

## 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(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。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, 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.
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.
- Kuwabara T, Imamaki T, Sugawara 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

## 2. 学会発表

### 国際学会

1. Toda N, Yokoi H, Kasahara M, Mori K,

### 国内学会

1. 石井輝、今牧博貴、森 潔、栗原孝成、笠

- 原正登、横井秀基、古賀健一、森慶太、加藤有希子、戸田尚宏、大野祥子、菅原照、柳田素子、中尾一和、向山政志  
分泌シグナル Ngal による肥満の positive feedback  
第 87 回日本内分泌学会学術総会 2014 年 4 月 24-26 日 福岡
2. 大野祥子、横井秀基、笠原正登、森 潔、桑原宏一郎、藤倉純二、内藤雅喜、栗原孝成、今牧博貴、石井輝、古賀健一、沼田朋大、菅原照、森泰生、柳田素子、中尾一和、向山政志  
糖尿病性腎症における N 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害の意義  
第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 2014 年 5 月 22-24 日 大阪
3. 石井輝、今牧博貴、栗原孝成、笠原正登、横井秀基、古賀健一、森慶太、加藤有希子、戸田尚宏、大野祥子、菅原照、柳田素子、中尾一和、向山政志、森 潔  
分泌シグナル Ngal の糖脂質代謝における意義  
第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 2014 年 5 月 24 日 大阪
4. 加藤有希子、横井秀基、森 潔、笠原正登、小川喜久、栗原孝成、徳留 健、岸本一郎、菅原照、中尾一和、柳田素子、向山政志  
アルドステロンによるポドサイト傷害に対するナトリウム利尿ペプチド A 受容体の機能解析  
第 57 回日本腎臓学会学術総会 2014 年 7 月 6 日 横浜
5. 森慶太、森 潔、笠原正登、横井秀基、栗原孝成、今牧博貴、石井輝、戸田尚宏、中尾一和、柳田素子、向山政志  
糸球体および近位尿細管に全く障害がないモデルにおける蛋白再吸収阻害の影響  
第 57 回日本腎臓学会学術総会 2014 年 7 月 6 日 横浜
6. 古賀健一、横井秀基、森 潔、笠原正登、栗原孝成、今牧博貴、菅原照、中尾一和、柳田素子、向山政志  
TGF- $\beta$ /CTGF/Smad シグナルを調節する microRNA-26a の糖尿病性腎症糸球体における発現解析  
第 57 回日本腎臓学会学術総会 2014 年 7 月 4 日 横浜
7. 今牧博貴、森 潔、森慶太、石井 輝、栗原孝成、笠原正登、横井秀基、古賀健一、加藤有希子、戸田尚宏、大野祥子、中尾一和、柳田素子、向山政志  
健常人及び腎不全症例における血中・尿中 NGAL の分子量の違い  
第 57 回日本腎臓学会学術総会 2014 年 7 月 4 日 横浜
8. 加藤有希子、横井秀基、森 潔、笠原正登、小川喜久、栗原孝成、徳留健、岸本一郎、菅原 照、中尾一和、柳田素子、向山政志  
アルドステロンによるポドサイト傷害に対する Na 利尿ペプチド/GC-A 系の保護作用の検討  
第 37 回日本高血圧学会総会 2014 年 10 月 19 日 横浜
9. 石井輝、笠原正登、横井秀基、栗原孝成、保野慎治、森 潔、藤本 明、田中佐智子、浅原哲子、阪本 貴、森井成人、堀井和子、酒井 建、向山政志、上嶋健治  
アムロジピン内服下の高血圧患者の圧利尿曲線に及ぼすアトルバスタチンの影響(DUET 試験)  
第 37 回日本高血圧学会総会 2014 年 10 月 19 日 横浜
10. 小口綾貴子、横井秀基、今牧博貴、栗原孝成、清水葉子、笠原正登、向山政志、塚本達雄、柳田素子  
腹膜透析中に急激に心嚢水・胸水を発症し血液透析移行後著名に改善した心外膜炎の一例  
第 20 回日本腹膜透析医学会学術集会 2014 年 9 月 6 日 山形

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし