

ゲノム情報の「書き換え」による高血圧性疾患の制御を通じた 病態解明と予防・治療法開発への応用

島根大学医学部病理学講座病態病理学
講師 大原 浩貴

はじめに

高血圧自然発症ラット (SHR) およびその垂型である脳卒中易発症SHR (SHRSP) は、高血圧とその合併症 (脳卒中、心肥大、腎硬化症など) の遺伝的病態モデルである。代表者はSHRSPのstromal interaction molecule 1 (*Stim1*) に生じたナンセンス変異 (p.Arg640X) を修正した*Stim1*-KI SHRSPが、野生型SHRSPよりも脳卒中症状を起こしにくく、生存率が改善されることを明らかにした⁽¹⁾。STIM1は小胞体のCa²⁺貯蔵の枯渇が誘導するストア作動性Ca²⁺流入 (SOCE) の必須因子である。SHRSPのSTIM1は野生型 (685アミノ酸) より短い変異型であり、SOCE誘導活性の低下を示す⁽²⁾。*Stim1*-KI SHRSPの血圧は野生型SHRSPと同等のため⁽³⁾、STIM1は血圧非依存的に臓器保護に働く可能性がある。

同時に、*Stim1* 近傍の第1染色体領域の遺伝子型が正常血圧ラット (WKY) 型であるSHRSPコンジェニックラット (SPwch1.71) が、野生型SHRSPよりも早期に脳卒中や腎障害を発症することを発見した⁽¹⁾。このWKY由来の約0.6 Mbのコンジェニック断片に存在する22個の遺伝子の中から、T細胞に特異的に発現するモノADPリボシル転移酵素mono-ADP-ribosyltransferase 2b (*Art2b*) を有力候補として同定した⁽¹⁾。ラットART2bには複数の遺伝子多型の存在による翻訳後修飾や活性が異なる2つのアレルが存在し⁽⁴⁾、SHRSPとWKYは互いに対立アレルを保持している。本研究では、これら2つの遺伝子の遺伝子多型を置換した複数のノックインラットを作製し、血圧や脳心腎血管系の病理学的表現型に及ぼす影響を生体レベルで検証することを目的とした。

脳卒中は日本人の死因の第4位、要介護要因の第2位に位置する。また、高血圧を主因とする腎硬化症は透析導入の主要原疾患の第2位であり、さらに増加傾向にある。高血圧ラットの高血圧性臓器障害を遺伝子多型レベルで制御する手法の開発は、健康長寿の実現につながる革新的な高血圧医療の創出への貢献が期待される。

結 果

SHRSPとWKYの*Art2b*配列には12か所のアミノ酸置換を伴う一塩基多型が存在し、SHRSPとWKYが異なる*Art2b*アレルを保持していることを確認している⁽¹⁾。いずれかのアレルが脳血管障害の発症に対して促進的 (もしくは抑制的) に作用する可能性を考慮し、まずGONAD法を用いてSPwch1.71 (*Art2b*はWKY型) と野生型SHRSPのそれぞれで*Art2b*を

ノックアウト (KO) した遺伝子改変モデルを作製し、既報⁽¹⁾と同様に脳卒中発症率と生存率を比較した (図1)。Art2b-KO SPwch1.71 および Art2b-KO SHRSP の2系統は解析中のため結論は出ていないが、SPwch1.71 と Art2b-KO SPwch1.71 の比較では本報告時点において有意差は確認されていない。一方、SHRSP と Art2b-KO SHRSP の比較では初期症状発症までの期間 (図1左) について有意傾向 ($p=0.093$, log-rank test) を認めている。

