

平成13年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

## トランスジェニックラットの作成とその公共利用のための胚バンクの検討

所属 自治医科大学分子病態治療研究センター 臓器置換研究部  
研究者 小林 英司

### 分担研究者

- (1) 自治医科大学 生理学第二講座 矢田俊彦
- (2) 自治医科大学 分子病態治療研究センター ゲノム機能研究部 間野博行
- (3) 自治医科大学 生化学講座 機能生化学部門 遠藤仁司
- (4) 自治医科大学 分子病態治療研究センター 発生工学研究部 袴田陽二
- (5) 国立小児病院 小児医療研究センター 実験外科生体工学部 利井 康
- (6) HAB 協議会付属霊長類機能研究所 佐藤哲男
- (7) 大塚製薬株式会社 宮本剛八郎

### 要旨

創薬等医学研究に有効なモデルラットの確立を目的に、ヒト等の遺伝子を持つトランスジェニック (Tg) ラットならびにその基盤となる遺伝子コンストラクトの作製を行った。更に、作製した Tg ラットを有効利用するための胚バンクシステムのあり方を検討した。

#### 1. 研究目的

創薬等臨床医学の研究用としてラット・マウス等の実験動物が広く利用されているが、ヒトと動物間で肝臓における薬物代謝酵素等に相違があり、動物実験の成績をヒトへ外挿することへの問題が指摘されている。本研究は、ヒトの病気を研究するには、ヒト疾患化モデルの作成が必要と考え、ヒト等の遺伝子をラットに遺伝子導入して Tg ラットを作成し、その有用性を明らかにするとともに、動物胚をバンキングすることは、ヒューマンサイエンスに携わる多くの研究者の研究発展に寄与するものと考え、そのシステム作りを検討することを目的とする。

#### 2. 研究方法

初年度(平成13年)は以下の項目について検討した。

- ① Tg ラットの作製とライン化 (小林、袴田)
- ② 生理学的研究に有用な Tg ラット作製のための基礎的研究 (矢田)
- ③ 血液疾患研究に有用な Tg ラット作製のための基礎的研究 (間野)
- ④ 生化学研究に有用な Tg ラット作製のための基礎的研究 (遠藤)

- ⑤ 薬物代謝能の測定 (佐藤、宮本)
- ⑥ ラット胚バンクシステムの検討 (小林)

### 3. 研究成果

袴田は、以下の Tg ラットの作製に成功した。

ヒト血液型(A,B)物質発現 Tg ラット:臨床ではドナー不足の理由から ABO 不適合移植が行われているが、今だ予後が不良である。その主な原因は、より有効な免疫抑制法を研究するモデル動物が存在しないことに起因する。袴田らは、げっ歯類におけるヒト血液型の分化(発達)及び免疫反応を研究する目的で、ヒト A, B transferase (h-Ats, h-Bts) Tg ラットの作製を行った。Tg ラットでは脳、だ液腺、肺、胃、腸管、膵臓および皮膚が染色されたが、赤血球、血管内皮では染色されなかった。特に小腸において抗原の発現が強く、A 型、B 型 Tg ラット間で小腸移植をしたところ、特異的な拒絶反応が認められ、本 Tg ラットがヒトの ABO 不適合移植モデルとなる可能性が示唆された。

EBNA-1 Tg ラット: EB ウイルスにより誘導される EVNA-1 (Epstein-Barr virus nuclear antigen-1) Tg ラットを作製し、EVNA-1 に腫瘍原性があることを明らかにした。EVNA-1 は臓器移植後におけるリンパ球増殖性疾患(PTLD)やホストの免疫寛容状態に関与することが知られている。従来、PTLD は EV ウイルス感染そのものによると考えられていたが、無ウイルス状態でも EVNA-1 タンパクが誘導されると PTLD 様の病態となることを明らかにした。

LacZ Tg ラット: 先に細胞マーキング用に GFP Tg ラットを作製したが、GFP は LacZ に比べ感度が低い。また、GFP ラットは outbred の Wistar ラットを遺伝背景に持つため、臓器移植モデルとして使用した場合、MHC が問題となる。今回、組織内の局在を明らかできる細胞マーキング用の動物モデルを開発する目的で、近交系ラットを用いて LacZ Tg ラットを作製した。LacZ Tg ラットは GFP Tg ラットと同じプロモーターを持ち、皮膚、筋肉系に強い発現が認められた。本ラットは臓器移植ならびに再生医学研究に有用なツールとなる可能性があることが示唆された。

HSV-tk Tg ラット: ガンシクロピルの投与により肝障害を誘発させられる、肝細胞移植モデル用 HSV-tk Tg を作製、6 匹ファンダーが得られた。現在解析中である。

研究分担者の矢田は生理学的研究に有用な Tg ラット作製のための基礎的研究として、生理学的研究に有用な遺伝子コンストラクト作成を検討した。膵ランゲルハンス島・細胞からのインスリン分泌は主に血中グルコース濃度により制御されており、この制御機構の破綻が、糖尿病である。グルコースによるインスリン分泌機構は消化管ホルモンの GLP-1 や GIP、膵ホルモンの PACAP といった、インクレチンホルモンにより増強される。これらのインクレチンは膵・細胞において各々の受容体からの刺激により cAMP 増加を引き起こしグルコース刺激によるインスリン分泌を促進する。cAMP の作用部位(分子標的)を同定することは、インスリン分泌機構の解明、新規インスリン分泌刺激薬開発の基礎的研究になる。本年度は cAMP の標的分子の dominant negative 型の発現 vector を構築し、in vitro でのインスリン分泌に対する影響を検討した。cAMP の標的分子が特異的なインスリン分泌調節分子として機能していることが示唆された。

研究分担者の間野は血液疾患研究に有用な Tg ラット作製のための基礎的研究として、血液疾患に有用な遺伝子コンストラクトの作成を検討した。白血病には、現在なお正確な診断が困難であり、かつ有効な治療法の存在しない白血病類縁疾患が数多くある。各患者の有効な治療法を選択する上でも正確な鑑別診断は必須であり、そのためには新たな分子診断マーカーの同定が最も重要であると考えられる。本年度は、骨髄異形成症候群 (MDS) と de novo 急性骨髄性白血病 (AML) との細胞生物学的相違の同定を目指した。MDS はしばしば AML 用への病態へと変化し、抗癌剤に抵抗性であるが、一般の AML は化学療法に反応性が良好である。したがって高齢者の白血病を診た場合、その患者が de novo の AML なのか MDS 由来なのかを判別することは治療法の上からも極めて重要である。自作カスタム DNA チップを用いて進行期の MDS 患者 5 例と de novo AML 5 例の冠者骨髄より造血幹細胞分画を純化し、比較したところ、Delta/Notch ファミリーに属する Dlk 遺伝子が前者に特異的に高発現することが明らかになった。Dlk が MDS 患者の造血幹細胞で高発現することは同疾患の発症機構への関与の面からも興味深い。現在 MDS の成因としての Dlk の意義を in vivo において検証するために、Dlk 発現 Tg ラットを作成するためのコンストラクトを作成中である。

研究分担者の遠藤は、生化学研究に有用な Tg ラット作製のための基礎的研究として、生化学研究に有用な遺伝子コンストラクト作成を目標に、当該年度は、ヒトミトコンドリア融合因子の新規クローニングとその機能解析を行った。ショウジョウバエのミトコンドリア融合因子からヒトホモログ (hfzo1-3) cDNA を単離した。これらをベクターに組み込み、これを HeLa 細胞に一過性発現後、ミトコンドリアの凝集を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。さらに各種欠失変異を作製し、同様の方法で機能ドメインを検定した。また電子顕微鏡を用いてミトコンドリア膜の融合を検定した。さらに本タンパクに対するポリクローナル抗体を作製した。HeLa 細胞からミトコンドリアを分画し、抗体を用いてミトコンドリア上の局在を生化学的に検定した。ヒトミトコンドリア融合因子 (hfzo1-3) は各々 741、769 および 757 のアミノ酸長を有する GTP 結合タンパクで、C 末端に二つの膜貫通ドメインと二つのコイルドコイルドメインを有する。また hfzo1 と 2 は一つの遺伝子から選択的スプライシングにて産生される。HeLa 細胞に一過性発現させたところいずれもミトコンドリアの凝集活性を示した。GTPase ドメインに不活型の点変異を導入すると、hfzo1 と 2 では凝集活性が抑制された。一番活性が高い hfzo2 を導入した HeLa 細胞をチトクローム C 染色後電子顕微鏡にてミトコンドリア像を観察すると、ミトコンドリア内膜の融合を示唆する像を認めた。HeLa 細胞のミトコンドリアを分離しプロテアーゼ保護実験を行ったところ、これらのタンパクは N 末端が細胞質側に存在し、C 末端がマトリックス側に存在することを示した。またミトコンドリア膜を可溶化してゲルろ過を行ったところ、いずれのタンパクも約 440kDa の複合体を形成していることを明らかにした。

共同研究者の佐藤らは創薬等に有効な Tg ラット作製のための基盤研究として、各種動物の肝臓における薬物代謝能を比較検討した。動物間で薬物代謝能は異なり、ヒトにおける薬物代謝やその毒性を評価するためには、ヒト型の肝細胞を有するモデル動物の確立が強く求められた。

小林は研究資源として多くの研究者が利用できるシステム作りのあり方を検討した。2001 年 8 月に作製された GFP ラットを論文発表し、2002 年 3 月末までに寄られた国内 8 件、海外 15 件分の分与依頼書をもとに Tg ラットの公開方法、ラット胚のバンク化そしてユーザーの現状を解析した。その結果、その何れもが胚の分与ではなく、動物個体での分与を希望していることが明らかとなった。

#### 4. 考察

創薬等臨床医学の研究には、これまで多くの実験動物が利用されてきた。特にラットおよびマウスは微生物学的にも遺伝学的にもよく統御されているため、薬物の薬効、安全性試験には欠か

せない動物である。ラットはマウスに比べ体サイズが約 10 倍大きく、繰り返しの採血、血圧測定あるいは尿量測定など生理学的パラメーターの測定が必要な実験に特に多用される。臓器移植実験においては外科手技の容易さに加え、拒絶反応のパターンがマウスに比して明瞭であることから、免疫抑制剤の薬効検定にはラットが使用される。しかし、薬物の多くを代謝する肝臓の薬物代謝酵素の活性が動物種で異なり、さらにはヒトにおいても人種で異なることが明らかにされるようになり、動物実験の成績をヒトへ外挿することへの危険性が指摘されている。しかし、*in vitro* の成績のみで薬効や安全性を評価することは難しく、創薬医学研究のために *in vivo* で利用できるヒト型モデルラットの確立が望まれている。我々はヒト型モデルラットの確立を目的に、発生工学的手法を駆使して関連遺伝子を導入したトランスジェニック(Tg)ラットの技術開発ならびにその動物の有用性を検討した。

Tg ラットの作製は、体サイズが大きいことによる飼育スペースと飼育管理費など経済的な問題ならびに受精卵膜が脆弱という作製上の技術的な問題からその作製はマウスに比べ一般的ではない。我々は高度の作製技術と効率的な Tg ラットのライン化により本年度、6 種類遺伝子 (GFP, EBNA-1, ヒト血液型 A, B, LacZ, tk) について Tg ラットの作製に成功した。各遺伝子はラットが臓器移植研究に有用である事に鑑み選択した。GFP Tg ラットは臓器移植のみならず、臓器再生の研究分野でも大きな注目をあびている。更に、生理学的、血液学的あるいは生化学的分野で有用な Tg ラットの作製を目指し、遺伝子の構築を検討している。

Tg ラットの作製に加え、GFP ラットをモデルにしてラット胚バンクシステムの円滑な運営をはかるためのシミュレーションを行った。その結果、システムに関する種々の問題が明らかとなった。現システムでは、トランスジェニックラットの寄託は、胚のみで動物個体での寄託はできない。分与については胚のみの対応で、個体の分与は不可能となっている。今回の研究から、分譲を希望する側についていえば、その大多数が凍結胚による分与を希望しないことが明らかとなった。ラット胚の凍結融解法には未だユニバーサルな方法が確立されておらず、またその方法に関する情報も少ない。従って、今回の結果は凍結胚を確実に個体化することが難しいためと考えられる。次に、寄託者側の問題として、寄託するための胚を準備することが難しいことである。寄託者が胚の取り扱いに精通していることは希で、仮に技術的に対応が可能であっても、凍結胚を準備する経済的負担が問題となる。今回の GFP ラットは既に国内外から 20 件を超える分与希望があり、胚で分与をする場合、最低でも施設あたり 1 本の凍結チューブが必要となる。その分の胚を寄託者に負担するのは、現実的ではない。今後、これらの問題を解決するためのさらなる調査研究が必要である。

今回のシミュレーションは、今更ながら論文の威力をまざまざと示す結果となった。分譲希望者は論文を読んで、問い合わせせてきている。今後、胚バンクシステムの方譲利用者を増やすためには寄託する胚と同時にその特徴を明らかにした履歴書が添付されていることが重要である。

海外からも多数の方譲依頼が寄せられたが、動物の方譲は、感染症の問題ならびに輸出にかかる経費が問題となる。従って、海外の胚バンクとも連携した世界バンクシステムの構築が望まれる。既に米国では 2001 年より NIH の援助を受けて、Rat Resource and Research Center が稼働

している。

GFP Tg ラットのシュミレーションの解析で、分与希望者はその動物の関連情報を求めている事も明らかとなった。従って、胚バンクの運営は寄託された胚の管理と分与業務だけでなく、寄託者への研究支援も合せて行うことがバンクシステムの発展には肝要であると思われる。

## 5. まとめ

胚バンクシステムの有効利用には以下の要件が必須である。

- 1) 創薬等医学研究に有用な胚のバンキング。
- 2) 胚の特徴を明記した履歴書（論文など）の添付。
- 3) 動物個体による寄託。
- 4) 動物個体による分与。
- 5) 他の胚バンクとの連携（データベースの共有）。
- 6) 有用な動物作成のための研究支援

## 6. 研究発表

- 1) Hakamata Y, Tahara K, Uchida H, Sakuma Y, Nakamura M, Kume A, Murakami T, Takahashi M, Takahashi R, Hirabayashi M, Ueda M, Miyoshi I, Kasai N, Kobayashi E. Green fluorescent protein-transgenic rat: a tool for organ transplantation research. *Biochem Biophys Res Commun*;286:779-785, 2001
- 2) Wang J, Murakami T, Hakamata Y, Ajiki T, Jinbu Y, Akasaka Y, Ohtsuki M, Nakagawa H, Kobayashi E. Gene gun-mediated oral mucosal transfer of interleukin 12 cDNA coupled with an irradiated melanoma vaccine in a hamster model: successful treatment of oral melanoma and distant skin lesion. *Cancer Gene Therap*; 8(10):705-712, 2001.
- 3) Mimuro J, Muramatsu S, Hakamada Y, Mori K, Kikuchi J, Urabe M, Madoiwa S, Ozawa K, Sakata Y. Recombinant adeno-associated virus vector-transduced vascular endothelial cells express the thrombomodulin transgene under the regulation of enhanced plasminogen activator inhibitor-1 promoter. *Gene Ther*; 8(22):1690-7, 2001
- 4) Tanaka A, Kamiakito T, Hakamata Y, Fujii A, Kuriki K, Fukayama M. Extensive neuronal localization and neurotrophic function of fibroblast growth factor 8 in the nervous system. *Brain Res*, 912(2):105-15, 2001
- 5) Tanaka A, Hasegawa Y, Hakamata Y, Kamiakito T, Kuriki K, Yoshida H, Fukayama M.

Purification of activins from androgen-independent Shionogi carcinoma cells demonstrates enhanced expression of activin betaB-subunit under androgen-depleted cell conditions in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*; 188: 194-200, 2001.

- 6) Kobayashi M, Kinouchi T, Hakamata Y, Kamiakito T, Kuriki K, Suzuki K, Tokue A, Fukayama M, Tanaka A. Isolation of an androgen-inducible novel lipocalin gene, Arg1, from androgen-dependent mouse mammary Shionogi carcinoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 77: 109-115, 2001.
- 7) Tanaka A, Kamiakito T, Hakamata Y, Fujii A, Kuriki K, Fukayama M. Extensive neuronal localization and neurotrophic function of fibroblast growth factor 8 in the nervous system. *Brain Res*; 912(2):105-15, 2001.
- 8) Zhou, C-J. Yada, T, Kohno, D. Kikuyama, S. Suzuki, R. Mizushima, H. Shioda, S. PACAP activates PKA, PKC and Ca<sup>2+</sup> signaling cascades in rat neuroepithelial cells. *Peptides*, 22, 1111-1117, 2001
- 9) Muroya, S. Uramura, K. Sakurai, T. Takigawa, M. Yada, T. Lowering glucose concentrations increases cytosolic Ca<sup>2+</sup> in orexin neurons of the rat lateral hypothalamus. *Neurosci. Lett*, 309, 165-168, 2001
- 10) Koriyama, N. Kakei, M. Nakazaki, M. Yaekura, K. Hashiguchi, H. Aso, K. Fukudome, M. Yada, T, Ito, S. Tei, C. Free radical-mediated tolbutamide desensitization of K<sup>+</sup>ATP channels in rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Endocr J.*, 48,,337-344, 2001
- 11) Aizawa, T. Kaneko, T. Yamauchi, K. Yajima, H. Nishizawa, T. Yada, T. Matsukawa, H. Nagai, M. Yamada, S. Sato, Y. Komatsu, M. Itoh, N. Hidaka, H. Kajimoto, Y. Hashizume K. Size-related and size-unrelated functional heterogeneity among pancreatic islets. *Life Sci.*, 69, 2627-2639, 2001
- 12) Yanagida, K. Yaekura, K. Arima, T. Yada, T. Glucose-insensitivity induced by Ca<sup>2+</sup> toxicity in islet  $\beta$ -cells and its prevention by PACAP. *Peptides*, 23, 135-142, 2002
- 13) Date, Y. Nakazato, M. Hashiguchi, S. Dezaki, K. Muhtashan S. Mondal, Hosoda, H. Kojima, M. Kangawa, K. Arima, T. Matsuo, H. Yada, Y. Matsukura, S. Ghrelin is present in pancreatic  $\beta$ -cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes*, 51, 124-129, 2002
- 14) Yamada, S. Komatsu, M. Aizawa, T. Sato, Y. Yajima, H. Yada, T. Hashiguchi, S. Yamauchi, K. Hashizume, K. Time-dependent potentiation of the  $\beta$ -cell is a Ca<sup>2+</sup>-independent phenomenon. *J Endocrinol.*, 172, 345-354, 2002
- 15) 柳田和弘, 矢田俊彦 膵 $\beta$ 細胞障害とインスリン分泌刺激薬. *PharmaMedica* 19(6), 39-44, 2001
- 16) 加計正文, 中田正範, 矢田俊彦 インスリン分泌の分子機構 *Annual Review 内分泌, 代謝* 2002, 46-54, 2002
- 17) Ohki, R., Yamamoto, K., Mano, H., Lee, R.T., Ikeda, U. & Shimada, K. Identification of

- mechanically induced genes in human monocytic cells by DNA microarrays. *J. Hypertens.* in press.
- 18) Okutomi, K., Ohmine, K., Ueno, S., Ueda, M., Ota, J., Yamashita, Y., Yoshida, K., Teramura, M., Ozawa, K., Mizoguchi, H. & Mano, H. DNA microarray analysis of multiple myeloma with purified CD138+ plasma cells. *Blood* in press.
  - 19) Yoshida, K., Ueno, S., Iwao, T., Yamasaki, S., Tsuchida, A., Ohmine, K., Ueda, M., Yamashita, Y., Ota, J., Chayama, K., Sato, K. & Mano, H. Identification of pancreatic ductal carcinoma-specific genes by DNA microarray with ductal cells of normal- and cancer-origin. *Gastroenterology*, in press.
  - 20) Makishima, H., Ishida, F., Ito, T., Kitano, K., Ueno, S.-i., Ohmine, K., Yamashita, Y., Ota, J., Ota, M., Yamauchi, K. & Mano, H. DNA microarray analysis of T-cell type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Br. J. Haematol.* in press.
  - 21) Yamashita, Y., Kajigaya, S., Yoshida, K., Ueno, S., Ota, J., Ohmine, K., Ueda, M., Miyazato, A., Ohya, K., Kitamura, T., Ozawa, K. & Mano, H. Sak serine/threonine kinase acts as an effector of Tec tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 39012-39020 (2001).
  - 22) Ohmine, K., Ota, J., Ueda, M., Ueno, S.-i., Yoshida, K., Yamashita, Y., Kirito, K., Imagawa, S., Nakamura, Y., Saito, K., Akutsu, M., Mitani, K., Kano, Y., Komatsu, N., Ozawa, K. & Mano, H. Characterization of stage progression in chronic myeloid leukemia by DNA microarray with purified hematopoietic stem cells. *Oncogene* 20, 8249-8257 (2001).
  - 23) Miyazato, A., Ueno, S., Ohmine, K., Ueda, M., Yoshida, K., Yamashita, Y., Kaneko, T., Mori, M., Kirito, K., Toshima, M., Nakamura, Y., Saito, K., Kano, Y., Furusawa, S., Ozawa, K. & Mano, H. Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. *Blood* 98, 422-427 (2001).
  - 24) Bony, C., Roche, S., Ueno, S., Sasaki, T., Crackower, M.A., Penninger, J., Mano, H. & Puceat, M. A specific role of phosphatidylinositol 3-kinase  $\alpha$ : a regulation of autonomic  $Ca^{2+}$  oscillation in cardiac cells. *J. Cell. Biol.* 152, 717-727 (2001).
  - 25) Kano, Y., Akutsu, M., Tsunoda, S., Mano, H., Sato, Y., Honma, Y. & Furukawa, Y. In vitro cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor STI571 in combination with antileukemic agents.



Blood 97, 1999-2007 (2001).

- 26) Yokohari, K., Yamashita, Y., Okada, S., Ohya Ki, K., Oda, S., Hatano, M., Mano, H., Hirasawa, H. & Tokuhisa, T. Isoform-Dependent Interaction of BRDG1 with Tec Kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 414-420 (2001).
- 27) Takahashi, M., Nishihira, J., Shimpo, M., Mizue, Y., Ueno, S., Mano, H., Kobayashi, E., Ikeda, U. & Shimada, K. Macrophage migration inhibitory factor as a redox-sensitive cytokine in cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* 52, 438-445 (2001).
- 28) Tago, K., Funakoshi, M., Mano, H., Yanagisawa, K., Hayakawa, M., Kuroiwa, K., Iwahana, H., Kasahara, T. & Tominaga, S. Presence of a genistein-responsive inhibitory mechanism on interleukin-1 alpha-induced NF-kappaB activation. *Eur. J. Biochem.* 268, 6526-6533 (2001).
- 29) Hayakawa, M., Sakashita, E., Ueno, E., Tominaga, S., Hamamoto, T., Kagawa, Y., and Endo, H. Muscle-specific exonic splicing silencer for exon exclusion in human ATP synthase gamma-subunit pre-mRNA. *J. Biol. Chem.* 277, in press, 2002.
- 30) Kirito, K., Watanabe, T., Sawada, K., Endo, H., Ozawa, K., and Komatsu, N. TPO regulates Bcl-xL gene expression through Stat5 and phosphatidylinositol-3-kinase activation pathways. *J. Biol. Chem.* 277, in press, 2002.
- 31) Otsuki, T., Furukawa, Y., Ikeda, K., Endo, H., Yamashita, T., Shinohara, A., Iwamatsu, A., Ozawa, K., Liu, J. M. Fanconi anemia protein, FANCA, associates with BRG1, a component of the human SWI/SNF complex. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2651-60, 2001.
- 32) Yoshida, S., Ioka, D., Matsuoka, H., Endo, H., and Ishii, A. Bacteria expressing single-chain immunotoxin inhibit malaria parasite development in mosquitoes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 113, 89-96, 2001.
- 33) Kagawa, Y., Inoki, Y. and Endo, H. Gene therapy by mitochondrial transfer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 49, 107-119, 2001.
- 34) 遠藤仁司: ミトコンドリアの相互作用と融合. *新ミトコンドリア学* pp 170-178, 共立出版、2001.
- 35) Hishikawa, S., Kobayashi, E., Sugimoto, K., Miyata, M. and Fujimura, A.: Diurnal variation in the biliary excretion of flomoxef in patients with percutaneous transhepatic biliary drainage. *Br J Clin Pharmacol* 52:65-68,2001
- 36) Kobayashi, M., To, H., Tokue, A., Fujimura, A., and Kobayashi, E.: Cisplatin-induced vomiting depends on circadian timing. *Chronobiol Int* 18:851-863, 2001
- 37) Nakao, A., Kobayashi, E., Yagi, T., Yoshino, T. and Tanaka, N.: Impact of tacrolimus and bone marrow augmentation on intestinal allograft survival and intragraft cytokine expression in rats. *J Med* 32:207-30, 2001

- 38) Nakao, A., Ogino, Y., Tahara, K., Uchida, H. and Kobayashi E.: Orthotopic intestinal transplantation cuff method in rats using: A histopathological evaluation of the anastomosis. *Microsurgery* 21:12-15,2001
- 39) Sakuma, Y., Uchida, H., Nagai, H. and Kobayashi E.: High-dose tacrolimus and lengthy survival of the bombined rat pancreas/spleen graft in a high-responder combination. *Transpl Immunol* 9:37-42, 2001
- 40) Takahashi, M., Nishihira, J., Shimpo, M., Mizue, Y., Ueno S., Mano, H., Kobayashi, E., Ikeda, U. and Shimada, K.: Macrophage migration inhibitory factor as a redox-sensitive cytokine in cardiac myocytes. *Cardiovas Res* 52(3):438-45, 2001
- 41) Tahara, K., Uchida, H., Kawarasaki, H., Hasizume, K. and Kobayashi, E.: Experimental small bowel transplantation using a newborn intestine in rats: III. – Long-term cryopreservation of rat newborn intestine. *J Pediatr Surg* 36:602-604,2001
- 42) Tomizawa, N., Uchida, H., Xiu, D.R., To, H., Fujimura, A. and Kobayashi, E.: Chronopharmacology of oral prednisolone in rats. *J Med* 32:135-51,2001
- 43) Uchida, H., Tahara, K., Takizawa, T., Inose, K., Yashiro, T., Hashizume, K., Ikeda, H., Takahashi, M. and Kobayashi, E.: Experimental small bowel transplantation using a newborn intestine in rats: IV. – Effect of cold preservation on the graft neovascularization. *J Pediatr Surg* 36:1805-1810, 2001.
- 44) Xiu, D.R., Hishikawa, S., Sato, M., Nagai, H., Uchida, H. and Kobayashi, E.: Rat auxiliary liver transplantation without portal vein reconstruction –Comparison with the portal vein-arterialized model. *Microsurgery* 21:189-195, 2001
- 45) Xiu, D.R., Uchida, H., To, H., Sugimoto, K., Kasahara, K., Nagai, H., Fujimura, A. and Kobayashi, E.: Simplified method of heterotopic rat heart transplantation using the cuff technique: Application to sublethal dose protocols of methotrexate on allografts survival. *Microsurgery* 21:16-21,2001
- 46) Kita, J., Kobayashi, E., Hishinuma, A., Kaneda, Y. and Kubota, K.: Genetic modification of cold-preserved renal grafts using HSP70 or bcl-2 HVJ-Liposome method. *Transplant Immunol* (in press)
- 47) Mizuta, K., Hishikawa, S., Hirota, M., Miyamoto, G., Fujimura, A., Hakamata, Y. and Kobayashi, E.: Fluoroquinolone concentrations in plasma, urine, and bile after oral administration in rats with renal failure: Useful technique for long-term bile collection. *J Med* (in press)
- 48) Nakao, A., Mitsuoka, N., Tahara, K., Tanaka, N., Kobayashi, E.: Experimental models of rat small intestinal transplantation: cuff method and suture method. *Transplant Proc* (in press)
- 49) Nakao, A., Tahara, K., Inoue, S., Tanaka, N. and Kobayashi, E.: Experimental models of small intestinal transplantation in rats: orthotopic versus heterotopic model. *Acta Medica Okayama* 56:2; , 2002
- 50) Nakao, A., Takeichi, T. Tahara, K., Uchida, H., Tanaka, N. and Kobayashi, E.: A combined cuff and suture technique for small intestinal transplantation in rats. *Microsurgery* (in press)
- 51) Sakuma, Y., Nagai, H., Sugimoto, K., Fujimura, A., Murakami, T., Uchida, H., Hakamata, Y., Takahashi, M. and Kobayashi, E.: Comparison of efficacy and toxicity between sandimmune® and neoral® in the cyclosporine-resistant rat allo-pancreas transplantation. *Res Commun Pharmacol*

Toxicol (in press)

- 52) Sakuma, Y., Tahara, K., Uchida, H., Hakamata, Y., Takahashi, M., Kume A., Nagai, H. and Kobayashi, E.: Cervical heart/lung transplantation in the rat: Migration of green fluorescent protein-expressed leukocytes. Transplantation (in press)
- 53) Takahashi, M., Takahashi, S., Shimpo, M., Naito, A., Ogata, Y., Kobayashi, E., Ikeda, U., Shimada, K.:  $\beta$ -very low density lipoprotein enhances inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells. Atherosclerosis (in press)
- 54) Xiu, D.R., Sakuma, Y., Nagai, H., To, H., Sugimoto, K., Fujimura, A., Uchida, H. and Kobayashi, E.: Chronotherapy of sublethal dose of methotrexate on rats with allo-geneic heart grafts. Res Commun Pharmacol Toxicol (in press)

6. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得 なし
- 2) 実用新案登録 なし
- 3) その他 なし

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第1分野  
先端的創薬技術の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社