

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	生薬及び漢方処方の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－非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立－	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	網脇祥子 …… 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 龍兒 …… 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	アレルゲン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	アレルゲン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（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2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究



## 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

所属 国立成育医療センター研究所

研究者 田上昭人

**研究要旨**  $\alpha 1$  アドレナリン受容体変異動物 ( $\alpha 1A, B, D$  ノックアウトマウス、二重欠損マウス、三重欠損マウス)、バソプレッシン受容体変異動物 (V1a ノックアウト、V1b ノックアウト) さらに疾患モデルを作成し、病態・疾患におけるそれぞれの受容体の機能解析・受容体特異的薬物の評価を行った。

### 分担研究者

- (1) 京都大学大学院薬学研究科 奥水崇鏡
- (2) 秋田大学医学部機能制御医学講座 中村靖夫
- (3) 旭化成ファーマ株式会社研究センター薬理研究所 生垣一郎
- (4) キッセイ薬品工業株式会社研究本部 小嶋正三
- (5) 日本オルガノン株式会社学術情報部 澤田照夫
- (6) アステラス製薬株式会社御幸が丘研究センター研究本部分子医学研究所ゲノム機能解析研究室 松七五三仁

### A. 研究目的

代表的ホルモンであるアドレナリン、バソプレッシンは生体内において循環系、内分泌系、糖代謝系、神経系などにおいて多彩な生理作用を有し、その調節機構の障害は種々の疾患・病態に関与している。本研究ではこれらのホルモンの受容体を介する調節機構につい

て遺伝子改変動物を用いて解析を行い、その情報伝達系の障害により生じる各種の疾患・

病態の解明を図る。遺伝子改変動物の解析により、受容体特異的薬物の長期的評価が可能となり、その薬理効果・副作用の予測が可能となる。また、遺伝子改変動物を用いて各種疾患モデル・病態モデルを作成することにより、病態・病因における各種生体内調節因子および関与する受容体の生理機能の解明が可能となり、薬物療法の開発、ゲノム創薬への応用が図れる。本研究では、アドレナリン受容体 (サブタイプ  $\alpha 1a, b, d$ )、バソプレッシン受容体 (サブタイプ V1a, b) 遺伝子改変動物を作成し、それぞれの受容体のリガンド/受容体の生理作用を明らかにすると同時に、病態におけるそれぞれの機能を明らかにし受容体特異的薬物の開発・臨床応用を行う。それぞれの受容体のリガンド、ホルモンが関与すると予想される病態モデルを作成することにより、その病態における受容体特異的薬物の薬理効果を評価検討し、さらにこれらの

病態下における新たな薬物標的因子をトランスクリプトーム、プロテオーム解析により探索をおこない、治療薬への応用を目指す。

## B. 研究方法

### I. 遺伝子改変動物の作成 (田上分担)

バソプレッシン受容体変異動物 (V1a ノックアウト、V1b ノックアウト)、 $\alpha 1$  アドレナリン受容体変異動物 ( $\alpha 1A$ , B, D ノックアウトマウス) を作成する。さらに、 $\alpha 1$  アドレナリン受容体複合欠損マウス ( $\alpha 1AB$  二重欠損マウス、 $\alpha 1AD$  二重欠損マウス、 $\alpha 1BD$  二重欠損マウスおよび  $\alpha 1ABD$  三重欠損マウス) の作成を行う。作成したノックアウトマウスの遺伝子発現解析は RT-PCR 法にて行う。

### II. 疾患モデル、病態モデルの解析

バソプレッシン受容体変異動物 (V1a ノックアウト、V1b ノックアウト)、 $\alpha 1$  アドレナリン受容体変異動物 ( $\alpha 1A$ , B, D ノックアウトマウス) を用いて生理機能の解析、病態モデルの作成・解析を行う。

#### 1. 循環機能系 (田上、小嶋、生垣、澤田分担)

##### 1-1) 血管損傷モデル

$\alpha 1$  アドレナリン受容体欠損マウス、V1a バソプレッシン受容体欠損マウスを用いて作成・解析を行う。

大腿動脈筋枝からカテーテルを挿入し、大腿大動脈内皮を機械的に損傷させ、動脈内皮の肥厚を解析する。

##### 1-2) 心筋増殖・心肥大に対するバソプレッシン受容体の機能解析

心筋増殖・心肥大に対するバソプレッシンの作用を調べるためにバソプレッシン受容体欠損マウスを用いて摘出した心筋細胞を用いて心筋増殖を調べる」。

1-3) 免疫抑制剤の副作用 (高血圧、腎障害) におけるバソプレッシン受容体の機能解析  
代表的免疫抑制剤であるシクロスポリン、FK506 の副作用 (高血圧、腎障害) に対するバソプレッシンの作用を解析するためにバソプレッシン受容体欠損マウスにシクロスポリン、FK506 を投与し、副作用の出現についてコントロールマウスと比較検討する。

#### 2. 糖・脂質代謝機能系 (田上、松七五三分担)

##### 2-1) グルカゴン分泌に対するバソプレッシン受容体の機能解析

グルカゴン分泌に対するバソプレッシンの作用を調べるためにバソプレッシン受容体欠損マウスを用いて摘出した膵臓ランゲルハンス島細胞を用いてグルカゴン分泌を調べる。

##### 2-2) グリコーゲン分解に対するバソプレッシン受容体の機能解析

グリコーゲン分解に対するバソプレッシンの作用を調べるためにバソプレッシン受容体欠損マウスを用いて摘出した肝臓細胞を用いてグリコーゲン分解を調べる。

##### 2-3) 脂質代謝に対するバソプレッシン受容体の機能解析

脂質代謝に対するバソプレッシンの作用を調べるためにバソプレッシン受容体欠損マウスを用いて血中ケトン体、トリグリセライド、遊離脂肪酸の測定を行う。



## 2-4) アンモニア代謝に対するバソプレッシン受容体の機能解析

アンモニア代謝に対するバソプレッシンの作用を調べるためにバソプレッシン受容体欠損マウスを用いて血中アンモニア、アミノ酸の測定を行う。

## 2-5) 糖尿病・肥満モデル

個体レベルでの糖負荷試験・高脂肪食負荷を行う。

2-6) 糖尿病モデルマウスである db/db マウスとの掛け合わせ動物の作出の予備検討として、db/db マウスの遺伝背景[C57/BL/KsJ]の一部が V1b 受容体遺伝子欠損マウスの遺伝背景[C57/BL/6J]に置き換わることによる病態発症への影響を調べる。具体的には、db/db マウス[遺伝背景は C57/BL/KsJ]と正常動物である C57/BL/6J マウスの F1 マウスを作出し、さらに F1 intercross にて db/db[KsJ:6J]を作出し、各種パラメーターを解析する。

## 3. 内分泌機能系 (田上、奥水分担)

### 3-1) アルドステロン分泌に対するバソプレッシン受容体の機能解析

アルドステロン分泌に対するバソプレッシンの作用を調べるためにバソプレッシン受容体欠損マウスを用いて摘出した副腎皮質細胞を用いてアルドステロン分泌を調べる。

### 3-2) 副腎髄質機能におけるバソプレッシン受容体の機能解析

安静時、バソプレッシン負荷時、ストレス負荷時の血中カテコールアミン濃度を解析する。

### 3-3) 成長ホルモン分泌に対するバソプレッシン受容体の機能解析

成長ホルモン分泌に対するバソプレッシンの作用を調べるためにバソプレッシン受容体欠損マウスを用いて摘出した下垂体細胞を用いて成長ホルモン分泌を調べる。

### 3-4) ACTH分泌に対するバソプレッシン受容体の機能解析

ACTH分泌に対するバソプレッシンの作用を調べるためにバソプレッシン受容体欠損マウスを用いて摘出した下垂体細胞を用いて ACTH分泌を調べる。

### 3-5) 副腎皮質内分泌機能に置ける V1a 受容体の機能解析

#### i). 細胞培養

マウス株化副腎皮質細胞である Y1 細胞を RPMI-1640 培地 (10%FCS, 50U/ml penicillin, 0.1mg/ml streptomycin 含有) 中で 37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下でそれぞれ培養した。細胞 (5x10<sup>5</sup> cells/ml) を ACTH 10 nM-1μM, Vasopressin 1μM を添加した培養液中で一定時間培養し、ホルモン分泌能を解析した。

#### ii). 副腎ステロイドホルモン分泌刺激試験

ACTH を腹腔内投与し 60 分後に尾採血して血清を分離した。ステロイドホルモン分泌能を遺伝子改変動物と野生型にて検討した。

#### iii). 血中ホルモン濃度測定

細胞上清や血液よりステロイドホルモン、Atrial natriuretic polypeptide を抽出しそれぞれ LC-MS 法、ELISA 法により測定した。

#### iv). 副腎の組織学的検索

細胞、副腎組織を 4%パラホルムアルデヒドで固定後凍結切片を作製した。切片では未染色で或はヘマトキシリンエオジン染色の後封入し、光学顕微鏡で観察した。蛍光観察には

緑色フィルターを用いた。また、ホルマリン固定パラフィン切片 (3  $\mu$ m) をヘマトキシリンエオジン染色後、副腎皮質の厚さ (N=3) を計測し比較検討した

v). RT-PCR

細胞、副腎組織から 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。抽出した mRNA 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。

vi). DNA チップによる遺伝子発現解析

細胞、副腎組織から 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 (2mg) 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、スキッチャード・プロット解析によりグローバル補正した。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 以下の場合に発現低下を認めるとした。

4. 泌尿生殖系 (田上、中村分担)

9-10 週令の雄性 1A KO (n=19) およびそのワイルドタイプマウス (1A WT, n=16)、雌性 1A KO (n=15) およびその 1A WT (n=20)、9-11 週令雄性 1D KO (n=7) およびそのワイルドタイプマウス (1D WT, n=19) をマウス用代謝ケージ内で個別に飼育し、個々の動物からの尿を採取し、電子天秤で重量測定し、コンピューターを使って経時的に尿量を記録した。12 時間毎に照明の on-off の切り替えを自動的に行う飼育室のマウス用代謝ケージ内で 47 時間の順応期間の後、47 時間連続して計測を行った。47 時間の総排尿量と排尿回数および一回排尿量を評価項目として用いた。

(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する。

C. 研究成果

1. 循環機能系

1-1) 血管損傷モデル

$\alpha$  1 A 欠損マウス、 $\alpha$  1 B 欠損マウス、 $\alpha$  1 D 欠損マウスおよび  $\alpha$  1 A B アドレナリン受容体二重欠損マウス用いて wire injury 後の



血管内皮の肥厚を測定した。その結果、コントロールと $\alpha 1 A$ 欠損マウス、 $\alpha 1 B$ 欠損マウス、 $\alpha 1 D$ 欠損マウスの間には差は認められなかったが、 $\alpha 1 A B$ アドレナリン受容体二重欠損マウスでは肥厚の程度が優位に抑制されていた。

この結果から、血管内皮の肥厚には、 $\alpha 1 A$ および、 $\alpha 1 B$ アドレナリン受容体が関与しているものと考えられた（論文投稿中）。

#### 1-2) 心筋増殖・心肥大に対するバソプレッシン受容体の機能解析

V1a バソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールの新生児のマウス心筋より心筋細胞並びに繊維芽細胞を分離し、バソプレッシン刺激による細胞増殖効果を検討した。その結果、V1a バソプレッシン受容体欠損マウス新生児心筋由来の細胞はコントロールに比べて増殖が抑制されており、心筋の発育・病的肥厚にバソプレッシン/V1a バソプレッシン受容体が関与していることが示唆された（論文投稿準備中）。

#### 1-3) 免疫抑制剤の副作用(高血圧、腎障害)におけるバソプレッシン受容体の機能解析

V1a バソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールマウスにシクロスポリンまたは、FK506を長期投与し投与中ならびに投与後の血圧、腎障害について解析した。その結果、コントロールマウスでは高血圧並びに腎障害が見られ、V1a バソプレッシン受容体欠損マウスでも同様に高血圧・腎障害が観察された。

## 2. 糖・脂質代謝機能系

#### 2-1) グルカゴン分泌に対するバソプレッシン受容体の機能解析

V1b バソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールマウスから抽出した膵臓ランゲルハンス島細胞を用いてグルカゴン分泌を調べた。その結果、V1b バソプレッシン受容体欠損マウス由来の膵臓ランゲルハンス島細胞では、V1b 受容体の変わりにオキシトシン受容体を介してグルカゴン分泌が行われていることが明らかとなった（論文投稿中）。

#### 2-2) グリコーゲン分解に対するバソプレッシン受容体の機能解析

V1a バソプレッシン受容体欠損マウス、V1b バソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールマウスから肝細胞を分離し、細胞に含まれるグリコーゲンおよびバソプレッシン刺激によるグリコーゲン分解を測定した。V1a バソプレッシン受容体欠損マウス由来の肝細胞では、バソプレッシン刺激によるグリコーゲン分解がV1b バソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールマウスに比べて抑制されていた。さらにV1a バソプレッシン受容体欠損マウス由来の肝細胞では刺激前のグリコーゲン含量も低値であった。この結果より、肝臓におけるグリコーゲン分解には、V1a バソプレッシン受容体が関与し、さらに、V1a バソプレッシン受容体欠損マウスでは糖代謝の変化によるグリコーゲンの蓄積量に変化しているものと考えられた。

#### 2-3) 脂質代謝に対するバソプレッシン受容体の機能解析

V1a バソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールマウスの血中ケトン体、トリ

グリセライド、遊離脂肪酸の測定を行った。V1a バソプレッシン受容体欠損マウスでは、コントロールに比べて血中ケトン体が増加し、トリグリセライド、遊離脂肪酸は低下していた。この結果より、バソプレッシンは、V1a バソプレッシン受容体を介して脂質代謝に関与し、V1a バソプレッシン受容体欠損マウスでは、脂質代謝が亢進していることが明らかとなった（論文投稿中）。

#### 2-4) アンモニア代謝に対するバソプレッシン受容体の機能解析

V1a バソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールマウスの血中アンモニア、アミノ酸の測定を行った。V1a バソプレッシン受容体欠損マウスでは、血中アンモニアが上昇しさらにアンモニア負荷後の血中アンモニアが高値を示した（論文投稿準備中）。

#### 2-5) 糖尿病・肥満モデル

V1a バソプレッシン受容体欠損マウス、V1b バソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールマウスを用いて糖負荷試験、インスリン負荷試験、クランプテストを行った。その結果、V1a バソプレッシン受容体欠損マウスでは、インスリン感受性が低下し、V1b バソプレッシン受容体欠損マウスでは、インスリン感受性が亢進している傾向が見られた（論文投稿中）。

2-6) db/db マウス [C57/BL/KsJ] と C57/BL/6J マウスの F1 マウスを作出し、F1 intercross にて db/db [KsJ:6J] を作出した。db/db (F1 intercross/KsJ:6J) は db/db (original) に比べインスリンレベルの上昇を認めたが、db/db (original) と同様に高血糖であった。さらに

経口糖負荷試験を行ったところ、db/db (F1 intercross/ KsJ:6J) は耐糖能不全病態を呈する事が確認された。また、体重にも大きな影響は無いことがわかった。

現在、V1b 受容体遺伝子欠損マウスと db/db マウスの掛け合わせにより F1 マウスを作出したところであり、来年度中には、V1b<sup>-/-</sup>/db/db マウス [KsJ:6J] の作出と表現系解析を実施する予定である。

### 3. 内分泌機能系

#### 3-1) アルドステロン分泌に対するバソプレッシン受容体の機能解析

V1a バソプレッシン受容体欠損マウス、V1b バソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールマウスから摘出した副腎皮質細胞を用いてアルドステロン分泌を調べた。その結果、V1a バソプレッシン受容体欠損マウスでは、バソプレッシン刺激によるアルドステロン分泌がコントロールに比べて低下していた（論文投稿中）。

#### 3-2) 副腎髄質機能におけるバソプレッシン受容体の機能解析

V1b バソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールマウスを用いて安静時、バソプレッシン負荷時、ストレス負荷時の血中カテコールアミン濃度を解析した。その結果、V1b バソプレッシン受容体欠損マウスではストレス負荷後のアドレナリン、ノルアドレナリンの分泌が低下していた (Ito et al, 2006 in press)。

#### 3-3) 成長ホルモン分泌に対するバソプレッシン受容体の機能解析



V1bバソプレッシン受容体欠損マウスおよびコントロールマウスから摘出した下垂体細胞を用いて成長ホルモン分泌を調べた。その結果、V1bバソプレッシン受容体欠損マウスでは、バソプレッシン刺激に対する成長ホルモン分泌の反応性の低下が見られた。

### 3-4) ACTH分泌に対するバソプレッシン受容体の機能解析

神経ホルモンであるバソプレッシン、及びオキシトシンは、下垂体前葉において、バソプレッシンV1b受容体を介してACTHを分泌することが報告されている。V1bバソプレッシン受容体欠損マウスを用いた研究により、V1bバソプレッシン受容体欠損マウスではバソプレッシンが下垂体前葉からのACTH分泌を促進しないことがすでに明らかになっている。本研究では、V1bバソプレッシン受容体欠損マウスの下垂体前葉初代培養細胞を用いて、オキシトシン刺激によるACTH分泌に対する変化を調べた。

マウス下垂体前葉を採取後、0.4% コラゲナーゼで2時間処理し、 $3.5 \times 10^5$  cells/well の濃度で24穴培養プレートに撒き込んだ。その後2日-3日おきに培地を交換し、培養5日目でオキシトシン刺激実験を行った。オキシトシンによる刺激は37°Cで3時間行った。受容体拮抗薬の処理は、オキシトシン刺激の5分前に行った。刺激後、培養上清を回収し、ACTH濃度をRIAで測定した。

コントロールマウスの下垂体前葉細胞において、オキシトシンは濃度依存的にACTHを分泌し、10nMの濃度で有意にACTHを分泌した ( $p < 0.05$ )。一方、V1bバソプレッシン

受容体欠損マウスの下垂体前葉細胞においても、濃度依存的なOT刺激によるACTH分泌が観察され、100nMのオキシトシン刺激で有意にACTHを分泌した ( $p < 0.01$ )。そして、V1b受容体特異的拮抗薬であるSSR149415 (SSR)を用いた実験により、SSRで前処理したコントロールマウスの下垂体前葉細胞では、100nMのオキシトシン刺激によるACTH分泌が阻害され、特に1mMのSSRで有意に阻害された ( $p < 0.05$ )。オキシトシン受容体拮抗薬CL-14-26 (1mM)ではオキシトシン刺激によるACTH分泌を阻害しなかった。これらの結果より、コントロールマウスにおいて、オキシトシンはオキシトシン受容体ではなくV1b受容体を介してACTHを分泌すると考えられ、これはラットに見られた見解と一致した。また、V1bバソプレッシン受容体欠損マウスにおいてオキシトシン刺激によるACTH分泌が見られることから、V1bバソプレッシン受容体欠損マウスではオキシトシン受容体がACTHを分泌することに関与していると考えられた。

### 3-5) 副腎皮質内分泌機能に置けるV1a受容体の機能解析

#### i). 副腎由来細胞株における Vasopressin の作用

Y1細胞をACTHとVasopressin (100nM)の存在化で刺激するとACTH単独よりもステロ

図1 Y1細胞におけるバソプレッシンの糖質コルチコイド分泌促進作用 (n=7)

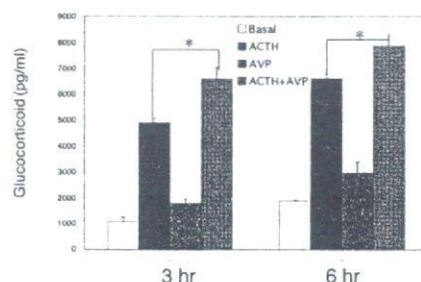
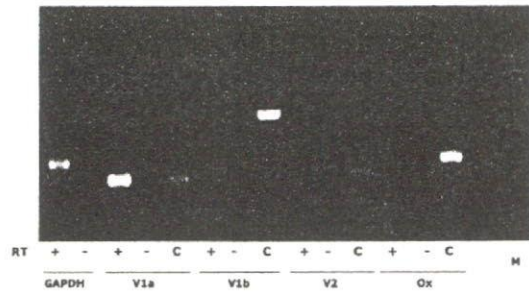


図2 副腎皮質細胞由来Y1細胞における  
バソプレッシン受容体ファミリーの発現



イドホルモンの分泌が亢進することが示された。(図1参照)。

この亢進は3時間後には有意な上昇となり6時間まで持続した。発現解析によりこの細胞にはV1a受容体が発現し、他のバソプレッシンファミリー受容体であるV1b, V2, オキシトシン受容体は存在しないことが示された。

(図2参照)

よって副腎皮質細胞に存在するV1a受容体は単独で、或はMC2メラノコルチン受容体と共同で糖質ステロイドの分泌を亢進させる能力を有することが明らかとなった。

ii). V1a遺伝子ノックアウトによる副腎皮質ホルモン分泌能の変化

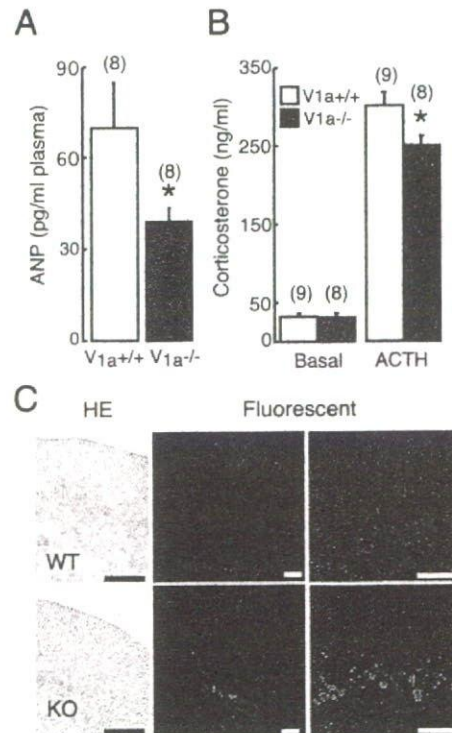
細胞レベルでのV1aの役割を個体レベルで評価するためノックアウトマウスの副腎皮質ホルモン分泌機能について解析したところ、有意にコルチコステロンの分泌が低下していた。

(図3参照。A. 血中Atrial natriuretic polypeptide濃度。V1a<sup>-/-</sup>マウスでは基礎値が有意に低下していた。B. 血中Corticosterone濃度。V1a<sup>-/-</sup>マウスでは基礎値に変化がないものの、adrenocorticotropine, ACTH, で刺激した際の分泌反応が有意に低下していた。C. 副腎皮質組織像。副腎皮質の3層構造(顆粒層、束状層、網状層)、特に束状層と網状層の境界が不鮮明となり、糖質ステロイドホルモンの分泌は基礎値、ACTH刺激時とも低下する。しかし副腎髄質のカテコラミン分泌は保たれておりV1a遺伝子が皮質特異的な発達に重要であることを示している。さらにV1a<sup>-/-</sup>マウスで

は皮質にLipofuscin様蛍光物質の蓄積が観察された)。

さらにパラフィン切片にて詳細に層構造を観察したところ、野生型マウスでは束状帯で淡明細胞がみられたが、V1a<sup>-/-</sup>では減少していた。またV1a<sup>-/-</sup>マウスでは、淡明細胞が少ないため束状帯と網状帯との境界が不明瞭であった。皮質(P=0.75)と球状帯(P=0.69)の厚さでは有意な差は認められなかった。

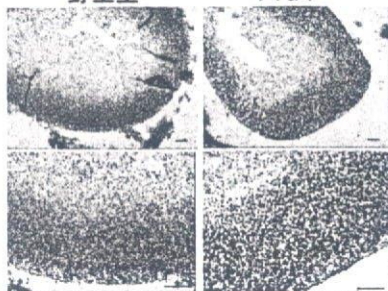
図3 V1a遺伝子改変マウスにおける  
血中ホルモン濃度、副腎組織像



野生型、V1a<sup>-/-</sup>とも副腎皮質束状帯に脂肪染色陽性像がみられ、両者に差は見られなかった。(図4) また脂肪染色においても



図4 副腎ズダンIV染色像 (bar 100 $\mu$ m)  
野生型 V1a<sup>-/-</sup>



#### 4. 泌尿生殖系

雄性 1A KO の総排尿量および排尿回数は雄性 1A WT のそれらの値より有意に多かったが、一回排尿量は両群間で差を認めなかった。同様に雌性 1A KO の総排尿量および排尿回数は雌性 1A WT のそれらの値より有意に多かったが、一回排尿量は両群間で差を認めなかった。雄性 1D KO の総排尿量および一回排尿量が雄性 1D WT のそれらの値より有意に少なかったが、排尿回数は両群間で差を認めなかった。

#### D. 考察

$\alpha 1$  アドレナリン受容体について各サブタイプ欠損マウス ( $\alpha 1A$ ,  $\alpha 1B$ ,  $\alpha 1D$  ノックアウト) および二重欠損マウス ( $\alpha 1AB$ ,  $\alpha 1AD$ ,  $\alpha 1BD$  ノックアウト) 三重欠損マウス ( $\alpha 1ABD$  ノックアウト) の作成に成功した。 $\alpha 1$  アドレナリン受容体拮抗薬は、降圧薬として用いられているが、何れも非選択的拮抗薬で各サブタイプの血管収縮・血圧調節機構における各サブタイプの生理機能は明らかでなかった。そこで作成した  $\alpha 1$  アドレナリン受容

体変異マウスを用いて血管内皮損傷モデルにおける各サブタイプの機能を解析したところ、動脈の血管損傷後の肥厚には  $\alpha 1A$  および  $\alpha 1B$  サブタイプが関与していることが明らかとなった。この結果より、 $\alpha 1$  選択的拮抗薬は、PTCA後の冠動脈内皮の肥厚の予防に効果が期待される。

バゾプレッシン受容体変異マウスについて各サブタイプ欠損マウス (V1a, V1b 欠損マウス) および V1ab 二重欠損マウスの作成に成功した。V1a バゾプレッシン受容体拮抗薬は、現在欧州にて開発が進められ血管拡張剤や月経困難症の治療薬として、V1b バゾプレッシン受容体拮抗薬は、抗不安薬として開発中であるが、長期投与・大量投与による副作用については明らかになっていない。そこで作成したバゾプレッシン受容体変異マウスについて解析を行った。

バゾプレッシンの心筋増殖に及ぼす効果については、V1a 受容体が関与していることが明らかとなった。このことは、この受容体拮抗薬の開発により、肥大を起こす心疾患の予防薬治療薬として開発されることが期待できる。免疫抑制剤投与における高血圧発症・腎障害の発症は、臨床上大きな問題とされる。この副作用のため、免疫抑制剤の投与の制限を余儀なくされることは、治療上大きな支障となる。そのため、免疫抑制剤 (サイクロスポリン、FK506) による高血圧や腎障害におけるバゾプレッシンの作用についてノックアウトマウスを用いて検討を行ったが、ノックアウトマウスでもコントロールと同様の副作用の出現が見られた。この結果より、免疫抑

制剤による高血圧・腎障害の発症にはバソプレッシン受容体拮抗薬は効果が期待できないものと考えられる。

バソプレッシンがインスリン分泌に影響を及ぼすことについては、既に昨年度報告しているが、さらに、バソプレッシンがグルカゴン分泌にも関与していることが明らかとなった。血糖調節においてバソプレッシンは、V1b 受容体を介してインスリン分泌・グルカゴン分泌調節を行いその他の因子とともに血糖の調節を行っているものと考えられる。

内分泌系に及ぼすバソプレッシンの影響としては、脳下垂体のACTHやコルチコステロン以外にアルドステロン等の副腎皮質ホルモンや副腎髄質ホルモン分泌にも関与していることが明らかとなった。

これらの結果は、V1a や V1b バソプレッシン受容体拮抗薬の薬物効果・副作用として薬物開発において重要な知見になるものと考えられる。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。

#### E. 結論

今回の種々の疾患モデル、病態モデルの作成により、 $\alpha_1$  アドレナリン受容体やバソプレッシン受容体を標的とする薬物効果・副作用が明らかとなり、受容体選択的薬物の臨床応用においてこれらの遺伝子改変動物は非常に有用と考えられる。

#### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Deighan C, Naghadeh MM, Daly CJ, Tanoue A, Tsujimoto G and M<sup>c</sup>Grath JC. Insights into the functional roles of  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes in mouse carotid arteries using knockout mice. *Br. J. Pharmacology*. 2005; 144: 558-565.
- 2) Hosoda C, Koshimizu T, Tanoue A, Nasa Y, Oikawa R, Tomabechi T, Fukuda S, Shinoura H, Oshikawa S, Takeo S, Kitamura T, Cotecchia S, Tsujimoto G. Two  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes regulating the vasopressor response have differential roles in blood pressure regulation. *Mol. Pharmacol*. 2005; 67: 912-922.
- 3) Chen Q, Takahashi S, Zhong S, Hosoda C, Zheng H-Y, Ogushi T, Fujimura T, Ohta N, Tanoue A, Tsujimoto G, Kitamura T. Function of the Lower Urinary Tract in Mice Lacking  $\alpha_{1d}$ -Adrenoceptor. *J. Urol*. 2005; 174(1): 370-374.
- 4) Erami C, Zhang H, Tanoue A, Tsujimoto G, Thomas SA, Faber JE. Adrenergic catecholamine trophic activity contributes to flow-mediated arterial remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(2):H744-53.
- 5) Hosoda C, Tanoue A, Shibano M, Tanaka Y, Hiroyama M, Koshimizu T, Cotecchia S, Kitamura T, Tsujimoto G, Koike K. Correlation between vasoconstrictor roles and mRNA expression of  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes in blood vessels of genetically engineered mice. *Br. J. Pharmacology*. 2005;146(3):456-466.
- 6) Lazaro-Suarez ML, Gomez-Zamudio JH, Gallardo-Ortiz IA, Tanoue A, Tsujimoto G,



Farias-Rodriguez VM, Villalobos-Molina R. Chloroethylclonidine reveals that alpha-adrenoceptors mediate contraction in aorta of alpha-adrenoceptor knockout mice. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2005; 25:179-183.

7) Egashira N, Tanoue A, Higashihara F, Fuchigami H, Sano K, Mishima K, Fukue Y, Nagai H, Takano Y, Tsujimoto G, Stemmelin J, Simiand J, Griebel G, Iwasaki K, Ikeda T, Nishimura R, Fujiwara M. Disruption of Prepulse Inhibition of Startle Reflex in V1b Receptor Knockout Mice: Reversal by Atypical Antipsychotic Drugs. *Neuropsychopharmacology.* 2005; 30:1996-2005.

8) Zacharia J, Hillier C, Tanoue A, Tsujimoto G, Daly CJ, McGrath JC, Macdonald A. Evidence for involvement of alpha(1D)-adrenoceptors in contraction of femoral resistance arteries using knockout mice. *Br J Pharmacol.* 2005; 146: 942-951.

9) Itoh S, Yamada S, Mori T, Miwa T Tottori K, Uwahodo Y, Yamamura Y, Fukuda M, Yamamoto K, Tanoue A, Tsujimoto G. Attenuated stress-induced catecholamine release in mice lacking the vasopressin V1b receptor. *Am J Physiol Endocrinology and Metabolism.* In press (2006)

## 2. 学会発表

### 1) 国際学会

(1) Birumachi J, Tanoue A.

Analysis for functional roles of vasopressin receptors in releasing adrenal hormones in mice

lacking V1a receptor.

The 6<sup>th</sup> EMBL Mouse Molecular Genetics Meeting, September 29 – October 2, Heidelberg (Germany), 2005.

(2) Nakamura, Y., Simpson, P. C., Tanoue, A., Ikegaki, I., Kawatani, M. and Tsujimoto, G.: Difference between  $\alpha$  1A and  $\alpha$  1D knockout mice on bladder function. 100th Annual Meeting of the American Urological Association, San Antonio, USA, May 22, 2005

### 2) 国内学会

(1) 石塚雄太、安部博史、田上昭人、石田康、河南洋 バソプレッシン V1b 受容体ノックアウトマウスの不安行動に対する SSRI・SNRI の効果 第9回日本適応医学会、4月、2005、宮崎

(2) 石塚雄太、安部博史、田上昭人、石田康、河南洋 バソプレッシン V1b 受容体ノックアウトマウスの不安行動に対する SSRI・SNRI の効果 第27回日本生物学的神経医学会、7月6日～8日、2005、大阪

(3) 美留町潤一、田上昭人 V1a バソプレッシン受容体遺伝子欠損マウスにおけるアルドステロン分泌機能の解析 第32回日本神経内分泌学会、7月7日、2005、沖縄

(4) 青柳利紀、廣山眞巳、美留町潤一、北川葉子、田上昭人 V1a バソプレッシン受容体ノックアウトマウスにおけるグリコーゲン代謝の変化 第32回日本神経内分泌学会、7月7日、2005、沖縄

(5) 北川葉子、美留町潤一、廣山眞巳、田上昭人 V1b 受容体ノックアウトマウスにおける

低インシュリン血漿及びインスリン感受性の  
亢進 第32回日本神経内分泌学会、7月7日、  
2005、沖縄

(6) 廣山眞巳、北川葉子、美留町潤一、押川小  
百合、中野瑞穂、遠藤春香、田上昭人 マウ  
スランゲルハンス島からのグルカゴン分泌に  
おけるバソプレッシンとオキシトシンレセプ  
ターの解析 第32回日本神経内分泌学会、7  
月7日、2005、沖縄

(7) 美留町潤一、田上昭人 成長ホルモン分  
泌に及ぼすバソプレッシン受容体機能の解析  
第79回日本薬理学会年会、3月8日～10日、  
2006、横浜

(8) 美留町潤一、藤原葉子、田上昭人 成長ホ  
ルモン分泌に及ぼすバソプレッシン受容体機  
能の解析 第141回日本獣医学会学術集会、  
3月19日～21日、2006、つくば

(9) 中村靖夫：膀胱刺激症状における $\alpha 1$ 受容  
体の関与についての実験的検討. 第18回北陸  
排尿障害研究会 コーヒーブレイクセミナー、  
金沢、2005年7月10日

(10) 中村靖夫： $\alpha 1$ 受容体サブタイプノック  
アウトマウスを用いた膀胱機能の実験的検討.  
第58回日本自律神経学会総会 シンポジウ  
ム2 排尿メカニズムの最近の研究の進歩、  
千葉、2005年10月27日

#### G. 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