

氏名	まつもと 千穂
学位(専攻分野)	博士 (人間・環境学)
学位記番号	人博第76号
学位授与の日付	平成11年7月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	人間・環境学研究科文化・地域環境学専攻
学位論文題目	モデル動物を用いた高血圧原因遺伝子の検索・同定

論文調査委員 (主査) 教授 家森幸男 教授 津田謹輔 助教授 森谷敏夫

論文内容の要旨

急速に進む高齢化社会において、21世紀には脳卒中・心筋梗塞などの循環器疾患が死因の首位を占めると予測されている。その最大のリスクファクターは本態性高血圧症である。これは、血管障害の基礎的疾患として最も一般的なものであり、罹患率が高い疾患であること、脳血管、心、腎障害などの二次障害を引き起こすことにより、今後いっそうの高齢化が進むに伴い大きな問題となると予測される。従って、高血圧症の成因を明らかにし、それに応じた根本的な予防法、治療法を確立することが緊急の課題となっている。しかし、高血圧症の90%以上を占める本態性高血圧症はいわゆる多因子遺伝性疾患であるために、ヒトを対象にした分析で原因遺伝子を同定することは困難であると考えられてきた。それに対して、上記の問題点を克服し、高血圧原因遺伝子を同定するためには遺伝的モデル動物を用いた戦略が最も有効である。その理由として、モデル動物は1) 遺伝的に均一であり、2) 実験的に大規模な家系を作ることができ3) 環境因子をコントロールすることができるため、ヒトでは極めて困難な連鎖分析が可能であるからである。

本研究では、(1) 本態性高血圧症のモデル動物を用いて、ラット高血圧原因遺伝子の候補領域を同定し、(2) 同定された領域のみを導入したコンジュニック動物を作製し、その領域の評価を行うことを目的とした。

(1) (SHRSP) 脳卒中易発症高血圧自然発症ラットとその対照動物である正常血圧ラット(WKY)から交配した第2世代(F2)を作製し、食塩負荷前後の血圧を測定した。このF2世代を対象に、全染色体をカバーする遺伝マーカーを用いて、各測定時期の血圧に対するゲノムスキャンを行った。その結果、雌雄ともに基礎的血圧上昇と連鎖する領域をラット第1および3番染色体上に見出した。さらに食塩負荷後の血圧上昇と連鎖する領域を雌性ではラット第3番染色体上の別の領域に、雄性では第10番染色体上に見出した。以上の結果より、SHRSPの高血圧原因遺伝子は少なくとも4つ以上の染色体領域に存在することが示唆された。

(2) 連鎖解析により原因遺伝子の候補領域が同定された次のステップとして、通常、コンジュニックラットの作製を行う。申請者は高血圧原因遺伝子が存在する可能性の最も大きいラット第1番染色体上の領域をさらに絞り込むために、この領域のみを導入したコンジュニックラットの作製を行うことにした。コンジュニックラットの作製に最も重要な鍵となるのが詳細な遺伝地図である。しかしSHRSPとWKYは遺伝的に近い動物であるために(染色体領域で35%しか差がない)、多型のある遺伝マーカーを多く得ることは容易ではない。従って、申請者は簡便かつ迅速に遺伝マーカーの単離が行える手法として、Randomly amplified microsatellite polymorphism (RAMP) 法に注目して、遺伝マーカーの単離を試みた。その結果、RAMP法により新たな遺伝マーカー(RAMPマーカー)を111単離し、これらのマーカーはラット全染色体上に分布した。新たに得られたRAMPマーカーを利用してラット第1番染色体上の候補領域をさらに限定することができた。さらに第1番染色体上の候補領域のみを導入したコンジュニックラットを作製することに成功した。これらのラットは90日齢の血圧においてWKYよりも有意に高い血圧を示した。

本研究ではSHRSPを用いた遺伝分析およびコンジュニックラットの作製により、ラット第1番染色体上に同定された高血圧原因遺伝子の候補領域内に確実に原因遺伝子が存在することを明らかにした。ラットとヒトの染色体領域には相同性が

あることが知られており、ラットでの原因遺伝子の解明はヒトの本態性高血圧原因遺伝子の解明に大きく寄与するものと考えられる。また、コンジュニクラットは導入された領域以外はコントロール系統と同じであるから、高血圧原因遺伝子のひとつだけを持つモデル動物であるといえる。原因遺伝子が単離されていない現状において、コンジュニクラットとコントロールラットを比較して、表現型に何らかの差が認められれば、それはコンジュニクラットの持つ高血圧原因遺伝子由来する可能性が高くなる。このようにコンジュニクラットは高血圧の生理生化学的な実験系としても非常に有用である。

論文審査の結果の要旨

本態性高血圧症の素因となる遺伝子を同定することで、素因を有するものを選び分けて集中的かつ効果的な予防を行うことや、その遺伝子産物を標的とした、より本質的な治療法を開発することができる。しかしながら、本症は多因子遺伝性疾患であること、家系ごとに原因遺伝子の異なる可能性があること、食習慣やストレスなどの環境因子に大きく影響されることなどから、ヒトを対象とした遺伝分析は困難であると考えられてきた。これに対し、申請者らは本態性高血圧症の遺伝的モデル動物である SHRSP を利用することにより、これらの困難を克服できるのではないかと考え検討を重ねてきた。

本研究において申請者は（１）SHRSP とその対照動物である WKY から作製した 200 匹の F2 ラットでの連鎖解析により基礎的高血圧、食塩感受性高血圧に関わる染色体領域を同定し、（２）その領域の詳細な遺伝地図の作製および遺伝マーカーの単離を行い、さらに（３）高血圧に関連する証拠の得られた染色体領域のみを SHRSP から受け継いだコンジュニクラットの作製を行った。

すなわち、申請者は（１）F2 ラットの各々の時期における血圧値と既存の遺伝マーカーとの連鎖解析により、ラット第 1、第 3 染色体上に基礎的高血圧、第 10 染色体上に雄性的食塩感受性高血圧、さらに第 3 染色体上の別の領域に雌性的食塩感受性高血圧と連鎖する領域を同定した。なかでも申請者は第 1 染色体上の基礎的高血圧に関与する領域に注目し、その領域の詳細な遺伝地図を作製して連鎖解析を行い、候補領域を限定した。この結果は高血圧原因遺伝子の同定の今後の展開に大いに貢献するものである。

（２）申請者は特に第 1 染色体上の基礎的高血圧に注目し、次のステップとして、この領域のみを SHRSP より受け継いだコンジュニクラットの作製を目標においた。コンジュニクラットの構築に必要な不可欠であるのがこの領域の詳細な遺伝地図であるが、SHRSP と WKY は遺伝的に近い系統なので有効な遺伝マーカーの単離が容易ではない。そこで申請者は新たな方法（AMP 法）を用いて遺伝マーカーの単離を行い、111 の遺伝マーカーの単離に成功した。これらのマーカーは第 1 染色体上にもマップされ、候補領域をさらに限定することができた。また、申請者が検討した RAMP 法での遺伝マーカーの単離が成功したことにより、この方法が他の系統にも応用でき、さらに従来方法よりも簡便かつ迅速に行えることが実証でき、分子遺伝学の分野における進歩に寄与することができた。

（３）新たに得られた LYMP マーカーと既存の遺伝マーカーを用いて、第 1 番染色体上の候補領域のみを導入したコンジュニクラットを作製することに成功した。これらのラットは WKY よりも有意に高い血圧を示した。この結果は、高血圧原因遺伝子の存在を物理的に特定の狭い領域内に限定できたことを証明している。申請者は、原因遺伝子について不明であるがその候補領域が確かめられている場合、この方法が最も有効かつ実証的であることを本研究により証明した。さらに、完成したコンジュニクラットは当該領域以外のゲノム上の領域が対照ラットとほぼ 100% 遺伝的に均一であるため、遺伝学研究にとどまらず高血圧の発症や病態の研究あるいは治療法の開発に優れたモデルを提供することになると考えられる。

申請者はモデル動物を用いた分子遺伝学的な分野において、生活習慣病の遺伝素因を明らかにすることを試みた。その結果、連鎖解析によって高血圧候補領域を同定し、その候補領域のみを有するコンジュニクラットの作製に成功した。コンジュニクラットを対象に、申請者が RAMP 法などを用いて開発した十分に密度の高い遺伝マーカーを用いれば、高血圧遺伝子の存在領域をさらに狭めることが可能となり、今後の高血圧原因遺伝子同定に向けた研究に多大の貢献をしたと高く評価しうる。さらに申請者の研究が進めば、モデルラットにおける高血圧原因遺伝子が同定・単離され、その発症メカニズムが解明されるのみならず、最終的にはヒト本態性高血圧症の発症機序を分子レベルで明らかにすることができ、これらの疾患の予知・予防および治療法の確立に貢献すると期待できる。

よって本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 11 年 5 月 21 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。