

マウス膵β細胞株MIN6を用いたコエンザイムQ10による アポトーシス抑制効果の検討

鳥取大学医学部統合内科医学講座病態情報内科学分野（主任 山本一博教授）

角 啓 佑

Coenzyme Q10 suppresses the apoptosis of mouse pancreatic beta-cell line MIN6.

Keisuke SUMI

*Division of Molecular Medicine and Therapeutics, Department of Multidisciplinary Internal Medicine,
Tottori University Faculty of Medicine, 36-1 Nishi-cho, Yonago, Tottori, 683-8504, Japan*

ABSTRACT

Coenzyme Q10 (CoQ10) has clinical therapeutic effects on mitochondrial (mt-) diabetes, but the specific mechanism is unclear. We investigated whether CoQ10 has protective effects on pancreatic beta-cells against mt-stress and apoptosis, using mouse pancreatic beta-cell line MIN6. Cultured MIN6 was divided into 4 groups; control group, staurosporine (STS) group, CoQ10+STS group (treated with STS following 30 μ M of CoQ10 4 hours) and Z-VAD+STS group [treated with STS following 30 μ M of Z-VAD-FMK (caspase inhibitor)]. We induced apoptosis by 0.5 μ M STS, the apoptosis inducer by mitochondria stress. STS group showed 47% cell viability after 16 hours, but CoQ10+STS group showed significantly higher viability of 76% using WST-8 assay, detecting mitochondria activity. DNA fragmentation was observed in STS group after 15 hours, but it was inhibited in CoQ10+STS group. In STS group, 15% of all cells were fluorescently stained with annexin-5 after 6 hours, showing early stage of apoptosis, but those were 1% in CoQ10+STS group. Caspase 3 was activated in STS group after 12 hours, but it was inhibited in CoQ10+STS group in the western blotting. Z-VAD+STS group showed the same results as CoQ10+STS group. These results suggest CoQ10 has protective effects on pancreatic beta-cells against mt-stress and apoptosis. (Accepted on December 26, 2012)

Key words : coenzyme Q10; Mitochondria; MIN6; apoptosis

はじめに

糖尿病の病態において、高血糖はインスリン作用不全により生じるが、インスリン作用不全はインスリン抵抗性とインスリン分泌不全に分類され

る。インスリン抵抗性とは、インスリンは分泌されているものの、効果が低下している状態であり、インスリン分泌不全はインスリン分泌そのものが低下している状態である。膵β細胞のインスリン分泌にはミトコンドリアが重要と考えられて

おり、遺伝的にミトコンドリア機能障害が起こるミトコンドリア糖尿病ではインスリン分泌不全が生じる¹⁾。ミトコンドリア糖尿病は日本人の糖尿病の原因の約1%を占めるとされている。一方、インスリン分泌能は膵 β 細胞の機能・量に依存するが、膵 β 細胞は増殖能の低い細胞であり、その量的・機能的低下にはアポトーシスの関与が大きいと考えられている²⁾。 β 細胞のアポトーシスは酸化ストレス、糖毒性、脂肪毒性、サイトカインなどによって引き起こされる。また、ミトコンドリア糖尿病モデル BHE/cdbラットは、アポトーシスが誘導されることによって膵 β 細胞が減少する³⁾。これらの結果から、インスリン分泌不全には β 細胞のミトコンドリア機能不全、アポトーシスが重要であると考えられる。ミトコンドリア糖尿病における治療法はインスリン注射以外に確立されていないが、いくつかの臨床研究にてコエンザイムQ10の有効性が報告されている⁴⁾。しかし、コエンザイムQ10のミトコンドリア糖尿病への基礎的な有効性やメカニズムを研究した報告はまだない。ミトコンドリア病ではミトコンドリアから産生される活性酸素種が障害の原因と考えられており⁵⁾、ミトコンドリア病の中枢神経症状へのコエンザイムQ10の有効性の報告がある⁶⁾。そのメカニズムはコエンザイムQ10の抗酸化作用とミトコンドリアへのATP供与作用から中枢保護に働くと考えられている⁷⁾。これらの背景からミトコンドリア糖尿病へのコエンザイムQ10の作用機序は膵 β 細胞に対するアポトーシス抑制効果ではないかと考えた。強力なアポトーシス誘導剤であり、ミトコンドリアストレス剤であるスタウロスポリンを用いて、ラット膵 β 細胞株INS-1にてミトコンドリアストレス、活性酸素種を生じることにより、アポトーシスを誘導することが報告されている⁸⁾。そこで我々はマウス膵 β 細胞株であるMIN6を用いてスタウロスポリンによるミトコンドリアストレスを与え、コエンザイムQ10による膵 β 細胞のアポトーシス抑制効果について検討を行った。

材料および方法

材料

マウス膵 β 細胞株であるMIN6を継代培養して用いた。牛胎児血清 (FBS) はThermo Fisher Scientific 社から、Phosphate Buffered Saline

(PBS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), ペニシリン及びストレプトマイシンはSigma-Aldrich社から、コエンザイムQ10は横浜油脂工業株式会社から、Z-VAD-FMK (以下Z-VADと記載する) はペプチド研究所から、2-メルカプトエタノール、スタウロスポリン及びポリアクリルアミドゲルは和光純薬工業株式会社から、protease inhibitor cocktail はBioVision社から、SDS-PAGE用サンプルバッファーはBIO-RAD社から、ウエスタンブロット転写用のメンブレンはMillipore社から、Western Blotting Detection ReagentはGEヘルスケア社から、Cell Counting Kit-8は株式会社同仁化学研究所から、Cell Lysis Buffer, 抗 β -actin抗体, 抗ウサギIgG抗体及びアネキシン5アポトーシス観察キットはMBL社から、抗カスパーゼ3抗体はCSTジャパン社から、Apoptotic DNA Ladder KitはRoche Diagnostics社からそれぞれ入手した。

細胞培養及びアポトーシスの誘導

MIN6は60mm細胞培養用dish (後でアネキシン5染色に用いるものはdishの中に敷いたカバーガラス上で) あるいは96wellプレート内でincubateした。培養用のメディアウムは以下の組成のDMEMを用いた。DMEM 1Lに対して4.5g/Lのグルコース, FBS150mL, 炭酸水素ナトリウム75mg, ペニシリン75 mg, ストレプトマイシン50mg, 2-メルカプトエタノール5 μ L。37 $^{\circ}$ C, 二酸化炭素濃度5%の培養室でMIN6が80%のsubconfluentになるまでincubateした。次に80%のsubconfluentになったdishあるいは96wellプレートにコエンザイムQ10を30 μ Mの濃度で4時間incubateしたもの (コエンザイムQ10投与群), あるいは汎caspase阻害剤としてスタウロスポリンによるアポトーシスを阻害することで知られているZ-VAD⁹⁾を30 μ Mの濃度で1時間incubateしたもの (Z-VAD投与群), 及び何も前投与していないもの (スタウロスポリン単独投与群) を用意した。その後それぞれに対してスタウロスポリンを0.5 μ Mの濃度で投与し、アポトーシスを誘導した。何も薬剤を投与していない細胞をコントロール (コントロール群) として用意した。

WST-8アッセイ

スタウロスポリン投与後96wellプレートで16

時間incubateしたMIN6を用いて、ミトコンドリア活性を測定するWST-8アッセイによって細胞生存率を測定した。WST-8アッセイはCell Counting Kit-8を用いて行い、キット試薬投与後2時間再び上記の培養条件でincubateし、その後450nmの吸光度を測定した。

DNA断片化

スタウロスポリン投与15時間後に、Roche Diagnostics社のApoptotic DNA Ladder Kitを用いて通常のプロトコールに従ってDNAを抽出した。1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行いDNA断片化について観察した。

アネキシン5染色

スタウロスポリン投与6時間後にdishからカバーガラスを取り出してPBSでメディアウムを除去した。アポトーシスの早期段階を測定するMBL社のアネキシン5アポトーシス観察キットを用いてプロトコール通りの手順でアネキシン5染色を行った後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)及びウエスタンブロッティングによるcleaved caspase 3アッセイ

スタウロスポリン投与12時間後に、dishからメディアウムを吸引し、PBSを用いて2回洗浄を行い、PBSを除去した。次にdishにprotease inhibitor cocktail を添加したCell Lysis Bufferを加え、セルスクレーパーを用いてMIN6を掻き取り、1.5mLマイクロチューブに移し替えた。作業はすべて氷上で行った。その後1.5mLチューブを4℃、15000 × gで20分間遠心分離し、上清を全細胞抽出液として使用した。各細胞抽出液10 μgを12.5%SDS-PAGEにロードし電気泳動した。蛋白は0.05%Tween20, 5%nonfat dried milkを加えたTris-buffered salineによりブロックされたニトロセルロース膜へ電氣的にtransferした。メンブレンを1000倍希釈の抗caspase 3抗体、抗β-actin抗体でincubateし、HRPでラベリングした抗ウサギIgG抗体を2次抗体として使用した。2次抗体incubate後GEヘルスケア社製のWestern Blotting Detection Reagentを使用したenhanced chemiluminescence法によって蛋白の検出を行った。Caspase 3の活性体であるcleaved caspase 3

の分子量17 kDaに該当する箇所のバンドを観察した。

統計

WST-8アッセイの各データの差については1元配置分散分析を行い、その後の多重比較としてGames-Howell法を用いた。データは±SDで表記し、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。アネキシン5染色陽性細胞の割合についてはcontrol群と各群の差についてカイ二乗検定を行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

スタウロスポリン単独投与群では16時間後にはWST-8アッセイにおいて、細胞生存率は47%まで低下していた。しかし、コエンザイムQ10投与群では細胞生存率は76% ($P < 0.01$; vs. スタウロスポリン単独投与群)、Z-VAD投与群の細胞生存率は60% ($P < 0.05$; vs. スタウロスポリン単独投与群)とスタウロスポリン単独投与群に比べて有意に細胞生存率を上昇させた(図1)。

DNA断片化を観察したところ、スタウロスポリン投与15時間でDNAの断片化がみられた。このDNAの断片化は、コエンザイムQ10投与群及び、Z-VAD投与群において減弱しており、両薬剤前投与によってアポトーシスの最終段階であるDNA断片化は抑制されていることがわかった(図2)。

また我々はアポトーシスの早期段階を観察する目的で、フォスファチジルセリンの細胞膜表面への提示についてアネキシン5染色を用いて観察した。コントロール群ではアネキシン5陽性染色陽性細胞の割合が0%であったのに対して、スタウロスポリン単独投与群では6時間後に全体の15%の細胞がアネキシン5染色に陽性であり、スタウロスポリン投与6時間後にはアポトーシスの早期段階が観察されることがわかった。一方でコエンザイムQ10投与群においてはアネキシン5染色陽性細胞の割合が1%まで低下していた。Z-VAD投与群ではアネキシン5染色陽性細胞の割合は3%まで低下していた(図3)。以上からコエンザイムQ10は、スタウロスポリンによって引き起こされる膵β細胞のアポトーシスを早期段階から抑制していることがわかった。

ミトコンドリアを介したアポトーシスの最終

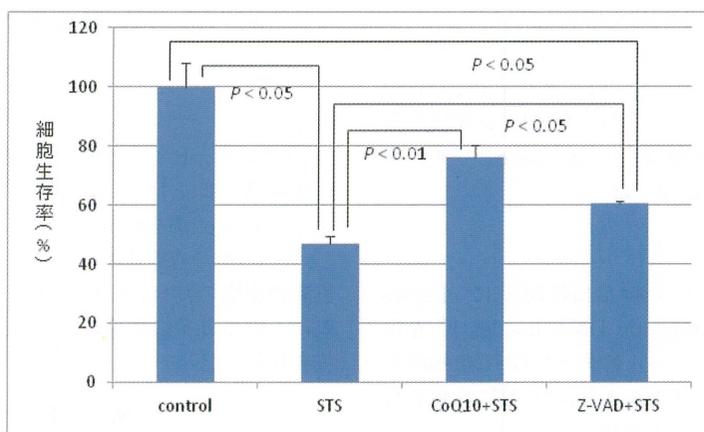


図1. WST-8アッセイによる細胞生存率測定

スタウロスポリン投与16時間後にWST-8アッセイにより細胞生存率を調べた。細胞生存率はコントロールの細胞生存率を100%として表してある。

STS:スタウロスポリン 0.5 μ M単独投与

CoQ10+STS:コエンザイムQ10 30 μ Mを4時間前投与+スタウロスポリン 0.5 μ M投与

Z-VAD+STS:Z-VAD 30 μ Mを1時間前投与+スタウロスポリン 0.5 μ M投与

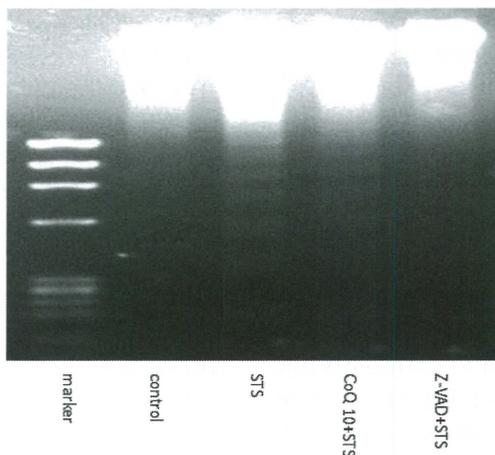


図2. DNA断片化

スタウロスポリン投与15時間後にアガロースゲル電気泳動法によってDNAの断片化を観察した。

STS:スタウロスポリン 0.5 μ M単独投与

CoQ10+STS:コエンザイムQ10 30 μ Mを4時間前投与+スタウロスポリン 0.5 μ M投与

Z-VAD+STS:Z-VAD 30 μ Mを1時間前投与+スタウロスポリン 0.5 μ M投与

段階では非活性型のcaspase 3が活性型であるcleaved caspase 3に変化し、このcleaved caspase 3がDNA断片化の最終的な引き金となることが知られている。我々はウェスタンブロッティング法を用いてcleaved caspase 3の発現を観察した。スタウロスポリン単独投与群では12時間後に

cleaved caspase 3の発現が観察された。コエンザイムQ10投与群及び、Z-VAD投与群ではcleaved caspase 3の発現が低下しており、アポトーシスの進行によって起こるcleaved caspase 3の発現が両薬剤の前投与によって抑制されていることが分かった(図4)。

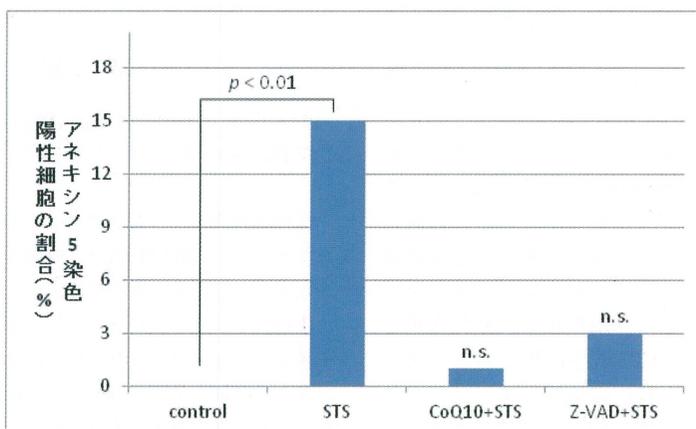


図3. フォスファチジルセリンの細胞膜表面への提示

スタウロスポリン投与6時間後にフォスファチジルセリンの細胞膜表面への提示（アポトーシスの早期段階）についてアネキシン5染色を用いて観察した。フォスファチジルセリンが細胞膜表面へ提示された細胞はアネキシン5染色陽性となる。それぞれの薬剤投与下で全細胞数に占めるアネキシン5染色陽性細胞の割合を%で表している。

STS:スタウロスポリン 0.5 μM単独投与

CoQ10+STS:コエンザイムQ10 30 μMを4時間前投与+スタウロスポリン 0.5 μM投与

Z-VAD+STS:Z-VAD 30 μMを1時間前投与+スタウロスポリン 0.5 μM投与

n.s.:not significant vs. control



図4. cleaved caspase3の観察

スタウロスポリン投与12時間後にウエスタンブロッティング法を用いて、活性型caspase3であるcleaved caspase 3の発現を観察した。

STS:スタウロスポリン 0.5 μM単独投与

CoQ10+STS:コエンザイムQ10 30 μMを4時間前投与+スタウロスポリン 0.5 μM投与

Z-VAD+STS:Z-VAD 30 μMを1時間前投与+スタウロスポリン 0.5 μM投与

考 察

ミトコンドリア糖尿病等の糖尿病において、インスリン分泌不全には膵β細胞のアポトーシスの関与が重要と考えられるが、今回の研究において、我々はミトコンドリアストレス剤であるスタウロスポリン®を用いてMIN6に対するアポトーシス誘導を試みた。スタウロスポリン0.5 μM投与で16

時間後には、細胞生存率はコントロール群の半分以下にまで低下していた。これはフォスファチジルセリンの細胞膜表面への提示、caspase 3の活性化、DNA断片化を介していることから、MIN6において有効なアポトーシス刺激になっていたと考えられた。細胞生存率測定、DNA断片化、アネキシン5染色、caspase 3活性化の観察結果から、コエンザイムQ10投与によって、スタウロスポリ

ンによるアポトーシス刺激から膵 β 細胞は保護されることが示された。またその保護効果は、汎カスパーゼ阻害剤であるZ-VADと同等以上の効果であり、抗アポトーシス剤としてのコエンザイムQ10の有用性を示唆するものであると考えられた。ミトコンドリア糖尿病に対するコエンザイムQ10の有用性について、詳細なメカニズムは報告されていないが、ミトコンドリア病の中中枢神経症状に対してはコエンザイムQ10による改善効果が報告されており⁶⁾、その作用機序は抗酸化作用とミトコンドリアへのATP供与作用であると考えられている⁷⁾。今回の我々の研究によって、コエンザイムQ10は膵 β 細胞に対しても抗アポトーシス作用を示すことが証明された。これもATP供与作用を介したミトコンドリアに対する直接保護効果の可能性が推測されるが、詳細な作用経路の解明は今後の検討課題である。

ミトコンドリア糖尿病では遺伝的なミトコンドリア機能障害によってインスリン分泌不全が生じるが¹⁾、2型糖尿病においても酸化ストレス等の後天的なストレスによるミトコンドリア機能不全、膵 β 細胞の機能不全が病態の進展に重要と考えられている¹⁰⁾。2型糖尿病患者に対するコエンザイムQ10投与が血糖コントロールを改善させたという報告があり¹¹⁾、臨床面においてもコエンザイムQ10による膵 β 細胞保護効果が示唆される。コエンザイムQ10はユビキノンとして心不全に対しては保険適応があるが、糖尿病に対する保険適応はない。しかしコエンザイムQ10はサプリメントとして既に一般的に多用されており、今後、コエンザイムQ10の膵 β 細胞保護効果がミトコンドリア糖尿病や2型糖尿病に対して有用であるというエビデンスが蓄積されれば、早期に臨床応用可能な薬剤であると考えられる。

今回の研究のlimitationは、スタウロスポリンによる膵 β 細胞刺激は非生理的な刺激であるということである。生理的な膵 β 細胞アポトーシス刺激に対してコエンザイムQ10の保護効果を検討することが今後の課題である。

しかし、今回の我々の研究によって、コエンザイムQ10はミトコンドリアストレスによって引き起こされるアポトーシスから膵 β 細胞を保護するという基礎的なメカニズムの一部が初めて証明された。今後更なる研究によって、より詳細なメカニズムを解明することで、コエンザイムQ10の臨

床応用も期待できると考えられた。

結 語

コエンザイムQ10は膵 β 細胞に対するアポトーシス抑制効果を持つことが示された。

今回の研究を行うにあたり、ご厚意でMIN6を提供して下さった川崎医科大学 重藤誠氏、加来公平教授、大阪大学 宮崎純一教授に深謝いたします。

本研究をまとめるにあたり、適切なご指導・ご助力を頂いた鳥取大学医学部地域医療学講座教授 谷口晋一先生、鳥取大学医学部統合内科医学講座病態情報内科学分野 学内講師 大倉毅先生に深謝いたします。

また、ご校閲いただいた鳥取大学医学部統合内科医学講座病態情報内科学分野教授 山本一博先生、鳥取大学医学部地域医療学講座教授 谷口晋一先生、鳥取大学医学部生理学講座統合生理学分野教授 渡邊 達生先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Ballinger SW. Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. *Nat Genet* 1992; 1: 11-15.
- 2) Butler AE. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 102-110.
- 3) Saleh MC. Mutated ATP synthase induces oxidative stress and impaired insulin secretion in beta-cells of female BHE/cdb rats. *Diabetes Metab Res Rev* 2008; 24: 392-403.
- 4) Suzuki S. The effects of coenzyme Q10 treatment on maternally inherited diabetes mellitus and deafness, and mitochondrial DNA 3243 (A to G) mutation. *Diabetologia* 1998; 41: 584-588.
- 5) Richter C. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to aging. *Int J Biochem Cell Biol* 1995; 27: 647-653.
- 6) Ogasahara S. Improvement of abnormal pyruvate metabolism and cardiac conduction defect with coenzyme Q10 in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 1985; 35:

- 372-377.
- 7) Frei B. Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. Proc Natl Acad Sci USA 1990; **87**: 4879-4883.
 - 8) Seleznev K. Calcium-independent phospholipase A2 localizes in and protects mitochondria during apoptotic induction by staurosporine. J Biol Chem. 2006; **281**: 22275-22288.
 - 9) Andersson M. Caspase and proteasome activity during staurosporin-induced apoptosis in lens epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000; **41**: 2623-2632.
 - 10) Ma ZA. Mitochondrial dysfunction and β-cell failure in type 2 diabetes mellitus. Exp Diabetes Res. 2012; 703538.
 - 11) Hodgson JM. Coenzyme Q10 improves blood pressure and glycaemic control: a controlled trial in subjects with type 2 diabetes. Eur J Clin Nutr 2002; **56**: 1137-1142.