

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

## 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

研究要旨 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) を用いて、分子生物学的・生理学的・薬理的解析を行った。さらに病態モデルにおける受容体の関与および受容体特異的薬物の解析を行った

分担研究者	評価と受容体特異的薬物の薬効評価を行う。
(1) 国立成育医療センター研究所 篠浦ひとみ、押川小百合	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。
(1) 山梨大学医学部薬理学教室 橋本敬太郎	
(2) 東京大学医学部泌尿器科 北村 唯一	B. 研究方法
(3) 東京薬科大学第一薬理学教室 竹尾 聡	マウス $\alpha 1$ アドレナリン受容体変異マウス ( $\alpha 1D, \alpha 1B$ および $\alpha 1D, \alpha 1B$ 二重欠損マウス) 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
(4) 福岡大学薬学部薬理学教室 高野 行夫	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。
(5) 京都大学大学院薬学研究科 辻本 豪三	具体的な解析法としては
(6) 旭化成ファーマ株式会社ライフサイエンス総合研究所薬理第一研究所 生垣 一郎	1) 変異動物の病理組織学的検討。
(7) キッセイ薬品工業株式会社・中央研究所 小嶋 正三	2) 体重増加・血圧・昇圧反応等生理的解析。
(8) 大塚製薬株式会社 薬効開発研究所 森 豊樹	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。
(9) 日本オルガノン株式会社研究開発管理室 広田 直美	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。
(10) 山之内製薬株式会社 分子医学研究所 ゲノム創薬研究室・ゲノム創薬 松七五三 仁	5) 学習記憶、痛覚反射の解析
A. 研究目的	6) 視床下部・脳下垂体・副腎ホルモン系の解析
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	

- 7) 膵臓ランゲルハンス細胞におけるインスリン分泌機能の解析
- 8) 高血圧モデルの作成および、in vitro, in vivoでの解析。
- 9) 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。
- 10) 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。

#### (倫理面への配慮)

動物実験に関しては動物愛護法を遵守し、各研究施設の動物実験指針に従い、実験動物の使用、飼養および保管の改善にも最大限努力した。

### C. 研究成果

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)、 $\alpha 1B$ アドレナリン受容体変異マウス、 $\alpha 1BD$ 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ついても同様に、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の作製し生理機能の解析および疾患モデルを作成し解析を行った。

#### D) $\alpha 1$ アドレナリン受容体変異マウスの解析

##### 1) 変異動物の病理組織学的検討

$\alpha 1B$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスでは心臓の重量がコントロールに比べて小さくまた心筋細胞もコントロールや $\alpha 1D$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスにくらべて小さいことが明らかになった。この結果よりマウス

の心臓の発育に $\alpha 1B$ 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。

##### 2) 薬理的解析(結合実験)

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、 $\alpha 1B$ アドレナリン受容体ノックアウトマウス、 $\alpha 1BD$ 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ガンドをもちいて結合実験を行った。 $\alpha 1D$ 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。

KMD3213を用いた競合的結合実験では、コントロールマウス大脳での高親和性と低親和性の分布の割合は2:8の割合であったが、 $\alpha 1D$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスの大脳では、高親和性と低親和性の分布の割合は3:7の割合であった。同様に大脳皮質、海馬を用いたKMD3213による競合的結合実験でもその割合がコントロールに比べて高親和性と低親和性の分布の割合に変化がみられた。

$\alpha 1B$ 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40%、肝臓でほぼ100%、心臓で約50%低下がみられたが、大動脈ではリガンド結合能に差はみられなかった。 $\alpha 1BD$ 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50%、肝臓でほぼ100%、心臓で約90%低下がみられた。

### 3) 昇圧反応

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中枢性の昇圧反応の解析を行った。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脳室内にフェニレフリンを投与したところ $\alpha 1D$ 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昇圧反応が低下していた。アンギオテンシンの投与では差は認められなかった。また、脳室内に高潮食塩水 (0.67M) を負荷したところ $\alpha 1D$ 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昇圧反応、飲水量の増加が低かった。以上の結果より、 $\alpha 1D$ アドレナリン受容体は中枢において昇圧反応や飲水量の調節に関与していることが明らかになった。

### 4) 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、肥大した膀胱では $\alpha 1D$ アドレナリン受容体の発現量の増加がみられた

### 5) マウス膀胱機能の解析

体重および膀胱の重さ：

Wild type(n=10)および $\alpha 1d-KO$  マウス(n=10)の平均体重はそれぞれ  $24.3 \pm 0.9g$  と  $23.6 \pm 0.5g$ 、平均膀胱重量はそれぞれ  $22.2$

$\pm 0.3mg$  と  $23.1 \pm 0.2mg$  であり、両者とも有意差を認めなかった。

24時間排尿パターン：

Wild type(n=10)および $\alpha 1d-KO$  マウス(n=10)の48時間排尿パターンを連続測定した。Wild type および $\alpha 1d-KO$  マウスの1日排尿量はそれぞれ  $2.299 \pm 0.118ml$  と  $2.107 \pm 0.148ml$  であり、両群間に有意な差を認めなかった。一方1日排尿回数は、Wild type および $\alpha 1d-KO$  マウスそれぞれ、 $14.7 \pm 3.2$  回、 $9.1 \pm 1.2$  回と $\alpha 1d-KO$  マウス群が有意に少なかった ( $p < 0.01$ )。また一回平均排尿量は、Wild type および $\alpha 1d-KO$  マウスそれぞれ、 $0.177 \pm 0.057ml$ 、 $0.238 \pm 0.076ml$  と $\alpha 1d-KO$  マウス群が有意に多かった ( $p < 0.05$ )。

膀胱内圧測定：

Wild type(n=4)および $\alpha 1d-KO$  マウス(n=4)において測定した。Wild type マウスの膀胱容量および排尿量はそれぞれ  $0.12 \pm 0.01ml$ 、 $0.11 \pm 0.01ml$  に対して、 $\alpha 1d-KO$  マウスはそれぞれ  $0.21 \pm 0.02ml$  ( $p < 0.01$ )、 $0.18 \pm 0.02ml$  ( $p < 0.01$ ) と有意に増加していた。一方、残尿量は両群とも  $0.02 \pm 0.01ml$  で、有意差を認めなかった。最大排尿時膀胱内圧は、Wild type マウス： $37.5 \pm 2.1mmHg$  に対して、 $\alpha 1d-KO$  マウスは  $36.6 \pm 2.4mmHg$  であり、明らかな差異を認めなかった。

### 6) 痛覚反射の解析

$\alpha 1D$ ノックアウトで膀胱の知覚が低下していたことより、痛覚刺激に対する反応をtail flick testおよびhot plate testにて評価を行った。

tail flick testは、マウスの尻尾を赤外線で熱刺激を行い、それに反応するまでの時間を見る検査で、 $\alpha 1D$ ノックアウトでは反応するまでの時間が延びていた。hot plate testは、55度のホットプレートの上に載せて前足・後ろ足を上げるまでの時間を見る検査で $\alpha 1D$ ノックアウトでは反応するまでの時間が延びていた。この結果より、 $\alpha 1D$ ノックアウトでは痛み刺激に対する反応性が低下していると考えられた。 $\alpha 1D$ サブタイプは、脊髄の前角、後角に発現していることから、脊髄に於いて知覚反射を促進させている機序が考えられており、 $\alpha 1D$ ノックアウトではその脊髄レベルで知覚・痛覚反射が低下し、同時に膀胱の知覚も低下しているものと考えられた。

#### 7) 学習記憶の解析

Y字迷路課題を用いて $\alpha 1D$ ノックアウトの作業記憶の解析を行った。その結果、ノックアウトマウスではコントロールに比べると低下がみられた。

#### 8) 摘出標本を用いた心筋 $\alpha_1$ -AR サブタイプの機能解析

方法：心臓全体としての $\alpha_1$ -ARサブタイプの機能を評価するため、摘出灌流心臓に $\alpha_1$ -AR刺激薬 phenylephrine (PE, 10 $\mu$ M)を投与し左室発生圧 (left ventricular developed pressure: LVDP) の変化を観察した。

結果：PE投与前の洞調律下での摘出灌流心臓標本のLVDP値はWT, 1B-KO, 1D-KOおよび1BD-KOでそれぞれ55.6  $\pm$  4.1, 68.1  $\pm$  4.1, 55.6  $\pm$  5.6, および66.4  $\pm$  3.3 mmHgであり、1B-KOおよび1BD-

KOのLVDPがWTと比べて有意に高かった。 $\beta$ -AR遮断薬 (timolol) 存在下、かつ心拍数を固定した灌流心臓では、PEによってLVDPは2相性の陽性変力作用を示した。この2相性のLVDP応答はWTに比べ1B, 1BD-KOでは減弱しており、また $\alpha_1$ -AR遮断薬 prazosin もしくは $\alpha_{1A}$ -AR選択的遮断薬 KMD-3213によって完全に消失した。また1D-KOではPEによる灌流圧 (coronary perfusion pressure) の上昇が有意に減弱していた。

次に右心室筋および左心房筋を用いて $\alpha_1$ -ARを介した心筋収縮力の応答性を検討した。電気刺激 (1.0 Hz, 10V) した右心室筋では、 $\alpha_1$ -AR刺激により持続的な発生張力の低下 (陰性変力作用) が認められた。このPEによる陰性変力作用は、prazosin もしくはKMD-3213により陽性変力作用へと転じた。またこの陰性変力作用はWTに比べ1B-KOでは減弱していた。

一方、電気刺激した左心房筋では、WTおよび1D-KOマウスの標本でPEにより発生張力の上昇 (陽性変力作用) が認められた。このWTおよび1D-KOで見られた陽性変力作用はprazosinにより消失したが、KMD-3213によってはほとんど影響を受けなかった。1Bおよび1BD-KOの左心房筋はPEによる $\alpha_1$ -AR刺激に対してほとんど反応しなかった。

#### 9) 虚血/再灌流障害に対する心筋 $\alpha_1$ -ARサブタイプの役割

方法： $\alpha_1$ -ARサブタイプ欠損マウスの灌流心臓に30分間の虚血、次いで60分間の再灌流を施し、心機能変化、norepinephrine

(NE) 遊離量および creatine kinase 遊離量を検討した。

結果：再灌流後の Rate pressure product (RPP) 回復率は、WT で  $42.3 \pm 8.9 \%$  であったが、1B-KO では回復率が  $18.7 \pm 5.1 \%$  と有意に低かった。再灌流直後の NE 遊離量は、1B-KO マウスで有意に増加していた。従って、1B-KO マウス心臓では、遊離量の増加した NE が  $\beta_1$ -AR を刺激してエネルギー不足の心臓の酸素消費を増大させ、虚血/再灌流障害を悪化させた可能性が考えられた。しかしながら、再灌流心臓からの creatine kinase 遊離量はいずれのマウス間で差はなかった。

本結果は、WT および 1B-KO では心筋細胞の虚血/再灌流障害がほぼ同程度であることを示唆している。虚血/再灌流障害が同程度であるにもかかわらず、1B-KO の虚血/再灌流後の心機能回復率が減弱していた詳しい機序は、本研究では明らかにできなかった。

## II) バソプレッシン受容体変異マウスの解析

### 1) 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。

### 2) V1a, V1b発現解析

作成した V1a, V1b ノックアウトでのバソプレッシン受容体の各サブタイプの発現量を RT-PCR で解析した。V1a 遺伝子の発現は、V1a ノックアウトで消失し、同様に V1b 遺伝子の発現は、V1b ノックアウトで消失し

ているのが確認できた。中枢における V1a, V1b の発現を in situ で調べた結果、V1a はマウスの大脳の視交叉上核に、V1b は海馬に強く発現しているのが明らかになった。

結合実験によるバソプレッシン受容体蛋白の解析では、V1aノックアウトの肝臓で消失し、腎臓で減少していた。

### 3) 体重増加

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の体重増加は生後4週目の測定ではコントロールマウスと差がみられなかったが、生後12週目の測定では、V1bバソプレッシン受容体のノックアウトマウスの発育の低下が観察された。

### 4) 病理組織的解析

脳下垂体、副腎、膵臓その他組織標本を作製しヘマトキシリン・エオジン染色にて解析を行ったが、異常は検出されなかった。

### 5) V1a, V1bノックアウトの血圧測定

Tail cuff による収縮期血圧、カテーテルを用いた中心動脈圧を測定した。いずれの方法でも V1aノックアウトでは血圧が低下していた。血中のカテコールアミン、バソプレッシンの測定を行ったが、濃度には差は見られなかった。しかしながら、腸管膜標本を用いたバソプレッシンに対する還流圧が、V1aノックアウトで消失していることより、V1aノックアウトではバソプレッシンに対する血管収縮反応が消失し、血管のトーンスが低下していることがV1aで血圧が低下していることの原因の一つだと考えられた。

これに対してV1aノックアウトではオスマウスにおいてコントロールに比べて血圧の上昇が観

察された。雌マウスでは差は認められなかった。

6) バソプレッシンに対する昇圧反応(末梢性および中枢性)

バソプレッシン刺激による昇圧反応はV1bノックアウトでは異常は認められなかったが、V1aノックアウトでは低下がみられた。脳室内にバソプレッシン投与した場合でもV1aノックアウトでは昇圧反応が抑制されていた。

7) フェニレフリンに対する昇圧反応(末梢性および中枢性)

ワイルドではフェニレフリン刺激により血圧は上昇し、心拍は低下した。これに対して、V1aノックアウトではフェニレフリン刺激により血圧は上昇してきたが、ワイルドに見られるような心拍の低下はみられなかった。中枢性のフェニレフリン刺激でもV1aノックアウトでは昇圧反応が低下が見られた。

8) 記憶・学習運動機能

運動機能：自発運動量センサーを用いた運動量は、暗期での運動量が増加していた。筋力、協調運動、Open-field法を用いた自発運動量は、V1a受容体ノックアウトマウスとWild typeマウスとの間に有意な差は認められなかった。

不安行動：明暗箱課題を用いた不安行動、高架式十字迷路課題を用いた不安行動、Conflict装置を用いた不安行動は、V1a受容体ノックアウトマウスとWild typeマウスとの間に有意な差は認められなかった。強制水泳試験では、不動時間の短縮傾向がみられた。感覚機能：Y字迷路を用いた自発交替行動、驚愕反応、Prepulse inhibition (PPI)において、V1a受容体ノックアウトマウスとWild

typeマウスとの間に有意な差は認められなかった。

学習・記憶機能：高架式十字迷路課題を用いた学習行動および水迷路課題においては、V1a受容体ノックアウトマウスとWild typeマウスとの間に有意な差は認められなかった。一方、8方向放射状迷路課題における空間学習は有意に障害された。

薬物投与の影響：選択的V1a受容体拮抗薬OPC-21268によって空間記憶の障害がみられた。

V1b受容体ノックアウトマウスは、wild typeマウスおよびV1a受容体ノックアウトマウスに比べ、侵害熱刺激の応答の低下が認められた。

9) HPA axisの解析

基礎状態におけるACTH、コルチコステロンおよびカテコールアミンの日内変動

野生型マウス(10匹)、V<sub>1b</sub>受容体ノックアウトマウス(7匹)の、夜間(19:00~22:30)のACTHレベルを測定した。個体ごとの値のばらつきが大きかったが、野生型マウスで、140 pg/mLであったのに対し、V<sub>1b</sub>受容体ノックアウトマウスで11 pg/mLと低値であった。昨年度に測定した、昼間のACTHレベルは、野生型マウスで、22 pg/mL、V<sub>1b</sub>受容体ノックアウトマウスで13 pg/mLであり、この結果をあわせて考えると野生型マウスでは顕著な日内変動が認められたのに対し、V<sub>1b</sub>受容体ノックアウトマウスでは日内変動が明らかでなかった。コルチコステロンおよびカテコールアミンについては、いずれのマウスでも明らかな日内変動は検出できなかった。



## 拘束ストレス負荷時の ACTH およびコルチコステロンおよびカテコラミン変動

### 試験① 拘束ストレスのホルモン変動に対する時間経過の検討

事前にハンドリング馴化した雄性マウスをチューブ(先端に通気孔を開けたプラスチック製の 50mL 遠心分離用コニカルチューブ)に入れ、拘束ストレスを与えた。拘束ストレス時間を 0.25, 0.5, 1 および 2 時間後と長くすると ACTH, コルチコステロンおよびカテコラミンの上昇が認められ、拘束ストレス 1 時間後にピークを示し、ACTH およびカテコラミンでは 2 時間で 1 時間後よりやや低値を示した。

### 試験② 拘束ストレスのホルモン変動の時間経過の検討

1 時間の拘束ストレス条件で、野生型マウスと V1b 受容体ノックアウトマウスの ACTH, コルチコステロンおよびカテコラミンの変動に関しを比較をおこなった。V1b 受容体ノックアウトマウスにおける ACTH, コルチコステロンの上昇は野生型マウスに比べ低いものであった。カテコラミンの上昇も、V1b 受容体ノックアウトマウスで野生型に比べ低値を示したが、統計的に有意差は認められなかった。

## 10) V1b 受容体ノックアウトマウスの V2 受容体機能の検討 (尿量, 尿浸透圧および電解質排泄)

### 試験① 内因性バソプレッシンによる V<sub>2</sub> 受容体の反応性の検討

代謝ケージにいれ、0~24 時間に自然排尿す

る尿を採取、雄性 V<sub>1b</sub> 受容体ノックアウトマウスおよび野生型マウスで比較したが、図 4 に示すように、0~24 時間の尿量に有意差は認められなかった。また、尿浸透圧および尿中電解質濃度 (Na, K, Cl) を定量したが、これらにも有意な差は認められなかった。

### 試験② DDAVP による V<sub>2</sub> 受容体の反応性の検討

V<sub>1b</sub> 受容体ノックアウトマウスおよび野生型マウスに水道水を体重の 5%経口的に負荷すると、投与後、0~4 時間に自然排尿する尿量が増加した。0~4 時間の尿量を、雄性 V<sub>1b</sub> 受容体ノックアウトマウスおよび野生型マウスで比較したが、図 4 に示すように、有意差は認められなかった。このとき、尿浸透圧および尿中電解質濃度 (Na, K, Cl) を定量したが、これらにも有意な差は認められなかった。

また、1~4 日の間隔をあけて、同じマウスを用い、ペプチド性 V<sub>2</sub> 受容体アゴニストである DDAVP を 100 ng/kg 皮下投与した後、上記と同様に体重の 5%の水負荷を行い、0~4 時間の尿を採取したが、図 4 に示すように、水負荷時に比べ 0~4 時間の尿量は DDAVP により減少し、その程度は V<sub>1b</sub> 受容体ノックアウトマウスおよび野生型マウスで差はなかった。

## 11) 膵臓ラ氏島インスリン分泌作用

バソプレッシンのインスリン分泌作用について調べた。膵臓ラ氏島を分離してきて、ラ氏島におけるバソプレッシン受容体各サブタイプの発現を RT-PCR で調べた。ワイルドの

ラ氏島では、V1b とオキシトシン受容体が発現していた。

次に摘出したラ氏島を用いてバソプレッシン刺激によるインスリン分泌、V1a 拮抗薬 SR49059、V1b 拮抗薬 SSR149415 の抑制作用を調べた。ワイルドでは、バソプレッシン刺激によりインスリン分泌が増えるが、この分泌刺激効果は V1a 拮抗薬 SR49059 では抑制されず、V1b 拮抗薬 SSR149415 で抑制された。

次に、ノックアウトをもちいてバソプレッシン刺激に対するインスリン分泌反応の解析を行った。ワイルド、V1aノックアウトではバソプレッシン刺激によりインスリン分泌がみられたが、V1bノックアウトではみられなかった。以上の結果より、バソプレッシンのインスリン分泌にはV1bが関与している事が明らかになった。

#### 12) 高血圧モデル

腎不全のモデルマウスは、コントロール、バソプレッシンV1a受容体ノックアウトマウスを用いて行った。

それぞれ7-9週令の雄のマウス15~20例ずつについて腎臓の垂全摘を行い、腎不全を起こすマウスの例数について解析を行った。コントロールマウスでは、15例中7例が腎不全によると思われる浮腫にて死亡した。これに対してバソプレッシンV1a受容体ノックアウトマウス20例中8例が死亡した。

急性腎不全を起こしたマウスは、ほぼ手術後1週間以内に死亡した。生存したマウスの血清クレアチニンの値はいずれのマウス群でもともに0.6~0.8mg/dlと上昇がみられたがマウス群間においては差が見られなかった。血漿中のカテ

コールアミン、アルドステロン、バソプレッシンの値には差が見られた。高血圧の発症頻度はコントロールに比べてV1a受容体ノックアウトマウスで有意に低下していた。

#### D. 考察

今回の解析により、 $\alpha 1$  アドレナリン受容体サブタイプの生理機能が明らかになった。サブタイプの生理作用を明らかにすることによりサブタイプ特異的薬物の効果及び副作用の予測が可能となり今後の薬物開発に役に立つものと考えられる。同様にバソプレッシン受容体V1aおよびV1bサブタイプの生理機能がノックアウトの解析により明かとなり、今後のゲノム創薬に役に立つものと考えられる。

#### E. 結論

今回の $\alpha 1$ ノックアウトの解析しフェノタイプを明らかにすることにより、各サブタイプ選択的な拮抗薬の効果を推定することが可能となった。例えば $\alpha 1 D$ サブタイプ選択的な拮抗薬であれば、心臓に対する収縮抑制が少なく、降圧効果を有し、高血圧の発症を予防し、起立性低血圧の発症を予防できるような治療薬となることが期待できる。このように $\alpha 1$ 受容体遺伝子改変動物の解析は、各受容体の生理機能、疾患関連性、受容体特異的薬物の効果を解明する上で非常に有用と考えられる。

また、同様にバソプレッシン受容体ノックアウトマウスの解析からも、推定される受容体特異的薬物の副作用および期待される効果について予想が可能となった。V1a 選択的拮抗

薬 SR49059 は、月経困難症・早産・レイノ一病に適応が考えられているが、長期投与・大量投与によりロックアウトで見られたような血圧の低下、圧受容体反射の障害、学習・記憶障害や、副作用として見られる可能性がある。

V1b 拮抗薬 SSR149415 は抗不安作用を示すことが動物実験で明らかになっていますが、この薬にも副作用として ACTH の分泌抑制、インスリン分泌抑制などの副作用がみられる可能性がある。

このことは、反対に V1a, V1b 選択的作動薬を用いることにより、例えば、V1a 選択的作動薬であれば血管収縮・昇圧や記憶学習の改善と言う効果が期待される。また、V1b 選択的作動薬であれば、ACTH 分泌刺激・インスリン分泌刺激効果が期待されます。以上のように遺伝子改変動物の解析により、新たな受容体の機能・薬物の効果が解明でき、ゲノム創薬への応用につながるものと考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

田上昭人

- 1 Chalothorn D, Tobita K, McCune DF, Robertson D, Perez DM, Edelmann SE, Tanoue A, Tsujimoto G, Post GR, Lasley RD, Plascik MT. Differential cardiovascular regulatory activities of the alpha 1B and alpha 1D adrenoceptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003; 305:1045-1053.
- 2 Koshimizu T, Tanoue A, Hirasawa A,

Yamauchi J and Tsujimoto G. Recent Advance of  $\alpha_1$ -Adrenoceptors Pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics* 2003; 98:235-244.

- 3 Harasawa I, Honda K, Tanoue A, Shinoura H, Okamura H, Murano N, Tsujimoto G, Higa K, Takano Y, Kamiya K. Responses to noxious stimuli in the mice lacking alpha 1D adrenergic receptors. *Neuroreport.* 2003; 14: 1857-1860.
- 4 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; 14: 107-113.
- 5 Tanoue A, Ito S, Oshikawa S, Kitagawa Y, Koshimizu T, Mori T & Tsujimoto G. The Vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions. *J. Clin Invest.* 2004; 113: 302-309.
- 6 Chu CP, Kunitake T, Kato K, Watanabe S, Qiu de L, Tanoue A, Kannan H. Related Articles, Links Abstract The alpha(1D)-adrenergic receptor modulates cardiovascular and drinking responses to central salt loading in mice. *Neurosci Lett.* 2004;

- 356: 33-36.
- 7 Egashira N, Tanoue A, Higashihara F, Mishima K, Takano Y, Tsujimoto G, Iwasaki K, Fujiwara M. V1a receptor knockout mice exhibit impairment of spatial memory in an eight-arm radial maze. *Neurosci Lett.* 2004; 356: 195-198.
- 8 Mishima K, Tanoue A, Tsuda M, Hasebe N, Egashira N, Takano Y, Kamiya H, Tsujimoto G, Iwasaki K, Fujiwara M. Characteristic of behavioral abnormalities in alpha 1D adrenoceptors deficient mice. *Behav. Brain. Res* In press. (2004)
- 9 Oshikawa S, Tanoue A, Koshimizu T, Kitagawa Y, Tsujimoto G. Vasopressin stimulates insulin release from islet cells through V1b receptors: A combined pharmacological/knockout approach. *Mol Pharmacol.* In press. (2004)

橋本敬太郎

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 nicardipine. *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>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange play an important role in reperfusion arrhythmias in rats? *Europ. J. Pharmacol.* 460: 43-50(2003)

北村唯一

なし

高野行夫

1) I. Harasawa, K. Honda, T. Tanoue, H. Shinoura, Y. Ishida, H. Okamura, N. Murao, G. Tsujimoto, K. Higa, H. Kamiya, Y. Takano.  
Responses to noxious stimuli in mice lacking α 1d-adrenergic receptors. *NeuroReport*14, 1857-1860 (2003)

- 2) K. Honda, N. Murao, T. Ibuki, H. Kamiya, Y. Takano.  
The role of spinal muscarinic acetylcholine receptors in clonidine-induced anti-nociceptive effects in rats.  
Biol. Pharm. Bul. 26,1178-1180 (2003)
- 3) A. Tanoue, S. Ito, K. Honda, S. Oshikawa, Y. Kitagawa., T. Koshimizu, T. Mori, G. Tsujimoto.  
The vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions.  
J. Clin. Invest. 113, 302-309 (2004)
- 4) N Egashira, A Tanoue, F Higashihara, K Mishima, Y Fukue, Y Takano, G Tsujimoto, K Iwasaki, M Fujiwara  
V1a receptor knockout mice exhibit impairment of spatial memory in an eight-arm radial maze.  
Neurosci Lett (2004) 356: 195-198.
- 5) K Mishima, A Tanoue, M Tsuda, N Hasebe, Y Fukue, N Egashira, Y Takano, H Kamiya, G Tsujimoto, K Iwasaki, M Fujiwara  
Characteristics of behavioral abnormalities in  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors deficient mice.  
Behav Brain Res (2004) (in press)
- 2 学会発表
- 1) Intrathecal clonidine inhibits mechanical allodynia via muscarinic M1 receptors of the spinal cord in diabetic mice.  
K. Honda, K. Koga, S. Ando, M. Koguchi, R. Saito, H. Kamiya, Y. Takano.  
The 1st Science and Research Symposium. Nagoya 2003.6
- 2) モルヒネによる抗侵害効果における脊髄内ムスカリン受容体の関与  
安藤 卓, 本多健治, 小林文人, 長岡佐知, 齋藤 亮, 高野行夫  
第77回日本薬理学会年会大阪 2004.3
- 辻本 豪三
- 1) Mishima K, Tanoue A, Tsuda M, Hasebe N, Egashira N, Takano Y, Kamiya H, Tsujimoto G, Iwasaki K, Fujiwara M. Characteristic of behavioral abnormalities in alpha 1D adrenoceptors deficient mice. Behav Brain Res. In press (2003)
- 2) Oshikawa S, Tanoue A, Koshimizu T, Kitagawa Y, & Tsujimoto G. Vasopressin stimulates insulin release from islet cells through V1b receptors: A combined pharmacological/knockout approach. Mol. Pharmacol. In press (2003)
- 3) Tanoue A, Ito S, Oshikawa S, Kitagawa Y, Koshimizu T, Mori T & Tsujimoto G. The Vasopressin V1b receptor critically

- regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions. *J. Clin Invest.* In press (2003)
- 4) 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(1): 672-8.
- 5) 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(2): 577-84.
- 6) Ogawa K, Hashida R, Miyagawa M, Kagaya S, Sugita Y, Matsumoto K, Katsunuma T, Akasawa A, Tsujimoto G, Saito H. Analysis of gene expression in peripheral blood eosinophils from patients with atopic dermatitis and in vitro cytokine-stimulated blood eosinophils. *Clin Exp Immunol.* 2003; 131(3): 436-45.
- 7) Nakamura T, Shiojima S, Hirai Y, Iwama T, Tsuruzoe N, Hirasawa A, Katsuma S, Tsujimoto G. Temporal gene expression changes during adipogenesis in human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 303(1): 306-12
- 8) Chalothorn D, McCune DF, Edelmann SE, Tobita K, Keller BB, Lasley RD, Perez DM, Tanoue A, Tsujimoto G, Post GR, Piascik MT. Differential cardiovascular regulatory activities of the alpha 1B- and alpha 1D-adrenoceptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 305(3): 1045-53.
- 9) Ishiwata H, Katsuma S, Kizaki K, Patel OV, 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.* 2003; 65(1): 9-18.
- 10) Richardson J, Chatwin H, Hirasawa A, Tsujimoto G, Evans PD. Agonist-specific coupling of a cloned human alpha(1A)-adrenoceptor to different second messenger pathways. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2003; 367(4): 333-41.
- 11) Fukuhara Y, Hirasawa A, Li XK, Kawasaki M, Fujino M, Funeshima N, Katsuma S, Shiojima S, Yamada M, Okuyama T, Suzuki S, Tsujimoto G. Gene expression profile in the regenerating rat liver after partial hepatectomy. *J Hepatol.* 2003; 38(6): 784-92.
- 12) Hashida R, Ogawa K, Miyagawa M,

- Sugita Y, Takahashi E, Nagasu T, Katsunuma T, Akasawa A, Tsujimoto G, Matsumoto K, Saito H. Analysis of gene expression in peripheral blood eosinophils from patients with atopic dermatitis by differential display. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003; 131 Suppl 1: 26-33.
- 13) Yamada M, Hirasawa A, Shiojima S, Tsujimoto G. Granzyme A mediates glucocorticoid-induced apoptosis in leukemia cells. *FASEB Journal.* 2003; 17(12): 1712-4.
- 14) Harasawa I, Honda K, Tanoue A, Shinoura H, Ishida Y, Okamura H, Murao M, Tsujimoto G, Higa K, Kamiya H, Takano Y. Responses to noxious stimuli in mice lacking  $\alpha_1$ -adrenergic receptors. *Neuro Report.* 2003; 14: 1857-1860.
- 15) Endo F, Tanaka Y, Tomoeda K, Tanoue A, Tsujimoto G, Nakamura K. Animal models reveal pathophysiologies of tyrosinemias. *Journal of Nutrition.* 2003; 133(6): 2063S-2067S.
- 16) Hashida R, Ogawa K, Miyagawa M, Sugita Y, Takahashi E, Nagasu T, Katsunuma T, Akasawa A, Tsujimoto G, Matsumoto K, Saito H. Analysis of Gene Expression in Peripheral Blood Eosinophils from Patients with Atopic Dermatitis by Differential Display. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003; 131(suppl 1): 26-33.
- 17) Fukuhara Y, Hirasawa A, Li X-K, Funeshima N, Kawasaki M, Katsuma S, Shiojima S, Yamada M, Okuyama T, Suzuki S, Tsujimoto G. Gene expression profiles in the regenerating rat liver after partial hepatectomy. *J Hepatology.* 2003; 38: 784-792.
- 18) Ogawa K, Hashida R, Miyagawa M, Kagaya S, Sugita Y, Matsumoto K, Katsunuma T, Akasawa A, Tsujimoto G, Saito H. Analysis of gene expression in peripheral blood eosinophils from patients with atopic dermatitis and in vitro cytokine-stimulated blood eosinophils. *Clin Exp Immunol.* 2003; 131: 436-445.
- 19) Richardson J, Chatwin H, Hirasawa A, Tsujimoto G, Evans PD. Agonist-specific coupling of a cloned human  $\alpha_1A$ -adrenoceptor to different second messenger pathways. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2003; 367: 333-341.
- 20) Chalothorn D, McCune DF, Edelmann SE, Tobita K, Keller BB, Lasley RD, Perez DM, Tanoue A, Tsujimoto G, Post GR, Plascik MT. Differential Cardiovascular Regulatory Activities of the  $\alpha_1B$ - and  $\alpha_1D$ -Adrenoceptor Subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 305(3): 1045-1053.
- 21) Tanoue A, Koshimizu T, Shibata K, Nasa Y, Takeo S, Tsujimoto G. Insights into  $\alpha_1$ -adrenoceptor function in health and disease from transgenic animal

- studies. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2003; 14:107-113.
- 22) 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.* 2003; 303: 306-312.
- 23) Koshimizu TA, Tanoue A, Hirasawa A, Yamauchi J, Tsujimoto G. Recent advances in alpha1-adrenoceptor pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics*. 2003; 98: 235-244.
- 24) Yoshida N, Masahide 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*. 2003; 17(6): 532-539.
- 25) 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*. 2003;65: 9-18.
- 26) 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.
- 27) 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*. 2003; 278(1): 672-678.
- 竹尾 聡
1. Yoshida H, Takahashi M, Koshimizu M, Tanonaka K, Oikawa R, Toyooka T, Takeo S. Decrease in sarcoglycans and dystrophin in failing heart following acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2003 Aug 1;59(2):419-27.
2. Tanonaka K, Toga W, Takahashi M, Kawana K, Miyamoto Y, Yoshida H, Takeo S. Hsp70 attenuates hypoxia/reoxygenation-induced activation of poly(ADP-ribose) synthetase in the nucleus of adult rat cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem*. 2003 Jun;248(1-2):149-55.
3. Sekiguchi M, Sugiyama Y, Takagi K, Takagi N, Takeo S, Tanaka O, Yamato I, Torigoe K, Nowakowski RS. Rapid appearance of pathological changes of



neurons and glia cells in the cerebellum of microsphere-embolized rats. *Brain Res.* 2003 Jul 18;978(1-2):228-32.

4. Takagi Y, Takagi N, Besshoh S, Miyake-Takagi K, Takeo S. Transient global ischemia enhances phosphorylation of the GluR1 subunit of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate receptor in the hippocampal CA1 region in rats. *Neurosci Lett.* 2003 Apr 24;341(1):33-6.

5. Tanoue A, Koshimizu T, Shibata K, Nasa Y, Takeo S, Tsujimoto G. Insights into alpha(1) adrenoceptor function in health and disease from transgenic animal studies. *Trends Endocrinol Metab.* 2003 Apr;14(3):107-13.

6. Maki T, Nasa Y, Tanonaka K, Takahashi M, Takeo S. Beneficial effects of sampatrilat, a novel vasopeptidase inhibitor, on cardiac remodeling and function of rats with chronic heart failure following left coronary artery ligation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Apr;305(1):97-105.

7. Takeo S, Miyake-Takagi K, Kikuchi K, Ando T, Ichikawa T, Omino K, Kajihara H, Takagi N, Tanonaka K. Effects of nefiracetam on cerebral adenylyl cyclase activity in rats with microsphere embolism-induced memory dysfunction. *Biol Pharm Bull.* 2003 Mar;26(3):318-22.

8. Takeo S, Niimura M, Miyake-Takagi K,

Nagakura A, Fukatsu T, Ando T, Takagi N, Tanonaka K, Hara J. A possible mechanism for improvement by a cognition-enhancer nefiracetam of spatial memory function and cAMP-mediated signal transduction system in sustained cerebral ischaemia in rats. *Br J Pharmacol.* 2003 Feb;138(4):642-54.

9. Tanonaka K, Iwai T, Motegi K, Takeo S. Effects of N-(2-mercapto-propionyl)-glycine on mitochondrial function in ischemic-reperfused heart. *Cardiovasc Res.* 2003 Feb;57(2):416-25.

10. Takeo S, Fukatsu T, Miyake-Takagi K, Takagi N, Niimura M, Nagakura A, Ando T, Tanonaka K. Persistent effects of delayed treatment with nefiracetam on the water maze task in rats with sustained cerebral ischemia. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Feb;304(2):513-23.

11. 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 Mar;109(6):765-75.

森 豊樹

Tanoue A, Ito S, Oshikawa S, Kitagawa Y, Koshimizu T, Mori T & Tsujimoto G. The Vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting co

nditions. J. Clin Invest. 2004; 113: 302-  
309.

廣田直美

なし

生垣 一郎

なし

小嶋 正三

なし

松七五三 仁

なし

H. 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