

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）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：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591010

研究課題名（和文） 遺伝子変異ラットを用いた新しいレプチン作用解析系の確立

研究課題名（英文） Generation of gene targeted rat models with obesity and lipodystrophy for elucidating the mechanism of leptin action

研究代表者

阿部 恵（ABE MEGUMI）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20568688

研究成果の概要（和文）：ENU法にてレプチン欠損 Lep^{mkyo}/Lep^{mkyo} ラット、セイピン欠損ラットを開発、解析した。また ob/ob マウスと比較して PPAR γ の発現、TZD による肝臓の脂肪蓄積や PPAR γ 発現の変化がマウスとラットで異なることが明らかになった。マウスラット共通に肝臓においてレプチンにより制御されている 8 遺伝子をマイクロアレイ法により同定した。セイピン欠損ラットでは精巣萎縮および精子形成不全を、空間作業記憶の低下、脳重量の低下を認めることを見出した。

研究成果の概要（英文）：We generated and characterized a leptin deficient Lep^{mkyo}/Lep^{mkyo} rat that had a nonsense mutation in leptin gene and seipin knockout rat by the method using ENU mutagenesis. TZDs differentially regulated hepatic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) mRNA expression and body fat distribution between Lep^{ob}/Lep^{ob} mice and Lep^{mkyo}/Lep^{mkyo} rats. We identified 8 genes those primarily respond to leptin in the liver commonly in rat and mouse. We detected that seipin deficient rat were infertile due to azoospermia and their spatial working memory is impaired along with brain weight decrease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：糖尿病・レプチン・動物モデル・遺伝子変異ラット・セイピン

1. 研究開始当初の背景

レプチンは脂肪細胞から分泌され、摂食調節、糖・脂質代謝・交感神経亢進作用を有し、エネルギーバランスの維持や改善に重要なホルモンである。これまで多く用いられてきたモデル動物であるマウスとヒトの種差を考慮すると、ヒトの代謝調節機構の検討にはマ

ウスの系のみでは不十分である。

我々の共同研究者である芹川らは近年、N-エチル-N-ニトロソウレア (ENU) による突然変異ラット群 Kyoto University Rat Mutant Archive (KURMA) から効率的に標的遺伝子変異を選択、個体復元する方法を開発した。

2. 研究の目的

これまで糖代謝調節機序解析のモデル実験動物としてマウスが多く用いられてきた。しかし、主要な糖取り込み臓器がヒトでは骨格筋であるのに対してマウスは肝臓であり、糖代謝に重要な PPAR γ の肝臓における発現様式がマウスとヒトでは全く異なることからヒトの糖代謝調節機序の解明およびヒトへの応用の前臨床段階解析にはラットの方が適していると考えられる。ENU を用いた新しい方法により最近得られたレプチン遺伝子変異（ノックアウト）ラットを用いて、レプチンの糖代謝調節機序の解明を行うと同時にヒトへの応用の前臨床段階の病態解明を目指す。また、同様の方法から先天性脂肪萎縮症の原因遺伝子のうち、我が国で最も頻度の高いセイピン遺伝子変異ラットの開発を行い、これを用いてセイピンの機能解析と脂肪萎縮の治療法の開発を行う。

3. 研究の方法

レプチン欠損ラットと野生型ラットの成長曲線、摂食量、糖代謝脂質代謝、エネルギー消費を測定した。また、肝臓の組織学的検討を行った。レプチン欠損ラットと野生型ラットにチアゾリジン（ロシグリタゾン、ピオグリタゾン）経口投与を4週間、および、*ob/ob* マウスマウスに対しても同様にチアゾリジン（ロシグリタゾン、ピオグリタゾン）経口投与を行い肝臓の組織学的検討やインスリン感受性臓器の遺伝子発現などを検討した。またこのレプチン欠損ラット、*ob/ob* マウスを用いて肝臓の遺伝子発現を野生型との比較およびレプチン投与前後でマイクロアレイにより比較した。

また、セイピン欠損ラットと野生型ラットの成長曲線、摂食量、糖代謝脂質代謝、エネルギー消費、肝臓の組織学的検討を行った。また、精巣重量や組織学的検討、脳重量や組織学的検討、空間認知記憶を測定するための Y 迷路試験、脳におけるセイピン遺伝子発現を *in situ hybridization* による解析を行った。セイピン欠損ラットの胎児線維芽細胞の脂肪細胞への分化誘導実験を行った。

4. 研究成果

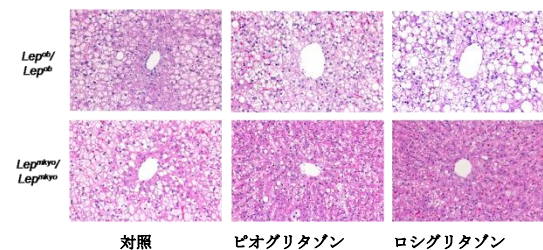
我々は N-エチル-N-ニトロソウレア (ENU) による突然変異ラット群 Kyoto University Rat Mutant Archive (KURMA) から効率的に標的遺伝子変異を選択、個体復元する方法を用いて *ob/ob* マウスのアミノ酸変異 R105X より上流である 92 番目のアミノ酸に Q \rightarrow X 変異を有するレプチン欠損ラット (F344- *Lep^{mkyo} / Lep^{mkyo}* ラット) を開発した (図 1)。

図 1 レプチン欠損ラットの外観



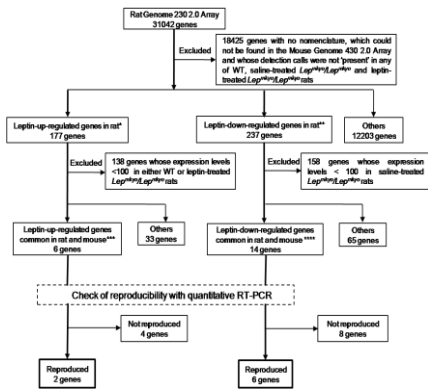
このラットの血中レプチン濃度は測定感度以下であり *ob/ob* マウスと同様に *Lep^{mkyo} / Lep^{mkyo}* ラットは著明な肥満、インスリン抵抗性を伴う糖代謝異常、脂質代謝異常、脂肪肝を認めた。*Lep^{mkyo} / Lep^{mkyo}* ラットが *ob/ob* マウスとほぼ同等な強い脂肪肝を呈するにもかかわらず脂質合成や脂肪分化に重要な核内転写因子である PPAR γ のアンタゴニストである TZD のロシグリタゾン、ピオグリタゾン投与により *Lep^{mkyo} / Lep^{mkyo}* ラットでは脂肪肝の改善を認める一方、*ob/ob* マウスでは脂肪肝の増悪が起こることを見出した。また *ob/ob* マウスでは TZD 投与前からすでに肝臓の PPAR γ の発現が上昇しており、TZD 投与によりさらに増加するが、*Lep^{mkyo} / Lep^{mkyo}* ラットでは肝臓の PPAR γ の発現は低いままであること、TZD 投与により筋肉内中性脂肪濃度、脂肪分布の変化がラットとマウスで異なることを明らかにした。このように重要な代謝調節臓器である肝臓において PPAR γ の発現、TZD による肝臓の脂肪蓄積の変化や PPAR γ 発現の変化がマウスとラットでは異なることが明らかになった。

図 2 レプチン欠損マウス (上段)、レプチン欠損ラット (下段) に対するピオグリタゾンおよびロシグリタゾン投与後の肝臓組織像



さらに、*Lep^{mkyo} / Lep^{mkyo}* ラット *ob/ob* マウスの 2 種類のモデル動物を用いて野生型と比較、またレプチン欠損動物にレプチンを投与し、前後の遺伝子発現を比較することによって体重に変化を来す前である投与初期に発現が変化する肝臓の遺伝子群の探索を行い、レプチンにより制御されている遺伝子の探索を行った。その結果、レプチンによって正に制御されている 2 遺伝子、負に制御されている 6 遺伝子を同定した。

表1 肝臓におけるレプチン制御遺伝子同定方法



同様の方法にて20番目のアミノ酸にL→X変異を有するセイピン欠損ラットを作成し、全身の白色脂肪細胞の著明な萎縮（図3）、高度脂肪肝、高インスリン血症を伴う耐糖能障害などを明らかにした。また、セイピン欠損ラットにおいて精巣萎縮および精子形成不全を認めること、空間作業記憶の低下を認めることを見出した。

図3 セイピン欠損ラットの白色脂肪細胞

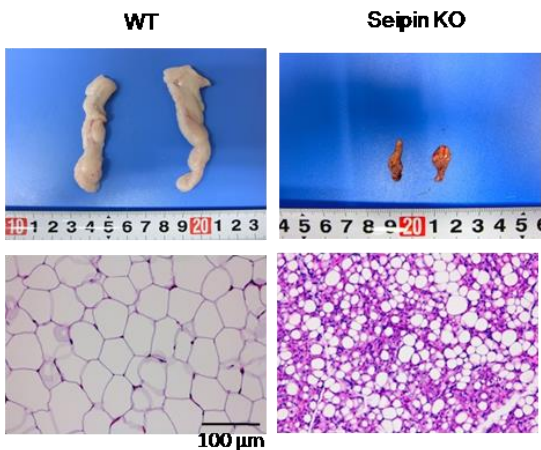
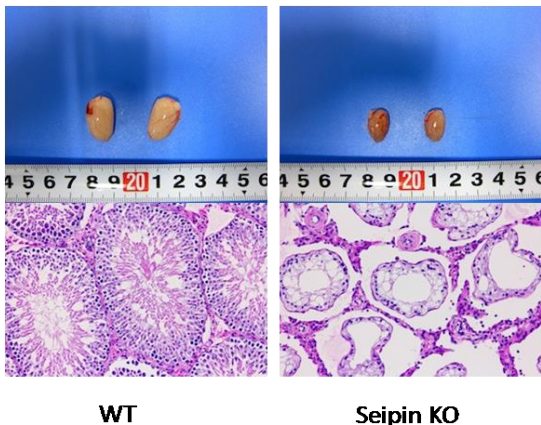


図4 セイピン欠損ラットの精巣



セイピン欠損ラットの胎児線維芽細胞の脂

肪細胞への分化誘導実験にて初期は脂肪分化能を有するものの後期において脂肪蓄積能が失われることを見出した。またセイピン欠損ラットから胎児線維芽細胞培養系を確立し、脂肪分化誘導を行い、誘導後7日目には一時的に脂肪細胞に脂肪蓄積を認めるものの、長期的には脂肪蓄積を維持しないことを明らかにした。

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3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 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
- ③ 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

〔学会発表〕（計12件）

- ① 海老原 健、肥満症治療におけるレプチンの可能性、第33回日本肥満学会、2012年10月11日-12日、京都市
- ② 阿部 恵、Development of Leptin Deficient Rats-Evidence of Superiority Over Lepob/Lepob Mice as a Model For Human Obesity, 19th European

- Congress on Obesity、2012年5月9日
ー12日、リヨン(フランス)
- ③ 阿部 恵、Development of leptin deficient *Lep^{mkyo}*/*Lep^{mkyo}* rat-evidence for its superiority over *Lep^{ob}*/*Lep^{ob}* mouse as a model for human obesity、15th International & 14th European Congress of Endocrinology、2012年5月5日ー9日、フィレンツェ(イタリア)
- ④ 阿部 恵、Dual Bioimpedanc 法を用いた内臓脂肪量測定装置のスクリーニング機器としての有用性、第85回日本内分泌学会学術総会、2012年4月19日ー21日、名古屋市
- ⑤ 海老原 健、遺伝子改変ラットの解析とトランスレショナルサイエンス、第47回高血圧関連疾患モデル学会学術総会、2011年9月6日ー7日、札幌市
- ⑥ 阿部 恵、レプチン欠損 ob/ob ラットの開発と糖脂質代謝解析、第54回日本糖尿病学会年次学術集会、2011年5月19日ー21日、札幌市
- ⑦ 阿部 恵、糖脂質代謝におけるレプチンの病態生理的意義に関する種族差の検討ーレプチン欠損 ob/ob ラットの開発と解析ー、第84回日本内分泌学会学術総会、2011年4月21日ー23日、神戸市
- ⑧ 海老原 健、Species difference of leptin effect between mouse and rat - Generation and analysis of ob/ob rat-、Keystone symposium、2011年1月12日ー17日、キーストーン(アメリカ)
- ⑨ 阿部 恵、Investigation of physiological role of leptin in obesity induced hypertension using a new rat model、第33回日本高血圧学会総会、2010年10月15日ー17日、福岡市
- ⑩ 阿部 恵、新規遺伝子変異動物作成技術を用いたレプチン遺伝子変異ラットの開発、第31回日本肥満学会、2010年10月1日ー2日、前橋市
- ⑪ 阿部 恵、Generation of a genetically obese leptin deficient rat、11th International Congress on Obesity、2010年7月11日ー15日、ストックホルム(スウェーデン)
- ⑫ 阿部 恵、Generation of a genetically obese leptin deficient rat、70nd scientific sessions American Diabetes Association、2010年6月25日ー29日、オーランド(アメリカ)

[図書] (計0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]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 恵 (ABE MEGUMI)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 20568688

(2) 研究分担者

海老原 健 (EBIHARA KEN)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 70362514