

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 29 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 挑戦的萌芽研究
 研究期間： 2011～2012
 課題番号： 23659136
 研究課題名（和文） 新規肥満治療ターゲットの発見とオミックス機構の解明
 研究課題名（英文） Identification of novel drug targets with Omics-based mechanisms for obesity treatment
 研究代表者
 田中 利男（TANAKA TOSHIO）
 三重大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号： 00135443

研究成果の概要（和文）：食餌性肥満モデルゼブラフィッシュを用いて、過食時・食事療法時の DNA マイクロアレイ実験およびネットワーク解析を行い、新規肥満治療遺伝子候補を抽出した。これらの遺伝子に対してモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた発現抑制実験を行い、MXD3 遺伝子を含む新規肥満治療ターゲットを発見し、そのオミックス機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We found new candidate genes for obesity treatment using DNA microarray experiments and pathway analyses with zebrafish model of diet-induced obesity. Gene knockdown studies of these candidates using morpholino antisense oligonucleotides revealed that several genes including *mxd3* could ameliorated the disease phenotypes in model animals. In addition, we clarify the mechanism of these therapeutic effects by Omics research approach.

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：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：創薬・ゲノム薬理学

1. 研究開始当初の背景

①我国におけるメタボリックシンドロームとその予備群は約 1900 万人と推定されている。今後このメタボリックシンドロームから動脈硬化性疾患の爆発的増加が予想され緊急性の高い社会問題となっている。メタボリックシンドロームの基本にある肥満の要因として過食が重要視されており、食欲のメカニズム解明を基盤とした新しい薬物療法は国際的にも強く期待されており、いくつかの食欲抑制薬は臨床的にも使用されるようになりつつある。一方、現在の食欲抑制薬にはいくつかの欠点もあり、新しい分子メカニズムによる食欲抑制薬の開発が待たれている。②そこで、我々は新しい食欲抑制機構に

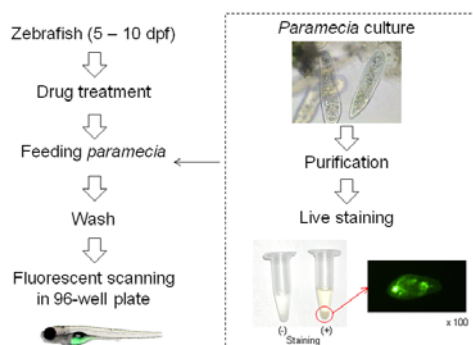
よる抗肥満薬を発見するため不可欠な *in vivo* ハイスループットスクリーニングシステムを世界に先駆けて構築（特願 2007-66971）したので本研究において、新しい抗肥満薬のオミックス機構研究システムを確立する。③摂食は、複雑な中枢性及び末梢性制御機構が存在し、数多くの摂食調節因子が存在するため、*in vivo* での統合的解析が必須である。一方、摂食制御を標的とする新しい薬物と遺伝子を探索するためには、ハイスループットスクリーニングシステムが不可欠である。しかしながら、摂食制御に作用する抗肥満薬スクリーニングは、従来より世界的には哺乳類を中心に行われ、探索スピードの遅さや開発コスト高により、新しい分子

機構の抗肥満薬創成が、極めて困難な状況にある。この課題を克服するために我々は (1) 哺乳類 (ラット、マウス) に次ぐ新しいモデル動物としてゼブラフィッシュを導入し、(2) ヒト肥満の内臓脂肪における遺伝子発現が酷似している肥満モデルを確立し (BMC Physiology 2010,10,21) (3) 精度の高いハイスループットの摂食定量システム (特願 2007-66971) を構築した。さらに現在世界で抗肥満薬として使用されている医薬品 (食欲抑制薬) がすべて用量依存性に作用することを明らかにした。これらの成果により、ケミカルスクリーニングにおけるハイスループットは既に確立しており、このシステムを基盤にして作用機構解析のハイスループット化が実現することになる。このことはゲノムワイドな包括的解析を初めて脊椎動物モデルにおいて可能にすることにより新しい摂食関連遺伝子や抗肥満遺伝子 (特開 2011-055755MXD3 遺伝子の発現阻害による肥満の抑制) 及び抗肥満薬の探索的研究における革命的システムとなる。

