

201324098B

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業

脂肪萎縮症に関する調査研究

平成 24～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 海老原 健

平成 26(2014)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業

脂肪萎縮症に関する調査研究

平成 24～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 海老原 健

平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告書	
脂肪萎縮症に関する調査研究	----- 1
京都大学医学部附属病院 臨床研究総合センター	海老原 健
京都大学医学研究科 メディカルイノベーションセンター	中尾 一和
慶應義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝内科	伊藤 裕
福岡大学医学部 内分泌・糖尿病内科	柳瀬 敏彦
埼玉県立小児医療センター 代謝内分泌科	望月 弘
神奈川県立こども医療センター 内分泌代謝科	安達 昌功
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 10
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 13

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
総合研究報告書

脂肪萎縮症に関する調査研究

主任研究者：海老原 建	京都大学医学部附属病院 臨床研究総合センター	准教授
分担研究者：中尾 一和	京都大学 医学研究科 メディカルイノベーションセンター	研究員
伊藤 裕	慶應義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝内科	教授
柳瀬 敏彦	福岡大学医学部 内分泌・糖尿病内科	教授
望月 弘	埼玉県立小児医療センター 代謝内分泌科	科長兼部長
安達 昌功	神奈川県立こども医療センター 内分泌代謝科	部長

研究要旨 脂肪萎縮症は予後不良な希少難病であるにもかかわらず認知度が低く、研究の進んでいない疾患である。その希少性のために実態調査も十分には行われておらず、診断基準も存在しない。このため脂肪萎縮症に対する医療の標準化など脂肪萎縮症の診療環境整備は遅れていた。一方、これまで脂肪萎縮症に対する確立した治療方法は存在しなかったが、脂肪萎縮症に伴う代謝異常に対してレプチン補充治療が 2013 年に薬事承認され市販が開始された。今後、医療費助成や適正な保険診療の実施には診断基準の整備が喫緊の課題である。本研究ではこれまでの研究結果をもとに、我が国における脂肪萎縮症の病型分類を行い、脂肪萎縮症の診断基準を提案した。また、脂肪萎縮症センターを設置し、今後、本研究で見出された症例について患者登録を行い主治医と連携することにより継続的なデータ収集を行う予定である。本研究では脂肪萎縮症の原因解明に関する研究として先天性症例を対象に既知の原因遺伝子について変異検索を実施し、既知遺伝子に変異の確認できなかった原因不明の症例については全ゲノム解析を開始した。さらに、脂肪萎縮症原因遺伝子の脂肪細胞分化過程における意義の解明を目的に疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。今後、これらの細胞を用いた検討により脂肪細胞分化過程における各原因遺伝子の脂肪萎縮症における病態生理的意義の解明が期待される。

A. 研究目的

脂肪萎縮症は予後不良な希少難病であるにもかかわらず認知度が低く、研究の進んでいない疾患である。その希少性のために実態調査も十分には行われておらず、診断基準も存在しない。このため脂肪萎縮症に対する医療の標準化など脂肪萎縮症の診療環境整備は遅れていた。一方、これまで脂肪萎縮症に対する確立した治療方法は存在しなかったが、脂肪萎縮症に伴う代謝異常に対してレプチン補充治療が 2013 年に薬事承認され市販が開始された。適正な保険診療の実施には診断基準の整備が喫緊の課題である。

脂肪萎縮症は、全身性のものや部分性のもの、また原因により先天性のもの後天性のものがあり、多種多様な疾患である。本研究では脂肪萎縮症の実態調査を行い、我が国における脂肪萎縮症の病型の傾向を把握するとともに、標準化治療に向けた脂肪萎縮症の診断基準の整備を行う。実態の把握や診断基準の整備は医療の適正化に貢献

するのみならず脂肪萎縮症研究を加速させることが期待される。

脂肪萎縮症は数百万人に 1 人とも言われる希少疾患で我が国における患者数は数百人程度であると考えられる。したがって症例数の上では個々の症例を把握管理することは十分可能であると考えられる。そこで本研究の実態調査で見出された症例については患者登録を行い主治医と連携することにより継続的なデータ収集を行う。また治療経過をモニターすることにより適正な治療指導を行い、診療環境ならびに患者予後の向上が期待できる。

一方、脂肪萎縮症には先天性のものと後天性のものが知られており、先天性脂肪萎縮症の原因遺伝子は 2001 年にセイピン遺伝子が世界で初めて報告された。以来これまでに数々の先天性脂肪萎縮症の原因遺伝子が報告されている。一方、依然、原因不明の症例も数多く存在する。また、既知の原因遺伝子であっても脂肪組織の発生における意義については未解明の部分が多い。

そこで本研究では、我が国における**脂肪萎縮症の全国実態調査および診断基準の策定**を目指す。また**脂肪萎縮症センターを立ち上げ**、実態調査で見出された症例について患者登録を行い主治医と連携することにより継続的なデータ収集を行う。治療経過をモニターすることにより適正な治療指導を行い、診療環境ならびに患者予後の向上を目指す。さらに脂肪萎縮症の遺伝子解析およびiPS細胞の樹立を行い、**脂肪萎縮症の原因遺伝子の解明とその病態における意義の解明**を目指す。

B. 研究方法

1) 脂肪萎縮症の実態調査

申請者らはこれまでに日本内分泌学会専門医を対象に平成15年度と平成19年度にアンケート調査を行い、それぞれ35症例および31症例を見出してきた。しかし当然ながら脂肪萎縮症患者が内分泌学会専門医以外にかかっていることも想定され、十分な調査とは言えない。そこで本研究ではより網羅的な調査を行うためにある一定病床数以上の病院を対象にアンケート調査を行う。また回答率の向上とより詳細な調査の実施のために調査は、症例の存在と簡単な質問から成る1次調査と、1次調査で存在の明らかになった症例に対して行うより詳細な2次調査の二段階で実施する。

2) 病型分類ならびに診断基準の策定

脂肪萎縮症は大きく、全身の脂肪組織が欠如する全身性脂肪萎縮症と、下肢などの特定の領域に限局して脂肪組織が消失する部分性脂肪萎縮症に分類される。また、それぞれに遺伝子異常による先天性のものと、自己免疫などによる後天性のものが存在する。これまでの調査結果および上記の調査結果を踏まえて脂肪萎縮症の病型分類および診断基準の提案を行う。

3) 脂肪萎縮症センターの設立

脂肪萎縮症は数百万人に1人とも言われる希少疾患であり、我が国の症例数は多くても数百人程度であると推定される。そこで脂肪萎縮症センターを設置し上記実態調査で見出した症例について症例登録を行い、主治医と連携することにより、治療経過のモニタリングを実施し継続的なデータ収集を行う。さらに適正な治療法の提案を行い、脂肪萎縮症に関する医療環境や予後の向上に努める。

4) 脂肪萎縮症の原因解明に関する研究

近年、先天性全身性脂肪萎縮症の原因遺伝子と

してはセイピン遺伝子やAGPAT2遺伝子、カベオリン1遺伝子、PTRF遺伝子が、先天性部分生脂肪萎縮症の原因遺伝子としてはLMNA遺伝子やPPARG遺伝子、ZMPSTE24遺伝子、AKT2遺伝子が相次いで報告されている。そこで本研究では上記実態調査で見出された先天性症例を対象に血液からゲノムDNAを採取し原因遺伝子の検索を行う。上記既知遺伝子に異常を認めない症例についてはさらに全ゲノム解析などにより原因遺伝子の解明を試みる。

また、先天性全身性脂肪萎縮症の皮膚より線維芽細胞を採取し、これより疾患特異的iPS細胞の樹立を試みる。樹立した疾患特異的iPS細胞を用いて脂肪細胞分化における原因遺伝子の病態生理的意義を検討する。

C. 研究結果

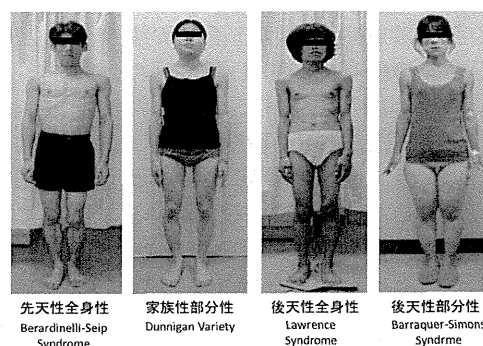
1) 脂肪萎縮症の実態調査

2013年7月に脂肪萎縮症に伴う代謝異常の治療薬としてレプチン製剤であるメトレレプチンが塩野義製薬より市販開始された。メトレレプチンには市販後全例調査が義務付けられており、塩野義製薬と協力して脂肪萎縮症の実態を含め調査することとなった。現在調査中である。

2) 病型分類ならびに診断基準の策定

これまでの研究から脂肪萎縮症は大きく、全身の脂肪組織が欠如する全身性脂肪萎縮症と、下肢などの特定の領域に限局して脂肪組織が消失する部分性脂肪萎縮症に分類される。また、それぞれに遺伝子異常による先天性のものと、自己免疫などによる後天性のものが存在する(図1)。

図1 多様な脂肪萎縮症



a) 先天性全身性脂肪萎縮症 (Berardinelli-Seip 症候群)

先天性全身性脂肪萎縮症の原因遺伝子としてはこれまでにAGPAT2遺伝子、セイピン遺伝子、カ

ベオリン1遺伝子およびPTRF遺伝子が同定されている。いずれも常染色体劣性の遺伝形式で受け継がれ、それぞれBSCL (Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy) 1、2、3、4型と呼ばれている。これまでに海外から報告されている症例の大半は1型か2型であり、少数ながら3型や4型あるいは原因不明のものが存在する。4型では脂肪萎縮のみならず筋萎縮や心筋症が認められる。

b) 後天性全身性脂肪萎縮症 (Lawrence 症候群)
後天性全身性脂肪萎縮症は小児期から思春期に発症することが多い。原因としてはしばしば先行感染を認めるが、発症への関与は不明である。若年性皮膚筋炎や若年性関節リウマチ、橋本病などの自己免疫性疾患に合併して発症することが多く、自己免疫の関与が強く示唆される。脂肪細胞の細胞膜に対する自己抗体の存在を証明したとする報告もある。世界で約50例の報告があるが、3:1の割合で女性に多い。

c) 家族性 (先天性) 部分性脂肪萎縮症
家族性 (先天性) 部分性脂肪萎縮症の原因遺伝子としてはLMNA遺伝子、PPAR γ 遺伝子、Akt2遺伝子、ZMPSTE24遺伝子などが相次いで同定されている。LMNA遺伝子異常による部分性脂肪萎縮症はDunnigan型と呼ばれ、思春期頃より四肢の皮下脂肪が減少する一方で代償性に頭頸部や上背部皮下に脂肪組織の増大を認める。PPAR γ 遺伝子変異による部分性脂肪萎縮症も四肢の脂肪萎縮が顕著であるが、頭頸部の脂肪組織の萎縮も認め、Kobbering型と呼ばれる。Dunnigan型、Kobbering型いずれも常染色体優性の遺伝形式をとる。ホモのLMNA遺伝子異常では下顎や鎖骨をはじめとする骨格異常を伴う“mandibuloacral dysplasia”を発症し、部分性の脂肪萎縮も認められる。同様の症状はホモのZMPSTE24遺伝子異常においても認められるが、ZMPSTE24遺伝子のヘテロ変異では無症状である。

d) 後天性部分性脂肪萎縮症
後天性脂肪萎縮症の原因としては、脂肪組織の破壊をもたらす自己抗体およびヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬やプロテアーゼ阻害薬などのHIV治療薬による副作用が知られている。自己免疫性の後天性脂肪萎縮症として知られるBarraquer-Simons症候群は小児期から思春期にかけて発症し、腹部より上半身の脂肪組織が減少し、下半身の脂肪組織は代償性に増大する。C3

補体価低値を示し、約1/3で膜性増殖性糸球体腎炎の合併を認める。これまでに約200例の報告があるが、発症頻度は女性で男性の3倍である。HIV関連部分性脂肪萎縮は、ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬やプロテアーゼ阻害薬の投与開始後3~6ヶ月で発症し、顔面や四肢、体幹の皮下脂肪組織が減少するとともに、内臓脂肪は逆に増加し、背部皮下脂肪組織もバッファローハンブ様に増大する。

上記知見をもとに脂肪萎縮症の分類を表1にまとめた。さらに診断基準を表2のように提案する。また、脂肪萎縮症の診断に際し有用な検査に付いても表3にまとめた。今後、日本内分泌学会などの関連学会に働きかけ脂肪萎縮症に関する委員会の設置や診断基準等の承認を目指す。

表1. 脂肪萎縮症の病型分類と原因

先天性	全身性	AGPAT2、BSCL2、ZMPSTE24 CAV1、PTRFの遺伝子異常 その他
	部分性	LMNA、PPARG、CIDEA AKT2、PLIN1の遺伝子異常 その他
後天性	全身性	自己免疫性 感染症 その他
	部分性	自己免疫性 薬剤性(抗ウイルス薬) その他

表2. 脂肪萎縮症の診断基準

- 脂肪組織の萎縮部位および程度の確認
DEXA、CT、MRI(T1強調画像)など
- 低栄養や消耗性疾患などによる痩せの除外
- 病歴聴取による先天性、後天性の判断
 - 先天性 → 遺伝子解析により別表の原因遺伝子に異常を認めた場合には確定
 - 後天性 → 別表の原因が認められる場合には確定

表3. 脂肪萎縮症の診断に有用な検査

- 脂肪組織の萎縮部位および程度の確認
DEXA、CT、MRI(T1強調画像)
- 血中レプチン濃度
(脂肪組織の萎縮程度により低下を認める)
- 高頻度に以下の代謝異常が認められる
 - ・ インスリン抵抗性
空腹時インスリン、経口ブドウ糖負荷試験、グルコースクランプ試験など
 - ・ 高トリグリセライド血症
 - ・ 脂肪肝
CT、超音波検査、AST、ALTなど
- 遺伝子検査(先天性の場合)
- 自己免疫に関する検査(後天性の場合) 抗体、補体など

3) 脂肪萎縮症センターの設立

認定NPO法人「日本ホルモンステーション」内に「脂肪萎縮症センター」を設置することとなった。これまで患者、患者家族、医師、研究者および一般市民を対象に脂肪萎縮症の啓蒙を主目的にNPO法人「脂肪萎縮性糖尿病・脂肪萎縮症センター」が分担研究者である中尾一和を理事長に運営されてきたが、啓蒙活動だけではなく継続的な情報収集なども目的として、一旦解散の上、認定NPO法人「日本ホルモンステーション」内に新たなセンターを立ち上げる事となった。今後、現在把握している患者情報や、上記の調査で得られた情報のデータベース化を行い、患者登録システムを構築する予定である。

4) 脂肪萎縮症の原因解明に関する研究

既知の原因遺伝子に付いては先天性全身性脂肪萎縮症 12 例を対象に遺伝子変異の検索を進め、10 例で seipin 遺伝子にホモ接合体変異が確認された。現在、既知遺伝子に変異の確認できなかった原因不明の症例について全ゲノム解析を実施中である。

seipin 遺伝子にホモ接合体変異が確認された 2 例の先天性全身性脂肪萎縮症より疾患特異的 iPS 細胞の樹立に成功した。脂肪細胞への分化実験において患者由来の iPS 細胞では脂質を蓄積する脂肪細胞に分化できないことが確認された。また、脂肪細胞分化におけるマスターレギュレーターと考えられている PPAR・遺伝子の発現上昇も認められなかった。一方、患者由来の iPS 細胞に正常な seipin 遺伝子を導入することにより脂肪細胞への分化能が回復することも確認した。今後、この細胞を用いて脂肪細胞分化過程における seipin の病態生理的意義について検討する予定である。

D. 考察

脂肪萎縮症は全身性あるいは部分性に脂肪組織が消失する疾患で、それぞれに先天性のものと後天性のものが知られている。先天性脂肪萎縮症の原因遺伝子が近年相次いで報告されているが、いまだ原因不明の症例も多数存在する。脂肪萎縮症は数百万人に 1 人とも言われる極めて希少な疾患であるため、これまで十分な調査がなされてこなかった。本研究では脂肪萎縮症の病型分類を行い、診断基準案を策定した。今後、調査や研究において役立つものと期待される。

また、これまで脂肪萎縮症の治療法は存在しなかったが、脂肪萎縮症に伴う代謝異常に対しレプチン製剤が 2013 年 7 月より市販開始された。しかし薬価が高額であるため、効果が期待できる症例においても経済状態を理由に治療を断念するケースが後を絶たない。この不幸な状況を打開するためには脂肪萎縮症が難病指定され医療費助成の対象となる必要がある。今回の脂肪萎縮症の病型分類および診断基準案の策定は脂肪萎縮症の難病指定への道を開くものである。

一方、現在、脂肪萎縮症に対する根治療法が存在しない。本研究で開始した脂肪萎縮症の全ゲノム解析や疾患特異的 iPS 細胞の樹立は、将来、脂肪萎縮症の根治療法開発に結びつくものと期待される。

E. 結論

本研究では我が国における脂肪萎縮症の病型分類を行い、脂肪萎縮症の診断基準を提案した。また、脂肪萎縮症センターを設置し、今後、本研究で見出された症例について患者登録を行い主治医と連携することにより継続的なデータ収集を行う。また、本研究では脂肪萎縮症の原因解明に関する研究として先天性症例を対象に既知の原因遺伝子に付いて変異検索を実施し、既知遺伝子に変異の確認できなかった原因不明の症例については全ゲノム解析を開始した。さらに、脂肪萎縮症原因遺伝子の脂肪細胞分化過程における意義の解明を目的に疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。今後、これらの細胞を用いて各原因遺伝子の脂肪萎縮症における病態生理的意義の検討を行う予定である。

F. 研究発表

1.論文発表

1. M. Aizawa-Abe, K. Ebihara, C.

- Ebihara, T. Mashimo, A. Takizawa, T. Tomita, T. Kusakabe, Y. Yamamoto, D. Aotani, S. Yamamoto-Kataoka, T. Sakai, K. Hosoda, T. Serikawa, K. Nakao. Generation of leptin deficient Lepmkyo/Lepmkyo rats and identification of leptin responsive genes in the liver. *Physiol Genomics*. 45: 786-793, 2013
2. M. Noguchi, K. Hosoda, M. Nakane, E. Mori, K. Nakao, D. Taura, Y. Yamamoto, T. Kusakabe, M. Sone, H. Sakurai, J. Fujikura, K. Ebihara, K. Nakao. In Vitro Characterization and Engraftment of Adipocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 22: 2895- 2905, 2013
 3. M. Ida, M. Hirata, S. Odori, E. Mori, E. Kondo, J. Fujikura, T. Kusakabe, K. Ebihara, K. Hosoda, K. Nakao. Early changes of abdominal adiposity detected with weekly dual bioelectrical impedance analysis during calorie restriction. *Obesity*. 21: E350-E353, 2013
 4. N. Yamada-Goto, G. Katsuura, K. Ebihara, M. Inuzuka, Y. Ochi, Y. Yamashita, T. Kusakabe, A. Yasoda, N. Asahara-Satoh, H. Ariyasu, K. Hosoda, K. Nakao. Intracerebroventricular administration of C-type natriuretic peptide suppresses food intake via activation of the melanocortin system in mice. *Diabetes*. 62: 1500- 1504, 2013.
 5. S. Meguro, Y. Kabeya, K. Tanaka, T. Kawai, M. Tomita, T. Katsuki, Y. Oikawa, Y. Atsumi, A. Shimada, M. Tanaka, J. Irie, Y. Saisho, H. Itoh. Past Obesity as well as Present Body Weight Status Is a Risk Factor for Diabetic Nephropathy. *Int J Endocrinol*. Article ID 590569, 2013.
 6. Y. Saisho, H. Hirose, R. Roberts, T. Abe, H. Kawabe, H. Itoh. C-reactive protein, high-molecular-weight adiponectin and development of metabolic syndrome in the Japanese general population: a longitudinal cohort study. *PLoS One*. 8:e73430, 2013.
 7. K. Kou, Y. Saisho, S. Satoh, T. Yamada, H. Itoh. Change in β -cell mass in Japanese nondiabetic obese individuals. *J Clin Endocrinol Metab*. 98:3724-3730, 2013.
 8. Y. Terawaki, T. Nomiya, Y. Akehi, H. Takenoshita, R. Nagaishi, Y. Tsutsumi, K. Murase, H. Nagasako, N. Hamanoue, K. Sugimoto, A. Takada, K. Ito, Y. Abe, Y. Sasatomi, S. Ogahara, H. Nakashima, T. Saito, T. Yanase. The efficacy of incretin therapy in patients with type 2 diabetes undergoing hemodialysis. *Diabetol Metab Syndr*. 5:10, 2013.
 9. M. Adachi, Y. Asakura, K. Muroya, H. Goto, H. Kigasawa. Abnormal adipose tissue distribution with unfavorable metabolic profile in five children following hematopoietic stem cell transplantation: a new etiology for acquired partial lipodystrophy. *Clin Pediatr Endocrinol*. 22:53-64, 2013.
 10. 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*. 287: 40441- 40447, 2012.
 11. M. Iwanishi, K. Ebihara, T. Kusakabe, S. Harada, J. Ito-Kobayashi, A. Tsuji, K. Hosoda, K. Nakao. Premature atherosclerosis in a Japanese diabetic patient with atypical familial partial lipodystrophy and hypertriglyceridemia. *Intern Med*. 51: 2573-2579, 2012.

12. 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.* 97: 3663- 3671, 2012.
 13. 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.* 302: E924-931, 2012.
 14. N. Yamada-Goto, G. Katsuura, Y. Ochi, K. Ebihara, T. Kusakabe, K. Hosoda, K. Nakao. Impairment of fear-conditioning responses and changes of brain neurotrophic factors in diet-induced obese mice. *J Neuroendocrinol.* 24: 1120-1125, 2012.
 15. Y. Kawano, J. Nakae, N. Watanabe, S. Fujisaka, K. Iskandar, R. Sekioka, Y. Hayashi, K. Tobe, M. Kasuga, T. Noda, A. Yoshimura, M. Onodera, H. Itoh. Loss of Pdk1-Foxo1 signaling in myeloid cells predisposes to adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Diabetes.* 61: 1935- 1948, 2012.
 16. M. Watanabe, K. Morimoto, SM. Houten, N. Kaneko-Iwasaki, T. Sugizaki, Y. Horai, C. Mataka, H. Sato, K. Murahashi, E. Arita, K. Schoonjans, T. Suzuki, H. Itoh, J. Auwerx. Bile Acid Binding Resin Improves Metabolic Control through the Induction of Energy Expenditure. *PLoS One* 7: e38286, 2012.
 17. K. Noda, B. Zhang, A. Iwatata, H. Nishikawa, M. Ogawa, T. Nomiyama, S. Miura, H. Sakou, K. Matsuo, E. Yahiro, T. Yanase, K. Saku Lifestyle : Changes Through the Use of Delivered Meals and Dietary Counseling in a Single-Blind Study: the STYLIST Study. *Circulaion J.* 76: 1335-1344, 2012.
 18. K. Kuramoto, T. Okamura, T. Yamaguchi, TY. Nakamura, S. Wakabayashi, H. Morinaga, M. Nomura, T. Yanase, K. Otsu, N. Usuda, S. Matsumura, K. Inoue, T. Fushiki, Y. Kojima, T. Hashimoto, F. Sakai, F. Hirose, T.Osumi. Perilipin 5, a lipid droplet-binding protein, protects the heart from oxidative burden by sequestering fatty acid from excessive oxidation. *J Biol Chem.* 287: 23852-23863, 2012.
 19. Y. Asakura, K. Muroya, T. Sato, K. Kurosawa, G. Nishimura, M. Adachi. First case of a Japanese girl with Myhre syndrome due to a heterozygous SMAD4 mutation. *Am J Med Genet A.* 158A: 1982-1986, 2012.
 20. M. Adachi, A. Soneda, Y. Asakura, K. Muroya, Y. Yamagami, F. Hirahara. Mass screening of newborns for congenital hypothyroidism of central origin by free thyroxine measurement of bloodsamples on filter paper. *Eur J Endocrinol.* 166: 829-838, 2012.
- 2.学会発表**
国際学会
1. Ken Ebihara, Megumi Aizawa-Abe, Tshutomu Tomita, Toru Kusakabe, Yuji Yamamoto, Daisuke Aotani, Sachiko Yamamoto-Kataoka, Takeru Sakai, Valentino Milton Gumbilai, Mingming Zhao, Kiminori Hosoda and Kazuwa Nakao. The human lipodystrophy gene product, seipin plays physiological roles beyond the adipose tissue. The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo, San Francisco,

- California in USA, June 15- 18, 2013.
2. Kazuwa Nakao, Kiminori Hosoda, Ken Ebihara, Toru Kusakabe, Megumi Aizawa-Abe, Daisuke Aotani. Impact of successful leptin replacement therapy in Japan on adult and child, systemic and partial lipodystrophy. The 2013 Obesity Week, Atlanta, Georgia in USA, Nov 11- 16, 2013.
 3. Daisuke Aotani, Ken Ebihara, Toru Kusakabe, Megumi Aizawa-Abe, Sachiko Kataoka, Takeru Sakai, Chihiro Ebihara, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao. The role of neuromedin U in glucose homeostasis. The 2013 Obesity Week, Atlanta, Georgia in USA, Nov 11- 16, 2013.
 4. M. Aizawa-Abe, K.Ebihara, C. Ebihara, T. Kusakabe, D.Aotani, V. Gumbili, T. Mashimo, T. Serikawa & K. Nakao. 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, Florence in Italy, May 5- 9, 2012.
 5. D.Aotani, K.Ebihara, N. Sawamoto, T. Kusakabe, M. Aizawa-Abe, S. Kataoka, T. Sakai, C. Ebihara, J. Fujikura, K. Hosoda, H. Fukuyama & K. Nakao. Leptin modulates brain neural activity associated with feeding behavior in patients with lipodystrophy. 15th International & 14th European Congress of Endocrinology, Florence in Italy, May 5- 9, 2012.
 6. M. Aizawa-Abe, K.Ebihara, C. Ebihara, T. Kusakabe, T. Serikawa, D.Aotani, V.M.J. Gumbili, T. Mashimo, K. Nakao. Development of Leptin Deficient Rats-Evidence of Superiority Over Lepob/Lepob Mice as a Model For Human Obesity. 19th European Congress on Obesity, Lyon, in France, May 9- 12, 2012.
 7. D.Aotani, K.Ebihara, N. Sawamoto, T. Kusakabe, M. Aizawa-Abe, S. Kataoka, T. Sakai, C. Ebihara, J. Fujikura, K. Hosoda, H. Fukuyama, K. Nakao. Leptin Modulates Brain Activity Associated With Feeding Behavior in Patients With Lipodystrophy. 19th European Congress on Obesity, Lyon, in France, May 9- 12, 2012.
 8. T. Sakai, T. Kusakabe, K. Ebihara, D. Aotani, S. Kataoka, C. Ebihara, Y. Yamamoto, M. Abe, J. Fujikura, K. Hosoda, K. Nakao. Beneficial Effects of Combination Therapy With Leptin and Exenatide in a Mouse Model of Type2 Diabetes With Increased Adiposity. 72nd scientific sessions American Diabetes Association, Philadelphia in USA, July 8- 12, 2012.
- 国内学会**
1. 海老原健. 脂肪細胞由来ホルモン、レプチンのトランスレショナルリサーチ. 第 86 回日本内分泌学会学術総会、2013/4/25-27、仙台
 2. 海老原千尋、海老原健、阿部 恵、日下部徹、青谷大介、片岡祥子、酒井 建、趙 明明、Valentino Gumbilai、細田公則、中尾一和. 新規モデルラットを用いたチアゾリジン誘導体 (TZD) の脂肪肝改善メカニズムの解明. 第 86 回日本内分泌学会学術総会、2013/4/25-27、仙台
 3. 片岡祥子、海老原健、阿部 恵、日下部徹、山本祐二、青谷大介、酒井 建、海老原千尋、細田公則、中尾一和. レプチンによる脂肪肝改善メカニズムの解明～肝特異的 Pten 欠損マウスを用いた検討～. 第 86 回日本内分泌学会学術総会、2013/4/25-27、仙台
 4. 内藤雅喜、藤倉純二、野口倫生、富田 努、日下部徹、孫 徹、海老原健、細田公則、中尾一和. 1 型糖尿病モデルマウスにおける高レプチン血症の影響. 第 86 回日本内分泌学会学術総会、2013/4/25-27、仙台
 5. 酒井 建、日下部徹、海老原健、青谷大介、片岡祥子、海老原千尋、阿部 恵、

- 山本祐二、藤倉純二、細田公則、中尾一和、肥満 2 型糖尿病治療におけるレプチン/GLP-1 受容体作動薬共投与の有用性. 第 86 回日本内分泌学会学術総会、2013/4/25-27、仙台
6. 日下部徹、海老原健、髭 秀樹、阿部 恵、青谷大介、片岡祥子、酒井 建、海老原千尋、藤倉純二、細田公則、中尾一和. 脂肪萎縮症におけるレプチンの黒色表皮腫改善効果. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013/5/16-15、熊本
 7. 海老原千尋、海老原健、阿部 恵、日下部徹、青谷大介、片岡祥子、酒井 建、趙 明明、Gumbilai Valentino、細田公則、中尾一和. 先天性全身性脂肪萎縮症 6 歳児症例におけるレプチン補充療法の有用性. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013/5/16-15、熊本
 8. 青谷大介、海老原健、日下部徹、阿部 恵、片岡祥子、酒井 建、海老原千尋、藤倉純二、細田公則、中尾一和. 部分性脂肪萎縮症に対するレプチン補充療法の有用性. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013/5/16-15、熊本
 9. 内藤雅喜、藤倉純二、野口倫生、富田 努、日下部徹、孫 徹、海老原健、細田公則、中尾一和. 1 型糖尿病モデルマウスにおける高レプチン血症の影響. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013/5/16-15、熊本
 10. 酒井 建、日下部徹、海老原健、青谷大介、片岡祥子、趙 明明、Milton Valentino、海老原千尋、阿部 恵、藤倉純二、山本祐二、細田公則、中尾一和. レプチンによる膵臓内脂肪蓄積の減少とインクレチン作用の増強. 第 34 回日本肥満学会、2013/10/11-12、東京
 11. 阿部 恵、海老原健、海老原千尋、日下部徹、青谷大介、酒井 建、片岡祥子、趙 明明、バレンチノ ガンプリアイ、山本祐二、細田公則、中尾一和. レプチン欠損 Lep^{mkyo}/Lep^{mkyo} ラットを用いた肝臓におけるレプチン感受性遺伝子の同定. 第 34 回日本肥満学会、2013/10/11-12、東京
 12. 青谷大介、海老原健、日下部徹、阿部 恵、片岡祥子、酒井 建、海老原千尋、藤倉純二、細田公則、中尾一和. ニューロメジンUのインスリン抵抗性における意義. 第 34 回日本肥満学会、2013/10/11-12、東京
 13. 内藤雅喜、藤倉純二、横井秀基、日下部徹、孫 徹、海老原健、向山政志、細田公則、中尾一和. インスリン分泌低下型糖尿病に対するレプチンの治療効果. 第 49 回日本臨床分子医学会学術集会、2012/4/13-14、京都
 14. 日下部徹、海老原健、酒井 建、青谷大介、片岡祥子、海老原千尋、阿部 恵、藤倉純二、細田公則、中尾一和. 肥満 2 型糖尿病に対するレプチン、アミリン共投与の有用性に関する検討. 第 109 回日本内科学会総会、2012/4/13-15、京都
 15. 内藤雅喜、藤倉純二、横井秀基、日下部徹、孫 徹、海老原健、向山政志、細田公則、中尾一和. Therapeutic Impact of Leptin on Diabetes Diabetic Complications, and Longevity in Insulin-Deficient Diabetic Mice. 第 109 回日本内科学会総会、2012/4/13-15、京都
 16. 野口倫生、細田公則、田浦大輔、森 栄作、松原正樹、曾根正勝、藤倉純二、海老原健、中尾一和. ヒト iPS 細胞由来脂肪細胞の脂肪細胞機能解析と細胞移植. 第 109 回日本内科学会総会、2012/4/13-15、京都
 17. 片岡祥子、海老原健、阿部 恵、日下部徹、青谷大介、酒井 建、藤倉純二、細田公則、中尾一和. レプチンを用いた非アルコール性脂肪肝治療の可能性に関する検討. 第 109 回日本内科学会総会、2012/4/13-15、京都
 18. 青谷大介、海老原健、澤本伸克、日下部徹、阿部 恵、片岡祥子、酒井 建、細田公則、福山秀直、中尾一和. fMRI を用いた、脂肪萎縮症の食欲異常およびレプチン治療による効果の検討. 第 109 回日本内科学会総会、2012/4/13-15、京都
 19. 内藤雅喜、藤倉純二、海老原健、宮永史子、横井秀基、日下部徹、山本祐二、孫 徹、向山政志、細田公則、中尾一

- 和. Therapeutic Impact of Leptin on Diabetes, Diabetic Complications, and Longevity in Insulin-Deficient Diabetic Mice. 第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012/4/19-21、名古屋
20. 日下部徹、海老原健、酒井 建、青谷大介、片岡祥子、海老原千尋、趙 明明、Milton Valentino、阿部 恵、藤倉純二、細田公則、中尾一和. レプチン、アミリン共投与による糖脂質代謝改善に関する検討. 第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012/4/19-21、名古屋
21. 阿部 恵、海老原健、海老原千尋、日下部徹、青谷大介、片岡祥子、酒井 建、趙 明明、Valentino MJ Gumbilal、細田公則、芹川忠夫、中尾一和. 遺伝子改変ラットを用いたチアゾリジンの脂肪肝に対する効果の種族差の検討. 第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012/4/19-21、名古屋
22. 後藤伸子、勝浦五郎、越智ゆかり、山下唯、海老原健、日下部徹、有安宏之、金本巨哲、三浦晶子、八十田明宏、荒井宏司、細田公則、中尾一和. 肥満に合併するうつ状態に対するアミリンおよびレプチンの抗うつ作用の検討. 第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012/4/19-21、名古屋
23. 酒井 建、日下部徹、海老原健、青谷大介、片岡祥子、海老原千尋、山本祐二、阿部 恵、藤倉純二、細田公則、中尾一和. レプチン/GLP-1 受容体作動薬共投与による肥満 2 型糖尿病治療の有用性. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012/5/17-19、横浜
24. 内藤雅喜、藤倉純二、横井秀基、森 栄作、野口倫生、富田 努、日下部徹、孫徹、海老原健、向山政志、細田公則、中尾一和. インスリン分泌低下型糖尿病に対するレプチンの治療効果. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012/5/17-19、横浜
25. 海老原健、阿部 恵、日下部徹、青谷大介、細田公則、中尾一和. 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、2012/10/11-12、京都
26. 酒井 建、日下部徹、海老原健、青谷大介、片岡祥子、海老原千尋、阿部 恵、藤倉純二、山本祐二、細田公則、中尾一和. レプチン/GLP-1 受容体作動薬共投与による肥満 2 型糖尿病治療の有用性. 第 33 回日本肥満学会、2012/10/11-12、京都
27. 野口倫生、細田公則、森 栄作、松原正樹、田浦大輔、曾根正勝、藤倉純二、海老原健、中尾一和. ヒト iPS 細胞由来脂肪細胞の分化誘導と細胞移植. 第 33 回日本肥満学会、2012/10/11-12、京都
28. 海老原千尋、阿部 恵、海老原健、Valentino Milton Gumbilal、日下部徹、青谷大介、酒井 建、趙 明明、山本祐二、細田公則、中尾一和. 脂肪萎縮症原因遺伝子 seipin の生体における意義に関する検討. 第 33 回日本肥満学会、2012/10/11-12、京都

G. 知的財産の出願・登録状況

なし

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌 (海老原 健・中尾 一和)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M. Aizawa-Abe, <u>K. Ebihara</u> , C. Ebihara, T. Mashimo, A. Takizawa, T. Tomita, T. Kusakabe, Y. Yamamoto, D. Aotani, S. Yamamoto-Kataoka, T. Sakai, K. Hosoda, T. Serikawa, <u>K. Nakao</u> .	Generation of leptin deficient Lepmkyo/Lepmkyo rats and identification of leptin responsive genes in the liver.	Physiol Genomics	45	786-793	2013
M. Noguchi, K. Hosoda, M. Nakane, E. Mori, K. Nakao, D. Taura, Y. Yamamoto, T. Kusakabe, M. Sone, H. Sakurai, J. Fujikura, <u>K. Ebihara</u> , <u>K. Nakao</u> .	In Vitro Characterization and Engraftment of Adipocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells.	Stem Cells Dev	22	2895-2905	2013
M. Ida, M. Hirata, S. Odori, E. Mori, E. Kondo, J. Fujikura, T. Kusakabe, <u>K. Ebihara</u> , K. Hosoda, <u>K. Nakao</u> .	Early changes of abdominal adiposity detected with weekly dual bioelectrical impedance analysis during calorie restriction.	Obesity	21	E350-E353	2013
N. Yamada-Goto, G. Katsuura, <u>K. Ebihara</u> , M. Inuzuka, Y. Ochi, Y. Yamashita, T. Kusakabe, A. Yasoda, N. Asahara-Satoh, H. Ariyasu, K. Hosoda, <u>K. Nakao</u> .	Intracerebroventricular administration of C-type natriuretic peptide suppresses food intake via activation of the melanocortin system in mice.	Diabetes	62	1500-1504	2013
L. Miyamoto, <u>K. Ebihara</u> , T. Kusakabe, D. Aotani, S. Yamamoto-Kataoka, T. Sakai, M. Aizawa-Abe, Y. Yamamoto, J. Fujikura, T. Hayashi, K. Hosoda, <u>K. Nakao</u> .	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	287	40441-40447	2012
M. Iwanishi, <u>K. Ebihara</u> , T. Kusakabe, S. Harada, J. Ito-Kobayashi, A. Tsuji, K. Hosoda, <u>K. Nakao</u> .	Premature atherosclerosis in a Japanese diabetic patient with atypical familial partial lipodystrophy and hypertriglyceridemia.	Intern Med	51	2573-2579	2012
D. Aotani, <u>K. Ebihara</u> , N. Sawamoto, T. Kusakabe, M. Aizawa-Abe, S. Kataoka, T. Sakai, H. Iogawa, C. Ebihara, J. Fujikura, K. Hosoda, H. Fukuyama, <u>K. Nakao</u> .	Functional Magnetic Resonance Imaging Analysis of Food-Related Brain Activity in Patients with Lipodystrophy Undergoing Leptin Replacement Therapy.	J Clin Endocrinol Metab	97	3663-3671	2012

T. Kusakabe, <u>K. Ebihara</u> , T. Sakai, L. Miyamoto, D. Aotani, Y. Yamamoto, S. Yamamoto-Kataoka, M. Aiza wa-Abe, J. Fujikura, K. Hosoda, <u>K. Nakao</u> .	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
N. Yamada-Goto, G. Katsuura, Y. Ochi, <u>K. Ebihara</u> , T. Kusakabe, K. Hosoda, <u>K. Nakao</u> .	Impairment of fear-conditioning responses and changes of brain neurotrophic factors in diet-induced obese mice.	J Neuroendocrinol	24	1120-1125	2012

雑誌 (伊藤 裕)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
S. Meguro, Y. Kabeya, K. Tanaka, T. Kawai, M. Tomita, T. Katsuki, Y. Oikawa, Y. Atsumi, A. Shimada, M. Tanaka, J. Irie, Y. Saisho, <u>H. Itoh</u> .	Past Obesity as well as Present Body Weight Status Is a Risk Factor for Diabetic Nephropathy.	Int J Endocrinol		Article ID 590569	2013
Y. Saisho, H. Hirose, R. Roberts, T. Abe, H. Kawabe, <u>H. Itoh</u> .	C-reactive protein, high-molecular-weight adiponectin and development of metabolic syndrome in the Japanese general population: a longitudinal cohort study.	PloS One	8	e73430	2013
K. Kou, Y. Saisho, S. Satoh, T. Yamada, <u>H. Itoh</u> .	Change in β -cell mass in Japanese nondiabetic obese individuals.	J Clin Endocrinol Metab	98	3724-3730	2013
Y. Kawano, J. Nakae, N. Watanabe, S. Fujisaka, K. Iskandar, R. Sekioka, Y. Hayashi, K. Tobe, M. Kasuga, T. Noda, A. Yoshimura, M. Onodera, <u>H. Itoh</u> .	Loss of Pdk1-Foxo1 signaling in myeloid cells predisposes to adipose tissue inflammation and insulin resistance.	Diabetes	61	1935-1948	2012
M. Watanabe, K. Morimoto, SM. Houten, N. Kaneko-Iwasaki, T. Sugizaki, Y. Horai, C. Mataka, H. Sato, K. Murahashi, E. Arita, K. Schoonjans, T. Suzuki, <u>H. Itoh</u> , J. Auwerx.	Bile Acid Binding Resin Improves Metabolic Control through the Induction of Energy Expenditure.	PLoS One	7	e38286	2012

雑誌 (柳瀬 敏彦)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Y. Terawaki, T. Nomiyama, Y. Akehi, H. Takenoshita, R. Nagaishi, Y. Tsutsumi, K. Murase, H. Nagasako, N. Hamanoue, K. Sugimoto, A. Takada, K. Ito, Y. Abe, Y. Sasatomi, S. Ogahara, H. Nakashima, T. Saito, <u>T. Yanase</u> .	The efficacy of incretin therapy in patients with type 2 diabetes undergoing hemodialysis.	Diabetol Metab Syndr	5	10	2013
K. Noda, B. Zhang, A. Iwatata, H. Nishikawa, M. Ogawa, T. Nomiyama, S. Miura, H. Sakou, K. Matsuo, E. Yahiro, <u>T. Yanase</u> , K. Saku	Lifestyle Changes Through the Use of Delivered Meals and Dietary Counseling in a Single-Blind Study: the STYLIST Study.	Circulaion J	76	1335-1344	2012
K. Kuramoto, T. Okamura, T. Yamaguchi, TY. Nakamura, S. Wakabayashi, H. Morinaga, M. Nomura, <u>T. Yanase</u> , K. Otsu, N. Usuda, S. Matsumura, K. Inoue, T. Fushiki, Y. Kojima, T. Hashimoto, F. Sakai, F. Hirose, T.Osumi.	Perilipin 5, a lipid droplet-binding protein, protects the heart from oxidative burden by sequestering fatty acid from excessive oxidation.	J Biol Chem	287	23852-23863	2012

雑誌 (安達 昌功)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>M. Adachi</u> , Y. Asakura, K. Muroya, H. Goto, H. Kigasawa.	Abnormal adipose tissue distribution with unfavorable metabolic profile in five children following hematopoietic stem cell transplantation: a new etiology for acquired partial lipodystrophy.	Clin Pediatr Endocrinol	22	53-64	2013
Y. Asakura, K. Muroya, T. Sato, K. Kurosawa, G. Nishimura, <u>M. Adachi</u> .	First case of a Japanese girl with Myhre syndrome due to a heterozygous SMAD4 mutation.	Am J Med Genet A	158A	1982-1986	2012
<u>M. Adachi</u> , A. Soneda, Y. Asakura, K. Muroya, Y. Yamagami, F. Hirahara.	Mass screening of newborns for congenital hypothyroidism of central origin by free thyroxine measurement of bloodsamples on filter paper.	Eur J Endocrinol.	166	829-838	2012

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

Generation of leptin-deficient *Lep^{mkyo}/Lep^{mkyo}* rats and identification of leptin-responsive genes in the liver

Megumi Aizawa-Abe,^{1,2} Ken Ebihara,^{1,2} Chihiro Ebihara,² Tomoji Mashimo,³ Akiko Takizawa,³ Tsutomu Tomita,² Toru Kusakabe,² Yuji Yamamoto,² Daisuke Aotani,^{1,2} Sachiko Yamamoto-Kataoka,² Takeru Sakai,² Kiminori Hosoda,^{1,2,4} Tadao Serikawa,³ and Kazuwa Nakao²

¹Department of Experimental Therapeutics, Translational Research Center, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan;

²Department of Medicine and Clinical Science, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan; ³Institute of Laboratory Animals, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan; and ⁴Department of Health and Science, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan

Submitted 8 March 2013; accepted in final form 24 June 2013

Aizawa-Abe M, Ebihara K, Ebihara C, Mashimo T, Takizawa A, Tomita T, Kusakabe T, Yamamoto Y, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Sakai T, Hosoda K, Serikawa T, Nakao K. Generation of leptin-deficient *Lep^{mkyo}/Lep^{mkyo}* rats and identification of leptin-responsive genes in the liver. *Physiol Genomics* 45: 786–793, 2013. First published June 25, 2013; doi:10.1152/physiolgenomics.00040.2013.—Leptin is one of the key molecules in maintaining energy homeostasis. Although genetically leptin-deficient *Lep^{ob}/Lep^{ob}* mice have greatly contributed to elucidating leptin physiology, the use of more than one species can improve the accuracy of analysis results. Using the *N*-ethyl-*N*-nitrosourea mutagenesis method, we generated a leptin-deficient *Lep^{mkyo}/Lep^{mkyo}* rat that had a nonsense mutation (Q92X) in leptin gene. *Lep^{mkyo}/Lep^{mkyo}* rats showed obese phenotypes including severe fatty liver, which were comparable to *Lep^{ob}/Lep^{ob}* mice. To identify genes that respond to leptin in the liver, we performed microarray analysis with *Lep^{mkyo}/Lep^{mkyo}* rats and *Lep^{ob}/Lep^{ob}* mice. We sorted out genes whose expression levels in the liver of *Lep^{mkyo}/Lep^{mkyo}* rats were changed from wild-type (WT) rats and were reversed toward WT rats by leptin administration. In this analysis, livers were sampled for 6 h, a relatively short time after leptin administration to avoid the secondary effect of metabolic changes such as improvement of fatty liver. We did the same procedure in *Lep^{ob}/Lep^{ob}* mice and selected genes whose expression patterns were common in rat and mouse. We verified their gene expressions by real-time quantitative PCR. Finally, we identified eight genes that primarily respond to leptin in the liver commonly in rat and mouse. These genes might be important for the effect of leptin in the liver.

ENU mutagenesis; *Lep^{mkyo}/Lep^{mkyo}* rat; *Lep^{ob}/Lep^{ob}* mouse; leptin responsive gene; microarray analysis

LEPTIN IS AN ADIPOCYTE-DERIVED hormone that regulates energy homeostasis mainly through the hypothalamus (1). In addition to food intake and energy expenditure, leptin regulates glucose and lipid metabolism (5, 13, 20). Leptin-deficient *Lep^{ob}/Lep^{ob}* mice are well known to have made a great contribution in the discovery of leptin, and they have been used as an animal model of obesity and obesity-associated diabetes mellitus. Although much has been learned from *Lep^{ob}/Lep^{ob}* mice, it is important to use other models of different species to generalize results from one species.

For the last 30 yr, many investigators have chosen to use mouse models, because the technologies of embryonic stem

cells allowed the generation of knockout and knock-in mice (7). However, rats have a long history in medical research, being fundamental from drug development to advances of neuroscience and physiology. Rats are considered to be a better model than mice in their behavioral and physiological characteristics, which are more relevant to humans.

Lep^{fa}/Lep^{fa} Zucker rats and *Lep^r/Lep^r* Koletzky rats already exist as rat models whose lack of leptin signals is due to mutations in the leptin receptor (22, 23). The phenotypes in these rats are also identical in many aspects to those in *Lep^{ob}/Lep^{ob}* mice (4). However, leptin receptor mutant rats are unfit models for the study of the effect of leptin treatment. Although generation of leptin knockout rats by pronuclear microinjections of zinc finger nucleases has been reported recently (26), the investigators did not assess the effect of leptin administration. So this is the first report of leptin administration in the leptin-deficient rat.

In this study, we used the *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) mutagenesis method to generate a leptin-deficient *Lep^{mkyo}/Lep^{mkyo}* rat that had a nonsense mutation (Q92X) in the leptin gene (17). The mutation site of *Lep^{mkyo}/Lep^{mkyo}* rat was upstream of that of R105X in *Lep^{ob}/Lep^{ob}* mice (28). We confirmed that *Lep^{mkyo}/Lep^{mkyo}* rats secreted no measurable leptin in the serum and that their obese phenotypes including severely fatty liver were comparable to *Lep^{ob}/Lep^{ob}* mice. To identify genes that respond to leptin in the liver, we compared gene expressions in the liver between *Lep^{mkyo}/Lep^{mkyo}* rats and their wild-type (WT) littermates and also between leptin-treated and saline-treated *Lep^{mkyo}/Lep^{mkyo}* rats by microarray analysis. We sorted out genes whose expression levels in the liver of *Lep^{mkyo}/Lep^{mkyo}* rats were changed from WT rats and were reversed toward WT rats by leptin treatment. Moreover, to identify genes that commonly respond to leptin in the liver of rats and mice, we did the same series of experiments with *Lep^{ob}/Lep^{ob}* mice. We finally identified eight genes that commonly respond to leptin in the liver of rats and mice. Using more than one species can improve the accuracy of analysis results. Thus, genes identified in this study might be important for the effect of leptin in the liver.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Rats with a leptin gene mutation were obtained by ENU mutagenesis of F344/NSlc rats, followed by MuT-POWER (Mu Transposition POoling method With sequencER) screening on the genomic DNA of 4,608 G1 male offspring in KURMA (Kyoto University Rat Mutant Archive). ENU mutagenesis procedures, screening protocols

Address for reprint requests and other correspondence: K. Ebihara, Dept. of Experimental Therapeutics, Translational Research Center, Kyoto Univ. Hospital, 54 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan (e-mail: kebihara@kuhp.kyoto-u.ac.jp).

(17), and intracytoplasmic sperm injection procedure were previously described (12). The forward primer and the reverse primer used for identifying mutation of the leptin gene were 5'-GCACCTGTTGTCCTCTTCC-3' and 5'-TGGAATCGTGCGGATAACTT-3', respectively. More than six backcross generations were performed against the F344/NSlc inbred background. Male C57Bl/6J *Lep^{ob}/Lep^{ob}* mice were purchased from CLEA Japan (Tokyo, Japan). Rats and mice were maintained on a 10 h light/14 h dark cycle (lights on 7:00 AM, lights off 9:00 PM) and fed ad libitum standard pellet diet (MF; Oriental Yeast, Tokyo, Japan). All animal care and experiments conformed to the Guidelines for Animal Experiments at Kyoto University and were approved by the Animal Research Committee of Kyoto University. The F344-*Lep^{mkys}* rat has been deposited into the National Bio Resource Project-Rat in Japan (NBPR-Rat no. 0628) and is available from the Project (<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/nbr>).

Genotyping for *Lep^{mkys}* mutation. Genotyping for *Lep^{mkys}* mutation was performed by real-time PCR system using TaqMan Sample-to-SNP kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) with a specific primer pair (forward primer sequences are 5'-GTTCTCCAGGTCATGAGC-TATCTG-3' and reverse primer sequences are 5'-CTGGCAGTC-TATCAACAGATCCT-3') and TaqMan MGB probes (WT probe sequences are 5'-TTGCCCTCCAAAACG-3' and mutant probe sequences are 5'-TTGCCCTCCTAAAACG-3'). Genomic DNA was extracted from whole blood. The cycling conditions were 20 s at 95°C followed by 40 cycles of 3 s at 95°C and 20 s at 60°C.

Whole body composition analysis. Twenty-week-old male rats under anesthesia were scanned from nose to anus by computer tomography with La Theta LCT-100 (Aloka, Tokyo, Japan). The X-ray source tube voltage was set at 50 kV with a constant 1 mA current. Aloka software estimated the volume of adipose tissue, bone, air, and the remainder using differences in X-ray density. Distinguishing intra-abdominal adipose tissue and subcutaneous adipose tissue was based on detection of the abdominal muscle layers. Fat weight was calculated using the commonly used density factor of 0.92 g/cm³. This method provides accurate estimation of total subcutaneous and intra-abdominal fat pads as validated by dissection (11).

Measurement of body length and rectal temperature. Body length was measured between nose and anus in 19-wk-old male rats under anesthesia. Rectal temperature was measured with a digital thermometer (BDT-100; Bio Research Center, Tokyo, Japan) at 10:00 AM in 19 wk old male rats.

Biochemical assays. Blood was obtained from the tail vein after overnight fasting at the age of 19 wk. Plasma leptin concentrations were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for rat leptin (Millipore, St. Charles, MO). Plasma glucose concentrations were measured by a glucose assay kit (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan). Plasma insulin concentrations were measured by an insulin-ELISA kit (Morinaga Institute of Biological Science, Yokohama, Japan). Plasma triglyceride, nonesterified fatty acid (NEFA), and total cholesterol concentrations were measured by enzymatic kits (Triglyceride E-test Wako, NEFA C-test Wako, and Cholesterol E-test Wako, respectively; Wako Pure Chemical Industries). To measure liver triglyceride contents, we sampled livers from 19 wk old rats and immediately froze them in liquid nitrogen. Lipids were extracted with isopropyl alcohol-heptane (1:1 vol/vol). After evaporating the solvent, we resuspended lipids in 99.5% (vol/vol) ethanol, and triglyceride content was measured by an enzymatic kit (Triglyceride E-test Wako, Wako Pure Chemical Industries).

Glucose tolerance test. Intraperitoneal glucose tolerance test was performed after overnight fasting of 19 wk old male rats. Rats received 2.0 mg/g glucose by intraperitoneal injection. Blood was sampled from the tail vein before and 15, 30, 60, 90, 120 min after the glucose load.

Liver histology. Livers were sampled from 19 wk old rats, fixed in 10% neutrally buffered formalin, and subsequently embedded in paraffin. Histological sections of 5 μm thickness were stained with hematoxylin and eosin and examined by light microscopy.

Liver sampling for microarray analysis. Recombinant murine leptin (generously supplied by Amgen, Thousand Oaks, CA) (1 μg/mg) or saline was intraperitoneally administered in 20 wk old *Lep^{ob}/Lep^{ob}* mice, *Lep^{mkys}/Lep^{mkys}* rats and their respective control littermates after 6 h fasting. Livers were sampled 6 h after leptin or saline administration and were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use for RNA isolation.

RNA extraction and microarray gene expression arrays. Details for the sample preparation and microarray processing are available from <http://www.affymetrix.com>. RNA was prepared from liver of three male mice or rats per group using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) reagent following the supplier's protocol. The quality and the concentrations of the extracted RNA were checked using the Nano-Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan). Each three RNA samples were pooled for analysis. We used 250 ng of total RNA for one cycle of cDNA synthesis. Hybridization, washing, and scanning of Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA) and Affymetrix GeneChip Rat Genome 230 2.0 Arrays were done according to standard Affymetrix protocols. The hybridized chips were scanned with an argon-ion laser confocal microscope (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA). Fluorometric data were processed by Affymetrix GeneChip Command Console software and analyzed with Affymetrix Expression Console software 7. Normalization was performed with Affymetrix Microarray Suite 5.0 (MAS5.0) algorithm to obtain the signal intensity and the detection call, which shows the expression of a gene with a defined confidence level for each probe set. The mRNA expression levels for all genes on the array were scaled to a mean of 500 for each array. The detection call can be "present" when the perfect match probes are significantly more hybridized than the mismatch probes, false discovery rate (FDR) < 0.04, "marginal" for FDR > 0.04, and < 0.06 or "absent," FDR > 0.06.

Real-time quantitative RT-PCR. Real-time quantitative RT-PCR was performed to validate expression levels of candidate leptin-responsive genes. Single-stranded cDNA was synthesized from 1 μg of total RNA using SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Quantitative RT-PCR was performed with SYBR Green (Applied Biosystems) by Applied Biosystems StepOnePlus RT-PCR System using gene-specific primer. The housekeeping rat or mouse mitochondrial subunit 18S rRNA genes were used for control and quantitative RT-PCR was performed with TaqMan (Applied Biosystems). The sequences of primers (Sigma-Genosys, Tokyo, Japan) used in the present study are as follows: rat Ccl2 (F) 5'-TAGCATCCAGTGCTGTCTC-3', rat Ccl2 (R) 5'-CAGCCGACTCATTGGGATCA-3', mouse Ccl2 (F) 5'-AGATG-CAGTTAACGCCCCAC-3', mouse Ccl2 (R) 5'-GACCCATTCCTTCT-TGGGGT-3', rat Cdc3 (F) 5'-AACAAAGCATGTGTCTCGGGT-3', rat Cdc3 (R) 5'-TCTTGGCCTGTTGAGACT-3', mouse Cdc3 (F) 5'-CCTCTGTTACCTAGTGTGG-3', mouse Cdc3 (R) 5'-TTTCGTCT-GCTGCGCTTAGA-3', rat Fkbp5 (F) 5'-ACTGACTCGCCTGACA-CAAG-3', rat Fkbp5 (R) 5'-GAGCGAGGTATCTGCCTGTC-3', mouse Fkbp5 (F) 5'-CTTGGACCACGCTATGGTTT-3', mouse Fkbp5 (R) 5'-GGATGTACTGCCAACACCTT-3', rat Inhbb (F) 5'-TCACGGTGA-CAGGTGGAATG-3', rat Inhbb (R) 5'-CCGTTTTTCGGATGCGATGTC-3', mouse Inhbb (F) 5'-TGACCCACTAGGCCGAAAC-3', mouse Inhbb (R) 5'-CAGGCCACTCGAAGGATTGT-3', rat Lin7a (F) 5'-AAGCCA-CAAGAATCCGGAGA-3', rat Lin7a (R) 5'-CTGACGACCAGCTTCA-CACT-3', mouse Lin7a (F) 5'-AGTACCAGTGCACAAGCTCC-3', mouse Lin7a (R) 5'-CATGTCTTTTCAGCCACCCCT-3', rat C-Myc (F) 5'-ATTCCAGCGAGAGACAGAGGGAGTG-3', rat C-Myc (R) 5'-ACGTTGAGGGGCATCGTCGTG-3', mouse C-Myc (F) 5'-CGCGC-CCAGTGGAGGATATC-3', mouse C-Myc (R) 5'-CCACATACAGTC-CTGGATGAT-3', rat Npr2 (F) 5'-TTGGGGAGAGTCTACGAGCA-3', rat Npr2 (R) 5'-CTCGGTACGTGATCACCAGG-3', mouse Npr2 (F) 5'-CCAGAACTGCTTAGCGGGAA-3', mouse Npr2 (R) 5'-CTGAC-CATTCCGCACCTTCT-3', rat Ppl (F) 5'-AGTGCTGCCACTCAAG-TACC-3', rat Ppl (R) 5'-CAGTCTCCCGTTGTTCTT-3', mouse Ppl (F) 5'-GCATGCTGAGTGGAAGGAGT-3', mouse Ppl (R) 5'-AAGTCT-