

発表番号 50 (0339)

食塩感受性高血圧と脳循環動態(脳血流・脳血管径)の解析  
-遺伝子改変マウスと遺伝的脳卒中ラットを用いた研究-

助成研究者名:野口孝則(神戸学院大学栄養学部)

共同研究者名:山田真久(理化学研究所脳科学総合研究センター)

糸原重美(理化学研究所脳科学総合研究センター)

池田克巳(武庫川女子大学生生活環境学部教授)

菅野巖(秋田県立脳血管研究センター)

家森幸男(WHO 循環器疾患予防国際共同研究センター)

生活習慣病のひとつである高血圧は、罹患率も高く、脳卒中や心筋梗塞などの重要な危険因子であることから高血圧の治療や予防につながる研究が重要視されている。本研究では、高血圧や脳循環疾患モデル動物を用いて新たな食塩感受性遺伝子の可能性を解析することを目的としておこなった。本研究において対象とした動物は以下の2種類である。(1) 遺伝的に高血圧を呈し、100%の確立で脳卒中(脳出血、脳梗塞)を発症する脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(Stroke-Prone Spontaneously Hypertension Rats; SHRSP)。(2) 主要な神経伝達物質であり血管拡張作用物質でもあるアセチルコリンに対する受容体の中でも頸動脈以降の脳血管平滑筋に特異的に発現していると報告されているムスカリン様アセチルコリン受容体(サブタイプ 5; M5R) 遺伝子を遺伝子工学的手法を用いて欠損させたマウス(M5R<sup>-/-</sup>)。以上2種の実験動物を用い、食塩水への嗜好性、食塩水投与による血圧の変化(低濃度長期間、低濃度・高濃度交互投与)、そして食塩水投与後の神経活動と脳循環(脳血管、脳血流量)の測定を行った。さらに、平成15年度助成によりオートラジオグラフィ法を用いたマウス定量的脳血流量測定法を開発し、測定を行った。

SHRSP、M5R<sup>-/-</sup>マウス共に食塩水を好む傾向があり、食塩水摂取により血圧の上昇がみられた。12週齢のSHRSPおよびWKYの脳血管径を観察した結果、WKY(80.2±3.5 μm)と比較して、SHRSP(55.3±4.1 μm)の中大脳動脈以下の細動脈において有意に血管径が減少していた。また同様に、野生型マウスと比較してM5R<sup>-/-</sup>マウス中大脳動脈以下の細動脈において有意に血管径が減少していた。さらに、定量的脳血流測定により大脳皮質、視床においてM5R<sup>-/-</sup>マウスの脳血流量の減少が明らかとなった。

本研究助成によってマウス脳循環測定システムを構築し、遺伝的に脳卒中を発症する脳卒中ラットと、遺伝子改変により脳血管拡張が减弱しているM5R<sup>-/-</sup>マウスの両者の食塩感受性高血圧と脳循環障害の関係を調べる事が可能となった。また、本研究助成により開発したマウスARG脳血流測定法は、今後、今回測定を行ったM5Rマウスのみならず、現在、多数作製されている遺伝子改変マウスにおける脳血流の定量的測定を行うことが本研究により可能となり、脳循環という観点から脳機能の解明につながる可能性が考えられた。



13

助成番号 0339

食塩感受性高血圧と脳循環動態（脳血流・脳血管径）の解析  
- 遺伝子改変マウスと遺伝的脳卒中ラットを用いた研究 -

助成研究者名 野口孝則（神戸学院大学栄養学部）

共同研究者名 山田真久（理化学研究所脳科学総合研究センター）

系原重美（理化学研究所脳科学総合研究センター）

池田克巳（武庫川女子大学生活環境学部教授）

菅野巖（秋田県立脳血管研究センター）

家森幸男（WHO 循環器疾患予防国際共同研究センター）

### 1. 研究目的

生活習慣病のひとつである高血圧は、罹患率も高く、脳卒中や心筋梗塞などの重要な危険因子であることから高血圧の治療や予防につながる研究が重要視されている。ゲノム研究により各種疾患関連遺伝子が同定され近い将来の医学に有用な情報が蓄積されている近年、高血圧研究においてはアンジオテンシノーゲンをはじめとする食塩感受性遺伝子の研究が盛んに行われている。現在まで、食塩を制限することによって高血圧の予防や治療が行われてきたが、今後、食塩感受性（または食塩耐性）遺伝子の同定や働きを解明し、遺伝と環境をコントロールすることが可能になれば今まで以上の高血圧予防効果があらわれると考える。

本研究では、高血圧や脳循環疾患モデル動物を用いて新たな食塩感受性遺伝子の可能性を解析することを目的としておこなった。

本研究において対象とした動物は以下の2種類である。

(1) 遺伝的に高血圧を呈し、100%の確立で脳卒中（脳出血、脳梗塞）を発症する脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（Stroke-Prone Spontaneously Hypertension Rats; SHRSP）

(2) 主要な神経伝達物質であり血管拡張作用物質でもあるアセチルコリンに対する受容体の中でも頸動脈以降の脳血管平滑筋に特異的に発現していると報告されているムスカリン様アセチルコリン受容体（サブタイプ 5；M5R）遺伝子を遺伝子工学的手法を用いて欠損させたマウス（M5R<sup>-/-</sup>）

以上2種の実験動物を用い、食塩水への嗜好性、食塩水投与による血圧の変化（低濃度長期間、低濃度・高濃度交互投与）、そして食塩水投与後の神経活動と脳循環（脳血管、脳血流量）の測定を行った。さらに、ソルト・サイエンス研究財団による助成を受け、定量的な脳血流量測定であるオートラジオグラフィ法をマウスを対象に開発することに成功し、測定を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1. 実験動物

使用した動物は以下の2種類であった。

#### 2.1.1. 脳卒中易発症高血圧自然発症ラット

（stroke-prone spontaneously hypertensive rats; SHRSP）

（特徴）遺伝的に高血圧を呈し、100%の確立で脳卒中（脳出血、脳梗塞）を発症する唯一の実験動物として共同研究者の家森らにより作製された（Figure 1.）。比較対照として正常血圧 Wistar Kyoto Rat（WKY）を用いた。

#### 2.1.2 ムスカリン様アセチルコリン受容体（サブタイプ5；M5R）遺伝子欠損マウス

（M5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice; M5R<sup>-/-</sup>）

（特徴）M5R は、主要な神経伝達物質であり血管拡張作用物質でもあるアセチルコリンに対する受容体の一つとして最近同定された遺伝子である。発現部位は頸動脈以降の脳血管平滑筋に特異的に発現していると報告されている。このマウスは、共同研究者である山田らにより M5R 遺伝子を遺伝子工学的手法を用いて欠損させることにより作製された。

また、M5R<sup>-/-</sup>マウスにおいてアセチルコリンによる血管拡張能を測定したところ、体循環では血管が拡張するのに対して、脳血管でのみアセチルコリンによる血管拡張能が減少する特徴を持っていることがわかっている。

### 2.2. 実験方法

#### 2.2.1. 食塩水に対する嗜好性

食塩水に対する嗜好性の実験は2つの給水瓶を用い、一方には食塩水（低濃度または高濃度）、もう一方には蒸留水を入れておき、実験動物に自動摂取させた量を測定することにより嗜好性を明らかにした。

#### 2.2.2. M5R<sup>-/-</sup>における食塩水投与による血圧の変化

遺伝子工学的に脳血管機能を障害したマウス（M5R<sup>-/-</sup>）において食塩水摂取による血圧の変化を測定した。測定は週に一度の間隔で行い、収縮期血圧、拡張期血圧、心拍数、体重を同時に測定した。食塩濃度による血圧への反応性の違いを明らかにすることを考え、食塩水の投与は以下の2パターンを試験した。

（1）低濃度長期間（0.9%生理食塩水を4か月間）

（2）低濃度・高濃度交互投与（8.0%生理食塩水と0.9%生理食塩水を5日間ずつ2回）

#### 2.2.3. 食塩水投与後の神経活動と脳循環（脳血管、脳血流量）の測定

上記の研究で用いた動物（SHRSP, M5R<sup>-/-</sup>）を用いる。食塩水への嗜好性や食塩水による血圧の変化を測定した後、脳循環動態を測定する。ラットを対象とした脳循環測定装置は所有していたが、マウスを対象とした脳循環測定装置がなかったために、今回の研究

助成によりマウス脳循環測定装置をセットアップすることができた。以下に詳細を記入する。

#### 2.2.3.1. マウス脳循環測定装置

本研究により確立した脳循環測定システムは以下の通りである (Figure 2.)

小動物用麻酔器 (TK-4、BRC) を用いてイソフルレン麻酔を行い、小動物脳定位固定装置 (SR6N、ナリシゲ) に動物を固定し、温度センサー付きサーモメーター (BAT-12、BRC) と小動物用体温保持装置 (BTW-100、BRC) により体温を一定に保つ。気管カニューレを挿入して小動物ベンチレーター (SAR-830/AP、BRC) による人工呼吸を行い、大腿動脈カニューレーションにより、圧トランスデューサ (MLT0698、BRC) を用いた直接法による動脈血圧のモニタリングを脳循環動態計測の間をとおして行う (ML117-BP Amp、BRC)。

マウス頭皮を切開し、頭頂部の片側頭蓋骨をドリルにより広範囲に削る。中大脳動脈以下の細動脈が観察できるようになる程度まで薄く削り、研磨後、ミネラルオイルの滴下により骨の透視性を高め、脳微少血管の観察を可能にする。反対側の頭頂部頭蓋骨も同様の処置をする。モーターフォーカスドライブ付き電動フォーカス実体顕微鏡 (MZAPO、ライカ) 下に動物を移動し、3CCD カラービデオカメラ (DXC-390、ソニー) を用いて画像処理用コンピュータ (PowerMac G4/800 dual、アップル) に脳血管画像を取り込み、TFT 液晶モニター (M7928J/A、アップル) 上で脳軟膜上の細動脈や細静脈の血管の構築を観察し、脳血管径の測定を行う。また、反対側の大脳皮質に観察される中大脳動脈以下の細動脈の真上に脳血流量測定用のプローブ (ALF プローブ C、アドバンス) を留置し、レーザードップラー法 (ALF-21R、アドバンス) を用いて脳血流量と脳血流速度の測定を行う。

脳循環動態測定前後には大腿動脈カニューレより採血を行い、全自動 pH/血液ガス分析装置 (パイエル M248G、パイエル) を用いて動脈血中の酸素分圧、二酸化炭素分圧、pH を測定し、データの信頼性を高める。また、脳循環測定終了後には腹大動脈より採血を行い、血液中の生化学検査を行うとともに、血球数計測 (赤血球数、白血球数、血小板数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度など) を行う。

本測定法を用いて観察したマウス脳軟膜上の微小血管の写真を Figure 3. に示す。

#### 2.2.3.2. ラット脳循環測定装置

飼育期間終了後のラットを用い、ネンプタール腹腔麻酔下 (60mg/kg) で気管カニューレ挿入により人工呼吸を行った。ラット右頭頂骨中央部に直径 5mm の骨窓を形成し、人工脳脊髄液を骨窓内に灌流し (骨窓内圧 ; 3 ~ 5mmHg)、CCD カメラを用いて脳血管をビデオモニター上で観察した。(Figure 4.)

#### 2.2.4. マウス脳血流量の定量的測定法

マウスにフローセン麻酔を行い、大腿動脈および大腿静脈カニューレーションにより血管を確保し、その後、約一時間にわたり体温調節、血圧のモニタリング、呼吸管理などにより動物を安定化させた。ヘパリンを静注し (100-200IU)、<sup>14</sup>C-iodoantipyrine (<sup>14</sup>C-IAP) を静

注 (100 $\mu$ L/1 分間) しながら、大腿動脈より3秒間に一回の割合 (20ポイント/1分間) で採血を行った。採血後、すぐにアルカリ化血とし、過酸化水素により脱色して液体シンチレーションカウンターにて定量し、標準曲線を作成した。また、採血終了直後 (1分間の<sup>14</sup>C-IAP 注入直後) に断頭を行い、イソペンタンおよび液体窒素にて瞬間的に凍結し、薄切凍結切片を作成し、標準濃度フィルムと一緒に5日間反応させ、現像後データ解析を行った。(Figure 5., 6.)

### 3. 実験結果

#### 3.1. 食塩水に対する嗜好性

##### 3.1.1. 遺伝的脳卒中ラット (SHRSP)

結果を Figure 7. に示す。正常血圧ラットと比較して、遺伝的脳卒中ラットは統計学的有意に生理食塩水を好むことが明らかとなった。

##### 3.1.2. ムスカリン受容体欠失マウス (M5R<sup>-/-</sup>)

結果を Figure 8. に示す。0.9%、2.0%、4.0%の3段階の濃度で試験を行った結果、M5R<sup>-/-</sup>は、4.0%食塩水で統計学的有意に食塩水を好むことがわかった。

#### 3.2. M5R<sup>-/-</sup>における生理食塩水に対する血圧の変化 (Figure 9.)

##### 3.2.1. 低濃度長期間 (0.9%生理食塩水を4か月間)

0.9%生理食塩水投与前の基礎的な収縮期血圧には野生型マウスと比較して有意差は見られなかった。生理食塩水投与後4週目まではM5R<sup>-/-</sup>、野生形マウスともに収縮期血圧が減少する傾向がみられたが、投与5週目以降M5R<sup>-/-</sup>マウスにおいて血圧の有意な上昇が見られた。投与5週目以降も血圧の上昇はみられなかった。M5R<sup>-/-</sup>は、食塩感受性に血圧が上昇することがわかった。

##### 3.2.2. 低濃度・高濃度交互投与 (8.0%生理食塩水と0.9%生理食塩水を5日間ずつ2回)

高濃度食塩水を投与したところ、M5R<sup>-/-</sup>は食塩感受性に血圧の有意な上昇がみられたが、野生型マウスでは血圧上昇の程度が低かった。5日間の高濃度食塩水負荷の後、5日間の生理食塩水負荷に切り替えたところ、野生型マウスは正常血圧まで血圧値が減少したが、M5R<sup>-/-</sup>マウスでは血圧値が正常血圧の値まで減少せず、統計学的有意に高い血圧値を示した。再び高濃度食塩水を負荷したところ、M5R<sup>-/-</sup>の血圧値はさらに上昇したが、野生型マウスの血圧上昇の程度は初回と同程度であった。

#### 3.3. 脳血管の観察結果

##### 3.3.1. 脳卒中ラット (SHRSP)

12週齢のSHRSPおよびWKYの脳血管径を観察した結果、WKY (80.2 $\pm$ 3.5 $\mu$ m)と比較して、SHRSP (55.3 $\pm$ 4.1 $\mu$ m)の中大脳動脈以下の細動脈において有意に血管径が減少して

いた。

### 3.3.2. M5R<sup>-/-</sup>マウス

12週齢の野生型マウスおよび M5R<sup>-/-</sup>マウスの脳血管径を観察した結果、野生型マウスと比較して M5R<sup>-/-</sup>マウス中大脳動脈以下の細動脈において有意に血管径が減少していた。(Figure 10-A、10-B)

### 3.4. 脳血流量の変化

#### 3.4.1. 脳卒中ラット (SHRSP)

WKY (70.2±5.5nL/sec)と比較して、SHRSP (45.7±6.2nL/sec)では脳血流量は統計学的有意に減少していた。

#### 3.4.2. M5R<sup>-/-</sup>マウス

野生型マウスと比較して、M5R<sup>-/-</sup>マウスでは統計学的有意に脳血流量が減少していた。(Figure 10-C)

### 3.5. M5R<sup>-/-</sup>マウスにおける定量的脳血流量の測定結果

結果を Table 2. に示す。安静時における脳血流量を比較すると、Cortex、Basal Ganglia、Hippocampus、Thalamic Nuclei、Hypothalamus において統計学的有意に減少していたが、Midbrain においては統計学的有意差は認められなかった。

## 4. 考察

平成14年度および平成15年度の研究助成により、マウス脳循環測定システムを構築し、遺伝的に脳卒中を発症する脳卒中ラットと、遺伝子改変により脳血管拡張が减弱している M5R<sup>-/-</sup>マウスの両者の食塩感受性高血圧および脳循環障害についての検討を行った。その結果、SHRSP、M5R<sup>-/-</sup>マウスともに脳血管径が減少していることが観察され、脳循環も障害され、食塩感受性に高血圧を呈することも明らかとなった。

重度の高血圧が脳循環を悪化させることはこれまでも理解されてきたが、M5R<sup>-/-</sup>マウスにおいては、通常の高血圧値は高くなく、正常高血圧を保持している。つまり、M5R<sup>-/-</sup>マウスは正常高血圧でありながら脳循環障害を発症するモデル動物として、脳卒中研究に幅広く用いられることが考えられる。また、このマウスの興味深いところは、通常は正常高血圧を維持しているにもかかわらず、生理食塩水の持続的な長期投与や、短期間の高濃度食塩水投与によって高血圧が上昇し、一度上昇した高血圧は正常高血圧に戻りにくいことである。

食塩感受性高血圧のメカニズムとしてはこれまでも多数報告されてきているが、今回、M5R<sup>-/-</sup>マウスを用いた研究によって M5R も何らかの関与をする受容体の一つとして考

えることができたと思う。

食塩水投与により急激な血圧上昇を示し、脳卒中を発症する SHRSP の病態との比較を目的として、今回の研究において SHRSP と WKY の実験も行った。M5R<sup>-/-</sup>マウスと同様に食塩嗜好性を示し、食塩感受性に高血圧を呈した。

平成14年度に行った脳循環測定は脳表の血管を対象として行った。その利点は、血管径の拡張や収縮を直接観察できる点にあり、脳血管径が食塩によって変化する様子を観察することができた。今回、さらに深部の食塩感受性の脳血流変化をとらえるため、放射性トレーサーを用いたオートラジオグラフィ（ARG）法を応用して脳深部を含めた脳全体の血流量を定量的に測定した。国内においては放射性物質の取扱いの規制や手技の困難さなどから ARG 法による脳循環測定は現在ほとんど行われていない。また、本方法は現在まで主にラットやネコを用いて行われてきた方法であり、近年までマウスを用いた研究報告はされていなかった。

平成15年度のソルト・サイエンス研究財団による研究助成により、マウスを対象とした ARG 法を開発することが出来た。今回測定を行った M5R マウスのみならず、現在、多数作製されている遺伝子改変マウスにおける脳血流の定量的測定を行うことが本研究により可能となり、脳循環という観点から脳機能の解明につながる可能性が考えられた。



Table 1. Body weight, systolic blood pressure (SBP), blood gases and blood biochemical markers in the M5R<sup>-/-</sup> mice and their wild-type littermates

		M5 <sup>+/+</sup>	M5 <sup>-/-</sup>
Body weight	(g)	39.3±0.7	39.9±0.9
SBP	(mmHg)	109.1±3.4	109.5±3.0
PaCO <sub>2</sub>	(mmHg)	34.5±1.2	33.1±1.9
PaO <sub>2</sub>	(mmHg)	123.2±2.5	121.0±1.5
pH		7.25±0.02	7.26±0.02
Blood Glucose	(mg/dL)	132.5±2.1	134.2±1.9
Total Protein	(g/dL)	5.2±0.1	4.9±0.2
Albumin	(g/dL)	1.88±0.01	1.87±0.01
Blood Urea Nitrogen	(mg/dL)	24.2±0.6	23.9±0.5
Creatinine	(μmol/L)	79.6±1.3	80.7±1.4
Total Cholesterol	(mg/dL)	108.0±1.4	107.3±1.3
triglyceride	(mg/dL)	53.4±2.6	58.0±3.2
Na	(mEq/L)	142.9±0.6	143.0±0.4
K	(mEq/L)	4.86±0.16	4.93±0.12
Cl	(mEq/L)	118.9±0.8	118.4±0.7
Ca	(mEq/L)	4.83±0.07	4.91±0.05
No. of mice		12	12

All values are means ± S.E.M..

Table 2. Resting CBF in  $M5R^{-/-}$  mice

Regions	CBF, mL/100g per min.		
	$M5^{+/+}$	$M5^{-/-}$	% Change
<b>Cerebral cortex</b>			
Frontal cortex	136.7±4.0	117.5±6.4	-14*
Somatosensory cortex	142.3±3.1	123.2±4.0	-13*
Parietal cortex	149.1±3.1	129.5±6.0	-13*
Temporal cortex	156.2±5.4	126.7±6.4	-19*
Occipital cortex	136.3±3.3	117.3±3.5	-14*
<b>Basal ganglia</b>			
Caudate-putamen	128.3±4.0	105.0±3.5	-18*
Globus pallidus	90.7±2.9	86.3±3.1	-5
Amygdala	103.2±4.0	88.5±1.8	-14*
<b>Hippocampus</b>			
CA1	90.2±3.0	76.0±2.7	-16*
CA3	90.7±3.7	78.7±2.1	-13*
Dentate gyrus	91.0±3.0	78.8±2.7	-13*
<b>Thalamic nuclei</b>			
Anterior	154.2±4.3	133.3±5.4	-14*
Reticular	149.7±3.9	127.8±5.2	-15*
Ventrobasal	147.2±7.7	122.7±4.1	-17*
Ventromedial	152.8±4.9	124.7±3.7	-18*
Intralaminar	148.0±3.3	116.5±4.1	-21*
<b>Hypothalamus</b>	99.2±3.9	83.5±3.6	-16*
<b>Midbrain</b>			
Substantia nigra	92.7±3.3	86.0±2.6	-7
Superior colliculus	148.7±3.1	143.3±3.0	-4
Inferior colliculus	209.3±4.7	196.5±3.7	-6

All values are means  $\pm$  s.e.m.; n = 6; \* $P < 0.05$  from  $M5R^{+/+}$  (Student's unpaired  $t$  test).



(a) normotensive Wistar Kyoto Rats. (b)SHRSP.  
 Figure 1. Pictures of Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats (SHRSP)

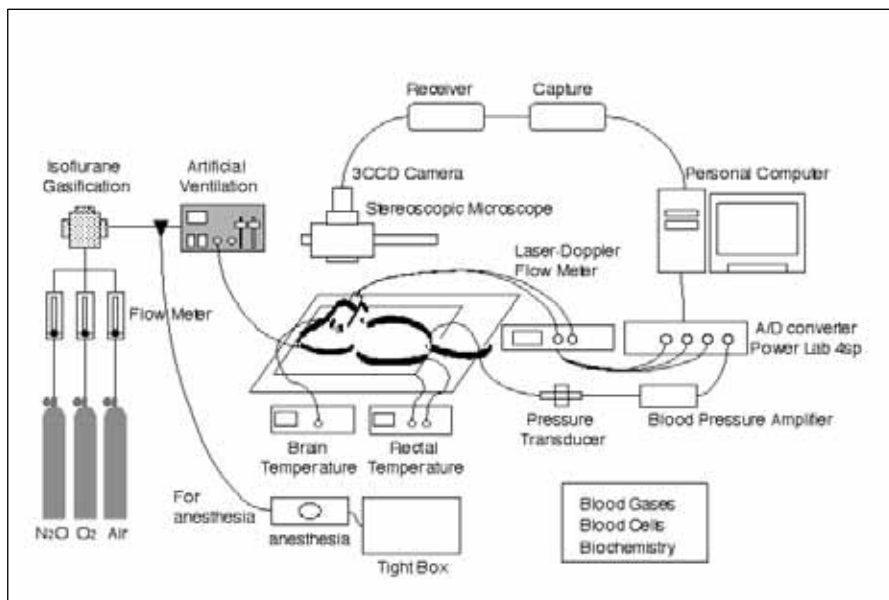


Figure 2. Cerebral Measurement System for Mouse.

Mice were initially anesthetized with a mixture of ketamine (200 mg/kg body weight, i.p.) and xylazine (10 mg/kg body weight, i.p.) and were breathing freely. The animals were fixed in a stereotaxic frame, with the bone overlying the dorsal surface positioned at the center of the left parietal bone. The animal in the stereotaxic frame was placed on the stage of a microscope equipped with a long-working-distance objective, and the cerebral vessels were monitored with a CCD camera and their images captured on a personal computer. The branches of the middle cerebral vessels were defined in the order from A1 to A3. A probe with a diameter of 0.5 mm was attached to the point of divergence of the middle cerebral vessel, and CBF in the parietal lobe was measured continuously using a laser Doppler flowmeter (ALF 21, Advance Co., Ltd, Tokyo) and that data were analyzed using a PowerLab system (AD Instruments, CA, USA). After a measuring of CBF and vessel diameter, blood samples (30µL) were obtained from the abdominal aorta to measure levels of arterial blood gases (PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>) and pH (Blood Gas Analyzer 248, Bayer Medical, Medford, MA, USA).

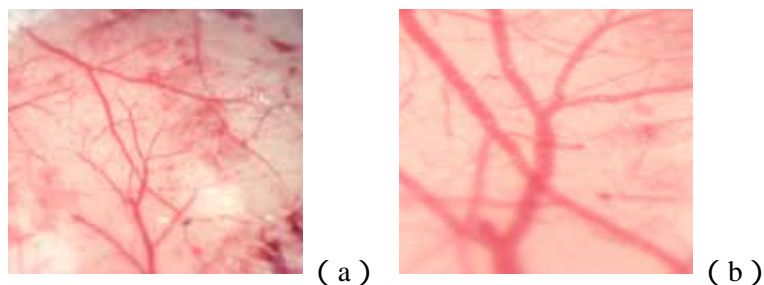


Figure 3. Cerebral microvessels in mouse.  
(a) broad area. (b) expansion of artery and venules.

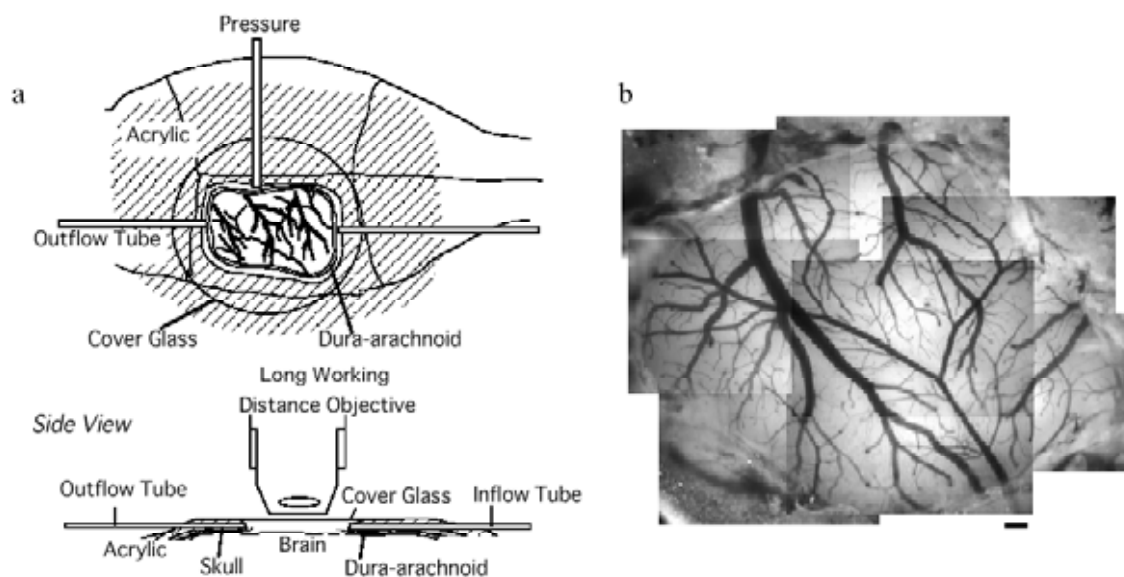


Figure 4. A schematic illustration of the closed cranial window methods (a).

The head of rat was fixed in a stereotaxic frame, and the skull was exposed by incision. A craniotomy (5 mm diameter) was performed in the center of the right parietal bone using a hand drill.

Pial arterioles and venules in SHRSP/Izm at the age of 4 weeks (b).

The pial vessels were observed on a video monitor and recorded on videotape by a CCD video camera. Bar is 100  $\mu$ m.



Figure 5. Photograph of ARG measurement.

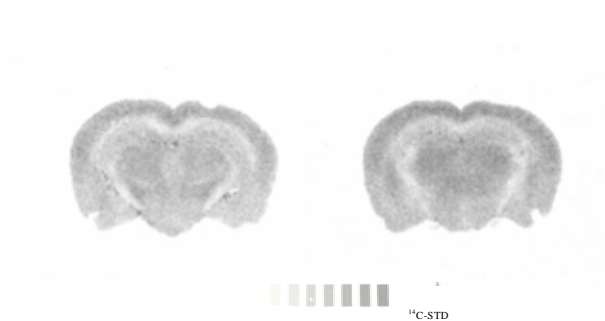


Figure 6. A photograph of brain slice after ARG measurement.

ARG measurement calculated as follows.

$$t = t' - \Delta t \quad (1) \quad C'_a = C_a(1 - e^{-rt}) \quad (2) \quad \ln(1 - C'_a / C_a) = -rt \quad (3)$$

$$r = 0.693 / T_{1/2}$$

$$C_i(T) = \lambda K e^{-KT} \int_0^T C'_a(t) e^{Kt} (1 - K/r) dt + (K/r) C'_a(T) \quad (4)$$

$$K = mF / \lambda W$$

$$C_i(T) = \lambda K e^{-KT} \int_0^T C'_a(t' - \Delta t) e^{K(t' - \Delta t)} (1 - K/r) dt + (K/r) C'_a(T) \quad (5)$$

(mg/day/rat)

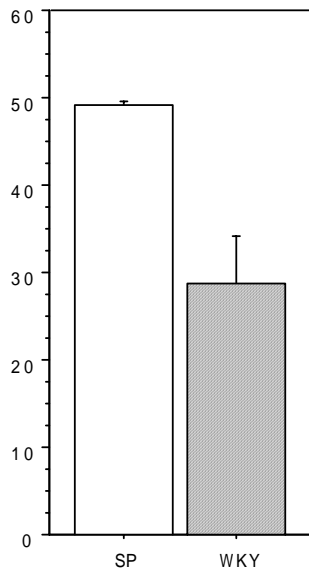


Figure 7. Salt water drinking in SHRSP.

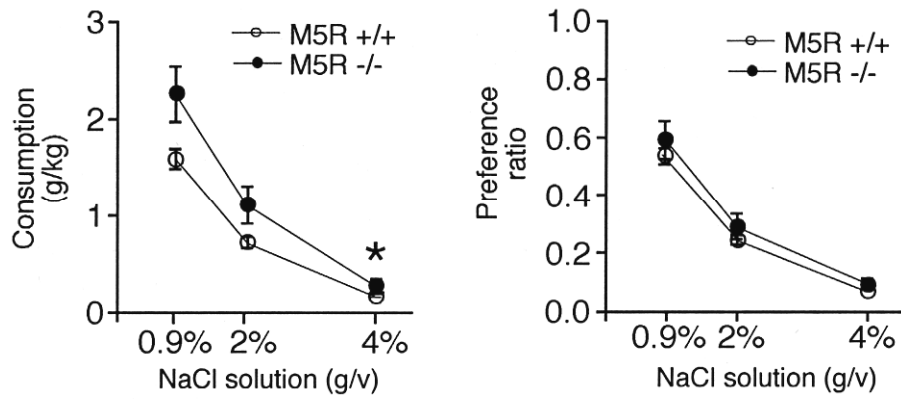


Figure 8. Salt consumption in M5R<sup>-/-</sup> mouse.

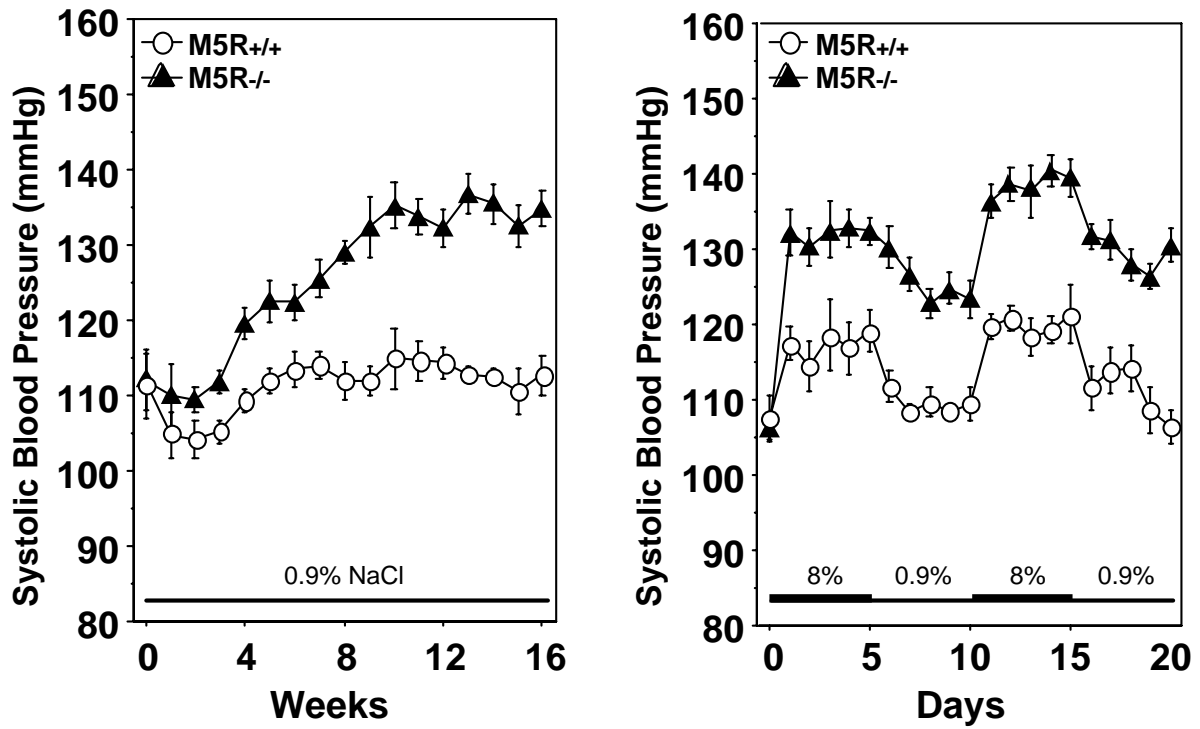


Figure 9. Salt-sensitive hypertension in M5R<sup>-/-</sup> mouse.

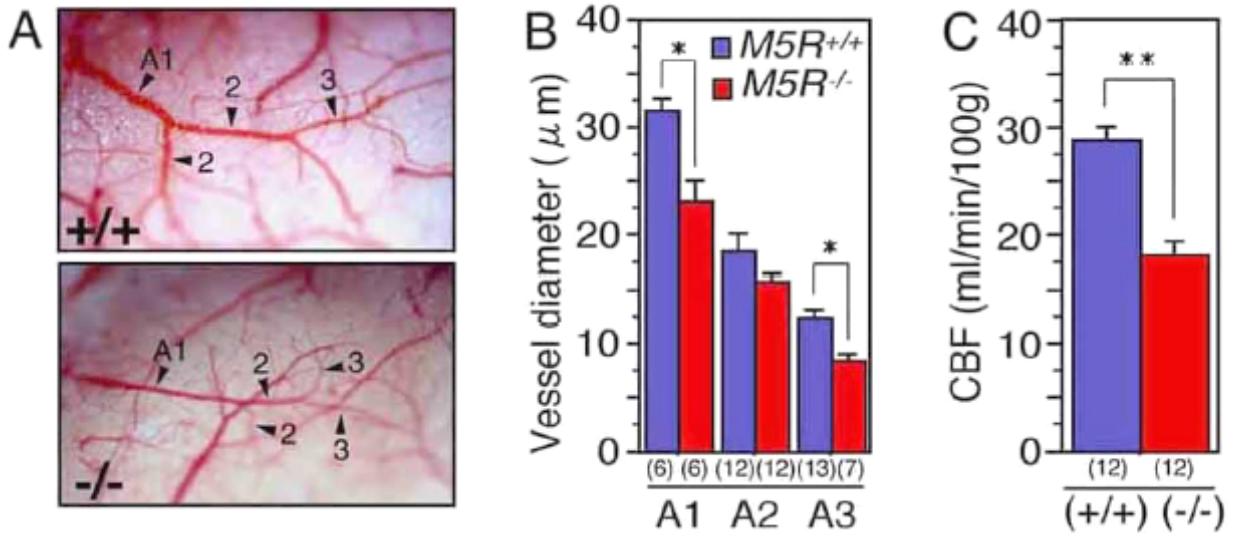


Figure 10. Cerebral circulation in M5R<sup>-/-</sup> mouse.

A; Picture of microvessels. B; Vessel diameter. C; Cerebral blood flow.

## **Salt-Sensitive Hypertension and Cerebral Circulation in Gene-Mutant Mouse and Genetically Stroke Rat**

Takanori Noguchi<sup>1),4)</sup>, Masahisa Yamada<sup>1)</sup>, Shigeoyoshi Itohara<sup>1)</sup>, Katsumi Ikeda<sup>2)</sup>, Yukio Yamori<sup>3)</sup>  
<sup>1)</sup>Brain Science Institute (BSI), RIKEN, Wako, Japan, <sup>2)</sup>School of Human Environmental Sciences, Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Japan, <sup>3)</sup>WHO Collaborating Center for Research on Primary Prevention of Cardiovascular Diseases, Kyoto, Japan. <sup>4)</sup>Faculty of Nutrition, Kobe Gakuin University, Kobe, Japan,

### Summary

Recently, the availability of transgenic mice has enabled us to examine the involvement of specific gene products in various pathological and physiological conditions. Furthermore, we used gene-targeting technology to generate M5 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice (M5R<sup>-/-</sup> mice). In the present study, we made a measurement system for blood pressure and cerebral hemodynamics (cerebral blood flow; CBF, vessel diameter; VD) in pial microcirculation in mouse. Using this system, we measured cerebral hemodynamics in gene mutant mice and genetically stroke model rat (stroke-prone spontaneously hypertensive rats; SHRSP) under physiological and pathological condition.

We first measured CBF and the diameter of cerebral arterioles using intravital microscopy through a cranial window in male M5R<sup>-/-</sup> and wild-type (M5R<sup>+/+</sup>) mice. All mice showed normal peripheral blood pressure (tail-cuff method) (M5R<sup>+/+</sup>, 111.6 ± 4.6 mmHg; M5R<sup>-/-</sup>, 111.8 ± 3.6 mm Hg; means ± s.e.m.; n = 8 for each group of 3 month-old mice). The branches of the middle cerebral arterioles (MCA) were defined in the order from A1 to A3. Under resting conditions, male M5R<sup>-/-</sup> mice showed a small but significant reduction (P < 0.05 in one-way ANOVA) in MCA diameter, as compared with M5R<sup>+/+</sup> mice. Laser-Doppler flowmeter measurements showed that male M5R<sup>-/-</sup> mice showed significantly lower (P < 0.001 in one-way ANOVA) CBF at the A1 branch of the MCA in the resting state. Male M5R<sup>-/-</sup> and M5R<sup>+/+</sup> mice did not differ in the levels of blood gases and pH (see Supplementary Methods).

We quantitated regional CBF in male M5R<sup>-/-</sup> and M5R<sup>+/+</sup> mice by using <sup>14</sup>C-labeled iodoantipyrine autoradiography. M5R<sup>-/-</sup> mice displayed significantly reduced CBF (P < 0.05) in all cortical, hippocampal, and thalamic regions studied. CBF was not significantly reduced in different regions of the midbrain.

These data strongly suggest that M5 receptor dysfunction leads to impaired CBF in higher brain regions.