

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461251

研究課題名(和文) 遺伝的高血圧モデルラットの食塩感受性は腎依存性か：腎交換移植による検討

研究課題名(英文) Contribution of kidney in salt-sensitive hypertension in SHRSP

## 研究代表者

今井 健介 (Imai, Kensuke)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：60457182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：食塩感受性の低い高血圧モデルラットSHRと、SHRに食塩感受性の高いラットの遺伝子存在領域を移し、食塩感受性の高くなったラットSHRpch1\_18の間で腎移植を行い、食塩感受性遺伝子が腎機能を介して血圧を上げているかどうかを検討することを目的に実験を行った。移植に際して数々の課題がわかり、これを解決するための術式改良を行った。これによって、移植の成功率が向上し、食塩負荷実験の例数を集めているところである。

研究成果の概要(英文)：A genetic hypertensive model rat, SHR, has low sensitivity to salt loading. We constructed a new hypertensive model based on SHR that harbored genomic fragments from a salt-sensitive hypertensive rat, SHRSP. This strain (called SHRpch1\_18) had higher salt sensitivity than did SHR. We attempted to transplant a kidney reciprocally between SHR and SHRpch1\_18 to explore the role of kidney in the salt-sensitivity in SHRSP. Many difficulties were found in kidney transplantation in rats. We performed trouble shooting in the operative method one by one to improve the operation. At the moment, we finally fixed the operative method and cumulate the cases to take data. We expect that we would obtain the first results within a year.

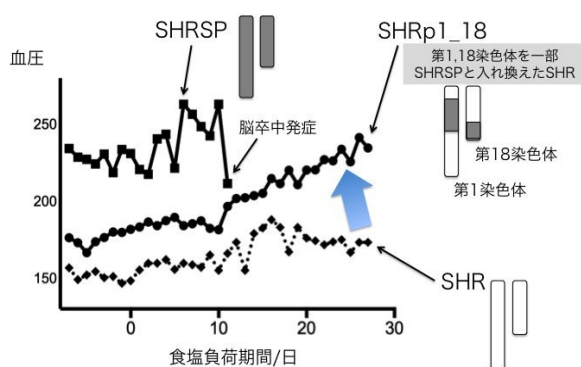
研究分野：腎臓内科学

キーワード：高血圧学

## 1. 研究開始当初の背景

食塩の過剰摂取が高血圧の主要な要因のひとつであることは明らかである。遺伝子ノックアウトマウス等を使用した研究や、ヒトにおける単一遺伝性高血圧疾患の解析で、いくつかの遺伝子異常が食塩感受性高血圧を起こすことが明らかになってきているが、自然発症の食塩感受性高血圧モデルおよび大多数のヒト本態高血圧において、どのようなメカニズムで食塩摂取が血圧上昇につながるかは未解明の部分が多い。

当大学の並河らは、食塩感受性に脳卒中を発症するモデルラットである stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP) と、高血圧を発症するが食塩負荷によって脳卒中を殆ど起こさない SHR との間で遺伝的解析を行い、第1, 18 染色体上に食塩負荷による脳卒中発症に関与する遺伝子が存在することを突き止めるとともに、その領域を SHRSP と SHR で入れ換えたコンジェニックラット (SHRpch1\_18) を作成し、第1, 18 染色体の両方が SHRSP 型を示すときにのみ、明らかな食塩感受性の血圧上昇がみられることを明らかにした (下図: Gandolgor et al. *Hypertension* 2013;62:55)。



SHRSPでみられる食塩依存性血圧上昇は、第1, 18染色体上の遺伝子で決まる。

このことは、この2つの染色体上に存在する遺伝子が相互作用をすることによって食塩感受性を起こすことを示唆している。これらの遺伝子とその相互作用のメカニズムが

明らかになれば、自然発症モデルラットにおける食塩感受性のメカニズムを明らかにすることができ、ヒト本態性高血圧症における食塩感受性の解明につながる重要な鍵が得られる。

遺伝子同定を行うためには、その遺伝子がどの臓器をターゲットとしているかを明らかにする必要がある。食塩感受性の場合には腎臓が明らかな候補であるが、他にも交感神経系や血管や腎に作用する各種のサイトカイン、ホルモン様物質の分泌臓器などが候補となる。そこで、本研究では、心臓外科医である技術を最大限活かして、SHR で第1, 18 染色体のみを SHRSP と入れ換えたダブルコンジェニックラット SHRpch1\_18 と SHR との間で腎移植を行い、食塩負荷に対する反応性への効果を検証することで、第1, 18 染色体上の遺伝子が直接腎機能を変化させて食塩感受性の獲得につながるのか、腎外の臓器が食塩感受性に重要なのかを明らかにすることを目的とする。本研究によって腎が主たるターゲットであることが明らかになれば、腎における遺伝子発現を SHR, SHRpch1\_18 間で網羅的に比較することで、候補遺伝子を同定することが可能となる。

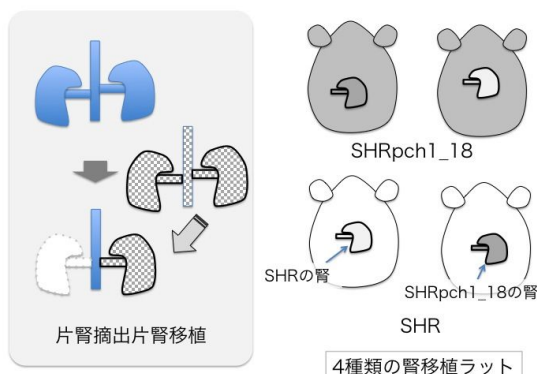
## 2. 研究の目的

本研究では、ダブルコンジェニックラット SHRpch1\_18 の食塩感受性血圧上昇における腎の役割を明らかにすることを目的とした。これによって腎が主なターゲット臓器であることの実験的証拠が得られれば、次のステップとして、腎をターゲットとした網羅的遺伝子発現解析を行って、SHRpch1\_18 と SHR を比較することで、原因遺伝子あるいはその下流にあって発現に差のある遺伝子を捕まえることができ、原因遺伝子同定に繋げることが出来る

## 3. 研究の方法

#### A) 腎移植実験

SHR と、SHR に SHRSP から第 1、18 染色体の一部を移した SHRpch1\_18 の間で、腎移植を行い、片腎は摘除する（下図）。对照実験として、SHR どうし、SHRpch1\_18 どうしで同様の腎移植を行う（下図）。



#### B) 食塩負荷実験

上記で作成した、

SHR→SHRpch1\_18, SHRpch1\_18→SHR, SHR→SHR, SHRpch1\_18→SHRpch1\_18 の 4 種類のパターンによる腎移植ラットに 1%食塩水を 1 ヶ月負荷し、血圧上昇をテレメトリーにて検討する。また、メタボリックケージを用いて、尿量、尿タンパク量、尿 Na, K, Cl 排泄量、尿中カテコラミン排泄量を 1 週間ごとに測定する。食塩負荷前と食塩負荷 1 ヶ月経過した時点で採血を行い、血中クレアチニン、血清 Na, K, Cl レベルの測定を行う。それぞれ、最低 N=5 を確保する。

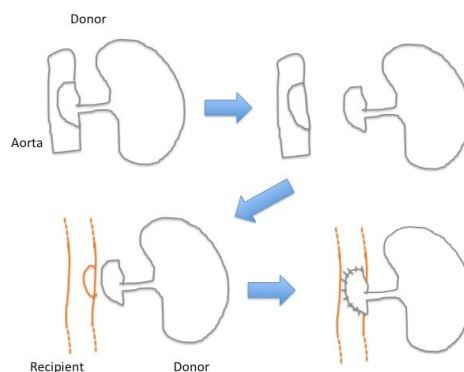
#### C) 腎の組織学的検索と遺伝子、蛋白質発現解析

実験終了後、腎を摘出し、病理組織学的検索を行う。同時に腎の一部を用いて、TGF $\beta$  やコラーゲンといった線維化のマーカー、糸球体障害のマーカーである nephrin, podocin 等について、遺伝子や蛋白質発現解析にて検討する。

#### 4. 研究成果

最初の 1 年で術式の確立を行うことを目標に腎移植を試みた。当初、SHR と SHRp1\_18

を準備し、2 匹同時の交換移植を試みたが、手術時間がかかりすぎて成功しなかったため、donor, recipient を区別して行う方向に変更した。ラットの donor と recipient のラットを麻酔下で開腹し、左腎を露出する。recipient 側の左腎摘出を行った後、donor の左腎を摘出し、ヘパリン生食にて還流して血液を除去した後、腎動脈、腎静脈を縫合、尿管より尿産生が見られるのを確認した後、0.6mm 径のシラスコンチューブを用いて尿管の接合を行った。直後に recipient の右腎を摘除し、閉腹して手術を終えた。この術式で数回の移植手術を行ったが、生存率が悪く、術式の改善について検討した。まず、手術時間を短縮すること、移植後の経過を観察してから右腎摘出を実施する方がよいとの判断で、左腎移植と右腎摘出を別途行う 2 段階手術とした。具体的には、移植術後 1 週間の経過観察を行った後、右腎摘出を行う。更に 1 週間の経過観察を行った後、実験を開始するというものである。また、腎動脈を端々接合するのではなく、大動脈壁を合わせて摘出した後、recipient の大動脈にパッチを当てるように縫合する方法を採った(下図参照)。



これによりリークなく短時間での血管縫合が可能となった。しかし、この術式で試みたラットの多くが、右腎摘出 1 週間程度で死亡し、実験遂行できなかった。このような死亡例について腎を調べたところ、腎盂の拡大がみられ、水腎症を起こしていたものと推察された。おそらくシラスコンチューブにて尿管

をつないだ部分で尿が流れなかったものと思われる。これは、尿管内の圧が低く、蠕動運動を欠く細いチューブ内を尿が通過できないためと思われる。そこで、更に術式を検討し、尿管近位にて直接 recipient と donor の尿管をつなぐ方法に変更した。これによって漸く移植の成功率を上げることが可能となった。現在、この術式をもとに SHR-->SHRpch1\_18,SHRpch1\_18-->SHRpch1\_18 の2つのパターンで移植手術を行い、例数を増やしているところである。

今後の展望:これまでにラットやマウスでの腎移植実験を行った報告はいくつかあるため、さほどの困難なく移植が可能だろうとの予測のもとに実験を開始したが、予想以上に様々な問題が発生したため、術式の確定に多くの時間を費やしてしまい、まだ本格的な検討の端緒についたところである。今後、SHR から SHRpch1\_18 への移植実験を遂行し、これを SHRpch1\_18 同士の移植実験の結果と比較して、このモデルにおける食塩感受性高血圧への腎の貢献について明らかにしたい。

## 5. 主な発表論文等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

今井 健介 (Imai Kensuke)  
島根大学・医学部・助教  
研究者番号：60457182