

ヒトレニン, ヒトアンギオテンシノーゲン両遺伝子を導入した高血圧モデルマウスの作成ならびに 血圧上昇機序の解析

杉村 圭一

近畿大学医学部第1内科学教室

Generation and analysis of hypertensive transgenic mice carrying both human renin and human angiotensinogen genes

Keiichi Sugimura

First Department of Internal Medicine, Kinki University School of Medicine, Osaka, Japan

ABSTRACT

The renin-angiotensin system (RAS) plays an important role in the regulation of blood pressure, and in the maintenance of electrolyte balance and fluid volume homeostasis. The RAS components include the enzyme renin, its substrate angiotensinogen, and angiotensin converting enzyme (ACE), but the participation of this system in the etiology of human essential hypertension remains unclear. Recently transgenic animals have been instrumental in providing new insights into a variety of cellular processes and biological actions as caused by the introduced genes of interest. In order to assess the functional role of the native human RAS in the development of high blood pressure, we have generated transgenic mice lines harbouring both human renin and human angiotensinogen genes by cross-mating separate lines of transgenic mice carrying either gene. Mice carrying either gene alone did not develop hypertension despite of the observed normal tissue-specific expression of the transgenes. However, strains carrying both genes exhibited a chronically sustained high blood pressure. Administration of a human renin-specific inhibitor (ES-8891) reduced effectively the elevated blood pressure only against the strains carrying both genes, but treatment of an angiotensin converting enzyme inhibitor (Captopril) and a selective antagonist directed at the angiotensin II receptor (DuP 753) reduced blood pressure not only in the dual gene carrier but also in each single gene carriers and wild type mice. These findings indicate that the development of high blood pressure observed in the transgenic mice lines which carry both human renin and angiotensinogen genes was initiated by the interaction between the products of two human genes.

Key words : Renin-angiotensin system, Hypertension, Transgenic mice

緒 言

近年、分子遺伝学の進歩に伴い、ヒト遺伝子およびマウス遺伝子に関する広範な解析がなされ、それぞれ数千にもおよぶ遺伝子が同定されている。その結果、ヒトとマウスの間には染色体上の遺伝子配列にかなりの相同性 (synteny homology) があることが判明した。この事実は、種差という問題を考慮すべきはもちろんであるが、ヒトの病因遺伝子に対応するマウスの遺伝子はヒトと相同の疾患形質を表現するという可能性を示唆している。言い換えれば、ヒトの病因遺伝子はマウス生体内でも機能し、マウスに対してヒトと同様の生理的変化を及ぼすると推測される。

最近、遺伝子導入法とよばれる新たな技術が開発され、特定の遺伝子を人為的に実験動物に導入することが可能になった^{1,2}。この手法を用い、ある疾患に関与していると考えられる因子を遺伝子レベルでマウスに導入することにより、遺伝子モデル動物とでもいふべき疾患モデルマウスが開発できるならば、従来不明であったその因子 (ならびに疾患) に関する多くの情報をうることができると考えられる。

ヒトの本態性高血圧症は多因子疾患と考えられているが、その中でもレニン-アンギオテンシン系 (RA 系) の関与は、組織 RA 系という概念の確立とともに再び注目されている。RA 系はその最終生理活性物質であるアンギオテンシン II を介して血圧の調節および体液中の電解質バランスの維持に重要な役割を果たしていると考えられているが、その異常とヒト本態性高血圧症発症との関係についてはいまだ不明な点が多い。

本研究では、ヒトにおける RA 系、特に組織 RA 系の動態異常と本態性高血圧症発症との関連メカニズムをより詳細に探求するための有効な手段となりうるモデル動物の開発を目的とし、Fukamizu ら^{3,4} により作成されたヒトレニン遺伝子導入マウス、ヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子導入マウスの 2 系統のトランスジェ

ニックマウスを用い、これらを交配させることにより、ヒト RA 系が遺伝子レベルで導入されたトランスジェニックマウスの作成を試み成功した。さらに、同マウスにおいて RA 系阻害剤を用いて導入遺伝子発現と生理的変化 (血圧上昇) との因果関係を薬理的に検討したので報告する。

方 法

1. ヒトレニンおよびヒトアンギオテンシノーゲン両遺伝子導入マウスの作成。

DNA マイクロインジェクション法により作成されたヒトレニン遺伝子導入マウス³ と、ヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子導入マウス⁴ の 2 系統のトランスジェニックマウスを互いに自然交配させ、両遺伝子が同時に導入されたトランスジェニックマウスを作成した。

1.1. 導入遺伝子の構造ならびに遺伝子導入法の概略

ヒトレニン、もしくはヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子単独導入マウスにおいて、導入したそれぞれの遺伝子の構造ならびに DNA 注入法の概要を Figure 1 および 2 に示す。

1.1.1. ヒトレニン遺伝子導入マウス

上流 3 kb の内在性プロモーター領域を含む全長 15 kb のヒトレニン遺伝子⁵ (Fig. 1a) を調整し、これをマイクロマンニピレーターを用いて通常 B6 系マウスの受精卵雄性前核に注入した。この受精卵を体外培養したのち、精管結紮した同種の雄マウスと交配させ偽妊娠状態にした雌 B6 系マウス (仮親) の輸卵管内に移植した。その後、仮親の子宮内で個体まで発生させた。

1.1.2. ヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子導入マウス

上流 1.3 kb の内在性プロモーター領域を含む全長 14 kb のヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子⁶ (Fig. 1b) を調整し、これを上と同じ方法で B6 系マウスに導入した。

1.2. 遺伝子導入の検定

マウスに目的の遺伝子が実際に導入されてい

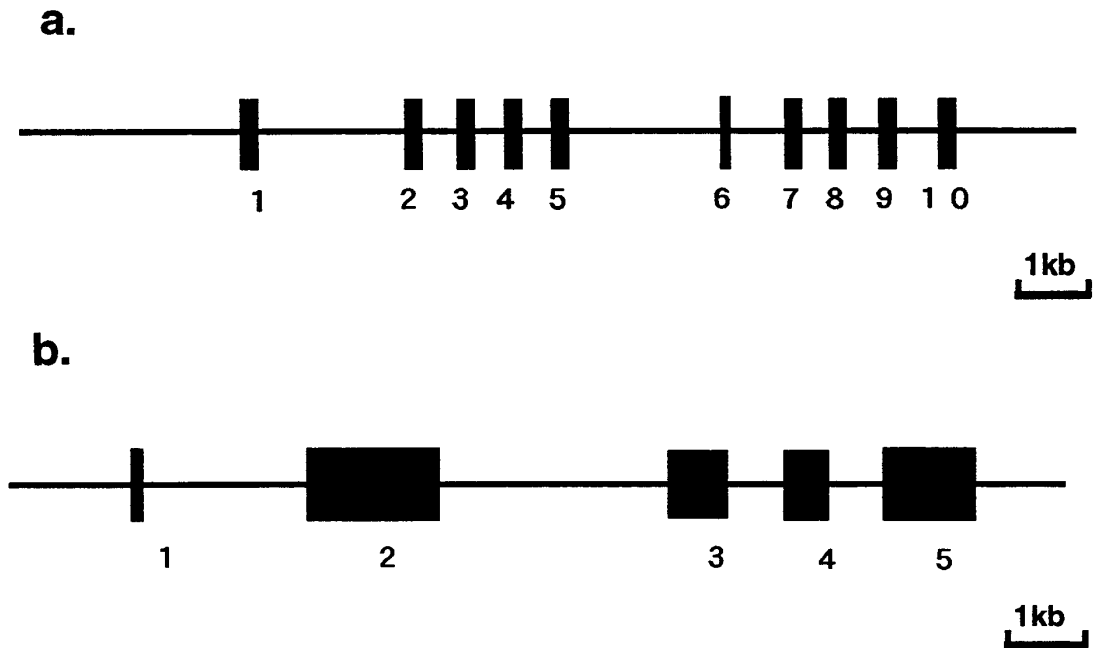


Fig. 1 Structures of the human renin and human angiotensinogen genes. a; Structure of the human renin gene. The 15kb fragment shown was used for microinjection. b; Structure of the human angiotensinogen gene. The 14kb fragment shown was used for microinjection. Locations of exons of each human gene are indicated by numbered solid bars.

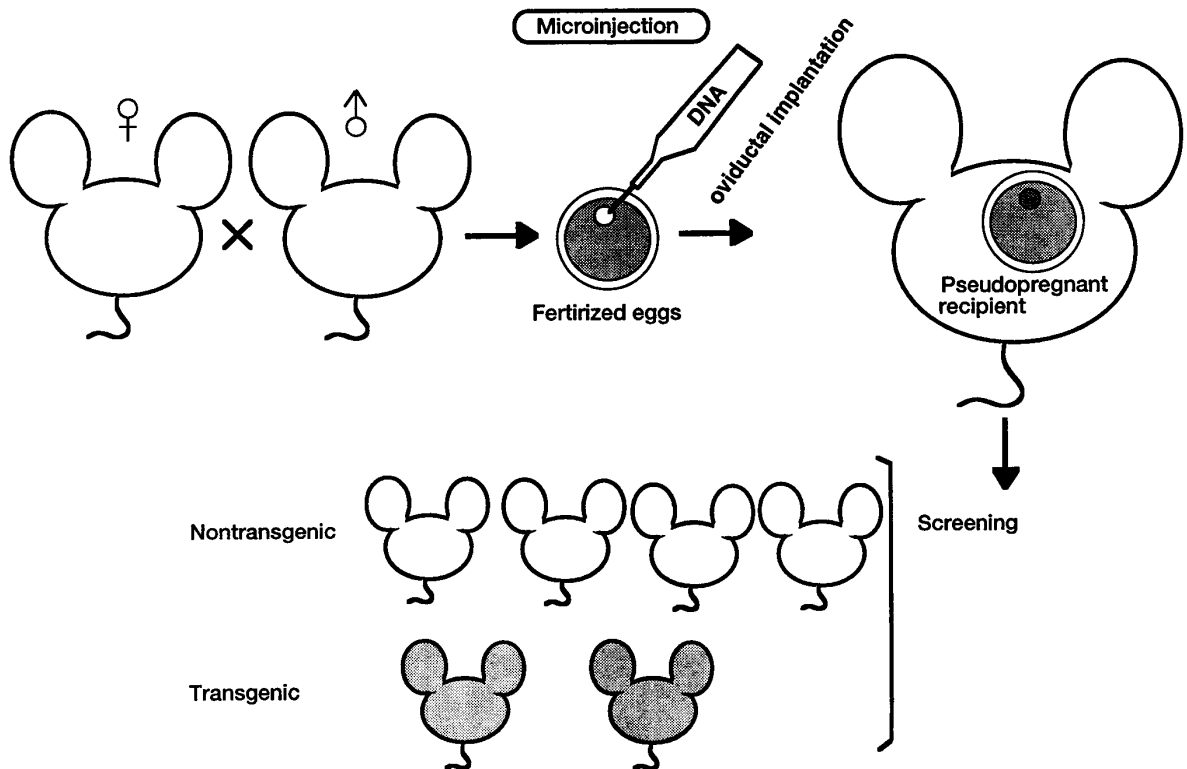


Fig. 2 Generation of transgenic mice by microinjection of genes into the fertilized eggs. Purified DNA fragments are microinjected into the pronucleus of 1-cell embryos. Embryos are transferred to the reproductive tract of a pseudopregnant recipient, where they develop to term. Then the initial screening is carried out by Southern blot analysis or polymerase chain reaction using specific probes or primers for examining the integration of microinjected transgene into mouse genome.

るかどうかを確かめるため、2系統のトランスジェニックマウスの交配により生まれた仔マウスの尻尾を一部切断し、そこからDNAを抽出してサザンブロッティング法⁷または polymerase chain reaction (PCR) 法⁸を用いて検定を行った。

1.2.1. ヒトレニン遺伝子

a. サザンブロッティング法

抽出したマウス DNA を制限酵素 EcoR I にて処理したのち、0.7% アガロースゲル上で泳動し、DNA 吸着膜 (Gene Screen Plus; DuPont, Boston, MA, U.S.A) に吸着させてプローブとのハイブリダイゼーションを行った。実際の反応は 1 M NaCl/10% dextran sulfate/1% sodium dodecyl sulfate (SDS) の条件下で 60°C, 16時間行ったのち、DNA 吸着膜を 2×standard saline citrate (SSC)/1% SDS, 65°C で 1時間 (1×SSC=0.15 M NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7.0), 0.1×SSC, 室温で 1時間 washing したものを乾燥させ、autoradiography を -70°C の条件下にて行った。用いた DNA プローブは、ヒトレニン遺伝子が組み込まれたプラスミド pHrn321⁹ を RsaI-EcoR I で制限酵素消化した 443 bp の DNA 断片に、[α -³²P] deoxycytidine triphosphate (dCTP) (3,000 Ci/mmol, Amersham, U.K.) をランダムプライマー法でラベルしたものを使用した。

b. PCR 法

ヒトレニン遺伝子 exon 10 の中に、両 primer 間の長さが 297 bp となるように sense primer, antisense primer をそれぞれ設定し、抽出したマウス DNA を鋳型にして PCR を行った。実際の反応は、Taq polymerase (Ampli Taq; Perkin Elmer Cetus, U.S.A.) 0.5 U/100 μ l の存在下で、denature 反応が 94°C, 1分, annealing 反応が 60°C, 2分, 伸長反応が 72°C, 1分で、合計30サイクル行った。

1.2.2. ヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子

a. サザンブロッティング法

抽出したマウス DNA を制限酵素 BamH I

にて処理したのち、ヒトレニン遺伝子の場合と同様の条件下で反応を行った。使用した DNA プローブは、ヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子が組み込まれたプラスミド pHag3¹⁰ を制限酵素 BstE II で処理した 1,262 bp の DNA 断片に、ヒトレニン遺伝子の場合と同様、[α -³²P] dCTP をランダムプライマー法でラベルしたものをを用いた。

b. PCR 法

ヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子 exon 5 の中に両 primer 間の長さが 365 bp となるように sense primer, antisense primer をそれぞれ設定し、ヒトレニン遺伝子の場合と同じ条件下で PCR を行った。

2. 血圧測定

マウスの収縮期血圧は PS-200 自動血圧測定器 (理研開発) を用い、Tail Cuff 法で測定した。1匹につき10回の測定を行い、その平均値を算出して血圧値とした。測定対象はヒトレニン遺伝子導入マウス、ヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子導入マウスおよび通常マウスは生後 6カ月齢のものを、ヒトレニン、ヒトアンギオテンシノーゲン両遺伝子導入マウスは生後 3 から 6カ月齢のものをもちいた。

3. マウス血中ヒトレニン、ヒトアンギオテンシノーゲン、アンギオテンシン I、アンギオテンシン II 濃度の測定

トランスジェニックマウスおよび通常マウスより採取した血液は、EDTA を添加した微量遠心チューブ (あらかじめ氷冷している) に入れ、すみやかに遠心、血漿分画を分離したのち、-70°C で保存した。血中ヒトレニン濃度はモノクローナル抗体をもちいた高感度なアッセイキット^{11,12} (Diagnostics Pasteur, 92430 Marnes La Coquette, France) を使って測定した。血漿中のレニン活性はアンギオテンシン I をラジオイムノアッセイにより経時的に測定し、アンギオテンシン I 合成速度を算出することにより求めた^{14,15}。血中ヒトアンギオテンシノーゲン濃度は、過剰の組み換え型ヒトレニンと標本とを反応させ、ラジオイムノアッセイを

用いて生成されたアンギオテンシン I を測定し求めた。血中アンギオテンシン I 濃度は抗アンギオテンシン I 抗体を用いてラジオイムノアッセイにて測定した。血中アンギオテンシン II 濃度は抗アンギオテンシン II 抗体¹⁶を用いてラジオイムノアッセイにて測定した。

4. 薬剤投与

Captopril¹⁷ (アンギオテンシン変換酵素阻害剤; 三共), DuP 753¹⁸ (アンギオテンシン II 拮抗剤; DuPont), ES-8891^{19,20} (ヒトレニン特異的阻害剤) は, それぞれ 500 mg/kg/day, 40 mg/kg/day, 80 mg/kg/day の濃度で給水ビンより経口投与 (24時間) した。

5. 統計学的処理

成績は平均値±標準偏差で示した。有意差検定は Student's t test で求め, $p < 0.05$ をもって有意とした。

結 果

1. トランスジェニックマウスの作成状況

ヒトレニン遺伝子導入マウスの系統 (hRN-8-12) より雄マウスを一匹 (hRN8-12-6L), ヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子導入マウスの系統 (hAG3-2, hAG2-5) より雌マウスを二匹 (hAG3-2-8L, hAG2-5-27L) 選び出し, 交配を行った。ただしヒトレニン遺伝子導入マウスにおいては同一系統内の交配により導入遺伝子が両接合子に挿入された (homozygote) 個体を採用しているが, ヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子導入マウスにおいては hAG3-2, hAG2-5 共, 導入遺伝子は一方の接合子にしか挿入されていない (heterozygote)。したがって, Mendel の法則により, 生まれた仔マウスのすべてにヒトレニン遺伝子が, 約50%にヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子がそれぞれ heterozygote に導入されていた。家系図, およびサザ

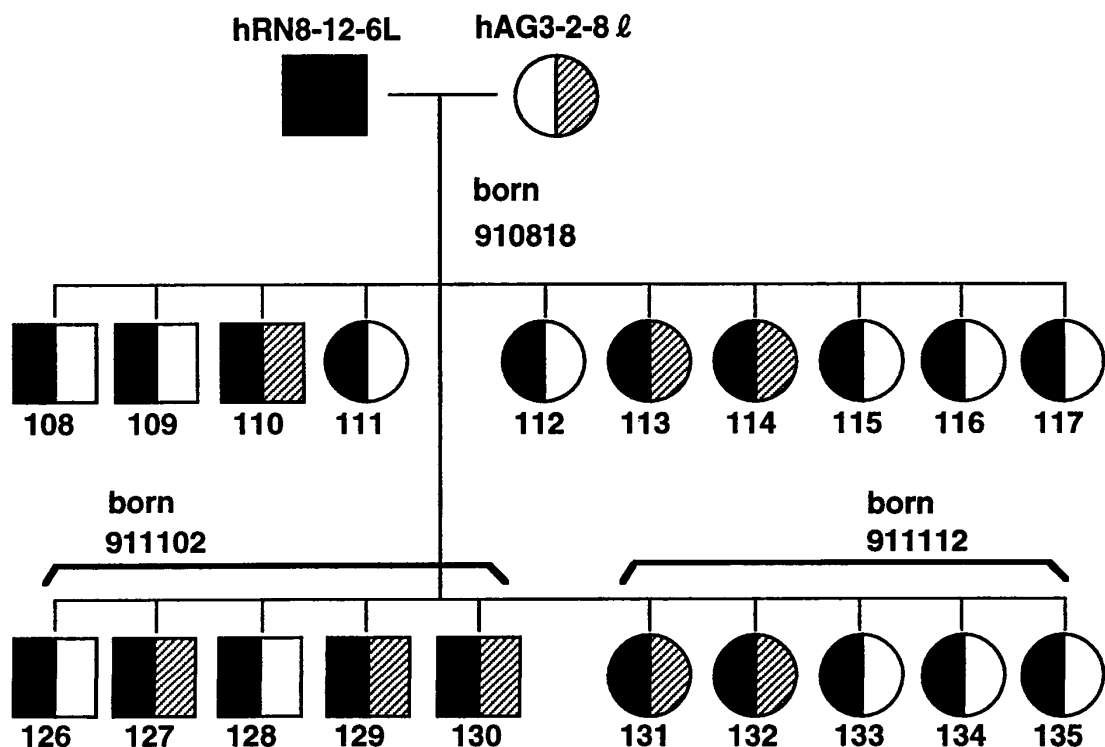


Fig. 3 Pedigree chart of the mice harbouring both human renin and human angiotensinogen genes.

□; male, ○; female, ■○; harbouring human renin gene, ■; harbouring human renin gene in homozygote fashion, ⊙; harbouring human angiotensinogen gene, ⊚; harbouring both genes.

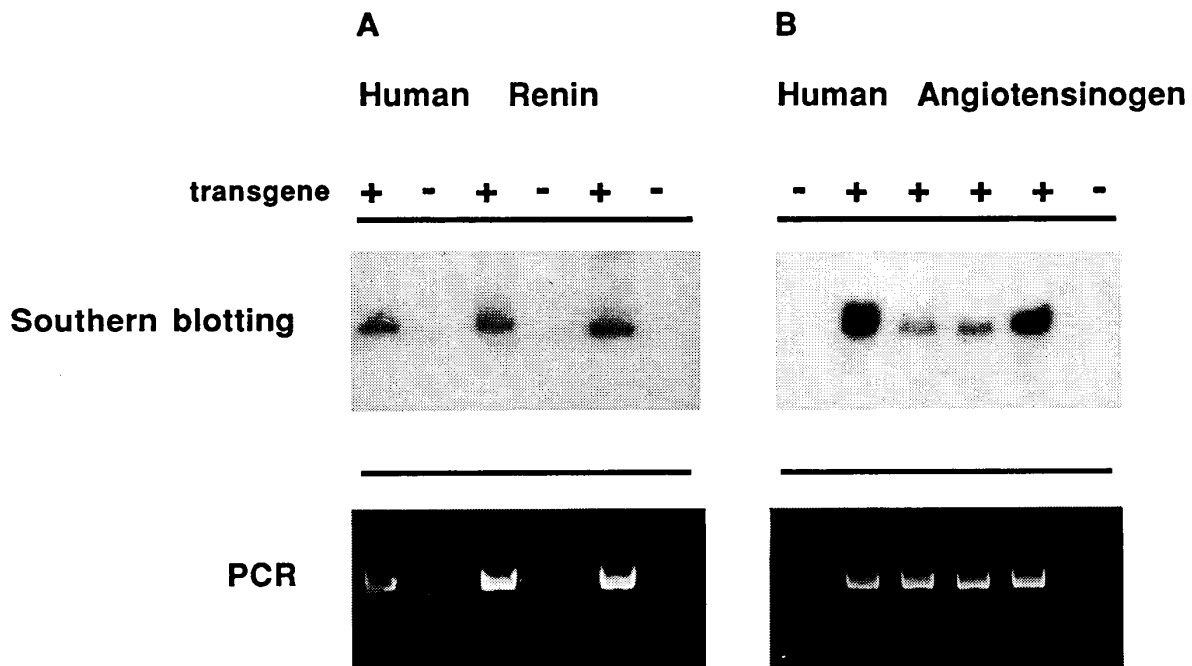


Fig. 4 The results from the PCR and Southern blot analysis, using the same genomic DNA samples from nontransgenic (-) and transgenic mice (+) carrying either the human renin or human angiotensinogen gene or both genes.

Table 1 Arterial blood pressure in transgenic mice

	n	Systolic blood pressure (mmHg)
R/A	8	130±7*
R/-	4	97±7
-/A	4	98±5
-/-	7	97±7

R/A: Transgenic mice harbouring both human renin gene and human angiotensinogen gene (3 from 6 months old)

R/-: Transgenic mice harbouring human renin gene (6 months old)

-/A: Transgenic mice harbouring human angiotensinogen gene (6 months old)

-/-: Wild type mice (6 months old)

Values of blood pressure are means±SD

n: total number of mice

*p<0.01 vs. other groups of siblings

ンブロッティング法, PCR 法による検定結果の一部を Figure 3, および 4 に示す.

2. 血圧変化

ヒトレニン, ヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子導入マウス (R/A), ヒトレニン遺伝子導入マウス (R/-), ヒトアンギオテンシノーゲ

ン遺伝子導入マウス (-/A), および通常マウス (-/-) の収縮期血圧を Table 1 に示した. ヒトレニン遺伝子, 又はヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子単独導入マウスでは通常マウスと比較して有意な血圧の変化は認められなかった. しかしながら両遺伝子が同時に導入されたマウス (R/A) においては有意な血圧上昇が観察された ($p<0.01$).

3. マウス血中ヒトレニン, ヒトアンギオテンシノーゲン, アンギオテンシン I, アンギオテンシン II 濃度

Table 2 に示すように, ヒトレニン濃度はヒトレニン遺伝子単独導入マウス, 両遺伝子導入マウスで高濃度で検出された. 特に前者では正常のヒトにおけるそれ (44 ± 18 pg/ml) の34倍の濃度であった. 他の2群においては検出されなかった. ヒトアンギオテンシノーゲン濃度は, ヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子単独導入マウス, 両遺伝子導入マウスで, 正常のヒトにおける濃度の8.3から18倍の濃度で検出され, 他の2群では検出されなかった. 血中アンギオテンシン I, アンギオテンシン II 濃度は両遺伝

Table 2 Human renin, human angiotensinogen, angiotensin I and angiotensin II in transgenic mouse plasma

	hRN (ng/ml)	hAG (ng/ml)	A I (ng/ml)	A II (pg/ml)
R/A	0.54±0.04	0.50±0.06	9.13±0.53	227.9±22.0
R/-	1.23±0.07	—	2.66±0.81	85.2±7.86
-/A	—	1.09±0.31	3.41±0.35	64.3±14.0
-/-	—	—	2.73±0.71	47.7±15.3

R/A: Transgenic mice harbouring both human renin gene and human angiotensinogen gene (4 from 7 months old n=4)

R/-: Transgenic mice harbouring human renin gene (7 months old n=3)

-/A: Transgenic mice harbouring human angiotensinogen gene (7 months old n=3)

-/-: Wild type mice (7 months old n=4)

All values are means±SD

hRN: human renin

hAG: human angiotensinogen

A I : angiotensin I

A II : angiotensin II

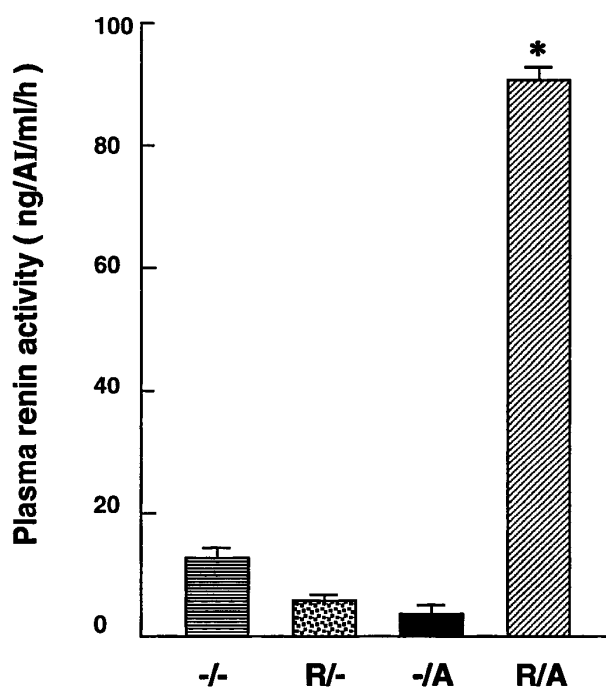


Fig. 5 Plasma renin activity assay in transgenic and nontransgenic mice. R/A; transgenic mice carrying both human renin and human angiotensinogen genes (4 from 7 months old), R/-; transgenic mice carrying human renin gene alone (7 months old), -/A; transgenic mice carrying human angiotensinogen gene alone (7 months old), -/-; wild type mice (7 months old). Values represent the means and standard errors of three male mice chosen for each determination. *, $P < 0.01$ vs other groups of siblings.

子導入マウスで他の群より有意に高く（約3から5倍）検出された。

血中レニン活性は両遺伝子導入マウスで他の群よりも有意に高かった ($p < 0.01$) (Fig. 5).

4. 薬剤投与

4.1. Captopril (アンギオテンシン変換酵素阻害剤)

Captopril 投与後、ヒトレニン、ヒトアンギオテンシノーゲン両遺伝子導入マウスの血圧はすみやかに正常化し、投与中止後再上昇した。またコントロール群（ヒトレニン遺伝子、ヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子単独導入マウス、および通常マウス）にも若干の血圧低下が認められた (Fig. 6).

4.2. DuP 753 (非ペプチド性アンギオテンシンII受容体拮抗剤)

本薬剤投与では Captopril 投与時とほぼ同様の変化が認められた (Fig. 7).

4.3. ES-8891 (ヒトレニン特異的阻害剤)

ES-8891 投与では両遺伝子導入マウスにのみ有意な血圧の低下があったがコントロール群においては認められなかった (Fig. 8).

なお、これら3種の薬剤投与において、各系統のマウスにおける有意な心拍数の変化は認められなかった。

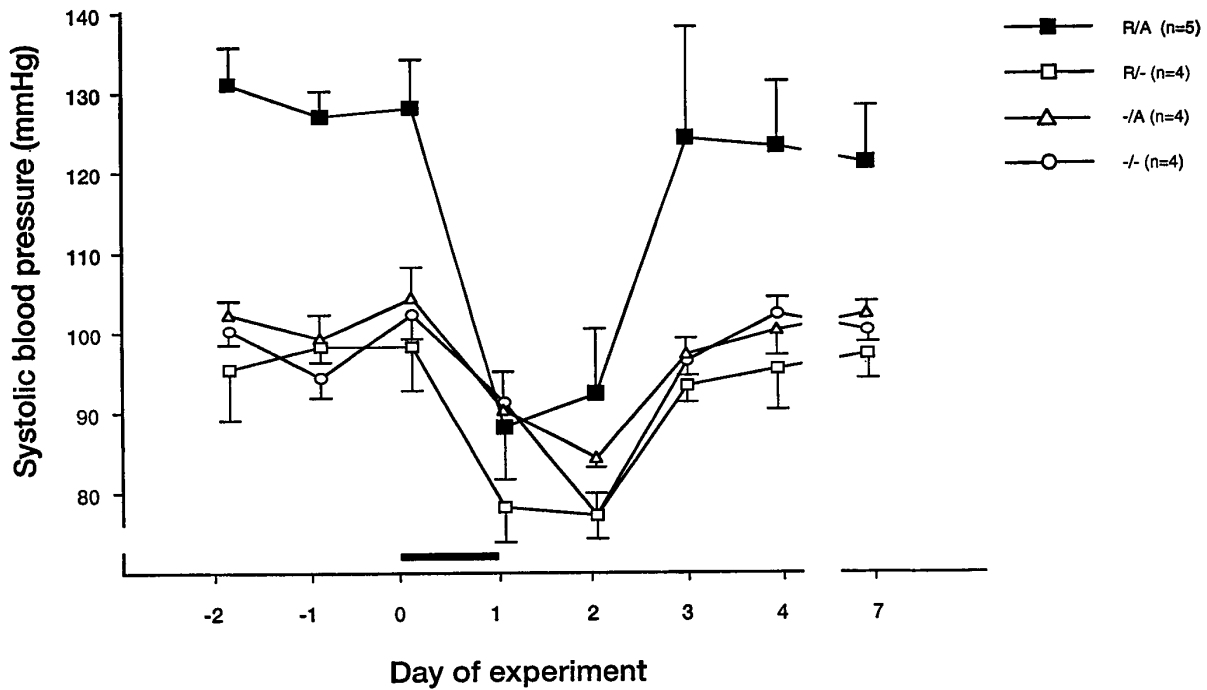


Fig. 6 Effects of Captopril (angiotensin converting enzyme inhibitor) on systolic blood pressure in three lines of transgenic mice and wild type mice. R/A; transgenic mice carrying both human renin and human angiotensinogen genes (3 from 6 months old), R/-; transgenic mice carrying human renin gene alone (6 months old), -/A; transgenic mice carrying human angiotensinogen gene alone (6 months old), -/-; wild type mice (6 months old). n; number of mice studied in each group. The duration of the treatment (Captopril; 500mg/kg/day) is indicated by the horizontal bar from day 0 to day 1. Values represent the means \pm SD.

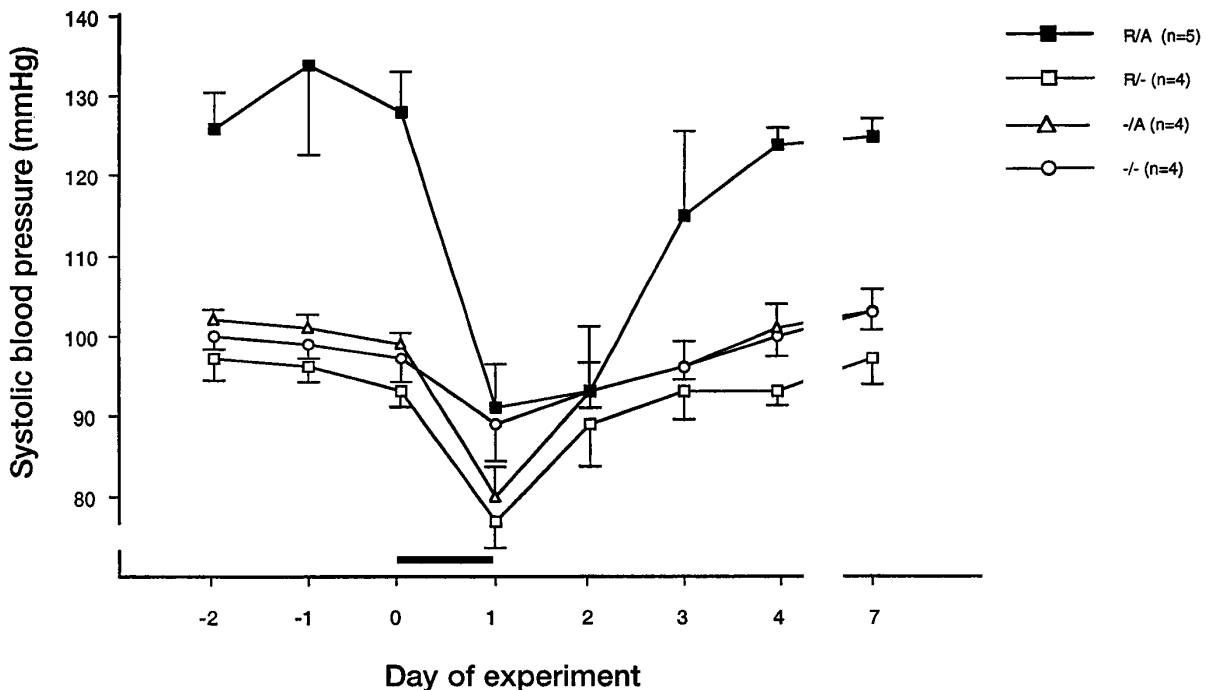


Fig. 7 Effects of DuP 753 (selective antagonist for angiotensin II type I receptor) on systolic blood pressure in three lines of transgenic mice and wild type mice. R/A; transgenic mice carrying both human renin and human angiotensinogen genes (3 from 6 months old), R /-, -/A; transgenic mice carrying either gene alone (6 months old), -/-; wild type mice (6 months old). n; number of mice studied in each group. The duration of the treatment (DuP 753; 40mg/kg/day) is indicated by the horizontal bar from day 0 to day 1. Values represent the means \pm SD.

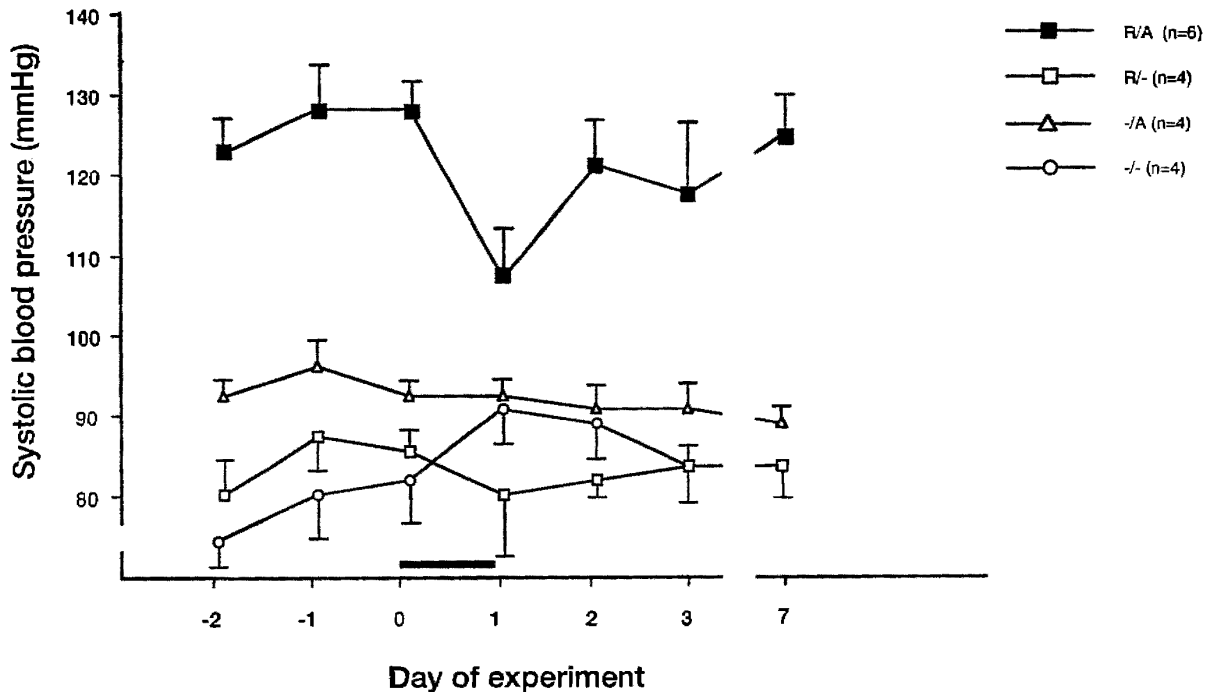


Fig. 8 Effects of BS-8891 (specific inhibitor for human renin) on systolic blood pressure in three lines of transgenic mice and wild type mice. R/A; transgenic mice carrying both human renin and human angiotensinogen genes (3 from 6 months old), R/-, -/A; transgenic mice carrying either gene alone (6 months old), -/-; wild type mice (6 months old). n; number of mice studied in each group. The duration of the treatment (ES-8891; 80mg/kg/day) is indicated by the horizontal bar from day 0 to day 1. Values represent the means \pm SD.

