

## 論文の内容の要旨

論文題目： 遺伝的背景を利用した新しい2型糖尿病マウスモデルの作製と解析

氏 名： 唐澤 博史

### 第1章：序論

2型糖尿病の病因には、環境・生活習慣因子と遺伝因子の両者が重要である。近代的なライフスタイルは慢性的なエネルギー過剰により肥満を発症させインスリン抵抗性を惹起する。さらに、膵β細胞のインスリン分泌機能が異常を来すことにより、インスリン抵抗性状態は2型糖尿病に移行するが、この過程には個人差及び民族差が大きく膵β細胞の耐性は主に遺伝因子によって規定されると考えられている。

2型糖尿病の研究には優れた動物モデルが必要であるが、理想的な2型糖尿病マウスモデルの確立には至っていない。これまでに、ヒトの2型糖尿病に病因・病態の類似したモデルとして、C57BL/6 (B6) 正常マウスに高脂肪食を与えて肥満を誘導した食餌誘導性モデルが報告されているが、その病態は肥満及びインスリン抵抗性病態にとどまっており、2型糖尿病の発症には至っていない。2型糖尿病の動物モデルは、その病態要素として膵β細胞機能異常を含むことが必要と考えられる。

現在、B6は代表的な正常マウス系統として各領域で汎用されているが、本系統は膵β細胞の耐

性が強い遺伝的背景を持つため、2 型糖尿病モデルとして利用するには不向きと考えられる。一方で、C57BL/6 (BKs) や DBA/2 は膵  $\beta$  細胞の耐性が弱い遺伝的背景を持つことが示唆されている。

マウス系統における糖尿病発症の違いが遺伝的に規定された膵  $\beta$  細胞の耐性の違いに起因するとすれば、BKs や DBA/2 マウスは高脂肪食負荷による食餌性肥満の誘導により糖尿病を発症し、優れた 2 型糖尿病マウスモデルになることが期待される。しかしながら、両系統は高脂肪食による肥満誘導に対して抵抗性を示すために、2 型糖尿病を発症するのに十分な肥満を誘導することが出来なかった。

これらの事から、理想的な 2 型糖尿病マウスモデルの確立には、膵  $\beta$  細胞が脆弱な遺伝的背景を持つマウスにおいて重度の肥満を誘導することにより、インスリン抵抗性状態から 2 型糖尿病発症に至らしめることが重要であると考えられる。

上記の仮説に基づき、本研究では 2 つの異なる手法を用いることで従来のモデルの問題点を克服し、正常マウスが肥満から糖尿病を発症する 2 型糖尿病マウスモデルを確立するに至った (第 2 章、第 3 章)。さらに、確立された 2 型糖尿病マウスモデルを用いて、膵  $\beta$  細胞機能異常と糖尿病発症にかかわる原因遺伝子を探索し、候補遺伝子の機能解析を行なった (第 4 章)。

## 第 2 章：高脂肪食負荷 BDF1 マウス 2 型糖尿病マウスモデル

B6 マウスは高脂肪食負荷によって著しい肥満を発症するが、膵  $\beta$  細胞の耐性が強く糖尿病を発症しない。一方、DBA/2 マウスは膵  $\beta$  細胞の耐性が弱いものの、高脂肪食負荷によって十分に肥満しない。本検討では、両マウス系統の交配により、高脂肪食負荷により肥満する形質と膵  $\beta$  細胞の耐性が弱く肥満糖尿病を発症しやすい形質とを両立させることで、2 型糖尿病モデルの確立を試みた。

B6 マウスと DBA/2 マウスの F1 雑種である BDF1 マウス (雄性) を購入し、通常食または高脂肪食を与えて肥満と糖尿病の発症を検討した。7 週齢より高脂肪食を与えた BDF1 マウスは、著明な体重増加と脂肪蓄積を呈する肥満を形成した後に、約 3 ヶ月で著しい高血糖と糖尿、及び HbA<sub>1c</sub> 上昇を呈する糖尿病を発症した。血漿中のインスリン濃度は上昇し、インスリン抵抗性が示唆された。これらのマウスは経口糖負荷試験において著しい耐糖能異常を示すとともに、糖負荷直後のインスリン分泌応答不全を呈した。また、膵ランゲルハンス島のインスリン含量は低下し、*in vitro* におけるグルコース応答性のインスリン分泌能も低下していた。

これらの結果から、BDF1 マウスは B6 マウスの肥満しやすい形質と DBA/2 マウスの膵  $\beta$  細胞が脆弱な形質を併せ持つことにより、高脂肪食負荷により肥満糖尿病を発症することが示された。糖尿病を発症した BDF1 マウスにおいては、*in vivo* および *in vitro* でインスリン分泌能の低下が認

められ、インスリン抵抗性に対する膵β細胞の代償不全が糖尿病発症の原因と考えられた。

本モデルは、病的には正常動物が高脂肪食によって肥満から糖尿病を発症する点で、病的にはインスリン抵抗性からβ細胞機能異常により糖尿病を発症する点で、ヒトの2型糖尿病に類似していると考えられる。本モデルは、2型糖尿病の発症メカニズムの解明および、その治療薬の薬効評価に有用と期待される。

### 第3章：GTG 処置過食肥満マウス2型糖尿病マウスモデル

DBA/2 マウスやBKs マウスは膵β細胞が脆弱な遺伝的背景を持ち、肥満から2型糖尿病に移行しやすいと考えられるが、高脂肪食負荷による肥満誘導には抵抗性を示す。本検討では、満腹中枢の存在する視床下部腹内側核のグルコース受容ニューロンを選択的に破壊する gold thioglucose (GTG) 投与により過食肥満を誘導し、2型糖尿病マウスモデルの確立を試みた。

いずれも雄性のB6、DBA/2、BKs、及びBDF1 マウスを購入し、7週齢でGTGまたはsaline（対照群）を腹腔内投与し、全群を通常食で飼育して肥満と糖尿病の発症を検討した。各系統のGTG処置マウスはいずれも過食性の肥満を呈し、対照群に対する体重増加および体脂肪率の上昇は4系統でほぼ同様であった。このとき、DBA/2、BKs、及びBDF1系統のGTG処置マウスは、体重増加に伴って著しい血糖値上昇を示す糖尿病を発症した。一方で、B6系統のGTG処置マウスは3系統のマウスと同程度の体脂肪・内臓脂肪量を示しながらも正常血糖を維持し、糖尿病を発症しなかった。DBA/2、BKs、及びBDF1系統のGTG処置マウスは約3ヶ月後に実施した耐糖能試験において顕著な耐糖能悪化と、糖負荷後のインスリン応答不全を示した。

これらの結果から、膵β細胞の耐性が弱い遺伝的背景を持ち、肥満から糖尿病に移行しやすいと考えられたDBA/2マウスおよびBKsマウスが、GTG処置による肥満誘導によって肥満糖尿病を発症することが示された。また、第2章にて同様の形質が示唆されたBDF1マウスも糖尿病を発症した。糖尿病を発症した3系統では、糖負荷試験におけるインスリン分泌低下と、膵ランゲルハンス島のインスリン含量低下が認められ、膵β細胞の機能不全が肥満糖尿病の発症の重要な原因と示唆された。なお、本検討では通常食において糖尿病を発症したことから、膵β細胞の機能不全の原因は脂質の過剰摂取による代謝異常ではなく、肥満とインスリン抵抗性によることが示唆される。

本モデルの病態はヒトの2型糖尿病に類似していると考えられ、2型糖尿病の発症メカニズムの解明および、その治療薬の薬効評価に有用と期待される。

### 第4章：DNAマイクロアレイを用いたRaldh3の同定と機能解析

高脂肪食負荷 BDF1 マウスで発症した糖尿病は、膵  $\beta$  細胞の機能異常に基づくと考えられる。本検討では、DNA マイクロアレイを用いて膵ランゲルハンス島の遺伝子発現解析を行い、肥満糖尿病で特異的に発現の上昇する遺伝子として Retinaldehyde dehydrogenase 3 (Raldh3) を同定し、機能解析を行った。Raldh3 はレチナールからレチノイン酸への変換を触媒する酵素であり、レチノイン酸合成組織で発現が認められるものの、その生理的機能は不明な部分が多い。

高脂肪食負荷によって糖尿病を発症した BDF1 マウスの膵島における Raldh3 の発現レベルは、通常食を与えた対照と比較して約 7 倍に上昇していた。また、遺伝的糖尿病モデルである *db/db* マウスの膵島においても、糖尿病の発症前後で約 20 倍の著しい Raldh3 発現上昇が認められた。また、膵  $\beta$  細胞と  $\alpha$  細胞に由来する MIN6 細胞と alphaTC1 clone 9 細胞を、高血糖を模した高グルコース条件で培養すると、いずれの細胞でも Raldh3 発現が著しく亢進したことから、Raldh3 は高血糖条件下において、膵  $\beta$  細胞と  $\alpha$  細胞で発現が亢進することが示唆された。さらに、MIN6 細胞と alphaTC1 clone 9 細胞に Raldh3 を強制発現させた結果、MIN6 細胞からのインスリン分泌が低下する一方で、alphaTC1 clone 9 細胞からのグルカゴン分泌が増加し、Raldh3 がインスリン分泌を抑制しかつ、抗インスリンホルモンであるグルカゴンの分泌を亢進させることにより糖代謝を悪化させる可能性が示唆された。

今後、膵島における Raldh3 の機能を解明する事で、2 型糖尿病の新たなメカニズムが明らかになる可能性が考えられる。なお、Raldh3 が細胞内のレチノイド代謝に与える影響や、レチノイドそのものによる細胞機能への影響等についても、さらに検討を進めることが必要である。

## 第 5 章：総括

本研究では、高脂肪食で肥満しやすい B6 マウスとの交配、及び、視床下部の満腹中枢を破壊する薬物の使用、の 2 種類の手法により、正常マウスが肥満から糖尿病を発症する新しい 2 型糖尿病マウスモデルを確立した。さらに、高脂肪食負荷 BDF1 マウスの膵ランゲルハンス島を用いた遺伝子発現解析により、2 型糖尿病発症の関連遺伝子として、Raldh3 を同定し、その機能の一部を明らかにした。

これらは、膵  $\beta$  細胞の機能異常や 2 型糖尿病の発症メカニズムの解明に寄与するとともに、肥満および 2 型糖尿病の新たな治療法の開発に貢献するものと期待される。