

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02390

研究課題名（和文）比較生物学的アプローチを用いた糖尿病における膵 細胞障害機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of pancreatic beta-cell failure in diabetes using comparative biology-based approach

研究代表者

横井 伯英（Yokoi, Norihide）

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：70311610

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、膵 細胞障害を呈する複数のマウスおよびラットの自然発症糖尿病モデルを用いて、交配実験と遺伝解析およびエクソーム解析により疾患候補遺伝子を同定し、ゲノム編集により病態発症における関与について検証した。また、これら複数のモデルを対象とする膵島のトランスクリプトームおよびプロテオーム解析により膵 細胞障害に関与するパスウェイを同定し、ヒトにおける知見を結集して膵 細胞障害の病態発症・進展機構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

複数のマウスおよびラットの自然発症糖尿病モデルを駆使した本研究により明らかとなった膵 細胞障害の病態発症・進展機構は、ヒト糖尿病における膵 細胞障害の病態発症・進展機構の解明や新規のメカニズムに基づく治療薬の開発の基盤となると考えられる。本研究は、同様の研究手法が適用可能な様々の研究分野において疾患モデルの有用性を実証するものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, by using several spontaneous animal models of type 2 diabetes with pancreatic beta-cell failure, we performed genetic analysis and exome analysis to identify diabetes susceptibility genes and verified the relationship of the candidate gene with pathophysiology by CRISPR/Cas9-mediated genome editing system. We also performed transcriptome and proteome analyses of the pancreatic islets of these models to identify pathways involved in the onset of pancreatic beta-cell failure. Together with the information of humans, we clarified a part of mechanisms involved in the development and progression of pancreatic beta-cell failure.

研究分野：分子遺伝学、分子糖尿病学、実験動物学

キーワード：疾患モデル 糖尿病 インスリン 膵 細胞障害 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

世界の糖尿病人口は2017年に4億2,500万人にのぼり、2045年までに約7億人に増加すると予測されており(国際糖尿病連合)、その克服は医学的、社会的にも極めて重要な課題である。糖尿病の大部分を占める2型糖尿病は、膵β細胞からのインスリン分泌不全とインスリンの標的臓器(肝臓、骨格筋、脂肪)におけるインスリン抵抗性により発症する。しかし、インスリン抵抗性のみでは糖尿病の発症に至らないことから、2型糖尿病発症の基盤には膵β細胞からのインスリン分泌不全が存在する。インスリン分泌不全には、膵β細胞の質的または量的な障害、あるいは両者が関与するが、その障害の程度は様々である。しかし、膵β細胞障害に関与する遺伝因子および障害の発症・進展機構は明らかでない。

糖尿病などの多因子疾患の遺伝素因や発症・進展機構を解明するには、遺伝的および環境的に統御可能な動物モデルを用いた解析が有力な手段となる。2013年に、研究代表者らは肥満モデル Zucker fatty (ZF) ラットを起源として新たに肥満性の2型糖尿病を発症する Zucker fatty diabetes mellitus (ZFDM) ラットを確立した(文献①)。ZFDM ラットはZF ラットと同一のレプチン受容体遺伝子変異 (fatty, fa) による肥満とインスリン抵抗性を呈し、糖尿病発症前には膵β細胞の過形成が認められるにもかかわらず、ZF ラットと比較してインスリン分泌量の不足、すなわちインスリン分泌不全(膵β細胞の質的障害)が見られる(文献②)。さらに、ZFDM ラットには糖尿病発症の前後から膵島構造の破壊による膵β細胞の減少(膵β細胞の量的障害)も認められる(文献②)。このように、ZFDM ラットは膵β細胞の質と量の障害という2種類の障害を呈するモデルとして位置づけられる。

KK-Ay マウスは、KK マウスに肥満遺伝子 Ay が導入された肥満性の2型糖尿病モデルである。研究代表者らは、KK-Ay マウスでは膵β細胞の量は保持される一方で、インスリン分泌不全(膵β細胞の質的障害)を呈するという興味深い病態を見出している(文献③)。

2. 研究の目的

本研究では、膵β細胞障害を呈する複数のマウスおよびラットの自然発症糖尿病モデルを用いて、交配実験と全ゲノム SNP 解析を用いた遺伝解析、エクソーム、全ゲノムシーケンス、トランスクリプトームおよびプロテオーム解析による遺伝素因と障害経路の同定ならびにゲノム編集による検証を行い、マウス・ラット・ヒトにおける知見を結集して普遍的な膵β細胞障害機構の解明に挑む。

3. 研究の方法

(1) 膵β細胞障害の遺伝素因の同定

膵β細胞障害の遺伝素因を同定するため、交配実験と遺伝解析を行う。研究代表者らは、これまでにZFDM ラットと肥満モデル ZF ラットの交配により作出した F2 仔による遺伝解析を試みたが、肥満を呈する fa/fa ホモ型のオスの F2 仔 145 匹のうち 1 匹しか糖尿病を発症せず、遺伝解析が困難であることが判明した。そこで、ZFDM 系統のオス fa/fa 個体と ZF 系統のメス fa/+ 個体との交配により作出した F1 のオスまたはメスに ZFDM 系統を戻し交配することにより、2種類の N2 仔を作出した。60 週齢までに、F1 のオスを用いた N2 仔では 57% が糖尿病を発症し、F1 のメスを用いた N2 仔では 20% が糖尿病を発症することを確認した。また、糖尿病非発症個体については糖負荷試験を実施し、血糖値の推移のデータを取得済みである。さらに、上記 2 種類の N2 仔について次世代シーケンサーを用いた全ゲノム SNP タイピングを行い、約 3 万個の SNP についての遺伝子型を取得している。

本研究では、上記で取得した表現型データと全ゲノム SNP タイピングデータを用いてカイニ

乗検定や量的形質遺伝子座 (QTL) 解析により糖尿病発症に関与するゲノム領域および疾患候補遺伝子を特定する。また、ZFDM ラットと ZF ラットのエクソーム解析と上記から明らかとなる疾患候補領域と照合することにより、候補遺伝子および候補変異を特定する。

(2) 膵 β 細胞障害の発症経路の同定

研究の開始後に、肥満性の 2 型糖尿病を発症する新たなマウスモデルとして NSY-Ay マウスが確立された (文献⑥)。そこで、膵 β 細胞障害の発症経路を同定するため、ZFDM ラット、KK-Ay マウスおよび NSY-Ay マウスについて、随時血糖値が正常な時期および随時血糖値の上昇とともに耐糖能異常が顕在化する時期に膵島を単離し、トランスクリプトーム解析により遺伝子発現の経時的変化を明らかにする。取得したデータを用いて主成分分析、判別分析、パスウェイ解析等により発現異常を示す遺伝子を同定するとともに、膵 β 細胞障害の発症・進展に関与する経路を同定する。

また、膵島のプロテオーム解析による異常修飾タンパク質の機能解析を継続して実施した。これまでに、ZFDM ラットと対照の ZF ラットの膵島を対象とする免疫沈降プロテオミクスにより ZFDM ラットに特異的な O-GlcNAc 修飾タンパク質を特定した。さらに、同様の免疫沈降プロテオミクスにより、インスリン分泌細胞株 MIN6-K8 においてグルコース刺激により O-GlcNAc 化され、GLP-1 刺激により O-GlcNAc 化がはずれるタンパク質を同定した。本研究では、これらのタンパク質についてインスリン分泌における機能的役割を検討する。

(3) ゲノム編集による候補変異の検証

上記 (1) および (2) から得られた膵 β 細胞障害への関与が疑われる候補遺伝子 (変異) について、ゲノム編集による検証を行う。候補遺伝子変異が劣性と考えられる場合は、ゲノム編集により野生型アレルへ置換し、膵 β 細胞障害が抑制されるか否かを検討する (レスキュー実験)。一方、候補遺伝子変異が優性と考えられる場合は、ゲノム編集によりノックアウトまたはノックダウンして、膵 β 細胞障害が抑制されるか否かを検討する。

(4) マウス・ラット・ヒトの比較生物学的解析による膵 β 細胞障害機構の解明

上記 (1)、(2) および (3) により同定された膵 β 細胞障害に関与する遺伝子 (変異) および障害の発症・進展に関与する経路について、ヒトにおける遺伝子異常による糖尿病の原因遺伝子 (変異)、ゲノムワイド関連解析により同定された糖尿病感受性遺伝子 (SNP などの多型)、ヒト膵島の遺伝子発現解析などの情報と比較検討することにより、マウス・ラット・ヒトにおける普遍的な膵 β 細胞障害機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 膵 β 細胞障害の遺伝素因の同定

肥満糖尿病モデル ZFDM ラットと単純肥満モデル ZF ラットとの交配により作出した戻し交雑仔 (N2) のうち肥満を呈する fa/fa ホモ型のオスの N2 仔について、分担者の須山らが開発した SNP タイピングのプラットフォームを用いて約 3 万個の SNP の遺伝子型判定を行うとともに須山らが開発したエクソーム解析 (発現制御領域含む) のプラットフォームを用いて候補遺伝子 (変異) を同定した。さらに、候補遺伝子における責任変異と考えられるものについて上記 N2 仔を用いて遺伝子型判定を実施し、糖尿病発症との関連について解析した。その結果、複数の候補遺伝子における変異と糖尿病発症との間に統計的に有意な関連が認められた。

(2) 膵 β 細胞障害の発症経路の同定

ZFDM ラット、KK-Ay マウスおよび NSY-Ay マウスについて、随時血糖値が正常な時期および随時血糖値の上昇とともに耐糖能異常が顕在化する時期に膵島を単離し、トランスクリプトーム解析を実施した。まず、膵島の長径を計測して比較したところ、NSY-Ay マウスでは膵島の肥大化が認められるが、ZFDM ラットと比較すると肥大化の程度が有意に小さいことがわかった。次に、それ

ぞれのモデルにおいて対照系統との遺伝子発現の比較解析により、遺伝子発現が異なる遺伝子群を抽出し、Gene OntologyおよびKEGGパスウェイ解析を実施した。その結果、いずれのモデルにおいても共通して、糖尿病モデルにおいて遺伝子発現が増加する遺伝子群には細胞外マトリックスや炎症関連のGOタームやKEGGパスウェイに関与する遺伝子が濃縮されていた。一方、糖尿病モデルにおいて遺伝子発現が減少する遺伝子群には2型糖尿病やインスリン分泌に関するGOタームやパスウェイに関与する遺伝子が濃縮されていた (ZFDMラットについては文献④)に一部発表済み)。

さらに、各モデルにおいて遺伝子発現が異なる遺伝子群についてモデル間の比較を実施した。その結果、ZFDMラットにおいて特異的に遺伝子発現が増加する遺伝子群が抽出され、これらには細胞増殖、血管新生および小胞体 (ER) ストレスなどのGOタームやパスウェイに関与する遺伝子が濃縮されていた。従って、ZFDMラットでは膵島の肥大化が促進されるが、同時にβ細胞の疲弊にも繋がり、最終的にβ細胞死ならびに膵島構造の破壊に至る一方で、KK-AyマウスおよびNSY-Ayマウスでは膵島の肥大化が軽度でありβ細胞の疲弊が抑えられ膵島構造が保持されることが示唆された。

また、ZFDMラットと対照のZFラットの膵島を対象とする免疫沈降プロテオミクス解析により同定した異常修飾タンパク質の機能解析を継続して実施した。これまでに、インスリン分泌細胞株MIN6-K8においてグルコース刺激によりO-結合型N-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc)化され、GLP-1刺激によりO-GlcNAc化がはずれる複数のタンパク質を同定している。これらのタンパク質のうち、O-GlcNAc化修飾を受ける可能性があるアミノ酸残基と、PKAリン酸化を受ける可能性があるアミノ酸残基が一致しているタンパク質を検索した結果、7つの候補タンパク質を同定した。このうち、Mef2d (Myocyte-specific enhancer factor 2D) のノックダウンおよびノックアウト細胞においてグルコース刺激によるインスリン分泌の増強が認められた。従って、Mef2dはO-GlcNAc化の亢進によるインスリン分泌障害に関与することが示唆された (文献⑤)。

(3) ゲノム編集による候補変異の検証

上記(1)および(2)から得られた膵β細胞障害への関与が疑われる1つの候補遺伝子(1塩基置換によるナンセンス変異)について、ZFDMラットを対象とするゲノム編集により変異アレルを野生型アレルへ置換した個体を作成した。複数のファウンダーのうち野生型アレルに置換されている個体が2匹得られ、これらをZFDMラットと交配して後代を作成した。後代個体のうちfa/fa個体について糖尿病の発症や膵β細胞障害が抑制されるか否か検証した。その結果、ゲノム編集個体においてもZFDMラットと同様に糖尿病発症が認められ、膵β細胞障害についてもZFDMラットと同程度であることが判明した。従って、当該遺伝子(変異)はZFDMラットの膵β細胞障害や糖尿病の発症に関与する可能性が低いことが示された。しかし、膵島における遺伝子発現量も高く、タンパク質の機能を欠失させるナンセンス変異であることから、膵島や他の組織における機能に何らかの障害が生じている可能性は否定できないと考えられた。

(4) マウス・ラット・ヒトの比較生物学的解析による膵β細胞障害機構の解明

上記(1)により同定された膵β細胞障害に関与する可能性のある複数の候補遺伝子(変異)について、ヒトにおける遺伝子異常による糖尿病の原因遺伝子(変異)、ゲノムワイド関連解析により同定された糖尿病感受性遺伝子(SNPなどの多型)、ヒト膵島の遺伝子発現解析などの情報と比較検討した。その結果、ヒトの遺伝子異常による糖尿病の原因遺伝子としては同定されていないが、ヒトの糖尿病感受性遺伝子座の近傍に位置すること、さらにヒト膵島においても発現が認められることが判明した。従って、これらの遺伝子はヒトにおける膵β細胞障害に関与する候補遺伝子と考えられた。

(5) 今後の展望

本研究では、膵β細胞障害を呈する複数のマウスおよびラットの自然発症糖尿病モデルを対象とするオミクス解析から膵β細胞障害に関与する可能性のある複数の候補遺伝子(変異)を

同定し、一部については機能的役割を明らかにした。本研究をさらに発展させ、様々な膵β細胞障害病態を呈する複数のモデルを対象とする多面的な解析により、糖尿病の発症の基盤にある膵β細胞障害に関与する遺伝因子および障害の発症・進展機構を解明すれば、ヒト糖尿病における膵β細胞障害機構の解明や新規のメカニズムに基づく糖尿病治療薬の開発につながるものと期待される。

<引用文献>

- ① Yokoi N, Hoshino M, Hidaka S, Yoshida E, Beppu M, Hoshikawa R, Sudo K, Kawada A, Takagi S, Seino S. A novel rat model of type 2 diabetes: the Zucker Fatty Diabetes Mellitus ZFDM rat. **J Diabetes Res** 2013:103731, 2013
- ② Gheni G, Yokoi N, Beppu M, Yamaguchi T, Hidaka S, Kawabata A, Hoshino Y, Hoshino M, Seino S. Characterization of the prediabetic state in a novel rat model of type 2 diabetes, the ZFDM rat. **J Diabetes Res** 2015:261418, 2015
- ③ Hashim M, Yokoi N, Takahashi H, Gheni G, Okechi OS, Hayami T, Murao N, Hidaka S, Minami K, Mizoguchi A, Seino S. Inhibition of SNAT5 induces incretin responsive state from incretin unresponsive state in pancreatic β-cells: study of β-cell spheroid clusters as a model. **Diabetes** 67:1795-1806, 2018
- ④ Hayami T, Yokoi N, Yamaguchi T, Honda K, Murao N, Takahashi H, Wang S, Seino Y, Kamiya H, Yabe D, Sweet IR, Mizoguchi A, Nakamura J, Seino S. Tumor-like features of gene expression and metabolic profiles in enlarged pancreatic islets are associated with impaired incretin-induced insulin secretion in obese diabetes: a study of ZFDM rat. **J Diabetes Investig** 11:1434-1447, 2020
- ⑤ Yoshida M, Yokoi N, Takahashi H, Hatano N, Hayami T, Ogawa W, Seino S. O-GlcNAcylation of myocyte-specific enhancer factor 2D negatively regulates insulin secretion from pancreatic β-cells. **Biochem Biophys Res Commun** 605:90-96, 2022
- ⑥ Ohno T, Miyasaka Y, Yoshida K, Kobayashi M, Horio F, Yokoi N, Mizuno M, Ikegami H. A novel model mouse for type 2 diabetes mellitus with early onset and persistent hyperglycemia. **Exp Anim** 71:510-518, 2022

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yoshida Mai, Yokoi Norihide, Takahashi Harumi, Hatano Naoya, Hayami Tomohide, Ogawa Wataru, Seino Susumu	4. 巻 605
2. 論文標題 O-GlcNAcylation of myocyte-specific enhancer factor 2D negatively regulates insulin secretion from pancreatic β -cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 90~96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.03.036	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 -
1. 著者名 Ohno Tamio, Miyasaka Yuki, Yoshida Kanta, Kobayashi Misato, Horio Fumihiko, Yokoi Norihide, Mizuno Masashi, Ikegami Hiroshi	4. 巻 71
2. 論文標題 A novel model mouse for type 2 diabetes mellitus with early onset and persistent hyperglycemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 510~518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.22-0061	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 -
1. 著者名 Yingyue Quan, Sugawara Kenji, Takahashi Harumi, Yokoi Norihide, Ohbayashi Kento, Iwasaki Yusaku, Seino Susumu, Ogawa Wataru	4. 巻 -
2. 論文標題 Stimulatory effect of imeglimin on incretin secretion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.14001	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 -
1. 著者名 Han Guirong, Takahashi Harumi, Murao Naoya, Gheni Ghupurjan, Yokoi Norihide, Hamamoto Yoshiyuki, Asahara Shun ichiro, Seino Yutaka, Kido Yoshiaki, Seino Susumu	4. 巻 12
2. 論文標題 Glutamate is an essential mediator in glutamine amplified insulin secretion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 920~930
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13497	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 -

1. 著者名 Mura0 Naoya, Yokoi Norihide, Takahashi Harumi, Hayami Tomohide, Minami Yasuhiro, Seino Susumu	4. 巻 55
2. 論文標題 Increased glycolysis affects -cell function and identity in aging and diabetes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 101414 ~ 101414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmet.2021.101414	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11件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 水野智花、伊藤佑奈、向山裕樹、星野貴一、宮坂勇輝、大野民生、横井伯英
2. 発表標題 比較トランスクリプトーム解析による肥満糖尿病モデルにおける膵島障害機序の解明
3. 学会等名 第71回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 吉田 舞、横井伯英、高橋晴美、波多野直哉、速水智英、小川 渉、清野 進
2. 発表標題 膵 細胞株の免疫沈降プロテオミクスによるインスリン分泌障害に関するタンパク質の同定
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村尾直哉、横井伯英、高橋晴美、清野進
2. 発表標題 解糖系の亢進が膵 細胞老化を制御する
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横井伯英
2. 発表標題 糖尿病の遺伝素因、膵 細胞再生機構、膵 細胞内代謝シグナルの解明
3. 学会等名 第35回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 足立直紀、廣小路知貴、重中咲希、中野堅太、吉原美奈子、谷口幸雄、岡村匡史、須山幹太、横井伯英
2. 発表標題 肥満糖尿病モデルZFDMLラットにおける糖尿病発症に関する遺伝子の探索
3. 学会等名 第36回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村尾直哉，横井伯英，高橋晴美，清野進
2. 発表標題 細胞内NAD代謝の変容が膵 細胞老化を制御する
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 舞，横井伯英，波多野直哉，速水智英，高橋晴美，小川 涉，清野 進
2. 発表標題 インクレチン応答性インスリン分泌障害に関する候補タンパク質の同定
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 足立直紀、廣小路知貴、重中咲希、中野堅太、吉原美奈子、吉田裕作、横瀬重雄、谷口幸雄、原田範雄、稲垣暢也、高橋晴美、清野進、岡村匡史、須山幹太、横井伯英
2. 発表標題 CRISPR/Cas9による2型糖尿病候補遺伝子におけるナンセンス変異のレスキュー実験
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣小路 知貴、足立 直紀、谷口 幸雄、横井 伯英
2. 発表標題 新規肥満糖尿病モデルZFDMLラットにおける糖尿病感受性遺伝子座の探索
3. 学会等名 日本動物遺伝育種学会第22回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学大学院農学研究科動物遺伝育種学分野ホームページ http://www.jkaabs.kais.kyoto-u.ac.jp/</p>

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	岡村 匡史 (Okamura Tadashi) (00333790)	国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・実験動物管理室長 (82610)	

6. 研究組織（つづき）

	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	須山 幹太 (Suyama Mikita) (70452365)	九州大学・生体防御医学研究所・教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関