

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：	17601
研究種目：	挑戦的萌芽研究
研究期間：	2011～2012
課題番号：	23650237
研究課題名（和文）	新規に確立した遺伝的内臓脂肪蓄積型肥満マウスの特徴と原因遺伝子の解明
研究課題名（英文）	Analyzing the mechanism of obesity in novel genetic obese C57Black mouse
研究代表者	
	中原 桂子 (NAKAHARA KEIKO)
	宮崎大学・農学部・准教授
	研究者番号：90315359

研究成果の概要（和文）：我々は先の遺伝的内臓脂肪蓄積型の肥満マウス ICR-Daruma マウスから同様の C57Black マウスを作成した。このマウスの特徴を調べた結果、ICR のダルママウスとほぼ同様な形質の肥満が認められ、4 週齢で内臓脂肪の蓄積が始まり、早期にレプチンとインスリン抵抗性を示した。ペアフェドを行うと肥満は抑制され、ペアフェドの解除によりすぐに肥満に移行した。4 週齢ではレプチン投与による視床下部の Stat3 リン酸化が認められたが 6 週齢では認められなかった。またインスリン投与では血糖の低下が雌に比べて雄で認められなかった。さらに遺伝子解析では ICR-Daruma と同様にレプチン受容体に 2 つの点変異が認められた。

研究成果の概要（英文）：We established a C57Black mouse demonstrating spontaneous obesity, and named it “C57Black-Daruma”. In the C57 Black -Daruma mouse, the leptin receptor gene sequence carried two base mutations, which are good candidates for the variation(s) responsible for the obese phenotype. As well as ICR-Daruma, C57 Black -Daruma mice developed characteristic visceral fat accumulation at 4 weeks of age, and the white adipose and liver tissues exhibited increases in cell size and lipid droplets, respectively. Moreover, the onset of impaired leptin signaling was early and manifested as hyperleptinemia and hyperinsulinemia. Pair-feeding completely inhibited obesity, although these mice rapidly developed hyperphagia and obesity followed by hyperleptinemia when pair-feeding ceased and free-access feeding was permitted.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：疾患モデル

1. 研究開始当初の背景

近年、人のみならず伴侶動物においても肥満は深刻な問題となっており、肥満とメタボリックシンドロームの研究は著しく増加している。そのモデル動物には遺伝的肥満マウスあるいは食事（60%高脂肪食）誘導性肥満マウス（DIO マウス）が用いられ、両者の使用数は年間 10 万匹を超えていると言われていいる。単一遺伝子変異による肥満マウスでは

現在 4 種の肥満マウス (ob, db, fat, tabby) が世界で使用されており、それぞれが長所と短所を有しており、人や伴侶動物の肥満にすべて適合するとは限らない。特に現代のメタボリックシンドロームは過食からレプチン抵抗性を獲得して行くケースが多く、先の 4 種の遺伝的肥満マウスには必ずしも当てはまらない。我々が以前に ICR マウスで発見し確立した遺伝的肥満マウスの Daruma マウスは、

離乳時の過食から始まり、次にレプチン抵抗性を獲得することや、食事制限で肥満が防止できる点などでこれまでのものと異なり、現代の肥満やメタボリックシンドロームの研究の好個なモデルになると推測される。一方で、ICR マウスは近交系ではないため変異の確率が高いため、普遍性のあるデータを得るには一般的な C57Black や C57Black/6J などの近交系マウスへ表現系を転換する必要がある。今回、ICR-Daruma マウスの肥満形質を C57Black/6J マウスに形質転換し、新たな C57Black-Daruma マウスを作成したので、この C57Black-Daruma マウスの特徴を調べる。

2. 研究の目的

今回確立した遺伝的肥満マウス C57Black/6J-Daruma を用いて、まず、肥満の特徴を形態学的、生理学的、生化学的あるいは分子生物学的に解析する。生後いつから過食、肥満、高血糖、高脂肪血症などが起こるのか、視床下部や褐色脂肪あるいは白色脂肪の肥満関連遺伝子発現はどのようになっているのか、自律神経系、循環器系および運動系機能はいつ、どのように変化するのか、レプチン抵抗性やインスリン抵抗性はいつ、どのように獲得されるのか、などを明らかにする。次に、レプチンシグナリングの異常か否かを、視床下部の Stat3 のリン酸化で検討する。また、サテライトマーカによる変異遺伝子の絞り込みと、シークエンサー（次世代）による変異部の全遺伝子塩基配列の同定を行い、一義的肥満原因遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

今回確立した遺伝的肥満マウス C57Black/6J-Daruma の肥満の表現系の特徴を明らかにし、また肥満の原因遺伝子を同定する。肥満の表現系については、離乳後から毎日 15 週齢まで、体重、摂食量、行動量、酸素消費量、呼吸商を計測する。また血液の生化学性状として、血糖値、血中 TG、GOT、GPT、コレステロール、HDL、LDL、インスリンおよびレプチン濃度を離乳後毎週 1 回測定する。耐糖試験は糖を負荷した後の血糖値の推移とインスリンの推移を持って検討する。肥満の発症メカニズムの解析として、離乳時から 2 週間間隔で視床下部、肝臓、白色脂肪および褐色脂肪の肥満関連遺伝子 mRNA の発現量をマイクロアレイとリアルタイム PCR で解析する。肥満原因遺伝子は、サテライトマーカによる絞り込みでホモ、ヘテロ、ワイルドに分かれる染色体部位を検索し、次世代シークエンサーで絞り込んだ部位の塩基配列すべてを決定し、変異部位を探索する。

次に、制限給餌期間および自由摂食に戻した時の各種パラメーターの推移を調べるため、給餌量を制限すれば肥満は起こらず、自

由摂食に戻すと急速に過食と肥満が発症するかどうかを C57Black/6J-Daruma マウスで検討する。離乳後にヘテロマウスの 1 日の摂食量と同量の餌を 3 週間給餌し、体重の推移から肥満が発症するか否かを調べる。また、制限給餌 1, 2, 3 週目で屠殺し、視床下部の摂食関連遺伝子 (NPY, Agrp, Hypocretin, POMC) の遺伝子発現量、血中のグレリン、糖、レプチン値を調べ、空腹感や満腹感の状況を推測する。さらに自由摂食に戻して 2, 5, 9 日後に屠殺し、先と同様なパラメーターを調べ、急速に肥満に移行する原因を解明する。

さらに、糖尿病の解析として、8-20 週齢の C57Black/6J-Daruma およびコントロールマウスにブドウ糖 (1.5g/kg/mouse) あるいはインスリンを腹腔内に投与し、30 分間隔で尾部より血液を採取し、血糖値とインスリン濃度を測定する (耐糖試験)。また雌雄の差が認められた場合には、去勢あるいはステロイドの慢性投与 (サイラスティックチューブの皮下への埋没による) による効果を調べ、雌雄差が性ホルモンによるのか否かを検討する。

4. 研究成果

(ア) サテライトマーカによる変異遺伝子の絞り込みと変異遺伝子の同定:

Daruma マウスの C57Black/6J-Daruma の 10 世代のマウスを使用し、ICR で使用したサテライトマーカと同様の方法で、変異遺伝子の絞り込みを行った。その結果、サテライトマーカでの絞り込みで変異部がレプチン受容体をコードする領域を含むものであることが確認された。そこで、レプチン受容体の全遺伝子を検索したところ、2カ所に点突然変異が認められた。一つはエクソン 8 の 1627 番目の塩基アデニンがグアニンに変異しており、もう一つはエクソン 15 の 2810 番目のチミンがシトシンに変異していた。このことから、ICR Daruma と同じ変異が C57Black/6J-Daruma に受け継がれていると推測された。

(イ) 3 週齢の Daruma マウスとコントロールマウスの肥満関連遺伝子 mRNA 発現の比較:

3 週齢の C57Black-Daruma マウスのマイクロアレイ解析による肥満関連遺伝子の mRNA とコントロールマウスのものを比較し、その発現量に相対的な差を認めたものを洗い出した。視床下部では摂食促進作用を持つ Galanin や NPY の mRNA の発現が増加していた。また、serotonin receptor 2C の mRNA の発現が減少していた。褐色脂肪では 9 週齢でみられたものよりも顕著な UCP-1 mRNA 発現の増加と 9 週齢でもみられた、Adiponectin

receptor 1、Adiponectin, C1Q and collagen domain containing、Complement component 3、加えて Leptin mRNA の発現の減少がみられた。白色脂肪では Leptin mRNA の発現の増加と Adiponectin receptor 2、Adiponectin receptor 1、Adiponectin、C1Q and collagen domain containing、Complement component 3、Peroxisome proliferator activated receptor gamma、Protein tyrosine phosphatase、non-receptor type 1、Sortilin 1、UCP-1 mRNA の発現の減少がみられた。膵臓では Glucagon、Islet amyloid polypeptide mRNA 発現の増加と Adiponectin receptor 2、Complement component 3、Cholecystokinin A receptor、Colipase、pancreatic、CPE、Galanin、Insulin I、Insulin II mRNA 発現の減少がみられた。肝臓では Adiponectin とその受容体の変化を除くと 9 週齢との差は小さく、Apolipoprotein A-IV、Opioid receptor、sigma 1 mRNA 発現の増加と Adiponectin receptor 2、Glucagon receptor mRNA 発現の減少がみられた。

(ウ) 3 週齢の Daruma マウスとコントロールマウスの視床下部および褐色脂肪における特徴的遺伝子 mRNA の定量的比較： マイクロアレイの結果を 1 次スクリーニングとし、その結果から相対的な差があり、また重要と思われる視床下部の NPY、Agrp、POMC、Hcrt、Sst、CPE と褐色脂肪の UCP-1、Adr3、Adipo について、3 週齢のマウスで Real Time-PCR を行った。その結果コントロールと比較して Daruma マウスで、視床下部の NPY、Agrp、POMC が有意に増加、褐色脂肪の UCP-1 で増加傾向が見られ、褐色脂肪の Adr3 で有意に減少していた。

(エ) 2 週齢以降の C57Black-Daruma マウスの体重：

C57Black-Daruma マウスの体重はコントロールマウスの体重と比較して 2 7 日齢以降で有意な増加がみられた。この結果は ICR-Daruma の 3 週齢から Daruma マウスはコントロールマウスと比較して有意に体重が増加していた、という結果に反した。しかし、C57Black-Daruma の測定では Daruma マウスの中に 1 2 日齢から特に体重が軽く、体重増加が遅かったものが 2 例あり、その成長の遅かった 2 例を除くと、体重は 1 9 日齢から有意に増加していた。

(オ) 2 週齢以降の Daruma マウスの血漿レプチン濃度：

2 週齢の時点で C57Black-Daruma マウスの血漿レプチン濃度はコントロールマウスの血漿レプチン濃度と比較して有意に増加しており、その増加は以降も 6 週齢まで持続していた。また、コントロールマウスの血漿レプチン濃度が 2 週齢をピークに、その後減少して行くのに対し、C57Black-Daruma マウスの血漿レプチン濃度は 2 週齢から 3 週齢に

かけては減少したが、その後成長と共に増加した。

(カ) 2 週齢の C57Black-Daruma マウスの諸臓器レプチン濃度：

2 週齢の C57Black-Daruma マウスとコントロールマウスの白色脂肪、褐色脂肪、大脳、心臓、筋肉、肺、肝臓、膵臓、脾臓、胃、小腸、腎臓、副腎、精巣について総タンパク量あたりのレプチン濃度の測定を行ったところ、C57Black-Daruma マウスはコントロールマウスと比較して、白色脂肪、肺、腎臓で有意に高い値を示した。

(キ) 制限給餌による C57Black-Daruma マウスの摂食量への影響：

3 週齢からペアフェドを行った結果、摂食制限時にはペアフェド Daruma マウスの摂食量は完全に自由摂食通常マウスの摂食量と一致し、自由摂食 Daruma マウスの摂食量を大きく下回った。摂食制限を解除しペアフェド Daruma マウスを自由摂食に戻すと、ペアフェド Daruma マウスの摂食量は一過性に自由摂食 Daruma マウスの摂食量をも超えるピークを示し、その後自由摂食 Daruma マウスに同調した。また、3 週齢の時点から既に、自由摂食 Daruma マウスの摂食量は自由摂食通常マウスと比較して有意に増加していた。4 週齢からペアフェドを行うと、ペアフェド Daruma マウスの摂食量は自由摂食通常マウスの摂食量と一致した。摂食制限を 4 週間または 7 週間行った群はどちらの摂食量も、自由摂食に戻すと一過性に自由摂食 Daruma マウスの摂食量をも超える摂食量のピークを示し、その後自由摂食 Daruma マウスに同調した。この結果は 3 週齢から摂食制限を行った場合と一致する。

(ク) 制限給餌による C57Black-Daruma マウスの体重への影響：

3 週齢からペアフェドを行った結果、摂食制限時にはペアフェド Daruma マウスの体重は自由摂食通常マウスの体重にほぼ同調し、自由摂食 Daruma マウスの体重を大きく下回った。摂食制限を解除し自由摂食に戻すとペアフェド Daruma マウスの体重は徐々に増加し、1 週間後には自由摂食 Daruma マウスにほぼ同調していた。また、3 週齢の時点から既に、自由摂食 Daruma マウスの体重は自由摂食通常マウスと比較して有意に増加していた。4 週齢からペアフェドを行うと、すでに自由摂食通常マウスに比べて増加していたペアフェド Daruma マウスの体重は、摂食制限を行っても自由摂食通常マウス程度まで減少することはなかった。ペアフェド Daruma マウスの体重の増加率は制限給餌を始めて 4 週間は自由摂食通常マウスと同程度で、成長曲線は平行しているが、6~7 週間目には体重の差は増加していた。4 週間摂食制限されたマウスと 7 週間摂食制限されたマウスは、自

由摂食に戻すと両群とも自由摂食 Daruma マウス程度まで体重が増加し、毎日常体重を観察した結果、7週間摂食制限されたマウスの体重は5～6日で自由摂食 Daruma マウス程度まで増加していた。

(ケ) 制限給餌による C57Black Daruma マウスの血中の肥満関連因子への影響

血漿レプチン濃度は摂食制限時にはCマウスよりもペアフェド Daruma マウスでやや高い値を示し、自由摂食 Daruma マウスではより高い値を示した。摂食制限を解除して3日後には血漿レプチン濃度はいずれのマウスでも摂食制限時から変化していなかったが、摂食制限を解除して2週間後にはペアフェド Daruma マウスの血漿レプチン濃度は自由摂食 Daruma マウスの血漿レプチン濃度と同程度にまで上昇していた。

血漿グレリン濃度は摂食制限時にはCマウスで自由摂食 Daruma マウスよりも高い値を示し、ペアフェド Daruma マウスはさらにそれを上回る値を示した。摂食制限を解除して3日後にはペアフェド Daruma マウスの血漿グレリン濃度は自由摂食 Daruma マウスの血漿グレリン濃度と同程度まで減少しており、摂食制限を解除して2週間後も減少したままであった。

血糖値は摂食制限時にはペアフェド Daruma マウスとCマウスで同程度の値を示し、自由摂食 Daruma マウスではC、ペアフェド Daruma マウスと比較して顕著に高い値を示した。ペアフェド Daruma マウスの血糖値は摂食制限解除後3日後から微弱な上昇はみられたが2週間後にも自由摂食 Daruma マウスの血糖値に追いつかなかった。

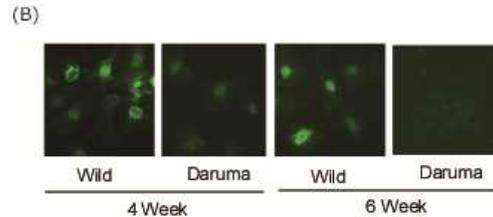
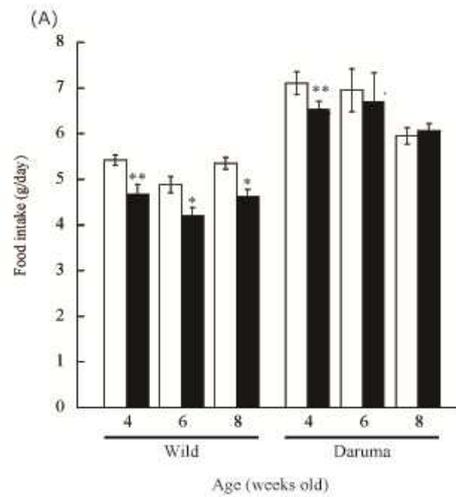
(コ) C57Black Daruma のレプチン抵抗性：

末梢レプチン投与の摂食への影響を4週齢、6週齢および8週齢のC57Black Daruma とwildマウスで比較したところ、wildマウスではいずれの週齢でもレプチンによる摂食減少が認められたが、C57Black Daruma マウスでは、4週齢のみ有意な減少が認められたが、6、8週齢では摂食の低下は認められなかった(右図A)。

次に4、6、8週齢のwildマウスとC57Black Daruma の視床下部を採取し、細胞に遊離して培養し、その培養液にレプチンを添加し、作用させた。90分後にStat3リン酸化の抗体を用いて免疫染色した結果、wildマウスではいずれの週齢のマウスの視床下部細胞で蛍光発色を認めたが、C57Black Daruma マウスでは4週齢の視床下部細胞のみ発色を認め、他の週齢では認めなかった(図B)。

(サ) C57Black Daruma のインスリン抵抗性：

8週齢の雌雄C57Black Daruma と雌雄wildマウスでインスリン投与後の血糖値を比較したところ、wildマウスでは雌雄差が無く、い



ずれも投与15分から血糖の有意な低下が認められた。一方、雌C57Black Darumaではwildマウスと同様な低下が認められたが、その低下はwildマウスよりも少なかった。一方で、雄C57Black Darumaではインスリン投与後の血糖低下は極めて小さく、明らかにインスリン抵抗性が推測された。

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)

K Nakahara, M Bannai, K Maruyama, Y Suzuki, R Okame, N Murakami: Characterization of a novel genetically obese mouse model demonstrating early-onset hyperphagia and hyperleptinemia. *Am. J. Physiology. Endocrinol. Metab.* in press 査読有り

K Nakahara, S Takata, M Ishii, K Nagao, M Bannai, M Takahashi, N Murakami: Hypothalamic gene expression involved in anorexia in rodents fed valine-deficient diet. *Amino Acids.* 42:1397-1404,2012 査読有り

M Bannai, N Kawai, K Ono, K Nakahara, N Murakami:

The effects of glycine on subjective daytime performance in partially sleep-restricted healthy volunteers *Front Neurol.* 3:61. 1-8, 2012

Y. Inoue, K. Nakahara, K. Maruyama, Y. Suzuki, Y. Hayashi, K. Kangawa, N. Murakami: Central and peripheral des-acyl ghrelin regulates body temperature in rats *Biochemical and Biophysical Research Communications* 430:278-283, 2012

T Sakamoto, K. Nakahara, K. Maruyama, T. Katayama, K. Mori, M. Miyazato, K. Kangawa, N. Murakami: Neuromedin S regulates cardiovascular function through the sympathetic

nervous system in mice. Peptides 32:1020-1026,
2011 査読有り

〔学会発表〕(計 件)

該当なし

〔図書〕(計 件)

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

なし

○取得状況(計 件)

名称: Mouse developing visceral fat type obesity
and diabetes

発明者: 村上昇、中原桂子

権利者: 同上

種類: 特許

番号: **US 7,847,147B2**

取得年月日: 2010年12月7日

〔その他〕

ホームページ等

http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~vet/vet_phy/index.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中原 桂子 (NAKAHARA KEIKO)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号: 90315359