

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 30 日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009 年度～2012 年度

課題番号：21300156

研究課題名（和文）

我国で発見された新規非肥 2 型糖尿病マウスによる疾患モデル群樹立と原因遺伝子の特定

研究課題名（英文）

Development of murine models of disease using a novel non-obese type 2 diabetes mellitus mouse discovered in Japan and isolation of responsible genes

研究代表者 松 島 芳 文 埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・研究員
(マツシマ ヨシブミ) 10094955

研究成果の概要（和文）：本糖尿病マウスは、非肥満性で常染色体性優性遺伝を示す自然発症の新規疾患モデルマウスである。ヘテロ接合体は 2 型糖尿病モデルとなるが、ホモ接合体は重篤な高血糖により生後 4 日で死に至る新生児糖尿病モデルとなることがわかった。

発端の変異マウスが NC/Jic と KOR1 との 2 近交系マウスの F2 個体に発見されたので、遺伝的背景を均一にする目的と、従来から糖尿病は多因子疾患であり解析が困難であるとされていたので、糖尿病発症に関与する修飾遺伝子を明らかにするモデルの樹立を行なった。

方法は交配実験により、変異遺伝子を遺伝的背景の異なる 10 系統の近交系に導入したコンジェニック糖尿病モデル、4 系統のアポ E 欠損高脂血症マウス (SHL) に導入した高脂血症併発糖尿病モデルの樹立を目指した。コンジェニック系の完成は N12 世代以上であるが、現状では、コンジェニック糖尿病モデルは、AKR, BALB/c, C3H/He, C57BL/6, DBA/2, JF1, NC/Jic および NC/Nga の 8 系統が完成し、高脂血症併発糖尿病モデルは B6.SHL, C.SHL, C3.SHL および D2.SHL の 4 系統が完成している。しかし、A/J および KOR1 の 2 系統はいずれも N6 世代でありコンジェニック化を進めている。

これらのコンジェニック糖尿病モデルは、各系統間で尿糖の出現週齢、血糖値の高低、発症の性差など、種々の表現型に著明な差異が認められ、個別医療に対応した新規モデルとしても有用である。また、これまでに糖尿病性腎症モデル樹立の報告は少なく、研究者から渴望されていたが、C57BL/6 コンジェニック系は腎臓の病理学的所見から、糖尿病性腎症の新規モデルである可能性が示唆された。

原因遺伝子のポジショナルクローニングは、マウス第 8 染色体のセントロメア近傍に候補領域を絞り込み、DNA シークエンスを行っている。その詳細は論文投稿前なので差し控える。

研究成果の概要（英文）：The murine models of diabetes reported in the present study are novel models of spontaneous disease. The mice are non-obese and show autosomal dominant inheritance. The type 2 diabetes models are heterozygote strains, whereas the neonatal diabetes mellitus models are homozygote strains that die due to severe hyperglycemia at 4 days after birth. The progenitor mutant mouse was discovered in the F2 population between the two inbred mouse strains NC/Jic and KOR1. Because diabetes is a multifactorial disease and its genetic analysis is difficult, murine models with the same genetic background were developed to isolate modification genes responsible for the onset of diabetes. Hybridization was used to introduce the mutant genes into 10 inbred strains with different genetic backgrounds to create congenic murine models of diabetes and into four apoE-deficient hyperlipidemia mouse (SHL) strains to develop murine models of diabetes with hyperlipidemia. Development of

congenic murine models is completed at the N12 or a later generation. Eight congenic strains for diabetes (AKR, BALB/c, C3H/He, C57BL/6, DBA/2, JF1, NC/Jic, and NC/Nga) and four strains for diabetes with hyperlipidemia (B6.SHL, C.SHL, C3.SHL, and D2.SHL) have been successfully developed in this study. However, A/J and KORI are both at the N6 generation and are being advanced to the later generations to generate congenic strains.

These congenic strains showed prominent differences with respect to various phenotypic characteristics, such as age in weeks at urinary sugar manifestation, blood sugar level, and sex difference, at disease onset. Therefore, they also have utility as novel models for personalized medicine. There are, as yet, few reports on the development of diabetic nephropathy models that researchers long for. However, pathological observations of the kidneys of the C57BL/6 congenic strain suggest that it may be a novel model of diabetic nephropathy.

Positional cloning of the responsible gene has narrowed down the candidate region to the vicinity of the centromere of the mouse chromosome 8. DNA sequencing is ongoing, and the results there of will be available before manuscript submission.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3500千円	1050千円	4550千円
2010年度	3200千円	960千円	4160千円
2011年度	3200千円	960千円	4160千円
2012年度	2900千円	870千円	3770千円
年度			
総計	12800千円	3840千円	16640千円

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：2型糖尿病、新生児糖尿病、自然発症、非肥満、コンジェニック系、糖尿病性腎症、疾患モデル、高脂血症併発モデル

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

日本産野生マウス由来 KOR1 と、愛玩用マウスから近交系化されアトピー性皮膚炎モデルである NC/Jic との交配実験中に、ケージの床敷きが異常に濡れているのに気付いた。その原因が糖尿病による多飲と多尿のためであると直感し、尿糖および血糖値を測定した。その結果、尿糖は強陽性であり、血糖値は 597mg/dl を示した。発端の雄マウスを含む実験群は、NC/Jic 雌と KOR1 雄の交配 F2、雄 16 匹、雌 21 匹であり、検索の結果さらに 2 匹の雄個体が糖尿病を発症していることがわかった。その後、糖負荷試験、病理学的検索および交配実験などの結果を総合し、非肥満性の新規 2 型糖尿病マウスであることが、示唆された。発端マウスは前述の様に交雑 F2 個体に見出されたので、疾患モデル動物学の立場から複数近交系へのコンジェニック化を提唱したところ、多くの糖尿病学および実験動物学研究者から、糖尿病は多因子疾患であり、発症には環境要因も複雑に関与している事は常識であり、コンジェニック化は不可能であるとされた。

2. 研究の目的

発端マウスは NC/Jic マウスと KOR1/Stm マウスとの交雑 F2 個体であり、遺伝的背景を均一にする目的と、糖尿病の複雑さは糖尿病発症に関与する種々の修飾遺伝子によると推定し、可能な限り遺伝的背景の異なるコンジェニック系糖尿病モデルの樹立を目標とした。また、原因遺伝子のポジショナルクローニングは、コンジェニック途上の個体を用いて行なった。

3. 研究の方法

コンジェニック系のドナー系統は実験用マウス (*Mus musculus domesticus*) から A/J、AKR、BALB/c、C3H/He、C57BL/6、DBA/2、NC/Nga、および NC/Jic マウス、日本産野生由来マウス (*Mus musculus molossinus*) からは KOR1/Stm および JF1/Ms マウスを選んだ。更に、申請者が樹立した 4 系統 (BALB/c、C3H/He、C57BL/6、および DBA/2) のコンジ

ェニックアポ E 欠損高脂血症マウスに原因遺伝子を導入した高脂血症と糖尿病の併発モデル 4 系統とで、総計 14 系統の完全コンジェニック糖尿病モデルの樹立に向けて交配実験を行った。

コンジェニック系の作出は、尿糖の出現と血糖値測定および糖負荷試験により、糖尿病発症を判定したヘテロ個体を戻し交配に用いた。原因遺伝子が特定された後は、DNA 判定によりヘテロ個体を選別して、継代を進めた。

原因遺伝子のポジショナルクローニングは、作出途上のコンジェニック系のうち、継代の進んでいる系、および実験用マウスに比し、マイクロサテライトマーカーの多型が豊富なモロシヌス由来の JF1 系および KOR1 系の発症個体を用いた。

4. 研究成果

本糖尿病の遺伝様式は、常染色体性の優性遺伝に従い、発端の変異遺伝子は NC/Jic マウス由来であることがわかった。

作出した全てのコンジェニック系において、原因遺伝子のヘテロ接合体の場合は、いずれの系も高インスリン血症であり、糖負荷試験の結果からも 2 型糖尿病モデルとなることがわかった。さらに、C57BL/6 系は、腎臓の病理所見から、国内外の研究者が渴望している糖尿病性腎症モデルとなることが示唆された。BALB/c 系、C3H/He 系、DBA/2 系、AKR 系、および A/J 系などは、糖尿病発症までに 4~5 ヶ月を要するので、脂肪、でんぷんなどのダイエット負荷による実験発症を組み合わせた糖尿予備軍モデル、逆に NC/Jic 系、NC/Nga 系および JF1/Ms 系は、生後 3~4 週齢から高血糖になり、尿糖は強陽性を呈するので、血糖降下剤、特定保健用食品などの効果検定モデルとして有用である。また、これらのコンジェニック系には、糖尿病発症に性差があり、KOR1/Stm 系および JF1/Ms 系は雌雄ともに発症する。しかし、他の系は、雄にのみ発症する系と、僅かな頻度で雌も発症する系とがあり、遺伝的背景の差

異が影響して複雑である。1型糖尿病モデルとして著明な NOD マウスは雌で 80%、雄で 20%の発症 (Makino, et. al, *Jikken Dobutsu*. 1980)であり、糖尿病の発症と性差を考察するモデルとしても有用である。

また、アポ E 欠損高脂血症マウス(SHL)の 4 系統コンジェニックマウス B6.SHL、C.SHL、D2.SHL および B6.SHL に変異遺伝子を導入した高脂血症と糖尿病の併発モデルの樹立は、国内外でほとんど報告例がなく、高脂血症が糖尿病を増悪させる原因遺伝子、それぞれの治療薬が及ぼす薬効と副作用などを検索するモデルとしても有用である。

一方、各コンジェニック系の原因遺伝子がホモ接合体の場合は、生後 0 日齢から、同腹非発症個体と比し、体重の減少が認められ、高血糖を呈し、生後 4～6 日以内に死亡する世界で初めての新生児致死性糖尿病モデルとなることがわかった。

原因遺伝子のポジショナルクローニングは、マウス第 8 染色体のセントロメア近傍にマッピングしたが、遺伝子の詳細は論文報告前なので差し控える。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. 松島芳文、日合 弘、新規 2 型糖尿病マウス DMS のコンジェニック系作出と原因遺伝子のポジショナルクローニングの現状、第 24 回日本糖尿病・肥満動物学会、2010 年 1 月 (大阪)

□2. 松島芳文、日合 弘、渡邊潤子、新規自然発症新生児糖尿病モデルマウスの発見と原因遺伝子のポジショナルクローニング、第 26 回日本糖尿病・肥満動物学会 2012 年 2 月 (名古屋)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○実施状況 (計 1 件)

名称：2 型糖尿病モデルマウス

発明者：松島芳文

権利者：埼玉県

種類：公開特許公報 (A)

番号：596164010

取得年月日：平成 19 年 8 月 10 日 (2007 年)

国内外の別：国内、米国

樹立したコンジェニック糖尿病モデル系は、バイオリソースのために、つくば理研バイオリソースセンター (BRC) への寄託を予定している。また、C57BL/6 系、C3H/He 系、および NC/Nga 系モデルについては、市販に向けて埼玉県と日本エスエルシー社と委託販売契約を交わすことが予定されている。

[その他]

ホームページ等

埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所ホームページ

http://www.saitama-cc.jp/rinsyousyuyou_lab/project08.html

(動画) 新規糖尿病マウス、NC/Nga 系コンジェニックマウスヘテロ個体

http://www.youtube.com/watch?v=btk_NF7wcnc

(動画) 新規糖尿病マウス、JF1 系コンジェニックマウス新生児糖尿病マウス

<http://www.youtube.com/watch?v=tK820-64fls>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松島芳文 (1)

研究者番号：10094955

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

