

**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
の開発と解析**

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中 尾 一 和

平成 25(2013)年 5 月

目 次

. 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 -

中尾 一和 ----- 1

. 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

- 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 -

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

- 心血管病モデル遺伝子変異ラット開発と解析 -

桑原 宏一郎 ----- 13

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

- 高血圧、腎臓病モデル遺伝子変異ラット開発と解析 -

横井 秀基 ----- 18

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

- 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 -

富田 努 ----- 22

. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 26

. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 28

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 内分泌代謝内科 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行い、疾患モデルとしての基盤確立を行った。

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
内分泌代謝内科
講師

横井 秀樹
京都大学大学院医学研究科
内分泌代謝内科
助教

富田 努
京都大学大学院医学研究科
内分泌代謝内科
医員

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。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、新規治療標的の同定を行なうと共に、このモデルを

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ているが、マウスはその小ささゆえに採血や組

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復元技術 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、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0b/0b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。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であることが示された。またマウスに比べて組織の大きいという利点を生かして、ラットの臍組織の解析も開始した。

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いくつかの表現形も見出しており、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はないかと推察しており、今後更に詳細な解析を継続している。

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かったが、血圧を測定したところ、血圧が高い傾向が特に雌において示された。現在さらに数を増やして解析を継続している。

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現在、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中である。

上記マウスに加えて、PPAR γ 、ラミンA、CNPの遺伝子変異ラットの作成にも成功しており、これらラットの解析も開始したところである。

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。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、生活習慣病関連疾患・難治性疾患モデルとして有効な可能性があることが確認されつつある。今後本年度に解析を開始した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、今後、これら病態解明・新規治療標的の同定および新規創薬開発の加速を目指したい。

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., and Nakao, K. Peritoneal fibrosis and high transpoare 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. N. Yamada-Goto, G. Katsuura, K. Ebihara, M. Inuzuka, Y. Ochi, Y. Yamashita, T. Kusakabe, A. Yasoda, N. Asahara- Satoh, H. Ariyasu, K. Hosoda, K. Nakao.
Intracerebroventricular administration of C-type natriuretic peptide suppresses food intake via activation of the melanocortin system in mice.
Diabetes. 2012. in press. doi: 10.2337/db12-0718
6. L. Miyamoto, K. Ebihara, T. Kusakabe, D. Aotani, S. Yamamoto-Kataoka, T. Sakai, M. Aizawa-Abe, Y. Yamamoto, J. Fujikura, T. Hayashi, K. Hosoda, K. Nakao.
Leptin activates hepatic 5' AMP-Activated Protein Kinase through sympathetic nervous system and $\alpha 1$ adrenergic receptor: A potential mechanism for improvement of fatty liver in lipodystrophy by leptin.
J Biol Chem. 287: 40441- 40447, 2012 doi: 10.1074/jbc.M112.384545
7. M. Iwanishi, K. Ebihara, T. Kusakabe, S. Harada, J. Ito-Kobayashi, A. Tsuji, K. Hosoda, K. Nakao K.
Premature atherosclerosis in a Japanese diabetic patient with atypical familial partial lipodystrophy and hypertriglyceridemia.
Intern Med. 51: 2573-2579, 2012 doi: 10.2169/internalmedicine.51.7461
8. D. Aotani, K. Ebihara, N. Sawamoto, T. Kusakabe, M. Aizawa-Abe, S. Kataoka, T. Sakai, H. Iogawa, C. Ebihara, J. Fujikura, K. Hosoda, H. Fukuyama, K. Nakao.
Functional Magnetic Resonance Imaging Analysis of Food-Related Brain Activity in Patients with Lipodystrophy Undergoing Leptin Replacement Therapy.
J Clin Endocrinol Metab. 97: 3663- 3671, 2012. doi: 10.1210/jc.2012-1872
9. N. Yamada-Goto, G. Katsuura, Y. Ochi, K. Ebihara, T. Kusakabe, K. Hosoda, K. Nakao.
Impairment of fear-conditioning responses and changes of brain neurotrophic factors in diet-induced obese mice.
J Neuroendocrinol. 24: 1120-1125, 2012. Doi; 10.1111/j.1365-2826.2012.02327.x.
10. T. Kusakabe, K. Ebihara, T. Sakai, L. Miyamoto, D. Aotani, Y. Yamamoto, S. Yamamoto-Kataoka, M. Aizawa-Abe, J. Fujikura, K. Hosoda, K. Nakao.
Amylin improves the effect of leptin on insulin sensitivity in leptin-resistant diet-induced obese mice.
Am J Physiol Endocrinol Metab. 302: E924-931, 2012. Doi: 10.1152/ajpendo.00198.2011.
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.* 2013;8(1):e53233. doi: 10.1371/journal.pone.0053233. Epub 2013 Jan 24.
12. 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* 2012 in press
13. 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. doi: 10.1038/emboj.2012.296. Epub 2012 Oct 26.

2. 学会発表 国際学会

なし

国内学会

1. 中尾一和
肥満症研究 -Adiposcience と
Adipomedicine-
第 45 回日本痛風・核酸代謝学会総会
2012 年 2 月 17 日、奈良市
2. 中尾一和
第 109 回日本内科学会総会・講演会 会
頭講演
内科学の使命と挑戦
第 109 回日本内科学会総会・講演会
2012 年 4 月 14 日、京都市
3. 中尾一和
内臓脂肪測定装置(DUALSCAN)の開発
と臨床的意義
第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会
2012 年 5 月 17 日、横浜市
4. 中尾一和
日本肥満学会の使命と先務
第 33 回日本肥満学会 2012 年 10 月 11
日、京都市

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
- 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・脂質代謝機能などに関する解析を行い、興味深い結果を得た。今後、これら樹立した遺伝子変異ラットの表現系解析を行い、病態解明を目指すとともに、新規創薬開発に利用する予定である。

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、レプチンおよび脂肪委縮症の原因遺伝子の一つである seipin 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およびseipin、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、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、現在これら遺伝子の機能を解析を始めている。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であることが示された。

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と考えている。また

いくつかseipinノックアウトマウスでは報告されていない表現形も見出しており、その一部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推察しており、今後更に詳細な解析を継続していく予定である。

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可能性が示唆された。今後そ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が加速されるものと考えている。

E. 結論

生活習慣病・難治性疾患関連遺伝子に関して、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、本年度は其中でレプチンおよびseipin遺伝子変異ラットの表現系の解析を行った。今後もスクリーニングを継続しつつ、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. N. Yamada-Goto, G. Katsuura, K. Ebihara, M. Inuzuka, Y. Ochi, Y. Yamashita, T. Kusakabe, A. Yasoda, N. Asahara- Satoh, H. Ariyasu, K. Hosoda, K. Nakao.
Intracerebroventricular administration of C-type natriuretic peptide suppresses food intake via activation of the melanocortin system in mice.
Diabetes. 2012. *in press*. doi: 10.2337/db12-0718
2. L. Miyamoto, K. Ebihara, T. Kusakabe, D. Aotani, S. Yamamoto-Kataoka, T. Sakai, M. Aizawa-Abe, Y. Yamamoto, J. Fujikura, T. Hayashi, K. Hosoda, K. Nakao.
Leptin activates hepatic 5' AMP-Activated Protein Kinase through sympathetic nervous system and $\alpha 1$ adrenergic receptor: A potential mechanism for improvement of fatty liver in lipodystrophy by leptin.
J Biol Chem. 287: 40441- 40447, 2012 doi: 10.1074/jbc.M112.384545
3. M. Iwanishi, K. Ebihara, T. Kusakabe, S. Harada, J. Ito-Kobayashi, A. Tsuji, K. Hosoda, K. Nakao K.
Premature atherosclerosis in a Japanese diabetic patient with atypical familial partial lipodystrophy and hypertriglyceridemia.
Intern Med. 51: 2573-2579, 2012 doi: 10.2169/internalmedicine.51.7461
4. D. Aotani, K. Ebihara, N. Sawamoto, T. Kusakabe, M. Aizawa-Abe, S. Kataoka, T. Sakai, H. Iogawa, C. Ebihara, J. Fujikura, K. Hosoda, H. Fukuyama, K. Nakao.
Functional Magnetic Resonance Imaging Analysis of Food-Related Brain Activity in Patients with Lipodystrophy Undergoing Leptin Replacement Therapy.
J Clin Endocrinol Metab. 97: 3663- 3671, 2012. doi: 10.1210/jc.2012-1872
5. N. Yamada-Goto, G. Katsuura, Y. Ochi, K. Ebihara, T. Kusakabe, K. Hosoda, K. Nakao.
Impairment of fear-conditioning responses and changes of brain neurotrophic factors in diet-induced obese mice.
J Neuroendocrinol. 24: 1120-1125, 2012. Doi; 10.1111/j.1365-2826.2012.02327.x.
6. T. Kusakabe, K. Ebihara, T. Sakai, L. Miyamoto, D. Aotani, Y. Yamamoto, S. Yamamoto-Kataoka, M. Aizawa-Abe, J.

Fujikura, K. Hosoda, K. Nakao.
Amylin improves the effect of leptin on insulin sensitivity in leptin-resistant diet-induced obese mice.
Am J Physiol Endocrinol Metab. 302: E924-931, 2012. Doi: 10.1152/ajpendo.00198.2011.

2. 学会発表 国際学会

1. M. Aizawa-Abe, K. Ebihara, C. Ebihara, T. Kusakabe, D. Aotani, V. Gumbili, T. Mashimo, T. Serikawa & K. Nakao.
Development of leptin deficient *Lep^{mkyo}/Lep^{mkyo}* rat-evidence for its superiority over *Lep^{ob}/Lep^{ob}* mouse as a model for human obesity
5th International & 14th European Congress of Endocrinology (ICE/ECE 2012) 2012.5.5-9, Florence, Italy
2. D. Aotani, K. Ebihara, N. Sawamoto, T. Kusakabe, M. Aizawa-Abe, S. Kataoka, T. Sakai, C. Ebihara, J. Fujikura, K. Hosoda, H. Fukuyama & K. Nakao.
Leptin modulates brain neural activity associated with feeding behavior in patients with lipodystrophy
5th International & 14th European Congress of Endocrinology (ICE/ECE 2012) 2012.5.5-9, Florence, Italy
3. M. Aizawa-Abe, K. Ebihara, C. Ebihara, T. Kusakabe, T. Serikawa, D. Aotani, V.M.J. Gumbili, T. Mashimo, K. Nakao.
Development of Leptin Deficient Rats-Evidence of Superiority Over *Lep^{ob}/Lep^{ob}* Mice as a Model For Human Obesity
19th European Congress on Obesity (ECO2012) 2012.5.9-12, Lyon, France
4. D. Aotani, K. Ebihara, N. Sawamoto, T. Kusakabe, M. Aizawa-Abe, S. Kataoka, T. Sakai, C. Ebihara, J. Fujikura, K. Hosoda, H. Fukuyama, K. Nakao.
Leptin Modulates Brain Activity Associated With Feeding Behavior in Patients With Lipodystrophy
19th European Congress on Obesity (ECO2012) 2012.5.9-12, Lyon, France
5. Takeru Sakai, Toru Kusakabe, Ken Ebihara,

Daisuke Aotani, Sachiko Kataoka, Chihiro Ebihara, Yuji Yamamoto, Megumi Abe, Junji Fujikura, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao.

Beneficial Effects of Combination Therapy With Leptin and Exenatide in a Mouse Model of Type2 Diabetes With Increased Adiposity
72nd scientific sessions American Diabetes Association
2012.6.8-12,
PHILADELPHIA

国内学会

1. 内藤雅喜、藤倉純二、横井秀基、日下部徹、孫 徹、海老原健、向山政志、細田公則、中尾一和
インスリン分泌低下型糖尿病に対するレプチンの治療効果
第 49 回 日本臨床分子医学会学術集会 京都 2012. 4. 13- 14
2. 日下部徹、海老原健、酒井 建、青谷大介、片岡祥子、海老原千尋、阿部 恵、藤倉純二、細田公則、中尾一和
肥満 2 型糖尿病に対するレプチン、アミリン共投与の有用性に関する検討
第 109 回 日本内科学会総会 京都 2012. 4. 13- 15
- 3.
4. 富田 努、細田公則、小鳥真司、孫 徹、藤倉純二、岩倉 浩、野口倫生、日下部徹、海老原健、中尾一和
新規のインスリン分泌調節因子 GPR40 の遺伝性肥満モデルでの発現調節と機能的意義
第 109 回 日本内科学会総会 京都 2012. 4. 13- 15
5. 小鳥真司、富田 努、孫 徹、藤倉純二、岩倉 浩、日下部徹、海老原健、細田公則、中尾一和
新規の G 蛋白共役型-脂質受容体 GPR119 の臨床的意義
第 109 回 日本内科学会総会 京都 2012. 4. 13- 15
6. 吉良友里、細田公則、富田 努、小鳥真司、孫 徹、藤倉純二、岩倉 浩、日下部徹、海老原健、中尾一和
7. G 蛋白共役型-脂質受容体 GPR40 の遺伝子発現と臨床的意義
第 109 回 日本内科学会総会 京都 2012. 4. 13- 15
8. 内藤雅喜、藤倉純二、横井秀基、日下部徹、孫 徹、海老原健、向山政志、細田公則、中尾一和
Therapeutic Impact of Leptin on Diabetes Diabetic Complications, and Longevity in Insulin-Deficient Diabetic Mice
第 109 回 日本内科学会総会 京都 2012. 4. 13- 15
9. 井田みどり、枘田 出、細田公則、海老原健、藤倉純二、岩倉 浩、日下部徹、阿部 恵、葛谷英嗣、中尾一和
Dual Bioelectric Impedance 法を用いた腹部内臓脂肪量測定装置の有用性について
第 109 回 日本内科学会総会 京都 2012. 4. 13- 15
10. 森 栄作、細田公則、野口倫生、藤倉純二、孫 徹、富田 努、内藤雅喜、日下部徹、海老原健、中尾一和
脂肪萎縮症に対する脂肪組織移植治療に関する検討
第 109 回 日本内科学会総会 京都 2012. 4. 13- 15
11. 野口倫生、細田公則、田浦大輔、森 栄作、松原正樹、曾根正勝、藤倉純二、海老原健、中尾一和
ヒト iPS 細胞由来脂肪細胞の脂肪細胞機能解析と細胞移植
第 109 回 日本内科学会総会 京都 2012. 4. 13- 15
12. 片岡祥子、海老原健、阿部 恵、日下部徹、青谷大介、酒井 建、藤倉純二、細田公則、中尾一和
レプチンを用いた非アルコール性脂肪肝治療の可能性に関する検討
第 109 回 日本内科学会総会 京都 2012. 4. 13- 15
13. 青谷大介、海老原健、澤本伸克、日下部徹、阿部 恵、片岡祥子、酒井 建、細田公則、福山秀直、中尾一和
fMRI を用いた、脂肪萎縮症の食欲異常およびレプチン治療による効果の検討
第 109 回 日本内科学会総会 京都 2012. 4. 13- 15
14. 仲野孝史、日下部徹、藤倉純二、岡村

- 昌彦、亀井士郎、伊藤尚弘、青谷大介、阿部 恵、海老原健、細田公則、中尾一和
長期間、糖尿病の経過を追うことができた Werner 症候群の一例
第 109 回 日本内科学会総会 京都 2012. 4. 13- 15
15. 富田 努、細田公則、小鳥真司、孫 徹、藤倉純二、岩倉 浩、野口倫生、日下部徹、海老原健、中尾一和
新規のインスリン分泌促進因子 GPR40 の遺伝性肥満モデルでの発現調節と機能的意義
第 85 回 日本内分泌学会学術総会 名古屋 2012. 4. 19- 21
16. 内藤雅喜、藤倉純二、海老原健、宮永史子、横井秀基、日下部徹、山本祐二、孫 徹、向山政志、細田公則、中尾一和
Therapeutic Impact of Leptin on Diabetes, Diabetic Complications, and Longevity in Insulin-Deficient Diabetic Mice.
第 85 回 日本内分泌学会学術総会 名古屋 2012. 4. 19- 21
17. 井田みどり、榊田 出、細田公則、海老原健、藤倉純二、岩倉 浩、日下部徹、山本祐二、阿部 恵、富田 努、葛谷英嗣、中尾一和
Dual Bioimpedanc 法を用いた内臓脂肪量測定装置のスクリーニング機器としての有用性
第 85 回 日本内分泌学会学術総会 名古屋 2012. 4. 19- 21
18. 野村英生、清水浩一郎、桑原宏一郎、阿部 恵、森 栄作、日下部徹、藤倉純二、孫 徹、海老原健、細田公則、中尾一和
禁酒と減量により血糖コントロールが改善した肝硬変合併糖尿病の一例
第 85 回 日本内分泌学会学術総会 名古屋 2012. 4. 19- 21
19. 野村英生、孫 徹、後藤伸子、勝浦五郎、野口倫生、富田 努、藤倉純二、海老原健、細田公則、中尾一和
高脂肪食負荷レプチントランスジェニックマウス中枢におけるレプチン抵抗性の検討
第 85 回 日本内分泌学会学術総会 名古屋 2012. 4. 19- 21
20. 富田 努、細田公則、小鳥真司、孫 徹、藤倉純二、岩倉 浩、野口倫生、日下部徹、海老原健、中尾一和
G 蛋白共役型-脂質受容体 GPR119 の臨床的意義：ヒト臍島およびインスリンノーマにおける遺伝子発現と臍島機能との関連
第 85 回 日本内分泌学会学術総会 名古屋 2012. 4. 19- 21
21. 日下部徹、海老原健、酒井 建、青谷大介、片岡祥子、海老原千尋、趙 明明、Milton Valentino、阿部 恵、藤倉純二、細田公則、中尾一和
レプチン、アミリン共投与による糖脂質代謝改善に関する検討
第 85 回 日本内分泌学会学術総会 名古屋 2012. 4. 19- 21)
22. 阿部 恵、海老原健、海老原千尋、日下部徹、青谷大介、片岡祥子、酒井 建、趙 明明、Valentino MJ Gumbilai、細田公則、芹川忠夫、中尾一和
遺伝子改変ラットを用いたチアゾリジンの脂肪肝に対する効果の種差の検討
第 85 回 日本内分泌学会学術総会 名古屋 2012. 4. 19- 21
23. 後藤伸子、勝浦五郎、越智ゆかり、山下 唯、海老原健、日下部徹、有安宏之、金本巨哲、三浦晶子、八十田明宏、荒井宏司、細田公則、中尾一和
肥満に合併するうつ状態に対するアミリンおよびレプチンの抗うつ作用の検討
第 85 回 日本内分泌学会学術総会 名古屋 2012. 4. 19- 21
24. 酒井 建、日下部徹、海老原健、青谷大介、片岡祥子、海老原千尋、山本祐二、阿部 恵、藤倉純二、細田公則、中尾一和
レプチン/GLP-1 受容体作動薬共投与による肥満 2 型糖尿病治療の有用性
第 55 回 日本糖尿病学会年次学術集会 横浜 2012. 5. 17- 19
25. 富田 努、細田公則、小鳥真司、藤倉純二、日下部徹、海老原健、中尾一和
新規 G 蛋白共役型-脂質受容体群 GPR40、GP119 の臨床的意義 (23)

- 第 55 回 日本糖尿病学会年次学術集会 横浜 2012. 5. 17- 19
26. 内藤雅喜、藤倉純二、横井秀基、森 栄作、野口倫生、富田 努、日下部徹、孫 徹、海老原健、向山政志、細田公則、中尾一和
インスリン分泌低下型糖尿病に対するレプチンの治療効果(口演 -11-15)
第 55 回 日本糖尿病学会年次学術集会 横浜 2012. 5. 17- 19
27. 井田みどり、柘田 出、細田公則、海老原健、藤倉純二、岩倉 浩、日下部徹、山本祐二、阿部 恵、富田 努、葛谷英嗣、中尾一和
Dual Bioelectrical Impedance Analysis 法を用いた内臓脂肪量測定装置のスクリーニング機器としての有用性(ポスター -P-240)
第 55 回 日本糖尿病学会年次学術集会 横浜 2012. 5. 17- 19
28. 野村英生、孫 徹、後藤伸子、勝浦五郎、野口倫生、富田 努、藤倉純二、海老原健、細田公則、中尾一和
高脂肪食負荷レプチン抵抗性モデルマウスにおけるレプチン反応性の検討
第 55 回 日本糖尿病学会年次学術集会 横浜 2012. 5. 17- 19
29. 海老原健、阿部 恵、日下部徹、青谷大介、細田公則、中尾一和
肥満症治療におけるレプチンの可能性
第 33 回 日本肥満学会 京都 2012. 10. 11- 12
30. 野口倫生、細田公則、森 栄作、松原正樹、田浦大輔、曾根正勝、藤倉純二、海老原健、中尾一和
ヒト iPS 細胞由来脂肪細胞の分化誘導と細胞移植
第 33 回 日本肥満学会 京都 2012. 10. 11- 12
31. 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、藤倉純二、山本祐二、細田公則、中尾一和
レプチン/GLP-1 受容体作動薬共投与による肥満 2 型糖尿病治療の有用性
第 33 回 日本肥満学会 京都 2012. 10. 11- 12
32. 野村英生、孫 徹、後藤伸子、勝浦五郎、野口倫生、富田 努、藤倉純二、海老原健、細田公則、中尾一和
レプチン抵抗性早期誘導モデルマウスの腹内側核におけるレプチン反応性の検討
第 33 回 日本肥満学会 京都 2012. 10. 11- 12
33. 井田みどり、柘田 出、細田公則、海老原健、藤倉純二、岩倉 浩、日下部徹、山本祐二、阿部 恵、富田 努、葛谷英嗣、中尾一和
Dual Bioelectrical Impedance 法を用いた内臓脂肪量測定装置のスクリーニング機器としての有用性
第 33 回 日本肥満学会 京都 2012. 10. 11- 12
34. 海老原千尋、阿部 恵、海老原健、Valentino Milton Gumbilai、日下部徹、青谷大介、酒井 建、趙 明明、山本祐二、細田公則、中尾一和
脂肪萎縮症原因遺伝子 seipin の生体における意義に関する検討
第 33 回 日本肥満学会 京都 2012. 10. 11- 12
35. 富田 努、細田公則、小鳥真司、藤倉純二、日下部徹、海老原健、中尾一和
G 蛋白共役型-中・長鎖脂肪酸受容体 GPR40 の遺伝性肥満モデルの膵島での発現調節
第 33 回 日本肥満学会 京都 2012. 10. 11- 12
36. 野口倫生、細田公則、森 栄作、松原正樹、藤倉純二、海老原健、中尾一和
ヒト多能性幹細胞由来前駆脂肪細胞の単離-細胞表面マーカーの探索-
第 33 回 日本肥満学会 京都 2012. 10. 11- 12
37. 小鳥真司、細田公則、富田 努、藤倉純二、日下部徹、海老原健、中尾一和
G 蛋白共役型-脂質受容体 GPR119 のヒトにおける遺伝子発現と生理的意義
第 33 回 日本肥満学会 京都 2012. 10. 11- 12
38. 後藤伸子、越智ゆかり、勝浦五郎、山下 唯、有安宏之、浅原哲子、金本巨哲、海老原健、三浦晶子、八十田明宏、荒井宏司、細田公則、中尾一和

高脂肪食負荷による絶食後再摂食の反応とオピオイド受容体アンタゴニストの作用

第 33 回 日本肥満学会 京都 2012. 10. 11- 12

39. 山下 唯、後藤伸子、勝浦五郎、越智ゆかり、有安宏之、金本巨哲、三浦晶子、海老原健、八十田明宏、荒井宏司、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

40. 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

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 内分泌代謝内科 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、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および Zinc Finger Nuclease 技術を用いて作製、樹立した、心血管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うち、脳性ナトリウム利尿ペプチド受容体遺伝子ノックアウト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(臍臓、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。

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。本年度は上記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に加え、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)ノックアウトラットの解析を中心におこなった。具体的にはナトリウム利尿ペプチド受容体遺伝子変異ラットにおいてはその血圧、尿中cGMP濃度の測定などを行い、BNPノックアウトラットにおいては、その血圧、心機能、心筋遺伝子発現を解析するとともに、大動脈縮窄による圧負荷モデルを作製し、その解析を行った。

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、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)の解析と、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)ノックアウトラットの解析を行った。分担研究者の横井らと解析した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が、血圧を測定したところ、血圧が高い傾向が特に雌において示された。現在さらに数を増やして解析を継続している。また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、比較検討を開始した。今後さらにこれら表現系解析を継続する予定である。

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現在、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明、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変異ラットおよびBNPノックアウトラットの作製とその系統樹立に成功し、その解析を開始した。今後、本ラットのさらなる解析が生活習慣病などの病態解明に役立つと共に、そ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、ナトリウム利尿ペプチド1型受容体(GC-A)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の作製、系統樹立にも成功した。今後、本研究にて得られた GC-A 変異ラットおよび BNP ノックアウトラットの表現系を解析し、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. 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. doi: 10.1371/journal.pone.0053233. Epub 2013 Jan 24.
2. 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* 2012 in press
3. 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. doi: 10.1038/emboj.2012.296. Epub 2012 Oct 26.
4. Yasuno S, Fujimoto A, Nakagawa Y, Kuwahara K, Ueshima K. Fixed-dose combination therapy of candesartan cilexetile and amlodipine besilate for the treatment of hypertension in Japan. *Expert Rev cardiovasc Ther*. 2012;10(5):577-83

2. 学会発表

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・乗原佳宏・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・乗原佳宏・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 Ca²⁺チャ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. 乗原佳宏、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った 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 乗原佳宏 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 Ca²⁺ 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, 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

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

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 内分泌代謝内科 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が、血圧を測定したところ、血圧が高い傾向が特に雌において示された。現在さらに数を増やして解析を継続している。また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、比較検討を開始した。今後さらにこれら表現系解析を継続する予定である。

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、その解析を開始した。今後、本ラットのさらなる解析が生活習慣病などの病態解明に役立つと共に、そ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、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. 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., and Nakao, K. Peritoneal fibrosis and high transpoare 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, P.K., 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.
- 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 TGFβ1-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

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 glucolipotoxicity 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,
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

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 内分泌代謝内科 医員

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、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 Seipin 遺伝子変異ラットの系統樹立の糖代謝、膵内分泌機能に関する解析を行い、興味深い結果を得た。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、新規創薬開発の加速に利用する予定である。

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

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seipin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およびseipin、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。その結果、レプチン遺伝子ナンセンス変異ラットでは明らかな肥満、耐糖能異常、脂質異常が見出された。また、レプチン遺伝子ナンセンス変異ラットの膵臓では、ラ氏島の拡大を認め、beta細胞などの肥大が考えられた。また、インスリン抵抗性を認めた。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インスリン抵抗性が認められ、ヒト脂肪委縮症と類似の表現系が得られたと考えており、更に詳細な解析を継続している。加えて、seipin遺伝子変異ラットの膵臓の解析を行い、beta細胞面積の増大を認めている。今後さらなる組織学的解析を加える予定である。

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。実際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膵組織の詳細な組織学的解析が可能であることが確認された。今後その表現系を、さらに詳細に解析することにより、これら遺伝子変異ラットのモデル動物としての意義が確立され

れば、病態解明・新規治療標的の同定および新規創薬開発の加速に寄与しうるものと考えている。

E. 結論

生活習慣病・難治性疾患関連遺伝子に関して、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、本年度は其中でレプチンおよび seipin 遺伝子変異ラットの表現系の解析を行った。今後もスクリーニングを継続しつつ、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. M. Zhao, Y. Li, J. Wang, K. Ebihara, X. Rong, K. Hosoda, T. Tomita, K. Nakao. Azilsartan treatment improves insulin sensitivity in obese spontaneously hypertensive Koletsky rats. *Diabetes Obes Metab.*13(12) 1123-1129. 2011.

2. 学会発表

国際学会

1. T. Tomita, K. Hosoda, S. Odori, Y. Kira, C. Son, J. Fujikura, H. Iwakura, M. Noguchi, E. Mori, M. Naito, T. Kusakabe, K. Ebihara, K. Nakao
Gene Expression of a G Protein-coupled Receptor, GPR40, in Pancreatic Islets of a Genetically Obese Rat Model
Keystone Symposia (Killarney, Co. Kerry, Ireland) May 15-20, 2011

国内学会

1. 富田努, 細田公則, 小鳥真司, 藤倉純二, 岩倉浩, 野口倫生, 森栄作, 内藤雅喜, 日下部徹, 海老原健, 中尾一和
新規のインスリン分泌調節因子 GPR40 の遺伝子肥満モデルでの発現調節
第 84 回日本内分泌学会学術総会、

- 2011.4.21-23、神戸
2. 野村英生, 孫徹, 後藤伸子, 勝浦五郎, 野口倫生, 富田努, 藤倉純二, 海老原健, 細田公則, 中尾一和
高脂肪食負荷マウス中枢におけるレプチン反応性の経時的変化の検討
第 84 回日本内分泌学会学術総会、2011.4.21-23、神戸
 3. 小鳥真司, 富田努, 孫徹, 藤倉純二, 野口倫生, 森栄作, 内藤雅喜, 日下部徹, 海老原健, 細田公則, 中尾一和
新規の G 蛋白共役型-脂質受容体 GPR119 の臨床的意義: ヒトおよびマウスでの膵島における遺伝子発現と膵島機能との関連
第 84 回日本内分泌学会学術総会、2011.4.21-23、神戸
 4. 阿部恵, 海老原健, 海老原千尋, 宮澤崇, 富田努, 日下部徹, 山本祐二, 宮本理人, 真下知士, 細田公則, 芹川忠夫, 中尾一和
糖脂質代謝におけるレプチンの病態生理的意義に関する種族差の検討 レプチン欠損 ob/ob ラットの開発と解析
第 84 回日本内分泌学会学術総会 2011.4.21-23、神戸
 5. 内藤雅喜, 藤倉純二, 森栄作, 小鳥真司, 野口倫生, 富田努, 孫徹, 日下部徹, 宮永史子, 宮本理人, 山本祐二, 海老原健, 細田公則, 中尾一和
Leptin Transgenic Akita mouse を用いたインスリン分泌低下型糖尿病に対するレプチン治療
第 84 回日本内分泌学会学術総会 2011.4.21-23、神戸
 6. 井田みどり, 榊田出, 細田公則, 海老原健, 藤倉純二, 岩倉浩, 日下部徹, 山本祐二, 阿部恵, 富田努, 葛谷英嗣, 中尾一和
Dual Bioimpedance 法を用いた内臓脂肪量測定装置のスクリーニング機器としての有用性
第 84 回日本内分泌学会学術総会 2011.4.21-23、神戸
 7. 富田努, 細田公則, 小鳥真司, 孫徹, 藤倉純二, 岩倉浩, 野口倫生, 森栄作, 内藤雅喜, 吉良友里, 日下部徹, 海老原健, 益崎裕章, 中尾一和
膵 細胞に高発現し、中・長鎖脂肪酸をリガンドする G 蛋白共役型受容体 GPR40 の遺伝性肥満モデルの膵島での発現調節
第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011.5.19-21、札幌
 8. 阿部恵, 海老原健, 海老原千尋, 宮澤崇, 富田努, 日下部徹, 山本祐二, 宮本理人, 真下知士, 細田公則, 芹川忠夫, 中尾一和
レプチン欠損 ob/ob ラットの開発と糖脂質代謝解析
第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011.5.19-21、札幌
 9. 内藤雅喜, 藤倉純二, 森栄作, 小鳥真司, 野口倫生, 富田努, 孫徹, 日下部徹, 宮永史子, 宮本理人, 山本祐二, 海老原健, 細田公則, 中尾一和
Leptin Transgenic Akita マウスを用いたインスリン分泌低下型糖尿病に対するレプチン治療
第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011.5.19-21、札幌
 10. 細田公則, 井田みどり, 榊田出, 海老原健, 藤倉純二, 岩倉浩, 日下部徹, 山本祐二, 阿部恵, 富田努, 葛谷英嗣, 中尾一和
Dual Bioimpedance 法を用いた内臓脂肪量測定装置のスクリーニング機器としての有用性
第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011.5.19-21、札幌
 11. 野村英生, 孫徹, 野口倫生, 富田努, 藤倉純二, 海老原健, 細田公則, 中尾一和
高脂肪食負荷レプチン抵抗モデルマウスにおける部位特異的レプチン反応性の検討
第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011.5.19-21、札幌
 12. 小鳥真司, 富田努, 孫徹, 藤倉純二, 野

野口倫生, 森栄作, 内藤雅喜, 日下部徹,
海老原健, 細田公則, 中尾一和
新規の G 蛋白共役型-脂質受容体
GPR119 の臨床的意義: ヒトおよびマウ
スでの膵島における遺伝子発現と膵島機
能との連関
第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、
2011.5.19-21、札幌

13. 富田努, 細田公則, 小鳥真司, 孫 徹,
藤倉純二, 岩倉浩, 野口倫生, 日下部徹,
海老原健, 中尾一和
G 蛋白共役型-脂肪酸受容体 GPR40 の遺
伝性肥満モデルの膵島での発現調節
第 32 回日本肥満学会 学術集会、
2011.9.23-24、兵庫県淡路島
14. 孫 徹, 野村英生, 後藤伸子, 勝浦五郎,
野口倫生, 富田努, 藤倉純二, 海老原健,
細田公則, 中尾一和
高脂肪食負荷レプチントランスジェニッ
クマウス中枢におけるレプチン反応性の
検討
第 32 回日本肥満学会 学術集会、
2011.9.23-24、兵庫県淡路島
15. 内藤雅喜, 藤倉純二, 森栄作, 野口倫生,
富田努, 孫 徹, 日下部徹, 海老原健,
細田公則, 中尾一和
Leptin Transgenic Akita mouse を用い
たインスリン分泌低下型糖尿病に対する
レプチン治療
第 32 回日本肥満学会 学術集会、
2011.9.23-24、兵庫県淡路島
16. 小鳥真司, 富田努, 孫 徹, 藤倉純二,
野口倫生, 森栄作, 内藤雅喜, 日下部徹,
海老原健, 細田公則, 中尾一和
G 蛋白共役型-脂肪酸受容体 GPR40 の遺
伝性肥満モデルの膵島での発現調節
第 32 回日本肥満学会 学術集会、
2011.9.23-24、兵庫県淡路島

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yokoi, H., Kasahara, M., Mori, K., Kuwabara, T., Toda, N., Yamada, R., Namoto, S., Yamamoto, T., Seki, N., Soma, N., Yamaguchi, T., Sugawara, A., Mukoyama, M., and Nakao, K.	Peritoneal fibrosis and high transpoare induced in mildly pre-injured peritoneum by 3,4-dideoxyglucosone-3-ene in mice.	Perit. Dial. Int.	33	143-154	2013
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
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
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	81	160-169	2012
N. Yamada-Goto, G. Katsuura, K. Ebihara, M. Inuzuka, Y. Ochi, Y. Yamashita, T. Kusakabe, A. Yasoda, N. Asahara- Satoh, H. Ariyasu, K. Hosoda, K. Nakao.	Intracerebroventricular administration of C-type natriuretic peptide suppresses food intake via activation of the melanocortin system in mice.	Diabetes..		In press	2012
L. Miyamoto, K. Ebihara, T. Kusakabe, D. Aotani, S. Yamamoto-Kataoka, T. Sakai, M. Aizawa-Abe, Y. Yamamoto, J. Fujikura, T. Hayashi, K. Hosoda, K. Nakao.	Leptin activates hepatic 5' AMP-Activated Protein Kinase through sympathetic nervous system and $\alpha 1$ adrenergic receptor: A potential mechanism for improvement of fatty liver in lipodystrophy by leptin.	J Biol Chem.	287	40441-40447	2012
M. Iwanishi, K. Ebihara, T. Kusakabe, S. Harada, J. Ito-Kobayashi, A. Tsuji, K. Hosoda, K. Nakao K.	Premature atherosclerosis in a Japanese diabetic patient with atypical familial partial lipodystrophy and hypertriglyceridemia.	Intern Med.	51	2573-2579,	2012

D. Aotani, K. Ebihara, N. Sawamoto, T. Kusakabe, M. Aizawa-Abe, S. Kataoka, T. Sakai, H. Iogawa, C. Ebihara, J. Fujikura, K. Hosoda, H. Fukuyama, K. Nakao.	Functional Magnetic Resonance Imaging Analysis of Food-Related Brain Activity in Patients with Lipodystrophy Undergoing Leptin Replacement Therapy.	J Clin Endocrinol Metab.	97	3663- 3671	2012
N. Yamada-Goto, G. Katsuura, Y. Ochi, K. Ebihara, T. Kusakabe, K. Hosoda, K. Nakao.	Impairment of fear-conditioning responses and changes of brain neurotrophic factors in diet-induced obese mice.	J Neuroendocrinol.	24	1120-1125	2012
T. Kusakabe, K. Ebihara, T. Sakai, L. Miyamoto, D. Aotani, Y. Yamamoto, S. Yamamoto-Kataoka, M. Aizawa-Abe, J. Fujikura, K. Hosoda, K. Nakao.	Amylin improves the effect of leptin on insulin sensitivity in leptin-resistant diet-induced obese mice.	Am J Physiol Endocrinol Metab.	302	E924-931	2012
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	e53233	2013
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		In press	2012
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 is crucial for pathological vascular remodelling in mice.	EMBO J	31	4428-40	2012