

神戸学院大学大学院薬学研究科学位論文

キニノーゲンノックアウトマウスにおける
キニノーゲンの機能解析

2024年1月

大中 佑介

目次

略語一覧.....	4
1 序論.....	6
1.1. カリクレイン・キニン系と血圧.....	6
1.2. カリクレイン・キニン系と炎症.....	9
1.3. Kng の構造と機能.....	10
1.4 研究の概要.....	11
2 本論.....	13
2.1 キニノーゲン遺伝子改変マウスの作成.....	13
2.1.1 Kng1、Kng2 の mRNA 発現分布.....	14
2.1.1.1 方法.....	14
2.1.1.2 結果.....	16
2.1.1.3 考察.....	17
2.1.2 Kng 遺伝子改変マウスの作成.....	18
2.1.2.1 方法.....	18
2.1.2.2 結果.....	21
2.1.2.3 考察.....	22
2.1.3 BK ^{del} K1 マウスおよび BK ^{del} K2 マウスの Genotyping.....	23
2.1.3.1 方法.....	23
2.1.3.2 結果.....	24
2.1.3.3 考察.....	25
2.1.4 BK ^{del} K1 マウスおよび BK ^{del} K2 マウスの血漿キニノーゲン量.....	25
2.1.4.1 方法.....	26
2.1.4.2 結果.....	27
2.1.4.3 考察.....	28
2.1.5 血漿キニノーゲンのウェスタンブロッティング.....	29
2.1.5.1 方法.....	29
2.1.5.2 結果.....	31
2.1.5.3 考察.....	32

2.1.6	血液凝固能の解析	33
2.1.6.1	方法	33
2.1.6.2	結果	34
2.1.6.3	考察	35
2.2	BK ^{del} K1 マウスおよび BK ^{del} K2 マウスの表現系の解析	36
2.2.1	体重と臓器重量	37
2.2.1.1	方法	37
2.2.1.2	結果	38
2.2.1.3	考察	40
2.2.2	血圧および心拍数	41
2.2.2.1	方法	42
2.2.2.2	結果	43
2.2.2.3	考察	44
2.2.4	尿中イオン排泄と循環血漿量	45
2.2.4.1	方法	46
2.2.4.2	結果	47
2.2.4.3	考察	49
2.3	エンドトキシンショックにおける Kng 機能の検討	50
2.3.1	エンドトキシンショック反応性の解析	50
2.3.1.1	方法	51
2.3.1.2	結果	52
2.3.1.3	考察	53
2.3.2	エンドトキシンショックにおける血圧の解析	54
2.3.2.1	方法	54
2.3.2.2	結果	55
2.3.2.3	考察	56
3	総括	57
3.1	Kng の生理的血圧調節における役割	57
3.2	Kng のエンドトキシンショック病態における役割	59
4	謝辞	61
5	引用文献	62

略語一覽

APTT	activated partial thromboplastin time
BK	bradykinin
BN/Ka	Brown Norway Katholiek
BPB	bromophenol blue
BW	body weight
CD14	cluster of differentiation 14
cDNA	complementary DNA
CRISPR/Cas9	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9
DNA	deoxyribonucleic acid
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ES	embryonic stem
H-Kng	high molecular weight kininogen
HPRT	hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase
HRP	horseradish peroxidase
KO	knock out
LD ₅₀	lethal dose 50
L-Kng	low molecular weight kininogen
LPS	Lipopolysaccharide
MD-2	myeloid differentiation protein 2
NO	nitric oxide
ORF	open reading frame
PAGE	poly-acrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PLA ₂	phospholipase A ₂
PT	prothrombin time
PVDF	poly-vinylidene difluoride
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
SBP	systolic blood pressure
SDS	sodium dodecyl sulfate

TBS-T	tris buffered saline with Tween 20
TLR4	toll-like receptor 4
TNF α	tumor necrosis factor
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
WT	wild type

1 序論

1.1. カリクレイン・キニン系と血圧

カリクレイン・キニン系は酵素カリクレインが、基質キニノーゲン (Kng) を限定分解し、ブラジキニン (BK) を生成する系として知られており、BK などのキニンは血管拡張、炎症、発痛、血管透過性の調節において、重要な役割を果たすことが知られている^{1,2}。BK はブラジルで毒蛇の研究をしていた M. Rosha e Silva が *Bothrops jararaca* の毒を血清とインキュベートすることにより、モルモットの回腸を「ゆっくりと (brady)」「収縮させる (kinein)」物質が産生され、その収縮が抗ヒスタミン薬で抑制できないことから新規の物質 (bradykinin) であると考え報告された³。この反応は蛇毒に含まれる酵素が基質である Kng を分解し BK を遊離する反応である。この反応を触媒する内在性 BK 遊離酵素としてカリクレインが知られている。1930 年に Frey と Kraut は尿をイヌの静脈内に投与すると、イヌの血圧が低下することを発見した。この血圧低下は尿中に血圧降下作用を有する物質が存在することを示しており、その物質は膵臓 (kallikreas) 由来であると考え、カリクレインと名付けられた⁴。その後の研究で、カリクレインは Kng の限定分解酵素であり、Kng からキニンを遊離することで血圧を下げることが明らかになった^{4,5}。この際、遊離するキニンは BK および、カリジンであり、これらキニンが受容体を介して生理作用を発現することが知られている。BK の受容体は BKB1 受容体 (B1 受容体) と、BKB2 受容体 (B2 受容体) の 2 種類が存在する⁶。1977 年に Regoli らは、摘出ウサギ大動脈において BK を添加することで収縮が起こることを見出し、この反応は BK の受容体を介して生じる現象であると考えた。さらに、通常は反応性が低いキニンペプチド (Des-Arg⁹-BK) が Krebs 緩衝液中で長時間インキュベートしたウサギ大動脈においては BK よりも強く収縮を引き起こすことを見出し、少なくとも 2 種の BK 受容体の存在が示唆された⁷。後に BK 受容体は B1 受容体と、B2 受容体の 2 種類が存在することが明らかになった⁸。その後、Des-Arg⁹-BK に強く反応する B1 受容体は、LPS などの炎症性刺激によってその発現が亢進することが見出された⁹。すなわち、B2 受容体は恒常的に発現しているのに対し、B1 受容体は炎症などに伴い、誘導され発現する受容体であることが明らかになった。

BK を in vivo で血管内に投与すると血管は弛緩し、血管拡張によって血圧低下を引き起こす¹。一方、大動脈などの摘出血管を緩衝液中でインキュベートし、直接 BK で刺

激すると血管は収縮する。長い間この矛盾、特に *in vivo* における BK の血管拡張のメカニズムについては未解明であった。1987 年、Furchgott らは血管内皮由来血管弛緩因子 (EDRF) の存在を証明した¹⁰。その後、Furchgott と Ignarro は全く別々に EDRF の本体が、一酸化窒素 (NO) であることを提唱した。そして、Moncada は化学発光法を用い EDRF の本体が NO であることを証明した¹¹。これらの発見により、BK の血管弛緩作用は主に血管内皮細胞に発現する B2 受容体を介して、血管内皮細胞において一酸化窒素合成を促進することによって血管を弛緩させ、その結果血圧を低下させることが明らかになった¹¹。

BK の NO を介した血管の弛緩作用については明らかになったが、それでは血管内において BK の遊離はどのように起こっているのだろうか。Kng は選択的スプライシングによって同一遺伝子から高分子 Kng (H-Kng) と低分子 Kng (L-Kng) として発現する。そして H-Kng は血漿カリクレイン、L-Kng は組織カリクレインによって限定分解を受けることで BK を遊離する。血液中には H-Kng と血漿カリクレインが豊富に存在するため、血液中における BK の遊離は、主に H-Kng と血漿カリクレインによって起こると考えられている。一方、血漿中には L-Kng は豊富に存在するものの、酵素である組織カリクレインがほとんど存在しないために、L-Kng の組織カリクレインによる BK 遊離は血液中ではほとんど起こらないと考えられてきた。通常、血漿カリクレインは不活性なプレカリクレインとして H-Kng とヘテロ二量体を形成し、血漿中に存在している¹²。そのため、血液中の血漿カリクレイン・H-Kng の反応は、これらの成分がリン脂質や血管外組織の負電荷表面に接触した際、内因系血液凝固反応と同時に開始する⁴。この反応の開始により、血液中の血液凝固第XII因子が活性化され血液凝固第XI因子を活性化する。この際、XII因子はプレカリクレインも同時に活性化し、血漿カリクレインを生ずる。活性化した血漿カリクレインは第XII因子、第XI因子を活性化し、血液凝固を促進するとともに、H-Kng を限定分解することで BK を遊離する (Fig. 1)。すなわち、炎症や組織の損傷に伴う血漿カリクレイン・H-Kng 系から生じた BK が主体となって血管内皮細胞に作用することで血管を拡張すると考えられている。H-Kng は L-Kng と比べ血漿カリクレインと親和性が高く⁴、L-Kng と親和性の高い組織カリクレインが血漿中にはほとんど存在しないことから、現在も血液中のカリクレイン・キニン系については L-Kng よりも H-Kng が重要であると考えられている。他方、L-Kng は血漿カリクレインによってほと

んど分解されず¹³、唾液腺や腎臓など局所的に産生される組織カリクレインによって分解されカリジンを遊離する⁴。遊離したカリジンは直接 BK 受容体に作用し、もしくはアミノペプチダーゼによって BK に変換されてから¹⁴、BK 受容体に作用し¹⁵、種々の生理活性を示す。とりわけ腎臓においては、Na の再吸収を抑制することで血圧を低く保つ役割を担っていると考えられている。1993 年、Majima らは遺伝的に Kng を細胞外に分泌できず、血漿中の Kng が欠損している Brown Norway Katholiek ラット (BN/Ka ラット) を用いて研究を行なった¹⁶。BN/Ka ラットおよび血漿中に Kng を持つ同系野生型ラットに高塩分食を給餌し、血圧を測定した。高塩分食給餌前の血圧は系統間に差はみられなかったが、高塩分食給餌開始から 1 週間後、WT ラットの血圧はほとんど変化がなかったのに対し、BN/Ka ラットの血圧は投与前に比べ有意上昇していた。また、この血圧上昇は、より塩分含量が高い餌を給餌した際、WT ラットにおいてもみられるようになった。さらに、BN/Ka ラットにおける、高塩分食を 1 週間与えた際の血圧上昇はウシ L-Kng を浸透圧ポンプによって持続的に 1 週間皮下投与することで高塩分食給餌前血圧程度にまで血圧が低下し、尿中への Na 排泄が増加していた。これらのことから血漿中の L-Kng が尿細管中に分泌され、Na⁺の再吸収を阻害し、結果高ナトリウム食における血圧上昇を抑制したと考えられた。これらの研究は腎臓 Na 排泄において L-Kng-組織カリクレイン系が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

このように炎症や組織の損傷、高塩分負荷などの病的要因が存在する状況においてカリクレイン・キニン系が活性化し、生じた BK が種々の活性を示すと考えられてきた。

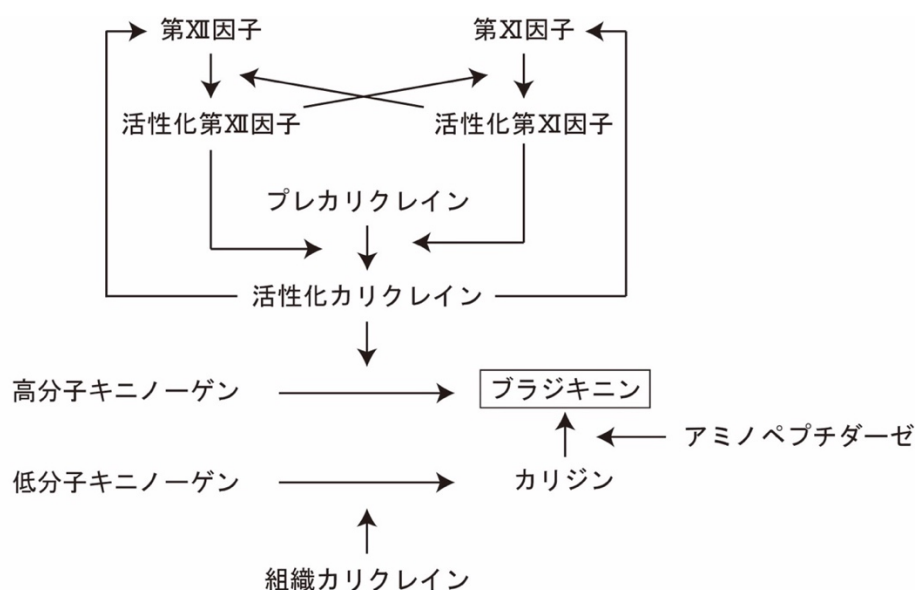


Fig. 1 キニンカリクレインシステムの概要

プレカリクレインは活性化された第XIII因子により活性化されることで、高分子キニノーゲンからブラジキニンを生ずる。組織カリクレインは低分子キニノーゲンを分解し、カリジンを生ずる。

1.2. カリクレイン・キニン系と炎症

炎症においてカリクレイン・キニン系が重要な役割を示すことは古くから知られている。とりわけ炎症の4兆候である「疼痛」、「発赤」、「腫脹」、「熱感」においてBKは重要な役割を果たしており、例えば疼痛において、BKは炎症メディエーターの中で最も強い発痛物質として知られている¹⁷。また、BKは血管拡張作用を有し、局所的に血流を増加し、血管透過性を亢進することで発赤、熱感、腫脹を引き起こすと考えられている⁴。さらに、BKの炎症を増強するメカニズムについては、骨格筋線維芽細胞においてBK受容体の刺激によりPLA₂の活性化を介してプロスタグランジンの産生を促進することが示されている¹⁸。Kngが生体における炎症に関与する実験的炎症モデルとしてはカラゲニン足浮腫がある。このモデルは含硫多糖類であるカラゲニンを足蹠に投与することで、炎症が引き起こされ足蹠が腫張する。このカラゲニン足浮腫モデルにおいて血漿Kngが欠損しているBN/Kaラットでは足浮腫が抑制されることが報告されている¹⁹。また、カラゲニンを胸腔内に投与することで炎症を惹起したラットにおいて胸腔中に滲出液や白血球の浸潤がみられる。この炎症反応は、あらかじめH-Kngと血漿カリ

クレインの反応を活性化する薬物の前投与により、H-Kng と血漿カリクレインを消費したラットにおいて抑制されたことから、カラゲニン誘発性胸膜炎に H-Kng が関与していることが示唆された²⁰。このようにカリクレイン・キニン系が炎症に重要な役割を果たすことは多くの研究から明らかになっている。

1.3. Kng の構造と機能

1963 年、Habermann らはウシの血液から分子量の異なる Kng の存在を示した²¹。1974 年、Komiya らはウシ新鮮血漿から H-Kng と L-Kng を精製した。これらの Kng をトリプシンで消化したのち、電気泳動とクロマトグラフィーにより 2 次元的に展開したペプチドマッピング法によるペプチドのスポットは、H-Kng において 48 スポット、L-Kng において 30 スポット存在した。そのうち 28 スポットは両方で共通しており、構造に高い相同性が示された²²。この高い相同性は、これら 2 種類の Kng が同一遺伝子の選択的スプライシングにより生じることに起因する²³(Fig. 2)。BK がコードされる exon 10 がそのまま翻訳されると H-Kng となり、exon 10 においてスプライシングが起こると L-Kng となる²⁴。そのため H-Kng と L-Kng は BK まで相同のアミノ酸を有し、どちらもキニンの前駆タンパクとして働くほか、システインプロテアーゼインヒビターとして機能する²⁵。一方、BK 以降のアミノ酸配列は異なっており、H-Kng は血液凝固因子と結合し、血液凝固に関与すること、さらに血漿カリクレインと結合し、ヘテロ二量体として循環することが知られているが²⁶、L-Kng にはこのような機能はない。これは exon 10 にこれらの機能を有するアミノ酸配列が存在している為である²⁴。そのため、血漿中のカリクレイン・キニン系は主に血漿カリクレイン・H-Kng 系が重要であると考えられている。他方、L-Kng は血漿中に H-Kng と比べ、約 4 倍多量に存在しているにも関わらず、その分解は血漿中にほとんど存在しない組織カリクレインによるもので、血液中ではほとんど機能せず組織限局的に作用しているのではないかと考えられている²⁷。

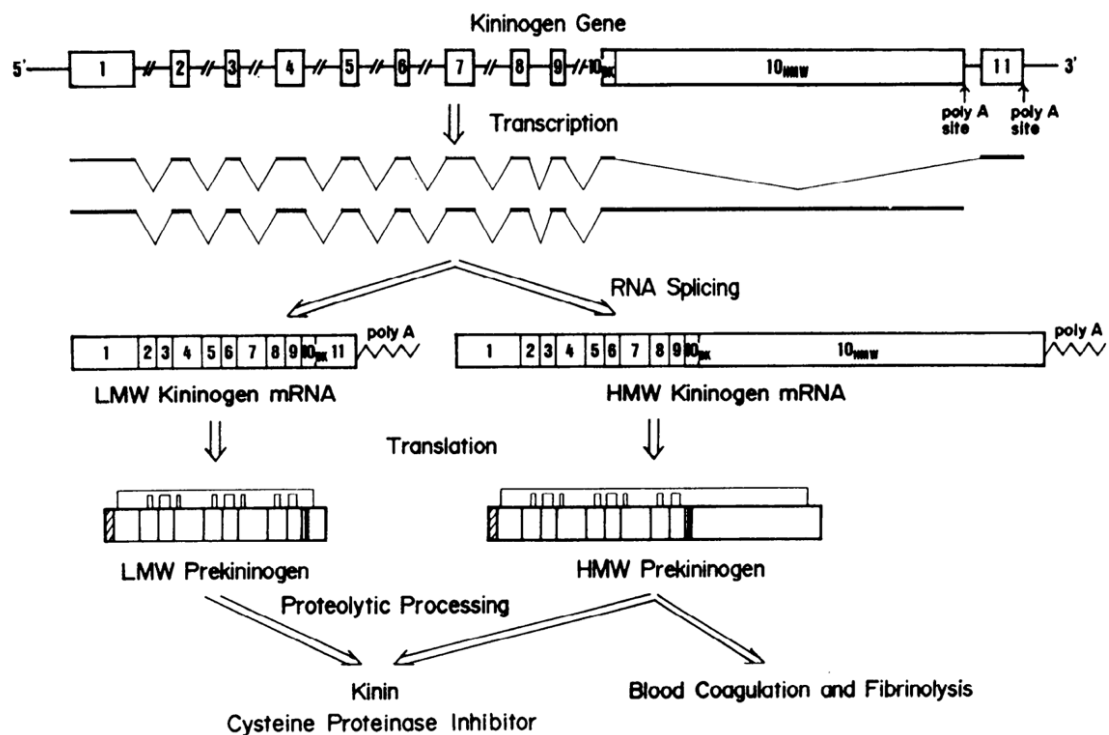


Fig. 2 Kng 遺伝子の選択的スプライシング (Nakanishi S., *et. al.* *Physiol Rev.* 1987.より引用)
 Exon 10 においてスプライシングを受けると L-Kng となり、スプライシングを受けずに完全に exon 10 が翻訳されると H-Kng となる。

1.4 研究の概要

カリクレイン・キニン系の血圧調節への関与については BK の血中投与により血管が拡張し血圧を下げること、L-Kng が Na^+ の再吸収を抑制することが知られているのみであり、本質的な生理的意義、恒常的な血圧調節についての関与に関してはいまだに不明な点が多い。特に組織カリクレイン・L-Kng 系については、その生理的役割、病態への関与に関してほとんど明らかにされていない。そのため、本研究では近年注目されているゲノム編集技術を用い、マウスゲノムにおいて Kng 遺伝子をターゲットとして破壊したマウスを作製し、reverse genetics 的に Kng の生理的役割、病態への関与を明らかにしようとした。

従来、マウス **Kng** は 1 遺伝子のみであると考えられてきたが²⁸、近年の研究で **Kng1** と **Kng2** の 2 gene が存在していることが明らかとなった²⁹。マウスゲノムの解読によって、これら 2 つの **Kng** 遺伝子は第 16 染色体上に近接して存在し、Open Reading Frame を有していることから、タンパクとして翻訳されると考えられる。これらの遺伝子はアミノ酸配列において 80 % 以上と相同性が非常に高く、マウスゲノム上で 2 つの **Kng** 遺伝子の距離が約 30 kbp と非常に近接していることから、ES 細胞を利用した相同組み替えによる遺伝子改変技術によって **Kng1** と **Kng2** の両方を同時に遺伝子改変することは困難であった。実際、我々の研究室で 2000 年に作製した ES 細胞を用いたノックアウト (KO) マウスでは、一つの **Kng** 遺伝子しか KO されていなかった。2012 年、Martin Jinek らは細菌の免疫システムをゲノム編集技術に応用し、CRISPR/Cas9 システムを考案した³⁰。この遺伝子改変技術は相同組み替えを必要とせず、従来法と比べより安価・迅速・簡便にゲノム編集が可能となった。そこで我々は CRISPR/Cas9 システムを用い、**Kng1**KO マウスと **Kng2**KO マウスの作成を試みた。本研究において、**BK^{del}K1** マウスと **BK^{del}K2** マウスの 2 系統の KO マウスの作成に成功し、その生化学的解析、および血圧に及ぼす影響、および LPS 投与敗血症モデルにおける **Kng** の関与について検討を行った。

2 本論

2.1 キニノーゲン遺伝子改変マウスの作成

Kng は哺乳動物において高度に保存されており、BK の供給源としての役割を有する。BK は血管を拡張し、血圧を低下させ、血管透過性を亢進し、炎症に関与する。Kng は BK の供給源としてだけでなく、血液凝固に関与し²⁶、システインプロテアーゼインヒビター活性を持ち²⁵、血管内皮細胞や血小板と結合するように多機能なタンパク質である³¹⁻³³。このように Kng、BK の持つ機能は非常に多岐にわたっているが、いまだに分かっていないことも多い。特に BK の半減期は十数秒程度と非常に短く、肺循環 1 回で血中 BK のおよそ 90 % が分解してしまうと言われる^{4,34,35}。そのため血液中の内在性 BK の測定は困難で、まして組織における BK の測定についても信頼できるデータは少ない。このため、Kng、BK の持つ機能の解析方法として、BK 受容体に対する拮抗薬を用いる薬理学的手法がとられてきたが³⁶、二つある BK 受容体を完全に拮抗することは難しい。また、Kng 遺伝子を欠損した動物モデルとして BN/Ka ラットを用いた研究があり¹⁶、この研究は一定の成果をもたらした。しかしラットにおいては、ラット特有の T-Kng を有しているため、ヒトやマウスにみられるカリクレイン・キニン系だけでなく、特殊なカリクレイン・T-Kng 系がキニンを供給し、機能している可能性は否定できない³⁷。また、Reverse genetics の手法を用いて、B1、B2 受容体の KO マウス^{38,39}やカリクレインの KO マウスが作製されてきた⁴⁰が、完全にキニンが消失したマウスではないため、クリアなデータは得られていない。キニンのソースを根本から無くすことができる唯一の方法は KngKO 動物の作成である。CRISPR/Cas9 を用いる方法では、Kng1、Kng2 を選択的に破壊することが可能となり、ピンポイントで遺伝子編集を行うことが出来る。そこで我々はマウスにおいて reverse genetics 的に Kng、BK の機能を明らかにするために Kng 遺伝子 KO マウスの作成を行った。

2.1.1 Kng1、Kng2 の mRNA 発現分布

Kng は哺乳動物において BK の前駆タンパク質として存在し、BK は血圧を低下させることが知られている。この Kng は血中に豊富に存在しており、そのほとんどは様々な血漿タンパク質と同様、肝臓において産生されていると考えられている⁴。Shesely らは、複数の臓器の mRNA を Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction 法 (RT-PCR 法) を用いて解析し、マウス肝臓において H-Kng1、L-Kng1 および L-Kng2 が発現していることを示した²⁹。つまり、マウス血漿中においてこれら 3 つの Kng が存在していると考えられている。一方、肝臓以外の組織においても Kng は発現しており、局所でパラクライン・オートクライン的に機能しているといわれている。例えば、腎臓において Kng 産生細胞が遠位尿細管に存在し⁴¹、尿細管内で BK を遊離する⁴² ことで集合管に存在する BK 受容体を介して、Na 排泄を促進することにより血圧を調節していると考えられている⁴³。そこで我々は Kng の主な産生臓器である肝臓および循環器系の組織である心臓、腎臓および呼吸器系の組織である肺における Kng の発現を RT-PCR 法を用いて検討した。

2.1.1.1 方法

Total RNA の抽出

8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを頸椎脱臼により安楽死処置した後、心臓、肝臓、腎臓、肺を摘出しサンプルとした。摘出したサンプルをすぐに ISOGEN II (NIPPON GENE, Japan) 2 ml 中でホモジナイズしたのち、4 °C、12,000 g、5 min 遠心分離し、上清を回収した。回収した上清に対し等量のイソプロパノールを加え、転倒混和後、室温にて 10 min インキュベートしたのち、再度 4 °C、12,000 g、5 min 遠心分離し Total RNA を沈殿させた。75 % エタノールでリンスし風乾したのち、ペレットを純水で溶解した。

逆転写反応 (reverse transcription)

溶解した RNA 溶液は Gene Quant (GE Healthcare) を用い紫外吸光法にて定量し、5 µg を PrimeScript™ IV 1st strand cDNA Synthesis Mix (Takara Bio, Japan) を用いて全量 20 µl の反応液中で 42 °C、20 min 逆転写反応を行なった。その後、70 °C、15 min インキュベートし酵素を失活させた後、直ちに氷冷し、cDNA サンプルとした。また、肝臓 RNA 5 µg を reverse transcriptase を含まない全量 20 µl の溶液中で同様に反応させたものを Negative control としてその後の PCR 反応に供した。

PCR

得られた cDNA サンプル 1 µl を最終濃度各 1 µM の primer set (Table 1) を使用し、Ex Premier™ DNA Polymerase Dye Plus (Takara Bio, Japan) を用いて増幅した。この際用いた primer set は増幅範囲にスプライシングサイトを含むように設計された。それぞれの予測 DNA 産物長は H-Kng1, 578 bp、H-Kng2, 576 bp、L-Kng1, 249 bp、L-Kng2, 238 bp、HPRT, 142 bp であった。

PCR の温度条件は、94 °C、1 min 初期の変性を行った後、98 °C, 10 sec、60 °C, 15 sec、68 °C, 30 sec を 35 回繰り返して増幅した。これによって得られた PCR 産物 2 µl を内因性コントロールである HPRT の PCR 産物 2 µl と混合し、2 % アガロースゲルにアプライし、電気泳動を行なった。泳動後、臭化エチジウムでゲルを染色したのち、トランスイルミネーターで検出した。DNA のサイズは 100 bp DNA Ladder マーカー (SUMOBIO Technology) と比較し、決定した。

Table 1 RT-PCR に用いた特異的プライマーの配列

Primerset	Forward	Reverse
H-Kng1	5'-AGCATTAGATATGACTGAAATGGCA-3'	5'-CTTCTGTCCTCCCCTGCATC-3'
L-Kng1	5'-TGCCAAGCATTAGATATGACTGAA-3'	5'-CGCTCCACACATCCCAGG-3'
H-Kng2	5'-TGCCAAGCATTAGATAAGACTATTCC-3'	5'-AGAGGTAACAGTTGGCTGGG-3'
L-Kng2	5'-GCATTAGATAAGACTATTCCTATCCG-3'	5'-ACATCTCAGGATTCTTCTGC-3'
HPRT	5'-TGGATATGCCCTTGACTATAATGAG-3'	5'-TGGCAACATCAACAGGACTC-3'

2.1.1.2 結果

RT-PCR の結果、H-Kng1 mRNA は肝臓 (Fig. 3A)、H-Kng2 mRNA は腎臓において発現しており (Fig. 3B)、L-Kng1 mRNA と L-Kng2 mRNA は肝臓と腎臓の両臓器において発現していることが明らかになった (Fig. 3C-D)。心臓と肺においては L-Kng1 mRNA と L-Kng2 mRNA が少量発現していた (Fig. 3C-D)。これらの DNA 断片長は予想された産物長であり、Negative control において増幅産物はみられなかった。

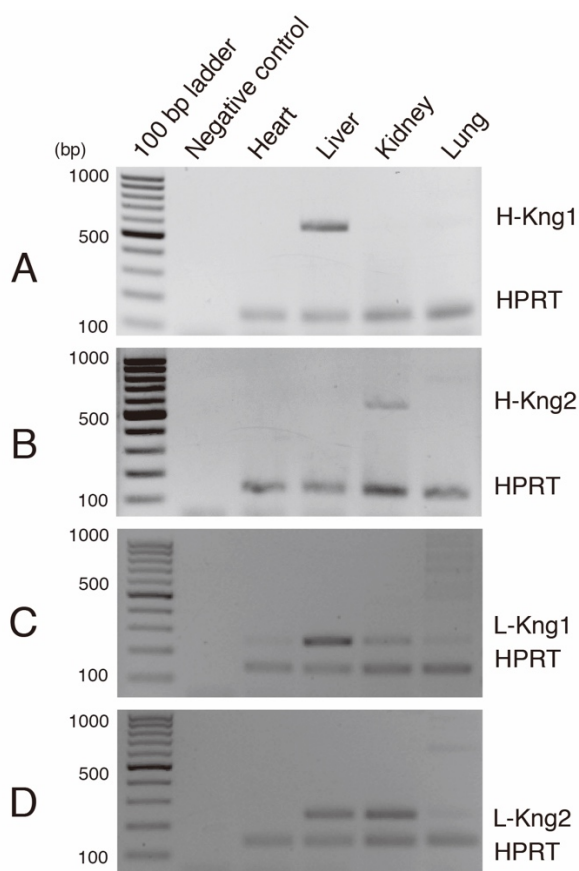


Fig. 3 心臓、肝臓、腎臓、肺における H-Kng1,2 および L-Kng1,2 mRNA の発現分布

Negative control、心臓、肝臓、腎臓、肺における H-Kng1 (A)、H-Kng2 (B)、L-Kng1 (C)、L-Kng2 (D) mRNA の発現および内在性コントロールである Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) の発現。実験は 3 匹のマウスを使用し、代表的な画像を提示した。

2.1.1.3 考察

Negative Control において増幅産物がみられなかったこと、すべての増幅産物が予想した産物長であったことから、mRNA 抽出時に混入したゲノム DNA が増幅された可能性は低い。そのため、これらの増幅産物は各臓器における mRNA の発現を示していると考えられる。マウスの Kng mRNA は肝臓において大量に発現しており、血漿中の Kng は肝臓由来のものが大半であると考えられている²⁸。したがって、マウスの肝臓において発現していた H-Kng1、L-Kng1、L-Kng2 (Fig. 3) が血漿中に分泌され機能しているのではないかと考えられた。また、L-Kng1、L-Kng2 が腎臓に発現していた。腎臓に発現する Kng は尿細管内で分解され BK を遊離し、血圧を低く保つ機能を持つと考えられており、高血圧患者において、健常者に比べ尿中組織カリクレイン量が減少していることが報告されている^{16, 44}。我々の結果と併せて考えると、腎臓局所的に L-Kng1、L-Kng2 が機能していることが考えられた。

2.1.2 Kng 遺伝子改変マウスの作成

2.1.1 の結果より、マウスには H-Kng1、L-Kng1、H-Kng2、L-Kng2 が発現していることが分かった (Fig. 3)。

そこで Kng1 遺伝子、Kng2 遺伝子を KO したマウスの作成を試みた。近年使用が加速している CRISPR/Cas9 法では遺伝子改変の原理に相同組み替えが必要なく、Kng1 と Kng2 のように遺伝子座が近い遺伝子を同時に改変できる。そこで、CRISPR/Cas9 法を用いて両遺伝子の KO を試みた。CRISPR/Cas9 法はガイド RNA と Cas9 タンパクを細胞に導入し、遺伝子を改変する手法である。ガイド RNA と Cas9 タンパクは複合体を形成する。ガイド RNA はまた導入された細胞内で相補的に DNA と結合する。DNA-ガイド RNA-Cas9 タンパクの複合体が形成されるとエンドヌクレアーゼである Cas9 によって二本鎖 DNA が切断される。その後、DNA 修復過程において変異が導入されることで簡便に遺伝子改変を行える。CRISPR/Cas9 法は従来方の ES 細胞における遺伝子の相同組み替え、胚への細胞の注入、キメラマウスの作成など多大な時間と手間がかかるものに比べて時間とコストが圧倒的に削減できる。なお、受精卵の遺伝子改変は共同研究者である放射線医学研究所塚本智史博士に依頼し行った。ここでは受精卵の遺伝子改変に関しての方法も含め示したい。

2.1.2.1 方法

ガイド RNA の調製

Kng1 および Kng2 における BK 領域周辺のゲノム DNA 配列を NCBI のデータベースより入手した。その配列情報を用いて CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>)、CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>) などの web ツールを使用してガイド RNA をそれぞれ設計した。設計の際にターゲット配列中に制限酵素である StuI により認識される配列を含むものを選択した。設計した gRNA 配列はそれぞれ Kng1 gRNA: GAAATGGCAAGAAGGCCTCC, Kng2 gRNA: AGACTATTCCTATCCGAAGG であった。これら gRNA を gRNA-scaffold 配列とともに T7 プロモータを含む合成二本鎖 DNA を鋳型に T7 Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて作成した。

受精卵の作成

実験に使用する modified HTF (mHTF) 培地、TYH 培地、kSOM 培地を実験に使用する 30 min 前から 5 % CO₂ インキュベーター内で 37 °C に加温しガス平衡を行った。8~12 週齢の雌性 C57BL/6J を過排卵処理し 90 µl の mHTF 内に卵を回収した。13 週齢の雄性 C57BL/6J マウスの精巣上体尾部より約 1 µl の精液を 5 % CO₂ でガス平衡した 100 µl の TYH 内に採取し受精能を獲得させるための前培養を 5% CO₂、37 °C、1.5 hr 行った。前培養後の精子培養液 10 µl を TYH 90 µl に移し、10 倍に希釈した。人工授精受精は卵を採取した培地内に、希釈した精子懸濁液 10 µl を静かに加え、5 % CO₂、37 °C で 5 時間静置することで行った。人工授精開始から 5 時間後、前核のある受精卵のみを kSOM 培地に移動し、その後の実験に使用するまで 5% CO₂、37 °C で培養した。

ガイド RNA および Cas タンパクの顕微注入と胚移植

作成した 2 つのガイド RNA (25 ng/µl) および Cas9 タンパク (50 ng/µl) を前核のみられた受精卵に顕微注入した。その後 37 °C インキュベーター内で 2 細胞期になるまで培養し、偽妊娠 ICR マウス卵管内に移植した。

Kng 遺伝子改変マウスの作出と DNA 配列決定

胚移植後得られたマウスを Guide-it Mutation Detection Kit (Takara Bio, Japan) を用いて変異導入の有無を確認した。変異導入のあったマウスを C57BL/6J マウスと交配し、F1 マウスを得た。F1 マウスを 3 週齢まで飼育したのち、イソフルラン麻酔下で尾の先端約 1 mm を採取し、Proteinase K 入りの Lysis Buffer 500 µl 中で DNA を抽出した。その後、5 M NaCl を 167 µl 加え攪拌し、不純物を塩析させた。次いで 4 °C、15,000 rpm、5 min 遠心分離を行い上清 550 µl を回収した。上清と等量のイソプロパノールを加え室温、10 min 混和した後、4 °C、15,000 rpm、10 min 遠心分離を行い、DNA を沈殿させた。その後、70 % エタノール 1 ml を加え、数回の転倒混和後、4 °C、15,000 rpm、10 min 遠心分離し、上清を完全に除去した。チューブ内に残ったペレットを 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1mM EDTA・2Na を含む Buffer 100 µl に溶解し、サンプルとした。変異が確認されたマウスの DNA を Ex Taq

polymerase (Takara Bio. Japan.) と終濃度各 1 μ M の特異的プライマーセット (Table 2) を用いて増幅し、増幅産物 1 μ l と Mighty TA-cloning Kit (Takara Bio. Japan) を用いてプラスミドに組み込み、ECOSTM Competent E. coli DH5 α (NIPPON GENE, Japan) を 6 分間プロトコルに従いヒートショック法で形質転換させた。2 % 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside と 0.1 M Isopropil 1-thio- β -D-galactoside を 20 μ l を均一に染み込ませた LB 寒天培地 (1 % トリプトン、0.5 % 酵母エキス、1 % NaCl、100 μ g/ml Ampicillin、1 % 寒天) に形質転換した大腸菌を播種したのち、37 $^{\circ}$ C で一晚培養した。培養後、青コロニーから十分に分離した白コロニーを選択し、2 ml の LB 培地 (1 % トリプトン、0.5 % 酵母エキス、1 % NaCl、100 μ g/ml Ampicillin) に懸濁し、再度 37 $^{\circ}$ C、一晚培養した。全量を回収し、プラスミドを NucleoSpin[®] Plasmid Easy Pure (Takara Bio) を用いて抽出した。抽出したプラスミドの配列をそれぞれの Forward primer を用いたサンガーシーケンスで決定した。変異が導入されたマウスを WT マウスと交配させ、F2 マウスを得たのち、変異が導入された F2 マウス同士を交配させることで F3 マウスを得た。

Table 2 DNA 配列確認特異的プライマーの配列

Primerset	Forward	Reverse
Kn1 Check	5'-GAAAGACTCACCCCATTTTG-3'	5'-CACGGTGATTCTTATTAGCC-3'
Kn2 Check	5'-GTCAGTGCATCTTCCCTTT-3'	5'-AAAGGCATCATCAGGTGCTT-3'

2.1.2.2 結果

CRISPR/Cas9 法を用いて、Kng1 遺伝子上の 1285 bp~1292 bp までの 8 bp が欠損したマウス (Fig. 4A) および Kng2 遺伝子上の 1337 bp と 1338 bp の間に 1 bp が挿入されたマウスの 2 系統のマウスが得られた (Fig. 4B)。これらのマウスの外観は WT マウスと区別できず、顕著な異常はみられなかった。

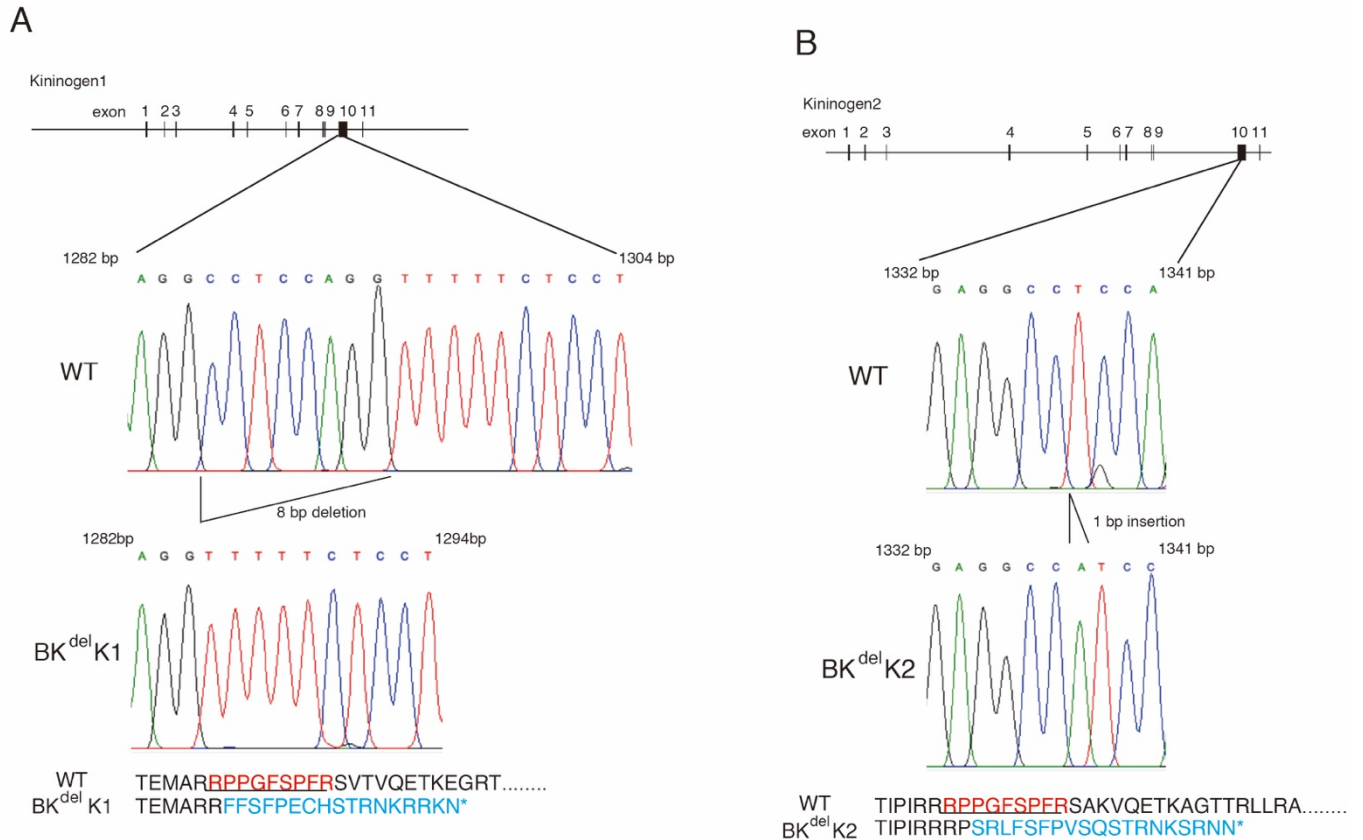


Fig. 4 BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスの DNA 配列と予測アミノ酸配列

BK^{del}K1 マウスの DNA は 8 塩基の欠損を生じ、BK の 2 番目のアミノ酸以降が変異している (A)。BK^{del}K2 マウスの DNA は 1 塩基の挿入を生じ、BK の 3 番目のアミノ酸以降が変異している (B)。

2.1.2.3 考察

作成された BK^{del}K1、BK^{del}K2 マウスにおいて、それぞれ Kng1 遺伝子、Kng2 遺伝子の BK をコードする領域においてフレームシフト変異を引き起こしていた。これらのマウスはそれぞれ BK^{del}K1、BK^{del}K2 と命名した。BK^{del}K1 マウスと BK^{del}K2 マウスの DNA 配列からアミノ酸配列を予測すると、それぞれ BK ペプチド配列の 2 番目もしくは 3 番目のアミノ酸以降がフレームシフト変異により全く異なったアミノ酸を指定していると予測された。そのため、BK^{del}K1 マウスの Kng1 と BK^{del}K2 マウスの Kng2 は BK を遊離できないことが予測された。

2.1.3 BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスの Genotyping

BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスは外観で区別がつかないが、Fig. 4 に示したように DNA 配列に変異が生じており、制限酵素である Stu I によって認識され、切断される配列が欠損している。そのため、変異箇所付近の DNA を PCR によって増幅し、Stu I を反応させることで、変異がない DNA は切断され、変異がある DNA は切断されない。これにより、変異がない DNA と変異がある DNA の断片長に差が生じ、簡便に遺伝子の変異が検出できる。この方法は、PCR-制限酵素フラグメント長解析法 (PCR-RFLP 法) と呼ばれ、遺伝子解析に利用されている。この、PCR-RFLP 法を用いてマウスの遺伝子型を検討した。

2.1.3.1 方法

Genome DNA の抽出と PCR

3 週齢のマウスをイソフルランで麻酔したのち、尾の先端約 1 mm を採取し、Proteinase K 入りの Lysis Buffer 500 μ l 中で DNA を抽出した。その後、5 M NaCl を 167 μ l 加え攪拌し、不純物を塩析させた。次いで 4 $^{\circ}$ C、15,000 rpm、5 min 遠心分離を行い上清 550 μ l を清潔なマイクロチューブに回収した。上清と等量のイソプロパノールを加え室温、10 min 混和した後、4 $^{\circ}$ C、15,000 rpm、10 min 遠心分離を行い、DNA を沈殿させた。その後、70 % エタノール 1 ml を加え、数回の転倒混和後、4 $^{\circ}$ C、15,000 rpm、10 min 遠心分離し、上清を完全に除去した。チューブ内に残ったペレットを 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1mM EDTA \cdot 2Na を含む Buffer 100 μ l に溶解し、サンプルとした。PCR 反応は 2 μ l のサンプルと Ex PremierTM DNA Polymerase Dye Plus (Takara Bio, Japan) および終濃度各 1 μ M の特異的なプライマーセット (Table 2) を使用し、全量 20 μ l 中で反応させた。

制限酵素反応

PCR によって増幅された産物 4 μ l と Stu I (New England Biolabs Japan, Tokyo) 2 U を全量 10 μ l の反応液において、37 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。その後、2%アガロースゲルを用い、電気泳動を行なった。

2.1.3.2 結果

PCR の結果、目的断片長 (Kng1: 313 bp、Kng2: 397 bp) の DNA が得られた。WT マウスの PCR 産物は Stu I 処理後、小さい DNA 断片 (Kng1: 181 bp / 132 bp、Kng2: 288 bp / 109 bp) のみが検出されたのに対し、BK^{del}K1 Homo マウスおよび BK^{del}K2 Homo マウスにおいては切断前の断片長と同じサイズの DNA 断片が検出された (Fig. 5)。また、BK^{del}K1 Hetero マウスおよび BK^{del}K2 Hetero マウスにおいてはその両方が検出された。

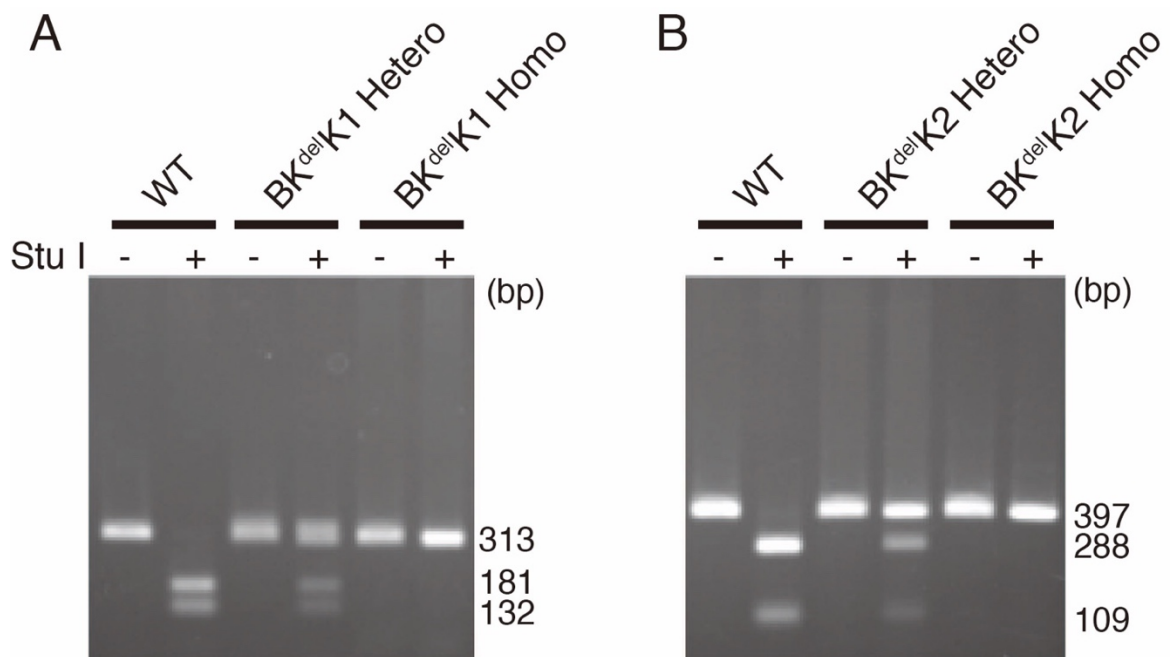


Fig. 5 Stu I による DNA 切断を用いた遺伝子型の解析

WT は Stu I によって完全消化され、切断断片のみがみられた。BK^{del}K1 Hetero は切断断片と未切断断片がみられた。BK^{del}K1 Homo は切断断片がみられなかった (A)。WT は Stu I によって完全消化され、切断断片のみがみられた。BK^{del}K2 Hetero は切断断片と未切断断片がみられた。BK^{del}K2 Homo は切断断片がみられなかった (B)。

2.1.3.3 考察

遺伝子特異的なプライマーを用いた PCR によって目的産物長のシングルバンドが検出されたことは、Fig. 4 にて配列を示した付近の DNA が増幅されたことを示している。Fig. 4 において WT は Stu I 認識配列が存在し、切断され、BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスの変異 DNA は Stu I 認識配列が欠損していることから、Stu I により切断されない。Stu I 処理によって WT マウスの DNA は完全に消化され、2 本のバンドが検出された。他方、BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスの DNA は消化されていなかった。hetero マウスにおいて WT マウスのように切断された DNA 断片と、BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスのような未消化の DNA 断片がみられた。この後、実験に供する前に本法で DNA の変異を解析し、WT マウスおよび BK^{del}K1 Homo マウス、BK^{del}K2 Homo マウスを実験に使用した。

2.1.4 BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスの血漿キニノーゲン量

2.1.2 の結果 BK^{del}K1、BK^{del}K2 マウスは Kng 遺伝子に変異しており、それぞれの BK ペプチド配列における 2 番目および 3 番目のアミノ酸以降の配列がフレームシフト変異していると考えられた。そのため、BK^{del}K1 マウスでは Kng1 遺伝子由来の、BK^{del}K2 マウスでは、Kng2 遺伝子由来の Kng は欠損しているはずである。

1 分子の Kng がトリプシンによって加水分解されると、1 分子の BK を遊離することが知られている⁴⁵。したがって、血漿をトリプシンで消化した際に生ずる BK を定量することで血漿中の総 Kng 量を測定することができる。そこで我々は BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスの血漿をトリプシンで消化し、生じた BK を ELISA 法により定量することで血漿総 Kng 量を定量した。

2.1.4.1 方法

血漿の採取

8 週齢の雄性 WT マウス、BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスをイソフルランで麻酔し、尾静脈からヘパリン処理された毛細管 (VC-H075H, TERUMO, Japan) を用いて血液を採取した。その後、4 °C、1,500 g、15 min で遠心分離し、上清を血漿として採取した。

トリプシンによる BK の遊離

得られた血漿を 62 °C、15 min で処理し、キニン分解酵素を失活させた。その血漿 10 µl を、0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に 250 µg/ml の濃度で溶解させたトリプシン 40 µl と混合し、37 °C、45 min 消化した。その後、0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に 200 µg/ml の濃度で調整した大豆由来トリプシンインヒビター 50 µl を混合し、サンプルとした。

ELISA による BK の定量

BK は Bradykinin ELISA kit (ENZO) を用い競合 ELISA 法で定量した。測定前にサンプルを Kit 付属のアッセイバッファーで 250 倍希釈した。測定手順は Kit の指示に従って行った。620 nm の波長の吸光度を MULTISKAN FC plate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA) を用いて測定した。すべてのサンプルは duplicate で測定し、得られた濃度の平均をサンプルの濃度とした。

有意差検定

得られたデータは平均値 ± 標準偏差で表した。データは Dunnett's test により有意差検定を行った。p < 0.05 であるとき、有意であると判定した。

2.1.4.2 結果

WT マウス血漿中の血漿 Kng 量は $1.03 \pm 0.33 \mu\text{g/ml}$ であったのに対し、BK^{del}K1 マウスと BK^{del}K2 マウスはそれぞれ $0.21 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.37 \pm 0.10 \mu\text{g/ml}$ と有意に減少していた (Fig. 6)。

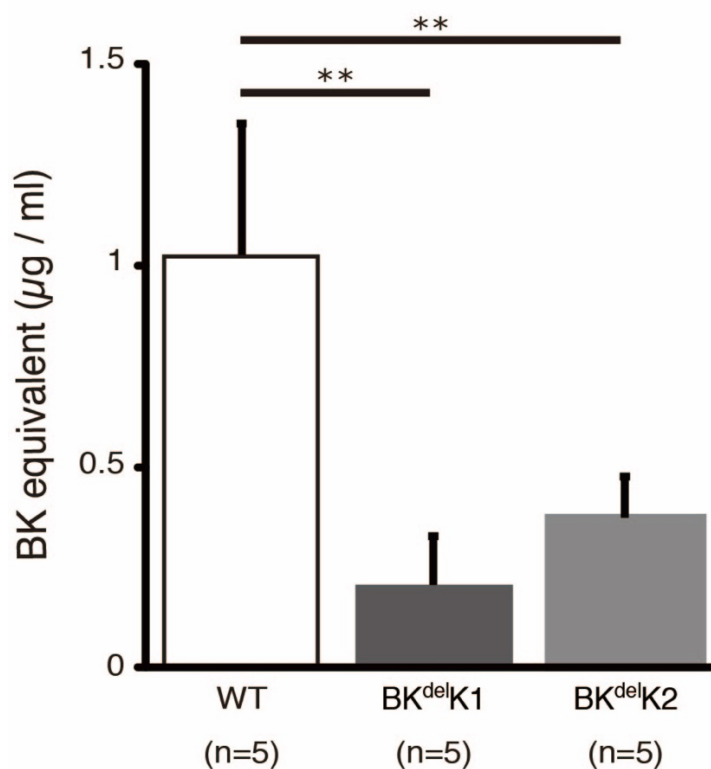


Fig. 6 血漿中総 Kng 量

トリプシン処理によって生じた BK 量を定量することにより求めた。

データは平均±標準偏差で示し、Dunnett's test により有意差検定を行った (**: $p < 0.01$)。

2.1.4.3 考察

この結果は $BK^{del}K1$ マウスおよび $BK^{del}K2$ マウスにおいて、BK を遊離できる Kng 量が減少していることを示している。 $BK^{del}K1$ 、 $BK^{del}K2$ マウスは 2.1.2 の結果から BK 配列が欠失していると考えられる。そのため、 $BK^{del}K1$ マウスと $BK^{del}K2$ マウスの血漿において Kng 量が減少していたものと考えられた。また、 $BK^{del}K1$ マウスと $BK^{del}K2$ マウスにおける、Kng 量が WT マウスの半分以下であるが、残存していた。この際、残存している Kng として、 $BK^{del}K1$ マウスにおいては Kng2 遺伝子が、 $BK^{del}K2$ マウスにおいては Kng1 遺伝子が正常に発現されるため、 $BK^{del}K1$ マウスにおいては Kng2 が、 $BK^{del}K2$ マウスにおいては Kng1 タンパク質が血漿中に発現しているものだと考えられた。血漿 Kng は主に肝臓において産生され、2.1.1 で示したように H-Kng1、L-Kng1、L-Kng2 が肝臓において発現していた。これらのことから $BK^{del}K1$ マウスにおいては肝臓由来の L-Kng2 が、 $BK^{del}K2$ マウスにおいては肝臓由来の H-Kng1、L-Kng1 が血漿中に分泌されているのではないかと考えられた。本法において H-Kng と L-Kng から BK を遊離させ、BK 換算量として Kng を定量しているため H-Kng と L-Kng の区別はつかず、さらなる検討が必要であると考えられた。

2.1.5 血漿キニノーゲンのウェスタンブロッティング

2.1.4 の結果、WT マウスに比べ、BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスは血漿中の総 Kng 量が減少していた。しかし、総 Kng 量を測定するために用いた方法は血漿中の Kng をトリプシンにより消化することで、完全に BK を遊離させ、その際生じた BK を測定する方法であるため、血漿中に存在する H-Kng、L-Kng の区別はつかない。H-Kng と L-Kng はスプライシングバリエーションであり、H-Kng は L-Kng にはない血漿カリクレインと結合する領域が存在する²⁴。そのため、血漿中において BK を遊離するのは主に H-Kng であると考えられている。そのため、血漿中において H-Kng が減少しているのか、L-Kng が減少しているのかを明らかにすることは Kng 機能の解析において重要であると考えた。そこで、BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウス血漿における、H-Kng および L-Kng のタンパク質発現についてウェスタンブロッティングにより検討を行った。

2.1.5.1 方法

血漿サンプルの調製

2.1.4 と同様に血漿を採取した。血漿は 4 % SDS、10 % 2-mercaptoethanol、20 % glycerol、0.004% bromophenol blue、0.125 M Tris-HCl (pH 6.8) を含むサンプルバッファーと等量混合し、96 °C、5 min 反応させた。反応後、使用まで-90 °Cで保存した。

SDS-PAGE

Tris-Glycine 系泳動バッファー (25 mM Tris、192 mM Glycine、0.1 % SDS) 中で、アクリルアミド濃度 12.5 %分離ゲルを用いて、作成した血漿サンプルを血漿 1 µl 相当量もしくは 0.1 µl 相当量を泳動した。泳動は、10 mA、30 min で濃縮し、次いで 90 V でサンプルバッファーに含まれる BPB がゲルの下端に至るまで行った。

ブロッティング

クリアトランス® PVDF メンブレン, 0.45 μm をメタノールに浸漬し、親水処理を行ったのち、EzFast Blot に濾紙とともに浸漬した。泳動後のゲルはトリミングしたのち EzFast Blot に浸漬した。1.4 mm 厚になるよう濾紙を重ねて置き、その上にメンブレン、ゲルを重ね、1.4 mm 厚となるよう濾紙を重ねた。ブロッティングには、パワードブロット 2M (ATTO, Japan) を用い、24 V、30 min のプロトコルで行った。転写後のゲルは CBB 色素で染色し、転写ムラがないことを確認した。

抗体反応

転写後のメンブレンを 3 % スキムミルクでブロッキングし、Rabbit antibodies for both H-KNG and L-KNG (Abcam, Cambridge, UK; ab175386) (1:1,000)、Rat antibodies for H-KNG (R&D Systems, Minneapolis, MN; MAB22061) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、Goat antibodies for transferrin (R&D Systems; AF3987) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBS-T; 1.37 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 25 mM Tris, 0.05 % Tween 20) を用いて希釈し、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩反応させた。TBS-T を用いて室温で 10 min、振盪しながら 3 回洗浄したのち、Peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Promega) (1:10,000)、Peroxidase-conjugated anti-rat and anti-goat IgG (Proteintech Japan, Tokyo, Japan; SA00001-15, SA00001-4) (1:10,000) を TBS-T で希釈し、室温、1 hr 反応させた。TBS-T を用いて室温で 10 min、振盪しながら 3 回洗浄し、HRP 基質であるイムノスター®ゼータ (Wako, Japan) を室温、5 min 反応させ、Chemi Doc (Bio-Rad, California, USA) で化学発光を検出した。

検出済みの抗体除去

検出後のメンブレンをあらかじめ 50 $^{\circ}\text{C}$ で加温した抗体除去バッファー (2% SDS、100 nM 2-mercaptoethanol、62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)) を含む溶液に浸し、50 $^{\circ}\text{C}$ 、30 min 振盪しながら反応させた。反応後すぐに TBS-T で 3 回すすぎ、TBS-T 中で室温、10 min 振盪しながら 2 回洗浄した。2 回の洗浄後、抗体反応の手順にしたがって次の目的抗原を検出した。

2.1.5.2 結果

WT および BK^{del}K2 マウス血漿では H-Kng が検出されたが、BK^{del}K1 マウス血漿では H-Kng は検出されなかった (Fig. 7A)。他方、L-Kng は BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスいずれにおいても検出されたが、発現量は WT マウスに比べ半量程度まで減少していた (Fig. 7B)。

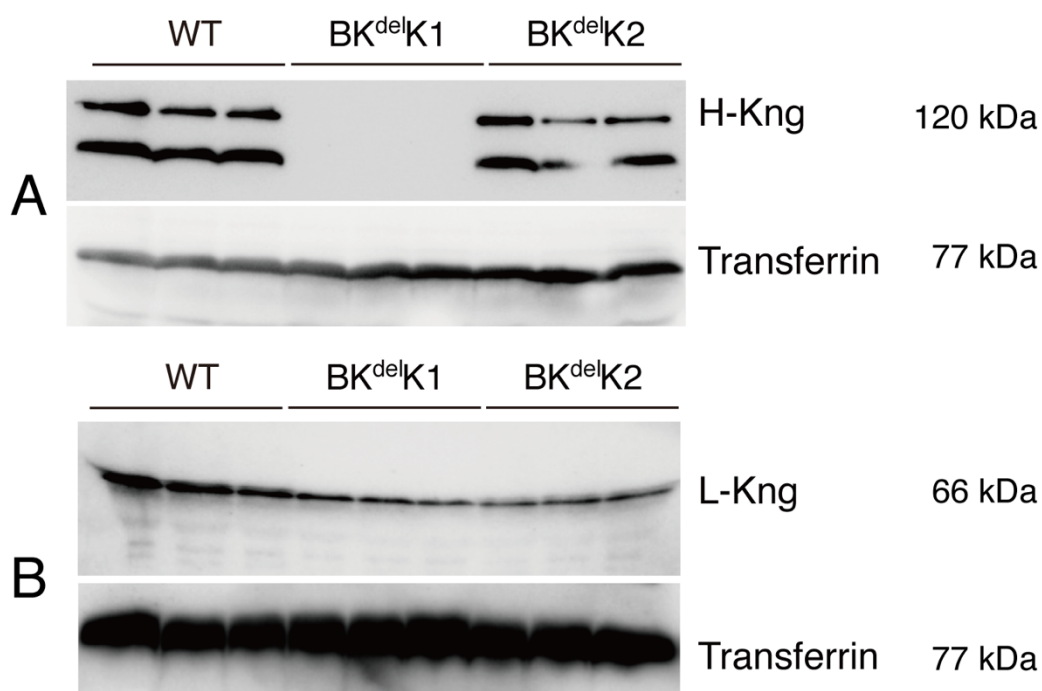


Fig. 7 ウェスタンブロットによる血漿 H-Kng と L-Kng の解析

WT マウス、BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウス血漿における H-Kng のウェスタンブロット解析。同メンブレンをリプロービングし Transferrin をローディングコントロールとして用いた (A)。WT マウス、BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウス血漿における L-Kng のウェスタンブロット解析。同じメンブレンをリプロービングし Transferrin をローディングコントロールとして用いた (B)。

2.1.5.3 考察

BK^{del}K1 マウス血漿における H-Kng の消失は、WT マウス肝臓において、H-Kng1 のみが発現しており、H-Kng2 は発現していない (Fig. 3) ことと符合する。即ち、マウス血漿においては肝臓由来の H-Kng1 のみが存在しており、H-Kng2 はマウス血漿に存在していないために、BK^{del}K1 マウスにおいては、血漿の H-Kng が消失していると考えられた (Fig. 7A)。また、血漿中に豊富に含まれている L-Kng はウェスタンブロットティングにおいても BK^{del}K1 マウス血漿および BK^{del}K2 マウス血漿において共に減少しており (Fig. 7B)、これは 2.1.4 でみられた ELISA による血漿 Kng 量が減少していた結果と一致している。

まとめると、BK^{del}K1 マウスは血漿中 H-Kng が消失、L-Kng は半分以下に減少しており、BK^{del}K2 マウスは血漿中 H-Kng が存在しているが、L-Kng については半分以下に減少したマウスであると考えられた。従来 of Kng1KO マウス⁴⁶では Kng2 が残存しているために、Kng1、Kng2 それぞれの機能は明らかに出来ない。本研究において BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスが作出できたことによって、Kng1 と Kng2 それぞれの生理的役割について解明でき、Kng の生体内における意義をより詳細に解析できると考えられた。

2.1.6 血液凝固能の解析

2.1.5 で BK^{del}K1 マウスにおいて H-Kng が消失し、L-Kng は減少しており、また BK^{del}K2 マウスにおいて H-Kng は発現しており L-Kng は減少していた。

血漿カリクレイン・H-Kng 系は血漿中において BK を供給する系であるが、他に内因系血液凝固カスケードを構成する因子としても知られている。このうち H-Kng はフィッツジェラルド因子とも呼ばれ、内因系血液凝固因子として機能している⁴⁷。実際、H-Kng 欠損血漿は正常血漿に比べ内因系血液凝固能の指標である活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) が延長する。そのため、APTT および外因系血液凝固能の指標 (PT) を測定し、BK^{del}K1 マウスと BK^{del}K2 マウスにおいて血液凝固能を解析した。

2.1.6.1 方法

血漿サンプルの調製

雄性 8 週齢の WT マウス、BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスを三種混合麻酔 (0.3 mg/kg メデトミジン, 4.0 mg/kg ミダゾラム、 5.0 mg/kg ブトルファノール) の腹腔内投与によって麻酔した。クエン酸 Na (0.11 M) 0.05 ml をあらかじめ充填したシリンジに麻酔したマウスの下大静脈より 0.45 ml 採血した。速やかに清潔な 1.5 ml プラスチックチューブに移し、転倒混和したのち 4 °C、1,500 g、15 min で遠心分離し上清を血漿サンプルとした。サンプルは氷上で保存し、1 時間以内に測定に使用した。

APTT の測定

37 °C で 1 分間加温されたトロンボチェック APTT-SLA 試薬 (Sysmex, Japan) 0.1 ml に 0.1 ml の血漿を加え、37 °C で 3 分間加温した。その後あらかじめ 37 °C に加温された CaCl₂ (0.02 M) を 0.1 ml 加え、凝固するまでの時間を目視で測定した。同一サンプルを 2 回測定し、その平均をサンプルの APTT としてその後の統計解析に使用した。

PT の測定

トロンボチェック PT プラス (Sysmex, Japan) 0.2 ml を 37 °C で 3 分間加温し、血漿 0.1 ml を加え、凝固するまでの時間を目視で測定した。測定は同一サンプルを 2 回測定し、その平均をサンプルの PT としてその後の統計解析に使用した。

有意差検定

得られたデータは平均値 \pm 標準偏差で表した。データは Dunnett's test により有意差検定を行った。p < 0.05 であるとき、有意であると判定した。

2.1.6.2 結果

APTT は、WT マウスにおいて 36.0 ± 11.0 sec であったのに対し、BK^{del}K1 マウスでは 80.6 ± 20.1 sec と有意に延長していた。他方、BK^{del}K2 マウスにおいては 42.7 ± 19.7 sec であり WT マウスと差はみられなかった (Fig. 8A)。PT は WT マウスの 14.6 ± 2.0 sec と比べ、BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスそれぞれ 14.2 ± 1.8 sec、 15.8 ± 1.2 sec といずれにおいても有意な変化はみられなかった (Fig. 8B)。

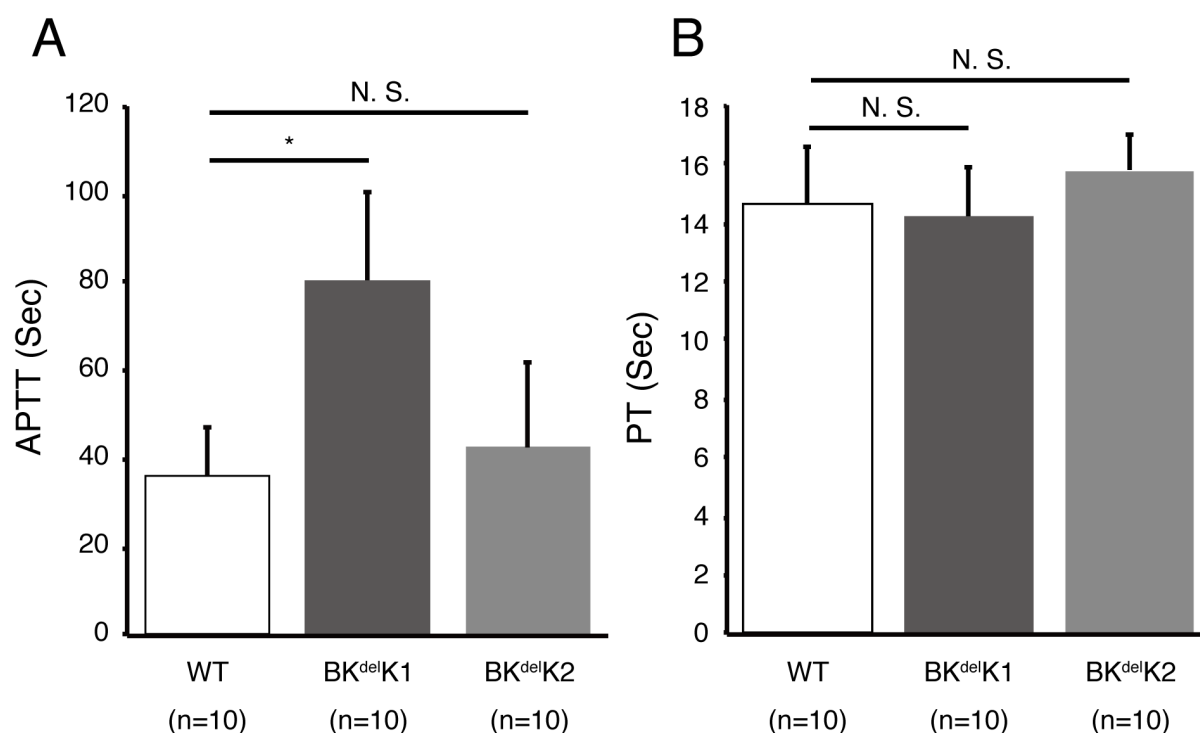


Fig. 8 WT、BK^{del}K1 および BK^{del}K2 における血液凝固能

マウスの血漿の APTT (活性化部分トロンボプラスチン時間) データは平均 ± 標準偏差で示し、Dunnett's test によって有意差検定を行なった (N.S. : $p \geq 0.05$, * : $p < 0.05$) (A)。PT (プロトロンビン時間) データは平均 ± 標準偏差で示し、Dunnett's test により有意差検定を行なった (N.S. : $p \geq 0.05$) (B)。

2.1.6.3 考察

BK^{del}K1 マウスでみられた延長した APTT と正常な PT は内因系血液凝固能が低下していることを示しており 2.1.5 のデータと合わせて考えると、BK^{del}K1 マウスにおいて内因系血液凝固因子の一つである H-Kng が消失していると考えられた。他方、BK^{del}K2 マウス血漿は WT マウスと同程度の APTT、PT を示し、血液凝固能に差はないことが示された。つまり、BK^{del}K2 マウス血漿においては正常に機能する H-Kng が WT マウスと同程度存在していることが考えられた。

2.2 BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスの表現系の解析

Kng の機能は BK の供給源としての機能である。BK の投与により血管は拡張し、血圧は低下する。そのためカリクレイン・キニン系は血圧降圧系として考えられてきた。しかしながら、正常時の血中 BK 量は非常に少なく、恒常的な血圧調節におけるカリクレイン・キニン系の関与は疑問視されてきた。これまでの研究において BK の受容体拮抗薬の投与や受容体 KO マウスが作成され、BK と血圧の関係が検討されてきた。これらの研究において、誘導型受容体である B1 受容体の欠損マウスの血圧は WT マウスと変化がないことが報告されている³⁸。一方、恒常的に発現している B2 受容体アンタゴニストの投与や B2 受容体ノックアウトマウスの血圧は有意に高くなることが報告されている^{36,40}。しかし、B1 受容体、B2 受容体両方を欠損したマウスは正常血圧であることが知られている⁴⁰。このように正常時血圧にカリクレイン・キニン系が関与するかは、いまだに明確になっていない。

一方、食塩負荷などの特別な状況においてカリクレイン・キニン系が血圧調節に重要な役割を担っていると考えられている。Majima らは細胞外に Kng が分泌できない BN/Ka ラットを用いた研究によって、食塩負荷時に Na⁺の再吸収を抑制し、血圧を低く保つ役割を担っていることを明らかにした。このラットは食塩負荷のない通常飼料では正常血圧であった。しかし、ラットには特有の T-Kng が発現しており BN/Ka ラットにおいても T-Kng は正常に発現しているためこの系が恒常的な血圧調節機能を補っていることも考えられ、BN/Ka ラットが Kng の血圧調節機能の全てを反映するとは言い難い。

そこで我々は BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスを作成し、これらのマウスの体重および各種臓器重量といった基礎的なデータ、恒常的な血圧と腎臓における Na⁺の再吸収について検討した。

2.2.1 体重と臓器重量

作成した BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスにおいて基本的な生理的指標である体重および各種臓器重量の測定を行った。また、ブラジキニン受容体は心臓において重要な役割を果たしている可能性がある。1999 年、Emanuelli らは 180 日齢では B2 受容体ノックアウトマウスの左心室重量は WT マウスに比べて有意に重いことを示した⁴⁸。一方、Meneton らのグループは、BK 遊離酵素である組織カリクレインノックアウトマウスは、左心室重量が減少することを示した⁴⁹。このように心臓重量において BK が影響を及ぼすことが考えられる。そこで BK^{del}K1 マウスと BK^{del}K2 マウスの心臓重量の測定を行った。

2.2.1.1 方法

体重の測定

マウスを生後 4 週齢で離乳し、自由飲食下で飼育した。4 週齢から 8 週齢の WT マウスおよび BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスの体重を 1 週間に 1 度測定した。測定の際、マウスの体型に差があるか観察した。

臓器重量の測定

生後 4 週齢で離乳したマウスを自由飲食下で飼育し、8 週齢に達するまで飼育した。8 週齢のマウスの体重を測ったのち、安楽死させ、すぐさま断頭し、放血させた。心臓は摘出後すぐにキムワイプ上でさらに十分に放血させたのち、重量を測定した。肝臓、腎臓、肺は摘出後、キムワイプ上で血液を拭ったのち重量を測定した。それぞれの臓器重量 (mg) は当該マウスの体重 (g) で補正した。

有意差検定

得られたデータは平均値 ± 標準偏差で表した。データは Dunnett's test により有意差検定をおこなった。p < 0.05 であるとき、有意であると判定した。

2.2.1.2 結果

8 週齢時点でのマウスの体重は、WT マウスが 22.23 g であったのに対し、BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスの体重はそれぞれ 22.22 g、21.52 g と有意な差はみられなかった。4 週齢時点の BK^{del}K1 マウスの体重は 16.3 ± 1.4 g であり同時期の WT の体重 14.8 ± 1.2 g に比べ有意に高かった。また、それ以外の週齢に有意な差はみられなかった (Fig. 9A)。

体重で補正された心臓重量は、WT で 5.4 ± 1.4 mg/g であり、BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスにおいてそれぞれ、 5.3 ± 0.9 mg/g、 5.3 ± 0.5 mg/g と有意な差はみられなかった (Fig. 9B)。肝臓重量は、WT で 43.6 ± 4.6 mg/g であり、BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスにおいてそれぞれ、 38.0 ± 7.6 mg/g、 49.3 ± 2.6 mg/g と有意な差はみられなかった (Fig. 9C)。腎臓重量は、WT で 11.6 ± 0.5 mg/g であったのに対し、BK^{del}K1 マウスで 13.7 ± 1.3 mg/g と有意に重かった。BK^{del}K2 マウスにおいては、 12.0 ± 0.4 mg/g と有意な差はみられなかった (Fig. 9D)。肺重量は、WT で 5.7 ± 0.3 mg/g であり、BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスにおいてそれぞれ、 5.9 ± 0.5 mg/g、 6.2 ± 0.3 mg/g と有意な差はみられなかった (Fig. 9E)。

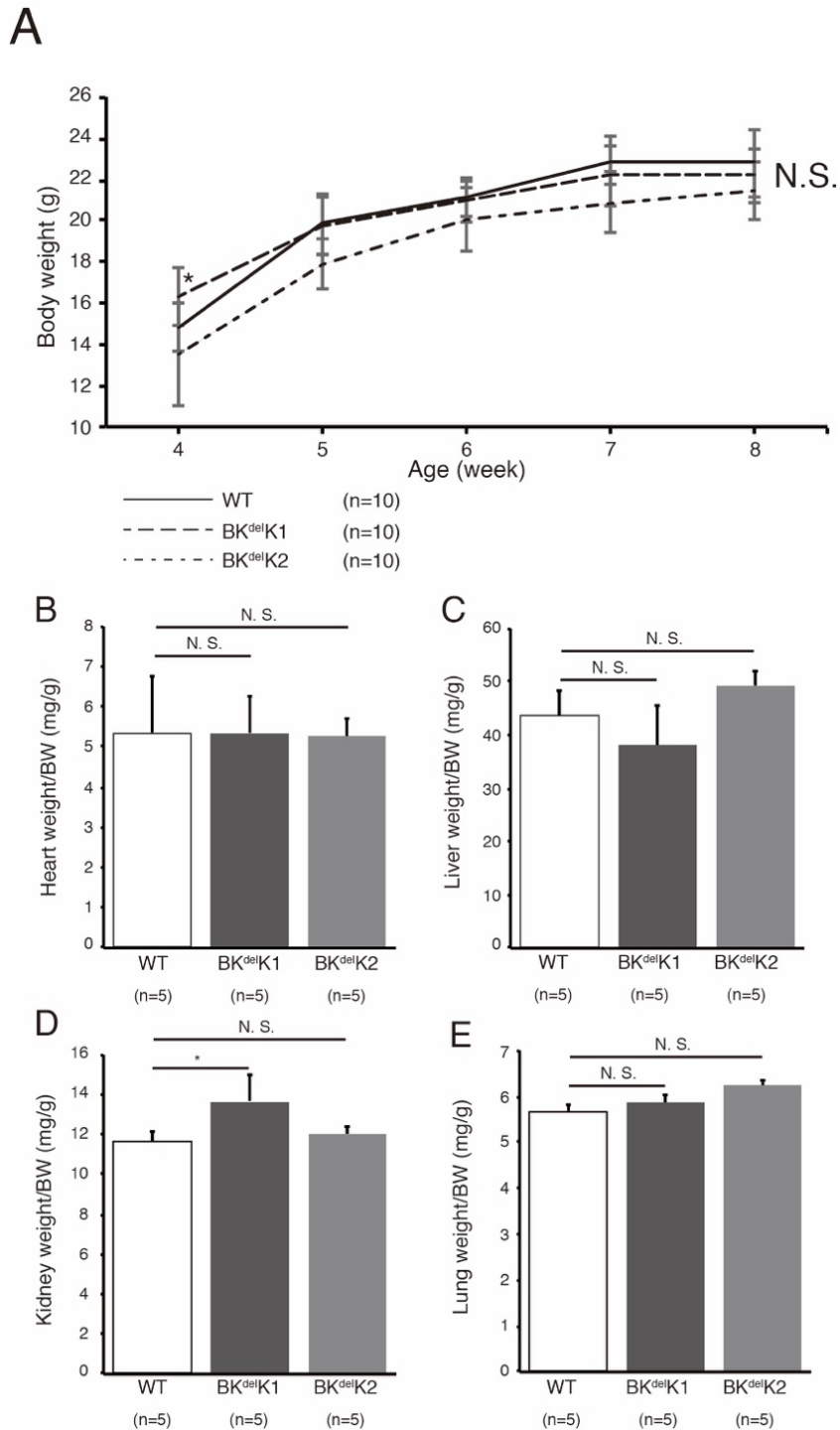


Fig. 9 4週齢から8週齢のマウスにおける体重とマウスの臓器重量

4週齢から8週齢のマウスにおける体重を平均 ± 標準偏差で示し、同週齢のWTマウスの体重との差をDunnett's testにより検定した(*: $p < 0.05$, N.S.: $p \geq 0.05$) (A)。8週齢のマウスの体重で補正された心臓 (B)、肝臓 (C)、腎臓 (D)、肺 (E)重量は平均 ± 標準偏差で示し、データはDunnett's testにより検定した。(*: $p < 0.05$, N.S.: $p \geq 0.05$)。

2.2.1.3 考察

実験に用いた 8 週齢の雄性マウスにおいて、BK^{del}K1 マウスと BK^{del}K2 マウスの外観は WT マウスと比べ差はみられず、その体重についても有意な差がみられなかった。WT マウスと比べ BK^{del}K1 マウスにおいて 4 週齢で、有意に体重が増加していたが、その他の週齢では有意な差はみられず、Kng 遺伝子の欠損による変化ではないと考えられた。また、8 週齢時点における心臓、肝臓、肺の重量についても影響はないと考えられた。

腎臓の重量は BK^{del}K1 マウスにおいて有意に増加していた。他方 BK^{del}K2 マウスにおいては H-Kng2 および L-Kng2 が腎臓で強く発現していたにもかかわらず (2.1.1 Fig. 3)、有意な差がみられなかったことから、Kng 遺伝子の欠損による変化かどうかはわからなかった。この差は実験的手技によることや BK^{del}K1 マウスの作成時に腎臓が大きなマウスが選択された可能性が考えられるが、この重量の差が何によるものなのか明らかにすることはできなかった。そのため、Kng が腎機能に影響を与えるか検討が必要であると考えられた。

2.2.2 血圧および心拍数

血圧調節は個体の生命維持に不可欠である。例えば低すぎる血圧は末梢に十分な酸素や栄養を送れなくなることから死に至る。一方、高すぎる血圧も脳血管障害や心血管障害、腎障害などの疾患に発展する可能性が高くなるために、投薬による適切な血圧管理が行われている。我が国において高血圧は収縮期血圧 140 mmHg または、拡張期血圧 90 mmHg 以上とされている⁵⁰。高血圧患者のうち 80 %が原因不明の本態性高血圧であり、根本的な治療は行えていない。我々は血圧調節にカリクレイン-キニン系が関係しているのではないかと考え、研究を行なった。

序論でも触れた通り、Kng は BK を遊離し、BK を生体に投与すると血圧は低下する¹。しかし、BK の血中半減期は 15 秒程度とされており、採血中にも BK は分解することから、血中 BK の定量は非常に難しく、報告により数 pg/ml から数 ng/ml とばらつきが大きい⁴。つまり、通常の生理的条件下における BK の正確な血中濃度すら明らかになっておらず、血中の BK が血圧調節にどのように働いているかについてはほとんど分かっていない。また、BK 受容体の欠損マウスによって BK の血圧調節について検討が行われているものの、その結果は一致していない。たとえば、恒常的に発現している B2 受容体アンタゴニストの投与や B2 受容体ノックアウトマウスの血圧は有意に高くなることが報告されている^{36,40}。一方、誘導型受容体である BK タイプ 1 受容体 (B1 受容体) の欠損マウスの血圧は WT マウスと変化がないことが報告されている³⁸。また、B1 受容体、B2 受容体両方を欠損したマウスは正常血圧であることが知られている⁴⁰。このように Kng、BK が血圧調節に関与しているかについては両論存在し、いまだに議論が分かれている。そこで我々が作出した BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスの血圧、心拍数を非観血的測定法であるテールカフ法によって測定し、Kng、BK が血圧調節に関与するかについて検討を行った。

2.2.2.1 方法

心拍数および血圧の測定

WT マウスと BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスを 8 週齢まで自由飲食下で飼育した。8 週齢の雄性マウスをアクリル製マウスホルダ内に保定し、無加温非観血型血圧計 (MK-2000, Muromachi Kikai, Japan) を用いて Tail-Cuff 法により心拍数および収縮期血圧を測定した。測定は室温 24 °C に維持された静かな部屋内で行った。測定を 10 回以上繰り返し、マウスを測定動作に馴化させたのち、測定動作中に明らかな体動がみられなかった 10 回の測定値の平均を当該マウスの心拍数・血圧とした。

有意差検定

得られたデータは平均値 ± 標準偏差で表した。データは Dunnett's test により有意差検定を行った。p < 0.05 であるとき、有意であると判定した。

2.2.2.2 結果

BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスの心拍数はそれぞれ 640 ± 27 beat/min、 650 ± 80 beat/min であり、WT の 655 ± 27 beat/min と比べ有意な差はみられなかった (Fig. 10A)。一方、血圧は BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスにおいてそれぞれ 112 ± 4.2 mmHg、 109 ± 4.8 mmHg であり、WT マウスの 101 ± 7.5 mmHg と比べ有意に上昇していた (Fig. 10B)。

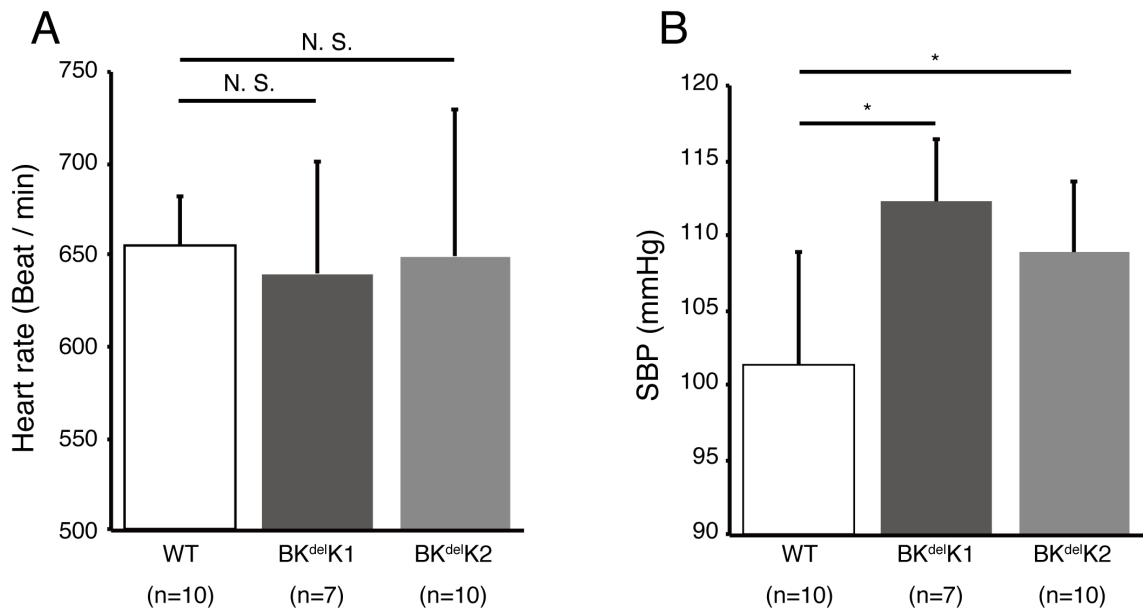


Fig. 10 WT および BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスの心拍数と血圧の測定

WT および BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスの心拍数の測定。データは平均 ± 標準偏差で示し、Dunnett's test により有意差検定を行なった (N.S. : $p \geq 0.05$) (A)。WT および BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスの血圧の測定。データは平均 ± 標準偏差で示し、Dunnett's test により有意差検定を行なった (* : $p < 0.05$)。

2.2.2.3 考察

BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスにおいて血圧が有意に高いことから Kng が正常時血圧調節に関わり、血圧を下げることによって、血圧恒常性の維持に寄与しているのではないかと考えられた。その血圧上昇は BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスにおいて心臓重量に影響がなかったことから (2.2.1 Fig. 9B)、心収縮力には影響せず、末梢血管抵抗や循環血液量に影響しているのではないかと考えられる。また、BK^{del}K2 マウスにおいて血漿 H-Kng は WT マウスと同程度存在し (2.1.5 Fig. 7A)、機能しているにもかかわらず (2.1.6 Fig. 8A)、その血圧は BK^{del}K1 マウスと同様に上昇していたことから、これらのマウスで共通して L-Kng が減少していたことが、血圧の上昇を引き起こしたのではないかと考えられる。つまり、恒常的な血圧調節に関する機能は血漿中 L-Kng の関与によることが示唆された。L-Kng の分解酵素である組織カリクレインの血漿中濃度は 0.3 ng/ml と少なく、血漿中において L-Kng は分解されにくいと考えられている⁵¹。そのため、L-Kng の機能は、組織カリクレインが高度に発現している腎臓や唾液腺などの組織近傍において重要視されている⁵²。腎臓はイオンや水分の再吸収を司り、循環血液量を調節することで血圧恒常性の調節に重要な機能を有している。そのため、L-Kng が腎臓に発現する組織カリクレインにより BK を遊離し、腎臓における Na⁺ および水の再吸収を抑制し、循環血液量を減少させることにより血圧を調節することが考えられた。

2.2.4 尿中イオン排泄と循環血漿量

前述した通り Kng は血圧降圧性ペプチドである BK の前駆タンパク質である。その降圧作用の一つは、腎臓において Na^+ の再吸収を抑制することで循環血液量が減少し、血圧を下げる作用であると考えられている。1993 年 Majima らは、Kng が細胞外に分泌できない遺伝子変異を持つキニノーゲン欠損ラット (BN/Ka ラット) を用いた研究を行い、通常食では BN/Ka ラットは正常血圧であるが、高塩分食を給餌した際に血圧が上昇することを示した¹⁶。その際、BN/Ka ラットは野生型ラットに比べ尿中 Na^+ 排泄量および尿量は減少しており、L-Kng を皮下に持続投与すると血圧は正常レベルにまで低下した。このような実験から、腎臓におけるカリクレイン-キニン系は過剰な Na^+ の再吸収を抑制し、循環血液量を減少させる働きを有し、食塩負荷時に高血圧の発症を抑制する機能を担うと考えられている。我々の作成した BK^{delK1} マウスや BK^{delK2} マウスでみられた正常時の血圧上昇は、BN-Ka ラットでみられた正常時の血圧に変化はないという報告と一見、異なっている。しかし、ラットには特有の T-Kng が存在している⁵³。T-Kng はヒトやマウスの L-Kng と構造が類似しているため、腎臓において発現する組織カリクレインの一種である rk1k10 によって切断されることで、Ile-Ser-BK (T-Kinin) を遊離しうる^{37 54}。T-Kinin は BK と同じように B2 受容体を介し作用することが知られている⁵⁵。BN/Ka ラットにおいて T-Kng は正常に発現しているため⁵⁶、BN/Ka ラットにおいては通常飼料レベルの NaCl 量であれば T-Kng が T-Kinin を遊離し、 Na^+ の再吸収を抑制するのではないだろうか。そのため BN/Ka ラットでは正常時血圧の変化はみられず、 BK^{delK1} マウスや BK^{delK2} マウスにおいては正常時血圧の上昇がみられたのではないかと考えられた。そこで我々はマウスにおいて食餌量、飲水量、尿量、24 時間あたりの尿中 Na、K イオン排泄量の測定および血漿量の測定を行い、L-Kng、BK の腎臓における再吸収抑制作用について検討した。

2.2.4.1 方法

個別代謝ケージへのマウスの馴化

7週齢の雄性 WT マウスおよび BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスを 24 時間、1 日おきに個別収容型代謝ケージ (KN-645, Natume, Japan) に収容し、1 週間ケージに馴化させた。

食餌量、飲水量、尿量の測定

事前に個別収容型代謝ケージに馴化させた 8 週齢のマウスを同ケージに収容した。収容時の給水器と給餌器の重量を測定し記録した。24 時間後マウスをケージから取り出し、給水器と給餌器の重量を測定し、収容時との差を飲水量、食餌量とした。代謝ケージ下部に溜まった尿を全量採取し、12,000 g、5 min 遠心分離を行い得られた上清の重量を尿量として測定した。

尿中 Na、K、クレアチニン濃度の測定

尿中 Na、K 濃度は選択的イオン電極により測定した。尿中クレアチニン濃度は酵素法によって測定した。得られた各種濃度に対し 24 時間あたりの尿量を乗ずることで 24 時間あたりの Na、K、クレアチニン排泄量を決定した。

色素法による血漿量の測定

8 週齢の WT マウスおよび BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスの体重を測定したのちイソフルランで麻酔し、孔径 0.22 μm の PVDF 製ディスポーザブルフィルターを用いて濾過滅菌した 2 %エバンスブルー溶液 60 μl を尾静脈より注入した。注入から 1 時間経過後、イソフルランで麻酔し、尾静脈から 2.1.4 と同様に血液を採取した。その後、1,500 g、15 min で遠心分離し、血漿として上清を採取した。得られた血漿 30 μl を 170 μl の生理食塩液で希釈し、MULTISKAN FC plate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA) を用いて 620 nm の波長の吸光度を測定した。サンプルは duplicate で測定し、得られた濃度の平均をサンプルの濃度とした。投与したエバンスブルー量 (120 μg) をサンプルの濃度で除し、血漿量を求め、体重で補正した。

有意差検定

得られたデータは平均値 \pm 標準偏差で表した。データは Dunnett's test によって有意差検定を行った。 $p < 0.05$ であるとき、有意であると判定した。

2.2.4.2 結果

飲水量は WT マウスで 4.1 ± 1.1 g/day であり、BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスではそれぞれ 3.3 ± 1.7 g/day、 4.4 ± 0.9 g/day であった (Fig. 11A)。食餌量は、WT マウスで 4.2 ± 0.2 g/day であり、BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスではそれぞれ 3.6 ± 0.5 g/day、 4.7 ± 0.2 g/day であった (Fig. 11B)。尿量は WT マウスで 0.36 ± 0.25 g/day であり、BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスではそれぞれ 3.2 ± 0.20 g/day、 0.34 ± 0.15 g/day であった (Fig. 11C)。尿中 Na⁺排泄量は WT マウスで 0.041 ± 0.020 mmol/day であり、BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスではそれぞれ 0.043 ± 0.021 mmol/day、 0.044 ± 0.027 mmol/day であった (Fig. 11D)。K⁺排泄量は WT マウスで 0.135 ± 0.047 mmol/day であり、BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスではそれぞれ 0.093 ± 0.055 mmol/day、 0.135 ± 0.080 mmol/day であった (Fig. 11E)。クレアチニン排泄量は WT マウスで 0.135 ± 0.047 mg/day であり、BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスではそれぞれ 0.093 ± 0.055 mg/day、 0.135 ± 0.080 mg/day であった (Fig. 11F)。体重で補正された血漿量は WT マウスで 0.088 ± 0.009 ml/g であり、BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスではそれぞれ 0.082 ± 0.014 ml/g、 0.100 ± 0.050 ml/g であった (Fig. 11G)。これらの結果において WT マウスと BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスに有意な差はみられなかった。

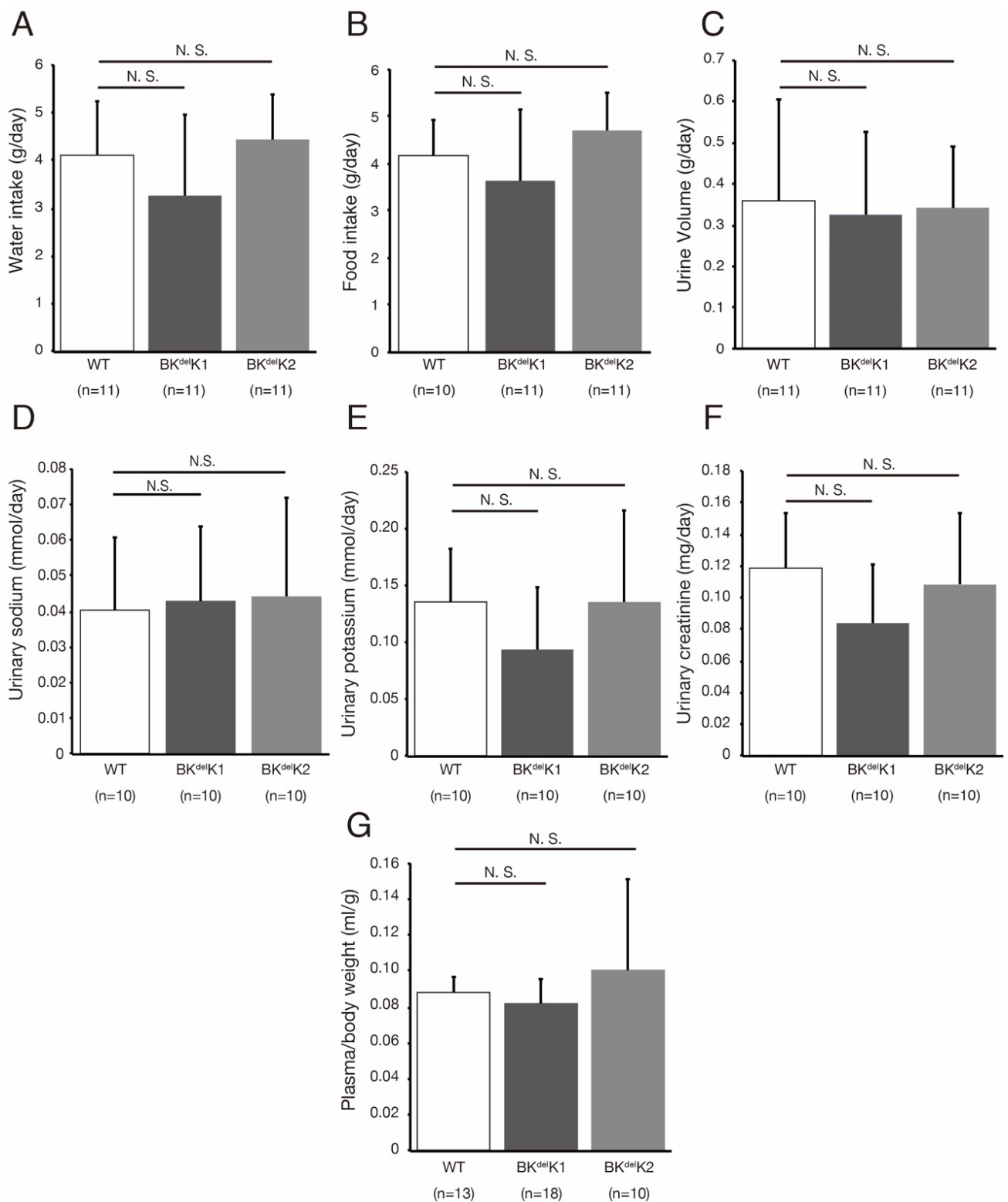


Fig. 11 飲水量、食餌量、尿量および尿中 Na^+ 、 K^+ 、クレアチニン排泄量、血漿量の測定
WT および BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスの飲水量 (A)、食餌量 (B)、尿量 (C)、尿中 Na^+ 排泄量 (D)、尿中 K^+ 排泄量 (E)、尿中クレアチニン排泄量 (F)、血漿量 (G) の測定。データは平均±標準偏差で示し、Dunnett's test により有意差検定を行なった (N.S. : $p \geq 0.05$)

2.2.4.3 考察

BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスの飲水量および食餌量は WT マウスに比べ、有意な差はなかったことから、摂取される Na⁺などの電解質量、水分量に差はないことを示している。また、BK^{del}K1 マウスは腎臓重量が有意に重かったが (2.2.1 Fig. 9D)、BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスの尿中クレアチニン排泄量に有意な差はみられず、腎機能は同等であると考えられた。さらに、24 時間あたりの Na⁺、K⁺排泄量に有意な差がなかったことから、BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスにおいて L-Kng の腎臓における Na⁺再吸収抑制作用の減弱はないと考えられた。これは循環体液量に変化していないことから同様に考えられる。つまり、L-Kng が腎臓以外に作用して血圧を低く保つことが示唆された。そのため我々は血管内で L-Kng が分解され、BK を遊離することで血圧調節を行っているのではないかと考えている。従来、血漿中の BK 量が少ないため、BK の血管拡張作用を介した恒常的な血圧調節はほとんどないと考えられてきた。しかし、血管内皮細胞が組織カリクレインを発現することや⁵⁷、組織カリクレインノックアウトマウスの摘出血管は Kng の添加による拡張を起こさないことを併せて考えると⁵⁸、L-Kng が血管内皮細胞の組織カリクレインによって BK を遊離し、血管内皮細胞周辺において高濃度の BK が存在できるのではないだろうか。これによって BK は血管内皮細胞に存在する B2 受容体を介して血管を拡張させ、恒常的に血圧を低く保っているのではないかと考えられる。

2.3 エンドトキシンショックにおける Kng 機能の検討

カリクレイン・キニン系は正常時には活性化されないため、正常時にはほとんど働いていないと考えられてきた。一方、炎症刺激などによりカリクレイン・キニン系が活性化されるような状況においては多量に BK が遊離し、多様な生理活性を示すと考えられている。例えば、BK の作用に発痛作用あり、BK の発痛作用は非常に強いとされている。また、カリクレイン・キニン系の炎症との関連については古くから検討されており、全身の炎症を強力に惹起する LPS 投与モデルにおいてもその関連が調べられている。

LPS は構造中に負電荷を有し、H-Kng は負電荷表面で活性化されたカリクレインにより分解されることで BK が遊離する⁵⁹。この際遊離した BK がエンドトキシンショックにおける血圧低下を引き起こすと考えられており、H-Kng が重要視されてきた。

我々は H-Kng が WT マウスと同程度存在し、機能している BK^{del}K2 マウスの解析により、恒常的な血圧調節に L-Kng が働いていることを示した (2.2.2 Fig. 10B)。我々はカリクレイン・キニン系が活性化される状況、例えば LPS を投与した際や、熱刺激時においても L-Kng が重要な役割を担っているのではないかと考えた。そこで、BK^{del}K1 マウスと BK^{del}K2 マウスのエンドトキシンショックにおける機能を解析した。

2.3.1 エンドトキシンショック反応性の解析

細菌内毒素 (LPS) はグラム陰性菌の外膜に存在するリポ多糖である。LPS は全身炎症を惹起することで多臓器不全を引き起こし、死に至らしめることがあり、エンドトキシンショックと呼ばれている。これは LPS と LPS 結合タンパク質の複合体がマクロファージに存在する CD14 と共同して MD-2/TLR-4 といったパターン認識受容体に認識されることで、マクロファージなどが多量のサイトカイン、たとえば TNF α を産生し、多臓器不全に至ると言われている。実際に CD14、MD-2、TLR-4 などの欠損マウスはエンドトキシンショック耐性を示す⁶⁰⁻⁶²。しかし、エンドトキシンショックのメカニズムについては、なお未解明である事が多く、治療法の確立までには至っていない。

エンドトキシンショックにおけるカリクレイン・キニン系の関与については古くから研究されている。例えば、LPS は負電荷を有しており、ラットに LPS を投与することにより血漿カリクレインが活性化され、H-Kng が分解される⁵⁹。このことから、H-

Kng の分解により生じた BK が血管を拡張させ、血管透過性を亢進し、血圧を低下させると考えられてきた。また、H-Kng を分解する酵素である血漿カリクレインを阻害する作用を持つ大豆由来のトリプシンインヒビターは、LPS により引き起こされる血圧低下を抑制する⁵⁹。他方、L-Kng は LPS 投与により分解されないとされ、エンドトキシンショックに関与しないと考えられてきた。一方、マウス脈絡叢上皮細胞株細胞 (ECPC4) において、培地中に LPS や TNF α を添加すると L-Kng の発現が亢進することが知られ、L-Kng が LPS と関与していることを示唆する報告もある⁶³。そのため、エンドトキシンショックにおいてどのようにカリクレイン・キニン系が関与しているのか、またその程度なども十分理解できているとは言い難い。そこで我々は BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスに LD₅₀ 相当量の LPS を投与し⁶⁴、カリクレイン・キニン系がエンドトキシンショックによる致死率に影響するかどうかを検討した。

2.3.1.1 方法

LPS 投与による生存率の解析

1 mg/ml の濃度で O111:B4 由来 LPS (Sigma) を PBS に分散し、超音波発生装置で 5 min 処理し、完全に溶解させた。直前に体重を測定した WT および BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスに LD₅₀ 相当量 (10.8 mg/kg) の LPS を腹腔内投与した。投与後 7 日間、24 時間毎に生存しているか観察した。

有意差検定

生存率は log-rank test により検定し、Bonferroni 法により調整した。データは Kaplan-Meier 曲線で示した。

2.3.1.2 結果

LPS 投与後 7 日目において、WT マウスの生存率は 67 %であったのに対し、BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスの生存率は 100 %と有意に生存率が高かった (Fig. 12)。

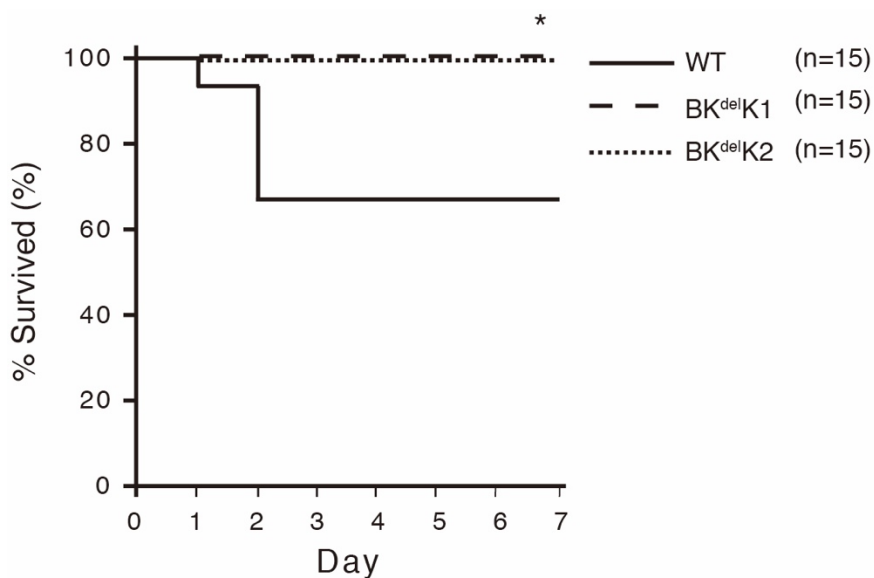


Fig. 12 LPS 投与後の生存率の解析

LPS 投与後の生存率比較。Log-rank test により検定し、Bonferroni 法により調整した (* : $P < 0.05$)。

2.3.1.3 考察

BK^{del}K1 マウスや BK^{del}K2 マウスにおける LPS 投与後の生存率が WT マウスに比べ高いことから、LPS が惹起する致死に Kng が関与していることが明らかになった。古くからエンドトキシンショックにおける血漿中 H-Kng の関与について検討されており、ラットの血漿を LPS とインキュベートすると血漿 H-Kng が分解することが知られている⁵⁹。また、ラットエンドトキシンショックによる致死率を BK 受容体拮抗薬である NPC 567 が改善することが知られている⁶⁵。このように Kng と LPS の関係は様々な研究がなされ、主に H-Kng が血漿カリクレインにより分解されることで遊離する BK が関与するのではないかと考えられてきた。

2017 年 Yang らは Kng1KO マウスを用いた研究によって、H-Kng が BK を介さずにエンドトキシンショックに関与すると報告した。彼らは H-Kng が LPS と複合体を形成し、この複合体が形成されはじめて TLR4 に認識されると主張しており、Kng1KO マウスにおいて血漿中に H-Kng がないため、H-Kng-LPS 複合体を形成することができず、エンドトキシンショック耐性が生じると考えた⁶⁶。一方、我々は本研究によって、BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスにおいて、エンドトキシンショック耐性が生じることを明らかにした (Fig. 12)。この結果は H-Kng が WT マウスと同様に存在し (2.1.5 Fig. 7)、機能している BK^{del}K2 マウスにおいて (2.1.6 Fig. 8) 生存率の改善を示しており、Yang らの主張と明らかに矛盾する。

この矛盾に関して、我々は L-Kng から遊離した BK が急激な血圧低下を引き起こし、循環不全により多臓器不全におちいることでマウスは死に至るのではないかと仮説をたて、さらなる検討を行った。

2.3.2 エンドトキシンショックにおける血圧の解析

従来、エンドトキシンショックにおいては H-Kng が中心であると考えられてきた。我々は L-Kng が減少し H-Kng は WT マウスと同様に存在し、機能する BK^{del}K2 マウスにおいてエンドトキシンショック耐性が生じることを見出した。これは L-Kng がエンドトキシンショックにおいて中心的な役割を担っていることを示しており、L-Kng が減少した BK^{del}K1 マウスや BK^{del}K2 マウスにおいてはエンドトキシンショック耐性がみられたのではないかと考えた。我々は、エンドトキシンショックにおいて L-Kng が組織カリクレインなどの酵素により分解され BK を遊離することでエンドトキシンショックにおける急激な血圧低下を引き起こしているのではないかと考え、LPS を投与した BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスにおける心拍数および血圧の変化について検討を行った。

2.3.2.1 方法

LPS 投与による心拍数および血圧の変化

WT および BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスの LPS 投与前の血圧および心拍数を 2.2.3 と同じように測定し、マウスのベースラインとした。その後、LD₅₀ 相当量の LPS を腹腔内に投与し、投与後 1 時間から 2 時間までの 1 時間、1 分毎に血圧を測定し、ベースラインと投与後の血圧、心拍数の差を血圧および心拍数の変化量として解析した。

有意差検定

得られたデータは平均値 ± 標準偏差で表した。データは Dunnett's test により有意差検定を行った。p < 0.05 であるとき、有意であると判定した。

2.3.2.2 結果

心拍数、血圧のベースラインは WT マウスで 600 ± 32 beat/min、 77.5 ± 3.1 mmHg、BK^{del}K1 マウスで 558 ± 33 beat/min、 91.8 ± 2.6 mmHg、BK^{del}K2 マウスで 539 ± 28 beat/min、 96.5 ± 3.7 mmHg であった。WT マウスにおいて LPS 投与後の心拍数は、ベースラインに比べ $+76.6 \pm 35.1$ beat/min 変化しており、BK^{del}K1 マウスと BK^{del}K2 マウスの LPS 投与後の心拍数の変化量はそれぞれベースラインと比べ $+94.5 \pm 40.4$ beat/min、 $+69.9 \pm 31.6$ beat/min と変化していた (Fig. 13A)。LPS 投与前後の心拍数の変化量は WT マウスと BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウス間において有意な差はみられなかった。WT マウスの LPS 投与後の血圧は、ベースラインに比べ -11 ± 5.8 mmHg と血圧が低下していたのに対し、BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスの LPS 投与後の血圧の変化量はそれぞれ -1.3 ± 9.9 mmHg、 -1.6 ± 6.6 mmHg とベースラインの血圧に比べほとんど変化していなかった (Fig. 13B)。

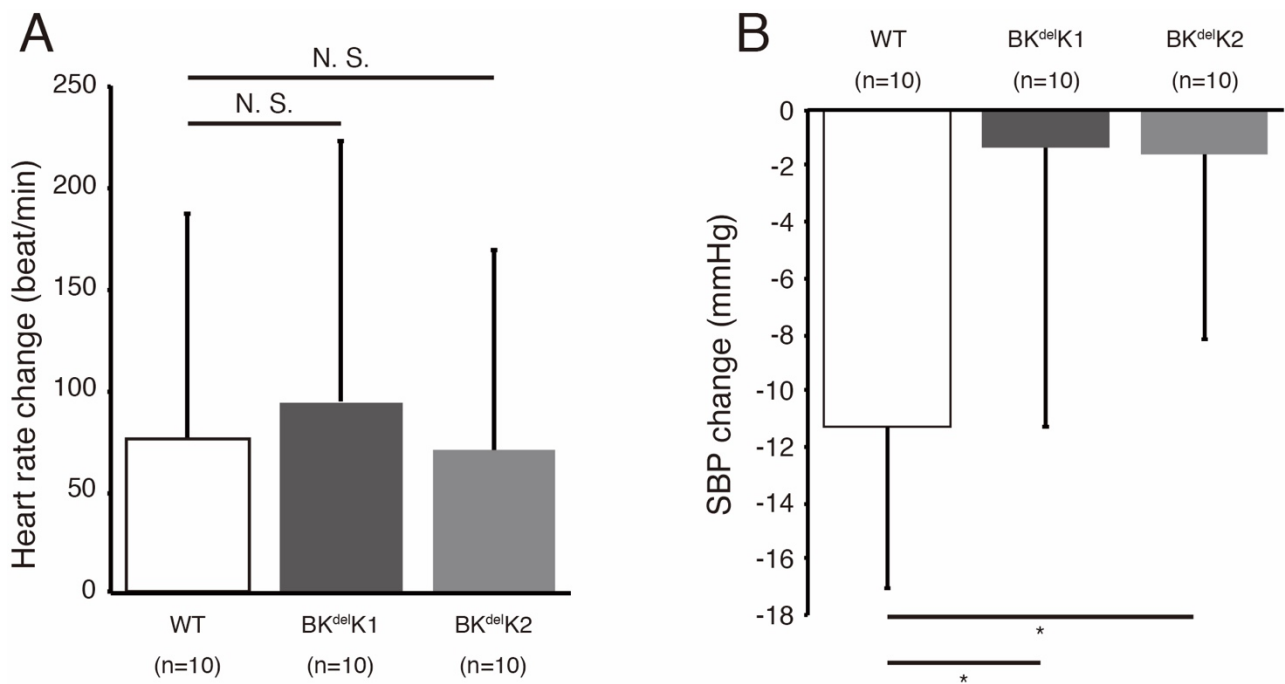


Fig. 13 LPS 投与後の生存率の解析

LPS 投与後の心拍数の変化量 (A) および 血圧の変化量 (B)。データは平均 \pm 標準偏差で示し、Dunnett's test により有意差検定を行なった (N.S. : $p \geq 0.05$ 、* : $p < 0.05$)

2.3.2.3 考察

LPS 投与後の心拍数は BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスにおいて差はみられず、血圧低下は WT マウスに比べ有意に抑制されていた。H-Kng が WT マウスと同様に存在している BK^{del}K2 マウスにおいて血圧が変化しなかったことは LPS により誘発される血圧低下に L-Kng が関与していることを示している。生体内において、血漿中の L-Kng は血管内皮細胞などで産生された組織カリクレインにより分解され、BK やカリジンを遊離し、NO を介した血管拡張作用によって血圧を低下させていると考えられる⁵⁷。エンドトキシンショックにおいても組織カリクレイン-L-Kng が活性化され、それによって生じた BK が血圧を低下させ、マウスは多臓器不全に陥るのではないかと考えられる。実際、いくつかの臨床研究ではエンドトキシンショックにおける組織カリクレイン-L-Kng 系の関与を示しており、血漿中の組織カリクレイン量が多い敗血症患者の予後が悪いこと^{67,68}。組織カリクレイン・L-Kng 系を阻害することが、エンドトキシンショックの重症化予防や根本的な治療につながることも考えられる。

Kng1 と Kng2 を同一個体内で KO したマウス (KngDKO マウス) や、組織カリクレインを KO したマウスの作成、解析を行うことで、エンドトキシンショックにおける組織カリクレイン・L-Kng 系の役割についてより詳細に明らかにでき、予防や治療に発展させられるのではないかと考える。

3 総括

Kng は古くから研究されてきた多機能タンパクで、現在もなお盛んに研究されている。その機能は血圧降下、炎症、発痛、血液凝固など多岐にわたるとされるが、そのほとんどが炎症や組織損傷に伴う病態下で重要な役割を担うと考えられてきた⁴。また Kng のスプライシングバリエーションのうち H-Kng は血漿カリクレインによって分解され、BK を遊離することから、血漿中における血漿カリクレイン・H-Kng 系が BK の主たる供給源であると考えられている。しかし、血漿中には H-Kng に比べ多量の L-Kng が含まれており、この機能はいまだに解明されず、注目もされていなかった⁶⁹。そこで著者らは Kng と血圧の関係についてより詳細に解析するために Kng 遺伝子改変マウス(BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウス)を作成し (2.1.2 Fig. 4)、生理的血圧、エンドトキシンショック病態においてどのような影響を及ぼすかを検討した。

3.1 Kng の生理的血圧調節における役割

カリクレイン・キニン系は BK の分解が非常に早く、血漿中の BK 濃度が低いために、生体内において通常は作用せず、炎症や血液凝固に伴い、多量の BK が遊離した際においてのみ働くものであるとされていた。しかし、BK の血漿中濃度が正確に測定できず、その重要性は詳細に理解できていなかった。そのため、BK の前駆タンパク質の Kng が消失した Kng 欠損ラット (BN/Ka ラット) を用いた実験を通じて、生体内におけるカリクレイン・キニン系の意義が考察されてきた。BN/Ka ラットは Kng 遺伝子の変異によって H-Kng と L-Kng が細胞外に分泌できないラットである。しかし、ラットにおいてはヒトやマウスには存在しない T-Kng と呼ばれるラット特有の Kng が存在しており、BN/Ka ラットにおいてもこの T-Kng は正常に発現しているため、ラットを用いて得た結果を他の生物に適用できるかは疑問である。そこで 1990 年ごろに我々の研究室ではカリクレイン・キニン系の全容を解明するために Kng KO マウスの作成に取り組んだ。しかしながら、ES 細胞を用いた KngKO マウスはなお Kng の発現がみられ研究は頓挫した。この KngKO マウス血漿中の Kng は、2004 年、Cardoso らがマウスにおいて Kng1 遺伝子と Kng2 遺伝子が存在することを明らかにしたことで、KO できなかった Kng2 遺伝子が発現しているものと考えられた⁷⁰。2008 年、Merkulov らはマウスにおい

て Kng1 遺伝子を欠損させたマウスを作成した⁴⁶。彼らは H-Kng1 の mRNA が肝臓において発現しており、H-Kng2 の mRNA は発現していないことから血漿中 H-Kng2 の不在に言及しており、実際に彼らの作成した Kng1KO マウス血漿において、H-Kng が消失し、H-Kng の持つ内因系血液凝固因子たる機能が低下していることについて記述している。このように Kng1KO マウスはすでに作出され、研究が進んでいる。しかし、マウス生体内において Kng2 は ORF を備え、BK の配列を有しており、mRNA として発現している Kng1KO マウスでは Kng2 が機能しており、マウスにおける Kng 機能の全体像は明らかにならない。

我々は Kng1 を KO したマウス(BK^{del}K1)、Kng2 を KO したマウス(BK^{del}K2)を作成し(2.1.2 Fig. 4)、その両方を研究対象に組み入れることで、Kng 機能をより詳細に明らかにすることを試みた。実際、我々が作成した BK^{del}K1 マウスと BK^{del}K2 マウスにおいて正常時の血圧が WT マウスに比べ有意に高いことが明らかになった(2.2.2 Fig. 10B)。また、マウス血漿中の H-Kng は BK^{del}K1 マウス血漿においてのみ消失していたことから(2.1.5 Fig. 7A)、そのほとんどが Kng1 遺伝子由来の産物であることが明らかになった。これは主に血漿タンパクを供給する肝臓において H-Kng1 の mRNA のみが発現しているという報告や、Kng1KO マウスにおいて H-Kng の生理機能である内因系血液凝固能が低下するという報告によって裏付けられるものであり、Merkulov らの作成した Kng1KO マウスの報告と一致する^{29,46}。他方、血漿中の総 Kng 量、L-Kng 量については BK^{del}K1 マウスと BK^{del}K2 マウスの両方において半量以下にまで減少しており、マウスにおける L-Kng1、L-Kng2 の存在が示された(2.1.4 Fig. 6、2.1.5 Fig. 7B)。さらに、BK^{del}K2 マウスにおいて血漿中の H-Kng が存在し、機能しているのにも関わらず(2.1.6 Fig. 8)、高血圧を呈していることから、BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスにみられた高血圧は H-Kng の欠損では説明できない。つまり、L-Kng が恒常的に血圧低下に働いているのではないかと考えられた。L-Kng は腎臓において Na⁺の再吸収を抑制し、循環血液量を減少させることで、食塩負荷時の血圧を低く保つことが知られていた¹⁶。BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスは尿中 Na⁺排泄量、循環血漿量に有意な差はみられず(2.2.4 Fig. 11)、L-Kng が腎臓以外に働いて恒常的に血圧を低下させていると考えられた。例えば、血中において L-Kng が分解され生じた BK が血管に作用する可能性がある。2003 年 Yayama らは血管の最も血液側に存在する細胞である血管内皮細胞が組織カリクレインを産生することを

示した⁵⁷。また、組織カリクレインを KO したマウスの血管は Kng 添加による拡張が起これなくなるという報告もある⁵⁸。これらのことを合わせて考えると、血漿中の L-Kng が血管内皮細胞より分泌された組織カリクレインによって分解され BK を生じ、血管を拡張させることで恒常的に血圧調節に関与していると考えられる。組織カリクレイン・L-Kng 系が血管内で働き恒常的に血圧低下に働くことは、炎症などの特定の状況下においてのみ血漿カリクレイン・H-Kng 系が活性化され作用するという考え方と全く異なるものである。ヒト本態性高血圧症はその 80% が原因不明であるとされるが、組織カリクレイン・L-Kng 系が関与している可能性も考えられる。Kng1、Kng2 両遺伝子を同一個体において KO した KngDKO マウスが確立できれば、更に明確な Kng の生理的役割の解明に繋がると考える。

3.2 Kng のエンドトキシンショック病態における役割

Kng と LPS の関係については古くから研究されており、ヒト敗血症患者において H-Kng、血漿カリクレイン、血液凝固因子が減少することから、H-Kng から BK が遊離していると考えられてきた⁷¹。実際、B2 受容体アンタゴニストである NPC567 がラットのエンドトキシンショックによる致死を劇的に改善する⁶⁵。一方、B2 受容体アンタゴニストに加え B1 受容体アンタゴニストを同時に投与した際、その保護的作用を減弱することが知られている⁷²。受容体欠損マウスにおいても同様に、B2 受容体欠損マウスは LPS 誘発低血圧が抑制されるのに対し、B1 受容体欠損マウスでは WT マウスに比べ有意に血圧が低くなる⁷³という報告がある。一方、B1 受容体欠損マウス、B2 受容体欠損マウスでは LPS 投与後に血圧が低下するが、B1/B2 両受容体欠損マウスは血圧が低下しないという報告があり、カリクレイン・キニン系のエンドトキシンショックにおける実質的な機能は明確にはなっていなかった⁴⁰。

2017 年 Yang らは Kng1KO マウスがエンドトキシンショック耐性を示すことを見出した。Yang らは H-Kng が LPS と複合体を形成し、LPS の毒性部 (Lipid A) を TLR に提示する役割を担っており、H-Kng が血中における LPS のキャリアとして働き、エンドトキシンショックの成因に重要であると主張した⁶⁶。我々もこの報告とほとんど同時期に BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスに対し LPS を投与し、BK^{del}K1 マウスだけでなく、血漿中に H-Kng が存在している BK^{del}K2 マウスにおいてもエンドトキシンショック耐性が生

じることを見出した (2.3.1 Fig. 12)。この結果は、血漿中の H-Kng がエンドトキシンショックの成因に重要であり、LPS のキャリアタンパクであるという Yang らの主張と明らかに矛盾する。我々は BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスにおけるエンドトキシンショック耐性はこれらのマウスにおいて共通して血漿 L-Kng が減少していることに起因し、BK^{del}K1 マウスと BK^{del}K2 マウスにおいて、LPS 投与後の血圧低下が抑制されたことから (2.3.2 Fig. 13B)、エンドトキシンショックにおいて、L-Kng が血圧下降に働いていると考えている。すなわち、血漿中の L-Kng が血管内皮細胞などにより産生された組織カリクレインによって分解され、BK を遊離し、血管を拡張させることにより血圧低下を引き起こし、最終的に多臓器不全、死に至るのではないかと考えられた。2021 年、臨床研究において、敗血症患者の予後は血中組織カリクレイン濃度と逆相関するという報告がなされており⁶⁷、この報告からもやはり血中における組織カリクレイン・L-Kng 系がエンドトキシンショックに関与することが考えられる。現状、BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスは完全な Kng ノックアウトではなく、Kng が残存しているためにそれぞれの欠損を補っている可能性がある。両方の Kng 遺伝子を完全に破壊した Kng ダブル KO マウスの作出と解析によって、よりクリアな結果が得られるのではないかと考えている。

Kng は古くから病態下での血圧降下に関して多くの検討が為されているが、恒常的な血圧調節に関してはその関与は明らかでなかった。今回の研究でキニンが恒常的な血圧調節に関与しており、L-Kng がその中心的な役割を担っていること、またエンドトキシンショックにおいて血圧降下の中心に存在している可能性を示すことが出来た。ヒトの疾患において原因がはっきりしていない本態性高血圧において組織カリクレイン・L-Kng 系が関与している可能性もある。また今回明らかにしたエンドトキシンショックにおける組織カリクレイン・L-Kng 系の重要性の発見は、エンドトキシンショックにおける新しい治療法の開発につながる可能性がある。

4 謝辞

本研究を進めるに当たって暖かいご指導とご鞭撻を賜りました、神戸学院大学薬学部 鷹野 正興 教授、ならびに刈谷 龍昇 講師、濱田 美知子 講師に心から感謝いたします。

本論文の作成にあたり、主査、副査として多大なご助言、ご校閲を賜りました神戸学院大学薬学部 福島 昭二 教授、神戸学院大学薬学部 屋山 勝俊 教授に厚く御礼申し上げます。

実験に関して、マウスを作成していただいた放射線医学総合研究所 塚本智史 博士、さまざまなご助力をいただきました神戸学院大学 前倉 孝治 氏、細胞分子生物学研究室メンバーに心から感謝いたします。

また、実験機器の使用を融通してくださった神戸学院大学薬学部 寺田 侑加 助教、神戸学院大学循環器薬理学研究室の皆様、心から感謝致します。

この研究を進める上で、合同発表会などさまざまな場面で励まし、応援していただいた神戸学院大学薬学部教職員の皆様、先輩、後輩、友人に御礼申し上げます。

末筆になりましたが、あたたかく見守り、多大なるご支援をいただきました家族に心から感謝します。

5 引用文献

- 1 Bonner, G., Preis, S., Schunk, U., Toussaint, C. & Kaufmann, W. Hemodynamic effects of bradykinin on systemic and pulmonary circulation in healthy and hypertensive humans. *J Cardiovasc Pharmacol* **15 Suppl 6**, S46-56 (1990).
- 2 Paterson, K. J., Zambreau, L., Bennett, D. L. & McMahon, S. B. Characterisation and mechanisms of bradykinin-evoked pain in man using iontophoresis. *Pain* **154**, 782-792, doi:10.1016/j.pain.2013.01.003 (2013).
- 3 Rocha, E. S. M., Beraldo, W. T. & Rosenfeld, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol* **156**, 261-273, doi:10.1152/ajplegacy.1949.156.2.261 (1949).
- 4 松尾寿之、鹿取信. (講談社, 1994).
- 5 Webster, R. G. Public administration. *Am J Public Health Nations Health* **51**, 1645-1646, doi:10.2105/ajph.51.11.1645 (1961).
- 6 Hall, J. M. Bradykinin receptors. *Gen Pharmacol* **28**, 1-6, doi:10.1016/s0306-3623(96)00174-7 (1997).
- 7 Regoli, D., Barabe, J. & Park, W. K. Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Can J Physiol Pharmacol* **55**, 855-867, doi:10.1139/y77-115 (1977).
- 8 Burch, R. M. & Kyle, D. J. Recent developments in the understanding of bradykinin receptors. *Life Sci* **50**, 829-838, doi:10.1016/0024-3205(92)90201-y (1992).
- 9 Regoli, D. C., Marceau, F. & Lavigne, J. Induction of beta 1-receptors for kinins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Pharmacol* **71**, 105-115, doi:10.1016/0014-2999(81)90391-5 (1981).
- 10 Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376, doi:10.1038/288373a0 (1980).
- 11 Palmer, R. M., Ferrige, A. G. & Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526, doi:10.1038/327524a0 (1987).
- 12 Mandle, R. J., Colman, R. W. & Kaplan, A. P. Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 4179-4183, doi:10.1073/pnas.73.11.4179 (1976).
- 13 Yano, M., Nagasawa, S. & Suzuki, T. Partial purification and some properties of high molecular weight kininogen, bovine kininogen-I. *J Biochem* **69**, 471-481 (1971).
- 14 E.Erdös(ed.). in *Handbook of Experimental Pharmacology* Vol. 25 suppl. 428 (Springer Berlin, Heidelberg, 1979).
- 15 Bastian, S., Loillier, B., Paquet, J. L. & Pruneau, D. Stable expression of human kinin B1 receptor

- in 293 cells: pharmacological and functional characterization. *Br J Pharmacol* **122**, 393-399, doi:10.1038/sj.bjp.0701380 (1997).
- 16 Majima, M. *et al.* High sensitivity to salt in kininogen-deficient brown Norway Katholiek rats. *Hypertension* **22**, 705-714, doi:10.1161/01.hyp.22.5.705 (1993).
 - 17 Keele, C. A. The chemistry of pain production. *Proc R Soc Med* **60**, 419-422 (1967).
 - 18 Muscella, A., Cossa, L. G., Vetrugno, C. & Marsigliante, S. Bradykinin stimulates prostaglandin E(2) release in human skeletal muscular fibroblasts. *Mol Cell Endocrinol* **507**, 110771, doi:10.1016/j.mce.2020.110771 (2020).
 - 19 Ikeda, Y., Ueno, A., Naraba, H. & Oh-ishi, S. Evidence for bradykinin mediation of carrageenin-induced inflammatory pain: a study using kininogen-deficient Brown Norway Katholiek rats. *Biochem Pharmacol* **61**, 911-914, doi:10.1016/s0006-2952(01)00536-6 (2001).
 - 20 Katori, M. *et al.* A possible role of prostaglandins and bradykinin as a trigger of exudation in carrageenin-induced rat pleurisy. *Agents Actions* **8**, 108-112, doi:10.1007/BF01972411 (1978).
 - 21 Habermann, E., Klett, W. & Rosenbusch, G. [Partial Purification and Properties of a Kininogen from Bovine Blood]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **332**, 121-142, doi:10.1515/bchm2.1963.332.1.121 (1963).
 - 22 Komiya, M., Kato, H. & Suzuki, T. Bovine plasma kininogens. III. Structural comparison of high molecular weight and low molecular weight kininogens. *J Biochem* **76**, 833-845 (1974).
 - 23 Kitamura, N. *et al.* A single gene for bovine high molecular weight and low molecular weight kininogens. *Nature* **305**, 545-549, doi:10.1038/305545a0 (1983).
 - 24 Nakanishi, S. Substance P precursor and kininogen: their structures, gene organizations, and regulation. *Physiol Rev* **67**, 1117-1142, doi:10.1152/physrev.1987.67.4.1117 (1987).
 - 25 Ohkubo, I., Kurachi, K., Takasawa, T., Shiokawa, H. & Sasaki, M. Isolation of a human cDNA for alpha 2-thiol proteinase inhibitor and its identity with low molecular weight kininogen. *Biochemistry* **23**, 5691-5697, doi:10.1021/bi00319a005 (1984).
 - 26 Tait, J. F. & Fujikawa, K. Primary structure requirements for the binding of human high molecular weight kininogen to plasma prekallikrein and factor XI. *J Biol Chem* **262**, 11651-11656 (1987).
 - 27 Hilton, S. M. & Lewis, G. P. The cause of the vasodilatation accompanying activity in the submandibular salivary gland. *J Physiol* **128**, 235-248, doi:10.1113/jphysiol.1955.sp005302 (1955).
 - 28 Takano, M. *et al.* Molecular cloning of cDNAs for mouse low-molecular-weight and high-molecular-weight prekininogens. *Biochim Biophys Acta* **1352**, 222-230, doi:10.1016/s0167-4781(97)00018-3 (1997).
 - 29 Shesely, E. G., Hu, C. B., Alhenc-Gelas, F., Meneton, P. & Carretero, O. A. A second expressed kininogen gene in mice. *Physiol Genomics* **26**, 152-157, doi:10.1152/physiolgenomics.00244.2005 (2006).

- 30 Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816-821, doi:10.1126/science.1225829 (2012).
- 31 Meloni, F. J., Gustafson, E. J. & Schmaier, A. H. High molecular weight kininogen binds to platelets by its heavy and light chains and when bound has altered susceptibility to kallikrein cleavage. *Blood* **79**, 1233-1244 (1992).
- 32 Jiang, Y. P., Muller-Esterl, W. & Schmaier, A. H. Domain 3 of kininogens contains a cell-binding site and a site that modifies thrombin activation of platelets. *J Biol Chem* **267**, 3712-3717 (1992).
- 33 Reddigari, S. R. *et al.* Human high molecular weight kininogen binds to human umbilical vein endothelial cells via its heavy and light chains. *Blood* **81**, 1306-1311 (1993).
- 34 Vane, J. R. The release and fate of vaso-active hormones in the circulation. *Br J Pharmacol* **35**, 209-242, doi:10.1111/j.1476-5381.1969.tb07982.x (1969).
- 35 Ferreira, S. H. & Vane, J. R. The disappearance of bradykinin and eledoisin in the circulation and vascular beds of the cat. *Br J Pharmacol Chemother* **30**, 417-424, doi:10.1111/j.1476-5381.1967.tb02148.x (1967).
- 36 Gavras, H., Benetos, A. & Gavras, I. Contribution of bradykinin to maintenance of normal blood pressure. *Hypertension* **9**, III147-149, doi:10.1161/01.hyp.9.6_pt_2.iii147 (1987).
- 37 Okamoto, H. & Greenbaum, L. M. Isolation and structure of T-kinin. *Biochem Biophys Res Commun* **112**, 701-708, doi:10.1016/0006-291x(83)91519-x (1983).
- 38 Pesquero, J. B. *et al.* Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8140-8145, doi:10.1073/pnas.120035997 (2000).
- 39 Borkowski, J. A. *et al.* Targeted disruption of a B2 bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. *J Biol Chem* **270**, 13706-13710, doi:10.1074/jbc.270.23.13706 (1995).
- 40 Cayla, C. *et al.* Mice deficient for both kinin receptors are normotensive and protected from endotoxin-induced hypotension. *FASEB J* **21**, 1689-1698, doi:10.1096/fj.06-7175com (2007).
- 41 Omata, K., Carretero, O. A., Scicli, A. G. & Jackson, B. A. Localization of active and inactive kallikrein (kininogenase activity) in the microdissected rabbit nephron. *Kidney Int* **22**, 602-607, doi:10.1038/ki.1982.218 (1982).
- 42 Scicli, A. G., Gandolfi, R. & Carretero, O. A. Site of formation of kinins in the dog nephron. *Am J Physiol* **234**, F36-40, doi:10.1152/ajprenal.1978.234.1.F36 (1978).
- 43 Tomita, K. & Pisano, J. J. Binding of [3H]bradykinin in isolated nephron segments of the rabbit. *Am J Physiol* **246**, F732-737, doi:10.1152/ajprenal.1984.246.5.F732 (1984).
- 44 Berry, T. D. *et al.* A gene for high urinary kallikrein may protect against hypertension in Utah kindreds. *Hypertension* **13**, 3-8, doi:10.1161/01.hyp.13.1.3 (1989).
- 45 Diniz, C. R. & Carvalho, I. F. A micromethod for determination of bradykininogen under several conditions. *Ann N Y Acad Sci* **104**, 77-89, doi:10.1111/j.1749-6632.1963.tb17654.x (1963).

- 46 Merkulov, S. *et al.* Deletion of murine kininogen gene 1 (mKng1) causes loss of plasma kininogen and delays thrombosis. *Blood* **111**, 1274-1281, doi:10.1182/blood-2007-06-092338 (2008).
- 47 Saito, H., Ratnoff, O. D., Waldmann, R. & Abraham, J. P. Fitzgerald Trait: Deficiency of a Hitherto Unrecognized Agent, Fitzgerald Factor, Participating in Surface-Mediated Reactions of Clotting, Fibrinolysis, Generation of Kinins, and the Property of Diluted Plasma Enhancing Vascular Permeability (PF/Dil). *J Clin Invest* **55**, 1082-1089, doi:10.1172/JCI108009 (1975).
- 48 Emanuelli, C. *et al.* Dilated and failing cardiomyopathy in bradykinin B(2) receptor knockout mice. *Circulation* **100**, 2359-2365, doi:10.1161/01.cir.100.23.2359 (1999).
- 49 Meneton, P. *et al.* Cardiovascular abnormalities with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2634-2639, doi:10.1073/pnas.051619598 (2001).
- 50 日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン作成委員会(編). *高血圧治療ガイドライン 2019*. p18 (ライフサイエンス出版, 2019).
- 51 Feener, E. P., Zhou, Q. & Fickweiler, W. Role of plasma kallikrein in diabetes and metabolism. *Thromb Haemost* **110**, 434-441, doi:10.1160/TH13-02-0179 (2013).
- 52 Hamid, S., Rhaleb, I. A., Kassem, K. M. & Rhaleb, N. E. Role of Kinins in Hypertension and Heart Failure. *Pharmaceuticals (Basel)* **13**, doi:10.3390/ph13110347 (2020).
- 53 Okamoto, H., Itoh, N. & Uwani, M. Identification of T-kininogen in rat urine. *Biochem Pharmacol* **36**, 2979-2984, doi:10.1016/0006-2952(87)90212-7 (1987).
- 54 Ma, J. X., Chao, J. & Chao, L. Molecular cloning and characterization of rKlk10, a cDNA encoding T-kininogenase from rat submandibular gland and kidney. *Biochemistry* **31**, 10922-10928, doi:10.1021/bi00159a036 (1992).
- 55 Gao, X., Stewart, J. M., Vavrek, R. J. & Greenbaum, L. M. Characterization of receptor-mediated actions of T-kinin. *Biochem Pharmacol* **46**, 1607-1612, doi:10.1016/0006-2952(93)90330-y (1993).
- 56 Hayashi, I. *et al.* Demonstration of the third kininogen in high and low molecular weight kininogens-deficient Brown Norway Katholiek rat. *Thromb Res* **36**, 509-516, doi:10.1016/0049-3848(84)90190-7 (1984).
- 57 Yayama, K., Kunimatsu, N., Teranishi, Y., Takano, M. & Okamoto, H. Tissue kallikrein is synthesized and secreted by human vascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* **1593**, 231-238, doi:10.1016/s0167-4889(02)00393-2 (2003).
- 58 Bergaya, S. *et al.* Decreased flow-dependent dilation in carotid arteries of tissue kallikrein-knockout mice. *Circ Res* **88**, 593-599, doi:10.1161/01.res.88.6.593 (2001).
- 59 Katori, M., Majima, M., Odoi-Adome, R., Sunahara, N. & Uchida, Y. Evidence for the involvement of a plasma kallikrein-kinin system in the immediate hypotension produced by endotoxin in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* **98**, 1383-1391, doi:10.1111/j.1476-5381.1989.tb12688.x (1989).

- 60 Haziot, A. *et al.* Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* **4**, 407-414, doi:10.1016/s1074-7613(00)80254-x (1996).
- 61 Hoshino, K. *et al.* Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* **162**, 3749-3752 (1999).
- 62 Nagai, Y. *et al.* Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* **3**, 667-672, doi:10.1038/ni809 (2002).
- 63 Takano, M. *et al.* Lipopolysaccharide activates the kallikrein-kinin system in mouse choroid plexus cell line ECPC4. *Neurosci Lett* **434**, 310-314, doi:10.1016/j.neulet.2008.01.072 (2008).
- 64 von Drygalski, A., Furlan-Freguia, C., Ruf, W., Griffin, J. H. & Mosnier, L. O. Organ-specific protection against lipopolysaccharide-induced vascular leak is dependent on the endothelial protein C receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**, 769-776, doi:10.1161/ATVBAHA.112.301082 (2013).
- 65 Wilson, D. D. *et al.* D-Arg-[Hyp3-D-Phe7]-bradykinin, a bradykinin antagonist, reduces mortality in a rat model of endotoxic shock. *Circ Shock* **27**, 93-101 (1989).
- 66 Yang, A. *et al.* An essential role of high-molecular-weight kininogen in endotoxemia. *J Exp Med* **214**, 2649-2670, doi:10.1084/jem.20161900 (2017).
- 67 Ran, X. *et al.* Tissue Kallikrein Exacerbating Sepsis-Induced Endothelial Hyperpermeability is Highly Predictive of Severity and Mortality in Sepsis. *J Inflamm Res* **14**, 3321-3333, doi:10.2147/JIR.S317874 (2021).
- 68 Lin, W. C., Chen, C. W., Chao, L., Chao, J. & Lin, Y. S. Plasma kallistatin in critically ill patients with severe sepsis and septic shock. *PLoS One* **12**, e0178387, doi:10.1371/journal.pone.0178387 (2017).
- 69 Mashiko, H. & Takahashi, H. Canine plasma kininogen: evidence for the presence of two kininogens and purification of high molecular weight kininogen and characterization as multi-functional molecule. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **117**, 535-543, doi:10.1016/s0305-0491(97)00008-4 (1997).
- 70 Cardoso, C. C. *et al.* Structure and expression of two kininogen genes in mice. *Biol Chem* **385**, 295-301, doi:10.1515/BC.2004.025 (2004).
- 71 DeLa Cadena, R. A. *et al.* Activation of the kallikrein-kinin system after endotoxin administration to normal human volunteers. *Blood* **81**, 3313-3317 (1993).
- 72 Siebeck, M. *et al.* Effect of combined B1 and B2 kinin receptor blockade in porcine endotoxin shock. *Immunopharmacology* **33**, 81-84, doi:10.1016/0162-3109(96)00060-4 (1996).
- 73 Seguin, T. *et al.* Hemodynamic and renal involvement of B1 and B2 kinin receptors during the acute phase of endotoxin shock in mice. *Int Immunopharmacol* **8**, 217-221, doi:10.1016/j.intimp.2007.08.008 (2008).

6 主論文

Ohnaka Y, Tsukamoto S, Iwai Y, Hamada-Kanazawa M, Kariya R, Takano M. Bradykinin deficiency causes high blood pressure in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2023 Nov 12;681:73-79. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.09.059. Epub 2023 Sep 22. PMID: 37757669.