

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461335

研究課題名(和文) 遺伝子改変ラットを用いたPPAR γ のエネルギー代謝における機能的意義の解明研究課題名(英文) Elucidation of functional significance of PPAR γ on energy metabolism using PPAR γ mutant rats.

研究代表者

阿部 恵 (AIZAWA-ABE, Megumi)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第3研究部・研究員

研究者番号：20568688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪細胞の分化を制御する核内受容体転写因子であるペルキシソーム増殖剤応答性受容体PPAR γ はマウスとヒトではリガンド刺激による糖代謝変化が異なることが知られていた。我々はラットでPPAR γ の機能を減弱させて対照と比較した。個体及び各インスリン作用臓器でのインスリン抵抗性が増大し、皮下脂肪および精巣周囲脂肪優位に白色脂肪細胞の大きさが増大かつ不均一化した。さらに高脂肪食負荷によって肝臓内脂肪蓄積も増加した。我々はラットにおいてPPAR γ が十分量存在することが正常な脂肪細胞数・形態維持、および糖代謝に必要であることを明らかにし、PPAR γ における研究において種差も重要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Agonist-induced activation of peroxisome proliferator-activated receptor-(PPAR γ) stimulates adipocyte differentiation and insulin sensitivity. In the context of the interspecies intranslatability of PPAR γ -related findings, we generated a PPAR γ mutant rat with a loss-of-function mutation. Heterozygous rats showed reduced fat mass with adipocyte hypertrophy and insulin resistance, which were highly predictable from known actions of PPAR γ agonists and phenotypes of patients with the PPAR γ mutation. We demonstrate that both alleles of PPAR γ are required for normal adipocyte development and insulin sensitivity in vivo. Furthermore, the study indicates that PPAR γ regulates mainly adipocyte number rather than adipocyte size in vivo. The choice of appropriate species as experimental models is critical, especially for the study of PPAR γ .

研究分野：代謝

キーワード：PPAR ラットモデル 糖代謝 脂肪細胞分化 種差

1. 研究開始当初の背景

医薬に開発においてヒトへの臨床応用段階で動物では予測されない結果が得られることも多く、種差による病態の違いの重要性が最近ますます認識されるようになった。申請者らはいち早くその重要性を認識し、マウスとは同じげっ歯類でも進化・遺伝学的に異なるラットに着目し、疾患モデルラットの構築を行ってきた。申請者らはこれまでに、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レプチン欠損ラット(Lepmkyo/Lepmkyo ラット)の開発(Aizawa-Abe et al. *Physiol. Genomics*,2013)や全身性脂肪萎縮症の原因遺伝子であるセイピン遺伝子にナンセンス変異を有するセイピン欠損ラット(SKO ラット)を開発、解析した。核内受容体転写因子ペルキシソーム増殖剤応答性受容体PPAR γ (Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma)はDNAに直接結合しmRNAの発現を制御する転写因子であり、脂肪細胞のマスターレギュレーターとして糖代謝を制御する。PPAR γ はチアゾリジン誘導体などの外因性リガンドおよび複数の内因性リガンドが直接結合することで機能を発揮し、外因性リガンドのチアゾリジン誘導体は脂肪細胞の分化を伴って血糖を低下させる。しかし、生体のエネルギー代謝におけるPPAR γ の役割、特に肥満の病態におけるPPAR γ の役割にはまだ解明されていないことが多く残されており、肥満の病態を制御するためにはそのさらなる解明が期待される。PPAR γ の歴史を辿ると、PPAR γ がオーファン受容体として発見され、その重要性が認識され始めた1990年代は、マウスES細胞の樹立により遺伝子改変動物の作成がマウスで発達した時期であった。そのために生体におけるPPAR γ の基礎研究はそのほとんどがマウスを用いた研究であった。一連のマウスの研究か

らPPAR γ の外因性リガンドチアゾリジン誘導体は肝臓のPPAR γ の発現を亢進させ、脂肪肝を増悪させることが明らかになった。しかし、ヒトではチアゾリジン誘導体は脂肪肝を改善させることが明らかになり (Belfort.R et al. *N Engl J Med.*,2006)、肥満病態におけるチアゾリジン誘導体の作用に種差があることが示唆された。そこで、申請者らは、新規に作成した脂肪肝を呈すLepmkyo/Lepmkyo ラットにチアゾリジン誘導体を4週間腹腔内投与したところ、驚いたことに、脂肪肝は著しい改善を認め、チアゾリジン誘導体によって脂肪肝が増悪したマウスと正反対の結果となり (図1)、チアゾリジン作用には種差が存在することが確認された。さらに種による肝臓におけるPPAR γ 受容体発現の違いを確認した。この事実をもとに、チアゾリジン誘導体以外にもこれまでマウスにおいて報告されているPPAR γ を制御する因子、PPAR γ によって制御される因子およびPPAR γ そのものの生体における意義、特に肥満病態のエネルギー代謝における意義について再考することが必要であると考えた。そこで、申請者らはこれまでに構築してきた遺伝子改変ラットの系と同様の方法からPPAR γ 遺伝子ヘテロ変異ラットの作成を試みた。本研究では、PPAR γ の生体における意義をラットの系を用いて解析しPPAR γ 系を利用した新しい診断方法や治療薬への臨床応用に展開するための基盤研究を行う。計画を進めていく上で、申請者はENU ミュータジェネシスによってDNA結合部位にあたるC163P変異を有するPPAR γ 遺伝子ヘテロ変異ラット(F344-PparC163P/+ ラット)を開発し、PparC163P/+ ラット同志の交配においてホモ変異ラットは胎生致死であるという予備的な研究結果を得ている。

2. 研究の目的

我々はこれまでにラットモデルを開発し、エネルギー代謝に関わる遺伝子変異に伴う表現型がマウスと異なることを見出した。ヒトや

ラットではチアゾリジン誘導体の投与により脂肪肝が改善するのに対してマウスでは増悪が認められるという正反対の結果が報告されており、PPAR γ のエネルギー代謝調節における臨床的意義を検討する上でマウスモデルは不向きであると考えられる。そこで本研究ではPPAR γ 遺伝子変異ラットを用いてPPAR γ のエネルギー代謝調節における臨床的意義を検討する。

3. 研究の方法

ENUによる遺伝子変異導入し、精子保存した4,608匹のF344/NSlcラットのアーカイブ Kyoto University Rat Mutant Archive (KURMA) から Mu Transposition Pooling Method With Sequencer (MuT-POWER)法を用いて *Pparg* 遺伝子変異 C193F を持つラットを得た。6世代以上バッククロスを行った。PCRによるジェノタイピングを行い、雌雄ラットを用いた。脂肪食負荷試験においては8週目から16週目まで脂肪含有率60%の脂肪負荷食で飼育した。ピオグリタゾン投与試験では8週齢から16週齢までピオグリタゾン3 mg/kg を傾向投与(0.7 mL)を行った。変異ラットと対照ラットの脂肪組織RNAからPPAR γ 2とC193F変異cDNAプラスミドを作成した。Hek293細胞を用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行いPPAR γ リガンドによって誘導される転写活性およびドミナントネガティブ作用の有無を確認した。ルシフェラーゼレポーターアッセイはSignal PPAR Reporter (luc) Kit (QIAGEN)を用いた。ChIPアッセイはpTARGET-3xFLAG-WT PPAR γ 2, or pTARGET-3xFLAG-C193F PPAR γ 2をHek293細胞に導入し、ピオグリタゾンで刺激6時間後にクロマチンを回収し、抗-FLAG mouse IgG抗体で免疫沈降を行い、lipoprotein lipase (LPL) および perilipin 2/ adipose differentiation related protein (PLIN2/ADRP) promoters に対するプライマーを用いて定量的 real-time PCR を施行した。また変異ラッ

トと対照ラットの胎児線維芽細胞の初代培養を行い脂肪分化能を比較した。ラットの体組成はLa Theta LCT-100で撮影したcomputed tomography (CT)を用いて行った。16週目で腹腔内ブドウ糖負荷試験では腹腔内に2.0 g/kgブドウ糖投与、インスリン負荷試験では0.75 IU/kgのインスリンを投与した。16週齢のラットを解剖し組織重量の測定、褐色脂肪細胞、皮下脂肪、腸間膜脂肪、精巣周囲脂肪の一部をホルマリン固定して組織学的検討、脂肪細胞の断面積測定、細胞数測定を行った。また、肝臓内中性脂肪含有量を測定した。脂肪組織のRNAを抽出、PPAR γ によって誘導される複数の遺伝子 *Fsp2*, *Adipoq*, *Cd36*, *Fabp4*, *Plin1* 発現をqPCRで検討した。寒冷刺激試験は4に24時間暴露した後、褐色脂肪細胞を採取して *UCP1* 発現をqPCRで検討した。

4. 研究成果

PPAR 遺伝子は脂肪細胞分化を担う主要遺伝子であり糖代謝調節にも深く関与する。本研究ではDNA結合領域にC163F変異を有するPPAR 遺伝子ヘテロ変異ラットを用いて、生体におけるPPAR の脂肪細胞分化およびエネルギー代謝調節における臨床的意義を検討した。これまでにこのPPAR 遺伝子のC163F変異によって実際にPPAR リガンドによって誘導される転写活性が低下していることをルシフェラーゼレポーターアッセイによって確認した。また、ChIPアッセイによりPPAR リガンドによって誘導されるLPL遺伝子、ADRP遺伝子のプロモーター領域への結合がないことを確認し、このPPAR 遺伝子ヘテロ変異ラットがPPAR の転写活性を減弱させたhaplo-insufficientラットモデルであることを確認した。PPAR 遺伝子ヘテロ変異ラットは雌雄ともに対照ラットと体重、摂食量に有意な差を認めず、高脂肪食飼育を行ってもこれらに有意差を

認めなかった。通常食飼育の PPAR 遺伝子ヘテロ変異ラットでは CT で測定した全身の総脂肪量、皮下脂肪量、腹腔内脂肪量は減少していたが高脂肪食で飼育するとその違いは消失した。また PPAR 遺伝子ヘテロ変異ラットでは精巣周囲脂肪量は減少していたが、腸間膜脂肪量には差を認めなかったことから PPAR の転写活性の影響は脂肪組織の部位によって異なることが示唆された。さらに脂肪細胞の大きさを検討すると、通常食飼育の PPAR 遺伝子ヘテロ変異ラットの脂肪細胞 1 個あたりの平均断面積は精巣周囲脂肪組織、腸間膜脂肪組織では増大し、皮下脂肪組織では差を認めないものの、いずれの脂肪組織でも脂肪細胞の大きさが不均一化し、大きい脂肪細胞が増加していた。高脂肪食飼育ではいずれの部位の脂肪組織においても PPAR 遺伝子ヘテロ変異ラットの脂肪細胞の 1 個あたりの平均断面積は増大し、同様に脂肪細胞の大きさの不均一化し、大きい脂肪細胞が増加した。脂肪細胞分化に対する PPAR の転写活性減弱の影響を調べるために PPAR 遺伝子ヘテロ変異ラットの皮膚線維芽細胞を脂肪細胞に分化誘導を行ったところ、分化脂肪細胞は対照ラットより減少していた。また、通常食飼育では肝臓重量には差はないものの、PPAR 遺伝子ヘテロ変異ラットでは肝細胞内に脂肪滴を認め中性脂肪含有量は有意に高く、高脂肪食飼育では肝臓重量、中性脂肪含有量ともに多かった。CT で測定した全身の骨格筋重量および腓腹筋内中性脂肪含有量は通常食飼育では差はないものの高脂肪食飼育では PPAR 遺伝子ヘテロ変異ラットの方が多く、腓腹筋内中性脂肪含有量は多かった。糖代謝においては、空腹時血糖値およびインスリン濃度は通常食では差がなかったが、高脂肪食飼育ではインスリン濃度の上昇を認め、インスリン抵抗性の増大が示唆され

た。ブドウ糖腹腔内負荷試験では通常食飼育でも PPAR 遺伝子ヘテロ変異ラットの耐糖能の低下を認め、高脂肪食飼育ではその違いはより顕著になった。インスリン負荷試験では通常食飼育では差を認めなかったが、高脂肪食飼育では血糖低下率が小さくなり、インスリン抵抗性の増大が示唆された。この脂肪食飼育における PPAR 遺伝子ヘテロ変異ラットのインスリン抵抗性の増大が肝臓、脂肪細胞（皮下脂肪、精巣周囲脂肪、腸間膜）、骨格筋のどの部位のインスリンシグナルの低下によるものかを明らかにするためにインスリン刺激による IRS1 と Akt のリン酸化を検討したところ、いずれの部位においてもほぼ同様に IRS1 と Akt のリン酸化は低下しており、特定の部位ではなくすべてのインスリン作用臓器のインスリンシグナルが低下していることが明らかになった。脂質代謝においては血漿中性脂肪、遊離脂肪酸、総コレステロールいずれも差を認めなかった。褐色脂肪細胞については肉眼所見、重量に差を認めず、寒冷刺激によっても重量変化や脂質含有量、UCP1 遺伝子発現に差を認めなかったことから、褐色脂肪細胞に対する PPAR の転写活性減弱の影響はほとんどないと考えられた。PPAR 遺伝子ヘテロ変異ラットに見られた表現型が PPAR リガンドであるピオグリタゾン投与することによってどのように変化するかを検討するために高脂肪食飼育 PPAR 遺伝子ヘテロ変異ラットに対してピオグリタゾンの経口投与を 8 週間行った。CT で測定した全身の皮下脂肪、腹腔内脂肪量が著明に増加し、組織所見では腸間膜脂肪量は変化なかったが、精巣周囲脂肪量を増加させた。また皮下脂肪の脂肪細胞 1 個あたりの断面積を縮小させたことから、脂肪細胞の数の増加が示唆された。肝臓重量、CT で測定した全身の骨格筋重量には差がなかったが、肝臓および骨格筋

内中性脂肪含有量は減少した。空腹時血糖値およびインスリン濃度は低下し、インスリン感受性が改善した。ピオグリタゾン投与によるインスリン感受性改善は脂肪細胞数の増加、機能改善および肝臓および骨格筋内中性脂肪含有量減少によることが示唆された。

高脂肪食飼育によって引き起こされた PPAR 遺伝子ヘテロ変異ラットの表現型がどのような分子機構によって各インスリン感受性臓器に關与しているのかを明らかにするために肝臓、骨格筋、脂肪細胞における PPAR によって誘導される複数の遺伝子 *Fsp2*、*Adipoq*、*Cd36*、*Fabp4*、*Plin1* 発現を検討した。通常食飼育ではこれらの遺伝子発現はどの臓器でも差がなかった。

高脂肪食飼育によって対照ラットは脂肪組織においてこれらの遺伝子すべてが発現増加したが、PPAR 遺伝子ヘテロ変異ラットでは発現増加が認められなかった。肝臓、骨格筋ではこれらの遺伝子発現に変化は認められなかった。本研究において PPAR

の転写活性能を減弱させた haplo-insufficient ラットモデルを用いることで PPAR の転写活性能を減弱の病態生理的意義を明らかにした。脂肪重量に差がないにも関わらず脂肪細胞が不均一化して大きい脂肪細胞が増えていたことは脂肪細胞数が減少して代償的に不均一に脂肪蓄積した結果であることが示唆され、PPAR

の十分量の転写活性が正常な脂肪蓄積能を有する成熟脂肪細胞への分化に必要であることを明らかにした。また、脂肪の部位により PPAR の転写活性の影響は異なり、白色脂肪細胞の中でも皮下脂肪組織、精巣周囲脂肪組織に重要であり、腸間膜脂肪組織に対する影響は少ないことが示唆された。また褐色脂肪組織に対する影響もほとんどないことが示唆された。

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 1 件)

Fat Mass Reduction With Adipocyte

Hypertrophy and Insulin Resistance in

Heterozygous PPAR γ Mutant Rats.

Gumbilai V, Ebihara K, Aizawa-Abe M,

Ebihara C, Zhao M, Yamamoto Y, Mashimo T,

Hosoda K, Serikawa T, Nakao K.

Diabetes 65:2954-2965, 2016

〔学会発表〕(計 1 件)

阿部恵、海老原健、他 9 名、「PPAR 遺伝子ヘテロ変異ラットの作成と解析」2016 年 10 月 7 日、第 37 回日本肥満学会一般口演、東京都江東区

〔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

阿部 恵 (AIZAWA-ABE, Megumi)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第 3

研究部・研究員

研究者番号：20568688

(2) 研究分担者

海老原 健 (EBIHARA, Ken)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70362514