

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
- 高血圧、腎臓病モデル遺伝子変異ラット開発と解析 -
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。本年度は、昨年度までに新規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得られた、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を有する遺伝子変異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(膵臓、中枢神経系)が困難であること、生理学的解析や移植実験が行ないにくいなどの問題がある。さらに、最近では代謝面においてヒトと大きく異なる生理的特徴が明らかとなった(Vassilopoulos, et al. Science 2009)。そのため、マウスと比べ体のサイズが大きく、採血や組織採取や系統的な生理学的解析が容易で、移植実験も行ないやすく、代謝面でもよりヒトに近いラットでの疾患モデル確立が期待されている。しかし、現時点ではES細胞の技術がラットで未確立のため、遺伝子改変ラットの効率的な作成は不可能である。最近、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。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

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。

本年度はこうした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の解析を中心におこなった。具体的には本ラットの血圧、尿中cGMP濃度の測定などを行い、本ラットのモデルラットとしての意義を解析した。

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

C. 研究結果

本年度は、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)の系統樹立を行い、その解析を行った。このラットはナトリウム利尿ペプチド1型受容体の 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。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。

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、研究を継続している。

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、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、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(GC-A)遺伝子変異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. 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, P.K., 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.
- M.Kasahara, T.Kuwabara, H.Imamaki, T.Kawanishi, A.Ishii, K.P.Mori, Y.Kato, S.Ono, N.Toda, Moin A. Saleem, A.Sugawara, K.Nakao
microRNA-26a is upregulated in glomeruli of diabetic mice and attenuates TGFβ1-induced extracellular matrix expression in podocytes by inhibiting both CTGF and SMAD2
American Society of Nephrology
Nov 1 (Oct 30 - Nov 4), 2012 San Diego
5. K.Koga, M.Mukoyama, H.Yokoi, M.Kasahara, T.Kuwabara, H.Imamaki, T.Kawanishi, A.Ishii, K.P.Mori, Y.Kato, S.Ono, N.Toda, A.Sugawara, K.Nakao
Analyses of microRNAs targeting CTGF in peritoneal fibrosis mouse model
American Society of Nephrology
Nov 2 (Oct 30 - Nov 4), 2012 San Diego

2. 学会発表 国際学会

1. Y.Kato, M.Mukoyama, H.Yokoi, Y.Ogawa, K.Mori, M.Kasahara, T.Kuwabara, H.Imamaki, T.Kawanishi, K.Nakao
Role of p38 mapk in aldosterone-induced glomerular injury in natriuretic peptide receptor-a deficient mice
Hypertension Sydney 2012
Sep 30-Oct 4, 2012 Sydney
 2. T.Kuwabara, K.Mori, M.Mukoyama, M.Kasahara, H.Yokoi, H.Imamaki, A.Ishii, K.Koga, K.P.Mori, Y.Kato, N.Toda, S.Ono, A.Sugawara, K.Nakao
Macrophage-mediated glucolipotoxicity contributes to progression of diabetic nephropathy through MRP8/TLR4 signaling
American Society of Nephrology
Nov 3 (Oct 30 - Nov 4), 2012 San Diego
 3. Ishii, H.Imamaki, K.Mori, M.Mukoyama, H.Yokoi, M.Kasahara, T.Kuwabara, Y.Ogawa, T.Kawanishi, K.Koga, K.P.Mori, Y.Kato, N.Toda, S.Ono, A.Sugawara, K.Nakao
Role of kidney injury biomarker Ngal in obesity and energy homeostasis
American Society of Nephrology
Oct 30 - Nov 4, 2012 San Diego
 4. K.Koga, M.Mukoyama, H.Yokoi, K.Mori,
6. K.P.Mori, M.Mukoyama, H.Yokoi, M.Kasahara, T.Kuwabara, H.Imamaki, Y.Ogawa, T.Kawanishi, A.Ishii, K.Koga, Y.Kato, N.Toda, S.Ono, A.Sugawara, K.Nakao
Alteration of renal lipid deposition and gene expression induced by fasting and high-fat diet feeding
American Society of Nephrology
Nov 3 (Oct 30 - Nov 4), 2012 San Diego
 7. K.P.Mori, K.Mori, M.Mukoyama, H.Yokoi, M.Kasahara, T.Kuwabara, H.Imamaki, A.Ishii, K.Koga, Y.Kato, A.Sugawara, T.Endo, M.Yanagita, K.Nakao
Acute disruption of megalin expression in renal cortex reveals compensatory reabsorption capacity of low molecular weight proteins in S3 segment of proximal tubules and collecting ducts
American Society of Nephrology
Nov 1 (Oct 30 - Nov 4), 2012 San Diego
 8. 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, I.Kishimoto, A.Sugawara, K.Nakao
p38 MAP kinase mediates aldosterone-induced podocyte injury in natriuretic peptide receptor (GC-A)-deficient mice
American Society of Nephrology

Nov 1 (Oct 30 - Nov 4), 2012 San Diego

9. N.Toda, H.Yokoi, M.Kasahara, K.Mori,
T.Kuwabara, H.Imamaki, K.Koga, A.Ishii,
Y.Kato, K.P.Mori, S.Ono, A.Sugawara,
M.Mukoyama, K.Nakao
Inducible CTGF (CCN2) Knockout Mice
Attenuates Anti-Glomerular Basement
Membrane Nephritis
American Society of Nephrology
Nov 1 (Oct 30 - Nov 4), 2012 San Diego

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし