

## 遺伝子改変動物をもちいたG蛋白質共役型受容体の機能解析

所 属 国立成育医療センター研究所 薬剤治療研究部  
研究者 田上 昭人

### 分担研究者

- |                           |               |
|---------------------------|---------------|
| (1) 国立成育医療センター研究所         | 篠浦 ひとみ、 押川小百合 |
| (2) 山梨大学医学部・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・ライフサイエンス総合研究所 | 生垣 一郎         |
| (7) キッセイ薬品工業株式会社・中央研究所    | 小嶋 正三         |
| (8) 大塚製薬株式会社・医薬第一研究所      | 伊藤 修司         |
| (9) 日本オルガノン株式会社・研究開発管理室   | 広田 直美         |
| (10) 山之内製薬株式会社・創薬研究本部     | 稲垣 治、松七五三 仁   |

### 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 $\alpha 1b, d$ )、バソプレッシン受容体 (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および病態モデルにおける受容体の関与について解析を行った。

### 1. 研究目的

G蛋白質共役型受容体 (アドレナリン受容体、バソ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。さらに各受容体に対する特異的作用薬・拮抗薬の開発を目指す。

### 2. 研究方法

マウス $\alpha 1$ 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った。V1a, V1bバソ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・薬理的解析を行った。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、解析を行った。

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。
- 2) 体重増加・血圧・昇圧反応等生理的解析。
- 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等の薬理的検討。
- 4) 受容体変異マウスにおける各サブタイプ遺伝子発現レベルをRT-PCR, in situ hybridization法を用いて分子生物学的解析。
- 5) 高血圧モデル・心不全モデル・血管損傷モデル・高脂肪食負荷モデル・尿道狭窄モデル等の疾患モデル動物の作成および, in vitro, in vivoでの解析。
- 6) 各受容体に対する特異的薬物を用いた変異動物あるいは疾患モデル動物の生理学的・薬理的解析。
- 7) 合成した化合物の薬理作用・生理作用を動物を用いた作用効果の解析および変異動物との比較・創薬への応用。

### 3. 研究成果

$\alpha 1 d$  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）、 $\alpha 1 b$  アドレナリン受容体/ $\alpha 1 d$  アドレナリン受容体二重欠損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、V1aバソプレッシン受容体、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し生理機能の解析を行った。V1aバソプレッシン受容体/V1bバソプレッシン受容体二重欠損マウスの作成についても行った。

#### 1) 変異動物の病理組織学的検討

$\alpha 1$  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。 $\alpha 1$  アドレナリン受容体ノックアウトマウスでは、心臓におけるヘマトキシリン・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。 $\alpha 1 b$  アドレナリン受容体/ $\alpha 1 d$  アドレナリン受容体二重欠損マウスでも組織重量、組織学的変化はみられなかった。以上の結果より $\alpha 1 b$  アドレナリン受容体および $\alpha 1 d$  アドレナリン受容体は心臓の発育発達に影響はないものと考えられた。

#### 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。 $\alpha 1 b$  アドレナリン受容体/ $\alpha 1 d$  アドレナリン受容体二重欠損マウスでは、さらに低血圧がみられ、血圧の維持には $\alpha 1 b$  アドレナリン受容体/ $\alpha 1 d$  アドレナリン受容体が重要な働きをしていることが明らかになった。

#### 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

$\alpha 1$  アドレナリン受容体ノックアウトマウス（ $\alpha 1 D$  ノックアウト、 $\alpha 1 B$  ノックアウト、BD二重欠損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。これに対して $\alpha 1 B$  ノックアウトでは反応性はコントロールと同程度にみられた。二重欠損マウスではその反応性は、完全に消失していた。

$\alpha 1 d$  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ジ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り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比べて、大脳で約10%、大脳皮質で約40%、海馬で約約10%、大動脈でほぼ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 $\alpha 1$ 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 プローブ方法をもちいて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) 心機能の解析

それぞれの遺伝子改変動物を用いて心臓エコーを行い、心機能の評価を行った。心拍出量はいずれのマウスでも変化はみられなかったが、心臓収縮力が $\alpha 1B$ ノックアウト、 $\alpha 1BD$ ノックアウトで低下がみられ、 $\alpha 1B$ 受容体が心臓において陽性変力作用に関与していることが明らかになった。

8) 起立負荷における血圧変化の解析

$\alpha 1$ ブロッカーの副作用である起立性低血圧にどのサブタイプが関与しているのか調べるために、それぞれの遺伝子改変動物を用いて起立負荷による血圧の変化を解析した。3分間75度の起立負荷をかけたときの血圧の変化は、コントロールマウスでは一過性に血圧は低下するものの次第に回復する傾向がみられたのに対し、 $\alpha 1$ ブロッカーを処置したコントロール群や $\alpha 1B$ ノックアウトでは血圧の回復が遅延する傾向がみられた。これに対して $\alpha 1D$ ノックアウトマウスではコントロールと同様血圧は回復する傾向がみられた。

9) 腎臓亜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 $\alpha 1$ アドレナリン受容体の関与を検討するためにコントロールおよび $\alpha 1b$ アドレナリン受容体ノックアウトマウス、 $\alpha 1d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウス、 $\alpha 1b/d$ 二重欠損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、腎臓の亜全摘(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。 $\alpha 1b$ 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群と同様の高血圧の発症がみられた。

10) シストメトリーを用いた膀胱機能の解析

シストメトリーを用いた膀胱機能の解析では $\alpha 1D$ ノックアウトマウスにおいて排尿間隔の延長がみられ、膀胱機能の低下がみられた。

11) 痛み刺激に対する反応性の検討

痛み刺激などによる反射、知覚反射経路に $\alpha 1$ アドレナリン受容体に関与しているかどうか調べるために $\alpha 1D$ ノックアウトマウスを用いて痛み刺激に対する反応性の検討を行った。その結果、 $\alpha 1D$ ノックアウトマウスにおいては痛みに対する反応性が低下していることが明らかになった。

12) 尿道狭窄による前立腺肥大モデル動物の作製・解析

前立腺肥大による膀胱機能および生理変化に係わる $\alpha 1d$ アドレナリン受容体の関与を検討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尿道狭窄によるの作製を行った。前立腺肥大モデルマウスの作製は、カテーテルを挿入後、尿道狭窄を外科的に行い、1週間後の膀胱の肥大・収縮反応・ $\alpha 1$ 遺伝子の発現レベルを解析した。コントロールマウスでは、膀胱の肥大がみられたのに対して、 $\alpha 1d$ 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。

#### 13) $\alpha 1b$ d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。

#### 14) $\alpha 1$ アドレナリン受容体変異マウスにおける血管損傷後リモデリングの解析

マウスの大腿動脈よりワイヤーカテーテルを挿入後胸部大動脈内皮を機械的に擦過後1週間、2週間、3週間、4週間後の動脈内皮の肥厚を調べた。コントロールマウスでは機械的損傷後1週目より内皮の肥厚がみられ4週目に肥厚は最大となった。今後同様の解析を遺伝子改変動物で行い、機械的損傷に対する内皮の肥厚を解析することにより血管リモデリングにおける $\alpha 1$ アドレナリン受容体の機能を明らかにする。

#### 15) V1a, V1bバソプレッシン受容体欠損および過剰発現マウス作成

ジーンターゲットング方法を用いてバソプレッシン受容体サブタイプV1a, V1b欠損マウスの作成を行った。それぞれの変異マウスは体重増加・生殖能力・体温などの一般的生理機能においては変化はみられなかったが、V1a欠損マウスにおいては血圧が低下している傾向がみられた。V1b欠損マウスでは血中のACTHが低下していた。

### 4 考察

今回の解析により、 $\alpha 1d$ アドレナリン受容体が血圧の維持及び高血圧発症に深く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拮抗薬は、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体の拮抗薬に比べて、より選択で副作用の少ない抗圧薬となる可能性が示唆され、今後 $\alpha 1d$ アドレナリン受容体選択的拮抗薬の開発とその効果の確認を検討する予定である。

またV1aバソプレッシン受容体欠損マウスも低血圧を示していることより、バソプレッシン受容体のなかでもV1aサブタイプが血圧の維持に重要な働きをしていることが明らかになり、この受容体選択的拮抗薬あるいは作動薬が血圧調節の薬物として臨床応用に結びつく可能性が開かれた。

### 5. まとめ

ジーンターゲットング方法を用いて $\alpha 1d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウス、V1a, V1bバソプレッシン受容体欠損マウスを作製した。

$\alpha 1d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウス、V1aバソプレッシン受容体欠損マウスは安静時の血圧が低下していた。食塩負荷による高血圧モデルでは、 $\alpha 1d$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスは、血圧が上昇しにくい傾向がみられた。以上のことより、 $\alpha 1d$ アドレナリン受容体選択的拮抗薬やV1aバソプレッシン受容体選択的拮抗薬は、新たな血圧調節の薬物として臨床応用に結びつく可能性が開かれた。

## 6. 研究発表

主任研究者

田上昭人

(学会発表)

田上昭人、篠浦ひとみ、押川小百合、辻本豪三

マウス組織におけるアルファ1-アドレナリン受容体各サブタイプ発現の解析：アルファ1-アドレナリン受容体異変マウスを用いた解析(1)

第75回日本薬理学会年会、2002年3月 熊本

辻本豪三、奈佐吉久、奥水崇鏡、押川小百合、河合孝幸、砂田幸江、竹尾聰、田上昭人

アルファ1-アドレナリン受容体各サブタイプの心血管機能における役割：アルファ1-アドレナリン受容体異変マウスを用いた解析(2)

第75回日本薬理学会年会、2002年3月 熊本

奈佐吉久、砂田幸江、福田晋也、荒牧亜衣、竹尾聰、田上昭人、辻本豪三

$\alpha$ 1-アドレナリン受容体各サブタイプ変異マウスを用いた大動脈収縮応答メカニズムの解析

第75回日本薬理学会年会、2002年3月 熊本

木庭正宏、田上昭人、押川小百合、宮脇茂樹、矢野純一、辻本豪三

高張食塩水負荷高血圧発症モデルにおけるアルファ1D-アドレナリン受容体機能の役割：アルファ1-アドレナリン受容体異変マウスを用いた解析(3)

第75回日本薬理学会年会、2002年3月 熊本

押川小百合、田上昭人、伊藤修司、福田めいこ、山本浩二、辻本豪三

V1bバソプレッシン受容体サブタイプ欠損マウスの作製および解析

第75回日本薬理学会年会、2002年3月 熊本

三島健一、田上昭人、津田聖一、長谷部伸嘉、江頭信昭、辻本豪三、岩崎克典、藤原道弘

$\alpha$ 1D-アドレナリン受容体欠損マウスの作業記憶および注意力障害の特性

第75回日本薬理学会年会、2002年3月 熊本

辻本豪三、平澤明、勝間進、塩島聡、田上昭人

疾患動物DNAチップ解析に基づくゲノム創薬研究

日本分子生物学会第25回年会シンポジウム、2002年12月 横浜

杉山雅英、吉田信代、田上昭人、平澤明、辻本豪三

電気制御DNAチップによる $\beta$ 2アドレナリン受容体遺伝子のSNPおよびハプロタイプピング

第47回日本人類遺伝学会 2002年11月 山梨

奥水崇鏡、上野晋、田上昭人、柳原輝行、辻本豪三

Dependence of agonist binding and desensitization rates of heteromeric P2X receptors on extracellular and C-terminal subdomains.

第107回日本薬理学会関東部会、2002年10月 甲府

奥水崇鏡、田上昭人、篠浦ひとみ、柴田克志、押川小百合、細田千尋、辻本豪三。

血圧調節における $\alpha$ 1アドレナリン受容体サブタイプの役割。

第12回日本循環薬理学会、2002年11月 京都

辻本豪三、細田千尋、奈佐吉久、小池勝夫、田上昭人。

$\alpha$ 1アドレナリン受容体サブタイプの血管機能における役割： $\alpha$ 1アドレナリン受容体変異マウスを用いた解析

第32回日本新脈管作動物質学会、2003年2月 大阪

辻本豪三、平澤 明、塩島 聡、勝間 進、山田将輝、田上昭人  
新規創薬標的探索のための機能ゲノム科学アプローチ  
第76回日本薬理学会年会、2003年3月 福岡

押川小百合、辻本豪三、田上昭人  
マウスバソプレッシン受容体各サブタイプのクローニング及び解析  
第76回日本薬理学会年会、2003年3月 福岡

田上昭人、奥水崇鏡、辻本豪三  
RNAエディティングによる変異エンドセリンB受容体遺伝子の解析  
第76回日本薬理学会年会、2003年3月 福岡

奥水崇鏡、Mu-Lan He、上野晋、田上昭人、柳原延章、Stanko S. Stojkovic、辻本豪三  
Novel splicing variant of mouse P2X2 receptors revealed Cterminal structure-dependent expression and desensitization of P2X2 receptors.  
第76回日本薬理学会年会、2003年3月 福岡

細田千尋、田上昭人、押川小百合、奥水崇鏡、奈佐吉久、竹尾聡、辻本豪三  
高張食塩水負荷高血圧発症モデルにおけるアルファ1Dおよびアルファ1B-アドレナリン受容体機能の役割：アルファ1-アドレナリン受容体変異マウスを用いた解析  
第76回日本薬理学会年会、2003年3月 福岡

(論文発表)

Tanoue A, Nasa Y, Koshimizu T, Shinoura H, Oshikawa S, Kawai T, Sunada S, Takeo S, Tsujimoto G. The alpha(1D)-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *J Clin Invest.* 2002; **109**: 765-775.

Tanoue A, Koshimizu T, Tsuchiya M, Ishii K, Osawa M, Saeki M, Tsujimoto G. Two novel transcripts for human endothelin B receptor produced by RNA editing/alternative splicing from a single gene. *J. Biol. Chem.* 2002; **277**: 33205-33212.

Tanoue A, Koba M, Miyawaki S, Koshimizu T, Hosoda C, Oshikawa S, Tsujimoto G. Role of the alpha1D-adrenergic receptor in the development of salt-induced hypertension. *Hypertension.* 2002; **40**: 101-106.

Yoshida N, Nishimaki Y, Sugiyama M, Abe T, Tatsumi T, Tanoue A, Hirasawa A, Tsujimoto G. SNP genotyping in the beta2-adrenergic receptor by electronic microchip assay, DHPLC, and direct sequencing. *J. Hum. Genet.* 2002; **47**: 500-503.

Koshimizu TA, Ueno S, Tanoue A, Yanagihara N, Stanko SS, and Tsujimoto G. Heteromultimerization modulates P2X receptor functions through participating extracellular and C-terminal subdomains. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 46891-46899.

Shinoura H, Shibata K, Hirasawa A, Tanoue A, Hashimoto K, Tsujimoto G. Key amino acids for differential coupling of alpha1-adrenergic receptor subtypes to Gs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; **299**: 142-147.

Katsuma S, Hada Y, Ueda T, Shiojima S, Hirasawa A, Tanoue A, Takagaki K, Ohgi T, Yano J,

Tsujimoto G. Signalling mechanisms in sphingosine 1-phosphate-promoted mesangial cell proliferation. *Genes Cells*. 2002; 7: 1217-1230.

Koshimizu T, Yamauchi J, Hirasawa A, Tanoue A, Tsujimoto G. Recent Progress in alpha 1-adrenoceptor pharmacology. *Biol. Pharam. Bull.* 2002; 25: 401-408.

Tanoue A, Koshimizu T, Tsujimoto G. Transgenic studies of  $\alpha$ 1-adrenergic receptor subtype function. *Life Sciences*. 2002; 71: 2207-2215.

Tsujimoto G, Tanoue A. Alpha 1D-adrenergic receptor knockout mice display impaired vascular contractile response to catecholamines. In "Catecholamine Research", Advances in Behavioral Biology. (Kluwer Academic / Plenum Publishers) 2002; 53: 285-288.

Katsuma S, Hada Y, Shiojima S, Hirasawa A, Tanoue A, Takagaki K, Ohgi T, Yano J, Tsujimoto G. Transcriptional profiling of gene expression patterns during sphingosine 1-phosphate-induced mesangial cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 300: 577-584.

Shibata K, Katsuma S, Koshimizu T, Shinoura H, Hirasawa A, Tanoue A, Tsujimoto G. alpha 1-Adrenergic Receptor Subtypes Differentially Control the Cell Cycle of Transfected CHO Cells through a cAMP-dependent Mechanism Involving p27Kip1. *J Biol Chem*. 2003; 278: 672-678.

Yoshida N, Sugiyama M, Tanoue A, Hirasawa A, and Tsujimoto G. Determination of a novel haplotype of beta 2 adrenergic receptor in the Japanese population by the combination of the electronic microchip assay using the nanoChip system with allelespecific PCR. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2003, 17 (6): 532-539.

Chalothorn D, Tobita K, McCune DF, Robertson D, Perez DM, Keller B, Edelmann SE, Tanoue A, Tsujimoto G, Post GR, Lasley RD, Piascik MT. Differential cardiovascular regulatory activities of the alpha 1B and alpha 1D adrenoceptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003, In press

Koshimizu T, Tanoue A, Hirasawa A, Yamauchi J and Tsujimoto G. Recent Advance of  $\alpha$ 1-Adrenoceptors Pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics*, 2003, 5535, 1-10, In press

Tanoue A, Koshimizu T, Shibata K, Nasa Y, Takeo S and Tsujimoto G. Insights into  $\alpha$ 1 adrenergic receptor function in health and disease from transgenic animal studies. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2003, In press

分担研究者  
橋本敬太郎  
(論文発表)

Sugiyama A and Hashimoto K.: Effects of a typical  $I_{Kr}$  channel blocker sematilide on the relationship between ventricular repolarization, refractoriness and onset of torsades de pointes. *Jpn. J. Pharmacol.* 88: 414-421(2002)

Saitoh M, Sugiyama A, Nakazawa T and Hashimoto K.: Cardiovascular effects of orally administered HNS-32, an originally synthesized azulene-1-carboxamide derivative, assessed in the in vivo rat model. *Jpn. J. Pharmacol.* 89: 316-319(2002)

Yoshida H, Sugiyama A, Satoh Y, Ishida Y, Yoneyama M, Kugiyama K and Hashimoto K.:

Comparison of the in vivo electrophysiological and proarrhythmic effects of amiodarone with those of a selective class III drug, sotalolol, using a canine chronic atrioventricular block model. *Circulation J.* 66 (8): 758-762(2002)

Horii I, Jito G, Hamada T, Jikuzono T, Kobayashi K and Hashimoto K.: Development of telemetry system in the common marmoset. Cardiovascular effects of astemizole and nifedipine. *J. Toxicological Sciences* 27 (2):123-130(2002)

Yoshida H, Sugiyama A, Satoh Y., Ishida Y, Kugiyama K and Hashimoto K.: Effects of disopyramide and mexiletine on the terminal repolarization process of the in situ heart assessed using the halothane-anesthetized in vivo canine model. *Circulation J.* 66(9): 857-862(2002)

Miyamoto S, Zhu B-M, Kamiya K, Nagasawa Y and Hashimoto K.: KB-R7943, a Na<sup>+</sup>·Ca<sup>2+</sup> exchange inhibitor, does not suppress ischemia·reperfusion arrhythmias nor digitalis arrhythmias in dogs. *Jpn. J. Pharmacol.* 90: 229-235(2002)

Zhu B-M, Miyamoto S, Nagasawa Y, Saitoh M, Komori S and Hashimoto K.: Does Cl<sup>-</sup>/HC 3<sup>-</sup> exchange play an important role in reperfusion arrhythmias in rats? *Europ. J. Pharmacol.* 460: 43-50(2003)

#### 北村唯一

Azuma T, Horie S, Tomita K, Takahashi T, Tanaka Y, Kashiwase K, Niede M, Takeuchi T, Ohta N, Shibata Y, Hirai H, Kitamura T.  
Dendritic cell immunotherapy for patients with metastatic renal cell carcinoma: University of Tokyo experience.  
*Int J Urol.* 9(6) : 340-6, 2002

#### 竹尾 聡

(論文発表)

Tanoue A, Nasa Y, Shinoura H, Oshikawa S, Kawai T, Sunada S, Takeo S, Tsujimoto G.  
The  $\alpha_{1D}$ -adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction.  
*J Clin. Invest.* 109: 765-775, 2002.

(口頭発表)

辻本豪三、奈佐吉久、奥水崇鏡、押川小百合、河合孝幸、及川怜、砂田幸江、竹尾聡、田上昭人  
アルファ1-アドレナリン受容体各サブタイプの心血管機能における役割：アルファ1-アドレナリン受容体変異マウスを用いた解析(2)  
第75回日本薬理学会(2002年3月・熊本)

奈佐吉久、砂田幸江、福田晋也、荒牧亜衣、竹尾聡、田上昭人、辻本豪三  
 $\alpha_1$ -アドレナリン受容体サブタイプ変異マウスを用いた大収縮応答メカニズムの解析  
第75回日本薬理学会(2002年3月・熊本)

Yoshihisa Nasa, Takayuki Kawai, Sachie Sunada, Ryo Oikawa, Satoshi Takeo, Akito Tanoue, Sayuri Oshikawa, Gozoh Tsujimoto,  
Definitive role of  $\alpha_{1D}$ -adrenergic receptors in the regulation of sympathetic vasoconstriction : functional analysis in receptor-deficient mice.  
XIVth World Congress of Pharmacology 第14回国際薬理学会議(2002年7月・San Francisco, California, USA)

#### 高野行夫

(論文発表)



Honda, K., Koga, K., Moriyama, T., Koguchi, M., Takano, Y. and Kamiya, H.  
Intrathecal  $\alpha_2$  adrenoceptor agonist clonidine inhibits mechanical transmission in mouse spinal cord via activation of muscarinic M1 receptors.  
Neuroscience Lett., 322, 161-164 (2002)

Ueno, S., Yamada, H., Moriyama, T., Honda, K., Takano, Y., Kamiya, H. and Katsuragi, T.  
Measurement of dorsal root ganglion P2X mRNA by SYBR green fluorescence.  
Brain Research Protocols 10, 95-101 (2002)

Honda, K., Murao, N., Ibuki, T., Kamiya, H. and Takano, Y.  
The role of spinal muscarinic acetylcholine receptors in clonidine-induced anti-nociceptive effects in rats.  
Biol. Pharma Bull, in press (2003)

Mishima, K., Tanoue, A., Tsuda, M., Hasebe, N., Fukue, Y., Egashira, N., Takano, Y., Kamiya, H., Tsujimoto, G., Iwasaki, K., Fujiwara M.  
Characteristics of behavioral abnormalities in  $\alpha_{1D}$ -adrenergic receptors deficient mice.  
Behav. Brain Res. Submitted (2003)

Harasawa, I., Honda, K., Tanoue, A., Shinoura, H., Ishida, Y., Okamura, H., Murao, N., Tsujimoto, G., Higa, K., Takano, Y., Kamiya, H.  
Responses to noxious stimuli in mice lacking  $\alpha_{1D}$ -adrenergic receptors.  
Neuroreport submitted (2003)

(口頭発表)

本多健治, 原澤一郎, 田上昭人, 篠浦ひとみ, 村尾南海子, 岡村均, 高野行夫, 辻本豪三, 比嘉和夫, 神谷大雄  
 $\alpha_{1D}$ -アドレナリン受容体欠損マウスに対する侵害刺激応答  
第73回日本薬理学会 (横浜市3月2001)

Harasawa I., Honda K., Tanoue A., Shinoura H., Murao N., Takano Y., Tsujimoto G., Okamura H., Higa H., Kamiya H.  
RESPONSES TO NOXIOUS STIMULI IN THE MICE LACKING THE  $\alpha_{1D}$ -ADRENERGIC RECEPTORS.  
Asian Pain Symposium, Nov.30-Dec1, 2000 Kyoto, Japan

三島健一, 田上昭人, 津田聖一, 長谷部伸嘉, 江頭伸昭, 辻本豪三, 岩崎克典, 藤原道弘.  
 $\alpha_{1D}$ -アドレナリン受容体欠損マウスの作業記憶および注意力障害の特性.  
第75回日本薬理学会年会. 2002. 3. 13-15 (熊本)

本多健治, 高野行夫, 神谷大雄  
疼痛における脊髄内アセチルコリンとノルアドレナリン神経の役割  
第75回日本薬理学会年会2002. 3, (熊本)

上野伸哉, 森山朋子, 山田博美, 本多健治, 高野行夫, 神谷大雄, 桂木猛  
坐骨神経結紮モデルの神経因性疼痛に対するP2X受容体の関与  
第75回日本薬理学会年会2002. 3, (熊本)

古賀浩平, 本多健治, 高口雅子, 森山朋子, 斎藤亮, 高野行夫, 神谷大雄  
Clonidineは脊髄のムスカリンM1受容体を介し機械刺激伝達を抑制する  
第75回日本薬理学会年会2002. 3, (熊本)

Honda, K., Koga, K., Koguchi, M., Saito, R., Takano, Y. and Kamiya, H.  
Clonidine inhibits mechanical transmission in mouse spinal cord via activation of muscarinic M1 receptors.

The third international symposium on the study of brain function 2002. 5, (福岡)

Honda, K., Koga, K., Koguchi, M., Saito, R., Takano, Y. and Kamiya, H.  
Clonidine inhibits mechanical transmission in mouse spinal cord via activation of muscarinic M1 Receptors.

XIVth world congress of pharmacology 2002. 7, (サンフランシスコ)

生垣一郎 該当なし

小嶋正三 該当なし

伊藤修司 該当なし

廣田直美 該当なし

稲垣 治 該当なし

#### 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