

**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**

新規創薬を目指した生活習慣病・難治性疾患モデル遺伝子変異ラットの開発と解析  
- 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

**研究要旨** 本研究課題は、新規開発され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。本年度は現在までに同定、系統樹立した遺伝子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。

**分担研究者**

海老原 健  
京都大学大学院医学研究科  
臨床研究総合センター 開発企画部  
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  
医員

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。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。最近京都大学大学院医学研究科動物実験施設の真下らが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。また加えて、Zinc Finger Nuclease 技術を用いて、任意の遺伝子に変異を有する遺伝子変異ラットを作製することも可能になった。本研究課題では、これら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作成し、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

**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、治療法開発が強く望まれている。現時点において、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

用いた新規創薬開発を加速させる基盤を樹立することを目的とする。

## B. 研究方法

本年度は、我々が現在までに同定、樹立した生活習慣病・難治性疾患関連遺伝子変異ラットの解析をおこなった。これらラットの同定、および系統樹立に関しては、生活習慣病・難治性疾患関連遺伝子変異を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し、変異遺伝子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た。またこの方法にて変異が見つからなかった重要な遺伝子に関しては、近年開発された Zinc Finger Nuclease 技術を用いて、対象の遺伝子に変異を有する遺伝子変異ラットを作製した。こうして樹立した複数の遺伝子変異ラット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)、海老原 (肥満、メタボリックシンドローム)、富田 (糖尿病)、横井 (CKD) らがおのおのの観点からその解析を開始した。これら実験動物を用いる研究に際しては「動物の愛護および管理に関する法律」(平成17年6月改正法)、「京都大学における動物実験の実施に関する規程」および「京都大学大学院医学研究科・医学部における動物実験の実施に関する規程」(いずれも平成19年4月改訂)を遵守して実施し、動物に与える苦痛を最小限にとどめるように最善の配慮を尽くしている。

## C. 研究結果

本年度は、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スクリーニングおよび Zinc Finger Nuclease 技術により既に得られた遺伝子変異ラットの解析を開始した。具体的には、レプチン、seipin、ナトリウム利尿ペプチド1型受容体遺伝子 (GC-A)、PPAR $\gamma$ 、ラミンA、脳性ナトリウム利尿ペプチド、C型ナトリウム利尿ペプチド遺伝子にナンセンスあるいはミスセンス変異、あるいは Zinc Finger Nuclease による

deletionを有するラットの表現系解析を進めた。

まずレプチン遺伝子ナンセンス変異ラットでは血中のレプチン濃度が検出感度以下に低下しており、食事摂取量の増加、エネルギー消費の低下と共に、明らかな肥満を認めた。また、耐糖能異常、インスリン抵抗性を認め、血中中性脂肪、コレステロール値の上昇などの脂質異常が見出された。また、著明な肝臓腫大が見られ、肝臓組織内に脂肪の蓄積を認め、脂肪肝を呈していることが考えられた。このようにレプチン遺伝子ナンセンス変異ラットはヒトにおける肥満症、メタボリックシンドロームの一つのモデルであることが明らかとなった。更に、これらマウスにレプチンを投与したところ、これらの表現形の改善を認めた。このことから本レプチン遺伝子変異ラットが肥満モデルとして創薬研究にも有用であることが示された。また、レプチンの作用機序を明らかにするために、肝臓において、レプチン遺伝子変異ラットおよびレプチン遺伝子に変異を有する0b/0bマウスそれぞれの肝臓においてレプチン投与前後で共通に変化する遺伝子群を探索した結果、最終的に8つの遺伝子がレプチン遺伝子変異ラット及びマウスにおいて共通に変化していることが明らかとなり、現在これら遺伝子の機能を解析を始めている。これらのことから本ラットが、肥満およびその合併症に関わる種を超えて保存されている病態の解明に有用であることが示された。またマウスに比べて組織の大きいという利点を生かして、ラットの臍組織の解析も開始した。

脂肪委縮症の原因遺伝子である seipin 遺伝子の変異ラットでは、脂肪の減少と耐糖能異常、インスリン抵抗性が認められ、また顕著な脂肪肝が見られ、ヒト脂肪委縮症と類似の表現系が得られたと考えている。また seipin ノックアウトマウスでは報告されていないいくつかの表現形も見出しており、その一部はマウスとラットやヒト間における seipin 遺伝子発現分布の差によるものではないかと推察しており、今後更に詳細な解析を継続している。

我々が樹立に成功した GC-A 変異ラットはナトリウム利尿ペプチド1型受容体 (GC-A) の guanylyl cyclase domain に変異を有し、その活性の低下が予想された。GC-A 変異ラットは野生

型ラットと比べ特に体重や成長には差がなかったが、血圧を測定したところ、血圧が高い傾向が特に雌において示された。現在さらに数を増やして解析を継続している。

BNPノックアウトラットに関しては、Zinc Finger Nuclease技術を用いて、BNP遺伝子に変異を入れた数系統のラットから、BNP遺伝子の2nd exonの大部分を結失した系統を樹立した。このラットの心臓組織、および心筋細胞では正常なBNP遺伝子発現およびBNP産生が見られないことを確認した。すでに我々の教室から発表したBNPノックアウトマウス同様、このBNPノックアウトラットの血圧、心機能、心重量は野生型と比し有意な差はなかった。ノックアウトマウスでは圧負荷時に心筋線維化がBNPノックアウトマウスでは亢進していたことから、BNPノックアウトラットに現在、大動脈縮窄による圧負荷モデルを作製しその表現形を解析中である。

上記マウスに加えて、PPAR $\gamma$ 、ラミンA、CNPの遺伝子変異ラットの作成にも成功しており、これらラットの解析も開始したところである。

#### D. 考察

生活習慣病関連疾患の病態解明においては複数の臓器における病態の同時進行的変化とそれに伴う液性因子を介した臓器間シグナルクロストーク解明が必須であり、またこれら病態には細胞老化も関与するため、その治療において細胞・臓器再生という観点も不可欠である。現在これら疾患の病態解析、創薬開発、再生医療研究には遺伝子改変技術が確立されているマウスがモデル動物として多く用いられているが、マウスはその小ささゆえに採血や組織採取が困難であること、生理学的解析や移植実験が行ないにくいなどの問題がある。そのため、マウスと比べ体のサイズが大きく、採血や組織採取や系統的な生理学的解析が容易で、移植実験も行ないやすく、代謝面でもよりヒトに近いラットでの疾患モデル確立が期待されている。本年度に行った遺伝子変異ラットの表現系解析から、これらラットが、生活習慣病関連疾患・難治性疾患モデルとして有効な可能性があることが確認されつつある。今後本年度に解析を開始した遺伝子変異ラットの表現系の詳細を引き続き解析し、これら疾患のモデルラット

の意義を確立することにより、共同研究なども通じて、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の加速を目指したい。

#### 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 スクリーニングと Zinc Finger Nuclease 技術により、複数の関連遺伝子変異ラットの同定、系統樹立に成功し、その表現系を開始した。今後、本年度に得られた遺伝子変異ラットの表現系をさらに詳細に解析し、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. Yokoi, H., Kasahara, M., Mori, K., Kuwabara, T., Toda, N., Yamada, R., Namoto, S., Yamamoto, T., Seki, N., Souma, N., Yamaguchi, T., Sugawara, A., Mukoyama, M., and Nakao, K.  
Peritoneal fibrosis and high transpoare induced in mildly pre-injured peritoneum by 3,4-dideoxyglucosone-3-ene in mice. *Perit. Dial. Int.* 33:143-154, 2013.
2. Ogawa, Y., Mukoyama, M., Yokoi, H., Kasahara, M., Mori, K., Kato, Y., Kuwabara, T., Imamaki, H., Kawanishi, T., Koga, K., Ishii, A., Tokudome, T., Kishimoto, I., Sugawara, A., Nakao, K.  
Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A protects podocytes from aldosterone-induced glomerular injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23:1198-1209, 2012.
3. 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.

4. Kuwabara, T., Mori, K., Mukoyama, M., Kasahara, M., Yokoi, H., Saito, Y., Ogawa, Y., Imamaki, H., Kawanishi, T., Ishii, A., Koga, K., Mori, PK., Kato, Y., Sugawara, A., Nakao, K.  
Exacerbation of diabetic nephropathy by hyperlipidaemia is mediated by toll-like receptor 4 in mice.  
*Diabetologia* 55:2256-2266, 2012.
5. N. Yamada-Goto, G. Katsuura, K. Ebihara, M. Inuzuka, Y. Ochi, Y. Yamashita, T. Kusakabe, A. Yasoda, N. Asahara- Satoh, H. Ariyasu, K. Hosoda, K. Nakao.  
Intracerebroventricular administration of C-type natriuretic peptide suppresses food intake via activation of the melanocortin system in mice.  
*Diabetes.* 2012. in press. doi: 10.2337/db12-0718
6. L. Miyamoto, K. Ebihara, T. Kusakabe, D. Aotani, S. Yamamoto-Kataoka, T. Sakai, M. Aizawa-Abe, Y. Yamamoto, J. Fujikura, T. Hayashi, K. Hosoda, K. Nakao.  
Leptin activates hepatic 5' AMP-Activated Protein Kinase through sympathetic nervous system and  $\alpha 1$  adrenergic receptor: A potential mechanism for improvement of fatty liver in lipodystrophy by leptin.  
*J Biol Chem.* 287: 40441- 40447, 2012 doi: 10.1074/jbc.M112.384545
7. M. Iwanishi, K. Ebihara, T. Kusakabe, S. Harada, J. Ito-Kobayashi, A. Tsuji, K. Hosoda, K. Nakao K.  
Premature atherosclerosis in a Japanese diabetic patient with atypical familial partial lipodystrophy and hypertriglyceridemia.  
*Intern Med.* 51: 2573-2579, 2012 doi: 10.2169/internalmedicine.51.7461
8. D. Aotani, K. Ebihara, N. Sawamoto, T. Kusakabe, M. Aizawa-Abe, S. Kataoka, T. Sakai, H. Iogawa, C. Ebihara, J. Fujikura, K. Hosoda, H. Fukuyama, K. Nakao.  
Functional Magnetic Resonance Imaging Analysis of Food-Related Brain Activity in Patients with Lipodystrophy Undergoing Leptin Replacement Therapy.  
*J Clin Endocrinol Metab.* 97: 3663- 3671, 2012. doi: 10.1210/jc.2012-1872
9. N. Yamada-Goto, G. Katsuura, Y. Ochi, K. Ebihara, T. Kusakabe, K. Hosoda, K. Nakao.  
Impairment of fear-conditioning responses and changes of brain neurotrophic factors in diet-induced obese mice.  
*J Neuroendocrinol.* 24: 1120-1125, 2012. Doi; 10.1111/j.1365-2826.2012.02327.x.
10. T. Kusakabe, K. Ebihara, T. Sakai, L. Miyamoto, D. Aotani, Y. Yamamoto, S. Yamamoto-Kataoka, M. Aizawa-Abe, J. Fujikura, K. Hosoda, K. Nakao.  
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. Doi: 10.1152/ajpendo.00198.2011.
11. Nishikimi T, Okamoto H, Nakamura M, Ogawa N, Horii K, Nagata K, Nakagawa Y, Kinoshita H, Yamada C, Nakao K, Minami T, Kuwabara Y, Kuwahara K, Masuda I, Kangawa K, Minamino N, Nakao K. Direct immunochemiluminescent assay for proBNP and total BNP in human plasma proBNP and total BNP levels in normal and heart failure *PLoS One.* 2013;8(1):e53233. doi: 10.1371/journal.pone.0053233. Epub 2013 Jan 24.
12. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kangawa K, Minamino N, Nakao K. Complexity of melicular forms of B-type natriuretic peptide in heart failure. *Heart* 2012 in press
13. Minami T, Kuwahara K, Nakagawa Y, Takaoka M, Kinoshita H, Nakao K, Kuwabara Y, Yamada Y, Yamada C, Shibata J, Usami S, Yasuno S, Nishikimi T, Ueshima K, Sata M, Nakano H, Seno T, Kawahito Y, Sobue K, Kimura A, Nagai R, Nakao K. Reciprocal expression of MRTF-A and myocardin in crucial for pathological vascular remodelling in mice. *EMBO J.* 2012 Nov 28;31(23):4428-40. doi: 10.1038/emboj.2012.296. Epub 2012 Oct 26.

## 2. 学会発表 国際学会

なし

## 国内学会

1. 中尾一和  
肥満症研究 -Adiposcience と  
Adipomedicine-  
第 45 回日本痛風・核酸代謝学会総会  
2012 年 2 月 17 日、奈良市
2. 中尾一和  
第 109 回日本内科学会総会・講演会 会  
頭講演  
内科学の使命と挑戦  
第 109 回日本内科学会総会・講演会  
2012 年 4 月 14 日、京都市
3. 中尾一和  
内臓脂肪測定装置(DUALSCAN)の開発  
と臨床的意義  
第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会  
2012 年 5 月 17 日、横浜市
4. 中尾一和  
日本肥満学会の使命と先務  
第 33 回日本肥満学会 2012 年 10 月 11  
日、京都市

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし