

平成 23年 6月 8日現在

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591049
 研究課題名 (和文) 高血圧自然発症ラットにおけるインスリン抵抗性遺伝子欠損マウスの解析
 研究課題名 (英文) Analysis of candidate gene deficient mice cause insulin resistance in Spontaneously Hypertensive Rats
 研究代表者 飯塚 陽子 (IIZUKA YOKO)
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：40420244

研究成果の概要 (和文)：

1) KAT-1 欠損マウスの各組織において、KAT-1 の発現が mRNA および蛋白レベルで欠損していることを確認した。KAT-1 欠損マウスは正常に出産・発育し、SHR と同様に、2) 普通食下において、tail-cuff 法および telemetry システム法により有意な血圧と脈拍の上昇を示し、12 週間高塩食下において、血圧の更なる上昇を示し、さらに、3) 高塩食下における 24 時間蓄尿中のカテコラミン分泌の亢進を呈し、4) 普通食下において、空腹時血糖値の有意な上昇とインスリン負荷試験によるインスリン抵抗性の亢進を示し、そして、5) 高脂肪食下における体重・脂肪組織重量の増加率の減少を示した。

研究成果の概要 (英文)：

1) Normal delivery, normal growth, and null expression of mRNA and protein in each organization of KAT-1 knockout mouse have been confirmed. KAT-1 knockout mouse demonstrates 2) significant increase of blood pressure under the normal chow, more increase of blood pressure under 12 weeks high salt diet by tail-cuff and telemetry system, 3) the rise of 24-hour urine catecholamine secretion under high salt diet, 4) significant increase of fast blood glucose, the rise of insulin resistance by insulin tolerance test under normal chow, 5) the decrease of the fat pat weight under high fat diet accompanied with increase in activity level.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常

1. 研究開始当初の背景

(1) 高血圧自然発ラット (SHR) は、高血圧を指標とした選択交配の繰り返しにより確立された本態性高血圧症の最も良いモデル動物であり、また同時に高インスリン血症と耐糖能異常、高中性脂肪血症と低 HDL-コレステロール血症、内臓脂肪蓄積等を呈する、いわゆるインスリン抵抗性症候群やメタボリックシンドロームの良いモデル動物でもある。SHR における高血圧を含むこれらの異常は複数の遺伝因子と環境因子の相互作用によって生ずる複合遺伝形質 (complex trait) と考えられるが、それらの原因遺伝子は必ずしも明らかではない。

(2) SHR におけるインスリン抵抗性原因遺伝子の染色体上での局在は、いわゆる QTL (quantitative trait locus) 解析によって調べられている。われわれは QTL 解析により、SHR の脂肪細胞におけるインスリン抵抗性原因遺伝子座位が、ラットの 3 番、4 番、および 1 2 番染色体に存在することを明らかにしている。

ラット 4 番染色体の QTL 領域に同定した Cd36 遺伝子 (*Cd36*) に関しては、米国 NIH 由来の SHR (SHR/NCrj) において欠失変異を認めるが、日本で樹立・維持されているオリジナルの SHR (SHR/Izm) に変異は認められず、その欠失変異は米国に供与された SHR が NIH で飼育されている間に新たに生じた *de novo* の変異であることを示した。また両 SHR 間での *in vivo* と *in vitro* の phenotype の比較、およびそれらの交配に由来する F2 交配集団の解析により、*Cd36* 変異は SHR におけるインスリン抵抗性の主要な原因ではないことを報告した (Nat Genet. 22: 226-8, 1999.、Curr Atheroscler Rep. 2: 453-4, 2000.、Lancet. 358: 243, 2001.)。

(3) 一方、ラットの 3 番染色体には血圧と体重、脂肪細胞でのインスリン抵抗性と脂肪分解障害に連鎖する QTL が集簇し、その原因候補遺伝子として KAT-1 (kynurenine aminotransferase-1 遺伝子) を同定し、SHR の KAT-1 には SHR に特異的な機能的変異 (E61G) が存在することなどを報告してきた (J Biol Chem. 277: 35779-82, 2002.)。さらに、アデノウイルスベクターと microinjection 法を用いた KAT-1 の過剰発現系の解析では、SHR の延髄吻側腹外側野 (RVLM) 領域での KAT-1 の選択的な過剰発現により、SHR の血圧や脈拍の減少を認め、この傾向はラットの交感神経活動が高まる夜

間により顕著に認められ、24 時間尿中カテコラミン分泌が有意に低下し、insulin tolerance test (ITT) の結果ではインスリン感受性が改善する傾向が認められた。また、KAT-1 を過剰発現させた SHR では、RVLM へのキヌレン酸の投与による血圧低下効果は著しく減弱していた。以上より、KAT-1 の異常が SHR における高血圧や交感神経活動亢進、インスリン抵抗性などの病因の一部を成す可能性が示唆された (現在投稿中)。

2. 研究の目的

本研究では、ジーンターゲット法による KAT-1 ノックアウトマウスの作成とその解析を通じて、KAT-1 のもつ生物学的機能の *in vivo* での解析を試み、高血圧をはじめとする SHR のインスリン抵抗性症候群と KAT-1 の異常との関連性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) KAT-1 ノックアウトマウスの作製

ES 細胞を用いたジーンターゲットの手法に従って行った。SHR において E61G ミセンス変異がマウスのエクソン 2 に存在しているため、翻訳開始点、E61G も含めた領域の欠損を狙ったターゲットベクターの構築を行った。ES 細胞への injection、マウス間での交配実験を通じて KAT-1 欠損マウスを作製し、その表現型の解析を行う。

(2) KAT-1 ノックアウトマウスの表現型解析

① KAT-1 アデノウイルスベクターによる過剰発現系の解析と同様に、*in vivo* の指標 (血圧、脈拍、体重・脂肪量、体温、血糖値、インスリン値、耐糖能、血中脂質値等)、および *in vitro* の指標 (単離脂肪細胞でのインスリン刺激後の糖の取り込み能とカテコラミン刺激後の脂肪酸産生能、および脂肪細胞のサイズなど) への影響を調べ、発現の評価として、Northern blot による mRNA レベル、KAT-1 活性レベル、Western blot による蛋白レベルの確認をする。血圧の評価は tail-cuff 法、および telemetry 法にて行い、交感神経活動の評価として、24 時間蓄尿中のカテコラミン 3 分画を測定し、糖代謝に与える影響についてブドウ糖負荷試験や、insulin tolerance test (ITT) を行う予定である。

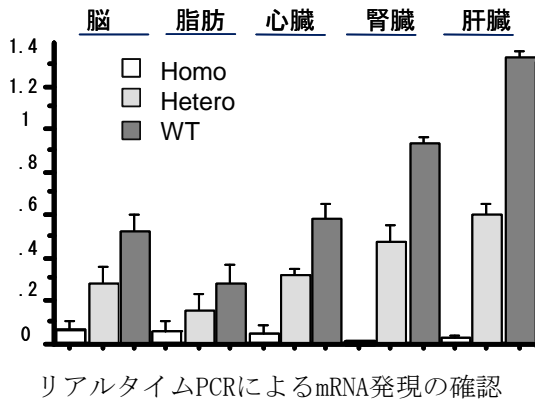
② KAT-1 ノックアウトマウスの各食餌負荷による影響

KAT-1 ノックアウトマウスにそれぞれ高塩食負荷、高脂肪負荷を行い、各食餌負荷による影響について検討する。表現型の解析と同

様の実験を行い、評価する予定である。

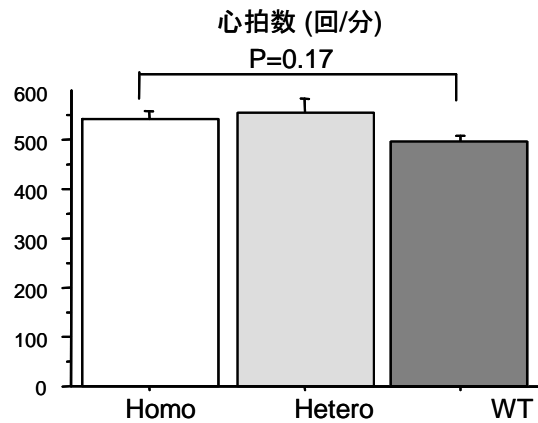
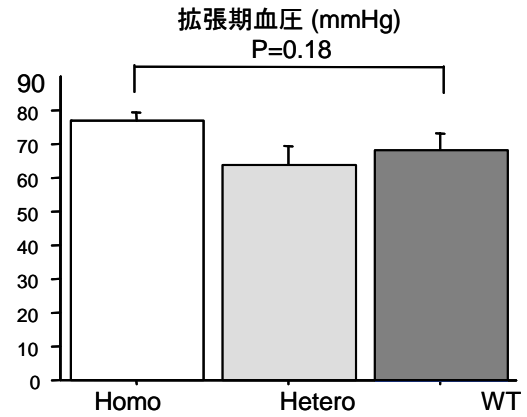
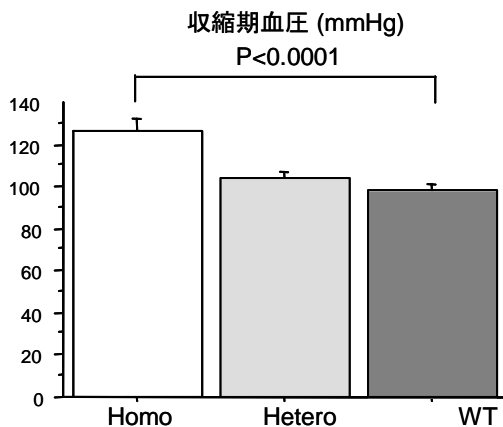
4. 研究成果

(1) KAT-1 欠損ホモマウスの各組織において、KAT-1 の発現が mRNA および蛋白レベルで欠損していることを確認した。KAT-1 遺伝子の欠損程度を評価するために、KAT-1 の発現を調べたところ、northern-blot、リアルタイム PCR 解析による mRNA レベルでも、western-blot 解析による蛋白レベルでも、WT と Hetero マウスに比べ、Homo マウスでの各臓器 KAT-1 の発現が欠失していることを確認した。



(2) 欠損ホモマウスは正常に出産・発育するが、8週齢以降、普通食下において、tail-cuff法および telemetry システム法により有意な血圧と脈拍の上昇を示し、12週間高塩食下および高脂肪食下において、血圧の更なる上昇を示し、この傾向はマウスの交感神経活動が高まる夜間により顕著に認められた。

KAT-1 欠損マウスにおいて、最も顕著な表現型は血圧が上昇することである。tail-cuff法による普通食における KAT-1 欠損マウスは WT マウスに比べ、収縮期血圧が有意に上昇し、拡張期血圧と心拍数も上昇傾向が認められた。

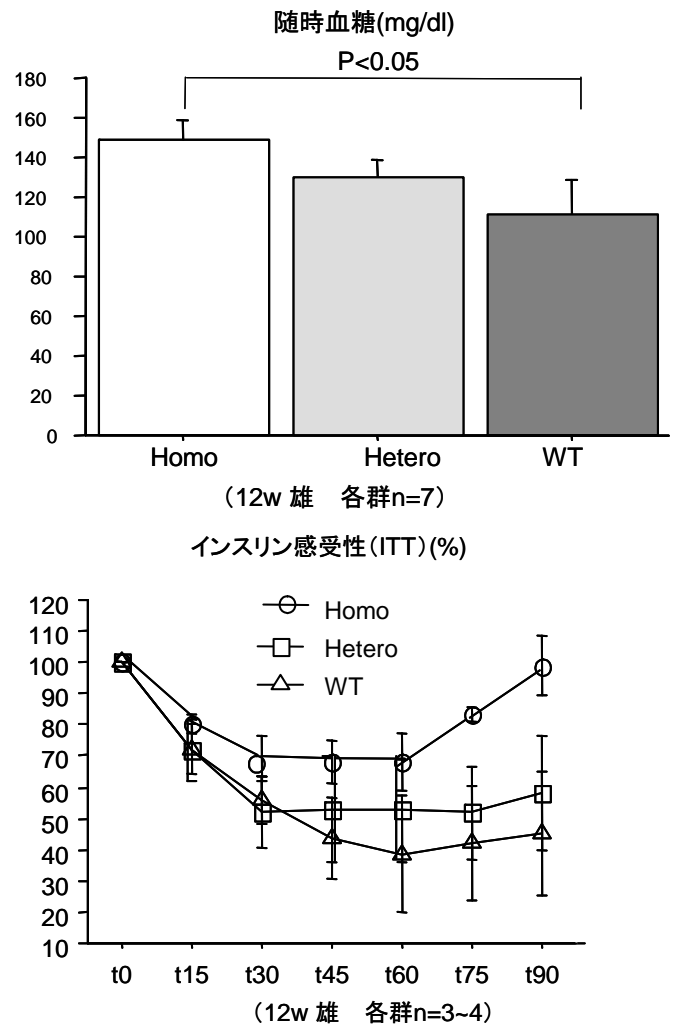
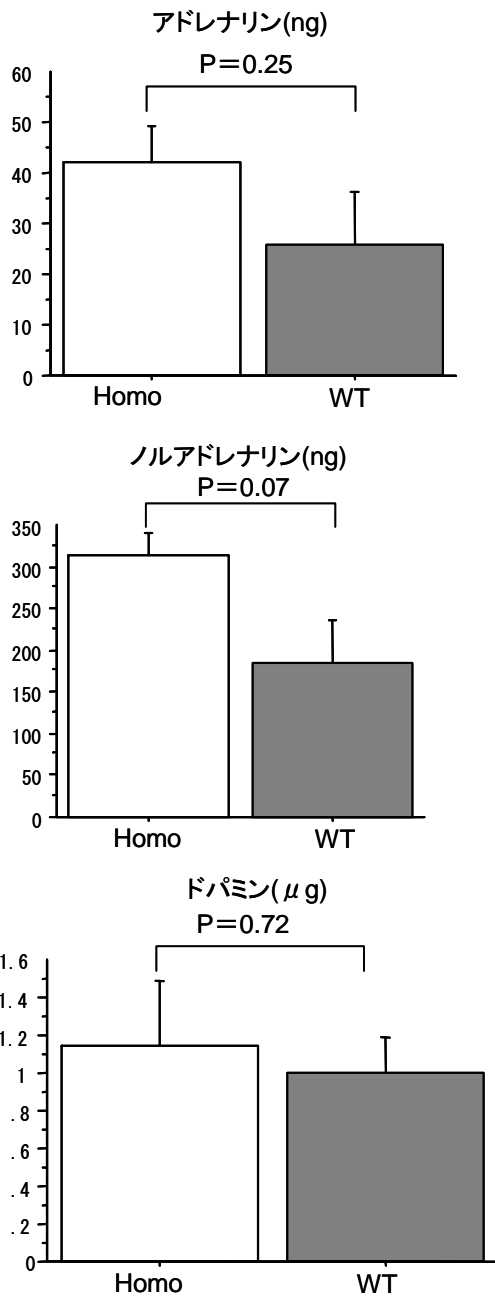


8週齢の雄のマウスを用い、12週間高塩食下で tail-cuff 法にて血圧、心拍数を評価した結果、高塩食負荷により、3群のマウスの血圧がすべて上昇したが、Homo マウスの血圧は、より高くなっていることが分かった。telemetry システム法による血圧、心拍数も評価してみたところ、WT マウスに比べ、Homo マウスは収縮期平均血圧が約 20mmHg 高く、拡張期平均血圧が約 15mmHg 高く、平均心拍数が約 100bpm 高いことが見られた。高塩食下で WT マウスに比べ、Homo マウスは収縮期平均血圧が約 30 mmHg 高いことを確認した。

12週間高脂肪食負荷し、tail-cuff法にて血圧、心拍数を評価したところ、高脂肪食負荷により、3群とも血圧が上昇したが、Homo マウスの収縮期血圧、拡張期血圧が共により上昇したことが見られた。

(3) 高塩食下における 24 時間蓄尿中のカテコラミン分泌の亢進を呈した。

12週間高塩食下において、24時間尿中カテコラミンは、WT マウスに比べ、Homo マウスの尿中アドレナリン、ノルアドレナリン、ドパミンは高い傾向が見られ、KAT-1 欠損マウスの交感神経が亢進していることが示唆された。

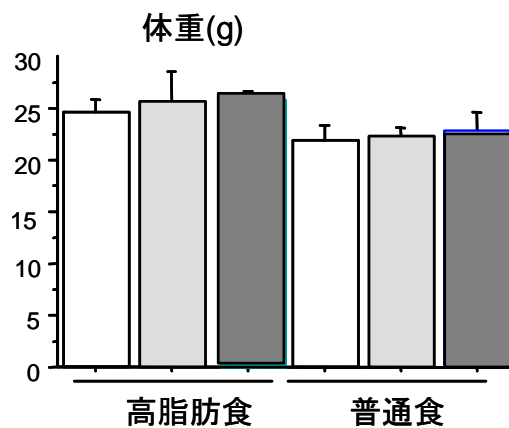


(4) 普通食下において、空腹時血糖値の有意な上昇とインスリン負荷試験によるインスリン抵抗性の亢進を示し、高脂肪食下における空腹時血糖値の更なる上昇を示した。

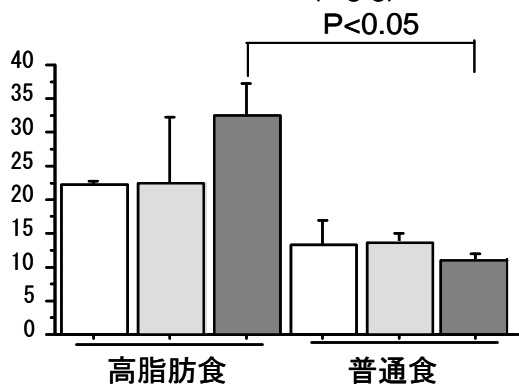
12 週齢の雄のマウスを用い、普通食下で Homo マウスは WT マウスに比べ、有意な血糖値の増加が認められた。一方、インスリン感受性に関しては、いずれの時点でも血糖値の増加が認められた。KAT-1 欠損マウスでは血糖値が高く、インスリン抵抗性が亢進している可能性が示唆された。

