

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月1日現在

機関番号：13301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791022
 研究課題名（和文） 新規インスリン抵抗性へパトカインセレノプロテインPを標的とした糖尿病治療法の探索
 研究課題名（英文） Screening for therapies of diabetes targeting novel hepatokine selenoprotein P that induces insulin resistance
 研究代表者
 御簾 博文 (MISU HIROFUMI)
 金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任助教
 研究者番号：80447680

研究成果の概要（和文）：抗糖尿病薬メトホルミンが AMP キナーゼ/Foxo3 経路を介して肝細胞でインスリン抵抗性誘導へパトカインであるセレノプロテインPの遺伝子発現を減弱させることを見出した。C2C12 筋細胞において、セレノプロテインP受容体の強い候補として膜タンパク候補1を同定した。今後、肝でのAMPキナーゼ/Foxo3経路および筋でのセレノプロテインP/膜タンパク候補1経路が新たな2型糖尿病の治療標的になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Antidiabetic drug metformin was shown to reduce selenoprotein P gene expression via AMP kinase/Foxo3 pathway in the cultured hepatocytes. Membrane protein X was identified as a strong candidate of the receptor of selenoprotein P in C2C12 myocytes. It is expected that AMPK/Foxo3 pathway in the liver and selenoprotein P/membrane protein 1 pathway in the muscle are novel therapeutic targets for type 2 diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：糖尿病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー、糖代謝異常、へパトカイン

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに、ヒト肝臓に発現している網羅的な遺伝子情報を利用して (*Diabetologia* 2007 H. Misu et al.)、肝臓由来分泌タンパクであるセレノプロテインPがインスリン抵抗性を誘導し高血糖を発症させる“糖尿病関連へパトカイン”であることを報告した (*Cell Metabolism* 2010 H. Misu et al.)。へパトカインセレノプロテインPの産生が2型糖尿病状態で亢進すること、セレノプロテインPノックアウトマウスは耐糖能が良好で肝臓や骨格筋でのインスリンシグナルが増強していることから、セレノプロテインPの作用を抑制することが2型糖尿病に対するまったく新しい治療法の開発につながることを強く示唆された。しかし、実

際にヒトにおいてへパトカインであるセレノプロテインPの作用を抑制する手段はまだ確立されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、セレノプロテインPを標的とした新しい2型糖尿病の治療を展開するための研究基盤を確立するために、肝細胞でのセレノプロテインP産生メカニズムの解明と標的細胞でのセレノプロテインP作用メカニズムの解明を目的とした。特に、肝細胞でセレノプロテインP遺伝子発現を抑制させる薬剤の検索ならびに標的細胞でのセレノプロテインP受容体の探索を重点的に研究をおこなった。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞におけるセレノプロテインP産生

抑制薬の探索

糖新生系を有しておりかつインスリンシグナル伝達系を明確に有しているラット肝癌由来培養細胞株である H4IIEC 細胞に各種の候補薬剤を処置し、セレノプロテイン P 遺伝子の発現量を Realtime PCR 法で、セレノプロテイン P 遺伝子の転写活性をルシフェラーゼアッセイ法で測定した。

(2) セレノプロテイン P の脂肪組織に対する作用の検討

SeP 欠損マウスにおいて、脂肪由来因子であり抗糖尿病、抗動脈硬化作用を有するとされるアディポネクチンの血中濃度を ELISA 法を用いて測定した。また、2 型糖尿病患者の血中アディポネクチン濃度を ELISA 法で測定し、セレノプロテイン P 濃度と比較検討した。

(3) 筋細胞におけるセレノプロテイン P 受容体の同定

代謝領域の実験において頻用される C2C12 筋管細胞において、セレノプロテイン P の受容体タンパクの候補となるタンパクを、RNAi 法を用いてノックダウンし、ノックダウンの作用を検討した。

4. 研究成果

(1) 肝細胞におけるセレノプロテイン P 産生抑制薬の探索

いくつかの薬剤を探索した結果、抗糖尿病薬として臨床使用されているメトフォルミンが、肝細胞におけるセレノプロテイン P 遺伝子発現を抑制することを見出した (図 1)。さらにメトフォルミンの下流において、AMP キナーゼ経路の下流で転写因子である Foxo3 がセレノプロテイン P 遺伝子の転写に関わっていることを見出した (図 2)。抗糖尿病薬メトフォルミンの新たな薬理機序が見出された (論文投稿中)。さらに、肝細胞での AMP キナーゼ/Foxo3 経路が 2 型糖尿病の新たな治療標的であることが強く示唆された。

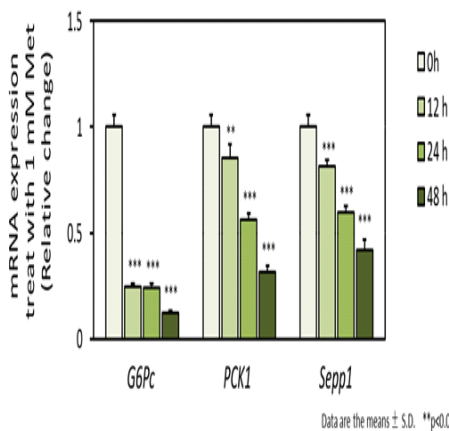


図 1. H4 肝細胞におけるメトフォルミンによるセレノプロテイン P 遺伝子の抑制

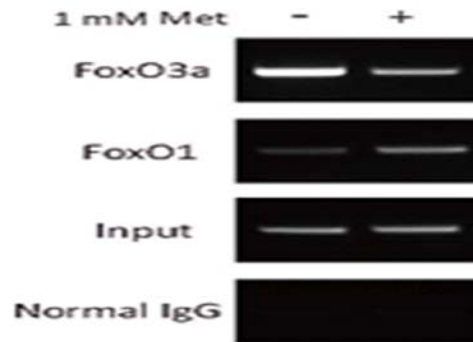


図 2. メトフォルミンによる Foxo3 転写活性の抑制

また、抗高脂血症薬として臨床使用されている ω 3 系脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) が、H4IIEC 肝細胞でのセレノプロテイン P 遺伝子発現および転写活性を抑制することを見出した (論文投稿中)。EPA はインスリン抵抗性へパトカインセレノプロテイン P の肝での産生を抑制することで、2 型糖尿病でみられるインスリン抵抗性を軽減している可能性がある。

(2) セレノプロテイン P の脂肪組織に対する作用の検討

セレノプロテイン P の脂肪組織への作用に関して、2 型糖尿病患者の血中セレノプロテイン P 濃度が、脂肪由来ホルモンであるアディポネクチン濃度と負に相関していること (図 3)、ならびにセレノプロテイン P を欠損させたホモノックアウトマウスでは、血中のアディポネクチン濃度が有意に上昇していること (図 4) を見出し論文報告した (PLoS ONE 2012 H. Mitsu et al.). この結果は、肝臓由来ホルモンであるセレノプロテイン P が脂肪由来ホルモンであるアディポネクチンの産生を抑制するという”肝臓-脂肪組織連関”の存在を強く示唆した。

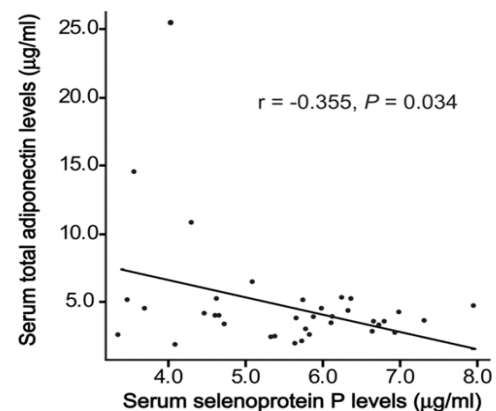


図 3. 糖尿病患者における血中セレノプロテイン P とアディポネクチンの負の相関

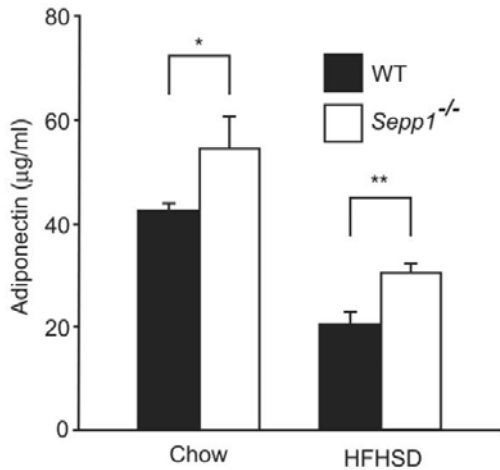


図 4. セレノプロテイン P 欠損マウスにおける高アディポネクチン血症

(3) 筋細胞におけるセレノプロテイン P 受容体の同定

C2C12 筋管細胞において、いくつかの候補タンパクの遺伝子発現を検討した (図 5)。その結果から、筋細胞で発現量の高いセレノプロテイン P 受容体候補膜タンパクを同定した。RNAi 法を用いたノックダウン実験をおこなった結果、膜タンパク候補 1 をノックダウンするとセレノプロテイン P 投与による細胞へのセレン供給が減弱することを見出した。さらに、膜タンパク X をノックダウンすると、セレノプロテイン P 投与によるミトコンドリア関連遺伝子 PGC-1 α に対する抑制効果は消失した (図 6)。この結果は膜タンパク X がセレノプロテイン P の受容体として機能することを強く示唆する。今後、セレノプロテイン P/膜タンパク X 経路が新たな 2 型糖尿病の治療標的になることが期待される。

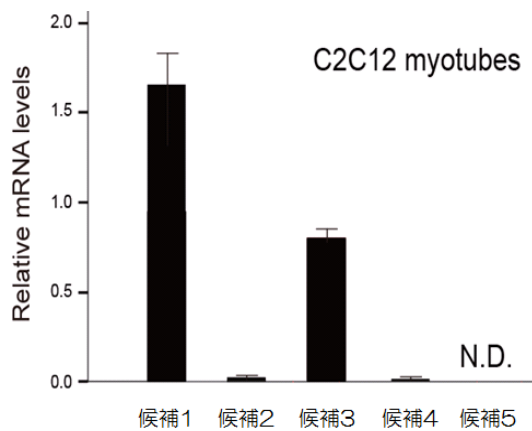


図 5. C2C12 筋管細胞でのセレノプロテイン P 受容体候補膜タンパクの遺伝子発現

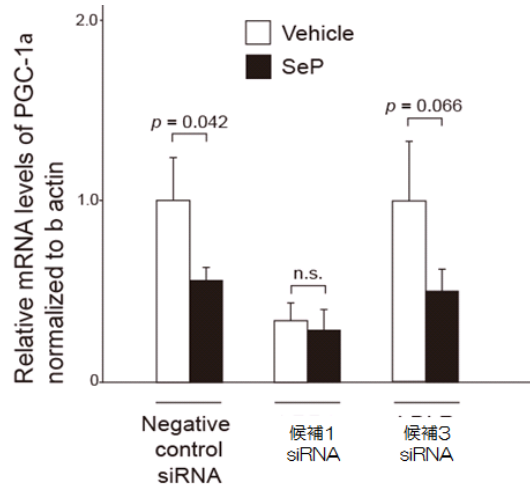


図 6. 候補膜タンパクのノックダウンがセレノプロテイン P 作用におよぼす影響

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 12 件)

①Otoda T, Takamura T, Misu H, (他 21 名) Proteasome dysfunction mediates obesity-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. *Diabetes*. 2013 62(3):811-24. 査読あり doi: 10.2337/db11-1652.

②Kita Y, Takamura T, Misu H (他 16 名) Metformin prevents and reverses inflammation in a non-diabetic mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One*. 2012;7(9):e43056. 査読あり doi: 10.1371/journal.pone.0043056.

③Takamura T, Misu H, (他 2 名) Fatty liver as a consequence and cause of insulin resistance: lessons from type 2 diabetic liver. *Endocr J*. 2012 30;59(9):745-63. 査読あり

④Misu H, (他 8 名) Regulation of glucose metabolism by liver-derived secretory proteins 'hepatokines'. *Nihon Rinsho*. 2012 ;70 Suppl 3:207-11. Japanese. 査読なし

⑤Kato K, Takeshita Y, Misu H, (他 5 名) Duodenal adenocarcinoma with neuroendocrine features in a patient with acromegaly and thyroid papillary adenocarcinoma: a unique combination of endocrine neoplasia. *Endocr J*. 2012 30;59(9):791-6. 査読あり

⑥Ando H, Kurita S, Shimizu A, Kato K, Ishikura K, Tajiri K, Uno M, Takeshita Y, Misu H (他 3 名) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of insulin aspart in patients with type 2 diabetes: assessment using a meal tolerance test under clinical conditions. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2012;39(6):528-34. 査読あり doi:10.1111/j.1440-1681.2012.05708.x.

⑦Takeshita Y, Takamura T, Kita Y, Ando H, Ueda T, Kato K, Misu H, (他 6 名) Beneficial effect of branched-chain amino acid supplementation on glycemic control in chronic hepatitis C patients with insulin resistance: implications for type 2 diabetes. Metabolism. 2012 ;61(10):1388-94. 査読あり doi: 10.1016/j.metabol.2012.03.011.

⑧Misu H, (他 8 名) Inverse correlation between serum levels of selenoprotein P and adiponectin in patients with type 2 diabetes. PLoS One. 2012;7(4):e34952. 査読あり doi: 10.1371/journal.pone.0034952.

⑨Misu H, (他 2 名) Novel strategies that target hepatokines for treatment of type 2 diabetes. Nihon Rinsho. 2012 ;70(1):157-63. Review. Japanese. 査読なし

⑩ Takeshita Y, Takamura T, Inoue O, Okumura M, Kato K, Sunagozaka H, Arai K, Misu H, (他 3 名) Slowly progressive insulin-dependent diabetes in a patient with primary biliary cirrhosis with portal hypertension-type progression. Intern Med. 2012;51(1):79-82. 査読あり

⑪ Iwakami S*, Misu H*, (他 5 名) Concentration-dependent dual effects of hydrogen peroxide on insulin signal transduction in H4IIEC hepatocytes. PLoS One. 2011;6(11):e27401. 査読あり doi: 10.1371/journal.pone.0027401. *Equal Contribution

⑫ Takamura T, Misu H, (他 1 名) The cutting-edge of medicine; clinical and molecular pathology of type 2 diabetic liver. Nihon Naika Gakkai Zasshi. 2011 10;100(6):1670-6. Japanese. 査読なし

[学会発表] (計 12 件)

①御簾博文 (他 2 名、1 番目)、インスリン抵抗性誘導へパトカインセレノプロテイン P の同定、第 48 回日本肝臓学会総会、2012 年 6 月 8 日、日航金沢ホテル、金沢市、石川県

②御簾博文 (他 5 名、1 番目)、抗酸化へパトカインセレノプロテイン P は活性酸素/AMPK/PGC1 α 経路の抑制を介して運動療法抵抗性の原因となる、第 65 回日本酸化ストレス学会学術集会、2012 年 6 月 7 日、あわぎんホール徳島県郷土文化会館、徳島市、徳島県 (酸化ストレス学会学術奨励賞受賞)

③御簾博文 (他 8 名、2 番目)、メトフォルミンは AMPK 活性化と FoxO3a 活性抑制を介してインスリン抵抗性へパトカインセレノプロテイン P の発現を抑制する、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012 年 5 月 19 日、パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県

④御簾博文 (他 6 名、2 番目)、H4IIEC 肝細胞における活性酸素のインスリンシグナルに対する二面的作用とその分子機構の解明、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012 年 5 月 19 日、パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県

⑤御簾博文 (他 7 名、1 番目)、へパトカインセレノプロテイン P は骨格筋 ROS/AMPK/PGC1 α 経路の抑制を介して運動療法抵抗性を誘導する、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012 年 5 月 19 日、パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県

⑥御簾博文 (他 5 名、3 番目)、EPA によるインスリン抵抗性誘導へパトカインセレノプロテイン P 転写活性の抑制、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012 年 5 月 19 日、パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県

⑦御簾博文 (他 4 名、1 番目)、抗酸化へパトカインセレノプロテイン P による運動療法抵抗性の発症、日本薬学会第 132 年会 特別シンポジウム、2012 年 3 月 29 日、北海道大学、札幌市、北海道

⑧御簾博文 (他 3 名、1 番目)、インスリン抵抗性誘導へパトカインセレノプロテイン P による運動療法感受性の制御に関する検討、第 26 回日本糖尿病肥満動物学会、2012 年 2 月 18 日、愛知県産業労働センター、名古屋市、愛知県

⑨御簾博文 (他 5 名、2 番目)、メトフォルミンによるインスリン抵抗性誘導へパトカインセレノプロテイン P の発現抑制に関する検討、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、

2011年5月21日、札幌プリンスホテル、札幌市、北海道

⑩御簾博文（他7名、2番目）、運動療法による脂肪肝改善の分子メカニズムに関する検討、第54回日本糖尿病学会年次学術集会、2011年5月21日、札幌プリンスホテル、札幌市、北海道

⑪御簾博文（他8名、2番目）、ヘパトカインセレンプロテインPは抗酸化能を介してインスリン抵抗性を誘導する、第54回日本糖尿病学会年次学術集会、2011年5月21日、札幌プリンスホテル、札幌市、北海道

⑫御簾博文（他9名、2番目）、2型糖尿病関連ヘパトカインセレンプロテインPの血管新生抑制作用に関する検討、第84回日本内分泌学会学術総会、2011年4月23日、神戸国際会議場、神戸市、兵庫県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

御簾 博文 (MISU HIROFUMI)

金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任助教

研究者番号：80447680

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし