

機関番号	34304
研究種目	基盤研究 (B)
研究期間	2008~2010
課題番号	20300145
研究課題名 (和文)	ヒト肥満による 2 型糖尿病発症機構解明のための研究用ラットリソース開発
研究課題名 (英文)	Development of rat resources for human models of type 2 diabetes accompanied with obesity.
研究代表者	
	松本 耕三 (MATSUMOTO KOZO)
	京都産業大学・総合生命科学部・教授
	研究者番号 : 00002246

研究成果の概要 (和文) :

肥満性 2 型糖尿病ラット OLETF の糖尿病原因遺伝子座 14 座の中から、Nidd4, Nidd6 遺伝子座を導入したコンジェニック系統を作製し、その特性解析を行った。2 系統ともにコントロールラットである F344 ラットに対し、有意に体重、腹腔脂肪量が増加した。さらに、空腹時血糖値が有意に高かった。このことは Nidd4, Nidd6 遺伝子座の中に、明らかに糖尿病原因遺伝子、なかでも肥満に伴い空腹時血糖値に影響を与える遺伝子の存在を明らかとした。

研究成果の概要 (英文) :

We developed a single congenic rat introgressed Nidd4 or Nidd6 locus responsible for the onset of diabetes in obese type 2 diabetes rat, OLETF. We chose F344 rat as the background strain. We found that both single congenic strains showed significantly higher body weight, abdominal fat volume and fasting glucose, respectively. From these results, we conclude that a diabetes gene(s) accompanied with obesity exists in the region for Nidd4 and Nidd6 loci.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2009 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野 : 実験動物遺伝学

科研費の分科・細目 : 実験動物学・実験動物学

キーワード : 肥満、糖尿病、ラット、モデル動物開発

1. 研究開始当初の背景

これまで多くの 2 型糖尿病モデル動物が提案されたが、人と同じような肥満に伴い 2 型糖尿病を発症するモデル動物はほとんどなく、OLETF ラットがその目的にかなう数少ないモデル動物であった。しかし OLETF の個体そのものの利用では肥満と 10 を超える

2 型糖尿病原因遺伝子座が混在した状態にあり、肥満と原因遺伝子との関係を明らかとすることは事実上不可能であった。そのため個々の 2 型糖尿病原因遺伝子座を非肥満ラット、F344 に導入した糖尿病遺伝子座導入コンジェニック系統、14 系統を作成³⁾、同じく肥満遺伝子(*Lepr*)を F344 に導入した肥満コ

ンジェニック系統も作成した。それらを組み合わせ合わせた肥満性ダブルコンジェニックラットを利用することにより、個々の2型糖尿病遺伝子の肥満状態における解析が初めて可能となるからである。

2. 研究の目的

過去10年で2型糖尿病患者は激増し、今後とも増大すると予想されている。しかもそれは世界レベルの現象であり、その大きな要因として肥満の増大が考えられている。事実、糖尿病の8割近くは肥満に伴い発症している。従って2型糖尿病の原因解明には肥満との関連を考慮せざるを得ない。そのような研究には優れたモデル動物が必須であるが、ヒト肥満性2型糖尿病解明のためのより実際的な実験モデルは見あたらない。その点に鑑み、本研究はヒト肥満と2型糖尿病との密接な関連を研究するためのより優れたモデル動物の開発を目的とする。

その目的のため、本研究では最近のヒト肥満性2型糖尿病遺伝子の Association Study において2型糖尿病原因遺伝子として強く支持された遺伝子を取り上げ、その遺伝子に対応するラットホモロジー遺伝子を含む糖尿病遺伝子座導入コンジェニック系統と肥満系統を組み合わせ合わせた新たなダブルコンジェニックラットを「肥満による2型糖尿病発症機構の研究リソース」として開発し、なぜ肥満により2型糖尿病発症が誘引されるかの病因解明の基礎的研究、さらには治療と予防研究のための実際的なより優れたヒト疾患モデルとしての、研究ラットリソースの確立を計る。また多くの研究者が利用しやすいよう、開発された系統はラットバイオリソースへ寄託される。

