

平成30年 5月29日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19509

研究課題名(和文)メトホルミンによるインスリン抵抗性誘導ヘパトカインLECT2の発現抑制機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of down regulation mechanism of Lect2 gene expression by metformin

研究代表者

高山 浩昭 (Takayama, Hiroaki)

金沢大学・医学系・技術職員

研究者番号：90725227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2)は肥満に伴って産生が増大し、骨格筋においてインスリン抵抗性を惹起するヘパトカインである。LECT2の産生を抑制することはインスリン抵抗性治療の新規標的となる可能性がある。本研究は、培養肝細胞において血糖降下薬メトホルミンがLect2遺伝子発現ならびにLect2タンパク分泌を抑制すること、その機序にはAMPKの活性化を介していることを明らかにした。また、メトホルミンはLECT2遺伝子プロモーター活性に影響を及ぼさなかったことから、mRNAの不安定化などその他の制御機構が存在すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：A hepatokine leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) which is overproduced with obesity cause insulin resistance in skeletal muscle. It is expected that suppression of LECT2 production is a new therapeutic target of insulin resistance, but no drug is known which lowering LECT2 production to date. Here I revealed that an oral anti-diabetic drug metformin can suppress Lect2 gene expression via AMPK activation in cultured hepatocyte. This pathway may relate RNA instability mechanism because metformin did not alter LECT2 promoter activity. Further experiment is needed to understand the molecular mechanism in this pathway much more.

研究分野：分子生物学

キーワード：Lect2 Metformin AMPK PKA

1. 研究開始当初の背景

申請者の研究グループは、肝臓由来分泌タンパクであるセレノプロテイン P (以下 SeP) がインスリン抵抗性と高血糖を誘導する“ヘパトカイン”であることを見出した (Misu, Takayama et al. Cell Metabolism 2010)。申請者は SeP 産生抑制薬を探索した結果、抗糖尿病薬メトホルミンが AMPK-FoxO3a 経路を介して肝細胞での SeP の発現を抑制することを報告した (Takayama et al. J. Biol. Chem. 2014)。

その後申請者らは、ヒト肝臓の遺伝子発現情報を用いて探索した結果、インスリン抵抗性を誘導する第二のヘパトカインとして Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) を同定した (Lan, Takayama et al. Diabetes 2014)。LECT2 は肥満に伴って産生が増大し、骨格筋においてインスリン抵抗性を惹起する。そのため LECT2 は SeP と同じくインスリン抵抗性に対する重要な治療標的であるが、これまでに LECT2 の産生を抑制する薬剤について詳細な検討はなされていない。申請者は予備的な検討によってメトホルミンが培養肝細胞において *Lect2* 産生を抑制する可能性を見いだした。

2. 研究の目的

- 1) メトホルミンによる LECT2 発現抑制作用を証明する。
- 2) メトホルミンが肝細胞において LECT2 遺伝子発現を抑制する分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

- 1) マウスより単離した初代培養肝細胞に種々の濃度でメトホルミンを処置し *Lect2* 遺伝子発現量ならびに培養培地中への *Lect2* タンパク放出量を検討する。
- 2) メトホルミン作用機序の鍵分子である AMPK または PKA のノックダウンが *Lect2* 遺伝子発現に及ぼす影響を検討する。

- 3) メトホルミンが *Lect2* プロモーター活性に及ぼす影響を検討するため、ヒト *LECT2* 遺伝子上流領域をルシフェラーゼベクターにクローニングしたレポーターベクターを作成し、メトホルミンに対する応答性を検討する。

4. 研究成果

- 1) マウス初代培養肝細胞に 0.5~2 mM の用量でメトホルミンを処置すると、*Lect2* mRNA 発現は濃度依存的また時間依存的に減弱した (図 1)。また 24 時間のメトホルミン処置により、培地中に放出される *Lect2* タンパク量は減少した (図 2)。

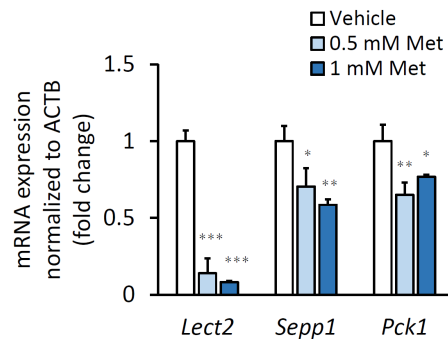


図 1. メトホルミンが遺伝子発現に及ぼす影響

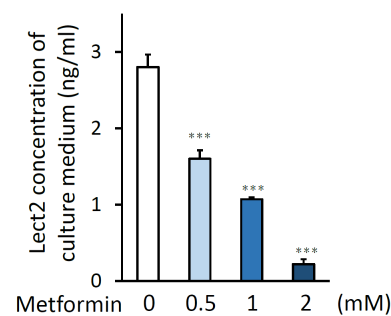


図 2. メトホルミンによる *Lect2* 分泌抑制

- 2) マウス由来 AML12 細胞において AMPK siRNA または PKA siRNA を用いてそれぞれの分子をノックダウンすることで、*Lect2* mRNA 発現に対するメトホルミンの作用機序においてどちらの分子がより重要なのか検討した。その結果、PKA ノックダウンはメトホルミンの作用を一部しか解除しなかった一方、AMPK をノックダウンすることでメトホルミン誘導性の *Lect2* 遺伝子発

現抑制が完全に消失することが明らかとなった。この結果は AMPK が鍵分子であることを示唆する。加えて、マウス初代培養肝細胞へのフォルスコリン処置は *Lect2* 遺伝子発現に影響を及ぼさなかったことも、PKA は *Lect2* 発現に関与しないことを示唆する。

3) メトホルミンによる *Lect2* mRNA 発現抑制がプロモーター活性の抑制によるものかどうか検討した。ヒト *LECT2* 遺伝子上流領域-1 から-2350 bp または-2350 から-4200 bp の配列をルシフェラーゼベクターにクローニングしたレポーターベクターを作成し、ラット肝癌由来 H4IIEC 細胞にトランスフェクションした後にメトホルミンを処置し、ルシフェラーゼ活性を評価した。その結果、いずれの領域においてもメトホルミンはルシフェラーゼ活性に変化を及ぼさなかった(図3)。さらに *LECT2* 遺伝子上流領域を検索したところ、約 15 kb 上流に様々な予想転写因子結合配列が種間で保存されていた約 140 bp を発見した。この配列を予想 *LECT2* 遺伝子プロモーターエンハンサー領域と考え、minimal promoter を含むルシフェラーゼベクターにクローニングした。しかしながら、この領域はメトホルミン処置によってむしろ活性が亢進した。これらの結果は、メトホルミンによる *Lect2* mRNA 発現抑制は、プロモーター活性の抑制を介していないことを示唆する。

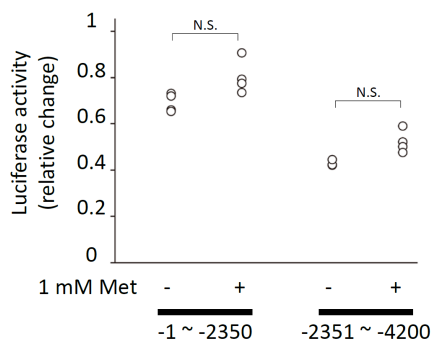


図3. メトホルミンが *Lect2* promoter 活性に及ぼす影響

4) メトホルミンが *Lect2* 遺伝子プロモーター活性と独立して遺伝子発現抑制する

機序として、miRNA の誘導に着目した。近年、メトホルミンが AMPK の下流で Dicer を誘導することで miRNA 発現を亢進することが報告されている。そこで、マウス初代培養肝細胞においてメトホルミン処置によって発現が変化する miRNA を、miRNA アレイによって網羅的に検索した。その結果、メトホルミン処置によって発現が亢進した miRNA は僅か 2 種類で、大多数の miRNA は発現が減弱していた(図4)。

