

平成15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

目 次

課題番号

KH11001

ハイスループットスクリーニングを指向した細胞機能解析法の
開発研究

川西 徹 …… 1

KH11002

ゲノム創薬を支援する高感度分析・解析技術の開発・応用に関
する研究

今井一洋 …… 11

KH11003

疾患モデル動物の開発および保存のための高度発生工学技術の
確立

小倉淳郎 …… 19

KH11004

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

小林英司 …… 25

KH11005

癌細胞の標的化を可能にするベクターの開発；単クローン抗体
からペプチドへの展開

石坂幸人 …… 32

KH11006

遺伝子改変動物をもちいたGタンパク質共役型受容体の機能解
析

田上昭人 …… 37

KH11007

新しい白血球の機能制御手法を適用したガン細胞の浸潤・転移
抑制方法の開発研究

鈴木和博 …… 53

KH11008

多剤耐性結核の診断と創薬探索技術としてのゲノム解析に関す
る研究

切替照雄 …… 65

KH12079

超機能性核酸類縁体（BNA）を用いたアンチセンス医薬品の開
発とその実践的応用

今西 武 …… 78

KH12084

コンディショナルノックインによる受容体機能変換マウス作成
と情報伝達機構の解析

笹岡俊邦 …… 82

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 医学部 臓器置換研究部
研究者 小林 英司

研究要旨 創薬等ヒューマンサイエンス研究に有用なトランスジェニック (Tg) ラットを作成し、その公共利用のための胚バンクシステムのあり方を検討した。本年度は、これまでに引続き新たに4種類の Tg ラットの作成を行い、その研究資源としての有用性を明らかにした。また、これまで作成した Tg ラットを HSRRB に寄託して、その特性を情報公開した。

分担研究者

- (1) 自治医科大学医学部 矢田俊彦
- (2) 自治医科大学医学部 間野博行
- (3) 自治医科大学医学部 遠藤仁司
- (4) 自治医科大学医学部 袴田陽二
- (5) 京都大学医学部 芹川忠夫
- (6) エイチ・イー・ピー研究機構 鈴木聡
- (7) 大塚製薬株式会社 宮本剛八郎
- (8) 国立成育医療センター 梨井 康

A. 研究目的

新薬開発を含め高度先進医療を推進するためにこれまでもラット・マウス等の実験動物が広く利用されてきている。しかしヒトとこれらの動物間では薬物代謝酵素等の相違があることやヒトの疾患に類似していないなどの問題があり、これらのいわゆる正常動物を使った実験の成績をヒトへ外挿することが困難な場合が多く存在している。これまで我々は、マウスより体サイズが大きく、薬物動態学などの薬学研究や臓器移植、再生医療などの高度先端医科学研究に有用な Tg ラットの作成を試みてきた。それにより、これまでマウスでは難であった臓器移植や再生医療のツールとしても大きく貢献できることが判明した。本研究は Tg ラットを作成するとともに、いち早くその特性を明らかにし、より多くの研究者に供与できる創薬疾患等の研究に有用なラットのバイオリソース構築のための検討を目的とした。

B. 研究方法

実際の臨床医学・薬学に役立つ Tg ラットをよりスピーディーに産出するために、以下の3段階の開発計画とした。すなわち基礎医学および薬学の分担者が *in vitro* 等で目的となる遺伝子をスクリーニングする。目的遺伝子は随時分担研究者が研究協力者を募り、絞込みを効率よく行う。次に目的遺伝子を Tg 可能なコンストラクトの作成を行い Tg ラットの産出を試みる。第三段階は、実際の Tg

動物の作成ならびにキャラクタライゼーションである。Tg はバイチャンスで生まれるため種々の細胞、組織で発現することから有用なラインの絞込みは解析研究を平行させながら行うこととした。

最終年度は、昨年までに作成した Tg ラットの解析を行うとともに、新規 Tg ラットとして (1) Rosa-LacZ Tg ラット、(2) Alb-Fcyfur-Tg ラット、(3) Alb-ATTR Tg ラット、(4) Alb-luci Tg ラットを作成し、ライン化を図った。また、昨年引き続き作成した Tg ラットの卵および精子保存法の開発を行った。

平成 15 年度は以下の項目について検討した。

- ① Tg ラットの作成とライン化 (小林、袴田)
- ② 生理学的研究に有用な Tg ラット作成のための基礎的研究 (矢田)
- ③ 血液疾患研究に有用な Tg ラット作成のための基礎的研究 (間野)
- ④ 生化学研究に有用な Tg ラット作成のための基礎的研究 (遠藤)
- ⑤ ヒトとラットにおける薬物代謝能相違の検討 (鈴木、宮本)
- ⑥ ラット受精卵/精子保存法の開発 (芹川)
- ⑦ ラット胚バンクシステムの運用に関する検討 (小林)

C. 研究成果

- (1) Tg ラットの作成効率とライン化に要する期間
Tg ラットの作成効率を表1に示した。

表1 Tgラットの作成とその効率

目的遺伝子	Rosa-LacZ	Fcyfur	ATTR	Alb-luci*	平均
Strain	LEW	LEW	DA	LEW	
Promoter	Rosa	Albumin	Albumin	Albumin	
移植卵数/injection数 (%)	413/448 (92.2)	220/220 (100)	177/180 (98.3)	240/260 (92.3)	263/277 (94.8)
出産匹数	68	25	13	29	35.3
Tg個体数	6	4	3	0	4.3
Tg発現率 (%)					
Tg/injection数	1.0	1.8	1.7	0	1.5
Tg/移植数	1.1	1.8	1.7	0	1.5
Tg/出産数	8.7	16.0	23.1	0.0	15.9
ライン化期間(月)	3	3	3	0	3.0

*: 平均値に含まれない

Tg ラットの発現率は導入遺伝子に依存するが、平均するとマイクロインジェクション数に対し 1.5%、移植卵数に対し 1.5%、出産数に対し 15.9% となり、Tg マウスの作成効率と同等であった (表 1)。また、Tg ラットの作成効率は、outbred と inbred の系統による差は認められなかった。従って、1 匹の Tg ラットを得るためには少なくとも 100 個以上の受精卵にマイクロインジェクションする必要があることが判明した。また、Tg ラットのライン化には平均で 3 ヶ月を要した。

(2) 各 Tg ラットの特性

Rosa-LacZ ラット

CAG プロモーターは Tg 動物の作成において導入遺伝子を全身性に強発現させる場合によく用いられるプロモーターであるが、必ずしも全身組織で強発現するとは限らない。先に作成した CAG-LacZ Tg ラットにおける LacZ の発現は、筋肉系では極めて高いが、肝臓および消化管系あるいは神経系では殆どない。全身組織の細胞をマーキングする目的で、CAG よりも強いプロモーター活性をもつ Rosa を用いて LacZ Tg ラットの作成を行った。Rosa-LacZ ラットにおける LacZ の発現様式を表 2 に示した。発現は全身性で、特に肝臓、小腸ならびに神経系で強い。本ラットは、これら臓器を対象にした組織再生研究用モデルとして有用である。

表2 CAG-LacZおよびRosa-LacZ Tgラットの主要臓器におけるLacZの発現様式

	CAG	Rosa
Brain	-	++
Cerebellum	-	++
Salivary gl.	+	NT
Trachea mucosa	-	NT
Lung	+/-	NT
Heart	++	+/-
Thymus	-	++
Spleen	-	++
Liver	+	+++
Pancreas	++	+++
Small bowel m.	-	++
Large bowel m.	-	NT
Kidney	++	++
Adrenal gl.	-	NT
Testis	-	NT
Epididymis	+	NT
Prostate gl.	+	NT
Skeletal muscle	+++	+/-
Skin	+	++
Articular cartilage	+	NT
Bone marrow	-	++

Alb-fcyfur ラット

先に薬剤誘導型の肝障害モデルの確立を目的にアルブミンプロモーター (Alb) の下流に HSV-tk 自殺遺伝子 (Herpes simplex virus thymidine kinase) を連結した遺伝子を用いて Alb-HSV-tk Tg ラットを作成した。しかし、肝炎の程度は軽度であった。今回、さらに重篤な肝障害が誘導されるラットの作出を目的に、TK よりも肝細胞毒性が強い CD 自殺遺伝子 (Cytosine Deaminase) を導入した Tg ラットの作成を試みた。また、今回、Tg 動物の効率的な選抜方法として、導入する目的遺伝子の下流にマーカー遺伝子を連結した (図 1)。本方法は、従来のマーカー遺伝子と目的遺伝子とを co-injection する方法に比べ、マーカー遺伝子の発現個体が必ず目的遺伝子をも有し、さらにその遺伝子発現をも保障する点で優れている。体サイズの大きな動物でトランスジェニック個体を作成し、ライン化をはかる場合、効率的なラインの選抜が肝要である。今回用いた遺伝子コンストラクトの構築は、Tg ラットに限らず、Tg 動物の選抜において極めて有効ツールとなりうる。

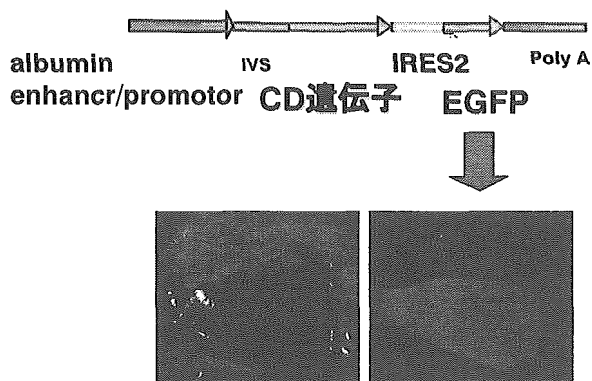


図1 導入遺伝子の可視化システム
目的遺伝子 (CD遺伝子) の下流に IRES-EGFP を連結させることで、目的遺伝子と EGFP を同時に翻訳させることが出来る。EGFP をマーカーにして目的の Tg ラットを選別できる。

Alb-ATTR ラット

ヒト疾患の原因遺伝子を動物に導入した Tg ラットを作成し、ヒト遺伝性疾患研究に対する Tg ラットの有用性を検討した。ヒト遺伝性肝疾患である家族性アミロイドニューロパチーの原因遺伝子 (変異型トランスサイレチン (ATTR)) を用いて Tg ラットの作成を行った。ATTR Tg ラットにおいて顕著な ATTR の産生が誘導された。産生レベルは、雌に比べ雄で有意に高い値を示した。

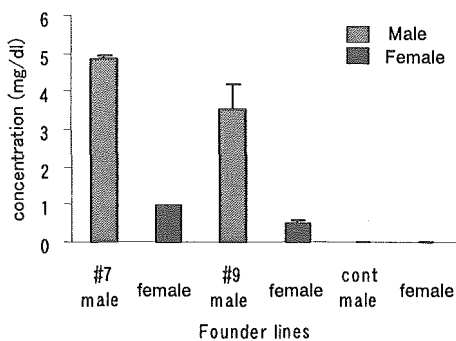


図2 Alb-ATTR Tgラットの血清中ATTR濃度
雄TgラットのATTR濃度は雌に比べ有意に高値を示す。

(3) ヒト代謝能を持つラット作成のための基盤研究

新薬開発において、ラットやマウスは薬効や毒性の検討する最初の重要な実験動物である。しかしヒトとの代謝能がそれらの動物で異なるためヒトの代謝を模倣する際の障害となっている。まずP450 サブタイプ活性のヒトと動物での違いを明らかにするため、ラット、とヒトのそれを測定した。ヒトでは3A4が半数以上を占めるのに対し、ラットには3A4サブタイプは殆んど存在しなかった。またラットのチトクロームP450総量はヒトのそれに比し約3倍であった。従って、ラットでは多くの薬剤がヒトに比し相対的に薬物動態値が低くなることが考えられる。つまり体重値あたりの薬物投与量においてはヒトに比し毒性が出にくくなる可能性がある。さらにヒトにおいてサブタイプ分画の半数以上を占めるとされる3Aが、ラットではその他のサブタイプと比較して相対的に低いことから、3Aを代謝酵素とする薬物の開発をラットで行う場合には薬物動態値を補正しながら検討することが必要である。ヒトに近い代謝を示すラットを開発するには、ヒト3A4遺伝子を発現するトランスジェニックラットが一つの候補と考えられた。また、我々の作成した肝障害Tgラットをベースにヒト肝細胞を持つTgラットの作成も大きな展望がある。

(4) ラット受精卵／精子保存法

ラット系統の受精卵および精子による凍結保存法を確立することを目的に、近交系ラット、突然変異系ラットを用いて、自然排卵と過排卵処置による排卵数の比較および精巣上体精子の凍結保存法について検討した。まず、31系統のラットにおける自然排卵と過排卵処置による排卵数の系統差を比較した。排卵数は、系統により大きな差が認

められた。マウスの緩慢法に準じてラット各系統の2細胞期胚凍結保存を行い、その一部を融解・移植して凍結保存胚の生存を検討した。生体まで発生した系統は5割で、移植胚数に対する出生率は約10%となった。凍結精子の融解テストの結果、すべて運動性が認められた。

(5) ラット胚バンクシステムの検討

胚バンクシステムのあり方の検討を目的に、GFPTg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い、開発された動物の情報公開とそれらの動物の使用希望者の現状を解析した。GFP Tgラットに関する問い合わせは世界中から数百に及んだ。そのうち分与依頼は、国内が29件、海外が20件であった。主たる研究目的は再生医療関係が35件、臓器移植が11件であった。対象臓器(細胞)としてはきわめて多彩な臓器(組織)であった。

GFP Tgラット提供機関リスト

国	施設	使用目的	対象臓器(細胞)	受け渡し	通知情報提供	その他付帯状況
国内	北海道大学	胚移植	肝、小腸	胚体	胚体における発現	
	東北大学	胚移植	心臓	胚体		
	東北大学	胚移植	卵	胚体		
	東北大学	胚移植	胚体	胚体		
	筑波大学	胚移植	胚体	胚体		
	三重大学	胚移植	胚体	胚体		
	大阪大学	胚移植	胚体	胚体		
	岡山大学	胚移植	小腸	胚体		
	広島大学	胚移植	胚体	胚体		
	山口大学	胚移植	胚体	胚体	胚体提供	
	千葉大学	胚移植	胚体	胚体		
	東京理科大学	胚移植	小腸	胚体		
	東京理科大学	胚移植	胚体	胚体		
	筑波大学	胚移植	胚体	胚体		
	熊本大学	胚移植	胚体	胚体		
海外	United States Air Force Academy	胚移植	骨髄	胚体		
	University of Miami School of Medicine	胚移植	小腸	胚体		
	UCLA	胚移植	腎臓	胚体	GFP-E6遺伝子の有無 骨髄における発現	
	Mayo Clinic Rochester MN USA	胚移植	腎臓	胚体	腎臓、脾臓における発現	
	University of Pennsylvania	胚移植	腎臓	胚体		
	US Army Robert Wood Johnson Medical Sch	胚移植	骨髄	胚体		
	University of Louisville	胚移植	腎臓	胚体		
	Massachusetts General Hospital	胚移植	腎臓	胚体		胚体提供
	VA Medical Center	胚移植	腎臓	胚体		胚体提供
	Tulane University School of Medicine	胚移植	腎臓	胚体		胚体提供
	Henry Ford Health Sciences Center	胚移植	腎臓	胚体		胚体提供
	University of California	胚移植	腎臓	胚体		胚体提供
	University of Southern California	胚移植	腎臓	胚体		胚体提供
	University of Pennsylvania	胚移植	腎臓	胚体		胚体提供
	University of Medicine and Dentistry of New Jersey	胚移植	腎臓	胚体		胚体提供
	Washington University School of Medicine	胚移植	腎臓	胚体		胚体提供
	Northeastern University	胚移植	心臓	胚体		胚体提供
	Bayle College of Medicine	胚移植	腎臓	胚体		胚体提供
	University of Health Network (Toronto)	胚移植	心臓	胚体		胚体提供
	イギリス	Imperial College School of Medicine	胚移植	心臓	胚体	
Heart Science Centre, Leeds City Hospital		胚移植	心臓	胚体		胚体提供
ドイツ	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf	胚移植	骨髄	胚体		胚体提供
	University Medical School Hamburg	胚移植	骨髄	胚体		胚体提供
フィンランド	BioResearch Helsinki	胚移植	骨髄	胚体	胚体提供	胚体提供
	Helsinki University Hospital	胚移植	骨髄	胚体		胚体提供
オーストラリア	University of Queensland	胚移植	骨髄	胚体		胚体提供
	Institute of Experimental Medicine ASB	胚移植	骨髄	胚体		胚体提供
台湾	Chang Gung Memorial Hospital and University	胚移植	骨髄	胚体		胚体提供
	MEPA University Hospital	胚移植	骨髄	胚体		T cell分化と免疫反応の解析、永年動物の提供

D. 考察

これまでトランスジェニックラットの作成は受精卵膜がマウスに比し脆弱のため作成効率が悪いとされていきたが、高度なマイクロインジェクション技術の開発により、高率に遺伝子導入個体を得ることが出来るようになった。今回のTgラットの作出率(Tg動物数/総出産数)は平均15.9%となり、マウスと同等の成績が得られた。体サイズの大きな動物でトランスジェニック個体を作成し、ライン化をはかる場合、効率的なラインの選抜が肝要である。我々は、可能な限り早期に遺伝

子発現個体の選抜を行った。今回、新たに目的遺伝子に選択マーカーを連結させる方法で、簡便に Tg ラットを選抜可能となるシステムを開発した。このシステムは、Tg 動物効率的に作出するための極めて有用なツールとなりうる。通常、導入した遺伝子の解析は F1 固体を用いて行うが、貴重な founder (F0) から安全に目的組織を得るためには、高度な外科手術を習得する必要がある。

Tg ラットは自然発症動物モデルと異なり人為的に作成されるため近年の研究動向にあわせたものをタイムリーに作成することが可能である。今回報告した Tg ラットはその動向を踏まえて作成したもので、何れも各研究分野で大きな注目を受けている。公的胚バンクが有効利用されるためには、先端医療等の研究に適するラット等の動物を計画性を持って作り出す部門の確立も必要である。

GFP Tg 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によれば、利用者は動物個体による分与を希望している。さらには作成された動物の特徴をそえた情報も求めていることが明らかとなった。この点は、今後の胚バンクシステムの運営上極めて重要な課題である。

研究に有用な動物または希少動物が、研究用資源バンクとして国内外で受精卵を中心に収集保存が開始されている。しかし、前者では生きた動物として研究利用されることが不可欠であり、マウス胚ではすでにシステム化され運用されている。一方、ラットでは近年ようやく開始されたが未成熟である。米国においては、いち早くラット胚バンク RRRC (Rat Resource and Research Center) が立ち上がり、NIH のサポートを受けてミュータントラットなどの胚の収集とその情報提供を開始している。その規模および情報量の充実度は日本の胚バンクのそれをはるかに凌駕している。しかし、Tg ラットに関しては極めて寄託数が少なく、本研究の成果を受け日本の HSRRB が世界をリードしている。研究資源バンクの充実と有効利用には、個々の胚バンクがそれぞれの特徴に応じた研究資源の収集とともに、利用者のニーズにあわせて、生きた動物での分与の実施が今後不可欠である。さらには、海外の研究者も利用可能となる国際間共同胚バンクシステムの構築が今後必要とされる。

E. まとめ

Tg ラットは創薬等ヒューマンサイエンス研究に極めて有用な研究資源となりうる。公的胚バンクはその研究資源がより多くの研究者に利用可能となるシステムであり、その意義は極めて高い。

今後、さらに円滑な動物胚バンクの運営には以下の要件が必須であると考える。

- 1) 国内におけるこれまでの創薬等医学研究に特色のあるラット胚のバンキングを充実する。
- 2) ラット胚の特徴を明記した論文などの情報収集とそれに関わるホームページの開設の必要。
- 3) ラットモデルの寄託者に対して動物個体による寄託の受け入れ。
- 4) ユーザーへの動物個体としての分与。
- 5) 他の胚バンクとの連携による国際化（データベースの共有）。
- 6) 国内の動物実験センターや動物業者に対するラット胚の取り扱い技術に対する普及啓蒙事業
- 7) 先端医科学や創薬等の研究に有用な新しいラット種作成に対する支援事業

F. 研究発表

- ・ 袴田陽二、安食孝士、井上成一郎、佐藤友紀、清水 尚、武田真一、藤代 準、吉野浩之、竹野勇一、五十嵐友香、村上 孝、金子隆志、高橋将文、遠藤仁司、小林英司：臓器移植研究のためのトランスジェニックラットの確立。今日の移植 16(6):632-634, 2003
- ・ Ajiki, T., Takahashi, M., Hakamata, Y., Murakami, T., Kariya, Y., Hoshino, Y., and Kobayashi, E.: Difficulty of getting a long-term graft survival of MHC disparate composite graft using CTLA4-Ig. Transplantation 76(2): 438, 2003
- ・ Ajiki, T., Takahashi, M., Inoue, S., Sakuma, Y., Oyama, S., Kaneko, T., Hakamata, Y., Murakami, T., Kume, A., Kariya, Y., Hoshino, Y., and Kobayashi, E.: Generation of donor hemato-lymphoid cells after rat limb composite grafting. Transplantation 75(5):631-636, 2003
- ・ Ajiki, T., Murakami, T., Kobayashi, Y., Hakamata, Y., Wang, J., Inoue, S., Nakagawa, H., Kariya, Y., Hoshino, Y., and Kobayashi, E.: Long-lasting gene expression by particle-mediated intramuscular transfection modified with bupivacain: Efficient combination therapy with IL-12 and IL-18 cDNA on the rat with carcinoma. Cancer Gene Ther 10(4):318-329, 2003
- ・ Hishikawa, S., Sugimoto, K., Kobayashi, E. and Fujimura A.: Dosing-time-dependent variation in the biliary excretion of flomoxef in rats. Chronobiol Int. 20(3): 463-71, 2003

