

**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～26 年度 総合研究報告書

研究代表者 中 尾 一 和

平成 27(2015)年 5 月

目 次

. 総合研究報告書

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 ----- 10

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 ----- 20

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 ----- 30

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 ----- 37

. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 42

. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 48

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総合研究報告書

新規創薬を目指した生活習慣病・難治性疾患モデル遺伝子変異ラットの開発と解析
- 生活習慣病・難治性疾患モデル遺伝子変異ラット開発の推進 -

主任研究者：中尾 一和

京都大学大学院医学研究科

メディカルイノベーションセンター 特任教授

研究要旨 本研究課題では、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、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した。本研究において、複数の生活習慣病関連遺伝子、難治性疾患関連遺伝子に変異を有する遺伝子変異ラットを同定し、系統樹立に成功し、それら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、有用性の確認を行った。

分担研究者

海老原 健
京都大学大学院医学研究科
臨床研究総合センター 開発企画部
准教授

桑原 宏一郎
京都大学大学院医学研究科
循環器内科
講師

横井 秀樹
京都大学大学院医学研究科
腎臓内科
助教

富田 努
京都大学大学院医学研究科
糖尿内分泌栄養内科
特定病院助教

ているが、マウスはその小ささゆえに採血や組織採取(膵臓、中枢神経系)が困難であること、生理学的解析や移植実験が行ないにくいなどの問題がある。さらに、最近では代謝面においてヒトと大きく異なる生理的特徴が明らかとなった。そのため、マウスと比べ体のサイズが大きく、採血や組織採取や系統的な生理学的解析が容易で、移植実験も行ないやすく、代謝面でもよりヒトに近いラットでの疾患モデル確立が期待されている。しかし、現時点ではES細胞の技術がラットで未確立のため、遺伝子改変ラットの効率的な作成は不可能である。最近京都大学大学院医学研究科動物実験施設の真下らがENUミュータジェネシスに、新規DNAスクリーニング法(MuT-power)、凍結精子アーカイブからの個体復元技術(ICSI)という一連の新規技術を組み合わせることにより、標的遺伝子変異ラットの効率的な作成システム構築に成功した。また加えて、Zinc Finger Nuclease技術を用いて、任意の遺伝子に変異を有する遺伝子変異ラットを作製することも可能になった。本研究課題では、これらのシステムを用いて生活習慣病関連・難治性疾患遺伝子変異ラットを作成し、その表現系を解析することにより心筋梗塞、心不全、糖尿病、肥満、脳卒中、CKDなどの新規生活習慣病や脂肪萎縮性糖尿病などの難知性疾患のモデルラットを開発し、その詳細な解析を通して病態解明、新規治療標的の

A. 研究目的

現在生活習慣病関連疾患である心筋梗塞、心不全、糖尿病、脳卒中、慢性腎臓病(CKD)などの病態解明、新規治療標的の同定に基づく新規治療薬、治療法開発が強く望まれている。現時点において、これら疾患の病態解析、創薬開発、再生医療研究には遺伝子改変技術が確立されているマウスがモデル動物として多く用いられ

定を行なうと共に、このモデルを用いた新規創薬開発を加速させる基盤を樹立することを目的とする。

B. 研究方法

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スクリーニングおよびZinc Finger Nuclease技術により、レプチン、セイピン、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/C、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、C型ナトリウム利尿ペプチド遺伝子(CNP)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を有するラットを得、系統樹立を行った。引き続き、これらラットを用いて、その表現系解析を行い、モデル動物としての意義の確立と、創薬開発研究への

応用の可能性を検討した。

まず我々は、レプチン遺伝子ナンセンス変異ラットを得て、系統樹立し解析を行った。本レプチン遺伝子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、これら変異ラットにレプチンを投与したところ、上記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、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、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った。現在これら遺伝子の機能解析を進めているところである。一方でレプチン変異ラットとob/obマウスではチアゾリジン誘導体投与に対する反応が異なっていることも見出し、その背景に肝臓におけるPPAR γ 遺伝子発現のマウスとラットの間での種差が存在する可能性を見出した。ラットの肝臓におけるPPAR γ 遺伝子発現パターンはヒトのそれと類似しており、そのためレプチン変異ラットはマウスと比べてよりヒトに類似した表現型を示すことが示唆された。これらのことから本レプチン変異ラットが、ヒトの肥満およびその合併症に関わる種を超えて保存されている病態の解明に有用なモデルであることが示された。

脂肪委縮症の原因遺伝子であるセイピン遺伝子の変異ラットを得、その系統樹立を行い、さらにその表現型の解析を行った。本セイピン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

系を示していた。またセイピンノックアウトマウスでは報告されていない、精巣機能異常や認知機能低下などの表現形も本ラットにおいて見出した。ラットとマウスの差異の原因の一部はセイピン遺伝子発現分布の差によるものであることが示唆され、本セイピン変異ラットがマウスと比べ、ヒト脂肪委縮症のよりよいモデル動物である可能性が示された。

また我々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る変異を有するGC-A変異ラットの樹立に成功し、その解析を行った。GC-A変異ラットは野生型ラットと比べ特に体重や成長には差がなく、また血圧にも有意な差は得られなかった。また、これらラットにANPを投与してcGMPの反応を観察したところ、変異ラットと野生型ラットで有意な差は認められなかった。これらのことから、本GC-A遺伝子変異は有意な機能的変異を伴っていないことが明らかとなった。

ラミンA/Cの遺伝子はその変異がヒトにおいて拡張型心筋症の原因となることが知られている。我々はラミンA/Cの遺伝子にミスセンス変異を持つ変異ラットを同定し、系統樹立に成功した。本ラットは正常に生まれるが、生後12週前後で死亡した。心エコーでは心拡大及び、心機能低下が確認され、ヒトラミン心筋症と類似した表現型を示していることが確認された。本モデルはヒトラミン心筋症の良いモデル動物であると考えており、現在本ラットを用いて、表現型、分子メカニズムの解明研究を継続している。

加えて、我々はPPAR γ 遺伝子に変異を有するラットの同定、系統樹立にも成功した。本変異ラットはホモ接合体ではノックアウトマウスと同様に胎生致死であった。そこでPPAR γ 遺伝子変異ヘテロ接合体ラットの表現型解析を解析したところ、マウスでのPPAR γ ノックアウトとは一部異なる表現型を観察しえた。今後さらなる解析を継続し、本ラットのモデル動物としての意義の確立に努めたい。

さらに我々はZinc Finger Nuclease技術を用いて、BNPノックアウトラットおよびCNPノックアウトラットの系統樹立にも成功した。BNPノックアウトラットに関しては、Zinc Finger Nuclease技術を用いて、BNP遺伝子に変異を入

れた数系統のラットから、BNP遺伝子の2nd exonの大部分を結失した系統を樹立した。このラットの心臓組織、および心筋細胞では正常なBNP遺伝子発現およびBNP産生が見られないことを確認した。すでに我々の教室から発表した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を解析している。

CNPは骨形成に重要であり、その受容体の機能喪失型変異がヒトにおいて低身長をきたすマロトー型遠位中間肢異形成症の原因であることが示されている。我々はZinc Finger Nuclease技術を用いてCNPを欠失するラットの樹立にも成功した。CNPノックアウトラットは予想通り短軀であったが、CNPノックアウトマウスはそのほとんどが生後数週間以内に死亡するのに対して、CNPノックアウトラットは死亡することなく、成獣まで生存可能であることが明らかとなり、CNPの骨形成をはじめ様々な臓器における役割の成獣における解析が初めて可能となった。CNPは血管の機能維持にも重要であることを我々を含む複数の研究者が明らかにしており、本ラットモデルは、そうした心血管系におけるCNPの意義の解析にも有用であると考えられ、現在解析を継続している。

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。本研究において行った遺伝子変異ラットの樹立とその表現系解析から、本研究において得られた遺伝子変異ラットが、ヒト生活習慣病関連疾患・難治性疾患モデル動物として有用である可能性が確認された。今後上記遺伝子変異ラットの表現系の詳細を引き続き解析し、これら疾患のモデルラットの意義を確立することにより、共同研究なども通じて、病態解明・新規治療標的の同定および新規創薬開発への応用を目指したい。

E. 結論

生活習慣病・難治性疾患関連遺伝子に関して、ENU ミュータジェネシスによる約 1600 匹分のラットミュータントアーカイブの高速 DNA スクリーニングと Zinc Finger Nuclease 技術により、複数の関連遺伝子変異ラットの同定、系統樹立に成功し、その表現系を解析し、そのモデル動物としての意義を示した。今後、本研究において得られた遺伝子変異ラットの表現系をさらに詳細に解析し、疾患モデルラットとしての意義の確立と、病態解明・新規治療標的の同定研究と新規創薬開発研究へのさらなる応用を目指したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.

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.
5. 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
6. 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
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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 transpore induced in mildly pre-injured peritoneum by 3,4-dideoxyglucosone-3-ene in mice. **Perit. Dial. Int.** 33:143-154, 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.** 2013;8(1):e53233.
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** 2013. 99(10):677-679.
13. Hitomi T, Habu T, Kobayashi H, Okuda H, Harada KH, Osafune K, Taura D, Sone M, Asaka I, Ameku T, Watanabe A, Kasahara T, Sudo T, Shiota F, Hashikata H, Takagi Y, Morito D, Miyamoto S, Nakao K, Koizumi A. The moyamoya disease susceptibility variant RNF213 R4810K (rs112735431) induces genomic instability by mitotic abnormality **Biochem Biophys Res Commun.** 439(4):419-26.. 2013
14. Hitomi T, Habu T, Kobayashi H, Okuda H, Harada KH, Osafune K, Taura D, Sone M, Asaka I, Ameku T, Watanabe A, Kasahara T, Sudo T, Shiota F, Hashikata H, Takagi Y, Morito D, Miyamoto S, Nakao K, Koizumi A. Downregulation of Securin by the variant RNF213 R4810K (rs112735431, G>A) reduces angiogenic activity of induced pluripotent stem cell-derived vascular endothelial cells from moyamoya patients. **Biochem Biophys Res Commun.** 438(1):13-9. 2013
15. Honda K, Sone M, Tamura N, Sonoyama T, Taura D, Kojima K, Fukuda Y, Tanaka S, Yasuno S, Fujii T, Kinoshita H, Ariyasu H, Kanamoto N, Miura M, Yasoda A, Arai H, Ueshima K, Nakao K. Adrenal reserve function after unilateral adrenalectomy in patients with primary aldosteronism. **J Hypertens.** 31(10):2010-7. 2013
16. Aizawa-Abe M, Ebihara K, Ebihara C, Mashimo T, Takizawa A, Tomita T, Kusakabe T, Yamamoto Y, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Sakai T, Hosoda K, Serikawa T, Nakao K. Generation of leptin-deficient Lepmkyo/Lepmkyo rats and identification of leptin-responsive genes in the liver. **Physiol Genomics.** 45(17):786-93. 2013
17. Noguchi M, Hosoda K, Nakane M, Mori E, Nakao K, Taura D, Yamamoto Y, Kusakabe T, Sone M, Sakurai H, Fujikura J, Ebihara K, Nakao K. In vitro characterization and engraftment of adipocytes derived from human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. **Stem Cells Dev.** 22(21):2895-905. 2013
18. Fujikura J, Hosoda K, Nakao K. Cell transplantation therapy for diabetes mellitus: endocrine pancreas and adipocyte. **Endocr J.** 60(6):697-708. 2013
19. Kitamoto A, Kitamoto T, Mizusawa S, Teranishi H, So R, Matsuo T, Nakata Y, Hyogo H, Ochi H, Nakamura T, Kamohara S, Miyatake N, Kotani K, Komatsu R, Itoh N,

- Mineo I, Wada J, Yoneda M, Nakajima A, Funahashi T, Miyazaki S, Tokunaga K, Masuzaki H, Ueno T, Chayama K, Hamaguchi K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Sakata T, Tanaka K, Matsuzawa Y, Nakao K, Sekine A, Hotta K. NUDT3 rs206936 is associated with body mass index in obese Japanese women. **Endocr J.** 60(8):991-1000. 2013
20. Ida M, Hirata M, Odori S, Mori E, Kondo E, Fujikura J, Kusakabe T, Ebihara K, Hosoda K, Nakao K. Early changes of abdominal adiposity detected with weekly dual bioelectrical impedance analysis during calorie restriction. **Obesity** (Silver Spring). 21(9):E350-3. 2013
21. Bando M, Iwakura H, Ariyasu H, Koyama H, Hosoda K, Adachi S, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T. Overexpression of intraislet ghrelin enhances β -cell proliferation after streptozotocin-induced β -cell injury in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 305(1):E140-8. 2013
22. Uosaki H, Magadum 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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
27. 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.
28. 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
29. Kitamoto T, Kitamoto A, Yoneda M, Hyogo H, Ochi H, Nakamura T, Teranishi H, Mizusawa S, Ueno T, Chayama K, Nakajima A, Nakao K, Sekine A, Hotta K. Genome-wide scan revealed that polymorphisms in the PNPLA3, SAMM50, and PARVB genes are associated with development and progression of nonalcoholic fatty liver disease in Japan. **Hum Genet.** 132(7):783-92. 2013
30. Sone M, Nakao K. Vascular research using human pluripotent stem cells and humoral factors.

Endocr J. 60(4):397-402. 2013

31. Yamada-Goto N, Katsuura G, Ebihara K, Inuzuka M, Ochi Y, Yamashita Y, Kusakabe T, Yasoda A, Satoh-Asahara N, Ariyasu H, Hosoda K, Nakao K. Intracerebroventricular administration of C-type natriuretic peptide suppresses food intake via activation of the melanocortin system in mice. **Diabetes.** 62(5):1500-4. 2013
32. Hotta K, Kitamoto A, Kitamoto T, Mizusawa S, Teranishi H, So R, Matsuo T, Nakata Y, Hyogo H, Ochi H, Nakamura T, Kamohara S, Miyatake N, Kotani K, Itoh N, Mineo I, Wada J, Yoneda M, Nakajima A, Funahashi T, Miyazaki S, Tokunaga K, Masuzaki H, Ueno T, Chayama K, Hamaguchi K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Sakata T, Tanaka K, Matsuzawa Y, Nakao K, Sekine A. Replication study of 15 recently published Loci for body fat distribution in the Japanese population. **J Atheroscler Thromb.** 20(4):336-50. 2013
33. Sakai T, Kusakabe T, Ebihara K, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Zhao M, Gumbilai VM, Ebihara C, Aizawa-Abe M, Yamamoto Y, Noguchi M, Fujikura J, Hosoda K, Inagaki N, Nakao K. Leptin restores the insulinotropic effect of exenatide in a mouse model of type 2 diabetes with increased adiposity induced by streptozotocin and high-fat diet. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 307: E712-719, 2014.
34. 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.
35. 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
36. Yamada Y, Kinoshita H, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kuwabara Y, Minami T, Yamada C, Shibata J, Nakao K, Cho K, Arai Y, Yasuno S, Nishikimi T, Ueshima K, Kamakura S, Nishida M, Kiyonaka S, Mori Y, Kimura T, Kangawa K, Nakao K. Inhibition of N-type Ca^{2+} channels ameliorates an imbalance in cardiac autonomic nerve activity and prevents lethal arrhythmias in mice with heart failure **Cardiovascular Research** 2014 104(1):183-93.
37. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, Yasuno S, Kinoshita H, Kuwabara Y, Nakao K, Minami T, Yamada C, Ueshima K, Ikeda Y, Okamoto H, Horii K, Nagata K, Kangawa K, Minamino N, Nakao K. The Effects of Super-Flux (High Performance) Dialyzer on Plasma Glycosylated Pro-B-Type Natriuretic Peptide (proBNP) and Glycosylated N-Terminal proBNP in End-Stage Renal Disease Patients on Dialysis. **PLoS One.** 2014 Mar 25;9(3):e92314.
38. 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.
39. 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.
40. Tomita T, Hosoda K, Fujikura J, Inagaki N, Nakao K. The G-Protein-Coupled Long-Chain Fatty Acid Receptor GPR40 and Glucose Metabolism. **Front Endocrinol (Lausanne).** 2014. 5:152.

41. 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.

42. Ebihara C, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Mashimo T, Tomita T, Zhao M, Gumbilai V, Kusakabe T, Yamamoto Y, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Sakai T, Hosoda K, Serikawa T, Nakao K.

Seipin is necessary for normal brain development and spermatogenesis in addition to adipogenesis.

Hum Mol Genet. 2015 *in press* [Epub ahead of print]

2. 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
5. 中尾一和

心血管内分泌代謝学と Translational
Science

第 17 回日本心血管内分泌代謝学会
学術総会 大阪 2013 年 11 月 23 日

6. 中尾一和
レプチンの Translational Science と医
師主導治験—脂肪萎縮症を対象と
したレプチン補充治療の実用化—
第 34 回日本肥満学会 2013 年 10 月
11 日、東京
7. 中尾一和
レプチンの Translational Science と医
師主導治験—脂肪萎縮症を対象と
したレプチン補充治療の実用化—
第 47 回日本小児内分泌学会学術集
会 2013 年 10 月 11 日 東京
8. 中尾一和
生活習慣病の臨床医学研究 - 21 世
紀の第 2 四半期の予想 Translational
Science と臨床応用 京都から世界
へ
第 39 回京都医学会 2013 年 9 月 29
日 京都
9. 中尾一和
レプチンのトランスレーショナル
リサーチ～脂肪萎縮症の新しい治
療
トランスレーショナルサイエンス
学術講演会 2013 年 9 月 25 日 札
幌
10. 中尾一和
Translational Science と疾患モデル
動物
第 49 回高血圧関連疾患モデル学会
学術総会 2013 年 9 月 7 日 東京
11. 中尾一和
レプチンの **Translational Science** と
臨床研究者(医師)主導治験—脂肪
萎縮症を対象としたレプチン補充
治療の実用化—レギュラトリーサ
イエンス学会第 3 回学術大会 2013
年 9 月 6 日 東京
12. 中尾一和
家庭血圧測定の重要性と進歩
日本高血圧学会 生涯教育講演会
2013 in 京都 2013 年 7 月 20 日 京
都

13. 中尾一和
21 世紀の第 2 四半期における内分
泌代謝学の展望—疾患の変遷と
Translational Science—
第 31 回内分泌代謝学サマ—セミナ
— 2013 年 7 月 13 日 大分湯布院
14. 中尾一和
レプチンの **Translational Science** と
医師主導治験—脂肪萎縮症を対象
としたレプチン補充治療の実用化
—
第 10 回 GPCR 研究会 2013 年 5 月
10 日 東京
15. 中尾一和
内 分 泌 代 謝 領 域 に お け る
Translational Research の実践
第 51 回 日本臨床分子医学会
2014.4.11-12. 東京
16. 中尾一和
内分泌代謝学とトランスレーショ
ナルサイエンス
第 29 回日本内分泌学会東北地方会
14.9.13
17. 中尾一和
内分泌代謝学とトランスレーショ
ナルリサーチ
第 64 回日本薬学会近畿支部総会・
大会 2014.10.11

H. 知的財産権の出願・登録状況

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。3年間の研究において、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、それぞれレプチン、セイピン、PPAR γ 遺伝子に変異を有する遺伝子変異ラットを同定し、その系統樹立に成功し、表現型の解析、創薬研究におけるモデル動物としての有用性の確認を行った。本研究により、これら遺伝子変異ラットの動物モデルとしての有用性が示され、今後の創薬開発への可能性が示された。

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(臓腑、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目指すと共に、このモデルを用いた新規創薬開発の加速への貢献を目的とする。

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、代表的アディポサイトカインであるレプチンの遺伝子、脂肪委縮症の原因遺伝子の一つであるセイピン遺伝子、PPAR γ 遺伝子にそれぞれ変異を有する遺伝子変異ラットの同定を行い、その系統樹立に成功した。さらに、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、セイピン、PPAR gamma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、糖負荷試験において耐糖能異常、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、これら遺伝子の機能解析も行った。これらのことは本ラットが、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唆される。さらにレプチン遺伝子ナンセンス変異ラットに血糖降下薬として臨床で使用されているチアゾリジン誘導体を投与し、その反応をob/obマウスと比較した。レプチン遺伝

子ナンセンス変異ラット、ob/obマウスともにチアゾリジン誘導体投与により血糖値の改善、インスリン値の低下を認めたが、興味深いことに、レプチン遺伝子ナンセンス変異ラットでは肝臓重量の減少を認めたのに対し、ob/obマウスでは逆に肝臓重量が増加した。一方精巢周囲脂肪量はレプチン遺伝子ナンセンス変異ラットではチアゾリジン投与により有意に増加したが、ob/obマウスでは不変かやや減少する傾向にあった。このことは同じレプチン遺伝子変異動物であっても、ラットとマウスではチアゾリジン誘導体に対する反応に質的差異があることを示すものである。実際、チアゾリジン誘導体の標的であるPPARgammaの遺伝子発現を肝臓において検討したところ、ob/obマウスの肝臓では野生型に比してPPARgammaの発現が亢進しており、チアゾリジン誘導体によりさらに有意に発現が亢進したが、レプチン変異ラットでは野生型に比しむしろ発現が低下傾向にあり、チアゾリジン誘導体投与でも有意な変化を示さなかった。こうした臓器における代謝関連遺伝子発現の種差が、薬物治療に対する反応の差異に寄与するものと考えられた。チアゾリジン誘導体はヒトでは脂肪を増やし、脂肪肝を改善させる効果が認められることから、今回、ob/obマウスよりもレプチン遺伝子変異ラットのほうが、少なくともチアゾリジン誘導体への反応に関してはよりヒトに近いモデルである可能性が示唆され、レプチン変異ラットの肥満モデル動物としての有用性が確認できた。

一方、脂肪委縮症の原因遺伝子であるセイピン遺伝子の変異ラットの系統樹立にも成功し、その表現型解析を行った。セイピン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。また記憶機能の低下や精子形成能の低下など、セイピンノックアウトマウスでは報告されていないが、ヒトで認められるものと類似の表現形がセイピン変異ラットでは見出された。この表現型の差異の原因はマウスとラットにおけるセイピン遺伝子発現の差によるものではないかと考えられる。このことからセイピンノックアウトマウスより、セイピン遺伝子変異ラットのほうが、よりヒ

トの病気に近いモデルである可能性が示唆され、本セイピン変異ラットの動物モデルとしての有用性が示された。今後これらラットモデルを用いて更に詳細な解析を継続していく予定である。

さらに我々はPPAR γ 遺伝子に変異を有するラットの同定、系統樹立にも成功し、その解析も行った。本遺伝子変異ラットのホモ接合体はノックアウトマウスと同様に胎生致死を示し、機能喪失型の変異であることが示唆された。そこで、変異ヘテロ接合体ラットを用いてその表現型の解析を進め、耐糖能などの表現型において興味深いデータを得た。今後さらなる解析を継続し行う予定である。

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セイピン遺伝子変異ラットにおいて、その脂肪蓄積、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ことが示唆された。またPPAR γ 遺伝子変異ラットの作製にも成功し、同様にノックアウトマウスとの差異を見出しつつある。今後これら遺伝子変異ラット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に役立てていきたい。

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、レプチン、セイピン、PPAR γ 遺伝

子変異ラットの解析を行った。今後、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意義を確立し、病態解明・新規治療標的の同定と新規創薬開発への応用を行いたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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
2. 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
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Yamada-Goto N, Katsuura G, Ebihara K, Inuzuka M, Ochi Y, Yamashita Y, Kusakabe T, Yasoda A, Satoh-Asahara N, Ariyasu H, Hosoda K, Nakao K. Intracerebroventricular administration of C-type natriuretic peptide suppresses food intake via activation of the melanocortin system in mice.
Diabetes. 62(5):1500-4. 2013
7. Aizawa-Abe M, Ebihara K, Ebihara C, Mashimo T, Takizawa A, Tomita T, Kusakabe T, Yamamoto Y, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Sakai T, Hosoda K, Serikawa T, Nakao K. Generation of leptin-deficient Lep^{mkyo}/Lep^{mkyo} rats and identification of leptin-responsive genes in the liver.
Physiol Genomics. 45(17):786-93. 2013
8. Noguchi M, Hosoda K, Nakane M, Mori E, Nakao K, Taura D, Yamamoto Y, Kusakabe T, Sone M, Sakurai H, Fujikura J, Ebihara K, Nakao K. In vitro characterization and engraftment of adipocytes derived from human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells.
Stem Cells Dev. 22(21):2895-905. 2013
9. Ida M, Hirata M, Odori S, Mori E, Kondo E, Fujikura J, Kusakabe T, Ebihara K, Hosoda K, Nakao K. Early changes of abdominal adiposity detected with weekly dual bioelectrical impedance analysis during calorie restriction.
Obesity (Silver Spring). 21(9):E350-3. 2013
10. Sakai T, Kusakabe T, Ebihara K, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Zhao M, Gumbilai VM, Ebihara C, Aizawa-Abe M, Yamamoto Y, Noguchi M, Fujikura J, Hosoda K, Inagaki N, Nakao K. Leptin restores the insulinotropic effect of exenatide in a mouse model of type 2 diabetes with increased adiposity induced by streptozotocin and high-fat diet.
Am J Physiol Endocrinol Metab. 307: E712-719, 2014.
11. Ebihara C, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Mashimo T, Tomita T, Zhao M, Gumbilai V, Kusakabe T, Yamamoto Y, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Sakai T, Hosoda K, Serikawa T, Nakao K. Seipin is necessary for normal brain development and spermatogenesis in addition to adipogenesis.
Hum Mol Genet. 2015 *in press* [Epub ahead of print]

2. 学会発表 国際学会

1. M. Aizawa-Abe, K.Ebihara, C. Ebihara, T. Kusakabe, D.Aotani, V. Gumbilai, 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. Gumbilai, T. Mashimo, K. Nakao. Development of Leptin Deficient Rats-Evidence of Superiority Over Lepob/Lepob 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
 6. Ebihara C, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Tomita T, Kusakabe T, Yamamoto T, Aotani, D, Yamamoto-Kataoka S, Sakai T, Gumbilal V.M, Zhao M, Hosoda K, Nakao K.
The human lipodystrophy gene product, seipin plays physiological roles beyond the adipose tissue.
The Endocrine Society's 95th Annual meeting & Expo 2013.6.15-18, San Francisco, California, USA
 7. Nakao K, Hosoda K, Ebihara K, Kusakabe T, Aizawa-Abe M, Aotani D.
Impact of successful leptin replacement therapy in Japan on adult and child, systemic and partial lipodystrophy.
The 2013 Obesity Week 2013.11.11-16, Atlanta, Georgia, USA
 8. Aotani D, Ebihara K, Kusakabe T, Aizawa-Abe M, Kataoka S, Sakai, T, Ebihara C, Hosoda K, Nakao K.
The role of neuromedin U in glucose homeostasis.
The 2013 Obesity Week 2013.11.11-16, Atlanta, Georgia, USA
 9. Sakai T, Ebihara K, Kusakabe, T Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Ebihara C, Aizawa-Abe M, Fujikura J, Hosoda K, Nakao K.
Effect of exenatide, a GLP-1 receptor agonist, on anti-diabetic effects of leptin in a mouse model of type 2 diabetes with increased adiposity.
The 36th Naito Conference 2013.9.10-13, SAPPORO
 10. Chihiro Ebihara, Ken Ebihara, Megumi Aizawa-Abe, Yuji Yamamoto, Sachiko Yamamoto-Kataoka, Mingming Zhao, Valentino Gumbilal, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao
Improvement effect of thiazolidine on fatty liver and type 2 diabetes requires adipose tissue: An evidence from the comparison between mice and rats
The Endocrine Society's 96th Annual Meeting 2014年6月22日 米国、シカゴ
 11. Ken Ebihara, Megumi Aizawa-Abe, Kiminori Hosoda, Toru Kusakabe, Daisuke Aotani, Kazuwa Nakao.
Translational Research of Leptin for Lipodystrophy in Japan.
Lipodystrophy in 2014: Leptin and Beyond 2014年10月18日 米国、アナーバー
 12. Chihiro Ebihara, Ken Ebihara, Megumi Aizawa-Abe, Tomoji Mashimo, Tsutomu Tomita, Mingming Zhao, Valentino Gumbilal, Yuji Yamamoto, Sachiko Yamamoto-Kataoka, Kiminori Hosoda, Tadao Serikawa, Kazuwa Nakao
The human lipodystrophy gene product, seipin plays physiological roles in the brain development and spermatogenesis in addition to the adipogenesis
Lipodystrophy in 2014: Leptin and Beyond 2014年10月17日~18日 米国、アナーバー
 13. Chihiro Ebihara, Ken Ebihara, Megumi Aizawa-Abe, Mingming Zhao, Valentino Gumbilal, Yuji Yamamoto, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao
Pathophysiological role of *Bscl2/Seipin* haploinsufficiency in adiposity and metabolism

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 Gumbilal、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族差の検討
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臍島での
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
応とオピエイト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
41. 海老原健
脂肪細胞由来ホルモン、レプチンのトランスレショナルリサーチ
第 86 回 日本内分泌学会学術総会 2013. 4. 25- 27 仙台市
42. 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
43. 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
44. 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
45. 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
46. 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
47. 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
48. 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
49. 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^{mkyo}/Lep^{mkyo} 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
50. 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

45. 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
46. 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
47. 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 (SK0) 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 is 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 molecular forms of B-type natriuretic peptide in heart failure. **Heart** 2013. 99(10):677-679.
5. Uosaki H, Magadum 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^{2+} 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^{2+} channels ameliorates an imbalance in cardiac autonomic nerve activity and prevents lethal arrhythmias in mice with heart failure **Cardiovascular Research** 2014 104(1):183-93.
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 18th 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 18th 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

5th 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 Kinoshita¹⁾, Yoshihiro Kuwabara, Kazuhiro Nakao, Chinatsu Yamada, Kenji Ueshima, Naoto Minamino, Takeshi Kimura, Kazuwa Nakao

Significance of O-glycosylation in proBNP processing
The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014/9/10-12
Kyoto

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、栗原佳宏、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 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 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, 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 Ca²⁺チャネル阻害は自律神経バランスを改善し突然死を予防する
第 37 回 日本高血圧学会総会 2014.10.17-19. 横浜、神奈川
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

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. 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, Koefler 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 β 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 glucolipototoxicity 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
Megalin-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 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

1. 加藤有希子、向山政志、横井秀基、森 潔、笠原正登、小川喜久、桑原孝成、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

2. 戸田尚宏、横井秀基、笠原正登、森 潔、桑原孝成、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

3. 加藤有希子、向山政志、横井秀基、森 潔、笠原正登、小川喜久、桑原孝成、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

4. 戸田尚宏、横井秀基、笠原正登、森 潔、桑原孝成、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、桑原孝成、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 Ca²⁺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- β /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

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セイピン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還元技術ICSIを用いて標的遺伝子変異ラット系統樹立に成功し、糖脂質代謝、膵分泌能を中心に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と摂食量の亢進をみとめた。レプチン遺伝子ナンセンス変異ラットに糖負荷試験を行った結果、血中グルコース濃度高値、高インスリン血症を認め、耐糖能の異常、インスリン抵抗性の存在が確認された。また、中性脂肪高値、遊離脂肪酸高値、総コレステロール値高値などの脂質異常も見出された。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。本変異ラットの膵頭におけるGPR40、Pdx1の遺伝子発現を検討したところ、いずれも約50%に低下していた。このことから本レプチン遺伝子変異ラットの食後高血糖、インスリン初期分泌低下にこれら遺伝子産物の発現低下が関与する可能性が示唆された。一方、脂肪委縮症の原因遺伝子であるセイピン遺伝子の変異ラットの解析も行い、ヒト脂肪委縮症に類似した脂肪減少、脂肪肝、糖代謝異常を認めた。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セイピン遺伝子変異ラットにおいて代謝パラメーターの解析においてより安定した結果を得られること、また、膵組織の詳細な組織学的解析および分子生物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への応用を進めていきたい。

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、その中でレプチンおよびセイピン遺伝子変異ラットの表現系、特に糖代謝および膵島の遺伝子発現の解析を行い、本遺伝子変異ラットのモデル動物としての有用性を示した。今後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への応用を進めていきたい。

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. Aizawa-Abe M, Ebihara K, Ebihara C, Mashimo T, Takizawa A, Tomita T, Kusakabe T, Yamamoto Y, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Sakai T, Hosoda K, Serikawa T, Nakao K.

Generation of leptin-deficient Lepmkyo/Lepmkyo rats and identification of leptin-responsive genes in the liver.

Physiol Genomics. 45(17):786-93.2013

3. Odori S, Hosoda K, Tomita T, Fujikura J, Kusakabe T, Kawaguchi Y, Doi R, Takaori K, Ebihara K, Sakai Y, Uemoto S, Nakao K. GPR119 expression in normal human tissues and islet cell tumors: evidence for its islet-gastrointestinal distribution, expression in pancreatic beta and alpha cells, and involvement in islet function.

Metabolism. 62(1):70-8.2013

4. Tomita T, Hosoda K, Fujikura J, Inagaki N, Nakao K.

The G-Protein-Coupled Long-Chain Fatty Acid Receptor GPR40 and Glucose Metabolism.

Front Endocrinol (Lausanne). 2014. 5:152.

2. 学会発表

国際学会

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. 冨田努, 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, 冨田努, 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, 冨田努, 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連関

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, 冨田努, 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, 冨田努, 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, 榎田出, 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, 冨田努, 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. 冨田努, 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. 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
17. 内藤雅喜, 藤倉純二, 森栄作, 小鳥真司, 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 (LepTg) マウスにおけるレプチン感受性の検討
第 34 回日本肥満学会、2013.10.11-12、東京都
18. 富田努, 細田公則, 小鳥真司, 藤倉純二, 海老原健, 中尾一和
膜型脂質受容体 GPR40 の遺伝性肥満 Koletsky ラット膵島での発現調節とその意義
第 34 回日本肥満学会、2013.10.11-12、東京都

19. 山下貴裕、森栄作、藤倉純二、野口倫生、富田努、孫徹、横井秀基、日下部徹、海老原健、細田公則、中尾一和
腎性浮腫との鑑別を要した Lipoedema の一例
第 34 回日本肥満学会、2013.10.11-12、東京都
20. 富田努
G 蛋白共役型—脂肪酸受容体 GPR40 の肥満・糖尿病での発現調節と意義
第 50 回日本糖尿病学会近畿地方会・第 49 回日本糖尿病協会近畿地方会、2013.11.23、京都市
21. 小鳥真司、富田努、藤倉純二、日下部徹、海老原健、細田公則、河野茂夫、中尾一和
G 蛋白共役型 - 脂質受容体 GPR119 の臨床的意義：ヒトの臍島および臍島細胞腫瘍における遺伝子発現と臍島機能との関連
第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013.5.16-18、熊本
22. 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 - 脂肪酸受容体 GPR40 の糖尿病における発現調節と意義
第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013.5.16-18、熊本
23. 内藤雅喜、藤倉純二、野口倫生、富田努、日下部徹、孫徹、海老原健、細田公則、中尾一和
1 型糖尿病モデルマウスにおける高レプチン血症の影響
第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013.5.16-18、熊本
24. 吉良友里、富田努、細田公則、藤倉純二、海老原千尋、阿部恵、海老原健、中尾一和、稲垣暢也
新規の遺伝性肥満モデル *mkyo/mkyo* ラット臍島における脂質受容体

GPR40 の遺伝子発現調節

第 88 回日本内分泌学会学術総会、2014.4.23-25、仙台国際センター

25. 吉良友里、富田努、細田公則、藤倉純二、海老原千尋、阿部 恵、海老原健、中尾一和、稲垣暢也
新規の遺伝性肥満モデル *mkyo/mkyo* ラット臍島における脂質受容体 GPR40 の遺伝子発現調節
第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、2015.5.21-24、山口県下関市

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
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	1198-209	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 in crucial for pathological vascular remodelling in mice.	EMBO J	31	4428-40	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	160-9	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	2256-66	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	40441-7	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	2573-9	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	3663-71	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	1120-5	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	E924-31	2012
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 transpore induced in mildly pre-injured peritoneum by 3,4-dideoxyglucosone-3-ene in mice.	Perit Dial Int	33	143-54	2013
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	99	677-9	2013
Hitomi T, Habu T, Kobayashi H, Okuda H, Harada KH, Osafune K, Taura D, Sone M, Asaka I, Ameku T, Watanabe A, Kasahara T, Sudo T, Shiota F, Hashikata H, Takagi Y, Morito D, Miyamoto S, Nakao K, Koizumi A.	The moyamoya disease susceptibility variant RNF213 R4810K (rs112735431) induces genomic instability by mitotic abnormality	Biochem Biophys Res Commun	439	419-26	2013
Hitomi T, Habu T, Kobayashi H, Okuda H, Harada KH, Osafune K, Taura D, Sone M, Asaka I, Ameku T, Watanabe A, Kasahara T, Sudo T, Shiota F, Hashikata H, Takagi Y, Morito D, Miyamoto S, Nakao K, Koizumi A.	Downregulation of Securin by the variant RNF213 R4810K (rs112735431, G>A) reduces angiogenic activity of induced pluripotent stem cell-derived vascular endothelial cells from moyamoya patients.	Biochem Biophys Res Commun	438	13-9	2013
Honda K, Sone M, Tamura N, Sonoyama T, Taura D, Kojima K, Fukuda Y, Tanaka S, Yasuno S, Fujii T, Kinoshita H, Ariyasu H, Kanamoto N, Miura M, Yasoda A, Arai H, Ueshima K, Nakao K.	Adrenal reserve function after unilateral adrenalectomy in patients with primary aldosteronism.	J Hypertens	31	2010-7	2013
Aizawa-Abe M, Ebihara K, Ebihara C, Mashimo T, Takizawa A, Tomita T, Kusakabe T, Yamamoto Y, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Sakai T, Hosoda K, Serikawa T, Nakao K.	Generation of leptin-deficient Lepmkyo/Lepmkyo rats and identification of leptin-responsive genes in the liver.	Physiol Genomics	45	786-93	2013

Noguchi M, Hosoda K, Nakane M, Mori E, Nakao K, Taura D, Yamamoto Y, Kusakabe T, Sone M, Sakurai H, Fujikura J, Ebihara K, Nakao K.	In vitro characterization and engraftment of adipocytes derived from human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells.	Stem Cells Dev	22	2895-905	2013
Fujikura J, Hosoda K, Nakao K	Cell transplantation therapy for diabetes mellitus: endocrine pancreas and adipocyte.	Endocr J	60	697-708	2013
Kitamoto A, Kitamoto T, Mizusawa S, Teranishi H, So R, Matsuo T, Nakata Y, Hyogo H, Ochi H, Nakamura T, Kamohara S, Miyatake N, Kotani K, Komatsu R, Itoh N, Mineo I, Wada J, Yoneda M, Nakajima A, Funahashi T, Miyazaki S, Tokunaga K, Masuzaki H, Ueno T, Chayama K, Hamaguchi K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Sakata T, Tanaka K, Matsuzawa Y, Nakao K, Sekine A, Hotta K.	NUDT3 rs206936 is associated with body mass index in obese Japanese women.	Endocr J	60	991-1000	2013
Ida M, Hirata M, Odori S, Mori E, Kondo E, Fujikura J, Kusakabe T, Ebihara K, Hosoda K, Nakao K.	Early changes of abdominal adiposity detected with weekly dual bioelectrical impedance analysis during calorie restriction.	Obesity	21	E350-3	2013
Bando M, Iwakura H, Ariyasu H, Koyama H, Hosoda K, Adachi S, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T.	Overexpression of intraslet ghrelin enhances β -cell proliferation after streptozotocin-induced β -cell injury in mice.	Am J Physiol Endocrinol Metab	305	E140-8	2013
Uosaki H, Magadum 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	624-33	2013
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	1384-95	2013

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	256-67	2013
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	E000150	2013
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	657-64	2013
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
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	544-53	2013
Kitamoto T, Kitamoto A, Yoneda M, Hyogo H, Ochi H, Nakamura T, Teranishi H, Mizusawa S, Ueno T, Chayama K, Nakajima A, Nakao K, Sekine A, Hotta K.	Genome-wide scan revealed that polymorphisms in the PNPLA3, SAMM50, and PARVB genes are associated with development and progression of nonalcoholic fatty liver disease in Japan.	Hum Genet	132	783-92	2013
Sone M, Nakao K	Vascular research using human pluripotent stem cells and humoral factors	Endocr J	60	397-402	2013
Yamada-Goto N, Katsuura G, Ebihara K, Inuzuka M, Ochi Y, Yamashita Y, Kusakabe T, Yasoda A, Satoh-Asahara N, Ariyasu H, Hosoda K, Nakao K.	Intracerebroventricular administration of C-type natriuretic peptide suppresses food intake via activation of the melanocortin system in mice.	Diabetes	62	1500-4	2013

Hotta K, Kitamoto A, Kitamoto T, Mizusawa S, Teranishi H, So R, Matsuo T, Nakata Y, Hyogo H, Ochi H, Nakamura T, Kamohara S, Miyatake N, Kotani K, Itoh N, Mineo I, Wada J, Yoneda M, Nakajima A, Funahashi T, Miyazaki S, Tokunaga K, Masuzaki H, Ueno T, Chayama K, Hamaguchi K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Sakata T, Tanaka K, Matsuzawa Y, Nakao K, Sekine A.	Replication study of 15 recently published Loci for body fat distribution in the Japanese population.	J Atheroscler Thromb	20	336-50	2013
Sakai T, Kusakabe T, Ebihara K, Aotani D, Yamamoto-Kat aoka S, Zhao M, Gumbilai VM, Ebihara C, Aizawa-Ab e M, Yamamoto Y, Noguchi M, Fujikura J, Hosoda K, Ina gaki N, Nakao K	Leptin restores the insulinotropic effect of exenatide in a mouse model of type 2 diabetes with increased adiposity induced by streptozotocin and high-fat diet.	Am J Physiol Endocrinol Metab	307	E712-719	2014
Tanaka M, Yamaguchi S, Yamazaki Y, Kinoshita H, Kuwahara K, Nakao K, Jay PY, Noda T, Nakamura T.	Somatic chromosomal translocation between <i>Ewsr1</i> and <i>Fli1</i> loci leads to dilated cardiomyopathy in a mouse model	Sci Rep	5	7826	2015
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
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, Kanga wa K, Nakao K	Inhibition of N-type Ca ²⁺ channels ameliorates an imbalance in cardiac autonomic nerve activity and prevents lethal arrhythmias in mice with heart failure	Cardiovascular Research	104	183-93	2014
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, Kan gawa 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	9	e92314	2014

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
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
Tomita T, Hosoda K, Fujikura J, Inagaki N, <u>Nakao K.</u>	The G-Protein-Coupled Long-Chain Fatty Acid Receptor GPR40 and Glucose Metabolism.	Front Endocrinol	5	152	2014
Kanda J, Mori K, Kawabata H, Kuwabara T, Mori KP, Imamaki H, Kasahara M, Yokoi H, Mizumoto C, Thoennisen 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	2014
Ebihara C, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Mashimo T, Tomita T, Zhao M, Gumbilai V, Kusakabe T, Yamamoto Y, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Sakai T, Hosoda K, Serikawa T, Nakao K.	Seipin is necessary for normal brain development and spermatogenesis in addition to adipogenesis.	Hum Mol Genet		In press	2015