

遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究

所属 国立成育医療センター研究所 薬剤治療研究部
研究者 田上昭人

研究要旨 $\alpha 1$ アドレナリン受容体変異動物 ($\alpha 1A, B, D$ ノックアウトマウス)、バソプレッシン受容体変異動物 (V1a ノックアウト、V1b ノックアウト) さらに疾患モデルを作成し、病態・疾患におけるそれぞれの受容体の機能解析・受容体特異的薬物の評価を行った。

分担研究者

- (1) 東京大学医学部泌尿器科 北村唯一
- (2) 東京薬科大学第一薬理学教室 竹尾聡
- (3) 福岡大学薬学部機能制御教室 高野行夫
- (4) 福岡大学薬学部臨床疾患薬理学 藤原道弘
- (5) 山之内製薬株式会社 分子医学研究所 ゲノム創薬研究室 ゲノム創薬 小堀正人
- (6) キッセイ薬品工業株式会社 中央研究所 小嶋正三
- (7) 旭化成株式会社 ライフサイエンス総合研究所 薬理第一研究所 生垣一郎
- (8) 日本オルガノン株式会社 研究開発管理室 廣田直美
- (9) 大塚製薬株式会社 薬物開拓研究所 森豊樹

A. 研究目的

代表的ホルモンであるアドレナリン、バソプレッシンは生体内において循環系、内分泌系、糖代謝系、神経系などにおいて多彩な生理作用を有し、その調節機構の障害は種々の疾患・病態に関与している。本研究ではこれらのホルモンの受容体を介する調節機構を遺伝子改変動物を用いて解析を行い、その情報伝達系の障害により生じる各種の疾患・病態の解明を図る。遺伝子改変動物の解析により、受容体特異的薬物の長期的評価が可能となり、その薬理効果・副作用の予測が可能となる。また、遺伝子改変動物を用いて各種疾患モデル・病態モデルを作成することにより、病態・病因における各種生体内調節因子および関与する受容体の生理機能の解明が可能となり、薬物療法の開発、ゲノム創薬も可能となる。本研究では、アドレナリン受容体 (サブタイプ $\alpha 1a, b, d$)、バソプレッシン受容体 (サブタイプ V1a, b) 遺伝子改変動物を作成し、それぞれの受容体のリガンド/受容体の生理作用を明らかにすると同時に、病態における

それぞれの機能を明らかにし受容体特異的薬物の開発・臨床応用を行う。それぞれの受容体のリガンド、ホルモンが関与すると予想される病態モデルを作成することにより、その病態における受容体特異的薬物の薬理効果を評価検討し、さらにこれらの病態下における新たな薬物標的因子をトランスクリプトーム、プロテオーム解析により探索をおこない、治療薬への応用を目指す。

B. 研究方法

1. 遺伝子改変動物の作成 (田上分担)
バソプレッシン受容体変異動物 (V1a ノックアウト、V1b ノックアウト)、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体変異動物 ($\alpha 1A, B, D$ ノックアウトマウス) を作成する。さらに、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体複合欠損マウス ($\alpha 1AB$ 二重欠損マウス、 $\alpha 1AD$ 二重欠損マウス、 $\alpha 1BD$ 二重欠損マウス) の作成を行う。作成したノックアウトマウスの遺伝子発現解析は RT-PCR 法にて行う。

2. 疾患モデル、病態モデルの解析

1) 循環器疾患モデル (田上、竹尾、小嶋分担)

(1) バソプレッシン V1a 受容体欠損マウス
実験には F5 以降のマウスを供した。実際には、8-12 週齢、体重 20-35 g の雄性 V1aR^{-/-}マウス (V1aR KO) およびその対照として V1aR^{+/+}マウス (WT) を用いた。AVP 脳室内投与の実験では 8-10 週齢、体重 20-30 g の雄性 C57BL/6J 系マウス (SLC) を使用した。飼料と水は自由に与え、恒温 (23 ± 1 °C)、恒湿 (55 ± 5 %)、定時照明 (12 時間明所、7:00-19:00; 12 時間暗所、19:00-7:00) の人工環境下で飼育した。

(2) 血圧測定および薬物投与

Tail-cuff 法によりマウスの覚醒下基礎血圧および心拍数を測定した。また、カテーテル法により AVP をはじめ各薬物静脈内投与後の血圧および心拍数変化を測定した。

(3) Tail-cuff 法による血圧測定

覚醒下マウスの収縮期血圧、拡張期血圧、および心拍数を tail-cuff 血圧測定装置 (BP-98A, Softron) を用いて測定した。マウスを血圧測定に慣れさせるため、実験を開始する前に少なくとも 3 日間の馴化期間 (即ち、この期間中の測定値は記録には含まれない) を設けた。その後、3 日間連続して毎日午後 1 時から 5 時までの間に血圧を測定した。従って、それぞれのマウスについて、血圧および心拍数の延べ測定回数は総計 30 - 50 回となり、第 3 日目の 8 - 10 回の測定の平均値を個々のマウスの血圧および心拍数値とした。

(4) カテーテル法による血圧測定

覚醒下マウスの動脈圧測定および薬物静脈内投与のため、二本のポリエチレンチューブをそれぞれ動脈血管内に留置した。マウスをペントバルビタール (40 mg/kg, i.p., Nembutal) で麻酔し、背臥位に固定した。頸部正中線切開後、左総頸動脈を単離し、動脈圧測定のためのポリエチレンチューブ (加熱して伸展加工した SP31) を挿入し先端部が大動脈弓に位置するように固定した。また、左頸静脈を単離し、薬物投与のためのポリエチレンチューブ (SP8) を挿入し固定した。両チューブ共に滅菌加ヘパリン生理食塩水で満たし、他端は皮下を経由させて頸背部より体外へ露出させて密封した後、術野を縫合した。感染防止のため縫合部をポビドンヨード液で消毒し、各マウスを個別に飼育した。手術後少なくとも 24 時間の回復安定化期間を設けた後、マウスを血圧測定用小型ケージ (高さ 11cm, 幅 13cm, 奥行き 13cm) に移し、血圧測定を開始した。全身血圧は動脈内ポリエチレンチューブに圧トランスデューサー (DX-360, Nihon Kohden) を接続して電気的信号に変換し、生体用歪みアンプ (AP-601G, Nihon Kohden) を介して増幅した。得られた全身血圧波形から心拍数計 (AT-601G, Nihon Kohden) を介して心拍数を計数した。得られた血圧、平均血圧、および心拍数波形はサーマルアレイレコーダー (RTA-1200, Nihon Kohden) で記録した。測定開始後、30 分間以上安定化させた後の値を基礎血圧および基礎心拍数とした。さらに、下記の方法に従い AVP あるいはその受容体拮抗薬を静脈内投与し血圧および心拍数変化を測定した。

(5) AVP 静脈内投与

基礎血圧測定後、AVP (0.1 - 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を静脈内投与 (bolus injection, 一回当たりの投与量 1 $\mu\text{L}/\text{g}$) し、血圧および心拍数の最大変化値を記録した。AVP による血圧応

答のタキフィラキシーを避けるために、血圧および心拍数が投与前値に完全に回復したことを確認し、かつ十分な投与間隔 (20 - 50 分間隔) を設けて次の用量の AVP を投与した。予備試験ではこの間隔後に再度 AVP を静脈内投与すると、初回と類似の血圧および心拍数反応が認められた。また、V1aR KO マウスについては、AVP による血圧応答に及ぼすバソプレシン V2 受容体アンタゴニスト (V2RX) 前投与の効果を検討した。V2RX として (adamantaneacetyl, O-Et-D-Tyr², Val⁴, aminobutyryl⁶, Arg^{8,9})-vasopressin (SIGMA) を用いた。AVP による血圧応答を測定した後、少なくとも 1 時間の投与間隔を空け、V2RX 存在下での AVP の血圧応答を測定した。V2RX (100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) は AVP 投与 10 分前から 20 分間、マイクロシリンジポンプ (CFV-2100, Nihon Kohden) を用いて持続注入した。

(6) AVP 静脈内持続投与

AVP の bolus injection を行った個体とは別の個体を用い、AVP (0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) の 10 分間静脈内持続投与による血圧および心拍数の経時変化を測定した。また、WT マウスについては、AVP による血圧応答に及ぼす V1aR アンタゴニスト (V1aRX) 前投与の効果を検討した。V1aRX として (β -mercapto- β , β -cyclopentamethylenepropionyl¹, O-Me-Tyr², Arg⁸)-vasopressin (SIGMA) を用いた。V1aRX (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) は AVP 投与開始 10 分前から 20 分間、マイクロシリンジポンプを用いて持続注入した。

(7) 心臓重量測定

カテーテル法による血圧測定終了後、マウスをペントバルビタール (60 mg/kg, i.p.) で麻酔し、心臓を摘出した。氷冷下の生理食塩水中で血液を洗浄し拭紙で水分を拭き、心房筋を除く心室重量 (湿重量) を秤量した。

(8) 心エコー法による心機能解析

マウスをペントバルビタール (40 mg/kg, i.p.) で麻酔し、胸部を剃毛した。加温マット (BWT-100, Bio Research Center, 設定温度 37°C) 上で左半側臥位をとらせ、加温したエコーゲルを胸部に塗布し、探触子 (7.5 - 15 MHz) を長軸および短軸方向にセットして心エコーの測定を開始した。心エコー測定装置は SSD-5500 (ALOKA) を用いた。2D 短軸像から拡張末期中隔厚 (inter-ventricular septal thickness, IVS), 左室拡張末期後壁厚 (left ventricular posterior wall thickness, LVPW), 左室拡張末期内腔径 (left ventricular internal diameter diastole, LVIDd) を測定し、左

室重量 (left ventricular weight (LV weight) = (IVS + LVIDd + LVPW)³ - (LVIDd)³) および左室重量体重比 (LV weight index = LV weight / body weight) を算出した。次に、左室長軸像の M モード画像より、左室収縮末期内腔径 (LVID systole, LVIDs) および左室拡張末期内腔径 (LVIDd) を測定し、左室内径短縮率 (fractional shortening (FS %) = [(LVIDd - LVIDs) / LVIDd] × 100) を算出した。また、三乗法 (Pombo 法) により内腔径から左室収縮末期容積 (end-systolic volume (ESV) = 1.047 × LVIDs³) および左室拡張末期容積 (end-diastolic volume (EDV) = 1.047 × LVIDd³) を求め、両値から左室駆出率 (ejection fraction (EF %) = [(EDV - ESV) / EDV] × 100) を算出した。最後に、半覚醒状態でドプラ法により右室流出路の心拍出量および一回拍出量を算出した。血流の速度時間積分値 (velocity time integral, VTI) が最大となるように肺動脈血流波形をモニターし、肺動脈径および心拍数 (heart rate, HR) を測定し、心拍出量 (cardiac output (CO) = VTI × [π × (pulmonary artery diameter / 2)²] × HR) および一回拍出量 (stroke volume (SV) = CO/HR) を算出した。全てのパラメータは連続する 3 心周期以上の測定から算出した。

(9) 心臓カテーテル法による心機能解析および脳室内投与

中枢 V1aR の役割を検討するため、AVP 脳室内投与後の心行動態の変化を測定した。これまでに、AVP 脳室内投与により、例えばラットなどでは交感神経系の活性化、血漿カテコラミン量の増大 (Unger et al., 1984)、および血圧および心拍数の上昇が惹起される (Pittman et al., 1982, Janiak et al., 1989) ことが報告されている (Johnston et al., 1985, Zerbe et al., 1985, King et al., 1985)。そこで本研究でははじめに、C57BL/6J 系マウスを用いて、血圧、心機能、および血漿カテコラミン量の変化を指標として AVP 脳室内投与の用量依存性を検討し、次に V1aR 変異マウスを用いて AVP 脳室内投与による心血管応答に対する V1aR の役割を検討した。

マウスをウレタン (1 g/kg, i.p.) で麻酔し、背臥位に固定した。頸部を正中線切開し、麻酔下の呼吸を確保するために気道を切開し、ポリエチレンチューブ (4 Fr, Atom) を挿入した。全身血圧測定のために左大腿動脈へポリエチレンチューブ (加熱して伸展加工した SP 31) を挿入した。左心室内圧測定のために右総頸動脈よりポリエチレンチューブ (SP

10) を挿入し、その先端部を左心室内腔まで導き、留置した。マウスを注意深く腹臥位に反転させ、頭部を脳定位固定装置に固定した。頭頂部を正中切開し、頭頂骨を露出させた。bregma 近傍に小孔を穿孔し、bregma より左側へ 1.0 mm, 尾側へ 0.3 mm, 頭蓋表面から 3.0 mm の深さの位置 (左側脳室) に AVP 投与用ステンレス注射針 (30 gauge) を挿入した。手術後、少なくとも 30 分以上安定化させた後、AVP を投与し、投与後 30 分間の左心室内圧、左心室収縮および拡張最大速度、平均血圧、収縮期および拡張期血圧、および心拍数の経時変化を測定した。左心室内圧変化から微分計 (ED-601G, Nihon Kohden) を介して得られた左心室内圧変化速度の最大値および最小値の絶対値をそれぞれ左心室収縮および弛緩最大速度とした。AVP はポリエチレンチューブ (PE 10) を介して接続した 10 μL マイクロシリンジを用いて投与した (1.0 μL/min, 1 分間)。C57BL/6J 系マウス (8 - 10 週齢, 雄性, SLC) では AVP 3 - 100 ng または生理食塩水を単回脳室内投与した。また、V1aR 変異マウスでは C57BL/6J 系マウスでの予備検討結果に基づき、AVP 10 ng を投与した。脳室内投与の成否は全ての実験の終了後、同じステンレス注射針から黒色インク (2 μL) を脳室内投与し、脳冠状スライスを観察することにより判定した。

(10) 血漿カテコラミン測定

AVP 脳室内投与後の血漿エピネフリンおよびノルエピネフリン濃度変化を測定した。1.2.7 の脳室内投与実験の終了後 (AVP 脳室内投与 30 分後)、左大腿動脈へ挿入したポリエチレンチューブより動脈血を採血し、遠心分離 (4°C, 3000 回転/分, 10 分間) して血漿を採取し、血漿カテコラミン定量試料とした。血漿標本は分析を行うまで -20°C で保存した。カテコラミンは常法に従い、ECD-HPLC 法 (Wagner et al., 1979) で定量分析した。

(11) 摘出腸間膜動脈床の灌流圧測定

ペントバルビタール (60 mg/kg, i.p.) 麻酔下、マウスより摘出腸間膜動脈床灌流標本を作製した。開腹し、上腸間膜動脈を単離し、先端を鈍化させたステンレス注射針 (27 gauge) を挿入し、直ちに 95% O₂ + 5% CO₂ 混合ガスで酸素化し、37°C に保温した Krebs-Henseleit 緩衝液の灌流 (流速 1.0 mL/min) を開始した。回腸部を残したまま腸間膜動脈床を摘出し、さらに、回腸の縦走筋方向に沿って腸間膜動脈との接合部で回腸部を完全に切離した。摘出した腸間膜標本を 37°C に保温したマグナス管内に固定し、標本

の乾燥を防ぐため、灌流液で浸した拭紙で標本を被覆した。灌流圧は圧トランスデューサー (DX-360, Nihon Kohden) で電気的信号に変換し、生体用歪みアンプ (AP-621G, Nihon Kohden) で増幅し、サーマルペンレコーダー (WT-645G, Nihon Kohden) で記録した。腸間膜動脈標本を 30 分以上安定化させ、AVP (5 および 50 pmol) を投与し、その後の灌流圧変化を測定した。

(1 2) 統計

結果は平均値±標準誤差で表した。基礎心行動態パラメータおよび心重量などの二群間 (V1aR KO マウス vs. WT マウス) の統計解析には unpaired Student's t-test を用いた。AVP 投与による心行動態パラメータ変化のような時間経過または用量変化を伴う二群間の統計解析には two-way analysis of variance (ANOVA) を用いた。AVP 脳室内投与による血漿カテコラミン量変化の統計解析には one-way ANOVA を用い、post-hoc test として Dunnett 法を用いた。危険率 5%未満 ($p < 0.05$) を有意差ありとみなした。

(1 3) $\alpha 1$ アドレナリン受容体欠損マウス、V1a バソプレッシン受容体欠損マウスを用いて腎臓全摘高張食塩水負荷による高血圧モデル動物の作製・解析を行った。

2) 血管損傷モデル (田上分担)

$\alpha 1$ アドレナリン受容体欠損マウス、V1a バソプレッシン受容体欠損マウスを用いて作成・解析を行った。大腿動脈筋枝からカテーテルを挿入し、大腿動脈内皮を機械的に損傷させ、動脈内皮の肥厚を解析した。

3) 糖負荷試験 (糖尿病モデル) (田上、小堀分担)

膵臓ランゲルハンス島細胞における薬物 (アドレナリン、バソプレッシン) 刺激に対するインスリン、グルカゴン応答性の解析した。また、個体レベルでの糖負荷試験を行った。また、高脂肪食負荷による体重の推移、耐糖能の変化を解析した。

4) 鎮痛・疼痛試験 (高野分担)

鎮痛効果における各受容体の機能を見るためにそれぞれの遺伝子改変動物における痛み刺激に対する反応性を検討し、これらの受容体特異的薬物の鎮痛薬を検討した。また、モルヒネ耐性獲得・依存性形成におけるバソプレッシン、バソプレッシン受容体のサブタイプの関与を明らかにするために耐性獲得・依存性形成時におけるバソプレッシン受容体拮抗薬の効果、バソプレッシン受容体遺伝子改変

動物における変化を検討した。

(1) 実験動物

実験には、25 - 35 g (4-18 週齢) の V1a, V1b 受容体受容体欠損マウスと対象の wild type マウスと、ddy 雄生マウスを用いた。

(2) 鎮痛実験

熱侵害刺激反応：熱侵害刺激反応は、hot-plate 法と tail-flick 法で評価した (Eur. J. Pharmacol. 505, 75 75-82 (2004)。

統計的処理は、多群検定のため One-way analysis of variance (ANOVA) で分散分析を行なった後、Dunnett's test を行ない、対象群 (薬物非存在下) との間の有意差を求めた。

5) 中枢機能におけるバソプレッシンの生理作用の解明 (藤原分担)

(1) 実験動物ならびに飼育方法

実験動物は、国立育成医療センター研究所薬剤治療研究部より提供された雄性 V1aR KO マウス、V1bR KO マウスおよび野生型マウス (WT マウス) を用いた。マウスは透明なプラスチックケージ (20cm × 30cm × 15cm) 中で飼育し、室温 23±2°C、湿度 60 ±2% および 12 時間の明暗サイクル (7:00 AM 点灯) の動物室で飼育した。なお、水および餌 (CE-2; 日本クレア株式会社、東京) は自由に摂取できるようにした。

(2) 実験装置ならびに実験手続き

2.1. Open-field 法を用いた自発運動量

自発運動量の測定には Hall の Open-field 装置を用いた。本装置は底面の直径 60 cm、壁の高さ 50 cm、壁の上縁の直径 80 cm のバケツ状のもので、内面は灰白色に塗ってあり、底面は赤色のペンキで線を引き、ほぼ等面積の 19 区画に分けてある。装置の底面中央上 80 cm の高さに 100 W 白色光を置き、装置内に限なく一定の照度が保たれるようにした。マウスを装置内に入れ 3 分間における自発運動量 (装置底面の区画を横切る回数; ambulation) ならびに立ち上がり行動 (rearing) の回数を測定した。

2.2. Rota-rod 法を用いた協調運動

Rota-rod 法は、骨格筋の協調運動の可否、筋弛緩およびバランス感覚などの運動機能の測定を目的とした試験法である。Rota-rod 法の装置は直径 3cm のプラスチック製の棒で、この上にマウスを回転方向と逆に頭を向けて乗せ、落下するまでの時間 (Latency to fall; sec) を測定した。回転速度は、1 日目に 1 分間に 5 回転 (5 rpm)、2 日目に 10 回転 (10 rpm)、3 日目に 15 回転 (15 rpm) として行った。観察時間を最大 120 秒とし、1 日 3 試行を 3 日間連続で行った。

2.3. トラクションメーター法による筋力の測定

筋力は福大式トラクションメーター (FU-1、室町機械株式会社、東京) を用いて測定した。可動式の金網上にマウスを乗せ、尾を一定の力でゆっくり後方に引いた時に抵抗する四肢の脚力を測定した。

2.4. 明暗箱課題を用いた不安行動

明暗箱は明箱 (27 cm×27 cm×18 cm) と暗箱 (27 cm×18 cm×18 cm) から成り、境界にマウスが自由に移動できる開口部 (7.5 cm×7.5 cm) を有するアクリル樹脂製の装置を用いた。明箱上方には明白色照明を配置した。マウスが明るくて広い場所を嫌い、暗くて狭い場所を好む性質を利用して不安状態を測定する装置である。測定は、マウスを明箱の中央に頭を暗箱に向けて置き、明箱、暗箱それぞれの滞在時間と移動回数を肉眼で 10 分間測定した。

2.5. 高架式十字迷路課題を用いた不安行動

高架式十字迷路は、壁のある 2 本の enclosed arm と壁のない open arm からなり、マウスが高い位置にある解放された場所を嫌う習性を利用して不安状態を測定する装置である。まず、マウスを一方の open arm の先端に頭が外側を向くように置き、それぞれの arm への進入回数と進入時の滞在時間を肉眼で 10 分間観察した。マウスがそれぞれの arm に入ったか否かの判定は、マウスの四肢が完全にいった時とした。

2.6. 強制水泳試験

強制水泳試験とは、水を入れた狭いシリンダー内にマウスを入れると、最初は水から逃れようと激しく遊泳するが、やがて逃れられないことを認知し、次第に不活発になり無動状態を呈するようになる (学習性無力状態)。この現象は、抗うつ薬により緩解されることからうつ病、特に意欲低下の病態モデルとして考えられている。実験には、塩化ビニール製の円筒形の水槽を使用した。水槽は、直径 11 cm、高さ 18 cm であり、これに約 23°C の水を床面から 10 cm のところまで入れた。この水槽内でマウスを泳がせ、その時の不動時間を MicroAct Scratching Test 1.03 (Neuroscience Inc.) で解析した。この装置は、マウスの前肢に微細かつ強力なマグネットを装着し、その磁力線の変化によって発生するコイル電流を高感度 AC アンプで増幅し電位変換するものである。測定は 1 日目に 15 分間、2 日目に 5 分間の試行を行った。なお、本装置内でマウスが静止している状態を不動時間とした。

2.7. Prepulse inhibition (PPI)

実験には、驚愕反応装置 (San Diego

Instruments 製) を使用した。測定箱の中には、Plexiglas 製フレーム上部に動物保存用 Plexiglas 製シリンダーを取り付けた動物用ホルダーを備え付けた。音はシリンダーの 25cm 上部に取り付けたスピーカーより与えた。さらに、フレーム下部に取り付けたトランジューサーによってシリンダー内の動物の動きを検出し、インターフェイスを通じてマイクロコンピュータに記録した。まず、実験では、パルスとして 120dB (20msec)、プレパルスとして 70dB (20msec) の音圧を使用し、プレパルス開始 100msec 後にパルスを与えるようにした。測定プログラムとしては、①音刺激なし、②100dB のみ、③120dB のみ、④70dB&100dB、⑤70dB&120dB の試行を不規則的に繰り返し、それぞれの試行間隔が平均 30 秒となるように 15~45 秒間隔で与えた。測定は、パルス開始直後から 100msec 測定し、さらに実験開始前には、馴化時間として 10 分間、65dB のホワイトノイズのみをバックグラウンドとして与えた。% PPI は、 $(A-B)/A \times 100$ として算出した。

(A : pulse のみの驚愕反応、B : prepulse を用いたときの驚愕反応)

2.8. 高架式十字迷路課題を用いた学習・記憶の検討

実験方法は、1 日目に訓練試行、その 24 時間後の 2 日目にテスト試行を行った。まず、マウスを一方の open arm の先端に頭が外側を向くように置き、いずれかの enclosed arm に入るまでの時間 (transfer latency) を測定した。最大観察時間を 60 秒とした。

2.9. 水迷路課題を用いた学習・記憶の検討

水迷路装置は、23°C 前後の水を入れた直径 150 cm、高さ 45 cm、水深 30.5 cm の円筒状のプールとマウスが逃避するための直径 12 cm のプラットホームからなる。プラットホームの表面は、水面下 1 cm のところにあるためにマウスから見るできない。マウスをスタート地点で頭が壁側を向くようにプールの中に入れ、ゴールに到達するまで観察した。最大観察時間を 120 秒とし、マウスが 120 秒以内にプラットホームを見つけない場合は、プラットホーム上に連れて行き、プラットホームの位置を認知させるために 30 秒間放置した。それからマウスを取り出し、すぐに乾いたタオルで拭いてケージに戻した。測定項目は、プラットホームに逃避するまでの遊泳時間 (swimming time ; sec) とした。1 日 3 試行を 3 日間、スタート地点とゴールであるプラットホームの位置を固定して行った。各試行間隔 (intertribal interval) を 30 分とした。

2.10. 8方向放射状迷路課題を用いた学習・記憶の検討

装置は、高架式 8 方向放射状迷路装置 (Neuroscience Inc.) を用いた。この装置は、床から 50 cm の高さに直径 18 cm の正 8 角形のプラットホームから放射状に伸びる長さ 30 cm、幅 6 cm、側壁高 2.5 cm の 8 本のアームから構成されている。これらの装置は全て透明なアクリル樹脂で作られている。各アームの先端には餌入れを設置し、報酬として餌 9 mg をそれぞれ 1 個ずつ置いてある。中央プラットホームと 8 本のアームの間には、高さ 20 cm の透明なアクリル樹脂製のギロチンドアを設置してある。訓練は、ギロチンドアで各アームの入口を遮閉されたプラットホームにマウスを入れ、1 分後にギロチンドアを解放し測定を開始した。マウスがアームに進入したら全てのギロチンドアを閉鎖し、そして一定の間隔をおいて全てのギロチンドアを解放するようにした。観察時間はマウスが 8 個の餌を全て取り終えるか、または 5 分間経過した時点を試行終了とし、1 日 1 試行として 15 試行にわたり空間記憶の獲得過程を観察した。測定項目は、最初の 8 選択において初めて訪れたアームの数 (正選択; no. of correct choices)、一度訪れたアームに 2 回以上訪れた数の総数 (誤選択; no. of error choices) および試行終了までの走行時間を計測した。空間記憶獲得基準は 8 個のうち 7 個の餌を連続して正選択するか (⑦-1)、あるいは 8 個の餌を誤選択することなく摂取した場合 (⑧-0) として、これを 3 試行にわたって連続した場合とした。

2.11. 薬物実験

使用した薬物は、haloperidol (大日本製薬)、risperidone (ヤンセン協和) および clozapine (Sigma) である。Haloperidol は生理食塩水に希釈した。Risperidone は生理食塩水に溶解した。Clozapine は、生理食塩水で 0.1 N HCl に調整した溶媒に溶解し、さらに 0.1 N NaOH を用いて pH を 6-7 に調整した。薬物は、テスト 30 分前に腹腔内投与した。

(3) 統計処理

統計処理には、対応のない Student's *t*-test (unpaired *t*-test)、2 元配置分散分析および Fisher's PLSD post-hoc test を使用した。薬物の作用においては、3 元配置分散分析および Fisher's PLSD post-hoc test を使用した。相関性については、Pearson's correlation coefficient test を使用した。なお、危険率 5%以下が認められる場合を統計学的に有意差有りとした。

6) 副腎髄質機能におけるバソプレッシン受容体の機能解析 (田上分担)

安静時、バソプレッシン負荷時、ストレス負荷時の血中カテコールアミン濃度を解析した。

7) 腎臓におけるバソプレッシン受容体の機能解析 (田上分担)

腎臓におけるバソプレッシンの生理作用について V1a, V1b 受容体の生理機能を中心に遺伝子改変動物を用いて解析を行った。

8) 肝臓再生モデルの作成 (田上分担)

マウスの肝臓を部分切除 (65% 切除) を行う。切除後 24, 48, 72 時間後の肝臓の再生率を解析した。

ア) 肝臓の再生率の評価方法

肝臓重量の測定、肝細胞における BrDU の取り込み率にて行った。

イ) 肝臓酵素の生化学的解析

肝細胞再生における肝細胞の酵素の解析・グリコーゲン代謝酵素の解析を行う。特に尿素サイクルに関する酵素発現、酵素活性の測定ならびにアンモニアの測定を行った。

ウ) DNA チップを用いた遺伝子プロファイリング (トランスクリプトーム) の構築
肝細胞再生における変動する遺伝子の解析し、薬物効果に関与する因子の同定を行った。

9) 膀胱の生理機能の解析 (北村分担)

$\alpha 1$ アドレナリン受容体欠損マウスを中心に作成・解析を行う。排尿、膀胱知覚における $\alpha 1$ アドレナリン受容体の生理機能の解明ならびに $\alpha 1$ 拮抗薬の臨床効果を検討するために代謝ケージを用いた測定を行う。さらに、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体特異的薬物を浸透圧ポンプを用いてコントロールマウスに持続注入してその効果を遺伝子改変動物と比較検討し、薬物の評価を行う。

12~14 週令の雌性 $\alpha 1d$ -KO マウスおよびその Wild type マウスを実験に用いた。室温 22°C、12/12 時間明暗調節できる飼育室で環境に慣れるまで 1 週間予備飼育後、24 時間排尿動態を独自に開発したメタボリックケージにて解析した。そのメタボリックケージはパソコンと繋がっている電子天秤の上に置き、マウスの 24 時間排尿パターンをパソコンで連続 2 日間記録し、1 日排尿量、排尿回数と 1 回排尿量を記録した。24 時間排尿動態測定後、膀胱内圧測定を試行した。ケタラル (75mg/kg,i.m.) とキノラジン (15mg/kg,i.m.) で麻酔後、マウスを仰臥位に固定して下腹部を正中切開し膀胱を暴露した。膀胱頂部よりシリコンチューブ (外径 0.8 mm) を挿入し、5-0 縫合糸で固定した。シリ

コンチューブの他端は皮下をマウスの背頸部まで通して後で接続できるように留置した。切開した腹部および背頸部皮膚を縫合閉創した。2日後マウスの背頸部よりシリコンチューブ端を出し、三方活栓を用いて、1cc シリンジー、auto micro シリンジーとトランスジューサーに接続し、無拘束無麻酔下で膀胱内圧測定を行った。1cc シリンジーをバックアップし、膀胱内残尿を除去後 auto micro シリンジーにて室温生食を 0.01ml/min 膀胱に注入した。尿道口から排尿が観察された時点で、生食の注入を停止し、膀胱容量と最大排尿時圧を記録した。注入量を膀胱容量として、膀胱内残尿量を測定した。排尿量=注入量-残尿量とした。1匹マウスごとに5分以上の間隔をあけて膀胱内圧測定を2回行い、再現性を確認してその平均値を採用した。またこれまでマウス膀胱における $\alpha 1$ -adrenoceptor subtypes の発現に関する報告が見られていないため、我々は real-time PCR 法を用いて、 $\alpha 1d$ -KO マウスおよびその Wild type マウス膀胱における同受容体 subtypes の mRNA 発現を定量的に解析した。

1 0) 泌尿器科疾患モデル (生垣、廣田、田上分担)

$\alpha 1$ アドレナリン受容体欠損マウスを中心に作成・解析を行う。シストメトリーを用いて膀胱機能の測定を行い、膀胱知覚における $\alpha 1$ アドレナリン受容体の機能解析を行う。さらに、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体特異的薬物を浸透圧ポンプを用いてコントロールマウスに持続注入してその効果を遺伝子改変動物と比較検討し、薬物の評価を行う。また、前立腺肥大症のモデルとして尿道狭窄モデルを作成し、膀胱機能に及ぼす受容体の影響を調べる。又、腎動脈狭窄による高血圧腎不全モデルを作成し解析する。尿道狭窄モデルの作製条件として8週令の雌マウスの尿管を弱めに狭窄し、狭窄後1週目における膀胱重量と生存率を解析した。摘出膀胱については $\alpha 1$ 刺激剤であるフェニレフリンによる収縮反応に対する選択的 $\alpha 1D$ 遮断剤である BMY7378 の作用を検討した。

C. 研究成果

1. 遺伝子改変動物の作成・解析 (田上、小嶋分担)

$\alpha 1$ アドレナリン受容体サブタイプ複合型欠損マウスはそれぞれのサブタイプの単独欠損マウスの交配により作成した。まず、それぞれの遺伝的背景を均一にするためにそれぞれの単独マウスを C57B6 マウスと交配を行い、

生まれてきたマウスの遺伝子型を解析した。さらに同様の交配を繰り返し遺伝的背景が C57B6 となるまで交配しノックアウトマウスを作成した。この遺伝的背景が同じのマウスを用いて二重欠損マウスの作成を交配により作成した。その結果 $\alpha 1AB$, $\alpha 1AD$, $\alpha 1BD$ 二重欠損マウスが作成され、各サブタイプの遺伝子発現の消失は RT-PCR にて確認した。

バソプレッシン受容体欠損マウス (V1a, V1b 受容体ノックアウトマウス) についても同様に遺伝的背景を均一にするためにそれぞれの単独マウスを C57B6 マウスと交配を行い、遺伝的背景が C57B6 となるノックアウトマウスを作成した。

2. 疾患モデル・病態モデル動物の作成

1) 循環器疾患モデル (田上、竹尾、小嶋分担)

(1) 基礎血圧および基礎心機能

V1aR が基礎血圧および心拍数の維持に関与するか否かを検討するため、tail-cuff 法および血管内カテーテル法により V1aR KO マウスの基礎血圧および心拍数を測定した。いずれの方法による測定でも、V1aR KO マウスの血圧 (収縮期血圧, 拡張期血圧, および平均血圧) は WT マウスと比較して有意に低かった。一方、基礎心拍数は、両測定方法で V1aR KO マウスと WT マウスの間に有意な差は認められなかった。ウレタン (1.0 g/kg) 麻酔下で心臓カテーテル法により心機能を測定したところ、V1aR KO マウスの左心室収縮期圧 (LVSP), 左心室拡張最大速度 (LV-dP/dt), 平均血圧 (MAP), および心拍数 (HR) は、WT マウスと比較して有意に低下していた。また、ペントバルビタール (40 mg/kg) 麻酔後の半覚醒状態で心エコー法により心機能を測定したところ、V1aR KO マウスの心拍出量 (CO) は、WT マウスと比較してわずかに低下している傾向であった (V1aR KO, 17.0 ± 0.62 mL/min; WT, 18.6 ± 0.42 mL/min, $p = 0.068$,)。さらに、V1aR KO マウスの一回拍出量 (SV) は WT マウスと変わらず、心拍数 (HR) は有意に低下していた。V1aR KO マウスと WT マウスの間で、左室内径短縮率 (FS), 左室駆出率 (EF) に有意な差は認められなかった。心エコー測定により測定した左室重量 (LV weight または LV weight index) および実際に摘出した心臓を秤量した心室重量体重比 (Heart / body weight) は、V1aR KO マウスと WT マウスの間で有意な差は認められなかった。

(2) AVP 静脈内投与に対する血圧および

心拍数応答

静脈内に投与された AVP は V1aR を介して血管平滑筋を収縮させ、血圧を上昇させると考えられている。そこで、この昇圧作用に対する V1aR の役割を、V1aR 変異マウスを用いて検証した。WT マウスでは AVP (0.1 - 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) の bolus injection により用量依存的な昇圧反応、およびそれに伴う反射性の心拍数低下 (圧受容体反射) が惹起された。一方、V1aR KO マウスでは AVP の昇圧反応および付随する圧受容体反射反応は全く認められなかった。V1aR KO マウスではむしろ高用量 (10 - 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) で用量依存的な降圧反応が認められた。この降圧作用は、V2RX (100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) の前処置により完全に消失した。さらに、V1aR KO マウスでは AVP の持続投与による昇圧反応も全く認められなかった。即ち、AVP (0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) の静脈内持続投与により、WT マウスでは約 28 mmHg の持続的な昇圧、およびそれに伴う徐脈反射が惹起されたが、V1aR KO マウスではこれらの変化が全く認められなかった。また、WT マウスで認められた AVP による持続的な昇圧は V1aRX (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) の前処置により完全に抑制された。V1aRX 投与により、WT マウスの基礎血圧および心拍数は変化しなかった。

(3) AVP による腸間膜動脈収縮反応

In vivo で V1aR KO マウスが AVP による昇圧反応を全く示さなかったことは、AVP の昇圧作用は V1aR のみを介して抵抗血管を収縮させることを明確に示している。そこで直接末梢血管床の V1aR 刺激による収縮反応が V1aR KO マウスでは消失しているのかを、摘出腸間膜動脈昇標本を用いて確認した。WT マウスの腸間膜動脈床標本では AVP (5 および 50 pmol) により用量依存的に灌流圧が増大したが、一方、V1aR KO マウスでは同量の AVP により灌流圧は全く変化しなかった。

(4) AVP 脳室内投与に対する血圧および心拍数応答

ラットでの報告例と同様に、マウスでも AVP 脳室内投与 (3 - 100 ng) により用量依存的な血圧、および心拍数の上昇が認められた。また、左心室内圧の用量依存的な上昇や、さらには低用量 AVP (3 および 10 ng) では左心室収縮および弛緩最大速度の用量依存的な増大が認められた。一方、高用量 AVP (30 および 100 ng) では血圧および心拍数は上昇したが、左心室収縮および弛緩最大速度の増大の度合いは減弱する傾向であった。

WT マウスでも C57BL/6J 系マウスと同様に、AVP 脳室内投与 (10 ng) により平均血

圧、左心室収縮期圧、および左心室収縮および弛緩最大速度が上昇した。これに対して、V1aR KO マウスでは AVP 脳室内投与による血圧および心拍数をはじめ、いずれの心行動態パラメータについても全く変化が認められなかった。

(5) AVP 脳室内投与による血漿カテコラミン量変化

AVP 脳室内投与により、血漿エピネフリン量および血漿ノルエピネフリン量は AVP の用量依存的に増大した。さらに WT マウスでは AVP 脳室内投与により血漿カテコラミン量が増大した (エピネフリン 10.50 ± 0.36 ng/mL, ノルエピネフリン 3.55 ± 0.13 ng/mL, $n=13$) が、V1aR KO マウスでは有意に低値であり (同 3.54 ± 0.43 , 1.61 ± 0.15 ng/mL, $n=7$, $p<0.05$), 血中カテコラミンの増大はほとんど見られなかった。

(6) $\alpha 1D$ アドレナリン受容体欠損マウス、 $\alpha 1B$ アドレナリン受容体欠損マウス、V1a バソプレッシン受容体欠損マウスを用いて腎臓垂全摘高張食塩水負荷による高血圧モデル動物の作製を行った。その結果、V1a バソプレッシン受容体欠損マウスおよび $\alpha 1D$ アドレナリン受容体欠損マウスでは血圧の上昇が、コントロールマウス、 $\alpha 1B$ アドレナリン受容体欠損マウスに比べて有意に抑制されていた。

2) 血管損傷モデル (田上分担)

$\alpha 1A$ アドレナリン受容体欠損マウス、 $\alpha 1B$ アドレナリン受容体欠損マウス、 $\alpha 1D$ アドレナリン受容体欠損マウス、 $\alpha 1AB$ アドレナリン受容体欠損マウス、V1a バソプレッシン受容体欠損マウスを用いて大腿動脈筋枝からカテーテルを挿入し、大腿動脈内皮を機械的に損傷させ、動脈内皮の肥厚を解析した。その結果 $\alpha 1AB$ アドレナリン受容体欠損マウスにおいて血管内皮の肥厚が著明に抑制されていた。

3) 糖負荷試験 (糖尿病モデル) (田上、小堀分担)

膵臓ランゲルハンス島細胞における薬物 (アドレナリン、バソプレッシン) 刺激に対するインスリン、グルカゴン応答性の解析した。コントロールマウスより摘出した膵臓ランゲルハンス島細胞では、バソプレッシン刺激によりインスリン、グルカゴンの分泌が見られた。バソプレッシン刺激によるインスリン分泌は V1b 受容体拮抗薬である SSR149415 により抑制され、V1b ノックアウトより摘出した膵臓ランゲルハンス島細胞では、インスリン分泌が見られないことよりこの作用に

は V1b 受容体が関与しているものと考えられた。バソプレッシン刺激によるグルカゴン分泌には、オキシトシン受容体拮抗薬、V1b 受容体拮抗薬にて抑制されないことより、それ以外の受容体を介している可能性が示唆された。

個体レベルでの糖負荷試験を行った。その結果、V1b 受容体ノックアウトでは血糖及びインスリンの反応性がコントロールに比べて低下していたことよりインスリン感受性が亢進している可能性が示唆された。

4) 疼痛・鎮痛モデル (高野分担)

(1) 一般行動観察

wild マウスと V1a および V1b 受容体欠損マウスの身体機能を調べるために、自発運動、協調運動および筋力の測定を行った。身体機能ではそれぞれのマウスの間で有意な差は認められなかった。

(2) 痛覚機能の検討

wild マウスと V1a および V1b 受容体欠損マウスの痛覚機能について、熱刺激に対する反応性を、中枢を介する侵害刺激反応と考えられている hot-plate test、脊髄を介する反応と考えられている tail-flick test を用い、強さの異なる刺激条件で検討した。

hot-plate test において、wild マウスと V1a 受容体欠損マウスで反応潜時は同程度であった。しかし、V1b 受容体欠損マウスでは、反応潜時が wild マウスに比べ有意に延長した。一方、tail-flick test では、弱い刺激 (IR INTENSITY 34) において V1a 受容体欠損マウスは、有意に反応潜時が短縮した。一方、V1b 受容体欠損マウスは弱い刺激および強い刺激 (IR INTENSITY 38) でともに有意に反応潜時が延長した。

5) 中枢機能におけるバソプレッシンの生理作用の解明 (藤原分担)

(1) Open-field 法を用いた自発運動量

V1aR KO および V1bR KO マウスは、WT マウスと比較して有意な差はみられなかった。

(2) Rota-rod 法を用いた協調運動

V1aR KO および V1bR KO マウスは、WT マウスと比較して有意な差はみられなかった。

(3) トラクションメーター法による筋力の測定

V1aR KO および V1bR KO マウスは、WT マウスと比較して有意な差はみられなかった。

(4) 明暗箱課題を用いた不安行動

V1aR KO および V1bR KO マウスは、WT マウスと比較して明箱および暗箱での滞在時間において有意な差はみられなかった。

(5) 高架式十字迷路課題を用いた不安行動
V1aR KO および V1bR KO マウスは、WT マウスと比較してそれぞれの arm での滞在時間において有意な差はみられなかった。

(6) 強制水泳試験

V1aR KO および V1bR KO マウスは、WT マウスと比較して不動時間に有意な差は認められなかった。

(7) PPI

V1aR KO マウスは、WT マウスと比較して驚愕反応および PPI において有意な差は見られなかった。一方、V1bR KO マウスは、WT マウスと比較して高い驚愕反応を伴った PPI の低下が認められた。しかしながら、驚愕反応と PPI の低下において相関性は認められなかった。

(8) 高架式十字迷路課題を用いた学習・記憶の検討

V1aR KO および V1bR KO マウスは、WT マウスと比較して transfer latency に有意な差は認められなかった。

(9) 水迷路課題を用いた学習・記憶の検討

V1aR KO および V1bR KO マウスは、WT マウスと比較して遊泳時間に有意な差は認められなかった。

(10) 8 方向放射状迷路課題を用いた学習・記憶の検討

V1aR KO マウスは、WT マウスに比べて有意な正選択数の減少と誤選択数の増加が認められた。また、V1aR KO マウスは有意に走行時間が延長した。一方、V1bR KO マウスは、WT マウスと比較して有意な差は認められなかった。

(11) V1bR KO マウスにおける PPI の障害に対する抗精神病薬の作用

V1bR KO マウスにおける PPI の障害に対して定型抗精神病薬である haloperidol は何ら影響を及ぼさなかった。一方、非定型抗精神病薬である risperidone は 1 mg/kg の用量において有意に PPI の障害を改善した。さらに、clozapine も 3 mg/kg の用量で有意に改善した。しかしながら、clozapine は驚愕反応も有意に低下した。

6) 副腎髄質機能におけるバソプレッシン受容体の機能解析 (田上分担)

安静時、バソプレッシン負荷時、ストレス負荷時の血中カテコールアミン濃度を測定した。V1b ノックアウトマウスでは低下傾向が見られている。

7) 腎臓におけるバソプレッシン受容体の機能解析 (田上分担)

腎臓におけるバソプレッシンの生理作用につ

いて V1a, V1b 受容体の生理機能を中心に遺伝子改変動物を用いて解析を行った。腎臓における cAMP の測定を行った結果、V1a ノックアウトではコントロールと同程度の cAMP が測定された。

8) 肝臓再生モデルの作成 (田上分担)
マウスの肝臓を部分切除 (65% 切除) を行った結果、コントロールに比べて V1a ノックアウトでは有意に死亡するケースが多く見られた。血中アンモニアの値もノックアウトで有意に上昇していた。

9) 膀胱の生理機能の解析 (北村分担)
コントロール及び $\alpha 1D$ ノックアウトマウスを用いて 24 時間排尿動態を独自に開発したメタボリックケージにて解析した。

(1) 体重および膀胱の重さ

Wild type (n=10) および $\alpha 1d$ -KO マウス (n=10) の平均体重はそれぞれ $24.3 \pm 0.9g$ と $23.6 \pm 0.5g$ 、平均膀胱重量はそれぞれ $22.2 \pm 0.3mg$ と $23.1 \pm 0.2mg$ であり、両者とも有意差を認めなかった。

(2) 24 時間排尿パターン

Wild type (n=10) および $\alpha 1d$ -KO マウス (n=10) の 48 時間排尿パターンを連続測定した。Wild type および $\alpha 1d$ -KO マウスの 1 日排尿量はそれぞれ $2.299 \pm 0.118ml$ と $2.107 \pm 0.148ml$ であり、両群間に有意な差を認めなかった。一方 1 日排尿回数は、Wild type および $\alpha 1d$ -KO マウスそれぞれ、 14.7 ± 3.2 回、 9.1 ± 1.2 回と $\alpha 1d$ -KO マウス群が有意に少なかった ($p < 0.01$)。また一回平均排尿量は、Wild type および $\alpha 1d$ -KO マウスそれぞれ、 $0.177 \pm 0.057ml$ 、 $0.238 \pm 0.076ml$ と $\alpha 1d$ -KO マウス群が有意に多かった ($p < 0.05$)。

(3) 膀胱内圧測定

Wild type (n=4) および $\alpha 1d$ -KO マウス (n=4) において測定した。Wild type マウスの膀胱容量および排尿量はそれぞれ $0.12 \pm 0.01ml$ 、 $0.11 \pm 0.01ml$ に対して、 $\alpha 1d$ -KO マウスはそれぞれ $0.21 \pm 0.02ml$ ($p < 0.01$)、 $0.18 \pm 0.02ml$ ($p < 0.01$) と有意に増加していた。一方、残尿量は両群とも $0.02 \pm 0.01ml$ で、有意差を認めなかった。最大排尿時膀胱内圧は、Wild type マウス: $37.5 \pm 2.1mmHg$ に対して、 $\alpha 1d$ -KO マウスは $36.6 \pm 2.4mmHg$ であり、明らかな差異を認めなかった。

(4) マウス膀胱における $\alpha 1$ -adrenoceptor subtypes の mRNA 発現の定量的解析

Wild type マウス膀胱における $\alpha 1a$, $\alpha 1b$, $\alpha 1d$ -adrenoceptor subtypes mRNA の

発現量はそれぞれ、 5.2 ± 0.7 , 1.0 ± 0.1 , and 6.3 ± 0.7 gene copies/ng total RNA であった。一方、 $\alpha 1d$ -KO マウスでは、 $\alpha 1d$ -adrenoceptor subtype の発現が消失していたが、 $\alpha 1a$, $\alpha 1b$ -adrenoceptor subtypes の発現量には明らかな変化を認めなかった。以上の結果より $\alpha 1D$ -KO マウスは Wild type マウスに比べて、著明な排尿回数の減少、膀胱容量の増加を認めた。

10) 泌尿器科疾患モデル (生垣、廣田、田上分担)

$\alpha 1$ アドレナリン受容体欠損マウスをもちいて解析を行った。

シストメトリーを用いて膀胱機能の測定を行い、膀胱知覚における $\alpha 1$ アドレナリン受容体の機能解析を行った結果、 $\alpha 1D$ アドレナリン受容体欠損マウスでは膀胱知覚が低下していた。

腎臓亜全的、腎動脈狭窄による高血圧腎不全モデルを作成した。 $\alpha 1d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスでは、コントロールマウス、 $\alpha 1b$ アドレナリン受容体ノックアウトマウス死亡率、高血圧の発症率が有意に低かった。

D. 考察

$\alpha 1$ アドレナリン受容体について各サブタイプ欠損マウス ($\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1D$ ノックアウト) および二重欠損マウス ($\alpha 1AB$, $\alpha 1AD$, $\alpha 1BD$ ノックアウト) の作成に成功した。 $\alpha 1$ アドレナリン受容体拮抗薬は、降圧薬として用いられているが、何れも非選択的拮抗薬で各サブタイプの血管収縮・血圧調節機構における各サブタイプの生理機能は明かできなかった。そこで作成した $\alpha 1$ アドレナリン受容体変異マウスを用いて血管収縮作用・血圧調節作用および高血圧モデルにおける各サブタイプの機能を解析したところ、大動脈の血管収縮には $\alpha 1D$ サブタイプが、腸管膜動脈では $\alpha 1A$ および $\alpha 1D$ サブタイプが関与し、血圧維持ならびに高血圧の発症には、 $\alpha 1D$ サブタイプが中心的な働きをしていることが明かとなった。又中枢神経機能における $\alpha 1D$ サブタイプの生理機能についてノックアウトマウスを用いて解析したところ学習記憶が障害されていることが明かとなった。この結果より、 $\alpha 1D$ 選択的拮抗薬は、非選択的 $\alpha 1$ 拮抗薬より降圧薬としては特異性が高いと考えられるが、中枢神経機能などに影響を及ぼす可能性が示唆された。また、膀胱機能における $\alpha 1$ アドレナリン受容体の機能について $\alpha 1A$ および $\alpha 1D$ ノックアウトを用いて解析を行った。その結果、 $\alpha 1D$ ノッ

クアウトでは、排尿間隔が延長し、膀胱刺激による排尿反射の低下が見られたのに対して、 $\alpha 1A$ ノックアウトではコントロールと差がみられなかった。この結果より、 $\alpha 1D$ 選択的拮抗薬は前立腺肥大症における膀胱刺激症状の改善に有効と考えられた。

バゾプレッシン受容体変異マウスについて各サブタイプ欠損マウス (V1a, V1b 欠損マウス) および及び V1ab 二重欠損マウスの作成に成功した。V1a バゾプレッシン受容体拮抗薬は、現在欧州にて開発が進められ血管拡張剤や月経困難症の治療薬として、V1b バゾプレッシン受容体拮抗薬は、抗不安薬として開発中であるが、長期投与・大量投与による副作用については明らかになっていない。そこで作成したバゾプレッシン受容体変異マウスについて解析を行った。V1a 欠損マウスでは、学習記憶障害が見られ、V1b 欠損マウスでは、副腎皮質ホルモン系の異常が見られた。さらに、V1b 欠損マウスから摘出された膵臓では AVP 刺激によるインスリン分泌の低下が見られた。さらに、血糖調節機構におけるバゾプレッシンの生理作用を各ノックアウトをもちいて解析したところ、V1b 欠損マウスでは、血中のインスリンが低下し、さらに、血糖も低下傾向が見られたことより、V1b 受容体が生体内において血糖調節機構において重要な生理機能を有していることが明らかとなった。これらの結果は、V1a や V1b バゾプレッシン受容体拮抗薬の副作用として学習記憶や内分泌系に異常をきたす可能性を示唆するものと考えられる。しかしながら、このことは、V1a, V1b 選択的作動薬を用いることにより、例えば、V1a 選択的作動薬であれば記憶学習の改善効果が期待され、また、V1b 選択的作動薬であれば、ACTH 分泌刺激・インスリン分泌刺激効果が期待される。以上のように遺伝子改変動物の解析により、新たな受容体の機能・薬物の効果が解明でき、ゲノム創薬への応用につながるものと考えられる。

E. 結論

今回の種々の疾患モデル、病態モデルの作成により、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体やバゾプレッシン受容体を標的とする薬物効果・副作用が明かとなり、受容体選択的薬物の臨床応用においてこれらの遺伝子改変動物は非常に有用と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

田上

1) Tanoue A, Ito S, Oshikawa S, Kitagawa Y, Koshimizu T, Mori T, Tsujimoto G. The

Vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions. *J. Clin Invest.* 2004; 113: 302-309.

2) Chu CP, Kunitake T, Kato K, Watanabe S, Qiu de L, Tanoue A, Kannan H. The alpha 1D-adrenergic receptor modulates cardiovascular and drinking responses to central salt loading in mice. *Neurosci Lett.* 2004; 356: 33-36.

3) Egashira N, Tanoue A, Higashihara F, Mishima K, Takano Y, Tsujimoto G, Iwasaki K, Fujiwara M. V1a receptor knockout mice exhibit impairment of spatial memory in an eight-arm radial maze. *Neurosci Lett.* 2004; 356: 195-198.

4) Oshikawa S, Tanoue A, Koshimizu T, Kitagawa Y, Tsujimoto G. Vasopressin stimulates insulin release from islet cells through V1b receptors: A combined pharmacological/knockout approach. *Mol Pharmacol.* 2004; 65: 623-629.

5) Mishima K, Tanoue A, Tsuda M, Hasebe N, Egashira N, Takano Y, Kamiya H, Tsujimoto G, Iwasaki K, Fujiwara M. Characteristic of behavioral abnormalities in alpha 1D adrenoceptors deficient mice. *Behav. Brain. Res* 2004; 152:365-373.

6) Zhang H, Thomas SA, Cotecchia S, Tanoue A, Tsujimoto G, Faber JE. Gene deletion of dopamine b-hydroxylase and $\alpha 1$ -adrenoceptors demonstrates involvement of catecholamines in vascular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287:H2106-H2114.

7) Koshimizu T, Tsujimoto G, Hirasawa A, Kitagawa Y, Tanoue A. Carvedilol Selectively Inhibits Oscillatory Intracellular Calcium Changes Evoked by Human $\alpha 1D$ - and $\alpha 1B$ -Adrenergic Receptors. *Cardiovascular Research* 2004; 63:662-72.

8) Deighan C, Naghadeh MM, Daly CJ, Tanoue A, Tsujimoto G and M^cGrath JC. Subtyping $\alpha 1$ -adrenoceptors: A combined pharmacological/knockout approach in rat and mouse carotid arteries. $\alpha 1$ -Adrenoceptors in rat and mouse carotid artery. *Br. J. Pharmacology.* In press (2005)

9) Hosoda C, Tanoue A, Nasa Y, Koshimizu T, Oikawa R, Tomabechi T, Fukuda S, Shinoura H, Oshikawa S,

Takeo S, Kitamura T, Cotecchia S, Tsujimoto G. Two α_1 -adrenergic receptor subtypes regulating the vasopressor response have differential roles in blood pressure regulation. *Mol. Pharmacol.* In press (2005)

10) Chen Q, Takahashi S, Zhong S, Hosoda C, Zheng H-Y, Ogushi T, Fujimura T, Ohta N, Tanoue A, Tsujimoto G, Kitamura T. Function of the Lower Urinary Tract in Mice Lacking α_{1d} -Adrenoceptor. *J. Urol.* 2005 (in press).

北村

Chen Q, Takahashi S, Zhong S, Hosoda C, Zheng H-Y, Ogushi T, Fujimura T, Ohta N, Tanoue A, Tsujimoto G, Kitamura T. Function of the Lower Urinary Tract in Mice Lacking α_{1d} -Adrenoceptor. *J. Urol.* 2005 (in press).

高野

1) A. Tanoue, S. Ito, K. Honda, S. Oshikawa, Y. Kitagawa., T. Koshimizu, T. Mori, G. Tsujimoto.

The vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions.

J. Clin. Invest. 113, 302-309 (2004).

2) N. Egashira, A. Tanoue, F. Higashihara, K. Mishima, Y. Fukue, Y. Takano, G. Tsujimoto, K. Iwasaki, M. Fujiwara

V1a receptor knockout mice exhibit impairment of spatial memory in an eight-arm radial maze.

Neurosci Lett 356: 195-198 (2004).

3) K. Mishima, A. Tanoue, M. Tsuda, N. Hasebe, Y. Fukue, N. Egashira, Y. Takano, H. Kamiya, G. Tsujimoto, K. Iwasaki, M. Fujiwara

Characteristics of behavioral abnormalities in α_{1d} -adrenoceptors deficient mice.

Behav Brain Res 152. 365-373 (2004).

4) K. Honda, S. Ando, K. Koga, Y. Takano The spinal muscarinic receptor subtypes contribute to the morphine-induced antinociceptive effects in thermal stimulation in mice.

Neurosci Lett 371: 235-238 (2004).

5) K. Koga, K. Honda, S. Ando, I. Harasawa, H. Kamiya, Y. Takano Intrathecal clonidine inhibits mechanical

allodynia via activation of the spinal muscarinic M1 receptor in streptozotocin-induced diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* 505: 75-82 (2004).

藤原

(1) Kenichi Mishima, Akito Tanoue, Masakazu Tsuda, Nobuyoshi Hasebe, Yoshihiko Fukue, Nobuaki Egashira, Yukio Takano, Hiro-o Kamiya, Gozoh Tsujimoto, Katsunori Iwasaki, Michihiro Fujiwara

Characteristics of behavioral abnormalities in α_{1d} -adrenoceptors deficient mice.

Behav. Brain Res. 第 152 卷 頁 365-373 2004 年 6 月

(2) Nobuaki Egashira, Akito Tanoue, Fuminori Higashihara, Kenichi Mishima, Yoshihiko Fukue, Yukio Takano, Gozoh Tsujimoto, Katsunori Iwasaki, Michihiro Fujiwara

V1a receptor knockout mice exhibit impairment of spatial memory in an eight-arm radial maze.

Neurosci Lett 第 356 卷 頁 195-198 2004 年 2 月

2. 学会発表

田上

1) 国際学会

(1) Tanoue A, Koshimizu T, Nasa Y, Tsujimoto G. Two α_{1d} -ARs regulating vasopressor response have differential roles in postural hypotension. The 5th EMBL Mouse Molecular Genetics Meeting. September 3-7, 2003, Heidelberg, Germany.

(2) Tanoue A, Nasa Y, Oikawa R, Fukuda S, Takeo S, Koshimizu TA, Shinoura H, Oshikawa S, Tsujimoto G.

Two α_{1d} -adrenoceptors regulating vasopressor response have different roles in postural hypotension.

XVIII World Congress International Society for Heart Research, August 7-11, Brisbane, Queensland (Australia), 2004.

(3) Chin Q, Takahashi S, Hosoda C, Zhong S, Zheng H-Y, Ohta N, Kitamura T, Tanoue A, Tsujimoto G.

Function of the lower urinary tract in mice lacking α_{1d} -adrenoceptor.

ICS/UGA Annual Meeting. August 25-27,

Paris (France), 2004

(4) Nakamura Y, Tsujimoto G, Tanoue A, Ikegaki I, Shinozaki S, Nimura T, Matsuda Y, Kawatani M.

Is alpha-1D adrenergic receptor responsible for irritative symptoms in mice? : Effects of acetic acid on bladder function in mice lacking alpha-1D adrenergic receptor. ICS/UGA Annual Meeting. August 25-27, Paris (France), 2004

竹尾

The vasopressin V1a receptor is critically involved in both central and peripheral regulation of blood pressure.

Ryo Oikawa, Yoshihisa Nasa, Yuji Kawahara, Chihiro Ashizawa, Rie Ishii, Sayaka Masuda, Akito Tanoue, Michi Kubota, Gozoh Tsujimoto, Satoshi Takeo. 第2回世界薬学会議, 2nd Pharmaceutical Sciences World Congress, PSWC 2004 (2004.6 京都)

高野

The spinal muscarinic M1 receptor contributes to the morphine-induced antinociception in mice.

Y. Takano, K.Honda, K. Koga, S.Ando, S. Nagaoka, T. Takahara, A. Kohashi, R. Saito.

31st Annual Meeting Society for Neuroscience. San Diego 2004.10.

2) 国内学会

田上

(1) 田上昭人 (特別講演)

遺伝子改変動物を用いた薬物受容体の機能解析及び創薬への応用

第102回熊本小児科学会、熊本(熊本県医師会館)、2月8日、2004.

(2) 美留町潤一、田上昭人

副腎ホルモン分泌に及ぼすバソプレッシン受容体機能の解析

第78回日本薬理学会年会、3月22日~24日、2005、横浜

(3) 輿水崇鏡、辻本豪三、田上昭人

カルベジロールのヒトアドレナリン受容体サブタイプに対する選択性について

第77回日本薬理学会年会、大阪(大阪国際会議場)、3月8日、2004.

(4) 田上昭人、輿水崇鏡、辻本豪三、伊藤修司、森豊樹、本多健治、押川小百合、北川葉子、窪田みち

V1b バソプレッシン受容体欠損マウスにおける視床下部一下垂体-副腎系への影響

第77回日本薬理学会年会、大阪(大阪国際会議場)、3月9日、2004.

(5) 細田千尋、田上昭人、北川葉子、輿水崇鏡、及川玲、苫米地敬、奈佐吉久、竹尾聰、辻本豪三

高張食塩水負荷高血圧モデルを用いたバソプレッシン受容体V1aサブタイプの機能解析：バソプレッシン受容体V1aサブタイプ変異マウスを用いた解析

第77回日本薬理学会年会、大阪(大阪国際会議場)、3月9日、2004.

(6) 北川葉子、押川小百合、田上昭人、輿水崇鏡、辻本豪三

Vasopressin stimulates insulin release from islet cells through V1b receptors: A combined pharmacological/knockout approach.

第77回日本薬理学会年会、大阪(大阪国際会議場)、3月9日、2004.

(7) 奈佐吉久、及川玲、石射里絵、竹尾聰、田上昭人、押川小百合、桑木共之、辻本豪三
バソプレッシン V1a 受容体欠損マウスの圧受容体反射機能の異常

第77回日本薬理学会年会、大阪(大阪国際会議場)、3月9日、2004.

(8) 東原史典、田上昭人、江頭伸昭、福江善彦、三島健一、辻本豪三、岩崎克典、藤原道弘

バソプレッシン V1b 受容体ノックアウトマウスの行動特性

第77回日本薬理学会年会、大阪(大阪国際会議場)、3月9日、2004.

(9) 北川葉子、廣山眞巳、美留町潤一、押川小百合、辻本豪三、田上昭人

マウス睪ランゲルハンス氏島からのグルカゴン分泌におけるバソプレッシン、オキシトシン受容体の機能解析

第78回日本薬理学会年会、3月22日~24日、2005、横浜

(10) 及川玲、奈佐吉久、河原裕司、増田清佳、芦沢千裕、竹尾聰、田上昭人、窪田みち、辻本豪三

バソプレッシンV1a受容体を介する中枢性・末梢性血圧調節；V1a受容体欠損マウスを用いた解析

第77回日本薬理学会年会、大阪(大阪国際会議場)、3月10日、2004.

(11) 田上昭人、輿水崇鏡、辻本豪三 (シンポジウム)

エンドセリンB受容体におけるRNA editingの検討

第77回日本薬理学会年会、大阪(大阪国際

会議場)、3月10日、2004.

(12) 田上昭人

遺伝子改変動物をもちいたG蛋白質共役型受容体の機能解析

ヒューマンサイエンス総合研究事業成果発表会、東京(JAホール)、

3月12日、2004.

(13) 中村靖夫、池田真、篠崎幸代、仁村俊枝、辻本豪三、田上昭人、生垣一郎、松田幸久、河谷正仁

$\alpha 1D$ 受容体欠損マウスの膀胱機能について
第92回日本泌尿器科学会総会、大阪(大阪国際会議場、リーガロイヤルホテル)、4月10日~13日、2004.

(14) 輿水崇鏡、辻本豪三、田上昭人

Carvedilol selectivity inhibits oscillatory intracellular calcium changes evoked by human $\alpha 1D$ - and $\alpha 1B$ - adrenergic receptors.

第25回日本臨床薬理学会年会、9月16日~19日、2004、静岡

(15) 長岡佐知、本多健治、安藤卓、小林文人、輿水崇鏡、田上昭人、辻本豪三、高野行夫

モルヒネ鎮痛耐性と身体依存に対するバソプレシンV1a受容体の関与

第57回日本薬理学会西南部会、11月26日、2004、九州

(16) 細田千尋、田上昭人、芝野真理、田中芳夫、輿水崇鏡、辻本豪三、小池勝夫
マウス血管における $\alpha 1$ -アドレナリン受容体サブタイプの発現分布とその機能解析
第78回日本薬理学会年会、3月22日~24日、2005、横浜

(17) Mori T, Kinoshita S, Fujiki H, Nakamura S, Miyazaki T, Tanoue A, Tsujimoto G.

Endogenous and exogenous vasopressin V2-receptor responses are intact in the mice lacking V1a or V1b receptors.

第78回日本薬理学会年会、3月22日~24日、2005、横浜

竹尾

(1) V1a受容体の末梢性・中枢性血圧調節に対する役割：V1a受容体KOマウスを用いた機能解析

奈佐吉久、及川玲、河原裕司、増田清佳、芦澤千裕、竹尾聰、田上昭人、辻本豪三

第34回日本心脈管作動物質学会(2005.2 京都)

(2) バソプレシンV1a受容体は正常血圧の維持に関与する

及川玲、奈佐吉久、河原裕司、日向孝充、冨田祐介、田上昭人、細田千尋、窪田みち、辻本豪三、竹尾聰

第78回日本薬理学会年会(2005.3 横浜)

(3) バソプレシンV1b受容体欠損は雄性マウスのみ高血圧フェノタイプを示す

奈佐吉久、及川玲、河原裕司、芦澤千裕、増田清佳、石射里絵、竹尾聰、田上昭人、押川小百合、辻本豪三

第78回日本薬理学会年会(2005.3 横浜)

高野

(1) モルヒネによる抗侵害効果における脊髄内ムスカリン受容体の関与

安藤卓、本多健治、小林文人、長岡佐知、斎藤亮、高野行夫

第77回日本薬理学会年会 大阪 2004.3

(2) 機械的痛覚過敏における脊髄中の高糖の関与

小林文人、本多健治、長岡佐知、高口雅子、斎藤亮、高野行夫

第78回日本薬理学会年会 横浜 2005.3.

(3) 侵害受容に対するバソプレシン受容体の関与；バソプレシン受容体欠損マウスを用いた研究

長岡佐知、本多健治、安藤卓、小林文人、輿水崇鏡、田上昭人、辻本豪三、高野行夫

第78回日本薬理学会年会 横浜 2005.3

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし