

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19560

研究課題名（和文）肝臓-骨格筋連関を標的とした運動効果増強薬の開発

研究課題名（英文）Development of exercise-enhancing therapy targeting the liver-skeletal muscle network

研究代表者

簗 俊成（Takamura, Toshinari）

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：00324111

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：肝臓から分泌されるセレノプロテインP（SeP）が運動抵抗性を誘導することを見出したことから、肝臓でのSeP発現を特異的に抑制し、運動効果を高める低分子化合物を同定するため、既存薬スクリーニングを行った。その結果、SePの転写活性を強力に抑制する低分子既存薬化合物を約50種類同定した。これらの中から毒性の低い3種類の化合物を選び、肝臓細胞株やマウス個体に投与し、SeP発現抑制効果を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化を背景に糖尿病、肥満症、サルコペニアが増大しており、運動効果を高める治療が求められている。今回同定したSeP発現抑制薬はこれまでにない運動効果増強薬となるだけでなく、2型糖尿病、脂肪肝、脂質異常症といった運動療法が効果を発揮するとされる多くの疾患に対しても全く新しい治療法になる可能性がある。さらに運動療法が持つ寿命延長効果をも増強することが出来れば、健康寿命延長薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Since we found that selenoprotein P (SeP) secreted by the liver induces resistance to exercise, we conducted a screening to identify small-molecule compounds that specifically suppress SeP expression in the liver and enhance the exercise effect. As a result, we identified about 50 small-molecule compounds that potently suppress the transcriptional activity of SeP. Among these, we selected three compounds with low toxicity. We administered these compounds to liver cell lines and mice and confirmed the inhibitory effect on SeP expression.

研究分野：代謝学

キーワード：糖尿病 肥満症 サルコペニア 薬剤スクリーニング 運動効果 健康寿命 セレノプロテインP ヘパトカイン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) および DNA チップ解析により独自に構築したヒト肝臓遺伝子発現情報 (Diabetologia 2004 & 2007, Obesity 2008) から、2 型糖尿病患者の肝臓で発現が亢進するセレノプロテイン P (Official Symbol: *SELENOP*) を同定した。セレノプロテイン P は元々必須微量元素である食事由来セレンを肝臓から全身に運ぶ分泌タンパク質として知られていたが、生活習慣病などの疾病との関連は不明であった。これまでにセレノプロテイン P が 2 型糖尿病で観察される多様なシグナル抵抗性を形成することを見出した。1) AMP キナーゼ阻害を介して肝臓にインスリン抵抗性を誘導する (Cell Metab 2010)。2) 血管内皮細胞に VEGF 抵抗性を誘導することで血管新生を阻害する (Diabetologia 2014)。3) 膵β細胞に小胞体ストレスを誘導してインスリン分泌を障害する (Nat Commun, 2017) 4) 運動による AMPK 活性化を阻害し、運動抵抗性を誘導する (Nat Med 2017)。セレノプロテイン P は 2 型糖尿病患者のみならず、脂肪肝患者や高齢者でも血中濃度が増加することから、セレノプロテイン P が過栄養状態や加齢状態で認められる全身病態の発現にも関与することが推察される。そこで、セレノプロテイン P を標的とした糖尿病治療開発に向けて、*SELENOP* 遺伝子のプロモーターをクローニングし、発現制御機構を明らかにした (J Biol Chem 2014 & 2017)。これを評価系として用い、肝臓の *SELENOP* 発現を抑制する化合物を運動増強薬のシーズとして探索することを構想した。

2. 研究の目的

高齢化を背景に糖尿病、肥満症、サルコペニアの増大しており、運動効果を高める治療が求められている。2 型糖尿病の基盤病態であるインスリン抵抗性、インスリン分泌不全、血管新生抵抗性などの多様なシグナル伝達抵抗性を惹起するヘパトカインとしてセレノプロテイン P を同定した。最近、セレノプロテイン P が骨格筋受容体 LRP1 を介して、運動の健康増進効果発現を阻害する運動

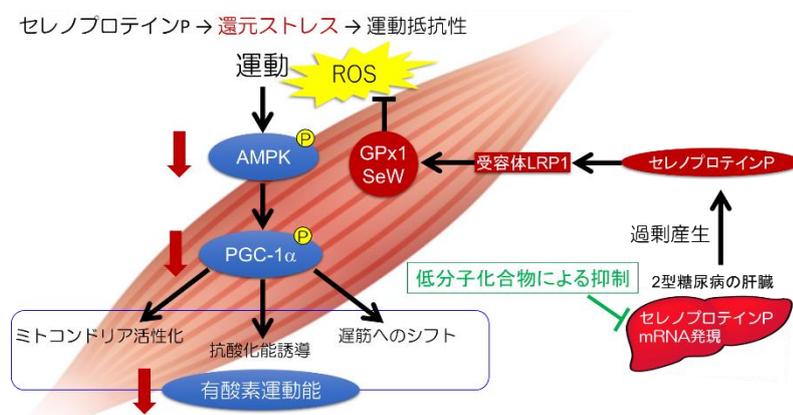


図1 セレノプロテインPを標的とした運動効果増強薬の開発

抵抗性を発症させ、その機序として、セレノプロテイン P が運動時に骨格筋で生じるシグナル分子としての活性酸素種を除去することで、AMP キナーゼの活性化を阻害する新機構を見出した (図 1)。ヒトで、セレノプロテイン P の血中レベルが運動の効果を知することも確認した。血中セレノプロテイン P レベルは 2 型糖尿病患者や高齢者で増加する。このような内在性の運動効果阻害因子は従来見つかっていないことから、セレノプロテイン P の過剰産生、あるいは受容体との結合を阻害する薬剤の開発が運動効果を高めることで、2 型糖尿病や加齢関連疾患に対する新しい治療につながる可能性を想起した。そこでセレノプロテイン P 遺伝子 *SELENOP* の発現制御を目指して、プロモーターをクローニングし、転写活性を制御する薬剤や転写因子を明らかにした。さらに、*SELENOP* 発現を抑制する siRNA やセレノプロテイン P の受容体結合を阻害する中和抗体を同定し、これらがセレノプロテイン P 作用を阻害することもモデル動物で確認した。本研究ではヘパトカインであるセレノプロテイン P を標的とした運動効果増強薬の探索・開発を行う。具体的には、肝臓からのセレノプロテイン P 過剰産生を抑制する薬剤を運動増強薬のシーズとして同定する。候補化合物が同定された後は、食餌性および先天的肥満マウスなどの 2 型糖尿病病態モデルマウスに対して、同定した候補薬剤の投与実験をおこなう。このように同定する運動効果増強薬は前例がなく、2 型糖尿病、肥満症、非アルコール性脂肪性肝疾患といった運動療法が効果を発揮するとされる多くの疾患に対する全く新しい治療法になる。さらに、運動療法が持つ寿命延長効果そのものをも増強する健康寿命延長薬の開発につながることを期待される。

3. 研究の方法

1) 培養肝細胞でのセレノプロテイン P 産生抑制薬の同定

すでに本研究遂行に向けて、*SELENOP*のプロモーター領域を分泌型ルシフェラーゼの上流につないだレポータープラスミドを作成した。レンチウイルスを使用して培養ラット H4IIEC 肝細胞にこのレポーター遺伝子をトランスフェクションし、*SELENOP*プロモーター下分泌型ルシフェラーゼを安定発現する肝細胞株を樹立した(図 2)。

レポータープラスミドを安定発現した細胞では *SELENOP* プロモーター活性に応答して分泌型ルシフェラーゼ (Gluc) を産生する。培養液中に分泌されたルシフェラーゼの化学発光を測定することで、細胞破碎することなく細胞内の *SELENOP* 転写活性を測定できる。加えて SV40 プロモーターの下流で恒常的に分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) を産生する。そのため Gluc 活性を SEAP 活性で補正することで、細胞数や発現導入効率を標準化することができる(図 2)。

この安定発現肝細胞を用いて、*SELENOP* 発現を抑制する薬剤をハイスルーアウトプットスクリーニングする。化合物ライブラリーは、東京大学創薬機構に協力を依頼済みであり、既存薬ライブラリー 1200 種とコアライブラリー 9600 種を用いる。既にコンパウンドを固着させてある 96well ないしは 384well プレートを使用する。応募時の予備的検討として、この細胞に *SELENOP* プロモーター活性抑制作用が既知であるメトホルミン (J Biol Chem 2014) またはインスリンを処置することで Gluc/SEAP 比が低下することを確認した。