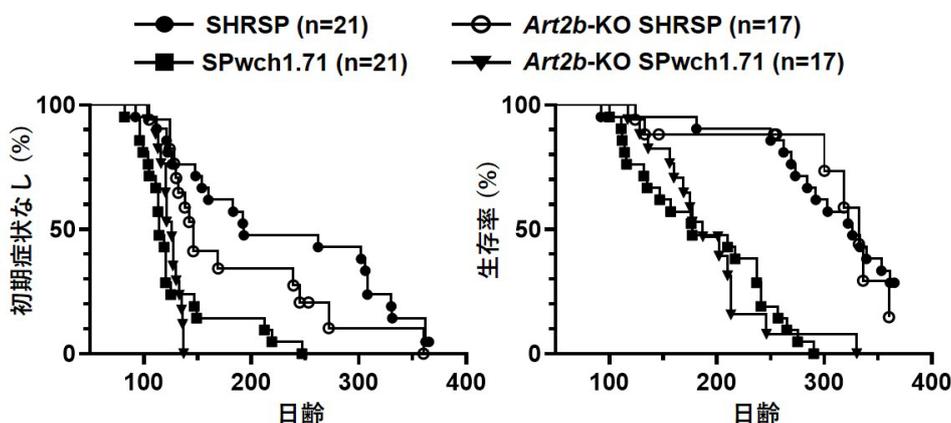


図1 1年を打ち切りとして、痙攣発作や自発活動の低下などの脳卒中発症を示唆する所見を初めて観察するまでの期間 (左) および生存率を評価中。

また既報⁽¹⁾における SHRSP コンジェニックラットの解析結果から、Stim1 の機能回復によって SPwch1.71 の病態を改善できる可能性が示唆されている。これを検証するため、DNA断片ノックインにより SPwch1.71 の Stim1

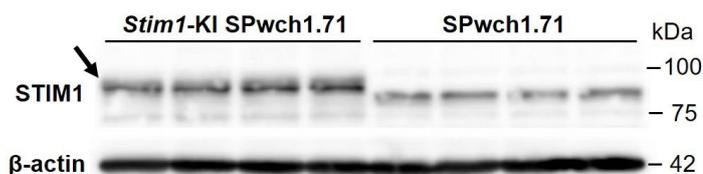


図2 Stim1-KI SPwch1.71 の作製。ナンセンス変異 (p.Arg640X) を DNA ノックインにより修正し、野生型 STIM1 (矢印) を発現する SPwch1.71 ラットを作製した。

に存在するナンセンス変異を修正した Stim1-KI SPwch1.71 を作製した。ウェスタンブロッティングにて変異型より高分子量である野生型 STIM1 の発現を確認し (図2)、図1と同様に野生型 SPwch1.71 と Stim1-KI SPwch1.71 の間で脳卒中発症率と生存率を比較した。こちらも Stim1-KI SPwch1.71 の解析は未完了であるため結論は出ていないが、脳卒中発症率と生存率のいずれについても有意差は確認されていない (図3)。

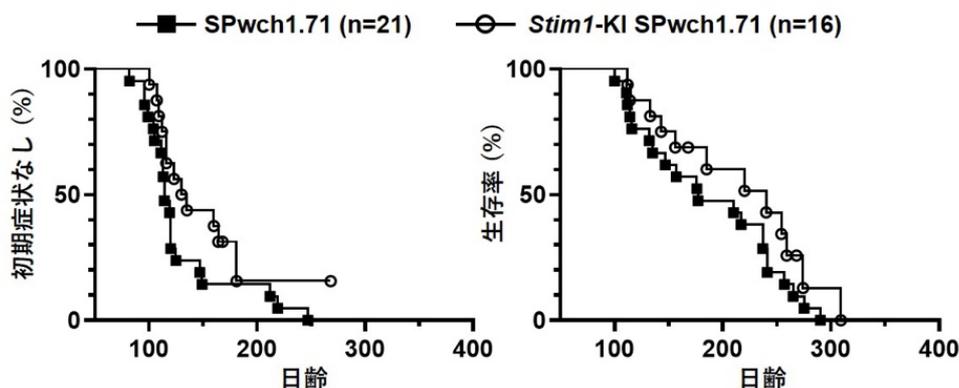


図3 野生型 SPwch1.71 と Stim1-KI SPwch1.71 の比較

SHRの血圧はSHRSPより低く、脳卒中を起こしにくい。*Stim1*の機能回復が血圧非依存的にSHRSPの脳卒中発症率や生存率改善に寄与する可能性が示唆されていることから⁽¹⁾、SHRにSHRSP型のナンセンス変異を導入したノックインモデル (*Stim1*-KI SHR) を作製した。確立した*Stim1*-KI SHRにおいて、SHRSPと同様の変異型STIM1の発現を確認し(データ非提示)、脳卒中抵抗性であるSHRにおいて脳卒中発症率の増加や生存期間の短縮が見られるかどうかを評価中である。

考 察

ラットART2bの酵素活性については、既報によればSHRSP型が高活性アレルと推測される⁽⁴⁾。*Art2b*-KO SHRSPにおいて脳卒中発症を示唆する初期症状の出現の早期化傾向が見られていることは(図1左)、ART2bの活性が脳血管障害の発症に対して抑制的に作用する可能性を示唆している。一方、*Art2b*-KO SPwch1.71とSPwch1.71の間で有意差が確認されていないことについては、SPwch1.71がもつWKY型*Art2b*アレルがもともと低活性であるため、欠損による影響が生じなかったと推測される。2つの*Art2b*アレルの間には12個のアミノ酸置換が存在することから、DNAノックインによりSHRSPおよびSPwch1.71の*Art2b*配列をそれぞれ「WKY型」と「SHRSP型(抑制型?)」に置換したモデルを作製することが、*Art2b*の遺伝子型と脳血管障害感受性との関連をより厳密に評価するために必要と考えられる。

SPwch1.71と共通したコンジェニック領域も保持するものの、その近傍にある*Stim1*遺伝子座を含むより広い染色体領域がWKY型アレルとなっている別のSHRSPコンジェニック系統(SPwch1.72)はSPwch1.71のような重症型の表現型を示さない⁽¹⁾。代表者は「SPwch1.72は野生型の*Stim1*アレルを持つことによって、SPwch1.71特異的なコンジェニック領域に存在する遺伝子の作用による高血圧性臓器障害の重症化が抑制されているのではないか?」と推測した。しかし予想に反して*Stim1*-KI SPwch1.71と野生型SPwch1.71の間で有意差は見られていないため(図2)、SPwch1.72特異的なコンジェニック領域には*Stim1*とは異なる臓器障害抑制因子が存在する可能性がある。

要 約

本研究では、SHRSPにおいて脳卒中発症抑制・生存率改善が確認されている*Stim1*、またSPwch1.71コンジェニックラットの重症型表現型の原因遺伝子候補である*Art2b*をターゲットにいくつかのノックアウト・ノックインラットを作製した。ゲノム編集ラットを作製し、それらの高血圧性臓器障害の自然発症性を比較検討するという研究の性質上、本研究期間内には本来の研究計画の一部を実施するに留まった。加えて当初の予想とは異なる結果も示されつつあるが、本研究の成果を踏まえて*Stim1*を介する脳血管障害抑制機構や

SPwch1.71の病態に関わる増悪遺伝子とその分子メカニズムを生体・細胞レベルで明らかにすることで、ヒト高血圧性疾患の新たな予防・治療法開発につながる新視点を提示できるはずである。

謝 辞

本研究計画の実施に当たり、大和証券財団より頂戴した助成金は経済的・精神的に大きな支えとなりました。私の研究へのご支援を賜りましたことに、深く感謝申し上げます。

文 献

1. Ohara H et al. Genotypes of *Stim1* and the proximal region on chromosome 1 exert opposite effects on stroke susceptibility in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Journal of Hypertension* 42: 118-128, 2024.
2. Ohara H et al. A nonsense mutation of *Stim1* identified in stroke-prone spontaneously hypertensive rats decreased the store-operated calcium entry in astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 476:406-411, 2016.
3. Odongoo B et al. Pathophysiological significance of *Stim1* mutation in sympathetic response to stress and cardiovascular phenotypes in SHRSP/Izm: in vivo evaluation by creation of a novel gene knock-in rat using CRISPR/Cas9. *Clinical and Experimental Hypertension* 43: 34-41, 2021.
4. Stevens LA et al. Regulatory role of arginine 204 in the catalytic activity of rat alloantigens ART2a and ART2b. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 19591-19596, 2003.