

令和 2 年 12 月 1 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461388

研究課題名(和文) 新たに見いだした抗肥満高耐糖能マウスにおける原因遺伝子の同定と糖代謝異常の解析

研究課題名(英文) Identification of causative genes of spontaneous dwarf mice and analysis of glucose metabolism

研究代表者

佐藤 貴弘 (SATO, TAKAHIRO)

久留米大学・分子生命科学研究所・准教授

研究者番号：50368883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、偶発的に得られた自然発生の矮小変異マウスに関する研究を行なった。このマウスは、抗肥満かつ高耐糖能という、既存の矮小変異マウスには見られない特徴をもっていた。そこで、このマウスの原因遺伝子を同定することを第一の目的とし、遺伝子マッピング解析および次世代シーケンシング解析を行った。さらに、PCRアレイ解析によって肥満や糖代謝のパスウェイに関する異常も調べた。このような研究から、抗肥満高耐糖能マウスの変異候補遺伝子として第16番染色体のCrebbp遺伝子を抽出することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究では、突然変異によって生まれた体の小さいマウスについてその原因となる遺伝子を調べ、どのような遺伝子異常があるのかを明らかにした。さらに、このマウスは、高脂肪食を食べても肥満しにくく、砂糖水を飲んでも血糖値が上がりにくいという特徴を持つことも見出した。したがって、このマウスを利用した研究から、メタボリックシンドロームの発症メカニズムの一端を明らかにすることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on spontaneously derived dwarf mutant mice. Since this mouse was characterized as anti-obesity and high glucose tolerance, it was considered to be a different mouse from known dwarf mutant mouse. Therefore, we aimed to identify causative genes by gene mapping analysis and next generation sequencing analysis. In addition, abnormal pathways related to obesity and glucose metabolism were also examined by PCR array analysis. Based on the above studies, the Crebbp gene of chromosome 16 was selected as a mutation candidate gene of this dwarf mutant mouse.

研究分野：内分泌学

キーワード：矮小 抗肥満 高耐糖能

1. 研究開始当初の背景

本研究で研究対象とした抗肥満高耐糖能マウスは、グレリン遺伝子欠損マウスを作出する過程で偶発的に得られたマウスである。グレリン遺伝子のヘテロ欠損マウス同士を交配したときに、眼間が広く、鼻部の短い頭部形成に異常の見られる矮小雄マウスが1個体だけ生まれた。

このように非常に特徴的な外見だったことから、近交系実験用マウスであるC57BL/6Jマウスの雌との戻し交配を12世代まで実施した。その結果、グレリン欠損の影響が完全に排除され、遺伝的な背景がC57BL/6Jマウスに均一化されたコンジュニック系統として樹立することができた(図1)。コンジュニック系統とは、ドナーとなる系統のある遺伝子領域を残しながら、その他の遺伝情報についてはレシピエントとなる系統と同一に交配・選択して得られた系統のことを言い、特定の遺伝子の働きを厳密に比較して調べるために適している。

このようにコンジュニック化された矮小マウスは、眼間が広く、鼻部の短い、頭部形成に異常のあるマウスであり、最初に発見された矮小マウスの外見的な異常形質をすべて引き継いでいた。このため、自然発生した矮小マウスに見られる異常形質は、何らかの遺伝子変異により誘導されていることが予想された。

また、血液生化学的検査を行うと、矮小マウスでは安静時の血糖値が低く、糖負荷試験をしても血糖値があまり上昇しないなど、矮小マウスが非常に高い耐糖能を持つこともわかった。さらに、高脂肪食の負荷実験を行うと、実験開始前に比べて高脂肪食負荷(12週間)後の体重は、正常マウスで約55.8%増加したのに対して、矮小マウスではわずか3.9%の増加にとどまった。このことから、矮小マウスは肥満に対して抵抗性を持つこともわかった。これらの結果から、本研究で使ったマウスは、これまでに知られている糖代謝のモデル動物とは異なる、抗肥満高耐糖能マウスだと考えられた。

以上のような背景から、自然発生した抗肥満高耐糖能マウスの異常がどのような遺伝子変異によって生じているのかを特定し、糖代謝を調節する新しい因子の発見に繋ぐことができれば、糖尿病や肥満症の新たな予防・治療戦略の構築に貢献できると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、偶発的に得られた、矮小、かつ抗肥満で高耐糖能という形質を持つ「抗肥満高耐糖能マウス」について、その原因遺伝子を明らかにすることを目的とした。また、内分泌学的な解析を行い、抗肥満高耐糖能マウスではどのように糖代謝が調節されているのかについての解析も試みた。

具体的な研究は、次のサブテーマに沿って実施した。

- (1) 抗肥満高耐糖能マウスにおける原因遺伝子の同定
- (2) 抗肥満高耐糖能マウスにおける糖代謝調節機構の解析

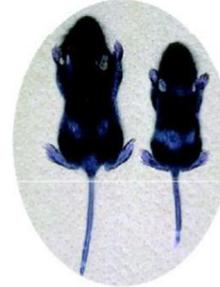


図1. 抗肥満高耐糖能マウス
同じ母親から同時に出生した同腹雄産仔。
正常マウス(左)に比べ、矮小のマウスが
抗肥満高耐糖能マウス(右)である。

これらのサブテーマのうち、最も本質的な結論が得られると考えられる「(1) 抗肥満高耐糖能マウスにおける原因遺伝子の同定」を重点的な研究課題として本研究を進めた。また、これらの研究から、原因遺伝子が糖尿病や肥満症の発症・進行にどのような役割を持つのか、その一端を明らかにすることも研究目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、新たに見いだした抗肥満高耐糖能マウスの原因遺伝子を同定し、このマウスに見られる糖代謝異常を解析するため、次のような研究手法で解析を進めた。

抗肥満高耐糖能マウスの原因遺伝子を同定するため、遺伝子マッピング法によって原因遺伝子が存在する可能性のある領域を40(Mbp)以内に狭めた。次に、この領域内で次世代シーケンシング解析を行い、原因候補遺伝子を抽出した。一方、抗肥満高耐糖能マウスの糖代謝がどのような機構で調節されているのかを調べるため、パスウェイ解析を中心とした解析を行った。詳細な研究の方法は次の通りである。

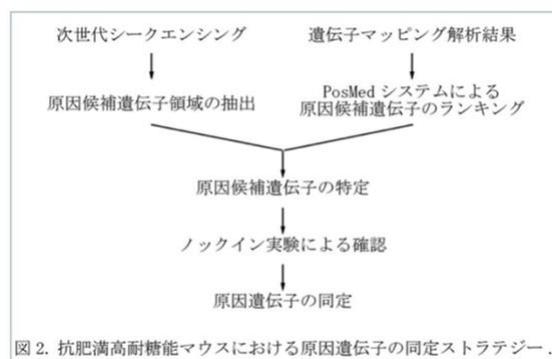


図2. 抗肥満高耐糖能マウスにおける原因遺伝子の同定ストラテジー。

(1) 抗肥満高耐糖能マウスにおける原因遺伝子の同定

C57BL/6J 系バックグラウンドの抗肥満高耐糖能雄マウスとDBA/2J 型の雌マウスを掛け合わせて得られたF1 マウスを用いてF2 マウスを得た。これらの個体をから尾を採取し、ゲノムを抽出して遺伝子マッピング解析を行った。

第一段階の遺伝子マッピングを終えて、抗肥満高耐糖能マウスの原因候補遺伝子が第16番染色体の約38.9(Mbp)の領域内にあることまでを突き止めた。その後、この領域内で10個のプロンプを設計して再度遺伝子マッピング解析を行ったところ、原因候補遺伝子は約21.7(Mbp)より上流にあることまで絞り込むことができた。

次に、この領域内で次世代シーケンシング解析を行って原因候補遺伝子の絞り込みを行った。次世代シーケンシング解析は北海道システム・サイエンス株式会社に委託して実施した。もし、変異が点突然変異の場合には、一塩基多型(SNP)なども含まれるために10,000か所を超える候補部位の抽出も予測される。そこで、効率よく原因候補遺伝子を見いだすため、すでに実施した遺伝子マッピングの結果を利用し、理化学研究所が一般公開しているPosMed(Positional Medline)システムを用いたバイオインフォマティクス解析も並行して行った(図2)。

具体的には、第16番染色体の約21.7(Mbp)の領域において、MEDLINEやOMIM等を含むドキュメントデータベースにて全文検索を行い、表現型を表すキーワードと関連づけられる遺伝子をすべて抽出する。次に、PosMedシステムの特徴を利用し、「機能(表現型)-遺伝子」あるいは「遺伝子-遺伝子」間の関連性を数学的な推論に基づいて探索し、ネットワーク的な繋がりを見いだす。この方法により、原因候補遺伝子として可能性の高いものを総合的にランキングすることができるため、原因候補遺伝子を数十個程度まで絞り込むことができる。

このように、遺伝子マッピング解析と次世代シーケンシング解析を効果的に組み合わせることによって原因候補遺伝子の絞り込みを行った。

(2) 抗肥満高耐糖能マウスにおける糖代謝調節機構の解析

抗肥満高耐糖能マウスは矮小であるが、予備的な検討からは既知の矮小マウスに見られるような成長ホルモン(GH)-インスリン様成長因子1(IGF1)系の異常は見られなかった。また、抗肥満高耐糖能マウスの耐糖能は非常に高かったが、糖負荷試験時のインスリン分泌は血糖値の推移に一致していたことから、正常な反応であると考えられた。その一方で、抗肥満高耐糖能マウスの安静時に見られる血中インスリン濃度は正常個体の約83%程度であったことから、抗肥満高耐糖能マウスの糖

代謝調節には未知の機構が存在するか、既知の調節機構の一部に何らかの内分泌学的な異常が生じている可能性があると考えられた。

そこで、まず、臓器重量を測定後、パラフィン切片(3 μ m)を作製し、常法にてヘマトキシリン・エオジン染色を行って組織像を観察した。

次に、抗肥満高耐糖能マウスでは糖代謝調節系のどのパスウェイに異常があるのかを明らかにするため、安静時や、絶食試験、糖負荷試験、インスリン負荷試験、高脂肪負荷などの条件下で糖代謝関連遺伝子のPCRアレイ解析を行う網羅的解析を実施した。PCRアレイ解析は、RT2 Profiler PCR Arrays(Qiagen社)のプレートを用い、StepOne Real-Time PCR System(Thermo Fisher社)により検討した。このアレイ解析によって得られる結果は、「(1)抗肥満高耐糖能マウスにおける原因遺伝子の同定」で原因候補遺伝子を絞り込む際にも有用な情報を提供できるという利点がある。

また、抗肥満高耐糖能マウスでは、高耐糖能という形質以外にも矮小や抗肥満という形質も見られる。このような形質は内分泌系の恒常性に異常や破綻が生じた場合に見られることから、抗肥満高耐糖能マウスの視床下部、下垂体、肝臓、膵臓、骨格筋、脂肪組織などの内分泌系組織あるいは関連組織を対象とし、成長、摂餌、肥満を調節するグレリンなどの既知のホルモンやペプチド含量の測定を行った。併せて、明暗周期下での赤外線センサーによる行動量測定や、高架式十字迷路試験、歩行試験などによる行動学的解析、握力試験なども実施した。

最後に、抗肥満高耐糖能マウスの原因遺伝子と病態との関わりを調べる目的で、糖尿病および肥満症を呈することが知られている2型糖尿病モデルマウス(KK-Ay/TaJcl系)を抗肥満高耐糖能マウスに交配させた。

以上の実験には、明暗周期が一定(明期:7:00~19:00, 暗期:19:00~7:00)、かつ室温(23 \pm 2 $^{\circ}$ C)および湿度(60 \pm 10%)が一定の範囲にある条件下で飼育された動物を用いた。本研究で行なったすべての動物実験は拡散防止措置(P1A)を遵守して行い、倫理面においては年度ごとに更新の必要な本学規定の「久留米大学動物実験委員会」の承認を得て実施した。定量PCR解析で使用するスタンダードなど、遺伝子組み換えの必要な実験に関しては「久留米大学遺伝子組換え実験安全委員会」の承認を得て使用した。

4. 研究成果

本研究では、「(1)抗肥満高耐糖能マウスにおける原因遺伝子の同定」を最重要課題と位置づけて研究を行なった。そのため、「(2)抗肥満高耐糖能マウスにおける糖代謝調節機構の解析」も、原因遺伝子の同定に繋げること意識しながら解析を実施した。

(1) 抗肥満高耐糖能マウスにおける原因遺伝子の同定

遺伝子マッピング解析により、原因候補遺伝子の存在領域が、第16番染色体の約21.7 (Mbp) より上流にあることまでを明らかにした。さらに、PosMed 解析から原因候補遺伝子として43 遺伝子を抽出することができた。これらすべての遺伝子について、原因候補遺伝子としてランキングされた順位の高い遺伝子から、順次、サンガー法によるシーケンシング解析を行った。

同時に次世代シーケンシングも行い、フィルタリング解析から変異候補遺伝子として *Crebbp* 遺伝子を抽出した。この遺伝子は PosMed 解析でも抽出された遺伝子であり、次世代シーケンシングで *Crebbp* 遺伝子に生じていることがわかった変異は、サンガー法による確認実験の結果とも一致した。

研究開始時の計画では、この変異遺伝子を正常動物に導入して同様の表現系が得られるのかを確認するところまで行う予定だったが、時間的な制約により本研究の期間内では達成できなかった。

しかし、現在（令和2年12月1日現在）、CRISPR-Cas9 システムによる確認実験も終了しており、抗肥満高耐糖能マウスの原因遺伝子が *Crebbp* 遺伝子であることを決定している。また、この遺伝子に変異が生ずるために、抗肥満高耐糖能マウスの形質が現れることも示すことができた。

(2) 抗肥満高耐糖能マウスにおける糖代謝調節機構の解析

本研究では、主として抗肥満高耐糖能マウスに見られる糖代謝の調節系について検討した。

はじめに、糖代謝に関係のある脳、肝臓、膵臓、副腎、骨格筋、白色脂肪、褐色脂肪や、成長に関わりの深い下垂体、骨（大腿骨）に加え、胸腺、肺、心臓、胃、小腸、腎臓などの組織像をヘマトキシリン・エオジン染色で観察した。いずれの臓器も抗肥満高耐糖能マウスで小さかったものの体重に比して正常な大きさであり、かつ同腹正常個体の組織像との大きな差は見られなかった。

次に、RT2 Profiler PCR Arrays を用いた PCR アレイ解析を行った。同腹の新生児雄個体を用いた Whole body 解析では、Adipogenesis、Autophagy、Growth Factor、Osteogenesis、Insulin Signaling の各項目において10 倍以上の発現差を認めた遺伝子は存在しなかった。

一方で、抗肥満高耐糖能マウスの腹腔内へグルコース（2 mg/kg）を投与し、膵臓や骨格筋の遺伝子発現を調べた解析からは、インスリン抵抗性に関する複数の遺伝子に発現変化が生じている可能性が示された。本研究では全体的な傾向を把握する目的で、複数個体の臓器をまとめて解析する手法を用いた。したがって、今後、より詳細な解析が必要である

が、抗肥満高耐糖能マウスの血糖値が低く維持されている一因であろうと考えている。

次に、血糖調節と行動リズムの関連について考察するため、抗肥満高耐糖能マウスを用いて行動学的解析を行った。明暗条件下における10日間の行動量や行動リズムには、正常個体と矮小個体（＝抗肥満高耐糖能マウス）の差は認められなかった。今後、恒常暗条件下で長期的な解析を実施することも必要だが、少なくとも光同調された条件下では、抗肥満高耐糖能マウスの行動リズムは正常に保たれていることが示された。すなわち、通常、実験には明暗周期が一定の飼育室で飼育したマウスを使用していることから、抗肥満高耐糖能マウスに見られる血糖値の異常は、サーカディアンリズムに起因する行動の異常によって生じている可能性は非常に小さいことがわかる。

また、高架式十字迷路などによる解析から、抗肥満高耐糖能マウスでは、複数の行動学的指標の値が同腹の正常個体よりも小さいことがわかった。このことは、抗肥満高耐糖能マウスが温順な性質を持つことを示している。本研究では、このような抗肥満高耐糖能マウスの性質と血糖値の異常との関係を明確にすることはできなかったが、今後の検討が必要な結果だと考えている。

最後に、低血糖の抗肥満高耐糖能マウスが、糖尿病および肥満症を呈する2型糖尿病モデルマウス（KK-Ay/TaJcl 系など）の病態を改善しうるのかを調べるため、両系統の交配を行った。しかしながら、これら交配によって産仔を得ることはできなかった。一部のモデルマウスではそのモデルマウス自身の繁殖能力に問題があることは知られているが、本研究で産仔を得ることができなかった理由は不明である。今後、この理由を明らかにしていくとともに、低血糖の抗肥満高耐糖能マウスが、糖尿病および肥満症を呈する2型糖尿病モデルマウスの病態を改善する可能性を探っていきたいと考えている。

このように本研究は、概ね計画通りに進めることができたが、すべての目標を達成できたわけではない。しかしながら、自然発生した抗肥満高耐糖能マウスの原因候補遺伝子を抽出することができた上、その後の研究から、原因遺伝子として第16番染色体上の *Crebbp* 遺伝子を同定できたことから、この遺伝子の新たな機能を提唱できると考えている。

抗肥満高耐糖能マウスを使用した今後の研究から、糖尿病や肥満症をはじめとして、未知の病態解明に繋がる成果が得られていくことが期待される。

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）

〔雑誌論文〕（計0件）

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

(出願中)

名称：CREBBP遺伝子に変異を導入された遺伝子改変動物

発明者：佐藤貴弘、児島将康、大石佳苗

権利者：学校法人 久留米大学

種類：特許権

番号：W02020004640

出願年月日：28.06.2019

国内外の別：国際出願

○取得状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 貴弘 (SATO, Takahiro)

久留米大学・分子生命科学研究所・准教授

研究者番号：50368883

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()