

2 型糖尿病モデル動物 *Megl/Grb10* 遺伝子導入マウスの有用性の検討 — 血漿成分及び糖尿病関連遺伝子の発現と発症の解析 —

山本 美江^{1,4)}・鈴木 治²⁾・山田-内尾こずえ²⁾・石野-金児智子³⁾・松田潤一郎²⁾・佐藤 勝紀⁴⁾

¹⁾国立感染症研究所獣医学部・²⁾医薬基盤研究所生物資源研究部・

³⁾東海大学健康科学部・⁴⁾岡山大学大学院自然科学研究科

【背景】

Megl/Grb10 遺伝子導入マウス (*Megl* マウス) はインスリンのシグナル伝達阻害による高インスリン血症を呈することから 2 型糖尿病モデルと考えられている。一般に 2 型糖尿病は肥満から糖尿病を発症すると考えられている。*Megl* マウスは肥満を伴わずに高血糖を発症するが、高脂肪・高カロリー飼料の摂取によっても高血糖の発症率が著しく増加する。

【目的】

2 型糖尿病の発症機序については不明な点が多く、その要因の一つに脂肪・カロリーの過剰摂取が挙げられる。*Megl* マウスを用いて行った高脂肪・高カロリー飼料の給与試験から、*Megl* マウスでは脂肪・カロリーの過剰摂取が糖尿病発症を増加させることが明らかになっている。*Megl* マウスにおける糖尿病発症の経緯を明らかにし、2 型糖尿病モデル動物としての有用性を検討するため、*Megl* マウスと対照マウスを高脂肪・高カロリー飼料及び通常飼料 (対照飼料) で飼育した時の血漿中のアディポネクチン量及び BMI 値を比較するとともに糖尿病に関連すると見られる遺伝子の発現量について他の糖尿病モデルマウスと比較検討した。

【材料および方法】

動物：血漿成分、BMI 値、遺伝子発現量の測定には 10 週齢から 12 週齢の C57BL/6N マウス由来 *Megl/Grb* 遺伝子導入マウス (TG+) (*Megl* マウス) と対照として同腹 (TG-) マウス (対照マウス) を用いた。さらに、遺伝子の発現量を比較するために以下の糖尿病モデルマウスを用いた。

1 型糖尿病モデル: NOD/Shi:Jic、

2 型糖尿病モデル: KK-Ay/Ta:Jcl、

BKScg-+Lepdb/+Lepdb/Jcl

これらの動物は導入後、対照飼料で飼育後、実験群と同様に絶食し、実験に供した。動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会規定にしたがって行った。

飼料：*Megl* マウスは下記の HFD 及び NFD を飼料として用い、離乳後から自由摂取で 30 週齢まで飼育した。

HFD：糖尿病・肥満研究用高脂肪飼料 QF (Quick Fat；日本クレア(株)) (高脂肪・高カロリ

一飼料))

NFD：繁殖飼料 CMF(オリエンタル酵母工業(株)) (対照飼料)

血漿成分：アディポネクチンを取り上げ、マウス・ラットアディポネクチン ELISA キット (大塚製薬 (株)) にて測定した。

BMI 値：10 週齢、15 週齢と 30 週齢時に体重と体長(肛門から鼻先まで) を測定し、体重 (g)/体長² (mm) の式から算出した。

遺伝子の発現量：*Grb10*、*Glut4* 及び *Ucp1* について ABI (Prism 7900HT) システムの TaqManR MGB プローブ (*Grb10*、*Glut4*、*Ucp1*) を用いて測定した。*Grb10*、*Glut4*、*Ucp1* の測定値から G3PDH を対照として発現比を求めた。取り上げた臓器は肝臓、膵臓、生殖器周囲脂肪、褐色脂肪および大腿筋である。

【結果】

血漿中のアディポネクチン量は *Megl* マウスの高脂肪・高エネルギー飼料(HFD)が最も高く、続いて対照マウスの HFD、*Megl* マウスの対照飼料(NFD)、対照マウスの NFD の順となった (Fig.1)。10 週齢時の BMI 値は対照マウスの HFD が最も高く、続いて対照マウスの NFD、*Megl* マウスの HFD、NFD の順となった (Fig.2)。HFD 及び NFD での *Megl* マウスと対照マウスの血漿アディポネクチン量と BMI 値について比較検討してみると、その間には逆相関が認められた。BMI 値は *Megl* マウスと対照マウスの間にいずれの週齢でも有意差がみられ、その値は加齢とともに増加し、高い週齢時では *Megl* マウスと対照マウスの差は大きくなった (Fig.3)。

Fig.4 は *Grb10* (Muscle, 大腿筋)、*Grb10* (Wat, 生殖器周囲脂肪)、*Glut4*、*Ucp1* の各遺伝子の発現量について示した。*Grb10*、*Glut4* 遺伝子の発現量はマウスの系統によって異なり、*Grb10* 遺伝子の発現量は *Megl* マウスで高く、特に生殖器周囲脂肪において発現量が増加し、*Megl* マウスにおいては内因性の *Grb10* 遺伝子発現量の増加が確認された。一方、*Glut4* 遺伝子の発現量は他の糖尿病モデルマウスが *Megl* マウスより高い値を示した。*Ucp1* 遺伝子は *Megl* マウスの高脂肪・高カロリー飼料(HFD)でのみ低い発現が認められた。

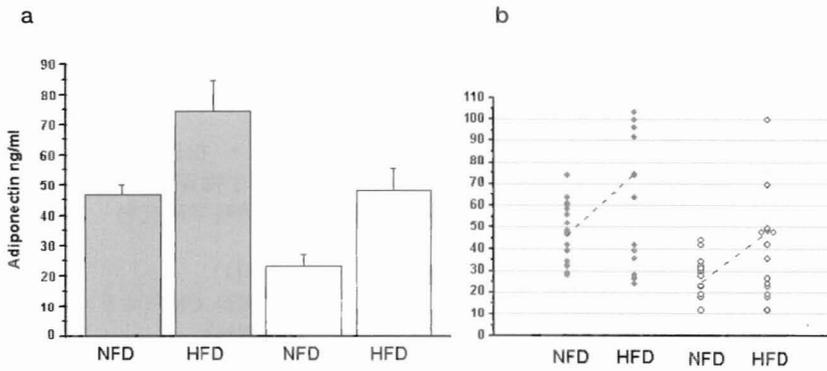


Fig. 1 血漿アディポネクチン量に及ぼす飼料の影響。

a 血漿アディポネクチン量 (NFD 飼育と HFD 飼育との比較) **b** 血漿アディポネクチンの量 (NFD の HFD に対しての増加量) Meg1 マウス (■) 対照マウス (□)

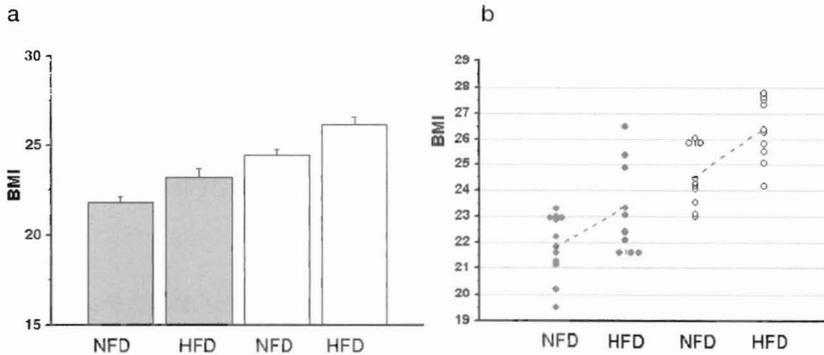


Fig. 2 BMI 値に及ぼす飼料の影響。

a BMI 値 (NFD 飼育と HFD 飼育との比較) **b** BMI 値 (NFD の HFD に対しての増加量) Meg1 マウス (■) 対照マウス (□)

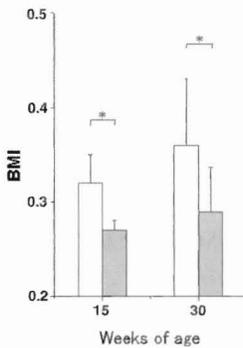


Fig. 3 BMI 値に及ぼすマウスの週齢と系統の影響。Meg1 マウス (■), 対照マウス (□) の 15 週齢と 30 週齢時の比較

【考察】

Meg1 マウスにおいては高脂肪・高カロリー飼料で飼育を行うことにより血漿アディポネクチン量が増加した。このアディポネクチン量の増加は高脂肪・高カロリー飼料による飼料の変化によって増強されたものと考えられる。本実験で認められた血漿アディポネクチン量と BMI 値との逆相関はヒト 2 型糖尿病と類似している。Meg1 マウスでは内因性の *Grb10* 遺伝子の発現量の増加が見られたことから、*Grb10* 遺伝子の発現量の増加は糖尿病の発症に関与することが示唆された。また、Meg1 マウスでは *Grb10* 遺伝子の発現量が他の糖尿病マウスと異なって高い値となり、一方 *Glut4* 遺伝子の発現抑制が認められたことから他の糖尿病モデルマウスとは異なる発症機構の存在が示唆され、Meg1 マウスは脂肪・カロリーの過剰摂取を原因とする 2 型糖尿病モデルとして有用であることが考えられた。

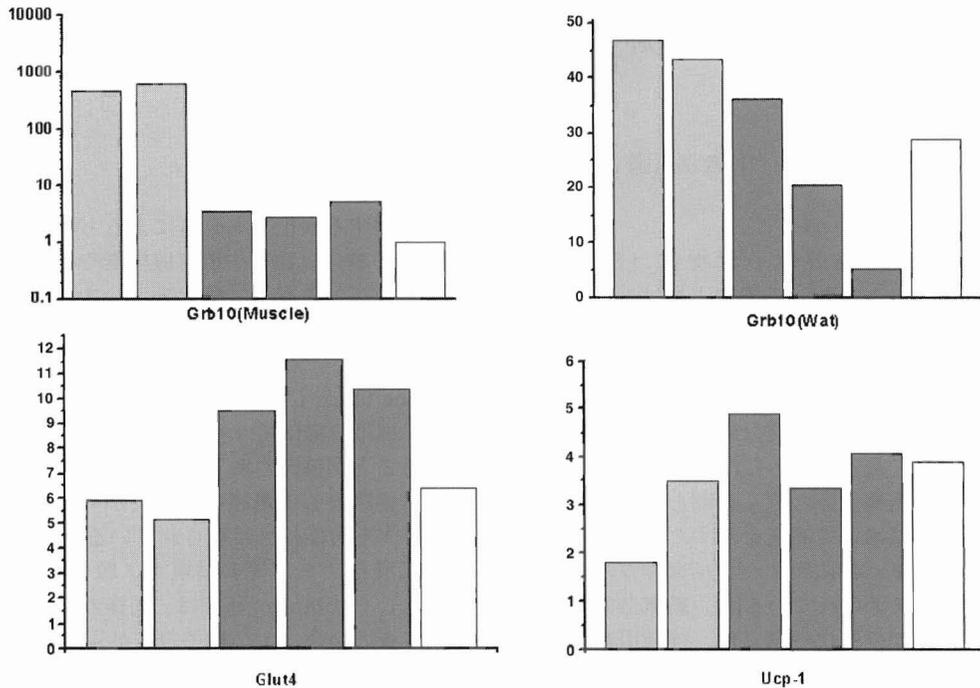


Fig. 4 リアルタイムPCR測定における *Grb10*(Muscle, 大腿筋)、*Grb10*(Wat, 生殖器周囲脂肪)、*Glut4*、*Ucp-1* の各遺伝子の発現量の比較。

Meg1 マウス HFD、NFD (■)、NOD/Shi:Jic; KK-Ay/Ta:Jcl, BKSg+Lepdb/+Lepdb/Jcl (■)、対照マウス (□)

【参考文献】

- 1) Hikichi T, Kohda T, Kaneko-Ishino T and Ishino F. Imprinting regulation of the murine *Meg1/Grb10* and human *GRB10* genes; roles of brain-specific promoters and mouse-specific CTCF-binding sites. *Nucleic Acids Res.* 31(5): 1398-406. 2003.
- 2) Miyoshi N, Kuroiwa Y, Kohda T, Shitara H, Yonekawa H, Kawabe T, Hasegawa H, Barton SC, Surani MA, Kaneko-Ishino T and Ishino F. Identification of the *Meg1/Grb10* imprinted gene on mouse proximal chromosome 11, a candidate for the Silver-Russell syndrome gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(3): 1102-1107. 1998.
- 3) 山本美江・鈴木治・山田内尾こずえ・石野金児智子・松田潤一郎・佐藤勝紀. 高脂肪・高カロリー飼料が遺伝子導入マウスの糖尿病発症に及ぼす影響. *岡山実験動物研究会報* 21: 35-37. 2004.
- 4) Shiura H, Miyoshi N, Konishi A, Wakisaka-Saito N, Suzuki R, Muguruma K, Kohda T, Wakana S, Yokoyama M, Ishino F and Kaneko-Ishino T. *Meg1/Grb10* over expression causes postnatal growth retardation and insulin resistance via negative modulation of the IGF1R and IR cascades. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 329: 909-916, 2005.

【要約】

Meg1/Grb10 遺伝子導入マウス (Meg1 マウス) は

インスリンのシグナル伝達阻害による高インスリン血症を呈することから2型糖尿病モデルと考えられている。Meg1 マウスは肥満を伴わずに高血糖を発症するが、脂肪・カロリーの過剰摂取によっても糖尿病の発症が著しく増加する。本研究はMeg1 マウスの2型糖尿病モデルとしての有用性を検討するために、Meg1 マウスと対照マウスを高脂肪・高カロリー飼料 (HFD) 及び対照飼料 (NFD) で飼育した時の血漿アディポネクチン量とBMI値を比較するとともに糖尿病関連遺伝子の発現量について他の糖尿病モデルマウスと比較検討した。

血漿アディポネクチン量はMeg1 マウスのHFDが最も高く、対照マウスのNFDが最も低い値を示した。一方、BMI値は対照マウスのHFDが最も高い値を示し、血漿アディポネクチン量とBMI値は逆相関が認められ、ヒト2型糖尿病と類似することが認められた。また、*Grb10*、*Glut4* 遺伝子の発現量はMeg1 マウスと他の糖尿病モデルマウスでは異なる値を示し、Meg1 マウスでの*Grb10* 遺伝子の発現量は高く、*Glut4* 遺伝子の発現量は低かった。

以上のことから、Meg1 マウスには他の糖尿病モデルと異なる発症機構の存在が示唆され、Meg1 マウスは2型糖尿病モデルとしての有用性が考えられた。