

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 佃 曜子

学位論文題名

Anti-adipogenic and anti-viral effects of L-carnitine on hepatitis C virus infection

(L-カルニチンの C 型肝炎ウイルス増殖抑制効果に関する研究)

【背景と目的】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、本邦における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50%程度にとどまっていた。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テラプレビル(Telaprevir)が2011年9月に、シメプレビル(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阻害剤のダクラタスビル(Daclatasvir)とNS3/4Aプロテアーゼインヒビターであるアスナプレビル(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に対する薬剤耐性ウイルスの問題や、DAAsには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。したがって、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しうる可能性が想定される。

そこで今回我々は、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。

【材料と方法】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感染細胞に対する抗酸化ストレス効果について検討を行った。

【結果】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。

考察：カルニチンはHCV感染培養系においてHCV増殖抑制効果を示した。ウイルス増殖抑制の機序はCPT-1の発現亢進を介した細胞内脂肪滴の減少による粒子形成抑制が関与している事が予想された。またカルニチンはHCV感染細胞に対し酸化ストレスの抑制効果を示し、HCV感染患者に対する新たな治療オプションとなりうる可能性が示唆された。