

## 【第123回生涯教育講座】

高血圧モデルラットSHR・SHRSPを用いた  
心血管病の原因遺伝子同定と病態解明研究おお はら ひろ き なび か とおる  
大 原 浩 貴 並 河 徹

キーワード：SHR, SHRSP, QTL 解析, コンジェニック系統, ゲノム編集

## 要 旨

高血圧自然発症ラット (SHR) とその脳卒中易発症垂系である SHRSP は、日本で開発されたヒト本態性高血圧・脳卒中モデルである。高血圧やその合併症の病態解明・降圧剤開発研究に大きく貢献し、心血管病に対する医療を飛躍的に進歩させた影の功労者である。しかし現在、高血圧患者や心疾患による死者数はむしろ増加傾向にあり、より優れた予防・治療法の確立が望まれる。ゲノムワイド関連解析 (GWAS) によりヒト心血管病リスクと相関する遺伝的多型が次々に同定されてきたが、今後はその疾患発症への意義を実証するモデルが必要となる。ゲノム編集技術の目覚ましい進歩はラットにおける容易な遺伝子改変を可能とし、実験モデルとしてのラットの利用価値が見直されつつある。SHR や SHRSP をベースとするゲノム編集モデルラットが、心血管病の撲滅に新たな道筋を示してくれるであろう。

## はじめに

厚生労働省の調査によると、平成27年の死亡者数の第1位は悪性新生物で、その数は37万131人 (死亡率 (人口10万人対) は295.2) である。第2位が心疾患で19万5933人 (同156.3)、第3位が肺炎で12万846人 (同96.4)、そして第4位が脳血管疾患で11万1875人 (同89.2) と続く。死亡者数および死亡率から判断すると、悪性新生物がもっと

も制圧すべき病ということになるが、心疾患や脳血管疾患はともに動脈硬化などの血管変化を基礎とする「血管病」であることから、これらを心血管病として総計すると、悪性新生物に次ぐ第2位に位置する疾患と捉えることができる。多くの優れた降圧剤の開発や診断技術、内科的・外科的治療法の確立により、心血管病に対する医療は確実に充実してきた。しかし今なお、心疾患と脳血管疾患が悪性新生物と並ぶ三大死因であることを踏まえると、これらの病の克服にはまだまだ多くの課題が残されていることは間違いない。実際に、高血圧患者や心疾患での死亡者数はむしろ増加傾

Hiroki OHARA et al.

島根大学医学部病理学講座病態病理学

連絡先：〒693-8501 島根県出雲市塩冶町89-1

島根大学医学部病理学講座病態病理学

向にあり、高齢化の進行も相まって、心血管病による死者数は今後ますます増加すると予想される。致死性の高いこれらの病気に対抗するためには、悪性新生物と同様に、早期にその発症リスクを知り、その病態メカニズムに基づく適切かつ効果的な治療法を提供できるような、優れた予防医療の構築が急務である。

医学研究において、マウスやラットを中心とする病態モデルの存在意義は多大である。高血圧自然発症ラット (spontaneously hypertensive rat; SHR) と脳卒中易発症 SHR (stroke-prone SHR; SHRSP) は、1960年代から70年代にかけて日本で開発された本態性高血圧モデルであり、心血管病の病態解明や今日用いられている多くの降圧剤の開発に広く貢献してきた。これらのモデルは人為的措置なしに高血圧や脳血管疾患を遺伝的に自然発症することから、これらの疾患の背景に遺伝的な素因が存在することを強く示唆している。本稿では、高血圧モデルラットの開発の歴史や、病態病理学教室で行われてきた遺伝学的アプローチを主軸とする高血圧・脳卒中原因遺伝子の同定研究の代表的な成果についても簡単に触れつつ、これらの動物モデルのヒト心疾患研究における意義を考察してみたい。

## 1. 高血圧モデル開発の歴史 –SHRの確立–

SHRは、京都大学で維持されていた Wistar 系ラットのクローズドコロニーから、京都大学医学部病理学教室の教授であった岡本耕造博士らにより確立された、日本発の本態性高血圧モデル動物である。クローズドコロニーとは、5年以上にわたって外部からの種動物の移入がなく、一定の集団内でのみ繁殖を維持されてきた動物群であり<sup>1)</sup>、世代ごとのランダム交配により集団内で遺

伝的な多様性が維持されていることが特徴である。ラット・マウス問わず、現在の生命科学研究では個体間の遺伝的なばらつきがなく、再現性の高い実験を行いやすいという点で近交系の使用が一般的となっている。しかしながら、クローズドコロニーは遺伝的な不均一性が存在する「ヒト集団」のモデルと見なすことができ、大規模な集団飼育が必要であるという維持面での問題があるものの、薬物の毒性検定試験モデルなどにおいて十分な利用価値がある。

SHRについては、多様な遺伝的背景を持つ京都大学 Wistar ラットコロニーの中から「高めの血圧」を指標として繰り返し近親交配を行うことで、遺伝的に高血圧を自然発症する近交系として確立され<sup>2)</sup>、その血圧は10週齢前後で180 mmHgにも達する(正常血圧ラットは130 mmHg程度)。高血圧のみならず、その他の表現型としてインスリン抵抗性やコレステロール代謝異常を示すことも知られている。

SHRは、20世代以上の近親交配を経て近交系として確立されるより前に、要請を受けて国内外の多くの研究室に寄贈された経緯があり、世界には遺伝的な隔りがある複数の垂系が存在する(図1)。例えば、日本においては島根難病研究所(現・ヘルスサイエンスセンター島根)と京都大学大学院人間環境学研究所での維持を経て、現在はSHR等疾患モデル共同研究会で維持されているSHR/Izmが代表的な系統として広く用いられている。一方、1966年にアメリカ国立衛生研究所(NIH)に分与されたSHR/Nや、さらにNIHからCharles Riverに寄託され、近交系として維持されているSHR/NCrlなども知られる。現在、Izm系統以外で商業的に購入可能な系統の多くは、NIH系である。

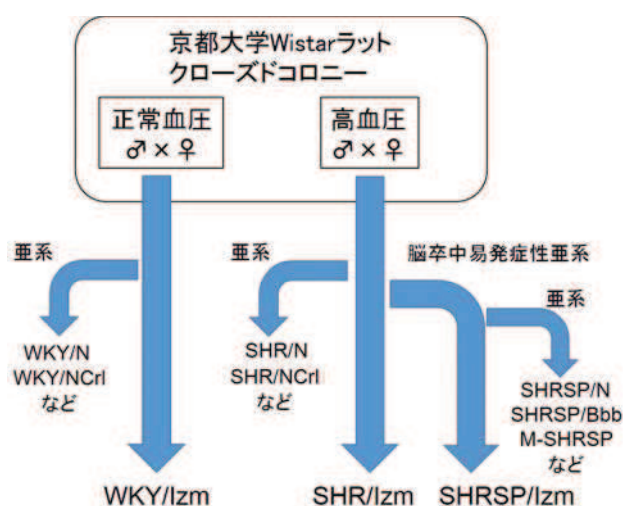


図1 SHR・SHRSPの起源

このような亜系が存在する点には、研究の遂行上、十分な注意が必要である。一例として、SHR/Nではスカベンジャー受容体をコードする*Cd36*遺伝子の欠損がインスリン抵抗性の原因遺伝子として報告されたが<sup>3)</sup>、亜系に当たるSHR/IzmはWKY/Izm (SHRと同じ京都Wistarコロニーから分離された正常血圧の対照ラット、図1参照)と同じ遺伝子型を持ち、欠損が見られなかったことから<sup>4)</sup>、*Cd36*欠損はSHR/Nで偶然生じた変異であり、SHR系統全般に共通する遺伝的メカニズムではないと考えられた。このように、ある亜系で原因となる候補遺伝子が見つかったとしても、それが他系統にも共通するものであるかを検討することが重要である。換言すれば、複数(あるいは全て)の亜系で共通する遺伝的変化を見出すことができれば、それこそが「本物」の疾患原因遺伝子である可能性が高くなる。

## 2. SHRSPの確立

脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) は、SHRよりもさらに重症の高血圧と脳血管疾患を遺伝的に自然発症する亜系として作出され<sup>5)</sup>、

その収縮期血圧は12週齢において200 mmHgを優に越える。SHRが確立された1960年代の日本における死亡率の第1位は、脳血管疾患であった。高血圧は脳卒中の主要なリスクファクターであるが、SHRは脳卒中をほとんど起こさないため、ヒト脳卒中を模倣した動物モデルの作製が望まれていた。SHRSPは、SHRの中で血管病変が比較的多く見られる亜系が存在することに注目して、その子孫を数世代にわたって飼育維持し、それらの親が死亡した際に脳血管障害が確認された場合、その親からの子孫個体を選択的に兄妹交配するという、複雑な交配方式を経て確立された<sup>6)</sup>。SHRとSHRSPの遺伝的組成はかなり近く、両者のゲノム比較解析によって効率的に脳卒中原因遺伝子を同定できると考えられる。実際にこの試みは我々の教室においてなされており、その成果については後述する。

SHRSPの作製は、島根大学医学部病理学講座の教授でおられた家森幸男先生が京都大学に在籍中になされた成果であり、病態病理学教室ではその伝統を引き継ぎ、SHR・SHRSPをモデルとする高血圧・脳卒中の病態解明研究を継続している。

## 3. SHR・SHRSPを用いた高血圧関連遺伝子の探索

高血圧は、遺伝的・環境的要因の複雑な相互作用により生じる多因子性疾患である。遺伝的素因に着目すると、その原因となる遺伝子はSHRやSHRSPの複数の染色体に散在していると推測される。血圧のようないわゆる「量的形質 (quantitative trait loci; QTL)」の程度に関わる遺伝子を同定する場合、ゲノム中に散在する多型マーカー (マイクロサテライトマーカーや一塩基多型 (SNP) など) と調査対象となる形質との連鎖頻

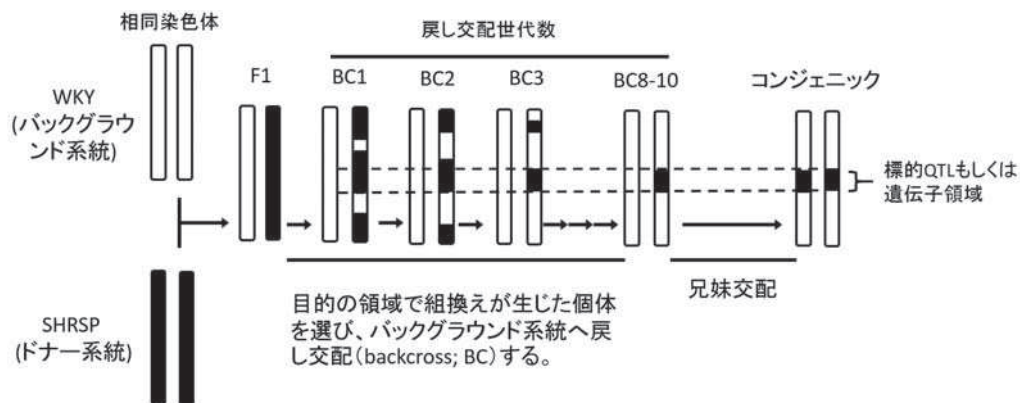


図2 コンジェニック系統の作成 (文献9)

度を調べる遺伝学的手法が用いられる。これが一般に、QTL解析と呼ばれるものであり、SHRやSHRSPにおける高血圧遺伝子の同定においても、この手法を用いて多くの研究がなされてきた。

その先駆けとなったのが、1991年のHilbertら<sup>7)</sup>とJacobら<sup>8)</sup>の報告である。いずれもSHRSPとWKYのF2交雑群を用いた血圧QTLのマッピングを行い、Hilbertらは第10染色体とX染色体に、Jacobらは第10染色体と第18染色体に候補領域をマップしたが、共通して第10染色体上のアンギオテンシン変換酵素(ACE)を有力遺伝子として見出した。その後、SHR×WKYなど、組み合わせの異なるペアでQTL解析が行われてきた<sup>9)</sup>。なかでも第1染色体は、我々の研究室を含め<sup>10)</sup>、多くの異なる研究室から独立して高血圧遺伝子の存在を示唆する報告がなされており、もっとも有力な染色体と考えられている。

QTL解析により候補となる染色体領域を絞り込んだあとは、そこに存在する(複数の)遺伝子が実際に量的形質の程度に関与することを実証する必要がある。この目的のために作製されるのが、「コンジェニック系統」である。

コンジェニック系統とは、遺伝的背景の異なる2系統の間で特定の染色体領域のみを交換した系

統のことである。図2に、バックグラウンド系統としてWKY、ドナー系統としてSHRSPを用いて作製するケースを例として示す。まず、親系統同士を交配してF1世代を得る。次に、このF1をWKYに戻し交配する。得られたF2世代の子について、SHRSPとWKYの間で多型性のあるDNA配列マーカーの遺伝子型を調べ、目的の染色体領域で組換えを生じた個体を選抜する。その個体を再び、WKYへ戻し交配し、同じ操作を繰り返す。戻し交配世代(N)の進行に伴い、ドナー系統の遺伝子の割合はおおむね、 $(1/2)^N$ となり減少していき、N10世代ではバックグラウンド系統の遺伝子に99.91%置換される計算となる<sup>1)</sup>。この操作を通常、12世代以上にわたって繰り返すことで、WKYゲノムを背景として、目的の染色体領域のみが「SHRSP型」になった系統が完成する(図2)。他の染色体領域に存在する遺伝子の影響を厳密に排除したうえで、組換え領域内の遺伝子が目的の表現型に与える影響を個体レベルで検証できる大きな利点があるが、その作製は長い時間(数年)と労力を要求される、大変地道な作業である。

我々は、SHRSP/Izm×WKY/IzmのF2交雑群におけるQTL解析から第1染色体に主要な血

圧 QTL をマップし<sup>10)</sup>、この領域をターゲットとして複数のコンジェニック系統を作製してきた。我々の研究では、この領域に SHRSP の過剰なストレス性昇圧反応に関与する遺伝子が存在することが明らかになっている。SHRSP の高血圧成因については、古くから交感神経系の重要性が指摘されてきた。最近の研究では、交感神経活性と血圧調節の中枢である吻側延髄腹外側野における過剰な活性酸素産生が鍵であるとする、神経性機序が一つのトピックとなっている<sup>11)</sup>。

ストレス性高血圧遺伝子の同定を目指してコンジェニック系統の解析を重ねた結果、その有力な候補として Stromal interaction molecule 1 (*Stim1*) を見出した<sup>12)</sup>。STIM1 は小胞体内腔の  $Ca^{2+}$  貯蔵センサーであり、 $IP_3$  レセプター刺激などにより  $Ca^{2+}$  貯蔵が枯渇すると、STIM1 は細胞膜上のイオンチャネル (Orai1, TRPCs) を開孔して細胞質への  $Ca^{2+}$  流入を誘導する (ストア作動性  $Ca^{2+}$  流入; SOCE)。SOCE は T 細胞など多くの非興奮性細胞における主要な  $Ca^{2+}$  流入経路とされ、様々な細胞機能調節に関わるが、詳細は他の総説などを参照されたい。

SHRSP の *Stim1* 遺伝子配列には、タンパク質合成を途中で停止させてしまうナンセンス変異が存在し (p.Arg640X)、正常型よりも短いアミノ酸配列から成る変異型として発現する<sup>12)</sup>。さらに、SHRSP 由来の培養アストロサイトにおいて SOCE 活性の低下が見られることがわかった<sup>13)</sup>。SHRSP の体内では、アストロサイト以外の細胞種においても SOCE 活性が障害されていると推測される。その分子機序は不明だが、STIM1 機能の異常が少なからず SHRSP の高血圧発症メカニズムに関与していると考えられた。

後述するゲノム編集技術の誕生により、ラット

でも容易に遺伝子ノックアウト・ノックインモデルを作出することが可能となった。我々は、STIM1 機能異常と高血圧発症との直接的な因果関係を明らかにするべく、SHRSP の *Stim1* 遺伝子変異をノックイン手法により正常配列に置換 (STIM1 機能を正常化) したモデルを作出し、現在解析を進めている。

#### 4. SHRSP における脳卒中原因遺伝子の探索

1000検体以上の SHRSP 脳標本を用いた病理組織学的評価により、SHRSP における脳血管病変の好発部位は、anteromedial cortex (33.7%)、occipital cortex (30.1%)、basal ganglia (24.5%) の3か所であることが示されており<sup>14)</sup>、大脳皮質領域での発生率が70%程度を占め頻度が高い。一方、ヒトでは basal ganglia での発生率が70%近くを占めるとされる。また、SHRSP ではヒトで多いアテローム血栓性梗塞は見られず、その病型は脳出血とラクナ梗塞である。このように、SHRSP とヒトの脳卒中病態には相違点が存在するものの、高血圧を背景として脳卒中を自然発症するようなモデルは他に例がなく、今もなお優れた脳卒中モデル動物として広く用いられている。

Ikeda らは、SHRSP/Izm と WKY/Izm の F2 交雑群に対して20週齢より食塩負荷を開始し、48週齢まで脳卒中発症の有無を観察することで、第4染色体に脳卒中感受性に関わる QTL をマップした<sup>15)</sup>。同時期に、Rubattu らはベルリンの Max Delbrück Center for Molecular Medicine で維持されていた SHR 亜系と、ハイデルベルグ大学で維持されていた SHRSP 亜系の F2 交雑群を用いて、第1染色体に脳卒中感受性を増大させる遺伝子座を、一方、第5染色体には脳卒中発症に対して抑制的に働く遺伝子座を同定している<sup>16)</sup>。

我々の研究室では、SHR/Izm と SHRSP/Izm の F2 交雑群を用いて、第 1, 18 染色体の 2 か所に主要な脳卒中 QTL を同定し、これらの染色体領域を親系統間で交換したコンジェニック系統を作製することで、QTL 解析により同定された遺伝子座が実際に脳卒中感受性に影響することを実証した<sup>17)</sup>。我々が同定した第 1 染色体の領域は Rubattu らの報告とは位置が異なるが、これについては用いた亜系の違いによると考えられる。実際、Izm 系統での血圧の比較では SHRSP の方が有意に SHR よりも高いが、Rubattu らが用いた亜系間では差が確認されていない<sup>16)</sup>。いずれにせよ、第 1 染色体に主要な脳卒中原因遺伝子が潜んでいる可能性が高く、腎臓における遺伝子発現マイクロアレイ解析や全ゲノム配列解析などを通じて、第 1 染色体上にいくつかの候補遺伝子を同定することに成功している<sup>18)</sup>。今後は、同定された個々の遺伝子が真に脳卒中原因遺伝子であると言えるかどうかを、ノックアウトラットなどの作製を通じて検証していく必要がある。

## 5. ゲノム編集技術による新たなモデル作製への展開

マウスと異なり、ラットでは ES 細胞の樹立が困難であったことから、その生理学的性質の優位性（体が大きく外科的処置がしやすい、サンプルサイズが大きい、など）にも関わらず遺伝子改変技術の適用はマウスに大きく後れを取っていた。そのような中で、ZFN (zinc finger nuclease), TALEN (transcription activator-like effector nuclease), CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins) といったいわゆる「ゲノム編集」と総称される技術の革新的進歩により、

ラットにおいても容易にノックアウト・ノックインモデルを作出することが可能となった。2009年の *Science* 誌に、Geurts らによりゲノム編集技術の中では第 1 世代にあたる ZFN 法を用いた初のノックアウトラット作製の報告がなされた。追うように、2010年に Tong らによってラット ES 細胞での相同組換えによる *p53* ノックアウトラット作製の報告が *Nature* 誌になされたが、作製効率の面でゲノム編集の方が圧倒的に有利であり、ラットにおける遺伝子改変はゲノム編集技術を用いるのが一般的である。

ゲノム編集技術の誕生により、SHR・SHRSP を用いた高血圧関連疾患研究は新たな局面を迎えた。すなわち、病態モデルを背景に遺伝子ノックアウトを行うことで、特定の遺伝子機能阻害による心血管病進展への効果を個体レベルで評価することが可能となった。我々は SHR において抗酸化遺伝子である Peroxiredoxin2 (*Prdx2*) をノックアウトしたモデルを作出し、ノックアウト SHR で酸化ストレスレベルの亢進が見られること、原因は不明だが食塩負荷条件において寿命の短縮が見られることを示した<sup>19)</sup>。Rubattu らは、第 1 染色体の脳卒中 QTL 近傍に位置する *Ndufc2* (NADPH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit) をノックアウトした SHR では脳卒中感受性が增大することを示している<sup>20)</sup>。これらはいずれも、ラットでの遺伝子改変が可能となったことによる成果である。

ゲノムワイド関連解析によりヒト心疾患のリスクとなる遺伝子多型が次々と見出されている。今後は、ヒト遺伝子で同定された遺伝子多型の疾患への寄与を実証することが必要であるが、SHR や SHRSP はそのベースとなる病態モデルとして利用価値が高い。開発から40年以上の月日が流れ

た今日においても, やはり SHR や SHRSP は代表的ヒト心疾患研究モデルであり, 彼らのヒト医

学への多大な貢献に改めて深く感謝したい。

## 参 考 文 献

- 1) 中釜齊, 北田一博, 庫本高志: 無敵のバイオテクニカルシリーズ マウス・ラット実験ノート, 羊土社, 2009年
- 2) Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963; 27: 282-293.
- 3) Aitman TJ, Glazier AM, Wallace CA et al. Identification of *Cd36 (Fat)* as an insulin resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet* 1999; 21: 76-83.
- 4) Gotoda T, Iizuka Y, Kato N et al. Absence of *Cd36* mutation in the original spontaneously hypertensive rats with insulin resistance. *Nat Genet* 1999; 22: 226-228.
- 5) Okamoto K, Yamori Y, Nagaoka Y. Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). *Circ Res* 1974; 34, 35 [Suppl 1]: 143-153.
- 6) 家森幸男, 高血圧自然発症ラット-脳卒中モデルの開発と予防への貢献-, 循環器専門医 2005年; 13巻: 365-372.
- 7) Hilbert P, Lindpainter J, Beckmann JS et al. Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* 1991; 353: 521-528.
- 8) Jacob H, Lindpaintner K, Lincoln SE et al. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell* 1991; 67: 213-224.
- 9) Nabika T, Kobayashi Y, Yamori Y. Congenic rats for hypertension: How useful are they for the hunting of hypertension genes? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27: 251-256.
- 10) Mashimo T, Nabika T, Matsumoto C et al. Aging and salt-loading modulate blood pressure QTLs in rats. *Am J Hypertens* 1999; 12: 1098-1104.
- 11) Kishi T, Hirooka Y. Oxidative stress in the brain causes hypertension via sympathoexcitation. *Front Physiol* 2012; 3: 335.
- 12) Ferdaus MZ, Xiao B, Ohara H et al. Identification of *Stim1* as a candidate gene for exaggerated sympathetic response to stress in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. 2014; 9: e 95091.
- 13) Ohara H, Nabika T. A nonsense mutation of *Stim1* identified in stroke-prone spontaneously hypertensive rats decreased the store-operated calcium entry in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 476: 406-411.
- 14) Yamori Y, Horie R, Handa H, Sato M, Fukase M. Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. 1976; 7: 46-53.
- 15) Ikeda K, Nara Y, Matsumoto C et al. The region responsible for stroke on chromosome 4 in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229: 658-662.
- 16) Rubattu S, Volpe M, Kreutz R et al. Chromosomal mapping of quantitative loci contributing to stroke in a rat model of complex human disease. *Nat Genet* 1999; 13: 429-434.
- 17) Gandolgor TA, Ohara H, Cui ZH et al. Two genomic region on chromosome 1 and 18 explain most of the stroke susceptibility under salt loading in stroke-prone spontaneously hypertensive rat/Izm. *Hypertension* 2013; 62: 55-61.
- 18) Niiya K, Ohara H, Isono M et al. Further dissection of QTLs for salt-induced stroke and identification of candidate genes in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Sci Rep* 2018; 8: 9403.
- 19) Mahal Z, Fujikawa K, Matsuo H et al. Effect of *Prdx2* depletion on blood pressure and life span in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2018, in press.
- 20) Rubattu S, Castro SD, Schulz H et al. *Ndufc2* gene inhibition is associated with mitochondrial dysfunction and increased stroke susceptibility in an animal model of complex human disease. *J Am Heart Assoc* 2016; 5: e 002701.