

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

シングルセル発現プロファイル解析の毒性評価への応用

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 杉本 幸彦

平成16 (2004) 年4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

シングルセル発現プロファイル解析の毒性評価への応用 杉本 幸彦	----- 1
------------------------------------	---------

### II. 分担研究報告

RNA 増幅法における迅速・効率化の検討 田中 智之	----- 7
-------------------------------	---------

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 11
---------------------	----------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 15
-----------------	----------

# 厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業） 総括研究報告書

シングルセル発現プロファイル解析の毒性評価への応用

主任研究者 杉本 幸彦 京都大学大学院薬学研究科助教授

## 研究要旨

本研究の目的は、シングルセル発現プロファイル解析法を用いてプロスタノイド受容体やヒスタミンの欠損マウスにおける毒性（表現型）の発現機構を明らかにすることで本法の有用性を示すことである。主任研究者は、組織切片から単一細胞（cDNA）を単離して RNA 増幅・アレイ解析「シングルセル発現プロファイル解析法」を習得し、プロスタノイド受容体などの遺伝子改変マウスにおける表現型発現メカニズムを明らかにすることを試みた。平成 15 年度は前年度までに得られた解析結果の再現性の検討ならびに他のアプローチによる結果の検証を行った。これら検討の結果、EP2 受容体欠損マウスにおける受精障害の機構や、視床下部 EP3 受容体発現ニューロンの性質、ヒスタミン欠損マウスにおけるマスト細胞異常の分子基盤を確立しつつある。

## 分担研究者

田中智之・京都大学薬学研究科・助手

### A. 研究目的

本研究の目的は、シングルセル発現プロファイル解析法を用いてプロスタノイド受容体やヒスタミンの欠損マウスにおける毒性（表現型）の発現機構を解析しその分子機作を明らかにすることで、本法の有用性を示すこと

である。本法により従来はなしえなかったシングルセルレベルでの毒性評価（高解像度のトキシコジェノミクス）が可能となり、医薬品の安全性向上に貢献するのみならず、新しい診断法としての応用も考えられる。

ゲノム情報を活用して薬物の毒性評価を行う上で、網羅的なマイクロアレイ解析は有効なツールであるが  $\mu\text{g}$  オーダーの RNA を必要とし、従って臓器などヘテロな細胞集団を解

析しているのが現状であり、有効な情報を得ることが困難であった。ペンシルベニア大の Eberwine らは、1990 年に T7-RNA ポリメラーゼを用いて低バイアスのまま RNA を増幅する方法を開発し、さらにこれを切片上の 1 細胞から RNA 増幅するシングルセル RNA 増幅法として公表した。主任研究者は、Eberwine との共同研究により本法を国内で初めて確立した。

主任研究者はこれまで、8 種類存在するプロスタノイド受容体のうち、特定の受容体欠損が生殖・消化管・中枢・免疫の各機能に障害を与えることを見出した。一方、分担研究者の田中は、ヒスタミン合成の律速酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) の欠損マウスが組織のマスト細胞に形態異常を示すことを見出した。そこで本課題では、これらの欠損マウスを題材として、表現型 (各機能障害) の本態を、高解像度の発現プロファイル解析により捕捉を試みる。

平成 15 年度は、前年度に確立した方法により結果の再現性を得ると共に、得られた結果の信憑性を検証した。さらに、EP4 欠損マウスにおける大腸粘膜上皮の保護機能の異常解析を開始した。(以上担当杉本)。方法全般については、切片調製、単離、RNA 増幅の高速化など個々に検討を加え、最適化を図った (担当田中)。

## B. 研究方法

### ①EP2 欠損マウスにおける生殖細胞解析

野生型ならびに EP2 欠損の 3 週齢雌マウスに妊馬血清ゴナドトロピン処理を行い、48 時間後にヒト絨毛性ゴナドトロピンを投与して、その 14 時間後に卵管から卵と卵丘細胞複合体を回収した。これを卵と卵丘細胞を個々にシングルセル発現解析に用いた。また野生型あるいは EP2 欠損マウスの卵-卵丘細胞による体外受精の系において、ケモカインあるいはケモカイン遮断薬を処理して、受精率に対する影響を調べた。

### ②視床下部 EP3 発現ニューロンにおける PGE<sub>2</sub> 投与によるプロフィール変化の解析

ラット EP3 発現ニューロンでの PGE<sub>2</sub> 刺激の有無における発現変化を解析した。ラット脳室内に生理食塩水あるいは PGE<sub>2</sub> を投与して固定後に視床下部切片を作成し、抗ラット EP3 抗体を用いて EP3 発現ニューロンを同定して、シングルセル発現解析を行った。発現変動を示した GABA-A 受容体アイソフォームに関して、in situ hybridization 法により視床下部での局在を調べた。この際、EP3 ヘテロ変異マウスを用いて、変異アレルにおいては EP3 の代わりに  $\beta$ -galactosidase が発現するのでこれを指標にして調べた。

### ③ヒスタミン欠損マウスにおけるマスト細胞解析 (担当田中)

野生型ならびに HDC 欠損マウスの腹腔から組織結合型のマスト細胞を回収し、トルイ

ジンブルー染色にて確認の後、シングルセル発現解析を行った。また密度勾配遠心法により純度 90%以上の HDC 欠損腹腔マスト細胞を精製し、酵素活性や酵素タンパク量を検討した。

#### (倫理面への配慮)

本申請課題は、基本的に動物実験のみを対象としており、平成 15 年度実施予定のマウスを用いた実験においては、動物愛護上問題となるような苦悶を与える実験や虐待行為等を含まず、試料の採取は麻酔下及び安楽死後を前提とする等の配慮が十分になされていることから、倫理面での問題は特にないものとする。また、平成 15 年度京都大学薬学研究科の動物実験委員会の承認を得ている。

### C. 研究結果

#### ①EP2 欠損マウスにおける卵丘細胞異常による受精障害の解析

平成 14 年度、排卵直後の卵・卵丘複合体を回収し、卵と卵丘細胞それぞれをシングルセル解析した結果、EP2 欠損マウスの卵丘細胞では、ケモカインとケモカイン受容体遺伝子群の発現が顕著に亢進していることを見いだした。平成 15 年度は、従来知見のなかった卵丘細胞におけるケモカインの役割に焦点を当てて解析結果の裏付けを試みた。Real time PCR 解析の結果、卵丘でのケモカイン発現は、野生型でも排卵に伴って出現すること

が判り、EP2 欠損マウスの受精障害は、ケモカインシグナリングの overshoot に起因するのではないかと仮説を立て、これを検証した。すなわち、野生型の卵-卵丘細胞による体外受精において、ケモカインは受精率を顕著に阻害したが、卵丘を除去すると阻害効果は見られなかった。EP2 欠損マウスの卵-卵丘複合体を用いた受精率は、野生型に比べて著しく低い。ケモカイン遮断薬を処理すると受精率を部分的に回復させた。従って、EP2 欠損マウスにおける受精障害は、少なくともケモカインシグナリングの異常亢進もしくは持続的亢進に起因するものと考えられた。

#### ②視床下部 EP3 発現ニューロンにおける PGE<sub>2</sub> 投与によるプロフィール変化の解析

平成 14 年度までに、視床下部 EP3 発現ニューロンでは、PGE<sub>2</sub> 処理により多くの遺伝子発現が低下すること、中でも GABA-A 受容体 gamma-1 ならびに gamma-2 の発現が顕著に低下することを見いだした。平成 15 年度、視床下部の GABA-A 受容体の局在を調べたところ、gamma-1、gamma-2 の両受容体イソフォームはともに EP3 の存在する視床下部の視索前野領域に豊富に存在することが判明した。現在、引き続き同一ニューロンが GABA-A 受容体と EP3 の両者を共発現するか否かを調べている。

#### ③ヒスタミン欠損マウスにおけるマスト細胞解析 (担当田中)

平成 14 年度に行ったマスト細胞のシングルセル発現プロファイル解析によって、HDC 欠損マウスのマスト細胞では、野生型に比べて、組織結合型マスト細胞の成熟に依存したマーカー遺伝子群の発現レベルが極端に低く、マスト細胞前駆細胞様の発現様式を示すことが判明した。そこで平成 15 年度は、密度勾配遠心法により純度 90%以上の HDC 欠損腹腔マスト細胞を精製し、酵素活性や酵素タンパク量を検討した。その結果、HDC 欠損マウス由来の腹腔細胞は、chymase 活性は野生型と有意な相違は示さなかったが、tryptase 活性、carboxypeptidase A 活性において著しいプロテアーゼ活性の低下が認められた。これらプロテアーゼ活性の低下は耳介皮膚組織でもやはり同様に確認された。またイムノブロット解析により、chymase レベルは変化がないが、tryptase レベルは低下しており、cathepsin G はほぼ完全に発現が消失していた。本腹腔マスト細胞においても、Real-time PCR 解析の結果、cathepsin G、MMCP-4, 5, 6, 7, neuropsin、carboxypeptidase A といった顆粒プロテアーゼ遺伝子発現の低下が確認された。

#### D. 考察

##### ①EP2 欠損マウスにおける生殖細胞解析

卵丘細胞 (cumulus cells) は、ゴナドトロピンの刺激 (LH surge) によって排卵の刺激を受けると、ヒアルロン酸などの細胞外

基質を分泌して、細胞間隙を拡大し、cumulus expansion と呼ばれる応答を示す。これは、卵胞内の内圧を高め、排卵効率に寄与すると考えられている。従来の検討により、EP2 受容体は、LH 刺激により卵丘細胞に発現誘導されることから、expansion 等の卵丘細胞機能を促進することが示されていたが、具体的な排卵・受精障害の分子機作は不明であった。今回、野生型の卵丘細胞でも、ケモカインとその受容体が共に排卵時に発現誘導を受け、卵丘細胞間、あるいは卵丘細胞-卵間の相互作用を促進しているが、EP2 欠損マウスではその発現レベルが過剰に亢進するために、相互作用が持続的に維持され、結果として受精を障害している可能性が示唆された。また、卵細胞における発現プロファイル変化も得られているが、その多くが機能未知遺伝子群であり、これらは分化初期段階における卵細胞解析の基礎データとして有用である。なお、平成 15 年度の研究結果の中で、ケモカイン遮断薬が EP2 欠損マウスの受精率を回復させたことから、有効な不妊治療薬としての応用が考えられた (特許出願中)。

##### ②視床下部 EP3 発現ニューロンにおける PGE<sub>2</sub> 投与によるプロファイル変化の解析

PGE<sub>2</sub> により多くの遺伝子発現レベルが低下したこと、ならびに GABA-A 受容体発現が低下したことは、最近、共同研究者の中村らの報告と照らして考えると興味深い。中村ら

は、PGE<sub>2</sub> の視床下部への局所投与による発熱応答が、GABA-A 受容体のアゴニストであるムシモールを投与すると抑制されることを見出している。これらの結果を考え合わせると、EP3 ニューロンは、通常は GABA による抑制性のシグナル支配を受けており、静的な状態にあるが、PGE<sub>2</sub>-EP3 シグナルの活性化により、GABA-A 受容体発現低下によって抑制性シグナルが解除されることで下行性に活動が伝達される可能性が考えられる。

### ③ヒスタミン欠損マウスにおけるマスト細胞解析 (担当田中)

従来の研究結果では、HDC 欠損マウスは、野生型に比べて、組織中マスト細胞の数が減少していること、ならびに顆粒染色性が低く電子顕微鏡解析では顆粒内の内容物密度が低いことから、顆粒形成の異常という現象が観察されていた。今回のシングルセル解析によって、HDC 欠損マウスのマスト細胞では、組織結合型マスト細胞の成熟に依存したマーカー遺伝子群の発現レベルが極端に低かった。また実際に HDC 欠損マウスでは、野生型に比べて顆粒プロテアーゼ活性、ならびにプロテアーゼタンパク質の発現量が顕著に低下していた。これらの結果は、HDC 欠損マウスのマスト細胞が未成熟であることを裏付けるものであり、既に推察していたように、ヒスタミンがその分化成熟に関与する可能性を強く支

持するものであった。

## E. 結論

上記の①～③の実験系に見られるように、シングルセル発現プロファイル解析系は、着実にその表現型に見合う形での結果を出しており、十分に解析系として使用に耐えるものと考えられた。また分担研究者の田中の方法論の検討により、シングルセル RNA 増幅法は、シングルセルに由来する RNA でも  $\mu\text{g}$  オーダーの RNA にまで十分に増幅する系へと改善することができた。一方、本増幅法の迅速化とハイスループット化に関しては、消化管の粘膜上皮細胞など、細胞 (集団) によっては、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) による回収が利用可能であり、迅速化が可能であると判断し、LCM による細胞回収を用いての EP4 欠損マウスの消化管上皮の解析を開始したところである。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Hatae, N., Kita, A., Tanaka, A., Sugimoto, Y., and Ichikawa, A. Induction of adherent activity in mastocytoma P-815 cells by the cooperation of two prostaglandin E2 receptor subtypes, EP3

and EP4. *J. Biol. Chem.* **278**, 17977-17981. (2003)

Oka, T., Oka, K., Kobayashi, T., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Ushikubi, F., Narumiya, S., Saper, C.B. Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP1 and EP3 receptors. *J. Physiol.* **551**, 945-954. (2003)

Amano, H., Hayashi, I., Endo, H., Kitasato, H., Yamashina, S., Maruyama, T., Kobayashi, M., Satoh, K., Narita, M., Sugimoto, Y., Murata, T., Yoshimura, H., Narumiya, S., and Majima, M. Host prostaglandin E2-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J. Exp. Med.* **197**, 221-232. (2003)

Segi, E., Haraguchi, K., Sugimoto, Y., Tsuji, M., Tsunekawa, H., Tamba, S., Tsuboi, K., Tanaka, S., and Ichikawa, A. Expression of messenger RNA for prostaglandin E receptor subtypes EP4/EP2 and cyclooxygenase isozymes in mouse periovulatory follicles and oviducts during superovulation. *Biol. Reprod.* **68**, 804-811. (2003)

Sugimoto, Y., Nakato, T., Kita, A., Hatae, N., Tabata, H., Tanaka, S., and Ichikawa, A. Functional domains essential for Gs activity in prostaglandin EP2 and EP3 receptors. *Life Sci.* **74**, 135-141. (2003)

杉本幸彦、市川 厚「受容体ノックアウトマウスを用いたプロスタノイド研究」  
HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY,  
10: 251-258, 2003

杉本幸彦、市川 厚「プロスタノイド受容体誘導の生理的役割」バイオサイエンスとインダストリー、61: 729-734, 2003

## 2. 学会発表

杉本幸彦 (オーガナイザー兼)

「マスト細胞の組織移行・接着とその制御」シンポジウム：マスト細胞のシグナル分子研究の最前線ーアレルギー性疾患の鎮静化を目指してー

日本薬学会第124年会2004年大阪

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

### 1. 特許取得

杉本幸彦、丹波茂郎、市川 厚。「ケモカイン阻害剤またはその塩を有効成分とする不妊治療剤」特願2004-48677 (特許出願中)

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



# 厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業） 分担研究報告書

## RNA 増幅法における迅速・効率化の検討

分担研究者 田中 智之 京都大学大学院薬学研究科助手

### 研究要旨

本研究の目的は、遺伝子変異マウスにおける毒性（表現型）の発現機構解析のためにシングルセル発現プロフィール解析法を最適化することである。分担研究者は、主任研究者が確立した「シングルセル発現プロフィール解析法」を基盤に、これを汎用性、再現性の点で改善し、高収量、高処理能力のある方法へと最適化を行うことを担当した。平成15年度は前年度の検討項目に加えさらに改善を加えてより再現性の高い方法を確立した。併せて、分担研究者が作成・解析してきたヒスタミン欠損マウスのマスト細胞の形態異常に関する解析を行った。その結果、本変異マウスの組織マスト細胞では顆粒プロテアーゼの遺伝子発現、これら酵素の総活性とタンパク量の減少を伴い、未成熟マスト細胞様の形質を持つことを同定した。

### A. 研究目的

本研究の目的は、遺伝子変異マウスにおける毒性（表現型）の発現機構の解析のためにシングルセル発現プロフィール解析法を最適化することである。

主任研究者の杉本が、Eberwine との共同研究により本邦で確立した「シングルセル RNA 増幅法」の原法は、独創的ではあるものの、技術と時間、労力において検討の余地があり、実用化のために迅速・効率化が望まれた。そ

こで方法全般に関して、検討を加えるとともに、分担研究者の作成したヒスタミン合成酵素（HDC）欠損マウスにおけるマスト細胞形態異常に関して本シングルセル解析法を用いて発現解析を行った。

### B. 研究方法

#### ①方法の検討

平成 14 年度の検討により切片調製、単離、RNA 増幅の条件が確定したが、これらに

加えて今年度は以下の点について検討を加えた。

(i) In situ 逆転写法

(ii) レーザーマイクロダイセクション(LCM)

(iii) マニュアルダイセクション

(iii) T7-RNA 増幅条件

## ②ヒスタミン欠損マウスにおけるマスト細胞の解析

野生型ならびに HDC 欠損マウスの腹腔から組織結合型のマスト細胞を回収し、トルイジンブルー染色にて確認の後、シングルセル発現解析を行った。また密度勾配遠心法により純度 90%以上の HDC 欠損腹腔マスト細胞を精製し、酵素活性や酵素タンパク量を測定した。

(倫理面への配慮)

本申請課題は、基本的に動物実験のみを対象としており、平成 15 年度実施予定のマウスを用いた実験においては、動物愛護上問題となるような苦悶を与える実験や虐待行為等を含まず、試料の採取は麻酔下及び安楽死後を前提とする等の配慮が十分になされていることから、倫理面での問題は特にないものと考えられる。また、平成 15 年度京都大学薬学研究科の動物実験委員会の承認を得ている。

## C. 研究結果

### ①方法の検討

(i) In situ 逆転写法

免疫組織化学により予め標的細胞を染色する場合、Eberwine の原法では、免疫染色後に In situ 逆転写を行っていたが、シングルセル RNA の分解を最大限に抑えるために、In situ 逆転写後に抗体染色を行った。その結果、In situ 逆転写によりエピトープの抗原性が失われずに染色出来る場合には、この手順で RNA 増幅をかける方が原法に比べて数倍の収量を得た。しかしながら、In situ 逆転写によりエピトープの抗原性が失われる場合がしばしば見られた。

(ii) レーザーマイクロダイセクション(LCM)

現在市販されている LCM 機器のレーザー径は、最小でも 7.5  $\mu\text{m}$  であり、これは小型細胞をシングルセルとして回収するには適さない。しかしながら、例えば子宮や消化管、血管などの管腔構造の最表層のシングルセルレイヤーを単離するような場合には、威力を発揮した。LCM による単離は、非常に多数のシングルセルレイヤーの処理が可能なので、かならずしも In situ 逆転写を必要としなかった。

(iii) マニュアルダイセクション

パッチクランプ電極を用いたマニュアルダイセクションの際に、Eberwine 原法ではシングルセル増幅後に RNA をプールしていたが、ダイセクション直後に、多くのシングルセルをプールして、減圧条件下での遠心濃縮によ

り体積を抑えれば、初発試料として使用することができること、またこのようなシングルセルプールから高効率での RNA 増幅が可能であることが判った。

#### (iv) T7-RNA ポリメラーゼによる増幅条件

T7-RNA-polymerase 反応に関しては、in situ transcription のキット使用を検討した。その結果、Ambion 社の Megascript、Epicentre Technology 社の Ampliscribe T7-flash のキット中の安定化 buffer を用いることで収量がさらに 1.5~2 倍に改善された。

#### ②ヒスタミン欠損マウスにおけるマスト細胞解析

平成 14 年度に行ったマスト細胞のシングルセル発現プロフィール解析によって、HDC 欠損マウスのマスト細胞では、野生型に比べて、組織結合型マスト細胞の成熟に依存したマーカー遺伝子群の発現レベルが極端に低く、マスト細胞前駆細胞様の発現様式を示すことが判明した。そこで平成 15 年度は、密度勾配遠心法により純度 90%以上の HDC 欠損腹腔マスト細胞を精製し、酵素活性や酵素タンパク量を検討した。その結果、HDC 欠損マウス由来の腹腔細胞は、chymase 活性は野生型と有意な相違は示さなかったが、tryptase 活性、carboxypeptidase A 活性において著しいプロテアーゼ活性の低下が認められた。これらプロテアーゼ活性の低下は耳介皮膚組織でもや

はり同様に確認された。またイムノブロット解析により、chymase レベルは変化がないが、tryptase レベルは低下しており、cathepsin G はほぼ完全に発現が消失していた。本腹腔マスト細胞においても、Real-time PCR 解析の結果、cathepsin G、MMCP-4, 5, 6, 7, neuropsin、carboxypeptidase A といった顆粒プロテアーゼ遺伝子発現の低下が確認された。

#### D. 考察

##### ①方法論の検討

今年度の方法論の検討・改善によって、ほぼ全てのシングルセルに対応できる RNA 増幅法を確立することができた。また LCM が使用できる場合には、ハイスループット化が可能であった。

##### ②ヒスタミン欠損マウスにおけるマスト細胞の解析

我々の従来の研究結果では、HDC 欠損マウスは、野生型野生型に比べ、組織マスト細胞数の減少と顆粒染色性の低下が観察されていた。今回の解析で、HDC 欠損マウスのマスト細胞では、その分化・成熟に依存した遺伝子群の発現レベルが低く、また実際に各酵素活性や蛋白質量の低下が見られたことから、マスト細胞前駆細胞様の発現様式に近い。この結果は、HDC 欠損マウスのマスト細胞が未成熟であることを遺伝子発現レベルで裏付け、ヒスタミンがその分化成熟に関与する可能性を強

く支持するものである。

## E. 結論

平成 14 年度の検討項目と併せて、Eberwine らの開発したシングルセル RNA 増幅法の原法に比べて、収量において約 10 倍、安定性においては飛躍的に向上が見られ、さらに種々の調製による切片に対応できる基礎知見が集積した。これらの基礎データは、平成 16 年度の本プロジェクトの展開に有用な知見となることが期待される。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Hatae, N., Kita, A., Tanaka, A., Sugimoto, Y., Ichikawa, A. Induction of adherent activity in mastocytoma P-815 cells by the cooperation of two prostaglandin E2 receptor subtypes, EP3 and EP4. *J. Biol. Chem.* 278, 17977-17981. (2003)

Tanaka, S., Deai, K., Inagaki, M., Ichikawa, A.. Uptake of histamine by mouse peritoneal macrophages and a macrophage cell line, RAW264.7. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285, C592-C598. (2003)

Furutani K, Aihara T, Nakamura E, Tanaka S,

Ichikawa A, Ohtsu H, Okabe S. Crucial role of histamine for regulation of gastric acid secretion ascertained by histidine decarboxylase-knockout mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307, 331-338. (2003)

### 2. 学会発表

Tanaka, S., Ichikawa, A. Ca<sup>2+</sup>-influx-mediated histamine synthesis in mast cells induced by IgE in the absence of antigen. Keystone Symposia, 2004 年 2 月 米国 Taos 市

田中智之、市川 厚. 「IgE 感作に伴うマスト細胞におけるヒスタミン合成の誘導」第 77 回日本薬理学会年会 2004 年 3 月 大阪

田中智之、杉本幸彦、市川 厚. 「マスト細胞の分化、成熟に関わるヒスタミン」日本薬学会第 124 年会 2004 年 3 月 大阪

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	ページ	出版年
Sugimoto Y, Narumiya S, Ichikawa A.	Insight into prostanoid functions: lessons from receptor- knockout mice.	Peter Curtis- Prior.	The Eicosanoids	John Wiley& Sons, Ltd.	West Sussex, 英 国	219- 252	2003

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Amano, H., Hayashi, I., Endo, H., Kitasato, H., Yamashina, S., Maruyama, T., Kobayashi, M., Satoh, K., Narita, M., Sugimoto, Y., Murata, T., Yoshimura, H., Narumiya, S., Majima, M.	Host prostaglandin E2-EP3 signaling regulates tumor- associated angiogenesis and tumor growth.	<i>J. Exp. Med.</i>	<b>197</b>	221-232	2003
Segi, E., Haraguchi, K., Sugimoto, Y., Tsuji, M., Tsunekawa, H., Tamba, S., Tsuboi, K., Tanaka, S., Ichikawa, A.	Expression of messenger RNA for prostaglandin E receptor subtypes EP4/EP2 and cyclooxygenase isozymes in mouse periovarian follicles and oviducts during superovulation.	<i>Biol. Reprod.</i>	<b>68</b>	804-811	2003
Mu, J., Kanzaki, T., Si, X., Tomimatsu, T., Fukuda, H., Shioji, M., Murata, Y., Sugimoto, Y., Ichikawa, A.	Apoptosis and related proteins in placenta of intrauterine fetal death in prostaglandin F receptor- deficient mice.	<i>Biol. Reprod.</i>	<b>68</b>	1968- 1974	2003

Tsuboi, K., Iwane, A., Nakazawa, S., Sugimoto, Y., Ichikawa, A.	Role of prostaglandin H2 synthase-2 in murine parturition: study on ovariectomy-induced parturition in prostaglandin F receptor-deficient mice.	<i>Biol. Reprod.</i>	<b>69</b>	195-201	2003
Saito, O., Guan, Y., Qi, Z., Davis, L.S., Komhoff, M., Sugimoto, Y., Narumiya, S., Breyer, R.M., Breyer, M.D.	Expression of the Prostaglandin F Receptor (FP) gene along the mouse genitourinary tract.	<i>Am. J. Physiol. Renal Physiol.</i>	<b>286</b>	F1164- F1170	2003
Hatae, N., Kita, A., Tanaka, A., Sugimoto, Y., Ichikawa, A.	Induction of adherent activity in mastocytoma P-815 cells by cooperation of two prostaglandin E <sub>2</sub> receptor subtypes, EP3& EP4.	<i>J. Biol. Chem.</i>	<b>278</b>	17977- 17981	2003
Hunyady B, Zolyomi A, Czimmer J, Mozsik G, Kozicz T, Buzas E, Tanaka S, Ichikawa A, Nagy A, Palkovits M, Falus A.	Expanded parietal cell pool in transgenic mice unable to synthesize histamine.	<i>Scand. J. Gastroenterol.</i>	<b>38</b>	133-140	2003
Tanaka S, Deai K, Inagaki M, Ichikawa A.	Uptake of histamine by mouse peritoneal macrophages and a macrophage cell line, RAW264.7.	<i>Am. J. Physiol. Cell Physiol.</i>	<b>285</b>	C592- C598	2003
Wagner W, Tanaka S, Ichikawa A, Fogel WA.	Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides against histidine decarboxylase: a study in mouse mammary epithelial cell cultures.	<i>Inflamm. Res.</i>	<b>52</b> (Suppl.1)	S59-62	2003
Wagner W, Ichikawa A,	Mouse mammary epithelial	<i>J. Physiol.</i>	<b>54</b>	211-223	2003