- Inoue, S., Tahara, K., Sakuma, Y., Hori, T., Uchida, H., Hakamata, Y., Murakami, T., Takahashi, M., Kawarasaki, H., Hashizume, K., Kaneko, M., Kobayashi, E.: Impact of graft length on surgical damage after intestinal transplantation in rats. *Transplant Immunol* 11(2):207-214, 2003
- Inoue, S., Tahara, K., Shimizu, H., Yoshino, H., Suzuki, C., Kaneko T., Hakamata, Y., Takahashi, M., Murakami, T., Kaneko, M. and Kobayashi, E.: Rat liver transplantation for total vascular reconstruction using a suture method. *Microsurgery* 23(5): 470-475, 2003
- Kawasaki, M., Fujino, M., Li, X.K., Kitazawa, Y., Funeshima, N., Takahashi, R., Ueda, M., Amano, T., Hakamata, Y., and Kobayashi, E.: Inducible liver injury in the transgenic rat by expressing liver-specific suicide gene. *BBRC* 311(4):920-928, 2003
- Kita, J., Kobayashi, E., Hishinuma, A., Kaneda, Y.: Genetic modification of cold-preserved renal grafts using HSP70 or bcl-2 HVJ-Liposome method. *Transplant Immunol* 11:7-14, 2003
- Mizuta, K., Kobayashi, E., Uchida, H., Hishikawa, S., Kawarasaki, H.: Increase of Bile Acid Production by Tacrolimus in the Rat Liver. *Transpl Proc* 35: 437-438, 2003
- Nagata, M., Takahashi, M., Muramatsu, S., Ueda, Y., Hanazono, Y., Takeuchi, K., Okada, K., Suzuki, Y., Kondo, Y., Suemori, M., Ikeda, U., Nakano, I., Kobayashi, E., Hasegawa, M., Ozawa, K., Nakatsuji, N. and Shimada, K.: Efficient gene transfer of a simian immunodeficiency viral vector into cardiomyocytes derived from primate embryonic stem cells. *J Gene Med* 5(11): 921-928, 2003
- Nakao, A., Mitsuoka, N., Tahara, K., Tanaka, N., Kobayashi, E.: Experimental models of rat small intestinal transplantation: cuff method and suture method. *Transplant Proc* 35:571-572, 2003
- Nakamura, M., Wang, J., Murakami, T., Ajiki, T., Hakamata, Y., Kaneko, T., Takahashi, M., Okamaoto, H., Mayumi, M. and Kobayashi, E.: DNA immunization of the grafted liver by particle-mediated gene gun. *Transplantation* 76:1369-75, 2003
- Ogata, Y., Takahashi, M., Ueno, S., Takeuchi, K., Okada, T., Mano, H., Ookawara, S., Ozawa, K., BerK, B.C., Ikeda, U., Shimada, K., Kobayashi, E.: Antiapoptotic Effect of Endothelin-1 in Rat Cardiomyocytes In Vitro. *Hypertension* 41:1156-1163, 2003
- Sato, Y., Igarashi, Y., Hakamata, Y., Murakami, T., Kaneko, T., Takahashi, M., Seo, N. and Kobayashi, E.: Establishment of Alb-DsRed2 transgenic rat for liver regeneration research. *BBRC* 311(2):478-481,2003
- Sato, Y., Ajiki, T., Inoue, S., Hakamata, Y., Murakami, T., Kaneko, T., Takahashi, M., and Kobayashi, E.: A novel gene therapy to the graft organ by a rapid injection of naked DNA I: Long-lasting gene expression in a rat model of limb transplantation. *Transplantation* 15;76(9):1294-8, 2003
- Shimizu, H., Takahashi, M., Takeda, S., Tahara, K., Inoue, S., Hakamata, Y., Kaneko, T., Takeyoshi, I., Morishita, Y. and Kobayashi, E.: Effect of conversion from cyclosporine A to mizoribine on transplant arteriosclerosis in rat aortic allograft models. *Microsurgery* 23(5):454-457, 2003
- Takahashi, M., Hakamata, Y., Murakami, T., Takeda, S., Kaneko, T., Takeuchi, K., Takahashi, R., Ueda, M., and Kobayashi, E.: Establishment of lacZ-transgenic rats: a tool for regenerative research in myocardium. *BBRC* 305:904-908, 2003
- Takahashi, M., Hakamata, Y., Takeda, S., Kaneko, T., Takeuchi, K., Takahashi, R., Ueda, M., Ikeda, U., Shimada, K. and Kobayashi, E.: Green Fluorescent Protein-Transgenic Rat as a Tool For Study of Transplantation and Regeneration in Myocardium. *Cardiovasc Eng* 3(2): 63-69, 2003
- Takahashi, M., Hakamata, Y., Takeuchi, K., and Kobayashi, E.: Effects of Different Fixatives on β -Galactosidase Activity. *J Histochem Cytochem* 51:1-2,2003 (Letter)
- Takeda, S., Takahashi, M., Kusano, E., Kobayashi, E.: Mycophenolate mofetile prevents development of urinary protein in autoimmune nephritis. (Letter) *Kidney Int* 64(1): 365-6, 2003
- Takeuchi, K., Sereemasapun, A., Inagaki, T., Hakamata, Y., Kaneko, T., Murakami, T., Takahashi, M., Kobayashi, E. and Ookawara, S.: Morphologic Characterization of Green Fluorescent Protein in Embryonic, Neonatal, Adult Transgenic Rats. *Anat Rec* 274A(2):883-336, 2003
- To, H., Ohdo, S., Shin, M., Uchimar, H., Yukawa, E., Higuchi, S., Fujimura, A., Kobayashi, E.: Dosing Time Dependency of Doxorubicin-induced cardiotoxicity and bone marrow toxicity in rats.

- JPP 55: 803-810, 2003
- Fujishiro, J., Inoue, S., Shimizu, H., Yoshino, H., Murakami, T. and Kobayashi, E.: Effect of FTY720 on rat small bowel transplantation. Transplantation (in press)
 - Inoue, S., Hakamata, Y., Kaneko, M., and Kobayashi, E.: Gene therapy for organ grafts using rapid injection of naked DNA DNA-application to the rat liver. Transplantation (in press)
 - Inoue, S., Tahara, K., Kaneko, T., Ajikiki, T., Takeda, S., Sato, Y., Hakamata, Y., Murakami, T., Takahashi, M., Kaneko, M. and Kobayashi, E.: Long-lasting donor passenger leukocytes after hepatic and intestinal transplantation in rats. Transplant Immunol 12(2):123-131, 2004
 - Sakuma, Y., Sato, Y., Inoue, S., Kaneko, T., Hakamata, Y., Takahashi, M., Murakami, T. and Kobayashi, E.: Lympho-myeloid chimerism achieved by spleen graft of green fluorescent protein transgenic rat in a combined pancreas transplant Model. Transplant Immunol (in press)
 - Shimizu, H., Takahashi, M., Takeda, S., Tahara, K., Inoue, S., Hakamata, Y., Kaneko, T., Takeyoshi, I., Morishita, Y. and Kobayashi, E.: Mycophenolate mofetil prevents transplant arteriosclerosis by direct inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation. Transplantation (in press)
- Shimizu,H.,Takahashi,M.,Takeda,S.,Inoue,S.,Fujishiro,J.,Hakamata,Y.,kaneko,T.,Murakami,T.,Takeyoshi,I.,Morishita,Y.,and Kobayashi,E.:Conversion from Cyclosporine A to Mycophenolate Mofetil ProtectsRecipient's Kidney and Prevents Intimal Hyperplasia in Rat AorticAllografts. Transplant Immunol (in press)
- Takeda, S., Takahashi, M., Mizukami, H., Kobayashi, E., Takeuchi, K., Hakamata, Y., Kaneko, T., Yamamoto, H., Ito, C., Ozawa, K., Ishibashi, K., Matsuzaki, T., Takata, K., Asano, Y. and Kusano, E.: Successful Gene Transfer Using Adeno-Associated Virus Vectors into the Kidney: Comparison among Adeno-Associated Virus Serotype 1 to 5 Vectors in vitro and in vivo. Nephron Experimental Nephrology (in press)
 - Kohno D., Gao H-G., Muroya S., Kikuyama S., Yada T. Ghrelin directly interacts with NPY-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A- and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. Diabetes 52:948-56, 2003
 - Funahashi H, Yada T., Suzuki R, Shioda S. Distribution, function, and properties of leptin receptors in the brain. Int Rev Cytol 224:1-27, 2003
 - Zhu Y, Miwa Y, Yamanaka A, Yada T., Shibahara M, Abe Y, Sakurai T, Goto K. Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussis toxin-insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins. J Pharmacol Sci. 92:259-266, 2003
 - Nakata M, Yada T. Endocrinology: Nitric Oxide-mediated insulin secretion in response to citrulline in islet β -cells. Pancreas 27:209-213, 2003
 - Funahashi H, Takenoya F, Guan JL, Kageyama H, Yada T., Shioda S. Hypothalamic neuronal networks and feeding-related peptides involved in the regulation of feeding. Anat Sci Int. 78:123-138, 2003
 - Rokkaku K, Onaka T, Okada N, Ideno J, Kawakami A, Honda K, Yada T., Ishibashi S. Neuromedin U facilitates oxytocin release from the pituitary via beta adrenoceptors. Neuroreport 14:1997-2000, 2003
 - Muroya S., Funahashi H., Yamanaka A., Kohno D, Uramura K, Nambu T., Shibahara M., Kuramochi M, Takigawa M., Yanagisawa M., Sakurai T., Shioda S., Yada T. Orexins(Hypocretins) Directly Interacts with Neuropeptide Y, POMC and Glucose-Responsive Neurons to Regulate Ca²⁺ Signaling in a Reciprocal Manner to Leptin: Orexigenic Neuronal Pathways in the Mediobasal Hypothalamus. Eur J Neurosci (in press).
 - Fujiwara K, Matsumoto H, Yada T., Inoue K. Identification of the Prolactin-Releasing Peptide-Producing Cell in the Rat Adrenal Gland. Regulatory peptides (in press).
 - Choi YL, Makishima H, Ohashi J, Yamashita Y, Ohki R, Koinuma K, Ota J, Isobe Y, Ishida F, Oshimi K and Mano H.: DNA microarray analysis of natural killer cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with purified CD3-CD56+ fractions. *Leukemia*, in press.
 - He H, Hirokawa Y, Gazit A, Yamashita Y, Mano H., Kawakami Y, Kawakami, Hsieh CY, Kung HJ, Lessene G, Baell J, Levitzki A and Maruta H: The Tyr-Kinase Inhibitor AG879, That Blocks the ETK-PAK1 Interaction, Suppresses the RAS-Induced PAK1 Activation and Malignant

- Transformation. *Cancer Biol Ther*, in press.
- Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, Ota J, Ohki R, Choi YL, Wada T, Konishi F, Nagai H and Mano H: Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 108: 237-242, 2004.
 - Yoshida K, Ueno S, Iwao T, Yamasaki S, Tsuchida A, Ohmine K, Ohki R, Choi YL, Koinuma K, Wada T, Ota J, Yamashita Y, Chayama K, Sato K and Mano H: Screening of genes specifically activated in the pancreatic juice ductal cells from the patients with pancreatic ductal carcinoma. *Cancer Sci* 94: 263-270, 2003.
 - Ueno S, Ohki R, Hashimoto T, Takizawa T, Takeuchi K, Yamashita Y, Ota J, Choi YL, Wada T, Koinuma K, Yamamoto K, Ikeda U, Shimada K and Mano H: DNA microarray analysis of in vivo progression mechanism of heart failure. *Biochem Biophys Res Commun* 307: 771-777, 2003.
 - Ueda M, Ota J, Yamashita Y, Choi YL, Ohki R, Wada T, Koinuma K, Kano Y, Ozawa K and Mano H: DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 123: 288-296, 2003.
 - Suzuki N, Nakamura S, Mano H and Kozasa T: Galpha 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 733-738, 2003.
 - Ota J, Yamashita Y, Okawa K, Kisanuki H, Fujiwara S, Ishikawa M, Choi YL, Ueno S, Ohki R, Koinuma K, Wada T, Compton D, Kadoya T and Mano H: Proteomic analysis of hematopoietic stem cell-like fractions in leukemic disorders. *Oncogene* 22: 5720-5728, 2003.
 - Oshima Y, Ueda M, Yamashita Y, Choi YL, Ota J, Ueno S, Ohki R, Koinuma K, Wada T, Ozawa K, Fujimura A and Mano H: DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 17: 1990-1997, 2003.
 - Ohmine K, Nagai T, Tarumoto T, Miyoshi T, Muroi K, Mano H, Komatsu N, Takaku F and Ozawa K: Analysis of Gene Expression Profiles in an Imatinib-Resistant Cell Line, KCL22/SR. *Stem Cells* 21: 315-321, 2003.
 - Ohki R, Yamamoto K, Ueno S, Mano H, Ikeda U and Shimada K: Effects of Olmesartan, an Angiotensin II Receptor Blocker, on Mechanically-Modulated Genes in Cardiac Myocytes. *Cardiovasc Drugs Ther* 17: 231-236, 2003.
 - Horwood NJ, Mahon T, McDaid JP, Campbell J, Mano H, Brennan FM, Webster D and Foxwell BM: Bruton's tyrosine kinase is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* 197: 1603-1611, 2003.
 - 遠藤仁司、水本清久: 第4章-6 スプライシング、In 分子生物学イラストレイテッド 改訂第2版 (田村隆明、山本 雅、編集) pp 142-152、羊土社、2003.
 - Jin, Y., Suzuki, H., Maegawa, S., Endo, H., Sugano, S., Hashimoto, K., Yasuda, K., and Inoue, K. A vertebrate RNA-binding protein Fox-1 regulates tissue-specific splicing via the pentanucleotide GCAUG. *EMBO J.* 22, 905-912, 2003
 - Satoh, M., Hamamoto, T., Seo, N., Kagawa, Y., and Endo, H. Differential sublocalization of Dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 482-493, 2003.
 - Sakashita, E., Tatsumi, S., Werner, D., Endo, H., and Mayeda, A. Human RNPS1 and Its associated factors: a versatile alternative pre-mRNA splicing regulator in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 24, 1174-1187, 2004
 - Inoki, T., Yamagami, S., Inoki, Y., Tsuru, T., Hamamoto, T., Kagawa, Y., Mori, T., and Endo, H. Human DDB2 splicing variants are dominant negative inhibitors of UV-damaged DNA repair. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 1036-1043, 2004.
 - Yokouchi K, Ito M, Nishino K, Yamanouchi K, Naito K, Suzawa M, Kato S, Hakamata Y, Endo H, Tojo H. Stage-specific regulatory element of mouse Sry gene. *Mol Reprod Dev* 64 (4): 389-396, 2003.
 - Nakatsukasa E, Kashiwazaki N, Takizawa A, Shino M, Kitada K, Serikawa T, Hakamata Y, Kobayashi E, Takahashi R, Ueda M, Nakashima T, Nakagata N. Cryopreservation of spermatozoa from closed colonies, and inbred, spontaneous mutant, and transgenic strains of rats. *Comp Med* 53 (6): 639-641, 2003.
- G. 知的所有権の取得状況
該当なし

平成15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16年9月30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