

201407013A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

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

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中 尾 一 和

平成27(2015)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

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中 尾 一 和

平成27(2015)年5月

目 次

I. 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 ー生活習慣病・難治性疾患モデル遺伝子変異ラット開発の推進ー	
中尾 一和	1
II. 分担研究報告書	
1. 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 ー肥満・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と解析ー	
海老原 健	6
2. 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 ー心血管病モデル遺伝子変異ラット開発と解析ー	
桑原 宏一郎	10
3. 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 ー高血圧、腎臓病モデル遺伝子変異ラット開発と解析ー	
横井 秀基	15
4. 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 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糖代謝・膵内分泌機能解析ー	
富田 努	20
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	23
IV. 研究成果の刊行物・別刷	25

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

メディカルイノベーションセンター 特任教授

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継続して行い、疾患モデルとしての基盤確立、有用性の確認を行った。

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
循環器内科
講師

横井 秀樹
京都大学大学院医学研究科
腎臓内科
助教

富田 努
京都大学大学院医学研究科
糖尿内分泌栄養内科
特定病院助教

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

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

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還元技術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 γ 、ラミンA/C、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Ob/Ob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。一方でレプチン変異ラットとob/obマウスではチアゾリジン誘導体投与に対する反応が異なっており、その背景には肝臓におけるPPAR γ 遺伝子発現のマウスとラットの間での種差が存在する可能性を見出した。ラットの肝臓におけるPPAR γ 遺伝子発現パターンはヒトのそれと類似しており、そのためレプチン変異ラットはマウスと比べてよりヒトに類似した表現型を示すことが示唆された。これら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なモデルであることが示された。

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、精巣異常や認知機能低下などの表現形も見出した、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あることが示唆された。これらのことから本セイピン変異ラットがヒトの脂肪委縮症のよいモデル動物である可能性が見いだされた。

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 *guanlyl 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く、また血圧にも有意な差は得られなかった。また、これらラットにANPを投与してcGMPの反応を観察したところ、変異ラットと野生型ラットで有意な差は認められなかった。これらのことから、本GC-A遺伝子変異は有意な機能的変異を伴っていないことが明らかとなった。

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、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した。

ラミンA/Cの遺伝子はその変異がヒトにおいて拡張型心筋症の原因となることが知られている。我々はラミンA/Cの遺伝子にミスセンス変異を持つ変異ラットを同定し、系統樹立に成功した。本ラットは正常に生まれるが、生後12週前後で死亡することを見出した。心エコーでは心拡大及び、心機能低下が確認され、ヒトラミン心筋症と類似した表現型を示していることが確認されつつある。今後さらにその表現型解析を継続する予定である。

CNPは骨形成に重要であり、その受容体の機能喪失型変異がヒトにおいて低身長をきたすマロト一型遠位中間肢異形成症の原因であることが示されている。我々はZinc Finger Nuclease技術を用いてCNPを欠失するラットの樹立に成功した。CNPノックアウトラットは予想通り短軀であったが、CNPノックアウトマウ

スはそのほとんどが生後数週間以内に死亡するのに対して、CNPノックアウトラットは死亡することなく、成獣まで生存可能であることが明らかとなり、CNPの骨形成をはじめ様々な臓器における役割の成獣における解析が可能となった。CNPは血管の機能維持にも重要であることを我々を含む複数の研究者が明らかにしており、本ラットモデルは、そうした心血管系におけるCNPの意義の解析にも有用であると考えられた。

さらに上記ラットに加えて、PPAR γ 遺伝子に変異を有するラットの同定、系統樹立にも成功し、本年度は解析を行った。本変異ラットはホモ接合体ではノックアウトマウスと同様に胎生致死であった。そこでPPAR γ 遺伝子変異ヘテロ接合体ラットの表現型解析を解析したところ、マウスでのPPAR γ ノックアウトとは一部異なる表現型を観察しつつある。今後さらなる解析を継続し、本ラットのモデル動物としての意義の確立に努めたい。

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、ヒト生活習慣病関連疾患・難治性疾患モデル動物として有用な可能性が確認された。今後上記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、病態解明・新規治療標的の同定および新規創薬開発への応用を目指した

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への応用を目指したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ebihara C, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Mashimo T, Tomita T, Zhao M, Gumbilai V, Kusakabe T, Yamamoto Y, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Sakai T, Hosoda K, Serikawa T, Nakao K. Seipin is necessary for normal brain development and spermatogenesis in addition to adipogenesis. **Hum Mol Genet.** 2015 *in press* [Epub ahead of print]
2. Sakai T, Kusakabe T, Ebihara K, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Zhao M, Gumbilai VM, Ebihara C, Aizawa-Abe M, Yamamoto Y, Noguchi M, Fujikura J, Hosoda K, Inagaki N, Nakao K. Leptin restores the insulinotropic effect of exenatide in a mouse model of type 2 diabetes with increased adiposity induced by streptozotocin and high-fat diet. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 307: E712-719, 2014.
3. Tanaka M, Yamaguchi S, Yamazaki Y, Kinoshita H, Kuwahara K, Nakao K, Jay PY, Noda T, Nakamura T. Somatic chromosomal translocation between *Ewsr1* and *Fli1* loci leads to dilated cardiomyopathy in a mouse model. **Sci Rep** 5:7826. 2015.
4. Oshita K, Itoh M, Hirashima S, Kuwabara Y, Ishihara K, Kuwahara K, Nakao K, Kimura T, Nakamura K, Ushijima K, Takano M. Ectopic automaticity induced in ventricular myocytes by transgenic overexpression of HCN2. **J Mol Cell Cardiol.** 80:81-89. 2015
5. Yamada Y, Kinoshita H, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kuwabara Y, Minami T, Yamada C, Shibata J, Nakao K, Cho K, Arai Y, Yasuno S, Nishikimi T, Ueshima K, Kamakura S, Nishida M, Kiyonaka S, Mori Y, Kimura T, Kangawa K, Nakao K. Inhibition of N-type Ca²⁺ channels ameliorates an imbalance in cardiac autonomic nerve activity and prevents lethal arrhythmias in mice with heart failure **Cardiovascular Research** 2014 104(1):183-93.
6. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, Yasuno S, Kinoshita H, Kuwabara Y, Nakao K, Minami T, Yamada C, Ueshima K, Ikeda Y, Okamoto H, Horii K, Nagata K, Kangawa K, Minamino N, Nakao K. The Effects of Super-Flux (High Performance) Dialyzer on Plasma Glycosylated Pro-B-Type Natriuretic Peptide (proBNP) and Glycosylated N-Terminal proBNP in End-Stage Renal Disease Patients on Dialysis. **PLoS One.** 2014 Mar 25;9(3):e92314.
7. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Nakao K. Macrophage-mediated glucolipotoxicity via myeloid-related protein 8/toll-like receptor 4 signaling in diabetic nephropathy. **Clin Exp Nephrol** 18:584-592, 2014.
8. Kuwabara T, Mori K, Kasahara M, Yokoi H, Imamaki H, Ishii A, Koga K, Sugawara A, Yasuno S, Ueshima K, Morikawa T, Konishi Y, Imanishi M, Nishiyama A, Nakao K, Mukoyama M. Predictive significance of

kidney myeloid-related protein 8 expression in patients with obesity- or type 2 diabetes-associated kidney diseases. **PLoS One** 9:e88942, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

9. Kanda J, Mori K, Kawabata H, Kuwabara T, Mori KP, Imamaki H, Kasahara M, Yokoi H, Mizumoto C, Thoennissen NH, Koeffler HP, Barasch J, Takaori-Kondo A, Mukoyama M, Nakao K. An AKI biomarker lipocalin 2 in the blood derives from the kidney in renal injury but from neutrophils in normal and infected conditions. **Clin Exp Nephrol** 19:99-106, 2015.

10. Tomita T, Hosoda K, Fujikura J, Inagaki N, Nakao K. The G-Protein-Coupled Long-Chain Fatty Acid Receptor GPR40 and Glucose Metabolism. **Front Endocrinol (Lausanne)**. 2014. 5:152.