(5) 高脂肪食下における体重・脂肪組織重量の増加率が減少した。

高脂肪食負荷による体重と組織重量の比較では、高脂肪食下により、3 群とも体重は増加し、脂肪組織重量も増加したが、Homo マウスでの体重、脂肪組織重量は低下傾向が認められ、高脂肪食負荷において、KAT-1 欠損マウスは肥満の発症を抑制的に働く可能性が示唆された。



体重で補正した辜丸
周囲脂肪組織重量(mg/g)



【結論】マウスにおいて KAT-1 の欠損が血圧の上昇や交感神経活動の亢進、およびインスリン抵抗性の亢進と糖代謝異常を引き起こすことが示された。

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 9 件)

- ① Takeuchi Y, Yahagi N, Iizuka Y, et al, Polyunsaturated fatty acids selectively suppress sterol regulatory element-binding protein-1 through proteolytic processing and autoloop regulatory circuit. J Biol Chem 査読有、285:11681-91, 2010.
- ② Sekiya M, Yahagi N, Iizuka Y, et al, Hormone-sensitive lipase deficiency suppresses insulin secretion from pancreatic islets of Lep(ob) (/) (ob) mice. Biochem Biophys Res Commun 査読有 387:511-5, 2009.
- ③ Sekiya M, Yahagi N, et al, Ablation of neutral cholesterol ester hydrolase 1 accelerates atherosclerosis. Cell Metab 査読有、10:219-28, 2009.
- ④ Sekiya M, Yahagi N, Iizuka Y, et al, Hormone-sensitive lipase is involved in hepatic cholesterol ester hydrolysis. J Lipid Res 査読有 49:1829-38, 2008.
- ⑤ Ishikawa M, Yahagi N, et al, Overexpression of nuclear SREBP-2 in pancreatic beta -cells results in cholesterol accumulation leading to insulin secretion defects and diabetes: A new model for beta -cell lipotoxicity. J Lipid Res 査読有

49:2524-34, 2008.

- ⑥ Okazaki H, Yahagi N, et al, Identification of neutral cholesterol ester hydrolase, a key enzyme removing cholesterol from macrophages . J Biol Chem 査読有 283:33357-64, 2008.
- ⑦ Kato T, Yahagi N, et al, Palmitate impairs and eicosapentaenoate restores insulin secretion through regulation of SREBP-1c in pancreatic islets. Diabetes 査読有 57:2382-92, 2008.
- ⑧ Inoue N, Yahagi N, et al, Cyclin-dependent kinase inhibitor, p21WAF1/CIP1, is involved in adipocyte differentiation and hypertrophy, linking to obesity and insulin resistance. J Biol Chem 査読有 283:21220-9, 2008.
- ⑨ Kumadaki S, Yahagi N, et al, Mouse Elovl-6 promoter is an SREBP target. Biochem Biophys Res Commun 査読有 368:261-6, 2008.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Iizuka Y, Yahagi N, et al, Establishment of kynurenine aminotransferase 1 (KAT-1) knockout mice as an animal model of spontaneous hypertension and insulin resistance observed in the spontaneously hypertensive rats, 日本動脈硬化学会、2010年7月15日、岐阜
- ② 飯塚陽子、矢作直也、他、SHRの高血圧とインスリン抵抗性原因遺伝子kynurenine aminotransferase 1 (KAT-1) 欠損マウスの作製と解析、日本糖尿病学会、2010年5月29日、岡山
- ③ 飯塚陽子、矢作直也、他、kynurenine aminotransferase 1 (KAT-1) のRNAiノックダウンによる解析、日本糖尿病学会、2009年5月23日、大阪
- ④ Iizuka Y, Yahagi N, et al, A search for genes underlying visceral fat accumulation in spontaneously hypertensive rat (SHR), 日本動脈硬化学会、2008年7月11日、筑波
- ⑤ 飯塚陽子、矢作直也、他、高血圧自然発症ラット (SHR) における内臓脂肪蓄積関連遺伝子の同定、日本糖尿病学会、2008年5月22日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯塚 陽子 (IIZUKA YOKO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40420244

(2) 研究分担者

矢作 直也 (YAHAGI NAOYA)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
准教授
研究者番号：60420246

(3) 連携研究者 なし