

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otonics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

研究期間 平成16年4月～平成19年3月

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) 東京大学医学部泌尿器科 北村唯一
- (3) 秋田大学医学部機能制御医学講座 中村

靖夫

- (4) 東京薬科大学第一薬理学教室 竹尾聡
- (5) 福岡大学薬学部機能制御教室 高野行夫
- (6) 福岡大学薬学部臨床疾患薬理学 藤原道

弘

- (7) 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

- (8) キッセイ薬品工業株式会社研究本部 小嶋 正三

- (9) 日本オルガノン株式会社学術情報部 澤田 照夫

- (10) 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遺伝子発現解析は RT-PCR 法にて行う。

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. 循環機能系の解析（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ノックアウトマウスの心拍数・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、F

K506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ボリン、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・蛋白代謝機能系の解析（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

個体レベルでの糖負荷試験・高脂肪食負荷を行い、体重変化、耐糖能の変化を解析する。

2-7) V1b受容体欠損とレプチン受容体二重欠損マウスの作成ならびに解析

糖尿病モデルマウスである db/db マウスとの掛け合わせ動物の作出の予備検討として、db/db マウスの遺伝背景[C57/BL/KsJ]の一部が V1b 受容体遺伝子欠損マウスの遺伝背景[C57/BL/6J]に置き換わることによる病態発症への影響を調べる。具体的には、db/db マウス[遺伝背景はC57/BL/KsJ]と正常動物である C57/BL/6J マウスの F1 マウスを作出し、さらに F1 intercross にて db/db[KsJ:6J]を作出し、各種パラメーターを解析する。

3. 内分泌機能系の解析（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) 細胞培養

マウス株化副腎皮質細胞であるY1細胞をRPMI-1640培地(10%FCS、50U/ml penicillin、0.1mg/ml streptomycin含有)中で37°C、5%CO₂存在下でそれぞれ培養した。細胞(5x10⁵ cells/ml)をACTH 10 nM-1mM、Vasopressin 1mMを添加した培養液中で一定時間培養し、ホルモン分泌能を解析した。

3-5-2) 副腎ステロイドホルモン分泌刺激試験

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。

3-5-3) 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。

3-5-4) 副腎の組織学的検索

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(3μm)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

3-5-5) RT-PCR

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。抽出したmRNAをサンプルとして、逆転写反応によりcDNAを合成し、任意に作製したPCRプライマーを用いてPCRを行い、アガロースゲル電気泳動した。PCRプライマーは、遺伝子の完全長cDNA配列をもとに作製した。

3-5-6) 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(2mg)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、スキャッチャード・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. 中枢神経系の機能解析 (田上、藤原、高野分担)

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

4-2-1) 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。

4-2-2) 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。

4-2-3) 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に入った時とした。

4-2-4) 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道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。

4-2-5) 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ェン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)

4-2-6) 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。

4-2-7) 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ができない。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ることができない場合は、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。

4-2-8) 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の正八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、そして一定の間隔に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。

4-2-9) 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。

4-2-10) 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。

4-3) 疼痛・鎮痛モデル

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. 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。

6. 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。

7. 肝機能の解析 (田上、澤田)

7-1) 肝臓における AVP の生理作用解析
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コラーゲン
コートディッシュで培養した。Bromodeoxy
uridine (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。

7-2) 肝臓再生モデルの作成

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。

7-2-1) 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。

7-2-2) 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。

7-2-3) 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。

8. 泌尿生殖機能系の解析 (北村、中村、田上、小嶋、生垣、澤田分担)

8-1) 膀胱の生理機能の解析

$\alpha 1$ 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、1 cc シリンジー、auto micro シリンジーとトランスジューサに接続し、無拘束無麻酔下で膀胱内圧測定を行った。1 cc 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 分間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。

8-2) 泌尿器科疾患モデル

$\alpha 1$ 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。

8-3) 泌尿生殖系の機能解析 (田上、中村分担)

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。

8-3-1) 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。

8-3-2) 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。

(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 $\alpha 1D$ アドレナリン受容体変異マウス(ノックアウトマウス)、 $\alpha 1B$ アドレナリン受容体変異マウス、 $\alpha 1A$ 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、 $\alpha 1D$ アドレナリン受容体変異マウスと $\alpha 1B$ 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バソ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バソプレッシン受容体変異マウスを作成した。さらに、C57BL/6J遺伝子背景のV1a, V1bバソ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バソプレッシン受容体二重欠損マウスの作成を行った。

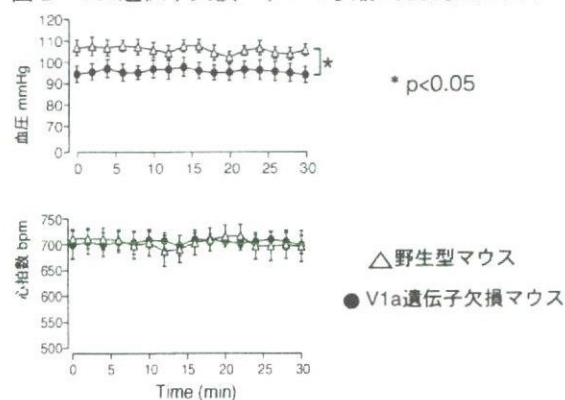
II. 遺伝子改変動物の解析と疾患モデル、病態モデルの解析

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）。

図1 V1a遺伝子欠損マウスの安静時基礎血圧低下



しかし、バソ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）。

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て $\alpha 1$ AD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)。

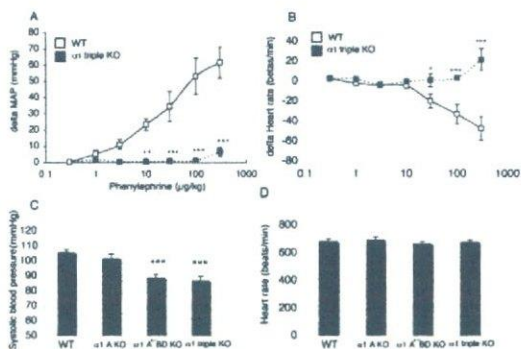


図2 フェニレフリンに対する昇圧反応と収縮期血圧

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)。

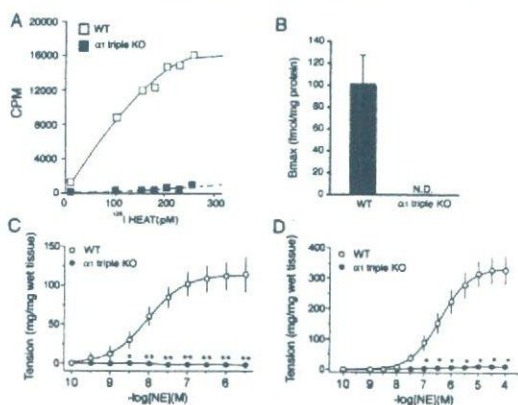


図3 大動脈、腸間膜動脈標本による収縮反応

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 $\alpha 1$ A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)。

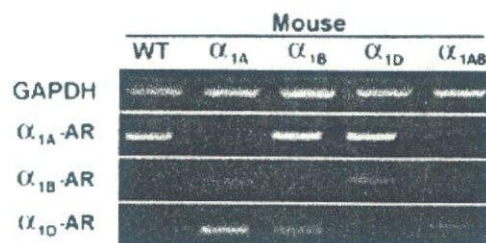


図4 大腿動脈における $\alpha 1$ 受容体

つぎに、 $\alpha 1$ A欠損マウス、 $\alpha 1$ B欠損マウス、 $\alpha 1$ D欠損マウスおよび $\alpha 1$ AB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 $\alpha 1$ A欠損マウス、 $\alpha 1$ B欠損マウス、 $\alpha 1$ D欠損マウスの間には差は認められなかったが、 $\alpha 1$ AB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)。

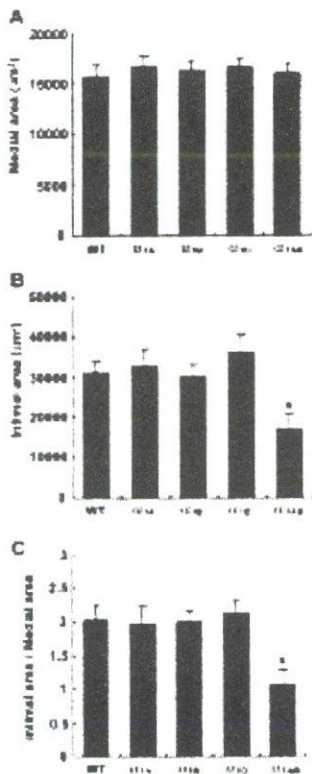


図5 血管内皮損傷後の内皮の肥厚

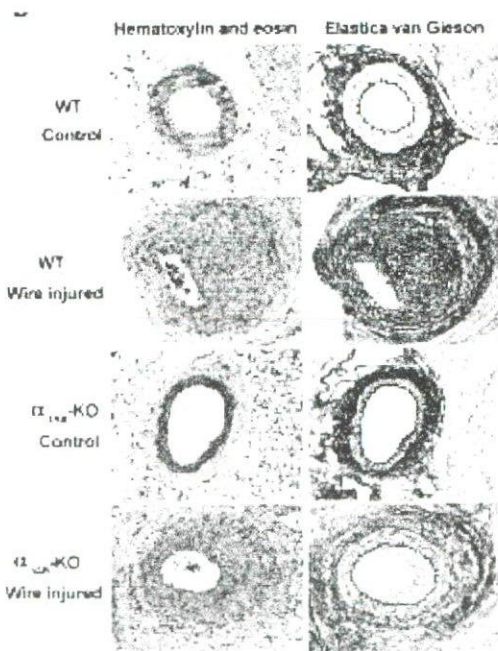


図6 コントロール及びノックアウトマウスにおけるの内皮の肥厚

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）。

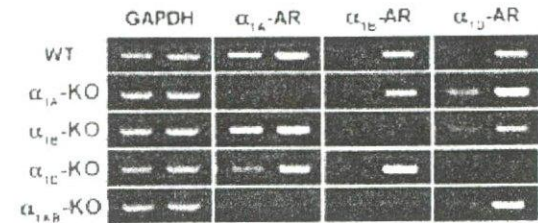


図7 血管内皮損傷前後の $\alpha 1$ 受容体の発現量解析

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）。

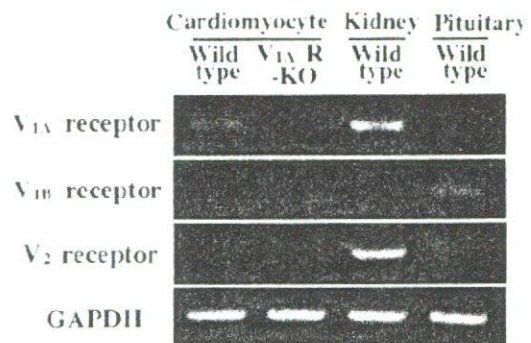


図8 マウス心筋細胞におけるバソプレッシン受容体の発現量解析

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)。

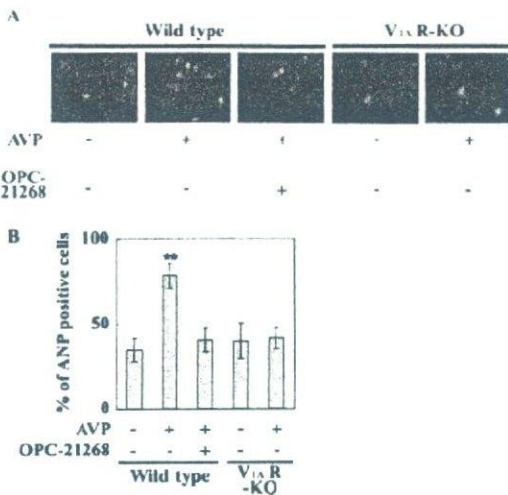


図9 心筋細胞の増殖効果

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)。

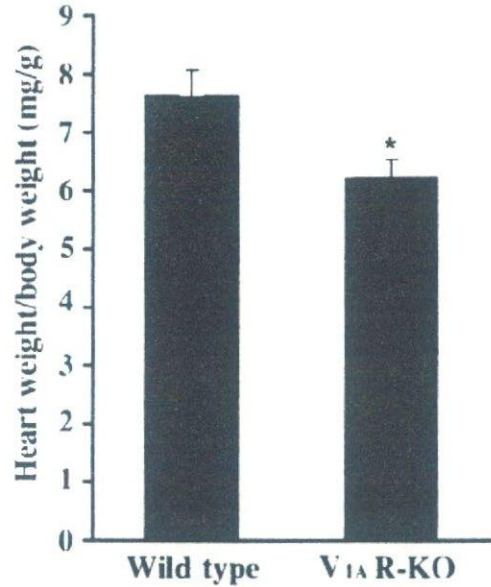


図10 大動脈狭窄による心肥大

1-6) 免疫抑制剤の副作用におけ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、V1a 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、V1b 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

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、V1b 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、V1b 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）。

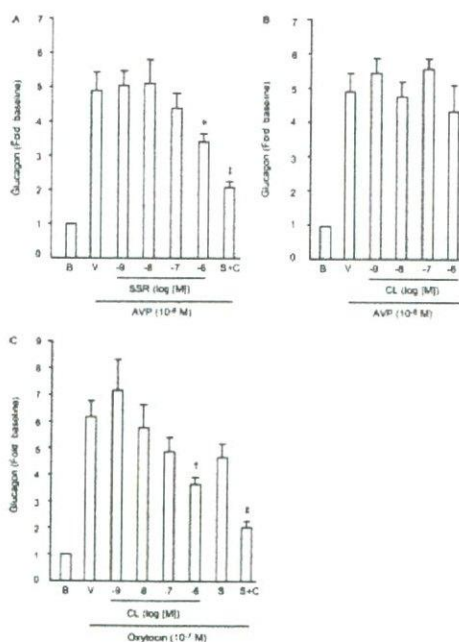


図11 ワイルドマウスにおけるグルカゴン分泌

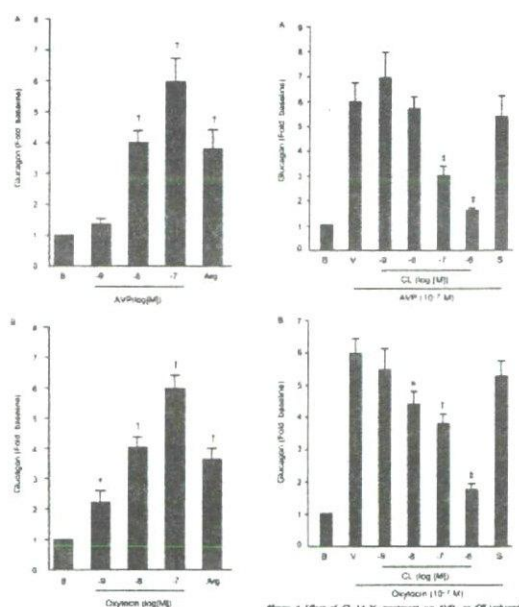


図12 V1b バソプレッシン受容体欠損マウスにおけるグルカゴン分泌

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

蓄積量が変化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)。

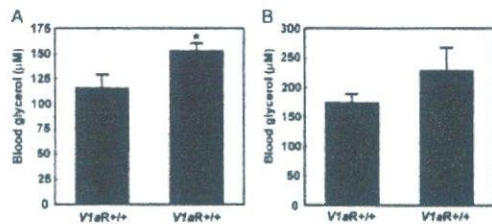


Fig. 1. Levels of Glycerol in Blood of *V1aR*^{+/+} and *V1aR*^{-/-} Mice

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)。

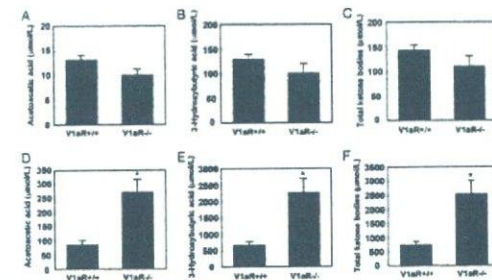


Fig. 2. Levels of Ketone Bodies in *V1aR*^{+/+} and *V1aR*^{-/-} Mice
Serum was prepared from the abdominal aorta of *V1aR*^{+/+} and *V1aR*^{-/-} mice under the feeding and fasting (24 h) conditions. The acetoacetic acid levels were compared under both feeding and fasting conditions (A and D). The 3-hydroxybutyrate acid levels were compared (B and E). The total ketone body levels were compared (C and F). The results are the mean ± 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)。

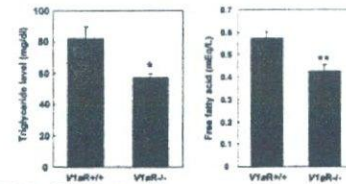


Fig. 3. Increased Catabolism of Triacylglyceride and FFA
Serum was prepared from the inferior vena cava of *V1aR*^{+/+} and *V1aR*^{-/-} mice. The TG concentrations were measured by the triglyceride 6-test Wako (left). Subsequent FFA concentrations were measured by the NEFA C-test Wako (right). The results are the mean ± SE of eight or 12 mice. These results show that the catabolism of TG and FFA were promoted in *V1aR*^{-/-} mice. Values are the mean ± 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)

	Tissue TG			
	Liver	Heart	Kidney	Muscle
Feeding				
<i>V1aR</i> ^{+/+}	5.41 ± 0.491	2.59 ± 0.059	3.57 ± 1.175	11.8 ± 1.704
<i>V1aR</i> ^{-/-}	5.17 ± 0.881	2.85 ± 0.384	2.15 ± 0.421	16.55 ± 2.75
P value	0.773	0.4508	0.3379	0.1984
Fasting				
<i>V1aR</i> ^{+/+}	29.17 ± 2.420	5.53 ± 0.904	7.68 ± 1.290	8.69 ± 1.860
<i>V1aR</i> ^{-/-}	29.71 ± 5.733	4.39 ± 0.676	6.08 ± 1.264	8.85 ± 3.100
P value	0.9278	0.308	0.43	0.5482

Values are the mean ± SE. These results were obtained from five mice. Units = TG/tissue weight (micrograms)

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)。

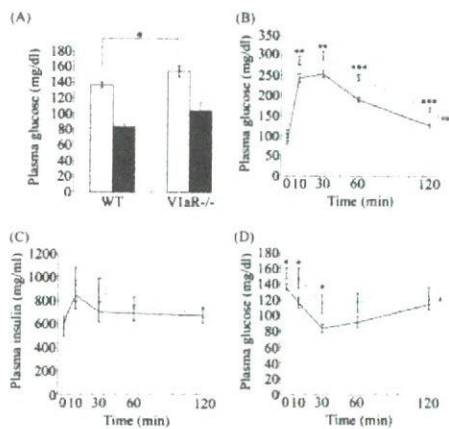


図16 血糖およびGTT, ITT

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)。

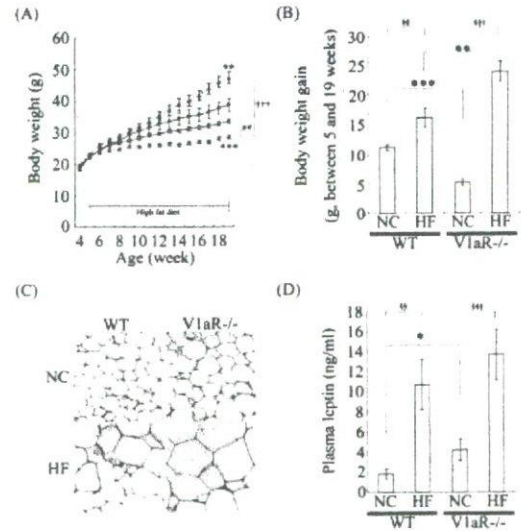


図17 高脂肪食負荷後の体重ならびに脂肪の変化

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)。

2-7) V1b 受容体欠損とレプチン受容体二重欠損マウスの作成ならびに解析

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。