

201407013B

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

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

平成24年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 中 尾 一 和

平成27(2015)年5月

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

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

平成24年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 中 尾 一 和

平成27(2015)年5月

## 目 次

### I. 総合研究報告書

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  
—生活習慣病・難治性疾患モデル遺伝子変異ラット開発の推進—

中尾 一和 ----- 1

### II. 分担研究報告書

1. 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開発と解析—

海老原 健 ----- 10

2. 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  
—心血管病モデル遺伝子変異ラット開発と解析—

桑原 宏一郎 ----- 20

3. 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  
—高血圧、腎臓病モデル遺伝子変異ラット開発と解析—

横井 秀基 ----- 30

4. 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—

富田 努 ----- 37

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 42

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 48

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
総合研究報告書

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  
ー生活習慣病・難治性疾患モデル遺伝子変異ラット開発の推進-

主任研究者：中尾 一和

京都大学大学院医学研究科

メディカルイノベーションセンター 特任教授

**研究要旨** 本研究課題では、新規開発され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、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した。本研究において、複数の生活習慣病関連遺伝子、難治性疾患関連遺伝子に変異を有する遺伝子変異ラットを同定し、系統樹立に成功し、それら遺伝子変異ラットの表現系解析を行い、疾患モデルとしての基盤確立、有用性の確認を行った。

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  
准教授

桑原 宏一郎  
京都大学大学院医学研究科  
循環器内科  
講師

横井 秀樹  
京都大学大学院医学研究科  
腎臓内科  
助教

富田 努  
京都大学大学院医学研究科  
糖尿内分泌栄養内科  
特定病院助教

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。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。最近京都大学大学院医学研究科動物実験施設の真下らが 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。また加えて、Zinc Finger Nuclease 技術を用いて、任意の遺伝子に変異を有する遺伝子変異ラットを作製することも可能になった。本研究課題では、これら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作成し、その表現系を解析することにより心筋梗塞、心不全、糖尿病、肥満、脳卒中、CKD などの新規生活習慣病や脂肪萎縮性糖尿病などの難知性疾患の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

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、治療法開発が強く望まれている。現時点において、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

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基盤を樹立す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変異を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し、変異遺伝子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た。またこの方法にて変異が見つからなかった重要な遺伝子に関しては、近年開発されたZinc Finger Nuclease技術を用いて、対象の遺伝子に変異を有する遺伝子変異ラットを作製した。こうして樹立した複数の遺伝子変異ラットは京都大学動物実験施設において桑原（心筋梗塞、心不全、高血圧、脳卒中）、海老原（肥満、メタボリックシンドローム）、富田（糖尿病）、横井(CKD)らがおのおのの観点からその解析を行った。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スクリーニングおよびZinc Finger Nuclease技術により、レプチン、セイピン、ナトリウム利尿ペプチド1型受容体遺伝子(GC-A)、PPAR $\gamma$ 、ラミンA/C、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、C型ナトリウム利尿ペプチド遺伝子(CNP)にナンセンスあるいはミスセンス変異、あるいはZinc Finger Nucleaseによるdeletionを有するラットを得、系統樹立を行った。引き続いて、これらラットを用いて、その表現系解析を行い、モデル動物としての意義の確立と、創薬開発研究への

応用の可能性を検討した。

まず我々は、レプチン遺伝子ナンセンス変異ラットを得て、系統樹立し解析を行った。本レプチン遺伝子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、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。また、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、これら変異ラットにレプチンを投与したところ、上記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、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、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った。現在これら遺伝子の機能解析を進めているところである。一方でレプチン変異ラットとob/obマウスではチアゾリジン誘導体投与に対する反応が異なっていることも見出し、その背景に肝臓におけるPPAR $\gamma$ 遺伝子発現のマウスとラットの間での種差が存在する可能性を見出した。ラットの肝臓におけるPPAR $\gamma$ 遺伝子発現パターンはヒトのそれと類似しており、そのためレプチン変異ラットはマウスと比べてよりヒトに類似した表現型を示すことが示唆された。これらのことから本レプチン変異ラットが、ヒトの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なモデルであることが示された。

脂肪委縮症の原因遺伝子であるセイピン遺伝子の変異ラットを得、その系統樹立を行い、さらにその表現型の解析を行った。本セイピン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

系を示していた。またセイピンノックアウトマウスでは報告されていない、精巣機能異常や認知機能低下などの表現形も本ラットにおいて見出した。ラットとマウスの差異の原因の一部はセイピン遺伝子発現分布の差によるものであることが示唆され、本セイピン変異ラットがマウスと比べ、ヒト脂肪委縮症のよりよいモデル動物である可能性が示された。

また我々はナトリウム利尿ペプチド1型受容体(GC-A)のguanylyl cyclase domainに変異を有し、その活性の低下が予想される変異を有するGC-A変異ラットの樹立に成功し、その解析を行った。GC-A変異ラットは野生型ラットと比べ特に体重や成長には差がなく、また血圧にも有意な差は得られなかった。また、これらラットにANPを投与してcGMPの反応を観察したところ、変異ラットと野生型ラットで有意な差は認められなかった。これらのことから、本GC-A遺伝子変異は有意な機能的変異を伴っていないことが明らかとなった。

ラミンA/Cの遺伝子はその変異がヒトにおいて拡張型心筋症の原因となることが知られている。我々はラミンA/Cの遺伝子にミスセンス変異を持つ変異ラットを同定し、系統樹立に成功した。本ラットは正常に生まれるが、生後12週前後で死亡した。心エコーでは心拡大及び、心機能低下が確認され、ヒトラミン心筋症と類似した表現型を示していることが確認された。本モデルはヒトラミン心筋症の良いモデル動物であると考えており、現在本ラットを用いて、表現型、分子メカニズムの解明研究を継続している。

加えて、我々はPPAR $\gamma$ 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た。本変異ラットはホモ接合体ではノックアウトマウスと同様に胎生致死であった。そこでPPAR $\gamma$ 遺伝子変異ヘテロ接合体ラットの表現型解析を解析したところ、マウスでのPPAR $\gamma$ ノックアウトとは一部異なる表現型を観察しえた。今後さらなる解析を継続し、本ラットのモデル動物としての意義の確立に努めたい。

さらに我々はZinc Finger Nuclease技術を用いて、BNPノックアウトラットおよびCNPノックアウトラットの系統樹立にも成功した。BNPノックアウトラットに関しては、Zinc Finger Nuclease技術を用いて、BNP遺伝子に変異を入

れた数系統のラットから、BNP遺伝子の2nd exonの大部分を結失した系統を樹立した。このラットの心臓組織、および心筋細胞では正常なBNP遺伝子発現およびBNP産生が見られないことを確認した。すでに我々の教室から発表したBNPノックアウトマウス同様、このBNPノックアウトラットの血圧、心機能、心重量は野生型と比し有意な差はなかった。ノックアウトマウスでは圧負荷時に心筋線維化がBNPノックアウトマウスでは亢進していたことから、BNPノックアウトラットに、大動脈縮窄による圧負荷モデルを作製しその表現形を解析している。

CNPは骨形成に重要であり、その受容体の機能喪失型変異がヒトにおいて低身長をきたすマロト一型遠位中間肢異形成症の原因であることが示されている。我々はZinc Finger Nuclease技術を用いてCNPを欠失するラットの樹立にも成功した。CNPノックアウトラットは予想通り短軀であったが、CNPノックアウトマウスはそのほとんどが生後数週間以内に死亡するのに対して、CNPノックアウトラットは死亡することなく、成獣まで生存可能であることが明らかとなり、CNPの骨形成をはじめ様々な臓器における役割の成獣における解析が初めて可能となった。CNPは血管の機能維持にも重要であることを我々を含む複数の研究者が明らかにしており、本ラットモデルは、そうした心血管系におけるCNPの意義の解析にも有用であると考えられ、現在解析を継続している。

#### 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。本研究において行った遺伝子変異ラットの樹立とその表現系解析から、本研究において得られた遺伝子変異ラットが、ヒト生活習慣病関連疾患・難治性疾患モデル動物として有用である可能性が確認された。今後上記遺伝子変異ラットの表現系の詳細を引き続き解析し、これら疾患のモデルラットの意義を確立することにより、共同研究なども通じて、病態解明・新規治療標的の同定および新規創薬開発への応用を目指したい。

## 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 スクリーニングと Zinc Finger Nuclease 技術により、複数の関連遺伝子変異ラットの同定、系統樹立に成功し、その表現系を解析し、そのモデル動物としての意義を示した。今後、本研究において得られた遺伝子変異ラットの表現系をさらに詳細に解析し、疾患モデルラットとしての意義の確立と、病態解明・新規治療標的の同定研究と新規創薬開発研究へのさらなる応用を目指したい。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ogawa, Y., Mukoyama, M., Yokoi, H., Kasahara, M., Mori, K., Kato, Y., Kuwabara, T., Imamaki, H., Kawanishi, T., Koga, K., Ishii, A., Tokudome, T., Kishimoto, I., Sugawara, A., Nakao, K.  
Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A protects podocytes from aldosterone-induced glomerular injury.  
**J. Am. Soc. Nephrol.** 23:1198-1209, 2012.
2. Minami T, Kuwahara K, Nakagawa Y, Takaoka M, Kinoshita H, Nakao K, Kuwabara Y, Yamada Y, Yamada C, Shibata J, Usami S, Yasuno S, Nishikimi T, Ueshima K, Sata M, Nakano H, Seno T, Kawahito Y, Sobue K, Kimura A, Nagai R, Nakao K.  
Reciprocal expression of MRTF-A and myocardin in crucial for pathological vascular remodelling in mice.  
**EMBO J.** 2012 Nov 28;31(23):4428-40.
3. 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.  
Pleiotrophin triggers inflammation and increased peritoneal permeability leading to peritoneal fibrosis.  
**Kidney Int.** 81, 160-169, 2012.
4. Kuwabara, T., Mori, K., Mukoyama, M., Kasahara, M., Yokoi, H., Saito, Y., Ogawa, Y., Imamaki, H., Kawanishi, T., Ishii, A., Koga, K., Mori, P. K., Kato, Y., Sugawara, A., Nakao, K.  
Exacerbation of diabetic nephropathy by hyperlipidaemia is mediated by toll-like receptor 4 in mice.  
**Diabetologia** 55:2256-2266, 2012.
5. 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
6. M. Iwanishi, K. Ebihara, T. Kusakabe, S. Harada, J. Ito-Kobayashi, A. Tsuji, K. Hosoda, K. Nakao K.  
Premature atherosclerosis in a Japanese diabetic patient with atypical familial partial lipodystrophy and hypertriglyceridemia.  
**Intern Med.** 51: 2573-2579, 2012
7. 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.

8. 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.
9. 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.
10. Yokoi, H., Kasahara, M., Mori, K., Kuwabara, T., Toda, N., Yamada, R., Namoto, S., Yamamoto, T., Seki, N., Souma, N., Yamaguchi, T., Sugawara, A., Mukoyama, M., and Nakao, K. Peritoneal fibrosis and high transpoare induced in mildly pre-injured peritoneum by 3,4-dideoxyglucosone-3-ene in mice. **Perit. Dial. Int.** 33:143-154, 2013.
11. Nishikimi T, Okamoto H, Nakamura M, Ogawa N, Horii K, Nagata K, Nakagawa Y, Kinoshita H, Yamada C, Nakao K, Minami T, Kuwabara Y, Kuwahara K, Masuda I, Kangawa K, Minamino N, Nakao K. Direct immunochemiluminescent assay for proBNP and total BNP in human plasma proBNP and total BNP levels in normal and heart failure **PLoS One.** 2013;8(1):e53233.
12. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kangawa K, Minamino N, Nakao K. Complexity of melicular forms of B-type natriuretic peptide in heart failure. **Heart** 2013. 99(10):677-679.
13. Hitomi T, Habu T, Kobayashi H, Okuda H, Harada KH, Osafune K, Taura D, Sone M, Asaka I, Ameku T, Watanabe A, Kasahara T, Sudo T, Shiota F, Hashikata H, Takagi Y, Morito D, Miyamoto S, Nakao K, Koizumi A. The moyamoya disease susceptibility variant RNF213 R4810K (rs112735431) induces genomic instability by mitotic abnormality **Biochem Biophys Res Commun.** 439(4):419-26.. 2013
14. Hitomi T, Habu T, Kobayashi H, Okuda H, Harada KH, Osafune K, Taura D, Sone M, Asaka I, Ameku T, Watanabe A, Kasahara T, Sudo T, Shiota F, Hashikata H, Takagi Y, Morito D, Miyamoto S, Nakao K, Koizumi A. Downregulation of Securin by the variant RNF213 R4810K (rs112735431, G>A) reduces angiogenic activity of induced pluripotent stem cell-derived vascular endothelial cells from moyamoya patients. **Biochem Biophys Res Commun.** 438(1):13-9. 2013
15. Honda K, Sone M, Tamura N, Sonoyama T, Taura D, Kojima K, Fukuda Y, Tanaka S, Yasuno S, Fujii T, Kinoshita H, Ariyasu H, Kanamoto N, Miura M, Yasoda A, Arai H, Ueshima K, Nakao K. Adrenal reserve function after unilateral adrenalectomy in patients with primary aldosteronism. **J Hypertens.** 31(10):2010-7. 2013
16. 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 Lepmkyo/Lepmkyo rats and identification of leptin-responsive genes in the liver. **Physiol Genomics.** 45(17):786-93. 2013
17. Noguchi M, Hosoda K, Nakane M, Mori E, Nakao K, Taura D, Yamamoto Y, Kusakabe T, Sone M, Sakurai H, Fujikura J, Ebihara K, Nakao K. In vitro characterization and engraftment of adipocytes derived from human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. **Stem Cells Dev.** 22(21):2895-905. 2013
18. Fujikura J, Hosoda K, Nakao K. Cell transplantation therapy for diabetes mellitus: endocrine pancreas and adipocyte. **Endocr J.** 60(6):697-708. 2013
19. Kitamoto A, Kitamoto T, Mizusawa S, Teranishi H, So R, Matsuo T, Nakata Y, Hyogo H, Ochi H, Nakamura T, Kamohara S, Miyatake N, Kotani K, Komatsu R, Itoh N, Mineo I, Wada J, Yoneda M, Nakajima A,



- Funahashi T, Miyazaki S, Tokunaga K, Masuzaki H, Ueno T, Chayama K, Hamaguchi K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Sakata T, Tanaka K, Matsuzawa Y, Nakao K, Sekine A, Hotta K.  
NUDT3 rs206936 is associated with body mass index in obese Japanese women.  
**Endocr J.** 60(8):991-1000. 2013
20. Ida M, Hirata M, Odori S, Mori E, Kondo E, Fujikura J, Kusakabe T, Ebihara K, Hosoda K, Nakao K.  
Early changes of abdominal adiposity detected with weekly dual bioelectrical impedance analysis during calorie restriction.  
**Obesity** (Silver Spring). 21(9):E350-3. 2013
21. Bando M, Iwakura H, Ariyasu H, Koyama H, Hosoda K, Adachi S, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T.  
Overexpression of intralyslet ghrelin enhances  $\beta$ -cell proliferation after streptozotocin-induced  $\beta$ -cell injury in mice.  
**Am J Physiol Endocrinol Metab.** 305(1):E140-8. 2013
22. Uosaki H, Magadum A, Seo K, Fukushima H, Takeuchi A, Nakagawa Y, Moyes KW, Narazaki G, Kuwahara K, Laflamme M, Matsuoka S, Nakatsuji N, Nakao K, Kwon C, Kass DA, Engel FB, Yamashita JK.  
Identification of Chemicals Inducing Cardiomyocyte Proliferation in Developmental Stage-Specific Manner with Pluripotent Stem Cells.  
**Circ Cardiovasc Genet.** 6(6):624-33. 2013.
23. Yasuno S, Kuwahara K, Kinoshita H, Yamada C, Nakagawa Y, Usami S, Kuwabara Y, Ueshima K, Harada M, Nishikimi T, Nakao K.  
Angiotensin II Type 1a receptor signaling directly contributes to the increased arrhythmogenicity in cardiac hypertrophy  
**Br J Pharmacol.** 170(7):1384-95. 2013.
24. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kangawa K, Nakao K.  
Adrenomedullin in Cardiovascular Disease: A Useful Biomarker, Its Pathological Roles and Therapeutic Application.  
**Curr Protein Pept Sci.** 14(4):256-267. 2013.
25. Kuwabara Y, Kuwahara K, Takano M, Kinoshita H, Arai Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Igata S, Usami S, Minami T, Yamada Y, Nakao K, Yamada C, Shibata J, Nishikimi T, Ueshima K, Nakao K.  
Increased Expression of HCN Channels in the Ventricular Myocardium Contributes to Enhanced Arrhythmicity in Mouse Failing Hearts.  
**J Am Heart Assoc.** 2(3):e000150. 2013.
26. Funayama A, Shishido T, Netsu S, Narumi T, Kadowaki S, Takahashi H, Miyamoto T, Watanabe T, Woo CH, Abe JI, Kuwahara K, Nakao K, Takeishi Y, Kubota I.  
Cardiac nuclear High Mobility Group Box 1 prevents the development of cardiac hypertrophy and heart failure.  
**Cardiovasc Res.** 99(4):657-64.2013
27. Nishikimi T, Okamoto H, Nakamura M, Ogawa N, Horii K, Nagata K, Nakagawa Y, Kinoshita H, Yamada C, Nakao K, Minami T, Kuwabara Y, Kuwahara K, Masuda I, Kangawa K, Minamino N, Nakao K.  
Direct Immunochemiluminescent Assay for proBNP and Total BNP in Human Plasma proBNP and Total BNP Levels in Normal and Heart Failure.  
**PLoS One.** 8(1):e53233. 2013.
28. Matsumoto E, Sasaki S, Kinoshita H, Kito T, Ohta H, Konishi M, Kuwahara K, Nakao K, Itoh N.  
Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis are promoted in mice lacking Fgf16.  
**Genes Cells.** 18(7):544-553.2013
29. Kitamoto T, Kitamoto A, Yoneda M, Hyogo H, Ochi H, Nakamura T, Teranishi H, Mizusawa S, Ueno T, Chayama K, Nakajima A, Nakao K, Sekine A, Hotta K.  
Genome-wide scan revealed that polymorphisms in the PNPLA3, SAMM50, and PARVB genes are associated with development and progression of nonalcoholic fatty liver disease in Japan.  
**Hum Genet.** 132(7):783-92. 2013
30. Sone M, Nakao K.  
Vascular research using human pluripotent stem cells and humoral factors.

- Endocr J.** 60(4):397-402. 2013
31. Yamada-Goto N, Katsuura G, Ebihara K, Inuzuka M, Ochi Y, Yamashita Y, Kusakabe T, Yasoda A, Satoh-Asahara N, Ariyasu H, Hosoda K, Nakao K. Intracerebroventricular administration of C-type natriuretic peptide suppresses food intake via activation of the melanocortin system in mice. **Diabetes.** 62(5):1500-4. 2013
32. Hotta K, Kitamoto A, Kitamoto T, Mizusawa S, Teranishi H, So R, Matsuo T, Nakata Y, Hyogo H, Ochi H, Nakamura T, Kamohara S, Miyatake N, Kotani K, Itoh N, Mineo I, Wada J, Yoneda M, Nakajima A, Funahashi T, Miyazaki S, Tokunaga K, Masuzaki H, Ueno T, Chayama K, Hamaguchi K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Sakata T, Tanaka K, Matsuzawa Y, Nakao K, Sekine A. Replication study of 15 recently published Loci for body fat distribution in the Japanese population. **J Atheroscler Thromb.** 20(4):336-50. 2013
33. 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.
34. Tanaka M, Yamaguchi S, Yamazaki Y, Kinoshita H, Kuwahara K, Nakao K, Jay PY, Noda T, Nakamura T. Somatic chromosomal translocation between *Ewsr1* and *Fli1* loci leads to dilated cardiomyopathy in a mouse model. **Sci Rep** 5:7826. 2015.
35. Oshita K, Itoh M, Hirashima S, Kuwabara Y, Ishihara K, Kuwahara K, Nakao K, Kimura T, Nakamura K, Ushijima K, Takano M. Ectopic automaticity induced in ventricular myocytes by transgenic overexpression of HCN2. **J Mol Cell Cardiol.** 80:81-89. 2015
36. Yamada Y, Kinoshita H, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kuwabara Y, Minami T, Yamada C, Shibata J, Nakao K, Cho K, Arai Y, Yasuno S, Nishikimi T, Ueshima K, Kamakura S, Nishida M, Kiyonaka S, Mori Y, Kimura T, Kangawa K, Nakao K. Inhibition of N-type Ca<sup>2+</sup> channels ameliorates an imbalance in cardiac autonomic nerve activity and prevents lethal arrhythmias in mice with heart failure **Cardiovascular Research** 2014 104(1):183-93.
37. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, Yasuno S, Kinoshita H, Kuwabara Y, Nakao K, Minami T, Yamada C, Ueshima K, Ikeda Y, Okamoto H, Horii K, Nagata K, Kangawa K, Minamino N, Nakao K. The Effects of Super-Flux (High Performance) Dialyzer on Plasma Glycosylated Pro-B-Type Natriuretic Peptide (proBNP) and Glycosylated N-Terminal proBNP in End-Stage Renal Disease Patients on Dialysis. **PLoS One.** 2014 Mar 25;9(3):e92314.
38. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Nakao K. Macrophage-mediated glucolipotoxicity via myeloid-related protein 8/toll-like receptor 4 signaling in diabetic nephropathy. **Clin Exp Nephrol** 18:584-592, 2014.
39. Kuwabara T, Mori K, Kasahara M, Yokoi H, Imamaki H, Ishii A, Koga K, Sugawara A, Yasuno S, Ueshima K, Morikawa T, Konishi Y, Imanishi M, Nishiyama A, Nakao K, Mukoyama M. Predictive significance of kidney myeloid-related protein 8 expression in patients with obesity- or type 2 diabetes-associated kidney diseases. **PLoS One** 9:e88942, 2014.
40. Tomita T, Hosoda K, Fujikura J, Inagaki N, Nakao K. The G-Protein-Coupled Long-Chain Fatty Acid Receptor GPR40 and Glucose Metabolism. **Front Endocrinol (Lausanne).** 2014. 5:152.

41. Kanda J, Mori K, Kawabata H, Kuwabara T, Mori KP, Imamaki H, Kasahara M, Yokoi H, Mizumoto C, Thoennissen NH, Koeffler HP, Barasch J, Takaori-Kondo A, Mukoyama M, Nakao K.

An AKI biomarker lipocalin 2 in the blood derives from the kidney in renal injury but from neutrophils in normal and infected conditions.

**Clin Exp Nephrol** 19:99-106, 2015.

42. Ebihara C, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Mashimo T, Tomita T, Zhao M, Gumbilai 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. 学会発表

### 国際学会

なし

### 国内学会

1. 中尾一和  
肥満症研究 -Adiposcience と Adipomedicine-  
第 45 回日本痛風・核酸代謝学会総会 2012 年 2 月 17 日、奈良市
2. 中尾一和  
第 109 回日本内科学会総会・講演会  
会頭講演  
内科学の使命と挑戦  
第 109 回日本内科学会総会・講演会  
2012 年 4 月 14 日、京都市
3. 中尾一和  
内臓脂肪測定装置(DUALSCAN)の  
開発と臨床的意義  
第 55 回日本糖尿病学会年次学術集  
会  
2012 年 5 月 17 日、横浜市
4. 中尾一和  
日本肥満学会の使命と先務  
第 33 回日本肥満学会 2012 年 10 月  
11 日、京都市

5. 中尾一和  
心血管内分泌代謝学と Translational  
Science

第 17 回日本心血管内分泌代謝学会  
学術総会 大阪 2013 年 11 月 23 日

6. 中尾一和  
レプチンの Translational Science と医  
師主導治験—脂肪萎縮症を対象と  
したレプチン補充治療の実用化—  
第 34 回日本肥満学会 2013 年 10 月  
11 日、東京

7. 中尾一和  
レプチンの Translational Science と医  
師主導治験—脂肪萎縮症を対象と  
したレプチン補充治療の実用化—  
第 47 回日本小児内分泌学会学術集  
会 2013 年 10 月 11 日 東京

8. 中尾一和  
生活習慣病の臨床医学研究—21 世  
紀の第 2 四半期の予想 Translational  
Science と臨床応用 京都から世界  
へ  
第 39 回京都医学会 2013 年 9 月 29  
日 京都

9. 中尾一和  
レプチンのトランスレーショナルリ  
サーチ～脂肪萎縮症の新しい治療  
トランスレーショナルサイエンス  
学術講演会 2013 年 9 月 25 日 札  
幌

10. 中尾一和  
**Translational Science** と疾患モデル  
動物  
第 49 回高血圧関連疾患モデル学会  
学術総会 2013 年 9 月 7 日 東京

11. 中尾一和  
レプチンの **Translational Science** と  
臨床研究者（医師）主導治験—脂肪  
萎縮症を対象としたレプチン補充  
治療の実用化—レギュラトリーサ  
イエンス学会第 3 回学術大会 2013  
年 9 月 6 日 東京

12. 中尾一和  
家庭血圧測定的重要性と進歩  
日本高血圧学会 生涯教育講演会  
2013 in 京都 2013 年 7 月 20 日 京  
都

13. 中尾一和  
21 世紀の第 2 四半期における内分  
泌代謝学の展望—疾患の変遷と  
**Translational Science** —  
第 31 回内分泌代謝学サマーセミナ  
ー 2013 年 7 月 13 日 大分湯布院
14. 中尾一和  
レプチンの **Translational Science** と  
医師主導治験—脂肪萎縮症を対象  
としたレプチン補充治療の実用化  
—  
第 10 回 GPCR 研究会 2013 年 5 月  
10 日 東京
15. 中尾一和  
内 分 泌 代 謝 領 域 に お け る  
**Translational Research** の実践  
第 51 回 日本臨床分子医学会  
2014.4.11-12. 東京
16. 中尾一和  
内分泌代謝学とトランスレーショ  
ナルサイエンス  
第 29 回日本内分泌学会東北地方会  
14.9.13
17. 中尾一和  
内分泌代謝学とトランスレーショ  
ナルリサーチ  
第 64 回日本薬学会近畿支部総会・  
大会 2014.10.11

H. 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。3年間の研究において、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、それぞれレプチン、セイピン、PPAR $\gamma$ 遺伝子に変異を有する遺伝子変異ラットを同定し、その系統樹立に成功し、表現型の解析、創薬研究におけるモデル動物としての有用性の確認を行った。本研究により、これら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可能性が示された。

**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、代表的アディポサイトカインであるレプチンの遺伝子、脂肪委縮症の原因遺伝子の一つであるセイピン遺伝子、PPAR  $\gamma$ 遺伝子にそれぞれ変異を有する遺伝子変異ラットの同定を行い、その系統樹立に成功した。さらに、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、セイピン、PPAR gamma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。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、これら遺伝子の機能解析も行った。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。一方精巢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。実際、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セイピン遺伝子の変異ラットの系統樹立にも成功し、その表現型解析を行った。セイピン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、セイピン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。この表現型の差異の原因はマウスとラットにおけるセイピン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PPAR $\gamma$ 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、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おいて興味深いデータを得た。今後さらなる解析を継続し行う予定である。

#### 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セイピン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PPAR $\gamma$  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、レプチン、セイピン、PPAR $\gamma$  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. 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
2. M. Iwanishi, K. Ebihara, T. Kusakabe, S. Harada, J. Ito-Kobayashi, A. Tsuji, K. Hosoda, K. Nakao K. Premature atherosclerosis in a Japanese diabetic patient with atypical familial partial lipodystrophy and hypertriglyceridemia. **Intern Med.** 51: 2573-2579, 2012
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Yamada-Goto N, Katsuura G, Ebihara K, Inuzuka M, Ochi Y, Yamashita Y, Kusakabe T, Yasoda A, Satoh-Asahara N, Ariyasu H, Hosoda K, Nakao K. Intracerebroventricular administration of C-type natriuretic peptide suppresses food intake via activation of the melanocortin system in mice.  
**Diabetes.** 62(5):1500-4. 2013
7. 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<sup>mkyo</sup>/Lep<sup>mkyo</sup> rats and identification of leptin-responsive genes in the liver.  
**Physiol Genomics.** 45(17):786-93. 2013
8. Noguchi M, Hosoda K, Nakane M, Mori E, Nakao K, Taura D, Yamamoto Y, Kusakabe T, Sone M, Sakurai H, Fujikura J, Ebihara K, Nakao K.  
In vitro characterization and engraftment of adipocytes derived from human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells.  
**Stem Cells Dev.** 22(21):2895-905. 2013
9. Ida M, Hirata M, Odori S, Mori E, Kondo E, Fujikura J, Kusakabe T, Ebihara K, Hosoda K, Nakao K.  
Early changes of abdominal adiposity detected with weekly dual bioelectrical impedance analysis during calorie restriction.  
**Obesity (Silver Spring).** 21(9):E350-3. 2013
10. Sakai T, Kusakabe T, Ebihara K, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Zhao M, Gumbilai 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.
11. Ebihara C, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Mashimo T, Tomita T, Zhao M, Gumbilai 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. 学会発表 国際学会

