

## 薬剤治療研究部（分子薬理研究室、実験薬理研究室）

### (1) 研究プロジェクト

遺伝子改変動物を用いたG蛋白質共役型受容体の個体レベルの機能解析。

G蛋白質共役型受容体の細胞レベルにおける機能解析：『可視化細胞生物学』手法の応用

生体内オーファンG蛋白質共役型受容体のリガンド探索、並びに機能解析。

G蛋白質共役型受容体の遺伝子発現レベルにおける機能解析

G蛋白質共役型受容体のバイオインフォマティクス

### (2) 研究の概要

医学が1つの "bioscience" であるならば、薬物治療も科学的客観性に基づいて行われなければならない。このことを bedside で実施するためには患者に投与されている薬物の体内動態（吸収、分布、代謝、排泄）、薬理作用、および臨床効果、副作用、中毒作用、そしてまた、これら薬物の有する特性が生理、病態や併用された他薬物との相互作用などでどのように変化するかを知ることは必須である。特に小児の薬物感受性が成人と大きく異なる原因をこれらの視点で検討する必要がある。この内、代謝速度の違いなど薬物動態の違いによるものは薬物の血中濃度を測定して薬用量を調節するなど対応が可能であり、また、わが国にもその領域の研究者がいるので、当研究部では受容体またはそれ以後の効果・副作用発現の機構の相違による薬物感受性異常の研究に主力を注いでいる。薬物作用機転の研究のためには分子生物学、細胞工学、細胞生理学的研究の理解が必要とされ、更に発生工学などの手法を用いた研究を推し進めている。

1980年代後半国際的に組織されたヒトゲノムプロジェクトは当初の予定より早く推移し、2003年にはほとんどのヒトゲノム塩基配列が明らかとなるとされている。現在、生命科学研究の関心は構造（塩基配列）から機能ゲノム科学（Functional Genomics）へと移行し、ポストゲノム時代へ突入しつつある。従来分子医学では特定の遺伝子（産物）に注目して病態や治療を解析してきたが、ゲノム医学時代に入って系統的なゲノムスクランニングやプロテオームスクランニングが可能となりつつある。このようなゲノムサイエンスの大きなうねりが生命科学そのものを大きく転換しつつあり、これからの生命科学の重要な主題は「ゲノム情報からの生命科学」であると認識している。この中において、当研究部ではオーファンG蛋白質共役型受容体（GPCR）をモデルに遺伝子から機能解析へのアプローチを開始しつつある。

G蛋白質共役型受容体（GPCR）は細胞膜を7回貫通する特徴的な分子構造を有し、単一の分子としては各種発生・分化の制御、多くの先天性異常症などの疾患責任分子として、また更に臨床治療標的として最も重要なものである。多彩なリガンドに対応して外的シグナルを受容し重要な生理機能の制御を司る巨大な遺伝子ファミリーで、ゲノム上約数千遺伝子が存在すると考えられている。現在までに約250の遺伝子が同定されているが、その中でリガンドとの対応が明らかなのは約150だけである。すなわち、他のGPCRはリガンド、生理的機能が不明の、いわゆる"オーファン受容体"である。現在のゲノム構造解析の進展、ゲノム・データベースの増大に伴い、非常に多くのGPCRがクローニングされつつあり、したがって今後急速にオーファンGPCRが増大することは予測に難くない。また、

オーファンGPCRは新しいバイオロジー(シグナル経路)を展開する可能性が高く、したがってそれら加速度的に増大するオーファン受容体に対応する生体内リガンド並びにその受容体生理機能を迅速かつ高効率に解析、同定することはまさに Functional Genomics のアプローチを考える上で格好のモデルである。

現在それらの問題に対しいくつかのアプローチを試みている。大きく分けると、バイオインフォマティクス、構造生物学などによるいわゆる"DRY BIOLOGY からのアプローチ"と従来の分子生物、細胞生物学研究に基づく、蛋白、細胞、個体レベルでのいわゆる"WET BIOLOGY からのアプローチ"に属するものであるが、相互に補完し合いゴールを目指している。具体的戦略として上記の5つの研究プロジェクトを進行している。

本年度における各研究プロジェクトの研究成果は以下の通りである。

#### 遺伝子改変動物を用いたG蛋白質共役型受容体の個体レベルの機能解析

近年、G蛋白質共役型受容体が多数クローニングされ、それぞれの受容体には従来の薬理特性からは予測できなかった新しいサブタイプが発見され、サブタイプ特異的薬物による機能評価が行われつつある。また更に、遺伝子改変動物を用い、各サブタイプ受容体の個体レベルでの機能評価が可能となり、現在受容体機能はこの新しい観点から考え直されようとしている。このような背景のもと、G蛋白質共役型受容体の代表であり、複数のサブタイプが存在することが知られてきているバゾプレッシン受容体や $\beta_1$ アドレナリン受容体をモデル系として用い、遺伝子改変動物(ノックアウトマウス、トランスジェニックマウス)による各受容体の個体レベルでの機能評価と新規開発薬物の個体レベルでの薬効評価を行った。

本年度は、各受容体のうち特に生理機能が明らかになっていない $\beta_1$ アドレナリン受容体、V1a、V1bバゾプレッシン受容体について、マウス未分化胚細胞を用いたジーンターゲット法およびトランスジェニック技術を用いて遺伝子改変マウスの作成を行い、この変異動物を解析し、受容体の生理機能、薬物の選択性を明らかにした。

具体的成果としては、本年度はマウス $\beta_1$ アドレナリン受容体のノックアウトマウスの作製および解析を行った。本研究から、血管の $\beta_1$ -ARの機能的意義について、以下のような新たな知見が得られた。

- 大動脈標本でのNE収縮に奇与する受容体サブタイプは、 $\beta_{1d}$ -ARが最も優位である。
  - $\beta_{1d}/-$ マウスでは、5-HTあるいはKClのような $\beta_1$ -AR作動薬以外の血管収縮生物質に対する感受性が亢進している可能性がある。
  - 血管平滑筋の $\beta_{1d}$ -ARは生体の循環機能維持に重要な役割を演じている。
- また、マウスバゾプレッシンV1a、V1b受容体のノックアウトマウスの作製を行った。

#### 体内オーファンG蛋白質共役型受容体のリガンド、機能探索

ヒトを含み全ての多細胞生物は、数々の情報伝達物質による細胞間コミュニケーション・ネットワークによって生命維持に必須のホメオスタシスを保っている。例えば食欲、睡眠、呼吸・循環などの我々がごく日常的に経験する基本的な生命現象の制御もすべて、複雑な全身性あるいは局所性の細胞間情報ネットワークによって営まれている。細胞間情報ネットワークは、まずホルモンや神経伝達物質等の細胞間情報伝達物質(リガンド)を同定し、さらにそれらを特異的に認識する受容体を同定することにより、大きく理解が進展してきた。しかし、新しいリガンドの発見は、近年徐々に頭打ちの感が出てきており、研究手法の転換が必要と考えられる。

現在臨床応用されている薬剤の約半数は、多様なリガンドを感知するG蛋白共役型の細胞表面受容体群を作用標的としているが、その大半は未だにオーファン受容体として残された

ままであり、ポストゲノムにおける生体内情報伝達ネットワークの基礎研究およびその応用としてのゲノム医薬開発の両面から見て、無限の可能性を秘めている。

本研究部では、リガンドが同定されていない受容体（オーファン受容体）をターゲットにして、未知のリガンドを探索し、その機能と作用機構を探究することにより、生命現象の理解を深め、新規医薬品等への応用の可能性を探索することも研究テーマとしている。

具体的な研究手法としては、通常の薬理学と逆の研究手法を採る。すなわち受容体をコードするゲノム情報からオーファン受容体を得、それを釣り餌として対応するリガンドを同定する手法を用いて、リガンド・受容体で構成される特異的な情報伝達経路を探索する。また、これと並行して、リガンドが特異的に結合したときに生じる細胞内シグナルの高感度検出系を、従来から行ってきた受容体の可視化技術を組み合わせ開発する。さらに、リガンド及び受容体の遺伝子を欠損あるいは過剰発現する動物（主としてマウス）を作製し、新規の細胞間情報ネットワークの機能解明を行い、生体内の高度な制御機能解明へと迫る。

本研究課題は、基本的な生命現象の遺伝子レベルでの解明に資するばかりでなく、受容体が新規医薬創製のためのターゲットとなり得ることから、現状で克服が困難な疾患に対する先進医療技術等の実現に向けた、先端的基盤技術の創出につながることを期待される。

### **蛋白質共役型受容体の遺伝子発現レベルにおける機能解析：臓器別標準化 cDNA マイクロアレイを用いた疾患モデル動物の解析**

国際的ヒトゲノムプロジェクトにより 2001 年はじめにヒトゲノムのドラフト配列が発表された。その結果、当初 10 万個前後存在すると考えられた発現遺伝子数が 3 万個前後であることが明らかになった。今後は、この少ない遺伝子がどのようにして高次機能を発揮しているか（機能ゲノム科学）へ研究の焦点が移行すると考えられる。遺伝子機能解析に関しては未だ汎用性のある方法論が確立していないが、近年開発された cDNA マイクロアレイ法は、微量検体で発現変動している遺伝子群を解析する技術として現在飛躍的にその普及性をのばしており、その応用はゲノムプロジェクトより得られた遺伝子情報と相まって、今後遺伝子機能解析の最有力な技術となることが期待されている。

次世代の医薬品探索にこれらの技術を導入することは、種々の病態に特異的な遺伝子発現パターンを同定し、医薬品開発のターゲットを迅速に発見することを可能にする。このような背景のもと、我々は病態モデル動物の病態特異的な遺伝子発現を明らかにすることを目的に、各臓器別標準化 cDNA ライブラリーの作成を行い、それを遺伝子ソースとして臓器別標準化 cDNA マイクロアレイの構築を行った。また、実際に作成したマイクロアレイを利用して、IgA 腎症モデルマウスの腎臓における遺伝子発現解析を行った。

具体的成果としては、

#### **(a)臓器別標準化 cDNA マイクロアレイの作成**

腎標準化ライブラリーより、任意に 4224 クローンを選択し、マイクロアレイを作成した。様々な遺伝子をランダムにスポットしたマイクロアレイと、今回作成した臓器別標準化 cDNA マイクロアレイに腎臓由来 RNA から作成したターゲット cDNA をハイブリダイズし、それらと比較した。様々な遺伝子をランダムにスポットしたマイクロアレイでは、解析可能なシグナル強度が得られないスポットが多く存在したが、標準化 cDNA マイクロアレイでは、80%以上のスポットにおいて、解析可能なシグナル強度が得られた。塩基配列解析の結果、このマイクロアレイには少なくとも 3000 の独立クローンが存在することが判明し、ライブラリーの標準化が確実に行われていることを確認することができた。以上のことから、標準化 cDNA ライブラリーとマイクロアレイを組み合わせた臓器別標準化 cDNA マイクロアレイは病態モデル動物

の評価に有効である可能性が示された。

#### **(b)cDNA マイクロアレイを用いた IgA 腎症モデルマウスの解析**

腎標準化 cDNA マイクロアレイを用いて、IgA 腎症モデルマウスである HIGA マウスの腎臓における遺伝子発現解析を行った。その結果、組織学的には 6 週齢では病態が現れていないが、遺伝子発現においてはすでに発現変動が見られることが明らかになった。また、メサンギウム細胞の増殖など明らかな病態が認められる 25 週齢では、6 週齢に比べて遺伝子発現の変動が小さいことが明らかになった。有意な発現変動が認められた遺伝子には、細胞周期や細胞増殖に関連する分子が含まれ、特に成長因子、及びその受容体の発現変動が認められた。その中には PDGF (platelet-derived growth factor) などヒト IgA 腎症患者において発現上昇が報告されている遺伝子、メサンギウム細胞の増殖に関連すると報告されている遺伝子なども存在した。

変動した遺伝子には病態との関連が報告されていない 7 回膜貫通型受容体 EDG5 も含まれていた。EDG には互いに配列相同性の高い 8 つのサブタイプが存在する。マイクロアレイでこれらの受容体の識別ができていないか確認するために、各サブタイプ特異的プライマーを用いて、半定量的 RT-PCR を行った。その結果、EDG5 はアレイデータと同じ程度 (約 3 倍) の発現上昇が認められ、EDG6 が約 4 倍、EDG2,3 が約 2 倍発現が上昇していた。EDG5 のリガンドである Sphingosine-1-phosphate (SPP) は PDGF の刺激によって産生されることが示されている。我々は、PDGF がリガンドである SPP のみでなく受容体も発現上昇させるのではと考え、ラット培養メサンギウム細胞を用いて実験を行った。その結果、PDGF 低濃度では EDG5 のみが、高濃度では EDG1,2,3,5 の発現上昇が認められた。PDGF と SPP がメサンギウム細胞の増殖に対して正に働くことから、病態時のメサンギウム細胞の増殖にこの PDGF-SPP-EDG の系が働いていることが考えられた。

以上より、臓器別標準化 cDNA ライブラリーは、その臓器で高発現している遺伝子を適度に排除し、発現量の少ない遺伝子を濃縮したものである。それを元に作成した臓器別標準化 cDNA マイクロアレイは、様々な遺伝子をランダムに張り付けた一般的なマイクロアレイよりも病態モデル動物の各臓器における遺伝子発現解析に有効である。今後は、ノックアウトマウスなどを用いたパスウェイ解析や薬物応答性、副作用に関連する遺伝子群の解析など広く適応を考えている。