

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08607

研究課題名(和文) 運動効果におけるリポ蛋白リパーゼの作用：ノックアウトウサギを用いた研究

研究課題名(英文) Role of lipoprotein lipase on Exercise effects.

研究代表者

西島 和俊 (Nishijima, Kazutoshi)

秋田大学・バイオサイエンス教育・研究サポートセンター・准教授

研究者番号：70435874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：運動の効果に関連すると考えられるリポタンパクリパーゼ(LPL)の作用を明らかにするためにCRISPR/Cas9システムを用いて遺伝子欠損ウサギを作出し、その特性を解析すること研究の目的とした。LPLはトリグリセリド(TG)の代謝に不可欠な酵素であり、ホモ欠損個体は致死となると考えられた。成体まで生存し、かつ高TG血症を示したウサギ個体について、定量的PCR法により脂質代謝関連遺伝子の発現解析を行った結果、ヒラメ筋においてはPGC-1、GLUT4、CRT-1、HMG-CoA、FAS等の発現が低下していたのに対し、肝臓ではPPAR-、SREP-2、CPT-1、FAS等の発現が上昇していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LPLは中性脂肪を遊離脂肪酸とグリセロールに加水分解し、血中の中性脂肪を低下させることから肥満・メタボリック症候群の治療ターゲットとなると考えられてきた。しかし、本研究により、LPLの作用は臓器により異なる可能性が示唆され、治療ターゲットとする際には慎重な検討が必要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：We challenged to establish lipoprotein lipase (LPL) knock-out rabbit to investigate the role of lipoprotein lipase which is related with exercise effects. LPL is an essential enzyme for triglyceride (TG) metabolism, and homo-deficient individuals were considered to be lethal. Sequence analysis on a survived individual with high plasma TG showed some gene modification around target site of CRISPR/Cas9, which seemed to be heterogenic. Expression analysis of lipid metabolism-related genes by quantitative PCR was performed on the gene-modified individual and it was shown that PGC-1, GLUT4, CRT-1, HMG-CoA, FAS were decreased in soleus muscle, and in contrast, expression of PPAR-, SREP-2, CPT-1, FAS were increased in the liver.

研究分野：脂質代謝学、実験動物学

キーワード：リポタンパクリパーゼ 中性脂肪 ノックアウトウサギ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満・メタボリック症候群は、心臓病や脳卒中などの動脈硬化性疾患誘起の危険性を飛躍的に増大させるため、現代病として社会的な問題となっている。肥満・メタボリック症候群に対しては、食事療法に加え、運動療法が中心的な改善法とされている。持続的な運動は、骨格筋におけるリポ蛋白リパーゼ (LPL) 活性を上昇させることが知られている。LPL は骨格筋や脂肪組織などで産生される酵素で、中性脂肪を遊離脂肪酸とグリセロールに加水分解する。申請者らの研究グループで開発した、ヒト LPL を全身に発現する (LPL-Tg) ウサギでは、骨格筋における LPL 活性が野生型ウサギの 4 倍程度あり、低体重で、血中の中性脂肪や総コレステロール値が低く、高脂肪食負荷によっても肥満やインスリン抵抗性が誘発されないことが明らかとなっている。これらのことから、LPL は肥満・メタボリック症候群の治療ターゲットとなると考えられるが、一方で、高脂肪食を負荷した際に LPL-Tg ウサギは脂肪肝を呈することも確認されている。

この病態が誘発されたメカニズムについては不明であるが、LPL の発現・活性を強制的に上昇させるだけでは運動療法の効果を再現できない可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、LPL ノックアウトウサギの特性を解析することで、LPL が各臓器においてどのような作用を持ち、肥満・メタボリック症候群における作用を明らかにし、ヒトにおけるより効果的な治療法の開発に寄与することを目的とした。

3. 研究の方法

ウサギの LPL に特異的な CRISPR/Cas9 のガイド RNA を構築した。雌ウサギから受精卵を採取し、マイクロインジェクション法により受精卵の雄性前核もしくは細胞質内に CRISPR/Cas9 のコンストラクトを注入し、偽妊娠させた仮親ウサギの卵管内に胚を移植して仔ウサギを得た。

出生したウサギのゲノム DNA のシーケンス解析を行うとともに、採血して血中の脂質、糖の測定を行い、各臓器を採取して、定量的 PCR 法により脂質代謝関連遺伝子の発現量を解析した。

4. 研究成果

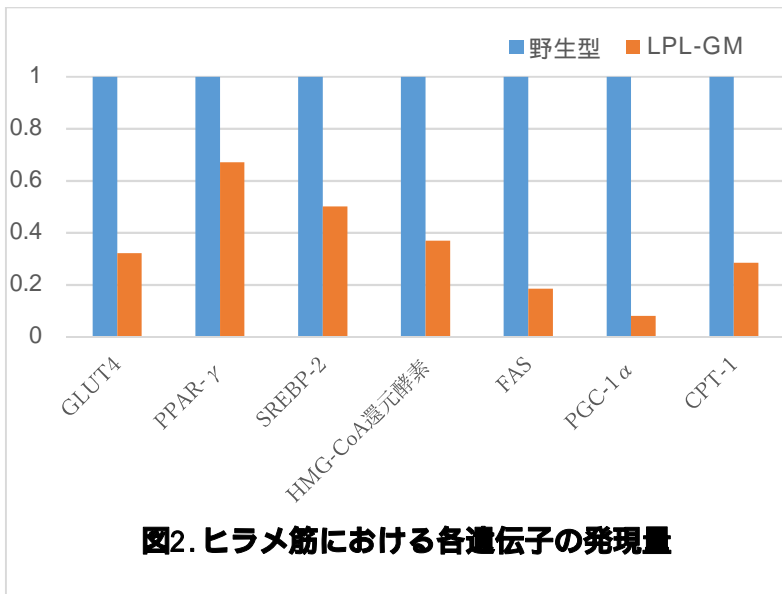
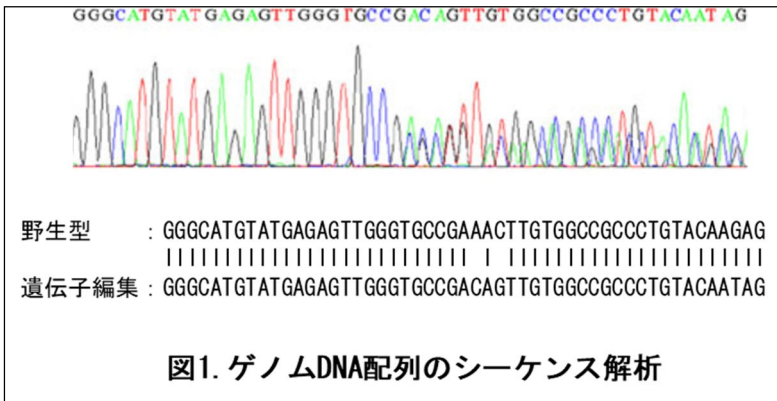
CRISPR/Cas9 のコンストラクトを前核もしくは細胞質内にマイクロインジェクションした胚の移植により得た 21 匹の産子のゲノム DNA を抽出し、シーケンス解析を行った。21 匹の内 8 匹は明らかな野生型の遺伝子配列を示したが、残りの個体においては何らかの遺伝子変異が確認された。しかし、多くの個体は離乳前に死亡し、生存した個体のほとんどは野生型の遺伝子配列を示した。

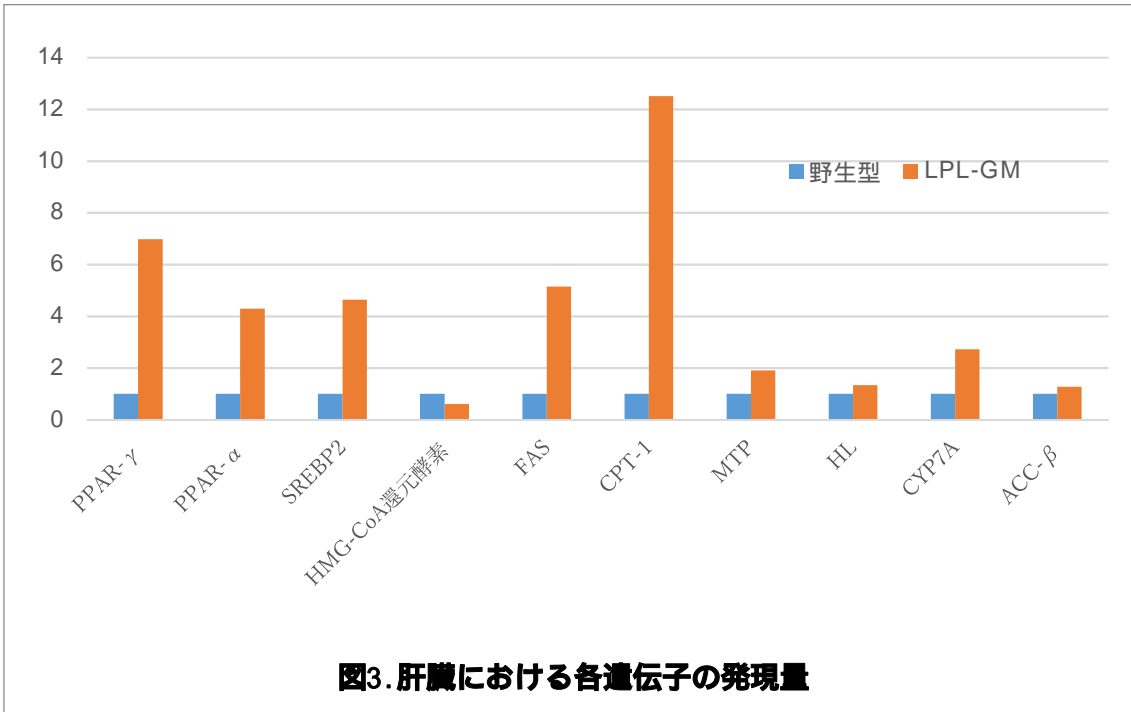
これらの内、離乳し、成体となったメス個体 (LPL-GM) の安楽殺時における血中の総コレステロール (TC) は 46 mg/dL、HDL-コレステロール (c) は 19 mg/dL、トリグリセリド (TG) は 230 mg/dL、グルコース (Glu) は 109 mg/dL であった。血中 TC、HDL-c、Glu 値は通常のウサギに比べて大きな差はみられなかったが、TG 値は通常ウサギ (20~30 mg/dL 程度) より顕著に高値であった。この個体のゲノム DNA の塩基配列のシーケンス解析を行ったところ、ガイド RNA を設定した領域の 3' 側において遺伝子配列が編集されたヘテロ接合様の波形が見られた (図 1)。この個体から産子 (F1) を得たが、いずれも高 TG 血症を示さなかったため、当該個体はモザイク体であると考

えられた。

この個体の各臓器を採取し、トータル RNA を抽出して定量的 PCR 解析を行った。ヒラメ筋においては、血中のグルコースを細胞内に取り込む GLUT4、LPL の発現を上昇させる PPAR- γ 、コレステロール代謝関連遺伝子の転写を制御する SREBP-2、コレステロールの合成に關与する HMG-CoA 還元酵素、脂肪酸の合成に關与する FAS、運動により発現が上昇し、ミトコンドリアを増加させる PGC-1 α 、ミトコンドリアでの脂肪酸の代謝に關与する CPT-1 の発現が野生型ウサギに比べて低下していた（図 2）。一方、肝臓においては、PPAR- α 、PPAR- γ 、SREBP-2、FAS、CPT-1 の発現量が野生型ウサギに比べて上昇していた。

これらの結果から、LPL の作用は臓器により異なり、治療ターゲットとする際には慎重な検討が必要となる可能性が示唆された。





5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nishijima K, Watanabe G, Kitajima S, Basaki K, Fukuda Y, Komatsu Y, Yano M, Obata T, Matsuo Y, Matsuda Y, Seki S.
2. 発表標題 Effect of inhibin antiserum administration and vulva color on superovulation in rabbit.
3. 学会等名 7th International Congress on Rabbit Biotechnology (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西田 裕一郎 (Yuichiro Nishida) (50530185)	佐賀大学・医学部・講師 (17201)	
研究分担者	新見 学 (Manabu Niimi) (80644898)	山梨大学・大学院総合研究部・助教 (13501)	