

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

新規遺伝子変異ラット作製技術に基づく
生活習慣病・難治性疾患モデルラットの開発

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中 尾 一 和

平成23（2011）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

新規遺伝子変異ラット作製技術に基づく
生活習慣病・難治性疾患モデルラットの開発

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中 尾 一 和

平成 23 (2011) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告書

新規遺伝子変異ラット作製技術に基づく生活習慣病・難治性疾患モデルラットの開発

－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. 新規技術開発に基づく生活習慣病・難治性疾患モデル遺伝子変異ラット作製 －新規遺伝子変異ラット作製技術の開発と応用－

芹川 忠夫 ----- 5

2. 新規技術開発に基づく生活習慣病・難治性疾患モデル遺伝子変異ラット作製 －新規遺伝子変異ラット作製技術の開発と生活習慣病・難治性疾患モデルラット開発への応用－

真下 知士 ----- 10

3. 新規遺伝子変異ラット作製技術に基づく生活習慣病・難治性疾患モデルラットの開発

－心血管病モデル遺伝子変異ラット開発－

桑原 宏一郎 ----- 14

4. 新規遺伝子変異ラット作製技術に基づく生活習慣病・難治性疾患モデルラットの開発

－高血圧、腎臓病モデル遺伝子変異ラット開発－

横井 秀基 ----- 18

5. 新規遺伝子変異ラット作製技術に基づく生活習慣病・難治性疾患モデルラットの開発

－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開発－

富田 努 ----- 22

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 26

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 31

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

新規遺伝子変異ラット作製技術に基づく生活習慣病・難治性疾患モデルラットの開発

－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	内分泌代謝内科	教授
分担研究者：芹川 忠夫	京都大学大学院医学研究科	附属動物実験施設	教授
真下 知士	京都大学大学院医学研究科	附属動物実験施設	特定准教授
桑原 宏一郎	京都大学大学院医学研究科	内分泌代謝内科	講師
横井 秀樹	京都大学大学院医学研究科	内分泌代謝内科	医員
富田 努	京都大学大学院医学研究科	内分泌代謝内科	医員

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。本年度は昨年引き続き研究分担者である芹川、真下らが開発した遺伝子変異ラット樹立技術を用いて、桑原、横井、富田が生活習慣病・難治性疾患関連遺伝子変異ラットのスクリーニングを行うと共に、レプチン、セイピンをはじめとする複数の候補遺伝子の変異ラットを同定し、その系統の樹立に成功し、表現系解析を開始した。来年度も引き続きスクリーニングを継続しつつ、樹立した遺伝子変異ラットの解析を行い、スーパー特区における創薬開発を加速させる。

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。最近研究分担者である芹川、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還元技術（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

本年度は、昨年度に続き生活習慣病・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った。候補遺伝子としては心筋梗塞モデルとしてLDL受容体、脳卒中、高血圧モデルとしてナトリウム利尿ペプチド関連遺伝子など、糖尿病モデルとしてインシュリン(*ins1*, *ins2*)、インシュリン受容体、*IRS1*, *2*, *PPAR γ* 、レプチン関連遺伝子、脂肪萎縮性糖尿病モデルとしてヒト脂肪萎縮症原因遺伝子である*AGPAT2*、*SEIPIN*など、CKDモデルとして*podocin*、*TRPC6*などをスクリーニングした。具体的にはそれぞれの標的遺伝子のcoding領域に対応するprimer setを作製し、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を行なった。この方法はDNA mismatches部位に特異的かつ短時間に挿入されるトランスポゾンMuの性質を利用し、さらにプール法および蛍光標識DNAを組み合わせることにより短時間かつ低コストで変異DNAのスクリーニング、変異ラットの同定を可能としたものである。このスクリーニングにより候補遺伝子の変異が見つかった場合は新規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を樹立していく。これらの過程はひとつの遺伝子のスクリーニング開始から、変異の同定、変異ラットの樹立までおよそ6ヶ月から1年で行なえる予定である。標的遺伝子の候補は中尾、桑原、富田、横井にて決定し、スクリーニング、個体復元は京都大学動物実験施設にて芹川、真下が行なった。変異ラット樹立後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)、富田(糖尿病、肥満)、横井(CKD)らがおのおのの観点からその解析を行う。現時点ではすでに年間およそ100primer setのスクリーニングが可能であるが、今後機器の充実などを行なうことによりそのスピードを現状の3倍にまでアップする予定である。ま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

本年度は昨年度から開始した生活習慣病・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スクリーニングを継続した。候補遺伝子としては心筋梗塞モデルとしてLDL受容体、脳卒中、高血圧モデルとしてナトリウム利尿ペプチド関連遺伝子など、糖尿病モデルとしてインシュリン(*ins1*, *ins2*)、インシュリン受容体、*IRS1*, *2*, *PPAR γ* 、レプチン関連遺伝子、脂肪萎縮性糖尿病モデルとしてヒト脂肪萎縮症原因遺伝子である*AGPAT2*、*SEIPIN*など、CKDモデルとして*podocin*、*TRPC6*などをスクリーニングを行った。これらスクリーニングの結果、現時点でレプチン、*SEIPIN*、ナトリウム利尿ペプチド1型受容体遺伝子をはじめとする複数の生活習慣病関連遺伝子にナンセンスあるいはミスセンス変異を有するラットの同定に成功し、さらに新規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樹立に成功した。現在これらラットの表現系解析を進めており一部非常に興味深い結果を得ている。今後表現系解析を継続すると同時に、スクリーニングに用いる機器の充実などを行なうことによりスクリーニングのスピードをさらにアップする予定である。

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が、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。

今後本年度に得られた遺伝子変異ラットの表現系を解析し、これら疾患のモデルラットの意義を確立し、共同研究なども通じてその詳細な解析を行うことにより、今後、これら病態解明・新規治療標的の同定および新規創薬開発が加速されるものと考えている。

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 スクリーニングを行い、複数の関連遺伝子変異ラットの同定、系統樹立に成功し、またその一部では肥満などの興味深い表現系を得た。今後機器の充実、技術改善によるさらなるスクリーニング速度の改善に尽くすとともに、本年度に得られた遺伝子変異ラットの表現系を解析し、疾患モデルラットを確立し、病態解明・新規治療標的の同定と新規創薬開発を加速させる予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Narazaki G, Uosaki H, Fukushima H, Kuwahara K, Harada M, Matsuda H, Matsuoka S, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Ikeda T, Sakata R, Mummery CL, Nakatsuji N, Yamanaka S, Nakao K, Yamashita JK. Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin-a. **PLoS One**. 6(2):e16734. 2011
2. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakao K. Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. **J Cardiol**. 2011 Feb 4. [Epub ahead of print] in press
3. Hata L, Murakami M, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kinoshita H, Usami S, Yasuno S, Fujiwara M, Kuwabara Y, Minami T, Yamada Y, Yamada Y, Nakao K, Ueshima K, Nishikimi T, and Nakao K. Zinc-finger protein 90 negatively regulates neuron-restrictive silencer factor-mediated transcriptional repression of fetal cardiac genes. **J Mol Cell Cardiol**. in press 2011.
4. Yamada N, Nakao K, et al. Impaired CNS leptin action is implicated in depression associated with obesity. **Endocrinology** 2011 in press
5. Rong X, Nakao K, Tomita T, Kuwahara K, et al. Angiotensin II type 1 receptor-independent beneficial effects of telmisartan on dietary-induced obesity, insulin resistance and fatty liver in mice. **Diabetologia**. 2011. in press
6. Takano M, Kinoshita H, Shioya T, Itoh M, Nakao K, Kuwahara K. Pathophysiological Remodeling of Mouse Cardiac Myocytes Expressing Dominant Negative Mutant of Neuron Restrictive Silencing Factor. **Circ J**. 74(12):2712-9. 2010.
7. Kuwahara K, Kinoshita H, Kuwabara Y, Nakagawa Y, Usami S, Minami T, Yamada Y, Fujiwara M, and Nakao K. MRTF-A is a common mediator of mechanical stress- and neurohumoral stimulation-induced cardiac hypertrophic signaling leading to activation of BNP gene expression. **Mol Cell Biol**. 30(17):4134-4148.2010
8. Kuwahara K, Nakao K. Regulation and significance of atrial and brain natriuretic peptides as cardiac hormones. **Endocr J**. 57(7):555-565.2010
9. Kinoshita H, Nakao K. et al. Inhibition of TRPC6 channel activity contributes to the antihypertrophic effects of natriuretic peptides-guanylyl cyclase-A signaling in the heart. **Circ Res**. 106(12): 1849-60. 2010
10. Fujii T, Nakao K. et al. Circulating C-type natriuretic peptide (CNP) rescues chondrodysplastic CNP knockout mice from their impaired skeletal growth and early death.. **Endocrinology**. 151(9) :4381-8. 2010
11. Iwakura H, Nakao K, et al. Establishment of a novel ghrelin-producing cell line. **Endocrinology**. 151(6): 2940-5. 2010.
12. Yamada G, Ariyasu H, Iwakura H, Hosoda H, Akamizu T, Nakao K, Kangawa K. Generation of transgenic mice overexpressing a ghrelin analog.. **Endocrinology**. 151: 5935-5940. 2010.
13. Ariyasu H, Iwakura H, Yamada G, Kanamoto N, Bando M, Kohno K, Sato T, Kojima M, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T. A postweaning reduction in circulating ghrelin temporarily alters growth hormone (GH) responsiveness to GH-releasing hormone in male mice but does not affect

somatic growth. **Endocrinology**. 151:1743-1750. 2010.

14. Yasuno S, Nakao K. et al. Is pulse pressure a predictor of new-onset diabetes in high-risk hypertensive patients?: a subanalysis of the Candesartan Antihypertensive Survival Evaluation in Japan (CASE-J) trial. **Diabetes Care**. 33(5): 1122-7. 2010.
15. Ueshima K, Yasuno S, Oba K, Fujimoto A, Mukoyama M, Ogihara T, Saruta T, Nakao K. Impact of left ventricular hypertrophy on the time-course of renal function in hypertensive patients-a subanalysis of the CASE-J trial-. **Circ J**. 74: 2132-2138. 2010
16. Nakao K., Hirata M, Oba K, Yasuno S, Ueshima K, Fujimoto A, Ogihara T, Saruta T; CASE-J Trial Group. Role of diabetes and obesity in outcome of the candesartan antihypertensive survival evaluation in Japan (CASE-J) trial. **Hypertens Res**. 33: 600-606. 2010
17. Mori K, Mukoyama M, Nakao K. Searching for novel intercellular signal-transducing molecules in the kidney and their clinical application.. **Clin Exp Nephrol**. 14(6): 523-7. 2010
18. Yasoda A, Nakao K. Translational research of C-type natriuretic peptide (CNP) into skeletal dysplasias. **Endocr J**. 57(8): 659-66. 2010
19. Yokoi H., Nakao K. et al. Podocyte-specific expression of tamoxifen-inducible Cre recombinase in mice. **Nephrol Dial Transplant**.. 25(7): 2120-4. 2010
20. Yasue S, Nakao K. et al. Adipose tissue-specific regulation of angiotensinogen in obese humans and mice: impact of nutritional status and adipocyte hypertrophy. **Am J Hypertens**. 23(4): 425-31. 2010
21. Okada S, Nakao K. et al. Adipose tissue-specific dysregulation of angiotensinogen by oxidative stress in obesity. **Metabolism**. 59(9): 1241-51.
22. Ishii-Yonemoto T, Nakao K. Tomita T. et al. Glucocorticoid reamplification within cells intensifies NF-kappaB and MAPK signaling and reinforces inflammation in activated preadipocytes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 298(5): E930-40. 2010

2. 学会発表

国際学会

1. 中尾一和. Translational Research and Animal Disease Model. 18th International Workshop on

Genetic Systems in the Rat. 2010.11.30. 京都

2. 中尾一和. Translational Research of Novel Hormones. International Symposium Frontiers in Biologically Active Peptide Research. 2010.12.7. 京都

国内学会

1. 中尾一和. 内分泌代謝学と臨床医学研究. 日本内分泌学会 第11回関東甲信越支部学術集会、2011.3.4、横浜

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

新規技術開発に基づく生活習慣病・難治性疾患モデル遺伝子変異ラット作製
－新規遺伝子変異ラット作製技術の開発と応用－

分担研究者：芹川 忠夫

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設 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。本年度は我々が開発した遺伝子変異ラット樹立技術を用いて、生活習慣病関連疾患、難治性疾患関連遺伝子変異ラットのスクリーニングを開始した。結果、レプチン、Seipin 遺伝子などのナンセンス変異体をはじめとする複数の候補遺伝子の変異体を同定し、遺伝子変異ラットの系統樹立を行った。来年度も引き続きスクリーニングを継続しつつ、遺伝子変異ラットの系統樹立を行うとともに、機器のさらなる充実、技術の改善を行い、さらに高効率な遺伝子変異ラット作製法の確立を目指す。これらによりスーパー特区における創薬開発を加速させる。

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。最近我々は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

本年度は生活習慣病・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スクリーニングを開始した。標的遺伝子のcoding領域に対応するprimer setを作製し、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を行なった。この方法はDNAミスマッチ部位に特異的かつ短時間に挿入されるトランスポゾンMuの性質を利用し、さらにプール法および蛍光標識DNAを組み合わせることにより短時間かつ低コストで変異DNAのスクリーニング、変異ラットの同定を可能としたもの

である。このスクリーニングにより候補遺伝子の変異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ていく。これらの過程はひとつの遺伝子のスクリーニング開始から、変異の同定、変異ラットの樹立までおよそ6ヶ月から1年で行なえる予定である。現時点ではすでに年間およそ100primer setのスクリーニングが可能であるが、今後機器の充実などを行なうことによりそのスピードを現状の3倍にまでアップする予定である。ま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

本年度から生活習慣病・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スクリーニングを開始した。候補遺伝子としてはレプチン、seipin遺伝子などをスクリーニング開始した。これらスクリーニングの結果、現時点でレプチン遺伝子をはじめとする複数の生活習慣病関連遺伝子にナンセンスあるいはミスセンス変異を有するラットの同定に成功し、さらに新規開発した個体還元技術ICSIを用いて一部標的遺伝子変異ラット系統樹立に成功し、現在表現系解析を開始しており、肥満、高血糖、血圧上昇などの興味深い表現系を確認しつつある。今後スクリーニング、系統樹立を継続すると同時に、スクリーニングに用いる機器の充実などを行なうことによりスクリーニングのスピードをさらにアップする予定である。

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变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。今後、ラットにおける遺伝子変異スクリーニング、変異ラット系統樹立効率を高めることにより、これら生活習慣病・難治性疾患の病態解明・新規治療標的の同定および新規創薬開発が加速されるものと考えている。

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スクリーニングを開始し、複数の生活習慣病・難治性疾患関連遺伝子変異ラットの同定、系統樹立に成功し、表現系を解析しつつある。今後もスクリーニングを継続しつつ、本年度に得られた遺伝子変異ラットの表現系を解析し、疾患モデルラットを確立し、病態解明・新規治療標的の同定と新規創薬開発を加速させる予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. A mutation in the gene encoding mitochondrial Mg²⁺ channel MRS2 results in demyelination in the rat. Kuramoto T, Kuwamura M, Tokuda S, Izawa T, Nakane Y, Kitada K, Akao M, Guénet JL, Serikawa T. PLoS Genet. 7(1):e1001262, 2011

2. Kyoto rhino rats derived by ENU mutagenesis undergo congenital hair loss and exhibit focal glomerulosclerosis. Kuramoto T, Kuwamura M, Tagami F,

- Mashimo T, Nose M, Serikawa T.
Exp Anim. 60(1):57-63, 2011.
3. Genetic Quality Control of the Rat Strains at the National Bio Resource Project – Rat. Kuramoto T, Nakanishi S, Yamasaki K, Kumafuji K, Sakakibara Y, Neoda Y, Takizawa A, Kaneko K, Otsuki M, Hashimoto R, Voigt B, Mashimo T, Serikawa T.
IBC 2010, vol. 2, article no. 12, pp. | doi: 10.4051/ibc.2010.2.4.0012
 4. Scn1a missense mutation causes limbic hyperexcitability and vulnerability to experimental febrile seizures. Ohno Y, Ishihara S, Mashimo T, Sofue N, Shimizu S, Imaoku T, Tsurumi T, Sasa M, Serikawa T. Neurobiol Dis. 41(2):261-269, 2010
 5. Inhibitory effects of levetiracetam on absence seizures in a novel absence-like epilepsy animal model, Groggy rat. Tokuda S, Sofue N, Ohno Y, Sasa M, Serikawa T. Brain Res. 1359:298-303, 2010
 6. Serotonergic Modulation of Absence-Like Seizures in Groggy Rats: a Novel Rat Model of Absence Epilepsy. Ohno Y, Sofue N, Imaoku T, Morishita E, Kumafuji K, Sasa M, Serikawa T. J Pharmacol Sci. 114(1):99-105, 2010
 7. Scn1a missense mutation impairs GABAA receptor-mediated synaptic transmission in the rat hippocampus. Ohno Y, Sofue N, Ishihara S, Mashimo T, Sasa M, Serikawa T. Biochem Biophys Res Commun. 400(1):117-122, 2010
 8. Survey of live laboratory animals reared in Japan (2009). Yagami K, Mashimo T, Sekiguchi F, Sugiyama F, Yamamura K, Serikawa T. Exp Anim 59(4):531-535, 2010
 9. A missense mutation of the gene encoding voltage-dependent sodium channel (Nav1.1) confers susceptibility to febrile seizures in rats. Mashimo T, Ohmori I, Ouchida M, Ohno Y, Tsurumi T, Miki T, Wakamori M, Ishihara S, Yoshida T, Takizawa A, Kato M, Hirabayashi M, Sasa M, Mori Y, Serikawa T. J Neurosci, 30(16):5744-53, 2010
 10. A novel middle-wavelength opsin (M-opsin) null-mutation in the retinal cone dysfunction rat. Xie B, Nakanishi S, Guo Q, Xia F, Yan G, An J, Li L, Serikawa T, Kuramoto T, Zhang Z. Exp Eye Res 91(1):26-33, 2010
 11. Hippocampal cell loss and propagation of abnormal discharges accompanied with the expression of tonic convulsion in the spontaneously epileptic rat. Hanaya R, Sasa M, Sugata S, Tokudome M, Serikawa T, Kurisu K, Arita K. Brain Res. 1328:171-180, 2010
 12. Identification of the rat Rex mutation as a 7-bp deletion at splicing acceptor site of the Krt71 gene. Kuramoto T, Hirano R, Kuwamura M, Serikawa T. J Vet Med Sci 72(7):909-912, 2010
 13. Antiepileptogenic and anticonvulsive actions of levetiracetam in a pentylenetetrazole kindling model. Ohno Y, Ishihara S, Terada R, Serikawa T, Sasa M. Epilepsy Res 89(2-3):360-364, 2010
 14. Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. Mashimo T, Takizawa A, Voigt B, Yoshimi K, Hiai H,

- Kuramoto T, Serikawa T. PLoS One. 5(1):e8870, 2010
15. Genetic analyses of fancy rat-derived mutations. Kuramoto T, Yokoe M, Yagasaki K, Kawaguchi T, Kumafuji K, Serikawa T. *Exp Anim* 59(2): 147-155, 2010
16. NBRP databases: databases of biological resources in Japan. Yamazaki Y, Akashi R, Banno Y, Endo T, Ezura H, Fukami-Kobayashi K, Inaba K, Isa T, Kamei K, Kasai F, Kobayashi M, Kurata N, Kusaba M, Matuzawa T, Mitani S, Nakamura T, Nakamura Y, Nakatsuji N, Naruse K, Niki H, Nitasaka E, Obata Y, Okamoto H, Okuma M, Sato K, Serikawa T, Shiroishi T, Sugawara H, Urushibara H, Yamamoto M, Yaoita Y, Yoshiki A, Kohara Y. *Nucleic Acids Res.* 38(Database issue): D26-32, 2010
17. Techniques for in vitro and in vivo fertilization in the rat. Kashiwazaki N, Seita Y, Takizawa A, Maedomari N, Ito J, Serikawa T. *Methods Mol Biol.* 597: 311-322, 2010
18. Effects of levetiracetam on hippocampal kindling in Noda epileptic rats. Ishimaru Y, Chiba S, Serikawa T, Sasa M, Inaba H, Tamura Y, Ishimoto T, Takasaki H, Sakamoto K, Yamaguchi K. *Brain Res.* 1309: 104-109, 2010
2. 学会発表
国際学会
1. Serikawa T
Mutant rat resources at National BioResource Project-Rat in Japan
The 4th AFLAS congress meeting
November 8, 2010, Taipei
2. Serikawa T
In pursuit of the Holstein rat
18th International Workshop on Genetic Systems in the Rat
Nov 30 -Dec 3, 2010
3. Serikawa T
NBRP-Rat: the worldwide rat resource center
18th International Workshop on Genetic Systems in the Rat
Nov 30 -Dec 3, 2010
- 国内学会
1. ジンクフィンガーヌクレアーゼにより作製した X 連鎖重症複合免疫不全ラット
真下知士、滝澤明子、吉見一人、国広弥生、田上史、日合弘、庫本高志、芹川忠夫
第 57 回日本実験動物学会、平成 22 年 5 月 12 日～14 日、京都市
2. 筋の不随意運動とてんかん様発作を併発するラット系統 KER の解析
石田 紗恵子、真下 知士、田上 史、西尾 健資、芹川 忠夫
第 57 回日本実験動物学会、平成 22 年 5 月 12 日～14 日、京都市
3. ジンクフィンガーヌクレアーゼを用いた効率的なノックアウトラット作製法
滝澤明子、真下知士、国広弥生、田上史、山崎賢一、芹川忠夫
第 57 回日本実験動物学会、平成 22 年 5 月 12 日～14 日、京都市
4. Nanog-Reporter システムを用いたラット ES 細胞株の樹立
Birger Voigt、滝澤 明子、田邊 剛士、沖田 圭介、真下 知士、庫本 高志、芹川 忠夫、山中 伸弥
第 57 回日本実験動物学会、平成 22 年 5 月 12 日～14 日、京都市
5. B10.S/SgSlc マウスに生じた Prkdc 遺伝子変異
高木弓枝、庫本高志、西井 薫、鈴木隆広、沖村祐弥、池川佳男、横瀬重男、酒井隆敏、増井則夫、中江 進、須藤カツ子、芹川忠

夫

第 57 回日本実験動物学会、平成 22 年 5 月 12 日～14 日、京都市

6. 日本で捕獲された野生ラットに由来する近交系 DOB/Oda の特性解析

井上聡子、庫本高志、根小田祐基、山崎賢一、岡島涼子、真下知士、織田銑一、芹川忠夫

第 57 回日本実験動物学会、平成 22 年 5 月 12 日～14 日、京都市

7. ラット demyelination (dmy) 変異のポジショナルクローニング

庫本高志、桑村 充、徳田智子、井澤武史、中根良文、北田一博、Jean-Louis Guenet、芹川忠夫

第 57 回日本実験動物学会、平成 22 年 5 月 12 日～14 日、京都市

8. Apc 変異ラット (KAD ラット) における DSS 誘発大腸炎

吉見一人、田中卓二、芹川忠夫、庫本高志
第 57 回日本実験動物学会、平成 22 年 5 月 12 日～14 日、京都市

9. ラット Arp3、Dao、Dihc2、Kng2、Srebfl 遺伝子の機能多型ジェノタイプピング

中西 聡、芹川忠夫、庫本高志

第 57 回日本実験動物学会、平成 22 年 5 月 12 日～14 日、京都市

10. 世界拠点としての NBRP-Rat

芹川忠夫、真下知士、滝澤明子、Voigt Birger、岡島涼子、山崎賢一、中西 聡、庫本高志

第 57 回日本実験動物学会、平成 22 年 5 月 12 日～14 日、京都市

11. 自発性てんかんモデル NER (Noda epileptic rat) における脳内 Fos 発現解析

原田悠耶、清水佐紀、石原 静、芹川忠夫、熊藤健太、笹 征史、大野行弘

第 57 回日本実験動物学会、平成 22 年 5 月 12 日～14 日、京都市

12. Tremor ラットにおける脳内 Fos 発現解析

今奥琢士、庫本高志、清水佐紀、芹川忠夫、笹 征史、大野行弘

第 57 回日本実験動物学会、平成 22 年 5 月 12 日～14 日、京都市

13. Tremor ラットにおける振戦行動の薬理的解析

大野行弘、清水佐紀、今奥琢士、石原 静、笹 征史、芹川忠夫、庫本高志

第 57 回日本実験動物学会、平成 22 年 5 月 12 日～14 日、京都市

E. 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

新規技術開発に基づく生活習慣病・難治性疾患モデル遺伝子変異ラット作製
—新規遺伝子変異ラット作製技術の開発と生活習慣病・難治性疾患モデルラット
開発への応用—

分担研究者：真下 知士

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設 特定准教授

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。本年度は我々が開発した遺伝子変異ラット樹立技術を用いて、生活習慣病関連疾患、難治性疾患関連遺伝子変異ラットのスクリーニングを開始した。結果、レプチン、Seipin 遺伝子などのナンセンス変異体、ナトリウム利尿ペプチド受容体のミスセンス変異体をはじめとする複数の候補遺伝子の変異体を同定し、これらのうち一部遺伝子変異ラットの系統樹立に成功した。来年度も引き続きスクリーニングを継続しつつ、遺伝子変異ラットの系統樹立を行うとともに、機器のさらなる充実、技術の改善を行い、さらに高効率な遺伝子変異ラット作製法の確立を目指す。これらによりスーパー特区における創薬開発を加速させる。

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。最近我々は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

本年度は生活習慣病・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スクリーニングを開始した。標的遺伝子のcoding領域に対応するprimer setを作製し、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を行なった。この方法はDNAミスマッチ

部位に特異的かつ短時間に挿入されるトランスポゾンMuの性質を利用し、さらにプール法および蛍光標識DNAを組み合わせることでより短時間かつ低コストで変異DNAのスクリーニング、変異ラットの同定を可能としたものである。このスクリーニングにより候補遺伝子の変異が見つかった場合は新規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を樹立していく。これらの過程はひとつの遺伝子のスクリーニング開始から、変異の同定、変異ラットの樹立までおよそ6ヶ月から1年で行なえる予定である。現時点ではすでに年間およそ100primer setのスクリーニングが可能であるが、今後機器の充実などを行なうことによりそのスピードを現状の3倍にまでアップする予定である。ま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

本年度から生活習慣病・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スクリーニングを開始した。候補遺伝子としてはレプチン、seipin遺伝子などをスクリーニング開始した。これらスクリーニングの結果、現時点でレプチン遺伝子、セイピン遺伝子、ナトリウム利尿ペプチド受容体1型遺伝子をはじめとする複数の生活習慣病関連遺伝子にナンセンスあるいはミスセンス変異を有するラットの同定に成功し、さらに新規開発した個体復元技術ICSIを用いて一部標的遺伝子変異ラット系統樹立に成功し、現在表現系解析を開始しており、肥満、高血糖や血圧上昇などの興味深い表現系を確認しつつある。今後スクリーニング、系統樹立を継続すると同時に、スクリーニングに用いる機器の充実などを行なうことによりスクリーニングのスピードをさらにアップする予定である。

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。今後、ラットにおける遺伝子変異スクリーニング、変異ラット系統樹立効率を高めることにより、これら生活習慣病・難治性疾患の病態解明・新規治療標的の同定および新規創薬開発が加速されるものと考えている。

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スクリーニングを開始し、複数の生活習慣病・難治性疾患関連遺伝子変異ラットの同定、系統樹立に成功し、表現系を解析しつつある。今後もスクリーニングを継続しつつ、本年度に得られた遺伝子変異ラットの表現系を解析し、疾患モデルラットを確立し、病態解明・新規治療標的の同定と新規創薬開発を加速させる予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuramoto T, Kuwamura M, Tagami F, Mashimo T, Nose M, Serikawa T. Kyoto rhino rats derived by ENU mutagenesis undergo congenital hair loss and exhibit focal

- glomerulosclerosis. *Exp Anim.* 2011;60(1):57-63.
2. Ohno Y, Ishihara S, Mashimo T, Sofue N, Shimizu S, Imaoku T, Tsurumi T, Sasa M, Serikawa T. Scn1a missense mutation causes limbic hyperexcitability and vulnerability to experimental febrile seizures. *Neurobiol Dis.* 2011 Feb;41(2):261-9.
 3. Ohno Y, Sofue N, Ishihara S, Mashimo T, Sasa M, Serikawa T. Scn1a missense mutation impairs GABAA receptor-mediated synaptic transmission in the rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Sep 10;400(1):117-22.
 4. Yagami K, Mashimo T, Sekiguchi F, Sugiyama F, Yamamura K, Serikawa T. Survey of live laboratory animals reared in Japan (2009). *Exp Anim.* 2010;59(4):531-5.
 5. Mashimo T, Ohmori I, Ouchida M, Ohno Y, Tsurumi T, Miki T, Wakamori M, Ishihara S, Yoshida T, Takizawa A, Kato M, Hirabayashi M, Sasa M, Mori Y, Serikawa T. A missense mutation of the gene encoding voltage-dependent sodium channel Nav1.1 confers susceptibility to febrile seizures in rats. *J Neuroscience* 30(16):5744-5753, 2010
 6. Mashimo T, Takizawa A, Voigt B, Yoshimi K, Hiai H, Kuramoto T, Serikawa T. Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS One* 5(1):e8870. 2010
2. 学会発表
国際学会
1. Mashimo T, Takizawa A, Kunihiro Y, Yoshimi K, Kuramoto T, Voigt B, Kobayashi J, Komatsu K, Hiai H, Serikawa T: SCID rats: targeted disruption of the DNA-PKcs gene via zinc finger nucleases. The XVIIIth International Workshop on Genetic Systems in the Rat, Kyoto, Nov 30 - Dec 3, 20102.
 2. Mashimo T: Genetically modified rat models of human epilepsy produced by a gene-targeting approach. Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, Oct 25, 20103.
 3. Mashimo T, Takizawa A, Voigt B, Yoshimi K, Hiai H, Kuramoto T, Serikawa T: Severe combined immunodeficiency (SCID) rats generated by zinc finger nuclease technology. 24th International Mammalian Genome Conference, Crete, Greece, Oct 17-21, 20104.
 4. Mashimo T: Creation of Knockout Rats: A New Paradigm for Target Validation and Preclinical Development. 22nd Annual Meeting of the KSMCB, Seoul, Korea, Oct 7, 2010
 5. Mashimo T: Recent progress of gene-targeting technologies in rats: ENU mutagenesis and zinc finger nucleases. 14th international SHR symposium, Montreal, Canada, Sep 24, 2010
 6. Mashimo T, Takizawa A, Voigt B, Kuramoto T, Serikawa T: KURMA - Kyoto University Rat Mutant Archive. EURAT Meeting 2010, Berlin, Germany, 27th May 2010
- 国内学会
1. 真下知士「ラットにおける遺伝子改変技術の進歩：再生医療に役立つモデル動物」第42回再生医療・臓器再建医学コースミーティング、京都、2011年2月18
 2. 真下知士「ラットにおける遺伝子改変技術の開発：ENU ミュータジェネシスとジンクフィンガーヌクレアーゼ」筑波大学人間総合科学研究科医学セミナー、筑波、2010年12月17日3.
 3. 真下知士「遺伝子機能解析の新展開：ノックアウトラットの作製法」高血圧学会・高血圧関連疾患モデル学会合同シンポジウム、博多、2010年10月15日4.
 4. 真下知士「ラットにおける遺伝子改変技術の開発」BioJapan2010 アカデミックシーズ発表会「京都大学」、横浜、2010年9月29日5.
 5. 真下知士「ラットにおける遺伝子改変技術と表現型解析によるゲノム機能解析の現状」日本遺伝学会第82回大会、札幌、2010年9月20日6.
 6. 真下知士「遺伝子組み換えモデル動物作成の新技術」京都大学大学院医学研究科神経科学ミニコース、京都、2010年9月17日7.

7. 真下知士「ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) により作製した X 連鎖重症複合免疫不全 (XSCID) ラット」iPS・ES・体性幹細胞 Forum2010、秋葉原 UDIX、東京、2010 年 6 月 29 日 8.
8. 真下知士「ラットにおける遺伝子改変技術の開発」京都大学「医学領域」産学連携推進機構／(社)芝蘭会 平成 22 年度第 1 回産学情報交流会、京都、2010 年 6 月 16 日 9.
9. 真下知士「ジンクフィンガーヌクレアーゼにより作製した Il2rg ノックアウト (XSCID) ラット」第 84 回彩都バイオサイエンスセミナー、茨木、2010 年 5 月 20 日 10.
10. 真下知士、滝澤明子、吉見一人、国広弥生、田上史、日合弘、庫本高志、芹川忠夫「ジンクフィンガーヌクレアーゼにより作製した X 連鎖重症複合免疫不全ラット」第 57 回日本実験動物学会総会、京都、2010 年 5 月 12 日 11.
11. 真下知士「ラットにおける遺伝子改変技術の開発」東海医学会講演会、伊勢原、2010 年 4 月 21 日 12. 真下知士、芹川忠夫「チャンネル病のモデル動物：電位依存性 Na⁺チャンネル Nav1.1 変異ラット」第 295 回 CBI 学会研究講演会、東京、2009 年 4 月 3 日

E. 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

新規遺伝子変異ラット作製技術に基づく生活習慣病・難治性疾患モデルラットの開発
ー心血管病モデル遺伝子変異ラット開発ー

分担研究者：桑原宏一郎

京都大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科 講師

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。本年度は研究分担者である芹川、真下らが開発した遺伝子変異ラット樹立技術を用いて、心血管病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を開始した。結果、レプチン遺伝子のナンセンス変異体、ナトリウム利尿ペプチド受容体遺伝子のミスセンス変異体をはじめとする複数の候補遺伝子の変異体を同定し、その変異ラットの系統樹立に成功した。来年度も引き続きスクリーニングを継続しつつ、樹立した遺伝子変異ラットの表現系解析を行い、スーパー特区における創薬開発を加速させる予定である。

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。最近研究分担者である芹川、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還元技術（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心筋梗塞、心不全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

本年度は生活習慣病・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スクリーニングを開始した。候補遺伝子としては心筋梗塞モデルとしてLDL受容体、脳卒中、高血圧モデルとしてナトリウム利尿ペプチド関連遺伝子などをスクリーニング開始した。具体的にはそれぞれの標的遺伝子のcoding領域に対応するprimer setを作製し、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を行なった。この方法はDNAミスマッチ部位に特異的かつ短時間に挿入されるトランスポゾンMuの性質を利用し、さらにプール法および蛍光標識DNAを組み合わせることにより短時間かつ低コストで変異DNAのスクリーニング、変異ラットの同定を可能としたもので

ある。このスクリーニングにより候補遺伝子の変異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ていく。これらの過程はひとつの遺伝子のスクリーニング開始から、変異の同定、変異ラットの樹立までおよそ6ヶ月から1年で行なえる予定である。現時点ではすでに年間およそ100primer setのスクリーニングが可能であるが、今後機器の充実などを行なうことによりそのスピードを現状の3倍にまでアップする予定である。ま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

本年度から生活習慣病・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スクリーニングを開始した。候補遺伝子としては心筋梗塞モデルとしてLDL受容体、脳卒中、高血圧モデルとしてナトリウム利尿ペプチド関連遺伝子などをスクリーニング開始した。これらスクリーニングの結果、現時点でレプチン遺伝子のナンセンス変異体およびナトリウム利尿ペプチド1型受容体遺伝子のミスセンス変異体をはじめとする複数の生活習慣病関連遺伝子にナンセンスあるいはミスセンス変異を有するラットの同定に成功し、さらに新規開発した個体還元技術ICSIを用いて一部標的遺伝子変異ラット系統樹立に成功し、現在これらラットの表現系解析を進めている。今後表現系解析を継続すると同時に、スクリーニングに用いる機器の充実などを行なうことによりスクリーニングのスピードをさらにアップする予定である。

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。本年度に得られた遺伝子変異ラットの表現系を解析し、これら疾患のモデルラットを確立し、共同研究なども通じてその詳細な解析を行うことにより、今後、これら病態解明・新規治療標的の同定および新規創薬開発が加速されるものと考えている。

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スクリーニングを開始し、複数の生活習慣病、心血管病関連遺伝子変異ラットの同定に成功し、その系統樹立を行った。今後もスクリーニングを継続しつつ、本年度に得られた遺伝子変異ラットの表現系を解析し、疾患モデルラットを確立し、病態解明・新規治療標的の同定と新規創薬開発を加速させる予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Narazaki G, Uosaki H, Fukushima H, Kuwahara K, Harada M, Matsuda H, Matsuoka S, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Ikeda T, Sakata R, Mummery CL, Nakatsuji N, Yamanaka S, Nakao K, Yamashita JK. Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin-a. **PLoS One**. 2011 Feb 22;6(2):e16734

2. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakao K. Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. **J Cardiol**. 2011 Feb 4. [Epub ahead of print] in press
 3. Hata L, Murakami M, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kinoshita H, Usami S, Yasuno S, Fujiwara M, Kuwabara Y, Minami T, Yamada Y, Yamada Y, Nakao K, Ueshima K, Nishikimi T, and Nakao K. Zinc-finger protein 90 negatively regulates neuron-restrictive silencer factor-mediated transcriptional repression of fetal cardiac genes. **J Mol Cell Cardiol**. *in press* 2011.
 4. Takano M, Kinoshita H, Shioya T, Itoh M, Nakao K, Kuwahara K. Pathophysiological Remodeling of Mouse Cardiac Myocytes Expressing Dominant Negative Mutant of Neuron Restrictive Silencing Factor. **Circ J**. 74(12):2712-9. 2010.
 5. Kuwahara K, Kinoshita H, Kuwabara Y, Nakagawa Y, Usami S, Minami T, Yamada Y, Fujiwara M, and Nakao K. MRTF-A is a common mediator of mechanical stress- and neurohumoral stimulation-induced cardiac hypertrophic signaling leading to activation of BNP gene expression. **Mol Cell Biol**. 30(17):4134-4148.2010
 6. Kuwahara K, Nakao K. Regulation and significance of atrial and brain natriuretic peptides as cardiac hormones. **Endocr J**. 57(7):555-565.2010
 7. Small EM, Thatcher JE, Sutherland LB, Kinoshita H, Gerard RD, Richardson JA, Dimairo JM, Sadek H, Kuwahara K, Olson EN. Myocardin-Related Transcription Factor-A Controls Myofibroblast Activation and Fibrosis in Response to Myocardial Infarction. **Circ Res**. 107(2):294-304.2010
 8. Kinoshita H, Kuwahara K, Nishida M, Jiang Z, Rong X, Kiyonaka S, Kuwabara Y, Kurose H, Inoue R, Mori Y, Li Y, Nakagawa Y, Usami S, Fujiwara M, Yamada Y, Minami T, Ueshima K, and Nakao K. Inhibition of TRPC6 Channel Activity Contributes to the Anti-hypertrophic Effects of Natriuretic Peptides-Guanylyl Cyclase-A Signaling in the Heart. **Circ Res**. 106(12): 1849-1860.2010
 9. Rong X, Li Y, Ebihara K, Zhao M, Naowaboot J, Kusakabe T, Kuwahara K, Murray M, Nakao K. Angiotensin II type 1 receptor-independent beneficial effects of telmisartan on dietary-induced obesity, insulin resistance and fatty liver in mice. **Diabetologia**. 53(8):1727-1731.2010
 10. Yokoi H, Kasahara M, Mukoyama M, Mori K, Kuwahara K, Fujikura J, Arai Y, Saito Y, Ogawa Y, Kuwabara T, Sugawara A, Nakao K. Podocyte-specific expression of tamoxifen-inducible Cre recombinase in mice. **Nephrol Dial Transplant**. 25(7):2150-2154. 2010.
 11. Li Y, Saito Y, Kuwahara K, Rong X, Kishimoto I, Harada M, Horiuchi M, Murray M, Nakao K. Vasodilator therapy with hydralazine induces angiotensin AT receptor-mediated cardiomyocyte growth in mice lacking guanylyl cyclase-A. **Br J Pharmacol**. 159(5):1133-1142.2010.
2. 学会発表
国際学会
1. Hideyuki Kinoshita, Koichiro Kuwahara, et al. T-type Ca²⁺ Channel Blockade Improved Cardiac Autonomic Nervous System Imbalance and Reduced Sudden Death in Mice Model of Chronic Heart Failure. European Society of Cardiology Congress2010 Aug28-Sept.01. Stockholm, Sweden.
 2. Hideyuki Kinoshita, Koichiro Kuwahara, et al. Blockade of TRPC Channel Prevents Pathological Cardiac Hypertrophy. Basic Cardiovascular Sciences 2010 Scientific Sessions Jul 19-22,2010. Rancho Mirage, CA, USA
 3. Koichiro Kuwahara, et al. Inhibition of TRPC6 Channel Contributes to the Anti-hypertrophic Effects Exerted by Natriuretic Peptides-Guanylyl Cyclase-A Signaling in the Heart. 20th European Meeting of Hypertension, June 18-21, 2010. Oslo, Norway
 4. Hideyuki Kinoshita, Koichiro Kuwahara, et al. TRPC6 is a novel therapeutic target against pathological cardiac remodeling. 20th World Congress of the International Society of Heart Research, May 13-16l, 2010. Kyoto.
 5. Koichiro Kuwahara, et al. NRSF maintains normal cardiac structure and function. 20th World Congress of the International Society of Heart Research, May 13-16l, 2010. Kyoto.
 6. Koichiro Kuwahara, et al. Inhibition of TRPC6 Channel Contributes to the Anti-hypertrophic Effects of Natriuretic Peptides-Guanylyl Cyclase-A Signaling in the Heart. 20th World

Congress of the International Society of Heart Research, May 13-16, 2010. Kyoto.

7. Hideyuki Kinoshita, Koichiro Kuwahara, et al. Blockade of T-Type Ca²⁺ Channel Prevents Sudden Death in Mice With Heart Failure. 20th World Congress of the International Society of Heart Research, May 13-16, 2010. Kyoto.
8. Yasuaki Nakagawa, Koichiro Kuwahara, et al. Effect of functional inhibition of p300 on the mitochondrial function and cell survival in the post-natal heart in mice. 20th World Congress of the International Society of Heart Research, May 13-16, 2010. Kyoto.

国内学会

1. Hideyuki Kinoshita, Koichiro Kuwahara, et al. Blockade of TRPC6 is a novel therapeutic approach against pathological cardiac remodeling. 第14回 日本心不全学会 学術集会 2010.10.7-9. 東京
2. 桑原宏一郎、他. Rho 依存性転写共役因子 myocardin-related transcription factor-A の心肥大シグナルにおける役割. 第33回 日本高血圧学会総会 2010.10.15-17. 福岡
3. 桑原宏一郎、他 木下秀之、桑原宏一郎、et al. 新規心肥大治療法としての TRPC 阻害の効果. 第47回 日本臨床分子医学会学術集会 2010.4.9-10. 東京
4. Koichiro Kuwahara, et al. Rho and actin dynamics-dependent nuclear translocation of MRTF-A is a common molecular mechanisms underlying both mechanical stretch- and neurohumoral stimulation-induced cardiac hypertrophy. 14th Annual Scientific Session of the Society of Cardiovascular Endocrinology and Metabolism March 31-April 1, 2010. Nara.
5. Hideyuki Kinoshita, Koichiro Kuwahara, et al. Natriuretic Peptides-Guanylyl Cyclase-A Signaling Pathway Inhibits TRPC6-Mediated Pro-Hypertrophic Signaling in the Hearts. 14th Annual Scientific Session of the Society of Cardiovascular Endocrinology and Metabolism March 31-April 1, 2010. Nara.
6. Ysuhiko Kuwabara, Koichiro Kuwahara, et al. T-type Ca²⁺ channel blockade improved

survival and arrhythmogenicity in the mouse model of myocardial infarction. 14th Annual Scientific Session of the Society of Cardiovascular Endocrinology and Metabolism March 31-April 1, 2010. Nara

7. Yasuaki Nakagawa, Koichiro Kuwahara, et al. Essential role of p300 in maintaining mitochondrial gene expression and cell survival in the postnatal heart. 14th Annual Scientific Session of the Society of Cardiovascular Endocrinology and Metabolism March 31-April 1, 2010. Nara.

E. 知的財産権の出願・登録状況 なし