

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34414

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18939

研究課題名(和文)新規アデノウイルスベクターを用いた糖尿病の遺伝子治療と遺伝子機能解析

研究課題名(英文) Gene therapy for diabetes mellitus and gene function analysis using a novel adenovirus vector

研究代表者

清水 かほり (Shimizu, Kahori)

大阪大谷大学・薬学部・助教

研究者番号：50737749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、2型糖尿病に対する新たな治療法を見出すため、ゲノムワイド関連解析GWASにより同定された2型糖尿病感受性遺伝子MAEAに着目した。MAEAは赤芽球島関連タンパク質であるが、2型糖尿病との関連は報告されておらず、その機能解明が待たれていた。そこでMAEAが2型糖尿病に与える影響を調べるため、生活習慣病の遺伝子治療用ベクターに資する新規アデノウイルスベクターを用いて、マウス及びマウス初代培養肝細胞にMAEAを高発現させた。その結果、MAEAを高発現させることで糖新生系遺伝子の発現が抑制された。以上より、MAEAは肝臓での糖新生の抑制を介して2型糖尿病の治療につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to determine a new treatment option for type 2 diabetes mellitus, this study focused on the macrophage erythroblast attacher (MAEA), a type 2 diabetes mellitus susceptibility gene identified via genome-wide association study (GWAS). MAEA encodes a protein involved in the terminal maturation and enucleation of erythroid cells; however, no association with type 2 diabetes mellitus has been reported and clarification of its functions is still awaited. Therefore, to investigate its effect on type 2 diabetes mellitus, MAEA was highly expressed in mouse and mouse primary hepatocytes using a novel adenovirus vector suitable as a gene therapy vector for metabolic diseases. Expression of the gluconeogenesis gene was suppressed by highly expressing MAEA. The results suggest that MAEA may lead to a new type of treatment for type 2 diabetes mellitus by suppressing gluconeogenesis.

研究分野：遺伝子治療学

キーワード：糖尿病 アデノウイルスベクター GWAS 遺伝子治療 MAEA 糖代謝

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は、慢性の高血糖を主徴とする疾患群であり、世界の糖尿病患者は年々増え続けている。2型糖尿病は糖尿病の9割以上を占め、その治療薬は数多く開発されてきた。しかしながら、一般的に2型糖尿病患者のQuality of life (QOL)は、2型糖尿病を罹患していない人に比べて低い傾向にあることから、2型糖尿病はいまだ克服されておらず、新たな2型糖尿病治療法の開発が求められている。

2型糖尿病患者の特徴は、日本人と欧米人では異なることが知られている。すなわち、日本人では肥満の頻度は高くなく、インスリン分泌能及びインスリン抵抗性が弱い。一方で、欧米人はその逆である。したがって、2型糖尿病の発症メカニズムは、人種によって異なる可能性が考えられている。

近年、ゲノムワイド関連解析 genome-wide association study (GWAS)により、日本人を含む東アジア人における2型糖尿病感受性遺伝子領域が新たに8か所同定された(Cho *et al.*, *Nat. Genet.*, 2011)。そこで、日本人の2型糖尿病により適した治療法を開発するため、GWASにより同定された日本人を含む東アジア人固有の新規2型糖尿病感受性遺伝子を用いて、2型糖尿病の遺伝子治療を試みることにした。

先進的な医療として注目されている遺伝子治療は、2012年に欧米で初めて家族性高コレステロール血症に対して販売承認されて以来、さらなる実用化に向けて研究が推進されている。2型糖尿病のように、慢性疾患に対する遺伝子治療では、導入遺伝子を安全かつ高効率に長期間に渡り発現させる必要がある。研究代表者らは以前に、肝障害性が低く、搭載遺伝子を高効率に長期に渡って発現可能な新規アデノウイルス(Ad)ベクターの開発に成功している(Shimizu *et al.*, *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2014)。

本研究では、遺伝子治療が2型糖尿病に対する新たな治療法のひとつとなることを目指し、本Adベクターを用いて東アジア人固有の2型糖尿病感受性遺伝子が2型糖尿病へ与える影響について検討した。

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者らが開発した新規Adベクターを用いて、GWASにより同定された日本人を含む東アジア人固有の2型糖尿病感受性遺伝子のひとつである遺伝子を高発現させることで、日本人により適した2型

糖尿病に対する遺伝子治療の基礎的検討を行うことを目的とした。

搭載する遺伝子の候補として、日本人を含む東アジア人における2型糖尿病感受性遺伝子のひとつである macrophage erythroblast attacher (MAEA)に着目した。MAEAは赤芽球島関連タンパク質であり、赤芽球の脱核に関与する。しかしながら、これまでに2型糖尿病との関連は報告されておらず、その機能の解明が待たれていた。そこで、MAEAを研究代表者らが開発した肝障害性が低く、長期に発現が可能な新規Adベクターに搭載し、糖代謝の中心臓器である肝臓において高発現させることで、MAEAの2型糖尿病に対する治療効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) MAEAの臓器分布の解析

着目した新規2型糖尿病感受性遺伝子のひとつであるMAEAの臓器分布を調べるため、C57BL/6マウスから主要な臓器を回収し、RNAを抽出後、定量的RT-PCRを用いてMAEA mRNA量を測定した。

(2) MAEAを搭載したAdベクターの作製および発現確認

MAEAをC57BL/6マウスの肝臓cDNAを用いてクローニングし、新規Adベクターに搭載した(Ad-MAEA)。作製したAd-MAEAがどの程度MAEAを発現可能か調べるため、C57BL/6マウスにAd-MARAを尾静脈内投与し、14日後に肝臓を回収し、MAEAの発現量を定量的RT-PCRを用いて測定した。

(3) MAEA遺伝子を導入後のマウスにおける表現型の変化の解析

2型糖尿病は糖代謝異常を呈することから、Ad-MAEAを用いてC57BL/6マウスにMAEAを高発現させることで、糖代謝等にどのような変化があるかを調べた。具体的には、体重測定、Ad-MAEA投与14日後の空腹時血糖値およびインスリン値の測定を行った。また、耐糖能についても評価するため、Ad-MAEA投与7および14日後に糖負荷試験を行った。さらに、Ad-MAEA投与14日後の肝臓を回収し、定量的RT-PCRにより、糖代謝に関与する遺伝子の発現を測定した。

(4) マウス初代培養肝細胞にMAEA遺伝子を導入後の遺伝子発現の変化の解析

MAEAの高発現が肝細胞に直接的に及ぼす影響を詳細に検討するため、C57BL/6マウ

スから初代培養肝細胞を単離後、Ad-MAEA を作用させた。そして、48 時間後に初代培養肝細胞から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR を用いて MAEA および糖代謝に関連する遺伝子の発現を調べた。

4. 研究成果

(1) MAEA の臓器分布の解析

MAEA は、調べたすべての臓器においてその発現が見られた。網状赤血球における MAEA 発現量と比較して、肝臓、膵臓、精巣上体周囲脂肪組織、骨格筋、腎臓、肺、心臓、精巣において高い発現が観察された。特に、骨格筋と精巣において MAEA mRNA の高い発現を示された。

(2) MAEA を搭載した Ad ベクターの作製および発現確認

作製した Ad-MAEA を C57BL/6 マウスに投与し、14 日後にマウスの肝臓を回収した。MAEA の発現量を調べるため、定量的 RT-PCR を行ったところ、Ad-MAEA 群は、コントロール群 (ホタルルシフェラーゼ遺伝子を搭載した Ad ベクター) よりも約 14 倍高い MAEA の発現を示した。したがって、作製した Ad-MAEA は、マウス肝臓において MAEA を高発現可能であることが示された。

(3) MAEA 遺伝子を導入後のマウスにおける表現型の変化の解析

MAEA をマウス肝臓中で高発現させることでマウスの表現型が変化するかを調べるため、Ad-MAEA を投与した後、体重を 5 週間測定した。その結果、Ad-MAEA 群とコントロール群はともに同程度の体重増加を示した。

次に、Ad-MAEA 投与 14 日後の空腹時血糖値およびインスリン値を測定したところ、Ad-MAEA 群とコントロール群との間に有意な差は認められなかった。さらに、耐糖能について評価するため、Ad-MAEA 投与 7 および 14 日後に糖負荷試験を行ったところ、Ad-MAEA 群とコントロール群は同様の結果であった。

一方で、Ad-MAEA 投与 14 日後の肝臓における糖新生系遺伝子 phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) の発現を測定したところ、コントロール群よりも PEPCK の発現が有意に抑制されていた。

(4) MAEA 遺伝子を導入後のマウス初代培養肝細胞の遺伝子発現の変化の解析

MAEA が糖新生などの糖代謝に及ぼす直接的な影響をより詳細に検討するため、マウス初代培養肝細胞に Ad-MAEA を作用させ、定量的 RT-PCR により種々の遺伝子発現を測定した。まず、MAEA の発現を調べたところ、コントロール群と比較して Ad-MAEA 群は 1000 倍以上高い発現を示した。

次に、糖新生系遺伝子 glucose-6-phosphatase (G6Pase), PEPCK, fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) の発現量を測定した。その結果、Ad-MAEA 群における G6Pase、PEPCK、FBPase の発現は、コントロール群よりも有意に低いことが示された。さらに、糖新生系遺伝子の発現を制御する hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF-4 α) の発現も、Ad-MAEA 群では抑制された。

以上より、MAEA の高発現は、マウス初代培養肝細胞において HNF-4 α mRNA の発現抑制を介して糖新生系遺伝子の発現を抑制することが示唆された。

今回、マウス初代培養肝細胞を用いた検討においては、MAEA の高発現は糖新生の抑制を示唆する結果が得られた。しかしながら、マウス個体を用いた検討においては、空腹時血糖値や耐糖能に MAEA の高発現による有意な変化は観察されなかった。この理由として、MAEA の発現レベルが考えられた。Ad-MAEA をマウス初代培養肝細胞に作用時は、コントロール群よりも MAEA の発現が 1000 倍以上高かったが、マウス肝臓においては約 14 倍の高さであった。今後、より高く MAEA を発現させることで、個体においても血糖値等に影響を与えることが推察され、2 型糖尿病治療につながる可能性が示唆された。

2 型糖尿病態下においては、糖新生の亢進により糖産生が増加している。糖新生を抑制することで糖産生が緩和されれば、空腹時高血糖が改善され、2 型糖尿病の病態緩和および治癒につながることを期待される。2 型糖尿病治療薬は多数開発されているものの、糖新生を抑制する治療薬はビッグアナイド系のみであり、さらなる治療薬の開発が待たれている。本研究により、MAEA は、糖新生を抑制可能な新たな 2 型糖尿病治療の標的となる可能性が見出された。

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)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Shimizu K., Okamoto M., Terada T., Sakurai F., Mizuguchi H., Tomita K., Nishinaka T.: Adenovirus vector-mediated macrophage erythroblast attacher (MAEA) overexpression in primary mouse hepatocytes attenuates hepatic gluconeogenesis. *Biochem. Biophys. Rep.*, 2017; 10, 192–197. (doi: 10.1016/j.bbrep.2017.04.010) 査読有
2. Shimizu K.: Development and Characterization of a Novel Adenovirus Vector Exhibiting MicroRNA-mediated Suppression of the Leaky Expression of Adenovirus Genes. *Yakugaku Zasshi*. 2015; 135 (12): 1349-56. (doi: 10.1248/yakushi.15-00190) 査読有
3. Iizuka S., Sakurai F., Shimizu K., Ohashi K., Nakamura S., Tachibana M., Mizuguchi H.: Evaluation of Transduction Properties of an Adenovirus Vector in Neonatal Mice. *Biomed. Res. Int.* 2015; 685374. (doi: 10.1155/2015/685374) 査読有

[学会発表](計 21 件)

1. 清水かほり、西中徹、富田晃司、寺田知行：糖尿病治療・予防を目指した改良型アデノウイルスベクターによる遺伝子と食品に関する検討、日本薬学会 138 年会、2018 年 (シンポジウム)
2. Shimizu K., Mikamoto T., Urayama Y., Nishinaka T., Sakurai F., Mizuguchi H., Tomita K., Terada T.: Therapeutic effect of adenovirus vector-mediated lysophosphatidylcholine acyltransferase overexpression on obesity and type 2 diabetes mellitus. 第 23 回日本遺伝子細胞治療学会、2017 年
3. Shimizu K., Sakurai F., Iizuka S., Tachibana M., Nishinaka T., Terada T., Mizuguchi H.: Adenovirus vector-induced hepatotoxicity during the early phase after systemic administration is attributed to inflammatory cytokine-induced leaky expression of adenovirus genes. 第 23 回日本遺伝子細胞

治療学会、2017 年

4. 清水かほり、三家本武成、裏山悠哉、西中徹、櫻井文教、水口裕之、富田晃司、寺田知行：改良型アデノウイルスベクターを用いたリン脂質リモデリング酵素の糖尿病への関与の検討、遺伝子・デリバリー研究会 第 17 回 シンポジウム、2017 年
5. 清水かほり、櫻井文教、飯塚俊輔、立花雅史、西中徹、寺田知行、水口裕之：アデノウイルスベクター投与後早期に生じる肝障害のメカニズム解明、遺伝子・デリバリー研究会 第 17 回 シンポジウム、2017 年
6. Shimizu K., Sakurai F., Iizuka S., Tachibana M., Nishinaka T., Terada T., Mizuguchi H.: Adenovirus vector-induced hepatotoxicity during the early phase of adenoviral treatment is attributed to inflammatory cytokine-induced leaky expression of adenovirus genes. American Society of Gene and Cell Therapy 20th annual meeting、2017 年
7. Shimizu K., Ogiya Y., Nishinaka T., Sakurai F., Mizuguchi H., Tomita K., Terada T.: Study of zinc finger AN1-type domain gene transduction by a novel adenovirus vector with lower hepatotoxicity for treatment of diabetes mellitus. European Society of Gene and Cell Therapy 24 th Annual Congress、2016 年
8. Shimizu K., Okamoto M., Nishinaka T., Sakurai F., Mizuguchi H., Tomita K., Terada T.: Study of erythroblastic-associated gene transduction by modified adenovirus vector for treatment of diabetes mellitus. 第 22 回日本遺伝子細胞治療学会、2016 年
9. 清水かほり、岡本実菜子、西中徹、櫻井文教、水口裕之、富田晃司、寺田知行：改良型アデノウイルスベクターを用いた赤芽球島関連タンパク質の 2 型糖尿病への関与の検討、第 16 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム、2016 年
10. 清水かほり、岡本実菜子、西中徹、櫻井

文教、水口裕之、富田晃司、寺田知行：改良型アデノウイルスベクターを用いた赤芽球島関連タンパク質の糖尿病への関与の検討、日本薬学会第 136 年会、2016 年

11. **清水かほり**：マイクロ RNA を利用してウイルス遺伝子の発現を抑制可能な新規アデノウイルスベクターの開発と機能評価、第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2015 年（招待講演）

12. **Shimizu K.**, Sakurai F., Iizuka S., Tachibana M., Nishinaka T., Terada T., Mizuguchi H. : Suppression of adenovirus vector-induced hepatotoxicity at the early phase via suppression of leaky expression of adenovirus genes. 第 21 回日本遺伝子治療学会学術集会、2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.osaka-ohtani.ac.jp/department/teacher/pharmacy/ph_shimizuk.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 かほり (SHIMIZU, Kahori)

大阪大谷大学・薬学部・助教

研究者番号：50737749