

平成15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

目 次

課題番号

KH11001

ハイスループットスクリーニングを指向した細胞機能解析法の
開発研究

川西 徹 …… 1

KH11002

ゲノム創薬を支援する高感度分析・解析技術の開発・応用に関
する研究

今井一洋 …… 11

KH11003

疾患モデル動物の開発および保存のための高度発生工学技術の
確立

小倉淳郎 …… 19

KH11004

トランスジェニックラットの作成とその公共利用のための胚バ
ンクの検討

小林英司 …… 25

KH11005

癌細胞の標的化を可能にするベクターの開発；単クローン抗体
からペプチドへの展開

石坂幸人 …… 32

KH11006

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

田上昭人 …… 37

KH11007

新しい白血球の機能制御手法を適用したガン細胞の浸潤・転移
抑制方法の開発研究

鈴木和博 …… 53

KH11008

多剤耐性結核の診断と創薬探索技術としてのゲノム解析に関す
る研究

切替照雄 …… 65

KH12079

超機能性核酸類縁体（BNA）を用いたアンチセンス医薬品の開
発とその実践的応用

今西 武 …… 78

KH12084

コンディショナルノックインによる受容体機能変換マウス作成
と情報伝達機構の解析

笹岡俊邦 …… 82

ハイスループットスクリーニングを指向した細胞機能解析法の開発研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
研究者 川西 徹

研究要旨 創薬のためのハイスループットスクリーニング (HTS) 系開発の基盤技術となる以下の開発研究を行った：(1)カスパーゼ活性化解析用蛍光プローブ開発；(2)細胞内情報伝達制御ケージド化合物の合成；(3)Ca²⁺依存性 K⁺チャンネル(Kca チャンネル)作用薬の検索のための HTS 系の開発；(4) *In vitro* リン脂質症検出系の構築と HTS 系作製；(5)多光子励起の応用に関する検討；(6)マルチカラー-FRET のための機器の最適化研究

分担研究者

- (1) 東邦大学理学部 古田寿昭
- (2) 東邦大学薬学部 重信弘毅
- (3) 昭和大学薬学部 百瀬和享
- (4) 名古屋市立大学薬学部 今泉祐治
- (5) 田辺製薬薬物動態研究所 成田 寛
- (6) カールツァイス 中村 竜

1. 研究目的

ポストゲノムを迎えて、医薬品開発においても、ゲノム解析によって明らかとなった遺伝子あるいは遺伝子生成物、およびその発現や機能を調節する物質をターゲットとして展開してゆくものと考えられる。これら新しい医薬品の研究開発をスピードアップさせるためには、効率的に細胞機能変化をスクリーニングできる解析系が必要となる。このような時代背景のもとに、本研究では HTS への応用を指向した細胞機能解析技術の開発をめざす。

HTS をめざす上で必要な要件としては、(1) 実験操作が簡便；(2) 大量のサンプルについて解析が可能；(3) 操作の自動化が可能、があげられる。しかしゲノムの構造解析と違って細胞機能は極めて多岐にわたり、解析手法もそれに応じて様々な特殊技術が使われているため、多くの細胞機能の解析に共通し HTS 化に直結する解析手法は少ない。そのような視点からみて、細胞機能の変化を光学的プローブを用いて光の強さあるいは色の変化として捉える解析法は、プレートリーダー等の測定機器を用いることにより、上記の要件を満たす極めて高効率の解析法になりうる。しかし、目的とする細胞機能を選択的に捉えるためには、(1) 選択性の高いプローブの開発；(2) HTS に利用できる

細胞の作製；(3) プローブの特性を考慮した測定及び解析機器類の考案、の3つの視点からの解析手法の開発が必要不可欠となる。本研究では(1) タンパク質性蛍光プローブの開発、改良；(2) 細胞内カルシウムイオン濃度制御系および Kca チャンネルスクリーニング細胞系の開発；(3) 測定機器としての FRET 解析用光学システムおよびマルチカラー解析システム等の開発、を各研究者が機能的にリンクして研究を進める。

2. 研究方法

(1) カスパーゼ活性化解析用蛍光プローブの設計
EYFP-ペプチド鎖 (カスパーゼ基質配列を含む) -ECFP という融合タンパク質発現用プラスミドを設計、FRET を利用したカスパーゼ活性化解析用蛍光プローブを作製した (昨年度報告参照)。カスパーゼに切断される特異的ペプチド鎖として LDCGIETDSGVD および KRKGDEV DGVDE を用いた。それぞれ主としてカスパーゼ 8/9、カスパーゼ 3 によって切断されることを確認した。ECFP 標識チトクローム c 発現用プラスミドは HeLa 細胞からチトクローム c 遺伝子を PCR クローニングし、これを pECFP ベクターの上流の制限酵素サイト (NheI - BamHI) に組み込んで作製した。核移行性プローブ YFP-peptide-CFP-NLS は核移行シグナル (simian virus 40 large T-antigen の核移行シグナル、3 コピー) を YFP-peptide-CFP の C 末端に挿入した。発現用プラスミドは Effectene (Quiagen) を用い HeLa 細胞に導入し、24-48 時間後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。ミトコンドリア膜電位を測定する場合には tetramethylrhodamine methyl ester の取り込みから昨年同様測定した。

(2) ケージド化合物の作製

光分解性保護基である Bhc 基 (6-ブロモ-7-ヒドロキシクマリン-4-イルメチル基) を用いて、さまざまなアミノ酸のケージド化合物およびアシルグリセロール類の各種ケージド化合物を合成し、その適用範囲を検討した。ケージとしての Bhc 基は、①紫外光によるケージ解除の効率が高い、②暗所での安定性が高い、③2光子励起を利用することで近赤外光によるケージ解除が可能である、④簡単な修飾を施すことで様々な方法で細胞内に導入することができる、などの特徴をもつ。

(3) Kca チャンネル作用薬の効率の探索系の開発
過去2年間に作製した Kca チャンネルサブユニット導入 HEK293 細胞を 100 nM の DiBAC₄(3)(bis-(1,2-dibutylbarbituric acid)-trimethine oxonol: Molecular Probe)を含む外液に 20 分間浸して色素を取り込ませた後、色素の存在下で実験を行った。490 nm の励起光を用いて、505 nm のダイクロイックミラーとフィルターで選択した 520 nm 以上の蛍光画像を取得した。

(4) *In vitro* リン脂質症検出系の構築と HTS 系作製

蛍光標識リン脂質アナログ NBD-PE (Fluorescent-labeled N-(7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-yl)-1, 2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt) を、培地に添加 (最終濃度: 0.5%) し 30 分間の超音波処理により懸濁し、CHL/IU 細胞 (Chinese hamster lung) の培養液に加えた。リン脂質症検出は蛍光顕微鏡観察と蛍光測定によるマニュアル法 (グルタルアルデヒド固定後、共焦点レーザー顕微鏡観察、アミオダロン固定後、透過電顕観察) ならびに蛍光測定を HTS 法にて行った。

(5) 多光子励起顕微鏡を用いた細胞間相互作用解析系の作製

流れ刺激負荷による、内皮細胞、平滑筋細胞間の相互作用を検討するため、内皮細胞のみに流れ刺激を負荷できる共培養用平行平板型流れ刺激負荷チャンバーを作成した。即ち Cell Culture Insert (polyethylen terephthalate membrane, thick: 10 μ m, pore size: 0.4 μ m) に細胞を播種、灌流液を負荷する流路 (幅: 7.4 mm, 高さ: 0.2 mm) を Insert 膜下側に設置し、Insert 膜上面には流れ刺激負荷がなく、Insert 膜下面には目的の流れ刺激負荷のできるチャンバーとした。多光子励起顕微鏡 RTS2000MP 及び Kr / Ar ion LASER (Ex. 488 nm) あるいは Ti:S モードロックレーザー (Ex. 780 nm) を使用し、Em. 503-550 nm の蛍光画像を取得した。Insert 膜上下面に播種した細

胞の Ca²⁺ 応答をピエゾ光軸駆動装置を用いて、画像取得と焦点変更にそれぞれ 0.53 秒、1 周期 2.13 秒で行うことにより測定・記録した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、各研究機関の動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施するものであり、倫理審査の承認を得ている。

3. 研究結果

(1) カスパーゼ活性化解析蛍光プローブの開発

昨年度作製した 2 つの GFP 変異体: ECFP 及び EYFP の間にカスパーゼ 8/9 あるいはカスパーゼ 3/6/7 の基質となるペプチド配列を挿入した融合タンパク質発現用プラスミド (おのおのイニシエーターカスパーゼプローブ IC-P, エフェクターカスパーゼプローブ EC-P と命名) を HeLa 細胞に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いてイメージング解析した。ミトコンドリア膜電位 (tetramethyl-rhodamine methyl ester (TMRME) の取り込みで測定) 低下のタイミングとの比較により、IC 活性化と EC 活性化のタイミングを比較したところ、細胞個々では IC 活性化のタイミングは 0.5~5.0 時間と様々であったが、各々の細胞では IC 活性化、EC 活性化、ミトコンドリア膜電位の脱分極は 30 分程度以内の時間差で生じた。

次いで、これらプローブのマルチカラー化を進めるために、GFP 誘導体を様々に変えたカスパーゼプローブを作製し、ECFP と EYFP の組み合わせ以外に、EGFP と DsRed2 の組み合わせ、EYFP と DsRed2 の組み合わせも同等の FRET 変化を示すことを見出した。この EGFP と DsRed2 との組み合わせの FRET プローブは、通常の顕微鏡観察において ECFP と同時使用が可能であるので、ECFP 標識チトクローム c 発現プラスミドを用い、同一細胞におけるミトコンドリアからのチトクローム c の遊離とカスパーゼ活性化のタイミングの比較を行い、2 種のカスパーゼの活性化、チトクローム c の遊離は各々の細胞では 15 分以内の時間差で生じることを見出した (Fig.1, Fig.2)。

さらに核移行シグナル、核排除シグナルを付加したカスパーゼ活性化プローブ発現プラスミドを作製、発現させてカスパーゼ活性化のタイミングを比較したが、核、細胞質でほぼ同時に活性化は開始していた。

以上のように作製したカスパーゼプローブについて、プレートリーダー Flex Station (Molecular

Device inc.)を用いた測定の可能性を検討した。TNF- α (200ng/ml)あるいは staurosporine (3 μ M)刺激により明瞭な蛍光強度比の変化を検出することができた(Fig.3)。カスパーゼの活性化のタイミングは細胞個々によって大きく異なるので、プレートリーダー全体の平均値を計測する測定系は不相当と考えられるが、細胞個々の反応の解析が可能なハイコンテツスクリーニング系へ適用することによってプローブの特性にあった高効率化が可能となろう。

(2) 細胞内情報伝達制御のための化合物の開発

光励起され、生理活性体となるケージド化合物の開発を継続して行った。

(2-1) アミノ酸類のケージド化合物の合成と光化学特性の評価— アミノ酸のケージとしての Bhc 基の可能性と限界を明らかにするために、各種アミノ酸の Bhc エステルと Bhc カルバメートを合成した。暗所での安定性($t_{1/2}$)が低かった GABA-OBhc を除いて、合成した全てのケージドアミノ酸は、光照射により定量的にもとのアミノ酸を放出することを確認した。このときの光反応効率(Φ_e)は、従来型のケージド化合物である 2-ニトロベンジル誘導体の 10 倍以上であることも明らかとなった。

(2-2) ペプチドの機能の光制御— 細胞接着等の光制御を目指して、RGD ペプチド(アルギニン(R)-グリシン(G)-アスパラギン酸(D)を含むペプチド)のケージド化合物を設計した。アスパラギン酸の側鎖のカルボキシル基にケージ(Bhc 基)を導入することで、ケージド RGDS ペプチド RGD(Bhc)S を合成した(Fig.4)。RGD(Bhc)S は、紫外光照射により定量的に RGDS ペプチドを放出すること、光照射前は RGD ペプチドとして働かないこと、および光照射によって HL-60 細胞にアポトーシスを起こすことを確認した。

(2-3) プロテインキナーゼの活性の光制御— ジアシルグリセロール(DG)の活性を光制御することで、プロテイン C(PKC)のキナーゼ活性と細胞内でのトランスロケーション活性を、時間的、空間的に制御する手法の開発を目的として研究を行った。まず、1,2-dioleoylglycerol(diC₈)をケージングした 3 種類のケージドジアシルグリセロール、Bhcmoc-diC₈, Bmcmoc-diC₈, および, Aqmoc-diC₈ を合成した(Fig.5)。その光分解効率(Φ_e)は、115-157 と充分高く、さらに光分解後のサンプルの HPLC 分析から Bhcmoc-diC₈ からはほぼ定量的に、また Aqmoc-diC₈ からも diC₈ が生成することを確認でき

た。εPKC-GFP 融合タンパク質を発現させた CHO-K1 細胞を調製し、εPKC の細胞内局在の変化を GFP の蛍光で可視化して観察したところ、細胞に 100 μ M の diC₈ を加えると、10 分後に細胞質から細胞膜へのトランスロケーションが観察された。一方、今回合成した 3 種類のケージド化合物を暗所で細胞に加えても、トランスロケーションは観察されないが、光照射後の各サンプルを細胞に加えたところ、diC₈ を加えた時と同様のトランスロケーションを観察することに成功した。中でも、Bhcmoc-diC₈ は 40 μ M という低濃度でも光照射によって効果的にトランスロケーションを引き起こせることが明らかとなった(Fig.6)。

(3) Kca チャネル作用薬の効率的探索系の開発

昨年度までに作製した Kca チャネル作用薬探索系においては、Kca チャネルの発現が十分でない細胞が混在し、アーチファクト等の原因になると考えられた。そこで、細胞個々のチャネルの発現を GFP 発現を指標にモニターし、比較した。まず GFP 遺伝子を組み込んだ哺乳類発現ベクターである pTracer-CMV2 に rSK2 を組み込み、HEKSK2 一過性発現系を構築した。緑色蛍光タンパク質(GFP)の蛍光シグナルにより、SK2 タンパク質の発現を確認して、GFP と蛍光波長が重ならない oxonol 系膜電位感受性蛍光プローブの DiBAC₄(5)を用いて薬効を評価した。GFP 陽性細胞において、SK2 チャネル開口薬であるクロロゾキサゾン投与により、蛍光強度が顕著に減少(過分極)し、さらに SK2 チャネル阻害薬であるアパミン投与により、蛍光強度は回復した(脱分極)。一方、単一 GFP 陰性細胞では、薬物による顕著な蛍光強度変化は検出されなかったが、GFP 陽性細胞と同一コロニーを形成する GFP 陰性細胞には、クロロゾキサゾンに反応するものが観察された。さらに、SK2 チャネルに対する薬物反応を最も効率よく検出できる条件を検討した。その結果、11~20 個程度の細胞群からなるコロニーで、GFP 発現効率が 20~30%程度以上ならば、正確かつ効率的に薬物反応が検出できることが明らかとなった。

以上より、一過性発現系においても、GFP 陽性細胞群と GFP 陰性細胞群を比較することで、容易にアーチファクトの除外が可能となり、高効率な Kca チャネル作用薬スクリーニング系が完成した。

(4) *In vitro* リン脂質症検出系の構築と HTS 系作製

医薬品候補化合物の安全性試験法として、

NBD-PE (蛍光標識リン脂質アナログ) の細胞への取り込みを原理とする、リン脂質症誘導能の簡便かつ高効率な試験法を開発した。研究はまずマニュアル法を確立し、さらに HTS 化へと進んだ。

(4-1) マニュアル法: NBD-PE の細胞内への取り込みへのアミオダロン、イミプラミン、クロロキン、およびプロプラノロールの作用を蛍光顕微鏡により検討した結果、それぞれ 3.125, 25, 6.25, および 40 μM 以上の濃度で蛍光顆粒の量あるいは大きさを濃度依存的に増加した(Fig.7)。アミオダロン 12.5 μM で処置した細胞を電子顕微鏡で観察した結果、細胞質内に少量のミエリン様構造物を含む大小の封入体 (ミエリノゾームの一種であると判断された (以後蛍光封入体と称する)) が認められた(Fig.8)。蛍光顕微鏡観察で蛍光封入体が確認された薬物濃度における蛍光測定値の最高増加率は、コントロールと比較してイミプラミンで 283, クロロキンで 463, プロプラノロールで 652%に達した(Fig.9)。ついで蛍光測定値の増加率を指標とした陽性・陰性の判定基準を設定するため、自社化合物ライブラリより選抜した 247 検体についてマニュアル法でリン脂質症誘導能を検討した結果、蛍光顕微鏡観察で 93 検体が陽性、154 検体が陰性と判断された。(1)蛍光顕微鏡観察で陽性と判定された検体の処置 (濃度範囲: 5~80 μM) による蛍光測定値の増加率は、アミオダロン処置による最大増加率の 25%以上の値を示し、(2)アミオダロンについて実施した 10 回の試験において、蛍光顕微鏡観察で陽性と判断された 3.125 μM 処理時の蛍光増加率は、アミオダロン処置による最大増加率の概ね 30%前後であった、という結果から蛍光測定法の場合の陽性判定基準として、「アミオダロン処置による蛍光測定値の最大増加率の 25%以上の増加率」を設定することが妥当と考えられた。

(4-2) HTS 法: 自社ライブラリから選抜した 247 検体について、上記マニュアル法から設定された判定基準を適用した HTS 法でリン脂質症誘導能を検討した。その結果、ハイスループット法では 102 検体が陽性、145 検体が陰性と判断された。そして、マニュアル法とハイスループット法のそれぞれで得られた判定結果の一致率を検討した結果、247 化合物のうちいずれの方法でも陽性であった検体が 79 検体 (32.1%)、陰性であった検体が 131 検体 (53.0%) で、陽性、陰性あわせ一致率は 85.1% であり、広く医薬品候補物質の安全性に関するスクリーニングへ応用が可能と考えられた。

(5) 多光子励起の応用の検討

Insert 膜の上下の膜面に細胞を培養する共培養用平行平板型流れ刺激負荷チャンバーを作製・使用し、多光子励起顕微鏡で上下を光学的に分けて観察することにより、細胞間相互作用の解析が可能であるか検討した。

膜の上下が光学的に分離できるか確認するためブタ冠状動脈血管平滑筋細胞(PCASMC) (Insert 膜上) から培養ウシ大動脈血管内皮細胞 (BAEC) (Insert 膜下) に向かって、2 μm 間隔で光軸断層像を取得したところ、12 μm 離れると、画像上ではそれぞれの細胞の形が明らかとなり、膜反対側の細胞の蛍光が見た目上確認出来なくなることが確認された。また、各細胞に焦点を合わせた場合の上下細胞間の距離は 16 μm となった。Insert 膜反対側への蛍光の漏れ込みを測定した (Fig.10)。Insert 膜反対側 (細胞焦点面より 16 μm) では、 $11.47\pm 0.80\%$ の蛍光が測定された。測定焦点面と細胞間の距離が離れると測定される蛍光強度は徐々に弱くなり、30 μm の距離では $1.13\pm 0.07\%$ とほとんど測定されなかった。

血管内皮細胞はリゾフォスファチジン酸および流れ刺激依存的な Ca^{2+} 上昇を示すが、この装置を用いて、Insert 膜上面及び下面に播種した BAEC の Ca^{2+} 上昇を指標とした反応率を比較検討した。LPA 存在下、Insert 膜下面での反応率は LPA 濃度依存的 (3~30 μM)、流れ刺激依存的 (10~20 $\text{dyne} / \text{cm}^2$) に上昇した。一方 Insert 膜上面では、このような LPA の作用は認められなかった。1 μM ATP 存在下、Insert 膜下面では、流れ刺激 10 $\text{dyne} / \text{cm}^2$ を負荷した場合に反応率 100% を示した。また、Insert 膜上面においても ATP は Ca^{2+} 応答を誘発し、ATP 濃度 (0.1~1 μM) 依存的に反応率が上昇する傾向にあった。以上の結果は、LPA 存在下における内皮細胞の Ca^{2+} 応答には流れ刺激負荷が必須であるのに対し、ATP は Insert 膜上面においても Ca^{2+} 応答を誘発したことから、流れは灌流液中の ATP を供給する役割を担うことが示唆している。ATP 及び LPA は共に血漿中に数百 nM 存在し、流れ刺激に依存して内皮細胞内 Ca^{2+} 応答を誘発する物質として報告してきたが、流れ刺激感受性は異なり、LPA は生体内で変化しうる流れ刺激の増強により Ca^{2+} 応答を誘発することが示唆された。

多光子励起顕微鏡の光学系は、このような光軸方向にある細胞を分離して計測可能であることから、細胞間相互作用の検討等、将来のより高度な HTS 解析系への応用が期待される。

(6) マルチカラー-FRET のための機器の最適化

GFP 誘導体の 2 種類の組み合わせによる FRET を同一細胞で測定するための最適化研究を行った。まず CFP/GFP (CG) 間, CFP/YFP (CY) 間, CFP/DsRed (CR) 間, GFP/YFP (GY) 間, GFP/DsRed (GR) 間, YFP/DsRed (YR) 間の FRET によって effector カスパーゼの活性化を検出するためのプローブについて, TNF- α により HeLa 細胞に細胞死を誘発した際の蛍光変化を比較した。その結果, CY および GR の蛍光強度比変化が最も大きかった。そこで CY-initiator カスパーゼプローブと GR-effector カスパーゼプローブを同一細胞に発現させ, 蛍光イメージングのスペクトル測定が可能なカールツァイス製 LSM510 Meta 共焦点レーザー顕微鏡による画像化の最適化を行った結果, initiator 及び effector カスパーゼの活性を示す 2 種類の FRET の蛍光強度比の変化を捉えることに成功した。

3. まとめ

- (1) カスパーゼ活性化解析用組換えタンパク質系蛍光プローブを設計, 発現させ, 細胞死刺激後に, カスパーゼカスケードの開始のタイミングは細胞間に大きな違いがあるものの, 一度開始すれば極めて短時間に伝搬することを明らかにした。さらにこれらプローブの多色化を行い, また核移行型, および核排除型プローブ発現プラスミドを作製, これらがプレートリーダーで利用可能なことを確認した。
- (2) アミノ酸のケージとしての Bhc 基の可能性と限界を明らかにするとともに, これを利用したアミノ酸, RGD ペプチド, およびジアシルグリセロール類のケージ化合物を合成し, 機能することを確認した。これら化合物は将来的には HTS 系に応用可能と考えられる。
- (3) Kca チャネルタンパク質を発現させた細胞をモニターすることにより, 過去 2 年間に作製した Ca²⁺依存性 K⁺チャネル作用薬の探索のための HTS 系の問題点を解決し, Kca チャネル作用薬の高効率探索系を完成させた。
- (4) 蛍光プローブ NBD-PE の細胞内への取り込みを利用して, 医薬品候補化合物等の In vitro リン脂質症検出系を構築し, 解析系

の HT 化を行った。

- (5) 多光子励起顕微鏡を用いて, 内皮細胞間, あるいは内皮細胞と平滑筋細胞間の相互作用の解析系を作製し, 多光子励起の将来的な HTS への利用の可能性を示した。
- (6) 2 種類の組み合わせによる GFP 誘導体間の FRET の同時測定の測定条件の最適化研究を行い, 蛍光スペクトル測定が可能な共焦点レーザー顕微鏡を用いて, 実現の可能性を示唆する結果を得た。

4. 研究発表

- 1) H. Tanaka, T. Kawanishi, K. Shigenobu: Atrio-ventricular difference in myocardial excitation-contraction coupling ---influence of T-tubules and endocardial endothelium --, *Recent. Res. Devel. Physiol.*, **1**, 253-262 (2003)
- 2) H. Tanaka, T., Kawanishi, K., Shigenobu: Optical Bioimaging: From Living tissue to a single molecule: atrio-Ventricular difference in myocardial excitation-contraction coupling - Sequential verses simultaneous activation of SR Ca²⁺ release units, *J. Pharmacol.Sci.*, **93**, 248-252 (2003)
- 3) Ishii-watabe, E. Uchida, A. Iwata, R. Nagata, K. Satoh, K. Fan, M. Murata, H. Mizuguchi, N. Kawasaki, T. Kawanishi, T. Yamaguchi, T. Hayakawa: Detection of Replication-Competent Adenovirus Spiked into Recombinant Adenovirus Vector Products by Infectivity-PCR, *Mol., Therapy*, **8**, 1009-1016 (2003)
- 4) H. Tanaka, K. Nishimaru, R. Makuta, W. Hirayama, T. Kawamura, T. Matsuda, Y. Tanaka, T. Kawanishi, and K. Shigenobu: Possible Involvement of prostaglandins F2 α and D2 In acetylcholine-induced positive Inotropy In Isolated mouse left atria, *Pharmacology*, **67**, 157-162 (2003)
- 5) T. Kobayashi, S. Niimi, T. Kawanishi, M. Fukuoka, and T. Hayakawa: Changes in peroxisomes proliferator-activated receptor g-regulated gene expression and inhibin/activin-follistatin system gene expression in rat testis ater an administration of di-n-butyl phralate, *Toxicol. Lett.*, **138**, 215-225 (2003)
- 6) S. Niimi, T. Oshizawa, T. Yamaguchi, M. Harashima, T. Seki, T. Ariga, T. Kawanishi, and T. Hayakawa, Specific expression of annexin III in

- rat-small-hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**, 770-774 (2003)
- 7) T. Kobayashi, H. Kawai, T. Suzuki, T. Kawanishi, and T. Hayakawa, Improved sensitivity of insulin in MALDI-TOF MS by premixing matrix CHCA with transferrin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (in press)
- 8) M. Hyuga, S. Hyuga, N. Kawasaki, M. Ohta, S. Itoh, S. Niimi, T. Kawanishi, T. Hayakawa : Enhancement of Hepatocyte Growth Factor-induced Cell Scattering in *N*-Acetylglucosaminyltransferase III-transfected HepG2 Cells, *Biol. Pharm. Bull.* **27** (in press)
- 9) 川西 徹, 河合 洋 : 細胞傷害機構のイメージング, *実験医学*, **22**, 428-429 (2004)
- 10) Nishimaru K., Tanaka Y., Tanaka H., Shigenobu K.: Pharmacological evidence for involvement of phospholipase D, protein kinase C and sodium-calcium exchanger in α -adrenoceptor-mediated negative inotropy in adult mouse ventricle. *J. Pharmacol. Sci.* **92**:196-202 (2003)
- 11) Nishimaru K., Tanaka Y., Tanaka H., Shigenobu K.: Inhibition of agonist-induced positive inotropy by a selective Rho-associated kinase inhibitor, Y-27632. *J. Pharmacol. Sci.*, **92**: 424-427 (2003)
- 12) Masumiya H., Yamamoto H., Hemberger M., Tanaka H., Shigenobu K., Chen SRW., Furukawa T.: The mouse sino-atrial node expresses both the type 2 and type 3 Ca^{2+} release channels/ryanodine receptors. *FEBS Lett.* **553**: 141-144 (2003)
- 13) Masumiya H., Saito M., Ito M., Matsuda T., Noguchi K., Iida-Tanaka N., Tanaka H., Shigenobu K.: Lack of action potential-prolonging effect of terfenadine on rabbit myocardial preparations. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 131-135 (2004)
- 14) Hashimoto, T., H. Ohata, and K. Momose. Itch-scratch response induced by lysophosphatidic acid in mice. *Pharmacology*, in press (2004)
- 15) Ohata, H., H. Yamada, T. Niioka, M. Yamamoto and K. Momose. Calcium imaging in blood vessel *in situ* employing two-photon excitation fluorescence microscopy. *J. Pharmacol. Sci.* **93**, 242-247 (2003)
- 16) Hashimoto, T., M. Yamashita, H. Ohata and Kazutaka Momose: Lysophosphatidic acid enhances *in vivo* infiltration and activation of guinea pig eosinophils and neutrophils via a Rho/ROCK-mediated pathway. *J. Pharmacol. Sci.* **91**, 8-14 (2003)
- 17) Nobe, K., Y. Sakai, H. Nobe and K. Momose. Dysfunction of aorta involves different patterns of intracellular signaling pathways in diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **471**, 195-204 (2003)
- 18) T. Ohwada, T. Nonomura, K. Maki, K. Sakamoto, S. Ohya, K. Muraki, and Yuji Imaizumi: Dehydroabietic acid derivatives as a novel scaffold for large-conductance calcium-activated K^+ channel openers: *Bioorg. Medic. Chem. Lett.*, **13**, 3971-3974 (2003)
- 19) N. Hatano, S. Ohya, K. Muraki, W. Giles and Y. Imaizumi: Dihydropyridine Ca^{2+} channel antagonists and agonists block Kv4.2, Kv4.3, and Kv1.4 K^+ channels expressed in HEL293 cells, *Brit. J. Pharmacol.*, **139**, 533-544 (2003)
- 20) N. Hatano, S. Ohya, K. Muraki, R.B. Clark, W.R. Giles and Y. Imaizumi: Two arginines in the cytoplasmic C-terminal domains are essential for voltage-dependent regulation of A-type K^+ current in the Kv4 channel subfamily, *J. Biol. Chem.*, **279**, 5450-5459 (2004)
- 21) K. Muraki, A. Sasaok, S. Ohya, M. Watanabe and Y. Imaizumi; Effects of KRN4884, a novel K^+ channel opener, on ionic currents in rabbit femoral arterial myocytes, *J. Pharmacol. Sci.*, **93**, 289-298 (2003)
- 22) K. Muraki, U. Iwata, Y. Katanosaka, T. Ito, S. Ohya, M. Shigekawa and Y. Imaizumi: TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes, *Circ. Res.*, **93**, 829-838 (2003)
- 23) H. Mizuno, T. K. Mal, K. I. Tong, R. Ando, T. Furuta, M. Ikura, A. Miyawaki, Photo-induced peptide cleavage for the green-to-red conversion of a fluorescent protein, *Molecular Cell* **12**, 1051-1058 (2003)
- 24) A. Z. Suzuki, T. Watanabe, M. Kawamoto, K. Nishiyama, H. Yamashita, M. Iwamura and T. Furuta, Coumarin-4-ylmethoxycarbonyls as Phototriggers for Alcohols and Phenols, *Org. Lett.*, **5**, 4867-4870 (2003)

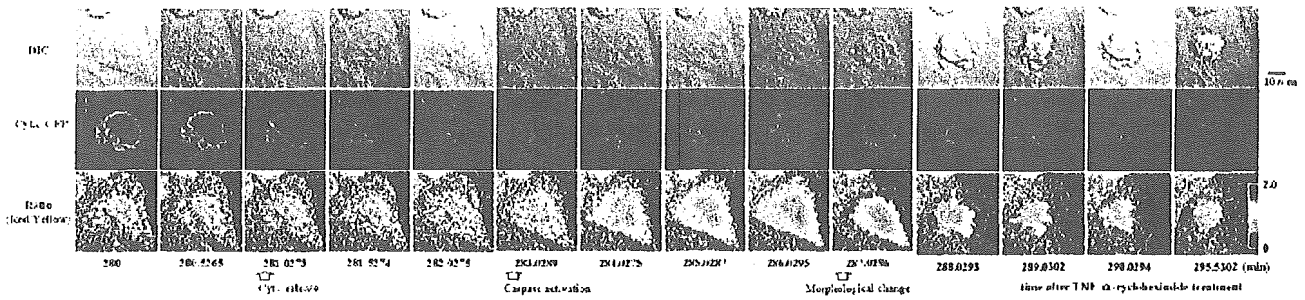


Fig. 1. Imaging of ECFP-conjugated cytochrome c and activation of EC-sensor. Figures below photos show the time after an addition of TNF- α /cycloheximide.

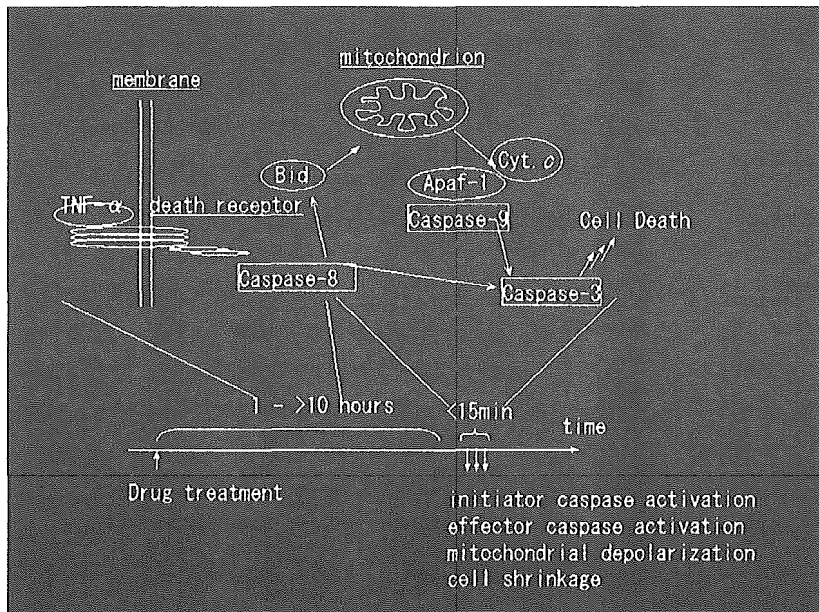
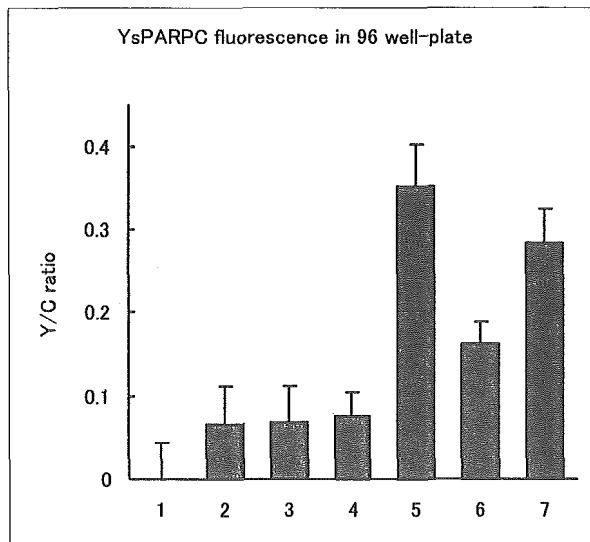


Fig. 2 Caspase cascade induced by TNF- α



1. No cell
2. HeLa
3. HeLa+Stau
4. HeLa+TNF
5. HeLa+Probe
6. HeLa+Probe+Stau
7. HeLa+Probe+TNF

Fig. 3 Detection of activation of caspase using EC-sensor with a FlexStation Platereader.

Fluorescence ratio changes 6 hours after the addition of Stau or TNF was shown as Averages \pm S.D.(n=6)

Stau: staurosporine 2 μ M
TNF: TNF- α 200ng/ml

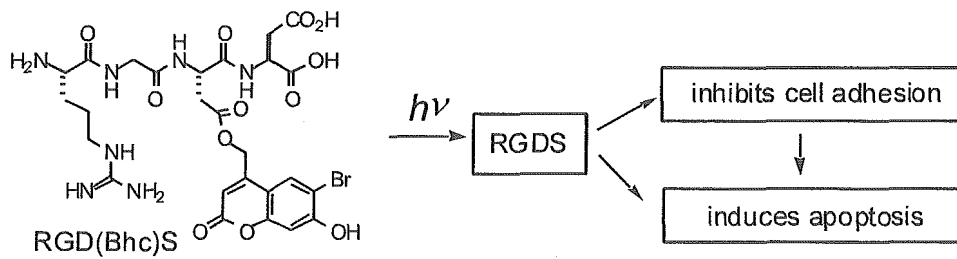


Fig. 4 Caged RGD peptide

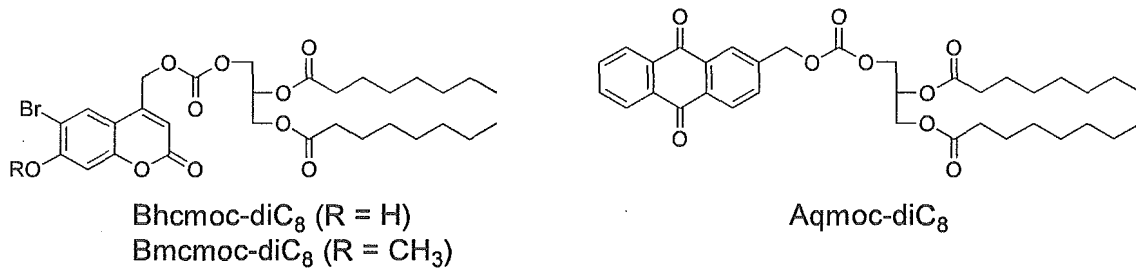


Fig. 5 Caged diacylglycerols

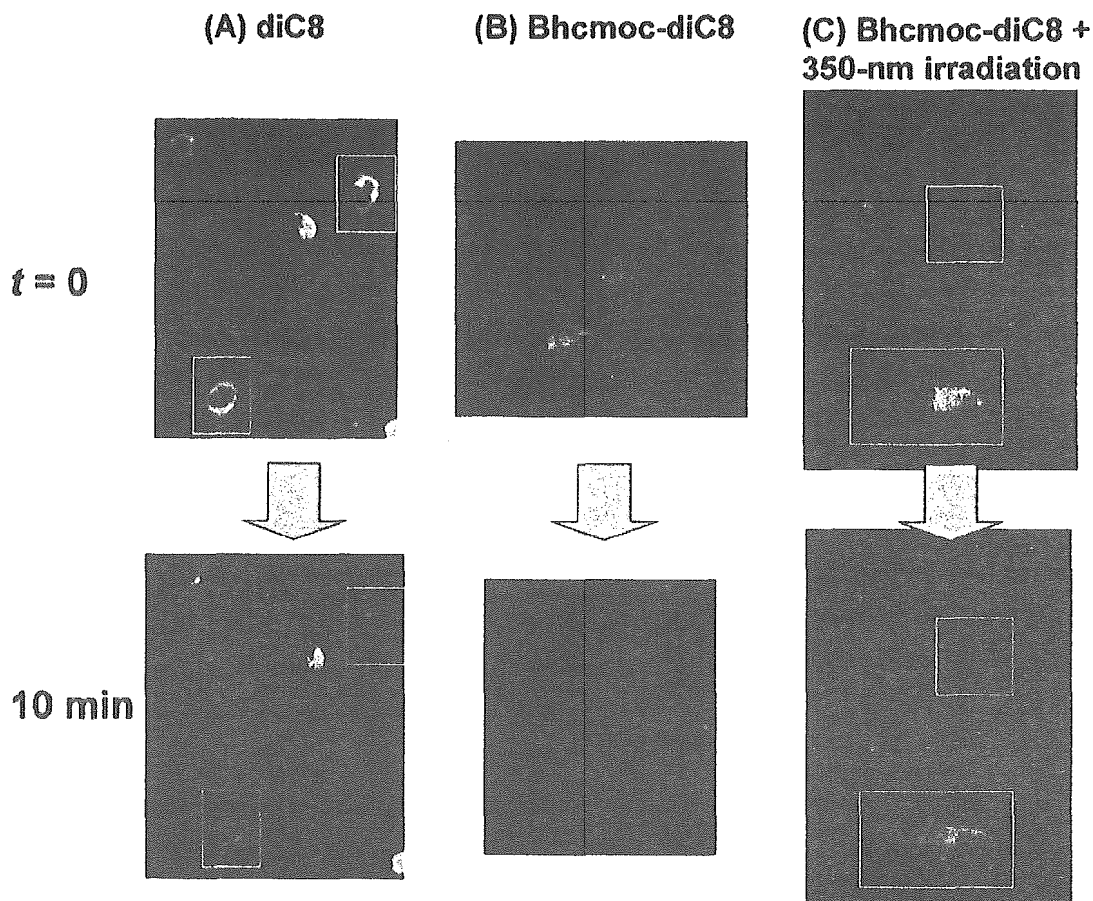


Fig. 6 Translocation of ePKC-GFP by Bhcmoc-diC₈ before and after photolysis. Fluorescence microscopic photos of CHO-K1 cells expressing PKC-GFP. Transfected CHO-K1 cells were treated with (A) diC₈, (B) Bhcmoc-diC₈ before photolysis and (C) Bhcmoc-diC₈ after photolysis.

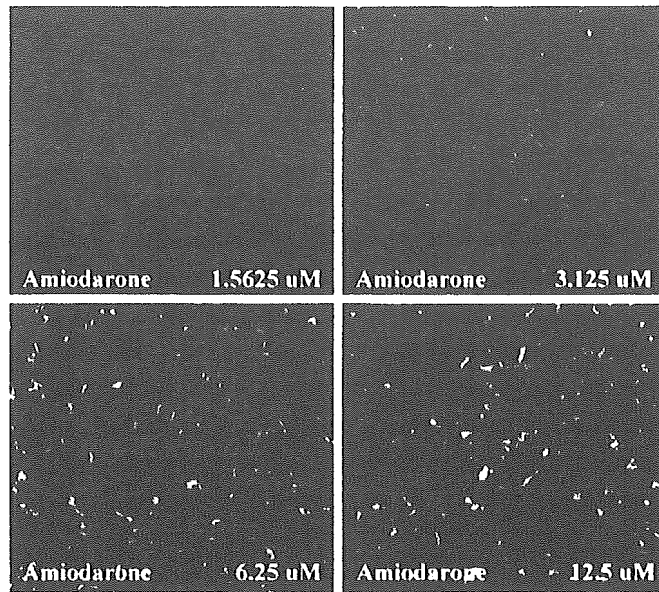


Fig. 7 Confocal laser scanning micrographs of CHL/IU cells treated with several concentrations of amiodarone in the presence of NBD-PE for 24 hrs. Formation of cytoplasmic fluorescent inclusions is observed in the cells treated with amiodarone at 3.124 μM or more.

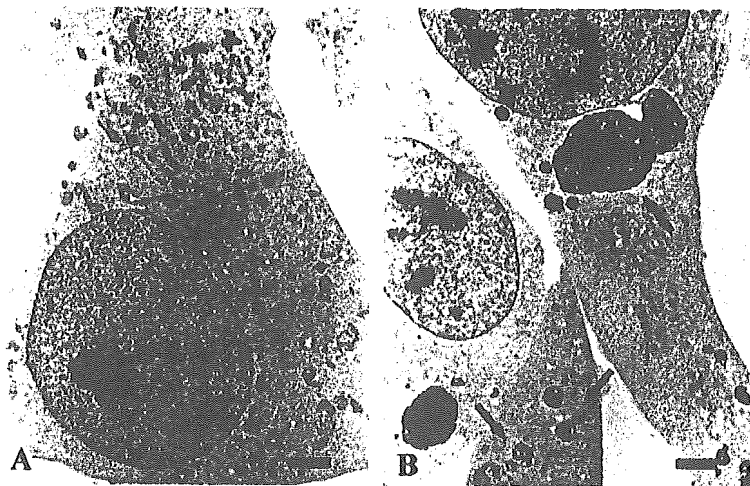


Fig. 8 Electron micrographs of CHL/IU cells treated with (B) or without (A) 12.5 μM of amiodarone in the presence of NBD-PE for 24 hrs. Cytoplasmic lysosomal bodies containing myelin figures are observed in cells treated with amiodarone (B, arrows). Bar = 2 μm .

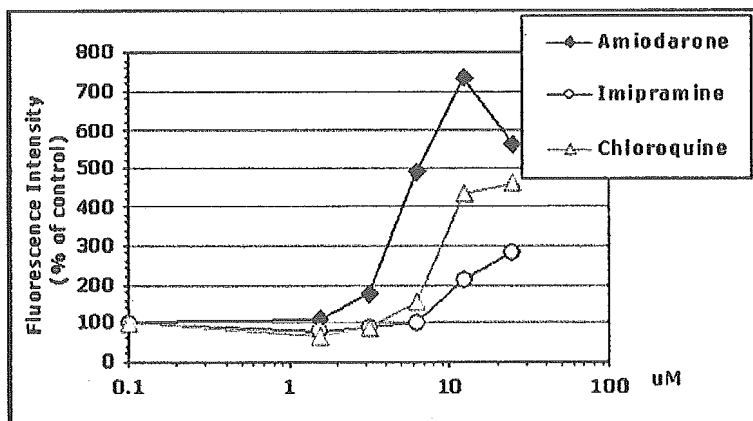


Fig.9 Total fluorescence of CHL cells treated with several concentrations of amiodarone, imipramine, chloroquine in the presence of NBD-PE for 24 hrs.

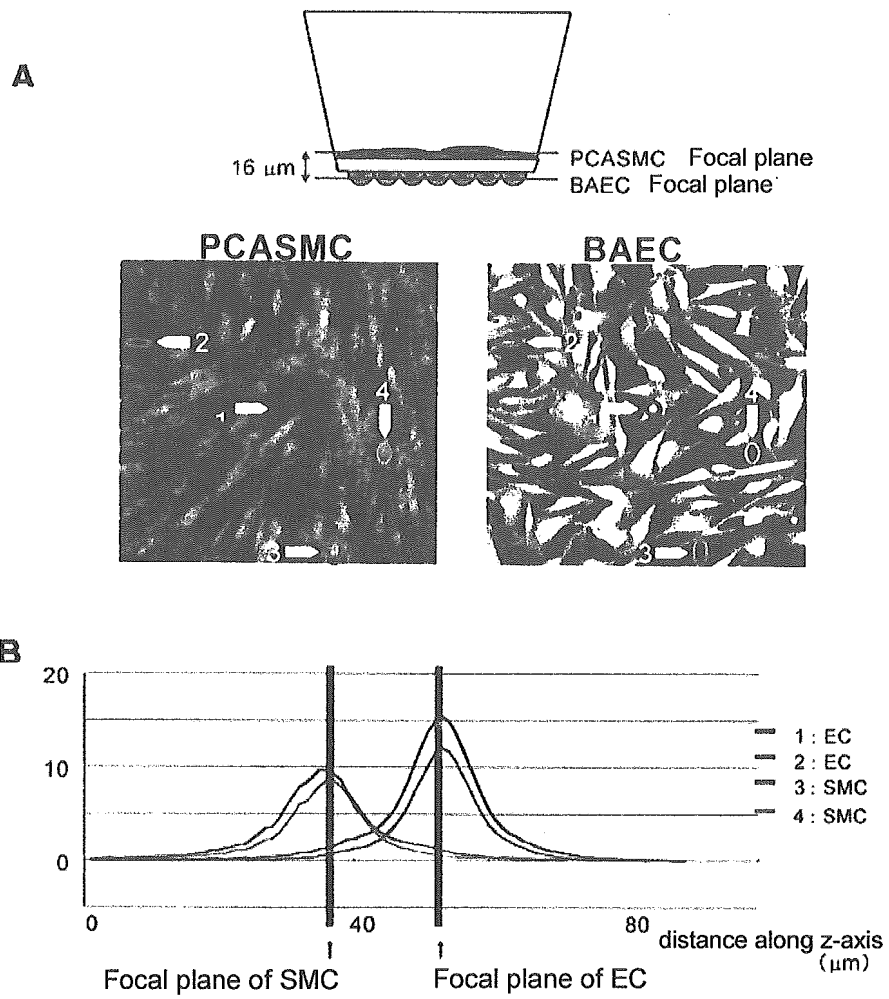


Fig.10 Multiphoton microscopy clearly distinguishes between smooth muscle cells and Endothelial cells

A:Fluorescence images of MC and EC on the focal plane The numbers shows the same positions.

B.Distribution of Fluorescence intensity in area No 1 - 4 on each sectioning images. The red lines shows the focal planes in each cell.

平成15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16年9月30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