

平成 22 年 6 月 2 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790715

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重要性

研究課題名（英文）The importance of sphingolipids in Hepatitis C virus replication

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）：C型肝炎ウイルス(HCV)は、脂質ラフトで複製することが報告されている。我々は、脂質ラフトを構成するとされているスフィンゴミエリンが RNA dependent RNA polymerase である HCV-NS5B と結合することで複製に寄与することを報告した。今回我々は、スフィンゴミエリンだけでなく他のスフィンゴ脂質も HCV 複製に寄与することを見出した。さらに、これらスフィンゴ脂質が HCV-NS5B と結合するだけでなく、積極的に機能を亢進させることを明らかにした。また、ヒト肝臓型キメラマウスを使用した *in vivo* における実験系でも、抗 HCV 効果に比例してスフィンゴ脂質の減少を認め、HCV 複製にスフィンゴ脂質が重要であることを示した。以上の結果は、スフィンゴ脂質が抗 HCV 薬の有望な標的であることを示しており、新規薬剤の開発につながることを期待された。

研究成果の概要（英文）：It is reported that hepatitis C virus (HCV) replicated on the lipid raft. We previously demonstrated that sphingomyelin contributed to HCV replication via binding HCV-NS5B (RNA dependent RNA polymerase). Here, we found that other sphingolipids contributed to HCV replication as well as sphingomyelin. Furthermore, we showed that sphingolipids activated RNA dependent RNA polymerase as well as bound it. Using chimeric mice with humanized livers infected by HCV, we also demonstrated that antiviral effect by SPT inhibitor is correlative to the reduction of sphingolipids in the treated chimeric mice liver, indicating that sphingolipids is essential to HCV replication *in vivo*. These findings will lead to the development of novel drugs to HCV.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 感染症内科学

キーワード：スフィンゴ脂質、C型肝炎ウイルス、SPT阻害剤、抗HCV剤

## 1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)は感染すると高率に慢性化し、やがて肝硬変に至り肝細胞癌の高リスク群となる。近年、ペグインターフェロン (Pegylated interferon: PEG-IFN) 及びリバビリン(Ribavirin) 併用療法の登場により、治療効果は向上した。しかしながら、同療法であっても、本邦で最も多いとされる genotype 1b 高ウイルス量のC型肝炎患者では約半数は治癒することができない。さらには PEG-IFN+Ribavirin による治療は血球減少をはじめとした副作用を伴い、高齢者の患者が多いとされる本邦では治療の完遂そのものが難しいことがある。

このため、より副作用の少ない効果的な薬剤が求められており、現在多くの新薬の臨床試験が行われている。これらの薬剤の多くはウイルス因子を標的としているため、耐性株出現の問題や genotype の違いにより効果が減弱するなどの問題点が指摘されている。

我々は、以前よりウイルスがその生活環で利用する宿主因子に着目し、これらを標的とした阻害剤のスクリーニングから、スフィンゴミエリンというスフィンゴ脂質の1つがウイルス複製の場である脂質ラフトにおいて、ウイルス複製に関与していることを見出し報告した。さらに、我々はスフィンゴミエリン以外のスフィンゴ脂質がHCV複製に関与している知見を得ていた。しかしながら、スフィンゴミエリンをはじめとしたスフィンゴ脂質がどのように複製複合体を形成するのか、複製複合体はどのような脂質成分で構成されるのかは不明な点が多かった。

## 2. 研究の目的

そこで我々は、これまでに我々が樹立したHCVレプリコン細胞やヒト肝臓型キメラマウスといった *in vitro* および *in vivo* のHCV複製系を利用し、スフィンゴ脂質合成の際に必要な各種酵素、輸送蛋白質などに対する阻害剤及び siRNA を使用してウイルス複製に与える影響、脂質動態の変化と脂質ラフトへの影響を解析する。これにより、HCV複製に必要な脂質成分を同定し、複製複合体の構造とHCV複製複合体の形成過程を明らかにすることを目的とした。

## 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する。

次に、すでにHCV複製に関与することを明らかにしたスフィンゴミエリンの阻害剤や上記解析でHCV複製に必要なと定されたスフィンゴ脂質の阻害剤を、投与した際の脂質動態の変化をLC/MSを使用し解析する。

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投与することにより、抗HCV効果と脂質動態の変化を解析する。

以上の結果を踏まえたうえで、HCV複製に必要なと判断された脂質とHCV蛋白質との関係を免疫沈降法や蛍光染色法等を使用して明らかにする。

## 4. 研究成果

HCVレプリコン細胞において、スフィンゴ脂質合成酵素の発現プラスミドを使用した強制発現系や、siRNAを使用した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。さらに、同定したスフィンゴ脂質が、スフィンゴミエリンと同様に、HCVが複製している場であるDRM分画に存在することを見出した。

次にスフィンゴ脂質とHCV蛋白質の関係を解析した。RNA dependent RNA polymerase であるHCV-NS5B蛋白質とスフィンゴ脂質の関係を *in vitro* で評価したところ、これらスフィンゴ脂質がRNA dependent RNA polymerase を活性化することを見出した。以上のことから、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。

次に、これらスフィンゴ脂質の合成を抑制するSPT阻害剤をHCV感染させたヒト肝臓型キメラマウスに投与し、その抗HCV効果および脂質動態の変化を解析した。すると、HCV感染動物モデルであるヒト肝臓型キメラマウスにおいて14日間で血中ウイルス量を1/100に抑制した。これは既存の治療薬であるPEG-IFNの効果は14日間で1/10であることを考えると、非常に強力な抗HCV効果であると考えられた。さらにはPEG-IFNやポリメラーゼ阻害剤と併用することで相乗効果を示した。以上の結果は、SPT阻害剤がC型肝炎ウイルスに対する有望な治療薬である強い可能性を示唆するものであった。さらに肝臓におけるスフィンゴ脂質をLC/MSで解析したところ、抗HCV効果に比例してスフィンゴ脂質の減少を認めた。以上のことから、ヒト肝臓型キメラマウスを使用した *in vivo* の実験系においてもHCV複製にスフィンゴ脂質が重要であることが示唆された。以上の実験

### SPT阻害剤の抗HCV効果

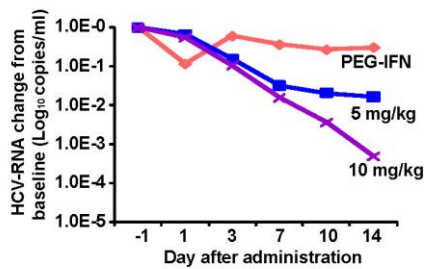


図1 血清中のHCV-RNAの推移

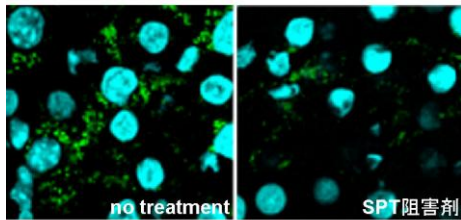


図2 肝臓中のHCVコア抗原の変化

結果を踏まえ、現在 HCV と分子種ごとのスフィンゴ脂質の解析を進めている。

### 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 4 件)

- ① 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.
- ② 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.
- ③ 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.

- ④ 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.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 平田雄一, 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. 12 横浜
- ② 平田雄一, 新規 SPT 阻害剤 NA808 の抗 HCV 効果, 第 57 回ウイルス学会, 2009. 10. 25-10. 27 東京
- ③ Yuichi Hirata, A newly synthesized serine palmitoyltransferase inhibitor, NA808, has a robust antiviral effect to hepatitis C virus via hindering host-virus interactions., 60th Annualmeeting of the American Association for the study of the liver disease., Oct30-Nov3, 2009, Boston, USA
- ④ Yuichi, Hirata, A newly synthesized serine palmitoyltransferase inhibitor, NA 808, has the strong effect to hepatitis C virus *in vitro* and *in vivo*., 44th Annualmeeting of the European Association for the study of the liver, April 22-26, 2009, Copenhagen, Denmark
- ⑤ 平田雄一, 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. 12 神戸
- ⑥ 平田雄一, 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, 2008. 10. 26-10. 28 岡山
- ⑦ 平田雄一, 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, 2008. 10. 1-10. 3 東京

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

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

なし

(3) 連携研究者

なし