

2型糖尿病早期診断・治療を目指した候補遺伝子群の探索と多機能性ナノ粒子を用いたin vivo機能解析

学位論文内容の要旨

世界的な2型糖尿病の患者数は過去30年間で約3億4700万人に達し、増加の一途を辿っているため、2型糖尿病の発症予防診断・画期的な治療法の開発が強く望まれている。特にゲノム・遺伝子発現情報を利用した研究開発は、病気の発症予測や原因因子を理論的に推測可能なため、2型糖尿病の診断・治療法開発に革新的な進展をもたらすことが期待されている。しかしながら、(1)膨大な情報の中から2型糖尿病の疾患に決定的に関わる遺伝子を効率よく発見する方法、(2)候補遺伝子の機能をin vivoで効率よく評価する方法、の2点が不十分であるために診断・治療へ向けた創薬開発が遅れているのが現状である。そこで(1)を解決するために、独自のアイデアに基づいて膨大な情報の中から疾患に重要な役割を担っていると思われる診断・治療候補分子の選定を試みた。そして(2)を解決する為に、申請者の所属する研究室で開発されている核酸デリバリーシステム：多機能性エンベロープ型ナノ構造体(Multifunctional Envelope-type Nano Device; MEND)に着目し、糖尿病関連組織の1つである肝臓への核酸デリバリーシステムの構築を試みた。上記に記載した2つの問題点を解決することによって、独自で開発された人工キャリアを用いたin vivo標的候補遺伝子のスクリーニングを行い、2型糖尿病の新規診断・治療標的分子の発見を行うことを目的とした。

初めに2型糖尿病早期診断可能な遺伝子探索を試みた。将来の2型糖尿病発症予測を確実にを行うためには、糖尿病関連組織（肝臓、脂肪組織、骨格筋）の遺伝子発現変動を調べるのが理想である。しかしながら、糖尿病を発症していない健康人に対してそのような非侵襲的な方法は非現実的である。そこで、サンプリングが容易な血液に着目して、白血球の網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、2型糖尿病発症前のOLETFラット白血球では、合計300遺伝子が1.5倍以上発現変動しており、そのうち4遺伝子がインスリンシグナル伝達関連経路に含まれていた。さらに、糖尿病関連組織間の相関について解析したところ、合計57遺伝子が血液と肝臓、脂肪組織、骨格筋間で共通発現変動しており、その一部は2型糖尿病の病態関連遺伝子が検出された。一方、糖尿病発症後のOLETFラットにおける解析も行ったところ、発症後の白血球、肝臓間でも合計29遺伝子が共通発現変動していた。従って、白血球と糖尿病関連組織との共通発現変動遺伝子群は、2型糖尿病早期診断に有望である可能性が示唆された。

次に新規2型糖尿病治療標的遺伝子群の探索を試みた。2型糖尿病モデルマウス(KKAYマウス)、健常マウス(C57BL/6Jマウス)を用いて肝臓の網羅的遺伝子発現解析を実施した。発症前(4週齢)、発症後(11週齢)のKKAYマウスの遺伝子発現プロファイルを比較して、2倍以上発現亢進している583遺伝子を抽出した。これらの遺伝子群の中には週齢差によって発現変動した遺伝子群が含まれていると考え、C57BL/6Jマウスで2倍以上発現亢進した193遺伝子、発現低下した793遺伝子との比較を行った。その結果、583遺伝子中442遺伝子が病態関連遺伝子、129遺伝子が週齢によって変動する遺伝子であった。Gene Ontology解析により442遺伝子の多くが脂質代謝に関わることが明らかとなり、これらを治

療標的候補遺伝子群とした。これらの候補遺伝子の機能解析を *in vivo* で行うため、pDNA, siRNA といった核酸を肝臓に送達可能な核酸デリバリーシステムの構築を行うことにした。

細胞膜透過能力を有する octaarginine(R8)ペプチドは、その機能以外に肝臓に集積するという特徴を有することが明らかとなっている。そこで、R8 ペプチドを基盤とした尾静脈投与型キャリアの構築に取り組んだ。初めに 2 種類の凝縮化 pDNA コア（負電荷凝縮化コア、正電荷凝縮化コア）を内封した R8 修飾 MEND (R8-MEND) をマウスに尾静脈投与したところ、肝臓での遺伝子発現活性は非常に低い値であった。そこで、肝臓での遺伝子発現活性を上昇させるために *in vivo* において様々な最適化を実施した。その結果、負電荷凝縮化コアの使用、総脂質量を減少させること、pH 応答性膜融合促進ペプチド (GALA) を修飾すること、の 3 点が重要な要因であることが明らかとなったが、特に負電荷凝縮体と GALA 修飾の組み合わせが最も遺伝子発現活性を上昇させる要因であり、肝臓での遺伝子発現活性は 3350 倍上昇した。最適化された R8-GALA-MEND は肝臓での遺伝子発現活性が他組織（肺、脾臓）と比べて有意に高いことから、肝臓指向性の高いキャリアであることが明らかとなった。さらにこの R8-GALA-MEND は pDNA 以外にも siRNA も搭載可能であり、肝臓の内在性遺伝子 SR-BI(scavenger receptor class B, member 1)の有意な発現抑制にも成功した。一方、R8-GALA-MEND に HGF(Hepatocyte Growth Factor, 肝細胞増殖因子)をコードした pDNA を内封して、急性肝炎の抑制効果を試みた。その結果、HGF pDNA 内封 R8-GALA-MEND を投与した群では、有意な肝障害の軽減、及び市販の肝臓導入試薬である *in vivo* jetPEI-Gal と比べて有意な生存率の延長も確認された。この結果は、構築された R8-GALA-MEND が急性肝炎を始めとする様々な病態を改善するための予防・治療ツールとして利用できる可能性があることを示している。

最後に肝臓への siRNA デリバリーシステムを用いた標的候補遺伝子の *in vivo* 機能解析を行った。DNA microarray 解析の結果、脂質代謝に関わった monoacylglycerol O-acyltransferase 1 (Mogat1) 遺伝子に着目した。Real-time PCR によって肝臓における遺伝子発現量を確認した結果、KKAy マウスにおいては病態の進行により徐々に発現の上昇が認められ、糖尿病発症後の段階で 35 倍発現亢進していた。さらに他の糖尿病モデル動物 db/db マウスや、高脂肪食負荷マウス肝臓においても有意な発現上昇が観察された。そこで、Mogat1 siRNA を MEND に内封し、10 週齢の KKAy マウスに投与することで *in vivo* 機能解析を実施した。その結果、投与 1 日後において血糖値の有意な低下が確認された。そして、グルコース負荷試験、ピルビン酸負荷試験の結果から、Mogat1 siRNA 投与群において全身性のグルコース代謝能力の改善、肝臓における糖産生量の減少が観察された。一方、顕微鏡観察の結果、Mogat1 siRNA 投与群では肝臓の血管周辺部位では異所性脂肪の量が減少していることが示唆された。以上の結果より、Mogat1 は新規 2 型糖尿病治療標的分子である可能性が示唆された。

本研究は DNA microarray による診断・候補遺伝子の探索研究と、*in vivo* 核酸デリバリーシステム研究を組み合わせた融合研究であり、その結果、Mogat1 遺伝子が 2 型糖尿病の新たな標的分子である可能性を示した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	原島秀吉
副査	教授	武田宏司
副査	准教授	秋田英万
副査	特任准教授	梶本和昭

学位論文題名

2型糖尿病早期診断・治療を目指した候補遺伝子群の探索と多機能性ナノ粒子を用いたin vivo機能解析

博士學位論文審査等の結果について（報告）

近年、2型糖尿病の発症予防診断・早期治療に関する研究は盛んに行われている。しかし、その多くは既知の2型糖尿病関連分子、もしくはその周辺に位置する分子に焦点を当てた研究である。2型糖尿病を引き起こすと考えられる新規標的分子を探索し、その機能を検証するという研究は未開拓の分野で、今後の発展が待たれている状況にある。林泰弘氏は、DNAマイクロアレイによる網羅的な診断・治療候補遺伝子探索研究と、肝臓への核酸デリバリーシステム開発研究を同時に行い、これらの研究を融合させることでin vivoにおいて2型糖尿病の新規標的分子の発見を行うことを目的としていた。

2型糖尿病の早期診断・治療標的遺伝子探索研究において、林泰弘氏は2型糖尿病発症前のOLETFラットを用いて、白血球（血液）と糖尿病関連組織（肝臓、脂肪組織、骨格筋）の共通発現変動遺伝子群に着目し、合計57遺伝子が2型糖尿病早期診断に有望である可能性を示した。これら遺伝子群は血糖値、インスリン量に異常がない週齢においても変動していることから、血清パラメーターよりも早期に、高感度で病態の進行を検出できる可能性が示唆されていた。早期治療候補遺伝子探索においては2型糖尿病発症前後のKKAyマウスを用いて、疾患の進行により変動する遺伝子群に着目して、脂質代謝関連遺伝子群が候補遺伝子群になることを示していた。これら候補遺伝子の抽出方法は非常に独自性が高いものであった。

次に、これら候補遺伝子の機能をin vivoで実証する目的で、肝臓での核酸（pDNA、siRNA）デリバリーシステムの開発研究を行っていた。林泰弘氏が所属していた北海道大学大学院薬学研究院・薬剤分子設計学研究室で構築された多機能性エンベロープ型ナノ構造体（MEND）に着目して研究

を進めていた。これまで *in vitro* 系ではアデノウイルスに匹敵する核酸導入効率を有していたが、静脈内投与型の肝臓への核酸送達は困難であった。林泰弘氏は MEND に内封する凝縮化核酸粒子の検討や、オクタアルギニン (R8)、エンドソーム脱出素子 (GALA) といった機能性ペプチドを MEND 膜表面に修飾することで、肝臓の pDNA 導入効率を飛躍的に高めることに成功していた。そしてこのシステムは siRNA も効率よく肝臓に送達させることが可能であった。さらに構築された R8-GALA-MEND は、急性肝炎の予防に有効であることも示されており、今後肝臓の疾患予防、治療に有効なシステムになる可能性が期待された。

最後に、林泰弘氏は上記に記載した遺伝子探索研究で発見した新規分子 Mogat1 の *in vivo* 機能解析を試みていた。Mogat1 は 2 型糖尿病モデルである KK^{Ay}, db/db マウス、また高脂肪食摂取マウスで高発現していることを明らかにしていた。肝臓標的型 siRNA デリバリーシステムを用いて肝臓で発現している Mogat1 をノックダウンしたところ、血糖値の減少、肝臓内での異所性脂肪の減少が観察されていた。さらに耐グルコース能、耐ピルビン酸能の改善がみられており、Mogat1 が新規 2 型糖尿病治療標的分子である可能性を示していた。この分子はこれまでのところ 2 型糖尿病と関連する報告はされていないため、本結果は、新しい 2 型糖尿病の治療法開発につながるものであると期待できる。

以上、林泰弘氏は、網羅的遺伝子発現解析と *in vivo* 核酸デリバリーシステムを組み合わせた画期的な 2 型糖尿病疾患関連分子探索の方法論を示していた。本研究の方法論は様々な疾患の鍵となる新規標的分子の発見にも利用できる可能性を示したという点で非常に興味深くかつ有用である。よって林泰弘氏は、北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格あるものと認める。