

4. 宿主因子を標的としたC型肝炎ウイルスの抑制

平田 雄一¹⁾, 須藤 正幸²⁾, 小原 道法¹⁾

1) 東京都臨床医学総合研究所 SARS, C型肝炎等感染症プロジェクト

2) 中外製薬 鎌倉研究所

C型肝炎ウイルスは、高率に持続感染を引き起こし、やがて肝硬変・肝細胞癌へと至る。PEG-IFN及びリバビリンの登場により治療成績は向上したが、本邦で多いとされる genotype 1b 高ウイルス量の患者は依然として治療抵抗性であり、およそ50%の奏効率である。現状を改善するためウイルス側の因子を標的とした薬剤の開発などの多くの試みがなされている。我々は、ウイルスが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検討を行ってきた。その中で、セラミド・スフィンゴ脂質合成の最上流酵素であるセリンパルミトイルトランスフェラーゼに対する阻害剤(SPT阻害剤)が、HCVの複製を抑制することを見出した。SPT阻害剤は、HCV感染動物モデルであるヒト肝臓型キメラマウスを使用した *in vivo* の実験において、現在最も効果が高いとされているPEG-IFNの20倍量投与とほぼ同等の効果を示し、両者を併用することで相乗効果を示した。その作用機序を解析するため、SPT阻害剤が脂質ラフトに与える影響を界面活性剤不溶性分画(DRM分画)を抽出し検討した。するとDRM上でRNA dependent RNA polymeraseであるNS5BがSPT阻害剤の投与により減少した。さらにBiacoreを使用しスフィンゴミエリンとNS5Bが結合することを見出した。以上の実験結果から、SPT阻害剤はHCVが複製している脂質ラフトにおいてスフィンゴミエリンを減少させ、脂質ラフトにNS5Bが留まれなくなり複製ができなくなるというモデルが考えられた。

はじめに

C型肝炎ウイルス(HCV)は、フラビウイルス科ヘパシウイルス属に属する+鎖のssRNAウイルスである。HCVは、主に血液を媒介して感染し、急性肝炎を生じた後に完全に排除されることなく、高率に持続感染化し慢性肝炎を引き起こす。その後、加齢に伴い肝硬変、肝細胞癌に至る¹⁸⁾。

現在、本邦において、年間3万5000人が肝疾患で死亡しているが、その75%はHCV感染に起因する慢性肝疾患患者である。このため、C型慢性肝炎、肝硬変は今や「第二の国民病」と位置付けられており、対応が急務とされている。

近年、PEG-IFN及びリバビリンの登場により、本邦で最も多いとされる難治性 genotype 1b 高ウイルス量のC型肝炎患者でさえ約半数は治療することができるようになった⁵⁾¹²⁾。しかしながら、依然として多くの患者は治療することができない状態である。さらに、PEG-IFN+リバビリンによる治療は、血球減少をはじめとした副作用を伴い、高齢者が多いとされる本邦では治療の完遂そのものが難しい²⁶⁾。

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治験が行われている。これらの薬剤の多くは、ウイルス因子を標的としており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¹⁷⁾。

我々は、以前よりウイルスがその生活環で利用する宿主

連絡先

〒113-8613 東京都文京区本駒込3丁目18番22号
東京都臨床医学総合研究所
SARS, C型肝炎等感染症プロジェクト
小原道法
TEL: 03-3823-2105
FAX: 03-3823-2965
E-mail: kohara-mc@igakuken.or.jp

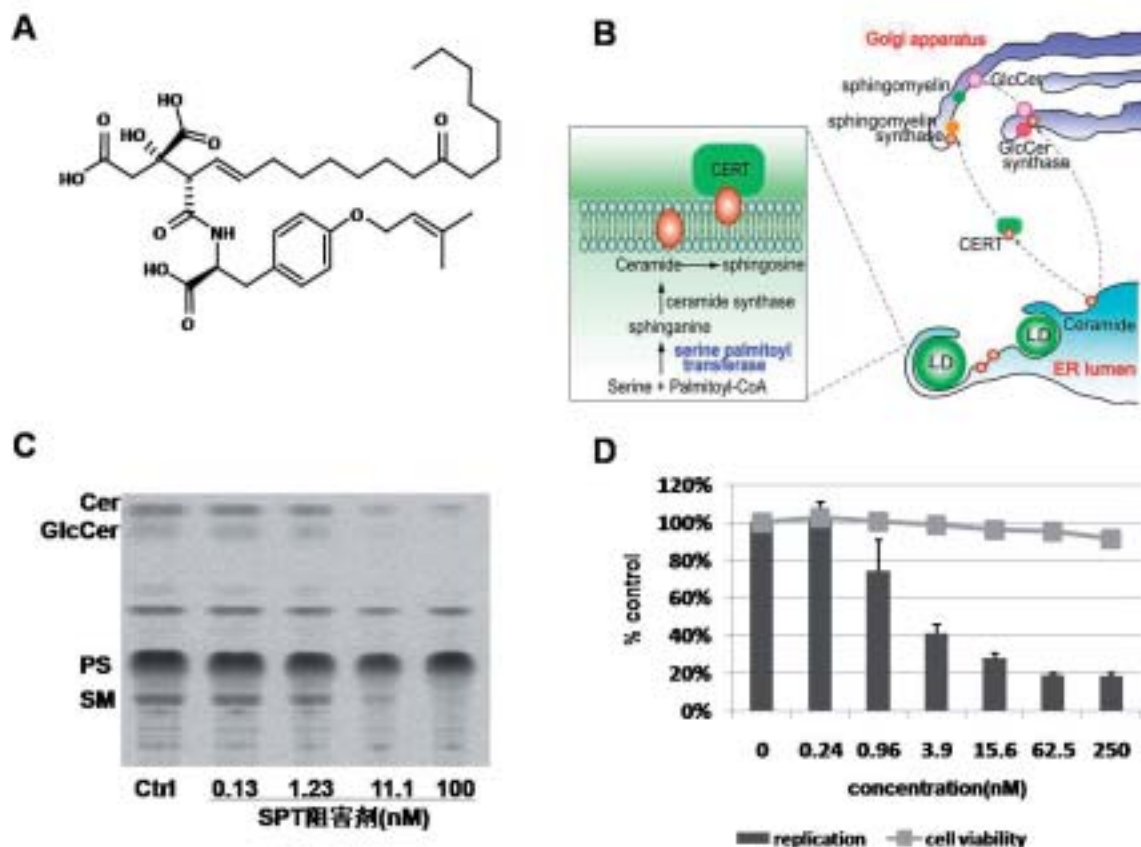


図1 HCV複製を抑制する化合物としてSPT阻害剤を同定

(A) HCVレプリコン細胞を使用したハイスループットスクリーニングから同定したNA255の化学構造

(B) スフィンゴ脂質のde novo合成経路。de novo合成経路においては、セラミドまでの合成が小胞体で行われ、その後ゴルジ体に運ばれスフィンゴ脂質が合成される。

(C) [¹⁴C]serineでラベルしTLCを行うことにより、SPT阻害剤が脂質に与える影響を検討した。SPT阻害剤はセラミドおよびスフィンゴ脂質の合成を阻害することがわかる。Cer：セラミド、GlcCer：グルコシルセラミド、PS：ホスファチジルセリン、SM：スフィンゴミエリン

(D) HCVレプリコン細胞を使用したミリオシンの複製抑制効果及び細胞毒性の検討

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、いくつかの阻害剤を同定し報告してきた¹⁵⁾¹⁹⁾²⁴⁾。本稿では、これらの中からセリンパルミトイルトランスフェラーゼ阻害薬（SPT阻害剤）に関して紹介したい。

1. 宿主因子をターゲットとした抗HCV薬の可能性

これまで、HCVは増殖の際に宿主因子を利用していることが報告されている⁶⁾⁷⁾¹⁶⁾²³⁾。これら宿主因子は抗HCV薬の標的となりうると考えられ、また前述した耐性株出現の問題やgenotypeの違いに起因する効果の減弱などの問題が克服できることが期待される。しかし、宿主因子という性質上、これらの阻害剤は副作用の面で問題があると考えられてきた。

我々は、臨床研究からサイクロスポリンA（CsA）が

HCVを抑制することを見出していた⁸⁾。このときCsAがどのようにしてHCV複製抑制効果を示すのかは不明であったが、免疫抑制剤として臨床使用されてきた検討から3つの標的（①シクロフィリン（CyP）、②カルシニューリン（CN）/NF-AT経路、③P-蛋白質（P-gp））に対する作用機序が示されていた。その後、Watashiらにより宿主因子であるシクロフィリンBがHCV複製を行っているRNA dependent RNA polymeraseであるNS5Bの活性化に必要であることが示されている²⁵⁾。つまり、この知見は宿主因子を標的とした抗HCV薬の可能性を示唆するものであった。

また、宿主因子を標的とした薬剤に伴う毒性に関しては、宿主因子を同定した後に、より抗HCV作用特異的な阻害剤を開発することにより毒性を軽減することが可能であると考えられる。このことは、我々が行ったヒト肝臓型キメ

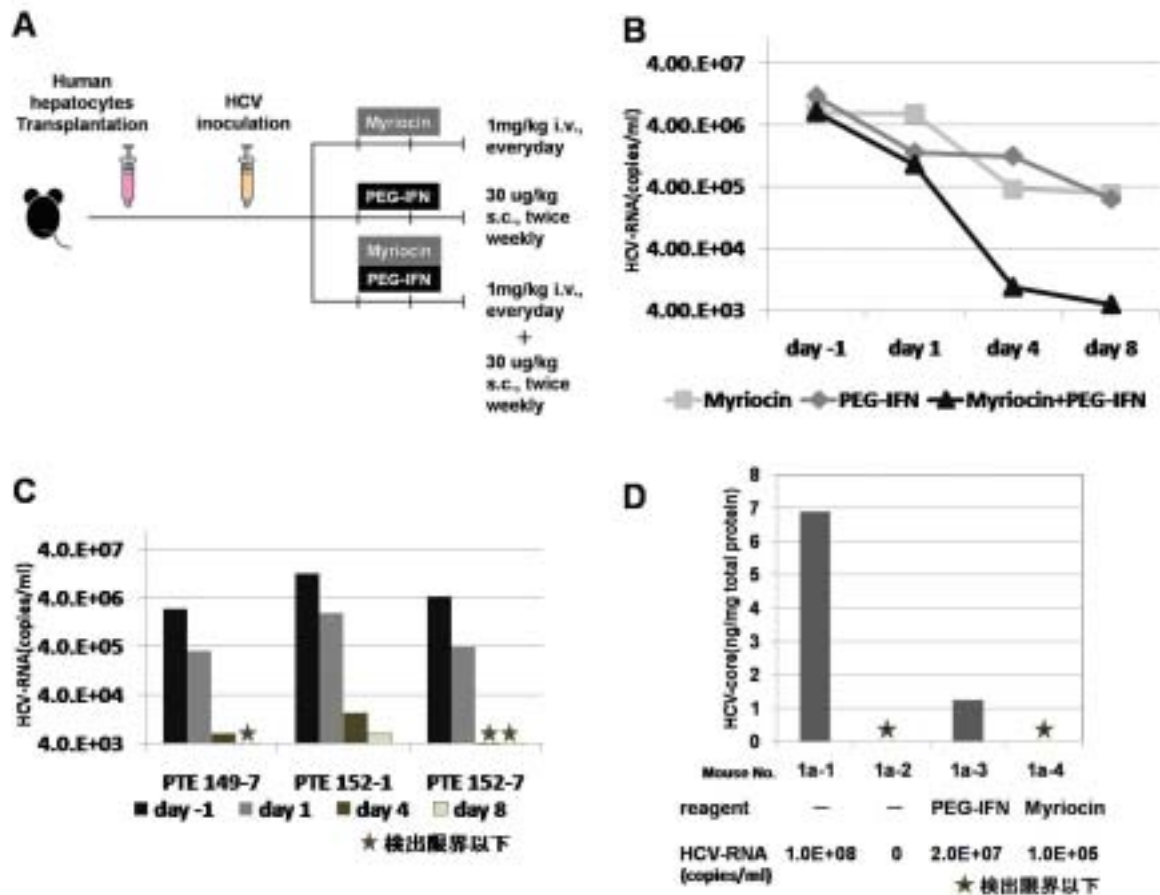


図2 ヒト肝臓型キメラマウスを使用した SPT 阻害剤の抗 HCV 効果の検討

- (A) ヒト肝臓型キメラマウスへの投与プロトコール。
 (B) 血清中 HCV-RNA 量の経日的な変化。いずれの群も 3 個体ずつ使用し平均値を表示している。
 (C) PEG-IFN+Myriocin 投与群の各個体における経日的な変化。3 個体中 2 個体は検出限界以下となっている。
 (D) 肝臓中の HCV-RNA 量および HCV core 量の変化

ラマウスに対して CsA とその免疫抑制活性を失くした誘導体 DEBIO-025 を投与した実験から明らかである⁹⁾。この実験では、実際臨床で人体に投与されている CsA を投与した群では投与したキメラマウスが 4 日目ですべて死亡したのに対して、DEBIO-025 投与群では全例生存し体重等の変化もほとんど見られなかった。このことは、宿主因子を標的とした阻害剤であっても、HCV 複製効果に対しての特異性を上げることにより毒性を軽減することができることを示唆している。以上から、HCV においては宿主因子が標的とする阻害剤の開発が可能であり、副作用の面も改善が期待できると考えられる。

2. HCV 複製を抑制する化合物としての SPT 阻害剤の同定

我々は HCV レプリコン細胞を使用したハイスクリーンから、HCV 複製を抑制する天然物として

NA255 を同定した(図 1A)¹⁹⁾。この NA255 は、既存の SPT 阻害剤であるミリオシンと類似の化学構造を有しており、SPT 阻害効果を認めるものであった。セリンパルミトイルトランスフェラーゼ (SPT) は、スフィンゴ脂質 (スフィンゴミエリンおよびスフィンゴ糖脂質) における de novo 合成経路の最上流酵素である。その合成経路は、次のようなものである (図 1B)。小胞体においてパルミトイル CoA 及びセリンからいくつかのステップを経てセラミドが合成され、その後 CERT などの輸送蛋白質によりゴルジ体へ運ばれスフィンゴミエリンおよびグルコシルセラミドをはじめとするスフィンゴ糖脂質が合成される。SPT 阻害剤はこの最上流を阻害することになる。実際、SPT 阻害剤添加によりスフィンゴ脂質が減少することが確認される (図 1C)。

我々は上記の SPT 阻害剤が HCV 複製を抑制するという知見から、SPT 阻害剤として知られているミリオシンを使用し、HCV レプリコン細胞でその複製抑制効果を確認した

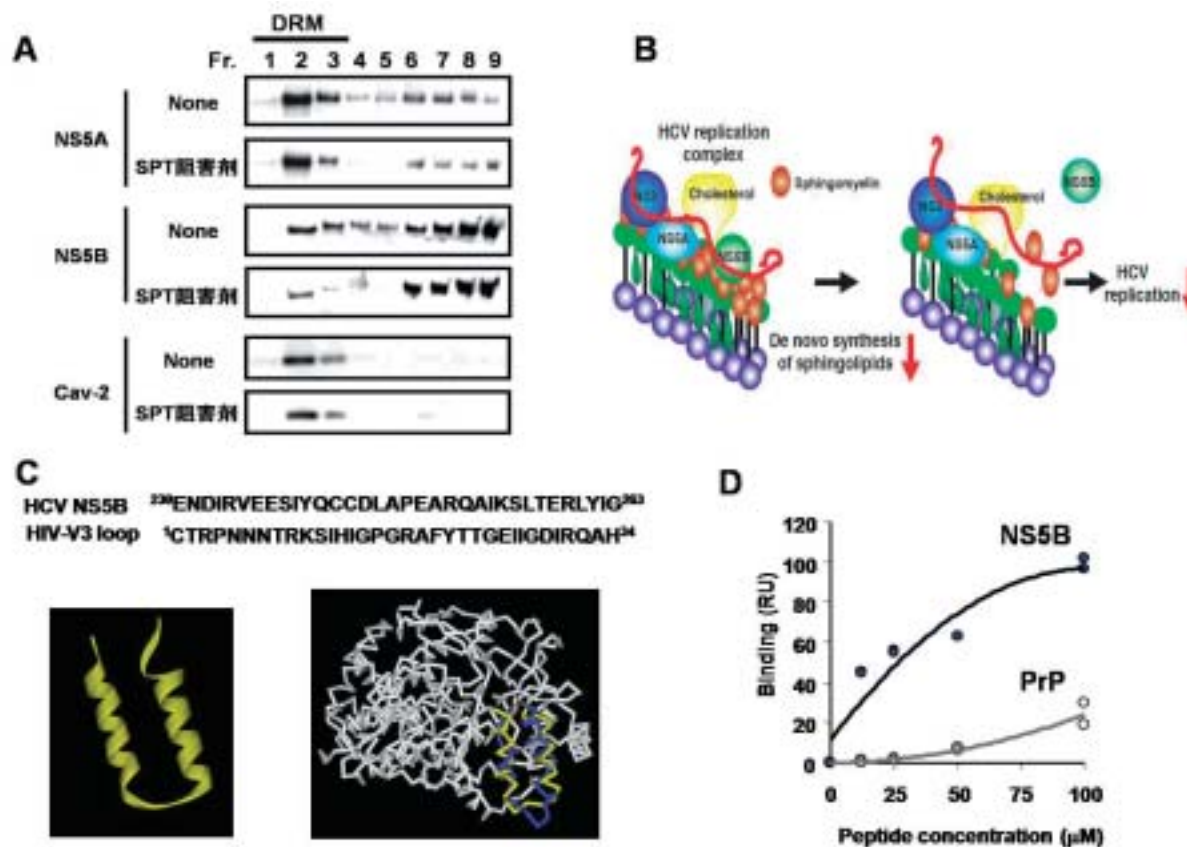


図3 SPT 阻害剤の作用機序

- (A) 4℃で detergent 処理後にシヨ糖濃度勾配遠心を行うことにより detergent resistant membrane 分画 (DRM 分画) を抽出し, SPT 阻害剤による HCV 蛋白質の変化を解析した. NS5B が DRM 分画から減少しているのがわかる.
- (B) SPT の作用機序モデル
- (C) HIV にてスフィンゴミエリンと結合することが知られている V3loop 領域 (青) と NS5B での V3loop-like 領域 (黄)
- (D) NS5B での V3loop-like 領域のペプチドを合成しスフィンゴミエリンと Biacore を使用して Binding Assay を行った.

ところ IC_{50} がおよそ 5.8nM と非常に強い複製抑制効果を認めた (図 1D). 他方で, 細胞毒性はほとんど認められなかった. 我々は, この実験結果から, スフィンゴ脂質の HCV 複製関与の可能性とスフィンゴ脂質合成阻害剤が抗 HCV 薬となりうる可能性を見出した.

3. HCV 感染モデル動物であるヒト肝臓型キメラマウスと SPT 阻害剤の抗 HCV 効果

*in vitro*での結果を受けて, さらに SPT 阻害剤の抗 HCV 効果を検討するためヒト肝臓型キメラマウスを使用した *in vivo*での検討を行った. ヒト肝臓型キメラマウスは, uPA/SCID マウスが肝障害を起こす免疫不全マウスであることを利用し, ヒト初代肝細胞を移植しマウス肝臓をヒト肝臓へ置換したものである²²⁾. 置換率はおよそ 70-80% であり, ヒトアルブミンを産生し, 代表的な薬剤代謝酵素である CYP の活性も認められる¹⁰⁾¹¹⁾. このヒト肝臓型キメ

ラマウスは, ヒト及びチンパンジーにしか感染しないとされる HCV に高率に感染し持続感染を起こす¹³⁾. 我々の検討では, genotyp 1a, 1b, 2a のいずれの遺伝子型であっても感染し, 10^6 から 10^7 copies/ml という high-titer で持続感染が成立する. このマウスを用いた実験により, 薬物のデリバリーや代謝を踏まえた抗ウイルス剤の評価が可能である¹⁴⁾.

我々は, HCV を持続感染させたヒト肝臓型キメラマウスを使用して, SPT 阻害剤の抗 HCV 効果の検討を行った. genotyp 1a, 1b の HCV を感染させたヒト肝臓型キメラマウスにミリオシン (1mg/kg) を連日投与し, 比較対象として PEG-IFN α -2a (ペガシス®) (30 μ g/kg) を 2 回/週で投与し, さらにミリオシンと PEG-IFN α -2a の併用投与を行った (図 2A). 経日的に血清中 HCV-RNA を評価したところ, ミリオシンは HCV-RNA 量を 1/10 ~ 1/100 低下させた. さらにミリオシンと PEG-IFN α -2a を併用するこ

とで相乗効果を示し、今回使用したキメラマウス3個体中2個体の血清中ウイルス量が検出限界以下となる強力な抗HCV効果を示した(図2B,C)。

次に肝臓中の変化を、肝臓内HCV-RNA及びHCV core蛋白質を定量し評価した。その結果、血清中HCV-RNAの経過と同様に肝臓内HCV-RNA及びHCV core蛋白質の低下を認めた(図2D)。以上の結果から、スフィンゴ脂質がHCVの増殖に必要な不可欠であること、そしてSPT阻害剤が有望な抗HCV薬となりうることを示された。

4. スフィンゴミエリンの減少がHCV複製の抑制を導く

それでは、このSPT阻害剤はどのようにして抗HCV作用を示すのであろうか？SPT阻害剤は前述のとおりスフィンゴ脂質のde novo合成系の最上流酵素を阻害する。つまり、SPT阻害剤により影響を受けるのはセラミド、スフィンゴミエリン、およびグルコシルセラミドを始めとするスフィンゴ糖脂質などである。そこで我々はSPT阻害剤によるHCV複製抑制の責任因子を規定するために、セラミド合成酵素の阻害剤であるfumonisinB1, CERTの阻害剤であるHPA-12, グルコシルセラミド合成酵素の阻害剤であるPPMP, NB-DNJなどを使用しHCVレプリコン細胞で検討を行った。

すると、fumonisinB1, HPA-12で濃度依存的に複製抑制効果が認められた。他方で、グルコシルセラミドの阻害剤であるPPMP, NB-DNJやスフィンゴシン1リン酸受容体のアゴニストであるFTY720では、それほど強い抑制効果が見られなかった。以上の結果は、スフィンゴミエリンがHCVの複製に関係していることを示唆している。そこで、スフィンゴミエリンとHCVの関係を検討した。

スフィンゴミエリンは原形質膜などを構成する脂質成分であるが、コレステロールとともに脂質ラフトと呼ばれる特殊な膜組織を形成することが知られている⁴⁾²¹⁾。他方で、HCVは脂質ラフトにおいて複製することが報告されている¹⁾²⁰⁾。そこで我々は、SPT阻害剤が脂質ラフトに与える影響を検討した。脂質ラフトは、4℃において界面活性剤で処理し、シヨ糖濃度勾配遠心を行うことより抽出される界面活性剤不溶性分画、いわゆるdetergent resistant membrane (DRM)として生化学的に抽出できることが知られている³⁾。すると、SPT阻害剤を投与することによりDRM上のスフィンゴミエリンが減少し、同時にRNA dependent RNA polymeraseであるNS5Bが減少した。一方で、他の非構造蛋白質であるNS3, NS4B, NS5AはDRM上での変化は認められなかった(図3A)。

そこで我々は、さらにスフィンゴミエリンと結合することが既に報告されているHIVのV3領域と類似の3次元構造があるかにつき検索を行った。すると、NS5B 230-263に類似の立体構造を形成する領域を見出した。そこで、Biacore systemを使用し上記領域のペプチドとスフィン

ゴミエリンのBinding Assayを行ったところ、ペプチド量に依存して結合量が増加した(図3C,D)。以上から、RNA dependent RNA polymeraseであるNS5Bはスフィンゴミエリンと脂質ラフト上で結合しHCV複製に寄与しているが、SPT阻害剤の投与により、脂質ラフト上のスフィンゴミエリンが減少し、NS5Bが脂質ラフト上に留まることが考えられた(図3B)。

おわりに

今回我々は、スフィンゴミエリンが脂質ラフトにおいてHCVの複製に寄与していること、およびSPT阻害剤が有望な抗HCV薬となりうることを示した。最近になりAizakiらによりスフィンゴミエリンが、我々が報告したHCV複製への関与だけでなく、成熟過程にも寄与している可能性が示唆された²⁾。さらに我々はHCVが感染することによりスフィンゴミエリンの産生が亢進することを見出している(未発表データ)。以上のことは、スフィンゴミエリンがHCVの生活環に広範に関わっていることを示唆している。スフィンゴミエリンが形成する膜構造が、HCVにおける侵入、複製、成熟、出芽という一連の生活環の中でどのように関わっていくのかは非常に興味深い。

スフィンゴミエリンをはじめとしたスフィンゴ脂質はそもそも原形質膜をはじめとする構造を形成するものとして考えられてきた。しかし、近年になり構造体としてだけでなく、シグナル伝達を始めとした特定の機能を有することが分かってきた。今回、我々が示した研究結果においてもスフィンゴミエリンがHCV感染により複製複合体を形成し、さらにRNA dependent RNA polymeraseと結合するという特定の機能を有することが示された。今後、HCVとスフィンゴ脂質の関係から新たなスフィンゴ脂質の機能を見出すことを期待している。

文 献

- 1) Aizaki, H., Lee, K.J., Sung, V.M., Ishiko, H. & Lai, M.M. Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology* 324, 450-461, 2004.
- 2) Aizaki, H., et al. Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *Journal of virology* 82, 5715-5724, 2008.
- 3) Brown, D.A. & Rose, J.K. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533-544, 1992.
- 4) de Almeida, R.F., Fedorov, A. & Prieto, M. Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. *Biophysical journal* 85, 2406-2416, 2003.
- 5) Fried, M.W., et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine* 347, 975-982, 2002.

- 6) Gao, L., Aizaki, H., He, J.W. & Lai, M.M. Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *Journal of virology* 78, 3480-3488, 2004.
- 7) Hamamoto, I., et al. Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *Journal of virology* 79, 13473-13482, 2005.
- 8) Inoue, K., et al. Combined interferon alpha2b and cyclosporin A in the treatment of chronic hepatitis C: controlled trial. *Journal of gastroenterology* 38, 567-572, 2003.
- 9) Inoue, K., et al. Evaluation of a cyclophilin inhibitor in hepatitis C virus-infected chimeric mice in vivo. *Hepatology* 45, 921-928, 2007.
- 10) Katoh, M., et al. Expression of human cytochromes P450 in chimeric mice with humanized liver. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 32, 1402-1410, 2004.
- 11) Katoh, M., et al. In vivo induction of human cytochrome P450 enzymes expressed in chimeric mice with humanized liver. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 33, 754-763, 2005.
- 12) Manns, M.P., et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358, 958-965, 2001.
- 13) Mercer, D.F., et al. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nature medicine* 7, 927-933, 2001.
- 14) Meuleman, P. & Leroux-Roels, G. The human liver-uPA-SCID mouse: A model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV. *Antiviral research*, 2008.
- 15) Nakagawa, S., et al. Hsp90 inhibitors suppress HCV replication in replicon cells and humanized liver mice. *Biochemical and biophysical research communications* 353, 882-888, 2007.
- 16) Okamoto, T., et al. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *The EMBO journal* 25, 5015-5025, 2006.
- 17) Parfieniuk, A., Jaroszewicz, J. & Flisiak, R. Specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 13, 5673-5681, 2007.
- 18) Poynard, T., Yuen, M.F., Ratziu, V. & Lai, C.L. Viral hepatitis C. *Lancet* 362, 2095-2100, 2003.
- 19) Sakamoto, H., et al. Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nature chemical biology* 1, 333-337, 2005.
- 20) Shi, S.T., Lee, K.J., Aizaki, H., Hwang, S.B. & Lai, M.M. Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2. *Journal of virology* 77, 4160-4168, 2003.
- 21) Simons, K. & van Meer, G. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27, 6197-6202, 1988.
- 22) Tatenno, C., et al. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *The American journal of pathology* 165, 901-912, 2004.
- 23) Tu, H., et al. Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology* 263, 30-41, 1999.
- 24) Umehara, T., et al. Serine palmitoyltransferase inhibitor suppresses HCV replication in a mouse model. *Biochemical and biophysical research communications* 346, 67-73, 2006.
- 25) Watashi, K., et al. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Molecular cell* 19, 111-122, 2005.
- 26) Yoshizawa, H. Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection in Japan: projection to other countries in the foreseeable future. *Oncology* 62 Suppl 1, 8-17, 2002.

Suppression of hepatitis C virus with the reagent targetting host factors

Yuichi HIRATA¹⁾, Masayuki SUDO²⁾, Michinori KOHARA¹⁾

1) Department of Microbiology and Cell Biology

Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science,

3-18-22 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8613, Japan

2) Kamakura Research Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co.Ltd.,

200 Kajiwara, Kamakura, Kanagawa 247-8530, Japan

Hepatitis C virus(HCV) develops persistent infection in most infected patients, and eventually cause chronic hepatitis, liver cirrhosis and then hepatocellular carcinoma. The combination therapy of PEG-IFN and ribavirin improves the efficacy in many patients, while it does not lead to sufficient achievements in genotype1b patients. To invent new anti-HCV reagent, we focused on host factors which HCV take advantage of in its life-cycle. We identified serine palmitoyltransferase inhibitor as anti-HCV reagent through high-through put screenig using HCV replicon cells. Moreover, we evaluate the anti-HCV effect of SPT-inhibitor *in vivo* with humanized chimeric mice. SPT-inhibitor led to rapid decline in serum HCV-RNA of about 1-2log within 8 day, futhermore the combination therapy of SPT-inhibitor and PEG-IFN achieved about 3log reduction in serum HCV-RNA. At last, we investigated the mechanism of anti-HCV effect of SPT-inhibitor. It has been reported that sphingolipids and cholesterol compose the lipid raft, in which the replication of HCV occur. We investigated the influence of SPT-inhibitor to lipid rafts by analysing the detergent resistant membrane(DRM) . The analysis proved that SPT inhibitor got HCV RNA dependent RNA polymerase (NS5B) to move to detergent soluble fraction from DRM, and Biacore analysis indicated the binding of sphingomyelin to NS5B. These results suggested SPT inhibitor got NS5B to release from replication complex.

