

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月10日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20590128

研究課題名（和文） セレン化合物による2型糖尿病の発症予防とその作用機序

研究課題名（英文） Prevention of type 2 diabetes mellitus by selenium compounds

研究代表者

上野 仁 (UENO HITOSHI)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：20176621

研究成果の概要（和文）：糖尿病発症に及ぼすセレン状態やセレン化合物投与の影響とその作用機序を解明することを目的として本研究を行った。亜セレン酸ナトリウム (Na_2SeO_3) は、2型糖尿病モデル NSY マウスに対して血糖低下と糖負荷後の血漿中 insulin 濃度を上昇させ耐糖能改善効果を示した。そこで、有効な耐糖能改善効果を示す候補化合物として Na_2SeO_3 、methylseleninic acid および seleno-L-methionine (SeMet) を nicotinamide/streptozotocin 誘発性短期糖尿病マウスモデルを用いて検討したところ、SeMet が最も高い耐糖改善効果を有することが認められた。この効果は、膵臓におけるセレン含有量と glutathione peroxidase 1 (GPX1) mRNA 発現量の上昇、ROS 産生抑制と、血漿中の遊離脂肪酸 (FFA) および HbA1C 濃度の低下ならびに adiponectin 濃度上昇によることが示唆された。この耐糖能改善作用機序を検討したところ、SeMet は、3T3-L1 脂肪細胞に対して、GPX1 発現量の増大に伴う ROS 産生抑制による insulin receptor substrate のリン酸化制御を介して phosphatidylinositol-3-kinase を活性化し、glucose 取込みを促進することが示された。また、Hepa 1-6 細胞において、FFA としての palmitate 処理により insulin 抵抗性が増大した状態における細胞内 glycogen 貯蔵に対する SeMet の影響について検討した結果、SeMet は FFA による glycogen 量の低下を正常レベルまで回復させることが判明した。また、SeMet 処理によって Hepa 1-6 細胞内 GPX1 発現量が増大した。これらの結果から、SeMet は、脂肪細胞および肝細胞に対する GPX1 の賦活化による細胞内 ROS 産生の抑制を介した insulin signal 伝達系を促進させることによって、insulin 抵抗性を改善することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to investigate the effect and its mechanisms of various selenium status and/or ingestion of selenocompounds on the development of diabetes mellitus. The supplementation of sodium selenite (Na_2SeO_3) resulted in the decrease of blood glucose and the increase of plasma insulin after oral glucose tolerance test in type 2 diabetes model NSY mice. As the possible candidates effective for glucose tolerance, Na_2SeO_3 , methyl seleninic acid and seleno-L-methionine (SeMet) were administered to streptozotocin/nicotinamide-induced short-term diabetic mouse model, and the results indicated that SeMet was most effective against glucose intolerance. The effect is presumably related to increased selenium content and glutathione peroxidase 1 (GPX1) mRNA expression and suppressed ROS production in pancreas, and decreased free fatty acid (FFA) and HbA1C levels and increased adiponectin level in plasma. SeMet accelerated glucose uptake by phosphatidylinositol-3-kinase activation through the suppression of ROS production that was linked to the control of insulin receptor substrate phosphorylation in 3T3-L1 adipocytes. The glycogen storage lowered by treatment of palmitate as FFA in Hepa 1-6 cells was recovered by SeMet until the normal level. These results suggest that SeMet exhibits the improving effects against insulin resistance by promoting insulin signaling in adipocytes and hepatocytes through the suppression of ROS production because the selenocompound predominantly enhances GPX1 expression in both cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：セレン、糖尿病、インスリン、耐糖能、酸化ストレス、セレノメチオニン

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病の発症要因として、ポリオール代謝経路の亢進、グリケーション、protein kinase C (PKC)などが関わっていることが従来から指摘されている。さらに、これらの要因には活性酸素種(ROS)による酸化ストレスが重要な鍵となっていることが考えられる。一方、生体内には細胞内で産生された ROS を除去するための酸化ストレス防御系が備わっている。セレンは、このような酸化ストレス防御系を担う一連の生理活性物質として重要な役割を演じている。その機能の代表的なものとして、Se 含有酵素である glutathione peroxidase 1 (GPX1) や thioredoxin reductase 1 (TR1)がある。このように、セレンは酸化ストレス防御系の賦活化の観点から2型糖尿病の予防に重要な役割を演じている可能性が考えられるが、栄養生理学的に必要な生体内濃度の範囲は極めて狭いため、これまで健康維持や疾病予防のために積極的に摂取利用されてはいない。とくに、わが国では過剰摂取による毒性を憂慮し、セレンが健康補助食品に積極的に利用されていないのが現状である。しかしながら、高齢者や入院患者の疫学調査において、その血中セレン濃度が低下していることや、がん患者と健康者の血中セレン濃度との間に統計学的に有意差が認められていることから、日常的にセレン欠乏となっている集団が存在することが考えられ、それによる健康影響が懸念される。

2. 研究の目的

糖尿病発症に及ぼすセレン摂取の影響とその作用機序を解明することを目的として、まず自然発症2型糖尿病モデルマウスである NSY マウスを用いて検討を行う。本マウスモデルの病態発症機構は、膵島β細胞における insulin 分泌機構に関与する ATP 感受性 K⁺-channel および電位依存性 Ca²⁺-channel の異常に起因する insulin 分泌能障害と、insulin 標的組織の insulin 受容体の感受性の低下によるものとされ、ヒトの2型糖尿病の発症機序と極めて類似している。そこで、セレンの欠乏状態から準高用量摂取状態までの各種セレン状態の NSY マウスを作製し、セレン状態と2型糖尿病発症や病状の進行との関連性について検討する。すなわち、NSY マウスにセレン欠乏試料または通常試料を与えるとともに、標準的なセレン化合物として亜セレン酸ナトリウム (Na₂SeO₃) 含有飲料水を長期にわたり各濃度群で自由摂取させ、各組織中セレン含有量を測定するとともに、空腹時血糖値やグルコース負荷時血糖値ならびに GPX1 や TR1 などのセレン含有酵素活性や各組織中の ROS 産生量などを指標として、2型糖尿病発症に対するセレンの有効性を検討する。一方、NSY マウスは、48週齢で累積発症率が100%に達するため、長期間の検討を必要とする。そこで、低用量の STZ の複数回投与と、その標的となる膵島β細胞で枯渇しやすい nicotinamide を併用投与することにより、従来の STZ 誘発性糖尿病モデルとは異なる2型糖尿病のモデルに近い、しかも短期間で検討可能なマウスモデルを構築する。そのうえで、セレンの有効な化学形ならびに最適摂取量を明らかにする。つぎに、セレンによる2型糖尿病発症予防の作用機序を解明する目的で、セレンが酸化ストレス防御系の賦活化による insulin 分泌の改善によるものか、あるいはセレン化合物自体の insulin 様作用によるものかを明らかにする。そのため、まずマウスインスリノーマ MIN6 細胞を用い、insulin 産生およびその分泌に対するセレン化合物の影響について検討する。セレン化合物は、糖尿病モデルマウスを用いた検討によって明らかになった有効なセレン化合物を用いる。また、insulin 標的組織として脂肪および肝臓を想定し、マウス 3T3-L1 脂肪細胞および Hepa1-6 肝癌

細胞を用いて insulin 受容体下のシグナル伝達系に対するセレン化合物の影響について検討を行う。これらの検討によって、セレンによる2型糖尿病発症予防の作用機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究成果

(1) NSY マウスの耐糖能低下に対するセレン状態の影響

① セレン摂取条件の違いによる組織中セレン含有量

欠乏レベルから十分量の摂取レベルでセレンを摂取させたときの各種セレン状態の NSY マウスを作製するにあたり、まず、通常の飼育用飼料を与える条件下におけるマウスのセレン摂取レベルを検討することによって、栄養生理～十分量の摂取レベルの各種セレン状態を作製するために摂取させる Na₂SeO₃ 含有飲料水の濃度を設定した。すなわち、セレン欠乏飼料摂取群においては飲料水中の Na₂SeO₃濃度を0 (Se-deficient diet-feeding control group : DC 群)、1.4 (Se-deficient diet-feeding low selenium group : DL 群) および 7.0 mg/L (Se-deficient diet-feeding high selenium group : DH 群) に設定した。また、通常飼料摂取群においては Na₂SeO₃濃度を0 (Normal diet-feeding control group : NC 群)、1.4 (Normal diet-feeding low selenium group : NL 群)、2.8 (Normal diet-feeding middle selenium group : NM 群) および 7.0 mg/L (Normal diet-feeding high selenium group : NH 群) に設定した。

通常飼料摂取群の NSY マウスはセレンの摂取レベルに関係なく組織中のセレン状態は十分に高かった。一方、セレン欠乏飼料摂取群のマウスは、血漿および肝臓において欠乏状態から十分に高い状態までの各種セレン状態であった。しかしながら、膵臓においては、DC 群はセレン欠乏状態であったが、DH 群は血漿および肝臓よりも低いセレン状態および DL 群は DC 群と DH 群の中間のセレン状態であった。これらのことから、NSY マウスに通常飼料あるいはセレン欠乏飼料とともに、各種濃度の Na₂SeO₃ 含有飲料水を摂取させることによって、欠乏状態から十分に高い状態までの各種セレン状態の NSY マウスを作製することが可能であった。

② 空腹時および糖負荷後における血糖値および血漿中 insulin 濃度に対するセレン状態の影響

欠乏状態から十分に高い状態までの各種セレン状態の NSY マウスが得られたので、NSY マウスの耐糖能低下に対するセレン状態が及ぼす影響を検討するため、通常飼料あるいはセレン欠乏飼料とともに各種濃度の Na₂SeO₃ 含有飲料水を6, 8 および 12 週間摂取させた NSY マウスの空腹時および糖負荷後における血糖値および血漿中 insulin 濃度を測定した。

糖負荷後血糖値を測定した結果、通常飼料摂取群およびセレン欠乏飼料摂取群ともに、摂取期間に依存して糖負荷後血糖値は上昇した。通常飼料摂取群の糖負荷後の血糖値は、いずれの摂取期間においてもセレン状態の影響を受けなかった。しかし、セレン欠乏飼料摂取群のうち、DC 群の糖負荷後血糖値はいずれの投与期間においても NC 群より上昇した。この DC 群で認められた高い血糖値は、DL、DH 群とセレン摂取量が増加するにつれて低下することが認められた。

次に、空腹時および糖負荷後の血漿中 insulin 濃度に対するセレン状態の影響を検討した。糖負荷後の血漿中 insulin 濃度を測定した結果、通常飼料摂取群およびセレン欠乏飼料摂取群ともに、摂取期間の経過時間に依存して糖負荷後の血漿中 insulin 濃度は上昇した。通常飼料摂取群の糖負荷後の血漿中 insulin 濃度は、

血糖値と同様に NSY マウスのセレン状態に関係なく有意な変動は認められなかった。しかしながら、セレン欠乏飼料摂取群の血漿中 insulin 値は、投与 8 および 12 週間後において、セレン状態の上昇に依存して増加した。また、このときの DL および DH 群の糖負荷後の血漿中 insulin 濃度は NL および NH 群よりも高かった。

③ 膵臓における酸化ストレスおよびその防御系に対するセレン状態の影響

NSY マウスの膵臓中 GPX4 および TR 活性を測定したところ、いずれの活性も極めて低い値であった。そこで、NSY マウスの膵臓における酸化ストレスおよびその防御系に対するセレン状態が及ぼす影響を検討するため、膵臓中 TBA-RS 値、GPX1 活性および GSH 含量を測定した。セレン欠乏飼料摂取群における GPX1 活性は、いずれの摂取群および摂取期間においても、この飼料の摂取開始前よりも有意に低下した。また、その活性はセレン状態の増加に依存して回復することが認められた。このことは、セレン欠乏飼料摂取群の NSY マウスの膵臓においては、セレン状態の上昇によって GPX1 が賦活化されることを示唆している。

次に、GSH 含有量を測定した結果、セレン欠乏飼料摂取群の膵臓中 GSH 含有量は、いずれの摂取期間においても投与前と比較して顕著に低下した。また、セレン摂取量の違いによる膵臓中 GSH 含有量の有意な変動は認められなかった。そのため、セレン欠乏飼料を摂取させたときのセレン状態の NSY マウスの膵臓では GSH 含有量が低下し、GPX1 が酸化ストレス防御系として十分に機能していない可能性が示唆された。

NSY マウスの膵臓において、酸化ストレスによって増加する過酸化脂質の分解産物である TBA-RS 値がセレン状態によってどのように影響を受けるかについて検討した。セレン欠乏飼料摂取群では、DC 群の膵臓中 TBA-RS 値は投与期間に依存して高くなったが、この高 TBA-RS 値はセレン摂取量に対応するセレン状態に依存して低下する傾向を示した。このことは、セレン欠乏飼料を摂取させた NSY マウスの膵臓において酸化ストレスが亢進し、セレンの摂取に対応するセレン状態の上昇によってこれが抑制されることを示した。

(2) 短期誘発糖尿病マウスモデルの耐糖能低下に対する 3 種のセレン化合物の影響

① 短期糖尿病マウスモデルの確立

糖尿病予防に対して有効なセレンの化学形を明らかにするため、糖尿病動物モデルの耐糖能低下に対するこれら 3 種のセレン化合物の影響について検討を行った。NSY マウスを用いた場合、2 型糖尿病を自然発症するまでの病態の進行が遅いため、長期間の検討が必要である。そのため、糖尿病誘発剤として繁用されている STZ を投与することによって、短期間で糖尿病を発症する糖尿病動物モデルを作製して検討することにした。まず、緩和な条件下の糖尿病発症マウスモデルを作製するため、STZ に対する感受性が比較的高い系統と考えられている C57BL/6 マウスおよび ICR マウスを用い、NA/STZ 投与後の随時血糖値を経過的に測定した。その結果、両系統のマウスともに NA/STZ 投与によって、投与開始前よりも飼育期間に依存して血糖値が上昇した。これら両系統のマウスの血糖値を比較したところ、ICR マウスの方が C57BL/6 マウスよりも血糖値が上昇しやすく、NA/STZ 投与 5 週間後の血糖値は 200 mg/dL 以上も高くなった。このときの ICR マウスの血漿中 insulin 濃度は C57BL/6 マウスの約 1/5 の値であった。NA/STZ 投与 5 週間後に 2000 mg/kg glucose の経口投与による耐糖能試験を行った結果、血糖値は C57BL/6 および ICR マウスともに糖負荷 60 分後にピークに達し、その後徐々に低下した。この血糖値の上昇率は、ICR マウスの方が C57BL/6 マウスよりも有意に高いことから、前者をそのモデル動物に使用することにした。

② 短期誘発糖尿病マウスモデルの耐糖能低下に対する Na₂SeO₃、MSA および SeMet の影響

糖尿病予防に対して有効なセレンの化学形を検討するため、短期誘発糖尿病マウスを用い、比較的セレン含有酵素への取り込み

率が高いと考えられる Na₂SeO₃、MSA および SeMet を候補化合物として、このマウスの耐糖能低下に対する栄養生理レベルのセレン化合物投与の影響を検討した。すなわち、6 週齢の雄性 ICR マウスに NA および STZ を投与した後、セレン欠乏飼料とともに 158 μg (2 μmol) Se/kg Na₂SeO₃、MSA あるいは SeMet の各セレン化合物を 5 週間強制経口投与し、投与期間終了後の膵臓中セレン含有量を測定するとともに、投与期間中の体重および随時血糖値および投与期間終了後の糖負荷後血糖値を測定した。

短期誘発糖尿病マウスの各セレン化合物の投与 5 週間後の各投与群における膵臓中のセレン含有量を測定した結果、各セレン化合物の投与群の膵臓中のセレン含有量は、NA/STZ 投与に関係なく有意に増加した。また、SeMet を投与した場合にその増加率は最も顕著であった。この結果から、3 種のセレン化合物のうち SeMet が、短期誘発糖尿病マウスの膵臓におけるセレン状態を最も高めることが示唆された。

