

令和 7 年 6 月 9 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2024

課題番号：21H03374・23K21628

研究課題名（和文）新たな減塩戦略につながる食塩嗜好性遺伝子の解明

研究課題名（英文）A study to identify causative genes for high salt preference in the spontaneously hypertensive rat, a genetic model rat for hypertension.

研究代表者

並河 徹（Nabika, Toru）

島根大学・学術研究院医学・看護学系・特任教授

研究者番号：50180534

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：高血圧の遺伝的ラットモデルであるSHRが食塩を好んで摂取することから、本研究ではSHRの食塩嗜好性に関する遺伝子同定を目的とした。SHRとその対照ラットであるWKYを交配して孫世代のラット約300匹と約400個同定したゲノムマーカーを用いて、第3染色体の端に食塩嗜好性遺伝子が存在することを突きとめ、この領域をSHRとWKYの間で入れ替えたラットを作成し、その遺伝子の効果を確認した。SHRにおける食塩嗜好性が、最も重要な塩味受容体である舌のENaC依存性であることを示した。ナトリウム欲求性をブラスに制御する脳神経核pre-LCでは、SHRの方が神経活性が低いことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトは生来、食塩を「美味しい」と感じて摂ろうとする機構を備えている。これは、ナトリウムが必須のミネラルであるのに、摂取することが難しかったために発達した機構であるが、現代社会では、食塩過剰摂取を招き、高血圧をはじめとする生活習慣病の重要な要因となっている。本研究で、高血圧の遺伝的モデルラットSHRにおける食塩過剰摂取の原因遺伝子のひとつがラットの第3染色体の端に存在することが明らかとなった。また、SHRと対照ラットであるWKYの比較から、舌の塩味受容体や脳のpre-LCが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。これらの結果は、食塩嗜好性の生理的機構を明らかにする上で貴重な成果である。

研究成果の概要（英文）：The spontaneously hypertensive rat (SHR), a genetic model rat of hypertension, is known to prefer salt water more than does the control Wistar-Kyoto rat (WKY). We conducted genetic as well as physiological experiments to identify the mechanism of the high salt preference in SHR. We found that 1) the causative gene(s) is in the telomeric region of the chromosome (Chr) 3 through a QTL analysis, and the result was confirmed in a congenic rat harboring a WKY fragment of Chr 3 on the SHR background, that 2) amiloride as well as denervation of the tympanic nerve reduced the salt preference in SHR, suggesting the important role of the epithelial Na channel on the tongue, and that 3) pre-LC, a brain nucleus known to drive salt appetite, was less active in SHR compared with WKY. These observations would help to identify the causative gene(s) for salt preference, and to develop a new strategy for reduction of salt intake in humans.

研究分野：実験病理学、遺伝学、実験動物学

キーワード：食塩嗜好性 QTL解析 SHR

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1) 本態性高血圧症は様々な心血管イベントの原因となる疾患であり、これを予防することは、健康寿命の延伸に加えて医療費を削減するためにも重要である。本態性高血圧症の発症機序は特定されるに至っていないが、食塩過剰摂取が重要な要因であり、減塩によって発症率を下げるができることが明らかとなっている (Mozaffarian D et al., N Engl J Med 2014)。しかしながら、これまで様々な方法で減塩が試みられてきたにもかかわらず、充分実効性のある方法は確立されていない。その原因のひとつに、必須ミネラルであるナトリウムを「好ましい」と感じる「塩味」反応が生理的メカニズムとしてヒトの体にビルトインされていることがある。つまり、生まれつき体内に備わった、塩味を「美味しい」と感じる機構により、減塩を実現することが難しくなっている。従って、塩味を好む機構を解明することができれば、画期的な減塩戦略に結びつく可能性があると考えられる。

2) 甘味、苦味、旨味、酸味と異なり、塩味のみが食塩濃度によって2相性の反応を起こすことが知られている。低い濃度では「美味しい」と感じて摂取が促進されるが、高い濃度では「塩辛い」と感じて忌避反応が起こる。近年この機序についての研究が進み、低濃度ナトリウムに対しては舌の塩味センサーである上皮性ナトリウムチャンネル (ENaC) が働いて摂取を促進するが、高濃度ナトリウムに対しては苦味と酸味のセンサーが活性化されることによって忌避反応を惹起することが明らかとなった (Oka Y et al., Nature 2013)。

3) また、我々の行った健康調査で、ヒトにおいても、薄い塩味を感知する感度のみならず濃い塩味に対する忌避反応にも個人差が存在することが判明した。これには、食習慣などの後天的要因が影響しているとともに、背景に遺伝的な因子の存在が示唆される。食塩嗜好性にかかわる遺伝子の存在は、本態性高血圧の遺伝的モデルである自然発症高血圧ラット (SHR) が、正常血圧対照ラットである WKY に比べて、食塩水を好んで飲むことでも強く示唆される。

2. 研究の目的

以上の背景をふまえ、本研究の目的は、SHR の食塩嗜好性の原因となる遺伝子を同定し、それをヒトでの減塩戦略に応用する方法を検討することである。具体的には、

1) 量的遺伝子 (QTL) 解析の手法を用いて、SHR と WKY の食塩嗜好性の差を説明出来る遺伝子領域 (食塩嗜好性 QTL) を同定する。

2) 生理学、神経科学的アプローチを用いて、SHR の食塩嗜好性に関与する生理的メカニズムに関する情報を得る。1) で得られた遺伝的情報と合わせて、候補遺伝子の絞り込み、同定を行う。

3) 上記の遺伝子情報を基に、ヒトでの関連解析を行い、食塩嗜好性遺伝子の同定を試みる。

3. 研究の方法

1) 食塩嗜好性の評価

8週令の SHR, WKY を用いた。

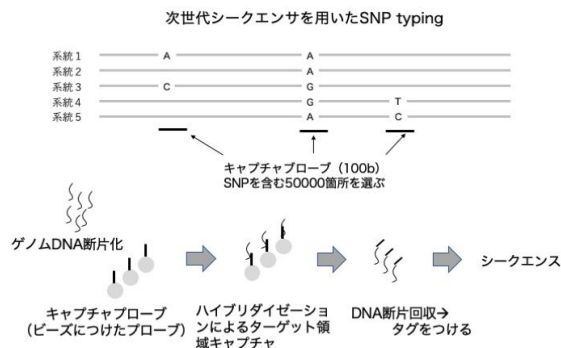
長期2ボトル実験: 様々な濃度の食塩水を入れたボトル (食塩水ボトル) と水を入れたボトル (水ボトル) を用意し、ラットが2つを自由に選んで摂取できるようにセットする。24時間ごとに2つのボトルの位置を入れ換えて、48もしくは72時間ラットに飲ませる。食塩水、水の消費量を測定し、食塩水消費量 (vol_salt) およびトータルの消費量に対する食塩水消費量の割合 (%salt) をもって、食塩嗜好性の指標とした。また、食塩水ボトルと水ボトル双方に ENaC 阻害薬である amiloride 100 μ M を加えて同様の実験を行い、ENaC の役割について検討した。

短期2ボトル: 24時間絶水後に、上記長期実験と同様の2ボトル自由摂取により、10分間の飲水量を測定した。ボトル位置は1分ごとに交換した。

味覚神経切断実験: 味覚情報を伝達する鼓室神経を外科的に切断し、上記と同様の実験を行った。

2) QTL 解析

SHR と WKY を交配して F2 世代 (孫世代) のラット約 300 匹を用意し、上記に従って長期2ボトル実験による食塩嗜好性を測定した。実験終了後にラットを安楽死させ、肝臓より DNA を抽出、約 300 匹の F2 ラットについて、約 400 の遺伝的マーカーと食塩嗜好性データとで QTL 解析を施行した。従来の QTL 解析では、ひとつひとつの microsatellite marker を PCR を用いて解析



していたため多くの労力と時間を要し、解析するマーカー数や個体数を増やすには限界があったが、今回は、次世代シーケンス技術とターゲットキャプチャー法を応用することにより、より多くの SNP marker を多数の F2 ラットを用いて短時間でタイピングすることが可能となった。今回は、ユニバーサルにラット系統で使用できるプローブとして、20 系統のラットの全ゲノムデータを比較して、これらの系統間で差のある SNP を約 50000 箇所抽出し、相補的なオリゴプローブを合成した。F2 ラット 300 匹と SHR, WKY から抽出して断片化したゲノム DNA とこれらのオリゴプローブをハイブリダイゼーションすることで SNP を含む DNA 断片を抽出し、これにタグを付して、次世代シーケンサーにて SNP 解析を実施した。QTL 解析には multiple imputation 法を用いた（前ページの図参照）。

3) コンジェニック系統

既に作成されていた、ラット第3染色体をターゲットとし、SHR をベースに当該染色体領域のみを WKY 由来のものに入れ換えたコンジェニックラット2系統を、保存凍結精子より個体復元した。SHR の卵子にコンジェニック由来の精子を顕微受精し、これを偽妊娠ラットの子宮に戻して産仔を得た。これはターゲット領域がヘテロになっているため、仔どうしを交配することでターゲット領域が WKY 型ホモとなるコンジェニックラット2系統を得た（3SW3, 3SW5）。このコンジェニック系統を用いて、上記に従って食塩嗜好性を検討した。

4) 神経科学的検討

ナトリウム摂取を刺激する脳神経核として、pre-LC が重要な役割をになっていることが報告されている（Augustine V et al., Cell 2020）。そこで、ナトリウム制限下での pre-LC 活性化について SHR, WKY 間で比較をおこなった。11 週令雄の SHR, WKY に低ナトリウム食（通常食に比べ手ナトリウム含有量 1/10）を 2 週間食べさせた後、ラットを安楽死させ、pre-LC 領域での c-fos（神経活性化のマーカー）発現を免疫蛍光染色法にて検討した。

5) 腸管における ENaC 発現

ENaC は、舌だけでなく、消化管の一部でも発現しており、食塩嗜好性に関連している可能性がある。そこで、SHR, WKY 間で腸管内の ENaC 遺伝子発現を比較した。12 週令雄を用い、overnight での絶食の後、ラットを安楽死させ、十二指腸、回腸、上行結腸、直腸、腎臓を採取し、凍結保存した。RNA 抽出後、RT-PCR にて ENaC の 3 つの subunit (α, β, γ) 遺伝子の発現レベルを検討した。

6) ヒトにおける関連解析

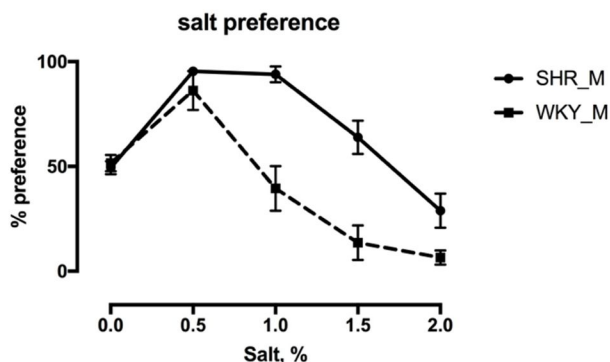
マウスにおいて、苦味や酸味のレセプターが高濃度の食塩に対する忌避反応に重要な役割を果たしているという報告があった（Oka Y et al., Nature 2013）。一方、苦味受容体のひとつである TAS2R19 にみられる遺伝子多型が苦味感受性に影響を与えることが知られている。そこで、今回、約 2300 名の健診受診者を対象に、尿中ナトリウム濃度から推定された塩分摂取量と TAS2R19 遺伝子多型との関連を調べた。塩分摂取量は、スポット尿中のナトリウム濃度を用いて田中らの計算式にて推定した（Tanaka T et al., J Hum Hypertens 2002）。TAS2R19 の遺伝子多型（rs10772420）は Taqman 法を用いてタイピングした。

これらの研究計画については、実施した研究施設の倫理委員会において承認を得ている。

4. 研究成果

1) 食塩嗜好性の評価

長期 2 ボトル法：0.5%, 1%, 1.5%, 2% と食塩濃度を増やして検討したところ、SHR, WKY とともに 0.5% では食塩水を好み、%salt は 90% 程度となり、濃度が増すに連れて減少したが、1, 1.5% では SHR の方が有意に高い %salt を示した。2% では有意な差はみられなかった（右図）。vol_salt を比較すると、0.5% 濃度において、SHR は WKY の 1.5~2 倍であることが明らかとなった。つまり、SHR では、WKY が忌避する濃度の食塩水も好んで飲むとともに、飲む量も WKY と比較して有意に多い。



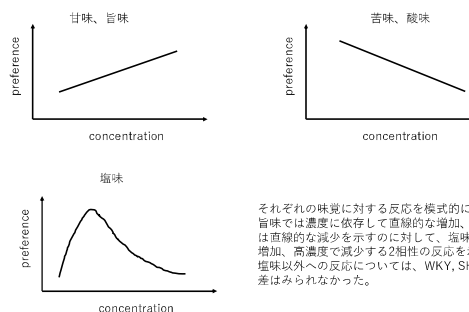
この傾向は SHR で血圧が上昇する 8 週令でも血圧上昇が始まる前の 4 週令でも同様であり、さらに、雌雄ともに同様であった。このことは、SHR と WKY の差が血圧などの 2 次的影響ではなく、生来の遺伝的差違であることを強く示唆していた。

また、amiloride を加えることで ENaC をブロックしたところ、%salt も vol_salt も SHR と WKY との差は消失したため、SHR の食塩嗜好性は ENaC に依存した現象であることが示唆された。同様の手法を用いて、甘味（ショ糖）、旨味（グルタミン酸）、苦味（キニン、カフェイン）、酸

味（酢酸）に対する反応を見たところ、塩味のような 2 相性の反応は示さず、また、SHR と WKY に有意差はみられなかった(右図)。これは、塩味についての SHR の反応は特異的であることを示している。

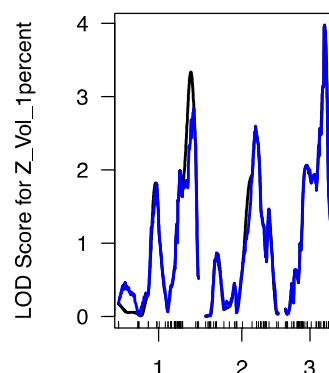
舌からの味覚神経の役割について検討するために鼓室神経切断の効果を検討したところ、SHR において vol_salt が減少し、WKY と同程度となった。%salt については神経切断の効果は限定的であった。

短期 2 ボトル法：長期法では、ナトリウムが体内に摂取されることで、腸管にある ENaC などの塩味受容体や、血中ナトリウム濃度の変化などを介した 2 次的変化が加わる可能性がある。そこで、純粋に味覚だけの反応をみるために、短期実験を実施した。その結果、SHR と WKY 両系統で、0.5%程度の低濃度食塩水でも%salt は 5~60%に留まり、長期実験のときのような高い食塩嗜好性は観察されなかった。これは、実験前の絶水時間が長く、ラットは食塩水と水の区別なく飲水した可能性が考えられる。両系統間の差は高濃度で WKY の方が優位に食塩水を好むという結果となったが、%salt は両系統ともに 2~30%程度であった。



