

Symposium on Development, Differentiation and Regeneration, Tokyo, May 2003

岡田洋平、島崎琢也、祖父江元、岡野栄之、マウス ES 細胞から運動ニューロン誘導の試み、神経組織の成長・再生・移植研究会 第 18 回学術集会、東京、2003 年 6 月

岡田洋平、島崎琢也、祖父江元、岡野栄之、マウス ES 細胞から運動ニューロン誘導の試み、第 26 回日本神経科学大会、名古屋、2003 年 7 月

Yohei Okada, Takuya Shimazaki, Gen Sobue, Hideyuki Okano, Generation of motor neuron progenitors from mouse embryonic stem cells, Keystone Symposia, Stem Cells (B2), Colorado, January 2004

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得(申請中)

(1)発明の名称: 胚性幹細胞からの神経幹細胞、運動ニューロンおよび GABA 作動性ニューロンの製造法

発明者: 岡野栄之 島崎琢也

出願番号: 特願 2001-099074,

申請日: 2001.3.30

PCT 出願: PCT/JP01/08703

(2)発明の名称: 記憶障害治療剤

発明者: 岡野栄之 島崎琢也 長尾省吾 松本義人

出願番号: 特願 2002-002433

申請日: 2002.1.11

PCT 出願: 無し

(3)発明の名称: 記憶障害治療剤スクリーニング法

発明者: 岡野栄之 島崎琢也 長尾省吾 松本義人

出願番号: 特願 2003-6298

申請日: 2003.1.14

PCT 出願: 無し

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

発現ベクターとしてのポリオウイルスの解析

分担研究者 野本 明男 東京大学大学院医学系研究科教授

小児マヒの病因であるポリオウイルスは、神経細胞、とくに運動神経細胞を標的とする RNA ウイルスであり、これまでの研究から血流中または骨格筋に接種すると、中枢神経系に侵入し、運動神経細胞で複製することが知られている。このポリオウイルスの性質は、運動神経細胞特異的な疾患である筋萎縮性側索硬化症の治療を目的としたウイルスベクターとなる可能性を秘めている。問題点は、1) ゲノムサイズが全長約 7500 塩基と短いため、挿入できる外来 mRNA の長さに限界があること、2) ポリオウイルス自体が運動神経細胞に対する毒性を有することである。本年度は、この 2 つの問題点を解決するための研究を展開した。その結果、3000 塩基程度の外来 mRNA の挿入が可能であること、およびポリオウイルスの毒性発現に中心的役割を担う 2A プロテアーゼの発現は、ウイルス複製にとって必須ではないこと、すなわち、ゲノムからこの領域を除き、ウイルス毒性を低下させることが可能であることを示した。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は運動神経細胞が損傷を受け、発症する疾患である。一方、小児マヒの病因であるポリオウイルスは、運動神経細胞に特異的に感染し、そこで複製する能力を保持している。したがってポリオウイルスの性質を利用し、ALS の進行を阻止、または治療する物質を運動神経細胞で発現させることを目的とした。

これまでの研究から、ポリオウイルスを骨格筋に接種すると神経軸索を経由し、中枢神経系の運動神経細胞に到達、そこでウイルス複製が開始されることが明らかとなっている。このウイルス伝播経路は、ポリオウイルスに対する血中抗体の影響を受け

にくいので、実用化するには非常に良い接種法である。この接種法を使用したポリオウイルスの BDNF(brain-derived neurotrophic factor)発現ベクターの作製に成功したが、現在は、ALS 治療にとって BDNF の効果は否定されている。

現在、ALS の進行を止める可能性のある物質としては、HGF(hepatocyte growth factor)と XIAP(X-linked inhibitor of apoptosis protein)の存在が知られている。これらの mRNA のコーディング領域は、それぞれ 2184 塩基および 1491 塩基であり、BDNF のそれ（約 400 塩基）と比べ長い。ポリオウイルスのゲノムは約 7500 塩基なので、HGF や XIAP などの長い mRNA が挿入可

能か否かが問題である。さらに運動神経細胞に対するポリオウイルス自体の毒性の問題もある。昨年度の研究では、RNA レプリコンをパッケージするためにスタンダードポリオウイルスを使用した。その場合の欠損ゲノム長は 1800 塩基程度までであった。これらの問題点を解決し、ALS に対する最終的な発症阻止ベクターを設計することが今年度の目的である。

B. 研究方法

ポリオウイルス I 型の強毒マホニー株ゲノムの全長 cDNA (感染性 cDNA クローン) のキャプシド蛋白質コーディング領域の全域を欠損させた変異体、およびさらに 3'側へと 2A プロテアーゼ領域を欠損させた変異体を作製した。それら cDNA から T7RNA ポリメラーゼを使用し、*in vitro* で RNA を合成した。それら RNA を HeLa 細胞にトランスフェクションし、RNA レプリコンとしての活性を、ポリオウイルス IRES 部位に相当する cDNA をプローブとしてスロットブロット法で測定した。

RNA レプリコンのパッケージングは、昨年のようなスタンダードウイルスの重感染によるのではなく、P1 キャプシド蛋白質コーディング領域を発現するように作製したワクチニアウイルス発現ベクターを重感染することにより行った。

(倫理面への配慮)

すべて *in vitro* の培養細胞系を使用した実験であり、倫理面に配慮する必要のない研究である。

C. 研究結果

まず変異 RNA (欠損を持つ RNA) の RNA レプリコンとしての活性を測定した。全長

の RNA、キャプシド全領域欠損 RNA、およびキャプシド全領域と 2A プロテアーゼ領域欠損 RNA を HeLa 細胞にトランスフェクションし、2 時間後と 8 時間後の RNA コピー数をスロットブロット法で比較した。その結果、キャプシド全領域欠損 RNA のコピー数が最も多いことが判明した。昨年の結果を考え合わせると、欠損が RNA 複製機能に関与しないかぎり、RNA が短い方がコピー数が多くなるという考えを支持する結果である。2A プロテアーゼ領域までを欠損させた RNA は、RNA としては最も短いにもかかわらず、そのコピー数は、全長 RNA と同程度であった。したがって、2A プロテアーゼは、RNA 複製にとって必須ではないが、ある程度 RNA 複製活性の維持に貢献していると考えられた。

次に P1 キャプシド蛋白質領域を発現するワクチニアウイルスベクターを重感染させることにより、各欠損 RNA がキャプシドにパッケージされるか否かを検討した。その結果、最も短い RNA である 2A プロテアーゼ領域までを欠損させた RNA もパッケージされることが明らかとなった。

D. 考察

昨年度までの研究により、2A プロテアーゼ領域のコーディング領域を 3 分の 1 欠損させても RNA レプリコン活性が観察されることが判明していたが、今年度は 2A プロテアーゼ領域全体の欠損変異でも RNA レプリコン活性があることを証明した。2A プロテアーゼは、これまでポリオウイルス複製 (ポリオウイルス RNA 複製) にとって重要であると信じられていただけに、基礎ウイルス学としても大変興味ある知見となった。2A プロテアーゼは、細胞

に対するポリオウイルスの毒性発現によって中心的役割を果たしているため、2A プロテアーゼの存在しないポリオウイルスベクターはより安全なウイルスベクターとして期待される。

RNA をパッケージする方法として、昨年度まではスタンダードウイルスの重感染による方法を用いてきたが、この方法では欠陥干渉 (DI) 粒子画分からスタンダードウイルスを完全に除くことは困難であり、何度 CsCl 平衡遠心法で分離を試みても 1000 分の 1 程度のスタンダードウイルスの混入があった。そこで、本年度は P1 キヤプシド蛋白質をワクチニアウイルスベクターで供給する方法に変えた。この方法によれば、ウイルス画分に SDS を添加すれば、エンベロープウイルスであるワクチニアウイルスを完全に破壊でき、DI 粒子を簡単に精製出来ることが判明した。このようにパッケージにより RNA をウイルス粒子とする技術も確立した。また最も短い 2A プロテアーゼ領域まで欠損させた RNA もパッケージされるという発見は、これまでの考え、すなわちパッケージされるには 5.6kb 以上の長さが必要であるという考えを打ち破る結果である。

E. 結論

ポリオウイルスを発現ベクターとして利用し、ALS 治療に有効と思われるタンパク質を脊髄の運動神経細胞で発現させるこ

とを目的に、基本的なゲノム改変のルール、および RNA をパッケージする方法を検討した。今や HGF を運動神経細胞で発現させるためのポリオウイルスベクター作製の基礎的な知見は十分に蓄積した。今後は、実際に HGF 発現ポリオウイルスベクターを作製し、ALS モデルマウスへ応用する実験を行う。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願番号：特願 2004-007394

名称：欠陥干渉粒子、ポリオウイルス欠損変異 RNA, cDNA およびプラスミド

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Dorfin による変異 SOD1 トランスジェニックマウスの治療の試み

分担研究者 祖父江 元¹⁾

研究協力者 丹羽 淳一¹⁾, 曾根 淳¹⁾, 河合 香里¹⁾, 石垣 診祐¹⁾, 伊藤 隆¹⁾,
菱川 望¹⁾, 竹内 英之¹⁾, 道勇 学¹⁾

¹⁾ 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科

研究要旨 Dorfin は孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) および SOD1 遺伝子変異を有する家族性 ALS のいずれにおいても運動ニューロン内に出現するユビキチン化封入体に局在し、野生型 SOD1 とは反応せず、変異 SOD1(mSOD1)のみを認識してユビキチン化し分解を促進するユビキチンリガーゼである。培養細胞モデルにおいては、Dorfin を発現させることにより、mSOD1 による神経細胞障害が抑制される。そこで、chicken β -actin プロモータ制御下に Dorfin を発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作出し、ALS モデルマウスである mSOD1-Tg マウスと交配することにより、mSOD1 による運動ニューロン障害の治療を試みた。

A. 研究目的

Dorfin は、遺伝子発現プロファイリングを行うことで、孤発性 ALS 脊髄において発現が増加している遺伝子として我々がクローニングした新規分子である。Dorfin は、N 末側に RING-finger / IBR ドメインを有するユビキチンリガーゼ(E3)をコードしている。孤発性 ALS および家族性 ALS のいずれにおいても、運動ニューロン内にユビキチン化封入体が発現することが病理学的特徴であるが、Dorfin は ALS のユビキチン化封入体に局在している。さらに我々は、Dorfin は野生型 SOD1 とは反応せず、家族性 ALS の原因となる mSOD1 のみを特異的に認識してユビキチン化し、プロテアソームでの分解を促進する「タンパク質品質管理」能力を有する E3 であることをこれまでに報告した。mSOD1 を発現する培養細胞モデルにおいては、Dorfin を共発現させることにより、mSOD1 による神経細胞障害が抑制される。

従って *in vivo* においても、Dorfin の発現を増強することにより、mSOD1 による運動ニューロン障害が軽減することが期待できる。そこで我々は、

Dorfin を高発現する Tg マウスを作出し、家族性 ALS のモデル動物である mSOD1-Tg マウスと交配することにより、mSOD1 による運動ニューロン障害の治療を試みた。

B. 研究方法

1. Dorfin-Tg マウスの作出 pCAGGS ベクターを用いて chicken β -actin プロモータ調節下に全身で全長 Dorfin を発現するコンストラクトを作製した。コンストラクト DNA を BDF1 マウス受精卵にマイクロインジェクションすることにより Tg マウスを作出した。導入遺伝子の確認は、マウス tail ゲノムのサザンブロットにより行った。導入遺伝子の発現の確認を RT-PCR, ウェスタンブロット, 免疫組織化学により行った。

2. Dorfin による mSOD1-Tg マウスの治療 mSOD1-Tg マウスとして、B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur (Jackson Laboratory)を用いた。mSOD1-Tg マウス雄と Dorfin-Tg マウス雌を交配し、mSOD1/Dorfin ダブル Tg マウスを作出した (図 1)。

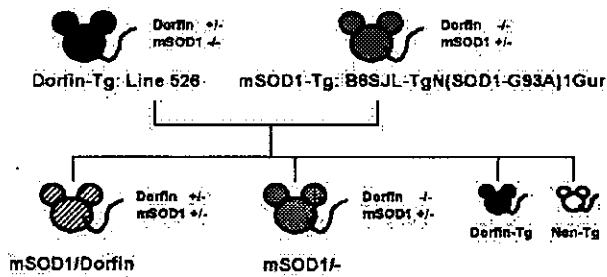


図1 mSOD1/Dorfin ダブル Tg マウスの作出

各週齢ごとに mSOD1/Dorfin-Tg マウスの臨床症状の観察, 体重測定, 行動・運動解析 (Rotarod, cage activity) を, mSOD1-Tg マウスと比較しながら行った. また, Tg マウス組織より RNA, DNA, タンパク質の抽出を行い, 分子生物学的解析や免疫組織化学的解析を行った.

(倫理面への配慮)

本研究においては, 実験動物 (マウス) の取り扱いにつき名古屋大学動物実験指針にもとづき, 動物の苦痛の除去・軽減に注意しつつ実験を行った.

C. 研究結果

Dorfin-Tg マウスが 5 系統得られ, そのうち比較的高コピー数の Dorfin が導入された Tg マウスが 2 系統得られた. サザンブロットにより高コピー数の Dorfin-Tg マウスでは, 約 20 コピーの Dorfin 遺伝子が導入されていた (図 2).

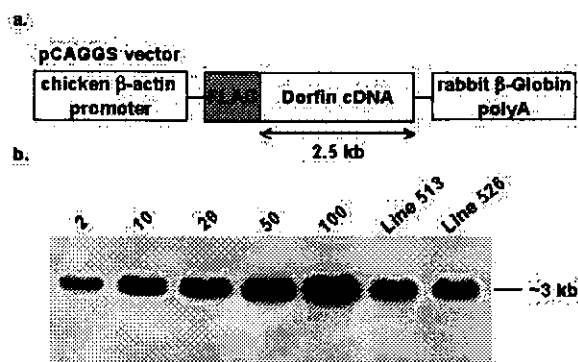


図 2 a. Dorfin 導入コンストラクトの略図. b. サザンブロットによる導入 Dorfin 遺伝子数の確認

Dorfin-Tg マウスの各臓器より抽出した RNA を

用いた RT-PCR では, Dorfin 導入遺伝子は Tg マウスの全身で発現しており, 脳および脊髄において高い発現が見られた (図 3). 筋肉での Dorfin 発現が特に高かったが, これは β -actin をプロモータに用いたことに起因していると考えられた.

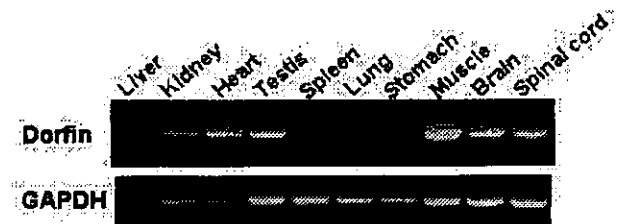


図 3 Dorfin-Tg マウス各臓器での導入 Dorfin mRNA の発現

マウス脊髄ホモジネートを用いたウェスタンブロットでは, ~ 100 kDa の全長 Dorfin が発現しており, 免疫組織化学によって脊髄前角運動ニューロン内および周囲のグリア細胞内に導入した Dorfin が発現していることを確認した. Dorfin の高発現のみでは, 生後 1 年以上経過を観察した限りにおいては運動機能や病理組織所見などには, 明らかな異常を認めず, non-Tg との相違は見られなかった.

ALS 症状の発症時期は, mSOD1-Tg(mSOD1^{-/-})では生後 109.0 日, ダブル Tg マウス(mSOD1/Dorfin)では, 109.4 日と差は認められなかった. 生存期間については, mSOD1-Tg(mSOD1^{-/-})は生後 131.5 日, ダブル Tg マウス(mSOD1/Dorfin)では, 153.0 日と有意差が認められ, Dorfin の高発現は mSOD1-Tg マウスの罹病期間および生存期間を延長した.

mSOD1-Tg マウス脊髄前角組織においては, 運動ニューロンおよび周囲のニューロピルに SOD1 およびユビキチンの蓄積が観察され, その蓄積は ALS 症状の進行とともに増加することが知られている. Dorfin は, mSOD1 を特異的に認識して, プロテアソームによりその分解を促進する E3 活性を有することから, 実際に *in vivo* においても mSOD1 量が減少しているかどうかを免疫組織化学的に検討した. mSOD1/Dorfin マウスでは mSOD1^{-/-}に比較して, SOD1 およびユビキチン蓄積の軽減が観察された (図 4).

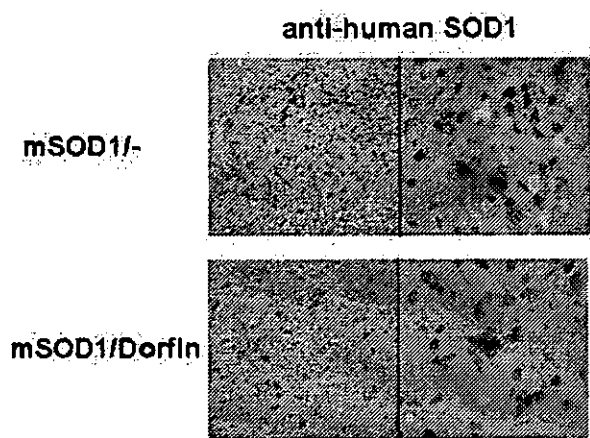


図 4 Tg マウス脊髄前角における SOD1 蓄積の比較 (抗ヒト特異的 SOD1 抗体).

D. 考察

Dorfin は我々が同定した E3 活性を有する新規分子であり、培養細胞を用いた *in vitro* における検討では、野生型 SOD1 とは反応せず、mSOD1 と特異的に結合してユビキチン化し、mSOD1 のプロテアソームでの分解を促進することや、mSOD1 の凝集体を減少させ神経細胞死を抑制することをこれまでに報告してきた。本研究においては、Dorfin が *in vivo* においても mSOD1 特異的 E3 として機能し、実際に mSOD1-Tg マウスの臨床症状や経過を改善するかどうかを検討した。全長 Dorfin を β -actin プロモータ調節下に全身に発現する Dorfin-Tg マウスの作出を試み、mSOD1-Tg マウスと交配することで Dorfin 高発現の治療効果を観察した。

mSOD1/Dorfin ダブル Tg マウスにおいては、ALS 症状の発症時期に変化は見られなかったが、生存期間を有意に延長した。免疫組織化学的検討においても、ダブル Tg マウスにおいて、SOD1 の蓄積の減少が観察され、これまでの *in vitro* での検討結果とよく一致している。今回の結果は、Dorfin の高発現が mSOD1 による運動ニューロン障害の治療に *in vivo* でも有効であることを示していると考えられる。発症時期に変化が見られなかった理由は不明であるが、罹病期間を延長することにより生存期間を延長しえたことは、実際に発症後より治療を始めざるをえない臨床への応用を考える上でも Dorfin による治療が有望であることを示唆して

いると思われる。

mSOD1 による運動ニューロン障害の病態機序として、mSOD1 の蓄積の結果、チトクローム c の放出とカスパーゼの活性化が起こり運動ニューロン死が生じるというアポトーシス経路の関与が考えられている。これまでに、抗アポトーシスタンパク質の高発現やカスパーゼ阻害剤の投与により mSOD1-Tg マウスを治療する試みが行われ、ある程度の有効性が示されてきた。我々が今回報告した E3 の発現増強によりユビキチン・プロテアソーム系を活性化し、mSOD1 蓄積を減少させることに基づく mSOD1-Tg の治療の試みは、mSOD1 による運動ニューロン障害カスケードのより上流での治療的介入であり、ユビキチン・プロテアソーム系の活性化による神経変性疾患の治療は、異常タンパク質の蓄積が原因であると推定されている ALS 以外のさまざまな神経変性疾患の治療戦略においても今後ますます重要な方法論になると考えられる。

E. 結論

Dorfin を高発現することにより、mSOD1-Tg マウスの生存期間が延長し、脊髄における SOD1 の蓄積に改善が認められた。今後は Dorfin-Tg ホモマウスを作出して Dorfin の発現量を増加させ、mSOD1-Tg マウスの治療にさらに改善が見られるかどうかを検討する。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. Takeuchi H, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. (2004) Dorfin prevents cell death by reducing mitochondrial localizing mutant superoxide dismutase 1 in a neuronal cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* in press.
2. Hishikawa N, Niwa J, Doyu M, Ito T, Ishigaki S, Hashizume Y, Sobue G. (2003) Dorfin localizes to the ubiquitinated inclusions in Parkinson's disease, dementia with lewy bodies, multiple system atrophy, and

IGF-1 髄腔内投与による SOD1 変異マウスにおける治療効果の検討

阿部康二¹⁾、永田哲也¹⁾、永野 功¹⁾、Hristelina Ilieva¹⁾、塩手美冬¹⁾
村上哲郎¹⁾、奈良井恒¹⁾、東海林幹夫¹⁾

1)岡山大学大学院医歯学総合研究科 神経病態内科学

研究要旨 インシュリン様成長因子(以下 IGF)-1 は、in vitro 及び in vivo で運動ニューロンに対する保護作用を持つことが知られている。しかし筋萎縮性側索硬化症 (以下 ALS)の患者に対する経皮的な投与法では効果が認められなかった。今回、我々は ALS モデル SOD1 変異マウス(G93A)を使用し、IGF-1 髄腔内投与による治療効果を検討した結果、ALS モデル SOD1 変異マウスにおいて治療的效果を持つことが示された。

A.研究目的

インシュリン様成長因子(以下 IGF)-1 は、in vitro 及び in vivo で運動ニューロンに対する保護作用を持つことが知られている。しかし ALS の患者に対する経皮的な投与法では効果が認められなかった。今回、我々は ALS モデル SOD1 変異マウス(G93A)を使用し、IGF-1 髄腔内投与による治療効果を検討した。

B.研究方法

ALSモデルSOD1変異マウス(G93A)を使用した。IGF-1を low dose 群(0.1mg/kg/day)及び high dose (1 mg/kg/day)群に分け、生後 140 日目(発症 80 日前)より腰部より髄腔内持続投与施行した。臨床的な評価としては、body weight、rotarod testing wheel-running activity、life span で行い、病理学的な評価は Nissl 染色により脊髄前角の運動ニューロンの数及び p-Akt、p-ERK、bcl-2 等の生存因子を免疫組織化学染色で対照群と比較検討した。

(倫理面への配慮)

モデル動物の飼育・管理は岡山大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して行われている。

C.研究結果

IGF-1 髄腔内投与は SOD1 変異マウスにおいて、対照群と比べて発症の遅延、生存期間の延長をもたらした。(Fig.1A, B) さらに IGF-1 髄腔内投与は体重減少の抑制、運動機能の低下の抑制をもたらした。(Fig.2A, B, C) 一方、病理学的には、運動ニューロン死の抑制を認め(Fig.3) 運動ニューロンにおける各種生存因子の発現の増加も認めた。(Fig.4)

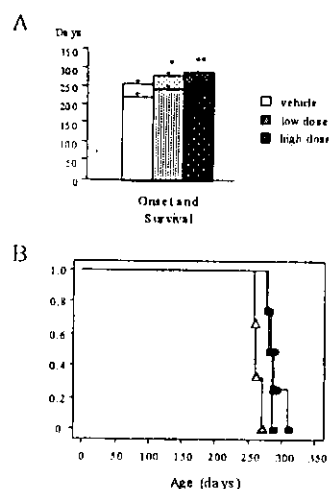


Fig. 1

Effects of IGF-1 administration on disease onset and survival of the G93A mice. (A) The mean onset of disease (lower bars) and mean survival (upper bars). Both the high-dose and low-dose treatments significantly delay the onset of clinical disease and prolong survival. The values shown are means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, versus vehicle treatment. (B) Cumulative probability of survival. Open triangles, control (vehicle), shaded squares,

low dose = 100 μ g/kg/day; filled circles, high dose = 1 mg/kg/day

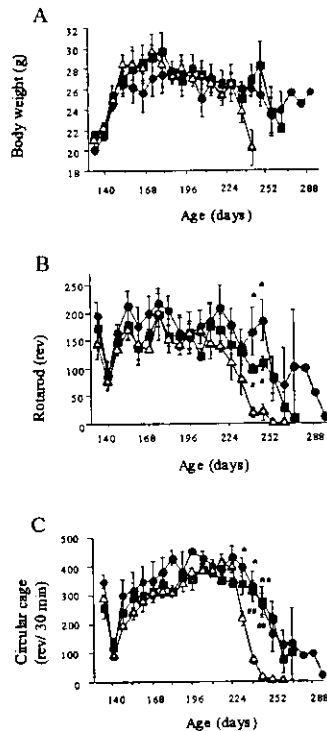


Fig. 2
Effects of IGF-1 treatment on the body weight and motor performance of G93A mice.
(A) The change in body weight of mice treated with IGF-1 (open triangles, vehicle; shaded squares, 100 μ g/kg/day; filled circles, 1 mg/kg/day).
(B) Effects of intrathecal administration of IGF-1 on rotarod performance. There is improved performance with IGF-1 treatment (shaded squares, 100 μ g/kg/day; filled circles, 1 mg/kg/day) compared with the control mice (open triangles) at 238 and 245 days of age.
(C) Effects of intrathecal administration of IGF-1 on wheel running activity. Animals treated with IGF-1 (shaded squares, 100 μ g/kg/day; filled circles, 1 mg/kg/day) show greater wheel activity than the control mice (open triangles).

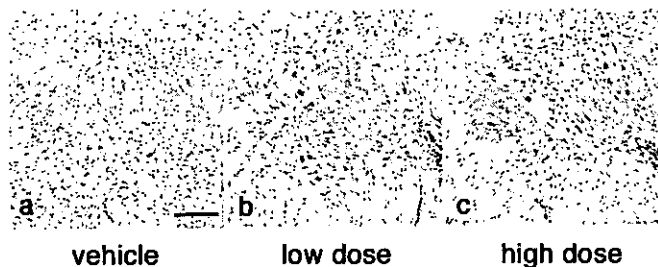


Fig. 3
Representative photomicrographs in the ventral horns of the lumbar spinal cord of G93A mice at 240 days of age. There is a profound loss of motor neurons in the ventral horn of the vehicle-treated G93A mice (a), and preserved numbers of motor neurons of the IGF-1-treated mice (b and c). Nissl stain. Scale bar in a = 100 μ m (also applies to b and c).

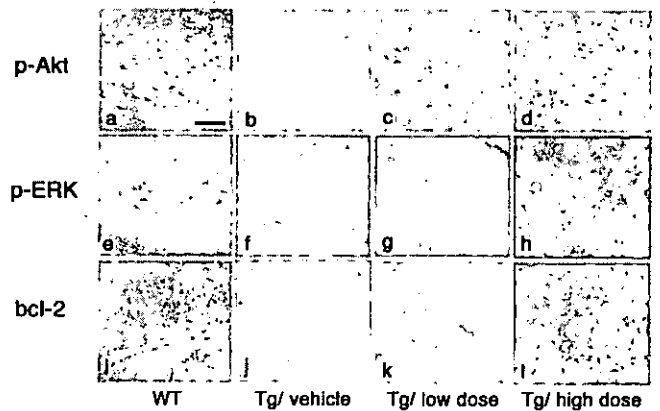


Fig. 4
Immunohistochemistry for phosphorylated Akt (p-Akt), phosphorylated ERK (p-ERK) and bcl-2 in the ventral horns of G93A mice. Immunohistochemistry demonstrates the apparent expression of p-Akt, p-ERK and bcl-2 in the cells in the ventral horns of G93A mice treated with IGF-1, whereas immunoreactivities for these proteins are virtually absent in the vehicle-treated mice. Scale bar in a = 100 μ m (also applies to all other panels).

D. 考察

IGF-1 の脊髄腔内持続注入は、G93A mutant SOD1 マウスの運動障害の発症を遅延させ、生存期間を延長した。更に治療群において、脊髄運動ニューロン死の抑制と生存因子の減少の抑制が認められた。またこれらの結果は Gage らの IGF-1 遺伝子治療の結果とも compatible と思われた

E. 結論

IGF-1 髄腔内投与が、ALS モデル SOD1 変異マウスにおいて治療的効果を持つことが示された。

F. 健康危険情報

特にありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

H. Ilieva, I. Nagano, T. Murakami, M. Shiote, M. Shoji, and K. Abe: Sustained induction of survival p-AKT and p-ERK signals after transient hypoxia in mice spinal cord with G93A mutant human SOD1 protein. *J. Neurol. Sci.* 215, 57-62, 2003

T. Murakami, H. Ilieva, M. Shiote, T. Nagata, I. Nagano, M. Shoji and , K. Abe: Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor is selectively impaired in mice carrying the mutant SOD1 gene. *Brain Res.* 989(2), 231-7, 2003

2. 学会発表

H. Ilieva, I. Nagano, T. Murakami, M. Shiote, T. Nagata, M. Shoji, and K. Abe.: Sustained induction of survival p-AKT and p-ERK signals after transient hypoxia in mice spinal cord with G93A mutant human SOD1 protein. 15th Int. Meeting on ALS/MND, Milan, Italy, 2003 11.17-19

M. Shiote, I. Nagano, T. Murakami, H. Ilieva, T. Nagata, M. Yokoyama, M. Shoji, and K. Abe. Therapeutic

benefit of intrathecal infusion of insulin-like growth factor-1 in transgenic mice that express a mutant human SOD1 gene.

15th Int. Meeting on ALS/MND, Milan, Italy, 2003
11.17-19

H. 知的財産権の出願・登録状況
特にありません。

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の新規治療法開発への挑戦 —HGF ファミリー分子 (HGF & HLP) の機能解析—

分担研究者：大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生分野 助教授 船越 洋

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を代表とする神経変性疾患は、神経細胞とその軸索の特異的変性を共通病態とする。したがって、これらの疾患でおこる神経細胞変性を阻止し、神経ネットワークを再建できれば有用である。私達は、この観点から新しい神経栄養因子としての HGF およびそのファミリー分子 (HGF-like protein: HLP) の機能解析を進めた。HGF 遺伝子を ALS モデル Tg マウスの神経系に高発現させると、運動機能の改善と寿命の延長効果が得られることを報告してきたが、発症後死亡するまでの duration は延長しなかった。これは、トランスジェニックマウスのアプローチでは、病態末期に十分量 HGF を供給できなかったためと考えられた。本年 ALS マウス duration の期間決定に重要な因子の発現制御を HGF 遺伝子発現の有無で解析したところ、最も duration と相関するとされる活性型 caspase-9 の発現誘導を、HGF 遺伝子発現で抑制できることが明らかとなった。このことは、HGF の供給方法の改善することにより ALS の発病だけでなく duration をも延長し、HGF がこれまで以上に ALS の寿命を延長できる可能性を示唆する重要な知見である。一方、HLP については、昨年までに神経細胞に直接作用する神経栄養作用に加えミクログリアに作用をもつこと (遊走促進活性) を明らかにしてきたが、本年度は HLP がミクログリアに作用し、様々なサイトカインの発現制御を担うことを明らかとした。この結果は、HLP が ①傷害ストレス時に神経細胞に対し保護作用を示すと同時に、② 傷害部位にすみやかにミクログリアを遊走・集積させ、そこで神経系のリモデリング (再構築) を積極的に促進している可能性を示唆する。今後 HGF に加えて、HLP の神経疾患における機能解析がさらに進むことが期待される。

1. 目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動ニューロンの特異的変性により運動麻痺を発症する致死性進行性神経変性疾患である。比較的若くして発症し、知能障害を伴わないために麻痺進行を自身で自覚しながら享受していく必要がある現時点で有効な治療法がない悲惨な疾患である。家族歴のある家族性 ALS (Familial ALS: FALS) と家族歴のない孤発性 ALS (Sporadic ALS: SALS) があるが、前者は遺伝解析研究の成果、原因として Superoxide dismutase 1 (SOD1) と ALS2 の遺伝子変異が同定された。このような遺伝解析の成果の著しい進歩とは裏腹に、治療法開発は依然未解決の問題である。もちろん SALS についてはいうまでもない。両者は原因を異にするが、運動ニューロン死とその神経軸索変性で発症し死に至るという点は共通である。逆に運動神経細胞死を抑制し、神経軸索再生し神経ネットワークの再建ができれば ALS の治療法開発に繋がると期待される。本研究の目的は、数ある神経栄養作用を持つ分子の中でも運動ニューロンに対する生存と突起伸長作用がより強力な肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor: HGF) に注目し、ALS における HGF およびその受容体 (c-Met) の機能とその作用分子機構を解析することである。昨年までに、HGF を ALS-Tg マウスに直接発現させると ALS-Tg における運動ニューロン死と

軸索変性による運動機能障害を抑制し寿命を延長することを明らかとしてきた。一方で昨年までの解析では、HGF は ALS の発症時期を延長するものの ALS 発症後死亡するまでの期間 (duration) は延長しない結果であった。この理由として発症後十分 HGF を供給できないことによることが示唆された。そこで本年は、ALS 病態末期の ALS の duration 決定に寄与する因子の発現制御に対する HGF の機能を解析を目的とし研究を進めた。

また、HGF のファミリー分子である HGF-like protein (HLP) について、HGF 同様の機能解析をすすめた。

2. 研究方法

(1) ALS-Tg と ALS-HGF ダブルトランスジェニックマウスの比較による HGF の各種活性型カスパーゼ発現誘導に対する解析 (特に duration に寄与するファクターに注目して) : 神経特異的 HGF 発現トランスジェニックマウス (HGF-Tg) (昨年度報告) とヒト ALS の原因変異遺伝子 (SOD1G93A) を発現し、ヒト ALS と同様の病態を示す ALS モデルトランスジェニックマウス (ALS-Tg) を交配することで、HGF 遺伝子を ALS-Tg の神経に直接発現させた際の ALS 病態進行に対する HGF の効果を以下の項目につき解析した。① 運動ニューロン数 (Cresyl violet 染色) ② 脊髄前根・後根における運動、感覚

神経繊維の解析 (トルイジンブルー染色) ③ 筋肉湿重量 ④ hindlimb reflex test (運動機能解析) ⑤ Rotorod test (運動機能解析) ⑥ Footprint (運動機能解析) ⑦ 発症時期 ⑧ 寿命 ⑨ 免疫染色 (c-Met, Tuj1, NSE, GFAP, Mac1) ⑩ ウェスタンブロット (c-Met, GFAP)

(2) HLP のミクログリアにおける機能解析

HLP の受容体 (Ron) の神経系における発現を、マウス初代培養大脳皮質ニューロン、培養アストロサイト、培養ミクログリアについて

① 定量的 Real-time PCR 法 (各種サイトカイン遺伝子) を Real-time PCR 法により解析し、各種サイトカインのミクログリアに対する発現制御について解析した。

* すべての遺伝子操作は DNA 組替え実験指針に従い、また動物実験は動物愛護面に配慮しかつ利用動物数を減らすように努めた。倫理面は大坂大学医学部動物実験指針に従った。

3. 研究結果及び考察

(1) HGF-ALS ダブル Tg マウスの解析: 運動機能障害に対する感度の高い後肢反射テストを用いて ALS/HGF ダブル Tg マウスと単独の Tg マウスおよび野生型マウスを比較した。その結果、ALS-Tg におこる運動機能障害が生後5ヶ月目より観察された。一方 ALS/HGF-Tg においては ALS 病態末期まで後肢反射テストで運動機能障害をほとんど認めなかった。この結果は、HGF が病態の初期においても機能できること、すなわち、HGF は ALS の初期から末期まで多段階で様々な作用分子機構を介し機能していることが示唆された。今後 HGF の ALS 病態初期における作用分子機能を明らかにしていく必要がある。

(2) HLP の神経系における機能

① HLP はミクログリアの各種サイトカイン発現を制御する。生後2日目のマウス (C57BL6) よりミクログリアを培養し、HLP 添加による各種サイトカインの発現制御を Real-time PCR 法にて定量的に解析した。その結果、昨年報告した HLP は遊走ミクログリアの細胞数が増加する活性に加え、特に神経障害時初期に発現制御を受けることが知られる数種類のサイトカインが、

大幅に発現制御を受けることが明らかとなった。HLP は神経栄養活性も持つことから、HLP は神経細胞の生存や突起伸長を促進することで神経保護に働くと同時に、ミクログリアがすみやかに損傷部位に遊走・集積することを促進させ、さらにミクログリアからの各種サイトカイン産生を修飾することでミクログリアが効率良く機能することを助ける新しい神経栄養因子であると示唆された。今後 HGF に加えて HLP の神経疾患における機能解析が進むことが期待される。

4. 結論

HGF は ALS モデル Tg マウスの病態進行過程で病態末期の duration 決定因子に対しても機能することが明らかとなった。このことは、HGF の供給法改善により HGF が ALS の duration の延長やさらなる ALS の寿命延長効果をもつことが期待できることを意味する。一方 HLP が神経細胞に加えミクログリアの各種サイトカイン発現制御にも機能できることを明らかとした。

5. 共同研究者

大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生分野: 鈴木 芳典、宮澤 大介、中村 敏一

6. 研究発表

1. Funakoshi H, and Nakamura T. Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications. *Clin Chim Acta* 327:1-23, 2003.
2. Kato S, Funakoshi H, Nakamura T, Kato M, Nakano I, Hirano A, Ohama E. Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in the anterior horn cells of the spinal cord in the patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS and familial ALS with superoxide dismutase 1 gene mutation. *Acta Neuropathol (Berl)*. 106(2):112-20, 2003.
3. Takahashi H, Funakoshi H, and Nakamura T. LIM-kinase as a regulator of actin dynamics in spermatogenesis. *Cytogenic and Genome Research* 2004, in press.
4. 中村健二、船越洋、中村敏一、神経再生因子としての肝細胞増殖因子 (HGF). 108-115, 脳の科学 (増刊号: 神経の再生), 2003.
5. 船越 洋、中村 敏一、ALS と神経栄養因子: HGF による新しい神経栄養因子 HGF による新しい治療法開発の可能性. 脳と神経, 55巻10号, 841-845, 2003.
6. 船越 洋、中村 敏一、肝細胞増殖因子 (HGF) は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の進行を遅らせる. 神経治療学 20巻5号, 533-540.

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	論文タイトル名	掲載誌名	巻ページ	出版年
Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, Kato C, Kurose Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M, Nakagawara A	NEDL1, a novel E3 Ubiquitin ligase for dishevelled1, targets mutant superoxide dismutase 1	J Biol Chem	in press	
Kato S, Saeki Y, Aoki M, Nagai M, Ishigaki A, Itoyama Y, Kato M, Asayama K, Awaya A, Hirano A, Ohama E	Histological evidence of redox system breakdown caused by superoxide dismutase 1 (SOD1) aggregation is common to SOD1-mutated motor neurons in humans and animal models	Acta Neuropathol (Berl)	107 149-58	2004
Tobisawa S, Hozumi Y, Arawaka S, Koyama S, Wada M, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, Goto K, Kato T	Mutant SOD1 linked to familial amyotrophic lateral sclerosis, but not wild-type SOD1, induces ER stress in COS7 cells and transgenic mice	Biochem Biophys Res Commun	303 496-503	2003
Tonchev A.B., Yamashima T, Zhao L., Okano H	Differential proliferative response in the posts ischemic hippocampus, temporal cortex and olfactory bulb of adult primates	Glia	42 209-224	2003
Tonchev A.B., Yamashima T., Zhao L., Okano H, J. and Okano H	Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys	Mol Cell Neurosci	23 292-301	2003
Kuo H.-C., Pau F.K.Y., Yeoman R.R., Mitalipov S.M., Okano H, Wolf D.P.	Differentiation of monkey embryonic stem cells into neural lineages	Biol Reprod	68 1727-1735	2003
Kayahara, T., Sawada, M., Takaishi, S., Fukui, H., Seno, H., Fukuzawa, H., Suzuki, K., Hiai, H., Kageyama, R., Okano, H., Chiba, T	Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine	FEBS Lett	535 131-135	2003

Sasaki T, Kitagawa K, Sugimura S, Omura-Matsuoka E, Tanaka S, Yagita Y, Okano H, Matsumoto M, Hori M	Cyclooxygenase-2 on Enhanced Proliferation of Neural Progenitor Cells in the Adult Mouse Hippocampus After Ischemia	J	Neurosci Res	72 461-471	2003
Nakamura Y, Yamamoto M, Oda E, Yamamoto A, Kanemura Y, Hara M, Suzuki A, Yamasaki M, Okano H	Expression of tubulin beta II in neural stem/progenitor cells and radial fibers during human fetal brain development		Lab Invest	83 479-489	2003
Yuasa Y, Okabe M, Yoshikawa S, Tabuchi K, Xiong W-C, Hiroimi Y, Okano H	Drosophila homeodomain protein REPO controls glial differentiation by cooperating with ETS and BTB transcription factors		Development	130 2419-2428	2003
Uchida K, Okano H, Hayashi, T, Mine Y, Tanioka Y, Nomura T, Kawase T	Grafted swine neuroepithelial stem cells can form myelinated axons and both efferent and afferent synapses with xenogeneic rat neurons		J Neurosci Res	72 661-669	2003
Kokuzawa J, Yoshimura S, Kitajima H, Shinoda J, Kaku Y, Iwama T, Morishita R, Shimazaki T, Okano H, Kunisada T, Sakai N	Hepatocyte growth factor promotes proliferation and neural differentiation of neural stem cells from mouse embryos		Mol Cell Neurosci	24 190-197	2003
Ishizuya-Oka A, Shimizu K, Sakakibara SI, Okano H, Ueda S	Thyroid hormone-upregulated expression of Musashi-1 is specific for progenitor cells of the adult epithelium during amphibian gastrointestinal remodeling		J Cell Sci	116 3157-3164	2003
Kanuka H, Kuranaga E, Hiratou T, Igaki T, Nelson B., Okano H, Miura M	Cytosol-endoplasmic reticulum interplay by Sec61alpha translocon in polyglutamine-mediated neurotoxicity in Drosophila		Proc Natl Acad Sci USA	100 11723-11728	2003
Baker H, Kobayashi K, Okano H, Saino-Saito S	Cortical and striatal expression of tyrosine hydroxylase mRNA in neonatal and adult mice		Cell Mol Neurobiol	23 503-518	2003
Tamaki T, Akatsuka A, Okada Y, Matsuzaki Y, Okano H, Kimura M	Growth and differentiation potential of main- and side-population cells derived from murine skeletal muscle		Exp Cell Res	291 83-90	2003
Miyanomori Y, Kobayashi H, Imai T, Watanabe M, Nagata T, Uesugi S, Okano H, Katahira M	Origin of fiber affinity to RNA of the N-terminal RNA-binding domain than that of the C-terminal one of a mouse neural protein, musashi1, as revealed by comparison of their structures, modes of interaction, surface electrostatic potentials, and backbone dynamics		J Biol Chem	278 41309-41315	2003

Yoshida T, Tokunaga A, Nakao K, Okano H	Distinct expression patterns of splicing isoforms of mNumb in the endocrine lineage of developing pancreas	Differentiation	71 486-495	2003
Hu QD, Ang BT, Karsak M, Hu WP, Cui XY, Duka T, Takeda Y, Chua W, Natesan S, Ng YK, Ling EA, Israel A, Maciag T, Small D, Trifonova R, Kopan R, Okano H, Nakafuku M, Chiba S, Hirai H, Schachner M, Pallen CJ, Watanabe K, Xiao ZC	F3/Contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation	Cell	115 163-175	2003
Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Ohsugi Y, Yoshizaki K, Kishimoto T, Toyama Y, Okano H	Blockade of interleukin-6 receptor ameliorates functional recovery in spinal cord injury	J Neurosci Res	In press	2004
Yamashima T, Tonchev B.A., Seki T, Sawamoto K, Okano H	Vascular adventitia generates neuronal progenitors in monkey hippocampus after ischemia	Hippocampus	In press	2004
Matsuzaki Y, Kinjo K, Mulligan, RC., Okano H	Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cell	Immunity	20 87-93	2004
Murata J, Murayama A, Horii A, Doi K, Harada T, Okano H, Kubo T	Expression of Musashi1, a neural RNA-binding protein, in the cochler of young adult mice	Neuroscience Letter	354 201-204	2004
Katsuno M, Adachi H, Sobue G	Sweat relief for Huntington's disease	Nat Med	in press	2004
Katsuno M, Adachi H, Tanaka F, Sobue G	Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA): Ligand-dependent pathogenesis and therapeutic perspective	J Mol Med	in press	2004
Koike H, Misu K, Sugiura M, Iijima M, Mori K, Yamamoto M, Hattori N, Mukai E, Ando Y, Ikeda S, Sobue G	Pathologic differences between early- and late-onset type I (TTR Met30) familial amyloid polyneuropathy	Neurology	in press	2004
Takeuchi H, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Tanaka F, Doyu M, Sobue G	Dorfin prevents cell death by reducing mitochondrial localizing mutant superoxide dismutase 1 in a neuronal cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis	J Neurochem	in press	2004

Watanabe H, Fukatsu H, Katsuno M, Sugiura M, Hamada K, Okada Y, Hirayama M, Ishigaki T, Sobue G	Muotiple regional 1H-MR spectroscopy in multiple system atrophy: NAA/Cr reduction in pontine base as a valuable diagnostic marker	J Neurol Neurosurg Psychiatry	75 103-109	2004
Nodera H, Bostock H, Kuwabara S, Sakamoto T, Asanuma K, Jia-Ying S, Ogawara K, Hattori N, Hirayama M, Sobue G, Kaji R	Nerve excitability properties in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A	Brain	127 203-211	2004
Ito T, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Doyu M, Sobue G	Dorfin localizes to Lewy bodies and ubiquitilates synphitlin-1	J Biol Chem	278 29106-29114	2003
Isuhara K, Yamagishi N, Saito Y, Adachi H, Kobayashi Y, Sobue G, Otsuka K, Hatayama T	Hsp105a suppresses the aggregation of truncated androgen receptor with expanded CAG repeats and cell toxicity	J Biol Chem	278 25143-25150	2003
Hishikawa N, Niwa J, Doyu M, Ito T, Istigaki S, Hashizume Y, Sobue G	Dorfin localizes to the ubiquitylated inclusions in Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, multiple system atrophy, and amyotrophic lateral sclerosis	Am J Pathol	163 609-619	2003
Hattori N, Yamamoto M, Yoshihara T, Koike H, Nakagawa N, Yoshikawa H, Ohnishi A, Hayasaka K, Onodera O, Baba M, Yasuda H, Saito T, Nakashima K, Kira J, Kaji R, Oka N, Sobue G and the Study Group for Hereditary Neuropathy in Japan	Demyelinating and axonal features of Charcot Marie Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients	Brain	126 134-151	2003
Hishikawa N, Hashizume Y, Yoshida M, Sobue G	Clinical and neuropathological correlates of Lewy body disease	Acta Neuropathol (Berl)	105 341-350	2003
Hamada K, Hirayama M, Watanabe H, Kobayashi R, Ito H, Ieda T, Koike Y, Sobue G	Onset age and severity impairment are associated with reduction of myocardial 123I-MIBG uptake in Parkinson's disease	J Neurol Neurosurg Psychiatry	74 423-426	2003

Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Sang C, Pagulatous G, Angelidis C, Kusakabe M, Yoshiki A, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G	Heat shock protein 70 chaperone overexpression ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant androgen receptor protein.	J Neurosci	23 2203-2211	2003
Abe Y, Kachi T, Arahata Y, Yamada T, Washimi Y, Iwai K, Ito K, Yanagisawa N, Sobue G	Occipital hypoperfusion in Parkinson's disease without dementia: correlation to impaired cortical visual processing	J Neurol Neurosurg Psychiatry	74 419-422	2003
Koike H, Iijima M, Sugiura M, Mori K, Hattori N, Ito H, Hirayama M, Sobue G	Alcoholic neuropathy is clinicopathologically distinct from thiamine-deficiency neuropathy	Ann Neurol	54 19-29	2003
Katsuno M, Adachi H, Doyu M, Minamiyama M, Sang C, Kobayashi Y, Inukai A, Sobue G	Leuprorelin rescue polyglutamine-dependent phenotypes in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy.*	Nature Medicine	9 768-773	2003
Wada M, Kimura M, Daimon M, Kurita K, Kato T, Johmura Y, Johkura K, Kuroiwa Y, Sobue G	An usual phenotype of McLeod syndrome with late onset axonal neuropathy	J Neurol Neurosurg Psychiatry	74 1697-1698	2003
Katsuno M, Adachi H, Inukai A, Sobue G	Transgenic mouse models of spinal and bulbar muscular atrophy(SBMA)	Cytogenet Genome Res	100 243-251	2003
Mori K, Iijima M, Sugiura M, Koike H, Hattori N, Ito H, Hirayama M, Sobue G	Sjogren's syndrome associated painful sensory neuropathy without sensory ataxia	J Neurol Neurosurg Psychiatry	74 1230-1322	2003
Manabe Y, Wang JM, Shiote M, Murakami T, Nagano I, Shoji M, Abe K	Glutamate enhances caspase-3 immunoreactivity in cultured spinal cord neurons of newborn rats	Neurol Res	25 312-316	2003
Ilieva H, Nagano I, Murakami T, Shiote M, Shoji M, Abe K	Sustained induction of survival p-AKT and p-ERK signals after transient hypoxia in mice spinal cord with G93A mutant human SOD1 protein	J. Neurol. Sci	215 57-62	2003

<p>Murakami T, Ilieva H, Shiote M, Nagata T, Nagano I, Shoji M, Abe K</p>	<p>Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor is selectively impaired in mice carrying the mutant SOD1 gene</p>	<p>Brain Res</p>	<p>989(2) 231-237</p>	<p>2003</p>
<p>Nagano I, Murakami T, Shiote M, Manabe Y, Hadano S, Yanagisawa Y, Ikeda JE, Abe K</p>	<p>Single-nucleotide polymorphisms in uncoding regions of ALS2 gene of Japanese patients with autosomal-recessive amyotrophic lateral sclerosis</p>	<p>Neurol Res</p>	<p>25(5) 505-509</p>	<p>2003</p>
<p>Ilieva HS, Nagano I, Murakami T, Shiote M, Manabe Y, Abe K.</p>	<p>Age-related changes in peroxisomal membrane protein 70 and superoxide dismutase 1 in transgenic G93A mice</p>	<p>Neurol Res</p>	<p>25(4) 423-426</p>	<p>2003</p>
<p>H. Funakoshi, T. Nakamura</p>	<p>Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications</p>	<p>Clinica Chimica Acta</p>	<p>327(1-2) 1-23</p>	<p>2003</p>
<p>S. Kato, H. Funakoshi, T. Nakamura, M. Kato, I. Nakano, A. Hirano, E. Ohama</p>	<p>Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in the anterior horn cells of the spinal cord in the patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS and familial ALS with superoxide dismutase 1 gene mutation</p>	<p>Acta Neuropathol</p>	<p>106(2) 112-120</p>	<p>2003</p>
<p>H. Takahashi, H. Funakoshi, T. Nakamura</p>	<p>LIM-kinase as a regulator of actin dynamics in spermatogenesis</p>	<p>Cytogenic and Genome Research</p>	<p>in press</p>	<p>2004</p>

書籍

著者	論文タイトル名	書籍名	出版社	巻ページ	出版年
青木正志、糸山泰人	治療戦略に有用な筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の動物モデルの開発	神経治療学	日本神経治療学会	20 527-532	2003
Okano H	Making and repairing the mammalian brain: Introduction	Semin Cell Dev Biol		14 159	2003
Okano H, Ogawa Y, Nakamura M, Kaneko S, Iwanami A, Toyama A	Transplantation of neural stem cells into the spinal cord after injury	Semin Cell Dev Biol		14 191-198	2003
Okano H	Neural stem cells as therapeutic agents for CNS injuries and disorders	Int Congr Ser		1810 1-6	2003
Hisahara S, Okano H, Miura M	Caspase-mediated oligodendrocyte cell death in the pathogenesis of autoimmune demyelination	Neurosci Res		46 387-397	2003
永野 功、横山正尚、森田 潔、阿部康二	筋萎縮性側索硬化症患者に対するIGF-1髄腔内投与療法 法の現状	神経治療学	日本神経治療学会	20 551-556	2003
阿部康二	神経疾患の再生医療 ～筋萎縮性側索硬化症～	Clinical Neuroscience		21 1180-1181	2003
船越 洋、中村敏一	ALSと神経栄養因子：HGFによる新しい神経栄養因子HGFによる新しい治療法開発の可能性	脳と神経		55 841-845	2003
船越 洋、中村敏一	肝細胞増殖因子 (HGF) は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の進行を遅らせる	神経治療学	日本神経治療学会	20 533-540	2003
中村健二、船越 洋、中村敏一	神経再生因子としての肝細胞増殖因子 (HGF)	脳の科学		25 増刊号 (神経の再生) 108-115	2003