

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05048

研究課題名(和文)新規2型糖尿病マウスの膵臓 -細胞喪失に関わる責任遺伝子の同定と病態解析

研究課題名(英文)Genetic and pathophysiologic analyses of type 2 diabetes mellitus in newly established mouse model DDD-Ay

研究代表者

須藤 淳一 (Suto, Jun-ichi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主席研究員

研究者番号：60355740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,700,000円

研究成果の概要(和文)：DDD-Ayは、私達が樹立した新規の肥満型2型糖尿病モデルマウスである。DDD-Ayマウスにおける糖尿病の特徴は、膵臓細胞の喪失による血中インスリンの低下をともなうことである。この点において、KK-Ayやob/obなど、他の肥満型2型糖尿病モデルマウスと大きく異なる。また、糖尿病の病態が飼育条件(群飼育 vs. 単独飼育)に強く依存することもDDD-Ayマウスの特徴である。本研究では、糖尿病の原因遺伝子同定を試み、10個の候補遺伝子(変異)を同定した。また、異なった飼育条件下における、体重や様々な血中成分の経時的変化を解析することにより、環境要因が糖尿病病態に及ぼす影響の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ob/obマウスなどと比較して、Ayマウスでは肥満の発症時期が比較的遅く、また重篤度が中庸である。この点において、日本人型の肥満を反映するモデルマウスであるといえる。今回、肥満遺伝子Ayが、その置かれた遺伝背景により、全く違ったタイプの糖尿病を引き起こすことが明らかとなった。特に、病態の重篤度が飼育条件に強く依存するという特徴が明確に認められるため、非遺伝要因の関与が示されている2型糖尿病モデルとして優れている。既に知られているKK-Ayマウスなどと共に利用されれば、より多様な日本人の体質を反映する糖尿病モデルが提供されることになる。研究・開発用の細かな需要に優れた選択枝を与えることができる。

研究成果の概要(英文)：DDD-Ay is a newly established mouse model for obese type 2 diabetes mellitus. Diabetes mellitus in DDD-Ay mice is characterized by decreased circulating insulin level as a consequence of beta-cell loss in the pancreatic islet. In this point, diabetes mellitus in DDD-Ay mice is distinguished from other obese type 2 diabetes model mice, such as KK-Ay or ob/ob mice. Severity of diabetes mellitus in DDD-Ay mice strongly depends on housing conditions (i.e., group housing versus individual housing). In this study, we aimed to identify gene causative of diabetes mellitus in DDD-Ay mice and found ten candidate genes. In addition, we characterized the environmental factors that influence the disease by analyzing changes in body weight and various metabolic phenotypes chronologically.

研究分野：遺伝学

キーワード：2型糖尿病 モデルマウス QTLマッピング 細胞喪失 Ayアレル DDD系統

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病は、遺伝因子と環境因子との複雑な相互作用により発症する多因子疾患である。発症に関わる遺伝的成因を同定し、重篤化に関わる環境要因を見出し、かつ両者の相互作用を解明することが肝要である。疾患の解明・治療のために、今日までに複数の2型糖尿病モデルマウスが開発されてきた。我国で開発されたKK-A<sup>y</sup>マウスを始めとして、多くの2型糖尿病モデルマウスは高インスリン血症を伴う。一方、私達は、DDDマウスに肥満遺伝子A<sup>y</sup>アリルを導入したマウス、DDD-A<sup>y</sup>を樹立した。予想に反して、DDD-A<sup>y</sup>マウスでは、膵臓のβ細胞の喪失に伴う顕著な血中インスリン量の減少による血糖値の上昇が認められた。私達は、DDD-A<sup>y</sup>マウスの血中インスリン量の減少に関与する量的形質遺伝子座(QTL)が第4染色体に同定した。この遺伝子座近傍には、既報の糖尿病感受性遺伝子の存在は知られておらず、本原因遺伝子が新規糖尿病感受性遺伝子、特にβ細胞の喪失に繋がる新規遺伝子である可能性が高い。一方で、2型糖尿病の発症には環境要因が影響することが知られているが、DDD-A<sup>y</sup>マウスの糖尿病は、飼育環境に強く依存することが明らかとなっている。すなわち、DDD-A<sup>y</sup>マウスを単独飼育することにより、糖尿病の発症時期が早期化し、病態も重篤化することが明らかとなっている。すなわち、DDD-A<sup>y</sup>マウスを利用して飼育環境を設定することにより、ストレスや社会的隔離といった環境要因がもたらす内分泌系への影響と糖尿病発症との関連性を明らかにできる。このように、私達が開発した新規非肥満型・インスリン分泌低下型2型糖尿病のモデルマウスであるDDD-A<sup>y</sup>マウスを用いて行う遺伝学的、病態生理学的解析は複雑な2型糖尿病の発症機構の解明において意義深い。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、第4染色体のQTLの原因遺伝子及び遺伝子変異の同定である。また、飼養条件(群飼育 vs. 単独飼育)の病態への影響を、内分泌学的解析により、経時的に解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 血中インスリン量の QTL マッピング

25 週齢の B6 × DDD-A<sup>y</sup> F2 A<sup>y</sup> マウス (n = 229) を用い、第 4 染色体について 12 マーカーを用いた詳細な QTL マッピングを行った。F2 マウスを血漿インスリン値の小さい順にソートし、106 個体について、膵臓病理標本作製し、膵島数及び β 細胞数などを測定し、第 4 染色体についての QTL マッピングを行った。また、血漿インスリン値の小さい 48 個体について、第 4 染色体以外の全ての常染色体及び X 染色体マーカーの遺伝子型を判別した。さらに、正常系統として C3H/HeJ (以下 C3H) を利用し、C3H × DDD-A<sup>y</sup> F2 A<sup>y</sup> マウス (n = 143) を作出し、第 4 染色体 QTL の効果を検討した。

#### (2) QTL コンジェニックマウスの育種と表現型解析

戻し交配産仔を用いた以前の研究結果に基づき、DDD 系統由来の第 4 染色体領域を、10 世代の間、様々な大きさで B6 系統に戻し交配した後、DDD 由来領域をホモ接合にした 4 系統の QTL コンジェニックマウスを既に樹立した。また、これらとは異なる 2 系統を新たに樹立した。以上のコンジェニックマウスについて、25 週齢時に体重・血糖値・血中インスリン量を測定した。

#### (3) 候補遺伝子検索

第 4 染色体 QTL の 95% 信頼領域に存在する全遺伝子のコード領域を対象に、非同義置換の有無を解析した。B6, KK, C3H については、米国ジャクソン研究所のデータベースに基づき、

DDD については、私達が過去に実施した全ゲノムエキソームシーケンス解析結果に基づき、候補遺伝子変異をリストアップした。

#### (4) 飼育環境による影響の解析

DDD マウス及び DDD- $A^y$  マウスを使用して、肥満や糖尿病発症に影響を及ぼすとされる社会的ストレス負荷モデルである群飼育と単独飼育で体重や血中成分の 7~25 週齢までの経時変化を比較し、飼育条件が病態の進行に及ぼす影響について検討した。

### 4. 研究成果

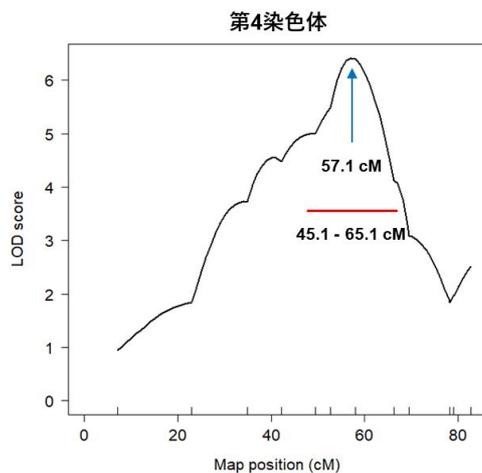


図1. 第4染色体インスリンQTL

(1) B6 × DDD- $A^y$  F2  $A^y$  マウス (n = 229) における、血中インスリン量の QTL マッピングの結果を図 1 に示す。

以前に行った戻し交配産仔を用いた QTL マッピング解析とは結果が相違し、QTL ピークはより近位部 (57.09 cM, 最近傍マーカーは *D4Mit279*, 57.93 cM) に位置した。DDD アリルインスリンを減少させた (図 2 左) F2 マウスのうち、血中インスリン量の低い個体及び血中インスリン量が高いが、QTL 近傍マーカーが DDD アリルのホモ型の個体、計 106 匹を選択し、膵臓の病理組織標本作製し、膵島数を計測し、さらに抗インスリン抗体による免疫染色により、各膵

島ごとの細胞数を計測した。これら表現型についても QTL マッピングは実施したが、有効な結果は得られなかった。表現型間の相関を見ると、血中インスリン量と膵島ごとの細胞数、あるいは総細胞数との間の相関は有意でなく (スピアマンの順位相関係数はそれぞれ -0.1770 及び 0.1444。p 値はそれぞれ 0.070 及び 0.14)。一方、血中インスリン量と膵島数との間の相関は有意であった (スピアマンの順位相関係数: 及び 0.4859; p 値: <0.0001)。したがって、血中インスリン量低下はむしろ膵島数の減少によるものである可能性が示唆された。

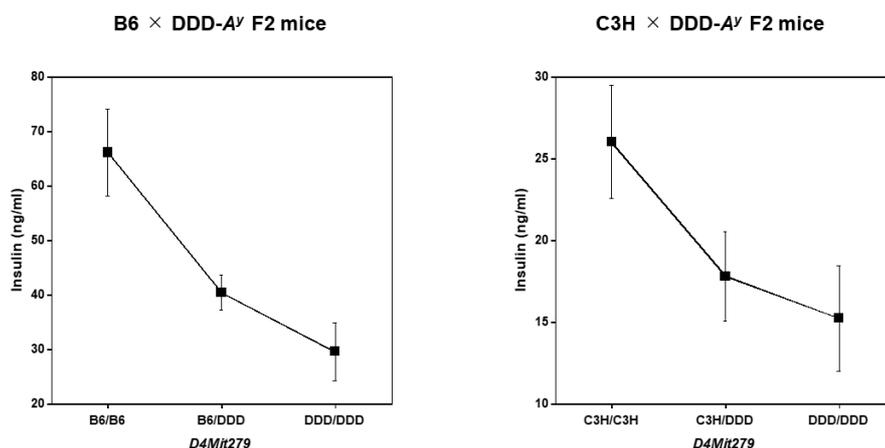


図2. D4Mit279遺伝子型の血中インスリン量に及ぼす効果

次に、正常系統として B6 でなく、C3H 系統を用い、C3H × DDD- $A^y$  F2  $A^y$  マウス (n = 143) を作出し、第 4 染色体 QTL マッピング

を行った。この実験の意義は、C3H の遺伝背景下でも、 $A^y$  アリルは高インスリン血症を引き起こすため、B6 を用いた場合と同様に、DDD アリルの表現型効果が認められれば、原因遺

伝子同定のために比較でき、かつゲノム情報が明らかにされた系統が追加されるためである。DDD-*A<sup>y</sup>* マウスを用いた経時的な糖尿病の発症の解析から、既に 10 週齢時には十分な血中インスリン量の低下が生じていることが明らかとなっているため、14 週齢時に採材した。この系統の組み合わせにおいても *D4Mit279* が多型マーカーとして使用できたため、このマーカーの遺伝子型ごとのインスリン値を比較したところ、DDD アリルが有意にインスリンを減少させた (図 2 右)。

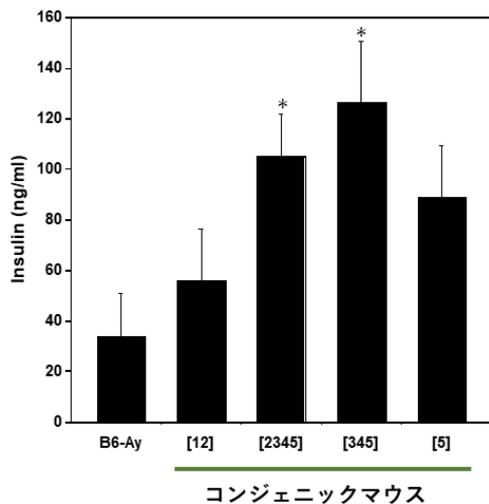


図3. QTLコンジェニックマウスにおける血中インスリン量の比較 (\*は有意差あり)

(2) コンジェニックマウスは、最も近位部 (動原体側) のマーカー *D4Mit12* (57.76 cM) (マーカー[1]) と最も遠位部 (テロメア側) のマーカー *D4Mit42* (82.64 cM) (マーカー[5]) 間で染色体領域が重複するように作出した 4 種類のコンジェニックマウスを解析した。これら 4 系統のうち、より近位部のマーカーを持つように作出された 3 系統は、予備試験において明らかに高血糖を示したため、十分に QTL 効果が確認されたと判断していたが、今回インスリンの解析結果は必ずしも予備試験の結果を裏付けなかった。ダネットの検定によれば、血中インスリン量に関しては、[345] 及び [2345] の系統に有意差 (それぞれ  $p < 0.02$  及び  $p < 0.03$ ) が認められたものの、値はコントロールの B6-*A<sup>y</sup>* マウスよりも高かった (図 3)。

コンジェニックマウスの膵臓の病理組織解析を完了していないので明言はできないが、以上の結果のみでは、QTL 効果が確認できたとは言えない。そこで、*D4Mit279* (*D4Mit12* の代用) 及び *D4Mit279* 及び *D4Mit52* (52.62 cM) の 2 通りのコンジェニックマウスを新たに作出した (未解析)。ただし、どちらの系統も、高血糖ではあるが、DDD-*A<sup>y</sup>* において観察されたような顕著な体重減少などは観察されなかった。これらコンジェニックマウスと正常マウス系統間で F2 マウスを作出し、第 4 染色体マーカーが本当に表現型効果を持つか否かを検討した。現在、*D4Mit279* のみを保有するコンジェニックマウスと B6 マウスの F2 マウスを 100 匹以上作出しており、現在解析中である。考慮しなければならないのは、エピスタシスの有無についてである。B6 × DDD-*A<sup>y</sup>* F2 *A<sup>y</sup>* マウスのうち、血中インスリン量の少ない方から 48 匹を選択し、これら個体について、遺伝子型が有意に偏るマーカーを獲得する目的で全ゲノム解析した。しかしながら、第 4 染色体以外に QTL が存在する可能性を支持する情報は得られなかった。

(3) 第 4 染色体 QTL 候補遺伝子としては、QTL の 95% 信頼領域を全て対象にするのが妥当である。B6、C3H 及び KK 系統の遺伝背景では、*A<sup>y</sup>* (*A<sup>yy</sup>*) アリルは膵島の肥大を伴う高インスリン血症を生じるが、DDD の遺伝背景では、*A<sup>y</sup>* アリルは膵島数・細胞の減少によるインスリン低下を生じる。したがって、候補遺伝子としては、B6、C3H 及び KK 系統で同じであるが、DDD 系統では異なることが第一の要件となる。既知の遺伝子機能と関係なく、この要件を満たす遺伝子を第 4 染色体 QTL の 95% 信頼領域から抽出したものが以下の表 1 のとおりとなる。これらの遺伝子について、変異マウスを作出・解析する予定である。

(4) 飼育条件の病態に及ぼす影響について経時的に解析した。本項目については、雌の DDD-*A<sup>y</sup>* マウスを用いて病態の性差を解析するとともに、一部実験はバックグラウンドである雌雄の