考 察

ヒトにおける本態性高血圧症の発症機転には、遺伝的素因のみならずその個人を取り巻くあらゆる環境的要因まで、多種多様な因子が関与しているといわれている。このような多因子疾患においては、その発症に深く関与していると考えられている因子の一つを遺伝子レベルで実験動物に導入し、その発現が個体に及ぼす生理学的、生化学的な変化を観察、検討することにより、その因子の生体内における役割がより明確にされるばかりではなく、同疾患の発症機序解明ならびに治療法の開発にも大きく貢献できると考えられる。

レニン-アンギオテンシン系 (RA 系) は、その動態異常がヒトの本態性高血圧症発症に深く関わっているということが古くから指摘されていたが、副腎、心臓、血管壁、脳などの局所におけるいわゆる組織 RA 系の役割や、カテコラ

ミンなど他の昇圧因子との関連などについて、いまだ不明な点が多い。緒言で述べたようにヒトレニン遺伝子またはヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子単独導入マウスは1991年、Fukami-zu ら^{3,4}により作成され、それぞれの導入遺伝子は一部を除いてヒトとほぼ同じ組織特異性を持って発現していることが確認されている^{21,22}。すなわち、両遺伝子固有の転写調節領域 (promotor region) はマウス生体内でもヒトの場合とほとんど同じように機能していると考えられる。にもかかわらず、これら2系統のトランスジェニックマウスの血圧は、野性型と比較して有意な変化は認められなかった。

レニン、アンギオテンシノーゲン間における酵素基質特異性は厳密なものであり、ヒトレニン遺伝子導入マウスにおいて、その導入遺伝子産物であるヒトレニンはマウス内在性のアンギオテンシノーゲンに対して作用せず、また同様にヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子導入マウ

スにおいてもその個体内で生産されたヒトアンギオテンシノーゲンはマウス内在性レニンによる影響をほとんど受けない。1992年、Fukami-zu ら²³は通常マウスおよびヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子導入マウスの肝臓抽出液を、それぞれ通常マウス又はヒトレニン遺伝子導入マウスの腎臓抽出液、組み替え型ヒトレニン又はマウス顎下腺レニンと共に反応させ、酵素—基質反応によるアンギオテンシン I 合成量をラジオイムノアッセイにより測定した結果を報告した。すなわち、ヒトレニン (=組み替え型ヒトレニンまたはヒトレニン遺伝子導入マウス腎臓抽出液) と共に反応を行った場合、ヒトアンギオテンシノーゲン (=ヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子導入マウス肝臓抽出液) と組み合わせた場合にのみアンギオテンシン I 過剰合成がおこり、ヒト—マウス間におけるレニン、アンギオテンシノーゲンの組み合わせではアンギ

オテンシン I の合成はほとんど認められなかった。この結果はレニン、アンギオテンシノーゲン間における種特異性の厳密さを証明するものであるといえる。したがってヒトレニン遺伝子導入マウスにおいて、その導入遺伝子産物であるヒトレニンはマウス内在性のアンギオテンシノーゲンに対して作用せず、また同様にヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子導入マウスにおいても、その個体内で産生されたヒトアンギオテンシノーゲンはマウス内在性レニンによる修飾をほとんど受けなかったものと考えられる。

しかしながら、もしトランスジェニックマウス中のヒトアンギオテンシノーゲンがなんらかの働きによりアンギオテンシン I に変換されたとすれば、それはマウス内在性のアンギオテンシン変換酵素により容易にアンギオテンシン II に変換され、更にマウス細胞膜上のアンギオテンシン II 受容体と結合し、その生理的活性を発

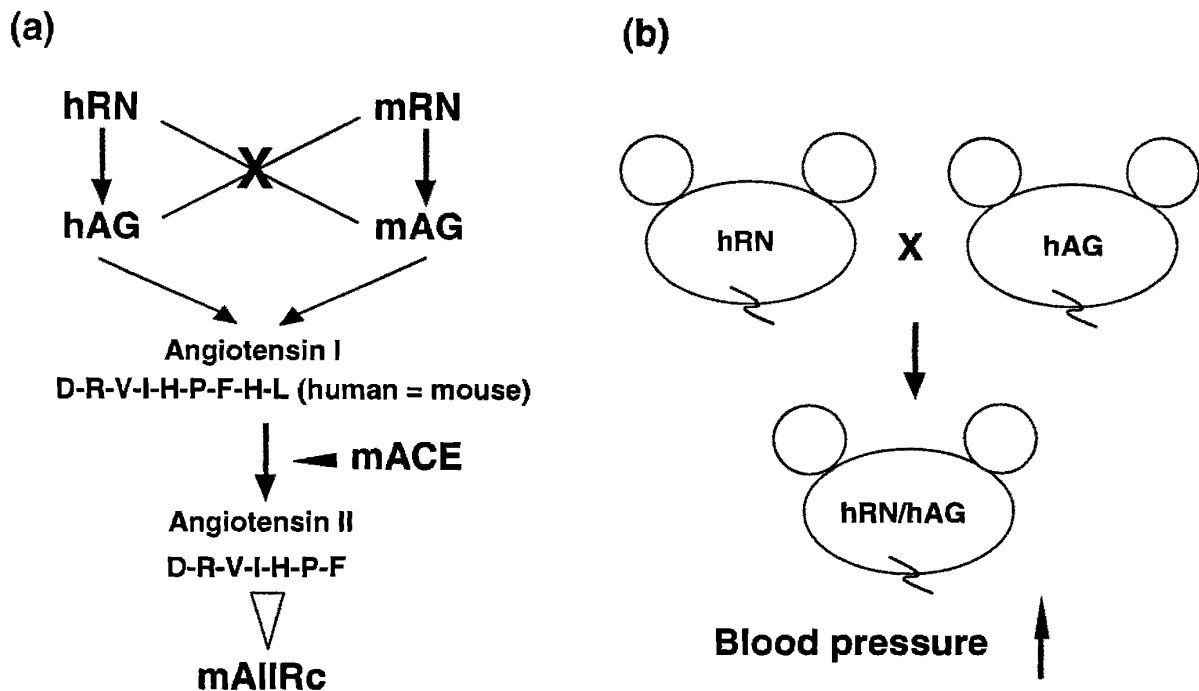


Fig. 9 Schematic representation of basic idea for generation of hypertensive mice carrying human renin-angiotensin system components. (a); Species specificity of renin-angiotensin system. Human renin does not cleave mouse angiotensinogen nor mouse renin cleave human angiotensinogen. The amino acid sequences of angiotensin I and angiotensin II are indicated by one letter. hRN; human renin, hAG; human angiotensinogen, mRN; mouse renin, mAG; mouse angiotensinogen, mACE; mouse angiotensin converting enzyme, mAII Rc; mouse angiotensin II receptor. (b); Hypertensive mice carrying both human renin and human angiotensinogen genes are produced by crossmating each single gene carrier.

