3. つくば高血圧マウスとつくば低血圧マウス

村 上 和 雄 深 水 昭 吉

筑波大学 応用生物化学系

Tsukuba Hypertensive and Tsukuba Hypotensive Mice

Kazuo MURAKAMI and Akiyoshi FUKAMIZU

Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba

Summary

We first constructed the chimeric renin-angiotensin cascade in mice comprising both human renin (h-RN) and human angiotensinogen (h-ANG) as well as the endogenous angiotensin converting enzyme and angiotensin II receptors. Although each single gene carrier did not develop hypertension, dual gene strains with the overactive RAS (Tsukuba hypertensive mice) exhibited a chronically sustained increase in blood pressure. During the crossmating experiments, we observed that transgenic female mice carrying the h-ANG gene, which displayed normal blood pressure in the nonpregnant state, developed hypertension at 19 days of gestation, only when they had been mated with transgenic males carrying h-RN. Pregnant females derived from other mating combinations did not show hypertension. On the basis of these results, we hypothesized that combination of paternal renin and maternal angiotensinogen might play a role in the development of pregnancy-associated hypertension.

We next generated angiotensinogen- and angiotensin type 1a receptor (AT1a)-deficient ($-/-$) mice. The systolic blood pressure of angiotensinogen- and AT1a-deficient mice dropped 33.5 and 22 mmHg, respectively, in comparison with that of the wild-type ($+/+$) mice. Angiotensinogen-deficient mice ($-/-$) was called Tsukuba hypotensive mice.

These observations demonstrated an indispensable role for the RAS in the blood pressure regulation.

結 言

レニン・アンギオテンシン (RA) 系は、血圧調節を含む心血管系の恒常性や高血圧症などの発症に重要な役割を演じていると考えられている。

1980 年代の前半から、レニン・アンギオテンシン系の研究に遺伝子工学的手法が導入され、RA 系の主要な成分である、レニン、レニン基質 (アンギオテンシノーゲン)、アンギオテンシン II 変換酵素の cDNA や核内遺伝子のクローニングが成功した。その結果、これらの遺伝子の構造や、その遺伝子の調節に関与する部位が次々と明らかになった。そして、これら遺伝子の細胞内での調節機構に関する研究もさかんになっていった。これらの結果を基盤として、1980 年代の後半から RA 系の発生工学的研究が開始された。

実験方法および成績

I. 遺伝子導入マウス

- 1) ヒト・レニンとヒト・アンギオテンシノーゲンの両遺伝子を有するマウス (つくば高血圧マウス)¹⁾

① まず、調節部位を含むヒト・レニン遺伝子を持った遺伝子導入 (トランスジェニック) マウスを作製した。ヒト・レニンはこのマウス腎の傍糸球体細胞で主として発現したが、血圧は正常であった。ついで、② ヒト・アンギオテンシノーゲン (ヒト・Agt) を有する遺伝子導入マウスを作製したが、その血圧も正常であった。そこで、① と ② の交配により、ヒト・レニンとヒト・Agt 遺伝子を持ったマウスを作製した。このマウスは、正常マウスより 30~40 mmHg 高い血圧を有し、この血圧は、ヒト・レニンの特異的阻害剤の投与により正常血圧にもどった。このマウスを「つくば

Table 1 Systolic blood pressure of Tsukuba hypertensive and hypotensive mice

	Systolic blood pressure
Tsukuba hypertensive mice	129.1±7.1
Wild type mice	100.4±4.4
Tsukuba hypotensive mice	66.9±4.1

高血圧マウス」と命名した (Table 1)。

このマウスにおける血漿中にヒト・レニンおよびヒト・Agt が存在することが明らかとなった。さらに、ヒト・レニンとヒト・Agt 間の反応がマウスの血中で起こっているかについては、野生型マウスと比較し、両遺伝子保有マウスでは血漿アンギオテンシン I (AI) 量が3~4 倍上昇していることから、ヒトの酵素と基質の反応がマウス個体において起こっていることが実証された。

また、両遺伝子保有マウスにおける AI の上昇は、同様にアンギオテンシン II (AII) の上昇を導き、RA 系の最終活性ペプチド (AII) が循環中に過剰に生成されていることが明らかとなった。

つくば高血圧マウスの血圧は、ヒト・レニンを特異的に抑制する薬剤の投与により顕著に低下したが、野生型マウスや、ヒトの一つの遺伝子のみを導入したマウスにおいては、血圧の低下が認められなかった。これらの結果より、つくば高血圧マウスにおいては、ヒト・レニンとヒト・Agt の特異的反応により産生した過剰な AI が、内在性のマウス・アンギオテンシン変換酵素により AII に変換され、高血圧を引き起こしていることが明らかとなった。

◇病態解析

RA 系は、高血圧の成因のみならず心肥大や動脈硬化においても中心的役割を担っている可能性が報告されている。私どもが開発したつくば高血圧マウスにおいても次のような興味深い病態が出現していた。多くの個体において3 カ月齢までに心肥大が起り、加齢とともに顕著な心肥大が観察された。さらに、心筋細胞の肥厚へと病態が進行する個体もかなりの頻度で出現する。また、大動脈基部より大動脈弓部における血管破裂を起こす個体も出現する。さらに、6 カ月以降において、腎糸球体硬化病変が高頻度に出現する。

また最近、つくば高血圧マウスに高脂肪、高コレス

テロール食を摂取させると、粥状動脈硬化の進展が顕著に亢進することが明らかとなった²⁾。

したがって、つくば高血圧マウスは、単に、高血圧の病態を解析するのみでなく、RA 系と心肥大、動脈硬化および腎障害などの組織病変の関係を解析する非常に有用なモデルである。

2) 妊娠高血圧マウス³⁾

ごく最近になり、上述したつくば高血圧マウスの作製過程において、ヒト・レニン遺伝子を導入したオスマウスとヒト・Agt 遺伝子を導入したメスマウスを交配させると、メスマウスの血圧が妊娠後期に上昇し、妊娠末期においては、大動脈弓部の血管破裂により、また心不全により半数以上が死亡するという非常に興味深い現象を見いだした。そこで私どもは、今回観察された現象が胎児由来の胎盤レニンにより引き起こされたものと予測を立て、胎盤レニンの母体透過性および母体血圧への影響を発生工学的手法から解析した。

まず初めに、野生型 (C57BL/6J) のメスマウスにヒト・レニン遺伝子を導入したオスマウスを交配させる実験系を組み立てた。もし、胎盤で発現するレニンが母体に透過性をもつならば、ヒト・レニン遺伝子をもたない野生型メスマウスの血中にヒト・レニンが検出されると考えられた。出産前日の妊娠 19 日目の胎盤では、大量のヒト・レニン mRNA が検出され、その発現量はつくば高血圧マウスのメスの腎臓の約 8 倍を示した。また、胎盤の組織抽出液中のヒト・レニン量を、ヒト・レニン特異的抗体を用いて解析したところ、大量の活性型および不活性型ヒト・レニンが検出され、野生型メスマウスの胎盤において、ヒト・レニンが mRNA およびタンパクレベルで大量に発現していることが示された。

次に私どもは、野生型メスマウスの血漿中のヒト・レニン量の測定をおこなった。その結果、妊娠 19 日目の母体血漿中には、正常なヒト血漿にくらべ大量の活性型ヒト・レニンが、また、その約 34 倍の不活性型ヒト・レニンが存在するが明らかとなった。この結果は、胎盤レニンが母体循環液中に放出される決定的な証拠であり、今回観察された現象については、次のような発症機序が考えられた。

ヒト・レニン遺伝子を導入したオスマウスと交配することにより、メスマウスの胎盤ではヒト・レニンが大量に発現する。また、このヒト・レニンは母体に透過性をもつため母体血中に大量に放出される、一方、

母体はヒト・レニン基質であるヒト・Agt 遺伝子をもつため、母体内ではヒト・レニンとヒト・Agt により種特異的な RA 反応が生じ、AI および AII の過剰生成が起こり、血圧が上昇したと考えられた。またこれらが引き金になり、大動脈弓部の血管破裂および心不全が発症したと考えられる。

実際に、妊娠 19 日目における収縮期血圧は、野性型マウス同士を交配させたコントロールでは、非妊娠と同様、正常血圧 100 mmHg 程度を示したのに対し、ヒト・レニン遺伝子をもつオスマウスと交配したヒト・Agt 遺伝子をもつメスマウスでは 156 mmHg と非常に高い血圧を示した。また、このとき母体血漿 AII 量はコントロールに比べ、約 6 倍と顕著に増加していた。

II. 遺伝子欠損マウス

1) つくば低血圧マウス (アンギオテンシノーゲン (Agt) 欠損マウス)⁴⁾

私どもはまず、RA 系唯一の基質である Agt の破壊を行った。その結果、野生型マウスおよびヘテロ変異型マウスにおいては、Agt 遺伝子発現が検出されたが、ホモ変異型マウスにおいては、同遺伝子の発現は検出されなかった。このことにより個体レベルにおいて、Agt 遺伝子の半分または完全な欠損に成功したことが示された。さらに、これらマウス血漿中の Agt および AI の産生は、ホモ変異マウスにおいては検出限界以下であり、本動物が Agt 欠損マウスであり、RA 系が機能しないマウスであることが明らかとなった。そこで、このマウスの血圧を悲観血式に測定したところ、野生型マウスとヘテロ変異型マウスとの間には血圧に有意な差が観察されなかったのに対し、このホモ変異型マウスでは血圧が、野生型マウスと比較すると、収縮期血圧で 34 mmHg も低く、このマウスを「つくば低血圧マウス」(Table 1) と命名した。これらのことは、血圧維持において RA 系を代償する昇圧系は存在せず、正常血圧制御においても RA 系が重要な役割を演じていることが明確に示された。現在、このつくば低血圧マウスの病態の解析中である。

2) アンギオテンシン II 受容体遺伝子欠損マウス⁵⁾

アンギオテンシン II (AII) 受容体は、少なくとも二つの型 (1 型と 2 型) があり、1 型には 1a と 1b 型がある。従来知られていた AII の作用は、そのほとんどが 1 型を介して伝達されると推定されている。この推定を実証し、さらに 1a および 1b 型の役割を

明らかにするため、多くの臓器で発現している 1a 型の遺伝子が欠損しているマウスを、私どもは 1995 年に創作した。このマウスの最高血圧は、コントロール・マウスに比べ、ヘテロ型では 10 mmHg、ホモ型では 22 mmHg それぞれ低下していた。この結果は、RA 系による血圧のコントロールには、1a 型受容体が重要な役割を演じていることを示している。

ごく最近、稲上らは 2 型受容体の生理的意義を解明するため、この受容体遺伝子を欠損したマウスを作製することに成功した⁶⁾。2 型受容体は、胎児の皮膚に多く発現していることから、胎児発育などに重要な作用をもつ受容体であると考えられていた。しかし、予想に反し、2 型受容体を欠損したマウスは、その血圧が顕著に上昇しており (25~30 mmHg)、さらに、静脈に注入した AII に対して過敏な血圧上昇作用を示すことがわかった。

したがって、この 2 型 AII 受容体は、主として、血圧上昇を抑える作用をもつことがわかった。AII は血圧の調節に関して、全く相反する作用を有することが明らかとなった。すなわち、AII は 1 型受容体 (AT1) を経由して血圧を上昇させる一方、2 型受容体 (AT2) を経由して血圧を降下させるという、大変興味ある事実が判明した。この事実は、AII が血圧上昇という生理作用に関して、アクセル (1 型受容体) とブレーキ (2 型受容体) を巧みに使い分けていることを示している。

総 括

レニン・アンギオテンシン (RA) 系の研究は、次々と新しい技術を導入することによって進歩してきた。これらの技術により RA 系の各成分の基本構造はもとより、RA 系の遺伝子導入マウスや遺伝子欠損マウスの創作まで、研究がほぼ完成した。ここまで研究が進むとは、研究を始めたときには全く予想できなかった。これらの技術により、分子レベルから個体レベルまでの RA 系の研究は一つのゴールを迎えたことになる。

しかし、これらの研究の一つの到着点である遺伝子導入マウスや遺伝子欠損マウスの創作は、新しい研究の出発点でもある。これらの新しいモデル動物を使って、RA 系の血圧調節以外の新しい生理作用、特に組織における RA 系の役割の解明を期待している。

文 献

- 1) Fukamizu, A., Sugimura, K., Takimoto, E., et al.: *J. Biol. Chem.*, **268**, 11617 (1993)
- 2) Sugiyama, F., Haraoka, S., Watanabe, T., et al.: *Lab Invest*, **76**, 835 (1997)
- 3) Takimoto, E., Ishida, J., Sugiyama, F., et al.: *Science*, **274**, 995 (1996)
- 4) Tanimoto, E., Sugiyama, F., Goto, Y., et al.: *J. Biol. Chem., Commun.*, **269**, 31334 (1994)
- 5) Sugaya, T., Nishimatsu, S., Tanimoto, K., et al.: *J. Biol. Chem.*, **270**, 18719 (1995)
- 6) Ichiki, T., Labosky, P.A., Shiota, C., et al.: *Nature*, **377**, 748 (1995)