

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25560368

研究課題名(和文) 運動抑制のみで動脈硬化・心房内血栓を自然発症するモデルラットの分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular genetic analysis of atherosclerosis and atrial thrombosis rat model spontaneously induced by hypoactivity

研究代表者

井本 逸勢(橘逸勢)(IMOTO, ISSEI)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：30258610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：高運動習性動物モデルであるSPORTS(Spontaneously Running Tokushima-Shikoku)ラットが、運動抑制により動脈硬化・心房内血栓を自然発症し脳塞栓を起こす原因遺伝子同定と運動による予防の分子基盤解明を試みた。自作のエクソーム解析と連鎖解析から、動脈硬化・心房内血栓原因遺伝子変異候補を複数同定し、血管組織を対象にした発現解析から、代謝、凝固、内皮機能関連遺伝子が抽出された。ラットDNAメチル化解析系やゲノム改変による機能解析系も構築できたが、これらの統合による原因遺伝子と分子機序の決定には至らず、未知の遺伝的異常や遺伝環境要因による多因子の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We tried to identify genetic alterations responsible for atherosclerosis and atrial thrombosis with cerebral infarction spontaneously induced by hypoactivity in the SPORTS (Spontaneously Running Tokushima-Shikoku) rat model and molecular mechanisms of preventive effects of exercise on these phenotypes. We modified our self-made rat exon capture system and linkage analysis system, and identified a set of candidate responsible genes using these systems. Genome-wide expression analysis of vascular system also identified candidate genes associated with these phenotypes. In addition, we established systems to determine DNA methylation status and modify genome structure in rats. However, specific gene(s) and molecular mechanisms responsible for those phenotypes were unable to be determined even though using integrated analysis of omics data, suggesting that unknown genomic alterations and/or polygene-environment interactions contribute to acquire these phenotypes in this model.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：スポーツ医学 ゲノム ラット 遺伝学 高血圧 血栓 エピジェネティックメモリー 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

連携研究者らにより Wistar 系ラットから樹立された、近交系の高運動習性動物モデルである SPORTS (Spontaneously Running Tokushima-Shikoku) ラットは、高運動習性以外にも、運動を抑制することで肥満・高血圧・高脂血症・高血糖などの危険因子を伴うことなく動脈硬化・心房内血栓を自然発症し、その結果高頻度に脳塞栓を起こす特徴的表現型を有する。

本ラットの動脈硬化の程度と心房内血栓の大きさは運動量抑制の程度に依存することから、遺伝的に規定された動脈硬化・心房内血栓形成促進という病態に対し、同様に遺伝的に規定される高運動機能が環境因子として拮抗的に作用していると考えられ、運動による抗動脈硬化・血栓形成のエピジェネティックメモリーの分子機序の研究に有用な疾患モデルである。本ラットのように特殊な組成や量の食餌や薬剤負荷、外科的処置を行うことなく運動時間制限のみで疾患病態形成における遺伝と運動(環境)の相互作用の検討と運動のエピジェネティックな疾患予防作用の分子基盤を実験的に解析可能なモデル動物は他にない。動脈硬化・心房内血栓形成形質の原因遺伝子座は BN ラットとの交配実験から高運動習性と異なることが示唆されているものの、申請者らによる平成 23 年度挑戦的萌芽研究での本ラットの高運動習性責任遺伝子探索を行った際には、血栓形成性等を説明し得る候補遺伝子の特定には至らなかった。これは、後述のようにラットゲノム情報の不完全さから十分に網羅的エクソーム解析が行えず、かつ血栓形成性形質の確認までに生後約 1 年かかり、バッククロス個体を用いた連鎖解析とエクソーム情報取得に必要な個体の確保が困難であることが理由であった。

2. 研究の目的

本研究では、SPORTS ラットが運動を抑制することで高度な動脈硬化・心房内血栓を自然発症し高頻度に脳塞栓を起こすことから運動による抗動脈硬化・血栓形成のエピジェネティックメモリーの分子機序の研究に有用なモデルであることに着目し、本ラットにおける未解明の動脈硬化・血栓形成の原因遺伝子を同定と病態発生と運動によるその抑制の分子機構を解明することで、遺伝と運動(環境)の相互作用の検討と運動のエピジェネティックな動脈硬化・血栓形成予防作用の分子基盤を解析可能な動物モデルとして確立する。本研究により、スポーツの健康維持に及ぼす効果の分子基盤の解析などスポーツ医学への貢献が期待される。

3. 研究の方法

本課題では、以下の方法で進めることを計画した。

(1)連鎖解析と全エクソンシーケンスによる

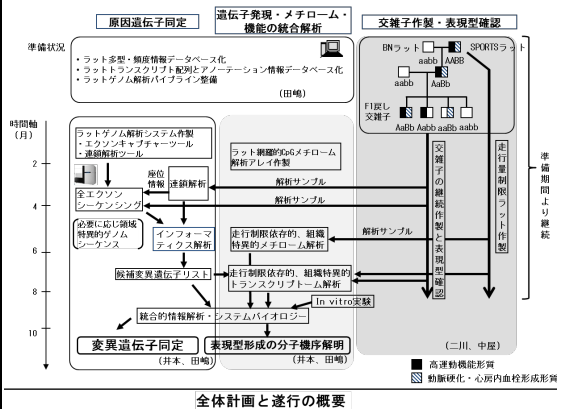
動脈硬化や心房内血栓の責任遺伝子候補探索

新規 Wistar 系 SPORTS ラット全エクソンシーケンス用キャプチャーシステムの作製

自作ラットゲノムデータベース(平成 24 年挑戦的萌芽研究)を SPORTS ラット全ゲノム配列データと最新改訂ラット参照配列(rn5)情報により SPORTS ラット用に改良・改変し、これを基に転写開始点-300 塩基を目途にプロモーター領域もターゲット領域としたプローブ配列を設計し、加えてこれまでのアレイタイプのカスタムエクソンキャプチャーシステムを液相タイプに変更した新規キャプチャーシステム(NimbleGen 社、約 45Mb 規模)を作製する。これにより、解析対象遺伝子数増(>18,000、現行 14,000)とプロモーター領域のカバーでの変異の見落とし防止と、プロトコルの簡便・短時間化による研究期間短縮と費用抑制を図り、解析効率を向上させる。

連鎖解析による病態に連鎖する染色体領域の決定

1 年以上の準備期間を経て作出する表現型が明確に分離された BN と SPORTS ラットの交雑子サンプル(平成 23 年度の挑戦的萌芽研究により F1 戻し交雑子となる BNx(BNxSPORTS)など手法は確立済み)を対象に、約 200 箇所一塩基多型(SNP)とマイクロサテライトの多型解析(リアルタイム PCR ならびに Sanger シーケンサーにより動作確認済み)を行い、表現型と連鎖する染色体領域を決定する。世代数を経た近交系のため、絞り込めは数 10Mb レベルの解像度に留まるが、1~多くとも数か所(交雑子からは 1 つの責任遺伝子が期待される)に候補領域が絞られると期待される。



次世代シーケンサーを用いた配列情報解析と候補遺伝子の選択

動脈硬化・血栓形成責任遺伝子(図、B に相当)を BB、Bb、bb で持つことが期待されるラットのゲノム DNA を解析費用を抑えるため各群でプールしてエクソンをキャプチャーで濃縮後、徳島大学で申請者らが使用する次世代シーケンサー(HiSeq1000、illumina 社)でエクソーム解析を行う。多系統のラットの多型情報を集約して表現型と無関係な

多型を除ける自作パイプラインを用いて連鎖候補領域内の候補遺伝子を絞り込み、サンガー法での個別シーケンスで検証する。尚、エクソーム解析で可能性の高い遺伝子候補が得られない場合には、上記自作ラットゲノム情報から連鎖候補領域特異的ゲノム配列キャプチャーシステムを追加作製してゲノムシーケンスを行い標的変異検索を行う。

(2)運動の SPORTS ラットの動脈硬化・心房内血栓形成に対する抑制効果とエピジェネティックメモリーの分子基盤の解析

ラットメチローム解析用アレイの作製

(1)の SPORTS ラットゲノムデータを基に、遺伝子とその周囲の CpG アイランドなどの CpG 配列約 3 万のメチル化状態を検出できるカスタムアレイ (illumina 社) を新規にデザイン・作製する。

SPORTS ラットでの運動抑制の DNA メチル化・遺伝子発現に及ぼす作用の解析

申請者らは、SPORTS ラットでの血栓形成が運動以外に L-アルギニン添加食長期投与による一酸化窒素 (NO) 供給でも抑制されることを見出している。候補遺伝子が NO の代謝や上流・下流のパスウェイに關与する可能性を考え、産生元である血管内皮だけでなく作用を及ぼす白血球、血小板、血管平滑筋、動脈硬化薬やマクロファージなど、運動制限を段階的に行い病態の程度を変えた SPORTS ラットから遠心やマイクロダイセクションを用いてそれぞれ分別して取得し、これを対象に網羅的に遺伝子発現 (Agilent 社) や可能な検体では DNA メチル化検出を行う。単独のデータでは因果関係を検討するには次元が不足しているが、運動抑制の程度と時間を変えた個体からデータを得ることで、システムバイオロジーを用いて遺伝子の発現量やメチル化の変化の關係性を解析することで中心 (ハブ) や辺縁に存在する遺伝子 (ノード) 群を抽出する (遺伝子間相互作用や運動のエピジェネティックメモリーのシステムの理解)。必要に応じ L-アルギニン投与時のデータを比較として用いる。これを (1) で得られる原因遺伝子候補と比較し、原因遺伝子変異の同定とその作用機序、運動の及ぼすエピジェネティックメモリーの原因遺伝子変異への作用機序のパスウェイ的解明を行う。

候補原因遺伝子の遺伝子発現パターンの解析

上記で絞り込まれた原因遺伝子候補の SPORTS ならびにコントロールラットでの組織特異的、運動負荷程度依存的 (SPORTS のみ) 発現を、特異抗体 (無い場合は *in situ* hybridization) により確認し、原因遺伝子としての妥当性を検討する。また、*in vitro* 機能解析の標的系を選択する。

in vitro 系を用いた原因遺伝子とその変異の分子機能とその修飾の実験的検証

発現情報と予測される機能に従い、選択した細胞系 (正常ラット大動脈内皮細胞、平滑

筋細胞、等の初代培養細胞やモデル培養細胞) を対象に、ウイルスベクターによる遺伝子導入あるいは人工ヌクレアーゼによるノックアウト・ノックインを行い、予測される機能変化に関して解析を行う。遺伝子導入が不可能な場合、SPORTS から得た標的候補単離細胞の薬理的機能解析により、コントロールとの反応性の違いを評価する。

4. 研究成果

(1)連鎖解析と全エクソンシーケンスによる動脈硬化や心房内血栓の責任遺伝子候補探索

新規 Wistar 系 SPORTS ラット全エクソンシーケンス用キャプチャーシステムの作製

自作ラットゲノムデータベースと SPORTS ラット全ゲノム配列データ、最新改訂ラット参照配列 (rn5) ならびに他の 5 系統のラットゲノム情報を収集して、液相タイプのカスタムラットエクソンキャプチャーシステムを非コード領域を一部含めて設計した。nr5 により、coding gene 数はヒト、マウスに並ぶ 22,940 となり、エクソームの対象として解析できるゲノム解析環境は改善された。

連鎖解析による病態に連鎖する染色体領域の決定

BN と SPORTS ラットの交雑子について、表現型が明確に分離されるもののみを選択してサンプルとし、これらを対象に表現型と連鎖する染色体領域を決定した。しかし、世代数を経た近交系のため、絞り込みは染色体レベルに留まり、候補領域の絞りこみには期待したほど有効ではなかったが、一定の効果が得られた。一方、予定していた、連鎖候補領域特異的ゲノム配列キャプチャーシステムの追加作製は変異検索には効果がないと考えられた。

次世代シーケンサーを用いた配列情報解析と候補遺伝子の選択

(1)- のデザインに従いラットエクソームキャプチャーシステムをカスタムで作製 (45Mb レベル) し、これを用いて、交雑子のエクソーム解析を行い、ラット多型情報を用いて、表現型と相關する遺伝子候補を複数得た。優性モデルを想定した場合に多くの候補が得られたため、(1)- の候補染色体領域と合わせても、絞り込みは十分行えず、変異候補のリスト化に留まった (未発表データ)。これらの変異は、PCR 産物のサンガー法での個別シーケンスでも確認された。

(2)運動の SPORTS ラットの動脈硬化・心房内血栓形成に対する抑制効果とエピジェネティックメモリーの分子基盤の解析

(1)の解析で、十分な候補遺伝子の絞り込みができなかったことから、ゲノムワイドなメチル化解析に代えて、標的組織のトランスクリプトーム解析とオミックスデータの統合解析を先行させて標的の絞り込みを行った。

メチル化解析と機能解析は、絞り込み後に限定して行うことから、ラットで有効なシステムの樹立を並行して行うこととした。

標的組織におけるトランスクリプトーム解析

原因遺伝子候補が多く有効に絞り込まれなかったことから、ゲノム網羅的遺伝子発現解析による発現変化との統合解析を行うため、標的となる大血管を対象にしたトランスクリプトーム解析を、SPORTS ラット、コントロール Wistar ラットを用いて行った。血栓形成前であっても、運動群と非運動群では SPORTS ラットの血管における遺伝子発現パターンに違いが認められた。パスウェイ解析でも、代謝、血液凝固、内皮機能、酸化ストレス等に関与する遺伝子の変化が抽出されてきた。この結果は、SPORTS ラットでの血栓形成が運動以外に L-アルギニン添加食長期投与による一酸化窒素 (NO) 供給でも抑制される所見に矛盾せず、候補遺伝子が NO の代謝や上流・下流のパスウェイに関与する可能性を示唆していた。しかし、(1)の候補遺伝子との直接または間接の関連は明らかではなかった。

運動による発現変化の見られた遺伝子に関して、DNA メチル化の関与を個別に検索するため、パイロシーケンス法によるメチル化変化の検索が行えるプラットフォームを確立した。しかし、予定した遺伝子の絞り込みが行えなかったことから、実際の原因遺伝子を用いた実験には至らなかった。

原因遺伝子の分子機能の実験的検証系の構築

ラット初代細胞や個体を用いた変異遺伝子候補の機能的確認実験を行うため、簡便かつ有効性が高いことから急速に普及の進む Crispr/Cas9 システムを導入し、これによるゲノム編集系の確立を行った。コントロール実験により、高効率のノックアウトについては有効性が確認できたが、ノックインはさらに改良が必要と考えられた。しかし、予定した遺伝子の絞り込みが行えなかったことから、実際の原因遺伝子を用いた実験には至らなかった。

これらの結果は、ゲノム解析プラットフォームが充分でなく未知の遺伝的異常が検出できていない可能性や遺伝環境要因による多因子での病態形成の可能性を示唆しており、今後これらを踏まえた検索を行って行く必要がある。

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 9 件)

Kikuchi R, Kikuchi Y, Tsuda H, Maekawa H, Kozaki KI, Imoto I, Tamai S, Shiotani A, Iwaya K, Sakamoto M, Sekiya T, Matsubara O. The expression and clinical significance

of connective tissue growth factor in advanced head and neck squamous cell cancer. *Hum Cell*. 2014 Apr 4. [Epub ahead of print] 査読有,

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13577-014-0092-0>

Nishi A, Numata S, Tajima A, Kinoshita M, Kikuchi K, Shimodera S, Tomotake M, Ohi K, Hashimoto R, Imoto I, Takeda M, Ohmori T. Meta-analyses of blood homocysteine levels for gender and genetic association studies of the MTHFR C677T polymorphism in schizophrenia. *Schizophr Bullet* 2014 Feb 17. [Epub ahead of print] 査読有,

<http://schizophreniabulletin.oxfordjournals.org/content/early/2013/11/11/schbul.sbt154.long>

Mitsui SN, Yasue A, Masuda K, Watanabe K, Horiuchi S, Imoto I, Tanaka E. Novel PAX9 mutations cause nonsyndromic tooth agenesis in Japanese patients. *J Dent Res* 2014 93(3):245-249. 査読有, doi:

10.1177/0022034513519801

Uno M, Saitoh Y, Mochida K, Tsuruyama E, Kiyono T, Imoto I, Inazawa J, Yuasa Y, Kubota T, Yamaoka S. NF- κ B inducing kinase, a central signaling 1 component of the non-canonical pathway of NF- κ B, contributes to ovarian cancer progression. *PLoS One* 2014;9(2):e88347 査読有,

doi: 10.1371/journal.pone.0088347

Honda J, Matsuoka H, Hirose C, Nagao T, Yoshida T, Takahashi M, Imoto I, Sasa S. Early results of omitting completion axillary lymph node dissection in sentinel lymph node metastasis-positive breast cancer patients. *Advances in Breast Cancer Research*

2013;2:126-132. 査読有,

doi: 10.4236/abcr.2013.24021

Kori H, Sei M, Nakahori Y, Imoto I* Impact of annual BMI gain on obesity development in Japanese 6-year-old nonobese children. *Pediatr Int* 2013;55(6):761-766. 査読有,

doi: 10.1111/ped.12172

Masuda K, Kuwano Y, Nishida K, Rokutan K, Imoto I. NF90 in Posttranscriptional Gene Regulation and MicroRNA Biogenesis. *Int J Mol Sci* 2013;14(8):17111-17121. 査読有, doi: 10.3390/ijms140817111

Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Shimodera S, Imoto I, Ohmori T. Plasma total homocysteine is associated with DNA methylation in patients with schizophrenia. *Epigenetics* 2013;8(6):584-590. 査読有,

doi: 10.4161/epi.24621

Sato Y, Jinam T, Iwamoto T, Yamauchi T, Yamauchi A, Imoto I, Inoue I, Tajima A. Replication study and meta-analysis of non-obstructive azoospermia in Japanese populations. *Biol Reprod* 2013;88(4):87.

査読有, doi: 10.1095/biolreprod

〔学会発表〕(計 2件)

岡本伸彦、他. 次世代シーケンサー解析により診断した SENDA 小児例. 日本人類遺伝学会第 58 回大会 2013 年 11 月 22 日. 江陽グランドホテル(宮城県仙台市)
梶浦耕一郎、他. ゲノムワイドな異常 DNA メチル化探索による新規メチル化標的喫煙関連肺腺癌抑制遺伝子の同定. 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013 年 10 月 3 日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.tokushima-u.ac.jp/med/culture/jinruiden/>

(徳島大学・大学院システムイノベーション研究部・人類遺伝学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井本 逸勢(橘 逸勢)
(IMOTO ISSEI) (TACHIBANA ISSEI)
徳島大学・大学院システムイノベーション研究部・
教授
研究者番号: 30258610

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

田嶋 敦(TAJIMA ATSUSHI)
徳島大学・大学院システムイノベーション研究部・
准教授
研究者番号: 10396864

中屋 豊(NAKAYA YUTAKA)
徳島大学・大学院システムイノベーション研究部・
教授
研究者番号: 50136222

二川 健(NIKAWA TAKESHI)
徳島大学・大学院システムイノベーション研究部・
教授
研究者番号: 20263824