

令和元年9月4日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26253046

研究課題名(和文) 内分泌器官としての肝臓病学の確立

研究課題名(英文) Study of the liver as an endocrine organ

研究代表者

金子 周一 (KANEKO, Shuichi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：60185923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,700,000円

研究成果の概要(和文)：過剰に摂取される栄養による全身への影響、とくに、過栄養による脂肪肝(NAFLD)および脂肪性肝炎(NASH)が及ぼす全身への影響について、遺伝子発現を中心として系統的に解析した。私達は世界に先駆けて過栄養にある肝臓がSelenoprotein PとLect2というヘパトカインを産生することを報告した。Selenoprotein Pは肝臓および骨格筋のインスリン抵抗性を亢進させ、骨格筋に働いて運動抵抗性を引き起こし、さらにSelenoprotein P濃度が将来の耐糖能障害を予測することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過剰な栄養は糖尿病、脂質異常症、高血圧といった多くの疾患と関連し、肝臓には脂肪肝を引き起こす。本研究では脂肪肝そのものが、ヘパトカインを介して糖尿病など他の全身疾患に影響を与えることを明らかにした。このことは肝臓を対象とした新たな治療薬や診断法を開発することが現代の多くの疾患を克服するうえで重要なことを示しており、学術的にも社会的にも意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Hyper-nutrition causes a variety of systematic diseases. Especially, function of the liver is impaired by the nutrition, and successively non alcoholic fatty liver (NAFLD) and non alcoholic steatohepatitis (NASH) are caused. In this study, we systematically analyzed gene expression profiles of the liver, and studied the effect of NAFLD and NASH on systemic diseases and the pathology. We have reported two proteins, Selenoprotein P and Lect 2, as hepatokines. Selenoprotein P induces insulin resistance of the liver and the muscle, and exercise resistance of the muscle. Also, we showed the measurement of Selenoprotein P predicts occurrence of glucose intolerance in future.

研究分野：消化器内科学

キーワード：ゲノム 発現制御 肝臓 栄養 生活習慣病

## 1. 研究開始当初の背景

長い飢餓の時代に、肝臓は栄養を効率的に利用して重要な代謝物の濃度を一定に保つ機能(恒常性:ホメオスタシス)を獲得した。グリコーゲンの発見者であるクロードベルナルは糖質代謝の観点から肝臓を内分泌器官と考えていた。飽食の時代となって肝臓は過剰な栄養にさらされている。過剰の栄養を肝臓が処理できない状態は、栄養代謝の恒常性を維持するという肝臓の重要な機能が破綻した状態であると言える。糖尿病、脂質異常症など栄養が関連する生活習慣病の克服は21世紀の最大の課題とされ、この病態に内臓脂肪の蓄積が関与していることが示されてきた。

内臓脂肪に加えて肝臓の脂肪化が糖尿病などの疾患に大きな役割を果たしていることが明らかになりつつあり、肝臓機能の破綻に対する新たな研究が求められている。私達は、過剰な栄養が肝臓内の環境を攪乱し、それに対する免疫系が動員され、広範に肝細胞の代謝経路が変化することを報告してきた。この過程において、肝臓がホルモンとしてセレノプロテインPを産生し(内臓脂肪からのアディポカインに対して我々はヘパトカインと命名)、糖尿病を悪化させることを世界ではじめて示した。私達の研究成果は、肝臓が新たな機序を介して全身の臓器に影響を及ぼすことを示すものであった。肝臓が他の臓器に影響を及ぼすと同時に、肝臓はインスリンなどのホルモンによる制御を受けている。こうした成果から、私達の独創的な研究をさらにすすめて、生活習慣病の克服に寄与する肝臓の基盤的な研究を実施することが必要であると考えた。

## 2. 研究の目的

ヘパトカインが標的臓器を障害する病態を明らかにし、肝臓が内分泌器官であることを体系的に示す。ヘパトカインおよび中枢神経がクッパー細胞などを標的として肝臓機能を制御していることを示すとともに、これまで解明されなかった lipotoxicity の機序を明らかにして肝臓における栄養代謝の障害機序を解明する。

### (1) 内分泌器官としての肝臓病学の確立

ヘパトカインの機能と特徴、および過栄養が関連する疾病との関連を明らかにする。

### (2) クッパー細胞などによる肝臓代謝の制御機構の解明

インスリンは肝細胞に直接に働いて糖質代謝を制御している。しかし、我々はヘパトカインおよび中枢神経がクッパー細胞などに作用し、肝細胞の代謝を制御する可能性を有している。ヘパトカインおよび中枢神経による肝臓代謝の制御機構を明らかにする。

