

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07073

研究課題名(和文) 加齢に伴う筋萎縮とインスリン抵抗性評価のための体内セレンおよびレドックス制御解析

研究課題名(英文) Analyses of selenium status and redox control for evaluation of atrophy and insulin resistance with aging

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) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：加齢に伴う筋力低下とインスリン抵抗性を評価するため本研究を行った。NSYマウスに高脂肪飼料を摂取させることで耐糖能低下とインスリン抵抗性が惹起されたが、SAMP1マウスではこのような変化は起こらなかった。SAMP1とSAMR1マウスで比較した場合、遺伝的な老化促進により運動機能低下、インスリン抵抗性惹起及び腓腹筋中SeIW発現量の有意な低下が観察された。

耐糖能異常のバイオマーカーの検討を行った結果、NSYマウスの高脂肪飼料摂取による血中SeIP及びセレン摂取による血中GPx3濃度が有意に増加した。そのため、血中SeIPは内臓脂肪症候群におけるインスリン抵抗性の指標となることが示唆された。

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であり、セレンタンパク質は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、加齢に伴う筋力低下とインスリン抵抗性との関係が明らかになるとともに、血中SeIPが内臓脂肪症候群におけるインスリン抵抗性の指標となることが示唆されたことは学術的意義が大きく身体的フレイル予防のためのバイオマーカー開発の一助になることが期待される。

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 due to aging. Although the NSY mouse model of insulin resistance exhibited the significant decrease in glucose intolerance and the induction of insulin resistance by high fat diet (HFD) ingestion-induced obesity, the senescence-accelerated mice (SAM)P1 did not exhibit such effects. In comparison of SAMP1 with SAMR1 as the control, however, a genetically accelerated aging was responsible to the significant decreases in motility function and selenoprotein (Se)IW expression in gastrocnemius, as well as the induction of insulin resistance. There were also significant increases in serum concentrations of SeIP by SeMet + HFD administration of NSY mice, whereas the GPx3 was augmented by supplementary SeMet only. The result indicated that the blood secretion of SeIP would be rather an indicator of metabolic syndrome.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：セレン レドックス 糖尿病 サルコペニア フレイル

## 1. 研究開始当初の背景

フレイルは、高齢者によく認められる老年症候群であり、身体機能や認知機能が低下して生活環境要因に対する脆弱性が高まった状態として認識されている。その病態生理や早期発見のためのバイオマーカーなどは、未だ解明されていないのが現状である。しかし、身体的フレイルに至る過程には、サルコペニアと呼ばれる加齢に伴う筋力低下や筋萎縮のほか、免疫異常、神経内分泌異常などの障害が複合的に関与していることが推定されている。とくに栄養生理学的な観点からサルコペニアの関与が大きいとされており、その原因や作用機序を解明することは身体的フレイル予防のために極めて重要である。

サルコペニアの進行には、加齢とともに耐糖能異常の一因としてインスリン抵抗性が大きく関係しているかもしれない。インスリン抵抗性の発症要因として、活性酸素種 (ROS) による酸化ストレスが鍵となっている。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) 1~4、6 などや、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耐糖能異常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は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、我が国をはじめ北米地域では健常者のセレン摂取量が高く、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、生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耐糖能異常の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耐糖能異常を予防するかについて研究を行ってきた。その結果、seleno-L-methionine (SeMet) が血糖低下に最も有効なセレン化合物の一つであり、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、セレンが欠乏状態から栄養生理レベルの状態下では SeMet 摂取により血糖上昇を抑制するとともに、栄養生理レベル内の上限近くでは反対に SeMet 摂取が血糖上昇を促進することを見出してきた。<sup>1)</sup> また、同時に肝臓中 GPx1 発現の増大とともに、高脂肪飼料摂取により selenoprotein P (SelP) の発現が促進されることも確認した。SelP 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。しかしながら、最近 SelP 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。そのため、セレンの長期摂取とともに加齢による筋力低下や筋萎縮との関連性について解明することは疾病予防の観点から有意義である。

## 2. 研究の目的

本研究では、加齢に伴う筋力低下や筋萎縮ならびにインスリン抵抗性を評価するため、その指標となりうる血中セレンおよびインスリン標的組織中のセレンタンパク質発現との関係を解析することを目的とする。これらの解析により、身体的フレイル予防のためのバイオマーカー開発の一助になることが期待される。

## 3. 研究の方法

### 1) 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の解析

耐糖能異常と筋肉中セレンタンパク質との関連性について検討するため、2 型糖尿病マウスモデルである NSY マウス (3 週齢) を用い、高脂肪食を 12 週間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た。このモデルマウス作製と同時にセレン含有飲料水を 12 週間経口摂取させ、耐糖能 (OGTT) およびインスリン負荷試験 (ITT) を行った。これら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下腿腓腹筋およびヒラメ筋において、耐糖能異常による発現変化量の多いセレンタンパク質である GPx1 および SelP のほかに、SelW、SelH などの発現量について RT-PCR 法および western blotting を用いて測定した。

### 2) 老化促進マウスモデルの運動疲労耐性および標的組織におけるセレンタンパク質発現の解析

加齢による筋力低下や筋萎縮とセレンタンパク質発現について解析を行った。老化促進モデルマウスである senescence accelerated mouse で senescence prone 系統の SAMP1 マウス (3 週齢) およびその比較対照で正常老化する senescence resistant の SAMR1 マウス (3 週齢) を用い、16

週齢まで通常飼育を行った。その後、1)の実験と同様の条件で高脂肪食を与るとともにセレン含有飲料水を12週間経口摂取させた。定期的にロータロッドによる運動疲労耐性の度合いを計測した。また、1)の実験と同様に血中 SelP、GPx3 などの解析、インスリン標的組織中の SelW、SelH などのセレンタンパク質発現量を測定した。

### 3) 血中セレンタンパク質の飛行時間型質量分析法による定量法開発の検討

血中セレンタンパク質の定量法を開発するため、バイオマーカーの指標となり得る血中 SelP、GPx3 などのセレンタンパク質の精製、定量について飛行時間型質量分析法を用いて検討した。

## 4. 研究成果

### 1) インスリン抵抗性マウスモデルのインスリン抵抗性および筋肉中セレンタンパク質発現

加齢に伴う筋力低下や筋萎縮ならびにインスリン抵抗性を評価するため、まずインスリン抵抗性マウスモデルにおける筋肉中のセレンタンパク質発現について解析した。その結果、NSY マウスに高脂肪飼料を摂取させることで耐糖能が低下するとともにインスリン抵抗性が惹起され、それに加え、SeMet を摂取させることでさらに耐糖能が低下することが示唆された (Fig. 1)。

このインスリン抵抗性マウスモデルの標的組織中のセレンタンパク質発現を調べたところ、とくに肝臓中の GPx1 および SelP mRNA 発現量およびそれらのタンパク質発現量がそれぞれ SeMet 摂取および高脂肪食摂取によって増大することが確認された。そこで、今回あらたに検討した筋肉中のセレンタンパク質発現量を測定したところ、とくに腓腹筋において SeMet + 高脂肪食摂取群で有意に SelP 発現量が増大することが認められた (Fig. 2A)。

以上のことから、NSY マウスにおけるインスリン抵抗性惹起とともに筋肉中の SelP 発現量が増大することが示唆された。

### 2) 老化促進マウスモデルの運動疲労耐性および筋肉中セレンタンパク質発現

このマウスモデルは京都大学胸部疾患研究所の竹田らによって確立された純系マウス系統群であり、促進老化・短寿命を特徴とする SAMP 系統と、正常老化を示す SAMR 系統からなる。SAMP 系統は、促進老化・短寿命を示すのみならず、病理学的変化を基準とした選抜交配を経て、老化アミロイドーシス、骨粗鬆症、学習・記憶障害などの多様な老化病態を特徴とする亜系統が樹立されており、老化・寿命のメカニズムの解明あるいは、加齢に伴い発症する多様な病態の発症機序解明のために広く用いられている。そこで、NSY マウスでの検討と同様に、老化促進マウスの SAMP1 マウス及びそのコントロールの SAMR1 マウスを比較して検討した結果、SAMP1 マウスと SAMR1 マウス間で体重増加に有意な差は認められなかったが、SAMP1 マウスにおいて高脂肪飼料摂取により体重の増加傾向が見られた。一方、両マウス間で運動疲労耐性を比較したところ、SAMP1 マウスのほうが明らかに運動疲労による運動性の低下が観察された (Fig. 3)。

これらのマウスモデルに高脂肪食を摂取させたところ、SAMR1 に通常飼料を摂取させた群が最も耐糖能が高く、SAMP1 に高脂肪食を摂取させた群が最も耐糖能が低い傾向を示した

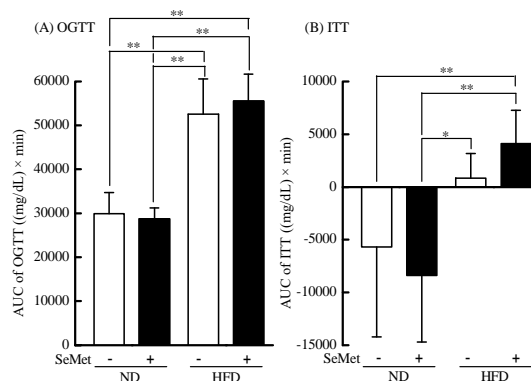


Fig. 1. Blood glucose area under the curves in OGTT (A) and ITT (B) of NSY mice on a supplementary SeMet and HFD. OGTT and ITT were performed 10 and 11 weeks after switching to a HFD and SeMet water. The blood glucose levels are shown as AUC. Values are the mean  $\pm$  SD (n = 8, \*\*P < 0.01).

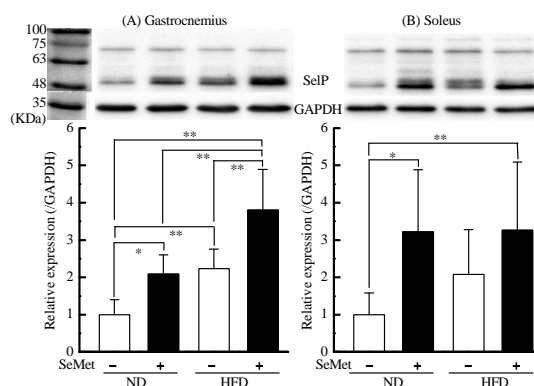


Fig. 2. Effect of a HFD and SeMet supplementation on SelP protein expression in gastrocnemius (A) and soleus muscles (B). Protein expression values are normalized to  $\beta$ -actin. Values are the mean  $\pm$  SD (n = 8, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01).

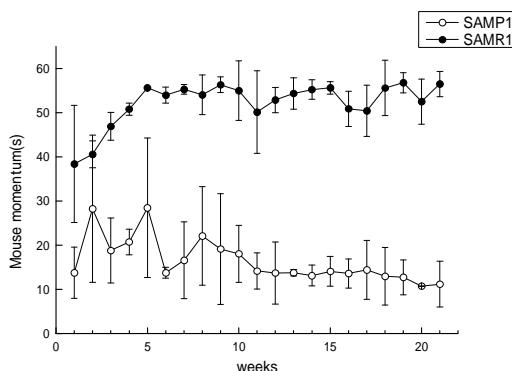


Fig. 3. Momentum in SAMP1 mice compared with SAMR1 mice. Values are the mean  $\pm$  SD (n=8).

( Fig. 4 ) また、SAMP1 に通常飼料を摂取させた群と SAMR1 に高脂肪食を摂取させた群において、ほぼ同程度の耐糖能を示した。

RT-PCR 法により peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator ( PGC ) -1 $\alpha$  およびセレンタンパク質の mRNA 発現を調べたところ、この高脂肪飼料摂取により肝臓、ヒラメ筋及び腓腹筋中の PGC-1 $\alpha$ 、GPx1、SelP、SelH 及び SelW mRNA 発現量が有意に高かった。しかし、通常飼料及び高脂肪飼料のいずれの摂取群においても、これらセレンタンパク質発現の増大にセレン負荷が関わっていないことが示唆された。一方、western blotting によるこれらセレンタンパク質発現量を調べたところ、このような高脂肪飼料摂取による有意差は認められなかった。そのため、NSY マウスによる検討結果とは異なり、SAMP1 マウス内では高脂肪飼料またはセレン摂取に依存する特徴的な変化は起こらないことが示唆された。しかし、SAMP1 マウスと SAMR1 マウス間で比較した場合、遺伝的な老化促進により運動機能の低下とともに高血糖及びインスリン抵抗性惹起及び腓腹筋における SelW 発現量の有意な低下が観察された ( Fig. 5 )

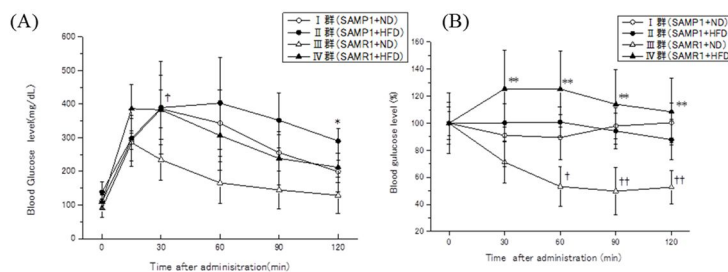


Fig. 4. Blood glucose levels by OGTT (A) and ITT (B) in SAMP1 and SAMR1 mice on a ND and HFD. OGTT are performed 7 weeks after switching to HFD. SAMP1 + ND (○), SAMP1 + HFD (●), SAMR1 +ND (△), SAMR1 + HFD (▲). Values are the mean  $\pm$  SD (n=8). Significantly difference: \* P<0.05: ND vs. HFD in SAMP1, † P<0.05: ND vs. HFD in SAMR1.

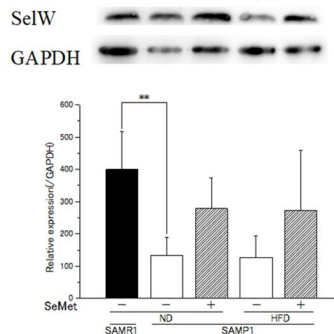


Fig. 5. The effect of a HFD and SeMet supplementation on SelW protein expression in the gastrocnemius muscle. Protein expression values are normalized to GAPDH. Value are the mean  $\pm$  SD (n=6-8). \*\*: p<0.01 SAMP1 vs SAMR1.

### 3 ) 血中セレンタンパク質の飛行時間型質量分析法による定量法の開発

耐糖能異常のバイオマーカーとしての可能性を検討するため、血中セレンタンパク質の定量法の開発を行った。マウス血清について、アフィニティカラムによる精製後、還元化およびアルキル化反応処理し、高速液体クロマトグラフ-飛行時間型質量分析計 ( LC-Q-TOF/MS ) を用いて検出可能な血清中タンパク質を網羅的に検討した。その結果、血中 SelP および GPx3 のペプチドフラグメントについて、各々4個および6個が検出可能であると判明した。また、LC-Q-TOF/MS の多重反応モニタリング ( MRM ) 法を利用した SelP および GPx3 ペプチドの相対定量法の検討を行ったところ、セレン負荷ならびに高脂肪飼料摂取のいずれの群においても検出強度が増大する傾向が見られた。

血中セレンタンパク質を分析するため、MRM 法にて確認した SelP および GPx3 のペプチド断片について合成品を入手し、LC-Q-TOF/MS のスキャンモードにてこれらペプチドの MS/MS スペクトルが一致するかどうかについて確認を行った。その結果、SelP および GPx3 のペプチド断片は MRM 法にて確認した特定のプロダクトイオンのみならず、他の検出されたプロダクトイオンの m/z も一致していた。これらの結果から、ソフトウェア上で確認された上記ペプチドは、正しく同定されていることが明らかとなった。

血中セレンタンパク質を高精度に分析するため、LC-Q-TOF/MS よりも検出感度や測定濃度範囲の大きさが優れているトリプル四重極の LC-MS/MS を用い、NSY マウスおよび SAMP1 マウスの血液を精製して定量化を行った。その結果、血中 GPx3 濃度は SAMP1 および SAMR1 マウスにおいてセレン摂取により上昇したが、SAMP1 マウス間では高脂肪飼料およびセレン摂取に

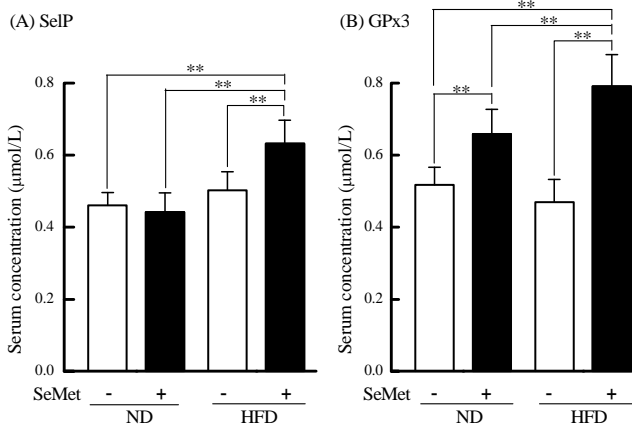


Fig. 6. Effect of a HFD and SeMet supplementation on the serum levels of SelP (A) and GPx3 (B). Values are the mean  $\pm$  SD (n = 8, \*\*P < 0.01).

関わらず血中 SelP 濃度の有意な変化は認められなかった。一方、NSY マウスにおいて高脂肪飼料摂取により血中 SelP 濃度が有意に増加した (Fig. 6)。また、セレン摂取により血中 GPx3 濃度が有意に増加することも確認された。

#### 4) まとめ

加齢による筋力低下や筋萎縮とセレンタンパク質発現の関連性を明らかにするため、老化促進マウスモデルを用いて検討したが、このマウスモデル内では高脂肪飼料またはセレン摂取に依存する特徴的な変化は起こらないことが示唆された。しかし、遺伝的な老化促進により運動機能の低下とともに高血糖及びインスリン抵抗性惹起及び腓腹筋における SelW 発現量の有意な低下が認められた。一方、血中セレンタンパク質の飛行時間型質量分析法による定量法を開発し、血中 SelP は内臓脂肪症候群におけるインスリン抵抗性の指標となることが示唆された。これらの解析により、身体的フレイル予防のためのバイオマーカー開発の一助になることが期待される。

---

#### < 引用文献 >

- 1) Murano K, Ogino H, Okuno T, Arakawa T, Ueno H. 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, 92-98 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荻野泰史, 村野晃一, 奥野智史, 上野 仁
2. 発表標題 糖尿病モデルマウスにおけるインスリン抵抗性の誘導と骨格筋中セレンタンパク質発現との関連性
3. 学会等名 第49回日本毒性学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荻野泰史, 尾崎美久, 村野晃一, 滝口侑真, 松坂海聖, 奥野智史, 上野 仁
2. 発表標題 老化に伴う耐糖能および運動機能低下と骨格筋中セレンタンパク質発現との関連性
3. 学会等名 フォーラム2022 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾崎美久, 香取大輝, 村野晃一, 荻野泰史, 奥野智史, 上野 仁
2. 発表標題 老化促進マウスモデルの組織中セレンタンパク質発現 - 酸化ストレスとの関連性 -
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 角田莉央, 佐戸駿也, 荻野泰史, 村野晃一, 奥野智史, 上野 仁
2. 発表標題 NSYマウスにおけるインスリン抵抗性惹起と筋中セレンタンパク質発現との関連性
3. 学会等名 フォーラム2021 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 尾崎美久、香取大輝、荻野泰史、村野晃一、奥野智史、上野 仁
2. 発表標題 老化促進マウスモデルにおける骨格筋のセレンタンパク質発現に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村野晃一、荻野泰史、建田 潮、奥野智史、上野 仁
2. 発表標題 ノンターゲットプロテオミクスを利用したマウス血清中セレンタンパク質の探索
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐戸駿也、角田莉央、荻野泰史、村野晃一、奥野智史、上野 仁
2. 発表標題 NSYマウスにおける骨格筋のセレンタンパク質発現とインスリン抵抗性との関連性に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荻野泰史、村野晃一、須澤大輝、奥野智史、荒川友博、上野 仁
2. 発表標題 高脂肪食摂取NSYマウスにおけるインスリン抵抗性の誘導とレドックス状態に及ぼすセレノメチオニンの影響
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須澤大輝、杉邨京香、村野晃一、荻野泰史、荒川友博、奥野智史、上野 仁
2. 発表標題 Hepa1-6肝癌細胞のインスリン抵抗性におけるROS産生とSeIP発現との関連性
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須澤大輝、杉邨京香、村野晃一、荻野泰史、荒川友博、奥野智史、上野 仁
2. 発表標題 インスリン標的組織におけるAktのリン酸化とセレノプロテインPとの関連性
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019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
研究分担者	荻野 泰史  (Ogino Hirofumi)  (80617283)	摂南大学・薬学部・助教   (34428)	
研究分担者	村野 晃一  (Murano Koichi)  (50827277)	地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・衛生化学部・ 研究員   (84407)	

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
---------	---------