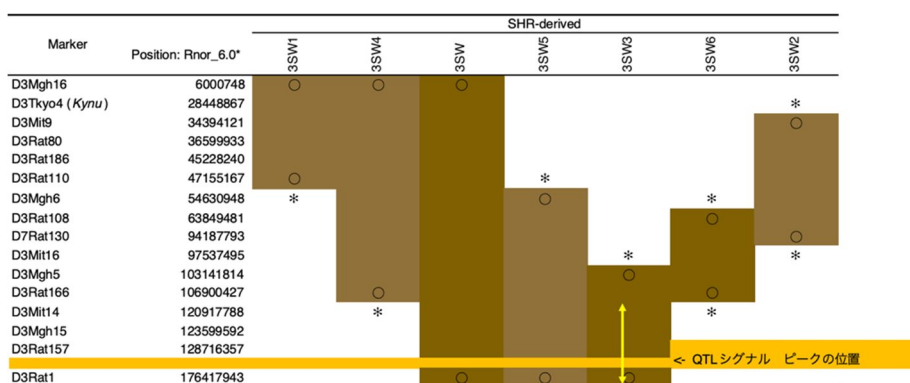
2) QTL 解析

ターゲットキャプチャー・シークエンス法により、シグナルの得られた SNP のうち、SHR と WKY がホモ型を示し、F2 約 100 匹を用いた解析で遺伝子型の比率が WKY ホモ型:ヘテロ型:SHR ホモ型=1:2:1 から大きく逸脱することのないものを抽出したところ、約 400 マーカーがこれに合致した。これらのマーカーを用いて QTL 解析を実施したところ、第 3 染色体のテロメア側に、150,000Kbp 付近をピークとする有意なシグナルを得る事ができた(右図)。特に 1%食塩水での vol_salt で LOD score が 4 となり、全ゲノムレベルで有意となる強い関連がみられた。



3) コンジェニック系統の作成と表現形解析

NBRP-rat に寄託してあるコンジェニック系統を検索したところ、QTL 解析で同定された第 3 染色体をターゲットとし、SHR のバックグラウンドに WKY の当該領域を入れたコンジェニックラットが 7 系統存在することが判明した。



茶で示した領域が WKY 由来の染色体領域である。

この中から、QTL 領域を含む 3SW5、3SW3 の 2 系統を選び、凍結精子を用いた顕微授精により個体を起ち上げた。

その結果、より広い WKY 由来の領域を有する 3SW5 において、SHR と比較して有意な食塩嗜好性の低下がみられ、この領域に食塩嗜好性に関与する遺伝子が存在することを確認することができた。この領域は約 100,000Kbp という広さであり、そこに存在する数百ある遺伝子の中から原因となる遺伝子を同定するのは困難である。今後、3SW6 や 3SW2 を更に起ち上げて食塩嗜好性を検討することでターゲットとなる領域を狭めるとともに、網羅的遺伝子発現解析などを駆使して脳神経核などでの発現状況、WKY、SHR 間での発現量の違いを調べるとともに、機能的変化を起こしうる遺伝子変異の探索を進めることで、食塩嗜好性の責任遺伝子同定に迫りたい。

4) 神経科学的検討

SHR では、pre-LC 領域のニューロンの活性化が亢進しており、食塩摂取欲求が高まっているのではないかと、この仮説の下に検討を行った。低ナトリウム食で2週間飼育した後に pre-LC での神経活性化を検討したところ、cFOS を発現する活性化ニューロンの数は SHR でむしろ減少していることが判明した。予想外の結果であったが、SHR では、pre-LC を含む系と異なる系によって食塩嗜好性が高まっており、それによって pre-LC の活性化がむしろ抑制されていた可能性が考えられる。これは、QTL 解析の結果から原因遺伝子の同定を試みる上で重要な情報となりうるものと考えられる。

5) 腸管における ENaC 発現解析

十二指腸や回腸での発現は観察されず、上行結腸や直腸での発現がみられた。特に直腸での発現が高く、alpha subunit が特に高発現していた。Positive control として腎の発現と比較したところ、腎ではむしろ gamma subunit の発現が高く、発現パターンの違いがみられた。系統間の有意差はみられなかった。

6) ヒトにおける関連解析

TAS2R19 遺伝子内にある SNP とスポット尿に基づく推定塩分摂取量との関連を検討したところ、minor allele G を有する方が major allele のホモ型より食塩摂取量が有意に多く、linear regression 解析にて他の因子を調整した後でも有意な効果がみられた。この遺伝子多型が苦味感受性にどのような影響を与えるのかについては、解明されていない点が多いが、苦味受容体が塩分摂取に影響を与える可能性を示唆する結果として注目される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tobita Hiroshi, Sakai Hiromichi, Yamaguchi Akane, Notsu Yoshitomo, Kataoka Masatoshi, Yazaki Tomotaka, Nabika Toru, Ishihara Shunji, Kobayashi Hironori	4. 巻 73
2. 論文標題 Association of lysophosphatidic acid molecules with liver fibrosis: different roles indicated	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 255 ~ 261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbn.23-58	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 Ohara Hiroki, Takeuchi Fumihiko, Kato Norihiro, Nabika Toru	4. 巻 42
2. 論文標題 Genotypes of Stim1 and the proximal region on chromosome 1 exert opposite effects on stroke susceptibility in stroke-prone spontaneously hypertensive rat	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Hypertension	6. 最初と最後の頁 118 ~ 128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/HJH.0000000000003566	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 Miyazaki Ryo, Abe Takafumi, Sakane Naoki, Ando Hitoshi, Yano Shozo, Okuyama Kenta, Isomura Minoru, Yamasaki Masayuki, Nabika Toru	4. 巻 53
2. 論文標題 Associations between dairy consumption and the physical function in Japanese community-dwelling older adults: The Shimane CoHRE study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Geriatric Nursing	6. 最初と最後の頁 19 ~ 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gerinurse.2023.06.014	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 Abe Takafumi, Okuyama Kenta, Kamada Masamitsu, Kitayuguchi Jun, Hamano Tsuyoshi, Waki Hidefumi, Nabika Toru, Isomura Minoru, Sundquist Kristina	4. 巻 33
2. 論文標題 Association between flexibility activity and blood pressure change among older adults in Japan: A 5 year longitudinal study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports	6. 最初と最後の頁 1552 ~ 1559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/sms.14386	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 Matsuo Hiroyuki, Kawakami Kohei, Ohara Hiroki, Kaneko Takehito, Mashimo Tomoji, Yamada Takaya, Nabika Toru	4. 巻 72
2. 論文標題 Apolipoprotein E-depletion accelerates arterial fat deposition in the spontaneously hypertensive rat	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 439 ~ 445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.23-0012	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 Ohara H, Nabika T	4. 巻 10
2. 論文標題 Genetic modifications to alter blood pressure level	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicine	6. 最初と最後の頁 1855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10081855.	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 Abe T, Tominaga K, Ando Y, Hamano T, Yano S, Isomura M, Nabika T.	4. 巻 45
2. 論文標題 Reduced masticatory performance and not using dentures are associated with hypertension in older adults with tooth loss: the Shimane CoHRE study.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hypertens Res	6. 最初と最後の頁 1553-1562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Wang M, Ohara H, Egawa M, Fukunaga S, Matsuo H, Ge ZR, Nabika T.	4. 巻 71
2. 論文標題 A 3-Mbp fragment on rat chromosome 1 affects susceptibility both to stroke and kidney injury under salt loading in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat: a genetic approach using multiple congenic strains.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Exp Anim	6. 最初と最後の頁 368-375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.21-0189.	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 Mahal Z, Matsuo H, Zahid HM, Notsu Y, Ohara H, Okamoto K, Nabika T.	4. 巻 31
2. 論文標題 Milk Fermented with Mushrooms Prevents Stroke in the Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats Independently of Blood Pressure.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Stroke Cerebrovasc Dis	6. 最初と最後の頁 106421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2022.106421	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 Miyazaki R, Abe T, Yano S, Okuyama K, Sakane N, Ando H, Isomura M, Yamasaki M, Nabika T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Associations between physical frailty and living arrangements in Japanese older adults living in a rural remote island: The Shimane CohRE study.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Gen Fam Med	6. 最初と最後の頁 310-318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgf2.544.	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 並河徹、Fahadur Reza、吉原美奈子、須山幹太、裕哲崇
2. 発表標題 SHRにおける食塩嗜好性の探索
3. 学会等名 第57回高血圧関連疾患モデル学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分担 者	横田 茂文 (Yokota Shigefumi) (50294369)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授 (15201)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	須山 幹太 (Suyama Mikita) (70452365)	九州大学・生体防御医学研究所・教授 (17102)	
研究分担者	加藤 規弘 (Kato Norihiro) (80293934)	国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・部長 (82610)	
研究分担者	碓 哲崇 (Sako Noritaka) (90243154)	朝日大学・歯学部・教授 (33703)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関