

機関番号：82609

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20200067

研究課題名（和文） C型肝炎ウイルス複製におけるスフィンゴ脂質の役割と動態変化・恒常性維持機構の解析

研究課題名（英文） The role of sphingolipids in hepatitis C virus replication and its alteration of sphingolipids metabolism.

研究代表者

平田 雄一（HIRATA YUICHI）

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・研究員

研究者番号：50439452

研究成果の概要（和文）：ヒト肝臓型キメラマウスを使用し、C型肝炎ウイルス(HCV)感染、スフィンゴ脂質合成阻害剤の処置の際の肝臓内脂質変化をLC/MSにより比較解析することで、HCVが感染することでスフィンゴ脂質代謝が亢進すること明らかにした、さらには、HCV複製に必要不可欠なスフィンゴミエリン分子種を同定し、これらスフィンゴミエリン分子種がウイルス

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that HCV altered sphingolipids metabolism, performing the analysis, using MS spectrometer, of the sphingolipids content in uninfected humanized chimeric mice, HCV infected chimeric mice, and HCV infected chimeric mice treated with the inhibitor of sphingolipids biosynthesis. Furthermore, specific sphingomyelin molecular species contributed to HCV replication, and these sphingomyelin molecular species activated the polymerase of HCV.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2009年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2010年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
総計	23,900,000	7,170,000	31,070,000

研究分野：医歯薬学・生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・生物科学

キーワード：分子・生体膜

1. 研究開始当初の背景

従来、スフィンゴ脂質は生体膜を構成する重要な要素として考えられてきた。しかし、近年、ノックアウトマウスを使った解析や細胞変異体の単離・解析などから、スフィンゴ脂質は細胞の分化・成長、アポトーシスにかかわる重要な構成要素であることが判明している。

そのような中で、我々はC型肝炎ウイルス(HCV)においてスフィンゴ脂質の一つであるスフィンゴミエリンが脂質ラフト上でHCV蛋白と結合し、ウイルスの複製にかかわっていることを世界に先駆けて報告した(Sakamoto et. al. Nat. Chem. Biol. 2005)。この結果は、HCVの複製やウイルス蛋白質を媒体とすることで、脂質機能の解析を行うことができる事を示していた。

脂質研究においては、脂質の扱いの難しさや解析系の制限などからその研究は難しいとされているが、我々はHCVを通してスフィンゴ脂質機能を解析することでスフィンゴ脂質における細胞内での新たな機能及び動態変化

白と結合し、ウイルスの複製にかかわっていることを世界に先駆けて報告した(Sakamoto et. al. Nat. Chem. Biol. 2005)。この結果は、HCVの複製やウイルス蛋白質を媒体とすることで、脂質機能の解析を行うことができる事を示していた。

と恒常性維持機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、C型肝炎ウイルスとスフィンゴ脂質の相互作用を利用することにより、スフィンゴ脂質の新たな機能及びスフィンゴ脂質の動態変化と恒常性維持機構の解析を行うことを目的とした。具体的には、1) HCV複製に関わるスフィンゴミエリン分子種及びスフィンゴ糖脂質を同定し、それらがどのように関わっているのか、2) どのように細胞内を移動しC型肝炎ウイルス複製の場(=脂質ラフト)を形成していくのか、3) HCV感染によるスフィンゴ脂質の動態変化と恒常性維持機構を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

HCVレプリコン細胞にスフィンゴ脂質合成経路における各種の阻害剤及び合成酵素阻害剤に対するsiRNAによるノックダウンを行うことによりHCV複製に必要なスフィンゴ脂質を同定した。

次に、上記解析でHCV複製に影響を与えたスフィンゴ脂質の阻害剤をHCVレプリコン細胞に投与し、その際の脂質動態の変化をLC/MSを使用し解析した。さらに人体にもっとも近いin vivo実験系であるHCV感染ヒト肝臓キメラマウスに上記阻害剤を投与し、RTD-PCRによるウイルス定量およびLC/MSを使用し脂質解析により、抗HCV効果と脂質動態の変化を分子種レベルで解析した。また、非感染キメラマウスとHCV感染キメラマウスLC/MSを使用して比較解析することでHCV感染によるスフィンゴ脂質の動態変化と恒常性維持機構を解析した。

以上の結果を踏まえたうえで、HCV複製に必要と判断された脂質とHCV蛋白質との関係をin vitroの実験系を構築し解析した。

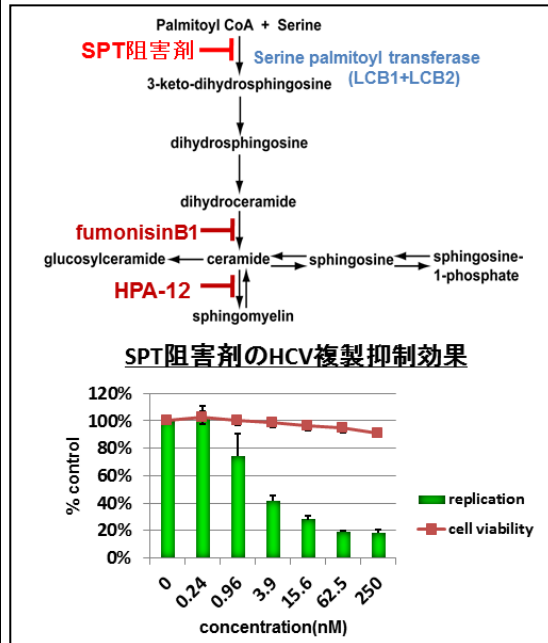
4. 研究成果

HCVレプリコン細胞に、スフィンゴ脂質合成経路の各種阻害剤であるセリンパルミトイルトランスフェラーゼ(SPT)阻害剤、fumonisin B1, HPA-12を投薬することにより、HCV複製は抑制されることを見出した。また、この結果はsiRNAを使用したノックダウンでも同様であった。このことは、これら薬剤が共通して影響を与えるスフィンゴミエリンがHCVの複製に必須であることを示している。

他方で、グルコシルセラミド合成酵素をノックダウンした場合でもHCV複製は抑制された。これはグルコシルセラミドやその下流産物であるラクトシルセラミドが複製に寄与していることを示している。そこで、これら脂質を補充することでHCV複製がレスキューされるかを検討したところ、グルコシルセラミドではHCV複製能は回復するもののそれ以外

では回復しなかった。このことは、グルコシルセラミドが複製に寄与していることを示していた。以上の結果から、我々はHCV複製に必須のスフィンゴ脂質としてスフィンゴミエリン、グルコシルセラミドを同定した。

図1. スフィンゴ脂質合成経路とSPT阻害剤のHCV複製抑制効果



つぎに、これらの脂質を共に抑制するSPT阻害剤をHCVレプリコン細胞に投与した際の脂質変化を解析した。まず、ラジオアイソトープを使用した解析を行ったところ、両脂質は投薬により減少した。また、これら脂質がHCV複製複合体が存在する界面活性剤不溶性分画で減少しているかを解析したところ、投薬により減少していた。上記結果は、HCV複製複合体において、これら脂質がHCV複製に寄与していることを示していた。

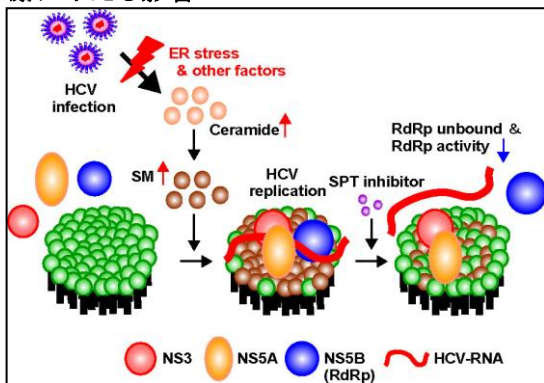
そこで我々は、分子種レベルで解析を行うため、投薬した際の脂質変化をLC/MSを使用して行うこととした。その結果、肝細胞において4種のスフィンゴミエリン分子種を同定し、これら分子種が投薬により減少することを見出した。さらにin vivo実験系であるHCV感染ヒト肝臓キメラマウスにSPT阻害剤を投与し、RTD-PCRによるウイルス定量およびLC/MSを使用し脂質解析により、抗HCV効果と脂質動態の変化を分子種レベルで解析したところ、特定のスフィンゴミエリン分子種の減少と抗ウイルス効果が強く相関することを見出した。

今回、LC/MSを使用した解析から得られた特定のスフィンゴミエリン分子種とHCV複製の関係がどのようなものかを解析するため、in vitroの解析を行った。我々は、すでにスフィンゴミエリンがRNA dependent RNA polymeraseであるHCV-NS5B蛋白質結合する

ことを既に報告していたが、さらにスフィンゴミエリンが RNA dependent RNA polymerase を活性化することを見出した。そこで、スフィンゴミエリン各種分子種と HCV-NS5B の関係を解析したところ、これら分子種は HCV NS5B により強く結合し、またより強く活性化させることを見出した。以上から、これらスフィンゴ脂質は HCV 複製の場を形成するだけでなく、より積極的に HCV 複製を促進していることが明らかとなった。

最後に、非感染キメラマウスと感染キメラマウスでのスフィンゴ脂質の動態を解析した、すると感染キメラマウスでは、非感染キメラマウスに比べ、肝臓ではスフィンゴミエリン合成酵素の mRNA が更新していること、さらに LC/MS の結果からスフィンゴミエリンが増加していることを見出した。分子種レベルの解析では、上記抗ウイルス効果と強く関連した特定のスフィンゴミエリン分子種も増加していた。このことは、スフィンゴ脂質のメタボリズムが HCV の感染によって自己の生存環境を整えるかのように変化していることを示していた。

図 2. C 型肝炎ウイルスがスフィンゴ脂質代謝に与える影響



今回我々は、LC/MS を使用することで、HCV 感染によりスフィンゴ脂質代謝が亢進することを明らかにした。さらには、代謝亢進により増加したスフィンゴミエリンの特定の分子種が RNA dependent RNA polymerase に結合し脂質ラフト上で安定化させ、さらには活性化させることで HCV 複製に寄与していることを見出した。これらの結果は、HCV の複製機構の一端を明らかにすると共に、スフィンゴ脂質合成阻害剤が HCV に対する治療薬として有望であることを示している。今後、HCV が細胞内のどのような機構を利用しスフィンゴ脂質代謝を亢進させているのか、これら脂質がどのような機構で複製の場となる特殊な膜を形成しているのかを検討する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕 (計 9 件)

(1) 研究代表者

- ① Weng L., Hirata Y., Arai M., Kohara M., Wakita T., Watashi K., Shimotohno K., He Y., Zhong J., Toyoda T. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype specific manner. J Virol., 査読あり, 2010, 84(22), 11761-70.
 - ② Hirata Y., Sudoh M., Kohara M. Suppression of hepatitis C virus (HCV) with serine palmitoyltransferase inhibitor. Yakugaku Zasshi, 査読なし, 2010, 130(2), 157-61.
 - ③ 平田雄一、小原道法: スフィンゴ脂質合成阻害薬の C 型肝炎ウイルスに対する薬理作用 肝胆膵、査読なし、2010、61 (増刊号)、216-222
 - ④ Takano T., Tsukiyama-Kohara K., Hayashi M., Hirata Y., Satoh M., Tateno C., Hayashi Y., Hishima T., Funata N., Sudo M., Kohara M. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. J. Hepatology, 査読あり, 2010, in press
 - ⑤ Amako Y., Tsukiyama-Kohara K., Katsume A., Hirata Y., Sekiguchi S., Tobita Y., Hayashi Y., Hishima T., Funata N., Yonekawa .H, Kohara M. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in Tupaia belangeri. J Virol., 査読あり, 2010, 84(1), 303-11.
 - ⑥ Nishimura T., Kohara M., Izumi K., Kasama Y., Hirata Y., Huang Y., Shuda M., Mukaidani C., Takano T., Tokunaga Y., Nuriya H., Satoh M., Saito M., Kai C., Tsukiyama-Kohara K. Hepatitis C virus impairs p53 via persistent overexpression of 3beta-hydroxysterol Delta24-reductase. J Biol Chem, 査読あり, 2009, 284(52), 36442-52.
 - ⑦ Hirata Y., Sudoh M., Kohara M. Suppression of hepatitis C virus with the reagent targeting host factors. Uirusu, 査読なし, 2008, 58(2), 207-13.
- (2) 研究分担者
- ① Machida K., Tsukiyama-Kohara K., Sekiguchi S., Seike E., Tone S., Hayashi Y., Kasama Y., Shimizu M., Takahashi H., Taya C., Yonekawa H.,

Tanaka N. and Kohara M. : Disruption of IFN signaling and HCV synergistically enhance lymphoproliferation through type II CD95 and interleukins. Gastroenterology, 査読あり, 2009, 137(1), 285-296

- ② 関口敏、飛田良美、小原道法 : 「C 型肝炎ウイルスの持続感染機構と病原性」
メディカル・サイエンス・ダイジェスト、
査読なし、2009、35 (6) 、14-17

〔学会発表〕 (計 24 件)

(1) 研究代表者

- ① Hirata Y., Nakagawa S., Tokunaga Y., Tanaka Y., Mizokami M., Inoue K., Kohara M. A Interferon lambda plays a critical role on antiviral response by hepatotropic inducer of innate immunity in human hepatocyte. The 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Disease, 2010. 10. 29-11. 2, Boston, USA
- ② 平田雄一、須藤正幸、小原道法 : スフィンゴ脂質合成阻害剤の抗 HCV 薬理作用
第 18 回 消化器病学会 関連週間 (JDDW2010)、2010. 10. 13-16、横浜
- ③ 平田雄一、井上和明、小原道法 : IFN λ を強力に誘導する核酸/リボソーム製剤の同定とその抗 HCV 効果
第 18 回 消化器病学会 関連週間 (JDDW2010)、2010. 10. 13-16、横浜
- ④ Hirata Y., Sudoh M., Tokunaga Y., Tobita Y., and Kohara M. : A newly synthesized serine palmitoyltransferase inhibitor, NA808, has a robust antiviral effect to hepatitis C virus via hindering host-virus interactions. The 17th International Meeting on Hepatitis C virus and related viruses, 2010. 9. 10-14, Yokohama
- ⑤ Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Taguchi R., Kohara M. : Hepatitis C virus altered the sphingolipids metabolism for better environment on its replication. KEYSTONE SYMPOSIA Bioactive Lipids, 2010. 6. 6-11, Kyoto
- ⑥ Hirata Y., Sudoh M., Tokunaga Y., Tobita Y., and Kohara M. : A newly synthesized serine palmitoyltransferase inhibitor, NA808, has a robust antiviral effect to hepatitis C virus via hindering host-virus interactions. 第 32 回日本分子生物学会、2009. 12. 9-12、横浜
- ⑦ Hirata Y., Sudoh M., Tokunaga Y., Tobita Y., and Kohara M. : A newly synthesized serine palmitoyltransferase inhibitor, NA808, has a robust antiviral effect to hepatitis C virus via hindering host-virus interactions. 60th Annual Meeting of the American Association for the study of the liver disease., 2009. 10. 30-11. 3, Boston, USA
- ⑧ 平田雄一、須藤正幸、池田和貴、徳永優子、飛田良美、田口良、小原道法 : 新規 SPT 阻害剤 NA808 の抗 HCV 効果. 第 57 回 ウイルス学会、2009. 10. 25-27、東京
- ⑨ Hirata Y., Sudoh M., Tokunaga Y., Tobita Y., Tsukuda T., Kohara M. : NA 808 has the strong effect to hepatitis C virus and in vivo. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses, 2009. 10. 3-7. Nice, France
- ⑩ Hirata Y., Sudoh M., Tsukuda T., Ikeda K., Taguchi R., and Kohara M. A newly synthesized serine palmitoyltransferase inhibitor, NA808, has the strong effect to hepatitis C virus *in vitro* and *in vivo*. 44th Annual Meeting of the European Association for the study of the liver, 2009. 4. 22-26, Copenhagen, Denmark
- ⑪ 平田雄一、池田和貴、須藤正幸、榎原琢也、飛田良美、田口良、小原道法 : スフィンゴミエリンは C 型肝炎ウイルス複製に必要な脂質成分である. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008. 12. 9-12、神戸
- ⑫ 平田雄一、須藤正幸、池田和貴、榎原琢也、飛田良美、田口良、小原道法 : SPT 阻害剤による HCV 複製阻害機序の解析. 第 56 回 ウイルス学会 学術集会、2008. 10. 26-28、岡山
- ⑬ 平田雄一、須藤正幸、小原道法 : セリンパルミトリルトランスフェラーゼ (SPT) 阻害剤の *in vitro* 及び *in vivo* における HCV 複製抑制効果の検討. 第 16 回日本消化器病学会 関連週間 (JDDW2008)、2008、東京
- ⑭ Hirata Y., Umehara T., Sudoh M. Kohara M. : Serine palmitoyltransferase inhibitor suppresses HCV replication in a mouse model. XIV International Congress of Virology 2008. 8. 10 -15 Istanbul
- ⑮ Hirata Y. Umehara T., Sudoh M., Yasui F., Kohara M. : Serine

Palmitoyltransferase Inhibitor Suppresses HCV Replication in a Mouse Model. 21th International Conference on Antiviral Research 2008. 4.13-17 Montreal

(2)研究分担者

- ① 棟方 翼、野本明男、小原道法：脂肪酸合成酵素を介したパルミチン酸による C 型肝炎ウイルスの複製制御 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010.11.7-9 徳島
- ② Munakata T., Nomoto A., Kohara M. : Palmitate regulates HCV replication. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2010.9.10-14. 横浜
- ③ Yasui F., Sudoh M., Kohara M. : Synthetic lipophilic antioxidant BO-653 suppresses HCV replication. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2010.9.10-14. 横浜
- ④ Munakata T., Inada M., Nomoto A., Kohara M. : Interphase cyclin-dependent kinases regulate hepatitis C virus replication. 第 32 回日本分子生物学会 2009.12.12 横浜
- ⑤ Munakata T., Inada M., Nomoto A., Kohara M. : サイクリン依存性リン酸化酵素阻害剤による C 型肝炎ウイルスの複製制御 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009.10.26 東京
- ⑥ Munakata T., Inada M., Nomoto A., Kohara M. : Anti-hepatitis C virus activity of cyclin-dependent kinase inhibitors. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses 2009.10.3-7. Nice, France
- ⑦ 関口 敏、千代智子、飛田良美、松原明弘、保富康宏、水野喬介、村井 深、小原道法：HCV 遺伝子組換えワクチニアウイルスの治療ワクチン効果 第 12 回日本ワクチン学会学術集会 2008.11.8-9 熊本
- ⑧ 関口 敏、飛田良美、千代智子、小原道法：新規 HCV 持続感染モデルマウスの作製とその病態解析 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008.10.26-28 岡山
- ⑨ Sekiguchi S., Tobita Y., Kohara M. : Persistent infection of Hepatitis C virus to get over the acquired immunity system 第 8 回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2008.9.7-11 兵庫

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

平田 雄一 (HIRATA YUICHI)
財団法人東京都医学研究機構・
東京都臨床医学総合研究所・研究員
研究者番号：50439452

(2)研究分担者

安井 文彦 (YASUI FUMIHIKO)
財団法人東京都医学研究機構・
東京都臨床医学総合研究所・研究員
研究者番号：40399473

棟方 翼 (MUNAKATA TSUBASA)
財団法人東京都医学研究機構・
東京都臨床医学総合研究所・研究員
研究者番号：50420237
(2009 年度-2010 年度)

関口 敏 (SEKIGUCHI SATOSHI)
財団法人東京都医学研究機構・
東京都臨床医学総合研究所・研究員
研究者番号：10462780
(2008 年度-2009 年度)

(3)連携研究者

小原 道法 (KOHARA MICHINORI)
財団法人東京都医学研究機構・
東京都臨床医学総合研究所・参事研究員
研究者番号：10250218

田口 良 (TAGUCHI RYO)
東京大学・医学 (系) 研究科 (研究院) ・
客員教授
研究者番号：20080210