

令和元年6月21日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08357

研究課題名(和文) インスリン抵抗性に及ぼすセレンタンパク質と体内レドックス制御解析

研究課題名(英文) Evaluation of effects of selenoprotein expression and redox control on insulin resistance

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： インスリン抵抗性と直接関係するセレンタンパク質を同定し、その作用機作と体内レドックス制御との関係を解析することを目的として本研究を行った。インスリン抵抗性マウスモデルを用いて検討した結果、インスリン抵抗性の発現には肥満による酸化ストレスの亢進とともに、セレン摂取による glutathione peroxidase (GPx) 1 および selenoprotein P (SepP) の関与が示唆された。

3T3-L1脂肪細胞およびHepa 1-6肝癌細胞を用いた検討において、SepPは肝細胞よりも他のインスリン標的細胞において作用することにより、インスリン抵抗性の増悪化に関与することが推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セレンは微量必須元素の一つあり、セレンタンパク質であるグルタチオンペルオキシダーゼ1は体内の酸化ストレス防御系を担う重要な酵素である。また、セレノプロテインPは肝臓で分泌される血漿中セレンタンパク質であり、従来はセレンの全身運搬・貯蔵として機能すると考えられてきた。日本人や北米人はセレン摂取量が比較的多いため、これらのタンパク質は体内で比較的多く発現していると考えられる。

本研究において、肥満による酸化ストレス亢進とともにセレン摂取により、これらのタンパク質の産生誘導とインスリン抵抗性の惹起が関係することを明らかにしたことは、学術的意義が大きいと思われる。

研究成果の概要(英文)： The study was performed to identify the selenoproteins that are directly related to an induction of insulin resistance and to clarify the mechanisms relating to their redox control in the insulin signaling. The NSY mouse model of insulin resistance exhibited that glutathione peroxidase 1 and selenoprotein P (SepP) induced by selenium supplementation contribute to the induction of insulin resistance, with the acceleration of oxidative stress by high fat diet ingestion-induced obesity.

The combination experiments of 3T3-L1 adipocytes with Hepa 1-6 hepatoma suggested that SepP may be related to an exacerbation of the insulin resistance by acting to the other insulin target cells rather than hepatocytes.

研究分野：環境・衛生系薬学

キーワード：セレン インスリン抵抗性 糖尿病 セレンタンパク質 レドックス 微量必須元素 ROS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

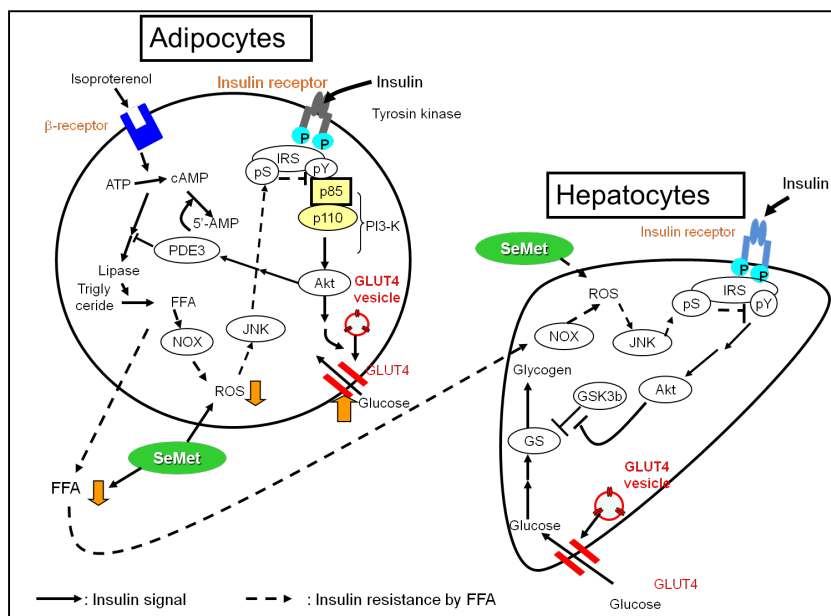
1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病は、遺伝的要因を背景に生活習慣を含む環境因子が作用することにより慢性高血糖をきたす代謝疾患の一群である。わが国では、糖尿病慢性合併症が急増し緊急な社会問題となっているが、2 型糖尿病発症の成因に関しては未だ分子レベルでの包括的解明には至っていない。このような代謝症候群の患者の多くは、インスリン作用の低下、すなわちインスリン抵抗性を示すようになることから、本疾患の発症機序を含め、その発症予防を導く因子とその作用機作を明らかにすることは大変重要である。

2 型糖尿病の予防因子として、脂肪細胞における脂肪分解抑制、脂肪合成促進および糖代謝の促進を指標とした、いわゆるインスリン様作用を有する物質のシーズ探索がなされてきた。一方、2 型糖尿病の発症要因として、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従来から指摘されている。セレンは、酸化ストレス防御系を担う重要な微量必須元素として重要な役割を演じており、その機能の代表的なものとして glutathione peroxidase (GPx) 1 および 4 や、thioredoxin reductase (TR) 1 などのセレン含有酵素が挙げられる。これらは、活性中心に seleno-L-cysteine 残基を有し、それぞれ glutathione (GSH)や thioredoxin (Trx) 1 を介して ROS を消去する。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ることが考えられるが、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、2 型糖尿病の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、患者と健常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。一方、北米地域では健常者の血中セレン濃度が比較的高い集団ほど高血糖であるという上記と正反対の疫学調査結果も報告されている。このため、体内のセレン状態とインスリン作用またはその抵抗性について未だ不明な点が多い。

このような背景から、本研究代表者はこれまでにセレンが 2 型糖尿病予防に有効であるかどうか、また有効である場合にどのような作用機序で発症を予防するかについて研究を行ってきた。その結果、ヒトの 2 型糖尿病と同様の機序で発症する動物モデルの NSY マウスに対してセレンが血糖上昇を抑制するとともに、streptozotocin (STZ)および nicotinamide (NA)併用投与による短期誘発糖尿病マウスモデルを開発して血糖低下に有効なセレン化合物を検索したところ、seleno-L-methionine (SeMet)が最も高い耐糖能改善効果を示すことや、膵島β細胞からのインスリン分泌量を十分高めることなく血糖降下作用を示すことを見出してきた。さらに、3T3-L1 脂肪細胞および Hepa 1-6 肝癌細胞を用いた検討により、SeMet の耐糖能改善作用機序として、脂肪細胞における insulin receptor substrate (IRS)の tyrosin 612 残基のリン酸化(pY)を介する phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)の活性化による glucose 取込みの促進および遊離脂肪酸の遊離の抑制と、脂肪細胞における遊離脂肪酸によって惹起された ROS 産生と、それによる glycogen 貯蔵量の低下を回復させることを明らかにし、その作用機作の一端を明らかにした。これらのインスリン標的組織において、SeMet は GPX1 の賦活化による酸化還元(redox)制御によってインスリン抵抗性を改善することをはじめて見出したことになる(右図)。

しかしながら、SeMet は同時に肝細胞に対して selenoprotein P (SepP)の発現も促進することが確認された。SepP は、肝臓で分泌される血漿中セレンタンパク質であり、従来はセレンの全身運搬・貯蔵として機能すると考えられてきた。しかし、SepP がインスリン抵抗性を反対に誘導することが報告されている a)。このことは、セレン摂取量を欠乏状態から栄養生理レベルまで上げることによってインスリン抵抗性の発症を予防するのに対して、それ以上の摂取レベルでは反対にインスリン抵抗性を誘導して 2 型糖尿病の罹患率を上昇させる可能性を懸念させる。そこで、本研究代表者はつぎに 2 型糖尿病マウスモデル NSY マウスに高脂肪食を摂取させてインスリン抵抗性を通常よりも早期に惹起させるとともに、SeMet を毎日経口投与し、インスリン抵抗性が惹起された状態における SepP を含むセレンタンパク質の発現を調べたところ、肝臓で発現するセレンタンパク質のうち、



SeMet は同時に肝細胞に対して selenoprotein P (SepP)の発現も促進することが確認された。SepP は、肝臓で分泌される血漿中セレンタンパク質であり、従来はセレンの全身運搬・貯蔵として機能すると考えられてきた。しかし、SepP がインスリン抵抗性を反対に誘導することが報告されている a)。このことは、セレン摂取量を欠乏状態から栄養生理レベルまで上げることによってインスリン抵抗性の発症を予防するのに対して、それ以上の摂取レベルでは反対にインスリン抵抗性を誘導して 2 型糖尿病の罹患率を上昇させる可能性を懸念させる。そこで、本研究代表者はつぎに 2 型糖尿病マウスモデル NSY マウスに高脂肪食を摂取させてインスリン抵抗性を通常よりも早期に惹起させるとともに、SeMet を毎日経口投与し、インスリン抵抗性が惹起された状態における SepP を含むセレンタンパク質の発現を調べたところ、肝臓で発現するセレンタンパク質のうち、

GPx1 発現量はセレン負荷および高脂肪食摂取のいずれにおいても上昇し、とくに両負荷によって相乗的に発現量が上昇することを見出した。一方、SepP 発現量は高脂肪食摂取によって上昇するが、セレン負荷には依存しないことが判明しつつある。

以上のことから、GPx1 はセレン摂取量に依存してインスリン抵抗性の改善にも、またその惹起にも関与するセレンタンパク質であり、SepP は高脂肪食摂取により惹起されるインスリン抵抗性には関係するが、その発現量はセレン負荷には依存しないという大変興味深い知見が得られつつあった。

a) Misu H. et al., A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab.* 12(5) 483-95 (2010).

2. 研究の目的

インスリン抵抗性と直接関係するセレンタンパク質を同定し、その作用機作と体内レドックス制御との関係を解析することを目的として本研究を行った。まず、セレン負荷したインスリン抵抗性マウスモデルを作製し、インスリン標的組織中の ROS 産生を測定するとともに、RT-PCR 法およびウエスタンブロッティング法を用いて GPx1 および SepP などのセレンタンパク質を中心に、それらの発現量およびインスリンシグナル分子の制御解析を行うことにより関連性を明らかにする。つぎに、インスリン標的細胞として脂肪細胞と肝細胞を用い、*in vitro* 系においてセレンタンパク質による redox 制御、ROS 産生とインスリンシグナル分子との関係を調べ、最終的にインスリン抵抗性の発症およびその予防に最も寄与するセレンタンパク質やその条件ならびに作用機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 2 型糖尿病モデル NSY マウスを用いた検討

インスリン抵抗性マウスモデルの標的組織におけるセレンタンパク質発現および ROS 産生の解析

2 型糖尿病マウスモデルである NSY マウスを用い、高脂肪食を摂取させることにより早期にインスリン抵抗性を発症するマウスモデルを作製する。このモデルマウス作製中に SeMet を毎日経口摂取させ、これらのマウスの膵臓ならびにインスリン標的組織である肝臓および脂肪組織におけるセレンタンパク質（とくに GPx1 および SepP）の発現量について RT-PCR 法およびウエスタンブロッティング法により測定するとともに、ROS 産生を 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)法または 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)法を用いて測定した。これらの検討により、インスリン標的組織におけるセレン負荷およびセレンタンパク質の発現と redox 状態との関係を解析した。

インスリン抵抗性マウスモデルの標的組織におけるインスリンシグナル分子の制御解析

インスリンシグナルの最初の IRS のリン酸化は PI3K を活性化するが、このリン酸化 IRS は protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B)活性体によって負に制御されている。また、PI3K は phosphatidylinositol4,5-bisphosphate (PIP2)を phosphatidylinositol3,4,5-tri-sphosphate (PIP3)にリン酸化することで phosphoinositide-dependent protein kinase (PDK)を活性化し、AKT をリン酸化して最終的に glucose transporter 4 (GLUT4)を細胞膜に局在化させて細胞内に glucose を取り込む。この PIP3-AKT 経路は、phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN)活性体によって負に制御されている。さらに、PTP-1B および PTEN は細胞内 ROS によって不活性化されると言われている。そこで、(1) のインスリン抵抗性マウスモデルのインスリン標的組織である肝臓を用い、PTP-1B および PTEN の発現を RT-PCR 法およびウエスタンブロッティング法により測定するとともに、これらの phosphatase 活性について、その不活性体および活性体の特異的抗体で捕捉して測定することにより、インスリン抵抗性を惹起したときのインスリンシグナルの制御解析を行った。

(2) 3T3-L1 脂肪細胞および Hepa 1-6 肝癌細胞を用いた検討

インスリン標的細胞のインスリンシグナル分子およびその制御因子に対するセレン負荷および遊離脂肪酸の影響解析

3T3-L1 脂肪細胞および Hepa 1-6 肝癌細胞を用い、SeMet および遊離脂肪酸処理によるセレンタンパク質（とくに GPx1 および SepP）の発現について RT-PCR 法およびウエスタンブロッティング法により測定するとともに、細胞内 ROS 産生および GLUT4 の発現について蛍光標識 ArrayScan により測定する。また、PTP-1B および PTEN の発現および phosphatase 活性を測定することにより、SeMet ならびに遊離脂肪酸の影響について検討した。

3T3-L1 脂肪細胞のインスリンシグナル分子およびその制御因子に対する SepP の影響解析

SepP は主に肝臓で産生され血漿中に分泌されるセレンタンパク質であるため、インスリン標的細胞である脂肪細胞に対しては、SepP は細胞外から供給されることが考えられる。そこで、3T3-L1 脂肪細胞を用い、セレン負荷として SeMet の代わりに Hepa1-6 肝癌細胞の培養上清に交換することにより、肝癌細胞から分泌された SepP が脂肪細胞においてインスリンシグナルに影響を与えるか否かについて検討した。

SepP ノックダウン肝細胞のインスリンシグナル分子およびその制御因子の解析

(2) に記したように、肝細胞では産生された SepP が直接インスリンシグナル分子およびその制御因子に作用している可能性が考えられる。そこで、Hepa 1-6 肝癌細胞に CRISPR/Cas9 を用いて 2 種類の vector を導入することにより、SepP 遺伝子発現をノックアウトした細胞を作製したこの細胞と通常の Hepa 1-6 細胞を比較することにより、SepP が肝細胞にインスリンシグナルに影響を与えるか否かについて検討した。

4. 研究成果

インスリン抵抗性と直接関係するセレンタンパク質を同定し、その作用機作と体内レドックス制御との関係を解析することを目的として、まず GPx1 または SepP とインスリン抵抗性との関連性を追求した。

(1) 2 型糖尿病モデル NSY マウスを用いた検討

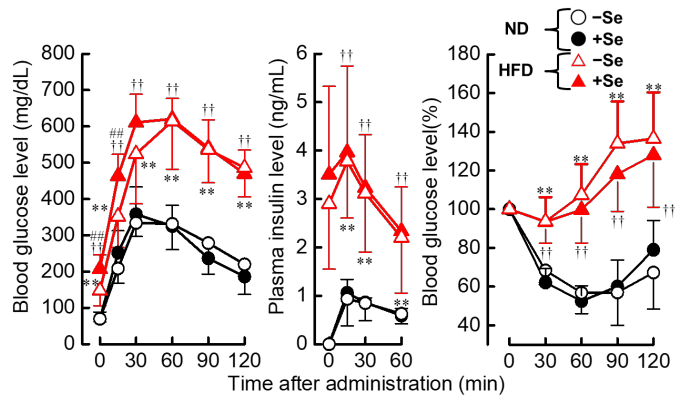
2 型糖尿病マウスモデルである NSY マウスを用い、2 mg/L SeMet 含有飲料水および高脂肪飼料 (HFD) を 12 週間自由摂取させることにより早期にインスリン抵抗性を発症するマウスモデルを作製して糖負荷試験 (OGTT)、インスリン負荷試験 (ITT) を行った。OGTT および ITT における血糖値は、HFD 摂取により有意に増加し、さらに SeMet 摂取により有意に増加した (右図)。そのときの血漿中インスリン量は HFD 摂取により有意に増加し、血漿中 adiponectin は有意に低

かった。

肝臓中 GPx1 mRNA 発現量は HFD および SeMet 摂取により有意に増加したが、肝臓中 Sepp1 mRNA 発現量は SeMet 摂取にかかわらず HFD 摂取により有意に増大した。また、これらのタンパク質発現量も同様であった (右図)。

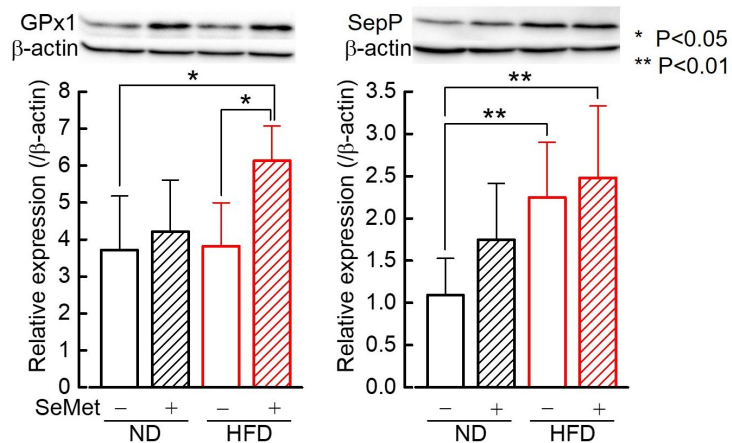
肝臓中 PTP 1-B 活性は HFD 摂取により有意に増加したが、SeMet 摂取により低下した。肝臓組織切片の HE 染色と 4-HNE 免疫染色により、脂肪滴の亢進と ROS 産生の亢進が確認された。

以上の結果、インスリン抵抗性の発現には肥満による酸化ストレスの亢進とともに、セレン摂取による GPx1 および Sepp1 の関与が示唆された。また、GPx1 の発現により PTP1-B 活性が上昇し、インスリンシグナル伝達が抑制されることが示唆された。



*P < 0.01 vs. ND control group, **P < 0.01 vs. ND SeMet treatment group, ##P < 0.01 vs. HFD control group at the same time points. N.D.: not detected

肝臓中 GPx1 および SepP 発現量



(2) 3T3-L1 脂肪細胞および Hepa 1-6 肝癌細胞を用いた検討

インスリン抵抗性マウスモデルを用いた検討では、その標的組織中のタンパク質の発現量や酵素活性の測定により、インスリン標的組織中のセレンタンパク質発現ならびに ROS 産生とインスリンシグナル分子の制御との関連性を推定できるが、より詳細な解析は難しい。そこで、*in vitro* 系において SepP を含めたセレン負荷による redox 制御、ROS 産生とインスリンシグナル分子との関係を調べた。

Hepa1-6 肝癌細胞に FFA を 16 時間曝露することにより ROS 産生が増加し、SepP mRNA 発現量が有意に上昇した。また、3T3-L1 脂肪細胞に FFA 曝露を行うと、GLUT4 mRNA 発現量が低下し、SeMet 曝露により TNF- α mRNA 発現量が上昇した。

これまでの検討では、SepP 量について ELISA 法による測定を何度も試みたが、未だ成功には至っていない。そこで、最終年度では新たに研究分担者を加え、機器分析による SepP の測定を試みた。SepP は標準品がないため、これをトリプシンで分解した時に生じるペプチド断片

を推測し、得られた 208 個のプリカーサーイオンやプロダクトイオンの m/z からデータ非依存的 MS/MS 取得法 (SWATH) にて SepP のペプチド断片を網羅的に測定した。また、分析の妨害となりうるアルブミンや IgG、トランスフェリンを除去するアフィニティカラムで精製したものを分析に使用した。しかしながら、マウス血漿および細胞培養培地のいずれのサンプルにおいても SepP を検出することができなかった。この原因として、アフィニティカラムで除去したものの以外にも SepP の検出を妨害する物質が存在する可能性が考えられ、さらに詳細に検討する必要性が示唆された。そこで、Hepa 1-6 肝癌細胞から分泌されうる SepP の影響を間接的に明らかにするため、肝癌細胞と 3T3-L1 脂肪細胞の共培養系について検討を行った。

培地同士交換後の条件下において、Hepa 1-6 肝癌細胞に FFA 曝露を行うと、SepP および PTP1B mRNA 発現量が上昇し、GLUT4 mRNA 発現量が減少した。

以上の結果から、Hepa1-6 肝癌細胞の FFA 曝露によって、インスリン抵抗性がより増悪化する可能性が示唆され、これに SepP mRNA 発現量の増加が関与する可能性が示唆された。そこで、Hepa1-6 肝癌細胞を用いて SepP ノックダウン細胞を作製し、SepP と細胞内インスリンシグナルに関与するリン酸化タンパク質 Akt との関連性について検討した。

Hepa1-6 細胞に CRISPR/Cas9 を用いて 2 種類の vector を導入することにより、SepP mRNA 発現量が一番低い細胞をスクリーニングした。タンパク質レベルでの SepP 発現量は、western blotting 法で測定した。これらの細胞に遊離脂肪酸(FFA)を曝露し、Akt のリン酸化割合を測定した。

Hepa1-6 細胞に G1 および G2 vector を導入したところ、SepP mRNA 発現量は低下傾向を示すが有意な低下は認められず、G2 vector を導入した場合のみに有意な低下が認められた。また、タンパク質レベルでの SepP 発現量も低下したため、G2 vector のみを導入した細胞をスクリーニングして SepP 発現量が最も低下した細胞を SepP ノックダウン Hepa1-6 細胞とした。Hepa1-6 細胞及び SepP ノックダウン細胞に FFA 曝露を行うことにより、両細胞とも FFA 曝露により Akt のリン酸化割合および p-Akt/Akt 割合が低下した。しかし、SepP ノックダウン細胞の Akt リン酸化割合および p-Akt/Akt の割合は、Hepa1-6 細胞よりも減少傾向を示した。

以上の結果から、Hepa1-6 細胞及び SepP ノックダウン細胞の FFA 曝露により、インスリン抵抗性が増悪化する可能性が示唆された。また、SepP は肝細胞よりも脂肪細胞などのほかのインスリン標的細胞に作用することにより、インスリン抵抗性の増悪化に関与することが推定された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Koichi Murano, Hirofumi Ogino, Tomofumi Okuno, Tomohiro Arakawa, Hitoshi Ueno, Role of Supplementary Selenium on the Induction of Insulin Resistance and Oxidative Stress in NSY Mice Fed a High Fat Diet, *Biol. Pharm. Bull.*, 41(1), 92-98, 2018. 査読有
<https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00622>

Hitoshi Ueno, Ryo Shimizu, Tomofumi Okuno, Hirofumi Ogino, Tomohiro Arakawa, Koichi Murano, Katsuhiko Nakamuro, Effect of Seleno-L-methionine on Oxidative Stress in the Pancreatic Islets of a Short-Term Induced Diabetic Mouse Model in Insufficient Selenium Status, *Biol. Pharm. Bull.*, 41(1), 80-85, 2018. 査読有
<https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00603>

[学会発表] (計 8 件)

須澤大輝、村野晃一、荻野泰史、荒川友博、奥野智史、上野 仁、Hepa1-6 肝癌細胞におけるインスリンシグナルと SepP 発現との関連性、2019 年 3 月 21 日、日本薬学会第 139 年会、幕張メッセ (千葉) 。

Hirofumi Ogino, Koichi Murano, Tomofumi Okuno, Tomohiro Arakawa, Hitoshi Ueno, Role of supplementary seleno-L-methionine on oxidative stress and the induction of insulin resistance in high fat diet-fed NSY mice, 2018 年 10 月 1 日、The 7th International Selenium Conference (Shiga, Japan)。
須澤大輝、仲江美咲、村野晃一、荻野泰史、荒川友博、奥野智史、上野 仁、インスリン標的細胞のインスリン関連遺伝子とセレンタンパク質遺伝子発現との関連性、2018 年 3 月 25 日 ~ 2018 年 3 月 28 日、日本薬学会、もてなしドーム (金沢) 。

村野晃一、荻野泰史、荒川友博、奥野智史、上野 仁、インスリン抵抗性とセレンタンパク質発現およびレドックス状態との関連性、第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会、2017 年 10 月 21 日 ~ 22 日、徳島大学 (徳島) 。

村野晃一、仲江美咲、西田侑樹、岸田悠人、荻野泰史、荒川友博、奥野智史、上野 仁、インスリン抵抗性発現に及ぼすセレンタンパク質の機能解析、フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー、2017 年 9 月 1 日 ~ 2 日、東北医科薬科大学 (仙台) 。

村野晃一、仲江美咲、西田侑樹、荻野泰史、荒川友博、奥野智史、上野 仁、インスリン標的細胞におけるインスリン抵抗性とセレンタンパク質発現との関連性、2017 年 3 月 24 日 ~ 27 日、日本薬学会第 137 年会、仙台国際センター (仙台) 。

堀切優也、村野晃一、片岡佑介、荻野泰史、荒川友博、奥野智史、上野 仁、2 型糖尿病マウスモデルのインスリン抵抗性におけるセレンタンパク質の関与、第 66 回日本薬学会近畿

支部総会・大会、2016年10月15日、大阪薬科大学（大阪）。
村野晃一、堀切優也、片岡佑介、荻野泰史、荒川友博、奥野智史、上野 仁、インスリン標的組織におけるレドックス状態とセレンタンパク質発現との関連性、フォーラム 2016：衛生薬学・環境トキシコロジー、2016年9月10日～11日、昭和薬科大学（東京）。

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：荻野 泰史

ローマ字氏名：(Hirofumi Ogino)

所属研究機関名：摂南大学

部局名：薬学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：80617283

研究分担者氏名：村野 晃一

ローマ字氏名：(Koichi Murano)

所属研究機関名：地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所

部局名：衛生化学部

職名：研究員

研究者番号（8桁）：50827277

(2)研究協力者

研究協力者氏名：須澤 大輝

ローマ字氏名：(Taiki Suzawa)

※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。