

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08787

研究課題名(和文) STIM1機能異常と高血圧：遺伝子改変SHRSPによる検討

研究課題名(英文) Dysfunction of STIM1 and Hypertension: evaluation using a novel genome-edited SHRSP

研究代表者

大原 浩貴 (Ohara, Hiroki)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：10609225

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)：脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(SHRSP)の高血圧の遺伝素因として、交感神経の過剰亢進が指摘されている。我々はSHRSPの過剰なストレス性交感神経反応に関わる候補遺伝子として、本モデルでナンセンス変異があるStim1を見いだした。本研究では、ゲノム編集によるノックインで変異を直したStim1 knock-in SHRSP (KI SHRSP) を作製し、そのストレス反応性を検討した。KI SHRSPは「拘束ストレス」条件における心拍値を除きストレス反応性(ノルエピネフリン排泄や血圧)の低下を示さず、Stim1はSHRSPにおける過剰なストレス性交感神経反応の原因遺伝子ではないことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代人は少なからず何らかの環境的・社会的ストレスに晒されており、これにより生じる高血圧病態が脳心血管病の危険因子となることが疫学的に指摘されている。多すぎるほどの物や情報が溢れる現代社会で、ストレスから完全に逃れることは困難であり、ストレス反応をうまく制御することが重要となる。ストレス感受性は個々人で異なり、感受性が高く昇圧が(過剰に)起こりやすい人もいれば、そうでない人もいる。本研究成果は、ヒト本態性高血圧のモデル動物において、ストレス刺激に対する過剰な交感神経反応を引き起こすメカニズムを解明することで、ストレス制御による新たな高血圧治療法とヒト脳心血管病予防法を開発することに貢献する。

研究成果の概要(英文)：Sympathetic hyperactivities have been thought to be a plausible genetic factor responsible for hereditary severe hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). We previously identified stromal interaction molecule 1 (Stim1), in which SHRSP had a nonsense mutation, as a possible candidate gene causally related to exaggerated sympathetic response to stress in SHRSP. In the current study, we created a genome-edited SHRSP which was knocked-in with the wild-type Stim1 by the CRISPR/Cas9 method to investigate whether the functional recovery of STIM1 would mitigate sympatho-excitation to stress in vivo in SHRSP. Unexpectedly, the Stim1 knock-in SHRSP did not show any significant reduction in stress responsiveness (urinary norepinephrine and blood pressure elevation under stress) except for HR under restraint stress condition. In conclusion, the results indicated that Stim1 is not major genetic determinant related to sympathetic hyperresponse to stress in SHRSP.

研究分野：実験動物学、実験病理学

キーワード：高血圧 ストレス 交感神経 脳卒中易発症高血圧自然発症ラット Stim1 CRISPR/Cas9

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

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) は本態性高血圧のモデルとして知られるが、ストレスや食塩摂取で過剰な交感神経活性の亢進を示すことから、このラットモデルにおける交感神経活性と高血圧発症機序との関連が古くから指摘されている (Yamori et al. 1985)。ヒトにおいても環境的要因によって引き起こされる交感神経活性亢進が高血圧発症の機序となることが示唆されており、SHRSP におけるストレス反応性亢進の原因遺伝子が明らかになれば、ヒト本態性高血圧の発症機序の解明に寄与する。

これまでの研究で、申請者は SHRSP と正常血圧対照ラット (WKY) の間で特定の染色体領域のみを組み替えた複数のコンジェニック系統を作成し、そのストレス感受性を評価することで、SHRSP のストレス性高血圧の原因となる有力な候補遺伝子 Stomal interaction molecule 1 (*Stim1*) を同定した (Ferdous et al. 2014 PLOS ONE)。この中で申請者は、SHRSP の *Stim1* 遺伝子にナンセンス変異が存在し、交感神経の活動性および血圧調節の中樞が存在する吻側延髄腹外側野 (RVLM) を含む脳幹組織において、野生型より短い変異型 STIM1 が発現していることを明らかにした。

STIM1 は小胞体膜に局在し、小胞体 Ca^{2+} の枯渇を感知して細胞膜に存在するイオンチャネルを開口させることで細胞質への Ca^{2+} 流入を誘導する〔ストア作動性カルシウム流入 Store-Operated Calcium Entry (SOCE)、図 1〕。SOCE は多くの細胞種における Ca^{2+} シグナルの誘導や Ca^{2+} 恒常性の維持に重要と考えられているため、STIM1 の変異は生理学的に重要な意味を持つと予想された。

実際、SHRSP のゲノムで *Stim1* が存在する領域のみを正常血圧ラット由来のものに置き換えたコンジェニックラット (SPwch1.72、図 2) と SHRSP から得られたアストロサイトで SOCE 活性を *in vitro* で比較すると、有意な差が見られることがわかった (図 3、Ohara, Nabika 2016 BBRC)。

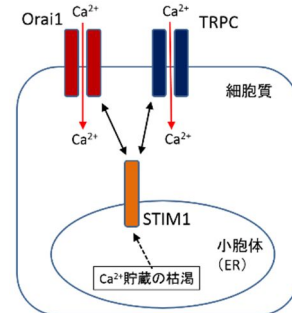


図1. STIM1はSOCEを制御する

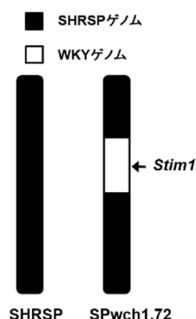


図2. 染色体構造の違い

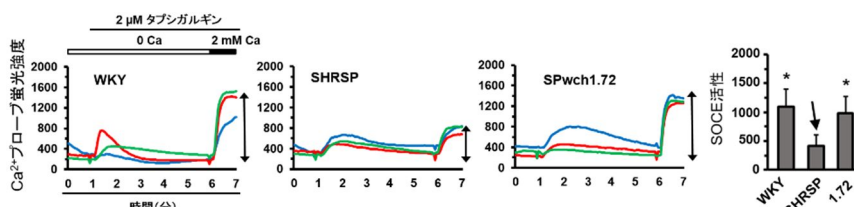


図3 SHRSPアストロサイトではSOCEが減弱している

2. 研究の目的

上記の知見にもとづき、本研究では、*Stim1* 遺伝子変異と高血圧発症との関連を個体レベルで明らかにするため、新規遺伝子改変技術である CRISPR/Cas9 により SHRSP の *Stim1* 変異を野生型に置換した「*Stim1* ノックイン SHRSP (KI SHRSP)」を作製し、SHRSP において *Stim1* の機能を正常化することで、その高血圧病態の改善が見られるかを検討し、加えてその分子機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Stim1 knock-in SHRSP (KI SHRSP) の作製

SHRSP/Izm は、SHR 等疾患モデル共同研究会 (京都) より購入した。CRISPR/Cas9 による KI SHRSP の作製は京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設で実施され、ヘテロ接合体として島根大学に搬入されたものを、SHRSP/Izm への戻し交配とヘテロ同士の交配により、SHRSP/Izm において *Stim1* アレルが野生型ホモとなったノックイン系統として確立した。本系統は、ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP-Rat) に系統保存委託し、精子保存済みである (SHRSP^{Stim1em1}, NBRP Rat No: 0917)。

オフターゲット解析

CRISPR design tool (crispr.mit.edu) により、使用した guide RNA 配列によるオフターゲット候補部位を探索した。0.6 以上の Hit Score を示した上位 7 か所 (すべて遺伝子間領域もしくはイントロンに存在) と、1 か所のエキソン内の候補部位 (*Mta2* 遺伝子内) について、サンガー法による DNA シーケンシングにより非特異的編集の有無を確認した。

テールカフ法による血圧、心拍測定

12 週齢の雄 (KI SHRSP; n=15, SHRSP; n=10) を用いて、テールカフ法 (BP-98A, Softron) により血圧および心拍を測定した。KI SHRSP の一部 (n=6) および SHRSP 全個体 (n=10) について、16、20 週齢での測定も行った。痙攣発作や明らかな体重減少、自発活動の低下といった

脳卒中発症を示唆する所見が見られた個体については、20 週齢での測定は行わなかった。

アストロサイト初代培養と Ca²⁺イメージング

生後 1~3 日齢の新生仔を炭酸ガス吸入により安楽死させた後、脳を摘出し shaking 法により大脳皮質アストロサイトを単離培養した (Ohara, Nabika 2016 *BBRC*)。カルシウム蛍光指示薬 (Fluo-8 AM) を用いた Ca²⁺イメージングにより、SOCE 活性を評価した (Ohara, Nabika 2016 *BBRC*)。

Western blotting

12 週齢雄より採取し凍結保存した脳幹組織、および培養アストロサイトを RIPA バッファーで処理し、タンパク抽出液を得た。抽出タンパクを 10%ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜に転写後、抗 STIM1 抗体と抗 β -actin 抗体により各タンパクを検出した。 β -actin に対する相対的発現量は、Image J を用いた densitometry により算出した。

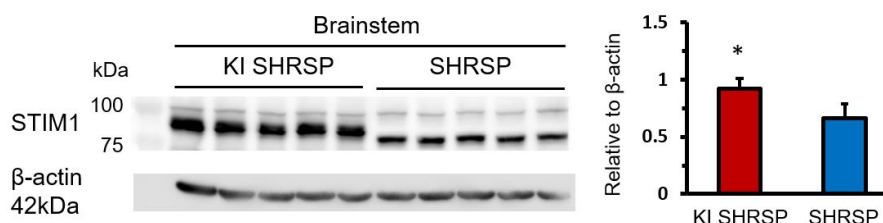
ストレス反応性の生理学的評価

物理的ストレスとして冷温ストレスを、精神的ストレスとして拘束ストレスを用いた (Ferdaus et al. 2014 *PLOS ONE*)。冷温ストレスはラットを 4 環境に 3 時間 (テレメトリー測定、後述) もしくは 6 時間 (ノルエピネフリン排泄量測定のための採尿) 暴露することで行った。拘束ストレスは体の大きさに合ったステンレス製金属ホルダー内にラットを 3 時間保定することで行った。ノルエピネフリンの測定は SRL (東京) に委託した。

11~12 週齢の雄ラットの腹腔内にテレメトリープローブ (HD-S10, Data Science Int.) を設置し、ストレス負荷前後の血圧および心拍の変動をモニターした。

4. 研究成果

オフターゲット解析において非特異的なゲノム編集の形跡は確認されず、作製された KI SHRSP では *Stim1* アレル特異的に遺伝子改変が行われていると考えられた。脳幹抽出物を用いた Western blotting により、KI SHRSP では野生型の STIM1 がタンパクレベルの有意な増加を伴って発現していることを確認した (結果 1)。これは、培養アストロサイトにおいても同様であった (データ非提示)。



結果 1. 脳幹における STIM1 の発現

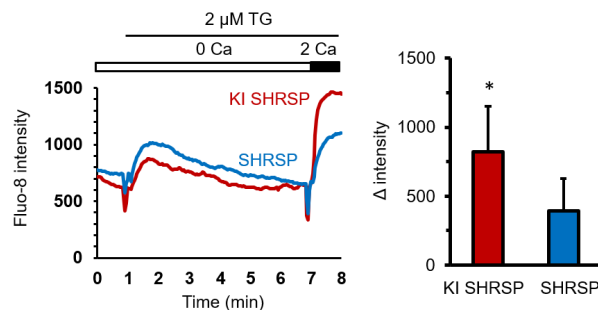
結果 2 の表に示す通り、テールカフ法による測定では、収縮期血圧 (SBP) および拡張期血圧 (DBP) いずれにおいても系統間で有意差は見られず、SHRSP における STIM1 の機能回復は血圧の基礎値に明らかな影響を与えないことがわかった。一方、心拍 (HR) は 16, 20 週齢において KI SHRSP が有意に低値であった。

結果 2. KI SHRSP および SHRSP の血圧、心拍の比較 (テールカフ法)

系統名	週齢	個体数	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)	HR (bpm)
SHRSP	12	10	199±10	138±13	350±18
	16	10	213±9	149±24	362±30
	20	7	233±10	176±9	384±34
<i>Stim1</i> KI SHRSP	12	15	199±22	139±14	349±25
	16	6	211±16	154±13	* 337±12
	20	5	226±12	165±8	* 341±22

* $P < 0.05$ vs. age-matched SHRSP

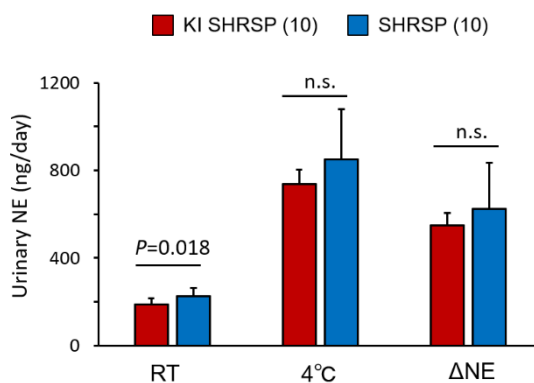
また、Ca²⁺イメージングを用いてタプシガルギン(TG)による強制的な小胞体Ca²⁺ストアの枯渇により誘導されるSOCE活性を比較したところ、KI SHRSP 由来のアストロサイトは SHRSP 由来のそれと比較して有意に高い SOCE 活性を示し、CRISPR/Cas9 によるノックインにより、SHRSP において STIM1 機能 (SOCE 活性) が回復していることが確認された(結果 3)。



結果 3. Ca²⁺イメージングによる SOCE 活性評価

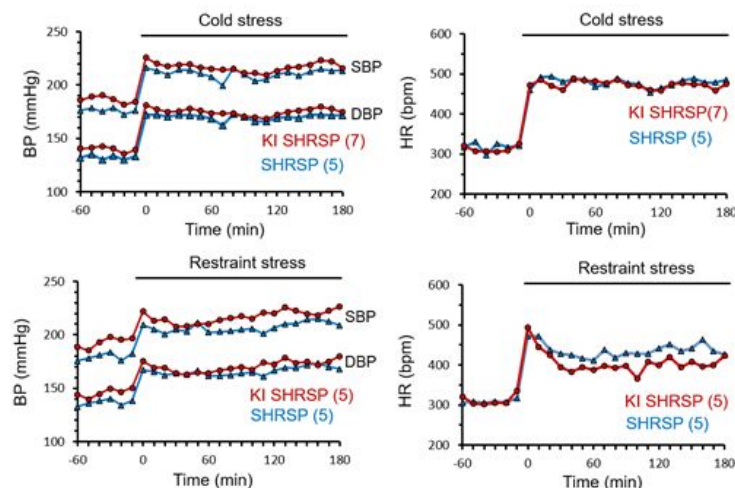
尿中へのノルエピネフリン(NE)排泄量は、交感神経活性をよく反映するマーカーとして齧歯類モデルでも頻用される。室温(RT)もしくは冷温ストレス(4℃)条件下で6時間採尿し、各条件におけるNE排泄量およびストレス負荷前後での排泄量変化(ΔNE)を評価した(結果 4)。

RTでは、差は僅かながら有意にKI SHRSPで低値であった。しかし、4℃およびΔNEでは系統間で有意差は見られなかった。通常の飼育環境(室温)におけるベースラインの交感神経活性については、血圧値(結果 2 参照)などに明らかに影響するレベルでは無いものの、系統間でわずかな違いが存在する可能性が示唆された。



結果 4. 尿中ノルエピネフリン排泄の比較

テレメトリー法により、冷温/拘束ストレス負荷前後でのBPおよびHR、またそれらのストレス負荷に伴う増加量(ΔBP, ΔHR)を比較した(結果 5)。テールカフ法による測定の結果(結果 2)と一致して、ストレス負荷前(ベースライン)のSBPおよびDBPには有意差は見られなかった。また、冷温ストレス・拘束ストレスいずれにおいても、ΔBPに有意差は認められなかった。冷温ストレスにおけるHRにおいても同様に有意差は見られなかったが、拘束ストレス中のHRおよびΔHRについてはKI SHRSPが有意に低値を示した(KI SHRSP vs. SHRSP (bpm), HR under restraint stress: 406±16 vs. 436±11, ΔHR: 94±12 vs. 128±23)。



結果 5. テレメトリー法による冷温/拘束ストレスによる血圧・心拍の測定

本研究では、遺伝子ノックインによりSHRSPでSTIM1機能を回復させた新たなゲノム編集SHRSPを作製し、STIM1変異と過剰なストレス性交感神経反応との関連を検討したが、これまでの研究経過から予想されたような抑制的效果は確認されなかった。一方で、テールカフ法による血圧・心拍測定(結果 2)や、テレメトリー測定における拘束ストレス(結果 5)に共通する「自発的運動の制限」という限定的なストレス環境において、心拍についてはKI SHRSPが有意に低値を示した。このことから、SHRSPにおけるSTIM1機能回復により、そのストレス反応性が部分的に改善される可能性が考えられたが、これは予想されなかった結果であり、今後より詳細な検証が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ngarashi Davis, Fujikawa Koichi, Ferdous Mohammed Zubaerul, Zahid Hasan M., Ohara Hiroki, Nabika Toru	4. 巻 42
2. 論文標題 Dual inhibition of NADPH oxidases and xanthine oxidase potently prevents salt-induced stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 981 ~ 989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-019-0246-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Reza Mohammad Farhadur, Ngarashi Davis, Koike Masamichi, Misumi Masaki, Ohara Hiroki, Nabika Toru	4. 巻 2019
2. 論文標題 Evaluation of Pathological Association between Stroke-Related QTL and Salt-Induced Renal Injury in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/5049746	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mahal Zinat, Fujikawa Koichi, Matsuo Hiroyuki, Zahid Hasan M., Koike Masamichi, Misumi Masaki, Kaneko Takehito, Mashimo Tomoji, Ohara Hiroki, Nabika Toru	4. 巻 42
2. 論文標題 Effects of the Prdx2 depletion on blood pressure and life span in spontaneously hypertensive rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 610 ~ 617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-019-0207-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Niiya Kaoru, Ohara Hiroki, Isono Masato, Sheikh Abdullah Md., Matsuo Hiroyuki, Fujikawa Koichi, Isomura Minoru, Kato Norihiro, Nabika Toru	4. 巻 8
2. 論文標題 Further dissection of QTLs for salt-induced stroke and identification of candidate genes in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-27539-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hiroki Ohara, Batbayar Odongoo, Davis Ngarashi, Toru Nabika
2. 発表標題 In vivo functional evaluation of STIM1 as a candidate gene responsible for exaggerated sympathetic response to stresses in SHRSP: establishment of Stim1 knock-in SHRSP
3. 学会等名 28th European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大原浩貴、Batbayar Odongoo、 Davis Ngarashi、並河徹
2. 発表標題 SHRSPにおけるカルシウム貯蔵センサーSTIM1の機能異常は高血圧発症に
3. 学会等名 第41回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大原浩貴、Batbayar Odongoo、 Davis Ngarashi、並河徹
2. 発表標題 STIM1機能異常はSHRSPにおける高血圧成因の一つか？
3. 学会等名 第53回高血圧関連疾患モデル学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroki Ohara, Davis L. Ngarashi, Toru Nabika
2. 発表標題 Evaluation of pathological basis of a SHRSP-based congenic strain characterized by early stroke occurrence
3. 学会等名 2017 ASH Annual Scientific Meeting with the AHA Council on Hypertension Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大原浩貴、Davis L. Ngarashi、並河徹
2. 発表標題 早期に脳卒中を自然発症するSHRSPコンジェニックラットの病態生理学的性質と
3. 学会等名 第40回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大原浩貴、Davis L. Ngarashi、並河徹
2. 発表標題 SHRSPの脳卒中自然発症を促進する遺伝性憎悪因子の探索
3. 学会等名 第53回高血圧関連疾患モデル学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大原浩貴、Yao Na、並河徹
2. 発表標題 E3ユビキチンリガーゼCBLCを介したSHRSPにおける食塩誘発性脳卒中の新規分子メカニズムの探索
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小池正道、三角将輝、ムハンマド・ファルハード・レザ、大原浩貴、並河徹
2. 発表標題 脳卒中モデルラットSHRSPの脳卒中QTLは腎障害に影響するか？：コンジェニックラットによる検討
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大原浩貴、並河徹	4. 発行年 2018年
2. 出版社 島根県医師会	5. 総ページ数 58
3. 書名 島根医学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----