

**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)らがおのこ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/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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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萎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 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された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ー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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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, 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.
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 Ca<sup>2+</sup> 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.

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

## H. 知的財産権の出願・登録状況