

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-206440

(P2008-206440A)

(43) 公開日 平成20年9月11日(2008.9.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
AO1K 67/027 (2006.01)	AO1K 67/027	2G045
GO1N 33/15 (2006.01)	GO1N 33/15	Z
GO1N 33/50 (2006.01)	GO1N 33/50	Z

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2007-46110 (P2007-46110)	(71) 出願人	504224153
(22) 出願日	平成19年2月26日 (2007.2.26)		国立大学法人 宮崎大学
特許法第30条第1項適用申請有り 第142回 日本		(74) 代理人	100091096
獣医学会学術集会にて発表 開催日：2006年9月2			弁理士 平木 祐輔
2日～2006年9月24日 演題番号：1-26 講		(74) 代理人	100096183
演要旨集発行日：平成18年8月31日			弁理士 石井 貞次
(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許		(74) 代理人	100118773
出願 (平成18年度生物系特定産業技術研究支援センタ			弁理士 藤田 節
ー「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」、		(74) 代理人	100111741
産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの)			弁理士 田中 夏夫
		(72) 発明者	村上 昇
			宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地
			国立大学法人宮崎大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 内臓脂肪型肥満と糖尿病を発症するマウス

(57) 【要約】

【課題】 早期の内臓脂肪型肥満症の発現、糖尿病及び高脂血症の併発という特性を有し、該形質が遺伝的に確立され、劣性遺伝するマウスの提供。

【解決手段】 肥満症を自然発症するマウスであり、肥満症を自然発症するという形質に関して常染色体劣性遺伝を示し、ホモ接合体のみ肥満となるICRマウス由来のdarumaマウス。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

内臓脂肪型肥満症を自然発症するマウスであり、内臓脂肪型肥満症を自然発症するという形質に関して常染色体劣性遺伝を示し、ホモ接合体のみ肥満となるICRマウス由来のdarumaマウス。

【請求項 2】

さらに以下の特性の少なくとも一つの特性を有する請求項 1 記載のdarumaマウス：

- (i) 糖尿病の併発；及び
- (ii) 高脂血症の併発。

10

【請求項 3】

4 週齢で内臓脂肪型肥満症を発症する請求項 1 又は 2 に記載のマウス。

【請求項 4】

受領番号FERM AP-21230である受精卵から得られる請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のdarumaマウス。

【請求項 5】

ICRマウスから、内臓脂肪型肥満症を自然発症するマウスであり、内臓脂肪型肥満症を自然発症するという形質に関して常染色体劣性遺伝を示し、ホモ接合体のみ肥満となるdarumaマウスを製造する方法であって、以下の工程を含む方法：

- (a) ICRマウスより肥満症マウスを選択し、ICRマウスと戻し交配する工程；
- (b) (a)の工程により得られたF1マウスより肥満症マウスを選択し、肥満症F1マウス同士を交配する工程；
- (c) (b)の工程により得られた子供マウスより肥満症マウスを選択し、肥満症マウス同士を交配する工程；及び
- (d) 肥満症を自然発症する子孫マウスを選択する工程。

20

【請求項 6】

(c)の工程を繰り返し行なう、請求項 5 記載のdarumaマウスを製造する方法。

【請求項 7】

マウスがさらに以下の特性の少なくとも一つの特性を有する、請求項 5 又は 6 に記載のdarumaマウスを製造する方法：

- (i) 糖尿病の併発；及び
- (ii) 高脂血症の併発；

30

【請求項 8】

請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法により得られるdarumaマウス。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 4 及び 8 のいずれか 1 項に記載のdarumaマウスである、ヒト肥満症及び / 又は糖尿病モデルマウス。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 4 及び 8 のいずれか 1 項に記載のdarumaマウスに被験物質を投与することを含む、肥満予防の健康食品、肥満治療剤又は糖尿病治療剤を評価又はスクリーニングする方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトの肥満及び糖尿病と同様の病態を示すマウスに関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトにおける疾患の原因を解明し、又はその治療法をスクリーニングするためにヒトの疾患を発現する動物モデルが有用である。

【0003】

近年、ヒトにおいて肥満や糖尿病が大きな問題となっており、その発症の機構の解明や

50

新たな治療薬の開発が希求されていた。

【0004】

肥満や糖尿病の動物モデルとして種々の動物が開発されていた。例えば、レプチン受容体を欠損し過食を特徴とするdb/dbマウス（非特許文献1を参照）、KKマウス（非特許文献2を参照）、レプチン遺伝子に異常を有し過食を特徴とするob/obマウスや高脂肪食飼育により肥満症と糖尿病を発症するマウス（特許文献1を参照）等が報告されていた。

【0005】

しかしながら、これらのマウスでは、肥満症や糖尿病を発症するのに時間がかかり、短時間で著しい肥満度を示すことはなかった。また、特許文献1に記載のマウスは、肥満症の自然発症という形質が遺伝的に確立されたマウスではなかった。

【0006】

【特許文献1】特開2005-110632号公報

【非特許文献1】Diabetologia, Vol.6, 268-273, 1970

【非特許文献2】Diabetes & metabolism, Vol.23, Suppl 2, 38-46, 1997

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

ヒトの肥満及び糖尿病の発症機構の解明及び治療薬の開発のために、ヒトの肥満及び糖尿病と同様に自然発症し、ヒトの肥満及び糖尿病の特徴を有するモデル動物が必要とされていた。本発明はこのような要望に応えるものであり、早期の内臓脂肪型肥満症の発現、糖尿病及び高脂血症の併発という特性を有し、該形質が遺伝的に確立され、劣性遺伝するマウスの提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、新たなヒト肥満及び糖尿病のモデル動物を開発すべく、マウス32000頭から自然発症肥満マウスをスクリーニングし、交配を繰り返して遺伝的肥満マウスを確立した。この肥満マウスは常染色体劣性遺伝を示し、ホモのみ肥満となる。また肥満に伴って糖尿病を併発する。典型的内臓脂肪型肥満であり、メタボリックシンドロームなどの研究に有効であった。本発明者等は新たに確立したマウスをdarumaと命名した。

【0009】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] 内臓脂肪型肥満症を自然発症するマウスであり、内臓脂肪型肥満症を自然発症するという形質に関して常染色体劣性遺伝を示し、ホモ接合体のみ肥満となるICRマウス由来のdarumaマウス。

[2] さらに以下の特性の少なくとも一つの特性を有する[1]のdarumaマウス：

(i) 糖尿病の併発；及び

(ii) 高脂血症の併発。

[3] 4週齢で内臓脂肪型肥満を発症する[1]又は[2]のマウス。

[4] 受領番号FERM AP-21230である受精卵から得られる[1]～[3]のいずれかのdarumaマウス。

[5] ICRマウスから、内臓脂肪型肥満症を自然発症するマウスであり、内臓脂肪型肥満症を自然発症するという形質に関して常染色体劣性遺伝を示し、ホモ接合体のみ肥満となるdarumaマウスを製造する方法であって、以下の工程を含む方法：

(a) ICRマウスより肥満症マウスを選択し、ICRマウスと戻し交配する工程；

(b) (a)の工程により得られたF1マウスより肥満症マウスを選択し、肥満症F1マウス同士を交配する工程；

(c) (b)の工程により得られた子供マウスより肥満症マウスを選択し、肥満症マウス同士を交配する工程；及び

(d) 肥満症を自然発症する子孫マウスを選択する工程。

[6] (c)の工程を繰り返し行なう、[5]のdarumaマウスを製造する方法。

10

20

30

40

50

[7] マウスがさらに以下の特性の少なくとも一つの特性を有する、[6]のdarumaマウスを製造する方法：

(i) 糖尿病の併発；及び

(ii) 高脂血症の併発。

[8] [5]~[7]のいずれかの方法により得られるdarumaマウス。

[9] [1]~[4]及び[8]のいずれかのdarumaマウスである、ヒト肥満症及び/又は糖尿病モデルマウス。

[10] [1]~[4]及び[8]のいずれかのdarumaマウスに被験物質を投与することを含む、肥満予防の健康食品、肥満治療剤又は糖尿病治療剤を評価又はスクリーニングする方法。

10

【発明の効果】

【0010】

本発明の肥満マウスdarumaは、従来の肥満症や糖尿病モデルマウスに比較して、早期に強度の内臓脂肪型肥満症を発症する。また、本発明の肥満マウスdarumaの肥満症は常染色体劣性遺伝のため、ホモ接合体のみ発症する。そのため、必要に応じて頭数を揃えることができる。本発明の肥満マウスdarumaは、肥満、摂食、エネルギー代謝、糖尿病の基礎研究のモデルのみならず、創薬や健康食品の評価のモデルとしても利用することが可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

20

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のマウスは以下の方法で確立することができる。

ICRマウスから自然発症肥満マウスを選択する。この際、自然発症肥満マウスは、4週齢において通常マウスの平均体重に対して雄で136.3%、雌で130.7%となり、10週齢では雌雄共に約2倍近い大きい体重を有するという特徴を持つ個体を選択する。選択した自然発症肥満マウスをICRマウスと戻し交配し、F1マウスを得る。該F1マウスは本発明の自然発症肥満に関連した遺伝子をヘテロで有するので、肥満を自然発症することはない。次いで、そのF1マウス同士を交配し、F2マウスを得る。該F2マウスは25%が肥満を自然発症する。さらに、F2マウス同士を交配することにより、肥満を100%自然発症するマウスが得られる。この段階で、本発明の肥満症を自然発症するマウスが確立できる。さらに、F2マウス同士の交配を繰り返してもよい。

30

【0012】

このようにして得られたマウスは、肥満症を自然発症するという形質に関してホモであり、肥満症を自然発症するという形質は常染色体劣性遺伝する。

【0013】

最終的に確立し、安定に肥満症という形質を保持し、遺伝するマウス系統を「daruma」と称する。

【0014】

本発明のdarumaマウスは遺伝的に安定であり、darumaマウス間で交配することにより、darumaマウスを子孫として得ることができる。

40

【0015】

本発明の肥満マウスdarumaの受精卵は、2007年2月21日付で、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国 茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に受領番号FERM AP-21230（識別のための表示は、「ダルママウス受精卵」）で寄託した。

【0016】

また、darumaマウスは、国立大学法人宮崎大学農学部村上研究室から譲渡を受けることができる。

【0017】

本発明の肥満マウスdarumaは以下の特徴を有する。

50

(1) 肥満度が極めて高く、成体の体重は通常マウスの約2倍又はそれ以上となる。なお、通常マウスとは、肥満、糖尿病を発症しておらず、血中脂質量も正常な正常マウスを意味する。

(2) 内臓脂肪型樽型肥満を特徴とする。

(3) 4週齢という早期に肥満症を発症する。さらに、肥満症の進行も早い。

また、雌雄共に肥満症を発症する。

(4) 通常マウスに比較して内臓脂肪が著しく増加する。肥満症マウスdarumaの腹部白色死亡組織において、脂肪細胞は脂肪により膨らみ細胞の大きさが上昇する。さらに、肝臓へ脂肪滴が溜まり、脂肪肝となる。

【0018】

(5) 糖尿病を併発する。すなわち、通常マウスに比較して血中インスリン濃度が上昇する。上昇は3週齢から認められ、成体においては、血中インスリン濃度は、通常マウスに対して好ましくは1.5倍以上、さらに好ましくは2倍以上に上昇する。また、血糖値も通常マウスに対して、有意に上昇する。さらに、糖負荷試験において、糖負荷後1～3時間において通常マウスに対して、血中インスリン濃度は、好ましくは1.5倍以上、さらに好ましくは2倍以上に上昇し、血糖値は、好ましくは1.5倍以上、さらに好ましくは2倍以上に上昇する。

【0019】

糖尿病の発症率は、雄で100%であり、雌で10%未満と、雌雄で発症率が異なる。

また、血中レプチン濃度も上昇する。上昇は3週齢から認められ、成体においては、血中レプチン濃度は、通常マウスに対して好ましくは1.5倍以上、さらに好ましくは2倍以上に上昇する。

血糖値、インスリン及びレプチン値の上昇は、早期、例えば4週齢で認められる。

【0020】

(6) 高脂血症を発症する。ここで、高脂血症とは血液中に存在する脂質の値が通常マウスに比較して多い状態をいう。本発明の肥満症マウスdarumaは、通常マウスに比較して総コレステロール、HDL-コレステロール及び遊離脂肪酸が多いという特徴を有する。総コレステロール濃度は通常マウスに対して、20%以上、好ましくは30%以上多い。HDL-コレステロール濃度は通常マウスに対して、15%以上、好ましくは20%以上多い。遊離脂肪酸濃度は、通常マウスに対して、20%以上、好ましくは30%以上多い。さらに、肝臓に脂肪が蓄積することにより、ALT(アラニンアミノトランスフェラーゼ)(GPT)濃度が上昇する。ALT濃度は通常マウスに対して、50%以上、好ましくは100%以上、さらに好ましくは200%以上多い。

ただし、本発明の肥満症マウスdarumaは、血中TG値は通常マウスと差がない。

【0021】

(7) 本発明の肥満症マウスdarumaは通常マウスに比較して、夜間の摂食量がやや増加するが、一日当たりの摂食量には有意の差は認められない。

(8) 通常マウスに比較して、一日の行動量の低下が認められる。

【0022】

本発明の肥満症マウスdarumaが発症する肥満症及び糖尿病はヒトの肥満症及び糖尿病に酷似しており、ヒトの肥満症及び糖尿病のモデル動物として用いることができる。

【0023】

また、本発明の肥満症マウスdarumaは、ヒトのメタボリックシンドロームと酷似した症状を呈しており、ヒトのメタボリックシンドロームのモデル動物として用いることができる。

【0024】

本発明の肥満症マウスdarumaは他の肥満モデルマウスと以下に記載するような異同が認められる。

【0025】

darumaの肥満は2型糖尿病を併発することが判明したが、これまでに2型糖尿病モデルマ

10

20

30

40

50

ウスで肥満を呈すものとして、単一遺伝子異常によるものでは、ob/ob、db/db、lethal yellow、fat、tubbyマウスが、また多因子遺伝子以上によるものではNSY、KKAy、NZO、TSOD、TallyHoマウスが知られている。

【0026】

ob/obマウスはdarumaと同様に4~5週齢頃から肥満を開始し、脂肪細胞からのレプチンシグナルの欠損から過食が認められ、糖尿病様の高血糖、耐糖能の低下、高インスリン血症、妊娠能力の低下、代謝低下、低体温症等が報告されている。ob/obマウスにおける高インスリン血症は体重が過剰に増加するまで発症しないため、肥満の結果、高インスリン血症を発症すると考えられている。この点はdarumaと大きく異なる。

【0027】

db/dbマウスはdarumaと同様に4~5週齢頃から肥満を開始し、過食、多飲及び多尿を呈し、血糖値はdarumaと異なり4~8週齢で急増し体重の増加に伴い上昇する。血漿インスリンは生後10~14日齢の早期で高値を示し、尿糖陽性率は10週齢を過ぎる頃には雌雄に関係なくほぼ100%に到達することが報告されており、雄での発症率が高いdarumaと異なる。

【0028】

Lethal yellowマウスはAgouti遺伝子座の優性の単一遺伝子変異による5種類の変異体の1つで、daruma、ob/ob及びdb/dbマウスと異なり肥満の進行が遅く、インスリン抵抗性、高レプチン血症及びレプチン抵抗性、不妊等を特徴とする。

【0029】

fatマウスはdarumaと異なり肥満開始時期が遅く6~8週齢で、その他高血糖、高レプチン血症及び高インスリン血症を呈する。ob/ob及びdb/dbマウスは糖尿病を発症し進行するにつれ重篤化するとインスリンレベルが減少するのに対し、fatマウスでは慢性的に高値を示すことが報告されており、darumaではインスリンレベルに変動が認められたため、インスリンレベルの推移もdarumaと異なる点である。また、fatマウスのこれらの症状は雄のみに認められ、雌は糖尿病様症状を呈さないことが知られている。

【0030】

tubbyマウスはdarumaと異なり肥満開始時期が遅く9~12週齢で、その進行はYellow obeseマウスに類似している。血糖値は正常若しくは低血糖で、インスリンレベルは週齢を追って徐々に上昇し高インスリン血症を示す。また、高レプチン血症を呈することが報告されている。

【0031】

また、以上のマウスで血液所見を比較すると、TG(triglyceride)レベルはob/ob、db/db、lethal yellow及びtubbyマウスで正常の1.5~2倍となるのに対し、fat及びdarumaは正常値を示した。血漿コレステロールレベルはob/ob、db/db、lethal yellow、fat及びtubbyマウスで上昇が認められ、主にHDL-コレステロールレベルの上昇による。高コレステロール血症のその程度は系統間に差が認められ、血漿コレステロールレベルはob/ob及びdb/dbマウスでは高度に、fatマウス、lethal yellowマウスの雄及びtubbyマウスの雄では軽度な上昇を示す。一方、darumaでは高コレステロール及びHDL-コレステロールレベルは慢性的な高値を示した。

【0032】

NSYマウスはdarumaと同様にICRマウス由来で、重篤な肥満や高インスリン血症を示すわけではないが、インスリン抵抗性、グルコースに対するインスリン反応性の低下及び高血糖等を特徴とする。NSYマウスは8週齢以降に糖尿病を発症し、48週齢までには雄でほぼ100%、雌では20%程度発症することが報告されている。

【0033】

KKAyマウスは肥満及び耐糖能障害が軽度なKKマウスにAgouti遺伝子座の優性の単一遺伝子変異で生じたAy遺伝子を導入することで作成され、肥満及び耐糖能障害が顕著で、高インスリン血症を示しインスリン抵抗性を特徴とすることが報告されている。

【0034】

NZOマウスは過食、肥満及びインスリン抵抗性を特徴とし、それらの進行に伴い膵島細

10

20

30

40

50

胞の傷害、低インスリン血症及び顕著な高血糖を呈することが報告されている。雄は12~22週齢の間に高血糖を呈し始めるが、一方雌では22週齢まで高血糖や低インスリン血症の進行は認められない。雄の高血糖はインスリンレベルに相関があり、血糖の上昇と共にインスリンレベルの低下が認められる。また、NZOマウスはTG及び血漿コレステロール値の高値を示す。

【0035】

TSODマウスはddY系統から体重増加や尿糖値を目安に選択的に交配し確立された系統で、過食、飲水量の増加、肥満、高血糖、高インスリン血症及び膵島の肥大を特徴とすることが報告されている。

【0036】

TallyHoマウスはすでに4週齢時には肥満、高インスリン血症及び高レプチン血症を呈し、この点においてはdarumaに類似しているが、これらの症状はTallyHoマウスでは高血糖を伴わず生じている点で異なる。また、顕著なTGレベルの上昇を特徴とすることが報告されている。

【0037】

本発明のマウスは、以下のモデル動物や評価用動物として用いることができる。

1. 過剰な内臓脂肪蓄積の原因を解析するモデル
2. 糖尿病を解析するモデル動物
3. 遺伝的肥満の解析モデル動物
4. 遺伝的糖尿病の解析モデル動物
5. 脂質代謝のモデル動物
6. 摂食機構の解析モデル動物
7. 既存の肥満関連物質との比較モデル動物
8. 肥満と運動の関係の解析モデル動物
9. 肥満予防の健康食品開発の評価用動物
10. 肥満治療剤の評価用動物
11. 糖尿病治療剤の評価用動物

【0038】

上記1から8の解析は、当業者ならば公知の方法を組合せて本発明の肥満症マウスdarumaを解析に用いることができる。

【0039】

上記のうち健康食品開発の評価用動物、肥満治療剤の評価用動物、糖尿病治療剤の評価用動物として用いることにより、公知の健康食品や化合物の肥満に対する治療又は予防効果及び糖尿病に対する治療又は予防効果を評価することができ、さらに肥満予防に効果がある新規な健康食品や肥満や糖尿病の治療又は予防に用いることができる化合物をスクリーニングすることができる。なお、本発明において健康食品という場合、健康食品のみならず特定保健用食品、栄養機能食品、栄養補助食品、サプリメント等を含む。ここで、特定保健用食品とは、食生活において特定の保健の目的で摂取をし、その摂取により当該保健の目的が期待できる旨の表示をする食品をいう。

【0040】

肥満予防に効果のある健康食品、肥満治療剤又は糖尿病治療剤を評価又はスクリーニングするためには、公知の健康食品、肥満治療剤若しくは糖尿病治療剤、又は効果を確認しようとする被験物質を本発明の肥満症マウスdarumaに投与し、投与により本発明の肥満症マウスの上記の特性(1)~(8)の特性に変化が認められるか否かを基準にすればよい。例えば、被験物質を投与することにより、体重増加が抑制される、内臓脂肪の蓄積が抑制される、糖尿病が緩和される、及び/又は高脂血症が緩和される場合、その被験物質は効果があると評価・判定することができる。

【実施例】

【0041】

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって

10

20

30

40

50

限定されるものではない。

【 0 0 4 2 】

実施例 1 肥満マウスdarumaの確立

2005年宮崎大学農学部獣医学科家畜生理学講座において維持されているICRマウスから肥満を呈するマウスが2匹見出された。この肥満が遺伝子変異のために起こった可能性を疑い、以下の実験を行った。肥満を生じたマウスを、戻し交配した。その結果、その子供に肥満を生じるものが現れた。そこで、遺伝子上に問題があると推測し、ワイルドのICRマウスを日本チャールズリバーから購入し、肥満マウスと交配させた。その結果、F1においてはすべて肥満を生じなかったが、F1同士を交配すると、約25%の確率で肥満が生じた。次にこの肥満マウス同士を交配するとすべてが肥満マウスとなった。さらに、ワイルドマウスと肥満マウスの交配、ヘテロとヘテロマウスの交配、及び肥満のホモ同士の交配を繰り返し、家系図を作成した。その結果、ワイルド同士及びホモとワイルドの交配では0%、ヘテロとホモの交配では48%（理論値は50%）、ヘテロとヘテロの交配では25%（理論値は25%）、ホモとホモの交配では100%（理論値100%）の値が得られた。このことから、肥満の原因が劣性遺伝であると推測した。そこで、この肥満マウス（ホモ）を別の系統BALB/cマウス（ワイルド）と交配させ肥満遺伝子が保存されるか否かを検討した。生まれたF1（理論的にはヘテロ）はすべて肥満を生じないが、F1同士の交配は肥満を生じた。そこで、このF1のヘテロを選び、再度ワイルドのBALB/cマウスと交配しF2を得た。このF2から再度ヘテロを選択し（F2とICR肥満ホモの交配で肥満を生じた時はそのF2はヘテロと解釈される）、再々度BALB/cマウス（ワイルド）と交配した。これを繰り返すことでコンジェニックマウスを2世代作成した。この間、肥満遺伝子は保持されていた。また、この肥満マウスは成熟に達しなくても離乳時（3週齢）で高レプチンを示すことが判明したので、これをホモのスクリーニングの指標とできることが判明した。以上のことから、この肥満マウスは常染色体劣性遺伝であることが明確になった。

10

20

【 0 0 4 3 】

実施例 2 肥満マウスdarumaと通常マウスの生理学的及び生化学的特徴の比較

(1) 外観の比較

図1に肥満マウスdarumaと通常マウスの外観の比較を示す。肥満マウスと通常マウスは同じ親から生まれたマウスである。図に示すように肥満マウスdarumaは内臓脂肪型樽型肥満を特徴とする。

30

【 0 0 4 4 】

(2) 成長曲線の比較

肥満マウスdarumaと通常マウスについて3週齢から24週齢まで体重を測定した。肥満マウスdaruma、通常マウス共に雄10匹、雌10匹を用いた。図2に成長曲線を示す。図2-1が雌の成長曲線、図2-2が雄の成長曲線を示す。雌では4週齢から、雄では6週齢から体重差が生じ、15週齢以降は倍近い体重差が生じた。この差はすべて内臓脂肪に起因していた。

【 0 0 4 5 】

(3) CTスキャン像の比較

13週齢の肥満マウスdaruma及び通常マウスのCTスキャン像を実験動物用X線CT撮影装置：LaTheta（アロカ株式会社）を用いて撮影した。図3に両マウスのCTスキャン像を示す。図3-1が通常マウスであり、図3-2が肥満マウスdarumaのCTスキャン像である。図中水色部分が脂肪を示す。通常マウスと比べ肥満マウスdarumaでは顕著な内臓脂肪量の増加が認められた。肥満マウスdarumaを開腹したところ、CTスキャンで得られた結果と同様に、特に腹部に大量の脂肪の蓄積が認められた。

40

【 0 0 4 6 】

(4) 生理機能の比較

4～19週齢の肥満マウスdaruma及び通常マウスについて、摂食量、行動量、血圧、体温、心拍数及び行動リズムを測定した。摂食量は、明期（L：休息期）と暗期（D：活動期）のそれぞれの摂食量と1日の総摂食量を測定するために、5、6、7、9週齢のマウ

50

ス(ワイルドと肥満)を12時間L:12時間Dで飼育し、粉末の餌に一週間順応させた。摂食量の測定は7時点灯直後と、19時消灯直前に行なった。行動量は、赤外線センサーによって動物の動きを計測する、室町機械株式会社製行動解析装置を使用して測定した。

【0047】

図4-1、図4-2、図4-3、図4-4、図4-5及び図4-6にそれぞれ摂食量、行動量、血圧、体温、心拍数及び行動リズムを示す。

【0048】

摂食量については、肥満マウスdarumaの夜間の摂食量がやや増加したが、大きな差は認められなかった。行動量については、明期、暗期及び1日(L+D)のいずれの行動量も肥満マウスdarumaで有意な行動量の減少が認められた。血圧については、7週齢までのマウスにおいて、肥満マウスdarumaで有意に上昇していた。体温は肥満マウスdarumaと通常マウスで有意な差は認められなかった。心拍数は肥満マウスdarumaで有意に上昇していた。

【0049】

行動リズムには異常は認められなかった(リズムの異常があれば摂食、行動量、代謝などさまざまな生理機能が影響を受けるが、リズムが正常なために、肥満はリズム障害で起こるものではないと言える)。

【0050】

(5) 血液生化学検査の比較

4、5、9及び10~13週齢の肥満マウスdaruma及び通常マウスから採血し、血液生化学検査を行った。各値の測定はDRI-CHEM3500V(FUJIFILM)を用いて行なった。検査項目は総蛋白量、AST、ALT、クレアチニン、尿素窒素、血清血糖、TG、遊離脂肪酸、総コレステロール、HDL-コレステロール、LDL-コレステロールであった。図5-1に10~13週齢のマウス(成体マウス)の平均の結果を示す。また、図5-2、図5-3、図5-4、図5-5及び図5-6に、それぞれAST、ALT、TG、総コレステロール及びHDL-コレステロールの4、5及び9週齢マウスの値を示す。肥満マウスdarumaにおいて通常マウスに比べ、ALT、遊離脂肪酸、総コレステロール、HDL-コレステロールが有意に高い値を示した。一方、総蛋白、AST、クレアチニン、尿素窒素、血清血糖、TG及びLDL-コレステロールは、肥満マウスdarumaと通常マウスで有意な差は認められなかった。

【0051】

(6) 血糖値、血中インスリン値及びレプチン値の比較

10週齢までの肥満マウスdaruma及び通常マウスから採血し、血糖値、血中インスリン及びレプチンを測定した。同時に各マウスの体重も測定した。血糖値は、DRI-CHEM3500V(FUJIFILM)により測定した。インスリンはレビスインスリンキット マウス-T(株シバヤギ)を使用し、血漿10µlを検体とした。キットの操作マニュアルに従い反応させ、全ての行程が終了した後に、吸光度測定(主波長450nm、副波長620nm)を行なった。さらに、標準曲線を作成し、測定結果の判定を行なった。レプチンはモリナガレプチン測定キット(株式会社森永生科学研究所)を使用し、血漿5µlを検体とした。キットの操作マニュアルに従い反応させ、全ての行程が終了した後に、吸光度測定(主波長450nm、副波長630nm)を行なった。さらに、標準曲線を作成し、測定結果の判定を行なった。

【0052】

図6-1に体重、図6-2に血糖値を示す。また、図7-1にインスリン値、図7-2にレプチン値を示す。血糖値においては、正常マウスに比べdarumaで高い値を示した。正常マウスでは例外なく全頭で100~200mg/dlの範囲に収まったのに対し、darumaでは、200mg/dl以上を示すものがほとんどであった。また、darumaマウスにおいては、雄の糖尿病発症率は、100%であったのに対して、雌の発症率は10%未満であった。血糖は個体差や採血時間、ストレス他、多くの要因で変動するので、同じ個体で毎週採血しても、一定の傾向をつかむ事は難しいにも関わらず、明らかに4~5週齢頃からdarumaが高い値を示したことから、darumaが高血糖症を発症していることは間違い無いと思われた。また、3週齢から肥満マウスdarumaにおいて、血中インスリン及びレプチン濃度いずれも高かった。

【0053】

10

20

30

40

50

さらに糖負荷試験を行なった。すなわち、グルコースを1.5g/kg体重の割合で腹腔内に投与して、投与直前、30分後、60分後、120分後及び180分後に上記の採血方法で採血し、血糖値とインスリン値を測定した。動物は4～8週齢の雄の正常マウスとdarumaをそれぞれ8～12匹ずつ使用した。

【0054】

図8-1に血糖値を図8-2にインスリン値を示す。糖負荷試験における血糖値及び血中インスリン濃度とも肥満マウスdarumaで通常マウスに比べ有意に高かった。

【0055】

(7) 脂肪及び肝臓の比較

肥満マウスdaruma及び通常マウスの腹部脂肪(白色脂肪及び褐色脂肪)及び肝臓を摘出し、組織切片を作成しHE染色し顕鏡した。図9にHE染色像を示す。肥満マウスdarumaの白色脂肪は脂肪細胞が脂肪で膨らみ細胞自体が大きくなっていた。また、肝臓に脂肪滴が溜まっていた。

【0056】

(8) 膵臓、腎臓及び筋肉組織の比較

肥満マウスdaruma及び通常マウスの膵臓、腎臓及び筋肉を摘出し、組織切片を作成しHE染色し顕鏡した。図10にHE染色像を示す。肥満マウスdaruma及び通常マウスのいずれにおいても異常は認められなかった。

【0057】

実施例3 他の肥満マウスとの比較(体重増加の比較及び交配実験)

成長曲線を作成したところ、darumaは雌雄共に離乳後4～5週齢頃から肥満を呈し始め、15週齢でcontrolの1.5倍、20週齢で約2倍の体重となった。darumaの肥満を呈し始める時期を他のモデルマウスと比較すると、fat(fat)マウスは6～8週齢頃、tubby(tub)マウスは9～12週齢頃と遅いものに対し、obese(ob)マウスやdiabetes(db)マウスは4～5週齢頃の早期から太り始めるので、darumaの肥満発症時期は後者のobese(ob)マウスやdiabetes(db)マウスのそれに類似している。一方、体重増加率のみを比較すると、darumaの体重増加像は、体重が緩やかに増加し50～60gでプラトーに達するobese(ob)マウスやdiabetes(db)マウス及びtubby(tub)マウスよりも、むしろこの3種の突然変異マウスに比べ急性に増加し、最終的に60～70gに達するfat(fat)マウスに類似している。

【0058】

また、遺伝子レベルで既存のモデルマウスと比較するために、各種モデルマウスとdarumaのヘテロ同士を交配させた。もし同じ遺伝子変異であれば、理論的にヘテロの交配であるので25%が肥満を発症するはずである。その結果、ほとんどが0%であったのに対し、diabetes(db)マウスとの交配によって生まれた子供にのみ、14%の確率で肥満の発症が認められた。このことから、darumaの肥満は少なくともobese(ob)マウスやfat(fat)マウス、tubby(tub)マウスと同一遺伝子の変異によるものではないことが推測される。しかし、diabetes(db)マウスとの交配において14%の確率で肥満が生じたことから、darumaの肥満の要因はdiabetes(db)マウスと共通している可能性が示唆されるが、darumaの肥満原因遺伝子がdiabetes(db)マウスと同一であれば、25%の確率で肥満の発症が認められると推測されるため、darumaの原因遺伝子はdiabetes(db)マウスと異なるものであることは確実といえる(図11)。そこで、darumaとdbマウス両者には直接の肥満原因遺伝子とは別に、共通した肥満危険因子の存在を想定することが可能となる。

【0059】

daruma特有の肥満遺伝子をAa(aが劣性遺伝子で、aaのみ肥満発症)、dbマウス特有の肥満遺伝子をCc(cが劣性遺伝子、ccのみ肥満発症)とする。これらはそれらのマウスにのみ特有なため、A遺伝子に関してdbマウスはAAを有し、C遺伝子に関してdarumaはCCを有する。そこで、これらを交配しても、aaとccの生まれる確率はゼロとなり、肥満は発症しない。ところが、肥満を起こす別の要因(危険因子みたいなものと考えられる)があり、その遺伝子をBとし、この要因は各系統内の交配では肥満発症に関与しないが両者の交配でbbになり、かつa及びcを持つ個体でのみ肥満を誘起すると考えれば、その確率は13.8%であり

10

20

30

40

50

両者の交配で得られた14%に近く、今回両者の交配により生まれた子供に肥満が認められたのが納得される。

【産業上の利用可能性】

【0060】

本発明の肥満症マウスdarumaは、肥満、摂食、エネルギー代謝、糖尿病の基礎研究のモデルのみならず、創薬や健康食品の評価のモデルとしても利用することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】肥満マウスdarumaと通常マウスの外観の比較を示す図である。

【図2-1】肥満マウスdarumaと通常マウスの雌マウスの成長曲線を示す図である。

10

【図2-2】肥満マウスdarumaと通常マウスの雄マウスの成長曲線を示す図である。

【図3-1】通常マウスのCTスキャン像を示す図である。

【図3-2】肥満マウスdarumaのCTスキャン像を示す図である。

【図4-1】肥満マウスdaruma及び通常マウスの生理機能の比較を示す図であり、摂食量の比較を示す図である。

【図4-2】肥満マウスdaruma及び通常マウスの生理機能の比較を示す図であり、行動量の比較を示す図である。

【図4-3】肥満マウスdaruma及び通常マウスの生理機能の比較を示す図であり、血圧の比較を示す図である。

【図4-4】肥満マウスdaruma及び通常マウスの生理機能の比較を示す図であり、体温の比較を示す図である。

20

【図4-5】肥満マウスdaruma及び通常マウスの生理機能の比較を示す図であり、心拍数の比較を示す図である。

【図4-6】肥満マウスdaruma及び通常マウスの生理機能の比較を示す図であり、行動リズムの比較を示す図である。

【図5-1】肥満マウスdaruma及び通常マウスの血液生化学検査の結果を示す図である。

【図5-2】肥満マウスdaruma及び通常マウスのAST値の比較を示す図である。

【図5-3】肥満マウスdaruma及び通常マウスのALT値の比較を示す図である。

【図5-4】肥満マウスdaruma及び通常マウスのTG値の比較を示す図である。

【図5-5】肥満マウスdaruma及び通常マウスの総-コレステロール値の比較を示す図である。

30

【図5-6】肥満マウスdaruma及び通常マウスのHDL-コレステロール値の比較を示す図である。

【図6-1】肥満マウスdaruma及び通常マウスの体重の比較を示す図である。

【図6-2】肥満マウスdaruma及び通常マウスの血糖値の比較を示す図である。

【図7-1】肥満マウスdaruma及び通常マウスのインスリン値の比較を示す図である。

【図7-2】肥満マウスdaruma及び通常マウスのレプチン値の比較を示す図である。

【図8-1】肥満マウスdaruma及び通常マウスの糖負荷試験における血糖値の比較を示す図である。

【図8-2】肥満マウスdaruma及び通常マウスの糖負荷試験におけるインスリン値を示す図である。

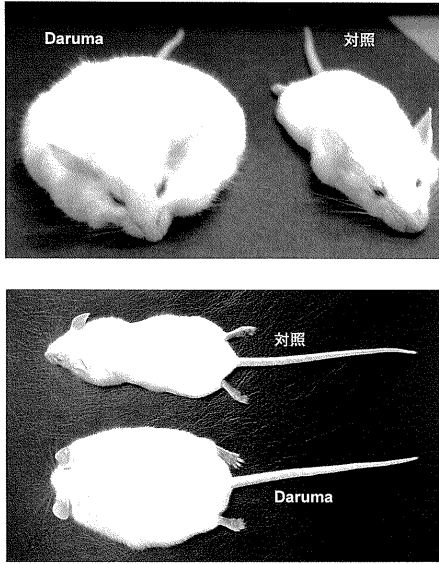
40

【図9】肥満マウスdaruma及び通常マウスの腹部脂肪及び肝臓の組織切片のHE染色像を示す図である。

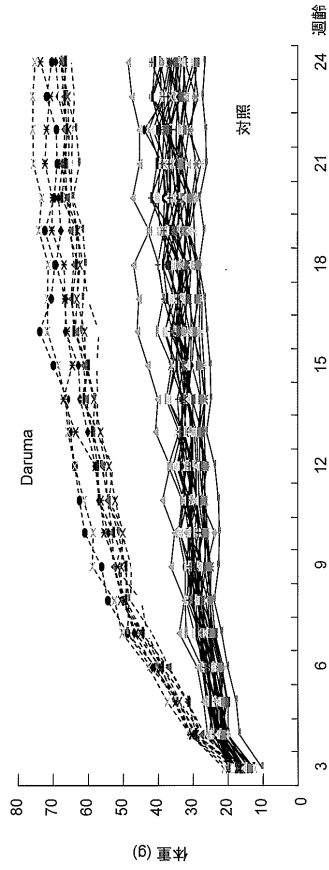
【図10】肥満マウスdaruma及び通常マウスの膵臓、腎臓及び筋肉の組織切片のHE染色像を示す図である。

【図11】他の肥満モデルマウスとの交配実験の結果を示す図である。

【 図 1 】

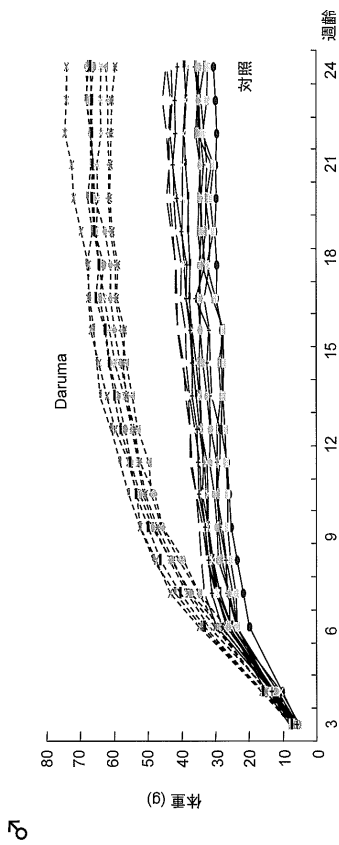


【 図 2 - 1 】



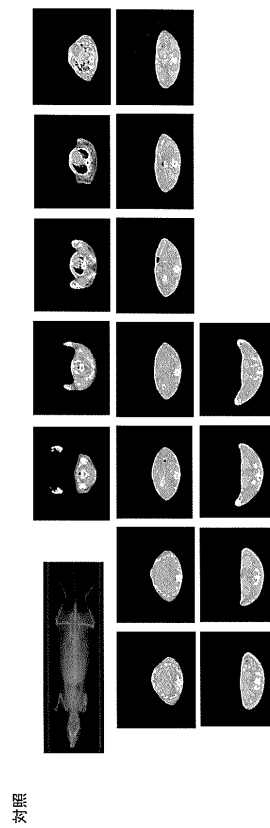
♀

【 図 2 - 2 】



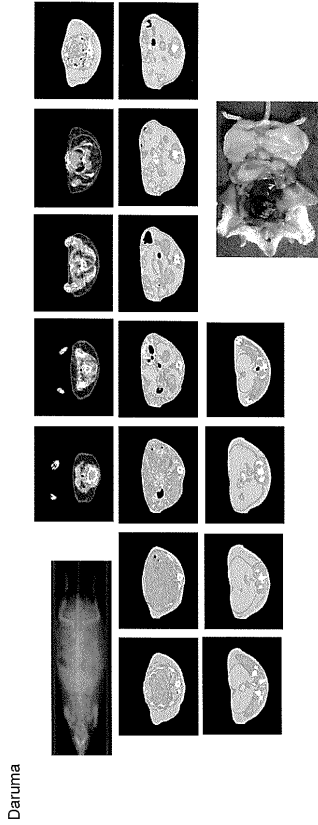
♂

【 図 3 - 1 】

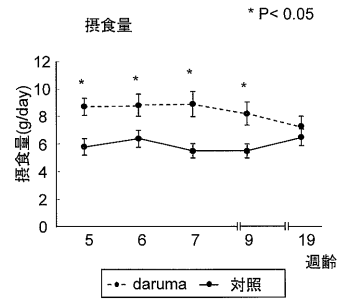


对照

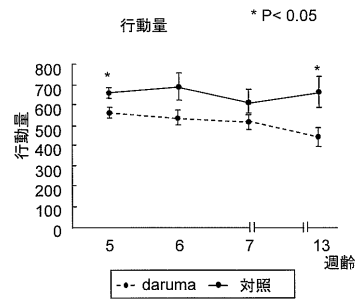
【 図 3 - 2 】



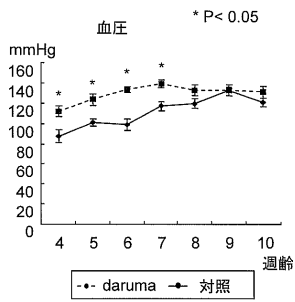
【 図 4 - 1 】



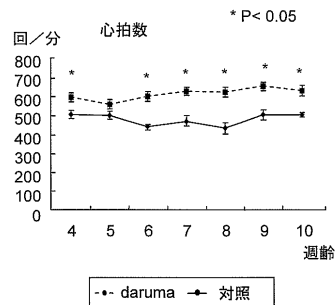
【 図 4 - 2 】



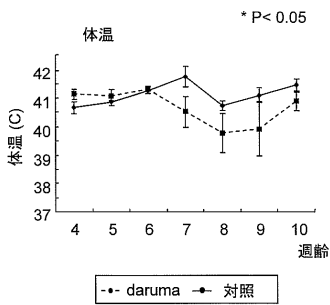
【 図 4 - 3 】



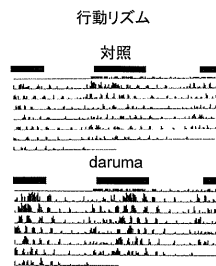
【 図 4 - 5 】



【 図 4 - 4 】



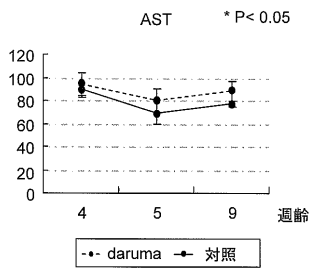
【 図 4 - 6 】



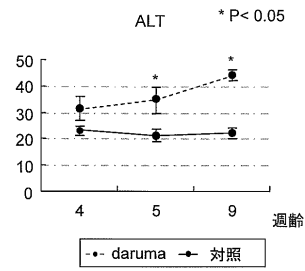
【 図 5 - 1 】

	対照	daruma
総蛋白	4.9 ± 0.235	5.35 ± 0.23274
AST(GOT)	110.3 ± 25.68	127.5 ± 14.9025
ALT(GPT)	32 ± 4.528	87.25 ± 13.8346*
クレアチニン	0.1 ± 0.037	0.06 ± 0.02041
尿素窒素	18 ± 1.732	23 ± 1.77951
血清血糖	153.8 ± 9.304	214.5 ± 28.3975
TG(中性脂肪)	73 ± 19.65	81 ± 11.0076
遊離脂肪酸	1.698 ± 0.095	2.4425 ± 0.15564*
総コレステロール	116.5 ± 9.35	170.25 ± 12.8022*
HDL-コレステロール	72 ± 4.123	95 ± 1.68325*
LDL-コレステロール	8.25 ± 0.75	11.75 ± 2.86865

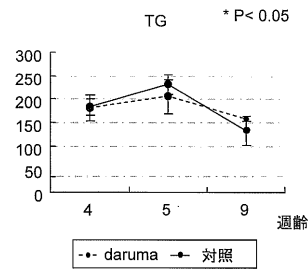
【 図 5 - 2 】



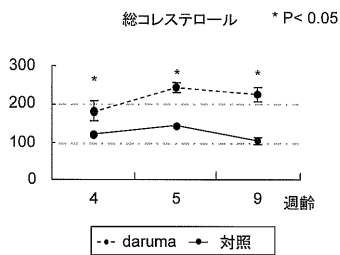
【 図 5 - 3 】



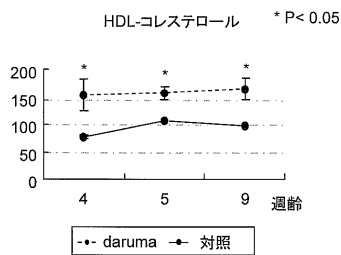
【 図 5 - 4 】



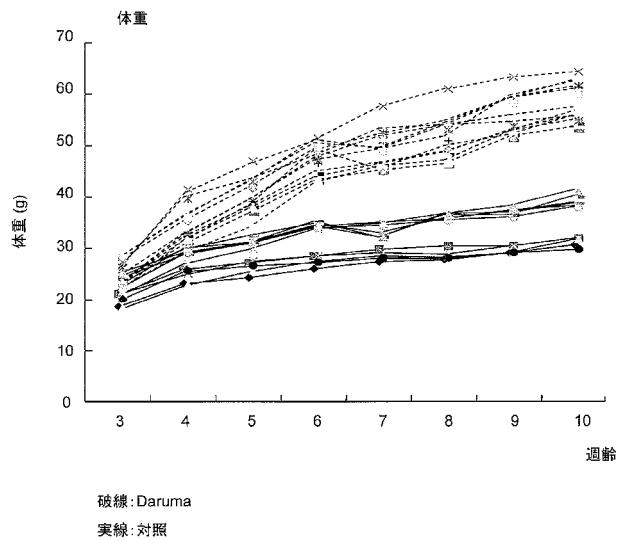
【 図 5 - 5 】



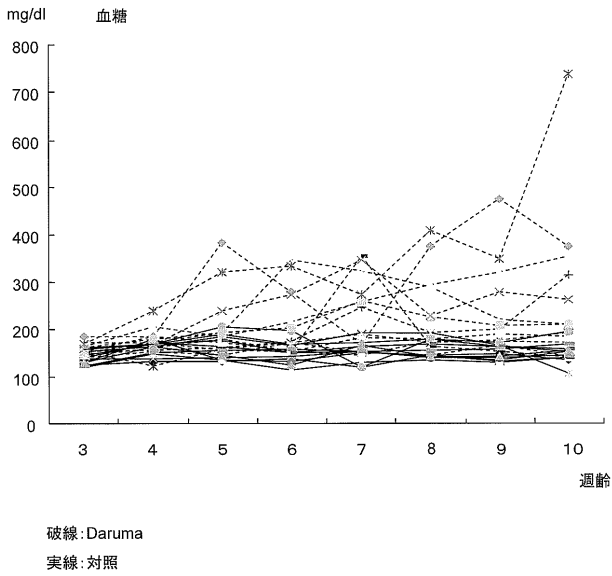
【 図 5 - 6 】



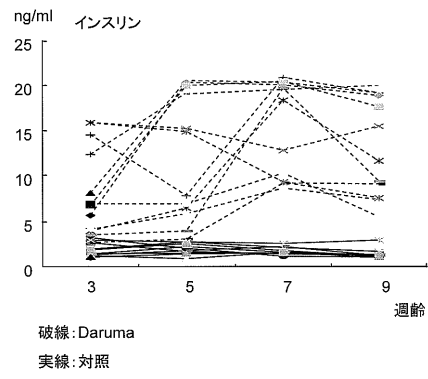
【 図 6 - 1 】



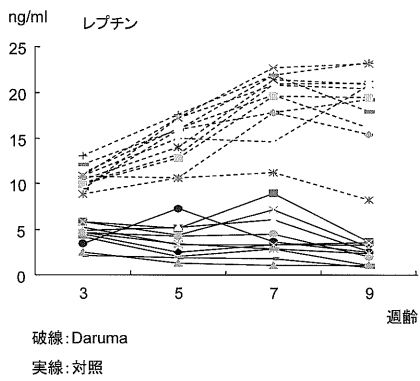
【 図 6 - 2 】



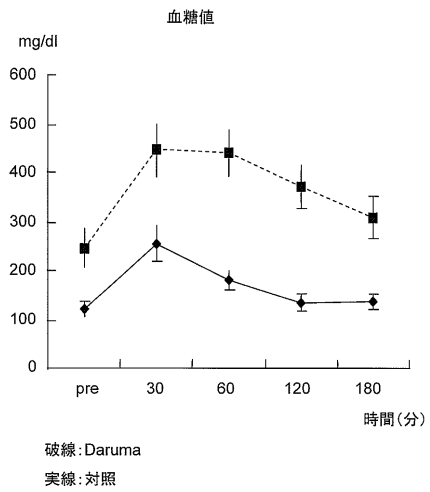
【 図 7 - 1 】



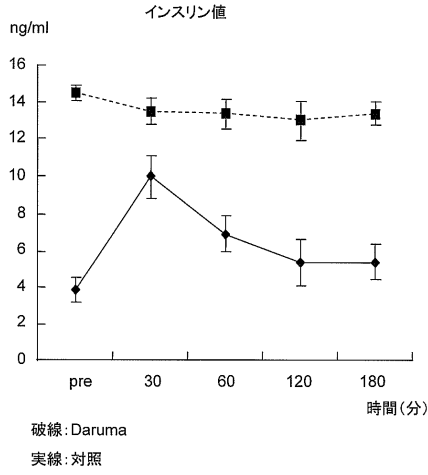
【 図 7 - 2 】



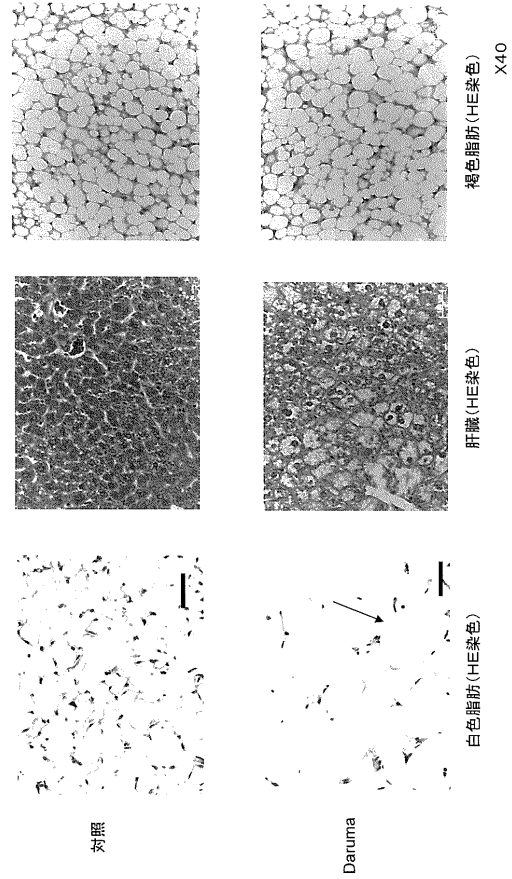
【 図 8 - 1 】



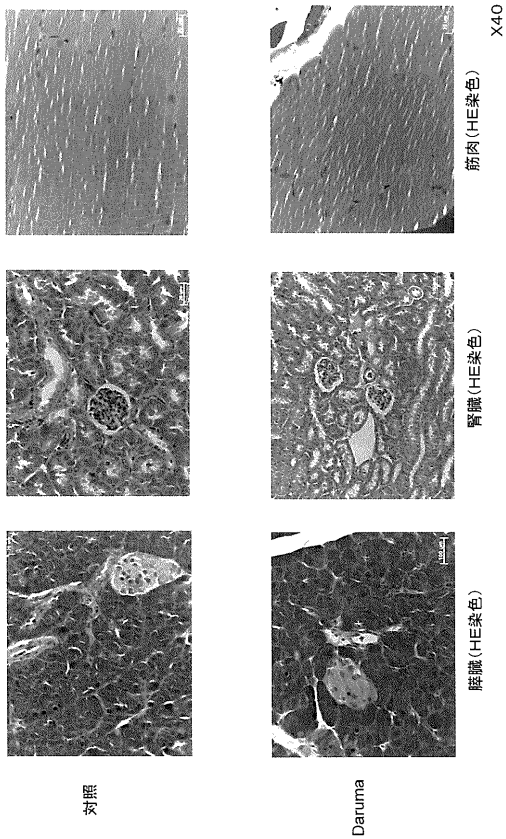
【 図 8 - 2 】



【 図 9 】



【 図 1 0 】



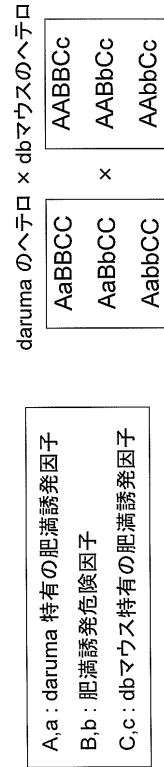
【 図 1 1 】

他の肥満モデルマウスとの交配結果の肥満発症率

Diabetes (db)	x	daruma	: 14%
Obese (ob)	x	daruma	: 0%
Fat (fat)	x	daruma	: 0%
Tubby (tub)	x	daruma	: 0%

理論値: もし同一遺伝子変異であれば25%に発症

daruma と db マウスの交配により生まれた子供の肥満発症について



bb かつ a,c の因子が揃う確率: 5/36 → 13.8% **肥満発症**

フロントページの続き

(72)発明者 中原 桂子

宮城県宮崎市学園木花台西1丁目1番地 国立大学法人宮崎大学内

Fターム(参考) 2G045 AA40 CA25 CB17 DA31 GC07 GC10