

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08980

研究課題名(和文) HCVに対するカルニチンの抗ウイルス/抗脂肪化/抗酸化効果の基礎的・臨床的検討

研究課題名(英文) Anti-Adipogenic and Antiviral Effects of L-Carnitine on Hepatitis C Virus Infection

研究代表者

小川 浩司(koji, ogawa)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：20735188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、HCVにより誘導される肝脂肪化とHCV増殖作用におけるカルニチンの効果を検討した。我々は、*in vitro* の解析にてカルニチンの抗HCV作用について1) HCVレプリコンに対しては抗ウイルス作用を有しなかった事 2) HCV全長のウイルスJFH-1株に対しては抗ウイルス作用を有していた3) カルニチンは、HCVエントリーには影響しなかった4) カルニチン投与によりLDの形成低下が確認される5) 肝脂肪化改善の機序の一つとしてCPT-1の発現上昇が関与する。6) カルニチンはHCVが惹起する酸化ストレスに対し、抗酸化作用がある事を明らかにした

研究成果の概要(英文)：We analyzed the anti-HCV activity of L-carnitine, a substance involved in the transport of fatty acids into mitochondria. Treatment of HCV JFH-1-infected cells with L-carnitine inhibited HCV propagation. In contrast, L-carnitine had no anti-HCV activity in the HCV replicon system, which is lacking viral assembly. In addition, L-carnitine did not affect HCV entry. However, L-carnitine treatment decreased intracellular lipid droplets, which are crucial for HCV assembly. The expression level of CPT-1 was decreased in JFH-1-infected cells, and L-carnitine treatment restored this expression. HCV-infected cells exhibited increased production of reactive oxygen species and glutathione oxidation. L-carnitine decreased oxidative stress induced by JFH-1-infection, as shown by glutathione/glutathione disulfide assays and MitoSOX staining. L-carnitine exhibited anti-HCV activity, possibly by inhibiting HCV assembly and through its anti-adipogenic activity in HCV-infected cells.

研究分野：肝臓病学

キーワード：HCV 肝脂肪化 カルニチン

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)は全世界で2億人の感染者が存在し、慢性肝疾患・肝癌の主因となる感染症である。C型慢性肝炎患者の20~30%は感染から20~30年後に肝硬変を来し、肝硬変症例は年率7%が肝細胞癌を発症する。つい最近まで、本邦においてのC型慢性肝炎に対する標準治療はペグインターフェロン(PEG-IFN)+リバビリン(RBV)併用療法であったが、難治例であるGenotype1b高ウイルス量C型慢性肝炎患者におけるウイルス排除率は、48週間のPEG-IFN+RBV併用療法を行っても約50%に留まっていた。近年、新規治療としてHCVのウイルスタンパクを特異的に阻害する薬剤:direct-acting antivirals(DAAs)が多数開発され治療効果の改善が報告されている。本邦においてもDAAsの中でも、NS3/4AプロテアーゼインヒビターであるTelaprevirが2011年9月に、Simeprevirが2013年9月に承認され、PEG-IFN+RBVと併用できるようになり、24週間の治療期間にて治療効果の改善が得られるようになった。また2014年7月には新規クラスのNS5A阻害剤のDaclatasvirとNS3/4AプロテアーゼインヒビターであるAsunaprevir併用療法が承認となり、今後、IFNを用いない内服治療が慢性C型肝炎患者に対しての主流になっていくことが予想される。しかしながらDAAsに対する薬剤耐性HCVの問題や、DAAsに非代償性肝硬変患者への治療適応が無いなどの問題があり、DAAsが治療の主流になると思われる今後においても、HCVに対する新たな治療や補助療法の研究が求められる。HCVは肝脂肪化を引き起こし、HCVの生活環と肝細胞内脂肪酸代謝は深く関与していることが知られている。HCVの複製複合体は、小胞体リン脂質の二重膜に覆われた小胞構造をとり、ゲノムRNAの複製反応はその小胞構造の内部で行われている。HCVは1本鎖、プラス鎖RNAウイルスであり、構造領域(コア、E1、E2)および非構造領域(p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B)から構成されている。HCVコアタンパクは脂肪滴の表面に局在し、脂肪滴の過形成と、脂肪滴周辺の膜構造体を誘導する事が報告されている。その膜構造体上に、ウイルス非構造タンパク、ゲノムRNA、複製複合体、E1タンパク、E2タンパクが局在し、ウイルス粒子の形成が行われる。従って、細胞内脂肪滴はHCVウイルス粒子形成に必須である。また、肝脂肪化は肝線維化や肝発癌を引き起こし、インスリン抵抗性の惹起、IFNの治療抵抗性の原因となる事が報告され、HCV感染患者の予後増悪の原因となっている。以上のことから、細胞内脂肪酸代謝をコントロールし肝脂肪化を抑制することでウイルス増殖を抑制し、さらに患者の予後改善に寄与する可能性が想定される。

2. 研究の目的

今回我々は、脂肪酸のβ酸化において重要な

役割を果たすL-カルニチン(以下カルニチン)に着目した。カルニチンは細胞質内の脂肪酸をβ酸化の場であるミトコンドリア内部に運搬する際に重要な役割を果たす物質である。C型慢性肝炎~肝硬変の患者で血清カルニチン濃度が低下していること、NASHの患者にカルニチンを投与すると肝脂肪化が改善した報告があり、カルニチンがHCV感染細胞の脂肪化を抑制するという仮説を立てた。本研究ではカルニチンの抗脂肪化効果・HCV増殖抑制効果ならびにHCVによって惹起される酸化ストレスに対する抑制効果について検討した。

3. 研究の方法

HCV増殖をレポーターアッセイとしてルシフェラーゼアッセイを行うことで定量できるHCVレプリコン細胞にカルニチン投与を行い、ウイルス増殖抑制効果について検討した。次に、Huh7.5.1細胞にジェノタイプ2a由来のJFH-1株RNAをトランスフェクションし、このHCV感染培養系にカルニチン投与を行い、培養上清中のHCVコア抗原の測定、ウェスタンブロット、免疫蛍光染色を施行してウイルス増殖抑制効果について検討した。また、HCV感染培養系にカルニチンを投与し、Oil Red O染色と免疫蛍光染色を行って肝脂肪化抑制効果について検討した。最後に、HCV感染培養系にカルニチンを投与してGSH/GSSGアッセイならびにMitoSOX染色を行い、カルニチンのHCV感染細胞に対する酸化ストレス効果について検討を行った。

4. 研究成果

HCVレプリコン細胞にカルニチンを投与しHCV増殖抑制効果の検討を行ったが、HCVレプリコン細胞に対するHCV増殖抑制効果は認めなかった。そこで、HCV感染培養系を用いた検討を行った。JFH-1感染細胞にカルニチン投与を行い培養上清中のウイルス量の測定・細胞内HCVコアタンパクの定量を行い抗ウイルス効果の検討を行ったところ、カルニチンは濃度依存性にウイルス量を減少させた。次に、カルニチン投与によるHCV感染細胞の脂肪化抑制効果の検討を行った。HCV感染細胞にOil Red O染色を行いその抽出液の吸光度を測定し細胞内脂肪滴の定量を行った。培養細胞は、HCV感染にて有意に細胞内脂肪量の増加を認め、更にカルニチン投与にて有意に細胞内脂肪滴が減少することが確認された。また免疫蛍光染色を行なったところ、HCV感染細胞ではHCVコアタンパクと共局在して多数の細胞内脂肪滴が認められたのに対し、カルニチンを投与したHCV感染細胞では細胞内脂肪滴が小さくなり減少しているのが認められた。カルニチンの抗脂肪化の機序を検討する目的で、β酸化の律速酵素であるCPT-1の発現をウェスタンブロットにて定量した。CPT-1はHCV感染により発現が低下したが、カルニチン投与により発現の回

復が認められた。最後に HCV 感染による酸化ストレスへのカルニチン投与が及ぼす影響を検討した。HCV 感染細胞に対しカルニチンを投与し、GSH/GSSG アッセイならびに MitoSOX 染色を行い酸化ストレスの定量を行った。培養細胞は HCV 感染により細胞内酸化ストレスは有意に上昇したが、カルニチン投与により有意に酸化ストレスの抑制が確認された。

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 18 件)

Sho T[¶], Suda G[¶], Nagasaka A, Yamamoto Y, Furuya K, Kumagai K, Uebayashi M, Terashita K, Kobayashi T, Tsunematsu I, Onodera M, Meguro T, Kimura M, Ito J, Umemura M, Izumi T, Kawagishi N, Ohara M, Ono Y, Nakai M, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N; NORTE Study Group([¶]Equal

contribution). Safety and efficacy of sofosbuvir and ribavirin for genotype 2 hepatitis C Japanese patients with renal dysfunction. *Hepatol Res.* 2018 Jan 9. doi: 10.1111/hepr.13056. [Epub ahead of print] PMID:29316051 査読あり

Suda G, Ogawa K, Morikawa K, Sakamoto N. Treatment of hepatitis C in special populations.

J Gastroenterol. 2018 Jan 3. doi: 10.1007/s00535-017-1427-x. [Epub ahead of print] Review. PMID:29299684 査読あり

Nakai M, Ogawa K, Takeda R, Ohara M, Kawagishi N, Izumi T, Umemura M, Ito J, Sho T, Suda G, Morikawa K, Sakamoto N. Increased serum C-reactive protein and decreased urinary aquaporin 2 levels are predictive of the efficacy of tolvaptan in patients with liver cirrhosis.

Hepatol Res. 2018 Feb;48(3):E311-E319. doi: 10.1111/hepr.12988. Epub 2017 Nov 3. 査読あり

Osamu Maehara[¶], Goki Suda[¶], Mitsuteru Natsuizaka, Shunsuke Ohnishi, Yoshito Komatsu, Fumiyuki Sato, Masato Nakai, Takuya Sho, Kenichi Morikawa, Koji Ogawa, Tomoe Shimazaki, Megumi Kimura, Ayaka Asano, Yoshiyuki Fujimoto, Shinya Ohashi, Shingo Kagawa, Hideaki Kinugasa, Seiji Naganuma, Kelly A. Whelan, Hiroshi Nakagawa, Koji Nakagawa, Hiroshi Takeda, Naoya Sakamoto([¶]Equal contribution)

Fibroblast growth factor-2-mediated

FGFR/Erk signaling supports maintenance of cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2017 Oct

26;38(11):1073-1083. doi:

10.1093/carcin/bgx095. 査読あり

Suda G, Ito J, Nagasaka A, Yamamoto Y, Furuya K, Okamoto M, Terashita K, Kobayashi T, Tsunematsu I, Yoshida J, Meguro T, Ohara M, Kawagishi N, Kimura M, Umemura M, Izumi T, Tsukuda Y, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N; NORTE Study Group.

Add-on effects of fluvastatin in simeprevir/pegylated-interferon/ribavirin combination therapy for patients with genotype 1 hepatitis C virus infection: A randomized controlled study. *Hepatol Res.* 2018

Feb;48(3):E146-E154. doi:

10.1111/hepr.12938. Epub 2017 Aug 10.

査読あり

Goki Suda^{1#}, Norihiro Furusyo^{2#}, Hidenori Toyoda^{3#}, Yoshiiku Kawakami^{4#}, Hiroki Ikeda⁵, Michihiro Suzuki⁵, Keiko Arataki⁶, Nami Mori⁷, Keiji Tsuji⁷, Yoshio Katamura⁸, Koichi Takaguchi⁹, Toru Ishikawa¹⁰, Kunihiro Tsuji¹¹, Noritomo Shimada¹², Atsushi Hiraoka¹³, Sho Yamsaki², Masato Nakai¹, Takuya Sho¹, Kenichi Morikawa¹, Koji Ogawa¹, Mineo Kudo¹⁴, Atsushi Nagasaka¹⁵, Ken Furuya¹⁶, Yoshiya Yamamoto¹⁷, Kanji Kato¹⁸, Yoshiyuki Ueno¹⁹, Etsuko Iio²⁰, Yasuhito Tanaka²⁰, Masayuki Kurosaki²¹, Takashi Kumada³, Kazuaki Chayama⁴ and

Naoya Sakamoto. Daclatasvir and asunaprevir in hemodialysis patients with hepatitis C virus infection: a nationwide retrospective study in Japan. *J Gastroenterol.* 2018

Jan;53(1):119-128. doi: 10.1007/s00535-017-1353-y. Epub 2017 May 30. 査読あり

Naoki Kawagishi¹ [¶], Goki Suda^{1¶*}, Masahiro Onozawa², Megumi Kimura¹, Osamu Maehara¹, Masatsugu Ohara¹, Takaaki Izumi¹, Machiko Umemura¹, Jun Ito¹, Masato Nakai¹, Takuya Sho¹, Mitsuteru Natsuizaka¹, Kenichi Morikawa¹, Koji Ogawa¹, and Naoya Sakamoto¹

([¶]Equal contribution). Comparing the risk of hepatitis B virus reactivation between direct-acting antiviral therapies and interferon-based therapies for hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2017 Dec;24(12):1098-1106. doi: 10.1111/jvh.12737 査読あり

Takuya Sho, Mitsuru Nakanishi,

Takuya Sho, Mitsuru Nakanishi,

Morikawa Kenichi, Masatsugu Ohara, Naoki Kawagishi, Takaaki Izumi, Machiko Umemura, Jun Ito, Masato Nakai, Goki Suda, Koji Ogawa, Makoto Chuma, Takashi Meguro, Michio Nakamura, Atsushi Nagasaka, Hiromasa Horimoto, Yoshiya Yamamoto, and Naoya Sakamoto. A Phase I study of combination therapy with sorafenib and 5-fluorouracil in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Drugs R D*. 2017 Sep;17(3):381-388. doi: 10.1007/s40268-017-0187-7. 査読あり

Kawagishi N[¶], Suda G[¶], Onozawa M, Kimura M, Maehara O, Ito J, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N ([¶]Equal contribution). Hepatitis B virus reactivation during hepatitis C direct-acting antiviral therapy in patients with previous HBV infection. *J Hepatol*. 2017 Nov;67(5):1106-1108. doi: 10.1016/j.jhep.2017.04.008. 査読あり

Takahiko Kobayashi, Junich Ishida, Yuichi Shimizu, Hiroshi Kawakami, Goki Suda, Tetsuhito Muranaka, Yoshito Komatsu, Masahiro Asaka and Naoya Sakamoto. Decreased RNA-binding motif 5 expression is associated with tumor progression in gastric cancer *Tumor Biology* March 2017: 1-9 査読あり

Suda G, Ogawa K, Yamamoto Y, Katagiri M, Furuya K, Kumagai K, Konno J, Kimura M, Kawagishi N, Ohara M, Umemura M, Ito J, Izumi T, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Tsubota A, Shimada N, Iio E, Tanaka Y, Sakamoto N; NORTE Study Group. Retreatment with sofosbuvir, ledipasvir, and add-on ribavirin for patients who failed daclatasvir and asunaprevir combination therapy. *J Gastroenterol*. 2017. Oct;52(10):1122-1129 doi: 10.1007/s00535-017-1328-z. 査読あり

Suda G, Ogawa K, Kimura M, Nakai M, Sho T, Morikawa K. Sakamoto N. Novel Treatment of Hepatitis C Virus Infection for Patients with Renal Impairment. *J Clin Transl Hepatol*. 2016 Dec 28;4(4):320-327. doi: 10.14218/JCTH.2016.00032. Review. 査読あり

Suda G, Nagasaka A, Yamamoto Y, Furuya K, Kumagai K, Kudo M, Terashita K, Kobayashi T, Tsunematsu I, Yoshida J, Meguro T, Kimura M, Ito J, Umemura M, Izumi T, Tsunematsu S, Sato F, Tsukuda Y, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N; NORTE

Study Group. Safety and efficacy of daclatasvir and asunaprevir in hepatitis C virus infected patients with renal impairment. *Hepatol Res*. 2017 Oct;47(11):1127-1136. doi: 10.1111/hepr.12851 査読あり

Tsukuda Y, Suda G^{*}, Tsunematsu S, Ito J, Sato F, Terashita K, Nakai M, Sho T, Maehara O, Shimazaki T, Kimura M, Morikawa K, Natsuizaka M, Ogawa K, Ohnishi S, Chuma M, Sakamoto N. (*Corresponding author)

Anti-adipogenic and antiviral effects of l-carnitine on hepatitis C virus infection. *J Med Virol*. 2017 May;89(5):857-866. doi: 10.1002/jmv.24692 査読あり

Tsunematsu S, Suda G^{*}, Yamasaki K, Kimura M, Izumi T, Umemura M, Ito J, Sato F, Nakai M, Sho T, Morikawa K, Ogawa K, Tanaka Y, Watashi K, Wakita T, Sakamoto N. (*Corresponding author). Hepatitis B virus X protein impairs -interferon signaling via up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3 and protein phosphatase 2A. *J Med Virol*. 2017 Feb;89(2):267-275. doi: 10.1002/jmv.24643. 査読あり

Seiji Tsunematsu,¹ Goki Suda,^{1*} Kazushi Yamasaki,¹ Megumi Kimura,¹ Izumi Takaaki,¹ Machiko Umemura,¹ Jun Ito,¹ Fumiyuki Sato,¹ Masato Nakai,¹ Takuya Sho,¹ Kenichi Morikawa,¹ Koji Ogawa,¹ Toshiya Kamiyama,² Akinobu Taketomi² and Naoya Sakamoto¹ (*Corresponding author)

Combination of neutrophil-to-lymphocyte ratio and early des-gamma-carboxyprothrombin change ratio as a useful predictor of treatment response for hepatic arterial infusion chemotherapy against advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2017 May;47(6):533-541doi: 10.1111/hepr.12775. Epub 2016 Aug 11. PMID:27423140 査読あり

Jun Ito, Goki Suda^{*}, Yoshiya Yamamoto, Atsushi Nagasaka, Ken Furuya, Kenichi Kumagai, Hideaki Kikuchi, Takuto Miyagishima, Tomoe Kobayashi, Megumi Kimura, Kazushi Yamasaki, Machiko Umemur, Takaaki Izumi, Seiji Tsunematsu, Fumiyuki Sato, Yoko Tsukuda, Katsumi Terashita, Masato Nakai, Takuya Sho, Mitsuteru Natsuizaka, Kenichi Morikawa, Koji Ogawa, and Naoya Sakamoto (* Corresponding author). Prevalence and

characteristics of naturally occurring sofosbuvir resistance-associated variants in patients with hepatitis C virus genotype 1b infection. Hepatol Res. 2016 Dec;46(13):1294-1303. doi: 10.1111/hepr.12685 査読あり
Morikawa K, Suda G, Sakamoto N. Viral life cycle of hepatitis B virus : host factors and druggable targets. Hepatol Res. 2016 Aug;46(9):871-7 査読あり

〔学会発表〕(計3件)

小川浩司、肝硬変患者に対するカルニチン製剤の有用性および初回投与量の検討 第41回日本肝臓学会東部会 2016年京王プラザホテル(東京)
小川浩司、C型肝炎合併慢性腎不全透析患者に対する Daclatasvir/Asunaprevir 併用療法の検討 第51回日本肝臓学会総会 2015年ホテル日航熊本(熊本)
小川浩司 B型肝炎肝疾患に対するエンテカビル投与後のHBs抗原、HBコア関連抗原の検討 第19回日本肝臓学会大会 2015 グランドプリンスホテル新高輪(東京)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小川 浩司 (Ogawa Koji)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号: 20735188

(2)研究分担者

坂本 直哉 (Sakamoto Naoya)
北海道大学・医学研究院・教授
研究者番号: 10334418

須田 剛生 (Suda Goki)
北海道大学・北海道大学病院・特任助教
研究者番号: 20447460

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者なし