

抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への 応用

所 属 国立成育医療センター 母児感染研究部
研究者 綱脇 祥子

研究要旨 実験的脳虚血モデルマウスを用いて、フリーラジカルによる神経細胞死を解析すると共に、血中フリーラジカルの動態を測定して病態との関連づけを行った。更に、プロタミンの神経細胞死に対する有用性を検討した。

分担研究者

- (1) 日生バイオ株式会社 松永政司
- (2) 昭和大学 医学部 塩田清二

A. 研究目的

最近、食細胞の活性酸素生成酵素 (phagocyte NADPH oxidase) のホモログ遺伝子が非食細胞にも続々と発見され、Nox/Duox family と命名されている。これら Nox/Duox family は血管内皮細胞にも発現しており、今後、NOS (nitric oxide synthase) を含めてフリーラジカルに起因する病態の解明と抗フリーラジカル療法の確立は益々重要となるであろう。各種神経疾患に於いてもフリーラジカルが病態の進行・重症度に関与する事が指摘されている。しかし、フリーラジカルの寿命が短いためその動態は殆ど捉えられていない。そこで、1) 脳虚血および脳外傷を含む神経救急疾患時に於けるフリーラジカルの動態を明らかにするため、実験的脳虚血モデルマウスを用い、血中フリーラジカルの動態を ESR (electron spin resonance) 法および FREE (free radical elective evaluator) 法を用いて解析した。次に、2) 酸化ストレスによる DNA 損傷と虚血性神経細胞死との関連性を探った。生体内で酸化損傷を受けた DNA すなわち 8-OH-dG は、DNA 本体より切り出されて血液中を輸送された後、尿中に排泄される。従って、尿中の 8-OH-dG は、生体の酸化ス

トレスモニターとして用いられている。しかし、脳虚血後の脳内における 8-OH-dG の動態は全く調べられていない。そこで、虚血性神経細胞死の誘導機構を解析する一環として、マウス一過性脳虚血後の脳内における 8-OH-dG を免疫組織学的手法により検出し、その組織学的定量化を試みた。更に、アポトーシス性神経細胞死との関連性を検討した。また、フリーラジカルは、脳心血管疾患以外にも悪性腫瘍、糖尿病、慢性関節リウマチなどの疾患、更には、老化などを含む多くの生命活動に深く関与する事が指摘されている。従って、抗フリーラジカル剤や抗酸化能を有する健康補助食品はこれら疾患の治療や予防に対して大きな有用性が期待されている。そこで、3) 鮭白子に多く含まれる核タンパク質 (核酸+プロタミン) に注目し、核タンパク質食負荷を行ったマウスに脳虚血ストレスを与えた際の虚血性神経細胞死に対する影響を調べた。さらに、核タンパクの主要成分である核酸とプロタミンの効果について検討を加えた。

B. 研究方法

1. 実験的脳虚血モデルマウスに於ける血中フリーラジカルの動態解析

1) マウス一過性前脳虚血モデル

脳虚血モデルは C57/BL6 マウスを 37-38℃ に体温を維持しながら混合ガス麻酔下、両総頸動脈

を 12 分間閉塞し再灌流した一過性総頸動脈閉塞 (tCCAO: transient common carotid artery occlusion) 海馬神経細胞死誘導モデルを使用した。経時的 (0、3、24 時間) に心臓採血を行い、血漿分離後、FREE 法により酸化ストレス (dROM: determination of reactive oxygen metabolite)、抗酸化ポテンシャル (BAP: biological antioxidative potential) を測定した。次に、上記 tCCAO モデルを用いて、神経細胞死に抵抗性を示す TNF- α 遺伝子欠損マウス (TNF-KO) および野生型マウスを低体温下にて処置した群 (低体温群) を用いて、野生型マウス体温維持群と比較した。更に、全身性のエンドトキシン様炎症を引き起こす LPS を腹腔投与 (30 mg/kg) し、3 時間後心臓採血を行い、局所性疾患である脳虚血モデルとの比較を行った。

2. 酸化ストレスによる DNA 損傷と虚血性神経細胞死

1) マウス一過性中大脳動脈閉塞モデル

BALB/c 系マウスを全身麻酔下、頸部を正中切開し、総頸動脈および外頸動脈を剥離して外頸動脈の遠位を閉塞後切断した。総頸動脈および内頸動脈を Zen 式クリップにて閉塞し、外頸動脈からナイロン糸を挿入して内頸動脈を介して中大脳動脈の血流を遮断し、脳虚血を惹起した。1 時間後再び全身麻酔下において挿入したナイロン糸を除去して血流を再開し、再灌流を施した。再灌流後、マウスは最大 96 時間後まで経時的に 2%パラホルムアルデヒドにより還流固定し、通例に従い脳の凍結切片 (8 μ m) を作製した。

