

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19074

研究課題名（和文）耐糖能異常ゼブラフィッシュを用いた治療標的遺伝子及び早期診断バイオマーカーの探索

研究課題名（英文）Exploration study on gene therapeutic targets and biomarkers for early diagnosis using an impaired glucose tolerance zebrafish model

研究代表者

臧 黎清 (Zang, Liqing)

三重大学・地域イノベーション学研究所・助教

研究者番号：10437105

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：耐糖能異常とは、インスリンの分泌不足や作用不良などによって生じる血糖値の正常化機構が不良になった状態である。耐糖能異常を早期に発見し治療介入することが、これからの予防的治療戦略として注目されている。本研究では、2型糖尿病モデルゼブラフィッシュを開発し、その網羅的遺伝子発現解析からHmox1などの治療標的遺伝子を発見した。これらの遺伝子の発現抑制により、糖尿病および耐糖能異常発症の改善が認められた。

研究成果の概要（英文）：Impaired glucose tolerance is a pre-diabetic state of type 2 diabetes mellitus (T2DM) that is associated with either insulin resistance, low insulin production or both. Early detection and therapeutic treatment of impaired glucose tolerance is now attracting attention as a prophylactic treatment strategy. In this study, we developed a T2DM model zebrafish and identified novel therapeutic targets gene (such as hmox1) by RNA-seq analysis. Knockdown study of these genes ameliorated the T2DM phenotypes including glucose intolerance.

研究分野：医学

キーワード：2型糖尿病 ゼブラフィッシュ 遺伝子抑制 治療標的遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

近年、日本では2型糖尿病とその予備軍(非顕在性耐糖能低下状態)の人口が急増し、迅速に対策が求められている。糖尿病は基本的に治癒することはないが、発症早期から治療的介入により、正常者と同等の健康寿命を保つことが可能である。糖尿病や耐糖能異常の診断には、血糖値やHbA1cなどの指標が用いられているが、これらをさらに早い段階、いわゆる前病段階で診断するためには、糖代謝異常を鋭敏に捉える新たなバイオマーカーが必要である。

ゼブラフィッシュは近年、マウス・ラットに続く第3のモデル動物として注目されており、すでに膵臓ベータ細胞を選択的に破壊や高濃度のグルコース溶液暴露などにより、2型糖尿病に類似した徴候が現れることが報告されている(Wound Repair Regen. 2010. 18; Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2014. 171)。我々の研究グループでは食餌性肥満ゼブラフィッシュモデルの開発に成功し(BMC Physiology. 2010. 10:21; J Funct Foods. 2015. 17)さらなる発展型として、給餌成分の改良により2型糖尿病(Type 2 Diabetes Mellitus; T2DM)モデルゼブラフィッシュの開発に成功した(Sci Rep. 2017. 7:1461)。

### 2. 研究の目的

我々は、これまでの研究成果「2型糖尿病ゼブラフィッシュ」の網羅的遺伝子発現解析結果から、耐糖能異常発症のゲノムメカニズムを明らかにしている。その結果を受け、今回の研究は、糖尿病および耐糖能異常の治療標的遺伝子・早期診断バイオマーカーの探索を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 糖尿病モデルゼブラフィッシュの作製

AB系統のゼブラフィッシュを循環システムに入れ、28度の水温に飼育した。健全な水環境を維持するため、水温、PH、アンモニア、硝酸塩、硬度など、システムの水の品質を表す重要な要素を定期的に監視し、良好な水質を確保した。本研究では、3か月齢のオスの健康個体を使用した。

我々は食餌性肥満ゼブラフィッシュモデルの作成方法を改良した給餌方法により、肥満症状に加え、空腹時高血糖を呈するゼブラフィッシュを作り出した。本モデルでは、Otohim-B2(日清丸紅飼料)を餌とし、自動給餌機により肥満群は一日6回(約120mg/fish/day)を投与し、正常群に対して一日1回Otohim-B2を投与した(約20mg/fish/day)。この糖尿病モデルはヒト糖尿病の病態解明と診断・治療に応用できるかを検証するため、糖負荷実験、インスリン抵抗性、糖尿病治療薬に対する応答性など評価した。さらに、次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子発現定量解析、またはIn silico

におけるネットワーク解析を行った。

#### (2) 遺伝子操作による糖代謝に及ぼす影響の確認

(1)で得られたゼブラフィッシュの膵臓・肝臓における網羅的遺伝子発現解析(RNA-Seq)は次世代シーケンサーを用いて行った。複数の糖尿病関連遺伝子あるいは新規遺伝子が抽出された。これらのうち、既知の糖代謝関連遺伝子heme oxygenase 1(hmox1)と機能の不明な新規遺伝子Xに対し、各自のin vivo-モルフォリノ・アンチセンス・オリゴヌクレオチド(MO)を合成した。ゼブラフィッシュを正常群、肥満群と肥満+MO群の3群に分けた。次に、肥満+MO群に対し、週2回MOの腹腔内注射を行い、遺伝子発現抑制実験を行った。投与方法は、ゼブラフィッシュを500ppmの2-PE(和光純薬)に入れ麻酔し、22Sハミルトンマイクロシリンジ(ハミルトン社)を用いて、各MO溶液を体重あたり15mg/kg量、腹腔内投与した。

実験期間は8週間とした。毎週身長・体重を測定し、実験終了時に空腹血糖値を測定した。

#### (3) CRISPR-Cas9システムによる遺伝子X変異系統作製

遺伝子Xに対してはCRISPR-Cas9システムを用いてノックアウト個体を作製した。まず遺伝子Xに対して特異的な配列を持つcrRNA 3種類、tracrRNA、Cas9 mRNAを合成した。そしてcrRNA(25µg)、tracrRNA(100µg)とCas9 mRNA(250µg)を同時に1-2細胞期のAB系統ゼブラフィッシュ受精卵に、マイクロインジェクションした。次に遺伝子Xの標的領域が切断されたのか検証するため、Heteroduplex Mobility Assay(HMA)を行った。48時間後のゼブラフィッシュを1匹当たり50µlのlysis buffer(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1mM EDTA, 0.2% Triton X-100, 200µg/ml proteinase K)に入れ、ゲノムDNAを抽出した。各配列に特異的なプライマーを用い、PCR増幅を行い、10% poly-acrylamide gel(WAKO)で分離し、変異体の確率を分析した。結果的に、遺伝子Xの変異を80%以上導入したcrRNA配列を決定した。このcrRNAをゼブラフィッシュ受精卵にマイクロインジェクションし、遺伝子変異F0ファウンダーを飼育した。成魚になったF0ファウンダーを野生型ゼブラフィッシュと交配し、ヘテロ接合体F1世帯を作製した。最終目的は、ホモ接合体を作製し、遺伝子X欠損系統を作り、肥満誘導下空腹血糖値を評価し、耐糖能異常への影響を検証した。

#### (4) Hmox1、遺伝子XのマウスsiRNA設計・合成・効率確認

遺伝子Xは、異なる配列のsiRNAを3つ設計し、合成した(Bioneer社)。Hmox1 siRNAの配列は、文献を参考し合成した(J Biol

Chem. 2004. 279)。各 siRNA をマウス肝がん細胞株 Hepa 1-6 (Riken Cell Bank) にトランスフェクションし、回収した細胞は Isogen により total RNA を抽出・精製した。次に、500 ng total RNA から cDNA を合成し、テンプレートとして特異的プライマーと Fast SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher) を用いて qRT-PCR を行った。装置は StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を用いた。最もノックダウン効率の高い siRNA 配列を決定し、マウス試験用として大量合成をした。

#### (5) siRNA-Lipoplex 複合体作製

siRNA 単体では、血液中で容易に分解されてしまう。この問題を解決するため、今回は siRNA Lipoplex 複合体技術を適用した (Bioconjug Chem. 2011. 22)。Dicetylphosphate-diethylenetriamine (DCP-DETA) を含んだポリカチオンリポソーム (PCL) を用いた。ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、コレステロール、および DCP-DETA (モル比で 1:1:1) を t-ブチルアルコールに溶解し、凍結乾燥した。リポソームはメンブランフィルター (Nucleopore) により 100nm 前後のサイズに調整した。リポソームおよび siRNA を混合し、室温で 20 分間インキュベートし、リポソーム/siRNA 複合体を形成した。凍結した Lipoplex を調製するために、複合体を液体窒素中で凍結させ、攪拌しながら 43 の水浴中で解凍した。In vivo 研究のために、Lipoplex を DSPE-PEG6000 (総脂質に対して 10mol%) と共に 40 で 10 分間インキュベートすることによりポリエチレングリコール (PEG) で修飾した。以上の工程により、脂質膜の間に siRNA が入り込んだ多重膜の PCL/siRNA 複合体が形成された。この siRNA-Lipoplex は血清中においても 1 週間以上、安定であった。

#### (6) BALB/cCrSlc 野生型マウスを用いた siRNA-Lipoplex のノックダウン効果確認

BALB/cCrSlc 野生型マウスを用いて、(5) で作製した Hmox1 と遺伝子 X の siRNA-Lipoplex を 50 μg/匹量を週 2 回、計 3 回尾静脈から投与し、最終投与の 48 時間後に、各群の膵臓組織を採集し、qPCR により Hmox1 と遺伝子 X の発現レベルを解析した。

#### (7) 自然発症 2 型糖尿病モデル NSY/Hos 系統マウスを用いた高脂肪食誘導実験

8 週齢、雄の自然発症 2 型糖尿病モデル NSY/Hos 系統マウスは、正常食 (クレア社) と高脂肪食 (HFD-58Y1, SLC 社) の 2 群に分け、両群ともに餌と水は一日中自由に摂取できる状態であった。実験期間は 10 週間とし、毎週体重・空腹血糖値を測定した。

#### (8) 自然発症 2 型糖尿病モデル NSY/Hos 系統マウスを用いた Hmox1、遺伝子 X のバリデーション試験

#### ン試験

16 週齢、雄の自然発症 2 型糖尿病モデル NSY/Hos 系統マウスは、正常食と高脂肪食、高脂肪食 + Hmox1 siRNA、高脂肪食 + 遺伝子 X siRNA の 4 群に分けた。最初の 2 週間は、4 群ともに正常食を与え、siRNA の 2 群のみ、Hmox1 と遺伝子 X の siRNA-Lipoplex を 50μg/匹量を週 2 回尾静脈から投与した。次に、3 週目から高脂肪食に変え、同じ量の siRNA-Lipoplex を同じ頻度で投与し、計 4 週間投与した。実験終了時、マウスの体重・空腹血糖値・血中インスリン量を測定し、肝臓・膵臓・脂肪組織を採集し、重量を測った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 2 型糖尿病モデルゼブラフィッシュ

本モデルは、肥満の進行に伴い、肥満群 (DIO) ゼブラフィッシュの空腹血糖値の変動を調べた結果、体重の増加と共に、空腹血糖値が肥満誘導 1 週目から上昇し、高い血糖値は実験終了時まで維持された (図 1)。

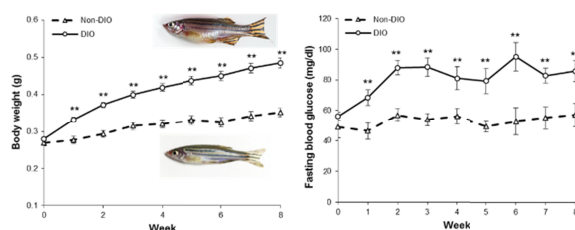


図 1、肥満誘導による体重・空腹血糖値の増加への影響

グルコースの腹腔内注射により糖負荷試験を行った結果、肥満群は正常群よりも各タイムポイントにおいて血糖値が上昇し、特に投与後 30 分、180 分の時点で正常群より有意に上昇した。そして、正常群は投与後 180 分で投与前 (= 正常レベル) に戻ったが、肥満群では高いレベルを維持し、グルコース投与前の値まで回復しなかった (図 2)。この結果から、肥満誘導されたゼブラフィッシュは耐糖能障害 (グルコース不耐性) があることが明らかとなった。

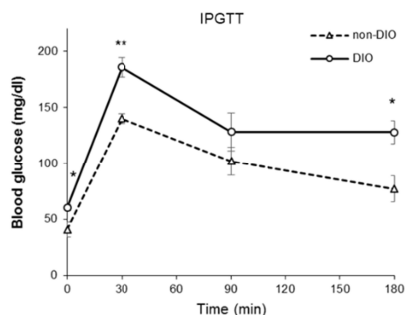


図 2、グルコース腹腔内注射による糖負荷試験

この耐糖能障害の原因が、インスリン抵抗性（インスリンが十分に働かないこと）であるか確認するため、インスリン分泌量を測定した。ウェストプロットに十分使用可能なゼブラフィッシュインスリン抗体はまだ見つからなかったため、インスリンに蛍光タンパク質 EGFP を発現させたゼブラフィッシュ系統 (*Tg(-1.0ins:EGFP)<sup>sc1</sup>*) を用い、その蛍光量で間接的にインスリンの分泌量を測った。図3 a,b に示すように、肥満群のインスリン由来の蛍光量は正常群の2.2倍も上昇した。本モデルは耐糖能障害と増加するインスリン分泌量が示唆しており、ヒトの2型糖尿病同様のインスリン抵抗性が示唆された。

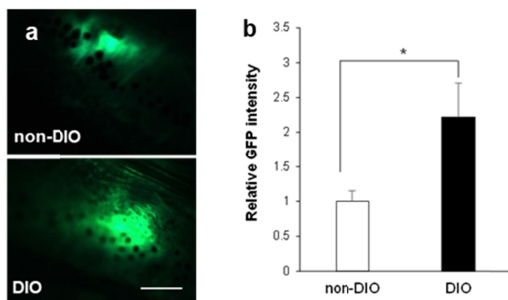


図3、肥満誘導によるインスリン分泌量の上昇

このゼブラフィッシュの膵臓由来の total RNA を回収し、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq を行った。ネットワーク解析の結果、ヒト病態に報告のある糖尿病関連パスウェイが本モデルにも存在していることを明らかにし（図4）、さらに本研究テーマの1つでもある遺伝子 X（および *hmx1*）の関与を推測した。

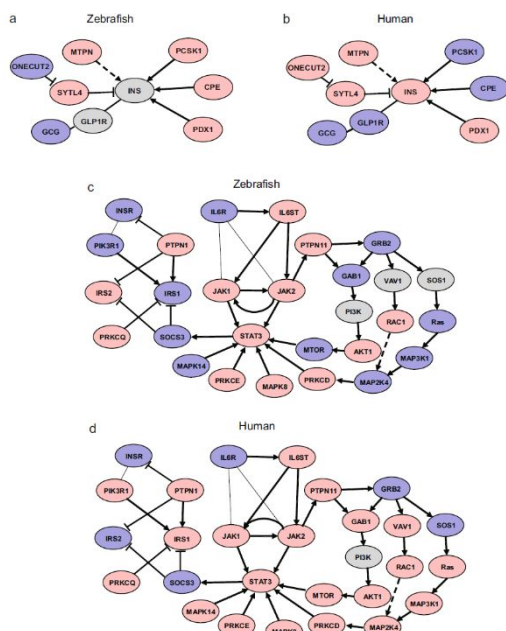


図4、糖尿病モデルゼブラフィッシュとヒト糖尿病患者のインスリン分泌・抵抗性関連遺伝子ネットワーク比較：a-b、インスリン分泌関連ネットワーク；c-d、インスリン抵抗

## 性関連ネットワーク

ここまでの研究成果により、過食による肥満形成に伴う糖尿病ゼブラフィッシュは、早期糖尿病の機序を解明するのに適しており、糖尿病の治療ターゲット発見のための有用な動物モデルであることが証明された。

（2）糖尿病モデルゼブラフィッシュを用いた *hmx1* と遺伝子 X の発現抑制による糖代謝への影響

（1）で予想された遺伝子 X および *hmx1* に対し、糖尿病ゼブラフィッシュにおける遺伝子発現抑制実験を行った。図5に示すように、肥満群に比べて、*hmx1* と遺伝子 X の発現抑制により空腹時血糖値の上昇を有意に抑制し、これらの遺伝子は2型糖尿病に対する治療標的遺伝子である可能性が示唆された。

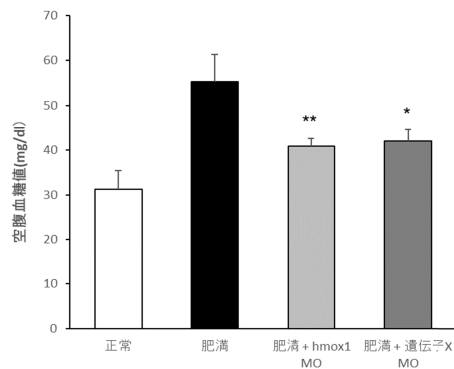


図5、MOによる空腹血糖値増加への影響

（3）*Hmx1*、遺伝子 X siRNA ノックダウン効果確認（*in vitro*）

次に糖尿病マウスにおける遺伝子 X と *Hmx1* の発現抑制を行うため、それぞれの siRNA を複数検討した。マウス肝がん細胞株 Hepa 1-6 に各 siRNA を導入し、qRT-PCR 法によりそれぞれのノックダウン効率を解析した。図6、図7に示すように、*Hmx1* siRNA は約 50%、遺伝子 X siRNA-2 は約 80% を抑制された。この結果により、マウス試験用の遺伝子 X siRNA 配列を決定した。

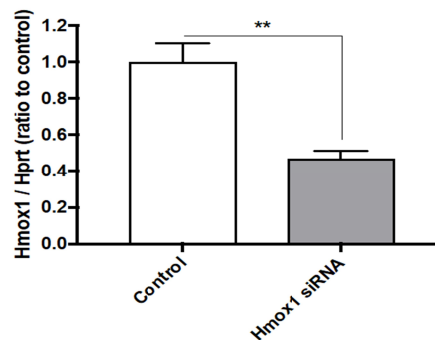


図6、*Hmx1* siRNA による発現抑制効果

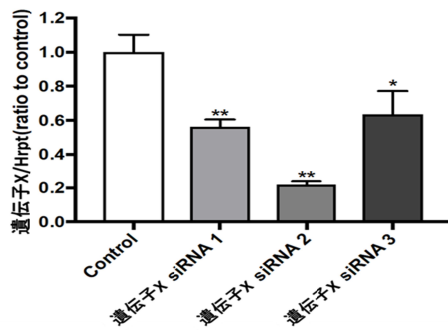


図7、遺伝子 X siRNA による発現抑制効果

(4) Hmx1、遺伝子 X siRNA ノックダウン効果確認 (in vivo)

Hmx1 siRNA と遺伝子 X siRNA を大量合成し、前述の方法にて多重膜の PCL/siRNA 複合体を調製した。これらの PCL/siRNA を野生型 BALB/cCrSlc マウスに尾静脈から投与し、計 3 回投与の後、膵臓組織の遺伝子レベルを調べた。その結果、Hmx1 遺伝子は 38%、遺伝子 X は 59% も抑制された (図 8)。

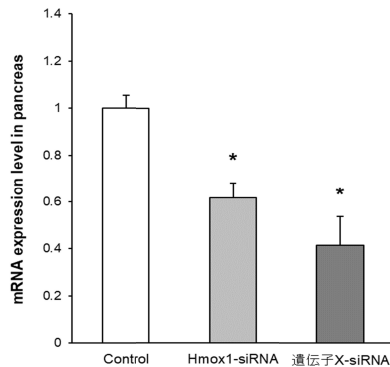


図8、膵臓での目的遺伝子の発現抑制

(5) 自然発症 2 型糖尿病モデル NSY/Hos 系統マウスを用いた高脂肪食負荷試験

自然発症 2 型糖尿病モデル NSY/Hos 系統マウスを用いて、予備実験として高脂肪食負荷試験を行った。高脂肪食誘導された NSY/Hos マウスは体重増加とともに、空腹血糖値も正常食群より有意に上昇した (図 9、10)。NSY/Hos マウスは 2 型糖尿病モデルとしての有用性を確認した。

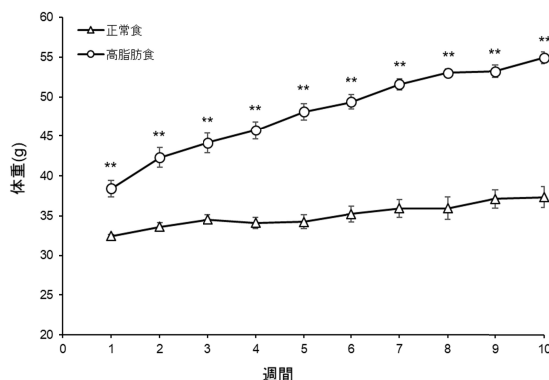


図9、高脂肪食誘導による体重増加

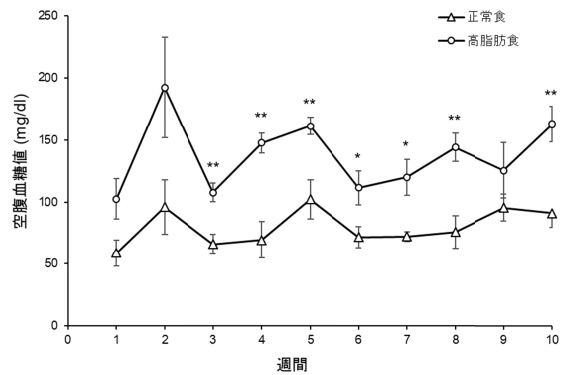


図10、高脂肪食誘導による空腹血糖値の増加

(6) 2 型糖尿病マウスへの PCL/siRNA 複合体の投与

前述の NSY/Hos マウスに対し、Hmx1 と遺伝子 X の PCL/siRNA 複合体を、上記の糖尿病誘導条件下で投与し、空腹時血糖値・肝臓・膵臓組織への影響を解析した。今後、再現性確認試験を行う予定である。

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)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Liqing Zang, Yasuhito Shimada, Norihiro Nishimura. Development of a Novel Zebrafish Model for Type 2 Diabetes Mellitus. Scientific Reports. 査読有. 2017, 7:1461.

2. 臧黎清、島田康人、西村訓弘、食餌性肥満ゼブラフィッシュを用いた天然由来抗肥満成分の探索研究、日本未病システム学会雑誌、査読有、2016、Vol.22、No.2、p62-66

3. Liqing Zang, Yasuhito Shimada, Yuhei Nishimura, Toshio Tanaka, Norihiro Nishimura. Repeated blood collection for blood tests in adult zebrafish. Journal of Visualized Experiments. 査読有. 2015, (102), e53272, doi: 10.3791/53272

4. Liqing Zang, Yasuhito Shimada, Toshio Tanaka, Norihiro Nishimura. Rhamnan sulphate from Monostroma nitidum attenuates hepatic steatosis by suppressing lipogenesis in a diet-induced obesity zebrafish model. Journal of Functional Foods. 査読有. 2015, 17: 364-370.

[学会発表](計 9 件)

1. 島田康人、山田英嗣、Richard White、臧

黎清、Ewa Snaar-Jagalska、Herman P Spaink、西村有平、田中利男、ゼブラフィッシュを用いた抗腫瘍薬の創薬スクリーニング、第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 16 日、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

2. 山田英嗣、Richard White、臧黎清、Ewa Snaar-Jagalska、Herman P Spaink、西村有平、島田康人、がん移植ゼブラフィッシュスクリーニングによる抗悪性黒色腫化合物の発見、第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 16 日、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

3. 島田康人、臧黎清、西村有平、田中利男、食餌性肥満モデルの新しい研究展開、第 2 回ゼブラフィッシュ創薬研究会、2016 年 11 月 4 日、みんなの森 ぎふメディアコスモス(岐阜県・岐阜市)

4. Yasuhito Shimada、Liqing Zang、Norihiro Nishimura、Toshio Tanaka、Diet-induced Obesity Model for Natural Products Drug Discovery、The 9th Zebrafish Disease Models Conference、20161006、Marina Bay Sands (Singapore)

5. Liqing Zang、Yasuhito Shimada、Norihiro Nishimura、Creation of Novel Zebrafish Model for Type 2 Diabetes Mellitus、The 9th Zebrafish Disease Models Conference、20161005、Marina Bay Sands (Singapore)

6. 臧黎清、島田康人、西村訓弘、新規 2 型糖尿病ゼブラフィッシュの構築および比較トランスクリプトーム解析による発症メカニズムの解明、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 27 日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

7. 島田康人、臧黎清、西村有平、西村訓弘、田中利男、in vivo スクリーニングによる新規抗肥満化合物、ラムナン硫酸の発見、第 129 回日本薬理学会近畿支部部会、2016 年 6 月 24 日、広島県医師会館(広島県・広島市)

8. 臧黎清、島田康人、西村訓弘、食餌性肥満ゼブラフィッシュモデルを用いた天然由来抗肥満成分の探索研究、第 80 回日本生化学会中部支部例会、2016 年 5 月 21 日、三重大学(三重県・津市)

9. 臧黎清、島田康人、西村訓弘、食餌性肥満ゼブラフィッシュモデルを用いた天然物の抗肥満効果に関する研究、第 22 回日本未病システム学会学術総会、2015 年 10 月 12 日、北海道大学 学術交流会館(北海道)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臧 黎清 (Zang, Liqing)  
三重大学・大学院地域イノベーション学  
研究科・助教  
研究者番号：10437105

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )