

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02364

研究課題名（和文）新規ラットモデルを用いた糖尿病遺伝素因と病態発症・進展機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of genetic factors and mechanisms involved in the development and progression of type 2 diabetes using a novel rat model of the disease

研究代表者

横井 伯英（YOKOI, Norihide）

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：70311610

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、研究代表者らが新規に確立した肥満・糖尿病モデルZFDMラットを対象として、交配実験、SNPタイピングおよびエクソーム解析による疾患候補遺伝子の同定とゲノム編集による候補遺伝子の検証を行うとともに、病態発症の鍵となる膵島に着目してmRNAシーケンス解析およびメタボローム解析による代謝障害の経時的変化の解明とプロテオーム解析による異常修飾タンパク質の同定を行うことにより遺伝素因と病態発症・進展機構の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により明らかとなったZFDMラットにおける遺伝素因と膵島障害の発症・進展機構は、ヒト糖尿病の遺伝素因と病態発症・進展機構の解明や新規のメカニズムに基づく治療薬の開発の基盤となると考えられる。また、同様の研究手法が適用可能な様々な研究分野において疾患モデルの有用性を実証するものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, by using the Zucker fatty diabetes mellitus (ZFDM) rat, a novel rat model of type 2 diabetes which has been developed by the representative researcher's group, we performed genetic analysis and exome analysis to identify diabetes susceptibility genes, CRISPR/Cas9-mediated genome editing of the candidate gene to verify the causality, mRNA-sequencing and metabolome analysis to elucidate longitudinal changes in metabolic dysfunction, and proteome analysis to identify abnormally modified proteins, resulting in the clarification of a part of genetic factors and mechanisms involved in the development and progression of the disease.

研究分野：分子糖尿病学、分子代謝学、実験動物学

キーワード：糖尿病 疾患モデル 遺伝素因 病態発症機構 オミクス 膵島障害

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は多因子疾患の代表例であり、その発症には遺伝因子と環境因子が複雑に関与する。世界の糖尿病人口は 2015 年に約 4 億人に上り、2040 年までに 6 億人以上に達すると予想されており、その克服は医学的、社会的にも極めて重要な課題である。インスリン抵抗性とインスリン分泌不全の両者が糖尿病発症の基盤にあると考えられているが、個々人が保有する遺伝素因ならびに病態の発症・進展機構については不明な点が多い。

従来、糖尿病の遺伝素因の解明には動物モデルを用いたアプローチとヒトを対象とするアプローチが存在するが、新規の動物モデルの報告がほとんど無いことや SNP を用いたヒトのゲノムワイド関連解析が可能となったことにより、近年ではヒトを対象とする研究が主流となっている。ゲノムワイド関連解析では効果が弱く頻度の高い多型が同定されるが、それらの機能的役割はほとんど明らかにされていない。一方、効果が大きく頻度の低い変異については、ヒトでの解析に限界があり、動物モデルを用いたアプローチが有用である。

最近、研究代表者らは肥満モデル Zucker fatty (ZF) ラットを起源として新たに肥満のみならず糖尿病を発症するモデル Zucker fatty diabetes mellitus (ZFDM) ラットを確立した(文献)。ZF ラットと ZFDM ラットは同一のレプチン受容体遺伝子変異 (fatty, fa) を有するにもかかわらず ZFDM ラットのみが糖尿病を発症する。また、膵島構築の破壊とインスリン分泌障害が ZFDM ラットにおける病態の特徴と考えられるが(文献) 病態発症・進展機構の全容は明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが新規に確立した肥満・糖尿病モデル ZFDM ラットを対象として、交配実験、SNP タイピングおよびエクソーム解析による疾患候補遺伝子の同定とゲノム編集による候補遺伝子の検証を行うとともに、病態発症の鍵となる膵島に着目して mRNA シーケンス解析およびメタボローム解析による代謝障害の経時的变化の解明とプロテオーム解析による異常修飾タンパク質の同定を行うことにより遺伝素因と病態発症・進展機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病遺伝素因の解明

ZFDM ラットと ZF ラットの交配実験

肥満・糖尿病モデル ZFDM 系統のオス fa/fa 個体 (肥満・糖尿病, 繁殖性有り) と肥満モデル ZF 系統のメス fa/+ 個体 (非肥満) を交配して F1 仔を作出し、次いで F1 のオス fa/fa 個体 (繁殖性確認済み) と F1 のメス fa/+ 個体の交配により F2 仔を作出する。また、ZFDM 系統と肥満モデル ZF 系統との交配により作出した F1 のオスまたはメスに ZFDM 系統を戻し交配することにより、2 種類の N2 仔を作出する。上記の F2 仔および N2 仔のうちオス fa/fa 個体について 60 週齢まで糖尿病発症について観察する。

SNP タイピングとエクソーム解析による疾患候補遺伝子の同定

上記の F2 仔および N2 仔の脾臓または尾から抽出したゲノム DNA を用いて次世代シーケンサーにより全ゲノムに散在する約 3 万個の SNP についての遺伝子型を取得し、上記で取得した表現型データとともにカイ二乗検定や量的形質遺伝子座 (QTL) 解析により糖尿病発症に関与するゲノム領域および疾患候補遺伝子を同定する。次に、ZFDM ラットと ZF ラットのエクソーム解析により前述の候補遺伝子における変異を同定する。

ゲノム編集による糖尿病候補遺伝子の検証

上記(1)の および により同定された候補遺伝子およびその変異についてゲノム編集による

検証を行う。特に、ZFDM ラットが有する機能欠失変異については、ゲノム編集により当該変異を野生型に置換して糖尿病発症が抑制されるかどうか検討する。また、下記(2)の の膵島の mRNA シーケンス解析により ZFDM ラットおよび対照の ZF ラットの間で発現量が顕著に異なる遺伝子を探索する。特に ZFDM ラットにおける発現量が低い遺伝子についてシーケンス解析により ZFDM ラットが有する変異を同定し、ゲノム編集により当該変異を野生型に置換して糖尿病発症が抑制されるかどうか検討する。

(2) 膵島代謝障害の発症・進展機構の解明

膵島の mRNA シーケンス解析とメタボローム解析による代謝障害の経時的変化の解明

随時血糖値が正常な 8 週齢および随時血糖値の上昇とともに耐糖能異常が顕在化する 12 週齢の ZFDM ラットおよび対照の ZF ラットから膵島を単離し、次世代シーケンサーを用いた mRNA シーケンス解析により遺伝子発現プロファイルの経時的変化を明らかにする。

また、上記と同時期の膵島からメタノール・クロロホルム法により水溶性代謝物を抽出し、質量分析計(CE-MS および LC-MS/MS)を用いたメタボローム解析により代謝プロファイルの経時的変化を明らかにする。

上記により取得した遺伝子発現および代謝プロファイルデータを用いて主成分分析、判別分析、パスウェイ解析等により病態発症・進展に関与する候補遺伝子および代謝物・代謝経路を特定する。

膵島プロテオーム解析による異常修飾タンパク質の同定

ZFDM ラットと対照の ZF ラットから約 1,000 個の膵島を単離し、抗 O-GlcNAc 抗体を用いた免疫沈降により O-GlcNAc 修飾タンパク質を抽出する。ポリアクリルアミドゲル電気泳動、銀染色、バンドの切り出し、ゲル内プロテアーゼ処理の後、得られたペプチド断片をイオントラップ型-飛行時間型の液体クロマトグラフ質量分析計(LCMS-IT-TOF)を用いて分析しタンパク質を同定する。両系統間で O-GlcNAc 修飾の相違が認められたタンパク質について、膵細胞における機能的役割を検討する。

4. 研究成果

(1) 糖尿病遺伝素因の解明

ZFDM ラットと ZF ラットの交配実験

肥満・糖尿病モデル ZFDM 系統と肥満モデル ZF 系統との間で F2 仔を 145 匹作出したが、60 週齢までに糖尿病を発症した個体は 1 匹のみであった。そこで、ZFDM 系統と ZF 系統との交配により作出した F1 のオスまたはメスに ZFDM 系統を戻し交配することにより、2 種類の N2 仔を作出した。N2 仔のうちオス fa/fa 個体について 60 週齢まで糖尿病発症について観察した結果、F1 のオスを用いた N2 仔では 57%が糖尿病を発症し、F1 のメスを用いた N2 仔では 20%が糖尿病を発症した。

SNP タイピングとエクソーム解析による疾患候補遺伝子の同定

上記 2 種類の N2 仔について次世代シーケンサーを用いた全ゲノム SNP タイピングを行い、約 3 万個の SNP についての遺伝子型を取得した。現在、上記で取得した表現型データとともにカイ二乗検定や量的形質遺伝子座(QTL)解析により糖尿病発症に関与するゲノム領域および疾患候補遺伝子の特定を進めている。すでに、ZFDM ラットと ZF ラットのエクソーム解析により複数の遺伝子にナンセンス変異およびミスセンス変異が存在することを確認しており、上記から明らかとなる疾患候補領域と照合することにより、候補遺伝子および候補変異を特定する。

ゲノム編集による糖尿病候補遺伝子の検証

下記(2)の の膵島の mRNA シーケンス解析により、対照の ZF ラットと比較して ZFDM ラ

ットにおける発現量が著しく低い遺伝子が同定された。次いで、当該遺伝子のシーケンス解析により ZFDM ラットにおいてナンセンス変異を発見した。そこで、ゲノム編集により当該変異を野生型に置換した ZFDM ラットを作出し、糖尿病発症が抑制されるかどうか検討している。

(2) 膵島代謝障害の発症・進展機構の解明

膵島の mRNA シーケンス解析とメタボローム解析による代謝障害の経時的変化の解明

随時血糖値が正常な 8 週齢および随時血糖値の上昇とともに耐糖能異常が顕在化する 12 週齢の ZFDM ラットおよび対照の ZF ラットから膵島を対象として、mRNA シーケンス解析により遺伝子発現プロファイルの経時的変化を明らかにするとともに、メタボローム解析により代謝プロファイルの経時的変化を明らかにした。その結果、12 週齢の ZFDM ラットの膵島では、膵細胞の分化度の低下と増殖性の亢進、解糖系と乳酸産生系の亢進、TCA 回路の減弱などの変化が確認された（文献 ）。

膵島プロテオーム解析による異常修飾タンパク質の同定

ZFDM ラットと対照の ZF ラットの膵島を対象とする免疫沈降プロテオミクスにより ZFDM ラットに特異的な O-GlcNAc 修飾タンパク質を特定した。さらに、同様の免疫沈降プロテオミクスにより、インスリン分泌細胞株 MIN6-K8 においてグルコース刺激により O-GlcNAc 化され、GLP-1 受容体アゴニスト Exendin-4 刺激により O-GlcNAc 化がはずれるタンパク質を同定した。現在、これらのタンパク質についてインスリン分泌における機能的役割を検討している。

(3) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究で用いた ZFDM ラットは研究代表者らが新規に確立した糖尿病モデルであり、本ラットを用いた研究については完全に先行している。既存の糖尿病モデルと異なり、ZFDM ラットは正常血糖の状態から重度の糖尿病への進展までを 10 週間ほどの期間で観察できるため、病態発症・進展の経時的な検討が容易であることなど、モデルとして優位性がある。また、これまで糖尿病の病態発症機構の解明のため膵島に着目した研究が行われているが、膵島の遺伝子発現と代謝プロファイルの経時的な変化を同時に捉えた研究は皆無である。さらに、タンパク質の O-GlcNAc 修飾と疾患との関連が注目されているが、膵島タンパク質の O-GlcNAc 化の糖尿病発症・進展における役割は不明である。

本研究では、新規のゲノム解析プラットフォームやゲノム編集技術を用いることにより迅速に候補遺伝子および変異を同定すること、mRNA シーケンス解析とメタボローム解析により膵島の代謝障害の経時的変化を捉えること、プロテオーム解析により膵島 O-GlcNAc 修飾タンパク質を同定しその病態発症・進展における役割を明らかにすることにより、新規の肥満・糖尿病モデル ZFDM ラットの遺伝素因と病態発症・進展機構の解明に挑んだ。本研究により明らかとなった ZFDM ラットにおける遺伝素因と膵島障害の発症・進展機構は、ヒト糖尿病の遺伝素因と病態発症・進展機構の解明や新規のメカニズムに基づく治療薬の開発の基盤となると考えられる。また、同様の研究手法が適用可能な様々な研究分野において疾患モデルの有用性を実証するものである。

(4) 今後の展望

本研究において遂行してきた ZFDM ラットの病態発症機構の解明に関する研究をさらに発展させ、様々な膵細胞障害を呈する複数のモデルを対象とする多面的な解析により、糖尿病の発症の基盤にある膵細胞障害に関与する遺伝因子および障害の発症・進展機構を解明すれば、ヒト糖尿病における膵細胞障害機構の解明や新規のメカニズムに基づく糖尿病治療薬の開発につながるものと期待される。

< 引用文献 >

Yokoi N, Hoshino M, Hidaka S, Yoshida E, Beppu M, Hoshikawa R, Sudo K, Kawada A, Takagi S, Seino S. A novel rat model of type 2 diabetes: the Zucker Fatty Diabetes Mellitus ZFDM rat. **J Diabetes Res** 2013:103731, 2013

Gheni G, Yokoi N, Beppu M, Yamaguchi T, Hidaka S, Kawabata A, Hoshino Y, Hoshino M, Seino S. Characterization of the prediabetic state in a novel rat model of type 2 diabetes, the ZFDM rat. **J Diabetes Res** 2015:261418, 2015

Hayami T, Yokoi N, Yamaguchi T, Honda K, Murao N, Takahashi H, Wang S, Seino Y, Kamiya H, Yabe D, Sweet IR, Mizoguchi A, Nakamura J, Seino S. Tumor-like features of gene expression and metabolic profiles in enlarged pancreatic islets are associated with impaired incretin-induced insulin secretion in obese diabetes: a study of ZFDM rat. **J Diabetes Investig** 11:1434-1447, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 TAKAHASHI Harumi, YOKOI Norihide, SEINO Susumu	4. 巻 95
2. 論文標題 Glutamate as intracellular and extracellular signals in pancreatic islet functions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the Japan Academy, Series B	6. 最初と最後の頁 246 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2183/pjab.95.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hayami Tomohide, Yokoi Norihide, Yamaguchi Takuro, Honda Kohei, Murao Naoya, Takahashi Harumi, Wang Shujie, Seino Yusuke, Kamiya Hideki, Yabe Daisuke, Sweet Ian R, Mizoguchi Akira, Nakamura Jiro, Seino Susumu	4. 巻 11
2. 論文標題 Tumor like features of gene expression and metabolic profiles in enlarged pancreatic islets are associated with impaired incretin induced insulin secretion in obese diabetes: A study of Zucker fatty diabetes mellitus rat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1434 ~ 1447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13272	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Hashim Mahira, Yokoi Norihide, Takahashi Harumi, Ghani Ghupurjan, Okechi Oduori S., Hayami Tomohide, Murao Naoya, Hidaka Shihomi, Minami Kohtarō, Mizoguchi Akira, Seino Susumu	4. 巻 67
2. 論文標題 Inhibition of SNAT5 Induces Incretin-Responsive State From Incretin-Unresponsive State in Pancreatic β -Cells: Study of β -Cell Spheroid Clusters as a Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 1795 ~ 1806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db17-1486	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横井伯英
2. 発表標題 医学とアミノ酸
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 舞, 横井 伯英, 速水 智英, 川畑 綾子, 高橋 晴美, 小川 渉, 清野 進
2. 発表標題 肥満糖尿病における膵島機能不全の機序の解明
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norihide Yokoi, Harumi Takahashi, Susumu Seino
2. 発表標題 Role of glutamate signaling in insulin secretion
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横井伯英
2. 発表標題 糖尿病の遺伝素因の解明 - 動物モデルを用いたアプローチ -
3. 学会等名 関西実験動物研究会第144回研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norihide Yokoi, Tomohide Hayami, Mai Yoshida, Harumi Takahashi, Yukio Taniguchi, Susumu Seino
2. 発表標題 Elucidation of genetic factors and pathogenesis of obese diabetes: Study of ZFDM rat
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 速水智英、横井伯英、吉田 舞、本田洸平、高橋晴美、神谷英紀、溝口 明、中村二郎、清野 進
2. 発表標題 肥満糖尿病の豚島におけるインクレチン応答性障害の発症機序
3. 学会等名 第34回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横井伯英、速水智英、波多野直哉、日高志保美、川畑綾子、星野貴一、星野雅行、清野 進
2. 発表標題 肥満糖尿病モデルZFDMラットの豚島におけるタンパク質糖鎖修飾の病態生理学的意義
3. 学会等名 第65回日本実験動物会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 速水智英、横井伯英、日高志保美、川畑綾子、グブルジャン ゲニ、マヒラ アシム、高橋晴美、神谷英紀、清野 裕、中村二郎、清野 進
2. 発表標題 肥満糖尿病の豚島におけるインクレチン応答性障害 オミクス解析による検討
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横井伯英、速水智英、吉田 舞、高橋晴美、清野 進
2. 発表標題 肥満2型糖尿病では肥大した膵島における糖代謝異常とO-GlcNAc化の亢進がインクレチン応答性インスリン分泌障害を引き起こす
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横井 伯英、速水 智英、川畑 綾子、星野 貴一、星野 雅行、清野 進
2. 発表標題 肥満糖尿病モデルZFDMLラットにおけるインクレチン作用障害の発症機序
3. 学会等名 第140回関西実験動物研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 速水智英、横井伯英、本田洸平、高橋晴美、神谷英紀、溝口明、中村二郎、清野 進
2. 発表標題 肥満2型糖尿病における肥大膵島は未分化細胞や癌細胞に類似した代謝様式に変化し、インクレチン応答性障害を呈する
3. 学会等名 第33回日本糖尿病・肥満動物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学大学院農学研究科動物遺伝育種学分野ホームページ
<http://www.jkaabs.kais.kyoto-u.ac.jp/>
 神戸大学大学院医学研究科 分子代謝医学部門ホームページ
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/phys1/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	谷口 幸雄 (TANIGUCHI Yukio) (10252496)	京都大学・農学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	波多野 直哉 (HATANO Naoya) (10332280)	神戸大学・医学研究科・医学研究員 (14501)	
研究分担者	須山 幹太 (SUYAMA Mikita) (70452365)	九州大学・生体防御医学研究所・教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関