

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：15201
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26293086
研究課題名(和文) 新技术を用いたダブルノックアウト高血圧・動脈硬化モデルラットの創出

研究課題名(英文) Establishment of a genetic rat model for combined hypertension and atherosclerosis using the genome editing technology.

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
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高血圧のラットモデルとして定評のある自然発症高血圧ラットにゲノム編集技術を応用してApoe, Prdx2, Akt1の3種の遺伝子のノックアウトを作成し、高血圧と動脈硬化を同時に発症する疾患モデルを作成した。高脂肪食負荷によって、ApoeノックアウトSHRは高度の高脂血症を呈し、明らかな動脈への脂質沈着亢進も確認できた。今後Prdx2ノックアウトによる酸化ストレス亢進や高血圧の脂質沈着亢進作用について、定量的に検討する予定である。

研究成果の概要(英文)：In this study, apolipoprotein E (Apoe) gene was knocked out in spontaneously hypertensive rat (SHR) to establish a hereditary model of combined hypertension and atherosclerosis in rats. In addition to Apoe, the peroxiredoxin 2 (Prdx2) and Akt1 were knocked out to explore effects of oxidative stress and NO on atherogenesis. Gene depletion was done using the CRISPR/Cas9 technology. The two knockout rats were then mated to obtain the double knockout SHRApoE(-/-)Prdx2(-/-). We successfully established 6 knockouts (2 for each of the three genes), and one double knockout. According to phenotype analyses, there was no significant difference in blood pressure between SHR and SHRApoE(-/-). The total cholesterol level in SHRApoE(-/-) was significantly higher than in SHR under a high-fat diet. Clear fat deposition in the aorta was observed in SHRApoE(-/-) and SHRApoE(-/-)Prdx2(-/-). These rats would be useful models for CVDs.

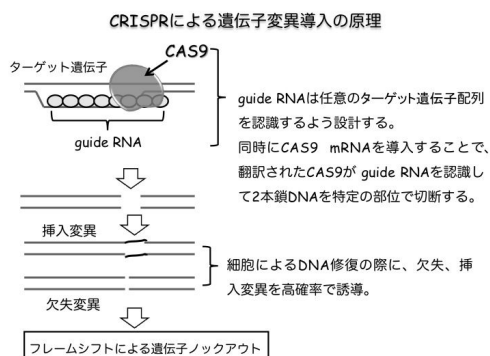
研究分野：基礎医学、実験病理学、実験動物学

キーワード：疾患モデル動物 高血圧 動脈硬化 ゲノム編集 ノックアウト

1. 研究開始当初の背景

Atherosclerosis をベースとして発症する代表的な疾患に、心筋梗塞とアテローム硬化性脳梗塞がある。その病態や発症機序については、遺伝子改変マウスを用いた研究が行われてきたが、ヒトにおけるこれらの病態が、糖尿病や高血圧など複合的な基礎疾患の影響を受けていることから、ヒトでの病態をより良く再現できる実験モデルが必要とされている。また、マウスは小型ゆえに、血液等のサンプルを繰り返し採取することが難しいこと、血圧測定や手術操作、各種の生理学的検査が難しいというデメリットも指摘される。これに対して、ラットはマウスのおよそ 10 倍の大きさを持つことから、上記のデメリットが解消できる利点がある。

従来、ラットでは遺伝子ノックアウトが不可能であり、そのためにマウスが用いられてきた経緯があるが、近年、新たな遺伝子ノックアウト技術が開発され、ラットでも容易に遺伝子改変を行うことが出来るようになった。特に CRISPR/CAS9 を用いる方法は、1) ES 細胞が不要なため、マウス以外の任意の種で遺伝子改変が可能であるのみならず、任意の系統のラットで直接ノックアウトが可能であることから、ラットで多数存在する自然発症病態モデルを使えること、2) 多重ノックアウトが短期間で容易に作成できること、3) ES 細胞を使う場合に比べて高効率かつ短時間にノックアウト動物の作成が可能であることにある。

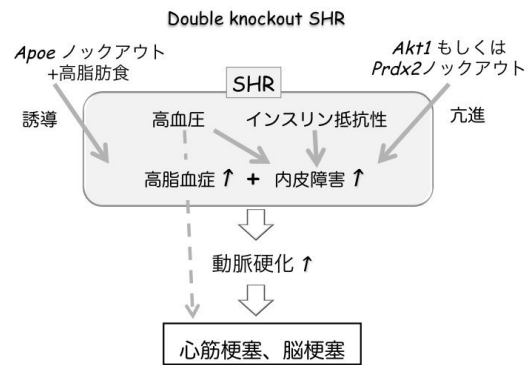


2. 研究の目的

本研究では、遺伝的に高血圧、インシュリン抵抗性を呈する自然発症モデルとして定評のある自然発症高血圧ラット (SHR) を用いて、このラットに Apoprotein E (*ApoE*)、Peroxisome oxidoreductin 2 (*Prdx2*)、*Akt1* の遺伝子をノックアウトすることで、高血圧を背景に有する動脈硬化モデルを作成することを目的とした。*ApoE* は VLDL や chylomicron に主として含まれるリポ蛋白をコードする遺伝子であり、これを欠損することで ApoE 受容体を介する脂質の肝等への取り込みが障害されることで、高度の高脂血症、動脈硬化の発症が期待できる。*Prdx2* は過酸化物の還元を行う酵素であり、

これを欠損することで酸化ストレスが亢進することが予想される。また、*Akt1* は NO 産生酵素 (NOS) の誘導に関与するとされており、これを欠損することで、NO 産生が阻害され、血管内皮の integrity が損なわれると期待される。本研究では、*ApoE* を欠損させた高血圧モデルラット SHR をベースに、更に、*Prdx2* や *Akt1* 欠損を組み合わせることで、重症の動脈硬化を起こすモデルラットを作成することを目指した。

3. 研究の方法



A) ノックアウト SHR の作成 : CRISPR/CAS9 の方法論を用いて、上記 3 つの遺伝子をターゲットに、CRISPR guide RNA をデザインし、CAS9 の mRNA とともに SHR の受精卵に microinjection する。得られた仔の DNA をスクリーニングして各遺伝子に deletion/insertion の入った個体を選別し、これを SHR と交配して雌雄のヘテロ接合体を取り、最終的にターゲットとした遺伝子にホモで変異の入った個体を得る。更に *ApoE* knockout (KO) に *Prdx2*, *Akt1* KO をそれぞれ交配して double KO SHR を得る。

B) 得られたノックアウト SHR に高脂肪食を与え、血清脂質レベル、血圧を検査するとともに、最終的に動脈硬化の程度や心、腎病変についての形態学的検討を、摘出した臓器を用いて行う。

4. 研究成果

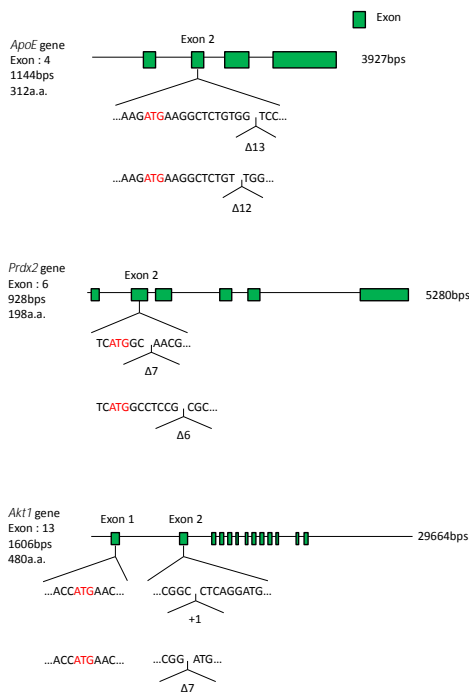
A) ノックアウト SHR 系統確立

ApoE, *Prdx2*, *Akt1* それぞれに異なる 2 種の deletion/insertion を持つ計 6 種のノックアウト SHR 系統を確立した。一部で変異がモザイクとなっていたため、交配によるホモ化に時間のかかった系統もあった。変異の詳細は右図に示す。これらはすべて National BioResource Project-Rat に寄託し、凍結精子保存を行って、系統保存に万全を期すとともに、研究者がこれらの系統を活用できるようにした。

また、*ApoE*, *Prdx2*-KO SHR を交配することにより、両方の遺伝子を欠損する double KO SHR を作出した。

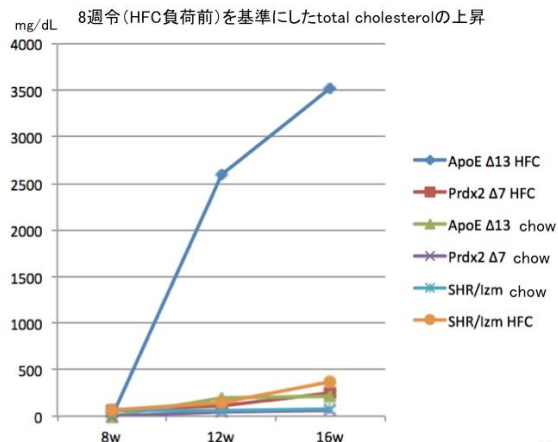
Akt1 については、ホモでこの遺伝子を欠損することで雌が不妊、雄も妊孕性が低下することが判明し、現在ヘテロでの維持を行って

いる。ヘテロでも産仔数が少なく *ApoE* と *Akt1* の double knockout 作成は成功していない。現在取り組んでいるところである。また、実験に用いるための個体を確保することも難しい状況であり、*Akt1* KO の表現型解析はこれからである。



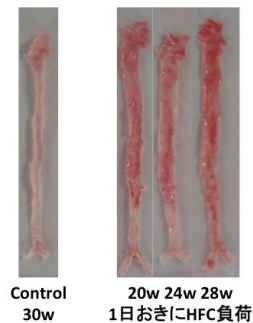
B) ノックアウト SHR の表現型解析

以下、*ApoE* KO, *Prdx2* KO についての表現型解析の結果の概要を記載する。
 血圧: いずれも SHR と同等の高血圧を呈する。
Prdx2 KO では酸化ストレスの亢進により、血圧が更に上昇すると考えられたが、tail-cuff 法を用いた測定で、baseline の血圧は SHR に比べて有意な上昇がみられた。
 血清脂質レベル: *ApoE* KO では通常の餌を与えても、総コレステロール、中性脂肪とも有意な上昇を認めた。標準的に用いられる高脂肪食 (パーム油 25%、コレステロール 5%、コル酸 2%) を負荷したところ、総コレステロールは高度な上昇を示したが (下図)、



ラットは食餌が滞って衰弱してしまった。このため、最適な餌の条件を検討する目的で、餌中のコレステロール、油脂、コル酸含有量の異なる3種類の餌 (ココアバター 20%、コレステロール 2%、コル酸 0.5%; ココアバター 15%、コレステロール 1%、コル酸 0.25%; ココアバター 20%、コレステロール 2%、コル酸 0%) の検討を行ったところ、摂餌は可能となったが、この餌では1ヶ月程度の実験期間で突然死がみられた。この期間では動脈への脂質沈着はまだ軽度にとどまっておらず、突然死の原因はまだ分かっていない。更に長期にわたる高脂肪食負荷を実現して動脈硬化病変を形成させるために、この餌をベースに高脂肪食を2日に1回与えるプロトコールと4日に1回与えるプロトコールで2ヶ月間観察を行ったところ、これらの条件では摂餌、体重に異常はみられず、最終的に2日に1回の脂肪食負荷で強い脂質沈着を観察できた (下図)。
 動脈への脂質沈着: 下図のとおり、上記の摂餌条件で強い脂質沈着を認めている。今後、*ApoE* KO, *ApoE/Prdx2* double KO を用いての定量的な解析を予定している。

SHR^{ApoE(-/-)Prdx2(-/-)}における脂質沈着



酸化ストレス: 尿中 isoprostane 測定により、*Prdx2* KO では酸化ストレスの亢進が確認できた。

C) 今後の展開

動脈硬化の作成実験に使用される一般的な高脂肪食を用いたところ、本モデルでは条件が厳しすぎたため、高度の衰弱がみられた。このため、餌の最適化に手間取り、本格的な定量的解析は今後の課題となっている。今後、動脈硬化の定量的解析、*Prdx2* KO による酸化ストレス亢進の影響の検討、WKY との交配により血圧を正常に下げた正常血圧 *ApoE* KO の作成と *ApoE* KO SHR との比較による、高血圧の動脈硬化促進作用の評価を予定している。また、このモデルにおいて、高脂肪食負荷の下で突然死がみられることから、心血管系への未知の影響がある可能性がある。この点についても今後検討していきたい。

5. 主な発表論文等
 [雑誌論文] (計 8 件)

- 1) Yamagata K, Sone N, Suguyama S, Nabika T : Different effects of arginine vasopressin on high-mobility group box 1 expression in astrocytes isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats and congenic SHRpch1_18 rats. *Int J Exp Pathol*. 査読有, 2016, Apr;97(2):97-106. doi: 10.1111
- 2) Ohara H, Nabika T: A nonsense mutation of Stim1 identified in stroke-prone spontaneously hypertensive rats decreased the store-operated calcium entry in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016, 査読有, 5;476(4):406-11. DOI: 10.1016
- 3) Zahid HM, Ferdous MZ, Ohara H, Isomura M, Nabika T : Effect of p22phox depletion on sympathetic regulation of blood pressure in SHRSP: evaluation in a new congenic strain. *Sci Rep*. 査読有, 2016 Nov ;6:36739. doi:10.1038
- 4) Isomura M, Saar K, Ohara H, Hübner N, Kato N, Nabika T: 1A.05 : Comparison of the whole genome sequence genetically distinct loci between SHR/IZM. *J Hypertens*. 査読有, 2015 Jun;33 Suppl 1:e2. doi: 0.1097
- 5) Yao H, Nabika T: Excess salt increases infarct size produced by photothrombotic distal middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive rats. *PLoS One*. 査読有, 2014 May 9;9(5):e97109. doi: 10.1371
- 6) Yamagata K, Yamamoto M, Kawakami K, Ohara H, Nabika T: Arginine vasopressin regulated ASCT1 expression in astrocytes from stroke-prone spontaneously hypertensive rats and congenic SHRpch1_18 rats. *Neuroscience*. 査読有, 2014, 16;267:277-85. doi: 10.1016
- 7) Ferdous MZ, Xiao B, Ohara H, Nemoto K, Harada Y, Saar K, Hübner N, Isomura M, Nabika T: Identification of stim1 as a candidate gene for exaggerated sympathetic response to stress in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *PLoS One*. 査読有, 2014, 15;9(4):e95091. doi: 10.1371
- 8) Yao H, Nabika T: Excess salt increases infarct size produced by photothrombotic distal middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive rats. *PLoS One*. 査読有, 2014, 9;9(5):e97109. doi: 10.1371
- 〔学会発表〕(計 33 件)
- 1) 大原浩貴、並河 徹: SHRSP の *Stim1* 遺伝子に存在するナンセンス変異はストローク作動性カルシウム流入 (SOCE) 活性の低下を引き起こす. 第 39 回日本高血圧学会総会, 2016 年 9 月 30 日, 仙台国際センター (宮城県仙台市)
- 2) 新谷 薫、並河 徹: ダブルコンジェニックラットを用いた SHRSP/IZM が持つ脳卒中感受性遺伝子存在領域の絞り込み. 第 39 回日本高血圧学会総会, 第 39 回日本高血圧学会総会, 2016 年 9 月 30 日, 仙台国際センター (宮城県仙台市)
- 3) 松尾裕之、藤川晃一、大原浩貴、並河 徹: Apoprotein E-knockout SHR; 新たな動脈硬化/高血圧モデル開発の試み. 第 39 回日本高血圧学会総会, 2016 年 9 月 30 日及び 10 月 1 日, 仙台国際センター (宮城県仙台市)
- 4) Ohara H, Nabika T : Stim1; a candidate gene for sympathetic stress response in SHRSP. 第 17 回国際 SHR 学会第/52 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 2016 年 9 月 22 日, 秋葉原 UDX Gallery (東京都)
- 5) Matsuo H, Kaneko T, Fujikawa K, Ohara H, Mashimo T, Nabika T : Development of a new rat model for combined hypertension and atherosclerosis; Apoprotein E-knockout SHR. 第 17 回国際 SHR 学会第/52 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 2016 年 9 月 22 日及び 9 月 23 日, 秋葉原 UDX Gallery (東京都)
- 6) Mohammad Farhadur Reza, Nabika T : Difference of Taste Sensitivity between SHR and WKY. 第 17 回国際 SHR 学会第/52 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 2016 年 9 月 22 日, 秋葉原 UDX Gallery (東京都)
- 7) Kaoru Niiya, Nabika T : Further reduction of stroke QTLs on chromosomes 1 and 18 in SHRSP using double subcongenic rats. 第 17 回国際 SHR 学会第/52 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 2016 年 9 月 22 日, 秋葉原 UDX Gallery (東京都)
- 8) Md Zahid Hasan, Nabika T : The precedence role of metabotropic glutamate receptors in the regulation of baseline blood pressure in SHRSP. 第 17 回国際 SHR 学会第/52 回高血圧関連

- 疾患モデル学会学術総会, 2016年9月22日, 秋葉原 UDX Gallery (東京都)
- 9) Nabika T: Depletion Of The Pphox Gene Reduced Blood Pressure Response To Glu Injection Into Rv1m In Shrsp. 第26回ヨーロッパ高血圧学会, 2016.6.13, パリ(フランス)
 - 10) Nabika T: The Truncated Stim1 Caused Impaired Store-Operated Calcium Entry In Astrocytes Of Shrsp. 第26回ヨーロッパ高血圧学会, 2016.6.11, パリ(フランス)
 - 11) 新谷 薫、松本真悟、ザヒッド ハッサン、並河 徹: 食塩感受性高血圧は皮膚の水分量と Na⁺, Cl⁻ 含有量 に関係するか? : SHRSP, SHR, WKY を用いた比較検討. 第63回日本実験動物学会総会 2016年5月18日, ミューザ川崎シンフォニーホール(神奈川県川崎市)
 - 12) 川上浩平、松尾裕之、新谷 薫、山田和夫、山田高也、並河 徹: 新型脳梗塞モデルとなりうるか? ; 高食塩食負荷高血圧自然発症ラット(SHR)での検討. 第63回日本実験動物学会総会, 2016年5月18日, ミューザ川崎シンフォニーホール(神奈川県川崎市)
 - 13) 大原浩貴、並河 徹: SHRSP における Stim1 遺伝子変異とそのカルシウムシグナル経路への影響に関する検討. 第51回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 2015年10月30日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)
 - 14) 新谷 薫、松本真悟、川上浩平、並河 徹: 食塩感受性高血圧は皮膚の水分量と Na⁺, Cl⁻ 濃度に依存するか? : SHRSP/Izm と SHR/Izm, WKY/Izm の比較検討. 第51回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 2015年10月30日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)
 - 15) ハッサン・ザヒド、大原浩貴、バトバヤル・オドンゴ、モハメッド・レザ、ジナト・マハル、磯村 実、並河 徹: RVLM へのグルタミン酸注入による血圧上昇は SHRSP と SHR で異なり、それは NADPHoxidase 活性の違いによる可能性がある. 第51回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 2015年10月31日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)
 - 16) デイビス・ヌガラシ、ハッサン・ザヒド、松尾裕之、バトバヤル・オドンゴ、モハメッド・レザ、ジナト・マハル、大原浩貴、磯村 実、並河 徹: 酸化ストレス低減は SHRSP の脳卒中発症を改善しない - p22phox ノックアウトコンジェニック SHRSP を用いた検討. 第51回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 2015年10月31日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)
 - 17) 大原浩貴、並河 徹: SHRSP で発現する変異型 STIM1 の機能評価: 培養アストロサイトを用いたカルシウムシグナル経路への影響の検証. 第38回日本高血圧学会総会, 2015年10月9日, 愛媛県県民文化会館ひめぎんホール(愛媛県松山市)
 - 18) 新谷 薫、並河 徹: SHRSP/Izm が持つ脳卒中感受性遺伝子存在領域の絞り込み: 18系統のコンジェニックラットを用いた探索. 回日本高血圧学会総会, 2015年10月9日, 愛媛県県民文化会館ひめぎんホール(愛媛県松山市)
 - 19) Isomura M, Nabika T: Comparison of the whole genome sequence revealed genetically distinct loci between SHR/Izm and SHRSP/Izm, 25th European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection. 2015.6.13, Milano(Italy)
 - 20) 松尾裕之、新谷 薫、星野仁美、ザヒドハッサン、オドンゴバトバヤル、並河 徹: 脳卒中感受性遺伝子領域をターゲットとした新たなダブルコンジェニック. 第62回日本実験動物学会総会, 2015年5月28日, 京都テルサ(京都府京都市)
 - 21) Hasan M. Zahid, Mohammed Zubaerul Ferdaus, Hiroki Ohara, Kohei Kawakami, Minoru Isomura and Toru Nabika: Effect of p22phox 'knock-out' on sympathetic nervous response to glutamate in SHRSP: evaluation in a new congenic strain. 第50回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 2014年12月5日, 和歌山県立医科大学 生涯研修センター(和歌山県和歌山市)
 - 22) 新谷 薫、松本真悟、川上浩平、並河 徹: 食塩感受性高血圧は皮膚の水分量と Na⁺ に依存するか? : SHRSP/Izm と SHR/Izm, WKY/Izm の比較検討. 第50回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 2014年12月5日, 和歌山県立医科大学 生涯研修センター(和歌山県和歌山市)
 - 23) 八尾博史、Mohammed Zubaerul Ferdaus, Hasan M. Zahid, 大原浩貴, 中原辰雄, 並河 徹: Nox サブユニット P220HOX を欠損した SHRSP における中大脳脈閉塞による局所脳虚血障害. 第50回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 2014年12月5日, 和歌山県立医科大学 生涯研修

センター（和歌山県和歌山市）

- 24) 大原浩貴、市川 純、並河 徹：SHRSPで発現する変異型（SHR s）におけるカルシウムシグナル関連因子の解析。第50回高血圧関連疾患モデル学会学術総会，2014年12月5日，和歌山県立医科大学生涯研修センター（和歌山県和歌山市）
- 25) 河村 博、三ツ林裕己、池田克己、川上浩平、斉藤 昇、並河 徹：コンジェニック・ラットの高血圧値、心拍数、活動量の変動の長期時系列解析。第50回高血圧関連疾患モデル学会学術総会，2014年12月6日，和歌山県立医科大学生涯研修センター（和歌山県和歌山市）
- 26) 磯村 実、加藤規弘、並河 徹：Whole genome sequence dataを用いたSHR、SHRSPのゲノム解析。第50回高血圧関連疾患モデル学会学術総会，2014年12月6日，和歌山県立医科大学生涯研修センター（和歌山県和歌山市）
- 27) 磯村 実、並河 徹：SHR系ラットの全ゲノムシーケンス解析。第37回日本高血圧学会総会，2014年10月18日，横浜パシフィコ（神奈川県横浜市）
- 28) 大原浩貴、並河 徹：酸化ストレスの心血管系疾患への影響評価：p22^{phox}欠損SHRSP。第37回日本高血圧学会総会 2014年10月18日，横浜パシフィコ（神奈川県横浜市）
- 29) Ohara H, Mohammed Zubaerul Ferdous, Isomura M, Nabika T: A1.2-MBP region on Rat chromosome 1 is involved in exaggerated sympathetic stress response in the stroke-prone spontaneously hypertensive Rat: Identification of stimi as a candidate gene. The 16th International SHR symposium, June18, Roma(Italy), 2014.6.18
- 30) Niiya K, Kawakami K, Hasan M. Zahid, Ohara H, Nabika T: A comparative study on water retention in the skin between SHRSP and SHR under salt loading. The 16th International SHR symposium, June18, Roma(Italy), 2014.6.18
- 31) Iwagami Y, Motonaga S, Mohammed Zubaerul Ferdous, Hasan M. Zahid, Ohara H, Kawakami K, Nabika T: The lack of the P22phox expression did not ameliorate the stroke-susceptibility in the congenic SHRSP.MES-(CYBA) Rat in spite of decreased blood pressure. The 16th International SHR symposium, June18, Roma(Italy), 2014.6.18
- 32) Kawakami K, Kobayashi Y, Yamada T, Nomura M, Nabika T: Lifespan study of SHR-CP rats fed ad libitum or calorie-restricted diets: Longevity, Growth, and Disease. The 16th International SHR symposium, June18, Roma(Italy), 2014.6.18
- 33) Hoshino H, Niiya K, Tanaka Y, Kawakami K, Ohara H, Nabika T: Further reduction of the congenic regions related to salt-induced stroke in SHRSP using multiple subcongenic strains. The 16th International SHR symposium, June18, Roma(Italy), 2014.6.18

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

家森 幸男 (Yamori Yukio)
武庫川女子大学・国際健康開発研究所・所長
研究者番号：80025600

真下 知士 (Mashimo Tomoji)
大阪大学・医学系研究科 附属共同研究実習センター・准教授
研究者番号：80397554