HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Anti-adipogenic and anti-viral effects of L-carnitine on hepatitis C virus infection
Author(s)	佃, 曜子
Description	配架番号：2159
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11677号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11677
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/63138
Type	doctoral thesis
File Information	Yoko_Tsukuda.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

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)

2015 年 3 月

北 海 道 大 学

佃 曜子

学 位 論 文

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)

2015 年 3 月

北 海 道 大 学

佃 曜子

目 次

発表論文目録および学会発表目録 ‥‥‥‥‥‥ 1 頁

緒言 ‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥ 2 頁

略語表 ‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥7 頁

実験材料と方法 ‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥8 頁

結果 ‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥15 頁

考察 ‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥32 頁

総括および結論 ‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥35 頁

謝辞 ‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥36 頁

引用文献 ‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥37 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究は以下の雑誌に投稿中である。

Journal of Virology

本研究は以下の学会に発表した。

平成 26 年 3 月　　APASL（ブリズベン,オーストラリア)

「Anti-adipogenic and anti-viral effect of L-Carnitine on hepatitis C virus infection」

平成 26 年 5 月　　第 50 回 日本肝臓学会総会(東京)

「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」

平成 26 年 10 月 24 日　　第 56 回 日本消化器病学会大会(神戸)

「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」

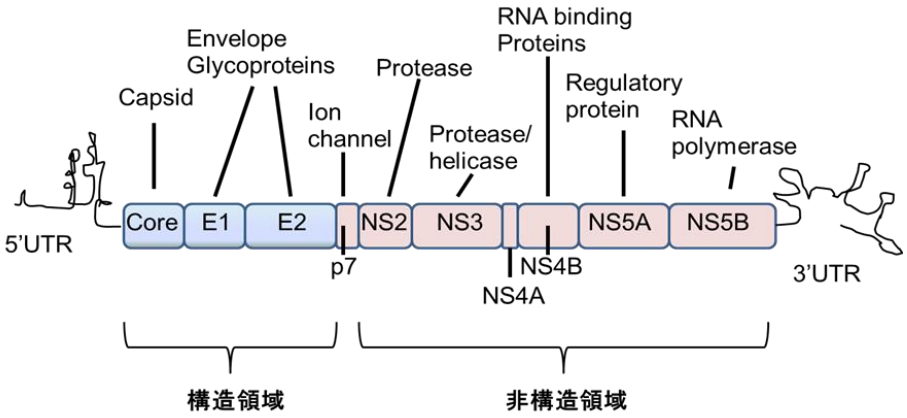
（ポスター優秀演題賞受賞）

緒　言

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・肝癌の主たる原因の一つである。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[1]、肝硬変症例は年率 7%は肝細胞癌を発症する[2]。

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 PEG-IFN+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[3]。近年、新規治療薬として 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、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 Telaplevir が 2011 年 9 月に、Simeplevir 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[4,5]。また 2014 年 7 月には新規クラスの NS5A 阻害剤である Daclatasvir と NS3/4A プロテアーゼインヒビターである Asunaplevir 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ている。しかしながら、必ずしもすべての患者が DAAs による恩恵を受けられるわけではなく、薬剤耐性 HCV を含め治療難治症例も依然存在する。全体で 80%の SVR 率を誇る Daclatasvir+Asunaprevir 療法においても、NS5A 領域 Y93H 変異のある患者での SVR 率は 50%と低率であり[6]、更に、非代償性の肝硬変患者への治療適応はない。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。

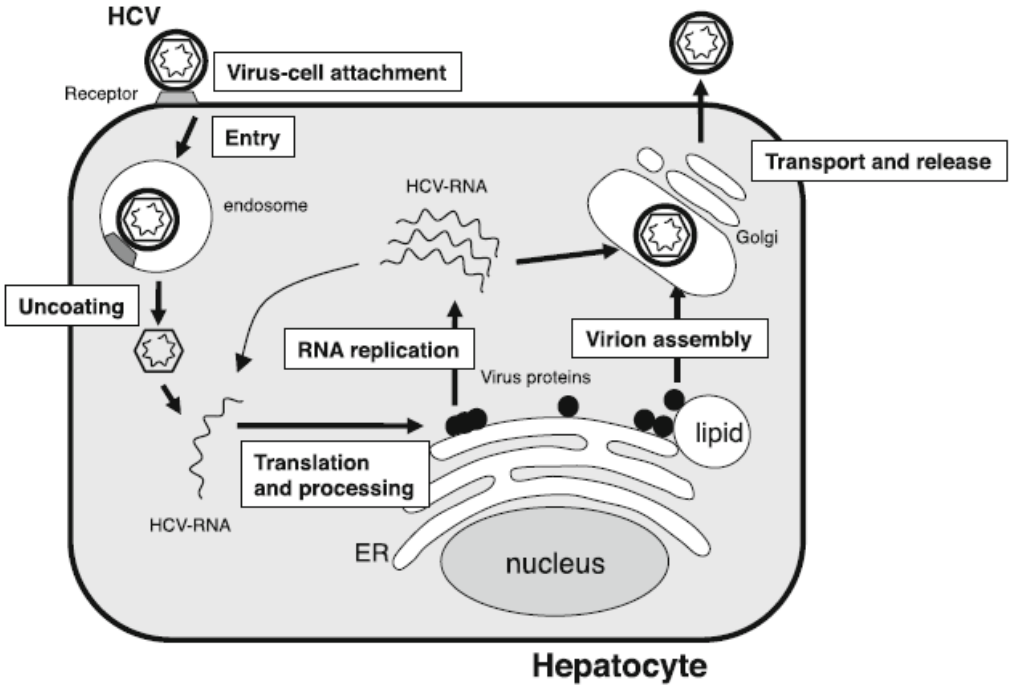
<HCV ウイルスゲノムの構造と機能>



HCV はフラビウイルス科のヘパシウイルス属に分類される、1 本鎖、プラス鎖

RNA ウイルスである。構造領域(Core、E1、E2)および非構造領域（p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B）から構成されており、上図のようにそれぞれが別の機能を持つ蛋白をコードしている。

<HCV ウイルスの生活環> 文献[7]より引用



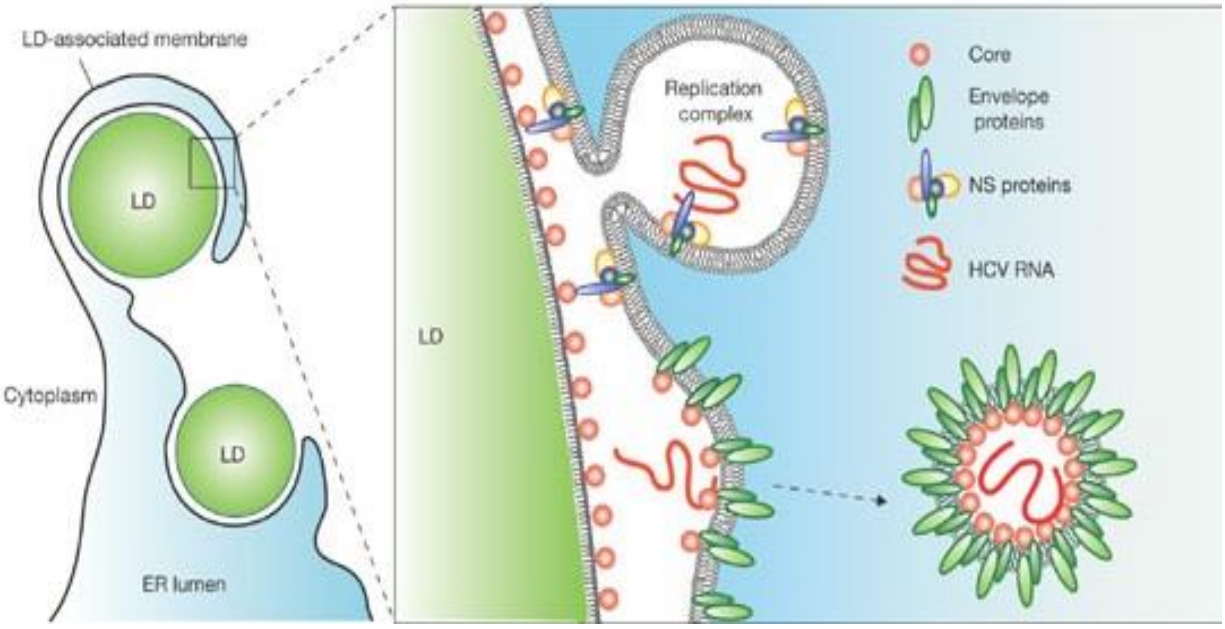
HCV の肝細胞への感染は、まず肝細胞表面のヘパラン硫酸などに吸着後、CD81、SRB-I、LDL-R、NPC1L1、Claudin-1、Occludin などのエントリーレセプターを介して細胞内へ侵入する(Entry)。その後細胞質内で脱核し、ウイルスゲノムが細胞質内へ放出され、そのまま mRNA として機能する。この RNA は 5'側の IRES 領域から翻訳され、大きな前駆体蛋白が合成される。その後、宿主細胞やウイルス自身のプロテアーゼによるプロセシングを受け、できた非構造タンパクが宿主細胞のタンパクと共に脂肪滴周囲で複製複合体を形成し、小胞構造内にて RNA の複製が行われる(Replication)。その後合成された HCV-RNA は細胞質へと運び出され、HCV コアタンパクへと受け渡されウイルス粒子が形成され(Assembly)、その後 VLDL 分泌系を介して細胞外へ放出されると考えられている(Releasing)。

肝脂肪化は C 型慢性肝炎に特徴的な病理組織像の一つであり、一般人口や B 型慢性肝炎患者と比較しても高率であることが知られている[8]。基礎的研究では HCV コアタンパクを発現したトランスジェニックマウスに肝脂肪化が惹起されることが示された[9]。また、Miyanari ら[10]の報告では、ジェノタイプ 2a ウイルス由来である JFH-1[11]株 RNA をトランスフェクションした細胞では脂肪滴の過

形成が観察されたのに対し、コア領域欠損 RNA をトランスフェクションした細胞ではそれが認められなかった。以上より、HCV 自体が肝細胞内の脂肪滴の過形成を惹起し、肝脂肪化の原因となると考えられている。

さらに、HCV によって惹起される肝脂肪化はインスリン抵抗性や肝線維化、酸化ストレス状態、発癌を惹起する事が報告されている[12,13]。また、肝脂肪化は IFN 治療抵抗性の原因となることも報告されている[14]。

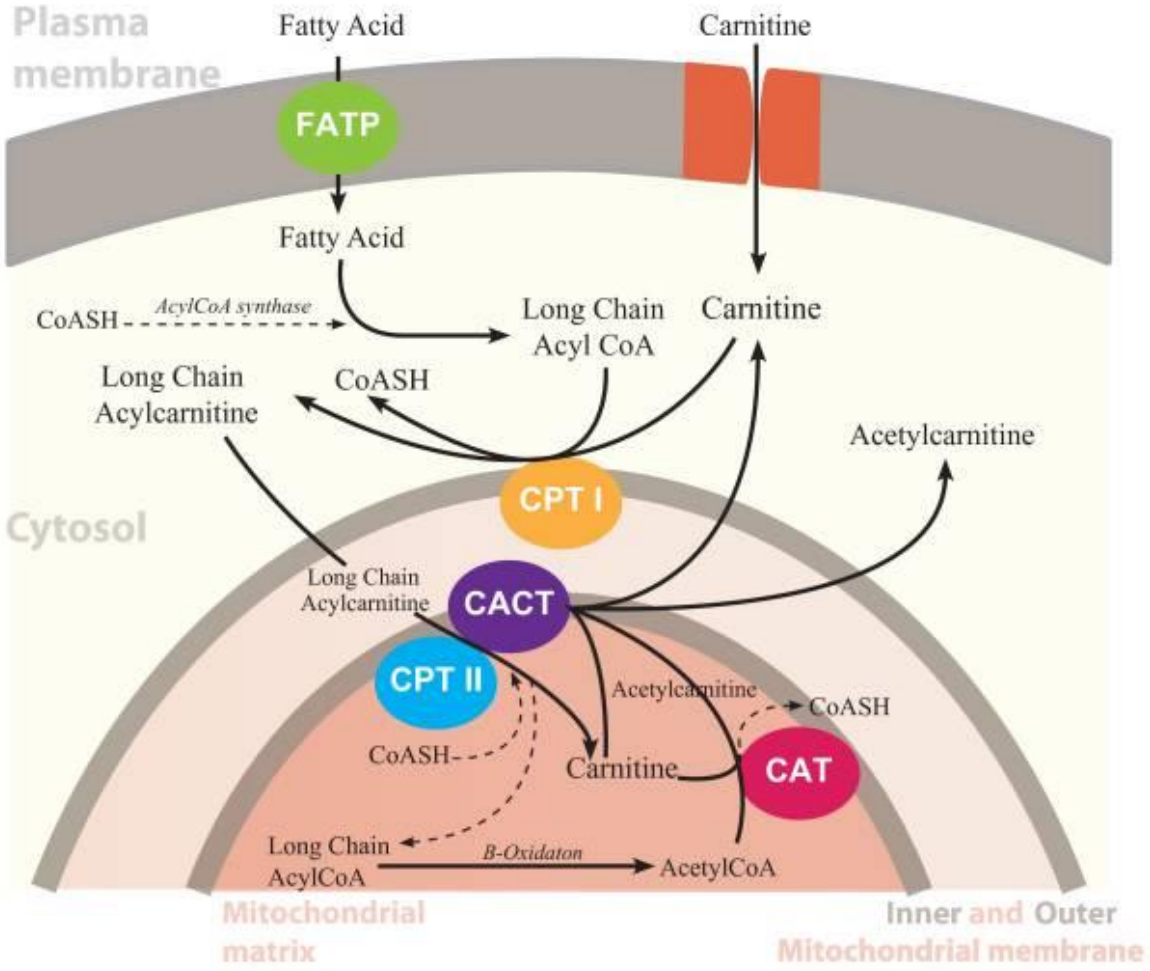
＜HCV のウイルス粒子形成のモデル＞　文献[10]より引用



HCV は脂肪滴の過形成と同時に、脂肪滴をウイルス粒子形成の足場として利用していることが報告されている[10]。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っており、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 コアタンパクは脂肪滴の表面に局在し、さらなる脂肪滴の過形成と、脂肪滴周辺の膜構造体が誘導される。その膜構造体上に、NS 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。

以上のことから、肝脂肪化の制御は慢性 C 型肝炎の治療における新たな標的であると考えられる。

＜脂肪酸代謝におけるカルニチンの役割＞文献[15]より引用



今回の研究で我々は、L-カルニチン(以下カルニチン)というビタミン様物質に着目した。カルニチンはβ酸化の場であるミトコンドリア内部に長鎖脂肪酸を輸送するにあたり重要な役割を果たす[15]。以下に脂肪酸代謝におけるカルニチンの役割について説明する。カルニチンは細胞膜上の有機カチオントランスポーターを介して細胞内に取り込まれる。一方、脂肪酸は細胞質ではコエンザイム A と結合したアシル CoA の状態で存在している。アシル CoA は CPT-1（カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1）という酵素の作用によりアシルカルニチンとなる。アシルカルニチンは CACT（カルニチン-アシルカルニチントランスロカーゼ）の働きによりミトコンドリア内膜を通過する。
ミトコンドリア内膜内部に存在する CPT-II（カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ II）により、アシルカルニチンは再びアシル CoA に転換される。アシル CoA は β 酸化を受けて代謝されアセチル CoA となり、クエン酸回路にて ATP が産生される。

これまでに肝硬変患者や HCV 感染患者で血清カルニチン濃度が減少すると

言われている[16]。近年、NASH 患者にカルニチンを含んだ食事療法を行ったところ、プラセボ群と比較して肝脂肪化の改善が認められたことが報告された[17]。また、カルニチンは NASH モデルマウスの肝脂肪化を抑制することも報告されている[18]。

そこで今回我々は、カルニチンが HCV によって惹起される肝脂肪化を抑制し、HCV 増殖抑制につながるのではないかという仮説を立てた。カルニチンの HCV 生活環に与える影響と、HCV 感染細胞における脂肪酸代謝や酸化ストレスに対するカルニチンの効果について検討した。

略 語 表

BODIPY: boron-dipyrromethene
cDNA:complementary ribonucleic acid
CLEIA: chemiluminescent enzyme immunoassay
DAAs:Direct Acting Antivirals
DAPI:4′ ,6-diamidino-2-phenylindole
DDW : double distilled water
DEPC:Diethylpyrocarbonate
DMEM:Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA:Deoxyribonucleic Acid
DDW : double distilled water
EDTA:Etylenediaminetetraacetic acid
FACS:Fluorescence activated cell sorter
FBS :Fetal Bovine serum
HCV:Hepatitis C Virus
HCVcc:Cell Cultured HCV
IFN:Interferon
MOPS:3-Morpholinopropanesulfonic acid
mRNA:messenger ribonucleic acid
PCR : Polymerase Chain Reaction
PEG-IFN : Pegylated Interferon
PBS:Phosphate Buffered Saline
PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF: polyvinylidene difluoride
qPCR:quantitive polymerase chain reaction
RBV:Ribavirin
RNA:Ribonucleic Acid
ROS:Reactive Oxygen Species
rpm:revolutions per minite
SVR:Sustained Virologic Response

実験材料と方法

1. 実験材料

1-1. 細胞

試薬

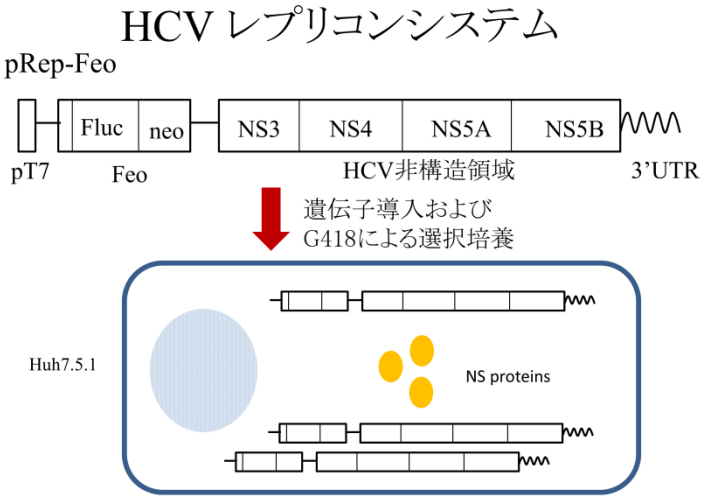
DMEM(High Glucose)	nacalai tesque
FBS	BioSource Intl.,Inc.
100mU/ml PenicillinG, 100μg/ml Streptmycin	GIBCO-Invitrogen
PBS	gibco
0.25% Trypsin-EDTA	gibco
G418 Sulfate Solution	Wako
L-Carnitine hydrochloride	Wako

各細胞の培養条件･継代条件

1-1-1. Huh7.5.1 細胞

Huh7.5.1 細胞はヒト肝癌細胞株である。10%(v/v)ウシ胎児血清 FBS、100mU/ml Penicillin、100μg/ml　Streptmycin を添加した DMEM を用いて 37℃、5%CO_2 の条件下にて培養した。細胞の継代は 90% confluent になり次第行った。

1-1-2. Huh7.5.1 Feo Replicon 細胞



文献[19]より改変

Huh7.5.1 Feo Replicon 細胞は東京医科歯科大学消化器内科学講座より供与された。Feo Replicon はウイルスゲノムの複製に必要なウイルス非構造蛋白質を含み、ホタルルシフェラーゼとネオマイシン耐性遺伝子の癒合遺伝子 Feo を発現した遺伝子で、これをヒト肝癌細胞由来の Huh7.5.1 細胞にトランスフェクションし、G418 を培地に加え選択培養することで得られた細胞が FeoReplicon 細胞である。

HCV ゲノムは細胞内で自律的に増殖し、細胞内 Replicon の発現レベルはリポーターアッセイとしてルシフェラーゼ活性を測定することにより簡便に調べることができる。

10%(v/v)ウシ胎児血清 FBS、100mU/ml Penicillin、100μg/ml　Streptmycin、選択培養のための 500μg/ml G418 を添加した DMEM を用いて 37℃、5%CO_2 の条件下にて培養した。細胞の継代は 90% confluent になり次第行った。

1-2. プラスミド

pJFH-1 :国立感染症研究所 脇田隆字先生より供与された。

JFH-1 は Genotype2a 由来の全長 RNA である。

1-3. カルニチン

L-カルニチン塩酸塩　　Wako

L-カルニチン塩酸塩は滅菌精製水で溶解して 1mM に調整し、1ml ずつ分注して-30℃で保存した。

2. 方法

2-1 . HCVcc RNA の作成

試薬および材料

制限酵素 XBaI	Roche
NEBuffer4	BioLab.
Agarose S	Wako
Ethidium Bromide	invitrogen
MinElute Gel Extraction Kit	QIAGEN
Nuclease free Water	
T7 RiboMax Express Large Scale RNA Production System	Promega
ISOGEN	Nippon Gene

プラスミド DNA 20μg に、Buffer とともに制限酵素 XBaI 20U を加え、37℃で 3 時間インキュベートし制限切断を行った。制限切断した DNA に 10% Loading

Dye を加え、1%アガロースゲルで電気泳動した。泳動後のゲルを Ethidium Bromide を添加した TAE 内で 20 分間振盪し、UV 下で観察しながら適切な DNA フラグメントをメスで切り出した。切り出したゲルから MinElute Gel Extraction Kit を用いて DNA を精製し、NanoDrop2000(ThermoSCIENTIFIC)により吸光度測定を行い濃度測定した。

この切断された DNA を T7 RiboMax Express Large Scale RNA Production System を用いて RNA へ in vitro transcription を行った。その後、テンプレート DNA1μl に対して DNase 1μl を加え 37℃、15 分でインキュベートすることでテンプレート DNA を切断した。これに ISOGEN400μl とクロロホルム 100μl を加え 5 秒撹拌し、15000rpm、4℃で 10 分遠心した。上清を回収しこれに ISOGEN400μl とクロロホルム 100μl を加え、15000rpm、10 分遠心した。再度上清を回収し、これに同量のイソプロパノールを加え、15000rpm、15 分、4℃で遠心した。上清を捨てた後、80%エタノール 500μl を加え 15000rpm、5 分、4℃で遠心し、上清を捨て風乾した。得られたペレットは Nuclease free Water で懸濁し、1μg/μl となるように濃度調整を行い-80℃で保存した。

2-2 .HCVccRNA transfection

試薬および材料

Opti-MEM	Invitrogen
4mm Electroporation Cuvette	BIO-LAD

RNA transfection は electroporation 法によって行なった。以下に手順を示す。confluent になった Huh7.5.1 細胞は 0.25% Trypsin-EDTA で回収し、PBS で 2 回洗浄した。氷上で HCVccRNA 10μg を Opti-MEM 500μl に加え、Huh7.5.1 細胞 5×10^6 個をその中に懸濁し、キュベットに入れた。GENE PULSER II (BIO-LAD ,Berkeley,California)を用いて 925μF,275V の条件下に electroporation を行なった。キュベットを室温で 5 分間静置した後、10cm ディッシュで細胞培養を行った。

2-3. Luciferase レポーターアッセイ

試薬および材料

1×Glo Lysis Buffer	Promega
Bright-Glo Luciferase Assay	Promega

HCV FeoReplicon 細胞の Luciferase 活性は Bright-Glo Luciferase Assay(Promega)を用いてルミノメーター(GloMax-Multi+detection System,Promega)により測定した。5×10^4 個/cm^2 の HCV FeoReplicon 細胞を 96 ウェルプレートに 37℃、5%CO_2

の環境下にて培養した。24 時間後にカルニチン入りの上清に交換した。96 時間後に上清を捨て PBS にて洗浄後、Lysis Buffer 100μl を加え室温にて 20 分静置し可溶化した。可溶化物 20μl に同量の Bright-Glo Luciferase Assay の基質を加えて、ルミノメーターにて測定した。

2-4. MTS アッセイ

試薬および材料

CellTiter 96 Aqueous One Solution Proliferation Assay　Promega

MTS アッセイは CellTiter 96 Aqueous One Solution Proliferation Assay(Promega)を用いて行なった。5×10^4 個/cm^2 の細胞を 96 ウェルプレートに 37℃、5%CO2 の環境下にて培養した。24 時間後にカルニチン入りの上清に交換した。96 時間後にそれぞれのウェルに 20μl の CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent を加え 5% CO_2 下にて 2 時間静置した。490nm の吸光度を GloMax-Multi+detection System(Promega)を用いて測定した。

2-5 .Oil Red O 染色および定量

試薬および材料

10% neutral buffered formalin	Wako
Lipid Assay Kit	Primary Cell

細胞内中性脂肪の染色および定量は Lipid Assay Kit(Primary Cell,Japan)を用いて行なった。Huh7.5.1 細胞または HCV RNA をトランスフェクションした Huh7.5.1 細胞は 24 ウェルプレートで 37℃、5%CO_2 の環境下にて培養した。96 時間後に上清を除去し PBS で 1 回洗浄した後、10% neutral bufferd formalin 500μl で一晩室温で固定した。固定液を除去し 500μl 精製水で洗浄し、Oil Red O 500μl を加えて 15 分間室温に静置した。Oil Red O 溶液を除去し、精製水で 3 回以上(精製水が透明になるまで)洗浄を繰り返し、プレートを風乾させた。

Oil Red O の定量は Lipid Assay Kit の抽出液を用いて行なった。上述の如く Oil Red O で染色した各ウェルに 500μl の抽出液を加え 30 分静置した。抽出液は各ウェルから 20μl ずつ回収し、測定用の 96 ウェルプレートに triplicate になるよう移し入れ、560nm の吸光度を GloMax-Multi+detection System(Promega)を用いて測定した。

2-6. 免疫蛍光染色

溶液および緩衝液の組成

細胞固定液	Aceton
封入剤	Dapi Fluoromount-G
Blocking Buffer	3% goat serum/PBS

一次抗体液　　一次抗体(1:1000)+Blocking Buffer
二次抗体液　　二次抗体(1:200)+ BODIPY(1:500) + Blocking Buffer

試薬および材料

25mm-round micro cover glass	Matsunami
Aceton	Wako
mouse IgG anti-HCV Core antibody	abcam
Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG antibody	Invitrogen
BODIPY 493/503	Invitrogen
Dapi Fluoromount-G	SouthernBiotech

HCV 感染 Huh7.5.1 細胞における HCV コアタンパクの発現を免疫蛍光染色にて確認した。免疫染色の手順を以下に示す。

6 ウェルプレートの各ウェルに 25mm 円形カバーガラスをセットし、Huh7.5.1 細胞ならびに HCV 感染 Huh7.5.1 細胞を 37℃、5%CO_2 の環境下にて培養した。96 時間後にカバーガラスを取り出し、PBS で 1 回洗浄した後、-30℃で Aceton にて 10 分固定した。PBS にて 2 回洗浄後、細胞膜透過液を加え 15 分間静置した。PBS にて 2 回洗浄後、1 次抗体として 1/250 量の mouse IgG anti-HCV core antibody を加え 37℃1 時間静置した。3 回の PBS による洗浄後、2 次抗体として 1/2000 量 Goat anti-mouse Alexa 594 (Invitrogen)および BODIPY を加え 37℃1 時間暗所で静置した。PBS で 3 回洗浄し、封入液を用いて封入した。蛍光は共焦点蛍光顕微鏡(BZ-8000, KEYENCE)を用いて検出した。

2-7. ウェスタンブロット

試薬および材料

50×Lysis Buffer	Cell Signaling
200mM PMSF	Wako
Bolt™ 4×LDS Sample Buffer	novex
Bolt™ Sample Reducing Agent	novex
Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus (SDS-PAGE)	novex
Mini Format, 0.2μm PVDF	BIO-RAD
Blocking One	nakalai tesque
Tween 20	Kanto Chemical
Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare

Lysis Buffer の組成

10×Lysis Buffer	50 μl
200mM PMSF	2.5 μl

DDW	447.5 μl
total	500 μl

Washing Buffer の組成

Blocking One	50ml
Tween20	1.5ml
DDW	450ml
total	500ml

1 次抗体

β-actin	Santa Cruz Biotechnology
HCV core	abcam
CPT-1	abcam

2 次抗体

ECL™ Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody
GE Healthcare

上記抗体は以下のとおり希釈した。

β-actin	1:5000
HCV core	1:5000
CPT-1	1:5000
Peroxidase linked whole antibody	1:2000

Huh7.5.1 細胞と HCV 感染 Huh7.5.1 細胞を使用し、コアタンパクと CPT-1 の発現について検討した。

Huh7.5.1 細胞および HCV 感染 Huh7.5.1 細胞を 6 ウェルプレート に散布し、HCV 感染 Huh7.5.1 細胞にはカルニチンを含まない DMEM ならびにカルニチン(500μM)を添加した DMEM で培養した。96 時間後に上清を除去し、PBS で洗浄し、氷上で Lysis buffer100μl を加え融解させセルスクレイパーを用いて回収した。回収したサンプルを 15000rpm、4℃で 30 分間遠心し、上清を回収した。得られたタンパクは Qubit®2.0 で濃度を測定し-80℃で保管した。

タンパクは最終タンパク濃度が 0.5μg/μl となるよう DDW 適量、4×Sample Buffer 25μl、Reducing Agent 10μl を添加し、70°C で 10 分間熱した。SDS-PAGE (165V、45 分間)にてマーカーとともに展開し、PVDF に転写させた。続いて Blotting One で振盪しながら室温で 30 分間インキュベートした。1 次抗体を加え 4℃で一晩静置した。Washing Buffer で 5 分間 3 回洗浄した後、2 次抗体を室温で 1 時間反応させた。Washing Buffer で 15 分間 2 回洗浄し、ECL™ Western Blotting

Analysis System を用いて検出した。

2-8. GSH/GSSG アッセイ

試薬および材料

GSH/GSSG-Glo™ Assay	Promega

細胞の酸化ストレスを定量するために、還元型グルタチオン(GSH)と酸化型グルタチオン(GSSG)の比を測定する GSH/GSSG Assay を行なった。Huh7.5.1 細胞および HCV 感染 Huh7.5.1 細胞を 96 ウェルプレートに散布し、HCV 感染 Huh7.5.1 細胞にはカルニチンを含まない DMEM ならびにカルニチン(500,5000μM)を添加した DMEM で培養した。96 時間後に上清を除去し、PBS で洗浄した後、Total Glutathione Reagent ならびに Oxidized Glutathione Reagent 50μl/well で細胞を可溶化した。可溶化したサンプルに Luciferin Generation Reagent 50μl/well を加え、室温で 30 分間静置した。そこへ Luciferin Detection Reagent を 100μl/well 加え、15 分間静置した後、蛍光を GloMax-Multi+detection System(Promega)を用いて測定し、総グルタチオン(GSH+GSSG)と GSSG のﾚﾍﾞﾙを算出した。総グルタチオンと GSSG の値から GSH 値を算出し、GSH/GSSG 比を算出した。

2-9. FACS 法による MitoSOX™ 染色細胞のカウント

溶液および緩衝液の組成

FACS Buffer	0.5%BSA+0.05% NaN3/PBS

試薬および材料

MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator	Molecular Probes
Live Cell Imaging Solution(1×)	Molecular Probes

細胞のミトコンドリア障害の程度を検討するために、細胞を MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator(以下 MitoSOX)で染色し、FACS でカウントし定量を行なった。Huh7.5.1 細胞および HCV 感染 Huh7.5.1 細胞を 10cm ディッシュに散布し、HCV 感染 Huh7.5.1 細胞にはカルニチンを含まない DMEM ならびにカルニチン(500μM)を添加した DMEM で培養した。96 時間後に上清を除去し PBS で洗浄した後、5μM に調整した MitoSOX を加え、37℃、5% CO_2 の条件下で 30 分間静置した。MitoSOX を吸引除去し PBS で洗浄し、TrypsinEDTA で細胞を回収した。回収した細胞は FACS Buffer 500μl にて再懸濁し、FACS CantoII(BD)を用いて解析した。

2-10. 統計処理

有意差検定には t-検定を行って p 値を求めた。

結 果

1. HCV レプリコン細胞に対するカルニチンの抗ウイルス効果の検討

5×10^4 個/cm^2 の HCV Feo レプリコン細胞(Genotype1b, 2a)を 96 ウェルプレートに撒き、24 時間後にカルニチン無しまたは 5,50,500,5000μM のカルニチンを含む上清に交換した。96 時間後にルシフェラーゼアッセイと MTS アッセイを行なった。

ルシフェラーゼアッセイでは、Genotype 1b,2a ともにカルニチン単独での抗 HCV 効果は認められなかった **(Figure 1A)**。 また、上記の濃度でのカルニチンの細胞毒性は認められなった**(Figure 1B)**。

Figure 1

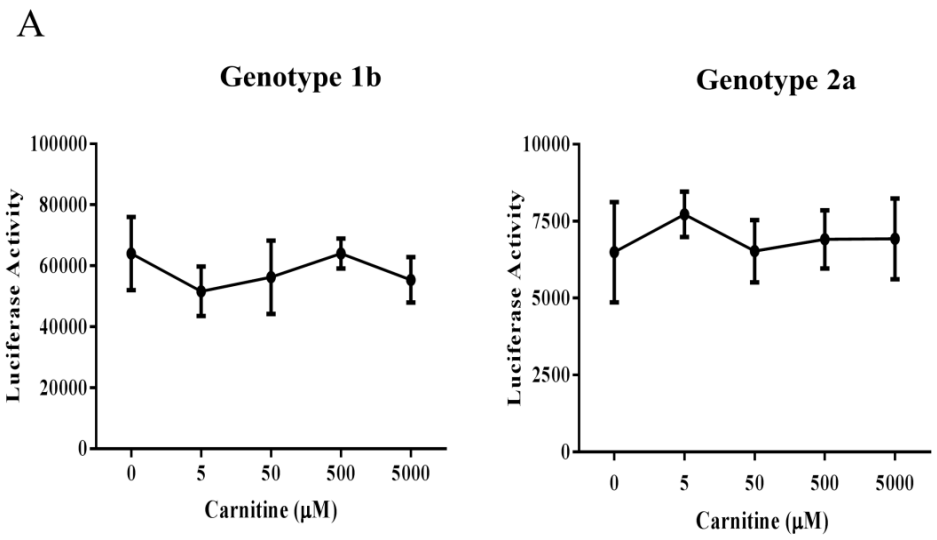


Figure 1. HCV レプリコン細胞に対するカルニチンの抗ウイルス効果の検討
HCV Feo レプリコン細胞(Genotype 1b, 2a)はカルニチン無しまたはカルニチン 5,50,500,5000μM を含む上清で培養した。
(A) 96 時間培養後、ルシフェラーゼアッセイを行なった。Genotype 1b, 2a ともにカルニチン単独での抗ウイルス効果は認めなかった。

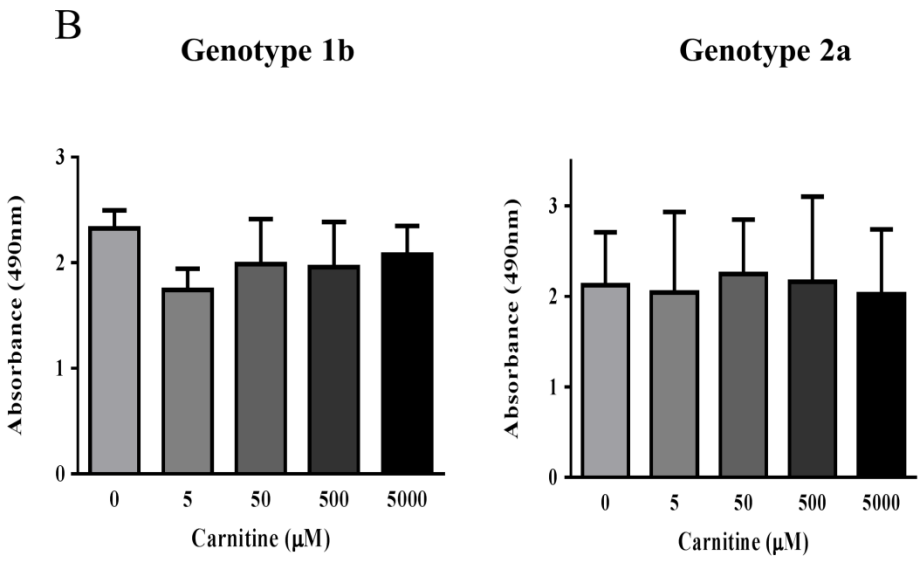


Figure 1.

(B) 96 時間培養後、MTS アッセイを行なった。Genotype 1b, 2a ともに、使用した濃度でのカルニチンの細胞毒性は認めなかった。

2. HCVcc に対するカルニチンの抗ウイルス効果の検討

pJFH-1 を制限酵素 XBaI にて制限切断し直鎖状にした。切断についてはアガロースゲル電気泳動にて確認した。その後、実験方法に記述したごとく、T7 RiboMax Express Large Scale RNA Production System を用いて in vitro transcriptation を行い HCV-RNA を合成した。HCV-RNA を上述のように HuH7.5.1 細胞に electroporation 法にて遺伝子導入し、カルニチン無しまたは 5,50,500,5000μM のカルニチンを含む上清で培養した。

2-1.HCV 感染細胞に対するカルニチンの細胞毒性の検討

上記のとおり培養してから 96 時間後に MTS アッセイを施行し、HCV 感染細胞に対するカルニチンの細胞毒性は認められなかった**(Figure 2A)**

Figure 2A.

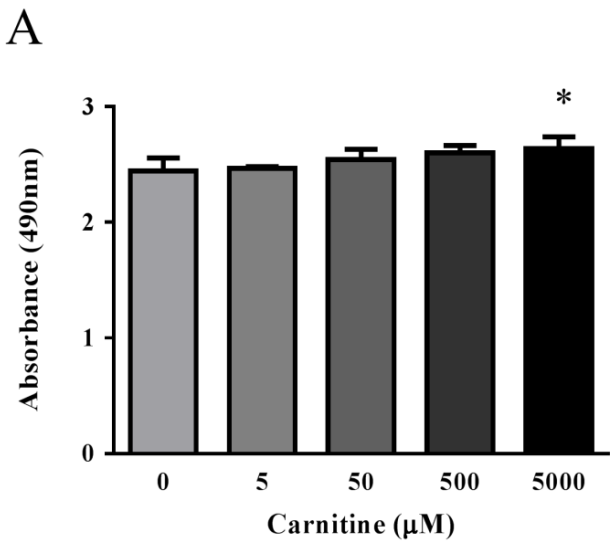


Figure 2A.

MTS アッセイ。使用した濃度でのカルニチンの HCV 感染細胞に対する細胞毒性は認めなかった。

2-2.上清中 HCV コア抗原の測定

上記のとおり培養してから 96 時間後に上清を回収し、SRL の外注検査に提出し、CLEIA 法にて HCV コア抗原を測定した。HCV コア抗原はカルニチンの濃度依存性に有意に減少し**(Figure 2B)**、カルニチンは HCV の増殖を抑制していることが示唆された。

Figure 2B.

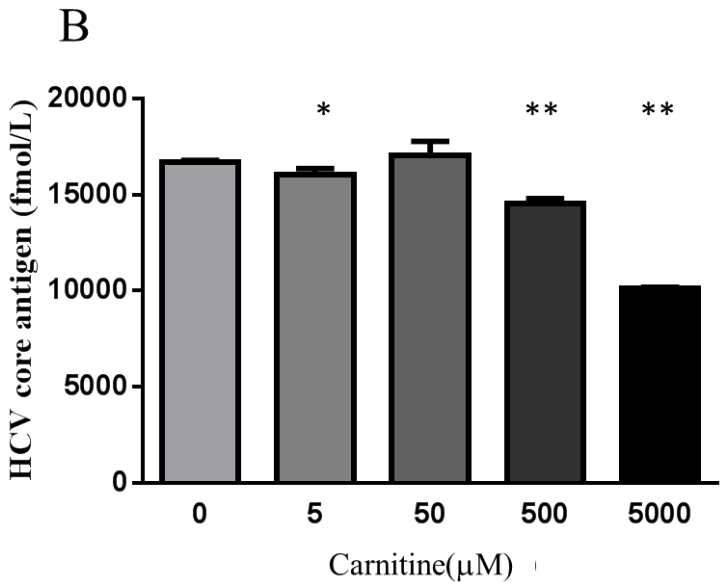


Figure 2B.

