

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23500494

研究課題名(和文) マウス体系的遺伝解析系を用いたストレプトゾトシン誘発糖尿病感受性遺伝子の解析

研究課題名(英文) Genetic analyses of the susceptibility gene for streptozotocin induced diabetes in A/J mice

研究代表者

大野 民生 (Ohno, Tamio)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90293620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ストレプトゾトシン(STZ)は膵細胞に対する特異的な細胞毒性を有しマウス・ラットの実験的糖尿病モデルの作製に汎用されているが、その原因遺伝子の解析は少ない。本研究により、A/J系統のChr.11にSTZ誘発糖尿病感受性遺伝子が存在する事を明らかにし、更にその存在領域をD11Mit163(27.7Mb)～D11Mit51(36.4Mb)に限局した。この領域内に存在する有力な候補遺伝子(Mpg: N-methylpurine-DNA glycosylase)にはアミノ酸置換を伴う変異が存在しており、この変異がA/J系統のSTZ感受性の原因と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Streptozotocin (STZ) is a well-known diabetogenic agent that has cytotoxic activities in pancreatic B-cells. It has been reported that inbred mouse strains differ in their susceptibility to the diabetogenic effect of STZ treatment. However, there has been little use of forward genetic approaches to analyze STZ susceptibility. Our analysis using A/J, SM/J and A/J-11SM mice identified the diabetogenic gene to STZ on Chr. 11. We developed Chr. 11 congenic strains from A/J-11SM mice and measured their susceptibility to STZ. Congenic mapping indicated that major locus for STZ susceptibility was present between D11Mit163 (27.7Mb) to D11Mit51 (36.4Mb) on Chr. 11. Exome sequencing analysis in SM/J and A/J mice revealed a non-synonymous coding mutation (A132S) in the Mpg (N-methylpurine-DNA glycosylase) gene suggested this to be the causative gene for STZ susceptibility in the A/J mouse strain.

研究分野：実験動物学

キーワード：マウス 体系的遺伝解析系 コンソミック系統 コンジェニック系統 ストレプトゾトシン 糖尿病感受性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) マウスは環境因子を厳密に統御できるため、糖尿病発症に關与する遺伝因子の解析には極めて有用な研究材料である。糖尿病モデル動物には主に人為的誘発モデル動物、自然発症モデル動物、発生工学的手法により作製されたモデル動物の3つに大別できるが、なかでも人為的誘発モデル動物は再現性や誘発効率が高く短期間で発症させられるため、同じ病態の糖尿病動物を特定の時期に大量に用意できるというメリットがある。特にストレプトゾトシン (STZ) は、膵β細胞の破壊によりインスリンの絶対的不足を起こす事でインスリン依存型糖尿病を発症させるため催糖尿病薬として汎用されている。

(2) 我々は表現型の違いを支配する遺伝子を染色体上の位置情報を手掛かりに同定する順遺伝学的手法により、各種疾患感受性遺伝子の解析を行ってきた。その過程で A/J と SM/J という2系統を起源とするコンソミック系統群 (A/J-NSM) やコンジェニック系統群、リコンビナント近交系 (SMXA・RI 系統群) 等の体系的遺伝解析系を独自に樹立して、糖・脂質代謝、腫瘍感受性、血算項目等の多因子遺伝形質の解析を行ってきた。

2. 研究の目的

マウス系統間には STZ 誘発糖尿病感受性に明確な系統差が存在する事が以前から知られているが、その原因となる遺伝因子は明らかにされていない。マウスの STZ 感受性を規定する遺伝子は膵β細胞の脆弱性に關与し糖尿病の発症に何らかの役割を有している可能性があると考えられる。本研究では、A/J と SM/J 系統から作製された上述の体系的遺伝解析系を用いて STZ 誘発糖尿病感受性を支配する遺伝子を同定する事を目的とした。これまでに実施された順遺伝学的手法によるマウス STZ 誘発糖尿病感受性原因遺伝子の解析は3報しか報告されていないが、そのうちの2報において STZ 誘発性糖尿病感受性遺伝子座の存在が示されている Chr.11 に焦点を絞り解析する事にした。

