

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：34310

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850089

研究課題名(和文) セレノプロテインP による膵臓ベータ細胞障害のメカニズム解析

研究課題名(英文) Mechanism study of the induction of cell death by selenoprotein P in pancreatic beta cells

研究代表者

高部 稚子 (Takabe, Wakako)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号：00436594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓 細胞由来細胞株を用いSeP の長時間添加による細胞死形態の解析を行った。糖尿病患者の血中濃度に相当するSePにより、アポトーシス実行因子であるcaspase-3の活性化が生じた。全caspase阻害剤により細胞死の緩和が認められることから、過剰なSePがアポトーシスを誘導することが示唆された。また、SePの添加により小胞体ストレスマーカーであるCHOP及びGRP78の発現亢進が認められ、更に小胞体ストレスを抑制することが報告されている4-フェニル酪酸により細胞死が抑制されたことから、SePは膵臓 細胞由来細胞株において、小胞体ストレスを介したアポトーシスを誘導していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Blood levels of selenoprotein P (SeP) are elevated in patients with type 2 diabetes. Also concentration of SeP correlated with insulin resistance. In this study, we aimed to clarify how excess selenoprotein P (SeP) induces disorder of MIN6 cells, a model of pancreatic beta cells. SeP induced cell death in dose-dependent manner in MIN6 cells. SeP induced caspase-3 activation and pan caspase inhibitor z-VAD-FMK rescued SeP-induced cell death suggested that excess SeP induces apoptosis in MIN6 cells. Several reports were shown the relationship between ER-stress and diabetes, in the next series of experiments we focused on contribution of ER-stress on SeP-dependent apoptosis. Marker proteins of endoplasmic reticulum (ER) stress such as CHOP and GRP78 were also induced by SeP. SeP-induced cell death were abolished by 4-Phenylbutyric acid, an inhibitor of ER stress. These result suggested that excess amount of SeP induced apoptosis via ER stress in pancreatic beta cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：糖尿病 細胞死

## 1. 研究開始当初の背景

(1) セレノプロテイン P (SeP)はセレン含有アミノ酸であるセレノシステイン (Sec) を 10 残基有する血漿セレノタンパク質であり、細胞に必須微量元素であるセレンを運搬する重要な役割を持つ。細胞内に運ばれた Sec を基に、セレン含有抗酸化酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼの合成が起こることから、SeP の酸化ストレス防御への寄与について研究がなされてきた。

しかし、近年、申請者の研究グループが、糖尿病患者の血中 SeP 濃度が健常人と比べて有意に高いこと、また、動物実験モデルにおいて、SeP 投与によりインスリン抵抗性が亢進することを報告した。しかし、過剰な SeP が糖尿病に寄与するメカニズムは未だ不明であった。

(2) 通常、食事等により上昇した血糖値は、膵臓のβ細胞から分泌されるホルモンであるインスリンにより筋肉等に取り込まれ、使用されることで恒常性が保たれている。その一方で、糖尿病患者、特に日本人の 95% を占める 2 型糖尿病患者では、全身のインスリン抵抗性を伴うことにより、血中の糖が取り込まれず、慢性的な高血糖状態を呈する。そのため、膵臓β細胞は、初期にはインスリン分泌量を増大させることで、血中の糖の消費を促すが、長期にわたる負荷により、最終的には細胞が障害を受け、インスリン分泌量の低下、あるいはβ細胞自体が細胞死により減少することが知られている。

このようにβ細胞の異常は、糖尿病態亢進と密接に関連している。日本の糖尿病患者数は 950 万人、予備軍も含めると 2000 万人以上との報告もあり(2012 年・厚生労働省「国民健康・栄養調査」)、今後も増加することが予想される。加えて、糖尿病は発症後数年を経て、その高血糖状態を原因とした網膜症・腎症・神経障害などの重篤な合併症を引き起こすことが知られており、予防法・治療法の確立が急務である。

## 2. 研究の目的

必須微量元素であるセレンは欠乏量と中毒量の幅が狭いことが知られているが、SeP についても、糖尿病患者の SeP 血中濃度は健常人と比べ 2 倍程度の差しかない。

我々は、糖尿病患者の血中濃度に相当する SeP が、インスリンを産生する膵細胞に障害を与えることで糖尿病の発症に寄与する、との仮説を立てた。本研究では、膵臓細胞由来細胞株において、SeP の長時間添加により生ずる細胞障害の詳細な解析を目指し、in vitro での検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験材料

細胞：マウス膵細胞由来細胞株・MIN6 細胞

SeP：ヒト血漿から精製し、定量後、リン酸緩衝液(PBS)にて濃度を調整した。

セレノシステイン：SeP と同等のセレン量を含む溶液として調整した後、使用した。

### (2) 細胞死の判定

SeP を細胞に添加した後、生細胞率を WST-8 法を用いて測定した。対照として、リン酸緩衝液(PBS)を添加したものをを用いた。

全カスパーゼ阻害剤 z-VAD-FMK 及び、小胞体ストレスの阻害剤である 4-フェニル酪酸は、SeP 添加 1 時間前に添加した。

### (3) ウエスタンブロット法

インスリンの検出は Tris-Tricine gel で行い、その他については 8%ないしは 10% acrylamide gel を用い、特異的抗体を用いて行った。

### (4) インスリン分泌量の測定

細胞に任意の刺激を与えた後、培養液を KREB buffer に置換し、緩衝液中に単位時間あたりに分泌されたインスリン量を、ELISA 法により定量した。

## 4. 研究成果

(1) マウス膵細胞由来細胞株である MIN6 細胞に可変量の SeP を添加し、72 時間培養した結果、濃度依存的な生細胞率の低下が認められた。健常人の血漿 SeP 濃度は 5  $\mu\text{g/ml}$  であり、糖尿病態では約 10  $\mu\text{g/ml}$  まで増加する。本研究で認めた MIN6 細胞死は、10  $\mu\text{g/ml}$  において有意に認められた(図 1)。SeP による MIN6 細胞死は、全カスパーゼ阻害剤 z-VAD-FMK によって抑制された。さらに、SeP 処理により、アポトーシス実行因子 Caspase-3 の断片化による活性化も確認された。このことから、過剰の SeP は、MIN6 細胞にアポトーシスを誘導することが示唆された。

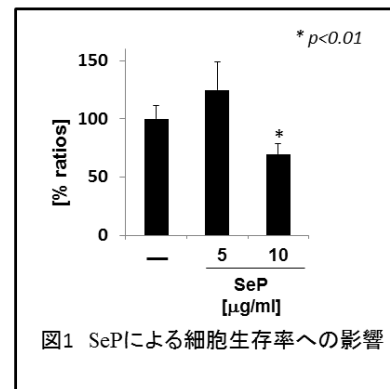


図1 SePによる細胞生存率への影響

興味深いことに、神経細胞や血球系細胞、筋芽細胞等、他の細胞株 6 種類を用い同様の

実験を行ったが、SeP による細胞死を示したものは膵臓 細胞由来細胞株のみであった。

(2) 近年、糖尿病の発症と小胞体ストレスとの関与が報告されていることから、膵臓細胞由来細胞株における SeP 誘導性アポトーシスへの、小胞体ストレス応答の関与について検討した。SeP 添加により、小胞体ストレス時に応答を示す転写因子である CHOP 及び分子シャペロンである GRP78 の誘導が起こることが示された。更に小胞体ストレスを抑制することが報告されている 4-フェニル酪酸 (4-PBA) により SeP 誘導性の細胞死が抑制されたことから、SeP は膵臓 細胞由来細胞株において、小胞体ストレス誘導性のアポトーシスを誘導していることが示唆された。

(3) SeP は、システインの硫黄がセレンに置き換わったセレノシステイン (Sec) の形でセレンを含む。MIN6 細胞死の誘導に SeP に含まれる Sec 自体が関与するかについて、セレノシスチン(2分子の Sec が Se 間で共有結合した化合物)の添加効果を検討した。その結果、セレノシスチン濃度依存的に MIN6 細胞死誘導が引き起こされた。また、SeP 10 µg/ml に相当するセレノシスチンで細胞死が認められたことから、SeP による細胞死の誘導には Sec の供給が関与していることが推測された。

次に、細胞内に供給された Sec のセレンを脱離し、細胞内セレン含有タンパク質の合成に関わる Selenocystein lyase (Scly)の関与について、siRNA 法を用いて検討した。SeP およびセレノシスチンによる MIN6 細胞死は、Scly のノックダウンにより有意に抑制された。

これらの結果から、SeP およびセレノシスチンにより供給された Sec から切り出されたセレンがアポトーシスの誘導に関与することが示唆された。更にセレノシスチンによる細胞死も、SeP 同様 細胞特異的であることを明らかにした。以上のことから、SeP が膵臓 細胞由来細胞において誘導する小胞体ストレスを介したアポトーシスには、セレン元素自体が関わっている可能性が示唆された。

(4) SeP が膵臓 細胞由来細胞株の機能に与える影響として、インシュリン合成・分泌について解析を行った。SeP による細胞死は添加後 72 時間以降に観察されるが、細胞内インシュリン合成・分泌とともに、細胞死が生じる前の SeP 添加後 48 時間において既に有意に低下していることが認められた。細胞死と同様、SeP によるインシュリン合成・分泌低下が 4-PBA により改善されることから、過剰の SeP が与える小胞体ストレスが、初期にはインシュリン合成・分泌の低下を惹起し、最終的に 細胞のアポトーシスに関与することが示唆された。

## 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 3 件)

Shibuya K, Watanabe T, Urano Y, Takabe W, Noguchi N, Kitagishi H. Synthesis of 24(S)-hydroxycholesterol esters responsible for the induction of neuronal cell death. *Bioorg Med Chem*. 2016 Jun 1;24(11):2559-66. 査読あり  
doi: 10.1016/j.bmc.2016.04.024.

Noguchi N, Urano Y, Takabe W, Saito Y. New aspects of 24(S)-hydroxycholesterol in modulating neuronal cell death. *Free Radic Biol Med*. 2015 Oct;87:366-72. 査読あり  
doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.036.

Vo DK, Urano Y, Takabe W, Saito Y, Noguchi N. 24(S)-Hydroxycholesterol induces RIPK1-dependent but MLKL-independent cell death in the absence of caspase-8. *Steroids*. 2015; 99(Pt B):230-7. 査読あり  
doi: 10.1016/j.steroids.2015.02.007.

[学会発表](計 5 件)

齋藤芳郎, 稲荷尚吾, 三田雄一郎, 高部稚子, 御簾博文, 篁俊成, 野口範子  
セレノプロテイン P による膵β細胞死に対するビタミン E の効果  
第 27 回ビタミン E 研究会 (2016 年 1 月 9 日)  
(香川、高松市)

稲荷尚吾, 高部稚子, 三田雄一郎, 御簾博文, 篁 俊成, 野口範子, 齋藤芳郎  
膵 細胞モデル MIN6 は過剰な Selenoprotein P により障害を受ける

第 88 回日本生化学会・第 38 回日本分子生物学会年会 合同年会 (BMB2015) (2015 年 12 月 3 日) 神戸ポートアイランド(兵庫、神戸市)

Khanh Vo-Diep, Yasuomi Urano, Wakako Takabe, Yoshiro Saito, Noriko Noguchi  
24(S)-Hydroxycholesterol Induces RIPK1-Dependent But MLKL-Independent Cell

Death in the Absence of Caspase-8.

SFRBM2015, Nov. 20, 2015 (Boston, USA)

Noriko Noguchi, Khanh Vo-Diep, Wakako Takabe, Yasuomi Urano, Yoshiro Saito

Two different ways for neuronal cell death induced by 24(S)-hydroxycholesterol.

European Network Oxysterol Res., Sep 25, 2015. (Bonn, Germany)

血漿セレン含有タンパク質 Selenoprotein P による膵臓 細胞障害のメカニズム解析

稲荷尚吾, 高部稚子, 三田雄一郎, 御簾博文, 篁 俊成, 野口範子, 斎藤芳郎

第 62 回日本生化学会近畿支部例会 (2015 年 5 月 16 日) 立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀、草津市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：ヒドロキシコレステロール脂肪酸エステル  
の検出方法

発明者：浦野 泰臣、野口 範子、北岸 宏亮、高部 稚子、丹野 将貴、渋谷 公幸、三宅 祥元

権利者：

種類：

番号：2015-186371

出願年月日：2015 年 11 月 9 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高部 稚子 (TAKABE, Wakako)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号：00436594