

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790846

研究課題名(和文) 高血圧責任遺伝子同定への新規アプローチ：ストレス応答遺伝子と高血圧をつなぐ

研究課題名(英文) A novel approach for identification of the genes responsible for hypertensive phenotype in SHRSP

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000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)は過剰なストレス感受性を示し、SHRSPで見られる循環器病態との関連が指摘されているが、原因となる遺伝的要素については不明である。以前我々はコンジェニック系統を用いた遺伝学的方法論を軸に、SHRSPの第1染色体の約1.8-Mbpの領域にストレス感受性遺伝子が存在することを示した。本研究ではサブコンジェニック系統を用いた解析により候補領域を約1.2-Mbpに絞り込んだ。さらに、SHRSPにおいてナンセンス変異に起因する変異型タンパク質の発現およびタンパク質レベルでの発現低下が見られたStim1遺伝子を有力な候補遺伝子として同定した。

研究成果の概要(英文)：Exaggerated sympathetic response to stress in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP) have been implicated in the pathogenesis observed in this strain. Previously, by using a congenic strain constructed between SHRSP and the normotensive Wistar-Kyoto rat (WKY), we showed that a 1.8-Mbp region on chromosome 1 of SHRSP affects the sympathetic response to stress. In this study, subcongenic analyses further narrowed down the candidate region to a 1.2-Mbp fragment. Gene expression analysis and whole genome sequence analysis identified Stim1 as a strong candidate gene as a nonsense mutation was found in this gene of SHRSP. A western blot analysis confirmed a truncated form of STIM1 in SHRSP. In addition, the analysis revealed that the protein level of STIM1 in the brainstem of SHRSP was significantly lower when compared with WKY. Our results suggested that Stim1 is a strong candidate gene responsible for the exaggerated sympathetic response to stress in SHRSP.

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：高血圧 疾患モデル ストレス コンジェニックラット

## 1. 研究開始当初の背景

高血圧自然発症脳卒中易発症ラット (SHRSP) はヒト本態性高血圧・脳血管疾患モデルとして現在も世界的に広く利用されている。代表者が所属する研究室では、SHRSP と正常血圧コントロールである Wistar-Kyoto ラット (WKY) の間で、特定の染色体領域のみを交換したコンジェニックラットを用いた遺伝学的・生理学的方法論を軸に、SHRSP における高血圧関連遺伝子の同定を試みてきた。

SHRSP は高いストレス感受性を示すことが知られており、その高血圧・脳卒中病態との関連が古くから指摘されている。我々は、ラット第 1 染色体にストレス感受性遺伝子が存在することを明らかにし、これらが交感神経活性の亢進を介して血圧上昇を引き起こす可能性を示した (Cai et al., 2003, Cai et al., 2004, Xiao et al. 2010)。現在、候補領域を最小で約 1.8-Mbp にまで絞り込むことに成功している (Xiao et al., 2010)。この領域には、カテコールアミン合成酵素遺伝子の発現調節に関わる転写因子をコードする *Phox2a* 遺伝子が存在し、有力な候補遺伝子と考えられた。

## 2. 研究の目的

有力な候補遺伝子である *Phox2a* 遺伝子を含んだまま、より狭い染色体領域を保持するサブコンジェニック系統を作成する。これにより、*Phox2a* のストレス感受性遺伝子としての候補性の検証ならびに候補領域の絞り込み、他の有力候補遺伝子の同定を目指した。

## 3. 研究の方法

### サブコンジェニック系統の作成

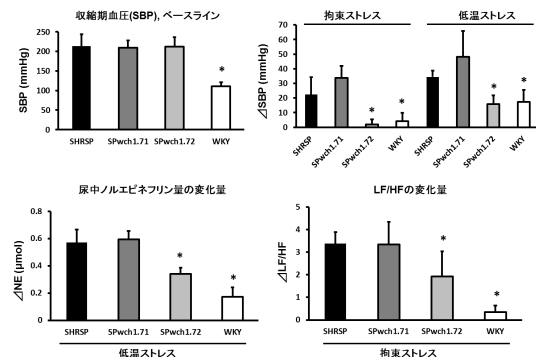
SHRSP ゲノムを背景に、WKY の第 1 染色体断片を移し替えたコンジェニック系統 (SHRSP.WKY-(D1Smu13-D1Wox33)/Izm, 以下 SPwch1.72 と略, Xiao et al., 2010) を SHRSP に戻し交配し、その F1 世代を相互交配して F2 世代を得た。この F2 世代から組換え体を選抜し、SHRSP に戻し交配することで雌雄のヘテロ個体を得た。これらを兄妹交配することで、SPwch1.72 より狭い WKY 由来の染色体領域を保持するコンジェニック系統 (SHRSP.WKY-(D1Smu13)/Izm, 以下 SPwch1.71 と略) を確立した。なお、SPwch1.71 がカバーする染色体領域には有力な候補遺伝子である *Phox2a* が含まれている。

ストレス感受性の評価と候補領域の絞り込み

SHRSP/Izm, WKY/Izm, SPwch1.71 および 1.72 いずれも 12 週齢雄性ラットを用いた。テレメトリー法による血圧測定、ならびに交

感神経活性の評価として尿中ノルエピネフリン量の測定および心拍変動のパワースペクトル解析 (高周波成分 (HF) に対する低周波成分 (LF) の比率 (LF/HF) を相対的な交感神経活性として算出) を行い、ストレス負荷によるこれらの生理学的パラメーターの変化値をストレス感受性の指標とした。ストレス負荷には、拘束ストレス (ラットを体の大きさに合わせたステンレスホルダーに 3 時間固定) もしくは低温ストレス (4 環境に 3 時間もしくは 6 時間放置) を用いた。

SPwch1.71, SPwch1.72 とともにベースラインの血圧は SHRSP と同等であった。拘束もしくは低温ストレスを与えた際の血圧変化は、SPwch1.72 は SHRSP よりも有意に低く、一方 SPwch1.71 は SHRSP と同等であった。同様に、交感神経活性についても SPwch1.72 のそれは SHRSP より有意に低いが、SPwch1.71 は SHRSP と同等であった。これらの結果は、SPwch1.71 がカバーする染色体領域はストレス感受性に影響しないことを示し、当初有力と考えられた *Phox2a* は候補遺伝子から除外された。結果として、ストレス感受性遺伝子の存在領域を約 1.2-Mbp、候補遺伝子を 12 個に絞り込んだ。



### 候補遺伝子の解析

我々が同定した第 1 染色体のストレス感受性領域は、交感神経活性と血圧調節の中樞とされる吻側延髄腹外側野 (RVLM) ニューロンの電気活動性に影響することが示されている (Iigaya et al., 2009)。このことから、我々は SP1.72 がカバーするコンジェニック領域に RVLM 機能を調節する遺伝子が存在すると予想し、RVLM を含む脳幹領域をターゲット臓器として選択した。

SHRSP/Izm と WKY/Izm をコントロール群と低温ストレス負荷群 (各 N=5) に分け、RVLM を含む脳幹領域から全 RNA およびタンパク質を抽出した。定量的 RT-PCR 解析により、低温ストレス負荷により SHRSP で有意に発現量が高くなる遺伝子を二つ (*Nup98*, *Pgap2*) 同定した。一方、WKY/Izm, SHR/Izm, SHRSP/Izm の全ゲノム配列から各候補遺伝子における非同義置換の有無を調べたところ、SHRSP/Izm の *Stim1* 遺伝子にナンセン

ス変異 (p.Arg640X) が存在することがわかった。ウェスタンブロット解析により SHRSP/Izm の脳幹で不完全長の変異型 STIM1 の発現が確認され、WKY/Izm と比してタンパク質レベルでの発現低下も見られた。さらに、WKY、SHR、SHRSP の亜系と、一般に利用される複数の実験用ラットについて個別にシーケンシングを行い、このナンセンス変異は SHRSP 系統に特徴的であることがわかった。

#### 4. 研究成果

本研究では、サブコンジェニック系統を用いた方法論により第 1 染色体のストレス感受性領域を最小で約 1.2-Mbp (最大で 1.8-Mbp) の範囲にまで絞り込み、さらに候補遺伝子の遺伝子発現解析とシーケンシング解析から、*Stim1* を有力な候補遺伝子として同定した。STIM1 は小胞体膜に存在する膜貫通タンパク質であり、小胞体内腔のカルシウム貯蔵を感知するセンサータンパク質として機能する。小胞体カルシウムストアの枯渇により、STIM1 とそのパートナー分子として働く細胞膜チャネルタンパク質 *Orai1* により誘導される「ストア作動性カルシウム流入 (SOCE)」は、多くの生理現象、病態との関連が示唆されているが、その実態については未知の点も多い。

2009 年に、Giachini らにより SHRSP の動脈における STIM1 の過剰発現とその高血圧病態との関連が指摘された。彼らと我々の報告の間にはいくつかの相違点があるが、SHRSP の循環器病態の背景に、STIM1 が関与する何らかの増悪シグナルが存在する可能性を提示している点は大変興味深い。変異による欠失とタンパクレベルでの発現低下、どちらが重要かは不明だが、カルシウム恒常性の制御という STIM1 の生理的機能を考慮すると、この遺伝子は現時点における最有力候補だと言える。現在、変異型 STIM1 が何らかの機能異常を示すかどうか、主に培養細胞系で検討中である。

#### 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 1 件)

Ferdous MZ, Xiao B, Ohara H, Nemoto K, Harada Y, Saar K, Hübner N, Isomura M, Nabika T. (2014) Identification of *Stim1* as a candidate gene for exaggerated sympathetic response to stress in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. PLoS ONE 9(4):e95091

[学会発表](計 5 件)

大原 浩貴, 磯村 実, 並河 徹:  
ストレス性高血圧原因遺伝子としての *Stim1* の同定: 高血圧モデルラット SHRSP を用いた研究. (招待講演) 第 91 回日本生理学会大会, 鹿児島市, 2014 年 3 月 16 日 ~ 18 日.

大原 浩貴, 並河 徹: 遺伝的高血圧モデルラット SHRSP におけるストレス性高血圧原因遺伝子の探索. 第 36 回日本高血圧学会総会, 大阪市, 2013 年 10 月 24 日 ~ 26 日.

大原 浩貴, 磯村 実, 並河 徹:  
ラット第 1 染色体に潜むストレス感受性と高血圧をつなぐ遺伝子の探索: ストレス性高血圧の原因遺伝子同定を目指して. 第 49 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 東京都, 2013 年 9 月 6 日 ~ 7 日.

Ohara H, Ferdous MZ, Isomura M, Nabika T: Search for the genes responsible for exaggerated sympathetic response to stress in stroke-prone spontaneously hypertensive rat: genetic and molecular biological approach using congenic strains. 15<sup>th</sup> International SHR Symposium/48<sup>th</sup> Japanese SHR Meeting. September 27-28, 2012, Melbourne, Australia.

大原 浩貴, 並河 徹: ストレス感受性から見た SHRSP における高血圧原因遺伝子の探索. 第 35 回日本高血圧学会総会, 名古屋市 2012 年 9 月 20 日 ~ 22 日.

[図書](計 0 件)

[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

<http://www.med.shimane-u.ac.jp/pathology/>

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：