

4. C型肝炎ウイルスによる糖代謝異常

勝二 郁夫¹⁾, 鄧 琳²⁾, 松井 千絵子²⁾, 堀田 博³⁾

1) 神戸大学大学院医学研究科附属感染症センター感染制御学分野

2) 神戸大学大学院医学研究科附属感染症センター微生物学分野

3) 神戸大学大学院保健学研究科経口ワクチン創薬研究開発講座

C型肝炎ウイルス (HCV) 感染は慢性肝炎, 肝硬変, 肝細胞癌などの肝内病変だけでなく, 甲状腺炎, 糖脂質代謝異常, 鉄代謝異常などの多彩な肝外病変を引き起こす。その中でも HCV 感染は2型糖尿病との合併が有意に多く, 肝線維化や慢性肝疾患の予後と密接な関係がある。また, HCV 感染において2型糖尿病の合併は肝癌のリスクを増大する。我々は HCV 感染による糖代謝異常の分子機序を解析する中で, 1) HCV 感染が細胞内の転写因子 forkhead box O1 (FoxO1) を介して糖新生を亢進させること, 2) HCV 感染が glucose transporter 2 (GLUT2) の発現を抑制させ, 糖の取り込み抑制を引き起こすことを報告してきた。また, この2つの経路において, HCV NS5A 蛋白質が重要な役割を担うことを見いだした。本稿では HCV 感染に伴う糖代謝異常の分子機序と HCV NS5A 蛋白質の役割について解説する。

1. はじめに

C型肝炎ウイルス (HCV) 感染は慢性肝炎, 肝硬変, 肝細胞癌などの肝内病変を引き起こすだけでなく, クリオグロブリン血症, リンパ腫, 甲状腺炎, 糖脂質代謝異常, 鉄代謝異常などの多彩な肝外病変を引き起こす¹⁾。その中でも2型糖尿病との合併が有意に多く, 肝線維化や慢性肝疾患の予後と密接な関係がある²⁻⁵⁾。また, HCV 感染において2型糖尿病の合併は肝癌のリスクを増大する⁶⁾。従来, HCV 感染による糖代謝異常の分子機序として HCV コア蛋白質の役割の重要性が報告されてきた^{7, 8)}。我々は HCV 感染による糖代謝異常の新たな経路を解析する中で, 1) HCV 感染が細胞内の転写因子 forkhead box O1 (FoxO1) を介して糖新生を亢進させること^{9, 10)}, 2) HCV 感染が glucose transporter 2 (GLUT2) の発現を抑制させ, 糖の

取り込み抑制を引き起こすこと^{10, 11)}を報告してきた。また, この2つの経路において, HCV NS5A 蛋白質が重要な役割を担うことを見いだした^{9, 12, 13)}。本稿では HCV 感染に伴う糖代謝異常の分子機序と HCV NS5A 蛋白質の役割について概説する。

2. 肝臓と糖代謝

肝臓はグリコーゲン分解と糖新生によりグルコースを産生し, 血中グルコース濃度の恒常性を保つために極めて重要な臓器である。糖新生は主として律速酵素である glucose 6-phosphatase (G6Pase) と phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) などの糖新生の律速酵素遺伝子の転写調節で制御される。また, 2型糖尿病では肝臓の糖産生, 特に糖新生に基づく糖産生が亢進することが知られている^{14, 15)}。

細胞内へのグルコースは促進拡散型糖輸送担体 (Glucose transporter; GLUT) と Na 共役能動輸送性糖輸送担体 (sodium glucose co-transporter; SGLT) で輸送される。GLUT は12回膜貫通型の膜蛋白質で, 現在14種類のアイソフォームが報告され, 正常肝細胞では GLUT2 がグルコースの取り込みを制御する¹⁶⁾。

3. HCV 感染と糖新生の亢進

HCV-1b レプリコン細胞や HCV J6/JFH1 感染 Huh-7.5 細胞を用いて解析したところ, HCV 感染により PEPCK 遺伝子や G6Pase 遺伝子の mRNA 量が増加し, 糖新生が

連絡先

〒650-0017

兵庫県神戸市中央区楠町7-5-1

神戸大学大学院医学研究科附属感染症センター感染制御学分野

TEL: 078-382-5500

FAX: 078-382-5519

E-mail: ishoji@med.kobe-u.ac.jp

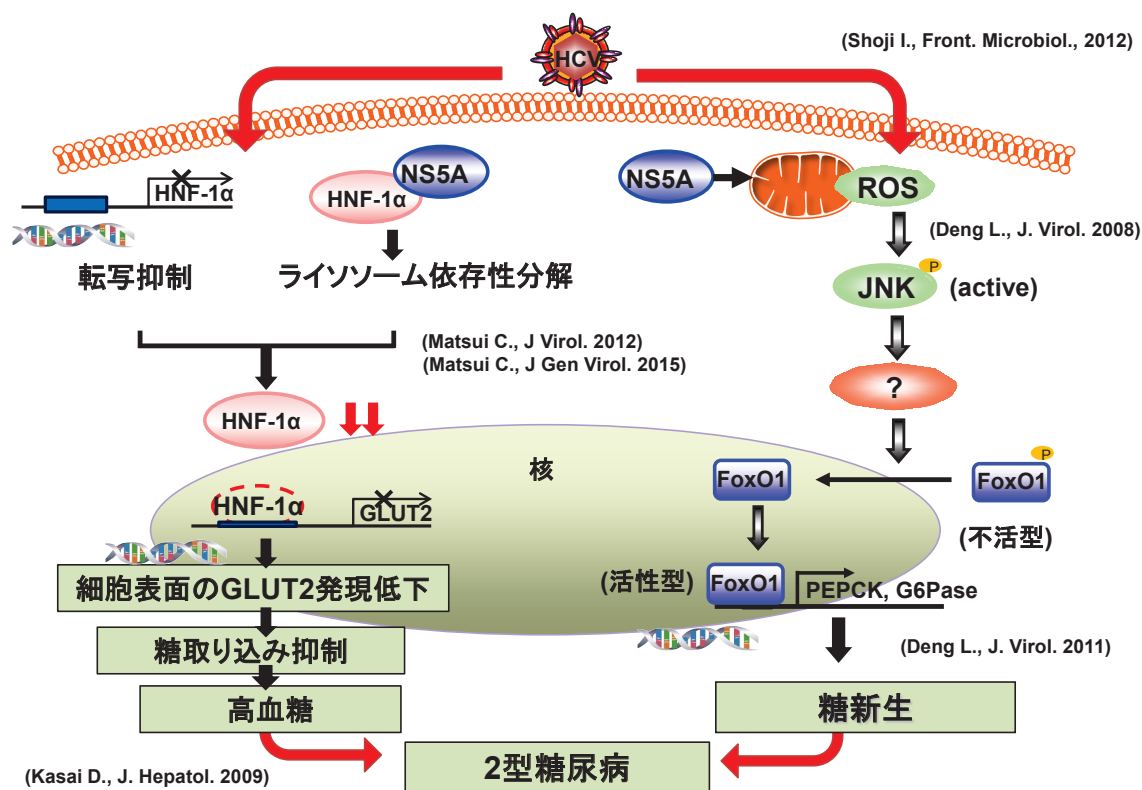


図1 HCV NS5Aによる糖代謝異常の分子機構

HCV感染がミトコンドリア障害に伴うROS産生からJNKを活性化し、FoxO1の脱リン酸化による核内貯留、持続的活性化が起こり、PEPCK、G6Paseの転写亢進と糖新生亢進へとつながる。HCV感染がglucose transporter 2 (GLUT2)の発現を抑制させ、糖の取り込み抑制を引き起こす。GLUT2遺伝子の転写抑制はHCV NS5AによるHNF-1 α のライソソーム依存性分解が関与する。

亢進することが分かった。PEPCK遺伝子やG6Pase遺伝子の転写は転写因子FoxO1により調節される。HCV感染細胞ではFoxO1をリン酸化するAktのSer473のリン酸化が亢進し、Aktが活性化しているのにも関わらず、FoxO1のSer319のリン酸化が抑制され、FoxO1が核内に長期留まることで糖新生系酵素のPEPCK、G6Paseの転写の持続亢進が起こると考えられた⁹⁾。

4. HCV感染によるJNK活性化とFoxO1の持続的活性化

HCV感染によるFoxO1活性化機構を明らかにするために、MitoSoxを指標にしてミトコンドリアの活性酸素種(Reactive oxygen species; ROS)産生を解析した。HCV感染細胞では著明にROS産生が亢進し、それに伴い、c-Jun N-terminal kinase (JNK)が活性化した。また、HCV感染により、FoxO1のSer319のリン酸化が抑制され核内貯留が亢進し活性化状態が持続していた。FoxO1の核内貯留におけるJNK活性化の役割を抗酸化剤N-acetyl cysteine (NAC)や選択的JNK阻害剤SP600125を用いて解析したところ、JNK活性化を抑制するとFoxO1の核内貯留も解除されたことから、JNK活性化が

FoxO1の脱リン酸化および核内貯留に関与すると考えられた。この経路に10種類のHCV蛋白質のうち、いずれが関与しているかを解析したところ、NS5A蛋白質がG6PaseやPEPCKのmRNAレベルを上昇させることから、主としてNS5A蛋白質の関与が示唆された⁹⁾。

以上より、HCV感染がミトコンドリア障害に伴うROS産生からJNKを活性化し、FoxO1の脱リン酸化による核内貯留、持続的活性化が起こり、PEPCK、G6Paseの転写亢進と糖新生亢進へとつながると考えられた(図1)。また、HCV蛋白質のうちNS5A蛋白質の関与が重要と考えられた。JNK活性化に伴う、FoxO1の脱リン酸化の分子機構が依然不明であるが、現在、ホスファターゼを中心にいくつかの宿主因子の関与について解析を進めている。

5. HCV感染とGLUT2発現の抑制と糖の取り込み抑制

慢性C型肝炎患者の肝組織においてGLUT2蛋白質の発現が対照群および慢性B型肝炎患者より著しく発現が抑制されている¹¹⁾。そこで、HCV RNAレプリコン細胞およびHCV J6/JFH1感染細胞で分子機構を解析したところ、細胞表面上のGLUT2蛋白質の発現が低下し、GLUT2

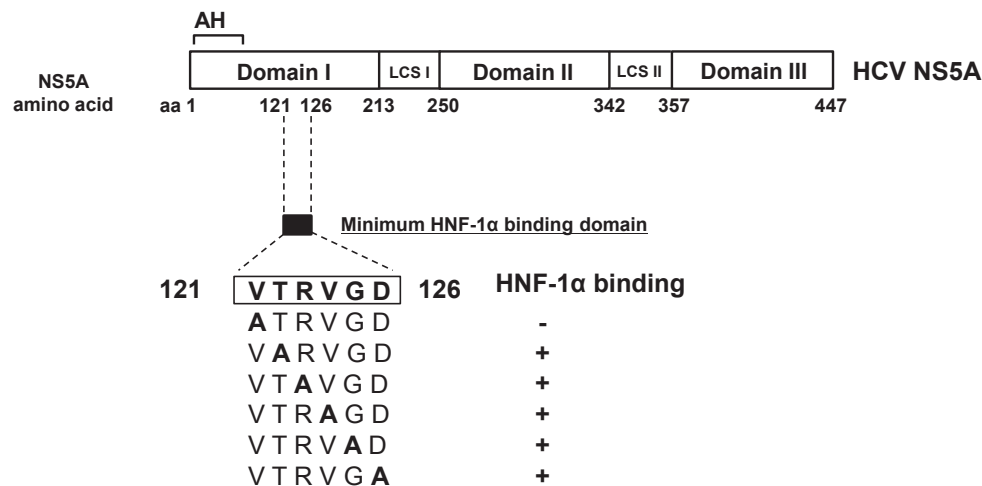


図2 HCV NS5A 蛋白質上の HNF-1 α 結合領域

HCV NS5A 蛋白質の aa 121-126 が結合に重要で、特に Val121 は結合に必須である。V121A 置換により NS5A と HNF-1 α との結合が消失する。Amphipathic helix, AH.

mRNA レベルも低下しており、GLUT2 遺伝子の転写抑制が原因と考えられた。転写調節部位をルシフェラーゼによるプロモーター解析をしたところ、細胞内の転写因子 Hepatocyte nuclear factor 1 α (HNF-1 α) が重要であることが示唆された¹²⁾。

HNF-1 α は分子量 79 kDa の細胞内の転写因子である。発見当初は肝細胞特異的な転写因子と考えられていたが、肝細胞以外にも、腎、脾、小腸でも発現している。HNF-1 α は糖、コレステロール、胆汁酸、リポ蛋白質の代謝に関わる様々な遺伝子発現を調節する¹⁷⁾。興味深いことに、HNF-1 α 遺伝子は常染色体優性遺伝性の単遺伝子型の糖尿病である type 3 of maturity-onset diabetes of the young (MODY3) の原因遺伝子¹⁸⁾ である。

6. HCV NS5A による HNF-1 α のライソソーム依存性分解

HCV 感染による HNF-1 α 発現への影響を明らかにするために、HCV J6/JFH1 を Huh-7.5 細胞に感染させ、HNF-1 α mRNA 量、および HNF-1 α 蛋白質への影響を解析した。HNF-1 α mRNA 量の減少量に比べ、HNF-1 α 蛋白質量が著明に減少した。プロテアソーム阻害剤およびライソソーム酵素阻害剤の解析から HNF-1 α 蛋白質の減少は、ライソソーム依存性分解の亢進が原因と考えられた¹²⁾。HCV 蛋白質の役割を解析したところ、10 個の HCV 蛋白質のうち、NS5A 蛋白質のみが GLUT2 遺伝子の転写を抑制した。そこで、NS5A 蛋白質による HNF-1 α 蛋白質への影響を解析したところ、NS5A 蛋白質は HNF-1 α 蛋白質との相互作用を介して分解へと誘導することが明らかとなった。NS5A 蛋白質上の HNF-1 α 結合領域を種々の NS5A 欠変異体を用いて解析したところ、NS5A ドメイン I に存在

する aa 121-126 の領域が両者の相互作用に重要であった (図 2)。中でも NS5A V121A 変異体は HNF-1 α と相互作用を失い、共局在しなくなることが示された¹³⁾。これより、特に NS5A Val121 残基が NS5A による HNF-1 α のライソソーム依存性分解に必須であることが示された。興味深いことに、NS5A Val121 は HCV の複製に重要な FKBP8 との相互作用にも必須であることが報告されている^{19,20)}。

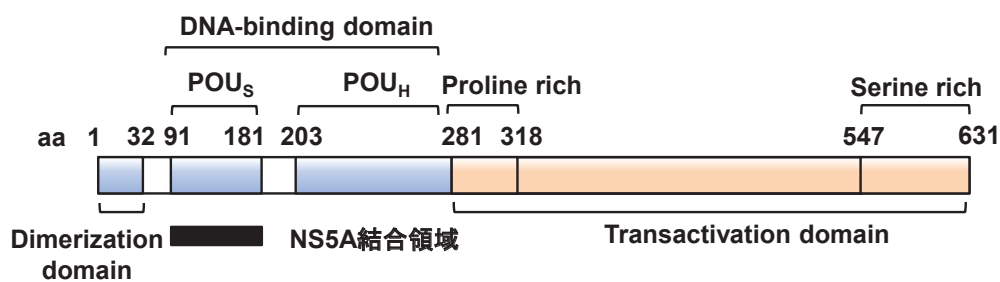
次に HNF-1 α 上の NS5A 結合領域を種々の HNF-1 α 欠変異体を用いて解析したところ、DNA 結合領域 (aa 91-276) のうち、POU specific (POUs) ドメイン (aa 91-181) が結合に重要であることが分かった¹³⁾ (図 3)。NS5A がどのようにして HNF-1 α を選択的にライソソーム依存性分解へと誘導するかについては依然として詳細が不明であり、現在、解析を進めている。

7. まとめ

HCV は肝細胞に感染し、糖新生の亢進と GLUT2 蛋白質の発現抑制を介して糖代謝異常を引き起こすという新しい経路を明らかにした。このいずれの経路においても HCV NS5A 蛋白質が重要な役割を果たしており、NS5A 蛋白質と宿主因子の相互作用が病原性発現に関与すると考えられた。今後、更に詳細に解析し、HCV 感染による病原性発現機構を解明していきたい。

8. 参考文献

- 1) Gill K, Ghazianian H, Manch R, Gish R. Hepatitis C virus as a systemic disease: reaching beyond the liver. *Hepatol Int.* 2015 [Epub ahead of print].
- 2) Mason AL, Lau JY, Hoang N, Qian K, Alexander GJ, Xu



HNF-1 α の3つのドメイン構造

- ・ Dimerization domain : aa 1-32
- ・ DNA-binding domain : aa 91-276
 - POU specific (POU_S) domain : aa 91-181
 - POU homeo (POU_H) domain : aa 203-280
- ・ Transactivation domain : aa 281-631

図3 HNF-1 α 蛋白質の構造と NS5A 結合領域

HNF-1 α 蛋白質は 631 アミノ酸からなる細胞内転写因子で Dimerization domain, DNA-binding domain, Transactivation domain の三つのドメイン構造を有する。HCV NS5A は aa 91-181 の POU_S domain と相互作用する。

- L, et al. Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 29: 328-33, 1999.
- 3) Mehta SH, Brancati FL, Strathdee SA, Pankow JS, Netski D, Coresh J, et al. Hepatitis C virus infection and incident type 2 diabetes. *Hepatology*. 38: 50-6, 2003.
- 4) Negro F, Alaei M. Hepatitis C virus and type 2 diabetes. *World J Gastroenterol*. 15: 1537-47, 2009.
- 5) Negro F. Mechanisms of hepatitis C virus-related insulin resistance. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 35: 358-63, 2011.
- 6) Arase Y, Kobayashi M, Suzuki F, Suzuki Y, Kawamura Y, Akuta N, et al. Effect of type 2 diabetes on risk for malignancies includes hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 57: 964-73, 2013.
- 7) Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Tsukamoto K, Kimura S, et al. Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology*. 126: 840-8, 2004.
- 8) Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, et al. Involvement of the PA28gamma-dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J Virol*. 81: 1727-35, 2007.
- 9) Deng L, Shoji I, Ogawa W, Kaneda S, Soga T, Jiang DP, et al. Hepatitis C virus infection promotes hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway. *J Virol*. 85: 8556-68, 2011.
- 10) Shoji I, Deng L, Hotta H. Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders. *Frontiers in microbiology*. 2: 278, 2011.
- 11) Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, et al. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *J Hepatol*. 50: 883-94, 2009.
- 12) Matsui C, Shoji I, Kaneda S, Sianipar IR, Deng L, Hotta H. Hepatitis C virus infection suppresses GLUT2 gene expression via downregulation of hepatocyte nuclear factor 1alpha. *J Virol*. 86: 12903-11, 2012.
- 13) Matsui C, Sianipar IR, Minami N, Deng L, Hotta H, Shoji I. A single-amino-acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupts physical and functional interaction with the transcription factor HNF-1alpha. *J Gen Virol*. 96: 2200-5, 2015.
- 14) Clore JN, Stillman J, Sugerma H. Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes. *Diabetes*. 49: 969-74, 2000.
- 15) Ogawa W, Kasuga M. Cell signaling. Fat stress and liver resistance. *Science*. 322: 1483-4, 2008.
- 16) Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol*. 202: 654-62, 2005.
- 17) Armendariz AD, Krauss RM. Hepatic nuclear factor 1-alpha: inflammation, genetics, and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 20: 106-11, 2009.
- 18) Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature*. 384: 455-8, 1996.

- 19) Okamoto T, Nishimura Y, Ichimura T, Suzuki K, Miyamura T, Suzuki T, et al. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *The EMBO journal*. 25: 5015-25, 2006.
- 20) Okamoto T, Omori H, Kaname Y, Abe T, Nishimura Y, Suzuki T, et al. A single-amino-acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. *J Virol*. 82: 3480-9, 2008.

Hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorder

Ikuo SHOJI¹⁾, Lin DENG²⁾, Chieko MATSUI²⁾, Hak HOTTA³⁾

1) Division of Infectious Disease Control, Center for Infectious Diseases, Kobe University Graduate School of Medicine

2) Division of Microbiology, Center for Infectious Diseases, Kobe University Graduate School of Medicine

3) Department of Oral Vaccine and Drug Development, Kobe University Graduate School of Health Sciences

Hepatitis C virus (HCV) infection often causes intrahepatic diseases, such as chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (HCC). Moreover, HCV infection exhibits various extrahepatic manifestations, such as thyroiditis, glucose and lipid metabolic disorder, and iron metabolic disorder. HCV infection is often associated with type 2 diabetes, involving hepatic fibrosis and poor prognosis. Type 2 diabetes increases the risk of HCC. We have been investigating molecular mechanisms of HCV-induced glucose metabolic disorder and we reported that HCV infection promotes hepatic gluconeogenesis through forkhead box O1 (FoxO1)-dependent pathway and that HCV infection suppresses the cell surface expression of glucose transporter 2 (GLUT2), resulting in suppression of glucose uptake. We have found that HCV NS5A protein plays important roles in these two independent pathways. Here we discuss the roles of HCV NS5A in HCV-induced glucose metabolic disorder.

