

## C型肝炎ウイルスによる糖代謝異常の分子機序の解明

神戸大学大学院医学研究科

鄧 琳

### 1 研究の背景と目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は、慢性肝疾患や肝細胞癌の原因となっているだけでなく、様々な肝外病変を引き起こすことが臨床的に知られている。HCV 感染患者において、2型糖尿病の合併率が高いことが報告されてきたが、HCV 感染による糖代謝異常に関わる分子機構並びにそれに関連するシグナル伝達異常の詳細については未だ不明な点が多い。

我々は HCV-2a J6/JFH1 感染系を用いて、HCV 感染は活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)産生の亢進を介して c-Jun N-terminal kinase (JNK)経路を活性化し、このことが転写因子 forkhead box O1 (FoxO1)のリン酸化(不活性型)を抑制してその転写活性を促進させ、糖新生系律速酵素遺伝子群の転写促進を介して糖新生を亢進させることを明らかにした(Deng et al., J. Virol., 2011)。しかしながら、HCV 感染細胞において、JNK による FoxO1 のリン酸化抑制 (FoxO1 の転写活性亢進)の分子機構は明確ではない。我々は、脱リン酸化酵素である MAPK phosphatase-3 (MKP-3)に着目し、HCV 複製・感染により、MKP-3 の mRNA 及びタンパク質の発現量が増加することを見出した。さらに、HCV 感染による MKP-3 発現量の増加が抗酸化剤 N-acetyl cysteine (NAC)及び JNK 阻害剤 SP60025 により解除されることを確認した。そこで本研究では、HCV 感染による FoxO1 のリン酸化低下及びグルコース産生亢進における MKP-3 の役割を解明することを目的とする。

### 2 研究方法・研究内容

#### (1) HCV 感染による MKP-3 発現上昇の分子機序の解明

- HCV NS5A 阻害剤である daclatasvir を用いて、HCV 複製を解除した場合、HCV 感染による MKP-3 発現上昇が消失するかどうかを検討する。これにより、HCV が特異的に MKP-3 の発現上昇を誘導するかどうか解明される。

- HCV 感染細胞・複製細胞における MKP-3 の細胞内局在を間接蛍光免疫染色法にて検討する。これにより、HCV 感染・複製が MKP-3 の細胞内局在へ及ぼす影響が解明される。

- 過酸化水素を Huh7.5 細胞に添加し、MKP-3 の発現量の変化について調べる。即ち、ROS/JNK 経路が MKP-3 の発現制御に寄与しているかを検討する。

#### (2) HCV 感染による FoxO1 のリン酸化低下及びグルコース産生亢進における MKP-3 の影響の解明

- MKP-3 は FoxO1 と相互作用するかどうかを調べるため、Huh7.5 細胞に MKP-3 の発現プラスミドを導入し、過剰発現した MKP-3 と細胞内の FoxO1 の相互作用について免疫沈降法にて解析する。

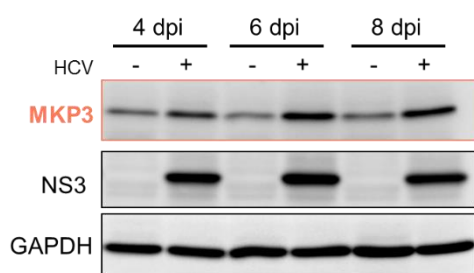
- MKP-3 発現が FoxO1 のリン酸化状態に及ぼす影響を調べるため、Huh7.5 細胞に MKP-3 の発現プラスミドを導入し、MKP-3 過剰発現により、経時的に細胞内の FoxO1 のリン酸化状態の変化について調べる。

- MKP-3 発現がグルコース産生を増加させるかどうかを調べるため、Huh7.5 細胞に MKP-3 の発現プラスミドを導入し、細胞内及び細胞外（培養上清中）のグルコース量を測定する。細胞内のグルコース量を細胞数で補正する。

- MKP-3 ノックアウト Huh7.5 細胞 (Huh7.5/MKP-3 KO) を作製し、Huh7.5/MKP-3 KO に HCV を感染させ、細胞内の FoxO1 のリン酸化状態と細胞内局在並びにグルコース産生量の変化について解析する。

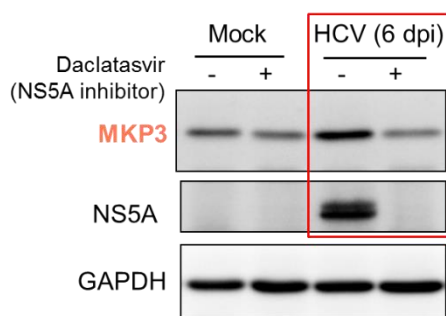
### 3 研究成果

#### (1) HCV 感染により、MKP-3 発現量が増加する。



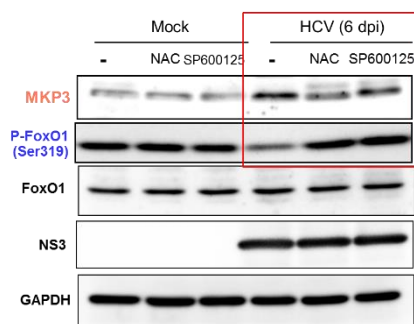
HCV-2a J6/JFH1 を Huh7.5 細胞に感染させ、感染後 4 日、6 日及び 8 日目、細胞を回収し、細胞内の MKP3 発現量をウエスタンブロットにて調べた。その結果、HCV 感染細胞内の MKP-3 発現量は非感染細胞と比べ、有意に増加することが分かった。

#### (2) HCV 感染は特異的に MKP-3 発現量を促進する。



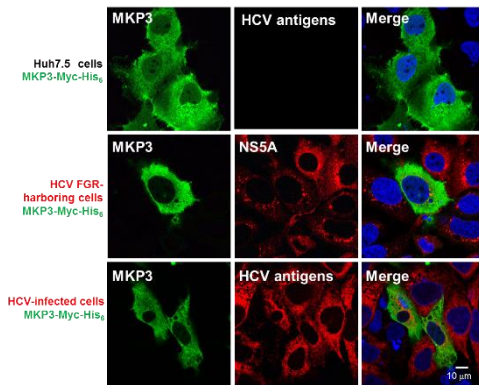
HCV 感染細胞を HCV NS5A 阻害剤である Daclatasvir で処理したところ、HCV 感染による MKP-3 発現量の増加は消失した。このことから、HCV 感染は特異的に MKP-3 発現量を促進すると考えられた。

#### (3) ROS/JNK 経路は HCV 感染による MKP-3 発現上昇に関与する。



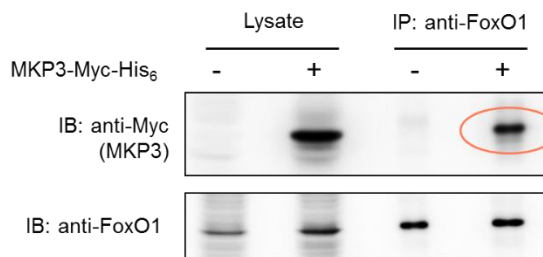
HCV 感染細胞を抗酸化剤 NAC あるいは JNK 阻害剤で処理したところ、HCV 感染による MKP-3 発現量の増加は低下した。このことから、ROS/JNK 経路は HCV 感染による MKP-3 発現上昇に関与すると考えられた。

(4) HCV 感染・複製により、MKP-3 が細胞質にリクルートされる。



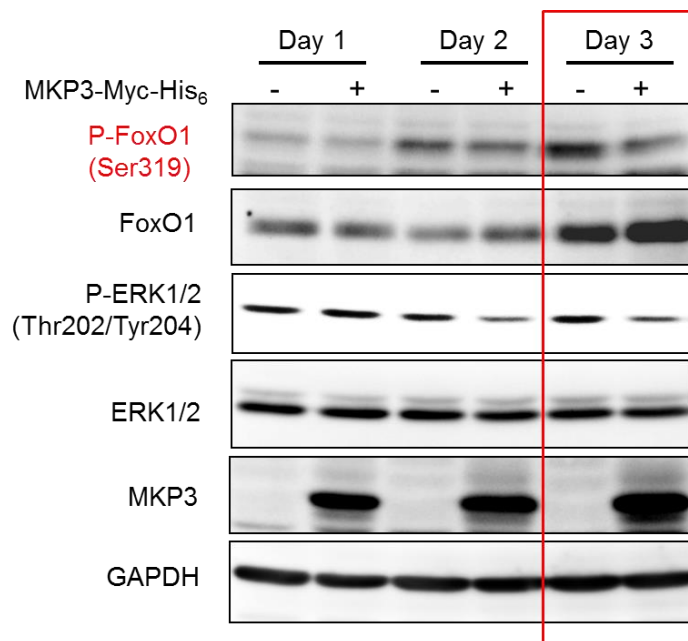
MKP-3 を Huh7.5 細胞に発現させた場合、MKP-3 は細胞全体(細胞質と核)に局在していた。一方、MKP-3 を HCV レプリコン複製細胞あるいは HCV 感染細胞に発現させた場合、MKP-3 は主に細胞質に局在していた。このことから、HCV 感染・複製により、MKP-3 が細胞質に移動し、細胞質に局在している FoxO1 を脱リン酸化することが示唆された。

(5) MKP-3 は内在性 FoxO1 と相互作用する。



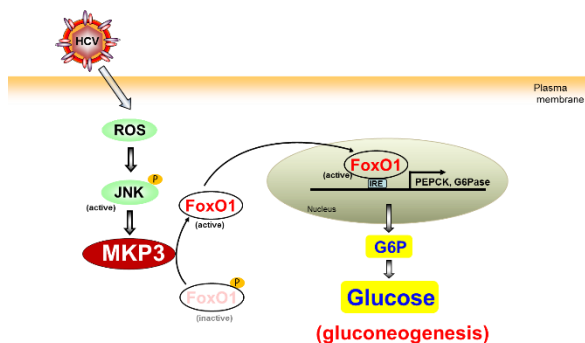
MKP-3 を Huh7.5 細胞に発現させ、三日後に抗 FoxO1 抗体にて免疫沈降を行ったところ、MKP-3 が共沈することが分かった。このことから、MKP-3 が FoxO1 と相互作用すると考えられた。

(6) MKP-3 発現により FoxO1 Ser-319 のリン酸化程度が低下する。



MKP-3 を Huh7.5 細胞に発現させ、1日、2日、3日目に細胞を回収し、経時的に細胞内トータル FoxO1 発現量及び FoxO1 の 319 番目 Ser のリン酸化程度の変化について調べた。その結果、MKP-3 発現 3 日目に、FoxO1(Ser 319)のリン酸化程度はコントロール細胞と比べて、低下することが分かった。このことから、MKP-3 は FoxO1 を脱リン酸化すると考えられた。

(7) HCV 感染による糖代謝異常の分子機序のモデル図



HCV 感染により、ROS/JNK シグナル経路が活性化し、このことが MKP-3 の発現を増強させ、FoxO1 の脱リン酸化を介して FoxO1 が核に移行する。その結果、糖新生系律速酵素遺伝子群の転写促進を介して糖新生を亢進させると考えられる。

(8) 残された課題

MKP-3 ノックアウト Huh7.5 細胞 (Huh7.5/MKP-3 KO) の作製を試みたが、失敗した。今後再度、Huh7.5/MKP-3 KO 細胞の作製を試み、HCV 感染によるグルコース産生亢進における MKP-3 の影響を明らかにしようと考えている。

4 生活や産業への貢献および波及効果

HCV 感染者は世界で 2 億人、日本に 200 万人存在しており、HCV 感染者の 21% は糖尿病であることが報告されている。また、糖尿病は C 型肝炎治療に悪影響を及ぼす可能性があることが明らかになった。そのため、HCV と糖尿病の関連性を解明することは緊急の課題である。本研究により、HCV 感染による糖新生亢進の分子機序がさらに明らかにした。糖新生誘導機構の解明は、糖尿病の治療法や新薬の開発への新たなヒントを生み出す可能性も考えられる。このように、本研究によってもたらされる成果は、単に学術的な意味だけではなく、疾患の原因解明及び治療にも大きく寄与するものであると考える。