

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15708

研究課題名(和文)新規糖尿病モデルマウスにおける、インスリン分泌不全原因遺伝子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of genes responsible for hypoinsulin secretion in a novel mouse model of diabetes mellitus

研究代表者

中野 堅太 (Nakano, Kenta)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・動物実験施設 専任研究員

研究者番号：10753189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Insulin hyposecretion (ihs)マウスは、非肥満とインスリン分泌不全を特徴とする新規糖尿病モデルである。申請者は、遺伝学的解析から、本マウスの糖負荷後の耐糖能異常および低インスリン血症の原因遺伝子が第18番染色体上に存在するを見出した。本研究では、膵島の遺伝子発現解析から、ihsマウス膵島において発現消失を示す候補遺伝子を同定し、本遺伝子のノックアウトマウスの解析から、この遺伝子がihsマウスの耐糖能異常および低インスリン血症の原因であることを明らかにした。また、本遺伝子は神経や液性因子を介し膵島からのインスリン分泌を間接的に制御する分子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血中インスリン濃度の制御機構は極めて複雑であり、神経や液性因子等を介して様々な臓器が互いに連携を取り合うことで、適切な血中インスリン濃度が維持されている。しかし、このような臓器間ネットワークを介したインスリン分泌制御機構には未解明の点が多く、その全容は依然として掴めていない。今回我々が同定した新規糖尿病原因遺伝子は、神経や液性因子を介し膵島からのインスリン分泌を間接的に制御する分子であることが示唆された。本遺伝子の機能を解明することで、新たなインスリン分泌制御機構が明らかになり、新たな糖尿病研究の基盤を提供するとともに、糖尿病の治療・予防における新たな創薬シーズの創出につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Insulin hyposecretion (ihs) mice are a novel diabetes model characterized by non-obesity and insulin secretory disorder. From QTL analysis and gene linkage analysis, we have identified that the gene responsible for glucose intolerance and hypoinsulinemia of ihs mouse is located on chromosome 18. We performed gene expression analysis in islets and identified gene X that exhibit loss of gene expression in islets of ihs mice. To clarify the effect of gene X on glucose metabolism, we performed an oral glucose tolerance test using gene X knockout mice. These mice showed marked glucose intolerance and hypoinsulinemia as well as ihs mice, indicating that gene X is one of the genes responsible for diabetes in ihs mice. The gene X was also suggested to be a molecule that indirectly regulates insulin secretion from pancreatic islets via neural and/or humoral factors. Therefore, functional analysis of geneX may lead to the elucidation of a new, atypical regulatory mechanism of insulin secretion.

研究分野：実験動物学

キーワード：糖尿病 低インスリン血症 インスリン分泌不全 耐糖能異常 Insulin hyposecretion ihs 臓器間ネットワーク 遺伝子改変マウス

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

インスリン分泌には、惹起経路と増幅経路が存在する。惹起経路はインスリン分泌に必須の経路であり、グルコースの代謝により生じる一連の反応によって強力なインスリン分泌を生じる。一方、増幅経路は、単独ではインスリン分泌を生じず、惹起経路を増強することによりインスリン分泌を促進する。現在、糖尿病の治療には増幅経路に作用するインクレチン関連薬が汎用されているが、これらの薬剤は惹起経路自体に障害を持つ患者では効果が得られない。惹起経路に作用する薬剤として、スルホニルウレア(SU) 剤が知られている。SU 剤は、ATP 依存性カリウムチャンネルに作用し、膵  $\beta$  細胞の脱分極を引き起こすことによってインスリン分泌を生じる。しかし、SU 剤では徐々に薬が効かなくなる“二次無効”が大きな問題となっている。以上のことから、惹起経路に作用する新規治療薬の開発が望まれている。Insulin hyposecretion (*ihs*)マウスは、非肥満とインスリン分泌不全を特徴とする新規糖尿病モデルマウスである。申請者は、これまで *ihs* マウスが惹起経路の一部であるカルシウムシグナル経路に障害を持ち、これに起因して重度のインスリン分泌障害を生じることを明らかにしてきた [Nakano K, et al. *J Diabetes Investig.* 2018]。したがって、本マウスの糖尿病原因遺伝子を同定し、機能を解明することで、新たなインスリン分泌制御機構が明らかとなり、惹起経路をターゲットとした新規糖尿病治療薬の創薬シーズの作出につながると考えられる。

### 2. 研究の目的

申請者は、糖負荷後の血糖値を指標とした遺伝学的解析から *ihs* マウスの耐糖能異常および、低インスリン血症の原因遺伝子がマウス第 18 番染色体上の約 0.5 Mb の領域 (*ihs* locus) に存在することを同定した。本研究では、膵島における遺伝子発現解析により候補遺伝子を絞り込み、CRISPR/Cas9 システムにより作製した候補遺伝子ノックアウトマウスの解析を行うことで、*ihs* マウスの糖尿病原因遺伝子を同定し、その機能を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1). *ihs* マウスの糖尿病候補遺伝子の同定：

*ihs* locus に存在する 20 個の候補遺伝子に関して、*ihs* マウスの単離膵島を用いた遺伝子発現解析を行い *ihs* マウスの膵島特異的に発現変動を示す遺伝子を同定した。

#### (2). 候補遺伝子欠損マウスの作製と表現型解析

CRISPR/Cas9 システムを用いて[Nakano K, et al. *Exp Anim.* 2022]、(1)で同定した候補遺伝子をノックアウトしたマウスを作製し、本マウスを用いて、糖負荷試験により耐糖能と血中インスリン濃度へ与える影響を検討した。

#### (3). 膵島の形態学的解析

ホルマリン固定した膵臓のパラフィン切片を用いて、インスリンとグルカゴンの二重免疫染色を行い、膵島の形態を評価した。 $\beta$ -cell mass は下記の式を用いて算出した。 $\beta$ -cell mass = ( $\beta$ -cell area/whole pancreas area)  $\times$  pancreas weight (mg)。また、膵島をクライオプレスで破碎し、インスリンを抽出することで膵臓におけるインスリン含有量を測定した。

#### (4). インスリン分解能の解析

ヒトインスリンを投与し、血中からのヒトインスリン消失時間を測定した。さらに、主要臓器におけるインスリン分解酵素(IDE)の発現量を Western blot にて解析した。

#### (5). 膵灌流実験

麻酔下で、マウスの腹部大動脈に注射針を留意し、各種グルコース溶液をペリスタポンプを用いて灌流した。この灌流液を門脈に留置したカニューレを介して回収し、灌流液中のインスリン濃度を測定した。

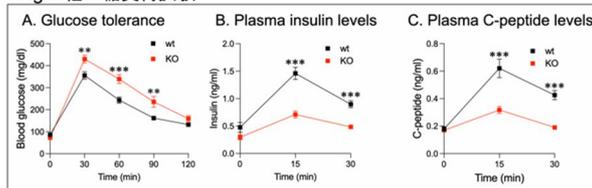
### 4. 研究成果

#### (1). *ihs* マウスの耐糖能異常および低インスリン血症原因遺伝子の同定

マウス第 18 番染色体上の *ihs* locus に存在する 20 個の候補遺伝子に関して、*ihs* マウスの単離膵島を用いた遺伝子発現解析を行った。その結果、有意な発現増加を示す遺伝子 2 個、発現低下を示す遺伝子 2 個を同定した。この中で、*ihs* マウスの膵島においてほぼ完全に遺伝子発現が消失していた *gene X* に着目した。データベースの解析から本遺伝子は、機能未知の新規遺伝子であることが示された。次に、*gene X* が *ihs* マウスの糖尿病の原因遺伝子であることを確認するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて、*gene X* ノックアウト(KO)マウスを作製し、糖代謝へ与える影響を検討した。経口糖負荷試験において、KO マウスは、*ihs* マウスと同様に、顕著な耐糖能異

常を示し(AUC: B6: 26,106.3 ± 984.8 vs KO: 33,641.7 ± 1,688.3,  $p < 0.001$ , Fig1 A)、さらに、血中インスリン濃度(AUC: B6: 32.2 ± 1.9 vs KO: 16.5 ± 1.4,  $p < 0.01$ , Fig1 B)、C-peptide 濃度(AUC: B6: 13.8 ± 1.2 vs KO: 7.5 ± 0.6,  $p < 0.01$ , Fig1 C)が有意に低下していた。以上の結果から、*gene X* が *ihs* マウスの糖負荷後の耐糖能異常および、低インスリン血症の原因遺伝子であることが明らかとなった。

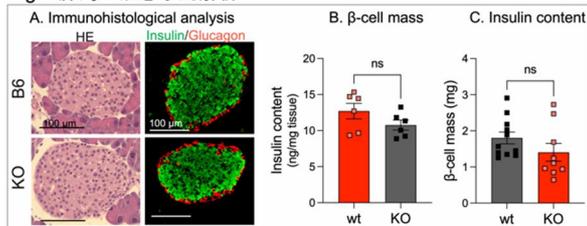
Fig1. 経口糖負荷試験



## (2). 膵島の形態学的解析

膵島の HE 染色像から、KO マウス膵島ではリンパ球をはじめとした炎症細胞の浸潤はなく、膵島の線維化も認められなかった(Fig2. A)。また、インスリンとグルカゴンの免疫染色像を見ても、齧歯類特有のマンデルコア構造が維持されており、膵島の形態が正常であることが示された(Fig2. A)。また、 $\beta$ -cell mass (Fig2. B) および、膵臓のインスリン含有量 (Fig2. C) にもコントロールとの間に有意な差は認められなかった。

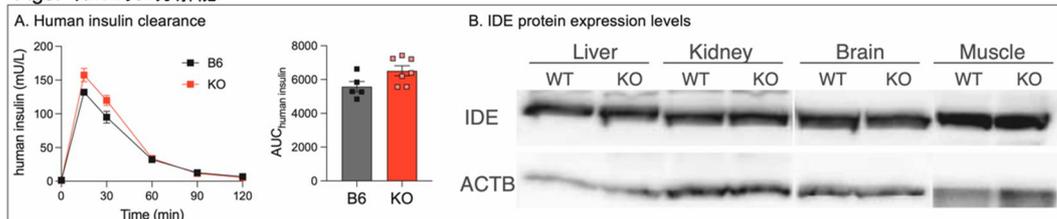
Fig2. 膵島の形態学的解析



## (3). インスリン分解能の解析

KO マウスとコントロールマウスのヒトインスリン分解能に差は認められなかった(Fig3. A)。また、インスリン分解酵素である IDE の発現量も KO マウスとコントロールマウスで同等であった(Fig3. B)。これらのことから KO マウスのインスリン分解能は正常であることが示唆された。

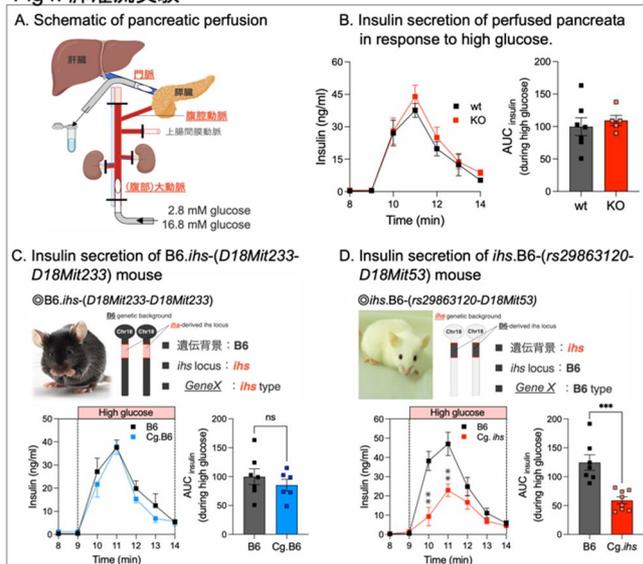
Fig3. インスリン分解能



## (4). インスリン分泌試験

インスリン分泌に対する *gene X* の効果を調べるため、膵灌流実験を実施した (Fig4. A)。その結果、KO マウスはコントロールマウスと同等のインスリン分泌能を示した (Fig4. B)。我々は以前、*ihs* マウスが膵灌流実験において顕著なインスリン分泌不全を呈することを報告しており [Nakano K, et al. *J Diabetes Investig.* 2018]、これは今回の KO マウスの結果と矛盾する。そこで、我々は *ihs* マウスが持つ、「糖負荷後の耐糖能異常・低インスリン血症」と、「膵灌流実験時のインスリン分泌不全」がそれぞれ別々の原因遺伝子によって規定されるのではないかと考えた。これを検証するため、B6 マウスへ *ihs* マウス由来の *ihs* locus を導入したコンジェニックマウス(B6. *ihs*-(D18Mit233-D18Mit235))と、*ihs* マウスへ B6 マウス由来の *ihs* locus を導入したコンジェニックマウス(*ihs*.B6-(rs29863120-D18Mit53))を作製した。B6. *ihs*-(D18Mit233-D18Mit235)マウスに関しては、経口糖負荷試験において *gene X* KO マウスと同様に、顕著な耐糖能異常と低インスリン血症を示すことをすでに報告している [Nakano K, et al. *PLoS One.* 2020.]。これら 2 系統のコンジェニックマウスを用いて、膵灌流実験を行なった。その結果、*ihs* マウス由来の *ihs* locus を導入した B6. *ihs*-(D18Mit233-D18Mit235) マウスは、KO マウスと同様にインスリンの分泌は正常であることが明らかになった (Fig4. C)。一方、B6 由来の正常な *gene X* を持つ *ihs*.B6-(rs29863120-D18Mit53) マウスは、高グルコース刺激に対して顕著なインスリン分泌不全を呈した (Fig4. D)。これらの結果は、*ihs* マウスが

Fig4. 膵灌流実験



持つ「糖負荷試験時の耐糖能異常および低インスリン血症」と「膵灌流実験時のインスリン分泌不全」が、それぞれ別々の原因遺伝子によって規定されることを示している。

以上、本研究から我々は、*ihs* マウスが示す糖負荷後の耐糖能異常および低インスリン血症の原因遺伝子として *gene X* を同定した。膵灌流実験は、糖負荷試験とは異なり生体内で見られる液性因子や神経制御によるインスリン分泌調節機構の影響を受けないことが知られている。*Gene X* KO マウスは、膵灌流実験においてインスリン分泌が正常であることから、*gene X* は膵β細胞に直接作用するのではなく、神経や液性因子を介して膵β細胞からのインスリン分泌を間接的に制御する因子であると考えられた。*in silico* の解析では、*gene X* が複数の神経伝達物質受容体と相互作用することが予測されており、この結果も本仮説を支持している。また、*ihs* マウスは *gene X* とは別に、膵β細胞を直接障害し、インスリン分泌不全を引き起こす原因遺伝子を持つことが示された。この原因遺伝子の同定には至っていないが、単離膵島を用いた解析から、この遺伝子が膵島においてカルシウムシグナルの障害を引き起こし、最終的に膵島からのインスリン分泌を直接障害することが示唆された。したがって、*ihs* マウスでは、原因遺伝子およびメカニズムの異なる2つの経路から直接的・間接的にインスリン分泌が障害され、これにより糖尿病発症することが明らかとなった。今後、*gene X* の詳細な機能解析を進めるとともに、カルシウムシグナルの障害を引き起こす原因遺伝子を同定することで、新たなインスリン分泌制御機構の解明と、糖尿病の予防・治療戦略における新たな研究基盤の構築につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 NAKANO Kenta, SHIMIZU Yukiko, ARAI Tetsuya, KANEKO Taketo, OKAMURA Tadashi	4. 巻 -
2. 論文標題 The versatile electric condition in mouse embryos for genome editing using a three-step square-wave pulse electroporator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.21-0130	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 Nakano Kenta, Yanobu-Takanashi Rieko, Shimizu Yukiko, Takahashi Yuki, Hiura Koki, Watanabe Masaki, Sasaki Hayato, Okamura Tadashi, Sasaki Nobuya	4. 巻 15
2. 論文標題 Genetic locus responsible for diabetic phenotype in the insulin hyposecretion (ihs) mouse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 234132-234132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0234132	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中野堅太、清水有紀子、佐々木隼人、佐々木宣哉、岡村匡史
2. 発表標題 アンドロゲンはihsマウスの糖代謝を悪化させ糖尿病の発症を引き起こす
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野 堅太、清水 有紀子、佐々木 宣哉、岡村 匡史
2. 発表標題 高テストステロン血症がihsマウスのインスリン分泌へ及ぼす影響
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 中野堅太, 清水有紀子, 佐々木宣哉, 岡村匡史
2. 発表標題 ihsマウスの耐糖能異常および低インスリン血症原因遺伝子の同定
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野堅太, 清水有紀子, 佐々木宣哉, 岡村匡史
2. 発表標題 耐糖能異常および低インスリン血症に関する新規遺伝子の同定
3. 学会等名 第35回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2022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

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