

博士學位論文

内容の要旨及び審査結果の要旨

第40号

2016年3月

京都産業大学

— は し が き —

本号は、学位規則（昭和 28 年 4 月 1 日 文部省令第 9 号）第 8 条の規定による公表を目的とし、平成 28 年 3 月 19 日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査結果の要旨を収録したものである。

学位番号に付した甲は学位規則第 4 条第 1 項によるもの（いわゆる課程博士）であり、乙は同条第 2 項によるもの（いわゆる論文博士）である。

目 次

課程博士

1 . 小谷 友理	〔博士（生物工学）〕	1
2 . 森 勇伍	〔博士（生物工学）〕	5
3 . 吉田 亜佑美	〔博士（生物工学）〕	11
4 . <small>オントン パーワレッド</small> Ontong Pawared	〔博士（生物工学）〕	17
5 . 佐々木 大樹	〔博士（生物工学）〕	21
6 . <small>スントンスイット ジーラワット</small> Soonthornsit Jeerawat	〔博士（生物工学）〕	27

論文博士

1 . 上野 信洋	〔博士（生物工学）〕	31
-----------	------------	-------	----

氏名（本籍）	佐々木 大樹（京都府）
学位の種類	博士（生物工学）
学位記番号	甲工第 24 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
論文題目	Study on genes for the onset of type 2 diabetes associated with obesity using new animal models
論文審査委員	主 査 松 卒 耕 三 教 授
	副 査 竹 内 実 教 授
	” 前 田 秋 彦 教 授

論文内容の要旨

2 型糖尿病は、多因子性の疾患であり近年、世界中で患者数が増加し続けており、国際糖尿病連合 (IDE) の発表によると 2014 年現在の世界の糖尿病有病数は 3 億 8670 万人に上ると言われている。2 型糖尿病発症には、不規則な生活や、運動不足、高脂肪、高カロリーな食事などの環境要因と遺伝的要因が重要な要因である。特に肥満は、先進国などで大きな問題になっており、肥満人口の増加に伴い 2 型糖尿病患者数も増加の一途を辿っている。しかしながら、なぜ肥満になると 2 型糖尿病を発症しやすくなるのか、またその原因遺伝子は何なのかについては分かっていない。そこで本研究では、肥満に伴って 2 型糖尿病を発症する新規のモデル動物を開発し、肥満下において 2 型糖尿病を発症させうる 2 型糖尿病原因遺伝子の探索研究を行った。

本論文では、自然 2 型糖尿病発症モデル動物である OLTEF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) ラットで発見された 14 の 2 型糖尿病原因遺伝子座の染色体第 14 番上に存在する *Nidd2/of* QTL 領域に注目し、解析を行った。*Nidd2/of* QTL 領域単一の影響を解析するために、正常ラット系統である F344 ラットに *Nidd2/of* QTL 領域を導入したシングルコンジェニック系統 (*F344-nidd2*) を作製した。さらに肥満下での *Nidd2/of* QTL 領域の作用を研究するために肥満遺伝子であるレプチン受容体欠損遺伝子 (*Lepr^{-/-}*) を F344 ラットに導入した肥満コントロールラット (*F344-fa*) を作製し、*F344-nidd2* と交配することによって、肥満で *Nidd2/of* QTL 領域を持つダブルコンジェニックラット (*F344-fa-nidd2*) を作製した。

作製した各コンジェニックラットを用いて表現系の解析を行った。*Nidd2/of* QTL 領域を導入した F344-*nidd2* と F344-*fa-nidd2* の体重は、それぞれのコントロールラットである F344 と F344-*fa* と比較して有意に軽い結果であった。しかし、それぞれの系統間での摂食量と Body Mass Index (BMI) には差が無かったことから、F344-*fa* ラットは F344-*fa-nidd2* ラットのコントロールとして利用出来ると判定された。耐糖能を調べるために経口糖負荷試験 (Oral Glucose Tolerance Test : OGTT) を行った。その結果、痩せ型である F344-*nidd2* と F344 との間には有意な血糖値の差は存在しなかった。しかしながら、肥満化させた F344-*fa-nidd2* と F344-*fa* との間には、糖負荷後 60 分以降、F344-*fa-nidd2* が有意に高い血糖値を示した。さらに糖負荷後 120 分の血糖値が F344-*fa* が約 160mg/dl と境界型糖尿病の値を示したのに対して、F344-*fa-nidd2* は約 230mg/dl であり糖尿病の基準である糖負荷後 120 分での血糖値が 200mg/dl を超えていた故に糖尿病であると判定した。次にインスリン抵抗性を調べるためにインスリン負荷試験 (Insulin Tolerance Test : ITT) と血中インスリン濃度測定を行った。その結果、痩せ型である F344-*nidd2* は F344 と比較して有意な差を示さなかった。しかしながら肥満コントロールである F344-*fa* は F344 と比較して有意なインスリン抵抗性を示し、肥満がインスリン抵抗性を惹起することが確認された。ところが F344-*fa-nidd2* は、F344-*fa* と比較して有意に高いインスリン抵抗性を示した。これらのことから肥満になるだけでも高血糖を示しインスリン抵抗性を惹起するが、肥満でさらに *Nidd2/of* QTL 領域を持つ F344-*fa-nidd2* は更なる異常な高血糖とインスリン抵抗性を示しその結果高血糖を招き、2 型糖尿病を発症していることが示された。このことから *Nidd2/of* QTL 領域内に肥満下において 2 型糖尿病を発症させる原因遺伝子の存在することが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

本論文構成は大きく二つに分けられている。第1部では新規糖尿病モデルラットの作製と維持、並びにそれらラットの表現型である、経時的な体重測定に始まり、糖負荷試験による血糖値、血中インスリン濃度測定、インスリン抵抗性試験等から構成されている。肥満遺伝子座と2型糖尿病遺伝子座の一つである Nidd2/of 遺伝子座の二つを正常ラット F344 に導入した、いわゆる肥満-糖尿病ラット (F344-fa-nidd2) とそのコントロールラットである肥満遺伝子座のみ導入した肥満ラット (F344-fa) の維持・作製には、肥満ラットは不妊のためヘテロで維持し、ホモを得る際はヘテロ同志の交配を行う必要がある。即ち、ヘテロとホモ接合体の選択が継代ごとに必要であり、さらにダブルコンジェニックのホモ個体は数十匹作成して1匹程度しか得られないことを考えると、実際は大変な作業であり、数千回におよぶ DNA 抽出、数万回に及ぶ遺伝子タイピングを行っている。申請者が正確な系統維持を数年にわたり継続してきた努力は、それ自体でその粘り強さ、研究に対する熱意として、十分評価するに値する。

さて、データの方を見てみると、正常ラットである F344 に肥満遺伝子(fa)を導入した F344-fa ラットは F344 に比較して糖負荷試験 (Oral glucose tolerant test: OGTT) で高い血糖値を示した。しかし、糖尿病ほど高くはなかった。しかし肥満と糖尿病遺伝子のダブルコンジェニック、F344-fa-nidd2 ラットは非常に高い糖負荷後血糖値を示した。しかも糖負荷後 120 分値は世界保健機構 (WHO) の糖尿病診断基準である 200 mg/dL を越えており、糖尿病と診断される。従って Nidd2 遺伝子座は肥満状態で非常に高い血糖値を示す糖尿病原因遺伝子を含んでいる事が示された。そのことは、糖尿病発症には肥満は重要であるが、それだけでは十分ではなく、糖尿病遺伝子の関与があって、はじめて糖尿病発症へと向かうことを明確に示した結果と云える。即ち、本論文により Nidd2 遺伝子座領域内に、本当の意味での、肥満に伴い、糖尿病を発症させる遺伝子のあることが示され、その意義は大きいと評価される。

一般に糖尿病は高血糖に先立ち、インスリン抵抗性が先に来ると考えられている。肥満になっただけでも非肥満ラットと比較して、非常に高い血中インスリン濃度を示している。実際、インスリン投与試験 (ITT) も行っており、その結果は単に肥満とするだけでもインスリン抵抗性となっていることを示している。そして、ダブルコンジェニックラットにおいては血中インスリン濃度は肥満コントロールラットよりもさらに有意に高く、ITT の結果はさらにインスリン抵抗性が有意に増していることを示している。従って、Nidd2 遺伝子座領域内にはインスリン抵抗性を引き起こす原因遺伝子の存在することが初めて示された。

本論文の後半、第2部では Nidd2 遺伝子座領域内にある遺伝子群のどの遺伝子が糖尿病発症に関与しているか、その遺伝子解析構成となっている。Nidd2 遺伝子座領域内、約 10 Mbp に約 90 の遺伝子が存在し、そのうち、肝臓内で発現している遺伝子約 60 遺伝子について、リアルタイム PCR 法にて肥満コントロールラット (F344-fa) と肥満-糖尿病遺伝子導入ダブルコンジェニックラ

ット(F344-fa-nidd2)におけるそれら各遺伝子の発現を比較検討している。肝臓を選んだ理由は肝臓が糖制御の要であり、また、インスリン抵抗性にもっとも大きく関与するからである。その結果、5個の遺伝子発現が有意差を示した。即ち、Abcg313, Hpse, Mapk10, Coq2, Plac8の各遺伝子である。その5個の遺伝子発現について、さらに詳細な検討を加えている。それは表現型のところですすでに述べられているように、非肥満ラットであるF344ならびにF344-nidd2ラット間では血糖値もインスリン抵抗性もほぼ同じく正常であり、それは空腹時も糖負荷後も変わらなかったこと、一方、肥満系統である肥満コントロールラットと肥満-糖尿病遺伝子導入ラット間では糖負荷後血糖値、血中インスリン濃度に関しては空腹時と糖負荷後共にダブルコンジェニックラットの方が有意に肥満コントロールラットよりも高い値であったこと、また、インスリン抵抗性も両者で違いのあることから、その表現型にマッチする遺伝子発現をしている遺伝子が本当の原因遺伝子となり得る。実際、申請者はそのような解析をおこなっている。即ち肥満コントロールラットと肥満-糖尿病遺伝子座導入ダブルコンジェニックラット間での遺伝子発現で、非肥満ラットではその発現に表現型上差異が無いので、遺伝子発現においても差異の無い遺伝子で、かつ、肥満状態で差異の生じているような遺伝子を捜せば良いことになる。

その結果、Abcg313, Hpse, Mapk10 遺伝子は非肥満状態でもそれら遺伝子発現に有意な差を生じていた。すなわち、肥満特異的では無いと云うことになり、それらは原因候補遺伝子から外されている。一方、Coq2 と Plac8 遺伝子は非肥満系統間では遺伝子発現上の有意差は認められなく、しかも肥満系統間では、Coq2 は空腹時と糖負荷後双方の遺伝子発現に有意差があり、血中インスリン濃度の表現型に良く対応しており、肥満特異的な原因候補遺伝子であると結論している。他方、Plac8 は非肥満系統間では有意差は無く、肥満状態で、糖負荷後において有意な差が認められた。興味あることに、Plac8 は空腹時では差を示さず、糖負荷後にのみ差異を示すことから、血糖値における表現型に良くマッチしている。いずれにせよ、Coq2 遺伝子と Plac8 遺伝子は肥満特異的発現を示した。さらに Coq2 と Plac8 の発現は Western blot によるタンパク質レベルでも確認され、mRNA 発現レベルとほぼ同じ傾向を示した。これらの結果から申請者は、Coq2 と Plac8 が肥満に伴い糖尿病を発症させる原因遺伝子の最有力候補であると結論している。

Discussion で触れられているが、Coq2 はコエンザイム Q10 形成に必須の遺伝子であり、その発現低下は各種効能がうたわれているコエンザイム Q10 形成を抑えることにつながり、そのことがインスリン抵抗性に関連しているかもしれないと推定している。一方、Nidd2 領域にある Plac8 は5'上流域(-419)に特殊なコンセンサス領域があり、コントロールのF344-faはGであり、OLETF由来糖尿病遺伝子を持つダブルコンジェニックラット(F344-fa-nidd2)ではAとなっている。興味深いことに調べた他の全ての系統ではGであった。発現に絡む領域なので、血糖値発現にも関与している可能性があるかと推定している。

以上の内容は Mammalian Genome (2015) 26:619-629, DOI 10.1007/s00335-015-9597-4 に、申請者の筆頭著者名で掲載済みであり、欧州糖尿病学会、日本糖尿病・肥満学会、日本実験動物学会、日本肥満学会においても発表された。主査、副査による博士論文本調査委員による論文

本審査において、内容的に良く絞り込まれており、肥満に伴う糖尿病原因遺伝子として初めての報告であり、その意義も大きいことから、調査委員全員一致で合格と判定され、博士論文として、十分に値すると判定された。それを受けて、博士論文発表の公聴会が行われ、審査員全員一致で佐々木大樹君の論文を博士論文に値するとして、合格とする。