

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

新規遺伝子変異ラット作製技術に基づく生活習慣病・難治性疾患モデルラットの開発
－高血圧、腎臓病モデル遺伝子変異ラット開発－

分担研究者：横井 秀基

京都大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科 助教

研究要旨 本研究課題は、新規開発した標的遺伝子変異ラット開発システムを用いて、生活習慣病や難治性疾患に関連する複数の遺伝子変異ラットを開発し、新規生活習慣病・難治性疾患モデルラットを樹立し、従来マウスにおいて実施・解析が困難であった系統的な生理学的解析、移植実験、薬理薬効評価解析などの施行を容易にする事により、生活習慣病関連疾患、難治性疾患の病態解明、新規治療標的の同定および創薬開発を加速させることを目的とする。本年度は、研究分担者である芹川、真下らが開発した遺伝子変異ラット樹立技術を用いて、高血圧、腎臓病に関連した生活習慣病・難治性疾患関連遺伝子変異ラットのスクリーニングを行った。結果、ナトリウム利尿ペプチド受容体遺伝子のミスセンス変異体を同定し、同遺伝子変異ラットの系統樹立に成功し、解析を行った。

A. 研究目的

現在生活習慣病関連疾患である心筋梗塞、心不全、糖尿病、脳卒中、慢性腎臓病(CKD)などの病態解明、新規治療標的の同定に基づく新規治療薬、治療法開発が望まれている。現在これら疾患の病態解析、創薬開発、再生医療研究には遺伝子改変技術が確立されているマウスがモデル動物として多く用いられているが、マウスはその小ささゆえに採血や組織採取(脾臓、中枢神経系)が困難であること、生理学的解析や移植実験が行ないにくいなどの問題がある。さらに、最近では代謝面においてヒトと大きく異なる生理的特徴が明らかとなった

(Vassilopoulos, et al. Science 2009)。そのため、マウスと比べ体のサイズが大きく、採血や組織採取や系統的な生理学的解析が容易で、移植実験も行ないやすく、代謝面でもよりヒトに近いラットでの疾患モデル確立が期待されている。しかし、現時点ではES細胞の技術がラットで未確立のため、遺伝子改変ラットの効率的な作成は不可能である。最近研究分担者である芹川、真下らはENUミュータジェネシスに、新規DNAスクリーニング法(MuT-power)、凍結精子アーカイブからの個体還元技術(ICSI)という一連の新規技術を組み合わせることにより、標的遺伝子変異ラットの効率的な作成システム構築に成功した。本研究課題では、このシステムを用いて生活習慣病関連・難治性疾患遺伝子変異ラットをスクリーニングし、その表現系を解析することにより高血圧、CKDなどの新

規生活習慣病モデルラットを開発し、その詳細な解析を通して病態解明、新規治療標的の同定を行なうと共に、このモデルを用いた新規創薬開発を加速させることを目的とする。

B. 研究方法

本年度は、生活習慣病・難治性疾患関連遺伝子に関するENUミュータジェネシスによる約1600匹分のラットミュータントアーカイブの高速DNAスクリーニングを開始した。候補遺伝子としては高血圧モデルとしてナトリウム利尿ペプチド関連遺伝子、腎臓病としてpodocin, TRPC6遺伝子などをスクリーニング開始した。具体的にはそれぞれの標的遺伝子のcoding領域に対応するprimer setを作製し、ENUミュータジェネシスを行なったラットの遺伝子アーカイブから新規変異DNAスクリーニング法(MuT-POWER法)を用いてスクリーニングを行なった。この方法はDNA mismatches部位に特異的かつ短時間に挿入されるトランスポゾンMuの性質を利用し、さらにプルダウンおよび蛍光標識DNAを組み合わせることにより短時間かつ低コストで変異DNAのスクリーニング、変異ラットの同定を可能としたものである。このスクリーニングにより候補遺伝子の変異が見つかった場合は新規開発した個体還元技術ICSIを用いて標的遺伝子変異ラットを樹立していく。これらの過程はひとつの遺伝子のスクリーニング開始から、変異の同定、変異ラットの樹立までおよそ6ヶ月から1年で行なえる。

現時点ではすでに年間およそ100primer setのスクリーニングが可能であるが、今後機器の充実などを行なうことによりそのスピードを現状の3倍にまでアップする予定である。またこれら実験動物を用いる研究に際しては「動物の愛護および管理に関する法律」（平成17年6月改正法）、「京都大学における動物実験の実施に関する規程」および「京都大学大学院医学研究科・医学部における動物実験の実施に関する規程」（いずれも平成19年4月改訂）を遵守して実施し、動物に与える苦痛を最小限にとどめるように最善の配慮を尽くしている。

C. 研究結果

本年度は、生活習慣病・難治性疾患関連遺伝子に関するENUミュータジェネシスによる約1600匹分のラットミュータントアーカイブの高速DNAスクリーニングを開始した。候補遺伝子としては高血圧モデルとしてナトリウム利尿ペプチド関連遺伝子、腎臓病モデルとしてpodocin, TRPC6遺伝子などをスクリーニング開始した。これらスクリーニングの結果、ナトリウム利尿ペプチド1型受容体遺伝子(GC-A)のミスセンス変異を有するラットの同定に成功し、さらに新規開発した個体還元技術ICSIを用いて同遺伝子変異ラット系統樹立に成功した。このラットはナトリウム利尿ペプチド1型受容体のguanlyl cyclase domainに変異を有し、その活性の低下が予想されることから、このラットの表現系解析をおこなった。今後さらに表現系解析を継続する予定である。

D. 考察

生活習慣病関連疾患の病態解明においては複数の臓器における病態の同時進行的変化とそれに伴う液性因子を介した臓器間シグナルクロストーク解明が必須であり、またこれら病態には細胞老化も関与するため、その治療において細胞・臓器再生という観点も不可欠である。現在これら疾患の病態解析、創薬開発、再生医療研究には遺伝子改変技術が確立されているが、マウスはモデル動物として多く用いられているが、マウスはその小ささゆえに採血や組織採取が困難であること、生理学的解析や移植実験が行ないにくいなどの問題がある。そのため、マウスと比べ体のサイズが大きく、採血や組織

採取や系統的な生理学的解析が容易で、移植実験も行ないやすく、代謝面でもよりヒトに近いラットでの疾患モデル確立が期待されている。本研究により得られた遺伝子変異ラットの表現系を解析し、これら疾患のモデルラットを確立し、共同研究なども通じてその詳細な解析を行うことにより、今後、これら病態解明・新規治療標的の同定および新規創薬開発が加速されるものと考えている。

E. 結論

生活習慣病・難治性疾患関連遺伝子に関して、ENUミュータジェネシスによる約1600匹分のラットミュータントアーカイブの高速DNAスクリーニングを開始し、ナトリウム利尿ペプチド1型受容体遺伝子に変異を有するラットの作製に成功した。今後もスクリーニングを継続しつつ、本研究にて得られたナトリウム利尿ペプチド1型受容体遺伝子変異ラットの表現系を解析し、疾患モデルラットを確立し、病態解明・新規治療標的の同定と新規創薬開発を加速させる予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yokoi, H., Kasahara, M., Mori, K., Ogawa, Y., Kuwabara, T., Imamaki, H., Kawanishi, T., Koga, K., Ishii, A., Kato, Y., Mori, P. K., Toda, N., Ohno, S., Muramatsu, H., Muramatsu, T., Sugawara, A., Mukoyama, M., and Nakao, K. (2012). Pleiotrophin triggers inflammation and increased peritoneal permeability leading to peritoneal fibrosis. *Kidney Int.* 81, 160-169.
2. Naito, M., Fujikura, J., Ebihara, K., Miyanaga, F., Yokoi, H., Kusakabe, T., Yamamoto, Y., Son, C., Mukoyama, M., Hosoda, K., and Nakao, K. (2011). Therapeutic impact of leptin on diabetes, diabetic complications, and longevity in insulin-deficient diabetic mice. *Diabetes* 60, 2265-2273.
3. Maki, T., Ihara, M., Fujita, Y., Nambu, T., Miyashita, K., Yamada, M., Washida, K., Nishio, K., Ito, H., Harada, H., Yokoi, H., Arai, H., Itoh, H., Nakao, K., Takahashi, R., Tomimoto, H. (2011). Angiogenic and vasoprotective effects of adrenomedullin on prevention of cognitive decline after chronic

cerebral hypoperfusion in mice. Stroke 42, 1122-1128..

4. 学会発表

国際学会

1. T.Kuwabara, K.Mori, M.Mukoyama, M.Kasahara, H.Yokoi, Y.Saito, Y.Ogawa, H.Imamaki, T.kawanishi, A.Ishii, K.Koga, M.imanishi, A.Nishiyama, A.Sugawara, K.Nakao
Hyperlipidemia promotes diabetic renal injury via TLR4 signaling
World Congress of nephrology
Apr 8-12, 2011 Vancouver, Canada
2. K.Mori, M.Mukoyama, M.Kasahara, H.Yokoi, T.Kuwabara, H.Imamaki, T.kawanishi, A.Ishii, K.Koga, K.P.Mori, Y.Kato, A.Sugawara, K.Nakao
Incomplete tubular compensation model for albuminuria in diabetes
World Congress of nephrology
Apr 8-12, 2011 Vancouver, Canada
3. K.Mori, J.Kanda, M.Mukoyama, H.Kabata, M.Kasahara, H.Yokoi, T.Kuwabara, K.Nakao
The kidney and neutrophils are the major sources of acute kidney injury biomarker Ngal
World Congress of nephrology
Apr 8-12, 2011 Vancouver, Canada
4. H.Yokoi, M.Kasahara, M.Mukoyama, K.Mori, Y.Ogawa, T.Kuwabara, H.Imamaki, T.kawanishi, K.Koga, A.Ishii, Y.Kato, K.P.Mori, H.Muramatsu, T.Muramatsu, A.Sugawara, K.Nakao
Pleiotrophin causes peritoneal inflammation and mesothelial cell proliferation in a mouse model of peritoneal fibrosis
World Congress of nephrology
Apr 8-12, 2011 Vancouver, Canada
5. T.Kuwabara, K.Mori, M.Mukoyama, M.Kasahara, H.Yokoi, Y.Saito, H.Imamaki, T.kawanishi, A.Ishii, K.Koga, K.P.Mori, Y.Kato, A.Sugawara, K.Nakao
Toll-Like Receptor 4-Mediated, Hyperinsulinemia-Independent Progression of Diabetic Nephropathy by Hyperlipidemia.

American Diabetes Association
June 24-28, 2011 San Diego

6. T.Kuwabara, K.Mori, M.Mukoyama, M.Kasahara, H.Yokoi, Y.Saito, H.Imamaki, T.kawanishi, A.Ishii, K.Koga, K.P.Mori, Y.Kato, A.Sugawara, K.Nakao
Aggravation of diabetic nephropathy by hyperlipidemia is mediated by MRP8/TLR4 signaling in macrophages
American Society of Nephrology
Nov 11, 2011 Philadelphia
7. T.kawanishi, M.Kasahara, H.Yokoi, T.Kuwabara, H.Imamaki, A.Ishii, K.Koga, Y.Kato, K.P.Mori, K.Ueshima, S.Tanaka, S.Yanaka, A.Sugawara, K.Nakao
Urinary level of Ngal is superior to urinary protein in prediction of chronic kidney disease progression
American Society of Nephrology
Nov 11, 2011 Philadelphia
8. K.Koga, H.Yokoi, M.Mukoyama, K.Mori, M.Kasahara, T.Kuwabara, H.Imamaki, T.kawanishi, A.Ishii, K.P.Mori, Y.Kato, M.Saleem, A.Sugawara, K.Nakao
Functional analysis of miR-30c, miR-26a and miR-379 in podocytes and their potential roles in diabetic nephropathy
American Society of Nephrology
Nov 11, 2011 Philadelphia
9. Y.Kato, M.Mukoyama, H.Yokoi, Y.Ogawa, K.Mori, M.Kasahara, T.Kuwabara, H.Imamaki, T.kawanishi, A.Ishii, K.Koga, K.P.Mori, A.Sugawara, K.Nakao
Blockade of p38 MAPK pathway ameliorates aldosterone-induced renal injury in guanylyl cyclase-A deficient mice
American Society of Nephrology
Nov 12, 2011 Philadelphia

国内学会

1. 川西智子、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、栗原孝成、今牧博貴、菅原照、中尾一和
慢性腎臓病患者において尿中 Ngal は腎機能と逆相関し、尿蛋白より優れた予後予測因子である
第 108 回日本内科学会総会・講演会
2011 年 4 月 15-17 日 東京

2. 栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、齋藤陽子、今牧博貴、川西智子、石井輝、古賀健一、森慶太、加藤有希子、菅原照、中尾一和
脂質による macrophage の MRP8/TLR4 シグナル活性化は肥満・高インスリン血症非依存性に糖尿病腎症を悪化させる
第 48 回日本臨床分子医学会学術集会
2011 年 4 月 17 日 東京
3. 横井秀基、小川喜久、向山政志、加藤有希子、森 潔、笠原正登、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、古賀健一、石井輝、森慶太、菅原照、中尾一和
Guanylyl cyclase-A 欠損マウスにおけるアルドステロンによる腎傷害のアンジオテンシン II・酸化ストレスの関与
第 84 回日本内分分泌学会学術総会
2011 年 4 月 22 日 神戸
4. 栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、齋藤陽子、小川喜久、今牧博貴、川西智子、石井輝、古賀健一、森慶太、加藤有希子、菅原照、中尾一和
MRP8/TLR4 シグナルを介した高脂血症による糖尿病腎症の新規悪化機序
第 84 回日本内分分泌学会学術総会
2011 年 4 月 21-23 日 神戸
5. 石井輝、森 潔、阿部恵、川西智子、今牧博貴、海老原健、田中智洋、笠原正登、横井秀基、古賀健一、菅原照、向山政志、中尾一和
肝臓及び脂肪に発現する分泌シグナル Ngal の意義
第 84 回日本内分分泌学会学術総会
2011 年 4 月 21 日 神戸
6. 古賀健一、向山政志、横井秀基、森 潔、笠原正登、栗原孝成、小川喜久、今牧博貴、川西智子、石井輝、森慶太、加藤有希子、Saleem Moin A、菅原照、中尾一和
糖尿病性腎症モデルマウスおよび培養ヒト糸球体上皮細胞における miRNA の発現の検討
第 84 回日本内分分泌学会学術総会
2011 年 4 月 23 日 神戸
7. 森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、齋藤陽子、小川喜久、今牧博貴、川西智子、石井輝、古賀健一、森慶太、加藤有希子、菅原照、中尾一和
高脂血症による糖尿病腎症進展の分子機構
第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会
2011 年 5 月 19-21 日 札幌
8. 古賀健一、向山政志、横井秀基、森 潔、笠原正登、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、石井輝、森慶太、加藤有希子、Saleem Moin A、菅原照、中尾一和
microRNA の糖尿病性腎症モデルマウス糸球体における発現と培養ヒト糸球体上皮細胞における意義
第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会
2011 年 5 月 19-21 日 札幌
9. 森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、栗原孝成、中尾一和
AKI と CKD のバイオマーカー
第 54 回日本腎臓学会学術総会
2011 年 6 月 15-17 日 横浜
10. 横井秀基、笠原正登、森 潔、小川喜久、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、古賀健一、石井輝、加藤有希子、森慶太、菅原照、向山政志、中尾一和
腹膜癒着に対するナトリウム利尿ペプチドの効果
第 54 回日本腎臓学会学術総会
2011 年 6 月 15-17 日 横浜
11. 栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、齋藤陽子、今牧博貴、川西智子、石井輝、古賀健一、森慶太、加藤有希子、菅原照、中尾一和
脂質による TLR4 シグナル活性化は糖尿病腎症を進展させる
第 54 回日本腎臓学会学術総会
2011 年 6 月 15-17 日 横浜
12. 今牧博貴、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、栗原孝成、小川喜久、川西智子、佐藤真杉、桑原隆、菅原照、中尾一和
末期腎不全における血液中 Ngal 濃度の逆説的疫学現象
第 54 回日本腎臓学会学術総会
2011 年 6 月 15-17 日 横浜
13. 川西智子、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、栗原孝成、今牧博貴、石井輝、古賀健一、加藤有希子、森慶太、田中佐智子、上嶋健治、菅原照、中尾一和
慢性腎臓病患者において尿中 Ngal は腎機能障害と相関し、腎予後予測に優れた因子である

- 第 54 回日本腎臓学会学術総会
2011 年 6 月 15-17 日 横浜
14. 石井輝、森 潔、栗原孝成、川西智子、今牧博貴、笠原正登、横井秀基、古賀健一、森慶太、加藤有希子、菅原照、向山政志、中尾一和
肥満における AKI バイオマーカー Ngal の意義
第 54 回日本腎臓学会学術総会
2011 年 6 月 15-17 日 横浜
15. 古賀健一、向山政志、横井秀基、森 潔、笠原正登、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、石井輝、森慶太、加藤有希子、Saleem Moin A、菅原照、中尾一和
培養ヒト podocyte および糖尿病性腎症モデルマウスを用いた糖尿病性腎症における microRNA 発現の検討
第 54 回日本腎臓学会学術総会
2011 年 6 月 15-17 日 横浜
16. 横井秀基、笠原正登、森 潔、栗原孝成、山口拓、相馬望、関奈々、山本敬史、名本真二、山田亮、菅原照、向山政志、中尾一和
3,4-DGE が腹膜の酸化ストレスおよび آپトーシスに及ぼす影響
第 56 回 (社) 日本透析医学会学術集会・総会
2011 年 6 月 17-19 日 横浜
17. 横井秀基、笠原正登、森 潔、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、古賀健一、石井輝、加藤有希子、森慶太、村松壽子、村松喬、菅原照、向山政志、中尾一和
ヒト腹膜における pleiotrophin の発現と機能的意義
第 56 回 (社) 日本透析医学会学術集会・総会
2011 年 6 月 17-19 日 横浜
18. 石井輝、笠原正登、垣田真以子、古賀健一、森 潔、横井秀基、栗原孝成、今牧博貴、加藤有希子、田中麻理、磯田義裕、柴田登志也、深津敦司、向山政志、中尾一和
胸腹水のコントロールに苦渋し、透析中の血圧低下をきたした多発性嚢胞腎の一例
第 56 回 (社) 日本透析医学会学術集会・総会
2011 年 6 月 17-19 日 横浜
19. 森慶太、笠原正登、古賀健一、森 潔、横井秀基、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、石井輝、加藤有希子、吉村耕治、深津敦司、向山政志、中尾一和
抗菌剤不応の PD 腹膜炎では、抗酸菌の塗抹・培養を検討すべきである。
第 56 回 (社) 日本透析医学会学術集会・総会
2011 年 6 月 17-19 日 横浜
20. 栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、齋藤陽子、今牧博貴、川西智子、石井輝、古賀健一、森慶太、加藤有希子、菅原照、中尾一和
高脂肪食による肥満・高インスリン血症を介さない糖尿病性腎症の悪化機序
第 32 回日本肥満学会
2011 年 9 月 23-24 日 淡路
21. 横井秀基、笠原正登、森 潔、小川喜久、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、古賀健一、石井輝、戸田尚宏、大野祥子、村松喬、村松壽子、菅原照、向山政志、中尾一和
pleiotrophin の腹膜線維症における意義と発現
第 17 回日本腹膜透析医学会学術集会・総会
2011 年 9 月 24-25 日 さいたま
22. 戸田尚宏、横井秀基、笠原正登、森 潔、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、古賀健一、石井輝、森慶太、加藤有希子、菅原照、向山政志、中尾一和
糖尿病患者の腹膜透析開始にともなう血糖管理への影響
第 17 回日本腹膜透析医学会学術集会・総会
2011 年 9 月 24-25 日 さいたま
23. 戸田尚宏、笠原正登、横井秀基、森 潔、吉本吉弘、栗原孝成、川西智子、今牧博貴、石井輝、古賀健一、加藤有希子、森慶太、向山政志、中尾一和
当院で経験した腹膜炎の検討
第 17 回日本腹膜透析医学会学術集会・総会
2011 年 9 月 24-25 日 さいたま
24. 森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、中尾一和
尿中バイオマーカーの新知見
第 41 回日本腎臓学会西部学術大会
2011 年 9 月 30 日-10 月 1 日 徳島

25. 笠原正登、向山政志、森 潔、横井秀基、
上嶋健治
脂質異常症による腎障害
第 41 回日本腎臓学会西部学術大会
2011 年 9 月 30 日・10 月 1 日 徳島
26. 石井輝、向山政志、藤本健志、森 潔、
笠原正登、横井秀基、栞原孝成、今牧博
貴、川西智子、古賀健一、森慶太、加藤
有希子、戸田尚宏、大野祥子、菅原照、
中尾一和
進行した腎機能障害を契機に疑われた家
族性若年性高尿酸血症性腎症 (FJHN) の
一例
第 41 回日本腎臓学会西部学術大会
2011 年 9 月 30 日・10 月 1 日 徳島
27. 石井輝、森 潔、栞原孝成、川西智子、
今牧博貴、笠原正登、横井秀基、菅原照、
向山政志、中尾一和
肥満、エネルギー代謝における Ngal の
意義
第 15 回日本心血管内分泌代謝学会総会
2011 年 11 月 25-26 日 大阪
28. 古賀健一、向山政志、横井秀基、森 潔、
笠原正登、栞原孝成、今牧博貴、Saleem
Moin A、菅原照、中尾一和
培養ヒト podocyte および糖尿病性腎症
モデルマウスを用いた microRNA の発現
解析と in vitro における microRNA の機
能的解
第 15 回日本心血管内分泌代謝学会総
2011 年 11 月 25-26 日 大阪
29. 石井輝、向山政志、森 潔、笠原正登、
横井秀基、栞原孝成、今牧博貴、川西智
子、貝藤裕史、中尾一和
無症候性の高度腎障害、高尿酸血症から
家族性若年性高尿酸血症性腎症 (FJHN)
が強く疑われた 1 例
第 196 回日本内科学会近畿地方会
2011 年 12 月 17 日 京都

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

新規遺伝子変異ラット作製技術に基づく生活習慣病・難治性疾患モデルラットの開発

－糖尿病・メタボリックシンドロームモデル遺伝子変異ラット開発

分担研究者：富田 努

京都大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科 非常勤講師

研究要旨 本研究課題は、新規開発した標的遺伝子変異ラット開発システムを用いて、生活習慣病や難治性疾患に関連する複数の遺伝子変異ラットを開発し、新規生活習慣病・難治性疾患モデルラットを樹立し、従来マウスにおいて実施・解析が困難であった系統的な生理学的解析、移植実験、薬理薬効評価解析などの施行を容易にする事により、生活習慣病関連疾患、難治性疾患の病態解明、新規治療標的の同定および創薬開発を加速させることを目的とする。本年度は、研究分担者である芹川、真下らが開発した遺伝子変異ラット樹立技術を用いた糖尿病、メタボリックシンドロームに関連した生活習慣病・難治性疾患関連遺伝子変異ラットのスクリーニングを継続すると同時に、その過程で同定した、レプチン、Seipin、ラミンA、PPAR γ 遺伝子変異ラットの系統樹立を行い、その解析を行い、興味深い結果を得た。今後も、樹立した遺伝子変異ラットの表現系解析を行い、病態解明研究を行うとともに、スーパー特区における創薬開発の加速に利用する予定である。

A. 研究目的

現在生活習慣病関連疾患である心筋梗塞、心不全、糖尿病、脳卒中、慢性腎臓病(CKD)などの病態解明、新規治療標的の同定に基づく新規治療薬、治療法開発が望まれている。現在これら疾患の病態解析、創薬開発、再生医療研究には遺伝子改変技術が確立されているマウスがモデル動物として多く用いられているが、マウスはその小ささゆえに採血や組織採取(脾臓、中枢神経系)が困難であること、生理学的解析や移植実験が行ないにくいなどの問題がある。さらに、最近では代謝面においてヒトと大きく異なる生理的特徴が明らかとなった(Vassilopoulos, et al. Science 2009)。そのため、マウスと比べ体のサイズが大きく、採血や組織採取や系統的な生理学的解析が容易で、移植実験も行ないやすく、代謝面でもよりヒトに近いラットでの疾患モデル確立が期待されている。しかし、現時点ではES細胞の技術がラットで未確立のため、遺伝子改変ラットの効率的な作成は不可能である。最近研究分担者である芹川、真下らはENUミュータジェネシスに、新規DNAスクリーニング法(MuT-power)、凍結精子アーカイブからの個体還元技術(ICSI)という一連の新規技術を組み合わせることにより、標的遺伝子変異ラットの効率的な作成システム構築に成功した。本研究課題では、このシステムを用いて生活習

慣病関連・難治性疾患遺伝子変異ラットをスクリーニングし、その表現系を解析することにより糖尿病、メタボリックシンドロームなどの新規生活習慣病モデルラットを開発し、その詳細な解析を通して病態解明、新規治療標的の同定を行なうと共に、このモデルを用いた新規創薬開発を加速させることを目的とする。

B. 研究方法

本年度は生活習慣病・難治性疾患関連遺伝子に関するENUミュータジェネシスによる約1600匹分のラットミュータントアーカイブの高速DNAスクリーニングを開始した。候補遺伝子としては高血圧モデルとしてナトリウム利尿ペプチド関連遺伝子、腎臓病としてレプチン、seipin、ラミンA遺伝子などをスクリーニング開始した。具体的にはそれぞれの標的遺伝子のcoding領域に対応するprimer setを作製し、ENUミュータジェネシスを行なったラットの遺伝子アーカイブから新規変異DNAスクリーニング法(MuT-POWER法)を用いてスクリーニングを行なった。この方法はDNAミスマッチ部位に特異的かつ短時間に挿入されるトランスポゾンMuの性質を利用し、さらにプール法および蛍光標識DNAを組み合わせることにより短時間かつ低コストで変異DNAのスクリ

ーニング、変異ラットの同定を可能としたものである。このスクリーニングにより候補遺伝子の変異が見つかった場合は新規開発した個体還元技術ICSIを用いて標的遺伝子変異ラットを樹立していく。これらの過程はひとつの遺伝子のスクリーニング開始から、変異の同定、変異ラットの樹立までおよそ6ヶ月から1年で行なえる。現時点ではすでに年間およそ100primer setのスクリーニングが可能であるが、今後機器の充実などを行なうことによりそのスピードを現状の3倍にまでアップする予定である。またこれら実験動物を用いる研究に際しては「動物の愛護および管理に関する法律」（平成17年6月改正法）、「京都大学における動物実験の実施に関する規程」および「京都大学大学院医学研究科・医学部における動物実験の実施に関する規程」

（いずれも平成19年4月改訂）を遵守して実施し、動物に与える苦痛を最小限にとどめるように最善の配慮を尽くしている。

C. 研究結果

昨年度から生活習慣病・難治性疾患関連遺伝子に関するENUミュータジェネシスによる約1600匹分のラットミュータントアーカイブの高速DNAスクリーニングを開始した。候補遺伝子としてはレプチン、seipin、ラミンA遺伝子などをスクリーニングした結果、現時点でレプチン遺伝子、seipin遺伝子、ラミンA遺伝子、PPAR γ 遺伝子に変異を有するラットの同定に成功し、さらに独自開発した個体還元技術ICSIを用いて標的遺伝子変異ラット系統樹立に成功し、表現系解析を行った。その結果、レプチン遺伝子ナンセンス変異ラットでは明らかな肥満、耐糖能異常などが見出され、一方seipin遺伝子変異ラットでは脂肪の減少と耐糖能異常が見出されている。今後これらマウスの表現系解析を継続する予定である。

D. 考察

生活習慣病関連疾患の病態解明においては複数の臓器における病態の同時進行的変化とそれに伴う液性因子を介した臓器間シグナルクロストーク解明が必須であり、またこれら病態には細胞老化も関与するため、その治療において細胞・臓器再生という観点も不可欠で

ある。現在これら疾患の病態解析、創薬開発、再生医療研究には遺伝子改変技術が確立されているマウスがモデル動物として多く用いられているが、マウスはその小ささゆえに採血や組織採取が困難であること、生理学的解析や移植実験が行ないにくいなどの問題がある。そのため、マウスと比べ体のサイズが大きく、採血や組織採取や系統的な生理学的解析が容易で、移植実験も行ないやすく、代謝面でもよりヒトに近いラットでの疾患モデル確立が期待されている。本年度に得られた遺伝子変異ラットの表現系を、共同研究なども通じてその詳細な解析を行うことにより、今後、これら病態解明・新規治療標的の同定および新規創薬開発が加速されるものと考えている。

E. 結論

生活習慣病・難治性疾患関連遺伝子に関して、ENUミュータジェネシスによる約1600匹分のラットミュータントアーカイブの高速DNAスクリーニングを行い、複数の糖尿病、メタボリックシンドローム関連遺伝子変異ラットの同定、系統樹立に成功し、表現系の解析を開始した。今後もスクリーニングを継続しつつ、本年度に得られた遺伝子変異ラットの表現系解析をさらに継続し、疾患モデルラットを確立し、病態解明・新規治療標的の同定と新規創薬開発を加速させる予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Zhao, Y. Li, J. Wang, K. Ebihara, X. Rong, K. Hosoda, T. Tomita, K. Nakao. Azilsartan treatment improves insulin sensitivity in obese spontaneously hypertensive Koletsky rats. *Diabetes Obes Metab.*13(12) 1123-1129. 2011.

2. 学会発表

国際学会

1. T. Tomita, K. Hosoda, S. Odori, Y. Kira, C. Son, J. Fujikura, H. Iwakura, M. Noguchi, E. Mori, M. Naito, T. Kusakabe, K. Ebihara, K. Nakao
Gene Expression of a G Protein-coupled

Receptor, GPR40, in Pancreatic Islets of a Genetically Obese Rat Model
Keystone Symposia (Killarney, Co. Kerry, Ireland) May 15-20, 2011

国内学会

1. 冨田努, 細田公則, 小鳥真司, 藤倉純二, 岩倉浩, 野口倫生, 森栄作, 内藤雅喜, 日下部徹, 海老原健, 中尾一和
新規のインスリン分泌調節因子 GPR40 の遺伝子肥満モデルでの発現調節
第 84 回日本内分泌学会学術総会、2011. 4. 21-23、神戸
2. 野村英生, 孫徹, 後藤伸子, 勝浦五郎, 野口倫生, 冨田努, 藤倉純二, 海老原健, 細田公則, 中尾一和
高脂肪食負荷マウス中枢におけるレプチン反応性の経時的変化の検討
第 84 回日本内分泌学会学術総会、2011. 4. 21-23、神戸
3. 小鳥真司, 冨田努, 孫徹, 藤倉純二, 野口倫生, 森栄作, 内藤雅喜, 日下部徹, 海老原健, 細田公則, 中尾一和
新規の G 蛋白共役型-脂質受容体 GPR119 の臨床的意義: ヒトおよびマウスでの膵島における遺伝子発現と膵島機能との連関
第 84 回日本内分泌学会学術総会、2011. 4. 21-23、神戸
4. 阿部恵, 海老原健, 海老原千尋, 宮澤崇, 冨田努, 日下部徹, 山本祐二, 宮本理人, 真下知士, 細田公則, 芹川忠夫, 中尾一和
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—レプチン欠損 ob/ob ラットの開発と解析—
第 84 回日本内分泌学会学術総会 2011. 4. 21-23、神戸
5. 内藤雅喜, 藤倉純二, 森栄作, 小鳥真司, 野口倫生, 冨田努, 孫徹, 日下部徹, 宮永史子, 宮本理人, 山本祐二, 海老原健, 細田公則, 中尾一和
Leptin Transgenic Akita mouse を用いたインスリン分泌低下型糖尿病に対するレプチン治療
6. 井田みどり, 榊田出, 細田公則, 海老原健, 藤倉純二, 岩倉浩, 日下部徹, 山本祐二, 阿部恵, 冨田努, 葛谷英嗣, 中尾一和
Dual Bioimpedance 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 84 回日本内分泌学会学術総会 2011. 4. 21-23、神戸
7. 冨田努, 細田公則, 小鳥真司, 孫徹, 藤倉純二, 岩倉浩, 野口倫生, 森栄作, 内藤雅喜, 吉良友里, 日下部徹, 海老原健, 益崎裕章, 中尾一和
膵β細胞に高発現し、中・長鎖脂肪酸をリガンドする G 蛋白共役型受容体 GPR40 の遺伝性肥満モデルの膵島での発現調節
第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011. 5. 19-21、札幌
8. 阿部恵, 海老原健, 海老原千尋, 宮澤崇, 冨田努, 日下部徹, 山本祐二, 宮本理人, 真下知士, 細田公則, 芹川忠夫, 中尾一和
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. 5. 19-21、札幌
9. 内藤雅喜, 藤倉純二, 森栄作, 小鳥真司, 野口倫生, 冨田努, 孫徹, 日下部徹, 宮永史子, 宮本理人, 山本祐二, 海老原健, 細田公則, 中尾一和
Leptin Transgenic Akita マウスを用いたインスリン分泌低下型糖尿病に対するレプチン治療
第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011. 5. 19-21、札幌
10. 細田公則, 井田みどり, 榊田出, 海老原健, 藤倉純二, 岩倉浩, 日下部徹, 山本祐二, 阿部恵, 冨田努, 葛谷英嗣, 中尾一和
Dual Bioimpedance 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 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、
2011. 5. 19-21、札幌