次に、短期誘発糖尿病マウスの耐糖能低下に対する影響を検討するため、各セレン化合物の投与期間中において随時血糖値を測定するとともに、各セレン化合物投与 5 週間後における glucose 経口負荷による耐糖能試験を行った。NA/STZ 単独投与群におけるマウスの血糖値は、投与前よりも顕著に増加し、NA/STZ 投与 1 週間後からセレン欠乏飼料のみの対照群に比べて有意に上昇した。NA/STZ+Na₂SeO₃ 併用投与群の血糖値は、Na₂SeO₃ 投与 2~4 週間において NA/STZ 単独投与群よりも有意に低下したが、この有意な低下は投与 5 週間後には消失することが認められた。NA/STZ+MSA 併用投与群の血糖値は、NA/STZ 単独投与群とほぼ同じレベルで有意差は認められなかった。一方、NA/STZ+SeMet 併用投与群の血糖値は、SeMet 投与 4 週間以降に NA/STZ 単独投与群よりも有意に低下することが認められた。

そこで、これらセレン化合物の投与 5 週間後に glucose 経口負荷による耐糖能試験を行った結果、いずれのセレン化合物も、その単独投与によって糖負荷後の血糖値はセレン欠乏飼料のみを摂取させた対照群と同じレベルであった。一方、NA/STZ 単独投与群の糖負荷後血糖値はセレン欠乏飼料のみを摂取させた対照群よりも有意に増加した。また、この血糖値は、NA/STZ+SeMet 併用投与群においてのみ、糖負荷 90 および 120 分後に NA/STZ 単独投与群よりも有意に低下することが認められた。

(3) SeMet による短期誘発糖尿病マウスモデルの耐糖能改善効果に対する膵臓の酸化ストレス防御系、insulin 分泌および標的組織への insulin 作用との関連性

① 短期誘発糖尿病マウスモデルの膵臓における酸化ストレス防御系および insulin 貯蔵に対する SeMet の影響

短期誘発糖尿病マウスモデルの検討において、SeMet が最も高い耐糖能改善効果を示したことから、膵臓における酸化ストレス防御系および insulin 貯蔵に対する SeMet 投与の影響を検討した。すなわち、SeMet を 158 μg (2 μmol) Se/kg の投与量で 5 週間投与した後、膵臓中 GPX1、GPX4 および TR1 mRNA 発現量および GSH 含有量、膵島中 8-OHdG 産生量および insulin 貯蔵量を測定した。まず、膵臓中 GPX1、GPX4 および TR1 mRNA 発現量を測定した結果、膵臓中 GPX1 mRNA 発現量は、NA/STZ 投与に関係なく SeMet 投与によって有意に増加した。一方、膵臓中 GPX4 および TR1 mRNA 発現量は、NA/STZ および SeMet 投与にかかわらず有意な変化は認められなかった。これらのことから、短期誘発糖尿病マウスモデルの膵臓における GPX1、GPX4 および TR1 mRNA 発現量のうち、GPX1 mRNA 発現量のみが SeMet 投与によって増加することが認められた。

酸化ストレスのマーカーである 8-OHdG を指標として、膵島中 8-OHdG 産生量を測定するため、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色および抗 8-OHdG 抗体による免疫染色を行った膵島の染色像を HE 染色で調べた結果、SeMet 投与に関係なく、NA/STZ 投与によって膵島の萎縮が観察された。一方、8-OHdG を検出するために免疫染色を行った結果、いずれの投与群も細胞核に 8-OHdG が検出された。これに加えて、NA/STZ 単独投与群および

NA/STZ+SeMet 併用投与群においては、細胞核の周辺部にも 8-OHdG が検出された。これらの染色像を用い、画像解析によって膵島全体の面積に対する 8-OHdG 陽性部分の面積比を膵島における 8-OHdG 産生量として表した結果、SeMet 単独投与群においては、セレン欠乏飼料のみを与えた対照群よりも 8-OHdG 産生量が有意に低下した。これに対して、NA/STZ 単独投与群の膵島における 8-OHdG 産生量は、セレン欠乏飼料のみを摂取させた対照群に比べて有意に増加した。しかしながら、これに SeMet を併用投与した場合、NA/STZ 単独投与群と比べて 8-OHdG 産生量は有意に抑制された。これらの結果から、セレン欠乏飼料の摂取および NA/STZ 投与によって膵島における ROS 産生量が増加し、8-OHdG 産生量が増加していることが考えられた。また、SeMet 投与によって膵臓の GPX1 が賦活化し、GPX1/GSH 系が酸化ストレス防御系として機能した結果、膵島の ROS 産生量が減少して 8-OHdG 産生が抑制されることが考えられた。

次に、膵島中の insulin 貯蔵量を把握するため、同組織の抗 insulin 抗体による免疫染色を行った結果、セレン欠乏飼料のみを摂取させた対照群および SeMet 単独投与群においては、膵島全体に insulin が検出された。これに対して、NA/STZ 単独投与群および NA/STZ+SeMet 併用投与群においては、insulin は膵島の一部のみ検出された。これらの染色像を用い、画像解析によって膵島全体の面積に対する insulin 陽性部位の面積比を膵島中 insulin 含有量として表した結果、セレン欠乏飼料のみを摂取させた対照群および SeMet 単独投与群の間には、膵島中 insulin 貯蔵量に有意差は認められなかった。しかしながら、NA/STZ 単独投与群の膵島中 insulin 貯蔵量は、セレン欠乏飼料のみを摂取させた対照群の約 55 % であり、SeMet の併用投与によってもこの値は増加しなかった。これらの結果より、膵島中 insulin 貯蔵量は NA/STZ 投与によって低下するが、これは SeMet 投与によって回復しないことが認められた。

② 短期誘発性糖尿病マウスモデルの血糖、血中 HbA1c、血漿中 insulin、FFA および adiponectin に対する SeMet の影響

SeMet は膵臓における GPX1/GSH 系の賦活化を介して膵島を酸化ストレスから防御することが示唆されたが、この酸化ストレス防御作用と NA/STZ 投与による耐糖能低下に対する SeMet の改善効果との関連性は低いことが示唆された。そこで、SeMet による耐糖能改善効果と血漿中 insulin 濃度との関連性について検討するため、158 μg (2 μmol) Se/kg SeMet 投与 5 週間後の短期誘発性糖尿病マウスモデルの血中 HbA1c 値、血漿中 insulin、FFA および adiponectin 濃度を測定した。まず、SeMet を 5 週間投与した場合の過去の累積的な血糖状態を表す指標となる HbA1c 値を測定した結果、血糖値と同様に、SeMet 単独投与によって血中 HbA1c 値は変化せず、セレン欠乏飼料のみを摂取させた対照群と同レベルであった。一方、NA/STZ 単独投与群の血中 HbA1c 値は、セレン欠乏飼料のみを摂取させた対照群よりも顕著に増加したが、これは SeMet の併用投与によって有意に低下することが認められた。このことより、SeMet は短期誘発性糖尿病マウスモデルに対して血糖降下作用を有することが確認されるとともに、この作用は SeMet を 5 週間投与している期間中に既に引き起こされていることが認められた。

この SeMet による血糖降下作用と血漿中 insulin 濃度との関連性を調べるために、SeMet 投与 5 週間後の血漿中 insulin 濃度を測定した結果、SeMet 単独投与群の血漿中 insulin 濃度は、セレン欠乏飼料のみを摂取させた対照群と比べて変化が認められなかった。一方、NA/STZ 単独投与群における血漿中 insulin 濃度は、セレン欠乏飼料のみを摂取させた対照群よりも顕著に減少した。しかしながら、この血漿中 insulin 濃度は、SeMet 併用投与によっても有意な変化が認められなかった。そこで、SeMet による血糖降下作用と血漿中 insulin 濃度との関連性をより詳細に検討するため、SeMet 投与 5 週間後に glucose 経口負荷による耐糖能試験を行った結果、糖負荷後血糖値を測定した場合、血糖値はいずれの投与群も糖負荷 30 分後にピークに達し、その後低下した。SeMet 単独投与群の糖負荷後の血糖値は、セレン欠乏飼料のみを

摂取させた対照群と比較して有意差は認められなかった。一方、NA/STZ 単独投与群の糖負荷後血糖値は、セレン欠乏飼料のみを摂取させた対照群よりも有意に増加したが、この血糖値は SeMet 併用投与によって糖負荷 90 および 120 分後に NA/STZ 単独投与群よりも有意に低下することが認められた。さらに、このときの血漿 insulin 濃度を測定した結果、NA/STZ 単独投与群を除いたいずれの群も、糖負荷 60 分後の血漿 insulin 濃度は糖負荷後直後に比べて増加し、これらはいずれも 120 分後には低下することが認められた。しかし、NA/STZ 単独投与群における血漿中 insulin 濃度は、糖負荷によって全く上昇しなかった。そのため、NA/STZ+SeMet 併用投与群の糖負荷 60 および 120 分後の血漿中 insulin 濃度は、NA/STZ 単独投与群よりも有意に高かったが、この 60 分後の値はセレン欠乏飼料のみを与えた対照群と比較して有意に低いことが認められた。さらに、SeMet 単独投与群の糖負荷 60 分後における血漿中 insulin 濃度は、セレン欠乏飼料のみを摂取させた対照群に比べて有意に低いことが認められた。これらの結果から、SeMet は NA/STZ 投与による血中 insulin 濃度の低下を一部回復することによって血糖降下作用を示すことが認められた。また、SeMet 単独投与時においては、糖負荷後の血糖値がセレン欠乏飼料のみを摂取させた対照群と同レベルにもかかわらず、糖負荷後の血漿中 insulin 濃度がこの対照群よりも低かったことから、SeMet が insulin 標的組織における insulin の血糖降下作用に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられた。

SeMet が insulin 標的組織において insulin receptor の感受性に影響を及ぼすか否かを検討した。すなわち、この標的組織における glucose 取り込みに影響を及ぼす FFA および adiponectin に着目し、SeMet 投与 5 週間後の短期誘発性糖尿病マウスモデルにおけるこれらの血漿中濃度を測定した。まず、SeMet 投与 5 週間後における各投与群の血漿中 FFA 濃度を測定した結果、SeMet 単独投与群においては、セレン欠乏飼料のみを与えた対照群よりも血漿中 FFA 濃度が減少する傾向が認められた。これに対して、NA/STZ 単独投与群の血漿中 FFA 濃度はセレン欠乏飼料のみを摂取させた対照群よりも有意に上昇したが、これに SeMet を併用投与した場合、血漿中 FFA 濃度は減少する傾向を示した。このことから、NA/STZ 投与による血漿中 FFA 濃度の増加が、SeMet の投与によって低下する傾向にあることが認められた。

次に、SeMet 投与 5 週間後に血漿中の adiponectin 濃度を測定した結果、SeMet 単独投与群の血漿中 adiponectin 濃度は、セレン欠乏飼料のみを摂取させた対照群との有意差は認められなかった。一方、NA/STZ 単独投与群の血漿中 adiponectin 濃度は、対照群よりも有意に低下したが、SeMet 併用投与によってセレン欠乏飼料のみを摂取させた対照群のレベルにまで回復することが認められた。したがって、NA/STZ 投与による adiponectin 分泌低下が、SeMet の投与によって改善されることが認められた。

(5) SeMet の耐糖能改善作用機序

① 3T3-L1 脂肪細胞における glucose 取込みおよび FFA 遊離に対する SeMet の影響

短期誘発性糖尿病マウスモデルを用いた検討において、SeMet は耐糖能改善効果を有し、膵臓における GPX1 mRNA 発現量上昇と ROS 産生の抑制ならびに NA/STZ 投与によって上昇した血漿中 FFA 濃度を低下させるとともに、低下した血漿中 adiponectin 濃度を回復させることが確認された。このことにより、SeMet はまず膵臓の酸化ストレス防御系を賦活化させることで insulin 分泌に影響を及ぼすことが考えられた。そこで、まずマウスインスリンノーマ MIN6 細胞の insulin 産生に対する SeMet の影響を検討した。その結果、SeMet は MIN6 細胞の insulin 産生および分泌にまったく影響しないことが判明した。

SeMet が脂肪組織での insulin 抵抗性を改善することが示唆されたため、短期誘発性糖尿病マウスモデルに対する SeMet の耐糖能改善効果には、insulin signal 経路を介した脂肪組織の glucose 取込みや FFA による ROS 産生に SeMet が影響を及ぼしていることが考えられる。そこで、糖・脂質代謝の実験系に多用されている

マウス胎仔由来の 3T3-L1 脂肪細胞を用いて SeMet が 2-DG の取込みを促進させるか否かについて検討を行った。その結果、0.1~5 μM SeMet 処理時において濃度依存的に 2-DG の取込み量は増加し、特に 1~5 μM においてその取込み量は有意に増加した。また、5 μM SeMet 処理時における 2-DG の取込み量は、1 nM insulin 処理時における 2-DG の取込み量の約 90 %程度を示した。

つぎに、isoproterenol 処理によって促進される FFA の遊離に対する SeMet の影響について検討した結果、isoproterenol 未処理において SeMet は FFA の遊離にほとんど影響を与えなかった。しかし、isoproterenol 処理によって促進された FFA の遊離は 1 nM insulin 処理時において有意に抑制され、また、2 および 5 μM SeMet 処理時においても FFA の遊離は有意に抑制された。

肥満により肥大化した脂肪細胞内において、FFA 産生によって惹起された ROS 産生の増大は、JNK を活性化して IRS serine 307 のリン酸化を促進し、insulin signal 経路を阻害することで glucose 取込みを阻害することが知られている。そこで、SeMet 処理時における 3T3-L1 脂肪細胞中の酸化的ストレス防御系酵素である GPX1、GPX4 および TR1 mRNA 発現量および細胞内 ROS 量の測定を行った。3T3-L1 脂肪細胞に対し、1~5 μM SeMet 処理時におけるこれら mRNA 発現量を測定した結果、SeMet 処理によって、GPX1 mRNA 発現量が増加したが、GPX4 および TR1 mRNA 発現量には有意な変化は観察されなかった。

3T3-L1 脂肪細胞中 ROS 産生に与える SeMet の影響について検討を行った。すなわち、1 nM insulin および 1~5 μM SeMet 処理時における細胞内 ROS 量を carboxy-DCFH-DA を用いて、CellomicsTM arrayscan によって測定した結果、1 nM insulin 処理時における細胞内 ROS 量の変化は認められなかった。しかし、SeMet は濃度依存的に細胞内 ROS 産生を有意に抑制した。

3T3-L1 脂肪細胞に対する SeMet の glucose 取込み促進作用が insulin signal 経路を介したものであるか否かについて検討を行った。すなわち、5 μM SeMet および 1 nM insulin 処理時における insulin receptor 関連因子 (Ins1, IRS1)、PI3-K に関与する因子 (Akt1, 2, 3) の p110 α catalytic subunit PI3K (PIK3ca, PIK3cb)、phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit (PIK3r1, PIK3r2) および PKC (prkcc, prkci, prkcz) の mRNA 発現量を real time RT PCR を用いて測定した結果、5 μM SeMet 処理時における insulin receptor および PI3-K 関連因子のうち、Akt, Pik3r および PKC mRNA 発現量は増加する傾向を示した。また、1 nM insulin 処理時においてもこれらの mRNA 発現量は増加する傾向を示した。

SeMet 処理によって、insulin receptor および PI3-K 関連因子の mRNA が誘導されることが示唆されたため、SeMet による glucose 取込み促進作用に insulin receptor tyrosin kinase のリン酸化や PI3-K の活性化が関与している可能性が考えられた。そこで、まず PI3-K の触媒サブユニットである p110 部位の阻害剤である wortmannin を用いて SeMet および insulin による 2-DG 取込み促進に対する影響を検討した。その結果、SeMet および insulin によって促進された 2-DG の取込みは、いずれの場合も 100 nM wortmannin 存在下で有意に抑制された。このことより、SeMet による 2-DG の取込みの促進作用は、insulin signal 経路の PI3-K か、それよりも上流において作用することが示唆された。

つぎに、insulin receptor tyrosin kinase のリン酸化阻害剤である HNMPA-(AM)₃ を用いて、SeMet および insulin による 2-DG 取込み促進に対する影響を検討した。その結果、insulin 処理によって促進された 2-DG の取込みは、10 μM HNMPA-(AM)₃ 存在下で有意に抑制されたが、SeMet 処理によって促進された 2-DG の取込みは、10 μM HNMPA-(AM)₃ 存在下において抑制されなかった。このことより、insulin の glucose 取込み促進には、insulin receptor tyrosin kinase のリン酸化を介して、PI3-K の活性化によって引き起こされることがあらためて確認された。しかし、SeMet による glucose 取込み促進には、insulin receptor tyrosin kinase のリン酸化は関与せず、その下流の PI3-K の活性化に至る insulin signal 経路において作用することが示唆された。

以上のことから、SeMet は細胞内の ROS 産生に依存する IRS の serine 307 残基のリン酸化または tyrosin 612 残基のリン酸化において関与している可能性が示唆された。そこで、SeMet が insulin signal 経路の IRS tyrosin 612 残基のリン酸化に間接的に関与するか否かについて検討を行った。すなわち、3T3-L1 脂肪細胞に対し 1~5 μM SeMet を処理したときの IRS tyrosin 612 残基のリン酸化タンパク質の発現量を測定した結果、insulin と同様に、SeMet は濃度依存的に IRS tyrosin 612 残基のリン酸化タンパク質の発現量を増加させた。

② Hepa1-6 細胞の glycogen 貯蔵に対する SeMet の影響

SeMet は脂肪細胞のみならず肝細胞に対しても insulin 抵抗性改善作用を示すかどうかを確認する必要がある。そこで、マウス肝癌由来 Hepa 1-6 細胞を用いて細胞内セレン量および細胞内 glycogen 貯蔵量に対する SeMet の影響について検討するとともに、酸化的ストレス防御系酵素として GPX1、GPX4 および TR1 mRNA を、また、セレンの貯蔵に関与すると考えられている selenoprotein P (SelP) mRNA 発現量を測定した。さらに、FFA として palmitate を処理することで insulin 抵抗性が増大した状態における Hepa 1-6 細胞の glycogen 貯蔵に対する SeMet の影響について検討した。

まず、Hepa1-6 細胞において SeMet がどの程度取込まれるかについて調べた。その結果、SeMet は濃度依存的に Hepa1-6 細胞内に取込まれ、5 μM SeMet を 24 時間処理した場合に取込まれたセレン量は約 40 ng Se/mg protein であった。この取込み量は、3T3-L1 脂肪細胞において 5 μM SeMet を無血清培地中で処理したときにおける 16 時間当たり取込まれたセレン量 (約 44 ng Se/mg protein) とほぼ同程度であった。このことより、SeMet は Hepa 1-6 細胞に対しても 3T3-L1 脂肪細胞とほぼ同程度に取込まれることが判明した。そこで、1~5 μM 濃度の処理条件において SeMet が insulin と同様に Hepa 1-6 細胞の glycogen 合成を促進するかどうかを検討した。すなわち、1 nM insulin または 1~5 μM SeMet を無血清培地中で 24 時間処理したときにおける Hepa1-6 細胞内 glycogen 量を測定したところ、1 nM insulin 処理時においては glycogen 量が有意に増加したが、1~5 μM SeMet 処理時においてはその貯蔵量に有意な変化は観察されなかった。

このことより、SeMet は insulin と異なり Hepa 1-6 細胞に対して glycogen 合成を直接促進させないことが示唆された。

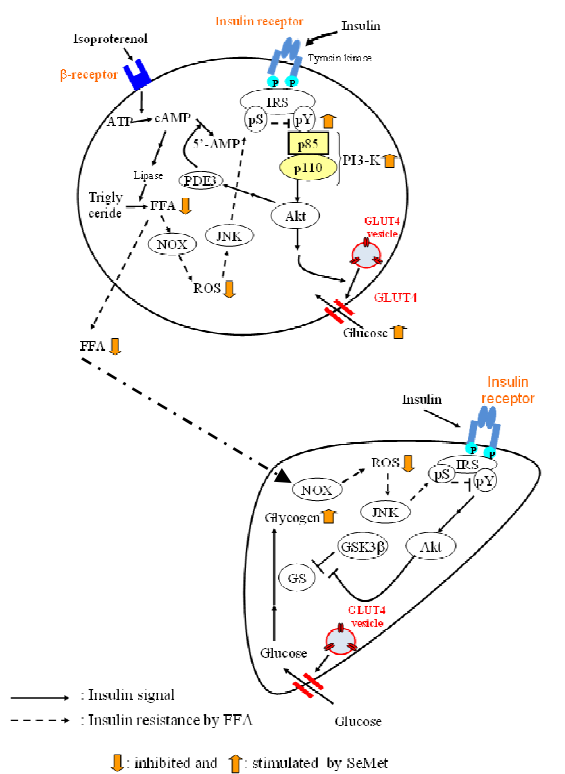
つぎに、SeMet が肝細胞に対して insulin 抵抗性を改善させるのか否かを明らかにするために、Hepa 1-6 細胞における酸化的ストレス防御系やセレン貯蔵に対する SeMet の影響について検討するとともに、0.2 mM palmitate を 6 時間処理することによって insulin 抵抗性が増大した状態における glycogen 貯蔵への影響について検討した。まず、1~5 μM SeMet 処理時における酸化的ストレス防御系酵素である GPX1、GPX4 および TR1 mRNA 発現量およびセレン貯蔵に関与する SelP mRNA 発現量を測定した結果、GPX1 および SelP mRNA 発現量は SeMet 処理濃度に依存して増大することが認められた。また、1 nM insulin 単独処理により細胞内 glycogen 量が増加したが、これに 0.2 mM palmitate を処理すると、その貯蔵量は有意に低下した。一方、1 nM insulin 存在下で 5 μM SeMet 処理した条件では、細胞内 glycogen 量に変化がなく、0.2 mM palmitate を処理した場合でも insulin 単独処理時で認められた有意な低下は観察されなかった。

(5) 総括

2型糖尿病モデル NSY マウスおよび短期誘発糖尿病マウスモデルを用い、セレンの糖尿病予防効果を検討したところ、とくに SeMet が耐糖能改善効果を示すと同時に、血漿中 FFA 濃度の抑制と adiponectin 濃度の上昇を惹起し、肝臓中 glycogen 貯蔵量を増加させることで insulin 抵抗性を改善させることが示唆された。

その作用機序を検討したところ、Scheme 1 に示すようなことが考えられる。すなわち、SeMet は脂肪細胞において GPX1 mRNA の賦活化を介して細胞内 ROS 産生を抑制することにより、JNK による IRS serine307 残基のリン酸化を抑制することで、

IRS tyrosin 612 残基のリン酸化を促進した。このことにより、PI3-K が活性化させ、Akt をリン酸化し、GLUT4 細胞膜局在化を引き起こすことで脂肪細胞内への glucose 取込みを促進することが考えられた。また、リン酸化された Akt は PDE3 をリン酸化して活性化させることによって、細胞内 cAMP の分解を促進して、脂肪分解を阻害することで FFA の産生を抑制することが考えられた。SeMet は脂肪細胞からの FFA の遊離を抑制することで肝細胞における insulin 抵抗性を改善することが考えられるとともに、FFA によって誘起された肝細胞での insulin 抵抗性を改善することが示唆された。この肝細胞における SeMet の insulin 抵抗性改善作用はおそらく GPX1 や SeIP の賦活化による酸化的ストレス防御系の亢進やセレン貯蔵の増大によって細胞内 ROS 産生が低下したことによることが考えられた。



Scheme 1. Proposed mechanism of insulin signal in adipocytes and hepatocytes, and the improvement action of SeMet against insulin resistance

IRS: insulin receptor substrate
 GS: glycogen synthase
 GSK3 β : glycogen synthase kinase-3 β
 PDE3: phosphodiesterase 3
 JNK: c-Jun N-terminal kinase
 Akt: AKT8 virus oncogene cellular homolog
 pY: phosphorylated tyrosine 612
 pS: phosphorylated serine 307

本研究では、SeMet が糖尿病マウスモデルにおける insulin 抵抗性改善効果を示し、この改善効果は脂肪細胞および肝細胞に対する insulin 抵抗性改善作用と深く関与していることが明らかになった。本研究の成果は、2 型糖尿病の予防を目的にセレンを利用する際の重要な基礎的知見になるものと考えられる。

4. 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 Ryo Shimizu, Fumitoshi Sakazaki, Tomofumi Okuno, Katsuhiko Nakamuro and Hitoshi Ueno, Difference in glucose intolerance between C57BL/6J and ICR strain mice with treptozotocin / nicotinamide-induced diabetes,

Biomedical Research, 査読有, 33(1), 2012, pp. 63-66.

- ② Ryo Shimizu, Hitoshi Ueno, Tomofumi Okuno, Fumitoshi Sakazaki, Katsuhiko Nakamuro, Effect of sodium selenite supplementation on glucose intolerance and pancreatic oxidative stress in type 2 diabetic mice under different selenium status, Journal of Health Science, 査読有, 55(2), 2009, pp. 271-280.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 荒川友博, 原義浩, 家次真優美, 坂崎文俊, 奥野智史, 上野仁, セレノメチオニンによるインスリン抵抗性改善作用の解析, 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 31 日, 北海道大学
- ② 荒川友博, 原義浩, 家次真優美, 清水良, 坂崎文俊, 奥野智史, 上野仁, セレノメチオニンによるインスリン抵抗性改善作用の解析, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 14 日, パシフィコ横浜
- ③ 原義浩, 家次真優美, 清水良, 荒川友博, 坂崎文俊, 奥野智史, 上野仁, セレノメチオニンのインスリン抵抗性改善作用とその機序, フォーラム 2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2011 年 10 月 27 日, 金沢エクセルホテル東急
- ④ 家次真優美, 原義浩, 芳松拓郎, 渡邊佳典, 福田葉月, 松尾有起, 荒川友博, 坂崎文俊, 奥野智史, 上野仁, 3T3-L1 脂肪細胞および Hepa1-6 肝細胞におけるセレノメチオニンのインスリン抵抗性改善作用機序, 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2011 年 10 月 22 日, 神戸学院大学ポートアイランドキャンパス
- ⑤ 原義浩, 家次真優美, 清水良, 中室克彦, 奥野智史, 坂崎文俊, 荒川友博, 上野仁, セレノメチオニンの 3T3-L1 細胞に対するインスリン様作用, 第 60 回日本薬学会 近畿支部総会・大会, 2010 年 10 月 30 日, 摂南大学
- ⑥ 原義浩, 家次真優美, 清水良, 中室克彦, 奥野智史, 坂崎文俊, 荒川友博, 上野仁, セレノメチオニンの 3T3-L1 細胞に対するインスリン様作用, フォーラム 2010 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2010 年 9 月 10 日, 星薬科大学
- ⑦ 上野仁, 清水良, 原義浩, 奥野智史, 坂崎文俊, 中室克彦, セレノメチオニンの短期糖尿病マウスモデルに対するインスリン様作用, フォーラム 2009 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2009 年 11 月 5 日, 沖縄コンベンションセンター
- ⑧ 清水良, 上野仁, 原義浩, 奥野智史, 坂崎文俊, 中室克彦, セレンによる糖尿病マウスモデルの耐糖能改善効果, 第 58 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2008 年 10 月 25 日, 神戸薬科大学
- ⑨ 上野仁, 清水良, 奥野智史, 坂崎文俊, 中室克彦, セレンの糖尿病マウスモデルに対する insulin 様作用, フォーラム 2008 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2008 年 10 月 17 日, 熊本市市民会館

5. 研究組織

(1)研究代表者
上野 仁 (UENO HITOSHI)
 摂南大学・薬学部・教授
 研究者番号: 20176621

(2)研究分担者
 なし

(3)連携研究者
 なし