

平成22年 5月20日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19500362
 研究課題名 (和文) 新規遺伝子組換えウサギによるメタボリックシンドロームにおける PPAR の役割
 研究課題名 (英文) The role of PPAR in metabolic syndrome with novel genetically modified rabbits
 研究代表者
 北嶋 修司 (KITAJIMA SHUJI)
 佐賀大学・総合分析実験センター・准教授
 研究者番号：70284643

研究成果の概要 (和文)：メタボリックシンドロームの病態解析のための新規病態モデルとして、これらの病態に関連すると考えられているヒト PPAR γ を脂肪組織特異的に過剰発現する遺伝子組換え (Tg) ウサギの作製を行った。作製した Tg ウサギの表現型解析を行ったところ、導入した遺伝子が脂肪組織特異的に発現していることは確認できたが、明らかな表現型の変化 (病態の発症) を見いだすことは出来なかった。今後、発現蛋白活性などのさらに詳細な検討が必要であると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：We generated transgenic (Tg) rabbits as a novel human disease model for metabolic syndrome. PPAR-gamma has been believed to be associated with pathologic status of it. Tg rabbits was designed to specifically overexpress human PPAR-gamma in their adipose tissue. As the results, we confirmed specific expression of mRNA of transgene in the adipose tissue of Tg rabbits, however, we could not find phenotypic differences (pathologic status) between Tg rabbits and wild type one. It is thought that more detailed further examination such as manifestation protein activity is required in future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：遺伝子組換え, ウサギ, 肥満, 病態モデル, PPAR

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国においても食生活や生活習慣の欧米化が進み、メタボリックシンドローム

といった病態が国民の健康において非常に重要な問題となってきた。メタボリックシンドロームで最も重要視されているのは内臓脂肪の過剰な蓄積であるが、内臓脂肪の蓄積にはいくつかの関連遺伝子が報告されている。その中でも最も重視されているのが Peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) γ である。PPAR γ は、核内受容体型の転写因子で、主に脂肪細胞で発現している脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであり、脂肪細胞分化の一連の遺伝子カスケードにおいて重要な役割を果たしているのみならず、脂肪細胞肥大化やインスリン抵抗性といった糖代謝異常の出現にも重要な役割を担っている。これまでの遺伝子組換えマウスを用いた検討からは、PPAR γ ヘテロ欠損マウスにおいて高脂肪食飼育下でも肥満やインスリン抵抗性の出現が抑制されることが報告されている。しかし、マウスの脂質代謝系はヒトと大きく異なっており、このような研究においては適切なモデル動物では無いと考えられる。そのため、マウス以外の動物種でのモデルの確立が望まれていた。

そこで、我々は脂質代謝系がヒトに類似し、動脈硬化に感受性を有する動物種であるウサギに着目し、ヒト PPAR γ 遺伝子を導入した新規遺伝子組換えウサギを作製し、このウサギモデルを用いてメタボリックシンドロームにおける PPAR γ の役割を解明する事を計画した。

2. 研究の目的

まず、ヒト PPAR γ 遺伝子を導入したトランスジェニック(Tg)ウサギを作成する。次いで、作出された Tg ウサギモデルを用いて内臓脂肪の蓄積、糖代謝ならびにインスリン感受性に及ぼすヒト PPAR γ の影響について検討を行う。これらの検討から脂肪細胞に特異的に過剰発現させた PPAR γ は脂肪蓄積の増加を引き起こすか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PPAR γ Tg ウサギの作製

過排卵処置を行った雌ウサギから採取した前核期受精卵の前核内にマニピュレーター操作によりヒト PPAR γ cDNA を注入した。注入が完了した受精卵は、hCG 注射により偽妊娠を誘発させた仮親ウサギの卵管内に胚移植した。胚移植後、生まれた仔ウサギの染色体へのヒト PPAR γ 遺伝子導入を PCR 検査で確認した。Tg ウサギ作製に使用したヒト PPAR γ cDNA は、脂肪組織で特

異的に発現させるため、上流に aP2 プロモーターを融合した。

(2) PPAR γ Tg ウサギの遺伝子解析

遺伝子導入が確認されたウサギをファウンダーとし、通常の日本白色種ウサギと交配して F1 Tg ウサギを得た後、F1 ウサギの各組織から抽出した mRNA を用いて Northern blot を行い、ヒト PPAR γ 特異的 mRNA の発現を確認した。また、脂肪組織における PPAR γ の発現量については real-time RT-PCR により解析を行った。

(3) PPAR γ Tg ウサギの表現型解析

F1 および F2 Tg ウサギを用いて表現型解析を行った。すなわち、a) 体重、脂肪重量、血漿脂質、グルコース、インスリンの測定、b) 静脈内糖負荷試験 (IVGTT)、インスリン負荷試験 (IVITT)、c) 脂肪組織の病理学的検査を実施した。

(4) 高脂肪食負荷による肥満誘導実験

PPAR γ Tg ウサギと対照ウサギに 10% 高脂肪食を 16 週間負荷して実験的肥満を惹起し、実験的肥満下における Tg ウサギの表現型について(3)と同様の解析を行った。

4. 研究成果

(1) PPAR γ Tg ウサギの作製

マイクロインジェクション後の生存胚 1,443 個を 48 匹の仮親ウサギの卵管内に移植した。その結果、28 匹の仮親が妊娠し (妊娠率 54.2%)、合計 83 匹の仔ウサギを出産した (移植胚数に対する出産率 8.3%)。PCR による遺伝子解析を行ったところ、4 匹に遺伝子導入が確認された (移植胚数に対する Tg 率、0.3%)。このうち、2 匹が正常に離乳し、P57 および P97 の 2 匹のファウンダーウサギを得ることに成功した。

(2) PPAR γ Tg ウサギの遺伝子解析

得られたファウンダーはいずれも雌であったため、ファウンダーウサギを野生型の雄と交配し、遺伝子解析用ならびに繁殖用の F1 ウサギを得た。P57 系統は、5 回出産させ、合計 18 匹の仔ウサギについて PCR による遺伝子解析を行ったが、いずれも導入遺伝子の伝達が確認できずモザイクであったと判断された。そのため、P57 系統については、繁殖によるコロニー拡大を断念した。いっぽう、P97 系統は、仔ウサギへの導入遺伝子の伝達が確認され、遺伝子組換えウサギの F1 雄ウサギを得ることに成功した。得られた F1 および F2 個体を用いて、導入遺伝子の発現ならびに Tg ウサギの表現型について解析を行

なった。その結果、Tg ウサギの各組織から抽出した mRNA を用い Northern blot で脂肪組織特異的に導入遺伝子の発現を確認した。さらに、脂肪組織を用いた real-time RT-PCR による検討においてもヒト PPAR γ mRNA の発現が確認された。

(3) PPAR γ Tg ウサギの表現型解析

PPAR γ Tg ウサギと同腹の non-Tg ウサギについて体重の推移、血漿脂質値、グルコース値、インスリン値、腹腔内脂肪重量の測定、さらには、静脈内糖負荷試験 (IVGTT)、インスリン負荷試験 (IVITT)を行ない比較検討を行なったが、いずれも PPAR γ Tg ウサギと同腹の non-Tg ウサギとの間に有意な差は認められなかった。さらに、脂肪組織についても病理組織学的観察を行ったが、脂肪細胞の大きさに差は認められなかった。

(4) 高脂肪食負荷による肥満誘導実験

通常食飼育下における PPAR γ Tg ウサギの表現型解析において PPAR γ Tg ウサギと non-Tg ウサギとの間に有意な差は観察されなかったことから、PPAR γ Tg ウサギに 10%高脂肪食を 16 週間負荷し、実験的肥満誘導下におけるヒト PPAR γ 過剰発現の影響についての検討を進めた。実験的肥満誘導後に体重、血漿脂質値、グルコース値、腹腔内脂肪重量、IVGTT ならびに IVITT を実施したが、いずれも PPAR γ Tg ウサギと non-Tg ウサギとの間に有意な差を見いだすことはできなかった。さらに、脂肪組織についても病理組織学的観察を行ったが、脂肪細胞の大きさに差は認められなかった。

以上の検討からは、PPAR γ の過剰発現による表現型の変化を Tg ウサギで観察することができなかった。Tg ウサギにおける導入遺伝子 (ヒト PPAR γ) の発現については、各組織での Northern blot, もしくは、脂肪組織を用いた real-time RT-PCR による検討で、脂肪組織特異的に導入遺伝子が発現していることを確認している。しかし、今後、最終的な結論を得るためには、脂肪組織におけるヒト PPAR γ の発現蛋白量ならびに発現蛋白機能についてより詳細な追加実験の検討が必要であると考えられることから、引き続き検討を進める予定である。

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 10 件)

- 1) Koike, T., Kitajima, S., Yu, Y., Nishijima, K., Zhang, J., Ozaki, Y., Morimoto, M., Watanabe, T., Bhakdi, S., Asada, Y.,

Chen, Y.E., Fan, J.: Human C-reactive protein does not promote atherosclerosis in transgenic rabbits. *Circulation* 120: 2088-2094, 2009.

- 2) Koike, T., Kitajima, S., Yu, Y., Li, Y., Nishijima, K., Liu, E., Sun, H., Ahmed Bilal Waqar, A.B., Shibata, N., Inoue, T., Wang, Y., Zhang, B., Kobayashi, J., Morimoto, M., Saku, K., Watanabe, T., Fan, J.: Expression of human apoAII in transgenic rabbits leads to dyslipidemia: a new model for combined hyperlipidemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29: 2047-2053, 2009.
- 3) Yu, Y., Koike, T., Kitajima, S., Liu, E., Morimoto, M., Shiomi, M., Hatakeyama, K., Asada, Y., Wang, K-Y., Sasaguri, Y., Watanabe, T., and Fan, J.: Temporal and quantitative analysis of expression of metalloproteinase (MMPs) and their endogenous inhibitors in atherosclerotic lesions. *Histol. Histopathol.* 23: 1503-1516, 2008.
- 4) Yamada, S., Wang, K-Y., Tanimoto, A., Fan, J., Shimajiri, S., Kitajima, S., Morimoto, M., Tsutsui, M., Watanabe, T., Yasumoto, K., and Sasaguri, Y.: Matrix metalloproteinase 12 is a factor that accelerates the initiation of atherosclerosis and stimulates the progression of fatty streaks to fibrous plaques in transgenic rabbits. *Am. J. Pathol.* 172: 1419-1429, 2008.
- 5) 北嶋修司, 森本正敏. 凍結精子による遺伝子組換えウサギの系統保存. 関西実験動物研究会会報. 30:16-20, 2008.
- 6) Liu, E., Morimoto, M., Kitajima, S., Yu, Y., Koike, T., Shiiki, H., Nagata, M., Watanabe, T., Fan, J.: Increased expression of vascular endothelial growth factor in kidney leads to progressive impairment of glomerular functions. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18: 2094-2104, 2007.
- 7) Kitajima, S., Jin, Y., Koike, T., Yu, Y., Liu, E., Morimoto, M., Shiomi, M., Marcovina, S., Watanabe, N. and Fan, J.: Lp(a) enhances coronary atherosclerosis in transgenic Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis* 193: 269-276, 2007.

- 8) Zhao, S., Liu, E., Chu, Y., Zheng, H., Kitajima, S., and Morimoto, M.: Numbers of publications related to laboratory animals. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 34: 81-86, 2007.
- 9) Liu, E., Kitajima, S., Wiese, E., Reifenberg, K., Morimoto, M., Watanabe, T. and Fan, J.: Re-establishment of Complement C6-deficient Rabbit Colony by Cryopreserved Sperm Transported from Abroad. *Exp. Anim.* 55(2): 167-171, 2007.
- 10) 北嶋修司, 詫広茂信, 友田清光, 森本正敏: ヒト疾患モデルとしての遺伝子組換えウサギの開発とその系統保存. *九州実験動物雑誌*. 23: 31-45, 2007.
- [学会発表] (計 13 件)
- 1) 漢那宗士, 西島和俊, 常吉梨沙, 森本正敏, 北嶋修司: ウサギの血清分離方法の検討. 第 43 回日本実験動物技術者協会総会 10 月 9-10 日 (2009) 新潟
- 2) Koike, T., Kitajima, S., Yu, Y., Nishijima, K., Zhang, J., Ozaki, Y., Morimoto, M., Watanabe, T., Asada, Y., Chen, E., and Fan, J.: Transgenic rabbits expressing Human C-reactive protein. 第 41 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 7 月 17-18 日 (2009) 下関
- 3) Morimoto, M., Kitajima, S., Nishijima, K., Koike, T. and Fan, J.: Immunoreactivity of neuropeptides in hypothalamus of the transgenic rabbits using immunohistochemical staining. 3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, Jun 4-5, 2009 (Xian, China)
- 4) Szikra, D., Nagy, S., Bernder, B., Hiripi, L., Kitajima, S., Pribenszky, C. and Bösze, Z.: Comparison of two rabbit semen cryopreservation protocol – a pilot study. 3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, Jun 4-5, 2009 (Xian, China)
- 5) Koike, T., Yu, Y., Kitajima, S., Zhang, J., Bhakdi, S., Chen, E.Y. and Fan, J.: Transgenic rabbits expressing human C-reactive protein. 3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, Jun 4-5, 2009 (Xian, China)
- 6) Kitajima, S., Maeda, T., Liu, E., Nishijima, K., Morimoto, M. and Watanabe, T. (Invited speaker): Technology suitable for rabbit semen conservation. 3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, Jun 4-5, 2009 (Xian, China)
- 7) 北嶋修司, 西島和俊, 森本正敏, 渡辺照男, 範江林: ウサギ採卵成績に影響を及ぼす要因の検討: 過去 5 年間の採卵成績の解析. 第 56 回日本実験動物学会総会 5 月 14-16 日 (2009), 埼玉
- 8) Koike, T., Fan, J., Yu, Y., Kitajima, S., Zhang, J., Bhakdi, S., Chen, E.Y.: Transgenic Rabbits Expressing human C-reactive Protein. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Annual Conference 2009, April 29-May 1 (2009), Washington DC, USA
- 9) 山田壮亮, 王 克鏞, 谷本昭英, 範江林, 島尻正平, 北嶋修司, 森本正敏, 渡辺照男, 笹栗靖之: 細胞外基質分解酵素 MMP-12 は、初期動脈硬化巣の形成から進展に重要な促進因子である. 第 3 回フォーラム「医療に貢献する実験用ウサギの新しい展開」7 月 26 日 (2008), 神戸
- 10) 前田達弘, 劉 恩岐, 詫広茂信, 北嶋修司, 森本正敏: 凍結融解後のウサギ精子受精能に及ぼす冷却速度の影響について. 第 25 回九州実験動物研究会 11 月 10 日 (2007), 熊本
- 11) 北嶋修司: 凍結精子による遺伝子組換えウサギの系統保存 (招待講演). 「トランスレーショナルリサーチにおけるウサギの重要性」 第 95 回 関西実験動物研究会 9 月 14 日 (2007), 神戸大学
- 12) 小池智也, 北嶋修司, 森本正敏, 塩見雅志, 渡辺照男, 浅田祐士郎, 畠山金太, 範江林: 動脈硬化病変の C 反応性蛋白 - その由来と病態生理学的重要性. 第 24 回 日本疾患モデル動物学会総会 8 月 31 日-9 月 1 日 (2007), 筑波
- 13) Kitajima, S. (Invited speaker): Rabbit semen conservation. 2nd International Meeting on Rabbit Biotechnology, Jun 14-15, 2007 (Paris, France)

〔図書〕(計2件)

- 1) Kitajima, S.: Improvement of rabbit production. Rabbit Biotechnology: rabbit genomics, transgenesis, cloning and models. Houdebine, L.-M. and Fan, J. (edt). pp 3-12, Springer Heidelberg (Germany), 2009.
- 2) Kitajima, S., Liu, E. and Fan, J.: Rabbit transgenesis. Rabbit Biotechnology: rabbit genomics, transgenesis, cloning and models. Houdebine, L.-M. and Fan, J. (edt). pp 37-48, Springer Heidelberg (Germany), 2009.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.animal.med.saga-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北嶋 修司 (KITAJIMA SHUJI)
佐賀大学・総合分析実験センター・准教授
研究者番号：70284643

(2) 研究分担者

範 江林 (FAN JIANGLIN)
山梨大学・医学工学総合研究部・教授
研究者番号：60272192
西島 和俊 (NISHIJIMA KAZUTOSHI)
佐賀大学・総合分析実験センター・助教
研究者番号：70435874

(3) 連携研究者

範 江林 (FAN JIANGLIN)
山梨大学・医学工学総合研究部・教授
研究者番号：60272192