

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500394

研究課題名（和文） β 細胞障害を呈する新規変異マウスを用いた糖尿病発症機序の解明

研究課題名（英文） Investigation of pathogenic mechanism of diabetes using novel mutant mice presenting with beta-cell dysfunction

研究代表者

井上 麻紀 (INOUE MAKI)

独立行政法人理化学研究所・疾患モデル評価研究開発チーム・開発研究員

研究者番号：90321728

研究成果の概要（和文）：

理研 ENU mutagenesis プロジェクトにより、 β 細胞障害による重篤な糖尿病の表現型を示す変異マウス系統が作出された。原因は新規翻訳タンパクの小胞体輸送に重要な役割を果たす *Srpr* (Signal recognition particle receptor) 遺伝子の N425K のミスセンス変異であった。変異型 *Srpr* を発現させた rat insulinoma 由来 INS-1 細胞は、細胞増殖と細胞の生存性とインスリン分泌能が低下した。本研究により、小胞体輸送の異常によるインスリン産生障害と β 細胞の障害が糖尿病を誘発するという、新しい発症メカニズムが示された。

研究成果の概要（英文）：

N-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) is an effective chemical mutagen that mainly introduces single base pair changes. In RKEN ENU mutagenesis project, we have established a severely diabetic mutant line presenting with severe beta-cell dysfunction. Through mapping analyses and sequencing of all exons in the fine-mapped region, we identified single missense mutation (N425K) in *Srpr* gene. *Srpr* is a key regulator of nascent chain transportation in endoplasmic reticulum (ER). Our results firstly show that dysfunction of ER export can lead to destruction of insulin-producing beta cells and pathogenesis of diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：糖尿病、モデルマウス、突然変異、 β 細胞、原因遺伝子、遺伝的背景、インスリン分泌、ENU

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は今日世界的に深刻な問題となっている生活習慣病のひとつである。発症メカニズムの解明、治療薬・治療法の開発は精力的に行われており、発症ならびに増悪に関与する遺伝子群は多数示唆されている。本研究は新規糖尿病原因遺伝子に変異を有する糖尿病モデルマウスの表現型ならびにその変異遺伝子の生理的機能を詳細に解析することにより、遺伝子の異常から糖尿病の発症に至る、新たなメカニズムを解明することを目的としたものである。

モデルマウスは糖尿病をはじめ各種疾患の病因、病態の研究や治療法の開発において、強力かつ必要不可欠な研究ツールである。応募者は化学変異原エチルニトロソウレア (ENU) により誘発された点突然変異を持つ糖尿病モデルマウスを作出し、表現型解析を進めるとともに、その原因となる変異遺伝子の探索を試みてきた。現在までにこのENU誘発変異マウスの中から、ヒト若年発症成人型糖尿病 (MODY2) の原因遺伝子であるグルコキナーゼ遺伝子 (*Gck*) の変異マウス、12系統を樹立した。*Gck* 遺伝子変異以外では、若齢より肥満とインスリン抵抗性を呈するヒト単一遺伝子性肥満症原因遺伝子 *Sim1* (Single-minded homoog1) 変異マウス1系統、また、高インスリン血症と高血糖を発症する *Insr* (インスリンレセプター) 変異マウス全3系統について、遺伝子変異を同定した。これら変異マウス系統はすべて理研バイオリソースセンターから分与されており (<http://www.brc.riken.jp/>より受付)、糖尿病モデルマウスとして各種研究への応用が可能である。

このように、様々なタイプの糖尿病モデルマウスの表現型解析と原因遺伝子の変異同定に関する研究過程において、本応募課題の研究対象である変異系統Mが検出された。このM系統は離乳前後から重篤な高血糖を発症し、多くは20週齢までに死亡する。この特徴的な新規変異モデルマウスを用いて新たな糖尿病発症メカニズムを解明しようとする試みが当研究課題の目的である。

2. 研究の目的

変異系統Mに関して、変異遺伝子の全ゲノムマッピングとファインマッピングを進め、約1Mbまで狭めたマップ領域内の全19遺伝子のエクソンをシーケンシングすることにより、点突然変異が1箇所同定されたが、その変異は現在までに糖尿病の原因遺伝子として報告のない遺伝子上に位置していた。このM系統の高血糖発症個体では、糖負荷時のインスリン分泌能が著しく低下しており、膵ランゲルハンス氏島においてインスリン陽性面積が減少していることが確認されたことから、インスリンを分泌する膵β細胞障

害がおこっていることが強く示唆された。本研究課題においては、この変異M系統の表現型を詳細に解析することにより、膵β細胞障害がインスリンの合成から分泌にいたる段階で何らかの障害が起こっているのか、またβ細胞が死滅する経路はどのようなものなのかを明らかにし、膵ラ氏島における、合成・分泌、さらに細胞死に関与する各種細胞内シグナル因子群の動態について明らかにすることを目的とした。一方、変異遺伝子側からのアプローチとして、この同定された遺伝子変異が実際にβ細胞の機能障害、あるいは、β細胞死などを誘発するかどうかを確認する必要がある。そのためにはβ細胞由来培養細胞において、この遺伝子の発現抑制や野生型ならびに変異型の強制発現などの系により、細胞の機能や増殖ならびに生存性に関する影響を調べたいと考えた。

さらに最終的には同定された変異遺伝子をβ細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成し、表現型の詳細な解析と変異M系統との比較検討を実施し、当該遺伝子が糖尿病発症の新たな原因遺伝子であることの最終的な確定をしたいと考えた。

3. 研究の方法

(1) ENU mutagenesis による、変異マウスの作出と高血糖個体のスクリーニング
雄 C57Bl/6J 系統マウスに ENU を腹腔内投与し、精子に点突然変異を誘発する。ENU を投与したマウス (G0) と野生型 DBA/2J マウスの産仔である、G1 世代をスクリーニングし、高血糖 (自由摂餌下で血糖値 200mg/mL) を呈したマウスのうち、野生型 DBA/2J マウスと交配し、産仔である G2 世代にも高血糖が検出された場合に、その系統は変異系統と判定された。

(2) 原因遺伝子探索～マッピングと候補遺伝子の解析：変異遺伝子同定の最初のステップとして、全ゲノム上の位置を大まかに決定するラフマッピングを実施した。具体的には、約 50 匹の戻し交配個体とマイクロサテライトマーカーならびに SNP マーカーを用いた連鎖解析を行なった。約 80 マーカーを用いたラフマッピング終了時点で変異の位置を 9 番染色体上に絞りさらにその領域を狭めるため、戻し交配個体を生産し、かつ、より高密度の SNP マーカーを設定してファインマッピングを実施し、狭めた領域内の遺伝子のエクソン領域をシーケンシングすることにより変異を同定した。

(3) 表現型解析 (高血糖、血中インスリンレベル、膵β細胞障害の解析)
血糖値の測定は自由摂餌下、尾先端からの採血サンプルを簡易血糖測定機 (Arkray) にて

測定。血中インスリンレベルは眼窩採血サンプルを遠心し、上清をELISA（シバヤギレビスインスリンキット）にて測定した。膵β細胞の測定は、膵臓FFPEサンプルを抗insulin, 抗glucagon, 抗PP, 抗somatostatin抗体（すべてDAKO）を用い、DAKO ENVISION-HRPシステムにて染色、対比染色後、陽性面積を算出した。

(4) Srpr N425K 変異の細胞内における効果の検討：Rat insulinoma 由来 INS-1 細胞にレンチウイルス（理研BRC, 三好らが開発したシステム）を用いて変異型、あるいは野生型 Srpr を発現させ、細胞増殖と毒性（Promega Cell titer 使用）、ならびにインスリン分泌能を測定した（培養上清をシバヤギレビスインスリンキットにて測定）。

4. 研究成果

(1) 変異遺伝子の同定

全ゲノムラフマッピングならびに、SNP マーカーを用いたファインマッピングの結果、候補領域を9番染色体上の0.87Mbの領域に狭めた。領域内の全19遺伝子のexon領域をすべてシーケンシングしたところ、Srpr (Signal recognition particle receptor) 遺伝子上、exon10, T1276A 変異により、Asn425 → Lys (N425K) のミスセンス変異を同定した。

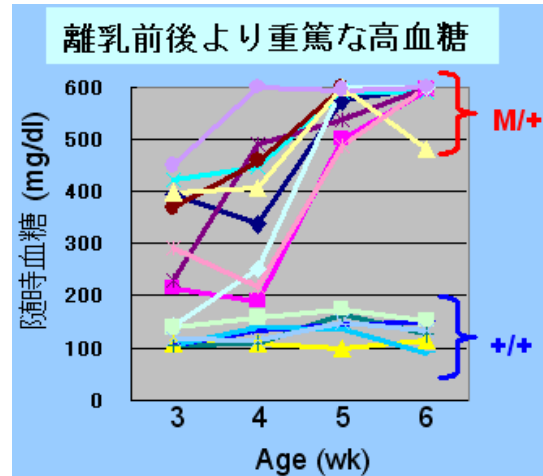
(2) 変異系統「M」の表現型解析

変異系統Mへのヘテロ変異個体の自由摂餌下の血糖値を測定したところ、離乳前後の3週齢時にはすでに抗血糖を発症していた（図1）。これらの個体の血中インスリンレベルを測定したところ、ヘテロ変異個体はすべてELISAにて検出限界以下の低値であった（図2）。また、免疫組織化学により、生後0日、1週齢、2週齢時の膵ラ氏島のインスリン陽性面積を算出し、野生型と比較したところ、ヘテロ変異マウスではインスリン陽性面積が生後3日から減少し1週齢で野生型よりも有意に減少していた。このとき、グルカゴン、ソマトスタチン、PP陽性面積には有意差はなかった（data not shown）。以上より、当変異系統では生後直後よりβ細胞でのインスリン産生機能低下あるいはβ細胞死などの重篤な障害が起こっていることがわかった。

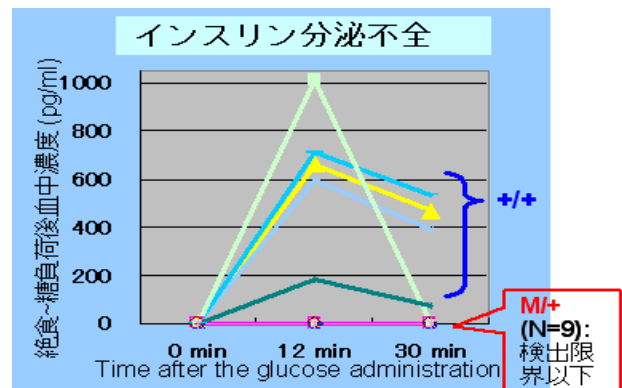
また、ホモ変異体の作成を試みたところ、生存ホモ産仔は確認できず、受精後経時観察により、胚を回収してgenotypingしたところ、blastocyst 65個中、ホモ胚は期待値16.3個（25%）に対し、実際は6個（9%）しか存在しなかった。以上より、ホモ変異体は発生の初期で致死となることが明らかとなった。

【図1】 変異系統Mは若齢より高血糖を発症

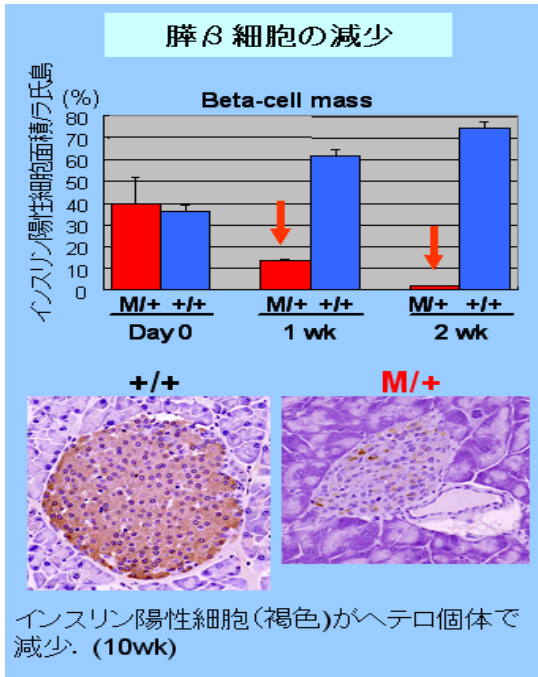
する



【図2】 変異系統Mは、低インスリン血症を発症する

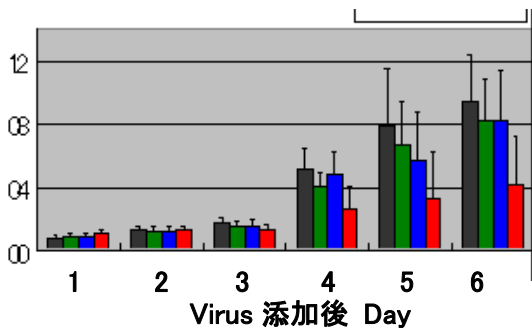


【図3】 変異系統Mは膵β細胞が減少



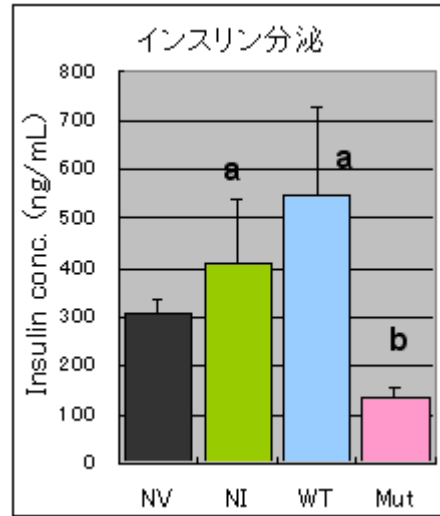
(3) 変異遺伝子の細胞内での機能解析：ラット膵β細胞由来の INS-1 細胞においてレンチウイルスを用いた強制発現系において解析を実施したところ、変異型発現細胞では、細胞死の誘導 (図 4) とインスリン分泌障害が確認された (図 5)。この細胞死の機構を解析したところ、細胞死に先立って、Caspase3/7, Caspase8, Caspase9 の活性上昇が確認された (図 6)、以上より、この遺伝子変異により、apoptosis が起こっていることが強く示唆された。なお、膵β細胞の障害に関しては各種 ER ストレス因子の関与が報告されているが、これら因子の発現レベル等には変化がみられなかった (data not shown)。

【図 4】 レンチウイルスにて発現誘導した INS1 細胞の生存率。変異型 Srpr 発現 INS1 細胞は細胞増殖阻害を受ける

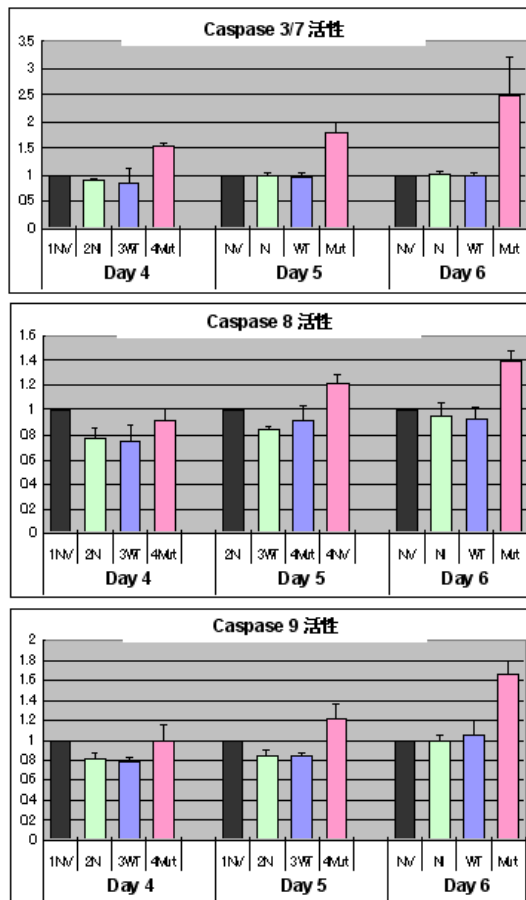


黒:viru なし、緑:empty virus、青:野生型 Srpr、赤:変異型 Srpr 発現細胞

【図 5】 virus 添加後 Day2 における、インスリン分泌能。培地交換 2 時間後の培養上清中のインスリンレベルを測定した。変異型 Srpr 発現細胞 (ピンク) は著しくインスリン分泌能が低下している。



【図 6】 virus 添加後 Day4~6 での Caspase 活性。Promega Caspase-Glo kit 使用。変異型 Srpr 発現細胞 (ピンク) で活性が高くなっている。



(4) TG マウスの作成：当該遺伝子の野生型あるいは点突然変異型を腓ラ氏島に特異的に発現するTGマウスを作成したが、生後半年齢までに高血糖を発症する個体はいなかった。また全身で当該遺伝子の野生型あるいは点突然変異型を発現するTGマウスでは、いずれも出生時に頭部形態の異常がみられ、生存産仔は得られなかった。

(5) まとめ

今回報告する変異マウスはSR α の、SRPとの結合領域に重要な部位にミスセンス変異を有していたことから、小胞体輸送の異常により、インスリンの産生が障害を受け、ひいては β 細胞の障害を引き起こして糖尿病を誘発するという、新しいメカニズムの可能性を提唱するものである。

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)

[学会発表] (計 1 件)

第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会
2009 年 5 月 24 日 (日曜日)
大阪国際会議場
口頭発表

「ENU 誘発大規模ミュータジェネシスにより開発された糖尿病モデルマウスの解析」
井上麻紀, 茂木浩未, 土岐秀明, 松井純子, 平山妙子, 若菜茂晴, 美野輪治, 野田哲生

[図書] (計 1 件)

ゲノム医学 第 38 号 Vol.9 No.2 (2009 年 6 月 1 日発行)メディカルレビュー社 特集タイトル「糖尿病とゲノム」(共著)
「マウス ENU mutagenesis による糖尿病原因遺伝子の探索と解析」井上麻紀・野田哲生

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 麻紀 (INOUE MAKI)
独立行政法人理化学研究所・疾患モデル評価
研究開発チーム・開発研究員
研究者番号：90321728

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし