様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　 ５ 年 　 ６ 月 １２ 日現在

機関番号：３２６６９
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｋ０６４０１

研究課題名（和文）新たな早期発症糖尿病モデルスンクスの確立：病態形成におけるFOXO1の役割

研究課題名（英文）Establishment of a novel early-onset diabetes model in house musk shrew (Suncus murinus)

研究代表者

佐々木　典康（Sasaki, Noriyasu）

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：２０３０７９７９

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）：非肥満型の早期糖尿病発症スンクス（EDS）における自然発生2型糖尿病の病態メカニズムを探るために、正常スンクス（BK）との交配により遺伝的背景を揃えた新規糖尿病スンクス（EDBK）を作出した。EDBKの糖尿病は、EDSよりも軽症であり、病因遺伝子がEDSのミトコンドリア遺伝子上に存在する可能性が示唆された。膵臓β細胞の分化や脱分化に関与する転写因子FOXO1の配列をスンクスで解析したところ、これまでに報告がある多くの哺乳類FOXO1と90%以上の高い相同性があり、高度に保存されていた。また肝臓での糖新生関連遺伝子の発現に関与するFOXO6も高度に保存されていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
早期発症糖尿病スンクス（EDS）は非肥満型で、成長にともない症状が寛解する珍しい自然発生２型糖尿病モデル動物であるが、正常な対照系統が入手しにくいため利用されていなかった。そこで本研究では、交配により正常なスンクス（BK）の遺伝的背景を持った新たな早期糖尿病発症スンクス（EDBK）系統を作出し、このEDBK スンクスでの病態解明に取り組んだ。一般的に動物食性（肉食性）のモデル動物が少ないことから、本研究の知見は生物学、医学、獣医学と幅広い分野での応用が可能であり、特に2型糖尿病病態解明のモデルに適していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to explore the pathogenesis of non-obese early onset diabetis (EDS) Suncus (Suncuns murinus). To generate a new diabetic Suncus (EDBK) strain with matched genetic backgrounds, we repeated crosses breed of EDS with normal BK strain.
Sequence analysis of the transcription factor FOXO1, which is involved in pancreatic beta cell differentiation and dedifferentiation, in suncus revealed a high degree of conservation with over 90% homology to many previously reported mammalian FOXO1s, indicating significant preservation. FOXO6, which is involved in the regulation and expression of gluconeogenesis-related genes in the liver, was also found to be highly conserved.
Our study provided valuable insights into the pathophysiological mechanisms underlying non-obese early-onset type 2 diabetes, utilizing a unique novel animal model.

研究分野：獣医生化学

キーワード：スンクス　早期発症糖尿病　FOXO1　FOXO6　モデル動物

※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。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

日本で実験動物化されたスンクス（House musk shrew、学名 *Suncus murinus*）はトガリネズミ科ジネズミ亜科ジャコウネズミ属に属する食虫性小動物である。バングラディッシュ由来 BAN 系統の中に早期に糖尿病を発症する個体が見つかり、早期発症糖尿病スンクス（EDS；early-onset diabetes in suncus）が作出された。EDS は非肥満型で、成長に伴って症状が寛解する珍しい自然発生 2 型糖尿病モデル動物である。しかし対照となる正常系統（BAN）が国内では入手しにくいため、これまでほとんど利用されてこなかった。そこで本研究では、交配によって遺伝的背景を BK 系統に揃えた新たな糖尿病発症スンクス（EDBK）系統を作出し、正常な BK 系統と比較を行うことで糖尿病の病態解明へアプローチすることを目指した。

2 型糖尿病患者の膵β細胞は機能障害と、その数の減少が認められるが、近年になって膵β細胞の減少は脱分化によるものとする説が提唱されている。EDS で見られる糖尿病も膵島炎が無く、成長に伴って症状が寛解することから、膵β細胞の脱分化説によって説明が可能と考えられる。さらに現在では膵β細胞でのインスリン分泌や膵β細胞の脱分化には転写因子 FOXO1 が重要な働きをしていると考えられるようになってきた。

これらの点から EDS でみられる糖尿病は膵β細胞の脱分化によるものである可能性が強く示唆され、その病態形成機構に興味が持たれるところである。

２．研究の目的

本研究では、EDS スンクスでみられる糖尿病において膵β細胞の FOXO1 がどのような発現、分布そして他の遺伝子の転写制御に関わっているかを検討し、スンクスの糖尿病病態にどのような役割を果たしているのかを明らかにすることを目的とした。すでに述べたように EDS は成長とともに症状が寛解する糖尿病を呈するため、膵β細胞の脱分化や再分化、インスリン分泌機能に関わる転写因子 FOXO1 の機能解明に有用なモデルとなる。

本研究では、(1) 「BK スンクスの遺伝的背景を持った早期糖尿病発症スンクス（EDBK）の作出」を目指した。EDS スンクスは遺伝子背景が他のスンクス系統とは異なるため、糖尿病個体と正常個体の比較を行うためには遺伝的背景を揃えた系統を用意する必要がある。そこで、BK との交配を繰り返すことで EDS の遺伝的背景を BK に近づけた新しい系統（EDBK）を作成することにした

次に、(2) 「スンクス FOXO1 の全長 cDNA クローニングと遺伝子解析」を実施。膵β細胞の分化・脱分化に関わる転写因子 FOXO1 の病態形成への寄与を明らかにするために、まずスンクス FOXO1 の全長 cDNA クローニングを行い、遺伝子解析を行った。

また糖尿病の際には、肝臓での糖新生亢進が血糖値上昇に強く影響するため、糖新生関連の遺伝子発現に影響を調べるために、(3) 「スンクス FOXO6 の全長 cDNA クローニングと遺伝子解析」も実施した。

本研究により自然発生糖尿病における FOXO1 および FOXO6 の役割解明が期待できるとともに、病態へ関与する関連遺伝子の検討も可能となる。加えて、新しく作出された EDBK スンクスは病態解明のみならず薬物治療モデル動物としても期待される。

３．研究の方法

(1) 新たな非肥満・早期発症糖尿病スンクス（EDBK）の作出

尿糖の存在を指標として糖尿病を発症している EDS オス個体 と、正常な BK メス個体 で交配を行い、生まれた個体から同様に尿糖を指標にして糖尿病の形質を有し、かつ BK スンクスの遺伝的背景（BK のミトコンドリア遺伝子）を持った EDBK スンクスを選抜し、クローズドコロニーとして循環交配方式で維持した。

(2)スンクス FOXO1 の全長 cDNA クローニングと遺伝子解析

膵β細胞の脱分化や再分化、インスリン分泌機能に関わる転写因子 FOXO1 の機能解明を目的として、まずスンクス FOXO1 の cDNA クローニングと遺伝子解析を実施した。BK スンクスの脂肪組織から抽出した RNA を鋳型とし、SMARTer RACE 5'/3' Kit （タカラバイオ）を用いて 5'RACE/3'RACE による全長 FOXO1 遺伝子の cDNA クローニングを行った。得られた PCR 断片は In-Fusion HD Cloning（タカラバイオ）を行い pRACE ベクターに組み込み後、大腸菌をトランスフォームしクローニングを行った。プラスミドを抽出し、サンガー法により DNA 配列を解析した。

(3)スンクス FOXO6 の全長 cDNA クローニングと遺伝子解析

糖新生関連の遺伝子発現に影響を調べるために転写因子 FOXO6 の機能解明を目的として、スンクス FOXO6 の cDNA クローニングと遺伝子解析を実施した。BK スンクスの脂肪組織か

ら抽出した RNA を鋳型とし、SMARTer RACE 5'/3' Kit （タカラバイオ）を用いて 5'RACE/3'RACE による全長 FOXO6 遺伝子の cDNA クローニングを行った。得られた PCR 断片は In-Fusion HD Cloning（タカラバイオ）を行い pRACE ベクターに組み込み後、大腸菌をトランスフォームしクローニングを行った。プラスミドを抽出し、サンガー法により DNA 配列を解析した。

４．研究成果

(1)この研究期間内に早期発症糖尿病の EDS スンクスと正常スンクスである BK スンクスから、BK スンクスの遺伝子背景を有する新たな糖尿病発症スンクス（EDBK）をクローズドコロニーでの循環交配で作出してきた。しかし、BK（雌）との交配を２～３代重ねると糖尿病の症状が軽減する傾向がみられるようになった。ミトコンドリア DNA を正常スンクスである BK と同一にするためメスには BK スンクスのみを利用してきたが、この BK メス個体からの産子に糖尿病が軽くなる傾向がみられている。一つの可能性として、糖尿病の元の系統である EDS スンクスではミトコンドリア DNA にも責任遺伝子が存在し、その遺伝子とゲノム上の病因遺伝子の相乗あるいは相加効果で重篤な糖尿病を発症していた可能性も窺える。そこで、EDS 由来のミトコンドリアを有する個体群も維持しながら、さらにコロニーの選抜を継続し、兄妹交配を増やすことで糖尿病形質を再度選抜し直し、糖尿病形質のはっきりと出現している個体同士での交配を試みている。

ただし、COVID-19 の緊急事態宣言下に繁殖コロニーを縮小ため、交配計画が上手く進まず、2022 年には EDS のメス個体が全て死亡し、以降は EDS を系統として維持することが不可能となった。