3. 研究の方法

(1) A/J 系統は日本 SLC から購入した個体を実験に用いた。SM/J 系統は理化学研究所バイオリソースセンターから分与後、自家繁殖させて実験に用いた。A/J-11SM 系統は我々の

研究室で確立し、維持している個体を実験に用いた。実験に使用したマウスは、市販の固形飼料を自由摂食させ、飲水は自動給水ノズルから自由飲水させた。温度 23±1、湿度 55±10、照明 12L12D でコントロールされた SPF 飼育室内で飼育した。Chr.11 コンジェニック系統群作製の作製は、A/J-11SM 雄個体を A/J 雌個体に戻し交配を行い、Chr.11 が SM/J と A/J 系統のヘテロ型となった雄個体を得た。得られたヘテロ雄個体を更に A/J 雌個体に戻し交配し、SM/J 由来の Chr.11 が断片化された雄個体群を起源としてコンジェニック系統群を作出した。遺伝子型の判定は、マウスの尾端より常法により抽出した DNA を用いて PCR-SSLP 法により行った。

(2) マウス腹腔内に STZ を 175 mg/kg B.W. の割合で1回投与した後の血糖値や糖尿病発症率の変化を1日間隔で2週間観察し、最後に深麻酔下で心臓から血液を採取した。血糖値は、イソフルラン吸入麻酔下で体重測定後に尾端より血液を採取し、血中グルコース測定器・グルテストエース R を使用して測定した。なお、血糖値が 200 mg/dl を越えた個体を糖尿病発症個体とした。心臓から採取した血液は 3,000 rpm、4 で5分間遠心して血漿を得て、それを EIA サンドイッチ法に基づく市販のキット用いて血中インスリン値を測定した。A/J とその他の系統との比較は、糖尿病発症率は Fisher's exact test、血糖値、血中インスリン値、体重減少率は A one-way analysis of variance (ANOVA) で解析後、Dunnett's multiple comparison test を行った。

4. 研究成果

(1) Chr.11 における STZ 感受性遺伝子の存在について： A/J、SM/J、A/J-11SM 系統の STZ 投与後の累積糖尿病発症率、血糖値、血中インスリン値を比較したところ、A/J 系統は高い糖尿病発症率 (100%)、顕著な高血糖 (> 400mg/dl)、顕著な低インスリン値 (< 0.1ng/ml) を示し STZ 誘発糖尿病に高感受性であった。一方、SM/J と A/J-11SM 系統は A/J 系統に対して有意に高い血中インスリン値 (> 0.2ng/ml) を示し、糖尿病発症率 (約 50%) と血糖値 (< 300mg/dl) は有意に低く STZ 誘発糖尿病に抵抗性を示した (図 1)。3 系統の STZ 感受性は「A/J > A/J-11SM SM/J」

であった。したがって、A/J 系統の Chr.11 には STZ 感受性遺伝子が存在する事が判明した。

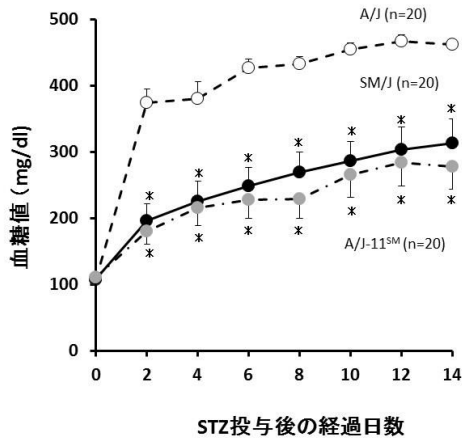


図1 A/J、SM/J、A/J-11SM系統のSTZ投与後血糖値

(2) Chr.11 上の STZ 感受性遺伝子の存在領域について： A/J 系統の Chr.11 に存在する STZ 感受性遺伝子の存在領域を特定するために、A/J-11SM 系統を起源として SM/J 由来の Chr.11 を断片化させたコンジェニック系統群を作成し、各系統の STZ 感受性を上述の方法で解析した。その結果、D11Mit163(27.7Mb) ~ D11Mit51(36.4Mb) の領域が SM/J 系統由来となっている 3 種のコンジェニック系統は何れも低い発症率 (< 40%) と血糖値 (< 250mg/dl) を示し STZ 抵抗性であることが判明した。一方、この領域が A/J 系統由来の 6 種のコンジェニック系統は何れも A/J 系統と同じレベルの STZ 感受性を示した(図2)。したがって、Chr.11 の 27.7 ~ 36.4Mb の 8.7Mb の領域内に STZ 感受性遺伝子が存在する事が判明した。

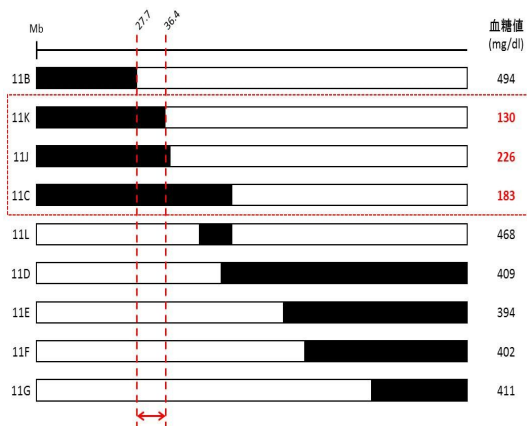


図2 Chr.11上のSTZ誘発糖尿病感受性遺伝子の存在領域

(3) STZ 感受性遺伝子の候補遺伝子解析について： A/J と SM/J 系統のゲノムのエキソン部分を市販のキットを用いて効率的に捕捉し、これを次世代シーケンサーで解読して両系統間のエキソン部分の変異を網羅的に解析して両系統間の変異遺伝子リストを作成した。更に、このリストのうち、Chr.11 の Chr.11 の 27.7 ~ 36.4Mb 内に存在する変異遺伝子を調べたところ、少なくとも 21 個の遺伝子にアミノ酸置換部位が存在している事が判明した。これらの遺伝子の機能についてマウスゲノムデータベースを用いて解析したところ、STZ 感受性に関与する可能性があるのは *Mpg*(N-methylpurine-DNA glycosylase) 遺伝子に絞られた。更に、この *Mpg* 遺伝子の KO マウスでは STZ 感受性が変化する事が報告されており、この遺伝子が極めて有力な候補遺伝子であると考えられた。

A/J 系統の *Mpg* 遺伝子には少なくとも 3 箇所のアミノ酸置換を伴う変異(V47L, S86L, A132S)が存在している。MPG の酵素活性に必須なのは 101 ~ 315 番目のアミノ酸残基であることや、種間でのアミノ酸配列が高度に保存されているのは 118 ~ 194 番目のアミノ酸残基領であることを考えると、A132S 変異が STZ 感受性の原因変異である可能性が高いと考えられた(図3)。更に、A/J 系統と同様に極端な STZ 誘発糖尿病感受性を示す MSM 系統や NZW 系統は *Mpg* 遺伝子に同じ変異を有していた。したがって、A/J 系統の *Mpg* 遺伝子内の A132S 変異がこの系統の STZ 誘発糖尿病感受性の原因遺伝子変異である可能性が極めて高いと考えられた。

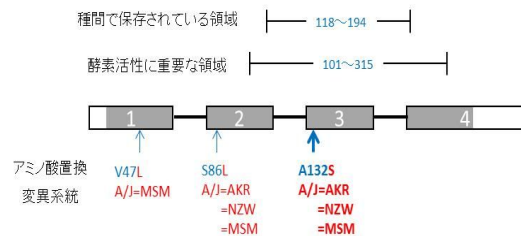


図3 *Mpg* 遺伝子の構造と変異

STZ による膵 β 細胞死の機構として、DNA 損傷が過剰に起きると PARP1 活性が急上昇しその基質となる細胞内 NAD が枯渇して膵 β 細胞死に至るといふ岡本理論がよく知られ

ている。MPG は損傷塩基の認識除去に関与していることから、A/J 系統では膵β細胞内に取り込まれた STZ により損傷した塩基の認識除去が *Mpg* 遺伝子の変異により過剰に起きて PARP1 活性が急上昇し、細胞内 NAD の極端な枯渇による過剰な膵β細胞死が起きる事が STZ 誘発糖尿病感受性の機構であると考えられた(表 1)。

表1 STZ投与による膵β細胞のネクローシス誘導の機構

| | 塩基の損傷 (アルキル化) | 損傷塩基の 認識と除去 (MPG) | 除去部位の 切断 (APEX1) | PARP-1 活性 | NAD量 | ATP量 | ネクローシス |
|------------------|------------------|-------------------------|------------------------|--------------|------|------|--------|
| 野生型Mpg (SM/J) | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↓ | ↓ | ↑ |
| 変異型Mpg (A/J) | ↑ | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | ↓↓ | ↓↓ | ↑↑ |
| Mpg KO | ↑ | → | → | → | → | → | → |
| Parp1 KO | ↑ | ↑ | ↑ | → | → | → | → |

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)

[学会発表](計6件)

前川智樹、小林美里、伊藤美佳子、大野欽司、馬場谷成、上田裕紀、池上博司、堀尾文彦、高橋雅英、大野民生。マウス系統間のストレプトゾトシン誘発糖尿病感受性の遺伝的解析。第124回関西実験動物研究会。2014年12月5日。京都大学楽友会館(京都府・京都市)。

前川智樹、小林美里、海野明広、井原邦夫、伊藤美佳子、大野欽司、堀尾文彦、高橋雅英、大野民生。マウス A/J 系統のストレプトゾトシン誘発糖尿病感受性遺伝子の解析。第61回日本実験動物学会総会。2014年5月16日。札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)。

大野民生、前川智樹、海野明広、平井佳奈、井原邦夫、伊藤美佳子、大野欽司、小林美里、堀尾文彦。A/J 系統に SM/J 系統の第11番染色体を導入したマウス・コンジェニック系統群の作出とその応用。第61回日本実験動物学会総会。2014年5月16日。札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)。

前川智樹、小林美里、海野明広、井原邦夫、伊藤美佳子、大野欽司、堀尾文彦、高橋雅英、大野民生。マウスのコンソミック系統(A/J-11SM)を応用したストレプトゾトシン誘発糖尿病感受性遺伝子の解析。第28日本糖

尿病肥満動物学会。2014年2月14日。宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)。

前川智樹、小林美里、海野明広、井原邦夫、柴田哲秀、大野欽司、堀尾文彦、高橋雅英、大野民生。

マウスを用いたストレプトゾトシン誘発糖尿病感受性遺伝子の解析。第116回関西実験動物研究会。2012年12月14日。聖護院御殿荘(京都府・京都市)。

大野民生。SM/J と A/J 系統を起源とするマウス体系的遺伝解析系を用いた多因子形質の解析。平成24年度国立遺伝学研究所研究会。マウス Forward Genetics の新潮。2012年12月07日。国立遺伝学研究所(静岡県・三島市)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 民生 (OHNO, Tamio)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 90293620

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

堀尾 文彦 (Horio, Fumihiko)

名古屋大学・生命農学研究科・教授
研究者番号: 20165591

池上 博司 (IKEGAMI, Hiroshi)

近畿大学・医学部・教授
研究者番号: 20221062

(4) 研究協力者

前川 智樹 (MAEGAWA, Tomoki)

名古屋大学・大学院医学系研究科・博士課程