

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590743

研究課題名（和文） C型肝炎ウイルスの脂質代謝への影響と新たな治療標的の開発の研究

研究課題名（英文） The study of development of the new therapeutic target for the hepatitis C virus through the influence of the lipid metabolism

研究代表者

齊藤 聡 (SAITO SATORU)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：00275041

研究成果の概要（和文）：C型肝炎ウイルス（HCV）は宿主の脂質代謝に影響を及ぼすことで、感染・増殖の効率を上げている可能性を示した。特に HCV のタンパクは超低比重リポ蛋白（VLDL）を代謝する肝性トリグリセリドリパーゼ（HTGL）を抑制し、中性脂肪に富んだり蛋白質を増加させていた。この現象は宿主の肝臓においても同様に認められた。以上より、HTGL の発現を増加させることが、HCV の新規治療薬の標的となり得ることを示した。

研究成果の概要（英文）：The hepatitis C virus (HCV) is affecting a host's lipid metabolism, and there is a possibility of raising the efficiency of infection and multiplication by HCV protein. We showed that especially HCV protein controlled the hepatic triglyceride lipase (HTGL) which metabolizes very-low density lipoprotein (VLDL). This phenomenon was similarly approved in a host's liver. In conclusion, the substance, which could increase the HTGL expression, could be a new therapeutic target for HCV.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
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・消化器内科

キーワード：ウイルス，肝炎

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎は感染後に肝硬変，肝臓癌に進展する可能性があり，いかに肝炎の段階で治療するかが重要となる。現在C型肝炎に対してウイルス排除可能な治療法はインターフェロン（IFN）であるが副作用が多く，また治療効果は治療を最後まで行わなければ判定できない。このため選択した治療法がいかに有効であるかを事前に評価することが重要である。一方，C型肝炎ウイルス（HCV）と脂質

代謝との関係がいくつかのグループから報告されている。これまでに事前に行った高感度ゲルろ過HPLC・リポ蛋白解析（LipoSEARCH）による結果から，脂質の特定分画が治療効果との相関関係が有ることが示唆された。本研究ではC型肝炎と脂質代謝との関係を利用し，治療効果を事前に予測し患者にとって無駄な治療を行わず，更には無駄な医療費を節約することを可能にすることを目的とした研究である。

2. 研究の目的

C型肝炎は感染後に肝硬変、肝臓癌に進展する可能性があり、いかに肝炎の段階で治療するかが重要となる。これまでC型肝炎に対してペグ化インターフェロン(PEG)とリバビリン(RBV)の併用療法が主に行われてきたが、未だに約50%の治癒率であり満足がいくものではない。一方、近年HCVと脂質代謝の関与がいくつかのグループから報告され、現在最も注目されている話題である。我々も高感度ゲル過HPLC・リポ蛋白解析(LipoSEARCH)による結果を用いて、脂質の特定分画が治療効果との相関関係が有ることを報告している。本研究ではC型肝炎による脂質代謝への影響を明らかにし、新たな治療標的を開発することを目標として、治療効果の向上をもたらすことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究で使用した細胞は、レプリコン細胞OR6でHCV遺伝子型1bの全長が組み込まれたHuh7由来の細胞である(岡山大学・加藤先生、池田先生より供与)。対照はOR6細胞にインターフェロン α (500 IU/ml)を添加し、HCV遺伝子を除去したOR6 cured細胞(OR6c)を4日間培養したものを用いた。

(1)上清のリポ蛋白質をゲル過クロマトグラフィー(Liposerch Inc:スカイライトバイオテック)を用いて解析した。この方法は、自動化された高速ゲル過クロマトグラフィー(HPLC)システムで、培養上清中のリポ蛋白構成脂質をリポ蛋白の粒子径別に20のサブクラスに分けて測定(サブクラス解析)することが可能である。

(2)脂質代謝に関与するコレステロールエステル転送蛋白(CETP)と肝性トリグリセリドリパーゼ(HTGL)のレプリコン細胞における発現状態をOR6細胞とOR6c細胞の間で酵素活性法、リアルタイムPCR法、およびWestern Blotting法によって比較検討した。

(3)OR6細胞にHTGLの発現ベクター

(pHTGL-FL)を遺伝子導入しHCVの複製に影響を及ぼすかを検討した。

(4)培養細胞を抗HTGL抗体であるsc-21741(Santa Cruz Biotechnology, INC)を用いて免疫染色を行ない、OR6細胞とOR6c細胞と比較検討した。

(5) *in vitro*で得られた結果よりC型肝炎患者におけるHTGLの発現を他の肝炎患者と比較するため、患者肝生検検体におけるHTGLの発現レベルについて比較検討した。

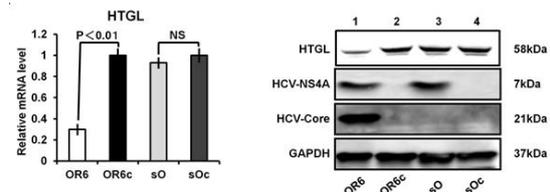
(6)細胞の代謝回転や飢餓時の栄養確保などの異化作用する自食作用(Autophagy)という現象が発見され、肝疾患やHCVとの関連もいくつか報告されている。HCVの複製増殖やAutophagyはともにLipid raft上で行われるため、密接な関係があると考えられる。そこ

でAutophagyを誘導したり、阻害したりすることでHCVの増殖に与える影響をリアルタイムPCR法、およびWestern Blotting法によって比較検討した。

4. 研究成果

(1)培養上清中リポ蛋白の脂質プロファイルを解析した結果、OR6c細胞では23.0 - 28.6 nmの大きさをLDL中の中性脂肪(TG)が多かった。一方、OR6細胞の培養上清中では23.0 - 28.6 nmでLDL中の総コレステロール(TC)と遊離コレステロール(FC)が多かった。以上から、OR6細胞ではウイルス遺伝子を除去したOR6c細胞と比較して、低比重リポ蛋白(LDL)の低下や超低比重リポ蛋白(VLDL)とLDLの中間代謝産物であるIDLが増加していることが示唆された。

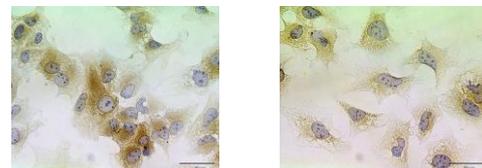
(2)培養液中のCETPの活性はOR6細胞とOR6c細胞との間では、有意な差を認めなかった。一方、HTGLはHCV蛋白を発現しているOR6細胞でmRNA、蛋白質レベルが有意に低下していることが認められた。



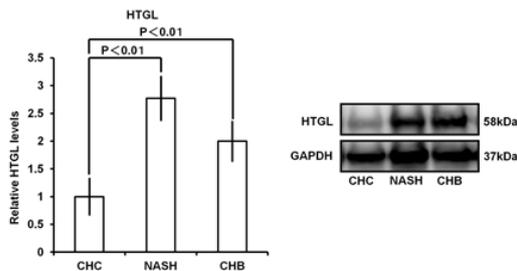
(Hepatol Res 2013;DOI10.1111/hepr.12072)

(3)OR6細胞にHTGLを強発現した後にWestern Blottingを行ったところHCVの構造蛋白、非構造蛋白の発現量に有意差は認めなかった。またLuciferaseアッセイによりHCVの複製効率を測定したところ、HTGLの発現程度に関係なくHCVの複製は変化しないことを確認した。

(4)培養細胞を用いた免疫染色では、HCVタンパクが発現しているOR6細胞と比較してOR6c細胞における細胞質の染色レベルが有意に高かった。

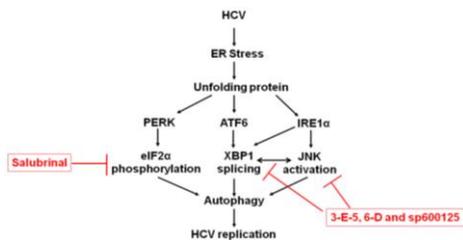


(5) C型肝炎患者の肝生検検体におけるHTGLの発現レベルは、非C型肝炎(B型肝炎, 非アルコール性脂肪肝炎)患者の肝生検検体におけるHTGLの発現に比較して低下していた。



(Hepatol Res 2013;DOI10.1111/hepr.12072)

(6)Autophagyは主に感染物質に対してはこれを排除することに働くと考えられていたが、ウイルスによっては増殖にこのAutophagyを利用することがある。OR6細胞を用いた結果ではHCVはAutophagyを増殖の足場としていることを示した。この現象は特にunfolded protein response (UPR)とAutophagyの経路を阻害することでHCVの増殖をコントロールすることが可能であることを示した。



(BBRC 2013;DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.01.103)

本研究では、HCVが宿主の脂質代謝に影響を及ぼしているが、特にHTGLの発現を低下させることで自身の感染・増殖を効果的にしている可能性を示した。この現象は宿主の肝臓の中でも確認された。このためフィブラート系のようなHTGLの発現を誘導することが新たな抗ウイルス薬としての標的となり得ることを示した。

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)Shinohara, Y, Imajo K, Yoneda M, Tomeno W, Ogawa Y, Kirikoshi H, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Nakajima A, Saito S. Unfolded Protein Response pathways regulate Hepatitis C Virus replication via modulation of Autophagy, *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.01.103, 査読有り

(2)Shinohara Y, Imajo K, Yoneda M, Tomeno W, Ogawa Y, Fujita K, Kirikoshi H, Takahashi J, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Nakajima A, Saito S. Hepatic triglyceride lipase

plays an essential role in changing the lipid metabolism in genotype 1b hepatitis C virus replicon cells and hepatitis C patients. *Hepatol Res*. 2013;DOI:10.1111/hepr.12072, 査読有り

(3)Mawatari H, Yoneda M, Fujita K, Nozaki Y, Shinohara Y, Sasaki H, Iida H, Takahashi H, Inamori M, Abe Y, Kobayashi N, Kubota K, Kirikoshi H, Nakajima A, Saito S. Association between lipoprotein subfraction profile and the response to hepatitis C treatment in Japanese patients with genotype 1b. *J Viral Hepat* 2010; 17(4): 274-279, 査読有り

(4)Mawatari H, Yoneda M, Fujita K, Nozaki Y, Shinohara Y, Sasaki H, Iida H, Takahashi H, Inamori M, Abe Y, Kobayashi N, Kubota K, Kirikoshi H, Nakajima A, Saito S. Association between phospholipids and free cholesterol in high-density lipoprotein and the response to hepatitis C treatment in Japanese with genotype 1b. *J Viral Hepat* 2010; 17(12): 859-865, 査読有り

[学会発表] (計13件)

(1)Shinohara Y, Fujita K, Imajo K, Mawatari H, Yoneda M, Shibata A, Kirikoshi H, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Nakajima A, Saito S: Autophagy regulates Hepatitis C Virus replication. The 62nd AASLD, San Francisco, USA, 2011. 11.07

(2)Shinohara Y, Fujita K, Imajo K, Mawatari H, Yoneda M, Shibata A, Kirikoshi H, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Nakajima A, Saito S: HCV proteins are involved in selective autophagy. The 62nd AASLD, San Francisco, USA, 2011.11.07

(3)篠原義康, 加藤真吾, 池田正徳, 加藤宣之, 前田慎, 中島淳, 斉藤聡: Hepatitis C Virus induces aggregation of p62. 第70回日本癌学会学術総会, 愛知, 2011年10月4日, 名古屋国際会議場

(4)Shinohara Y, Fujita K, Imajo K, Mawatari H, Yoneda M, Shibata A, Kirikoshi H, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Nakajima A, Saito S: Hepatitis C Virus regulates p62 metabolism. International Union of Microbiological Societies 2011 Sapporo, Japan, 2011.09.15, Sapporo Convention Center (hokkaido)

(5)篠原義康, 馬渡弘典, 藤田浩司, 米田正人, 今城健人, 芝田渉, 桐越博之, 船越健悟, 池田正徳, 加藤宣之, 前田慎, 中島淳, 斉藤聡: HCVレプリコン細胞におけるVLDL, LDLreceptorの検討. 第23回日本肝臓学会西部会, 岡山, 2011年6月12日, 岡山プラザホテ

ル

(6)篠原義康, 藤田浩司, 米田正人, 野崎雄一, 今城健人, 鈴木香峰理, 馬渡弘典, 桐越博之, 船越健悟, 池田正徳, 加藤宣之, 前田慎, 中島淳, 斉藤聡: HCV レプリコン細胞を用いた ER stress を介した細胞死の検討および HCV 複製増殖におけるオートファジーの役割. 第 33 回日本分子生物学会 1P-1047 兵庫, 2010 年 12 月 7 日, 神戸国際会議場

(7)篠原義康, 藤田浩司, 米田正人, 野崎雄一, 今城健人, 鈴木香峰理, 馬渡弘典, 桐越博之, 船越健悟, 池田正徳, 加藤宣之, 前田慎, 中島淳, 斉藤聡: HCV レプリコン細胞を用いたリボ蛋白代謝の解析. 肝臓学会東部会 0-135 東京, 2010 年 12 月 3 日, 京王プラザホテル

(8)Shinohara Y, Fujita K, Nozaki Y, Imajo K, Mawatari H, Yoneda M, Kirikoshi H, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Nakajima A, Saitou S: Hepatic triglyceride lipase may play important role to change the lipoprotein profiles in the HCV replicon system. *American Association for the Study of Liver Diseases* 1048. Boston, USA, November, 2010. 11.07

(9)Shinohara Y, Fujita K, Nozaki Y, Imajo K, Mawatari H, Yoneda M, Kirikoshi H, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Nakajima A, Saitou S: The ER stress caused by hepatitis C virus in replicon cells was reversed by interferon treatment. *American Association for the Study of Liver Diseases* 877 Boston, USA, November, 2010. 11.07

(10)篠原義康, 藤田浩司, 米田正人, 野崎雄一, 今城健人, 鈴木香峰理, 馬渡弘典, 桐越博之, 船越健悟, 池田正徳, 加藤宣之, 前田慎, 中島淳, 斉藤聡: HCV レプリコン細胞におけるリボ蛋白代謝の解析. 第 58 回ウイルス学会 01-5-15 徳島, 2010 年 11 月 7 日, あわぎんホール

(11)Shinohara Y, Fujita K, Nozaki Y, Imajo K, Mawatari H, Yoneda M, Kirikoshi H, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Nakajima A, Saito S: Clearance of the Hepatitis C virus replicon by interferon-alpha treatment restored the signal pathway involving JNK. *17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses*. P-257 Japan, September, 2010. 09.11, Pacifico Yokohama (kanagawa)

(12)Shinohara Y, Fujita K, Nozaki Y, Imajo K, Mawatari H, Yoneda M, Kirikoshi H, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Nakajima A, Saito S: Hepatitis C Virus infection changes the lipoprotein profiles

in the replicon system. P-279 *17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses*. P-257 Japan, September, 2010. 09.11, Pacifico Yokohama (kanagawa)

(13)篠原義康, 野崎雄一, 藤田浩司, 米田正人, 馬渡弘典, 桐越博之, 船越健悟, 中島淳, 斉藤聡: 培養細胞における Hepatitis C virus 遺伝子型 1b の脂質代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響. 第 46 回日本肝臓学会総会 0-254 山形, 2010 年 5 月 27 日, 山形国際ホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斉藤 聡 (SAITO SATORU)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号: 00275041

(2) 研究分担者

中島 淳 (NAKAJIMA ATSUSHI)
横浜市立大学・附属病院・教授
研究者番号: 30326037
桐越 博之 (KIRIKOSHI HIROYUKI)
横浜市立大学・附属病院・助教
研究者番号: 80347294

(3) 連携研究者

()

研究者番号: