



HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters.

笠井, 大介

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4728

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004728>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



| | |
|------------|------------------|
| 氏 名 | 笠井 大介 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（医学） |
| 学 位 記 番 号 | 博い第 4728 号 |
| 学位授与の 要 件 | 学位規則第 5 条第 1 項該当 |
| 学位授与の 日 付 | 平成 21 年 9 月 25 日 |

【 学位論文題目 】

HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters.(C 型肝炎ウイルスの複製はグルコース輸送体の細胞表面への発現抑制を介して細胞内へのグルコースの取り込みを抑制する。)

審 査 委 員

| | | | |
|-----|-----|----|----|
| 主 査 | 教 授 | 林 | 祥剛 |
| | 教 授 | 清野 | 進 |
| | 教 授 | 中村 | 俊一 |

(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters.

C型肝炎ウイルスの複製はグルコース輸送体の細胞表面への発現抑制を介して細胞内へのグルコースの取り込みを抑制する。

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻

微生物学

(指導教員：堀田 博教授)

笠井 大介

目的

C型肝炎ウイルス (HCV) はフラビウイルス科ヘパシウイルス属の一本鎖 RNA ウイルスであり、世界中に広く分布している。HCV の持続感染は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌などの肝内病変を引き起こすのみならず膜性増殖性腎症や2型糖尿病などの肝外病変を引き起こすことが知られている。HCV 持続感染による2型糖尿病発症の機序としてはインスリン抵抗性の存在が示唆されているが、詳細に関しては未だ不明の点が多い。

グルコースの輸送においては様々なグルコーストランスポーター (GLUT) ファミリーが重要な役割を果たしていることが知られており、肝細胞、膵β細胞等においては特異的に GLUT2 の発現が認められ、肝細胞癌を含む種々の悪性腫瘍には GLUT1 の発現が認められている。本研究では HCV-RNA レプリコン複製細胞及び感染培養細胞を用いて GLUT2、GLUT1 を介した肝細胞へのグルコースの取り込みにおける HCV の影響についての解析を行った。

材料と方法

ヒト肝がん細胞由来の Huh7.5 細胞と、同細胞に HCV-1b 由来の NS3-NS5B をコードした HCV サブゲノム RNA を安定導入したサブゲノム RNA レプリコン細胞 (SGR)、HCV-1b 由来の全長 RNA を安定導入したフルゲノム RNA レプリコン細胞 (FGR)、HCV-2b 由来の感染性 HCV 粒子を感染させた HCV 感染培養細胞、及びこれらの細胞をインターフェロン (IFN) で処理して HCV 複製を著しく低下させた細胞を作製し、これらを用いて以下の研究を行った。

結果

1 HCV の複製は細胞内へのグルコースの取り込みを抑制する

Huh-7.5 と比較して、SGR、FGR、HCV 感染細胞においてグルコースの取り込みは約 50-60%抑制された。また IFN 処理により SGR、FGR、HCV 感染細胞の HCV 複製を抑制すると、細胞内へのグルコースの取り込みは回復した。一方でコントロールとして測定したチミジンの細胞内への取り込みは抑制を認めなかった。

2 HCV の複製は細胞表面への GLUT2、GLUT1 の発現を抑制する

GLUT2、GLUT1 の細胞表面への発現は Huh-7.5 に比して SGR、FGR において著明に抑制されていた。一方、コントロールとして測定したトランスフェリンレセプターの細胞表面への発現は SGR、FGR ともに抑制を認めなかった。また SGR、FGR を IFN で処理した細胞においては細胞表面への GLUT2、GLUT1 の発現は回復していた。一方で HCV 感染

細胞においても GLUT2 の細胞表面への発現は抑制を認めたものの、GLUT1 に関して抑制の程度はわずかであった。IFN 処理後の細胞においては GLUT2 の発現の抑制は認められず、また各細胞間においてトランスフェリンレセプターの発現には差がなかった。

ある種のウイルスはユビキチン化・プロテアソーム分解を介して標的蛋白の細胞表面への発現を抑制することが知られている。そこで我々はプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチンを用いて、プロテアソームが GLUT の細胞表面への発現に及ぼす影響に関して検討を行った。Huh-7.5、SGR、FGR をラクタシスチンにて処理したのちに GLUT2、GLUT1、トランスフェリンレセプターの細胞表面への発現を解析したところ、各細胞において GLUT2、GLUT1 ともにラクタシスチン処理群と非処理群の間で細胞表面への発現に明らかな差を認めなかったが、トランスフェリンレセプターに関しては各細胞においてラクタシスチン処理群で細胞表面への発現の増強を認めた。

3 HCV の複製は GLUT2 の転写を抑制する

HCV RNA の複製が GLUT2、GLUT1 の転写レベルでの発現に与える影響を検討した。その結果 GLUT2 mRNA の発現は SGR、FGR、HCV 感染細胞において有意に抑制されていたが、抑制の程度は SGR と比して FGR においてより大きかった。これらの細胞を IFN で処理したところ、いずれの細胞においても GLUT2 mRNA の発現が回復した。一方で GLUT1 mRNA の発現は HCV RNA の複製及び HCV 感染の影響を受けなかった。