2. 学会発表 国際学会

なし

国内学会

1. 中尾一和
内分泌代謝領域における
Translational Research の実践
第 51 回 日本臨床分子医学会
2014.4.11-12. 東京
2. 中尾一和
内分泌代謝学とトランスレーショ
ナルサイエンス
第 29 回日本内分泌学会東北地方会
14.9.13
3. 中尾一和
内分泌代謝学とトランスレーショ
ナルリサーチ
第 64 回日本薬学会近畿支部総会・
大会 2014.10.11

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
－肥満・メタボリックシンドロームモデル遺伝子変異ラットの作成と解析－
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 準教授

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。本年度は、肥満、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の過程で同定し系統樹立した、レプチンおよび *Seipin* 遺伝子変異ラットの脂肪蓄積、糖・脂質代謝機能などの表現型解析、薬物治療に対する反応の解析を行い、興味深い知見を得た。本研究により、これら樹立した遺伝子変異ラットの動物モデルとしての有用性が示され、今後の創薬開発への応用が望まれる。

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。最近京都大学 動物実験施設の芹川、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肥満、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目指すと共に、このモデルを用いた新規創薬開発の加速への貢献を目的とする。

B. 研究方法

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い、肥満、メタボリックシンドローム関連遺伝子変異として、レプチン、脂肪委縮症の原因遺伝子の一つである *seipin* 遺伝子、PPAR gamma 遺伝子の変異ラットの同定を行い、その系統樹立に成功した。本年度は特にこれら変異ラットの糖・脂質代謝、脂肪蓄積に関して解析をおこなった。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

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レプチン、seipin、PPARgamma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。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、糖負荷試験において耐糖能異常、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。さらにレプチン遺伝子ナンセンス変異ラットでは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ob/ob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、本年度はこれら遺伝子の機能を解析を行った。これらのことは本ラットが、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唆される。さらにレプチン遺伝子ナンセンス変異ラットに血糖降下薬として臨床で使用されているチアゾリジン誘導体を投与し、その反応をob/obマウスと比較した。レプチン遺伝子ナンセンス変異ラット、ob/obマウスと

もにチアゾリジン誘導体投与により血糖値の改善、インスリン値の低下を認めたが、興味深いことに、レプチン遺伝子ナンセンス変異ラットでは肝臓重量の減少を認めたのに対し、ob/obマウスでは逆に肝臓重量が増加した。一方精巣周囲脂肪量はレプチン遺伝子ナンセンス変異ラットではチアゾリジン投与により有意に増加したが、ob/obマウスでは不変かやや減少する傾向にあった。このことは同じレプチン遺伝子変異動物であっても、ラットとマウスではチアゾリジン誘導体に対する反応に質的差異があることを示すものである。チアゾリジン誘導体の標的であるPPARgammaの遺伝子発現を肝臓において検討したところ、ob/obマウスの肝臓では野生型に比してPPARgammaの発現が亢進しており、チアゾリジン誘導体によりさらに有意に発現が亢進したが、レプチン変異ラットでは野生型に比しむしろ発現が低下傾向にあり、チアゾリジン誘導体投与でも有意な変化を示さなかった。こうした臓器における代謝関連遺伝子発現の種差が、薬物治療に対する反応の差異に寄与するものと考えられた。チアゾリジン誘導体はヒトでは脂肪を増やし、脂肪肝を改善させる効果が認められることから、今回、ob/obマウスよりもレプチン遺伝子変異ラットのほうが、少なくともチアゾリジン誘導体への反応に関してはよりヒトに近いモデルである可能性が示唆され、レプチン変異ラットの肥満モデル動物としての有用性が確認できた。

一方、脂肪委縮症の原因遺伝子であるseipin遺伝子の変異ラットの解析も行った。seipin遺伝子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。また記憶機能の低下や精子形成能の低下など、seipinノックアウトマウスでは報告されていないが、ヒトで認められるものと類似の表現形がセイピン変異ラットでは見出された。この際の原因はマウスとラットにおけるseipin遺伝子発現の差によるものではないかと考えられる。このことからセイピンノックアウトマウスより、セイピン遺伝子変異ラットのほうが、よりヒトの病気に近いモデルである可能性が示唆され、本セイピン変異ラットの動物モデルとしての有用性が示

された。今後これらラットモデルを用いて更に詳細な解析を継続していく予定である。

さらに我々は昨年度PPAR γ 遺伝子に変異を有するラットの同定、系統樹立にも成功し、本年度はその解析も行った。本遺伝子変異ラットのホモ接合体はノックアウトマウスと同様に胎生致死を示し、機能喪失型の変異であることが示唆された。そこで、変異ヘテロ接合体ラットを用いてその表現型の解析を進め、耐糖能などの表現型に興味深いデータを得た。今後さらなる解析を行う予定である。

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生理学的解析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、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。今回得られたレプチンおよび seipin 遺伝子変異ラットにおいて、その脂肪蓄積、糖脂質代謝の解析によりこれらがヒトの病態類似のモデル動物として有用であることが示唆された。また PAR γ 遺伝子変異ラットの作製にも成功し、同様にノックアウトマウスとの差異を見出しつつある。今後これら遺伝子変異ラットの表現系をより詳細に解析することにより、病態解明・新規治療標的の同定および新規創薬開発に役立てていきたい。

E. 結論

生活習慣病・難治性疾患関連遺伝子に関して、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、本年度はレプチン、seipin 遺 PPAR γ 遺伝子変異ラットの解析を行った。今後、これら遺伝子変異ラットの表現系解析をさらに

継続し、疾患モデルラットとして意義を確立し、病態解明・新規治療標的の同定と新規創薬開発への応用を行いたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ebihara C, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Mashimo T, Tomita T, Zhao M, Gumbilal V, Kusakabe T, Yamamoto Y, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Sakai T, Hosoda K, Serikawa T, Nakao K. Seipin is necessary for normal brain development and spermatogenesis in addition to adipogenesis. **Hum Mol Genet.** 2015 *in press* [Epub ahead of print]
2. Sakai T, Kusakabe T, Ebihara K, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Zhao M, Gumbilal VM, Ebihara C, Aizawa-Abe M, Yamamoto Y, Noguchi M, Fujikura J, Hosoda K, Inagaki N, Nakao K. Leptin restores the insulinotropic effect of exenatide in a mouse model of type 2 diabetes with increased adiposity induced by streptozotocin and high-fat diet. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 307: E712-719, 2014.

2. 学会発表

国際学会

1. Chihiro Ebihara, Ken Ebihara, Megumi Aizawa-Abe, Yuji Yamamoto, Sachiko Yamamoto-Kataoka, Mingming Zhao, Valentino Gumbilal, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao
Improvement effect of thiazolidine on fatty liver and type 2 diabetes requires adipose tissue: An evidence from the comparison between mice and rats
The Endocrine Society's 96th Annual Meeting 2014年6月22日 米国、シカゴ

2. Ken Ebihara, Megumi Aizawa-Abe,
Kiminori Hosoda, Toru Kusakabe, Daisuke
Aotani, Kazuwa Nakao.
Translational Research of Leptin for
Lipodystrophy in Japan.
Lipodystrophy in 2014: Leptin and Beyond
2014年10月18日 米国、アナーバー

3. Chihiro Ebihara, Ken Ebihara, Megumi
Aizawa-Abe, Tomoji Mashimo, Tsutomu
Tomita, Mingming Zhao, Valentino
Gumbilai, Yuji Yamamoto, Sachiko
Yamamoto-Kataoka, Kiminori Hosoda,
Tadao Serikawa, Kazuwa Nakao
The human lipodystrophy gene product,
seipin plays physiological roles in the brain
development and spermatogenesis in
addition to the adipogenesis
Lipodystrophy in 2014: Leptin and Beyond
2014年10月17日~18日 米国、アナー
バー

4. Chihiro Ebihara, Ken Ebihara, Megumi
Aizawa-Abe, Mingming Zhao, Valentino
Gumbilai, Yuji Yamamoto, Kiminori
Hosoda, Kazuwa Nakao
Pathophysiological role
of *Bscl2/Seipin* haploinsufficiency in
adiposity and metabolism
The Endocrine Society's 97th Annual
Meeting 2015年3月7日 米国、サンデ
イエゴ

国内学会

1. 海老原 健、阿部 恵、細田公則、中尾
一和
脂肪細胞由来ホルモン、レプチンのトラ
ンスレーショナルリサーチ
第32回内分泌代謝学サマーセミナー 2014
年7月10日 山梨県、河口湖富士レー
クホテル 招待

2. 海老原 健、阿部 恵、細田公則、中尾
一和
疾患モデルラットを用いた脂肪細胞関連

遺伝子の病態生理的意義の解明
第37回日本高血圧学会総会 2014年10
月18日 横浜市、パシフィコ横浜 招
待

3. 海老原千尋、海老原 健、阿部 恵、真
下知士、細田公則、芹川忠夫、中尾一和
セイピン欠損 (SKO) ラットを用いた先天
性全身性脂肪萎縮症原因遺伝子セイピン
の生理的意義の解明
第29回日本糖尿病・肥満動物学 2015
年2月13日 京都市、京都大学医学部
創立百周年記念施設「芝蘭会館」

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 循環器内科 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、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、昨年度に引き続き、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、脳性ナトリウム利尿ペプチドノックアウトラット、ラミン A/C 変異ラットの解析を行うと共に、C-type ナトリウム利尿ペプチド遺伝子ノックアウトラットの解析も開始した。

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(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。本年度は本手法を用いて見出し系統樹立した、拡張型心筋症の原因遺伝子の一つであるラミン

A/C遺伝子に変異を持つラットの解析を継続した。

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)およびC-type ナトリウム利尿ペプチド(CNP)ノックアウトラットの解析も行った。

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、ラミンA/C変異ラットの解析と、Zinc Finger Nuclease技術により作製したBNPノックアウトラットおよびCNPノックアウトラットの解析を行った。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大動脈縮窄による圧負荷モデルを作製しその表現形の解析を行った。

さらに同様の手法を用いてCNPノックアウトマウスの作成、樹立にも成功した。本ラットはCNPノックアウトマウスと同様、生直後から短軀であったが、ノックアウトマウスと異なり、新生児期での死亡がみられなかった。このこと

から本ラットではCNP欠損の成獣における意義の解析が可能となり、有用な動物モデルとなりうることを示された。現在本CNPノックアウトラットの表現型を解析継続している。

また、ENUミュータジェネシスライブラリーから新たに拡張型心筋症の原因遺伝子の一つであるラミンA/C遺伝子の変異ラットの系統樹立に成功した。本マウスは生後12週前後で死亡することが判明し、心機能を解析したところ、明らかな心拡大と心機能低下を認めた。現在さらに表現型を解析中である。

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BNPのノックアウトラット、BNPのファミリーホルモンであるCNPのノックアウトラット、拡張型心筋症の原因遺伝子であるラミンA/C遺伝子変異ラットの系統樹立に成功し、その解析を行った。今後、本ラット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、ラミンA/C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、CNPノックアウトラットの作製、系統樹立にも成功し、解析を行った。今後、本研究にて得られたラミンA/C変異ラット、

BNP ノックアウトラット、CNP ノックアウト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. Tanaka M, Yamaguchi S, Yamazaki Y, Kinoshita H, Kuwahara K, Nakao K, Jay PY, Noda T, Nakamura T. Somatic chromosomal translocation between *Ewsr1* and *Fli1* loci leads to dilated cardiomyopathy in a mouse model. **Sci Rep** 5:7826. 2015.
2. Oshita K, Itoh M, Hirashima S, Kuwabara Y, Ishihara K, Kuwahara K, Nakao K, Kimura T, Nakamura K, Ushijima K, Takano M. Ectopic automaticity induced in ventricular myocytes by transgenic overexpression of HCN2. **J Mol Cell Cardiol.** 80:81-89. 2015
3. Yamada Y, Kinoshita H, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kuwabara Y, Minami T, Yamada C, Shibata J, Nakao K, Cho K, Arai Y, Yasuno S, Nishikimi T, Ueshima K, Kamakura S, Nishida M, Kiyonaka S, Mori Y, Kimura T, Kangawa K, Nakao K. Inhibition of N-type Ca^{2+} channels ameliorates an imbalance in cardiac autonomic nerve activity and prevents lethal arrhythmias in mice with heart failure **Cardiovascular Research** 2014 104(1):183-93.
4. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, Yasuno S, Kinoshita H, Kuwabara Y, Nakao K, Minami T, Yamada C, Ueshima K, Ikeda Y, Okamoto H, Horii K, Nagata K, Kangawa K, Minamino N, Nakao K. The Effects of Super-Flux (High Performance) Dialyzer on Plasma Glycosylated Pro-B-Type Natriuretic Peptide (proBNP) and Glycosylated N-Terminal proBNP in End-Stage Renal Disease Patients on Dialysis. **PLoS One.** 2014 Mar 25;9(3):e92314.

2. 学会発表

国際学会

1. K.Kuwahara, C.Yamada, Y.Kuwabara, H.Kinoshita, Y.Nakagawa, T.Nishikimi, K.Nakao, T.Kimura
Pivotal contribution of renin-angiotensin system to promoting arrhythmogenic remodeling in mice model of chronic heart failure with lethal arrhythmias
Gordon Conference: Angiotensin The Renin-Angiotensin System Beyond Angiotensin II March 2-7, 2014 Renaissance Tuscany Il Ciocco Resort Lucca (Barga), Italy
2. Nakao K, Kuwahara K, Nishikimi T, Nakagawa Y, Kinoshita H, Tokudome T, Sone M, Kimura T, Kangawa K and Nakao K
C-type Natriuretic Peptide Derived from Vascular Endothelial Cells Contributes to the Regulation of Blood Pressure
The 18th International Vascular Biology Meeting (IVBM 2014), April 14-18, Kyoto
3. Minami T, Kuwahara K, Kuwabara Y, Cho K, Kinoshita H, Nakagawa Y, Ueda K, Kimura T.
Reciprocal expression of MRTF-A and myocardin is crucial for pathological vascular remodeling in mice
The 18th International Vascular Biology Meeting (IVBM 2014), April 14-18, Kyoto
4. Toshio Nishikimi, Yasuaki Nakagawa, Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, Yoshihiro Kuwabara, Chinatsu Yamada, Kazuhiro Nakao, Satoru Usami, Takeshi Kimura, Kazuwa Nakao
DOMINANTLY INCREASED PLASMA PROBNP, A PRECURSOR OF B-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE, IN PATIENTS WITH RENAL FAILURE
5th International Society of Hypertension (ISH) Athene, Greece, 2014/6/13-16.

5. C. Yamada, K. Kuwahara, Y. Kuwabara, H. Kinoshita, Y. Nakagawa, T. Nihikimi, K. Nakao, T. Kimura
Critical involvement of renin-angiotensin system for developing arrhythmogenic remodeling in mice with chronic heart failure and lethal arrhythmias
ESC 2014.8.30-9.3 Barcelona, Spain

6. Yamada C, Kuwahara K
Renin-angiotensin system promotes arrhythmogenic remodeling in mice with heart failure and sudden arrhythmic death
The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014/9/10-12
Kyoto

7. Yasuaki Nakagawa, Toshio Nishikimi, Koichiro Kuwahara, Shinji Yasuno, Hideyuki Kinoshita¹⁾, Yoshihiro Kuwabara, Kazuhiro Nakao, Chinatsu Yamada, Kenji Ueshima, Naoto Minamino, Takeshi Kimura, Kazuwa Nakao
Significance of O-glycosylation in proBNP processing
The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014/9/10-12
Kyoto

8. Yasuaki Nakagawa, Toshio Nishikimi, Koichiro Kuwahara, Shinji Yasuno, Hideyuki Kinoshita, Yoshihiro Kuwabara, Kazuhiro Nakao, Chinatsu Yamada, Kenji Ueshima, Naoto Minamino, Takeshi Kimura, Kazuwa Nakao
Role of O-glycosylation in N-terminal region of human proBNP in its processing mechanisms
AHA Scientific Sessions 2014
2014.11.15-19.Chicago, USA

国内学会

1. 中川靖章、錦見俊雄、桑原宏一郎、木下秀之、
栗原佳宏、山田千夏、中尾一泰、保野慎治、
上嶋健治、木村剛、南野直人、中尾一和

脳性(B型)ナトリウム利尿ペプチド前駆体
proBNP プロセッシングにおける糖鎖結合の
役割

第 51 回 日本臨床分子医学会
2014.4.11-12. 東京

2. 中川靖章、錦見俊雄、桑原宏一郎、保野慎治、
木下秀之、栗原佳宏、中尾一泰、山田千夏、
上嶋健治、南野直人、木村剛、中尾一和
血液透析患者における BNP 前駆体 proBNP
についての検討
第 87 回日本内分泌学会学術総会 2014 年 4
月 24-26 日 福岡国際会議場

3. Yoshihiro Kuwabara, Koichiro Kuwahara,
Makoto Takano, Hideyuki Kinoshita, Yuji Arai,
Yasuaki Nakagawa, Shinji Yasuno, Sachiyo Igata,
Satoru Usami, Takeya Minami, Yuko Yamada,
Kazuhiro Nakao, Chinatsu Yamada, Junko
Shibata, Toshio Nishikimi, Kenji Ueshima,
Kazuwa Nakao
Increased Expression of HCN channels in the
Ventricular Myocardium Contributes to
Enhanced Arrhythmicity in Mouse Failing
Hearts
第 31 回日本心電学会学術集会, 2014.7.22-25、
東京

4. Chinatsu Yamada, Koichiro Kuwahara, Hideyuki
Kinoshita, Yasuaki Nakagawa, Toshio
Nishikimi, Kazuwa Nakao, Takeshi Kimura
Pivotal involvement of renin-angiotensin system
in promoting arrhythmogenic remodeling in
mice with chronic heart failure and lethal
arrhythmias
第 18 回日本心不全学会学術集会
2014.10.10-12. 大阪

5. Yasuaki Nakagawa, Toshio Nishikimi, Koichiro
Kuwahara, Shinji Yasuno, Hideyuki Kinoshita,
Yoshihiro Kuwabara, Kazuhiro Nakao, Chinatsu
Yamada, Kenji Ueshima, Naoto Minamino,
Takeshi Kimura, Kazuwa Nakao
Role of O-glycosylation in N-terminal
region of human proBNP in proBNP

processing

第 18 回日本心不全学会学術集会

2014.10.10-12. 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

6. 桑原宏一郎、山田優子、木下秀之、中川靖章、柴田純子、山田千夏、森泰生、中尾一和、木村剛

拡張型心筋症モデルマウスにおける N 型 Ca²⁺チャネル阻害は自律神経バランスを改善し突然死を予防する

第 37 回 日本高血圧学会総会

2014.10.17-19. 横浜、神奈川

7. 桑原宏一郎

心血管系におけるナトリウム利尿ペプチドの産生制御と作用機序の新知見

第 18 回日本心血管内分泌代謝学会総会

2014.11.21-22. 横浜、神奈川

8. 中川靖章、錦見俊雄、桑原宏一郎、保野慎治、木下秀之、山田千夏、上嶋健治、南野直人、中尾一和、木村剛

ヒト proBNP プロセッシングにおける O 型糖鎖修飾の意義についての検討

第 18 回日本心血管内分泌代謝学会総会

2014.11.21-22. 横浜、神奈川

9. 桑原宏一郎、中尾一和、木村剛

心不全に伴う不整脈突然死発症にかかわる分子メカニズム

第 44 回 日本心脈管作動物質学会

2015.2.6-7. 高松、香川

10. Yasuaki Nakagawa, Toshio Nishikimi, Koichiro Kuwahara, Shinji Yasuno, Hideyuki Kinoshita, Yoshihiro Kuwabara, Chinatsu Yamada, Kenji Ueshima, Naoto Minamino, Kazuwa Nakao, Takeshi Kimura

O-glycosylation in N-terminal region of proBNP regulates its processing in ventricular myocytes

第 31 回 国際心臓研究会(ISHR)日本部会

2014 年 11 月 28-29 日 ウィンクあいち

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 腎臓内科
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昨年度より継続して行った。

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

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 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年でこ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guanlyl 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。血圧を測定したところ、最終的に野生型ラットと変異ラットでは血圧にも差が認められなかった。次に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たところ、野生型ラットと有意な差はやはり得られなかった。このことから本ミスセンス変異が機能的意義を有する者出るとする証拠を得ることができなかった。現在、すでに得られているBNPノックアウトラット（心臓に関してすでに解析中）を用いて、その腎臓の表現系解析を行っているところである。

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。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、その解析を行ったが残念ながら、機能的に意義がある変異ではないものと考えられた。現在、すでに得られているBNPノックアウトラット（心臓に関してすでに解析中）を用いて、その腎臓の表現系解析を開始している。

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、変異に機能的意義がないことを確認した。現在は、すでに得られているBNPノックアウトラットを用いて、その腎臓病モデルラットとしての可能性を検討し、病態解明・新規治療標的の同定と新規創薬開発への有用性を明らかにしたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Nakao K. Macrophage-mediated glucolipotoxicity via myeloid-related protein 8/toll-like receptor 4 signaling in diabetic nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 18:584-592, 2014.
2. Kasahara M, Nakagawa T, Yokoi H, Kuwabara T, Yasuno S, Mori K, Mukoyama M, Ueshima K. Do statins play a role in renoprotection? *Clin Exp Nephrol* 18:282-285, 2014.
3. Kuwabara T, Mori K, Kasahara M, Yokoi H, Imamaki H, Ishii A, Koga K, Sugawara A, Yasuno S, Ueshima K, Morikawa T, Konishi Y, Imanishi M, Nishiyama A, Nakao K, Mukoyama M. Predictive significance of kidney myeloid-related protein 8 expression in patients with obesity- or type 2 diabetes-associated kidney diseases. *PLoS One* 9:e88942, 2014.
4. Kanda J, Mori K, Kawabata H, Kuwabara T, Mori KP, Imamaki H, Kasahara M, Yokoi H, Mizumoto C, Thoenissen NH, Koeffler HP, Barasch J, Takaori-Kondo A, Mukoyama M, Nakao K. An AKI biomarker lipocalin 2 in the blood derives from the kidney in renal injury but from neutrophils in normal and infected conditions. *Clin Exp Nephrol* 19:99-106, 2015.
5. Yokoi H, Yanagita M. Commentary: Decrease of muscle volume in chronic kidney disease: the role of mitochondria in skeletal muscle. *Kidney Int* 85: 1258-1260, 2014.

2. 学会発表

国際学会

1. Toda N, Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Kuwabara T, Imamaki T, Sgawara A, Matsusaka T, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M. The Role of Mesangial Cell-Derived CTGF in Anti-Glomerular Nephritis American Society of Nephrology ASN 2014 November 13, 2014 Philadelphia
2. Koga K, Yokoi H, Mori K, Kasahara M, Kuwabara T, Moin S, Sugawara A, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M. Glomerular microRNA-26a expression correlates with eGFR in diabetic nephropathy and its regulation in podocytes American Society of Nephrology ASN 2014 November 13, 2014 Philadelphia
3. Kato Y, Yokoi H, Mori K, Kasahara M, Ogawa Y, Kuwabara T, Tokudome T, Kishimoto I, Sugawara A, Matsusaka T, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M. Role of the natriuretic peptide GC-A receptor on podocytes in Aldosterone-induced glomerular injury American Society of Nephrology ASN 2014 November 14, 2014 Philadelphia
4. Kato Y, Yokoi H, Mori K, Kasahara M, Ogawa Y, Kuwabara T, Tokudome T, Kishimoto I, Sugawara A, Matsusaka T, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M. Effects of atorvastatin on salt sensitivity and blood pressure in hypertensive patients (DUET study) American Society of Nephrology ASN 2014 November 15, 2014 Philadelphia