

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17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

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第1分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 …… 13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 …… 17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 25

第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 …… 66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析;癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 …… 113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 …… 117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 …… 120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 ……	124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 ……	129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 ……	134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 ……	142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 ……	148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 ……	152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 ……	156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 ……	160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 ……	167
 第3分野			
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 ……	175
KH31025	生薬及び漢方処方of科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 ……	185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤 由起子 ……	194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 ……	200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 ……	210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 ……	218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 ……	226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 ……	235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 ……	243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 ……	252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 ……	257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ ……	261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

バイオフィotonicsを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発

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 細胞機能解析用のバイオフィotonicsプローブを開発・利用し、疾患に伴って生じる細胞組織障害を簡便かつ定量的に解析する方法の開発研究を行った；(1) 小胞体ストレスによる細胞組織障害を解析し、小胞体ストレス関連のカスパーゼの活性化を解析するための新規プローブ作製を開始した；(2) ケージド化合物により細胞集団の中の一部の細胞の任意のタンパク質機能を調節することに成功した；(3) 脳底動脈の血管径と細胞内カルシウム濃度変化の同時測定系を構築した；(4-1) ペースメーカー細胞の再構築により K⁺チャンネル関連細胞機能障害解析細胞系を開発した；(4-2) 心筋細胞膜およびミトコンドリアの各種 K⁺チャンネルに対する作用を検出する系を構築し解析を行った；(5) 薬剤性肝障害を蛍光プローブで検出可能であることを示した；(6) タンパク質生産用アポトーシス耐性株の作成に成功した。

分担研究者

- (1) 田辺製薬株式会社 藤村久子
- (2) 三菱ウェルファーマ株式会社 小林 薫
- (3) 東邦大学理学部 古田寿昭
- (4) 昭和大学薬学部 大幡久之
- (5) 名古屋市立大学薬学部 今泉祐治
- (6) 東邦大学薬学部 重信弘毅

1. 研究目的

治療用医薬品の多くは疾病に伴う細胞組織障害からの防御、あるいは細胞組織障害からの回復を促す作用によって効果を現す。したがって疾病による細胞組織障害の解析技術は疾病治療用医薬品の創薬において、最も重要な基盤技術の一つといえる。しかしながら細胞組織障害を細胞機能の障害（異常）という面から客観的に定量性をもって解析する手法は十分にはない。

近年、細胞機能に係る生体内パラメーターに対する感受性蛍光プローブ（バイオフィotonicsプローブ）を用いて、その変動を測定する手法が開発され、生物学・医学領域の研究に広く用いられている。この方法は、様々な細胞機能に関係するパラメーターを光の色あるいは強さに変換し、光計測によって解析するという手法である。使用するバイオフィotonicsプローブは通常生体内の多種多様な共存物の中で機能しなければならぬため、高い特異性が要求される。したがってプローブ開発にあたっては生体

反応の特異性を巧みに利用した分子設計が必要であり、生体内での使用方法を確立させるまでには十分な検討が必要である。しかし、光という共通の物理的シグナルの計測によって種々の細胞機能の測定が可能であるため、光計測機器（分光器、蛍光光度計、顕微鏡測光、顕微鏡画像解析、プレートリーダー等）を用いた解析系を一度確立することができれば、ルーチン試験にも応用可能な簡便な細胞組織障害の客観的、定量的解析系となる。この特徴は、とりわけバイオゲノム時代の創薬においては、様々な局面で活用可能な特性である。

そこで、本研究では、細胞機能解析用のバイオフィotonicsプローブを開発・利用することにより、疾患に伴って生じる細胞組織障害を簡便かつ定量的に解析する方法を確立し、創薬シーズ探索のためのハイスループットスクリーニング、医薬品候補化合物のセレクション、医薬品候補化合物の安全性評価、タンパク質性医薬品の品質（生物活性）評価等への応用を図る。

2. 研究方法

(1) Death receptor 関連細胞内情報伝達系解析用プローブの開発

HeLa 細胞や C2C12 細胞に、Effectene (Qiagen) もしくは Lipofectamin2000 (Invitrogen) を用いて初年度報告したイニシエーター・エフェクターカスパーゼ活性検出用プローブ発現用プラスミドを

遺伝子導入した。遺伝子導入後 2-3 日に TNF- α もしくは小胞体ストレス誘起物質（ツニカマイシン、タブシガルギン、MG132）により細胞を処理し、各種測定を行なった。

共焦点レーザー顕微鏡によるリアルタイムイメージングは初年度報告した方法を用いて行った。

(2) ケージド化合物を用いた、タンパク質および遺伝子の機能を光制御する方法の開発

光応答性機能性分子であるケージド化合物を活用することにより、低分子量情報分子から、タンパク質の機能までを、高い時空間分解能で光制御する手法を確立し、治療標的分子の機能評価へと展開することを目指し、以下の3つの項目について実験を行った。1) 局所活性化を可能にするケージド化合物の最適化（2光子励起に最適な phototrigger の評価指針の確立および設計・合成）、2) タンパク質の機能発現を光制御する方法の開発（活性化因子の時空間動態とそれによる細胞内応答の同時観察）、3) 局所刺激による特異的な細胞応答の解析（局所刺激と細胞機能の関連を明らかにする方法の確立）。

(3) 二光子励起観察による細胞組織障害測定法の構築

脳底動脈、腸間膜動脈をマウスより摘出した。カバーガラスに、3 μ L CELL-TAK (0.92 mg/mL) を塗布し風乾させた後、摘出した脳底動脈を貼付けた。血管組織を 10 μ M fura red/AM 溶液で浸し、遮光した。30 分後、KHH 溶液で 4~5 回洗浄し、続けて 10 μ M fluo-4/AM 溶液を 30 分間遮光しながら負荷した。KHH 溶液で 4~5 回洗浄し、このカバーガラスを測定用チャンバーに SH111 コンパウンドを用いて装着し、KHH 溶液を満たした。共焦点レーザー顕微鏡 (RTS2000MP システム, Bio Rad) を用いて、fluo-4/AM (Ex:488 nm, Em:503-553 nm) と fura red/AM (Ex:488 nm, Em:580-700 nm) による蛍光画像を 2 チャンネル用いて取得した。

[Ca²⁺]_i 変化の解析は、画面全体の fura red/AM と fluo-4/AM 各々の平均蛍光強度を数値化し、各々のバックグラウンドを差し引いた後、fluo-4/fura red の比を求めた。適用前の蛍光強度比を 100%とした時の蛍光強度の変化率を [Ca²⁺]_i 変化の指標とした。一方、収縮応答の解析は、一定以上の蛍光強度を示す血管の断面積から平均血管径を求め、収縮率を算出した。適用前の平均血管径を 100%とした時の血管径変化率を収縮率とした。

(4-1) K⁺チャンネル関連細胞機能障害解析細胞系等の開発-1

HEK 細胞と小コンダクタンス Ca²⁺活性化 K⁺ (SK2) チャンネルを定常的に発現させた HEK 細胞に、RyR3 遺伝子をリン酸カルシウム共沈法によって一過性に遺伝子導入し、RyR3 単独発現細胞 (RyR3-HEK) 及び SK2 チャンネルと RyR3 共発現細胞 (SK2/RyR3-HEK) を作製した。[Ca²⁺]_i の蛍光指示薬として、10 μ M fura-2/AM を HEK 細胞に負荷した。[Ca²⁺]_i の測定には、蛍光画像解析システム ARGUS/HiSCA (浜松ホトニクス) を用いた。細胞内の生理的状态を保持するために、ナイスタチン穿孔パッチクランプ法を用いた。膜電位の記録は、膜電流固定法によって行った。実験は、室温 (24 \pm 1 $^{\circ}$ C) で行った。

(4-2) K⁺チャンネル関連細胞機能障害解析細胞系等の開発-2

心筋細胞はモルモットおよびマウスの心臓よりランゲンドルフ灌流法により単離した。単離心室筋細胞の膜電位のパッチクランプ法による測定、および摘出心筋組織標本の収縮力活動電位測定は常法によって測定した。また、モルモット心筋細胞のミトコンドリアに tetramethyl rhodamine ethylester (TMRE) を load し、落射蛍光顕微鏡法により 488nm で励起した蛍光強度をミトコンドリアの膜電位の指標とした。ミトコンドリアの電子伝達系の指標として flavoprotein の酸化還元状態を反映した自家蛍光を計測した。

冠動脈灌流モルモット右心室筋標本の虚血再灌流モデルとしては麻酔下のモルモットに対し、大動脈内に逆行性にカニューレを挿入して染溶液を流入させ、冠状動脈灌流の開始と同時に体から心臓を切り離した。左右の心房と左心室及び中隔を取り除き右心室のみにして、収縮力、活動電位の測定及び心筋組織内 ATP 定量に用いた。標本の安定後、灌流液を停止させ organ bath 内の染溶液を通気するガスを 95%O₂-5%CO₂ から 95%N₂-5%CO₂ に切り替えることにより標本を虚血状態とし 30 分後、ガスを元に戻して再灌流を開始した。

(5) ラット初代培養肝細胞における in vitro 肝毒性検出系の開発

ラット肝細胞をコラゲナーゼ灌流法で単離し、コラーゲンコートプラスチックディッシュに播種した。単離後2時間培養して接着させた肝細胞に被験物質を20時間暴露し、細胞内総GSH (tGSH) ならびに還元型GSH (rGSH) 含量を、それぞれ Total Glutathione Quantification Kit (Dojindo Molecular Technologies, Inc), 蛍光プローブ ThioGlo™ 1により測定した。培養上清中のLDH量測

定によって細胞生存率を算出した。

脂肪沈着の有無と程度は蛍光顕微鏡による細胞質内の蛍光小体の観察と、fluorometry (SpectraMax M2, Molecular Devices)による蛍光強度の上昇で評価した。また、酸化ストレス関連遺伝子、脂質代謝関連遺伝子の変動をTaqMan RT-PCRにより解析した。

(6) バイオフォトリクスプローブを用いたタンパク質生産用細胞基材のモニタリング法の開発

CHO-K1 PFM (CHO-K1 を無血清浮遊培養に馴化した細胞) を $0.1\sim 0.5\times 10^6$ cells/mL の密度で、増殖培地 (EX-CELL 302 GS MODIFIED w/o L-Glutamine に L-Glutamine を 4 mmol/L となるように添加した培地) に播種し、アポトーシス誘導試薬 (ツニカマイシンまたは過酸化水素) を添加して 37°C で 3-4 日間、125 rpm の振とう培養を行った。細胞の生存率が低下した場合、アポトーシス誘導試薬の濃度を下げて継代し、生存率を回復させてから改めて試薬の濃度を上昇させた。細胞の生存率はエリスロシン B 染色法を用いて計測した。また、Caspase TagTM Pan-Caspase In Situ Assay Kit を使用して、蛍光色素でラベルしたカスパーゼインヒビター (FAM-VAD-FMK, 励起 400nm, 蛍光 520nm 緑色) で活性型のカスパーゼの発現を確認し、Propidium Iodide (励起 490nm, 蛍光 637nm 赤色) で死細胞を確認した。染色したサンプルを蛍光顕微鏡 (IX71, OLYMPUS) を用いて撮影した。

(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) Death receptor 関連細胞内情報伝達系解析用プローブによるアポトーシスの測定

近年、小胞体における異常タンパク質の蓄積がアポトーシスを引き起こすことが明らかになっており、アルツハイマー病やパーキンソン病などの疾患との関連が注目されている。小胞体ストレスによる細胞障害の測定に、昨年度確立した検出系を適用した。

HeLa 細胞を各種小胞体ストレス誘発物質で処理し、導入したカスパーゼ検出用プローブが切断されることを確認後、タブシガルギン (20 μ M) 処理時のカスパーゼの活性化のイメージングを行

った (図 1)。多くの細胞はエフェクターカスパーゼが活性化されると 4-8 分後に細胞萎縮が観察されたが、ミトコンドリア膜電位の低下との相関は見られず、TNF- α による細胞死誘導とよく似た結果であった。しかし一方で、細胞死を起こした細胞の 3 割程度においてはエフェクターカスパーゼの活性化を経ない細胞萎縮も観察された。本現象は TNF- α による細胞死誘導時には観察されておらず、小胞体ストレスによる細胞死では TNF- α 処理による細胞死と比べエフェクターカスパーゼの活性化を経ない経路が重要な役割を担う可能性が示唆された。さらに、ダブル FRET 法により、タブシガルギン処理した細胞内でのイニシエーターおよびエフェクターカスパーゼの活性化を同時検出した。YRic の蛍光強度比の低下が認められず、CRec の蛍光強度比が低下する細胞が観察されており、単一の細胞においてどのような反応経路を経て細胞死に至るかを解析できる手法として有効であると考えられる。

また、小胞体ストレスによる細胞組織障害時特異的に働くことが示唆されているカスパーゼ 12 の活性検出プローブの開発を行った。ECFP と EYFP の間にカスパーゼ 12 の活性化により切断されると考えられるペプチド (ATAD, NKGIATADTDEE, TKAHVETDFIAF, LDLDSEPD, LDSD, SEPD, PEPD) を導入し、マウスの筋芽細胞株 C2C12 に発現させた。TNF- α とツニカマイシンによる処理を行い、プローブの切断の検討を行った結果、TKAHVETDFIAF, LDLDSEPD, SEPD がツニカマイシンにより切断されると共に、カスパーゼ 12 の活性化を引き起こさないと考えられている TNF- α 処理においても切断が確認された。しかし、小胞体ストレスにより活性化される他のカスパーゼ (3, 9) により切断されなければカスパーゼ 12 の活性化解析に適用できる可能性があり、現在切断特異性等の詳細な検討を継続して行っている。

(2) ケージド化合物を用いた、タンパク質および遺伝子の機能を光制御する方法の開発

光照射そのものによる細胞への影響を最小限に抑えるためには光反応効率の高い光分解性保護基を用いる必要がある。さらに、高い 3 次元の空間分解能で局所活性化を実現するためには、2 光子励起の適用が望ましい。まず、光分解性保護基として、(6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl)methyl 基 (Bhc 基)、nitroveratryloxycarbonyl 基 (NVOC 基)、4-methyl-7-nitroindolyl 基 (MNI 基) をグリニンに

導入して、3種類のケージドグリシンを合成した。紫外光照射による1光子励起反応条件下では、Bhcmoc-Glyの光反応効率が最も高く、350 nm 光照射時の光反応の量子収率(Φ)は0.074、そのときの反応効率 $\Phi\epsilon$ は982であり、光反応効率は、他のケージド化合物よりも約10倍高かった。

次に、Ti-サファイアレーザーを用いて2光子励起条件下での反応効率を比較した。光反応効率として、2光子励起の吸収断面積(δ)と光反応の量子収率(Φ)の積をuncaging action cross-section(δ_0)と定義した。フルオレセインを規準物質とし、これに対する相対値としてケージドグリシンの δ_0 値を求めた。720 nm 光照射における δ_0 はBhcmoc-Glyで1.11 GMであり、MNI-Glyと比較すると約7倍、NVOC-Glyと比較すると約100倍効率が低いことを明らかにした。

また、タンパク質の機能発現を光制御する方法の開発を試みた。プロテインキナーゼC(PKC)は、増殖や分化など、さまざまなシグナル伝達に関わっており、刺激時に細胞膜等の特定の部位へのトランスロケーションが起こる。しかしその制御機構や活性化の仕組みは明らかでなく、PKCのトランスロケーションを光制御できれば、機構解明の有用なツールになると考えられる。そこで、rat ϵ PKCのトランスロケーションを阻害するインヒビターペプチド(EAVSLKPT)のLys側鎖に、Bhc基の誘導体であるBmcmoc基を導入したケージド化合物EAVSLK(Bmcmoc)PTを合成した。 ϵ PKC-DsRed融合タンパク質を一過的に発現させたCHO-K1細胞をホルポールエステル刺激した結果、光照射しないケージドペプチド存在下では、 ϵ PKCの細胞膜へのトランスロケーションは阻害されなかったのに対し、光照射後のケージドペプチドを細胞内に導入すると、インヒビターペプチドを導入したときと同様の阻害効果が観測された。さらに、ケージドペプチドを導入し、一部の細胞に405 nmのレーザー光を照射後、ホルポールエステル(PMA)刺激を行ったところ、光照射した細胞のみで、 ϵ PKCのトランスロケーションが有意に阻害されていた(図2)。

(3) 二光子励起観察による細胞組織障害の解析

平成16年度に、摘出したマウス大動脈や腎動脈のカルシウム応答と収縮反応性を流れ刺激下で共焦点レーザー走査顕微鏡や二光子レーザー走査顕微鏡を用いて評価する方法を確立した。平成17年

度は、このイメージング技術を用いてより細かい血管であるマウス脳底動脈や腸間膜動脈の機能や障害性を評価する方法を確立することを試みた。

マウス脳底動脈(直径:100~150 μ m, 長さ:約5 mm)を共焦点レーザー顕微鏡のステージに血管の長軸方向がx-y方向になるように設置し、z軸方向に100 μ mを1 mm間隔で断層画像を取得し、x-z画像を再構築した。50 mM KCl適用により生じる Ca^{2+} 応答と収縮反応の典型例を示した(図3)。 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は収縮より数秒先行して起こり、10秒以内に急激に上昇してピークに達した後、なだらかに下降し、静止レベルより25%高い位置で一定になったのに対し、収縮は $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に比べ穏やかに生じ、30秒後にはほぼ最大に達した。収縮率は適用前の血管径を100%として約20%であった。適用から2分間連続的に測定したが、ピーク時とほぼ同程度のレベルで持続した。また、マウス脳底動脈のKCl適用による反応性には、2~13%の間で用量依存性が認められた。KClの濃度が高濃度になる程、 $[Ca^{2+}]_i$ は迅速に上昇し、ピーク後の下降も速い反応であった。一方、収縮反応は最大収縮を持続的に維持し、収縮の上昇率と $[Ca^{2+}]_i$ のピークレベルとの相関は、Spearmanにより順位相関係数0.97と高い相関性を示した。

また、張力測定が可能なマウス腸間膜動脈第二分枝のKCl適用による収縮反応をイメージング法と張力測定法で比較検討した。その結果、KCl用量依存性についてほぼ一致する結果が得られた。さらに、脳底動脈と腸間膜動脈の収縮及び Ca^{2+} 応答の比較を行ったところ、20 mM KCl適用による収縮反応で、脳底動脈は腸間膜動脈有意に反応性が高かった。同様に、 Ca^{2+} 応答も、腸間膜動脈に比べて、脳底動脈の反応性が有意に高かった。

(4-1) K^+ チャンネル関連細胞機能障害解析細胞系等の開発-1

本研究は細胞内 Ca^{2+} 濃度変化と細胞機能の関連を仲介する K^+ チャンネルの役割と病態でのその役割の変化を光学的に解析するモデル細胞系と解析手法の確立を行なうことを目的としている。昨年度はリアノジン受容体遺伝子をHEK293細胞に導入し、細胞障害によるペースメーカー機能障害を画像解析によって解析する系を作製した。本年度はさらに Ca^{2+} 活性化 K^+ チャンネルを共発現させることにより上記発現系ペースメーカーモデルを進化させ、 Ca^{2+} 振動を細胞間の信号伝播が可能なペースメーカー電位へと変換するモデルの構築を試みた。

RyR3-HEKにSK2チャンネルを共発現させた

SK2/RyR3-HEK 細胞で観察された Ca^{2+} オシレーションは、静止時の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) が RyR3-HEK 細胞に比べて有意に増加していた。 Ca^{2+} オシレーションの頻度やピーク時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、そして $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化量は、SK2 チャンネルによる影響を受けなかった。次に、SK2/RyR3-HEK 細胞において、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と膜電位の同時測定を行ったところ、周期的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変動と同期した過分極が観察された。これより、RyR3 と Ca^{2+} 感受性を有する SK2 チャンネルが細胞内 Ca^{2+} を介して機能連関し、 Ca^{2+} シグナルが電気信号に変換されたと考えられる。また、SK2/RyR3-HEK 細胞群において、隣接する 2 細胞の細胞内 Ca^{2+} 動態を観察したところ、 Ca^{2+} オシレーションが同期している例が多数観察された。SK チャンネルの阻害薬である 100 nM アパミンの投与によって同期が消失したことより、 Ca^{2+} オシレーションが SK2 チャンネルの活性化によって電気信号に変換され、その電気信号が伝播した隣接細胞において Ca^{2+} オシレーションをトリガーするため、同期が起きていると推測される。また、この同期は細胞間の電氣的連絡を担うギャップジャンクションの阻害薬である 30 μM 18 β -グリチルリチン酸や 1 mM ヘプタノールによって阻害されたことから、電気信号はギャップジャンクションを介して伝播すると考えられる。

(4-2) K^+ チャンネル関連細胞機能障害解析細胞系等の開発-2

心筋ミトコンドリア機能の制御について蛍光プローブを用いて検討し、心筋虚血再灌流傷害の薬物による軽減との関連を解析する系を作製した。即ち心筋ミトコンドリアに TMRE を load し、モルモット心筋細胞の蛍光強度を測定したところ、疑似虚血細胞外液にさらすことにより減少した。この反応は $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構阻害薬やクロライドチャンネル阻害薬など K^+ チャンネル以外の作用点を有する薬物によって抑制された。モルモット心筋細胞のミトコンドリアの flavoprotein の自家蛍光は diazoxide により増大し、この現象は 5-hydroxydecanoate で抑制された。Glibenclamide は自家蛍光を増大させたが、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構阻害薬やクロライドチャンネル阻害薬にはそのような作用は認められなかった。

(5) ハイコンテンツスクリーニングシステムを用いた毒性プロファイリング・スクリーニング系の開発

医薬品に起因する毒性で最も重篤なものの一つとして、薬剤性肝障害があげられ、創薬の早期に

において肝毒性誘発性の有無を明らかにすることは、安全性の高い化合物を開発する上で重要である。薬剤性肝障害の要因の一つとして、フリーラジカル代謝物が酸化ストレス（脂質過酸化）による細胞膜傷害を起こし毒性を発現するとされている。

今年度の研究では昨年度に引き続き蛍光標識プローブを用いたラット初代培養肝細胞における酸化ストレス検出法を検討するとともに、薬剤性肝障害における病理学的変化の一つである脂肪蓄積の *in vitro* 検出系について検討をおこなった。

陽性対照化合物 (Cyclosporine A (CsA), Diethyl maleate (DEM), Acetaminophen (APAP), Clozapine (CZP), Troglitazone (TGZ)) を暴露した細胞において、細胞内 rGSH の減少が認められ、これは total GSH の変動と相関していた。また、酸化ストレス応答系の転写因子である Nrf2 とその応答遺伝子である NQO1, HO-1, GCLM, TXNR1, GST Ya などの発現が上昇し、活性酸素種の除去やグルタチオン合成の経路が活性化されていることが示唆された。

脂肪蓄積検出のための各種蛍光プローブおよび被験物質の暴露タイミングの検討を行い、前培養 48 時間後に蛍光標識脂肪酸である BODIPY500/510 存在下で各被験物質を肝細胞に 24 時間暴露することとした。被験物質としては陽性対照化合物 CsA, Tamoxifen (TMX), Clofibrate (CFR), Tetracycline (TC), Carbon tetrachloride (CT) を用いた。いずれの被験物質暴露でも細胞質内の蛍光小体が観察され (図 4), well の蛍光強度は TMX を除いて溶媒対照 well の 1.2-3.1 倍に上昇していた。また、肝細胞における脂質代謝・合成に関連する 7 遺伝子の発現変動を測定したところ全般に発現低下傾向が認められ、特に脂肪酸合成酵素 Fasn の顕著な発現低下がすべての被験物質暴露により認められた。

(6) バイオフィトニクスプローブを用いたタンパク質生産用細胞基材のモニタリング法の開発

バイオフィトニクスプローブを利用してタンパク質生産用細胞の細胞状態のモニタリング法の開発をめざすにあたって、まず、タンパク質生産に有効なアポトーシス耐性株の確立をめざした。まずアポトーシス誘導試薬 (ツニカマイシン、過酸化水素) を添加した培地に細胞を馴化した。播種密度が 0.3×10^6 cells/mL を下回らない条件で $0.1 \mu\text{g/mL}$ ツニカマイシン含有培地中の比増殖速度が $0.025/\text{h}$ の細胞を得て、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ ツニカマイシン馴化細胞 (以下、PFMT01) とし、凍結保存した。また、 3 mmol/L 過酸化水素で $0.024/\text{h}$ 以上で増殖

するようになった細胞を 3 mmol/L 過酸化水素馴化細胞 (以下, PFMH30) とし, 凍結保存した. PFMT01, PFMH30, 非馴化の CHO-K1 PFM 細胞の 3 種類の細胞をそれぞれアポトーシス誘導試薬無添加の培地で 3-4 継代した後, 細胞の生存率と活性型カスパーゼ発現を指標としてアポトーシス誘導試薬に対する耐性確認実験を行った. ツニカマイシンを 0.2 μ g/mL 添加した場合, 非馴化 CHO-K1 PFM 細胞, PFMH30 は生存率低下と活性型カスパーゼの発現が確認されたが, PFMT01 は高い生存率を維持し活性型カスパーゼの発現している細胞が少なかった. 同様に過酸化水素を 2 もしくは 5 mmol/L 添加して確認を行い, PFMH30 は, 過酸化水素耐性, ツニカマイシン感受性であり, PFMT01 は, ツニカマイシン耐性, 過酸化水素感受性であることを確認した.

D. 考察

(1) Death receptor 関連細胞内情報伝達系解析用プローブによるアポトーシスの測定

エフェクターカスパーゼ活性検出プローブにより TNF- α 等の細胞死誘発物質とは異なる細胞障害刺激である小胞体ストレス時の反応が解析できたことより, 本プローブによる解析は様々な要因による細胞組織障害の解析法として非常に有効であるといえる. 一方, 一部細胞において小胞体ストレス誘発時に本プローブの活性化を経ずに細胞萎縮の起こる細胞も認められ, 細胞組織障害解析法としてさらに他の反応を解析するプローブを開発することでより広範な細胞障害解析が可能になると考えられる. 本年度はカスパーゼ 12 の活性検出プローブの開発も開始した. 本プローブを含めた小胞体ストレスによる細胞障害測定プローブの作製は, より多くの要因による細胞組織障害のモニターを可能とするという点に加え, 現在不明な部分が多い小胞体ストレスによる細胞死のメカニズムの解析を可能にするかもしれない.

(2) ケージド化合物を用いた, タンパク質および遺伝子の機能を光制御する方法の開発

これまで, ケージド化合物の 2 光子励起の効率について, その波長依存性を調べた報告はなく, これが初めての例である. Bhc 基を光分解性基として用いたケージド化合物は, 1 光子および 2 光子励起のどちらの条件にも適用できることを確認した. 今後は, Bhc 基をリード化合物に, さらに優れた性質を持つ光分解性保護基の設計指針を確立する.

また, 限られた領域に光照射することで, 一部

の細胞のみで PKC のトランスロケーションを有意に阻害できた. この結果から細胞集団中の一部の細胞の任意のタンパク質の機能調節が可能であると考えられる.

(3) 二光子励起観察による細胞組織障害の解析

マウス脳底動脈は, 構造上非常に薄く, 脆弱であるため, 張力を測定することは困難と考えられる. また, Ca^{2+} シグナルは細胞内で複雑な時間経過で変化し, さまざまな空間的分布をとるため, Ca^{2+} 応答を細胞レベルで可視化することは重要である. 今回, マウス脳底動脈の Ca^{2+} 応答と反応性についてイメージング技術を用いて同時測定する新たな評価法を確立し, 種々の微小血管組織の反応性を構造的・機能的側面から解析するのに有用であることを示した. また本法は血管障害性物質の評価および障害機序の検討等にも有用であり, 医薬品候補化合物の作用機構の解析等への応用が期待される.

(4-1) K^+ チャンネル関連細胞機能障害解析細胞系等の開発-1

RyR3 によって惹起される非伝播性の細胞内 Ca^{2+} オシレーション (図 5①) が, SK2 チャンネル共発現下では, 伝播性の電気信号 (過分極) に変換されて律動性の電位変化 (図 5②) を生じることが示された. この電気シグナルが, ギャップジャンクションを介して隣接細胞に伝播 (図 5③) し, 細胞内 Ca^{2+} 動態の同期化 (図 5④) を促すことが示唆された. これらの性質は, 末梢組織におけるペースメーカー細胞である ICCs と非常に類似しており, その再構築系モデル作製の一步として捉えることができる. 本研究成果は, K^+ チャンネルの役割と病態でのその役割の変化を光学的に解析するモデル細胞系と解析手法の確立と共に, 生命現象に重要な役割を果たすペースメーカー機構の生理機能解明や, ペースメーカーの異常に伴う各種疾患に向けた創薬スクリーニング系を確立する上で非常に意義があると考えられる.

(4-2) K^+ チャンネル関連細胞機能障害解析細胞系等の開発-2

昨年までの検討で $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構阻害薬やクロライドチャンネル阻害薬などが心筋収縮力維持作用を有することを明らかにした. 今回, 蛍光プローブを用いたミトコンドリア膜電位モニタリング法によって, これらの薬物が虚血時のミトコンドリア膜電位を維持することを示した. これら薬物にはミトコンドリアに対する直接作用は見られず,

ミトコンドリア機能維持が一時作用点の異なるいくつかの心筋保護薬に共通の最終メカニズムである可能性が示された。

(5) ハイコンテツスクリーニングシステムを用いた毒性プロファイリング・スクリーニング系の開発

薬剤処理による細胞内 GSH 量の減少は、レドックスのバランスが崩れていることを示しており、細胞内 GSH 量の減少を毒性発現の指標と捉えることができるかと推察される。また、蛍光標識脂肪酸を用いることにより薬剤によって惹起される脂肪沈着を *in vitro* で検出できる可能性が見いだされた。今後、Fluorometry を用いた定量的な測定にむけて試験条件の最適化を実施する予定であり、薬剤性肝障害のメカニズム検討や肝毒性化合物のスクリーニングへの応用を目指す。

(6) バイオフォトニクスプローブを用いたタンパク質生産用細胞基材のモニタリング法の開発

アポトーシス誘導試薬である過酸化水素及びツニカマイシンに耐性を持つ宿主細胞を得た。今後、これらの細胞の細胞機能を蛍光プローブを用いてモニターし、タンパク質生産細胞の細胞状態のリアルタイムモニタリング法への応用をはかる予定である。

E. 結論

(1) エフェクターカスパーゼ活性検出プローブを小胞体ストレスによる細胞組織障害解析に適用し、細胞組織障害の反応メカニズムの解明に利用可能であることを示した。また、細胞組織障害の詳細な解析を可能とするために、作製済みのプローブでは検出不可能な細胞障害誘発経路の反応検出プローブの作製を開始した。

(2) タンパク質の機能制御を行うケージド化合物を合成し、細胞集団の中の一部の細胞のみで任意のタンパク質の機能を調節可能であることを示した。また、ケージド化合物の局所活性化のための検討を行った。

(3) 張力測定等、従来の方法でその反応性を評価するのは困難であった微小血管の収縮反応性、さらには、そのカルシウム動態との連関を評価する系を確立した。

(4-1) HEK 細胞に小コンダクタンズ Ca^{2+} 活性化 K^+ (SK2) チャネルと RyR3 を共発現させることにより、 Ca^{2+} 振動を細胞間の信号伝播が可能なペースメーカー電位へと変換するモデルの構築に成功した。
(4-2) 心筋ミトコンドリア機能を蛍光プロ

ブにより検出する系を立ち上げ、 Na^+/Ca^{2+} 交換機構阻害薬やクロライドチャネル阻害薬などが間接的作用により虚血時のミトコンドリア膜電位を維持することを示した。

(5) ラット初代培養肝細胞を用いた *in vitro* の検討を通じて、薬剤処置によって肝細胞に誘発される酸化ストレス・脂肪蓄積を蛍光プローブで検出可能であることを示した。

(6) アポトーシス耐性宿主細胞を取得するためにアポトーシス誘導試薬である過酸化水素及びツニカマイシンに対して耐性を有する細胞を取得し、凍結保存した。得られた細胞は、アポトーシス誘導試薬を含まない培地で継代した後も耐性を保有することを確認した。

F. 研究発表

- (1) H. Kawai, T. Suzuki, T. Kobayashi, H. Sakurai, H. Ohata, K. Honda, K. Momose, I. Namekata, H. Tanaka, K. Shigenobu, R. Nakamura, T. Hayakawa, and T. Kawanishi; Simultaneous real-time detection of initiator- and effector-caspase activation by double FRET analysis. *J. Pharmacol.Sci.* **97**:361-368 (2005)
- (2) T. Suzuki, T. Nishimaki-Mogami, H. Kawai, T. Kobayashi, Y. Shinozaki, Y. Sato, T. Hashimoto, Y. Asakawa, K. Inoue, Y. Ohno, T. Hayakawa, and T. Kawanishi, Screening of novel nuclear receptor agonists by a convenient reporter gene assay system using GFP derivatives, *Phytomedicine* (in press)
- (3) Tanaka H., Namekata I., Takeda K., Shimizu Y., Moriwaki R., Hirayama W., Sato A., Kazama A., Kawanishi T., Shigenobu K.: Unique excitation-contraction characteristics of mouse myocardium as revealed by SEA0400, a specific inhibitor of Na^+-Ca^{2+} exchanger. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, **371**:526-534 (2005).
- (4) 田中光, 川西 徹, 重信弘毅: Ca^{2+} の動きをミリ秒の眼で見る --- 共焦点顕微鏡による心筋細胞内カルシウムイオンの高速画像化 ---. *日本薬理学雑誌* **126**:287-294 (2005)
- (5) H. Kawai, T. Suzuki, T. Kobayashi, A. Ishii-Watabe, H. Sakurai, H. Ohata, K. Honda, K. Momose, T. Hayakawa, T. Kawanishi, :Caspase cascade proceeds rapidly after cytochrome c release from mitochondria in TNF- α -induced, *Exp. Cell Res.*, (Under Submission)
- (6) C. D. Wood, T. Nishigaki, T. Furuta, S. A. Baba, A. Darszon, *J. Cell. Biol.* **169**, 725-731 (2005)
- (7) H. Ando, M. Kobayashi, T. Tsubokawa, K. Uyemura, T. Furuta, H. Okamoto, Lhx2 mediates the activity

- of Six3 in zebrafish forebrain growth, *Dev. Biol.* **287**, 456-468 (2005)
- (8) 古田寿昭, 光であやつる細胞機能, 光学, s (4) 213-219, 2005
- (9) 古田寿昭, タンパク質の機能を光で制御する, ファルマシア, **41** (8) 789-790, 2005
- (10) Y-II Fang, H. Namiki, E. Tsunoda, S. Shioda, M. Shibata, M. Nakatani, T. Katagiri, Y. Takeyama, H. Ohata, K. Honda, K. Momose (2005) Marked increase in the histamine content of neointima after stent implantation of pig coronary artery and growth-promoting effects of histamine in cultured smooth muscle cells. *Life Sci.* **77**, 241-251.
- (11) Hashimoto, T., H. Ohata, and K. Momose (2005) Lysophosphatidic acid induces histamine release from mast cells and skin fragments. *Pharmacology*, **75**, 13-20.
- (12) 宮崎拓郎, 山本雅幸, 本田一男, 大幡久之 (2005) 流れ刺激存在下の血管内皮細胞において認められる細胞内カルシウム濃度上昇によるカルパインを介する細胞形態の制御, 日本薬理学雑誌, **126** (4), 256-261.
- (13) Hashimoto, T., H. Ohata and K. Honda. (2006) Lysophosphatidic acid induces plasma exudation and histamine release in mice via LPA. *J. Pharmacol. Sci.* **100**, 82-87.
- (14) Ohya S, Kuwata Y, Sakamoto K, Muraki K, Imaizumi Y. Cardioprotective effects of estradiol include the activation of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in cardiac mitochondria. *Am J Physiol*, **289**, H1635-1642 (2005).
- (15) Sade H, Muraki K, Ohya S, Hatano N, Imaizumi Y. Activation of large-conductance Ca^{2+} activated K^+ channels by cannabinoids. *Am J Physiol*, **290**, C77-C86 (2006).
- (16) Sakamoto K, Nonomura T, Ohya S, Muraki K, Ohwada T, Imaizumi Y. Molecular mechanisms for BK channel activation by a novel opener, 12, 14-dichlorodehydroabietic acid. *J Pharmacol Exp Ther*, **316**, 144-153 (2006).
- (17) Morimura K, Ohi Y, Yamamura H, Ohya S, Muraki K, Imaizumi Y. A two step Ca^{2+} intracellular release underlies excitation-contraction coupling in mouse urinary bladder myocytes. *Am J Physiol*, **290**, C388-C403 (2006).
- (18) Namekata I., Nakamura H., Tanaka H., Shigenobu K.: Cardioprotection without cardiosuppression by SEA0400, a novel inhibitor of Na^+ - Ca^{2+} exchanger, during ischemia-reperfusion injury in guinea-pig myocardium. *Life Sci.* **77**:312-324 (2005)
- (19) Matsuda T., Takeda K., Ito M., Yamagishi R., Tamura M., Nakamura H., Saito T., Itokawa M., Yamashita T., Tsuruzoe N., Tanaka H., Shigenobu K.: Atria selective prolongation by NIP-142 of refractory period and action potential duration in guinea-pig myocardium. *J. Pharmacol. Sci.* **98**:33-40 (2005)
- (20) Tanaka H., Namekata I., Takeda K., Shimizu Y., Moriwaki R., Hirayama W., Sato A., Kazama A., Kawanishi T., Shigenobu K.: Unique excitation-contraction characteristics of mouse myocardium as revealed by SEA0400, a specific inhibitor of Na^+ - Ca^{2+} exchanger. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, **371**:526-534 (2005)
- (21) Bai C., Namekata I., Kurokawa J., Tanaka H., Shigenobu K., Furukawa T.: Role of nitric oxide in Ca^{2+} sensitivity of the slowly activating delayed rectifier K^+ current in cardiac myocytes. *Circ. Res.* **96**:64-72 (2005)
- (22) Otsuka K., Tanaka Y., Tanaka H., Koike K., Shigenobu K.: Comparison of the inhibitory effects of docosahexaenoic acid (DHA) on U46619- and phenylephrine-induced contractions in guinea-pig aorta. *Biol. Pharm. Bull.* **28**:1298-1300 (2005)
- (23) Nouchi H., Tanaka H., Shigenobu K.: Pharmacological properties of the developing chick myocardium. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* **11**:37-45 (2005)
- (24) Tanaka H., Shigenobu K.: Pathophysiological significance of T-type calcium channels: T-type calcium channels and drug development. *J. Pharmacol. Sci.* **99**: 214-220 (2005)
- (25) 田中光: Ca^{2+} の動きをミリ秒の眼で見る--- 共焦点顕微鏡による心筋細胞内カルシウムイオンの高速画像化 ---. 日本薬理学雑誌 **126**:287-294 (2005)

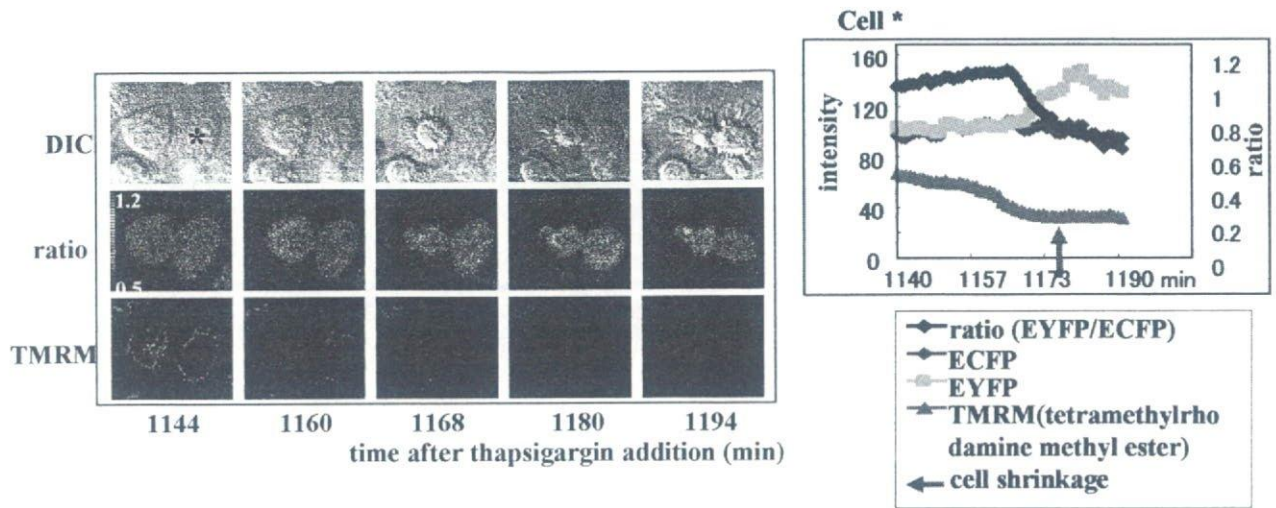


図1 エフェクターカスパーゼ活性化のイメージング
 左図：タプシガルギン(20 μ M)処理後のHeLa細胞. 上より微分干渉像, 蛍光強度比 (EYFP/ECFP), テトラメチルローダミンメチルエステルの蛍光. 右図：蛍光強度, および蛍光強度比の変化を数値化したグラフ.

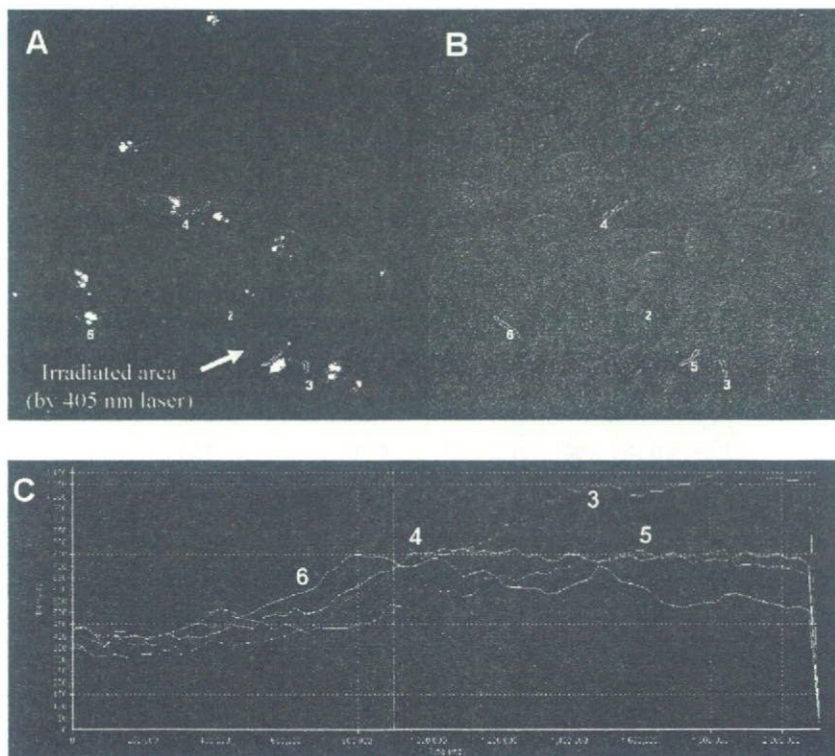


図2 α PKのトランスロケーション解析
 α PK-DsRedを発現させたCHO-K1細胞の蛍光像 (A) と位相差像 (B). 赤で囲んだ領域のケージド化合物を光で活性化した. (C) 図A, Bで示した領域の蛍光強度の経時変化. 細胞はPMAで処理した.

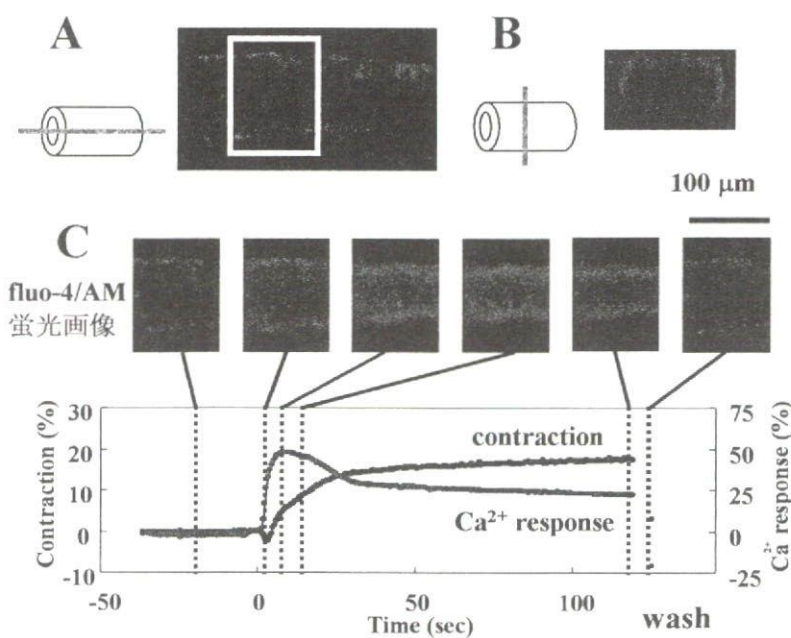


図3 マウス脳底動脈における50 mM KCl適用による収縮反応及びCa²⁺応答の典型例
 摘出したマウス脳底動脈に10 μM fluo-4/AMを30分間負荷し、共焦点レーザー顕微鏡により1.17秒間隔で光学断層像を取得した。Aは、血管の長軸方向に断層した画像を示し、脳底動脈のリングに垂直方向の光学断層画像をBに示した。Cは、50 mM KCl適用時のマウス脳底動脈における収縮反応及びCa²⁺応答の典型例。取得した光学断面の蛍光画像から血管の直径変化を測定し、KClが到達前の無刺激時の血管の直径を100%とし、収縮率を算出した。KCl到達前の蛍光強度を100%とし、蛍光強度の増加率をCa²⁺応答として求めた。上の画像は、50 mM KCl適用による血管の経時的な形態変化を血管の光学断層像として示す。

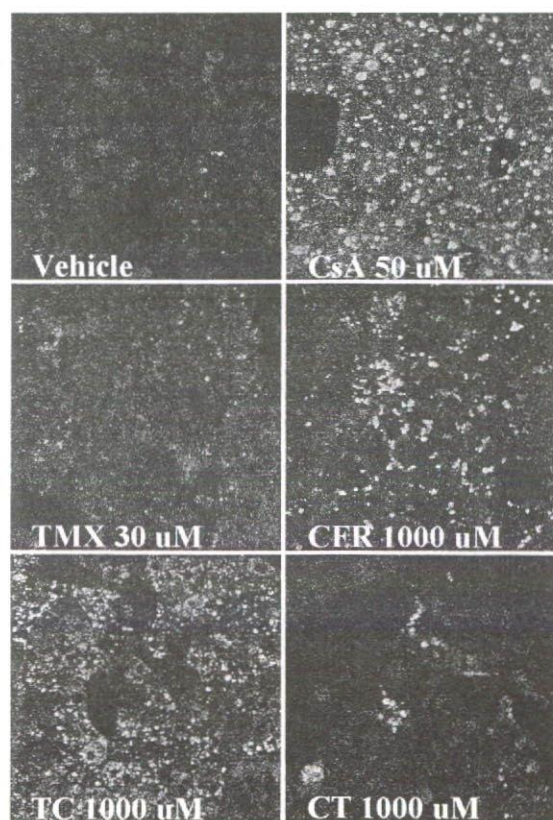


図4 前培養48時間後のラット初代肝細胞にBODIPY500/510 (蛍光標識脂肪酸) 存在下で各試験物質を24時間暴露した時の蛍光小体像 (脂肪蓄積)。

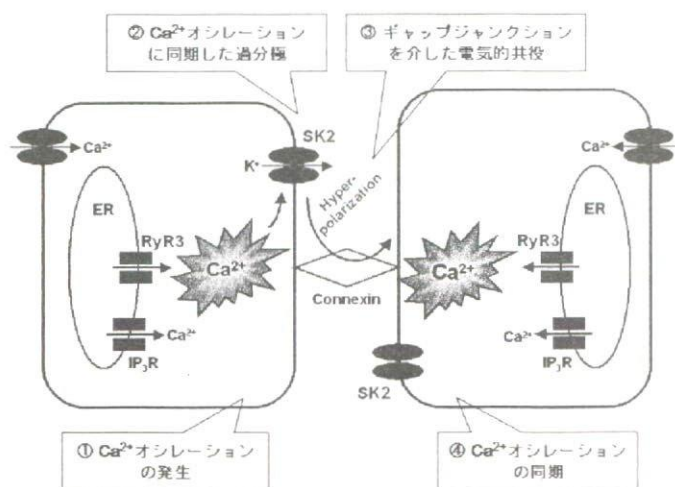


図5 RyR3とSK2チャネルによるCa²⁺オシレーション伝播のモデル図

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31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