4 HCV の複製は GLUT2 のプロモーター活性を抑制する

GLUT2 のプロモーター活性に HCV の複製が与える影響を検討するためにルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、SGR、FGR、HCV 感染培養細胞において GLUT2 のプロモーター活性は有意に低下していた。また IFN 処理した細胞群においてはプロモーター活性の回復を認めた。

5 GLUT1、GLUT2 の過剰発現は SGR、FGR 及び HCV 感染培養細胞において細胞内へのグルコース取り込みを増加させる

GLUT1 及び GLUT2 を SGR、FGR、HCV 感染細胞に過剰発現させた細胞を用いてグルコースの細胞内への取り込みを測定したところ、各細胞とも GLUT1、GLUT2 を発現させた群においてグルコースの取り込みが有意に増加した。

6 HCV 感染患者では肝組織の GLUT2 発現が低下する

肝組織においては GLUT2 が糖輸送に重要な役割を果たしている。そのため我々は、病理診断用に採取した HCV 感染ヒト肝組織（非がん部）、HBV 感染ヒト肝組織（非がん部）および HCV 非感染ヒト肝組織を抗 GLUT2 抗体にて免疫染色を行い、その発現に関して検討を行った。その結果、非感染肝組織においては GLUT2 が細胞膜近縁に分布している像が得ら

れたが、HCV 感染肝組織では大部分において GLUT2 の発現が有意に低下しており、発現部位においてもその程度は正常組織よりも低いものであった。これら GLUT2 の発現の低下は HCV 感染肝組織 9 検体中 8 検体 (89%) に認められた。肝組織における GLUT2 mRNA は HCV 感染肝組織において低下傾向であったものの非感染肝組織との統計学的有意差は認められなかった。HBV 感染肝組織においても GLUT2 の発現の低下が認められたが、HCV 感染肝組織と比較して発現低下部位はより限局的な傾向にあった。

考察

HCV の持続感染は 2 型糖尿病の増悪因子であることが知られており、持続感染による肝臓の線維化がその原因と考えられてきた。一方で HBV 感染による肝硬変患者よりも HCV 感染による肝硬変患者により 2 型糖尿病の発症が多いことから HCV 感染自体が直接インスリン抵抗性の原因となっている可能性も指摘されてきたが、詳細な機序に関しては明らかにされていない。そこで我々は HCV 感染がグルコーストランスポーターの発現を介してグルコースの細胞内への取り込みに与える影響についての検討を行った。

細胞内へのグルコースの取り込みは HCV 複製細胞において有意に低下する一方、IFN 処理により取り込みが改善することより、HCV の複製が細胞内へのグルコースの取り込みを抑制することが示された。グルコースの取り込みにおいてはインスリンに依存する機序と依存しない機序が報告されているが、我々の行った解析ではインスリンの濃度が肝細胞内へのグルコースの取り込みに与える影響は大きくなかった。

GLUT はグルコースの取り込みに重要な役割を果たしているが、GLUT2、GLUT1 ともに HCV の複製により細胞表面への発現は著明に抑制されていた。GLUT2 の転写レベルでの発現はグルコース濃度に依存し、高血糖状態では GLUT2 mRNA の発現が増加するとの報告がなされているが、我々の解析では HCV の複製により GLUT2 mRNA の発現が著明に抑制されることが示され、さらに転写の抑制は GLUT2 のプロモーター活性の抑制により引き起こされていることも明らかになった。GLUT2 のプロモーター活性は sterol response element binding protein (SREBP)-1c の過剰発現によって促進されることが知られているが、HCV の複製は SREBP-1c の発現を著明に抑制することも示された。一方で GLUT1 においては細胞表面への発現の抑制は認められたものの転写レベルでの抑制は認められなかった。これらの原因として HCV の複製が GLUT1 (及び GLUT2) の細胞表面への発現を抑制する過程においてユビキチン・プロテアソーム系による分解が関与する可能性を考え解析を行ったが、プロテアソームインヒビター処理による発現の改善が認められなかったことより否定的であると考えられた。その他にも GLUT1 の細胞内輸送に対して HCV が関与している可能性なども推測されるが、細胞内輸送に対する解析は行えておらず今後さらに検討を要すると考えられた。

肝組織の免疫染色では HCV 感染肝組織において GLUT2 の著明な発現抑制が不均一に認められたものの GLUT2 mRNA の発現抑制はわずかであった。これらの結果より、生体の肝組織内では全ての肝細胞に均一に HCV が感染しているわけではなく、そのため GLUT2 の発現抑制が不均一に観察され、また mRNA の発現抑制が有意差のないレベルまでマスクされているものと推測された。

今回我々は HCV の複製が細胞表面への GLUT2 及び GLUT1 の発現の抑制を介して細胞内へのグルコースの取り込みを抑制していることを明らかにした。肝細胞内へのグルコースの取り込みが抑制されることによりグルコースの代謝が阻害され、HCV 持続感染による糖尿病の進行が惹起されるものと考えられた。

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|-------------------------------------|--|-----|-------|
| 受 付 番 号 | 甲 第 2 0 4 6 号 | 氏 名 | 笠井 大介 |
| 論 文 題 目 Title of Dissertation | HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters C 型肝炎ウイルスの複製はグルコース輸送体の細胞表面への発現抑制を介して細胞内へのグルコースの取り込みを抑制する | | |
| 審 査 委 員 Examiner | 主 査 林 祥 剛 Chief Examiner 副 査 清 野 進 Vice-examiner 副 査 中 村 俊 一 Vice-examiner | | |

(要旨は1，000字～2，000字程度)

C型肝炎ウイルス（HCV）はフラビウイルス科ヘパシウイルス属の一本鎖 RNA ウィルスであり、世界中に広く分布している。HCV の持続感染は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌などの肝内病変を引き起こすのみならず膜性増殖性腎症や2型糖尿病などの肝外病変を引き起こすことが知られている。HCV 持続感染による2型糖尿病発症の機序としてはインスリン抵抗性の存在が示唆されているが、詳細に関しては未だ不明の点が多い。一方、グルコースの輸送においては様々なグルコーストランスポーター（GLUT）ファミリーが重要な役割を果たしていることが知られており、肝細胞、膵β細胞等においては特異的に GLUT2 の発現が認められ、肝細胞癌を含む種々の悪性腫瘍には GLUT1 の発現が認められている。本研究では HCV-RNA レプリコン複製細胞及び感染培養細胞を用いて GLUT2、GLUT1 を介した肝細胞へのグルコースの取り込みにおける HCV の影響についての解析が行われた。ヒト肝がん細胞由来の Huh7.5 細胞と、同細胞に HCV-1b 由来の NS3-NS5B をコードした HCV サブゲノム RNA を安定導入したサブゲノム RNA レプリコン細胞（SGR）、HCV-1b 由来の全長 RNA を安定導入したフルゲノム RNA レプリコン細胞（FGR）、HCV-2b 由来の感染性 HCV 粒子を感染させた HCV 感染培養細胞、及びこれらの細胞をインターフェロン（IFN）で処理して HCV 複製を著しく低下させた細胞を作製し、これらを用いて以下の研究が行われた。HCV の持続感染は2型糖尿病の増悪因子であることが知られており、持続感染による肝臓の線維化がその原因と考えられてきた。HBV 感染による肝硬変患者よりも HCV 感染による肝硬変患者により2型糖尿病の発症が多いこと HCV 感染自体が直接インスリン抵抗性の原因となっている可能性も指摘されてきたが、詳細な機序に関しては明らかにされていなかった。そこで本研究では HCV 感染がグルコーストランスポーターの発現を介してグルコースの細胞内への取り込みに与える影響についての検討が行われた。細胞内へのグルコースの取り込みは HCV 複製細胞において有意に低下する一方、IFN 処理により取り込みが改善することより、HCV の複製が細胞内へのグルコースの取り込みを抑制することが示した。グルコースの取り込みにおいてはインスリンに依存する機序としない機序が報告されているが、本研究で行われた解析ではインスリンの濃度が肝細胞内へのグルコースの取り込みに与える影響は大きくなかった。GLUT はグルコースの取り込みに重要な役割を果たしているが、GLUT2、GLUT1 とともに HCV の複製により細胞表面への発現は著明に抑制されていた。GLUT2 の転写レベルでの発現はグルコース濃度に依存し、高血糖状態では GLUT2 mRNA の発現が増加するとの報告がなされているが、本研究では HCV の複製により GLUT2 mRNA の発現が著明に抑制されることが示され、さらに転写の抑制は GLUT2 のプロモーター活性の抑制により引き起こされていることも明らかにされた。GLUT2 のプロモーター活性は sterol response element binding protein (SREBP)-1c の過剰発現によって促進されることが知られているが、HCV の複製は SREBP-1c の発現を著明に抑制することも示された。GLUT1 においては細胞表面への発現の抑制は認められたものの転写レベルでの抑制は認められなかった。これらの原因として HCV の複製が GLUT1（及び GLUT2）の細胞表面への発現を抑制する過程においてユビキチン・プロテアソーム系による分解が関与する可能性を考え解析が行われたが、プロテアソームインヒビター処理による発現の改善が認められなかったことより否定的であると考えられた。その他にも GLUT1 の細胞内輸送に対して HCV が関与している可能性なども推測されたが、本研究では細胞内輸送に対する解析は行われず、今後さらに検討

を要すると考えられた。また、肝組織の免疫染色では HCV 感染肝組織において GLUT2 の著明な発現抑制が不均一に認められたものの GLUT2 mRNA の発現抑制はわずかであった。これらの結果より、生体の肝組織内では全ての肝細胞に均一に HCV が感染しているわけではなく、そのため GLUT2 の発現抑制が不均一に観察され、また mRNA の発現抑制が有意差のないレベルまでマスクされているものと推測された。

本研究は、HCV の複製が細胞表面への GLUT2 及び GLUT1 の発現の抑制を介して細胞内へのグルコースの取り込みを抑制していることを明らかにし、HCV 持続感染による糖尿病が惹起される機序の一端を示した重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認め、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。