

課題番号	LS067
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成 23 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	生体リズム学を基盤とする時間医薬イノベーション
研究機関・ 部局・職名	京都大学・薬学研究科・准教授
氏名	土居 雅夫

1. 当該年度の研究目的

生体リズム学に基づく時間医薬研究の展開を目指し、生体リズムを積極的に変更・調整するための医薬品開発と、生体リズムの破綻がもたらす疾病の分子メカニズムの解明およびそのヒトへの応用という研究課題を立案し、次のような計画を立てた。すなわち、生体リズム調整薬の開発へ向けたオーファン G 蛋白質共役受容体 (GPR) リガンド検索性の細胞株の樹立。脳内中枢時計 SCN を用いた DNA マイクロアレイ解析による GPR シグナル下流の情報収集。リズム異常に起因する疾病検査のための時計遺伝子欠損マウスの作製。新規降圧薬ターゲット HSD3B1 に対する選択的阻害薬開発へ向けた既存薬トリロスタンの類縁化合物設計。ヒト副腎アルドステロン産生細胞における *Hsd3b1* の発現制御解析。 *Hsd3b1* promoter-ルシフェラーゼ Transgenic マウスの作製。HSD3B1 定量識別のためのモノクローナル抗体の作製ならびに質量分析系のセットアップ。このように、各種測定系の確立・研究展開のための情報収集・遺伝子改変マウスの作成を行うことを目標にした。

2. 研究の実施状況

上記計画に従って課題を遂行した結果、順調に研究が進み、下記の成果を得た。とくに、これまでに私共はすでに脳内中枢時計 SCN において発現するオーファン GPR を同定していたが、2011 年度はこれに加え、さらに新たに GPR 下流の制御因子 RGS16 (Regulator of G-protein Signaling 16) を見出し、これが SCN の 24 時間振動を規定することを明らかにした (Doi et al., Nature Commun, 2011)。このことは先述の GPR とともに、SCN 内の GPR シグナルを標的とした創薬が睡眠覚醒障害などに対する新たな治療薬となることを支持する結果である。この他、GPR 安定発現細胞株を樹立し、新規降圧薬ターゲット HSD3B1 に対してはトリロスタンの類縁化合物を設計した。また、*Hsd3b1* の発現を調べた結果、ヒトのアルドステロン産生細胞において機能的な分子時計が存在することを明らかにした。*Hsd3b1* Transgenic マウスについては残念ながら目的に合致するラインを得ることができなかったが、並行して進めた時計遺伝子欠損マウスの作製は順調である。HSD3B1 サブタイプ識別のための質量分析においては定量用ペプチドの選定を行い質量分析系の基礎的セットアップを終えた。また、質量分析と並行してモノクローナル抗体の作製に挑んだ。これまでヒトの HSD3B はサブタイプ間の極度の構造的類似性から、サブタイプ特異的な抗体を樹立するのは困難とされてきた。しかしながら私共は今回、GANP マウスを利用した高親和性抗体作製技術を用いて膨大な数のモノクローナル抗体をスクリーニングした結果、HSD3B1 に特異的なサブタイプ選択的抗体を樹立することに成功した。この抗体は今後、原発性アルドステロン症の病因識別へ向けたヒトへの臨床応用を行う上で病態解析の重要なツールになると考えられる。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 7 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 4 件 <u>Doi M</u>, Ishida A, Miyake A, Sato M, Komatsu R, Yamazaki F, Kimura I, Tsuchiya S, Kori H, Seo K, Yamaguchi Y, Matsuo M, Fustin JM, Tanaka R, Santo Y, Yamada H, Takahashi Y, Araki M, Nakao K, Aizawa S, Kobayashi M, Obrietan K, Tsujimoto G, Okamura H: Circadian regulation of intracellular G-protein signaling mediates intercellular synchrony and rhythmicity in the suprachiasmatic nucleus. Nature Commun. 2, 327 (2011) Tanaka R, Tainaka M, Ota T, Mizuguchi N, Kato H, Urabe S, Chen Y, Fustin JM, Yamaguchi Y, <u>Doi M</u>, Hamada S, Okamura H: Accurate determination of S-phase fraction in proliferative cells by dual fluorescence and peroxidase immunohistochemistry with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) and Ki67 antibodies. J. Histochem. Cytochem. 59, 791-798 (2011) Imanishi M, Nakamura A, <u>Doi M</u>, Futaki S, Okamura H: Control of circadian phase by an artificial zinc finger transcription regulator. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 50, 9396-9399 (2011) Ota T, Fustin JM, <u>Doi M</u>, Okamura H: Molecular clocks in adrenal cortex. Mol. Cell. Endocrinol. 349, 30-37 (2011) (掲載済み一査読無し) 計 3 件 <u>土居雅夫</u>, 岡村 均: これからもっと増える生体リズム調節分子ー細胞時計からシステム時計のメカニズムへー 細胞工学 Special Review 31, 344-348 (2012) <u>土居雅夫</u>, 岡村 均: 細胞内 G 蛋白質シグナルの仕分けが生体リズムのタイミングを決めるー目覚まし遺伝子 RGS16 の発見ー 化学と生物 50, 5-7 (2012) <u>土居雅夫</u>: 高血圧と生体リズム異常ー新たな高血圧治療薬の開発に向けてー 医学のあゆみ 239, 876-881 (2011) (未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 16 件</p>	<p>専門家向け 計 15 件 <u>Doi M</u>, Okamura H: Temporal regulation of intracellular G protein signaling mediates intercellular synchrony and circadian rhythmicity in mammalian pacemaker neurons. Keystone Symposia, G Protein-Coupled Receptors: Molecular Mechanisms and Novel Functional Insights, Banff, Canada, February 17-22, 2012 [Poster] <u>Doi M</u>: Optogenetics: Manifold applications. The 8th Meeting of Japanese-German Frontiers of Sciences, Tokyo, Japan, October 27-31, 2011 [Chair & Planning group member] <u>Doi M</u>: Temporal Regulation of Intracellular G protein Signaling Mediates Intercellular Synchrony and Circadian Rhythmicity in Mammalian Pacemaker Neurons. The 8th Meeting of Japanese-German Frontiers of Sciences, Tokyo, Japan, October 27-31, 2011 [Poster] <u>Doi M</u>, Okamura H: Circadian regulation of intracellular G-protein signaling mediates intercellular synchrony and rhythmicity in the suprachiasmatic nucleus. Gordon Research Conference, Chronobiology, Lucca, Italy, June 12-17, 2011 [Poster] Ota T, <u>Doi M</u>, Okamura H: Molecular Clocks in Adrenal Zona Glomerulosa. The 37th Meeting of the International Aldosterone Conference, Boston, USA, June 2-3, 2011 [Speaker] <u>Doi M</u> and Okamura H: Coordinated regulation of circadian rhythms and homeostasis by the hormonal suprachiasmatic nucleus outputs. The 3rd World Congress of Chronobiology, Puebla, Mexico, May, 5-9 2011 [Speaker] <u>Doi M</u>: Body clock disturbances behind the pathogenesis of hypertension. The 6th International Symposium on Receptor Mechanisms, Signal Transduction and Drug Effects, Kyoto, Japan, April 1, 2011 [Invited speaker] <u>土居雅夫</u>: Exploitable Drug Targets for Circadian Clock Related Diseases. 第 34 回 日本分子生物学会 (横浜)2011 年 12 月 14 日 [座長兼ワークショップ講演] <u>土居雅夫</u>, 岡村 均: 視交叉上核ニューロン群の同期パターンを決める細胞内 G 蛋白質シグナル制御. 第 18 回日本時間生物学会年会(名古屋)2011 年 11 月 25 日 [座長兼シンポジウム講演] <u>土居雅夫</u>, 岡村 均: 脳内中枢時計における G 蛋白質を介したリズム調整システム. 第 84 回 日本生化学会大会(京都)2011 年 9 月 22 日 [シンポジウム講演] <u>土居雅夫</u>: 生体リズム学を基盤とする時間医薬研究の展開. 創薬薬理フォーラム 第 19 回シンポジウム(東京, 日本薬学会会長井記念館)2011 年 9 月 13 日 [シンポジウム講演] <u>土居雅夫</u>: 時計遺伝子と病気. 第 8 回 KEIO Clinical Science Club(東京)2011 年 7 月 27 日 [招待講演]</p>

様式19 別紙1

	<p>太田拓巳, 土居雅夫, 岡村 均: 副腎アルドステロン産生細胞における時計遺伝子群の自律的発現振動プロフィール. 第28回内分泌代謝学サマーセミナー(仙台)2011年7月8日 [ポスター発表]</p> <p>土居雅夫: これからもっと増える生体リズム調節分子～細胞時計からシステム時計の解析へ～東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻セミナー(東京大学)2011年7月6日 [招待講演]</p> <p>土居雅夫: 若手シンポジウム 第84回 日本内分泌学会学術総会(神戸)2011年4月23日 [座長・世話人]</p> <p>一般向け 計1件</p> <p>土居雅夫: 生体リズムと高血圧. 第3回 薬学の未来を考える京都シンポジウム—創と療の革新—(京都)2011年10月1日 [一般講演]</p>
図書 計1件	<p>土居雅夫, 江本憲昭, 岡村 均: 概日リズムと循環時間生物学 (海老原史樹文, 吉村 崇 編) 化学同人 p105-116 (2012)</p>
産業財産権 出願・取得状況 計0件	<p>(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件</p>
Webページ (URL)	<p>京都大学薬学研究科ホームページ 医薬創成情報科学専攻システムバイオロジー分野 土居雅夫 http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/system-biology/doimasa/</p> <p>京都大学ホームページ 細胞内G蛋白質シグナルの仕分けが生体リズムのタイミングを決める http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2011/110525_2.htm</p>
国民との科学・技術対話の実施状況	<p>2011年8月11日開催の京都大学薬学部オープンキャンパスにて高校生23名を対象に本研究プログラムの紹介および研究内容に関する討論会を行った。また、一般向け講演として2011年10月1日に開催された第3回薬学の未来を考える京都シンポジウム—創と療の革新—(京都)の参加者66名に対し、「生体リズムと高血圧」というタイトルで本プログラムの趣旨やすでに得られた成果に関する講演を行った。</p>
新聞・一般雑誌等掲載 計7件	<p>2011年6月2日掲載 朝日新聞(朝刊27面) 「目覚ましたんぱく 脳内に」</p> <p>2011年5月25日掲載 読売新聞(朝刊33面) 「体内時計 調節たんぱく質」</p> <p>2011年5月25日掲載 産経新聞(朝刊24面) 「“体内時計”司るタンパク質」</p> <p>2011年5月25日掲載 京都新聞(朝刊23面) 「体内時計を調律 タンパク質発見 睡眠障害治療に道」</p> <p>2011年5月25日掲載 日刊工業新聞(25面) 「体内時計の正確なリズム形成 たんぱく質を特定」</p> <p>2011年5月25日掲載 日本経済新聞(夕刊14面) 「朝寝坊させない たんぱく質発見 京大、新薬開発に一役」</p> <p>2011年5月25日掲載 中日新聞(夕刊12面) 「目覚まし遺伝子発現 マウス脳内、壊すと朝寝坊」</p>
その他	なし

4. その他特記事項

2011年4月20日 文部科学省 平成23年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞受賞

2012年3月30日 日本薬学会 平成24年度日本薬学会奨励賞受賞

実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	121,000,000	53,000,000	0	68,000,000	0
間接経費	36,300,000	15,900,000	0	20,400,000	0
合計	157,300,000	68,900,000	0	88,400,000	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	50,523,576	0	0	50,523,576	49,822,745	700,831	0
間接経費	15,900,000	0	0	15,900,000	7,950,000	7,950,000	0
合計	66,423,576	0	0	66,423,576	57,772,745	8,650,831	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	37,016,570	遺伝子発現検査装置、実験試薬、実験消耗品等
旅費	1,373,798	研究成果発表旅費(アメリカ・カナダ国際学会)等
謝金・人件費等	3,816,703	非常勤教職員人件費、実験補佐員謝金
その他	7,615,674	実験動物飼育管理業務請負等
直接経費計	49,822,745	
間接経費計	7,950,000	
合計	57,772,745	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
BMK-PKG-M X-I BioMark-I システム MXパッ ケージ	米国フリューダイ ム社製	1	20,983,200	20,983,200	2011/6/20	京都大学