

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

課題番号		
KH11001	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	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 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
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 …… 30
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 …… 40
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 …… 100
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 …… 126
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 …… 144
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 …… 154
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 …… 168
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 …… 181
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 …… 196
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 …… 208
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 …… 221
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 …… 235
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 …… 247
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 …… 262
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 …… 286
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 …… 300
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 …… 310
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 …… 318

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 …… 344
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 …… 358
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 …… 373
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 …… 390
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 …… 402
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 …… 417
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 …… 435
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的手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 449
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 …… 466
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 …… 481
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 …… 494
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 …… 509
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 …… 525
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 …… 537
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 …… 551
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 …… 566
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 …… 576

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 薬品部
研究者 川西 徹
研究期間 平成16年4月～平成19年3月

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、創薬における様々な局面に応用可能な、細胞組織障害の簡便かつ定量的解析法の開発研究を行った。

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

A. 研究目的

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して、疾患に伴って生じる細胞組織障害を解析する技術があげられる。本研究は、細胞機能に係る生体内パラメータに対する感受性蛍光プローブ（バイオフィotonicsプローブ）を開発・利用することにより、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トション、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）評価等への応用を目指して実施した。

B. 研究方法

研究は、細胞組織障害を解析するためのバイオフィotonicsプローブの開発、バイオフィotonicsプローブ使用に最適化した解析機器の開発、開発されたプローブおよび解析機器の生体への応用技術の開発、の3つの視点から行なった。

（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。

C. 研究結果

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

作製した蛍光特性の異なるカスパーゼ活性化検出 FRET 型プローブにより、2つの細胞内反応を同時に検出・測定するダブル FRET 法の確立に成功した。この系を用いて TNF- α と小胞体ストレスにより誘導されるアポトーシスの比較検討を行い、それぞれに特徴的な現象を見出した。また、新規プローブとして小胞体ストレスによる細胞死に関与するカスパーゼ 12 の活性化検出プローブ、TNF- α 等の細胞死誘発物質によって引き起こされる TNFR1 の重合反応を解析するプローブ、TNF- α や小胞体ストレスによる細胞死に関与していると考えられている TRAF2 の局在を解析するプローブの作製、検討を行なった。

（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

光分解性の保護基で生理活性分子を保護し、一時的にその活性を失わせたケージド化合物を作製し、組織障害に伴う細胞応答を高い時空間分解能で制御する方法について検討を行なった。Bmcnoc 基を導入したペプチド核酸（PNA）を作製し、照射により遺伝子転写を誘導することに成功した。また、PNA が ssRNA と相補鎖形成する性質を利用して、mRNA の翻訳阻害によるアンチセンス効果の光制御を試み、ある程度阻害できることを示した。タンパク質の機能制御を行うケージド化合物として、プロテインCキナーゼ（ 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の Lys 側鎖に Bmcnoc 基を導入したケージド化合物 **EAVSLK(Bmcnoc)PT** やケージドジアシルグリセロール（Bhc-moc-diC8）、ケージドアラキドン酸（Bhc-AA）作製し、 ϵ PKC のトランスロケーション

を光照射部位特異的に制御することに成功した。

(3) 二光子励起観察による細胞組織障害測定法の構築

多光子励起顕微鏡を利用して細胞内カルシウムイオン動態と血管機能および細胞障害性を解析するシステムを構築した。本法により、非常に細く脆弱であるため従来の張力測定による収縮弛緩反応の評価が困難である微小血管の、内皮依存的な弛緩反応をカルシウム動態ととともに評価することも可能となった。また、NO 産生も評価可能であった。

(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

K⁺チャンネル作動性薬物のスクリーニングおよびその細胞機能障害性の検索に応用可能な SK2 チャンネルと RyR3 共発現細胞 (SK2/RyR3-HEK) を作製した。RyR3 によって惹起される Ca²⁺オシレーションが SK2 チャンネル共発現下では、細胞膜電位の過分極という律動性の電位変化に変換されることを示した。また、この電気シグナルがギャップジャンクションを介し隣接細胞に伝播し、細胞内 Ca²⁺動態の同期化を促すと示唆された。これらの性質は、末梢組織におけるペースメーカー細胞と非常に類似しており、その再構築系モデル作成の一步としても考えることができる。

(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

細胞膜を透過性にした心筋細胞株 (H9c2) を用いてミトコンドリア上のチャンネルやトランスポーターの活性を画像化によって検出する系を構築した。この系により正常時および虚血時のミトコンドリア Ca²⁺動態について検討し、心筋虚血-再灌流傷害時にはミトコンドリア上の Na⁺/Ca²⁺交換機構 (NCX) に作用せずに、細胞膜上の NCX を選択的に抑制する薬物が心保護薬として有用であると推測された。

(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。さらに化合物の肝臓における脂肪蓄積誘発性を評価するための、FDSS/IMACS (浜松ホトニクス) を用いたハイコンテントスクリーニングシステム構築に成功した。また、脂肪蓄積に関連する多数遺伝子の発現解析を併用することにより、脂肪蓄積のメカニズムを

化合物ごとに特徴付けられる可能性を見出した。

(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

アポトーシス誘導試薬である過酸化水素及びピニカマイシンに対して耐性を有する細胞をアポトーシス耐性宿主細胞として取得した。培養細胞が継代を重ねるに連れてそのタンパク質生産性が落ちるといふ現象が起こるが、ミトコンドリア膜電位を評価することで、細胞のタンパク質産生能力を比較・推定できる可能性を示した。

D. 考察

(1) ダブル FRET 法は、他の手法では確認が困難な単一細胞における 2 種の反応の活性化状況の解析を行なうことが出来るため、どのような反応経路を経て細胞死に至るかを解析する上で非常に有効な手法である。さらに現在作成・検討中のプローブを併用することにより、多くの要因から引き起こされる細胞組織障害のモニターが可能となる。

(2) 今後ケージド PNA を細胞内に導入する工夫をし、細胞内に導入後に光誘導することにより、組織障害時に誘導される炎症性サイトカインやケモカイン等を組織、時期特異的に発現することが可能となる。また、照射する光の強度と時間の検討等を行なうことにより、組織障害に伴う細胞応答に関与するシグナル伝達、および、細胞死等に関わる因子の局所動態をケージド化合物で光制御する技術が完成する。

(3) 本法は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とともに、血管障害性物質の評価および障害機序の検討にも応用可能である。

(4-1) 本研究結果は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、今後の薬物治療戦略に大いに貢献することが期待できる。

(4-2) 構築した細胞膜透過性 H9c2 細胞はカリウムチャンネルを含むミトコンドリア内膜上の各種トランスポーターの機能解析に有用である。

(5) 各種化合物の肝臓における脂肪蓄積誘発性をプロファイリング/スクリーニングできる可能性が見出された。

(6) ミトコンドリア膜電位と組換えタンパク質生産速度には密接な関係があることが強く示唆された。今後ミトコンドリア膜電位を組換えタンパク質工程の安定化かつ効率化に生かせるかどうか

を検討する。

E. 結論

バイオフィトニクスプローブを開発・利用することにより、各種細胞組織障害を簡便かつ定量的に解析する方法の開発に成功した。開発した技術はいずれも創薬支援技術として非常に有用である。

F. 研究発表 (他に日本語総説 12 報)

- (1) H. Kawai, T. Suzuki, T. Kobayashi, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, T. Kawanishi. Simultaneous imaging of initiator / effector caspase activity and mitochondrial membrane potential during cell death in living HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1693**, 101-110 (2004)
- (2) H. Tanaka, C. Komikado, H. Shimada, K. Takeda, I. Namekata, T. Kawanishi, K. Shigenobu; The R(-)-Enantiomer of Efonidipine Blocks T-type but Not L-type Calcium Current in Guinea-Pig Ventricular Myocardium, *J Pharmacol. Sci.*, **96**, 499-501 (2004)
- (3) 川西 徹, 河合 洋: 細胞傷害機構のイメージング, *実験医学* **22**, 428-429 (2004)
- (4) T. Nishigaki, C. D. Wood, Y. Tatsu, N. Yumoto, T. Furuta, D. Ellias, K. Shiba, S. A. Baba, A. Darszon, A sea urchin jelly peptide induces a cGMP-mediated decrease in sperm intracellular Ca^{2+} before its increase. *Dev. Biol.* **272**, 376-388 (2004).
- (5) T. Furuta, H. Takeuchi, M. Isozaki, Y. Takahashi, M. Sugimoto, M. Kanehara, T. Watanabe, K. Noguchi, T. M. Dore, M. Iwamura, R. Y. Tsien, Bhc-cNMPs as either water-soluble or membrane-permeant photo-releasable cyclic nucleotides for both one and two-photon excitation. *ChemBioChem*, **5**, 1119-1128 (2004)
- (6) H. Ando, T. Furuta, H. Okamoto, Photo-mediated Gene Activation using Caged mRNA in Zebrafish Embryos. *Methods in Cell Biology*, **77**, 159-171 (2004)
- (7) T. Furuta, K. Noguchi, Controlling cellular systems with Bhc-caged compounds. *Trends Anal. Chem.* **23**, 511-519 (2004)
- (8) T. Hashimoto, H. Ohata, and K. Momose. Itch-scratch response induced by lysophosphatidic acid in mice. *Pharmacology* **72**, 51-56 (2004)
- (9) Masumiya H., Saito M., Ito M., Matsuda T., Noguchi K., Iida-Tanaka N., Tanaka H., Shigenobu K.: Lack of action potential-prolonging effect of terfenadine on rabbit myocardial preparations. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 131-135 (2004)
- (10) Takeda K., Yamagishi R., Masumiya H., Tanaka H., Shigenobu K. Effect of cilnidipine on L- and T-type calcium currents in guinea-pig ventricle and action potential in rabbit sinoatrial node. *J. Pharmacol. Sci.* **95**: 398-401 (2004)
- (11) Tanaka H., Masumiya H., Shigenobu K. Dihydropyridines with dual blocking activity on L-type and T-type Ca^{2+} channels. *Recent Res. Devel. Life Sci.* **2**:121-128 (2004)
- (12) Nakahara T, Mitani A, Kubota Y, Maruko T, Sakamoto K, Tanaka Y, Koike K, Shigenobu K, Ishii K. MaxiK channel-triggered negative feedback system is preserved in the urinary bladder smooth muscle from streptozotocin-induced diabetic rats. *J Smooth Muscle Res.* **40**:97-109 (2004)
- (13) Tanaka Y, Koike K, Alioua A, Shigenobu K, Stefani E, Toro L. Beta1-subunit of MaxiK channel in smooth muscle: a key molecule which tunes muscle mechanical activity. *J Pharmacol Sci.* **94**:339-47 (2004)
- (14) Masahiro Aoyama, Aki Yamada, Jing Wang, Susumu Ohya, Shinji Furuzono, Takayo Goto, Yasushi Ito, Tatsu-aki Matsubara, Kaoru Shimokata, Shingo Hotta, Wayne Chen, Yuji Imaizumi & Shinsuke Nakayama. Requirement of ryanodine receptor for pacemaker Ca^{2+} activity in ICC and HEK293 cells transfected with RyR3. *J. Cell Sci.* **171**, 2813-25 (2004)
- (15) 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)
- (16) 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).
- (17) 田中光, 川西 徹, 重信弘毅: Ca^{2+} の動きをミリ秒の眼で視る --- 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)
- (18) T. Furuta, Chapter 1.2: Coumarin-4-ylmethyl Phototriggers, in "Dynamic Studies in Biology: Phototriggers, Photoswitches and Caged

- Biomolecules*," M. Goeldner and R. S. Givens Eds, WILEY-VCH, Weinheim, pp 29-55 (2005)
- (19) C. D. Wood, T. Nishigaki, T. Furuta, S. A. Baba, A. Darszon, *J. Cell. Biol.* **169**, 725-731 (2005)
- (20) 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)
- (21) 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.
- (22) Hashimoto, T., H. Ohata, and K. Momose (2005) Lysophosphatidic acid induces histamine release from mast cells and skin fragments. *Pharmacology*, **75**, 13-20.
- (23) Namekata I., Nakamura H., Tanaka H., Shigenobu K.: Cardioprotection without cardiosuppression by SEA0400, a novel inhibitor of Na⁺-Ca²⁺ exchanger, during ischemia-reperfusion injury in guinea-pig myocardium. *Life Sci.* **77**:312-324 (2005)
- (24) 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)
- (25) Bai C., Namekata I., Kurokawa J., Tanaka H., Shigenobu K., Furukawa T.: Role of nitric oxide in Ca²⁺ sensitivity of the slowly activating delayed rectifier K⁺ current in cardiac myocytes. *Circ. Res.* **96**:64-72 (2005)
- (26) 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)
- (27) Nouchi H., Tanaka H., Shigenobu K.: Pharmacological properties of the developing chick myocardium. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* **11**:37-45 (2005)
- (28) 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)
- (29) Ohya S, Kuwata Y, Sakamoto K, Muraki K, Imaizumi Y. Cardioprotective effects of estradiol include the activation of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac mitochondria. *Am J Physiol*, **289**, H1635-1642 (2005).
- (30) 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 (2006) *Phytomedicine*, **13**, 401-411
- (31) A. Specht, J. S. Thomann, K. Alarcon, W. Wittayanan, D. Ogden, T. Furuta, Y. Kurakawa, M. Goeldner, New Photoremovable Protecting Groups for Carboxylic Acids with High Photolytic Efficiencies at Near-UV Irradiation. Application to the Photocontrolled Release of L-Glutamate. *ChemBioChem.* **7**, 1690-1695 (2006).
- (32) 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.
- (33) Namekata I., Kawanishi T., Iida-Tanaka N., Tanaka H., Shigenobu K.: Quantitative fluorescence measurement of cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibition by kinetic analysis in stably transfected HEK293 cells. *J. Pharmacol. Sci.* **101**: 356-360 (2006)
- (34) Namekata I., Shimada H., Kawanishi T., Tanaka H., Shigenobu K.: Reduction by SEA0400 of myocardial ischemia-induced cytoplasmic and mitochondrial Ca²⁺ overload. *Eur. J. Pharmacol.* **533**:108-115 (2006)
- (35) Kamata K., Satoh T., Matsumoto T., Noguchi E., Taguchi K., Kobayashi T., Tanaka H., Shigenobu K.: Enhancement of methoxamine-induced contractile responses of rat ventricle in streptozotocin-induced diabetes is associated with α 1Adrenoceptor upregulation. *Acta. Physiol. Scand.* **188**:173-183 (2006)
- (36) Matsuda T., Ito M., Ishimaru S., Tsuruoka N., Saito T., Iida-Tanaka N., Hashimoto N., Yamashita T., Tsuruzoe N., Tanaka H., Shigenobu K.: Blockade by NIP-142 of carbachol-induced action potential shortening and GIRK 1/4 channel. *J. Pharmacol. Sci.* **101**:303-310 (2006)
- (37) Kato K., Nouchi H., Ishikura K., Takaishi S., Motodate S., Tanaka H., Okudaira K., Mochida T., Nishigaki R., Shigenobu K., Akita H.: A facile access to spiro furanone skeleton based on

- Pd(II)-mediated cyclization-carbonylation of proargyric esters. *Tetrahedron* **62**: 2545-2554 (2006)
- (38) Tanaka Y., Tang G., Takizawa K., Eghbali M., Nishimaru K., Shigenobu K., Koike K., Stefani E., Toro L.: Kv channels contribute to nitric oxide- and atrial natriuretic peptide-induced relaxation of a rat conduit artery. *J Pharmacol Exp Ther*. **317**:341-354 (2006)
- (39) Somei M., Noguchi K., Yoshino K., Mori K., Asada M., Yamada F., Tanaka Y., Shigenobu K., Koike K.: 1-Hydroxytyohimbine and its derivatives: new potent α 2-blockers for the treatment of erectile dysfunction. *Heterocycles* **69**: 259-269 (2006)
- (40) Sakamoto K, Nonomura T, Ohya S, Muraki K, Ohwada T, Imaizumi Y. Molecular mechanisms for BK channel activation by a novel opener, 12, 14-dichlorodehydroabiatic acid. *J Pharmacol Exp Ther*, **316**, 144-153 (2006).
- (41) 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).
- (42) Morimura K, Yamamura H, Ohya S, Imaizumi Y. Voltage-dependent Ca^{2+} -channel block by openers of intermediate and small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in urinary bladder smooth muscle cells. *J Pharmacol Sci*, **100**, 237-241 (2006).
- (43) Kiyoshi H, Yamazaki D, Ohya S, Kitsukawa M, Muraki K, Saito SY, Ohizumi Y, Imaizumi Y. Molecular and electrophysiological characteristics of K^+ conductance sensitive to acidic pH in aortic smooth muscle cells of WKY and SHR. *Am J Physiol*, **291**, H2723-H2734 (2006).
- (44) Yamazaki D, Aoyama M, Ohya S, Muraki K, Asai K, Imaizumi Y. Novel functions of small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel in enhanced cell proliferation by ATP in brain endothelial cells. *J Biol Chem*, **281**, 38430-38439 (2006).
- (45) 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).
- (46) 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 cell death (2007) *J Pharmacol. Sci.*, **103**, 159-167
- (47) Takahara A., Nakamura H., Nouchi H., Tamura T., Tanaka T., Shimada H., Tamura M., Tsuruoka N., Takeda K., Tanaka H., Shigenobu K., Hashimoto K., Sugiyama A.: Analysis of arrhythmogenic profile in a canine model of chronic atrioventricular block by comparing In vitro effects of the class III antiarrhythmic drug nifekalant on the ventricular action potential indices between normal heart and atrioventricular block heart. *J. Pharmacol. Sci.* **103**: 181-188 (2007)
- (48) Nouchi H., Kaeriyama S., Muramatsu A., Sato M., Hirose K., Shimizu N., Tanaka H., Shigenobu K.: Muscarinic receptor subtypes mediating positive and negative inotropy in the developing chick ventricle. *J. Pharmacol. Sci.* **103**:75-82 (2007)
- (49) Tanaka H., Shimada H., Namekata I., Kawanishi T., Iida-Tanaka N., Shigenobu K.: Involvement of the Na^+/Ca^{2+} exchanger in ouabain-induced inotropy and arrhythmogenesis in guinea-pig myocardium as revealed by SEA0400. *J. Pharmacol. Sci.* **103**:241-246 (2007)
- (50) Hotta S, Yamamura H, Ohya S, Imaizumi Y. Methyl- β -cyclodextrin prevents Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in smooth muscle cells of mouse urinary bladder. *J Pharmacol Sci*, **103**, 121-126 (2007).
- (51) Morimoto T, Sakamoto K, Sade H, Ohya S, Muraki K, Imaizumi Y. Voltage-sensitive oxonol dyes are novel large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel activators selective for β 1 and β 4 but not for β 2 subunits. *Mol Pharmacol*, **71**, 1075-1088 (2007).
- (52) Hotta S, Kozo M, Ohya S, Muraki K, Takeshima H, Imaizumi Y. Ryanodine receptor type 2 deficiency changes excitation-contraction coupling and membrane potential in urinary bladder smooth muscle. *J Physiol*, in press (DOI: 10.1113/jphysiol.2007.130302).
- (53) Fujimura et al. (2007) Cell-based fluorescence assay for evaluation of new drugs potential for phospholipidosis in an early stage of drug development. *Exp and Toxicol Pathol* (in press).
- (54) Nouchi H., Tanaka H., Shigenobu K. Pharmacological properties of the developing chick myocardium. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* (in press)

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19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