

研 究 報 告 書

「ヘパトカインを介した肝臓による恒常性維持機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研 究 者: 御簾 博文

1. 研究のねらい

肝臓は生体内で最大級の生理活性物質産生工場である。肝臓が糖・脂質などの液性因子を血中に放出することで全身の恒常性維持に中心的な役割を担うことは古くから知られてきた。19 世紀中ごろ、後に“実験医学の父”と呼ばれるフランスの生理学者クロードベルナールは、肝臓がグリコーゲンを貯蔵することおよび肝臓が血中グルコースの放出源であることを見出し、このような肝臓によるグルコースの分泌を“内分泌”と呼んだ。さらにベルナールは、生体の内部環境は組織液の循環によって外部から独立していることを提唱しており、これは“生体の恒常性”という概念の創出につながったと思われる。しかしながらこのような肝由来液性因子による恒常性維持に関する研究は、肝由来液性因子があまりにも膨大な種類におよぶためか、これまで遅れていた。そのようななかで申請者はこれまでに、肝臓由来の機能未知な分泌タンパクを“ヘパトカイン”と総称することを提唱してきた。

そこで今回申請者は、ヘパトカインによる全身の恒常性維持機構の破綻が、2 型糖尿病や動脈硬化といった過栄養関連疾患の発症に大きく寄与していると仮説を立てた。申請者は今回、これまでに同定した二つのヘパトカインである selenoprotein P (以下 SeP)と Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (以下 LECT2)の多面的な作用の解明およびその受容体の同定から、肝臓を標的とした過栄養関連疾患の新規診断・治療法開発を目指す。申請者はこれまでに、100 例以上の脂肪肝および 2 型糖尿病患者から肝生検をおこない、ヒト肝臓の包括的な遺伝子発現を明らかにしてきた (Diabetologia 2007)。このようなヒト肝発現遺伝子情報を駆使することで、微量元素セレンの輸送タンパクとして知られていた SeP が 2 型糖尿病の肝で過剰に産生されること、SeP が全身にインスリン抵抗性を誘導することで高血糖発症に寄与することを明らかとし、このような肝由来の機能未知な分泌タンパクを“ヘパトカイン”と呼ぶことを提唱した (Cell Metabolism 2010)。さらに最近、肥満で産生が上昇し、骨格筋インスリン抵抗性を惹起する飽食応答ヘパトカインとして LECT2 を同定した (Diabetes 2014)。本研究では、これら二つのヘパトカインの全身における多面的な作用を解明すると同時に、ヘパトカイン受容体を同定することで、“ヘパトカイン分泌による全身の恒常性維持機構”を明らかにする。

2. 研究成果

(1) 概要

今回の研究で、2 型糖尿病や肥満といった過栄養で発現が増加するヘパトカインである SeP ならびに LECT2 が、運動の感受性や体温調節といった様々な全身の恒常性維持に大きな役割を担うこと、これらヘパトカインの過剰分泌が全身の恒常性を破綻させ、過栄養関連疾患の発症に原因的に働くことを明らかにした (下図)。

まず、2 型糖尿病患者で発現が増加するヘパトカインである SeP の過剰が、“運動抵抗性”

“膵インスリン産生障害”“非ふるえ性熱産生障害”などの様々な病態を惹起することを培養細胞とマウスを用いた実験および臨床研究によって実証した (*Nature Medicine* 2017, *Nature Communications* 2017)。肝臓由来液性因子であるヘパトカインの分泌異常が、様々な全身の恒常性維持機構を破綻させ、過栄養関連疾患に原因的に働くことが示された。さらに、SeP の作用を中和する抗体の投与が、2 型糖尿病モデルマウスの高血糖を改善することを見出した (*Nature Communications* 2017)。この結果は、肝臓由来液性因子であるヘパトカインの作用を是正することが 2 型糖尿病という全身疾患の治療法につながることを示した。

ヘパトカイン異常によって生じる病態のなかでも特に、SeP が受容体 LRP1 を介して骨格筋に作用すること、過剰な SeP が筋で活性酸素を消去することで、運動をおこなってもその健康増進効果が減弱あるいは消失するという“運動抵抗性”という病態が生じることを世界で初めて明らかにした (*Nature Medicine* 2017)。運動トレーニングに対する感受性が個々人で異なる原因のひとつに肝臓由来液性因子があることが示された。運動療法は多くの内科的な疾患に対して施行されているが、運動療法の効果にはかなりの個人差があることが知られていた。本研究は、肝臓由来液性因子である SeP の作用を抑制する薬剤の同定が、運動療法の感受性を自在に増強する夢の創薬につながることを示唆している。

また、ヘパトカインの分泌異常を診断する手段として、ヒト SeP 血中濃度を選択的かつ迅速に定量する測定系を確立した (*J Clin Lab Anal* 2016)。この方法を用いて血液中の SeP 濃度を測定することで、運動トレーニングに対する反応良好群と反応不良群を予知できることを報告した (*Nature Medicine* 2017)。ヘパトカインの血中濃度測定によって、これまでは定量化できなかった様々な病態を診断できる可能性がある。

今回の研究は、ヘパトカイン SeP ならびに LECT2 の過剰分泌が様々な病態を発症させることを明らかにした。今後、これらのヘパトカインを標的とした過栄養関連疾患に対する新たな診断・治療法の開発に向けて、さらなる研究に邁進したいと考えている。

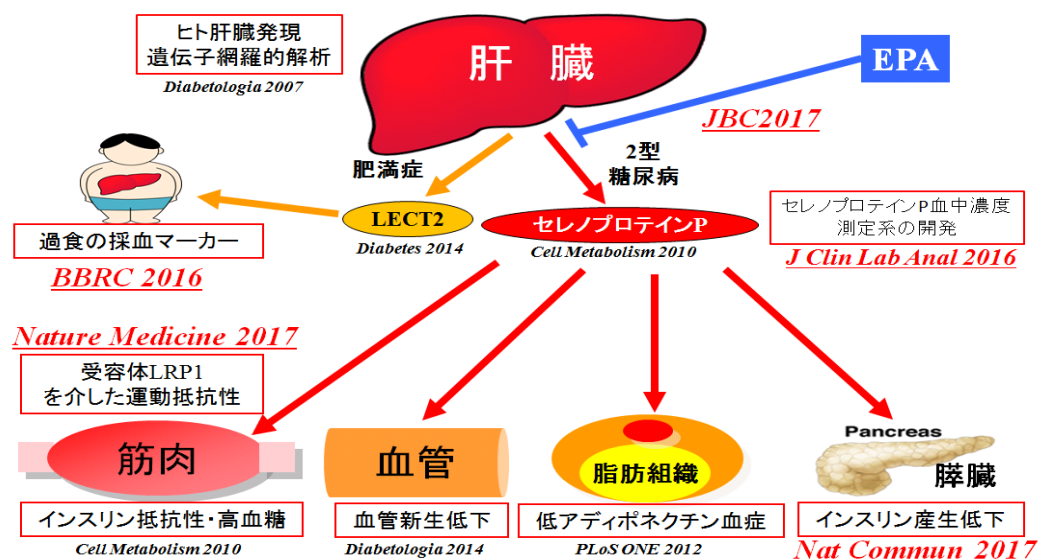


図 ヘパトカインによる全身の恒常性制御とその破綻
(赤字は今回のさきがけ研究によって得られた成果を示す)

(2) 詳細

研究テーマ A「ヘパトカイン SeP/受容体 LRP1 経路による運動療法抵抗性誘導機構の解明」

2 型糖尿病で発現が増加するヘパトカインである SeP に関して、運動療法の感受性に与える作用を検討した。SeP ホモ欠損マウスでは対照マウスと比較して、トレーニング後に運動持久力およびインスリン感受性が増強しており、運動後に酸化ストレスマーカーと AMPK リン酸化が増加していることを見出した。次に、siRNA によるスクリーニングを用いて筋細胞での SeP 受容体を探索した。その結果、Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) を発現抑制すると、SeP の作用、細胞との結合ならびに細胞への取り込みが減弱することを見出した。骨格筋特異的 LRP1 欠損マウスでは、投与した SeP の筋への取り込みが低下すること、SeP 投与による運動誘導性 AMPK リン酸化に対する阻害効果が消失することを見出した。最後に、健常被験者を用いて臨床研究をおこなった。血中 SeP 濃度高値の被験者では、トレーニングによる最大酸素摂取量(有酸素運動能)の増加が乏しかった。以上の結果より、SeP が受容体 LRP1 を介して骨格筋に作用すること、過剰な SeP が運動時に骨格筋で活性酸素/AMPK 経路を抑制することで、運動をおこなっても運動持久力増加・インスリン感受性増強などの健康増進効果の発現が減弱あるいは消失するという“運動抵抗性”という病態が生じることを明らかにした (*Nature Medicine* 2017 H.Misu et al)。

研究テーマ B「SeP と LECT2 の多面的作用に関する検討」

SeP の褐色脂肪組織における非ふるえ性熱産生に対する作用を検討した。SeP ホモ欠損マウスは、寒冷刺激による低体温に対して抵抗性を示した。一方、精製 SeP 処置は初代培養褐色脂肪細胞においてノルアドレナリン誘導性の細胞温度上昇を有意に抑制した。ヘパトカイン SeP は褐色脂肪細胞においてノルアドレナリン抵抗性を誘導することで非ふるえ性熱産生を低下させることを明らかにした(論文準備中)。

同志社大学との共同研究で、ヒト SeP の細胞内取り込みを阻害するモノクローナル中和抗体を見出した。SeP 中和抗体投与は、2 型糖尿病モデルマウスにおいて高血糖を抑制することを見出した。また、SeP 処置が膵β細胞において小胞体ストレスに関連してインスリン産生を抑制すること、SeP 中和抗体がこのインスリン産生抑制を解除することを見出した (*Nature Communications* 2017)。

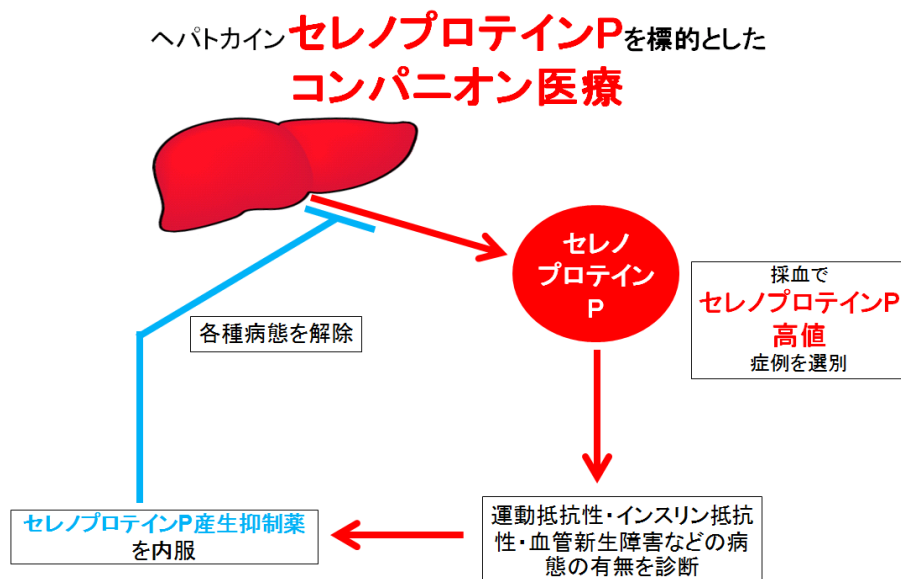
次に、肥満で発現が増加するヘパトカインである LECT2 の食種変更に対する血中濃度の反応性をマウスを用いて検討した。マウスに対して高脂肪食および通常食をスイッチし、肥満-減量-再度肥満というマウスリバウンドモデルを作成したところ、血中 LECT2 濃度は体重の増減よりも鋭敏かつ急速に変化することを見出した。この血中 LECT2 濃度は、体重や脂肪組織重量よりも肝中性脂肪含有量と強い正相関を呈した。血中 LECT2 が体重の変化に先行して鋭敏に変動する脂肪肝マーカーであることが見出された (*BBRC* 2016)

また、試薬メーカーとの共同研究で、ヒト SeP 血中濃度を選択的かつ迅速に定量する測定系を確立した (*J Clin Lab Anal* 2016)。この方法を用いて血液中の SeP 濃度を測定することで、運動トレーニングに対する反応良好群と反応不良群を予測できることを報告した (*Nature Medicine* 2017)。

3. 今後の展開

臨床に向けた今後の展開として、ヘパトカイン SeP を標的としたコンパニオン医療の実用化に向けた研究を考えている（下図）。これは、まず被験者に対して採血をおこない、血中 SeP 濃度が高い症例を選別することで、運動抵抗性・インスリン抵抗性・血管新生低下などの従来では検知できなかった様々な病態の有無を診断する。次にそのような症例に対しては SeP 産生抑制薬や SeP 中和抗体の投与をおこない、各種の病態を解除する。特に、SeP による運動抵抗性の解除は、運動の寿命延長効果の増強を介して、日本人の健康寿命の延伸を促す治療法に発展できるものと期待している。現在、肝細胞における強力な SeP 遺伝子発現抑制薬を同定すべく、低分子化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを計画している。

基礎研究に向けた今後の展開として、SeP、LECT2 以外のさらなるヘパトカインの探索を進めようと考えている。特に、超高齢化社会を迎える日本の現状を考慮し、老化に関連したヘパトカインの同定を計画している。老齢マウスならびに若年マウスから肝臓を摘出し、RNA Seq 解析を用いて包括的な遺伝子解析を開始した。また、年齢に関連してヒト肝臓での遺伝子発現が変動するヘパトカインを探索している。



4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

・研究目的の達成状況

当初予定していたヘパトカインの骨格筋への作用機構やヘパトカインの多面的な作用に関しては、おおむね予定どおり達成できたと考える。

・研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

実施体制および研究費執行には問題がなかったと考える。ただ、さがけ期間中、大きな論文の査読と追加実験に時間とマンパワーをとられてしまったため、さがけ後の次のステップに向けた挑戦的な実験に多くの時間をかけられなかった部分があり、これを反省点とした。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

今回、さきがけで発表した論文に関してプレスリリースをおこない、いくつかの新聞にはそれに関する記事が記載された。さらなる社会への波及効果を考えると、いつの日かヘパトカインを標的とした診断・治療法の実用化を実現したい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

肝臓から分泌される生理活性物質をヘパトカインと呼び、その存在を提唱してきた本研究者は2型糖尿病や肥満といった過栄養で発現が増加するヘパトカインであるSePならびにLECT2を見いだしこれらが運動の感受性や体温調節といった様々な全身の恒常性維持に大きな役割を担うこと、これらヘパトカインの過剰分泌が全身の恒常性を破綻させ、様々な病態を発症させることを明らかにした。また、ヘパトカインの分泌異常を診断する手段として、ヒトSeP血中濃度を選択的かつ迅速に定量する測定系を確立し、この方法を用いて血液中のSeP濃度を測定することで、運動トレーニングに対する反応良好群と反応不良群を予知できることを解明した。今後、これらのヘパトカインを標的とした過栄養関連疾患に対する新たな診断・治療法の開発が期待でる。

以上のように御簾博文研究者は本研究課題によりヘパトカインの概念を確立するとともにPhysician scientistとしての位置を確固たるものにした。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. H. Misu*, H. Takayama, Y. Saito, Y. Mita, A. Kikuchi, K. A. Ishii, K. Chikamoto, T. Kanamori, N. Tajima, F. Lan, Y. Takeshita, M. Honda, M. Tanaka, S. Kato, N. Matsuyama, Y. Yoshioka, K. Iwayama, K. Tokuyama, N. Akazawa, S. Maeda, K. Takekoshi, S. Matsugo, N. Noguchi, S. Kaneko and T. Takamura*. Deficiency of the hepatokine selenoprotein P increases responsiveness to exercise in mice through upregulation of reactive oxygen species and AMP-activated protein kinase in muscle. *Nature Medicine* 2017 23 508-516
*Co-corresponding author
2. Y. Mita, K. Nakayama, S. Inari, Y. Nishito, Y. Yoshioka, N. Sakai, K. Sotani, T. Nagamura, Y. Kuzuhara, K. Inagaki, M. Iwasaki, H. Misu, M. Ikegawa, T. Takamura, N. Noguchi and Y. Saito. Selenoprotein P-neutralizing antibodies improve insulin secretion and glucose sensitivity in type 2 diabetes mouse models. *Nature Communications* 2017 8(1) 1658
3. K. Chikamoto, H. Misu*, H. Takayama, A. Kikuchi, K. A. Ishii, F. Lan, N. Takata, N. Tajima-Shirasaki, Y. Takeshita, H. Tsugane, S. Kaneko, S. Matsugo and T. Takamura*. Rapid response of the steatosis-sensing hepatokine LECT2 during diet-induced weight cycling in mice *Biochem Biophys Res Commun* 2016 478 1310-1316
*Co-corresponding author
4. M. Tanaka, Y. Saito, H. Misu, S. Kato, Y. Kita, Y. Takeshita, T. Kanamori, T. Nagano, M. Nakagen, T. Urabe, T. Takamura, S. Kaneko, K. Takahashi and N. Matsuyama.

Development of a Sol Particle Homogeneous Immunoassay for Measuring Full-Length Selenoprotein P in Human Serum *J Clin Lab Anal* 2016 30 114-122

5. N. Tajima-Shirasaki, K. A. Ishii, H. Takayama, T. Shirasaki, H. Iwama, K. Chikamoto, Y. Saito, Y. Iwasaki, A. Teraguchi, F. Lan, A. Kikuchi, Y. Takeshita, K. Murao, S. Matsugo, S. Kaneko, H. Misu and T. Takamura. Eicosapentaenoic acid down-regulates expression of the selenoprotein P gene by inhibiting SREBP-1c protein independently of the AMP-activated protein kinase pathway in H4IIEC3 hepatocytes *J Biol Chem* 2017 292 10791-10800

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. 御簾博文 ヘパトカインによる糖代謝維持機構とその破綻 第 32 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 シンポジウム 2018/2/23 Invited
2. 御簾博文 “サイレンシングヘパトカイン”セレノプロテイン P の過剰による 2 型糖尿病関連病態の発症 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 シンポジウム 2017/12/9 Invited
3. 御簾博文 ヘパトカインセレノプロテイン P と骨格筋受容体 LRP1 による”運動抵抗性”の発症 第 3 回日本筋学会 シンポジウム 2017/8/5 Invited
4. 御簾博文、篁 俊成 ヘパトカインセレノプロテイン P の肥満関連病態に対する多面的効果 第 37 回日本肥満学会 シンポジウム 2016/10/7 Invited
5. 御簾博文、篁 俊成、金子周一 ヘパトカインによる全身の恒常性制御 第 3 回肝臓と糖尿病・代謝研究会 シンポジウム 2016/7/16 Invited
6. Hirofumi Misu Regulation of glucose metabolism and angiogenesis by hepatokines. The 48th Annual Scientific Meeting of the Japan Atherosclerosis Society, 2016/7/14, Invited
7. Hirofumi Misu, Toshinari Takamura, Shuichi Kaneko Hepatokine selenoprotein P induces exercise resistance via skeletal muscle receptor LRP1. Japan Digestive Disease Week 2015 International Session 2015/10/9
8. Hirofumi Misu Hepatokine selenoprotein P and skeletal muscle receptor LRP1 induce exercise resistance by inhibition of ROS and AMPK. The 46th NIPS (National Institute of Physiological Science) International Symposium 2015/10/2
9. 御簾博文 ヘパトカイン selenoprotein P・LECT2 によるインスリン感受性の制御機構 第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 シンポジウム 2015/2/14 Invited

受賞

1. 第 29 回日本糖尿病合併症学会 Young Investigator Award (2014 年)
2. JDDW 2015 Best Presenter Award in International Session (2015 年)

3. 金沢市医師会金沢医学館記念医学賞（2017 年）
4. 第 38 回日本内分泌学会研究奨励賞（2018 年）

プレスリリース

JST・金沢大学プレスリリース 肝臓ホルモン「ヘパトカイン」が運動の効果を無効に 運動の効果に個人差がある原因の一つを解明！ 平成 29 年 2 月 28 日

<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20170228-2/index.html>

→このプレスリリースはその後読売新聞、日本経済新聞、北陸中日新聞、北國新聞に記事として取り上げられた。