1. M. Aizawa-Abe, K.Ebihara, C. Ebihara, T. Kusakabe, D.Aotani, V. Gumbilai, T. Mashimo, T. Serikawa & K. Nakao.  
Development of leptin deficient Lep<sup>mkyo</sup>/Lep<sup>mkyo</sup> rat-evidence for its superiority over Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup> mouse as a model for human obesity  
5<sup>th</sup> International & 14<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology (ICE/ECE 2012) 2012.5.5-9, Florence, Italy
2. 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  
5<sup>th</sup> International & 14<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology (ICE/ECE 2012) 2012.5.5-9, Florence, Italy
3. M. Aizawa-Abe, K.Ebihara, C. Ebihara, T. Kusakabe, T. Serikawa, D.Aotani, V.M.J. Gumbilai, T. Mashimo, K. Nakao.  
Development of Leptin Deficient Rats-Evidence of Superiority Over Lepob/Lepob Mice as a Model For Human Obesity  
19<sup>th</sup> European Congress on Obesity (ECO2012) 2012.5.9-12, Lyon, France



4. 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  
19<sup>th</sup> European Congress on Obesity (ECO2012) 2012.5.9-12, Lyon, France
5. Takeru Sakai, Toru Kusakabe, Ken Ebihara, Daisuke Aotani, Sachiko Kataoka, Chihiro Ebihara, Yuji Yamamoto, Megumi Abe, Junji Fujikura, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao.  
Beneficial Effects of Combination Therapy With Leptin and Exenatide in a Mouse Model of Type2 Diabetes With Increased Adiposity  
72<sup>nd</sup> scientific sessions American Diabetes Association 2012.6.8-12, PHILADELPHIA
6. Ebihara C, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Tomita T, Kusakabe T, Yamamoto T, Aotani,D, Yamamoto-Kataoka S, Sakai T, Gumbilal V.M, Zhao M, Hosoda K, Nakao K.  
The human lipodystrophy gene product, seipin plays physiological roles beyond the adipose tissue.  
The Endocrine Society's 95<sup>th</sup> Annual meeting & Expo 2013.6.15-18, San Francisco, California, USA
7. Nakao K, Hosoda K, Ebihara K, Kusakabe T, Aizawa-Abe M, Aotani D.  
Impact of successful leptin replacement therapy in Japan on adult and child, systemic and partial lipodystrophy.  
The 2013 Obesity Week 2013.11.11-16, Atlanta, Georgia, USA
8. Aotani D, Ebihara K, Kusakabe T, Aizawa-Abe M, Kataoka S, Sakai, T Ebihara C, Hosoda K, Nakao K.  
The role of neuromedin U in glucose homeostasis.  
The 2013 Obesity Week 2013.11.11-16, Atlanta, Georgia, USA
9. Sakai T, Ebihara K, Kusakabe, T Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Ebihara C, Aizawa-Abe M, Fujikura J, Hosoda K, Nakao K.  
Effect of exenatide, a GLP-1 receptor agonist, on anti-diabetic effects of leptin in a mouse model of type 2 diabetes with increased adiposity.  
The 36<sup>th</sup> Naito Conference 2013.9.10-13, SAPPORO
10. 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 96<sup>th</sup> Annual Meeting 2014年6月22日 米国、シカゴ
11. 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
12. Chihiro Ebihara, Ken Ebihara, Megumi Aizawa-Abe, Tomoji Mashimo, Tsutomu Tomita, Mingming Zhao, Valentino Gumbilal, 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
13. Chihiro Ebihara, Ken Ebihara, Megumi Aizawa-Abe, Mingming Zhao, Valentino Gumbilal, Yuji Yamamoto, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao  
Pathophysiological role of *Bscl2/Seipin* haploinsufficiency in

adiposity and metabolism  
The Endocrine Society's 97<sup>th</sup> Annual  
Meeting 2015 年 3 月 7 日 米国、サン  
ディエゴ

#### 国内学会

1. 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 京都 2012. 4. 13- 14
2. 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 京都 2012. 4. 13- 15
3. 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  
新規のインスリン分泌調節因子 GPR40 の遺伝性肥満モデルでの発現調節と機能的意義  
第 109 回 日本内科学会総会 京都 2012. 4. 13- 15
4. 小鳥真司、富田 努、孫 徹、藤倉純二、岩倉 浩、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  
第 109 回 日本内科学会総会 京都 2012. 4. 13- 15
5. 吉良友里、細田公則、富田 努、小鳥真司、孫 徹、藤倉純二、岩倉 浩、日下部徹、海老原健、中尾一和
6. G 蛋白共役型-脂質受容体 GPR40 の遺伝子発現と臨床的意義  
第 109 回 日本内科学会総会 京都 2012. 4. 13- 15
7. 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 京都 2012. 4. 13- 15
8. 井田みどり、海老原健、藤倉純二、岩倉 浩、日下部徹、阿部 恵、葛谷英嗣、中尾一和  
Dual Bioelectric Impedance 法を用いた腹部内臓脂肪量測定装置の有用性について  
第 109 回 日本内科学会総会 京都 2012. 4. 13- 15
9. 森 栄作、細田公則、野口倫生、藤倉純二、孫 徹、富田 努、内藤雅喜、日下部徹、海老原健、中尾一和  
脂肪萎縮症に対する脂肪組織移植治療に関する検討  
第 109 回 日本内科学会総会 京都 2012. 4. 13- 15
10. 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 京都 2012. 4. 13- 15
11. 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 京都 2012. 4. 13- 15
12. 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 京都 2012. 4. 13- 15
13. 仲野孝史、日下部徹、藤倉純二、岡村昌彦、亀井士郎、伊藤尚弘、青谷大介、阿部 恵、海老原健、細田公則、中尾一和  
長期間、糖尿病の経過を追うことができた Werner 症候群の一例  
第 109 回 日本内科学会総会 京都 2012. 4. 13- 15

14. 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  
新規のインスリン分泌促進因子 GPR40 の遺伝性肥満モデルでの発現調節と機能的意義  
第 85 回 日本内分泌学会学術総会 名古屋 2012. 4. 19- 21
15. 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 名古屋 2012. 4. 19- 21
16. 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 Bioimpedanc 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 85 回 日本内分泌学会学術総会 名古屋 2012. 4. 19- 21
17. 野村英生、清水浩一郎、桑原宏一郎、阿部 恵、森 栄作、日下部徹、藤倉純二、孫 徹、海老原健、細田公則、中尾一和  
禁酒と減量により血糖コントロールが改善した肝硬変合併糖尿病の一例  
第 85 回 日本内分泌学会学術総会 名古屋 2012. 4. 19- 21
18. 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抵抗性の検討  
第 85 回 日本内分泌学会学術総会 名古屋 2012. 4. 19- 21
19. 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-脂質受容体 GPR119 の臨床的意義：ヒト臍島およびインスリンノーマにおける遺伝子発現と臍島機能との関連  
第 85 回 日本内分泌学会学術総会 名古屋 2012. 4. 19- 21
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 名古屋 2012. 4. 19- 21)
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 Gumbilai、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 名古屋 2012. 4. 19- 21
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 名古屋 2012. 4. 19- 21
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 横浜 2012. 5. 17- 19
24. 富田 努、細田公則、小鳥真司、藤倉純二、日下部徹、海老原健、中尾一和  
新規 G 蛋白共役型-脂質受容体群 GPR40、GP119 の臨床的意義 23)  
第 55 回 日本糖尿病学会年次学術集会 横浜 2012. 5. 17- 19
25. 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(口演 I-11-15)  
第 55 回 日本糖尿病学会年次学術集  
会 横浜 2012. 5. 17- 19
26. 井田みどり、柘田 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 Bioelectrical Impedance  
Analysis 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(ポスター III-P-240)  
第 55 回 日本糖尿病学会年次学術集  
会 横浜 2012. 5. 17- 19
27. 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  
高脂肪食負荷レプチン抵抗性モデルマ  
ウスにおけるレプチン反応性の検討  
第 55 回 日本糖尿病学会年次学術集  
会 横浜 2012. 5. 17- 19
28. 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 京都 2012.  
10. 11- 12
29. 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 京都 2012.  
10. 11- 12
30. 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 京都 2012.  
10. 11- 12
31. 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  
レプチン抵抗性早期誘導モデルマウス  
の腹内側核におけるレプチン反応性の  
検討  
第 33 回 日本肥満学会 京都 2012.  
10. 11- 12
32. 井田みどり、柘田 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 Bioelectrical Impedance 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 33 回 日本肥満学会 京都 2012.  
10. 11- 12
33. 海老原千尋、阿部 恵、海老原健、  
Valentino Milton Gumbilai、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 京都 2012.  
10. 11- 12
34. 富田 努、細田公則、小鳥真司、藤倉  
純二、日下部徹、海老原健、中尾一和  
G 蛋白共役型-中・長鎖脂肪酸受容体  
GPR40 の遺伝性肥満モデルの膝島での  
発現調節  
第 33 回 日本肥満学会 京都 2012.  
10. 11- 12
35. 野口倫生、細田公則、森 栄作、松原  
正樹、藤倉純二、海老原健、中尾一和  
ヒト多能性幹細胞由来前駆脂肪細胞の  
単離-細胞表面マーカーの探索-  
第 33 回 日本肥満学会 京都 2012.  
10. 11- 12
36. 小鳥真司、細田公則、富田 努、藤倉  
純二、日下部徹、海老原健、中尾一和  
G 蛋白共役型-脂質受容体 GPR119 のヒ  
トにおける遺伝子発現と生理的意義  
第 33 回 日本肥満学会 京都 2012.  
10. 11- 12
37. 後藤伸子、越智ゆかり、勝浦五郎、山  
下 唯、有安宏之、浅原哲子、金本巨  
哲、海老原健、三浦晶子、八十田明宏、  
荒井宏司、細田公則、中尾一和  
高脂肪食負荷による絶食後再摂食の反  
応とオピオイド受容体アンタゴニスト  
の作用  
第 33 回 日本肥満学会 京都 2012.  
10. 11- 12
38. 山下 唯、後藤伸子、勝浦五郎、越智  
ゆかり、有安宏之、金本巨哲、三浦晶  
子、海老原健、八十田明宏、荒井宏司、