

201010004B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

トランスクリプトソーム解析による医薬品の副作用機構の解明と、  
その副作用感受性診断、及び創薬への応用

平成20年度～22年度 総合研究報告書

主任研究者 水島 徹

平成23（2011）年 3月

## 目次

### I. 総合研究報告

トランスクリプトソーム解析による医薬品の副作用機構の解明と、その副作用感受性診断、及び創薬への応用 -----1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----14

III. 研究成果の刊行物・別刷 -----18

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

（総合）研究報告書

トランスクリプトソーム解析による医薬品の副作用機構の解明と、  
その副作用感受性診断、及び創薬への応用

主任研究者 水島 徹 熊本大学大学院生命科学研究部教授

### 研究要旨

我々が確立した薬剤性間質性肺炎に関する動物モデルにおいて、薬剤性間質性肺炎を起こす種々の薬剤効果を検討し、全ての薬剤が間質性肺炎様症状を起こすことを見出した。また PC-SOD やピルフェニドンにより、この症状が改善することを見出した。一方我々は、中用量ブレオマイシンをあらかじめ投与したマウスにレフルノミドを投与すると、TNF- $\alpha$ を投与しなくても間質性肺炎様症状が誘導されることを見出した。

次に我々は、この動物モデルの改善に取り組み、簡便、かつ再現性のよい動物モデルの構築に成功した。このモデルにおいてレフルノミドによる間質性肺炎の発症機構を検討し、レフルノミドが上皮細胞の上皮間葉転換を起こすことがその原因であること、及びその上皮間葉転換は、ウリジンの枯渇、Notch シグナルの活性化、転写因子 SIP1 の活性化を介して起こることを発見した。

さらに我々は、ゲフィチニブ（イレッサ）の間質性肺炎（肺繊維症）副作用に関する研究を行った。我々は、ゲフィチニブによる遺伝子発現変化の網羅的解析から、ゲフィチニブが熱ショックタンパク質（HSP）70（強力な細胞保護作用と抗炎症作用を持つ）の発現を強く抑制することを見出した。また我々はマウスを用いて、ゲフィチニブ依存に肺繊維化を起こす系（薬剤性間質性肺炎の動物モデル）を確立し、このモデルにおいてゲフィチニブ依存に HSP70 の発現が抑制されること、及び HSP70 過剰発現マウス（ゲフィチニブによる HSP70 発現抑制が起こらないマウス）では、ゲフィチニブ依存の肺繊維化も見られないことを見出した。以上の結果は、ゲフィチニブは HSP70 の発現を抑制することにより、間質性肺炎（肺繊維症）を起こすことを示唆している。

## A. 研究目的

医薬品の副作用、特に副作用感受性に関する個人差が臨床現場で大きな問題になっている。問題は、その副作用の発症機構が十分に理解されていないため、新薬候補品の副作用、及び患者の副作用感受性を予測出来ない点である。そこで本研究で我々はトランスクリプトソーム解析を用いて医薬品の副作用発症機構を解明し、新薬候補品の副作用、及び副作用感受性に関する個人差を予測する方法を確立する。この研究は以下に述べるように、新薬の開発にも繋がる。以下に我々がこれまで行ってきた、非ステロイド系抗炎症薬 (NSAID) に関する研究の成果を述べる。

アスピリンを代表とする NSAID は優れた抗炎症薬として世界中でよく使用されているが、その胃潰瘍副作用 (NSAID 潰瘍) が臨床現場で大きな問題になっている (米国では年間 16500 人が NSAID 潰瘍で亡くなっている)。我々は NSAID が誘導する遺伝子をストレス遺伝子チップ (自ら開発した、ストレス遺伝子に特化した DNA チップ) で解析し、NSAID が胃粘膜細胞死を誘導すること、及びこの細胞死が NSAID 潰瘍の原因であることを見出した。実際、市販されている NSAID の細胞傷害性と胃潰瘍副作用の間には有意な相関性が見られた (副作用予測システムの確立)。この結果は、細胞傷害性の少ない NSAID は胃潰瘍副作用

の少ない NSAID になることを示している。実際我々はそのような NSAID の合成に成功し、それらが十分な抗炎症作用を示すにも関わらず、ほとんど胃潰瘍を起こさないことを見いだした (現在前臨床試験中)。またこの細胞傷害に影響を及ぼす複数の遺伝子を同定し、その遺伝子多型により細胞の NSAID 感受性が変化することを見出したので、本研究で我々はこの成果を基に、患者の NSAID 潰瘍感受性を予測する方法を確立する。

また最近我々は、臨床現場で間質性肺炎副作用が問題になっている抗癌剤や抗リウマチ薬に関しても、ストレス遺伝子チップによるトランスクリプトソーム解析を行った。その結果、これらの医薬品が抗炎症作用を持つタンパク質の発現を強く抑えることを見出した。またこれまで成功していなかった薬剤性間質性肺炎の実験動物モデルの確立に成功し、これらの抗炎症タンパク質の減少が薬剤性間質性肺炎の原因になっていることを示唆した。以上の成果を受けて本研究で我々は、薬剤性間質性肺炎、及び他の医薬品副作用に関して、その発症機構を解明し、新薬候補品の副作用、及び患者の副作用感受性を予測する方法を確立すると共に、副作用の少ない新薬の開発に向けた研究も行う。

## B. 研究方法

抗癌剤 (ゲフィチニブ (イレッサ) な

ど)、抗リウマチ薬 (レフルノミド、エタネルセプトなど)、漢方薬 (小紫胡湯など) による間質性肺炎副作用 (薬剤性間質性肺炎) が臨床現場で大きな問題になっているが、その発症メカニズムはほとんど分かっていない。また欧米では、我が国ほど薬剤性間質性肺炎は問題になっていない。そこで薬剤性間質性肺炎発症機構を解明し、新薬候補品の副作用、及び患者の副作用感受性を予測する方法を確立すると共に、副作用の少ない新薬を開発することは大変重要である。これまでに我々は、これらの医薬品が SOD、HO-1、Nrf2、HSP など抗炎症作用を持つタンパク質の発現を強く抑えることを見出している。

薬剤性間質性肺炎研究が遅れていたのは、その動物モデルが確立されていなかったためである。我々は、TNF- $\alpha$  (薬剤性間質性肺炎において重要な役割を果たしている)、及び低用量ブレオマイシン (高用量ブレオマイシン単独で、間質性肺炎症状が現れる) をあらかじめ投与したマウスに、レフルノミドやエタネルセプトを投与すると、間質性肺炎症状が現れることを見出し、薬剤性間質性肺炎モデルを確立したと考えている。このモデルにおいて、PC-SOD (SOD を修飾し安定性を高めた製剤で、現在、間質性肺炎治療薬としての臨床試験中)、及び HO-1 の誘導剤により、この間質性肺炎様症状が改善することを見出した。以上の結果

は、これらの医薬品が抗炎症タンパク質を低下させることにより、間質性肺炎を引き起こしている可能性を示している。

そこで我々は、他の薬剤性間質性肺炎を起こす薬剤、及びその他の薬剤をこのモデルで検討し、このモデルが新薬候補品の間質性肺炎副作用を予測するシステムとして使用出来るかを検討する。また、SOD、Nrf2、HSP のノックアウトマウスや過剰発現マウスにおける薬剤性間質性肺炎を調べることにより、これらの因子が薬剤性間質性肺炎に関与していることを証明する。

### C. 研究結果

我々は、我々が確立した薬剤性間質性肺炎に関する動物モデル (TNF- $\alpha$ 、及び低用量ブレオマイシンを投与したマウスにさらに薬剤を投与し、間質性肺炎様症状が誘導されるかを調べる) において、薬剤性間質性肺炎を起こす種々の薬剤 (ゲフィチニブ、イマチニブ、パクリタキセル、アミオダロン、エタネルセプト、インフリキシマブ) の効果を検討し、全ての薬剤が間質性肺炎様症状 (組織傷害、炎症性細胞の浸潤、組織の繊維化、肺機能の低下) を起こすことを見出した。また PC-SOD やピルフェニドン (臨床試験において、間質性肺炎に対して有効性を示した医薬品) により、この症状が改善することを見出した。以上の結果は、このモデルが新薬候補品の間質性肺炎副作

用を予測するシステム、及び間質性肺炎治療薬の評価システムとして有用であることを示している。

一方我々はイマチニブなどが抗炎症タンパク質 (SOD、Nrf2、HSP) の発現を強く抑えることを見出していた。そこで本年度我々は、これらタンパク質のノックアウトマウスにおける薬剤性間質性肺炎 (上記のモデル) を調べ、これらのノックアウトマウスが薬剤性間質性肺炎を起こしやすいことを見出した。以上の結果から、ゲフィチニブなどはこれら抗炎症タンパク質を低下させることにより薬剤性間質性肺炎を起こしていることが考えられる。

一方我々は、中用量ブレオマイシンをあらかじめ投与したマウスにレフルノミドを投与すると、TNF- $\alpha$ を投与しなくても間質性肺炎様症状が誘導されることを見出した (より簡便な動物モデルの確立)。またこの時、上皮細胞の上皮間葉転換 (EMT、最近間質性肺炎に深く関与していることが報告) が起きることを見出した。以上の結果は、レフルノミドはEMTを起こすことにより、薬剤性間質性肺炎を誘導していることを示唆している。

そこで我々は、はさらに解析を進め、まずレフルノミド依存の EMT を試験管内で再現し、これがレフルノミドのピリミジン合成阻害作用に依存していること、及びこの EMT が Notch シグナル系を介する新しい機構で誘導されることを見出

した。さらに我々はレフルノミドを化学的に修飾し、EMT 誘導作用、及び間質性肺炎誘導作用を弱めることに成功した。

以上の結果は、レフルノミドは上皮細胞の EMT を起こすことにより、薬剤性間質性肺炎を誘導することを示唆している。

さらに我々はウリジンを経気道投与することにより、レフルノミド投与依存の肺での EMT 誘導、及び肺の繊維化をほぼ完全に抑制できることを見出した。この結果は、レフルノミド依存の薬剤性肺線維症の治療法の確立に繋がると考えている。

このように本研究により、これまでほとんど分かっていなかった薬剤性間質性肺炎誘導機構がかなり明らかになった。特に今年度の我々の結果から、薬剤性間質性肺炎に上皮細胞の EMT が関与することが初めて示唆された。この結果は、薬剤性間質性肺炎の予防 (新薬候補品の間質性肺炎副作用の予測)、及びその治療薬の開発に大きく貢献すると思われる。

ゲフィチニブ (イレッサ) の間質性肺炎 (肺繊維症) 副作用による死亡者は多く、社会問題になっている。一方、ある種の肺癌治療にはこの医薬品が必要不可欠であり、その治療法の確立、及び副作用の少ないゲフィチニブ誘導體 (改良薬) の開発が急務になっている。

最近我々は、ゲフィチニブによる遺伝子発現変化の網羅的解析から、ゲフィチニブが熱ショックタンパク質 (HSP) 70

(強力な細胞保護作用と抗炎症作用を持つ)の発現を強く抑制することを発見した。また我々はマウスを用いて、ゲフィチニブ依存に肺繊維化を起こす系(薬剤性間質性肺炎の動物モデル)を確立し、このモデルにおいてゲフィチニブ依存にHSP70の発現が抑制されること、及びHSP70過剰発現マウス(ゲフィチニブによるHSP70発現抑制が起こらないマウス)では、ゲフィチニブ依存の肺繊維化も見られないことを見出した。以上の結果は、ゲフィチニブはHSP70の発現を抑制することにより、間質性肺炎(肺繊維症)を起こすことを示唆している。

#### D. 考察

結果の欄に記載した

#### E. 結論

このように我々の研究により、これまでほとんど分かっていなかった薬剤性間質性肺炎誘導機構がかなり明らかになり、また我々の確立した動物モデルが有用であることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Makise, M., Matsui, N., Yamairi, F., Takahashi, M., Takehara, M., Asano, T. and Mizushima, T. Analysis of origin recognition complex in *Saccharomyces cerevisiae*, by use of

degron mutants. *J. Biochem.* 43, 455-465. (2008)

2. Mizushima, T. Development of new type of NSAIDs with lower gastric side effects. *Inflammation and Regeneration* 28, 100-104. (2008)
3. Matsuo T, Chen, J., Minato, Y., Ogawa, W., Mizushima, T., Kuroda, T. and Tsuchiya T. SmdAB, a heterodimeric ABC type multidrug efflux pump, in *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 190, 648-654. (2008)
4. Takehara, M., Makise, M., Takenaka, H., Asano, T. and Mizushima, T. Analysis of mutant origin recognition complex with reduced ATPase activity *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. J.* 413, 535-543. (2008)
5. Ishihara, T., Takahashi, M., Higaki, M., Takenaga, M., Mizushima, T. and Mizushima Y. Prolonging the *in vivo* residence time of prostaglandin E(1) with biodegradable nanoparticles. *Pharm. Res.* 25, 1686-1695. (2008)
6. Mima, S., Takehara, M., Takada, H., Nishimura, T., Hoshino, T., and Mizushima, T. NSAIDs suppress the expression of claudin-2 to promote invasion activity of cancer cells. *Carcinogenesis* 10, 1994-2000. (2008)

7. Ishihara, T., Tanaka, K., Tasaka, Y., Namba, T., Suzuki, J., Ishihara, T., Okamoto, S., Hibi, T., Takenaga M., Igarashi, R., Sato, K., Mizushima, Y. and Mizushima, T. Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase (PC-SOD) against colitis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 328, 152-164. (2009)
8. Tanaka, K., Suemasu, S., Ishihara, T., Tasaka, Y., Arai, Y. and Mizushima, T. Inhibition of both COX-1 and COX-2 and resulting decrease in the level of prostaglandins E2 is responsible for NSAID-dependent exacerbation of colitis *Eur. J. Pharmacol.* 603, 120-132. (2009)
9. Makise, M., Takehara, M., Kuniyasu, A., Matsui, N., Nakayama, H. and Mizushima, T. Linkage between phosphorylation of the origin recognition complex and its ATP-binding activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 284, 3396-3407. (2009)
10. Namba, T., Houman, T., Nishimura, T., Mima, S., Hoshino, T. and Mizushima, T. Up-regulation of S100P expression by non-steroidal anti-inflammatory drugs and its role in their anti-tumorigenic effects. *J. Biol. Chem.* 284, 4158-4167. (2009)
11. Namba, T., Tanaka, K., Ito, Y., Ishihara, T., Hoshino, T., Gotoh, T., Endo, M., Sato, K. and Mizushima, T. Positive role of CHOP, a transcription factor involved in the ER stress response in the development of colitis. *Am. J. Pathol.* 174, 1786-1798. (2009)
12. Takehara, M., Nishimura, T., Mima, S., Hoshino, T. and Mizushima, T. Effect of claudin expression on paracellular permeability, migration and invasion of colonic cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 825-831. (2009) (Selected for highlighted paper and selected for cover photograph in the issue)
13. \*Takeda, M., \*Maeda, T. (\*equal contributors), Ishihara, T., Sakamoto, H., Yuki, K., Takasaki, N., Nishimura, F., Yamashita, T., Tanaka, K., Takenaga, M., Igarashi, R., Higaki, M., Yamakawa, N., Okamoto, Y., Ogawa, O., Otsuka, M., Mizushima, Y. and Mizushima, T. Synthesis of prostaglandin E<sub>1</sub> phosphate derivatives and their encapsulation in biodegradable nanoparticles. *Pharm. Res.* 26, 1792-1800. (2009)
14. Hoshino, T., Namba, T., Takehara, M., Nakaya, T., Sugimoto, Y., Araki, W., Narumiya, S., Suzuki, T. and



- Mizushima, T. Prostaglandin E<sub>2</sub> stimulates the production of amyloid- $\beta$  peptides through internalization of the EP<sub>4</sub> receptor. *J. Biol. Chem.* 284, 18493-18502. (2009)
15. Suemasu, S., Tanaka, K., Namba, T., Ishihara, T., Katsu, T., Fujimoto, M., Adachi, H., Sobue, G., Takeuchi, K., Nakai A. and Mizushima, T. Role for HSP70 in protecting against indomethacin-induced gastric lesions. *J. Biol. Chem.* 284, 19705-19715. (2009)
16. Asano, T., Tanaka, K., Yamakawa, N., Adachi, H., Sobue, G., Goto, H., Takeuchi, K. and Mizushima, T. HSP70 confers protection against indomethacin-induced lesions of the small intestine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330, 458-467. (2009) (Selected for highlighted paper).
17. Ishihara, T., Takeda, M., Sakamoto, H., Kimoto, A., Kobayashi, C., Takasaki, N., Yuki, K., Tanaka, K., Takenaga, M., Igarashi, R., Maeda, T., Yamakawa, N., Okamoto, Y., Otsuka, M., Ishida, T., Kiwada, H., Mizushima, Y. and Mizushima, T. Accelerated blood clearance phenomenon upon repeated injection of PEG-modified PLA-nanoparticles. *Pharm. Res.* 26, 2270-2279. (2009)
18. Ishihara, T., Takahashi, M., Higaki, M., Mizushima, Y. and Mizushima, T. Preparation and characterization of a nanoparticulate formulation composed of PEG-PLA and PLA as anti-inflammatory agents. *Int. J. Pharm.* 385, 170-175. (2010)
19. Yamakawa, N., Suemasu, S., Kimoto, A., Arai, Y., Ishihara, T., Yokomizo, K., Okamoto, Y., Ohtsuka, M., Tanaka, K. and Mizushima, T. Low direct cytotoxicity of loxoprofen on gastric mucosal cells. *Biol. Pharm. Bull.* 33, 398-403.
20. Matsuda, M., Hoshino, T., Yamashita, Y., Tanaka, K., Maji, D., Sato, K., Adachi, H., Sobue, G., Ihn, H., Funasaka, Y. and Mizushima, T. Prevention of ultraviolet B radiation-induced epidermal damage by expression of heat shock protein 70. *J. Biol. Chem.* 285, 5848-5858. (2010)
21. Tanaka, K., Ishihara, T., Azuma, A., Kudoh, S., Ebina, M., Nukiwa, T., Sugiyama, Y., Tasaka, Y., Namba, T., Ishihara, T., Sato, K., Mizushima, Y. and Mizushima, T. Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase (PC-SOD) on

- bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 298, L348-L360. (2010)
22. Ishihara, T., Tanaka, K., Tashiro, S., Yoshida, K. and Mizushima, T. Protective effect of rebamipide against celecoxib-induced gastric mucosal cell apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 79, 1622-1633. (2010)
23. Hoshino, T., Matsuda, M., Yamashita, Y., Takehara, M., Fukuya, M., Mineda, K., Maji, D., Ihn, H., Adachi, H., Sobue, G., Funasaka, Y. and Mizushima, T. Suppression of melanin production by expression of HSP70. *J. Biol. Chem.* 285, 13254-13263. (2010)
24. Namba, T., Tanaka, K., Ito, Y., Hoshino, T., Matoyama, M., Yamakawa, N., Isohama, Y., Azuma, A. and Mizushima, T. Induction of EMT-like phenotypes by an active metabolite of leflunomide and its contribution to pulmonary fibrosis. *Cell Death Differ.* 17, 1882-1895. (2010)
25. Tanaka, K., Tanaka, Y., Namba, T., Azuma, A. and Mizushima, T. Heat shock protein 70 protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Biochem. Pharmacol.* 80, 920-931. (2010)
26. Namba, T., Hoshino, T., Suemasu, S., Takarada-Iemata, M., Hori, O., Nakagata, N., Yanaka, A. and Mizushima, T. Suppression of expression of endoplasmic reticulum chaperones by *Helicobacter pylori* and its role in exacerbation of NSAID-induced gastric lesions. *J. Biol. Chem.* 285, 37302-37313. (2010)
2. 学会発表 (招待講演のみ)
1. 水島徹 創薬を基盤とした大学改革、教育改革—熊本大学薬学部の取り組み— 富山大学での招待講演 (2008) (富山)
  2. 水島徹 ドラッグリプロファイリング 研究 東京大学薬学部での招待講演 (2008) (東京)
  3. 水島徹 Prostaglandin E<sub>2</sub> による Amyloid β 産生促進の分子機構解析 第一三共 (株) 研究所での招待講演 (2008) (東京)
  4. 水島徹 HSF1 ノックアウトマウスの、胃潰瘍、炎症性腸疾患感受性 日本薬理学会シンポジウムでの招待講演 (2008) (東京)
  5. 水島徹 副作用の少ない非ステロイド系抗炎症薬の開発 日本薬学会シンポジウムでの招待講演 (2008) (東京)
  6. Tohru Mizushima Genetic evidence for a

- protective role of heat shock proteins against irritant-induced gastric lesion and IBD. Digestive Disease Week (2008) (San Diego)
7. 水島徹 種々の消化管疾患疾患に対する HSP の保護効果 名古屋 HSP 研究会での招待講演 (2008) (名古屋)
  8. 水島徹 NSAIDs 潰瘍発症の分子機構 日本潰瘍学会での特別講演 (2008) (札幌)
  9. 水島徹 種々の消化管疾患疾患に対する HSP の保護効果 第5回 OMC Gastroenterology and Hepatology Research Group での特別講演 (2008) (大阪)
  10. Tohru Mizushima Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase (PC-SOD) on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. 13th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (2008) (Bangkok)
  11. 水島徹 HSP 誘導を介した、GGA の種々の消化管疾患治療効果 第10回 HSP/GGA 勉強会での特別講演 (2008) (札幌)
  12. 水島徹 NSAIDs 潰瘍発症機構とムコスタによる抑制効果に関する分子機構 大塚製薬での特別講演 (2008) (東京)
  13. 水島徹 HSF1、及び HSPs の遺伝子改変マウスを用いた、胃潰瘍、及び炎症性腸疾患に対する生体防御機構研究 日本薬学会関東支部会での特別講演 (2008) (千葉)
  14. 水島徹 私が受け継ぐ医薬品開発研究—リポ剤の次に来るもの— 日本 DDS 学会での招待講演 (2008) (東京)
  15. 水島徹 トランスクリプトソーム解析による医薬品の副作用機構の解明と、その副作用感受性診断、及び創薬への応用 医薬基盤研での特別講演 (2008) (大阪)
  16. 水島徹 トランスクリプトソーム解析による医薬品の副作用機構の解明と、その副作用感受性診断、及び創薬への応用 創薬バイオマーカー探索研究事業研究発表会での招待講演 (2008) (東京)
  17. 水島徹 温故知新創薬研究 第二回 熊本創薬シンポジウムでの招待講演 (2008) (熊本)
  18. 水島徹 医薬品開発の新しい流れ—既存薬の研究から新薬へ—第2回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウムでの特別講演 (2008) (京都)
  19. 水島徹 温故知新創薬研究 北海道大学薬学部での招待講演 (2009) (熊本)
  20. 水島徹 間質性肺炎に対する PC-SOD の効果 厚生労働省班会議での招待講演 (2009) (東京)
  21. 水島徹 既存薬の再評価と新たな適応の発見 大塚製薬研究所での招待講演

- 演 (2009) (徳島)
22. 水島徹 既存薬の再評価と新たな適応の発見 大正製薬 (株) での招待講演 (2009) (東京)
23. 水島徹 副作用の少ない NSAIDs の開発 第一三共 (株) での招待講演 (2009) (東京)
24. 水島徹 既存薬を利用した新しい創薬への挑戦 昭和薬科大学での招待講演 (2009) (東京)
25. 水島徹 温故知新創薬研究への挑戦 既存薬を利用した新しい創薬研究 慶應大学での招待講演 (2009) (東京)
26. 水島徹 徐放性 PGE1 製剤の開発 小野薬品工業 (株) での招待講演 (2009) (大阪)
27. 水島徹 PC-SOD に関する創薬研究 帝人ファーマ (株) での招待講演 (2009) (東京)
28. 水島徹 徐放性 PGE1 製剤の開発 旭化成ファーマ (株) での招待講演 (2009) (静岡)
29. 水島徹 徐放性 PGE1 製剤の開発 ロート製薬 (株) での招待講演 (2009) (東京)
30. Tohru Mizushima Development of new type of NSAIDs with lower gastric side effects. International conference on ulcer research (2009) (Split)
31. Tohru Mizushima Protective role for HSF1 and HSP70 against various gastrointestinal diseases. International conference on ulcer research (2009) (Split)
32. Tohru Mizushima A protective role of HSP70 against various diseases. The international congress on stress response in biology and medicine (2009) (Sapporo)
33. Tohru Mizushima Protective role of HSP70 against various gastrointestinal diseases. The international congress on stress response in biology and medicine (2009) (Sapporo)
34. Tohru Mizushima Case studies of drug repositioning in Japan. Drug repositioning summit (2009) (Boston)
35. 水島徹 ムコスタの新しい作用機構の発見 大塚製薬研究所での招待講演 (2009) (徳島)
36. 水島徹 NSAID 起因性胃潰瘍、小腸潰瘍、炎症性腸疾患に対する HSP70 の保護効果 日本潰瘍学会での招待講演 (2009) (東京)
37. Minoru Matsuda and Tohru Mizushima Prevention of ultraviolet B-induced
38. epidermal damage by expression of HSP70 International congress on photobiology (2009) (Dusseldorf)
39. 水島徹 世界初の HSP 誘導化粧品の新創製 再春館製薬所新商品発売式典での招待講演 (2009) (熊本)
40. 水島徹 トランスクリプトソーム解析による医薬品の副作用機構の解明と、その副作用感受性診断、及び創薬

- への応用 創薬バイオマーカー探索  
研究事業研究発表会での招待講演  
(2009) (東京)
41. Tohru Mizushima Therapeutic effect of  
lecithinized superoxide dismutase  
(PC-SOD) on idiopathic pulmonary  
fibrosis in humans and  
bleomycin-induced pulmonary fibrosis in  
mice. 2<sup>nd</sup> International Conference on  
Drug Discovery and Therapy (2010)  
(Dubai)
42. 水島徹 我が国の医薬品開発発展の  
ための提言 第三回熊本創薬シンポ  
ジウムでの招待講演 (2010) (熊本)
43. 水島徹 薬剤性間質性肺炎における  
EMT の関与 国立医薬品食品衛生研  
究所での招待講演 (2010) (熊本)
44. 水島徹 ドラッグリプロファイリン  
グ 日本薬学会での招待講演 (2010)  
(熊本)
45. 水島徹 徐放性 PGE1 製剤の開発  
アステラス製薬 (株) 研究所での招待  
講演 (2010) (静岡)
46. 水島徹 徐放性 PGE1 製剤の開発  
武田薬品工業 (株) 研究所での招待講  
演 (2010) (大阪)
47. 水島徹 創薬研究者養成プログラム  
熊本大学GPフォーラムでの招待講演  
(2010) (熊本)
48. 水島徹 薬剤性肺傷害における、  
EMT の役割 肺サーファクタント分  
子病態研究会 (2010) (札幌)
49. 水島徹 HSP70 によるメラニン産生  
抑制、及び紫外線に対する保護 日本  
化粧品学会 (2010) (東京)
50. Tohru Mizushima Protective role for  
HSP70 against various diseases. 8th  
international workshop on the molecular  
biology of stress response (2010) (Seorak)
51. Tohru Mizushima Therapeutic effect of  
lecithinized superoxide dismutase  
(PC-SOD) on idiopathic pulmonary  
fibrosis (IPF) in humans and  
bleomycin-induced pulmonary fibrosis in  
mice. American Thoracic Society  
International Conference (2010) (New  
Orleans)
52. 水島徹 紫外線に対する熱ショック  
タンパク質の効果と化粧品への応用  
明日の化粧品科学を創造する FJ セミ  
ナー (2010) (東京)
53. 水島徹 NSAID潰瘍発症機構の解明  
と、胃潰瘍副作用の少ない NSAID の  
開発 整形外科痛みを語る会 (2010)  
(淡路島)
54. 水島徹 レバミピドによるアポトー  
シス抑制機構 ムコスタ小腸研究会  
(2010) (大阪)
55. 水島徹 温故知新創薬研究への挑戦  
関水教授還暦記念シンポジウム  
(2010) (東京)
56. 水島徹 熱ショックタンパク質の多  
彩な薬理作用とその応用 消化器病  
態生理勉強会 (2010) (東京)

57. 水島徹 熱ショックタンパク質の多彩な薬理作用とその応用 日本蘇生学会での招待講演 (2010) (宇都宮)
58. 水島徹 薬剤性肺傷害における、EMTの役割 日本分子生物学会・生化学会合同大会でのシンポジウム (2010) (神戸)
59. 水島徹 既存薬の新しい薬効の発見とその医薬品開発への展開 熊本県薬剤師会学術研修会特別講演 (2010) (熊本)
60. 水島徹 熱ショックタンパク質の多彩な薬理作用とその応用 臨床ストレス応答学会大会招待講演 (2010) (熊本)
61. 水島徹 ドラッグリプロファイリング研究など、現在行っている医薬品開発の紹介と、共同研究開発、連携の提案 富士フイルム(株)での招待講演 (2010) (小田原)
62. 水島徹 セレコキシブ依存の胃潰瘍に対するレバミピドの効果 日本潰瘍学会シンポジウム招待講演 (2010) (大阪)
63. 水島徹 胃潰瘍副作用の少ないNSAIDの開発 生理研研究会『極性細胞の病態生理解明に向けた多角的アプローチ』招待講演 (2010) (岡崎)
64. 水島徹 セレコキシブ依存の胃潰瘍に対するレバミピドの効果 日本潰瘍学会シンポジウム招待講演 (2010) (大阪)
65. 水島徹 特発性肺線維症、潰瘍性大腸炎治療薬としての、レシチン化SODの開発 国際フリーラジカル会議招待講演 (2010) (京都)
66. 水島徹  $\beta$ グルカンの新機能-HSP誘導機能と機能性食品、化粧品、医薬品への応用 食品開発展での招待講演 (2010) (東京)
67. 水島徹 アルツハイマー病と慢性炎症 東京大学医学部での招待講演 (2010) (東京)
68. 水島徹 既存薬の新しい薬理作用の発見と、適応拡大への応用 鹿児島県薬剤師会特別講演 (2011) (鹿児島)
69. 水島徹 皮膚における熱ショック蛋白質の役割とその応用 第3回熊本乾癬病診連携フォーラム (2011) (熊本)
70. 水島徹 トランスクリプトソーム解析による医薬品の副作用機構の解明と、その副作用感受性診断、及び創薬への応用 創薬バイオマーカー探索研究事業研究発表会での招待講演 (2011) (東京)
71. 水島徹 既存薬の作用分子機構の解明と創薬への展開 日本薬学会での受賞講演 (2011) (東京)
- G.知的所有権の取得状況
1. 特許取得  
該当なし
  2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

研究成果に刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Makise, M., Matsui, N., Yamairi, F., Takahashi, M., Takehara, M., Asano, T. and <u>Mizushima, T.</u>	Analysis of origin recognition complex in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , by use of degron mutants.	<b>J.Biochem</b>	43	455-465	2008
<u>Mizushima, T.</u>	Development of new type of NSAIDs with lower gastric side effects.	<b>Inflammation and Regeneration</b>	28	100-104	2008
Matsuo T, Chen, J., Minato, Y., Ogawa, W., <u>Mizushima, T.</u> Kuroda, T. and Tsuchiya T.	SmdAB, a heterodimeric ABC type multidrug efflux pump, in <i>Serratia marcescens</i> .	<b>J. Bacteriol.</b>	190	648-654	2008
Takehara, M., Makise, M., Takenaka, H., Asano, T. and <u>Mizushima, T.</u>	Analysis of mutant origin recognition complex with reduced ATPase activity <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> .	<b>Biochem. J.</b>	413	535-543	2008
Ishihara, T., Takahashi, M., Higaki, M., Takenaga, M., <u>Mizushima, T.</u> and Mizushima Y.	Prolonging the <i>in vivo</i> residence time of prostaglandin E(1) with biodegradable nanoparticles.	<b>Pharm. Res.</b>	25	1686-1695	2008
Mima, S., Takehara, M., Takada, H., Nishimura, T., Hoshino, T., and <u>Mizushima, T.</u>	NSAIDs suppress the expression of claudin-2 to promote invasion activity of cancer cells.	<b>Carcinogenesis</b>	10	1994-2000	2008
Ishihara, T., Tanaka, K., Tasaka, Y., Namba, T., Suzuki, J., Ishihara, T., Okamoto, S., Hibi, T., Takenaga M., Igarashi, R., Sato, K., Mizushima, Y. and <u>Mizushima, T.</u>	Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase (PC-SOD) against colitis.	<b>J. Pharmacol. Exp. Ther.</b>	328	152-164	2009
Tanaka, K., Suemasu, S., Ishihara, T., Tasaka, Y., Arai, Y. and <u>Mizushima, T.</u>	Inhibition of both COX-1 and COX-2 and resulting decrease in the level of prostaglandins E2 is responsible for NSAID-dependent exacerbation of colitis	<b>Eur. J. Pharmacol.</b>	603	120-132	2009



Makise, M., Takehara, M., Kuniyasu, A., Matsui, N., Nakayama, H. and <u>Mizushima, T.</u>	Linkage between phosphorylation of the origin recognition complex and its ATP-binding activity in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	<i>J. Biol. Chem.</i>	284	3396-3407	2009
Namba, T., Houman, T., Nishimura, T., Mima, S., Hoshino, T. and <u>Mizushima, T.</u>	Up-regulation of S100P expression by non-steroidal anti-inflammatory drugs and its role in their anti-tumorigenic effects.	<i>J. Biol. Chem.</i>	284	4158-4167	2009
Namba, T., Tanaka, K., Ito, Y., Ishihara, T., Hoshino, T., Gotoh, T., Endo, M., Sato, K. and <u>Mizushima, T.</u>	Positive role of CHOP, a transcription factor involved in the ER stress response in the development of colitis.	<i>Am. J. Pathol.</i>	174	1786-1798	2009
Takehara, M., Nishimura, T., Mima, S., Hoshino, T. and <u>Mizushima, T.</u>	Effect of claudin expression on paracellular permeability, migration and invasion of colonic cancer cells.	<i>Biol. Pharm. Bull</i>	32	825-831	2009
*Takeda, M., *Maeda, T. (*equal contributors), Ishihara, T., Sakamoto, H., Yuki, K., Takasaki, N., Nishimura, F., Yamashita, T., Tanaka, K., Takenaga, M., Igarashi, R., Higaki, M., Yamakawa, N., Okamoto, Y., Ogawa, O., Otsuka, M., Mizushima, Y. and <u>Mizushima, T.</u>	Synthesis of prostaglandin E <sub>1</sub> phosphate derivatives and their encapsulation in biodegradable nanoparticles.	<i>Pharm. Res</i>	26	1792-1800	2009
Hoshino, T., Namba, T., Takehara, M., Nakaya, T., Sugimoto, Y., Araki, W., Narumiya, S., Suzuki, T. and <u>Mizushima, T.</u>	Prostaglandin E <sub>2</sub> stimulates the production of amyloid- $\beta$ peptides through internalization of the EP <sub>4</sub> receptor.	<i>J. Biol. Chem.</i>	284	18493-18502	2009
Suemasu, S., Tanaka, K., Namba, T., Ishihara, T., Katsu, T., Fujimoto, M., Adachi, H., Sobue, G., Takeuchi, K.,	A Role for HSP70 in protecting against indomethacin-induced gastric lesions.	<i>J. Biol. Chem</i>	284	19705-19715	2009

Nakai A. and Mizushima, T.					
Asano, T., Tanaka, K., Yamakawa, N., Adachi, H., Sobue, G., Goto, H., Takeuchi, K. and Mizushima, T.	HSP70 confers protection against indomethacin-induced lesions of the small intestine.	<i>J. Pharmacol. Exp. Ther.</i>	330	458-467	2009
Ishihara, T., Takeda, M., Sakamoto, H., Kimoto, A., Kobayashi, C., Takasaki, N., Yuki, K., Tanaka, K., Takenaga, M., Igarashi, R., Maeda, T., Yamakawa, N., Okamoto, Y., Otsuka, M., Ishida, T., Kiwada, H., Mizushima, Y. and Mizushima, T.	Accelerated blood clearance phenomenon upon repeated injection of PEG-modified PLA-nanoparticles.	<i>Pharm. Res</i>	26	2270-2279	2009
Ishihara, T., Takahashi, M., Higaki, M., Mizushima, Y. and Mizushima, T.	Preparation and characterization of a nanoparticulate formulation composed of PEG-PLA and PLA as anti-inflammatory agents.	<i>Int. J. Pharm</i>	385	170-175	2010
Yamakawa, N., Suemasu, S., Kimoto, A., Arai, Y., Ishihara, T., Yokomizo, K., Okamoto, Y., Ohtsuka, M., Tanaka, K. and Mizushima, T.	Low direct cytotoxicity of loxoprofen on gastric mucosal cells.	<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	33	398-403.	2010
Matsuda, M., Hoshino, T., Yamashita, Y., Tanaka, K., Maji, D., Sato, K., Adachi, H., Sobue, G., Ihn, H., Funasaka, Y. and Mizushima, T.	Prevention of ultraviolet B radiation-induced epidermal damage by expression of heat shock protein 70.	<i>J. Biol. Chem.</i>	285	5848-5858.	2010
Tanaka, K., Ishihara, T., Azuma, A., Kudoh, S., Ebina, M., Nukiwa, T., Sugiyama, Y., Tasaka, Y., Namba, T., Ishihara, T., Sato, K., Mizushima, Y. and Mizushima, T.	Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase (PC-SOD) on bleomycin-induced pulmonary fibrosis.	<i>Am. J. Pathol.</i>	298	L348-L360.	2010
Ishihara, T., Tanaka,	Protective effect of	<i>Biochem.</i>	79	1622-1633.	2010

K., Tashiro, S., Yoshida, K. and Mizushima, T.	rebamipide against celecoxib-induced gastric mucosal cell apoptosis.	<i>Pharmacol.</i>			
Hoshino, T., Matsuda, M., Yamashita, Y., Takehara, M., Fukuya, M., Mineda, K., Maji, D., Ihn, H., Adachi, H., Sobue, G., Funasaka, Y. and Mizushima, T.	Suppression of melanin production by expression of HSP70.	<i>J. Biol. Chem.</i>	285	13254-13263.	2010
Namba, T., Tanaka, K., Ito, Y., Hoshino, T., Matoyama, M., Yamakawa, N., Isohama, Y., Azuma, A. and Mizushima, T.	Induction of EMT-like phenotypes by an active metabolite of leflunomide and its contribution to pulmonary fibrosis.	<i>Cell Death Differ.</i>	17	1882-1895.	2010
Tanaka, K., Tanaka, Y., Namba, T., Azuma, A. and Mizushima, T.	Heat shock protein 70 protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice.	<i>Biochem. Pharmacol.</i>	80	920-931.	2010
Namba, T., Hoshino, T., Suemasu, S., Takarada-Iemata, M., Hori, O., Nakagata, N., Yanaka, A. and Mizushima, T.	Suppression of expression of endoplasmic reticulum chaperones by <i>Helicobacter pylori</i> and its role in exacerbation of NSAID-induced gastric lesions.	<i>J. Biol. Chem.</i>	285	37302-37313	2010

## Analysis of Origin Recognition Complex in *Saccharomyces cerevisiae* by Use of Degron Mutants

Masaki Makise<sup>1,†</sup>, Nanako Matsui<sup>1,†</sup>, Fumiko Yamairi<sup>1,†</sup>, Naoko Takahashi<sup>2</sup>,  
Masaya Takehara<sup>1</sup>, Teita Asano<sup>1</sup> and Tohru Mizushima<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto 862-0973; and <sup>2</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama 700-8530, Japan

Received November 22, 2007; accepted December 7, 2007; published online January 22, 2008

Origin recognition complex (ORC), a six-protein complex (Orc1p–Orc6p), may deeply involve in initiation of chromosomal DNA replication. However, since most temperature-sensitive *orc* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* show the accumulation of cells with nearly 2C DNA content, the exact stage at which ORC acts is not fully understood. In this study, we constructed a heat-inducible degron mutant for each ORC subunit. As well as each targeted subunit, other subunits of ORC were also rapidly degraded under non-permissive conditions. In the *orc5* degron mutant, incubation under the non-permissive conditions caused accumulation of cells with nearly 2C DNA content, and phosphorylation of Rad53p. When Orc5p (ORC) is depleted, this inhibits G1/S transition and formation of a pre-replicative complex (pre-RC). For pre-RC to form, and G1/S transition to proceed, Orc5p (ORC) must be present in late G1, rather than early G1, or G2/M. Block and release experiments revealed that Orc5p (ORC) is not necessary for S and G2/M phase progression. We therefore propose that ORC is necessary for the G1/S transition and pre-RC formation, and accumulation of cells with nearly 2C DNA content seen in various *orc* mutants is due to inefficient pre-RC formation, and/or induction of checkpoint systems.

**Key words:** DNA replication, heat inducible degron mutant, ORC, Orc5p, pre-replicative complex.

Abbreviations:  $\alpha$ -factor,  $\alpha$  mating factor; DHFR, dihydrofolate reductase; FACS, fluorescence-activated cell sorter; HA, haemagglutinin; HU, hydroxyurea; MCM, mini-chromosome maintenance complex of proteins; ORC, origin recognition complex; pre-RC, pre-replication complex.

The initiation of chromosomal DNA replication is tightly regulated to replicate the genome just once per cell cycle. To reveal the underlying molecular mechanism for this regulation, it is important to understand the initiator of chromosomal DNA replication. In *Escherichia coli*, DnaA is the initiator of chromosomal DNA replication: temperature-sensitive *dnaA* mutants show defects in initiation of DNA replication, and an *in vitro* chromosomal DNA replication system, reconstituted from purified enzyme, is dependent on DnaA (1). In eukaryotes, origin recognition complex (ORC) is the most likely initiator. ORC was originally identified as a six-protein complex that specifically binds to *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) origins of chromosomal DNA replication (2) (in this manuscript, 'ORC' refers to *S. cerevisiae* ORC). ORC homologues have been found in various eukaryotic species, including humans (3). Although there is only weak homology in amino acid sequence between ORC and DnaA, these two factors share a number of functions; (i) both bind to each origin of chromosomal DNA replication (1, 2); (ii) both bind to ATP and ADP, they have intrinsic ATPase activity, and adenine

nucleotides bound to them regulate their activities (4–10) (iii) both proteins interact with replicative DNA helicase and recruit it to each origin of DNA replication (1, 10, 11). These observations strongly suggest that ORC is the initiator of chromosomal DNA replication. However, an origin-dependent *in vitro* chromosomal DNA replication system has not yet been developed for eukaryotes, so the dependency of replication on ORC has not been formally proved.

Most temperature-sensitive *S. cerevisiae* *orc* mutants show the accumulation of cells with nearly 2C DNA content at non-permissive temperatures (12–16), suggesting that ORC may be involved in the G2/M progression rather than the G1/S transition. This observation argues against the idea that ORC initiates DNA replication. On the other hand, the contribution of ORC to the initiation has been suggested by using temperature-sensitive *orc* mutants and block and release experiments, microscopic observation and 2D gel experiments (13, 16–19). Thus, exact role of ORC *in vivo* is not yet fully understood. There are significant problems in interpreting results with such temperature-sensitive mutants; some mutant proteins show gain-of-function, and the mutant protein may maintain some functions even at non-permissive temperatures.

To address this issue, we used genetic systems that cause rapid and conditional elimination of the target protein. In yeast, we generally use a genetic shut-off

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +81 96 371 4323, Fax: +81 96 371 4323, E-mail: mizu@gpo.kumamoto-u.ac.jp

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.