

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 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
2. 研究開発代表者： 成松 久（国立研究開発法人産業技術総合研究所）
3. 研究開発の成果

HBV 感染過程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を開発するために、5つの課題を設定し以下の研究成果（HBV の新規濃縮・検出法の開発、新規ターゲットの効果確認、HBs 抗原（ワクチン）の開発、HBs 抗原アレイの開発）を得た。

HBV（HBs 抗原）の糖鎖解析：B型肝炎患者血清のサブバイラルパーティクル（SVP）中の HBs 抗原を解析し、今年度は特に M-HBs の PreS2 領域の糖鎖付加部位の同定と N-結合型ならびに O-結合型糖鎖の構造を明らかにした。また、既存ワクチン接種後に樹立された抗体群で抗原決定基' a' を認識する抗体は、いずれも糖鎖付加が起こっている HBs 抗原には反応しにくいことが明らかとなった。さらに、糖鎖無しの HBs 抗原を認識する抗体を用いて、HBV 感染患者の血清収集を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、このレクチンを用い Dane 粒子と SVP を選別できる可能性を見出した。

HBV 感染可能細胞の解析、HBV-宿主細胞における糖鎖の役割：HBV 感染実験において HBV 上の糖鎖が感染効率に影響することが示唆されたことから、トランスクリプトーム解析によってリストアップした内在性レクチンについて、ヒト肝キメラマウス細胞と HBV を用いて siRNA スクリーニングを実施した。siRNA スクリーニングによって HBV 感染抑制の効果が認められた内在性レクチンの cDNA を3個以上クローニングし、作製した NTCP 発現 HuH7 細胞を用いて HBV 感染への影響を解析した。

糖鎖変異の HBV の増殖・感染能への影響：HBV 産生細胞を用いた糖鎖遺伝子 siRNA スクリーニングによって、HBs 抗原と HBV DNA を減少させる糖鎖遺伝子を同定することに成功した。siRNA#79（5-100 nM）は細胞増殖への影響や細胞毒性を示さず HBV 分泌を抑制したので、siRNA#79 をトランスフェクションした肝細胞のトランスクリプトーム解析を行い、off-target や副作用の有無を解析した。また、HBV に感染させたヒト肝キメラマウス細胞に siRNA#79 をトランスフェクションし HBV DNA が減少することを確認した。エンテカビル耐性 HBV 株にも siRNA#79 が有効であることも明らかとなった。

糖鎖修飾を受けた HBs 抗原の大量精製：ワクチン候補として出芽酵母での糖鎖付加型 L-HBs 抗原を産生し、菌体内からの抽出法と超遠心法による糖鎖付き HBs 抗原の精製法を確立した。また、トランスグライコシレーション法や酵素法などにより糖鎖付き抗原ペプチドを作製した。糖鎖付き PreS1 ペプチド、PreS2 ペプチド及び L-HBs や M-HBs を Balb/c マウスに免疫し、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結果、抗原反応性の異なるマウス血清を得た。さらに、異なる免疫源を摂取して得た B細胞を迅速スクリーニング法により単離して抗体 cDNA を取得した。また、本研究において免疫実験用に調製した各種 HBs 抗原をスポットしたアレイを作製し、HBs 抗体検出系を開発した。ワクチン接種者の血清や背景肝の異なる HBV 感染患者の血清を新規解析方法によって測定した所、S-HBs 抗原を用いた従来の測定法よりも高感度に抗 HBs 抗体を測定することが出来た。HBV 感染者における中和抗体のエピトープ部位の解析やアレイの応用法について検討している。

以上の結果から、ワクチンとしての効果的な接種法、中和抗体の獲得、新規創薬ターゲットの有効性や新規検出系の開発などが進展した。