11. 野村英生, 孫徹, 野口倫生, 冨田努, 藤倉純二, 海老原健, 細田公則, 中尾一和
高脂肪食負荷レプチン抵抗モデルマウス
における部位特異的レプチン反応性の検討
第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、
2011. 5. 19-21、札幌
12. 小鳥真司, 冨田努, 孫徹, 藤倉純二, 野口倫生, 森栄作, 内藤雅喜, 日下部徹, 海老原健, 細田公則, 中尾一和
新規の G 蛋白共役型・脂質受容体 GPR119 の臨床的意義：ヒトおよびマウスでの臍島における遺伝子発現と臍島機能との連関
第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、
2011. 5. 19-21、札幌
13. 冨田努, 細田公則, 小鳥真司, 孫徹, 藤倉純二, 岩倉浩, 野口倫生, 日下部徹, 海老原健, 中尾一和
G 蛋白共役型・脂肪酸受容体 GPR40 の遺伝性肥満モデルの臍島での発現調節
第 32 回日本肥満学会 学術集会、
2011.9.23-24、兵庫県淡路島
14. 孫徹, 野村英生, 後藤伸子, 勝浦五郎, 野口倫生, 冨田努, 藤倉純二, 海老原健, 細田公則, 中尾一和
高脂肪食負荷レプチントランスジェニックマウス中枢におけるレプチン反応性の検討
第 32 回日本肥満学会 学術集会、
2011.9.23-24、兵庫県淡路島
15. 内藤雅喜, 藤倉純二, 森栄作, 野口倫生, 冨田努, 孫徹, 日下部徹, 海老原健, 細田公則, 中尾一和
Leptin Transgenic Akita mouse を用いたインスリン分泌低下型糖尿病に対するレプチン治療
第 32 回日本肥満学会 学術集会、
2011.9.23-24、兵庫県淡路島
16. 小鳥真司, 冨田努, 孫徹, 藤倉純二,

野口倫生, 森栄作, 内藤雅喜, 日下部徹, 海老原健, 細田公則, 中尾一和
G 蛋白共役型・脂肪酸受容体 GPR40 の遺伝性肥満モデルの臍島での発現調節
第 32 回日本肥満学会 学術集会、
2011.9.23-24、兵庫県淡路島

E. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
N. Yamada-Goto, K. Ebihara, <u>K. Nakao</u> , et al.	Impairment of fear-conditioning responses and changes of brain neurotrophic factors in diet-induced obese mice.	Journal of Neuroendocrinology		In press	2012
T. Kusakabe, K. Ebihara, <u>K. Nakao</u> , et al.	Amylin improves the effect of leptin on insulin sensitivity in leptin-resistant diet-induced obese mice.	Am J Physiol Endocrinol Metab.	302	E924-931	2012
TH. Page, Z. D'Souza, S. Nakanishi, T. <u>Serikawa</u> , CD. Pusey, TJ. Aitman, HT. Cook, J. Behmoaras.	Role of a novel rat-specific Fc receptor in macrophage activation associated with crescentic glomerulonephritis.	J Biol Chem	287	5710-5719	2012
H. Yokoi, K. Mori, M. Mukoyama, <u>K. Nakao</u> , et al.	Pleiotrophin triggers inflammation and increased peritoneal permeability leading to peritoneal fibrosis.	Kidney Int	81	160-169	2011
T. Nishikimi, M. Ikeda, Y. Takeda, T. Ishimitsu, I. Shibasaki, H. Fukuda, H. Kinoshita, Y. Nakagawa, <u>K. Kuwahara</u> , <u>K. Nakao</u>	The effect of glycosylation on plasma N-terminal proBNP-76 levels in patients with heart or renal failure.	Heart	98	152-61.	2011
<u>K. Kuwahara</u> , <u>K. Nakao</u> .	New Molecular Mechanisms for Cardiovascular Disease: Transcriptional Pathways and Novel Therapeutic Targets in Heart Failure.	J Pharmacol Sci	116	337-342	2011
E. Kondo, A. Yasoda, T. Tsuji, T. Fujii, M. Miura, N. Kanamoto, N. Tamura, H. Arai, T. Kunieda, <u>K. Nakao</u> .	Skeletal Analysis of the Long Bone Abnormality (Ibab/Ibab) Mouse, A Novel Chondrodysplastic C-Type Natriuretic Peptide Mutant.	Calcif Tissue Int	90	307-318	2011
N. Kanamoto, T. Tagami, Y. Ueda-Sakane, M. Sone, M. Miura, A. Yasoda, N. Tamura, H. Arai, <u>K. Nakao</u> .	Forkhead box A1 (FOXA1) and A2 (FOXA2) oppositely regulate human type 1 iodothyronine deiodinase gene in liver.	Endocrinology	153	492-500	2011
K. Mori, M. Mukoyama, <u>K. Nakao</u> .	PPAR- α transcriptional activity is required to combat doxorubicin-induced podocyte injury in mice.	Kidney Int	79	1274-1276	2011

T. Sonoyama, M. Sone, K. Miyashita, N. Tamura, K. Yamahara, K. Park, N. Oyamada, D. Taura, M. Inuzuka, K. Kojima, K. Honda, Y. Fukunaga, N. Kanamoto, M. Miura, A. Yasoda, H. Arai, H. Itoh, <u>K. Nakao</u>	Significance of adrenocorticotropin stimulation test in the diagnosis of an aldosterone-producing adenoma.	J Clin Endocrinol Metab	96	2771-2778	2011
T. Maki, <u>K. Nakao</u> , et al.	Angiogenic and vasoprotective effects of adrenomedullin on prevention of cognitive decline after chronic cerebral hypoperfusion in mice.	Stroke	42	1122-1128	2011
M. Naito, K. Ebihara, <u>K. Nakao</u> , et al.	Therapeutic impact of leptin on diabetes, diabetic complications, and longevity in insulin-deficient diabetic mice.	Diabetes	9	2265-2273	2011
M. Zhao, K. Ebihara, <u>K. Nakao</u> , et al.	Azilsartan treatment improves insulin sensitivity in obese spontaneously hypertensive Koletsky rats.	Diabetes Obes Metab	12	1123-1129	2011
K. Hotta, A. Kitamoto, T. Kitamoto, <u>K. Nakao</u> , A. Sekine, et al.	Genetic variations in the CYP17A1 and NT5C2 genes are associated with a reduction in visceral and subcutaneous fat areas in Japanese women.	J Hum Genet	57	46-51	2011
M. Bando, H. Iwakura, H. Ariyasu, H. Hosoda, G. Yamada, K. Hosoda, S. Adachi, <u>K. Nakao</u> , K. Kangawa, T. Akamizu.	Transgenic overexpression of intralyslet ghrelin does not affect insulin secretion or glucose metabolism in vivo.	Am J Physiol Endocrinol Metab	302	E403-408	2012
J. Fujikura, K. Nakao, M. Sone, M. Noguchi, E. Mori, M. Naito, D. Taura, M. Harada-Shiba, I. Kishimoto, A. Watanabe, I. Asaka, K. Hosoda, <u>K. Nakao</u>	Induced pluripotent stem cells generated from diabetic patients with mitochondrial DNA A3243G mutation.	Diabetologia	55	1689-1698	2012
S. Ishida, Y. Sakamoto, T. Nishio, S. Baulac, M. Kuwamura, Y. Ohno, A. Takizawa, S. Kaneko, <u>T. Serikawa</u> , <u>T. Mashimo</u> , <u>T. Mashimo</u>	Kcna1-mutant rats dominantly display myokymia, neuromyotonia and spontaneous epileptic seizures.	Brain Research	1435	154-166	2012
K. Hayashi, S. Ueshima, M. Ouchida, <u>T. Mashimo</u> , T. Nishiki, T. Sendo, <u>T. Serikawa</u> , H. Matsui, H. I. Ohmori.	Therapy for hyperthermia-induced seizures in Scn1a mutant rats.	Epilepsia	52	1010-1017	2011
C. McDermott-Roe, J. Ye, R. Ahmed, X. Sun, <u>T. Serikawa</u> , et al.	Endonuclease G is a novel determinant of cardiac hypertrophy and mitochondrial function	Nature	478	114-118	2011

T. Kuramoto, M. Yokoe, R.Hashimoto, H. Hiai, <u>T. Serikawa</u> .	A rat model of hypohidrotic ectodermal dysplasia carries a missense mutation in the Edaradd gene.	BMC Genetics	12	91	2011
S. Sugata, R. Hanaya, K. Kumafuji, M. Tokudome, <u>T. Serikawa</u> , K. Kurisu , K. Arita, M. Sasa.	Neuroprotective effect of levetiracetam on hippocampal sclerosis-like change in spontaneously epileptic rats.	Brain Res Bull	86	36-41	2011
M. Kuwamura, K. Inumaki, M. Tanaka, M. Shirai, T. Izawa, J. Yamate, R.J. Franklin, T. Kuramoto, <u>T. Serikawa</u> .	Oligodendroglial pathology in the development of myelin breakdown in the dmy mutant rat.	Brain Res	1389	161-168	2011

Received Date : 24-Nov-2011

Revised Date : 27-Mar-2012

Accepted Date : 04-Apr-2012

Article type : Original Article

Impairment of fear-conditioning responses and changes of brain neurotrophic factors in diet-induced obese mice

Short title: Cognition and brain neurotrophins in diet-induced obese mice (53/60)

Nobuko Yamada-Goto ^a, Goro Katsuura ^a, Yukari Ochi ^a, Ken Ebihara ^{a, b}, Toru Kusakabe ^a, Kiminori Hosoda ^a, Kazuwa Nakao ^a

^a Department of Medicine and Clinical Science, Kyoto University Graduate School of Medicine, 54, Shougoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan.

^b Department of Experimental Therapeutics, Translational Research Center, Kyoto University Hospital, 54, Shougoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan.

Correspondence to Goro Katsuura, PhD

Department of Medicine and Clinical Science, Kyoto University Graduate School of Medicine, 54, Shougoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan.

Phone: +81-75-751-3171

Fax: +81-75-771-9452

E-mail address: goro@kuhp.kyoto-u.ac.jp

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as an 'Accepted Article', doi: 10.1111/j.1365-2826.2012.02327.x
© 2012 The Authors. Journal of Neuroendocrinology © 2012 Blackwell Publishing Ltd

Abstract

Recent epidemiological studies demonstrate that obesity is related to high incidence of cognitive impairment. In the present study, cognitive behaviors in diet-induced obese (DIO) mice fed 60% high-fat diet for 16 weeks were compared with those in mice fed control diet (CD) in fear-conditioning tests including both contextual and cued elements which preferentially depend on the amygdala and hippocampus, respectively, and moreover, the contents of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NT-3) in the brain areas were examined in both CD and DIO mice. In fear-conditioning tests, the freezing percentage of both contextual fear and cued fear responses in DIO mice were significantly lower than in CD mice. The contents of BDNF in the cerebral cortex and hippocampus of DIO mice were significantly lower than those of CD mice. Its receptor, full-length TrkB in the amygdala of DIO mice significantly decreased compared with that of CD mice, but not in the cerebral cortex, hippocampus and hypothalamus. On the other hand, the contents of NT-3 in the hippocampus, amygdala and hypothalamus of DIO mice were significantly higher than those of CD mice. Its receptor, full-length TrkC was not significantly different between CD and DIO mice. The present study demonstrated that DIO mice show impairment of both amygdala-dependent contextual and hippocampus-dependent cued responses in the fear-conditioning tests, and imbalance in the interaction between the BDNF and NT-3 systems in the cerebral cortex, hippocampus and amygdala related to cognition and fear.

Keywords:

high-fat diet, obese mouse, fear-conditioning test, cognition, brain neurotrophic factors.

Introduction

Obesity is defined as increased adipose mass resulting from chronic excess of energy intake over energy expenditure. Obesity is becoming a world-wide problem as it is associated with serious comorbidities, including a high incidence of type II diabetes and cardiovascular disease, and increased risk of many forms of cancer. In addition, epidemiological studies have demonstrated that the incidence of depression and cognitive impairment is higher in obese subjects than normal body weight subjects (1, 2). We recently demonstrated that impaired leptin action in the hippocampus is involved in depression associated with diet-induced obesity in mice (3).

Energy homeostasis including food intake and energy consumption has been demonstrated to be regulated predominantly by orexigenic and anorexigenic systems in the hypothalamus. Recently, several lines of evidence have indicated that energy regulations are also modulated by extra-hypothalamic brain areas originally related to regulation of emotion and cognition, such as the nucleus accumbens, amygdala, hippocampus and cerebral cortex (4). These findings suggest that maintaining energy homeostasis and regulating emotion and cognition share common brain regions, as well as bidirectional interaction between energy regulation and emotional/cognitive functions. In this regard, obese rats fed saturated fat and refined sugar show impaired acquisition and retention of spatial memory in the water maze test which is dependent on the

hippocampus (5). Electrophysiological studies in genetically obese Zucker rats with leptin-receptor deficiency demonstrated that long-term potentiation (LTP) of the hippocampal CA1 region, which is closely related to memory formation and is predominately regulated by the glutamatergic system, especially N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and α -amino-3-hydroxyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors (6), is markedly impaired in comparison with lean rats (7). These findings suggest dysfunction of the hippocampus in obese animals. The amygdala, as well as the hippocampus, which has been established as playing a pivotal role in regulation of fear, emotion and cognition (8, 9), has been suggested to be involved in energy regulation because lesion of the amygdala has been reported to induce hyperphagia, resulting in marked obesity (10, 11). Moreover, the amygdala has recently been demonstrated to be one of the brain regions regulating appetite via activation of the melanocortin system (12).

Memory formation involves long-term structural alterations of synapses, so-called neuronal plasticity involving cellular and molecular mechanisms of synapse formation, neurite outgrowth, and behavioral adaptation (13). Cellular and molecular events involved with neuronal plasticity are under the range of action of neurotrophic factors including brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NT-3) (14, 15). BDNF and NT-3 act via high-affinity tyrosine kinase receptors, TrkB and TrkC, respectively (16, 17). The BDNF system in the brain is demonstrated to have anti-obesity and anti-diabetic effects, as well as regulation of neural modeling and cognitive processes (18, 19, 20, 21). Although actions of NT-3 in the brain on energy regulation are not yet known, BDNF and NT-3 act in opposite directions in neurite outgrowth and neural activities (22, 23). Moreover, glucocorticoid is reported to show

opposite effect on regulation of BDNF and NT-3 expressions in the brain (24).

To explore cognition in diet-induced obese (DIO) mice, in the present study we examined the cognitive behavior of DIO mice fed high-fat diet (HFD) using fear-conditioning tests involving regulation mainly by the hippocampus and amygdala (25), and also investigated the contents of BDNF and NT-3 and the expressions of their receptors, TrkB and TrkC in the cerebral cortex, hippocampus, amygdala and hypothalamus of DIO mice as compared with control mice.

Materials and Methods

Animals and diets

Male C57BL/6J mice (6 weeks old) were obtained from Japan SLC, Inc. (Shizuoka, Japan). They were housed on a 12:12-h light-dark cycle (the light was switched on at 7:00 am) and at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ room temperature. The animals had ad libitum access to water and food. They were randomly divided into two groups: mice fed HFD (DIO: Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ; No. D12492: 524 kcal per 100 g) and mice fed control diet (CD: CE-2, CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan: 346.8 kcal per 100 g). Both groups were fed for 16 weeks. Experiments were performed between 13:00 and 15:00. All experiments were performed in accordance with the guidelines established by the Institutional Animal Investigation Committee at Kyoto University and the United States National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Every effort was made to optimize the comfort and minimize the use of animals.

Blood sampling and analysis of metabolic parameters

Blood samples were taken from the thoracic aorta using a syringe containing heparin sodium and aprotinin. The blood samples were centrifuged at 14,000 rpm for 2 min, and plasma was separated and stored at -20°C until assayed. Plasma metabolic parameters were analyzed according to our previous report (3).

Fear-conditioning test

The fear-conditioning test was performed as described in a previous report (26). Briefly, training sessions consisted of pairing a neutral stimulus (conditioned stimulus; CS) of a tone and an aversive stimulus (unconditioned stimulus; US) of an electric foot shock. The conditioning chamber was surrounded by a sound-attenuated chest with an observation window. The foot shock was delivered via the grid floor composed of stainless steel rods. The tone was provided by a ventilation fan making a noise of 65 dB. On the first day, each mouse was trained 10 times to associate foot shock with the tone, which was presented for 30 s as a conditioned stimulus and 0.5 mA foot shock for 2 s as an unconditioned stimulus. Mice were then returned to their home cages. Twenty-four hours later, the contextual response and the cued response were observed. To examine the contextual conditioning response, each mouse was placed in the conditioning chamber without the tone for 5 min and freezing behavior was measured every 1 min. Freezing was defined as the absence of all movement except for respiration. Freezing was monitored continuously by an observer and was recorded on a chart via a switch. Freezing time was summed, and the freezing percentage was calculated per minute. This response mainly depends on the hippocampus. Three hours after termination of the

contextual conditioning response, the cued conditioning response was examined by placing each mouse in a new clear plastic cage with the tone for 3 min. Freezing behavior was measured every 1 min. This response mainly depends on the amygdala.

Jumping-vocalization response

To compare the responses to foot shock of DIO mice with those of CD mice, the test was performed as described in a previous report (26) with the foot shock box used in the experiment on contextual fear conditioning of CD and DIO mice. Each mouse was placed individually in the box. After a 3-min period of habituation to the test box, shock titrations were continued upwards and downwards in a stepwise manner (0.5 mA, 2 s). Jumping responses to the foot shock were scored as 0 - 3 and vocalization responses to the foot shock were scored as 0 - 3. Response scores 0, 1, 2 and 3 indicate no response, slight response, moderate response and marked response, respectively. Data are presented as the total score of these two responses.

Spontaneous locomotor activity

As described in our previous report (3), spontaneous locomotor activity was measured for 30 min immediately after CD and DIO mice fed CD and HFD, respectively, for 16 weeks were placed in a new cage.

Elevated plus-maze test

This test was performed according to our previous report (27). The elevated plus-maze (Muromachi Kikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) was constructed of gray Plexiglas and consisted of four arms (300 mm long × 60 mm wide): two closed arms with high gray