

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19300143

研究課題名（和文） メタボリックシンドローム・コンソミック系統の開発

研究課題名（英文） Development of consomic mouse model for metabolic syndrome

研究代表者

杉山 文博 (SUGIYAMA FUMIHIRO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：90226481

研究成果の概要（和文）：NZO/HILtJマウスはメタボリックシンドロームを発症するが、C3H/HeJマウスは発症しない。我々はNZO/HILtJマウスより複数の肥満、糖代謝異常および高血圧に連鎖する量的形質遺伝子座（QTL）を同定した。メタボリックシンドロームの発症機構解明に有用なモデル動物作製のため、NZOマウスの第7、第12及び第17染色体をC3Hマウスのそれらに置換したNZO/HILtJ-Chr 7^{C3H/HeJ}、NZO/HILtJ-Chr 12^{C3H/HeJ}およびNZO/HILtJ-Chr 17^{C3H/HeJ}コンソミックマウス3系統の作製に成功した。これら3系統のコンソミックマウスについて肥満、糖代謝および血圧について検討したところNZO/HILtJマウスと有意な差が見られなかった。NZO/HILtJマウス第7、第12及び第17染色体には単独でNZO/HILtJマウスのメタボリックシンドローム発症に関わる遺伝子は存在しないことが明らかとなった。さらに我々はNZO/HILtJマウス繁殖支持系統においてトランスポゾン媒介によるFgf5欠損自然発生変異マウスを発見した。Fgf5はヒト高血圧と強く連鎖することより、今後高血圧やメタボリックシンドロームの基礎研究におけるモデルマウスとなる可能性が期待された。

研究成果の概要（英文）：The development of metabolic syndrome is found in NZO/HILtJ mice, but not in C3H/HeJ mice. We identified quantitative trait loci associated with obesity, abnormal glucose metabolism and hypertension. To develop the animal model for understanding the molecular mechanism of metabolic syndrome, we successfully produced three consomic mouse strains, NZO/HILtJ-Chr 7^{C3H/HeJ}, NZO/HILtJ-Chr 12^{C3H/HeJ} and NZO/HILtJ-Chr 17^{C3H/HeJ}. There were no significant differences in obesity, glucose metabolism and blood pressure between the consomic mice and NZO/HILtJ mice. These results demonstrate that a single major gene associated with metabolic syndrome was not located on the chromosome 7, 12 and 17 of NZO/HILtJ mice. Furthermore, we found Fgf5-deficient natural mutant mice from ICR mouse colony supporting the breeding of NZO/HILtJ mice. The Fgf5-deficient mice might be useful animal model for the basic research of hypertension and metabolic syndrome, because there is strong significant association between hypertension and Fgf5 polymorphism in human.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：NZOマウス、量的形質遺伝子座、高血圧、肥満、糖尿病、メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

(1) メタボリックシンドロームは極めて罹患率の高い疾患であり、高血糖、高血圧、高脂血症を合併する疾患であるが、その原因遺伝子は良く理解されていない。

(2) *NZO/HILtJ* マウスは糖尿病、肥満に加え、我々の研究より高血圧も合併することが示され、メタボリックシンドロームの基礎研究に有用なマウスであることが明らかとされたが、その原因遺伝子は不明である。

2. 研究の目的

メタボリックシンドローム発症に関わる遺伝的発症機構解明の有用なモデル動物の開発するため、

- (1) *NZO/HILtJ* マウスの繁殖維持方式の確立。
- (2) *NZO/HILtJ* におけるメタボリックシンドローム量的形質遺伝子座 (QTL) を同定
- (3) *NZO/HILtJ-Chr<C3H/HeJ>/Utr* マウス系統の作製
- (4) *NZO/HILtJ-Chr<C3H/HeJ>/Utr* マウスの形質解析
- (5) *NZO/HILtJ* マウス繁殖支持系統より発生した自然発症変異マウスの発見とその原因遺伝子解析

を目的とした。

3. 研究の方法

動物：*NZO/HILtJ* マウスは the Jackson Laboratory より、*C3H/HeJ* やその他マウスは日本チャールスリバーおよび日本クレアより導入した。マウスは筑波大学生命科学動物資源センターにて繁殖および実験に供された。

QTL 解析：222 匹の *NZO/HILtJ x C3H/HeJ F2* マウスを作製し、血漿グルコース、血漿インスリン、血漿レプチン濃度の測定、体重および非観血式血圧測定を実施した。遺伝型は全ゲノムを平均して 18.1 cM 間隔にて配置した 92 個のマイクロサテライトマーカー及び 12 個の一塩基多型 (SNP) マーカーを用い解析した。メタボリックシンドローム形質の同定には 3 つのステージ戦略より行った。最初は有意な main effect を持つ QTL の探索を実施し、有意な限界値は 1000 回のパーミュテーションテストにて評価された。第 2 は有意な interactive effect を持つ QTL の探索を実施した。最後にこれら有意な QTL に対し multiple-regression 解析を実施し、統計学的にメタボリックシンドロームの各形質に連鎖するゲノム領域を解析した。

コンソミックマウス作製：コンソミック系統は、86 個のマイクロサテライトマーカーおよび 74 個の SNPs マーカーを用いた。*NZO/HILtJ* マウスと *C3H/HeJ* マウスを交配して、*NCN1* マウスを作製

し、この *NCN1* オスマウスを *NZO/HILtJ* メスマウスに交配し戻し交配個体 *NCN2* マウスを得た。その後、目的の *C3H* マウス由来の染色体はヘテロ接合体として維持し、他の染色体はゲノムワイドに *NZO* マウスに置き換わっている個体を選別し戻し交配を繰り返した。

形質解析：血漿グルコース、血漿インスリン、血漿レプチンは市販の測定キットによって解析された。血圧は非観血式測定方法にて BP-98A (ソフトロン) を用い解析した。内臓脂肪含量は小動物用 CT 装置 (LCT-100, ALOKA) によって解析された。

4. 研究成果

(1) *NZO/HILtJ* マウスの繁殖維持方式の確立
基盤系統である *NZO/HILtJ* マウスは短命で、繁殖能力が低く、コンソミック系統の作製維持に困難を要することが予想された。そこで、制限給餌により *NZO/HILtJ* マウスのメタボリックシンドローム発症と繁殖能力への影響を検討した。結果、3.5g 制限給餌は *NZO* マウスのメタボリックシンドロームの内、肥満、糖尿病を軽減させることが明らかとなった。さらに制限給餌は *NZO/HILtJ* マウスの繁殖能力の改善に効果的であることが明らかとなった。これらの結果は *NZO/HILtJ-Chr<C3H/HeJ>/Utr* コンソミック系統の開発において、この制限給餌方法が有用であることが示唆された。

(2) *NZO/HILtJ* におけるメタボリックシンドローム形質量的遺伝子座 (QTL) を同定
NZO/HILtJ x C3H/HeJ F2 マウスを用いた量的形質遺伝子座解析を実施した。グルコースに連鎖する 6 種類の遺伝子座、インスリンに連鎖する 3 種類の遺伝子座、レプチンに連鎖する 4 種類の遺伝子座、体重に連鎖する 5 種類の遺伝子座、血圧に連鎖する 3 種類の遺伝子座を同定した。

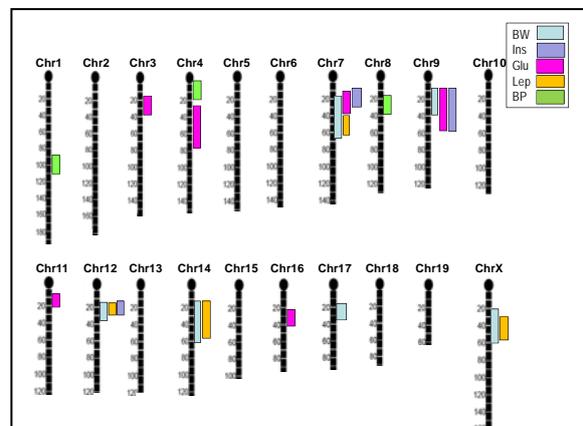


表 1 *NZO/HILtJ x C3H/HeJ F2* マウスにおけるメタボリックシンドローム QTL

そこで、これら遺伝子座の遺伝強度等を考慮し、肥満、糖代謝、高血圧に連鎖する QTL が存在する 10 本の染色体 (第 1、4、5、7、8、11、12、15、17、18 番) について NZO/*HILtJ* マウスを基盤とし、候補染色体を *C3H/HeJ* マウスに置き換えた 10 系統のコンソミック系統の開発を実施した。

(3) NZO/*HILtJ*-Chr <*C3H/HeJ*>/*Utr* マウス系統の作製

コンソミック系統を構築するため、肥満、糖代謝異常、高血圧に連鎖する QTL が存在する 10 本の染色体 (第 1、第 4、第 5、第 7、第 8、第 11、第 12、第 15、第 17、第 18 染色体) について、NZO/*HILtJ* マウスを基盤とし、候補染色体を *C3H/HeJ* にそれぞれ置き換えた 10 系統のコンソミック系統開発を実施した。第 7、第 8、第 12、第 17、第 18 染色体コンソミック系統は第 7 世代まで到達し、第 1、第 15 染色体コンソミック系統は第 8 世代目が候補染色体以外ゲノムワイドに NZO/*HILtJ* マウスの遺伝背景に置き換わっていることが明らかとなった (第 4 及び第 5 染色体コンソミック系統は繁殖困難に至った)。そこで主要な 3 系統について染色体の特質を明らかにするため以下の実験を実施した。また、全ての系統は凍結受精卵にて系統保存を行った。

