





## 論文審査の要旨および担当者

学位申請者	中野 堅太 (DV15007 実験動物学)
学位論文題目	新規糖尿病モデルマウス( <i>ihs</i> )における糖尿病病態 および遺伝学的解析
担当者	主査 北里大学教授 折野 宏一  副査 北里大学教授 黒瀬 陽平  副査 麻布大学教授 山下 匡  副査 北里大学准教授 岡田 宗善 

### 論文審査の要旨

糖尿病はインスリンの分泌不全および、インスリン作用の不足による慢性的な高血糖を主徴とした代謝疾患である。糖尿病人口は、世界的に爆発的な増加を示しており、日本を含む東アジア諸国の糖尿病患者数は世界の糖尿病患者の4分の1を占めると言われている。糖尿病は1型(T1D)と2型(T2D)に大別され、ヒトでは大半がT2Dである。欧米人では大半でT2Dであり、肥満型でインスリン抵抗性が強い。一方、日本人を含む東アジア人では非肥満型で、インスリン分泌能が低いという特徴を持つ。

糖尿病は、複数の遺伝的・環境的要因が組み合わさり発症する多因子疾患であり、その病態は多彩で、極めて長い経過を経て発症・進展し病態が変遷していく。従って、ヒトの疾患との類似性を持つ異なる多種多様な動物モデルを開発し、解析することはこの疾患に対するより深い理

解をもたらす。このため、糖尿病研究においては、交配や飼育環境を人為的に操作でき、これらの効果を経時的に調べることができるモデル動物が非常に有用となる。しかし、現在報告されている糖尿病モデルの多くは欧米人型の肥満・インスリン抵抗性モデルであり、日本人を含む東アジア人で一般的な非肥満・インスリン分泌不全型のモデルは非常に少ない。

本研究室では、慢性腎症のモデルである ICGN マウスから新たに、非肥満型の新規糖尿病モデル (*his*: insulin hyposecretion) マウスを樹立した。本研究では、このマウスの糖尿病病態を解析し、原因遺伝子を明らかにするために遺伝学的解析を行った。

## 第 1 章 *ihs* マウスにおける糖尿病病態解析

*ihs* 雄マウスは、27 週齢で 50%、42 週齢までに約 90%の個体が糖尿病を発症したが、雌マウスでは観察期間である 51 週齢までに糖尿病の発症は見られなかった。経口糖負荷試験では、*ihs* マウスは雌雄ともにグルコース応答性インスリン分泌 (GSIS) の顕著な低下を認め、これに伴った耐糖能異常を示した。一方で、インスリン感受性は雌雄ともに正常であり、膵臓におけるインスリン含有量においても差は認められなかった。膵島の形態学的解析では、 $\alpha/\beta$  細胞比の増加および、 $\beta$  細胞面積の低下を認めたものの、炎症性細胞の浸潤および膵島の線維化等の著しい形態異常は見られなかった。以上の結果から、本マウスの糖尿病発症には雌雄差が存在し、糖尿病はインスリン分泌不全に起因することが示された。

## 第2章 *ihs* マウスにおけるインスリン分泌不全病態の解析

インスリン分泌は膵  $\beta$  細胞では取込まれたグルコースの代謝による細胞内 ATP 濃度の増加が、ATP 感受性カリウムチャネルの閉鎖を引き起こし、これにより生じた脱分極が電位依存性カルシウムチャネル (VDCC) を開口させ、細胞内へのカルシウム流入がインスリン顆粒の開口放出により起こる。*ihs* マウスの GSIS 異常は、この経路のどこかに障害を持つと考えられる。インスリン分泌不全病態を詳細に解析するため、膵灌流実験および単離膵島を用いたインスリン分泌実験を行い、障害部位の特定を行った。膵灌流実験において、*ihs* マウスは、高グルコース刺激に対してインスリン分泌を示さず、さらに  $\beta$  細胞に強制的な脱分極を誘起する塩化カリウム刺激に対してもインスリン分泌を生じなかった。*ihs* マウスの単離膵島はインスリン分泌を促進するスルフォニル尿酸剤刺激に対しても効果が認められなかった。一方、VDCC 非依存的に細胞内へカルシウムを導入するイオノフォアで膵島を刺激するとインスリン分泌を生じることを見出した。これらの結果から、*ihs* マウスにおけるインスリン顆粒の分泌不全は、VDCC を介したカルシウム流入等のカルシウムシグナルにおける極めて初期の経路に障害を持つことが示唆された。

## 第3章 *ihs* マウスにおけるインスリン分泌不全原因遺伝子の探索

*ihs* マウスのインスリン分泌不全原因遺伝子を同定するため、近交系の C57BL/6 (以下、B6) マウスとの戻し交雑群を作製し糖負荷試験を行い、血糖値を指標として連鎖解析を行った。その結果、18 番染色体上の *D18Mit132-D18Mit186* (50.8 Mb) の間で強い連鎖が認められた。次に、*ihs*

マウスの 18 番染色体上の 5.9 Mb の領域を B6 マウスへ導入したコンジュニックマウス {B6. *ihs*-(*D18Mit233*-*D18Mit12*)、以下 B6-*ihs* マウス} を作製し、インスリン分泌能を調べた。その結果、B6-*ihs* マウスでは、グルコース刺激に対して著しいインスリン分泌不全を呈した。以上の結果から、本原因遺伝子が 18 番染色体上に存在することが明らかとなった。さらに、SSLP および SNP マーカーの数を増やし、原因遺伝子座の周辺をより詳細にマッピングすることで、候補領域を *D18Mit70*-*D18Mit12* (1.3 Mb) まで絞り込むことに成功した。しかしながら、この領域にはインスリン分泌やカルシウムシグナルとの直接的な関与が報告されている遺伝子は存在しない。従って、*ihs* マウスのインスリン分泌不全は、新規の遺伝子変異によって生じることが示唆された。

#### 第 4 章 糖尿病発症における性ホルモンの影響

*ihs* マウスは雌雄ともにインスリン分泌不全に起因する耐糖能異常を有するものの、糖尿病発症には性差が存在する。性ホルモンの影響を調べるために、*ihs* マウスに卵巣除去 (OVX)、精巣除去 (ORX) 手術を施し糖尿病発症率を比較検討した。コントロールには偽手術を行った雌雄の *ihs* マウスを使用した。OVX 群では糖尿病を発症した個体は存在しなかった。一方、雄マウスにおいては、コントロール群では 15 週齢までに全ての個体が糖尿病を発症したのに対し、ORX 群では観察期間である 40 週齢までに糖尿病を発症した個体は存在しなかった。また、ORX 群ではコントロール群と比較し、耐糖能が有意に改善することを見出した。一方、インスリン感受性には両群間で差は見られなかった。以上の結果から、*ihs* マウ

スの糖尿病発症には精巣から分泌されるアンドロゲンが深く関与し、アンドロゲンは *ihs* マウスのインスリン分泌不全病態を増悪させることで糖尿病の発症を引き起こすことが示唆された。

### 【論文審査の結果】

本研究の成果から、*ihs* マウスが、1) 非肥満・インスリン分泌不全型のモデルであること、2) カルシウムシグナルの初期経路に障害を持つこと、3) その原因が新規の遺伝子変異である可能性が高いことを明らかにされた。特に東アジア諸国の糖尿病病態を反映する非肥満・インスリン分泌不全型の有用なモデルを確立したことは意義深いものである。*ihs* マウスの解析から、カルシウムシグナルを介した新たなインスリン分泌制御機構が解明され、糖尿病の予防・治療における新たな創薬標的が同定されることが期待される。

これらの一連の研究により、*ihs* マウスは非肥満・インスリン分泌不全型の有用なモデルになることが解明され、東アジア諸国の糖尿病病態の解明・治療に繋がる研究であり、極めて高い価値を有するものと判断された。特に審査員一同は、本論文が新規の知見を多く含み医学や獣医学の発展に寄与するものとの認識で一致した。さらに著者が真摯な研究態度と豊かな人間性を持ち、将来研究成果を社会に還元できる能力を有するものであり、博士（獣医学）の学位の授与に値すると判断した。