

機関番号：34509

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700709

研究課題名(和文) コエンザイム Q10 によるインスリン分泌システムの調節機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of insulin secretion system by coenzyme Q₁₀

研究代表者

奥野 正顕 (OKUNO MASA AKI)

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号：40359790

研究成果の概要(和文):

コエンザイム Q10(CoQ₁₀)は ATP 産生賦活作用と抗酸化作用という二つの生理作用を有する唯一の生体内物質である。それぞれ、膵細胞の機能発現と機能維持に重要な役割を果たすと推定される。そこで、この仮説を証明するため、CoQ₁₀のインスリン分泌システムにおける役割について検討した。

ラット由来膵細胞株 RIN5F 細胞に高濃度の亜セレン酸ナトリウムを添加して酸化ストレスを誘導すると、24 時間後には大部分の細胞が死滅した。しかしながら、CoQ₁₀ で前処置するとこの細胞障害は著明に抑制された。また、CoQ₁₀ の合成経路を促進あるいは抑制すると、インスリン分泌に関わる遺伝子群の発現が変動することが明らかとなった。一方、ストレプトゾトシンにより膵細胞を部分的に破壊した 1 型糖尿病ラットの膵臓で CoQ₁₀ 含量は低下したが、糖尿病状態が改善した個体では CoQ₁₀ 含量は正常レベル近くまで回復していた。以上の結果から、CoQ₁₀ は、膵細胞の保護ならびにインスリン分泌システムに重要な役割を果たすと考えられる。

研究成果の概要(英文):

Coenzyme Q10 (CoQ₁₀) is the endogenous substance possessing 2 physiological actions: ATP production-activating and antioxidative actions. Both actions are assumed to play important roles in the exhibition and maintenance of pancreatic β -cell function. To demonstrate this hypothesis, the role of CoQ₁₀ in the insulin secretion system was investigated.

When sodium selenite was added at a high concentration to induce oxidative stress in RIN5F cells, a rat-derived pancreatic β -cell line, most cells died within 24 hours. However, when cells were pretreated with CoQ₁₀, this cytopathy was markedly inhibited. When the CoQ₁₀ synthesis pathway was enhanced or inhibited, the expression of genes involved in insulin secretion altered. On the other hand, the CoQ₁₀ content was decreased in the pancreas of type 1 diabetic rats in which pancreatic β -cells were partially destroyed induced by streptozotocin, but it returned close to the normal level in animals in which the diabetic condition was improved. These findings suggest that CoQ₁₀ plays an important role in the protection of pancreatic β -cells and the insulin secretion system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：コエンザイム Q10 / 糖尿病 / インスリン分泌 / 酸化ストレス / 膵細胞 / アポトーシス / 抗酸化作用 / ATP

1. 研究開始当初の背景

CoQ₁₀ はわが国において、1974年に代謝性強心剤の医療用医薬品として承認・販売された。以後、長らくOTCも含めて医薬品として扱われてきたが、厚生労働省による食薬区分の見直しにより、2001年から食品としての使用が可能となった。申請者の研究室では長年にわたりCoQ₁₀の効能・効果・安全性を示す科学的裏付けを行ってきた。そのような研究成果に基づき、現在では、機能性健康食品素材としてCoQ₁₀を含有する製品が数多く商品化され、健康維持や美容の目的で広く利用されている。

CoQ₁₀の生理作用はATP産生賦活作用と抗酸化作用に大別される。このような二つの生理作用を兼ね備えた生体内物質は他に類を見ず、ともに膵細胞の機能亢進と保護につながると推定される。近年、申請者はインスリン治療で血糖値をコントロールすることができない重篤な糖尿病患者を対象とした膵細胞の再生医療に関する基礎的検討を行ってきた。その過程で糖尿病の予防を行うことの重要性を再認識し、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

膵細胞が血糖値の上昇を感知すると、グルコースは細胞内に取り込まれ代謝されることによってATP/ADP濃度比は増加する。これが引き金となりインスリンが分泌され、血糖値は正常の範囲に保たれる。膵細胞が慢性的に高血糖に曝されるとその機能は低下し、糖尿病はさらに悪化する。このいわゆる膵細胞糖毒性に酸化ストレスが関与することが明らかとなりつつある。酸化ストレスとはフリーラジカルの過剰産生と抗酸化能の低下による組織障害と定義されている。膵細胞は抗酸化系酵素の発現がきわめて弱いことから、抗酸化能は低く、酸化ストレスの影響を強く受けやすい。酸化ストレスにより膵細胞の機能が低下すると糖尿病の重篤化を招く恐れがある。

一方、CoQ₁₀はミトコンドリア電子伝達系の必須因子として、生体のエネルギー(ATP)産

生を調節する働きをもつ。また、CoQ₁₀はさまざまな酸化ストレスに対して抵抗性を示すことが知られている。そして、この二つの作用のうち、前者は膵細胞の機能発現に、後者はその機能維持に重要な役割を果たすと推定される。本研究ではこの仮説を証明するため、CoQ₁₀のインスリン分泌システムにおける役割について検討した。

3. 研究の方法

本研究では、CoQ₁₀が膵細胞の機能維持(酸化ストレスの抑制)ならびに機能発現(インスリン分泌)にどのような影響をおよぼすのか明らかにするため、膵細胞株や糖尿病モデル動物を用いて解析した。

まずはじめに、CoQ₁₀が酸化ストレスにより惹起される膵細胞の機能低下を抑制することができるのかどうか検討した。膵細胞株RIN-5F細胞に50・M亜セレン酸ナトリウムを添加することによって酸化ストレスを誘導した。これとは別に0.5~50・MのCoQ₁₀で前処置を行い、細胞の形態や生存率を比較した。さらに、酸化ストレスの指標として活性酸素種(ROS)の産生を、また、アポトーシスの指標としてDAPIによる核染色やJC-1によるミトコンドリア膜電位の変化を調べた。

膵細胞におけるCoQの生理機能を明らかにするため、4-ヒドロキシ安息香酸ならびに4-アミノ安息香酸を用いて、RIN-5F細胞内のCoQ含量をそれぞれ増加あるいは減少させた後、膵細胞機能遺伝子群の発現やインスリン分泌にどのような影響が認められるのか検討した。

CoQが糖尿病の発症を抑制する可能性について検討するため、ストレプトゾトシンを投与して作製した1型糖尿病モデルラットにおける膵臓中のCoQ含量を測定するとともに、CoQ₁₀を投与することでその症状が改善されるのかどうか調べた。

4. 研究成果

ラット由来膵 細胞株RIN-5F細胞に50・M 亜セレン酸ナトリウムを添加して酸化ストレスを誘導すると、その約15時間後から、細胞の形態は急激に変化し始め、24時間後にはほぼすべての細胞が培養皿から剥離した。一方、亜セレン酸ナトリウムを添加する前日から50・M CoQ₁₀を加えると、細胞の形態変化や剥離は著明に抑制されることが明らかとなった。次に、水溶性ホルマザンを生成するテトラゾリウム塩(WST-8)を用いて、細胞の生存率について検討した。その結果、亜セレン酸ナトリウムを添加すると、細胞の生存率は著しく低下したが、CoQ₁₀はこれを濃度依存的に抑制した。続いて、そのメカニズムを明らかにするため、以下の検討を行った。

アポトーシスの指標として、蛍光色素DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)による核染色を行ったところ、亜セレン酸ナトリウムを添加すると蛍光顕微鏡下でクロマチンの凝集を観察することができたが、CoQ₁₀はこれを抑制する傾向が認められた。

蛍光色素 CM-H₂DCFDA は細胞内でエステラーゼにより分解された後、ROS と反応すると緑色の蛍光を発する。亜セレン酸ナトリウムの添加時には大多数の細胞が未処置の細胞に比べ、強い緑色蛍光を発したが、CoQ₁₀を加えるとこの緑色蛍光は消失するか、減弱するように見受けられた。したがって、CoQ₁₀は亜セレン酸ナトリウムによるROS産生量の増加を抑制すると考えられる。

陽イオン性の蛍光色素 JC-1 を用いて、ミトコンドリアの膜電位差を蛍光顕微鏡下、定性的に評価した。ミトコンドリアの膜電位が正常なとき、細胞内に取り込まれた JC-1 はミトコンドリア内膜へ高濃度に蓄積し、その結果、この色素同士が会合して赤色の蛍光を発する。一方、ミトコンドリアの障害などにより正常な膜電位が失われると、JC-1 は細胞質に分散して会合することができないため、モノマーとして存在し、緑色の蛍光を発する。未処置の細胞ではミトコンドリアは正常な膜電位を有するため、JC-1 はミトコンドリアに集積して J-会合体を形成する。したがって、ほぼすべての細胞は赤色の蛍光を発し、緑色の蛍光は認められなかった。続いて、亜セレン酸ナトリウムを添加すると、大部分の細胞が緑色の蛍光を発し、対照的に赤色の蛍光はごく一部の細胞でしか認められなかった。しかしながら、CoQ₁₀を加えると、大部分の細胞で緑色の蛍光は消失し、赤色の蛍光が認められるようになった。これらの結果は、CoQ₁₀が亜セレン酸ナトリウムにより誘導されるミトコンドリアの膜電位消失を抑制することを示した。

最近、*p*-ヒドロキシ安息香酸および *p*-ニト

ロ安息香酸が CoQ₁₀ の合成経路をそれぞれ促進あるいは抑制することが報告された。これにより、CoQ₁₀ を外因的に与えるのではなく、細胞内に存在する CoQ₁₀ を増加あるいは減少させることによって、その生理作用について容易に検討することが可能となった。そこで、RIN-5F 細胞を *p*-ヒドロキシ安息香酸や *p*-ニトロ安息香酸の存在下で培養したところ、細胞内の CoQ₁₀ 含量がそれぞれ著明に増加あるいは減少することを確認した。さらに、CoQ₁₀ 含量の増減に応じて、グルコース応答性インスリン分泌に必要ないくつかの遺伝子の発現が変動した。

最後に、CoQ₁₀ の糖尿病発症におよぼす影響について検討した。ストレプトゾトシンを腹腔内に投与して作製した1型糖尿病モデルラットの膵臓では湿重量あたりの CoQ₁₀ 含量が有意に低下していたが、糖尿病状態が改善した個体では正常レベル近くまで回復していた。しかしながら、現時点では、CoQ₁₀ を投与しても、ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルラットの血糖値は有意に回復していないことから、今後、発症に至るメカニズムが異なる複数の糖尿病モデル動物について、同様の検討を行う予定である。

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)

[学会発表](計6件)

奥野正顕、武智大志、藤田翔、高橋隆幸、岡本正志：「コエンザイム Q10 による白内障発症予防効果とその作用機序」、第1回アンチエイジング研究会、2010年8月12日(木)、於 神戸学院大学(兵庫)

奥野正顕、藤田翔、武智大志、岡本正志：「コエンザイム Q10 による白内障発症予防効果とその作用機序」、第62回日本ビタミン学会、2010年6月12日(土)、於いわて県民情報交流センター(岩手)

奥野正顕、藤田翔、武智大志、岡本正志：「コエンザイム Q10 による白内障発症予防効果」、日本コエンザイム Q 協会 第7回研究会、2010年1月26日(火)、於 東京工科大学(東京)

奥野正顕、藤田翔、武智大志、岡本正志：「コエンザイム Q10 による白内障発症予防効果」、第59回日本薬学会近畿支部総会・大会、2009年10月24日(土)、於近畿大学(大阪)

M. Okuno, A. Kettawan, C. Kunthida, S. Fujita, D. Takechi, T. Takahashi, T. Kishi, T. Okamoto: 「Distribution of Oxidized and Reduced Forms of Coenzyme Q Homologues in Japanese Foods」, 8th International Food Data Conference, October 1-3, 2009, Bangkok, Thailand

奥野正顕、藤田翔、武智大志、高橋隆幸、紀氏健雄、岡本正志：「コエンザイム Q10 による白内障発症防御作用」、第 324 回脂溶性ビタミン総合研究委員会、2009 年 7 月 10 日（金）於 神戸学院大学（兵庫）

〔その他〕

日本コエンザイム Q 協会 第 7 回研究会奨励賞 受賞（東京工科大学、2010 年 1 月）

「コエンザイム Q10 による白内障発症予防効果とその作用機序」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥野 正顕（OKUNO MASA AKI）
神戸学院大学・薬学部・助教
研究者番号：40359790

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし