

201110006A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中 尾 一 和

平成24(2012)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開発

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中 尾 一 和

平成24(2012)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 ----- 13

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 ----- 24

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 28

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	助教
富田 努	京都大学大学院医学研究科	内分泌代謝内科	非常勤講師

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、樹立に成功したレプチン、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の表現系解析を行い、疾患モデルとしての基盤確立を行った。

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(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年で行なうことができる。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)らがおのこの観点からその解析を行う。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、PPAR γ 、ラミンA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、これらラットの表現系解析を進めた。

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。今後本年度に得られた遺伝子変異ラットの表現系を引き続き解析し、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、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たい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. H. Yokoi, K. Mori, M. Mukoyama, K. Nakao, et al. Pleiotrophin triggers inflammation and increased peritoneal permeability leading to peritoneal fibrosis. *Kidney Int* 81: 160-169, 2012.
2. Kondo E, Yasoda A, Tsuji T, Fujii T, Miura M, Kanamoto N, Tamura N, Arai H, Kunieda T, Nakao K. Skeletal Analysis of the Long Bone Abnormality (lbab/lbab) Mouse, A Novel Chondrodysplastic C-Type Natriuretic Peptide Mutant. *Calcif Tissue Int*. 90:307-18, 2012.
3. Kanamoto N, Tagami T, Ueda-Sakane Y, Sone M, Miura M, Yasoda A, Tamura N, Arai H, Nakao K. Forkhead box A1 (FOXA1) and A2 (FOXA2) oppositely regulate human type 1 iodothyronine deiodinase gene in liver. *Endocrinology*. 153:492-500, 2012.
4. Nishikimi T, Ikeda M, Takeda Y, Ishimitsu T, Shibasaki I, Fukuda H, Kinoshita H, Nakagawa Y, Kuwahara K, Nakao K. The effect of glycosylation on plasma N-terminal proBNP-76 levels in patients with heart or renal failure. *Heart*. 98(2):152-61. 2012.
5. Kuwahara K, Nakao K. New Molecular Mechanisms for Cardiovascular Disease: Transcriptional Pathways and Novel Therapeutic Targets in Heart Failure. *J Pharmacol Sci*. 17;116(4):337-342.2011
6. N. Yamada-Goto, K. Ebihara, K. Nakao, et al. Impairment of fear-conditioning responses and changes of brain neurotrophic factors in diet-induced obese mice. *Journal of Neuroendocrinology*. 2012. in press.
7. T. Kusakabe, K. Ebihara, K. Nakao, et al. 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.
8. K. Mori, M. Mukoyama, K. Nakao. PPAR- α transcriptional activity is required to combat doxorubicin-induced podocyte injury in mice. *Kidney Int* 79: 1274-1276, 2011.
9. Sonoyama T, Sone M, Miyashita K, Tamura N, Yamahara K, Park K, Oyamada N, Taura D, Inuzuka M, Kojima K, Honda K, Fukunaga Y, Kanamoto N, Miura M, Yasoda A, Arai H, Itoh H, Nakao K. Significance of adrenocorticotropin stimulation test in the diagnosis of an aldosterone-producing adenoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 96:27 71-8, 2011.
10. T. Maki, K. Nakao, et al. Angiogenic and vasoprotective effects of adrenomedullin on prevention of cognitive decline after chronic cerebral hypoperfusion in mice. *Stroke* 42:1122-1128, 2011.
11. M. Naito, K. Ebihara, K. Nakao, et al. Therapeutic impact of leptin on diabetic complications, and longevity in insulin-deficient diabetic mice. *Diabetes*. 9: 22 65- 2273, 2011.
12. M. Zhao, K. Ebihara, K. Nakao, et al. Azilsartan treatment improves insulin sensitivity in obese spontaneously hypertensive Kolesky rats. *Diabetes Obes Metab*. 12: 112 3- 1129, 2011.
13. Hotta K, Kitamoto A, Kitamoto T, Mizusawa S, Teranishi H, 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, Yoshimatsu H, Sakata T, Tanaka K, Matsuzawa Y, Nakao K, Sekine A. Genetic variations in the CYP17A1 and NT5C2 genes are associated with a reduction in visceral and subcutaneous fat areas in Japanese women. *J Hum Genet*. 57(1):46-51.2012.
14. Bando M, Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Yamada G, Hosoda K, Adachi S, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T. Transgenic overexpression of intralyslet ghrelin does not affect insulin secretion or glucose metabolism in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 302(4):E403-8.2012.
15. Fujikura J, Nakao K, Sone M, Noguchi M, Mori E, Naito M, Taura D, Harada-Shiba M, Kishimoto I, Watanabe A, Asaka I, Hosoda K, Nakao K. Induced pluripotent stem cells generated from diabetic patients wi

th mitochondrial DNA A3243G mutation.
Diabetologia. 2012 *in press*

2. 学会発表

国際学会

なし

国内学会

1. 中尾一和.
肥満と高血圧
第 34 回日本高血圧学会総会日本肥満学会合同シンポジウム
2011 年 (平成 23 年) 10 月 21 日 (宇都宮市)
2. 中尾一和.
肥満症・メタボリックシンドロームのトピックス
第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会
2011 年 (平成 23 年) 5 月 19 日 (札幌市)

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継続した。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。

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(臓器、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。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、表現系を解析が行われた。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. Kcna1 mutant rats dominantly display myokymia, neuromyotonia and spontaneous epileptic seizures. Ishida S, Sakamoto Y, Nishio T, Baulac S, Kuwamura M, Ohno Y, Takizawa A, Kaneko S, Serikawa T, Mashimo T. Brain Res. 2011 Nov 13. [Epub ahead of print]

2. Role of a novel rat-specific Fc receptor in macrophage activation associated with crescentic glomerulonephritis. Page TH, D'Souza Z, Nakanishi S, Serikawa T, Pusey CD, Aitman TJ, Cook HT, Behmoaras J. J Biol Chem. 287:5710-9. 2011

3. Endonuclease G is a novel determinant of cardiac hypertrophy and mitochondrial function.
McDermott-Roe C, Ye J, Ahmed R, Sun X, Serafin A, Ware J, Bottolo L, Muckett P, Cañas X, Zhang J, Rowe GC, Buchan R, Lu H, Braithwaite A, Mancini M, Hauton D, Martí R, García-Arumí E, Hubner N, Jacob H, Serikawa T, Zidek V, Papousek F, Kolar F, Cardona M, Ruiz-Meana M, García-Dorado D, Comella JX, Felkin LE, Barton PJR, Arany Z, Pravenec M, Petretto E, Sanchis D, Cook SA. *Nature* 478:114-118, 2011

4. A rat model of hypohidrotic ectodermal dysplasia carries a missense mutation in the Edaradd gene.
Kuramoto T, Yokoe M, Hashimoto R, Hiai H, Serikawa T. *BMC Genetics* 12:91, 2011

5. Neuroprotective effect of levetiracetam on hippocampal sclerosis-like change in spontaneously epileptic rats.
Sugata S, Hanaya R, Kumafuji K, Tokudome M, Serikawa T, Kurisu K, Arita K, Sasa M. *Brain Res Bull* 86(1-2):36-41, 2011

6. Therapy for hyperthermia-induced seizures in Scn1a mutant rats.
Hayashi K, Ueshima S, Ouchida M, Mashimo T, Nishiki T, Sendo T, Serikawa T, Matsui H, Ohmori I. *Epilepsia* 52(5):1010-1017, 2011

7. Oligodendroglial pathology in the development of myelin breakdown in the dmy mutant rat.
Kuwamura M, Inumaki K, Tanaka M, Shirai M, Izawa T, Yamate J, Franklin RJ, Kuramoto T, Serikawa T. *Brain Res.* 1389:161-168, 2011

Rat ENU mutagenesis-KURMA, an update
EURATRANS 1st annual meeting,
May 30th and 31st, 2011, Stresa, Italy.

2. Tadao Serikawa
Current Status of the Rat Resource in Japan
2011 KRIBB Conference,
Daejeon, Korea, Sep. 28 - Oct. 1, 2011

3. Takashi Kuramoto, Mayuko Yokoe, Ryoko Hashimoto, Hiroshi Hiai, Tadao Serikawa
A rat model of hypohidrotic ectodermal dysplasia carries a missense mutation in the Edaradd gene
Rat Genomics & Models, December 7-10, 2011, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA

4. Tomoji Mashimo, Akiko Takizawa, Junya Kobayashi, Yayoi Kunihiro, Kazuto Yoshimi, Saeko Ishida, Koji Tanabe, Ami Yanagi, Asato Tachibana, Takashi Kuramoto, Birger Voigt, Hiroshi Hiai, Chie Tateno, Kenji Komatsu, Tadao Serikawa
SCID rats as an animal model for preclinical xenotransplantation
Rat Genomics & Models, December 7-10, 2011, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA

5. Birger Voigt, Tomoji Mashimo, Takehito Kaneko, Hiroaki Taketsuru, Yuki Neoda, Yuki Takihara, Yu-ichi Sakakibara, Kumi Kosako, Saeko Ishida, Ken-ichi Yamasaki, Satoshi Nakanishi, Takashi Kuramoto, Tadao Serikawa
The 10th year of the National BioResource Project Rat in Japan
Rat Genomics & Models, December 7-10, 2011, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA

2. 学会発表 国際学会

1. Tomoji Mashimo, Takehiko Kaneko, Birger Voigt, Takashi Kuramoto, Tadao Serikawa

国内学会

1. 多田羅絢加、今奥琢士、三好 慧、安達咲希、木津朋也、清水佐紀、庫本高志、芹川忠夫、笹 征史、大野行弘

- 本態性振戦モデル Tremor ラットにおける β 受容体遮断薬の作用解析
第 119 回日本薬理学会近畿部会
2011/07/08,名古屋
2. 長尾侑紀、原田悠耶、奥田 葵、藤本 恵、芹川忠夫、笹 征史、大野行弘
てんかんモデル Noda epileptic rat (NER) におけるアストロサイト内 向き整流性カリウムチャンネル Kir4.1 の発現解析
第 119 回日本薬理学会近畿部会
2011/07/08,名古屋
 3. 長尾侑紀、原田悠耶、奥田 葵、藤本 恵、芹川忠夫、笹 征史、大野行弘
全般性強直・間代発作モデル Noda epileptic rat におけるアストロサイト Kir4.1 チャンネルの病態解析
第 7 回日本てんかん学会近畿地方会
2011/07/23, 京都
 4. 石田紗恵子、真下知士、麓 直浩、Stephanie Baulac、Philippe Couarch、桑村 充、池田昭夫、高橋良輔、芹川 忠夫
Lgi1 変異ラットの開発：常染色体優性外側側頭葉てんかん(ADLTE)のモデル動物として
第 7 回日本てんかん学会近畿地方会
2011/07/23, 京都
 5. 奥村貴裕、寺田 亮、石原 静、富田 知里、北宅良祐、芹川忠夫、笹 征史、大野行弘
精神発作モデル Groggy ラットにおける SV2A および SNARE 関連タンパクの発現解析
次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011, 2011/08/31, 東京
 6. 安達咲希、多田羅絢加、今奥琢士、三好 慧、木津朋也、清水佐紀、庫本高志、芹川忠夫、笹征史、大野行弘
本態性振戦モデル Tremor ラットにおける Fos 発現を指標にした β 受容体遮断薬の作用解析
次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011, 2011/08/31, 東京
 7. 真下知士、芹川忠夫
ラット遺伝子改変技術のめざましい進歩
第 47 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会 2011,9,6-7, 北海道
 8. 海老原 健、阿部 恵、真下知士、海老原千尋、Valentino Gumbirai、日下部 徹、細田公則、芹川忠夫、中尾一和
遺伝子改変ラットの解析とトランスレーショナルサイエンス
第 47 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会 2011,9,6-7, 北海道
 9. 山口 拓、富樫廣子、芹川忠夫、吉岡 充弘
SHR 亜系と行動特性
第 47 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会 2011,9,6-7, 北海道
 10. 木津朋也、多田羅絢加、今奥琢士、三好 慧、安達咲希、清水佐紀、庫本高志、芹川忠夫、笹 征史、大野行弘
本態性振戦モデル Tremor ラットを用いたプロプラノロールの抗振戦作用機序解析
第 61 回日本薬学会近畿支部大会, 2011/10/22, 神戸
 11. 多田羅絢加、今奥琢士、三好 慧、安達咲希、木津朋也、佐藤真穂、杉内友音、清水佐紀、笹 征史、芹川忠夫、庫本高志、大野行弘
Tremor ラットにおける β 受容体遮断薬の振戦抑制メカニズムの解析
第 21 回臨床精神薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2011/10/27-29, 東京
 12. 奥村貴裕、寺田 亮、石原 静、北宅良祐、富田知里、徳留健太郎、田中智也、笹 征史、芹川忠夫、大野行弘
強直・間代性発作モデル Noda epileptic rat (NER) における SV2A および SNARE 関連タンパクの発現解

析

第 21 回臨床精神薬理学会・第 41 回
日本神経精神薬理学会合同年会,
2011/10/27-29, 東京

13. 長尾侑紀、原田悠耶、奥田 葵、藤本
恵、向井崇浩、小野朝香、阪上嘉久、
芹川忠夫、笹 征史、大野行弘

Noda epileptic rat (NER)における扁桃核アストロサイト Kir4.1 チャンネルの発現低下

第 21 回臨床精神薬理学会・第 41 回
日本神経精神薬理学会合同年会,
2011/10/27-29, 東京

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行い、遺伝子変異ラットの系統樹立を行った。結果、レプチン、Seipin 遺伝子などのナンセンス変異体、ラミンA、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、これら遺伝子変異ラットの系統樹立に成功した。

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(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 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。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スクリーニングを行った。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、ラミンA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、現在表現系解析を継続しており、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。

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スクリーニングを行い、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、表現系を解析した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishida S, Sakamoto Y, Nishio T, Baulac S, Kuwamura M, Ohno Y, Takizawa A, Kaneko S, Serikawa T, Mashimo T: Kcna1-mutant rats dominantly display myokymia, neuromyotonia and spontaneous epileptic seizures. *Brain Research* 1435: 154-66, 2012
2. Hayashi K, Ueshima S, Ouchida M, Mashimo T, Nishiki T, Sendo T, Serikawa T, Matsui H, Ohmori I. Therapy for hyperthermia-induced seizures in Scn1a mutant rats. *Epilepsia* 52(5): 1010-7, 2011
3. 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*, 60(1): 57-63, 2011

著書・総説

1. 真下知士、芹川忠夫：ジンクフィンガー

- ヌクレアーゼ (ZFN)、*細胞工学* Vol31(3), p296-301, 2012
2. 真下知士、芹川忠夫：ジンクフィンガーヌクレアーゼによる遺伝子改変動物の作製、*Medical Science Digest* Vol38(1), p10-11, 2012
 3. 真下知士：新しい遺伝子改変技術「ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)」、*生物と化学*、日本農芸化学会編、p220-222、2011
 4. 真下知士：ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) によるノックアウトラットの作製方法、*生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール (モデル動物利用マニュアル)* 編／小幡裕一、城石俊彦、芹川忠夫、田中啓二、米川博通、L I C、p494-499、2011
 5. 真下知士：ENU ミュータジェネシスによる標的遺伝子変異ラットの作製方法、*生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール (モデル動物利用マニュアル)* 編／小幡裕一、城石俊彦、芹川忠夫、田中啓二、米川博通、L I C、p487-493、2011

2. 学会発表

国際学会

1. Mashimo T: Zinc-finger nucleases (ZFNs) as gene-targeting technology in animals. University of Queensland, Brisbane, Australia, May 11, 2011
2. Mashimo T: Zinc-finger nucleases (ZFNs) as gene-targeting technology in animals. Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australia, May 10, 2011
3. Mashimo T: Zinc-finger nucleases (ZFNs) as gene-targeting technology in animals. University of Technology Sydney, Sydney, Australia, May 9, 2011
4. Mashimo T: Creation of Knockout Rats Using Zinc-Finger Nucleases. Australasian Gene Therapy Society Meeting, Melbourne, Australia, May 4, 2011
5. Mashimo T: Zinc-finger nucleases (ZFNs) as gene-targeting technology in animals. Auckland University Medical School, Auckland, New Zealand, May 3, 2011
6. Tomoji Mashimo, Akiko Takizawa, Junya Kobayashi, Yayoi Kunihiro, Kazuto Yoshimi,

Saeko Ishida, Koji Tanabe, Ami Yanagi, Asato Tachibana, Takashi Kuramoto, Birger Voigt, Hiroshi Hiai, Chise Tateno, Kenshi Komatsu, Tadao Serikawa: SCID rats as an animal model for preclinical xenotransplantation. The 2011 meeting on Rat Genomics & Models, Cold Spring Harbor, New York, USA, Dec 7 - 10, 2011

国内学会

1. 真下知士「重症免疫不全 SCID ラットとその応用研究について」第 5 回ラットリソースリサーチ研究会、京都、2012 年 2 月 3 日
2. Mashimo T: Zinc-finger nucleases (ZFNs) as gene-targeting technology in animals. 第 34 回日本分子生物学会、横浜、2011 年 12 月 13 日
3. 真下知士、芹川忠夫「ラット遺伝子改変技術のめざましい進歩」第 47 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会、札幌、2011 年 9 月 6 日
4. 真下知士「遺伝子改変動物作製技術の新しい展開」シグマアルドリッチ ライフサイエンスセミナー 2011、大阪、2011 年 8 月 25 日
5. 真下知士「ZFN による遺伝子改変ラットの作製法」自然科学研究機構・基礎生物学研究所共同利用共同研究・研究会、岡崎、2011 年 7 月 11 日
6. 真下知士「ジンクフィンガーヌクレアーゼを利用した遺伝子改変動物の作製」第 58 回日本実験動物学会総会、東京、2011 年 5 月 27 日
7. 真下知士「ラット遺伝子改変技術の進歩：ヒト化ラットの開発に向けて」AK 拠点招聘セミナー、京都、2011 年 4 月 20 日
8. 真下知士「人工ヌクレアーゼ ZFN/TALEN による遺伝子改変ラットの作製」第 1 回ゲノム編集研究会、広島、2012 年 2 月 28 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行った。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。また ZFN 技術を用いた BNP ノックアウトラットの作製も行った。今後これら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。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を用いてこれら遺伝子変異ラット系統樹立に成功し、現在その表現系解析を進めている。また本法で得られなかったBNP遺伝子変異に関して、ZFN技術を用いてノックアウトラットを作製することに成功し、その解析も行っている。今後表現系解析を継続する予定である。

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。本研究にて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. Kuwahara K, Nakao K. New Molecular Mechanisms for Cardiovascular Disease: Transcriptional Pathways and Novel Therapeutic Targets in Heart Failure. **J Pharmacol Sci.** 17;116(4):337-342.2011

2. Nishikimi T, Ikeda M, Takeda Y, Ishimitsu T, Shibasaki I, Fukuda H, Kinoshita H, Nakagawa Y, Kuwahara K, Nakao K. The effect of glycosylation on plasma N-terminal proBNP-76 levels in patients with heart or renal failure. **Heart**. 98(2):152-61. 2012.

2. 学会発表

国際学会

1. N-type Ca²⁺ channel blockade prevents sudden death in mice with heart failure
Yuko Yamada, Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, Yoshihiro Kuwabara, Yasuaki Nakagawa, Junko Shibata, Chinatsu Yamada, Takeya Minami, Satoshi Usami, Kazuhiro Nakao, Toshio Nishikimi, Kazuwa Nakao
Basic Cardiovascular Sciences 2010 Scientific Sessions Jul 18-21,2011. New Orleans, LO, USA
2. MRTF-A, a Rho-dependent coactivator of SRF, plays a critical role in vascular remodeling
Takeya Minami, Koichiro Kuwahara, Yasuaki Nakagawa, Yoshihiro Kuwabara, Kazuhiro Nakao, Hideyuki Kinoshita, Satoru Usami, Chinatsu Yamada, Junko Shibata, Toshio Nishikimi, Minoru Takaoka, Masataka Sata, Ryoza Nagai, Kazuwa Nakao.
Basic Cardiovascular Sciences 2010 Scientific Sessions Jul 18-21,2011. New Orleans, LO, USA
3. European Society of Cardiology Congress2011 Aug27-31. Paris, France,
4. HCN channel inhibition with ivabradine prevents sudden arrhythmic death in a mouse model of dilated cardiomyopathy.
Yoshihiro Kuwabara, Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita¹ Yasuaki Nakagawa, Satoru Usami, Takeya Minami, Yuko Yamada, Masataka Fujiwara, Shinji Yasuno, Kenji Ueshima and Kazuwa Nakao.
European Society of Cardiology Congress2011 Aug27-31. Paris, France
5. Blockade of TRPC6/3 is a Novel Therapeutic Approach for Preventing Pathological Cardiac Hypertrophy

Hideyuki Kinoshita, Koichiro Kuwahara, Motohiro Nishida, Hitoshi Kurose, Shigeki Kiyonaka, Yasuo Mori, Yoshihiro Kuwabara, Yasuaki Nakagawa, Kenji Ueshima, Kazuwa Nakao
European Society of Cardiology Congress2011 Aug27-31. Paris, France

6. N-type Ca²⁺ channel blockade prevents sudden arrhythmic death in mice with heart failure
Yuko Yamada, Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, Yoshihiro Kuwabara, Yasuaki Nakagawa, Junko Shibata, Chinatsu Yamada, Takeya Minami, Satoshi Usami, Kazuhiro Nakao, Toshio Nishikimi, Kazuwa Nakao
4th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session (APHRS2011) September20-22. 2011. Fukuoka
7. Inhibition of HCN overexpressed in failing heart of dilated cardiomyopathy mouse model by ivabradine prevents sudden arrhythmic death
Yoshihiro Kuwabara, Koichiro Kuwahara, Makoto Takano, Hideyuki Kinoshita, Yoshihiro Kuwabara, Yasuaki Nakagawa, Satoshi Usami, Kazuhiro Nakao, Takeya Minami, Toshio Nishikimi, Kazuwa Nakao
4th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session (APHRS2011) September20-22. 2011. Fukuoka
8. Inhibition of HCN overexpression in failing heart of dilated cardiomyopathy mouse model by ivabradine prevents sudden arrhythmic death
Yoshihiro Kuwabara, Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, Makoto Takano, Yasuaki Nakagawa, Satoru Usami, Kazuhiro Nakao, Takeya Minami, Yuko Yamada, Chinatsu Yamada, Junko Shibata, Toshio Nishikimi, Kenji Ueshima and Kazuwa Nakao
American Heart Association Scientific Session Nov 12-16, 2011. Orlando, USA
9. N-Type Ca²⁺ Channel Blocker is Effective to Prevent Sudden Cardiac Death in Mice with Heart Failure
Yuko Yamada, Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, Yoshihiro Kuwabara, Yasuaki Nakagawa, Junko Shibata, Chinatsu

Yamada, Takeya Minami, Shinji Yasuno, Satoshi Usami, Kazuyasu Nakao, Toshio Nishikimi, Kenji Ueshima, American Heart Association Scientific Session Nov 12-16, 2011. Orlando, USA

国内学会

1. バセドウ病を合併した滲出性収縮性心膜炎の一例
山田千夏、桑原宏一郎、柴田純子、南丈也、中尾一泰、栗原佳宏、木下秀之、宇佐美覚、中川靖章、錦見俊雄、中尾一和
第 22 回 日本心エコー学会 学術集会 2011.4.21-23. 鹿児島
2. Rho 依存性 SRF 共役転写因子 MRTF-A は血管リモデリングを制御する
南 丈也・桑原宏一郎・中川靖章・木下秀之・宇佐美覚・山田千夏・栗原佳宏・中尾一泰・柴田純子・錦見俊雄・中尾一和
2011,4.23 第 84 回日本内分泌学会学術総会 (神戸)
3. 受容体活性化型 Ca^{2+} チャンネル TRPC3/6 阻害の病的肥大抑制効果
木下秀之、桑原宏一郎、清中茂樹、森泰生、西田基宏、黒瀬等、榮向路、李育浩、中川靖章、保野慎治、宇佐美覚、藤原正隆、桑原佳宏、山田優子、南丈史、山田千夏、柴田純子、錦見俊雄、上嶋健治、中尾一和
2011,4.23 第 84 回日本内分泌学会学術総会 (神戸)
4. ANP・BNP 遺伝子発現調節因子 NRSF の機能阻害による心筋症モデルマウスにおける不整脈発症・突然死に対する HCN チャンネル阻害の効果
栗原佳宏、桑原宏一郎、木下秀之、鷹野誠、中川靖章、宇佐美覚、柴田純子、山田千夏、南丈也、山田優子、藤原正隆、保野慎治、錦見俊雄、上嶋健治、中尾一和、
2011,4.23 第 84 回日本内分泌学会学術総会 (神戸)
5. 心房性および脳性ナトリウム利尿ペプチドの発現制御及び心不全発症における役割(シンポジウム)
桑原宏一郎、中尾一和
2011,4.23 第 84 回日本内分泌学会学術総会 (神戸)
6. 拡張型心筋症・不整脈死モデルマウスにおける N 型 Ca^{2+} チャンネル阻害の有用性の検討
山田優子、桑原宏一郎、木下秀之、桑原佳宏、中川靖章、柴田純子、山田千夏、南丈也、保野慎治、宇佐美覚、中尾一泰、錦見俊雄、上嶋健治、森泰生、中尾一和
第 34 回日本日本高血圧学会総会 10 月 20-22 日、宇都宮、栃木
7. ANP・BNP 遺伝子発現調節因子 NRSF により制御される HCN チャンネルの心不全モデルマウスにおける突然死発症への関与 (YIA)
栗原佳宏、桑原宏一郎、木下秀之、鷹野誠、中川靖章、宇佐美覚、柴田純子、山田千夏、南丈也、山田優子、藤原正隆、保野慎治、錦見俊雄、上嶋健治、中尾一和、
第 15 回日本心血管内分泌学会、11 月 25-26 日、大阪
8. 病的血管リモデリングでみられる血管平滑筋細胞形質転換における Rho 依存性転写共役因子 MRTF-A の意義 (YIA)
南 丈也・桑原宏一郎・中川靖章・木下秀之・中尾一泰・栗原佳宏・山田千夏・柴田純子・宇佐美覚・錦見俊雄・中尾一和
第15回日本心血管内分泌学会、11月25-26日、大阪
9. BNP 遺伝子発現調節領域における serum response factor 応答領域の新たな同定とその心筋細胞肥大反応における意義
桑原宏一郎・木下秀之・栗原佳宏・中川靖章・南 丈也・山田千夏・柴田純子・宇佐美覚・錦見俊雄・中尾一和
第 15 回日本心血管内分泌学会、11 月 25-26 日、大阪
10. Translational Research of Natriuretic Peptide in Cardiovascular Disease
Koichiro Kuwahara, Kazuwa Nakao (Meet the Experts)
The 76th Annual Scientific Meeting of The Japanese Circulation Society March 16-18 2012, Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, Japan
11. Increased HCN channels in failing hearts possibly contribute to ventricular arrhythmias

Yoshihiro Kuwabara, Koichiro Kuwahara, Makoto Takano, Hideyuki Kinoshita¹, Yasuaki Nakagawa, Satoru Usami, Shinji Yasuno, Kazuhiro Nakao, Takeya Minami, Yuko Yamada Chinatsu, Yamada¹, Junko Shibata, Toshio Nishikimi, Kenji Ueshima and Kazuwa Nakao.

The 76th Annual Scientific Meeting of The Japanese Circulation Society March 16-18 2012, Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, Japan

12. MRTF-A, a rho-dependent co-activator of SRF, plays a critical role in vascular remodeling by regulating smooth muscle cell migration

Takeya Minami, Koichiro Kuwahara, Junko Shibata, Chinatsu Yamada, Yoshihiro Kuwabara, Kazuhiro Nakao, Hideyuki Kinoshita, Satoru Usami, Shinji Yasuno, Yasuaki Nakagawa, Kenji Ueshima, Toshio Nishikimi, Minoru Takaoka, Masataka Sata, Ryozi Nagai, Kazuwa Nakao

The 76th Annual Scientific Meeting of The Japanese Circulation Society March 16-18 2012, Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, Japan

13. TRPC3/6 Ion Channels as Potentially Novel Therapeutic Targets against Pulmonary Arterial Hypertension

Hideyuki Kinoshita, Koichiro Kuwahara, Shigeki Kiyonaka, Yasuo Mori, Junko Shibata, Chinatsu Yamada, Takeya Minami, Kazuhiro Nakao, Yoshihiro Kuwabara, Shinji Yasuno, Satoru Usami, Yasuaki Nakagawa, Toshio Nishikimi, Kenji Ueshima, Kazuwa Nakao

The 76th Annual Scientific Meeting of The Japanese Circulation Society March 16-18 2012, Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, Japan

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし