

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 糖尿病内分泌栄養内科
特定病院助教

研究要旨 本研究課題は、新規開発した標的遺伝子変異ラット開発システムを用いて、生活習慣病や難治性疾患に関連する複数の遺伝子変異ラットを開発し、新規生活習慣病・難治性疾患モデルラットを樹立し、従来マウスにおいて実施・解析が困難であった系統的な生理学的解析、移植実験、薬理薬効評価解析などの施行を容易にする事により、生活習慣病関連疾患、難治性疾患の病態解明、新規治療標的の同定および創薬開発を加速させることを目的とする。本研究において、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、レプチンおよびセイピン遺伝子変異ラットの糖代謝、膵内分泌機能に関する解析を行い、GPR40 や Pdx1 遺伝子発現低下を認めた。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、新規創薬開発への応用を探る。

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

我々は生活習慣病・難治性疾患関連遺伝子に関するENUミュータジェネシスによる約1600匹分のラットミュータントアーカイブの高速DNAスクリーニングを行い、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、レプチンおよびセイピン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。本研究では、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す。

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セイピン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、糖脂質代謝、膵分泌能を中心に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と摂食量の亢進をみとめた。レプチン遺伝子ナンセンス変異ラットに糖負荷試験を行った結果、血中グルコース濃度高値、高インスリン血症を認め、耐糖能の異常、インスリン抵抗性の存在が確認された。また、中性脂肪高値、遊離脂肪酸高値、総コレステロール値高値などの脂質異常も見出された。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。本変異ラットの膵頭におけるGPR40、Pdx1の遺伝子発現を検討したところ、いずれも約50%に低下していた。このことから本レプチン遺伝子変異ラットの食後高血糖、インスリン初期分泌低下にこれら遺伝子産物の発現低下が関与する可能性が示唆された。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解析も行い、ヒト脂肪委縮症に類似した脂肪減少、脂肪肝、糖代謝異常を認めた。今後、更に詳細な解析を継続していく予定である。

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セイピン遺伝子変異ラットにおいて代謝パラメーターの解析においてより安定した結果を得られること、また、膵組織の詳細な組織学的解析および分子生物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への応用を進めていきたい。

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、その中でレプチンおよびセイピン遺伝子変異ラットの表現系、特に糖代謝および膵島の遺伝子発現の解析を行い、本遺伝子変異ラットのモデル動物としての有用性を示した。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への応用を進めていきたい。

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. 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

3. Odori S, Hosoda K, Tomita T, Fujikura J, Kusakabe T, Kawaguchi Y, Doi R, Takaori K, Ebihara K, Sakai Y, Uemoto S, Nakao K. GPR119 expression in normal human tissues and islet cell tumors: evidence for its islet-gastrointestinal distribution, expression in pancreatic beta and alpha cells, and involvement in islet function.

Metabolism. 62(1):70-8.2013

4. 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.

2. 学会発表

国際学会

1. T. Tomita, K. Hosoda, S. Odori, Y. Kira, C. Son, J. Fujikura, H. Iwakura, M. Noguchi, E. Mori, M. Naito, T. Kusakabe, K. Ebihara, K. Nakao

Gene Expression of a G Protein-coupled Receptor, GPR40, in Pancreatic Islets of a Genetically Obese Rat Model

Keystone Symposia (Killarney, Co. Kerry, Ireland) May 15-20, 2011

国内学会

1. 冨田努, 細田公則, 小鳥真司, 藤倉純二, 岩倉浩, 野口倫生, 森栄作, 内藤雅喜, 日下部徹, 海老原健, 中尾一和

新規のインスリン分泌調節因子 GPR40 の遺伝子肥満モデルでの発現調節

第 84 回日本内分泌学会学術総会、2011.4.21-23、神戸

2. 野村英生, 孫徹, 後藤伸子, 勝浦五郎, 野口倫生, 冨田努, 藤倉純二, 海老原健, 細田公則, 中尾一和

高脂肪食負荷マウス中枢におけるレプチン反応性の経時的変化の検討

第 84 回日本内分泌学会学術総会、2011.4.21-23、神戸

3. 小鳥真司, 冨田努, 孫徹, 藤倉純二, 野口倫生, 森栄作, 内藤雅喜, 日下部徹, 海老原健, 細田公則, 中尾一和

新規の G 蛋白共役型-脂質受容体 GPR119 の臨床的意義: ヒトおよびマウスでの膵島における遺伝子発現と膵島機能との連関

第 84 回日本内分泌学会学術総会、2011.4.21-23、神戸

4. 阿部恵, 海老原健, 海老原千尋, 宮澤崇, 冨田努, 日下部徹, 山本祐二, 宮本理人, 真下知士, 細田公則, 芹川忠夫, 中尾一和

糖脂質代謝におけるレプチンの病態生理的意義に関する種族差の検討 レプチン欠損 ob/ob ラットの開発と解析

第 84 回日本内分泌学会学術総会 2011.4.21-23、神戸

5. 内藤雅喜, 藤倉純二, 森栄作, 小鳥真司, 野口倫生, 冨田努, 孫徹, 日下部徹, 宮永史子, 宮本理人, 山本祐二, 海老原健, 細田公則, 中尾一和

Leptin Transgenic Akita mouse を用いたインスリン分泌低下型糖尿病に対するレプチン治療

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, 榎田出, 細田公則, 海老原健, 藤倉純二, 岩倉浩, 日下部徹, 山本祐二, 阿部恵, 冨田努, 葛谷英嗣, 中尾一和

Dual Bioimpedance 法を用いた内臓脂肪量測定装置のスクリーニング機器としての有用性

第 84 回日本内分泌学会学術総会 2011.4.21-23、神戸

7. 冨田努, 細田公則, 小鳥真司, 孫徹, 藤倉純二, 岩倉浩, 野口倫生, 森栄作, 内藤雅喜, 吉良友里, 日下部徹, 海老原健, 益崎裕章, 中尾一和

膵細胞に高発現し、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. 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
17. 内藤雅喜, 藤倉純二, 森栄作, 小鳥真司, 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 (LepTg) マウスにおけるレプチン感受性の検討
第 34 回日本肥満学会、2013.10.11-12、東京都
18. 富田努, 細田公則, 小鳥真司, 藤倉純二, 海老原健, 中尾一和
膜型脂質受容体 GPR40 の遺伝性肥満 Koletsy ラット膵島での発現調節とその意義
第 34 回日本肥満学会、2013.10.11-12、東京都

19. 山下貴裕、森栄作、藤倉純二、野口倫生、富田努、孫徹、横井秀基、日下部徹、海老原健、細田公則、中尾一和
腎性浮腫との鑑別を要した Lipoedema の一例
第 34 回日本肥満学会、2013.10.11-12、東京都
20. 富田努
G 蛋白共役型—脂肪酸受容体 GPR40 の肥満・糖尿病での発現調節と意義
第 50 回日本糖尿病学会近畿地方会・第 49 回日本糖尿病協会近畿地方会、2013.11.23、京都市
21. 小鳥真司、富田努、藤倉純二、日下部徹、海老原健、細田公則、河野茂夫、中尾一和
G 蛋白共役型 - 脂質受容体 GPR119 の臨床的意義：ヒトの臍島および臍島細胞腫瘍における遺伝子発現と臍島機能との関連
第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013.5.16-18、熊本
22. 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 - 脂肪酸受容体 GPR40 の糖尿病における発現調節と意義
第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013.5.16-18、熊本
23. 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、2013.5.16-18、熊本
24. 吉良友里、富田努、細田公則、藤倉純二、海老原千尋、阿部恵、海老原健、中尾一和、稲垣暢也
新規の遺伝性肥満モデル *mkyo/mkyo* ラット臍島における脂質受容体

GPR40 の遺伝子発現調節

第 88 回日本内分泌学会学術総会、2014.4.23-25、仙台国際センター

25. 吉良友里、富田努、細田公則、藤倉純二、海老原千尋、阿部 恵、海老原健、中尾一和、稲垣暢也
新規の遺伝性肥満モデル *mkyo/mkyo* ラット臍島における脂質受容体 GPR40 の遺伝子発現調節
第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、2015.5.21-24、山口県下関市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし