厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
研究報告書

ミトコンドリア機能と活性酸素代謝病態

井上正康　大阪市立大学大学院医学研究科教授

研究要旨　ミトコンドリアやペルオキシゾームが細胞内における活性酸素産生の主な場であることに注目し、両オルガネラとSOD1の細胞内相互作用を解析し、本疾患における活性酸素代謝の場の異常が発症機構に関与する可能性を明らかにした。さらに、FALSではミトコンドリア局所での活性酸素病態が増強し、これが本オルガネラ依存性のアポトーシスを誘起すること、およびその背景に長鎖脂肪酸の内膜毒性と膜電位消失、これに続くチトクロムc遊離が関与すること、およびその毒性がカルニチンにより抑制できることを明らかにした。

A. 研究目的

家族性筋萎縮性側索硬化症(FALS)発症にはCu/Zn-SODの点突然変異が関与することは判明したが、その分子関連は不明である。我々は、青森県のFALS患者のSOD1遺伝子構造と赤血球内のSOD1の活性及び酵素化学的解析を行い、様々な物性変化を明らかにすると同時に、他の変異SODとの比較解析から、本病態の解明には分子物性のみならず、SOD1の細胞内超微局在性を明らかにする必要があることを提唱してきた。

ミトコンドリアやペルオキシゾームが細胞内における活性酸素産生の主な場であることに注目し、両オルガネラとSOD1の細胞内相互作用を解析し、本疾患における活性酸素代謝の場の異常が発症機構に関与する可能性を明らかにした。さらに、FALSではミトコンドリア局所での活性酸素病態が増強し、これが本オルガネラ依存性のアポトーシスを誘起すること、およびその背景に長鎖脂肪酸の内膜毒性と膜電位消失、これに続くチトクロムc遊離が関与すること、およびその毒性がカルニチンにより抑制できることを明らかにした。

B. 研究方法

1. ヒト型SOD1の特異抗体を調整した。ヒトSOD1はラットやマウスのSOD1とは電気泳動上の移動度が異なる為齧歯類組織やオルガネラ中のSOD1と外から添加したヒト型SOD1を分別検出可能である。また、Mn-SODおよびペルオキシゾーム膜タンパク質PMP-70の特異抗体を調整した。wistarラットの肝、及び脳より細胞分画法により各顆粒画分及び細胞質画分を分離し、各画分におけるSOD1の局在をWestern blotting法により解析した。ヒト皮膚の繊維芽細胞を用いた免疫染色により形態学的にもその局在を検討した。SOD1と各オルガネラ膜との結合関係についても界面活性剤などの処理により検討した。2. 正常および本研究室で見つけたAsn86Ser (N86S)変異SOD1を遺伝子工学的手法により酵母で発現調整し、ラット肝より分離したミトコンドリア及び、ペルオキシソーム膜との相互作用を検討した。同様に、5種類のFALS　変異SODの膜結合能についても検討した。

3. ミトコンドリア依存性の細胞死が長鎖脂肪酸遊離に起因すること、およびこれを縫合してβ酸化に動員するカルニチンが各種細胞におけるミトコンドリア依存性アポトーシスを著明に抑制することを見いだした。そこで、神経細胞死やFALSトランスジェニックマウスの病態に対するカルニチンの保護作用を検討した。

C. 研究結果

（１）SOD1の細胞内超微局在性の解析

細胞分画法及び免疫染色による検討の結果、これまではすべて細胞質に均一に局在すると考えられていたSOD1が細胞内のミトコンドリアやペルオキシソーム膜と一致して存在していることが判明した。さらにSOD1の細胞内顆粒に対する結合性は顆粒表面の細胞質側に可逆的に結合していることが示された。さらに、ミトコンドリアにおいては、膜電位の変化に応じてその結合性に変化が見られた。

（2）変異SOD1の細胞内局在性変化

FALS患者において見られた変異型SOD1の細胞内局在を膜結合実験により検討した結果、すべての変異SOD1は両オルガネラ膜に対する結合力が低下していた。

（3）カルニチンが神経細胞PC12の細胞死を著明に抑制することが判明した。解析の結果、その保護作用はミトコンドリア内膜における長鎖脂肪酸毒性の抑制と膜電位低下阻止によること、およびこれがチトクロムcの放出を阻害したことによることが判明した。

さらに、FALSトランスジェニックマウスにカルニチンを飲用摂取させると、その病態進行が抑制され、死亡率も低下する可能性が判明しつつある。

D, E. 考察及び結論

現在までにFALS患者で見られる変異部位の多くはSOD分子の立体構造に影響する特性が強く、変異SOD1の多くは分子構造特性が変化していることが多い。

細胞内におけるO_2^-の消去反応は拡散律速で起こらなければ本酵素の存在意義は無いと考えられる。したがって、本研究で見いだしたごとく、SOD1が活性酸素産生の主座であるミトコンドリアとペルオキシゾーム膜表面に結合局在化していることは極めて重要である。これにより、両オルガネラから細胞質側にリークしてくるO_2^-をその膜表面で瞬時効率良く消去していると考えられる。また、FALSにおいて見られる変異SOD1のオルガネラへの結合能が低下していることより、変異SOD1の局在性変化が細胞内O2-の消去不全を誘起し、活性酸素傷害が蓄積しうる可能性を示唆する。したがって、FALSをミトコンドリア・ペルオキシゾーム病と捉えることが可能である。

本研究では神経細胞のミトコンドリア依存性細胞死がカルニチンにより著明に抑制されること、およびFALSトランスジェニックマウスの臨床病態が著明に軽減することも判明した。この所見は、FALS患者でもカルニチンの保護作用をテストしてみる意義があることを示唆する。今後、この点に注目し、病態動物モデルおよびFALS患者における病態軽減法の開発を目指したい。

G. 研究発表

1.　論文発表

1. M. Tsuchiya, H. Tokai, Y. Takehara, Y. et al. : Am J Respir Crit Care Med　162, 1257-1261, 2000

2. C. Sakata, H. Tanaka, S.Takemura, et al/ : J. Hepatobiliary Pancreat Surg, 7(1), 78-85, 2000

3. M. Kashiba, M. Inoue : Biochem Pharmacol, 59, 557-561, 2000

4. Y. Takada, E. Sato, T. Nakajima, et al. : Int. J. Hyperthermia, 16, 275-286, 2000

5. K. Suzumura, E. Kasahara, Y. Ohnishi et al. : Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 27, 709-714, 2000

6. K. Suzumura, E. Kasahara, Yi Wang et al. : J. Nutr. Sci. Vitaminol., 46, 205-209, 2000

7. A. Nakamura, A. M. Park, K. Nagata et al. : Free Radic Biol Med, 28, 1611-1618, 2000

8. M. Kashiba, J. Oka, R. Ichikawa et al. : Biochem. J., 351, 313-318, 2000

9. Tsuchiya, M., Maeda, K., E F. Sato et al. : Am. J. Res. Criti. Car. Med., 163, 1-6, 2001

10. Tomita, M., Sato, E.F., Nishikawa, M et al. : Arthritis & Rheumatism, in press　2001

ESRI・MRI 法による多ラジカル種の分別画像解析システムの開発

内海　英雄　九州大学大学院薬学研究科　機能分子解析学分野

生体内におけるフリーラジカルの発生は多くの疾病の発症・進展に関与すると考えられている。近年、特に、複数のフリーラジカル種によるクロストークの重要性が注目されており、個々のフリーラジカル種の産生局所を区別して画像解析することが望まれている。本研究では、複数のラジカルを ESR-CT により分別画像化するためのアルゴリズムを確立した。また、ラジカル種の分布臓器を明らかにするために、ESRI と MRI を融合した画像解析システムの試作を行った。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症の成因の一つとして、抗酸化酵素である Cu/Zn-SOD の遺伝子異常が明らかにされ、その発症に、フリーラジカルが関与する可能性が示唆され、複数のラジカル種によるクロストークの重要性が指摘されている。このような、ラジカル同士のクロストークの重要性を明らかにするには、これらフリーラジカルが各々組織のどこで・どの程度産生しているかを画像解析することが望まれる。そこで、複数のフリーラジカルを ESR-CT により各々分別画像化するためのアルゴリズムを確立した。また、これまでの研究成果を発展させ、ESRI と MRI を融合させた磁気共鳴画像解析装置の開発を試みた。

B. 研究方法

ESR-CT：生体計測 L-band ESR の外部磁場内に磁場勾配を発生させる三次元磁場勾配コイルおよび掃引コイルを設置し、磁場勾配内における ESR シグナルの測定を行った。

Z-X 平面の磁場勾配を回転させ、6 射影軸毎に 15～20 の投影スペクトルを得た。各投影スペクトルを Shepp-Logan フィルタを用いたフィルタ補正逆投影法により、スペクトル－空間画像を再構成し、さらに、得られた画像を代数的復元法により補正を行った。次に、6 スペクトル－空間画像から各ラジカルの空間情報を分離し、再度逆投影と補正を行い、各ラジカル種の二次元空間画像を構築した。

C. 研究結果および考察

アルゴリズムの確立

ヒドロキシラジカルおよび一酸化窒素ラジカルを各々 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide(DMPO)および Fe^{+-} N-methyl-D-glucamine dithiocarbamate (Fe-MGD)に捕捉し、得られた DMPO-OH と NO-Fe-MGD を分離画像した。DMPO-OH のシグナルはピーク高さ比が 1:2:2:1 の 4 本線であり、NO-Fe-MGD は 1:1:1 の 3 本線である。両ラジカルの ESR シグナルの積分波形を比較すると、DMPO-OH の 4 番目のピークは NO-Fe-MGD のいずれのピークとも重ならないのに対し、DMPO-OH の 1 番目のピークは NO-Fe-MGD の 1 番目のピークと重なる。スペクトル－空間画像から DMPO-OH に対しては、4 番目のピークの面積から空間情報（$P_{DMPO\text{-}OH}$）を得た。一方、NO-Fe-MGD は、DMPO-OH の 1 番目のピークと NO-Fe-MGD の 1 番目のピークとの面積和からの空間情報（$P_{DMPO\text{-}OH+NO\text{-}Fe\text{-}MGD}$）から $P_{DMPO\text{-}OH}$ を差し引いた値を用いた。また、DMPO-OH のシグナルは時間と共に減衰するので、減衰速度より補外法により $P_{DMPO\text{-}OH}$ をデータ取り込み開始時のシグナル強度に補正した。0、30、60、90、120 および 150° の射影軸における空間情報から、DMPO-OH および NO-Fe-MGD に対する ESR-CT 画像を構築した。本法により、各ラジカル種毎に分別画像化が可能であった。

融合型 ESRI/MRI 画像解析装置の試作

上記アルゴリズムを用いることにより、複数のラジカル種を分別画像化することが可能となった。ESR-CT の問題点として、フリーラジカルしか見えないため、その産生組織・部位の特定が困難であるといった欠点を有している。そこで、ESR-CT 画像に臓器の MRI 画像を重畳できる融合型 ESRI/MRI 画像解析装置の試作を試みた。

一般に、MRI ではパルス法が、ESRI では連続波法が用いられている。これは ESR で対象とするフリーラジカルのスピン－スピン緩和時間が非常に短いためである。画像化法にはパルス法が有利であるが、緩和時間が短く傾斜磁場付加が困難と考えられるので連続波を用いた画像解析法を開発した。我々が開発した ESRI は 300 MHz、10 mT である。一方、診断用 MRI では 200 mT の外部磁場で 8 MHz 程度の電磁波が用いられている。そこで、今回我々は、診断用 MRI と ESRI を併設し、同一動物個体に対して MRI 画像と ESRI 画像を取り込み、両画像を重畳するシステムを検討した。現在、ESRI については、時系列 ESR 画像解析手法を用いることにより、活性酸素・フリーラジカルの産生量の画像化を試みている。

D. 研究発表

1. 論文発表

Matsumoto K. and Utsumi H. (2000) Development of separable electron spin resonance-computed tomography imaging for multiple radical species: An application to OH and NO. Biophys. J., 79(6) 3341-3349.

Sano H., Naruse M., Matsumoto K., Oi T. and Utsumi H. (2000) A new nitroxyl-probe with high retention in the brain and its application for brain imaging. Free Radic. Biol. Med., 28(6) 959-969.

2. 学会発表

Utsumi H. Utilization of nitroxyl probes for clinical and pharmaceutical applications. 23rd International EPR Symposium (Denver).

Sano H., Naruse M., Oi T. and Utsumi H. *In vivo* ESR measurements of free radical reactions by hypoxic-ischemic brain damage in whole mice. 23rd International EPR Symposium (Denver).

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
研究報告書

GDNF 発現 AAV ベクターによる ALS 遺伝子治療
——マウスにおける基礎的実験——

中野今治

はじめに

神経栄養因子は種々のペプチドからなる一群の成長因子であり、神経系の発達や神経細胞の生存と維持に重要な役割を演じている．その１つである GDNF はターゲットで産生される栄養因子であり、脊髄運動ニューロンや中脳ドパミンニューロンに対してもっとも強力な栄養作用を有する因子の１つである．Glial cell line-derived neurotrophic factor（GDNF）を投与すると、軸索損傷による運動ニューロン死や運動ニューロンの programmed cell death が軽減されることがマウス、ラット、鶏で見出されている[1)4)]．この作用は胎生期の動物の運動ニューロンのみでなく、成獣のニューロンでも認められる[2) 5)]．また、家族性筋萎縮性側索硬化症のモデル動物（G1H トランスジェニックマウス）の筋に GDNF 遺伝子を組み込んだ筋芽細胞を導入すると、下位運動ニューロンの生存率が改善する[3)]． これら実験結果は、ALS や脊髄性筋萎縮症のような運動ニューロン疾患に対し、GDNF が有効である可能性を示すものである．

アデノ随伴ウィルス（AAV）ベクターは、導入された細胞内で増殖能力を取り戻す危険性がほとんどないこと、長期の遺伝子発現が可能なこと、神経細胞や筋細胞のような非分裂細胞にも導入されうること、細胞毒性や免疫反応惹起性が無いことが利点として挙げられる．

我々は、この AAV ベクターに GDNF 遺伝子を組み込んで ALS の遺伝子治療実験を行ってきた．本年度はその基礎的データを報告する．

共同研究者：王　立軍[1)]、Lu Yanyan[1)]、
村松慎一[1)]、池口邦彦[1)]、藤本健一[1)]、
水上浩明[2)]、小澤　敬也[2)]
所属：1) 自治医科大学神経内科、
2) 自治医科大学分子病態研究センター

A. 方法

1) ベクター：組換えアデノ随伴ウィルス（recombinant adenoassociated virus: rAAV）ベクターを使用し、治療遺伝子として GDNF 遺伝子を組み込んだ．脊髄前角の内因性 GDNF と識別するために、GDNF 遺伝子の下流に FLAG の遺伝子を組み込んだ．FLAG 遺伝子を組み込んでも導入する GDNF の活性は変化せず、GDNF-FLAG の融合たんぱく質は抗 FLAG 抗体で同定できた．コントロールベクターとして AAV-LacZ を使用した．

2) 材料

(1) 293 細胞：rAAV-GDNF-FLAG を 293 細胞に導入して培養した後､細胞を溶解して SDS-PAGE で分離し、抗 GDNF 抗体、抗 FLAG 抗体を用いて Western blot を行った．

(2) 腓腹筋：マウスの腓腹筋に rAAV-LacZ（$6X10^8$ particles）と rAAV-GDNF-FLAG を導入して２週間後（rAAV-LacZ）と３週間後（rAAV-GDNF-FLAG）に同筋での β-galactosidase 活性と GDNF-FLAG 融合蛋白の発現を調べた．

(3) 前角運動ニューロン：マウスの腓腹筋に rAAV-GDNF-FLAG を導入して３週間後に下部腰髄と仙髄の前角運動ニューロンでの GDNF-FLAG の発現を検索した．

B. 結果

(1) 293 細胞：SDS-PAGE では抗 GDNF 抗体、抗 FLAG 抗体のいずれにおいても同じ場所（約 24.4KD）にバンドが認められた．

(2) マウス腓腹筋：rAAV-LacZ の導入により、多数の筋線維に β-galactosidase の活性が同定された．個々の陽性筋線維では細胞質全体が染色されていた．一方、rAAV-GDNF-FLAG を導入し

て抗 FLAG 抗体で染色すると相当数の筋線維が陽性となり、融合蛋白の分布は筋細胞膜近傍に限局していた（図１）．抗 GDNF 抗体と抗 FLAG 抗体で二重免疫染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、両抗体で染色される部位は一致した．

(1) 前角運動ニューロン：腓腹筋に rAAV-GDNF-FLAG を導入したマウスでは、下部腰髄と仙髄において導入した側と同側の相当数の前角運動ニューロンが、抗 GDNF 抗体と抗 FLAG 抗体で二重免疫染色された（図２）．なお、腓腹筋に rAAV-LacZ を導入したマウスの前角運動ニューロンではβ-galactosidase 活性は見られなかった．

C．考察

マウス腓腹筋での遺伝子発現蛋白の分布は rAAV-LacZ では筋線維細胞の細胞質全体に均質に見られたのに対し、rAAV-GDNF-FLAG では筋線維細胞の細胞膜に沿って発現していた．この分布は GDNF-FLAG の融合蛋白が細胞外に分泌される可能性を示す所見と考えられる．

腓腹筋に rAAV-GDNF-FLAG を導入した場合、対応する髄節の前角運動ニューロン内にも融合蛋白の存在が確認された．筋線維内にはこの融合蛋白が発現することが確認されているので、筋で合成された蛋白が運動ニューロンの軸索を逆行輸送された可能性は十分考えられる．これに加えて AAV ベクター自体がやはり逆行輸送されて運動ニューロンの細胞体に達し、そこで融合蛋白が産生された可能性も否定できない．ただ、rAAV-LacZ を腓腹筋に導入した場合には、前角運動ニューロンにはβ-galactosidase の活性が見られないことを考えると、この可能性は低いと思われる．

GDNF 遺伝子の下流に FLAG 遺伝子を導入した AAV ベクターを使うことにより、外来性の GDNF と内因性の GDNF を明確に判別することができる．この方法は、GDNF のみならず他の神経栄養因子の効果を見るときにも利用でき、ALS のモデル動物での遺伝子治療実験の有力なツールになるものと思われる．

文献

1) Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, et al.: GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle [see comments]. Science 266(5187): 1062-1064, 1994

2) Li L, Wu W, Lin LF, et al..: Rescue of adult mouse motoneurons from injury-induced cell death by glial cell line-derived neurotrophic factor. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 9771-5, 1995

3) Mohajeri MH, Figlewicz DA, Bohn-MC: Intramuscular grafts of myoblasts genetically modified to secrete glial cell line-derived neurotrophic factor prevent motoneuron loss and disease progression in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. Hum Gene Ther 10: 1853-1866, 1999

4) Oppenheim RW, Houenou LJ, Parsadanian AS, et al.: Glial cell line-derived neurotrophic factor and developing mammalian motoneurons: regulation of programmed cell death among motoneuron subtypes. J Neurosci. 20: 5001-11, 2000

5) Yan Q, Matheson C, Lopez OT: In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons [see comments]. Nature 373: 341-344, 1995

図説明

図１．マウス腓腹筋に rAAV-GDNF-FLAG を導入して、そこに発現した GDNF-FLAG 融合蛋白．融合蛋白は筋細胞膜近傍に限局している．抗 FLAG 抗体免疫染色．左 X10, 右 X200

図２．腓腹筋に rAAV-GDNF-FLAG を導入したマウスの脊髄前角運動ニューロン．同一ニューロンが抗 GDNF 抗体（左）と抗 FLAG 抗体の両者で染まっている．X50.

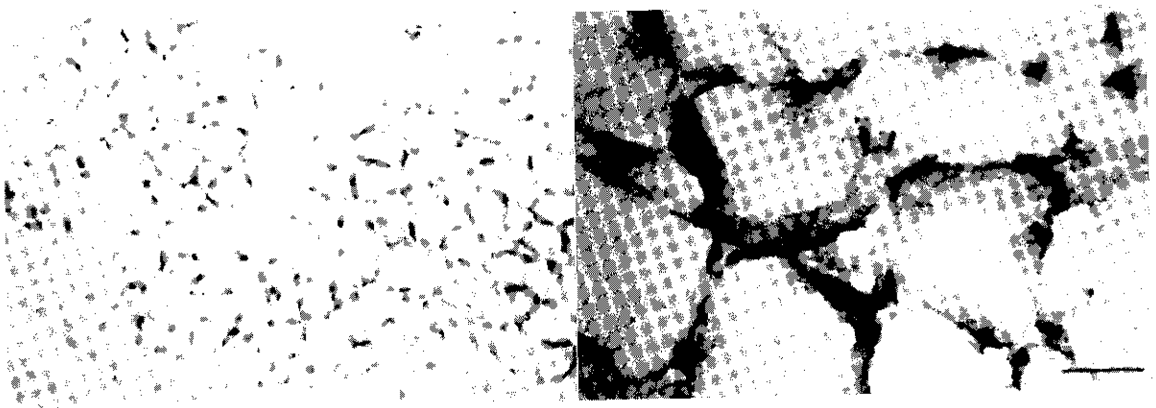

図 1.

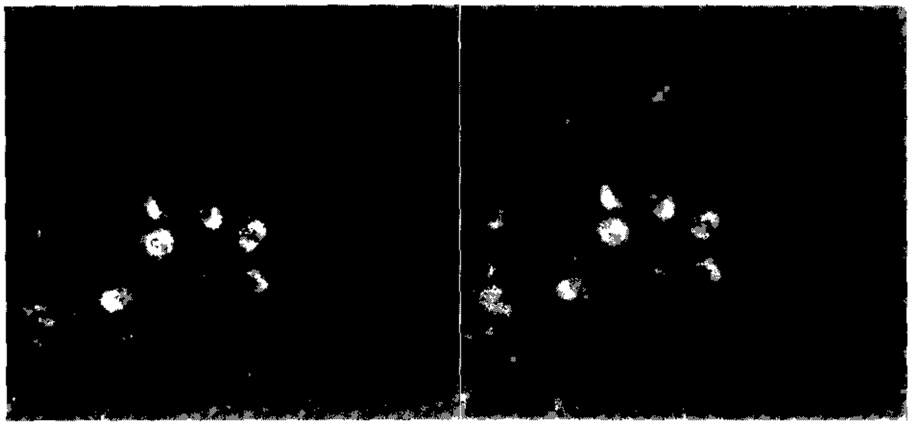

図 2.

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の脊髄における HGF-cMet system の発現に関する研究

研究者　中野今治　自治医科大学神経内科教授

研究要旨　ALS の脊髄前角残存神経細胞における HGF 及び cMet の発現について解析した．症例は，弧発性 ALS38 例，正常対照 20 例の各脊髄剖検材料を用いた．ALS 臨床経過は発症後 6 ヶ月〜11 年 5 ヶ月だった．免疫組織化学的には，一次抗体に human HGF 抗体，human cMet 抗体を用いた．同時に，発症後 2 年，11 年 5 ヶ月の ALS と正常対照の脊髄組織で Western blot 解析を行った．ALS 脊髄残存神経細胞では，HGF-cMet はほぼ同一神経細胞に発現し，ALS38 症例の全経過において，必ず両者陽性の神経細胞が存在していた．ALS のどの時期においても astrocyte での HGF の発現は認められなかったが，発症 2 年以後の症例で，一部の reactive astrocyte に cMet が高発現していた．cMet 強陽性を示す reactive astrocyte は HGF と cMet の発現量が減少している神経細胞の近傍に集簇していた．Western blot の結果では，HGF は，発症後 2 年の症例で正常に比べ発現量が増加し，発症後 11 年 5 ヶ月の症例で HGF の発現量は減少していた．cMet も HGF と同様だった．即ち，ALS 残存神経細胞は，HGF と cMet の両方を高発現し，自らを生存させていることが判明した．大部分の reactive astrocyte は，神経細胞死による空間を埋め合わせる組織再構築のためと考えられるが，一部 reactive astrocyte の cMet 発現は，astrocyte-neuron relationship を介する神経細胞生存のメカニズムの一つであると考えられた．

中野今治 [1]，加藤信介 [2]，船越　洋 [3]，中村敏一 [3]，平野朝雄 [4]，加藤雅子 [5]，大浜栄作 [2]
[1] 自治医科大学神経内科，[2] 鳥取大学脳神経病理，[3] 大阪大学バイオメディカル教育研究センター腫瘍生化学，[4] Montefiore Medical Center 神経病理，[5] 鳥取大学第二病理

A．研究目的

孤発性 ALS では，原因不明の脊髄前角細胞死が生ずるが，一方では，残存神経細胞も存在していることも事実である．今回我々は，ALS の脊髄前角残存神経細胞に着目し，これら残存神経細胞が，ALS における原因不明の細胞死から，どのようなメカニズムで自らを守って生存しているのかについて解析した．この解明に際し，我々は，HGF-cMet system に着目し，ALS での脊髄前角残存神経細胞の生存メカニズムの一つを解明し得た．

B．研究方法

症例：弧発性 ALS38 例の脊髄を用いた．正常対照として，中枢神経系に異常を認めない 20 例(年齢：38〜75 歳)の脊髄剖検材料を用いた．ALS の臨床経過は，発症後 6 ヶ月から 11 年 5 ヶ月までの症例群であった．免疫組織化学的解析：ホルマリン固定，パラフィン包埋切片を用い，一次抗体には human HGF 抗体，human cMet 抗体を用いた．免疫反応産物は，ABC 法を用いて可視化した．Western blot 解析：発症後 2 年，発症後 11 年 5 ヶ月の ALS と正常対照の各脊髄組織を用いた．

C．結果と考察

組織学的検索では，おおむね臨床経過と共に残存脊髄前角細胞が減少していく傾向を示した．正常脊髄前角細胞における HGF 及び cMet の染色性は，細胞体全体がびまん性に陽性を呈し，ほとんど全ての神経細胞が染色された．ALS での残存神経細胞における HGF の発現は，残存神経細胞のごく一部に高度な発現が認められた．注目すべきことに，連続切片を用いた解析から，ほとんどの場合，HGF 強陽性神経細胞は同時に cMet 強陽性神経細胞でもあった．発症後 3 年以後の ALS では，臨床経過が長くなるにつれて，HGF 及び cMet の両方を強発現している神経細胞の数は減少し，HGF,

cMet 共に胞体の一部のみが陽性の残存神経細胞が観察されたり，両方陰性の神経細胞数も増加するようになった．発症後７年以後の症例においては，残存神経細胞自身もごくわずかしか認めず，しかも萎縮を示すものがほとんどであった．ほとんどの萎縮残存神経細胞はHGF及びcMetの両者は陰性であった．しかしながら，萎縮神経細胞のごく一部には，HGF及びcMetの両方陽性の神経細胞があった．即ち，ALS脊髄残存神経細胞におけるHGF-cMetの発現は，両者はほぼ同一神経細胞に発現し，ALS38症例の全経過において，必ず両者陽性の神経細胞は存在していた．また，ALS全例において神経細胞消失にともない reactive astrtocyte の出現と gliosis を認めた．特に reactive astrocyte における HGF-cMet system の発現に関しての結果は，HGF においては ALS38 症例全症例において，いずれの時期においても astrocyte での有意な発現は認められなかった．一部の reactive astrocyte に cMet が高発現してくるのは，発症後約２年以後の症例に目立った．cMet 強陽性を示す reactive astrocyte はHGF及びcMetの両方の発現量の減少している神経細胞の近傍に集簇する傾向を示し，ほとんど脊髄灰白質に限局されていた．Astrocyte 内 cMet 発現は，神経細胞への foot process に最も強く認められた．経過 11 年５ヶ月の症例でも，ごく一部の reactive astrocyte が cMet 陽性を呈し，ほとんど灰白質に限局していた．Western blot 解析の結果では，HGFは，発症後2年の症例では，正常に比べ HGF の量が増加している傾向を示した．発症後 11 年５ヶ月の症例では，HGF の発現量は減少していたが，HGFは同定でき，ごく少数にもかかわらず HGF 陽性神経細胞が免疫組織化学的に存在していたことと一致していた．cMet も HGF と同様の傾向を示した．即ち，ALS 残存神経細胞は，HGF と cMet の両方を高発現し，autocrine，神経細胞間 paracrine にて，自らを生存させていることが判明した．そして，HGF-cMet system 系発現の破綻した神経細胞は，やがて細胞死を迎えるものと考えられた．cMet に関しては，残存神経細胞自身の HGF-cMet system による rescue が破綻する時期から，神経細胞近傍の reactive astrocyte が高発現していた．大部分の reactive astrocyte は，神経細胞死による空間を埋め合わせる組織再構築のためと考えられている．しかしながら，ALS における astrocyte 内 EAAT2 機能低下が astrocyte-neuron relationship の障害の一つであることを考慮した場合，astrocyte の cMet 発現はこの ALS における astrocytic dysfunction を HGF をより多く up-take することにより recovery したい表れであり，この astrocyte の recovery 免疫組織化学像は，astrocyte-neuron relationship を介する神経細胞生存のメカニズムの一つであると考えられた．

D. 研究発表

1. Kato S., Horiuchi S. Liu J., et al. Advanced glycation endproduct-modified superoxide dismute-1 (SOD1)-positive inclusions are common to familial amyotrophic lateral sclerosis patients with SOD1 gene mutations and transgenic mice expressing human SOD1 with a G85R mutation. Acta Neuropathol 100, 490-505, 2000

2. Kato S., Horiuchi S., Nakashima K, et al. Astrocytic hyaline inclusions contain advanced glycation endproducts in familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase 1 gene mutation: immunohistochemical and immunoelectron microscopical analyses. Acta Neuropathol 97, 260-266, 1999

3. Bruijn, L. I. Houseweart M. K., Kato S., et al. Aggregation and motor toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. Science 281, 1757-1912, 1998

4. Kato S., Hayashi H., Nakashima K., et al. Pathological characterizatio of astrocytic hyaline inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis. Am J Pathol 151, 611-620, 1997

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
研究報告書

家族性ALSの治療法に関する研究

研究協力者　　大阪大学　佐古田三郎

（研究要旨）著者らは、銅のキレーターであるトリエンチンとアスコルビン酸が家族性ALSマウス（FALSマウス=G93Aマウス）に有用であることを以前報告した。本研究では、トリエンチン単独及びアスコルビン酸単独投与が、FALSマウスに有用かどうかを発症前投与と発症後投与で検討した。トリエンチン（0.5％）投与群は明らかな死亡の延長を認めた。アスコルビン酸投与群でも同様の傾向を認めた。銅のキレーターであるトリエンチンと抗活性酵素作用を持つアスコルビン酸は単独でも効果を有することが明らかになった。しかし発症後投与ではどの薬剤も有意な効果を示さなかった。

A. 研究目的

Superoxide dismutase-1（SOD-1）の変異に起因する家族性ALSの治療法の開発を目標とする。今回はモデル動物を用いて種々の薬剤の発症前と発症後投与の効果を検討した。

B. 研究方法

FALSマウスはG93Aマウス（Jacksonより購入）を用いた。発症前投与の薬剤とその濃度、用いたマウスの匹数などを表1に示した。発症後投与のそれは表2に示した。発症前投与は生後50日から開始した。尻尾を持ってマウスを持ち上げ、両後肢の伸びにわずかな左右差が見られる時点を発症、両後肢とも動かなくなる時点を死亡と判定した。

表1　発症前投与薬剤の一覧

Treatment	concentration in distilled water or diet	No. of mice
trientine (low)	0.2% (W/V) in distilled water	8
trientine (high)	0.5% (W/V) in distilled water	8
ascorbate	0.8% (W/W) in the diet	8
riluzole	100 μg/ml in distilled water	7
none	Standard AIN-93G and distilled water	7

表2　発症後投与薬剤の一覧

Treatment	concentration in distilled water or diet	No. of mice
trientine (low)	0.2% (W/V) in distilled water	8
trientine (high)	1.2% (W/V) in distilled water	8
ascorbate	0.8% (W/W) in the diet	8
riluzole	100 μg/ml in distilled water	8
none	Standard AIN-93G and distilled water	6

C. 研究結果

生後50日から発症前投与ではどの薬剤も発症日を遅延させることはできなかった。死亡日に及ぼす影響をみると、トリエンチン0.2％は効果がないが0.5％では明らかな効果がみられた。アスコルビン酸やリルゾールでもある程度の効果が観察された（表3）。発症後投与はおよそ80日過ぎ頃から開始したが、どの治療方法も有意な効果を示さなかった（表4）。

表4　各種薬剤のFALSモデル死亡に対する影響（発症後投与）

treatment group	onset (days)	statistical analysis
control	125.3 ± 13.1	
trientine 0.2%	125.5 ± 7.9	not significiant
trientine 1.2%	124.9 ± 7.9	not significiant
ascorbate	133.4 ± 10.4	not significiant
riluzole	133.9 ± 7.5	not significiant

D. 考察

前回に筆者らは、トリエンチン0.2％とアスコルビン酸混合療法が発症と死亡を有意に遅らせたと報告した。今回トリエンチンとアスコルビン酸単独でも効果があることが判明した。今回の実験でトリエンチンは死亡を遅らせたが、発症日に対しては効果がなかった。これは今回の発症前治療の開始が、病理学的変化が出現した後から開始された為と考えられる。ポジティブ・コントロールとしてリルゾールを用いたが、以前の報告通りリルゾールは効果を示した。今迄の治療実験では、ペニシラミン、ビタミンE、creatine、N-acetyl-L-cysteine（NAC）、などが有効であると示されている。我々の今回の実験と合わせて考えると、銅のキレーターと抗活性酵素を有する薬剤が本疾患に有効だと推察される。患者への応用という実際面から考慮すると、リル

表3　各種薬剤のFALSモデルの発症及び死亡における効果（発症前投与）

treatment group	onset (days)	statistical analysis	end-point (days)	P-value t-test	P-value Mantel-Cox	P-value Wilcoxon
control	83.3 ± 2.4		123.6 ± 3.1			
rientine 0.2%	82.8 ± 2.7	not significiant	128.9 ± 10.0	>0.05	>0.05	>0.05
trientine 0.5%	83.3 ± 2.8	not significiant	130.1 ± 5.8	0.020	0.002	0.007
ascorbate	83.0 ± 1.5	not significiant	133.4 ± 13.5	>0.05	0.044	>0.05
riluzole	80.7 ± 3.5	not significiant	135.1 ± 11.4	0.023	0.023	>0.05

ゾールは臨床用量をはるかに超える量での効果であり実用性に乏しいが、トリエンチンやNACは比較的臨床用量に近く臨床応用の期待が持てる薬剤である。発症したFALSマウスに有効な治療法は今迄みつかっておらず今回の実験でも無効であった。

E. 結論

銅のキレーターであるトリエンチンは単独でも明らかにFALSマウスの死亡を延長させた。アスコルビン酸も同様の傾向を示した。銅のキレーターと抗酸化作用を有する薬剤の混合投与の臨床応用が可能性として示された。

F. 健康危機情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Benefit of a combined treatment with trientine and ascorbate in familial amyotrophic lateral sclerosis model mice
Seiichi Nagano, Yasuko Ogawa, Takehiko Yanagihara, Saburo Sakoda
Neurosci Lett 265 (1999) 159-162

Reduction of Metallothioneins Promotes the Disease Expression of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice in a Dose-Dependent Manner
Seiichi Nagano, Masahiko Satoh, Hisae Sumi, Harutoshi Fujimura, Chiharu Tohyama, Takehiko Yanagihara, Saburo Sakoda
Eur J Neurosci (in press)

2. 学会発表

第41回日本神経学会総会

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

筋萎縮性側索硬化症治療薬（出願中）

2. 実用新案登録

3. その他

株式会社ツムラとの共同研究である。

Galectin-1 は ALS spheroid や conglomerate inclusion の構成成分である

研究協力者　　加藤　丈夫　山形大学医学部第三内科教授

研究要旨：HepSS-1（抗ヘパラン硫酸抗体；生化学工業）は ALS の初期病変の一つである spheroid や conglomerate inclusion を強く免疫染色する。そこで、ヒト脊髄から HepSS-1 により認識される物質を分離・精製・アミノ酸配列を決定し、galectin-1 であることを明らかにした。次に、galectin-1 が ALS の spheroid や conglomerate inclusion に局在するか否かを確認するため、recombinant ヒト galectin-1 に対する抗体を作成し ALS 脊髄を免疫染色した。Spheroid と conglomerate inclusion は全てこの抗体により強く免疫染色された。galectin-1 は ALS の脊髄前角に認められる spheroid や conglomerate inclusion の構成成分であった。

A. 研究目的

ALS 患者の脊髄前角にはいろいろな神経病理学的変化が認められるが、その中でも運動ニューロンの軸索や核周部へのニューロフィラメントの異常蓄積は ALS の初期病変の一つと考えられており、運動ニューロン死に関与している可能性がある。神経病理学的には、軸索へのニューロフィラメントの異常蓄積は spheroid を形成し、核周部への異常蓄積は conglomerate inclusion を形成する。1993 年私達は、ヘパラン硫酸に対する単クローン抗体 HepSS-1（生化学工業）が spheroid や conglomerate inclusion を強く免疫染色することを報告した。ヘパラン硫酸は生体内ではほとんどの場合蛋白質（core protein）に結合し、ヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）として存在する。HSPG は core protein の種類およびヘパラン硫酸の組成・数などにより、多種多様な分子種が存在すると考えられている。本研究では、ALS の spheroid や conglomerate inclusion に蓄積する、HepSS-1 に認識される分子を同定する。

B. 研究方法・結果

1. 正常ヒト脊髄をトリス塩酸緩衝液(TBS, pH 7.6)でホモジネートし、遠心後、TBS 可溶性画分を得た。沈渣は 8 M 尿素-TBS でホモジネートし、遠心後、尿素可溶性画分を得た。Western blot による解析の結果、HepSS-1 に認識される分子は尿素可溶性画分に存在し、約 14 kDa であった。そこで、尿素可溶性画分を陰イオン交換カラムクロマトグラフィー（MonoQ, Pharmacia）、2 次元電気泳動、in-gel digestion with trypsin、

逆相HPLC、およびEdman法に分離・精製・アミノ酸配列を決定し、以下の配列を得た：DSNNLCLHFNP, EAVFPFQPGS, および LPDGYEFK。これらのアミノ酸配列はヒトgalectin-1の内部アミノ酸配列に完全に一致した。

2. 次に、ALSのspheroidやconglomerate inclusionに本当にgalectin-1が局在するか否かを確認するため、孤発性ALS 8例、家族性ALS 4例（SOD1遺伝子のA4V 変異あり）、対照例 3例の脊髄を抗galectin-1抗体を用いて免疫組織化学的検討を行った。抗galectin-1抗体は、recombinantヒトgalectin-1を抗原として作成した。抗galectin-1抗体はALSのspheroidやconglomerate inclusionを強く免疫染色した。家族性ALSでは、ニューロフィラメントの異常蓄積構造物であるcord-like neurite swellingも強く免疫染色された。HepSS-1を用いた免疫電顕（immuno-gold法）では、銀粒子はニューロフィラメント上、あるいはきわめて近接する位置に認められた。

C. 考察

Galectin-1は分子量 14.5 kDa の蛋白質であり、β-galactosideに結合するレクチンの一種である。分子中に6個のシステイン残基が存在し、還元状態ではレクチン活性を有するが、酸化状態（分子内に3つのSS結合が形成される）ではレクチン活性は消失し、強い神経再生促進作用を有する。今回、ALSのspheroidやconglomerate inclusionにgalectin-1の蓄積が認められたが、それに関して 2 つの可能性が考えられる。1 つは、ALS では病初期より軸索輸送が障害されていると報告されているので、galectin-1 は 2 次的に胞体のconglomerate inclusionや軸索近位部のspheroidに蓄積した可能性。この場合には、galectin-1 の軸索遠位部への輸送は障害されていると考えられるので、もし galectin-1 が軸索や骨格筋の栄養因子として作用している場合にはALS の病態に関与していると考えられる。もう一つの可能性は、変性過程にあるALS 運動ニューロンが自らの再生を促進するためにgalectin-1 を over-production している可能性である。上記 2 つの可能性のいづれの場合にも、galectin-1はALSの治療に使用できる可能性がある。

D. 結論

galectin-1はALSの脊髄前角に認められる初期病変であるspheroidやconglomerate inclusionの構成成分である。

培養脊髄運動ニューロンに対するホスホジエステラーゼ(PDE)阻害剤の保護効果に関する研究

研究者　下濱　俊，中溝知樹　　京都大学大学院医学研究科脳病態生理学講座臨床神経学

研究要旨　ラット脊髄初代培養系に慢性的にグルタミン酸を曝露した際に認められる選択的運動ニューロン死が PDE 阻害剤の投与により抑制された。PDE 阻害剤の ALS 治療薬としての可能性が示唆された。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対する有効な治療法が切望されている。本研究では、ラット脊髄初代培養系を用いて PDE 阻害剤の運動ニューロン保護効果を解析し、ALS に対する新たな治療法の可能性について検討する。

B. 研究方法

胎生 16 日目のラット胎児より脊髄腹側を取り出し、トリプシン処理したあと、ピペッティングにて細胞を分散し、ポリエチレンイミンでコートしたカバースリップの上に撒いた。培養開始後 1，4，6，8 日目に培地を交換し、11 日目にグルタミン酸+グルタミン酸トランスポーター阻害薬を含む培地に 24 時間曝露した。14 日目に固定し免疫染色に供した。SMI32 抗体を用いることにより、運動ニューロンを同定した。全ニューロンの同定には抗 MAP2 抗体を用いた。顕微鏡下で生存細胞数を計数し、無処置対照群に対する百分率としてその生存を評価した。
（倫理面への配慮）
動物は NIH の実験動物の使用に関するガイドラインを遵守して扱われた。

C. 研究結果

培養脊髄ニューロンを低濃度(30μM)のグルタミン酸とグルタミン酸トランスポーター阻害薬に 24 時間曝露すると、選択的運動ニューロン死が認められた。このとき培地中に PDE 阻害剤であるアミノフィリンまたはジピリダモールを加えておくと、濃度依存性に、この運動ニューロン死が抑制された。

D 考察

我々はすでに cGMP アナログが急性ラジカル毒性から運動ニューロンを保護することを見出している。今回、PDE 阻害剤投与で細胞内の c GMP 濃度を持続的に上昇させることにより、慢性グルタミン酸毒性からも運動ニューロンを保護することができた。

PDE には多数のアイソザイムが存在し、一大スーパーファミリーを形成している。現在知られているだけで PDE1～11 のファミリーが存在する。各ファミリーに 1 から数個の遺伝子が存在し、そのそれぞれについて複数の splice variant が存在する。このうち、cGMP を分解するのは PDE1,2,5,6,9,10,11 の 7 つのファミリーである。

アミノフィリンは非選択的な PDE 阻害剤であるが、ジピリダモールは PDE5,6,7,8,10,11 の選択的阻害剤である。これらのうち、PDE6 は網膜に特異的に発現する酵素であり PDE7,8 は cAMP 特異的な酵素であることから、運動ニューロン保護効果には PDE5,10,11 もしくは未同定の(新規の)アイソザイムが関与していることが示唆される。今後、このアイソザイム、さらには splice variant を決定し、

これに特異的な阻害剤を開発することで、ALS に対する新しい治療法につながることが期待される。

E. 結論

PDE 阻害剤には運動ニューロン保護効果があり、ALS 治療薬としての可能性が示唆された。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表
1) Urushitani M, Inoue R, Nakamizo T, Sawada H, Shibasaki H, Shimohama S. Neuroprotective effect of cyclic GMP against radical-induced toxicity in cultured spinal motor neurons. J Neurosci Res 2000;61:443-448
2) Nakamizo T, Urushitani M, Inoue R, Shinohara A, Sawada H, Honda K, Kihara T, Akaike A, Shimohama S. Protection of cultured spinal motor neurons by estradiol. Neuroreport. 2000;11:3493-3497.
3) Urushitani M, Nakamizo T, Inoue R, Sawada H, Kihara T, Honda K, Akaike A, Shimohama S. *N*-methly-*D*-aspartate receptor-mediated mitochondrial Ca^{2+} overload in acute excitotoxic motor neuron death: A mechanism distinct from chronic neurotoxicity after Ca^{2+} influx. J Neurosci Res 2001 ; in press
4) 下濱 俊. NO ラジカルと神経細胞死. 小児神経学の進歩 29: 89-102, 2000
5) 中溝知樹, 漆谷 真, 下濱 俊. 運動ニューロン疾患とステロイドホルモン. 最新医学 55: 1700-1704, 2000

2. 学会発表
1) T. Oeda, N. Kitagawa, T. Imura, R. Kohno, S. Nakamura, S. Shimohama. A *Chaenorabditis elegans* model of familial amyotrophic lateral sclerosis. Society for Neuroscience, 30th Annual Meeting. New Orleans, Nov. 2000
2) 中溝知樹, 下濱 俊, 漆谷 真, 本田和弘, 木原武士, 澤田秀幸, 柴﨑 浩, 井上亮拓, 赤池昭紀. 培養脊髄運動ニューロンの慢性グルタミン酸毒性に対するエストラジオールの保護効果. 第 41 回日本神経学会総会 松本，2000 年 5 月
3) 漆谷 真, 下濱 俊, 中溝知樹, 本田和弘, 木原武士, 澤田秀幸, 柴﨑 浩, 井上亮拓, 赤池昭紀. 脊髄ニューロンの急性グルタミン酸毒性におけるミトコンドリア活性酸素の関与. 第 41 回日本神経学会総会 松本，2000 年 5 月
4) 大江田知子, 下濱 俊, 北川尚之, 河野隆一, 井村徹也, 柴﨑 浩. 変異型ヒト superoxide dismutase 1 (SOD1) 導入 *Chaenorabditis elegans (C.elegans)*の酸化ストレスに対する脆弱性. 第 41 回日本神経学会総会 松本，2000 年 5 月

H. 知的財産権の出願・登録状況
いまのところ予定なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

（分担研究者）

研究成果の刊行に関する一覧表

原著論文

著者	論文タイトル	掲載誌名	巻 ページ	出版年
A. Okado-Matsumoto T. Myint, J. Fujii N. Taniguchi	Gain in Functions of Mutant Cu,Zn-Superoxide Dismutase as a Causative Factor in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis: Less Reactive Oxidant Formation but High Spontaneous Aggregation and Precipitation	Free Radical Research	33 65-73	2000
Hirokawa N.	Stirring up development with the heterotrimeric kinesin KIF3	Traffic	1 29-34	2000
Okada.Y, N. Hirokawa	Mechanism of the single-headed processivity : Diffusional anchoring between "k-loop" of kinesin and the C-terminus of tubulin.	Proceedings of the National Academy of Science of the USA	97 640-645	2000
Kikkawa. M., Y. Okada N. Hirokawa	15Å resolution model of the menomeric kinesin motor: KIF1A	Cell	100 241-252	2000
Takeda, S., H. Yamazaki D.-H. Seog, Y. Kanai S. Terada , N. Hirokawa	KIF3 motor transports fodrin-associating vesicles important for neurite building	Journal of Cell Biology	148 1255-1266	2000
Setou, M., T. Nakagawa D-H. Seog, N. Hirokawa	Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport	Science	288 1796-1802	2000
Kanai, Y., Y. Okada Y. Tanaka, A. Harada S. Terada, N. Hirokawa	KIF5C, a novel neuronal kinesin enriched in motor neurons	Journal of Neuroscience	20 6374-6384	2000
Takei, Y., J. Teng A. Harada, N. Hirokawa	Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes	Journal of Cell Biology	150 989-1000	2000

著　者	論文タイトル	掲載誌名	巻 ページ	出版年
Terada, S., M. Kinjo N. Hirokawa	Oligomeric tubulin in large transporting complex is transported via kinesin in squid giant axons	Cell	103 141-155	2000
Jianguo, C., T. Nakata Z. Zhang, N. Hirokawa	The carboxyl-terminal tail domain of neurofilament protein-H (NF-H) forms the crossbridges and regulates neurofilament bundle formation	Journal of Cell Science	113 3861-3869	2000
Nakagawa, T., M. Setou D.-H. Seog, K. Ogasawara N. Dohmae, K. Takio N. Hirokawa	A novel motor, KIF13A, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex	Cell	103 569-581	2000
Terada, S., N. Hirokawa	Moving on to the cargo problem of microtubule-dependent motors in neurons	Current Opinion in Neurobiology	10 566-573	2000
Abe K	Pharmacology of cerebral ischemia-Eight international symposium	ID Weekly Highlights	8 22-24	2000
Abe K	Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against ischemic brain injury	J. Cereb. Blood Flow Metabol.	20 1393-1408	2000
Hayashi T et al	Loss of bag-1 immunoreactivity in rat brain after transient MCA occlusion	Brain Res	852 496-500	2000
Hayashi T et al	Vascular endothelial growth factor protects ischemic brain damage with MCA occlusion in rats	Isch. Blood Flow Brain	6 120-127	2000
Hayashi T et al	c-Jun N-terminal kinase (JNK) and JNK interacting protein response in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion	Neurosci. Lett.	284 195-199	2000

著　　者	論 文 タ イ ト ル	掲 載 誌 名	巻 ページ	出版年
Hayashi T et al	Phosphorylation of retinoblastoma protein in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion	Neuropath. Appl. Neurobiol.	26 390-397	2000
Kashihara K et al	Inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy associated with interstitial lung disease	Clin. Rheumatol.	19 235-237	2000
Kashihara K et al	Temporal profile of CRE DNA-binding activity in the rat hipocampus following a kindling stimulation	Epi. Res.	40 171-177	2000
Kashihara K et al	Effects of repeated methyl levodopa administration on apomorphine sensitivity of rotational behavior and striatal Fos expression of rats with unilateral6-OHDA lesions	Neurosci. Res.	38 273-279	2000
Kitagawa H et al	Glial cell line-derived neurotrophic factor protects ischemic brain injury in an association with the reduction of apoptotic signals but not with the improvement of r CBF	Isch. Blood Flow Brain	6 161-167	2000
Kohira I et al	Elevation of neuron-specific enolase in serum and cerebrospinal fluid of early stage Creutzfeldt-Jacob disease	Acta Neurol. Scand.	102 385-387	2000
Manabe Y et al	Isolated oculomotor nerve palsy in lymphoma	Neurol. Res	22 347-348	2000
Manabe Y et al	A case of spinocerebellar ataxia accompanied by severe involvement of the motor neuron system	Neurol. Res.	22 567-570	2000
Manabe Y et al	Infarct presenting with a combination of Wallenberg and posterior spinal artery syndromes	J. Neurol. Sci.	176 155-157	2000

著　　者	論　文　タ　イ　ト　ル	掲　載　誌　名	巻 ページ	出版年
Manabe Y et al	Sjoren's symdrome with acute transverse myelopathy as the initial manifestation	J. Neurol. Sci.	176 158-161	2000
Manabe Y et al	Fluctuating monoplegia due to venous insufficiency by spinal arachnoiditis ossificans	J. Neurol. Sci.	178 163-166	2000
Narai H et al	Isolated abducens nerve palsy caused by vascular compression	Neurology	55 453-454	2000
Sakurai M et al	Cyclin D1 and Cdk4 protein induction in motor neurons after transient spinal cord ischemia	Stroke	31 200-207	2000
Sakurai M et al	Adenovirus-mediated GDNF gene delivery reduces motor neuron injury after transient spinal cord ischemia in rabbits	J. Thorac. Cardiovasc. Surg.	120 1148-1157	2000
Sasaki C et al	Temporal profile of cytochrome c and caspase-3 immunoreactivities and TUNEL stainingafter permanent MCA occlusion in rats	Neurol. Res	22 223-228	2000
Takahashi K et al	Myositis as a manifestation od chronic graft-versus-host disease	Int. Med	39 482-485 2000	2000
Wang JM et al	Reduction of ischemic brain injury by topical application of IGF-1 after transient MCA occlusion in rats	Brain Res.	859 381-385	2000
Zhang WR et al	Protective effect of Ginkgo extract on rat brain with transient middle cerebral artery occlusion	Neurol. Res.	22 517-521	2000

著　　者	論　文　タ　イ　ト　ル	掲　載　誌　名	巻 ページ	出版年
Nakamura K, Funakoshi H Miyamoto K, Tokunaga F Nakamura T	Molecular Cloning and Functional Characterization of a Human Scavenger Receptor with C-Type Lectin (SRCL), a Novel Member of a Scavenger Receptor Family	Biochem Biophys Res Commun.	280 1028-1035	2001
Sun W, Funakoshi H Matsumoto K, Nakamura T	A sensitive quantification method for evaluating the level of hepatocyte growth factor and c-met / HGF receptor mRNAs in the nervous system using competitive RT-PCR	Brain Res Brain Res Protoc.	5 190-7.	2000
船越　洋、松本邦夫 中村敏一	特集　神経栄養因子研究の新しい展開：HGFの神経系における機能と神経疾患治療への展望	神経研究の進歩	44 414-422	2000

書　籍

著者	論文タイトル	書籍全体の編集者	出版社	巻 ページ	出版年
Ian A, Makay Keeth D. Brown	バイオ実験法シリーズ：Growth Factors and Receptors: A Practical Approach	監訳　中村敏一 （第1～第3章 分担　船越　洋）	メディカル・サイエンス・インターナショナル	1-258 (1-78)	2000
Kathy Baker	アット・ザ・ベンチ：バイオ研究完全指南 At the Bench: A Laboratory Navigator	監訳　中村敏一 （第4～第5章 分担　船越　洋）	メディカル・サイエンス・インターナショナル	1 475 (73-103)	2000