

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 感染症実用化研究事業 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

(英語) Program on the Innovative Development and the Application of New Drugs for Hepatitis B

研究開発課題名：(日本語) 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

(英語) Medical application of glycotecnologies for functional analyses to Hepatitis B virus

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門 糖鎖技術研究グループ 総括研究主幹 成松 久

所属 役職 氏名：(英語) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, Glycoscience and Glycotecnology Research Group, Principal research manager, Hisashi Narimatsu

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) [1] HBV(HBs 抗原)の糖鎖解析

開発課題名：(英語) [1] Glycan structure analyses of Hepetitis B virus surface antigen, HBs

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所 研究グループ長 梶 裕之

所属 役職 氏名：(英語) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, Group Leader, Hiroyuki KAJI

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所

上級主任研究員 久野 敦

所属 役職 氏名： (英 語) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, Chief Senior Researcher, Atsushi Kuno

研究開発分担者 (日本語) 公立大学法人福島県立医科大学
講師 伊藤 浩美

所属 役職 氏名： (英 語) Public University Corporation Fukushima Medical University, Department of Biochemistry, Assistant Professor, Hiromi Ito

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人国立国際医療研究センター
研究プロジェクト長 溝上 雅史

所属 役職 氏名： (英 語) National Center for Global Health and Medicine. Director, Genome Medical Sciences Project, Masashi Mizokami

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人国立国際医療研究センター
肝疾患研修室長 是永 匡紹

所属 役職 氏名： (英 語) National Center for Global Health and Medicine. Chief, The Research Center for Hepatitis and Immunology, Masaaki Korenaga

分担研究 (日本語) [2] HBV 感染と比較糖鎖解析

開発課題名： (英 語) [2] Comparative analysis of glycosylation of host cells and HBV

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所
主任研究員 榎谷内 晶

所属 役職 氏名： (英 語) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, Senior Researcher, Akira Togayachi

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所
上級主任研究員 久野 敦

所属 役職 氏名： (英 語) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Chief Senior Researcher, Atsushi Kuno

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所
招聘研究員 安形 清彦

所属 役職 氏名： (英 語) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Invited Senior Researcher, Kiyohiko Angata

分担研究 (日本語) [3] HBV-宿主細胞間相互作用機構の解明

開発課題名: (英語) [3] Analysis of interaction mechanism between HBV and hepatic host cells

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所
主任研究員 舘野 浩章

所属 役職 氏名: (英語) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,
Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, Senior
Researcher, Hiroaki Tateno

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所
主任研究員 佐藤 隆

所属 役職 氏名: (英語) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,
Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, Senior
Researcher, Takashi Sato

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所
招聘研究員 安形 清彦

所属 役職 氏名: (英語) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,
Invited Senior Researcher, Kiyohiko Angata

研究開発分担者 (日本語) 公立大学法人名古屋市立大学
研究員 飯島 沙幸

所属 役職 氏名: (英語) Public university corporation of NAGOYA CITY UNIVERSITY,
Researcher, Sayuki Iijima

分担研究 (日本語) [4] 糖鎖変異のHBVの増殖・感染能への影響

開発課題名: (英語) [4] Effect of glycan alteration on HBV growth and infection

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所
招聘研究員 安形 清彦

所属 役職 氏名: (英語) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,
Invited Senior Researcher, Kiyohiko Angata

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所
主任研究員 榎谷内 晶

所属 役職 氏名: (英語) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Senior
Researcher, Akira Togayachi

研究開発分担者 (日本語) 愛知医科大学

教授 米田 政志

所属 役職 氏名: (英語) Department of Gastroenterology, Aichi Medical University School of Medicine, Professor, Masashi Yoneda

研究開発分担者 (日本語) 愛知医科大学

教授 伊藤 清顕

所属 役職 氏名: (英語) Department of Gastroenterology, Aichi Medical University School of Medicine, Professor, Kiyooki Ito

分担研究 (日本語) [5] 糖鎖修飾を受けた HBs 抗原の大量精製

開発課題名: (英語) [5] Large scale preparation of glycosylated HBs antigens

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所

上級主任研究員 千葉 靖典

所属 役職 氏名: (英語) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, Chief Senior Researcher, Yasunori Chiba

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所

主任研究員 桐谷内 晶

所属 役職 氏名: (英語) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Senior Researcher, Akira Togayachi

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所

主任研究員 佐藤 隆

所属 役職 氏名: (英語) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Senior Researcher, Takashi Sato

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所

上級主任研究員 久野 敦

所属 役職 氏名: (英語) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Chief Senior Researcher, Atsushi Kuno

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所

主任研究員 館野 浩章

所属 役職 氏名: (英語) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Senior Researcher, Hiroaki Tateno

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所

招聘研究員 安形 清彦

所属 役職 氏名: (英語) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,
Invited Senior Researcher, Kiyohiko Angata

研究開発分担者 (日本語) 公立大学法人富山大学

助教 田尻 和人

所属 役職 氏名: (英語) Toyama University Hospital, Third Department of Internal Medicine,
Assistant Professor, Kazuo Tajiri

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人国立国際医療研究センター

研究プロジェクト長 溝上 雅史

所属 役職 氏名: (英語) National Center for Global Health and Medicine. Director, Genome Medical
Sciences Project, Masashi Mizokami

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人国立国際医療研究センター

肝疾患研究室長 是永 匡紹

所属 役職 氏名: (英語) National Center for Global Health and Medicine. Chief, The Research
Center for Hepatitis and Immunology, Masaaki Korenaga

II. 成果の概要 (総括研究報告)

【和文】

本研究の目的は、肝疾患や B 型肝炎ウイルス(HBV)作製・感染実験の専門家と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 (補完的医工連携体制) により、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の開発を目指す事である。本目的のため 5 つの課題 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) 糖鎖変異の HBV の増殖・感染能への影響、5) 糖鎖修飾を受けた HBs 抗原の大量精製を実施し、以下の成果を得た。

1. HBV の糖鎖: HBV 感染者血清中の HBs 抗原を解析し、ワクチン開発の基礎情報となる L-HBs の PreS1 および PreS2 領域、M-HBs の PreS2 領域、S 領域における修飾、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 (産総研・福島医)。S, M, L-HBs には、占有率が異なる割合で N 型糖鎖や O 型糖鎖が結合していた。また、L や M-HBs の N' 末端の就職やアミノ酸配列と糖鎖修飾の関連についても情報を得る事ができた。これらの情報は本来の HBV により近い抗原を作製する以下の実験のために用いた。

2. HBV 感染と糖鎖: 一次肝細胞と肝がん細胞株の糖鎖関連遺伝子の発現を次世代シーケンサーでホールトランスクリプトーム解析し、糖鎖関連遺伝子や HBV 受容体候補分子などの発現を比較した。一次肝細胞については、継時的な変化も解析し、HBV 感染能と糖タンパク質の発現プロファイルを明らかにした (名市・産総研)。また、HBV 上の糖鎖と HBs 抗原を認識する抗体を用いて HBV を微量で検出する系の開発に成功し、感染性のある HBV 粒子 (Dane 粒子) とサブバイラルパーティクル (SVP) とを区別する方法を開発した (産総研・国際医セ)。

3. HBV-宿主細胞における糖鎖: NTCP など HBs 抗原を認識する受容体が幾つかクローニングされ、安定発現株が樹立されているが、感染可能な肝細胞と比較して HBV の感染効率を満足するものは得られていない。HBV をグリコシダーゼ処理することによって HBV 感染能が低下することから、糖鎖が HBV 感染時に認識される可能性が示唆された。トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析を基に、肝細胞に発現しているレクチン候補をリストアップした。これらの候補遺伝子の siRNA を用い HBV 感染スクリーニングによって、内在性レクチンの cDNA を 3 個以 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た。これらの候補遺伝子 cDNA を NTCP と共発現する HuH7 細胞を作成した (産総研・名古屋市)。

