

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461334

研究課題名(和文)ヘパトカインセレノプロテインPによる運動療法抵抗性誘導機構の解明

研究課題名(英文)Investigation of exercise resistance induced by hepatokine selenoprotein P

研究代表者

御簾 博文 (Misu, Hirofumi)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：80447680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はこれまでに、肝由来分泌タンパクセレノプロテインP(SeP)がインスリン抵抗性を誘導して高血糖を発症させるヘパトカインであることを報告した。本研究では、SePによる運動療法抵抗性の発症という新たな病態概念を提唱した。筋肉細胞において、SePが活性酸素依存性AMPKリン酸化を減弱すること、SeP欠損マウスの運動感受性が亢進していること、SePの筋受容体がLRP1であることを見出した。SePの過剰は受容体LRP1を介して筋で活性酸素/AMPK経路を抑制することで“運動抵抗性”を惹起する。SeP/LRP1の阻害薬は運動療法の感受性を増強させる新たな2型糖尿病治療薬となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have previously identified selenoprotein P (SeP) as a type 2 diabetes-upregulated hepatokine that induces insulin resistance and hyperglycemia. In this study, we propose a novel pathological concept SeP-induced exercise resistance. We have found out that SeP impairs ROS-induced AMPK phosphorylation in cultured myotubes. SeP knockout mice showed increased sensitivity to exercise training. siRNA screening revealed that LRP1 functions as a SeP receptor in cultured myotubes. This study demonstrates that overproduction of SeP induces exercise resistance by suppressing ROS/AMPK through muscle receptor LRP1. Our study opens the door for inhibitors of SeP/LRP1 axis as new drugs for physical inactivity-associated diseases such as type 2 diabetes.

研究分野：糖尿病学

キーワード：ヘパトカイン 運動抵抗性 セレノプロテインP

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに、肝臓由来分泌タンパクであるセレノプロテイン P (以下 SeP) がインスリン抵抗性を誘導することで高血糖を発症させる“糖尿病関連ヘパトカイン”であることを報告した (Misu et al. Cell Metabolism 2010)。

この報告で、2 型糖尿病状態では肝臓での SeP 産生が過剰になること、SeP タンパクは、全身にインスリン抵抗性を誘導し高血糖を発症させることを明らかにした。活性酸素の除去に働くとしていた SeP が、むしろ糖代謝を悪化させるという結果は驚きであった。その後申請者は、活性酸素の代表である過酸化水素は、低濃度ではむしろ細胞のインスリン伝達を増強することを報告した (Misu et al. PLoS ONE 2011)。これらの結果は、一般には生体に有害とされる活性酸素が、ときに生体に有益に作用することを示唆した。

2. 研究の目的

近年、運動療法は骨格筋に活性酸素を産生させること、むしろこの活性酸素が運動の健康増進効果の担い手であることが報告された (Ristow ら PNAS 2009)。この報告から申請者は、抗酸化タンパクである SeP が運動療法によって筋で生成される活性酸素を除去してしまうことで、運動療法による健康増進効果を妨げているという仮説を立てた。本研究では、このヘパトカイン SeP による“運動療法抵抗性”の発症という仮説を、培養細胞ならびにモデルマウスを用いて検証した。また、骨格筋での SeP 受容体を同定し、筋での SeP 作用メカニズムを解明することで、SeP を標的とした“運動療法の感受性を増強する”という新たな糖尿病治療の開発にむけた、基盤的研究をおこなった。

3. 研究の方法

“SeP による運動療法抵抗性”という新たな病態概念の確立と、SeP を標的とした運動療法の感受性を増強するという新たな糖尿病治療の開発に向けて、以下の二点の研究をおこなった。

まず、SeP が運動療法の感受性に及ぼす影響を検討した。SeP 欠損マウスと C2C12 筋細胞をモデルとして、SeP が AMP キナーゼ/PGC-1 /ミトコンドリア経路におよぼす影響を検討した。次に、骨格筋での SeP 受容体を同定し、SeP の筋での作用メカニズムを解明した。最終的には受容体のノックアウトマウスを作成し、in vivo での表現型を解析した。

4. 研究成果

(1) 単回有酸素走行直後の SeP 欠損マウスの骨格筋では、TBARS、AMPK リン酸化、および PGC-1 遺伝子発現が有意に増加した。

(2) 60%高脂肪食下にて 30 日間の運動トレーニングを負荷した SeP 欠損マウスでは、運動耐容能の増加とインスリン感受性の上昇を認めた。

(3) C2C12 筋管細胞において、活性酸素種の一つである H2O2 処置は AMPK リン酸化を増強し

た。SeP タンパク前処置はこの H2O2 による AMPK リン酸化を減弱させた。

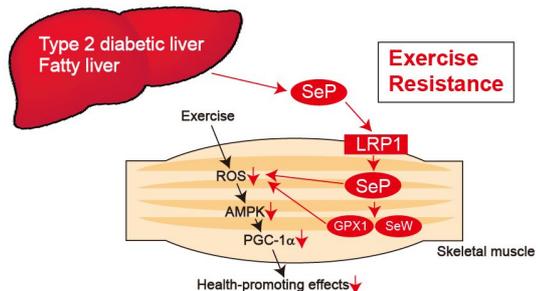
(4) siRNA によるノックダウンスクリーニングの結果、Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) をノックダウンした筋細胞において SeP 処置による GPX1 誘導が減弱することを見出した。

(5) LRP1 を発現抑制した筋細胞では細胞とアイソトープラベルした SeP の結合が有意に減少した。

(6) MCK-Cre を用いて筋特異的 LRP1 欠損マウスを作成した。このマウスでは骨格筋におけるインスリン誘導性 Akt リン酸化が増強しており、グルコースクランプで評価したインスリン依存性の抹消組織での糖取り込みもまた増加していた。

(7) 筋特異的 LRP1 欠損マウスでは、投与した SeP の筋での取り込みならびに筋における SeP による運動誘発性 AMPK リン酸化に対する減弱作用が有意に低下した。さらに、筋特異的 LRP1 欠損マウスに 30 日間の運動トレーニングを負荷すると、SeP 欠損マウスと同様に運動耐容能の増加とインスリン感受性の上昇を認めた。

以上の結果は、SeP-LRP1 経路が骨格筋において活性酸素を除去することで“運動療法抵抗性”を惹起することを示す。SeP-LRP 軸の阻害薬は、2 型糖尿病を代表とする身体活動低下に関連した疾患に対して、運動の感受性を増強する新たな治療薬になる可能性がある (下図、論文リバイズ中)。



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 14 件)

M. Tanaka, Y. Saito, H. Misu, (他 11 名) Development of a Sol Particle Homogeneous Immunoassay for Measuring Full-Length Selenoprotein P in Human Serum. *J Clin Lab Anal.* 2016 30(2) 114-22. 査読あり doi: 10.1002/jcla.21824

K. Yamada, E. Mizukoshi, H. Sunagozaka, K. Arai, T. Yamashita, Y. Takeshita, H. Misu, (他 6 名) Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic

steatohepatitis. **Liver Int.** 2015 35(2) 582-90. 査読あり doi: 10.1111/liv.12685

Y. Takeshita, T. Takamura, Y. Kita, T. Otoda, K. Kato, H. Wakakuri, M. Yamada, H. Misu, (他 2 名) Establishment of Rationale for Antiaging Diabetic Medicine Study Chapter Vildagliptin vs liraglutide as a second-line therapy switched from sitagliptin-based regimens in patients with type 2 diabetes: A randomized, parallel-group study. **J Diabetes Investig.** 2015 6(2) 192-200. 査読あり doi: 10.1111/jdi.12269

A. Takazakura, M. Sakurai, Y. Bando, H. Misu, (他 7 名) Renoprotective effects of atorvastatin compared with pravastatin on progression of early diabetic nephropathy. **J Diabetes Investig.** 2015 6(3) 346-53. 査読あり doi: 10.1111/jdi.12296

S. Matsugo, K. Kanamori, H. Sugiyama, H. Misu (他 1 名) Physiological roles of peroxido-vanadium complexes: Leitmotif as their signal transduction pathway. **J Inorg Biochem.** 2015 147 93-8. 査読あり doi: 10.1016/j.jinorgbio.2015.02.008

K. Kato, Y. Takeshita, H. Misu, (他 3 名) Liver steatosis is associated with insulin resistance in skeletal muscle rather than in the liver in Japanese patients with non-alcoholic fatty liver disease. **J Diabetes Investig.** 2015 6(2) 158-63. 査読あり doi: 10.1111/jdi.12271

Y. Takeshita, T. Takamura, M. Honda, Y. Kita, Y. Zen, K. Kato, H. Misu, (他 8 名) The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial. **Diabetologia.** 2014 57(5) 878-90. 査読あり doi: 10.1007/s00125-013-3149-9

H. Takayama, H. Misu, (他 14 名) Metformin suppresses expression of the selenoprotein P gene via an AMP-activated kinase (AMPK)/FoxO3a pathway in H4I IEC3 hepatocytes. **J Biol Chem.** 2014 289(1) 335-45. 査読あり doi: 10.1074/jbc.M113.479386

F. Lan*, H. Misu*, *Equal contribution (他 24 名) LECT2 Functions as a Hepatokine That Links Obesity to Skeletal Muscle Insulin Resistance. **Diabetes.** 2014 63(5) 1649-64. 査読あり doi: 10.2337/db13-0728

K. Kato, T. Takamura, Y. Takeshita, Y. Ryu, H. Misu, (他 6 名) Ectopic fat

accumulation and distant organ-specific insulin resistance in Japanese people with nonalcoholic Fatty liver disease. **PLoS One.** 2014 9(3) e92170. 査読あり doi: 10.1371/journal.pone.0092170

K. Ishikura*, H. Misu*, *Equal contribution (他 22 名) Selenoprotein P as a diabetes-associated hepatokine that impairs angiogenesis by inducing VEGF resistance in vascular endothelial cells. **Diabetologia.** 2014 57(9) 1968-76. 査読あり doi: 10.1007/s00125-014-3306-9

K. Hosohata, H. Ando, Y. Takeshita, H. Misu, (他 3 名) Urinary Kim-1 is a sensitive biomarker for the early stage of diabetic nephropathy in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. **Diab Vasc Dis Res.** 2014 査読あり doi: 10.1177/1479164114531299

H. Sugiyama, S. Matsugo, H. Misu, (他 10 名) Regulation of the physiological effects of peroxido vanadium(V) complexes by the electronic nature of ligands. **J Inorg Biochem.** 2013 121 66-76. 査読あり doi: 10.1016/j.jinorgbio.2012.12.014

T. Otoda, T. Takamura, H. Misu, (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

[学会発表](計 17 件)

御簾博文, (他 6 名、2 番目)、ヘパトカインセレノプロテインPは骨格筋受容体LRP1を介して運動療法抵抗性を惹起する、第30回日本糖尿病肥満動物学会、2016年3月11日、大宮ソニックシティ、さいたま市、埼玉県

御簾博文, (他 4 名、2 番目)、ヘパトカインセレノプロテインPは筋受容体LRP1を介して“運動療法抵抗性”を惹起する、第27回分子糖尿病シンポジウム、2015年12月5日、丸ビルホール&コンファレンススクエア、千代田区、東京都

御簾博文, (他 3 名、1 番目)、ヘパトカイン SeP と筋受容体 LRP1 による運動感受性制御、第30回日本糖尿病合併症学会、2015年11月27日、愛知県産業労働センターウインクあいち、名古屋市、愛知県

御簾博文, (他 10 名、1 番目)、ヘパトカインセレノプロテインP血中濃度による運動療法抵抗性の予知に関する検討、第58回日本糖尿病学会年次学術集会、2015年5月23日、東京第一ホテル下関、下

関市、山口県
御簾博文 (他 名、 番目)、ヘパトカイン selenoprotein P・LECT2 によるインスリン感受性の制御機構、第 29 回日本糖尿病肥満動物学会、2015 年 2 月 14 日、京都大学芝蘭会館、
H. Misu, (他 3 名、1 番目)、Hepatokine selenoprotein P induces exercise resistance via skeletal muscle receptor LRP1、Japan Digestive Disease Week 2015、2015 年 10 月 9 日、Grand Prince Hotel New Takanawa、港区、東京都
H. Misu (他 0 名、1 番目)、Hepatokine selenoprotein P and skeletal muscle receptor LRP1 induce exercise resistance by inhibition of ROS and AMPK、The 46th NIPS (National Institute of Physiological Science) International Symposium、2015 年 10 月 2 日、Nagoya Congress Center、名古屋市、愛知県
御簾博文、(他 7 名、1 番目)、インスリン抵抗性誘導ヘパトカインセレノプロテイン P の骨格筋における受容体の探索、第 57 回日本糖尿病年次学術集会、2014 年 5 月 24 日、リーガロイヤルホテル大阪、大阪市、大阪府
御簾博文、(他 4 名、1 番目)、抗酸化ヘパトカインセレノプロテイン P は VEGF 抵抗性を介して糖尿病性血管新生障害に寄与する、第 65 回日本酸化ストレス学会学術集会、2014 年 9 月 5 日、同志社大学今出川キャンパス、京都市、京都府
御簾博文、(他 2 名、1 番目)、飽食感知ヘパトカイン LECT2 の同定とその機能解析、第 50 回日本肝臓学会総会、2014 年 5 月 29 日、ホテルニューオータニ、千代田区、東京都
御簾博文、(他 7 名、1 番目)、肥満関連ヘパトカイン LECT2 の同定、第 87 回日本内分泌学会学術総会、2014 年 4 月 24 日、福岡国際会議場、福岡市、福岡県
H. Misu, (他 4 名、1 番目)、A novel role for selenoprotein P in the regulation of insulin sensitivity、17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (SFRRRI 2014)、2014 年 3 月 25 日、Kyoto International Conference Center、京都市、京都府
御簾博文、(他 2 名、2 番目)、肥満関連ヘパトカイン LECT2 の同定と機能解析、第 25 回分子糖尿病シンポジウム、2013 年 12 月 7 日、千里阪急ホテル、豊中市、大阪府
御簾博文、(他 7 名、1 番目)、ヘパトカインセレノプロテイン P は活性酸素月 AMPK 月 PGC1 経路の抑制を介して”運動療法抵抗性”を誘導する、第 36 回日本分子生物学会年次学術集会、2013 年

12 月 3 日、神戸国際会議場、神戸市、兵庫県

H. Misu, (他 6 名、1 番目)、Circulating levels of selenoprotein P predict future hyperglycemia in nondiabetic Japanese people、49th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD)、2013 年 9 月 24 日、Fila de Barcelona's Gran Via exhibition centre、Barcelona、Spain
御簾博文、(他 8 名、1 番目)、インスリン抵抗性誘導ヘパトカインセレノプロテイン P による高血糖発症予知に関する検討、第 56 回日本糖尿病年次学術集会、2013 年 5 月 16 日、熊本市民会館、熊本市、熊本県

御簾博文、(他 4 名、1 番目)、ヘパトカインセレノプロテイン P による運動療法抵抗性発症に関する検討、第 86 回日本内分泌学会学術総会、2013 年 4 月 26 日、仙台国際会議場、仙台市、宮城県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

御簾 博文 (MISU HIROFUMI)
金沢大学・医薬保健研究域医学系・准教授
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