3. 研究の方法

(1) 一つ目は「肥満に伴う2型糖尿病発症機構解明のためのラットリソースの開発」に関して：手法的には交配によるものである。しかし *Lepr* 肥満遺伝子をもつコンジェニック系統はホモでは維持が出来ないことから、ヘテロでの交配となり、生まれた子供の遺伝子スクリーニングを行いつつ、選抜していくこととなる。そのヘテロ動物と OLETF ラット由来の糖尿病遺伝子を個々に持つ Nidd4 あるいは Nidd6 糖尿病遺伝子座コンジェニック系統のホモ個体を交配して二重のヘテロ個体を作成し、それらを再度交配することにより、ダブルコンジェニックラットを得る。具体的には、OLETF 2型糖尿病関連遺伝子座を F344 系統ラットの挿入した F344. OLETF-(D11Mgh4-D11Mgh1)Tj、および F344. OLETF-(D1Rat166-D1Rat90)/Tj、と肥満遺伝子座導入ラット F344-Z-leprfa/Tj を交配しマイクロサテライトマーカーによる選

抜を行いダブルコンジェニックラットを開発する。

(2) シングルコンジェニックの高カロリー食の影響：F344. OLETF-(D11Mgh4-D11Mgh1)Tj、および F344. OLETF-(D1Rat166-D1Rat90)/Tj に通常食または高脂肪食を給餌し生後25週に CT スキャンによる体脂肪量測定および経口糖負荷試験を行う。

(3) ダブルコンジェニック系統の特性解析：ダブルコンジェニック、肥満と Nidd それぞれのシングルコンジェニック、基準系統の4系統に関し、糖尿病の各種表現型の経時的变化を測定・解析していく。

(4) 同時に、今回ターゲットとしている *IGF2BP2* と *TCF7L2* 遺伝子の発現状態を経時的にリアルタイム PCR により定量的に測定することにより、両遺伝子の糖尿病原性を評価する。即ち、ヒト2型糖尿病原因遺伝子として高い確度で示唆された *IGF2BP2* と *TCF7L2* 遺伝子の、OLETF ラットにおける exon 領域シーケンスを決定し、他の系統との比較において、どの領域が異なるのかを探索し、シーケンスのどの部分が糖尿病に関係するかを検討する。

(5) ショウジョウバエを用いた糖尿病候補遺伝子の機能解析 1) 発現解析 *imp*(*igf2bp2* ホモログ)の protein trap 系統を取り寄せ、GFP(レポーター遺伝子)の発現を解析 2) RNAi ノックダウン法を用いた *imp* 遺伝子の機能低下型系統の作製 Gal4/UAS システムを用いて、*imp* 遺伝子ターゲット RNA を中枢神経特異的に発現する系統を作製し検討を加えた。

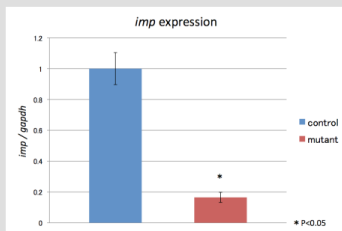
4. 研究成果

(1) OLETF ラット糖尿病候補遺伝子 exon polymorphysim 解析 *tcf7l2* 及び *igf2bp2* 遺伝子の exon 領域、それぞれ 1377bp, 1542bp の配列を正常型系統 F344 と OLETF ラットで比較した。*tcf7l2* 遺伝子については多型は見いだされなかった。*igf2bp2* 遺伝子については、exon4 と exon8 でそれぞれ1カ所の1塩基置換多型を同定した。しかしながら、どちらの変位もアミノ酸置換を伴わないサイレント変位であった。一部、イントロン領域の配列を比較したが、その領域内においては多型は同定されなかった。従って、調べた範囲内における両系統間におけるシーケンスの大きな違いは認められないという、結果に終わった。しかし、それら遺伝子の調節領域、あるいは unknown な intoron 領域の調査

は済んでいない。実際、ヒト糖尿病原因遺伝子では intron 領域に糖尿病に関わるシーケンスがあると云う報告があることから、その点を鑑みて、まだシーケンスされていないそれら遺伝子の他の領域についての詳細な検討は今後必要と思われる。

(2) ショウジョウバエを用いた糖尿病候補医で因子の機能解析 igf2bp2 ホモログの

図1 *imp*遺伝子knockdown系統における*imp*発現量

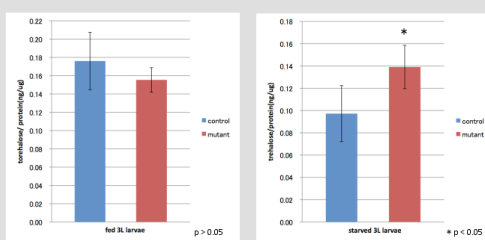


C155系統を Controlとし、ハウスキーピング遺伝子である*gap*を Referenceとして、今回作成した*imp* knockdown mutantにおける*imp*の発現量を、qPCRを用いて検証した。Controlと比較して、*imp* knockdown mutantでは、*imp*の発現量が1/5以下に低下していた。

imp 遺伝子は3齢幼虫の中樞神経の一部の神経細胞で発現していることを確認した。そこで、中樞神経でのみ *imp* の発現を抑制する系統を作製した。定量 PCR 法を用いた解析の結果、*imp* 遺伝子の発現が有意に低下していることを確認した (図1)。

この系統の体液中糖濃度を定量化した。その結果、摂食時は有意な差が見られなかったが、空腹時は糖濃度の有意な上昇が観察された(図2)。この結果は、*imp* が糖代謝に関与していることを示唆している。興味深いことに、この遺伝子がマップされている Nidd4/of 遺伝子座は、我々の QTL 解析において、空腹

図2 *imp*遺伝子knockdown系統における糖代謝

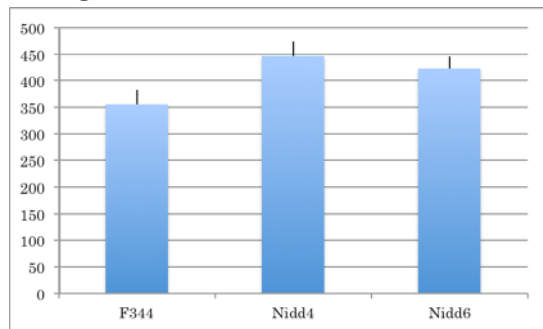


3齢幼虫の体液中糖濃度、すなわちトレハロース量を測定した。餌を十分に与えたとき、対照群と比較して有意な差は見られなかったが、7時間絶食させたときは有意差がみられた。

時血糖に関与することが示唆されている。今後、OLETF ラットにおける *imp* 遺伝子の発現を検証すべきであると考えられる。

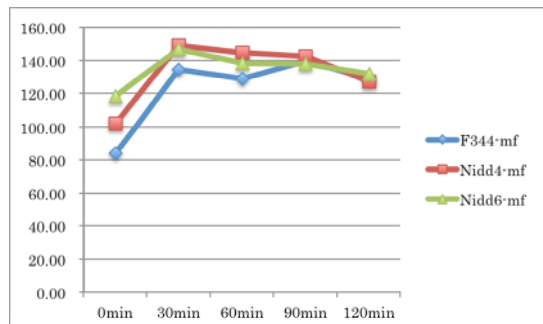
(3) Nidd4 糖尿病遺伝子座導入シングルコンジェニック系統と Nidd6 糖尿病遺伝子座導入コントロールラット F344 における体重の相違：下図に示したように、25 週齢にお

る Nidd4 シングルコンジェニックラット、Nidd6 シングルコンジェニックラットの通常食における体重は 447 ± 27.6 g、 423 ± 23.5 g であった。それらに対しコントロール



ラットである F344 ラットは 355 ± 26.5 g であった。Nidd2 及び Nidd6 糖尿病遺伝子座を個別に導入されたシングルコンジェニック系統はそのコントロールラットより、約 100 g も体重が重かった。その差異は統計的に有意差があった。この事実は Nidd4、Nidd6 遺伝子座の領域内に体重増加をもたらす遺伝子が存在することを示している。

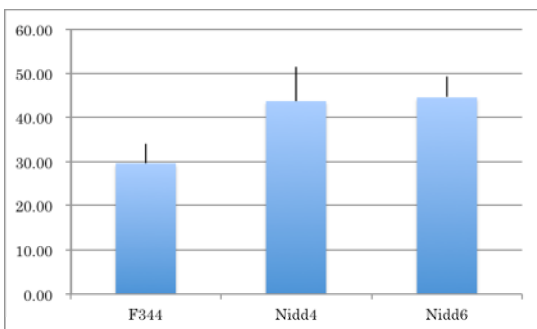
一方、血糖値を測定するとそれら 2 系統の糖尿病シングルコンジェニック系統は F344 コントロールラットに比して OGTT 地で 0 分、30 分、90 分値で高い値を示した。特に 0 分



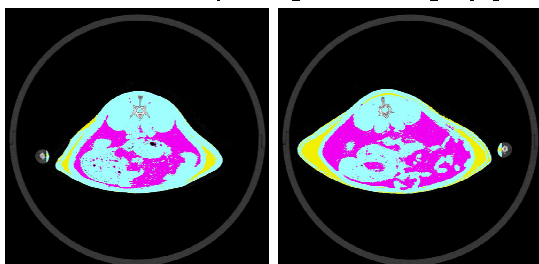
値、即ち空腹時血糖値が明瞭に高い点が興味深い。Nidd4 遺伝子座はもともと空腹時血糖値に対する遺伝子座として決定された経緯があるので、それをシングルコンジェニックにおいて証明したことになる。また、Nidd6 は OGTT、30 分後の血糖値に対する遺伝子座であるが、今回もそれを示したが、さらに空腹時血糖値に対しても有意な影響を示したことは興味深い。

(4) 肥満因子としての腹腔脂肪量：

X線CTによる非侵襲的方法にて Nidd2、Nidd4 シングルコンジェニック並びに F344 コントロールラットの腹腔脂肪量を測定した。図に示したとおり、腹腔脂肪量は Nidd4、Nidd6 両シングルコンジェニック系統は F344 ラットに比してほぼ 1.5 倍と高く、統計的にも有意差があった。



F344.OLETF-(D11Mgh4-D11Mgh1)Tj

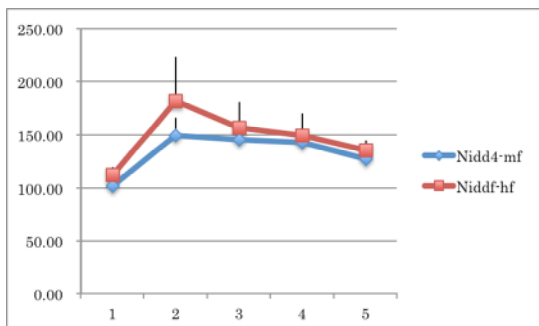


通常食給餌群

高脂肪食給餌群

(5) 通常食と高カロリー食：

肥満に強く関わっているのは食事であり、従って高カロリー食による実験は必須である。今回はNidd4 シングルコンジュニック系統について調査を行った。高カロリー食により体重は高めではあるが、有意差はなかった。一方、腹腔脂肪量は有意に高カロリー食で高



く現れた。その腹腔のCT スキャン図を示す。血糖値に関しては有意差はなかったが、OGTTの全ポイントにおいて高い値を示した。

以上のように、これまでの結果から、Nidd4, Nidd6 糖尿病遺伝子座は、ヒトの糖尿病原因遺伝子と考えられている *tcf7l2* 及び *igf2bp2* 遺伝子の exon 部分のシーケンスに関しては関連がなかったが、intron 部分に関してはまだ可能性が残っている。実際、Nidd4, Nidd6 シングルコンジュニックの特性は腹腔脂肪の増大、空腹時血糖値の有意な上昇を示しており、明らかに糖尿病に関わる遺伝子が存在していることを示しているからである。現在、Nidd4, Nidd6 に肥満遺伝子を導入したダブルコンジュニックを育成中であり、それらを解

析することにより、肥満に伴う2型糖尿病の原因遺伝子探索はより確かなものとなると考えている。

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5件)

①福村智恵、小瀬博之、竹田知世、栗田裕子、落合和彦、山田宣永、松本耕三、Genetic interaction between hyperglycemic QTLs is manifested by high calorie diet in the OLETF derived congenic rat Experimental Animals、査読有、60(2)、2011、p125-132

②小瀬博之、佐渡義一、山田宣永、松本耕三、Genetic Mapping Found Major QTLs for Antibody Induced Glomerulonephritis in WKY rats Exemental Animals、査読有、59(2)、2009、p193-198

③小瀬博之、山田宣永、松本耕三、An OLETF allele of hyperglycemic QTL Nidd3/of is dominant. Exp. Animals、査読有、57、135-138、2008

[学会発表] (計5件)

①小瀬博之、岡部正隆、松本耕三、広海健、A transcription factor Samuel is involved in the regulation of germ cell proliferation in spermatogenesis 52nd Drosophila Research Conference、2011年3月、サンディエゴ(アメリカ)

②小瀬博之、落合和彦、山田宣永、松本耕三、多因子性疾患遺伝解析における「2次疾患モデル動物」としてのショウジョウバエの可能性、第57回日本実験動物学会、2010年5月、京都市

③小瀬博之、高木互、高田梨佳、岡部正隆、松本耕三、広海健、転写因子 Svp による精原細胞増殖・分化プログラム切り替え機構の可能性、第62回日本動物学会関東支部大会、2010年3月、つくば市

[その他]

ホームページ等

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~koko/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 耕三 (MATSUMOTO KOZO)
京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号：00002246

(2) 研究分担者

小瀬 博之 (HIROYUKI KOSE)
国際基督教大学・教養学部・准教授
研究者番号：90314856
落合 和彦 (KAZUHIKO OCHIAI)
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号：30550488