

4 5

助成番号 0045

食塩感受性高血圧ラットの病因遺伝子の決定と機能解明

助成研究者：檜垣 實男 (大阪大学大学院医学系研究科)
 共同研究者：荻原 俊男 (大阪大学大学院医学系研究科)
 勝谷 友宏 (大阪大学大学院医学系研究科)

食塩感受性はヒト本態性高血圧症の成因に関わる最も重要な病態である。そこで、高血圧ラットの遺伝子解析によって、食塩感受性遺伝子を同定し、その遺伝子機能の解明を行うことで、食塩感受性に関する病態を明らかにしようとした。さらにモデル動物の結果をヒトにあてはめる事でヒト食塩感受性遺伝子の同定と機能解明も行った。高血圧自然発症ラット(spontaneously hypertensive rat: SHR)と正常血圧ラット(Wistar-kyoto rat: WKY)の交配によって、F1ラットを、F1間の兄妹交配によってF2ラット(雄 120匹)を作製した。また食塩感受性ダールラット(DSR: Dahl salt-sensitive rat)と食塩抵抗性ダールラット(DSS: Dahl salt-resistant rat)を用いた交配によるF2ラットも作製した。各ラットの血圧と心拍数を無麻酔・無拘束下に24時間測定した。その後、致死量のペントバルビタール投与を行い、屠殺後摘出した肝細胞からDNAを抽出した。各ラットDNAを用い、血圧値と連鎖を示す遺伝子座位を、213個のマイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイドスクランによって検出した。SHRおよびDSSに共通する、血圧値に連鎖する座位として、フォスホリパーゼC δ 1(PLC δ 1)遺伝子、PKATA(Peroxisomal 3 keto-acyl Co A thiolase)遺伝子、ニューロペプチドY遺伝子(NPY)とサブスタンスP受容体遺伝子(SPR)近傍の座位、P45011 β 遺伝子を見出した。また、遺伝子導入法を用いて、SHRの脳アンジオテンシノーゲンコアプロモーター領域が高血圧に関係していることを明らかにした。次いでヒト食塩感受性遺伝子の検討も行った。岩手県大迫町の一般住民で40歳以上の954人を対象とした。この研究ではAGT/T+31Cと随時血圧、昼間血圧平均の間には関連を認めなかったが、夜間拡張期血圧には有意差が認められた(CC>CT>TT, $p<0.05$)。AGT/T+31C多型と血圧日内変動との関連では、extreme-dipper(179名)ではCC型63.7%、CT型30.7%、TT型5.6%、dipper(505名)ではおのおの70.5%、26.1%、30.4%、non-dipper(228名)ではおのおの74.6%、23.7%、1.8%、reverse-dipper(42名)ではおのおの83.3%、16.7%、0.0%であった。CC型を有する者では30.4%にnon-dipper型の血圧変動を認めたのに対し、CT型は26.0%、TT型は12.9%と有意に($p<0.03$)少ない傾向にあった。血圧日内変動パターンを前述の4タイプに分類すると、C+31アレルの数に応じて、non-dipper型が増加した。元来、アンジオテンシノーゲンは水と食塩を身体に保持するレニン-アンジオテンシン系の律速段階とされ、食塩感受性に関係した高血圧の有力な候補遺伝子である。食塩感受性と関連が深いとされるnon-dipperの頻度がCC型で高かったことから、本多型保有者では、より積極的な減塩に努め、循環器合併症を予防することが望ましいと考えられる。本研究結果は、T+31CのCアレルが高血圧患者の食塩感受性を高め、non-dipper型を惹起しやすいことを示唆するものであった。

10

助成番号 0045

食塩感受性高血圧ラットの病因遺伝子の決定と機能解明

助成研究者：檜垣 實男 (大阪大学大学院医学系研究科)

共同研究者：荻原 俊男 (大阪大学大学院医学系研究科)

勝谷 友宏 (大阪大学大学院医学系研究科)

① 研究目的

食塩感受性はヒト本態性高血圧症の成因に関わる最も重要な病態である。そこで、高血圧ラットの遺伝子解析によって、食塩感受性遺伝子を同定し、その遺伝子機能の解明を行うことで、食塩感受性に関する病態を明らかにしようとした。さらにモデル動物の結果をヒトにあてはめる事でヒト食塩感受性遺伝子の同定と機能解明も行った。

② 研究方法

1. 高血圧モデルラットの遺伝子解析

高血圧自然発症ラット(spontaneously hypertensive rat: SHR)と正常血圧ラット(Wistar-kyoto rat: WKY)の交配によって、F1ラットを、F1間の兄妹交配によってF2ラット(雄120匹)を作製した。また食塩感受性ダールラット(DSR: Dahl salt-sensitive rat)と食塩抵抗性ダールラット(DSS: Dahl salt-resistant rat)を用いた交配によるF2ラットも作製した。各ラットの血圧と心拍数を無麻酔・無拘束下に24時間測定した。その後、致死量のペントバルビタール投与を行い、屠殺後摘出した肝細胞からDNAを抽出した。各ラットDNAを用い、血圧値と連鎖を示す遺伝子座位を、213個のマイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイドスクランニングによって検出した¹⁾。

2. 遺伝子導入法を用いた食塩感受性遺伝子の機能解析

我々はアンジオテンシノーゲン遺伝子の転写調節機構の詳細な検討を行い、遺伝子発現に最も重要とされるコアプロモーター領域における多型によって、アンジオテンシノーゲン遺伝子の転写亢進が起こって高血圧が発症するメカニズムを明らかにした²⁾。ところが、このような高血圧タイプの人血中アンジオテンシノーゲン濃度を測定すると必ずしも高くはなく、アンジオテンシノーゲンの転写調節機構は複雑であることが分かった。アンジオテンシノーゲン産生は肝臓とその他の組織中で行われており、血中アンジオテンシノーゲンはすべて肝臓由来である。筑波大学の深水らの研究では、アンジオテンシノーゲンのコアプロモーター領域の多型は脳神経におけるアンジオテンシノーゲン産生に重要であることが分かった。そこで、高血圧モデルであるSHRの脳内に高効率な遺伝子導入法(HVJ-リポソ-

ム法)を用いて, アンジオテンシノーゲンコアプロモーター結合部位に対するデコイ型核酸を導入し, 全身の血圧変動を観察した.

3. ヒト食塩感受性遺伝子の検討

本研究は東北大学との共同研究として実施した. 岩手県大迫町の一般住民の中で, 研究計画と遺伝子解析の同意を得られた40歳以上の954人を対象とした. 対象者から10mlの採血を行い, 白血球分画を分離後, QIAamp DNA Blood Kit (QIAGEN Inc.)を用いてDNAを抽出した. 健診時の随時血圧(CBP)に加え, Colin ABPM 630を用いて30分毎に24時間以上の自由行動下血圧(ABP)を測定した. 昼間および夜間血圧の平均値を算出し, 降圧度(昼間SBP平均-夜間SBP平均/昼間SBP平均) $\geq 20\%$ のものを extreme-dipper, $20\% >$ 降圧度 $\geq 10\%$ のものを dipper, $10\% >$ 降圧度 $\geq 0\%$ のものを non-dipper, 夜間SBP平均の方が高いものを reverse-dipper と定義した. アンジオテンシノーゲン遺伝子(AGT)のイントロン1に存在し, M235T多型と連鎖不平衡にあるT+31Cを大量検体の高速処理が可能なTaqMan PCR法によって決定した. 各種血圧値と遺伝子型の関連は分散分析法(ANOVA)によって, また血圧変動パターンと遺伝子型の関連は分割表分析を用いた X^2 検定により検討した.

③ 研究結果

1. ラットの遺伝子解析

SHRおよびDSSに共通する, 血圧値に連鎖する座位として, フォスホリパーゼC $\delta 1$ (PLC $\delta 1$)遺伝子, PKATA(Peroxisomal 3 keto-acyl Co A thiolase)遺伝子, ニューロペプチドY遺伝子(NPY)とサブスタンスP受容体遺伝子(SPR)近傍の座位, P45011 β 遺伝子を見出している(図1). さらに現在, SHRとWKY腎臓における発現差から見出した2種の遺伝子がF2ラットの血圧値と連鎖することを見出し, 詳細について検討を行っている(第24回日本高血圧学会総会発表予定).

2. 脳へのアンジオテンシノーゲン遺伝子デコイの導入

脳室内へのデコイ核酸の投与によって, 脳内アンジオテンシノーゲンmRNA発現の低下が認められた. これに伴い, 有意な血圧低下が7日間に渡って認められた(図2, 図3). この際, 血中アンジオテンシノーゲン濃度とアンジオテンシンII濃度に変化は認められなかった. これらの結果から, 脳のアンジオテンシノーゲン遺伝子の過剰発現が高血圧の発症に関与していることが明らかになった.

3. ヒトでの検討

一方, ヒトにおける研究ではAGT/T+31Cと随時血圧, 昼間血圧平均の間には関連を認めなかったが, 夜間拡張期血圧には有意差が認められた(CC > CT > TT, $p < 0.05$). AGT/T+31C多型と血圧日内変動との関連では, extreme-dipper(179

名)ではCC型63.7%, CT型30.7%, TT型5.6%, dipper(505名)ではおのおの70.5%, 26.1%, 30.4%, non-dipper(228名)ではおのおの74.6%, 23.7%, 1.8%, reverse-dipper(42名)ではおのおの83.3%, 16.7%, 0.0%であった。CC型を有する者では30.4%にnon-dipper型の血圧変動を認めたのに対し, CT型は26.0%, TT型は12.9%と有意に($p < 0.03$)少ない傾向にあった。血圧日内変動パターンを前述の4タイプに分類すると, C+31アレルの数に応じて, non-dipper型が増加した(図3)。

④ 考察

ラットを用いた遺伝子解析は, 使用するラットが遺伝的に均一(純系)であること, 交配実験が容易であること, 環境因子を均質に調整できること, 遺伝子型と表現型が一致(100%の浸透率)することなどから, 人の研究に対して有利であると考えられている。本研究では食塩感受性高血圧ラット(ダールラット)をSHRと対比しつつ遺伝子解析することによって, 食塩感受性遺伝子を同定することを試みたが, 213個の遺伝子マーカーのかなりのものが交配種間での多型を示さなかったことから, 解析に苦心した。このような交配実験では, 通常の実験に用いる近い亜系の交配でなく, 遺伝的に離れた亜系間の交配が好ましいと考えられた。一方, モデルラット腎臓におけるmRNA発現差から見出された新規遺伝子に関しては, これが食塩感受性に関与している可能性は高く, さらに研究を進めていきたいと考えている。

一方, アンジオテンシノーゲン遺伝子(AGT)について, ヒトでの検討を行った。AGT/T+31C多型はイントロン1に位置し, Evi-1やElf-1などの転写因子の結合部位に相当している。Evi-1はSmad3と関連してTGF- β の転写に影響することや, Elf-1はeNOSの転写調節に影響することが報告されている。そのため本多型は, 単にM235Tとの関連というよりは, 積極的にAGTの転写に関係しているのかもしれない。元来, アンジオテンシノーゲンは水と食塩を身体に保持するレニン-アンジオテンシン系の律速段階とされ, 食塩感受性に関係した高血圧の有力な候補遺伝子である。食塩感受性と関連が深いとされるnon-dipperの頻度がCC型で高かったことから, 本多型保有者では, より積極的な減塩に努め, 循環器合併症を予防することが望ましいと考えられる。本研究結果は, T+31CのCアレルが高血圧患者の食塩感受性を高め, non-dipper型を惹起しやすいことを示唆するものであった。

⑤ 今後の課題

ラットの遺伝子解析によってより多くの食塩感受性遺伝子を見出し, これをヒトの大規模疫学研究で実証してゆくという研究システムを確立できたので, 今後はより数多くの候補遺伝子の発見に努力せねばならないと考えている。

なお研究成果の一部は、学術雑誌³⁻¹²⁾に掲載した。

⑥ 文 献

1. Ogihara T, Katsuya T, Higaki J., Genetic analysis of essential hypertension in Japanese populations. *Ann New York Acad Sci* 2000; 902: 8-16.
2. Sato N, Katsuya T, Nakagawa T, Ishikawa K, Fu Y, Asai T, Fukuda M, Suzuki F, Nakamura Y, Higaki J., Ogihara T. Nine polymorphisms of angiotensinogen gene in the susceptibility to essential hypertension. *Life Sci.* 2000;68:259-72.
3. Matsubara M, Ohkubo T, Michimata M, Hozawa A, Ishikawa K, Katsuya T, Nagai K, Tsuji I, Higaki J., Araki T, Satoh H, Hisamichi S, Ito S, Ogihara T, Imai Y. Japanese individuals do not harbor the T594M mutation but do have the P592S mutation in the C-terminus of the beta-subunit of the epithelial sodium channel: the Ohasama study. *J Hypertens.* 2000; 18: 861-6.
4. Katsuya T, Sato N, Asai T, Fukuda M, Takiuchi S, Fu Y, Hanayama R, Moriguchi A, Rakugi H, Higaki J., Ogihara T. Association of polymorphism in the promoter region of the apolipoprotein E gene with diastolic blood pressure in normotensive Japanese. *Hypertens Res.* 2000; 23: 271-5.
5. Ohishi M, Rakugi H, Miki T, Katsuya T, Okamura A, Kamide K, Nakata Y, Takami S, Ikegami H, Yanagitani Y, Tabuchi Y, Kumahara Y, Higaki J., Ogihara T. Deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene is associated with postprandial hyperglycaemia in individuals undergoing general check-up. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000; 27: 483-7.
6. Higaki J., Baba S, Katsuya T, Sato N, Ishikawa K, Mannami T, Ogata J, Ogihara T. Deletion allele of angiotensin-converting enzyme gene increases risk of essential hypertension in Japanese men : the Suita Study. *Circulation.* 2000; 101: 2060-5.
7. Ishikawa K, Imai Y, Katsuya T, Ohkubo T, Tsuji I, Nagai K, Takami S, Nakata Y, Satoh H, Hisamichi S, Higaki J., Ogihara T. Human G-protein beta3 subunit variant is associated with serum potassium and total cholesterol levels but not with blood pressure. *Am J Hypertens.* 2000; 13: 140-5.
8. Tsujita Y, Iwai N, Katsuya T, Higaki J., Ogihara T, Tamaki S, Kinoshita M, Mannami T, Ogata J, Baba S. Lack of association between genetic polymorphism of CYP11B2 and hypertension in Japanese: the Suita Study. *Hypertens Res.* 2001; 24: 105-9.

9. Fu Y, Katsuya T, Higaki J, Asai T, Fukuda M, Takiuchi S, Hatanaka Y, Rakugi H, Ogihara T. A common mutation of low-density lipoprotein receptor gene is associated with essential hypertension among Japanese. *J Hum Hypertens*. 2001; 15: 125-30.
10. Higaki J, Katsuya T, Morishita R, Ogihara T. Symposium on the etiology of hypertension--summerizing studies in 20th century. *Hypertension and genes. Intern Med*. 2001; 40: 144-7.
11. Ishikawa K, Baba S, Katsuya T, Iwai N, Asai T, Fukuda M, Takiuchi S, Fu Y, Mannami T, Ogata J, Higaki J, Ogihara T. T+31c polymorphism of angiotensinogen gene and essential hypertension. *Hypertension*. 2001; 37: 281-5.
12. Takami S, Imai Y, Katsuya T, Ohkubo T, Tsuji I, Nagai K, Satoh H, Hisamichi S, Higaki J, Ogihara T. Gene polymorphism of the renin-angiotensin system associates with risk for lacunar infarction. The Ohasama study. *Am J Hypertens*. 2000; 13: 121-7.

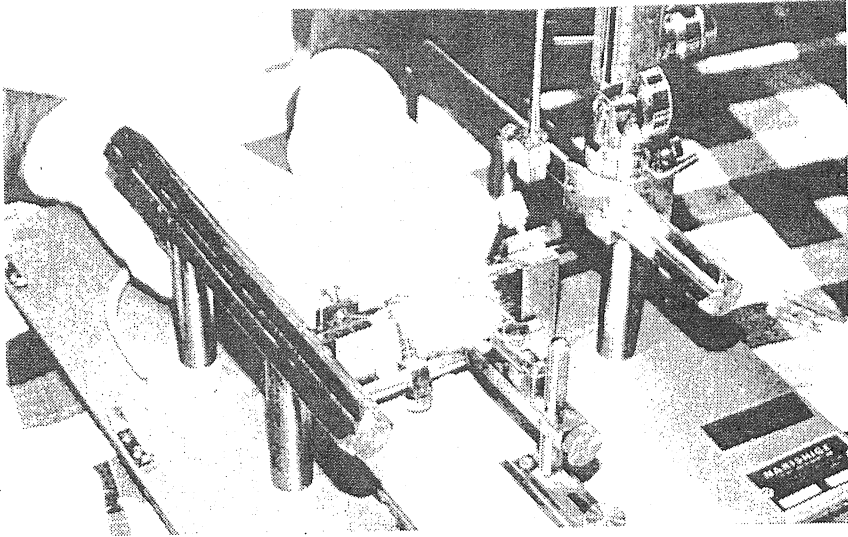


Figure 2. Introduction of the decoy against the core promoter region of angiotensinogen gene into the rat cerebral ventricle.

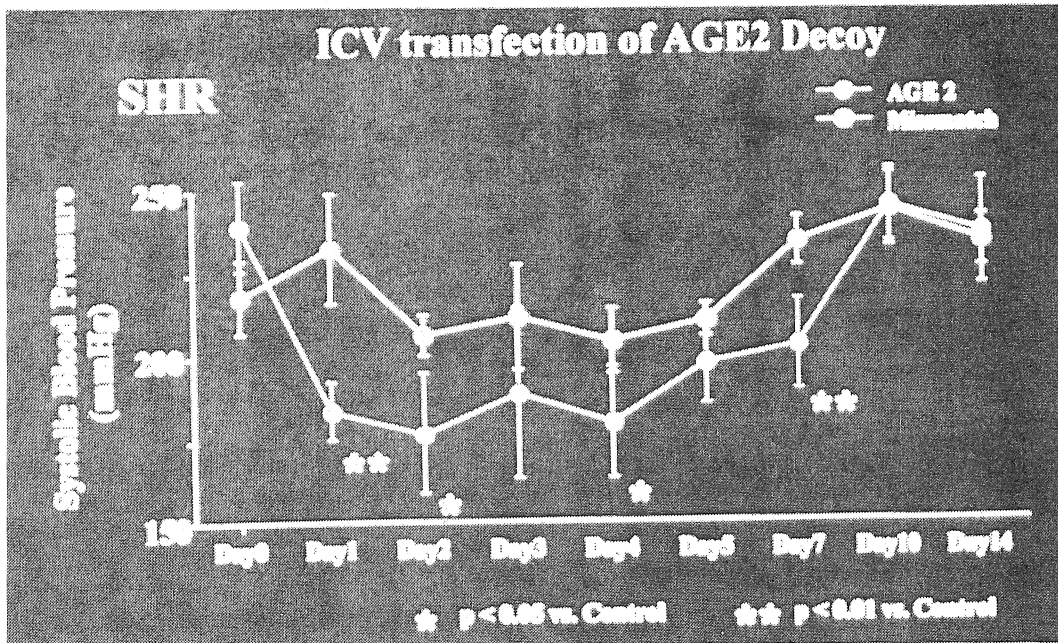


Figure 3. Change of the blood pressure of the rats after the introduction of the decoy.

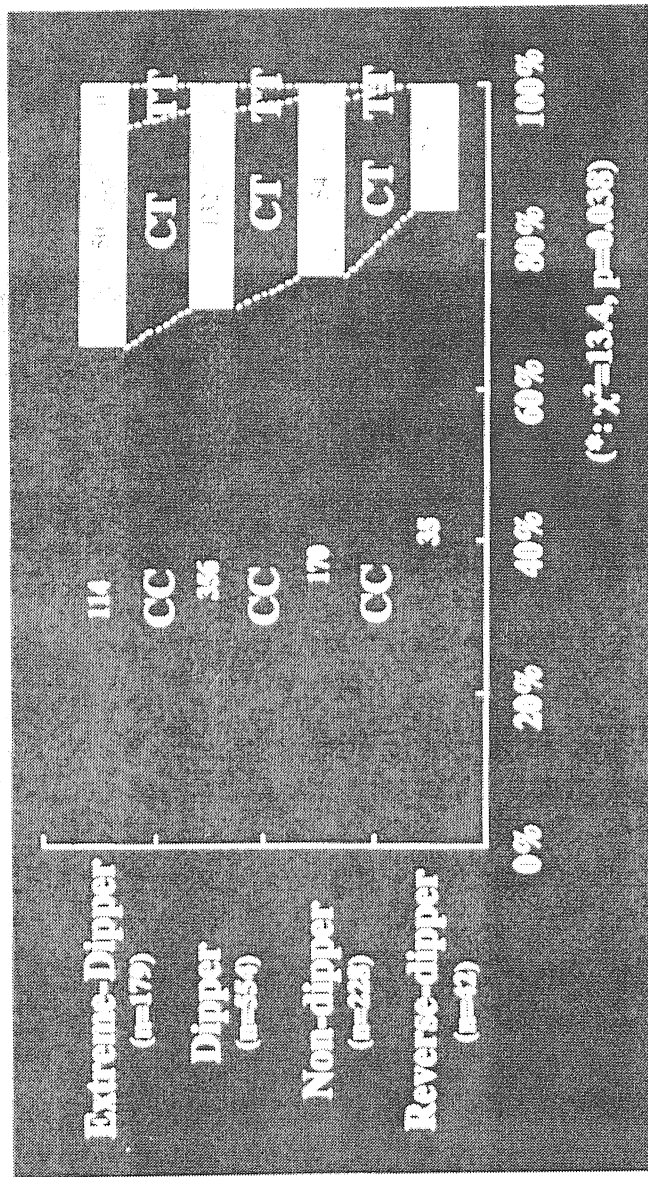


Figure 4. Angiotensinogen gene / T+31C polymorphism and BP variation.

Dissection and functional analysis of salt-sensitivity genes in rats
Higaki J, Katsuya T, and Ogihara T. Department of Geriatric Medicine,
Osaka University Graduate School of Medicine

Summary

Recent progress in the Human Genome Project is exploring the etiology of hypertension from the aspect of salt-sensitivity. As a first approach to identify the salt-sensitivity genes, we carried out a rat cross experiment. Crosses were made between 3 male spontaneously hypertensive rats and 3 female Wistar-Kyoto rats to make F1 hybrid. F1 hybrid were intercrossed for the study of F2 segregating generation. The other cross between Dahl's salt-sensitive and Dahl's salt-resistant rats was also made. Using 213 microsatellite markers, we found several candidate loci responsible for blood pressure. The arterial natriuretic peptide receptor locus, guanylate cyclase A on chromosome 2, neuropeptide Y locus on chromosome 4, and gamma crystallin locus on chromosome 9 were associated with high blood pressure. Peroxisomal ketoacyl-coA thiolase locus on chromosome 8 was associated with low blood pressure. However, there is a big difference in physiological state between rat and human, suggesting that rat results are not equal to human results. We then performed a genetic epidemiological study on a cohort in Ohazama, to investigate the relationship between the dipping phenomenon in 24-hour blood pressure and angiotensinogen genotype. It has been reported that there is a relation between the non-dipper type of 24-hour blood pressure profile and salt sensitivity. In this study, the 235T allele is presented as +31C. In the non-dipper type, which is common in patients with salt sensitivity, the incidence of CC genotype was significantly higher than in the dipper type. In the reverse-dipper type, in which the night-time blood pressure is higher than the daytime pressure, the incidence of CC was even higher. On the other hand, in extreme dippers, in whom there was an extreme blood pressure fall at night, the incidence of CC was lowest. These data suggest that the higher frequency of non-dipper type, which is possibly related to salt sensitivity, in CC carriers suggested the genetic involvement of angiotensinogen polymorphism in the risk for cardiovascular disease.