

## 遺伝子組換えウサギを用いた肥満の研究

総合分析実験センター 生物資源開発部門 森本正敏

### 1) 研究進捗状況

研究実施計画にしたがい, Peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR)- $\gamma$  遺伝子導入ウサギの作出を行った。遺伝子組換えウサギの作出には, 脂肪組織特異的に PPAR- $\gamma$  を過剰発現するように脂肪細胞を標的にした調節遺伝子である AP2 プロモーターの下流にラット PPAR- $\gamma$  cDNA を繋いだ construct を作製し, これを倒立顕微鏡にセットしたマイクロマニピレーターを用いて, マイクロインジェクション法によりウサギ受精卵前核内に注入した。ウサギ受精卵は, 濾胞刺激ホルモン (FSH) もしくは妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) を注射して過排卵処理を施した雌ウサギから採取した。現在までに 22 匹の雌ウサギより 483 個の卵を採取して 342 個の受精卵にインジェクションを行い, このうち 225 個をヒト絨毛性腺刺激ホルモン (hCG) の注射により偽妊娠を誘導した 8 匹の仮親ウサギの卵管内に移植した。その結果 8 匹中 5 匹の仮親ウサギが妊娠し, 18 匹の仔ウサギを出産した。胚移植により得られた仔ウサギの耳の一部から組織を採取して DNA を抽出し, Southern blot 法ならびに PCR 法による遺伝子解析を実施したところ, これらのうちの一匹 (雌) にラット PPAR- $\gamma$  遺伝子が導入されていることが確認された。さらに, この遺伝子導入が確認されたウサギをファウンダーとして野生型の雄ウサギを交配し, F1 ウサギを得て組織における導入遺伝子の発現を Northern blot 法で検討したところ, 遺伝子組換えウサギの組織, 特に大動脈とマクロファージで導入遺伝子の発現が確認された。

以上のように, 我々はすでに PPAR- $\gamma$  遺伝子導入ウサギの 1 系統 (P7 系統) の作出に成功している。現在, さらに PPAR- $\gamma$  発現量の異なる (より発現量の高い) 新たな系統の作出を目指して遺伝子組換えウサギの作出を継続するとともに, 今後の計画を実施するため, P7 系統の大規模な繁殖を開始している。今後, 生まれてきた F2 ウサギを用いて高脂肪食負荷による肥満、糖代謝に及ぼす PPAR- $\gamma$  の役割について検討を進めていく予定である。

### 2) 研究課題についての発表論文等

#### 学術論文

1. Ichikawa T, Kitajima S, Liang J, Koike T, Wang X, Sun H, Okazaki M, Morimoto M, Shikama, H., Watanabe, T., and Fan, J.: Overexpression of lipoprotein lipase

in transgenic rabbits leads to increased small dense LDL in plasma and promotes atherosclerosis. *Lab. Invest.* 84:715-726, 2004.

2. Kitajima S, Morimoto M, Liu E, Koike T, Higaki Y, Taura Y, Mamba K, Itamoto K, Tsutsumi K, Yamada N, Watanabe T, and Fan J: Overexpression of lipoprotein lipase improves insulin resistance induced by a high-fat diet in transgenic rabbits. *Diabetologia* 47:1202-1209, 2004.

3. Koike T, Liang J, Wang X, Ichikawa T, Shiomi M, Liu G, Sun H, Kitajima S, Morimoto M, Watanabe T, Yamada N, and Fan J: Overexpression of Lipoprotein lipase in transgenic Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits improves hyperlipidemia and obesity. *J. Biol. Chem.* 279: 7521-7529, 2004.

4. Wang X, Liang J, Koike T, Sun H, Ichikawa T, Kitajima S, Morimoto M, Shikama H, Watanabe T, Sasaguri Y, and Fan J: Overexpression of human matrix metalloproteinase-12 enhances the development of inflammatory arthritis in transgenic rabbits. *Am. J. Pathol.* 165: 1375-1383, 2004.

5. Ichikawa, T., Liang, J., Kitajima, S., Koike, T., Wang, X., Sun, H., Morimoto, M., Shikama, H., Watanabe, T., Yamada, N. and Fan, J.: Macrophage-derived lipoprotein lipase increases aortic atherosclerosis in cholesterol-fed transgenic rabbits. *Atherosclerosis* 179: 87-95, 2005.

6. Kitajima S., Liu E., Morimoto M., Koike T., Koike Y., Watanabe T., and Imagawa S., and Fan, J.: Transgenic rabbits with increased VEGF expression developed hemangiomas in the liver: A new model for the Kasabach-Merritt syndrome. *Lab. Invest.* inpress.

7. Liu. E., Kitajima, S., Higaki, Y., Morimoto, M., Sun, H., Yamada, N., and Fan, J.: High lipoprotein lipase activity increases insulin sensitivity in transgenic rabbits. *Metabolism.* 54: 132-138, 2005.

10. Sun, H., Koike, T., Ichikawa, T., Hatakeyama, K., Shiomi, M., Zhang, B.,

Kitajima, S., Morimoto, M., Watanabe, T., Asada, Y., Chen, YE., Fan, J.: C-reactive protein in atherosclerotic lesions: its origin and pathophysiological significance. Am. J. Pathol. 167:xxx-xxx, 2005.(inpress Octover)

11. Watanabe, N., Nakagawa, H., Kitajima, S., Liu, E., Morimoto, M, Watanabe, T and Fan, J.: Establishment of a SPF colony of human apo(a) transgenic rabbits by frozen-thawed embryo transfer. Exp. Anim. 54(4): 353-357,2005.

#### 学会発表

1. 北嶋修司, 森本正敏: Tg ウサギの作製及び繁殖, 精子保存について. 日本実験動物科学・技術ながさき 2004 (第 51 回日本実験動物学会総会, 第 38 回日本実験動物技術者協会総会, 第 1 回アジア実験動物学会連合 合同開催). 2004,5,20-23. 講演要旨集 91 (シンポジウム).

2. 北嶋修司, 森本正敏, 劉 恩岐, 王 曉斐、渡辺照男, 范 江霖: VEGF 遺伝子導入ウサギの特性-肝における血管腫様病変の形成-. 第 36 回日本動脈硬化学会, 2004,7,23-24. 講演要旨集 194.

3. 小池智也, 北嶋修司, 森本正敏, 塩見雅志, 范 江霖: Tg ウサギを実際に利用した研究 脂質代謝及び糖尿病研究のための LPL WHHL Tg ウサギ -. 日本実験動物科学・技術ながさき 2004 (第 51 回日本実験動物学会総会, 第 38 回日本実験動物技術者協会総会, 第 1 回アジア実験動物学会連合 合同開催). 2004,5,20-23. 講演要旨集 90 (シンポジウム).

4. 小池智也, 梁 景岩, 王 曉斐, 市川朝永, 塩見雅志, 孫 慧君, 森本正敏, 北嶋修司, 山田信博, 范 江霖: Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL)ウサギへのリポ蛋白リパーゼの過剰発現による高脂血症および肥満の改善. 第 36 回日本動脈硬化学会, 2004,7,23-24. 講演要旨集 244.

5. Koike T, Shiomi M, Ichikawa T, Liang J, Wang X, Kitajima S, Morimoto M, Watanabe T, Yamada N, Fan J: Enhanced atherosclerosis in transgenic Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits expressing human lipoprotein lipase. AHA Second Asia

Pacific Scientific Forum. 2004,11,7-24. Circulation (suppl III) 110(17): 211.

6. 劉 恩岐, 北嶋修司, 森本正敏, 范 江霖: リポ蛋白リパーゼトランスジェニックウサギにおけるインスリン感受性の亢進. 第 51 回日本実験動物学会総会, 2004, 5, 20-23. 講演要旨集 187.

7. 詫広茂信, 森本正敏, 北嶋修司, 友田清光: 遺伝子組み換えウサギにおける繁殖方法の検討 人工授精による繁殖-. 平成 16 年度機器・分析技術研究会プログラム. 2004, 9, 16-17. 平成 16 年度機器・分析技術研究会報告 277-278.

8. 渡邊暢彦, 北嶋修司, 森本正敏: トランスジェニックウサギの SPF 化と供給について. 日本実験動物科学・技術ながさき 2004 (第 51 回日本実験動物学会総会, 第 38 回日本実験動物技術者協会総会, 第 1 回アジア実験動物学会連合 合同開催) 2004, 5, 20-23. 講演要旨集 92 (シンポジウム).

9. 小池智也, 市川朝永, 畠山金太, 塩見雅志, 張 波, 北嶋修司, 森本正敏, 渡辺照男, 浅田祐士郎, 范 江霖: 動脈硬化病変の C 反応性蛋白・その由来と病態生理学的重要性. 第 52 回 日本実験動物学会総会 5 月 18-20 日 (2005), 東京 講演要旨集 p235

10. Koike, T., Shiomi, M., Liang, J., Kitajima, S., Morimoto, M., Watanabe, T., Yamada, N., Fan, J.: Enhanced atherosclerosis in transgenic Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits expressing human lipoprotein lipase. The 1st International Conference on Transgenic Rabbits, June 18 (2005), Tsukuba, Japan

11. 梁 景岩, 王 曉斐, 北嶋修司, 小池智也, 市川朝永, 森本正敏, 渡辺照男, 范 江霖: 動脈硬化発生・進展における MMP-12 の役割・トランスジェニックウサギを用いた研究. 第 52 回 日本実験動物学会総会 5 月 18-20 日 (2005), 東京 講演要旨集 p236

12. Liang, J., Kitajima, S., Wang, X., Koike, T., Jin Y., Morimoto, M., Fan, J.: Participation of macrophage elastase (MMP-12) in atherosclerosis The 1st International Conference on Transgenic Rabbits, June 18 (2005), Tsukuba, Japan

13. Liu, E., Kitajima, S., Koike, T., Morimoto, M., Watanabe, T., Fan, J.: Human

LPL transgenic rabbits-Application of transgenic rabbit to human metabolic syndrome. The 1st International Conference on Transgenic Rabbits, June 18 (2005), Tsukuba, Japan

14. 中西陽子, 友田清光, 詫広茂信, 劉 恩岐, 北嶋修司, 森本正敏: 遺伝子組み換えウサギの効率的な繁殖方法に関する検討-人工授精における精子数の検討- 第39回日本実験動物技術者協会総会 6月24-25日(2005), 金沢 講演要旨集 p85