

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名: “老化遅延”を目指した新たな内分泌因子の同定と応用

### 2 研究者氏名: 下村 伊一郎

技術員: 鈴木 英美 (研究期間 H15.4.1.~H18.3.31.)

### 3 研究のねらい:

広範な生物種において、種々の老年病の発症を遅延させ寿命を延長する最も効果的な方法はカロリー制限である。そして、その対極に過食により発生する生活習慣病があり、つまり生活習慣病は老化加速病と言える。私たちは、それまで単なるエネルギー貯蔵臓器と考えられていた脂肪組織が、実は活発に生理活性因子を産生・分泌していることを見だし、それら脂肪細胞由来分泌因子をアディポサイトカインとして概念づけた。アディポサイトカインの中で、レプチンが脂肪萎縮性糖尿病に対し抗糖尿病効果を示すことを見だし臨床応用に至らしめた。また私たちが発見した脂肪組織特異的分泌因子アディポネクチンは抗糖尿病効果に加え、直接血管壁に作用して抗高血圧および抗動脈硬化作用を持ち、肥満時の低アディポネクチン血症が、これら生活習慣病の最上流に位置すること、さらにはアディポネクチン産生増強が治療につながることを示した。これらの知見は、脂肪組織以外の末梢臓器も、生活習慣病の病態に重要な分泌因子を産生している可能性を示唆した。

本研究では、活発な栄養の負荷を受け、生活習慣病・老年病と関連すると考えられる肝臓、小腸、筋肉、などの末梢組織由来の分泌因子を同定し、エネルギー代謝との相関を明らかにすることを目的とした。今回、分泌因子をより選択的に同定する signal sequence trap (SST) 法を導入し、肝臓、小腸、筋肉、より摂食抑制および過食という老化の速度を決定する生理状況により、その産生が調節される新たな分泌因子群を同定する。これらの分泌因子群を介した新たな臓器連関を見いだすことで、生活習慣病発症のメカニズムひいては「老化遅延」にむけた診断・治療法の開発を目指す。

### 4 研究成果:

#### (1) 方法

#### a) SST 法による分泌蛋白 cDNA 断片クローニング

分泌因子検索にあたり、signal sequence trap (SST) 法を用いた。本法では分泌蛋白に比較的特有なシグナルシーケンスをアミノ末端に有する cDNA フラグメントのみを選択的に単離する。オリジナルのベクターは東京大学医化学研究所北村俊雄博士らにより開発された。

#### b) 試料とする組織サンプル

摂取量の減少及び過食により、様々なホルモンをお互いに産生しあうことで末梢臓器連関に関与している可能性を有する臓器として、骨格筋、小腸、肝臓をそのサンプルとする。極端な摂食抑制状態、過食状態、のモデルとして、24 時間絶食マウス、及びその絶食後の 12 時間再摂食マウス、過食を呈する肥満糖尿病マウスのそれぞれの上記臓器より、Total RNA を採取。臓器ごとに、絶食群、再摂食群、過食群のすべての RNA サンプルを同量ずつプールした poly A RNA を SST 法への試料とした。

#### (2) 肝臓における結果

肝臓において 1156 クローンの解析を終了した。そのうち 965 クローンがシグナルシーケンスを有し、SST 法の系がうまくいっていることがわかった。958 クローンは 88 種類の既知遺伝子であった。7 クローンが新規あるいは機能未知遺伝子であった。7 クローンの中 6 クローンは機能未知遺伝子として登録済みで、2 クローンは膜貫通領域を有せず、シグナルシーケンスのみで、分泌蛋白である可能性が考えられた。また 1 クローンは完全な新規遺伝子であった。しかしこれらの遺伝子はいずれも肝臓特異的なものではなく、広く他臓器・組織にも発現しているものであり、さらなる解析に関して priority の高いものとは判断しなかった。

#### (3) 小腸における結果

小腸において 780 クローンの解析を終了した。80 種類の既知遺伝子と 8 種類の機能未知遺伝子よりなっていた。8 種類のうち、4 種類は膜貫通領域を持たず分泌蛋白と考えられた。

Intectin (インテクチン) と命名した 1 つのクローンはシグナルシーケンスを含んで 111 アミノ酸よりなる新規の機能未知蛋白で、組織分布上完全に小腸特異的なものであった。さらに絶食・再摂食で小腸遺伝子発現量が低下・上昇し、かつ過食肥満糖尿病マウスである db/db マウス小腸で発現増強が見られ、栄養により活発に発現制御を受けていた。さらに in situ hybridization により小腸内での発現分布を見ると、小腸粘膜上端の粘膜上皮細胞にのみ強い遺伝子発現が見られた。粘膜上皮細胞への発現実験により、栄養因子である脂肪酸により引き起こされるアポトーシスを増強させる作用が見られた。小腸粘膜上端の栄養性脱落に関わることが推察された。

#### (4) 骨格筋における結果

骨格筋において 1812 クローンの解析を終了した。シグナルシーケンスを有した 66 種類の機能未知遺伝子が同定された。このうち 18 種類は膜貫通領域を持たず分泌蛋白と考えられた。

Musclin (マスキリン) と命名した遺伝子はマウスの組織分布において、ほぼ骨格筋特異的に遺

伝子発現が見られた。シグナルシーケンスをふくんで約 130 アミノ酸よりなる新規蛋白であった。アミノ酸配列上、2 種の蛋白切断部位が見られ、プロセッシングを受けていた。C2C12 筋肉細胞の分化系で、本遺伝子の著明な発現誘導が見られた。さらに絶食・再摂食により遺伝子発現の低下・再上昇が見られ、栄養による活発な制御が見られた。そして in vivo, in vitro の系で、本遺伝子発現がインスリンにより正に、cAMP により負に制御されることがわかった。さらに肥満糖尿病マウス筋肉において本遺伝子発現の上昇が見られ、生理作用として筋肉や肝臓に対してインスリン作用を抑制することがわかった。肥満時に筋肉でのマスキリン産生が上昇することが、筋肉そのものおよび肝臓に作用して、インスリン抵抗性を引き起こし、糖尿病の発症および病態に関与することが推察された。現在ノックアウトマウスの解析を進めている。

#### (5) 考察

シグナルシーケストラップ法(SST法)を用いることにより、末梢臓器で発現調節される分泌因子の候補遺伝子を同定した。

肝臓における解析では、同法により取れてくるクローンの4-5割がアルブミンであった。我々は共同研究者らと、肝臓特異的分泌因子である ANGPTL3 についての生理病態学的意義を明らかにしてきたが、今回の SST 法で、ANGPTL3 はクローンとして取れてこなかった。原理的には、遺伝子発現レベルの多寡に応じて取れてくるはずだが、

小腸由来のインテグリンに関しては、ヒトホモログを同定すべく解析を進めたが、分子生物学的手法およびデータベース上も当該クローンを同定することができず、老化予防の観点からヒトにおける意義付けの解明を進めるのは現在のところ困難である。

マスキリンについては、ヒトホモログも同定し、骨格筋における高発現も確認された。他のグループが、同因子(osteocrineと命名)がマウス胎生期の骨芽細胞に発現することを報告した。現在おこなっているノックアウトマウスの解析を通じて、本因子の生理病態学的意義を明らかにしていきたい。また現在、血中濃度測定系の開発をおこなっており、この血中濃度測定系を用いて肥満・2型糖尿病の病態診断応用を目指したい。さらに、マスキリン受容体探索をおこなっており、すでにその候補分子のひとつが見いだされている。さらなる受容体探索、細胞内シグナル伝達を明らかにし、受容体作動薬の開発を通じて創薬へと発展させたい。本因子マスキリンの発見は、骨格筋が代謝の上で重要な分泌臓器として機能するというミオカイン概念の提唱に至った。

#### 5 自己評価:

当初の目標として以下の5点を挙げた。1)新規分泌因子を発見する。2)脂肪組織以外の末梢臓器が分泌因子を産生していることを示す。3)新規因子の生理活性を見いだし他臓器への関与を明らかにする。4)病態学的意義を明らかにする。5)老化加速病と言える生活習慣病診断治療

に向けた今後の医学応用へ向かわせる。

1)については骨格筋特異的に産生分泌される新規因子マスキリンの発見に至り、その後の解析を進展させることができた。小腸より同定し当初分泌因子と考えていた新規因子インテクチンに関しては、その完全な小腸特異的発現、強い栄養制御、そして脂肪酸誘導性の粘膜アポトーシスへの関与から、高脂肪食時の小腸粘膜恒常性維持に関わる因子として注目したが、GPI アンカー型蛋白である可能性およびヒトホモログを同定することができず、ヒトへの医学応用の側面からは、その後の研究の発展には至らなかった。

2)については、骨格筋が、予想を超えて種々の分泌因子遺伝子を発現・産生していることがわかり、特に強い栄養制御を受け、肥満糖尿病状態に変化し、かつ代謝と関わる生理作用を有するマスキリンの発見は、生活習慣病領域における骨格筋由来分泌因子群ミオカイン(myokine)概念の創成に至った。これはすでに多くの医学応用へと発展したアディポサイトカイン概念に引き続くものとする。

3)マスキリンの作用臓器について、現在、筋肉自身および肝臓が考えられ、これらの培養細胞への生理活性を見いだすことができた。現在、マスキリン欠損動物および過剰産生動物モデルの確立および表現型解析をおこなっており、筋肉、肝臓に加えてどのような臓器に作用が及ぶのか、および全身の恒常性にどう関わるのかを明らかにしようとしている。

4)現在、ヒトおよびマウスの血中マスキリン濃度を決定するための ELISA 系の構築をおこなっている。この系の確立により、種々の生理状態および疾患時におけるマスキリン血中濃度を知ることができ、病態学的意義の解明につながると考える。

5)は4)と関わるが、まず、現在構築中のヒト血中マスキリン濃度測定系の確立は、私たちが予想している肥満糖尿病状態の予知および病勢把握につながると考えている。同じ肥満度でも、筋肉からのマスキリン産生の多くなる個体では糖尿病になりやすく、逆にマスキリンの上昇しない個体では糖尿病になりにくいのではないかという可能性を考えている。またマスキリンが糖尿病発症につながる因子とした場合、その受容体の同定は作動薬による糖尿病治療につながる可能性を有する。現在、マスキリンと結合性を有した膜蛋白の同定をおこなっており、すでに既知の膜蛋白に強く結合することを見いだしている。今後、未知の結合蛋白の同定とその生理活性発揮に至るシグナル伝達系を明らかにしたい。

以上、本研究は、脂肪組織以外の末梢臓器である骨格筋が新規の分泌因子を産生し、他臓器に作用し、栄養代謝および病態発症にかかわる可能性を示し、筋肉由来分泌因子ミオカイン概念の創成につながった。見いだされた新規因子マスキリンに関して得られる知見は、今後、老化加速状態である過食による肥満そしてそれに付随して発症する糖尿病状態克服に向けた新たな診断薬および治療薬の創出につながる可能性を有していると考えられる。医学応用へ向けは、簡便で正確な血中濃度測定系の開発と、糖代謝調節に関わる受容体の同定が、今後の重要な課題で

ある。

#### 6 研究総括の見解:

網羅的アプローチは誰も試みるところであるが、それを医療に具体化しようとするところに特色がある。その狙いの成就是、常に対象とするところを自分の眼でみ、自分の手でふれることから自ずと生じる医学思想の形成があつて始めて可能となるであろう。さもないと、散漫なデータの集積にとどまってしまう。たとえ、因子の同定に個別的に成功したとしてもである。本研究者は優れた医学的感覚と臨床医としての才能に恵まれているだけに将来の大成を期待したい。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1. Kitazawa H, Nishihara T, Nambu T, Nishizawa H, Iwaki M, Fukuhara A, Kitamura T, Matsuda M, and Shimomura I. Intectin, a novel small intestine-specific glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, accelerates apoptosis of intestinal epithelial cells. J Biol Chem. 279:42867-42874, 2004.
2. Nishizawa H, Matsuda M, Yamada Y, Kawai K, Suzuki E, Makishima M, Kitamura T, and Shimomura I. Musclin, a novel skeletal muscle derived secretory factor. J Biol Chem. 279: 19391-19395, 2004.

##### 日本語総説(9件)

1. 福原淳範、西澤 均、下村伊一郎 (2005)  
「代謝系サイトカイン Musclin と Visfatin」  
実験医学 23(20)増刊:118-123(羊土社)
2. 松田守弘、下村伊一郎 (2005)  
「肝由来因子 Angptl3 と筋肉由来因子 Musclin の病態的意義」  
メタボリックシンドローム 病態の分子医学:111-117
3. 西澤 均、船橋 徹、下村伊一郎 (2005)  
「Musclin-新規骨格筋由来分泌因子-」,糖尿病学 2005:60-64(診断と治療社)
4. 西澤 均、船橋 徹、下村伊一郎 (2005)  
「アディポサイトカインとミオカイン」  
実験医学増刊 ダイナミックに新展開する脂質研究 23(6):198-203(羊土社)
5. 西澤 均、下村伊一郎 (2004)  
「肥満とエネルギー代謝」  
Annual Review 内分泌,代謝 2004:142-145(中外医学社)

## 受賞

平成 15 年度 日本糖尿病学会賞リリー賞

## 招待講演(国内 28件)

### 1. 下村伊一郎 (2005)

ランチョンセミナー「生活習慣病の新たな標的と治療」, 日本薬学会第125年会(東京ビッグサイト)

### 2. 下村伊一郎 (2004)

ワークショップ「老化加速病・生活習慣病に関わる新たな分泌因子の同定と応用」  
第27回日本分子生物学会年会(神戸ポートピアホテル)

### 3. 下村伊一郎 (2004)

シンポジウム「肥満症・生活習慣病にかかわる新たな分泌因子の同定と医学応用」  
日本人類遺伝学会第 49 回大会(東京:シェーンバッハ・サボー)

### 4. 下村伊一郎 (2004)

ランチョンセミナー「新たな末梢臓器由来分泌因子とメタボリックシンドローム」  
第46回日本脂質生化学会(熊本市産業文化会館)

### 5. 下村伊一郎 (2004)

ランチョンセミナー「臓器特異的内分泌因子と疾患」  
第81回日本生理学会大会(札幌コンベンションセンター)

### 6. 下村伊一郎 (2004)

特別講演「新規内分泌因子の同定と医学応用」  
第32回薬物活性シンポジウム(大阪:千里ライフサイエンスセンター)

### 7. 下村伊一郎 (2004)

特別講演「新たな内分泌因子の同定とメタボリックシンドローム」  
社団法人 日本薬学会 第20回創薬セミナー(八ヶ岳ロイヤルホテル)

### 8. 下村伊一郎 (2004)

ランチョンセミナー「メタボリックシンドロームの治療標的」  
第77回日本内分泌学会学術総会(国立京都国際会館)

## 招待講演(国外)

### 1. Shimomura I (2005)

‘Novel Secretory Factors, Associating with Metabolic Syndrome ’  
Seoul Symposium on Obesity and Diabetes (Seoul National University Hospital, Korea)

2. Shimomura I (2005)

Keystone Symposia 'Diabetes Mellitus: Molecular Mechanisms, Genetics and New Therapies' 'Obesity: Molecular Physiology and Genetics of the Control of Body Weight' (Keystone Resort, Colorado USA)

3. Shimomura I (2004)

Symposium 'Molecular Target in the Metabolic Syndrome'

American Heart Association Scientific Sessions 2004 (Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans USA)

4. Shimomura I (2004)

Symposium 'Adipocytokines'

American Diabetic Association 64th Scientific Sessions (Orange County Convention Center, Orlando USA)

5. Shimomura I (2004)

Keystone Symposia 'Molecular Control of Adipogenesis and Obesity' (Fairmont Banff Springs, Banff, Alberta, Canada)