

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790938

研究課題名(和文) サイトカインLECT2の糖尿病性血管障害における役割解析

研究課題名(英文) Relationship between LECT2 and diabetic microvascular complications

研究代表者

奥村 彰規 (Okumura, Akinori)

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：90392357

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)：サイトカインLECT2について、肥満、糖尿病および糖尿病性細小血管障害に対してどのような変動があるかを、ヒト血清中の濃度を測定し、比較解析した。まず、糖尿病ではない人間ドック被験者では、肥満であると血清LECT2濃度は、非肥満者に比べ有意に高く、加えて脂肪肝を呈するとLECT2濃度が高値を示した。また、インスリン抵抗性とも正の相関を示した。次に、糖尿病患者で血清LECT2濃度を測定すると、LECT2は糖尿病そのものよりも三大合併症の一つである糖尿病網膜症に強く関連する因子であることが明らかとなった。これらから、LECT2は肥満関連因子であり、糖尿病網膜症の発症に關与する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) is an anti-inflammatory molecule expressed in the liver. However, the clinical relevance of LECT2 in obesity and diabetes is unknown. The objective of this study was to determine whether serum LECT2 levels are affected by of obesity, diabetes, and its microvascular complications. A cross sectional study comprising 493 subjects were tested for LECT2 using a highly sensitive assay. The present study indicates that serum LECT2 levels are increased by obesity and decreased in diabetic retinopathy. These results suggest that LECT2 is a novel obesity-related protein and associated with the presence of diabetic retinopathy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：糖尿病 細小血管障害 肥満 LECT2

1. 研究開始当初の背景

糖尿病における血管障害は、最も深刻な合併症であるにもかかわらず自覚症状がなく進行する。その原因、発症機序について、これまで多くの研究がなされ、徐々に明らかになりつつあるが、より効果的な治療法の確立のためにはさらなる研究が必要である。また2型糖尿病に密接に関連する肥満の関連因子にも合併症への関与が多数報告されている。特に、炎症系・炎症系サイトカインが脂肪細胞、骨格筋細胞、肝細胞など多様な臓器・器官より血中に放出され血管障害を進展または抑制していることが明らかとなっている。

サイトカイン LECT2 (Leukocyte cell-derived chemotaxin 2) は、Yamagoe らにより、ヒト好中球走化性因子として報告された。この LECT2 は、ホモロジー検索から哺乳動物において何ら類似のタンパク質が見つからず、ファミリーをつくらない生体内で単一のものでありながらも、脊椎動物で高度に保存されている。哺乳類では、肝細胞で特異的に産生され、恒常的に血中に分泌されている。我々は、LECT2 がこれまでに肝炎や関節炎の発症・進展において抗炎症的に作用することを報告してきた。しかし、肥満や糖尿病をはじめとする代謝性疾患との関連については全く不明であった。

2. 研究の目的

これまで LECT2 については白血球、肝細胞、軟骨細胞、骨芽細胞等に対する機能が報告されているものの、糖尿病性細小血管障害に関連する血管内皮細胞をはじめとする各種細胞に対する機能とその作用機序については報告がない。それだけでなく、糖尿病など生活習慣病に対しては LECT2 の血中レベルの変動の有無すら報告がないため、LECT2 が糖尿病の診断、糖尿病性血管障害に対する治療の新しいターゲットの一つとなる可能性を探索することを目的とした。また、同時に生理活性を持つ LECT2 がどのような高次構造となっているかを明らかにすることも活性探索および創薬上、重要となる情報であるため解析を行った。

3. 研究の方法

(1) ヒト血清を使った血中 LECT2 濃度測定

既存のヒト LECT2 ELISA は、血漿用であり、血清に不応であったため、血清測定を可能とするべく測定条件の至適化を行った。従来の ELISA 法にて血清の測定を行った結果、リコンビナント LECT2 の添加回収試験で回収率はわずか 60% 未満であったが、血清に 300mM 塩化ナトリウムを添加することで、添加回収試験にて 95% 以上の回収率を得ることができたため、以降の血清測定を改良 ELISA 法で行った。

(2) 非糖尿病被験者の血中 LECT2 濃度測定

国立国際医療研究センターの人間ドックを受診した日本人からインフォームドコンセントが取れたうち、年齢 40 から 69 歳、過去 5 年間癌の罹病歴なし、ヘモグロビン A1c が 6.5% 未満、糖尿病・高血圧・高脂血症に関する内服薬なしの条件で選抜した 231 人 (男性 113 人、女性 118 人) より血清中 LECT2 濃度を測定し、体格指数などの身体測定結果や血液検査による各検査値、腹部エコーによる脂肪肝の有無に対して単相関解析を行った。相関関係が認められた因子については多重回帰分析を行い、血中 LECT2 濃度と独立して関与する因子の探索を行った。

(3) 糖尿病患者の血中 LECT2 濃度測定

国立国際医療研究センターを受診した 2 型糖尿病日本人患者からインフォームドコンセントが取れたうち、年齢 40 から 69 歳、過去 5 年間癌の罹病歴なし、採血より前後 1 年以内に糖尿病細小血管障害 (神経障害、網膜症、腎症) の診断がなされているという条件で 262 人 (男性 178 人、女性 84 人) を選抜した。血清中 LECT2 濃度を測定し、体格指数などの身体測定結果や血液および尿検査による各検査値、糖尿病細小血管障害の有無に対して単相関解析を行った。相関関係が認められた因子については多重回帰分析を行い、血中 LECT2 濃度と独立して関与する因子の探索を行った。

(4) LECT2 の高次構造解析

既に確立されているリコンビナント LECT2 分泌 CHO 細胞の培養上清よりリコンビナント LECT2 を精製した。金属イオンの結合確認は、エレクトロスプレーイオン化法によるマスマスペクトロメトリー解析およびエックス線吸収微細構造分析により解析した。

タンパク質立体構造予測サーバーである Robetta (<http://rosetta.bakerlab.org/>) で、シグナル配列を含まないヒト LECT2 の配列の構造予測を行った。さらに、この予測されたモデルへ、これまでの SS 結合などの知見を組み込む操作は、タンパク質構造解析ソフトの MOE で行った。

4. 研究成果

(1) 肥満や脂肪肝を呈すると血清中 LECT2 濃度が上昇する

健常者と考えられる人間ドック受診者 231 名の血中 LECT2 濃度は 43.5 ± 13.6 ng/ml であり、体格指数 (BMI)、腹囲、ウエスト・ヒップ比、ウエスト・身長比と正の相関を示した。

肥満患者の血中 LECT2 濃度は、非肥満者に比べ有意に高いことが明らかとなった。加えて、脂肪肝を呈すると LECT2 濃度は高値を示すことも見出した。また、肥満と関連の強いインスリン抵抗性とも正の相関を示した (図 1)。この結果は、LECT2 は新規の肥満関連因子であることを示唆している。

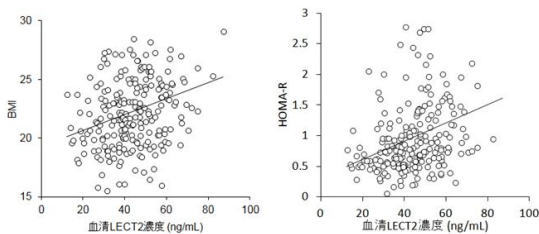


図1 血中LECT2濃度は肥満とインスリン抵抗性に正の相関が認められる

(2) 糖尿病性網膜症患者では血清中LECT2濃度が低下している

肥満およびインスリン抵抗性に相関が認められたため、糖尿病患者血清のLECT2濃度を測定した。その結果、見かけ上は若干低下傾向がみられていたが、糖尿病細小血管障害ごとに検討した結果、糖尿病網膜症のみが有意に血中LECT2の平均濃度が低くなることを見出した。単相関解析の結果でも、網膜症の有無は独立した規定因子であり、逆に網膜症のロジスティック回帰分析でもLECT2は独立した規定因子となった。この相関関係は、性別、年齢、BMI、ヘモグロビンA1c、血圧、中性脂肪、 β -GTPなどで調整しても有意であった。これらの結果より、LECT2は糖尿病そのものよりも糖尿病網膜症に強く関連する因子であることが明らかとなった。

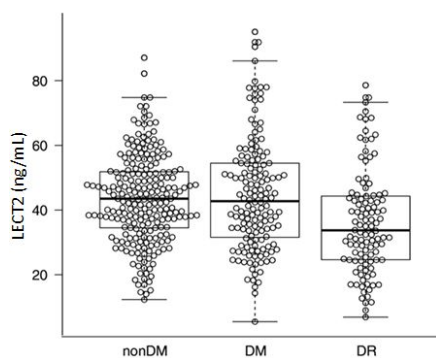


図2 血中LECT2濃度は網膜症を併発しない場合、健常者と差は無いが、網膜症を発症すると有意に低値を示す。

(3) LECT2の機能に関する構造解析

これまでの研究において、培養細胞に組換えLECT2を添加して解析を行う中で、活性が安定しないケースが生じたため、LECT2のタンパク化学的解析を行った。Pfamデータベースによるアミノ酸配列の隠れマルコフモデル解析では、LECT2のC末端3分の2に及ぶ領域は、亜鉛イオンを活性中心にもつタンパク質であるペプチダーゼM23のグループに分類されることが明らかとなった。しかしLECT2が亜鉛イオンを結合しているかは不明であった。そこで、LECT2の生理活性の探索

の一環として、亜鉛イオン結合タンパク質であるか否かをエレクトロスプレーイオン化法によるマスペクトロメトリー解析およびエクス線吸収微細構造分析により解析した。その結果、LECT2は亜鉛結合タンパク質であることを明らかとした。

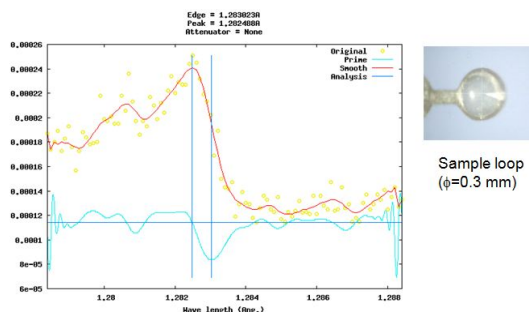


図3 エクス線吸収微細構造分析によるLECT2に結合する亜鉛原子の特定

さらに、LECT2をEDTA等で処理することで、亜鉛イオンの除去を試みるとLECT2がオリゴマー化することを見出した。この現象は塩化亜鉛の添加により抑制することができること、加熱することで十数量体の特異的な会合をすることも明らかとなった。

これまでに得られた知見を統合するために、タンパク質立体構造予測サーバーRobettaにLECT2の配列を予測させたところ、5つの候補が得られた。このうち1つの候補のみ我々が同定したLECT2のジスルフィド結合が3組とも妥当な位置にあり、かつ、リゾスタフィン様の亜鉛結合モチーフも保持されていた。この予測されたモデルを元に、1)S-S結合の生成、2)亜鉛の配位、3)水系でのエネルギー最小化計算を行った。その結果、NMRおよびCDスペクトル解析の結果と類似したシートに富み、亜鉛の結合部位が谷間に位置するような構造と予測された。なんらかのタンパク質と特異的に相互作用する可能性が考えられた。

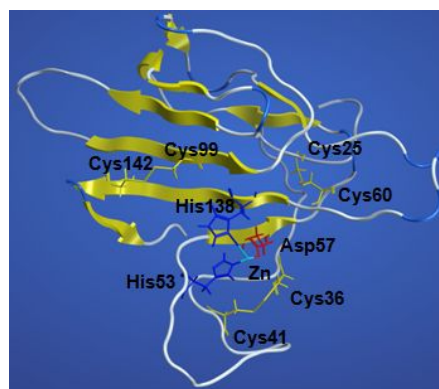


図4 in silico解析によるLECT2の高次構造予測

また、ペプチダーゼ活性をもつか否かの探索を行ったが、これまでに有効なものは見つかっていない。さらに、同一ファミリーであるリゾスタフィンが構造予測上で相同性が高いものとして見出されたため、ブドウ球菌に対する溶菌活性についても探索したが活性は確認できなかった。

今後、受容体タンパク質をはじめとする相互作用する物質の探索を試み、肥満や糖尿病網膜症への創薬ターゲットになる可能性を見出したい。

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 2件)

- (1)Akinori Okumura, Takehiro Suzuki, Hideyuki Miyatake, Tomoya Okabe, Yuki Hashimoto, Takuya Miyakawa, Hai Zheng, Hiroyuki Unoki-Kubota, Hideaki Ohno, Naoshi Dohmae, Yasushi Kaburagi, Yoshitsugu Miyazaki, Masaru Tanokura, Satoshi Yamagoe. "Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 is a zinc-binding protein" *FEBS Letters* **587**, 404-409 (2013)、査読有
DOI: 10.1016/j.febslet.2013.01.025
- (2)Akinori Okumura, Hiroyuki Unoki-Kubota, Yumi Matsushita, Tomoko Shiga, Yuriko Moriyoshi, Satoshi Yamagoe, Yasushi Kaburagi. "Increased serum leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) levels in obesity and fatty liver" *BioScience Trends* **7**, 276-283 (2013)、査読有
DOI: 10.5582/bst.2013.v7.6.276

[学会発表](計 5件)

- (1)奥村 彰規、久保田浩之、松下由実、志賀智子、森吉百合子、鍋木康志 "Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 は新規の肥満関連因子である" 第56回日本糖尿病学会年次学術集会、ホテル日航熊本ほか(熊本) 2013年5月16-18日
- (2)奥村 彰規、久保田浩之、松下由実、志賀智子、森吉百合子、鍋木康志 "血中 LECT2 濃度は肥満と脂肪肝の予測因子となりうるか" 第34回日本肥満学会、東京国際フォーラム(東京) 2013年10月11-12日
- (3)Akinori Okumura, Takehiro Suzuki, Hideyuki Miyatake, Takuya Miyakawa, Hai Zheng, Hiroyuki Unoki-Kubota, Naoshi Dohmae, Yasushi Kaburagi, Masaru Tanokura, Satoshi Yamagoe "Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 is a zinc-binding protein: the monomeric

forms are stabilized by the zinc ion" The 36th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kobe, Japan, December 3-6, 2013

- (4)奥村 彰規、久保田浩之、松下由実、本田律子、梶尾裕、野田光彦、鍋木康志 "血中タンパク質 LECT2 の糖尿病網膜症患者における血中濃度と網膜毛細血管内皮細胞への影響" 第57回日本糖尿病学会年次学術集会、大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル・ホテルNCB(大阪) 2014年5月22-24日
- (5)Akinori Okumura, Hiroyuki Kubota, Yumi Matsushita, Tomoko Shiga, Ritsuko Honda, Hiroshi Kajio, Mitsuhiro Noda, Yasushi Kaburagi "Serum leukocyte cell-derived chemotaxin 2 levels are decreased in patients with diabetic retinopathy" The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Yokohama, Japan, November 25-27, 2014

[その他]

ホームページ

肥満や脂肪肝のある患者では血清中 LECT2 濃度が上昇する

<http://www.ncgm-dmcomp.umin.jp/lect2.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥村 彰規 (OKUMURA AKINORI)

独立行政法人国立国際医療研究センター・臓器障害研究部・上級研究員

研究者番号：90392357