

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2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

目 次

課題番号

20030895A KH21009	リン脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	西島正弘 …… 1
896A KH21010	低酸素センサーを介する虚血性および変性性神経疾患の機序解明と新規治療薬開発	芝崎 太 …… 6
897A KH21011	細胞内情報伝達分子を標的とした抗ウイルス剤および抗癌剤の開発	松田道行 …… 19
898A KH21012	抗動脈硬化性リポ蛋白質HDLの代謝制御機構	新井洋由 …… 25
899A KH21013	ゲノム修復と細胞分裂に関連する因子の構造機能解析と応用に関する研究	葛西正孝 …… 33
900A KH21014	難治性疼痛に関与するATP受容体の機能解析と医療への応用	井上和秀 …… 39
901A KH21015	動脈硬化症進展阻止のための血管内皮細胞特異的発現EDG受容体作働薬・拮抗薬の開発	望月直樹 …… 47
902A KH21016	天然物由来シグナル伝達制御物質の探索と創薬への応用に関する研究	上原至雅 …… 51
903A KH21017	肥満/糖尿病発症予防のためのターゲット遺伝子の同定と制御法の開発	江崎 治 …… 55
904A KH21018	ゲノム情報にもとづいた移植免疫抑制にかかわる遺伝子の検索と創薬への応用に関する研究	絵野沢 伸 …… 59
905A KH21019	神経・免疫・内分泌相関による生体防御機構の解明と創薬	田平 武 …… 62
906A KH21020	レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 67
907A KH21021	感染症に関連した免疫異常の解析と新規制御物質の開発	鈴木和男 …… 74
908A KH21022	自己免疫性膵炎発症に関連するIgG 4型抗体の認識する自己抗原の検索、ならびに特異的診断システムの開発	川 茂幸 …… 84
909A KH21024	動物細胞におけるラフト等の脂質膜ドメインを介した生体機能調節機構の解析と疾病関連因子探索への応用	北川隆之 …… 89
910A KH21025	新規サイトカインの炎症性疾患における役割の解析と創薬への応用	山越 智 …… 95
911A KH21026	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	辻本豪三 …… 104
912A KH21027	細胞死をもたらすストレスシグナル伝達機構の解析および生体防御機構の解明	桃井 隆 …… 111
913A KH22071	ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発	鈴木康夫 …… 118
914A KH22072	サイトカインシグナル制御分子による慢性関節リウマチの治療薬の開発	吉村昭彦 …… 121
915A KH22073	T細胞の活性化およびヘルパーT細胞サブセットの分化を特異的に制御する手法の樹立	宮武昌一郎 …… 125
916A KH22082	変異型HB-EGFノックインマウスによる循環器疾患の解析	目加田英輔 …… 133

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 京都大学大学院 薬学研究科
研究者 辻本 豪三

研究要旨 マイクロアレイ cDNA チップを用いて疾患動物モデルにおける病態遺伝子発現の解析と既存の薬物治療により変動する発現遺伝子群の絞り込み、さらに機能ゲノム解析を行った。特に、がん、呼吸器疾患、腎疾患などで創薬標的候補遺伝子群の解析に成功した。

分担研究者

- (1) 国立成育医療センター 平澤明
- (2) 国立成育医療センター 塩島聡
- (3) 岐阜薬科大学薬学部 永井博弐
- (4) 産業医科大学医学部 柳原延章
- (5) 京都大学大学院薬学研究科 金子周司
- (6) 田辺製薬(株) 創薬研究所 有賀千浪
- (7) 東レ(株) 医薬研究所 山田将輝
- (8) 日本新薬(株) 東部創薬研究所 高垣和史
- (9) 日研化学(株) 佐野哲郎

A. 研究目的

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。過去2年間本研究によりラット並びにモルモット各種臓器標準化 cDNA マイクロアレイチップを作製できた。例えば、ラット腎臓 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。本年度は対象疾患を(1)血液がん：京大・辻本研と東レ株式会社医薬研究所、成育医療センターは白血病ステロイド治療に関し、また日本新薬は血液癌の新規抗ガン剤治療に関して、(2)喘息：京大・辻本研、岐阜大・永

井研、日研化学、成育医療センターではアレルギーを対象として、それぞれの疾患モデルを作成したチップによる解析研究を行った。更に(3)ゲノム機能解析：田辺製薬は薬物のゲノム毒科学研究、京大・金子研並びに産業医大・柳原研ではアフリカツメガエル卵母細胞発現系によるゲノム機能解析研究をそれぞれ行った。本報告書では主として cDNA マイクロアレイチップによるヒト白血病の DNA チップ解析を中心に報告する。

DNA チップによる体系的かつ網羅的な遺伝子発現解析は、疾患分子機構の解明やゲノム創薬における標的分子の抽出・同定において、その有用性が注目されている。

Dexamethasone や prednisolone などのステロイド薬

(glucocorticoid) は、抗アレルギー・抗炎症作用を有し、喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患の治療薬として頻用される一方、白血病細胞に apoptosis を誘導させる作用があり、その治療薬としても用いられている。しかし、ステロイド薬の白血病細胞に対する apoptosis 誘導における具体的な分子機構については、何らかの発現遺伝子が標的分子として関与していることは想定されているが、具体的にどのような発現遺伝子がこれに関与しているか明らかではない。そこで、ステロイド薬の白血病細胞に対する apoptosis 誘導における分子機構の解明を目的として、DNA チップを用いた遺伝子発現解析を行った。

B. 研究方法

1. 細胞培養

ヒト前B急性白血病株化細胞である 697 細胞、および 697 細胞に Bcl-2 を強発現させた株化細胞である 697-BCL2 細胞を RPMI-1640 培地 (10%FCS, 50U/ml penicillin, 0.1mg/ml streptomycin 含有) 中で 37°C、5%CO₂ 存在下でそれぞれ培養した。細胞 (5x10⁵ cells/ml) を dexamethasone (Sigma) および 3,4-dichloroisocoumarin (3,4-DCI, Sigma) を添加した培養液中で一定時間培養し、以下の実験に用いた。

2. Apoptosis 測定

細胞を一定時間培養後、細胞生存率 (cell viability) を

トリパンブルー色素排除法 (0.4%トリパンブルー/PBS) により測定した。また、DNA 断片化 (DNA fragmentation) は、細胞を proteinase K (0.1mg/ml) および RNase (50µg/ml) 処理した後、抽出した DNA をアガロースゲル電気泳動して解析した。Caspase-3 活性は、蛍光標識ペプチドである Ac-DEVD-AMC (0.1mM) を基質とした Caspase-3 fluorescent assay (BioDynamics Laboratory) を用いて測定した。Annexin V 陽性細胞数の割合は、細胞を FITC-annexin V 染色 (BD Pharmingen) し、flow cytometry (Becton Dickinson) を用いて解析した。

3. DNA チップ作製

cDNA マイクロアレイチップ作製の cDNA 調製は、ヒト Unigene cDNA の 4032 クローン (Invitrogen) より、96 穴マイクロプレート形式で大腸菌を増殖させ、プラスミド DNA を調製した。プラスミド DNA を鋳型として挿入 cDNA 断片を PCR により増幅し、これを精製・濃縮した。cDNA マイクロアレイチップの作製は、調製した cDNA を、アミノ基処理されたスライドガラス上に GMS417 Arrayer (Affimetrix) を用いてスポットした。スポットした cDNA は、ベーキング (80°C、1 時間) および UV クロスリンク (60mj) により固定化した。

4. DNA チップによる遺伝子発現解析

細胞から ISOGEN (日本ジーン) を用いて total RNA を抽出し、Oligotex dT-30 (Takara) を用いて mRNA を精製した。精製した mRNA をサンプルとして、蛍光標識 cDNA を調製した。すなわち、mRNA (2µg) から逆転写反応 (Superscript II, Invitrogen) 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 (Amersham Bioscience) を反応系に加えることにより、cDNA を蛍光標識した。蛍光標識した cDNA を Microcon-YM30 (Millipore) を用いて精製・濃縮し、DNA チップ上に滴下し、カバースリップ法を用いてハイブリダイゼーション (65°C、15 時間) させた。ハイブリダイズしなかった蛍光標識 cDNA を SDS を含む洗浄液で除去した後、DNA チップ上の蛍光シグナルを GenePix4000 (Axon) を用いてスキャンした。蛍光シグナル画像の数値化および解析は、GenePix Pro 3.0 (Axon) を用いて行った。各クローンの蛍光シグナル強度は、スキャッチャード・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。

5. RT-PCR

細胞から上記の方法により抽出した total 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 を行い、アガロースゲル電気泳動した。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。

6. Granzyme A 測定

細胞内の granzyme A 蛋白量は、ELISA 法 (Human granzyme A enzyme immunoassay, CLB) により測定した。また、granzyme のプロテアーゼ活性は、蛍光標識ペプチ

ドである Z-GPR-AMC (0.8mM, Enzyme Systems Products) を基質として測定した。

C. 研究結果

1. Dexamethasone による apoptosis 誘導

697 細胞を臨床的な濃度 (100nM) の dexamethasone を含む培養液中で一定時間培養すると、細胞生存率の低下、DNA 断片化および Caspase-3 活性の上昇がみられ、apoptosis が誘導されることが示された (図 1)。

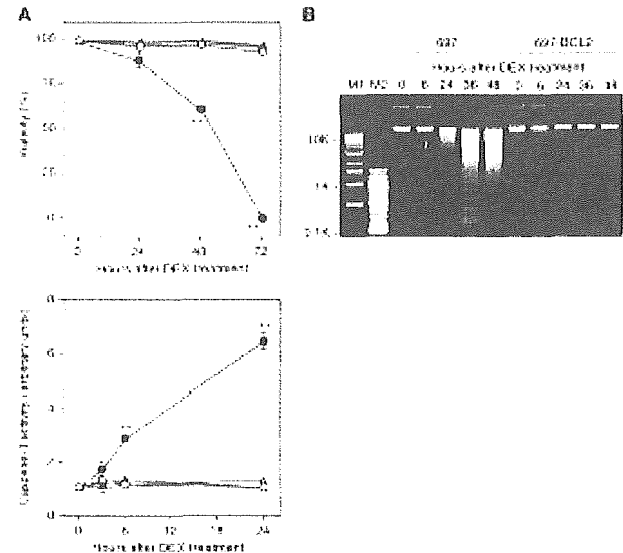


図 1. 697 細胞および 697-BCL2 細胞における dexamethasone による apoptosis 誘導。697 細胞および 697-BCL2 細胞を dexamethasone (DEX, 100 nM) を含む培養液中で一定時間培養し、apoptosis 誘導を測定した。A. 細胞生存率 (%) をトリパンブルー色素排除法で測定した。B. DNA 断片化。細胞から抽出した DNA をアガロースゲル電気泳動した。M1, 0.5-100k bp DNA ladder markers. M2, 100 bp DNA ladder markers (New England Biolabs). C. Caspase-3 活性。Cell lysate 中の caspase-3 活性を蛍光標識ペプチド Ac-DEVD-AMC を基質として測定した。Dexamethasone 非処理時の活性を 1 unit とした。○: 非処理 697 細胞、●: dexamethasone 処理 697 細胞、△: 非処理 697-BCL2 細胞、▲: dexamethasone 処理 697-BCL2 細胞。数値は平均値 ±SE を示す。**: $P < 0.01$ vs. dexamethasone 非処理。

2. Dexamethasone による遺伝子発現変化

Dexamethasone による apoptosis 誘導に関連した遺伝子発現について、DNA チップを用いて解析した。その結果、dexamethasone により発現が変化した遺伝子として、26 個の遺伝子が同定された (表 1)。発現が上昇した遺伝子は 17 個であり、granzyme A、glucocorticoid 受容体および SOCS-2 などの遺伝子が含まれていた。一方、発現が減少した遺伝子は 9 個であり、EGRI および AML1 などの遺伝子が含まれていた。このような DNA チップによる遺伝子発現の解析結果は、RT-PCR 法により確認された (図 2)。

表 1. DNA チップ解析により同定された dexamethasone により発現が変化した遺伝子

Group	Accession no.	Gene
Up-regulated:		
<i>Signal transduction</i>		
	M10901	Glucocorticoid receptor alpha (GR-alpha)
	U71321	FK506-binding protein 51 kDa (FKBP51)
	M57230	Gp130
	NM_004414	Down syndrome critical region 1 (DSCR1)
	AF037989	Suppressor of cytokine signaling-2 (SOCS-2)
<i>Growth arrest & apoptosis</i>		
	U93181	SET-binding factor 1 (SBF1)
	M13226	Granzyme A (GZMA)
	X61123	B-cell translocation gene 1 (BTG1)
	U72649	B-cell translocation gene 2 (BTG2)
	U52682	Interferon regulatory factor 4 (IRF4)
<i>Immune response</i>		
	M83664	MHC class II lymphocyte antigen DP beta
<i>Metabolism</i>		
	S70330	Renal dipeptidase (RDP)
	M94054	Lysyl oxidase (LOX)
	D10704	Choline kinase (CHK)
<i>Extra cellular matrix</i>		
	X91171	Laminin alpha-4 (LAMA4)
	M61916	Laminin beta-1 (LAMB1)
	AF274874	Keratin 5 (KRT5)
Down-regulated:		
<i>Growth arrest & apoptosis</i>		
	X52541	Early growth response 1 (EGR1)
	X79067	EGF-response factor-1 (ERF-1)
	D89789	Acute myeloid leukemia 1 (AML1)
	Z49107	Galectin-9
<i>Immune response</i>		
	NM_144646	Immunoglobulin J chain
<i>Metabolism</i>		
	X01630	Argininosuccinate synthetase (ASS)
	D17547	Tyrosinase-related protein 2 (TYRP2)
	NM_006636	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2
	M61715	Tryptophanyl-tRNA synthetase (WARS)

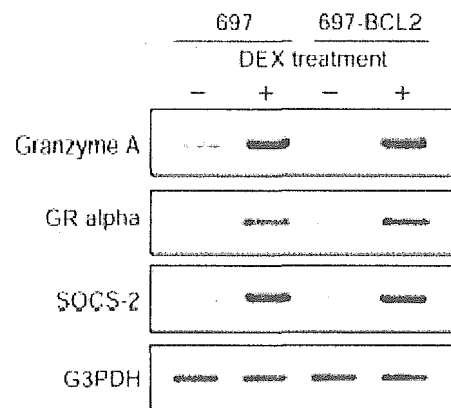


図 2. RT-PCR 法による遺伝子発現変化の解析. 697 細胞および 697-BCL2 細胞を dexamethasone (DEX, 100 nM) を含む培養液中で 24 時間培養し、細胞から total RNA を抽出、逆転写後、granzyme A、glucocorticoid 受容体 α (GR α)、SOCS-2 および G3PDH に特異的なプライマーを用いて PCR した。

3. Bcl-2 強発現細胞における dexamethasone による遺伝子発現変化

Dexamethasone による遺伝子の発現変化は、dexamethasone の作用による直接的なものか、あるいは、apoptosis 誘導の結果による 2 次的なものかを区別するため、抗 apoptosis 活性を有する Bcl-2 を強発現させた 697-BCL2 細胞を用いて検討した。697-BCL2 細胞に dexamethasone (100nM) を作用させても、細胞生存率、

DNA 断片化および Caspase-3 活性に変化はみられず、apoptosis は誘導されないことが確認された (図 1)。このような 697-BCL2 細胞において、granzyme A、glucocorticoid 受容体および SOCS-2 の遺伝子発現は、dexamethasone により 697 細胞と同様に上昇した (図 2)。したがって、dexamethasone によるこれら遺伝子の発現変化は、dexamethasone の作用による直接的なものであることが示唆された。

4. Dexamethasone による granzyme A の発現誘導

DNA チップ解析により同定された dexamethasone による発現変化遺伝子のうち、granzyme A 遺伝子の apoptosis 誘導との関連性についてさらに検討した。Granzyme A は、セリンプロテアーゼの一種であり、細胞傷害性 T 細胞やナチュラルキラー細胞などの免疫細胞が、感染細胞やがん細胞などの標的細胞に apoptosis を誘導させる際に働くエフェクター分子として知られている。しかし、白血病細胞などの非標的細胞における、dexamethasone による apoptosis 誘導においてはその役割は知られていなかった。697 細胞を dexamethasone (100nM) を含む培養液中で一定時間培養すると、granzyme A の遺伝子発現は経時的に上昇した (図 3 A、B)。また、細胞内の granzyme A の蛋白量も経時的に上昇した (図 3 C)。このような dexamethasone による granzyme A の発現上昇は、697-BCL2 細胞においてもみられた (図 3 D)。さらに、細胞内の granzyme A のプロテアーゼ活性も、dexamethasone により上昇した (図 4 A)。

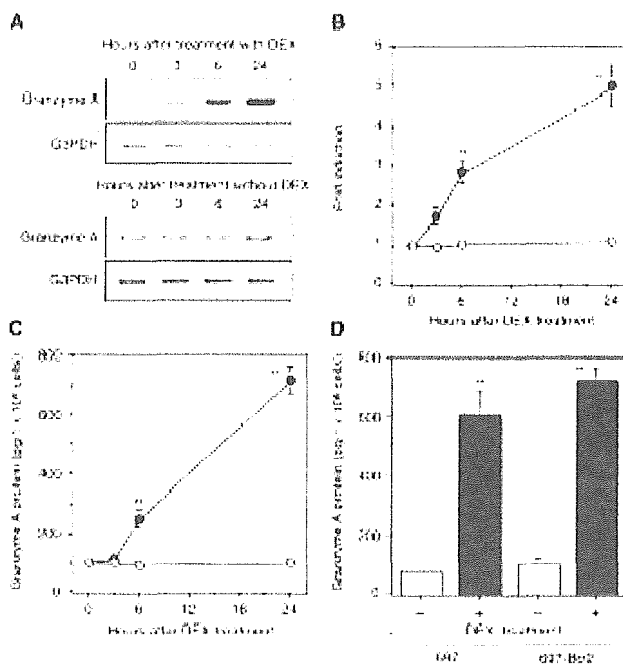


図 3. Dexamethasone による granzyme A の発現誘導. A. 697 細胞を dexamethasone (DEX, 100 nM) を含む培養液中で一定時間培養し、細胞から total RNA を抽出、逆転写した後、granzyme A および G3PDH に特異的なプライマーを用いて PCR した。B. Granzyme A mRNA の発現変化を、G3PDH mRNA で補正して示した。C. 697 細胞を dexamethasone (100 nM) を含む培養液中で一定時間培養し、cell lysate 中の granzyme A 蛋白量を ELISA で測定した。D. 697 細胞および 697-BCL2 細胞

胞を dexamethasone (100 nM) を含む培養液中で 24 時間培養し、cell lysate 中の granzyme A 蛋白量を ELISA で測定した。○: 非処理細胞、●: dexamethasone 処理細胞。数値は平均値±SE を示す。*: $P < 0.01$ vs. dexamethasone 非処理。

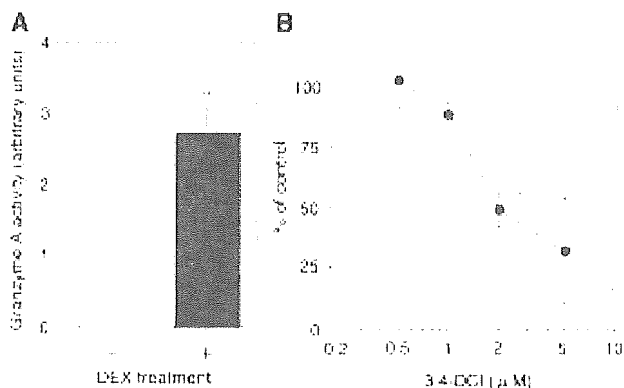


図4. Granzyme A の活性変化。697 細胞を dexamethasone (DEX, 100 nM) を含む培養液中で 24 時間培養した。A. 培養後、cell lysate 中の granzyme A のプロテアーゼ活性を蛍光標識ペプチドである Z-GPR-AMC を基質として測定した。Dexamethasone 非処理時の活性を 1 unit とした。B. 培養後、cell lysate に 3,4-DCI (0.5~5 μM) を添加し、granzyme A のプロテアーゼ活性に対する 3,4-DCI の阻害活性を Z-GPR-AMC を基質として測定した。数値は平均値±SE を示す。*: $P < 0.01$ vs. dexamethasone 非処理。

5. Dexamethasone による apoptosis 誘導に対する granzyme A 阻害の効果

Dexamethasone により発現誘導される granzyme A の、apoptosis 誘導における関与についてさらに検討した。697 細胞を dexamethasone (100 nM) を含む培養液中で 24 時間培養し、cell lysate に granzyme A 阻害剤である 3,4-DCI を添加した後、granzyme A のプロテアーゼ活性を測定した。その結果、granzyme A のプロテアーゼ活性は、3,4-DCI によって阻害されることが確認された (図 4 B)。なお、cell lysate に 3,4-DCI を添加しても、caspase-3 活性は阻害されなかった (data not shown)。そこで、このような granzyme A 阻害剤である 3,4-DCI を用いてさらに検討した。697 細胞を dexamethasone (100 nM) および 3,4-DCI (1~5 μM) を含む培養液中で 24 時間培養すると、dexamethasone による caspase-3 活性の上昇は 3,4-DCI により抑制された (図 5 A)。また、dexamethasone による annexin V 陽性細胞数の上昇も、3,4-DCI により抑制された (図 5 B)。したがって、dexamethasone による apoptosis 誘導における granzyme A の関与が示唆された。なお、dexamethasone による granzyme A、glucocorticoid 受容体および SOCS-2 の遺伝子発現の上昇は、3,4-DCI により影響を受けなかったことから、3,4-DCI は dexamethasone のシグナルそのものを阻害することは無いことが示唆された。以上より、dexamethasone により発現誘導される granzyme A の、apoptosis 誘導における寄与が明らかになった (図 6)。

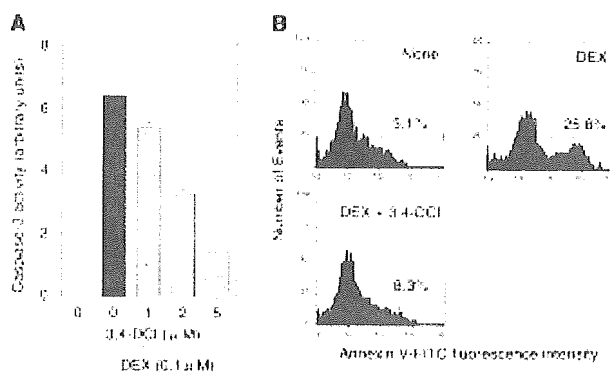


図5. Granzyme A 阻害剤の apoptosis 誘導に対する効果。A. 697 細胞を dexamethasone (DEX, 100 nM) および 3,4-DCI (1~5 μM) を含む培養液中で 24 時間培養した。Cell lysate 中の caspase-3 活性を Ac-DEVD-AMC を基質として測定した。Dexamethasone 非処理時の活性を 1 unit とした。数値は平均値±SE を示す。*: $P < 0.01$ vs. dexamethasone 非処理。B. 697 細胞を dexamethasone (100 nM) および 3,4-DCI (5 μM) を含む培養液中で 6 時間培養した。培養後、FITC-annexin V 陽性細胞数を flow cytometry で測定した。図中の数値は apoptosis 細胞数の割合 (%) を示す。

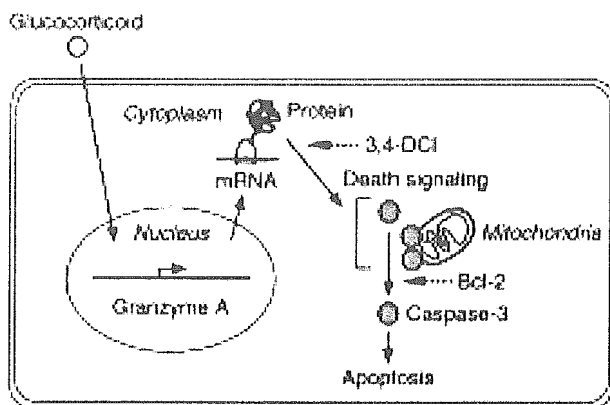


図6. Dexamethasone により発現誘導される granzyme A の apoptosis 誘導における寄与。

D. 考察

本研究で取り組んだ DNA チップによる遺伝子発現解析は、疾患の病状悪化や薬の治療効果に関与する遺伝子を見出すうえで、極めて有用な手段であると考えられた。本研究では、ステロイド薬の白血病治療に関与する遺伝子を見出すことに成功した。すなわち、ステロイド薬の白血病細胞に対する apoptosis 誘導においては、ステロイド薬の作用により発現誘導される granzyme A 遺伝子が重要な働きを担っていることが明らかにされた。疾患や治療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可能性がある。ステロイド薬は作用が強力な反面、副作用が強いことが問題となっている。本研究により見出された granzyme A を足がかりとする、副作用の無い優れた医薬品の開発が期待される。

E. 結論

ステロイド薬の白血病細胞に対する apoptosis 誘導の分

子機構について、DNA チップを用いて解析した。その結果、*granzyme* の遺伝子発現が関与していることが見出された。副作用のない優れた治療薬の開発につながる可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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: 672-678, 2003.

2) 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.

3) 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.

4) Yoshida N, Masahide Sugiyama M, Tanoue A, Hirasawa A, Tsujimoto G.

Determination of a novel haplotype of β 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: 532-539, 2003.

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

Recent advances in alpha 1-adrenoceptor pharmacology. Pharmacol. Ther. 98: 235-244, 2003.

6) 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.

7) 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. 14: 107-113, 2003.

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. 305: 1045-1053, 2003.

9) 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. 367: 333-341, 2003.

10) 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. 131: 436-445, 2003.

11) 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. 38: 784-792, 2003.

12) Yamada M, Hirasawa A, Shiojima S, Tsujimoto G.

Granzyme A mediates glucocorticoid-induced apoptosis in leukemia cells.

FASEB. Journal. 17: 1712-1714, 2003.

13) Hasida R, Ogawa K, Miyagawa M, Sugita Y, Takahashi E,

- Nagatu T, Katunuma 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.* 131: 26-33, 2003.
- 14) Endo F, Tanaka Y, Tomoeda K, Tanoue A, Tsujimoto G, Nakamura K.
Animal models reveal pathophysiologies of tyrosinemias. *J. Nutr.* 133: 2063-2067, 2003.
- 15) Harasawa I, Honda K, Tanoue A, Shinoura H, Ishida Y, Okamura H, Muraio M, Tsujimoto G, Higa K, Kamiya H, Takano Y.
Responses To Noxious Stimuli in Mice Lacking $\alpha 1d$ -Adrenergic Receptors. *Neuro Report.* 14: 1857-1860, 2003.
- 16) Nagata N, Oshida T, Yoshida NL, Yuyama N, Sugita Y, Tsujimoto G, Katsunuma T, Akasawa A, Saito H.
Analysis of highly expressed genes in monocytes from atopic dermatitis patients. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 132: 156-167, 2003.
- 17) Oshikawa S, Tanoue A, Koshimizu T-A, Kitagawa Y, Tsujimoto G.
Vasopressin stimulates insulin release from islet cells through V1b receptors: A combined pharmacological/knockout approach. *Mol. Pharmacol.* 65: 623-629, 2004.
- 18) Tanoue A, Ito S, Honda K, 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.* 113: 302-309, 2004.
- 19) Herath CB, Shiojima S, Ishiwata H, Katsuma S, Kadowaki T, Ushizawa K, Imai K, Takahashi T, Hirasawa A, Tsujimoto G, Hashizume K.
Pregnancy-associated changes in genome-wide gene expression profiles in the liver of cow throughout pregnancy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313: 666-680, 2004.
- 20) Yaguma K, Matsumoto O, Guan le L, Kawano Y, Kamiya N, Tsujimoto G, Sugiura Y.
Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of DNA decamer d (CCAGGCCTGG) complexed with cobalt (III)-peplomycin. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60: 144-145, 2004.
- 21) Horiuchi M, Tsutsui M, Tasaki H, Morishita T, Suda O, Nakata S, Nihei S, Miyamoto M, Kouzuma R, Okazaki M, Yanagihara N, Adachi T and Nakashima Y,
Upregulation of vascular extracellular superoxide dismutase in patients with acute coronary syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(1): 106-111, 2004.
- 22) Kawada Y, Ueno S, Asayama K, Tsutsui M, Utsunomiya K, Toyohira Y, Morisada N, Tanaka K, Shirahata A and Yanagihara N,
Stimulation of catecholamine synthesis by orexin-A in bovine adrenal medullary cells through orexin receptor 1. *Biochem Pharmacol* 66(1): 141-147, 2003.
- 23) Toyohira Y, Utsunomiya K, Ueno S, Minami K, Uezono Y, Yoshimura R, Tsutsui M, Izumi F and Yanagihara N,
Inhibition of the norepinephrine transporter function in cultured bovine adrenal medullary cells by bisphenol A. *Biochem Pharmacol* 65(12): 2049-2054, 2003.
- 24) Nagata T, Harayama N, Sasaki N, Inoue M, Tanaka K, Toyohira Y, Uezono Y, Maruyama T, Yanagihara N, Ueta Y and Shibuya I,
Mechanisms of cytosolic Ca^{2+} suppression by prostaglandin E2 receptors in rat melanotrophs. *J Neuroendocrinol* 15(1): 33-41, 2003.
- 25) Yanagihara N, Toyohira Y, Tanaka K, Ueno S and Tsutsui M,
Disturbances in catecholamine synthesis, release and reuptake by xenoestrogens. *J. UOEH* 25: 169-179, 2003
- 26) 柳原延章, 豊平由美子, 上野 晋, 筒井正人,
内分泌攪乱物質のカテコールアミン動態への影響
脳の科学 25: 1149-1154, 2003

27) 山本繁樹, 藤本裕司, 安田幸一郎, 柳原延章, 森田恵美子, 森本勲夫,
慢性甲状腺炎と関節リウマチを合併したインスリン自己免疫症候群の1例
糖尿病 46: 813-818, 2003

2. 学会発表

1) 辻本豪三

ゲノム創薬プラットフォームの新トレンド
第2回国際バイオEXPO、東京、5月16日、2003

2) 辻本豪三

ゲノム機能科学の創薬研究応用
第67回日本生化学会中部支部例会、津、5月24日、2003

3) 辻本豪三

薬理ゲノミクスからゲノム医療の展開
第42回日本ME学会、札幌、6月3日、2003.

4) 辻本豪三

ゲノム創薬からゲノム医療の展開
第19回日本DDS学会、京都、6月19日、2003

5) 辻本豪三

DNAチップのゲノム創薬研究への応用
第76回日本生化学会大会、横浜、10月15日～18日、2003

6) 川上聖子, 高田悠記, 久米利明, 赤池昭紀, 金子周司

ラット胎仔由来大脳皮質初代培養ニューロンにおける
TRPM2の役割に関する研究
第77回日本薬理学会年会、大阪、3月8日、2004

7) 辻本豪三

ゲノムインフォマティクスに基づく創薬
第77回日本薬理学会年会、大阪、3月9日、2004

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

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2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

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