

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22480

研究課題名（和文）過剰な抗酸化・還元作用による生体障害「還元ストレス」の確立に向けた網羅的研究

研究課題名（英文）Omics analysis for the establishment of "reductive stress," a biological disorder caused by excessive antioxidant and reductive environment

研究代表者

齋藤 芳郎 (Saito, Yoshiro)

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：70357060

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：活性酸素を還元・無毒化する抗酸化システムは、細胞の生存維持に重要な役割を担っているが、近年、過剰な抗酸化・還元作用による生体障害(以下、還元ストレス)が、2型糖尿病の発症・進展に深く関与することが明らかとなってきた。そこで本研究では、還元ストレスを負荷した細胞の網羅的な解析から、過剰な還元状態における特徴的な細胞応答を同定し、還元ストレス応答を分子レベルで明らかにすることを目的として行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで活性酸素種による生体障害“酸化ストレス”が注目され、活発な研究がなされてきた。しかし、最近の研究から、微量のROSが適応反応を誘導して“良いストレス”として機能することや、シグナル伝達分子として機能する必須な役割も明らかとなってきた。一方、活性酸素種を消去する抗酸化系の向上による障害が見いだされ、本研究より“酸化と還元のバランスのとれた状態が重要である”というパラダイムシフトへの方向性が見いだされた。本研究を軸に“酸化は悪、還元は善”という形で築かれた学術体系を大きく変革し、様々な疾患や生活習慣病、老化に対する新たな学術大系「還元ストレス学」を確立する。

研究成果の概要（英文）：Antioxidant systems that reduce and detoxify reactive oxygen species (ROS) play an important role in maintaining cell homeostasis. However, in recent years, biological disorders induced by excessive antioxidants and reducing enzymes, namely reductive stress, have caused insulin resistance, involving in the onset and progression of type 2 diabetes. Thus, the purpose of this study is to identify the characteristic cellular response in the excessive reduction state by the comprehensive analysis and to clarify the reductive stress response at the molecular level.

研究分野：生化学 細胞生物学

キーワード：還元ストレス セレノプロテインP 膵 細胞 インスリン分泌 小胞体ストレス セレン代謝 インスリン抵抗性 硫黄代謝

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、研究者個人に帰属します。

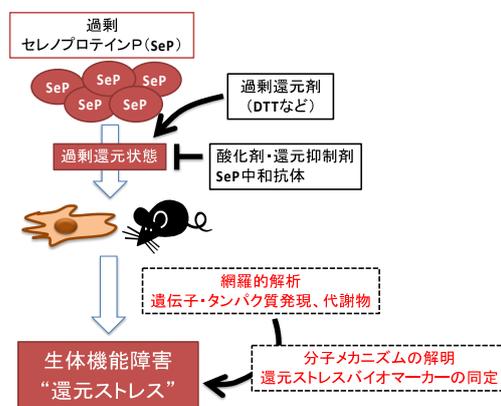
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

過酸化水素などの活性酸素を還元・無毒化する抗酸化システムは、細胞の生存維持に重要な役割を担っている。しかし、近年過剰な抗酸化による弊害・機能障害が報告されるようになった。申請者の研究から、2型糖尿病患者で抗酸化タンパク質セレノプロテインP (SeP)が増加し、過剰SePによる過度な抗酸化・還元作用による生体障害(以下、還元ストレス)が糖尿病の発症・進展に深く関与することが明らかとなった。しかし、その詳細は明らかでは無く、“還元ストレス”を定義づける細胞応答も明確では無い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、過剰な還元状態の亢進による生体障害“還元ストレス”の分子メカニズムを明らかにし、「還元ストレス学」を創出することである。本研究では、還元ストレスを負荷した細胞および臓器について、遺伝子発現、タンパク質発現および代謝物量の変化を網羅的に解析し、過剰な還元状態における細胞応答を明らかにすることを目的として行う。さらに、本研究により、還元ストレスに特徴的な生命現象を見だし、還元ストレス状態を示す“還元ストレスバイオマーカー”を同定する。以上、還元ストレス応答を分子レベルで明らかにし、共通した細胞応答を見いだして、“還元ストレスの生物学的概念”を確立する。本研究から“酸化と還元のバランスのとれた状態が重要である”というパラダイムシフトを目指す。本研究より、“酸化は悪、還元は善”で築かれた学術体系を大きく変革し、様々な疾患や生活習慣病、老化に対する新たな学術大系「還元ストレス学」を確立する。



本研究の概要

本研究では、過剰な還元状態による生体障害について、網羅的解析を行い、その分子メカニズムを明らかにして、“還元ストレスバイオマーカー”を同定する。本研究より、「還元ストレス学」の確立に挑戦する。

3. 研究の方法

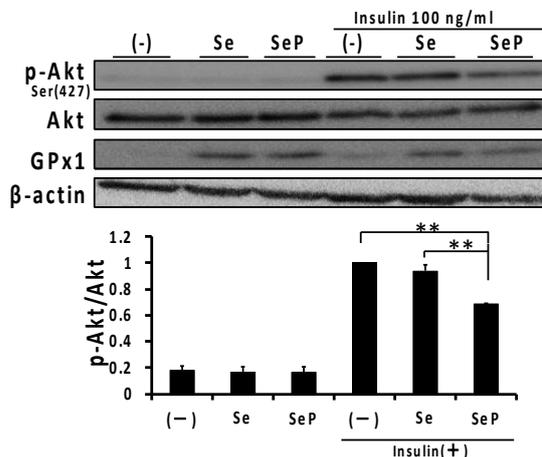
応募者は、抗酸化タンパク質“セレノプロテインP (SeP)”が2型糖尿病患者で増加することを見だし、培養細胞・マウスにおいて過剰SePによる還元ストレス誘導条件を確立している。SePは、細胞に必須微量元素“セレン”を運搬するトランスポーターである。SePによって運ばれたセレンは、活性酸素を還元・無毒化するGPxなどの細胞内セレン含有タンパク質の生合成に用いられる。我々の研究から、2型糖尿病患者で増加したSePが、過剰な抗酸化作用によりインスリン抵抗性やインスリン分泌を悪化させることが明らかとなった。過剰SePによる2型糖尿病の悪化には、過剰なセレン供給に伴う細胞内セレン含有タンパク質の増加、還元状態の亢進が関与すると考えられる。これまでに、2型糖尿病患者の血中SeP濃度(10 μg/ml、以下過剰SeP)による細胞機能障害の系として、骨格筋由来C2C12細胞、血管内皮細胞HUVEC、膵β細胞由来MIN6細胞(インスリン分泌の低下)の実験系が確立されている。さらに、過剰SePをマウスに投与するin vivoでの評価系(インスリン抵抗性・分泌など)も確立した。

本研究では、まず、骨格筋や膵β細胞モデルについて、過剰SePによる還元ストレス状態と類所の細胞応答を誘導する抗酸化物質(グルタチオン、ビタミンE・C)を同定し、細胞内の酸化還元状態の変化に伴う障害を明らかにする。次に、代謝物量を網羅的に解析し、還元ストレスにおける特徴的な細胞応答を見いだす。

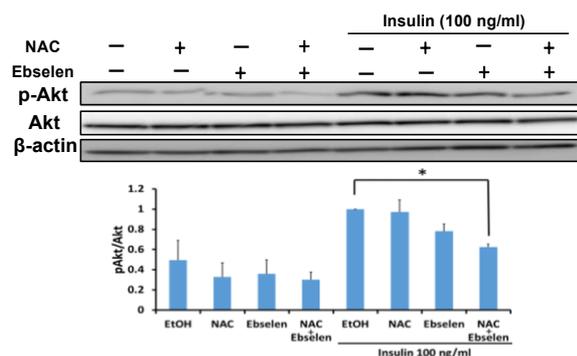
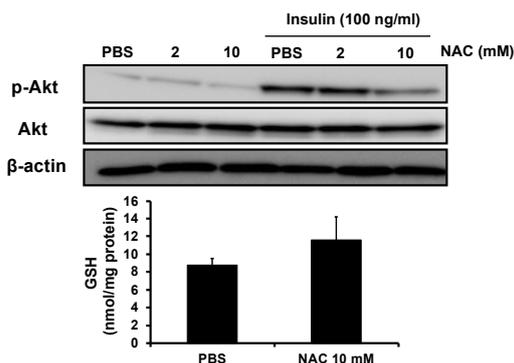
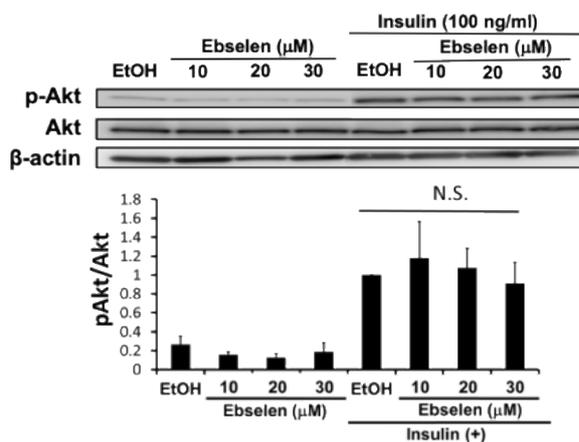
4. 研究成果

(1) C2C12 筋管細胞における還元ストレスによるインスリン抵抗性の誘導

これまで、骨格筋由来C2C12細胞では、過剰SeP添加に伴うインスリン抵抗性の誘導が認められている。過剰SePによるインスリン抵抗性の誘導が、セレン化合物で誘導可能か検討した結果、セレン源となる亜セレン酸ナトリウムやセレノシスチン(セレノシステインが2分子ジセレナイド結合したアミノ酸)では、過剰量添加してもインスリン抵抗性の誘導は認められなかった。なお、インスリン抵抗性の誘導は、インスリン添加後のAktリン酸化より評価を行った。右図にその一例



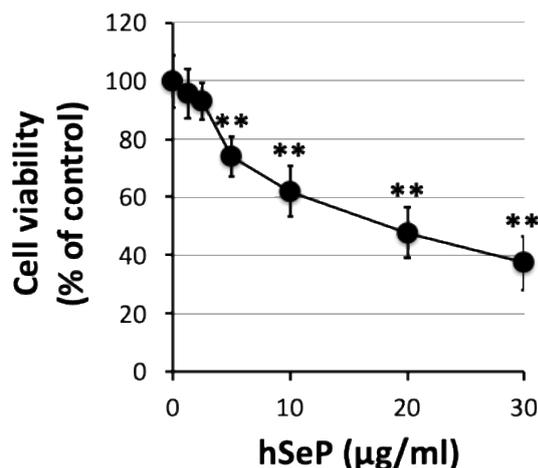
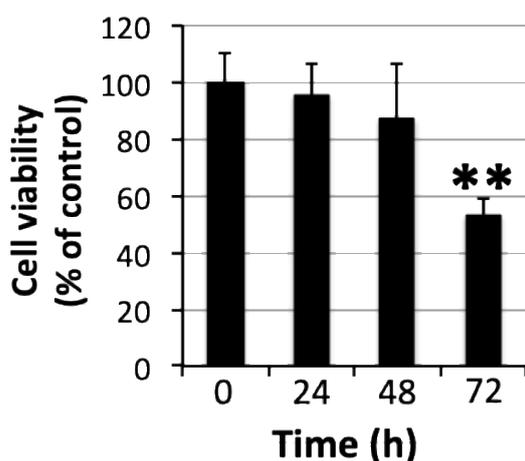
を示した。過剰 SeP では、Akt のリン酸化が有意に低下し、インスリン抵抗性が誘導されているのに対し、同程度細胞内セレン含有タンパク質を増加する亜セレン酸ナトリウムでは、インスリン抵抗性の誘導が認められなかった。同様に、セレノシスチンでもインスリン抵抗性が誘導されなかったことから、過剰 SeP によるインスリン抵抗性の誘導には、SeP のセレン供給作用だけでは説明できないと考えられた。さらに、GPx と類似の ROS 消去作用を示す低分子化合物エブセレンの添加効果についても検討を行った。その結果、細胞毒性を示さない濃度まで検討を行ったが、エブセレンはインスリン抵抗性を誘導しないことが明らかになった (右図)。

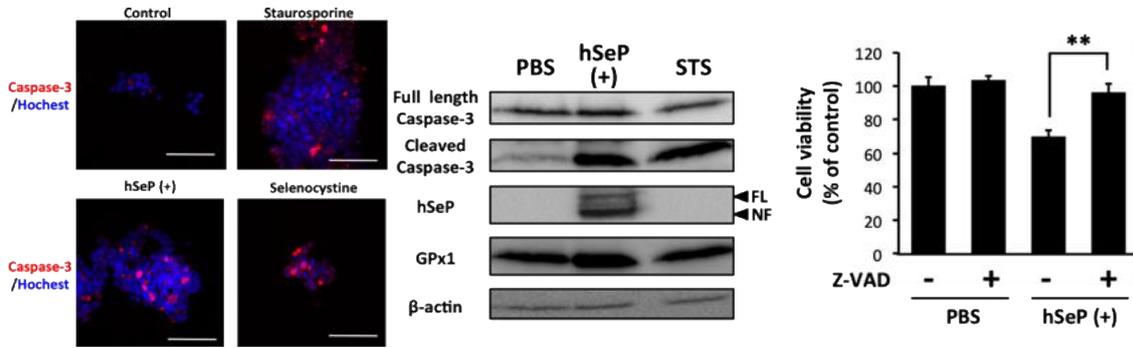


多くの培養細胞系で、細胞内グルタチオンを増加する n-アセチルシスチニン (NAC) がインスリン抵抗性を誘導することから、通常細胞保護実験に用いられている 2 mM および過剰量として 10 mM NAC で細胞を処理し、インスリン抵抗性の誘導を検討した。その結果、過剰 NAC 処理によりインスリン抵抗性が誘導されることが明らかとなった (上左図)。他方、過剰 SeP 処理により細胞内グルタチオンの増加を認めたことから、NAC とエブセレンの共存効果について検討を行った。その結果、それぞれ単独ではインスリン抵抗性を誘導しない濃度の NAC とエブセレンを共存させるとインスリン抵抗性が誘導された (上右図)。この結果から過剰 SeP による骨格筋インスリン抵抗性の誘導には、セレン供給および細胞内グルタチオンの増加が重要であると考えられた。過剰 SeP 処理 C2C12 筋管細胞において、網羅的解析を行い、上記経路と関連する代謝経路や、還元ストレスを示すバイオマーカーの探索を行った。今後、特異性について検証し、還元ストレスバイオマーカーを確立する。

(2) 膵 β 細胞モデル MIN6 における還元ストレスの誘導

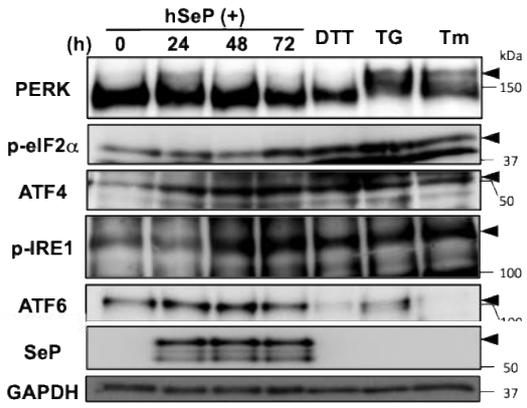
これまで、膵 β 細胞モデル MIN6 の過剰 SeP 添加後、48 時間までは生細胞数に影響を及ぼさないが、グルコース依存性のインスリン分泌が低下することが明らかとなった。過剰 SeP 処理時間を 72 時間まで延長した結果、有意な生細胞数の低下が認められた (下左図)。72 時間後の生細胞数低下の用量依存性では、5 μ g/ml 以上で生細胞数が低下することが分かった (下右図)。この結果から、糖尿病患者の血中 SeP 濃度に相当する 10 μ g/ml において MIN6 細胞の細胞死が誘導されることが分かった。





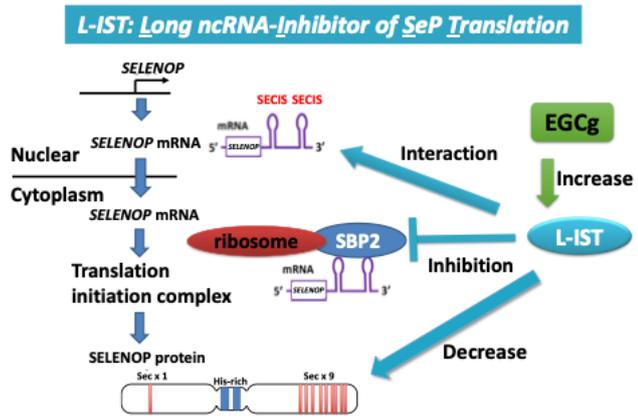
過剰 SeP による MIN6 細胞死の細胞死形態について検討を行った結果、活性化型 Caspase-3 特異的抗体による染色が認められ (上左図)、western blot 解析では活性化型 Caspase-3 のバンドが検出された (上中央図)。また、この細胞死は、Caspase 阻害剤である Z-VAD によって有意に抑制されることから、アポトーシス様の細胞死が誘導されていると考えられた (上右図)。

これまで、膵β細胞由来 MIN6 では、過剰 SeP 添加に伴う小胞体ストレス応答が観察されている。小胞体ストレスマーカーの経時的な変化について解析した結果、これまで同様 PERK のリン酸化は観察されなかったが ATF4 の増加、IRE1 のリン酸化が過剰 SeP 添加後、48 時間後から観察された (右図)。eIF2α のリン酸化は、72 時間後で顕著であった。また、ATF6 の変化は見られなかった。eIF2α や ATF4、IRE-1 の変化は、SeP と等量のセレノシチンや、還元剤 DTT でも観察され、過剰 SeP による細胞内還元環境の関係が示唆された。過剰 SeP 処理 MIN6 細胞において、網羅的解析を行い、上記経路と関連する代謝経路や、還元ストレスを示すバイオマーカーの探索を行った。今後、特異性について検証し、還元ストレスバイオマーカーを確立する。



(3) セレノプロテインP発現を低下するノンコーディング RNA L-IST の発見

SeP のゲノム配列を用いた相同性解析から、我々は SeP の mRNA 3' 非翻訳領域にあるセレノシチン挿入配列 (SECIS) に相同な配列を持つ遺伝子 *CCDC152* を見いだした。*CCDC152* の機能を探るべく、SeP を発現分泌スルヒト肝がん由来 HepG2 細胞にトランスフェクトした結果、*CCDC152* 遺伝子が SeP タンパク質レベルを低下する作用を持つ事を見いだした。さらに、*CCDC152* 遺伝子は開始コドンに相当する部位を除いても機能し、タンパク質としてではなく、ノンコーディング RNA として機能することがわかった。さらに、*CCDC152* 遺伝子は SeP mRNA と直接相互作用し、SeP mRNA への SECIS 結合タンパク質 2 (SBP2) の結合を低下し、リボソームのリクルートを阻害して、SeP タンパク質レベルを低下することが明らかとなった。*CCDC152* 遺伝子の上記機能から、SeP の翻訳を抑制する新規ノンコーディング RNA L-IST (LncRNA Inhibitor of SeP Translation) と命名した。L-IST を増加する低分子化合物を探索した結果、カテキン成分であるエピガロカテキンガレート EGCg が、L-IST を増加し、SeP タンパク質レベルを低下することが分かった。EGCg の SeP 低下作用における L-IST の役割を明らかにするため、L-IST siRNA 系を構築した結果、EGCg による SeP タンパク質の減少は、L-IST siRNA で有意に抑制された。この結果から、EGCg による SeP タンパク質低下作用に L-IST が関与することが明らかとなった。EGCg は、マウスに投与した場合にも L-IST を増加し、SeP タンパク質レベルを低下した。以上の結果を右上図にまとめた。上記、L-IST に関する研究結果を *Nucleic Acids Research* 誌に投稿し、受理された (IF 11.5)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kosuge Masato, Furusawa-Nishii Emi, Ito Koyu, Saito Yoshiro, Ogasawara Kouetsu	4. 巻 10
2. 論文標題 Point mutation bias in SARS-CoV-2 variants results in increased ability to stimulate inflammatory responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17766
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74843-x	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 Saito Yoshiro	4. 巻 703
2. 論文標題 Lipid peroxidation products as a mediator of toxicity and adaptive response-The regulatory role of selenoprotein and vitamin E	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 108840 ~ 108840
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2021.108840	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 Kikuchi Nobuhiro, Satoh Kimio, Satoh Taijyu, Yaoita Nobuhiro, Siddique Mohammad Abdul Hai, Omura Junichi, Kurosawa Ryo, Nogi Masamichi, Sunamura Shinichiro, Miyata Satoshi, Misu Hirofumi, Saito Yoshiro, Shimokawa Hiroaki	4. 巻 39
2. 論文標題 Diagnostic and Prognostic Significance of Serum Levels of SeP (Selenoprotein P) in Patients With Pulmonary Hypertension	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 2553 ~ 2562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/ATVBAHA.119.313267	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 Tsutsumi Ryouhei, Saito Yoshiro	4. 巻 43
2. 論文標題 Selenoprotein P; P for Plasma, Prognosis, Prophylaxis, and More	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 366 ~ 374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b19-00837	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 Saito Yoshiro	4. 巻 66
2. 論文標題 Selenoprotein P as an in vivo redox regulator: disorders related to its deficiency and excess	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.19-31	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 Saito Yoshiro	4. 巻 167
2. 論文標題 Selenoprotein P as a significant regulator of pancreatic cell function	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 119~124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz061	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 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 16件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Yoshiro Saito
2. 発表標題 Janus Face of Antioxidative Selenoprotein P: Friend or Foe?
3. 学会等名 Virtual 2021 Annual Meeting and ToxExpo (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 斎藤芳郎
2. 発表標題 抗酸化因子セレノプロテインPの機能と疾患 - 両刃の剣としての必須微量元素セレン
3. 学会等名 日本農芸化学会2021大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 斎藤芳郎
2. 発表標題 レドックス制御因子セレノプロテインPの発現制御と疾患
3. 学会等名 第1回レドックスR&D戦略委員会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 斎藤芳郎
2. 発表標題 セレノプロテインPを介した新規セレン輸送メカニズム
3. 学会等名 第73回 日本酸化ストレス学会 / 第20回日本NO学会 合同学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 斎藤芳郎
2. 発表標題 生命半金属セレンのダイナミクス制御機構の解明
3. 学会等名 フォーラム2020衛生薬学・環境トキシコロジー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 斎藤芳郎
2. 発表標題 セレン-硫黄代謝の接点およびクロストーク：生体内における識別とその制御
3. 学会等名 第47回 日本毒性学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤芳郎
2. 発表標題 血漿セレン含有タンパク質セレノプロテインPを標的とした生活習慣病の予防・治療法の開発
3. 学会等名 第61回 日本生化学会中国・四国支部例会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤芳郎
2. 発表標題 必須微量元素セレンの代謝と疾患－高血糖予測マーカーとしての可能性
3. 学会等名 第41回 東北薬学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiro Saito
2. 発表標題 Biology and Pharmaceutical Sciences of Essential Trace Element “Selenium” Development of Novel Prophylaxis for Type 2 Diabetes
3. 学会等名 International Symposium on Pharmaceutical Sciences in Sendai 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiro Saito
2. 発表標題 Selenoprotein P as a regulator of pancreatic beta cell function-Association between the pancreas and liver
3. 学会等名 8th International Selenium Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 斎藤芳郎
2. 発表標題 必須微量元素セレンの代謝と疾患-レドックス制御の破綻と酸化/還元ストレス
3. 学会等名 第20回 脳研 × 高度先進 × COI 合同セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 斎藤芳郎
2. 発表標題 過剰セレンプロテインPを標的としたテラーメイド2型糖尿病治療の開発-インスリン抵抗性およびインスリン分泌の改善
3. 学会等名 Scientific Exchange Meeting in 金沢 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiro Saito
2. 発表標題 Selenoprotein P and diabetes: Its excess and pancreatic toxicity
3. 学会等名 13th International Society for Trace Element Research in Humans (ISTERH2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 斎藤芳郎
2. 発表標題 生体内におけるセレン代謝とエネルギー産生
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiro Saito
2. 発表標題 Selenoprotein P as a significant redox regulator in vivo: Relevance to pancreatic beta cell function
3. 学会等名 1st STINT-JSPS Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiro Saito
2. 発表標題 Selenoprotein and lipid oxidation- Disorders related to its deficiency and excess
3. 学会等名 Japan-Aston symposium on lipid oxidation in inflammation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 城 宜嗣、津本 浩平	4. 発行年 2021年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 564
3. 書名 生命金属ダイナミクス~生体内における金属の挙動と制御~	

1. 著者名 内田 浩二	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 242
3. 書名 食と健康を結ぶメディカルサイエンス	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究内容
<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~taisya/outline/index.html>
 研究成果
<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~taisya/research/index.html>

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
研究分担者	堤 良平	東北大学・薬学研究科・助教	
	(Tsutsumi Ryouhei) (50435872)	 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
デンマーク	University of Copenhagen			
イタリア	University of Modena and Reggio Emilia			
ハンガリー	National Institute of Oncology	Dept. of Mol Immunol Toxicol		
デンマーク	Panum Institute University of Copenhagen			