

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870376

研究課題名(和文) SHRSPの遺伝性脳卒中発症を支配する原因遺伝子の同定とその分子病態の解明

研究課題名(英文) Identification of stroke susceptible genes in the stroke-spontaneously hypertensive rats and evaluation of its molecular pathogenesis

研究代表者

大原 浩貴(Hiroki, Ohara)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：10609225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：以前我々は、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(SHRSP)の第1、18染色体上に、食塩負荷により促進されるSHRSPの脳卒中感受性を支配する遺伝子が存在することを明らかにした。本研究では、SHRSPとその祖先系統で脳卒中耐性を示すSHR、およびこれらの系統間で第1、18染色体の脳卒中感受性に関わる量的形質遺伝子座(QTL)を交換したダブルコンジェニック系統(Pr1_18、Rp1_18)を対象としてマイクロアレイによる網羅的遺伝発現解析を行い、有力な候補遺伝子の同定を試みた。また、当該染色体領域に存在するmiRNAの発現解析を行った。

研究成果の概要(英文)：In the previous study, we showed that two genomic regions on rat chromosome (chr) 1 and 18 determines most of the stroke susceptibility under salt loading in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). In the present study, we performed a microarray-based screening to identify promising candidate genes by using SHRSP, stroke-resistant SHR and two of reciprocal congenic strains (Pr1_18 and Rp1_18) covering the quantitative trait loci (QTL) on chr 1 and 18. Quantitative expression analysis for miRNA on the chr 1 QTL was also performed.

研究分野：実験病理学

キーワード：脳卒中易発症高血圧自然発症ラット コンジェニックラット 脳卒中感受性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

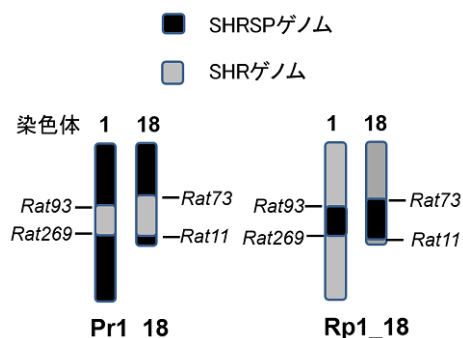
脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) は、重度の高血圧と共に脳卒中を自然に発症する遺伝的な脳卒中モデルである。SHRSP は脳卒中が遺伝的な要因により起こることを強く示唆する存在であるが、その遺伝的要因については未知の点が多い。

我々は、SHRSP ゲノムに存在すると予想される脳卒中感受性遺伝子の存在領域の絞り込みを行ってきた。この目的のため、まず、SHRSP を脳卒中をおこさない対照ラット (SHR) と交配して 295 匹の孫世代を作成した。次に、この孫世代のラットが脳卒中を発症するまでの期間を調べ、マイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析を行うことにより、第 1, 18 染色体の上に脳卒中感受性と関わる量的形質遺伝子座 (QTL) が存在することを明らかにした (*Hypertension* 2013;62:55-61)。

この結果をもとに、我々は SHRSP と SHR の間で交配を重ね、この 2 つの脳卒中関連 QTL 領域を SHRSP と SHR の間で交換したダブルコンジュニックラットを作成した。これらのダブルコンジュニックラットの脳卒中感受性を親系統 (SHRSP と SHR) と比較したところ、SHRSP ゲノムを背景とする Pr1_18 は SHRSP と比較して脳卒中感受性が大幅に低下し、SHR ゲノムを背景とする Rp1_18 は SHR と比較して脳卒中感受性が大幅に増加することがわかった (*Hypertension* 2013;62:55-61)。この結果から、遺伝学的解析により同定された QTL 領域が、実際に SHRSP の脳卒中感受性に影響することを確認できた。

2. 研究の目的

第 1, 18 染色体の脳卒中関連 QTL 領域に含まれる数百個の遺伝子が、研究開始時点での有力な候補であった。SHRSP と SHR の全ゲノム配列の比較から、その中の 33 個の遺伝子でアミノ酸置換を伴う一塩基多型が同定されたが、既知の機能から推測して有力と考えられる遺伝子は見つかっていない (*Hypertension* 2013;62:55-61)。このような状況を考慮し、遺伝子発現マイクロアレイにより得られる網羅的な遺伝子発現情報を軸に、有力な候補遺伝子を同定することを主たる目的として研究を実施した。



3. 研究の方法

①ラットからの脳および腎臓の採取

SHRSP と SHR、およびこれらの中で第 1, 18 染色体の脳卒中感受性 QTL を交換したダブルコンジュニックラット 2 系統 (Pr1_18, Rp1_18) を解析に用いた。背景で述べた通り、Pr1_18 は「SHRSP を背景に SHR から当該染色体領域を移入した系統」であり、Rp1_18 はその「裏返し」となるコンジュニック系統である。いずれも 12 週齢の雄性ラットを用い、コントロール群、食塩負荷群を各々 5 匹ずつとした。食塩負荷については、12 週齢より 1% 食塩水の自由摂取を 1 週間行った。イソフルランでの深麻酔下に開腹して脱血後、脳および腎臓を摘出した。直ちに液体窒素中で凍結し、使用時まで -80°C にて保存した。

②全組織凍結サンプルからの RNA 抽出

脳については大脳縦列より切開し半分割したもの、腎臓については片腎を RNA 精製に供した。これらより、低分子 RNA を含む全 RNA サンプルを調製した。得られた RNA は Agilent 6000 Nano Kit を用いて Agilent 2100 Bioanalyzer により品質の確認を行った。

③マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析は Whole Rat Genome DNA マイクロアレイ 4×44K Ver. 3.0 (Agilent Technologies) を用いて行った。解析に供した条件群毎に $N=4\sim 5$ で評価し、 $P<0.05$ 、蛍光強度比で 1.5 倍量の変化を示すプローブを抽出した。

④miRNA 発現解析

miRNA のデータベースである miRBase (<http://www.mirbase.org/>) での検索から、我々が同定した脳卒中感受性領域には計 8 個の miRNA (chr1 領域に 6 個、chr18 領域に 2 個) が存在することが明らかになっている。まず、文献的に報告のある miRNA が多く含まれている chr1 の miRNA について優先的に発現解析を行った。TaqMan microRNA RT Kit および TaqMan microRNA Assay により対象とする miRNA の逆転写し、定量的に発現量を比較した。内因性コントロールには U6 snRNA を用いた。

4. 研究成果

まず、SHRSP と Pr1_18 の比較で有意差を示す遺伝子を抽出し、これらの中からコンジュニック間 (Pr1_18, Rp1_18) で「裏返し」の発現変動を示す遺伝子を選択した (例えば SHRSP > Pr1_18 かつ Rp1_18 > Pr1_18 となるような遺伝子)。研究期間中は、コントロール群間の比較で抽出された変動遺伝子についてのみ定量的 RT-PCR による再検を実施し、食塩負荷群については今後実施する予定である。

コントロール群について、SHRSP > Pr1_18

かつRp1_18>Pr1_18 (あるいはその逆) の発現変動を示す遺伝子を抽出したところ、脳については「SHRSP で発現大」が6個 (*Pcmd1*, *Banp*, *Rgs11*, *Pde9a*, *Slc35c2*, *Gpm6b*)、
「SHRSP で発現小」が1個 (*Acyp2*)、腎については「SHRSP で発現大」が4個 (*Gapdh-ps1*, *Pcmd1*, *Clu*, *Nfi13*)、「SHRSP で発現小」が2個 (*Azgp1*, *Fuom*)、以上のものが候補遺伝子として選抜された。

このようにして選抜された各遺伝子について定量的RT-PCRによる再検を行った。我々の予想に反して、SHRSP と SHR の比較では再現性が取れるが、コンジェニック間の比較ではその「背景となる親系統」と同一の発現変動を示す (例えば SHRSP>SHR である場合は Pr1_18>Rp1_18 となる等) 遺伝子が大半であった。すなわち、マイクロアレイでの結果の再現性は部分的にしか確認できず、これらの遺伝子がコンジェニック系統で見られる脳卒中感受性の変化に関わる可能性は否定的であった。

ただし、今回の選抜方法で残った遺伝子は全て、chr1、18 の脳卒中 QTL の外あるいは他の染色体に存在するもののみであったため、今後は当該 QTL に存在する遺伝子を選択する、あるいは SHRSP と SHR、Pr1_18 と Rp1_18 の間でそれぞれ比較を行い、その中で共通する遺伝子を抽出するなど、新たな選抜基準を考慮する必要があると考える。予算の関係上、マイクロアレイを実施可能なサンプル数などに制限があり遂行不可能な部分があったため、これらは今後の課題である。

miRNA に関しては、chr1 の QTL に存在する6個の miRNA について定量的発現解析を行った。コントロール、食塩負荷両条件について、脳・腎における発現を定量的に比較したが、SHRSP と SHR の間で有意差の見られる miRNA はなく、chr1 QTL に存在する miRNA の関与は否定的であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Yao H, Ferdaus MZ, Zahid HM, Ohara H, Nakahara T, Nabika T. (2015) Focal ischemic injury with complex middle cerebral artery in stroke-prone spontaneously hypertensive rats with loss-of-function in NADPH oxidase. *PLoS One* 10(9):e0138551.
- ② Yamagata K, Yamamoto M, Kawakami K, Ohara H, Nabika T. (2014) Arginine vasopressin regulated ASCT1 expression in astrocytes from stroke-prone spontaneously hypertensive rats and congenic

SHRpch1_18 rats. *Neuroscience* 267:277-285.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 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 (大阪府豊中市), 千里ライフサイエンスセンター, 2015年10月30日~31日.
- ② 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 (愛媛県松山市), ひめぎんホール, 2015年10月9日~11日.
- ③ 大原浩貴, 市川純, 並河徹: SHRSP で発現する変異型 STIM1 の機能解析. 第50回高血圧関連疾患モデル学会学術総会 (和歌山県和歌山市), 和歌山県立医科大学生涯研修センター, 2014年12月5日~6日.
- ④ 大原浩貴, Hasan M. Zahid, 元永早希恵, 八尾博史, 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 (神奈川県横浜市), パシフィコ横浜, 2014年10月17日~19日.
- ⑤ Hiroki Ohara, Mohammed Zubaerul Ferdaus, Minoru Isomura, Toru Nabika. A 1.2-Mbp region on rat chromosome 1 is involved in exaggerated sympathetic stress response in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat: Identification of *Stim1* as a candidate gene. The 16th International SHR Symposium (Rome, Italy), S. Andrea Hospital, 2014年6月18日.

[図書] (計 1 件)

- ①大原浩貴, 松尾裕之, 新谷薫, 並河徹. 北隆館、高血圧関連疾患モデル動物の開発の現状と展望 (分担)、2015年、*BIO Clinica* 11月号

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大原 浩貴 (OHARA, Hiroki)
島根大学・医学部・助教
研究者番号：10609225

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：