

平成13年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

## 遺伝子改変動物をもちいたGタンパク質共役型受容体の機能解析

所 属 国立小児病院・小児医療研究センター小児薬理研究部  
研究者 田上 昭人

### 分担研究者

- |                       |                   |
|-----------------------|-------------------|
| (1) 国立小児病院・小児医療研究センター | 篠浦ひとみ、押川小百合、岩崎しずえ |
| (2) 山梨医科大学薬理学教室       | 橋本 敬太郎            |
| (3) 東京大学医学部泌尿器科       | 北村 唯一             |
| (4) 東京薬科大学第一薬理学教室     | 竹尾 聡              |
| (5) 福岡大学薬学部薬理学教室      | 高野行夫              |
| (6) 旭化成株式会社           | 生垣 一郎             |
| (7) キッセイ薬品工業株式会社      | 小嶋 正三             |
| (8) 大塚製薬株式会社          | 伊藤 修司             |
| (9) 日本オルガノン株式会社       | 広田 直美             |
| (10) 山之内製薬株式会社        | 稲垣 治              |

### 要 旨

代表的G蛋白質共役型受容体 (GPCR) である $\alpha 1$ アドレナリン受容体 (サブタイプ $\alpha 1a, b, d$ )、バゾプレッシン受容体 (サブタイプV1a, b) のそれぞれのサブタイプの遺伝子改変動物 (トランスジェニック、ノックアウトマウス) を作出し、各受容体サブタイプの生体内での生理機能の解析を行った。

#### 1. 研究目的

G蛋白質共役型受容体 (アドレナリン受容体、バゾプレッシン受容体等) の遺伝子改変動物 (トランスジェニック、ノックアウトマウス) の作製とそれらによる疾患動物モデルを作出し、各受容体の生体内での生理、病態機能の評価と受容体特異的薬物の薬効評価を行う。

#### 2. 研究方法

マウス $\alpha 1d$ アドレナリン受容体変異マウス (ノックアウトマウスおよびトランスジェニックマウス) について分子生物学的・薬理的・病態生理学的解析を行う。V1a, V1bバゾプレッシン受容体に関しても同様に、変異動物を作成し分子生物学的・病理組織学的・薬理的解析を行う。さらにこれらの変異動物をもちいて病態モデル動物を作製し、解析を行う。

具体的な解析法としては

- 1) 変異動物の病理組織学的検討を行う。
- 2) 体重増加・血圧等生理的解析を行う。
- 3) 大動脈血管平滑筋を用いてin vitroにおける種々の血管作動薬に対する反応性を検討する。
- 4) in vivoにおける血管作動薬物の作用を比較検討する。
- 5) 改変動物由来組織を用いて $\alpha 1$ アドレナリン受容体に対するリガンド結合能の検討を行う。
- 6) マウス $\alpha 1d$ アドレナリン受容体変異マウスにおける $\alpha 1$ アドレナリン受容体 ( $\alpha 1a, \alpha 1b, \alpha 1d$ ) の発現レベルをRT-PCR, in situ hybridization法を用いて解析する。
- 7) 腎臓垂全摘高張食塩水負荷による高血圧モデル動物を作製し、in vitro, in vivoでの解析を行う。
- 8) マウス $\alpha 1d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスと $\alpha 1b$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスの交配により $\alpha 1bd$ 二重欠損マウスの作製を行い、生理学的・薬理的解析を行う。

### 3. 研究成果

マウス $\alpha 1 d$ アドレナリン受容体変異マウス（ノックアウトマウスおよびトランスジェニックマウス）の作製をおこない、以下の解析を行った。またバソプレッシン受容体に関しても同様に、V1bバソプレッシン受容体のノックアウトマウスおよびトランスジェニックマウスの作製に成功した。V1aバソプレッシン受容体ノックアウトマウスおよびトランスジェニックマウスに関しては作成中である。

#### 1) 変異動物の病理組織学的検討

$\alpha 1 d$ アドレナリン受容体変異マウスの心臓、大血管、腎臓について病理組織学的検討を行った。 $\alpha 1 d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスでは、コントロールに比べて心臓重量が優位に大きかった。ヘマトキシリン・エオジン染色による病理所見および壁の厚さには差はみられなかった。大血管、腎臓の所見に著変はみられなかった。

#### 2) 体重増加・血圧等生理的解析

$\alpha 1 d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスについて生後4週目に体重を測定し成長について評価を行った。ノックアウトマウスの4週目における体重は、コントロールと差がみられず、成長には異常は見られなかった。非観血的血圧測定、心拍測定法であるTail cuff法および観血的測定方法により心拍数及び血圧の測定を行った。非観血的および観血的測定法において心拍数はコントロールに比べて差はみられなかったが、血圧（収縮期血圧、平均動脈圧）はいずれの測定方法においても $\alpha 1 d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスでは、コントロールに比べて低値であった。

#### 3) 大動脈血管平滑筋を用いてin vitroにおける種々の血管作動薬に対する反応性

$\alpha 1 d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスおよびコントロールマウスより大動脈を摘出し、種々の血管収縮作動薬に対する収縮反応を検討した。交感神経作動薬であるノルエピネフリンに対する収縮反応は、コントロールに比べて $\alpha 1 d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスでは優位に収縮力が低下していた。同様に $\alpha 1$ アドレナリン受容体作動薬であるフェニレフリンに対する収縮反応も低下していた。一方、セロトニンに対する収縮反応は $\alpha 1 d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスではコントロールマウスよりむしろ亢進している傾向が見られた。

$\alpha 1 d$ アドレナリン受容体特異的拮抗薬であるBMY7378を用いたノルエピネフリンに対する収縮反応の抑制効果は、コントロールマウスではその抑制効果がみられたが、 $\alpha 1 d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスでは抑制効果がみられなかった。

#### 4) in vivoにおける血管作動薬物の作用

$\alpha 1 d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスおよびコントロールマウスの内径動脈にカテーテルを挿入し中心動脈圧測定し、種々の血管収縮作動薬に対する昇圧反応を検討した。

交感神経作動薬であるノルエピネフリンに対する昇圧反応は、コントロールに比べて $\alpha 1 d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスでは優位に昇圧反応が低下していた。同様に $\alpha 1$ アドレナリン受容体作動薬であるフェニレフリンに対する昇圧反応も低下していた。一方、昇圧作用を有するバソプレッシンやアンギオテンシンに対する昇圧反応はコントロールマウスとくらべて差はみられなかった。

$\alpha 1 d$ アドレナリン受容体特異的拮抗薬であるBMY7378や $\alpha 1$ アドレナリン受容体特異的拮抗薬ブナゾシンを用いたノルエピネフリンに対する昇圧反応の抑制効果は、コントロールマウスではBMY7378とブナゾシン両方においてその抑制効果がみられたが、 $\alpha 1 d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスではBMY7378の抑制効果はみられなかった。ブナゾシンによる抑制効果はみられた。

#### 5) 改変動物由来組織を用いた $\alpha 1$ アドレナリン受容体に対するリガンド結合能の検討

コントロールおよび $\alpha 1 d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスより大脳、大脳皮質、海馬、大動脈、心臓、肝臓、腎臓より細胞膜標本を精製し、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体に対する放射能標識を行ったリガンドをもちいて結合実験を行った。 $\alpha 1 d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスの各組織ではコントロールにくらべて、大脳で約10%、大脳皮質で約40%、海馬で約約10%、大動脈ではほぼ100%、心臓で約10%低下がみられたが、肝臓および腎臓ではリガンド結合能に差はみられなかった。

6) マウス $\alpha 1d$ アドレナリン受容体変異マウスにおける $\alpha 1$ アドレナリン受容体 ( $\alpha 1a$ ,  $\alpha 1b$ ,  $\alpha 1d$ ) の発現レベルをRT-PCR, in situ hybridization法を用いた解析

コントロールおよび $\alpha 1d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスの各組織における $\alpha 1$ アドレナリン受容体 ( $\alpha 1a$ ,  $\alpha 1b$ ,  $\alpha 1d$ ) の発現レベルをRT-PCR方法、蛍光色素を用いたTaqMan プローブ方法を用いてmRNAの発現量を定量した。 $\alpha 1d$ の発現量は、 $\alpha 1d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスでは大脳、大動脈、心臓、肝臓、腎臓、肺、脾臓いずれにおいても発現はみられなかった。一方、 $\alpha 1a$ および $\alpha 1b$ 受容体の発現量は、大脳、肝臓、腎臓、肺、脾臓ではコントロールと差がみられなかったものの、大動脈、心臓では $\alpha 1d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスにおいてその発現量が増加している傾向が見られた。中枢神経系における $\alpha 1d$ アドレナリン受容体の発現部位を詳細に検討するためにin situ hybridization法を用いた解析をおこなった。その結果、 $\alpha 1d$ アドレナリン受容体は中枢神経系において大脳皮質・海馬・視床・扁桃において強く発現していることが明らかになった。

7) 腎臓全摘高張食塩水負荷による高血圧モデル動物の作製・解析

高血圧発症・維持に関する $\alpha 1d$ アドレナリン受容体の関与を検査するためにコントロールおよび $\alpha 1d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスを用いて高血圧モデルマウスの作製を行った。高血圧モデルマウスの作製は、腎臓の全摘(右腎臓全摘、左腎臓半分摘出)を行った後、1%高張食塩水を飲料水として摂取させた。コントロールマウスでは、8例中6例で高血圧の発症がみられたのに対し、 $\alpha 1d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスでは14例中2例にしか高血圧の発症はみられなかった。心拍数には差はみられなかった。血中クレアチニンの値は差がみられなかったが、カテコールアミン・アルドステロンの値はコントロールマウスに比べて $\alpha 1d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスでは優位に低下していた。

8)  $\alpha 1bd$ 二重欠損マウスの作製および生理学的・薬理的解析

マウス $\alpha 1d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウス ( $\alpha 1d^{-/-}$ ) と $\alpha 1b$ アドレナリン受容体ノックアウトマウス ( $\alpha 1b^{-/-}$ ) の交配により、 $\alpha 1d^{-/+} : \alpha 1b^{-/+}$ の作製を行った。次に $\alpha 1d^{-/+} : \alpha 1b^{-/+}$ マウスと $\alpha 1d^{-/-} : \alpha 1b^{+/+}$ マウスの交配を行い、生まれてきたマウスの遺伝子型の解析により、 $\alpha 1d^{-/-} : \alpha 1b^{-/+}$ マウスの選別を行った。さらに、 $\alpha 1d^{-/-} : \alpha 1b^{-/+}$ マウス同士との交配により $\alpha 1d^{-/-} : \alpha 1b^{-/-}$ マウス ( $\alpha 1bd$ 二重欠損マウス) の作製を行い、生理学的・薬理的解析を行った。

作製した $\alpha 1bd$ 二重欠損マウスのRNAを抽出し、 $\alpha 1d$ -アドレナリン受容体、 $\alpha 1b$ -アドレナリン受容体の発現の消失をRT-PCR方法にて確認した。

次に、薬理的解析方法である結合実験、競合的結合実験を用いて $\alpha 1bd$ 二重欠損マウスにおいて $\alpha 1d$ -アドレナリン受容体、 $\alpha 1b$ -アドレナリン受容体蛋白の消失ならびに残存している $\alpha 1$ -アドレナリン受容体蛋白が $\alpha 1a$ -アドレナリン受容体のみであることを確認した。

血圧はTail cuff方法ならびに観血的測定法を用いて収縮期血圧、平均血圧、心拍数を測定した。 $\alpha 1bd$ 二重欠損マウスは、コントロールマウスに比べて血圧及び心拍数も低いことが明らかになった。

#### 4 考察

今回の解析により、 $\alpha 1d$ アドレナリン受容体の生理機能の一部が明らかになった。従来より $\alpha 1d$ アドレナリン受容体は、大動脈に強く発現しその収縮反応に関与していることは示唆されていたが、今回我々の解析により、 $\alpha 1d$ アドレナリン受容体は大動脈を初めとする血管において収縮反応とそれを介する血圧調節に関与していることが明らかになった。 $\alpha 1d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスは、体重増加・繁殖力に異常はみられず、その外見上も異常はみられなかった。各臓器の異常も肉眼的病理組織学的にも異常はみられなかったが、心重量が変異マウスにおいてコントロールより重たかったのは、 $\alpha 1d$ アドレナリン受容体が心臓の発生・分化・発育に何らかの機能を有している可能性が示唆された。摘出した大動脈標本で $\alpha 1d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスではその収縮反応が著しく低下していたこと結合実験でノックアウトマウスの大動脈ではその結合能が消失していたことよりマウス大動脈において $\alpha 1$ アドレナリン受容体のなかで $\alpha 1d$ アドレナリン受容体がほぼ大部分を占めていることが明らかになった。また、ノックアウトマウスで安静時の血圧が低下し、昇圧反応も低下していることより末梢の抵抗血管においても $\alpha 1d$ アドレナリン受容体が血管収縮を介する血圧の調節に関与していることが明らかになった。 $\alpha 1d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスにおいて $\alpha 1d$ アドレナリン受容体の発現はRNAレベルでも蛋白レベルでも消失していることは今回のRT-PCR, TaqMan プローブ法を用いた解析、結合実験より明らかになったが、その他のサブタイプである $\alpha 1a$ ,  $\alpha 1b$ の発現量が心臓や大動脈で増加している傾向が見られたことは、欠損した $\alpha 1d$ 受容体の機能を $\alpha 1a$ ,  $\alpha 1b$ が代償的に補っている可能性が示唆された。中枢神経系において $\alpha 1d$ 受容体が発現していることは従来より報告されていたが、その機能に

については明らかでなかった。今回我々の解析により1 d受容体が中枢神経系の中でも特異的に発現し、それぞれの部位で中枢の高次機能に関与することが示唆された。今後、中枢神経系における1 d受容体の機能については記憶や行動の評価を行い明らかにしていく予定である。高血圧モデルに関しては、コントロールにくらべて明らかに $\alpha 1 d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスで高血圧の発症が低かったことより、塩分負荷による高血圧発症に $\alpha 1 d$ アドレナリン受容体に関与していることが証明された。その機序として末梢血管において血管の収縮反応をかいする昇圧反応・高血圧の維持が最も考えられるが、中枢性に $\alpha 1 d$ 受容体を介しての高血圧の発症や腎臓におけるナトリウムの再吸収をかいする高血圧の発症も可能性として考えられた。今回の解析によりより選択的な $\alpha 1 d$ アドレナリン受容体拮抗薬を用いることにより、従来の1アドレナリン受容体拮抗薬であるプラゾシン、ドキサゾシンなどにくらべて、より特異的で副作用が少ない降圧剤の開発が可能となるものと考えられる。

## 5. まとめ

ジーンターゲティング方法を用いて $\alpha 1 d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスを作製した。

この変異マウスは安静時の血圧が低下していた。

$\alpha 1$ アドレナリン受容体作動薬であるノルエピネフリン、フェニレフリンに対する昇圧反応も低下していた。

塩分負荷による高血圧の発症はコントロールに比べて $\alpha 1 d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスでは優位に低下していたことより高血圧の発症に $\alpha 1 d$ アドレナリン受容体に関与していることが示唆された。

以上の結果より $\alpha 1 d$ アドレナリン受容体選択的拮抗薬は従来の1アドレナリン受容体拮抗薬であるプラゾシン、ドキサゾシンなどにくらべて、より特異的で副作用が少ない降圧剤の開発が可能となるものと考えられた。

## 6. 研究発表

田上昭人

### 1. The $\alpha_{1D}$ -adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction.

Akito Tanoue, Yoshihisa Nasa, Takaaki Koshimizu, Hitomi Shinoura, Sayuri Oshikawa, Takayuki Kawai, Sachie Sunada, Satoshi Takeo, Gozoh Tsujimoto

Journal of Clinical Investigation 2002, Volume 109, Number 6, 765-775.

### 2. Takei Y, Swietlik M, Tanoue A, Tsujimoto G, Kouzarides T, Laskey R.

MCM3AP, a novel acetyltransferase that acetylates replication protein MCM3.

EMBO Reports. 2: 119-123, 2001.

### 3. Koshimizu T, Goor F.V., Tomic M, Wong A.O., Tanoue A, Tsujimoto G, Stojkovic S.S.

Characterization of calcium signaling by purinergic receptor-channels expressed in excitable cells.

Mol Pharmacol. 58: 936-945, 2000.

分担研究者

橋本敬太郎

### 1. Xue, Y.X., Yamada, C., Aye N.N. and Hashimoto, K.: MS-551 and KCB-328, two class III drugs aggravated adrenaline-induced arrhythmias. Br. J. Pharmacol. 124: 1712-1718, 1998

### 2. Saitoh, M., Aye, N.N., Komori, S., Nakazawa, T. and Hashimoto, K.: Effects of HNS-32, a novel antiarrhythmic drug, on ventricular arrhythmias induced by coronary artery occlusion and reperfusion in anesthetized rats. Molecular and Cellular Biochemistry 205(1-2): 133-140, 2000.

### 3. Sugiyama, A., Yatomi, Y., Ozaki, Y. and Hashimoto, K.: Sphingosine 1-phosphate induces sinus tachycardia and coronary vasoconstriction in the canine heart. Cardiovascular Res. 46: 119-125, 2000.

### 4. Homma, N., Hirasawa, A., Shibata, K., Hashimoto, K. and Tsujimoto, G.: Both $\alpha_{1A}$ - and $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor subtypes couple to the transient outward current (I<sub>TO</sub>) in rat ventricular myocytes. Brit. J. Pharmacol. 129: 1113-1120, 2000

### 5. Miyamoto, S., Zhu, B-M, Teramatsu, T., Aye, N.N. and Hashimoto, K.: QT-prolonging class I drug, disopyramide, does not aggravate but suppresses adrenaline-induced arrhythmias. Comparison with cibenzoline and pilsicainide. Europ. J. Pharmacol. 400: 263-269, 2000

### 6 Akie, Y., Ni, C., Aye, N.N., Xue, Y.X. and Hashimoto, K.: Proarrhythmic

effects of four class III antiarrhythmic drugs, MS-551, sotalolol, dofetilide

and KCB328, examined using ambulatory ECG. Asia Pacific J. Pharmacol. 14: 101-109, 2000

### 7. Satoh Y., Sugiyama A., Chiba K., Tamura K. and Hashimoto K.: QT-prolonging effects of sparfloxacin, a fluoroquinolone antibiotic, assessed in the in vivo canine model with monophasic action potential monitoring. J. Cardiovas. Pharmacol. 36: 510-515, 2000

北村唯一

### 1. Kondo, K., Hnma, Y., Takahashi, S., Kitamura, T and Kawabe, K.: Transvaginal ultrasound of urethral sphincter at the mid urethra in continent and incontinent women. J. Urol., 165 : 149-152, 2001.

高野行夫

### 1. Honda, K., Harada, A., Takano, Y. and Kamiya, H.: Involvement of M3 muscarinic receptors of the spinal cord in formalin-induced nociception in mice. Brain Res., 859, 38-44 (2000)

### 2. Nakayama, Y., Takano, Y., Shimohigashi, Y., Tanabe, S., Fujita, T., Kamiya, H. and Tsujimoto, G.: Pharmacological characterization of a novel AVP4-9 binding site in rat hippocampus. Brain Res., 858, 416-423 (2000).

### 3. Eun Jung Kim, Jung-Kil Seo, Chan-Hee Kim, Hung Tae Kim, Takano, Y., Kamiya, H., Sannamu Lee, Sugi-hara, G. and Nam Gyu Park.: Structure and biological activity of the neuropeptide $\gamma$ . Peptide Science., 1999, 467-470 (2000)

### 4. Kodani, M., Sakata, N., Takano, Y., Kamiya, H., Katsuragi, T., Tony E. Hugli. and Abe, M.: Intratracheal administration of anaphylatoxin the prolonged production of cysteinyl-leukotrienes. Immunopharmacology, 49, 263-274 (2000)

### 5. Ariuni, H., Saito, R., Nago, S., Hyakusoku, M., Takano, Y. and Kamiya, H.: The role of tachykinin NK-1 receptors in the area postrema of ferrets in emesis. Neuroscience Letters., 286, 123-126 (2000)

廣田直美

### 1. Goldfarb RH, Kitson RP, Brunson KW, Yoshino K, Hirota N, Kirii Y, Kotera Y, Inoue Y, Ohashi M. Enhanced anti-metastatic efficacy of IL-2 activated NK (A-NK) cells with novel benzothiazoles. Anticancer Re

1999) 19(3A), 1663-7.

竹尾 聡

1.T. Iwai, K. Tanonaka, M. Koshimizu, S. Takeo. Diazoxide preserves mitochondrial energy-producing ability in ischaemic rat heart. Brit J Pharmacol, 2000; 129: 1219-1227.

生垣 一郎

1.Yamamoto, Y., Ikegaki, I., Sasaki, Y. and Uchida, T.: The protein kinase inhibitor fasudil protects against ischemic myocardial injury induced by endothelin-1in the rabbit., J. Cardiovasc. Pharmacol. (2000), 35, 203-211.

小嶋 正三

1.Shinagawa K. Kojima M., Ichikawa K., Hiratochi M., Aoyagi S. and Akahane M. : Participation of thromboxane A2 in the cough response in guinea-pigs: antitussive effect of ozagrel. Br. J. Pharmacol. (2000) 131, 266-270

伊藤 修司

稲垣 治

Inagaki O., Asano, M., Takenaka T. In vitro and in vivovasodilatory activity of barnidipine and itsenantiomers Biol. Pharm. Bull. 1999;22(2):151-156

7. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得 なし
- 2) 実用新案登録 なし
- 3) その他 なし

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社