

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590911

研究課題名（和文）SHRSP コンジェニックラットを用いたストレス性高血圧遺伝子探索

研究課題名（英文）Search for genes responsible for stress-induced hypertension in SHRSP congenic rats.

研究代表者 並河 徹 (NABIKI TORU)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：50180534

研究成果の概要（和文）：stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP)は遺伝的に重症高血圧を発症するモデルラットである。これまでの研究でその第1染色体上に血圧のストレス反応性に関与する遺伝子が存在することが明らかとなった。そこで本研究では、この遺伝子を同定することを目標に、その存在領域を1.2Mbpまで狭めるとともに、その領域内に、有力な候補遺伝子としてSHRSPでtruncationのある遺伝子を同定した。

研究成果の概要（英文）：The stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP) is a genetic model rat for essential hypertension. We previously identified that a region of chromosome 1 harbored a gene (or genes) responsible for exaggerated stress response in SHRSP. In the present study, we narrowed down the region to 1.2 Mbp and found a strong candidate gene that had a truncation in SHRSP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：高血圧、モデルラット、遺伝

1. 研究開始当初の背景

本態性高血圧は複数の遺伝素因と環境因子が複合して発症に関与しているが、その環境要因のひとつとしてストレスの重要性が古くから指摘されている。近年の社会的変化でストレスの影響が大きくなっており、ストレス性高血圧の1形態として「職場高血圧」の臨床的意義も問題となっている。stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP)は遺伝的に重症高血圧と脳卒中を発症するモデ

ルラットであるが、飼育条件によって脳卒中発症頻度が変化するなど、ストレス感受性の高い高血圧モデルであることが知られている。我々は、このSHRSPにおいて第1染色体に高血圧遺伝子の存在する領域を見出し、正常血圧のWKYラットをもとに、この領域だけをSHRSPのゲノムと組み換えたChr1コンジェニックラット(WKYpch1.0)を作成した。このコンジェニックを用いた検討から、この染色体領域が、種々のストレスに対する交感神経系の

反応性亢進を引き起こしていることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、この「ストレス感受性遺伝子」を同定することを最終的な目標とし、①その存在領域を可能な限り絞り込む、②その領域内に存在する遺伝子について、遺伝子発現解析と遺伝子配列の検討により、候補となる遺伝子を捜すことを目的とした。

3. 研究の方法

①SHRSP と WKY を戻し交配し、第 1 染色体上の特定の領域のみをこの 2 系統間で入れ換えたコンジェニックラットを作成した (図 1)。これをさらに戻し交配し、より狭い領域を有する複数のサブコンジェニックラットを作成した。

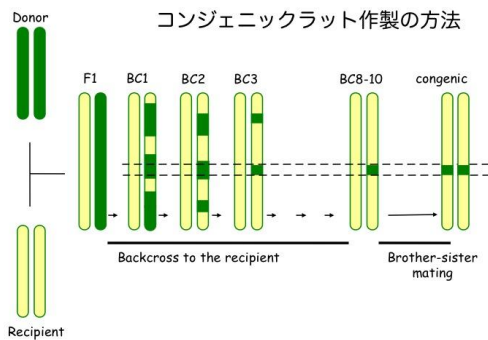


図 1

②これらのサブコンジェニックラットと、そのもととなった SHRSP, WKY を用いて、(a) radio-telemetry を用いて、非拘束無麻酔下で血圧を連続的にモニターし、これらのラットに拘束ストレス、寒冷ストレスをかけたときの血圧上昇の程度について検討する、(b) radio-telemetry を用いて心拍数をモニターし、その変動のフーリエ解析により、相対的な交感神経活性の拘束ストレス、寒冷ストレス下での変化を検討する、(c) 寒冷ストレス下での尿中ノルアドレナリン排泄量を検討する、の 3 種類の異なる指標を用いて交換神経活性を評価した。

③上記の結果絞り込まれた 1.2Mbp の領域内にある遺伝子について、脳幹での遺伝子発現と、蛋白質翻訳領域内での遺伝子変異の有無について RT-PCR, genome sequencing にて検討し、SHRSP と WKY の差を説明できる遺伝子がないかを検討した。

4. 研究成果

①戻し交配により、SHRSP のゲノムを背景として、WKY 由来の第 1 染色体小断片を挿入し

た 2 種類のサブコンジェニック系統 (SPwch1.71, 1.72) を作成した (図 2)。

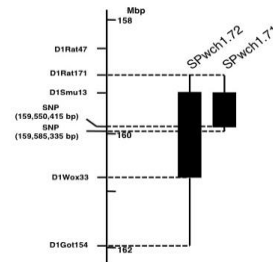


図 2

これらを用いて、ストレスに対する反応性を検討したところ、

①SPwch1.71 は、拘束ストレス、寒冷ストレスに対する血圧上昇が SHRSP と変わらなかったのに対し、SPwch1.72 では有意に低下していた (寒冷ストレスに対する反応を図 3 に示す)。

寒冷ストレスに対する反応

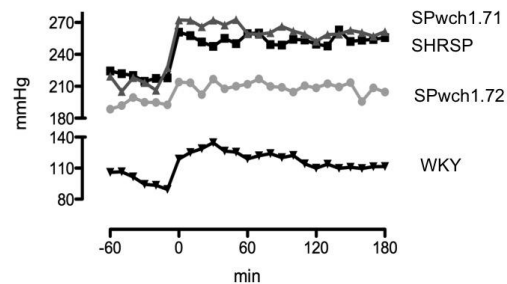


図 3

②SPwch1.71 では、心拍数の変動解析によって、相対的な交感神経活性のストレス下での上昇が SP と同程度であったのに対して、SPwch1.72 では有意に低かった。

③寒冷ストレス下での尿中ノルアドレナリン排泄が SP に比べて SPwch1.72 では有意に低かったが、SPwch1.71 では差がなかった。という結果を得た。このことは、SPwch1.71 がもつ WKY 由来の断片上にはストレス反応性にかかわる遺伝子は存在せず、SPwch1.72 と 1.71 の差に相当する染色体領域に存在することを示唆している (図 4)。

1.2Mbp のこの領域に焦点を絞って、そこに存在する遺伝子について検討を行った。この領域には表 1 に示すように、17 個の遺伝子の存在が知られている。しかし、そのうちの 8 個についてはアノテーションがつかって

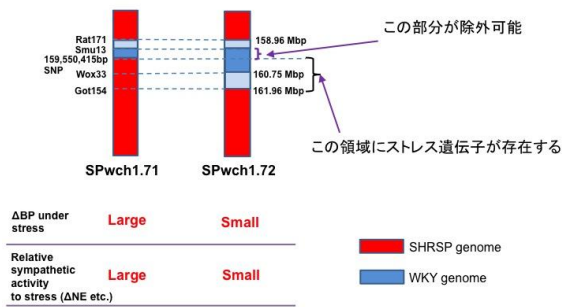


図 4

ず、遺伝子としての機能が不明なものであった。そこで、残りの 9 個の遺伝子について、脳幹での発現を WKY, SHRSP で比較するとともに、蛋白質翻訳領域のシーケンス解析を行った。

表 1 この領域内に存在する遺伝子

RGD_ID	Symbol	Annotation
628819	Tnc2	Transient receptor potential cation channel, subfamily G, member 2
1598289	LOC395319	Hypothetical LOC395319
628834	Arl5	ADP-ribosyltransferase 5
1304951	Arl1	ADP-ribosyltransferase 1
629142	Chna10	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 10
71053	Huqf8	Huqf8 protein 8B
619744	Pgag2	Polysialylphosphatidylinositol attachment to proteins 2
621510	Rtag	via homolog gene family, member G (Rtag G)
1592628	LOC688521	Hypothetical protein LOC688521
2231095	LOC100390965	Ribosomal protein S29-like
1306831	Stm1	Stromal interaction molecule 1
2300483	LOC100381270	Ribonucleotide reductase M1
1562403	RGD1081403	Similar to glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)
1300795	Twd1	Tripartite motif-containing 21
1590919	LOC293190	Similar to Bcl-2-like 1 isoform 3
1560664	RGD1800664	Similar to high mobility group protein 1-like 10 (HMGB-1L10)
2302319	LOC100381348	Hypothetical LOC100381348

RGD: Rat Genome Database. Source: rgd.mcw.edu.

その結果、4つの遺伝子は脳幹での発現がなく、除外することができた。脳幹での遺伝子発現を室温での定常状態と寒冷ストレスに暴露した状態で WKY, SHRSP 間の比較を行ったところ、いずれも系統間での差がないか、あっても marginal なものであり、生理学的に有意な差とは考えにくかった。

これに対して、蛋白質翻訳領域のシーケンスを行ったところ、2つの遺伝子において SHRSP がアミノ酸をコードする部分がストップコドンに変わるナンセンス変異を持つことが明らかとなった。そのうちのひとつは脳幹での発現がみられないものであったことから、残るひとつの遺伝子がストレス感受性を決める遺伝子の有力な候補と考えられた。この遺伝子のコードする蛋白質は、このナンセンス変異によって SHRSP で C 末端側が短くなっていることをウエスタンブロットにて確認できた。

現在、これらの結果について論文投稿準備中である。また、この変異が遺伝子機能におよぼす影響について検討を行っている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- 1) Gandolgor TA, Cui ZH, Nabika T (他 7 名, 10 番目): Two genomic regions of chromosome 1 and 18 explain most of the stroke susceptibility under salt loading in stroke-prone spontaneously hypertensive rat/Izm. Hypertension. 査読有り, 2013;in press.
- 2) Yao H, Nabika T.: Standards and pitfalls of focal ischemia models in spontaneously hypertensive rats: With a systematic review of recent articles. J Transl Med. 査読有り, 2012;10:139. doi:10.1186/1479-5876-10-139.
- 3) Nabika T, (他 3 名, 1 番目): The stroke-prone spontaneously hypertensive rat: still a useful model for post-GWAS genetic studies? Hypertens Res. 査読有り, 2012;35:477-84. doi: 10.1038/hr.2012.30.
- 4) Hashimoto M, Nabika T (他 5 名, 3 番目): Effects of hydrogen-rich water on abnormalities in a SHR. Cg - Leprcp/NDmcr rat - a metabolic syndrome rat model. Med Gas Res. 査読有り, 2011;1:26. doi: 10.1186/2045-9912-1-26.
- 5) Xiao B, Harada Y, Kawakami K, Nabika T.: A 1.8-Mbp fragment on chromosome 1 affects sympathetic response to stress: evaluation in reciprocal congenic strains between stroke-prone spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat. J Hypertens. 査読有り, 2011;29:257-65. doi: 10.1097/HJH.0b013e32834137cd.
- 6) Yao H, Nabika T.: Characterizing photothrombotic distal middle cerebral artery occlusion and YAG laser-induced reperfusion model in the Izumo strain of spontaneously hypertensive rats. Cell Mol Neurobiol. 査読有り, 2011;31:57-63. doi: 10.1007/s10571-010-9553-5.
- 7) Sakurai-Yamashita Y, Nabika T, Niwa M.: Blood pressure-independent factors determine the susceptibility to delayed neuronal death in the stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Cell Mol Neurobiol. 査読あり, 2010;30:283-7.

〔学会発表〕(計 20 件)

- 1) 並河 徹: 遺伝的モデルラット SHRSP を用いた高血圧, 脳卒中遺伝子の探索. 第 58 回日本病理学会秋期特別総会. 2012 年 11 月 22 日. ウィンクあいち (名古屋市)
- 2) Nabika T: The prospect for animal research in Japan-Disease models beyond SHR ~ . Cardiovascular Genetics Symposium2012. 15th International SHR Symposium 48th Japanese SHR SHR Meeting. 2012 年 9 月 27 日. Melbourne Brain Cnter. Melbourne (Australia)
- 3) Ohara H, Ferdaus Zubaerul Mohammed, Isomura M, Nabika T: Search for the genes responsible for exaggerated sympathetic response to stress in SHRSP: genetic and molecular biological approach using congenic strains. Cardiovascular Genetics Symposium2012. 15th International SHR Symposium 48th Japanese SHR SHR Meeting. 2012 年 9 月 27 日. Melbourne Brain Cnter. Melbourne (Australia)
- 4) 八尾 博史, 並河 徹: 食塩前負荷により中大脳動脈閉塞による脳梗塞は血圧変動を伴わずに増大する: 高血圧自然発症ラットとダブルコンジェニックラットを用いた検討. 第 35 回日本高血圧学会総会. 2012 年 9 月 22 日. ウェスティンナゴヤキャッスル (名古屋市)
- 5) 並河 徹, 大原 浩貴: SHRSP の遺伝的脳卒中感受性の殆どは 2 つの染色体領域で決定される. 第 35 回日本高血圧学会総会. 2012 年 9 月 20 日. ウェスティンナゴヤキャッスル (名古屋市)
- 6) 大原浩貴, 並河 徹: ストレス感受性から見た SHRSP における高血圧原因遺伝子の探索. 第 35 回日本高血圧学会総会. 2012 年 9 月 20 日. ウェスティンナゴヤキャッスル (名古屋市)
- 7) Xiao B, Ohara H, Zubaerul F, Kawakami K, Isomura M, Nabika T: Further Refinement of the Quantitative Trait Locus Regulating Sympathetic Response in the Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat. 22nd European Meeting on Hyertension and cardiovascular Protection. 2012 年 4 月 27 日. ExCeL London. London (England)
- 8) 大原浩貴, 並河 徹: SHRSP の脳卒中感受性は 2 つの染色体領域に起因する: double congenic 系統での検討. 第 34 回日本高血圧学会総会. 2011 年 10 月 20 日. 栃木県総合文化センター (宇都宮市)
- 9) 小川淑子, ツェンデアユーシ ガンドルゴル, 大原浩貴, 島田大輝, 川上浩平, 崔 宗虎, 並河 徹: 第 1, 18 染色体上の QTL は SHRSP の脳卒中感受性の大部分を説明する. 第 47 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会. 2011 年 9 月 7 日. 北海道大学 (札幌市)
- 10) Ferdaus MZ, Xiao B, Ohara H, Kawakami K, Nabika T: Further refinement of the QTL regulating sympathetic stress-response in SHRSP. 第 47 回高血圧関連疾患モデル学会総会, 2011 年 9 月 7 日. 北海道大学 (札幌市)
- 11) 並河 徹, 崔 宗虎, 小川淑子, Tsend-Ayush Gandolgor, 島田大輝, 川上浩平, 大原浩貴, 磯村 実: 遺伝解析に基づく新たなモデルラット作成: congenic strategy からの展開. 第 47 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会. 2011 年 9 月 6 日. 北海道大学 (札幌市)
- 12) Nabika T, Cui ZH, Ogawa T, Gandolgor TA, Kawakami K, Ohara H: Synergic Efect of Two Qtls on chromosome 1 and 18 Accounts for the Difference of Stroke-Susceptibility Between SHR and SHRSP; A Sutudy on Double-Congenic Strains. 21st European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Prevention. 2011 年 6 月 18 日. MICO Milano Congressi. Milano (Italy)
- 13) ツェンデアユーシ ガンドルゴル, 小川淑子, 大原浩貴, 崔 宗虎, 並河 徹: SHRSP 由来の第 1, 18 染色体領域は相乗的に SHR の脳卒中感受性を亢進させる. 第 58 回日本実験動物学会総会. 2011 年 5 月 26 日. タワーホール船堀 (東京都江戸川区)
- 14) Xiao B, Nabika T: Effect of a 1.8-Mbp genomic fragment on chromosome 1 on sympathetic response to stressors:

Evaluation in reciprocal congenic strains between SHRSP and WKY. The X VIII th International Workshop on Genetic Systems in the Rat. 2010年12月1日. 京都大学 (京都市)

15) Cui ZH, Ogawa T, Gandolgor T-A, Xiao B, Kawakami K, Nabika T: Synergic effect of two QTLs on chromosome 1 and 18 accounts for the difference of stroke-susceptibility between SHR and SHRSP; A study on a double-congenic strain. The X VIII th International Workshop on Genetic Systems in the Rat. 2010年12月1日. 京都大学 (京都市)

16) 並河 徹: ラット第1染色体上の1.5Mbpの領域がSHRSPのストレス反応性に関与する. 第33回日本高血圧学会総会. 2010年10月16日. 福岡国際会議場 (福岡市)

17) Xiao B, Nabika T: Effect of a small genomic fragment on chromosome 1 on sympathetic response to stressors: Evaluation in reciprocal congenic strains between SHRSP and WKY. 6th International ISP Congress and 14th International SHR Symposium. 2010年9月23日. Palais des Congres. Montreal (Canada)

18) Nabika T, Yasui N, Notsu Y, Njelekela M, Nara Y, Yamori Y, Ikeda K: Association of the plasma ARG/ADMA ratio with the salt-sensitivity. 20th European Meeting on Hypertension. 2010年6月20日. Norway Exhibition & Convention Center. Oslo (Norway)

19) Xiao B, Nabika T: Effects of small genomic fragment on chromosome 1 on the sympathetic reactivity to stresses: Evaluation in the reciprocal congenic strains between WKY and SHRSP. 第57回日本実験動物学会総会. 2010年5月13日. 京都テルサ (京都市)

20) 崔 宗虎, 並河 徹: SHRSP/Izm と SHR/Izm のコンジェニックラットによる脳卒

中関連遺伝子の探索, 第57回日本実験動物学会総会. 2010年5月12日. 京都テルサ (京都市)

[図書] (計2件)

1) Yao H, Nabika T: Standards and pitfalls regarding the SHR model in genetic hypertension and stroke. In: Hypertension, Heredity and Stroke eds. Moratinos C, Cárdenas B, Nova Science, 2010; 114-123.

2) 並河 徹: 循環器疾患, 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 2010, 439-442.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

並河 徹 (Nabika Toru)
島根大学・医学部・教授
研究者番号: 50180534

(2) 研究分担者

原田 祐治 (Harada Yuji)
島根大学・医学部・准教授
研究者番号: 60228658

崔 宗虎 (Cui ZH)

島根大学・医学部・助教
研究者番号: 50379690

(3) 連携研究者

()

研究者番号: