

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 ファーマコジェノミックスを用いた薬物標的因子の探索・解析ならびにゲノム創薬への応用
- 1.2 プロテオミックスを用いた疾患関連因子の探索
- 1.3 ファーマコジェネティックスを用いたオーダーメイド医療の確立
- 1.4 トキシコジェノミックスを用いた薬物毒性・安全性試験法の確立

2. 研究の概要

小児難治性疾患には、遺伝性疾患を含む数多くの難治性疾患があり、原因が不明のものや原因が明らかになっていても有効な治療法が確立されていないものなど多数残されている。近年のゲノムプロジェクトの進展に伴い、新たな疾患関連遺伝子や薬物標的因子も明らかになりつつあり、小児難治性疾患に関連した蛋白質や薬物標的因子の解明も期待されている。このような背景のもと、薬剤治療研究部では、成育医療における新規治療薬標的分子の探索、生体物質および薬物の受容体と細胞シグナル伝達機構の解明ならびにゲノム創薬への応用を図っている。研究手法として、分子生物学的手法・細胞生物学的手法・遺伝子工学的手法を用い、その分子レベルから個体レベルにおける機能解析を図り、小児難治性疾患の病因の解明と薬物療法の開発を目指し、最終的には治療に貢献することを目標としている。当研究部では、前記の研究法・研究分野を通して成育医療における薬物療法の研究を推進している。特に、ファーマコジェノミックスを用いた薬物標的因子の探索・解析ならびにゲノム創薬への応用は、数年にわたり研究を進めてきている。この研究テーマでは新規薬物療法の開発を目的に、遺伝子改変動物を用いて薬物受容体の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 ファーマコゲノミックスを用いた薬物標的因子の探索・解析

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およびゲノム創薬への応用

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。

A) 1アドレナリン受容体

1アドレナリン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、遺伝子構造の解析を行った。これらの受容体の中で、特に1Dアドレナリン受容体について、ES細胞を用いたジーンターゲティング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てきている。マウス1D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の結果、本受容体が血圧調節に重要な働きをし、さらに高血圧症の発症ならびにその維持に重要な働きをしていることを証明した。

今年度は、1Dアドレナリン受容体ノックアウトマウスを用いてさらに循環調節機構および中枢神経系におけるカテコールアミン/1アドレナリン受容体の機能解析を行った。循環調節機構におけ

る 1D アドレナリン受容体の生理作用として高張食塩水を中枢（脳室内）に負荷した場合、1D アドレナリン受容体ノックアウトマウスでは、高張食塩水負荷にたいして飲水反応が低下していることを明らかにした。中枢神経系における生理作用として 1D アドレナリン受容体ノックアウトマウスでは、痛覚刺激に対する反応性が低下、作業記憶が低下していたことより、カテコールアミンによるこれらの生理作用に 1D アドレナリン受容体が関与していることが明らかになった。また 1D アドレナリン受容体ノックアウトマウスおよび 1B アドレナリン受容体ノックアウトマウスの血管を用いた解析により、各血管における 1 アドレナリン受容体サブタイプの機能が明らかとなった。

以上、1 アドレナリン受容体ノックアウトマウスの解析より、サブタイプ選択的な 1D アドレナリン受容体拮抗薬の開発により、現在臨床応用されている 1 アドレナリン受容体拮抗薬に比べ、血圧調節においてより選択的な降圧剤となる可能性が明らかとなった。

B) バゾプレッシン受容体

バゾプレッシン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バゾプレッシン受容体サブタイプ遺伝子のクローニング、遺伝子構造の解析を行った。バゾプレッシン受容体の中で、特に V1a, V1b 受容体について、ES 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てきている。

