

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅰ）

目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィotonics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 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
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 …… 30
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 …… 40
KH21006	病態時の侵害情報伝達に關与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 100
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 …… 126
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 …… 144
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 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
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 …… 181
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 …… 196
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 …… 208
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 …… 221
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 …… 235
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 …… 247
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 …… 262
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 …… 286
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 …… 300
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 …… 310
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 …… 318

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 …… 344
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 …… 358
KH31025	生薬及び漢方処方of科学的品質保証に関する研究	合田幸広 …… 373
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 …… 390
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 …… 402
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ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里勝利 …… 417
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 …… 435
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的手法の開発に関する研究	斎藤嘉朗 …… 449
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 …… 466
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 讓 …… 481
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 …… 494
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 …… 509
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 …… 525
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 …… 537
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	網脇祥子 …… 551
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 龍兒 …… 566
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 …… 576

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 川崎病急性期に血中濃度が上昇する TNF- α がヒト冠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を抑制し、エダラボンが頭部外傷を軽減させた。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

食細胞の O_2 生成酵素 (phagocyte NADPH oxidase) は生体組織中最大の酸素ラジカル発生源であり、殺菌に用いられる。近年、この食細胞活性酸素生成系のホモログ遺伝子が様々な組織に発見され、Nox family NADPH oxidases と命名されている。これら Nox family NADPH oxidases 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になるであろう。昨年度までに、川崎病急性期に血中濃度が上昇する冠動脈疾患の臨床マーカー neopterin がヒト冠動脈血管内皮細胞の自発的な活性酸素生成能を増強すること、神経ペプチド (PACAP: pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) が、脳海馬領域の酸化ストレスおよび加齢に伴う血中酸化ストレスの上昇を抑制すること、核タンパクの餌負荷が、脳循環改善作用を介してマウス脳虚血後の海馬 CA1 領域に於ける虚血性神経細胞死を抑制することを報告した。

本年度は、1) 川崎病に於ける冠動脈瘤の発症機序を明らかにすべく、冠動脈血管内皮細胞に於ける活性酸素生成系を明らかにすると共に、冠動脈瘤発症の鍵として考えられている TNF- α の影響を解析した。更に、未だ予備的段階であるが、川崎病モデルマウスの作成を試みた。次に、2) 神経ペプチド (PACAP) による脳虚血性神経細胞死抑制作用が活性酸素と関連

しているか PACAP-KO マウスを用いて解析すると共に、頭部損傷に対する酸化剤エダラボン投与の治療効果を検討した。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-ITg マウスを用いて検討した。

B. 研究方法

1. 冠動脈血管内皮細胞に於ける活性酸素生成系

1) ヒト冠動脈血管内皮細胞の培養

正常ヒト冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC: 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 μ g/ml human epidermal growth factor、1 μ g/ml hydrocortisone、50 μ g/ml gentamicin、50 ng/ml Amphotericin B、120 μ 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。活性酸素生成の測定には、96 穴プレートにて培養した HCAEC を使い、mRNA および蛋白質の解析には直径 10 cm のディッシュで培養した細胞を使用した。HCAEC に対する TNF- α の影響は、上記培地で培養して 6 割以上の培養密度に達した細胞に 10 ng/ml TNF- α を添加し、6~21 時間後に解析した。

2) 活性酸素 (O_2 、 H_2O_2) 生成測定

過酸化水素 (H_2O_2) の定量はスコボレチン法を用いた。TNF- α 処理および未処理の HCAEC を phosphate buffered saline (PBS) で洗浄した後、1.2 mM $MgCl_2$ 、33.3 μ M スコボレチン、0.88 U/ml HRP を含む 5 mM glucose-PBS (PBSG) 中で 37 $^{\circ}C$ 、45 分間反応させた後、Mithras LB940 プレートリーダーで測定し、 H_2O_2

生成量を求めた。O₂生成活性は、シトクロム c 法で測定した。蛋白定量は Lowry 法に従った。HCAEC の H₂O₂ および O₂生成活性は、nmol H₂O₂/min/mg protein および nmol O₂/min/mg protein として求めた。

3) Nox family NADPH oxidases の mRNA 発現

HCAEC から total RNA を抽出し、各種 Nox (Nox1, Nox2, Nox4)、活性調節因子 (p22, p67, p47, p41, p51)、Rac1, Rac2 に対する特異的プライマーセットを用いた RT-PCR を行い mRNA の発現量を調べた。Nox4 に関しては、更に、5種類の splicing variants (A~E) を区別できるプライマーセットを用いた。配列解析は、ダイターミネータ法による direct sequencing で行った。

4) Nox family NADPH oxidases の蛋白質発現

HCAEC を回収した後、黒田らの方法 (Kuroda et al, Genes to Cells 10: 1139, 2005) に従って核画分および非核画分を調整した。Nox2 型 NADPH oxidase 構成因子 (Nox2, p22, p67, p47) の発現解析は、コントロールとして好中球の膜およびサイトゾル画分を用い、それぞれに対する抗体を用いてイムノプロット法で検出した。Nox4 の検出は、isoform C を除き全ての splicing variant に共通である "loop region" 配列 (⁴⁹⁰SQTDGIQKIIGEK⁵¹¹) に対する抗体を作成して行った。1次抗体、HRP 標識2次抗体と反応させた後、ECL-Plus 法で検出した。

5) Nox2 および Nox4 に於ける糖鎖修飾の解析

食細胞の Nox2 は N-glycosylation を受けていることが知られているが、他の細胞で発現した場合、糖鎖を持たない可能性が示唆されている (Bayraktutan et al, Arterioscler Thromb Vasc Biol 20: 1903, 2000)。そこで、HCAEC に発現している Nox2 および Nox4 の糖鎖修飾の有無について調べるため、4,000 U/ml peptide:N-glycosidase F (PNGase F) で 37°C、90 分間処理した後、イムノプロット法にて解析した。

2. PACAP およびエダラボンによる酸化ストレスの抑制

1) ペプチドおよび動物

PACAP-KO マウスは大阪大学・薬学部 馬場明道先生より提供された。PACAP38 は Peptide 研 (大阪) より購入し、エダラボン (MCI-162) は三菱ウェルファーマより供与を受けた。

2) イムノプロット解析

PACAP-KO マウスおよび野生型マウスの若齢個体 (50-60 日齢)、老齢個体 (180 日齢以上) の脳内に於

ける抗酸化物質の発現量をイムノプロット法により解析した。各マウスはペントバルビタール (50 mg/kg, ip) 麻酔下で断頭し、大脳をホモジェナイズした後、SDS-PAGE を行い PDVF 膜に転写した。次に、抗酸化物質である Zn/Cu superoxide dismutase (SOD)、Mn SOD、Heme oxygenase (HO) -1、-2、に対する1次抗体、続いて HRP 標識2次抗体を反応させ、ECL-plus 法により X線フィルム上に感光させた後、画像解析ソフト (UN-SCAN IT gel) によりシグナル強度を定量化した。

3) *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⁻) 検出はヒドロキシエチジウム (HEt) の投与により行った。HEt は O₂⁻と反応して安定な赤色蛍光色素であるエチジウム (Et) になる。生後 180 日の PACAP (+/+, -/-) マウスに 3.5%セボフレンを含む N₂O/O₂ の吸入麻酔下で HEt を総頸静脈より投与した。1 時間後、ペントバルビタール麻酔下で、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た後凍結切片を作成し、海馬領域を励起波長 546 nm にて観察した。更に、HEt シグナルの細胞内局在を明らかにするため、抗 cathepsin-D 抗体 (リソソームマーカー) および抗 COX2 抗体 (ミトコンドリアマーカー) を用いて多重免疫染色を行なった。

4) 電子顕微鏡観察

マウスを 4%ホルマリン/0.4%グルタルアルデヒドにて灌流固定した後、脳組織を取り出し、同固定液に一晩に浸漬固定した。ピプラトームで 30 μm の厚さに薄切りし、1%四酸化オスミウムで 1 時間固定した。エタノール脱水後 Epon 樹脂に包埋し、脳ブロックを 60-70 nm の厚さに薄切りし、1%酢酸ウラニルと 0.1%クエン酸鉛を用いて染色した。超薄切片は日立 H-7600 電子顕微鏡で観察した。

5) 受動的回避反応試験

受動的回避反応試験は田中らの報告に準じて行なった (Tanaka S. et al. J Neurosci Res. 2006)。ステップスルー型受動的回避学実験箱は、やや大型の明室と小さな暗室の 2 部から構成されており、スライディングドアで暗室と明室が区切られている。学習・記憶試験は 2 日に分けて行なった。実験初日、マウスを明室に移した後にスライディングドアを開放する。マウスは暗室へ移動するとすぐに電気ショックを与えられた。電気ショックを受けてから 300 秒以上暗室へ入らなかった (明室に留まった) 個体を学習した個体であると見

なし、学習するまでに暗室へ入った回数をカウントした。実験 24 時間後に再びマウスを明室に入れ、暗室に入室するまでの潜時を測定した。各試行は 600 秒を限度とし、600 秒以内に暗室に入室しなかったマウスは、その明暗潜時を 600 秒と見なした。

6) 頭部損傷モデルの作成

ラットにペントバルビタール麻酔を施し、脳定位固定装置にマウントした。頭部切開後、冠状縫合とラムダ縫合間に 5 x 5 mm の頭蓋骨を局部切除し、液体窒素にて冷却した直径 4 mm の金属の棒を大脳皮質表面に 1 分間接置した。障害 10 分後、エダラポン (3 mg/kg) または生理食塩水を大腿動脈より投与した。障害直後、6、12、24 時間後に 2%セボフルレン吸入麻酔下で頸静脈より採血を行い、以下、7)に示す方法で ROM、アルコキシラジカルを測定した。頭部損傷領域の測定には、障害 48 時間後、深麻酔したラットから脳を摘出し、厚さ 2 mm の冠状断脳切片を作成して用いた。切片を 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride で処理した後、損傷部表面の写真を撮影し、白く染め残された損傷領域の面積を解析ソフト (Canbas10) により算出した。

7) 酸化ストレス測定

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) 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 H₂O₂ の酸化力をユニット (U) として求めた。

8) Electron Spin Resonance (ESR) 法

ESR 法により直接アルコキシラジカル (RO[•]) の検出を行なった。ラットの心採血により得られた静脈血を速やかにスピントラップ剤 (5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide) と混合し、30 分以内に ESP スペクトロメーターにより波形を測定した。ラジカル濃度の定量化は波形の第 1 ピークを対象とし、MnO を指標として標準化を行なった。

3. 関節リウマチに対する核タンパク食の効果

1) 動物、餌負荷スケジュール

HTLV-1 Tg マウスは、岩倉洋一郎教授 (東京大学医

科学研究所) から供与された。HTLV-1 Tg および野生型マウス (雄) は、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。餌負荷終了時に麻酔下で心臓採血を行い、血清を分離し、rheumatoid factor (RF) と活性酸素代謝物 (ROM) の測定に用いた。また、深麻酔下で関節を摘出し、以下 2)および 3)に示した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) 組織化学的变化の評価

関節の組織学的変化を評価するため、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

に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。ヤギ抗マウス IgG 1 次抗体、ビオチン標識抗ヤギ IgG 2 次抗体を用い、ABC および DAB 法により発色させた。

5) Rheumatoid factor (RF) 値の測定

関節リウマチの指標のひとつである血清中の IgG (RF) 値を測定した。マウス血清は餌負荷終了時に採取し、100 倍に希釈して測定に用いた。測定は、レビス®リウマチ因子 IgG 型-マウス ELISA kit を用いて ELISA 法にて行なった。

6) 関節組織に於ける酸化ストレスの評価

関節リウマチ発症の際、NO ラジカルが発生することが知られている。NO ラジカルとその過酸化物である peroxynitrite が生成されると組織蛋白質中のチロシンがニトロ化されて 3-nitrotyrosine (3-NT) が生じる。従って 3-NT は NO ラジカルによる細胞障害の指標となる。そこで、関節組織中のフリーラジカルの局在を確認するため、抗 3-NT 抗体を用いて免疫染色を行った。マウスは3ヶ月間の餌摂取終了時に、麻酔下で2%パラホルムアルデヒド液にて灌流固定し、前肢と後肢関節を摘出した。関節は、2%パラホルムアルデヒド液にて1晩浸漬固定した後、14%EDTA 液にて1週間脱灰した。その後は 20%ショ糖に置換し、常法に従って凍結ブロックを作成した。組織はクリオスタットにて 8 μ m の厚さに薄切した。ウサギ抗 3-NT 1 次抗体、ビオチン標識抗ウサギ IgG 2 次抗体を用い、ABC、DAB 法により発色させた。

7) 血清中の酸化ストレス測定

血清中のフリーラジカルによる酸化ストレスは、前述した FREE を用いて測定した (詳細は p3 の 7) を参照)。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、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なった。動物愛護の観点に基づき無用なストレス、苦痛を動物に与えぬよう飼育環境に配慮し、麻酔薬の使用など適切に行なった。更に、KO マウスの使用に関しては、当該研究機関の遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を得た。

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) H₂O₂ 生成活性および TNF- α の影響

In vitro で培養したヒト冠動脈血管内皮細胞

(HCAEC) の活性酸素生成能についてシトクロム c 還元法 (O₂⁻) およびスコボレチン法 (H₂O₂) を用いて検討した結果、HCAEC からの自発的な O₂⁻ 生成は検出されず、カタラーゼ感受性を示す自発的な H₂O₂ 生成活性が認められた。TNF- α がこの自発的な H₂O₂ 生成活性を 1.7~2.6 倍亢進することが分かった。

2) 各種 Nox 構成因子の mRNA 発現および TNF- α の影響

HCAEC の H₂O₂ 生成能を裏付ける Nox family NADPH oxidases について解析した。mRNA の発現について解析したところ、酸化還元中心である各種 Nox 中、Nox4 が最も多く発現していることが分かった。次いで Nox2 が認められ、Nox1 も僅かに発現していた。Nox1 と Nox4 はそれぞれ大腸粘膜上皮細胞および腎皮質に高発現する Nox として発見され、前者の活性調節因子として新規サイトゾル因子 p51 (食細胞 p67 のホモログ) および p41 (食細胞 p47 のホモログ) の関与が報告されている。HCAEC は、mRNA としてこれら活性調節因子中、p47、p67、p51、更に、低分子 G 蛋白質 Rac1 および Rac2 を発現していた。TNF- α 存在下で 6~21 時間培養したところ、Nox2 および p67 は発現量を上昇させたが、他の Nox や Rac に関しては影響がなかった。

Nox4 は、データベース上 5 種類の splicing variants (A~E) が登録されているが、それぞれの組織分布は不明である。そこで、HCAEC に於ける Nox4 splicing variants の発現を調べるため、各 variant に対する特異的プライマーセットを用いて RT-PCR を行ったところ、isoform A と isoform B が発現していることが分かった。その他の isoforms (C, D, E) は検出されなかった。

3) Nox2 型 NADPH oxidase 蛋白質の発現

RT-PCR の結果から、HCAEC に Nox2 型 NADPH oxidase の全構成因子 (Nox2、p22、p67、p47、Rac2) が発現していることが確認され、食細胞型 O₂⁻ 生成系の存在が考えられた。そこで、これら Nox2 型 NADPH oxidase の構成因子が HCAEC に於いて蛋白質として発現しているか各構成因子に対する抗体を用いて解析した。抗 Nox2 抗体を用いて解析したところ、酸化還元中心である Nox2 蛋白質は HCAEC の非核画分のみ約 80 kDa のシャープなバンドとして確認され、核画分には検出されなかった。食細胞の Nox2 (~85 kDa) は、PNGase F 処理による糖鎖切断後のコア蛋白質 (~65 kDa) が同じ抗体で認識されるが、~80 kDa として検出された HCAEC の Nox2 は、PNGase F 処

理しても分子量に変化はなかった。従って、HCAEC に存在する Nox2 は糖鎖修飾を受けていないと言える。この糖鎖の欠損およびコア蛋白質の分子量の違いは、HCAEC に於ける Nox2 の細胞内局在性および機能が食細胞と異なる可能性を示唆している。

HCAEC に存在する他の構成因子 (p67, p47) についても蛋白質の発現が認められ、TNF- α 処理 21 時間後、p67 の発現増強が非核画分に観察された。他の構成因子の発現増強は認められなかった。しかし、p67 は Nox2, p22, p47, Rac2 と複合体を形成することにより高い活性酸素生成能を発揮することから、血管内皮細胞障害に対する影響は大きいと予想される。

4) Nox4 の解析

RT-PCR の結果より、HCAEC では Nox4 が最も多く発現しており、isoform A の他に isoform B の存在も明らかになった。この結果から、HCAEC に於ける H₂O₂ 生成を担う責任分子として Nox4 が重要な役割を果たす可能性が考えられる。そこで、Nox4 蛋白質の発現を検証するため、isoform C を除き全ての splicing variants を認識できる "loop region" に対する抗体を作成し、核画分および非核画分のイムノプロットを行った。その結果、核画分および非核画分に異なる分子量 (約 68 kDa および 75 kDa) のバンドが認められ、両バンドとも抗体作成に用いた合成ペプチドで競争的に消失した。この結果は、両バンドが Nox4 蛋白質であることを示している。Nox4 は配列上 N-glycosylation モチーフを 4 ヶ所持つため、75 kDa 蛋白質の PNGase F による糖鎖切断を試みた。しかし、75 kDa 蛋白質の分子量は変化せず、糖鎖修飾ではないことが判明した。従って、この結果は、mRNA で確認した Nox4 の isoform A と isoform B がそれぞれ非核画分および核画分に選択的に局在していることを示している。両 isoform のアミノ酸配列から予想される分子量の理論値は、それぞれ 67 kDa、63 kDa で電気泳動上で見られた差に近く、この可能性は高いと考えられる。

2. PACAP およびエダラボンによる酸化ストレスの抑制

1) PACAP-KO マウスに於ける酸化ストレスの解析

PACAP-KO マウスと野生型マウスの若齢個体、老齢個体に於いて脳内の抗酸化物質の発現量をイムノプロット法により解析した。若齢個体では、Mn SOD および HO-1 発現量が PACAP-KO マウスで有意に低下していた。老齢個体と比較したところ、上記の 2 つの抗酸化物質の発現量はより顕著に低下し、加えて HO-2

の発現量も有意に減少した。しかし Zn/Cu SOD の発現量は、若齢個体および老齢個体においても有意な差が認められなかった。

次に、脳内酸化ストレスの細胞内局在を明らかにするため、O₂ 発生部位を HEt を用いて顕微鏡観察した。生後 180 日齢の PACAP-KO マウスの海馬 CA1 領域では野生型と比べて HEt のシグナルが増加しており、Cathepsin-D 陽性反応 (リソソームマーカー) および COX 陽性反応 (ミトコンドリアマーカー) と重なった。電子顕微鏡による形態観察により、生後 180 日齢の PACAP-KO マウスでは、一部ミトコンドリアが凝集・変形しており、そこにリソソームが融合した自己食像観察された。

2) PACAP-KO マウスの記憶・学習試験

酸化障害が顕著に認められた海馬 CA1 領域は記憶や学習に強く関与する領域である。そこで PACAP-KO マウスに於いて記憶・学習行動に異常がみられるか否かを調べるため、受動的回避反応試験を行なった。生後 180 日齢までのマウスに関しては、野生型および PACAP-KO マウスに於いて学習・記憶ともに有意な差は認められなかった。しかし生後 180 日齢以上の老齢個体を用いたところ、野生型に比べて PACAP-KO マウスでは有意に学習能力の低下が認められ、更に、刺激 24 時間後における記憶力も低下していた。

3) エダラボン投与による頭部外傷改善効果

頭部外傷モデルラットを作成し、強い抗酸化能を持つエダラボン投与後の障害領域とフリーラジカルの関連を解析した。頭部外傷 48 時間後の損傷領域を比較した結果、エダラボン投与群 (5.0 \pm 2.1 mm²) では生理食塩水を投与した対照群 (7.8 \pm 3.6 mm²) に比べて有意に損傷領域が減少していた。次に頭部外傷後の血液中的のアルコキシルラジカルを ESR 法により直接同定・定量した。頭部外傷 6 時間後にはアルコキシルラジカル濃度は上昇を始め、対照群では 24 時間後にかけて更に増加した。エダラボン投与群では投与 24 時間後におけるアルコキシルラジカル濃度の上昇が対照群よりも有意に低下した (223.8 \pm 17.9 vs. 78.9 \pm 58.6)。血清中の ROM (活性酸素代謝産物) 値を同様に測定した結果、頭部外傷 6、12 時間後において、エダラボン投与群では対照群と比べて有意に ROM 値が減少していた。

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。HTLV-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せず、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

HTLV-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=20) は10週齢より上昇し、18週齢時では 1.2 ± 0.29 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=16) であり、餌負荷期間中ほとんど上昇しなかった。NP-0.6%群のスコアも上昇したが、NF 群より低かった。また、前肢においても同様の傾向が認められた。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

核タンパク負荷による関節組織の形態変化を観察した。餌負荷終了時（18週齢）、後肢に於いて、NF 群はグレード4の割合が70%であったのに対し、NP-0.6%群は44%、NP-1.2%群は28%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14%、NP-1.2%群は27%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。HTLV-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。

4) 血清中の rheumatoid factor (RF) 値

関節リウマチの指標のひとつである血清中 RF 値を調べた。野生型マウスの RF 平均値は 13752 ± 3295 mU/ml だった。NF 群は 25815 ± 3569 mU/ml、NP-0.6%群は 26591 ± 5493 mU/ml と野生型に比べ高値を示した。しかし、NP-1.2%群は 19390 ± 3562 mU/ml と、NF 群および NP-0.6%群に比べ有意に低下した。

5) 酸化ストレスの評価

関節組織の 3-nitrotyrosine (3-NT) 免疫染色を行った。野生型マウスでは 3-NT 陽性反応は殆ど認められなかったが、HTLV-I Tg マウスでは軟骨細胞に強い 3-NT 陽性反応が認められた。それに対し、NP-1.2%群ではこの陽性反応が殆ど認められなかった。次に、餌摂取終了後、マウス血清中の ROM 値を測定した。NF 群は 159.9 ± 9.9 U (n=19) であったのに対し、NP-0.6%群は 139.2 ± 10.4 U (n=11) と低値を示し、NP-1.2%群では 125.2 ± 7.1 U (n=16) と有意に低下した。

D. 考察

1. 冠動脈血管内皮細胞に於ける活性酸素生成系

本研究では、ヒト冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC) が自発的に H_2O_2 を生成し、川崎病急性期に血中濃度が上昇する TNF- α がその生成活性を亢進することが明らかになった。冠動脈瘤の発症に至る過程で TNF- α が決定的な役割を果たしていることが報告されている。従って、川崎病急性期に高値 TNF- α の作用により血管内皮細胞の H_2O_2 生成能が亢進し、その酸化ストレスが血管内皮の傷害、ひいては、血管壁全層の傷害に至り、動脈瘤を発症する可能性が考えられる。HCAEC に於ける H_2O_2 生成活性の責任酵素群として、Nox family NADPH oxidases が考えられ、今回 mRNA および蛋白質レベルの発現を解析した。その結果、食細胞の Nox2 型 NADPH oxidase の全構成因子 (Nox2、p22、p67、p47) および Nox4 の異なる2つの isoform (A and B) の発現が蛋白質レベルでも確認された。Nox1 およびその活性調節因子 (p51)、更に、Rac を mRNA レベルで確認した。この様に、HCAEC には3つの酸化還元中心 (Nox1、Nox2、Nox4) が発現しているが、蛋白質発現が確認できた Nox2 と Nox4 が主に H_2O_2 生成に関与すると考えている。食細胞には Nox2 型 NADPH oxidase (Nox2、p22、p67、p47) しか発現していない。しかし、HCAEC では数種の酸化還元中心、活性調節因子が発現しており、これらがどの様な組み合わせで機能しているか不明である。本研究で得られた細胞内分布から整理すると、Nox2 型 NADPH oxidase の構成因子 (Nox2、p22、p67、p47) は、HCAEC の非核画分のみ存在し、核画分には存在しなかった。この結果から、スコボレチン法で確認した H_2O_2 の細胞外放出は、食細胞と同様なメカニズムで HCAEC の非核領域で活性化されて O_2 が生成され、 H_2O_2 に転換された可能性が考えられるが、今後検証する必要がある。もう一つ興味深い点として、HCAEC に於ける Nox2 蛋白質の特徴が掲げられる。HCAEC に発現している

Nox2 コア蛋白質 (~80 kDa) の分子量が食細胞の Nox2 コア蛋白質 (~65 kDa) と大きく異なる点である。この結果は、HCAEC に於ける Nox2 が食細胞とは異なる生成過程を経ると共に、その担う機能が異なる可能性を示している。

HCAEC で最大発現していた Nox4 は、isoform A が非核画分に、isoform B が核画分にそれぞれ特異的に局在していた。しかし、これらが生成する活性酸素種や活性調節因子は殆ど解明されていない。非核画分には isoform A と p22 が共に確認され、食細胞型 Nox2 の様に両者が複合体を形成していると考えられる。しかし、HCAEC の核画分には p22 が存在せず isoform B が単独発現しており、今後の興味深い課題である。

以上、HCAEC に於いて各種 Nox family NADPH oxidases の異なる細胞内分布および分子量の違いが示された。自発的な H₂O₂ 生成は血管内皮細胞の増殖に必要であると言われている。しかし、この自発的 H₂O₂ 生成が川崎病急性期に上昇するサイトカイン (特に TNF- α) により賦活化されて、その酸化ストレスによって細胞成分や tight-junction を構築する構造蛋白質の酸化が進行して血管内皮細胞の傷害、ひいては、血管壁全層の傷害に至り、動脈瘤を形成する可能性が考えられる。現在、川崎病モデルマウスを作成しており、冠動脈血管内皮細胞の弱体化を確認している。この川崎病モデルマウスを用いて、冠動脈瘤の形成に食細胞が生成する O₂ が関与するか Nox2-KO マウスで検証する予定である。

2. PACAP およびエダラボンによる酸化ストレスの抑制

昨年度、PACAP が生体内の抗酸化能を上昇させ、酸化ストレスを減少させることを報告した。更に、PACAP-KO マウスでは野生型マウスと比較して抗酸化能の減少と酸化ストレス度の上昇が認められた。しかし PACAP それ自身に抗酸化作用がないことから、間接的に抗酸化物質の発現を促進させることにより体内の酸化ストレス度を低減させていることが推察された。そこで、本年度は、イムノプロット法により抗酸化物質の発現を野生型および PACAP-KO マウスの若齢個体、老齢個体と比較した。その結果、ミトコンドリアに局在する Mn SOD と HO-1 発現量が PACAP-KO マウスにおいて低下し、この減少が老齢個体では顕著になることを明らかにした。細胞質に存在している Zn/Cu SOD では差がみられず、PACAP がミトコンドリアに局在する抗酸化物質の発現を促す可能性が明ら

かになった。この結果は、初年度に報告した PACAP 投与が脳虚血後に誘導されるミトコンドリア破綻 (cytochrome c 放出) を抑制すると言う結果と合致している。

また、昨年度、老齢 PACAP-KO マウスの海馬領域において O₂⁻ (HEt シグナル) の増強が認められることを報告した。本年度は免疫蛍光染色法、電子顕微鏡的観察法と組み合わせることにより、HEt シグナルの細胞内局在を明らかにした。HEt シグナルはリソソームに局在し、PACAP-KO マウスではこのシグナルが野生型よりも増強していた。更に、この HEt シグナルは、ミトコンドリアマーカーである COX 免疫陽性反応とも重複した。電子顕微鏡で解析したところ、老齢 PACAP-KO マウスでは神経細胞内のミトコンドリアに形態異常が認められ、そこにリソソームが融合して自己食食を起こしている像が多数認められた。これらの結果から、PACAP が欠如することによりミトコンドリアに於ける抗酸化物質の発現量が低下し、ATP 産生過程に伴って生成されるフリーラジカルを処理できなくなり、ミトコンドリアの障害、変形、自己食食が起きるのではないかと考えている。

以上の結果より、PACAP-KO マウスでは海馬の神経細胞に機能障害が起きている可能性が示唆された。海馬は記憶・学習行動に関わる領域であることから、野生型と PACAP-KO マウスにおいて記憶・学習行動に違いがあるか否かを受動的回避反応試験により解析した。生後 180 日齢までのマウスに関しては、野生型および PACAP-KO マウスにおいて学習・記憶ともに有意な差は認められなかった。しかし生後 180 日齢以上の老齢個体を用いて観察した結果、野生型に比べて PACAP-KO マウスでは有意な学習能力の低下が認められ、さらに刺激 24 時間後における記憶力も低下した。老齢 PACAP-KO マウスに記憶・学習行動の異常が認められたことから、PACAP 欠損により体内での抗酸化作用が低下して神経細胞に障害が生じ、海馬の機能低下が起きている可能性が示唆された。

エダラボン (MCI-162) は抗酸化物質であり、現在、心循環器系障害および脳梗塞患者に対する治療薬として認可されている。しかし、生体内におけるフリーラジカルの半減期は数秒単位であり、その検出は困難であることから、エダラボンが実際に体内における酸化ストレスを軽減させているかについては不明な点が多かった。本研究に於いて、頭部外傷モデル動物ではエダラボン投与により損傷面積が減少することから、エダラボンが脳虚血のみならず頭部外傷にも予防・治療

効果のあることが明らかとなった。さらに、エダラボン投与群では酸化ストレス度およびフリーラジカルであるアルコキシルラジカル濃度が有意に減少した。以上の結果から、エダラボン投与は生体内で抗酸化的に働き、組織障害を抑制していると考えられる。

フリーラジカルは中枢・末梢組織の損傷、炎症反応に伴って増加し、障害を引き起こすのみならず生活習慣病や老化とも深く関わることが知られている。PACAP のような内因性抗酸化物質誘導作用を持つペプチドや、エダラボンのような抗フリーラジカル剤の更なる効果の解析を進めることは、幅広い酸化ストレスに起因する疾患の画期的な治療薬の開発に繋がると確信する。

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 HTLV-I Tg マウスを用いて 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、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。最後に、ラジカルに対する核タンパク摂取の効果を検討するために、酸化ストレスマーカーである 3-NT 染色を行い、血清中の活性酸素代謝物 (ROM) を調べた。

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、HTLV-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 12 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。次に、HTLV-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 週齢以降そのスコアが増加した。このスコア上昇は核タンパクの濃度に依存して抑制された。HTLV-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。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た。核タンパク負荷は、おそらく関節炎に起因している HTLV-I Tg マウスの体重減少および関節肥大を抑制すると考えられる。

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・後肢共に約 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。HTLV-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 HTLV-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 HTLV-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。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が可能になれば、関節リウマチの進行や悪化が軽減できる可能性がある。更に、核タンパクの抗フリーラジカル作用を解明することで、関節リウマチのみならずフリーラジカルが原因となっている多くの疾患に対する代替医療が可能となるであろう。

E. 結論

1. 冠動脈血管内皮細胞に於ける活性酸素生成系

川崎病急性期に血中濃度が上昇する TNF- α が、ヒト冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC) の自発的 H₂O₂ 生成能を増強した。HCAEC には、Nox4 および Nox2 が発現しており、TNF- α がこれらの Nox を活性化して血管内皮細胞に傷害を与え、冠動脈瘤発症の引き金になると考えられる。

2. PACAP およびエダラボンによる酸化ストレスの抑制

PACAP は生体内で内因性抗酸化物質の誘導因子としての作用を持ち、老化に伴う記憶障害を改善し、抗フリーラジカル剤であるエダラボンは体内のフリーラジカル量を減少させて頭部外傷を軽減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、HTLV-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) Ohtaki H, Takeda T, Dohi K, Yofu S, Nakamachi T, Satoh K, Hiraizumi Y, Miyaoka H, Shioda S. 2007 Appearance of oxidative damage of mitochondria after transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Neurosci Res* (in press).
- 1) Ohtaki H, Takeda T, Dohi K, Yofu S, Nakamachi T, Matsuno R, Hodoyama M, Shioda S. 2007 Oxidative damage of DNA increases in mitochondria prior to nucleus after cerebral ischemia and trigger apoptotic neuronal cell death. *Neurosci Res* (in press)
- 1) Matsuno R, Ohtaki H, Nakamachi T, Watanabe J, Yofu S, Hayashi D, Takeda T, Nonaka N, Seki M, Nakamura M, Itabashi K, Shioda S. Distribution and localization of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide - specific receptor (PAC1R) in the rostral migratory stream of the infant mouse brain. *Regul Pept* 2007 (in press).
- 1) Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Dohi K, Watanabe J, Hayashi D, Matsuno R, Nonaka N, Itabashi K, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) type 1 receptor (PAC1R) colocalize with activity - dependent neuroprotective protein (ADNP) in the mouse brain. *Regul Pept* 2007 (in press).
- 1) Inoue H, Ohtaki H, Nakamachi T, Shioda S, Okada Y. Block of Chloride Channel Attenuates Delayed Neuronal Cell Death Induced by Transient Forebrain Ischemia. *J Neurosci Res* 2007 (in press).
- 1) Dohi K, Satoh K, Nakamachi T, Yofu S, Hiratsuka K, Nakamura S, Ohtaki H, Yoshikawa T, Shioda S, Aruga T. Does Edaravone (MCI-186) Act as an Antioxidant and a Neuroprotector in Experimental Traumatic Brain Injury? *Antioxid Redox Signal* 2007;9:281-287.
- 1) Nakamachi T, Li M, Shioda S, Arimura A. Signaling involved in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-stimulated ADNP expression. *Peptides* 2006;27:1859-64.

- 1) Watanabe J, Ohno F, Shioda S, Kikuyama S, Nakaya K, Nakajo S. Involvement of protein kinase C in the PACAP-induced differentiation of neural stem cells into astrocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1070:597-601.
- 1) Watanabe J, Ohba M, Ohno F, Kikuyama S, Nakamura M, Nakaya K, Arimura A, Shioda S, Nakajo S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-induced differentiation of embryonic neural stem cells into astrocytes is mediated via the beta isoform of protein kinase C. *J Neurosci Res* 2006;84:1645-55.
- 1) 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* 2006;83:557-66.
- 1) Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Aizawa Y, Takaki A, Hodoyama K, Yofu S, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Kopf M, Iwakura Y, Matsuda K, Arimura A, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:7488-93.
- 1) Dohi K, Jimbo H, Ikeda Y, Fujita S, Ohtaki H, Shioda S, Abe T, Aruga T. Pharmacological brain cooling with indomethacin in acute hemorrhagic stroke: antiinflammatory cytokines and antioxidative effects. *Acta Neurochir Suppl* 2006;96:57-60.
- 1) Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Yofu S, Hodoyama K, Matsunaga M, Aruga T, Shioda S. Controlled normothermia during ischemia is important for the induction of neuronal cell death after global ischemia in mouse. *Acta Neurochir Suppl* 2006;96:249-53.
- 1) Ohtaki H, Fujimoto T, Sato T, Kishimoto K, Fujimoto M, Moriya M, Shioda S. Progressive expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenesis after chronic ischemic hypoperfusion in rat. *Acta Neurochir Suppl* 2006;96:283-7.
- 1) Shioda S, Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Watanabe J, Nakajo S, Arata S, Kitamura S, Okuda H, Takenoya F, Kitamura Y. Pleiotropic functions of PACAP in the CNS: neuroprotection and neurodevelopment. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1070:550-60.
- 2) Dohi K, Nishino S, Nakamachi T, Ohtaki H,

- Morikawa K, Takeda T, Shioda S, Aruga T. CSF orexin A concentrations and expressions of the orexin-1 receptor in rat hippocampus after cardiac arrest. *Neuropeptides* 2006;40:245-50.
- 3) 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 and massive hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 2006;34:2820-6.
 - 4) Dohi K, Satoh K, Mihara Y, Nakamura S, Miyake Y, Ohtaki H, Nakamachi T, Yoshikawa T, Shioda S, Aruga T. Alkoxy radical-scavenging activity of edaravone in patients with traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2006;23:1591-9.
2. 学会発表
- 1) Tsunawaki S, Nishida S, Shimoyama T, Yoshida LS. *Aspergillus* acquires invasiveness by inhibiting the NADPH oxidase of neutrophils with gliotoxin. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, June 18-23, 2006.
 - 2) Tsunawaki S, Nishida S, Shimoyama T, Yoshida LS. Fungal gliotoxin targets cytochrome *b558* of the human neutrophil NADPH oxidase. Gordon Research Conference (1st meeting for Nox family NADPH oxidases). Les Diablerets, Switzerland, October 15-20, 2006.
 - 3) Nakamachi T, Ohtaki H, Dohi K, Hodoyama K, Yofu S, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Arimura A, Shioda S.; Endogenous PACAP acts as a neuroprotectant against ischemic neuronal damage mediating bcl-2 signal.; 6th International Congress of Neuroendocrinology (ICN 2006) (2006/6/19-6/22) Pittsburgh, PA.
 - 4) Nakamachi T, Ohtaki H, Dohi K, Yofu S, Hodoyama K, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Arimura A, Shioda S.; PACAP suppresses an ischemic neuronal damage mediating in IL-6 signaling.; The 16th International Symposium on Regulatory Peptides (2006/8/30-9/2) Kanagawa.
 - 5) Matsuno R, Ohtaki H, Nakamachi T, Watanabe J, Yofu S and Shioda S; Expression of PACAP specific receptor 1 (PAC1R) in the subventricular zone of mouse brain during postnatal development; Half-day Symposium on GPCR (3rd) (2006/9/2) Kanagawa
 - 6) Nakamachi T, Ohtaki H, Dohi K, Hayashi D, Hodoyama K, Yofu S, Hashimoto S, Shintani N, Baba A, Arimura A, Shioda S.; Endogenous PACAP protect neuron against brain ischemia mediating bcl-2-cytochrome c pathway; Society for Neuroscience 36th Annual Meeting (2006/10/14-18) Atlanta, Ga.
 - 7) Tanaka S, Shibutani, T, Ohtaki H, Shioda S, Numazawa S, Yoshida T; Inhibition of microglial activation attenuates lipopolysaccharide-induced learning deficit in rats; Society for Neuroscience 36th Annual Meeting (2006/10/14-18) Atlanta, Ga.
3. 著書
- 1) Nakajo S, Watanabe J, Ohba M, Ohno F, Kikuyama S, Nakaya K, Shioda S. 2007 Involvement of β isoform of PKC in PACAP-induced differentiation of neural stem cells into astrocytes. pp. 121-134 In: *New Frontiers in regenerative Medicine*. Springer-Verlag, Tokyo.
 - 2) Ohtaki H, Nakamachi T, Watanabe J, Yofu S, Matsunaga M, Matsuno R, Dohi K, Shioda S. 2007 Does PACAP have therapeutic potential in the field of neuroregenerative medicine? pp. 135-142 In: *New Frontiers in regenerative Medicine*. Springer-Verlag, Tokyo.
 - 3) Dohi K, Ohtaki H, Kudo Y, Nakamachi T, Shioda S, Aruga T. 2007 The surgical procedures of hippocampal ischemia models for the study of regeneration in rats. pp. 143-152 In: *New Frontiers in regenerative Medicine*. Springer-Verlag, Tokyo.
- 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18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19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