(4) NZO/*HILtJ*-Chr 7 *C3H/HeJ*, NZO/*HILtJ*-Chr 12 *C3H/HeJ* および NZO/*HILtJ*-Chr 17 *C3H/HeJ* コンソミックマウスの形質解析

複数のメタボリックシンドローム形質と連鎖する遺伝子座 (QTL) が存在する第 7 染色体及び第 12 番染色体、さらに体重に高い LOD スコアを示した第 17 番染色体コンソミックマウスはホモ化を行い、肥満は体重、血漿レプチンレベルおよび *in vivo* CT 画像解析装置による腹腔内脂肪量を計測によって評価、糖代謝は血漿インスリンレベル、血漿グルコースレベルを検査、血圧は非観血式測定方法にて各形質が解析された。しかしながら、3 種類系統のコンソミックマウスと NZO/*HILtJ* マウス間において各形質とも有意な差は観察されなかった。

これらの結果より、NZO/*HILtJ* マウス第 7、第 12 及び第 17 染色体には単独で NZO/*HILtJ* マウスのメタボリックシンドローム発症に関わる遺伝子は存在しないことが明らかとなった。

(5) NZO/*HILtJ* マウス繁殖支持系統より発生した長毛形質を示す自然発症変異マウスの発見

NZO/*HILtJ*-Chr <*C3H/HeJ*>/*Utr* マウス育成を補助するための ICR マウスコロニーにおいて長毛形質を示すマウスが自然発生した。遺伝子解析の結果、第 5 染色体に位置する *Fgf5* 遺伝子にレトロトランスポゾンが挿入し、*Fgf5* 遺伝子が破壊されていることが明らかとなった。*Fgf5* はヒト高血圧と強い連鎖することが知られており、今後高血圧やメタボリックシンドロームの基礎研究に役立つモデルマウスなる可能性が期待された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Mizuno S, Iijima S, Okano T, Kajiwara N, Kunita S, Sugiyama F, Yagami K. Retrotransposon-mediated *Fgf5*^{no-Utr} mutant mice with long pelage hair. *Exp Anim* 60:161-167 (2011) 有
- ② Feng M, Deerhake ME, Keating R, Thaisz J, Xu L, Tsaih SW, Smith R, Ishige T, Sugiyama F, Churchill GA, DiPetrillo K. Genetic analysis of blood pressure in 8 mouse intercross populations. *Hypertension* 54: 802-809 (2009) 有
- ③ Sakairi A, Ishida J, Honjo K, Inaba S, Nakamura S, Sugiyama F, Yagami K, Fukamizu A. Angiotensin type 1 receptor blockade prevents cardiac remodeling in mice with pregnancy-associated hypertension. *Hypertens Res* 31: 216-275 (2008) 有
- ④ Kato H, Ishida J, Nagano K, Honjo K, Sugaya T, Takeda N, Sugiyama F, Yagami K, Fujita T, Nangaku M, Fukamizu A. Deterioration of atherosclerosis in mice lacking angiotensin II type 1A receptor in bone marrow-derived cells. *Lab Invest.* 88:731-739 (2008) 有
- ⑤ Nishihara E, Tsaih SW, Tsukahara C, Langley S, Sheehan S, DiPetrillo K, Kunita S, Yagami K, Churchill GA, Paigen B, Sugiyama F. Quantitative trait loci associated with blood pressure of metabolic syndrome in the progeny of NZO/*HILtJ*x*C3H/HeJ* intercrosses. *Mamm Genome.* 18:573-83 (2007) 有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 石毛太郎、西野入燈、國田智、杉山文博、八神健一 メタボリックシンドロームを発症する NZO マウスにおける制限給餌の効果 第 56 回日本実験動物学会総会 (2009 年 5 月 15 日) 埼玉
- ② 西原絵里、Tsaih SW、塚原千恵子、DiPetrillo K、Churchill GA、國田智、杉山文博、八神健一 (NZO x *C3H*) マウスにおける血圧量的遺伝子座解析 第 54 回日本実験動物学会 (2007 年 5 月 24 日) 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 文博 (SUGIYAMA FUMIHIRO)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
准教授
研究者番号：90226481

(2) 研究分担者

國田 智 (KUNITA SATOSHI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
講師
研究者番号：10195472

深水 昭吉 (FUKAMIZU AKIYOSHI)
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・
教授
研究者番号：60199172