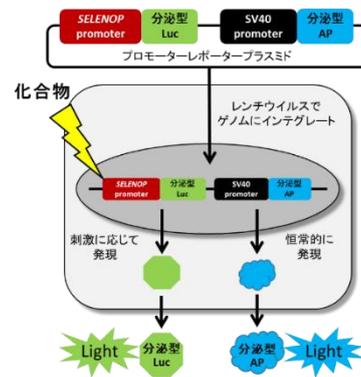


図2 *SELENOP*プロモーター活性化により分泌型ルシフェラーゼを安定発現する肝細胞株の樹立

4. 研究成果

臨床で使用されている 1200 種類の既存薬ライブラリー(東京大学創薬支援センター)を用いた、セレノプロテイン P プロモーター下分泌型ルシフェラーゼスクリーニングによって、肝臓細胞で SeP の転写活性を強力に抑制する低分子化合物を数十種類同定した。さらにこれらの中から毒性が低い 3 (X、Y、Z) 化合物選んだ。このうち X 化合物は構造展開の実現可能性が低く、副作用の影響も大きいいため、マウス初代培養肝臓細胞やヒト肝臓細胞株を用いて、SeP の遺伝子発現量やタンパク質量の変化、インスリンシグナルへの影響を精査し、また、マウス個体への投与も行い、血中 SeP タンパク質濃度や血糖値の変化を調べ、学術論文として投稿した。構造展開の実現可能性が高い 2 (Y、Z) 化合物については、類似既存薬および周辺化合物ライブラリー(大阪大学大学院薬学研究科附属創薬センター)を用いて 2 次スクリーニング(それぞれ Y について 70 化合物、Z について 160 化合物)を行った。結果、Y については類似および周辺化合物に抑制効果がなかった。Z については、周辺化合物においても一次スクリーニングと同程度の抑制効果があった。

東京大学創薬支援センターの低分子化合物(既存臨床薬)1200種類のライブラリーを用いて一次スクリーニングを施行
化合物濃度 2 μM に固定、10%FBS, DMEM に添加して 24h



培養肝細胞においてセレノプロテイン P 遺伝子の転写活性を抑制する低分子化合物を 48 種類、増加させる 2 種類を同定した。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
A	1516	2495	2717	2488	2393	2395	2424	2443	2454	2471	2473	2513	2489	2440	2524	2524	2439	2479	2420	2470	2472	2521	2520	2520	2520
B	2278	2381	2318	2412	2360	2388	2363	2467	2468	2311	2412	2412	2518	2370	2366	2434	2350	2330	2446	2473	2481	2471	2470	2470	2470
C	2314	2366	2384	2419	2371	2338	2362	2370	2410	2361	2340	2363	2420	2324	2379	2444	2376	2404	2369	2376	2420	2370	2370	2370	2370
D	2316	2310	2360	2360	2362	2366	2366	2366	2366	2366	2366	2366	2366	2366	2366	2366	2366	2366	2366	2366	2366	2366	2366	2366	2366
E	2383	2383	2404	2411	2413	2413	2413	2413	2413	2413	2413	2413	2413	2413	2413	2413	2413	2413	2413	2413	2413	2413	2413	2413	2413
F	2387	2372	2382	2384	2385	2385	2385	2385	2385	2385	2385	2385	2385	2385	2385	2385	2385	2385	2385	2385	2385	2385	2385	2385	2385
G	2374	2371	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421
H	2334	2433	2476	2466	2419	2341	2355	2458	2472	2420	2420	2420	2420	2420	2420	2420	2420	2420	2420	2420	2420	2420	2420	2420	2420
I	2471	2378	2378	2368	2367	2361	2441	2333	2472	2324	2437	2436	2330	2418	2424	2441	2458	2424	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421
J	2329	2360	2376	2366	2323	2319	2411	2367	2420	2320	2420	2420	2414	2412	2414	2420	2420	2420	2420	2420	2420	2420	2420	2420	2420
K	2366	2366	2367	2468	2361	2418	2404	2370	2361	2364	2378	2412	2368	2366	2361	2366	2418	2361	2361	2361	2361	2361	2361	2361	2361
L	2330	2330	2419	2383	2376	2376	2402	2404	2411	2374	2384	2364	2424	2383	2390	2405	2404	2473	2420	2384	2384	2384	2384	2384	2384
M	2340	2423	2330	2322	2332	2349	2372	2404	2412	2311	2363	2340	2381	2449	2420	2377	2413	2390	2370	2428	2414	2428	2414	2428	2414
N	2327	2327	2327	2327	2316	2340	2409	2321	2321	2321	2321	2474	2409	2328	2411	2364	2409	2378	2378	2378	2378	2378	2378	2378	2378
O	2443	2376	2342	2424	2360	2352	2352	2352	2352	2352	2352	2352	2352	2352	2352	2352	2352	2352	2352	2352	2352	2352	2352	2352	2352
P	2413	2414	2379	2408	2417	2403	2345	2319	2340	2341	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421	2421

図3 低分子化合物(既存臨床薬ライブラリー)を用いたスクリーニング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Murai Kazuhisa, Honda Masao, Shirasaki Takayoshi, Shimakami Tetsuro, Omura Hitoshi, Misu Hirofumi, Kita Yuki, Takeshita Yumie, Ishii Kiyoko, Takamura Toshinari, Urabe Takeshi, Shimizu Ryogo, Okada Hikari, Yamashita Taro, Sakai Yoshio, Kaneko Shuichi	4. 巻 25
2. 論文標題 Induction of Selenoprotein P mRNA during Hepatitis C Virus Infection Inhibits RIG-I-Mediated Antiviral Immunity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Host & Microbe	6. 最初と最後の頁 588 ~ 601.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chom.2019.02.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Willis Scott A, Sargeant Jack A, Yates Thomas, Takamura Toshinari, Takayama Hiroaki, Gupta Vinay, Brittain Emily, Crawford Joe, Parry Si?n A, Thackray Alice E, Varela-Mato Veronica, Stensel David J, Woods Rachel M, Hulston Carl J, Aithal Guruprasad P, King James A	4. 巻 未定
2. 論文標題 Acute Hyperenergetic, High-Fat Feeding Increases Circulating FGF21, LECT2, and Fetuin-A in Healthy Men	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Nutr	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jn/nxz333	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sargeant Jack A., Aithal Guruprasad P., Takamura Toshinari, Misu Hirofumi, Takayama Hiroaki, Douglas Jessica A., Turner Mark C., Stensel David J., Nimmo Myra A., Webb David R., Yates Thomas, King James A.	4. 巻 43
2. 論文標題 The influence of adiposity and acute exercise on circulating hepatokines in normal-weight and overweight/obese men	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism	6. 最初と最後の頁 482 ~ 490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1139/apnm-2017-0639	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Chadani Hiroshi, Usui Soichiro, Inoue Oto, Kusayama Takashi, Takashima Shin-ichiro, Kato Takeshi, Murai Hisayoshi, Furusho Hiroshi, Nomura Ayano, Misu Hirofumi, Takamura Toshinari, Kaneko Shuichi, Takamura Masayuki	4. 巻 19
2. 論文標題 Endogenous Selenoprotein P, a Liver-Derived Secretory Protein, Mediates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 878 ~ 878
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19030878	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito Yoshiro, Misu Hirofumi, Takayama Hiroaki, Takashima Shin-ichiro, Usui Soichiro, Takamura Masayuki, Kaneko Shuichi, Takamura Toshinari, Noguchi Noriko	4. 巻 41
2. 論文標題 Comparison of Human Selenoprotein P Determinants in Serum between Our Original Methods and Commercially Available Kits	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 828 ~ 832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Igawa Hirobumi, Kikuchi Akihiro, Misu Hirofumi, Ishii Kiyo-aki, Kaneko Shuichi, Takamura Toshinari	4. 巻 10
2. 論文標題 p62-mediated autophagy affects nutrition-dependent insulin receptor substrate 1 dynamics in 3T3-L1 preadipocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 32 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.12866	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oo Swe Mar, Misu Hirofumi, Saito Yoshiro, Tanaka Mutsumi, Kato Seiji, Kita Yuki, Takayama Hiroaki, Takeshita Yumie, Kanamori Takehiro, Nagano Toru, Nakagen Masatoshi, Urabe Takeshi, Matsuyama Naoto, Kaneko Shuichi, Takamura Toshinari	4. 巻 8
2. 論文標題 Serum selenoprotein P, but not selenium, predicts future hyperglycemia in a general Japanese population	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-35067-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mohri Kensuke, Misu Hirofumi, Takayama Hiroaki, Ishii Kiyo-aki, Kikuchi Akihiro, Lan Fei, Enyama Yasufumi, Takeshita Yumie, Saito Yoshiro, Kaneko Shuichi, Takamura Toshinari	4. 巻 42
2. 論文標題 Circulating Concentrations of Insulin Resistance-Associated Hepatokines, Selenoprotein P and Leukocyte Cell-Derived Chemotaxin 2, during an Oral Glucose Tolerance Test in Humans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 373 ~ 378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00549	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 篁 俊成
2. 発表標題 摂取カロリー設定と3大栄養素バランスに関する論考 Issues on dietary calorie and macronutrient balance
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 御簾 博文, 篁 俊成
2. 発表標題 Diabetes-associated systemic pathology induced by hepatokines
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高山 浩昭, 御簾 博文, 斎藤 芳郎, 篁 俊成
2. 発表標題 抗酸化ヘパトカイン " セレノプロテインP " が惹起する全身の糖尿病関連病態
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺村 千里, 竹下 有美枝, 高山 浩昭 , 海古井 由佳, 田中 健雄, 金森 岳広, 篁 俊成
2. 発表標題 EPA製剤が2型糖尿病患者の血中セレノプロテインP濃度と臓器特異的インスリン感受性に及ぼす効果
3. 学会等名 第34回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鴨下 恭子, 石井 清明, 田島 奈津美, 白崎 尚芳, 高山 浩昭, 竹下 有美枝, 金子 周一, 篁 俊成
2. 発表標題 インスリン抵抗性や運動抵抗性を惹起するセレノプロテインPに対するEPAの制御機構
3. 学会等名 第34回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Xingyu Yao, Hiroaki Takayama, Kiyoko-aki Ishii, Toshinari Takamura
2. 発表標題 Search for inhibitors against selenoprotein P that cause insulin resistance and exercise resistance.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hein Ko Oo, 高山 浩昭, Swe Mar Oo, 石井 清朗, 篁 俊成
2. 発表標題 Locally-circulating selenoprotein P regulates ROS-mediated thermogenesis in brown fat
3. 学会等名 第31回分子糖尿病学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroaki Takayama, Swe Mar Oo, Hirofumi Misu, Kiyo-aki Ishii, Toshinari Takamura
2. 発表標題 Anti-oxidative hepatokine selenoprotein P impairs brown fat thermogenesis by suppressing mitochondrial ROS
3. 学会等名 Keystone Symposia Obesity and Adipose Tissue Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Takamura, K. Kaku, A. Yoshida, H. Kusakabe, H. Sukanami
2. 発表標題 Gamma-glutamyltransferase levels reflect glycaemic status in type 2 diabetic people treated with an SGLT2 inhibitor
3. 学会等名 the 54th EASD Annual Meeting 2018 in Berlin, Germany (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 簗 俊成
2. 発表標題 肝臓-骨格筋連関が形成する糖尿病の新病態
3. 学会等名 第5回肝臓と糖尿病・代謝研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 簗 俊成
2. 発表標題 Lessons from type 2 diabetic liver
3. 学会等名 第84回日本生化学会東北支部会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菅 俊成
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患のReal-World Data：肝病理進展に寄与する病態
3. 学会等名 第53回糖尿病学の進歩（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shuichi Kaneko, Toshinari Takamura, Hirofumi Misu	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Wiley	5. 総ページ数 202
3. 書名 Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases	

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学大学院 医学系研究科 内分泌・代謝内科学 https://metabology.w3.kanazawa-u.ac.jp/ 金沢大学 内分泌・代謝内科学分野 https://www.facebook.com/TakamuraLab/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------