

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14917

研究課題名（和文）脳梗塞の発症メカニズムをゲノム編集ラットを用いて解明する

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of cerebral infarction using genome-edited rats

研究代表者

垣野 明美（Akemi, Kakino）

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：00534637

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ゲノム編集技術によりLOX-1遺伝子を欠損させた脳卒中易発症系高血圧自然発症ラット（SHRSP）を用いて、脳梗塞発症・進展におけるLOX-1の機能的役割について検討を行った。ラットの臨床症状およびMRI画像診断による病態解析の結果、LOX-1欠損により脳梗塞発症の遅延が認められた。また、遺伝子発現解析やmicroRNA発現変動解析から、LOX-1欠損ラットは野生型に比べて神経保護作用が増大していることを示す結果を得た。以上よりLOX-1が脳梗塞の発症や病態進行に関与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞は要介護状態を招く最も予防が重要な疾患である。本研究結果では、病理学的にヒトの脳卒中とよく類似しているSHRSPでLOX-1を欠損させると脳梗塞の発症や病態進行が遅延することを示した。すなわち、LOX-1作用阻害が、脳梗塞の新しい予防・治療法のための標的となる可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the functional role of LOX-1 in stroke development and progression using LOX-1 knockout Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat (SHRSP) produced by genome editing technology. The results of pathology analysis by clinical symptoms and MRI imaging of the rat showed that cerebral infarction was found to be delayed by LOX-1 deficiency. In addition, gene expression analysis and microRNA expression analysis before and after stroke showed that the neuroprotective effect was increased in LOX-1-deficient rats. Our data indicate that LOX-1 is involved in stroke development and progression, and it is suggested that inhibition of LOX-1 action may be a target for new preventive / therapeutic methods for stroke.

研究分野：薬理学

キーワード：脳梗塞 LOX-1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は、我が国の超高齢化に伴い増加しており、一旦発症すると治療法が限られるばかりか、重度の要介護状態を招く原因として最も多い。したがって、最も予防が重要な疾患である。

では、脳梗塞のリスクを高める因子は何か？それは脳梗塞の原因として働くのか？我々は、健康者約 2,500 人の 11 年間の追跡調査により、血中の変性 LDL を LOX-1 のリガンドとして測定すると、変性 LDL 高値が、脳梗塞発症の独立した危険因子で、発症リスクが 3 倍以上高まることを、明らかにした(Inoue N, Kakino A, Sawamura T, et al. Clin Chem 2010)。また、ヒト変性 LDL をマウスに投与すると中大脳動脈結紮による脳梗塞巣が LOX-1 依存的に拡大することを見出した(Shen M, Sawamura T, et al. Blood 2016)。

このことから、変性 LDL が脳梗塞発症のリスクファクターであり、かつ、脳梗塞の増悪因子であることが明らかになった。では、実際に脳梗塞発症の原因として変性 LDL-LOX-1 系は機能しているのだろうか？これをゲノム編集により LOX-1 遺伝子をノックアウトした脳卒中自然発症ラットを用い解析を行うことにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、LOX-1 の脳梗塞発症・病態進行における役割を明らかにすることである。これにより、LOX-1 の機能抑制により脳卒中の発症や重症化を制御する、新しい予防・治療の展望を切り開くことを目指す。

3. 研究の方法

(1)脳卒中自然発症ラット (Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat, SHRSP) における LOX-1 遺伝子操作の評価

ZFN (Zinc Finger Nuclease) 技術により作出した LOX-1 ノックアウトラットの LOX-1 遺伝子産物の機能欠失を確認するため、同変異を持つラット LOX-1 の cDNA を作製し、COS-7 細胞に発現させ、LOX-1 リガンドである酸化 LDL の反応性を調べた。また、LOX-1 遺伝子欠損ラットが正常に繁殖するのか、LOX-1 遺伝子が欠損しただけで何か特殊な形質が発現していないか、ラットの基本的な性質を確認した。

(2)脳卒中発症解析

通常飼育条件下あるいは食塩負荷条件下で、体重、血圧変化を経時的に測定するとともに、MRI 画像診断を行い、脳卒中発症時期を解析した。加えて、体重変化または歩行異常（前肢・後肢の麻痺）および活動性の低下などの臨床症状をスコア化し発症・重症度の評価も行った。

(3)遺伝子発現解析、microRNA 変動解析

脳卒中未発症時点(8 週齢)の雄性ラットの脳組織から全 RNA を抽出してマイクロアレイを実施し網羅的な遺伝子発現解析を行い、野生型と LOX-1KO で発現量の差が大きいものについて定量 RT-PCR により検証した。また、脳虚血で変動すると言われている特定の microRNA に着目し、脳卒中発症前後の血漿中および脳組織における microRNA の変動について解析を行った。

4. 研究成果

(1)SHRSP における LOX-1 遺伝子操作の評価

ダイレクトシーケンス法でゲノム配列を確認した結果、LOX-1 遺伝子ノックアウトラットでは、LOX-1 遺伝子上に 4 塩基の欠失変位が誘導されていた。これによりフレームシフトが起こり、以後のアミノ酸配列の変異と全長の 364 アミノ酸残基から 103 残基への短縮が起こる (図 1a)。同配列を持つ cDNA 発現ベクターを構築し、COS-7 細胞に発現させ、DiI 標識酸化 LDL の取り込みを観察した。その結果、ラット LOX-1 は濃度依存的な結合を認めるのに対し変異体への酸化 LDL 結合は認められなかった(図 1b)。すなわち、変異 LOX-1 遺伝子産物は機能を欠失していることが示された。

ラットの基本的な性質について

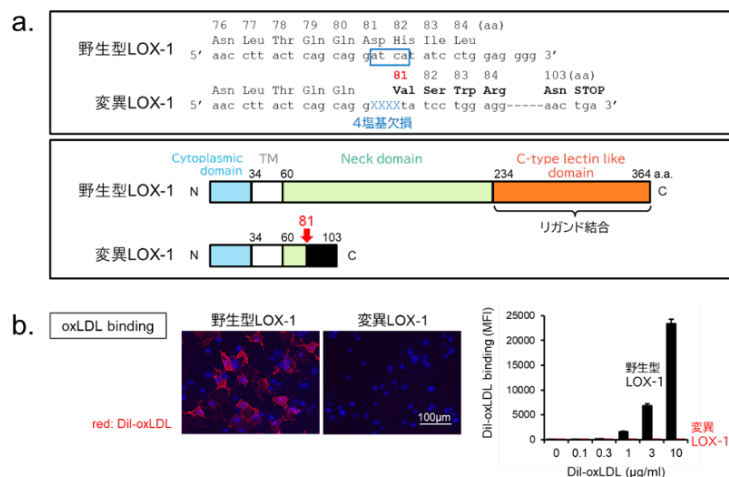


図 1. ゲノム編集による変異とその遺伝子産物の機能欠損の評価

では、ヘテロ遺伝子欠損の交配により、野生型 (WT) : ヘテロ遺伝子欠損 : ホモ遺伝子欠損 (KO) がメンデル遺伝法則に従いほぼ 1:2:1 で生まれ、また、脳卒中を発症していないと考えられる成長早期での体重増加や血圧上昇、一般的な血液生化学などの指標は、WT と KO で有意な差は認められなかった。

(2) 脳卒中発症解析

通常飼育条件下における歩行異常・活動性低下などの臨床症状の評価から、LOX-1 遺伝子欠損 SHRSP では野生型 SHRSP に比べて自然経過での神経症状発現の遅延、生存期間の延長が認められた。さらに脳の MRI 画像診断を経時的に行うことにより詳細に脳梗塞の発症を評価したところ、画像診断の結果からもやはり LOX-1 遺伝子欠損により脳梗塞発症が有意に遅延していた (図 2a)。また、SHRSP で脳梗塞を誘発する高食塩負荷条件下でも同様に経過観察・画像診断を行ったところ、やはり、LOX-1 欠損により脳梗塞発症の抑制が認められた (図 2b)。以上の結果から、LOX-1 が脳梗塞の病態に促進的に働いていることが示唆された。

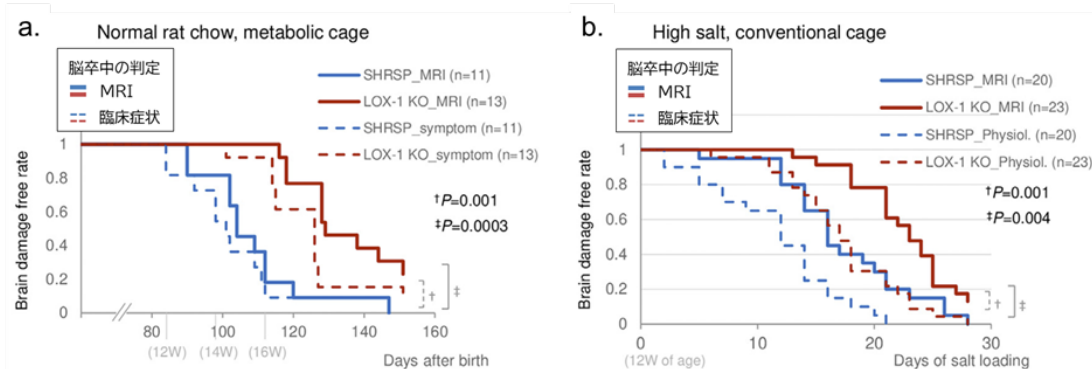


図 2. ラット病態解析

(3) 遺伝子発現解析、microRNA 変動解析

脳卒中発症前の脳組織の遺伝子発現解析の結果、野生型に比べ LOX-1KO では炎症下で増加する ccl2、endothelin-1 の遺伝子発現が有意に低下しており、逆に、神経保護作用を有すると言われている因子の遺伝子発現が LOX-1KO で高くなっていることがわかった。また、miRNA マイクロアレイ解析で脳虚血により変動・増加が認められた 7 つの microRNA (miR-150-5p, 27a-3p, 451-5p, 140-3p, 30d-5p, 320-3p, 93-5p) に着目し、脳卒中発症前 (12 週齢) と上記観察で発症を認めた時点 (~16 週齢) の血漿中の microRNA の変動を定量解析した結果、野生型では発症後に有意な増加が認められるのに対し、LOX-1KO では変動しないあるいは変動が非常に小さいことがわかり、この結果からも、LOX-1 欠損により脳卒中の病態が抑制されることが示された。また、脳損傷後に血中レベルが増加する miRNA の一つ miR-320 については、LOX-1KO の脳組織内では増加しているが血中レベルは変動しないというミスマッチが認められており、LOX-1 遺伝子欠損により血液脳関門 (Blood-brain barrier, BBB) 破綻が抑制されている可能性が考えられた。それを裏付ける結果として、野生型の脳虚血モデルでは、タイトジャンクション形成に重要な occludin、tight junction protein-1 の発現減少傾向が認められるのに対し、LOX-1KO の脳虚血モデルではそれが抑制されていた。

以上より、自然発症脳卒中ラット SHRSP において、LOX-1 遺伝子欠損は神経保護作用を呈し、BBB 破綻の抑制がされた。一方、先行研究では、LOX-1 が神経細胞アポトーシスを促進することが報告されており、神経保護作用の機序として BBB 破綻の抑制および神経細胞アポトーシスの抑制といった多面的な作用が考えられる。

本研究では、病理学的にヒトの脳卒中とよく類似している SHRSP で LOX-1 を欠損させると脳梗塞の発症や病態進行が遅延することを示した。LOX-1 作用阻害は、脳梗塞の新しい予防・治療法のための標的となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Liang Yi-Qiang, Kakino Akemi, Matsuzaka Yasunari, Mashimo Tomoji, Isono Masato, Akamatsu Tomohisa, Shimizu Hana, Tajima Michiko, Kaneko Takehito, Li Lei, Takeuchi Fumihiko, Sawamura Tatsuya, Kato Norihiro	4. 巻 51
2. 論文標題 LOX-1 (Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1) Deletion Has Protective Effects on Stroke in the Genetic Background of Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stroke	6. 最初と最後の頁 1835 ~ 1843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/STROKEAHA.120.029421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 垣野明美, 藤田佳子, 沢村達也
2. 発表標題 炎症条件下でおきる向血栓性反応にLOX-1は関与する
3. 学会等名 第51回日本動脈硬化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沢村達也, 垣野明美
2. 発表標題 血管内皮細胞のkey molecule LOX-1を標的とした創薬
3. 学会等名 第21回応用薬理シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梁一強, 垣野明美, 松坂恭成, 竹内史比古, 沢村達也, 加藤規弘
2. 発表標題 ZFN法により作成したLOX-1 Knockout SHRSPにおける脳卒中発症遅延とその機序の探究
3. 学会等名 第41回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------