

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
- 肥満・メタボリックシンドロームモデル遺伝子変異ラットの作成と解析 -
分担研究者：海老原 健 京都大学大学院医学研究科 臨床研究総合センター
開発企画部 準教授

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、肥満、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脂肪蓄積、糖・脂質代謝機能などの表現型解析、薬物治療に対する反応の解析を行い、興味深い知見を得た。本研究により、これら樹立した遺伝子変異ラットの動物モデルとしての有用性が示され、今後の創薬開発への応用が望まれる。

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(臓腑、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肥満、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目指すと共に、このモデルを用いた新規創薬開発の加速への貢献を目的とする。

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、肥満、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、脂肪委縮症の原因遺伝子の一つである seipin 遺伝子、PPAR gamma 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・脂質代謝、脂肪蓄積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、seipin、PPARgamma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。まずレプチン遺伝子ナンセンス変異ラットでは血中のレプチン濃度が検出感度以下に低下しており、食事摂取量の増加、エネルギー消費の低下と共に、明らかな肥満を認めた。また、糖負荷試験において耐糖能異常、インスリン抵抗性を認め、血中中性脂肪、コレステロール値の上昇などの脂質異常が見出された。さらにレプチン遺伝子ナンセンス変異ラットでは著明な肝臓腫大が見られ、肝臓組織内に脂肪の蓄積を認め、脂肪肝を呈していることが考えられた。このようにレプチン遺伝子ナンセンス変異ラットはヒトにおける肥満症、メタボリックシンドロームの一つのモデルであることが明らかとなった。更に、これらマウスにレプチンを投与したところ、これらの表現形の改善を認めた。このことから本レプチン遺伝子変異ラットが肥満モデルとして創薬研究にも有用であることが示された。また、レプチンの作用機序を明らかにするために、肝臓において、レプチン遺伝子変異ラットおよびレプチン遺伝子に変異を有するob/obマウスそれぞれの肝臓においてレプチン投与前後で共通に変化する遺伝子群を探索した結果、最終的に8つの遺伝子がレプチン遺伝子変異ラット及びマウスにおいて共通に変化していることが明らかとなり、本年度はこれら遺伝子の機能を解析を行った。これらのことは本ラットが、肥満およびその合併症に関わる種を超えて保存されている病態の解明に有用であることが示唆される。さらにレプチン遺伝子ナンセンス変異ラットに血糖降下薬として臨床で使用されているチアゾリジン誘導体を投与し、その反応をob/obマウスと比較した。レプチン遺伝子ナンセンス変異ラット、ob/obマウスと

もにチアゾリジン誘導体投与により血糖値の改善、インスリン値の低下を認めたが、興味深いことに、レプチン遺伝子ナンセンス変異ラットでは肝臓重量の減少を認めたのに対し、ob/obマウスでは逆に肝臓重量が増加した。一方精巣周囲脂肪量はレプチン遺伝子ナンセンス変異ラットではチアゾリジン投与により有意に増加したが、ob/obマウスでは不変かやや減少する傾向にあった。このことは同じレプチン遺伝子変異動物であっても、ラットとマウスではチアゾリジン誘導体に対する反応に質的差異があることを示すものである。チアゾリジン誘導体の標的であるPPARgammaの遺伝子発現を肝臓において検討したところ、ob/obマウスの肝臓では野生型に比してPPARgammaの発現が亢進しており、チアゾリジン誘導体によりさらに有意に発現が亢進したが、レプチン変異ラットでは野生型に比しむしろ発現が低下傾向にあり、チアゾリジン誘導体投与でも有意な変化を示さなかった。こうした臓器における代謝関連遺伝子発現の種差が、薬物治療に対する反応の差異に寄与するものと考えられた。チアゾリジン誘導体はヒトでは脂肪を増やし、脂肪肝を改善させる効果が認められることから、今回、ob/obマウスよりもレプチン遺伝子変異ラットのほうが、少なくともチアゾリジン誘導体への反応に関してはよりヒトに近いモデルである可能性が示唆され、レプチン変異ラットの肥満モデル動物としての有用性が確認できた。

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耐糖能異常、インスリン抵抗性が認められ、また顕著な脂肪肝が見られ、ヒト脂肪委縮症と類似の表現系が得られた。また記憶機能の低下や精子形成能の低下など、seipinノックアウトマウスでは報告されていないが、ヒトで認められるものと類似の表現形がセイピン変異ラットでは見出された。この際の原因はマウスとラットにおけるseipin遺伝子発現の差によるものではないかと考えられる。このことからセイピンノックアウトマウスより、セイピン遺伝子変異ラットのほうが、よりヒトの病気に近いモデルである可能性が示唆され、本セイピン変異ラットの動物モデルとしての有用性が示

された。今後これらラットモデルを用いて更に詳細な解析を継続していく予定である。

さらに我々は昨年度PPAR γ 遺伝子に変異を有するラットの同定、系統樹立にも成功し、本年度はその解析も行った。本遺伝子変異ラットのホモ接合体はノックアウトマウスと同様に胎生致死を示し、機能喪失型の変異であることが示唆された。そこで、変異ヘテロ接合体ラットを用いてその表現型の解析を進め、耐糖能などの表現型に興味深いデータを得た。今後さらなる解析を行う予定である。

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生理学的解析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、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。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、その脂肪蓄積、糖脂質代謝の解析によりこれらがヒトの病態類似のモデル動物として有用であることが示唆された。また PAR γ 遺伝子変異ラットの作製にも成功し、同様にノックアウトマウスとの差異を見出しつつある。今後これら遺伝子変異ラットの表現系をより詳細に解析することにより、病態解明・新規治療標的の同定および新規創薬開発に役立てていきたい。

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、本年度はレプチン、seipin 遺 PPAR γ 遺伝子変異ラットの解析を行った。今後、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への応用を行いたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ebihara C, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Mashimo T, Tomita T, Zhao M, Gumbilal V, Kusakabe T, Yamamoto Y, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Sakai T, Hosoda K, Serikawa T, Nakao K. Seipin is necessary for normal brain development and spermatogenesis in addition to adipogenesis. **Hum Mol Genet.** 2015 *in press* [Epub ahead of print]
2. Sakai T, Kusakabe T, Ebihara K, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Zhao M, Gumbilal VM, Ebihara C, Aizawa-Abe M, Yamamoto Y, Noguchi M, Fujikura J, Hosoda K, Inagaki N, Nakao K. Leptin restores the insulinotropic effect of exenatide in a mouse model of type 2 diabetes with increased adiposity induced by streptozotocin and high-fat diet. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 307: E712-719, 2014.

2. 学会発表

国際学会

1. Chihiro Ebihara, Ken Ebihara, Megumi Aizawa-Abe, Yuji Yamamoto, Sachiko Yamamoto-Kataoka, Mingming Zhao, Valentino Gumbilal, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao
Improvement effect of thiazolidine on fatty liver and type 2 diabetes requires adipose tissue: An evidence from the comparison between mice and rats
The Endocrine Society's 96th Annual Meeting 2014年6月22日 米国、シカゴ

2. Ken Ebihara, Megumi Aizawa-Abe, Kiminori Hosoda, Toru Kusakabe, Daisuke Aotani, Kazuwa Nakao. Translational Research of Leptin for Lipodystrophy in Japan. Lipodystrophy in 2014: Leptin and Beyond 2014年10月18日 米国、アナーバー

3. Chihiro Ebihara, Ken Ebihara, Megumi Aizawa-Abe, Tomoji Mashimo, Tsutomu Tomita, Mingming Zhao, Valentino Gumbilai, Yuji Yamamoto, Sachiko Yamamoto-Kataoka, Kiminori Hosoda, Tadao Serikawa, Kazuwa Nakao. The human lipodystrophy gene product, seipin plays physiological roles in the brain development and spermatogenesis in addition to the adipogenesis. Lipodystrophy in 2014: Leptin and Beyond 2014年10月17日~18日 米国、アナーバー

4. Chihiro Ebihara, Ken Ebihara, Megumi Aizawa-Abe, Mingming Zhao, Valentino Gumbilai, Yuji Yamamoto, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao. Pathophysiological role of *Bscl2/Seipin* haploinsufficiency in adiposity and metabolism. The Endocrine Society's 97th Annual Meeting 2015年3月7日 米国、サンディエゴ

国内学会

1. 海老原 健、阿部 恵、細田公則、中尾一和
脂肪細胞由来ホルモン、レプチンのトランスレーショナルリサーチ
第32回内分泌代謝学サマーセミナー 2014年7月10日 山梨県、河口湖富士レークホテル 招待

2. 海老原 健、阿部 恵、細田公則、中尾一和
疾患モデルラットを用いた脂肪細胞関連

遺伝子の病態生理的意義の解明
第37回日本高血圧学会総会 2014年10月18日 横浜市、パシフィコ横浜 招待

3. 海老原千尋、海老原 健、阿部 恵、真下知士、細田公則、芹川忠夫、中尾一和
セイピン欠損(SKO)ラットを用いた先天性全身性脂肪萎縮症原因遺伝子セイピンの生理的意義の解明
第29回日本糖尿病・肥満動物学 2015年2月13日 京都市、京都大学医学部創立百周年記念施設「芝蘭会館」

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし