

4-2-9 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

- 1.1 遺伝子改変動物を用いた薬物受容体の個体レベルの機能解析
- 1.2 生体内オーファン受容体のリガンド、機能探索
- 1.3 リガンド開閉型受容体チャンネルの機能解析
- 1.4 EBM による治療の薬理作用に関する研究

2. 研究の概要

ヒトゲノム塩基配列が明らかとなった、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。従来の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った。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研究そのものを大きく転換しつつあり、これからの生命科学研究の重要な主題は「ゲノム情報からの生命科学研究」であると認識している。この中において、当研究部では、薬物標的因子の探索・解析を行い、新規薬物療法の開発を目的に、G蛋白質共役型受容体（GPCR）をモデルにして分子レベルから個体レベルでの機能解析・薬物評価を行っている。

3. 研究成果

3.1 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ている。

これまでに、それぞれの受容体サブタイプの遺伝子改変動物を作成するためにマウスの受容体サブタイプ遺伝子のクローニング、遺伝子構造の解析、遺伝子改変用プラスミドの作成を行ってきた。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1D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。

3.2 生体内オーファン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、大きく理解が進んできた。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蛋白質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事が期待される。

3.3 リガンド開閉型受容体チャネルの機能解析

上述したG蛋白質共役型受容体に加え、細胞膜上に存在し、各種薬物の標的と成り得る受容体蛋白質にはチャネル型の分子が挙げられる。我々はこのリガンド制御性チャネル型受容体に関しても、機能解析を通じて新たな薬物治療の方法を検索している。具体的には、細胞内でエネルギー貯蔵に利用されるアデノシン三リン酸(ATP)が、細胞障害時や、神経伝達物質分泌時に細胞外へ移行しオートクライン、パラクラインとして各種細胞機能を制御することを明らかにしてきた。特に、細胞膜表面のチャネル型ATP受容体(P2X受容体)ファミリーについて、その全て(P2X1-P2X7)のサブタイプをクローニングし、分子生物学及び、細胞生物学の手法を用い、この受容体の活性化、不活化の分子機構、及び薬物によるそれらの修飾に関する新たな機能調節様式について知見を得た。

これまでに、全てのP2X受容体サブタイプについて、チャネル活性化による電流と、細胞内カルシウム反応の相関を解析し、この受容体の機能発現には、膜電位の脱分極に加えて、細胞内カルシウムの上昇が重要な役割を担うことを明らかにしている。この結果はP2X受容体の発現量の多い下垂体組織等でのP2X受容体の役割を理解するために有用であると考えられた。

本年度は、P2X受容体は下垂体、副腎皮質、膵臓などの内分泌臓器と神経系に存在し、その活性化は標的細胞内カルシウム濃度を大きく変化させ、シナプス伝達を含めた各種分泌機能を明らかにした。この際に異なるP2X受容体サブタイプ同士が集まって一つのチャネルを形成すると、同種のサブタイプのみによって形成されるチャネルとは異なった薬物感受性や、活性化様式を示すことが分かった。この分子機構は、受容体の細胞外部分と細胞内カルボキシル基末端におけるドメインにより協調してなされることを明らかにした。また、このような異種サブタイプによるP2Xチャネルの中で、脊髄における痛覚の伝達に重要なP2X2/P2X3チャネルに特異的に結合し、その働きを調節する薬物が8-azidoATPであることを発見した。

今後さらにこの受容体について理解を深めることにより、痛みなどのATPによる情報伝達機構の解明と、新たな薬物開発の可能性が考えられる。

3.4 EBMによる治療の薬理作用に関する研究

研究の目的:大規模臨床試験に基づく薬物治療の目的は、医療、社会、経済の各分野において、より効果的、効率的な治療方針を解明することにある。これまで経験的に使用されてきた治療薬の使用に、多数の症例から成る統計的な論理基盤を与える意味で、EBM(Evidence based medicine)による治療が果たす意義は大きい。しかし、このようにして有効性が示された個々の薬物についても、全ての薬理作用が解明されているわけではない。薬物の作用点を受容体分子である場合も

同様に、一つの薬物が複数の異なる受容体サブタイプに、特有の優先順位で作用する。そこで、大規模臨床試験で有効性が示された薬物の作用点を、ヒトゲノム情報を利用して包括的に解明し、これまで不明であった薬物の作用機構を解明していくことは、新たな治療標的分子の発見と、より選択的な薬物の開発を効率的に行える方法であると考えられる。

研究計画：本研究では、これまで多数の患者を対象とした大規模臨床研究で有効性は示されてはいたものの、作用機序の解明が不十分であった薬物として細胞膜に存在するGタンパク質共役型受容体の拮抗薬について、その特性を明らかにし、より効果的な治療法の基盤を構築する。これら受容体に対する薬物は特異性が低く、副作用を伴うことも多い。このため、個々の受容体特異的な作用を理解し、より効果のある副作用の少ない新薬を得ることは、これまでの薬物のみを使用した基礎実験からは困難である。具体的にそのような薬物の一例として、幾つもの大規模臨床試験において、慢性心不全治療薬として効果が確立されたカルベジロールが挙げられる。この薬物はアドレナリン受容体サブタイプに広く作用することが知られているが、その正確な分子標的となるサブタイプ特異性や順序については未だ不明な点が多い。そこで、この研究において、ヒトアドレナリン受容体発現細胞系と特定のサブタイプ受容体を欠損させた動物を用い、受容体特異的生理作用を同定した上で、カルベジロールの作用点を明らかにする。さらに、薬物使用によるトランスクリプトーム、プロテオームの変化を網羅的に解析することにより、心不全治療に有効な情報伝達系における新たな、特異性の高い治療対象を同定する。

この研究の成果は、既に大規模臨床試験で有効性が示された治療法について、そのメカニズムに対する理解を分子レベルで深め、さらに有効で副作用の少ない次世代の薬物を開発する方法論的基盤を示すことにあると考えられる。