

した神経細胞により有効に機能するのか、それとも一般的にc-Met発現細胞に機能する、いかえるとHGF治療を考える際、ALSに罹患しHGFが作用してほしい細胞により有効に作用するかそれともそうでない多くの細胞へも機能するかどうかを解析することは重要である。本研究では、HGFの実際のシグナル伝達細胞をc-Met受容体へのチロシンリン酸化で評価した。さらにHGFの特異的シグナル伝達HGFのc-Met受容体側からみたHGFの特異的分子機構についても研究を進めた。

方法

[ALS/HGFダブルトランスジェニックマウスの作成] Tg-SOD1G93A (ALS-Tg) と神経特異的HGF発現トランスジェニックマウス (HGF-Tg) を交配することでWildtype, HGF-Tg, ALS-Tg, ALS/HGF-Tgの4群を作成した (Sun, Funakoshi et al., J. Neurosci., 2002に準じた)。

[解析] 組織解析に加えて、c-Metのチロシンリン酸化を評価することでHGFの細胞へのシグナル伝達の指標とした。一方、c-Met抑制に機能するはjuxtamembrane領域のSerのリン酸化は、同領域のリン酸化ペプチドを作製し免疫して得たSerリン酸化ペプチドポリクローナル抗体を用いて免疫染色により評価した。

結果と考察

[c-Metの脳幹運動神経細胞における発現] c-Met受容体は、顔面・舌下といった脳幹部の成体運動神経細胞において発現していた。さらにALS-Tgにおいてもc-Met受容体が発現していた。

[HGFの脳幹運動ニューロンに対する機能] HGFが脳幹運動ニューロンに発現するc-Metに作用することで、ALSの神経変性を抑制するか否かをALS-TgとHGF-Tgを交配することで評価した。その結果、これまで明らかにしてきた脊髄の運動ニューロンと同様に、HGFはALSの脳幹運動ニューロンの神経変性を抑制することが明らかとなった。そこで、これまで明らかにしてきた脊髄運動神経細胞に加えて、HGFが脳幹運動神経の変性を抑制すること、すなわちHGFがALSに罹患変性することが知られる広範囲運動神経細胞に機能できることが明らかとなった。

[ALSによるc-Metのチロシンのリン酸化の神経特異性] HGFのシグナル伝達をc-Met

のチロシンリン酸化により評価した。運動神経細胞のc-Metチロシンリン酸化は、正常マウスにおいては検出限界以下であった。驚くことに、HGF単独のTgマウス (HGF-Tg) では、運動神経細胞におけるc-Metのチロシンリン酸化はdetection limit以下であった。このことから、HGFは正常運動神経細胞に比べて、ALS神経細胞でより効率よく濃度依存的にシグナルを伝達できることが明らかとなった。このことは、ALSに対する安全なHGF治療法開発の基盤となり得ることを示唆している。またその分子機構についても解析した。

[HGFのグリオーシスに対する機能] 本研究では脳幹部運動神経核におけるグリオーシスを解析した。その結果、HGFによりアストロサイトとミクログリアの両方のグリオーシスが抑制されることが明らかとなった。グリオーシスの初期にはグリア細胞におけるc-Metの受容体の発現を免疫染色上認めない。本研究ではHGFがいかにして運動ニューロンに機能してグリオーシスを抑制するかその分子機構を解析・考察した。

[HGFの筋肉に於ける機能の示唆] HGFとc-Metは筋肉において発現し、筋肉運動を制限することで発現制御を受けることが明らかとなった。今後は筋肉でのHGF, c-Metの発現制御から見たALSに有用なHGFと理学治療法開発も視野に入れて研究を進展させたい。

以上の研究成果は、まさにHGFが広範囲ALS運動ニューロン変性を抑制し、治療薬となる可能性を強く示唆するものである。一方2005年に入り、他施設から弧発性ヒトALS患者脊髄に対するDNAアレイ法において、HGF mRNAがALS脊髄運動ニューロンで発現上昇を認めることが明らかにされた (Jiang YM et al. Ann Neurol, 2005)。これらの治験は、弧発例の免疫染色結果 (Kato et al., 2003) を支持し、HGFが家族性に加えて弧発例でも治療薬となる可能性が示唆された。

まとめ

HGFは従来報告してきた脊髄に加え脳幹運動神経での神経変性進行阻止に向けて機能することが明らかとなった。HGFはALS神経により効率的に作用することからALSに安全な治療薬となることが期待された。今後HGFのALS臨床適用に向け基礎研究を進展させたい。

研究協力者

青木正志、糸山泰人、東北大神経内科
加藤信介、鳥取大学脳研病理
立野勝彦、金沢大学基礎理学療法科
竹尾聡、東京薬科大学薬理学教室

文献

Zhao MZ, et al., Novel therapeutic strategy for stroke in rats by bone marrow stromal cells and ex vivo HGF gene transfer with HSV-1 vector. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:1-13, 2006.
Ishihara N et al, Inhibition of apoptosis-inducing factor translocation

is involved in protective effects of hepatocyte growth factor against excitotoxic cell death in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem* 95:1277-1286, 2005.

Isogawa K, et al., Anxiolytic effect of hepatocyte growth factor infused into rat brain. *Neuropsychobiology* 51(1):34-38, 2005.

Tanaka S et al, Expression of Hepatocyte Growth Factor in Rat Skeletal Muscle. *J Phys Ther Sci* 17:109-113, 2005.

大谷若菜他., Hepatocyte growth factor (HGF) 日本臨床:116-122, 2005.

筋萎縮性側索硬化症に対する肝細胞増殖因子(HGF)を用いた挑戦的治療法の開発とその基盤研究
分担研究報告書

肝細胞増殖因子(HGF)-cMet システムに基づいた筋萎縮性側索硬化症(ALS)ストレスによる
運動神経細胞死阻止に関する基盤研究：ヒト剖検例に関する病理組織学的解析

分担研究者 加藤信介 鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経病理部門 助教授

研究要旨 筋萎縮性側索硬化症(ALS)の脊髄残存前角神経細胞における肝細胞増殖因子(HGF)及び cMet の発現について解析した。症例は、孤発性 ALS(SALS)40 例, 変異 SOD1 を伴う家族性 ALS(FALS) 2 家系 5 症例、正常対照 20 例の各脊髄剖検材料を用いた。SALS 臨床経過は発症後 6 ヶ月から 11 年 5 ヶ月だった。免疫組織化学的解析には、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 6 ヶ月, 11 年 5 ヶ月の SALS と正常対照の脊髄組織で Western blot 解析を行った。SALS40 症例の全経過においては、SALS の臨床経過と共に、HGF 及び cMet 両者陰性の HGF-cMet システムが破綻した残存神経細胞が増加していた。発症後約 3 年までの SALS 脊髄残存神経細胞の一部には、HGF-cMet システムが up-regulate している残存神経細胞が存在していたが、それ以後の臨床経過の長い SALS では経過と共に HGF-cMet システムが up-regulate している残存神経細胞数は激減していった。しかし、注目すべき点は、SALS 40 症例全例において脊髄残存神経細胞の一部には、必ず HGF あるいは cMet 陽性の残存神経細胞が存在していたことである。ALS のどの時期においてもアストロサイトでの HGF の発現は認められなかったが、発症後 3-4 年をピークに、一部の反応性アストロサイトに cMet が高発現していた。cMet 強陽性を示す反応性アストロサイトは 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 6 ヶ月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 の発現量は減少した。cMet も HGF と同様だった。即ち、SALS においては、大部分の残存神経細胞は HGF-cMet システムが破綻するために細胞死に至るが、残存神経細胞の一部には、経過中に必ず HGF-cMet システムを発現している残存神経細胞が存在していて、ALS ストレスから自らを守って生存する可能性を探っていることが判明した。大部分の反応性アストロサイトは、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、cMet を発現している反応性アストロサイトは、HGF を取り込むことによりアストロサイト自らの機能回復を行うことにより、アストロサイトと神経細胞との relationship を介する神経細胞生存のメカニズムの一つとして考えられた。この HGF-cMet 生存機構に基づき、ALS の脊髄残存前角神経細胞に HGF を直接導入することにより、変異 SOD1 を含めた ALS ストレスに対して、脊髄残存前角神経細胞は自らを守って生存し続けると、本研究から結論づけた。

研究協力者：加藤雅子¹、船越 洋²、中村敏一²、青木正志³、糸山泰人³

¹鳥取大学医学部病院病理、²大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生分野、³東北大学大学院医学系研究科神経内科分野

A. 研究目的

孤発性 ALS(SALS)では原因不明の ALS ストレスによって脊髄前角細胞死が生じ、変異 SOD1 を伴う家族性 ALS(FALS)では変異 SOD1 ストレスによって脊髄前角細胞死が生ずるが、

一方では、残存前角細胞も存在していることも事実である。今回我々は、ALS の脊髄残存前角細胞に着目し、これら残存神経細胞が、ALS ストレスから、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、我々はヒト ALS 剖検例として SALS と変異 SOD1 を伴う FALS の両者を詳細に解析することにより、肝細胞増殖因子 (HGF) とそのリセプターである cMet に着目し、ALS での脊髄残存前角細胞の生存機構の一つに HGF-cMet システムが存在していたことを解明し得た。

B. 研究方法

1. 剖検材料：症例は SALS 40 例と変異 SOD1 を伴う FALS 2 家系 5 症例の脊髄を用いた。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。SALS は、発症後 6 ヶ月症例から 11 年 5 ヶ月症例までの 40 症例である。FALS は変異 SOD1 として 2 塩基欠損を示した Japanese Oki Family と A4V を示した American C Family の 2 家系 5 症例であった。

2. 組織化学的及び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た。組織化学的解析には、ヘマトキシリン・エオシン染色、Klüver-Barrera 染色、Bielschowsky 染色の各ルーチン染色を施行した。免疫組織化学的解析として、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、avidin-biotin-immunoperoxidase complex 法を用いて 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 発色にて可視化した。

3. Western blot 解析：発症後 2 年 6 ヶ月症例と発症後 11 年 5 ヶ月症例の SALS と正常対照の各脊髄組織を用いた。

本研究は、鳥取大学倫理委員会にて、第 2001-150 号の許可を受けて実施した。

C. 研究結果

1. 病理組織学的解析：脊髄における SALS の本質的病理組織学的所見は、脊髄前角細胞

の変性・脱落・消失であった。脊髄前角細胞の消失に伴って、その軸索の伝導路である脊髄前根の大径有髄線維は消失していた。脊髄残存前角細胞は萎縮し、リポフスチン充満神経細胞が目立った。SALS40 症例を詳細に病理組織学的な解析を行うと、ほぼ病悩期間の長さに比例して脊髄残存前角細胞は減少していた。反応性アストロサイトやグリオースもまた脊髄前角細胞の脱落・消失した部位に著明に認められた。上位運動神経細胞の伝導路である外側皮質脊髄路や前皮質脊髄路の大径有髄線維が高度に障害されていた。FALS の病理組織像は脊髄前角細胞の変性・脱落・消失に加え、脊髄 Clarke 核と後索の中間根帯も障害される後索型 FALS であった。FALS の 2 家系 5 症例全例とも変異 SOD1 の形態的 hallmark である neuronal LBHI (Lewy body-like hyaline inclusion) を認めた。

2. 免疫組織化学的解析：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、ほとんど全ての正常脊髄前角細胞が染色された。SALS での残存神経細胞における HGF 及び cMet の発現は、発症後 3 年までの SALS 症例の残存神経細胞のごく一部に高度な発現が認められた。注目すべき所見は、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 SALS 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残存神経細胞の数は激減し、時に 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、どちらか一方のみ陽性である残存神経細胞が認められた。発症後 3 年以後の SALS において、目立った所見は HGF-cMet システムの破綻した両者陰性の残存神経細胞数が極めて増加していた像であった。発症後 7 年以後 11 年 5 ヶ月までの症例においては、残存神経細胞自身もわずかしか認めず、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、HGF-cMet システムは破綻していた。しかし、萎縮残存神経細胞のごく一部には、HGF 及び cMet の両者陽性の萎縮残存神経細胞があった。即ち、SALS 脊髄残存前角細胞において、HGF-cMet システムの up-regulate していた脊髄残存前角細胞は、SALS 40 症例の全経過において、少数ではあるが必ず存在していた。

SALS 40 症例全例において脊髄前角細胞消失にともない反応性アストロサイトの出現と gliosis を認めた。特に反応性アストロサイトにおける HGF-cMet システムの発現に関する結果は、HGF においては SALS 40 症例全症例において、いずれの時期においても反応性アストロサイトでの有意な発現は認められなかった。発症後約3年から4年の SALS 症例をピークに、一部の反応性アストロサイトに cMet が高発現していた。cMet 強陽性を示す反応性アストロサイトは HGF 及び cMet の両方の発現量の低下している神経細胞の近傍に集簇する傾向を示した。反応性アストロサイト内 cMet 発現は、残存神経細胞、特に HGF 及び cMet の両方の発現量の減少している残存神経細胞への foot process に最も強く認められた。変異 SOD1 を伴う FALS における、封入体を形成しない脊髄残存前角細胞及び反応性アストロサイトにおける HGF-cMet システムの動態は、SALS の結果と全く同一であった。LBHI 形成神経細胞における HGF-cMet システムの動態に関しては、次の2点に集約出来る。第1点は、封入体である LBHI に HGF と cMet とが internalization を生じ、封入体内に凝集してしまっている。第2点は、HGF と cMet が封入体内に凝集してしまうために、LBHI 形成神経細胞の胞体内の HGF 及び cMet の発現量が減少し、LBHI 形成神経細胞では HGF-cMet システムが破綻していた。

3. Western blot 解析: Western blot では、HGF については、約 69kDa の α 鎖と約 34kDa の β 鎖との二重のバンドが出現した。HGF の発現量をみてみると、発症後2年6ヶ月の症例では、

正常対照に比べ HGF の量がわずかに増加していた。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 では約 140kDa の単一バンドが出現した。発現量をみてみると、cMet も HGF と同様の傾向を示した。即ち、発症後2年6ヶ月 SALS では、正常対照に比べ cMet の量が増加し、発症後11年5ヶ月 SALS では、cMet の発現量は減少していた。

D. 考察

今回の正常脊髄の解析により、ヒトの正常状態においては、脊髄前角細胞は、HGF と cMet の両方を一定のレベル発現し、自分自身による autocrine、あるいは神経細胞間の paracrine によって、正常状態を維持していることが明らかとなった。

SALS に罹患すると、脊髄前角細胞は、原因不明の ALS ストレスにより、最終的には細胞死を生ずる。しかし、本研究の解析により、原因不明の SALS ストレスに対して、脊髄前角細胞は無抵抗に細胞死を受け容れているのではないことが解明した。最も注目すべき所見は、SALS 経過中に脊髄残存前角細胞の一部は、HGF と cMet の両方を高発現し、HGF-cMet システムを up-regulate していた所見が存在していたことである。即ち、SALS 脊髄残存前角細胞において、HGF-cMet システムの up-regulate していた脊髄残存前角細胞は、SALS 40 症例の全経過において、少数ではあるが必ず存在していた。このことは、原因不明の SALS ストレスに対して、SALS 脊髄残存前角細胞の一部は HGF-cMet システムを up-regulate することにより、自らを守って生存する機構の1つとしていたことが判明したのである。一方では、SALS の経過にほぼ比例して、HGF-cMet システムの破綻した HGF 及び cMet 両者陰性の SALS 脊髄残存前角細胞は多数認められた。このような HGF-cMet システムの破綻した SALS 脊髄残存前角細胞は、やがては細胞死に至る

ものと考えられ、SALS の経過と共に脊髄前角細胞が変性・脱落・消失する像が増加する病理組織学的結果と一致していた。

cMet の発現に関しては、残存神経細胞自身の HGF-cMet システムによる回復機構が破綻する時期から、HGF 及び cMet の発現量の少ない残存神経細胞近傍の反応性アストロサイトが cMet を高発現していた。大部分の反応性アストロサイトは、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、SALS におけるアストロサイト内 EAAT2 機能低下がアストロサイトと神経細胞との relationship の障害の一つであることを考慮した場合、アストロサイトの cMet 発現はこの ALS におけるアストロサイトの EAAT2 機能低下を含めた機能障害に対して、HGF をより多く取り込むことにより機能障害を回復したい表れであると考えられる。この cMet 陽性のアストロサイト自身の機能障害回復の免疫組織化学像は、アストロサイトと神経細胞との 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。

変異 SOD1 を伴う FALS における、封入体を形成しない脊髄残存前角細胞及び反応性アストロサイトにおける HGF-cMet システムの動態は、SALS のそれと全く同一であったという結果は、ALS における HGF-cMet システムの動態の普遍性を示した結果と言える。

本研究から、SALS における原因不明の ALS ストレスに対しても、変異 SOD1 を伴う FALS における変異 SOD1 ストレス（毒性）に対しても、脊髄残存前角細胞の一部は HGF-cMet システムを細胞死阻止・生存機構の 1 つとしていたことが解明できたのである。この解明は、HGF-cMet 生存機構に基づき、ALS の脊髄前角細胞に HGF を直接導入することにより、これらストレスに対して、脊髄前角細胞は自らを守って生存し続ける極めて高い可能性があることと本研究から結論づけられた。

E. 結論

ALS ストレスに対して、脊髄残存前角細胞

の一部は HGF-cMet システムを細胞死阻止・生存機構の 1 つとして作用させていたことを解明した。この HGF-cMet 生存機構に基づき、ALS の脊髄残存前角神経細胞に HGF を直接導入することにより、脊髄前角細胞死阻止が可能となることを結論づけられ、本研究が ALS に対する HGF を用いた挑戦的治療法確立の基盤研究の一助となった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato S, Kato M, Abe Y, Matsumura T, Nishino T, Aoki M, Itoyama Y, Asayama K, Awaya A, Hirano A, Ohama E: Redox system expression in the motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS, superoxide dismutase 1 (SOD1)-mutated familial ALS, and SOD1-mutated ALS animal models. *Acta Neuropathol* 2005, 110(2): 101-112.
2. Aoki M, Kato S, Nagai M, Itoyama Y: Development of a rat model of amyotrophic lateral sclerosis expressing a human SOD1 transgene. *Neuropathology* 2005, 25(4): 365-370.
3. Ikeda K, Aoki M, Kawazoe Y, Sakamoto T, Hayashi Y, Ishigaki A, Nagai M, Kamii R, Kato S, Itoyama Y, Watabe K: Motoneuron degeneration after facial nerve avulsion is exacerbated in presymptomatic transgenic rats expressing human mutant Cu/Zn superoxide dismutase. *J Neurosci Res* 2005; 82(1): 63-70.
4. Fukada M, Kato S, Miyoshi M, Yamaguchi K, Imoto T, Watanabe T: Systemic administration of lipopolysaccharide upregulates angiotensin II expression in rat renal tubules: immunohistochemical and ELISA studies. *Peptides* 2005, 26(11): 2215-2221.

2. 学会発表

1. 加藤信介、加藤雅子、青木正志、糸山泰人、阿部靖子、西野武士、朝山光太郎、栗屋昭、平野朝雄、大浜栄作. 筋萎縮性側索硬化症(ALS)における残存運動神経細胞生存機序としてのレドックス機構 upregulation の解明. 第46回日本神経病理学会総会学術研究会(2005、宇都宮).
 2. 加藤信介. 脱髄疾患の病理(含 PML): 第46回日本神経学会教育コース「神経病理学の基礎」第46回日本神経病理学会総会学術研究会(2005、宇都宮).
 3. 加藤信介. SOD1 遺伝子異常を伴う生体系における細胞死のメカニズム: AGE 形成に伴う凝集毒性. 第15回日本メイラード学会(2005、大阪).
 4. 加藤雅子、加藤信介、青木正志、糸山泰人、阿部靖子、西野武士、朝山光太郎、大浜栄作. 変異 SOD1 を伴う家族性筋萎縮性側索硬化症のモデル動物における肝の経時的病理組織像の検討: 肝細胞と脊髄前角細胞の比較. 第46回日本神経病理学会総会学術研究会(2005、宇都宮).
 5. 加藤雅子、加藤信介、堀江 靖. 肝細胞癌における fetal glycoprotein 68 の発現の検討. 第94回日本病理学会総会(2005、横浜).
- H. 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: なし.

抗 HGF 抗体の髄腔内投与による ALS ラット病態進行の促進および

HGF などの神経栄養因子による神経前駆細胞賦活の試み

分担研究者 青木正志 東北大学病院神経内科

研究要旨 肝細胞増殖因子（HGF）が筋萎縮性側索硬化症（ALS）のモデルマウス・ラットの両方で運動ニューロン保護、生存延長効果をもつことは既に報告されている。この HGF が ALS 様病態進行を抑制する重要な生理的因子であるか否かを明らかにするため、抗 HGF 抗体を用いて内因性 HGF の中和を試み、病態悪化の有無を検討した。さらには ALS ラット脊髄における未分化な神経前駆細胞の増殖は、運動ニューロン脱落が進行した発症後期から末期になりはじめて有意なものとなる。このような細胞群を早期から賦活し組織修復に役立てることを目的として、再生誘導因子の 1 つである HGF の髄腔内投与を試みたところ、本モデルラット脊髄の新生細胞増殖の促進が確認された。さらには再生誘導因子 EGF と FGF-2 を同時に髄腔内投与した群では発症後にもかかわらず新生細胞の増加、未分化神経前駆細胞の増殖、グリア前駆細胞の増殖が促進された。将来的に種々の再生誘導因子を組み合わせ髄腔内投与することによって新規治療法開発につながる可能性がある。

分担研究者：青木正志

東北大学病院神経内科助手

研究協力者：割田 仁¹、水野秀紀¹、石垣あや¹、松本有史¹、加藤昌昭¹、船越 洋²、中村敏一²、岡野栄之³、糸山泰人¹

¹東北大学大学院医学系研究科神経内科

²大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生分野

³慶應義塾大学医学部生理学

モデル動物に供給することで運動ニューロン死を抑制し生存期間を延長できることが、(1) 変異 *Cu/Zn SOD* 遺伝子導入マウスと中枢神経系内に HGF を過剰発現する *HGF* 遺伝子導入マウスの交配実験、および (2) 変異 *Cu/Zn SOD* 遺伝子導入トランスジェニック (Tg) ラットに対する髄腔内 HGF 投与実験という二つの方法によって既に示されている。

本研究①では、Tg ラットにおける内因性 HGF の ALS 様病態進行に対する生理的意義を明らかにするため、抗 HGF 抗体を髄腔内投与して中和すると病態が悪化するか否かを行った。

近年までに正常成体脊髄にも神経前駆細胞

A. 研究目的

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) は細胞分裂・形態形成・細胞遊走促進、細胞死抑制、そしてアポトーシス抑制といった多様な作用をもつ生体内物質である。この HGF を外来性に筋萎縮性側索硬化症 (ALS)

が存在し潜在的神経再生能があることが報告されてきた中で、a) 細胞移植 だけでなく b) 内在性神経前駆細胞を活性化することが ALS の新規治療戦略として注目されている。神経前駆細胞の増殖、分化調節、突起伸展、生存維持に関わるさまざまな因子が報告され、損傷、脱髄モデルでは脊髄における *in vivo* の再生誘導実験が試みられているが、ALS のような変性病態における内在性神経前駆細胞の活性化の報告はまだない。

本研究②および③では、ALS の画期的治療法となりうる脊髄の再生医療開発を念頭に、ALS ラットモデル脊髄へ代表的な再生誘導因子である HGF、上皮細胞成長因子 (EGF) および線維芽細胞成長因子 (FGF-2) を髄腔内持続投与して、内在性神経前駆細胞の活性化を試みた。

B. 研究方法

①抗 HGF 抗体の髄腔内投与

東北大学神経内科で確立・系統維持している G93A 変異 *Cu/Zn SOD-Tg* ラットと正常同腹仔ラット腰髄の内因性ラット HGF レベルを酵素免疫測定法で明らかにした。その結果をもとに同 Tg ラットを対象に内因性 HGF が誘導されてくる週齢から 4 週間、皮下に留置した浸透圧ポンプよりウサギポリクローナル抗ラット HGF 特異抗体を 5 μg /体重(g) 髄腔内に持続投与した。コントロールとしては同量の正常ウサギ IgG を投与した (各群 $n=5$)。ラットは注意深く連日観察し発症日 (四肢のいずれかに筋力低下が明らかとなった日)、死亡日 (筋力低下により立ち直り反射が得られなくなった日) を特定した。今回の病理学的検討には、死亡時の腰髄灌流固定凍結切片を用いた。

②HGF 髄腔内投与による内在性神経前駆細胞の賦活の試み

発症直前かつ脊髄運動ニューロン脱落開始直

後の 18 週齢 (pre-symptomatic, Pre 期)、および発症後期にあたる 22 週齢 (symptomatic, Sym 期) の H46R 変異 *Cu/Zn SOD-Tg* ラットに対して、ヒトリコンビナント HGF (総量 100 μg /匹) を 2 週間にわたり浸透圧ポンプ (Alzet model 2002, 流量 0.5 μL /時) によって髄腔内に持続投与した。vehicle としては人工髄液を用いた。HGF 投与群と vehicle 投与群 (各群 $n=4\sim 5$) いずれに対しても HGF 投与期間の後半 1 週間にチミジン類似体 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を 1 日 1 回腹腔内投与 (50 mg/kg 体重) して新生細胞を標識した。2 週間の投与期間終了翌日に脊髄腰膨大部の灌流固定後凍結切片を作成して蛍光免疫組織化学的に解析した。一個体につき少なくとも 5 切片以上の多重切片を得て、一横断切片あたりの BrdU 陽性細胞数を計測、統計学的検討を加えた。

③再生誘導因子 EGF と FGF-2 の髄腔内同時投与による内在性神経前駆細胞の賦活の試み
発症後 (23 週齢) の H46R 変異 *Cu/Zn SOD-Tg* ラットを対象とし、上皮細胞成長因子 (EGF) および線維芽細胞成長因子 (FGF-2) の同時投与群 (EGF+FGF-2 群, $n=5$) と、人工髄液のみを投与する対照群 ($n=5$) に分けた。EGF+FGF-2 群に対してヒトリコンビナント EGF, ヒトリコンビナント FGF-2 各々 6,000 ng を常法にしたがい作成した人工髄液に希釈し、正常ラット血清アルブミン、ヘパリンを各々 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 IU/mL となるように調整して総量 200 μL とした。

上述の 7 日間投与終了翌日に、エーテル深麻酔下のラットより 4%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液による灌流固定および浸漬固定後の凍結切片を作成。腰膨大部脊髄の 12 μm 厚切片において BrdU と各種選択的マーカーとの多重蛍光免疫組織化学を行った。さらに、Tg ラットにおける EGF 受容体 (EGFR)、FGF 受容体 1 型 (FGFR1) の局在、前角細胞脱落

の程度、ユビキチン陽性封入体の存在についても免疫組織化学的に検討した。

(倫理面への配慮)

すべての遺伝子操作は本学 DNA 組換え実験指針に従い、また動物実験は同動物実験指針に従った上で動物愛護面に配慮しかつ利用動物数を極力減らすように努めた。

C. 研究結果

①抗 HGF 抗体の髄腔内投与

Tg ラット腰髄では正常同腹仔に比して内因性 HGF の誘導が発症前 (約 14 週齢) より認められた。

コントロール群に比して抗 HGF 抗体投与群では、より早期に発症する傾向 ($P=0.1843$)、有意に速い進行 ($P=0.0299$, 図)、より早期の死亡が認められた ($P=0.0463$)。

抗 HGF 抗体投与群の死亡時病理学的所見では、脊髓前角ニューロンの著明な脱落と著しいミクログリア、アストロサイト増生を認め、コントロール群と同様であった。

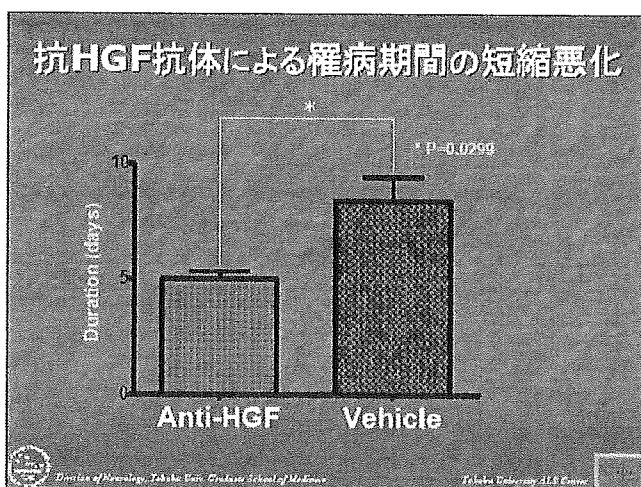


図. 罹病期間は抗 HGF 抗体投与群で有意に短縮悪化していた ($P=0.0299$)。

②HGF 髄腔内投与による内在性神経前駆細胞の賦活の試み

Pre 期と Sym 期の vehicle 投与群だけを比較すると、病期の進行に伴い BrdU 陽性細胞数が増加していた。これに対して、Pre 期の HGF 投与群では vehicle 群に比較して BrdU 陽性細胞数がさらに増加する傾向が認められた (有意差なし)。一方、Sym 期の HGF 投与群では vehicle 群に比較して優位に BrdU 陽性細胞数が増加していた。

③再生誘導因子 EGF と FGF-2 の髄腔内同時投与による内在性神経前駆細胞の賦活の試み

EGF+FGF-2 群と対照群における NeuN (成熟神経細胞マーカー) 陽性面積を前角で比較すると両者に有意差はなかった。

BrdU 陽性の新生細胞は脊髓灰白質および白質において有意に EGF+FGF-2 群で増加しており、実質広くにわたって増殖促進されていた。また、総じて灰白質より白質に分布する新生細胞が多く、この傾向は両群とも同様であった。

より未分化な細胞群として nestin および NG2 (それぞれ未分化神経前駆細胞およびグリア前駆細胞の選択的マーカー) を発現する新生細胞をみると、これも脊髓腹側を中心に EGF+FGF-2 群で有意な増加が認められた。さらに成熟グリア細胞への分化を検討するためアストログリアのマーカー GFAP 陽性の新生細胞を検索すると、これも EGF+FGF-2 群で有意に増加していた。現在、その他の細胞選択的マーカー (希突起膠細胞、神経細胞等) を発現する新生細胞についても検討中である。

一方、EGFR は主として神経細胞の胞体および神経突起に、また FGFR1 は神経細胞の胞体と中心管周囲の上衣層に明らかな陽性像を認め、前角および白質には FGFR1/GFAP 二重陽性細胞を多数確認できた。

D. 考察

本 ALS モデルラットにおいて運動ニューロン脱落とともに誘導されてくる内因性のラット HGF を抗 HGF 抗体の髄腔内投与によって中和すると、病態が悪化することが明らかとなった。すなわち、抗 HGF 抗体投与は ALS 様病態の進行を促進したと考えられた。このことから、HGF が ALS 様病態の進行を遅らせている重要な生理的抑制因子であることが示唆される。

内因性 HGF の意義（作用点）をさらに明らかにするためには、本研究で示された抗 HGF 抗体投与による病態加速メカニズムの解明が有用と考えられる。

鳥取大学の加藤らは、変異 *Cu/Zn SOD* に伴う家族性 ALS だけでなくヒト孤発性 ALS においても剖検脊髄の残存運動ニューロンに HGF とその受容体 *c-Met* の発現を報告しており、ヒト ALS における HGF の重要性を示唆している。

以上より、外来性 HGF の供給は生理的な HGF の病態進行抑制作用を強化するという点でヒト ALS に対する理論的かつ有力な新規治療法になり得ると考えられる。HGF による新規治療法開発の次なる段階としては上述の既報をふまえ、齧歯類よりヒトに近い霊長類における HGF 投与の安全性試験が必要であり、ヒトの前臨床試験に向けて今後の研究進展が期待される。

本来、成体ラット脊髄では生理的条件下においても一定の新生細胞が存在し、おもにグリア細胞新生にあずかっているとされる。我々はこれまでに、ALS ラットモデル脊髄では発症期以前から新生細胞が進行性に増加してグリア細胞新生 (*gliogenesis*) の亢進が認められるとともに、運動ニューロン脱落が顕著となった末期に至っては未分化神経前駆細胞も増殖していることを報告してきた。

本研究では、まず HGF 投与によって病

態下脊髄で増加しつつある新生細胞をさらに増加させることが示された。近年、*in vitro* で HGF が *neurosphere* 形成細胞の増殖、ニューロンへの分化促進といった再生誘導能を示すことが報告されている。本研究により *in vivo* でも、HGF が神経前駆細胞を賦活させる可能性が示された。しかし、HGF は多様な機能をもつサイトカインであることから、神経前駆細胞への直接賦活効果だけでなく、運動ニューロン死抑制効果、*astrocyte* 機能改善効果を介した間接効果もまた想定される。したがって、HGF が増殖促進した細胞群についての解析に加え、HGF 受容体 *c-Met* の発現や前駆細胞以外の細胞種、細胞外環境への効果についても検討を要する。

また、運動ニューロン脱落開始直後 (Pre 期) よりは、より進行期 (Sym 期) に HGF を投与する方が新生細胞増加促進の度合いが大きいことが示された。このことは、運動ニューロン脱落が一定レベル以上に生じた環境の方がより新生細胞の増加を許容しやすいという可能性を示唆し、細胞外環境 (液性因子等) の関与が想定される。

さらには EGF と FGF-2 を同時に髄腔内持続投与することによって発症後の ALS ラットモデル脊髄の新生細胞をさらに増加させられることが示された。中でも未分化神経前駆細胞やグリア前駆細胞のマーカーを発現する新生細胞が有意に増加していたことは、分化誘導しうる細胞の由来 (ソース) を移植によってではなく、活性化した内在性神経前駆細胞からも誘導できる可能性を示唆している。今後、より効果的な内在性神経前駆細胞活性化のために至適投与時期 (病期)、投与量の検討が必要と考えられる。

未分化神経前駆細胞に対する増殖・分化誘導活性が知られる因子の中で、EGF、FGF-2 はもっとも基本的で重要なものとされている。とりわけ FGF-2 には他にも神経細胞保護効果、神経細胞の突起伸展作用など多様な活性も併

せ持つことが知られている。したがって、EGF、FGF-2 が増殖促進した細胞群についての増殖・分化誘導活性だけでなく、運動神経細胞そのものへの効果、細胞外環境 (niche) への効果についても検討課題となりうる。

EGFR、FGFR1 蛋白の局在をみるといずれも神経細胞に陽性像を認めたが、EGF+FGF-2 持続投与群において前角細胞脱落の程度に差がないことから、今回の神経前駆細胞活性化が神経細胞死抑制に伴う二次的な効果である可能性は低く、神経前駆細胞への直接効果が主である可能性が高い。今回 FGFR1 陽性像を認めた中心管上衣層や実質の細胞群の性質をより詳細に明らかにするとともに、本病態下の EGF、FGF-2 作用メカニズムを検討することが重要と考えられる。

本研究で“髄腔内投与”による再生誘導因子の効果を明らかにしたことは、将来的な臨床応用の観点からまた重要と考えられる。すなわち、脳血液関門を通過しにくい因子を効率よく、全身性副作用を軽減して中枢神経広汎に投与したいといった系統的神経変性疾患の場合、有用な投与方法であることをあらためて示したと考えられる。

E. 結論

HGF は ALS 様病態の進行抑制因子として重要な生理的意義をもっている可能性が示唆された。外来性 HGF の供給は ALS の新しい治療法を開発する上で理論的かつ有力な戦略として期待できる。また HGF の髄腔内投与により脊髄の新生細胞増殖の促進が確認された。さらには EGF・FGF-2 の複合投与によって、発症後の病態下においても未分化神経前駆細胞やグリア前駆細胞をも含めた神経前駆細胞の増殖促進が可能であることが示唆された。今後、他の再生誘導因子や分化調節因子との複合／漸次投与、さらには再生阻害因子の抑制、治療的遺伝子導入などとの組み合わせを検討することで、内在性神経前駆細胞を利用

した新規治療法開発へとつながることが期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Toyama Y, Sobue G, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, Okano H: Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. *J Neurosci Res* 83: 119-133, 2006
- 2) Aoki M, Kato S, Nagai M, Itoyama Y: Development of a rat model of amyotrophic lateral sclerosis expressing a human SOD1 transgene. *Neuropathology* 25: 365-370, 2005
- 3) Ikeda K, Aoki M, Kawazoe Y, Sakamoto T, Hayashi Y, Ishigaki A, Nagai M, Kamii R, Kato S, Itoyama Y, Watabe K: Motoneuron degeneration after facial nerve avulsion is exacerbated in presymptomatic transgenic rats expressing human mutant Cu/Zn superoxide dismutase. *J Neurosci Res* 82: 63-70, 2005
- 4) Kato S, Kato M, Abe Y, Matsumura T, Nishino T, Aoki M, Itoyama Y, Asayama K, Awaya A, Hirano A, Ohama E: Redox system expression in the motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS, superoxide dismutase 1 (SOD1)-mutated familial ALS, and SOD1-mutated ALS animal models. *Acta Neuropathol* 110: 101-112, 2005
- 5) Chang-Hong R, Wada M, Koyama S, Kimura H, Arawaka S, Kawanami T, Kurita K, Kadoya T, Aoki M, Itoyama Y, Kato T: Neuroprotective effect of oxidized galectin-1 in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 194: 203-211, 2005

6) Suzuki N, Aoki M, Hinuma Y, Takahashi T, Onodera Y, Ishigaki A, Kato M, Warita H, Tateyama M, Itoyama Y: Expression profiling with progression of dystrophic change in dysferlin-deficient mice (SJL). *Neurosci Res* 52: 47-60, 2005

2. 学会発表

割田 仁 ほか, 外来性再生誘導因子投与による ALS モデルラット脊髄神経前駆細胞賦活の試み, 第 46 回日本神経学会総会 2005.5 鹿児島

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許登録

ラットを用いた ALS モデル (出願済)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

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:頁	出版年
Fujiwara N, Miyamoto Y, Ogasahara K, Takahashi M, Ikegami T, Takamiya R, Suzuki K. and Taniguchi N	Different Immunoreactivity against Monoclonal Antibodies between Wild-type and Mutant Copper/Zinc Superoxide Dismutase Linked to Amyotrophic Lateral Sclerosis.	J. Biol. Chem.	280:5061-5070	2005
Takamiya R, Takahashi M, Park Y.S. Tawara Y, Fujiwara N. Miyamoto Y, Gu J, Suzuki K and Taniguchi N	Overexpression of Mutated Cu,Zn-SOD in Neuroblastoma Cells Results in Cytoskeletal Change.	Am. J. Physiol. Cell Physiol.	288:C253-C259	2005
Isono K, Nemoto K, Li Y, Takada Y, Suzuki R, Katsuki M, Nakagawara A, Koseki H	Overlapping roles for homeodomain-interacting protein kinases Hipk1 and Hipk2 in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals.	Moll. Cell. Biol.		in press
Inamori K, Gu J, Ohira M, Kawasaki A, Nakamura Y, Nakagawa T, Kondo A, Miyoshi E, Nakagawara A, Taniguchi N	High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in favorable neuroblastomas: Involvement of its effect on apoptosis.	FEBS Lett.		in press
Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T, Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H	Aberrant methylation of RASGRF2 and RASSF1A in human non-small cell lung cancer.	Oncol. Rep.		in press
Machida T, Fujita T, Ooo M L, Ohira M, Isogai E, Mihara M, Hirato J, Tomotsune D, Hirata T, Fujimori M, Adachi W, Nakagawara A.	Decreased expression of pro-apoptotic BMCC1, a novel gene with the BNIP2 and Cdc42GAP homology (BCH) domain, is associated with poor prognosis in human neuroblastomas.	Oncogene		in press
Kaneko Y, Kobayashi II, Watanabe N, Tomioka N, Nakagawara A	Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan.	Pediatr. Blood Cancer		in press

Hosoda M, Ozaki T, Miyazaki K, Hayashi S, Furuya K, Watanabe K, Nakagawa T, Hanamoto T, Todo S, Nakagawara A	UFD2a mediates the proteasomal turnover of p73 without promoting p73 ubiquitination.	Oncogene		in press
Koshikawa N, Maejima C, Miyazaki K, Nakagawara A, Takenaga K.	Hypoxia selects for high-metastatic Lewis lung carcinoma cells overexpressing Mcl-1 and exhibiting reduced apoptotic potential in solid tumors.	Oncogene		in press
Ozaki T, Nakagawara A.	p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world.	Cancer Sci.	96:729-737	2005
Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y, Hanada R, Nakagawara A, Kaneko Y	Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma.	Cancer Sci.	96:653-660	2005
Aoyama M, Ozaki T, Inuzuka H, Tomotsune D, Hirato J, Okamoto Y, Tokita H, Ohira M, Nakagawara A	LMO3 interacts with neuronal transcription factor, HEN2, and acts as an oncogene in neuroblastoma.	Cancer Res.	65:4587-4597	2005
Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Nakagawa A, Sakai R.	Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma.	Am J Pathol.	167:213-222	2005
Gotoh T, Hosoi H, Jehara T, Kuwahara Y, Ozone S, Tsuchiya K, Kuroda H, Ohira M, Nakagawara A, Sugimoto T.	Prediction of MYCN amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative PCR.	J. Clin. Oncol.	23: 5205-5210	2005
Hanamoto T, Ozaki T, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Nakanishi M, Yamamoto H, Kikuchi H, Todo S, Nakagawara A	Identification of protein kinase A catalytic subunit beta as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function.	J. Biol. Chem.	280:16665-16675	2005

Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Isogai E, Kaneko S, Nakagawa A, Hirata T, Kubo H, Goto T, Yamada S, Yoshida Y, Fuchioka M, Ishii S, Nakagawara A	Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate-risk neuroblastomas.	Cancer Cell	7:337-350	2005
Ozaki T, Hosoda M, Miyazaki K, Hayashi S, Watanabe K, Nakagawa T, Nakagawara A	Functional implication of p73 protein stability in neuronal cell survival and death.	Cancer Lett.	228:29-35	2005
Lin L, Ozaki T, Takada Y, Kageyama H, Nakamura Y, Hata A, Zhang J-H, Simonds W, Nakagawara A, Koseki H	Topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a co-activator of p53 in growth suppression induced by DNA damage.	Oncogene	24:3385-3396	2005
Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, Nakagawara A.	A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas.	Cancer Lett.	228:5-11	2005
Abe M, Ohira M, Kaneda A, Yagi Y, Yamamoto S, Kitano Y, Takato T, Nakagawara A, Ushijima T.	CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas.	Cancer Res.	65:828-834	2005
Kramer S, Ozaki T, Miyazaki K, Kato C, Hanamoto T, Nakagawara A.	Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells.	Oncogene	24:938-944	2005
Zhao MZ, Nonoguchi N, Ikeda N, Watanabe T, Furutama D, Miyazawa D, Funakoshi H, Kajimoto Y, Nakamura T, Dezawa M, Shibata MA, Otsuki Y, Coffin RS, Liu WD, Kuroiwa T, Miyatake SI.	Novel therapeutic strategy for stroke in rats by bone marrow stromal cells and ex vivo HGF gene transfer with HSV-1 vector.	J Cereb Blood Flow Metab	18:1-13	2006
Ishihara N, Takagi N, Niimura M, Takagi K, Nakano M, Tanonaka K, Funakoshi H, Matsumoto K, Nakamura T, Takeo S.	Inhibition of apoptosis-inducing factor translocation is involved in protective effects of hepatocyte growth factor against excitotoxic cell death in cultured hippocampal neurons.	J Neurochem.	319(4):1277-1286	2005

Isogawa K, Akiyoshi J, Kodama K, Matsushita H, Tsutsumi T, Funakoshi H, Nakamura T.	Anxiolytic effect of hepatocyte growth factor infused into rat brain.	Neuropsychobiology	5(1):34-38	2005
Tanaka S, Tanaka J, Kawahara E, Funakoshi H, Nakamura T, Tachino K	Expression of Hepatocyte Growth Factor in Rat Skeletal Muscle.	J Phys Ther Sci.	17:109-113	2005
Chiyonobu T, Sasaki J, Nagai Y, Takeda S, Funakoshi H, Nakamura T, Sugimoto T, Toda T	Effects of fukutin deficiency in the developing mouse brain.	Neuromuscul Disord	15(6):416-426	2005
Kato S, Kato M, Abe Y, Matsumura T, Nishino T, Aoki M, Itoyama Y, Asayama K, Awaya A, Hirano A, Ohama E	Redox system expression in the motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS, superoxide dismutase 1 (SOD1)-mutated familial ALS, and SOD1-mutated ALS animal models.	Acta Neuropathol	110(2):101-112	2005
Fukada M, Kato S, Miyoshi M, Yamaguchi K, Imoto T, Watanabe T	Systemic administration of lipopolysaccharide upregulates angiotensin II expression in rat renal tubules: immunohistochemical and ELISA studies.	Peptides	26(11):2215-2221	2005
Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Toyama Y, Sobue G, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, Okano H	Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats	J Neurosci Res	83: 119-133	2006
Aoki M, Kato S, Nagai M, Itoyama Y	Development of a rat model of amyotrophic lateral sclerosis expressing a human SOD1 transgene	Neuropathology	25: 365-370	2005
Ikeda K, Aoki M, Kawazoe Y, Sakamoto T, Hayashi Y, Ishigaki A, Nagai M, Kamii R, Kato S, Itoyama Y, Watabe K	Motoneuron degeneration after facial nerve avulsion is exacerbated in presymptomatic transgenic rats expressing human mutant Cu/Zn superoxide dismutase	J Neurosci Res	82: 63-70	2005

<p>Chang-Hong R, Wada M, Koyama S, Kimura H, Arawaka S, Kawanami T, Kurita K, Kadoya T, Aoki M, Itoyama Y, Kato T</p> <p>Suzuki N, Aoki M, Hinuma Y, Takahashi T, Onodera Y, Ishigaki A, Kato M, Warita H, Tateyama M, Itoyama Y</p>	<p>Neuroprotective effect of oxidized galectin-1 in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis</p> <p>Expression profiling with progression of dystrophic change in dysferlin-deficient mice (SJL)</p>	<p>Exp Neurol</p> <p>Neurosci Res</p>	<p>194: 203-211</p> <p>52: 47-60</p>	<p>2005</p> <p>2005</p>
--	---	---------------------------------------	--------------------------------------	-------------------------

書籍

著者	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	巻：頁	出版年
Nakagawara A.	Chapter 5. Molecular and developmental biology of neuroblastoma.	S. Cohn & N-K. Cheung	Neuroblastoma	Springer-Verlag, Heidelberg	41-53	2005
大谷若菜、船越中村敏一 洋	肝細胞増殖因子(HGF)	中川勝文	日本臨床	日本臨床社	63:116-122	2005