

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08911

研究課題名（和文）グレリンとLEAP2による肝臓の糖代謝調節機序の解析

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of hepatic glucose metabolism by ghrelin and LEAP2

研究代表者

迫田 秀之（Sakoda, Hideyuki）

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：50376464

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：グレリンの内因性アンタゴニストLEAP2が肝臓で糖脂質代謝を調節する分子機序を解析し、ヒト糖尿病や肥満症、NAFLDでLEAP2を測定し病態との関連を明らかにした。髄液中のヒトLEAP-2が細菌性髄膜炎の患者の髄液中で有意に増加していた。細菌性髄膜炎において、LEAP-2は脳内で局所性に産生され、潜在的なバイオマーカーとして有用である可能性が考えられた。カロリー制限したマウスへのLEAP2投与は、炎症を惹起しより体重減少を生じた。グレリン受容体欠損マウスでもLEAP2が同様の効果を示すため、カロリー制限下においては、グレリン受容体を介さない作用を示すと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グレリンのアゴニストが癌力ヘキシアの治療薬として実用化されている。LEAP2がグレリンを阻害する機序や病態における役割を解析して、グレリンとLEAP2による摂食やエネルギー代謝調節機構を明らかにすることで、新たな治療薬やバイオマーカーの開発に貢献できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：To Analyze the molecular mechanism by which the endogenous antagonist of ghrelin, LEAP2, regulates glucose and lipid metabolism in the liver, we examined LEAP2 in pathological conditions.

Human LEAP-2 in CSF was significantly increased in the patients with bacterial meningitis. In bacterial meningitis, LEAP-2 is produced locally in the brain and may be useful as a potential biomarker. Administration of LEAP2 to calorie-restricted mice induced inflammation and more weight loss in both C57BL/6 J mice or Ghslr-KO mice. Our findings suggest that LEAP2 functions independently of GHSR, implying that LEAP2 affects physiology beyond the ghrelin-GHSR system.

研究分野：糖脂質代謝

キーワード：ペプチド 糖脂質代謝 臓器連関 肥満

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓や腸管から分泌されるペプチド liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2)は、抗菌ペプチドとして報告されていた。2017年に、LEAP-2がグレリン受容体(GHSR)の内因性アンタゴニストとして報告された。LEAP-2は、グレリンの成長ホルモン分泌、摂食亢進、血糖上昇、体温低下作用に拮抗的に働く。LEAP-2はラットおよびマウスでグレリンの摂食亢進作用と成長ホルモン分泌促進作用を抑制した。ラット脳室内へのグレリン投与による血糖上昇と体温低下作用も、LEAP-2が抑制した。血漿LEAP-2は、絶食で低下し摂食で増加して、グレリンと反対の血行動態を示した。この時、肝臓のLEAP-2発現量が同様の変化を認めることから、肝臓から分泌されるLEAP-2がLEAP-2の血中濃度を決定すると考えられた。

このように、胃から分泌されるグレリンと肝臓から分泌されるLEAP-2による、摂食と成長ホルモン分泌調節に関わる胃・肝臓臓器連関を示して報告した(J Endocrinol, 2020)。グレリンは、空腹時にエネルギー欠乏を感知して胃からの分泌が増加し、摂食を促し、代謝を抑え血糖を維持するなどエネルギー欠乏状態を解消する作用がある。LEAP-2の主要発現臓器は肝臓と小腸である。小腸のLEAP-2は、管腔内に分泌されて抗菌ペプチドとして作用していることが考えられる。一方で、肝臓のLEAP-2は、肝臓のエネルギー状況や炎症を感知して血中に分泌されて、グレリン作用を調節することが予想される。肝臓は糖脂質代謝を調節する主要な器官であり、グレリンとLEAP-2は直接肝臓に働くとともに、LEAP-2が血中に分泌されて全身の臓器の代謝を調節することも考えられる。本申請では、グレリンとLEAP-2が、胃・肝臓臓器連関で生体の恒常性維持に働く機序を詳細に解析する。

### 2. 研究の目的

グレリンとLEAP-2が肝臓で糖脂質代謝を調節する分子機序を解析する。グレリン刺激で分泌した成長ホルモンが肝臓で糖新生を亢進することで血糖を上昇する。我々は、GHSRが肝臓でも発現しLEAP-2発現量を調節することを明らかにした。そこで、グレリンが直接肝臓のGHSRに作用して、糖新生や脂質代謝を調節することも考えられ本申請で精査していく。本申請で、逆にLEAP-2が胃のグレリン発現量や分泌を調節する可能性も探る。さらに、脂肪肝やNASHモデル動物でLEAP-2の発現量や分泌、グレリンの肝臓での作用を詳細に検討し、最終的には、ヒト糖尿病や肥満症、NAFLDでLEAP-2を測定し病態との関連を明らかにする。

### 3. 研究の方法

肝細胞と胃におけるグレリンとLEAP-2の役割

Hepa1-6、AML12、HepG2など肝細胞由来の培養細胞をグレリンとLEAP-2で刺激して、それぞれの発現量と糖新生、解糖系、脂質代謝に関する遺伝子群の発現量変化を解析する。肝細胞をパルミチン酸やサイトカインで刺激したモデルでグレリン、LEAP-2、GHSRなどの発現量を測定する。

病態モデル動物の抗LEAP-2抗体による治療効果の検証

高脂肪食負荷マウス、db/dbマウス、NASH食負荷マウスなどで、各組織におけるLEAP-2発現量と血中濃度を測定する。抗LEAP-2マウスモノクローナル抗体をこれらの実験動物に投与して、摂食量、体重、血糖など測定する。肝臓のグリコーゲンや中性脂肪含量を測定し、糖脂質代謝に関連する遺伝子群の発現量変化を解析することで、抗LEAP-2抗体による治療効果を検証す

る。

#### ヒトを対象とした臨床研究

グレリンと拮抗する新規のペプチドである LEAP-2 の血中濃度を測定し BMI や血糖値と相関関係を調べることで、LEAP-2 の肥満症や糖尿病、肝障害の病態における役割を解析する。さらに本来の抗菌ペプチドとしての役割を検証する目的で、髄膜炎患者の血中と髄液中の LEAP-2 を測定する。

##### (1) 食事負荷後の血中 LEAP-2 の分泌動態と糖脂質代謝の関連

健常者、2 型糖尿病、肥満症を対象として、食事負荷試験 (Meal tolerance test: MTT) を行う。試験食の摂取前、摂取開始後経時的に採血を行い、LEAP-2、血糖、インスリン、グレリン、成長ホルモン等を測定する。

##### (2) 内分泌代謝疾患と血中 LEAP-2 の関連

グレリンが成長ホルモン分泌を促進することから、下垂体腫瘍など内分泌疾患で LEAP-2、血糖、インスリン、グレリン、成長ホルモン等を治療前後で解析する。NASH 患者を対象として、肝機能や NASH スコアと LEAP-2 との関連を解析する。

##### (3) 脳炎、髄膜炎と血中・髄液中 LEAP-2 の関連

LEAP-2 は、抗菌ペプチドとしての作用を有しており、感染症や炎症で増加することが予想される。予備検討で髄液中に LEAP-2 が存在する結果を得ている。感染性髄膜炎、自己免疫性髄膜炎の治療前後に採血と腰椎穿刺で髄液採取を行い、LEAP-2、血糖、インスリン、グレリン、成長ホルモン等を測定する。

#### 4. 研究成果

生理活性ペプチドは、ホルモンとしての役割に加えて、自律神経や免疫を介した多臓器関連で生体の恒常性維持に働く。肝臓や腸管から分泌される抗菌ペプチド LEAP2 が、グレリン受容体の内因性アンタゴニストで、グレリンの成長ホルモン分泌と摂食亢進作用を抑制することが報告された。申請者は、LEAP2 がグレリンの血糖上昇と体温低下作用にも拮抗的に働く一方で、グレリンが肝臓での LEAP2 発現を抑制することから、グレリンと LEAP2 は、摂食と成長ホルモン分泌調節に関わる胃・肝臓臓器関連を示すことを報告した。本申請では、グレリンと LEAP2 が肝臓で糖脂質代謝を調節する分子機序を解析し、ヒト糖尿病や肥満症、NAFLD で LEAP2 を測定し病態との関連を明らかにした。

髄液中のヒト LEAP-2 の存在を世界で初めて同定した。LEAP-2 濃度は、細菌性髄膜炎の患者の髄液中で有意に増加していた。細菌性髄膜炎において、LEAP-2 は局所性に産生され、潜在的なバイオマーカーとして有用である可能性が考えられた。血中と髄液中の LEAP2 濃度は異なる動態を示すことから、LEAP2 は脳内でも産生されることが示唆された。

カロリー制限したマウスへの LEAP2 投与は、炎症を惹起しより体重減少を生じた。グレリン受容体欠損マウスでも LEAP2 が同様の効果を示すため、カロリー制限下においては、グレリン受容体を介さない作用を示すと考えられた。

2 型糖尿病患者を対象に、LEAP2 と代謝関連因子の関係を解析した。空腹時血中 LEAP2 は、体重、ウエスト周囲径、HOMA-R、血中中性脂肪濃度等の指標と正の相関を示した。高度肥満症の 39 例 (糖尿病 26 例を含む) をスリーブ状胃切除術前と 12 ヶ月後で解析した。術前血中 LEAP2 は、ROC 解析によりカットオフ値 2.88 pmol/mL、感度 80.0%、特異度 75.9% で術後の体重減少を予測した。2 型糖尿病の寛解は、カットオフ値 4.25 pmol/mL、感度 85.7%、特異度 66.7% で予測

できた。血中 LEAP2 は、減量代謝改善手術の予後予測因子としての有用性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Islam Md Nurul, Zhang Weidong, Sakai Katsuya, Nakazato Yuki, Tanida Ryota, Sakoda Hideyuki, Takei Toshiki, Takao Toshifumi, Nakazato Masamitsu	4. 巻 151
2. 論文標題 Liver-expressed antimicrobial peptide 2 functions independently of growth hormone secretagogue receptor in calorie-restricted mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 170763 ~ 170763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2022.170763	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 Sakai Katsuya, Shiomi Kazutaka, Mochizuki Hitoshi, Islam Md Nurul, Nabekura Hiroki, Tanida Ryota, Sakoda Hideyuki, Nakazato Masamitsu	4. 巻 11
2. 論文標題 Human liver expressed antimicrobial peptide 2 elevation in the cerebrospinal fluid in bacterial meningitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain and Behavior	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/brb3.2111	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	張 維東 (Zhang Weidong) (90753616)	宮崎大学・医学部・助教  (17601)	
研究分担者	イスラム エムディーヌルル (Islam Md Nurul) (10870149)	宮崎大学・医学部・研究員  (17601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	中里 雅光  (Nakazato Masamitsu)  (10180267)	宮崎大学・フロンティア科学総合研究センター・特別教授    (17601)	

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