

201110004B

別添1

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

創薬および臨床試験の効率化に資するメタボリックシンドロームと

心血管病のモデルラットの開発研究

平成21年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者 加藤 規弘

平成24(2012)年 5月

## 目 次

I. 総合研究報告	
創薬および臨床試験の効率化に資するメタボリックシンドロームと	
心血管病のモデルラットの開発研究-----	1
加藤 規弘	
(資料) 日本高血圧学会演題抄録7題	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	17
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	21

## 厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進 研究事業）

## 総合研究報告書

創薬および臨床試験の効率化に資するメタボリックシンドロームと  
心血管病のモデルラットの開発研究

研究代表者 加藤 規弘 国立国際医療研究センター 部長

研究要旨 近年、新規薬剤や器具の開発により、個別病態の治療という点では、目覚ましい進歩が認められるものの、脳卒中・心筋梗塞などの脳心血管病（以下、心血管病と略）の患者数自体は増加の一途をたどっており、QOL および生命予後の改善という点で、詳細な病態の理解に立脚した治療および予防戦略の強化が求められている。細胞や遺伝子などを材料とした基礎研究から重要な知見が得られても、それが個体レベルでどのように作用するのか、を知ることが臨床応用のためには不可欠であり、こうした観点から疾患モデル動物の有用性が高い。心血管病（ないしメタボリックシンドローム）リスクファクターである高血圧や糖尿病に関しては、各々適切なモデル動物がいくつか存在するが、心血管病そのものに関しては、必ずしも十分な整備状況といえないため、本研究で新規モデルの開発を試みた。

高血圧自然発症ラット（SHR）系統から一連のコンジェニック系統を作成し、それらを用いて高血圧、脳卒中易発症性などの感受性遺伝子座の探索・確認、遺伝子間相互作用の検討、疾患モデルとしての特徴付け・表現型解析を行った。合計 8 つのラット染色体領域を組み換えたコンジェニック系統を作成・確立し、そのなかには劇症型脳卒中易発症 SHR（E-SHRSP）をはじめとして、染色体 1 番のストレス感受性、染色体 3 番の心肥大、染色体 4 番のメタボリックシンドローム（代謝関連形質の集積）、染色体 15 番の脂質、等の特徴的な疾患関連表現型を呈するラットが含まれていた。また、げっ歯類の弱点とされてきた cholesteryl ester transfer protein（CETP）のトランスジェニック・ラットを作成し、ヒトの動脈硬化型脂質異常を模することができた。さらに疾患モデル活用の一例として SHR 系統での高血圧性腎硬化症の解析を行い、補体 C3 の遺伝的な発現増加、C3a 受容体を介した間葉系細胞の合成型形質転換、アンジオテンシン II（Ang II）産生を認め、同ラットモデルが心血管病の基盤病態—リモデリング—に対する新規の治療標的開発において有用性が高いことを示した。

このような薬剤開発等に向けた先駆的研究の利便性向上という観点は言うまでもなく、臨床的命題のモデル動物でのシミュレーションが可能となることによる臨床試験の負担軽減という経済性の観点においても今後大きな社会的・行政的貢献が期待できる。

## 研究分担者

並河徹・島根大学医学部 教授

福田昇・日本大学大学院 教授

として汎用されている SHR 系統をベースにして、心血管病ないし動脈硬化の新規モデル動物の開発と、創薬・臨床試験を効率的に推進するうえでのモデル動物の有用性の強化を研究目的とする。心血管病の病態メ

## A. 研究目的

本研究では、インスリン抵抗性のモデル

カニズムに関する重要な知見が基礎研究から得られつつあるが、それを薬剤開発等につなげる「橋渡し研究」へと展開するためには、心血管病の適切なモデル動物の開発が不可欠である。ヒトと全く同じとはいかなくても、個体レベルでの評価システムは、創薬シーズの探索および開発された薬剤候補化合物の安全性・治療効果の判定にとって、重要な研究ツールである。近年、日本人の心血管病の基盤病態として粥状動脈硬化（以下、動脈硬化）の関与度が大きくなり、その適切な疾患モデル動物の開発が切に望まれている。動脈硬化のモデルとしては、ウサギやブタ、遺伝子改変マウス（Apo E ノックアウトマウスなど）が一般的に用いられる。繁殖の利便性や遺伝子操作のし易さという点では、マウスが最も適しているものの、顕著な高脂血症を呈する系統のマウスにおいてさえ、冠動脈硬化や心筋梗塞の発症は報告されていない。こうしたなかで、1999年、Dahl食塩感受性ラットにヒト cholesteryl ester transfer protein (CETP) を導入したトランスジェニック (Tg) ラットが作成され、高脂血症および、全身の動脈硬化とともに心筋梗塞を生ずることが報告された (Herrera *et al.* Nat Med. 5; 1383-1389)。それ以前にも、複数のマウス系統において CETP の Tg モデルは作成されてきたが、冠動脈硬化や心筋梗塞の報告はなされていない。すなわち現時点では、Dahl 食塩感受性ラット由来の Tg モデルだけであるが、ラットとマウスとの種差、および高血圧素因との重合が、冠動脈硬化や心筋梗塞の発症において重要ではないかと推測されている。これまでに研究代表者らは、血圧・血糖・脂質・肥満度・心肥大・脳卒中の起こし易さ等が互いに異なる、14 系統の染色体組み換えラット (consomic/congenic ラット) を SHR 系統から作成してきた。これら一連の疾患関連形質を意図的に組み合わせて集積することにより、創薬や臨床試験の多様な

具体的命題に対応できる“心血管病評価用ラットパネル”を開発しようという点で本研究の独創性が高い。

そこで本研究は (1) ヒトの動脈硬化性心血管病を探究する上でのげっ歯類の弱点とされてきた CETP の欠損を補うべく、Tg ラットを作成して、脂質代謝障害から動脈硬化への進展を模する新規モデル動物を開発すること、(2) メタボリックシンドロームなどの動脈硬化リスクファクターの集積に関して、代表的な組み合わせパターンの疾患モデルラットを新たに開発すること、そして (3) これらを創薬および臨床試験の効率化に役立てるべく“心血管病評価用ラットパネル”として整備すること、を主たる目的とする。

## B. 研究方法

本研究の実実施計画は大きく三つの部分から成る。一つ目は、SHR にヒト CETP を導入した Tg ラットを作成・表現型解析する部分、二つ目は、同 Tg ラットも含めて、心血管病関連形質（動脈硬化リスクファクター形質と個々の臓器障害）を特徴的に有する、一連の近交系ラットから“心血管病評価用ラットパネル”を作成・整備する部分、そして三つ目は心血管病の新規治療法開発に向けた病態探究（疾患モデルを活用した研究）の実践である。

1) ヒト CETP を導入した Tg ラットの作成  
ヒト Apo C3 promoter (-1,114位から+24位までの1.43-kb断片) とヒト CETP の全長 cDNA (1.57-kb断片)、および SV40 の poly-A シグナル配列から成る recombinant transgene を作成し、それを SHR に導入して 4~6 系統のトランスジェニック・ラットの作出を試みた。Transgene の construct を準備した後、トランスジェニック founder 繁殖の部分は外注作業を行った。その後、各系統での導入 transgene のコピー数および発現

臓器の確認をqRT-PCR法で行い、血中脂質レベルの変化を指標に、モデルとして適切な系統を選別した。

脂質のリポタンパク分画だけでなく、血圧、血糖、インスリン、脂肪肝などのリスクファクター形質について、Tg系統間の違い、および経時的変動を調べた。

相当量のヒト CETP の RNA を肝臓で発現し、血中 CETP 活性も高く、HDL-cholesterol (特に HDL1 分画) の顕著な低下を示す Tg 系統 (30 コピー導入) に関して、免疫組織学的検査で動脈硬化 (大動脈と冠動脈) の状態を予備的に調べた。この際、高脂肪高コレステロール食 (動脈硬化誘導食) の飼育条件下で検討した。

2) 心血管病評価用ラットパネルの作成  
研究代表者らは、これまでに SHR ないしその亜系である脳卒中易発症 SHR (SHR-SP) の一部の染色体 (または染色体断片) を対照系統の WKY と組み換えた consomic/congenic ラットを 14 系統作成してきた。組み換えの標的とした染色体領域には、リスクファクター形質 (血圧・血糖・脂質・肥満度) や臓器障害 (心肥大・脳卒中の起こし易さ) 等を規定する遺伝子座が認められている。作成された consomic/congenic ラットは、これらの心血管病関連形質の一部に関して、元祖の SHR/SHR-SP よりも病的である。たとえば、SHR 由来のラット染色体 19 番の consomic ラットは SHR よりも 10% 以上脂肪重量が多く、同様にラット染色体 1 番の congenic ラットは SHR よりも 20% 以上血糖値が高い。したがって、consomic/congenic ラットどうしを組み合わせることにより、元祖の SHR/SHR-SP よりも心血管病関連形質の『濃縮』した新規モデル動物を作成することが可能である。

全てのラット系統は近交系として維持されているため系統内での遺伝的背景は均一である。組み換えられた染色体断片の

移行 (transfer) を多型性 marker でモニタリングしながら、double recombinant (2 カ所の組み換え断片を同時に保有する系統) を順次作成し、画一的なプロトコールに従って系統ごとの心血管病関連形質に関するデータを収集・整備した。新規 10 系統の作成を行い、1 系統あたり雄雌とも 20 匹の phenotyping を目標として進めた。

遺伝子どうしの相互作用が疾患発症の鍵となることが示唆されており、遺伝的高血圧ラットの複数の責任遺伝子 (領域) を正常血圧ラットに移入することで、限られた数の遺伝子 (領域) の組み合わせで親系統と同等の高血圧や脳卒中を起こす系統の新規作出を試みた。

3) 疾患モデルでの高血圧性腎硬化症の病態探究

分担研究者 (福田) らは、SHR 由来間葉系細胞では WKY に比較して補体 C3 を発現し、補体 C3 が心血管腎臓病を惹起している可能性を報告してきた。治療標的としての同分子機序の有用性を探究すべく、SHR、SHR-SP および WKY の腎臓での C3、C3a 受容体の免疫染色を行い、腎糸球体からメサンジウム細胞 (MC) を単離継代培養し、臭素化デオキシウリジン (BrdU) 取り込みによる DNA 生合成、収縮型形質マーカー  $\alpha$ -SMA、合成型形質マーカー Osteopontin の発現、RIA による Ang II の産生を評価した。これらに対する C3a 受容体拮抗薬の作用を検討した。さらに SHR-SP、WKY での *in vivo* 食塩負荷実験における BrdU 取り込みにより臓器増殖能を評価し、C3a 受容体拮抗薬の作用も検討した。

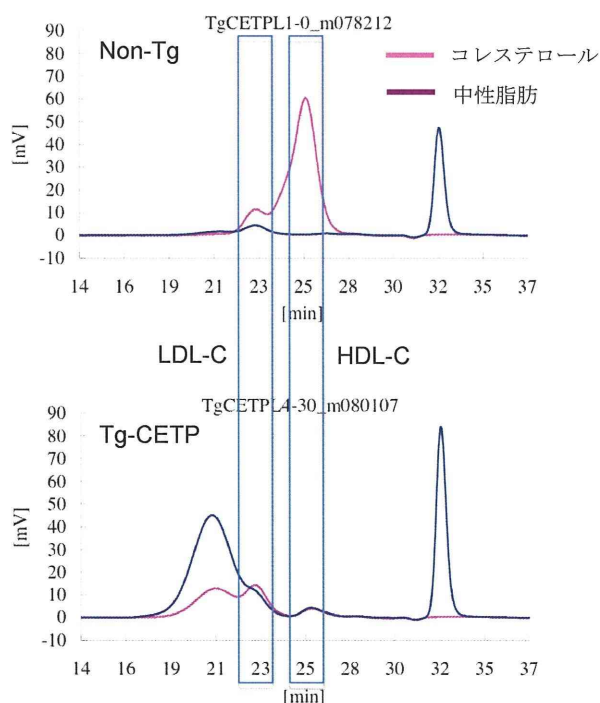
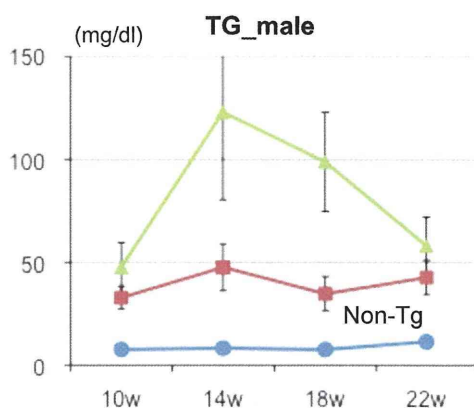
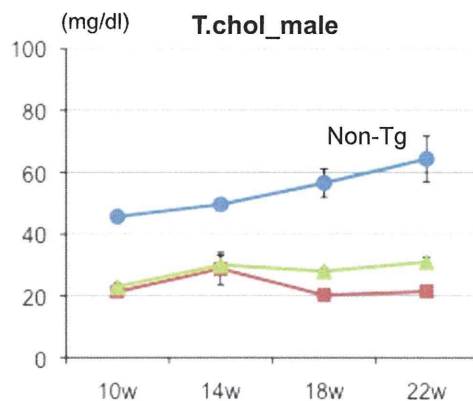
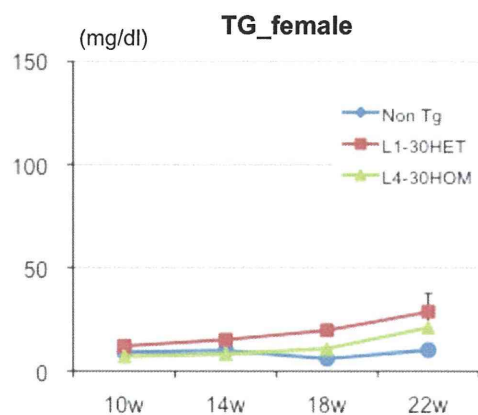
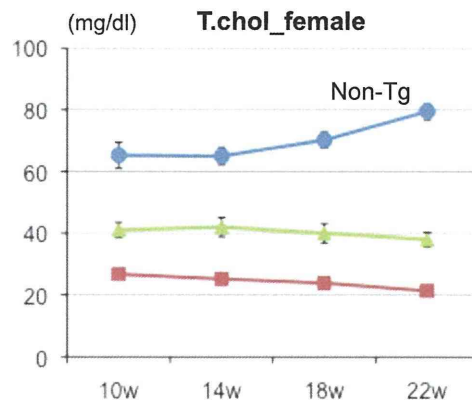
(倫理面への配慮)

当該研究ではヒト由来試料を取り扱わない。「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」および「厚生労働省における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守し、動物愛護に配慮して研究立

案し、立案した動物実験計画の妥当性について、機関内の動物実験委員会の審査と許可を受けて進める。

### C. 研究結果

1. ヒトCETP-Tgラットの作成・表現型解析  
transgene の導入に成功した系統が全部で 5 系統あり、そのうちの、3 系統 (L1-6HOM、L1-30HET、L4-30HOM) の繁殖に成功した。L1-30HET のホモ型作成を試みたが、胎生致死の可能性が高く出生しないため、ヘテロ型状態で維持しており、L1-6HOM は現在表現型解析中である。血中脂質レベルに関しては、導入 copy 数にほぼ対応して (多くなればなるほど) 総コレステロール (TC) が顕著に低下し、逆に中性脂肪 (TG) が顕著に上昇していた [non-Tg 系統に比べて TC が 1/2-1/3 以下、TG が 3-4 倍以上に増加]。TG の上昇は雄ラットでより顕著であった。



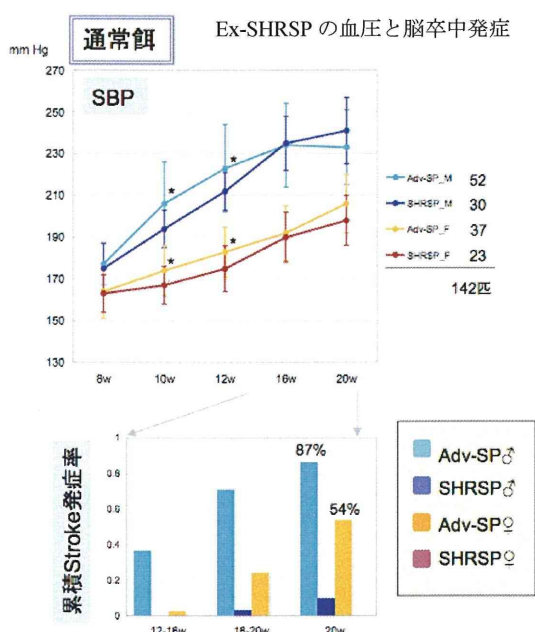
Tg ラットでは、リポタンパク泳動において、HDL-C の低下と中性脂肪の上昇が顕著。

もともとラット TC の最大リポタンパク分画は HDL であるが、TC (HDL 分画) ↓、TG (VLDL 分画) ↑という、ヒトの動脈硬化型の脂質異常が見られた。

Tg ラットでは、さらに脂肪肝の進行、雌での血圧上昇 (16 週齢で 14-19 mmHg 上昇、 $P < 0.05$ ) が認められた。

## 2. “心血管病評価用ラットパネル”の整備

SHR およびその亜系である脳卒中易発症 SHR (SHR-SP) より作成したコンジェニック系統に関して、高血圧、脳卒中、心肥大、脂質、体重、脂肪重量などの疾患関連表現型を調べた。なかでも顕著な表現型を示す「劇症型脳卒中易発症 SHR (Ex-SHRSP)」系統とともに、染色体 1 番のストレス感受性、染色体 3 番の心肥大、染色体 4 番のメタボリックシンドローム (代謝関連形質の集積)、染色体 15 番の脂質、等の (作成した) コンジェニック系統に関する臨床的評価を行った。



また、多因子疾患の成因・病態解析で重要な課題「遺伝子間相互作用」を探究すべく、コンジェニック系統同士を組み合わせたもの (double、triple コンジェニック系統) の

開発を進めた。特にラット染色体 1 番、3 番、4 番に注目し、本研究開始時に着手していた 14 系統に加えて、サブコンジェニック系統 (組み換え断片をより狭小化したもの) を新規に作成し責任遺伝子領域を絞り込むことができた。

また高血圧に関しては染色体 1 番と 9 番、1 番と 13 番の間等で、脳卒中に関しては 1 番と 18 番の間で double congenic 系統を作成し、遺伝子間相互作用の検討を行ったところ、SHR と SHR-SP 間の脳卒中感受性の違いはわずか 2 つの染色体領域の入れ換えによって大部分説明可能であり、確立した congenic 系統は新たなモデル動物として有用と考えられた。

Ex-SHRSP は、通常餌での飼育下で高率に脳卒中を自然発症すること (左下図)、食塩負荷により更に発症時期を早められること、等が判明した。さらに詳細な病態機序の解析 (マイクロアレイ解析など) を行ったところ、脳での発現変動を示す脳卒中感受性関連分子の候補がいくつか見いだされた。

## 3. モデルラットでの心血管病の病態探究

心血管病のなかでも特に腎障害 (高血圧性腎硬化症) に関して、先ず血圧影響の無い培養細胞 (*in vitro*) 実験系において補体 C3 の病因/病態的関与の検討を進めた。腎臓での C3、C3a 受容体の免疫染色により、C3 が糸球体で、C3a 受容体が尿細管で各々発現していることを確認した。糸球体からメサンジウム細胞 (MC) を単離後継代培養し、SHR および SHR-SP の MC が、対照の WKY の MC よりも過剰増殖を示すこと、合成型形質マーカーの高発現、Ang II の過剰産生を示すことを見いだした。さらに個体 (*in vivo*) 実験系で C3a 受容体拮抗薬を投与したところ、これらの変動を有意に抑制できた。



上述した、研究結果の第1項、第2項に関しては、その成果を来る日本高血圧学会等で発表予定であり、その演題抄録（計7演題）を参考資料として添付する。

#### D. 考察

CETP-Tg ラットに関しては、今後、更に広範な表現型解析を進めるとともに、脂肪肝や動脈硬化病変などの病理学的所見を調べて、ヒト疾患モデルとしての有用な情報を付加していく。心血管病のリスクファクターとして低 HDL-cholesterol 血症が知られているが、その臨床的意義に関しては十分なエビデンスが得られていない。近年、新たな機序の（HDL-C を上昇させ且つ LDL-C を低下させる）脂質異常症治療薬として CETP 阻害薬が開発・発売された。最初に発売された CETP 阻害薬は、血圧上昇と共に内皮機能が低下し心血管事故が増えてしまったために中止されたという経緯があることから、新規に発売される CETP 阻害薬に関しては安全性の確認が強く求められている。げっ歯類で本来欠損する CETP を transgene として外的に導入し作成されたモデル動物は、CETP 阻害薬による心血管病治療での強力な臨床評価ツールとなり得る。

本研究で作成した一連のコンジェニック系統は、右上表に例示した通り、元となる近交系ラットと比べて特徴的な心血管病関連表現型を示す。これらは、各々の病態機序を探究するうえでも、また既存の治療薬の臨床評価を行ううえでも、有用な疾患モデルとなる。特に Ex-SHRSP や脳卒中関連コンジェニック系統は、脳卒中の自然歴と薬物介入の timing、機序を検討するうえでも有用性が高い疾患モデルと考えられる。

また従来、高血圧性心血管/腎障害は高血圧の“結果”と考えられていたが、血圧影響の無い培養細胞系においても、内因性異常として C3 の遺伝的過剰発現とそれに伴う細胞増殖が認められた。こうした知見は、

モデル動物での検証プロセスを経て、新規の治療標的開発において有望な介入ポイントを提供し得るものと考えられる。

疾患形質	作成手法	特徴的表現型
CETP 遺伝子導入	transgenic	HDL-C↓、TG↑
脳卒中	congenic : Ex-SHRSP	劇症型脳卒中 易発症性
ストレス感受性	congenic : 染色体 1 番	交感神経活性 ↑
心肥大	congenic : 染色体 3 番	心肥大、血圧→
メタボリックシンドローム	congenic : 染色体 4 番	脂質、血圧、 insulin 変動
脂質	congenic : 染色体 15 番	総コレステロール↑

表. 本研究で開発した主な疾患モデルラット

#### E. 結論

CETP の Tg ラットを開発し、ヒトの動脈硬化型脂質異常を呈することを確認した。SHR 系統から、一連の特徴的な心血管病関連表現型を示すコンジェニック系統を開発し心血管病評価用ラットパネルとして整備した。高血圧性腎障害の病態改善に、補体 C3 阻害の治療的有用性を確認した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nabika T, Ohara H, Kato N, Isomura M. The stroke-prone spontaneously hypertensive rat: still a useful model for post-GWAS genetic studies? *Hypertens Res*. 2012 Mar 8. doi: 10.1038/hr.2012.30. [Epub ahead of print].

Takeuchi F, Kato N, *et al*. Genome-wide association study of coronary artery disease in the Japanese. *Eur J Hum Genet*. 2012, 20: 333-40.



- Kato N, *et al.* Meta-analysis of genome-wide association studies identifies common variants associated with blood pressure variation in east Asians. *Nat Genet.* 2011, 43: 531-8.
- Takeuchi F, Kato N, *et al.* Detection of common single nucleotide polymorphisms synthesizing quantitative trait association of rarer causal variants. *Genome Res.* 2011, 21: 1122-30.
- Sasawatari S, Kato N, *et al.* The solute carrier family15A4 regulates TLR9 and NOD1 functions in the innate immune system and promotes colitis in mice. *Gastroenterology.* 2011, 140: 1513-25.
- Takeuchi F, Kato N, *et al.* Confirmation of ALDH2 as a major locus of drinking behavior and of its variants regulating multiple metabolic phenotypes in Japanese. *Circ J.* 2011, 75: 911-8.
- Takeuchi F, Kato N, *et al.* Association of obesity susceptibility genetic variants with type 2 diabetes in the Japanese. *Diabetologia.* 2011, 54: 1350-9.
- Takeuchi F, Kato N *et al.* Blood pressure and hypertension are associated with seven loci showing male-specific interaction with age among the Japanese. *Circulation.* 2010, 121: 2302-9.
- Takeuchi F, Kato N *et al.* Evaluation of pharmacogenetic algorithm for warfarin dose requirements in Japanese patients. *Circ J.* 2010, 74: 977-82.
- Takeuchi F, Kato N *et al.* Common variants at the *GCK*, *GCKR*, *G6PC2-ABCB11*, and *MTNR1B* loci are associated with fasting glucose in two Asian populations. *Diabetologia.* 2010, 53: 299-308.
- Hashimoto M, Nabika T, *et al.* Effects of hydrogen-rich water on abnormalities in a SHR.Cg-Leprcp/NDmcr rat - a metabolic syndrome rat model. *Med Gas Res.* 2011, 1: 26.
- Xiao B, Harada Y, Kawakami K, Nabika T. A 1.8-Mbp fragment on chromosome 1 affects sympathetic response to stress: evaluation in reciprocal congenic strains between stroke-prone spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat. *J Hypertens.* 2011, 29: 257-65.
- Hamano T, Nabika T, *et al.* Contributions of social context to blood pressure: findings from a multilevel analysis of social capital and systolic blood pressure. *Am J Hypertens.* 2011, 24: 643-6.
- Nabika T. Quality over quantity? No, quality and quantity. *Hypertens Res.* 2010, 33: 110-1.
- Han Y, Fukuda N, *et al.* Role of complement 3a in the synthetic phenotype and angiotensin II-production in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2012, 25: 284-9.
- Yoshida Y, Fukuda N, *et al.* Treatment with valsartan stimulates endothelial progenitor cells and renal label-retaining cells in hypertensive rats. *J Hypertens.* 2011, 29: 91-101.
- Yamamoto C, Fukuda N, *et al.* Protective effects of statin on cardiac fibrosis and apoptosis in adrenomedullin knockout mice with the angiotensin II and high salt loading. *Hypertens Res.* 2011, 34: 348-53.
- Fukuda N. Transforming growth factor- $\beta$  as a treatment target in renal diseases. *J Nephrol.* 2009, 22: 708-15.

## 2. 学会発表

加藤規弘, 竹内史比古, 山本健, 磯野正人, 勝谷友宏, 杉山卓郎, 並河徹, 藤岡農宏, 大中佳三, 家森幸男, 山口修平, 小林祥泰, 高柳涼一, 荻原俊男. 日本人での大規模追試研究による、7つの候補遺伝子と血圧値/高血圧との関連の検討. 第34回日本高血圧学会総会, 宇都宮, 10月, 2011.

Horikoshi M, Kato N, Wiltshire S, Asimit J, Rayner NW, Robertson N, Takeuchi F, Teo YY, Zeggini, E, McCarthy M, Morris A, T2D-GENES Consortium. Trans-Ethnic Fine-Mapping of T2D Susceptibility Loci. ADA Annual Meeting 2011, San Diego, USA, June, 2011.

Tsend-Ayush Gandolgor, 小川淑子, 大原浩貴, 崔宗虎, 並河徹: SHR-SP由来の第1、18染色体領域は相乗的にSHRの脳卒中感受性を亢進させる. 第58回日本実験動物学会総会, 東京都江戸川区, 2011年5月25日~27日

桐原由美子, 武智眞由美, 黒崎薫, 海津幸子, 並河徹, 山田高也: Zucker Diabetic Fatty (ZDF) ラットの長期飼育における病理学的変化について. 第58回日本実験動物学会総会, 東京都江戸川区, 2011年5月25日~27日

並河徹: 疾患モデルラット研究の最前線. 第47回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 北海道, 2011年9月6日~7日(座長)

池田和也, 福田昇, 遠藤守人, 山元智衣, 上野高浩, 松本紘一, 相馬正義. 高血圧性血管および腎リモデリングにおける補体C3の役割. 第40回日本心脈管作動物質学会, 高松, 2011.02.

Zhou Xueli, 福田昇, 上野高浩, 遠藤守人, 松本紘一, 相馬正義. UUOモデルマウスで

の腎髄質上皮間葉化(EMT)による補体C3を介した腎尿細管でのレニン産生. 第47回高血圧関連疾患モデル学会, 札幌, 2011.09

Zhou Xueli, 福田昇, 遠藤守人, 上野高浩, 松本紘一, 相馬正義. 腎尿細管での上皮間葉化(EMT)現象により補体C3とレニン分泌. 第41回日本腎臓学会東部学術大会, 東京, 2011.10

竹内史比古, 加藤規弘. 遺伝子型間での量的形質の異分散性を活用した精密マッピング. 第55回日本人類遺伝学会, 大宮, 10月, 2010.

Cui ZH, Ozawa T, Gandolgor T-A, Xiao B, Kawakami K, Nabika T. Synergic effect of two QTLs on chromosome 1 and 18 accounts for the difference of stroke-susceptibility between SHR and SHRSP; A study on a double-congenic strain. The 18th International Workshop on Genetic Systems in the Rat. Nov 30-Dec 3, 2010. Kyoto, Japan.

Xiao B, Nabika T. Effect of a 1.8-Mbp genomic fragment on chromosome 1 on sympathetic response to stressors: Evaluation in reciprocal congenic strains between SHRSP and WKY. The 18th International Workshop on Genetic Systems in the Rat. Nov 30-Dec 3, 2010. Kyoto, Japan.

並河徹: ラット第1染色体上の1.5Mbpの領域がSHRSPのストレス反応性に関与する. 第33回日本高血圧学会総会, 福岡, 2010年10月15~17日.

Xiao B, Nabika T: Effect of a small genomic fragment on chromosome 1 on sympathetic response to stressors: Evaluation in reciprocal congenic strains between SHRSP and WKY. 6<sup>th</sup> International ISP Congress and 14<sup>th</sup> International SHR Symposium. September 22-25,

2010. Montreal, Canada.

Xiao B, Nabika T: Effects of small genomic fragment on chromosome 1 on the sympathetic reactivity to stresses: Evaluation in the reciprocal congenic strains between WKY and SHRSP. 第 57 回日本実験動物学会総会. 京都市、2010 年 5 月 12 日～14 日

崔 宗虎, 並河 徹: SHRSP/Izm と SHR/Izm のコンジェニックラットによる脳卒中関連遺伝子の探索, 第 57 回日本実験動物学会総会, 京都市 2010 年 5 月 12 日～14 日

Fukuda N, Ikeda K, Ying H, Ueno T, Tsunemi A, Matsumoto K. Complement 3 is involved in the cardiovascular remodeling in hypertension. The 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology. Kyoto, 2010. 3.

池田和也、福田 昇、上野高浩、山元智衣、松本紘一. 補体C3と高血圧性腎硬化症との関連性の検討. 第53回 日本腎臓学会学術総会. 神戸、2010. 6.

Ikeda K, Fukuda N, Han Y, Ueno T, Tsunemi A, Matsumoto K. Complement 3 is a primary factor for the cardiovascular and renal remodelings in spontaneously hypertensive rats. 14<sup>th</sup> International SHR Symposium. Montreal, 2010. 9.

Ueno T, Fukuda N, Tahira K, Matsumoto T, Soma M, Ikeda K, Yamamoto J, Yamori Y. Dyslipidemia and Altered Hepatic Gene Expression in a New Rat Metabolic Syndrome Model (SHRSP. ZLepr-fa IzmDpre). 14<sup>th</sup> International SHR Symposium. Montreal, 2010. 9.

池田和也、上野高浩、福田 昇、相馬正義、遠藤守人、山元智衣、松本紘一. 高血圧症性血管および腎リモデリングにおける補体 C3 の役割. 第 33 回日本高血圧学会. 福岡、

2010.10.

山元智衣、松本太郎、福田 昇. ラット胸大動脈リング 3 次元培養系を用いた血管に局在する血管内皮前駆細胞と血管構成細胞との相互作用についての検討. 第 33 回 日本高血圧学会. 福岡、2010.10.

加藤規弘, 梁一強, Zaidi Ali, 竹内史比古. 劇症型脳卒中易発症モデルラットの作成とポジショナルクロニング. 第 32 回日本高血圧学会総会, 大津, 10 月, 2009.

並河 徹: 心血管疾患のモデル動物: SHR and beyond. 第 32 回日本高血圧学会総会, 大津, 10 月, 2009.

肖 冰, 並河 徹: A small fragment on chromosome 1 controls urinary volume and orepinephrine excretion during cold stress. 第 45 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 東京

池田和也、福田 昇ら、SHR および SHR-SP における血管リモデリング、腎硬化症における補体 C3 の関与. 第 45 回高血圧関連疾患モデル学会, 東京, 9 月, 2009.

池田和也、福田 昇ら、高血圧症性血管リモデリングおよび腎硬化症における補体 C3 の関与. 第 32 回日本高血圧学会総会, 大津, 10 月, 2009.

G. 知的財産権の出願・登録状況  
特記すべきものなし。

## 第 35 回日本高血圧学会 抄録 (1)

高血圧自然発症ラット (SHR) 系統を用いた、遺伝的血压制御における中和的な遺伝子間相互作用の同定

Identification of "neutralizing" gene-gene interaction in the regulation of blood pressure in the SHR strains

秋山康一、梁 一強、磯野正人、竹内史比古、加藤規弘

【目的】近年、ヒトでは大規模ゲノムワイド関連解析が実施可能となり、血压関連遺伝子座が相当数同定されるようになってきた。しかし、この「遺伝子座」は有意な関連シグナルの位置を示すだけであり、責任遺伝子自体の同定や病態機序の解明に至るまでには依然として多くの障害がある。本研究は、障害の一つ「遺伝子間相互作用」をモデル動物での血压遺伝子探索を通じて実証することを目的とする。

【方法】脳卒中易発症 SHR (SHRSP) でのゲノム・スキャンで、血压値との最も強い連鎖を示したラット染色体 1 番に対するコンジェニック系統を多段階的に作成することによって物理的絞り込みを行った。合わせて、DNA マイクロアレイでの遺伝子発現解析、リシークエンシングでの genetic variant 解析等を組み合わせて、同染色体上の血压遺伝子探索を系統的に進めた。血压、その他の代謝関連形質を標的とし、コンジェニック系統あたり雄雌 60—110 匹ずつのラットを解析した。

【成績】スピードコンジェニック法の第一段階では、ドナー系統の Wistar Kyoto ラット (WKY) の染色体 1 番 270 M-bp 領域をレシピエント系統の SHRSP に導入した SHRSPwch1 を作成した。SHRSPwch1 では、SHRSP に比べて、雄 29.3 mmHg、雌 16.0 mmHg (雄雌ともに  $P < 1 \times 10^{-20}$ ) 16 週齢の血压低下を認めた。第二段階以後では、注目する染色体領域の一部を異なるサイズで保

有するサブコンジェニック系統を計 15 系統作成した。これらを組み合わせて解析した結果、ラット染色体 1 番上には少なくとも 10 個の血压遺伝子座の存在が判明した。そのうち、Bp1-2 (90.4—93.8 M-bp) と Bp1-3 (93.8—94.8 M-bp) は互いに隣接しており、WKY 型の Bp1-3 アレルを単独で有する場合には SHRSPwch1 とほぼ同程度の血压低下が見られ、更に WKY 型の Bp1-2 アレルが加わった場合 (Bp1-2+Bp1-3) には 7—12 mmHg 血压上昇が見られた。Bp1-3 領域にはカリクレイン (KLK) ファミリーの遺伝子が 28 個集積しており、そのうち 6 つのみに関して、Bp1-3 単独では 2—12 倍程度 mRNA 発現が有意に (多重検定補正  $P < 0.05$ ) 増加し、Bp1-2+Bp1-3 では何れも SHRSP のレベルに復帰/軽減していた。これら KLK 遺伝子のクラスターが Bp1-3 の責任遺伝子と推定された。Bp1-2 に関しては、SHRSP と WKY 間の mRNA 発現に有意差はないが、アミノ酸置換型多型を有する *Plekhl1* が候補遺伝子と推定された。

【結論】SHR 系統由来の高密度コンジェニック系統作成法により、一染色体上に >10 個の血压遺伝子座を分離・同定し、その一部の隣接遺伝子同士 (Bp1-2 とカリクレイン遺伝子群 Bp1-3 の間) で、血压、mRNA 発現ともに「中和」する方向の遺伝子間相互作用を実証できた。

## 第 35 回日本高血圧学会 抄録 (2)

高血圧自然発症ラット (SHR) 系統における心肥大遺伝子の探索: Endonuclease G 遺伝子の確認と新規遺伝子座の同定

Exploration of cardiac hypertrophy loci in the SHR strains: confirmation of endonuclease G and identification of a novel locus

梁 一強、秋山康一、磯野正人、加藤規弘

【目的】心肥大は遺伝性で見られる形質であり、心血管病を含む全ての死亡の独立した危険因子である。従来、高血圧の二次的変化が主因を成すと考えられてきたが、近年、高血圧とは独立した遺伝的機序の存在が示唆されている。本研究は、SHR およびその亜系 (脳卒中易発症 SHR: SHRSP) を用いたコンジェニック系統作成手法により、心肥大の責任遺伝子座の同定を目的とする。

【方法】我々が以前に行ったゲノム・スクランにより、心肥大の指標 (体重補正後心重量: Hw/Bw) の量的形質遺伝子座が認められた、ラット染色体 3 番に対するコンジェニック系統 [ドナー系統の遺伝子領域を残しながら、その他の遺伝情報をレシピエント系統と同一にすべく 6 世代以上選択交配して得られた遺伝的組み換え系統で、導入したコンジェニック断片以外はレシピエント系統と同一の遺伝情報を保有する] を多段階的に作成し、Hw/Bw、血圧、体重 (Bw)、後腹膜脂肪重量 (adipose/Bw) 等への遺伝的影響を検討した。各コンジェニック系統で 30—60 匹のラットを解析した。

【成績】遺伝的背景の均一化を早めるべく 210 余の多型マーカーを用いたスピードコンジェニック法を採用した。第一段階では、ドナー系統の Wistar Kyoto ラット (WKY) の染色体 3 番全体 171 M-bp をレシピエント系統の SHR と SHRSP に各々導入した、SHRwch3 と SHRSPwch3 を作成した。SHRwch3 と SHRSPwch3 では雄で 4.4—8.4% ( $P < 0.002$ )、雌で 1.6—6.5% ( $P = 0.12-5 \times 10^{-5}$ )

の心重量低下を認めた。16 週齢の血圧は、雄で 14.1—36.2 mmHg、雌で 17.9—23.3 mmHg (雄雌とも  $P < 4 \times 10^{-8}$ ) の低下を認めた。第二段階では、染色体 3 番を大きく 3 分割して、各部分を単独保有するコンジェニック系統を SHR と SHRSP に対して 3 系統ずつ作成した。第三段階では、二部分ずつ保有するコンジェニック系統を 2 系統ずつ作成した。こうして段階的に調べた結果、ラット染色体 3 番上には少なくとも 2 つの (血圧への影響とは一部独立した) 心肥大遺伝子が存在することが判明した。さらにコンジェニック系統を一つ追加作成したところ、推定存在範囲を Hw-1 (1—25 M-bp) と Hw-2 (90—115 M-bp) に狭めることができた。Hw-1 領域には、最近、別グループが報告した Endonuclease G (*Endog*) が存在しており、心臓での同遺伝子 mRNA 発現量を調べたところ、SHR と SHRSP では WKY よりも 5 倍近く発現低下 ( $P < 2 \times 10^{-7}$ ) していた。

【結論】SHR および SHRSP 由来のコンジェニック系統を段階的に作成することにより、2 つの心肥大遺伝子を同定した。そのうちの一つ Hw-1 に関しては、*Endog* が責任遺伝子である可能性が確認された。

## 第 35 回日本高血圧学会 抄録 (3)

高血圧自然発症ラット (SHR) 系統での、動脈硬化の多面的効果に関わる遺伝的機序の探索：血圧遺伝子座 SHR-Bp4-1~Bp4-3 の同定

Exploration of genetic loci with pleiotropic effects on atherosclerosis in the SHR strains: identification of three novel blood pressure loci

梁 一強、秋山康一、磯野正人、加藤規弘

【目的】メタボリック・シンドロームの概念に従い、これまで、特定の責任遺伝子は pleiotropic effect (多面的効果) をもち動脈硬化リスクを協調して高める方向に作用すると推定されてきたが、近年、必ずしも協調的でない (相反する) 方向に作用し得る可能性が示唆されている。本研究は、SHR を用いたコンジェニック系統作成手法により、動脈硬化リスクの責任遺伝子座の同定及び多面的効果の検討を目的とする。

【方法】ゲノム・スキャンにより、複数の動脈硬化リスク指標の責任遺伝子座が集積して認められた、ラット染色体 4 番に対するコンジェニック系統 [ドナー系統の遺伝子領域を残しながら、その他の遺伝情報をレシピエント系統と同一にすべく 6 世代以上選択交配して得られた遺伝的組み換え系統で、導入したコンジェニック断片以外はレシピエント系統と同一の遺伝情報を保有する] を二段階で作成し、血圧、体重 (Bw)、心重量 (Hw/Bw)、後腹膜脂肪重量 (adipose/Bw)、血糖、脂質等への遺伝的影響を検討した。各コンジェニック系統で 40—50 匹のラットを解析した。

【成績】遺伝的背景の均一化を早めるべく 210 余の多型マーカーを用いたスピードコンジェニック法を採用した。第一段階では、ドナー系統の Wistar Kyoto ラット (WKY) の染色体 4 番 48 M-bp 領域をレシピエント系統の SHR に導入した SHRwch4-1 を作成した。SHRwch4-1 では、SHR に比べて 16

週齢の血圧が、雄で 13.7 mmHg、雌で 10.3 mmHg (雄雌とも  $P < 3 \times 10^{-5}$ ) の低下を認めた。その他、SHR に比べて血糖上昇 (雄で 12.7 mg/dl、雌で 11.4 mg/dl) と脂肪重量低下 (雄で 13%、雌で 7%) が有意であった。第二段階では、標的染色体領域の一部を互いに異なるサイズで保有するサブコンジェニック系統を 5 系統作成した。これらの計 6 系統を組み合わせて解析した結果、ラット染色体 4 番上には少なくとも 3 つの血圧遺伝子座の存在が判明した [Bp4-1 が 0—11 M-bp、Bp4-2 が 32—34 M-bp、Bp4-3 が 45—49 M-bp にマッピングされた]。動脈硬化リスク指標に対する多面的効果という観点からは、Bp4-2 で昇圧アレルが血糖低下 (不一致) 方向の、Bp4-3 で降圧アレルが心肥大促進 (不一致) 方向及び脂肪重量低下 (一致) 方向の遺伝的効果を示した。更に Bp4-3 の推定存在範囲で、腎臓での発現変動遺伝子を探索したところ、唯一 *Fam3c* が SHR で WKY よりも 1.6 倍近く発現低下 ( $P = 5 \times 10^{-5}$ ) しており、同遺伝子は、脳、心臓、腎臓等で高発現していた。

【結論】SHR 由来のコンジェニック系統を二段階で作成することにより、3 つの血圧遺伝子座を同定し、その一部では非協調的な多面的効果が認められた。Bp4-3 の候補遺伝子として *Fam3c* が見出された。

第 35 回日本高血圧学会 抄録 (4)

高血圧自然発症ラット (SHR) 系統における高コレステロール血症責任遺伝子の探索: コレステロール遺伝子座 TC15-1 及び TC15-2 の同定

Exploration of genetic loci responsible for hypercholesterolemia in the SHR strains: identification of two novel cholesterol loci

梁 一強、秋山康一、磯野正人、加藤規弘

【目的】高コレステロール血症は遺伝性の強い形質であり、心血管病の主要な危険因子である。げっ歯類での脂質代謝は一部霊長類と異なるが、その遺伝的機序の解明は高血圧等の他の動脈硬化リスクとの協調作用を理解するうえでも重要である。本研究は、SHR およびその亜系 (脳卒中易発症 SHR : SHRSP) を用いたコンジェニック系統作成手法により、高コレステロール血症の責任遺伝子の同定を目的とする。

【方法】我々が以前に行ったゲノム・スキャンにより、血中コレステロール値の量的形質遺伝子座が認められた、ラット染色体 15 番に対するコンジェニック系統を二段階で作成し、総コレステロール (TC)、中性脂肪、遊離脂肪酸、血圧、体重 (Bw)、心重量 (Hw/Bw) 等への遺伝的影響を検討した。各コンジェニック系統で 60—90 匹のラットを解析した。

【成績】遺伝的背景の均一化を早めるべく 210 余の多型マーカーを用いたスピードコンジェニック法を採用した。第一段階では、ドナー系統の Wistar Kyoto ラット (WKY) の染色体 15 番全体 110 M-bp をレシピエント系統の SHR と SHRSP に各々導入した、SHRwch15 と SHRSPwch15 を作成した。SHRwch15 と SHRSPwch15 では雄で 6.9—23.8% ( $P < 0.006$ )、雌で 24.6—29.3% ( $P < 1 \times 10^{-14}$ ) の TC 上昇を認めた。16 週齢の血圧は、雄で 22.8—23.9 mmHg、雌で 11.2—27.2 mmHg (雄雌とも  $P < 1 \times 10^{-10}$ ) の

低下を認めた。更に、SHRSPwch15 に高脂肪食負荷を行ったところ、通常餌に比べて TC が 2.3 倍 ( $P = 3 \times 10^{-4}$ ) 上昇し、顕著な boost 効果が認められた。第二段階では、染色体 15 番を大きく 2 分割して、各部分を単独保有するコンジェニック系統を SHR と SHRSP に対して 2 系統ずつ作成した。これらの計 6 系統を組み合わせて解析した結果、ラット染色体 15 番上には少なくとも 2 つのコレステロール遺伝子座の存在が判明した [TC-1 が 0—61 M-bp、TC-2 が 61—110 M-bp にマッピングされた]。同祖先からの亜系同士でありながら、SHR と SHRSP 由来のコンジェニック系統間では、血中コレステロール値に対する TC-2 の遺伝的効果が逆向きであった。TC-1 領域には、2 つの機能的候補遺伝子 *Acox2* と *Ephx2* が存在しており、肝臓での両遺伝子の mRNA 発現量を調べたところ、SHR と SHRSP では WKY よりも *Acox2* が 1.6 倍以上発現上昇 ( $P < 2 \times 10^{-7}$ )、*Ephx2* が 5 倍以上発現低下 ( $P < 4 \times 10^{-6}$ ) していた。

【結論】SHR および SHRSP 由来のコンジェニック系統を作成することにより、2 箇所のコレステロール遺伝子を同定した。そのうちのひとつ TC15-1 に関しては、候補遺伝子 *Acox2* と *Ephx2* の有意な発現変動を認め



第 35 回日本高血圧学会 抄録 (5)

ヒト cholesteryl ester transfer protein の高血圧ラットへの遺伝子導入と代謝関連形質に対する影響の評価：第 1 報

First report on the evaluation of metabolic effect by gene transfer of human cholesteryl ester transfer protein

梁 一強、秋山康一、磯野正人、岡村匡史、加藤規弘

【目的】ヒトの動脈硬化を模する上でのげっ歯類の弱点の一つとされてきた cholesteryl ester transfer protein (CETP) の欠損を補うべく、高血圧自然発症ラット(SHR)由来のトランスジェニック (Tg) ラットを作出して、脂質及び関連する代謝形質への影響を評価し、動脈硬化への進展の有無を明らかとすることを目的とする。

【方法】ヒト ApoC3 promoter とヒト CETP の全長 cDNA を含む recombinant transgene を作成し、それを SHR に導入して 3 系統の Tg ラットを作出した。各系統での導入コピー数および発現臓器の確認を qRT-PCR 法で行い、血中脂質レベルの変化を指標に、モデルとして適切な系統を選別した。Transgene が導入されなかったコロニーを対照群として、総コレステロール (TC)、中性脂肪(TG)、血糖、血圧等を経時的に測定し、肝臓及び後腹膜脂肪重量 (Liver/Bw と Adipo/Bw) の変化、血管の動脈硬化性変化をヘテロ接合体ラットで評価した。脂質に関して解析した個体数は各系統 5-7 匹。

【成績】3 系統の founder から導入コピー数の異なる Tg ラットが計 4 系統作出できた (L1-3、L1-30、L2-3、L3-15 : ハイフンの後はコピー数)。L2-3 は小腸でのみ発現しており、血中脂質の変化が見られなかった。他の 3 系統は肝臓で高発現しており、雄雌ともほぼ「L1-30 > L3-15 = L1-3」の順に血中脂質の変化 (TC の低下と TG の上昇) が顕著であった。30 週齢の L1-30 で、TC は

雄 31%、雌 27%に低下し ( $P < 1 \times 10^{-4}$ )、TG は雄 250%、雌 410%に上昇した ( $P < 0.06$ )。また Liver/Bw は雄 13%、雌 18%上昇し ( $P < 1 \times 10^{-4}$ )、Adipo/Bw は雄 20%、雌 23% 上昇した (有意差はなし)。特に雌において、肝発現のある Tg ラット 3 系統では血圧上昇を認めた (16 週齢で 14-19 mmHg 上昇、 $P < 0.05$ )。高脂肪食負荷への反応には、一部分性差が見られたものの、non-Tg と Tg の間の違いが目立たず、両群共に高脂肪食負荷に伴って肝腫大が同程度に進行するため、Liver/Bw への影響も通常餌飼育の場合ほどには両群間で差がなかった。血中 CETP レベルは負荷後に Tg ラットで 1.5 倍程度上昇していた。脂質の変化が最も顕著な L1-30 系統に関して 10 週間高脂肪食負荷を行った後に、同じ週齢の通常餌飼育のラットとの間で大動脈の組織標本像を比較したところ、いずれも明らかな異常所見を認めなかった。

【結論】SHR にヒト CETP を導入した結果、TC は 3 分の 1 以下に低下、TG は 2.5 倍以上に上昇し、脂肪肝の進行、雌での血圧上昇が認められた。今回のヘテロ接合体を用いた予備的評価では、少なくとも 10 週間の単純な高脂肪食負荷では明らかな動脈硬化性変化を示さなかったが、今後、ホモ接合体での、より長期かつ詳細な観察が必要である。

## 第 35 回日本高血圧学会 抄録 (6)

高血圧自然発症ラット (SHR) 系統を用いた、高脂肪食負荷時の脂質制御におけるヒト脂質関連遺伝子群及びメチル化機序の関与の検討 Evaluation of human lipid-associated genes and methylation in the SHR fed on high lipid diet

秋山康一、梁 一強、磯野正人、加藤規弘

【目的】近年、ヒトでは大規模ゲノムワイド関連解析 (GWAS) が実施可能となり、脂質関連遺伝子座が多数同定されるようになってきた。しかし、この「遺伝子座」は有意な関連シグナルの位置を示すだけであり、責任遺伝子自体の同定や病態機序の解明に至るまでには依然として多くの障害がある。本研究は、モデル動物での高脂肪食負荷実験を通じて、ヒト責任“候補”遺伝子の確認、及び脂質制御におけるメチル化機序の関与する可能性の検討を目的とする。

【方法】SHR に高脂肪食 (5% lard、2% cholesterol) を 12 週齢から 16 週齢まで 4 週間投与し、通常餌で飼育したラット (対照群) と比較した。両群 4 匹ずつで生理学的 (血圧、体重など)・生化学的指標 (脂質、血糖など) を測定すると共に、16 週齢時に肝臓・脂肪組織を摘出して mRNA の発現変動をマイクロアレイで解析した。ヒトの GWAS で見出された 95 カ所の脂質関連遺伝子座に関して、ラット homolog を探し、マイクロアレイでの発現変動を調べた。更に、高脂肪食と同様、メチル化誘導食である低タンパク食飼育下での肝臓の mRNA 発現データと比較して両食餌条件で共通に有意な発現低下の見られた遺伝子を標的として、メチル化の程度をメチル化感受性制限酵素 HapII で評価した。

【成績】高脂肪食負荷により、SHR で総コレステロール値は有意に上昇した (59.9 vs. 142.2 mg/dl、 $P < 0.001$ )。肝臓で 222 個、脂肪組織で 82 個の遺伝子が有意 ( $|\text{fold change}| \geq 2$ 、

$P < 0.05$ ) な発現変動を示し、両組織に共通するものの中に LRP5 (既知のコレステロール代謝関連遺伝子) が含まれていた。Clustering により、肝臓での chemokine activity、lymphocyte proliferation、gluconeogenesis、MHC class II を介した抗原提示等に関わる pathway の機能的関与が示唆された。ヒトの GWAS で見出された 95 カ所のうち、26 遺伝子がラットの肝臓/脂肪で発現変動を示していた。また低タンパク食負荷と共通して顕著に発現低下していた *Sc4mol*、*Hmgs1*、*Acss2*、*Idi1* に関して、各々 2-3 カ所の CpG サイトでメチル化の程度を比較したところ、発現低下を説明し得るような、高脂肪食負荷による有意なメチル化促進は認められなかった。

【結論】脂質レベルのような量的形質の責任遺伝子を同定/確認するアプローチの一つとして、ラットでの負荷実験と、それに伴う標的組織での mRNA 発現変動を評価する手法の有用性が明らかとなり、ヒトの脂質関連遺伝子座の約 4 分の 1 に関しては、責任“候補”遺伝子の発現変動を同定できた。限られた介入時期・期間での検討ではあるが、高脂肪食負荷という DNA メチル化を誘導し得る介入実験に伴う肝臓での遺伝子発現変動において、エピジェネティック機構に基づく発現抑制は普遍的でないと思われる。

## 第 32 回日本高血圧学会 抄録 (7)

劇症型脳卒中易発症モデルラットの作成と  
ポジショナルクローニング

加藤規弘、梁 一強、Ali Zaidi、竹内史比古

【目的】高血圧治療が普及するにつれて、脳卒中の発症率は低下してきた。しかし依然として脳卒中患者の絶対数は多く、寝たきり、認知症などの、高齢者における日常の活動障害の主たる原因となっている。その成因、病態の解明を目指して、既存の脳卒中モデルをさらに改変することにより、劇症型（自然発症）脳卒中易発症ラットを作成することを目的とする。

【方法】脳卒中易発症自然高血圧発症ラット (SHRSP) と対照の Wistar Kyoto (WKY) ラットとの間で染色体 1 番の 49Mb 領域を組み換えたコンジェニック・ラット (Ex-SHRSP) を作成し、脳卒中発症率、血圧等の生理学的指標の測定、遺伝子多型マーカー（マイクロサテライト、SNP）を用いた同祖性 (identity by descent) マッピング、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行なった。なお、飼育期間中の脳卒中発生は、全例、脳を解剖して病変の有無を確認した。

【成績】標的とする 49Mb の染色体断片を、donor の WKY から recipient の SHRSP に組み換えたコンジェニック・ラット (Ex-SHRSP) を作成し 20 週齢まで通常食 (SP diet, 船橋農場) 下で飼育したところ、極めて高率に脳卒中を自然発症した: 雄 57 匹中 46 匹 (81%)、雌 47 匹中 19 匹 (40%) が脳卒中を発症。同様に SHRSP を飼育した場合、雄 13 匹中 1 匹 (8%)、♀ 21 匹中 0 匹 (0%) が脳卒中を発症した。さらに食塩負荷 (12 週齢以後、1% 食塩水を投与) を行なったところ、Ex-SHRSP では雄雌全例が、SHRSP では雄全例と雌 43% が 8 週以内に脳卒中を発症したが、発症までの日数は約 20 日間、Ex-SHRSP の方が SHRSP よりも早くなって

いた。通常食餌下では、雌では Ex-SHRSP の方が血圧上昇傾向を示したが、雄では系統間に差が見られず、食塩負荷時には、雄雌とも血圧に系統間の有意差が見られなかった。責任遺伝子は、同祖性の情報に基づいて、計 18Mb 断片内に存在する 122 遺伝子に絞り込まれた。またマイクロアレイ解析では、臓器特異的に顕著な発現変動を示す遺伝子群が見られたが、なかには *Trub1* などの、普遍的に有意な系統差を示す遺伝子も存在した。これらは structural variant に依るものと推測される。

【結論】ラット染色体 1 番の WKY 由来のゲノム断片上に、脳卒中を劇症化する遺伝子の存在が確認され、その推定リストが ~120 程度にまで絞り込まれた。脳卒中を発症した個体では経時的な血圧モニタリングができないために、「正味の」血圧値を Ex-SHRSP と SHRSP 間で比較することは困難であるが、少なくとも系統間の顕著な血圧差は存在せず、血圧上昇が脳卒中劇症化の一義的原因とは考えにくい。現在、さらにサブコンジェニック・ラインの作成等を進めており、脳卒中遺伝子の同定が期待される。

## 別添4

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 【 書籍 】

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
加藤規弘	高血圧関連遺伝子の解明はどこまで進みどこへ向かうのか？		EBM循環器疾患の治療 2012- 2013	中外医学社	東京	2011	360-363
加藤規弘	ゲノムワイド関連解析 (GWAS)		動脈硬化予防	メディカルレビュー社	東京	2011	98-99
福田 昇	アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬	熊谷裕生、小室一成、堀内正嗣、森下竜一	高血圧ナビゲーター 第3版	メディカルレビュー	東京	2011	248-249
加藤規弘	高血圧のゲノムワイド関連解析		Annual Review 循環器 2011	中外医学社	東京	2011	94-99
加藤規弘	ゲノムと循環器病		カラー版循環器病学—基礎と臨床—	西村書店	東京	2010	111-120
加藤規弘	高血圧研究における遺伝子解析の現状と展望		高血圧 (上) 第4版 - 基礎編 - 日本臨床 2009年増刊	日本臨床	東京	2009	22-28
福田 昇	Stem cells, oxidative stress and new treatment strategies for cardiovascular diseases	Bashir M. Matata, Maqsood M. Elahi	Oxidative Stress: A Focus on Cardiovascular Diseases	NOVA SCIENCE	New York	2010	279-293

【 雑 誌 】

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takeuchi F, Kato N <i>et al.</i>	Genome-wide association study of coronary artery disease in the Japanese.	<i>Eur J Hum Genet</i>	20(3)	333-40	2011
Kato N <i>et al.</i>	Meta-analysis of genome-wide association studies identifies common variants associated with blood pressure variation in east Asians.	<i>Nat Genet</i>	43(6)	531-8	2011
Takeuchi F, Kato N <i>et al.</i>	Detection of common single nucleotide polymorphisms synthesizing quantitative trait association of rarer causal variants.	<i>Genome Res</i>	21(7)	1122-30	2011
Takeuchi F, Kato N <i>et al.</i>	Association of obesity susceptibility genetic variants with type 2 diabetes in the Japanese.	<i>Diabetologia</i>	54(6)	1350-1359	2011
Takeuchi F, Kato N <i>et al.</i>	Confirmation of ALDH2 as a major locus of drinking behavior and of its variants regulating multiple metabolic phenotypes in Japanese.	<i>Circ J.</i>	75(4)	911-918	2011
Takeuchi F, Kato N <i>et al.</i>	Blood pressure and hypertension are associated with 7 loci in the Japanese population.	<i>Circulation</i>	121(21)	2302-2309	2010
Takeuchi F, Kato N <i>et al.</i>	Evaluation of pharmacogenetic algorithm for warfarin dose requirements in Japanese patients.	<i>Circ J</i>	74(5)	977-82	2010