### (3) 過栄養によって肝臓機能が破綻する機序の解明

糖・脂質代謝異常とヘパトカイン産生は lipotoxicity によって生じると考えられる。しかし、lipotoxicity を引き起こす因子は不明である。ヘパトカイン、中枢神経の関与を含めて lipotoxicity を引き起こす因子を同定し、肝臓における栄養代謝の障害機序を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 内分泌器官としての肝臓病学の確立

肝臓から分泌されるヘパトカインが標的臓器を障害する病態を明らかにし、肝臓が内分泌器官であることを体系的に示す。

1-1. セレノプロテインP 研究は順調に進行しており、さらにセレノプロテインP の機能解析と病態の研究を実施する。

#### 1-1-1. 筋肉におけるセレノプロテインP 受容体の獲得。

LRP1 が受容体であることを確認する。

#### 1-1-2. 血管新生阻害効果の検証。

セレノプロテインP の投与によって血管内皮の VEGF 反応性が低下することを確認している。その機序を確認する。

#### 1-1-3. 運動機能抑制効果の検証。

セレノプロテインP が運動療法の効果を抑制することを見いだしている。機序を明らかにするとともに、有している筋 LRP1 欠損マウスを用いて運動機能の回復を確認する。

#### 1-1-4. 各種疾患における意義と新しいバイオマーカーとしての可能性。

企業と共同で血中のセレノプロテインP 濃度を測定する方法を開発した。この系を用いて各種疾患とセレノプロテインP との関連を検討する。

#### 1-1-5. セレノプロテインP の発現を抑制する薬剤の探索。

メトフォルミンが AMP キナーゼ/Foxo3 経路を介してセレノプロテインP 遺伝子の発現を抑制することを示した。さらに解析をすすめる。

1-2. 多数のヘパトカイン候補を特許としており、それら候補から他のヘパトカインを同定する。

#### 1-2-1. 新たに同定したヘパトカインである LECT2 の機能解析。

機能解析と全身における作用を明らかにする。

- (2) クッパー細胞などによる肝臓代謝の制御機構の解明  
 ヘパトカインおよび中枢神経による肝臓代謝の制御機構を明らかにする。
- 2-1.ヘパトカインが及ぼすクッパー細胞などへの作用の解析。  
 クッパー細胞に及ぼす影響を明らかにし、炎症を介して代謝制御に作用する機序を検討する。
- 2-2.中枢神経の神経系を明らかにし、神経終末がクッパー細胞に及ぼす機序、クッパー細胞が肝細胞に及ぼす作用を解析。  
 クッパー細胞の IL-6 とそれにより活性化される肝細胞転写因子 STAT3 が重要な役割を果たすことを明らかにしているが (Cell Metabolism 2006)、このメカニズムは、インスリンのみならず、ヒスタミン (Diabetes 2013) やレプチンなどでも利用されており、中枢神経と肝臓をつなぐ基盤原理である可能性が考えられる。迷走神経を切除し肝臓 STAT3 の活性化を確認する。また、クッパー細胞活性の抑制にかかわる受容体の探索を行う。ヘパトカインによる中枢神経制御の解析を開始する。
- (3) 過栄養によって肝臓機能が破綻する機序の解明
- 3-1.マウスおよびヒトサンプルにおける RNA seq、メチル化解析、ChIP 解析を実施。  
 培養細胞、40 匹のマウス肝臓と、連続肝生検を行った 30 例 (65 検体) を用いて行う。
- 3-2.マウスおよびヒトサンプルにおける詳細脂質解析。  
 培養細胞、マウスおよびヒト肝臓の包括的脂肪酸解析を行う。
- 3-3.全ゲノム塩基配列解析と、候補遺伝子経路・遺伝子の抽出。  
 ヒト肝臓を用いた exome 解析を 20 例に実施してきた。本年度は PacBio と HiSeq によるヒト正常肝臓を用いた全ゲノム塩基配列解析を実施する。

#### 4. 研究成果

私達は世界に先駆けて、過栄養にある肝臓が Selenoprotein P というヘパトカインを産生することを報告した (Cell metabolism 2010)。本研究では Selenoprotein P が有する機能を明らかにするとともに、その作用機序を解明した。また、血液を用いた測定系を作製し、その臨床的な意義についての研究を行った。

Selenoprotein P は肝臓および骨格筋のインスリン抵抗性を亢進させるだけでなく (Cell metabolism 2010)、骨格筋における Selenoprotein P のレセプターを明らかにし、Selenoprotein P が筋肉に働いて運動抵抗性を引き起こすことを明らかにした (Nature Med 2017)。従来から運動療法によってもインスリン抵抗性が改善しない群が存在することが明らかにされていたが、その機序は不明であった。本研究により、その機序のひとつに Selenoprotein P の関与が明らかにされた。これは運動療法による糖尿病の改善、脂肪肝の改善などの治療法を考える上で重要な事実を明らかにしたものである。

Selenoprotein P 濃度の市販の測定法と私達が開発した測定法との違いを明らかにするとともに (Biol Pharm Bull, 2018)、Selenoprotein P の血中濃度と糖負荷試験の関係を示した (Biol Pharm Bull, 2019)。また、Selenoprotein P 濃度が将来の耐糖能障害を予測することを明らかにした (Sci Rep 2018)。

もうひとつの Lect2 は、摂取する食事に対して迅速に反応することを示し ((Diabetes 2014, BBRC 2016)、Lect2 が飽食センサーのひとつになりうることを示した。

糖尿病の治療薬として広く使用されている DPP4 の、脂肪肝への効果を明らかにした (Diabetes 2016)。Sirt2 が糖取り込みに重要な役割を果たすこと (Nature Commun 2018)、グルコラファニンが褐色脂肪細胞を通して肥満とインスリン抵抗性を改善すること (Diabetes 2017)、エイコサペンタエン酸が Selenoprotein P を低下させることを明らかにした (J Biol Chem)。また、脂肪肝ではアルコールの関与が課題であり、低容量の場合、NAFLD ではより発がんを低下させる可能性を明らかにした (ProS One 2018)。脂肪肝について、アルコールの関与が低容量の場合、より発がんを低下させる可能性を明らかにした (ProS One 2018)。肝硬変、肝がんにかかわる因子の研究を行った (J Gastroenterol in press, Biochem J 2019, Proc Natl Acad Sci U S A 2018, Hepatology 2019)。摂取する物質と治療法としての側面に注目し、分岐鎖アミノ酸 BCAA が及ぼす肝臓への効果から、線維化を抑制すること、およびその機序を解析した (Oncotarget in press)。また、脂肪肝に対する治療法のひとつとして Vitamin A の有用性が指摘されている。そこで、他の抗酸化剤であるアスタキサンチンの効果を肝臓における発現遺伝子プロファイルから解析した (Int J Mol Sci 2017)。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 21 件) 全て査読有

1. K Mohri, H Misu, H Takayama, KA Ishii, A Kikuchi, F Lan, Y Enyama, Y Takeshita, Y Saito, S Kaneko, T Takamura. Circulating concentrations of insulin resistance-associated hepatokines, selenoprotein P and leukocyte cell-derived chemotaxin 2, during an oral glucose tolerance test in humans. Biol Pharm Bull 42(3):373-8, 2019. doi: 10.1248/bpb.b18-00549.

2. Y Takeshita, Y Kita, KI Kato, T Kanamori, H Misu, S Kaneko, T Takamura. Effects of metformin and alogliptin on body composition in people with type 2 diabetes. *J Diabetes Investig* 10(3):723-730, 2019. doi:10.1111/jdi.12920.
3. L Xu, N Nagata, M Nagashimada, F Zhuge, Y Ni, G Chen, J Kamei, H Ishikawa, Y Komatsu, S Kaneko, T Ota. A porcine placental extract prevents steatohepatitis by suppressing activation of macrophages and stellate cells in mice. *Oncotarget* 9(19):15047-60, 2018. doi:10.18632/oncotarget.24587.
4. K Yamada, E Mizukoshi, T Seike, R Horii, M Kitahara, H Sunagozaka, K Arai, T Yamashita, M Honda, S Kaneko. Light alcohol consumption has the potential to suppress hepatocellular injury and liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One* 13(1):e0191026, 2018. doi:10.1371/journal.pone.0191026.
5. H Watanabe, Y Inaba, K Kimura, M Matsumoto, S Kaneko, M Kasuga, H Inoue. Sirt2 facilitates hepatic glucose uptake by deacetylating glucokinase regulatory protein. *Nat Commun* 9(1):30, 2018. doi:10.1038/s41467-017-02537-6.
6. SM Oo, H Misu, Y Saito, M Tanaka, S Kato, Y Kita, H Takayama, Y Takeshita, T Kanamori, T Nagano, M Nakagen, T Urabe, N Matsuyama, S Kaneko, T Takamura. Serum selenoprotein P, but not selenium, predicts future hyperglycemia in a general Japanese population. *Sci Rep* 8(1):16727, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-35067-2.
7. Y Saito, H Misu, H Takayama, SI Takashima, S Usui, M Takamura, S Kaneko, T Takamura, N Noguchi. Comparison of Human Selenoprotein P Determinants in Serum between Our Original Methods and Commercially Available Kits. *Biol Pharm Bull* 41(5):828-32, 2018. doi:10.1248/bpb.b18-00046.
8. XY Qin, H Suzuki, M Honda, H Okada, S Kaneko, I Inoue, E Ebisui, K Hashimoto, P Carninci, K Kanki, H Tatsukawa, N Ishibashi, T Masaki, T Matsuura, H Kagechika, K Toriguchi, E Hatano, Y Shirakami, G Shiota, M Shimizu, H Moriwaki, S Kojima. Prevention of hepatocellular carcinoma by targeting MYCN-positive liver cancer stem cells with acyclic retinoid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(19):4969-74, 2018. doi:10.1073/pnas.1802279115.
9. N Nagata, L Xu, S Kohno, Y Ushida, Y Aoki, R Umeda, N Fuke, F Zhuge, Y Ni, M Nagashimada, C Takahashi, H Suganuma, S Kaneko, T Ota. Glucoraphanin Ameliorates Obesity and Insulin Resistance Through Adipose Tissue Browning and Reduction of Metabolic Endotoxemia in Mice. *Diabetes* 66(5):1222-36, 2017. doi:10.2337/db16-0662.
10. H Misu, H Takayama, Y Saito, Y Mita, A Kikuchi, K Ishii, K Chikamoto, T Kanamori, N Tajima, F Lan, Y Takeshita, M Honda, M Tanaka, S Kato, N Matsuyama, Y Yoshioka, Iwayama K, Tokuyama K, Akazawa N, Maeda S, Takekoshi K, Matsugo S, Noguchi N, S Kaneko, T Takamura. Deficiency of the hepatokine selenoprotein P increases responsiveness to exercise in mice through upregulation of reactive oxygen species and AMP-activated protein kinase in muscle. *Nature Med* 23(4):508-16, 2017. doi: 10.1038/nm.4295.
11. N Tajima-Shirasaki, KA Ishii, H Takayama, T Shirasaki, H Iwama, K Chikamoto, Y Saito, Y Iwasaki, A Teraguchi, F Lan, A Kikuchi, Y Takeshita, K Murao, S Matsugo, S Kaneko, H Misu, T Takamura. Eicosapentaenoic acid down-regulates expression of the selenoprotein P gene by inhibiting SREBP-1c protein independently of the AMP-activated protein kinase pathway in H4IIEC3 hepatocytes. *J Biol Chem* 292(26):10791-800, 2017. doi:10.1074/jbc.M116.747006.
12. F Zhuge, Y Ni, M Nagashimada, N Nagata, L Xu, N Mukaida, S Kaneko, T Ota. DPP-4 inhibition by linagliptin attenuates obesity-related inflammation and insulin resistance by regulating M1/M2 macrophage polarization. *Diabetes* 65(10):2966-79, 2016. doi:10.2337/db16-0317.
13. K Chikamoto, H Misu, H Takayama, A Kikuchi, KA Ishii, F Lan, N Takata, N Tajima-Shirasaki, Y Takeshita, H Tsugane, S Kaneko, S Matsugo, T Takamura. Rapid response of the steatosis-sensing hepatokine LECT2 during diet-induced weight cycling in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 478(3):1310-6, 2016. doi:10.1016/j.bbrc.2016.08.117.
14. Y Inaba, T Furutani, K Kimura, H Watanabe, S Haga, Y Kido, M Matsumoto, Y Yamamoto, K Harada, S Kaneko, S Oyadomari, M Ozaki, M Kasuga, H Inoue. Growth arrest and DNA damage-inducible 34 regulates liver regeneration in hepatic steatosis in mice. *Hepatology* 61(4):1343-56, 2015. doi: 10.1002/hep.27619.
15. Y Takeshita, T Takamura, Y Kita, T Otoda, K Kato, H Wakakuri, M Yamada, H Misu, Y Matsushima, S Kaneko; Establishment of Rationale for Antiaging Diabetic Medicine (ERA-DM) Study Chapter 2 Group. 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* 6(2):192-200, 2015. doi:10.1111/jdi.12269.

16. Y Ni, M Nagashimada, F Zhuge, L Zhan, N Nagata, A Tsutsui, Y Nakanuma, S Kaneko, T Ota. Astaxanthin prevents and reverses diet-induced insulin resistance and steatohepatitis in mice: A comparison with vitamin E. Sci Rep 5:17192, 2015. doi: 10.1038/srep17192.
17. K Yamada, E Mizukoshi, H Sunagozaka, K Arai, T Yamashita, Y Takeshita, H Misu, T Takamura, S Kitamura, Y Zen, Y Nakanuma, M Honda, S Kaneko. Response to Importance of confounding factors in assessing fatty acid compositions in patients with non-alcoholic steatohepatitis. Liver Int 35(6):1773, 2015. doi: 10.1111/liv.12755.
18. T Takamura, S Kitamura, Y Zen, Y Nakanuma, M Honda, S Kaneko. Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Liver Int 35(2):582-90, 2015. doi: 10.1111/liv.12685.
19. K Ishikura, H Misu, M Kumazaki, H Takayama, N Matsuzawa-Nagata, N Tajima, K Chikamoto, F Lan, H Ando, T Ota, M Sakurai, Y Takeshita, K Kato, A Fujimura, KI Miyamoto, Y Saito, S Kameo, Y Okamoto, Y Takuwa, K Takahashi, H Kidoya, N Takakura, S Kaneko, T Takamura. Selenoprotein P as a diabetes-associated hepatokine that impairs angiogenesis by inducing VEGF resistance in vascular endothelial cells. Diabetologia 57(9):1968-76,2014. doi:10.1007/s00125-014-3306-9.
20. F Lan, H Misu, K Chikamoto, H Takayama, A Kikuchi, K Mohri, N Takata, H Hayashi, N Matsuzawa-Nagata, Y Takeshita, H Noda, Y Matsumoto, T Ota, T Nagano, M Nakagen, KI Miyamoto, K Takatsuki, T Seo, K Iwayama, K Tokuyama, S Matsugo, H Tang, Y Saito, S Yamagoe, S Kaneko, T Takamura. LECT2 functions as a hepatokine that links obesity to skeletal muscle insulin resistance. Diabetes 63(5):1649-64,2014.doi:10.2337/db13-0728.
21. Y Takeshita, T Takamura, M Honda, Y Kita, Y Zen, KI Kato, H Misu, T Ota, M Nakamura, K Yamada, H Sunagozaka, K Arai, T Yamashita, E Mizukoshi, S Kaneko. The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomized controlled trial. Diabetologia 57(5):878-90, 2014. doi:10.1007/s00125-013-3149-9.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

名称：非アルコール性脂肪性肝炎治療剤

発明者：金子周一、酒井佳夫

権利者：金沢大学

種類：特許

番号：特願 2018-064300 号

出願年：平成 30 年

国内外の別：国内

名称：非アルコール性脂肪性肝炎検出方法、該肝炎の重篤度判定方法及び該肝炎の治療評価判定方法

発明者：酒井佳夫、金子周一、餅田初音

権利者：金沢大学

種類：特許

番号：特願 2017-027560 号

出願年：平成 29 年

国内外の別：国内

名称：2 型糖尿病患者の治療薬選択の補助方法，治療薬の効果予測方法及び検査方法

発明者：御簾博文、竹下有美枝、篁俊成、金子周一

権利者：金沢大学、アルフレッサファーマ株式会社、同志社大学

種類：特許

番号：PCT/JP2015/075760

出願年：平成 27 年

国内外の別：国外

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：本多 政夫  
ローマ字氏名：HONDA, Masao  
所属研究機関名：金沢大学  
部局名：保健学系  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：00272980

### (2) 研究分担者

研究分担者氏名：井上 啓  
ローマ字氏名：INOUE, Hiroshi  
所属研究機関名：金沢大学  
部局名：新学術創成研究機構  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：50397832

### (3) 研究分担者

研究分担者氏名：篁 俊成  
ローマ字氏名：TAKAMURA, Toshinari  
所属研究機関名：金沢大学  
部局名：医学系  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：00324111

### (4) 研究分担者

研究分担者氏名：水腰 英四郎  
ローマ字氏名：MIZUKOSHI, Eishiro  
所属研究機関名：金沢大学  
部局名：医学系  
職名：准教授  
研究者番号(8桁)：90345611

### (5) 研究分担者

研究分担者氏名：御簾 博文  
ローマ字氏名：MISU, Hirofumi  
所属研究機関名：金沢大学  
部局名：医学系  
職名：准教授  
研究者番号(8桁)：80447680

### (6) 研究分担者

研究分担者氏名：竹下 有美枝  
ローマ字氏名：TAKESHITA, Yumie  
所属研究機関名：金沢大学  
部局名：附属病院  
職名：助教  
研究者番号(8桁)：40507042

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。