

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07395

研究課題名（和文）新規に同定されたマイオカインを介した動脈硬化、NASH抑制効果の検証

研究課題名（英文）Investigation of the anti-atherosclerosis and NASH effects of a newly identified myokine

研究代表者

大西 俊一郎 (Onishi, Shunichiro)

国際医療福祉大学・医学部・講師

研究者番号：60894805

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、骨格筋由来の分泌因子R3hdmlが、NAFLDに果たす役割を検証した。R3hdmlノックアウトマウスを用いた実験で、R3hdml欠損が脂肪肝を悪化させ、そのメカニズムとして、R3hdmlがPIP3によるAKTシグナル伝達を促進し、METによるPTK2シグナル伝達を抑制することが示唆された。さらに、血中R3hdml抗体濃度が肝線維化マーカーであるFib-4指数と正の相関関係にあることが明らかになった。加えて、抗体スクリーニングにより、NASH関連因子としてPEPCK抗体を同定した。糖尿病患者においては、PEPCK抗体濃度が予後と関連していることも明らかし報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣の欧米化に伴い、虚血性心疾患などの動脈硬化性疾患の罹患率は増え続けており、常に我が国の死因の上位を占めている。動脈硬化は血管壁における慢性炎症に伴い、脂質の異常蓄積によって生じる。さらに脂質の肝臓への蓄積する病態に、非アルコール性脂肪肝があり、時に炎症（非アルコール性脂肪性肝炎（NASH））が慢性化し、肝硬変、肝がんを生じる。脂肪肝からNASHまでを含む一連の肝疾患（NAFLD）の罹患率は1,000万人以上であると推定されており、動脈硬化とともに、その予防法や治療法の開発は喫緊の課題である。R3hdmlとNASHとの関連を明らかにすることで、新たな治療戦略開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the role of R3hdml, a skeletal muscle-derived secretory factor, in NAFLD. Using R3hdml knockout mice, we found that R3hdml deficiency exacerbates steatosis. The mechanism is suggested to be that R3hdml promotes PIP3-mediated AKT signaling and suppresses MET-mediated PTK2 signaling. Furthermore, we found a positive correlation between serum R3hdml antibody levels and the Fib-4 index, a marker of liver fibrosis. In addition, antibody screening identified PEPCK antibody as a NASH-related factor. In diabetic patients, PEPCK antibody levels were also found to be associated with prognosis.

研究分野：糖尿病・代謝

キーワード：マイオカイン NASH NAFLD

1. 研究開始当初の背景

【動脈硬化や脂肪肝の克服は現代の我が国における喫緊の課題である】

生活習慣の欧米化に伴い、虚血性心疾患などの動脈硬化性疾患の罹患率は増え続けており、常に我が国の死因の上位を占めている。動脈硬化は血管壁における慢性炎症に伴い、脂質の異常蓄積によって生じる。さらに脂質の肝臓への蓄積する病態に、非アルコール性脂肪肝があり、時に炎症（非アルコール性脂肪性肝炎（NASH））が慢性化し、肝硬変、肝がんを生じる。脂肪肝から NASH までを含む一連の肝疾患（NAFLD）の罹患者は 1,000 万人以上であると推定されており、動脈硬化とともに、その予防法や治療法の開発は喫緊の課題である。本研究は我々が同定した新規マイオカイン R3hdm1 の動脈硬化や NASH に対する効果を検証することにある。

【筋衛星細胞分泌蛋白 R3h domain containing-like (R3hdm1) の発見】

申請者らのグループはこれまで腎系球体発現遺伝子の同定とその機能解析を行ってきた。この目的のため新しいマウス系球体採取方法を確立（Am J Pathol 2002）し、マウス系球体特異的 cDNA ライブラリーや系球体特異的 cDNA マイクロアレーを作成し、新たな系球体特異的遺伝子を同定しその機能解析を行ってきた（EMBO J 2006）。この過程で系球体特異的な遺伝子の一つとして R3hdm1 遺伝子を同定した。R3hdm1 は正常な状態では系球体に特異的に発現が観察される。機能解析を行った所、transforming growth factor beta (TGF- β) の細胞内シグナルのうち p38MAPK を阻害し、系球体構成細胞の一つであるポドサイトのアポトーシスや細胞老化の抑制に関与していることを明らかにした（論文投稿中）。さらに近年のゲノムワイド関連解析にて R3hdm1 遺伝子がアジア人や日本人の 2 型糖尿病の発症に関連する候補遺伝子の一つである可能性が報告された（Nat Genet 2011、PLoS One 2013、Diabetes Metab Res Rev. 2017）。そこで R3hdm1 遺伝子と糖尿病との関連を検討する目的で、糖尿病を含む病的な条件における腎外組織での R3hdm1 の発現様式を検討したところ、肥満 2 型糖尿病モデルマウス (db/db マウス) の骨格筋で発現が増加した。さらに骨格筋にコブラ毒であるカルジオトキシン (CTX: Cobra cardiotoxin) やグリセロールを注入し傷害すると障害前には殆ど検出されない R3hdm1 が、筋細胞の再生時期に一致して遺伝子レベル、タンパクレベルでの発現増加が観察された。さらに R3hdm1 発現細胞の同定を目的にマウス筋衛星細胞を単離し、R3hdm1 を観察したところ、単離衛星細胞で発現し、さらに分化に伴ってその発現が増加することを明らかにした。この発見を契機に、これまで申請者は活性化した筋衛星細胞から分泌される R3hdm1 は筋衛星細胞の増殖や分化を促し、骨格筋の発達や再生に重要な役割を果たすことを明らかにし報告した（EMBO rep 2019）。

2. 研究の目的

本研究の目的は R3hdm1 を将来、動脈硬化や NASH の新たな治療に結び付けるべく 動脈硬化や NASH モデルマウスに対する R3hdm1 の役割とそのメカニズム解析と、R3hdm1 を実臨床に結び付けるために血液中 R3hdm1 濃度を測定しその臨床的意義を明らかにすることである。さらに新たな NASH をはじめとした代謝関連疾患マーカーを開発することとした。

3. 研究の方法

(1) R3hdm1 ノックアウトマウスの表現型を野生型マウスと比較する

(2) 血中 R3hdml タンパク濃度を ELISA 法で、R3hdml 自己抗体を Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay (AlphaLISA)法で測定し、臨床所見との関連を検討。

(3) 新たな代謝関連マーカーの開発

4. 研究成果

(1) R3hdml ノックアウトマウスの表現型を野生型マウスと比較

R3hdml ノックアウトマウス (KO) にマウス NASH モデルであるコリンメチオニン欠乏食を負荷することで野生型に比し脂肪肝が悪化した (図1)

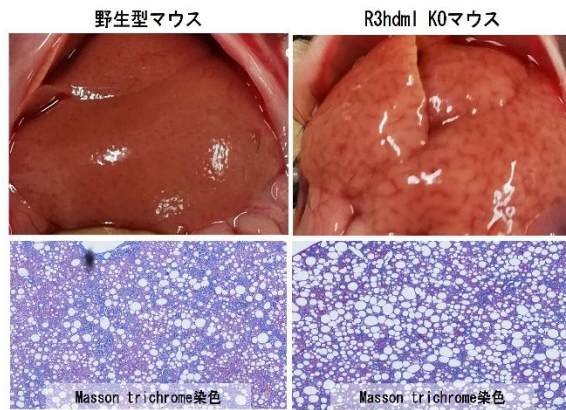


図1 コリン欠乏高脂肪食飼料 (CDAHFD)

R3hdml の欠損に伴う脂肪肝の悪化のメカニズムを検討するため、R3hdml ノックアウトマウス (KO) と野生型マウス (WT) の胎児肝臓から RNA と抽出し Illumina NextSeq 500 を用いて RNA-seq 解析を行った。発現変動解析、階層的クラスタリング、Gene Ontology エンリッチメント解析などを行った。その結果、R3hdml の欠損に伴い、肝臓において Glucose metabolism、

Gluconeogenesis、PIP3 activates AKT signaling などが低下し、MET activates PTK2 signaling が増加することが明らかとなった。

(2) 血中 R3hdml 抗体濃度測定の臨床所見との関連を検討

健常人ならびに糖尿病患者の血中抗 R3hdml 抗体濃度を測定し、その臨床的意義を検討する。研究同意が得られた健常人 (96 名)、糖尿病患者 (274 名) を対象とした。

R3hdml タンパクの一部を GST (glutathione S-transferases)-融合タンパクとして大腸菌で発現させ、glutathione-Sepharose を用いてアフィニティ精製をした。この精製タンパク質を抗原として、glutathione-donor beads と anti-human-IgG-acceptorbeads を用いて Alpha (amplified luminescent proximity homogeneous assay)-LISA 法により血清抗体レベルを測定した。その結果、健常人では抗 R3hdml 抗体濃度は GPT ($r = 0.254$, $p = 0.12$) と相関し、糖尿病患者では抗 R3hdml 抗体濃度は BMI ($r = 0.266$, $p < 0.001$)、GOT ($r = 0.276$, $p < 0.001$)、GPT ($r = 0.284$, $p < 0.001$)、GGT ($r = 0.230$, $p < 0.001$)、HbA1c ($r = 0.166$, $p = 0.006$)、TG ($r = 0.166$, $p = 0.006$)、HDLC ($r = -0.141$, $p = 0.021$)、UA ($r = 0.218$, $p < 0.001$) と代謝関連因子との関連が観察された。この結果より R3hdml に対する抗体が産生され、その作用が阻害されることで非アルコール性脂肪肝の発症・進展が進行することが考察された。

(3) 血中 PEPCK 抗体と糖尿病との関連

さらに新たな代謝関連疾患マーカー探索を行った。我々は、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PEPCK)に注目した。自己抗体は、細胞破壊により細胞内タンパク質が漏れ出し産生され、繰り返しの漏れ出しは抗体値を上昇させる。特にインスリン抵抗性を有する糖尿病患者は糖新生が亢進し、さらに NAFLD NASH を合併しやすいため、肝細胞から PEPCK が漏れ、抗体値を上昇させるとの仮説で研究を進めた。R3hdmI 抗体を測定した健常者(96名)、糖尿病患者(274名)を対象とした。その結果、図2に示すように糖尿病患者では有意に PEPCK 抗体が上昇していることを明らかにした。

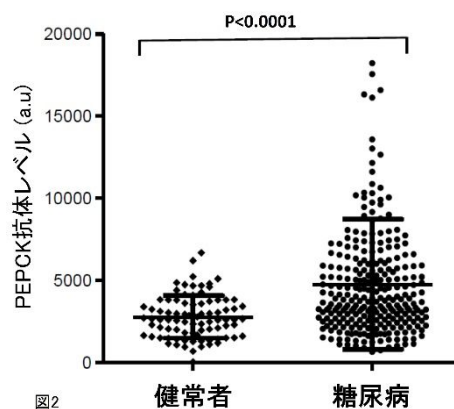


図2

続いて、糖尿病患者で PEPCK 抗体と臨床所見との関連を検討した所、高血圧患者の方が非高血圧患者よりも抗体値が高かった。

項目		
男女	男性	女性
Sample number	156	119
PEPCK抗体	4,823	4,692
P value (vs 男性)		0.5812
DM type	Type-1 DM	Type-2 DM
Sample number	28	215
PEPCK抗体	3,866	5,058
P value (vs 1型糖尿病)		0.0642
肥満	BMI < 25	BMI ≥ 25
Sample number	156	114
PEPCK抗体	5,066	4,379
P value (vs BMI < 25)		0.3676
高血圧	高血圧なし	高血圧あり
Sample number	144	240
PEPCK抗体	6,105	7,666
P value (vs 高血圧なし)		0.0198*
心疾患の既往	なし	あり
Sample number	257	18
s-PCK1-Ab level	4,791	4,415
P value (vs 心疾患なし)		0.7568
脂質異常症	なし	あり
Sample number	237	26
PEPCK抗体	4,955	3,767
P value (vs 脂質異常症なし)		0.0941
喫煙	Non-smoker	Smoker
Sample number	142	131
PEPCK抗体	4,491	5,015
P value (vs 喫煙なし)		0.5445
アルコールの有無	なし	あり
Sample number	160	114
PEPCK抗体	4,560	5,071
P value (vs アルコールなし)		0.9975

表1 糖尿病患者血中 PEPCK 抗体濃度と臨床所見

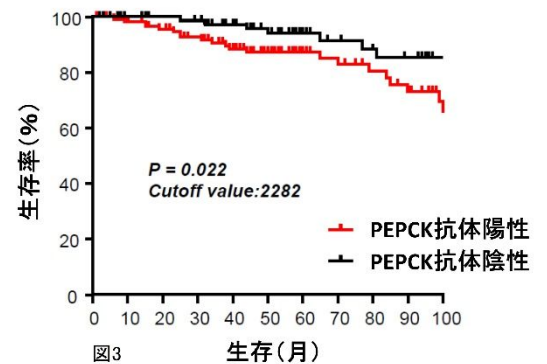
さらに糖尿病患者の臨床所見と抗体値の相関分析では、抗体値と年齢、Ca 値、CPK、血小板数、血圧の間に有意な相関が見られた(表2)。

	r value	P value
年齢	0.1777	0.0032*
体重 (kg)	-0.1072	0.0766
BMI	-0.0364	0.5515
AST	0.1024	0.0926
ALT	-0.0152	0.8027
TP	0.0342	0.5905
UA	0.0568	0.3548
T-CHO	0.0434	0.5189
NA	-0.0517	0.4027
K	0.0323	0.6022
CL	0.0411	0.5065
Ca	-0.2075	0.0312*
G-GTP	0.0353	0.5648
CHE	-0.1264	0.1102
TG	0.0842	0.1669
Creatinin	0.0203	0.7390
eGFR	0.1043	0.0865
CPK	-0.1567	0.0176*
GLU	0.0480	0.4358
HbA1c	-0.0460	0.4515
LDL-CHO	0.1172	0.0596
GA	-0.1362	0.1098
HDL-CHO	-0.0634	0.3028
WBC	-0.0056	0.9307
RBC	-0.0661	0.3058
PLT	-0.1851	0.0039*
血圧	0.1571	0.0092*

表 2 糖尿病患者血中 PEPCK 抗体濃度と臨床検査

最後に、PEPCK 抗体の予測価値を評価するために ROC 曲線解析を行い、Youden 指数のカットオフ値を設定した。DM 患者を 100 ヶ月経過観察し、生存率をカットオフ値上下で比較した。期間中には 33 の死亡例が確認され、死因は心筋梗塞 2 例、脳梗塞 1 例、がん 12 例、死因不明 18 例。抗体高値の方が低値よりも予後不良であることが確認された ($P = 0.022$) (図 3)。

本研究により R3hdml の機能低下は NAFLD、NASH を悪化させ、臨床的には R3hdml 抗体によって R3hdml の機能が阻害されることにより肝障害を含めた代謝関連疾患と関連する可能性が示唆された。さらに本研究を通じて、新たな代謝関連マーカーとして PEPCK 抗体が同定され、PEPCK 抗体は DM 患者の新たな予後予測マーカーとなり得る可能性がある。PEPCK 抗体に関して BMC Endocr Disord.;23(1):239 に報告した。



死因: 2名 心筋梗塞、1名 脳梗塞、12名 悪性新生物、18名 不明

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshida Tomohiko, Masuyama Hidenori, Yamagata Hiroki, Miyabayashi Makoto, Onishi Shunichiro, Inaba Yosuke, Takemoto Minoru	4. 巻 6
2. 論文標題 The Incidence and Risk Factors of Hyponatremia in Pulmonary Tuberculosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Endocrine Society	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/jendso/bvac130	査読の有無 無
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 Miyabayashi Makoto, Onishi Shunichiro, Yoshida Tomohiko, Takemoto Minoru	4. 巻 17
2. 論文標題 A case of doxorubicin and cyclophosphamide therapy-induced type 1 diabetes: a case report	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Medical Case Reports	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13256-023-03755-x	査読の有無 無
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 Yamagata Hiroki, Hayashi Aiko, Yoshida Yoich, Koshizaka Masaya, Onishi Shunichiro, Yoshida Tomohiko, Hiwasa Takaki, Takemoto Minoru	4. 巻 13
2. 論文標題 Association of high proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 antibody level with poor prognosis in patients with diabetes: a prospective study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-32644-y	査読の有無 無
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 -

〔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	竹本 稔 (Takemoto Minoru) (60447307)	国際医療福祉大学・医学部・主任教授 (32206)	

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
---------	---------