

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17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

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第1分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 …… 13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 …… 17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 25

第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 …… 66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 …… 113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 …… 117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 …… 120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用－非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立－	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 謙 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭 金正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭 金正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	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	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の
開発に関する研究

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 網脇 祥子

研究要旨 川崎病発症期に血中濃度が上昇する neopterin がヒト冠状動脈内皮細胞の自発的な活性酸素生成能を増強した。神経ペプチド (PACAP) が、脳海馬領域の酸化ストレス、加齢に伴う血中酸化ストレスを抑制した。核タンパクの餌負荷が、リウマチ様関節炎に対して改善効果を持つ事が明らかになった。

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。昨年度は、脳虚血時に於ける血中フリーラジカルの動態解析を行った。更に、脳虚血時、神経細胞死に先だってミトコンドリア内の酸化障害が増加し、その結果、ミトコンドリアからアポトーシスシグナルであるチトクローム *c* が放出され、神経細胞死が誘導されることを示した。最後に、サケ白子由来の核タンパク摂取が、マウス脳虚血後の海馬 CA1 領域に於ける神経細胞死を抑制すること、更に、その抑制効果に一酸化窒素 (NO) ラジカルが関与することを見出して報告した。

本年度は、1) 川崎病に於ける冠状動脈瘤の発症機序を明らかにすべく、冠状動脈血管内皮細胞の活性酸素生成系を解析した。次に、2) 脳虚血性神経細胞死抑制作用を有する神経ペプチド (PACAP: pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) が、活性酸素生成と関連しているか PACAP-KO マウスを用いて検討した。最後に、3) フリーラジカルが関与する疾患である関節リウマチに対してサケ白子由来核タンパク摂

取が有用であるか、リウマチ様関節炎を自然発症する HTLV-I Tg マウスを用いて検討した。

B. 研究方法

1. 冠状動脈血管内皮細胞に於ける活性酸素生成系

1) ヒト冠状動脈血管内皮細胞の培養

正常ヒト冠状動脈血管内皮細胞 (HAEC : 3 継代目) は Cambrex 社より購入した。血管内皮細胞用基礎培地に添加因子 (5% FCS, 0.01 $\mu\text{g/ml}$ human epidermal growth factor, 1 $\mu\text{g/ml}$ hydrocortisone, 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin, 50 ng/ml Amphotericin B, and 120 $\mu\text{g/ml}$ bovine brain extract) を加えて増殖培地を調整し、培養フラスコ中で継代した。実験には 96 穴プレートを用いて培養した 5~7 継代目の細胞を使用した。

2) H_2O_2 定量

生成された活性酸素は、過酸化水素 (H_2O_2) としてスコポレチン法を用いて定量した。還元型スコポレチン (AH_2) は 350 nm で励起すると 460 nm の蛍光を放つ。西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 存在下、還元型スコポレチンは H_2O_2 と 1:1 で反応し、無蛍光の酸化型スコポレチンに変換される。この蛍光減少量を用いて H_2O_2 を定量する。 H_2O_2 生成量は、試薬 H_2O_2 の検量線を用いて算出した。

3) ヒト冠状動脈血管内皮細胞の H_2O_2 生成活性

増殖培地で培養したヒト冠状動脈血管内皮細胞 (HAEC) は、実験開始 4 時間前に基礎培地に置き換えた。PBS で洗浄した後、33.3 μM スコポレチン、0.88 U/ml HRP を含む 5 mM glucose-PBS (PBSG) 中で 37°C、30 分間反応させた。次に、上清のスコポレチン蛍光

強度を Wallac 社製 Arvo 1420 型プレートリーダーで測定し、HAEC が生成した H_2O_2 量を定量した。HAEC の H_2O_2 生成活性は、 $nmol H_2O_2/min/mg\ protein$ として表記した。Neopterin は、HAEC を基礎培地に置き換えると同時に添加し、4 時間培養した。

2. PACAP による酸化ストレスの抑制

1) ペプチドおよび動物

神経ペプチド PACAP (商品名: PACAP38)、VIP および PACIR アンタゴニスト、PACAP6-38 は Peptide 研 (大阪) より購入した。PACAP は、*vasoactive intestinal polypeptide (VIP) / secretin/ glucagons family* に属する神経ペプチドとして知られている。PACAP はこれまで、VIP の 1000 倍高い親和性を有する PACAP 特異的レセプター (PACIR)、および、PACAP と VIP がほぼ同等の親和性を有する VIP/PACAP レセプター 1、2 (VPACR 1, 2) に結合することが報告されている。PACAP-KO マウス (C57/B6J) は馬場明道先生 (大阪大学・薬学部) より提供された。

2) 酸化ストレス測定方法

フリーラジカルによる酸化ストレスは、free radical electron evaluator (FREE; Health & Diagnostics Limited Co., Italy) を用い、活性酸素代謝物 (ROM: reactive oxygen metabolite) および生物学的抗酸化ポテンシャル (BAP: biological antioxidant potential) として測定した。

ROM は脂質過酸化物であるヒドロキシペルオキシド (R-OOH) より生じるアルコキシラジカル (R-O[•]) およびペルオキシラジカル (R-OO[•]) を鉄 (Fe²⁺ および Fe³⁺) の酸化還元を利用して測定する。その結果として生じる芳香アミン (A-NH₂) のピンクの誘導体 ([A-NH₂[•]]) を 546 nm で比色定量する。データは 100 mL あたりの 0.08 mg H_2O_2 の酸化力をユニット (U) として示した。

BAP は、チオシアン酸誘導体 (AT: 無色) と三塩化鉄 (FeCl₃) の酸化複合体 (FeCl₃-AT: 茶褐色) に対し、試料 (BP) の還元力 (e⁻の遷移) による茶褐色の減少 (FeCl₃-AT: 無色) として測定した。データは Fe³⁺ から Fe²⁺ の還元量 (μmol/L) として示した。

3) PACAP-KO マウスに於ける酸化ストレスの比較

PACAP-KO (+/+, +/- および -/-) マウスの血中酸化ストレスは、生後 50 から 208 日の雄性マウスを用いて比較した。動物はペントバルビタール麻酔後 (50

mg/kg, ip)、右心室より血液を採取し 15,000 rpm で 20 分間遠心した血清を用い、ROM および BAP を測定した。

4) PACAP 投与による酸化ストレスの比較

PACAP38 (=PACAP) 投与による血中酸化ストレスを ROM および BAP により測定した。野生型マウス (86.5 ± 3.3 日齢、n=4-6) は 3.5%セボフレンを含む N₂O/O₂ の吸入麻酔後、総頸静脈より採血 (80 μL) した。次に、この総頸静脈より PACAP38 (0.05、5、500 nmol/kg) を投与した。PACAP38 投与後 1、3、6、16、および 24 時間後、採血を行った。全ての血液は遠心分離後、血清を採取し ROM および BAP の測定を行った。これらに加え、PACAP の作用機序を調べるため、PACIR のアンタゴニストである PACAP6-38 (500 nmol/kg) および VPACRs のアゴニストである VIP (500 nmol/kg) を投与し、投与前および投与後 3 時間における血清の ROM および BAP を測定した。

5) *In situ* スーパーオキシドアニオンの検出

脳内のスーパーオキシドアニオン (O₂⁻) の検出は、ヒドロキシエチジウム (HEt; Molecular Probes) の投与により行った。HEt は O₂⁻ と反応し、安定な赤色の蛍光色素であるエチジウム (Et) になることが知られている。生後 180 日の PACAP-KO (+/+, +/-) マウスに 3.5%セボフレンを含む N₂O/O₂ の吸入麻酔下で HEt (200 μL; 1 mg/mL 0.9% NaCl/1% DMSO) を総頸静脈より投与した。1 時間後、ペントバルビタール (50 mg/kg, ip) 麻酔を行い、左心室より生食を灌流して血液を除去した後、2%PFA にて灌流固定した。直ちに脳を取り出し、20%ショ糖溶液で置換し、凍結切片を作成した。最後に、切片の海馬領域を励起波長 546 nm にて観察した。

3. 関節リウマチに対する核タンパク食の効果

1) 餌負荷スケジュール

HILV-I Tg マウス (Balb/c 系) は、岩倉洋一郎教授 (東京大学医科学研究所) から供与された。核タンパク負荷は、HILV-I Tg および野生型マウス (雄) を、6 週齢時に無作為に 3 群に分けた後、無核タンパク餌 (NF)、サケ白子より調整した核タンパク (NP) を 0.6% もしくは 1.2% 含有した餌を 18 週齢までの 3 ヶ月間自由摂取させた。餌負荷期間中、マウスは 1 週間おきに体重、関節厚を計測した。そして、餌負荷終了時にペ

ントバルビタール (50 mg/kg i.p.) 麻酔下で関節を採取し、組織学的評価を行った。

2) 関節厚の計測方法

マウスの関節径は、デジタル式ノギスを用いて計測した。関節は、前肢 (手首) と後肢 (足首) の長・短径を、餌負荷期間中 (6~18 週齢)、1 週間おきに 8 回計測した。関節厚は、体重増加に伴う関節の成長を考慮し、関節計測値を体重で除して算出した。結果は、計測開始時を 100% として 0~3 の 4 段階にスコア化した。

スコア	関節肥大率
0	≤ 100%
1	≤ 110%
2	≤ 120%
3	> 120%

3) 組織学的変化の評価

関節の組織学的変化を比較するため、ヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色とトルイジンブルー (TB) 染色を行なった。マウスは、3 ヶ月間の餌負荷終了時に、ペントバルビタール (50 mg/kg i.p.) 麻酔下で 10% 中性緩衝ホルマリン液にて還流固定し、前肢と後肢関節を摘出した。関節を 10% 中性緩衝ホルマリン液に 3 日間浸漬固定した後、1% 蟻酸にて 1 週間脱灰した。その後は常法に従ってパラフィンブロックを作成した。マイクロトームで 4 μm の厚さに薄切し、染色した組織切片を山本らの報告 (Yamamoto H. et al. Arthritis Rheum. 36: 1612-1620 1993) に従いグレード 0~4 の 5 段階に分けた。関節の炎症が悪化するほど、グレードが高くなる。

0: 組織変化なし

1: 滑膜細胞の肥厚

2: 炎症性細胞の浸潤、フィブリノイドの浸潤

3: パンヌス形成、骨や軟骨の破壊

4: リンパ小節の形成、血管新生

4) 関節の IgG 染色

関節リウマチ発症時、血中 IgG が上昇することが知られている。そこで関節に於ける IgG 沈着を調べるため、抗 IgG 抗体による免疫染色を行った。染色はパラフィン切片を用いた。キシレンにより切片からパラフィンを除去し、0.01 M リン酸緩衝液で洗浄した後、0.3% 過酸化水素液に 30 分間浸漬した。1 次抗体はヤギ抗マウス IgG 抗体 (SIGMA, M8019) を用い、4℃

で 1 晩反応させた。2 次抗体は抗ヤギ IgG 抗体 (Vector) を用い、ABC および DAB 法により発色させた。

(倫理面への配慮)

動物実験を含む本研究は、当該研究機関の動物実験指針に従い、動物実験委員会の承認の下に行った。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. 冠状動脈血管内皮細胞に於ける活性酸素生成系

1) ヒト冠状動脈血管内皮細胞の H₂O₂ 生成活性

初めに、*in vitro* で培養したヒト冠状動脈血管内皮細胞 (HAEC) の H₂O₂ 生成活性をスコポレチン法で調べた。感染防御を担う食細胞は異物を認知して、あるいは、phorbol myristate acetate (PMA) 等で刺激して初めて活性酸素を生成する。興味深い事に、HAEC は、これら異物や刺激剤が存在しない条件下でも自発的に活性酸素を生成することが分かった。そして、培養開始後、HAEC の H₂O₂ 生成活性は上昇し、4 日目に最大活性 (18.0 nmol H₂O₂/min/mg protein) を示した。これは、細胞分裂が活発に起こって confluency に至るまでの期間と一致し、これ以降は著しく低下して 6 日目の H₂O₂ 生成活性は 0.7 nmol H₂O₂/min/mg protein であった。最大活性を示す 4 日目の H₂O₂ 生成活性は、PMA で刺激したマクロファージ (3 nmol H₂O₂/min/mg protein) より 6 倍高い値であった。カタラーゼの添加により、スコポレチンの蛍光減少が完全に抑制されることから、H₂O₂ を特異的に定量したと言える。

2) Neopterin の効果

Neopterin は、各種冠状動脈疾患において必ず血中濃度が上昇するため、これら疾患の診断に於ける臨床マーカーとなっている。川崎病急性期の患児では、血中の neopterin 濃度が 20~50 nM となっており、先天性心臓疾患患児の 2.5~5.0 倍の高値を示す。Neopterin は、活性化マクロファージ・単球が産生することが知られているが、その生理活性および冠状動脈疾患に於ける発症病理への関与は不明である。そこで、HAEC の H₂O₂ 生成活性に対する neopterin の影響を検討した。HAEC (day 2) を neopterin 存在下で 4 時間培養したところ、neopterin 濃度に依存して H₂O₂ 生成活性が亢進した。Day 2 の HAEC は低い H₂O₂ 生成活性しか示

さないが、neopterin 処理により day 4 に匹敵する高い H₂O₂ 生成活性が得られた。しかし、同様の実験を day 4, day 6 の HAEC を用いて行っても、neopterin による活性の上昇は見られなかった。

2. PACAP による酸化ストレスの抑制

1) PACAP-KO マウスの酸化ストレス

PACAP-KO (+/+, +/-, -/-) マウス血清中の酸化ストレスを ROM にて計測したところ、動物の加齢に伴い増加した。生後 50 日から 216 日齢まで検討したところ、PACAP の遺伝子系 (+/+, +/-, -/-) に拘わらず相関係数 (r²) 0.74 以上の高い相関を示した。一方、BAP の相関係数はおよそ 0.3 であり、抗酸化ポテンシャルは加齢と有意な相関を認めなかった。50 から 100 日齢 (若年齢) と 150 日から 200 日齢 (老齢) の動物の ROM および BAP を PACAP (+/+, +/-, -/-) マウスで比較したところ、若年齢マウスではほとんど違いが認められなかったが、老齢マウスでは、PACAP (-/-) マウスは PACAP (+/+) マウスに比べて有意に ROM が高く、BAP が低い結果が得られた。

2) PACAP の酸化ストレスに対する影響

PACAP38 (=PACAP) の血中酸化ストレスに対する影響を検討した。PACAP38 を 0.5, 5 および 500 nmol/kg、野生マウスの静脈に単回投与したところ、投与後 1 時間より濃度依存的に ROM の低下および BAP の上昇が認められた。特に 500 nmol/kg 投与すると、有意な ROM の低下と BAP の上昇が認められた。これらの応答は投与後 3 から 6 時間の間に最も強くなった。そこで、投与後 3 時間目における PACAP、VIP、PACAP6-38 (PAC1R のアンタゴニスト) の単独投与および PACAP と PACAP6-38 の共投与を行い PACAP の抗酸化ストレス能に対するレセプターの関与を調べた。その結果、PACAP は有意に ROM を低下させ、BAP を上昇させたが、VIP および PACAP6-38 の単独投与では酸化ストレス抑制効果は認められなかった。更に、PACAP6-38 の共投与は PACAP 単独投与で見られた有意な ROM の低下および BAP の上昇を抑制した。

3) PACAP の脳内活性酸素に対する影響

PACAP が脳虚血後の神経細胞死誘導に対する抑制作用を有することを我々は報告してきた。そこで、血清で認められた PACAP の抗酸化ストレス能が組織レベルでも認められるか、180 日齢の PACAP-KO (+/+, -/-)

マウスを用い、HEt による *in situ* 組織法で検討した。記憶や学習に關与する海馬の CA1 領域に着目し、HEt と O₂ との反応物である安定型の Et (赤色蛍光色素) を蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、野生型 (+/+) マウスに比べ、PACAP 遺伝子欠損型 (-/-) マウスでは赤色蛍光数が増加し、O₂ が生成されていることが分かった。

3. 関節リウマチに対する核タンパク食の効果

1) 体重の経時的変化

餌負荷期間中 (6~18 週齢) の体重を経時的に計測した。リウマチ様関節炎を自然発症する HILV-I Tg マウスの体重は、餌負荷開始時 (6 週齢) に於いて NF 群、NP-0.6% 群、NP-1.2% 群の 3 群間でほとんど差は認められなかった。NF 群の体重は 10 週齢まで増加したが、12 週齢時より徐々に減少し、18 週齢では餌負荷開始時より減少した。それに対して、NP-0.6% 群の体重は、餌負荷期間中殆ど変化しなかった。NP-1.2% 群の体重は加齢に伴い徐々に増加した。野生型マウスの体重は、餌負荷期間中、3 群間で殆ど差は認められなかった。

2) 関節の肥大

次に、マウスの関節厚を比較した。HILV-I Tg マウスの後肢関節に於ける関節肥大率のスコアを比較したところ、NF 群 (n=7) は 10 週齢より上昇し、18 週齢時では 1.57 ± 0.48 であった。一方、18 週齢時に於ける NP-1.2% 群のスコアは 0 (n=9) であり、餌負荷期間中ほとんど上昇しなかった。NP-0.6% 群のスコアは若干上昇し、NF 群と NP-1.2% 群の中間あたりの値を示した。また、前肢においても同様の傾向が認められ、NF 群はスコアが上昇したが、NP 群は、核タンパクの濃度に依存してスコアの上昇が抑制された。野生型マウスのスコアは、3 群とも餌負荷終了時まで殆ど変化しなかった。

3) 関節の組織学的変化

HILV-I Tg マウス関節組織の形態変化に対する核タンパク負荷の効果を山本らの基準に従って評価した。餌負荷終了時 (18 週齢)、後肢に於ける、グレード 4 の割合は、NF 群が 100%であったのに対し、NP-0.6% 群は 50%、NP-1.2% 群は 34% とそれぞれ減少した。また、グレード 0 の割合は、NF 群が 0%であったのに対し、NP-0.6% 群は 33%、NP-1.2% 群は 34% と、核タ

ンパクの濃度に依存して増加した。前肢に於いても、後肢に於ける組織変化と同様に、核タンパクの濃度に依存してグレード4が減少し、グレード0が増加した。

次に、後肢関節の IgG 染色を行なった。IgG 陽性反応は、野生型マウスの関節では殆ど認められなかった。HILV-I Tg マウスの場合、NF 群の関節組織は 5 例中 5 例 (100%)、滑膜細胞に強い陽性反応が認められた。一方、NP-0.6%群は 5 例中 3 例 (60%)、NP-1.2%群は 9 例中 3 例 (約 33%) に陽性反応が認められた。前肢関節に於いても、核タンパク負荷群の IgG 陽性反応は、NF 群に比べ弱かった。

D. 考察

1. 冠状動脈血管内皮細胞に於ける活性酸素生成系

川崎病は未だ原因不明な乳幼児期に多い急性熱疾患であり、全身性の急性血管炎を引き起こす。患児の約 10%が冠状動脈瘤を併発し、突然死に至る場合もある。冠状動脈瘤の発症機序は解明されていないが、血管内膜傷害による冠状動脈の弱体化に起因すると考えられている。本研究では、川崎病に於ける全身性血管炎、特に、冠状動脈瘤の発症病理を理解すべく、冠状動脈血管内皮細胞の活性酸素生成能および冠状動脈疾患の臨床マーカーである neopterin の影響を解析した。

ヒト冠状動脈血管内皮細胞 (HAEC) は、自発的に高い H_2O_2 生成活性を示めることが明らかになった。HAEC に於ける自発的 H_2O_2 生成の生理的意味は不明であるが、細胞分裂時 (day 2~4) に高い活性を示し、confluency 移行後 (day 6) 活性が低下したことから、細胞分裂の調節シグナルとして働いている可能性が考えられる。一方、川崎病急性期にはこのシグナル反応が様々な血管作動性因子によって乱されることが考えられる。今回、川崎病急性期に報告されている neopterin の平均血中濃度 (~25 nM) で処理した HAEC (day 2) は、未処理細胞より 5 倍高い H_2O_2 生成活性を示した。この結果から、川崎病急性期に血中濃度が上昇している neopterin が血管内皮細胞の H_2O_2 生成活性を必要以上に亢進させ、血管内皮細胞自身のみならず、他の血管壁構築細胞 (平滑筋細胞、繊維芽細胞) にも酸化ストレスを与えて障害を起こし、血管炎、ひいては、動脈瘤を形成する可能性が考えられる。小児期の冠状動脈がまだ未発達であることを考慮すれば、neopterin の血中濃度の上昇が、患児の血管構築細胞に重大な変化

を引き起こすことも考えられる。今後、neopterin を含めて川崎病急性期に上昇する血管作動性物質の中から、血管内皮細胞に高い H_2O_2 生成活性を付与する因子を検索する。更に、血管内皮細胞の自発的 H_2O_2 生成を担う責任因子を同定してその生成機序を明らかにし、川崎病における血管炎発症および冠状動脈瘤形成の発症病理を明らかにしたいと考えている。

2. PACAP による酸化ストレスの抑制

本研究では、神経ペプチド PACAP の抗酸化ストレス作用を PACAP-KO マウスおよび PACAP38 の投与により明らかにした。更に、その作用機序に PAC1R の関与を示唆した。加えて、PACAP の抗フリーラジカル作用は循環レベルだけでなく脳内の組織レベルでも認められることを明らかにした。

PACAP は 1989 年に羊の視床下部から発見されて以来、血管拡張作用、抗炎症作用、細胞死抑制作用が報告されている。これらの作用は、脳虚血性神経細胞死、神経変性疾患モデル (パーキンソン病、アルツハイマー病)、リポ多糖類 (LPS) 投与による炎症反応、ストレプトゾトシン投与による糖尿病性腎炎など多くの動物実験モデルで証明されている。しかし、その作用機序は十分に理解されていない。

活性酸素由来のフリーラジカルは多くの疾患や老化に関与することが知られている。上記モデル動物においても活性酸素の関与が指摘されている。更に、最近、我々は、PACAP がミトコンドリアに局在する抗アポトーシス因子である bcl-2 を制御することにより、アポトーシスシグナルであるチトクローム *c* の放出を抑制し、脳虚血性神経細胞死を軽減させることを見出した。更に、脳虚血時、ミトコンドリア内の酸化障害が増加し、その結果としてミトコンドリアからのアポトーシスシグナルであるチトクローム *c* が放出され、神経細胞死が誘導されことから、PACAP が抗酸化ストレスに影響を与えるのではないかと考えた。

まず、PACAP-KO マウスを用い PACAP の遺伝子系の違いで酸化ストレスに変化があるかどうか FREE を用いて検討した。その結果、加齢に正相関して、血清中の ROM は増加しているが、BAP レベルは加齢に殆ど相関しないことが明らかになった。このことは、老化に伴い血清の酸化ストレスが増加することを示している。そこで、PACAP (+/+, +/-, -/-) マウスの ROM

および BAP を若年齢および老齢マウスでそれぞれ比較したところ、老齢 PACAP (-/-) マウスがその野生型マウスにくらべ有意に ROM が高く BAP が低いことを見出した。昨年、我々は FREE を用い LPS および脳虚血後の ROM および BAP の変動を報告した。それらによると LPS や脳虚血のような活性酸素生成が亢進されるようなストレス下では、マウスの場合、BAP はストレスの強さに応答して高くなることを報告した。しかし、PACAP-KO マウスは ROM が高く BAP が低いというこれまでとは異なる結果を得た。PACAP-KO マウスでは、その遺伝子欠損により抗酸化因子の産生が低下しているため、加齢に伴う酸化ストレスに応答できないのではないかと考えられる。そこで、正常マウスを用い、PACAP38 投与による抗酸化能を検討した。その結果、PACAP38 の静脈内単回投与は有意に BAP の上昇と ROM の低下を認めた。更に、この効果は、VPACRs のアゴニストである VIP では無効であり、PACAP に特異的なレセプターである PACIR のアンタゴニスト PACAP6-38 でキャンセルされるため、PACIR を介する作用である可能性が示唆された。

次に、この抗酸化ストレス能が、脳内のラジカル産生に影響するか HEt 投与による O_2^- の検出で解析した。HEt は、 O_2^- と反応して安定型の Et を形成する。HEt は、他のラジカルとは反応しないことが知られており Et のシグナルは O_2^- 産生の指標となる。本実験の結果、PACAP (-/-) マウスでは明らかに脳内での O_2^- 生成上昇が認められており、PACAP が脳内のラジカル産生抑制に関与していることを強く示唆した。

近年、さまざまな神経変性疾患の発症に酸化ストレスの蓄積が寄与することが示されている。本研究結果は、PACAP が加齢に伴うラジカル産生の上昇を抑制し、その結果として老化や神経変性疾患などの発症抑制に関与している可能性を示している。

3. 関節リウマチに対する核タンパク食の効果

本研究では、リウマチ様関節炎を自然発症するモデル動物：HILV-I Tg マウス (Balb/c 系) を用いて NF、NP-0.6%、NP-1.2% を含有した餌を 6 週齢から 18 週齢まで 3 ヶ月間長期負荷を行い、体重、関節厚の経時的変化を調べた。更に、餌負荷終了時に於ける関節の組織染色により、病理組織学的形態変化、関節への IgG 沈着を比較した。

野生型マウスの体重は、餌負荷期間中、3 群間で殆ど差は認められなかった。このことは、各負荷餌に於いて栄養価に大きな違いはないと考えられる。これらの餌を用い、HILV-I Tg マウスの関節炎発症に対する核タンパク負荷の効果を検討した。

関節リウマチは関節炎を主徴とする自己免疫疾患の一つである。ヒト関節リウマチの主な症状は体重減少や関節肥大などである。本研究で示した様に、HILV-I Tg マウスの体重は、餌負荷開始時 (6 週齢) に於いて 3 群間で殆ど差は認められなかった。しかし、餌負荷後、NF 群の体重は 10 週まで増加したが、その後は徐々に減少した。これに反し、NP-1.2% 負荷群の体重は、餌負荷期間中、加齢に伴い徐々に増加した。16 週齢に於いて、NP-1.2% 群は NF 群に比べ有意に増加していた。この結果は、核タンパク負荷が HILV-I Tg マウスの体重減少を抑制することを示している。次に、HILV-I Tg マウスの前後肢関節厚を計測したところ、NF 群では 8 週齢よりそのスコアが増加した。このスコアの上昇は核タンパクの濃度に依存して抑制された。HILV-I Tg マウスは 2 から 3 ヶ月で関節炎を発症することが報告されている (Iwakura Y. et al. Science. 30: 1026-1028, 1991)。NF 群に認められた関節厚のスコア上昇および体重減少はこれら関節炎の発症時期と一致しており、関節炎に起因していると考えられる。従って、核タンパク負荷は、おそらく関節炎に起因している HILV-I Tg マウスの体重減少および関節肥大を抑制したと考えられる。

そこで、NF 群と NP 群における体重や関節厚の違いが関節炎の発症と一致しているかどうか、餌負荷終了時 (18 週齢) の関節を組織学的に検討した。NF 群は前肢、後肢ともに重篤な炎症所見であるリンパ小節の出現や骨・軟骨の破壊が明瞭に認められたのに対し、NP 群ではこれらの所見が減少し、前肢で約 4 割、後肢で約 3 割の動物に病理所見を認めなかった。更に、リウマチ性関節炎の臨床診断の一つである IgG の上昇を、関節の IgG 染色により調べた。NF 群の関節は、全個体が滑膜細胞を中心に強い IgG 陽性反応を示した。これに対し、NP 群は濃度依存的に IgG の陽性反応を抑制した。これらの結果は、NP 群に認められた体重減少や関節肥大の抑制が、核タンパク摂取により関節炎が改善した結果である可能性を示している。

これまで、核タンパク負荷の関節リウマチに対する

有用性は全く報告されていない。HILV-I Tg マウスに認められる体重の減少、関節の肥大、関節炎の悪化および IgG の上昇は、関節リウマチ患者における主要な症候と非常に類似している。更に、関節リウマチ患者の約 3% が HILV-I に感染していることが報告されている。従って、本研究で示された核タンパクの長期間負荷による HILV-I Tg マウス関節炎の症候改善および発症遅延は、核タンパクの摂取がヒトの関節リウマチに対しても有効である可能性を示している。

核タンパクの関節炎に対する抑制機序は未だよく分かっていない。しかし、これまでに、核タンパクが免疫応答に対して影響を及ぼすことが報告されている。マウスに核タンパクの負荷を行うと、免疫性のバランスが液性免疫 (Th2) から細胞性免疫 (Th1) にシフトすることが報告されている (Sudo N. et al. *Clin Exp Allergy*. 30: 979-987. 2000)。関節リウマチは、自己免疫疾患の一つとして考えられており、免疫性のバランスが Th2 側にシフトしていることが示されている。Th2 型の代表的なサイトカインには IL-1 β や TNF α が含まれ、これらのサイトカインにより誘導される活性酸素の関与が挙げられる。我々はこれまでに IL-1 の遺伝子改変マウスを用いて、脳虚血後 IL-1 が神経細胞の酸化障害を増加させ、神経細胞死を誘導することを報告した (Ohtaki H. et al. *Neurosci Res*. 45: 313-324. 2003)。本研究では、核タンパクの活性酸素に対する直接的な作用は検討していないが、核タンパクは Th2 型のサイトカイン産生を制御して活性酸素生成を減少させるかもしれない。

関節リウマチは、病気の進行や薬剤の長期使用による副作用が引き起こす QOL の低下が問題になっている。本研究により、核タンパクによる代替医療で関節リウマチの進行や悪化が軽減できる可能性が示された。今後、免疫性のシフトや活性酸素生成に対する影響を含め、核タンパクによる関節リウマチ抑制作用の機序を明らかにする予定である。

E. 結論

1. 冠状動脈血管内皮細胞に於ける活性酸素生成系

ヒト冠状動脈血管内皮細胞が自発的に大量の活性酸素を生成し、川崎病発症期に血中濃度が上昇することが報告されている neopterin がその生成能を増強することが明らかになった。この増強された血管内皮細胞

からの活性酸素生成が血管構築細胞を傷害し、血管炎、更に、冠状動脈瘤の形成に寄与するかもしれない。

2. PACAP による酸化ストレスの抑制

PACAP は、その特異的レセプターである PAC1R を介して加齢に伴う酸化ストレスの抑制に直接関与することが示唆された。

3. 関節リウマチに対する核タンパク食の効果

サケ白子由来核タンパクは、HILV-I Tg マウスの関節炎に対し改善効果が認められた。このことより、核タンパクの摂取は、ヒト関節リウマチに対しても有用性があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishida S, Yoshida LS, Shimoyama T, Kobayashi T, Tsunawaki S. Fungal metabolite gliotoxin targets flavocytochrome *b558* in the activation of the human neutrophil NADPH oxidase. *Infect Immun*. 73: 235-244 (2005).
- 2) Kawahara T, Kohjima M, Kuwano Y, Mino H, Teshima-Kondo S, Takeya R, Tsunawaki S, Wada A, Sumimoto H, Rokutan K. *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 (2005).
- 3) Shioda S, Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Watanabe J, Nakajo S, Arata S, Kitamura S, Okuda H, Kitamura Y, Kikuyama S. Pleiotropic function of PACAP in the CNS: Neuroprotection and Neurodevelopment. *Ann NY Acad Sci* (in press).
- 4) Yin L, Kudo Y, Ohtaki H, Yofu S, Matsunaga M, Shioda S. Ultrastructural study on the demyelination of the white matter in the rat spinal cord after cardiac arrest and massive hemorrhagic shock. *Breathing, Feeding, and Neuroprotection (Eds, Homma I, and Shioda S) Springer-Verlag (Tokyo)* (in press).
- 5) Kudo Y, Ohtaki H, Dohi K, Yin L, Nakamachi T, Endo S, Yofu S, Hiraizumi Y, Miyaoka H, Shioda S. Neuronal damage in rat brain and spinal cord after

- cardiac arrest with massive hemorrhagic shock. *Crit Care Med* (in press).
- 6) Ohtaki H, Yin L, Dohi K, Yofu S, Nakamachi T, Matsunaga M, Shioda S. Engagement of proinflammatory cytokines after cerebral ischemia. *Breathing, Feeding, and Neuroprotection* (Eds, Homma I, and Shioda S) Springer-Verlag (Tokyo) (in press).
 - 7) Ohtaki H, Fujimoto T, Sato T, Kishimoto K, Fujimoto M, Moriya M, Shioda S. Progressive expression of vascular endothelium growth factor (VGEF) and angiogenesis after chronic ischemic hypoperfusion in rat. *Acta Neurochiru Suppl* (in press).
 - 8) Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Yofu S, Hodoyama K, Matsunaga M, Aruga T, Shioda S. Controlled normothermia during ischemia is important the induction of neuronal cell death after global ischemia in mouse. *Acta Neurochiru Suppl* (in press).
 - 9) Nakamachi T, Li M, Shioda S, Arimura A. Signaling involved in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-stimulated ADNP expression. *Peptides* (in press).
 - 10) Tanaka S, Ide M, Shibutani T, Ohtaki H, Numazawa S, Shioda S, Yoshida T. Lipopolysaccharide-induced microglial activation induces learning and memory deficits without neuronal cell death in rats. *J Neurosci Res.* (in press, available online).
 - 11) Narita M, Nagumo Y, Hashimoto S, Narita M, Khotib J, Miyatake M, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakamachi T, Shioda S, Suzuki T. Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. *J Neurosci.* 26:398-405 (2006).
 - 12) Matsuda K, Maruyama K, Nakamachi T, Miura T, Uchiyama M, Shioda S. Inhibitory effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) on food intake in the goldfish, *Carassius auratus*. *Peptides.* 26:1611-1616 (2005).
 - 13) Shibata M, Sueki H, Suzuki H, Watanabe H, Ohtaki H, Shioda S, Nakanishi-Ueda T, Yasuhara H, Sekikawa K, Iijima M. Impaired contact hypersensitivity reaction and reduced production of vascular endothelial growth factor in tumor necrosis factor-alpha gene-deficient mice. *J Dermatol.* 32:523-533 (2005).
 - 14) Dohi K, Satoh K, Ohtaki H, Shioda S, Miyake Y, Shindo M, Aruga T. Elevated plasma levels of bilirubin in patients with neurotrauma reflect its pathophysiological role in free radical scavenging. *In Vivo.* 19:855-860 (2005).
 - 15) Dohi K, Ripley B, Fujiki N, Ohtaki H, Shioda S, Aruga T, Nishino S. CSF hypocretin-1/orexin-A concentrations in patients with subarachnoid hemorrhage (SAH). *Peptides.* 26:2339-2343 (2005).
 - 16) Dohi K, Ohtaki H, Shioda S, Aruga T. Magnesium sulfate therapy in patients with acute neuronal damage: The problem of intravenous administration. *Crit Care Med.* 33:698-699 (2005).
 - 17) Ohtaki H, Dohi K, Nakamachi T, Yofu S, Endo S, Kudo Y, Shioda S. Evaluation of Brain Ischemia in Mice. *Acta Histochem Cytochem* 38:99-106 (2005).
 - 18) Ogawa T, Nakamachi T, Ohtaki H, Hashimoto H, N S, Baba A, Watanabe J, Kikuyama S, Shioda S. Monoaminergic neuronal development is not affected in PACAP-gene-deficient mice. *Regul Pept.* 126:103-108 (2005).
 - 19) Ohno F, Watanabe J, Sekihara H, Hirabayashi T, Arata S, Kikuyama S, Shioda S, Nakaya K, Nakajo S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes differentiation of mouse neural stem cells into astrocytes. *Regul Pept.* 126:115-122 (2005).
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31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