2. 研究の目的

本研究は世界に先駆けて創成したヒト臨床オミックスが類似した食餌性肥満モデル (BMC Physiology 2010,10,21) を活用して臨床抗肥満薬のオミックス機構を解明し、すでに見出している候補遺伝子の中から新規肥満治療遺伝子 (特願 2009-208272 MXD3 遺伝子の発現阻害による肥満の抑制) を確立する。すなわち、独自の食餌性肥満モデル内臓脂肪における遺伝子発現変動はヒト肥満内臓脂肪と類似性が著しく高いことを明らかにしており (BMC Physiology 2010,10,21)、これら発現変動遺伝子の 1 つである新規肥満遺伝子 MXD3 をノックダウンすると、BMI、血漿トリグリセライド、内臓脂肪等を抑制することを見出しており、こ

図1. 蛍光パラメシアを用いた摂食量定量方法



れらの中から新規肥満治療ターゲットとしての機能を確立し、そのオミックス機構を解明する。

3. 研究の方法

1) 摂食量測定技術

透明系統ゼブラフィッシュ (MieKomachi 系統) に対し、蛍光色素でラベルした paramecia を給餌することにより、摂食量を定量的に測定する技術を開発した (図 1)。蛍光色素 4-Di-10-ASP で染色した paramecia を精製し、受精後 6-10 日目のゼブラフィッシュに給餌、一定時間後の消化管内の蛍光量を、96 ウェルプレートリーダー (Wallac Arvo, PerkinElmer 社) で測定することにより摂食量を定量化した (成果論文 2)。

2) 食餌性肥満ゼブラフィッシュの構築

受精後 3-4 か月齢の AB 系統および rose mutant 系統のゼブラフィッシュを使用した。1.7L の小型水槽に 5 匹の魚を入れ、培養したアルテミア幼生を 1 日 3 回過剰給餌した。1 ヶ月の過剰給餌により、食餌性肥満ゼブラフィッシュを構築した。身長体重は毎週 1 回測定した (成果論文 1 参照)。

3) DNA マイクロアレイによる内臓脂肪の網羅的遺伝子発現解析

回収した内臓脂肪組織から total RNA を抽出・精製し、DNA マイクロアレイ実験を行った。Total RNA は Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (Agilent Technologies 社) を用いて Cy3 ラベルし、Agilent Zebrafish Whole Genome Oligo Microarrays (G2518A) にハイブリダイゼーションした。その後 Agilent G2565BA Scanner を用いて各スポットの蛍光イメージを取得し、Feature Extraction software (Agilent Technologies 社) を用いて数値化した。NIC を投与した群と control を比較したとき、One-way ANOVA で $P < 0.01$ のスポットを有意な発現変動を認めたものとした。

4) in silico におけるネットワーク解析

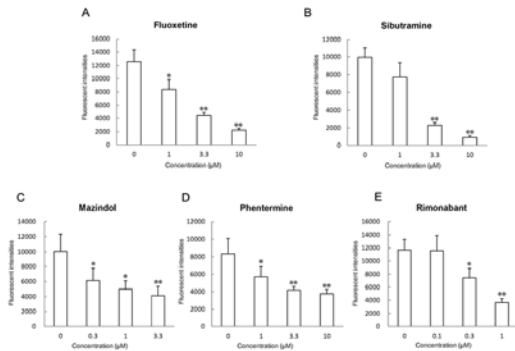
発現変化が確認できた遺伝子群について、個々の遺伝子産物の機能の詳細を文献で調べていくのは膨大な時間がかかり、現実的とはいえない。自動 blast 法 (Batch blast) により一括してゼブラフィッシュ遺伝子をヒト先祖遺伝子 (オルソログ) に変換し、文献マイニングをベースとしたネットワーク解析ソフトウェアによる解析を行った。このネットワーク解析は Pathway Studio (World Fusion 社) を使用した。

5) モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた目的遺伝子の発現抑制

各遺伝子に対する特異的モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドは Gene Tool 社に合成依頼した。過剰給餌期間のゼブラフィッシュの腹腔内に Lipofectamine2000 (Life

Technologies 社)と混合したモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを体重あたり 50 $\mu\text{mol/kg}$ になるように腹腔内にガラスキャピラリー (GD-1、ナリシゲ社) とガス式

図2. 各抗肥満薬による摂食抑制の定量化

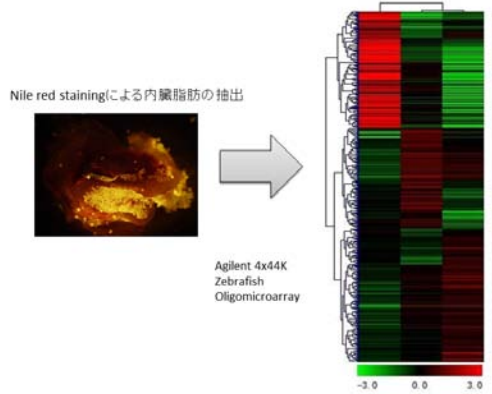


インジェクター (FemtoJet、Eppendorf 社) を用いて注入した。基本的に注入は週 1 回行った。

4. 研究成果

1) 過食時の肥満遺伝子クラスター解析
 1)-1. 食餌量を過剰に投与した場合、摂食量は飽和曲線を示すことをすでに明らかにしており、投与量ではなく摂取量の定量を確立した本システムを活用した (担当: 田中、西村)。この結果、図2に示すようにrimonabant, sibutramine, mazindol, fluoxetine

図3 DNAマイクロアレイによる内臓脂肪の網羅的遺伝子発現変化



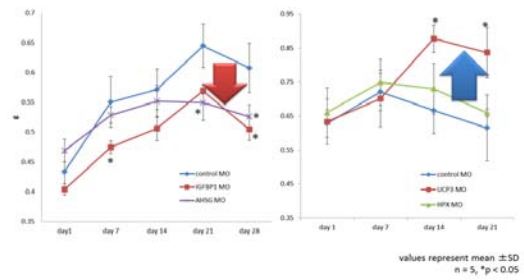
(serotonin-selective reuptake inhibitor), phentermine (catecholamine releaser) など抗肥満薬による摂食抑制の定量化に成功した (成果論文 2)。

1)-2. 摂食定量後、内臓脂肪を剔出し、DNA マイクロアレイにより内臓脂肪遺伝子発現変動を解析した (担当: 田中、西村)。その結果、発現が変動した 190 遺伝子の抽出に成功した。

1)-3. 内臓脂肪等における肥満遺伝子クラスターの解明 (田中、西村)。遺伝子オントロジー解析と階層クラスター

分析を組み合わせた方法によるバイオインフォマティクス解析を行い、肥満遺伝子クラスターの抽出に成功した (図 3)。

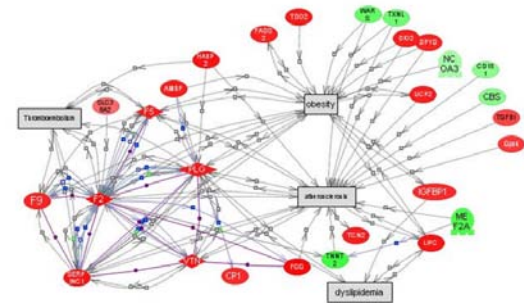
図4 新規肥満制御遺伝子による体重増加抑制



1)-4. ノックダウンスクリーニングによる新規肥満制御遺伝子の探索 (島田)。

「1)-3. 肥満遺伝子クラスター」から抽出し

図5 過食時の内臓脂肪遺伝子ネットワーク



た遺伝子群に対し、それぞれを選択的に発現できるモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成し、過食誘導期間週に 1 回腹腔内にマイクロインジェクション投与した。体重増加を中心にモニタリングした結果、図 4 に示すように MXD3 をはじめ、複数の遺伝子で新規肥満制御遺伝子を抽出することに成功した。

1)-5. 過食時の内臓脂肪遺伝子ネットワークの解明 (島田)。

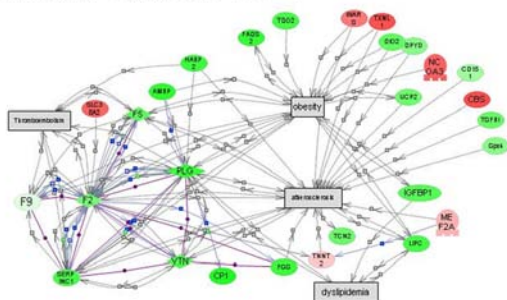
「1)-4. ノックダウンスクリーニング」で確立された肥満制御遺伝子群を中心に、パスウェイ解析を中心としたネットワーク構築を行った。その結果を図 5 に示す。

2) 食事療法時の肥満遺伝子クラスター解析 (西村、島田)

2)-1. DNA マイクロアレイによる、食事療法後の内臓脂肪の遺伝子発現変動解析。食餌性肥満ゼブラフィッシュに対し、食事制限 (2 日 1 回給餌) を 2 週間行った。その結果、体重は約 32%減少し、増加していた血漿中中性脂肪もほぼ正常値まで減少した。その後、内臓脂肪を摘出し、DNA マイクロアレイ解析を行った (図 3、右端のカラム)

2)-2. 食事療法時の遺伝子発現変動解析からの肥満遺伝子クラスターの解明。

図6 食事療法時の内臓脂肪遺伝子ネットワーク



「1)-5. 過食時の内臓脂肪遺伝子ネットワークの解明」で構築したネットワークに「2」-1. 食事療法時の遺伝子発現プロファイル」をインポートし、バリデーション解析を行った。その結果、図6に示すように緑色(図5では赤色)の遺伝子は食事療法応答性が確認でき、肥満遺伝子クラスターとして抽出できた。

表1 ノックダウンスクリーニングにより抽出された新規肥満制御遺伝子

human ortholog (symbol)	zebrafish gene (symbol)	gene name	Gene/RefSeq status	blinded against human ortholog	molecular function	cellular component	biological process
1	hpf4a	hpf4a	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	322356 provisional	Identites = 376/455 (83%) Positives = 412/455 (90%)	Transcriptional Factor	NUCLEUS
2	MXD3	mxl3	matrix metalloproteinase 3	364371 provisional	Identites = 153/206 (74%) Positives = 137/206 (66%)	Protein binding	NUCLEUS
3	UCP3	ucp3	uncoupling protein 3	83908 provisional	Identites = 218/302 (72%) Positives = 281/302 (93%)	transporter activity	mitochondrion
4	IGFBP4	igfbp4	insulin-like growth factor binding protein 4	317638 provisional	Identites = 101/258 (39%) Positives = 134/258 (52%)	insulin-like growth factor binding	extracellular region
5	HSD3B7	hdsb7	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase domain containing 7	327462 provisional	Identites = 197/263 (75%) Positives = 254/263 (97%)	3-oxo-hydroxy-5-ene steroid synthetase activity	cytoplasm
6	AHG3	ahg3	ALPHA-3-HS-GLYCOPROTEIN	395956 provisional	Identites = 87/205 (42%) Positives = 131/205 (64%)	kinase inhibitor activity	extracellular region
7	GPIX	gpi1a	glutathione peroxidase 1	323928 VALIDATED	Identites = 73/111 (66%) Positives = 93/111 (84%)	glutathione peroxidase	mitochondrion
8	KRAS	kras	ret sarcoma virus homolog, transforming growth factor beta-inducible	448286 PREDICTED	Identites = 181/188 (96%) Positives = 181/188 (96%)	Transcriptional Factor	cytoplasm
9	TGFB1	tgfb1	transforming growth factor beta, inducible	321421 provisional	Identites = 424/473 (89%) Positives = 527/473 (111%)		extracellular region

2)-3. ノックダウンスクリーニングによる新規肥満抑制遺伝子の探索。
これまでの一連の解析から、表1に示す遺伝子に対して、それぞれに特異的なモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成し、過剰給餌期間のゼブラフィッシュの腹腔内に週1回ペースでマイクロインジェクションした。その結果、MXD3をはじめ、一部の遺伝子では内臓脂肪の制御が明らかとなり、食事療法との関連性が証明できた。

総括

我々はすでに世界に先駆けて独自に食餌性肥満ゼブラフィッシュモデルを確立している。このモデルの内臓脂肪における遺伝子発現プロファイル解析からヒト肥満との類似性を明らかにしているが (BMC Physiology 2010, 10, 21)、今回の研究では(1) 肥満からメタボリックシンドローム合併症への進展に関与する遺伝子クラスター (合併症遺伝子群) と(2)内臓脂肪制御に関与する遺伝子ネ

ットワークを明らかにした。さらに、独自に見出している内臓脂肪の新規肥満遺伝子 (特願 2009-208272 MXD3 遺伝子の発現阻害による肥満の抑制) の治療遺伝子ネットワークを、DNA マイクロアレイを用いて明らかにした。現在このMXD3については論文投稿中である。

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4件)

1. A High-Throughput Fluorescence-Based Assay System for Appetite-Regulating Gene and Drug Screening
Shimada Y, Hirano M, Nishimura Y, Tanaka T

PLoS ONE 2012, 7(12) e52549 査読有

2. Green tea extract suppresses adiposity and affects the expression of lipid metabolism genes in diet-induced obese zebrafish

Takahiro Hasumura, Yasuhito Shimada, Junya Kuroyanagi, Yuhei Nishimura, Shinichi Meguro, Yoshinori Takema and Toshio Tanaka

Nutrition & Metabolism 2012, 9:73 査読有

3. A novel protocol for the oral administration of test chemicals to adult zebrafish.

Liqing Zang, Daizo Morikane, Yasuhito Shimada, Toshio Tanaka, and Norihiro Nishimura

Zebrafish December 2011, 8(4): 203-210.

査読有

4. Transcriptome analysis of anti-fatty liver action by Campari tomato using a zebrafish diet-induced obesity model.

Toshiyuki Tainaka, Yasuhito Shimada, Junya Kuroyanagi, Liqing Zang, Takehiko Oka, Yuhei Nishimura, Norihiro Nishimura and Toshio Tanaka

Nutrition & Metabolism 2011, 8:88 査読有

[学会発表] (計7件)

(1) 第86回日本薬理学会 (2013. 3. 23)

福岡国際会議場

島田 康人

蛍光 in vivo ハイスループット摂食量測定技術による定量的システムズ薬理学研究

(2) 第122回薬理学会近畿部会 (2012. 11. 16)

大阪府 千里ライフサイエンスセンター

島田 康人

新規抗肥満標的遺伝子としてのMXD3 に関するシステムズ薬理学研究

(3)第 85 回日本薬理学会(2012. 3. 14)

京都国際会館

西村 有平

新しい in vivo イメージングとオミックス創薬

(4) 第 120 回日本薬理学会近畿部会(2011. 11. 11)

ホテルグランピア京都

島田 康人

食餌性肥満ゼブラフィッシュによる機能性食品の薬理ゲノミクス研究

(5)ゲノム創薬フォーラム(2011. 11. 9)

日本薬学会館 長井記念ホール

田中 利男

ターゲットバリテーションとオミックス創薬スクリーニング

(6)第 84 回日本生化学会大会(2011. 9. 24)

京都国際会館

田中 利男

オミックス創薬科学におけるターゲットバリテーション

(7)第 134 回内分泌セミナー(2011. 9. 3)

東京都 ノボ ノルディスクファーマ(株)

田中 利男

新しい生活習慣病モデルとオミックス医学

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 利男 (TANAKA TOSHIO)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号： 00135443

(2)研究分担者

西村 有平 (NISHIMURA YUHEI)

三重大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号： 30303720

島田 康人 (SHIMADA YASUHIRO)

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号： 40378427