今年度は、V1a および V1b バゾプレッシン受容体ノックアウトマウスをもちいて内分泌系、代謝系および中枢神経系におけるバゾプレッシン/V1a および V1b バゾプレッシン受容体の機能解析を行った。中枢神経系におけるバゾプレッシン/V1a バゾプレッシン受容体の機能解析をノックアウト動物を用いて行ったところ、V1a バゾプレッシン受容体欠損動物では学習・記憶能力に低下が見られた。この結果よりバゾプレッシン/V1a バゾプレッシン受容体が中枢機能において学習・記憶に重要な働きをしていることが明かとなった。V1bR ノックアウトでは統合失調症患者でみられる情報処理障害を観察する prepulse inhibition の障害がみられ、これには前頭葉皮質のドパミン機能の低下が関与していること、この障害は定型抗精神病薬によって改善されないが、非定型抗精神病薬によって改善され、これらの薬の反応性が統合失調症患者の臨床所見と一致していた。このことから、V1bR ノックアウトマウスは統合失調症の動物モデルとして新規の抗精神病薬の評価ツールとして有用であることが明らかとなった。

内分泌系においては、視床下部 下垂体 副腎系ホルモン軸において V1b バゾプレッシン受容体欠損マウスでは血中 ACTH の低下、副腎皮質ホルモンの低下、ストレス負荷時における ACTH、副腎皮質ホルモンの反応の低下が見られたことより、バゾプレッシン/V1b バゾプレッシン受容体が、視床下部 下垂体 副腎系ホルモン軸において重要な働きをしていることを明らかにした。さらに、バゾプレッシンのインスリン分泌作用に V1b バゾプレッシン受容体が関与していることを明らかにした。以上の結果より、V1a バゾプレッシンあるいは V1b バゾプレッシン受容体選択的薬物により、学習記憶の刺激作用、ACTH 分泌刺激、インスリン分泌刺激、統合失調症患者でみられる情報処理障害を改善させる新規の抗精神病薬になる可能性が期待され、選択的薬物の開発によりこれらの薬理効果が期待できることが明らかとなった。

3.2 プロテオミクスを用いた疾患関連因子の探索ならびにゲノム創薬への応用

創薬プロテオームファクトリープロジェクトは、厚生労働省・ヒューマンサイエンス振興財団・製薬企業・ナショナルセンターが参加する国家プロジェクトである。このプロジェクトは、我が国の主要疾患である糖尿病・癌・高血圧・痴呆症・免疫アレルギー疾患・腎疾患などにおける疾患関連たんぱく質の探索・同定する目的にて、平成 15 年度より開始されている。さらにこのプロジェクトでは、これらの疾患の診断・治療・予防に関心を持つ我が国の医療関係者等が共に利用できるよう

に発現プロテオミクスの基盤的データベースを構築し、新規たんぱく質やデータベースに関する知的財産を確保・活用してこれらの疾患に対する画期的な医薬品などの創出に役立てることを目的としている。

国立成育医療センター研究所は、平成 15 年度より、厚生労働科学研究である「疾患関連たんぱく質解析研究事業」に分担研究者として参加し、研究協力機関として「創薬プロテオームファクトリープロジェクト」の研究協力を行ってきている。このプロジェクトにおける我々の分担は、免疫アレルギー疾患・腎疾患をはじめとする小児難治性疾患患者由来の試料供給および疾患関連蛋白の探索・解析である。本研究では、免疫アレルギー疾患・腎疾患をはじめとする小児難治性疾患に関する疾患関連たんぱく質を網羅的に解析し、病態や投薬によって発現変動する因子をタンパク質レベルにて測定し、新規薬物療法を開発することを目的としている。薬剤治療研究部では、腎疾患（IgA 腎症、ネフローゼ症候群）の患者より得られたヒト試料（血清、尿）について最新のプロテオーム解析装置ならびにバイオインフォーマテックスを用いて疾患関連たんぱく質の網羅的解析をプロテオームファクトリー施設との共同で行っている。解析後、ヒト試料におけるプロテオーム・プロファイリングを構築し、疾患特異的蛋白の探索・同定と共に、病態・投薬に伴う変化を解析する。

3.3 ファーマコジェネティックスを用いたオーダーメイド医療の確立

成育医療において数多くの薬物が臨床で用いられているが、当研究部では、薬剤の薬物動態、薬物代謝の解析と薬物代謝・動態に関与する遺伝子情報を組み合わせた薬物療法の研究開発を行っている。特に、薬物代謝・動態に関与する遺伝子の中から薬物の細胞内吸収・排出に関与している MDR1 トランスポーターの機能解析および薬物動態・代謝に及ぼす影響を調べている。

MDR1 の生体内機能を解明するためノックアウトマウスが作成され解析が行われているが、脳内での薬剤蓄積や神経毒性など脳への影響が大きく、消化管や肝臓などにおける MDR1 の機能を解析することは困難であった。今年度は、消化管や肝臓などにおける MDR1 の機能を解析するため、臓器特異的 MDR1 欠損マウスを作成中である。

3.4 トキシコゲノミクスを用いた成育医療における薬物試験法の確立

トキシコゲノミクス（毒性遺伝情報学）は、疾患や毒性影響における遺伝子と環境因子の相互関係を理解するために、ヒトゲノム情報とゲノム解析方法を応用して遺伝子レベルで解明する 21 世紀の毒性評価・創薬テクノロジーである。DNA マイクロアレイやプロテインチップを用いることにより、遺伝子およびたんぱく質発現プロファイリングの構築が可能となる。現在、手術中に病変部位とともにやむを得ず切除される正常組織（主に肝臓、腎臓）の供出を受け、日本人の組織から得られた培養細胞を用いた解析に重点が置かれている。しかし、十分な倫理評価と研究計画の審査、インフォームドコンセントの取得など課題は多く、施設の整備やワーキンググループの教育等にかかる費用と時間は莫大ながら、その対価は年間獲得データが数十例と必ずしも大きくない。

一方、動物実験等から、環境因子や薬物が小児、特に胎児や胚発生段階において高い毒性影響を持ち、形態形成・機能発現の異常予測と早期対処が求められ、トキシコゲノミクスの必要性が高まっている。近年の臍帯血を用いた研究では高濃度の内分泌攪乱物質、重金属、植物エストロゲンが検出されており胎児がこれらの物質に常に重被曝する危険性を示唆しているが、各臓器に及ぼす直接影響を検討する術は充分とは言えず、誕生後の追跡調査、および実験動物のデータに頼るしかない。本研究では、この点に着目し、ヒト献体組織に代わる新規研究ツールとしてヒト幹細胞を用いることによりトキシコゲノミクス研究を安価に、しかも短期間で行う技術を開発し、人体発生過程における薬物および環境物質毒性評価の方法論の確立と新薬開発への応用を目指している。ヒト幹細胞を用いて、様々な臓器に発生過程の細胞群をつくり、薬物・環境因子に対する毒性反応を遺伝子解析で検討する。ヒト幹細胞より神経細胞や心筋、血球細胞、肝細胞および血管内皮などに分化誘導を行い、諸組織における各発生段階について主に DNA マイクロアレイ解析を中心に毒性試験を行い、

形態形成、機能発現の異常にかかわるゲノム発現系を包括的に捉え、基礎となるデータベースの作成を行う。それにより、人体に直接メスを入れることなく発育障害や形成異常をより in vivo に近い形で詳細に再現することが可能になり、同時にその水面下で動く遺伝子群の解明も進められる。さらに遺伝子群のデータをもとに遺伝子改変動物実験を組み合わせることにより、より詳細で正確な毒性評価が可能となると共に薬物・環境物質の長期的、大量暴露時の直接効果の推定が可能となる。さらに、個体レベルでの薬物の効果について検討することが可能となり、新薬の開発が可能になる。

今年度は、幹細胞から種々の組織への分化誘導を行い、培養系の確立を行った。