

2011/0006B

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21年度～23年度 総合研究報告書

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21年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者 中 尾 一 和

平成24(2012)年5月

目 次

I. 総合研究報告

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

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
ー新規遺伝子変異ラット作製技術の開発と応用ー

芹川 忠夫 ----- 8

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
ー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ー

真下 知士 ----- 15

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

ー心血管病モデル遺伝子変異ラット開発ー

桑原 宏一郎 ----- 20

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

ー高血圧、腎臓病モデル遺伝子変異ラット開発ー

横井 秀基 ----- 27

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

ー糖尿病・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ー

富田 努 ----- 36

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 41

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 50

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総合研究報告書

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

研究代表者：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

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。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。

研究分担者：

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

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。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、個体還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った。これら実験動物を用いる研究に際しては「動物の愛護および

管理に関する法律」(平成17年6月改正法)、「京都大学における動物実験の実施に関する規程」および「京都大学大学院医学研究科・医学部における動物実験の実施に関する規程」(いずれも平成19年4月改訂)を遵守して実施し、動物に与える苦痛を最小限にとどめるように最善の配慮を尽くした。

C. 研究結果

平成21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、レプチン、*SEIPIN*、ナトリウム利尿ペプチド1型受容体(*GC-A*)遺伝子、ラミンA、*PPAR γ* などの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、一部非常に興味深い結果を得た。例えば、レプチンのナンセンス変異を有するラットは著明な肥満を呈したが、同じレプチン遺伝子の欠損マウスである*Ob/Ob*マウスと比較して、チアゾリジン誘導体に対する反応が複数の組織において異なることが明らかになりつつある(投稿準備中)。またヒト先天性全身性脂肪萎縮症の原因遺伝子である*SEIPIN*の変異マウスはヒトと同様に全身の脂肪萎縮と耐糖能の異常を認め、ヒトの全身性脂肪萎縮症の良いモデル動物となりうる可能性が示唆されている(未発表データ)。今後、さらに引き続き、表現系解析を行うと同時に、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。今後本研究により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、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、耐糖能異常などの興味深い表現系を得た。今後、本研究において得られた遺伝子変異ラットの表現系を引き続き解析し、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. Nakao K, Yasoda A, Ebihara K, Hosoda K, Mukoyama M. Translational research of novel hormones: lesson from animal models and rare human diseases for common human diseases. *J Mol Med.* 87(10):1029-39. 2009.
2. Ishii-Yonemoto T, Masuzaki H, Yasue S, Okada S, Kozuka C, Tanaka T, Noguchi M,

Tomita T, Fujikura J, Yamamoto Y, Ebihara K, Hosoda K, Nakao K. Glucocorticoid reamplification within cells intensifies NFkB and MAPK signaling and reinforces inflammation in activated preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 in press

3. Nakagawa Y, Kuwahara K, Takemura G, Akao M, Kato M, Arai Y, Takano M, Harada M, Murakami M, Nakanishi M, Usami S, Yasuno S, Kinoshita H, Fujiwara M, Ueshima K, Nakao K. p300 plays a critical role in maintaining cardiac mitochondrial function and cell survival in postnatal hearts. *Circ. Res.* 105(8):746-754. 2009.
4. Kinoshita H, Kuwahara K, Takano M, Arai Y, Kuwabara Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Nakanishi M, Harada M, Fujiwara M, Murakami M, Ueshima K, Nakao K. T-type Ca²⁺ channel blockade prevents sudden death in mice with heart failure. *Circulation.* 120(9):743-752. 2009.
5. K. Nakao. Nat Clin Pract Endocrinol Metab. Adiposcience and adipotoxicity. Feb;5(2):63. 2009.
6. D. Taura, M.D., M. Noguchi, M. Sone, K. Hosoda, E. Mori, Y. Okada, K. Takahashi, K. Homma. N. Oyamada, M. Inuzuka, T. Sonoyama, K. Ebihara, N. Tamura, H. H. Itoh. Suemori, N. Nakatsuji, H. Okano, S. Yamanaka, K. Nakao. Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells *FEBS Lett.* 583(6):1029-33. 2009
7. T. Kusakabe, H. Tanioka, K. Ebihara, M. Hirata, L. Miyamoto, F. Miyayama, H. Hige, D. Aotani, T. Fujisawa, H. Masuzaki, K. Hosoda. K. Nakao. Beneficial effects of leptin on glycaemic and lipid control in a mouse model of type 2 diabetes with increased adiposity induced by streptozotocin and a high-fat diet. *Diabetologia.* 52(4):675-83, 2009
8. A. Yasoda, H. Kitamura, T. Fujii, E. Kondo, N. Murao, M. Miura, N. Kanamoto, Y.

- Komatsu, H. Arai, K. Nakao. Systemic administration of C-type natriuretic peptide as a novel therapeutic strategy for skeletal dysplasias. *Endocrinology*. 150(7):3138-44. 2009
9. Y. Li, Y. Saito, K. Kuwahara, X. Rong, I. Kishimoto, M. Harada, Y. Adachi, M. Nakanishi, H. Kinoshita, M. Horiuchi, M. Murray, K. Nakao. Guanylyl cyclase-A inhibits angiotensin II type 2 receptor-mediated pro-hypertrophic signaling in the heart. *Endocrinology*. 92(3):1066-72. 2009
 10. S. Yasuno, S. Usami, K. Kuwahara, M. Nakanishi, Y. Arai, H. Kinoshita, Y. Nakagawa, M. Fujiwara, M. Murakami, K. Ueshima, M. Harada, K. Nakao. Endogenous cardiac natriuretic peptides protect the heart in a mouse model of dilated cardiomyopathy and sudden death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 296(6):H1804-10. 2009
 11. D. Taura, M. Sone, K. Homma, N. Oyamada, K. Takahashi, N. Tamura, S. Yamanaka, K. Nakao. Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 29(7):1100-3. 2009
 12. T. Sonoyama, N. Tamura, K. Miyashita, Park, N. Oyamada, D. Taura, M. Inuzuka, Y. Fukunaga, M. Sone, K. Nakao. Inhibition of hepatic damage and liver fibrosis by brain natriuretic peptide. *FEBS Lett*. 18;583(12): 2067-70. 2009
 13. T. Kuwabara, K. Mori, M. Mukoyama, M. Kasahara, H. Yokoi, Y. Saito, T. Yoshioka, Y. Ogawa, H. Imamaki, T. Kusakabe, K. Ebihara, M. Omata, N. Satoh, A. Sugawara, J. Barasch, K. Nakao. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney Int*. 75(3):285-94. 2009
 14. 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
 15. 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
 16. 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.
 17. Yamada N, Nakao K, et al. Impaired CNS leptin action is implicated in depression associated with obesity. *Endocrinology* 2011 in press
 18. 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
 19. 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.
 20. 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
 21. Kuwahara K, Nakao K. Regulation and significance of atrial and brain natriuretic peptides as cardiac hormones. *Endocr J*. 57(7):555-565. 2010
 22. 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

23. 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
24. Iwakura H, Nakao K., et al. Establishment of a novel ghrelin-producing cell line. **Endocrinology**. 151(6): 2940-5. 2010.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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
29. 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
30. 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
31. Yasoda A, Nakao K. Translational research of C-type natriuretic peptide (CNP) into skeletal dysplasias. **Endocr J**. 57(8): 659-66. 2010
32. Yokoi H., Nakao K. et al. Podocyte-specific expression of tamoxifen-inducible Cre recombinase in mice. **Nephrol Dial Transplant**.. 25(7): 2120-4. 2010
33. Yasue S, Nakao K. et al. dipose 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
34. Okada S, Nakao K. et al. Adipose tissue-specific dysregulation of angiotensinogen by oxidative stress in obesity. **Metabolism**. 59(9): 1241-51.
35. 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
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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
41. 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.

42. 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.
43. 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.
44. 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.* 96:2771-8, 2011.
45. 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.
46. M. Naito, K. Ebihara, K. Nakao, et al. Therapeutic impact of leptin on diabetes, diabetic complications, and longevity in insulin-deficient diabetic mice. *Diabetes.* 9: 2265- 2273, 2011.
47. M. Zhao, K. Ebihara, K. Nakao, et al. Azilsartan treatment improves insulin sensitivity in obese spontaneously hypertensive Koletsy rats. *Diabetes Obes Metab.* 12: 1123- 1129, 2011.
48. 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.
49. 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.
50. 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 with mitochondrial DNA A3243G mutation. *Diabetologia.* 2012 in press

2. 学会発表 国際学会

1. Kazuwa Nakao. Translational Research in Endocrinology and Metabolism. The 8th Congress of Chinese Society of Endocrinology, in Nan Jing, September 5, 2009
2. Kazuwa Nakao. Translational Research -Lessons from Animal Models and Rare Human Diseases-, World Health Summit, in Berlin, October 2, 2009
3. 中尾一和. Translational Research and Animal Disease Model. 18th International Workshop on Genetic Systems in the Rat. 2010.11.30. 京都
4. 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. 肥満症やメタボリックシンドロームに対する診断と治療法. 第2回肥満症治療学会学術集会、2009.7.10、東京
2. 中尾一和. 疾患モデル動物、稀少難病から Common Disease への展開. 第45回高血圧関連疾患モデル学会学術総会、2009.9.4、東京
3. 中尾一和. メタボリックシンドロームと高血圧—Adipotoxicity の概念と分子基盤—. 第32回日本高血圧学会総会、2009/10/2、大津
4. 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
5. 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）

6. 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。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

平成21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。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年で行なえる。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

平成21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、レプチン、seipin、ラミンA、PPAR γ 、GC-A遺伝子など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、表現系を解析した。今後もスクリーニングを継続しつつ、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、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. Mashimo T, Hadjebi O, Amair-Pinedo F, Tsurumi T, Langa F, Serikawa T, Sotelo C, Guénet JL, Rosa JL. Progressive Purkinje cell degeneration in tambaleante mutant mice is a consequence of a missense mutation in HERC1 E3 ubiquitin ligase. PLoS Genet. 5(12):e1000784, 2009
2. Yoshimi K, Tanaka T, Takizawa A, Kato M, Hirabayashi M, Mashimo T, Serikawa T, Kuramoto T. Enhanced colitis-associated colon carcinogenesis in a novel Apc mutant rat. Cancer Sci. 100(11):2022-7, 2009
3. Serikawa T, Mashimo T, Takizawa A, Okajima R, Maedomari N, Kumafuji K, Tagami F, Neoda Y, Otsuki M, Nakanishi S, Yamasaki K, Voigt B, Kuramoto T: National BioResource Project-Rat

- and related activities. *Exp Anim.* 58(4):333-41. 2009, Review
4. 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
 5. 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
 6. 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
 7. 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
 8. 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
 9. 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
 10. 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
 11. 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
 12. 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
 13. 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
 14. 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
 15. 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
 16. 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
 17. 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
18. 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
 19. 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
 20. 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
 21. 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
 22. 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]
 23. 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
 24. 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
 25. 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
 26. 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
 27. 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
 28. 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
 29. 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
 30. 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.

2. 学会発表
国際学会

1. Mashimo T, Takizawa A, Voigt B, Yoshimi K, Hiai H, Kuramoto T, Serikawa T: Severe combined immunodeficiency (X-SCID) rats developed by targeted gene disruption using zinc-finger nucleases. The 2009 meeting on Rat Genomics & Models, Cold Spring Harbor, New York, USA, Dec 2 - 5, 2009.
2. Mutant rat resources at National BioResource Project-Rat in Japan
The 4th AFLAS congress meeting
November 8, 2010, Taipei
3. Serikawa T. In pursuit of the Holstein rat. 18th International Workshop on Genetic Systems in the Rat. Nov 30 -Dec 3, 2010
4. Serikawa T. NBRP-Rat: the worldwide rat resource center. 18th International Workshop on Genetic Systems in the Rat. Nov 30 -Dec 3, 2010
5. Tomoji Mashimo, Takehiko Kaneko, Birger Voigt, Takashi Kuramoto, Tadao Serikawa
Rat ENU mutagenesis-KURMA, an update
EURATRANS 1st annual meeting, May 30th and 31st, 2011, Stresa, Italy.
6. Tadao Serikawa
Current Status of the Rat Resource in Japan
2011 KRIBB Conference,
Daejeon, Korea, Sep. 28 - Oct. 1, 2011
7. 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
8. 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

9. 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

国内学会

1. 真下知士、大守伊織、大内田守、大野行弘、鶴見東志子、三木崇史、若森実、森泰生、芹川忠夫
熱刺激誘発けいれん感受性ラットの開発：新たな熱性けいれんモデルとして
Neuro2009 (第 32 回日本神経科学大会)、名古屋、2009 年 9 月 16 日
2. 真下知士、芹川忠夫
ラット ENU ミュータジェネシスプロジェクト
第 56 回日本実験動物学会総会、大宮、2009 年 5 月 15 日
3. 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
4. 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、2010 年 5 月 12 日～14 日、京都市
5. 石田 紗恵子、真下 知士、田上 史、西尾 健資、芹川 忠夫。
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。
第 57 回日本実験動物学会、2010 年 5 月

- 12日～14日、京都市
6. 滝澤明子、真下知士、国広弥生、田上史、山崎賢一、芹川忠夫。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。第57回日本実験動物学会、2010年5月12日～14日、京都市
 7. 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。
Nanog-Reporter システムを用いたラット ES 細胞株の樹立。
第 57 回日本実験動物学会、2010 年 5 月 12 日～14 日、京都市
 8. 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。
B10.S/SgSlc マウスに生じた Prkdc 遺伝子変異。
第 57 回日本実験動物学会、2010 年 5 月 12 日～14 日、京都市
 9. 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、織田銃一、芹川忠夫。
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。第 57 回日本実験動物学会
2010 年 5 月 12 日～14 日、京都市
 10. 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。
ラット demyelination (dmy) 変異のポジショナルクローニング。
第 57 回日本実験動物学会、2010 年 5 月 12 日～14 日、京都市
 11. 吉見一人、田中卓二、芹川忠夫、庫本高志。
Apc 変異ラット (KAD ラット) における DSS 誘発大腸炎。
第 57 回日本実験動物学会、2010 年 5 月 12 日～14 日、京都市
 12. 中西 聡、芹川忠夫、庫本高志。
ラット Arp3、Dao、Dihc2、Kng2、Srebf1 遺伝子の機能多型ジェノタイプニング。
第 57 回日本実験動物学会、2010 年 5 月 12 日～14 日、京都市
 13. 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。
世界拠点としての NBRP-Rat。
第 57 回日本実験動物学会、2010 年 5 月 12 日～14 日、京都市
 14. 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。
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。
第 57 回日本実験動物学会、2010 年 5 月 12 日～14 日、京都市
 15. 今奥琢士、庫本高志、清水佐紀、芹川忠夫、笹 征史、大野行弘。
Tremor ラットにおける脳内 Fos 発現解析。
第 57 回日本実験動物学会、2010 年 5 月 12 日～14 日、京都市
 16. 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。
Tremor ラットにおける振戦行動の薬理学的解析。
第 57 回日本実験動物学会、2010 年 5 月 12 日～14 日、京都市
 17. 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
 18. 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
 19. 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
 20. 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
21. 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
22. 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
23. 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
24. 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
25. 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
26. 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
27. 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
28. 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
29. 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。絵平成21年度から23年度にかけて、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(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

平成21年度より生活習慣病・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

平成21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. Mashimo T, Hadjebi O, Amair-Pinedo F, Tsurumi T, Langa F, Serikawa T, Sotelo C, Guénet JL, Rosa JL. Progressive Purkinje cell degeneration in tambaleante mutant mice is a consequence of a missense mutation in HERC1 E3 ubiquitin ligase. *PLoS Genet.* 5(12):e1000784, 2009
2. Yoshimi K, Tanaka T, Takizawa A, Kato M, Hirabayashi M, Mashimo T, Serikawa T, Kuramoto T. Enhanced colitis-associated colon carcinogenesis in a novel Apc mutant rat. *Cancer Sci.* 100(11):2022-7, 2009
3. Serikawa T, Mashimo T, Takizawa A, Okajima R, Maedomari N, Kumafuji K, Tagami F, Neoda Y, Otsuki M, Nakanishi S, Yamasaki K, Voigt B, Kuramoto T: National BioResource Project-Rat and related activities. *Exp Anim.*

58(4):333-41. 2009, Review

4. 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
5. 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
6. 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.
7. 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.
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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

12. 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.

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, Takizawa A, Voigt B, Yoshimi K, Hiai H, Kuramoto T, Serikawa T: Severe combined immunodeficiency (X-SCID) rats developed by targeted gene disruption using zinc-finger nucleases. The 2009 meeting on Rat Genomics & Models, Cold Spring Harbor, New York, USA, Dec 2 - 5, 2009.
- 2.