

[別紙 1]

論 文 の 内 容 の 要 旨

論 文 題 目 Roles of α -calcitonin gene-related peptide (α CGRP) in the regulation of nociceptive, cardiovascular and respiratory functions revealed by gene targeting

侵害受容、心血管、および呼吸調節における α -calcitonin gene-related peptide (α CGRP)の役割

— α CGRP 遺伝子欠損マウスを用いた検討から—

氏 名 大 橋 芳 雄

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide : CGRP) は、1982 年にカルシトニン (CT) 遺伝子の解析から発見された 37 個のアミノ酸残基からなるペプチドで、中枢および末梢神経系のみならず心臓、呼吸器、消化管、表皮や血管にも多く認められ、そのほとんどが求心性知覚神経の遠位終末部に存在している。CT/CGRP は 6 個のエクソンから構成される共通の遺伝子にコードされているが、組織特異的なスプライシングにより、甲状腺 C 細胞では CT mRNA (エクソン 1-4) が、神経組織では CGRP mRNA (エクソン 1-3、5-6) が産生される。また、CT/CGRP 共通遺伝子とは異なる遺伝子でコードされるアイソフォームも見いだされており、それぞれ α 、 β CGRP と呼ばれる。 α と β CGRP の生理作用は同じである。近年、末梢神経系において、ノルアドレナリン、アセチルコリンといった古典的神経伝達物質以外の物質を伝達物質とする、非アドレナリン非コリン作動性 (non-adrenergic non-cholinergic : NANC) 神経と呼ばれる神経の存在が注目されているが、こうした NANC 神経の一つにカプサイシン感受性神経があげられる。これは、トウガラシの辛み成分であるカプサイシン処理によってその神経に含有される物質が枯渇される神経の総称であるが、こうした神経の研究により、従来求心性神経とされてきた一次知覚神経が、中枢を経ずに直接その遠位端である末梢組織に対しても作用していることが明らかとなってきている。CGRP はこのカプサイシン感受性 NANC 神経の伝達物質

として、疼痛の知覚のみならず、強力な血管拡張作用を介した局所の血流調節、陽性変時・変力作用、および気管平滑筋の収縮などを司っている可能性が報告されている。

CGRP の生理的および病態生理的意義を実際に生体レベルで明らかにするためには、ジーンターゲット法による解析が有用と考えられる。そこで本研究では、特に α CGRP の侵害受容、循環および呼吸調節における生理的意義を明らかにするため、 α CGRP 遺伝子欠損マウスを樹立し、正常マウスとの比較検討を行った。

BALB/c マウス遺伝子ライブラリーよりマウス CT/ α CGRP 遺伝子をクローニングし、この共通遺伝子の中で α CGRP のみに変異遺伝子を導入するため、第3~5エクソンを含む7.0 kbの断片のうち、 α CGRP を特異的にコードする第5エクソンにネオマイシン耐性遺伝子を挿入し、コンストラクト 5'端に単純ヘルペス由来チミジンキナーゼ遺伝子を連結したDNAコンストラクトを作成した。このコンストラクトを、エレクトロポレーションにより129/Sv マウスより樹立されたES細胞SM-1に導入し、薬剤耐性を利用した positive-negative selection を行ってPCR・Southern解析で遺伝子型を決定した結果、G418・ganciclovir 存在下で生き残ったクローンより、相同組み換えの起こったES細胞を得た。これらのES細胞をC57BL/6 マウスより得られた胚盤胞にマイクロインジェクション法にて導入しキメラマウスを得、germline transmission を確認した。さらにその子孫より α CGRP 遺伝子欠損マウスを樹立した。

α CGRP 遺伝子発現の欠損の確認は、RT-PCR および免疫組織染色にて行った。ノックアウトマウスでは、 α CGRP mRNA を示す286 bpのbandは脳幹、脊髄、肺いずれの部位でも認められず、脊髄における抗CGRP抗体による染色でも後索は染色されなかった。用いた抗体は β CGRP に対しても100%の交差反応性を有しており、このことより β CGRP の代償性の過剰発現は存在しないと考えられた。一方、CT遺伝子の発現は甲状腺においてmRNAレベルおよびタンパクレベルでも両者で差を認めず、 α CGRP 遺伝子の欠失によりCTの発現は影響を受けていないばかりか、alternative splicing が一方的にCT産生の方向に進むわけではないことも示された。血中カルシウム、リン、CT濃度にも差を認めなかった。

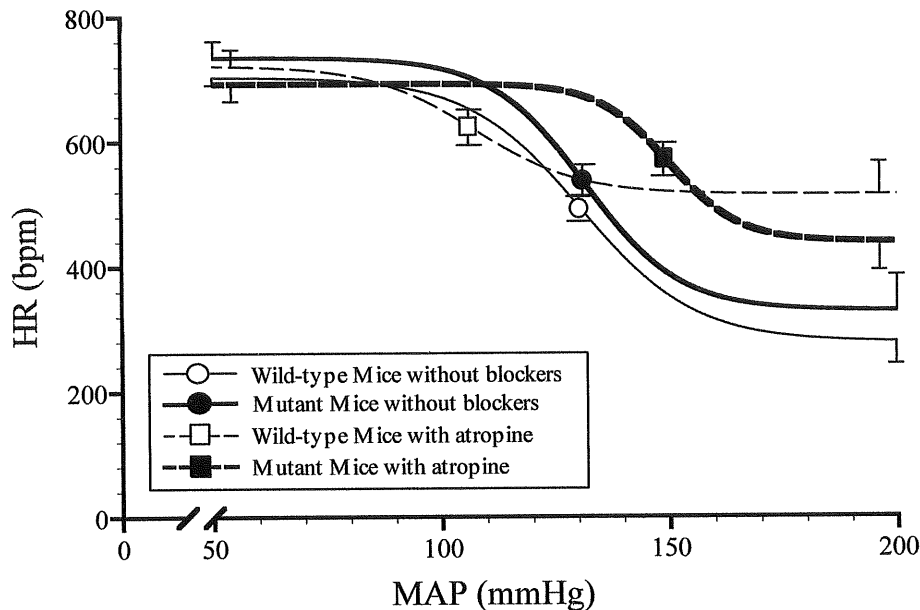
最初に、生後8週から16週の雄のノックアウトマウス(KO)および野生型(WT)について、侵害刺激に対する反応性を検討した。55°Cに加熱したhot plate上にマウスを置き、最初に後肢を舐めるまでの時間(lick latency)および3分間に後肢を舐める回数(lick frequency)を観察したが、いずれもKOおよびWTで反応に差を認めなかった。さらに強い機械的刺激を加えるため、マウスの尻尾にクリップをはさみ(tail clip)、同様に尻尾を舐めるあるいは噛むまでの時間および回数を検討したが、やはり両者に有意な差を認めなかった。一方、化学刺

激に対する反応性は WT と KO で明瞭に差が認められた。カプサイシン 50 μ g を足底皮下に注射したところ、5 分間の lick frequency は KO で有意に低下していた (KO : 3.7 \pm 0.6 vs. WT : 8.2 \pm 1.3, P<0.05)。lick latency は有意差は認めなかったものの、KO で延長している傾向があった。従って、 α CGRP は、通常の温痛覚にはあまり重要ではないものの、急性炎症を引き起こすような強い組織障害に際しては、痛みの重要な伝達物質であると考えられた。

次に、循環制御における α CGRP の役割について検討するため、大腿動脈へのカニューレーションを行い、観血的連続圧測定にて、まずウレタン麻酔下での血圧・心拍数測定を行った。KO では有意に平均血圧の上昇 (KO : 107.7 \pm 2.2 vs. WT : 99.3 \pm 2.2 mmHg, P<0.01) および心拍数の上昇 (KO : 681.1 \pm 6.3 vs. WT : 622.3 \pm 8.3 bpm, P<0.01) が認められた。KO での平均血圧の上昇は無麻酔・無拘束下でも認められ (KO : 119.0 \pm 2.9 vs. WT : 104.6 \pm 5.7 mmHg, P<0.05)、テレメトリーを用いた無麻酔・無拘束下での心拍数測定でも KO で有意の上昇を認めた (KO : 554.4 \pm 26.4 vs. WT : 475.0 \pm 23.5 bpm, P<0.05)。KO での血圧上昇が末梢血管抵抗の上昇によるものなのか、それとも心拍数上昇に伴うものなのかを検討するため、末梢性 α_1 -blocker であるプラゾシン (1 μ g/g) を腹腔内投与し、血圧・心拍数の変化を観察したが、プラゾシン投与後も心拍数は KO で有意に上昇していたのに対し、血圧の差は消失した。一方心臓超音波法による検討では一回拍出量に両者で差を認めず、従って、KO における平均血圧の上昇は、心拍数上昇の結果ではなく末梢血管抵抗の上昇によるものと考えられた。

さらに、 α CGRP が心臓自律神経系におよぼす影響を検討するため、薬物の投与実験を行った。副交感神経遮断薬であるアトロピンを腹腔内投与すると、WT、KO とも有意な心拍数上昇が認められたが、その上昇率は WT で有意に大きかった。また、 β 遮断薬であるアテノロールを投与すると、両者とも有意に心拍数は減少したが、その減少率は KO で有意に大であった。心臓における交感神経活性の亢進あるいは副交感神経活性の減弱が考えられたため、次に動脈圧受容体反射について検討した。麻酔下にフェニレフリン (1-100 μ g) あるいはニトロプルシッド (1-30 μ g) を動注し、反応性の心拍低下あるいは上昇を測定してグラフ上にプロット、ソフトウェア DeltaGraph を用いて既報の等式にカーブフィットを行った ($y = p_4 + p_1 / (1 + \exp [p_2 (x - p_3)])$)、y は心拍数、x は血圧)。KO と WT で得られたカーブに差はなかったが、アトロピン投与下で圧受容体反射を検討すると、顕著な差が認められた (図)。すなわち、KO で WT と比較してカーブの右方偏位が認められ、MAP₅₀ (上記等式の p₃ 値に相当) は有意に上昇を認めた (KO : 150.0 \pm 7.1 vs. WT : 107.5 \pm 18.1 mmHg, P<0.05)。アテノロール投与下の圧受容体反射には KO、WT で差を認めなかった。以上の結果より、KO では交感神経活性が亢進していると考えられた。尿中カテコラミン代謝産物の増加お

よび心拍変動の減少も KO で認められ、いずれも交感神経活性の亢進を支持するものと考えられる。



α CGRP は末梢の血管周囲ばかりでなく、特に圧受容体反射の中樞である下位脳幹にも多く認められる。従って、 α CGRP はその交感神経抑制作用を介して、末梢において局所循環を調節しているだけでなく、中枢性にも特に圧受容体反射を介して循環制御に関与していると考えられる。

最後に、呼吸調節に関して検討した。下位脳幹は、動脈圧受容体反射だけでなく、呼吸の反射にも関与している。そこで、種々の機械的・化学的刺激を加え、呼吸数の変化を検討した。侵害刺激として tail pinch 刺激、化学刺激として、肺内の C-fiber を刺激するフェニルピグアナイド (0.04, 0.4 μ g/g)、および低酸素状態として頸動脈小体を直接刺激する NaCN (3.5 μ g/g) を投与したが、いずれの刺激に対しても WT と KO で呼吸数の変動に差は認められなかった。従って、 α CGRP はこうした呼吸の反射の調節にはあまり関与していないと考えられた。ただし、 α CGRP の気道過敏性に与える影響については更なる検討が必要である。

臨床的に α CGRP は冠動脈攣縮、レイノー病、心不全、気管支攣縮などへの関与が報告されており、今回樹立した α CGRP 遺伝子欠損マウスは、 α CGRP のこうした循環器・呼吸器疾患における意義を考える上で重要な動物モデルになることが期待される。