

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860294

研究課題名(和文)食餌性肥満ゼブラフィッシュを用いた糖代謝異常ゲノムメカニズムの解明研究

研究課題名(英文) Transcriptome analysis of glucose metabolism disorder using a zebrafish diet-induced obesity model

研究代表者

臧 黎清 (Zang, Liqing)

三重大学・医学部・技術員

研究者番号：10437105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖代謝異常とは、糖尿病または糖尿病にはなっていないが血糖が高めである状態である。その原因はインスリン作用の不足によるものだが、その詳細な発症までのゲノムメカニズムはまだ明らかになっていない。本研究では、食餌性肥満ゼブラフィッシュの肝臓における遺伝子発現が次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した。パイオインフォマティクス解析によりヒト糖尿病と共通するパスウェイを確立し、さらに複数の新規治療標的遺伝子候補の抽出に成功した。また、遺伝子発現抑制実験や糖尿病治療薬の投与により、ゼブラフィッシュがヒトの糖代謝異常症モデルに十分なりうることを証明した。

研究成果の概要(英文)：Glucose metabolism disorders, such as diabetes mellitus, are pathological conditions in which the blood glucose cannot be maintained within the normal range. The pathogenesis of these conditions are either relatively low insulin production or insulin resistance or both, but there are little understanding of the mechanisms at present. In this study, we performed comparative transcriptome analysis of liver and pancreas tissue from diet-induced obese zebrafish using next-generation sequencer. Bioinformatics analysis revealed that obese zebrafish and human share common pathophysiological pathways related to glucose metabolism, and several new treatment target gene candidates were identified. In addition, we demonstrated that this diet-induced obesity model is utility as an animal model for human glucose metabolism disorders by gene knockdown experiments and diabetes therapeutic drugs treatment.

研究分野：医学

キーワード：糖代謝異常 ゼブラフィッシュ 肥満モデル 遺伝子発現抑制 インスリン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、日本人は食事の西洋化、都市生活による若年からの運動不足などが原因で、肥満を伴うインスリン分泌低下と感受性低下(インスリン抵抗性)を主原因とした糖代謝異常、いわゆる糖尿病とその予備軍が急増し、迅速に対策を取る必要のある社会問題となっている。糖尿病はある意味不可逆な病態であり、基本的に治癒することはないが、発症早期から状態を改善すると健康人並の健康寿命を保つことが可能となっている。すなわち、糖尿病患者数を減らすためには予防、とくに糖代謝異常を早く検知し、治療を開始すべきである。初期の糖代謝異常は運動・食事療法で治すことができるが、ストレスの多い人や忙しい勤労者にとっては機能性食品・薬剤という治療法の選択肢も必要になる。2009年には2型糖尿病の予備軍である「境界型糖尿病」から2型糖尿病になるのを防ぐ治療法として、糖の吸収を抑える薬剤が保険での使用が初めて認められたため、今後は従来の食事運動指導に加えて、薬物による糖尿病予防も積極的に行うことが可能となっている。

これまで糖代謝異常を研究するためのモデル動物はげっ歯類(マウス・ラット)が中心だったが、ほとんどが完成した糖尿病モデルであり、初期の糖代謝異常を反映しているとは考えにくい現状がある。そこで我々はゼブラフィッシュを用いて、糖代謝異常モデルの開発を考案した。

21世紀に入り、小型魚類ゼブラフィッシュのヒト疾患モデル動物としての利用が増加している。ゼブラフィッシュは体長約3-4cmの小型脊椎魚類であり、1970年代より、動物個体発生におけるモデル動物として研究されてきた。ゼブラフィッシュは哺乳類動物が持つ臓器のほとんどを保有し、その組織学的類似性も非常に高い(Goldsmith 2004)。また、ゲノム間の相同性・類似性を評価するシンテニーはヒト-ゼブラフィッシュ間で70~80%であり、生命活動に重要な、細胞内シグナル伝達・細胞増殖・がん化に関する遺伝子・タンパク質に関しては特に高度に保存されている。ゲノムレベルでのヒトとの類似性も証明されつつある。これらの研究報告を受け、2003年以降、医学研究分野において、ゼブラフィッシュは、マウス・ラットに続く第3のモデル動物としての地位を固めつつある。すでに2010年、膵臓ベータ細胞を選択的に破壊による糖尿病モデルが報告されている(Olsen, Sarras et al. 2010)。研究代表者は、既に食餌性肥満ゼブラフィッシュモデルの開発に成功し、哺乳類動物で見られる一般的な病態生理学パスウェイと高度に類似していることも明らかにした(Oka, Nishimura et al. 2010.)。さらに、その応用として、種々の機能性食品の抗肥満作用の評価およびそのメカニズムを明らかにしてきた(Tainaka, Shimada et al. 2011; Hasumura, Shimada et al. 2012)。