Tanaka S Panula P Fogel WA.	histamine system.	<i>Pharmacol.</i>			
Furutani K, Aihara T, Nakamura E, Tanaka S, Ichikawa A, Ohtsu H, Okabe S.	Crucial role of histamine for regulation of gastric acid secretion ascertained by histidine decarboxylase-knockout mice.	<i>J. Pharmacol. Exp. Ther.</i>	307	331-338	2003
Shoda, J., Ueda, T., Kawamoto, T., Todoroki, T., Asano, T., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Maruyama, T., Nimura, Y., and Tanaka, N.	Prostaglandin E receptors in bile ducts of hepatolithiasis patients and the pathobiological Significance for cholangitis.	<i>Clin. Gastroenterol. Hepatol.</i>	1	285-296	2003
Minami, T., Matsumura, S., Mabuchi, T., Kobayashi, T., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Ichikawa, A., Narumiya, S., Ito, S.	Functional evidence for interaction between prostaglandin EP3 and kappa-opioid receptor pathways in tactile pain induced by human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) glycoprotein gp120.	<i>Neuropharmacology</i>	45	96-105	2003
Oka, T., Oka, K., Kobayashi, T., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Ushikubi, F., Narumiya, S., Saper, C.B.	Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP1 and EP3 receptors.	<i>J. Physiol.</i>	551	945-954	2003
Tsuchiya, S., Tanaka, S., Sugimoto, Y., Katsuyama, M., Ikegami, R., Ichikawa, A.	Identification & characterization of a novel progesterone receptor-binding element in the mouse prostaglandin E receptor subtype EP2 gene.	<i>Genes to Cells</i>	8	747-758	2003
Sugimoto, Y., Nakato, T., Kita, A., Hatae, N., Tabata,	Functional domains essential for Gs activity in	<i>Life Sci.</i>	74	135-141	2003

H., Tanaka, S., Ichikawa, A.	prostaglandin EP2 and EP3 receptors.				
杉本幸彦、市川 厚.	受容体ノックアウトマウスを用いたプロスタノイド研究	HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY	10	251-258	2003
杉本幸彦、市川 厚.	プロスタノイド受容体誘導の生理的役割	バイオサイエ ンスとインダ ストリー	61	729-734	2003
田中智之	ヒスタミン生合成を介して発現する生理機能の解析	薬学雑誌	123	547-559	2003
(紹介記事)	単一細胞の遺伝子増幅法を確立	日経先端技術	55	3-4	2004
(紹介記事)	単一細胞遺伝子増幅確立	日経産業新聞		2月23日	2004



## 単一細胞の遺伝子増幅法確立

京都大学大学院薬学研究所の杉本幸彦助教のグループは、単一細胞に由来するゲノム(全遺伝情報)の発現データを正確に解析するための遺伝子増幅法を確立した。一兆分の一のRNA(リボ核酸)を百万倍に増やすことができる。網羅的に一度に数万種の遺伝子発現を調べられるマイクロアレイ法への応用を前提としたもので、毒性解析による医薬品の安全性向上、創薬や診断などの医療応用が見込めるといふ。

杉本助教らはまず、壊れやすいRNAをcDNA(相補的デオキシリボ核酸)に変換。cDNAにはタグと呼ばれる特別な配列を挿入しておく。この状態で顕微鏡下、組織から一細胞をはがしてDNAを抽出。タグ配列だけを認識するRNA合成酵素を用いると、逆転写産物を特定のRNA分子に偏ることなく増幅できた。

20030638

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。