

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

新規創薬を目指した生活習慣病・難治性疾患モデル遺伝子変異ラットの開発と解析
- 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糖代謝・膵内分泌機能解析 -
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 医員

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、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の過程で同定し系統樹立した、レプチンおよび Seipin 遺伝子変異ラットの系統樹立の糖代謝、膵内分泌機能に関する解析を行い、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、新規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(膵臓、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。最近京都大学 動物実験施設の芹川、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復元技術(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

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スクリーニングを行い、糖尿病、メタボリックシンドローム関連遺伝子変異として、レプチンおよびseipin遺伝子の変異ラットの同定を行い、その系統樹立に成功した。本年度は特にこれら変異ラットの糖代謝、膵内分泌機能に関して解析をおこなった。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

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スクリーニングの結果レプチンおよびseipin、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復元技術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、脂質異常が見出された。また、レプチン遺伝子ナンセンス変異ラットの膵臓では、ラ氏島の拡大を認め、beta細胞などの肥大が考えられた。また、インスリン抵抗性を認めた。一方、脂肪委縮症の原因遺伝子であるseipin遺伝子の変異ラットの解析も行った。seipin遺伝子変異ラットでは脂肪の減少とインスリン抵抗性が認められ、ヒト脂肪委縮症と類似の表現系が得られたと考えており、更に詳細な解析を継続している。加えて、seipin遺伝子変異ラットの膵臓の解析を行い、beta細胞面積の増大を認めている。今後さらなる組織学的解析を加える予定である。

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。実際今回得られたレプチンおよび seipin 遺伝子変異ラットにおいて膵組織の詳細な組織学的解析が可能であることが確認された。今後その表現系を、さらに詳細に解析することにより、これら遺伝子変異ラットのモデル動物としての意義が確立され

れば、病態解明・新規治療標的の同定および新規創薬開発の加速に寄与しう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、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、本年度は其中でレプチンおよび seipin 遺伝子変異ラットの表現系の解析を行った。今後もスクリーニングを継続しつつ、これら遺伝子変異ラットの表現系解析をさらに継続し、疾患モデルラットとしての意義を確立し、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. 富田努, 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, 富田努, 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, 富田努, 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関連
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, 富田努, 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, 富田努, 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
第 84 回日本内分泌学会学術総会 2011.4.21-23、神戸
 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, 富田努, 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. 富田努, 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 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, 富田努, 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, 富田努, 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, 富田努, 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, 富田努, 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, 富田努, 孫徹, 藤倉純二, 野

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 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、
2011.5.19-21、札幌

13. 富田努, 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
伝性肥満モデルの膵島での発現調節
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, 富田努, 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,
富田努, 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, 富田努, 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
伝性肥満モデルの膵島での発現調節
第 32 回日本肥満学会 学術集会、
2011.9.23-24、兵庫県淡路島

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし