

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
- 心血管病モデル遺伝子変異ラット開発と解析 -
分担研究者：桑原宏一郎 京都大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科 講師

研究要旨 本研究課題は、新規開発した標的遺伝子変異ラット開発システムを用いて、生活習慣病や難治性疾患に関連する複数の遺伝子変異ラットを開発し、新規生活習慣病・難治性疾患モデルラットを樹立し、従来マウスにおいて実施・解析が困難であった系統的な生理学的解析、移植実験、薬理薬効評価解析などの施行を容易にする事により、生活習慣病関連疾患、難治性疾患の病態解明、新規治療標的の同定および創薬開発を加速させることを目的とする。本年度は、昨年度までに新規遺伝子変異ラット樹立技術および Zinc Finger Nuclease 技術を用いて作製、樹立した、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うち、脳性ナトリウム利尿ペプチド受容体遺伝子ノックアウトラットの解析を行った。

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、京都大学の芹川、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 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

変異ラットをスクリーニング、作製し、その表現系を解析することにより心血管病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

昨年度までに、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血管病モデルとしてナトリウム利尿ペプチド関連遺伝子、TRPC6遺伝子などをスクリーニングした。具体的にはそれぞれの標的遺伝子のcoding領域に対応するprimer setを作製し、ENUミュータジェネシスを行なったラットの遺伝子アーカイブから新規変異DNAスクリーニング法(MuT-POWER法)を用いてスクリーニングを行なった。この方法はDNAミスマッチ部位に特異的かつ短時間に挿入されるトランスポゾンMuの性質を利用し、さらにプール法および蛍光標識DNAを組み合わせることにより短時間かつ低コストで変異DNAのスクリーニング、変異ラットの同定を可能としたものである。このスクリーニングにより候補遺伝子の変異が見つかった場合は新規開発した個体復元技術ICSIを用いて標的遺伝子変異ラットを樹立した。これらの過程はひとつの遺伝子のスクリーニング開始から、変異の同定、変異ラットの樹立までおよそ6ヶ月から1

年で行なうことが可能である。

また上記独自の手法に加え、近年Zinc Finger Nuclease技術を用いた標的遺伝子変異ラット作製技術も確立されてきた。本年度は上記スクリーニングにより得られ、系統樹立した、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ラットに加え、Zinc Finger Nuclease技術により作製した脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)ノックアウトラットの解析を中心におこなった。具体的にはナトリウム利尿ペプチド受容体遺伝子変異ラットにおいてはその血圧、尿中cGMP濃度の測定などを行い、BNPノックアウトラットにおいては、その血圧、心機能、心筋遺伝子発現を解析するとともに、大動脈縮窄による圧負荷モデルを作製し、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スクリーニングの結果得られた、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(GC-A変異ラット)の解析と、Zinc Finger Nuclease技術により作製した脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)ノックアウトラットの解析を行った。分担研究者の横井らと解析した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。またこの変異が機能的変異であることをより直接的に確認するためにGC-A変異ラットにANPを静脈内注射し、その血圧および尿中cGMP濃度を前後で測定し、比較検討を開始した。今後さらにこれら表現系解析を継続する予定である。

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、および培養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。

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。今回、心臓ホルモンであるナトリウム利尿ペプチドの受容体であるGC-Aにミスセンス変異を有するGC-A変異ラットおよびBNPノックアウトラットの作製とその系統樹立に成功し、その解析を開始した。今後、本ラットのさらなる解析が生活習慣病などの病態解明に役立つと共に、そのモデル動物としての利用が、新規治療標的の同定および新規創薬開発につながることを期待し、研究を継続する。

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、ナトリウム利尿ペプチド1型受容体(GC-A)遺伝子に変異を有するラットの

作製、系統樹立に成功した。また、Zinc Finger Nuclease 技術により BNP ノックアウトラットの作製、系統樹立にも成功した。今後、本研究にて得られた GC-A 変異ラットおよび BNP ノックアウトラットの表現系を解析し、疾患モデルラットとしての意義を確立し、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. 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.
2. 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
3. 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.
4. Yasuno S, Fujimoto A, Nakagawa Y, Kuwahara K, Ueshima K. Fixed-dose combination therapy of candesartan cilexetile and amlodipine besilate for the treatment of hypertension in Japan. *Expert Rev cardiovasc Ther*. 2012;10(5):577-83

2. 学会発表

国内学会

1. 南 丈也・桑原宏一郎・中川靖章・木下秀之・中尾一泰・乗原佳宏・錦見俊雄・中尾一和
血管リモデリングにおける新規治療標的としての Rho 依存性転写共役因子 MRTF-A の意義
第 49 回日本臨床分子医学会 2012.4.13-14. 京都
2. 南 丈也・桑原宏一郎・中川靖章・木下秀之・中尾一泰・乗原佳宏・錦見俊雄・中尾一和
miR-1 を介した Rho 依存性転写共役因子 MRTF-A 発現制御の血管リモデリングにおける意義
第 85 回日本内分泌学会学術総会 2012.4.23. 名古屋
3. 山田優子、桑原宏一郎、木下秀之、桑原佳宏、中川靖章、柴田純子、山田千夏、南丈也、保野慎治、宇佐美覚、中尾一泰、錦見俊雄、上嶋健治、森泰生、中尾一和
拡張型心筋症マウスにおける N 型 Ca²⁺チャネル阻害による自律神経活性調節を介した不整脈突然死予防の有用性
第 85 回日本内分泌学会学術総会 2012.4.23. 名古屋
4. 乗原佳宏、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、保野慎治、錦見俊雄、上嶋健治、中尾一和
冠動脈 CT と負荷心筋 SPECT の fusion 画像が責任冠動脈病変の同定に有用であった 2 症例
第 113 回日循近畿地方会 2012.6.16 大阪
5. 山田千夏 桑原宏一郎 木下秀之 乗原佳宏 南丈也 中尾一泰 宇佐美覚 保野慎治 中川靖章 錦見俊雄 上嶋健治 中尾一和
慢性心不全・突然死モデルマウスの不整脈源性基質形成における、レニン-アンジオテンシン系の関与の検討
第 29 回日本心電学会学術集会 2012.10.12-13 幕張,
6. Yuko Yamada, Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, Yoshihiro Yoshihiro Kuwabara, Yasuaki Nakagawa, Chinatsu Yamada, Takeya Minami, Shinji Yasuno, Kazuhiro Nakao, Toshio Nishikimi,

- Kenji Ueshima, Yasuo Mori,
Wataru Shimizu, Kenji Kangawa, Kazuwa Nakao
N-Type Ca²⁺ Channel Blockade Prevents Sudden Death in Mice with Heart Failure
第 29 回国際心臓研究学会(ISHR)日本部会、2012. 10.26~27. 福岡
7. Takeya Minami, Koichiro Kuwahara, Yasuaki Nakagawa, Hideyuki Kinoshita, Kazuhiro Nakao, Yoshihiro Kuwabara, Toshio Nishikimi, Kazuwa Nakao
Reciprocal expression of MRTF-A and Myocardin is crucial for pathological vascular remodeling in mice
第 29 回国際心臓研究学会(ISHR)日本部会、2012. 10.26~27. 福岡
8. 山田 千夏 桑原 宏一郎 木下 秀之 錦見 俊雄 桑原 佳宏 南 丈也 中尾 一泰 中川 靖章 中尾 一和
左室リモデリング進行及び催不整脈性抑制におけるレニン阻害の有用性の検討
第 16 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 2012.11.23-24. 東京
9. Yasuaki Nakagawa, Toshio Nishikimi,, Koichiro Kuwahara Yoshihiro Kuwabara, , Hideyuki Kinoshita, Makoto Takano, Satoru Usami, Kazuhiro Nakao, Takeya Minami, Yuko Yamada, Chinatsu Yamada, Junko Shibata, Kenji Ueshima and Kazuwa Nakao
Glycosylation of plasma N-terminal proBNP and its effect on NT-proBNP assay in hemodialysis patients
第 77 回日本循環器学会学術総会 2013.3.15-17. 横浜
10. 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
Translational Repressor NRSF plays an essential role in maintaining normal cardiac structure and function after birth
第 77 回日本循環器学会学術総会 2013.3.15-17. 横浜
11. Chinatsu Yamada, Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, Makoto Takano, Yasuaki Nakagawa, Satoru Usami, Yoshihiro Kuwabara, Kazuhiro Nakao, Takeya Minami, Yuko Yamada, Toshio Nishikimi, Kenji Ueshima and Kazuwa Nakao
Inhibition of renin-angiotensin system strongly prevents arrhythmogenic left ventricular remodeling and sudden cardiac death in mice with dilated cardiomyopathy
第 77 回日本循環器学会学術総会 2013.3.15-17. 横浜
- 国際学会**
1. Takeya Minami, Koichiro Kuwahara, Yasuaki Nakagawa, Hideyuki Kinoshita, Kazuhiro Nakao, Yoshihiro Kuwabara, Yuko Yamada, Chinatsu Yamada, Junko Shibata, Satoru Usami, Toshio Nishikimi, Kazuwa Nakao
Reciprocal expression of MRTF-A and myocardin mediated by miR-1 is crucial for phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells
Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Scientific Session 2012(ATVB 2012) 2012.4.18-20. Chicago
2. 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
Overexpression of HCN Channels in Failing Heart Contributes to Increased Ventricular Arrhythmicity
Basic Cardiovascular Sciences 2012 Scientific Sessions (BCVS 2012) 2012.7.23-26. New Orleans
3. Koichiro Kuwahara, Kazuwa Nakao
Molecular mechanisms underlying cardioprotective effects of natriuretic peptide. The 7th Oulu Symposium, 2012.8 30-9.2, Oulu, Finland
4. Direct renin inhibitor prevents ventricular remodeling and sudden arrhythmic death in mice with dilated cardiomyopathy
C. Yamada, K. Kuwahara, T. Minami, Y. Kuwabara, K. Nakao, H. Kinoshita, S. Usami, Y. Nakagawa, T. Nishikimi, K. Nakao
ESC congress 2012. 2012.8.25-29. Munich,

Germany

5. Chinatsu Yamada, Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, Yoshihiro Kuwabara, Takeya Minami, Kazuhiro Nakao, Shinji Yasuno, Yasuaki Nakagawa, Kenji Ueshima, Kazuwa Nakao

Direct Renin Inhibitor Strongly Prevents Ventricular Arrhythmogenic Remodeling and Sudden Cardiac Death in Mice with Dilated Cardiomyopathy

AHA2012. 2012.11.3-7. Los Angeles, U.S.A

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし