様　式　Ｆ－１９－２

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ５ 月 ２３ 日現在

機関番号：１４１０１
研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）
研究期間：2016～2017
課題番号：１５ＫＫ０３０５

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（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Identification of therapeutic target genes and early diagnosis biomarkers of abnormal glucose tolerance using a zebrafish model(Fostering Joint International Research)

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科・助教

研究者番号：１０４３７１０５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　10,200,000円
渡航期間：　12ヶ月

研究成果の概要（和文）：　肥満は2型糖尿病の発症を増加させる最も重要な因子と考えられている。肥満によるインスリン抵抗性発症メカニズムを明らかにすることは、2型糖尿病およびその合併症の予防と治療において最大の研究テーマである。私たちは、2型糖尿病モデルゼブラフィッシュを用いて、幾つかの治療標的遺伝子候補を発見してきた。本研究では、米国ヴァンダービルト大学医学部のWenbiao Chen教授と国際共同研究を通して、これまで発見してきた新規治療標的遺伝子のバリデーションスタディを行った。その結果、耐糖能異常に関与する２つの新規治療標的遺伝子を発見した。

研究成果の概要（英文）：　Obesity is considered as one of the most important factors that facilitates the incidents of type 2 diabetes mellitus (T2DM). The onset mechanism of insulin resistance induced by obesity is the greatest research interest in the prevention and treatment of T2DM with its complications. We have found several candidates of therapeutic target genes by using our original zebrafish model for T2DM. In this study, we performed validation studies of these candidates by international collaborating with Prof. Wenbiao Chen in Vanderbilt University School of Medicine, USA. As a result, we discovered two novel therapeutic targets involved in glucose intolerance.

研究分野：医歯薬学

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

世界の成人の 11 人に 1 人が糖尿病に罹患し、その患者数は 2017 年には 4 億 2,500 万人に達した。そして、さらに 3 億 5000 万人以上の成人が 2 型糖尿病の予備群と考えられている（文献 1）。2 型糖尿病は一度発症すると、たとえその後の血糖コントロールが良好であっても、患者の生命予後は非常に悪い（文献 2）。そのため、糖尿病の前段階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重要である。特に日本人は欧米人に比べインスリンの分泌能が低く、食生活の欧米化や運動不足により肥満に伴うインスリン抵抗性が進行し、相対的なインスリンの作用不足に陥りやすい。骨格筋と肝臓はインスリンの主要な作用臓器であり、特に骨格筋はヒトにおいて最大のグルコースの消費臓器である。骨格筋におけるインスリン抵抗性は 2 型糖尿病の原因の１つであり、心筋梗塞や脳卒中などの大血管合併症や、腎症や網膜症などの細小血管合併症の発症要因にもなっている。肥満によるインスリン抵抗性発症メカニズムを明らかにすることは、2 型糖尿病およびその合併症の予防と治療において最大の研究テーマであり、世界的な緊急課題の１つとなっている。

ゼブラフィッシュの膵臓は、外分泌部および内分泌部の両方を有し、形態形成および基本的な細胞構造もヒトの膵臓に類似している（文献 3）。我々の研究グループは 2 型糖尿病モデルゼブラフィッシュの開発に世界で初めて成功し（文献 4）、新規バイオマーカー・治療標的遺伝子候補を発見してきた（平成 25-26 年度科研費若手成果）。一方、米国ヴァンダービルト大学医学部の Wenbiao Chen 教授の研究チームは、骨格筋特異的な IGF-I 受容体機能阻害によるインスリン抵抗ゼブラフィッシュ系統（zMIR）を作製し、耐糖能異常に対する新規治療法探索研究を行なっている。

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、Chen 教授らとの国際共同研究により、研究代表者が発見した耐糖能異常候補遺伝子群は骨格筋インスリン抵抗との関連性、ノックアウトモデルの構築及び耐糖能・肥満表現型解析を目的とする。

３．研究の方法

（１）zMIR を用いた 2 型糖尿病モデルゼブラフィッシュの構築

我々の研究グループが開発した技術（文献４）を用いて、zMIR ゼブラフィッシュに 2 型糖尿病を誘導した。Otohime-B2（日清丸紅飼料）が自動給餌機を用いて給餌した。過剰給餌群は一日 6 回（約 120 mg/fish/day）を投与し、正常群に対して一日 1 回 Otohime-B2 を投与した（約 20 mg/fish/day）。実験期間は 8 週間とし、2 週間 1 回に体長、体重および空腹血糖値の変化を測定するとともに、肝・膵臓及び骨格筋組織を回収した。一方、AB 系統（野生型）は対照群として同様の試験を行った。

（２）耐糖能異常関連候補遺伝子群の発現量解析

（１）で回収した肝・膵臓及び骨格筋組織から Isogen（ニッポンジ-ン）により total RNA を抽出・精製し、次に 200 ng total RNA から cDNA を合成した（東洋紡ライフサイエンス）。得られた cDNA を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）を用いてリアルタイム PCR により耐糖能異常関連候補遺伝子群の経時的発現レベルを解析した。装置は StepOnePlus リアルタイム PCR システム（Applied Biosystems）を使用した。

（３）CRISPR-Cas9 システムによるノックアウト zMIR ゼブラフィッシュの構築

（２）での遺伝子解析結果により、zMIR 糖尿病ゼブラフィッシュでは顕著に変動していた 4 つの遺伝子に対し CRISPR-Cas9 システムによるノックアウト系統を構築した。各目的遺伝子に対して特異的な配列を持つ sgRNA 合成用プライマー3 種類を合成し、MaxiScript T7 kit （ Invitrogen ） で CRISPR-Cas9 sgRNA を合成した。そして、sgRNA（40-50 pg）と Cas9 Protein（250 pg）を 1-2 細胞期の zMIR 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。次に各遺伝子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。インジェクション 24 時間後のゼブラフィッシュ胚を１匹当たり 20μl の lysis buffer (50mM NaOH)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、遺伝子変異を 80%以上導入した sgRNA 配列を決定し、この sgRNA 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 ファウンダーを作製した。

（４）ノックアウトゼブラフィッシュの耐糖能解析

（３）で得られた F0 ファウンダー受精卵を飼育し、2 か月齢時に 4 週間の前述同様の過剰試験を行い、体長・体重および空腹血糖値を測定した。

４．研究成果

（１）zMIR を用いた 2 型糖尿病モデルゼブラフィッシュ

我々の研究グループでは、2017 年に野生型（AB 系統）を用いた 2 型糖尿病モデルゼブラフィッシュの開発に成功した（文献 4、平成 25-29 年度科研費）。このモデルでは正常群（49 ±7 mg/mL）の約 1.8 倍の血糖値（88 ±7 mg/mL）を呈し、脂質異常症や脂肪肝など血管障害（動脈硬化）症状を伴っていた。本研究で使用した zMIR 系統は 3 ヶ月齢の時にすでに高血糖を示しており（82 ±9 mg/dL）、さらに我々の過剰給餌法を組み合わせると、体重の増加とともに（図 1）、空腹時血糖値が正常値の４倍に上昇した（図 2、171 ±39 mg/dL）。

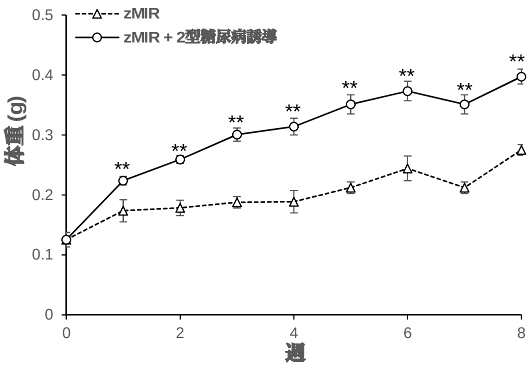

図1. 2型糖尿病を誘導したzMIR系統の体重の増加

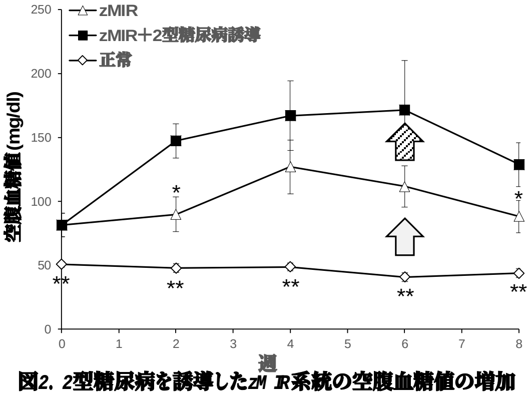

図2. 2型糖尿病を誘導したzMIR系統の空腹血糖値の増加

（２）耐糖能異常関連遺伝子の経時的発現量解析

２型糖尿病を誘導した zMIR 系統の肝膵臓と骨格筋組織を回収し、リアルタイム PCR により耐糖能異常関連候補遺伝子群の発現量を経時的に解析した。その結果、顕著に変動した 4 つの遺伝子を抽出した。図 3 に示すように、遺伝子 A の発現量は、2 型糖尿病を誘導４週目以降増加していた。

骨格筋組織でも同様に、遺伝子 A の発現量は６週目以降、有意（$p < 0.05$）に上昇していた（図 4）。

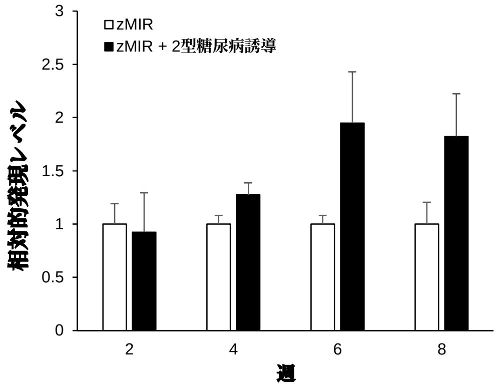

図3. 2型糖尿病zMIR肝膵臓での遺伝子Aの経時的変化

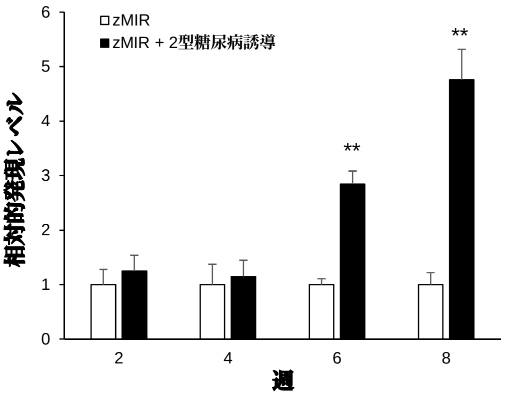

図4. 2型糖尿病zMIR骨格筋での遺伝子Aの経時的変化

（３）CRISPR-Cas9 システムによるノックアウト zMIR ゼブラフィッシュの構築

（２）で抽出した 4 つの遺伝子に対し、各遺伝子の特異的な配列を持つ sgRNA を各 3 種類合成し、ゼブラフィッシュ受精卵にマイクロインジェクトした。次に、ゲノム編集効率を確認するため、ゲノム DNA を抽出し、HMA を行った。結果の例として遺伝子 B のケースを示す。遺伝子 B に対する 3 種類の sgRNA の中、sgRNA1 の方が 6 個中 6 個の胚で変異導入が確認された（図 5，赤線部）。このように全ての標的遺伝子に対して一番の効率の良い sgRNA を決定し、それぞれのノックアウトゼブラフィッシュを作製した。

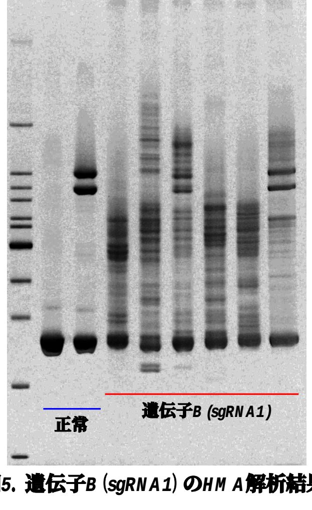

図5. 遺伝子B (sgRNA1) のHMA解析結果

（4）ノックアウトゼブラフィッシュの耐糖能解析

４種類のノックアウトゼブラフィッシュ系統に対し、2 型糖尿病誘導を行い、空腹血糖値の変化を測定した。その結果、遺伝子 A と B のノックアウト系統では、2 型糖尿病誘導時でも高血糖状態が発症しなかった（あるいは軽減された）（図６）。

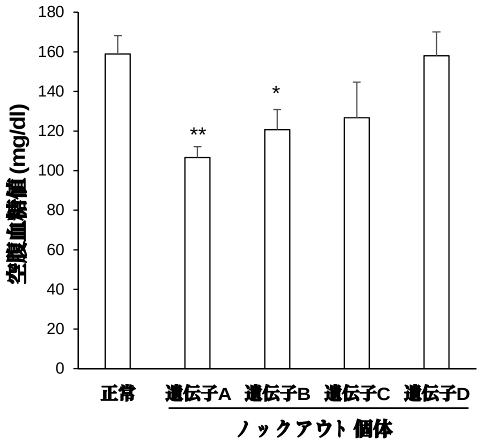

図6. ノックアウトゼブラフィッシュの2型糖尿病誘導に対する空腹血糖値の変化

以上の研究により、耐糖能異常に対する２つの新規治療標的遺伝子を発見した。

現在、2 型糖尿病モデルゼブラフィッシュ・マウスを用いて、これらの遺伝子の１つが膵臓のインスリン分泌に関与することを明らかにしつつある。今後、より詳細な研究を行い、これら２遺伝子の２型糖尿病への発症あるいは予防作用に関する分子メカニズムを明らかにしていく計画である。

＜引用文献＞

① 糖尿病アトラス第 8 版 2017. http://www.diabetesatlas.org/

② Group AC, Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, et al. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. The New England journal of medicine (2008) 358(24):2560-72. doi: 10.1056/NEJMoa0802987. PubMed PMID: 18539916.

③ Tehrani Z, Lin S. Endocrine pancreas development in zebrafish. Cell Cycle (2011) 10(20):3466-72. doi: 10.4161/cc.10.20.17764. PubMed PMID: 22030554.

④ Zang L, Shimada Y, Nishimura N. Development of a Novel Zebrafish Model for Type 2 Diabetes Mellitus. Sci Rep (2017) 7(1):1461.doi:10.1038/s41598-017-01432-w. PubMed PMID: 28469250; PubMed Central PMCID: PMC5431185.

５．主な発表論文等

（研究代表者は下線）

〔雑誌論文〕（計　1　件）

①Liqing Zang, Yasuhito Shimada, Norihiro Nishimura. Development of a Novel Zebrafish Model for Type 2 Diabetes Mellitus. Scientific Reports. 査読有. 2017; 7:1461.
DOI:10.1038/s41598-017-01432-w

〔学会発表〕（計　7　件）

① 島田 康人、岡崎 文美、臧 黎清、中山 寛子、西村 訓弘．２型糖尿病ゼブラフィッシュの腸内細菌叢の比較マイクロバイオーム解析．生命科学系学会合同年次大会（ConBio 2017）．2017 年．

② Yasuhito Shimada, Liqing Zang, Norihiro Nishimura. Development of a Zebrafish Model for Type 2 Diabetes Mellitus. 第 23 回小型魚類研究会. 2017 年.

③ Liqing Zang, Yasuhito Shimada, Norihiro Nishimura. Zebrafish - a powerful tool to assess anti-obesity effects of natural products. The 10th Zebrafish Disease Models Meeting. 2017 年.

④ Liqing Zang, Yasuhito Shimada, Norihiro Nishimura. Development of a Novel Zebrafish Model for Type 2 Diabetes Mellitus. 2017 Midwest Zebrafish Meeting. 2017 年.

⑤ 島田 康人、臧 黎清、西村 有平、西村 訓弘．新規 2 型糖尿病ゼブラフィッシュの創成．第 131 回日本薬理学会近畿部会．2017 年．

⑥ 島田 康人、臧 黎清、岡崎 文美、吉村 円、西村訓弘．2 型糖尿病ゼブラフィッシュの構築およびその腸内細菌叢の網羅的解析．第 81 回日本生化学会中部支部例会．2017 年．

⑦ 桑山 采、島田 康人、臧 黎清、竹中 喬紀、西村 訓弘．紅藻類ダルスによる内臓脂肪・脂肪肝抑制作用メカニズムの解明．第 81 回日本生化学会中部支部例会．2017 年．

〔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：
出願年月日：
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)研究協力者
〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕
　Chen, Wenbiao
　バンダビルド大学・医学部・准教授

〔その他の研究協力者〕
島田　康人（Shimada, Yasuhito）
三重大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：40378427