

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11646

研究課題名（和文）リポタンパク質受容体とセレノプロテインPを標的とした2型糖尿病抑制の食品成分探索

研究課題名（英文）Dietary and nutritional approaches for prevention of type 2 diabetes targeting lipoprotein receptor and selenoprotein P

研究代表者

金 東浩（KIM, DongHo）

大阪市立大学・大学院生活科学研究科・准教授

研究者番号：70326271

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：セレノプロテインPの過多はインスリン抵抗性を惹起し2型糖尿病発症の原因となる。インスリン分泌機構にはwntシグナルが深く関与する。本研究では、セレノプロテインPとwntの受容体として機能するリポタンパク質受容体ファミリー遺伝子の発現パターンを調べた。また、wntシグナル活性とセレノプロテインP発現量に対するリポタンパク質受容体ファミリー遺伝子の影響について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちはこれまでに複数のリポタンパク質受容体遺伝子を発見しその機能について明らかにしてきた。本研究では、リポタンパク質受容体遺伝子の新たな機能であるwntとセレノプロテインPの受容体としての役割を担う可能性について検討を行い、apoer2以外にLRP10の関与を示唆するデータが得られた。今後、インスリンシグナルに対するLRP10の影響を調べる必要があると考える。

研究成果の概要（英文）：Abundance selenoprotein P induces insulin resistance and causes the onset of type 2 diabetes. The wnt signal transduction is involved in the insulin secretion mechanism. In this study, we investigated the expression pattern of lipoprotein receptor family genes that function as receptors for selenoprotein P and wnt. We also investigated the effects of lipoprotein receptor family genes on wnt signaling activity and selenoprotein P expression.

研究分野：生体機能学

キーワード：リポタンパク質受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本の糖尿病患者の 95%以上が 2 型糖尿病で 42%以上が糖尿病性腎症を合併し心不全を伴う尿毒症に陥り人工透析が必要となる。全体透析患者数は 2020 年 12 月時点で 33 万人を上り、そのうち約 13 万人が糖尿病性腎症の患者である。過去 35 年間、全体透析患者数は 5 倍に増加したのに対し、糖尿病性腎症の透析患者数は 20 倍にも増加している。2 型糖尿病の発症抑制は、健全な超高齢化社会を構築する為の喫緊な課題であるが、未だ有効な方策が見出されていない。2 型糖尿病の発症には、栄養素による影響が広く認識され、最近、必須微量元素セレンが注目されている。天然には様々なセレン化合物が知られ、食品中の多くはセレノシステインの形態で存在する。摂食により腸管から吸収されたセレノシステインは肝臓に取り込まれて、主にセレノプロテイン P として合成・分泌され、体内を循環し末梢組織の細胞表面受容体を介して取り込まれる。近年、アメリカの大規模臨床研究により、セレン摂取量と 2 型糖尿病発症リスクに正の相関が示された (Ann Intern Med. 2007, 147, 217-223)。また、空腹時血糖値と血漿セレノプロテイン P 濃度に正の相関を示し、セレノプロテイン P 投与は肝臓や筋肉でインスリン抵抗性を惹起した (Cell Metab. 2010, 12, 483-95)。以上のように、セレノプロテイン P はインスリン抵抗性を惹起し 2 型糖尿病の発症に影響を与えることが示されたが、その詳細な分子機構については不明な点が多い。私たちはリポタンパク質受容体の生体内での機能について研究を行っているが、私たちが発見した apoER2 がセレノプロテイン P の受容体であることが報告された (J Biol Chem. 2007, 282, 12290-12297)。リポタンパク質受容体は、現在までに 10 種類以上の受容体が発見されリポタンパク質受容体遺伝子ファミリーを形成し、リポタンパク質のみならず 30 種類以上の分子と結合することが知られている。LRP5 は wnt シグナル伝達経路の受容体として機能し、インスリン分泌機構に必須であることが明らかになっている (Proc Natl Acad Sci U S A. 2003, 100, 229-234)。私たちは、セレノプロテイン P が過剰に存在する場合、リポタンパク質受容体が担っている wnt シグナル伝達経路と拮抗することにより wnt シグナル伝達経路に異常を起し、インスリンシグナル伝達経路に影響を与えると予想している。

2. 研究の目的

セレノプロテイン P の過剰はインスリン抵抗性を惹起し 2 型糖尿病発症の一因であることが示され、必須微量元素セレンの食品栄養科学的な重要性が再認識されている。しかし、セレノプロテイン P の過剰が惹起するインスリン抵抗性の詳細な分子機構は不明である。また、セレノプロテイン P の産生を阻害すれば、2 型糖尿病発症を抑制できると予想される一方、全身でセレン欠乏が惹起される副作用も考えられる。私たちは、セレノプロテイン P の細胞内への取込みを担うリポタンパク質受容体と wnt シグナル伝達経路に注目し、セレノプロテイン P の過剰による 2 型糖尿病発症の分子機構の解明とセレノプロテイン P の産生や取込みの阻害による 2 型糖尿病発症を抑制可能性の解明を試みている。本研究では、まず、リポタンパク質受容体遺伝子ファミリーの中で、wnt シグナル伝達経路の活性とセレノプロテイン P の産生や取込みに、如何なる受容体が関わっているかについて検討することにした。

3. 研究の方法

(1) リポタンパク質受容体遺伝子ファミリーの遺伝子発現量

ヒト肝臓由来の HepG2 細胞を 10%FBS 含有の DMEM 培地で 48 時間培養後、総 RNA を抽出し、リアルタイム PCR により各種リポタンパク質受容体遺伝子の発現量を測定した。また、パイオインフォマティクスを活用した *in silico* 解析により肝臓でのリポタンパク質受容体遺伝子ファミリーの遺伝子発現量を比較検討した。

(2) wnt シグナル伝達経路の活性に対するリポタンパク質受容体遺伝子ファミリーの影響

各種リポタンパク質受容体の cDNA の末端に myc タグを挿入した DNA 断片を PCR により増幅し、動物細胞発現ベクターへ挿入した遺伝子組換え DNA を作製した後、HEK293 細胞に導入することによりリポタンパク質受容体の過剰発現系を確立した。リポタンパク質受容体の過剰発現は myc 抗体を用いた免疫プロットにより行い、発現量と細胞内局在を確認した。Wnt シグナル伝達経路の活性指標である TCF レポータープラスミド (TOP-Flash) を、Wnt3a 遺伝子または上記で作製したリポタンパク質受容体遺伝子と共に HEK293 細胞に導入し、TCF 活性をルシフェラーゼアッセイにより測定し、リポタンパク質受容体が Wnt シグナル伝達経路に与える影響を検討した。

(3) セレノプロテイン P 遺伝子発現に対するリポタンパク質受容体遺伝子ファミリーの影響

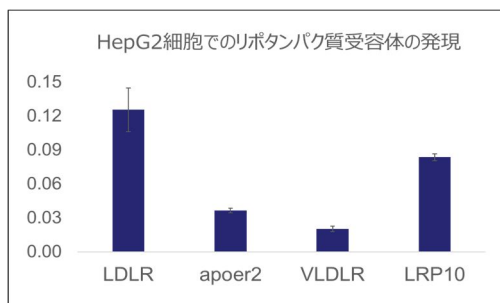
ヒト肝臓由来の HepG2 細胞を 10%FBS 含有の DMEM 培地で 24 時間培養後、上記で作製した各種リポタンパク質受容体の遺伝子組換え DNA を導入し 24 時間培養することにより、リポタンパク質受容体を一過性に過剰発現する HepG2 細胞を作製した。細胞から総 RNA を抽出し、リアルタイム

PCRによりセレノプロテインPの遺伝子の発現量を測定した。

4. 研究成果

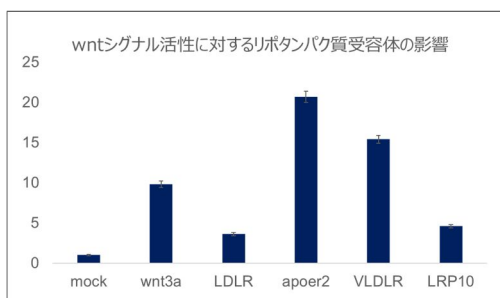
(1) HepG2細胞と肝臓での各種リポタンパク質受容体の遺伝子発現量

HepG2細胞でのリポタンパク質受容体の遺伝子発現量は、LDLRが最も高く、セレノプロテインPの受容体と知られる apoer2はLDLRの25%しか発現しなかった。次に、LRP10はLDLRよりは低いがあpoer2やVLDLRよりは多く発現した。肝臓での各受容体の発現量についてnTPM(normalized transcripts per million)を用いて解析するとLDLRが60.4, apoer2が0.3, VLDLRが3.1, LRP10が0.2となり、HepG2細胞と比較すると組織と培養細胞間で発現パターンが大きく異なることが示された。



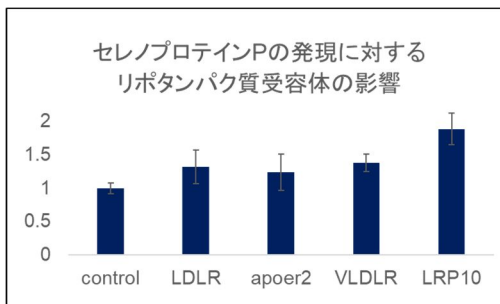
(2) リポタンパク質受容体は Wnt シグナル伝達経路を正と負に調節する

各種リポタンパク質受容体ファミリー遺伝子が過剰発現する細胞を作製し、それぞれのリポタンパク質受容体の過剰発現によって、Wntシグナル伝達経路の活性化に影響を与えることを見出した。Wntシグナル伝達経路の活性は、Wnt3aによって約10倍まで上昇し、apoer2とVLDLRの過剰発現によってさらに亢進したが、LDLRとLRP10の過剰発現によって抑制された。このことは、リポタンパク質受容体がWntシグナル伝達経路を正と負に調節することを示唆する。



(3) LRP10を過剰発現するHepG2細胞ではセレノプロテインPの遺伝子発現が亢進する

各種リポタンパク質受容体ファミリー遺伝子が過剰発現する細胞を作製し、セレノプロテインPの受容体と知られる apoer2の過剰発現による影響はなかったが、LRP10の過剰発現によって、セレノプロテインPの遺伝子発現が亢進することを見出した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 志賀遼太郎, 金庭玲子, 苅谷匠, 出口美輪子, 佐伯茂, 金東浩
2. 発表標題 メタボリック症候群モデル動物の脂質代謝関連遺伝子発現に対する絶食の影響
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上田 祐未, 苅谷匠, 水野晴香, 増田俊哉, 金東浩, 佐伯茂
2. 発表標題 3T3L1細胞の脂肪分化に対するクルクミノイドの抑制効果
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水野晴香, 前西康太, 鬼丸祐二, 出口美輪子, 金東浩, 佐伯茂
2. 発表標題 間葉系幹細胞のWnt/ β -カテニンシグナル伝達経路に対する分岐鎖アミノ酸代謝系の影響
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 苅谷匠, 小濱健悟, 鬼丸祐二, 増田俊哉, 金東浩, 佐伯茂
2. 発表標題 クルクミンは間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を抑制する
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水野晴香, 前西康太, 鬼丸祐二, 金東浩, 佐伯茂
2. 発表標題 間葉系幹細胞のWnt/beta-cateninシグナル伝達経路に対する分岐鎖アミノ酸の影響
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上田祐未, 苅谷匠, 水野晴香, 増田俊哉, 金東浩, 佐伯茂
2. 発表標題 3T3-L1前駆脂肪細胞の脂肪分化に対するクルクミノイドの影響
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 苅谷匠, 小瀨健悟, 鬼丸祐二, 増田俊哉, 金東浩, 佐伯茂
2. 発表標題 Wnt シグナルによる間葉系幹細胞から骨芽への分化誘導に対するクルミンの影響
3. 学会等名 第58回日本栄養・食糧学会 近畿支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金庭 玲子, 出口 美輪子, 仲 朋美, 金東浩, 佐伯茂
2. 発表標題 自然発症2型糖尿病モデル動物の糖質代謝関連遺伝子発現に対する絶食の影響
3. 学会等名 第58回日本栄養・食糧学会 近畿支部大会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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