

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-295867
(P2005-295867A)

(43) 公開日 平成17年10月27日(2005.10.27)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
AO1K 67/027	AO1K 67/027 ZNA	4B024
AO1K 67/02	AO1K 67/02	
C12N 15/09	C12N 15/00 A	

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2004-115646 (P2004-115646)	(71) 出願人	503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(22) 出願日	平成16年4月9日(2004.4.9)	(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
		(74) 代理人	100095360 弁理士 片山 英二
		(74) 代理人	100093676 弁理士 小林 純子
		(72) 発明者	島野 仁 茨城県つくば市竹園3-16-102-206
		(72) 発明者	山田 信博 東京都杉並区荻窪1-33-9
		Fターム(参考)	4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA05 CA11 DA02 FA02 FA10 GA12

(54) 【発明の名称】 2型糖尿病モデルとしての非ヒトトランスジェニック動物

(57) 【要約】

【課題】 2型糖尿病モデル動物、このモデル動物を用いる糖尿病治療薬のスクリーニング方法などを提供すること。

【解決手段】 上記課題は、活性型SREBP-2タンパク質をコードするDNAがプロモーターの制御下に配置されている組換えDNAが導入され、膵臓細胞における活性型SREBP-2タンパク質の過剰発現により2型糖尿病の症状を呈する、2型糖尿病モデルとしての非ヒトトランスジェニック動物、このトランスジェニック動物を用いて糖尿病の治療薬をスクリーニングする方法などによって達成される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

活性型 SREBP-2タンパク質をコードする DNA がプロモーターの制御下に配置されている組換え DNA が導入され、膵臓細胞における活性型 SREBP-2タンパク質の過剰発現により 2 型糖尿病の症状を呈する、2 型糖尿病モデルとしての非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 2】

前記 2 型糖尿病の症状が、コレステロール代謝異常と膵臓細胞におけるインスリン分泌障害を含む前記請求項 1 に記載のトランスジェニック動物。

【請求項 3】

前記活性型 SREBP-2タンパク質をコードする DNA がヒト活性型 SREBP-2 c DNA である、前記請求項 1 に記載のトランスジェニック動物。 10

【請求項 4】

前記プロモーターがラットインスリン I 遺伝子のプロモーターである、前記請求項 1 又は 2 に記載のトランスジェニック動物。

【請求項 5】

前記組換え DNA に、さらに遺伝子マーカーが導入されている、前記請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

【請求項 6】

前記遺伝子マーカーが緑色蛍光タンパク質である、前記請求項 5 に記載のトランスジェニック動物。 20

【請求項 7】

マウス、ラット又はウサギである前記請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

【請求項 8】

マウスである前記請求項 7 に記載のトランスジェニック動物。

【請求項 9】

前記請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載のトランスジェニック動物を用いる、2 型糖尿病治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 10】

前記トランスジェニック動物に、試験化合物を投与した後に糖尿病の症状の変化を観察する工程を含む、前記請求項 9 に記載の 2 型糖尿病治療薬のスクリーニング方法。 30

【請求項 11】

ヒト活性型 SREBP-2タンパク質をコードする DNA がプロモーターの制御下に配置されている組換え DNA を構築し、前記組換え DNA 及び遺伝子マーカーを非ヒト動物の受精卵に導入し、得られた受精卵を偽妊娠非ヒト哺乳動物に移植し、その動物を飼育し、前記遺伝子マーカーの発現産物を指標として、生まれた仔から前記組換え DNA を有する仔を選択する、2 型糖尿病の症状を呈するトランスジェニック動物の作製方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、2 型糖尿病モデルとしての非ヒトトランスジェニック動物、このモデル動物を用いる糖尿病治療薬のスクリーニング方法、2 型糖尿病モデル動物の作製方法等に関する。 40

【背景技術】

【0002】

糖尿病は現在生活習慣病の中核として現代の国民病と呼ばれ、その予防・治療方法の開発は急務である。糖尿病の発症機構は解明されていないが、血糖を低下させるホルモンであるインスリンの不足（インスリン分泌不全）とインスリン作用障害（インスリン抵抗性）という 2 つの病態が混在していると言われている。また、通常、糖尿病は、（1）インスリンをつくる膵臓の細胞まで破壊され、インスリンを補充し続けなければならない 50

型；(2) インスリンの分泌不足やインスリンの働きが悪くなっている2型；(3) 特定の原因によるその他の糖尿病；(4) 妊娠糖尿病等に分類されている。

【0003】

1型糖尿病は、自己免疫疾患の一つであり、臨床的にインスリン依存型糖尿病と呼ばれることもある。1型糖尿病では、インスリンを分泌する膵臓の細胞が自己の免疫系から攻撃を受け破壊される。インスリンは、血液中の糖を細胞に吸収させ、血糖値を下げる働きをもっているホルモンの一つで、その分泌が減ると、血液中の糖は増え、細胞中の糖は不足する。この状態が続くと、細胞は生命活動を維持できなくなるので、さまざまな臓器障害、失明や足の壊死がもたらされることになる。1型糖尿病のモデルマウスは公知であり、そのモデルマウスを用いて1型糖尿病の治療に関する研究も進んでいる(例えば、Science. 10
2003 Nov 14;302(5648):1223-7参照)。

【0004】

2型糖尿病は、臨床的視点からインスリン非依存型糖尿病と呼ばれることもあり、膵臓の細胞におけるインスリン分泌不全と、インスリン抵抗性とによって発症する。インスリン分泌不全とインスリン抵抗性のどちらが強く関わっているかは個々の症例あるいは各症例の経過によって異なるが混在していることも多い。インスリン分泌不全は、正常な場合は、食事をとりブドウ糖が吸収され血糖値が上がり始めると、それに対応して瞬時にインスリンが分泌されるが、インスリン分泌不全の状態では、この反応が欠如し、血糖の上昇に遅れてインスリンが分泌される。なお、インスリンが分泌されているのに、様々な原因でインスリンの作用が障害された状態をインスリン抵抗性があるという。1型糖尿病 20
は免疫学的機序が明確で病態を反映したモデルマウスは前述のように既に報告されている。しかし、2型糖尿病モデルマウスに関しては、成因が複雑であるためヒトの病態を十分に説明するモデルは、未だに報告されていない。

【0005】

一方、SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) ファミリーは、ステロール合成制御転写因子ファミリーで、コレステロール合成系酵素群、LDLレセプター遺伝子プロモーター領域に共通する特異配列SREに結合し転写発現を制御する。SREBPにはSREBP-1a, SREBP-1c及びSREBP-2の2つのサブファミリーがあることが知られている。今までの研究によって生体内では、SREBP-1cが脂肪酸、中性脂肪(トリグリセリド)の合成を、SREBP-2がコレステロールの合成を担っていることが知られている(J Clin Invest 1996;9 30
8:1575-1584; J Clin Invest 1997;99:846-854; J Clin Invest 1998;101:2331-2339; 総説Cell. 1997;89:331-40(非特許文献1))。しかしながら、SREBP-2と糖尿病、特に2型糖尿病との関係については未だ報告されていない。

【0006】

また、特表2003-501102号公報(特許文献1)には、SREBPタンパク質を発現させ又は異常な発現をさせるために遺伝学的に修飾されたハエ又は線虫である動物モデルが開示されている。しかし、この公報に記載された実験動物(ハエ又は線虫)モデルは、脂質代謝に関する研究用に用いられるものである。いずれにしろ、この公報にも、SREBPタンパク質と糖尿病との関係については何ら示唆されていない。

【特許文献1】特表2003-501102号公報 40

【非特許文献1】総説Cell. 1997;89:331-40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

国内の糖尿病患者数は6~700万人と推定され、その予備軍も同数いると言われている。糖尿病の発症機序は解明されておらず、有効な治療薬もないのが現状である。特に、わが国では2型糖尿病が90~97%と圧倒的に多く、この2型糖尿病の治療方法あるいは治療薬の開発が強く望まれている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者等は、ヒト活性型SREBP-2タンパク質をコードするDNAをマウスに導入することにより、インスリン分泌細胞である膵臓の細胞に特異的にSREBP-2を強制的に過剰発現させたマウスを作製した。この場合、想定される変化は膵臓細胞内でのコレステロール代謝の変動（合成の活性化）のみであったところ、驚くべきことに、このマウスでは、コレステロール代謝異常に加えて顕著なインスリン分泌の低下をきたし血糖が上昇し、明確に2型糖尿病に類似する症状を呈することを見出した。このような病態は、細胞に脂肪酸過剰状態、中性脂肪（トリグリセリド）が蓄積してインスリン分泌が低下するという、従来の脂肪毒性学説による作用機序とは異なるものである。つまり、コレステロール代謝の変動ないしはSREBP-2そのものが2型糖尿病の病因として考えられるということであり、コレステロール代謝がらみでのインスリン分泌低下や糖尿病との関連について今までに報告がなかったことを考慮すると、この発見は極めて画期的なものと言える。

10

【0009】

本発明は、上記知見に基づいて完成されたもので、次に示す、2型糖尿病モデルとしての非ヒトトランスジェニック動物、このモデル動物を用いる糖尿病治療薬のスクリーニング方法、2型糖尿病モデル動物の作製方法等を提供する。

【0010】

(1) 活性型SREBP-2タンパク質をコードするDNAがプロモーターの制御下に配置されている組換えDNAが導入され、膵臓細胞における活性型SREBP-2タンパク質の過剰発現により2型糖尿病の症状を呈する、2型糖尿病モデルとしての非ヒトトランスジェニック動物。

(2) 前記2型糖尿病の症状が、コレステロール代謝異常と膵臓細胞におけるインスリン分泌障害を含む前記(1)に記載のトランスジェニック動物。

20

(3) 前記前記活性型SREBP-2タンパク質をコードするDNAがヒト活性型SREBP-2c DNAである、前記(1)に記載のトランスジェニック動物。

(4) 前記プロモーターがラットインスリンI遺伝子のプロモーターである、前記(1)又は(2)に記載のトランスジェニック動物。

【0011】

(5) 前記組換えDNAに、さらに遺伝子マーカーが導入されている、前記(1)～(4)のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

(6) 前記遺伝子マーカーが緑色蛍光タンパク質である、前記(5)に記載のトランスジェニック動物。

30

(7) マウス、ラット又はウサギである前記(1)～(6)のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

(8) マウスである前記(7)に記載のトランスジェニック動物。

【0012】

(9) 前記(1)～(8)のいずれかに記載のトランスジェニック動物を用いる、2型糖尿病治療薬のスクリーニング方法。

(10) 前記トランスジェニック動物に、試験化合物を投与した後に糖尿病の症状の変化を観察する工程を含む、前記(9)に記載の2型糖尿病治療薬のスクリーニング方法。

(11) ヒト活性型SREBP-2タンパク質をコードするDNAがプロモーターの制御下に配置されている組換えDNAを構築し、前記組換えDNA及び遺伝子マーカーを非ヒト動物の受精卵に導入し、得られた受精卵を偽妊娠非ヒト哺乳動物に移植し、その動物を飼育し、前記遺伝子マーカーの発現産物を指標として、生まれた仔から前記組換えDNAを有する仔を選択する、2型糖尿病の症状を呈するトランスジェニック動物の作製方法。

40

【発明の効果】

【0013】

本発明のトランスジェニック動物は、新規の2型糖尿病モデル動物として、糖尿病の発症機構の研究ならびに糖尿病治療薬のスクリーニングのツールとして有用である。特に、他の既存の糖尿病モデル動物は糖尿病の発症要件として高脂肪食負荷を必要とするものや著明な肥満をきたしているものが多いが、本発明の好ましい態様によるトランスジェニックマウスは、自然発症し、かつ肥満をきたしておらず、日本人に多い2型糖尿病の病態

50

に類似している。したがって、本発明によるトランスジェニックマウスはそのような病態の2型糖尿病モデルマウスとして有用である。

【0014】

以下、本発明を詳細に説明する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

1. 2型糖尿病モデル動物としての非ヒトトランスジェニック動物

本発明は、膵臓細胞にコレステロール合成制御転写因子SREBP-2を過剰発現させることによりインスリン分泌能が低下する新規な2型糖尿病のモデル動物を提供するものである。このようなモデル動物は、2型糖尿病の発症機序解明および治療薬開発に有用である。

10

具体的には、本発明の第1の態様によれば、活性型SREBP-2タンパク質をコードするDNAがプロモーターの制御下に配置されている組換えDNAが導入され、膵臓細胞におけるSREBP-2の強制過剰発現により2型糖尿病の症状を呈する、2型糖尿病モデルとしての非ヒトトランスジェニック動物が提供される。

【0016】

本明細書において、「SREBP-2タンパク質」は、ステロール調節エレメント結合タンパク質 (Sterol Regulatory Element Binding Protein) であるSREBPのサブファミリーの一つであり、コレステロール合成の制御に関与する公知の膜結合型タンパク質である。SREBP-2遺伝子及びSREBP-2タンパク質は、例えば、Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Dec 15; 90(24):11603-7等の文献に記載されている。特に、ヒトSREBP-2タンパク質のアミノ酸配列は、NCBIにAccession No. AAA50746として登録されており、配列番号1で示される。ヒトSREBP-2cDNAの塩基配列はGenBankにAccession No. U02031として登録されており、配列番号2で示される。

20

【0017】

SREBP-2の内因性発現に関しては、多少の強弱はあるもののほとんどの組織にあまねく発現している。ただし、転写因子としては、極めてユニークであるが、SREBP-2は膜結合型タンパク質として存在しており、そのままでは転写因子として活性を発揮できない。その細胞がコレステロールの要求が高まった時だけ、活性部分が切断され、核内に移行し、コレステロール合成系の遺伝子群の発現を高め、コレステロールを供給する。逆にコレステロールが十分の際は、切断されず、SREBP-2の転写活性は発揮されない。このシステムにより細胞内のコレステロール量は適切にコントロールされている。

30

【0018】

上記のSERBP-2に起因するコレステロール調節機構は、細胞一般に働いているシステムであり、正常の細胞内でも同様の機構が働いていると推測される。本発明のトランスジェニック動物では、核内に移行する部分のみ、つまり活性型のSREBP-2を強制過剰発現しているため、上記フィードバックがかからず、強制的にコレステロールの合成が高まった状態になる。つまり、本発明のトランスジェニック動物は、細胞特異的に持続活性化しており、その結果、2型糖尿病の症状を呈するのである。ここで、2型糖尿病の症状としては、コレステロール代謝異常(過剰合成)、膵臓細胞におけるインスリン分泌障害の他、高血糖、尿糖陽性、肥満をきたさないなどの症状が挙げられる。これらの症状は、公知の手法に基づいて判断することができる。例えば、高血糖及びインスリンの分泌障害については、ブドウ糖負荷試験において高血糖およびインスリン低下等の傾向を調べることによって判断することができる。これらの症状を呈しているか否かについては、当業者の判断によって行なうことができる。例えば、コレステロールの過剰合成については、マウスの膵臓からランゲルハンス氏島(以下、「ラ氏島」ともいう)を単離し、脂質抽出し、コレステロール含量を測定した場合に、正常動物群と比較してモデル動物群のラ氏島中のコレステロール量が10%以上、より明確には20%以上、さらに明確には30%以上増加している場合にコレステロールが過剰合成されていると判断することができる。また、インスリン分泌障害については、例えば、マウスの膵臓からラ氏島を単離し、高グルコー

