

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590166

研究課題名(和文) 体内レドックス制御によるインスリン抵抗性発症予防とその作用機序

研究課題名(英文) Studies on preventive pathophysiology of insulin resistance by internal redox control

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：体内レドックス制御によるインスリン抵抗性の発症予防およびその作用機序を解明することを目的として、2型糖尿病の病態に近い2種のマウスモデルやin vitro系を用いて検討した。その結果、セレン欠乏のみならず、亜鉛欠乏によって耐糖能が低下したが、亜鉛投与によるインスリン抵抗性改善作用は期待できないことが示唆された。

そこで、高用量のセレン負荷がインスリン抵抗性を惹起する可能性に着目し、甲状腺ホルモン代謝やセレンタンパク質発現との関連性を検討したところ、インスリン抵抗性の惹起にセレンタンパク質のグルタチオンペルオキシダーゼ1およびセレノプロテインP1発現が関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The studies were conducted with a mouse model close to the pathophysiology of type 2 diabetes, streptozotocin and nicotinamide treatment (STZ/NA) or NSY mice and the in vitro systems to clarify a possible prevention of insulin resistance by internal redox control and its mechanisms. Although the glucose tolerance ability was suppressed by zinc deficiency as well as selenium deficiency of STZ/NA mice, the supplemented zinc was not likely to improve the insulin resistance. As there was a possibility that insulin resistance might be caused by highly supplemented selenium, the relevance to the metabolisms of thyroid hormone or selenoprotein expressions was investigated. The results suggested that the expressions of glutathione peroxidase 1 and selenoprotein P 1 were related to the pathogenesis of the insulin resistance of NSY mice.

研究分野：公衆衛生学

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

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 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。その発症要因として、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グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx) 1 および 4 などのセレン含有酵素が挙げられる。しかし、セレンは栄養生理学的に必要な生体内濃度の範囲は極めて狭く、わが国では過剰摂取による毒性を憂慮し、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。しかしながら、高齢者や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。

(2) インスリン標的組織では、インスリンシグナル経路が酸化還元(レドックス)状態によって制御されることが最近報告されつつあり、セレノ-L-メチオニン(SeMet)は GPx1 の賦活化によるレドックス制御によってインスリン抵抗性を改善することを見出している。しかしながら、SeMet は同時に肝細胞に対してセレノプロテイン P (Sepp1) の発現も促進する。

(3) Sepp1 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、ごく最近になって Sepp1 がインスリン抵抗性を反対に誘導する可能性が報告されている。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。Sepp1 はこれまでレドックス制御に直接関与するような報告はないため、この生理作用や発現制御機構を明らかにすることはインスリンシグナルとレドックス制御との関連性のみならず、インスリン抵抗性の発症予防の解明のために極めて重要である。一方、亜鉛は肝臓で ROS を消去するメタロチオネンを誘導することが知られている。

## 2. 研究の目的

セレン以外の 2 型糖尿病予防のための必須元素のみならず、もう一つのレドックス制御因子として亜鉛化合物をセレンと併用または単独処理することによって、これらの体内レドックス制御によるインスリン抵抗性の発症予防ならびにインスリンシグナルに対

する Sepp1 などのセレンタンパク質やメタロチオネンなどの作用とその機序について解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 2 型糖尿病の病態になるべく近く、しかも自然糖尿病発症動物モデルよりも短期間で糖尿病を発症する動物モデルである、短期誘発糖尿病マウスモデルを用いて検討を行った。すなわち、マウスに 120 mg/kg nicotinamide (NA) と 100 mg/kg nicotinamide (STZ) 投与後、MF 飼料、セレン欠乏飼料または亜鉛欠乏飼料を 5 週間摂取させるとともに、SeMet または硫酸亜鉛を投与することにより、セレンおよび亜鉛状態が欠乏レベルから栄養生理レベルまでの各種段階のマウスモデルを作製し、SeMet と亜鉛との単独または併用投与による体内レドックス制御によるインスリン抵抗性発症への影響について検討した。

(2) インスリン受容体を有する Hepa 1-6 肝癌細胞を用い、SeMet および遊離脂肪酸(FFA) 処理時における GPx1、GPx4 および Sepp1 などのセレンタンパク質の mRNA 発現量を解析した。また、3T3-L1 脂肪細胞および Hepa 1-6 肝癌細胞を用い、甲状腺ホルモンの代謝酵素であり、セレン酵素であるヨードチロニン脱ヨウ素化酵素(Dio) 1~3 の mRNA 発現量を解析した。

(3) 2 型糖尿病マウスモデルである NSY マウスに高脂肪飼料を摂取させることにより、糖尿病を発症する 40 週齢よりも早期にインスリン抵抗性を発現する動物モデルを作製した。このマウスモデルのインスリン標的組織中のセレンタンパク質の発現とインスリン抵抗性の関連性の検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) 短期誘発糖尿病マウスモデル作製のため、従来は ICR 雄性マウスに対して STZ と、その標的組織である膵島 B 細胞で枯渇しやすい NA をそれぞれ 100 mg/kg および 120 mg/kg で併用投与していた。しかし、ICR マウスは STZ に対して感受性が高く、さらにセレン欠乏によって糖負荷時の血漿中インスリンが枯渇し、随時血糖値も 500 mg/dL を超えてしまっていた。そこで、もう少し緩和な条件を検討するため、NA の投与量は変更せずに STZ の投与量を 50 mg/kg と 80 mg/kg に変えて MF 飼料、セレン欠乏飼料または亜鉛欠乏飼料を与えながら、1 週間ごとの随時血糖値、5 週間後の血中 HbA1C 濃度および糖負荷後の経時的血糖値を測定した。その結果、いずれも STZ 投与量ならびにセレンまたは亜鉛欠乏飼料摂取にかかわらず有意な差は認められず、5 週間後の血中インスリンおよびアディポネクチン濃度だけが 80 mg/kg STZ 投与によって低下した。そのため、低用

量の STZ 投与では糖尿病マウスモデルの作製が困難であることが認められたため、これまでと同様の用量において短期誘発糖尿病マウスモデルを作製することにした。

(2) 100mg/kg STZ および 120 mg/kg NA 投与による短期誘発糖尿病マウスモデルを用いて検討を行った結果、通常飼料、セレン欠乏飼料および亜鉛欠乏飼料を 5 週間摂取させたときの糖負荷後血糖値は、亜鉛欠乏飼料群で最も高く、ついでセレン欠乏飼料群、通常飼料群の順に高値を示した。しかし、1~5 週間の摂取期間中の随時血糖値では、各群間で有意な差は認められず、5 週間後の血漿中 HbA1c 値においても同様であった。

亜鉛摂取量を変化させた場合の影響を調べるため、短期誘発糖尿病マウスモデルに亜鉛欠乏飼料を摂取させるとともに、通常飼料摂取時とほぼ同程度の亜鉛摂取量となる 10 mg Zn/kg 投与量とその 2 倍量である 20 mg Zn/kg 投与量で硫酸亜鉛を 1 週間に 6 日間、5 週間にわたり強制経口投与し、耐糖能に対する亜鉛摂取の影響を検討した。その結果、10 mg Zn/kg 投与群の随時血糖値は、通常飼料摂取群との間に有意な差は認められなかったが、20 mg Zn/kg 投与群の随時血糖値は、通常飼料群よりも低値を示す傾向が認められた。しかし、血中インスリン濃度およびアディポネクチン濃度に対しては、亜鉛投与による有意な改善効果は認められなかった。また、肝臓中の亜鉛量は、20 mg Zn/kg 投与群でも通常飼料摂取群に比べて低かった。

以上の結果から、セレン欠乏のみならず、亜鉛欠乏によって耐糖能が低下することが示唆された。一方、硫酸亜鉛を通常飼料よりも多く摂取させることにより、随時血糖値が低下する可能性が示唆されたが、無機の亜鉛化合物投与によるインスリン抵抗性改善作用は期待できないことが示唆された。

(3) 亜鉛によるレドックス制御とインスリン抵抗性との関連性は低いことがわかってきたため、セレン単独でのレドックス制御や Sepp1 高発現との関連性について、Hepa 1-6 肝細胞を用いて検討した。その結果、SeMet 処理により濃度依存的に Sepp1 および GPx1 mRNA 発現量が有意に増加した。FFA 処理によりインスリン抵抗性を惹起させると、Sepp1 および GPx1 mRNA 発現量が増加したが、GPx4 mRNA 発現量は減少した。そのため、インスリン抵抗性の発現に Sepp1 および GPx1 が関与する可能性が示唆された。

甲状腺ホルモン代謝とインスリン抵抗性との関連性について、3T3-L1 脂肪細胞および Hepa 1-6 肝癌細胞を用いて検討した。甲状腺ホルモンであるチロキシン (T4) は、セレン含有酵素の一つであるヨードチロニン脱ヨウ素化酵素 (Dio) 1~3 により活性型のトリヨードチロニン (T3) に変換される。そこで、健常人でのセレンの過剰状態が Sepp1

と同様に Dio による T3 活性化や分解を介してインスリン抵抗性の原因となるのかどうかについて、Dio 合成に対する影響を調べた結果、3T3-L1 脂肪細胞ではインスリン処理により Dio2 および Dio3 mRNA 発現量が増加した。一方、Hepa 1-6 肝癌細胞では SeMet 濃度依存的に Dio1 および Dio3 mRNA 発現量が有意に低下したが、FFA 処理では Dio mRNA 発現量に有意に影響は認められなかった。そのため、甲状腺ホルモン代謝とインスリン抵抗性との関連性は低い可能性が示唆された。

(4) 疫学調査等において、比較的高いセレン摂取がインスリン抵抗性を惹起する可能性が示唆されている。そこで、*in vivo* において高セレン負荷とインスリン抵抗性との関連性を評価するために、インスリン抵抗性マウスモデルを比較的短期間に構築する予備的検討を行った。

2 型糖尿病マウスモデルである NSY マウスに高脂肪飼料を摂取させたところ、通常飼料を摂取させた動物群に比べ、早期に血糖値および血漿中インスリン値が上昇することが判明した。すなわち、2 型糖尿病マウスモデルである NSY マウスに高脂肪飼料を摂取させることにより、糖尿病を発症する 40 週齢よりも早期にインスリン抵抗性を発現する動物モデルが作製できることが分かったため、つぎにセレン負荷によるインスリン標的組織中のセレンタンパク質の発現とインスリン抵抗性の関連性について検討した。

5 週齢の雄性 NSY マウスを通常飼料群と高脂肪飼料群に分け、それぞれ滅菌水道水と 2 mg Se/L SeMet 含有滅菌水道水を与え、12 週間飼育した。その結果、NSY マウスの随時血糖値は、SeMet 投与に関わらず、高脂肪飼料摂取によって増大した。糖負荷後血糖値および 12 週間飼育後血漿中インスリン量は、高脂肪飼料摂取によって増大するとともに、糖負荷後血糖値は SeMet 投与によりさらに増大したが、血漿中インスリン量は減少した。肝臓中 GPx1 および Sepp1 mRNA 発現量は、高脂肪飼料摂取によって増大した (図 1)。

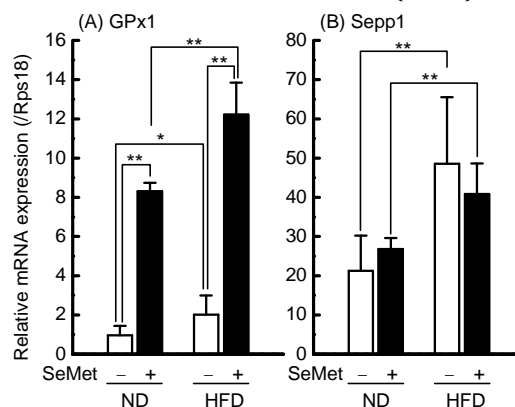


図 1 .NSY マウスの肝臓中 GPx1 および Sepp1 mRNA 発現量  
高脂肪飼料群: HFD、通常飼料群: ND .

以上のことから、2 型糖尿病マウスモデルにおいて、SeMet 投与に関わらず、高脂肪飼料の摂取によりインスリン抵抗性が誘導されるとともに、インスリン抵抗性に肝臓中セレンタンパク質のGPx1 および Sepp1 の関与が示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Okuno T, Miura K, Sakazaki F, Nakamuro K, Ueno H, Methylseleninic acid (MSA) inhibits 17 $\beta$ -estradiol-induced cell growth in breast cancer T47D cells via enhancement of the antioxidative thioredoxin/ thioredoxin reductase system, Biomed Res, 33 (4), 2012, 201-210.

DOI: 10.2220/biomedres.33.201

Shimizu R, Sakazaki F, Okuno T, Nakamuro K, Ueno H, Difference in glucose intolerance between C57BL/6J and ICR strain mice with streptozotocin/nicotinamide-induced diabetes, Biomed Res, 33 (1), 2012, 63-66.

DOI: 10.2220/biomedres.33.63

〔学会発表〕(計 6 件)

村野晃一、西田恒志郎、石田ちあき、荻野泰史、荒川友博、奥野智史、上野 仁、Hepa 1-6 マウス肝癌細胞におけるセレンタンパク質発現に対する細胞内レドックス状態の影響、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜

片岡佑介、村野晃一、堀切優也、荻野泰史、荒川友博、奥野友博、上野 仁、2 型糖尿病マウスモデルのインスリン抵抗性に関するセレンタンパク質の探索、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜

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、2 型糖尿病マウスモデルにおけるインスリン抵抗性とセレンタンパク質発現の関連性、フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー、2015 年 9 月 18 日、神戸学院大学

村野晃一、片岡佑介、堀切優也、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におけるセレンおよび高脂肪飼料摂取とインスリン抵抗性の関連性、日本薬学会 135 年会、2015 年 3 月 25 日～28 日、神戸

上野 仁、福田 葉月、松尾 有起、村野 晃一、山下 力也、西田 恒志郎、奥野 智史、荒川 友博、荻野 泰史、脂肪細胞および肝細胞のインスリン受容体シグナルにおけるセレノメチオニンの影響、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28 日～30 日、熊本

村野晃一、福田葉月、米光涼、松尾有起、荻野泰史、荒川友博、奥野智史、上野 仁、短期誘発糖尿病マウスモデルに対するセレ

ンおよび亜鉛欠乏の影響評価、日本薬学会第 133 年会、2013 年 03 月 30 日、パシフィコ横浜

## 6 . 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

荻野泰史 (OGINO, Hirofumi)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：80617283

(3) 研究協力者

村野晃一 (MURANO, Koichi)