主論文の要旨

Congenic mapping and candidate gene analysis for streptozotocin-induced diabetes susceptibility locus on mouse chromosome 11

（マウス 11 番染色体上のストレプトゾトシン誘発糖尿病感受性遺伝子座のコンジェニック・マッピングと候補遺伝子解析）

名古屋大学大学院医学系研究科　総合医学専攻
実験動物科学講座　実験動物科学分野
（指導：髙橋 雅英　教授）
前川 智樹

【目的】

β細胞特異的な毒性を有するストレプトゾトシン（STZ）は、実験動物に糖尿病を誘発させる薬剤として汎用されている。以前より、STZ 誘発糖尿病に対する感受性がマウス系統間で大きく異なる事が報告されている。特に、1 型糖尿病モデルの NOD 系統や 2 型糖尿病モデルの NSY 系統等は STZ 感受性を示す事が知られている。近年、膵β細胞の脆弱性は 1 型と 2 型の糖尿病に共通する危険因子と認識されている。マウスの STZ 誘発糖尿病感受性遺伝子は未だに同定されていないが、我々は、STZ 誘発糖尿病感受性は膵β細胞の脆弱性と密接に関係しており、STZ 感受性遺伝子の同定は膵β細胞の脆弱性を規定する遺伝因子の同定に繋がると推定している。これまでに報告されている STZ 感受性遺伝子座に関する論文では、何れもマウス第 11 番染色体（Chr.11）上に感受性遺伝子座が報告されている。そこで本研究では Chr.11 に着目し、我々が独自に樹立した Chr.11 のコンソミック系統（A/J-11^{SM}）を用いて STZ 誘発糖尿病感受性遺伝子の同定を目的とした研究を行った。

【方法】

Chr.11 コンジェニック系統群の作出： A/J-11^{SM} 系統（A/J 系統の Chr.11 を SM/J 系統の Chr.11 と置換した系統）と A/J 系統を交配させ、SM/J 系統由来の Chr.11 が断片化された 12 系統で構成される Chr.11 コンジェニック系統群を樹立した（Suppl. Fig. 1）。 STZ 感受性：8 週齢雄マウスの腹腔内に STZ を多量単回投与（175mg/kg BW）または少量頻回投与（40mg/kg BW×5 回）した後に血糖値を経時的に測定した。血糖値が 250 ml/dl 以上で糖尿病発症とした。経時測定終了時に採血し、血中インスリン値を測定した。 塩基配列解析：ゲノムアセンブリデータ（GRCm38.p4）よりプライマー配列を設計し、GoTaq Green Master Mix を用いて PCR 反応を行い、ExoSAP-IT を用いて精製した。この PCR 産物を BigDye TM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いて反応させた後、3730xl DNA Analyzer により解析した。

【結果】

STZ 多量単回投与において、SM/J 系統と A/J-11^{SM} 系統は A/J 系統に対し糖尿病発症率、血糖値、インスリン値とも有意な低値を示し、A/J 系統の Chr.11 に STZ 感受性遺伝子が存在する事が判明した（Fig. 1）。次に、樹立したコンジェニック系統群から SM/J 系統由来の断片化された Chr.11 領域が Chr.11 全体をカバーするように 6 系統（A.SM-Chr.11B、11C、11D、11E、11G、11K）を選抜し、各系統に STZ 多量単回投与を行った。その結果、SM/J 系統由来の *D11Mit163*～*D11Mit51* 領域を持つ 2 つのコンジェニック系統の糖尿病発症率と血糖値は、他のコンジェニック系統及び A/J 系統より有意な低値を示した（Fig. 2）。即ち、STZ 感受性遺伝子座は *D11Mit163*（27.72Mb）～*D11Mit51*（36.39Mb）に存在する事が判明し、この遺伝子座を *Stzds1*（STZ-induced diabetes susceptibility 1）と命名した。更に、STZ 少量頻回投与に対する *Stzds1* の効果を調べるために、SM/J 系統由来の *Stzds1* 遺伝子座を持つ A.SM-

Chr.11K 系統と A/J 系統に STZ 少量頻回投与を行ったが、両者の糖尿病発症率と血糖値には差がなく、*Stzds1* 遺伝子座は少量頻回投与に対しては効果がない事が判明した（Table 1）。

マウスの Chr.11 上には、STZ 誘発糖尿病感受性に関与する 14 遺伝子が報告されているが、*Stzds1* 領域内に存在するのは、N-methylpurine-DNA glycosylase（*Mpg*）遺伝子のみであった（Suppl. Table 3）。サンガー法による塩基配列解析により、A/J 系統の *Mpg* 遺伝子にアミノ酸置換やフレームシフトを伴う 5 箇所の変異を見出した（Table 2）。その中で Exon3 の 132 番目のアミノ酸の変異（p.Ala132Ser）だけは、齧歯類においてアミノ酸配列が完全に保存されている領域内に存在しており（Suppl. Fig.2-6）、この変異が STZ 感受性の原因変異である可能性が推定された（Fig. 3）。15 系統について MPG の 132 番目のアミノ酸と STZ 感受性との関連性を解析したところ、セリン型系統では糖尿病発症率と血糖値がアラニン型系統より高い傾向があったが、両群間に有意差は認められなかった（Table 3）。

【考察】

我々は A/J-11^{SM} 系統を起源として A/J 系統に SM/J 系統の Chr.11 の染色体断片を導入した 12 系統から構成される Chr.11 コンジェニック系統群を樹立し（Suppl. Fig. 1）、そのうちの 6 系統の STZ 感受性を解析する事で *Stzds1* 遺伝子座の存在領域を Chr.11 の 27.72～36.39Mb に限局した。A/J 系統と SM/J 系統を用いた遺伝解析により Chr.11 には肺腫瘍感受性、血中脂質濃度、耐糖能異常等の遺伝子座が存在する事が示されている。本研究で樹立した Chr.11 コンジェニック系統群は、これら遺伝子座の解析に有効なリソースになると考えられた。

膵β細胞内に取り込まれた STZ は DNA 塩基をアルキル化して DNA 損傷を与える。その修復のために poly ADP-ribose polymerase（PARP）が活性化されるが、この PARP の活性化は細胞内の NAD や ATP を減少させ細胞内のエネルギーが枯渇して膵β細胞のネクローシスが引き起こされる。MPG はアルキル化による DNA の損傷部位の認識と除去に極めて重要とされており、*Stzds1* 領域内に存在する *Mpg* 遺伝子は STZ 誘発糖尿病感受性の有力な候補遺伝子であると考えられた。これまでに、*Mpg* 欠損マウスは STZ 多量単回投与に対し膵β細胞の損傷を起こさない事が報告されている。これは *Mpg* 欠損マウスではアルキル化による損傷塩基の除去が行われないために、PARP が活性化されず膵β細胞のネクローシスが起きないためと考えられている。一方、A/J 系統は STZ に対して高い感受性を示した。これは A/J 系統の MPG は機能獲得型変異であり、DNA のアルキル化損傷部位の過剰な認識と切除を誘導し、膵β細胞内の NAD と ATP の著しい枯渇を引き起こすためと推測された。STZ によるマウスの糖尿病の発症には、多量単回投与または少量頻回投与の 2 つの方法が用いられている。コンジェニック系統の解析より *Stzds1* 遺伝子座は、STZ の多量単回投与に対し作用を有するが、少量頻回投与には作用を示さなかった（Table 1）。同様に、*Mpg* 欠損マウスも STZ の多量単回投与に対し作用を示すが、少量頻回投与には抵抗性を示さないとされ

ている。STZ 投与方法に係る両者の類似性は、*Mpg* 遺伝子が *Stzds1* 遺伝子座の原因遺伝子と推定する一因である。

Mpg 遺伝子の塩基配列解析により、A/J 系統と SM/J 系統間に見出した 5 箇所の変異のうち、p.Ala132Ser 変異は齧歯類でアミノ酸配列が高度に保存された領域内に存在し、かつこの部位は酵素活性に重要な領域であった（Fig. 3）。一方、*Mpg* 遺伝子の発現量と STZ 感受性の間に相関は見られなかった（Suppl. Fig. 7）。従って、*Mpg* 遺伝子の p.Ala132Ser 変異が *Stzds1* の有力な候補遺伝子変異であると考えられた。なお、MPG の 132 番目のアミノ酸型（セリン/アラニン）だけではマウス系統間の STZ 感受性差を説明できない事（Table 3）から、STZ 誘発性糖尿病感受性には *Mpg* 遺伝子以外の多数の遺伝子座が関係していると考えられた。

【結論】

我々は、A/J-11^{SM} 系統から作出されたサブ・コンジェニック系統群を用いて STZ 感受性遺伝子座（*Stzds1*）を Chr.11 の 8.67Mb の領域内にマッピングし、その有力な候補遺伝子として *Mpg* 遺伝子を見出した。更に、A/J 系統の *Mpg* 遺伝子に 5 箇所の変異部位を特定し、そのうち p.Ala132Ser 変異が STZ 誘発糖尿病感受性に関与している可能性が高い事を示した。今後、CRISPR/Cas9 システムにより A/J 系統のこの変異を修正したノックインマウスを作製して、この変異の STZ 感受性への関与が実証できれば、膵 β 細胞の脆弱性に関わる分子機構の一端の解明に繋がると考えられる。