

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14975

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を用いたマウスのストレプトゾトシン感受性遺伝子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and analysis of the susceptibility gene for streptozotocin-induced diabetes in mice using the genome editing technology

研究代表者

宮坂 勇輝 (Miyasaka, Yuki)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30778098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスA/J系統のストレプトゾトシン(STZ)感受性候補変異として見出したMpg遺伝子のp.Ala132Ser変異とマウスNSY/Hos(NSY)系統のSTZ感受性候補変異として見出したRad50遺伝子のp.Gly200Val変異のSTZ感受性への関与を検証する為、本研究ではそれぞれの変異をゲノム編集技術により正常型に置換したマウスを作製し、そのSTZ感受性を調査した。その結果、Mpg遺伝子のp.Ala132Ser変異はSTZ感受性へ関与していないことが確認された。一方、Rad50遺伝子のp.Gly200Val変異はNSY系統のSTZ感受性を規定する変異の一つであることが実証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス系統間にはSTZ感受性に差異が存在する事が知られているが、その原因遺伝子を同定した例は無い。本研究では、効果の小さい変異ではあるもののSTZ感受性を規定する遺伝子変異を特定することに成功した。STZ感受性遺伝子は膵島の脆弱性に関与していることが推定される為、本研究で特定した変異は膵島脆弱性に起因する糖尿病発症機構の解明に繋がるヒントになると期待される。

研究成果の概要(英文)：A missense mutation (p.Ala132Ser) in N-methylpurine-DNA glycosylase (Mpg) is a candidate mutation for streptozotocin (STZ) susceptibility in A/J mice. Alternatively, a missense mutation (p.Gly200Val) in DNA repair protein RAD50 (Rad50) is a candidate mutation for STZ susceptibility in NSY/Hos (NSY) mice. To confirm the effects of these mutations on STZ susceptibility, we developed a knock-in mice strain in which each mutation was replaced with a normal allele via CRISPR/Cas9-mediated genome editing technology. We analyzed STZ susceptibility in the knock-in mice and revealed that a p.Ala132Ser mutation in Mpg was not associated with STZ susceptibility in A/J mice. Conversely, a p.Gly200Val mutation in Rad50 was confirmed as a mutation that regulates STZ susceptibility in NSY mice.

研究分野：実験動物学

キーワード：マウス ストレプトゾトシン 糖尿病感受性遺伝子 膵島脆弱性 ゲノム編集技術

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ストレプトゾトシン (STZ) は膵島を特異的に破壊し、確実に糖尿病を誘発する薬剤としてマウス・ラットの実験的糖尿病モデルの作製に汎用されている。古くからマウス系統間には STZ 感受性に系統間差異が存在し、それが複数の遺伝因子に制御されていることが知られているが、原因遺伝子は同定されていない。STZ 感受性は膵島脆弱性に関与していると推定されることから、STZ 感受性を規定する遺伝的要因を特定することは、糖尿病発症機構の解明に貢献できると考えられる。研究代表者が所属する研究室では、複雑な多因子遺伝形質の効果的な遺伝解析系の樹立を目的として、マウス SM/J 系統と A/J 系統を起源とした SMXA・RI 系統群と A/J-NSM コンソミック系統群からなる体系的遺伝解析系を樹立しており (*Exp. Anim.*, 52:415-448, 2003., *Mamm. Genome*, 23:764-769, 2012.)、この体系的遺伝解析系を STZ 感受性の解析に応用することで、マウス第 11 番染色体上の 27.7~36.4 Mb の約 9 Mb に A/J 系統の STZ 感受性遺伝子座を同定した。更に、SM/J 系統と A/J 系統のエキソーム解析によるゲノム比較解析により A/J 系統の STZ 感受性を規定しうる有力な遺伝子変異として N-methylpurine-DNA glycosylase (*Mpg*) 遺伝子内のミスセンス変異 (c.394_395GC>AG, p.Ala132Ser) を見出した。 *Mpg* 遺伝子は DNA ダメージの修復機能を担っており、そのノックアウトマウスでは STZ 感受性が低下することが報告されている (*Mol. Cell. Biol.*, 5605-5613, 2001.)。うえ、研究代表者らが見出した p.Ala132Ser 変異は MPG の酵素活性に重要とされる領域内に存在することから (*Biochemistry*, 37:580-589, 1998.)、この変異は極めて有力な候補変異であると考えられた。

一方、研究代表者が所属する研究室では、上記の体系的遺伝解析系とは別に、STZ 感受性に明確な違いが認められるマウス NSY/Hos 系統と C3H/HeN 系統を起源とした体系的遺伝解析系を用いた STZ 感受性遺伝子の解析も実施しており、この解析では、第 11 番染色体上の 45.3~60.5 Mb に NSY/Hos 系統の STZ 感受性遺伝子座を同定した。更に、エキソーム解析による両系統間のゲノム比較解析により、当該領域内に DNA repair protein RAD50 (*Rad50*) のミスセンス変異 (c.599G>T, p.Gly200Val) を見出した。 *Rad50* 遺伝子は *Mpg* と同様に DNA の損傷修復機能を持つ (*EMBO J.*, 33:2422-2435, 2014) ことに加え、研究代表者らが見出した p.Gly200Val 変異はマウス系統の中でも糖尿病自然発症モデル (NSY/Hos 系統と NOD/Shi 系統) のみが保有する変異であることから、この変異は NSY の STZ 感受性を規定する有力な候補変異であると考えられた。

そこで我々は上記 2 つの変異の STZ 感受性への関与を実証し、その遺伝子の機能解析ができれば膵島脆弱性に起因する糖尿病発症機構の解明につながる知見が得られると期待した。

2. 研究の目的

本研究は *Mpg* および *Rad50* 遺伝子に検出されたミスセンス変異を CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術により正常型に置換したノックインマウスを作製・解析することで STZ 感受性を規定する原因遺伝子 (変異) を特定し、その遺伝子の機能解析を行うことで膵島脆弱性機構の一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス

本研究で使用したマウスは名古屋大学大学院医学系研究科実験動物部門の SPF 飼育室 (温度: 23、湿度: 55%、照明 12L12D) で飼育した。A/J 系統は日本 SLC 社から購入し、SM/J 系統、C3H/HeN 系統、A.SM-Chr11 コンジェニック系統群および C3.NSY-Chr11 コンジェニック系統は我々が維持している系統を使用した。 *Mpg* ノックインマウス (*Mpg*・KI)、 *Mpg* ノックアウトマウス (*Mpg*・KO) および *Rad50* ノックインマウス (*Rad50*・KI) は我々が新たに作製し使用した。本研究は名古屋大学医学系研究科動物実験委員会の承認下で実施した。

(2) CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術によるノックインマウスの作製

Mpg・KI マウスは、 *Mpg* に検出されたミスセンス変異 (c.394_395GC>AG, p.Ala132Ser) 近傍に設計した gRNA と Cas9 タンパク質および野生型 (SM/J 系統) 由来の塩基を含む一本鎖 DNA をエレクトロポレーション法により A/J の受精卵 (1 細胞期) に導入することで作製した。得られたマウスの *Mpg* の遺伝子型とオフターゲット候補配列はサンガーシークエンス法により確認した。なお、gRNA のターゲット配列とオフターゲット候補配列は CRISPOR オンラインツール (<http://crispor.tefor.net/crispor.py>) により検索した。また、本研究では *Mpg*・KI マウスの作製過程で得られた *Mpg*・KO マウスも解析に使用した。

Rad50・KI マウスは、 *Rad50* に検出されたミスセンス変異 (c.599G>T, p.Gly200Val) 近傍に設計した gRNA と Cas9 タンパク質および野生型 (C3H/HeN 系統) 由来の塩基を含む一本鎖 DNA をマイクロインジェクション法により STZ 感受性である C3H.NSY-Chr11R2B1 (*D11Nds3-D11Mit261*) コンジェニック系統の受精卵 (1 細胞期) に導入することで作製した。得られたマウスのオン・オフターゲットは上記同様、サンガーシークエンス法により確認した。

(3) STZ 感受性解析

Mpg・KI および KO マウスの STZ 感受性は 8 週齢雄個体に STZ を多量単回 (200 mg/kg B.W. × 1) 投与後、血糖値および糖尿病発症率を 1 日間隔で 14 日間観察し、A/J および SM/J 系

統と比較することで調査した。血糖値はイソフルラン吸入麻酔下で尾端より血液を採取し、血糖測定器（グルテストアイ）を用いて測定した。なお、血糖値が 250 mg/dL 以上の個体を糖尿病発症個体とした。

Rad50・KI マウスの STZ 感受性は 8 週齢雄個体に STZ を多量 (225 mg/kg B.W. × 1) 単回投与および少量連続 (60 mg/kg B.W. × 5) 投与し、投与後の血糖値と糖尿病発症率を C3H.NSY-Chr11R2B1 および C3H/HeN 系統と比較することで解析した。多量単回投与後の血糖値は 1 日間隔で 14 日間観察し、少量連続投与後の血糖値は 5 日間隔で 25 日間観察した。なお、血糖値の測定および糖尿病発症個体の算出は (3) と同様の方法で実施した。

(4) *Mpg* 遺伝子の発現比較解析

トータル RNA は A/J 系統、SM/J 系統および A.SM-Chr11 コンジェニック系統群 (11B, 11C, 11K) の 8 週齢雄個体の腎臓および肝臓から抽出した。発現解析は得られた RNA を用いて cDNA を合成後、定量的 RT-PCR により実施した。

4. 研究成果

(1) *Mpg* 遺伝子の STZ 感受性効果の検証

Mpg 遺伝子の p.Ala132Ser 変異の STZ 感受性への関与を検証する為、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集を行った。その結果、*Mpg* 遺伝子の p.132Ser (変異型) のみが野生型由来の p.132Ala に置換された *Mpg*・KI マウスの作製に成功した。次に、このマウスを系統化し、STZ 多量単回投与後の血糖値を A/J 系統と比較したが、両系統間の血糖値に有意な差は認められず、糖尿病発症率にも有意差は検出されなかった (図 1)。以上の結果から、*Mpg* 遺伝子の p.Ala132Ser 変異は A/J 系統の STZ 感受性を規定する変異でないことが判明した。

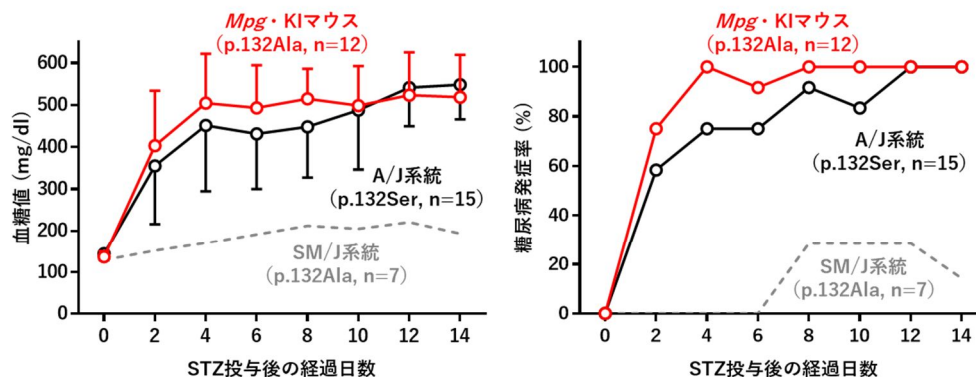


図1. A/J系統, SM/J系統および*Mpg*・KIマウスの8週齢雄個体における STZ多量単回 (200 mg/kg B.W. × 1) 投与後の血糖値と糖尿病発症率の変化

(1) の結果から p.Ala132Ser 変異は完全に否定的であったが、*Mpg* の遺伝子機能やノックアウトマウスの表現型情報から *Mpg* 遺伝子は依然として有力な候補遺伝子であると考えられた。そこで、我々は *Mpg* 遺伝子に存在する別の変異を再検討した結果、A/J 系統は *Mpg* 遺伝子の発現調節推定領域に SNP (g.32226679G>C) を保有していた。そこで、この SNP の原因遺伝子変異としての可能性を検討する為、A/J と SM/J 系統およびそれらを起源とするコンジェニックマウス 3 系統の *Mpg* 遺伝子の発現量を調査したところ、その SNP を保有する A/J 系統とコンジェニック系統では *Mpg* 遺伝子の発現量が有意に高く、STZ に対しても感受性を示すことが明らかとなった (図 2)。

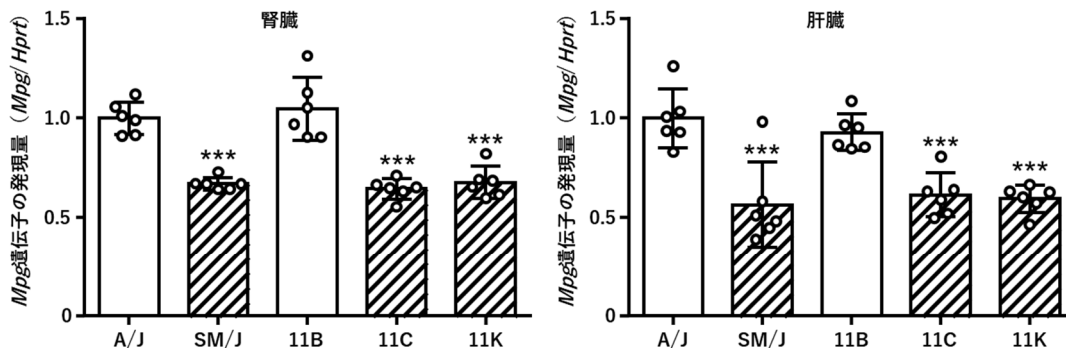


図2. A/J系統, SM/J系統およびA.SM-Chr.11コンジェニックマウス3系統間の*Mpg*遺伝子の発現比較 (***) $P < 0.001$ vs. A/J系統)

□ g.32226679C保有系統 (STZ感受性系統) ▨ g.32226679G保有系統 (STZ抵抗性系統)

次に、*Mpg* 遺伝子の発現量の変化が STZ 感受性に影響するのを検証する為、*Mpg*・KI マウスの作製過程で得られた *Mpg*・KO マウスのヘテロ個体（発現量半減個体）の STZ 感受性解析を実施した。その結果、*Mpg*・KO ヘテロマウスの STZ 多量単回投与後の血糖値は A/J 系統と比較して有意に抑制されており、糖尿病発症率も大きく減少した（図 3）。

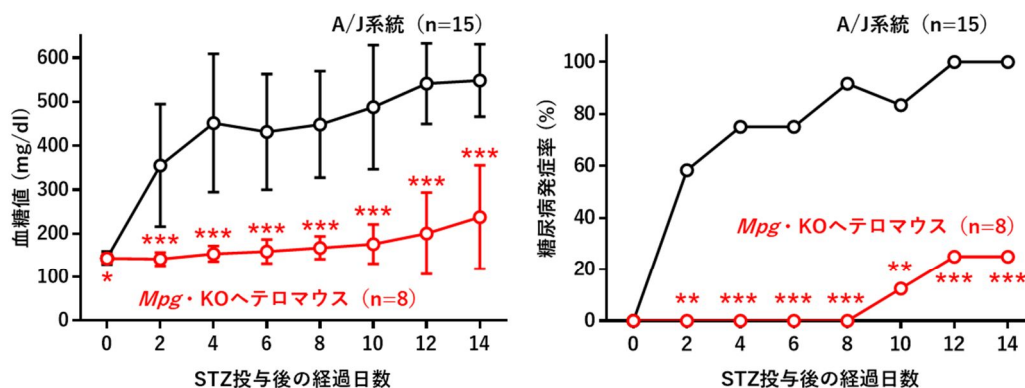


図3. A/J系統および*Mpg*・KOヘテロマウスのSTZ多量単回（200 mg/kg B.W.×1）投与後の血糖値と糖尿病発症率の変化

(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. A/J系統)

以上の結果より、A/J 系統の STZ 感受性は *Mpg* 遺伝子の発現調節領域に存在する SNP に起因する発現量の増加が原因である可能性が示唆された。現在、この SNP を野生型（SM/J 型）に置換したノックインマウスをゲノム編集技術により作製しており、このマウスの STZ 感受性が A/J 系統よりも抑えられれば、この SNP が A/J 系統の STZ 感受性変異であると証明できると考えている。

(2) *Rad50* 遺伝子の STZ 感受性効果の検証

CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術により、STZ 感受性である C3H.NSY-Chr11R2B1 系統の *Rad50* 遺伝子の p.200Val（変異型）のみを野生型由来の p.200Gly に置換した *Rad50*・KI マウスの作製に成功した。このマウスを系統化し、STZ 感受性解析を実施した。STZ 多量単回投与後の血糖値と糖尿病発症率は C3H.NSY-Chr11R2B1 系統と比較して抑制される傾向が認められたが、両系統間に有意な差は認められなかった。一方、STZ 少量連続投与後の *Rad50*・KI マウスの血糖値と糖尿病発症率は、C3H.NSY-Chr11R2B1 系統と比較して有意に抑制されており、C3H/HeN 系統と類似した表現型を示した（図 4）。したがって、*Rad50* 遺伝子の p.Gly200Val 変異は NSY 系統の STZ 感受性を規定する遺伝子変異の一つであり、特に少量連続投与に対する STZ 感受性に効果を持つことが示唆された。

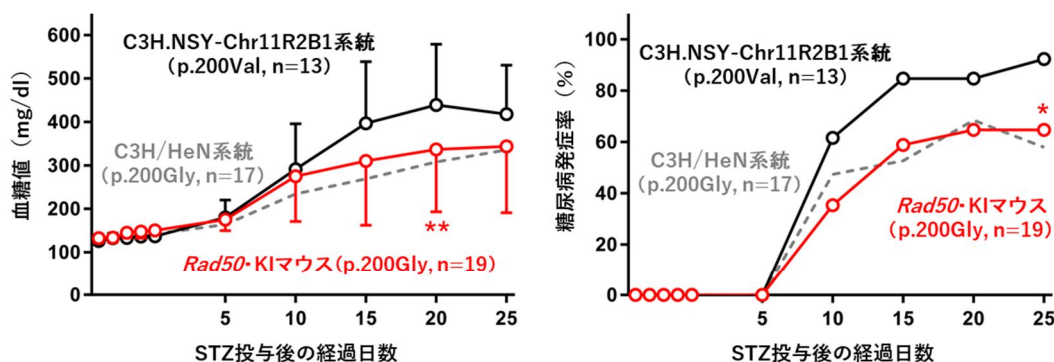


図4. C3H/HeN系統, C3H.NSY-Chr11R2B1系統および*Rad50*・KIマウスのSTZ少量連続（60 mg/kg B.W.×5）投与後の血糖値と糖尿病発症率の変化

(*P<0.05, **P<0.01 vs. C3H.NSY-Chr11R2B1系統)

本研究では STZ 感受性変異を特定後、その遺伝子（変異）の機能解析を実施することを目的として実験を進めてきたが、研究期間内に *Rad50* 遺伝子の機能解析を実施する事はできなかった。*Rad50*・KI マウスは多量単回投与より免疫学的関与が大きいとされる少量連続投与において STZ 抵抗性を示した。*Rad50* 遺伝子は dsDNA-*Rad50*-CARD9 複合体を形成し、炎症性サイトカインを誘導することが報告されている（*Nat Immunol.*, 15:534-536, 2014.）。また、DNA 修復酵素は膵島の炎症性因子の発現を上昇させるとの報告もある（*Diabetes*, 67:2305-2318, 2018.）。したがって、本研究で特定した *Rad50* 遺伝子の p.Gly200Val 変異は膵島において炎症性因子（IL-1 など）の活性化や産生に影響を与え、膵島の破壊を促進する可能性が推定された。

(3) 総括

本研究では膵細胞の脆弱性に関与する遺伝的要因の特定を目指し、STZ感受性遺伝子に注目して解析を実施した。膵細胞の脆弱性は1型と2型糖尿病共通の発症要因の一つと推定されており、その原因遺伝子としてDNA修復酵素XRRC4が報告されている(*Nat. Genet.*, 48:519-27, 2016.)。本研究期間中に原因遺伝子として実証することはできなかったが、本研究の成果からDNA修復酵素MPGの変異がSTZ感受性を規定する有力な候補変異であると考えられた。更に、本研究によってDNA修復酵素RAD50のミスセンス変異(p.Gly200Val)は、効果は弱いもののSTZ感受性に関与することが実証された。以上のことから、膵細胞の脆弱性にはDNA修復酵素が密接に関連している可能性が推定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maegawa Tomoki, Miyasaka Yuki, Kobayashi Misato, Babaya Naru, Ikegami Hiroshi, Horio Fumihiko, Takahashi Masahide, Ohno Tamio	4. 巻 29
2. 論文標題 Congenic mapping and candidate gene analysis for streptozotocin-induced diabetes susceptibility locus on mouse chromosome 11	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mammalian Genome	6. 最初と最後の頁 273-280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00335-018-9742-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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 宮坂勇輝、前川智樹、名倉巧真、小林美里、馬場谷成、池上博司、堀尾文彦、大野民生
2. 発表標題 マウスNSY系統のストレプトゾトシン誘発糖尿病感受性遺伝子の解析 - Rad50遺伝子のミスセンス変異 (p.G200V) について -
3. 学会等名 第34回日本糖尿病・肥満動物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学大学院医学系研究科実験動物科学講座ホームページ https://www.med.nagoya-u.ac.jp/sisetu/experimentalanimalscience.htm

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
研究協力者	大野 民生 (Ohno Tamio) (90293620)	名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	堀尾 文彦 (Horio Fumihiko) (20165591)	名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授 (13901)	
研究協力者	小林 美里 (Kobayashi Misato) (20456586)	名古屋大学・大学院生命農学研究科・講師 (13901)	