

令和元年6月14日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18389

研究課題名(和文) 糖尿病メダカを用いたアジア人型糖尿病発症機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of an Asian type II diabetes mellitus using leptin receptor-deficient medaka

研究代表者

菅田 慎一 (Chisada, Shinichi)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：90639791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究は、過剰な肥満ではなく、成育過程における過食時期が及ぼす血糖制御機構の解明を目的とし、肥満を伴わないアジア人型糖尿病の原因解明を目指した。過食時期としては、若齢期が重要であり、若齢期から過食を継続すると血糖値異常になるが、成魚期に初めて過食を開始した場合、血糖値異常を引き起こさないことを明らかにした。また、既存のモデル生物より早く網膜症、白内障を示し、また外科的手術や薬剤処理をせずに腎症とAtubular glomeruliを示す新たなモデル生物を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満は糖尿病のリスクである。しかし、本研究では、肥満になる時期にも注目する必要があることを明らかにしたことに社会的意義がある。メダカもヒトと同じような血糖値制御機構をもち、若年期に食べ過ぎるとその後成魚期に糖尿病になるが、若年期に食べ過ぎず、成魚期に初めて食べ過ぎる期間を設けた場合、そのメダカは糖尿病にならない。また、本研究の糖尿病メダカは、既存のモデル生物より早く網膜症等を示す、実験を遂行する上で有益なモデルであり、さらに外科的手術や薬剤処理をせずに、摂餌量の制御だけで腎症等を示す、ヒトへの外挿性を考慮するうえで有益なモデルであることを明らかにしたことに学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Our research using leptin receptor-deficient medaka would contribute to understanding the cause of Asian type 2 diabetes without obesity. The adult mutant did not become obesity and but showed signs of diabetes, such as fasting hyperglycemia and impaired insulin secretion, which was a late-onset disorder caused by excessive feeding at the post-juvenile stage. The mutant also showed histopathological characteristics similar to those in ocular and renal lesions of human and rodent models of diabetic retinopathy and nephropathy. Leptin receptor-deficient medaka would be an animal model for understanding type 2 diabetes without obesity and ocular/renal pathogenetic mechanisms.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：メダカ ヒト疾患モデル 糖尿病網膜症 糖尿病性腎症 糖尿病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在の糖尿病患者数は、全世界で3億5千万を超え、2030年には倍増するとみられ特に東アジアの国々では、直近20年で5-10倍の患者数増加が報告された。これは、生活様式の変化と食の欧米化が原因とされている。2型糖尿病は人種、生活様式、そして遺伝的な要因が複雑に関与する疾患である。例えばコーカサス系人種では、肥満による重度のインスリン抵抗性が起因となり、代償インスリン分泌、膵臓細胞の疲弊、インスリン分泌不全、そして高血糖になる。ゲノムワイド関連解析(GWAS)では53のコーカサス系人種型2型糖尿病感受性遺伝子が同定された。一方、アジア人は、肥満と重度のインスリン抵抗性を伴わないインスリン分泌不全を示す。GWASによりアジア人特有の2型糖尿病感受性遺伝子が報告され、最も相関の強かったKCNQ1遺伝子のノックアウトマウスが作製され、KCNQ1遺伝子のグルコース代謝への関与は示唆されたが、2型糖尿病発症への関与は不明であった。現在までに、アジア人型2型糖尿病のメカニズムは解明されていない。

(2) レプチン(Lep)は脂肪細胞から分泌され、視床下部で発現するレプチン受容体に作用し、食欲抑制、糖代謝、そしてエネルギー消費等を制御し、体のエネルギー恒常性を維持する。LepRK0マウスは過食・肥満の結果、コーカサス系人種型2型糖尿病様症状を示す。一方、LepRK0ラットは一時的な高血糖を示すが、ヒト糖尿病症状に一致する点は少ない。LepK0マウスはインスリン抵抗性を示すが、インスリン分泌不全にならない。従って、主にLepRK0マウスが2型糖尿病モデルとして利用されている。

(3) 申請者は、LepRK0メダカに肥満を伴わない糖尿病様症状を見出した。LepRK0メダカは、コーカサス系人種型糖尿病及びモデルマウスとは異なり、肥満に関係なく空腹時高血糖を示し(内臓脂肪と血糖値の相関係数 $R=0.01741$)、軽微なインスリン抵抗性を示す。膵臓細胞にはインスリン産生細胞が検出され、血糖異常がインスリン分泌誘導剤により回復可能なことから、LepRK0メダカは自らインスリンを産生しているが、インスリン分泌不全により高血糖を示したと推測された。脂肪蓄積に関して、メダカ、ゼブラフィッシュ、そしてフグ等は、齧歯類、及びマグロやサケ等と異なり、皮下や筋節間に脂肪が蓄積しにくい。申請者は、その生理的特徴が影響して、LepRK0メダカが肥満を伴わない糖尿病様症状を示したと考え、LepRK0メダカの糖尿病様症状の原因解明が、アジア人型糖尿病の特徴である肥満を起因としないインスリン分泌不全の原因解明につながると考えた。

2. 研究の目的

LepRK0メダカの表現型に、肥満を伴わない2型糖尿病様症状を見出した。マウスやラットと異なり脂肪を蓄積しにくいメダカを利用した本研究では、肥満を伴わない糖尿病の原因解明を行い、また、合併症の探索を行い、2型糖尿病と合併症を示す新たなモデル生物の確立を目指す。

3. 研究の方法

本申請研究の目的を達成するには、LepRK0メダカの成長過程における(1)血糖値、(2)血中インスリン濃度、(3)血糖調節組織における遺伝子発現、(4)合併症の探索と解析が必要である。申請前時点で(1)と(4)の一部を終了した。次に、蛍光免疫法を用いてLepRK0メダカ成魚の血中インスリン濃度、及びインスリン分泌動態を明らかにする。また、摂餌量、代謝量に影響を受け、肥満によらないインスリン分泌不全に関与するマーカー遺伝子候補をインスリン分泌組織(ブロックマン小体)、さらに関連組織としてインスリン作用組織(肝臓、脂肪組織)にて探索する。次に、マーカー遺伝子に関してLepRK0メダカの成長過程における発現変化を定量PCR、トランスクリプトーム解析等で追跡する。

4. 研究成果

(1) インスリン測定法を確立；メダカインスリンを化学合成し、それを抗原とする抗インスリン抗体を作製した。また、ビオチン標識したメダカインスリンを作製した。Andoh & Nagasawaの方法(Gen Comp Endocrinol, 2002, 125(3), pp365-374)に基づき、メダカの血中インスリン値の測定法を確立した。

以下の(2)(3)の研究中の飼育条件では、LepRK0メダカは孵化後10-12週齢に初めて産卵を開始する成長速度である。また、「過食給餌」とは、通常WTメダカに給餌する量のおよそ1.7倍量の粉餌を給餌することと設定した。用いた粉餌の組成は、である。

(2) 高血糖をもたらす飼育条件ともたらさない飼育条件；LepRK0メダカは、孵化後2週齢から孵化後7週齢までの間に過食給餌されると、早くも3週間後に、遅くても4週間以内に空腹時高血糖値を示すことが分かった。その高血糖値は、過食給餌から通常量の給餌に戻して数週間すると戻る個体と戻らない個体があった。一方で、LepRK0メダカは、孵化後8週齢以降に初めて過食給餌されると、その後10週間以内の観察では空腹時高血糖値を示さないことが分かった。以上の結果から、LepRK0メダカが空腹時高血糖を示すには、単に過食給餌が必要なわけではなく、孵化後2週齢から孵化後7週齢までの間から始まる過食給餌が必要であることが分かった。

(3)空腹時高血糖を示した LepRK0 メダカのインスリン分泌能；(2)の空腹時高血糖を示し始めた週齢では、インスリン分泌が促進されており、軽微なインスリン抵抗性を示していた。空腹時高血糖を示した LepRK0 メダカの孵化後 16 週齢ころの血中インスリン濃度は、WT メダカと空腹時高血糖を示さない LepRK0 メダカと比べて半分以下であった。つまり、LepRK0 メダカの空腹時血糖値の上昇は、軽微なインスリン抵抗性とインスリン分泌不全によることが分かった。

(4)膵臓 細胞の数とインスリン分泌に関わる遺伝子発現；孵化後 16 週齢における膵臓 細胞の数と面積に関して、空腹時高血糖を示した LepRK0 メダカ、WT メダカ、空腹時高血糖を示さない LepRK0 メダカの間に有意な差は認められない。一方で、過食給餌し空腹時高血糖を示し始めた LepRK0 メダカの膵臓、肝臓、脂肪組織では、インスリンの過剰分泌を示す遺伝子発現が確認され、またその後の孵化後 16 週齢では、インスリン分泌を促す遺伝子の発現が低下していたことが明らかとなった。これにより、(3)のインスリン分泌能を裏付ける遺伝子発現情報を得た。

(5)網膜症、白内障を示す新たなモデル生物の確立；申請前時点で、LepRK0 メダカは糖尿病の合併症として不安障害様行動を示すことを明らかにしていた。本研究期間中、偶然に、水晶体が白濁した LepRK0 メダカを発見した。孵化後 28 週齢のことであった。その後、改めて試験区を設け、過食給餌飼育を開始し、孵化後 10 から 37 週齢の LepRK0 メダカの網膜、及び水晶体を病理組織学的に解析した。その結果、LepRK0 メダカは孵化後 20 週齢以降に、既存の糖尿病モデルげっ歯類と同様に網膜の菲薄化、網膜中心静脈や毛細血管のうっ血等の網膜症に特徴的な病変と、水晶体繊維の変性やモルガニ球の形成といった白内障に特徴的な病変を示すことが分かった。これらの病変は糖尿病罹患後に起こる微小血管障害を起因とする合併症の糖尿病網膜症と類似しており、LepRK0 メダカが網膜症、白内障を示す新たなモデル生物であることを明らかにした。またこれらの病変を示した週齢は、既存のモデルげっ歯類と比べて比較的早期であることから、LepRK0 メダカは実験を遂行する上で学術的にも有用であることが分かる。

(6)腎症を示す新たなモデル生物の確立；LepRK0 メダカが微小血管障害を起因とする病変を網膜、及び水晶体にもつことから、腎病変ももつ可能性が示唆された。従って、改めて試験区を設け、過食給餌飼育を開始し、孵化後 10 から 30 週齢の LepRK0 メダカの腎臓を病理組織学的に解析し、また血中クレアチニン値を測定することで腎機能を推測した。その結果、LepRK0 メダカは孵化後 20 週齢以降に、既存の糖尿病モデルげっ歯類やヒトと同様に、糸球体毛細血管の拡張、輸入・輸出動静脈の拡張、フィブリンキャップの形成、メサンギウム基質の増生といった糖尿病性腎症に特徴的な病変や、糸球体係蹄の萎縮、ボーマン囊の拡張、尿細管の拡張といった Atubular glomeruli に特徴的な病変を示すことが分かった。糖尿病モデルげっ歯類がこれらの病変をもつには、外科的処置、薬剤処理、追加の遺伝子組換え処理を必要とすることが多い。一方、LepRK0 メダカは過食給餌されることにより、これら病変を示す。ヒトは主に生活習慣や加齢を原因として糖尿病やその合併症に罹患する。従って、食べ過ぎによる糖尿病性腎症を解析するうえで LepRK0 メダカは有用であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Chisada S, Hirako A, Sugiyama A, Renal lesions in leptin receptor-deficient medaka (*Oryzias latipes*), *Journal of Toxicologic Pathology*, 査読有, in press, 2019
Tonoyama Y, Shinya M, Toyoda A, Kitano T, Oga A, Nishimaki T, Katsumura T, Oota H, Wan MT, Yip BWP, Helen MOL, Chisada S, Deguchi T, Au DWT, Naruse K, Kamei Y, Taniguchi Y, Abnormal nuclear morphology is independent of longevity in a *zmpste24*-deficient fish model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS), *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 査読有, 209, 2018, pp54-62
DOI: 10.1016/j.cbpc.2018.03.006

Chisada S, Hirako A, Sugiyama A, Ocular lesions in leptin receptor-deficient medaka (*Oryzias latipes*), *Journal of Toxicologic Pathology*, 査読有, 31(1), 2018, pp65-72
DOI: 10.1293/tox.2017-0042

〔学会発表〕(計 8 件)

菅田慎一, 吉田正雄, 荻田香苗, 水棲脊椎動物におけるマイクロプラスチックの生殖影響, 第 89 回日本衛生学会学術総会, 2019 年

菅田慎一, 杉山晶彦, 摂餌量のコントロールで糖尿病網膜症・腎症メダカを作出する, 第 4 回ゼブラフィッシュ・メダカ創薬研究会, 2018 年

菅田慎一, メダカとその飼育方法を利用した糖尿病と合併症の研究へのアプローチ, 第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年

菅田慎一, 平光彩乃, 杉山晶彦, レプチン受容体欠損メダカの糖尿病性網膜症・白内障モデル動物としての有用性の検討, 第 34 回日本毒性病理学会, 2018 年

菅田慎一, 吉浦康寿, 安藤忠, Julian Stolper, 亀井保博, 成瀬清, 谷口善仁, アジ

ア人型 2 型糖尿病様症状を示す新モデル生物, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年

Chisada S, Taniguchi Y, Andoh T, Stolper J, Yoshiura Y, Kamei Y, Naruse K, Leptin receptor knockout medaka exhibit impaired insulin secretion, 第 21 回小型魚類研究会, 2015 年

Chisada S & Naruse K, SOP of medaka husbandry and special reference to see-through medaka, The 9th European Zebrafish Meeting, 2015

Chisada S, Taniguchi Y, Andoh T, Stolper J, Yoshiura Y, Kamei Y, and Naruse K, Leptin receptor knockout medaka exhibit hyperglycemia and impaired insulin secretion, The 9th European Zebrafish Meeting, 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 糖尿病網膜症、白内障及び/又は腎症モデル実験動物

発明者: 菅田慎一, 杉山晶彦

権利者: 杏林大学、鳥取大学

種類: 特許

番号: 特願 2018-173609

出願年: 2018

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:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。