2) 8-OH-dG の免疫染色

経時的に作製した脳凍結切片は抗 8-OH-dG 抗体を用いて免疫染色を行った。同時に 8-OH-dG 陽性細胞同定のために抗 neurofilament 200 (NF200; 神経細胞マーカー) 抗体と、細胞内局在を同定するために蛍光標識された抗 cytochrome oxidase subunit I (COX; ミトコンドリアマーカー) 抗体および DAPI (核マーカー) を用い多重染色を行った。

3) 脳組織に於ける 8-OH-dG の分布

脳組織内 8-OH-dG の検出は、8-OH-dG、neurofilament 200 および DAPI の 3 重染色した切片を用いた。同一画像内でそれぞれの染色像をデジタルカメラにて撮影した。次に、画像解析ソフト上においてコントラストを調節し、それらのイメージより 3 者が全て陽性な細胞を 8-OH-dG 陽性神経細胞 (DAPI⁺/NF200⁺/8-OH-dG⁺) とした。一方、DAPI および 8-OH-dG は共存するが NF200 が共存しない細胞をその他 (神経細胞以外) の細胞 (DAPI⁺/NF200⁻/8-OH-dG⁺) とした。計測は、bregma -0.5 から +0.5mm 付近の前額断像を用い、虚血側半球および正常側の脳皮質それぞれ 3 ヶ所 (somatosensory cortex、piriform cortex および striatum) で行った。

4) ミトコンドリアからの cytochrome c 放出

ミトコンドリア・細胞質分画キットを用いてミトコンドリア画分と細胞質画分に分けた後、western blotting 法で虚血前および再灌流 6 時間後における cytochrome c を観察した。分画マーカーは COX および β -actin を用いた。さらに免疫染色により COX と cytochrome c を二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて免疫組織学的に調べた。

3. 虚血性神経細胞死に対する核タンパク (核酸 + プロタミン) の効果

1) 核タンパク食負荷および実験スケジュール

C57/BL6 マウスに対し、正常食 (Nor: MF 食、オリエンタル酵母) を 1 週間与えて順化した後、無作為に無核酸食 (NF)、1.2% 核タンパク含有食 (NP)、1.2% 核酸含有食 (DNA) および 1.2% プロタミン含有食 (PT) を 1 週間自由摂取させた。これらは、鮭白子より調整した。1 週間後、25 分間もしくは 15 分間の一過性両総頸動脈閉塞 (tCCAO) を行った。25 分間の虚血負荷を受けたマウスに対しては、脳虚血後 7 日間の個体生存数を追跡した。15 分間の虚血負荷を受けたマウスに対しては、脳虚血 2 日後における海馬 CA1 領域に於ける神経細胞死を検討した。

2) 組織学的評価

海馬 CA1 領域に於ける神経細胞死の評価は以下

の様に行った。脳を摘出し、ホルマリン固定を行った後パラフィンブロックを作製した。海馬 CA1 を含む冠状断切片はマイクロトームにて $4\mu\text{m}$ の厚さに薄切した。その後、トルイジンブルー染色を行い、単位面積あたりの形態学的に正常な細胞数を計測した。またアポトーシス様細胞死は TUNEL 法を用いて染色し、その陽性細胞数を計測した。

3) 局所脳血流量 (rCBF) の測定

7 日間 NF あるいは NP を与えたマウスの脳虚血中の rCBF を測定した。rCBF はレーザードップラー血流装置にて行い中大脳動脈領域の血流量を虚血前、脳虚血中 (5 および 10 分) および再灌流 5 分後に測定した。脳虚血前の血流を 100% とした。

4) アルギニンおよび一酸化窒素 (NOx) の定量

7 日間 NF、NP あるいは PT を与えたマウスの尿 (アルギニン、NOx) および血漿 (アルギニン) を定量した。血漿中のアルギニン含有量は、Ninhydrin 法に準じて amino acid analyzer を用いて定量した。NOx 含有量は、HPLC を用いて Griss 法を用い 540nm にて定量した。

(倫理面への配慮)

動物実験を含む本研究は、当該研究機関の倫理規定に従い、動物愛護の観点に基づきマウスの取扱には、痛み・恐怖を与えないよう適切に行った。

C. 研究結果

1. 実験的脳虚血モデルマウスに於ける血中フリーラジカルの動態解析

1) TNF-KO マウスに於ける海馬虚血性神経細胞死

一過性前脳虚血後、48 時間目における TNF-KO マウスおよびその野生型マウスの海馬 CA1 領域に於ける神経細胞死を解析した。トルイジンブルー染色で残存する形態的に正常な細胞数、更に TUNEL 染色によりアポトーシス様細胞死を示す神経細胞数をカウントした。その結果、TNF-KO マウスでは正常神経細胞数の残存が多く、アポトーシス性神経細胞死の有意な減少が認められた。

2) 各種障害モデルによる dROM および BAP の

比較

野生型体温維持群、TNF-KO および野生型低体温群マウスを用いた前脳虚血負荷、更に、LPS 投与エンドトキシン性炎症モデルマウスを用い、血漿中の酸化ストレス (dROM) および抗酸化ポテンシャル (BAP) を FREE 法により測定した。血漿は、ストレス負荷後 0、3 および 24 時間後に心臓採血を行い、遠心分離により調整した。野生型体温維持群マウスの dROM は、ストレス負荷前には 115 ± 13 carr U (1 carr U = 0.08 mg/H₂O₂/dL) を示した。脳虚血や炎症時においてラジカル産生が増強される事が示唆されている。しかし、酸化ストレスの指標である dROM は、脳虚血負荷 3 時間後では 88 ± 20 carr U、LPS 投与群では 103 ± 5 carr U と予想に反して低下していた。虚血性神経細胞死抑制が認められる TNF-KO マウスは 84 ± 10 carr U、野生型低体温群は 94 ± 10 carr U を示した。24 時間後、野生型群においては、体温維持群、低体温群いずれも 120 carr U 付近を示し、虚血前と殆ど変わらなかった。しかし、TNF-KO マウスにおいては 151 ± 31 carr U と虚血前に比べ高値を示した。

野生型マウスの BAP は、ストレス負荷前には 2817 ± 379 μM を示した。3 時間後における値は、脳虚血負荷では 4018 ± 158 μM 、LPS 投与では 4069 ± 252 μM と上昇した。虚血性神経細胞死に抵抗性を示す TNF-KO マウスは 3294 ± 166 μM 、野生型低体温群は 3205 ± 368 μM を示し、抗酸化ポテンシャルの上昇が抑えられた。24 時間目における野生型体温維持群、TNF-KO、野生型低体温群の BAP は、それぞれ 2390 ± 368 μM 、 2814 ± 368 μM 、 2619 ± 368 μM を示し、野生型体温維持群が低い傾向を示した。

2. 酸化ストレスによる DNA 損傷と虚血性神経細胞死

1) 神経細胞ミトコンドリアに於ける 8-OH-dG の発現

8-OH-dG 陽性反応を脳虚血・再灌流後 96 時間後まで調べたところ、増加する傾向を示した。DAPI と二重染色したところ、8-OH-dG 陽性反応

は、虚血早期、核には殆ど存在しなかった。更に虚血前および虚血後 2 4 時間後において神経細胞マーカーである NF200 と 2 重染色を行ったところ、虚血前では 8-OH-dG 反応は認められないが虚血後 24 時間後においては核の周囲に 8-OH-dG 陽性反応が認められた。そこで、8-OH-dG がどの細胞内小器官に局在しているのか検討した。8-OH-dG は DNA の酸化ストレスマーカーであり、ミトコンドリアには一本鎖 DNA が存在する事が知られている。そこで、ミトコンドリアマーカーの COX および核マーカーの DAPI と 8-OH-dG の多重染色を試みた。その結果、8-OH-dG 陽性反応は明らかに COX と共存しており、脳虚血後の DNA の酸化ストレスは主にミトコンドリアに生じる事が明らかになった。

2) 脳虚血後の 8-OH-dG の発現の変化

次に、脳虚血後の 8-OH-dG 陽性細胞数をニューロンおよびその他の細胞に分けて計測した。脳虚血前の 8-OH-dG 陽性反応は somatosensory cortex と striatum において約 10%の細胞に認められた。一方、piriform cortex においては約 20%の細胞に観察された。脳虚血・再灌流後 3 時間目より脳虚血側において 8-OH-dG 陽性細胞数は 40%と有意に増加した。12 時間後に於いて 60%と更に増加し、その後 9 6 時間後まで殆ど変わらなかった。9 6 時間後においては正常側においても 20%と増加し、striatum においては有意差を認めた。ニューロンとの共存を調べたところ、ほとんどが NF200 と共存し、ニューロン以外の細胞は 96 時間後においても 20%に満たなかった。

3) 酸化ストレスとアポトーシスの関与

ミトコンドリアに対する酸化ストレスは、ミトコンドリアから細胞質へ cytochrome c の放出を誘導し、アポトーシスの引き金になると考えられている。そこで、8-OH-dG の組織染色が有意に高くなる虚血 6 時間後の cytochrome c の細胞質への放出を、western blotting および免疫組織学的手法を用いて調べた。脳虚血前、cytochrome c は細胞質画分に殆ど観察されないが、脳虚血 6 時間後においては細胞質への増加が認められた。COX

と cytochrome c の 2 重染色においても、虚血前には両者はほとんど同じ位置に共染色されるが、脳虚血 6 時間後には cytochrome c 陽性反応が COX 外周囲でも観察されるようになった。24 時間後ではその傾向はより顕著になった。アポトーシスのマーカーである TUNEL 染色を試みたところ、脳虚血 6 時間後でわずかに陽性反応が認められ始め、24 時間後では明らかに増加した。これらの結果から、8-OH-dG の組織染色により観察されたミトコンドリアの酸化ストレスの増加が、アポトーシスの引き金となって神経細胞死を引き起こす可能性が示された。

3. 虚血性神経細胞死に対する核タンパク質 (核酸+プロタミン) の効果

1) tCCAO (25 分) 後のマウス生存率の比較

25 分間脳虚血後のマウス生存率は、Nor の 80% に対し、NF は 60%だった。虚血 1 日後の生存率は Nor が 70%と殆ど変化しなかったが、NF では 20%で殆どのマウスが死亡した。NF に 1.2%の核タンパクを添加した NP 群は、脳虚血後の生存率が 77.8%で Nor と変わらなかった。虚血 1 日後の生存率は 55.6%となり NF (20%) に比べ明らかに改善した。7 日目まで観察したところ、生存率は全ての群で約 10%であった。

2) tCCAO (15 分) 後の海馬 CA1 領域における神経細胞死への影響

NF 群において tCCAO (25 分)を行った際、死亡率が高かった。そのため、脳虚血による神経細胞死の評価をするために、虚血時間を 15 分に短縮した。更に、核タンパクのどの成分が虚血性神経細胞死の防御に関与しているかを明らかにするため、核タンパクの主要成分である DNA 群と PT 群を追加した。神経細胞死の組織学的評価は、トルイジンブルー染色と TUNEL 染色で行った。トルイジンブルー染色は形態的に大きな円形の核と明瞭な核小体を有する錐体細胞を正常細胞として計測した。NP 群と PT 群では、脳虚血・再灌流 2 日後、海馬 CA1 に於ける錐体細胞の萎縮と脱落が軽度であったが、NF 群と DNA 群では形態的に正常な細胞が少なかった。更に、それらの神経細胞死

は TUNEL 染色によっても明らかになった。TUNEL 陽性細胞は NP 群と PT 群はわずかであったが、NF 群と DNA 群は、多数の TUNEL 陽性細胞が認められた。正常細胞数は、NF、NP、DNA および PT 群でそれぞれ 18.4 ± 4.3 , 35.7 ± 4.0 , 24.3 ± 7.0 , 32.0 ± 3.8 であった。NP 群の正常細胞数は NF 群より有意に高かった ($p < 0.05$)。TUNEL 陽性細胞数は、NF、NP、DNA および PT 群で 29.2 ± 45.1 , 9.3 ± 3.7 , 21.0 ± 6.2 , 9.3 ± 3.0 であった。NP ($p < 0.01$) および PT ($p < 0.05$) 群の TUNEL 陽性細胞数は NF 群より有意に低かった。

3) アルギニンおよび NO_x 含量

NP 群と PT 群において 15 分間の tCCAO による海馬 CA1 の錐体細胞の細胞死は有意に減少した。これらの結果はプロタミンが虚血性神経細胞死に対し抑制効果を有する事を示している。プロタミンはアルギニンを 20~75% 含むタンパクである。そこで、血漿、尿中および各餌中のアルギニン量を定量した。更に、アルギニンは血管拡張因子 NO の基質である事が知られている。そこで、同時に尿中 NO を定量した。NP、PT および NF 餌中のアルギニン量は 1.20、1.53 および 0.77% であり、NP および PT は NF 餌の約 2 倍量のアルギニンを含んでいた。これらの餌の経口摂取 7 日後の血漿アルギニン含量を定量したところ NP (84.8 ± 8.3 mol/L)、PT (88.9 ± 6.0 mol/L) 群における血漿中のアルギニン量は NF (70.1 ± 5.5 mol/L) 群より高かった。尿中のアルギニン量も血漿と同様に NF (6.5 mol/L) 群に比べ NP (11.3 mol/L) と PT (8.7 mol/L) 群で高値を示した。NO_x 含量を NO₂⁻ および NO₃⁻ として定量したところ NP と PT 群の尿中 NO はいずれも NF 群よりも高かった。

4) 脳虚血中の rCBF の比較

NP および PT 群は、血中および尿中のアルギニン量が高く、尿中 NO 量で示された様に NO 産生の亢進が示唆された。そこで、NP および PT により虚血中の rCBF が影響されるかどうかをレーザードップラー血流計を用い検討した。NF および NP 群の虚血前、虚血中 (5、10 分) および再灌流後 5 分における rCBF を測定したところ、脳虚血前

の局所脳血流量は殆ど変わらなかった。脳虚血後の rCBF は、NF、NP 群それぞれ脳虚血 5 分後に 29.5 ± 3.0 , $34.6 \pm 1.6\%$ に低下した。10 分後の脳血流量は 21.3 ± 1.5 , $27.6 \pm 2.0\%$ と更に低下したが NP 群の rCBF は NF 群に比べ有意に高かった ($p < 0.05$)。再灌流 5 分後の rCBF は NF、NP 群それぞれ 95.7 ± 4.4 , $89.7 \pm 2.9\%$ に回復し両者に差は認められなかった。以上、核タンパク中の主要成分であるプロタミンはアルギニンとして NO の基質となり脳虚血中の血流の低下を抑制し、虚血ストレスによる神経細胞死を抑制している可能性がある。

D. 考察

1. 実験的脳虚血モデルマウスに於ける血中フリーラジカルの動態解析

今回、我々は局所性モデルであるマウス前脳虚血および全身性モデルである LPS 投与によるエンドトキシン性炎症の異なる酸化ストレス関連モデルマウスを用いて、血漿中の酸化ストレス (dROM)、抗酸化ポテンシャル (BAP) を FREE 法により明らかにした。さらに、脳虚血モデルにおいては、神経細胞死に抵抗性を示す TNF-KO マウス、虚血時に神経保護作用を示す低体温負荷群のマウスを用い、脳虚血ストレスの違いにより血中の酸化ストレス (dROM) および抗酸化ポテンシャル (BAP) に違いが生じるかどうか検討した。

ヒトでは、頭部外傷など救急・急性期にラジカル産生が増加する事が認められている。しかし、本研究では、少なくともマウスに於いて、脳虚血や LPS 投与によるストレス負荷後、ヒトの例で観察されたような見かけ上の酸化ストレスの増大は認められなかった。さらに、興味深い事に、脳虚血や LPS 投与によるストレス負荷により、逆に、大量の抗酸化性物質が動員されることが示された。この抗酸化性物質の産生は、TNF-KO マウスや低体温負荷群の野生型マウスに於いては抑制されていた。この事実は、少なくともマウスでは、強いストレス下では大量の抗酸化性物質が動員され、見かけ上、酸化ストレスが軽減される可能性を示

している。更に、24 時間後の野生型マウスの dROM は、体温維持群と低体温群ではほとんど変わらなかった。しかし、野生型マウスの BAP に関して、体温維持群は、低体温群に比べ低い値を示した。この事実は、初期に動員された大量の抗酸化性物質が、亜急性期・慢性期における BAP の低下を招いたためではないかと考えている。

2. 酸化ストレスによる DNA 損傷と虚血性神経細胞死

本研究では、酸化ストレスによる DNA 損傷を示す 8-OH-dG の脳虚血後の脳内に於ける動態を明らかにした。8-OH-dG は、脳虚血・再灌流後、数時間で主に神経細胞のミトコンドリアに増加が見られた。更に、ミトコンドリアに対する酸化ストレスの増加は、一連のアポトーシス誘導の引き金となるミトコンドリアから細胞質への cytochrome c の放出を増加させ、脳虚血性神経細胞死を誘導する可能性が考えられた。

8-OH-dG は、癌や炎症、脳虚血の際に生じる DNA の酸化ストレスマーカーとして臨床検査に用いられている。これらの疾患に於いて、DNA の酸化障害は核の酸化障害を意味していると考えられてきた。即ち、病態時に発生する活性酸素は細胞の核やミトコンドリアの DNA を傷害し、その結果、正常なタンパクの合成阻害や異常タンパクの産生による細胞の機能不全を起こし、細胞が死滅すると言うものである。しかしながら、本研究では、脳虚血性神経細胞死誘導の際にアポトーシスが生じ始める脳虚血・再灌流 6 時間後に於いて、殆どの 8-OH-dG は核周囲のミトコンドリアに見られた。この事実は、神経系では癌や炎症の際とは異なる酸化障害機構があることを示している。神経細胞は非常にミトコンドリアが発達しており、エネルギー産生の際にミトコンドリアから大量の活性酸素種が放出されていると考えられている。従って、病態時には、核の酸化に先立ってミトコンドリアが酸化障害を受ける。その結果としてミトコンドリアから細胞質へ cytochrome c の放出が起こり、それを引き金とするアポトーシスにより神経細胞死が引き起こされると考えられる。

3. 虚血性神経細胞死に対する核タンパク（核酸 + プロタミン）の効果

本年度は、鮭白子由来の核タンパクの摂取が脳虚血性神経細胞死に対して有用性が認められるかどうか、マウス tCCAO モデルを用いて検討した。その結果、NF では強い脳虚血刺激（25 分間虚血）に対して脳虚血 1 日目の死亡が顕著に認められたが、NP はその強い虚血刺激に対する個体の死亡を遅延させることが示された。更に、その個体の死亡が脳虚血による神経細胞死と関連することを 15 分間の脳虚血刺激により明らかにした。同時に、核タンパクの主要成分であるプロタミンと DNA を負荷した群を用い、核タンパク中のどの成分が有用であるか検討した。脳虚血 2 日後の海馬 CA1 に於ける神経細胞死を比較したところ NF 群に比べ NP 群は神経細胞死が有意に減少していた。さらに PT 群も同様に神経細胞死抑制効果が認められたが、DNA の負荷は神経細胞死抑制効果が認められなかった。これらの結果より、NP 群における神経細胞死に対する防御効果はプロタミンに依存する事が示唆された。更に、脳虚血中の rCBF が NF に比べ NP が有意に高く、これらの細胞死抑制作用の一つとして、脳虚血中の脳血流改善作用があることが示唆された。

E. 結論

1. 実験的脳虚血モデルマウスに於ける血中フリーラジカルの動態解析

少なくともマウスに於いては、脳虚血や LPS 投与によるストレス負荷後、大量の抗酸化性物質が動員され、見かけ上、血漿中の酸化ストレスが低下することが示された。この背景として、強いストレスを受けたマウスでは、ヒトでは認められなかった急激な抗酸化性物質の産生が増加し、酸化ストレスから個体を防御する機構が循環器系に備わっている可能性が考えられる。

2. 酸化ストレスによる DNA 損傷と虚血性神経細胞死

脳虚血時には核 DNA の障害に先立ってミトコンドリア DNA が酸化障害を受ける。その結果、

ミトコンドリア誘発性のアポトーシスによって神経細胞死を起こすことが示された。

3. 虚血性神経細胞死に対する核タンパク（核酸＋プロタミン）の効果

核タンパク負荷は、脳虚血時の急性期にその主要成分のプロタミンの脳循環改善作用を介して虚血性神経細胞死を抑制することが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishida S, Yoshida LS, Shimoyama T, Kobayashi T, Tsunawaki S. (2005) Fungal metabolite gliotoxin targets flavocytochrome b558 in the activation of the human neutrophil NADPH oxidase. *Infect Immun.* 73: 235-244.
- 2) Kawahara T, Kohjima M, Kuwano Y, Mino H, Teshima-Kondo S, Takeya R, Tsunawaki S, Wada A, Sumimoto H, Rokutan K. (2005) *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide activates Rac1 and transcription of NADPH oxidase Nox1 and its organizer NOXO1 in guinea pig gastric mucosal cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288: C450-457.
- 3) Kobayashi T, Ogawa Y, Watanabe Y, Furuya M, Kataoka S, Garcia Del Saz E, Tsunawaki S, Dinauer MC, Seguchi H. (2004) Mitochondrial transmembrane potential is diminished in phorbol myristate acetate-stimulated peritoneal resident macrophages isolated from wild-type mice, but not in those from gp91-*phox*-deficient mice. *Histochem Cell Biol.* 122: 323-332.
- 4) Li G, Kobayashi T, Tsunawaki S, Ogawa Y, Seguchi H. (2004) Gliotoxin inhibits superoxide production and exocytosis of the oxidant-producing intracellular compartments in human neutrophils stimulated with phorbol myristate acetate. *Acta Histochem Cytochem.* 37: 183-189.
- 5) Tsunawaki S, Yoshida LS, Nishida S, Kobayashi T, Shimoyama T. (2004) Fungal metabolite gliotoxin inhibits assembly of the human respiratory burst NADPH oxidase. *Infect Immun.* 72: 3373-3382.
- 6) Yoshida LS, Nishida S, Shimoyama T, Kawahara T, Teshima S, Rokutan K, Kobayashi T, Tsunawaki S. (2004) Superoxide generation by Nox1 in guinea pig gastric mucosal cells involves a component with p67^{phox}-ability. *Biol Pharm Bull.* 27: 147-155.
- 7) Kawahara T, Kuwano Y, Teshima-Kondo S, Takeya R, Sumimoto H, Kishi K, Tsunawaki S, Hirayama T, Rokutan K. (2004) Role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 1 in oxidative burst response to Toll-like receptor 5 signaling in large intestinal epithelial cells. *J Immunol.* 172: 3051-3058.
- 8) Sakagami H, Matsumoto H, Satoh K, Shioda S, Chowdhury SA, Hashimoto K, Kikuchi H, Nishikawa H, Terakubo S, Shoji Y, Nakashima H and Shimada J. (2005) Cytotoxicity and radical modulating activity of Moxa smoke. *In Vivo* (in press)
- 9) Dohi K, Ohtaki H, Shioda S, Aruga T (2005) Magnesium sulfate therapy in patients with acute neuronal damage: The problem of intra- venous administration. *Crit Care Med* 33:1-2.
- 10) Ohno F, Watanabe J, Sekihara H, Hirabayashi T, Arata S, Kikuyama S, Shioda S, Nakaya K, Nakajo S. (2005) Pituitary adenylate cyclase- activating polypeptide promotes differentiation of mouse neural stem cells into astrocytes. *Regul Pept.* 126:115-122.
- 11) Ogawa T, Nakamachi T, Ohtaki H, Hashimoto H, N S, Baba A, Watanabe J, Kikuyama S, Shioda S. (2005) Monoaminergic neuronal development is not affected in PACAP-gene-deficient mice. *Regul Pept.* 126:103-108.
- 12) Nakamachi T, Endo S, Ohtaki H, Yin L, Dohi K, Kudo Y, Funahashi H, Matsuda K, Shioda S. (2005) Orexin-1 receptor expression after global ischemia in mice. *Regul Pept.* 126:49-54.

- 13) Dohi K, Satoh K, Moriwaki H, Ohtaki H, Shioda S, Aruga T (2004) Free radical monitoring with ex vivo ESR in critical care & emergency medicine free radical and hyperbaric oxygen therapy- *J Jap Associ Clin Hyperbaric Oxygen Dividing* 1:2-8.
- 14) Ohtaki H, Dohi K, Yofu S, Nakamachi T, Kudo Y, Endo S, Aruga T, Goto N, Watanabe J, Kikuyama S, Shioda S. (2004) Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38 (PACAP38) on tissue oxygen content—treatment in central nervous system of mice. *Regul Pept.* 123:61-67.
- 15) Yin L, Ohtaki H, Nakamachi T, Kudo Y, Makino R, Shioda S. (2004) Delayed expressed TNFR1 co-localize with ICAM-1 in astrocyte in mice brain after transient focal ischemia. *Neurosci Lett.* 370:30-35.
- 16) Dohi K, Aruga T, Satoh K, Shioda S. (2004) Choto-san (Kampo Medicine) for the treatment of headache. *Headache* 44:375.
- 17) Ohtaki H, Yin L, Nakamachi T, Dohi K, Kudo Y, Makino R, Shioda S. (2004) Expression of tumor necrosis factor alpha in nerve fibers and oligodendrocytes after transient focal ischemia in mice. *Neurosci Lett.* 368:162-166.
- 18) Shioda S, Ohtaki H, Suzuki R, Nakamachi T, Takenoya F, Dohi K, Nakajo S. (2004) Prevention of delayed neuronal cell death by PACAP and its molecular mechanism *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 123:243-252.
2. 学会発表
- 1) Tsunawaki S, Yoshida LS, Nishida S, Shimoyama T. Fungal metabolite gliotoxin Inhibits assembly of the human respiratory burst NADPH oxidase. *The 4th International Peroxidase Meeting.* October 27-30, 2004, Kyoto.
- 2) Tsunawaki S, Nishida S, Shimoyama T, Yoshida LS. Fungal metabolite gliotoxin targets flavocytochrome b558 in the activation of the human phagocyte NADPH oxidase. *The 4th International Peroxidase Meeting.* October 27-30, 2004, Kyoto.
- 3) Yofu S, Ohtaki H, Takaki A, Matsunaga M, Yin L, Shioda S. Nucleoprotamine supplement protects mouse hippocampal neurons from delayed cell death after global ischemia. *The Annual Global Conference on Neuroprotection and Neuroregeneration (GCNN).* Zermatt (Switzerland) 2004/2/8-10.
- 4) Ohtaki H, Yin L, Nakamachi T, Dohi K, Horai R, Asano M, Iwakura Y, Shioda S. Suppression of Oxidative Neuronal Cell Death after Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Interleukin-1 Gene Deficient Mice. *The Annual Global Conference on GCNN.* Zermatt (Switzerland) 2004/2/8-10.
- 5) Nakamachi T, Ohtaki H, Yin L, Dohi K, Endo S, Kudo Y, Funahashi H, Shioda S. Orexin-1 receptor expression after global ischemia in mice. *The Annual Global Conference on GCNN.* Zermatt (Switzerland) 2004/2/8-10
- 6) Yin L, Ohtaki H, Nakamachi T, Endo S, Kudo Y, Shioda S. Expression of type I pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor (PAC1R) in mouse brain after transient focal ischemia. *5th AOSCE.* Nara (Japan) 2004/3/26-30
- 7) Nakamachi, H. Ohtaki, L. Yin, K. Dohi, S. Endo, Kudo Y, Shioda S. Immunohistochemical observation of Orexin-1 receptor (OX1R) expression after brain ischemia. *5th AOSCE.* Nara (Japan) 2004/3/26-30.
- 8) Ohtaki H, Dohi K, Nakamachi T, Yin L, Shioda S. Apoptotic neuronal cell death after brain ischemia. *5th AOSCE Nara (Japan)* 2004/3/ 26-30.
- 9) 大滝博和, 小川哲朗, 中町智哉, 渡邊潤, 中条茂男, 塩田清二. PACAP による神経細胞死防御と神経再生への展望 第1回昭和大学再生医療研究会 東京 2004/7/9.
- 10) 塩田清二, 大滝博和, 中町智哉, 高木厚司, 土肥謙二. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP)による神経細胞死抑制と IL-6 産生機構 第68回日本インタ

- ーフェロン・サイトカイン学会学術集会 青森 2004/7/29-31.
- 11) 大滝博和, 中町智哉, 土肥謙二, 尹麗, 高木厚司, 宝来玲子, 浅野雅秀, 岩倉洋一郎, 塩田清二 IL-1 による虚血性神経細胞死誘導における酸化ストレスの関与. 第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 青森 2004/7/29-31.
- 12) Ohtaki H, Endo S, Nakamachi T, Yin Li, Kudo Y, Goto N, Shioda S. Increased astroglial expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the perifocal region of infarction after transient focal ischemia in mice. *16th International Congress of the International Federation of Associations of Anatomists (IFAA)* Kyoto (Japan) 2004/8/22-27.
- 13) Ohtaki H, Dohi K, Satoh K, Takaki A, Yin L, Endo S, Goto N, Shioda S. DNA oxidation of mitochondria in neurons is induced prior to that of nucleus after transient cerebral ischemia. *The 1st Showa International Symposium for Life Science*. Tokyo (Japan) 2004/8/31.
- 14) Dohi K, Satoh K, Moriwaki H, Mihara Y, Miyake Y, Shioda S, Aruga T. Free radical monitoring in patients with neuroemergency diseases. *The 1st Showa International Symposium for Life Science*. Tokyo (Japan) 2004/8/31.
- 15) Dohi K, Ohtaki H, Takaki A, Nakamachi T, Satoh K, Muneoka K, Shioda S. Increases of oxidative damages in mitochondria after cerebral ischemia. *The Society for Neuroscience's 34th Annual Meeting*. San Diego (CA) 2004/10/23-27.
- 16) Yofu S, Ohtaki H, Takaki A, Matsunaga M, Yin L, Shioda S. Nucleoprotamine supplement protects mouse hippocampal neurons from delayed cell death after global ischemia. *The Annual Global Conference on Neuroprotection and Neuroregeneration (GCNN)*. Zermatt (Switzerland) 2004/2/8-10.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- 塩田清二, 大滝博和, 岡田泰伸, 井上華. 申請中 (2004) 脳虚血・遅発性神経細胞死防御薬剤.