揮しうるものと予測できる。なぜならばアンギオテンシン I に関してはヒトマウス間でそのアミノ酸配列に差はなく，マウス生体内では同一物質とみなされる筈だからである (Fig. 9a)。

このような考え方から，本研究では一方のトランスジェニックマウス (ヒトレニン遺伝子導入マウス) を酵素産生系，もう一方 (ヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子導入マウス) を基質供与系とみなして，これら両者をかけ合わせるにより双方の遺伝子を同時にあわせ持ったマウスの作成を企画した (Fig. 9b)。マウス個体内でヒトレニン，ヒトアンギオテンシノーゲンが同時に産生されるならば，基質であるヒト

アンギオテンシノーゲンは酵素ヒトレニンによりアンギオテンシン I に変換され，先に述べたような経過でマウス生体内で十分にその生理的活性を発揮しうるものと予測したからである。実際にヒトレニン，ヒトアンギオテンシノーゲン両遺伝子導入マウスにおいて収縮期血圧 120～140 mmHg 程度 (通常マウスでは 90～100 mmHg 程度) の有意な血圧上昇が認められた (Table 1)。また，両遺伝子導入マウスの血中アンギオテンシン I 濃度，アンギオテンシン II 濃度および血中レニン活性は，コントロール群に比較して有意な上昇が認められ (Fig. 5, Table 2)，先の予測を裏付けるものであった。

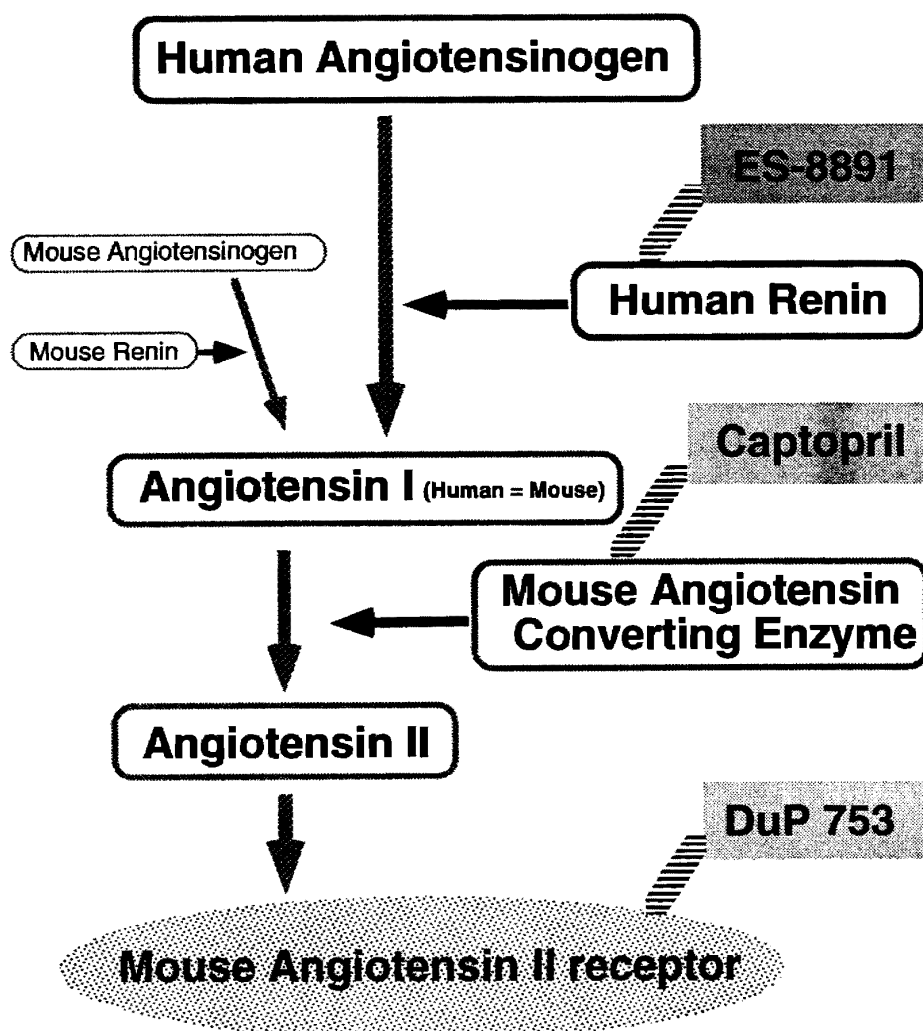


Fig. 10 Sites of intervention of three antihypertensive drugs on chimeric renin-angiotensin system in transgenic mice carrying both human renin and angiotensinogen genes. Sites of inhibition are indicated by thick zebra bars. Captopril; angiotensin converting enzyme inhibitor, DuP 753; selective antagonist for angiotensin II type I receptor, ES-8891; specific inhibitor for human renin.

次に、このマウスで認められた血圧の上昇が実際に導入遺伝子であるヒトレニンおよびヒトアンギオテンシノーゲンにより惹起されたものか否かを明確にするため、3種類のRA系阻害剤投与による血圧の変化を観察した。Captopril (アンギオテンシン変換酵素阻害剤)、DuP 753 (アンギオテンシンII受容体拮抗剤)の投与下でマウスの血圧はすみやかに正常化し、またコントロール群にも若干の血圧低下が認められた。しかしヒトレニン特異的な阻害剤であるES-8891の投与下では両遺伝子導入マウスにおいて明らかな血圧低下が見られたにもかかわらず、コントロール群の血圧に有意な変化は認められなかった。Captopril, DuP 753はそれぞれマウス内在性のアンギオテンシン変換酵素およびアンギオテンシンII受容体に対して作用するものであるからその効果はコントロール群においても認められる筈である。しかしES-8891の場合、マウス内在性のレニンにはほとんど影響せず、ヒトレニンのみを標的とするため、その降圧効果は導入遺伝子であるヒトレニン(およびヒトアンギオテンシノーゲン)の発現により血圧上昇をきたしている両遺伝子導入マウスにおいてのみ現われたものと考えてよいであろう (Fig. 10)。

一般にマウスに外来遺伝子を導入した場合、その挿入箇所によってはマウス内在性のある遺伝子の発現を妨げてしまう可能性が指摘されている²⁴。しかし本研究におけるモデルの場合、正常血圧である2系統のトランスジェニックマウス同士をかけあわせることにより作り出されたのであるから、少なくとも導入した遺伝子によってマウス内在性のなんらかの血圧制御因子の発現が妨害されたために血圧上昇がおこったという可能性は除去しうるものと思われる。

マウスまたはラットなどの実験動物に対し、RA系コンポーネントを遺伝子レベルで導入することにより、血圧上昇を含む生理的な変化や導入遺伝子の機能を調べる試みは本研究のほかにもいくつかのものが報告されている²⁶⁻³³。1990年、Mullinsら²⁶はラットにマウスの

Ren 2 遺伝子を導入し、収縮期血圧 200 mmHg 以上の高血圧を呈するモデル動物を作成した。また同年、Ohkuboら²⁷はラットレニン、ラットアンギオテンシノーゲン遺伝子をマウスに導入し、有意な血圧上昇が認められたことを報告した。特に前者では副腎、血管壁などにおける導入遺伝子の強い発現が観察されており^{34,35}、今まで不明であったマウス顎下腺レニンの役割が明らかになるとともに、これら臓器における組織レニン-アンギオテンシン系の高血圧発症機序に対する重要性が確認されたといえる。しかしながら、これら2者のモデル動物においては本研究におけるそのように導入遺伝子が生理的な発現状態を呈しておらず、また近似種(マウス-ラット)の遺伝子を導入しているため、たとえばヒトレニン特異的な阻害剤であるES-8891のような種特異的に作用する薬剤を使った血圧上昇機序の解析はなされていない。

これら遺伝子導入法による高血圧マウス(またはラット)は本研究のものも含めて、よく知られているところのOkamotoら²⁵による高血圧自然発症ラット(spontaneous hypertensive rat: SHR)などとは異なり、必ずしも本態性高血圧症の各要素を包括的に含むものではない。しかし既知の遺伝子を導入することにより惹起された高血圧であるから、少なくともその遺伝的背景(genetic background)については明らかであると考えられる。

本研究におけるトランスジェニックマウスは現段階ではその導入遺伝子がヒトレニン遺伝子、ヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子共、heterozygoteに挿入されている。したがって同系統内での交配では、えられた仔マウス全てに両遺伝子が導入されているのではなく、Mendelの法則により各遺伝子の導入率は50%になり、したがって両遺伝子が同時に導入された個体をうる確率は25%となる。また各個体に対して目的の遺伝子が導入されているかどうかを確かめるため、サザンブロッティング法、PCR法などによる検定が必要となる。将来的には

以上のような短所を補うため各導入遺伝子が homozygote に挿入されたいわゆる純系の確立が望ましいものと思われる。そのようなモデルにおいては同系統間の交配による目的遺伝子の導入率は100%となり、検定の必要もなく、研究に要する個体数の獲得は容易となる。更に導入遺伝子産物の産生が両遺伝子が heterozygote に挿入された個体に比してより亢進し、それとともに生理的変化(血圧上昇)がより著明になる可能性も考えられる。

以上、本研究ではヒトの RA 系コンポーネントを遺伝子レベルで導入することにより高血圧モデルマウスを作成した。その血圧上昇機序としては導入遺伝子の発現および相互作用によるマウス生体内における RA 系の亢進が主たる要因になっていると考えられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、絶えず懇切なご指導と御校閲を賜りました恩師香取瞭教授に深甚の謝意を捧げます。

また終始、御助言と御指導を頂いた堀内正嗣博士、濱純吉博士に対して心から感謝致します。

さらに筑波大学応用生物化学系村上研究室において本研究の御指導、御協力を賜りました村上和雄教授、深水昭吉博士および研究室の皆様、筑波大学動物実験センターの先生方に深謝の意を表します。

本論文の要旨は第30回日本臨床代謝学会(1993年4月, 大阪), 第15回近畿高血圧研究会(1993年7月, 大阪)で発表した。

文 献

- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980 ; 77 : 7380-7384.
- Gordon JW, Ruddle FH. Gene transfer into mouse embryos: production of transgenic mice by pronuclear injection. *Methods Enzymol* 1983 ; 101 : 411-413.
- Fukamizu A, Seo MS, Hatae T, Yokoyama M, Nomura T, Katsuki M, Murakami K. Tissue specific expression of the human renin gene in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1989 ; 165 : 826-832.
- Takahashi S, Fukamizu A, Hasegawa T, et al. Expression of the human angiotensinogen gene in transgenic mice and transfected cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 ; 180 : 1103-1109.
- Miyazaki H, Fukamizu A, Hirose S, et al. Structure of the human renin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; 81 : 5999-6003.
- Fukamizu A, Takahashi S, Seo MS, et al. Structure and Expression of the human angiotensinogen gene. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 7576-7582.
- Southern E. Detection on specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975 ; 98 : 503-517.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987 ; 155 : 335-350.
- Imai T, Miyazaki H, Hirose S, et al. Cloning and sequences analysis of cDNA for human renin precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983 ; 80 : 7405-7409.
- Kageyama R, Ohkubo H, Nakanishi S. Primary structure of human preangiotensinogen deduced from the cloned cDNA sequence. *Biochemistry* 1984 ; 23 : 3603-3609.
- Simon D, Badouaille G, Pau B, Guyenne TT, Corvol P, Menard J. Measurement of active renin by the 4G1 anti human renin monoclonal antibody. *Clin Exp Hypertens* 1987 ; A9 : 1333-1340.
- Dessi-Fulgheri P, Cocco F, Glorioso N, Babbiera F, Madeddu P, Rappelli A. Immunoradiometric assay of active renin in human plasma, comparison with plasma renin activity. *Clin Exp Hypertens* 1987 ; A9 : 1389-1390.
- Cornette JC, Evans DB, Forlong AM, Sharma SK. Renin activity determination using human plasma as a substrate. *Anal Biochem* 1987 ; 163 : 93-99.
- Hatae T, Takimoto E, Fukamizu A, Murakami K. Kinetic studies on recombinant human renin with recombinant human angiotensinogen cloned from chinese hamster ovalium cell. *Biomed Res* 1992 ; 13 : 381-383.
- Printz MP, Printz JM, Dworschack RT. Human angiotensinogen. *J Biol Chem* 1977 ; 252 : 1654-1662.

16. Kim S, Tokuyama M, Hosoi M, Yamamoto K, Adrenal and circulating renin angiotensin system in stroke prone hypertensive rats *Hypertension* 1992 ; 20 : 280-291.
17. Ondetti M, Cushman DW. Enzymes of the renin angiotensin system and their inhibitors. *Annu Rev Biochem* 1982 ; 51 : 283-308.
18. Rhaleb NE, Rouissi N, Nantel F, D'Orleans-Juste P, Regoli D. DuP 753 is a specific antagonist for the angiotensin receptor. *Hypertension* 1991 ; 17 : 480-484.
19. Kokubu T, Hiwada K, Murakami E, Muneta S, Kitami Y, Salmon PF. ES-8891, an orally active inhibitor of human renin. *Hypertension* 1990 ; 15 : 909-913.
20. Ii Y, Murakami E, Hiwada K. Effect of renin inhibitor, ES-8891, on renal renin secretion and storage in the marmoset : comparison with captopril. *J Hypertens* 1991 ; 9 : 1119-1125.
21. Seo MS, Fukamizu A, Nomura T, Yokoyama M, Katsuki M, Murakami K. The human renin gene in transgenic mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990 ; 16 (Suppl. 4) : S8-S10.
22. Fukamizu A, Uehara S, Sugimura K, et al. Cell type specific expression of the human renin gene. *J Biol Regl Homeost Agents* 1991 ; 5 : 112-116.
23. Fukamizu A, Takimoto E, Sugimura K, et al. Dependence of angiotensin production in transgenic mice carrying either the human renin or human angiotensinogen genes on species specific kinetics of the renin angiotensin system. *Drug Res* 1993 ; 43 : 222-225.
24. Jaenisch R. Transgenic animals. *Science* 1988 ; 240 : 1468-1474.
25. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963 ; 27 : 282-263.
26. Mullins, JJ, Peters J, Ganten D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren2 gene. *Nature* 1990 ; 344 : 541-544.
27. Ohkubo H, Kawakami H, Kakehi Y, et al. Generation of transgenic mice with elevated blood pressure by introduction of the rat renin and angiotensinogen genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 5153-5157.
28. Ganten D, Wagner J, Zeh K, et al. Species specificity of renin kinetics in transgenic rats harboring the human renin and angiotensinogen genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 7806-7810.
29. Kimura S, Mullins JJ, Bunnemann B, et al. High blood pressure in transgenic mice carrying the rat angiotensinogen gene. *EMBO J* 1992 ; 11 : 821-827.
30. Sigmund CD, Jones CA, Kane CM, Wu C, Lang JA, Gross KW. Regulated tissue and cell specific expression of human renin gene in transgenic mice. *Circ Res* 1992 ; 70 : 1070-1079.
31. Sigmund CD, Jones CA, Faian JR, Mullins JJ, Gross KW. Tissue and cell specific expression of a renin promotor reporter gene construct in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 ; 170 : 344-350.
32. Sigmund CD, Okuyama K, Ingelfinger J, et al. Isolation and characterization of renin expression cell lines from transgenic mice containing a renin promotor viral oncogene fusion construct. *J Biol Chem.* 1991 ; 265 : 19916-19922.
33. Sigmund CD, Jones CA, Jacob HJ, et al. Pathophysiology of vascular smooth muscle in renin promotor T antigen transgenic mice. *Am J Physiol* 1991 ; 260 : F249-F257.
34. Hilgers KF, Peters J, Veelken R, et al. Increased vascular angiotensinogen formation in female rats harboring the mouse Ren-2 gene. *Hypertension* 1992 ; 19 : 687-691.
35. Bader M, Zhao Y, Sander M, et al. Role of tissue renin in the pathophysiology of hypertension in TGR(mREN2) 27 rats. *Hypertension* 1992 ; 19 : 681-686.