

## マイクロアレイDNAチップを用いた各種病態関連発現遺伝子の解析

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 辻本 豪三

### 分担研究者

- |                           |                      |
|---------------------------|----------------------|
| (1) 国立成育医療センター研究所 薬剤治療研究部 | 勝間進、塩島聡、宮本幸、西牧裕子、平澤明 |
| (2) 岐阜薬科大学薬学部薬理学教室        | 永井博弐                 |
| (3) 産業医科大学薬理学教室           | 柳原延章                 |
| (4) 田辺製薬株式会社              | 京野潔                  |
| (5) 東レ株式会社                | 須藤哲央                 |
| (6) 日本新薬株式会社              | 村井正俊                 |
| (7) 日産化学工業株式会社            | 岩間武久                 |
| (8) 日研化学株式会社              | 佐野哲朗                 |

### 要旨

薬理学において、従来疾患モデル動物として薬効評価に用いられている動物モデルはラット、マウス、モルモットが主であり、その遺伝子解析はヒトと比して著しく遅れており、遺伝子情報も乏しい。このような背景の疾患モデル動物における体系的かつ網羅的な遺伝子発現解析が可能となれば、従来蓄積されている疾患モデル動物を用いた膨大な生理、生化学薬理データを遺伝子変動と関連して有効に活用することができる。昨年度本研究により作製したラット腎臓標準化 cDNA マイクロアレイチップを用い、抗糸球体基底膜抗血清投与による、ヒト糸球体腎炎によく類似したラット糸球体腎炎モデルの腎臓組織における発現変動遺伝子を解析した。その結果、腎疾患の病態形成、病状の悪化や治療のターゲットに関連する可能性の極めて高い遺伝子群を見出すことができた。

### 1. 研究目的

昨年度本研究によりラット腎臓標準化 cDNA マイクロアレイチップを作製できた。この DNA チップは、腎疾患の病状の悪化、あるいは改善に関連する遺伝子(群)を見出すために有用であると考えられる。疾患に関与する遺伝子が明らかになれば、それをターゲットとした医薬品を開発することができる。本年度は東レ株式会社医薬研究所、田辺製薬、日本新薬等で協力してラット糸球体腎炎モデルを解析した。また、日本新薬では腎結石モデルを、日産化学工業では脂肪細胞分化を、日研化学ではアレルギーを対象として、それぞれの疾患モデル解析用チップ作製を行った。本報告書では主としてラット腎臓標準化 cDNA マイクロアレイチップによるラット糸球体腎炎モデルの解析結果につき報告する。

## 2. 研究方法

### 2-1 ウサギ抗糸球体基底膜抗血清によるラット糸球体腎炎モデルの作製

ラット糸球体基底膜を抗原とするウサギ抗血清をラットに投与することにより、ラット糸球体腎炎モデルを作製した。

#### 糸球体腎炎誘発用の抗血清投与液の調製

糸球体腎炎誘発用の抗血清投与液は、ラット糸球体基底膜を抗原としてアジュバンドと共にウサギに皮下投与して免疫し、得られたウサギ抗ラット糸球体基底膜抗血清を非働化および赤血球吸収処理した後、生理食塩水で5倍希釈しメンブレンフィルター（孔径0.22 $\mu$ m, 日本ミリポア）で濾過滅菌して調製した。また、対照用の血清投与液は、非免疫のウサギより得られた血清を同様に非働化および赤血球吸収処理した後、生理食塩水で5倍希釈し濾過滅菌して調製した。

#### 糸球体腎炎の誘発

糸球体腎炎の誘発は、ラットに上記の腎炎誘発用の抗血清投与液を静脈内投与することにより行った。すなわち、ラット（Wistar-Kyoto系, 7週齢, 雄性, 日本チャールズリバー）をエーテルにて麻酔し、抗血清投与液をラット体重1kgあたり3mlの割合で尾静脈内投与した。一方、正常（糸球体腎炎非誘発）ラットには、上記の対照用の血清投与液（3ml/kg）を同様に投与した。抗血清投与液を投与した週を腎炎誘発0週目とした。

#### 糸球体腎炎マーカーの測定

糸球体腎炎マーカーとしては、尿蛋白（尿中総蛋白排泄量）および血中クレアチニン濃度を測定した。ラットを個別に代謝ケージに入れ自由摂食・飲水下で24時間尿を採取し、24時間尿量（ml/day）と尿中総蛋白濃度（mg/ml）を測定して、それらの積により尿中総蛋白排泄量（mg/day）を求めた。尿中総蛋白濃度測定のための尿サンプルには、採取した尿を遠心して得た遠心上清を用い、測定には体外診断用医薬品キット（TP テストワコー, 和光純薬）を使用した。血中クレアチニン濃度測定のための血液サンプルは、ラットをエーテルにて麻酔し、尾静脈より採血した血液を遠心して得た遠心上清（血清画分）を用い、測定には体外診断用医薬品キット（クレアチニン II-HA テストワコー, 和光純薬）を使用した。

#### 腎臓の採取と組織検査

腎臓組織サンプルは、腎炎誘発後2週目にラットをエーテルにて麻酔し、全採血により安楽死させ後に、腎臓を摘出して採取した。組織検査では、10%リン酸緩衝中性ホルマリン液で固定し、常法に従いパラフィン切片を作製した後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施し鏡検した。

## 2-2 ラット腎臓標準化 cDNA マイクロアレイチップによる発現変動遺伝子の解析

昨年度の本研究により作製できたラット腎臓標準化 cDNA マイクロアレイチップを用いて、ラット系球体腎炎モデルの腎臓組織における発現変動遺伝子を解析した。

### 腎臓組織からの RNA 抽出

ラットより腎臓組織サンプルを採取し、RNA を ISOGEN (日本ジーン) を用いて抽出した。抽出した RNA から poly(A)+mRNA を Oligotex dT-30 (ロシュダイアグノスティックス) を用いて分離精製し、ラット腎臓標準化 cDNA マイクロアレイチップによる発現変動遺伝子の解析に用いた。

### 蛍光標識 cDNA の調製

ラットの腎臓組織から抽出、精製した poly(A)+mRNA をサンプルとして、蛍光標識 cDNA を調製した。すなわち、poly(A)+mRNA (2 μg) から逆転写反応により cDNA を合成する際に、蛍光標識された FluoroLink Cy3-dUTP あるいは FluoroLink Cy5-dUTP (アマシャム・ファルマシア) を反応系に加えることにより、cDNA を蛍光標識した。蛍光標識された cDNA は、Microcon-YM30 (日本ミリポア) を用いて精製、濃縮した。調製した cDNA 溶液を cDNA マイクロアレイチップのハイブリダイゼーションに用いた。

### cDNA マイクロアレイチップのハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションは、蛍光標識された cDNA 溶液をマイクロアレイチップ上に滴下し、カバースリップ法を用いて 65°C で 15 時間インキュベーションして行った。反応終了後、ハイブリダイズしなかった蛍光標識 cDNA を、SDS を含む洗浄液で繰り返し洗浄して除去した。

### 蛍光シグナルの検出と解析

ハイブリダイズさせたマイクロアレイチップ上の蛍光シグナルの検出および画像化には、GenePix4000 (アクソン) を用いた。各クローンの蛍光シグナル画像の数値化および解析は、GenePix Pro 3.0 (アクソン) を用いて行った。各クローンの蛍光シグナル強度は、スキッチャード・プロット解析によりグローバル補正した。Cy5 と Cy3 の蛍光シグナル強度比が 2.0 以上の場合を発現上昇を認めるとし、0.5 以下の場合を発現低下を認めるとした。

### RT-PCR 法による検証

cDNA マイクロアレイチップによる遺伝子発現変動の解析結果は、RT-PCR 法により検証した。すなわち、系球体腎炎誘発ラットおよび正常ラットより採取した腎臓組織から上記の方法により抽出した RNA をサンプルとして、逆転写反応により cDNA を合成し、任意に作製した PCR プライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動した後、NIH Image 1.60 を用いて数値化し半定量的に解析した。PCR プライマーは、遺伝子の完全長 cDNA 配列をもとに作製した。

### 3. 研究成果

#### 3-1 ウサギ抗糸球体基底膜抗血清によるラット糸球体腎炎モデルの作製

ラットにウサギ抗糸球体基底膜抗血清を至適量 (3ml/kg ラット体重) で投与することにより、臨床のヒト糸球体腎炎によく類似したラット糸球体腎炎モデルを作製した (図1~3)。

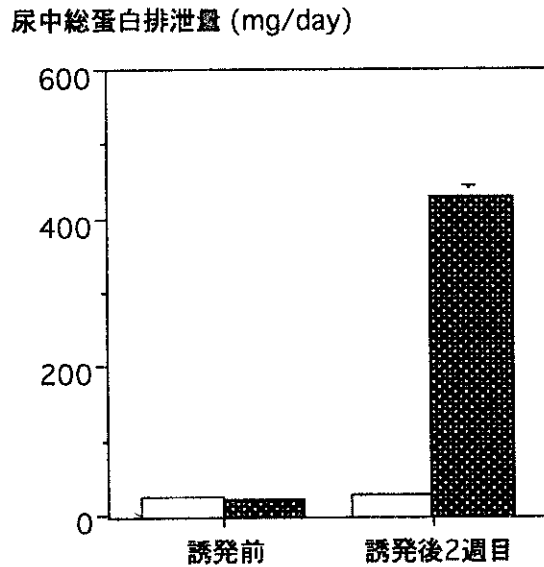


図1 糸球体腎炎誘発による腎機能マーカーの尿中総蛋白排泄量の上昇 糸球体腎炎誘発前および誘発後2週目に、糸球体腎炎誘発群(■)および正常群(□)のラットより24時間尿を採取し、尿中の総蛋白排泄量を測定した。図中の各値は4例の平均値±標準誤差を示す。

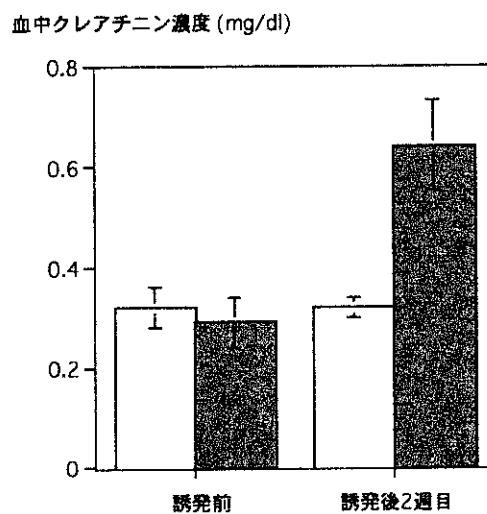


図2 糸球体腎炎誘発による腎機能マーカーの血中クレアチニン濃度の上昇 糸球体腎炎誘発前および誘発後2週目に、糸球体腎炎誘

発群(■)および正常群(□)のラットより尾静脈血を採取し、血清中のクレアチニン濃度を測定した。図中の各値は4例の平均値±標準誤差を示す。

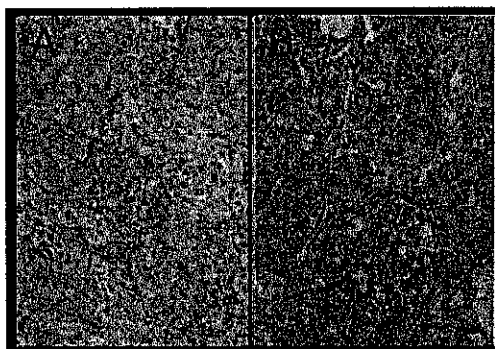


図3 腎臓組織の糸球体腎炎誘発に伴う変化 糸球体腎炎誘発後2週目に、正常群(A)および糸球体腎炎誘発群(B)のラットより腎臓組織を採取し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施した。

### 3-2 ラット腎臓標準化 cDNA マイクロアレイチップによる発現変動遺伝子の解析

ラット腎臓標準化 cDNA マイクロアレイチップを用いて、ラット糸球体腎炎モデルの腎臓組織における発現変動遺伝子を解析した。その結果、チップ上のすべてのスポットから、Cy5 および Cy3 にそれぞれ由来する蛍光シグナルが検出された(図4)。チップ上のすべてのスポットについて Cy5 と Cy3 の蛍光シグナル強度をプロット解析した結果、多くのスポットについてはシグナル強度比は1にほぼ等しかったが、47個のスポットについてはシグナル強度比が2.0以上となり、遺伝子の発現上昇が認められた(図5)。特に osteopontin 遺伝子では、正常群に対する糸球体腎炎誘発群の発現量比は11.1~14.1に達し、発現の顕著な上昇が認められた(表1)。また、cDNA マイクロアレイチップによる遺伝子発現変動の解析結果は、RT-PCR 法により検証した。その結果、検証対象とした何れの遺伝子においても、RT-PCR 法により発現上昇が確認された(図6)。

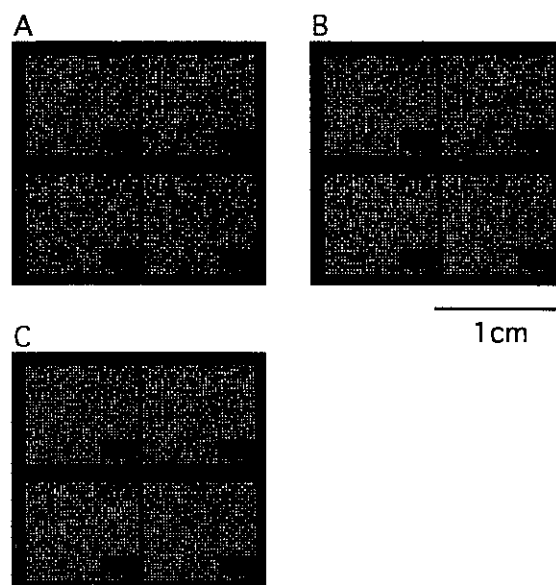


図4 ラット腎臓標準化 cDNA マイクロアレイチップ上の蛍光シグナル 腎炎誘発前および誘発後 2 週目に、糸球体腎炎誘発群および正常群のラットより腎臓組織を採取した。Poly(A)<sup>+</sup>mRNA (2 μg) より Cy5 あるいは Cy3 の蛍光標識 cDNA をそれぞれ合成し、等量ずつ混合した後、ラット腎臓標準化 cDNA マイクロアレイチップに競合的にハイブリダイズさせ、チップ上の蛍光シグナルを GenePix 4000 で検出した。図は、腎炎誘発群のサンプルを Cy5 で、正常群のサンプルを Cy3 で蛍光標識したシグナルの検出結果 (1 例) を示す。A : Cy5 蛍光シグナルの生データ画像、B : Cy3 蛍光シグナルの生データ画像、C : Cy5 と Cy3 の蛍光シグナルのオーバーレイによる二次データ画像

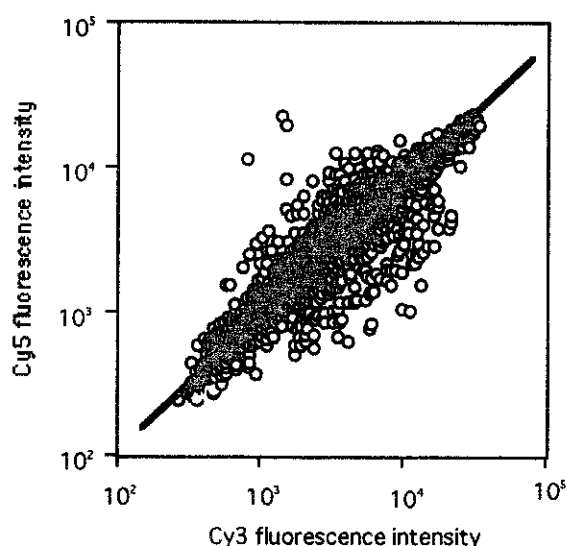


図5 蛍光シグナル強度のプロット解析 GenePix 4000 で画像化したチップ上の Cy3 および Cy5 の蛍光シグナルを GenePix Pro 3.0 を用いて数値化した。各スポットの蛍光シグナル強度を両対数プロットした。図は、腎炎誘発群のサンプルを Cy5 で、正常群のサンプルを Cy3 で蛍光標識した解析結果 (1 例) を示す。図中には、グローバル補正に用いた回帰直線 (赤色) を示す。

表 1. ラット糸球体腎炎モデルの腎臓組織における発現変動遺伝子

発現量比 (腎炎誘発/正常)	クローン 番号	アクセッション 番号	遺伝子名
14.1	SLK12823	M14656	Rat osteopontin

11.5	SLK13129	M14656	Rat osteopontin
11.1	SLK10827	M14656	Rat osteopontin
2.9	SLK11312	X92439	Mouse collagen IV $\alpha$ 1
2.9	SLK11521	X16956	Rat beta-2-microglobulin
2.7	SLK12086	AL118514	Streptomyces coelicolor cosmid D25
2.6	SLK12332	X92439	Mouse collagen IV $\alpha$ 1
2.6	SLK12740	Y00441	Rat beta-2-microglobulin
2.5	SLK10791	AF121217	Mouse collagen I $\alpha$ 2
2.4	SLK12179	X15096	Rat acidic ribosomal phosphoprotein P0
2.1	SLK13863	D25224	Rat 40kDa ribosomal protein
2.1	SLK13181	X16956	Rat beta-2-microglobulin

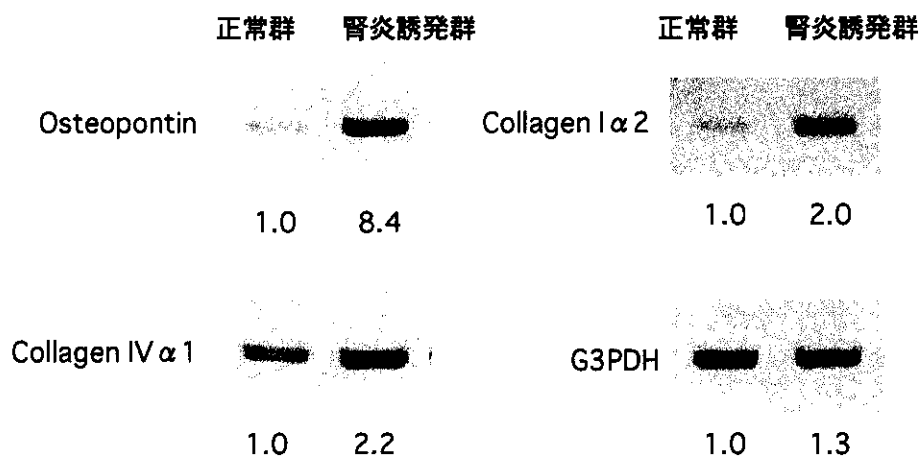


図4 RT-PCR 法による遺伝子発現上昇の確認 糸球体腎炎誘発前および誘発後 2 週目に、腎炎誘発群および正常群のラットより腎臓組織を採取した。RNA (2 $\mu$ g) をより cDNA をそれぞれ合成し、完全長 cDNA 配列をもとに作製したプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動した後、NIH Image 1.60 で数値化し半定量的に解析した。

#### 4. 考察・まとめ

ラットにウサギ抗糸球体基底膜抗血清を投与することにより、臨床のヒト糸球体腎炎によく類似したラット糸球体腎炎モデルを作製した。ラット腎臓標準化 cDNA マイクロアレイチップを用いて、ラット糸球体腎炎モデルの腎臓組織における発現変動遺伝子を解析した。その結果、腎疾患の病態形成、病状の悪化や治療のターゲットに関連する可能性の極めて高い遺伝子群を見出すことができた。

本研究により作製したラット糸球体腎炎モデルは、ラットにウサギ抗ラット糸球体基底膜抗血清を投与することにより、糸球体腎炎を誘発させる腎疾患病態モデルであり、最も一般的な原発性糸球体腎炎の病態モデルである。本検討におけるモデル作製の成否については、腎機能マーカーの尿蛋白および血中クレアチニン濃度を測定することにより確認した。腎炎誘発後 2 週目では、尿蛋白は正常値の数十倍に上昇し、血中クレアチニン濃度は正常値の 2 倍に上昇したことから、本モデルに一般的な糸球体濾過能の低下を伴

う腎炎・腎不全の病態を呈していることがわかる。

このようなラット糸球体腎炎モデル、および、昨年度の本研究により作製したラット腎臓標準化 cDNA マイクロアレイチップは、腎疾患の病状の悪化、あるいは改善に関する遺伝子を見出すために有用であると考えられる。疾患に関与する遺伝子が明らかになれば、それをターゲットとした医薬品の開発がスタートできることから、本研究の意義は大きい。腎炎や糖尿病性腎症により透析導入に至る患者は毎年増加しており、維持透析患者数は12万人に達している。また、その医療費は7,000億円に及ぶと試算できる。腎炎や糖尿病性腎症をいかに予防・治療するかは腎臓病学において重要な課題である。

そこで、ラット腎臓標準化 cDNA マイクロアレイチップを用いて、ラット糸球体腎炎モデルの腎臓組織において発現量が変動する遺伝子を解析した。その結果、腎疾患の病態形成、病状の悪化や治療のターゲットに関連する可能性の極めて高い遺伝子群を見出すことができた。今後さらに、得られた結果と薬理データとの相関から、腎疾患の根治療法につながる創薬ターゲットを絞り込むことができる。

## 5. 研究発表

### 辻本 三 :

1) Sugawara T, Hirasawa A, Hashimoto K, Tsujimoto G.

Differences in the subcellular localization of  $\alpha$ 1-adrenoceptor subtypes can affect the subtype selectivity of drugs in a study with the fluorescent ligand BODIPY-FL prazosin.

Life Sciences.70: 2113-2124, 2002.

2) Sugimoto Y, Fujisawa R, Tanimura R, Lattion A.L, Cottechia S, Tsujimoto G, Nagao T, Kurose H.

$\beta$ 1-Selective agonist (-)-1-(3,4-Dimethoxyphenethylamino)-3-(3,4-dihydroxy)-2-propanol [(-)-RO363] differentially interacts with key amino acids responsible for  $\beta$ 1-selective binding in resting and active states.

JPharmacol.Exp.Ther.301: 51-58, 2002.

3) Chalothorn D, McCune D.F, Edelmann S.F, Benovic J.L, Tsujimoto G, Piascik M.T.

Differences in the cellular localization and agonist mediated internalization properties of the alpha1-adrenoceptor subtypes.

Mol. Pharmacol. 61(5):1008-1016, 2002.

4) Koshimizu T, Yamauchi J, Hirasawa A, Tanoue A, Tsujimoto G.

Recent progress in  $\alpha$ 1-adrenoceptor pharmacology.

BiolPharm. Bull. 25: 401-408, 2002.

5) 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.

6) Tanoue A, Koshimizu T, Tsuchiya M, Ishii K, Oawa M, Saeki M, Tsujimoto G.

Two novel transcripts for human endothelin B receptor produced by RNA editing /alternativesplicing from a single gene.



J. Biol. Chem. 277 : 33205-33212, 2002.

7) Tanoue A, Koba M, Miyawaki S, Koshimizu T, Hosoda C, Oshikawa S, Tsujimoto G.

Role of the  $\alpha$ 1D-adrenergic receptor in the development of salt-induced hypertension.

Hypertension. 40: 101-106, 2002.

8) Yamauchi J, Hirasawa A, Miyamoto Y, Kokubu H, Nishii H, Okamoto M, Sugawara Y,

Tsujimoto G, Itoh H.

Role of Dbp's big sister in the anti-mitogenic pathway from  $\alpha$ 1B-adrenergic receptor to c-Jun N-terminal kinase.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 23; 296: 85-92, 2002

9) Katsuma S, Shiojima S, Hirasawa A, Takagaki K, Kaminishi Y, Koba M, Hagidai Y, Murai M, Ohgi T, Yano J,

Tsujimoto G.

Global analysis of differentially expressed genes during progression of calcium oxalate nephrolithiasis.

Biochem Biophys Res Commun. 23; 296: 544-551, 2002.

10) Yoshida N, Nishimaki Y, Sugiyama M, Abe T, Tatsumi T, Tanoue A, Hirasawa A, Tsujimoto G.

SNP genotyping in the  $\beta$ 2-adrenergic receptor by electronic microchip assay, DHPLC, and direct sequencing.

J. Hum. Genet. 47: 500-503, 2002.

11) Yamauchi J, Miyamoto Y, Kokubu H, Nishii H, Okamoto M, Sugawara Y, Hirasawa A,

Tsujimoto G, Itoh H.

Endothelin suppresses cell migration via the JNK signaling pathway in a manner dependent upon Src kinase, Rac1, and Cdc42.

FEBS Lett. 527(1-3): 284, 2002.

12) Shinoura H, Tsujimoto G, Teranishi Y, Tsuru H.

Antagonistic effects of antimuscarinic drugs on  $\alpha$ 1-adrenoceptors.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 366(4): 368-371, 2002.

13) Hashizume K, Ishiwata H, Kizaki K, Yamada O, Takahashi T, Imai K, Patel OV, Akagi S, Shimizu M, Takahashi S, Katsuma S, Shiojima S, Hirasawa A, Tsujimoto G, Todoroki J, Izaike Y.

Implantation and placental development in somatic cell clone recipient cows.

Cloning and Stem Cells. 4(3): 197-209, 2002.

14) Heishi M, Kagaya S, Katsunuma T, Nakajima T, Yuki K, Akasawa A, Maeda M, Gunji S,

Sugita Y, Tsujimoto G, Saito H.

High-density oligonucleotide array analysis of mRNA transcripts in peripheral blood cells of severe atopic dermatitis patients.

Int. Arch. Allergy Immunol. 129: 57-66 2002.

15) Takei Y, Assenberg M, Tsujimoto G, Laskey R.

The MCM3 acetylase MCM3AP inhibits initiation, but not elongation of DNA replication via interaction with

MCM3.

J. Biol. Chem. 277:43121-43125, 2002.

16) Nakajima T, Inagaki N, Tanaka A, Tanaka H, Yoshikawa M, Tamari M, Hasegawa K, Matsumoto K, Tachimoto H, Ebisawa M, Tsujimoto G, Matsuda H, Nagai H, Saito H.

Marked increase in CC chemokine gene expression in both human and mouse mast cell transcriptomes following Fcε receptor I cross-linking.

Blood. 100: 3861-3868, 2002.

17) Imai Y, Nakada A, Hashida R, Sugita Y, Tanaka T, Tsujimoto G, Matsumoto K, Akasawa A, Saito H, Oshida T.

Cloning and characterization of the highly expressed ETEA gene from blood cells of atopic dermatitis patients.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 297: 1282-1290, 2002.

18) Shinoura H, Shibata K, Hirasawa A, Tanoue A, Hashimoto K, Tsujimoto G.

Key amino acids for differential coupling of α1-adrenergic receptor subtypes to Gs.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 299: 142-147, 2002.

19) 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. 277(49): 46891-46899, 2002.

20) Matsumoto Y, Oshida T, Obayashi I, Imai Y, Matsui K, Yoshida N-L, Nagata N, Ogawa K, Obayashi M, Kashiwabara T, Gungi S, Nagasu T, Sugita Y, Tanaka T, Tsujimoto G, Hirasawa A, Saito H.

Identification of highly expressed genes in peripheral blood T cells from patients with atopic dermatitis.

Int Arch Allergy Immunol. 129(4): 327-340, 2002.

21) Katsuma S, Hada Y, Shiojima S, Hirasawa A, Tanoue A, Takagaki K, Ohgi T, Yano J, Tsujimoto G.

Signaling mechanisms in sphingosine 1-phosphate-promoted mesangial cell proliferation.

Genes to Cells. 7(12):1217-1230, 2002.

22) Shibata K, Katsuma S, Koshimizu T, Shinoura H, Hirasawa A, Tsujimoto G.

Alpha 1-Adrenergic receptor subtypes differentially control cell cycle of transfected CHO cells through a cAMP-dependent mechanism involving p27Kip1.

J Biol Chem. 278(1): 672-678, 2003

23) 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. 300: 577-584, 2003.

24) Ishiwata H, Katsuma S, Kizaki K, Patel O-V, Nakano H, Takahashi T, Imai K, Hirasawa A, Shiojima S, Ikawa H, Suzuki Y, Tsujimoto G, Izaike Y, Todoroki J, Hashizume K.

Characterization of Gene Expression Profiles in Early Bovine Pregnancy Using a Custom cDNA Microarray.  
Mol Reprod Dev. 65: 9-18, 2003.

25) Yoshida N, Sugiyama M, Tanoue A, Hirasawa A, 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 allele-specific PCR  
Drug Metabolism and Pharmacokinetics. 17(6): 532-539, 2003.

26) Koshimizu TA, Tanoue A, Hirasawa A, Yamauchi J, Tsujimoto G.

Recent advances in  $\alpha$ 1-adrenoceptor pharmacology.  
Pharmacology & Therapeutics. 5535, 1-10, 2003. (in press).

27) Nakamura T, Shiojima S, Hirai Y, Iwama T, Tsuruzoe N, Hirasawa A, Katsuma S, Tsujimoto G.

Temporal gene expression changes of adipogenesis in human mesenchymal stem cells.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 303: 306-312, 2003. (in press).

#### **Monograph (in English)**

1) Katsuma S, Shiojima S, Hirasawa A, Suzuki Y, Ikawa H, Takagaki K, Kaminishi Y, Murai M, Ohgi T, Yano J, Tsujimoto G.

Functional genomic search of G-protein coupled receptors (GPCR) using microarrays with normalized cDNA library.

Methods in Enzymology 345; 585-600, 2002

2) Tsujimoto G, Tanoue A.

$\alpha$ 1D-adrenergic receptor knockout mice display impaired vascular contractile response to catecholamines.

Catecholamine Research, Advances in Behavioral Biology. Vol.53: 285-288, 2002, Kluwer Academic / Plenum Publishers.

#### **Review (in English)**

1) Tanoue A, Koshimizu T, Tsujimoto G.

Transgenic studies of  $\alpha$ 1-adrenergic receptor subtype function.

Life Sciences 71(19):2207-2215, 2002.

2) Tsujimoto G

Recent Research Development of Alpha-1 Adrenoceptors

**Biological & Pharmaceutical Bulletin (in press)**

3) Hirasawa A, Awaji T, Xu Z, Shinoura H, Tsujimoto G.

Minireview: Regulation of subcellular localization of  $\alpha$ 1-adrenoceptor subtypes.

Life Sciences (in press).

### 分担研究者

永井 博 氏 :

1) Takizawa, T., Kawada, N., Tanaka, H., Nagai, H.

Effect of antiallergic drugs on interleukin 5-induced eosinophil infiltration of rat airways.

Biol. Pharm. Bull. 25, 318-322 (2002)

2) Murakami, M., Yoshihara, K., Shimbara, S., Lambeau, G., Singer, A., Gelb, M.H., Sawada, M., Inagaki, N., Nagai, H., Kudo, I.

Arachidonate release and eicosanoid generation by group IIE phospholipase A2.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 292 (3), 689-696 (2002)

3) Murakami, M., Yoshihara, K., Shimbara, S., Lambeau, G., Gelb, M.H., Singer, A.G., Sawada, M., Inagaki, N., Nagai, H., Ishihara, M., Ishikawa, Y., Ishii, T., Kudo, I.

Cellular arachidonate-releasing function and inflammation-associated expression of group IIF secretory phospholipase A2.

J. Biol. Chem. 277 (21), 19145-19155 (2002)

4) Murakami, M., Yoshihara, K., Shimbara, S., Sawada, M., Inagaki, N., Nagai, H., Naito, M., Tsuruo, T., Moon, T.C., Chang, H., Kudo, I.

Group IID heparin-binding secretory phospholipase A2 is expressed in human colon carcinoma cells and human mast cells and up-regulated in mouse inflammatory tissues.

Eur. J. Biochem. 269 (11), 2698-2707 (2002)

5) Tanaka, H., Masuda, T., Tokuoka, S., Takahashi, Y., Komai, M., Nagao, K., Nagai, H.

Time course study on the development of allergen-induced airway remodeling in mice: the effect of allergen avoidance on established airway remodeling.

Inflamm. Res. 51, 307-316 (2002)

6) Kato, T., Kimata, M., Tsuji, T., Shichijo, M., Murata, M., Miura, T., Serizawa, I., Inagaki, N., Nagai, H.

Role of protein kinase A in the inhibition of human mast cell histamine release by  $\alpha$ -adrenergic receptor agonists.

Allergol. Int. 51, 197-203 (2002)

7) Inagaki, N., Igeta, K., Kim, J.F., Nagao, M., Shiraishi, N., Nakamura, N., Nagai, H.

Involvement of unique mechanisms in the induction of scratching behavior in BALB/c mice by compound 48/80.

Eur. J. Pharmacol. 448, 175-183 (2002)

8) Takahashi, Y., Tokuoka, S., Masuda, T., Hirano, Y., Nagao, M., Tanaka, H., Inagaki, N., Narumiya, S., Nagai, H.

Augmentation of allergic inflammation in prostanoid IP receptor deficient mice.

Br. J. Pharmacol. 137, 315-322 (2002)

9) Miyagawa, N., Homma, T., Kagechika, H., Shudo, K., Nagai, H.

Effect of synthetic retinoid, TAC-101, on experimental autoimmune disease.

Pharmacology 67, 21-31 (2003)

**柳原 延章 :**

1) Yanagihara N., Utsunomiya K, Toyohira Y, Ueno S, Tsutsui M, Cheah T.B., Izumi F.

Leptin stimulates catecholamine synthesis via tyrosine hydroxylase phosphorylation- dependent and -independent pathways in cultured bovine adrenal medullary cells.

In: Catecholamine Research: From molecular insights to clinical medicine.

Edited by Nagatsu T., Nabeshima T., McCarty R., Goldstein D.

Advances in Behavioral Biology Volume 53

Kluwer Academic / Plenum Publishers, NY. 2002

2) Morishita T., Tsutsui M., Shimokawa H., Tasaki H., Suda O., Kobayashi K., Horifuchi M., Okuda H., Tsuda Y., Yanagihara N., Nakashima Y.

Long-term treatment with perindopril ameliorates dobutamine-induced myocardial ischemia in patients with coronary artery diseases.

Japn. J. Pharmacology 88: 100-107, 2002

3) Sagata K., Minami K., Yanagihara N., Shiraishi M., Toyohira Y., Ueno S., Shigematsu A.

Tramadol inhibits norepinephrine transporter function at desipramine-binding sites in cultured bovine adrenal medullary cells.

Anesthesia & Analgesia 94: 901-906, 2002

4) Yamanoto S., Morimoto I., Tanaka Y., Yanagihara N. and Eto S.

The mutual regulation of arginine-vasopressin and PTHrP secretion in dissociated supraoptic neurons.

Endocrinology 143 (4): 1521-1529, 2002

5) Hara K., Minami K., Ueno S., Toyohira Y., Tsutsui M., Shigematsu A., Yanagihara N.

Up-regulation of noradrenaline transporter in response to prolonged exposure to ketamine.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacology 365: 406-412, 2002

6) Shiraishi M., Shibuya I., Minami K., Uezono Y., Okamoto T., Yanagihara N., Ueno S., Ueta Y., Shigematsu A.

A neurosteroid anesthetic, alphaxalone, inhibits nicotinic acetylcholine receptors in cultured bovine adrenal medullary cells.

Anesthesia & Analgesia 95: 900-906, 2002

- 7) Shiraiishi M., Minami K., Uezono Y., Yanagihara N., Shigematsu A., Shibuya I.  
Inhibitory effects of tramadol on nicotinic acetylcholine receptors in adrenal medullary cells  
and in *Xenopus* oocytes expressing  $\alpha 7$  receptors.  
British J. Pharmacology 136: 207-216, 2002
- 8) Shibuya I., Utsunomiya K., Toyohira Y., Ueno S., Tsutsui M., Cheah T.B., Ueta Y., Izumi F., Yanagihara N.  
Regulation of catecholamine synthesis by leptin.  
In: The chromaffin cells: Transmitter biosynthesis, storage, release, actions, and informatics,  
edited by D.T. O'Connor and L.E. Eiden  
Annals of The New York Academy of Sciences Volume 971: 522-527  
The New York Academy of Sciences, New York, 2002
- 9) Hiwatashi Y., Kurahashi Y., Hatada R., Ueno S., Honma T., Yanagihara N., Yanase H.,  
Iwanaga T., Ohizumi Y., Yamakuni T.  
Glucocorticoid inhibits expression of V-1, a catecholamine biosynthesis regulatory protein, in  
cultured adrenal medullary cells.  
FEBS Letters 528: 166-170, 2002
- 10) Suda O., Tsutsui M., Morishita T., Tanimoto A., Horiuchi M., Tasaki H., Huang P.L.,  
Sasaguri Y., Yanagihara N., Nakashima Y.  
Long-term treatment with N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester causes arteriosclerotic coronary  
lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice.  
Circulation 106: 1729-1735, 2002
- 11) Morishita T., Tsutsui M., Shimokawa H., Horiuchi M., Tanimoto A., Suda O., Tasaki H., Huang P.L.,  
Sasaguri Y., Yanagihara N., Nakashima Y.  
Vaculoprotective roles of neuronal nitric oxide synthase.  
The FASEB Journal express articles 10. 1096/fj.02-0155fje.
- 12) Koshimizu T., Ueno S., Tanoue A., Yanagihara N., Stojilkovic S.S., Tsujimoto G.  
Heteromultimerization modulates P2X receptor functions through participating extracellular  
and C-terminal subdomains.  
J Biol Chem. 277: 46891-46899, 2002
- 13) 筒井正人、上野晋、豊平由美子、柳原延章  
一酸化窒素合成酵素の構造と機能  
蛋白質核酸酵素 47: 2024-2031, 2002
- 14) Nagata T., Harayama N., Sasaki N., Inoue M., Tanaka K., Toyohira Y., Uezono Y.,  
Maruyama T., Yanagihara N., Ueta Y., Shibuya I.  
Mechanisms of cytosolic Ca<sup>2+</sup> suppression by prostaglandin E2 receptors in rat melanotrophs.  
J. Neuroendocrinology 14: 1-14, 2002

15) Horishita T., Minami K., Yanagihara N., Shiraishi M., Okamoto T., Shiga Y., Ueno S.,

Shigematsu A.

Alphaxalone, a neurosteroid anesthetic, inhibits norepinephrine transporter function in cultured bovine adrenal medullary cells.

Anesthesia & Analgesia 95: 1661-1666, 2002

京野 潔 : 該当なし

須藤 哲央 : 該当なし

村井 正俊 :

1) Katsuma S, Shiojima S, Hirasawa A, Suzuki Y, Ikawa H, Takagaki K, Kaminishi Y, Murai M.

Ohgi T, Yano J, Tsujimoto G.

Functional genomic search of G-protein-coupled receptors using microarrays with normalized cDNA library.

Methods Enzymol 2002; 345: 585-600.

岩間 武久 : 該当なし

佐野 哲朗 : 該当なし

#### 6. 知的所有権の取得状況

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