

## 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

平田 雄一,<sup>a</sup> 須藤 正幸,<sup>b</sup> 小原 道法<sup>\*,a</sup>

## Suppression of Hepatitis C Virus (HCV) Replication with Serine Palmitoyltransferase Inhibitor

Yuichi HIRATA,<sup>a</sup> Masayuki SUDOH,<sup>b</sup> and Michinori KOHARA<sup>\*,a</sup>

<sup>a</sup>Department of Microbiology and Cell biology, The Tokyo metropolitan Institute of Medical Science, 2-1-6 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan, and <sup>b</sup>Kamakura Research Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co. Ltd., 200 Kajiwara, Kamakura, Kanagawa 247-8530, Japan

(Received August 28, 2009)

Hepatitis C virus (HCV) persists chronically in most infected patients, eventually causing chronic hepatitis, liver cirrhosis, and in some cases hepatocellular carcinoma. The combination therapy of PEG-IFN and ribavirin improves efficacy in many patients, although it does not lead to sufficient achievements in genotype 1b patients. To aid in invention of new anti-HCV reagents, we focused on host factors that contributed to HCV lifecycle. We identified serine palmitoyltransferase inhibitor as an anti-HCV reagent through high-throughput screening using HCV replicon cells. We investigated the mechanism of anti-HCV effect of SPT inhibitor. It has been reported that sphingolipids and cholesterol compose the lipid raft where replication of HCV occurs. We investigated the influence of SPT inhibitor to lipid rafts by analyzing the detergent-resistant membrane (DRM). The analysis showed that SPT inhibitor moved HCV RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) to detergent-soluble fraction from DRM, and Biacore analysis indicated binding of sphingomyelin to NS5B. These results suggest that SPT inhibitor disrupts the interaction between NS5B and sphingomyelin. Moreover, we evaluated 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 1–2 log within 8 days. Furthermore, combination therapy of SPT inhibitor and PEG-IFN achieved about 3 log reduction in serum HCV-RNA.

**Key words**—hepatitis C virus (HCV); host factor; sphingomyelin; lipid raft

## はじめに

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 高ウイルスの患者は依然として治療抵抗性であり、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。<sup>1)</sup>

われわれは、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、いくつかの阻害剤を同定し報告してきた。<sup>2-4)</sup> 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. サイクロスポリン A 関連物質による抗 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。<sup>5,6)</sup> これら宿主因子は抗 HCV 薬の標的となり得ると考えられ、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。

われわれはこれまでに C 型肝炎ウイルス (HCV) が原因で発症する C 型劇症肝炎の治療経過から、サイクロスポリン A (CsA) が HCV の増殖を抑制することを見出し、HCV の治療に積極的に CsA

<sup>a</sup>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 (〒156-8506 東京都世田谷区上北沢 2-1-6), <sup>b</sup>中外製薬鎌倉研究所 (〒247-8530 神奈川県鎌倉市梶原 200)

\*e-mail: kohara-mc@igakuken.or.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム S33 で発表したものを中心に記述したものである。

を用いる治療法を開発してきた。<sup>7)</sup> 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 [CsA は、①CyP, ②カルシニューリン (CN)/NF-AT 経路, ③P-タンパク質 (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サイクロフィリン 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た。<sup>8)</sup> 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。CsA は環状ペプチドで、カルシニューリン B (CnB) 結合部位とサイクロフィリン結合部位を有している。抗 HCV 剤としては免疫抑制活性は副作用に当たるので、免疫抑制活性をなくすために CnB 結合部位に変異を導入した誘導体 DEBIO-025 が作られた。<sup>9)</sup> DEBIO-025 は免疫抑制活性は CsA に比較して 1/7161 とほとんどないにもかかわらず、CsA よりも強い抗 HCV 活性を示し、CnB 阻害活性 (免疫抑制活性) を除去した CsA 誘導体は安全性が高く、強い抗 HCV 活性を示すことが明らかとなった。<sup>9)</sup> これらのことから、HCV においては宿主因子を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

われわれは HCV レプリコン保持細胞を用いた抗 HCV 物質のランダムスクリーニングにより、カビの一種である *Fusarium sp.* F1476 株から HCV レプリコンの複製を阻害する低分子化合物 NA255 を単離した [Figs. 1(A) and (B)].<sup>3)</sup> その化学構造は免疫抑制剤として知られるミリオシンに類似していたが [Fig. 1(A)], 免疫抑制作用は認められなかった。一方、ミリオシンはスフィンゴ脂質生合成経路の律速酵素であるセリンパルミトイルトランスフェラーゼ (SPT) の特異的な阻害剤であり、下流物質の生合成量を減少させる [Fig. 1(C)]. SPT 阻害剤を HCV レプリコン保持細胞に投与したところ、これらは細胞毒性を示さずに、濃度依存的に HCV レプリコンの複製を阻害し、50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) の値は約 5 nM であった [Fig. 1(B)]. 同時に、これらの阻害剤は SPT の活性を阻害し、細胞内のスフィンゴ脂質及び脂質ラフトを不安定化させていた。

また、SPT 阻害剤による HCV レプリコンの複製阻害能はスフィンゴ脂質生合成経路の反応中間体であるジヒドロスフィンゴシン、スフィンゴシン、スフィンゴシン-1-リン酸 [Fig. 1(C), 下線] を培養液中加入することで減弱した (Table 1)。これらのことからスフィンゴ脂質や脂質ラフトは HCV の複製に重要な役割を果たしていることが示唆された。

次に、スフィンゴ脂質や脂質ラフトと複製の直接的な関係を調べた。HCV タンパク質の配列解析の結果、HCV ゲノムの複製反応を行う酵素である NS5B に HIV-1 の糖タンパク質 120 (gp120) に含まれる V3 ループ様の構造を含んでいた。V3 ループはスフィンゴ脂質の 1 つであるスフィンゴミエリンとの相互作用が知られ、実際に NS5B もスフィンゴミエリンと相互作用することを明らかにした [Fig. 2(A)]. つまりスフィンゴミエリンは NS5B が脂質ラフトに結合するための直接的な足場となっていると考えられる。また、HCV レプリカーゼは他の宿主タンパク質を介してラフト上に存在していることが報告されている。スフィンゴ脂質の減少は脂質ラフトの形成を抑制することから、NA255 やミリオシンは HCV レプリカーゼが安定に機能するための足場を破綻させ、その結果として HCV レプリコンの複製を阻害したと考えられる [Fig. 2(B)]. われわれは本研究により、脂質ラフト上で HCV の複製が起こっているという直接的な発見とは別の経路から、HCV の複製とスフィンゴ脂質及び脂質ラフトの関係を明らかにした。

## 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

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。<sup>10)</sup> 遺伝子型 1a, 1b, 2a のいずれの遺伝子型であっても感染し、10<sup>6</sup> から 10<sup>7</sup> 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。

われわれは、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

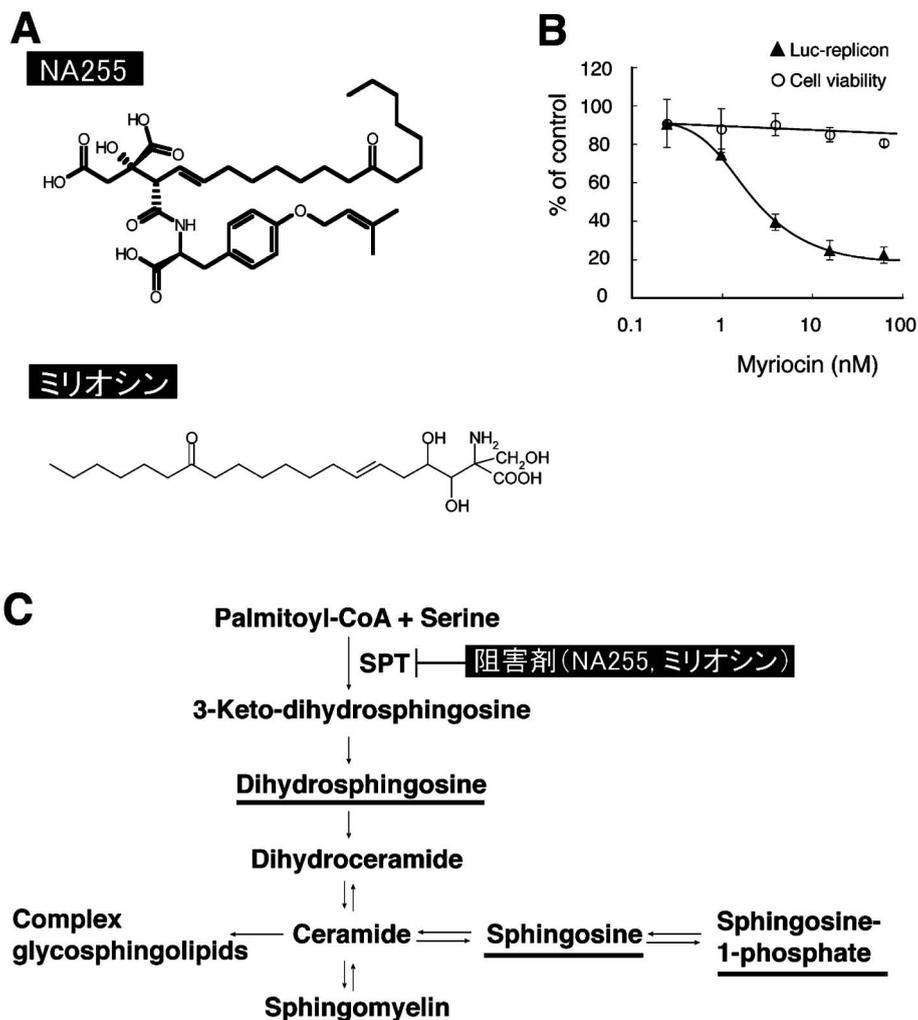


Fig. 1. The Identification of SPT Inhibitor as the Anti-HCV Compound

(A), The structure of NA255; (B), The effect of SPT inhibitor on the suppression of HCV replication and cell viability; (C), *de novo* biosynthesis pathway of sphingolipids.

Table 1. Exogenous Sphingolipids Restore the Anti-HCV Effect of Myriocin

添加するスフィンゴ脂質 ( $\mu\text{M}$ )	ミリオシンの $\text{IC}_{50}$ (nM)	
無添加	0	5.8
ジヒドロスフィンゴシン	1.0	77.7
	2.5	>1000
スフィンゴシン	1.0	22.4
	2.5	>1000
スフィンゴシン-1-リン酸	1.0	14.7
	2.5	>1000

果の検討を行った。genotype 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 (1 mg/kg) を連日投与し、比較対照として PEG-IFN- $\alpha$ -2a (ペガシス®) (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) を 2 回/週で投与

し、さらにミリオシンと PEG-IFN- $\alpha$ -2a の併用投与を行った [Fig. 3(A)]. 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- $\alpha$ -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 [Figs. 3(B) and (C)].<sup>4)</sup>

次に肝臓中の変化を、肝臓内 HCV-RNA 及び HCV core タンパク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 タンパク質の低下を認めた [Fig. 3(D)]. 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 薬となり得ることが示

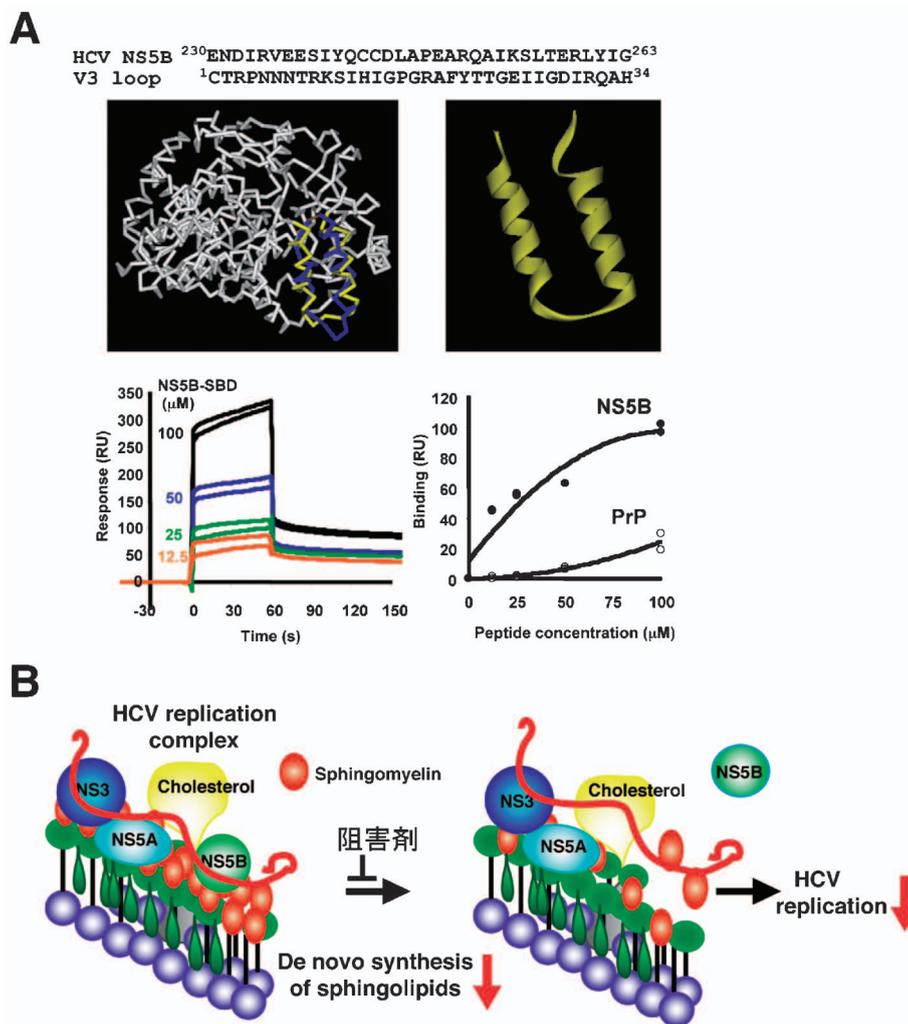


Fig. 2. The Mechanism of Anti-HCV Effect by SPT Inhibitor

(A) V3 loop domain (blue) and V3 loop-like domain in HCV nonstructural 5B polymerase (yellow) V3 loop domain of HIV is known to bind to sphingomyelin. We synthesized the peptide of V3 loop-like domain and then examined binding assay between V3 loop-like domain peptide and sphingomyelin using Biacore system. (B) The schematic model of anti-HCV effect by SPT inhibitor. The reduction of sphingomyelin disrupts the binding of sphingomyelin to HCV nonstructural 5B polymerase in the lipid raft.

された。

おわりに

今回われわれは、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、及び SPT 阻害剤が有望な抗 HCV 薬となり得ることを示した。最近になり Aizaki らによりスフィンゴミエリンが、われわれが報告した 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。<sup>2)</sup> さらにわれわれは HCV が感染することにより特定の分子種のスフィンゴミエリン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 の生活環に広範に係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係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始めとしたスフィンゴ脂質はそもそも原形質膜を始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、われわれ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。

本研究は、平田雄一研究員、楳原琢哉研究員 (東

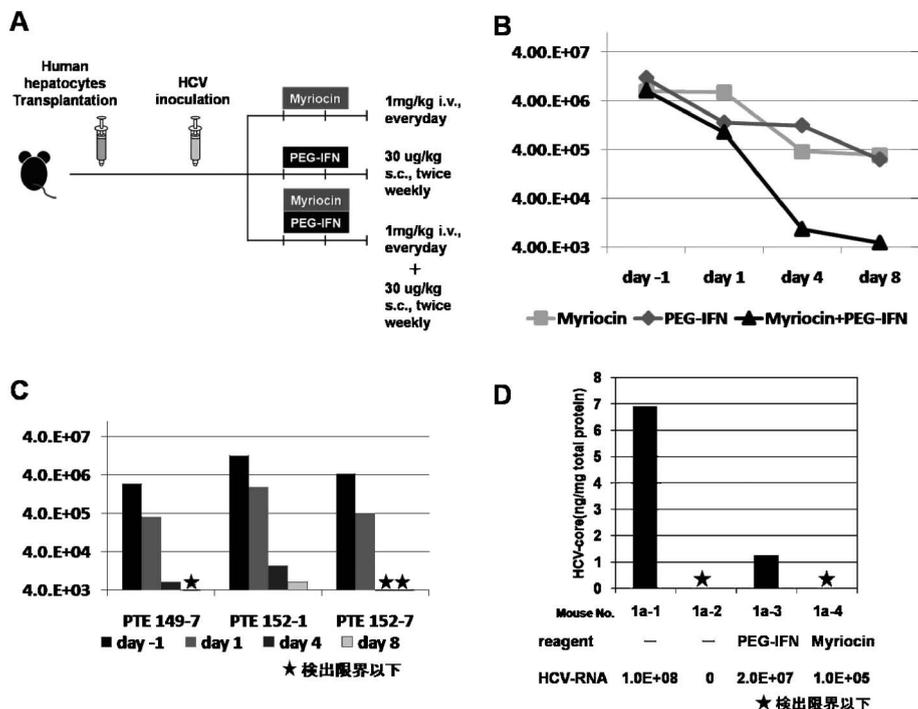


Fig. 3. The Anti-HCV Effect of SPT Inhibitor in the Animal Model Using Humanized Chimeric Mice

(A) Schedule of experiments using chimeric mice infected with HCV. (B) The change of serum HCV-RNA. This graph shows the average of three mice in each group. (C) The change of serum HCV-RNA in each individual mouse treated with PEG-IFN and Myriocin Serum HCV-RNA was not detected in two of three mice. (D) The change of HCV-RNA and HCV core protein in the liver.

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), 井上和明博士 (昭和大学藤が丘病院消化器内科), 坂本洋博士, 須藤正幸博士 (中外製薬株式会社鎌倉研究所) との共同研究で行われたものです。

## REFERENCES

- 1) Parfieniuk A., Jaroszewicz J., Flisiak R., *World J. Gastroenterol.*, **13**, 5673–5681 (2007).
- 2) Nakagawa S., Umehara T., Matsuda C., Kuge S., Sudoh M., Kohara M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **353**, 882–888 (2007).
- 3) Sakamoto H., Okamoto K., Aoki M., Kato H., Katsume A., Ohta A., Tsukuda T., Shimma N., Aoki Y., Arisawa M., Kohara M., Sudoh M., *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 333–337 (2005).
- 4) Umehara T., Sudoh M., Yasui F., Matsuda C., Hayashi Y., Chayama K., Kohara M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **346**, 67–73 (2006).
- 5) Gao L., Aizaki H., He J.-W., Lai M. M. C., *J. Virol.*, **78**, 3480–3488 (2004).
- 6) Hamamoto I., Nishimura Y., Okamoto T., Aizaki H., Liu M., Mori Y., Abe T., Suzuki T., Lai M. M. C., Miyamura T., Moriishi K., Matsuura Y., *J. Virol.*, **79**, 13473–13482 (2005).
- 7) Inoue K., Sekiyama K., Yamada M., Watanabe T., Yasuda H., Yoshiba M., *J. Gastroenterol.*, **38**, 567–572 (2003).
- 8) Watashi K., Ishii N., Hijikata M., Inoue D., Murata T., Miyanari Y., Shimotohno K., *Mol. Cell*, **19**, 111–122 (2005).
- 9) Inoue K., Umehara T., Ruegg U. T., Yasui F., Watanabe T., Yasuda H., Dumont J.-M., Scalfaro P., Yoshiba M., Kohara M., *Hepatology*, **45**, 921–928 (2007).
- 10) Tateno C., Yoshizane Y., Saito N., Kataoka M., Utoh R., Yamasaki C., Tachibana A., Soeno Y., Asahina K., Hino H., Asahara T., Yokoi T., Furukawa T., Yoshizato K., *Am. J. Pathol.*, **165**, 901–912 (2004).