

氏名(本籍)	阪川隆司(東京都)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第388号
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	遺伝子欠損マウスを用いた中枢レニン・アンジオテンシン系の機能解析
論文審査委員	(主査) 二宮博義 (副査) 赤堀文昭 藤谷英男

論文内容の要旨

レニン-アンジオテンシン系 (renin-angiotensin system; RAS) は、生体内の水・電解質平衡の調節、循環血液量および血圧の調節に重要な役割を担っており、高血圧の発症・維持に関与している。RASの唯一の基質であるアンジオテンシノーゲン (angiotensinogen; ATN) はレニンによりアンジオテンシン I (angiotensin I; AI) に変換されるが、AIは生理的に不活性である。AIはアンジオテンシン変換酵素 (angiotensin converting enzyme; ACE) によりアンジオテンシン II (angiotensin II; AII) に変換され、細胞膜表面に存在する特異的なAII受容体に結合することにより生理作用を発現する。AII受容体にはタイプ1受容体 (AT₁) およびタイプ2受容体 (AT₂) の2種類のサブタイプが存在する。AT₁受容体はアンジオテンシンの主生理機能に関与していることが知られている。一方、AT₂受容体はAIIと結合するがその生理機能は不明な点が多い。

遺伝子工学の発達に伴いRASの各遺伝子の構造が明らかにされ、研究は急速に発展した。また、RASは循環血中のみで作用すると考えられてきたが、各構成因子が脳、心臓などの組織にも観察され血中RASとは独立した組織RASの概念が確立され、その生理機能の解明が注目されている。

現在、脳内でのRASの機能は、血圧制御の他、飲水行動の制御、疼痛閾値など知覚神経系の制御、カテコールアミン作動性神経系を介した運動機能の制御、学習記憶機能への関与、うつ不安症状の制御、脳血流量の制御、脳梗塞による遅発性神経細胞死への関与等が報告されている。これら報告の多くはアンジオテンシン自体を脳内へ直接注入した実験、ACE阻害剤 (ACE inhibitor; ACEI) あるいはAII受容体サブタイプ選択的リガンドを用いた薬理試験で得られた知見であり、内因性の脳内RASを直接修飾した結果ではない。近年、発生活工学的手法の導入により遺伝子欠損動物が作製され、RAS各構成因子の機能が個体レベルで解析できるようになった。ATN遺伝子欠損マウスは収縮期および拡張期の血液が低下しており、AT₂受容体遺伝子欠損マウスは収縮期および拡張期の血圧が上昇していること

が報告されているが、中枢神経系の変化については検討されていない。

そこで、筆者は脳内RASの機能を解明する目的で、ATN遺伝子欠損マウス（筑波大学応用生物系村上和雄教授より提供）およびAT₂受容体遺伝子欠損マウス（バンダービルト大学医学部生化学稲上 正教授より提供）を用いて、行動薬理学的および神経化学的手法による機能解析を行った。なお、各実験における対照動物としては、ATN遺伝子欠損マウス (-/-) およびAT₂受容体遺伝子欠損マウス (-/γ、-/-)ともそれぞれの野生型マウス (+/+ : +/γ、+/+)を用いた。

中枢機能解析には以下の行動薬理学的解析手法を用いた。

1. 自発運動量の測定（探索行動量および自発運動量に対する影響：ATN、AT₂）
2. 強制水泳法（うつ状態の検討：ATN、AT₂）
3. 明暗選択性試験（不安行動の検討：ATN、AT₂）
4. 受動的回避反応（学習・記憶機能の検討：ATN、AT₂）
5. 疼痛閾値に対する作用（知覚神経系の検討：ATN、AT₂）
6. 脳浮腫形成に対する作用（遅発性神経細胞死への関与の検討：ATN、AT₂）
7. オープンフィールド法（脱糞行動による不安状態の検討：AT₂）
8. 高架式十字迷路法（不安状態の検討：AT₂）
9. 脳内 β エンドルフィン含量の測定（疼痛過敏の精査：AT₂）
10. Hexobarbital誘発睡眠に対する作用（中枢神経の非特異的制御あるいは興奮性の検討：AT₂）

神経化学的機能解析としては、不安症状の発現に関与しているノルエピネフリン（Norepinephrine ; NE）およびコルチコトロピン遊離因子（corticotropin releasing factor : CRF）、および疼痛閾値制御に関係しているβ-エンドルフィン作動性神経系の関与を検討した（AT₂）。

結果、ATN遺伝子欠損マウスは強制水泳法を用いた場合、うつ症状様行動の減弱が観察された。ATN遺伝子欠損マウスは自発運動量が低下していることより、ATN遺伝子欠損マウスのうつ症状様行動の減弱は運動量の増加に基づいた変化ではないと考えられる。また、ATN遺伝子欠損マウスは不安行動の増強あるいは減弱が認められなかったことより、ATN遺伝子欠損マウスは特異的にうつ症状様行動の減弱が発現していると考えられる。

雄性AT₂受容体遺伝子欠損マウスは自発運動量には影響を受けず、探索行動量のみが減少していた。しかし、雄性AT₂受容体遺伝子欠損マウスの探索行動量および自発運動量は野生型マウスと比較して差がなかった。運動量に関しては性差が認められた。

AT₂受容体遺伝子欠損マウスは明暗選択性試験での明室滞在時間の短縮、高架式十字迷路でのオープンアーム滞在時間の短縮、オープンフィールド法での脱糞数の増加が認められ、野生型マウスと比較して、不安状態が強くと発現していた。AT₂受容体遺伝子欠損マウスの強制水泳法の無動時間、hexobarbital誘発睡眠時間および自発運動量は野生型マウスと差がなかった。すなわち、AT₂受容体遺伝子欠損マウスは特異的に不安状態の増加を示し、この作用は非特異的な中枢抑制あるいは中枢興奮に起因するものではない。

ATN遺伝子欠損マウスおよびAT₂受容体遺伝子欠損マウスを用いた、受動的回避反応および疼痛閾値測定実験より、脳内のATNおよびAT₂は学習・記憶機能に関与している可能性は低いことが示唆された。

ATN遺伝子欠損マウスおよびAT₂受容体遺伝子欠損マウスの脳浮腫形成作用に対する検討結果より、ATNおよびAT₂受容体はグルタミン酸神経毒性発現には関係していないと考えられる。

AT₂受容体遺伝子欠損マウスは疼痛過敏になっていた。免疫組織学的に脳内β-エンドルフィン含有を測定した結果、β-エンドルフィン含有細胞が存在する視床下部弓状核において、AT₂受容体遺伝子欠損マウスは野生マウス型と比較してβ-エンドルフィン含量が減少していた。従って、AT₂受容体遺伝子欠損マウスの疼痛過敏には視床下部弓状核内のβ-エンドルフィン含量の減少が関与していると考えられる。

行動薬理的検討で認められたAT₂受容体遺伝子欠損マウスの不安状態増加はα₁アドレナリン受容体アンタゴニストであるprazosinにより抑制され、α₁アドレナリン受容体作用薬(phenylephrine) α₂アドレナリン受容体拮抗薬(yohimbine)、α₂アドレナリン受容体作用薬(clonidine)、β₁/β₂アドレナリン受容体拮抗薬(propranolol)、β₁/β₂アドレナリン受容体作用薬(isoproterenol)では影響がなかった。従って、AT₂受容体遺伝子欠損マウスは脳内でα₁アドレナリン受容体の感受性が高まっていることが不安状態を増強していると考えられる。AT₂受容体遺伝子欠損マウスにα₁アドレナリン受容体作用薬のphenylephrineを投与した場合、明室滞在時間はさらには短縮されることはなかった(不安状態の増強は認められなかった)。この点に関しては、AT₂受容体遺伝子欠損マウスはすでに強い不安状態を呈しており、さらなる増強作用は検出できなかったと考えられる。

AT₂受容体遺伝子欠損マウスの扁桃体での³H-prazosin結合は野生型マウスと比較して有意(P<0.05)に減少していた。すなわち、AT₂受容体遺伝子欠損マウスの扁桃体内において、AIIはAT₁受容体を介して、NE(ノルエピネフリン)作動性神経系の活動を制御しており、NE神経活動が増強した結果、NE遊離が増加しα₁アドレナリン受容体ダウンレギュレーションを引き起こしたと思われる。NEの過剰遊離が不安発症に関与しているとの報告より、AT₂受容体遺伝子欠損マウスの不安状態増加にはNEの過剰遊離が関与していると考えられる。AT₂受容体遺伝子欠損マウスの不安状態増加はα₂アドレナリン受容体の拮抗薬および作用薬で影響を受けなかったことより、AT₂受容体遺伝子欠損マウスの不安状態の増加には青斑核は関与していないと考えられる。

AT₂受容体遺伝子欠損マウスの不安惹起作用はCRF(コルチコトロピン遊離因子)受容体拮抗物質であるα-helical CRF₉₋₄₁の脳室内投与では影響を受けず、扁桃体での¹²⁵I-CRF結合数にも変化はなかった。さらに、視床下部-下垂体-副腎系の活性化の指標である血中副腎皮質刺激ホルモンおよびコルチコステロン濃度は野生型マウスと差がなかった。従って、AT₂受容体遺伝子欠損マウスの不安状態の増加にはCRF受容体は関与していないものと考えられる。

神経細胞においてAIIによる神経活動の修飾作用はAT₁およびAT₂受容体の相互作用が重要な働きをしていると推定される。AT₂受容体遺伝子欠損マウスはAT₂受容体が欠損した結果、AT₁受容体が活性化

され不安を惹起したと考えられる。

以上、ATN遺伝子欠損マウスおよびAT₂受容体遺伝子欠損マウスを用いて、行動薬理的および神経化学的手法を用いて機能解析を行った結果、脳内RASの機能として、現在解明している中枢循環調節の他に、脳内ATNはうつ状態の制御に関与しており、脳内AT₂受容体は α_1 アドレナリン受容体を介して不安状態を制御していることを明確にした。臨床上、ACEI（アンジオテンシン変換酵素阻害剤）は高血圧の治療に汎用されているが、同時に抗うつおよび抗不安作用を呈することが知られている。ACEIの抗うつおよび抗不安作用には脳内RASの関与が示唆されていたがその詳細は不明であった。本研究結果より、うつ不安症状と脳内RASの関係が明確になったと共に、ATN遺伝子欠損マウスおよびAT₂受容体遺伝子欠損マウスは精神疾患病態モデルになりうる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

レニン-アンジオテンシン系（renin-angiotensin system; RAS）は、生体内の水・電解質平衡の調節、循環血液量および血圧の調節に重要な役割を担っており、高血圧の発症・維持に関与している。従来、RASは循環血中のみで作用すると考えられてきたが、近年、血中RASとは独立した組織RASが脳および心臓などに存在することが確認されている。現在、脳内でのRASの機能は、血圧制御の他、飲水行動の制御、疼痛閾値など知覚神経系の制御、カテコールアミン作動性神経系を介した運動機能の制御、学習記憶機能への関与、うつ・不安症状の制御、脳血流量の制御、脳梗塞による遅発性神経細胞死への関与等が報告されている。これら報告の多くはアンジオテンシン自体を脳内へ直接注入した実験、アンジオテンシン変換酵素阻害剤あるいはアンジオテンシンII受容体サブタイプ選択的リガンドを用いた薬理試験で得られた知見であり、内因性の脳内RASを直接修飾した結果ではない。そこで、著者は脳内RASの機能を再検討する目的で、アンジオテンシンシノーゲン（ATN）遺伝子欠損マウスおよびアンジオテンシンII Type2（AT₂）受容体遺伝子欠損マウスを用いて、以下の実験（行動薬理的解析）を行った。

材料と方法：

- 1) 自発運動量の測定（探索行動量および自発運動量に関する影響）
- 2) 強制水泳法（うつ状態の検討）
- 3) 明暗選択性試験（不安行動の検討）
- 4) 受動的回避反応（学習・記憶機能の検討）
- 5) 疼痛閾値に対する作用（疼痛閾値の検討）
- 6) オープンフィールド法（脱糞行動による不安状態の検討）
- 7) 高架式十字迷路法（不安状態の検討）

さらに、著者は上記の実験結果の裏付けのために、以下の実験（神経化学的機能解析）を行った。

- 1) β エンドルフィン含量の測定（疼痛過敏の精査）

- 2) アドレナリン受容体薬理作用試験 (α_1 アドレナリン受容体拮抗薬のprazosin投与)
- 3) [^3H]-prazosinによる扁桃体神経細胞のトレース
- 4) Hexobarbital誘発睡眠に対する作用 (中枢神経の非特異的抑制あるいは興奮性の検討)
- 5) コルチコトロピン (CRF) 遊離因子の検討
 α -helical CRF₉₋₄₁ (受容体拮抗物質) の脳室内投与
 $[^{125}\text{I}]$ -CRF による扁桃体神経細胞のトレース
- 6) 副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) およびコルチコステロン (corticosterone) の血中濃度測定
- 7) 脳浮腫形成に対する作用 (遅発性神経細胞死への関与の検討)

実験結果と結論：

筆者は上記の一連の実験より、以下の結論を得た。

ATN遺伝子欠損マウスは強制水泳法により、うつ症状様行動の減弱が観察された。AT₂受容体遺伝子欠損マウスでは探索行動量の減少、明暗選択性試験での明室滞在時間の短縮、高架式十字迷路でのオープンアーム滞在時間の短縮、オープンフィールド法での脱糞数の増加が認められた。ATN遺伝子欠損マウスおよび対照マウスには、上記の行動に差は認められなかった。これらの結果は、AT₂受容体遺伝子欠損マウスでは特異的に不安状態が強く発現していることを意味するものである。

AT₂受容体遺伝子欠損マウスでは、疼痛過敏状態であることが明らかになった。また、免疫組織学的に脳内 β -エンドルフィン含量を測定した結果、視床下部弓状核の β -エンドルフィン含有細胞数が野生型 (対照) マウスと比較して減少していた。これは、AT₂受容体遺伝子欠損マウスの疼痛過敏は β -エンドルフィン量の減少が関与していることを示唆するものである。

AT₂受容体遺伝子欠損マウスの不安状態は、 α_1 アドレナリン受容体拮抗薬であるprazosinにより改善された。また、 $[^3\text{H}]$ -prazosinによる α_1 アドレナリン受容体の数の測定では、対照マウスと比較して受容体の数が減少していた。これは、 α_1 アドレナリン受容体の数の減少にもかかわらず不安状態が高まっていることを示すものである。この現象を著者は次のように考察している。ノルエピネフリン作動性神経ではノルエピネフリンの分泌はAT₂受容体により抑制的に、アンジオテンシン II Type₁ (AT₁) 受容体により促進的に制御されており、AT₂受容体欠損によりAT₁受容体への抑制がなくなりAT₁受容体の活性が高まりノルエピネフリン遊離が増加し、その結果、 α_1 アドレナリン受容体がダウンレギュレーションを起こした。しかし、 α_1 アドレナリン受容体の個々の活性化が起きていることから不安徴候は増強される結果となった。

Hexobarbitalの誘発睡眠作用に関する検討により、AT₂受容体遺伝子欠損マウスと対照マウスでは睡眠作用に差がないことから、AT₂受容体遺伝子欠損マウスの特異的不安徴候は、中枢抑制あるいは中枢興奮に起因するものではない。

受動的回避反応の結果、ATNおよびAT₂受容体遺伝子欠損マウスと対照マウスでは反応に差は認められなかった。従って、脳内のATNおよびAT₂受容体は学習・記憶機能に関与している可能性は低い。

α -helical CRF₉₋₄₁ (CRF受容体拮抗物質) の脳室内投与試験および¹²⁵I-CRFによる扁桃体神経細胞トレースおよびACTHおよびコルチコステロンの血中濃度測定の結果、AT₂受容体遺伝子欠損マウスと対照マウスでは差は認められなかった。従って、AT₂受容体遺伝子欠損マウスの不安発現にはコルチコトロピン受容体は関与しないことが考えられる。

脳浮腫形成の検討から、凍傷による脳浮腫形成にATNおよびAT₂受容体遺伝子欠損マウスと対照マウスでは差は認められなかった。従って、ATNおよびAT₂受容体はグルタメート神経毒性発現に関係していないことが考えられる。

論文の評価：

以上のように本研究は、ATN遺伝子欠損マウスおよびAT₂受容体遺伝子欠損マウスを用い、脳内RASが中枢循環調節の他に不安およびうつ状態の発現にも関与していることを示唆し、その発現に脳内AT₂受容体が重要な役割をはたしていることを明らかにした。本研究の成果は関連研究の発展に寄与するものと思われる。本論文は行動薬理学および実験動物学上、高く評価される業績であり、博士(獣医学)の学位授与に値するものと認める。