

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09740

研究課題名(和文) 糖尿病関連ヘパトカインを制御する新規転写因子の同定

研究課題名(英文) Identification of a novel transcription factor that regulates diabetes-related hepatokine.

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓由来分泌タンパクであるSePおよびLECT2が、インスリン抵抗性を誘導し高血糖を発症させるタンパク質であることを報告した。本研究では、両者を制御する転写因子を標的とした肥満2型糖尿病に対する治療を開発するための研究基盤を確立する。2型糖尿病患者の肝臓での遺伝子発現データから、SePおよびLECT2と正に相関する転写因子Xを同定することができた。そこで、後天的な肝臓特異的転写因子X欠損マウスを作成した。このマウスでは肝臓において転写因子Xの発現量低下と共に、SePとLect2の発現量の低下も認められた。加えて、糖新生系遺伝子発現の低下と空腹時血糖の低下も確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓は膨大な種類の分泌タンパクの産生源であり、血液凝固因子やアルブミンの産生を介して血液凝固状態の調整や血漿浸透圧の維持などの機能を発揮している。しかしながら肝臓はあまりに膨大な種類の分泌タンパクを産生していることから、これらの機能解析はこれまで十分に行われてこなかった。そこで、本研究では肝臓が未知の分泌タンパクを産生することで2型糖尿病における全身の病態形成に寄与していることを示すことができた。また、これらを制御する因子も発見できたことで、新たな肥満2型糖尿病に対する治療を開発するための研究基盤を確立することができた。

研究成果の概要(英文)：We reported that liver-derived secretory proteins SeP and LECT2 are proteins that induce insulin resistance and cause hyperglycemia. In this study, we establish a research base for developing a treatment for obesity type 2 diabetes. From the gene expression data in the liver of patients with type 2 diabetes, we were able to identify the transcription factor X that positively correlated with SeP and LECT2. Therefore, the liver-specific transcription factor X-deficient mouse was created. In these mice, the expression levels of transcription factor X and the expression levels of SeP and Lect2 were also decreased in the liver. Also, a decrease in gluconeogenic gene expression and a decrease in fasting blood glucose could be confirmed.

研究分野：代謝内分泌

キーワード：2型糖尿病

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓は膨大な種類の分泌タンパクの産生源であり、血液凝固因子やアルブミンの産生を介して血液凝固状態の調整や血漿浸透圧の維持などの様々な機能を発揮している。しかしながら肝臓があまりに膨大な種類の分泌タンパクを産生していることから、これらの機能解析はこれまでに十分でなかったと思われる。これまでのいくつかの研究で申請者は、肝臓が未知の分泌タンパクを産生することで 2 型糖尿病における全身の病態形成に寄与していると仮説を立て、このような新たな機能が見いだされた肝由来因子をヘパトカインと呼ぶことを提唱してきた。このようなヘパトカイン仮説をさらに発展させて、今回の研究は、肝臓におけるある転写因子の過剰な活性化がヘパトカインの異常分泌を起こすことで全身のインスリン抵抗性と高血糖を惹起するという新しい病態コンセプトを提唱すると同時に、肝臓の転写因子の乱れを是正しヘパトカインの分泌を正常化することで、全身の糖代謝を改善するという新しい治療法の開発をめざしている。申請者はこれまでに、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ヘパトカインとしてセレノプロテイン P (SERENOP) と LECT2 を同定した (Misu et al. Cell Metabolism 2010, Lan, Misu et al. Diabetes 2014)。さらに最近、骨格筋での Selenop の受容体を同定し、Selenop がこの受容体を介して運動療法の感受性を劇的に低下させることを見出した (Misu et al. Nature Medicine 2018)。このように申請者は、新たな機能が同定された肝由来分泌タンパクをヘパトカインと総称することを提唱するとともに、実験動物および培養細胞実験を用いてヘパトカインである SERENOP と LECT2 の肝臓での過剰産生が 2 型糖尿病の有望な新規治療標的であることを明らかとしてきた。しかしながら、肥満症や 2 型糖尿病において肝臓で SERENOP と LECT2 が過剰に産生される分子機序は完全には解明されていない。その後申請者は、抗糖尿病薬メトホルミンが転写因子 Foxo3 の不活化を介して肝細胞での SeP 発現を抑制することを報告した (Takayama, Misu et al. JBC 2014)。この結果から申請者は、肝細胞には SERENOP と LECT2 の両者の産生を制御する新規の鍵転写因子が発現しており、この鍵因子の過剰な活性化が 2 型糖尿病でのヘパトカイン異常分泌の原因となると仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究では、肝細胞においてヘパトカイン SERENOP と LECT2 の両者の発現を制御する新規鍵転写因子を同定し、その機能解析をおこなうことで、肝臓でのヘパトカイン異常分泌を是正するという新たな 2 型糖尿病治療の開発にむけた、基盤的な研究をおこなう。

### 3. 研究の方法

- (1) 培養肝細胞を用いて転写因子 X による Selenop と Lect2 の遺伝子発現制御機構の詳細を明らかにするため、プロモーターのどの領域に結合するか、DNA 上の応答配列が何であるかをルシフェラーゼアッセイで調べた。
- (2) 肝臓特異的な転写因子 X の遺伝子欠損マウスを作成することで、転写因子 X の糖代謝およびインスリン感受性におよぼす作用を *in vivo* で検討した。肝臓で特異的に転写因子 X を欠損させたときにヘパトカイン Selenop と Lect2 の肝臓での遺伝子発現量や血中濃度が低下するか、ならびに全身のインスリン感受性がどうなるかを検討した。

### 4. 研究成果

① これまでに数年にわたって蓄積してきた 2 型糖尿病患者の肝臓の包括的な発現遺伝子情報 (H. Misu et al. Diabetologia 2007) を用いて、SERENOP および LECT2 の両者の肝遺伝子発現と発現が正相関する転写因子を網羅的に探索した結果、候補となる転写因子 X を同定した。② 2 型糖尿病患者の肝での転写因子 X の発現量は、患者のインスリン抵抗性指数と正相関していた。③ マウス肝細胞 AML12 においてアデノウイルスベクターを用いて候補となっている転写因子 X を過剰発現すると、Selenop と Lect2 の両者の遺伝子発現および転写活性は有意に上昇した。④ マウス肝細胞 AML12 において siRNA 導入法を用いて候補となっている転写因子 X をノックダウンすると、realtime PCR 法によって評価した Selenop と Lect2 の両者の遺伝子発現は有意に低下した。

#### (1) 転写因子 X の Selenop と Lect2 プロモーター上の結合配列の決定

申請者はこれまでに、マウス肝細胞 AML12 において転写因子 X をアデノウイルスベクターを用いて過剰発現すると Selenop と Lect2 の転写活性が上昇することをルシフェラーゼアッセイを用いて確認している。Selenop と Lect2 それぞれのルシフェラーゼ活性は転写因子 X によって数倍に上昇しており、この結果は Selenop および Lect2 のプロモーター領域に直接的に転写因子 X が結合することを示唆する。そこで Selenop および Lect2 のプロモーターの deletion mutant を用いて、プロモーター領域のどの領域に転写因子 X が結合するかを同定した。さらにプロモーターベクターに point mutation を導入することで、最終的には転写因子 X の Selenop ならびに Lect2 プロモーター領域における DNA 結合配列を決定した。

#### (2) 各種の病態モデルマウスを用いた転写因子 X の発現に関する解析

申請者はすでに、ヒト肝臓において、転写因子 X の遺伝子発現量がインスリン抵抗性の重症度と有意に正相関することを見いだしている。そこで CRISPR/Cas9 技術を用いて、転写因子 X の flox マウスを作成し、このマウスとアルブミンプロモーター-Cre マウスを交配させることによって、肝臓特異的な転写因子 X 欠損マウスを作成した。遺伝子発現解析の結果、肝臓における転写因子 X

の発現量は低下していたが、Selenop と Lect2 の発現量は野生型と比べて変わらなかった。また、血糖値、インスリン値、体重、耐糖能も変化はなかった。そこで、転写因子 X の flox マウスに Cre 発現アデノウイルスを尾静脈から投与し、後天的な肝臓特異的転写因子 X 欠損マウスを作成した。このマウスでは肝臓において転写因子 X の発現量低下と共に、Selenop と Lect2 の発現量の低下も認められた。加えて、糖新生系遺伝子発現の低下と空腹時血糖の低下も確認できた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mohri K, Misu H, Takayama H, Ishii KA, Kikuchi A, Lan F, Enyama Y, Takeshita Y, Saito Y, Kaneko S, Takamura T.	4. 巻 42
2. 論文標題 Circulating Concentrations of Insulin Resistance-Associated Hepatokines, Selenoprotein P and Leukocyte Cell-Derived Chemotaxin 2, during an Oral Glucose Tolerance Test in Humans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 373-378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00549	査読の有無 有
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 Oo Swe Mar, Misu Hirofumi, Saito Yoshiro, Tanaka Mutsumi, Kato Seiji, Kita Yuki, Takayama Hiroaki, Takeshita Yumie, Kanamori Takehiro, Nagano Toru, Nakagen Masatoshi, Urabe Takeshi, Matsuyama Naoto, Kaneko Shuichi, Takamura Toshinari	4. 巻 8
2. 論文標題 Serum selenoprotein P, but not selenium, predicts future hyperglycemia in a general Japanese population	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-35067-2	査読の有無 有
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 M. Sugiyama, A. Kikuchi, H. Misu, H. Igawa, M. Ashihara, Y. Kushima, K. Honda, Y. Suzuki, Y. Kawabe, S. Kaneko and T. Takamura	4. 巻 13
2. 論文標題 Inhibin betaE (INHBE) is a possible insulin resistance-associated hepatokine identified by comprehensive gene expression analysis in human liver biopsy samples	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0194798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0194798	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 K. R. Shima, T. Ota, K. I. Kato, Y. Takeshita, H. Misu, S. Kaneko and T. Takamura	4. 巻 6
2. 論文標題 Ursodeoxycholic acid potentiates dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin by enhancing glucagon-like peptide-1 secretion in patients with type 2 diabetes and chronic liver disease: a pilot randomized controlled and add-on study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMJ Open Diabetes Res Care	6. 最初と最後の頁 e000469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjdr-2017-000469	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 H. Chadani, S. Usui, O. Inoue, T. Kusayama, S. I. Takashima, T. Kato, H. Murai, H. Furusho, A. Nomura, H. Misu, T. Takamura, S. Kaneko and M. Takamura	4. 巻 19
2. 論文標題 Endogenous Selenoprotein P, a Liver-Derived Secretory Protein, Mediates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 Epub
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19030878	査読の有無 有
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 N. Tajima-Shirasaki, K. A. 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 and T. Takamura	4. 巻 292
2. 論文標題 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 10791 ~ 10800
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M116.747006	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 Sargeant Jack A., Aithal Guruprasad P., Takamura Toshinari, Misu Hirofumi, Takayama Hiroaki, Douglas Jessica A., Turner Mark C., Stensel David J., Nimmo Myra A., Webb David R., Yates Thomas, King James A.	4. 巻 3
2. 論文標題 The influence of adiposity and acute exercise on circulating hepatokines in normal-weight and overweight/obese men	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Appl Physiol Nutr Metab	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1139/apnm-2017-0639	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Mita Yuichiro, Nakayama Kaho, Inari Shogo, Nishito Yukina, Yoshioka Yuya, Sakai Naoko, Sotani Kanade, Nagamura Takahiro, Kuzuhara Yuki, Inagaki Kumi, Iwasaki Miki, Misu Hirofumi, Ikegawa Masaya, Takamura Toshinari, Noguchi Noriko, Saito Yoshiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Selenoprotein P-neutralizing antibodies improve insulin secretion and glucose sensitivity in type 2 diabetes mouse models	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-01863-z	査読の有無 有
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 H. Misu, H. Takayama, Y. Saito, Y. Mita, A. Kikuchi, K. A. Ishii, K. Chikamoto, T. Kanamori, N. Tajima, F. Lan, Y. Takeshita, M. Honda, M. Tanaka, S. Kato, N. Matsuyama, Y. Yoshioka, K. Iwayama, K. Tokuyama, N. Akazawa, S. Maeda, K. Takekoshi, S. Matsugo, N. Noguchi, S. Kaneko and T. Takamura	4. 巻 23
2. 論文標題 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Medicine	6. 最初と最後の頁 508 ~ 516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nm.4295	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 H. Misu, H. Takayama, Y. Saito, Y. Mita, A. Kikuchi, K. A. Ishii, K. Chikamoto, T. Kanamori, N. Tajima, F. Lan, Y. Takeshita, M. Honda, M. Tanaka, S. Kato, N. Matsuyama, Y. Yoshioka, K. Iwayama, K. Tokuyama, N. Akazawa, S. Maeda, K. Takekoshi, S. Matsugo, N. Noguchi, S. Kaneko and T. Takamura	4. 巻 23
2. 論文標題 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Medicine	6. 最初と最後の頁 508-516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nm.4295	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 K. Chikamoto, H. Misu, H. Takayama, A. Kikuchi, K. A. Ishii, F. Lan, N. Takata, N. Tajima-Shirasaki, Y. Takeshita, H. Tsugane, S. Kaneko, S. Matsugo and T. Takamura	4. 巻 478
2. 論文標題 Rapid response of the steatosis-sensing hepatokine LECT2 during diet-induced weight cycling in mice	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 1310-1316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2016.08.117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 M. Tanaka, Y. Saito, H. Misu, S. Kato, Y. Kita, Y. Takeshita, T. Kanamori, T. Nagano, M. Nakagen, T. Urabe, T. Takamura, S. Kaneko, K. Takahashi and N. Matsuyama	4. 巻 30
2. 論文標題 Development of a Sol Particle Homogeneous Immunoassay for Measuring Full-Length Selenoprotein P in Human Serum	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J Clin Lab Anal	6. 最初と最後の頁 114-122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcla.21824	査読の有無 有
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 Y. Isobe, M. Sakurai, Y. Kita, Y. Takeshita, H. Misu, S. Kaneko and T. Takamura	4. 巻 7
2. 論文標題 Fat-free mass and calf circumference as body composition indices to determine non-exercise activity thermogenesis in patients with diabetes	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig	6. 最初と最後の頁 352-358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.12421	査読の有無 有
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13件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hirofumi Misu
2. 発表標題 Contribution of the hepatokine selenoprotein P to the various pathologies of type 2 diabetes
3. 学会等名 The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress: FAOPS2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 御簾博文
2. 発表標題 ヘパトカインセレノプロテインPと糖尿病全身病態との関連
3. 学会等名 第33回日本糖尿病・肥満動物学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 御簾博文
2. 発表標題 ヘパトカインセレノプロテインPの2型糖尿病病態に対する多面的作用
3. 学会等名 日本薬学会第138年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 御簾博文
2. 発表標題 ヘパトカインによる糖代謝維持機構とその破綻
3. 学会等名 第32回日本糖尿病肥満動物学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 御簾博文
2. 発表標題 “サイレンシングヘパトカイン” セレノプロテインPの過剰による2型糖尿病関連病態の発症
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 御簾博文，高山浩昭，金森岳広，菊地晶裕，石井清朗，金子周一，簗. 俊成
2. 発表標題 ヘパトカインセレノプロテインPと筋受容体LRP1は活性酸素・AMPK経路の抑制によって運動抵抗性を誘導する
3. 学会等名 第60回日本糖尿病会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 御簾博文
2. 発表標題 ヘパトカインセレノプロテインPと骨格筋受容体LRP1による“運動抵抗性”の発症
3. 学会等名 第3回日本筋学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 御簾博文,高山浩昭, 金子周一, 篁. 俊成
2. 発表標題 ヘパトカインSePは筋受容体LRP1を介して運動抵抗性を惹起する
3. 学会等名 第90回日本内分泌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高山浩昭, 御簾博文, 菊地晶裕, 石井清朗, 斎藤芳郎, 金子周一, 篁俊成
2. 発表標題 ヘパトカインセレノプロテインPが惹起する運動療法抵抗性に関する解析
3. 学会等名 第31回日本糖尿病肥満動物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 御簾博文, 篁俊成
2. 発表標題 ヘパトカインセレノプロテインPの肥満関連病態に対する多面的効果
3. 学会等名 第37回日本肥満学会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 御簾博文, 篁俊成, 金子周一
2. 発表標題 ヘパトカインによる全身の恒常性制御
3. 学会等名 第3回肝臓と糖尿病・代謝研究会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hirofumi Misu
2. 発表標題 Regulation of glucose metabolism and angiogenesis by hepatokines
3. 学会等名 The 48th Annual Scientific Meeting of the Japan Atherosclerosis Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 御簾博文 篁俊成 金子周一
2. 発表標題 ヘパトカインセレノプロテインPの過剰産生は筋受容体LRP1を介して運動療法抵抗性の原因となる
3. 学会等名 第102回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2016年

〔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