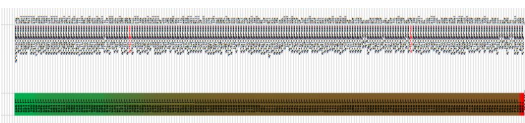


図4. miRNA 発現ヒートマップ

メトホルミンによって発現が亢進した 2 種の miRNA は *Lect2* 遺伝子上に相補的な配列が無い場合、標的の miRNA では無いと判断した。次に、*Lect2* 遺伝子 3'UTR 領域に結合しうる miRNA をデータベースから検索し、なかでも脂肪肝に関連する miR-29a に着目して検討を行った。その結果、miR-29a mimic は *Lect2* 遺伝子発現に影響を及ぼさず、また miR-29a inhibitor はメトホルミンの作用を解除しなかった。

まとめ

本研究は、経口血糖降下薬メトホルミンが AMPK の活性化を介して、インスリン抵抗性誘導ヘパトカイン *Lect2* の発現を抑制することを示した。メトホルミンは *LECT2* プロモーター活性に影響を及ぼさないため、その機序には mRNA の不安定化などが予想される。より詳細な制御機構の解明にはさらなる検討を要する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

1. Tajima-Shirasaki N, Ishii K, Takayama H,

and other 14
Eicosapentaenoic Acid Downregulates
Expression of the Selenoprotein P Gene by
Inhibiting SREBP-1c Independently of the
AMPK Pathway in H4IIEC3 Hepatocytes
Journal of Biological Chemistry, 229,
10791-10800 (2017) 査読有り

2. Misu H, **Takayama H**, and other 23.
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, 23, 508–516 (2017) 査読
有り
3. Chikamoto K, Misu H, **Takayama H**, and
other 10.
Rapid response of the steatosis-sensing
hepatokine LECT2 during diet-induced
weight cycling in mice
**Biochemical and Biophysical Research
Communications**, 478, 3, 1310-1316 (2016)
査読有り

[学会発表](計 7件)

1. 高山浩昭、Swe Mar Oo、御簾博文、石
井清朗、篁 俊成 第 38 回日本肥満学
会 口演 (2017 年 10 月)
2. 高山浩昭、御簾博文、金森岳広、中川
浩実、島 孝佑、喜多裕樹、竹下有美枝、
太田嗣人、金子周一、篁 俊成 第 60
回日本糖尿病学会年次学術集会 ポス
ター (2017 年 5 月)
3. 高山浩昭、御簾博文、菊地晶裕、石井
清朗、斉藤芳郎、金子周一、篁 俊成 第
31 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学
術集会 口演 (2017 年 2 月)
4. 高山浩昭、御簾博文、菊地晶裕、石井
清朗、篁 俊成 第 59 回日本糖尿病学
会年次学術集会 口演 (2016 年 5 月)
5. 高山浩昭、御簾博文、菊地晶裕、石井
清朗、斉藤芳郎、金子周一、篁 俊成 第
30 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学
術集会 口演 (2016 年 2 月)

6. 高山浩昭、御簾博文、斉藤芳郎、金子
周一、篁 俊成 第 27 回分子糖尿病学
シンポジウム 口演 (2015 年 12 月)
7. 高山 浩昭、御簾 博文、菊地 晶裕、
石井 清朗、金森 岳広、金子 周一、
篁 俊成 第 2 回肝臓と糖尿病・代謝研
究会 ポスター (2015 年 5 月)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<https://metabology.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織
(1)研究代表者
高山 浩昭 (TAKAYAMA, Hiroaki)
金沢大学・医学系・技術職員
研究者番号：90725227

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()