

3. 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, 2010.
4. Mashimo T: Genetically modified rat models of human epilepsy produced by a gene-targeting approach. Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, Oct 25, 2010.
5. 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, 2010.
6. 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
7. 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
8. Mashimo T, Takizawa A, Voigt B, Kuramoto T, Serikawa T: KURMA - Kyoto University Rat Mutant Archive. EURAT Meeting 2010, Berlin, Germany, 27th May 2010
9. Mashimo T: Zinc-finger nucleases (ZFNs) as gene-targeting technology in animals. University of Queensland, Brisbane, Australia, May 11, 2011
10. Mashimo T: Zinc-finger nucleases (ZFNs) as gene-targeting technology in animals. Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australia, May 10, 2011
11. Mashimo T: Zinc-finger nucleases (ZFNs) as gene-targeting technology in animals. University of Technology Sydney, Sydney, Australia, May 9, 2011
12. Mashimo T: Creation of Knockout Rats Using Zinc-Finger Nucleases. Australasian Gene Therapy Society Meeting, Melbourne, Australia, May 4, 2011
13. Mashimo T: Zinc-finger nucleases (ZFNs) as gene-targeting technology in animals. Auckland University Medical School, Auckland, New Zealand, May 3, 2011
14. 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「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
2. 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「ジッ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
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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

7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 真下知士「遺伝子組み換えモデル動物作成の新技术」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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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
17. 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
18. 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
19. 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
20. 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
21. 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
22. 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
23. 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。平成21年度より、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。さらにこれら樹立した遺伝子変異ラットの表現系解析を行った。今後さら時解析を継続し、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

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。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

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。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、その解析も行った。今後さらに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. 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.
2. 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.
3. Kuratomi S, Ohmori Y, Ito M, Shimazaki K, Muramatsu SI, Mizukami H, Uosaki H, Yamashita J, Arai Y, Kuwahara K, Takano M. The cardiac pacemaker-specific channel Hcn4 is a direct transcriptional target of MEF2. **Cardiovasc Res**. 83(4):682-7. 2009
 4. Yasuno S, Usami S, Kuwahara K, Nakanishi M, Arai Y, Kinoshita H, Nakagawa Y, Fujiwara M, Murakami M, Ueshima K, Harada M, Nakao K. 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
 5. Li Y, Saito Y, Kuwahara K, Rong X, Kishimoto I, Harada H, Adachi Y, Nakanishi M, Kinoshita H, Horiuchi M, Murray M, Nakao K. Natriuretic peptide receptor/guanylyl cyclase-A inhibits angiotensin II type 2 receptor-mediated pro-hypertrophic signaling in the heart. **Endocrinology** 150(8):3759-65. 2009
 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. 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
 10. 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
 11. 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
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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
 15. 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
 16. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakao K. Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. **J Cardiol**. 57(2):131-140.2011
 17. 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.** 50(6): 972-981. 2011.

18. 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. Koichiro Kuwahara. Transcriptional Pathways Regulating Cardiac Remodeling. 2009MRC international Symposia April 13, 2009 in Korea.
2. Hideyuki Kinoshita, Koichiro Kuwahara, Kazuwa Nakao. Cardiac natriuretic peptides inhibit TRPC6-mediated prohypertrophic signaling through cGMP-PKG pathway. 4th International Conference on cGMP, June 19-21, September 14, 2009 in Germany.
3. Koichiro Kuwahara Angiotensin receptors signaling in cardiac remodeling. 14th International Congress of Endocrinology ICE2010, March 26-30, 2010 in Kyoto
4. 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.
5. 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
6. 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
7. 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 13-16, 2010. Kyoto.
8. Koichiro Kuwahara, et al. NRSF maintains normal cardiac structure and function. 20th World Congress of the International Society of Heart Research, May 13-16, 2010. Kyoto.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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
13. 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, Ryozo Nagai, Kazuwa Nakao.
Basic Cardiovascular Sciences 2010 Scientific Sessions Jul 18-21,2011. New Orleans, LO, USA
14. European Society of Cardiology Congress2011 Aug27-31. Paris, France.
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
15. 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
16. 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 (APHR2011)
September20-22. 2011. Fukuoka
17. 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 (APHR2011)
September20-22. 2011. Fukuoka
18. 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
19. 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, Kazuhiro Nakao, Toshio Nishikimi, Kenji Ueshima, American Heart Association Scientific Session Nov 12-16, 2011. Orlando, USA
- 国内学会
1. 木下秀之、桑原宏一郎、井上隆司、西田基宏、黒瀬等、清中茂樹、森泰生、榮向路、李育浩、村上政男、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、原田昌樹、上嶋健、中尾一和。
ナトリウム利尿ペプチドの心保護作用における TRPC6 の役割. 第 82 回日本内分泌学会学術総会 2009.4.23-4.25 (群馬、前橋)
 2. 桑原宏一郎、中尾一和. 心臓内分泌代謝機能における転写共役因子の役割. 第 82 回日本内分泌学会学術総会 2009.4.23-4.25 (群馬、前橋)
 3. Hideyuki Kinoshita, Koichiro Kuwahara, Kazuwa Nakao. Inhibition of TRPC6 channel activity mediates the anti-hypertrophic effects of natriuretic peptides-guanylyl cyclase-A signaling in the heart. The73rd Annual Scientific Meeting of The Japanese Circulation Society. March 5-7 2010, Kyoto International Conference Center Kyoto Japan
 4. Koichiro Kuwahara, Kazuwa Nakao. Myocardin-related transcription factor-A is a common mediator of mechanical stretch- and neurohumoral stimulation-induced hypertrophic response. The73rd Annual Scientific Meeting of The Japanese Circulation Society. March 5-7 2010, Kyoto International Conference Center Kyoto Japan
 5. 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
 6. 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
7. 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
 8. 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.
 9. 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.
 10. Yushiro 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
 11. 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.
 12. 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
 13. 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)
 14. 受容体活性化型 Ca²⁺チャネル TRPC3/6 阻害の病的な心肥大抑制効果
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)
 15. 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)
 16. 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)
 17. 拡張型心筋症・不整脈死モデルマウスにおける N 型 Ca²⁺チャネル阻害の有用性の検討
山田優子、桑原宏一郎、木下秀之、栗原佳宏、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 回日本高血圧学会総会 10 月 20-22 日、宇都宮、栃木
 18. ANP・BNP 遺伝子発現調節因子 NRSF により制御される HCN チャ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
 19. 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
 20. 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
 21. 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

22. 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

23. 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, Ryozo Nagai, Kazuwa Nakao

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

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

Hideyuki Kinoshita, Koichiro Kuwahara, Shigeaki 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

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
－高血圧、腎臓病モデル遺伝子変異ラット開発－

分担研究者：横井 秀基

京都大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科 助教

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。平成21年度より、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、高血圧、腎臓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、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同定し、同遺伝子変異ラットの系統樹立に成功し、解析を行った。

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（脾臓、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高血圧、CKD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。候補遺伝子としては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、腎臓病としてpodocin, TRPC6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 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

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。候補遺伝子としては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、腎臓病モデルとしてpodocin, TRPC6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、ナトリウム利尿ペプチド1型受容体遺伝子(GC-A)の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を用いて同遺伝子変異ラット系統樹立に成功した。このラットはナトリウム利尿ペプチド1型受容体のguanlyl cyclase domainに変異を有し、その活性の低下が予想されることから、このラットの表現系解析をおこなった。今後さらに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が、マウスは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。本研究により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、ナトリウム利尿ペプチド1型受容体遺伝子に変異を有するラットの作製に成功した。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ナトリウム利尿ペプチド1型受容体遺伝子変異ラットの表現系を解析し、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. Kasahara M, Mori K, Satoh N, Kuwabara T, Yokoi H, Shimatsu A, Sugawara A, Mukoyama M, Nakao K. Reduction in urinary excretion of neutrophil gelatinase-associated lipocalin by angiotensin receptor blockers in hypertensive patients. *Nephrol Dial Transplant* 24:2608-2609, 2009
2. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, Yoshioka T, Ogawa Y, Imamaki H, Kusakabe T, Ebihara K, Omata M, Satoh N, Sugawara A, Barasch J, Nakao K. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage in glomeruli, proximal and distal nephrons. *Kidney Int* 75:285-294, 2009.
3. 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*. 2010 Jul;25(7):2120-4
4. Naito, M., Fujikura, J., Ebihara, K., Miyanaga, F., Yokoi, H., Kusakabe, T., Yamamoto, Y., Son, C.,

Mukoyama, M., Hosoda, K., and Nakao, K.. Therapeutic impact of leptin on diabetes, diabetic complications, and longevity in insulin-deficient diabetic mice. *Diabetes* 60, 2265-2273.2011

5. Maki, T., Ihara, M., Fujita, Y., Nambu, T., Miyashita, K., Yamada, M., Washida, K., Nishio, K., Ito, H., Harada, H., Yokoi, H., Arai, H., Itoh, H., Nakao, K., Takahashi, R., Tomimoto, H. Angiogenic and vasoprotective effects of adrenomedullin on prevention of cognitive decline after chronic cerebral hypoperfusion in mice. *Stroke* 42, 1122-1128.. 2011
6. Yokoi, H., Kasahara, M., Mori, K., Ogawa, Y., Kuwabara, T., Imamaki, H., Kawanishi, T., Koga, K., Ishii, A., Kato, Y., Mori, P. K., Toda, N., Ohno, S., Muramatsu, H., Muramatsu, T., Sugawara, A., Mukoyama, M., and Nakao, K.. Pleiotrophin triggers inflammation and increased peritoneal permeability leading to peritoneal fibrosis. *Kidney Int.* 81, 160-169.2012

1. 学会発表 国際学会

1. M.Mukoyama, Y.Ogawa, H.Yokoi, M.Kasahara, K.Mori, T.Yoshioka, Y.Saito, T.Kuwabara, H.Imamaki, I.Kishimoto, A.Sugawara, K.Nakao. Protective effects of natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A signaling on aldosterone-induced glomerular injury. World Congress of nephrology (ISN) Milano, May 22-26, 2009
2. H.Yokoi, M.Kasahara, M.Mukoyama, K.Mori, Y.Saito, Y.Ogawa, T.Kuwabara, H.Imamaki, T.kawanishi, H.Muramatsu, T.Muramatsu, A.Sugawara, K.Nakao. Microarray analysis of peritoneum in experimental peritoneal fibrosis identifies pleiotrophin, a profibrotic and inflammatory factor. World Congress of nephrology (ISN) Milano, May 22-26, 2009
3. H.Yokoi, M.Kasahara, M.Mukoyama, K.Mori, N.Iga, T.Ishimura, Y.Saito, Y.Ogawa, T.Kuwabara, H.Imamaki, T.kawanishi, A.Sugawara, K.Nakao. Renoprotective effects of the N- and L-type calcium channel blocker cilnidipine in diabetic db/db mice. World Congress of nephrology (ISN) Milano, May 22-26, 2009
4. K.Mori, T.Kuwabara, M.Kasahara, N.Satoh, Y.Saito, H.Yokoi, H.Imamaki, T.Nagae, Y.Ogawa, T.kawanishi, J.Barasch, A.Sugawara, M.Mukoyama, K.Nakao. Urinary excretion of ker ngal is increased in diabetic nephropathy by impaired tubular reabsorption, which can be attenuated by angiotensin receptor blockade. World Congress of nephrology (ISN) Milano, May 22-26, 2009
5. M.Mukoyama, Y.Ogawa, H.Yokoi, M.Kasahara, K.Mori, T.Yoshioka, Y.Saito, T.Kuwabara, H.Imamaki, I.Kishimoto, A.Sugawara, K.Nakao. Renoprotective role of natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A signaling in aldosterone-induced podocyte injury. 米国内分泌学会 ENDO Washington DC, June 10-13,2009.
6. K.Mori, M.Mukoyama, N.Satoh, T.Kuwabara, Y.Saito, H.Yokoi, H.Imamaki, Y.Ogawa, T.kawanishi, A.Sugawara, K.Nakao. Neutrophil Gelatinase-Associated Liocalin as a Novel Urinary Biomarker of Diabetic Nephropathy and its Response to Angiotensin Receptor Blocker 米国内分泌学会 ENDO Washington DC, June 10-13,2009
7. H.Yokoi, M.Kasahara, M.Mukoyama, K.Mori, Y.Saito, Y.Ogawa, T.Kuwabara, H.Imamaki, T.kawanishi, H.Muramatsu, T.Muranatsu, A.Sugawara, K.Nakao. Role of a Novel Growth Factor, Pleiotrophin, in Peritoneal Fibrosis. American Society of Nephrology San Diego, Oct 27-Nov 1,2009
8. Y.Ogawa, M.Mukoyama, H.Yokoi, M.Kasahara, K.Mori, T.Yoshioka, Y.Saito, T.Kuwabara, H.Imamaki, T.kawanishi, I.Kishimoto, A.Sugawara, K.Nakao. Renoprotective role of natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A signaling in aldosterone-induced glomerular injury. American Society of Nephrology San Diego, Oct 27-Nov 1,2009
9. T.Kuwabara, K.Mori, M.Mukoyama, H.Yokoi, Y.Ogawa, H.Imamaki, T.Kuwabara, A.Ishii, K.Koga, A.Sugawara, K.Nakao. Combination of hyperglycemia and hyperlipidemia synergistically aggravates albuminuria, tubular lipid accumulation and macrophage infiltration, in parallel with inflammation and extracellular matrix expression. American Society of Nephrology San Diego, Oct 27-Nov 1,2009
10. H.Imamaki, K.Mori, T.Kuwabara, M.Mukoyama, M.Kasahara, H.Yokoi, Y.Saito, Y.Ogawa, T.kawanishi, A.Ishii, K.Koga, A.Sugawara, K.Nakao. Serum Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Levels are

- determined by Nutritional Status and White Blood Cell Counts but Not by Iron in Maintenance Hemodialysis Patients. American Society of Nephrology San Diego, Oct 27-Nov 1, 2009
11. H.Yokoi, M.Kasahara, M.Mukoyama, K.Mori, K.Kuwahara, J.Fujikura, Y.Arai, Y.Saito, Y.Ogawa, T.Kuwabara, H.Imamaki, T.kawanishi, A.Ishii, K.Koga, A.Sugawara, K.Nakao. Podocyte-Specific Expression of Tamoxifen-inducible Cre Recombinase in Mice . ISN Nexus Symposium 2010 Kyoto, April, 16, 2010
 12. Y.Ogawa, M.Mukoyama, H.Yokoi, M.Kasahara, K.Mori, T.Yoshioka, Y.Saito, T.kuwabara, H. Imamaki, T.kawanishi, K.Koga, A.Ishii, I.Kishimoto, A.Sugawara, K.Nakao. Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A signaling exerts antagonistic effects on the local rennin-angiotensin-aldosterone system in kidney. ISN Nexus Symposium 2010 Kyoto, April, 16, 2010
 13. M.Kasahara, H.Yokoi, K.Mori, N.Iga, T.Ishimura, Y.Ogawa, T.Kuwabara, H.Imamaki, T.kawanishi, K.Koga, A.Ishii, A.Sugawara, M.Mukoyama, K.Nakao . The N- and L-type calcium channel blocker cilnidipine reduces albuminuria in diabetic db/db mice. Vancouver Hypertension 2010 ISH2010. Sep 28, 2010 Vancouver, Canada
 14. H.Yokoi, M.Kasahara, K.Mori, T.Kuwabara, T.kawanishi, K.Koga, A.Ishii, K.Mori, Y.Kato, A.Sugawara, M.Mukoyama, K.Nakao . Atrial natriuretic peptide prevents peritoneal adhesion formation with inhibiting macrophage and CD3-positive cell infiltration. American Society of Nephrology. Nov 19, 2010 Denver
 15. H.Yokoi, M.Kasahara, M.Mukoyama, K.Mori, T.Kuwabara, A.Sugawara, K.Nakao . Podocyte-Specific Expression of Tamoxifen-inducible Cre Recombinase in Mice. American Society of Nephrology. Nov 19, 2010 Denver
 16. H.Yokoi, M.Kasahara, K.Mori, T.Kuwabara, R.Yamada, S.Namoto, T.Yamamoto, N.Seki, T.Yamaguchi, N.Souma, A.Sugawara, M.Mukoyama, K.Nakao . The role of 3,4-dideoxyglucosone-3-ene in peritoneal fibrosis. American Society of Nephrology. Nov 18, 2010 Denver
 17. K.Koga, M.Mukoyama, H.Yokoi, K.Mori, M.Kasahara, T.Kuwabara, Y.Ogawa, H.Imamaki, T.kawanishi, A.Ishii, K.Mori, Y.Kato, Moin A.Saleem, A.Sugawara, K.Nakao . MicroRNA expression analysis in angiotensin II -stimulated human podocytes and its glomerular expression in diabetic mice . American Society of Nephrology. Nov 19, 2010 Denver
 18. T.Kuwabara, K.Mori, M.Mukoyama, M.Kasahara, H.Yokoi, Y.Saito, Y.Ogawa, H.Imamaki, T.kawanishi, A.Ishii, K.Koga, M.imanishi, A.Nishiyama, A.Sugawara, K.Nakao
Hyperlipidemia promotes diabetic renal injury via TLR4 signaling
World Congress of nephrology
Apr 8-12, 2011 Vancouver, Canada
 19. K.Mori, M.Mukoyama, M.Kasahara, H.Yokoi, T.Kuwabara, H.Imamaki, T.kawanishi, A.Ishii, K.Koga, K.P.Mori, Y.Kato, A.Sugawara, K.Nakao
Incomplete tubular compensation model for albuminuria in diabetes
World Congress of nephrology
Apr 8-12, 2011 Vancouver, Canada
 20. K.Mori, J.Kanda, M.Mukoyama, H.Kabata, M.Kasahara, H.Yokoi, T.Kuwabara, K.Nakao
The kidney and neutrophils are the major sources of acute kidney injury biomarker Ng2
World Congress of nephrology
Apr 8-12, 2011 Vancouver, Canada
 21. H.Yokoi, M.Kasahara, M.Mukoyama, K.Mori, Y.Ogawa, T.Kuwabara, H.Imamaki, T.kawanishi, K.Koga, A.Ishii, Y.Kato, K.P.Mori, H.Muramatsu, T.Muramatsu, A.Sugawara, K.Nakao
Pleiotrophin causes peritoneal inflammation and mesothelial cell proliferation in a mouse model of peritoneal fibrosis
World Congress of nephrology
Apr 8-12, 2011 Vancouver, Canada
 22. T.Kuwabara, K.Mori, M.Mukoyama, M.Kasahara, H.Yokoi, Y.Saito, H.Imamaki, T.kawanishi, A.Ishii, K.Koga, K.P.Mori, Y.Kato, A.Sugawara, K.Nakao
Toll-Like Receptor 4-Mediated, Hyperinsulinemia-Independent Progression of Diabetic Nephropathy by Hyperlipidemia.
American Diabetes Association
June 24-28, 2011 San Diego
 23. T.Kuwabara, K.Mori, M.Mukoyama, M.Kasahara, H.Yokoi, Y.Saito, H.Imamaki, T.kawanishi, A.Ishii, K.Koga, K.P.Mori, Y.Kato, A.Sugawara, K.Nakao
Aggravation of diabetic nephropathy by hyperlipidemia is mediated by MRP8/TLR4 signaling in macrophages
American Society of Nephrology

Nov 11, 2011 Philadelphia

24. T.kawanishi, M.Kasahara, H.Yokoi, T.Kuwabara, H.Imamaki, A.Ishii, K.Koga, Y.Kato, K.P.Mori, K.Ueshima, S.Tanaka, S.Yanaka, A.Sugawara, K.Nakao
Urinary level of Ngal is superior to urinary protein in prediction of chronic kidney disease progression
American Society of Nephrology
Nov 11, 2011 Philadelphia
25. K.Koga, H.Yokoi, M.Mukoyama, K.Mori, M.Kasahara, T.Kuwabara, H.Imamaki, T.kawanishi, A.Ishii, K.P.Mori, Y.Kato, M.Saleem, A.Sugawara, K.Nakao
Functional analysis of miR-30c, miR-26a and miR-379 in podocytes and their potential roles in diabetic nephropathy
American Society of Nephrology
Nov 11, 2011 Philadelphia
26. Y.Kato, M.Mukoyama, H.Yokoi, Y.Ogawa, K.Mori, M.Kasahara, T.Kuwabara, H.Imamaki, T.kawanishi, A.Ishii, K.Koga, K.P.Mori, A.Sugawara, K.Nakao
Blockade of p38 MAPK pathway ameliorates aldosterone-induced renal injury in guanylyl cyclase-A deficient mice
American Society of Nephrology
Nov 12, 2011 Philadelphia

国内学会

1. 栗原孝成、森 潔、佐藤哲子、向山政志、笠原正登、横井秀基、菅原照、中尾一和. 糖尿病性腎症の尿細管障害マーカーとしての尿中 Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (Ngal). 第 106 回日本内科学会講演会. 2009 年 4 月 10-12 日 東京
2. 栗原孝成、森 潔、佐藤哲子、向山政志、笠原正登、横井秀基、齋藤陽子、今牧博貴、小川喜久、川西智子、菅原照、中尾一和. 腎障害の新規バイオマーカーである尿中 Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (Ngal) は糖尿病・肥満を有する高血圧患者においてアンジオテンシン受容体拮抗薬投与により減少する. 第 82 回日本内分泌学会学術総会. 2009 年 4 月 23-25 日 群馬
3. 横井秀基、笠原正登、向山政志、森 潔、吉岡徹朗、齋藤陽子、小川喜久、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、菅原照、中尾一和. 腹膜線維症進展に關与する増殖因子 pleiotrophin の意義. 第 82 回日本内分泌学会学術総会. 2009 年 4 月 23-25 日 群馬
4. 小川喜久、向山政志、横井秀基、笠原正登、森 潔、吉岡徹朗、齋藤陽子、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、菅原照、岸本一郎、中尾一和. アルドステロンに拮抗するナトリウム利尿ペプチド/GC-A シグナルの腎保護効果. 第 82 回日本内分泌学会学術総会. 2009 年 4 月 23-25 日 群馬
5. 栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、齋藤陽子、小川喜久、今牧博貴、川西智子、菅原照、中尾一和. 正常マウスにおける尿中へのアルブミン断片の排泄. 第 52 回日本腎臓学会学術総会. 2009 年 6 月 3-5 日 横浜
6. 横井秀基、笠原正登、向山政志、森 潔、伊賀那津子、石村拓也、齋藤陽子、小川喜久、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、菅原照、中尾一和. シルニジピンの 2 型糖尿病性腎症モデルマウスに対する腎保護作用. 第 52 回日本腎臓学会学術総会. 2009 年 6 月 3-5 日 横浜
7. 小川喜久、向山政志、横井秀基、笠原正登、森 潔、吉岡徹朗、齋藤陽子、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、岸本一郎、菅原照、中尾一和. アルドステロンの腎障害に対する guanylyl cyclase-A シグナルの意義の検討. 第 52 回日本腎臓学会学術総会. 2009 年 6 月 3-5 日 横浜
8. 横井秀基、笠原正登、向山政志、森 潔、吉岡徹朗、齋藤陽子、小川喜久、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、村松壽子、村松喬、菅原照、中尾一和. 腹膜線維化における新規増殖因子 pleiotrophin の機能的意義の解析. 第 54 回 (社) 日本透析医学会学術集会・総会. 2009 年 6 月 5-7 日 横浜
9. 今牧博貴、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、栗原孝成、小川喜久、川西智子、菅原照、山田東祥治、佐藤眞杉、岡田喜久雄、桑原隆、中尾一和. 血液透析患者における血中 Ngal 濃度と臨床パラメーターとの関連. 第 54 回 (社) 日本透析医学会学術集会・総会. 2009 年 6 月 5-7 日 横浜
10. 川西智子、笠原正登、宇佐美俊輔、横井秀基、栗原孝成、齋藤陽子、小川喜久、今牧博

- 貴、岩元則幸、森 潔、向山政志、中尾一和。カフ狭窄、感染、虫垂・大網の倦絡による注排液不良をきたした高齢者腹膜透析症例。第 54 回 (社) 日本透析医学会学術集会・総会。2009 年 6 月 5-7 日 横浜
11. 向山政志、横井秀基、澤井一智、森 潔、中尾一和。CKD、podocyte injury と CCN ファミリー (CCN1, 2) . 日本 CCN ファミリー研究会第 3 回学術集会。2009 年 8 月 28-29 日 岡山
 12. 横井秀基、向山政志、笠原正登、森 潔、齋藤陽子、小川喜久、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、菅原照、中尾一和。マウス腹膜線維症モデルにおける CTGF/CCN2 の発現と意義の解明。日本 CCN ファミリー研究会第 3 回学術集会。2009 年 8 月 28-29 日 岡山
 13. 栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、小川喜久、今牧博貴、川西智子、菅原照、中尾一和。糖尿病及び高脂血症の相乗効果による腎障害悪化モデルの検討。第 45 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会。2009 年 9 月 4-5 日 東京
 14. 小川喜久、向山政志、横井秀基、笠原正登、森 潔、吉岡徹朗、齋藤陽子、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、古賀健一、石井輝、岸本一郎、菅原照、中尾一和。アルドステロンの腎障害に対するナトリウム利尿ペプチド/GC-A シグナルを介した保護作用。第 45 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会。2009 年 9 月 4-5 日 東京
 15. 徳永幸史、笠原正登、川西智子、栗原孝成、森 潔、横井秀基、桑原隆、菅原照、向山政志、中尾一和。幼少時発症し再々腎生検にて Fibronectin 腎症と診断した一例。第 189 回日本内科学会近畿地方会。2009 年 9 月 26 日 大阪
 16. 財間千景、笠原正登、川西智子、森 潔、横井秀基、小川喜久、栗原孝成、菅原照、向山政志、中尾一和。腎生検にて肉芽腫性間質性腎炎を認めた 1 例。第 189 回日本内科学会近畿地方会。2009 年 9 月 26 日 大阪
 17. 横井秀基、笠原正登、向山政志、森 潔、伊賀那津子、石村拓也、齋藤陽子、小川喜久、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、菅原照、中尾一和。N-/L-type Ca²⁺ channel blocker シルニジピンの 2 型糖尿病性腎症モデルマウスにおける蛋白尿減少機序の検討。第 32 回日本高血圧学会学術集会。2009 年 10 月 1-3 日 大津
 18. 小川喜久、向山政志、横井秀基、笠原正登、森 潔、吉岡徹朗、齋藤陽子、今牧博貴、川西智子、岸本一郎、菅原照、中尾一和。アルドステロンの腎障害に対するナトリウム利尿ペプチド/GC-A シグナルの保護作用。第 32 回日本高血圧学会学術集会。2009 年 10 月 1-3 日 大津
 19. K.Mori, M.Mukoyama, M.Kasahara, N.Satoh, T.Kuwabara, Y.Saito, H.Yokoi, H.Imamaki, Y.Ogawa, T.kawanishi, A.Sugawara, K.Nakao. Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Diabetic Nephropathy and Hypertension and Its Response to Angiotensin Receptor Blocker. 第 32 回日本高血圧学会学術集会。2009 年 10 月 1-3 日 大津
 20. 川西智子、笠原正登、徳永幸史、栗原孝成、横井秀基、森 潔、小川喜久、今牧博貴、古賀健一、小谷泰一、桑原隆、菅原照、向山政志、中尾一和。診断に苦慮した幼少時発症の免疫沈着病の一例。第 39 回日本腎臓学会西部学術大会。2009 年 10 月 16-17 日 和歌山
 21. 今牧博貴、森 潔、向山政志、栗原孝成、桑原隆、吉田壽幸、岡田喜久雄、佐藤眞杉、山田東祥治、田上喜久男、笠原正登、横井秀基、小川喜久、川西智子、Jonathan Barasch、菅原照、友杉直久、中尾一和。新規鉄輸送蛋白 Ngal の血中濃度の血液透析患者における調節機構。第 13 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会。2009 年 10 月 23-24 日 埼玉
 22. 栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、小川喜久、今牧博貴、川西智子、菅原照、中尾一和。糖尿病及び高脂血症の合併は脂肪毒性を増強し、相乗的に腎障害を悪化させる。第 13 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会。2009 年 10 月 23-24 日 埼玉
 23. 川西智子、向山政志、西村知美、今牧博貴、横井秀基、森 潔、吉岡徹朗、小川喜久、栗原孝成、石井輝、古賀健一、兼松明弘、白石裕介、菅原照、笠原正登、中尾一和。腹膜透析を経て腎移植施行後に急性腎後性腎不全を発症した多発性嚢胞腎患者の一例。第 15

- 回日本腹膜透析研究会. 2009年11月28-29日 静岡
24. 横井秀基、笠原正登、向山政志、森 潔、齋藤陽子、小川喜久、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、村松壽子、村松喬、菅原照、中尾一和. 腹膜線維化における新規増殖因子 pleiotrophin の意義. 第15回日本腹膜透析研究会. 2009年11月28-29日 静岡
 25. 栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、小川喜久、今牧博貴、川西智子、石井輝、古賀健一、菅原照、中尾一和. 糖尿病と高脂血症の合併による相乗的な腎障害の分子機構の解明. 第83回日本内分泌学会学術総会. 2010年3月25-28日 京都
 26. 横井秀基、笠原正登、向山政志、森 潔、小川喜久、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、村松壽子、村松喬、菅原照、中尾一和. 長期腹膜透析合併症である腹膜線維症進展における新規増殖因子 pleiotrophin の意義. 第47回日本臨床分子医学会学術集会. 2010年4月11日
 27. 横井秀基、笠原正登、森 潔、小川喜久、栗原孝成、齋藤陽子、今牧博貴、川西智子、古賀健一、石井輝、菅原照、向山政志、中尾一和. タモキシフェン誘導性糸球体上皮細胞特異的 Cre 過剰発現マウスの作成. 第53回日本腎臓学会学術総会. 2010年6月17日 神戸
 28. 小川喜久、向山政志、横井秀基、笠原正登、森 潔、吉岡徹朗、齋藤陽子、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、古賀健一、石井輝、岸本一郎、菅原照、中尾一和. ミネラルコルチコイド受容体を介した腎傷害に対する guanylyl cyclase-A シグナルの保護効果. 第53回日本腎臓学会学術総会. 2010年6月17日 神戸
 29. 横井秀基、笠原正登、森 潔、小川喜久、栗原孝成、齋藤陽子、今牧博貴、川西智子、古賀健一、石井輝、関奈々、山本敬史、名本真二、山田亮、菅原照、向山政志、中尾一和. 3,4-DGE による腹膜線維症発症機序の検討. 第55回(社)日本透析医学会学術集会・総会. 2010年6月18日 神戸
 30. 横井秀基、笠原正登、森 潔、小川喜久、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、古賀健一、石井輝、菅原照、向山政志、中尾一和. ナトリウム利尿ペプチド/GC-A 系の腹膜癒着軽減作用. 第55回(社)日本透析医学会学術集会・総会. 2010年6月18日 神戸
 31. 川西智子、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、栗原孝成、今牧博貴、菅原照、中尾一和. 慢性腎臓病患者において尿中 Ngal は腎機能と逆相関し、尿蛋白より優れた予後予測因子である. 第108回日本内科学会総会・講演会. 2011年4月15-17日 東京
 32. 栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、齋藤陽子、今牧博貴、川西智子、石井輝、古賀健一、森慶太、加藤有希子、菅原照、中尾一和. 脂質による macrophage の MRP8/TLR4 シグナル活性化は肥満・高インスリン血症非依存性に糖尿病腎症を悪化させる. 第48回日本臨床分子医学会学術集会. 2011年4月17日 東京
 33. 横井秀基、小川喜久、向山政志、加藤有希子、森 潔、笠原正登、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、古賀健一、石井輝、森慶太、菅原照、中尾一和. Guanylyl cyclase-A 欠損マウスにおけるアルドステロンによる腎傷害のアンジオテンシン II・酸化ストレスの関与. 第84回日本内分泌学会学術総会. 2011年4月22日 神戸
 34. 栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、齋藤陽子、小川喜久、今牧博貴、川西智子、石井輝、古賀健一、森慶太、加藤有希子、菅原照、中尾一和. MRP8/TLR4 シグナルを介した高脂血症による糖尿病腎症の新規悪化機序. 第84回日本内分泌学会学術総会. 2011年4月21-23日 神戸
 35. 石井輝、森 潔、阿部恵、川西智子、今牧博貴、海老原健、田中智洋、笠原正登、横井秀基、古賀健一、菅原照、向山政志、中尾一和. 肝臓及び脂肪に発現する分泌シグナル Ngal

- の意義
第 84 回日本内分泌学会学術総会
2011 年 4 月 21 日 神戸
36. 古賀健一、向山政志、横井秀基、森 潔、笠原正登、栗原孝成、小川喜久、今牧博貴、川西智子、石井輝、森慶太、加藤有希子、Saleem Moin A、菅原照、中尾一和
糖尿病性腎症モデルマウスおよび培養ヒト糸球体上皮細胞における miRNA の発現の検討
第 84 回日本内分泌学会学術総会
2011 年 4 月 23 日 神戸
37. 森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、齋藤陽子、小川喜久、今牧博貴、川西智子、石井輝、古賀健一、森慶太、加藤有希子、菅原照、中尾一和
高脂血症による糖尿病腎症進展の分子機構
第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会
2011 年 5 月 19-21 日 札幌
38. 古賀健一、向山政志、横井秀基、森 潔、笠原正登、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、石井輝、森慶太、加藤有希子、Saleem Moin A、菅原照、中尾一和
microRNA の糖尿病性腎症モデルマウス糸球体における発現と培養ヒト糸球体上皮細胞における意義
第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会
2011 年 5 月 19-21 日 札幌
39. 森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、栗原孝成、中尾一和
AKI と CKD のバイオマーカー
第 54 回日本腎臓学会学術総会
2011 年 6 月 15-17 日 横浜
40. 横井秀基、笠原正登、森 潔、小川喜久、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、古賀健一、石井輝、加藤有希子、森慶太、菅原照、向山政志、中尾一和
腹膜癒着に対するナトリウム利尿ペプチドの効果
第 54 回日本腎臓学会学術総会
2011 年 6 月 15-17 日 横浜
41. 栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、齋藤陽子、今牧博貴、川西智子、石井輝、古賀健一、森慶太、加藤有希子、菅原照、中尾一和
脂質による TLR4 シグナル活性化は糖尿病腎症を進展させる
第 54 回日本腎臓学会学術総会
2011 年 6 月 15-17 日 横浜
42. 今牧博貴、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、栗原孝成、小川喜久、川西智子、佐藤真杉、桑原隆、菅原照、中尾一和
末期腎不全における血液中 Ngal 濃度の逆説的疫学現象
第 54 回日本腎臓学会学術総会
2011 年 6 月 15-17 日 横浜
43. 川西智子、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、栗原孝成、今牧博貴、石井輝、古賀健一、加藤有希子、森慶太、田中佐智子、上嶋健治、菅原照、中尾一和
慢性腎臓病患者において尿中 Ngal は腎機能障害と相関し、腎予後予測に優れた因子である
第 54 回日本腎臓学会学術総会
2011 年 6 月 15-17 日 横浜
44. 石井輝、森 潔、栗原孝成、川西智子、今牧博貴、笠原正登、横井秀基、古賀健一、森慶太、加藤有希子、菅原照、向山政志、中尾一和
肥満における AKI バイオマーカー Ngal の意義
第 54 回日本腎臓学会学術総会
2011 年 6 月 15-17 日 横浜
45. 古賀健一、向山政志、横井秀基、森 潔、笠原正登、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、石井輝、森慶太、加藤有希子、Saleem Moin A、菅原照、中尾一和
培養ヒト podocyte および糖尿病性腎症モデルマウスを用いた糖尿病性腎症における microRNA 発現の検討
第 54 回日本腎臓学会学術総会
2011 年 6 月 15-17 日 横浜
46. 横井秀基、笠原正登、森 潔、栗原孝成、山口拓、相馬望、関奈々、山本敬史、名本真二、山田亮、菅原照、向山政志、中尾一和
3,4-DGE が腹膜の酸化ストレスおよびアポトーシスに及ぼす影響
第 56 回 (社) 日本透析医学会学術集会・総会
2011 年 6 月 17-19 日 横浜
47. 横井秀基、笠原正登、森 潔、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、古賀健一、石井輝、加藤有希子、森慶太、村松壽子、村松喬、菅原照、向山政志、中尾一和
ヒト腹膜における pleiotrophin の発現と機能的意義
第 56 回 (社) 日本透析医学会学術集会・総会
2011 年 6 月 17-19 日 横浜
48. 石井輝、笠原正登、垣田真以子、古賀健一、森 潔、横井秀基、栗原孝成、今牧博貴、加藤有希子、田中麻理、磯田義裕、柴田登志也、深津敦司、向山政志、中尾一和
胸腹水のコントロールに苦渋し、透析中の血圧低下をきたした多発性嚢胞腎の一例
第 56 回 (社) 日本透析医学会学術集会・総会
2011 年 6 月 17-19 日 横浜

49. 森慶太、笠原正登、古賀健一、森 潔、横井秀基、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、石井輝、加藤有希子、吉村耕治、深津敦司、向山政志、中尾一和
 抗菌剤不応の PD 腹膜炎では、抗酸菌の塗抹・培養を検討すべきである。
 第 56 回 (社) 日本透析医学会学術集会・総会
 2011 年 6 月 17-19 日 横浜
50. 栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、齋藤陽子、今牧博貴、川西智子、石井輝、古賀健一、森慶太、加藤有希子、菅原照、中尾一和
 高脂肪食による肥満・高インスリン血症を介さない糖尿病性腎症の悪化機序
 第 32 回日本肥満学会
 2011 年 9 月 23-24 日 淡路
51. 横井秀基、笠原正登、森 潔、小川喜久、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、古賀健一、石井輝、戸田尚宏、大野祥子、村松喬、村松壽子、菅原照、向山政志、中尾一和
 pleiotrophin の腹膜線維症における意義と発現
 第 17 回日本腹膜透析医学会学術集会・総会
 2011 年 9 月 24-25 日 さいたま
52. 戸田尚宏、横井秀基、笠原正登、森 潔、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、古賀健一、石井輝、森慶太、加藤有希子、菅原照、向山政志、中尾一和
 糖尿病患者の腹膜透析開始にともなう血糖管理への影響
 第 17 回日本腹膜透析医学会学術集会・総会
 2011 年 9 月 24-25 日 さいたま
53. 戸田尚宏、笠原正登、横井秀基、森 潔、吉本吉弘、栗原孝成、川西智子、今牧博貴、石井輝、古賀健一、加藤有希子、森慶太、向山政志、中尾一和
 当院で経験した腹膜炎の検討
 第 17 回日本腹膜透析医学会学術集会・総会
 2011 年 9 月 24-25 日 さいたま
54. 森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、中尾一和
 尿中バイオマーカーの新知見
 第 41 回日本腎臓学会西部学術大会
 2011 年 9 月 30 日-10 月 1 日 徳島
55. 笠原正登、向山政志、森 潔、横井秀基、上嶋健治
 脂質異常症による腎障害
 第 41 回日本腎臓学会西部学術大会
 2011 年 9 月 30 日-10 月 1 日 徳島
56. 石井輝、向山政志、藤本健志、森 潔、笠原正登、横井秀基、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、古賀健一、森慶太、加藤有希子、戸田尚宏、大野祥子、菅原照、中尾一和
 進行した腎機能障害を契機に疑われた家族性若年性高尿酸血症性腎症 (FJHN) の一例
 第 41 回日本腎臓学会西部学術大会
 2011 年 9 月 30 日-10 月 1 日 徳島
57. 石井輝、森 潔、栗原孝成、川西智子、今牧博貴、笠原正登、横井秀基、菅原照、向山政志、中尾一和
 肥満、エネルギー代謝における Ngal の意義
 第 15 回日本心血管内分泌代謝学会総会
 2011 年 11 月 25-26 日 大阪
58. 古賀健一、向山政志、横井秀基、森 潔、笠原正登、栗原孝成、今牧博貴、Saleem Moin A、菅原照、中尾一和
 培養ヒト podocyte および糖尿病性腎症モデルマウスを用いた microRNA の発現解析と in vitro における microRNA の機能的解
 第 15 回日本心血管内分泌代謝学会総会
 2011 年 11 月 25-26 日 大阪
59. 石井輝、向山政志、森 潔、笠原正登、横井秀基、栗原孝成、今牧博貴、川西智子、貝藤裕史、中尾一和
 無症候性の高度腎障害、高尿酸血症から家族性若年性高尿酸血症性腎症 (FJHN) が強く疑われた 1 例
 第 196 回日本内科学会近畿地方会
 2011 年 12 月 17 日 京都

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
－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

分担研究者：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。平成21年度より、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た糖尿病、メタボリックシンドローム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継続すると同時に、その過程で同定した、レプチン、Seipin、ラミンA、PPAR γ 遺伝子変異ラットの系統樹立を行い、その解析を行った。今後も、樹立した遺伝子変異ラットの表現系解析を行い、病態解明研究を行うとともに、スーパー特区における創薬開発の加速に利用する予定である。

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(脾臓、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。候補遺伝子としては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、腎臓病としてレプチン、seipin、ラミンA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 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、ラミンA遺伝子などをスクリーニングした結果、現時点でレプチン遺伝子、seipin遺伝子、ラミンA遺伝子、PPAR γ 遺伝子に変異を有するラットの同定に成功し、さらに独自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、表現系解析を行った。その結果、レプチン遺伝子ナンセンス変異ラットでは明らかな肥満、耐糖能異常などが見出され、一方seipin遺伝子変異ラットでは脂肪の減少と耐糖能異常が見出されている。今後これらマウスの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。本研究により得られた遺伝子変異ラットの表現系を、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、複数の糖尿病、メタボリックシンドローム関連遺伝子変異ラットの同定、系統樹立に成功し、表現系の解析を行った。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解析をさらに継続し、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. X. Rong, Y. Li, K. Ebihara, M. Zhao, T. Kusakabe, T. Tomita, M. Murray, K. Nakao. Irbesartan treatment up-regulates hepatic expression of PPAR α and its target genes in obese Koletsky (fa(k)/fa(k)) rats: a link to amelioration of hypertriglyceridaemia. *Br J Pharmacol.* 160(7):1796-807. 2010
2. S. Okada, C. Kozuka, H. Masuzaki, S. Yasue, T. Ishii-Yonemoto, T. Tanaka, Y. Yamamoto, M. Noguchi, T. Kusakabe, T. Tomita, J. Fujikura, K. Ebihara, K. Hosoda, H. Sakaue, H. Kobori, M. Ham, YS. Lee, JB. Kim, Y. Saito, K. Nakao. Adipose tissue-specific dysregulation