40

50

スの培養液中におけるインスリン分泌量を測定した場合に、正常動物群と比較してモデル動物群の培養液中インスリン量が20%以上、より明確には30%以上減少している場合にインスリン分泌障害であると判断することができる。あるいは、生体におけるインスリン分泌能の低下については、糖負荷試験すなわちマウス個体にブドウ糖を負荷し、経時的に採血し、血中インスリン濃度を測定し、正常動物群と比較してモデル動物群のインスリン濃度が、統計的有意差をもって低下している場合に個体としてインスリン分泌障害であると判断することができる。また、高血糖については、上記糖負荷試験あるいは繰り返し採血を行い、正常動物群と比較してモデル動物群の血糖値が、統計的有意差をもって高値であるときに高血糖と判断することができる。糖尿病の診断は、ヒトの診断基準を単純に当てはめられないため、安定して高血糖を呈し、尿糖が陽性の場合に糖尿病といえる。インスリン分泌低下型の糖尿病の場合は、上記インスリン分泌能の低下も、糖尿病の診断を強く支持する。

10

【0019】

ここで、本明細書でいう「活性型SREBP-2タンパク質」は、上記のようにして切断されたSREBP-2タンパク質の活性部分あるいはその変異タンパク質をいう。より詳しくは、「活性型SREBP-2タンパク質」は、配列番号1で表されるアミノ酸配列の1~460番目のアミノ酸残基を有するタンパク質（ヒト活性型）、またはその変異タンパク質であって、コレステロール合成関与遺伝子に対する転写因子としての活性を有するものをいう。本発明でいう活性型SREBP-2タンパク質は、いずれの種由来のものでもよいが、好ましくはヒト由来である。ここで、「変異タンパク質」は、コレステロール合成関与遺伝子に対する転写因子としての機能を有する限り特に限定されないが、例えば、上記ヒトタンパク質のアミノ酸配列に対して欠失、置換、挿入、及び/または付加が生じたアミノ酸配列からなる変異タンパク質である。アミノ酸の変異部位および個数は、変異タンパク質が転写活性を保持している限り特に制限はないが、変異個数は通常1~30アミノ酸残基、好ましくは1~10アミノ酸残基、さらに好ましくは1~数個（例えば6個）である。

20

【0020】

本発明においては、対象とする動物の種類は特に限定されないが、好ましい動物として、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウシなどが挙げられる。この中では、作製が容易であることからマウスが最も好ましい。

【0021】

30

2. トランスジェニック動物の作製

本発明は上記トランスジェニック動物の作製方法も提供する。具体的には、本発明のトランスジェニック動物の作製方法は、(1)ヒト活性型SREBP-2タンパク質をコードするDNAがプロモーターの制御下に配置されている組換えDNAを構築し、(2)前記組換えDNA及び遺伝子マーカーを非ヒト動物の受精卵に導入し、(3)得られた受精卵を偽妊娠非ヒト哺乳動物に移植し、(4)その動物を飼育し、(5)前記遺伝子マーカーの発現産物を指標として、生まれた仔から前記組換えDNAを染色体中に有する仔を選択し、交配によりラインを確立後、組換えDNA由来のタンパクが目的の組織に安定して発現しているラインを選択する工程を含む。

【0022】

40

トランスジェニック動物（例えば、マウス）の作製方法はよく知られており、例えば、(1) Methods in Enzymology Vol 225 "Guide to techniques in mouse development" edited by Paul M. Wassarman, Melvin L. DePamphilis, Academic Press, INC.; (2) 羊土社「ジーンターゲットの最新技術」; (3) Gordon, J. W. (1993) Guide to Techniques in Mouse Development (Wassarman, P. M., and DePamphilis, M. L., Eds.), Academic Press, San Diegoなどに詳細に記載されている。また、本発明に用いられるPCR、プライマーの作製、ゲノムDNAの調製、クローニング、酵素処理等の方法は、当業者によく知られている通常の方法により行うことができる（"Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Third Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York(2001年)等参照）。

50

【0023】

本発明において好ましく用いられる動物は上述したようにマウスであるから、以下、トランスジェニックマウスの作製を例に挙げて本発明の非ヒトトランスジェニック動物の作製方法について説明する。

【0024】

本発明のトランスジェニックマウスの作製に際しては、まず、本発明で用いる活性型SREBP-2遺伝子がプロモーターの制御下に配置されるように組換えDNA(又はDNAコンストラクト)を構築する。本発明で用いる活性型SREBP-2タンパク質をコードするDNAは、DNA合成、cDNAクローニング、ゲノムクローニング、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術、及び、これらの手段の組合せを含む多数の製法により製造され得る(例えば、Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Third Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York(2001年)等参照)。

10

【0025】

本発明で用いる活性型SREBP-2タンパク質をコードするDNAは、通常の遺伝子組換え技術により構築することができる。例えば、既知のアミノ酸配列及び塩基配列情報等をもとに設計し、合成したプライマーやプローブを用い、PCR法やハイブリダイズ法によりcDNAライブラリーをスクリーニングして得ることができる。このようにして得られる目的のDNAを適当なプロモーターの下流に連結したDNAコンストラクト又は発現ベクターを作成することにより、適当な宿主中でSREBP-2タンパク質を発現させることができる。なお、本発明で用いる活性型SREBP-2タンパク質をコードするDNAは、好ましくはヒト活性型SREBP-2cDNAである。

20

【0026】

ここで用いられるベクターとしては、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス(ファージを含む)等が挙げられる。このベクターもまた、通常の遺伝子組換え技術を用いて、設計、構築することができる。このベクターにおいて、通常、プロモーター及びヒト活性型SREBP-2遺伝子が発現可能なように5'から3'方向に連結される。プロモーターとしては、SREBP-2遺伝子を膵臓細胞特異的に発現可能であれば特に限定されないが、例えば、ラットインスリンI遺伝子のプロモーター(Alpert S, Hanahan D, Teitelman G. Cell. 1988 Apr 22;53(2):295-308)、アミリンプロモーター等が例示される。本発明においては、ラットインスリンI遺伝子のプロモーターが特に好ましい。なお、目的遺伝子が適格に発現するように、必要に応じて、エンハンサー、サイレンサー、ポリA付加シグナルなどを発現ベクター中に組み込むことができる。

30

【0027】

好ましくは、上記ベクターに、本発明で用いるDNAと共に、遺伝子マーカーを導入することが好ましい。そのような遺伝子マーカーとして、例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP、EGFP等)、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ等が挙げられる。上記DNAと共に遺伝子マーカーを発現ベクターに導入した場合は、仔マウスに発現している遺伝子マーカーの発現産物を指標とすることにより、前記組換えDNA及び遺伝子マーカーの導入、発現の有無を効率良く確認することができる。

40

【0028】

このようにして得られる組換えDNAを受精卵に導入する方法としては、マイクロインジェクション法、レトロウイルス・ベクターによる方法、又は、胚性幹細胞を用いる方法等が挙げられるが、マイクロインジェクション法が通常用いられる。なお、本発明に用いられる受精卵の培養、マイクロインジェクション、受精卵の移植等の方法は、当業者によく知られている通常の方法により行うことができる。

次いで、マイクロインジェクションによって上記組み換えDNAを導入した受精卵を偽妊娠マウスの卵管に移植する。そして、そのマウスを飼育し、生まれた仔マウスから前記組換えDNAを有する仔マウスを選択することによって本発明のトランスジェニックマウスを得ることができる。生まれた仔マウスからの組換えDNAを有する仔マウスの選択は、例え

50

ば、マウス尾より抽出したゲノムDNAを鋳型とし、ヒトSREBP-2遺伝子の塩基配列や発現に要する随伴する塩基配列上その他の一部を有する特異的なプライマーを用いたPCRにて、前記組換えDNAの導入の有無を内因性マウスSREBP-2とは識別して確認する方法により行うことができる。また、遺伝子マーカーを発現ベクターに導入した場合は、遺伝子マーカーの発現産物を指標とすることにより、前記組換えDNA及び遺伝子マーカーの導入の有無を確認することができる。

【0029】

本願発明のトランスジェニックマウスが2型糖尿病モデルマウスとして使用可能か否かについては、そのマウスにまず導入遺伝子の膵臓細胞における発現を確認し、その直接の効果として細胞におけるコレステロール代謝異常(過剰合成)を検討する。さらに最終的には膵臓細胞におけるインスリン分泌障害の他、高血糖、多尿、尿糖陽性等の糖尿病としての表現型が現われているか否かによって判断する。

10

【0030】

3. スクリーニング方法

本願発明者らが作製したトランスジェニックマウスは、後述の実施例において確認されているように、所見上も、検査上もさらに病理学的にも2型糖尿病のモデルマウスであると結論づけることができる。したがって、本発明のトランスジェニックマウスは2型糖尿病の動物モデルとして2型糖尿病の発症機序を解明し、その治療法及び治療薬を開発するためのスクリーニングツールとして有用である。

【0031】

したがって、本発明の他の態様によれば、前記トランスジェニック動物に、試験化合物を投与した後に糖尿病の症状の変化を観察する工程を含む、2型糖尿病治療薬のスクリーニング方法が提供される。具体的には、本願発明のトランスジェニックマウスを被験マウス群、及び、非トランスジェニック同胞を対照マウス群にわけ、被験マウス群に試験する試験化合物を投与し、その後、被験マウス群、及び、対照マウス群のそれぞれから尿及び血液を採取し、尿中の糖含有量、血糖値等を測定し、これらの測定値を比較・検討することによって、試験化合物が2型糖尿病の治療薬として有効であるか否かを的確に判断することができる。

20

【実施例】

【0032】

以下、本発明を実施例及び実験例に基づいてより具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

30

【0033】

(1) インスリンプロモーター制御下SREBP-2遺伝子発現ベクターの作製

分子生物学的手法一般に関しては、標準的手法に従って行った(Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Third Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York(2001年)等参照)。トランスジェニックマウス作製に必要なマイクロインジェクション用DNAの調整のため、インスリンプロモーター制御下SREBP-2遺伝子発現ベクターの作製を行った。図1にその構成を示す。

【0034】

40

(プロモーター：)

導入遺伝子の生体内で細胞における特異的発現のため、過去のTgマウスにおいて発現実績のあるラットインスリンプロモーターI (Alpert S, Hanahan D, Teitelman G. Cell . 1988 Apr 22;53(2):295-308)を発現プロモーターとして用いた。ラットゲノムDNAをテンプレートとして下記プライマーを用いて、-715 bpから+31 bp部分をPCRにより得た。

5'プライマー：5'-TCTCAACTCCTTGAAAATAGCTACCT-f-3'(配列番号3)

3'プライマー：-GGTCTATGATTGTAGCTGGTCACTTA-r-3'(配列番号4)

なお、DNAポリメラーゼとしては、platinum Pfx DNA polymerase (インビトロゲン社)を用いた。

【0035】

50

(発現 cDNA)

ヒトSREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Protein) のcDNAは、ヒトSREBP-2cDNA発現ベクター-pCMVhSREBP-2 (ヒトSREBP-2の転写活性部分1~460アミノ酸残基を含むcDNAの発現ベクター、Amemiya-Kudo M, Shimano H, Hastly AH, Yahagi N, Yoshikawa T, Matsuzaka T, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Sato R, Kimura S, Ishibashi S, Yamada N. J Lipid Res. 2002 43(8):1220-35.)より用いた。

【0036】

転写を終了させるポリAシグナルについては、上記発現ベクター中のヒト成長ホルモンのポリAシグナルを用いた。以上のDNAをプラスミドブルースク립トII SK(+/-) (ストラタジーン社)内に図1の様に融合させ、発現ベクターを構築した。PCRより得たDNA部分に関しては、DNAシーケンシングにより塩基配列を確認した。発現ベクターの機能は、細胞のセルラインにトランスフェクションしてSREBP-2の転写活性をルシフェレースリポーターアッセイならびに発現タンパクをウェスタンブロット法で確認した。

10

【0037】

(2) マイクロインジェクション用DNAの調整

キアゲン社のプラスミド精製キットを用いて、上記のプラスミドDNAを大量精製し、制限酵素NotI, XhoIで切断し、図1に示す注入DNA部分をアガロース電気泳動にて分離後、QIAEX II Gel Extraction Kit (キアゲン社)を用いて精製した。

【0038】

20

(3) トランスジェニックマウスの作製

トランスジェニックマウスの作製は成書Methods in Enzymology Vol 225"Guide to techniques in mouse development" edited by Paul M. Wassarman, Melvin L. DePamphilis, Academic Press, INC.に準じて行った。概要はB6SJL / F2マウス間の自然交配によって得られた受精卵 (BDF₂) の雄性前核に(1)で得られた発現遺伝子を、調整し、マイクロインジェクション (micro-injection) 法 (オハイオ大学発明の米国特許4873191に基づき施行) にて、約1000コピー共導入後、ICR偽妊娠マウス (0.5dpc) の卵管内に移植し作製した。受精卵移植後19.5dpcで妊娠マウスから帝王切開で生存仔を摘出または自然出産させ、45匹のF0マウスを得た。

【0039】

30

得られた45匹から尾DNAを抽出し後述のPCR法にて5匹のF0マウスのゲノムDNAに注入遺伝子の導入を確認した。以後このPCRはジェノタイピングのスクリーニングにも用いた。

具体的には、尾DNAを鋳型に、導入遺伝子部分に特異的な下記プライマーセットを用いて以下の反応条件で行った。

【0040】

プライマー:

(hBP-2側, sense) : 5'AGCTTCTAAAGGGCATCGACCTA3' (配列番号5)

(hGH側, antisense) : 5'TAGAGGACACCTAGTCAGACAAAATGAT3' (配列番号6)

【0041】

PCR条件:

40

94	x	4min.	x	1cycle
94	x	1min.	x	35cycle
60	x	1min.	x	35cycle
72	x	1min.	x	35cycle
72	x	4min.	x	1cycle

【0042】

(4) 発現ラインの特定

上記の結果、染色体DNAへの導入が認められた5匹のファウンダーマウスにC57BL6/Jマウス (クレア社より購入) を交配し、子孫に上記同様の尾DNAのPCRにて、遺伝子の導入を確認して、ラインを確立した。

50

各ラインの子孫マウスの臍臓よりラ氏島を分離して、総RNAをTRIzol (インビトロゲン社)を用いて抽出し、さらにリアルタイムPCR法により、ヒトSREBP-2の発現を検討した。発現の最も多いラインAを確定し、C57BL6/Jマウスとの交配を繰り返し、繁殖ならびに遺伝子背景をC57BL6/Jストレインのそれに近付けるように戻し交配を繰り返した。

この交配の期間中、ジェノタイピングより得たトランスジェニックマウスと非トランスジェニック同胞マウスを対照に初期解析を行った。トランスジェニックマウスラインAは安定して、メンデルの法則に従って同胞中50%に近い陽性率を示し、導入遺伝子の染色体組み込みが安定して伝搬していることが確認された。またラ氏島(単離方法後述)由来RNAから定量性リアルタイムPCR法を用いて、ヒトSREBP-2mRNAの発現を測定すると(方法後述ならびに図5参照)個体間のばらつきなく安定して確認され、細胞特異的ヒトSREBP-2過剰発現トランスジェニックマウスラインが確立したと考えられた。

10

【0043】

なお、定量性リアルタイムPCR法は次のようにして行なった。各サンプルをTrizolを用いてRNAを抽出、これよりcDNAの合成は、サーモスクリプト(インビトロゲン社)を使用し、TaqMan (Applied Biosystems、ABI社)による定量性PCR(50°C 2分、95°C 10分の後、95°C 15秒、60°C 1分を40サイクル)をABI Prism 7000 PCR instrument (Applied Biosystems)を用いて施行した。用いたプライマーならびにプローブは、次の通りである。

【0044】

ヒトSREBP-2:

5'-CCAACTCTGCAAGTCAAGGTTTCT-f-3' (配列番号7)

5'-GCGTGATCATTACCGTCTGTTGT-r-3' (配列番号8)

マウスHMGCα合成酵素:

5'-AGGAAACTTCGCTCACACCT-f-3' (配列番号9)

5'-GCCATGTATCTGTTTTGGCC-r-3' (配列番号10)

プローブ:

CAGCAGCCCAGCAGAGGTTTTCTACAATC (配列番号11)

サイクロフィリン:

5'-TGGCTCACAGTTCTTCATAACCA-f-3' (配列番号12)

5'-ATGACATCCTTCAGTGGCTTGTC-r-3' (配列番号13)

プローブ:

5'-TCCATGCCCTCTAGAACTTTGCCGAA-3' (配列番号14)

20

30

【0045】

(5) 作製マウスの表現型: 糖尿病の確認

上記のようにして得たトランスジェニックマウスラインAは普通食にて飼育中、尿糖陽性、多尿を認め、糖尿病の発症が示唆された。図2に示すように空腹時血糖を測定すると(グルコース測定キット、和光純薬)、トランスジェニックマウス群では174 mg/dlと非トランスジェニック同胞対照群の99 mg/dlに比して有意に高値を示し、インスリン値(ELISAキット、シバヤギ)は測定感度以下であった。通常の摂食下では、300~500 mg/dlと明らかに糖尿病の血糖値を示した。

40

【0046】

トランスジェニックマウス群において、糖負荷試験(1g/kg体重(20%溶液)のブドウ糖を尾静脈より注射、経時的(前、5、15、30分)に眼窩静脈より採血、血糖ならびに血中インスリン値を測定)を施行すると、インスリン分泌障害型の糖尿病パターンを示した(図3)。すなわち、各時間ポイントで対照に比し、有意の高値を示し、糖負荷に対する高血糖が遷延した。また対照群で認められた血糖上昇に応じた血中インスリン値の上昇も、トランスジェニックマウス群ではほとんど認められず、インスリン分泌障害が著明であった。

【0047】

さらにインスリン分泌障害を直接に確認する目的で、臍臓ラ氏島を分離すると、ラ氏島

50

の個数、個々のサイズに約50%程度の減少を認めており、さらにその形態に異常を認め、ラ氏島の障害が認められた。分離した後、サイズをそろえた上で個々のラ氏島に関して培養時におけるインスリン分泌能を検討したところ、図4に示すように培養液中のブドウ糖に対するインスリン分泌も50%低下しており、個々のラ氏島に関してインスリン分泌能の低下を認めた。

なお、ラ氏島の単離は、次のようにして行なった。マウスを頸椎脱臼にて屠殺し、胆管結紮後、コラゲナーゼ溶液(4mg/ml、10mM HEPES (pH 7.4) 0.5% BSA (KRBH) 2.5 mlを膵管に注入し膨潤した膵臓をさらに37°Cで3.5分培養し、KRBHで洗浄後、単離したラ氏島を実体顕微鏡下で、採取した。

【0048】

以上より、確立したラットインスリンプロモーターヒトSREBP-2トランスジェニックマウスでは、インスリン分泌障害による糖尿病を呈することが確認された。ライン別の発現量の検討の際、図5に示すようにヒトSREBP-2発現量がラインAよりも少ないが発現の認められたラインBに関して同様の検討を一部行い、発現量がより少ないことに合致して、糖尿病に関する各検討事項が軽度存在することが確認された。すなわち導入遺伝子SREBP2の発現量に応じた表現系を呈していることがわかり、ラインAの表現系が遺伝子導入による非特異的効果でなく、発現したSREBP-2の量依存性の効果であることが確認された。

【0049】

(6) 作製マウス糖尿病の病態

上記のようにして作製されたトランスジェニックマウスにおいては、1型糖尿病に認められるような細胞廃絶によるインスリンの枯渇ではなく、基礎分泌よりもむしろブドウ糖刺激に対する応答分泌が障害されている点において、2型糖尿病の病態を呈している。またこのマウスは、体重や、外見、解剖上の脂肪組織重量は正常と同等で、肥満を認めない。すなわち同じ2型糖尿病でも肥満糖尿病モデルやインスリン抵抗性モデルマウスとは明かに病態が異なり、日本人に比較的多く認められる非肥満性インスリン分泌障害型の2型糖尿病モデルマウスとなる。図5に示すように導入遺伝子の発現量に応じてコレステロール合成系の鍵酵素であるHMGCoA合成酵素の発現も誘導されており、本マウスの細胞ではコレステロール合成が活性化されていると考えられ、糖尿病発症との関連が推測された。

上記のようにして作製されたトランスジェニックマウスは、インスリン分泌障害の新しい機序により糖尿病を発症しており、糖尿病発症の新しい概念を包含している。従来よりインスリン分泌障害の病因として、細胞に中性脂肪が蓄積することが注目されてきた。本マウスでは、コレステロールが蓄積することが予想され、コレステロール代謝とインスリン分泌障害という全く新しい病体機序の可能性を示唆している点でも新規性の高い糖尿病モデルといえる。

【産業上の利用可能性】

【0050】

本発明の非ヒトトランスジェニック動物は、2型糖尿病の発症機構の研究ならびに2型糖尿病の治療薬のスクリーニング用ツールとして有用である。本発明の好ましい態様によるトランスジェニックマウスは、繁殖の際、子孫の半数が病態マウス、半数が正常対象群として利用できるため、研究に好都合である。また他に知られている2型糖尿病に近い病態を示すモデル動物は肥満が著明であったり、インスリン抵抗性が前面にでており糖尿病を発症させるのに長期に高脂肪食などの特別負荷食を投与しなければならない点で不便であった。本マウスは、肥満を呈しておらず、また普通食において、若年時よりインスリン分泌を低下した糖尿病を発症する利便性にすぐれたモデルである。またさらに上記負荷食を与えることにより、より重篤な糖尿病を惹起することもできる利点もある。

以上より、本発明の他の態様によるスクリーニング方法は、日本人に多いとされる2型糖尿病の治療薬をスクリーニングする際に有効に利用できる。

【図面の簡単な説明】

【0051】

10

20

30

40

50

【図1】図1は、SREBP-2遺伝子発現ベクターの構成を示す。

【図2】図2は、SREBP-2トランスジェニックマウスの空腹時血糖値と空腹時インスリン値を示すグラフである。

【図3】図3は、経静脈糖負荷試験における血糖値の変化及び血中インスリン値の変化を示すグラフである。

【図4】図4は単離ラ氏島グルコース刺激時のインスリン分泌能を示す。

【図5】図5は、導入遺伝子ヒトSREBP-2とHMGCoA合成酵素の発現量の比較を示す。

【配列表フリーテキスト】

【0052】

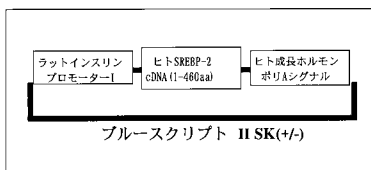
- 配列番号 3 : プライマー
- 配列番号 4 : プライマー
- 配列番号 5 : プライマー
- 配列番号 6 : プライマー
- 配列番号 7 : プライマー
- 配列番号 8 : プライマー
- 配列番号 9 : プライマー
- 配列番号 10 : プライマー
- 配列番号 11 : プライマー
- 配列番号 12 : プライマー
- 配列番号 13 : プライマー
- 配列番号 14 : プライマー

10

20

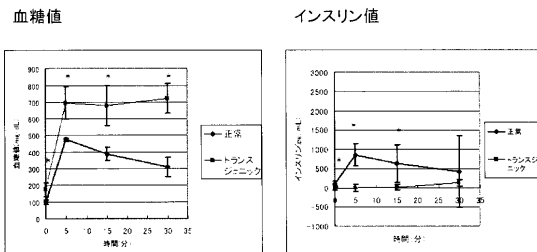
【図1】

トランスジェニックマウス作製用発現ベクターの構成



【図3】

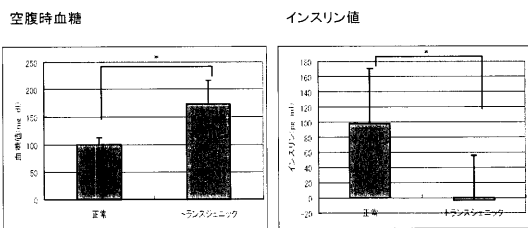
経静脈糖負荷試験



平均値 ± SD, n=5, *p<0.05 (スチューデントt検定)

【図2】

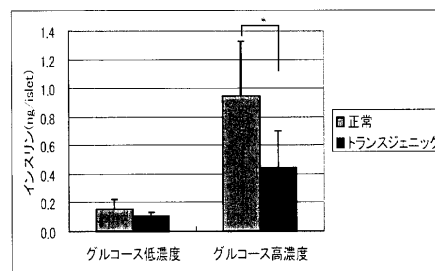
SREBP-2トランスジェニックマウスの空腹時血糖とインスリン



平均値 ± SD, n=20, *p<0.05 (スチューデントt検定)

【図4】

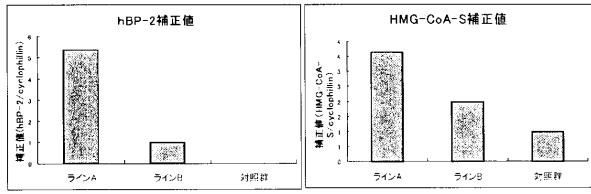
単離ラ氏島グルコース刺激時インスリン分泌能



平均値 ± SD, n=10, *p<0.05 (スチューデントt検定)

【 図 5 】

導入遺伝子SREBP-2(hBP-2)とHMGCoA合成酵素の発現量



【 配列表 】

[2005295867000001.app](#)