

令和 元 年 6 月 12 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07094

研究課題名(和文)新規インスリン分泌不全糖尿病モデルマウスの開発と原因遺伝子の同定

研究課題名(英文)Novel murine model of congenital diabetes

研究代表者

佐々木 宣哉(sasaki, nobuya)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：20302614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：新規に発見した糖尿病マウスは、膵島の形態的異常およびリンパ球浸潤は見られず、インスリン陽性細胞数も正常であること、既知の糖尿病やインスリン分泌関連遺伝子に変異が認められず、血中のインスリン濃度が顕著に低い。本所見からインスリン分泌不全に起因する糖尿病を発症すると推測され、insulin hyposecretionよりihsマウスと命名した。連鎖解析により原因遺伝子座を同定したところ、第18番染色体に座位する単一の劣性遺伝子によって糖尿病を発症することが明らかとなった。この遺伝子座には既知の糖尿病関連遺伝子が存在しないことから、新規の遺伝子産物がインスリン分泌を制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病の医療費の総額は年間1兆2千億円を超え、国の医療費を圧迫していることからもわかるように、既存の薬物では血糖値のコントロールや合併症の予防に限界があり、新規の分子標的の発見が求められている。膵細胞でのインスリン分泌はさまざまな細胞内シグナルによって制御されているが、その詳細にはいまだ不明な点が多い。本研究によって、インスリン分泌を制御する遺伝子やそれが関与するシグナル経路が判明すれば、糖尿病の病態進展機構の解明、予防・治療薬の開発、新規バイオマーカーの開発に役立つことが期待される。これらはヒト糖尿病に共通する分子病態の把握や分子診断、治療法開発への応用が考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to develop and characterize a novel, non-obese murine strain with spontaneous diabetes; the insulin hyposecretion (ihs) mouse. The pancreatic islets were examined histologically, and the mRNA expression of pancreatic B-cell specific genes or genes associated with monogenic diabetes was examined by RT-qPCR. The ihs mice showed several distinctive diabetes-related characteristics: (i) the onset of diabetes was observed only in the male mice; (ii) there were no differences in insulin content between the ihs and control mice; (iii) impaired insulin secretion was elicited by glucose, potassium chloride and sulfonylureas; (iv) there was a significant reduction of relative B-cell volume with no signs of inflammation or fibrosis; (v) they showed a normal glycemic response to exogenous insulin; and (vi) the mice were not obese.

研究分野：実験動物学

キーワード：糖尿病 連鎖解析 原因遺伝子 インスリン分泌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は、インスリンの分泌不全および、インスリン作用の不足による慢性的な高血糖を主徴とした代謝疾患である。糖尿病は1型(T1D)と2型(T2D)に大別され、ヒトの糖尿病の大半がT2Dである。T2Dは、人種によりその病態が異なり、一般的に欧米人では肥満型で、末梢組織でのインスリン抵抗性が強い。一方、日本人を含む東アジア人では非肥満型で、インスリン分泌能が低いという特徴を持つ。近年の東アジア諸国におけるT2D患者の増加は劇的であり、現在大きな問題となっている。T2Dは、複数の遺伝的、環境的要因が組み合わさり発症する多因子疾患であり、その病態は多彩で、極めて長い経過を経て発症・進展し病態が変遷していく。このため、糖尿病研究においては、交配や飼育環境を人為的に操作でき、これらの効果を経時的に調べることができるモデル動物が非常に有用となる。しかし、現在報告されている糖尿病モデルの多くは欧米人型の肥満・インスリン抵抗性モデルであり、日本人を含む東アジア人で一般的な非肥満・インスリン分泌不全型のモデルは非常に少ない。

2. 研究の目的

本研究では、慢性腎症のモデルであるICGNマウスから新たに、非肥満型の新規糖尿病モデル(insulin hyposecretion; *ih*s)マウスを樹立した。本研究では、このマウスの糖尿病病態を解析し、原因遺伝子を明らかにするために遺伝学的解析を行った。

3. 研究の方法および4. 成果

(1) *ih*s マウスにおける糖尿病病態解析

随時血糖値 250mg/dl 以上を糖尿病と定義し、まず *ih*s マウスの糖尿病発症率を調べた。*ih*s 雄マウスは、27 週齢で 50%、42 週齢までに約 90% の個体が糖尿病を発症した。一方、雌マウスでは観察期間である 51 週齢までに糖尿病を発症した個体は存在しなかった。このことから、本マウスの糖尿病発症には雌雄差が存在することが明らかとなった。さらに、経口糖負荷試験の結果、*ih*s マウスは雌雄ともにグルコース応答性インスリン分泌(GSIS)の顕著な低下を認め、これに伴った耐糖能異常を示した。一方で、インスリン感受性は雌雄ともに正常であり、膵臓におけるインスリン含有量においてもコントロールマウスと比較して差は認められなかった。膵島の形態学的解析では、 α/β 細胞比の増加および、 β 細胞面積の低下を認めたものの、炎症性細胞の浸潤および膵島の線維化等の著しい形態異常は見られなかった。以上の結果から、*ih*s マウスの糖尿病はインスリン分泌不全に起因することが明らかとなった。

(2) *ih*s マウスにおけるインスリン分泌不全病態の解析

膵 β 細胞に取り込まれたグルコースは代謝され、細胞内の ATP 濃度が上昇し、これを感知した ATP 感受性カリウムチャネルが閉鎖することで細胞膜の脱分極を生じる。これにより電位依存性カルシウムチャネル(VDCC)が開閉し、細胞内へのカルシウム流入が引き金となりインスリン分泌が生じる。*ih*s マウスは、GSIS 異常を示すことから、この経路のどこかに障害を持つと考えられる。*ih*s マウスのインスリン分泌不全病態を詳細に解析するため、膵灌流実験および単離膵島を用いたインスリン分泌実験を行い、障害部位の特定を行った。膵灌流実験において、*ih*s マウスは、高グルコース刺激に対してインスリン分泌を示さず、さらに、 β 細胞に強制的な脱分極を誘起する塩化カリウム刺激に対してもインスリン分泌を生じないことを見出した。さらに、*ih*s マウスの単離膵島はインスリン分泌を促進する SU 剤刺激に対してもインスリン分泌の増加が認められなかった。これらの結果から、*ih*s マウスは、インスリン分泌における VDCC 以降の経路に障害を持つことが示唆された。さらに、VDCC 非依存的に細胞内へカルシウムを導入するイオノフォアで膵島を刺激するとインスリン分泌を生じることを見出した。この結果は、*ih*s マウスにおいて、インスリン顆粒の細胞膜への輸送・結合・融合によるインスリン放出経路が正常であることを示している。以上の結果から、*ih*s マウスは、VDCC を介したカルシウム流入等のカルシウムシグナルにおける極めて初期の経路に障害を持つことが示唆された。

(3) *ih*s マウスにおけるインスリン分泌不全原因遺伝子の探索

*ih*s マウスのインスリン分泌不全原因遺伝子を同定するため、C57BL/6 (以下、B6) マウスとの戻し交雑群を作製し、糖負荷 60 分後における血糖値を指標として連鎖解析を行った。その結果、18 番染色体上の *D18Mit132-D18Mit186* (50.8 Mb) の間で強い連鎖が認められた。次に、*ih*s マウスの 18 番染色体上の 5.9 Mb の領域を B6 マウスへ導入したコンジェニックマウス { B6.*ih*s-(*D18Mit233-D18Mit12*)、以下 B6-*ih*s マウス } を作製し、インスリン分泌能を調べた。その結果、B6-*ih*s マウスでは、グルコース刺激に対して著しいインスリン分泌不全を呈した。以上の結果から、本原因遺伝子が 18 番染色体上に存在することが明らかとなった。さらに、SSLP および SNP マーカーの数を増やし、原因遺伝子座の周辺をより詳細にマッピングすることで、候補領域を *D18Mit70 - D18Mit12* (1.3 Mb) まで絞り込むことに成功した。この領域には 38 個の遺伝子が存在するが、インスリン分泌やカルシウムシグナルとの直接的な関与が報告されている遺伝子は存在しない。したがって、*ih*s マウスのインスリン分泌不全は、新規の遺伝子変異によって生じることが示唆された。

(4) 糖尿病発症における性ホルモンの影響

ihs マウスは雌雄ともにインスリン分泌不全に起因する耐糖能異常を有するものの、糖尿病発症には明らかな性差が存在する。糖尿病発症における性ホルモンの影響を明らかにするために、*ihs* マウスに卵巣除去(OVX)、精巣除去(ORX)手術を施し糖尿病発症率を検討した。コントロールには偽手術(sham ope)を行った雌雄の *ihs* マウスを使用した。雌マウスでは、OVX 群、sham ope 群ともに全観察期間を通して、糖尿病を発症した個体は存在しなかった。一方、雄マウスにおいては、sham ope 群では 15 週齢までにすべての個体が糖尿病を発症したのに対し、ORX 群では観察期間である 40 週齢までに糖尿病を発症した個体は存在しなかった。また、この時、ORX 群では sham ope 群と比較し、耐糖能が有意に改善することを見出した。一方、インスリン感受性には両群間で差は見られなかった。以上の結果から、*ihs* マウスの糖尿病発症には精巣から分泌されるアンドロゲンが深く関与し、アンドロゲンは *ihs* マウスのインスリン分泌不全病態を増悪させることで糖尿病の発症を引き起こすことが示唆された。

以上の成果から、*ihs* マウスが、1)東アジア人と類似した非肥満・インスリン分泌不全型のモデルであること、2)カルシウムシグナルの初期経路に障害を持つこと、3) その原因が新規の遺伝子変異である可能性が高いことを明らかにした。*ihs* マウスの解析から、カルシウムシグナルを介した新たなインスリン分泌制御機構が解明され、糖尿病の予防・治療における新たな創薬標的が同定されることが期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Novel murine model of congenital diabetes: The insulin hyposecretion mouse.
Nakano K, Yanobu-Takanashi R, Takahashi Y, Sasaki H, Shimizu Y, Okamura T, Sasaki N.
J Diabetes Investig. 2019, 10(2):227-237. doi: 10.1111/jdi.12895. [査読あり]

〔学会発表〕(計 5 件)

1. *ihs* マウスのインスリン分泌不全原因遺伝子座の同定
中野堅太, 清水有紀子, 佐々木隼人, 安田千穂, 高橋悠記, 岡村匡史, 佐々木宣哉
第 66 回日本実験動物学会 2019 年 5 月 16 日
2. 新規インスリン分泌不全型糖尿病モデル(*ihs*)マウスにおける 疾患遺伝子のコンジェニック解析
中野堅太, 清水有紀子, 高梨理絵子, 佐々木隼人, 佐々木宣哉, 岡村匡史
第 33 回日本糖尿病・肥満動物学会 2019 年 3 月 15 日
3. *ihs* マウスの糖尿病発症における性ホルモンの影響
中野堅太, 高梨理絵子, 高橋悠記, 安田千穂, 佐々木隼人, 清水有紀子, 岡村匡史, 佐々木宣哉
第 161 回 日本獣医学会学術集会 2018 年 9 月 12 日
4. インスリン分泌型新規自然発症糖尿病モデルの表現型解析
中野堅太, 高梨理絵子, 佐々木隼人, 高橋悠記, 清水有紀子, 岡村匡史, 佐々木宣哉
第 65 回 日本実験動物学会 2018 年 5 月 27 日
5. 新規インスリン分泌不全型糖尿病モデルマウスの表現型解析
中野堅太, 清水有紀子, 高梨理絵子, 佐々木隼人, 岡村匡史, 佐々木宣哉
第 160 回 日本獣医学会学術集会 2017 年 9 月 14 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：新規インスリン分泌不全マウス
発明者：佐々木宣哉, 佐々木隼人
権利者：北里大学
種類：特許
番号：JP2018088848
出願年：2018
国内外の別：日本

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：岡村 匡史
ローマ字氏名： Tadashi Okamura

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。