

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、生直後から短躯であったが、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、
柴原佳宏、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、柴原佳宏、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

なし

第 18 回日本心不全学会学術集会
2014.10.10-12. 大阪

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

H. 知的財産権の出願・登録状況