培養上清を回収し HCV コア抗原濃度を測定した。カルニチン 500μM，5000μM 投与にて培養上清中の HCV コア抗原の有意な減少を認めた。

2-3. HCV 感染細胞内タンパクのウェスタンブロット

上記のとおり培養してから 96 時間後に細胞内総タンパクを抽出し、HCV コアタンパクを定量する目的でウェスタンブロットを行なった。カルニチン濃度依存性に細胞内 HCV コアタンパクの発現減少が認められた **(Figure 2C)**。

Figure 2C.

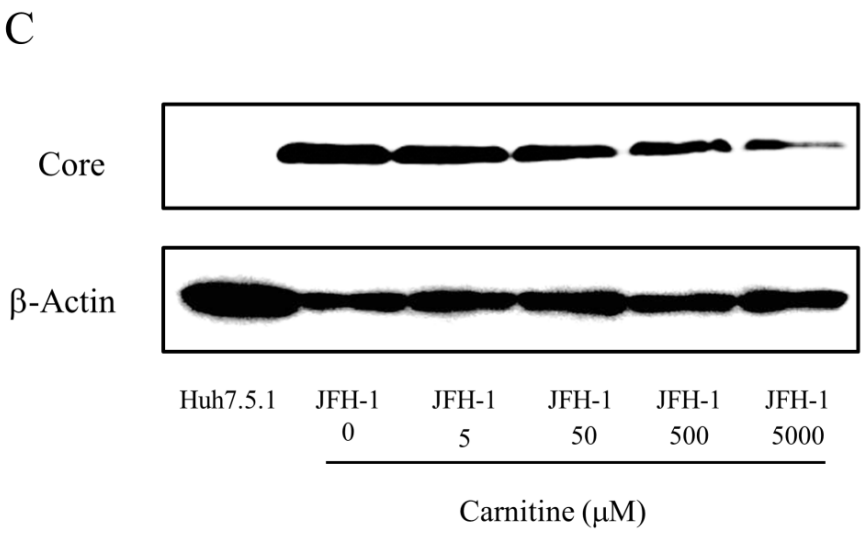


Figure 2C.

細胞内タンパクを抽出し、抗 HCV コア抗体を用いてウェスタンブロットを行なった。カルニチンは濃度依存性に HCV 感染細胞内のコアタンパクの発現を低下させた。

2-4. HCV 感染細胞に対する免疫蛍光染色

HCV 感染細胞のうち、カルニチン非投与、カルニチン 500μM を投与した細胞に対し、上記の如く培養 96 時間後に抗 HCV コア抗体を一次抗体として免疫蛍光染色を行なった。青は細胞核、赤は HCV コア抗体を示す。それぞれ 3 視野ずつ観察し、総細胞数と HCV 感染細胞数をカウントした。その結果、カルニチン 500μM を投与した細胞では、HCV に感染している細胞の割合が減少しているのが認められた (**Figure 2D**)。

Figure 2D

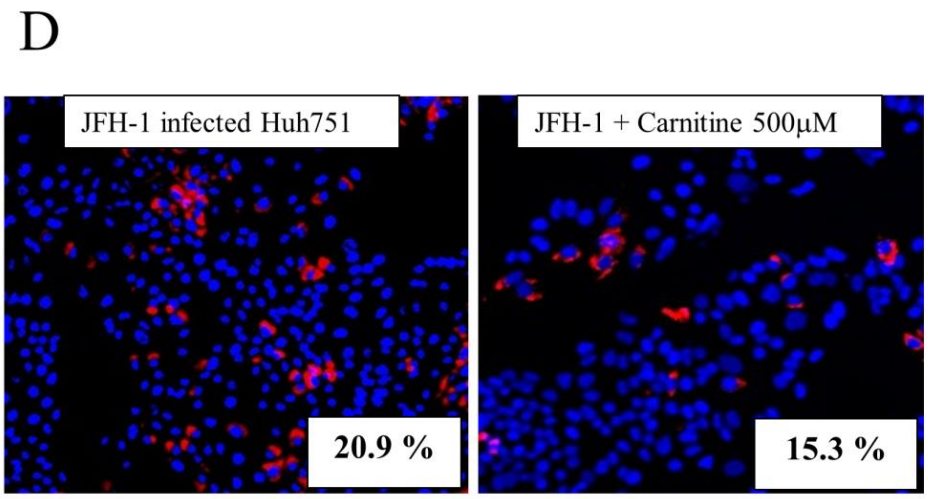


Figure 2D.

HCV 感染細胞をカバーガラス上に撒き、カルニチン（－）、カルニチン 500μM を含む上清中で 96 時間培養した後、免疫蛍光染色を行なった。赤(抗 HCV コア抗体)が HCV コアタンパク、青(Dapi)が細胞核を示す。 HCV コア陽性の細胞数の割合をカウントしたところ、カルニチンを投与した群で HCV 感染細胞の割合が減少していることが確認された。

3. HCV 感染による細胞内脂肪滴増加

次に、Oil Red O 染色を用いて、HCV 感染による細胞内脂肪滴誘導の有無の検討を行った.Mock または JFH-1 RNA を遺伝子導入した Huh7.5.1 細胞をそれぞれ 96 時間培養し、実験方法で述べたとおり Oil Red O で染色した。染色した細胞を乾燥させ抽出液を加え、抽出液の吸光度を測定・定量した。HCV 感染細胞は HCV 非感染細胞と比較して有意に細胞内脂肪滴の増加を認めた(**Figure 3A**)。

Figure 3A

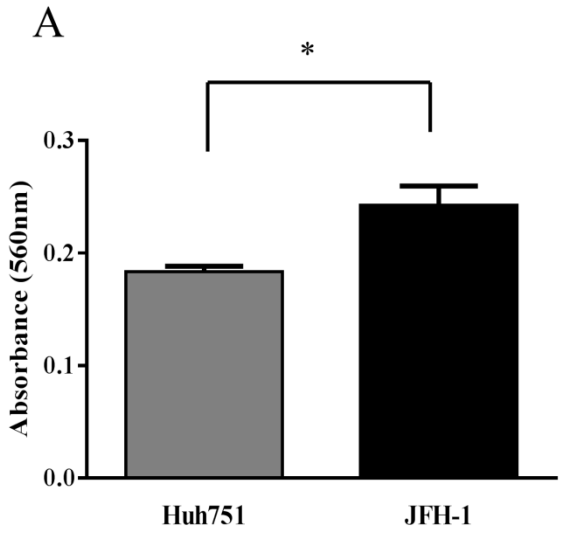


Figure 3A.

HCV 非感染 Huh7.5.1 細胞と HCV 感染 Huh7.5.1 細胞を 96 時間培養し(いずれもカルニチン無し)、Oil Red O 染色による細胞内脂肪滴の定量を行なった。HCV 感染細胞では有意に細胞内脂肪滴の増加を認めた。

さらに、HCV 感染細胞に対して抗 HCV コアタンパクを一次抗体として免疫蛍光染色を行なったところ、細胞内に多くの脂肪滴を認め、脂肪滴がコアタンパクと共局在している様子が観察された(**Figure 3B**)。
以上のことから、既報どおり HCV 感染は細胞内脂肪滴を増加させることが確認できた。

Figure 3B

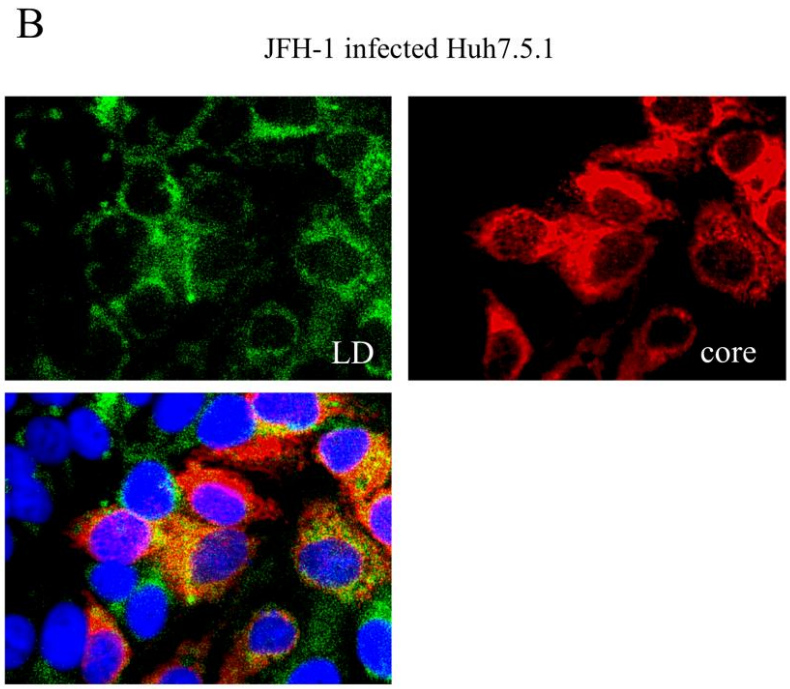


Figure 3B.
HCV 感染 Huh7.5.1 細胞を 96 時間培養し、免疫蛍光染色を行なった。緑(BODIPY)が脂肪滴、赤(抗 HCV コア抗体)が HCV コアタンパク、青(Dapi)が細胞核を表す。HCV 感染細胞では多数の細胞内脂肪滴が観察された。

4. HCV 感染細胞におけるカルニチンの抗脂肪効果の検討

続いて、HCV 感染細胞をカルニチン無しまたは 5,50,500,5000μM のカルニチンを含む上清で 96 時間培養し、それぞれの細胞において Oil Red O 定量を行なった。その結果、カルニチンは濃度依存性に HCV 感染細胞の細胞内脂肪滴を減少させた(**Figure 4A**)。

Figure 4A

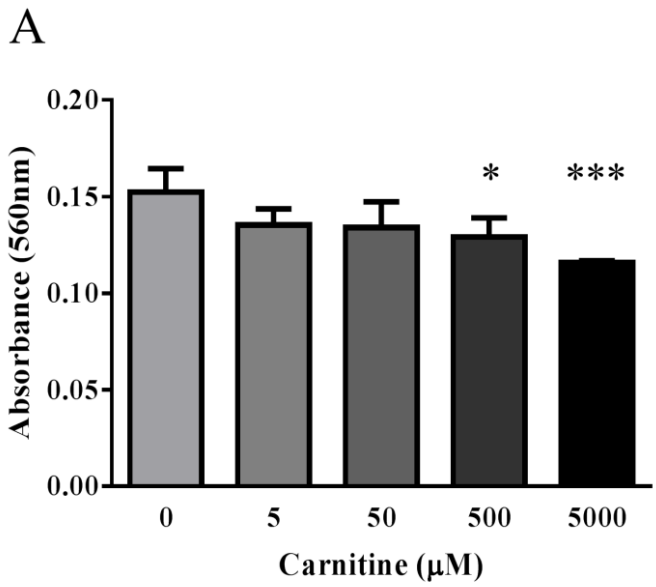


Figure 4A.

JFH-1 RNA を遺伝子導入した Huh7.5.1 細胞をカルニチン無しまたはカルニチン 5,50,500,5000μM を含む上清で 96 時間培養し、Oil Red O 染色により細胞内脂肪滴を定量した。カルニチンは濃度依存性に HCV 感染細胞の細胞内脂肪滴を減少させた。

また、HCV 感染細胞のうち、カルニチン無しの上清とカルニチン 500μM を含む上清でそれぞれ 96 時間培養した細胞について、抗 HCV コア抗体を一次抗体として免疫蛍光染色を行なった。カルニチンを投与していない HCV 感染細胞では、細胞内に多数かつ粒子の粗大な脂肪滴を認めるのに対し、カルニチン 500μM を投与した HCV 感染細胞では脂肪滴が減少し粒子が小さくなっている様子が観察された(**Figure 4B)**。

以上より、カルニチンは HCV 感染細胞において細胞内脂肪滴を減少させる効果があることが確認された。

Figure 4B

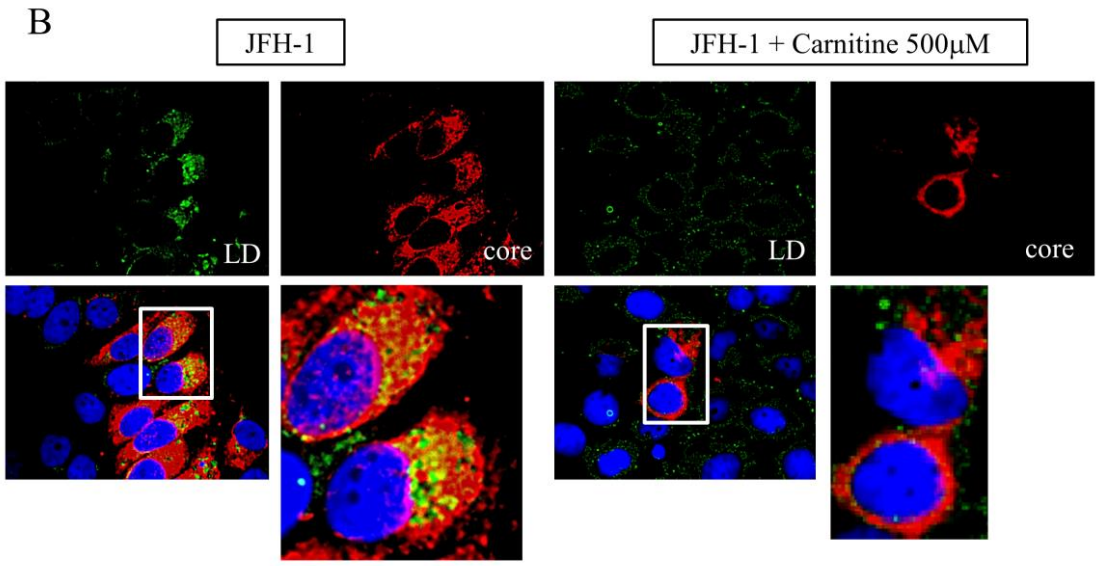


Figure 4B.

JFH-1 RNA を遺伝子導入した Huh7.5.1 細胞をカルニチン無しまたはカルニチン 500μM を含む上清で 96 時間培養し、免疫蛍光染色を行なった。緑(BODIPY)が脂肪滴、赤(抗 HCV コア抗体)が HCV コアタンパク、青(Dapi)が細胞核を表す。カルニチン 500μM を投与した HCV 感染細胞では、細胞内脂肪滴が減少し、脂肪滴のサイズが小さくなっている様子が観察された。

5. HCV 感染細胞におけるカルニチンの抗脂肪効果の機序に関する検討

カルニチンの抗脂肪効果の機序を検討するために、Carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT-1)の発現をウェスタンブロット法で検討した。CPT-1 はミトコンドリア外膜上に存在し脂肪酸のβ酸化において重要な役割を果たす酵素である。CPT-1 は HCV 感染により発現が低下することが報告されている。[20]. カルニチン非投与細胞をネガティブコントロールとして、500μM のカルニチンを含む上清で 96 時間培養した HCV 感染細胞からタンパクを抽出し、ウェスタンブロットを行なった。その結果、CPT-1 の発現は HCV 感染に伴い低下するものの、カルニチン投与により上昇することが確認された(Figure 5) 。

Figure 5

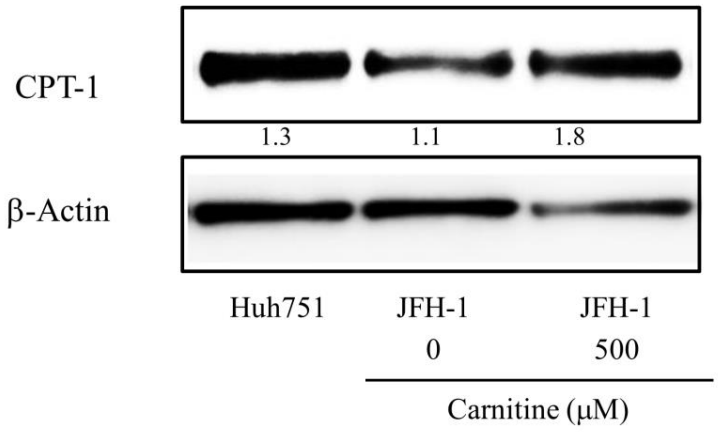


Figure 5.

カルニチンの HCV 感染細胞における CPT-1 発現に対する影響

Huh7.5.1 細胞ならびに JFH-1 RNA を遺伝子導入した Huh7.5.1 細胞をカルニチン無しまたは 500μM のカルニチンを含む上清で培養した。96 時間後、タンパクを抽出して抗 CPT-1 抗体を一次抗体としてウェスタンブロットを行なった。発現強度はβ-actin をコントロールとして densitometry で測定した。

6. HCV 感染細胞に対するカルニチンの抗酸化効果に関する検討

HCV コアタンパクは細胞内の ROS の産生を亢進させ、酸化ストレスを誘導することが報告されている [21]. 一方で、カルニチンは ROS 産生を減少させるという報告がなされている [22]。そこで今回、HCV 感染細胞に対するカルニチンの抗酸化効果について GSH/GSSG アッセイと MitoSOX^{TM} Red 染色を用いて検討した。Huh7.5.1 細胞をネガティブコントロールとして、カルニチン無しの上清とカルニチンを含む上清とで 96 時間培養した HCV 感染細胞に対して GSH/GSSG アッセイと MitoSOX^{TM} Red 染色を行なった。

6-1.HCV 感染細胞における GSH/GSSG アッセイ

グルタチオンは細胞内に存在する抗酸化物質であり、総グルタチオンのうちほとんどは GSH(還元型グルタチオン)として存在している。酸化ストレス状態では GSH は減少して GSSG(酸化型グルタチオン)が増加し、GSH/GSSG 比が減少する。今回はコントロールとして Huh7.5.1 細胞と、カルニチン無しの上清およびカルニチン 500μM または 5000μM を加えた上清で 96 時間培養した HCV 感染細胞を用いて GSH/GSSG 比の測定を行なった。**Figure 6A** に示す通り、GSH/GSSG 比は HCV 感染細胞で低下し、カルニチン投与によりその比は回復した。すなわち、カルニチンは HCV 感染細胞の酸化ストレスを軽減させる効果があることが示唆された。

Figure 6A

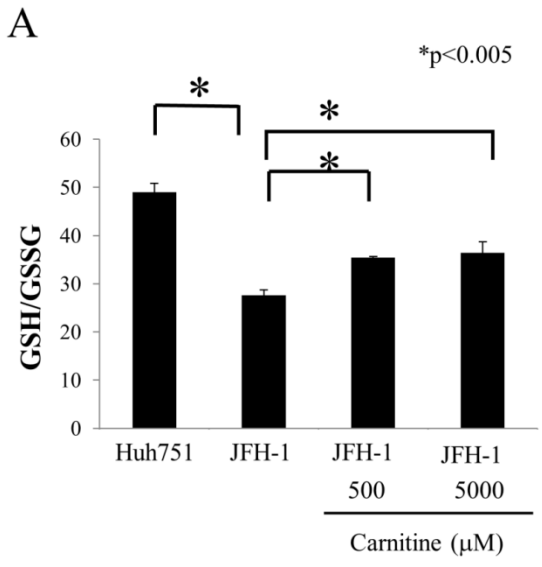


Figure 6A.

GSH/GSSG アッセイ。

HCV 感染により GSH/GSSG 比は低下したが、カルニチン投与により GSH/GSSG 比は上昇した。すなわちカルニチンにより HCV 感染細胞の酸化ストレスが軽減されたことが示された。

6-2.HCV 感染細胞におけるミトコンドリア障害の検討

MitoSOX™ Red は生細胞中のミトコンドリアの活性酸素を検出することができる蛍光染色液である。今回 HCV 感染細胞におけるミトコンドリア障害の程度を検討するために、細胞を MitoSOX™ Red で染色し、FACS CantoII を用いて検討を行った。コントロールとして Huh7.5.1 細胞と、カルニチン無しの上清およびカルニチン 500μM を加えた上清で 96 時間培養した HCV 感染細胞を用いて MitoSOX™ Red 染色を施行した。HCV 感染によりミトコンドリア障害を受けた細胞数は増加するが、カルニチン投与によりその数は減少することが示された (**Figure 6B**) 。

Figure 6B

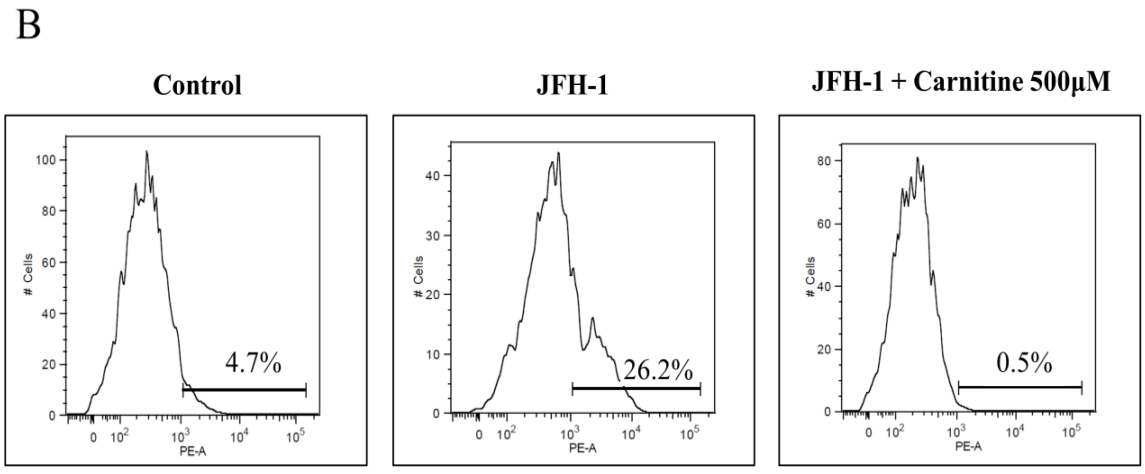


Figure 6B.

MitoSOX™ Red で染色した細胞を回収し、FACS Canto II でカウントした。HCV 感染によりミトコンドリア障害を受けた細胞数は増加したが、カルニチン投与によりその数は減少した。カルニチンは HCV 感染細胞のミトコンドリア障害を軽減することが示された。

考 察

今回の研究で、カルニチンは濃度依存性に HCV 増殖を抑制しうる事が示された。Oil Red O 染色による細胞内脂肪滴の定量ならびに免疫蛍光染色の結果、カルニチンは HCV 感染細胞の細胞内脂肪滴を減少させることが明らかとなった。以上の結果より、カルニチンはウイルス粒子形成に必要な細胞内脂肪滴を減少させることにより、ウイルスの増殖を抑制している可能性が予想された。 さらに、カルニチンは HCV 感染細胞に対して抗酸化効果を発揮することも示された。本研究の結果より、HCV 感染患者においてカルニチンは治療オプションのひとつとなり得る可能性が示唆される。

カルニチンは脂肪酸が代謝される過程において、脂肪酸を細胞質からミトコンドリア内部に運搬するにあたり重要な役割を果たす物質である [15]。ヒトでは体内のカルニチンの 75%は食物由来であり、ヒトのカルニチンの体重 1kg あたりの摂取量は 2-12 μmol/日である [23]。カルニチンはヒトの体内でリジンとメチオニンから生合成もされており、その主な場は肝、腎、脳である [24]。

カルニチンは脂肪酸のβ酸化に関与する重要な物質であり、カルニチンが欠乏すると重大な健康問題を引き起こす。原発性カルニチン欠乏症（Primary carnitine deficiency；PCD）は、カルニチンのトランスポーターである細胞膜上の有機カチオントランスポーター2（OCTN2）が欠損しているために起こる、常染色体劣性の脂肪酸代謝障害である [25]。原発性カルニチン欠乏症のモデルマウス（juvenile visceral steatosis）では脂肪肝や肝腫大を呈する [26]。二次性カルニチン欠乏症は Fanconi 症候群、血液透析、低栄養 [15]、バルプロ酸などによる薬剤投与 [27]、肝硬変 [16] などにより引き起こされる。

肝脂肪化は HCV 感染患者に特徴的な組織学的特徴である [8]。 また肝脂肪化は肝線維化を助長し、肝癌の発症率を増加させることや、IFN 療法の奏効率を低下させることが報告されている [12,13,28,29]。 Figure 3A,B のとおり、本研究では HCV 感染細胞では細胞内脂肪滴が多いことが示され、これまでの報告 [10] と矛盾しない結果であった。HCV 感染による肝脂肪化の機序はコアトランスジェニックマウスモデル [9] や感染培養系を用いた実験 [10] により研究されてきた。HCV タンパクの中でもコアタンパクが肝脂肪化を引き起こす上で重要な役割を果たすことが明らかにされている [9,30]。コアタンパクは宿主細胞の正常な脂肪酸代謝機構を破綻させ、脂肪酸合成の促進、脂肪酸取り込みの促進、肝細胞からの VLDL 分泌障害、脂肪酸分解（β酸化）の抑制を介して肝脂肪化を引き起こす [31]。 Sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1)は脂肪酸合成経路にかかわる酵素群を転写する転写因子であるが、HCV コアタンパクは脂質合成を正に制御する SREBP-1 を活性化することで脂肪酸合成を亢進させることが知られている [28]。 脂肪酸の取り込み亢進は、HCV コアタンパクがインスリン

抵抗性を引き起こすことが原因であると考えられている[32]。細胞内の脂肪酸はVLDLとして分泌されるが、HCV感染者の肝臓ではVLDLを形成するのに必要なmicrosomal triglyceride transfer protein（MTP）が減少しており、HCVによるVLDL分泌障害が報告されている[33]。
また、HCVによるミトコンドリアでのβ酸化の抑制も肝脂肪化に関与している[21]。 細胞内での脂肪酸代謝の機序の一つとしてβ酸化の律速酵素であるCPT-1の発現がHCV感染により低下し[20,34]、これにより脂肪酸の分解が抑制されている。

HCVは自身が惹起した肝脂肪化をウイルス増殖のために巧みに利用している。HCVは脂質ラフト上に複製複合体を形成し[35]、脂肪滴はHCV感染性粒子の形成に必須である[10]。

今回の研究では、カルニチンはHCVレプリコンに対して抗ウイルス効果は認められなかった(Figure 1A)。これに対し、カルニチンはJFH-1感染培養系においてはウイルス増殖抑制効果を示した(Figure 2A)。JFH-1 RNAはHCVの全長RNAであるが、HCVレプリコンにはHCV構造タンパク領域が欠如している。これらの結果の相違は、HCV非構造タンパク、特にコアタンパクの有無が影響していると思われ、カルニチンのHCV増殖抑制効果はHCVのゲノム複製ではなく粒子形成を抑制していることによる可能性が予想される。細胞内脂肪滴の定量や免疫蛍光染色の結果(Figure 4A,B) 、カルニチンはHCV感染細胞の脂肪滴を縮小・減少させることが示された。以上のことから、カルニチンはHCVの粒子形成に必須である細胞内脂肪滴を減少させることでウイルス粒子形成を抑制している事が予想される。

脂肪酸の細胞内代謝において、長鎖脂肪酸をミトコンドリア内部に運搬させることがカルニチンの役割である。C型慢性肝炎患者の血清カルニチン濃度は健常人のそれと比較して低値であることが報告されている[36]。細胞を用いたin vitroの研究でもHCV感染によるカルニチン減少が報告されている[37]。HCV感染によりカルニチン欠乏状態になると思われ、HCV感染患者へカルニチンを投与することで長鎖脂肪酸のミトコンドリア内部への運搬を正常化することができると思われる。

HCVコアタンパクがβ酸化の律速酵素であるCPT-1の発現を低下させ、肝脂肪化の一因となっていることがこれまでに報告されている[20,34]。本研究ではHCV感染によりCPT-1の発現は低下したが、カルニチン投与によりその発現は回復した。すなわち、HCV感染細胞のCPT-1の発現を亢進させることがカルニチンの抗脂肪化効果に影響している可能性が示唆された。

カルニチンはスーパーオキサイドアニオン基や過酸化水素を除去し、抗酸化効果もあることが報告されている[38] 。肝臓以外の臓器では、カルニチンの投与が抗酸化効果を介して冠動脈疾患に有効であるとの報告がされている[39]。HCV

感染、とりわけ HCV コアタンパクが肝細胞の酸化ストレスを亢進させる[21]。酸化ストレスは肝癌発症を助長するが、これはテロメラーゼの活性化や血管新生の促進が関与するとされている[40]。 当科では以前、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG （8-hydroxy-2’-deoxyguanosine）が高値である HCV 感染患者から有意に肝発癌が上昇する事を報告している[41]。NASH マウスモデルを用いた研究により、カルニチンはミトコンドリアでのβ酸化を亢進し、肝での酸化還元を正常化させることで酸化ストレスならびに発癌を軽減することが報告されている[18]。 本研究ではカルニチンは HCV 感染細胞の GSH/GSSG 比を増加させ、細胞のミトコンドリア障害を軽減することを示した（Figure 6A,B）。 これらの結果は、カルニチンは HCV 感染細胞の酸化ストレスを軽減していることを示した。

カルニチンは様々な肝疾患の治療に用いられるようになってきている。肝硬変患者においては血清カルニチン濃度は低下しているが[16]、カルニチンは血清アンモニア濃度を低下させ肝性脳症を改善する。この効果はカルニチンの肝ミトコンドリア機能の改善によるものとされている[42]。 Malaguarnera *et al.*[17] はカルニチンが NASH 患者の肝脂肪化・肝線維化を改善したと報告している。B 型慢性肝炎患者でも、カルニチンが血清 ALT 値を改善したという報告もある[43]。慢性 C 型肝炎患者では血清カルニチン濃度が減少しており[36]、in vitro の研究では HCV 感染により細胞内カルニチンが減少し脂肪酸が増加することが報告されている[37]。 本研究はカルニチンが HCV 増殖を抑制し肝脂肪化を軽減することを初めて報告するものである。 C 型慢性肝炎患者へのカルニチン投与は、他の肝疾患同様に、補助的治療となる可能性があると思われる。HCV 感染患者に対する DAAs 治療はきわめて奏効率の高い抗 HCV 療法ではあるが、DAAs は非代償性 C 型肝硬変の患者には適応がないのが現状である[44,45]。カルニチン投与はこのような患者に対しての効果的な補助療法となりうる可能性が示唆された。

総 括 および 結 論

本研究において､以下の知見が得られた。

１．カルニチンは HCV 感染培養系に対して抗ウイルス効果を示した。

２．カルニチンはβ酸化の律速酵素である CPT-1 の upregulation を介して肝細胞の脂肪滴を減少させた。

３．カルニチンは HCV 感染細胞の酸化ストレスを減少させた。

以上の知見から、カルニチンは抗ウイルス効果・抗脂肪化効果・抗酸化効果によりC型慢性肝炎～肝硬変の患者の治療オプションとなる可能性があると考えられた。今回の結果を踏まえ多施設施設共同観察研究「C 型肝硬変患者に対する L-carnitine 投与による C 型肝炎ウイルス感染に与える影響の検討」（北海道大学病院自主臨床研究承認番号 No14-0098）を行い、カルニチン投与前後の血清 HCV-RNA 定量や酸化ストレスマーカー（8-OHdG）などを測定し、カルニチンの HCV 感染症に与える影響の検討を行っている。

HCV 感染と肝線維化・肝発癌は密接な関係があり、カルニチンは抗酸化作用を示すことで HCV による肝線維化や発癌を抑制する可能性が示唆される。カルニチンによる肝発癌抑制効果については HCV トランスジェニックマウスなどを用いた動物実験によりさらなる検討が必要である。

謝　辞

本研究を遂行するにあたり、有益な御指導・御助言をいただきました北海道大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野、坂本直哉教授に深く感謝いたします。　終始実験・研究の御指導、御助言を頂きました須田剛生先生には感謝に堪えません。

病棟業務の間に研究のための時間を筆者に提供下さった北海道大学医学研究科内科学講座消化器内科学分野肝臓グループの先生方に厚く御礼申し上げます。

最後に、研究生活を支えてくれた家族に感謝します。

2015 年 3 月

佃 曜子

引用文献

1 Alter, M. J. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* **26**, 62S-65S (1997).

2 Nishiguchi, S. *et al.* Randomised trial of effects of interferon-alpha on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis C with cirrhosis. *Lancet* **346**, 1051-1055 (1995).

3 Sakamoto, N. *et al.* Association of IL28B variants with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy reveals intersubgenotypic differences between genotypes 2a and 2b. *J. Med. Virol.* **83**, 871-878 (2011).

4 Jacobson, I. M. *et al.* Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2405-2416 (2011).

5 Fried, M. W. *et al.* Once-daily simeprevir (TMC435) with pegylated interferon and ribavirin in treatment-naive genotype 1 hepatitis C: the randomized PILLAR study. *Hepatology* **58**, 1918-1929 (2013).

6 Suzuki, Y. *et al.* Dual oral therapy with daclatasvir and asunaprevir for patients with HCV genotype 1b infection and limited treatment options. *J. Hepatol.* **58**, 655-662 (2013).

7 Sakamoto, N. & Watanabe, M. New therapeutic approaches to hepatitis C virus. *J. Gastroenterol.* **44**, 643-649 (2009).

8 Czaja, A. J., Carpenter, H. A., Santrach, P. J. & Moore, S. B. Host- and disease-specific factors affecting steatosis in chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* **29**, 198-206 (1998).

9 Moriya, K. *et al.* Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J. Gen. Virol.* **78 (Pt 7)**, 1527-1531 (1997).

10 Miyanari, Y. *et al.* The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1089-1097 (2007).

11 Wakita, T. *et al.* Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* **11**, 791-796 (2005).

12 Moucari, R. *et al.* Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis. *Gastroenterology* **134**, 416-423 (2008).

13 Vidali, M. *et al.* Interplay between oxidative stress and hepatic steatosis in the progression of chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* **48**, 399-406 (2008).

14 Poynard, T. *et al.* Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. *Hepatology* **38**,

75-85 (2003).

15 Flanagan, J. L., Simmons, P. A., Vehige, J., Willcox, M. D. & Garrett, Q. Role of carnitine in disease. *Nutr. Metab.* **7**, 30 (2010).

16 Daniel Rudman, C. W. S., Joseph D.Ansley. Deficiency of Carnitine in Cachectic Cirrhotic Patients. *J. Clin. Invest.* **60**, 716-723 (1977).

17 Malaguarnera, M. *et al.* L-carnitine supplementation to diet: a new tool in treatment of nonalcoholic steatohepatitis--a randomized and controlled clinical trial. *Am. J. Gastroenterol.* **105**, 1338-1345 (2010).

18 Ishikawa, H. *et al.* L-carnitine prevents progression of non-alcoholic steatohepatitis in a mouse model with upregulation of mitochondrial pathway. *PloS ONE* **9**, e100627 (2014).

19 Tanabe, Y. *et al.* Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon- alpha. *J. Infect. Dis* **189**, 1129-1139 (2004).

20 Cheng, Y., Dharancy, S., Malapel, M. & Desreumaux, P. Hepatitis C virus infection down-regulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and carnitine palmitoyl acyl-CoA transferase 1A. *World. J. Gastroenterol* **11**, 7591-7596 (2005).

21 Korenaga, M. *et al.* Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production. *J. Biol. Chem.* **280**, 37481-37488 (2005).

22 Andrieu-Abadie, N. *et al.* L-carnitine prevents doxorubicin-induced apoptosis of cardiac myocytes: role of inhibition of ceramide generation. *FASEB* **13**, 1501-1510 (1999).

23 Rebouche, C. J. Carnitine function and requirements during the life cycle. *FASEB* **6**, 3379-3386 (1992).

24 Vaz, F. M. & Wanders, R. J. A. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem. J.* **361**, 417-429 (2002).

25 Longo, N., Amat di San Filippo, C. & Pasquali, M. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* **142C**, 77-85 (2006).

26 Koizumi, T., Nikaido, H., Hayakawa, J., Nonomura, A. & Yoneda, T. Infantile disease with microvesicular fatty infiltration of viscera spontaneously occurring in the C3H-H-2(0) strain of mouse with similarities to Reye's syndrome. *Lab. Anim.* **22**, 83-87 (1988).

27 Verrotti, A., Trotta, D., Morgese, G. & Chiarelli, F. Valproate-induced hyperammonemic encephalopathy. *Metab. Brain. Dis.* **17**, 367-373 (2002).

28 Moriishi, K. *et al.* Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 1661-1666 (2007).

29 Fujinaga, H., Tsutsumi, T., Yotsuyanagi, H., Moriya, K. & Koike, K. Hepatocarcinogenesis in hepatitis C: HCV shrewdly exacerbates oxidative stress by modulating both production and scavenging of reactive oxygen species. *Oncology* **81 Suppl 1**, 11-17 (2011).

30 Moriya, K. *et al.* The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat. Med.* **4**, 1065-1067 (1998).

31 Syed, G. H., Amako, Y. & Siddiqui, A. Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. *Trends. Endocrinol. Metab.* **21**, 33-40 (2010).

32 Kawaguchi, T. *et al.* Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1 and 2 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3. *Am. J. Pathol.* **165**, 1499-1508 (2004).

33 Perlemuter, G. *et al.* Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *FASEB* **16**, 185-194 (2002).

34 Nishina, S. *et al.* Hepatitis C virus protein and iron overload induce hepatic steatosis through the unfolded protein response in mice. *Liver Int.* **30**, 683-692, (2010).

35 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).

36 Azin Nassiri, S. D.-K., Hossein Khalili, Mohsen Nassiri-Toosi, and Alireza Abdollahi. Serum carnitine level and its associated factors in patients with chronic viral hepatitis. *Future Virol.* **9**, 373-383 (2014).

37 Roe, B., Kensicki, E., Mohney, R. & Hall, W. W. Metabolomic profile of hepatitis C virus-infected hepatocytes. *PloS ONE* **6**, e23641 (2011).

38 Gulcin, I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life sciences* **78**, 803-811 (2006).

39 Lee, B. J., Lin, J. S., Lin, Y. C. & Lin, P. T. Effects of L-carnitine supplementation on oxidative stress and antioxidant enzymes activities in patients with coronary artery disease: a randomized, placebo-controlled trial. *Nutr J.* **13**, 79 (2014).

40 Jo, M. *et al.* Oxidative stress is closely associated with tumor angiogenesis of hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol.* **46**, 809-821 (2011).

41 Chuma, M. *et al.* 8-Hydroxy-2'-deoxy-guanosine is a risk factor for

development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**, 1431-1436 (2008).

42 Malaguarnera, M. *et al.* Oral acetyl-L-carnitine therapy reduces fatigue in overt hepatic encephalopathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Am. J. Clin. Nutr.* **93**, 799-808 (2011).

43 Jun, D. W. *et al.* Efficacy and safety of entecavir plus carnitine complex (GODEX(R)) compared to entecavir monotherapy in patient with ALT elevated chronic hepatitis B: randomized, multicenter open-label trials. The GOAL study. *Clin. Mol. Hepatol.* **19**, 165-172 (2013).

44 Forns, X. *et al.* Antiviral therapy of patients with decompensated cirrhosis to prevent recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *J. Hepatol.* **39**, 389-396 (2003).

45 Carrion, J. A. *et al.* Antiviral therapy increases the risk of bacterial infections in HCV-infected cirrhotic patients awaiting liver transplantation: A retrospective study. *J. Hepatol.* **50**, 719-728 (2009).