研究代表者はこの食餌性肥満ゼブラフィッシュモデルの空腹血糖値が正常群より有意に上昇している表現型に注目した。肥満の進行に伴い、肥満ゼブラフィッシュの空腹血糖値の変動を調べた結果、体重の増加と共に、肥満群(Diet-induced obesity, DIO)の空腹血糖値が肥満誘導1週目から増加し、高い血糖値においては実験終了時まで維持された。これらの結果を総合的に勘案し、過食による肥満形成に伴い、軽度の耐糖能異常が誘発されると結論づけた。

## 2. 研究の目的

糖代謝異常とは、糖尿病または糖尿病にはなっていないが血糖が高めである状態である。糖代謝異常である糖尿病とその「予備軍」を合わせて急増している。その発症メカニズムがインスリン作用の不足によるもので、1型・2型糖尿病とともにその上流には発症要因として遺伝因子と環境因子が存在するが、多くについては特定の遺伝子異常はまだ証明されていない。また、2型糖尿病は肥満が要因となる環境因子に大きく影響される事が知られている。本研究は、過食による肥満ゼブラフィッシュモデルを用いて糖代謝異常に関するゲノムメカニズムを網羅的に解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 食餌性肥満ゼブラフィッシュの作製と空腹血糖値のモニタリング

AB系統のゼブラフィッシュを循環システムに入れ、27-28度の水温に飼育した(Westerfield, 2007)。健全な水環境を維持するため、水温、PH、アンモニア、硝酸塩、硬など、システムの水の品質を表す重要な要素を定期的に監視し、良好な水質を確保した。本研究では、3か月齢のオスの健康個体を使用した。

ゼブラフィッシュを肥満群(DIO; 餌は1日5回)と正常群(non-DIO; 餌は1日1回)に分け、定期的に各グループの体長、体重、BMI、空腹血糖値(グルテスタ Neo スーパー, 三和化学研究所)、中性脂肪(TG L-type Kit, 和光純薬社)を測定した。実験期間は8週間とした。なお、血糖値と中性脂肪の測定にはゼブラフィッシュから血液を採取する必要があり、同じ個体から連続採血する方法については成果論文1と5に記載した。実験終了時、ゼブラフィッシュを氷水に入れ安楽死させ、マイクロCTスキャン(R\_mCR, リガク社)を行った。i-View type R ソフトウェア(モリタ製作所)を用いて3Dイメージを再構築し、CT Atlas Metabolic Analysis Ver. 2.03 ソフトウェア(リガク社)を用いて内臓脂肪体積を測定した。その詳細な方法については成果論文2に記載した。

(2) 次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子配列取得と発現定量解析(RNA-Seq)

正常群と肥満群から3匹ずつを選択し、それぞれの肝臓組織を採取した。回収した組織はそれぞれ1 mlのIsogenに漬け、5-mm zirconia ビーズ(バイオメディカルサイエンス社)を入れ、Mixer Mill MM 300(レッチェ社)を用いてホモジナイズした。各サンプルのtotal RNAはIsogenとRNeasy mini kit(QIAGEN社)のコンビネーションにより抽出・精製した。次に、各5 µgのtotal RNAはribosomal RNA除去(Ribo-Zero Magnetic Kit, Epicentre社)を行った。Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 Pico Chip(Agilent Technologies社)でribosomal RNA除去したtotal RNAの濃度と純度を確認し、次世代シーケンサー(NGS)ライブラリー(Ion Total RNA-Seq Kit v2, Life Technologies社)を調整した。その後、Ion Protonシステム(Life Technologies社)により網羅的な遺伝子配列解析を行った。

NGSから出てきた大量のリードについて、ゼブラフィッシュリファレンスゲノム(Zv9)を参照配列として、TopHat v2.0.10ソフトウェア(Center for Computational Biology, Johns Hopkins University)を用いてマッピング処理を行い、cufflinks v2.0.2ソフトウェア(Cole Trapnell's lab, University of Washington)によりリードカウントデータが得られた。さらに、TCC法(TMM正規化+DEGES補正)を用いてリードカウントデータの正規化を行い、RのTCCパッケージによりサンプル同士の各遺伝子の発現量に差があるかを検定した。肥満群と正常群と比較し、 $P < 0.01$ を有意な発現変動を認めたものとした。

### (3) In silicoにおけるネットワーク解析

(2)で得られた発現変動遺伝子群から、Life Science Knowledge Bankデータベース(ワールドフュージョン社)を用いて、ゼブラフィッシュとヒトに共通して存在する遺伝子(オルソログ)を抽出した。これらのオルソログの発現変化量をベースに、ネットワーク解析ソフトウェア(PathwayStudio, エルゼビア社)を用いて、耐糖能異常に関連するパスウェイを予測した。さらに新規なものを含む耐糖能異常に関連する複数の遺伝子候補を抽出した。

### (4) 遺伝子操作による糖代謝に影響を及ぼす遺伝子群の同定

(3)で得られた候補遺伝子に対し、モルフォリン・アンチセンス・オリゴヌクレオチド(MO)を合成した(GeneTool社)。次に、食餌性肥満ゼブラフィッシュに対し、週2回MOの腹腔内注射を行い、遺伝子発現抑制実験を行った。投与方法は、ゼブラフィッシュを500 ppmの2-PE(和光純薬)に入れ麻醉させ、体重を測定してからMOを15 mg/kg・BWのドーズで22Sハミルトンマイクロシリンジ(ハミルトン社)を用いて腹腔内に注射した。実験期間は8週間とした。毎週身長・体重を

測定し、実験終了時に空腹血糖値、中性脂肪とトータルコレステロール(T-cho L-type Kit, 和光純薬社)を測定した。

### (5) 糖尿病治療薬による本疾患モデルゼブラフィッシュの応答性検証

食餌性肥満ゼブラフィッシュに対し、以下の条件にてヒト臨床で使用されている糖尿病治療薬メトホルミン(Metformin)、ピオグリタゾン(Pioglitazone)、グリベンクラミド(Glibenclamide)を投与した。

薬剤	体重あたり投与量 (mg/kg BW)
メトホルミン	150
ピオグリタゾン	3
グリベンクラミド	1

投与方法は、治療薬を投与する前に空腹血糖値を測定し、上記の条件にて1日1回治療薬の腹腔内注射を行うこととし、1週間後の空腹血糖値を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 食餌性肥満ゼブラフィッシュの作製と空腹血糖値のモニタリング

肥満の進行に伴い、肥満ゼブラフィッシュの空腹血糖値の変動を調べた結果、体重の増加と共に、肥満群(DIO)の空腹血糖値が肥満誘導1週目から増加し、この高い血糖値は実験終了時まで維持された(図1、図2)。

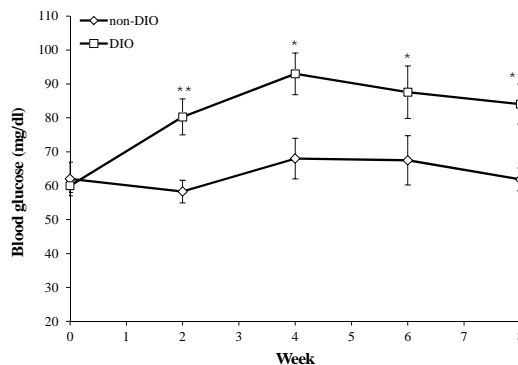


図1. 過食による体重の増加への影響

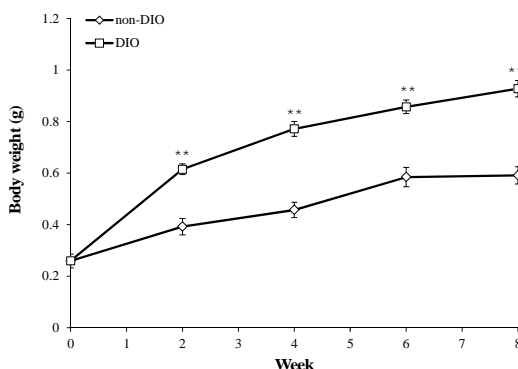


図2. 過食による空腹血糖値増加への影響

以上の結果により、過食による肥満形成に伴い、耐糖能の低下が誘発されると結論付けられた。

(2) 次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子配列取得と発現定量解析(RNA-Seq)

次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子配列取得の結果、肥満群では約 1950 万、正常群では約 1923 万のタグがカウントされ、それぞれ約 47%と 50%のマッピング率であった。さらに、発現定量解析の結果、約 340 個遺伝子の発現変化を認めた。

(3) In silico におけるネットワーク解析

上記 340 のゼブラフィッシュ遺伝子から 244 のヒトオルソログが得られた。パスウェイネットワーク解析の結果、脂質代謝や糖質代謝関連パスウェイを中心に変動していたことが明らかになった。インスリンの分泌に関連する発現変動遺伝子のネットワーク解析結果を図 3 に示す。赤色の部分は過食により発現上昇した遺伝子で、青色の部分は過食により発現減少した遺伝子である。2 型糖尿病の主要な原因遺伝子の 1 つとして同定されている TCF7L2 遺伝子(矢印)は、転写因子でありランゲルハンス島細胞に発現する遺伝子である。DIO ゼブラフィッシュの TCF7L2 遺伝子の発現量は Control の半分まで減少した。2 型糖尿病患者の膵臓の TCF7L2 の発現量が正常人に比べて減少することに関しては既に報告されており(Shu, Matveyenko et al, 2009)、我々の結果と合致していた。

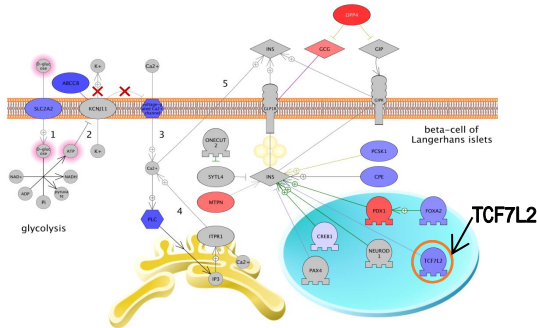


図 3. インスリン分泌に関連する発現変動遺伝子ネットワーク

(4) 遺伝子操作による糖代謝に影響を及ぼす遺伝子群の同定

ネットワーク解析で抽出した遺伝子群について、下記 6 種類の遺伝子について MO を合成した。

Gene symbol	Gene name
glua	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase) a
chrm2a	cholinergic receptor, muscarinic 2a
cry2b	cryptochrome 2b
stra13	stimulated by retinoic acid 13 homolog (mouse)
dpp4	dipeptidyl-peptidase 4
insa	preproinsulin (ins)

DIO ゼブラフィッシュに定期的な腹腔内注射を行ったところ、図 4 に示すように、インスリン遺伝子 (insa) の発現抑制による空腹時血糖値の有意な上昇を確認した。また、過剰給餌時の体重増加を抑制した(図 5)。以上

の結果は、本モデルゼブラフィッシュにおいても、ヒトと同様に、インスリンが耐糖能機能に深く関与していることを示している。

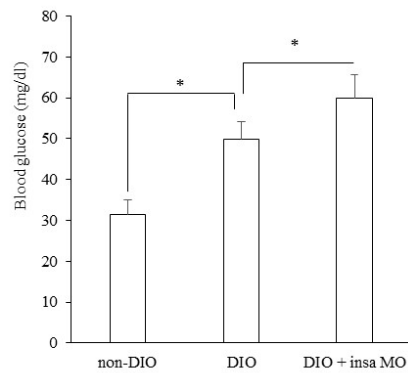


図 4. insa MO による空腹血糖値増加への影響

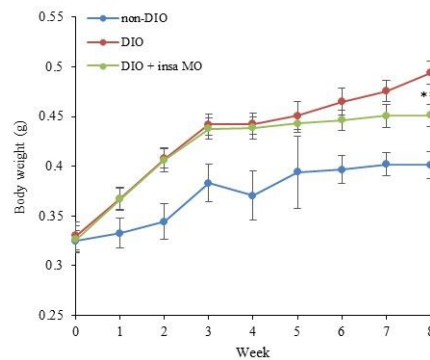


図 5. insa MO による体重の増加への影響

(5) 糖尿病治療薬による本疾患モデルゼブラフィッシュの応答性検証

ヒト臨床で使用されている糖尿病治療薬メトホルミン、ピオグリタゾン、グリベンクラミドを肥満ゼブラフィッシュに投与した結果、メトホルミンは投与前の 60 mg/dl から 44 mg/dl に、ピオグリタゾンは投与前の 60 mg/dl から 49 mg/dl に、空腹時血糖値の上昇を抑制した。以上の結果は、本肥満ゼブラフィッシュが人間の薬にも反応することを示唆した(図 6)。

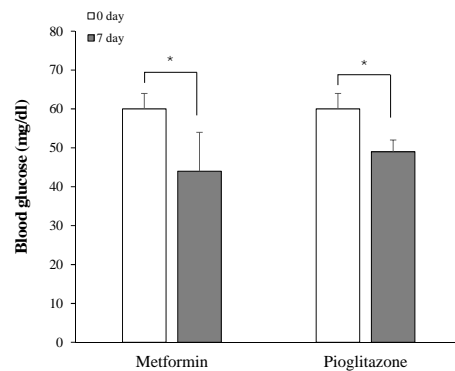


図 6. メトホルミンとピオグリタゾンによる血糖値の上昇抑制

以上の結果より、我々が確立した糖代謝異常症モデルともいえる肥満ゼブラフィッシュ

ユの病態メカニズムが、オミックスレベルでのヒトの疾患モデルに十分なりうることが示唆される。

#### 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 5 件)

1. Zang L, Shimada Y, Nishimura Y, Tanaka T, Nishimura N. Repeated blood collection for blood tests in adult zebrafish. Journal of Visualized Experiments. 査読有. 2015, In Press.
2. Zang L, Shimada Y, Kawajiri J, Tanaka T, Nishimura N. Effects of Yuzu (Citrus junos Siebold ex Tanaka) peel on the diet-induced obesity in a zebrafish model. Journal of Functional Foods. 査読有. 2014, Sep 10: 499-510.
3. Hiramitsu M, Shimada Y, Kuroyanagi J, Inoue T, Katagiri T, Zang L, Nishimura Y, Nishimura N, Tanaka T. Eriocitrin ameliorates diet-induced hepatic steatosis with activation of mitochondrial biogenesis. Scientific Reports. 査読有. 2014 Jan 15;4:3708.
4. Umemoto N, Nishimura Y, Shimada Y, Yamanaka Y, Kishi S, Ito S, Okamori K, Nakamura Y, Kuroyanagi J, Zhang Z, Zang L, Wang Z, Nishimura N, Tanaka T. Fluorescent-based methods for gene knockdown and functional cardiac imaging in zebrafish. Molecular Biotechnology. 査読有. 2013 Oct;55(2):131-142.
5. Zang L, Shimada Y, Nishimura Y, Tanaka T, Nishimura N. A novel, reliable method for repeated blood collection from aquarium fish. Zebrafish. 査読有. 2013 Sep;10(3):425-432.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：脂質の生体内沈着抑制剤、飼料および飼育方法

発明者：伊藤克、籠谷和弘、臧黎清、西村訓弘

権利者：同上

種類：特許

番号：2014-105901

出願年月日：2014年5月22日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

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

臧 黎清 (Liqing Zang)

三重大学・医学部・技術員

研究者番号：10437105

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：