

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅰ）

目 次

課題番号			
KH11001	バイオフィトニクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤	16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司	21
KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹	30
KH21005	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	田上昭人	40
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀	100
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆	126
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司	144
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎	154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫	168
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆	181
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓	196
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳	208
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎	221
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治	235
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山耕造	247
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出利光	262
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島正弘	286
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木哲朗	300
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西正孝	310
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤準一	318

KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功 刀 浩 …… 344
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉 岡 澄 江 …… 358
KH31025	生薬及び漢方処方of科学的品質保証に関する研究	合 田 幸 広 …… 373
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工 藤 由 起 子 …… 390
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能 美 健 彦 …… 402
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉 里 勝 利 …… 417
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜 山 行 雄 …… 435
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクス的手法の開発に関する研究	斎 藤 嘉 朗 …… 449
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山 口 照 英 …… 466
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 謙 …… 481
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川 崎 ナ ナ …… 494
KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内 田 恵 理 子 …… 509
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純 一 …… 525
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永 井 洋 士 …… 537
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱 脇 祥 子 …… 551
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍 兒 …… 566
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名 和 行 文 …… 576

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

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、二重欠損マウス、三重欠損マウス)、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、V1a/V1b二重欠損マウス) 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) 京都大学大学院薬学研究科 奥水 崇鏡
- (2) 旭化成ファーマ株式会社研究センター薬理研究所 生垣 一郎
- (3) キッセイ薬品工業株式会社研究本部 小嶋 正三
- (4) 日本オルガノン株式会社学術情報部 澤田 照夫
- (5) アステラス製薬株式会社御幸が丘研究センター研究本部分子医学研究所ゲノム機能解析研究室 松七五三 仁

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について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、ゲノム創薬への応用が図れる。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

I. 遺伝子改変動物の作成・維持・繁殖 (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、V1a/V1b 二重欠損マウス)、 $\alpha 1$ 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、 $\alpha 1BD$ 二重欠損マウスおよび $\alpha 1ABD$ 三重欠損マウス) の作成を行う。作成したノックアウトマウスの系統維持・繁殖は PCR 法にて遺伝子型を確認して行う。

II. 遺伝子改変動物の解析と疾患モデル・病態モデルの作成・解析

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) を用いて生理機能の解析、病態モデルの作成・解析を行う。

1. 循環機能系 (田上、小嶋、生垣、奥水、澤田分担)

1-1) 血圧調節機構および心機能の解析

Tail cuff 法および中心動脈カテーテルを用いて作成したマウスの心拍数・収縮期血圧、フェニレフリンに対する昇圧反応を解析する。

1-2) 脈管収縮機構の解析

$\alpha 1ABD$ アドレナリン受容体三重欠損マウスの大動脈、腸間膜動脈標本による収縮反応を解析した。

1-3) 血管損傷モデル

$\alpha 1$ アドレナリ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、大腿大動脈内皮を機械的に損傷させ、動脈内皮の肥厚を解析する。

1-4) 心筋増殖に対するバソプレッシン受容体の機能解析

心筋細胞増殖に対するバソプレッシンの作用を調べるためにバソプレッシン受容体欠損マウスを用いて摘出した心筋細胞を用いて心筋増殖を調べる。

1-5) 心肥大に対するバソプレッシン受容体の機能解析

大動脈を狭窄し、1週間後の心重量を測定し心肥大効果を判定する。

1-6) 免疫抑制剤の副作用 (高血圧、腎障害) におけるバソプレッシン受容体の機能解析

代表的免疫抑制剤であるシクロスポリン、FK506の副作用 (高血圧、腎障害) に対するバソプレッシンの作用を解析するためにバソプレッシン受容体欠損マウスにシクロスポリン、FK506を投与し、副作用の出現についてコントロールマウスと比較検討する。

2. 糖・脂質・蛋白代謝機能系 (田上、松七五三分担)

2-1) インスリン分泌に対するバソプレッシン受容体の機能解析

インスリン分泌に対するバソプレッシンの作用を調べるためにバソプレッシン受容体欠損マウスを用いて摘出した膵臓ランゲルハンス島細胞を用いてインスリン分泌を調べる。

2-2) グルカゴン分泌に対するバソプレッシン受容体の機能解析

グルカゴン分泌に対するバソプレッシンの作用を調べるためにバソプレッシン受容体欠損

マウスを用いて摘出した膵臓ランゲルハンス島細胞を用いてグルカゴン分泌を調べる。

2-3) グリコーゲン分解に対するバソプレッシン受容体の機能解析

グリコーゲン分解に対するバソプレッシンの作用を調べるためにバソプレッシン受容体欠損マウスを用いて摘出した肝臓細胞を用いてグリコーゲン分解を調べる。

2-4) 脂質代謝に対するバソプレッシン受容体の機能解析

脂質代謝に対するバソプレッシンの作用を調べるためにバソプレッシン受容体欠損マウスを用いて血中ケトン体、トリグリセライド、遊離脂肪酸の測定を行う。

2-5) 蛋白代謝に対するバソプレッシン受容体の機能解析

アンモニア代謝に対するバソプレッシンの作用を調べるためにバソプレッシン受容体欠損マウスを用いて血中アンモニア、アミノ酸の測定を行う。

2-6) 糖尿病・肥満モデル

2-6-1) 高脂肪食負荷試験の追試験：今回の試験では匹数確保のため前回(129Sv:C57BL/6J=1:1)とは異なる遺伝背景(=1:3)のV1b受容体遺伝子欠損マウスおよび同腹のWTマウスを用い、15週間の高脂肪食負荷を行った。具体的には、前回マウスとC57BL/6JのF1マウス作出後、F1 intercrossにて必要マウスを確保した。

2-6-2) db/dbマウスとの掛け合わせ動物の作出：昨年度までの予備検討結果を踏まえ、V1b受容体遺伝子欠損マウス(C57BL/6Jへbackcross済み)を用いて作出した。具体

的には、V1b遺伝子欠損マウスとdb/dbマウス(C57BL/KsJ)のF1マウスを作出し、F1 intercrossにてdb/db[KsJ:6J]を作出した。

3. 内分泌機能系(田上、興水分担)

3-1) アルドステロン分泌に対するバソプレッシン受容体の機能解析

アルドステロン分泌に対するバソプレッシンの作用を調べるためにバソプレッシン受容体欠損マウスを用いて摘出した副腎皮質細胞を用いてアルドステロン分泌を調べる。

3-2) 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

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する。

3-3) 成長ホルモン分泌に対するバソプレッシン受容体の機能解析

成長ホルモン分泌に対するバソプレッシンの作用を調べるためにバソプレッシン受容体欠損マウスを用いて摘出した下垂体細胞を用いて成長ホルモン分泌を調べる。

3-4) ACTH分泌に対するバソプレッシン受容体の機能解析

ACTH分泌に対するバソプレッシンの作用を調べるためにバソプレッシン受容体欠損マウスを用いて摘出した下垂体細胞を用いてACTH分泌を調べる。

3-5) 副腎皮質内分泌機能に置けるV1a受容体の機能解析

3-5-1) 血中ホルモン濃度測定

細胞上清や血液よりステロイドホルモン、Atrial natriuretic polypeptideを抽出しそれぞれLC-MS法、ELISA法により測定した。

3-5-2) 副腎の組織学的検索

5-40 週令のマウスについて細胞、副腎組織を4%パラホルムアルデヒドで固定後凍結切片を作製した。切片では未染色で或はヘマトキシリンエオジン染色の後封入し、光学顕微鏡で観察した。蛍光観察には緑色フィルターを用いた。また、ホルマリン固定パラフィン切片(3 μm)をヘマトキシリンエオジン染色後、副腎皮質の厚さ(N=3)を計測し比較検討した(3-5-3)副腎ステロイドホルモン分泌刺激試験

血中ホルモンの基礎値を計測するためには、単独飼育としたマウスについてケージ取り扱いから15秒以内に断頭により体幹より採血した。分泌刺激試験は、ペントバルビタールで軽く麻酔した後安静を30分以上保ち、その後ACTHを腹腔内投与し60分後に尾採血して血清を分離した。ステロイドホルモン分泌能を遺伝子改変動物と野生型にて検討した。(3-5-4)DNAチップによる遺伝子発現解析

細胞、副腎組織からISOGEN(日本ジーン)を用いてtotal RNAを抽出し、Oligotex dT-30(Takara)を用いてmRNAを精製した。精製したmRNAをサンプルとして、蛍光標識cDNAを調製した。すなわち、mRNA(20 μg)から逆転写反応(Superscript II、Invitrogen)によりcDNAを合成する際に、蛍光標識されたFluoroLink Cy3-dUTPあるいはFluoroLink Cy5-dUTP(Amersham Bioscience)を反応系に加えることにより、cDNAを蛍光標識した。蛍光標識したcDNAをMicrocon-YM30(Millipore)を用いて精製・濃縮し、DNAチップ上に滴下し、カバースリップ法を用いてハイブリダイゼーション(65℃、15時間)さ

せた。ハイブリダイズしなかった蛍光標識cDNAをSDSを含む洗浄液で除去した後、DNAチップ上の蛍光シグナルをスキャンした。蛍光シグナル画像の数値化および解析は、GenePix Pro 3.0(Axon)を用いて行った。各クローンの蛍光シグナル強度は、スキッチャード・プロット解析によりグローバル補正した。蛍光シグナル強度比が2.0以上の場合を発現上昇を認めるとし、0.5以下の場合に発現低下を認めるとした。

4. 中枢神経系(田上分担)

4-1) アルコール嗜好性に対するバソプレッシンの作用

アルコール嗜好性に対するバソプレッシンの作用をバソプレッシン受容体欠損マウスを用いて検討した。

4-2) 社会行動などの高次脳機能に対するバソプレッシンの作用

マウスの行動及び不安行動を解析した。

5. 泌尿生殖系(田上、小嶋、生垣、澤田分担)

5-1) 排尿機能

9-10 週令の雄性1A KO(n=19)およびそのワイルドタイプマウス(1A WT, n=16)、雌性1A KO(n=15)およびその1A WT(n=20)、9-11 週令雄性1D KO(n=7)およびそのワイルドタイプマウス(1D WT, n=19)をマウス用代謝ケージ内で個別に飼育し、個々の動物からの尿を採取し、電子天秤で重量測定し、コンピューターを使って経時的に尿量を記録した。12時間毎に照明のon-offの切り替えを自動的に行う飼育室のマウス用代謝ケージ内で47時間の順応期間の後、47時間連続して計測を

行った。47時間の総排尿量と排尿回数および一回排尿量を評価項目として用いた。

5-2) 生殖機能

$\alpha 1$ ABD アドレナリン受容体三重欠損マウスを用いて組織所見、交配による妊娠成功率・精子数・精子機能、射精機能について解析を行った。

6. 肝機能系 (田上、澤田分担)

バソプレッシン V1a 受容体 (V1aR) はユビキタスな発現を示すが、肝臓にも多く発現している。バソプレッシン (AVP) は肝臓においてグリコーゲン分解による血糖調整作用や肝細胞増殖作用を有することがなど明らかになっている。肝臓における様々な AVP の作用を V1aR ノックアウトマウス (V1aR-KO マウス) を用いて解析を行う。まずは、肝細胞の増殖能の比較を行う。さらに、V1aR-KO マウスにおける肝機能を調べるため、血清中の GOT と GPT を測定し、肝臓アンモニア処理能力を測定する。また、肝臓組織中アシルカルニチンと血清中ケトン体量を測定することにより肝臓における脂質代謝を検討する。肝細胞増殖能を観察するため、マウスの肝臓の部分切除 (70~80%) を施し、48 時間後に初代肝細胞をカラーゲンコートディッシュで培養した。Bromodeoxyuridine (BrdU) を 24 時間取込ませた後、細胞を抗 BrdU 抗体で DAPI と共に蛍光染色する。血清中 GOT と GPT は HPLC にて測定する。アンモニアトランステストとインドシアニンググリーン取込みテストにて肝臓のアンモニア処理能力を測定する。肝臓中アシルカルニチンはタンデム MS を用いて測定した。血清中ケトン体は酵素法にて測定する。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては動物愛護法を遵守し、各研究施設の動物実験指針に従い、実験動物の使用、飼養および保管の改善にも最大限努力する。

C. 研究成果

I. 遺伝子改変動物の作成

マウス $\alpha 1$ D アドレナリン受容体変異マウス (ノックアウトマウス)、 $\alpha 1$ B アドレナリン受容体変異マウス、 $\alpha 1$ A アドレナリン受容体変異マウスを用いてそれぞれ交配を行い、生まれたマウスの DNA タイピングを行った。その結果、 $\alpha 1$ D アドレナリン受容体変異マウスと $\alpha 1$ B アドレナリン受容体変異マウスの交配により、 $\alpha 1$ DB アドレナリン受容体二重変異マウスの作製に成功した。同様に、 $\alpha 1$ D アドレナリン受容体変異マウスと $\alpha 1$ A アドレナリン受容体変異マウスの交配により、 $\alpha 1$ AD アドレナリン受容体二重変異マウスの作製に成功した。また $\alpha 1$ A アドレナリン受容体変異マウスと $\alpha 1$ B アドレナリン受容体変異マウスの交配により、 $\alpha 1$ AB アドレナリン受容体二重変異マウスの作製に成功した。その結果、 $\alpha 1$ アドレナリンサブタイプ単独欠損マウスと二重欠損マウスがそろい、生体内における各受容体の機能解明が可能となった。さらに作成した、 $\alpha 1$ AB アドレナリン受容体二重変異マウスと $\alpha 1$ BD アドレナリン受容体二重変異マウスの交配により $\alpha 1$ A+/-B-/-D+/- アドレナリン受容体変異マウスを作成した。次に $\alpha 1$ A+/-B-/-D+/- アドレナリン受容体変異マウス同士の交配を行い、生まれてき

たマウスのDNAタイピングを行い、 $\alpha 1$ A-/-B-/-D-/-アドレナリン受容体変異マウス（三重欠損マウス）をスクリーニングした。

V1a, V1bバゾプレッシン受容体変異マウスは、129SvとC57BL/6Jの混合遺伝子背景のマウスをC57BL/6Jとの戻し交配によりC57BL/6J遺伝子背景のV1a, V1bバゾプレッシン受容体変異マウスの交配により、C57BL/6J遺伝子背景のV1a/V1bバゾプレッシン受容体二重欠損マウスの作成を行った。

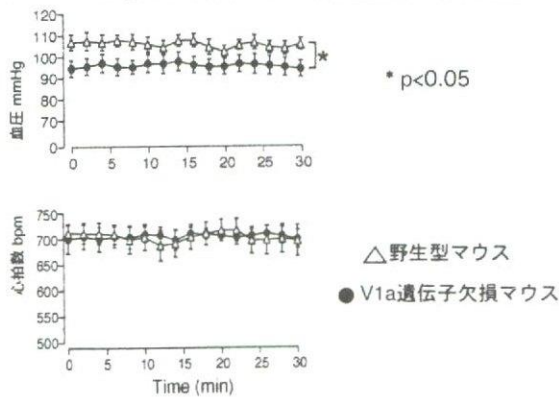
II. 遺伝子改変動物の解析と疾患モデル、病態モデルの解析

1. 循環機能系

1-1) 血圧調節機構および心機能の解析

V1a受容体遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと比較し安静無麻酔時の体血圧が有意に低く、V1a受容体が安静時の血圧維持に関わることが初めて明らかとなった。

図1 V1a遺伝子欠損マウスの安静時基礎血圧低下



しかし、バゾプレッシンの血中濃度を考えると遺伝子欠損マウスの血圧低下は血管平滑筋のV1a受容体を介する作用からは考えにくく、何らかの別の機構があることを示唆した。さらに、非観血的に尾動脈においてカフによ

る動脈圧測定を行ったところ、観血的測定と同様にV1a-/-で有意に低いことが確認された。（表1参照）

表1 遺伝子改変マウスの安静時基礎血圧

	V1a+/+		V1a-/-		P value
	mean	SD	mean	SD	
Carotid artery (conscious)					
SBP	131 ± 1		123 ± 1		<0.001
MAP	107 ± 1		99 ± 1		<0.001
DBP	89 ± 1		80 ± 1		<0.001
HR	667 ± 7		684 ± 7		n.s.
n	69		58		

Tail cuff およびカテーテルによる収縮期血圧および心拍数を測定した。 $\alpha 1$ ABDアドレナリン受容体三重欠損マウスではコントロールマウス、 $\alpha 1$ Aアドレナリン受容体三重欠損マウスに比べて有意に血圧が低下していた。 $\alpha 1$ BDアドレナリン受容体二重欠損マウスとは有意差はみられなかった。また $\alpha 1$ アドレナリン受容体作動薬であるフェニレフリン刺激に $\alpha 1$ ABDアドレナリン受容体三重欠損マウスでは昇圧反応は見られなかった（図2）。

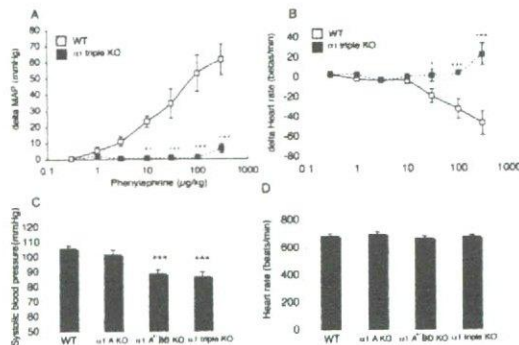


図2 フェニレフリンに対する昇圧反応と収縮期血圧

1-2) 脈管収縮機構の解析

大動脈、腸間膜動脈標本を用いてノルエピネフリンに対する収縮反応を見たところ、三重欠損マウスでは完全に消失していた（図3）。

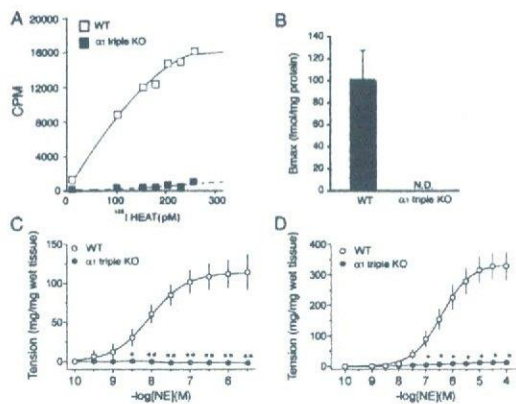


図3 大動脈、腸間膜動脈標本による収縮反応

1-3) 血管損傷モデル

マウス大腿動脈に発現している $\alpha 1$ 受容体をRT-PCRにて解析した。その結果、マウス大腿動脈では $\alpha 1A$ サブタイプが最も発現していることが明らかとなった（図4）。

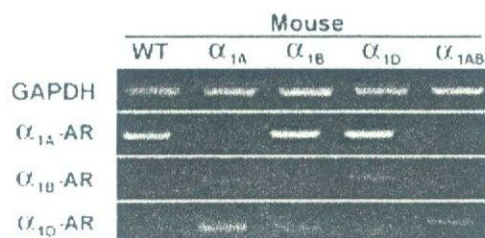


図4 大腿動脈における $\alpha 1$ 受容体

つぎに、 $\alpha 1A$ 欠損マウス、 $\alpha 1B$ 欠損マウス、 $\alpha 1D$ 欠損マウスおよび $\alpha 1AB$ アドレナリン受容体二重欠損マウスを用いて wire injury 後の血管内皮の肥厚を測定した。その結果、コントロールと $\alpha 1A$ 欠損マウス、 $\alpha 1B$ 欠損マウス、 $\alpha 1D$ 欠損マウスの間には差は認められなかったが、 $\alpha 1AB$ アドレナリン受容体二重欠損マウスでは肥厚の程度が

優位に抑制されていた（図5、6）。

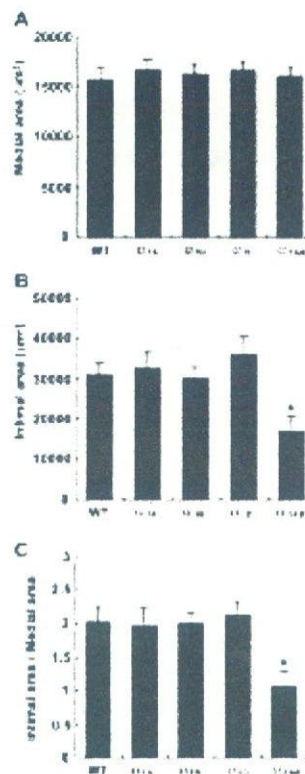


図5 血管内皮損傷後の内皮の肥厚

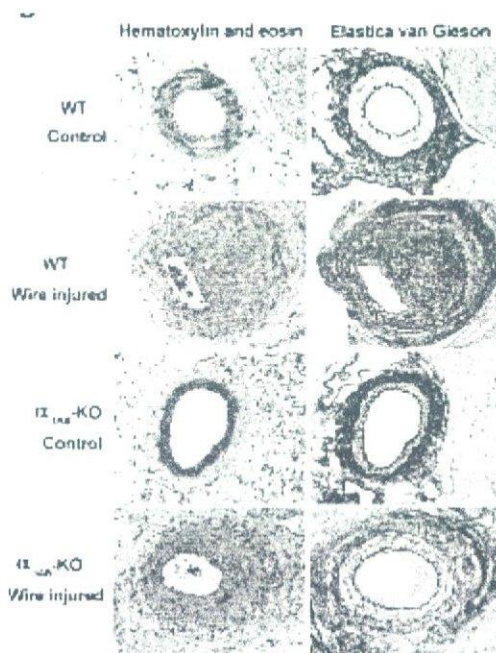


図6 コントロール及びノックアウトマウスにおけるの内皮の肥厚

この結果から、血管内皮の肥厚には、 $\alpha 1 A$ および、 $\alpha 1 B$ アドレナリン受容体が関与しているものと考えられた（論文投稿中）。また新たに増殖してくる血管内皮では $\alpha 1$ 受容体の発現量の上昇が観察された（図7）。

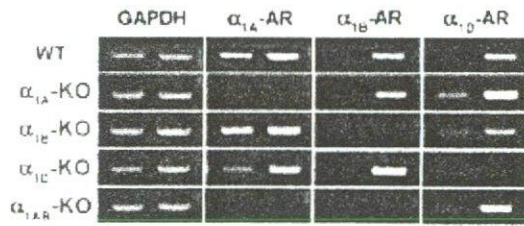


図7 血管内皮損傷前後の $\alpha 1$ 受容体の発現量解析

1-4) 心筋増殖・心肥大に対するバソプレッシン受容体の機能解析

V1a バソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールの新生児のマウス心筋より心筋細胞並びに繊維芽細胞を分離し、その細胞に発現しているバソプレッシン受容体をRT-PCRにて解析した。その結果、マウス心筋ではV1a バソプレッシン受容体が発現しているのが明らかとなった（図8）。

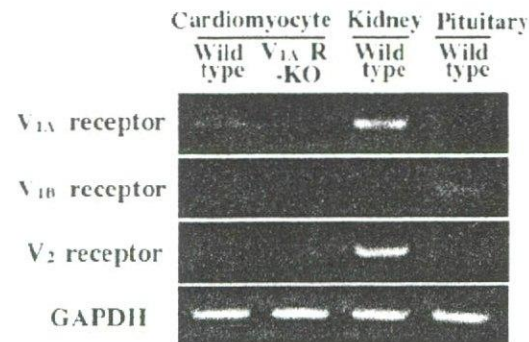


図8 マウス心筋細胞におけるバソプレッシン

次にV1a バソプレッシン受容体ノックアウトマウス及びコントロールマウス由来の心筋細胞を用いてバソプレッシン刺激による細胞増殖効果を検討した。その結果、V1a バソプレッシン受容体欠損マウス新生児心筋由来の細胞はコントロールに比べてAVP 刺激による増殖が抑制されており、心筋の発育・病的肥厚にバソプレッシン/V1aバソプレッシン受容体が関与していることが示唆された（図9）（Hiroyama et al, 2007）。

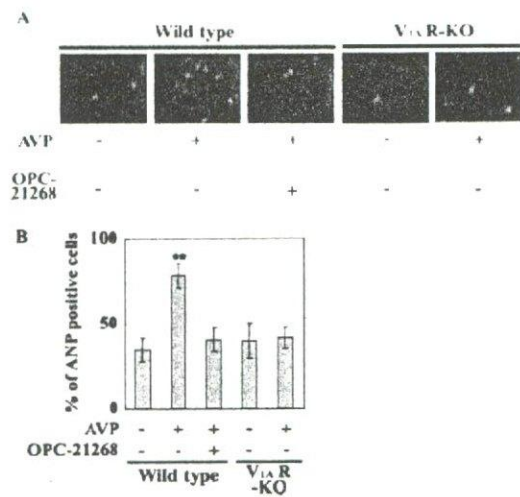


図9 心筋細胞の増殖効果

1-5) 心肥大に対するバソプレッシン受容体の機能解析

コントロール及びV1a バソプレッシン受容体欠損マウスの大動脈を狭窄し、1週間後の心重量を測定し心肥大効果を判定した。その結果、V1a バソプレッシン受容体欠損マウスでは心重量が有意に低下していた（図10）。

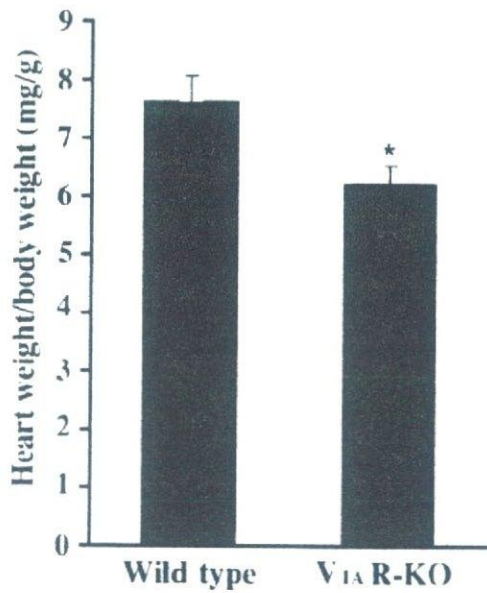


図10 大動脈狭窄による心肥大

1-6) 免疫抑制剤の副作用(高血圧、腎障害)におけるバソプレッシン受容体の機能解析

V_{1a} バソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールマウスにシクロスポリンまたは、FK506を長期投与し投与中ならびに投与後の血圧、腎障害について解析した。その結果、コントロールマウスでは高血圧並びに腎障害が見られ、V_{1a} バソプレッシン受容体欠損マウスでも同様に高血圧・腎障害が観察された。

2. 糖・脂質・蛋白代謝機能系

2-1) インスリン分泌に対するバソプレッシン受容体の機能解析

インスリン分泌に対するバソプレッシンの作用を調べるためにバソプレッシン受容体欠損マウスを用いて摘出した膵臓ランゲルハンス島細胞を用いてインスリン分泌を調べた。摘出した膵臓ランゲルハンス島細胞ではAVP

刺激によるインスリン分泌は低下していた。また、V_{1b} バソプレッシン受容体欠損マウスでは、血中インスリンの値が低下していた。さらにインスリン負荷試験、クランプテストで末梢組織における糖の取り込みの亢進がみられた(論文投稿準備中)。

2-2) グルカゴン分泌に対するバソプレッシン受容体の機能解析

V_{1b} バソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールマウスから摘出した膵臓ランゲルハンス島細胞を用いてグルカゴン分泌を調べた。その結果、V_{1b} バソプレッシン受容体欠損マウス由来の膵臓ランゲルハンス島細胞では、V_{1b} 受容体の代わりにオキシトシン受容体を介してグルカゴン分泌が行われていることが明らかとなった(図11, 12)(Fujiwara et al., 2007)。

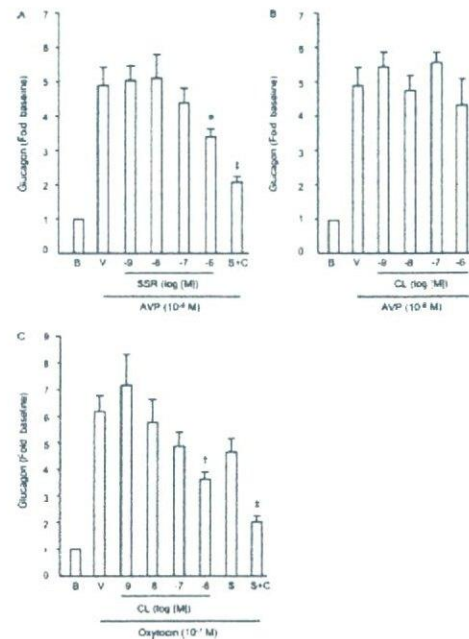


図11 ワイルドマウスにおけるグルカゴン分泌

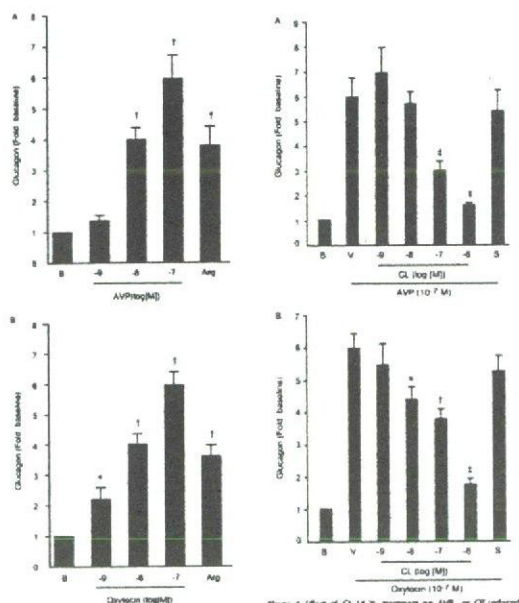


図 12 V1bバソプレッシン受容体欠損マウスにおけるグルカゴン分泌

2-3) グリコーゲン分解に対するバソプレッシン受容体の機能解析

V1aバソプレッシン受容体欠損マウス、V1bバソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールマウスから肝細胞を分離し、細胞に含まれるグリコーゲンおよびバソプレッシン刺激によるグリコーゲン分解を測定した。V1aバソプレッシン受容体欠損マウス由来の肝細胞では、バソプレッシン刺激によるグリコーゲン分解がV1bバソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールマウスに比べて抑制されていた。さらにV1aバソプレッシン受容体欠損マウス由来の肝細胞では刺激前のグリコーゲン含量も低値であった。この結果より、肝臓におけるグリコーゲン分解には、V1aバソプレッシン受容体が関与し、さらに、V1aバソプレッシン受容体欠損マウスでは糖代謝の変化によるグリコーゲンの

蓄積量が増加しているものと考えられた。

2-4) 脂質代謝に対するバソプレッシン受容体の機能解析

V1aバソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールマウスの血中ケトン体、トリグリセライド、遊離脂肪酸の測定を行った。V1aバソプレッシン受容体欠損マウスでは、グリセロール値が摂食時も空腹時も上昇していた(図13)。

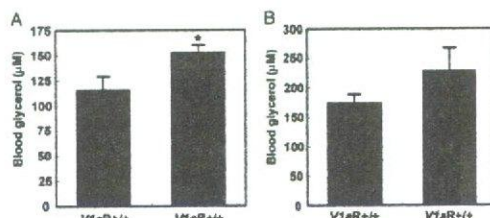


Fig. 1. Levels of Glycerol in Blood of *V1aR*^{+/+} and *V1aR*^{-/-} Mice

図 13 摂食時及び空腹時の血中グリセロール値

血中ケトン体は、空腹時コントロールに比べて血中ケトン体が増加していた(図14)。

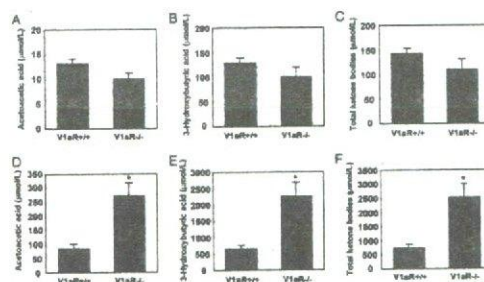


Fig. 2. Levels of Ketone Bodies in *V1aR*^{+/+} and *V1aR*^{-/-} Mice
Serum was prepared from the abdominal aorta of *V1aR*^{+/+} and *V1aR*^{-/-} mice under the feeding and fasting GA conditions. The acetoacetic acid levels were compared under both feeding and fasting conditions (A and D). The 3-hydroxybutyric acid levels were compared (B and E). The total ketone body levels were compared (C and F). The results are the mean \pm SE. These results show that the level of ketone bodies increased in *V1aR*^{-/-} mice under the fasting condition but not under the feeding condition. * 0.01 < P < 0.05.

図 14 摂食時及び空腹時の血中ケトン体値

トリグリセライド、遊離脂肪酸は低下していた(図15)。

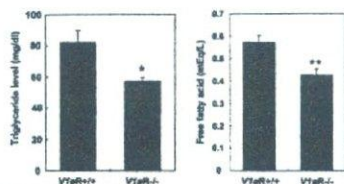


Fig. 2. Increased Catabolism of Triacylglycerols and FFA
Serum was prepared from the inferior vena cava of *V1aR^{+/+}* and *V1aR^{-/-}* mice. The TG concentrations were measured by the triglyceride 6-test Wako (pH). Subsequent FFA concentrations were measured by the NEFA C-test Wako (pH). The results are the mean \pm SE of eight or 12 mice. These results show that the catabolisms of TG and FFA were promoted in *V1aR^{-/-}* mice. Values are the means \pm SE. *, 0.01 < P < 0.05; **, P < 0.01 compared with *V1aR^{+/+}* mice.

図15 血中トリグリセライドおよび遊離脂肪酸
また組織中のトリグリセライドには差はみられなかった (表2)

	Liver	Heart	Kidney	Muscle
Feasting				
<i>V1aR^{+/+}</i>	5.41 \pm 0.491	2.50 \pm 0.059	3.57 \pm 1.175	11.8 \pm 1.704
<i>V1aR^{-/-}</i>	5.17 \pm 0.081	2.88 \pm 0.284	2.15 \pm 0.431	18.58 \pm 2.75
P value	0.775	0.4506	0.3279	0.1684
Fasting				
<i>V1aR^{+/+}</i>	26.17 \pm 2.420	5.53 \pm 0.504	7.53 \pm 1.280	6.58 \pm 1.880
<i>V1aR^{-/-}</i>	29.71 \pm 5.783	4.29 \pm 0.678	6.09 \pm 1.284	8.95 \pm 3.100
P value	0.0275	0.385	0.43	0.5402

Values are the means \pm SE. These results were obtained from five mice. Levels: TG (tissue weight (mg/gm)).

表2 組織トリグリセライド

この結果より、バソプレッシンは、V1a バソプレッシン受容体を介して脂質代謝に関与し、V1a バソプレッシン受容体欠損マウスでは、脂質代謝が亢進していることが明らかとなった (Hiroyama et al., 2007)。

2-5) タンパク質代謝に対するバソプレッシン受容体の機能解析

V1a バソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールマウスの血中アンモニア、アミノ酸の測定を行った。V1a バソプレッシン受容体欠損マウスでは、血中アンモニアが上昇しさらにアンモニア負荷後の血中アンモニアが高値を示した。またこのV1a バソプレッシン受容体欠損マウスではタンパク質代謝が亢進していることが明らかとなった (Hiroyama et al., 2007)。

2-6) 糖尿病・肥満モデル

V1a バソプレッシン受容体欠損マウス、V1b バソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールマウスを用いて糖負荷試験、インスリン負荷試験、クランプテストを行った。その結果、V1a バソプレッシン受容体欠損マウスでは、インスリン感受性が低下し、V1b バソプレッシン受容体欠損マウスでは、インスリン感受性が亢進している傾向が見られた (論文投稿中)。

V1a バソプレッシン受容体欠損マウスでは、血中グルコースの値がコントロールに比べ高く、グルコース負荷により血糖及びインスリン値が高い傾向を示した (図16)。

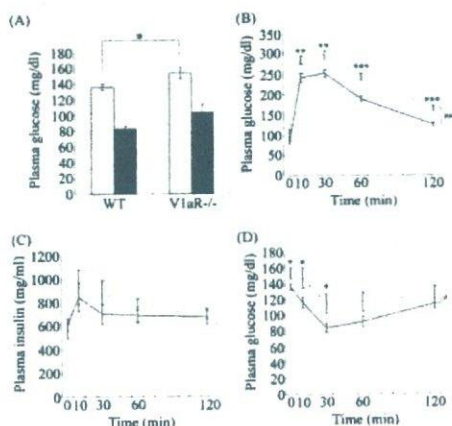


図16 血糖およびGTT, ITT

また高脂肪食負荷によりV1a バソプレッシン受容体欠損マウスでは、コントロールに比べて体重増加が著明で脂肪組織の脂肪滴も大きい傾向がみられた (図17)。

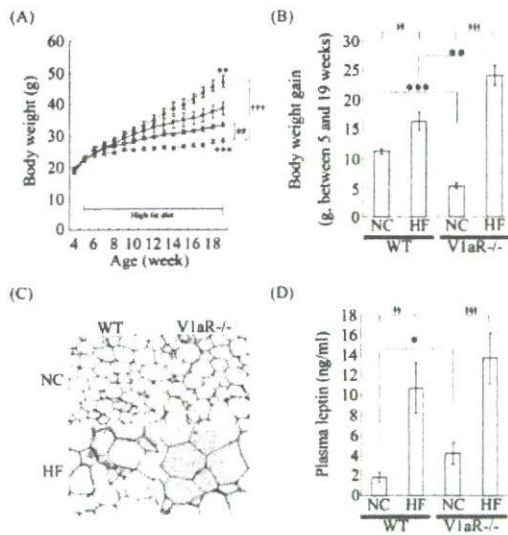


図 17 高脂肪食負荷後の体重ならびに脂肪の変化

以上の結果より V1a バソプレッシン受容体欠損マウスでは耐糖能が低下していることが明らかとなった (Aoyagi et al., 2007)。

V1b 受容体遺伝子欠損マウス (129Sv:C57BL/6J=1:3) へ 15 週間の高脂肪食負荷試験を行ったが、前回 (2004 年度) 認められたような抗肥満の表現系は認められなかった。

V1b^{-/-}db/db マウス [KsJ:6J] を作出し、マウス作出後 7 週齢時点から 16 週齢まで経時的に観察を行った。V1b 欠損 db/db マウス [KsJ:6J] は db/db マウス [KsJ:6J] に比べて体重増加率が小さく、抗肥満の傾向が認められたが有意差はなかった。血糖値は 7 週齢から 13 週齢まで V1b 欠損 db/db マウスで低値傾向を示したが、16 週齢までには全く差異を認めなかった。また、生後 8 週齢時点で経口糖負荷試験を行ったが、耐糖能に差異は認めなかった。

3. 内分泌機能系

3-1) アルドステロン分泌に対するバソプ

レッシン受容体の機能解析

V1a バソプレッシン受容体欠損マウス、V1b バソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールマウスから摘出した副腎皮質細胞を用いてアルドステロン分泌を調べた。その結果、V1a バソプレッシン受容体欠損マウスでは、バソプレッシン刺激によるアルドステロン分泌がコントロールに比べて低下していた (Birumachi et al., 2007)。

3-2) 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

V1b バソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールマウスを用いて安静時、バソプレッシン負荷時、ストレス負荷時 (急性、慢性) の血中カテコールアミン濃度を解析した。その結果、V1b バソプレッシン受容体欠損マウスではストレス負荷後のアドレナリン、ノルアドレナリンの分泌が低下していた (図 18) (Ito et al, 2006)。

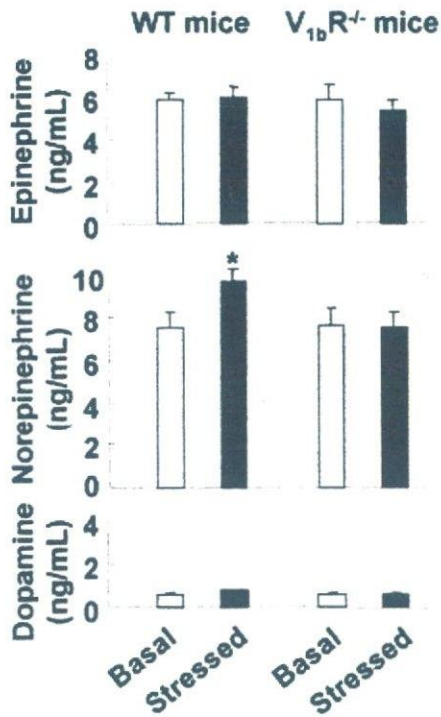


図18 安静時及びストレス負荷時の血中カテコールアミン値

3-3) 成長ホルモン分泌に対するバソプレッシン受容体の機能解析

V1bバソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールマウスから摘出した下垂体細胞を用いて成長ホルモン分泌を調べた。その結果、V1bバソプレッシン受容体欠損マウスでは、バソプレッシン刺激に対する成長ホルモン分泌の反応性の低下が見られた。

3-4) ACTH分泌に対するバソプレッシン受容体の機能解析

神経ホルモンであるバソプレッシン、及びオキシトシンは、下垂体前葉において、バソプレッシンV1b受容体を介してACTHを分泌することが報告されている。V1bバソプレッシン受容体欠損マウスを用いた研究により、

V1bバソプレッシン受容体欠損マウスではバソプレッシンが下垂体前葉からのACTH分泌を促進しないことがすでに明らかになっている。本研究では、V1bバソプレッシン受容体欠損マウスの下垂体前葉初代培養細胞を用いて、オキシトシン刺激によるACTH分泌に対する変化を調べた。

マウスの下垂体前葉を採取後、0.4% コラゲナーゼで2時間処理し、 3.5×10^5 cells/well の濃度で24穴培養プレートに撒き込んだ。その後2日-3日おきに培地を交換し、培養5日目でオキシトシン刺激実験を行った。オキシトシンによる刺激は37℃で3時間行った。受容体拮抗薬の処理は、オキシトシン刺激の5分前に行った。刺激後、培養上清を回収し、ACTH濃度をRIAで測定した。

コントロールマウスの下垂体前葉細胞において、オキシトシンは濃度依存的にACTHを分泌し、10nMの濃度で有意にACTHを分泌した ($p < 0.05$)。一方、V1bバソプレッシン受容体欠損マウスの下垂体前葉細胞においても、濃度依存的なOT刺激によるACTH分泌が観察され、100nMのオキシトシン刺激で有意にACTHを分泌した ($p < 0.01$)。そして、V1b受容体特異的拮抗薬であるSSR149415 (SSR)を用いた実験により、SSRで前処理したコントロールマウスの下垂体前葉細胞では、100nMのオキシトシン刺激によるACTH分泌が阻害され、特に1μMのSSRで有意に阻害された ($p < 0.05$)。オキシトシン受容体拮抗薬CL-14-26 (1μM)ではオキシトシン刺激によるACTH分泌を阻害しなかった。これらの結果より、コントロールマウスにおいて、

オキシトシンはオキシトシン受容体ではなく V1b 受容体を介して ACTH を分泌すると考えられ、これはラットに見られた見解と一致した。また、V1b バソプレッシン受容体欠損マウスにおいてオキシトシン刺激による ACTH 分泌が見られることから、V1b バソプレッシン受容体欠損マウスではオキシトシン受容体が ACTH を分泌することに関与していると考えられた。

3-5) 副腎皮質内分泌機能に置ける V1a 受容体の機能解析

V1a の役割を個体レベルで評価するためノックアウトマウスの副腎皮質ホルモン分泌機能について解析したところ、有意にコルチコステロンの分泌が低下していた。V1a^{-/-}マウスでは基礎値に変化がないものの、adrenocorticotropine, ACTH, で刺激した際の分泌反応が有意に低下していた。さらに V1a^{-/-}マウスでは、副腎皮質組織像。副腎皮質の3層構造(顆粒層、束状層、網状層)、特に束状層と網状層の境界が不鮮明となり、糖質ステロイドホルモンの分泌は基礎値、ACTH 刺激時とも低下する。しかし副腎髄質のカテコラミン分泌は保たれており V1a 遺伝子が皮質特異的な発達に重要であることを示している。特に 11 週令以降の V1a^{-/-}マウスでは皮質に Lipofuscin 様蛍光物質の蓄積が観察された。

週令を追って副腎皮質の自家蛍光物質沈着の変化を観察したところ、6 週令では野生型マウス、V1a^{-/-}共に沈着物質は観察されなかった。しかし 11 週令では明らかに V1a^{-/-}マ

ウスにおいて自家蛍光物質が増加し、沈着の分布は主として網状層で一部束状層に観察された。40 週令になると野生型でも副腎皮質の蛍光沈着物が観察され始めたが、その数と量は V1a^{-/-}でははるかに多く観察された。

(図 19 参照)

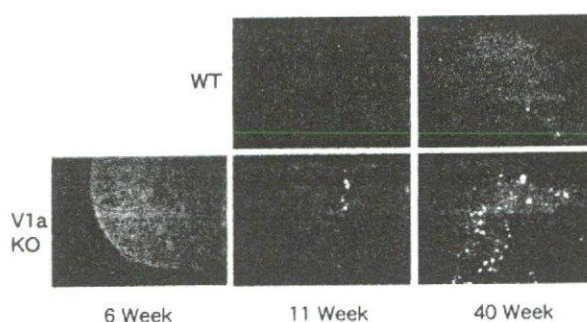


図 19 週齢による副腎皮質蛍光物質沈着の変化

よって V1a 受容体は副腎皮質に生後進む加齢変化に似た沈着物を低減させるために必要な機能を担うと考えられた。この組織変化を踏まえて遺伝子発現パターンの網羅的解析を進めることが有用であると判断された。

V1a^{-/-}の基礎血圧低下の原因を詳しく調べたところ、遺伝子欠損マウスでは循環血液量が減少し加えてこの減少を代償する機能を担う神経反射が減弱していることが示唆された。さらに循環血液量の減少は心臓に対する前負荷を低下させ、心房性ナトリウム利尿ペプチドの血中濃度は変異型マウスで低下していた。

4. 中枢神経系

4-1) アルコール嗜好性に対するバソプレッシンの作用

アルコール嗜好性に対するバソプレッシンの作用をバソプレッシン受容体欠損マウスを用いて検討した。その結果、V1a バソプレッシン受容体欠損マウスではアルコール嗜好性が亢進していることが明らかとなった（論文投稿中）。

4-2) 社会行動などの高次脳機能に対するバソプレッシンの作用

V1a バソプレッシン受容体欠損マウスでは、不安行動が低下していることが明らかとなった（Egashira et al., 2006）。

5. 泌尿生殖系

5-1) 排尿機能

雄性 1A KO の総排尿量および排尿回数は雄性 1A WT のそれらの値より有意に多かったが、一回排尿量は両群間で差を認めなかった。同様に雌性 1A KO の総排尿量および排尿回数は雌性 1A WT のそれらの値より有意に多かったが、一回排尿量は両群間で差を認めなかった。雄性 1D KO の総排尿量および一回排尿量が雄性 1D WT のそれらの値より有意に少なかったが、排尿回数は両群間で差を認めなかった。

5-2) 生殖機能

精巣、輸精管、精子の組織所見に、ワイルドマウスおよび $\alpha 1$ アドレナリン受容体三重欠損マウスに差はみられなかった（図 20）。

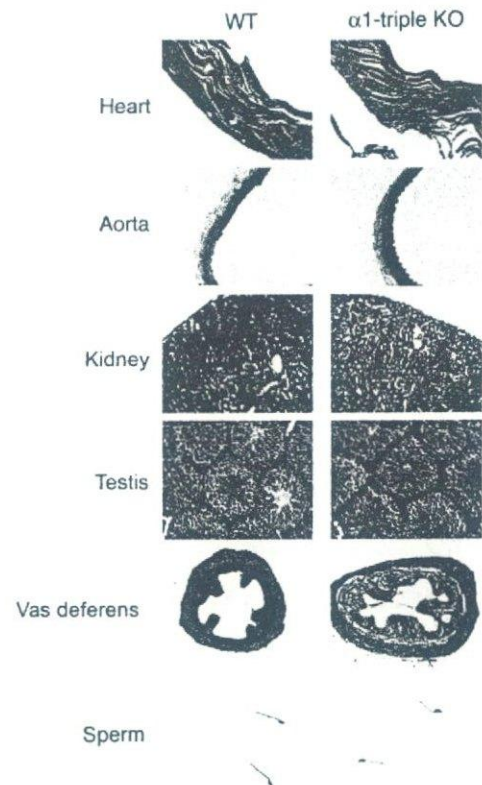


図 20 変異マウスの病理所見

変異マウスの交配成功率について検討を行った。その結果雄の三重欠損マウスでは、妊娠成功率が低下し、射精機能が低下していることが明らかとなった（図 21）。

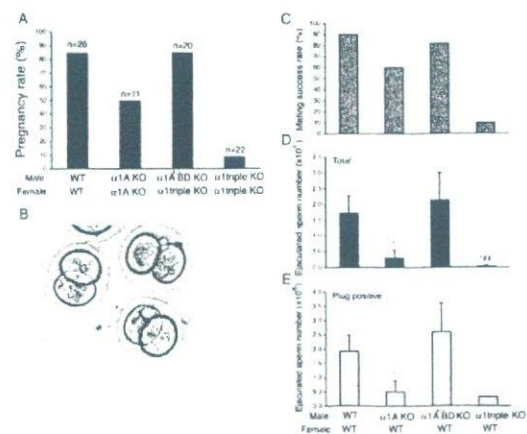


図 21 妊娠成功率及び精子数

精子機能については異常は見られなかった（表

3)。

Supplemental Table 2 Sperm function

	Mobile sperm (%)	Progressive sperm (%)	Path velocity ($\mu\text{m/s}$)	Straight line velocity ($\mu\text{m/s}$)	Curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$)	Amplitude of lateral head displacement (μm)
Wild type	73±8	22±5	121±7	100±5	220±8	14.5±0.6
$\alpha 1A$ -AR KO	78±1	15±2	119±3	92±2	210±5	14.5±0.4
$\alpha 1A^{-/-}$ -BD-AR KO	82±1	22±2	127±2	100±2	225±2	14.6±0.3
$\alpha 1$ -AR triple KO	80±2	23±3	129±3	103±4	225±5	14.1±0.4

Values are expressed as the mean±S.E.M. (n=6 in each group).

表3 精子機能

さらに、輸精管の収縮反応について検討を行った。マウスの輸精管を摘出し、ノルエピネフリン、電気刺激、 $\alpha\beta$ -mATP刺激に対する収縮反応を調べた。その結果、三重欠損マウスでは、輸精管のノルエピネフリンに対する収縮反応は消失し、電気刺激に対する収縮反応は低下、 $\alpha\beta$ -mATP刺激に対する収縮反応は亢進していることが明らかとなった(図22)。

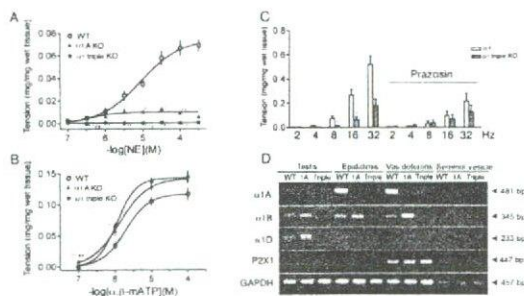


図22 生殖系における $\alpha 1$ 受容体の解析

また、 $\alpha 1$ 受容体は精巣、精巣上体、輸精管、精囊線の各組織に発現がみられ、 $\alpha 1A$ 欠損マウスでは $\alpha 1B$ および $\alpha 1D$ 受容体の発現が亢進しているのが明らかとなった(図22)。

6. 肝機能系

V1aRを欠損した細胞は予想と異なり、野生型

に比べ高い増殖能を示した(図23)。

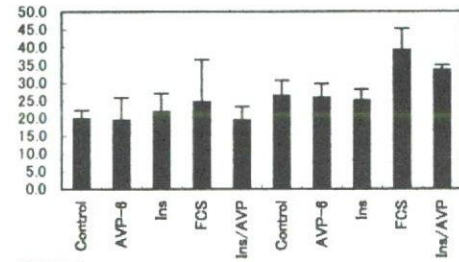


Figure 1

図23 肝細胞増殖能

GOTとGPTレベルは正常であり肝障害は認められなかった(図24)。

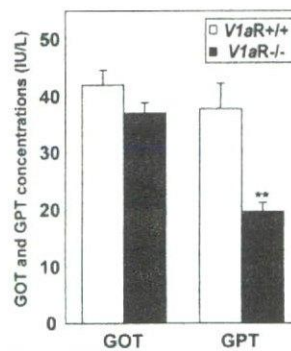


Figure 2

図24 血中GOT, GPT

しかし、アンモニア処理能力は有為に低下していた(図25)。

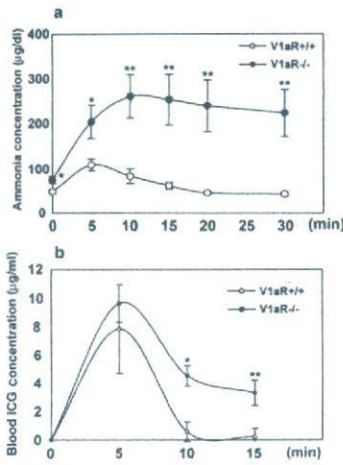


Figure 3

図25 アンモニア負荷試験およびICGテスト

また、絶食時、V1aR-KO マウスの血清中ケトン体と肝臓中アシルカルニチンが増加していることから(表4)、絶食時に肝臓での脂質代謝がV1aR-KO マウスで亢進していることが明らかになった。

Table 1. Measurement of tissue carnitine and C2-acylcarnitine

	Feeding condition							
	Liver		Heart		Kidney		Muscle	
	V1aR+/+	V1aR-/-	V1aR+/+	V1aR-/-	V1aR+/+	V1aR-/-	V1aR+/+	V1aR-/-
Carnitine	7.32±0.395	14.06±1.322	49.05±2.714	53.94±1.563	7.70±0.411	6.89±0.517	34.26±2.612	30.39±2.958
p value	0.0012		0.0590		0.2437		0.3734	
Acylcarnitine(C2)	0.31±0.041	0.27±0.029	0.82±0.050	0.78±0.081	0.61±0.023	0.67±0.025	0.15±0.004	0.20±0.005
p value	0.4348		0.6416		0.0796		0.0004	
	Fasting condition							
	Liver		Heart		Kidney		Muscle	
	V1aR+/+	V1aR-/-	V1aR+/+	V1aR-/-	V1aR+/+	V1aR-/-	V1aR+/+	V1aR-/-
Carnitine	12.28±0.804	17.10±1.881	43.01±2.627	54.56±5.188	8.36±0.845	11.61±0.835	29.14±1.500	24.84±2.411
p value	0.0715		0.1104		0.0657		0.1992	
Acylcarnitine(C2)	0.29±0.014	0.34±0.016	0.86±0.070	0.78±0.070	0.57±0.040	0.48±0.014	0.18±0.023	0.20±0.013
p value	0.4248		0.4209		0.0473		0.5111	

表4 組織アシルカルニチンの値

D. 考察

α1アドレナリン受容体について三重欠損マウス(α1ABD ノックアウト)を作成し、単独欠損マウス、二重欠損マウスと共に解析した。α1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らかでなかった。そこで作成したα1アドレナリン受容体変異マウスを用いて血管内皮損傷モデルにおける各サブタイプの機能を解析したところ、動脈の血管損傷後の肥厚にはα1Aおよびα1Bサブタイプが関与していることが明らかとなった。この結果より、α1選択的拮抗薬は、PTCA後の冠動脈内皮の肥厚の予防に効果が期待される。また、α1三重欠損マウスで輸精管の収縮障害によると考えられる射精障害が観察された。

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。

バゾプレッシンの心筋増殖に及ぼす効果については、V1a受容体が関与していることが明らかとなった。このことは、この受容体拮抗薬の開発により、肥大を起こす心疾患の予防薬治療薬として開発されることが期待できる。実際にマウスで大動脈狭窄モデルを作成したところノックアウトマウスで心肥大が抑制されたことよりV1a受容体が関与しているものと考えられる。

免疫抑制剤投与における高血圧発症・腎障害の発症は、臨床で大きな問題とされる。この