

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430101

研究課題名(和文) インスリン分泌不全型糖尿病モデルラットを用いて脂肪蓄積遺伝子を同定する

研究課題名(英文) Genetic linkage analysis and identification of obesity-related gene in LEA rat

研究代表者

岡村 匡史 (OKAMURA, TADASHI)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・実験動物管理室長

研究者番号：00333790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：LEAラットは先天性なインスリン分泌不全に起因する非肥満型糖尿病モデルであり、さらに尿細管上皮細胞が特異的に変性するため腎性糖尿を発症する。それに加え、LEAラットには、抗肥満遺伝子が存在することが示唆されたため、正常系統のBNラット第10染色体の一部をLEAラットに導入したコンジエニック系統を用いて、遺伝学的解析を行ったところ、肥満遺伝子はラット第10染色体上に存在することが明らかとなった。さらに、次世代シーケンサーを用いた解析により、1つの候補遺伝子変異を同定した。

研究成果の概要(英文)：The LEA rat has been recently established as a novel, non-obese animal model for type 2 diabetes. In LEA rats, the disappearance of tubular epithelial cell layer associated with thickening of basement membrane were evident in renal proximal tubules, resulting in renal glucosuria. Genome-wide linkage analysis indicated that causative gene for glucoseuria was located on rat Chr.10. During the process to identify the causative gene for glucoseuria, we established a congenic strain carrying the BN rat-derived Chr.10 segment on the LEA rat genetic background. The body weight and the accumulation of intraabdominal fat of congenic strain were significantly increased compared with those of the LEA rat, suggesting obesity-related gene(s) were located in rat Chr.10. One candidate gene mutation associated with obesity has been identified by whole genome sequencing of LEA rat.

研究分野：実験動物学

キーワード：LEAラット 肥満 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

2010年の国民健康・栄養調査によると、20歳以上の日本人における肥満者（BMI 25以上）の割合は、男性 30.4%、女性 21.1%であり、男性では過去 30年間でその割合はほぼ一定した増加傾向である。近年、食生活やライフスタイルの欧米化に伴い、肥満が増加しており、肥満特に内臓脂肪の蓄積はメタリックシンドロームの重要な危険因子である。肥満は遺伝因子と環境因子が複雑に絡み合う多因子疾患であり、その原因も多岐にわたるため環境因子を十分にコントロールできないヒトでの研究には、限界がある。

インスリン分泌不全型糖尿病モデルである LEA ラットは、先天的なインスリン分泌不全に加え、加齢と共に膵β細胞の線維化が進行し、耐糖能が悪化する。経口糖負荷後血糖値および尿糖に関する量的形質遺伝子座（QTL）解析により、インスリン分泌不全の原因遺伝子は第 1 染色体、腎尿細管上皮変性は第 10 染色体に存在することがわかっている。また、LEA ラットでは第 10 染色体に存在するシスチントランスポーターをコードするシスチノシン（Ctns）遺伝子に変異があり、細胞内リソソームにシスチンが蓄積することにより、腎尿細管上皮変性が引き起こされる。

LEA ラットの Ctns 遺伝子変異を同定する過程で、正常系統である BN ラットの第 10 染色体の一部を LEA ラットに導入したコンジェニック系統を作成したところ、コンジェニック系統の体重は、LEA ラットに比べて有意に増加していた。両系統間で摂餌量に有意な差はないことから、ラット第 10 染色体には、肥満に関連する遺伝子が存在することが示唆された。

2. 研究の目的

LEA ラットは、BN ラットの第 10 染色体の一部を LEA ラットに導入したコンジェニック系統に比べ、有意に体重が減少していることから、LEA ラット第 10 染色体には、抗肥満遺伝子の存在が示唆されている。本研究は、次世代シーケンサーを用いた網羅的な塩基解読により、LEA ラットに存在する抗肥満遺伝子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

LEA ラットと BN ラットの第 10 染色体の一部を LEA ラットに導入したコンジェニック系統を交配し、LEA ラットと BN ラットで多型が確認できたマイクロサテライトマーカー 128 個を用いて遺伝子型判定を行い、最も組換え立の高い個体を選抜し、サブコンジェニック系統を作出した。腹腔内脂肪量は、実験動物用 X 線 CT 装置（Latheta LCT-100、Hitachi）を用いて CT 画像を撮像し、腹腔内脂肪量を定量した。LEA ラットおよび BN ラットの肝臓および腎臓から抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行い、次世代シ

ークエンサーを用いて LEA ラットの全ゲノムシーケンスを行った。

すべての動物実験は、国立国際医療研究センター動物実験委員会の承認後、“国立国際医療研究センター動物実験等に関する規則”に従って行われた。

4. 研究成果

(1) X 線 CT 装置を用いた腹腔内脂肪量解析

正常系統である BN ラットの第 10 染色体の一部（約 36.8Mb）を LEA ラットに導入したコンジェニック系統の体重は、10、20 および 30 週齢で LEA ラットに比べて有意に増加していた。両系統で蓄積する脂肪量に差があることが予想されたため、実験動物用 X 線 CT 装置を用いて、ラットの腹腔内脂肪量を測定した。その結果、20 週齢の LEA ラットの腹腔内脂肪量は、コンジェニック系統に比べ約 1/3 程度であり、LEA ラットは腹腔内脂肪蓄積が顕著に少ないことが明らかとなった。これらのことから、ラット第 10 染色体（約 36.8Mb）には、腹腔内脂肪の蓄積をコントロールする遺伝子が存在することが明らかとなった。

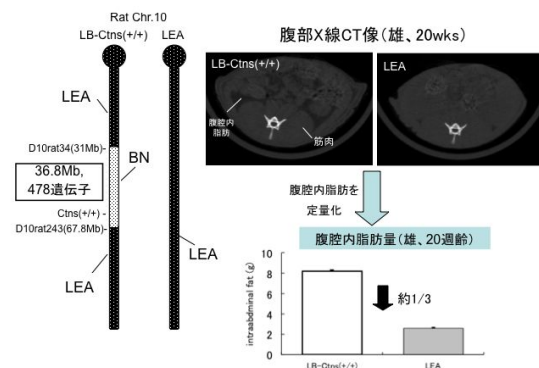


図1 LEAラットの腹腔内脂肪量は、顕著に少ない

(2) サブコンジェニック系統の樹立

ラット第 10 染色体には、LEA ラットの腎性糖尿の原因遺伝子であるシスチノシン（Ctns）遺伝子が存在する。Ctns 遺伝子が原因遺伝子として報告されているシスチノーシス患者では、成長遅延が見られるため、Ctns 遺伝子変異が抗肥満の原因であることが考えられた。その可能性を排除するため、正常な Ctns 遺伝子を含む BN ラットの 3.16Mb を LEA ラットに導入したサブコンジェニックラットを作製し、X 線 CT 装置を用いて腹腔内脂肪を定量した。その結果、サブコンジェニック系統では、LEA ラットと同様、体重および腹腔内脂肪量の蓄積は、有意に減少していた。このことから、抗肥満遺伝子は、ラット第 10 染色体上の Ctns 遺伝子を含む 3.16Mb を除いた 28.94Mb（385 遺伝子）に存在することが明らかになった。

(3) マイクロアレイによる遺伝子発現解析

マイクロアレイ解析を行った結果、候補領

域内で発現量が 2 倍以上であった遺伝子は、8 週齢の肝臓で 9 遺伝子（増加：7 遺伝子、減少：2 遺伝子）、24 週齢の肝臓で 2 遺伝子（減少：2 遺伝子）であった。さらに腎臓においては 8 週齢で 6 遺伝子（増加：3 遺伝子、減少：3 遺伝子）、24 週齢で 8 遺伝子（増加：4 遺伝子、減少：4 遺伝子）であった。

(3)全ゲノムシーケンスによる遺伝子変異解析

抗肥満遺伝子を同定するため、次世代シーケンサーを用いて LEA ラット全ゲノム配列を解読した。その結果、第 10 染色体上の候補領域内に合計 210 個（108 遺伝子）の機能的に重要だと推測される遺伝子変異が同定された。その変異の中には嗅覚受容体の変異が 73 変異（33 遺伝子）存在しており、それらを除外すると疾患候補遺伝子は 75 遺伝子であった。さらに、遺伝子の機能が著しく低下すると予想される、annotation impact “high”である変異は 3 遺伝子のみであった（図 2）。そのうち、肥満あるいはインスリン抵抗性と関連が予想される遺伝子は 1 つであり、その遺伝子はマイクロアレイ解析においても、コントロールに比べ LEA ラット肝臓では 2 倍以上発現量が低下していた。

本研究により LEA ラットに存在する抗肥満遺伝子の候補遺伝子を 1 つ同定した。この遺伝子の変異は、エクソン/イントロンジャンクションに 1 塩基が挿入されているため、スプライシングエラーにより機能が喪失していることが予想される。現在、この候補遺伝子の機能解析を進めており、LEA ラットの抗肥満メカニズムを解明すると共に、新たな創薬標的になり得るかの検討を行っている。

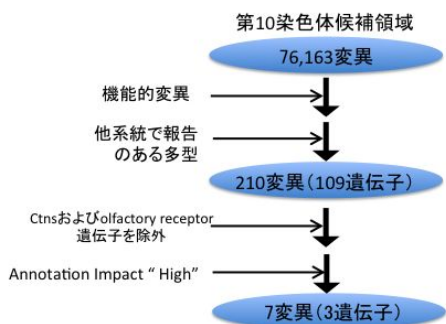


図2 NGS解析からの遺伝子変異の絞り込み

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. Takahashi E, Hiroyuki Unoki-Kubota H, Yukiko Shimizu Y, Okamura T, Iwata W, Kajio H, Yamamoto-Honda R, Shiga T, Yamashita S, Tobe K, Okumura A,

- Matsumoto M, Yasuda K, Noda M and Kaburagi Y. Proteomic Analysis of Serum Biomarkers for Pre-Diabetes Using the LEA Rat, a Spontaneous Animal Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Investig.* Feb 2.(2017) doi: 10.1111/jdi.12638. (査読有り)
2. Marusugi K, Nakano K, Sasaki H, Kimura J, Yanobu-Takanashi R, Okamura T, Sasaki N. Functional validation of tensin2 SH2-PTB domain by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *J. Vet. Med. Sci.* 78, 1413-1420 (2016) doi:10.1292/jvms.16-0205 May 30(査読有り)
3. Sugiyama K, Sasano T, Kurokawa J, Takahashi K, Okamura T, Kato N, Isobe M, Furukawa T. Oxidative Stress Induced Ventricular Arrhythmia and Impairment of Cardiac Function in Nos1ap Deleted Mice. *Int Heart J.* 57, 341-349 (2016) doi: 10.1536/ihj.15-471 May 9. (査読有り)
4. Hashidate-Yoshida T, Harayama T, Hishikawa D, Morimoto R, Hamano F, Tokuoka SM, Eto M, Tamura-Nakano M, Yanobu-Takanashi R, Mukumoto Y, Kiyonari H, Okamura T, Kita Y, Shindou H, Shimizu T. Fatty acid remodeling by LPCAT3 enriches arachidonate in phospholipid membranes and regulates triglyceride transport. *eLife* 4: e06328 (2015) doi: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.06328> (査読有り)

〔学会発表〕（計 8 件）

1. 清水有紀子、大熊喜彰、岡村匡史、七野浩之：シスチノーシスの確定診断に用いるシスチン分析法の確立、第 58 回日本先天代謝異常学会/第 14 回アジア先天代謝異常シンポジウム、新宿、2016 年 10 月
2. 清水有紀子、高梨理絵子、中野 堅太、大熊喜彰、岡村匡史：シスチノーシスモデルラットを用いた白血球中シスチン測定法の確立、第 159 回日本獣医学会学術集会、藤沢、2016 年 9 月
3. 清水有紀子、大熊喜彰、岡村匡史：LC/MS/MS による白血球中のシスチン定量法、第 63 回日本実験動物学会総会、川崎、2016 年 5 月
4. 岡村匡史：肥満研究における非肥満型糖尿病モデル LEA ラットの有用性、第 30 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会（スポンサーシンポジウム 1）、大宮、2016 年 3 月
5. 岡村匡史：様々な変異を有する LEA ラットの有用性、第 9 回ラットリサーチリソース研究会、京都、2016 年 1 月
6. 清水有紀子、高梨理絵子、岡村匡史：LEA ラットにおける抗肥満遺伝子の探索、第 62 回日本実験動物学会総会、京都、2015 年 5 月

7. 岡村匡史、笠井憲雪：ユニークな糖尿病モデルLEAラットの有用性、第157回日本獣医学会学術集会（実験動物医学会シンポジウム）、札幌、2014年9月
8. 清水有紀子、高梨理絵子、金井孝夫、岡村匡史：新規シスチン蓄積症モデルラットの樹立、第61回日本実験動物科学技術2014、札幌、2014年5月

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡村 匡史 (OKAMURA Tadashi)
国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・室長
研究者番号：00333790

(2)連携研究者

清水 有紀子 (SHIMIZU Yukiko)
国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所設・技術職員
研究者番号：00469983