糖鎖合成阻害剤のHBV阻害剤としての報告はあるが、本格的な治療薬としては使用されていない。本研究班では、B型肝炎ウイルス(HBV)の感染や複製における糖鎖の役割を明らかにし、B型肝炎の新規治療薬の開発を目指す事を目的としている。そこで本研究課題では、糖鎖遺伝子の機能解析技術を開発・実用化してきた糖鎖生物学者と肝疾患やHBV作製・感染実験の専門家との協力体制により、HBVの増殖・分泌に必要な糖鎖合成系・糖鎖関連遺伝子を解析し、HBVに対する創薬ターゲットを探求している。これまでに、HBs抗原上の糖鎖の有無とHBVの増殖・分泌との関係を解明するために、タグ付きのHBs抗原を構築し肝がん細胞で発現させる系を開発した。まず糖鎖合成の阻害剤を用い、ウイルス粒子形成・分泌や感染への糖鎖の影響が現れる事を確認した。肝がん細胞や肝細胞の糖鎖遺伝子発現の解析を基に作製したsiRNAプレートをを用いて糖鎖改変細胞を作製しスクリーニングを行った結果、86 siRNAターゲットのうち約15糖鎖遺伝子でHBs抗原の糖鎖が減少した。HBVを産生する肝細胞(HepG2.2.15.7細胞)を用いたスクリーニングから、HBV粒子の形成・分泌能を抑制する創薬ターゲット候補をリストアップした。二次スクリーニングの結果から最もHBV抑制活性が認められたsiRNAの効果含糖鎖合成阻害剤と比較した結果、AFP分泌への影響やレクチンプロテイングへの影響などはほとんど確認されなかった。またHuH7細胞をsiRNAで形質転換した後にトランスクリプトーム解析し、ターゲット遺伝子の発現量の低下とともに主な遺伝子発現の変化情報を得た。

A. 研究目的

日本には約110-140万人のB型肝炎ウイルス(HBV)保有者がいると考えられ、従来型の母子感染に加え水平感染によっても広がりつつある。HBV感染患者の約10%が慢性肝炎や肝硬変、さらにその内の数%の患者が肝細胞癌を発

症するとされ、長期にわたる治療と経過観測が必要となっている。現在HBVの治療法としてインターフェロンが用いられるが、B型肝炎においてはインターフェロンによる治療成績が悪い場合が多く、特にgenotype間での治療効果に差がある事が報告されている。次に核酸アナロ

グ剤の継続投与が実施されているが、HBV DNA 中の変異による薬剤耐性ウイルスの出現が問題になっている。また、日本ではHBV ワクチンはユニバーサルワクチンとして実施されておらず、公費接種が広がるまで輸血・移植における感染事故や水平感染を防ぐ事は難しい。実際に HIV や HCV より微量のウイルス混入で感染が成立することから、HBV にとっては輸血による感染事故が未だに報告されている。従って、HBV の感染/複製機構のより詳細な理解を進め、逆転写酵素に代わる新規の創薬ターゲットを開発する事が重要である。

ウイルスの形成・分泌において糖鎖が重要であることが明らかになりつつあるが、HBV における糖鎖の機能は未だに不明なままである。実際に HBs 抗原上に糖鎖が付加されている事が知られているが、糖鎖の無い HBs 抗原も存在し両者が一つの HBV 粒子内に含まれている可能性が高い。しかし伊藤らは、糖鎖付加の阻害は感染性を有する HBV の粒子形成や分泌を減少させる事を示唆しており、糖鎖付加を制御する事により HBV の放出を阻害する事が考えられる。本研究では、HBV 作製細胞の糖鎖合成系を阻害する事により、ウイルス粒子の形成や分泌に関わる糖鎖構造を同定し、抗 HBV の創薬のターゲットを探索する。

B. 研究方法

本研究では、HBV 感染における糖鎖の機能を解析し、HBV に対する創薬ターゲット分子を探索するために、HBs 抗原上の糖鎖の有無を解析する系の開発、糖鎖改変細胞の作製、siRNA ライブラリーなどを用いてスクリーニングを進めた。

(1) 糖鎖合成阻害剤の HBs 抗原粒子形成・分泌への影響解析：

HBV のエンベロープタンパク質である S-HBs 抗原 cDNA (genotype C、名古屋市立大学より

供与頂いた) を PCR で増幅サブクローニングし、分泌シグナルとタグを導入し、S-HBs 抗原発現ベクターを構築した。塩基配列を確認した後に、プラスミド DNA をエンドトキシンフリーで調製した。

HuH7 細胞に S-HBs 抗原の発現ベクターを導入し、24 時間後にツニカマイシンなどの糖鎖合成阻害剤を含む培地と交換した。48 時間後に培養上清から S-HBs 抗原を抗体ビーズで回収し、SDS-PAGE とウエスタンブロッティングを行い HBs 抗原の発現量と糖鎖の有無を確認した。

(2) 糖鎖遺伝子の発現解析とライブラリーの調整：

肝細胞の一次培養、HuH7 細胞や HepG2 細胞などの肝がん細胞から total RNA を調製し、cDNA を合成した後に糖鎖遺伝子の発現量を qRT-PCR 解析(糖鎖遺伝子 qPCR アレイシステム) やトランスクリプトーム解析(次世代シーケンサー) を実施した。この結果を基に糖鎖遺伝子をその発現パターンで 2 群(抑制目的と過剰発現目的) に分け、それぞれ cDNA ライブラリーと siRNA ライブラリーの作成を進めた。siRNA ライブラリーの作製は 86 個の糖鎖遺伝子にそれぞれ 3 種類の合成 siRNA を用いた。今年度は特に siRNA によるスクリーニングを行った。

(3) 二次スクリーニング：

愛知医科大学において HBV 産生細胞である HepG2.2.15.7 細胞を用いて、HBV 分泌抑制効果のある siRNA のリストアップを行った(伊藤、米田の分担報告書を参照)。1 つの遺伝子につき 3 種の siRNA をそれぞれ 12-well プレートに固定した。形質転換前にトランスフェクション試薬と混ぜ、HuH7 細胞をトリプシン処理した細胞を調製し、リバーストランスフェクションを

行った。24時間後に S-HBs 抗原の発現ベクターを導入し、48時間後に上述の様に S-HBs 抗原を回収し、ウエスタンブロッティングにより S-HBs 抗原の発現と糖鎖の有無を検出した。

(4) siRNA の糖タンパク質合成への影響：

siRNA 処理の肝細胞への影響を解析するために、まず糖タンパク質である AFP の発現量を測定した。コントロールとしてツニカマイシン処理を施した HuH7 細胞と siRNA 処理後の HuH7 細胞を用意し、さらにウシ血清不在下で培養し培養上清を回収した。サンプルは SDS-PAGE で展開し PVDF 膜に転写後に抗 AFP 抗体で検出した。

次に糖鎖合成への影響を見るために、コントロール siRNA 同様に HuH7 細胞をトランスフェクションし、48時間後に PBS で洗浄後、細胞を溶解し遠心後にライセートを得た。サンプルは SDS-PAGE で展開し PVDF 膜に転写後に E-PHA などでレクチンブロッティングを行った。

(5) siRNA の効果の検証：

siRNA がターゲット mRNA 量を減少させていることを確認するために、siRNA 処理後の HuH7 細胞からトータル RNA を調製し、cDNA を合成後に遺伝子特異的プライマーを用いて qRT-PCR により発現量を測定した。サンプル間の調整には ACTB 遺伝子を測定して用いた。

次にターゲット遺伝子 mRNA をノックダウンするために必要な siRNA 濃度を決定するために、HuH7 細胞を 100, 10, 1, 0.1 nM siRNA で処理し、ターゲット遺伝子の mRNA 量を qRT-PCR によって測定した。siRNA 処理後の HuH7 細胞からトータル RNA を調製し、トランスクリプトーム解析を実施し、ターゲット遺伝子を含む mRNA 発現量の変化情報を収集した。

(倫理面への配慮)

本研究課題を進めるにあたり、文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成25年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）」を遵守している。また各種手続き（産総研：遺伝子組換え実験、微生物実験、ヒト由来試料実験倫理審査；愛知医科大学：HBV 作製に関する文部科学大臣確認）を行い、許可の承認を得ている。実験に関わる研究者及び技術者にワクチン接種と血液検査 HBV 取り扱いにおける諸注意を周知して実施した。

C. 研究結果

(1) HBV 表面上の糖鎖は HBs 抗原への糖鎖修飾であり、糖鎖合成系の HBs 抗原の形成・分泌への影響を調べるために、これまでに、genotype C の **リコンビナント S-HBs 抗原の高発現系と精製法を確立した**。HuH7 細胞に cDNA をトランスフェクションし、48時間後に培養上清から抗体ビーズを用いてリコンビナント S-HBs 抗原を回収した。SDS-PAGE で展開し、抗 FLAG 抗体でウエスタンブロットした結果、糖鎖有無の2本のバンド(N型糖鎖有の p28 と N型糖鎖無しの p25) が検出され、N型糖鎖有無の割合はほぼ 1:1 に維持されていた。

この系を用い HuH7 細胞に S-HBs 抗原の発現ベクターを導入24時間後に糖鎖合成阻害剤を含む培地と交換し、S-HBs 抗原の発現と糖鎖の付加を確認した。一部の糖鎖合成阻害剤によって S-HBs 抗原の分泌が有意に減少する事が確認されたが、HBV 阻害活性が報告されている糖鎖合成阻害剤の効果は少なかった（図1）。

HBsAg-protein expression in HuH7 cells
Effect of inhibitors for glycosylation pathways

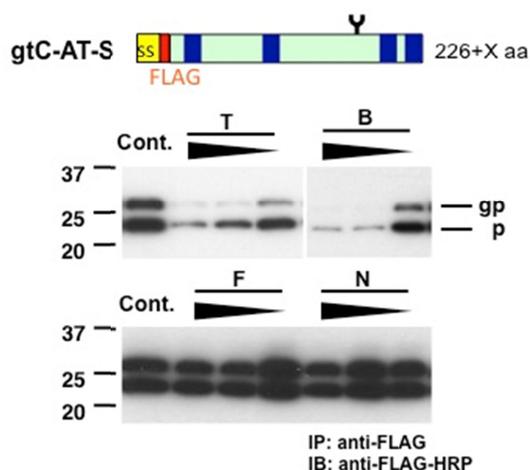


図1 糖鎖合成阻害剤のHBs抗原粒子形成・分泌への影響 S-HBsをHuH7細胞で発現させると糖鎖有り(gp)と糖鎖の付いていない(p)HBs抗原の2種の(糖)タンパク質が検出される。糖鎖合成阻害剤を添加した場合、HBs抗原上の糖鎖修飾が抑制されHBs抗原の分泌量が減少した。

(2) これまでに肝細胞や肝がん細胞のトランスクリプトーム解析から糖鎖関連遺伝子の発現プロファイルを作成した。その結果を基にHBV上の糖鎖合成に関与する遺伝子として86遺伝子に対するsiRNAライブラリーを作成した。

siRNAライブラリーによる糖鎖遺伝子のノックダウンは一部の糖鎖遺伝子についてはqRT-PCRによって確認した。HuH7細胞あるいはHepG2細胞をsiRNAで形質転換後にRNAを調製し、qRT-PCRによって確認した。調べた限り、おおむね70-90%発現量を低下させることに成功しているが、50%前後のものも見られ、効果に差があるsiRNAも認められた。

次にsiRNAをプレートにコーティングしリパーソトランスフェクションにより3種のsiRNA/wellをHuH7細胞に導入し、24時間後にS-HBs抗原の発現ベクターで形質転換し、

S-HBs抗原の発現を解析した。スクリーニングの結果、10種以上の遺伝子について、コントロールsiRNAと比較して、S-HBs抗原の発現の低下あるいは糖鎖付加の減少を確認した(図2)。

2nd screening of siRNAs

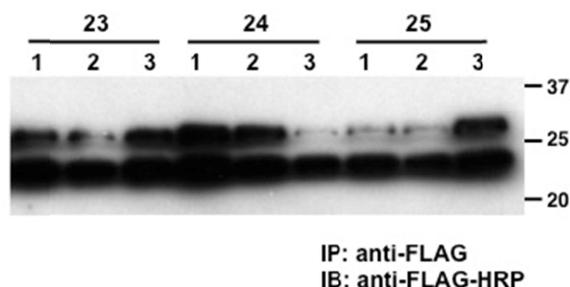


図2 siRNAプレートの二次スクリーニングの実験例 HBs抗原cDNAで形質転換後に、HuH7細胞の培養上清より回収したHBs抗原を検出した。糖鎖遺伝子siRNAの添加により糖鎖を有するHBs抗原の減少が確認された。

(3) これらの実験と並行して、HBV産生細胞であるHepG2.2.15細胞を用いてHBV粒子の分泌への影響を解析しており、幾つかのsiRNAにHBVの分泌を低下させる効果が認められた(伊藤と米田の課題を参照)。そこで、siRNAの肝細胞における糖タンパク質合成への影響を解析する実験を行った。HuH7細胞にターゲットsiRNAでトランスフェクションし、代表的な肝臓の分泌糖タンパク質であるAFPの発現量に有意な変化は見られなかった(図3)。同様にライセート中の糖タンパク質のレクチンプロットティングも調べた限りでは差が見られなかった。

Effect of siRNAs on expression of AFP

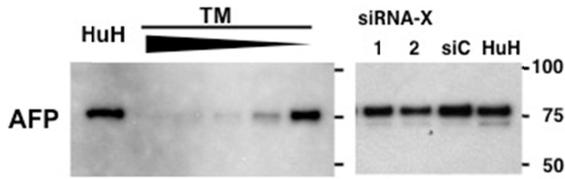


図3 肝細胞で分泌される糖タンパク質 AFP の発現への影響 HuH7 細胞をツニカマイシンで処理すると AFP の分泌は阻害されるが、siRNA 処理では AFP の発現に変化は見られなかった。

(4) siRNA の効果的な濃度を確認するために、HuH7 細胞を 100, 10, 1, 0.1 nM siRNA で処理し、ターゲット遺伝子の mRNA 量を qRT-PCR によって測定した結果、0.1 nM では効果が低いが 1 nM 以上であれば 70% 程度以上減少させる効果が認められた (図 4)。

次に、効果を転写レベルで網羅的に解析するために siRNA 処理した HuH7 細胞からトータル RNA を調製し、トランスクリプトーム解析を行った結果、ターゲット遺伝子の発現が約八分の一まで減少していることと糖鎖関連遺伝子では数個の発現変化を除きほとんど発現量に変化が認められなかった。

qRT-PCR of target mRNA after siRNA transfection

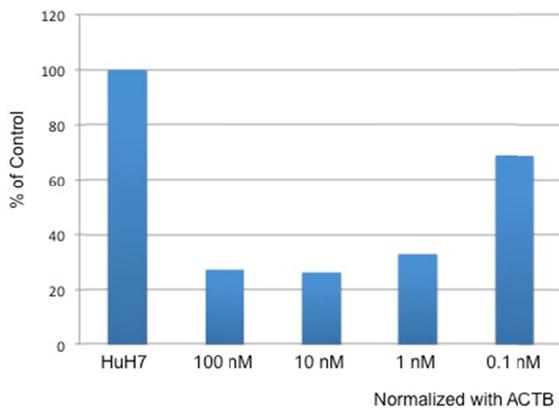


図4 siRNA の至適濃度の検討 siRNA 処理後にトータル RNA を調製しターゲット mRNA 量を qRT-PCR 法で定量した。

D. 考察

本研究では糖鎖から見た HBV 感染における創薬ターゲットを選定することを目的としている。これまでの当研究班の成果から、1) HBV 上の糖鎖構造は HBV を産生する肝細胞上の糖鎖構造に比べ単純であること、2) その HBV 上の糖鎖が感染効率に関与している可能性、3) HBs 抗原上の糖鎖が抗体による認識を阻害する可能性が考えられた。本研究課題から HBs 抗原上の糖鎖が感染性のある HBV の形成・分泌に関与している可能性が示された。すなわち宿主肝細胞側の糖鎖合成系は HBV の糖鎖修飾も担うので、宿主肝細胞の糖鎖合成系を阻害することにより、HBV の感染に関わる糖鎖の改変、HBV 形成や HBs 抗原の構造に重要な糖鎖や糖鎖関連分子を抑制出来ると考えられる。

伊藤らの研究により、感染能の有る HBV の分泌には HBs 抗原上の N 型糖鎖の付加が必要である事が明らかになっている。実際に、ツニカマイシンなどの N 型糖鎖の合成阻害では、HBV DNA を含まないウイルス様粒子が放出されるものの感染能を有する HBV 粒子は分泌されない。本研究ではツニカマイシンやプレフェルディン A などの糖鎖合成阻害剤が有意に S-HBs 抗原の発現を抑制する事が示されたが、ノジリマイシンでは抑制効果が少なかった。

糖鎖の重要性が確認されたので、糖鎖遺伝子の siRNA ライブラリーにより糖鎖改変細胞を作成し、HBV の分泌や感染にどのような影響を及ぼす糖鎖遺伝子をスクリーニングした。既に 10 種以上の糖鎖遺伝子 siRNA が S-HBs 抗原上の糖鎖の発現を抑制する事や HBV 形成・分泌を阻害する事が明らかになった (米田・伊藤の分担報告書も参照)。siRNA 処理によってアポトーシスなどは見られず細胞増殖への影響は観察されていない。AFP などの糖タンパク質の分泌への影響も見られておらず、ツニカマイシンなどの効果と異なるメカニズムによって

HBV 抑制が起きていると考えられる。今後創薬の可能性を含め、HBV 阻害のメカニズムを明らかにする必要がある。また今後、生体内肝細胞の活動に影響を及ぼさない濃度の決定や(感染)肝細胞だけを選択的に輸送する技術開発が重要である。

E. 結論

これまで HBV 感染・複製における糖鎖の役割は殆ど解析されておらず、当研究班では HBV あるいは宿主肝細胞の糖鎖及び糖鎖関連分子をターゲットとした創薬の可能性を研究している。

本研究課題では、まず幾つかの糖鎖合成阻害剤が有意に S-HBs 抗原の発現を抑制する事を見出したが、細胞毒性などの問題が大きい。糖鎖遺伝子の siRNA ライブラリーにより糖鎖改変細胞作製を可能にし、10 種以上の糖鎖遺伝子 siRNA を創薬ターゲット候補としてリストアップする事に成功した。特に細胞増殖への毒性も見られず、HBs 抗原の分泌や HBV DNA 量を抑制する siRNA について特許出願した。

以上のように、HBV の感染過程(粒子形成・分泌)における糖鎖合成の重要性と糖鎖機能解析を中心に医用応用のための基盤研究を進めた。さらに搭載遺伝子をターゲットとした B 型肝炎を治療する新規治療薬の開発へ進める。

F. 健康危険情報

特記すべき情報なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

特記すべき情報なし。

2. 学会発表

- 1) Angata K, Ito K, Togayachi A, Sato T, Ito H, Ocho M, Yoneda M, Narimatsu H. Glycosylation of HBsAg and its role in secretion pathway. TAsL-Japan Hepatitis B Workshop held in Taipei, Apr. 19-20, 2014.
- 2) Angata K, Ito K, Togayachi A, Sato T, Ito H, Ocho M, Yoneda M, Narimatsu H. Analysis and targeting of glycosylation in HBV secretion. The 6th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology (ACGG) held in Hyderabad, India, Dec. 9-12, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

B 型肝炎ウイルス分泌阻害剤に関する特許
審査請求：1 件(特願 2015-084520)

2. 実用新案登録

該当事項なし。

3. その他

該当事項なし。

糖鎖修飾を受けた HBs 抗原の大量精製

研究分担者 千葉 靖典 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 研究チーム長
研究分担者 佐藤 隆 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 主任研究員
研究分担者 梅谷内 晶 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 主任研究員
研究分担者 安形 清彦 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 招聘研究員
研究分担者 成松 久 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 招聘研究員

研究要旨:本分担課題ではヒト型糖鎖を発現する酵母を用い HBs 抗原の大量精製を進めるとともに、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とを目的としている。本年度は、酵母での HBs 抗原 L-タンパク質 (L-HBs) の調製、動物培養細胞を用いた HBs 抗原 M-タンパク質 (M-HBs) の調製を行なった。また化学-酵素ハイブリッド合成法を用いて、Pre-S1 領域、S-領域の糖鎖付加部位を含む部分領域について糖鎖構造を均一化した糖ペプチドの合成法を確立し、調製を行なった。これらの糖タンパク質、糖ペプチドを用いてマウスへの免疫実験を行い、抗体生産能の評価を行なった。糖鎖付き PreS1 ペプチド及び市販の糖鎖なし 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。糖鎖なし 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。

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バックス(Merck社、GenotypeAを認識)、ビームゲン(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や、Genotypeの異なるウイルスの水平感染が指摘されている。また免疫源とした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ある。実際にボランティアにビームゲンを免疫して得られ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ますが、これらの抗体は糖鎖を持ったHBs抗原に対して反

応性を示さないことが当研究班の研究結果より明らかになった。このことは天然の B 型肝炎ウイルスに対し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。

そこで本課題では、天然の HBs 抗原と同様に糖鎖を有する HBs 抗原の大量精製を行うことを目的とする。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。

B. 研究方法

(1) 酵母による HBs 抗原の調製 : H25 年度までに開発した L-HBs 抗原発現酵母を培養し、菌体内から抽出する条件 (抽出バッファー、溶解温度、遠心分離条件) を検討した。次に KBr 密度勾配超遠心法、およびシュクロース密度勾配超遠心法による精製条件を検討し、精製法を確立した。計 2.4 L の培養を行ない、52 g の菌体から確立した方法で L-HBs を精製した。

(2) リコンビナント M-HBs の発現 : 免疫抗原に用いるリコンビナント M-HBs を、培養細胞系を用いて作製した。H25 年度に開発した S-HBs の高効率発現法に倣い、genotype C の M-HBs をコードする遺伝子を分泌発現用ベクター pFLAG-CMV3(Sigma-aldrich) に導入した。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 M-HBs をアフィニティ精製した。抗 FLAG 抗体からの溶出は、FLAG ペプチド用いて競合溶出した。

(3) ハイブリッド合成法による糖鎖付加 HBs 抗原部分ペプチドの調製 : Pre-S1 の糖鎖付加部位を含む 46AA のペプチド

(GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNN PDWDFNPNKDHWPANQV) および 3 番目の N に GlcNAc を付加した糖ペプチドを化学合成した。また S 領域の糖鎖付加部位を含む領域 (CTKPSDG(A)NCTK-Biotin) についてジスルフィド結合を利用して環状化したペプチド、および 8 番目の N に GlcNAc を付加した糖ペプチドも作製した。一方、市販の Sialyl Glycopeptide から ENGase を用いて糖鎖を切断、精製し、オキサゾリン化反応を行って糖鎖ドナーを調製した。この糖鎖ドナーと化学合成した糖ペプチドを混合し、Glycosynthase を添加してトランスグリコシレーション反応を行った。得られた糖鎖転移産物を逆相カラムで分離することで均一な糖鎖を有する HBs 抗原の部分糖ペプチドを調製した。

(4) HBs 抗原免疫マウスにおける抗体価上昇の確認 : マウスに対する免疫手法ならびに抗体価の測定方法を確立するために、ビームゲン(リコンビナント S-HBs タンパク質) を Balb/c マウスに免疫し、その免疫マウス血清を用いて抗 HBs 抗原抗体の ELISA 測定系の構築を行った。市販の各種抗 HBs 抗体のうち、陽性コントロールとして使用可能なものがあるかどうかを検討した。次に、L-HBs 抗原、M-HBs 抗原をマウスに免疫し、その抗体価の上昇を観察した。さらに免疫マウス血清を用いて、HBs 抗原における領域ごとの反応性を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18 年 6 月 1 日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知) 及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守し、あらかじめ産総研の組換え DNA 実験委員会、および動物実験委員会の承認を得ている。

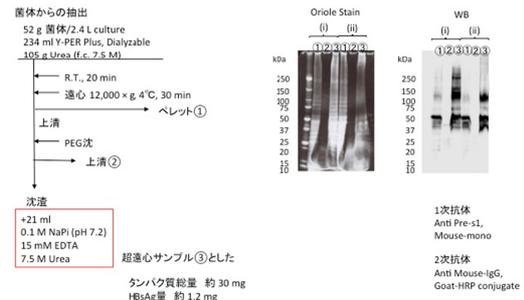
C. 研究結果

(1) 酵母による HBs 抗原の調製 :

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。

昨年度までは、培養上清中から糖鎖付加型の L-HBs 精製を試みていたが、除ききれないタンパク質の混在があり、また生産量もごく微量で使いにくいと判断した。そこで今年度は培養した酵母菌体からの HBs 抗原の精製を検討した。培地は 1x カザミノ酸培地を用い、昨年度と同様の条件で培養した。培養した菌体から容易に L-HBs を調製するため、市販の菌体溶解液 (Y-PER Plus, Dialyzable ; Pierce 社) を用い、抽出できるかどうか、またその抽出条件 (抽出バッファー、溶解温度、遠心分離条件) を検討した。その結果、7.5 M の尿素を含め Y-PER Plus を抽出バッファーとし、室温、20 分で抽出を行うのがよいことが示された。この抽出を行った後に 12,000 x g で遠心、上清を PEG 沈した沈殿物に L-HBs が多量に含まれていることが確認された (図 1)。この沈殿物を 7.5 M 尿素、15 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸バッファー (pH

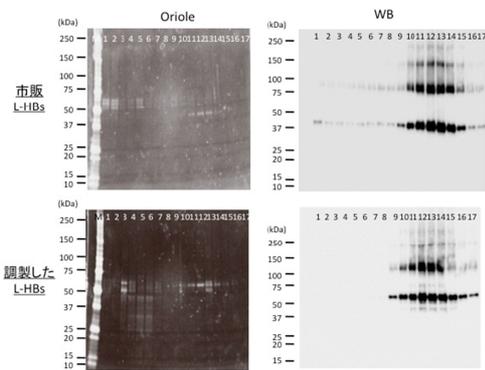
7.2) で溶解し、粗抽出液とした。



(図 1) 酵母からの抽出条件の検討

次に超遠心による精製条件を検討した。既報に従い、10-40%の臭化カリウム (KBr) による密度勾配を設定し、Beckman SW 55 Ti ローターで $m73,000 \times g$ 、4、16 時間超遠心を行なった。チューブの上層から溶液を 0.3 ml ずつ回収し、各フラクションについて抗 PreS1 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。夾雑タンパク質が比較的多い (KBr 密度の軽い) 画分を除き、抗体反応陽性のフラクションを回収した。この溶液を PEG 沈し、この沈殿物を 7.5 M 尿素、15 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.2) で溶解して次の超遠心に供した。

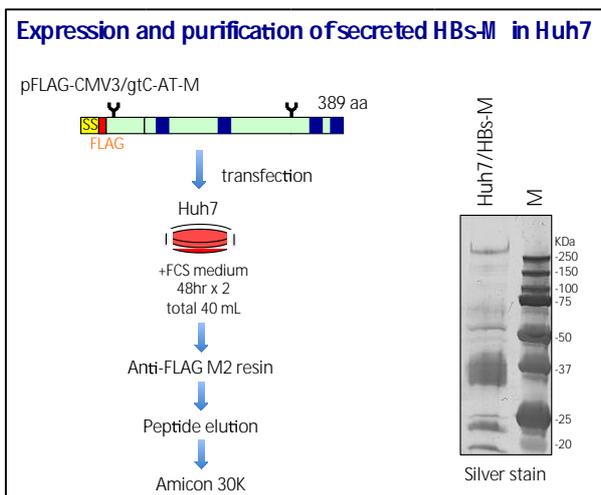
次のステップとして、5-50%のシュクロース密度勾配を設定し、上記と同条件で超遠心を行なった。チューブの上層から溶液を 0.3 ml ずつ回収し、各フラクションについて SDS-PAGE を行い、Oriole 染色 (Bio-Rad 社) と抗 PreS1 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、密度の高いフラクションにモノマー、ダイマーのシグナルが確認された。また Oriole 染色によりほぼ均一に精製されていると考えられた (図 2)。



(図2) シュクロース密度勾配遠心後の各フラクションの SDS-PAGE (Oriole 染色) とウエスタンブロット解析

(2) リコンビナント M-HBs の発現 :

免疫抗原に用いるリコンビナント M-HBs について培養細胞系を用いて作製した。genotype C の M-HBs をコードする遺伝子を分泌発現用ベクターに導入、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、リコンビナント M-HBs をアフィニティ精製した。およそ 40 mL の培養上清を用いて 18.6 μg のタンパク質が精製できた。精製した M-HBs を SDS-PAGE で展開し、銀染色した結果、37 KDa 付近にメインのバンドが観察され、さらに複数のタンパク質バンドも含まれていることがわかった (図3)



(図3) M-HBs の調製方法と精製した M-HBs の銀染色

(3) ハイブリッド合成法による糖鎖付加 HBs 抗原部分ペプチドの調製 :

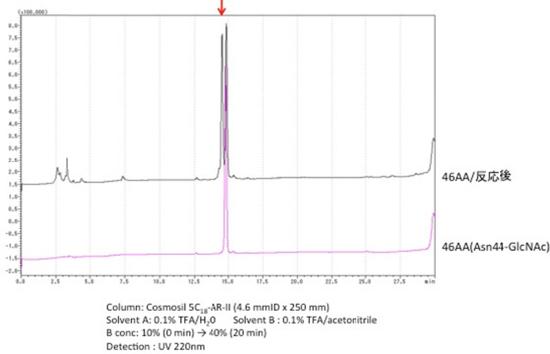
免疫原やスクリーニングで必要となる、HBs の各領域のペプチド、糖ペプチドについて合成を検討した。ペプチド部分は化学的合成法、糖鎖部分の転移は酵素を利用する、いわゆるハイブリッド合成により目的物の調製を検討した。

Pre-S1 の糖鎖付加部位を含む 46AA のペプチド (GTNLSVNPPLGFFPDHQLDPAFGANS NNPDWDFNPNKDHWEANQV) および 3 番目の N に GlcNAc を付加した糖ペプチドはペプチドシンセサイザーにより化学合成した。ペプチドシンセサイザーによるペプチドの合成は 40 残基程度が一般的であり、それ以上は収率が落ちることが予想された。また GlcNAc を含む糖ペプチドの調製には Thr-GlcNAc-Fmoc が必要となる。これらのことから糖ペプチドの合成経験を有する産総研北海道センターの清水に協力を依頼し、合成を進めた。清水らが開発したマイクロ波を利用した合成法により 46 残基のペプチドの合成に成功した。一方、S 領域の糖鎖付加部位を含む領域

(CTKPSDG(A)NCTK-Biotin) についてジスルフィド結合を利用して環状化したペプチド、および 8 番目の N に GlcNAc を付加した糖ペプチドについては、外部委託により作製した。

次に糖ペプチドに転移する糖鎖の調製を検討した。既に当研究班の梶らにより、HBs が有する N-型糖鎖の構造は、α2,6 結合のシアル酸を還元末端に持つ二分岐複合型糖鎖であることが示されている。そこで同じ構造の糖鎖であり、大量に入手可能な市販の Sialyl Glycopeptide から ENGase を用いて糖鎖を切断し、グラファイトカーボンカラムを用いて精製した。さらに既報に従い、還元末端のオキサゾリン化を行うとともに、千葉らが開発したオキサゾリン化糖鎖の大量精製法を用いて糖鎖ドナーを調製した。この糖鎖ドナーと化学合成した糖ペプチドを混合

し、Glycosynthase を添加してトランスグリコシレーション反応を行った。得られた糖鎖転移産物を逆相カラムで分離することで均一な糖鎖を有する HBs 抗原の部分糖ペプチドを調製した(図4)。

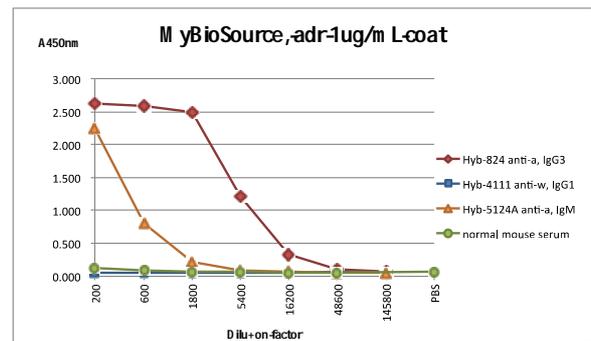
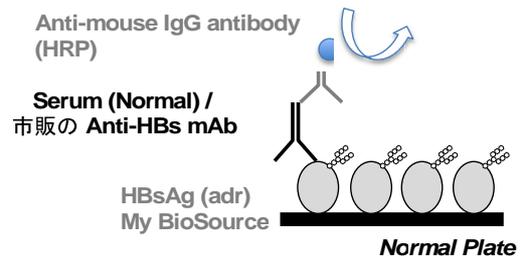


(図4) α 2,6 シアル酸付加二分岐複合型 Pre-S1 糖ペプチドの精製

(4) HBs 抗原免疫マウスにおける抗体価上昇の確認:

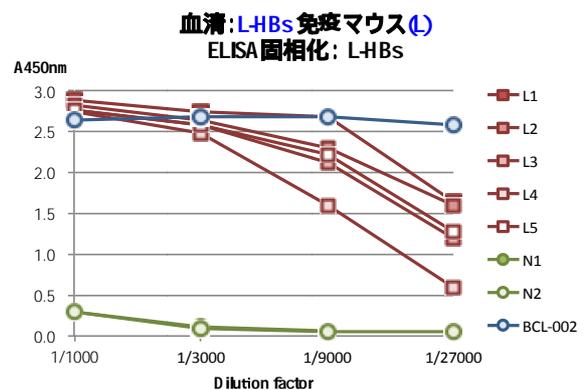
まず、マウスに対する免疫手法ならびに抗体価の測定方法を確立するために、ビームゲン(リコンビナント S-HBs タンパク質)を Balb/c マウスに免疫し、その免疫マウス血清を用いて抗 HBs 抗原抗体の ELISA 測定系の構築を行った。市販の各種抗 HBs 抗体(特殊免疫研究所・anti-HBs mAb: Hyb-824、Hyb-4111、Hyb-5124A、特殊免疫研究所・anti-Pre-S1 mAb: Hyb-T0606、Beacle・anti-Pre-S1 mAb-2: BCL-AB-002、など)のうち、陽性コントロールとして使用可能なものがあるかどうかを検討した結果、anti-HBs mAb (Hyb-824) や Pre-S1 mAb-2 (BCL-AB-002)などが十分な反応性を示し、陽性コントロールとして使用可能であることが分かった(図5)。またビームゲンに対する抗体価が上昇していることも観察された。これは従来からの知見通りであった。

ELISA & (HBs antigen recombinant protein, 227aa)



(図5) HBs 抗原抗体の ELISA 測定系の構築

次に、L-HBs 抗原(Beacle 社製)を 5 匹のマウスに免疫し、その抗体価の上昇を観察した。L-HBs 抗原に対する抗体価を測定したところ(図6)、いずれのマウスにおいても抗体価上昇を観察した。

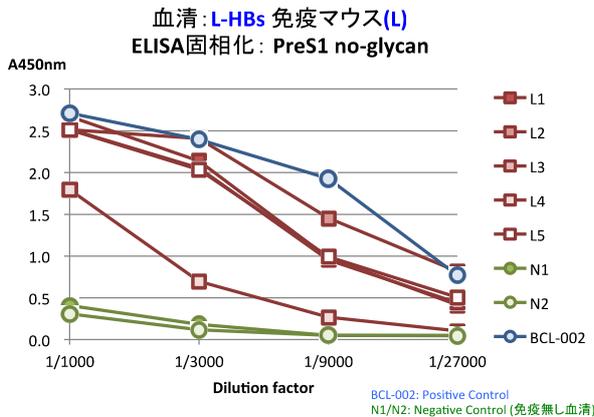


↑ (L) 群: Lの免疫で、L-HBs(免疫原)への反応を示す

(図6) L-HBs 抗原に対する抗体価測定

また、同免疫マウス血清を使用して、Pre-S1 ペプチドに対する反応を確認したところ、やはり同様にいずれのマウスにおいても抗体の反応を

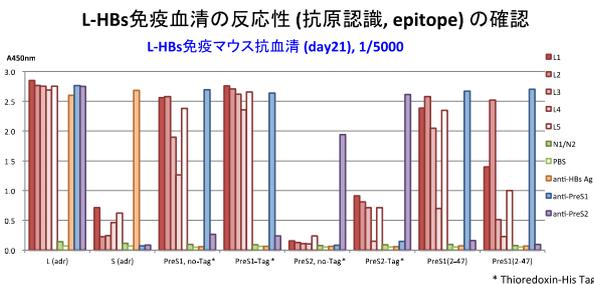
認めた（多少の個体差があった）（図 7）。



↑ (L) 群：L-HBsの免疫で、Pre-S1への反応性も良い

（図 7）Pre-S1 ペプチドに対する反応性

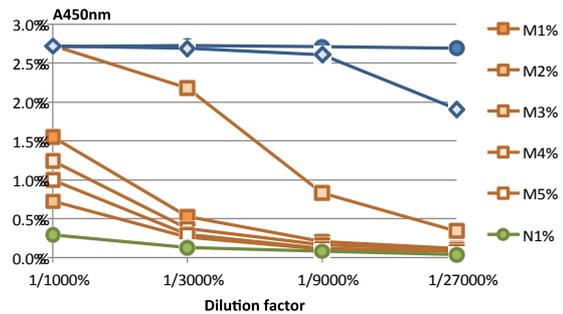
この L-HBs 免疫マウス血清を用いて、HBs 抗原における領域ごとの反応性を検討した（図 8）。その結果、L-HBs 免疫マウス抗血清での傾向としては、L-HBs (免疫原) は反応性良いこと、Pre-S1 領域が特に強く反応していること（つまり抗原性が高いことを意味すると考えられる）Pre-S1 領域に比べると弱い S 抗原や Pre-S2 領域でもちゃんと反応性が有ること、が明らかとなった。全ての領域で反応性が見られたことは、L-HBs 抗原のワクチンへの応用が有用であることを示していると考えられた。



（図 8）L-HBs 免疫血清の反応性の確認

次に、M-HBs 抗原(前述)を 5 匹のマウスに免疫し、その抗体価の上昇を観察した。M-HBs 抗原に対する抗体価を測定したところ（図 9）いずれのマウスにおいても抗体価上昇を観察した。

血清：M-HBs免疫マウス (M), day21
ELISA固相化：L-protein

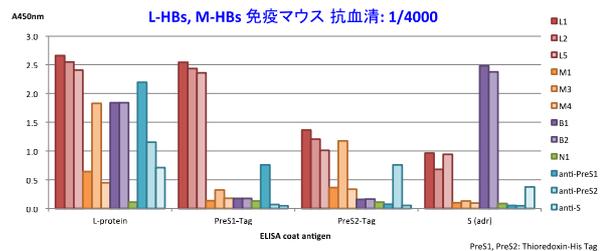


↑ (M)群：M&HBsの免疫で、Lproteinへの弱い反応有り

（図 9）M-HBs 抗原に対する抗体価測定

この M-HBs 免疫マウス血清を用いて、HBs 抗原における領域ごとの反応性を検討した（図 10）。その結果、M-HBs 免疫マウス抗血清での傾向として、M-HBs は前述の L-HBs と比較して抗体価が上がりやすく、マウスによってばらつきあるようであった。また、M-HBs は L-HBs 免疫に比べると、PreS2 に対する抗体価も低めであり、且つ、S-HBs に対する抗体価も L-HBs よりも低いことが明らかとなった。

M-HBs免疫血清の反応性 (抗原認識, epitope) の確認



（図 10）M-HBs 免疫血清の反応性の確認

現在、得られた L-HBs 免疫マウス血清あるいは M-HBs 免疫マウス血清を使用して、各種抗原に対する反応性について生化学的な解析を進めているところである。

D. 考察

（1）今回の結果では、酵母の菌体内から L-HBs 抗原が調製できることが確認された。超遠心の

条件等についてはほぼ確定したものの、一方で各工程後の PEG 沈で回収率を下げていることが示唆された。加えて超遠心後のサンプルの濃縮も重要であり、この工程でもロスが見られるため、今後クロスフローによる限外ろ過や透析、凍結乾燥の条件等も検討する必要がある。また大量調製のためには、培養条件と抽出条件の再検討が必要であるため、免疫実験の結果を見ながら今後改良を進めていく必要がある。なお得られた L-HBs については、H27 年度に免疫を行ない、抗原としての有効性を評価する予定である。

(2) 今回の結果から、37 KDa 付近にメインのバンドが観察され、さらに複数のタンパク質バンドも含まれていることがわかった。M-HBs は粒子状の構造を保持していることが考えられるが、免疫抗原としては問題ないと思われた。

(3) 糖転移反応後の精製において、産物の溶出時間がわからないのがひとつの課題である。すなわち HPLC 上で見られるピークの内、産物に対応するものがどれかを MS 解析して確認後、ピークの回収を行わなければならない。LC-MS などの活用も今後重要になると思われる。なお得られた糖ペプチドは免疫実験での抗体価の上昇の確認や、エピトープ決定、目的の抗体のスクリーニングなどにより利用される予定である。

(4) 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。

E. 結論

(1) 酵母での HBs 抗原 L-タンパク質(L-HBs)の調製法を検討し、L-HBs の調製を行なった。

得られた L-LBs は電気泳動場で均一であった。

(2) 動物培養細胞を用いた HBs 抗原 M-タンパク質(M-HBs)の調製を行なった。精製した M-HBs はメインのバンドと、さらに複数のタンパク質バンドも含まれていることが示唆されたが、免疫抗原としては問題ないと判断した。

(3) 化学-酵素ハイブリッド合成法を用いて、Pre-S1 領域、S-領域の糖鎖付加部位を含む部分領域について糖鎖構造を均一化した糖ペプチドの合成法を確立し、調製を行なった。

(4) (2) ~ (3) の糖タンパク質、糖ペプチドを用いてマウスへの免疫実験を行い、抗体生産能の評価を行なった。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 の反応が比較的良好であった。

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

特記すべき情報なし。

2. 学会発表

特記すべき情報なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

該当事項なし。

2. 実用新案登録

該当事項なし。

3. その他

該当事項なし。

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
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	59(5)	1726-37	2014
Kusumoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Ueda R.	Strategy for preventing hepatitis B reactivation in patients with resolved hepatitis B virus infection after rituximab-containing chemotherapy.	Hepatology	60(2)	765-6	2014
Kuno A, Matsuda A, Unno S, Tan B, Hirabayashi J, Narimatsu H.	Differential Glycan Analysis of an Endogenous Glycoprotein: Toward Clinical Implementation-From Sample Pretreatment to Data Standardization.	Methods Mol Biol	1200	265-85	2014
Korenaga M, Nishina S, Korenaga K, Tomiyama Y, Yoshioka N, Hara Y, Sasaki Y, Shimonaka Y, Hino K.	Branched-chain amino acids reduce hepatic iron accumulation and oxidative stress in hepatitis C virus polyprotein-expressing mice.	Liver Int	35(4)	1303-14	2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	2014
Abe M, Miyake T, Kuno A, Imai Y, Sawai Y, Hino K, Hara Y, Hige S, Sakamoto M, Yamada G, Kage M, Korenaga M, Hiasa Y, Mizokami M, Narimatsu H.	Association between Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein and the fibrosis stage of non-alcoholic fatty liver disease.	J Gastroenterol	[Epub ahead of print]		2014
Zou X, Chi X, Pan Y, Du D, Sun H, Matsuda A, Li W, Kuno A, Zhang X, Narimatsu H, Niu J, Zhang Y.	LecT-Hepa facilitates estimating treatment outcome during interferon therapy in chronic hepatitis C patients.	Clin Proteomics	11(1)	44	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
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 <i>Wisteria floribunda</i> agglutinin-positive Mac-2 binding protein (WFA+-M2BP), for assessing liver fibrosis.	J Gastroenterol	50(1)	76-84	2015
Tamaki N, Kurosaki M, Kuno A, Korenaga M, Togayachi A, Gotoh M, Nakakuki N, Takada H, Matsuda S, Hattori N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Mizokami M, Narimatsu H, Izumi N.	<i>Wisteria floribunda</i> agglutinin positive human Mac-2-binding protein as a predictor of hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients.	Hepatol Res	[Epub ahead of print]		2015
Totani H, Kusumoto S, Ishida T, Masuda A, Yoshida T, Ito A, Ri M, Komatsu H, Murakami S, Mizokami M, Ueda R, Niimi A, Inagaki H, Tanaka Y, Iida S.	Reactivation of hepatitis B virus (HBV) infection in adult T-cell leukemia-lymphoma patients with resolved HBV infection following systemic chemotherapy.	Int J Hematol	101(4)	398-404	2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hamada-Tsutsumi S, Iio E, Watanabe T, Murakami S, Isogawa M, Iijima S, Inoue T, Matsunami K, Tajiri K, Ozawa T, Kishi H, Muraguchi A, Joh T, Tanaka Y.	Validation of cross-genotype neutralization by hepatitis B virus-specific monoclonal antibodies by in vitro and in vivo infection.	PLoS One	10(2)	e0118062.	2015
Iijima S, Matsuura K, Watanabe T, Onomoto K, Fujita T, Ito K, Iio E, Miyaki T, Fujiwara K, Shinkai N, Kusakabe A, Endo M, Nojiri S, Joh T, Tanaka Y.	Influence of Genes Suppressing Interferon Effects in Peripheral Blood Mononuclear Cells during Triple Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis C.	PLoS One	10(2)	e0118000.	2015
Takahashi H, Ikeda M, Kumada T, Osaki Y, Kondo S, Kusumoto S, Ohkawa K, Nadano S, Furuse J, Kudo M, Ito K, Yokoyama M, Okusaka T, Shimoyama M, Mizokami M.	Multicenter cooperative case survey of hepatitis B virus reactivation by chemotherapeutic agents.	Hepatol Res	[Epub ahead of print]		2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujiyoshi M, Kuno A, Gotoh M, Fukai M, Yokoo H, Kamachi H, Kamiyama T, Korenaga M, Mizokami M, Narimatsu H, Taketomi A.	Clinicopathological characteristics and diagnostic performance of Wisteria floribunda agglutinin positive Mac-2-binding protein as a preoperative serum marker of liver fibrosis in hepatocellular carcinoma.	J Gastroenterol		[Epub ahead of print]	2015
Hirabayashi J, Kuno A, Tateno H.	Development and Applications of the Lectin Microarray.	Top Curr Chem		[Epub ahead of print]	2015