

高脂肪・高カロリー飼料が *Megl/Grb10* 遺伝子導入マウスの 糖尿病発症に及ぼす影響

山本美江^{1,2)}・鈴木治²⁾・山田一内尾こずえ²⁾

石野一金児智子³⁾・松田潤一郎²⁾・佐藤勝紀⁴⁾

¹⁾岡山大学大学院自然科学研究科・²⁾国立感染症研究所獣医科学部

³⁾東海大学健康科学部・⁴⁾岡山大学農学部

【背景】

ヒトⅡ型糖尿病は複数の遺伝因子に加え、環境因子が重なりあって発症する多因子病である。中でも環境因子(生活習慣)、特に食事の影響が大きいと考えられている。母親性の発現を示すインプリンティング遺伝子である *Megl/Grb10* 又はヒト *GRB10* 遺伝子をチキンβ-アクトチンプロモーターの下流に、かつラビットβ-グロブリンポリAの上流に含有する導入遺伝子を構築し、*Megl/Grb10* を過剰発現するように設計された *Megl/Grb10* 遺伝子導入マウスは正常マウスに比べて出生時より体が小さく成長してもその差は変わらない²⁾。*Megl/Grb10* 遺伝子導入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Ⅱ型糖尿病モデルと考えられている¹⁾。

【目的】

Megl/Grb10 遺伝子導入マウスの糖尿病の発症率が低い場合、本研究では飼料の変化によって発症率が向上できるかどうかを確認し、糖尿病の発症促進を促す条件を明らかにすることを目的としてⅡ型糖尿病発症に及ぼす飼料の影響について検討した。

【方法】

C57BL/6Nマウス由来 *Megl/Grb* 遺伝子導入マウスの発症系ラインである10系 (*Megl/10L*) ♂、18系 (*Megl/18L*) ♀およびその親系統 (C57BL/6N; TG-) ♂を正常コントロールとして用いた。繁殖・育成時は繁殖飼料CMF(オリエンタル酵母)の自由摂取とした。3週齢で離乳後、QF飼育群では5週齢から糖尿病発症促進飼料QF(クイックファット、日本クレア(株))に変更し、一方CMF飼育群ではCMFをそのまま継続した。

* QF(日本クレア(株))糖尿病発症・肥満促進飼料

動物性油脂添加:粗脂肪=15.3%

高カロリー 425kcal/100g:CMFの1.15倍

ショ糖添加 約20%

* CMF(オリエンタル酵母(株))特殊繁殖用飼料
粗脂肪:8.9%

カロリー=369kcal/100g

体重測定と尿試験紙(ウロラプステック三共)による尿糖測定を毎週行ない、25週齢まで観察した。尿糖が陽性時(100mg/dlを陽性)には全血を用いてフリースタイルメーター(ニプロ社製)により血中グルコース濃度を測定した。血中グルコース(250mg/dl)以上を発症とした。

同腹のマウスがすべて発症した時点又は6ヶ月で観察を終了した動物はエーテル麻酔下にて屠殺後、膵臓を10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した。3μm切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色(HE染色)および抗insulin抗体(DAKO A0564)を用いた免疫染色を行い、顕微鏡下で観察した。

【結果】

図1は *Megl/10L* (TG+, TG-) と *Megl/18L* (TG+, TG-) の経時的な体重の変化を示した。体重は各々5匹の平均値で示したが、*Megl/10L* と *Megl/18L* では飼料に関係なく、*Megl/18L* がやや軽い傾向が見られた。*Megl/10L* と *Megl/18L* と共にTG(+)個体では飼料を変化させても体重に著しい変化が見られなかった。一方、正常コントロール群であるTG(-)個体ではTG(+)個体よりも出生時からの体重が重く、増体重量も大きかった。

正常コントロール群であるTG(-)個体では飼料を変化させると、体重の増加量は大きくなり、CMF飼育よりQF飼育の方が有意に増えている(図1)。*Megl/10L* の正常コントロール群であるTG(-)個体では15週齢ぐらいから体重の増加に差が大きくなり始め、30週齢では最大7g(CMF飼育39g:

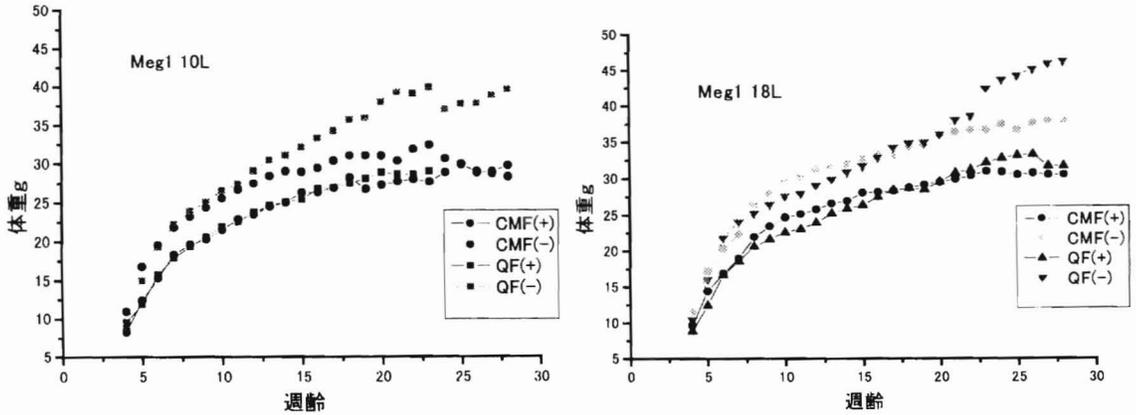


図1 飼料による体重の変化

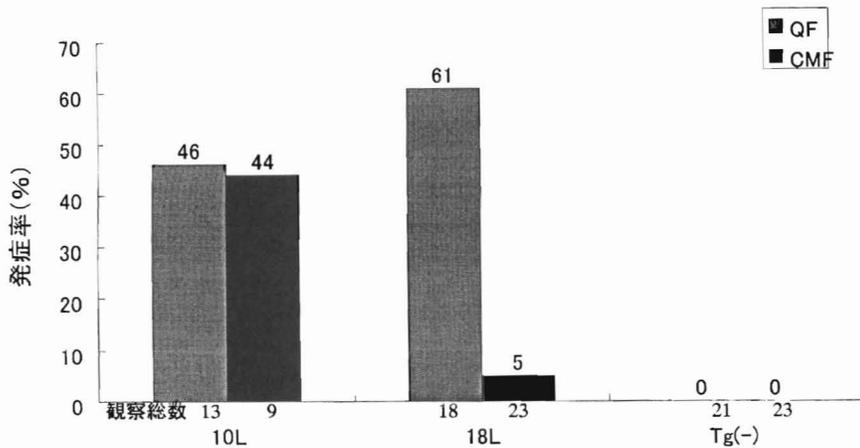


図2 飼料の違いと糖尿病発症の関係

QF飼育46%)の差が開いた。Meg1/18Lの正常コントロール群であるTG(-)個体では10週齢ぐらいから体重の増加に差が大きくなり始め、15週齢では3g(CMF飼育29g:QF飼育32g)の差となり、その差は大きくなり、25週齢で最大8g(CMF飼育30g:QF飼育38g)の差が開いた。発症と判定した尿糖陽性で、かつ250mg/dl以上の非絶食時血糖値が観察されたMeg1/10L TG(+)個体はCMF飼育では9匹中4匹、QF飼育では13匹中6匹であった。

Meg1/18L TG(+)個体はCMF飼育では23匹中1匹、QF飼育では18匹中11匹であった。正常コントロール群であるTG(-)個体群ではいずれの飼料でも糖尿病発症個体は観察されなかった(図2)。発症時の週齢はMeg1/10LではCMF飼育では22週齢から、QF飼育では20週齢で観察され、Meg1/18LではCMF飼育では13週齢、QF飼育では10週齢から観察された。

HE染色の結果、Meg1 TG(+)個体の膵組織にお

いて、膵外分泌の空洞化・変性が認められ、さらにランゲルハンス島の肥大も確認できた。

免疫染色の結果、Meg1 TG(+)の膵において、ランゲルハンス島は肥大しているものの、インスリンを産生していることが明らかとなった。

【考察】

高脂肪、高カロリー、シヨ糖添加飼料によって糖尿病の発症が著しく増加し、糖尿発症も早期に誘発できることが明らかになり、糖尿病の発症には飼料の影響が大きいことが確認された。正常コントロール群であるTG(-)動物の体重が糖尿発症促進飼料によって体重の増加が著しくなる時期とTG(+)個体の糖尿病の発症時期と重なることは脂肪の蓄積やインスリン抵抗性との関係が考えられる。本研究の結果、Meg1/Grb遺伝子導入マウスはヒトII型糖尿病モデルとして食餌で誘発すること

が可能であることが明らかになり、糖尿病治療薬のスクリーニングや糖代謝調節機能や糖尿病発症機構の解明に有用なモデルといえる。また、高血糖による生体内での2次的弊害(網膜症、腎症、神経症)の解析に用いることが出来ると考えられる。

【要約】

Meg1/Grb10遺伝子導入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、Ⅱ型糖尿病モデルと考えられている。そこで、本モデルマウスを用いてⅡ型糖尿病発症に及ぼす飼料の影響について検討した結果、ヒトⅡ型糖尿病モデルとして有用性を確認することが出来た。

本研究は、東京医科歯科大学石野史敏教授との共同研究である。

【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. USA.* 95(3):1102-1107. 1998