

論文内容の要旨

論文題目 高血圧自然発症ラット (SHR) におけるインスリン抵抗性遺伝子 KAT-1 (kynurenine aminotransferase 1) 欠損マウスの作製および解析

指導教官 門脇 孝 教授

東京大学大学院医学系研究科

2005 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 周 宇ハン

高血圧自然発症ラット (Spontaneously Hypertensive Rat: SHR) は、高血圧を指標とした選択交配の繰り返しにより確立された本態性高血圧症のモデル動物であり、同時に糖・脂質代謝異常等を呈する、いわゆる metabolic syndrome の良いモデル動物である。SHR におけるこれらの異常は、複数の遺伝因子と環境因子によって生じている複合遺伝形質 (complex trait) であり、その原因遺伝子自体はまだほとんど明らかにされていない。

SHR におけるインスリン抵抗性原因遺伝子の染色体上での局在は、い

わゆる QTL (quantitative trait locus) 解析によって同定されつつある。本研究室では、脳卒中を起こしやすい SHR である SHRSP と Wistar Kyoto rats (WKY) の交配による F2 を用いた QTL 解析の結果、ラット 3 番染色体上の D3Mgh16 の近傍に血圧上昇、体重減少と有意な連鎖を示す QTL の存在を認め、当研究室では QTL 法を用いて、その近傍に原因候補遺伝子として、kynurenine aminotransferase 1 (KAT-1) 遺伝子を同定した。

KAT-1 遺伝子は、456 アミノ酸よりなる蛋白質をコードし、その mRNA は神経や腎臓、脂肪組織などに幅広く発現し、トリプトファンの代謝産物であるキヌレニンを経由してキヌレン酸に変換する酵素として知られている。また、キヌレン酸はグルタミン酸などの興奮性アミノ酸の内因性拮抗物質として、興奮性アミノ酸受容体、特にグルタミン酸の NMDA 受容体等を介して神経保護的に働くものと考えられている。さらに、SHR の脳や、延髄、腎臓では、正常血圧コントロールである WKY に比べ、KAT-1 活性が有意に低下していること、免疫組織染色で KAT-1 が延髄の腹外側核などの血圧関連部位で発現していることなどより、KAT-1 遺伝子が SHR の高血圧原因候補遺伝子として、注目されてきた。本研究室では、これまでに、Glu61Gly ミスセンス変異を同定した。

一方、血圧調節領域である延髄吻側腹外側野 (rostral ventrolateral medulla :RVLM) では、グルタミン酸に代表される興奮性アミノ酸が作用し、血圧や心拍数を低下することが報告されている。本研究室では、KAT-1 アデノウイルスベクターを用い、SHR の RVLM に microinjection し、コントロールである LacZ に比べ、KAT-1 導入 SHR では、血圧も心拍数も有意に低下し、交感神経活動のマーカである 24 時間尿中カテコラミン分泌が有意に低下したことを示した。逆に、KAT-1 を knockdown

する siRNA アデノウィルスベクターを RVLM に選択的に導入した WKY では、血圧と心拍数が有意に上昇し、24 時間尿中カテコラミン分泌の有意な増加したことにより、鏡像関係的にあることを確認した。

本研究では、KAT-1 の果たす役割を明らかにするため、ジーンターゲティング法を用い、KAT-1 ノックアウトマウスを作製、樹立した。野生型 (WT)、Hetero、Homo マウスがほぼ通常の割合 (1 : 2 : 1) で生まれ、これらのマウスの各組織において、northern-blot 解析や real-time PCR 解析による mRNA レベルの解析でも、western-blot 解析による蛋白質レベルの解析でも、KAT-1 の mRNA と蛋白質の発現は、Homo マウスで消失していることを確認した。

表現型の解析は現段階でまだバッククロスが終了していない hybridbackground の F3 を用い行った。tail-cuff 法とテレメトリー法により、血圧と脈拍を測定した。tail-cuff 法にて 12 週齢の雄のマウスを用い、血圧と心拍数を評価した。KAT-1 ノックアウトマウスは WT マウスに比べ、普通食下において収縮期血圧 (SBP) が有意な上昇を示した ($p < 0.0001$)。雌のマウスにおいても、普通食下において Homo マウスは WT マウスに比べ、収縮期血圧が有意な上昇を示した ($p < 0.0001$)。また、tail-cuff 法にて 6 週齢から血圧と心拍数の経時変化を評価した。普通食下における Homo マウスは WT マウスに比べ、収縮期血圧が雄のマウスにおいて 7 週齢から、雌のマウスにおいて 8 週齢から有意な上昇を示した。

さらに、8 週齢の雄マウスを用い、テレメトリー法による血圧と心拍数、および活動度を無拘束状態で連続監視した。WT マウスに比べ、Homo マウスは収縮期血圧の平均が約 20mmHg 高く、拡張期血圧の平均が約 15mmHg 高く、心拍数の平均が約 100bpm 多いことが確認された。

次に、12週齢の雄のマウスを用い、血糖値とインスリン感受性について検討した。普通食において Homo マウスは WT マウスに比べ、有意な血糖値の上昇 ($p < 0.05$) を示した。一方、インスリン感受性に関しては、4時間絶食後、普通食下での ITT を行い、Homo マウスは WT マウスに比べ、いずれの時点でも血糖値が高く、KAT-1 ノックアウトマウスではインスリン抵抗性が存在する可能性が示唆された。

また、12週齢の雄マウスを用い、24時間尿蛋白を評価した。普通食下において Homo マウスは WT マウスに比べ、尿中蛋白の有意な増加を示した ($p < 0.02$)。8週齢の雄マウスを用い、12週間高塩食下において、24時間尿カテコラミンを調べ、雄、雌の両方において、WT マウスに比べ、Homo マウスでは尿中アドレナリン、ノルアドレナリンおよびドパミンが高い傾向が見られ、KAT-1 ノックアウトマウスの交感神経活動が亢進している可能性が示唆された。

さらに、高塩食、高脂肪食負荷はKAT-1ノックアウトマウスに与える影響についても検討した。12週間高塩食下でtail-cuff法にて血圧、心拍数を測定した。雄と雌の両方において、高塩食負荷により、3群のマウスの血圧がすべて上昇したが、Homoマウスの血圧が最も高いことが確認された。また、テレミトリー法にて高塩食下ではWTマウスに比べ、Homoマウスは収縮期平均血圧で約30 mmHg高いことが確認できた。同時にマウスの活動度も評価したが、HomoマウスはWTマウスに比べ、普通食下でも、高塩食下でも共に活動度が高いことが判明した。

一方、雄のマウスを用い、12週間高脂肪食下で tail-cuff 法にて血圧、心拍数を測定し、雄と雌の両方において、3群とも血圧が上昇したが、Homo マウスの収縮期血圧が最も高いことが確認された。

12週間高脂肪食下で体重と組織重量、糖・脂質も評価した。高脂肪食

下により、3群ともで脂肪組織重量が有意に増加した。Homoマウスの脂肪組織重量の増加はWTマウスに比べて軽度となる傾向が認められ、KAT-1の欠損が肥満の発症を抑制的に働く可能性が示唆された。

さらに、KAT-1のヒト相同遺伝子CCBL1は9番染色体の長腕（9q34）に存在しており、この領域は高血圧や2型糖尿病、内臓肥満と連鎖することが報告されており、ヒトにおいても、CCBL1の異常が高血圧、糖尿病、肥満の原因の一部となっている可能性が考えられる。

以上より、現時点において hybrid background の段階で、KAT-1 ノックアウトマウスでは、1) 血圧の上昇、2) 血糖値の上昇、インスリン抵抗性の亢進、3) 尿蛋白の増加、4) 高塩食負荷における血圧の更なる上昇、カテコラミン分泌の亢進、5) 高脂肪食負荷において、血圧の更なる上昇、脂肪組織重量の低下、血糖値の更なる上昇、総コレステロール値の上昇抑制が認められた。今後、戻し交配を終了してから、上記表現型を再確認する予定である。

また、血圧、糖・脂質代謝、肥満に与える影響を明らかにするため、各肥満モデルマウス、動脈硬化モデル動物であるLDL受容体ノックアウトマウス、あるいはアポEノックアウトマウスとの交配による解析、アデノウイルスを用いたレスキュー実験、ヒトにおける解析等をさらに進めていく予定である。