

平成 22 年 3 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590531  
 研究課題名（和文） 遺伝子発現プロファイルによる肥満モデル動物に対する代謝改善薬の効果の解析  
 研究課題名（英文） Gene expression profiling in the obesity model rats

研究代表者  
 今井 順一（IMAI JYUNICHI）  
 福島県立医科大学・医学部・准教授  
 研究者番号：70376739

研究成果の概要：肥満モデルラットを通常ラットと比較して、複数の組織において両者間で発現レベルが有意に変化している肥満関連遺伝子群を特定した。これらの遺伝子群によるデータセットは、クラスタ分析により両者を明確に区別することができ、「肥満のメカニズムの解明」、「抗肥満薬の評価系」、「肥満治療薬標的分子の探索」、「食物の安全性評価」などに使用できる可能性がある。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・分子生物学

キーワード：肥満・生活習慣病・動物モデル・メタボリックシンドローム・遺伝子発現プロファイル

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 肥満について

肥満は「生活習慣病」の根幹をなす中心的な病態であり、特に内臓脂肪蓄積型肥満は「メタボリックシンドローム」とも呼ばれ、皮下脂肪蓄積型肥満に比べ耐糖能異常・高血圧・高脂血症を来しやすく、心筋梗塞・狭心症・脳梗塞といった動脈硬化性疾患の合併頻度が高いことが明らかとなっていた。一般に、高トリグリセリド血症、高血糖、高血圧、肥満は「死の四重奏」とも呼ばれ、冠動脈疾患群においては、このうち3因子以上合併すると危険因子を持たない群と比較して約 36

倍発症危険度が上昇するというデータもある（Nakamura et al., Jpn. Circ. J. 2001）。また、厚生労働省の調査では、高血圧患者数は3,900万人、高脂血症は2,200万人、糖尿病（予備軍を含め）は1,620万人、肥満症は468万人と言われ、医療費の問題とも併せて大きな社会問題となっていた。

## (2) 脂肪組織の研究

肥満と脂肪組織とが密接な関連性を持つことは周知の事実であり、当時、いくつかのグループにより脂肪組織における遺伝子発現について、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析する試みが行われていた。例えば、

Nadler らはレプチン遺伝子の ob/ob 変異を C57BL6 マウスに導入することにより、レプチン欠損による肥満によって脂肪組織の遺伝子発現に与える影響を解析していた (Nadler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000)。また、Soukas らも同様に ob/ob マウスの脂肪組織の遺伝子発現に与える影響を解析していた (Soukas et al., Gene Dev. 2000)。

このように、これまでは脂肪組織については多くの研究がなされていた。これは、脂肪組織がアディポサイトカインと呼ばれる分泌タンパクを産生する内分泌臓器として注目されており、それらのいくつかはメタボリックシンドロームの病態生理に関与していると考えられているからであった。

### (3) これまでの研究の問題点

しかしながら、これらの研究は脂肪組織にターゲットを絞り、また、ある一部の遺伝子に着目して研究を進めているものがほとんどであった。ところが、近年のゲノムプロジェクトの成果などから、あらゆる病態の原因について必ずしもごく限られた一部の遺伝子だけで説明することが困難であることが分かってきた。肥満に伴う病態についても例外ではなく、脂肪組織や今まで研究されてきた遺伝子以外のものがそれらに関与している可能性が高い。したがって、肥満に伴うこれらの病態の解明、あるいは治療およびその予防をするためには、脂肪細胞に限らずその他の臓器についても総合的かつ網羅的に肥満に伴う変化を捉え、解析をする必要があった。

## 2. 研究の目的

今日多く見られる肥満の主な原因は、過食と運動不足を促進する環境にある。さらに、食生活の欧米化に伴う脂質の取りすぎが、肥満、糖尿病などの代謝疾患性生活習慣病の発症の大きな要因と考えられている。しかし、近年の肥満研究の成果により、肥満の遺伝的影響に対する知見も著しく増加している。

脂肪組織における遺伝子発現を DNA マイクロアレイ解析を用いて網羅的に解析する試みが行われている。Nadler らはレプチン遺伝子の ob/ob 変異を C57BL6 マウスに導入することにより、レプチン欠損による肥満が脂肪組織の遺伝子発現に与える影響を解析している(78 遺伝子が上昇、136 遺伝子が低下)。肥満により発現が低下する遺伝子には、ミトコンドリア系の諸酵素とともに、脂肪細胞の分化過程で発現が増強する遺伝子が多く認められた (Nadler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000)。

Soukas らは ob/ob マウスの脂肪組織の遺伝子発現解析を行い 476 の遺伝子の発現が有意に変動することを見出し、炎症関連遺伝子の増加や脂肪合成系遺伝子の減少に着目してい

る (Soukas et al., Gens Dev. 2000)。

また、個体レベルでもノックアウトマウスやトランスジェニックマウスなどの技術を用いてターゲットとなる遺伝子を絞った研究もなされている。例えば、11 $\beta$ -HSD-1 遺伝子の過剰発現によって脂肪組織でのグルココルチコイド作用を亢進させ、内臓脂肪組織が過剰に蓄積するという所見も得られている (Masuzaki et al., Science 2001)。

しかしながら、これらの研究は脂肪細胞 (あるいは脂肪組織) にターゲットを絞り、また、ある一部の遺伝子に着目して研究を進めそれらと肥満にともなう病態との関連性について示しているものがほとんどである。ところが、近年、あらゆる病態の原因について必ずしも単一の遺伝子、あるいはごく限られた一部の遺伝子だけで説明することが困難であることが明らかとなってきている。さらには、近年のゲノムプロジェクトの進行によりゲノムワイドな解析が可能となったために、病態の発症において今までターゲットとして考えられてこなかった組織や遺伝子が発現しているということがわかってきたことも事実である。肥満に伴う病態の発症についても例外ではなく、脂肪組織や今まで研究されてきた遺伝子以外のものがそれらに関与している可能性が高い。したがって、肥満に伴うこれらの病態の発症の解明、あるいは治療およびその予防をするためには、脂肪細胞に限らずその他の臓器についても総合的かつ網羅的に肥満に伴う変化を捉え、解析をする必要がある。

肥満のモデルとしては、Zucker ラットが利用できる。Zucker ラットは単一劣性遺伝子 (fa 遺伝子) をホモにもつことを特徴とし、食欲を抑制する作用をもつホルモン (レプチン) の受容体を遺伝的に欠損したラットである。このラットは食欲に抑制が効かず、過食により生後 4 週齢頃より高度な肥満状態が見られる。さらに高脂血症、高インシュリン血症及び耐糖性の異常を示すことが知られている。また、近年は、メタボリックシンドロームのモデル動物としても利用されている。Zucker ラット (fa/fa) は対照となる正常ラット (lean) と比較して、絶食時糖負荷試験、非絶食時血糖値、絶食時および非絶食時の血清中コレステロール、トリグリセライド、尿素窒素、クレアチニンおよびインシュリン濃度の各項目について経時的に測定したところそれぞれ一定期間経過後に有意な差が認められている (日本チャールス・リバー)。

そこで、われわれは、まず、これらのデータを基にして Zucker ラットが肥満に伴う様々な病態を発症する際に脂肪組織に限らず生体内の各組織でどのような変化が起こっているのかについて DNA マイクロアレイを使用して遺伝子発現変化という観点から網羅的

に調べることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 肥満モデル動物の作製・取得

高脂肪餌（オリエンタル酵母社製）と通常の餌（オリエンタル酵母社製）をそれぞれ一定期間 Wistar ラットに与え続け、肥満のモデル動物を作製した。

また、単一劣性遺伝子（fa 遺伝子）をホモにもつことを特徴とし、生後 4 週齢頃より肥満状態が見られ、さらに高脂血症、高インシュリン血症及び耐糖性の異常を示すことが知られている Zucker ラット（fatty）およびその正常型 Zucker ラット（lean）を日本チャールス・リバー社から購入した。

#### (2) 実験条件

高脂肪餌を長期間（4 週間～12 週間）Wistar ラット（日本チャールス・リバー社製）に与え続け（以下、「高脂肪餌ラット（TF）」と呼ぶ）、肥満モデルラットの作製を試みた。また、その対照として、通常の餌を同様に長期間（4 週間～12 週間）Wistar ラットに与え続けた（以下、「通常餌ラット（NF）」と呼ぶ）。

また、Zucker ラット（fatty）および、Zucker ラット（lean）を長期間（10 週間）飼育した。

これらの高脂肪餌ラット（TF）、通常餌ラット（NF）、Zucker ラット（fatty）、その対照となる正常ラット（lean）に対して、実験対象となる臓器を採取した。

#### (3) 期間

高脂肪餌ラット（TF）、通常餌ラット（NF）を飼育後、0 週後、4 週後、8 週後、12 週後の各種臓器を採取し、遺伝子発現プロファイルを取得した。一方、Zucker ラット（fatty）および正常ラット（lean）に関しては購入後、10 週間飼育した後に各種臓器を採取し、遺伝子発現プロファイルを取得した。

#### (4) DNA マイクロアレイの作製

DNA マイクロアレイは当研究室の DNA マイクロアレイ作製装置を使用して作製した。

#### (5) サンプル調製

抽出した臓器については液体窒素で即時に凍結したのち、ISOGEN で溶解し添付された実験プロトコルに従って total RNA を抽出した。その後、polyA+RNA 抽出キットを使用して添付された実験プロトコルに従って polyA+RNA を抽出した。

サンプルの標識およびハイブリダイゼーションについてはラベル&ハイブリダイゼーションキット（マイクロダイアグノスティック社製）を購入し、添付された実験プロトコルにしたがって行った。

#### (6) データ解析

取得したデータについては、データ解析ソフト（マイクロダイアグノスティック社製）に

よりデータを対数相対値に変換した後、それぞれの遺伝子発現プロファイルと比較した。肥満あるいは、肥満にともなう各種病態の発症にともなって変動する遺伝子発現変動を各臓器において比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) 肥満モデルラットの作製

最初に、高脂肪餌を長期間（4 週間～12 週間）与えたラットと通常餌を与えたラットを作製した。通常餌ラット（NF）と高脂肪餌ラット（TF）の体重を経時的に測定したところ、両間では体重変動に有意な差はなかった（図 1）。また、食餌の摂取量についても有意な差はなかった（Data not shown）。

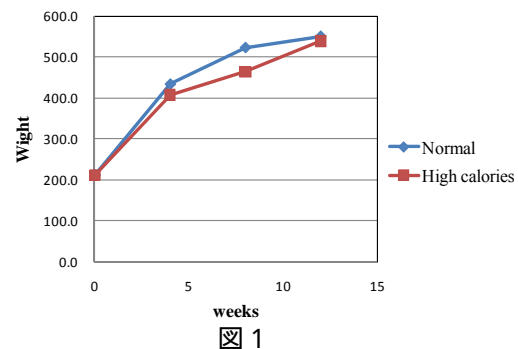


図 1

一方、Zucker ラット（fatty）と正常ラット（lean）についても経時的に体重および摂取量の測定を行ったところ、Zucker ラット（fatty）は Zucker ラット（lean）と比較して体重が有意に増加していた。（ $p = 0.017$ ）（図 2）。また、餌の摂取量も Zucker ラット（fatty）の方が Zucker ラット（lean）と比較して、約 2 倍多かった（Data not shown）。

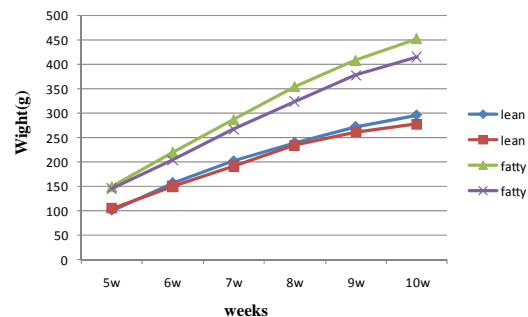


図 2

#### (2) 血液生化学検査

高脂肪餌ラット（TF）および通常餌ラット（NF）について、実験開始から 12 週間後に血液を採取し、血液生化学検査を行った。その結果、AST (GOT) 値は TF 群の方が約 3.3 倍高かった。また、ALT (GPT) 値も TF 群の方が約 4.4 倍高かった。さらに、T-CHO 値も

TF 群の方が約 2.8 倍高かった (図 3)。

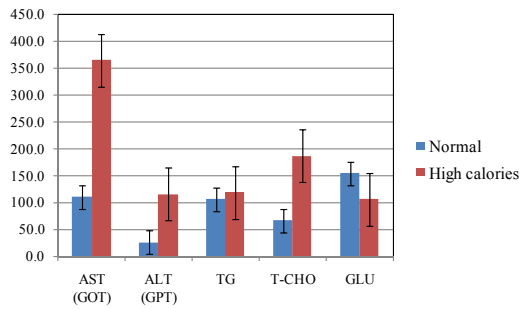


図 3

一方、Zucker Rat についても飼育開始後 10 週間後に血液を採取し、血液生化学検査を行ったところ、AST (GOT)と ALT (GPT)の値は差がなかった。しかし、TG の値は 10 倍以上の差があった。さらに、T-CHO は 2 倍程度の差があった (図 4)。

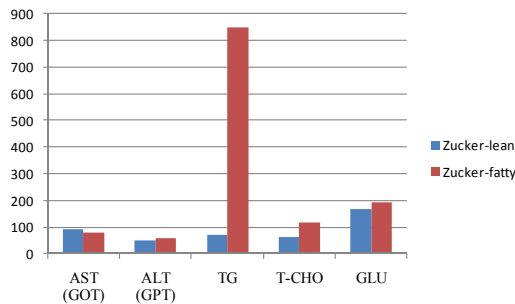


図 4

### ( 3 ) 肝臓組織の観察

高脂肪餌ラット (TF) の解剖時に組織の観察を行ったところ、肝臓には脂肪沈着が確認された (data not shown)

### ( 4 ) 動物モデル

以上のことから、高脂肪餌で一定期間飼育することにより、内臓脂肪蓄積型肥満の動物モデルを作製することができたと考える。また、高脂肪餌で飼育したラットは、組織観察や血液生化学検査の結果等から、Zucker Rat とは異なる肥満の類型であると考えることができた。

### ( 5 ) 遺伝子発現解析 (肝臓)

肝臓における遺伝子発現プロファイルから、高脂肪餌ラット (TF) 群と通常餌ラット (NF) 群との間で発現レベルに有意差のある遺伝子群を  $p < 0.0001$  の条件で抽出したところ、168 遺伝子を特定できた。それら 168 遺伝子のみを用いてサンプル間のクラスタ分析を行ったところ、NF 群と TF 群を明確に区別することが可能であった (図 5)。

また、NF 群と TF 群との間で差のある遺伝子群を  $p < 0.00001$  の条件で抽出したところ、67 遺伝子を特定できた。それら 67 遺伝子のみを用いてサンプル間のクラスタ分析を行

ったところ、NF 群と TF 群を明確に区別することが可能であった (図 6)。

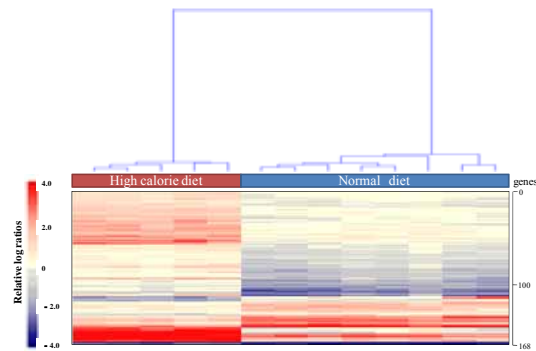


図 5

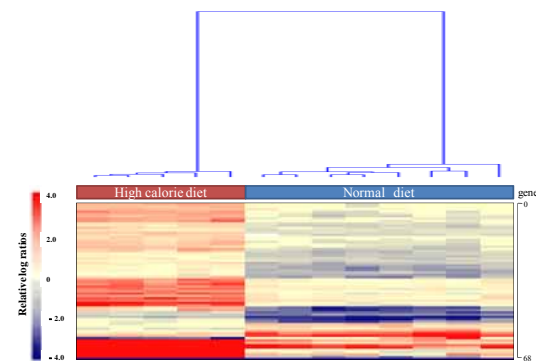


図 6

これらの結果は、これらの遺伝子群は高脂肪餌により内臓脂肪蓄積型肥満となった場合の原因遺伝子を含んでいる可能性があることを示している。したがって、これらの遺伝子群をさらに研究していくことで、内臓脂肪蓄積型肥満のメカニズムの解明または、治療薬の開発が進む可能性が高まると考える。

また、Zucker ラットについては、Zucker ラット (fatty) と Zucker ラット (lean) の両方で発現比が 2 倍以上異なる遺伝子は 103 遺伝子存在した。これらの遺伝子群によりクラスタ分析を行ったところ、Zucker ラット (fatty) と Zucker ラット (lean) を明確に区別することが可能であった (図 7)。これらの結果は、Zucker ラットモデルにおいて、肥満の原因となる遺伝子群を含んでいる可能性があることを示している。また、これらの遺伝子群をさらに研究することによって、Zucker ラットの肥満モデルにおいて、そのメカニズムの解明または、肥満治療薬の開発が進む可能性が高まると考える。



図 7

また、高脂肪餌ラット (NF) 群と通常餌ラット (TF) 群で差のあった遺伝子群と Zucker ラット (fatty) と Zucker ラット (lean) で差のあった遺伝子はほとんど一致しなかった (Data not shown)。このことは、高脂肪餌を与えることにより作製した内臓脂肪蓄積型肥満と遺伝子異常に基づく Zucker ラットモデルとは遺伝子発現レベルで異なる変化が起こっていることを示しており、これらの違いをさらに研究することで、メタボリックシンドロームに関するメカニズムおよびその治療・予防法の開発が進む可能性があると考えている。

#### (6) 高脂肪餌モデルと遺伝子改変モデル (Zucker) の相違

高脂肪餌で肥満を引き起こした場合と、遺伝子改変により肥満を引き起こした場合の相違を遺伝子発現レベルで比較した。その結果、対照 (実験開始直前の動物) が最も遺伝子発現レベルで離れており、次に Zucker ラット (fatty) が離れていた。また、Zucker ラット (lean) と通常餌ラット (NF) は遺伝子発現レベルではほとんど相違がないことが判明した。さらに、高脂肪餌ラット (TF) よりも、Zucker ラット (fatty) の方が遺伝子発現レベルでの変化が大きいことが判明した (図 8)。

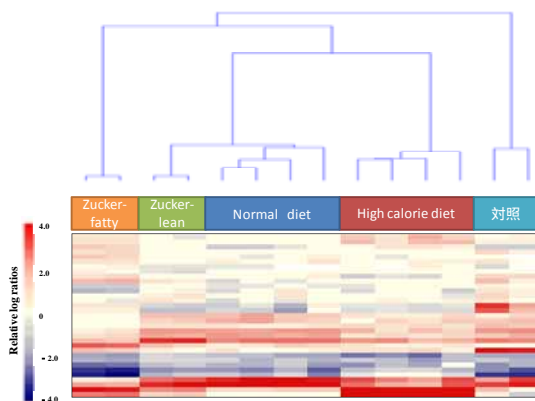


図 8

このことは、高脂肪餌モデルと遺伝子改変モデル (Zucker) では発現レベルで変化している遺伝子が異なっており、肥満の原因となる遺伝子または治療のターゲットの候補となる遺伝子が異なることを意味している。

#### (7) 遺伝子発現解析 (血液)

高脂肪餌ラット (TF) および通常餌ラット (NF) の間で血液において発現レベルで有意に差があった遺伝子を抽出したところ、47 遺伝子存在した。この 47 遺伝子のみでクラスタ分析を行ったところ、両者を明確に区別することが可能であった (図 9)。このことは、血液においても、肥満に伴って変化を生じることが判明し、これらの遺伝子発現レベルの変化が、肥満のバイオマーカーになり得ることを意味している。

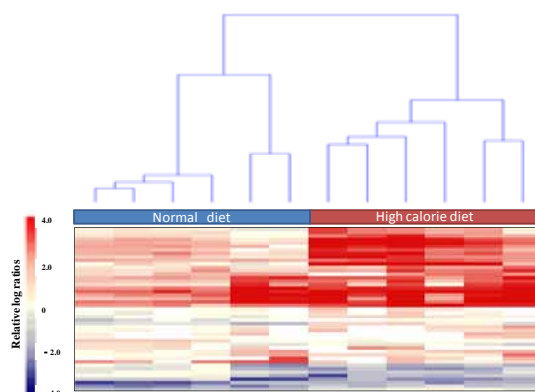


図 9

#### (8) 遺伝子発現解析 (膵臓、血管)

高脂肪餌ラット (TF) および通常餌ラット (NF) の間で膵臓において発現レベルで有意に差があった遺伝子を抽出したところ、19 遺伝子存在した。また、血管において同様の解析を行ったところ、20 遺伝子存在した。これらの遺伝子のみでクラスタ分析を行ったところ、それぞれ両者を明確に区別することが可能であった (Data not shown)。このことは、肥満に伴い膵臓や血管も遺伝子発現レベルで変化を生じていることを意味しており、肥満に伴う疾患の原因・治療・予防法の開発などにつながる可能性がある。

### 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)

Goshima N, Kawamura Y, Fukumoto A, Miura A, Honma R, Satoh R, Wakamatsu A, Yamamoto J, Kimura K, Nishikawa T, Andoh T, Iida Y, Ishikawa K, Ito E, Kagawa N, Kaminaga C, Kanehori K, Kawakami B, Kenmochi K, Kimura R, Kobayashi M, Kuroita T, Kuwayama H,

Maruyama Y, Matsuo K, Minami K, Mitsubori M, Mori M, Morishita R, Murase A, Nishikawa A, Nishikawa S, Okamoto T, Sakagami N, Sakamoto Y, Sasaki Y, Seki T, Sono S, Sugiyama A, Sumiya T, Takayama T, Takayama Y, Takeda H, Togashi T, Yahata K, Yamada H, Yanagisawa Y, Endo Y, Imamoto F, Kisu Y, Tanaka S, Isogai T, Imai J, Watanabe S, Nomura N. Human protein factory for converting the transcriptome into an in vitro-expressed proteome. Nat. Methods., 5, 1011-1017. 2008. 査読有

Hamaguchi I, Imai J, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Naito S, Maeyama J, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Kato H, Mizutani T, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K. Application of quantitative gene expression analysis for pertussis vaccine safety control. Vaccine, 26, 4686-4696, 2008. 査読有

Fujita N, Imai J, Suzuki T, Yamada M, Ninomiya K, Miyamoto K, Iwasaki R, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Watanabe S, Suda T, Toyama Y, Miyamoto T. Biochem Biophys Res Commun., 372, 367-372, 2008. 査読有

Mizukami T, Imai J, Hamaguchi I, Kawamura M, Momose H, Naito S, Maeyama J, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K. Application of DNA microarray technology to influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine safety evaluation. Vaccine, 26, 2270-2283, 2008. 査読有

Yamaguchi N, Oyama T, Ito E, Satoh H, Azuma S, Hayashi M, Shimizu K, Honma R, Yanagisawa Y, Nishikawa A, Kawamura M, Imai J, Ohwada S, Tatsuta K, Inoue J, Semba K, Watanabe S. NOTCH3 signaling pathway plays crucial roles in the proliferation of ErbB2-negative human breast cancer cells. Cancer Res. 68, 1881-1888, 2008. 査読有

Yamaguchi N, Ito E, Azuma S, Honma R, Yanagisawa Y, Nishikawa A, Kawamura M, Imai J, Tatsuta K, Inoue J, Semba K, Watanabe S. FoxA1 as a lineage-specific oncogene in luminal type breast cancer. Biochem Biophys Res Commun. 365, 711-717, 2008. 査読有

Ninomiya K, Miyamoto T, Imai J, Fujita N, Suzuki T, Iwasaki R, Yagi M, Watanabe S, Toyama Y, Suda T. Osteoclastic activity induces osteomodulin expression in osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun., 362, 460-466,

2007. 査読有

Kato H, Honma R, Sanda T, Fujiwara T, Ito E, Yanagisawa Y, Imai J, Okamoto T, Watanabe S. Knock down of hSNF5/Ini1 causes cell cycle arrest and apoptosis in a p53-dependent manner. Biochem Biophys Res Commun., 361, 580-585, 2007. 査読有

Ito E, Honma R, Yanagisawa Y, Imai J, Azuma S, Oyama T, Ohwada S, Akiyama T, Nomura N, Inoue J, Watanabe S, Semba K. Novel clusters of highly expressed genes accompany genomic amplification in breast cancers. FEBS Lett. 581, 3909-3914, 2007. 査読有

Hamaguchi I, Imai J, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Kato H, Naito S, Maeyama J, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Mochizuki M, Ochiai M, Yamamoto A, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K. Two vaccine toxicity-related genes Agp and Hpx could prove useful for pertussis vaccine safety control. Vaccine, 25, 3355-3364, 2007. 査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今井 順一 (IMAI JYUNICHI)  
福島県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：70376739

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者