Location	Gene	Cn	B6	C3H	KK	DDD
118621362	Ebna	SN:51	G	G	G	A
119187689	Ermap	SY:35	G	G	G	T
124751363	Inpp5b	TR:148	C	C	C	G
124751377	Inpp5b	DH:153	G	G	G	C
124751437	Inpp5b	AP:173	G	G	G	C
124751452	Inpp5b	SG:178	A	A	A	G
124751575	Inpp5b	HY:219	C	C	C	T
124751609	Inpp5b	LR:230	T	T	T	G
124777344	Inpp5b	VG:259	T	T	T	G
124777410	Inpp5b	PL:281	C	C	C	T
124838420	Mtf1	SP:424	T	T	T	C
124902671	Epha10	LS:537	T	T	T	C
125048776	Gnl2	Lt:467	C	C	C	A
125063523	Gnl2	DV:646	A	A	A	T
125068116	Snip1	SY:76	C	C	C	A
125103000	Meaf6	HY:168	C	C	C	T
125108354	Meaf6	AT:189	G	G	G	A
125126988	Zc3h12a	SG:21	T	T	T	C
126507160	Ag04	TA:631	T	T	T	C
126508451	Ag04	VI:541	C	C	C	T

表1. QTL候補遺伝子 (変異)

り、これは  $A^y$  アリルによる高インスリン効果によるものであり、雌では飼育条件の違いの効果  
があまり強く働かないことが示された。

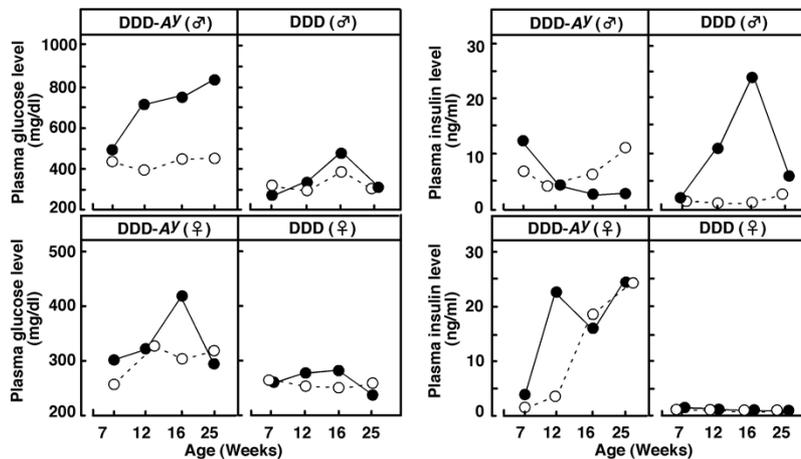


図4. 飼育条件の違いによる血糖値 (左) およびインスリン量 (右) の比較  
群飼育 (○) vs. 単独飼育 (●)

ALT, BUN など) の量、あるいは膵臓における関連遺伝子 (Insulin1, Insulin2, Glucagon) の発現量をリアルタイム PCR 法により比較した。7 週齢における *Ins1* および *Ins2* mRNA 量は単独飼育が群飼育に比較して高く、単飼の 25 週齢では単独飼育の 7 週齢に比べて mRNA 量は 1/5 程度に減少した。群飼育では両 mRNA とともに大きな変動はなかった。これらの結果は血中インスリン濃度の結果と一致しており、25 週齢 DDD- $A^y$  雄マウスの膵臓ではインスリン分泌を行う  $\beta$  細胞が減少しているという既報の結果とも一致していた。

上に述べた幾つかの追加実験及び未完了の実験の終了の後、成果を公表予定である。

DDD マウスについても実施した。データは 7, 12, 16, 25 の各週齢時に採取した。糖尿病表現型に関しては単独飼育の効果が明確に得られた (図 4 左: 血糖値; 右: インスリン量)。また、性差に関して、雌 DDD- $A^y$  マウスは、単独飼育時の血糖値は雄の約半分程度であり、血漿を対象にした値であることを考量すると、さほどの高血糖ではない。また、雌 DDD- $A^y$  マウスでは、単独飼育・群飼育によらず、概してインスリンレベルが高かった。雌 DDD マウスと比較すると明らかなお

飼育条件の違いによる糖尿病表現型の差が具体的には何に依存しているのかを明らかにするために、様々な血中脂質 (コレステロール、中性脂肪) や毒性マーカー (AST,

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小島美咲、須藤淳一
2. 発表標題 2型糖尿病モデルとして新規に樹立したDDD.Cg-Ay マウスの特性解析：飼育条件が病態に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小島 美咲  (Kojima Misaki)  (80355742)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・シニア特別研究員    (82111)	