

## 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：14301  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659476  
 研究課題名（和文） 新規遺伝子変異ラット作製システムを用いた内分泌代謝病態モデルラットの開発と解析  
 研究課題名（英文） Development and analysis of model rats for diseases of endocrinology and metabolism  
 研究代表者  
 中尾 一和 (NAKAO KAZUWA)  
 京都大学・医学研究科・教授  
 研究者番号：00172263

研究成果の概要（和文）： ENUミュータジェネシスによる標的遺伝子変異ラットの効率的な作製システムを用いて、レプチンノックアウトLep<sup>mkyo</sup>/Lep<sup>mkyo</sup>ラットの開発に成功した。今後、マウスとの比較によりレプチン作用の種差の解明が期待される。

また、上記方法を用いてseipinノックアウト（SKO）ラットを作製した。Seipin遺伝子異常は全身性脂肪萎縮症の原因であるが、SKOラットの解析を通してseipinは白色脂肪組織の発生のみならず中枢神経系の発生や精子形成に重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）： Using the method with ENU (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea) mutagenesis, we generated a leptin deficient *Lep<sup>mkyo</sup>/Lep<sup>mkyo</sup>* rat that had a nonsense mutation (Q92X) in leptin gene. *Lep<sup>mkyo</sup>/Lep<sup>mkyo</sup>* rats showed obese phenotypes including fatty liver, which were comparable to *Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>* mice. *Lep<sup>mkyo</sup>/Lep<sup>mkyo</sup>* rat is the treatable rat model lacking leptin signal and will bring further understanding of obesity and its complications.

Mutations in the Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 gene (*BSCL2*) are the underlying defect in patients with congenital generalized lipodystrophy type 2. Using the method with ENU (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea) mutagenesis, we generated a seipin deficient (seipin KO) rat that had a premature stop codon (L20X) in *BSCL2*. The present study clearly revealed the physiological roles of seipin not only in adipose tissue but also brain and testis.

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	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内分泌学

キーワード：疾患モデルラット・エネルギー代謝・脂肪細胞・レプチン

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに、脂肪細胞由来ホルモンであるレプチンが肝臓において高発現するレプチン過剰発現トランスジェニックマウスを作製し、この解析を通してレプチンのインスリン感受性亢進作用および脂質代謝促進作用を明らかにしてきた (Diabetes 48: 1882, 2009, Am J Physiol 280: E334, 2001)。さらいこのマウスと脂肪萎縮性糖尿病モデルマウスである A-ZIP/F-1 マウスを交配することにより、脂肪萎縮性糖尿病のインスリ

ン抵抗性の主な原因はレプチン欠乏であり、レプチンが脂肪萎縮性糖尿病治療薬として有用であることを示した (Diabetes 50: 1440, 2001)。しかしながら、マウスにおいて骨格筋特異的にインスリン受容体をノックアウトしても耐糖能異常を来さないことや、A-ZIP/F-1 マウスに PPAR $\gamma$  アゴニストを投与すると血中中性脂肪が低下する一方で脂肪肝が増悪するなどヒト脂肪萎縮症では観察されない現象がマウスモデルを用いた検討で報告されている (Mol Cell 2: 559, 1998、

J Clin Invest 106: 1221, 2000)。したがってマウスモデルを用いて得られた知見はヒトに適応する前に他の動物種でも検討する必要がある。一方、ラットでは糖取り込みにおける骨格筋の比重がよりヒトに近く、肝臓における PPAR $\gamma$  の発現様式もヒトに類似していることから、ヒトの糖脂質代謝調節機構の解明にはラット疾患モデルが有用であると考えられる。

## 2. 研究の目的

従来、生体における糖脂質代謝調節機構の研究には疾患モデル動物として、遺伝子改変技術の利用が容易なマウスを多いることが殆どであった。しかし、糖取り込みにおける骨格筋と肝臓の比重や糖脂質代謝に重要な役割を有する PPAR $\gamma$  の肝臓における発現様式の違いから、マウスを用いた糖脂質代謝研究の結果をそのままヒトに適応するには限界がある。一方、糖取り込みにおける骨格筋の比重や肝臓における PPAR $\gamma$  の発現様式がヒトに類似しているラットは、ヒトの糖脂質代謝調節機構の解明に有用であると考えられる。本研究では、ENU ミュータジェネシスによる標的遺伝子変異ラット作製システムを用いて、肥満および糖尿病モデルラットを作製し、糖脂質代謝研究における有用性を検討する。

## 3. 研究の方法

ENU ミュータジェネシスによる標的遺伝子変異ラット作製システムを用いて、糖尿病・肥満関連分子を中心に、各種ノックアウトラットの作製を行い、糖脂質代謝領域における種差を明らかにする。肥満モデルラットとして ob/ob ラット、全身性脂肪萎縮症モデルラットとしてセイピンノックアウトラット作製を作成し、これらのモデル動物の表現型を解析する。

## 4. 研究成果

レプチン遺伝子にナンセンス変異を有する事実上のレプチンノックアウトラット Lepmkyo/Lepmkyo ラットの開発に成功した。従来レプチン受容体を欠損した fa/fa ラットは存在したが、レプチン投与によりレプチン作用を観察できるレプチンシグナル欠損ラットは初めてであり、今後、マウスとの比較によりレプチン作用の種差の解明が期待される。

また、我々は上記の方法を用いて、60 番目のアミノ酸が終止コドンとなる点変異 (T239A) を seipin 遺伝子に認める seipin ノックアウト (SKO) ラットを作製した。Seipin 遺伝子異常は全身性脂肪萎縮症の原因であるが、seipin 蛋白質の機能は殆ど解明されていない。SKO ラットでは全身の白色脂肪組織の消失が認められ、白色脂肪組織の発

生に seipin が必要であることが証明された。また SKO ラットの精巣では精子の著しい低形成が認められ、精子形成における seipin の重要性が明らかとなった。さらに SKO ラットでは学習記憶の低下が認められ、中枢神経系の正常発育における seipin の関与も示唆された。以上、seipin は白色脂肪組織の発生のみならず多彩な生理作用を有していることが明らかとなった。

## 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 4 件)

- ① L. Miyamoto, K. Ebihara, T. Kusakabe, D. Aotani, S. Yamamoto-Kataoka, T. Sakai, M. Aizawa-Abe, Y. Yamamoto, J. Fujikura, T. Hayashi, K. Hosoda, K. Nakao, Leptin activates hepatic 5' AMP-Activated Protein Kinase through sympathetic nervous system and  $\alpha 1$  adrenergic receptor: A potential mechanism for improvement of fatty liver in lipodystrophy by leptin, J Biol Chem, 査読有、287 巻、2012、40441-40447、DOI: 10.1074/jbc.M112.384545
- ② M. Iwanishi, K. Ebihara, T. Kusakabe, S. Harada, J. Ito-Kobayashi, A. Tsuji, K. Hosoda, K. Nakao, Premature atherosclerosis in a Japanese diabetic patient with atypical familial partial lipodystrophy and hypertriglyceridemia, Intern Med, 査読有、51 巻、2012、2573-2579、DOI: 10.2169/internalmedicine.51.7461
- ③ D. Aotani, K. Ebihara, N. Sawamoto, T. Kusakabe, M. Aizawa-Abe, S. Kataoka, T. Sakai, H. Iogawa, C. Ebihara, J. Fujikura, K. Hosoda, H. Fukuyama, K. Nakao, Functional Magnetic Resonance Imaging Analysis of Food-Related Brain Activity in Patients with Lipodystrophy Undergoing Leptin Replacement Therapy, J Clin Endocrinol Metab, 査読有、97 巻、2012、3663-3671、DOI: 10.1210/jc.2012-1872
- ④ N. Yamada-Goto, G. Katsuura, Y. Ochi, K. Ebihara, T. Kusakabe, K. Hosoda, K. Nakao, Impairment of fear-conditioning responses and changes of brain neurotrophic factors in diet-induced obese mice, J Neuroendocrinol, 査読有、24 巻、2012、1120-1125、DOI: 10.1111/j.1365-2826.2012.02327.x

- ⑤ T. Kusakabe, K. Ebihara, T. Sakai, L. Miyamoto, D. Aotani, Y. Yamamoto, S. Yamamoto-Kataoka, M. Aizawa-Abe, J. Fujikura, K. Hosoda, K. Nakao, Amylin improves the effect of leptin on insulin sensitivity in leptin-resistant diet-induced obese mice, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 査読有、302 巻、2012、E924-931、DOI:10.1152/ajpendo.00198.2011
- ⑥ M. Naito, J. Fujikura, K. Ebihara, F. Miyana, H. Yokoi, T. Kusakabe, Y. Yamamoto, C. Son, M. Mukoyama, K. Hosoda, K. Nakao, Therapeutic impact of leptin on diabetes, diabetic complications, and longevity in insulin-deficient diabetic mice, *Diabetes*, 査読有、9 巻、2011、2265-2273、DOI: 10.2337/db10-1795.
- ⑦ M. Zhao, Y. Li, J. Wang, K. Ebihara, X. Rong, K. Hosoda, T. Tomita, K. Nakao, Azilsartan treatment improves insulin sensitivity in obese spontaneously hypertensive Koletsky rats, *Diabetes Obes Metab*, 査読有、12 巻、2011、1123-1129、DOI: 10.1111/j.1463-1326.2011.01471.x.
- ⑧ N. Yamada, G. Katsuura, Y. Ochi, K. Ebihara, T. Kusakabe, K. Hosoda, K. Nakao, Impaired CNS Leptin Action Is Implicated in Depression Associated with Obesity, *Endocrinology*, 査読有、152 巻、2011、2634-2643、DOI: 10.1210/en.2011-0004.

[学会発表] (計 15 件)

- ① 富田 努、G 蛋白共役型-中・長鎖脂肪酸受容体 GPR40 の遺伝性肥満モデルの膵島での発現調節、第 33 回日本肥満学会、2012 年 10 月 11 日-12 日、京都市
- ② 海老原千尋、脂肪萎縮症原因遺伝子 seipin の生体における意義に関する検討、第 33 回日本肥満学会、2012 年 10 月 11 日-12 日、京都市
- ③ 富田 努、新規 G 蛋白共役型-脂質受容体群 GPR40、GP119 の臨床的意義、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012 年 5 月 17 日-19 日、横浜市
- ④ 阿部 恵、Development of Leptin Deficient Rats-Evidence of Superiority Over Lepob/Lepob Mice as a Model For Human Obesity、19<sup>th</sup> European Congress on Obesity、2012 年 5 月 9 日-12 日、リヨン (フランス)
- ⑤ 阿部 恵、Development of leptin deficient *Lep<sup>mkyo</sup>/Lep<sup>mkyo</sup>* rat-evidence for its superiority over *Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>*

- mouse as a model for human obesity、15<sup>th</sup> International & 14<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology、2012 年 5 月 5 日-9 日、フィレンツェ (イタリア)
- ⑥ 阿部 恵、遺伝子改変ラットを用いたチアゾリジンの脂肪肝に対する効果の種族差の検討、第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012 年 4 月 19 日-21 日、名古屋市
- ⑦ 富田 努、G 蛋白共役型-脂質受容体 GPR119 の臨床的意義: ヒト膵島およびインスリンノーマにおける遺伝子発現と膵島機能との関連、第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012 年 4 月 19 日-21 日、名古屋市
- ⑧ 富田 努、新規のインスリン分泌促進因子 GPR40 の遺伝性肥満モデルでの発現調節と機能的意義、第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012 年 4 月 19 日-21 日、名古屋市
- ⑨ 吉良友里、G 蛋白共役型-脂質受容体 GPR40 の遺伝子発現と臨床的意義、第 109 回日本内科学会総会、2012 年 4 月 13 日-15 日、京都市
- ⑩ 富田 努、新規のインスリン分泌調節因子 GPR40 の遺伝性肥満モデルでの発現調節と機能的意義、第 109 回日本内科学会総会、2012 年 4 月 13 日-15 日、京都市
- ⑪ 中尾一和、肥満と高血圧、第 34 回日本高血圧学会総会日本肥満学会合同シンポジウム、2011 年 10 月 21 日、宇都宮市
- ⑫ 中尾一和、Development of leptin deficient rats *Lepmkyo/Lepmkyo* - evidence for
- ⑬ its superiority over *Lepob/Lepob* mice as a model for human obesity、Annual Joint Meeting of KSSO and JASSO、2011 年 10 月 16 日、ソウル (韓国)
- ⑭ 中尾一和、Translational Science of the CNP/GC-B/cGMP System、5<sup>th</sup> International Conference on cGMP、2011 年 6 月 24 日、ザクセン・アンハルト州 (ドイツ)
- ⑮ 中尾一和、肥満症・メタボリックシンドロームのトピックス、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011 年 5 月 19 日、札幌市

[図書] (計 件)  
なし

[産業財産権]  
○出願状況 (計 0 件)  
なし

○取得状況 (計 0 件)  
なし

[その他]

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~med2/index-jp.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 一和 (NAKAO KAZUWA)  
京都大学・医学研究科・教授  
研究者番号：00172263

(2) 研究分担者

なし