

- 細田公則、中尾一和  
脳特異的 GC-B 欠損マウスを用いた  
CNP/GC-B 系の中枢性エネルギー代謝調  
節に及ぼす作用の解析  
第 33 回 日本肥満学会 京都 2012.  
10. 11- 12
39. 松原正樹、野口倫生、日下部徹、藤倉  
純二、海老原健、細田公則、中尾一和  
LMNA 遺伝子異常を伴った家族性部分性  
脂肪萎縮症患者由来 iPS 細胞の脂肪細  
胞分化の検討  
第 33 回 日本肥満学会 京都 2012.  
10. 11- 12
40. 海老原健  
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 86 回 日本内分泌学会学術総会  
2013. 4. 25- 27 仙台市
41. 海老原千尋、海老原健、阿部 恵、日  
下部徹、青谷大介、片岡祥子、酒井 建、  
趙 明明、Valentino Gumbilai、細田公  
則、中尾一和  
新規モデルラットを用いたチアゾリジ  
ン誘導体 (TZD) の脂肪肝改善メカニ  
ズムの解明  
第 86 回 日本内分泌学会学術総会  
2013. 4. 25- 27 仙台市
42. 片岡祥子、海老原健、阿部 恵、日下  
部徹、山本祐二、青谷大介、酒井 建、  
海老原千尋、細田公則、中尾一和  
レプチンによる脂肪肝改善メカニ  
ズムの解明～肝特異的 Pten 欠損マウスを用  
いた検討～  
第 86 回 日本内分泌学会学術総会  
2013. 4. 25- 27 仙台市
43. 酒井 建、日下部徹、海老原健、青谷  
大介、片岡祥子、海老原千尋、阿部 恵、  
山本祐二、藤倉純二、細田公則、中尾  
一和  
肥満 2 型糖尿病治療におけるレプチン  
/GLP-1 受容体作動薬共投与の有用性  
第 86 回 日本内分泌学会学術総会  
2013. 4. 25- 27 仙台市
44. 日下部徹、海老原健、髭 秀樹、阿部  
恵、青谷大介、片岡祥子、酒井 建、  
海老原千尋、藤倉純二、細田公則、中  
尾一和  
脂肪萎縮症におけるレプチンの黒色表  
皮腫改善効果  
第 56 回 日本糖尿病学会年次学術集会  
2013. 5. 16- 18 熊本市
45. 海老原千尋、海老原健、阿部 恵、日  
下部徹、青谷大介、片岡祥子、酒井 建、  
趙 明明、Gumbilai Valentino、細田公  
則、中尾一和  
先天性全身性脂肪萎縮症 6 歳児症例に  
おけるレプチン補充療法の有用性  
第 56 回 日本糖尿病学会年次学術集会  
2013. 5. 16- 18 熊本市
46. 青谷大介、海老原健、日下部徹、阿部  
恵、片岡祥子、酒井 建、海老原千尋、  
藤倉純二、細田公則、中尾一和  
部分性脂肪萎縮症に対するレプチン補  
充療法の有用性  
第 56 回 日本糖尿病学会年次学術集会  
2013. 5. 16- 18 熊本市
47. 酒井 建、日下部徹、海老原健、青谷  
大介、片岡祥子、趙 明明、Milton  
Valentino、海老原千尋、阿部 恵、藤  
倉純二、山本祐二、細田公則、中尾一  
和  
レプチンによる膵臓内脂肪蓄積の減少  
とインクレチン作用の増強  
第 34 回 日本肥満学会 2013. 10.  
11- 12 東京
48. 阿部 恵、海老原健、海老原千尋、日  
下部徹、青谷大介、酒井 建、片岡祥  
子、趙 明明、バレンチノ ガンブリ  
アイ、山本祐二、細田公則、中尾一和  
レプチン欠損 Lep<sup>mkyo</sup>/Lep<sup>mkyo</sup> ラットを  
用いた肝臓におけるレプチン感受性遺  
伝子の同定  
第 34 回 日本肥満学会 2013. 10.  
11- 12 東京
49. 青谷大介、海老原健、日下部徹、阿部 恵、  
片岡祥子、酒井 建、海老原千尋、藤倉純  
二、細田公則、中尾一和  
ニューロメジン U のインスリン抵抗性  
における意義  
第 34 回 日本肥満学会 2013. 10. 11-  
12 東京
50. 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

45. 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

46. 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。3年間の研究において、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 変異ラットを同定し、その系統樹立に成功した、加えてこれら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 変異ラットの表現型解析を行った。さらに、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系統樹立にも成功し、その解析も行った。

#### 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

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。本手法を用いて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を見出し系統樹立し、解析を行った。

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。Zinc Finger Nuclease技術により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を作製、系統樹立し、これらマウスの解析も行った。

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

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、ラミンA/C変異ラットを同定し、その系統樹立に成功し、その表現型の解析を行った。また、Zinc Finger Nuclease技術によりBNPノックアウトラットおよびCNPノックアウトラットを作製し、これら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、ヒトラミン心筋症のモデルラットとして意義あるものと考えられた。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. Minami T, Kuwahara K, Nakagawa Y, Takaoka M, Kinoshita H, Nakao K, Kuwabara Y, Yamada Y, Yamada C, Shibata J, Usami S, Yasuno S, Nishikimi T, Ueshima K, Sata M, Nakano H, Seno T, Kawahito Y, Sobue K, Kimura A, Nagai R, Nakao K. Reciprocal expression of MRTF-A and myocardin in crucial for pathological vascular remodelling in mice. **EMBO J**. 2012 Nov 28;31(23):4428-40.
2. Yasuno S, Fujimoto A, Nakagawa Y, Kuwahara K, Ueshima K. Fixed-dose combination therapy of candesartan cilexetil and amlodipine besilate for the treatment of hypertension in Japan. **Expert Rev cardiovasc Ther**. 2012;10(5):577-83
3. Nishikimi T, Okamoto H, Nakamura M, Ogawa N, Horii K, Nagata K, Nakagawa Y, Kinoshita H, Yamada C, Nakao K, Minami T, Kuwabara Y, Kuwahara K, Masuda I, Kangawa K, Minamino N, Nakao K. Direct immunochemiluminescent assay for proBNP and total BNP in human plasma proBNP and total BNP levels in normal and heart failure **PLoS One**. 2013;8(1):e53233.
4. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kangawa K, Minamino N, Nakao K. Complexity of melicular forms of B-type natriuretic peptide in heart failure. **Heart** 2013. 99(10):677-679.
5. Uosaki H, Magadam A, Seo K, Fukushima H, Takeuchi A, Nakagawa Y, Moyes KW, Narazaki G, Kuwahara K, Laflamme M, Matsuoka S, Nakatsuji N, Nakao K, Kwon C, Kass DA, Engel FB, Yamashita JK. Identification of Chemicals Inducing Cardiomyocyte Proliferation in Developmental Stage-Specific Manner with Pluripotent Stem Cells. **Circ Cardiovasc Genet**. 6(6):624-33. 2013.
6. Kuwahara K. Role of NRSF/REST in the Regulation of Cardiac Gene Expression and Function. **Circ J**. 77(11):2682-6. 2013.
7. Yasuno S, Kuwahara K, Kinoshita H, Yamada C, Nakagawa Y, Usami S, Kuwabara Y, Ueshima K, Harada M, Nishikimi T, Nakao K. Angiotensin II Type 1a receptor signaling directly contributes to the increased arrhythmogenicity in cardiac hypertrophy **Br J Pharmacol**. 170(7):1384-95. 2013.
8. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kangawa K, Nakao K. Adrenomedullin in Cardiovascular Disease: A Useful Biomarker, Its Pathological Roles and Therapeutic Application. **Curr Protein Pept Sci**. 14(4):256-267. 2013.
9. Kuwabara Y, Kuwahara K, Takano M, Kinoshita H, Arai Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Igata S, Usami S, Minami T, Yamada Y, Nakao K, Yamada C, Shibata J, Nishikimi T, Ueshima K, Nakao K. Increased Expression of HCN Channels in the Ventricular Myocardium Contributes to Enhanced Arrhythmicity in Mouse Failing Hearts. **J Am Heart Assoc**. 2(3):e000150. 2013.
10. Funayama A, Shishido T, Netsu S, Narumi T, Kadowaki S, Takahashi H, Miyamoto T, Watanabe T, Woo CH, Abe JI, Kuwahara K, Nakao K, Takeishi Y, Kubota I. Cardiac nuclear High Mobility Group Box 1 prevents the development of cardiac hypertrophy and heart failure. **Cardiovasc Res**. 99(4):657-64.2013
11. Nishikimi T, Okamoto H, Nakamura M, Ogawa N, Horii K, Nagata K, Nakagawa Y, Kinoshita H, Yamada C, Nakao K, Minami T, Kuwabara Y, Kuwahara K, Masuda I,

- Kangawa K, Minamino N, Nakao K. Direct Immunochemiluminescent Assay for proBNP and Total BNP in Human Plasma proBNP and Total BNP Levels in Normal and Heart Failure. **PLoS One**. 8(1):e53233. 2013.
12. Matsumoto E, Sasaki S, Kinoshita H, Kito T, Ohta H, Konishi M, Kuwahara K, Nakao K, Itoh N. Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis are promoted in mice lacking Fgf16. **Genes Cells**. 18(7):544-553.2013
13. Nishida M, Ishikawa T, Saiki S, Sunggip C, Aritomi S, Harada E, Kuwahara K, Hirano K, Mori Y, Kim-Mitsuyama S. Voltage-dependent N-type Ca<sup>2+</sup> channels in endothelial cells contribute to oxidative stress-related endothelial dysfunction induced by angiotensin II in mice. **Biochem Biophys Res Commun**. 434(2):210-6. 2013.
14. 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**. 25;9(3):e92314. 2014.
15. 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.
16. 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.
17. 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

## 2. 学会発表

### 国際学会

1. Takeya Minami, Koichiro Kuwahara, Yasuaki Nakagawa, Hideyuki Kinoshita, Kazuhiro Nakao, Yoshihiro Kuwabara, Yuko Yamada, Chinatsu Yamada, Junko Shibata, Satoru Usami, Toshio Nishikimi, Kazuwa Nakao Reciprocal expression of MRTF-A and myocardin mediated by miR-1 is crucial for phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells  
Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Scientific Session 2012 (ATVB 2012) 2012.4.18-20. Chicago
2. Yoshihiro Kuwabara, Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, Makoto Takano, Yasuaki Nakagawa, Satoru Usami, Kazuhiro Nakao, Takeya Minami, Yuko Yamada, Chinatsu Yamada, Junko Shibata, Toshio Nishikimi, Kenji Ueshima and Kazuwa Nakao  
Overexpression of HCN Channels in Failing Heart Contributes to Increased Ventricular Arrhythmicity  
Basic Cardiovascular Sciences 2012 Scientific Sessions (BCVS 2012) 2012.7.23-26. New Orleans
3. Koichiro Kuwahara, Kazuwa Nakao  
Molecular mechanisms underlying cardioprotective effects of natriuretic peptide. The 7th Oulu Symposium, 2012.8 30-9.2, Oulu, Finland
4. Direct renin inhibitor prevents ventricular remodeling and sudden arrhythmic death in mice with dilated cardiomyopathy  
C. Yamada, K. Kuwahara, T. Minami, Y. Kuwabara, K. Nakao, H. Kinoshita, S. Usami, Y. Nakagawa, T. Nishikimi, K. Nakao  
ESC congress 2012. 2012.8.25-29. Munich, Germany

5. Chinatsu Yamada, Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, Yoshihiro Kuwabara, Takeya Minami, Kazuhiro Nakao, Shinji Yasuno, Yasuaki Nakagawa, Kenji Ueshima, Kazuwa Nakao  
Direct Renin Inhibitor Strongly Prevents Ventricular Arrhythmogenic Remodeling and Sudden Cardiac Death in Mice with Dilated Cardiomyopathy  
AHA2012. 2012.11.3-7. Los Angeles, U.S.A
6. Yamada C, Kuwahara K, Kinoshita H, Nishikimi T, Nakagawa Y, Kuwabara Y, Nakao K, Nakao K  
Inhibition of renin-angiotensin system potently prevents arrhythmogenic left ventricular remodeling and sudden cardiac death in mice with dilated cardiomyopathy  
International Symposium of Aldosterone and Related Substances in Hypertension 2013 2013.4.27-28. Sendai, Japan
7. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, Yasuno S, Kinoshita H, Kuwabara Y, Yamada C, Nakao K, Ueshima K, Nakao K  
Effect of hemodialysis on precursor proBNP and glycosylated NT-proBNP in end-stage renal disease patients  
European Society of Cardiology 2013 (ESC 2013) 2013/8/31-9/4 Amsterdam, Netherland
8. Kinoshita H, Kuwahara K, Nishida M, Kurose H, Kiyonaka S, Mori Y, Yamada C, Kuwabara Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Nishikimi T, Ueshima K, Nakao K  
Blockade of TRPC6 is a Novel Therapeutic Approach Against Pathological Cardiac Remodeling  
International Conference on Endothelin ET-13 2013,9.8-11. Tokyo
9. Yamazaki M, Honjo H, Kodama I, Nakagawa Y, Kuwahara K, Kamiya K  
Mechanisms of lethal arrhythmias in a transgenic mouse model with heart failure and sudden cardiac death.  
Venice Arrhythmias 2013, 2013.10.27-29. Venice, Italy
10. Nishikimi T, Nakagawa Y, Minamino N, Ikeda M, Ishimitsu T, Yamada C, Nakao K, Minami T, Kuwabara Y, Kinoshita H, Kangawa K, Kuwahara K, Nakao K  
*O*-glycosylated Pro B-type Natriuretic Peptide is Cleaved intracellularly By Furin in Ventricular Myocytes and Atrial Myocytes : Importance of the Distance Between the *O*-glycosylation Sites and Cleaved Sites  
AHA Scientific Sessions 2013 2013.11.16-20. Dallas, USA
11. 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
12. 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 18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting (IVBM 2014), April 14-18, Kyoto
13. 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 18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting (IVBM 2014), April 14-18, Kyoto
14. 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

5<sup>th</sup> International Society of  
Hypertension(ISH) Athene, Greece,  
2014/6/13-16.

15. 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

16. 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

17. Yasuaki Nakagawa, Toshio Nishikimi,  
Koichiro Kuwahara, Shinji Yasuno,  
Hideyuki Kinoshita<sup>1)</sup>, 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

18. 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. 南 丈也・桑原宏一郎・中川靖章・木下秀  
之・中尾一泰・栗原佳宏・錦見俊雄・中  
尾一和

血管リモデリングにおける新規治療標的  
としての Rho 依存性転写共役因子  
MRTF-A の意義

第 49 回日本臨床分子医学会 2012.4.13-14.  
京都

2. 南 丈也・桑原宏一郎・中川靖章・木下秀  
之・中尾一泰・栗原佳宏・錦見俊雄・中  
尾一和

miR-1 を介した Rho 依存性転写共  
役因子 MRTF-A 発現制御の血管リ  
モデリングにおける意義

第 85 回日本内分泌学会学術総会  
2012.4.23. 名古屋

3. 山田優子、桑原宏一郎、木下秀之、桑原佳  
宏、中川靖章、柴田純子、山田千夏、南  
丈也、保野慎治、宇佐美覚、中尾一泰、  
錦見俊雄、上嶋健治、森泰生、中尾一和  
拡張型心筋症マウスにおける N 型 Ca<sup>2+</sup>  
チャンネル阻害による自律神経活性調節を  
介した不整脈突然死予防の有用性  
第 85 回日本内分泌学会学術総会  
2012.4.23. 名古屋

4. 栗原佳宏、桑原宏一郎、木下秀之、鷹野  
誠、中川靖章、宇佐美覚、柴田純子、山  
田千夏、南丈也、山田優子、保野慎治、  
錦見俊雄、上嶋健治、中尾一和  
冠動脈 CT と負荷心筋 SPECT の fusion 画  
像が責任冠動脈病変の同定に有用であつ  
た 2 症例

第 113 回日循近畿地方会 2012.6.16 大  
阪

5. 山田千夏 桑原宏一郎 木下秀之 栗原  
佳宏 南丈也 中尾一泰 宇佐美覚 保  
野慎治 中川靖章 錦見俊雄 上嶋健治  
中尾一和

慢性心不全・突然死モデルマウスの不整  
脈源性基質形成における、レニン-アン  
ジオテンシン系の関与の検討

第 29 回日本心電学会学術集会  
2012.10.12-13 幕張,

6. Yuko Yamada, Koichiro Kuwahara,  
Hideyuki Kinoshita, Yoshihiro Yoshihiro  
Kuwabara, Yasuaki Nakagawa, Chinatsu



- Yamada, Takeya Minami, Shinji  
Yasuno, Kazuhiro Nakao, Toshio Nishikimi,  
Kenji Ueshima, Yasuo Mori,  
Wataru Shimizu, Kenji Kangawa, Kazuwa  
Nakao  
N-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Blockade Prevents  
Sudden Death in Mice with Heart Failure  
第 29 回国際心臓研究学会(ISHR)日本部  
会、2012.10.26~27. 福岡
7. Takeya Minami, Koichiro Kuwahara, Yasuaki  
Nakagawa, Hideyuki Kinoshita, Kazuhiro  
Nakao, Yoshihiro Kuwabara, Toshio  
Nishikimi, Kazuwa Nakao  
Reciprocal expression of MRTF-A and  
Myocardin is crucial for pathological  
vascular remodeling in mice  
第 29 回国際心臓研究学会(ISHR)日本部  
会、2012.10.26~27. 福岡
8. 山田 千夏 桑原 宏一郎 木下 秀  
之 錦見 俊雄 桑原 佳宏 南 丈  
也 中尾 一泰 中川 靖章 中尾 一和  
左室リモデリング進行及び催不整脈性抑  
制におけるレニン阻害の有用性の検討  
第 16 回日本心血管内分泌代謝学会学術  
総会 2012.11.23-24. 東京
9. Yasuaki Nakagawa, Toshio Nishikimi,,  
Koichiro Kuwahara Yoshihiro Kuwabara, ,  
Hideyuki Kinoshita, Makoto Takano, Satoru  
Usami, Kazuhiro Nakao, Takeya Minami,  
Yuko Yamada, Chinatsu Yamada, Junko  
Shibata, Kenji Ueshima and Kazuwa  
Nakao Glycosylation of plasma N-terminal  
proBNP and its effect on NT-proBNP assay  
in hemodialysis patients  
第 77 回日本循環器学会学術総会  
2013.3.15-17. 横浜
10. Yoshihiro Kuwabara, Koichiro Kuwahara,  
Hideyuki Kinoshita, Makoto Takano,  
Yasuaki Nakagawa, Satoru Usami, Kazuhiro  
Nakao, Takeya Minami, Yuko Yamada,  
Chinatsu Yamada, Junko Shibata, Toshio  
Nishikimi, Kenji Ueshima and Kazuwa  
Nakao  
Translational Repressor NRSF plays an  
essential role in maintaining normal cardiac  
structure and function after birth  
第 77 回日本循環器学会学術総会  
2013.3.15-17. 横浜
11. Chinatsu Yamada, Koichiro Kuwahara,  
Hideyuki Kinoshita, Makoto Takano,  
Yasuaki Nakagawa, Satoru Usami, Yoshihiro  
Kuwabara, Kazuhiro Nakao, Takeya Minami,  
Yuko Yamada, Junko Shibata, Toshio  
Nishikimi, Kenji Ueshima and Kazuwa  
Nakao  
Inhibition of renin-angiotensin system  
strongly prevents arrhythmogenic left  
ventricular remodeling and sudden cardiac  
death in mice with dilated cardiomyopathy  
第 77 回日本循環器学会学術総会  
2013.3.15-17. 横浜
12. 中尾一泰、桑原宏一郎、錦見俊雄、中川  
靖章、木下秀之、宇佐美覚、桑原佳宏、  
南丈也、山田千夏、山田優子、保野慎治、  
上嶋健治、曾根正勝、寒川賢治、中尾一  
和  
血管壁ナトリウム利尿ペ  
プチド系の意義の解明－  
血管内皮細胞特異的 C 型  
ナトリウム利尿ペプチド  
(CNP)ノックアウトマウ  
スの解析－  
第 50 回 臨床分子医学会、2013/4/12-13,  
東京
13. 山田 千夏, 桑原 宏一郎, 木下 秀之, 錦  
見 俊雄, 中尾 一泰, 桑原 佳宏, 中川 靖  
章, 中尾 一和  
拡張型心筋症モデルマウスにおける左室  
リモデリング及び不整脈源性基質形成に  
おけるレニン－アンジオテンシン系の意  
義  
第 50 回 臨床分子医学会、2013/4/12-13,  
東京
14. 山田千夏、桑原宏一郎、木下秀之、錦見  
俊雄、中尾一泰、桑原佳宏、保野慎治、  
中川靖章、上嶋健治、中尾一和  
左室リモデリング進行及び催不整脈性抑  
制におけるレニン－アンジオテンシン系  
の検討  
第 86 回 日本内分泌学会学術総会、  
2013.4.25-27. 仙台
15. 中川靖章、錦見俊雄、桑原宏一郎、保野  
慎治、木下秀之、桑原佳宏、中尾一泰、  
山田千夏、上嶋健治、中尾一和  
透析患者における血中 N 端 proBNP の糖  
鎖修飾と測定系への影響について  
第 2 回 臨床高血圧フォーラム 201  
3年5月25日~26日 東京

16. 木下秀之、桑原宏一郎、清中茂樹、森泰生、赤木達、中村一文、栗原佳宏、中川靖章、錦見俊雄、中尾一和  
肺動脈性肺高血圧症に対する新規治療標的としての TRPC3/6 阻害効果の検討  
第 2 回 日本肺循環学会学術集会  
2013.6.22-23 東京
17. 中村友美、長野仁美、龍英美子、高橋恵子、木下秀之、栗原佳宏、中川靖章、桑原宏一郎、山本善博、中尾一和  
当院における強皮症、間質性肺炎を伴う肺高血圧患者 2 症例に対する PGI2 持続静注療法導入の試み  
第 2 回 日本肺循環学会学術集会  
2013.6.22-23 東京
18. Yamada C, Kuwahara K  
Contribution of renin-angiotensin system to the generation of arrhythmogenic substrate in mice with dilated cardiomyopathy and lethal arrhythmia  
第 30 回国際心臓研究学会(ISHR)日本部会、San Diego、2013.6.29
19. Kuwahara K, Nakao K  
Myocardin-related transcription factor-A plays a pivotal role in vascular remodeling  
第 45 回 日本動脈硬化学会  
2013.7.18-19. 東京
20. 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、中尾一和  
透析患者における血中 B 型(脳性)ナトリウム利尿ペプチド前駆体 proBNP についての検討  
第 61 回心臓病学会 2013. 9.20-22 熊本
21. 山崎正俊、本莊晴朗、小川貴史、中川靖章、桑原宏一郎、児玉逸雄、神谷香一郎  
dnNRSF-Tg マウスにおける致死性心室性不整脈の発生機序  
第 30 回日本心電学会学術集会、2013.10.1、青森
22. 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、中尾一和  
透析中の末期腎不全患者における血中 proBNP についての検討  
第 36 回 日本高血圧学会 2013.10.24-26. 大阪
23. Nakao K, Kuwahara K, Nishikimi T, Nakagawa Y, Usami S, Kinoshita H, Minami T, Kuwabara Y, Yamada C, Yamada Y, Tokudome T, Nakao YM, Yasuno S, Ueshima K, Sone M, Kangawa K  
Impact of C-type Natriuretic Peptide Derived from Vascular Endothelial Cells on Blood Pressure.  
第 36 回 日本高血圧学会 2013.10.24-26. 大阪
24. 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、古賀健一、沼田朋大、菅原照、森泰生、中尾一和、向山政志  
N 型 Ca チャネルノックアウトマウスを用いた糖尿病性腎症における N 型カルシウムチャネルの意義  
第 36 回 日本高血圧学会 2013.10.24-26. 大阪
25. 桑原宏一郎  
ナトリウム利尿ペプチド発現制御機構解明による心血管病治療標的の同定  
第 17 回日本心血管内分泌代謝学会総会  
2013.11.22-23. 大阪
26. 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、中尾一和  
維持血液透析患者における血中 B 型(脳性)ナトリウム利尿ペプチド前駆体についての検討  
第 17 回日本心血管内分泌代謝学会総会  
2013.11.22-23. 大阪
27. 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、中尾一和  
維持血液透析患者における proBNP についての検討  
第 17 回日本心不全学会学術集会  
2013.11.28-30.埼玉
28. Kinoshita H, Kuwahara K  
TRPC3/6 as Potentially Novel Therapeutic Targets for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension  
第 78 回日本循環器学会学術集会  
2014.3.21-23.東京
29. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, Yasuno S, Kinoshita H, Kuwabara Y, Nakao K, Yamada C, Ueshima K, Minamino N,

- Kimura T, Nakao K  
Elucidation of molecular mechanism of human proBNP: role of O-glycosylation in N-terminal region of proBNP  
第 7 8 回日本循環器学会学術集会  
2014.3.21-23.東京
30. Nishikimi T, Nakagawa Y, Minamino N, Ikeda M, Ishimitsu T, Yamada C, Nakao K, Minami T, Kuwabara Y, Kinoshita H, Kangawa K, Kuwahara K, Nakao K  
Molecular mechanism of lower processing rate in human proBNP: importance of the distance between the O-glycosylation and cleavage sites  
第 78 回日本循環器学会学術集会  
2014.3.21-23.東京
31. 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
32. 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
33. Yoshihiro Kuwabara, Koichiro Kuwahara, Makoto Takano, Hideyuki Kinoshita, Yuji Arai, Yasuaki Nakagawa, Shinji Ysuno, 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
34. 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
35. 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
36. 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 Ca<sup>2+</sup>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
37. 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
38. 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

39. 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

40. 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

**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  
－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** 本研究課題では、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。本研究において、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(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

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年で行なうことが

可能である。

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

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、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)を同定し、その系統樹立を行い、表現型解析を行った。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、その変異部位からGC-AのcGMP産生活性の低下が予想された。そこでGC-A変異ラットの表現型解析を詳細に行ったところ、本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生体において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、野生型ラットと降圧反応およびcGMP濃度変化に有意な差はやはり認められなかった。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。今後、すでに得られている脳性ナトリウム利尿ペプチド(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. 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, Nakao K. Peritoneal fibrosis and high transport are 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, PK., 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.
5. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Nakao K. Macrophage-mediated glucolipototoxicity via myeloid-related protein 8/toll-like receptor 4 signaling in diabetic nephropathy. **Clin Exp Nephrol** 18:584-592, 2014.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
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.

### 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 glucolipototoxicity 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, 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 TGF $\beta$ 1-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
  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
  10. Kato Y, Mukoyama M, Yokoi H, Mori K, Kasahara M, Ogawa Y, Kuwabara T, Kishimoto I, Sugawara A, Nakao K  
p38 MAPK signaling mediates aldosterone-induced renal injury in natriuretic peptide receptor (GC-A)-deficient mice  
ISARSH2013  
Apr28 (27-28) 2013 Sendai
  11. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Imamaki H, Ishii A, Koga K, Mori K.P, Kato Y, Sugawara A, Nakao K  
Macrophage-mediated glucolipotoxicity via MRP8/TLR4 signaling in diabetic nephropathy  
World Congress of Nephrology WCN 2013  
June 01(May 31-June 4), 2013 Hong-Kong
  12. Koga K, Mukoyama M, Yokoi H, Mori K, Kasahara M, Kuwabara T, Imamaki H, Ishii A, Saleem MA, Sugawara A, Nakao K  
microRNA-26a attenuates TGF-[beta]-induced extracellular matrix production by inhibiting CTGF and Smad2 in diabetic nephropathy  
World Congress of Nephrology WCN 2013  
June 01(May 31-June 4), 2013 Hong-Kong
  13. Mori K.P, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Kuwabara T, Imamaki H, Ishii A, Koga K, Kato Y, Toda N, Ohno S, Endo T, Yanagita M, Sugawara A, Nakao K  
Megaline-Independent reabsorption of low



molecular weight proteins at collecting ducts revealed by drug-inducible megalin knockout mice

World Congress of Nephrology WCN 2013  
June 01(May 31-June 4), 2013 Hong-Kong

14. Mori K.P, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Kuwabara T, Imamaki H, Sugawara A, Koga K, Kato Y, Nakao K  
High fat diet- or fasting-induced renal lipid deposition is differentially associated with changes in systemic and renal lipid-modulating factors  
World Congress of Nephrology WCN 2013  
June 01(May 31-June 4), 2013 Hong-Kong

15. Toda N, Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Kuwabara T, Imamaki, Koga K, Ishii A, Kato Y, Mori K.P, Ohno S, Sugawara A, Matsusaka T, Nakao N, Mukoyama M  
Systemic Deletion of CTGF Ameliorates Anti-Glomerular Basement Membrane Nephritis with Reduction of Macrophage Infiltration  
American Society of Nephrology ASN 2013  
November 7-10, 2013 Atlanta

16. 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 Membrane Nephritis  
American Society of Nephrology ASN 2014  
November 13, 2014 Philadelphia

17. 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

18. 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

19. 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

#### 国内学会

- 加藤有希子、向山政志、横井秀基、森 潔、笠原正登、小川喜久、栗原孝成、今牧博貴、石井輝、古賀健一、森慶太、岸本一郎、菅原照、中尾一和  
アルドステロン投与腎傷害モデルにおけるナトリウム利尿ペプチド/GC-A 系の p38 MAPK 抑制作用  
第 86 回日本内分泌学会学術総会 2013 年 4 月 26 日 (25-27) 仙台
- 戸田尚宏、横井秀基、笠原正登、森 潔、栗原孝成、今牧博貴、石井輝、古賀健一、森慶太、加藤有希子、大野祥子、菅原照、向山政志、中尾一和  
抗糸球体基底膜 (GBM) 腎炎における CTGF の役割  
第 86 回日本内分泌学会学術総会 2013 年 4 月 26 日 (25-27) 仙台
- 加藤有希子、向山政志、横井秀基、森 潔、笠原正登、小川喜久、栗原孝成、今牧博貴、石井輝、古賀健一、森慶太、岸本一郎、菅原照、中尾一和  
GC-A ノックアウトマウスにおけるアルドステロン投与腎障害モデルに対する p38MAPK 阻害薬の腎保護作用の検討  
第 56 回日本腎臓学会学術総会 2013 年 5 月 10 日 (10-12 日) 東京
- 戸田尚宏、横井秀基、笠原正登、森 潔、栗原孝成、今牧博貴、石井輝、古賀健一、森慶太、加藤有希子、大野祥子、菅原照、向山政志、中尾一和  
抗糸球体基底膜 (GBM) 腎炎における CTGF の意義

- 第56回日本腎臓学会学術総会 2013年5月10-12日 東京
5. 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
  6. 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 大阪
  7. 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
  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
  9. 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
  10. 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
  11. 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
  12. 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
  13. 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
  14. 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

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  
－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－  
分担研究者：富田 努  
京都大学大学院医学研究科 糖尿病内分泌栄養内科  
特定病院助教

**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。本研究において、糖尿病、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、レプチンおよびセイピン遺伝子変異ラットの糖代謝、膵内分泌機能に関する解析を行い、GPR40 や Pdx1 遺伝子発現低下を認めた。今後も、樹立した遺伝子変異ラットの表現系解析を行い、病態解明研究を行うとともに、新規創薬開発への応用を探る。

#### 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(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 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

我々は生活習慣病・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スクリーニングを行い、糖尿病、メタボリックシンドローム関連遺伝子変異として、レプチンおよびセイピン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。本研究では、これら変異ラットの糖代謝、膵内分泌機能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