

氏名	むらの こういち 村野 晃一
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	薬博甲 第35号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者
学位授与の年月日	平成30年3月23日
学位論文題目	インスリン抵抗性惹起とセレンタンパク質発現との関連性に関する研究
論文審査委員	（主査）太田 壮一 （副査）高松 宏治 （副査）上野 仁

別紙 1

博士論文要旨

論文題目 : インスリン抵抗性惹起とセレンタンパク質発現との
関連性に関する研究

申請者 村野 晃一 

専攻分野 健康薬学

研究指導分野 公衆衛生学

指導教員 上野 仁

2 型糖尿病は、遺伝的素因を背景に肥満、高血圧、喫煙、飲酒、ストレスなどの環境要因が加わることで発症する代謝性疾患である。インスリン分泌能の低下がその発症要因の一つであり、遺伝的素因として日本人はその分泌能が低いことが挙げられる。また、環境要因の中でも、肥満はインスリン抵抗性を惹起する要因の一つとして重要であると考えられる。これらのことから、日本人はそのインスリン分泌能の低さにより、軽度の肥満であってもインスリン抵抗性が惹起されるリスクの増加が懸念される。

セレンは、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) 1 やセレノプロテイン P (SelP) などのセレンタンパク質の発現を介して酸化ストレス防御の役割を担っている。活性酸素種 (ROS) による酸化ストレスは、インスリンシグナル分子のリン酸化を抑制することが報告されていることから、インスリン抵抗性の惹起に寄与することが考えられる。そのため、生体内セレン状態を高めることにより酸化ストレス防御系を賦活化させ、それによる糖尿病発症を予防する目的の研究が行われてきた。しかし、最近、英国の前向き研究や北米の疫学研究の結果から、栄養生理レベル内であってもセレン摂取量が多い集団や血中セレン濃度が高い集団において、高血糖に対するオッズ比が増大することが報告されたことから、セレンの補充が反対に糖尿病発症率を増加させる懸念が指摘されている。したがって、通常の食事からセレンを摂取するだけでも糖尿病発症リスクの高い集団が存在することが考えられる。しかし、栄養生理レベル内のセレン摂取とインスリン抵抗性惹起との関連性については明らかではない。そこで、本研究では栄養生理レベル内のセレン状態におけるインスリン抵抗性

惹起とセレンタンパク質発現との関連性の解明を試みた。

第1章 2型糖尿病マウスモデルにおけるインスリン抵抗性惹起とセレンタンパク質発現との関連性

インスリン抵抗性とセレンタンパク質発現との関連性について検討するため、まずヒトの2型糖尿病に近い病態を示す Nagoya-Shibata-Yasuda (NSY) マウスモデルを用い、通常の飼育期間よりもインスリン抵抗性が早期に惹起されるマウスモデルの作製を試みた。その結果、NSY マウスに HFD を 12 週間摂取させることにより、血漿中遊離脂肪酸 (FFA) およびインスリン量が増加するとともに、アディポネクチン量が低下し、インスリン抵抗性が惹起された。このことから、インスリン抵抗性マウスモデルが構築できたため、次に通常の飼育環境と比べて約 5 倍のセレン摂取量となるように 2 mg Se/L セレノ-L-メチオニン (SeMet) 含有飲料水をインスリン抵抗性マウスモデルに自由摂取させることにより、インスリン抵抗性の惹起とセレン摂取との関連性について検討した。その結果、SeMet を栄養生理レベル内で自由摂取することにより、肝臓中および血漿中セレン量が増加するとともに、インスリン抵抗性マウスモデルのグルコース負荷後の血糖値が増加した。これらの結果から、SeMet 摂取により耐糖能が低下する可能性が示唆された。

この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との関連性を検討するため、まず肝臓、筋肉および膵臓の 6 種類のセレンタンパク質の mRNA 発現量を測定し、インスリン抵抗性の惹起に関与するセレンタンパク質の探索を試みた。その結果、肝臓において、酸化ストレス防御系に関与する GPx1 および SelP mRNA 発現量が顕著な変動を示したことから、これらがインスリン抵抗性に関与することが考えられた。そこで、これらタンパク質発現量を測定した結果、インスリン抵抗性マウスモデルに SeMet を栄養生理レベル内で自由摂取させることにより、GPx1 発現量が増加するとともに、SelP 発現量は SeMet 摂取の有無にかかわらず HFD 摂取によって発現量が増大することが判明した。この結果を踏まえ、次に肝組織の形態を観察するとともに、4 ヒドロキシ-2-ノネナール (4HNE) を用いて酸化ストレスに対する生体内セレン状態の影響を検討した。その結果、SeMet 摂取の有無にかかわらず、HFD 摂取によって脂肪蓄積と肝実質細胞の肥大化が認められるとともに酸化ストレスの亢進が確認された。そこで、インスリンシグナルを負に制御するプロテインチロシンホスファターゼ (PTP) 1B に着目し、肝組織中の PTP 活性を測定したところ、HFD 摂取群で PTP 活性が増大した。

以上の結果から、インスリン抵抗性マウスモデルにおいて、通常のセレン状態および高セレン状態のどちらの状態においても、HFD 摂取によるインスリン抵抗性の惹起に肝組織の脂肪蓄積と PTP 活性の増大が関係するとともに、GPx1

および SelP 発現量の増加がインスリン抵抗性の惹起に関与する可能性が考えられた。

第 2 章 インスリン標的細胞におけるインスリン抵抗性惹起とセレンタンパク質発現との関連性

インスリン抵抗性惹起への関与の可能性が示唆された GPx1 と SelP の発現制御因子を明らかにするため、マウス Hepal-6 肝癌細胞に FFA としてパルミチン酸ナトリウムを曝露することにより、インスリン抵抗性マウスモデルの肝組織の状態を再現できるか否かについて検討した。その結果、FFA 曝露により ROS 産生量が増加したため、マウスモデルの肝組織における酸化ストレス状態を再現できることが示唆された。また、GPx1 mRNA 発現量が SeMet 曝露によって増加したことから、GPx1 は細胞内セレン状態に依存して発現することが示唆された。一方、SelP mRNA 発現量が FFA 曝露によって増加し、その増加は ROS 消去剤曝露によって低下したことから、SelP は ROS 産生に依存して発現することが示唆された。次に、SelP は細胞内で生合成された後、細胞外に分泌されることに着目し、Hepal-6 肝癌細胞由来の SelP を含んだ培養上清と、他のインスリン標的細胞である 3T3-L1 脂肪細胞由来の FFA を含んだ培養上清を相互交換することにより、SelP がインスリン抵抗性惹起に及ぼす影響について検討した。その結果、Hepal-6 肝癌細胞において、3T3-L1 脂肪細胞由来の FFA 曝露によって、PTP1B mRNA 発現量が上昇するとともに、グルコースの取り込みに関与するグルコーストランスポーター4 (GLUT4) mRNA 発現量が減少することが考えられた。さらに、3T3-L1 脂肪細胞においても、Hepal-6 肝癌細胞から分泌された SelP が GLUT4 mRNA 発現量の低下を介してインスリン抵抗性を惹起する可能性が示唆された。また、Hepal-6 肝癌細胞において、FFA 曝露により SelP mRNA 発現量が増加したときの GLUT4 mRNA 発現量の減少率は、Hepal-6 肝癌細胞から分泌された SelP による 3T3-L1 脂肪細胞 GLUT4 mRNA 発現量の減少率に比べて大きかった。そのため、3T3-L1 脂肪細胞よりも Hepal-6 肝癌細胞でのインスリン抵抗性に対する SelP の影響を調べるのが優先されるべきであると考えられた。

第 3 章 Hepal-6 肝癌細胞におけるプロテインキナーゼ B (Akt) のリン酸化に及ぼす SelP ノックアウトの影響

Hepal-6 肝癌細胞のインスリンシグナル伝達に対する FFA および SeMet 曝露の影響について、Akt およびリン酸化 Akt (p-Akt) 発現量を指標に検討した。その結果、FFA 曝露は Akt のリン酸化を抑制したが、SeMet 曝露はそのリン酸化に影響を及ぼさなかった。そのため、SeMet 曝露によって増加した GPx1 は主にインスリンシグナル伝達には影響しないことが示唆された。しかし、SelP

発現量は FFA 曝露によって増加するため、細胞内 SelP の変動がインスリンシグナル伝達に関与する可能性があり、さらに詳細に検討する必要性が考えられた。そこで、まずクラスター化規則的配置短回文配列リピート (CRISPR) /CRISPR 関連タンパク質 9 (Cas9) 法を用いて SelP ノックアウト Hepa1-6 肝癌細胞の作製を試みた結果、SelP 発現量が低下した細胞系を作製することができた。その細胞を用いて、細胞内 SelP がインスリンシグナル伝達に及ぼす影響について検討した結果、SelP のノックアウトは FFA 曝露によって低下した Akt のリン酸化に影響を及ぼさず、細胞内 SelP はインスリンシグナル伝達に直接関与しないことが明らかとなった。すなわち、FFA 曝露によって惹起される ROS 産生とそれによる PTP 活性の上昇や PTP1B 発現量の増大による Akt のリン酸化の低下に対して、細胞内の SelP は直接関与しないことが考えられた。

以上の結果を総合すると、インスリン抵抗性マウスモデルを作製し、インスリン標的細胞における詳細な検討から、FFA の曝露による ROS 産生と PTP1B 発現の増大ならびに PTP 活性の上昇とともにインスリン抵抗性が惹起され、セレンタンパク質である SelP 発現量が肝臓で増加することが明らかとなった。また、SeMet の生理学的摂取レベル内であっても、HFD 摂取による耐糖能の低下が促進されるとともに、肝臓において GPx1 発現量が増加した。しかし、細胞内の GPx1 や SelP は上述のインスリンシグナル伝達の抑制によるインスリン抵抗性惹起には直接関与しなかった。SelP は肝臓中で生合成され、糖鎖修飾を受けた後、血中でタンパク質分解を受けることが報告されていることから、別のアイソフォームの SelP が脂肪細胞に取り込まれてインスリン抵抗性を惹起することが推定されるが、今後詳細な検討が必要と考える。

本研究の成果は、栄養生理学的な生体内セレン状態であっても、肥満を防止することによって、SelP を介したインスリン抵抗性惹起の 1 次予防に貢献できると考えられる。また SelP は、インスリン抵抗性の指標として 2 次予防にもつながるとともに、インスリン抵抗性改善の治療標的となりうることが期待される。