

特集“臨床に必要な高齢者精神障害の知識”

これからの老年精神医学にはもっと明確なポジティブな目標を掲げることが求められている。人生の締めくくりとして有終の美を迎えるためにアフクティブ・エイジング、プロダクティブ・エイジング、あるいはサクセッフル・エイジングなどの標語が掲げられている。エイジズムはすでに過去の悪習であり、積極的に高齢者のメンタルヘルスへの貢献が求められるようになってきているといえよう。高齢者に対するニヒリズムを卒業した新しい、老年精神医学の役割が期待されている。(編集後記より)

●B5判 ●特価6,510円(本体6,200円) 送料200円

第1部 総論

1. 老年期について (浴風会認知症介護研究・研修東京センター) 長谷川 和夫
2. 脳と心の老化 (大阪大学名誉教授) 西村 健
3. 高齢者精神障害の疫学 (大阪大学) 徳永 博正・他

第2部 各論

1. 軽度認知障害 (大阪大学) 工藤 喬・他
2. アルツハイマー病 (大阪大学) 田中 稔久・他
3. 若年認知症 (南魚沼市立ゆきくに大和病院) 宮 永 和夫
4. 血管性認知症 (住友病院) 宇高不可思・他
5. レビー小体型認知症 (愛媛大学) 清水 秀明・他
6. 前頭側頭型認知症 (熊本大学) 橋本 衛・他
7. 大脳皮質基底核変性症 (大悟病院老年期精神疾患センター) 三山 吉夫
8. 進行性核上麻痺 (筑波大学) 水上 勝義
9. 特発性正常圧水頭症 (大阪大学) 数井 裕光・他
10. クロイツフェルト・ヤコブ病 (金沢大学) 浜口 毅・他
11. 高齢者のせん妄・意識障害 (大阪大学) 谷向 仁・他
12. 統合失調症の高齢化 (滝澤病院) 大森 健一
13. 高齢者の妄想性障害 (群馬病院) 三賀 史樹・他
14. 高齢者の気分障害 (国立精神・神経センター) 樋口 輝彦
15. 高齢者の不安障害 (島根大学) 堀口 淳・他
16. 高齢者の自殺 (岩手医科大学) 智田 文徳・他
17. 高齢者の身体表現性障害・解離性障害 (栗津神経サナトリウム) 越 野 好文
18. 高齢者の適応能力と性格変化 (東京慈恵会医科大学附属柏病院) 津村 麻紀・他
19. 高齢者のアルコール・薬物乱用 (三光病院) 洲 諒
20. 高齢者の睡眠障害 (秋田大学) 武村 尊生・他
21. 高齢者の性障害 (札幌医科大学) 加藤 隆一
22. 高齢者の身体疾患に伴う精神障害 (大阪府立急性期・総合医療センター) 木村 亮・他

第3部 治療と対応

1. 高齢者の薬物療法 (兵庫医科大学) 守田 嘉男
2. 高齢者への非薬物療法—心理療法 (高知大学) 井関 美咲・他
3. 高齢者へのリハビリテーション (森之宮病院) 矢倉 一・他
4. 高齢者の身体看護および介護 (大阪大学) 三上 洋
5. 高齢者の精神看護 (石川県立看護大学) 天津 米子・他
6. 高齢者のヘルパー活用 (認知症介護研究・研修東京センター) 中尾真裕子・他
7. 高齢者のデイサービス (東北福祉大学) 加藤 伸司
8. 老人保健施設 (奈良県立医科大学) 森川 将行・他
9. 高齢者医療センター (順天堂東京江東高齢者医療センターメンタルクリニック) 熊谷 亮・他
10. 介護保険制度 (国立長寿医療センター) 遠藤 英俊・他
11. 成年後見法 (東京都老人総合研究所) 本間 昭

発行所 **AM** アークメディア 〒102-0075 東京都千代田区三番町7-1 朝日三番町プラザ406号
TEL 03-5210-0871/FAX 03-5210-0874/振替00160-5-129545

From Cyclosporin to DEBIO

中川美奈*** 坂本直哉*** 渡辺 守*

索引用語：サイクロスポリンA, サイクロフィリン, PPIase活性,
サイクロフィリン阻害剤, DEBIO-025

1 はじめに

C型慢性肝炎(HCV)の肝病態進展の阻止にウイルス排除は不可欠であり、持続的なウイルス排除を目的としてインターフェロン(IFN)療法が施行されてきた。現時点で効果的な治療はPeg-IFNとribavirinの併用療法であり、難治例に対しても著効率は約50%まで期待できるようになったが、その効果はいまだ十分とはいえず新たな治療法の開発が望まれている。

蛋白質の高次構造形成や転写制御、ウイルス感染などに重要な役割を担っていることで知られるイムノフィリンの1つであるサイクロフィリンは、ヒト後天性免疫不全ウイルス(HIV-1)のGag蛋白質と結合し、HIV-1ウイルス粒子に取り込まれることが報告され¹⁾注目を集めたが、そののちもサイクロフィリンがウイルス感染や増殖に関与することが次々と報告されている²⁻⁵⁾。近年、HCVに関して

もサイクロフィリンとの関連性が報告され^{6,7)}、サイクロフィリンを新たなターゲットとした治療戦略が期待されている。

本稿ではサイクロフィリンに注目が集まる契機となった免疫抑制剤サイクロスポリンA(CsA)から、現在欧米を中心に臨床試験が行われているサイクロフィリン阻害剤の1つDEBIOまで、筆者らの知見も含めて概説したいと思う。

2 サイクロスポリンAとサイクロフィリン

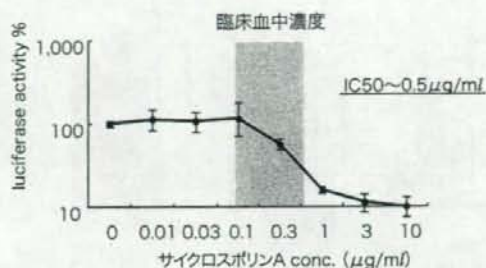
CsAは11個の疎水性アミノ酸からなる環状ペプチドである。1970年代初頭に、サンド社(現ノバルティスファーマ)によって抗菌物質として発見されたが、1976年にBorelらによりT細胞の活性化を抑制することが報告され⁸⁾、CsAは臓器移植後の拒絶反応抑制のための免疫抑制剤として広く用いられるようになった⁹⁾。現在では、各種の臓器移植後の

Mina NAKAGAWA *et al*: From cyclosporin to DEBIO

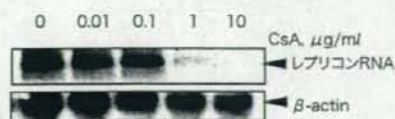
*東京医科歯科大学消化器内科 [〒113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45]

**同 分子肝炎制御学講座

A. レプリコン増殖



B. ノーザン・プロット



C. ウェスタン・プロット



図3 CsAの抗HCV効果

HCVレプリコン増殖はCsAの濃度依存性に抑制され、その50%抑制濃度は $\sim 0.5 \mu\text{g/ml}$ であり、臨床血中濃域にてその効果がみられることがわかった(A)。ノーザンプロット(B)およびウェスタンプロット(C)でも、レプリコンRNAおよびHCV蛋白の発現が濃度依存性に抑制されることが確認された。

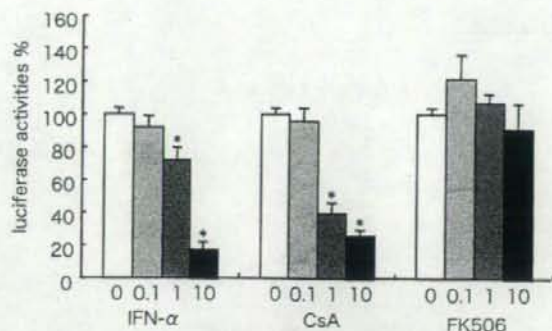
白質である。当初、サイクロフィリンはCsAに結合すること以外にどのような作用を持っているか不明であったが、1989年サイクロフィリンの持つPPIase (=Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) 活性が明らかとなり、細胞内機能を制御する非常に重要な蛋白の1つとして多に注目を集めるようになった^{11,12)}。

PPIase 活性とは一言でいえば、蛋白質のなかのペプチド結合のシス型とトランス型の変換を促進する酵素、つまり、蛋白質の高次構造の形成において重要な役割を担う作用のことである。プロリンはプロリン環を持っていて、通常の条件下でもシス型とトランス型が立体障害をきたすことなく共存できるが、PPIase 活性を持つサイクロフィリンは、プロリン残基との間のペプチド結合を180度回転させて構造変換を促進し、蛋白質を正しい構造に折れたたむ広義の分子シャペロンと考えられる(図1)。CsA同様に免疫抑制剤としてしられるタクロリムス(FK506)も、細胞内受容体であるFK binding protein (FKBP)と

複合体を形成することが知られるが、FKBPもサイクロフィリン同様にPPIase 活性を有しており、蛋白質の高次構造の形成に重要な役割を担っている。

CsAとFK506はカルシニューリン(CN)を阻害することで、免疫応答を抑える薬剤であることが広く知られている。図2に示すようにT細胞の受容体が抗原刺激を受けると、細胞内のCNが活性化し、転写因子NFATを脱リン酸化し、種々のサイトカイン遺伝子発現を誘導するが、構造上全く異なるCsA-サイクロフィリン、FK506-FKBPの複合体が同一の蛋白質CNの活性発現制御系に作用し、T細胞活性化の細胞内シグナル伝達系を抑制して免疫抑制作用を発現することは実に興味深い。さらに、これら複合体の形成によりサイクロフィリンやFKBPが持つPPIase 活性が阻害されることも明らかになってきており、この活性阻害はCN系の阻害を介した免疫抑制効果とは関係がない。サイクロフィリンやFKBPの基質や作用機序などこれから解明す

A. レプリコン増殖



B. ISREリポーターアッセイ

(Interferon stimulated response elements)

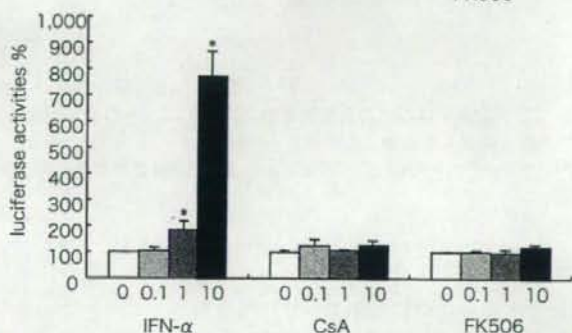


図4 抗HCV効果とISRE活性への影響

レプリコン増殖はCsAの濃度依存性に抑制されたが、FK506では臨床血中濃度をはるかに超えた濃度においても増殖抑制効果は認められない。HCV増殖を同様に強力に抑制するIFN α は、遺伝子転写調節領域にあるISREにより制御させるIFN誘導遺伝子の発現を介して、抗ウイルス作用を呈し、IFN α 添加によってISRE活性は上昇する。しかし、CsAではこのようなISRE活性の上昇は認められず、そのHCV抑制効果はIFNとは独立した作用機構を介することが明らかとなった。

べき点が多いが、蛋白質の高次構造の形成に重要な役割を担うシャペロン機能をもつ宿主因子として、多岐にわたる疾患への関与が報告されており、さまざまな分野の研究者にとって非常に興味深い蛋白質といえる。

3 サイクロスポリンAの持つHCV増殖抑制効果

2003年inoueらにより、C型慢性肝炎患者においてIFN α とCsAの併用投与がIFN単独よりも治療効果が有意に上昇することが報告されたが¹³⁾、その作用機序は十分明らかとさ

れていなかった。われわれは、HCVの培養細胞で複製増殖モデルであるHCVレプリコンシステムを改変したキメラリポーター発現レプリコンによるHCV発現定量系を用いて、薬剤・サイトカインなどの抗ウイルス効果を解析したところ、CsAが濃度依存性にHCVレプリコン増殖を抑制し、臨床血中濃度域にてHCVの抗ウイルス効果を認めることを報告した(図3)¹⁴⁾。ほぼ同時期に国内から同様の報告がなされ¹⁵⁾、CsAの持つ抗HCV効果が注目された。

現在HCV治療の基軸となっているIFN α

表1 サイクロフィリンファミリー

Protein name	Protein size	Subcellular localization
CypA	18 kDa	Cytoplasm
CypB	18-20 kDa	ER and Secretory Pathway
CypC	18 kDa	Secretory Pathway
CypF, Cyp3	18-22 kDa	Mitochondria
PP1L1, CypM	18 kDa	Cytoplasm
USA-Cyp, Cyp20	20 kDa	Nucleus
CypE, Cyp33A	40 kDa	Nucleus
Cyp33B	< 40 kDa	Nucleus
Cyp40	40 kDa	Nucleus
colon cancer Ag10	50 kDa	Nucleus
Cyp60	60 kDa	Nucleus
CARS-Cyp	89kDa	Nucleus
NK-TRCYP	89kDa	Nucleus
RAN-BP2, NUP-358	358kDa	Nucleus

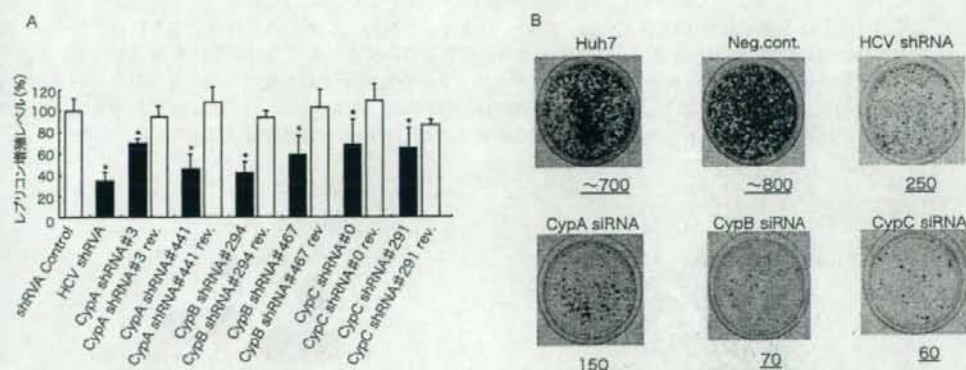


図5 shRNAによるCyp発現抑制時のHCV増殖レベルの解析

サイクロフィリンのサブタイプの内、HCVゲノム増殖コンプレックスが存在するとされる細胞質、および小胞体に局在する、サイクロフィリンA, B, Cについて、HCVレプリコン増殖に与える影響を検討した。それぞれ2種のshRNA発現ベクターを作成し、これを用いてノックダウン細胞を作成し、HCVレプリコンの増殖効果を解析したところ、サイクロフィリンの発現抑制により、HCVレプリコン増殖は40~60%と有意に抑制された(A) (Cyp;サイクロフィリン, HCV shRNAはすでにHCVを抑制することが確認されているshRNA。各shRNAのrev.はターゲット部位の配列を逆にしたコントロール)。また、サイクロフィリンを恒常的にノックダウンした細胞の解析では、レプリコンの増殖によるコロニー形成能は明らかに低下し、サイクロフィリンがHCV増殖に関与していると考えられた(B)。Bの下段数字はコロニー数。

は、ISRE (=interferon stimulation response element)により制御されるインターフェロン誘導遺伝子の発現を介して、抗ウイルス作用を呈する。われわれの検討ではIFN α によ

てISRE活性は濃度依存性に上昇するが、CsAではこのようなISRE活性の上昇は認められず、そのHCV抑制効果はインターフェロンとは独立した作用機構を介すると考えら

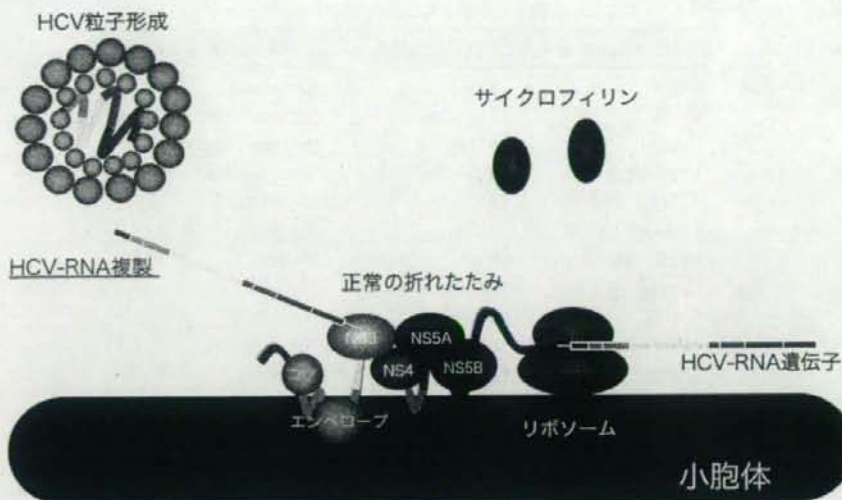


図6-1 HCV蛋白の折れたたみとサイクロフィリン

細胞内に侵入したウイルスRNAはメッセンジャーRNAとして機能しウイルス蛋白質が作られる。ウイルスRNA複製に必要なNS蛋白は、細胞質の小胞体膜上で宿主細胞の蛋白質とともに複製複合体を形成し、ウイルスRNAを転写複製する。シャペロン蛋白などの助けをかりて正常に折れたたまれた複合体は、さらにウイルス粒子を形成し細胞外に放出されると考えられる。この一連の機構の中で、サイクロフィリンはHCV粒子形成において正常な折れたたみを助けるシャペロンとして重要な役割をはたしている可能性が考えられる。

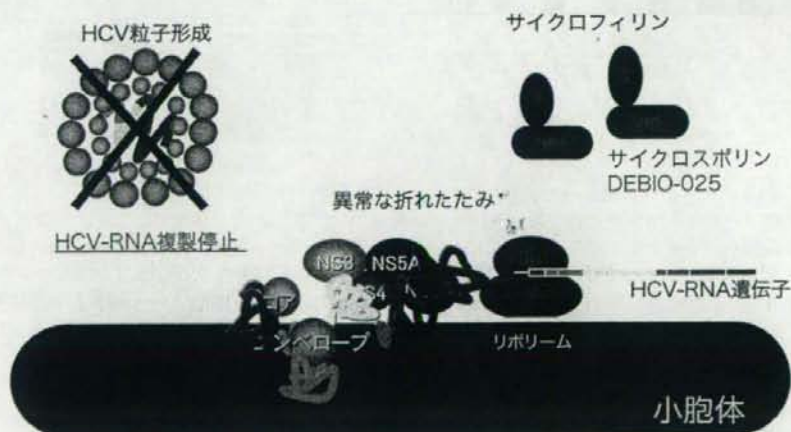


図6-2 サイクロフィリン阻害剤によるHCV増殖停止機構(仮説)

HCV複製増殖機構において、サイクロフィリンのシャペロン機能を阻害するCsAや後述するDEBIOなどの薬剤が存在すると、結果として異常な蛋白の折れたたみが起こり、HCVはウイルス粒子を形成することができなくなり、RNA複製は停止することになる。

れた(図4)⁶⁾。さらに、FK506にはHCVの抑制効果がみられないことから、両者の違いである細胞内受容体であるサイクロフィリンに注目した。

ヒトの場合、サイクロフィリンとFKBPのサブタイプはそれぞれ15種類前後も存在することが報告されている。これらは組織特異性を示し、細胞質以外にも細胞膜や細胞内小器官に特異的に存在するが、ほぼすべての細胞に普遍的に存在するものから、組織あるいは細胞特異的に存在するものまで多種多様である。サイクロフィリンとFKBPのPPIaseとしての違いに関しては、酵素の基質特異性にあるという報告があり¹⁶⁾、FKBPはプロリンの前のアミノ酸が疎水性のものである場合にのみ活性を示すのに対して、サイクロフィリンはプロリンの前のアミノ酸が、ほぼどの種類であっても高い酵素活性を示すためFKBPのような選択性を持たないことが両者の違いにつながるという。この基質特異性の違いが、生理的に何らかの意味を持っていると信じられているが、生体内での機能との関連性についてはいまだ明らかにされていない。サイクロフィリンは表1に示すように約15種類知られており、細胞内のあらゆる画分に存在しているが¹⁷⁾、われわれの検討ではHCVレプリコンの複製増殖は、HCV増殖複合体の存在するとされる細胞質、小胞体などに多いとされるサイクロフィリンA,B,Cが関与していると考えられる結果が出ており、引き続き検討を進めている(図5)⁶⁾。

4 サイクロフィリン阻害剤のHCV複製増殖への影響

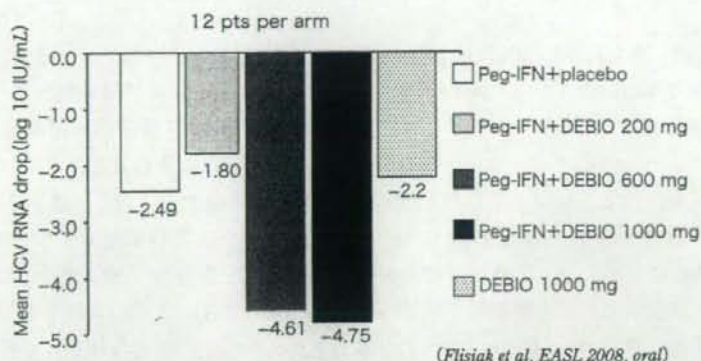
HCVの複製増殖の詳細に関しては不明な点が多いが、その主な増殖の場は肝臓と考えられている。細胞内に侵入したウイルス

RNAはメッセンジャーRNAとして機能しウイルス蛋白質が作られ、ウイルスRNA複製に必要なNS蛋白質は、細胞質の小胞体膜上で宿主細胞の蛋白質とともに複製複合体を形成し、+鎖から-鎖、-鎖から+鎖のウイルスRNAを転写複製し、シャペロン蛋白などの助けをかりて正常に折れたたまった複合体は、さらにウイルス粒子を形成し細胞外に放出されると考えられる。サイクロフィリンはHCV粒子形成において、正常な折れたたみを助けるシャペロンとして重要な役割を果たしている可能性が考えられる(図6-1)。

この一連のHCV複製増殖機構において、サイクロフィリンのシャペロン機能を阻害するCsAや後述するDEBIOなどの薬剤が存在すると、結果として異常な蛋白の折れたたみが起こり、HCVはウイルス粒子を形成することができなくなり、RNA複製は停止することになる(図6-2)。サイクロフィリン阻害剤の作用機序については、いまだ十分解明されておらず、今後の研究が待たれるところであるが、実際に免疫抑制作用のないDEBIO¹⁸⁾やNIM811^{18,19)}、サイクロスポリンD⁶⁾といったサイクロフィリン阻害剤がHCV増殖を特異的に抑制することから、臨床応用に大きな期待が持たれている。

5 サイクロフィリン阻害剤DEBIOの登場

DEBIO-025は免疫抑制作用のないサイクロフィリン阻害剤で、2006年はじめてHCV増殖を抑制することが報告され¹⁸⁾、HCVキメラマウスの実験でもIFNとの相乗効果を認めることが報告された²⁰⁾。現在欧米を中心に慢性C型肝炎に対するDEBIO-025の治療(PhaseII)が進行中だが、宿主因子を標的とした薬剤であることから薬剤耐性出現率が低



(Flisiak et al, EASL 2008, oral)

図7 DEBIO-025とPEGインターフェロン併用療法の治療効果(G1患者, Day29)

2008年EASL (European association for the study of the liver, 欧州肝臓学会議)の報告ではDEBIO-025の600~1,000 mg/日投与とPEGインターフェロンの併用により相加効果が得られることが報告された。副作用は1,000 mg/日投与群で24人中5人に3.1~8.1 mg/dlの高ビリルビン血症をみたが、治療終了後速やかに改善したという。(Flisiak et al, EASL 2008, oral)

いことが予想され、現在最も期待できる薬剤の1つと考えられる。

最近HCV/HIV共感染患者に対するDEBIO-025の効果がFlisiakらにより報告された²¹⁾。DEBIO-025を1,200 mg/日、14日間単独内服させた19人の患者群と4人のプラセボ群で解析をしているが、DEBIO-025投与群では平均-3.63 log、最大で-4.37 logのウイルス量低下を認め、DEBIO-025投与群の3人で治療期間中血中HCVの一時陰性化をみた。副作用としては、15人(78.9%)で高ビリルビン血症が出現したが、投与終了後速やかに治療前値に改善したとされる。今回の対象患者はGenotype1, 3, 4であったが、一時的なHCV陰性化が得られた症例は3つの遺伝子型1名ずつであったと報告されており、遺伝子型によらず効果が期待できることが示された。

2008年EASL (European association for the study of the liver, 欧州肝臓学会議)では、Genotype1に対するDEBIO-025とPeg-IFN併用療法について、投与4週後の時点での効果

につき報告がなされた(図7)。先述のFlisiakらの報告であるが、DEBIO-025投与量600~1,000 mg/日とPEG-IFNを併用することにより相加効果が得られるという。副作用は200~600 mg/日投与群ではプラセボ群と同等であり、1,000 mg/日と高用量投与群では24人中5人に3.1~8.1 mg/dlの高ビリルビン血症をみたが、治療終了後、速やかに改善したという。今回の報告でもDEBIO-025単独投与群でもPeg-IFN単独群に近い程度のウイルス量の低下をみており、副作用も重篤なものがないことから、IFN使用困難な血小板低値例や高齢者へのDEBIO-025単独治療に期待が持てる。今後の症例の積み重ね、最終治療効果の解析が待たれるところである。

6 おわりに

Peg-IFNとribavirinの併用療法により、難治例といわれたGenotype1高ウイルス量の症例でも著効率は約50%まで期待できるようになったが、その著効率はウイルスの遺伝子構造やウイルス量で大きく異なり、全く治療

効果のみられない症例も存在する。さらに、その強い副作用と脱落症例の多さから治療効果の低下や治療導入不能例が存在することが問題となっている。サイクロフィリン阻害剤のような宿主因子を標的とした治療は、ウイルスの変異獲得による耐性出現率が低く、IFNとは異なる機序で抗ウイルス効果を示し、現在著効が得られない症例にも効果が期待できる。今回紹介したDEBIOは副作用も比較的軽度であり、一日も早い臨床現場への登場が待たれる薬剤である。

文 献

- 1) Luban J, Bossolt KL, Goff SP et al : Human immunodeficiency virus type 1 gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* 73 : 1067-1078, 1993
- 2) Franke EK, Yuan HE, Luban J : Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* 372 : 359-362, 1994
- 3) Thali M, Bukovsky A, Göttinger HG et al : Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* 372 : 363-365, 1994
- 4) Luban J : Absconding with the chaperone: essential cyclophilin-Gag interaction in HIV-1 virions. *Cell* 87 : 1157-1159, 1996
- 5) Sayah DM, Sokolskaja E, Luban J et al : Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. *Nature* 430 : 569-573, 2004
- 6) Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M et al : Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin A is mediated by blockade of cyclophilins. *Gastroenterology* 129 : 1031-1041, 2005
- 7) Watashi K, Ishii N, Shimotohno K et al : Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* 19 : 111-122, 2005
- 8) Borel JF, Feurer C, Stähelin H et al : Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 6 : 468-475, 1976
- 9) Matsuda S, Koyasu S : Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 47 : 119-125, 2000
- 10) Handschumacher RE, Harding MW, Speicher DW et al : Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226 : 544-547, 1984
- 11) Fischer G, Wittmann-Liebold B, Schmid FX et al : Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* 337 : 476-478, 1989
- 12) Takahashi N, Hayano T, Suzuki M : Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* 337 : 473-475, 1989
- 13) Inoue K, Sekiyama K, Yoshiba M et al : Cgombined interferon alpha2b and cyclosporin A in the treatment of chronic hepatitis C: controlled trial. *J Gastroenterol* 38 : 567-572, 2003
- 14) Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M et al : Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun* 313 : 42-47, 2004
- 15) Watashi K, Hijikata M, Shimotohno K et al : Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* 38 : 1282-1288, 2003
- 16) Harrison RK, Stein RL : Substrate specificities of the peptidyl prolyl cis-trans isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein: evidence for the existence of a family of distinct enzymes. *Biochemistry* 29 : 3813-3816, 1990
- 17) Braaten D, Luban J : Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells. *Embo J* 20 : 1300-1309, 2001
- 18) Paeshuyse J, Bartenschlager R, Neyts J et al : The Non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatology* 43 : 761-770, 2006
- 19) Goto K, Watashi K, Shimotohno K et al : Evaluation of the anti-hepatitis C virus effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporine A, and NIM811. *Biochem Biophys Res Commun* 343 : 879-884, 2006
- 20) Inoue K, Yoshiba M, Kohara M et al : Evaluation of a cyclophilin inhibitor in hepatitis C virus-infected chimeric mice in vivo. *Hepatology* 45 : 921-928, 2007
- 21) Flisiak R, Crabbe R, Scalfaro P et al : The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfecting with hepatitis C and human immunodeficiency virus. *Hepatology* 47 : 817-826, 2008

薬剤選択肢として位置づけられることになる
と考えられる。またHCVによる肝不全に対
する肝移植の際に、移植片のHCV感染を防
止する目的での臨床応用が考えられる。

一方また、HCV治療薬開発の問題から離
れて、純粋に科学的側面で考えると、HCV
の極めて複雑な受容体システムの相互の役割
を解明する上で、様々なクラスのエントリー
阻害剤をみいだすことは非常に重要と考えら
れる。われわれは、同定した阻害剤をシーズ
として創薬展開を計ると同時に、それらを
「探り針(プローブ)」として複雑なHCVエン
トリー機構全体の理解とその解明に役立てた
いと願っている。国内外における今後の研究
展開を期待したい。

文 献

- 1) Lohmann V, Korner F, Koch J et al : Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepa-
toma cell line. *Science* 285 : 110-113, 1999
- 2) Wakita T, Pietschmann T, Kato T et al : Produc-
tion of infectious hepatitis C virus in tissue cul-
ture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11 :
791-796, 2005
- 3) Lagging LM, Meyer K, Owens RJ et al : Func-
tional role of hepatitis C virus chimeric glyco-
proteins in the infectivity of pseudotyped virus. *J*
Virology 72 : 3539-3546, 1998
- 4) Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL : Infectious
hepatitis C virus pseudo-particles containing
functional E1-E2 envelope protein complexes. *J*
Exp Med 197 : 633-642, 2003
- 5) Buckwold VE, Beer BE, Donis RO : Bovine viral
diarrhea virus as a surrogate model of hepati-
tis C virus for the evaluation of antiviral agents.
Antiviral Res 60 : 1-15, 2003
- 6) Zhong J, Gastaminza P, Cheng G et al : Robust
hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad*
Sci USA 102 : 9294-9299, 2005
- 7) Bertaux C, Daelemans D, Meertens L et al :
Entry of hepatitis C virus and human immuno-
deficiency virus is selectively inhibited by car-
bohydrate-binding agents but not by polyanions.
Virology 366 : 40-50, 2007
- 8) Bolmstedt AJ, O'Keefe BR, Shenoy SR et al :
Cyanovirin-N defines a new class of antiviral
agent targeting N-linked, high-mannose gly-
cans in an oligosaccharide-specific manner. *Mol*
Pharmacol 59 : 949-954, 2001
- 9) Boyd MR, Gustafson KR, McMahon JB et al :
Discovery of cyanovirin-N, a novel human immu-
nodeficiency virus-inactivating protein that binds
viral surface envelope glycoprotein gp120: po-
tential applications to microbicide development.
Antimicrob Agents Chemother 41 : 1521-1530,
1997
- 10) O'Keefe BR, Smee DF, Turpin JA et al : Potent
anti-influenza activity of cyanovirin-N and interac-
tions with viral hemagglutinin. *Antimicrob Agents*
Chemother 47 : 2518-2525, 2003
- 11) Helle F, Wychowski K, Vu-Dac N et al : Cyanovi-
rin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding
to envelope protein glycans. *J Biol Chem* 281 :
25177-25183, 2006
- 12) Zitzmann N, Mehta AS, Carrouee S et al : Imino
sugars inhibit the formation and secretion of
bovine viral diarrhea virus, a pestivirus model
of hepatitis C virus: implications for the devel-
opment of broad spectrum anti-hepatitis virus
agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 11878-11882,
1999
- 13) Whitby K, Taylor D, Patel D et al : Action of cel-
gosivir (6 O-butanoyl castanospermine) against
the pestivirus BVDV: implications for the treat-
ment of hepatitis C. *Antivir Chem Chemother* 15
: 141-151, 2004
- 14) Pavlovic D, Neville DC, Argaud O et al : The hep-
atitis C virus p7 protein forms an ion channel that
is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar deri-
vatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 6104-6108,
2003
- 15) Boriskin YS, Pécheur EI, Polyak SJ : Arbidol: a
broad-spectrum antiviral that inhibits acute and
chronic HCV infection. *Virology* 3 : 56, 2006
- 16) Evans MJ, von Hahn T, Tschernie DM et al : Clau-
din-1 is a hepatitis C virus co-receptor required
for a late step in entry. *Nature* 446 : 801-805, 2007

* * *

IV 坂本 穰

山梨大学大学院 医学工学総合研究部

研究要旨: C型慢性肝炎に対するPEG-IFN+Ribavirin併用療法においても1b型かつ高ウイルス量症例は難治であるが、治療効果予測因子として最も重要なものはISDRのアミノ酸変異数であり、2個以上の変異があれば極めて高い治療効果が得られる。一方、ISDRのアミノ酸変異数が0ないしは1個であっても、コア70番のアミノ酸がアルギニンであれば、高い効果が得られるものの、アルギニン以外に変異していると48週治療では、ウイルス排除は期待できない。そこで、治療開始前にこれらを検討することで、治療法や治療期間などの選択が可能となり、個別化医療にも応用可能であると考えられる。しかし、上記ウイルス側因子が同一のサブグループ内においては、年齢・性別、肝線維化などの宿主因子が関与しており、効率的な治療を目指すためにはこれら因子も考慮し、データマイニング手法を用いた、個別化治療アルゴリズムを作成する必要があると考えられる。

A. 研究目的

C型慢性肝炎に対するインターフェロン治療は急速に進歩したが、難治の1b型かつ高ウイルス量症例においては、標準かつ最強のPEG-IFN+Ribavirin併用療法を48週間行っても、約半数でのみウイルス排除が可能であるにすぎない。効率的かつ安全に治療を推進するためには治療効果予測が重要であり、治療効果予測因子を見出すことで、これらを個別化医療アルゴリズムに投入するための基礎的情報を得ることを目的に、ウイルス側の治療効果予測因子であるHCVのISDR(Interferon sensitivity determining region)とコアアミノ酸変異からインターフェロン治療効果予測について検討した。

B. 研究方法

2004年12月から山梨大学第1内科と関連施設で組織するY-PERS(Yamanashi

PEG-interferon+Ribavirin Study)で集積された1b高ウイルス量症例のうちPEG-IFN α 2b(ペグイントロン)+Ribavirin(レベトール)併用療法を12ヶ月間行い、治療効果が判明している194例を検討対象とした。これらにつき、年齢、性別、BMI、肝組織(F・A因子)および投与前のAlb、 γ GTP、AST、ALT、T.Chol、血糖、HbA1c、白血球数、好中球数、Hb、血小板数、AFPの臨床検査値およびHCVRNA量(Amplicorハイレンジ法)、HCVコア蛋白量、ISDR変異数、コア70番および90番アミノ酸変異を検討した。
(倫理面での配慮)

臨床試験の目的・方法・副作用、患者に関する個人情報の守秘義務、患者の権利・保護等に関し、十分に説明し、文書で同意を取得し研究をおこなった。なお、これらの研究の実施計画については、山梨大学医学部倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1) 全例の SVR (Sustained viral response) 率は ITT 解析で 48%であった。治療効果予測因子につき、短変量解析を行い、5%の危険率で有意を認められた項目について、多変量ロジスティック回帰分析を行うと、有意な因子は、年齢 60 歳未満、F 因子 1 以下、ISDR 変異数 2 個以上、コア 70 番アミノ酸アルギニン (R) であり、このうち最も強い因子は ISDR 変異数 2 個以上の、ウイルス側因子であった (Odds 比 164.571, $p=0.0008$)。とくに、ISDR 変異数 0 ないしは 1 個と 2 個以上の症例に分けて検討すると、ISDR 0・1 変異の SVR 率は 40%であったが、2 個以上の SVR 率は 81%であった。 ($p=0.00001$)。

2) しかし、ISDR 変異数 0 ないし 1 個の症例でも治療終了時のウイルス消失率は 92%であるため、52%は治療終了とともにウイルスが再燃するために最終的なウイルス排除がなされない。そこで、ISDR 変異数 0 ないし 1 個の症例に限り、SVR に寄与する因子につき再度検討した。この結果は、年齢 60 歳未満、F 因子 1 以下、T.Chol 160 以上、コア 70 番アミノ酸 R であり、最も強い因子はコアアミノ酸が野生型のアルギニンであることであった (Odds 比 49.457, $p=0.0014$)。ISDR 変異数 0 ないし 1 個の症例では、コア 70 番のアミノ酸が R であれば 58%の SVR であるのに対し、R 以外の置換が見られた症例では 11%の SVR に過ぎないことがあきらかになった。

3) ここまでの検討では、SVR に寄与する因子として抽出されたものは、年齢、肝線維化、コレステロール、ISDR、コアアミノ酸置換であったが、これらは独立した因子であったため、これらについて、サブグループに分け、SVR 率

を検討した。この際、今回の検討では有意差はなかったが傾向の見られた性別を検討に加え、グループ間で差異の小さかった T.Chol は除き、ISDR 変異数、コアアミノ酸変異、性別、肝線維化、年齢によって分けたサブグループ内の SVR 率を検討した。この結果、ISDR 変異数が 0 ないし 1 個の症例でコア 70 番アミノ酸が R の症例では、全体の SVR 率は 58%であったが、男性で F1 症例で 60 歳未満の SVR 率は 90%で、男性・F1・60 歳以上では 50%、男性・F2 以上・60 歳未満では 43%、男性・F2 以上・60 歳以上では 20%と、それぞれの群で大きな SVR 率の差が見られた。

D. 考察

1) C 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療効果を規定する因子として、最も重要なものは ISDR のアミノ酸変異数であり、2 個以上の変異があれば十分にウイルス排除可能であると考えられた。しかし、0 ないし 1 個変異例は難治であり、これらを治療開始前に測定することで、治療抵抗例や、易治療例を特定できると考えられた。

2) さらに、ISDR 変異数 0 ないし 1 個の難治が予測される症例でも、コアアミノ酸を測定することで、治癒可能な症例と難治例を選別可能となり、治療法の工夫など個別化医療への道が開けると考えられた。

3) 治療効果を規定する因子として重要なものはウイルス側の要因であったが、ウイルス側の要因が同一である場合は、宿主要因が関与しており、年齢・性、肝線維化、脂肪化などを考慮して治療法を決定する必要があると考えられた。

4) さらに、実際の治療に当たっては、治療開始以降の、副作用の有無、薬剤中止・減量、ウ

ウイルス消失時期、ウイルス減少速度などを考慮することが今後必要になると思われた。

E. 結論

C型慢性肝炎に対するPEG-IFN+Ribavirin併用療法において、治療効果予測因子として重要なものはISDRやコア70番のアミノ酸置換であることが明らかになった。これらのデータをデータマイニング手法を用いた個別化治療アルゴリズムに投入することで、高精度の治療予測と個別化医療に臨床応用可能であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Matsui A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Yamashita A, Sakamoto N, Itoh M, Enomoto N. Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 2008 Feb 1;197(3):361-70.
- 2) 坂本穰、榎本信幸. インターフェロン療法の現況:標準治療のエビデンス. *日本内科学会雑誌*97: 57-63. 2008
- 3) 坂本穰、榎本信幸. C型慢性肝炎-HCV遺伝子変と治療効果-. *Mebio* 25: 89-93. 2008
- 4) 坂本穰、榎本信幸. ウイルス性肝炎のプライマリケア. *診断と治療.* 96: 422-428. 2008
- 5) 坂本穰、榎本信幸. ISDRからみた高齢者のC型慢性肝炎に対する治療法. *消化器科*46(4): 464-469. 2008

- 6) 前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. Hepatitis Virus Genome Wide Analysis. *肝疾患 Review* 2008-2009: 92-97. 2008
- 7) 坂本穰、榎本信幸. C型肝炎ウイルス遺伝子解析と診療への応用. *Medical Practice:* 25(10). 1798-1802. 2008
- 8) 坂本穰、榎本信幸. Interferon sensitivity determining region: ISDR. *肝胆膵*57(5): 773-779. 2008
- 9) 坂本穰、榎本信幸. 日本におけるC型肝炎治療のコンセンサス. ISDRにより治療効果はどう変わるか?. *Progress in Medicine* 28: 2647-2651. 2008

2. 学会発表

- 1) 坂本穰、前川伸哉、雨宮史武、北村敬利、井上泰輔、岡田俊一、榎本信幸. ISDRとコア領域のアミノ酸変異によるPEG-IFN/Ribavirin併用療法の治療効果予測. 第94回日本消化器病学会総会、2008.5.8、福岡
- 2) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸. ウイルス変異からみたC型慢性肝炎に対する治療方針. 第44回日本肝臓学会総会(シンポジウム)、2008.6.5、愛媛
- 3) 前川伸哉、金山明日香、宮崎千賀子、雨宮史武、松井啓、北村敬利、井上泰輔、坂本穰、岡田俊一、榎本信幸. HCV全ゲノム検索によるペグインターフェロン併用療法における治療感受性規定因子の検索. 第44回日本肝臓学会総会(ワークショップ)、2008.6.5、愛媛
- 4) 坂本穰. Y-PERSにより得られたC型慢性肝炎における難治例と対策. 第2回東京肝疾患研究会、2008.6.28、東京
- 5) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸. ウイルス

- 変異からみたC型慢性肝炎の治療法. 第50回日本消化器病学会大会(JDDW2008)(シンポジウム)、2008.10.1、東京
- 6) 坂本穰、井上泰輔、榎本信幸. 遺伝子変異からみた1b型のC型慢性肝炎に対するインターフェロンのテーラーメイド治療. 第12回日本肝臓学会大会(JDDW2008)(シンポジウム)、2008.10.2、東京
- 7) 前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. Whole HCV genome sequencing による治療感受性領域の検索. 第12回日本肝臓学会大会(JDDW2008)(ワークショップ)、2008.10.2、東京
- 8) 坂本穰、柏木賢治、榎本信幸. インターネットを用いた肝炎診療ネットワークの構築. 第12回日本肝臓学会大会(JDDW2008)(ワークショップ)、2008.10.2、東京
- 9) 坂本穰. Y-PERS が明らかにしたPEG-IFN α 2b+Ribavirin 併用療法におけるISDRとCore領域変異による治療効果予測因子. 第12回日本肝臓学会大会(JDDW2008)(サテライトシンポジウム)、2008.10.2、東京
- 10) 坂本穰、前川伸哉、坂本穰. ウイルス変異と宿主因子を考慮したPEG-IFN/Ribavirin 療法の個別化医療. 第37回日本肝臓学会東部会(シンポジウム)、2008.12.4、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

論文・著作発表

Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Matsui A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Yamashita A, Sakamoto N, Itoh M, Enomoto N.
Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 2008 Feb 1;197(3):361-70.

坂本穰、榎本信幸. インターフェロン療法の現況:標準治療のエビデンス. *日本内科学会雑誌* 97: 57-63. 2008

坂本穰、榎本信幸. C型慢性肝炎-HCV 遺伝子変と治療効果-. *Mebio* 25: 89-93. 2008

坂本穰、榎本信幸. ウイルス性肝炎のプライマリケア. *診断と治療.* 96: 422-428. 2008

坂本穰、榎本信幸. ISDRからみた高齢者のC型慢性肝炎に対する治療法. *消化器科* 46(4): 464-469. 2008

前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. Hepatitis Virus Genome Wide Analysis. *肝疾患 Review* 2008-2009: 92-97. 2008

坂本穰、榎本信幸. C型肝炎ウイルス遺伝子解析と診療への応用. *Medical Practice*: 25(10). 1798-1802. 2008

坂本穰、榎本信幸. Interferon sensitivity determining region: ISDR. *肝胆脾* 57(5): 773-779. 2008

坂本穰、榎本信幸. 日本におけるC型肝炎治療のコンセンサス. ISDRにより治療効果はどう変わるか?. *Progress in Medicine* 28: 2647-2651. 2008

学会発表

坂本穰、前川伸哉、雨宮史武、北村敬利、井上泰輔、岡田俊一、榎本信幸. ISDRとコア領域のアミノ酸変異による PEG-IFN/Ribavirin 併用療法の治療効果予測. 第 94 回日本消化器病学会総会、2008.5.8、福岡

坂本穰、前川伸哉、榎本信幸. ウイルス変異からみた C 型慢性肝炎に対する治療方針. 第 44 回日本肝臓学会総会(シンポジウム)、2008.6.5、愛媛

前川伸哉、金山明日香、宮崎千賀子、雨宮史武、松井啓、北村敬利、井上泰輔、坂本穰、岡田俊一、榎本信幸. HCV 全ゲノム検索によるペグインターフェロン併用療法における治療感受性規定因子の検索. 第 44 回日本肝臓学会総会(ワークショップ)、2008.6.5、愛媛

坂本穰. Y-PERS により得られた C 型慢性肝炎における難治例と対策. 第 2 回東京肝疾患研究会、2008.6.28、東京

坂本穰、前川伸哉、榎本信幸. ウイルス変異からみた C 型慢性肝炎の治療法. 第 50 回日本消化器病学会大会(JDDW2008)(シンポジウム)、2008.10.1、東京

坂本穰、井上泰輔、榎本信幸. 遺伝子変異からみた 1b 型の C 型慢性肝炎に対するインターフェロンのテーラード治療. 第 12 回日本肝臓学会大会(JDDW2008)(シンポジウム)、2008.10.2、東京

前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. Whole HCV genome sequencing による治療感受性領域の検索. 第 12 回日本肝臓学会大会(JDDW2008)(ワークショップ)、2008.10.2、東京

坂本穰、柏木賢治、榎本信幸. インターネットを用いた肝炎診療ネットワークの構築. 第 12 回日本肝臓学会大会(JDDW2008)(ワークショップ)、2008.10.2、東京

坂本穰. Y-PERS が明らかにした PEG-IFN α 2b+Ribavirin 併用療法における ISDR と Core 領域変異による治療効果予測因子. 第 12 回日本肝臓学会大会(JDDW2008)(サテライトシンポジウム)、2008.10.2、東京

坂本穰、前川伸哉、坂本穰. ウイルス変異と宿主因子を考慮した PEG-IFN/Ribavirin 療法の個別化医療. 第 37 回日本肝臓学会東部会(シンポジウム)、2008.12.4、東京

Targeting Lipid Metabolism in the Treatment of Hepatitis C Virus Infection

Fumitake Amemiya,^{1*} Shinya Maekawa,^{1*} Yoshie Itakura,¹ Asuka Kanayama,¹ Akira Matsui,¹ Shinichi Takano,¹ Tatsuya Yamaguchi,¹ Jun Itakura,¹ Takatoshi Kitamura,¹ Taisuke Inoue,¹ Minoru Sakamoto,¹ Kozue Yamauchi,¹ Shunichi Okada,¹ Atsuya Yamashita,² Naoya Sakamoto,² Masahiko Itoh,² and Nobuyuki Enomoto¹

¹First Department of Internal Medicine and ²Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Yamanashi, Yamanashi, and ³Department of Gastroenterology and Hepatology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Recently, microdomains of organelle membranes rich in sphingomyelin and cholesterol (called "lipid rafts") have been considered to act as a scaffold for the hepatitis C virus (HCV) replication complex. Using the HCV cell culture system, we investigated the effect of myriocin, a sphingomyelin synthesis inhibitor, on HCV replication. We also investigated the combined effect of myriocin with interferon (IFN) and myriocin with simvastatin. Myriocin suppressed replication of both a genotype 1b subgenomic HCV replicon (Huh7/Rep-Feo) and genotype 2a infectious HCV (JFH-1 HCV) in a dose-dependent manner (for subgenomic HCV-1b, maximum of 79% at 1000 nmol/L; for genomic HCV-2a, maximum of 40% at 1000 nmol/L). Combination treatment with myriocin and IFN or myriocin and simvastatin attenuated HCV RNA replication synergistically in Huh7/Rep-Feo cells. Our data demonstrate that the sphingomyelin synthesis inhibitor strongly suppresses replication of both the subgenomic HCV-1b replicon and the JFH-1 strain of genotype 2a infectious HCV, indicating that lipid metabolism could be a novel target for HCV therapy.

Hepatitis C virus (HCV) is a major etiologic agent of liver diseases, affecting 170 million people worldwide [1]. Fifty-five percent to 85% of acute infections become persistent [2], and at least 20% of patients with chronic HCV infection progress to cirrhosis within 20 years [3]. With therapeutic advances, including the recent combination of pegylated interferon (IFN) plus ribavirin, half of patients can achieve a sustained virologic response [4]. However, the remaining half cannot clear the virus, demonstrating a strong need for HCV-specific therapies.

Positive-strand RNA viruses replicate intracellularly on certain membrane structures, including the endoplasmic reticulum [5], the Golgi apparatus [6], endo-

somes, and lysosomes [7]. During replication, RNA viruses form distinct replication complexes made of several membrane compartments and viral proteins [8]. In HCV, the membranous web (consisting of vesicles in a membranous matrix) has been described in the cellular matrix of HCV replicon-harboring cells [9, 10]. This membranous web is considered to be the HCV replication complex, consisting of viral and host proteins.

Recent studies suggest that the HCV replication complexes are formed on lipid rafts (which are detergent-insoluble microdomains of intracellular vesicular membranes rich in cholesterol and sphingolipid) [11–13]. It has been reported that viral nonstructural proteins and both positive- and negative-sense HCV RNAs were localized distinctively in a fraction of lipid rafts when subgenomic HCV replicon cells were subjected to membrane flotation analysis [12]. On the other hand, recent studies have demonstrated that agents related to lipid metabolism affect the replication of genotype 1 HCV. Leu et al. [14] reported that polyunsaturated fatty acids exerted strong anti-HCV activity on a subgenomic HCV-1b replicon. Moreover, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors (statins), which prevent cholesterol synthesis, have been shown to suppress replication of ge-

Received 29 May 2007; accepted 24 September 2007; electronically published 23 January 2008.

Potential conflicts of interest: none reported.
Financial support: Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (scientific research grant 17390216).

* F.A. and S.M. contributed equally to this work.
Reprints or correspondence: Dr. Shinya Maekawa, First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Yamanashi, 1110, Shimokato, Chuo, Yamanashi 400-8588, Japan (maekawa@yamanashi.ac.jp).

The Journal of Infectious Diseases 2008; 197:361–70
© 2008 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.
0022-1899/2008/197/03-0007\$15.00
DOI: 10.1093/infdis/jin128

nomic and subgenomic HCV-1b replicons [15, 16]. Even though the precise mechanism has not been defined, these agents may attenuate HCV replication through the destruction of lipid rafts, according to their pharmacological actions. If this is the mechanism, sphingomyelin, the remaining and essential component of lipid rafts, might play a role in HCV replication. With this in view, recent studies have demonstrated that a sphingomyelin synthesis inhibitor attenuated the replication of a subgenomic HCV-1b replicon in cultured cells [17] and the replication of genomic HCV-1 in a chimeric mouse model [18]. However, investigation of anti-HCV activity in these agents has been limited to genotype 1 HCV, and the combined effect of these agents has not been determined. If they do not target the HCV structure itself but exert their antiviral activity through destruction of the host's lipid raft, it would be plausible to speculate that they might be effective irrespective of the viral isolate, and the combined effect of these agents might be additive or synergistic.

In the present study, we investigated the role played by the sphingomyelin synthesis pathway and the mevalonate pathway in HCV replication, using a subgenomic HCV-1b replicon and the particle-producing cell culture HCV 2a model of JFH-1 HCV [19].

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and HCV replicon. The human hepatoma cell lines Huh7 and Huh7.5.1 [20] were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum at 37°C in 5% CO₂. The subgenomic HCV replicon used was derived from Rep-Feo (genotype 1b) [21, 22], and a full-length genomic HCV RNA was derived from genotype 2a JFH-1 HCV [19]. Subgenomic or genomic HCV RNA was synthesized from replicon cDNA-harboring plasmids (pRep-Feo and pJFH-1) by means of T7 polymerase (RiboMax Large Scale RNA Production System; Promega) and transfected into these cells. For the subgenomic replicon, cell lines stably expressing the replicon were established (Huh7/Rep-Feo) in the presence of 500 µg/mL G418.

Reporter plasmids and luciferase assay. pISRE-TA-Luc expressing the *Renilla* luciferase reporter gene under control of the IFN-stimulated response element (ISRE) was constructed by replacing the firefly luciferase gene with the *Renilla* luciferase gene of pISRE-TA-Luc, purchased from Invitrogen. Luciferase activity was quantified using the Bright-Glo or Dual-Luciferase assay system (both from Promega) and a luminometer (AB-2250; ATTO). Assays were performed in triplicate, and the results were expressed as mean ± SD percentages of the control values. QuantiLum recombinant luciferase (Promega) was used as the positive control for the analysis.

Reagents. The reagents used included myriocin (Biomol), IFN-α 2b (Santa Cruz Biotechnology), phytosphingosine hydrochloride (Sigma), 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (2-HP-β-CyD; Sigma), and simvastatin (Cosmobio).

Northern blotting. Total cellular RNA was extracted from cells by means of Isogen (Wako). The RNA was separated by denaturing agarose-formaldehyde gel electrophoresis and transferred to a membrane from a NorthernMax kit (Ambion). The membrane was hybridized with a digoxigenin-labeled probe that was specific for the nonstructural replicon sequence. The signals were detected in a chemiluminescence reaction by using a digoxigenin detection kit (Roche) and were visualized by using an LAS-1000 imaging system (Fuji Film).

Western blotting. Ten micrograms of total cell lysate was separated using NuPAGE 4%–12% Bis-Tris gel (Invitrogen) and was blotted onto an Immobilon polyvinylidene difluoride membrane (Roche). The membrane was incubated with an anti-core monoclonal antibody (MAB; Affinity Bioreagents), an anti-NS3 MAB (Virogen), an anti-NS5A MAB (gift from Burckstummer, Robert Koch Institute), or a anti-β-catenin MAB (Sigma). Detection was done in a chemiluminescence reaction (ECL; Amersham).

Dimethylthiazol carboxymethoxyphenyl sulfophenyl tetrazolium (MTS) assays. To evaluate cytotoxicity, MTS assays were performed using a CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), in accordance with the manufacturer's instructions.

Thin-layer chromatography (TLC). The lipid fraction of cells treated with myriocin was extracted using the method of Bligh and Dyer [23], and total lipids from the cells treated with myriocin were extracted with 3 mL of chloroform. The extracts were spotted onto silica gel TLC plates (Merck) and were chromatographed with chloroform-methanol-water (65:25:4 [vol/vol/vol]). The plate was visualized with a molybdenum spray.

Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). TaqMan RT-PCR targeting the 5' untranslated region was used for the quantitation of intracellular genomic JFH-1 HCV RNA. The sequences of the sense and antisense primers and the TaqMan probe were 5'-TCCGGAACCGGTGAGTACA-3', 5'-CTAAGGTTTAGGATTCGTGCTCAT-3', and 5'-(FAM)CAC-CCTATCAGGCAGTACCACAAGGCC(TAMRA)-3', respectively. The method has been described elsewhere [24].

Short interfering RNA (siRNA) analysis. The sequence encoding the LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase (SPT) was selected as the target for siRNA (sense, 5'-AACAA-CAUCGUUCAGGUCCUTT-3'; antisense, 5'-AGGGCCUG-AAACGAUGUUGTT-3'). siRNA targeting enhanced green fluorescent protein (GFP) was used as the negative control (sense, 5'-CUUACGUGAGUACUUCGATT-3'; antisense, 5'-UCG-AAGUACUCAGCGUAATT-3'). (Underlined letters indicate deoxyribonucleotides.)