

学位論文要旨

新規糖尿病モデルマウス(*ihs*)における糖尿病病態および  
遺伝学的解析

The pathophysiological and genetic characterization of novel model of  
congenital diabetes: the insulin hyposecretion mouse.

北里大学大学院獣医学系研究科  
獣医学専攻 博士課程

中野 堅太

Nakano Kenta

指導教授 佐々木 宣哉

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。糖尿病は1型(T1D)と2型(T2D)に大別され、ヒトの糖尿病の大半がT2Dである。T2Dは、人種によりその病態が異なり、一般的に欧米人では肥満型で、末梢組織での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。近年の東アジア諸国におけるT2D患者の増加は劇的であり、現在大きな問題となっている。T2D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。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(insulin hyposecretion: *ihs*)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

随時血糖値 250mg/dl 以上を糖尿病発症と定義し、まず *ihs* マウスにおける糖尿病の発症率を調べた。*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。一方、雌マウスでは観察期間である51週齢までに糖尿病を発症した個体は存在しな

かった。このことから、本マウスの糖尿病発症には雌雄差が存在することが明らかとなった。さらに、経口糖負荷試験の結果、*ih*s 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コントロールマウスと比較して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、*ih*s マウスの糖尿病はインスリン分泌不全に起因することが明らかとなった。

## 第2章 *ih*s マウスにおけるインスリン分泌不全病態の解析

膵  $\beta$  細胞に取り込まれたグルコースは代謝され、細胞内の ATP 濃度が上昇し、これを感知した ATP 感受性カリウムチャンネルが閉鎖することで細胞膜の脱分極を生じる。これにより電位依存性カルシウムチャンネル(VDCC)が開口し、細胞内へのカルシウム流入が引き金となりインスリン分泌が生じる。*ih*s マウスは、GSIS 異常を示すことから、この経路のどこかに障害を持つと考えられる。*ih*s マウスの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、*ih*s 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いことを見出した。さらに、*ih*s マウスの単離膵島はインスリン分泌を促進する SU 剤刺激に対してもインスリン分泌の増加が認められなかった。

これらの結果から、*ih*s マウスは、インスリン分泌における VDCC 以降の経路に障害を持つことが示唆された。さらに、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。この結果は、*ih*s マウスにおいて、インスリン顆粒の細胞膜への輸送・結合・融合によるインスリン放出経路が正常であることを示している。以上の結果から、*ih*s マウスは 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 *ih*s マウスにおけるインスリン分泌不全原因遺伝子の探索

*ih*s 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、F<sub>1</sub> および N<sub>2</sub> 個体群を用いた交配実験、遺伝子型と表現型の相関解析および連鎖解析による染色体マッピング、さらに糖負荷後血糖値における QTL 解析を行った。その結果、*ih*s マウスのインスリン分泌不全原因遺伝子 (*ih*s 遺伝子) は、常染色体単一劣性遺伝の様式をとることが明らかとなった。糖尿病と遺伝子型の相関解析において、第 18 番染色体上の SSLP マーカーである *D18Mit233* に非常に強い相関 ( $P < 1 \times 10^{-18}$ ) が見られ、さらに QTL 解析においても、*D18Mit233-D18Mit235* の間の領域で非常に強い連鎖 (LRS=125;  $P < 1 \times 10^{-28}$ ) が認められた。これらの結果から、*ih*s マウスのインスリン分泌不全原因遺伝子は、18 番染色体上の *D18Mit233-D18Mit235* の領域に存在することが強く示唆された。この領域には、199 個の遺伝子が存在するが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。したがって、*ih*s 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

*ih*s マウスは雌雄ともに顕著なインスリン分泌不全を有するものの、糖尿病発症には明らかな性差が存在する。糖尿病発症における性ホルモンの影響を明らかにするために、*ih*s 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検討した。コントロールには偽手術(sham ope)を行った雌雄の *ih*s マウスを使用した。雌マウスでは、OVX 群、sham ope 群ともに全観察期間を通して、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、sham ope 群では 15 週齢までにすべ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、この時、ORX 群では sham ope 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、*ih*s 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 *ih*s 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。

以上の成果から、*ih*s マウスが、1)東アジア人と類似した非肥満・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した。*ih*s 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。