(2)FOXO1 の遺伝子クローニングは、正常スンクス（BK）で実施した。さらにスンクスゲノムプロジェクトの KAT スンクスゲノムデータベースより KAT スンクス FOXO1 の推定データも得た。BK および KAT の FOXO1 は非常によく保存されており、他の動物種との相同性も 97～98%と高かった。KAT 系スンクスゲノムのデータと部分配列の比較をしたところ、比較を行った領域においては KAT 系と BK 系の FOXO1 に違いは認められなかった。この領域を BLASTN で相同検索したところ、イベリアモグラ（*Talpa occidentalis*）の FOXO1 配列と約 91%の相同性を示した。同じくコガシラネズミイルカ（*Phocoena sinus*）、ヒトコブラクダ（*Camelus dromedarius*）、シロイルカ（*Delphinapterus leucas*)も 91%の相同性であった。

この領域のアミノ酸配列を比較したところ、先の動物種以外にホオヒゲコウモリ属の FOXO1 と高い相同性が見られた。全般的に多くの動物種と 90%以上の相同性を有しており、FOXO1 の機能の重要性から鑑みて高度に保存されていることが示唆された。また、FOXO1 の機能に重要なリン酸化部位、フォークヘッドモチーフ、DNA 結合部位なども高度に保存されていることが確認できた。一方で、アミノ末端側の領域は、ヒトやマウスなどの FOXO1 とは相同性が低く、一方で他の肉食動物のものとは相同性が高いことから、アミノ末端側の配列の差異は食性の違い、あるいは糖新生への依存度の違いの影響を受ける可能性が示唆された。肉食性動物は糖新生活性が高い動物が多いことから、FOXO1 のアミノ末端側の違いが糖代謝に影響を与えている可能性が考えられた。

(3)糖尿病の際には、肝臓での糖新生亢進が血糖値上昇に強く影響するため、糖新生関連の遺伝子発現に影響を及ぼす転写因子 FOXO6 についても検討を試みた。摂食状態のスンクスでは、肝臓での FOXO6 発現が著しく低いため、肝臓からのクローニングは困難であった。そこで脂肪組織の cDNA から RACE 法により FOXO6 の全長クローニングを試みた。得られた部分配列は、他の動物種と比較すると高度に保存されており、コビトジャコウネズミ（*Suncus etruscus*）の FOXO6 と 99%程度の相同性を示した。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 Kaneda Hisako、Hori Misa、Shinomiya Haruka、Nakajima Ayaka、Yamazaki Shingo、Sasaki Noriyasu、Sato Tsuyoshi、Kaneda Takeharu	４．巻 46
２．論文標題 <i>Rosa centifolia</i> petal extract induces endothelium‐dependent and endothelium‐independent vasorelaxation in rat aorta and prevents accumulation of inflammatory factors in human umbilical vein endothelial cells	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Journal of Food Biochemistry	６．最初と最後の頁 e14148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jfbc.14148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計6件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 山崎 慎吾，大塩 寛子，木村 琴乃，神田 秀憲，佐々木 典康，金田 剛治
２．発表標題 雄ブタ尿道平滑筋のフェニレフリン収縮に対する各種選択的ホスホジエステラーゼ阻害薬の影響
３．学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
４．発表年 2022年

１．発表者名 山本一郎，福田雄大，道下正貴，佐々木典康，川角浩
２．発表標題 ネコ中鎖脂肪酸受容体GPR84の性状解析
３．学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
４．発表年 2022年

１．発表者名 永沼菜美子，森優子，神田秀憲，佐々木典康，金田剛治
２．発表標題 摘出ラット回腸平滑筋収縮に対する柑橘系ポリフェノールの影響
３．学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
４．発表年 2021年

１．発表者名 山崎 慎吾，絹山 寿理亜，金田 寿子，佐々木 典康，金田 剛治
２．発表標題 摘出回腸平滑筋収縮に対する大豆イソフラボン麹菌発酵物の抑制効果と作用機序の解析
３．学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
４．発表年 2021年

１．発表者名 神田 秀憲，鈴木 雄貴，永井 雄太，佐々木 典康，浦川 紀元，清水 一政，金田 剛治
２．発表標題 Ouabainによるモルモット回腸平滑筋の収縮抑制とグルコース取込みの関連性について
３．学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
４．発表年 2021年

１．発表者名 山崎慎吾，絹山寿理亜，金田寿子，佐々木典康，金田剛治
２．発表標題 摘出ラット回腸平滑筋における大豆イソフラボン麹菌発酵物による収縮抑制効果
３．学会等名 第63回日本平滑筋学会総会
４．発表年 2021年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

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	金田　剛治 (KANEDA TAKEHARU) (10350175)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授 (32669)	

６．研究組織（つづき）

	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	神田　秀憲 (KANDA HIDENORI) (30825609)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教 (32669)	

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