4. 糖鎖変異による HBV の増殖阻害: 新規創薬ターゲットを探索するために糖鎖関連遺伝子をスクリーニングし、HBV の増殖・分泌に影響する遺伝子を同定した。上記 2. の肝細胞で発現している糖鎖遺伝子情報を基に 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。これまでに 3 種の糖鎖関連遺伝子の siRNA で細胞増殖に影響せず HBV 増殖を阻害することが明らかとなった。HBV に感染させたヒト肝キメラマウス細胞でも、siRNA-X をトランスフェクションし、エンテカビルと同レベルで HBV 分泌を抑制した。また、エンテカビル耐性株を用いても、siRNA の効果が確認できたことから、siRNA-X が HBV 分泌阻害剤として有効であることが示された (愛知医・産総研、特許申請済み)。

5. 糖鎖付加型 HBs 抗原の応用: 現行のワクチン (糖鎖の付加されていない S-HBs 抗原) とは異なる新規ワクチン候補として、糖鎖付加型 L-HBs 抗原、M-HBs 抗原、ペプチド合成法によって作製した糖ペプチドを作製した。各種抗原に対する反応性を S-HBs 抗原と比較し、HBs 抗原のほぼ全域を認識する血清群の獲得に成功した。また、L-HBs 抗原と S-HBs 抗原の免疫により上昇する抗体価や抗体群の違いから、接種法の改良により少ない回数で広範囲の抗体を獲得する結果が得られる可能性が示された。これらの抗原が抗体価を上昇させるワクチン (抗原) として有効であることが確認できた。免疫で獲得した血清に HBV 感染阻害の効果を認めたため、この免疫マウス B 細胞より特異的抗体の cDNA (重鎖と軽鎖) を取得した (産総研・富山大)。この抗体をリコンビナントタンパク質として調製し、中和抗体として非常に有用であることを確認した (産総研・国際医セ)。また、上記 HBs 抗原をスポットしたアレイを作製し高感度 HBs 抗体検出系を開発し、感染者の血清中に PreS1 や PreS2 に対する抗体を検出することに成功した (産総研・国際医セ)。

以上により、HBV 上の糖鎖解析を基に HBV に対する新規ワクチン候補の導出、HBV 検出方法の開発、肝臓細胞のトランスクリプトーム解析から、siRNA スクリーニングを実施し、HBV の感染や増幅に関わる遺伝子の同定に成功し、創薬ターゲットの候補を見つけることができた。

【英文】

In this program, we established a collaborative team including expertise on hepatic diseases and hepatic virus B (HBV) and glyco biologist developing analytical methods for glycan structures and function of glycosylations. Our research aimed to reveal roles of glycan in HBV infection and develop new drugs against HBV. For this purpose, we tried 5 themes including 1) Glycan structure analyses of HBV (HBsAg), 2) Comparative analysis of glycosylation of host cells and HBV, 3) Analysis of interaction mechanism between HBV and hepatic host cells, 4) Effect of glycan alteration on HBV growth and infection, 5) Large scale preparation of glycosylated HBs antigens.

1. Glycans on HBV: To develop new HBV vaccines, we analyzed HBsAg purified from patients by mass spectrometry and collected information on the modification such as glycosylation. We identified

glycosylation sites and structures of N-glycans and O-glycans located in PreS1 in L-HBs, PreS2 in M-HBs, and S-HBs. The obtained information was used to generate HBsAg or HBs-peptides with glycans for immunization and antibody production.

2. Glycans and HBV infection: Whole transcriptome analysis using next-generation sequencing was applied to find different expression of glycogenes and candidate receptors for HBV. As primary human hepatic cells grew, they changed expression of glycoproteins and lost susceptibility to HBV infection. We also succeeded to develop an HBV detection method using recognizing molecules for HBsAg and its glycosylation, which can distinguish Dane particles and sub-viral particles (SVP).

3. Roles of glycans in HBV-host cells interaction: Although NTCP has been found as a candidate as an HBV receptor, it has been suggested other receptor molecules to enhance incorporation of HBV into hepatic cells. Since glycans and lectins are involved in many pathogen infections for human being, glycans on HBV was removed and accessed for ability of infection. Glycosidase treatment reduced HBV infection into primary hepatic (PHH) cells, suggesting that glycans on HBV are recognized by intrinsic lectin molecule(s) expressed by PHH cells. We made siRNAs for the candidate molecules selected from the data of whole transcriptome analysis, and several siRNA could reduce HBV infection.

4. Growth inhibition of HBV by changing glycosylation: We have investigated the effects of various siRNAs targeting glycogenes on HBV replication by using an siRNA screening panel. The siRNA screening panel included 86 siRNA mixtures that could knock down each specific glycogene. Some siRNAs inhibited the secretion of HBV in the culture supernatant and reduced the titer of HBV DNA as well as HBsAg levels in the culture supernatant without cellular toxicity. This siRNA also worked for mutated HBV resistant to entecavir, indicating its usefulness as an inhibitor effective to HBV with mutations.

5. Application of HBsAg with glycosylation: Current HBV vaccine is produced in yeast and does not contain glycans. According to the evidences obtained above “1”, we designed glycosylated HBsAg and glyco-peptides to use as antigens. We could prepare serum recognizing all L, M, S-HBsAg and also found difference of antigenicity of each glycoprotein compared to S-HBsAg, indicating that use of different HBsAg for immunization has a benefit to generate effective antiserum against HBV. Importantly, antiserum showed strong inhibition activity for HBV infection. We successfully cloned cDNAs of the antibodies and confirmed that the produced recombinant antibodies neutralized HBV infection into PHH cells.

Taken together, we proposed future vaccine based on the results of glycoproteome of HBsAg, developed detection method of HBV using specific molecules for glycan and HBsAg, and found new targets inhibiting HBV secretion and infection from the studies of whole transcriptome and siRNA-screening.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 2件、国際誌 5件）

1. Shoji H, Yoshio S, Mano Y, Kumagai E, Sugiyama M, Korenaga M, Arai T, Itokawa N, Atsukawa M, Aikata H, Hyogo H, Chayama K, Ohashi T, Ito K, Yoneda M, Nozaki Y, Kawaguchi T, Torimura T, Abe M, Hiasa Y, Fukai M, Kamiyama T, Taketomi A, Mizokami M, Kanto T. Interleukin-34 as a fibroblast-derived marker of liver fibrosis in patients with

- non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep.* 2016 Jul 1;6:28814.
2. Kumagai E, Mano Y, Yoshio S, Shoji H, Sugiyama M, Korenaga M, Ishida T, Arai T, Itokawa N, Atsukawa M, Hyogo H, Chayama K, Ohashi T, Ito K, Yoneda M, Kawaguchi T, Torimura T, Nozaki Y, Watanabe S, Mizokami M, Kanto T. Serum YKL-40 as a marker of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep.* 2016 Oct 14;6:35282. doi: 10.1038/srep35282.
 3. 是永匡紹, 溝上雅史 【臨床応用を見据えた肝線維化研究の新展開】 診断 M2BPGi 測定と肝線維化 肝・胆・膵. 74:55-63. 2017.
 4. 田中靖人, 飯島沙幸. II 知っておきたいC型肝炎とC型肝炎ウイルス (HCV), 南山堂, 2016, 48-69.
 5. Murakawa M, Asahina Y, Kawai-Kitahata F, Nakagawa M, Nitta S, Otani S, Nagata H, Kaneko S, Asano Y, Tsunoda T, Miyoshi M, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tanaka Y, Iijima S, Tsuchiya K, Izumi N, Tohda S, Watanabe M. Hepatic IFNL4 expression is associated with non-response to interferon-based therapy through the regulation of basal interferon-stimulated gene expression in chronic hepatitis C patients. *J Med Virol.* 2017, 89: 1241-1247
 6. Baudi I, Iijima S, Chin'ombe N, Mtapuri-Zinyowera S, Murakami S, Isogawa M, Hachiya A, Iwatani Y, Tanaka Y. Molecular epidemiology of co-infection with hepatitis B virus and human immunodeficiency virus (HIV) among adult patients in Harare, Zimbabwe. *J Med Virol.* 2017, 89, 257-66.
 7. Tajiri K, Shimizu Y. New horizon for radical cure of chronic hepatitis B virus infection. *World Journal of Hepatology* 2017: 8(21), 863-73.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Real world のレジパスビル・ソホスブビル 口頭, 是永匡紹、是永圭子、溝上雅史, 第 20 回肝臓学会大会 (JDDW2016), 2016/11/3, 国内
2. Serum Levels of Wisteria Floribunda Agglutinin-Positive Mac-2 Binding Protein as a Time-Dependent Predictor of Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis C Patients. ポスター, Chia-Lin Chang, Mei-Hsuan Lee, Hui-Han Hu, Jessica Liu, Chin-Lan Jen, Chien-Yu Su, Sheng-Nan Lu, Li-Yu Wang, Masaaki Korenaga, Masashi Mizokami, Chien-Jen Chen, Hwai-I Yang., AASLD2016 (アメリカ肝臓病学会), 2016/11/12, 国外
3. WFA+-M2BP as a predictor of hepatocellular carcinoma in individuals who were seronegative for both HBV surface antigen and anti-HCV antibody. ポスター, Hui-Han Hu, Chia-Lin Chang, Jessica Liu, Chin-Lan Jen, Wen-Sheng Luo, Yu-Ling Lin, Chien-Yu Su, Cheng-Ze Jiang, Mei-Hsuan Lee, Sheng-Nan Lu, Li-Yu Wang, Masaaki Korenaga, Masashi Mizokami, Chien-Jen Chen, Hwai-I Yang., AASLD2016 (アメリカ肝臓病学会), 2016/11/11, 国外
4. Development of Novel Anti-viral Agents against Hepatitis B Virus by using an siRNA Screening Panel Targeting the Carbohydrate Synthesis System., Ito K, Yoneda M, Angata K, Watashi K, Wakita T, Iijima S, Tanaka Y, Tong S, Mizokami M, Narimatsu H, APDW 2016, Kobe, Japan, November, 2016., 国内

5. Development of Novel Anti-viral Agents against Hepatitis B Virus by using an siRNA Screening Panel Targeting the Carbohydrate Synthesis System., Ito K, Yoneda M, Angata K, Watashi K, Wakita T, Iijima S, Tanaka Y, Tong S, Mizokami M, Narimatsu H, 2016 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Seoul, Korea, September, 2016, 国外
6. Mechanisms of Interaction between Host Glycosylation System and Hepatitis B Virus Replication System. Ito K, Yoneda M, Angata K, Watashi K, Wakita T, Iijima S, Tanaka Y, Tong S, Mizokami M, Narimatsu H, The 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Tokyo, Japan, February, 2016, 国内
7. 糖鎖機能を標的とした B 型肝炎ウイルス排除に向けた取り組み 口頭 伊藤清頭、米田政志 第 102 回日本消化器病学会総会, パネルディスカッション, 東京, 2016 年 4 月, 国内
8. 遺伝子型の異なる B 型肝炎ウイルス株に対するワクチン免疫後中和抗体の感染防御能の検討, 一般演題, 堤進, 飯尾悦子, 渡邊綱正, 村上周子, 五十川正記, 飯島沙幸, 井上貴子, 松波加代子, 田尻和人, 小澤龍彦, 田中靖人, 第 26 回抗ウイルス療法学会総会, 2016/5/13, 国内.
9. Hepatocellular carcinoma-associated core N51H mutation with BCP PC mutations in HBV genotype Flb enhances infectivity and up-regulates C-Myc and GAB2, Poster Sessions, Hayashi S, Khan AA, Ogawa K, Kawashima K, Simons-Petrusa B, Homan CE, McMahon BJ, Murakami S, Iijima S, Isogawa M, Watanabe T, Tanaka Y, The 67th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases(AASLD2016), 2016/11/11, 国外.
10. Use of whole transcriptome analysis to determine glyco gene expression in hepatic cells. ポスター, Angata, K., Sawaki, H., Tsujikawa, S., Ocho, M., Togayachi, A., and Narimatsu, H. The 6th Charles Warren Workshop 2016, Sapporo, Japan, Aug. 2016. , 国内
11. Analyses of glyco gene expression by RNA sequencing to determine the different glycan synthesis. 口頭 Kiyohiko Angata, Shigeko Tsujikawa, Takashi Sato, Akira Togayachi, and Hisashi Narimatsu. The 8th ACGG conference, Wuxi (China), 2016/10/15, 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
特になし

(4) 特許出願