

令和元年6月11日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04499

研究課題名(和文) マウスを用いた1型と2型糖尿病の双方の発症に関わる原因遺伝子の同定とその機能解析

研究課題名(英文) Isolation of common causative gene for type 1 and 2 diabetes using diabetic NSY mouse.

研究代表者

堀尾 文彦 (Horio, Fumihiko)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：20165591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病(T1DM)と2型糖尿病(T2DM)の両方の表現型をもつNSYマウスを用いて、今までに同定例のない1型と2型糖尿病の発症に共通した第11番染色体上の糖尿病責任遺伝子の単離と同定に挑戦した。NSYの第11番染色体断片を保有するコンジェニック系統の解析の結果、インスリン分泌不全とインスリン抵抗性を規定するT2DM遺伝子を別々の領域に、さらに別の領域にT1DM遺伝子が存在することを明らかにした。それぞれの候補遺伝子を選抜した。当初の目的のT1DMとT2DMに共通した責任遺伝子の存在を証明することには繋がらなかったが、新規の特性に富んだ糖尿病責任遺伝子の存在を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、NSYマウスの第11番染色体のT2DM遺伝子としてインスリン分泌不全を規定するものがセントロメア～25.96 Mb領域に、インスリン抵抗性を規定するものが48.49～71.70 Mb領域に、T1DM責任遺伝子が44.45～48.49 Mb領域に存在することを初めて明らかにした。主目的のT1DMとT2DMに共通した膵ラ氏島細胞の遺伝子の同定については、インスリン分泌不全とT1DM感受性遺伝子の存在領域が分離したことから、目的に合致した遺伝子の発見には繋がらなかった。しかし、NSYマウスの第11番染色体上の3つの異なるタイプの糖尿病責任遺伝子の遺伝学的解剖と存在の証明に成功した。

研究成果の概要(英文)：As NSY mice develop the phenotype of both type 1 diabetes (T1DM) and type 2 diabetes (T2DM), we tried to isolate a common causative gene for both T1DM and T2DM on chromosome 11. By using congenic strains possessing a partial part of NSY's chromosome 11, we isolated three independent chromosomal regions for impaired insulin secretion (0-25.96 Mb), insulin resistance (44.45-48.49 Mb) and streptozotocin-inducible T1DM (48.49-71.70 Mb) on chromosome 11. Moreover, we selected candidate genes in each region. As a result, we could not isolate a common causative gene for both T1DM and T2DM, but this result contributes to identify a novel diabetogenic gene on mouse chromosome 11.

研究分野：栄養生化学

キーワード：1型糖尿病 2型糖尿病 疾患感受性遺伝子 膵臓ランゲルハンス氏島 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

1 型糖尿病 (T1DM) は膵臓細胞の破壊によるインスリン欠乏により発症し、2 型糖尿病 (T2DM) はインスリン分泌不全とインスリン感受性低下の組み合わせで発症する。両者は複数の遺伝子の作用で発症する多因子疾患であり、その原因遺伝子の同定には糖尿病発症と連鎖する染色体領域を決定して遺伝子同定へと繋げる順行性遺伝学的手法が有効である。この手法により、T1DM と T2DM モデル動物から複数の原因遺伝子が同定され発症機構の解明に寄与している (*Curr. Genomics*, 9:324(2008), *Mamm. Genome*, 25:401 (2014))。一方、糖尿病モデル動物の系統樹立過程に着目してみると、同じ祖先系統から T1DM と T2DM の系統が確立されている例がマウス、ラットに存在し (*ILAR J.*, 45:268(2004))、祖先系統には T1DM と T2DM の双方の発症に関与する遺伝子が存在していたことを示している。更に、ヒトの T1DM 家系には T2DM 患者も多いという報告もある (*Diabetes*, 54:S40(2005))。これらの事実は異なる病型に分類される両糖尿病の双方の発症に関わる遺伝的要因(原因遺伝子)の存在を示唆しているが、そのような遺伝子が同定された例はない。

T2DM モデルとして開発されたマウス NSY 系統は T1DM の表現型も示し、その原因遺伝子がともに第 11 番染色体(Chr.11)に存在する事から、この Chr.11 には両糖尿病の発症に関与する遺伝子が存在すると考えられる。NSY 系統は同定例のない T1DM と T2DM の両方を引き起こす糖尿病原因遺伝子を解明するために適したモデルマウスと考えられる。

## 2. 研究の目的

NSY マウスと対照系統 (C3H マウス) を交配することにより我々が独自に作出したコンジェニック系統群と、NSY 系統の網羅的遺伝子変異情報とを駆使して、NSY 系統の Chr.11 に存在する T1DM と T2DM の双方の発症に関与する糖尿病遺伝子を同定しその機能を明らかにする。この遺伝子は両糖尿病の発症機構に共通した鍵因子であり、その機能を標的にした栄養学的な糖尿病予防法や治療法につなげる事を目的とする。

本研究では、挑戦する課題として以下の項目を掲げた。

- (1) Chr.11 全領域をカバーするコンジェニック系統群を用いて、導入された染色体領域と各系統の T1DM と T2DM 形質の連鎖解析を行い、T1DM と T2DM の発症に関与する原因遺伝子の存在する染色体領域を絞り込む。
- (2) C3H 系統を遺伝的背景として NSY 系統由来の染色体領域を持ち両糖尿病を呈するコンジェニック系統と C3H 系統から膵臓ランゲルハンス氏島(ラ氏島)を単離して、その網羅的遺伝子発現量解析を行い、両系統間で発現レベルが異なる遺伝子を当該領域内で候補として選抜する。
- (3) NSY と C3H 系統間のゲノム変異情報を用いて、絞り込んだ当該領域内のエキソンに変異(アミノ酸置換を伴う変異、欠失、挿入)を有する遺伝子を T1DM および T2DM の責任遺伝子の候補遺伝子として選抜する。
- (4) 上述の解析から選抜された候補遺伝子について、膵島培養細胞(MIN6 細胞)での過剰発現あるいは発現抑制系や遺伝子改変(過剰発現、ノックアウト)マウスを作出して糖尿病発症作用を解析し、原因遺伝子を同定する。

## 3. 研究の方法

### (1)コンジェニック系統群を用いた糖尿病責任遺伝子の存在領域の絞り込み

対照系統である C3H マウスの第 11 番染色体を NSY マウスの第 11 番染色体で部分置換した 8 種類のコンジェニック系統を作出した。各コンジェニック系統の第 11 番染色体の NSY 由来

領域を図 1 に示した。各コンジェニック系統の T2DM と T1DM 形質の判定結果とそれぞれの導入した NSY 染色体領域との連鎖解析により、両形質を発症させる糖尿病遺伝子の存在する染色体領域の絞り込みを行った。T2DM 形質については、各コンジェニック系統と C3H (6 週齢、雄) に、通常飼料 (CE-2、日本クレア (株) 製) あるいは高脂肪食を与えて 11 週間飼育した。T2DM 形質として、血糖値と血中インスリン濃度測定、耐糖能試験、インスリン分泌試験、インスリン負荷試験を行った。T1DM 形質については、各コンジェニック系統に通常飼育用飼料を与えて 8 週齢で STZ を腹腔内投与 (175 mg/kg 体重) してその後の血糖値の上昇を指標とした。

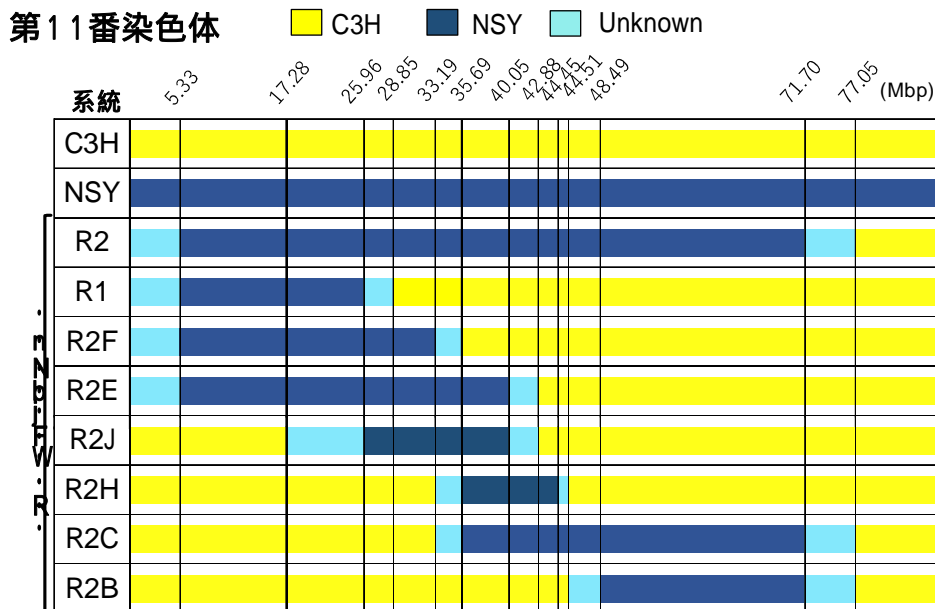


図 1 8 系統のコンジェニックマウス (R2, R1, R2F, R2E, R2J, R2H, R2C, R2B) の第 11 番染色体の NSY 由来領域

**(2) T2DM におけるインスリン分泌不全を規定する責任遺伝子の候補遺伝子の選抜**

次世代シーケンサー解析により整備した NSY と C3H 系統間のゲノム変異情報を用いて、絞り込まれた染色体領域内で両系統間でエキソンに変異 (アミノ酸置換を伴う変異、欠失、挿入) を有する遺伝子を選抜した。それらの内、ラ氏島機能や糖代謝への関与が示唆されている遺伝子を候補として探索した

それに続いて、上記の変異を有さない遺伝子の中で、ラ氏島機能や糖代謝への関与が示唆されている遺伝子を候補として選抜した。

**(3) T2DM におけるインスリン抵抗性を規定する責任遺伝子の候補遺伝子の選抜**

次世代シーケンサー解析により整備した NSY と C3H 系統間のゲノム変異情報を用いて、絞り込まれた染色体領域内で両系統間でエキソンに変異 (アミノ酸置換を伴う変異、欠失、挿入) を有する遺伝子を選抜した。それらの内、インスリン作用およびインスリン抵抗性への関与が示唆されている遺伝子を候補として探索した

それに続いて、上記の変異を有さない遺伝子の中で、インスリン作用およびインスリン抵抗性への関与が示唆されている遺伝子を候補として選抜した。

**(4) インスリン分泌不全を示すコンジェニック系統と C3H 系統から分離した膵ラ氏島を用いた網羅的遺伝子発現解析による糖尿病遺伝子の候補遺伝子の探索**

両系統の膵臓をコラーゲナーゼ灌流法によって消化してラ氏島を分離して、そのインスリン分泌能の測定と RNA 抽出を行った。両系統から抽出した RNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行、両系統間で発現レベルの異なる遺伝子を候補遺伝子として探索する。

**(5) T1DM の責任遺伝子の存在領域の決定および候補遺伝子の選抜と、その同定の試み**

コンジェニック系統での STZ 投与による T1DM 発症の解析結果から、T1DM の責任遺伝子の存在領域を限定し、候補遺伝子を選抜した。その遺伝子の遺伝子改変マウスを用いて、その遺伝子の糖代謝への影響を確認して、同定を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) コンジェニック系統群を用いた糖尿病責任遺伝子の存在領域の絞込み

##### (1)-1 T2DM におけるインスリン分泌不全を規定する責任遺伝子の存在領域の絞込み

各コンジェニック系統においてインスリン分泌能試験を行い、その試験で測定したグルコース投与による血糖値の増加に対する血中インスリン濃度の上昇の比 (Insulinogenic index) を算出した。この値は、インスリン分泌能を表すのに適しており、値が低いほど、インスリン分泌能が低い。測定した各系統の Insulinogenic index を、図 2 に示した。

この結果から、NSY マウスのインスリン分泌不全を規定する責任遺伝子は、第 11 番染色体のセントロメア ~ 25.96 Mb の領域に存在することが明らかとなった (図 3)。

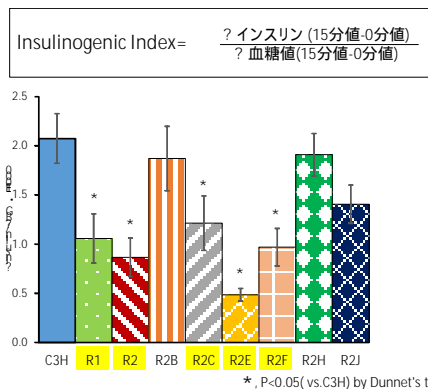


図2 C3Hマウスおよび各コンジェニック系統のインスリン分泌能

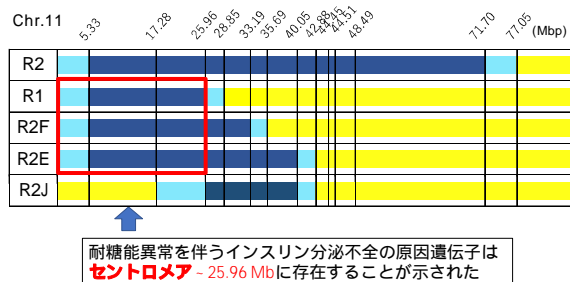


図3 インスリン分泌不全の責任遺伝子の存在領域

##### (1)-2 T2DM におけるインスリン抵抗性を規定する責任遺伝子の存在領域の絞込み

各コンジェニック系統においてインスリン負荷試験を行い、その試験結果のグラフの曲線下面積 (AUC) を図 4 に示す。この値が大きい程、インスリン抵抗性が強い。

この結果から、NSY マウスのインスリン抵抗性を規定する責任遺伝子は、第 11 番染色体の 44.45 ~ 48.49 Mb の領域に存在することが明らかとなった (図 5)。

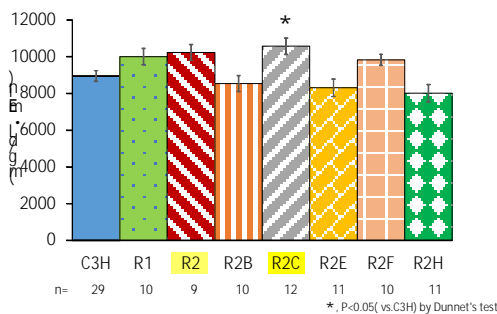


図4 インスリン負荷試験における曲線下面積

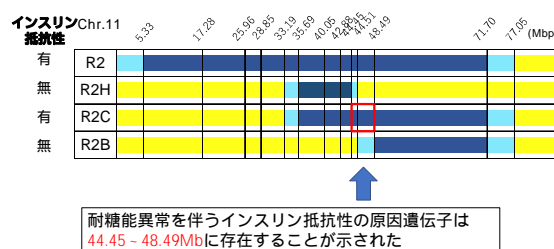


図5 インスリン抵抗性の責任遺伝子の存在領域

##### (1)-3 T1DM の責任遺伝子の存在領域の絞込み

STZ 誘発性 T1DM の各コンジェニック系統の各系統の感受性を調べたところ、R2B 系統が糖尿病感受性であり、第 11 番染色体の 48.49 ~ 71.70 Mb 領域に責任遺伝子が存在することが明らかとなった。

##### (2) T2DM におけるインスリン分泌不全を規定する責任遺伝子の候補遺伝子の選抜

第 11 番染色体のセントロメア ~ 25.96 Mb の領域には 338 個の遺伝子が存在するが、NSY と C3H マウス間でエクソン領域にアミノ酸置換を伴う変異を有する遺伝子の中には、インスリン分泌に関与すると推定されるものは見出せなかった。そこで、この変異のない遺伝子の中で、インスリン分泌への関与が推定される遺伝子を候補遺伝子として以下の 6 個の遺伝子を選抜した (表 1)。

##### (3) T2DM におけるインスリン抵抗性を規定する責任遺伝子の候補遺伝子の選抜

第 11 番染色体の 48.49 ~ 71.70 Mb 領域には 51 個の遺伝子が存在するが、NSY と C3H マウス間でエクソン領域にアミノ酸置換を伴う変異を有する遺伝子の中には、インスリン抵抗性やインスリン感受性に関与することが推定されるものは見出されなかった。そこで、上記の変異のない遺伝子の中で、インスリン抵抗性への関与が推定される遺伝子を候補遺伝子として以下の 2 個の遺伝子を選抜した (表 2)。

表1 インスリン分泌不全の責任遺伝子の候補遺伝子

<u>Gal3st1</u> ( Galactose-3-O-sulfotransferase 1 )	Rガラクトシルセラミドからスルファチドを生成する。
<u>Tbc1d10a</u> ( TBC1 domain family, member 10a)	インスリン放出における顆粒膜のエンドサイトーシスとエキソサイトーシスを切り替える。
<u>Nf2</u> ( Neurofibromin 2 )	メルリントンパク質をコードしており細胞接着に関与している。
<u>Ewsr1</u> ( Ewing sarcoma breakpoint region 1 )	胸腺におけるインスリンの発現の調節を行う。
<u>Gck</u> ( Glucokinase )	ATP産生経路である解糖系の律速酵素。最もよく知られる糖尿病遺伝子の1つ。
<u>Ogdh</u> ( Oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase )	ミトコンドリア内のクエン酸回路の一端を担う代謝酵素。

表2 インスリン抵抗性の責任遺伝子の候補遺伝子

<u>Adam19</u> (A disintegrin and metalloproteinase)	TNF- $\alpha$ を活性化するAdam28やAdam17を含むAdamファミリーの一つ。ADAM19抗体は肥満マウスにおける肥満やインスリン抵抗性を改善し、TNF- $\alpha$ の量を減少させる。
<u>Ebf-1</u> (Early B cell factor 1)	EBFタンパク質はDNAと結合することで転写活性を調節する。3T3L-1細胞においてEbf-1をノックアウトすると、グルコース取り込み量が増加し、インスリン受容シグナルが改善する。

(4)インスリン分泌不全を示すコンジェニック系統と C3H 系統から分離した腓ラ氏島を用いた網羅的遺伝子発現解析による糖尿病遺伝子の候補遺伝子の探索

インスリン分泌不全を示す R2E 系統と、対照系統の C3H マウスから腓ラ氏島をコラゲナーゼ灌流法により単離する実験法を確立しようと1年半以上の期間をかけて行ってきた。その結果、予期していなかったことに、信頼できるインスリン分泌能測定結果を得るまでに至らなかった。やっと現在、信頼できる結果が出つつあるのが現状である。

(5)T1DM の責任遺伝子の存在領域の決定および候補遺伝子の選抜と、その同定の試み

第 11 番染色体の 48.49 ~ 71.70 Mb 領域に存在する遺伝子の中で、C3H マウスに対して NSY マウスにおいてエクソン領域でアミノ酸置換を起こす変異を有する遺伝子で腓ラ氏島 細胞の脆弱性に関与する遺伝子として Rad50 を選抜した。この遺伝子を T1DM 責任遺伝子として同定するために、R2B1 コンジェニック系統 ( R2B からさらに分断した断片を持つコンジェニック系統 ) に C3H マウス型の Rad50 遺伝子を導入した遺伝子改変マウス ( Rad50-KI マウス ) を作製し、このマウスでは T1DM 形質が改善されるかを検討した。STZ 誘発性 T1DM による高血糖の推移を図 6 に示した。結果として、Rad50 のアミノ酸多型は STZ 感受性に効果は持っていると考えられるが、この効果は C3H までの回復をもたらすものではなく、48.49 ~ 71.70 Mb 領域には Rad50 以外の感受性遺伝子も存在すると考えられた。

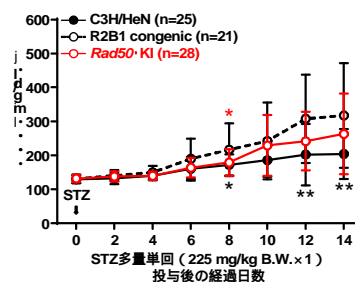


図6 STZ投与後の血糖値上昇  
C3H/HeN:対照系統  
R2B1 congenic:STZ感受性コンジェニック系統  
Rad50-KI:R2B1にC3HのRad50遺伝子を導入した系統

(6) 総括

本研究では、NSY マウスの第 11 番染色体の T2DM 責任遺伝子としてインスリン分泌不全を規定するものがセントロメア ~ 25.96 Mb 領域に、インスリン抵抗性を規定するものが 44.45 ~ 48.49 Mb 領域に存在することを明確にできた。そして、T1DM 責任遺伝子が 48.49 ~ 71.70 Mb 領域に存在することを明らかにした。本研究の主要な課題である、T1DM と T2DM に共通した腓ラ氏島 細胞の脆弱性を規定する遺伝子の同定については、インスリン分泌不全と T1DM 感受性遺伝子の存在領域が分離していることが明らかとなったことから、両糖尿病に共通した責任遺伝子の存在の証明とはならなかった。しかしながら、NSY マウスの第 11 番染色体上の 3 つの異なるタイプの糖尿病責任遺伝子の遺伝学的解剖と存在の証明に成功することができた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Suzuki, M., Kobayashi, M., Ohno, T., Kanamori, S., Tateishi, S., Murai, A. and Horio, F.: Genetic dissection of the fatty liver QTL F11sa by using congenic mice and identification of candidate genes in the liver and epididymal fat. BMC Genet., 17,145(2016) ( 査読有 )
2. Kobayashi, M., Suzuki, M., Ohno, T., Tsuzuki, K., Taguchi, C., Tateishi, S., Kawada, T., Kim, Y., Murai, A. and Horio, F.: Detection of differentially expressed candidate genes for a fatty liver QTL on mouse chromosome 12. BMC Genet., 17,73(2016) ( 査読有 )

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 長田裕太郎、小林美里、田中沙良、大野民生、村井篤嗣、堀尾文彦  
NSY マウスの2型糖尿病遺伝子座(Nidd1nsy)のコンジェニックマウスを用いた解析  
日本農芸化学会 2019 年度大会(東京)2019.3.27
2. 長田裕太郎、小林美里、大野民生、村井篤嗣、堀尾文彦  
NSY マウスの2型糖尿病遺伝子座(Nidd1nsy)の作用と存在領域の解析  
第72回日本栄養・食糧学会大会(岡山)2018.5.12

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~anutr/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：大野民生

ローマ字氏名：Ohno Tamio

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：90293620

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：小林美里

ローマ字氏名：Kobayashi Misato

研究協力者氏名：村井篤嗣

ローマ字氏名：Murai Atsushi

研究協力者氏名：池上博司

ローマ字氏名：Ikegami Hiroshi

研究協力者氏名：森 仁志

ローマ字氏名：Mori Hitoshi