

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 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390145

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 specific SM molecular species that these endogenous SM species interacted with HCV nonstructural 5B polymerase to enhance viral replication

研究代表者

小原 道法 (KOHARA MICHINORI)

財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・副参事研究員

研究者番号：10250218

研究成果の概要（和文）：

スフィンゴミエリンは、HCV 複製の場とされる脂質ラフトを構成する宿主由来の脂質である。我々はこれまでに、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ (SPT) の阻害剤が、スフィンゴミエリンの合成を抑制することで脂質ラフトに影響を与え、抗 HCV 効果を示すことを報告してきた。しかしながら、既存の SPT 阻害剤は、免疫抑制効果を有することや、宿主由来の脂質を抑制するという薬剤の性質から副作用の可能性が見込まれていた。そこで、今回、肝臓特異性を持ち、免疫抑制効果のない、新規 SPT 阻害剤である NA808 を使用し、抗 HCV 効果および宿主に与える影響を検討した。我々は脂質ラフトを構成するスフィンゴミエリンを分子種レベルで同定し 4 種存在することを明らかにした。Egg や brain 由来のスフィンゴミエリン (SM) からそれぞれの分子種を HPLC により分離し、HCV 遺伝子複製を行う RNA 合成酵素 (RdRp) との関係を解析した。すると、脂質ラフトを構成する 3 種の SM 分子種すべてがいずれもほぼ同程度の強さで RdRp と結合した。この結果は、HCV 感染細胞において HCV 複製複合体を構成する SM が RdRp と結合することを示している。さらには、我々はこれら SM 分子種が RdRp の活性に与える影響を検討した。すると、すべての SM 分子種において程度の差はあるものの濃度依存的に RdRp の活性を上昇させることを見出した。これは、HCV の感染が脂質ラフト上のスフィンゴミエリン濃度を上昇させ、その結果 RdRp を脂質ラフトにとどめさせるだけでなく、RdRp の活性を上昇させることで HCV 複製に寄与していることを示していた。以上の結果は、HCV 感染によりスフィンゴ脂質代謝は変化をし、その結果 HCV の複製にとって好都合な環境が作り出されていることを示していた。

研究成果の概要（英文）：

Lipids are key components in the viral life cycle that affect host-pathogen interactions. In this study, we investigated the effect of HCV infection on sphingolipid metabolism, especially on endogenous SM levels, and the relationship between HCV replication and endogenous SM molecular species. We demonstrated that HCV induces the expression of the genes encoding sphingomyelin (SM) synthases. We observed associated increases of both total and individual sphingolipid molecular species, as assessed in human hepatocytes and in the detergent-resistant membrane (DRM) fraction in which HCV replicates. SGMS-1 expression had a strong correlation with HCV replication. Inhibition of sphingolipid biosynthesis with a hepatotropic serine palmitoyltransferase inhibitor, NA808, suppressed HCV-RNA production while also interfering with sphingolipid metabolism. Further, we identified the specific SM molecular species that comprise the DRM fraction and demonstrated that these endogenous SM species interacted with HCV nonstructural 5B polymerase to enhance viral replication. Our results reveal that HCV alters sphingolipid metabolism to promote viral replication, providing new insights into the formation of the HCV replication complex and the involvement of host lipids in the HCV life cycle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：細胞

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。

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蛋白と相互作用し、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)。現在、さらに解析を進め、スフィンゴミエリン以外のスフィンゴ脂質がウイルスの複製に関与していること、また驚くべきことに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見出している。このような結果は、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おり、HCVを通してスフィンゴ脂質機能を解析することで細胞内での新たな機能及び動態変化と恒常性維持機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

我々は、スフィンゴミエリンがウイルスの複製に必須であることを *in vitro*, *in vivo* の解析から報告してきた。しかし、スフィンゴミエリンはその側鎖脂肪酸長の違いから複数の分子種が存在する。どの分子種が、HCV複製に関わっているのかについては明らか

になっていない。我々がHCV複製を抑制することを見出しているスフィンゴミエリン合成経路の阻害剤・分解酵素を使用し、その際のスフィンゴミエリン分子種の変化をLC/MSを使用し定量的に解析する。これにより、HCV複製に必須なスフィンゴミエリン分子種を特定する。

さらに、我々はこれまでにスフィンゴミエリンだけでなくスフィンゴ糖脂質がHCVの複製に関与していることを見出している。さらに、そのスフィンゴ糖脂質はスフィンゴミエリンと同様に、界面活性剤処理後にショ糖濃度勾配遠心処理を行って抽出した detergent resistant membrane 画分(DRM画分)に存在することを見出しだしている。これまで、細胞内でのスフィンゴ糖脂質の局在とその機能を解析した例はほとんどなく、我々はC型肝炎ウイルスをツールとしてスフィンゴ糖脂質の局在と機能を解析していく。そこで、まずsiRNAを使用した関連合成酵素のノックダウンや発現プラスミドを強制発現することなどにより複製に関わるスフィンゴ糖脂質を同定する。その上で、同定された脂質成分の細胞内局在を免疫沈降法・蛍光染色により解析していく。

3. 研究の方法

複数のHCVレプリコン保持細胞およびHCV感染細胞で、スフィンゴ脂質合成経路における各種の阻害剤および合成酵素に対するsiRNAによる網羅的なノックダウンを行うことによりHCV遺伝子複製に必須なスフィンゴミエリンの分子種およびスフィンゴ糖

脂質を同定する。阻害剤と siRNA によるノックダウンの両方で評価することで、HCV 遺伝子複製に与える効果を正しく評価することが可能となる。さらに、同定されたスフィンゴ脂質合成経路における合成酵素の発現プラスミドを使用し、強制発現させ HCV の複製効果を評価することにより、上記解析結果の確認を行っていく。また、これら阻害剤をマウスに投与することにより、in vivo での評価を行う。この際、人体に最も近い系と考えられる uPA-SCID マウスの肝細胞を人肝細胞で置換したヒト肝臓キメラマウスに HCV を感染させたモデルを使用する (*Nature medicine* 7:927-933 (2001))。これにより、実際に人体で生じているウイルス複製過程をより正確に反映した系での脂質成分の同定を行うことができる。

4. 研究成果

我々は MS を使用したスフィンゴミエリンの定量解析を行い動物モデルにおけるスフィンゴミエリンの動態変化を明らかにした。ヒト肝臓型キメラマウスにおいて肝臓内のスフィンゴミエリンは HCV 感染に伴い増加していた。さらに、肝臓内でのスフィンゴミエリン合成酵素誘導と HCV-RNA 量は相関関係にあり、スフィンゴミエリンが存在することが HCV 複製に重要であることが HCV 感染の動物モデルにおいても示唆された。また、このスフィンゴミエリンの増加は、①アポトーシスを誘導するとされるセラミドも上昇していること、②セラミドからスフィンゴ糖脂質、スフィンゴシンなどの各脂質を形成する酵素である glucosylceramide synthase、ceramidase の発現も上昇していること、からセラミド蓄積によるアポトーシス回避のために、セラミドから各脂質への転移酵素が上昇していることが原因であると考えられた。

これまでの我々の実験結果から、スフィンゴミエリンの増加が HCV 複製に寄与するか否

かを検討した。HCV 持続感染細胞ではコントロール細胞と比較してスフィンゴミエリン合成酵素の誘導がかかっており、さらに HCV 複製複合体が存在するとされる脂質ラフトでのスフィンゴミエリン量が顕著に増加していた。これまでに我々は、スフィンゴミエリンが HCV-RNA dependent RNA polymerase (RdRp) である NS5B と結合すること、そしてその結合が RdRp を脂質ラフトにとどめ複製を行っていくのに重要であることを示した。そこで、我々は脂質ラフトを構成するスフィンゴミエリンを分子種レベルで同定し 4 種存在することを明らかにした。Egg や brain 由来のスフィンゴミエリン (SM) からそれぞれの分子種を HPLC により分離し、RdRp との関係解析した。すると、脂質ラフトを構成する 3 種の SM 分子種すべてがいずれもほぼ同程度の強さで RdRp と結合した。この結果は、HCV 感染細胞において HCV 複製複合体を構成する SM が RdRp と結合することを示している。さらには、我々はこれら SM 分子種が RdRp の活性に与える影響を検討した。すると、すべての SM 分子種において程度の差はあるものの濃度依存的に RdRp の活性を上昇させることを見出した。これは、HCV の感染が脂質ラフト上のスフィンゴミエリン濃度を上昇させ、その結果 RdRp を脂質ラフトのとどめさせるだけでなく、RdRp の活性を上昇させることで HCV 複製に寄与していることを示していた。以上の結果は、HCV 感染によりスフィンゴ脂質代謝は変化をし、その結果 HCV の複製にとって好都合な環境が作り出されていることを示していた。

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 24 件) 全て査読有り

- ① Konoishi H., Okamoto K., Ohmori Y., Yoshino H., Ohmori H., Ashiara M., Hirata Y., Ohta A., Sakamoto H., Hada

- N., Katsume A., Kohara M., MOrikawa K., Tsukuda T., Shimma N., Foster G., Alazawi W., Aoki Y., Arisawa M., Sudoh M.: An orally available, small-molecule interferon inhibits hepatitis C virus replication. *Sci. Comm.* (2012) in press
- ② Weng L., Kohara M., Wakita T., Shimotohno K., Toyoda T.: Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase. *Gene* 469:79-87 (2012)
- ③ Saito M., Kohara M., Kasama Y., Tsukiyama-Kohara K.: Hepatitis C virus induces overexpression of 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase through Spl. *J. Med. Viro.* 84:733-746 (2012)
- ④ Kasama Y., Saito M., Takano T., Nishimura T., Satoh M., Wang Z., Elwy N., Harada S., Kohara M., Tsukiyama-Kohara K.: Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3. *Virus Res.* 163:405-409 (2012)
- ⑤ Tsukiyama-Kohara K., Sekiguchi S., Kasama Y., Salem N. E., Machida K., Kohara M.: Hepatitis C virus-related lymphomagenesis in a mouse model. *Hematology* 2011:167501. *Epub* 2011 (2011)
- ⑥ Ciyo T., Sekiguchi S., Hayashi M., Tobita Y., Kanegae Y., Saito I., Kohara M.: Conditional hepatitis C virus gene expression without induction of severe inflammatory responses through the use of a Cre-expressing recombinant adenovirus in mice. *Virus Research* 160(1-2):89-97 (2011)
- ⑦ Satoh M., Saito M., Takano T., Kasama Y., Nishimura T., Nishito Y., Hirata Y., Arai M., Sudoh M., Kai C., Kohara M., Tsukiyama-Kohara K.: Monoclonal antibody 2-152a suppresses hepatitis C virus infection through betaine/GABA transporter-1. *J. Infectious Disease* 204(8):1172-1180 (2011)
- ⑧ 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* 55:512-521 (2011)
- ⑨ Kimura K., Kohara M.: *Frontiers of Model Animals for Human Diseases. Exp. Anim.* 60(2), 93-100 (2011)
- ⑩ Takano T., Kohara M., Kasama Y., Nishimura T., Saito M., Kai C., Tsukiyama-Kohara K.: Translocase of outer mitochondrial membrane 70 is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response. *J. Med. Viro.* 83:801-809 (2011)
- ⑪ Kimura K., Sekiguchi S., Hayashi S., Hayashi Y., Hishima T., Nagaki M., Kohara M.: Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury. *J. Leukocyte Biology* 89:433-442 (2011)
- ⑫ Arai M., Suzuki H., Tobita Y., Takagi A., Okamoto K., Ohta A., Sudoh M., Kohara M.: Establishment of infectious HCV virion-producing cells with newly designed full-genome replicon RNA. *Arch. Viro.* 156:295-304 (2011)
- ⑬ Yoshikawa K., Ogata A., Matsuda C., Kohara M., Iba H., Kitade Y., Ueno Y.: Incorporation of biaryl units into the 5' and 3' ends of sense and antisense strands of siRNA duplexes improves strand selectivity and nuclease resistance. *Bioconjugate Chemistry* 22:42-49 (2011)
- ⑭ Kasama Y., Sekiguchi S., Saito M., Tanaka K., Satoh M., Kuwahara K., Sakaguchi N., Takeya M., Hiasa Y., Kohara M., Tsukiyama-Kohara K.: Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas *in vivo*. *Blood* 116(23):4926-4933 (2010)
- ⑮ Satoh M., Saito M., Tanaka K., Iwanaga S., Salem N. E., Seki T., Okada S., Kohara M., Harada S., Kai C., Tsukiyama-Kohara K.: Evaluation of a recombinant measles virus expressing hepatitis C virus envelope proteins by infection of human PBL-NOD/Scid/Jak3null mouse. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 33(6):81-88 (2010)
- ⑯ 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. Viro.* 84(22):11761-70 (2010)
- ⑰ Nuriya H., Inoue K., Tanaka T., Hayashi Y., Hishima T., Funata N., Kaji K.,

- Hayashi S., Kaneko S., Kohara M. : Detection of hepatitis B and C viruses in almost all hepatocytes by modified PCR-based *in situ* hybridization. *J. Clinical Microbiology* 48(11):3843-3851 (2010)
- ⑱ 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. Virology* 84(1):303-311 (2010)
- ⑲ Satoh K., Takahashi H., Matsuda C., Umehara T., Tanaka T., Miyasaka M., Zeniya M., Kohara M. : Natural killer cells target HCV core proteins during the innate immune response in HCV transgenic mice⁹¹. *J. Medical Virology* 82(9):1545-1553 (2010)
- ⑳ Nishimura T., Kohara M., Izumi K., Kasama Y., Hirata Y., Huang Y., Shuda M., Nuriya H., Tokunaga Y., Sato M., Saito M., Kai C. and Tsukiyama-Kohara K. : Hepatitis C virus impairs P53 via persistent over-expression of 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase. *J. Biol. Chem.* 284(52):36442-36452 (2009)
- ㉑ Uto H., Stuver S.O., Hayashi K., Kumagai K., Sasaki F., Kanmura S., Numata M., Moriuchi A., Hasegawa S., Oketani M., Ido A., Kusumoto K., Hasuike S., Nagata K., Kohara M. and Tsubouchi H. : Increased rate of death related to presence of viremia among hepatitis C virus antibody-positive subjects in a community-based cohort study. *Hepatology* 50(2):393-9 (2009)
- ㉒ 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* 137(1): 285-296 (2009)
- ㉓ Weng L., Du J., Zhou J., Ding J., Wakita T., Kohara M. and Toyoda T. : Modification of hepatitis C virus 1b RNA polymerase to make a highly active JFH1-type polymerase by mutation of the thumb domain. *Arch Virol.* 154(5):765-773 (2009)
- ㉔ Ueno Y., Watanabe Y., Shibata A., Yoshikawa K., Takano T., Kohara M. and Kitade Y. : Synthesis of nuclease-resistant siRNAs possessing universal overhangs. *Bioorganic & Medicinal chemistry.* 17(5):1974-81 (2009)
- [学会発表] (計 20 件)
- ① Nishimura T., French marine bark extract pycnogenol is a new candidate of Hepatitis C virus therapeutic material. 第 34 回日本分子生物学会 2011.12.14. パシフィコ横浜
- ② Hirata Y., Interferon-lambda plays a critical role in antiviral response in human hepatocytes. 第 34 回日本分子生物学会 2011.12.14. パシフィコ横浜
- ③ Wada T., Evaluation of the therapeutic effect of DNA vaccines in the mouse model of chronic HCV infection. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011.11.28. 幕張メッセ (千葉)
- ④ Kimura K., Recombinant vaccinia virus encoding hepatitis C virus nonstructural protein modulates host immune response and ameliorates chronic hepatitis in mouse model. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011.11.28. 幕張メッセ (千葉)
- ⑤ Hirata Y., Suppression of sphingomyelin augmented by hepatitis C virus has robust anti-viral effects in human livers. The American Association for the Study of Liver Disease 2011.11.8. San Francisco
- ⑥ Kimura K., Recombinant vaccinia virus encoding hepatitis C virus nonstructural protein modulates host immune response and ameliorates chronic hepatitis in mouse model. The American Association for the Study of Liver Disease 2011.11.8. San Francisco
- ⑦ 木村公則、HCV 持続発現マウスを用いた HCV ワクチンの開発、第 15 回日本肝臓学会大会、2011.10.20. 福岡サンパレス
- ⑧ 平田雄一、ヒト肝細胞での自然免疫応答における IFN- λ の重要性とその誘導メカニズム、第 15 回日本肝臓学会大会、2011.10.20. 福岡サンパレス
- ⑨ 高野貴士、C 型肝炎ウイルスの複製における DHCR24 の役割、第 70 回日本癌学会学術総会、2011.10.5. 名古屋国際会議場
- ⑩ 小原道法、C 型肝炎発症におけるウイルス蛋白質と炎症サイトカイン、第 70 回日

本癌学会学術総会、2011. 10. 5. 名古屋国際会議場

- ⑪ Hirata Y., Suppression of sphingomyelin augmented by hepatitis C virus has robust anti-viral effects in human livers. International Union of Microbiological Societies 2011.9.13. 札幌コンベンションセンター
- ⑫ Kasama Y., Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas in mice. 18th International Symposium Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2011.9.10. Seattle(米国)
- ⑬ Takano T., Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. 18th International Symposium Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2011.9.10. Seattle(米国)
- ⑭ Tokunaga Y., Novel infectious clone of HCV 1a strain HCV-RMT efficiently replicate in vitro and in vivo using adaptive mutations. 18th International Symposium Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2011.9.10. Seattle(米国)
- ⑮ Munakata T., Regulation of HCV replication by fatty acid synthase. 18th International Symposium Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2011.9.10. Seattle(米国)
- ⑯ Tsukiyama-Kohara K., Spontaneous development of B-cell lymphomas by persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells in mice. 2011ASBMB, 2011.7.25-26、広州(中国)
- ⑰ 小原道法, HCV 持続発現マウスを用いた HCV 治療ワクチンの開発、第 10 回 CBSM, 2011.6.24. 軽井沢プリンスホテル(長野)
- ⑱ 井上和明, PCR と in situ hybridization を組み合わせた HCV と HBV のウイルスゲノム存在様式可視化の試み、47 回日本肝臓学会総会、2011.6.2. ホテルグランパシフィック(東京)
- ⑲ 木村公則, HCV 感染による慢性肝炎の病態形成と炎症性サイトカインの関与、第 47 回日本肝臓学会総会、2011.6.2. ホテルグランパシフィック(東京)
- ⑳ 大槻貴博, 新規 C 型慢性肝炎モデルマウスを用いた C 型慢性肝炎の病態解析、第 58 回日本実験動物学会総会、2011.5.25. タワーホール船堀(東京)

〔図書〕(計 8 件)

- ① 小原恭子, 他, 日本臨床、新時代のウイルス性肝炎学—HCV の病原性発現に關与するウイルス因子とその機能、2011、97-102
- ② 小原恭子, 他, BIO Clinica、C 型肝炎ウイルスによる免疫攪乱と炎症発がん、2011、42-48
- ③ 須藤正幸, 他, BIO Clinica、細胞膜成分を標的とした C 型肝炎治療薬、2011、58-62
- ④ 平田雄一, 他, 肝胆膵、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、2011、216-222
- ⑤ 平田雄一, 他, 薬学雑誌、SPT 阻害剤による C 型肝炎ウイルス(HCV)複製阻害機序の解析、2010、157-161
- ⑥ 平田雄一, 他, YAKUGAKU ZASSHI、SPT 阻害剤による C 型肝炎ウイルス(HCV)複製阻害機序の解析、2010、157-161
- ⑦ 小原恭子, 他, Summer、C 型肝炎ウイルスと B リンパ腫、2009、61-63
- ⑧ 関口 敏, 他, メディカル・サイエンス・ダイジェスト、C 型肝炎ウイルスの持続感染機構と病原性、2009、14-17

〔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

小原 道法 (KOHARA MICHINORI)

財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・副参事研究員

研究者番号：10250218

(2) 研究分担者

平田 雄一 (HIRATA YUUCHI)

財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員

研究者番号：50439452

棟方 翼 (MUNAKATA TSUBASA)

財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：50420237

徳永 優子 (TOKUNAGA YUUKO)

財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員

研究者番号：80555011