

図8 ラットPC12細胞(付着)穿孔例
SP350デジタルカメラで撮影 対物レンズ10倍

細胞膜穿孔処理直後の写真。上段は透過照明写真、下段は蛍光写真
膜穿孔処理時の光源は蛍光顕微鏡の100W水銀ランプ、WUフィルタ(広域紫外励起用)を通し、100%光量で照射。
穿孔体による加圧 70g/cm²一回、140g/cm²一回の2回

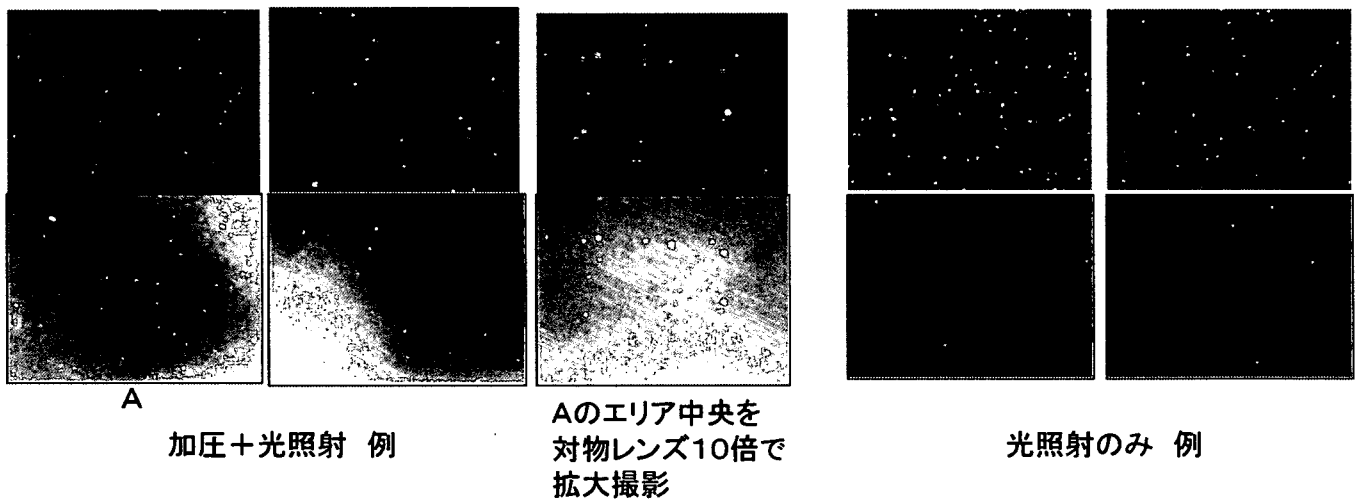


図9 マウス単核球(浮遊)穿孔例
QICAM-C冷却CCDカメラ(モノクロ高感度)で撮影 対物レンズ4倍

細胞膜穿孔処理直後の写真。上段は透過照明写真、下段赤枠は蛍光写真
膜穿孔処理時の光源は蛍光顕微鏡の100W水銀ランプ、NUフィルタ(狭域紫外励起用)を通し、100%光量で照射。照射時間は0,20,40,80,160秒で実施。
穿孔体による加圧 140/cm²一回

分担研究報告書

ES 細胞由来神経幹細胞移植における細胞内因性・外因性必要条件の検討

分担研究者

東北大学先進医工学研究機構 客員准教授

加藤 英政

研究要旨

ES 細胞などの分化多能性を保持した細胞が、未来医療に貢献する日はそう遠いものではなく、さらに iPS 細胞発見を契機に、今後はこの動きがますます加速すると考えて我々は研究を推進してきた。これら未分化細胞には、内包された性質として、常に安全面の不安が隠れているが、未来の再生医療で要求される細胞の種類をすべて産生可能な細胞は、これら未分化細胞以外には存在しないと考えている。このような背景を基に、今回我々は、マウス ES 細胞の高効率神経分化誘導系を用い、脳梗塞モデルマウスに対する治療効果発揮のためにクリアすべき案件、すなわち細胞の安全性、生着率、分化効率などを調べる目的で、1) ES 細胞分化誘導系における細胞内因性因子に関する検討（＝安全性、分化効率）および、2) 移植先での ES 細胞由来神経幹細胞の挙動の 2 点について検討を加え、奇形腫形成抑制、分化効率の向上などに関する重要な知見を得た。

A. 研究目的

慢性に移行する脳梗塞治療には、内因性の新生血管網形成促進に加えて、体外由来の神経系細胞・組織を移植することが有効であろうと考えている。そのため、ここでは、昨今神経系細胞への分化誘導プロトコールが多く示されているマウス ES 細胞由来神経分化誘導を施した神経幹細胞を創出し、これらをモデルマウスに移植し、これらの生着率・分化率などを指標に解析を施し、本試行の妥当性と問題点をクリアにしていくことを本年度の目的とした。

ES 細胞はその本質としてほぼすべての種類の細胞に分化可能な「万能細胞」であり、精密な制御を行わないとどんな細胞が出現するのか予想がつかない。とくに、これから派生する奇形腫（テラトーマ）は、その臨床応用を考える上で必ず考慮しなければならない「難問」である。現在、様々な方法で分化多能性を有する細胞が創出されているが、この問題はこれら細胞すべてに当てはまる共通の問題である。

ES 細胞由来細胞からのテラトーマ形成には、①細胞内因性および②細胞外因性 (=移植先細胞外環境) の2つの因子が関与することが想像される。①に関しては、ES 細胞のそもそもの分化多能性を完全に消去しきれていない場合があげられる。つまり、例え1個の細胞でも、元々増殖能の極めて高いES細胞の性質を残した細胞が培養皿に残っていると、それが移植した先でさらに増殖し、ランダムな分化を経てテラトーマを形成する可能性が残る場合である。これに対して②は、一見培養皿の中では完全に目的細胞への変換が進んでいるように見えても、移植した先の環境 (例: 血清成分への暴露) で再度細胞の増殖性が獲得され、腫瘍形成がおこることが懸念される。本年度の研究では、この2つの側面から、ES 細胞由来神経幹細胞移植における基礎的な生物学的データの取得を行った。

B. 研究方法

C. 研究結果

① 細胞内因性必要条件の割り出し

ES 細胞から神経系細胞を誘導する方法に関しては、大筋で加藤らが独自に開発した分化プロトコールに準じた (図1; 参照: I. Embryonic stem cell derived neural progenitors display temporal restriction to neural patterning. Bouhon IA[§], Joannides A[§], Kato H[§], *Chandran S and *Allen ND. *Stem Cells*. 24:1908-1913. 2006 (§貢献度同等) II. Neural differentiation of mouse embryonic stem cells in chemically defined medium. Bouhon IA, Kato H, Chandran S, *Allen ND. *Brain Res Bull*. 68(1-2):62-75. 2005 III. ES 細胞の神経系細胞への分化誘導法 *加藤 英政、伊藤 亜佐子 バイオテクノロジージャーナル (羊土社) Vol.5 No.5 556-559 2005年)。

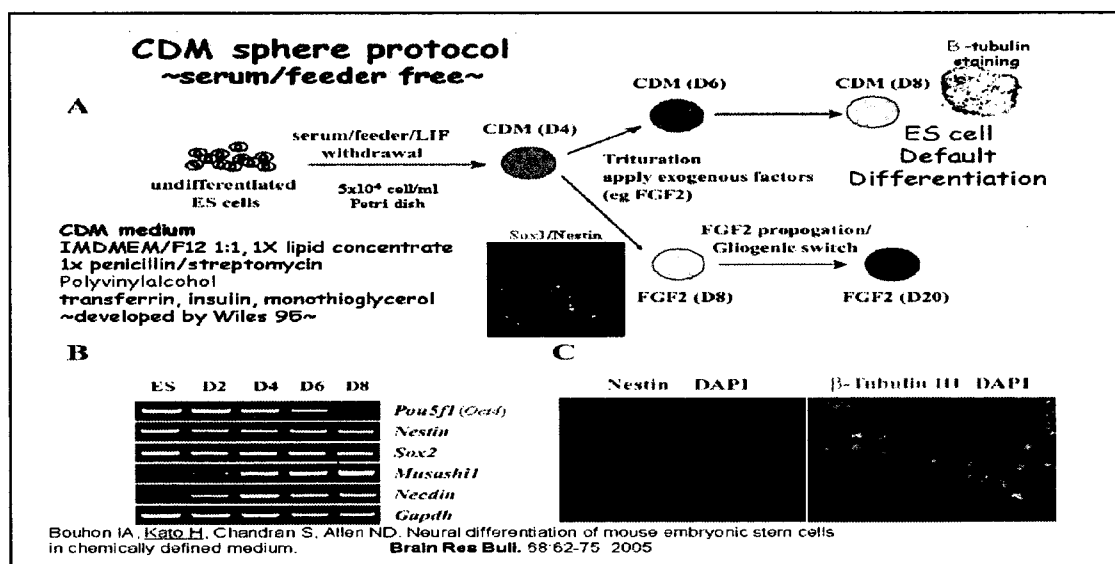


図1 神経系へのデフォルト分化系を用いたES細胞からの神経系細胞への分化誘導

本誘導法の特徴は、細胞の発生分化に中性的な培地（図中 A の CDM 培地）を用い、フィーダー細胞なしの状態、デフォルト神経分化を介して、臨床価値の高い前脳様神経細胞が誘導できる点である。しかも、これらの神経前駆体細胞は、神経発生学で知られるパターン形成の諸原理を適応することによって、体系的に脳のほとんどの部位にも対応する細胞に分化誘導し分けることが可能であることを示した。C:この方法を用いると、分化誘導約 8 日間で、神経幹細胞を 90%以上 (Nestin 陽性率)、またさらなる分化成熟をおこなうとほぼ純粋な形で神経細胞 (β tubulin 陽性率) が取得できる。

本研究において、このような純粋な神経細胞を移植することを考えた。しかし、図 1B で見受けられるように、本プロトコールにおいては、ES 細胞の未分化マーカーである Pou5f1/Oct4 が完全には消え去っておらず、分化しきっていない未分化な細胞の存在が完全には否定できなかった。

そこで今回の研究では、同時に臨床応用および実験の再現性向上を鑑みて、ES 細胞を無血清培地で培養することで、その後の問題点の解消を試みた。

本着想に行き着いた経緯として、将来の再生医療を鑑みて、マウス ES 細胞を無血清培地にて培養し始めたことがあげられる。これによって神経系細胞への分化誘導率が格段に向上した。具体的には、図 2 で模式的に示すように、フィーダー細胞 (MEF) 上で培養維持している状態から、無フィーダー状態に至るまでの「適応培養」を施す。この時、そのまま血清培地 (FBS) にて MEF を希釈して行くものと (No1)、徐々に無血清培地 (Culti) に適応させながら MEF を希釈する方法 (No2) の 2 群に分けて施行した。神経分化誘導 (ND) に供する細胞は、MEF が十分に除かれかつ、No2 シリーズが完全に無血清状態になった継代数 5~10 のものである。この際、各継代における ES 細胞の品質評価を目的に、Nanog や Oct4 などの未分化マーカーを指標に FACS 解析を加える。興味深いことに、それぞれのシリーズ間で、これら FACS プロファイルには大差がない。いわゆる「未分化マーカー」から判断すれば、血清培養でも無血清培養でも、これら ES 細胞は定義上、未分化性を保持していることになる。しかし、これらから派生した神経系細胞を別々に観察すると、血清培養から誘導した細胞からは神経細胞 (ニューロン) が認められるのに対して、その後派生してくるはずのグリア細胞は認められなかった。このように、本系においては、ES 細胞の初期状態 (=未分化状態) が細胞に記憶され (=おそらくエピジェネティックな機構による)、その後の神経系細胞の運命決定に影響を与えていることが示唆された。

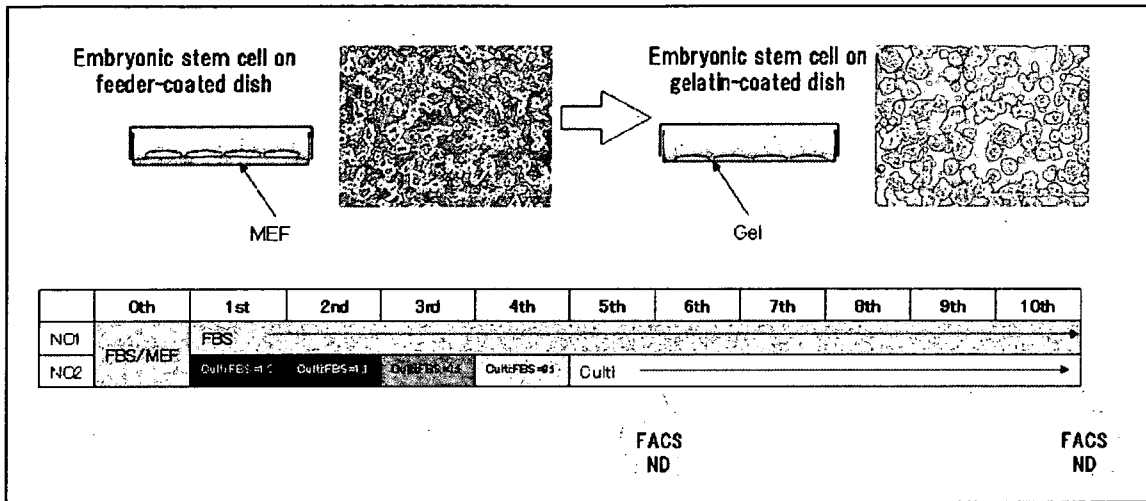


図2 ES細胞の血清・無血清培養の対比

次にこのように別個に増殖させたES細胞に対して、前述の神経分化誘導プロトコールを施し、その結果を様々な分化状態を評価するマーカーを用いて発現解析を行なった(図3)。

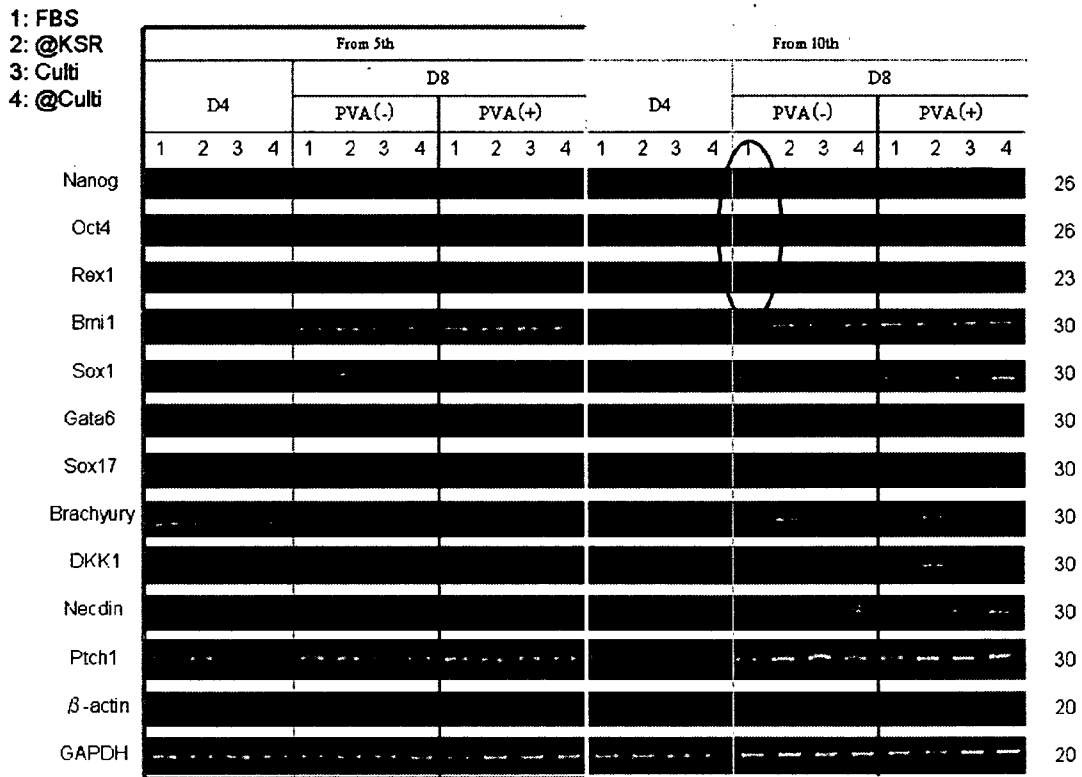


図3 様々な培養条件下のES細胞から分化誘導させた神経系細胞の発現解析

大きな図なので、重点的にポイントを絞って見てゆきたい。

図2との対応では、まず最上段にある「5th」「10th」はそれぞれES細胞の状態で何回継代したかを示している。ここでは基本的に同様な結果が得られているため、右側だけに着目して頂きたい。また次の欄に、「D4」「D8」に関しては、分化誘導した日数を示しており、今回はD8における結果を中心に解説する。

さらに「PVA(-)」「PVA(+）」とあるのは、以前に報告した分化誘導用の培地に含まれていた牛血清アルブミンに置換する形で用いたポリビニルアルコール(PVA)を分化誘導4日目以降加えたのか否かを示している。

またこの表にある1～4の数字は、図2で言うところの培養条件を示す「No1」「No2」(にそれぞれ1と4が)に対応していることを示している。よって、基本的には1と4の列を比較して頂きたい。

さて、まず注目したいのが、どの条件でスタートしても、神経系への分化の度合いをしめすマーカー(Sox1やNecdin)に大差は無い点である。換言すれば、いずれの方法でES細胞を培養維持しようと、出来てくる神経細胞の割合にはほとんど差は認められない。

さらに楕円で示した部分に着目頂きたい。これは、8日間の分化誘導を施した後の「残存する」未分化性細胞の存在を確認するデータである。これによると、1の条件(血清培養)で維持したES細胞からは、本条件ではこれら未分化性マーカーが抜けきっていないのが認められる。これは、前述の図1ですでに述べたことと一致する。しかし、血清を含まない条件で維持したES細胞から、全く同一の分化誘導プロトコールを施すと、これらのマーカーは検出感度以下となっている(2-4の該当するPCR結果)。これは分化誘導前のES細胞の初期状態が、その後の分化に影響することを示している。

もう1点改良点としてあげたいのが、分化誘導の途中からPVAを抜いた方が、分化が良くなる点である。特にNanogを指標に比較すると、その差異が顕著であった。

まとめると、移植までの細胞加工の工程においては、

- 1) ES細胞を無血清で培養し、
- 2) 我々の開発したCDM分化誘導を施し、
- 3) 分化誘導4日目からPVAを排除し、
- 4) 全行程8日目まで分化させる

ことによって、極力未分化な細胞を残さない神経幹細胞誘導培養が可能となることが示された。

② 細胞外因性必要条件の割り出し

ここまでの実験により、ほぼ移植する細胞側の要件は定まったように考えて

いたが、実際に移植する際には、分化誘導の日数、移植組織片のサイズなど更に自由度が存在する。ここで、8日間の分化誘導期間は、一応、未分化細胞が消失する最低限の日数を目安としている。しかし、ここで8日目に誘導された細胞塊を解析してみたところ、様々な分化成熟段階を示す細胞が混在していることが明らかになった(図1)。脳の神経細胞移植の前例としては、パーキンソン病に対するドーパミン作動性神経細胞移植の報告が多数存在するが、どの成熟段階の神経細胞を移植するのが最適であるのかなどを示唆する結果には統一性がない。

そこで最初に、様々な培養ルートにて作成したES細胞由来神経幹細胞を別々にヌードマウスの皮下に注射し、そのテラトーマ形成能を評価した。

当初の思惑では、培養環境下において、残存する未分化細胞が少ない培養法の方が、より安全な(=テラトーマ形成能が低い)ものだとの予想を立てており、これらを比較検討する目的で、

- a. 血清培養したES細胞由来の分化誘導8日間の細胞塊移植群
- b. 無血清培養したES細胞由来の分化誘導8日間の細胞塊移植群
- c. 無血清培養したES細胞由来の分化誘導10日間の細胞塊移植群

を別々にヌードマウスの腹部皮下に移植し、臨床的状況を鑑みて、長期間(6週間後に)観察を行った(図4)。

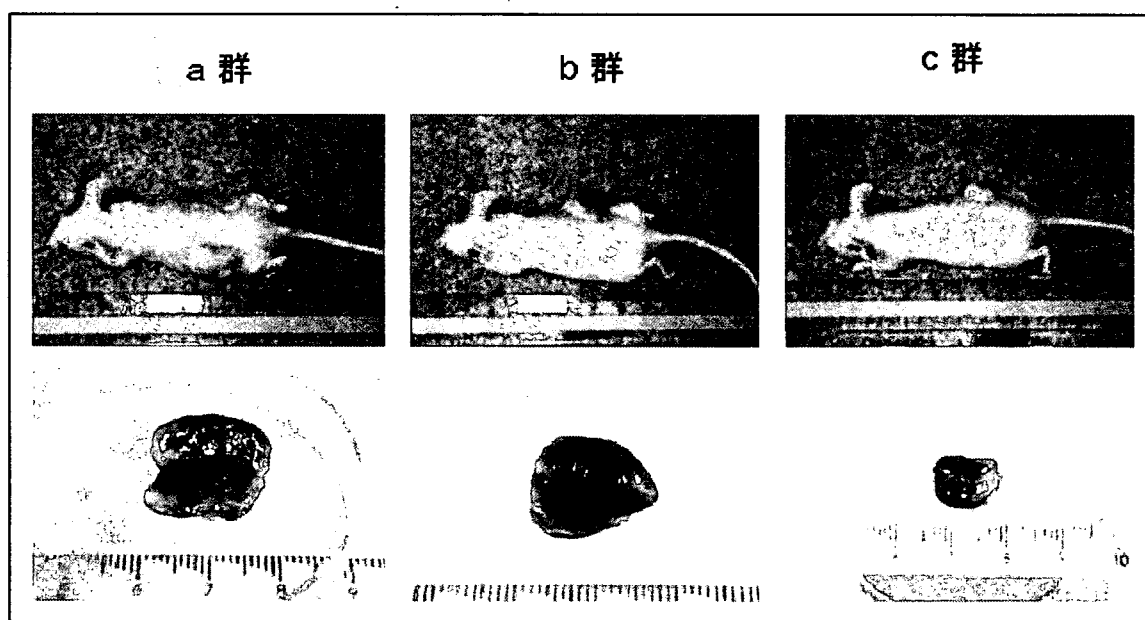


図4 ES細胞由来神経幹細胞移植後に見られたテラトーマ(代表例)

a群: 血清培養したES細胞由来の分化誘導8日間の細胞塊移植群

b群: 無血清培養したES細胞由来の分化誘導8日間の細胞塊移植群

c群: 無血清培養したES細胞由来の分化誘導10日間の細胞塊移植群

・・・各群とも、移植後6週間では、血管が豊富なテラトーマ形成を示した。

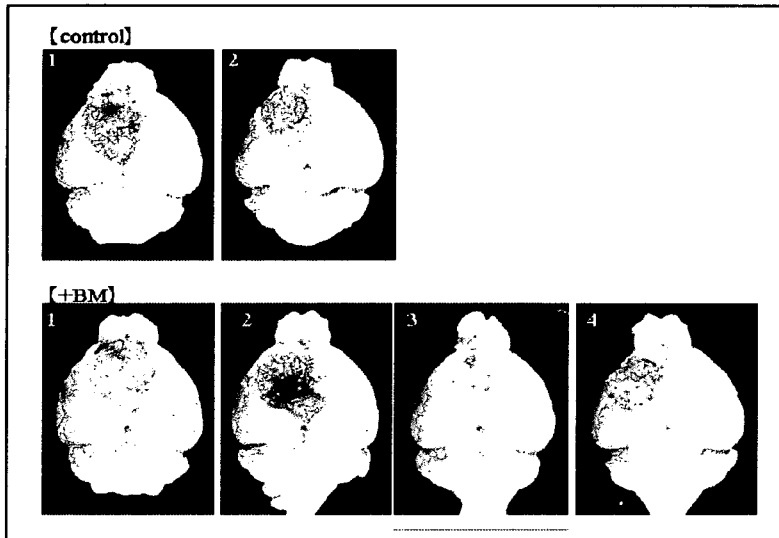
移植前には、図3で示すほどの差異があったものの、図4で対応するa群とb群を比較しても明らかなように、その差異は無くなっている。c群に関しては、本例ではいささか小さめではあったが、これと平行して行った他の2セットの実験では、この10日誘導群の傾向は必ずしも一定でなかった。

さらには、これと前後して、共同研究者の松山らによって開発された脳卒中モ

デルマウスに、図4でいうところのb,c群で用意した細胞塊を梗塞巣近辺に定位的に移植した(図5)。

図5 脳梗塞モデルマウス病変部へのES細胞由来神経幹細胞移植の結果

いずれも脳梗塞4日目に、脳梗塞周囲の生き残っている脳組織に神経幹細胞を移植した。+BM群には、血管床を形成させている。



残念ながら、ここでも、著明なテラトーマ形成をほぼ全群で認めた。

形成された腫瘍の辺縁は比較的整であり、良性腫瘍であると思われたが、さらに詳しく解析するために、組織切片を作成し、顕微鏡観察を行った(図6)。

図6 梗塞モデルマウスに形成された腫瘍の組織像

腫瘍の中は一様でなく、テラトーマの特徴をよく現していた。ただ、腫瘍の辺縁は整であり、良性腫瘍を思わせる。

ここで興味深かった点は、移植先の脳組織内ではなく、おそらく注射針を抜く際に漏れ出たと考えられる髄膜外に腫瘍が形成されている点である。このように、ES細胞由来の細胞も、移植先の外環境によってその生着やその後の増殖が異なる点が明らかになった。また同時に、移植前の細胞塊の「品質」評価に

関しては、いわゆる未分化性を示すマーカーを見た場合、例え定量的には優位に差異が認められていても、最終的にはその差異が移植後には反映されない事実を示してしまったと考える。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては実験に供する動物の数を最小限にとどめると共に、外科的手術や細胞採取など際して実験動物に苦痛を与えないなど、動物実験指針を遵守し研究を行っている。

D. 考察

ES細胞を使っている以上、必ず「テラトーマは大丈夫か?」と聞かれる。我々は、このような批判に答えるべく、分化誘導後の未分化細胞の残留、つまり細胞内因性の危険性を最小限に抑える工夫を施し、そのインパクトをはかるべく実験を立案し施行した。現に、通常の解析方法では、移植前の細胞には未分化細胞が検出できないまでに、この課題をクリアしたと考えていた。しかし、現にテラトーマは本研究においても再現性良く形成された。

ただ我々は、この方針自体は誤りではなかったと考えている。実際、文献をくまなく探すと、「正直に」記述してあるものでは、必ずと言ってよいほどテラトーマを経験した旨が記載されている。そのほとんどが、ES細胞を牛胎仔血清入りの培地で培養している。そこで、今回の我々の差別化ポイントでもある「無血清培養」にその改良点を求めた。当然、分化誘導「後」に、未分化細胞が残留しているのは問題点が多い。このような細胞を移植してしまえば、その後の制御が効くはずがないからである。これは、移植先の環境には、ほとんどの場合、未分化細胞を目的細胞に誘導する因子が局所に存在していないことに起因する。そもそも「目的」が何であるか、移植された先の環境が知る由も無い訳である。

我々は、この神経分化誘導プロトコールに関しては、計100回以上試みており、そのほとんどにおいて各段階のサンプルを解析して、このような未分化細胞の残留が極めて低いことを確認している。しかしながら、今回の結果の誘因が「たった1個の細胞が、移植した $10^6\sim 10^7$ 個に混入していた可能性」であることは否定のしようがない。単純に我々にはそれだけの解析力が無いのである。このことは、ES細胞を始めとした分化多能性をもつ細胞を臨床応用にすることを考えた場合、必ず克服しなければならない技術課題でもありと考えさせられる。来年度以降の課題としたい。

ただ、むしろ考えなければならない可能性は、細胞外因性環境の影響である。

分化誘導の効率を安定させようとする、血清を用いたプロトコールは使えない。したがって、今回の我々の方法のように、なるべく化学的に組成が安定

した製剤を用いて、分化誘導過程を行うことになる。ただし、これらは最終的には、患者の体内、すなわち血清成分に暴露されるのは必然である。わかりやすく言えば、「培養皿の中だけで通用する」状態をみただけでは、臨床上当然要求されてくる「長期間にわたって生体内で安全でかつ有益な機能回復」を担保できないということであろうか。

来年度は頻発するテラトーマに対処するため、長期間細胞分裂阻害効果を有する薬剤であるマイトマイシン C を用いた処理などを組み合わせるとともに、特に細胞外環境としてのスカフォールドなどに、このような細胞増殖抑制作用などを持たせる手法を併用したいと考えている。

E. 結論

ES 細胞を用いた再生医療実現ほど「bench to clinic」の障壁が高いものはないだろうと考えている。本邦では、iPS 細胞発見を機に、分化多能性細胞の臨床応用への機運が高まってきた。しかし前述の通り、これらの細胞は「万能性 vs 分化制御の必要性」という「諸刃の刃」的構造を必ず内包する。したがって、今後は、我々がこの研究で直面した問題点が、ますます脚光を浴び、その打破が中心的課題となることと考えている。本研究では、引き続きこれらの問題点を正面からとらえ、解決の道を探りたい。

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

特願 2006-314709

審査請求期限：平成 21 年 11 月 24 日

発明の名称：オリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト哺乳動物

発明者：加藤 英政、伊藤 拓哉

出願人：国立大学法人東北大学

東北大学発明整理番号：P20060213（識別番号 504157024）

出願日：2006. 11. 21

掲載論文一覧表

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号 ページ	出版年
Uno H, <u>Taguchi A</u> , Oe H, Nagano K, Yamada N, Moriwaki H, Naritomi H.	Relationship between Detectability of Ischemic Lesions by Diffusion-Weighted Imaging and Embolic Sources in Transient Ischemic Attacks.	<i>Eur Neurol</i>	59 38-43	2008
Yoshihara T, <u>Taguchi A</u> , Matsuyama T, Shimizu Y, Kikuchi- <u>taura2 A</u> , Soma T, Stern. D.M, Yoshikawa H, Kasahara Y, Moriwaki H, Nagatsuka K, Naritomi H.	Increase in Circulating CD34-Positive Cells in Patients with Angiographic Evidence of Moyamoya-like Vessels.	<i>J Cereb Blood Flow Metab</i> in press.		2007
Okada S, Makino H, Nagumo A, Sugisawa T, Fujimoto M, Kishimoto I, Miyamoto Y, Kikuchi-Taura2 A, Soma T, <u>Taguchi A</u> , Yoshimasa Y.	Circulating CD34-positive cell number is associated with brain natriuretic peptide level in type 2 diabetes patients.	<i>Diabetes Care</i> in press.	59 38-43	2007
<u>Taguchi A</u> , Matsuyama T, Nakagomi T, Shimizu Y, Fukunaga R, Tatsumi Y, Yoshikawa H, Kikuchi-Taura A, Soma T, Moriwaki H, Nagatsuka K, Stern D.M, Naritomi H.	Circulating CD34-positive cells provide a marker of vascular risk associated with cognitive impairment.	<i>J Cereb Blood Flow Metab</i>		2007
Yoshihara T, Ohta M, Itokazu Y, Matsumoto N, Dezawa M, Suzuki Y, <u>Taguchi A</u> , Watanabe Y, Adachi Y, Ikehara S, Sugimoto H, Ide C.	Neuroprotective effect of bone marrow-derived mononuclear cells promoting functional recovery from spinal cord injury.	<i>J Neurotrauma</i>	24 1026-36	2007
<u>Taguchi A</u> , Wen Z, Myojin K, Yoshihara T, Nakagomi T, Nakayama D, Tanaka H, Soma T, Stern D.M, Naritomi H, Matsuyama T.	Granulocyte colony-stimulating factor has a negative effect on stroke outcome in a murine model.	<i>Eur J Neurosci</i>	26 126-33	2007
Myojin K, <u>Taguchi A</u> , Umetani K, Fukushima K, Nishiura N, Matsuyama T, Kimura H, Stern D, Imai Y, Mori H.	Visualization of intracerebral arteries by synchrotron radiation microangiography.	<i>AJNR Am J Neuroradiol</i>	28 953-7	2007
Uno H, Oe H, Taguchi A, Nagano K, <u>Naritomi H</u> .	Relationship between diffusion-weighted imaging detectability of ischemic lesions and embolic sources in transient ischemic attacks.	<i>Europ Neurol</i>	59:38-43.	2008

Yoshihara T, Taguchi A, Matsuyama T, Shimizu Y, Kikuchi-aura2 A, Soma T, Stern. D.M, Yoshikawa H, Kasahara Y, Moriwaki H, Nagatsuka K, <u>Naritomi H.</u>	Increase in Circulating CD34-Positive Cells in Patients with Angiographic Evidence of Moyamoya-like Vessels.	<i>J Cereb Blood Flow Metab</i> in press.		2007
Yamada N, Higashi M, Otsubo R, Sakuma T, Oyama N, Tanaka R, Iihara K, <u>Naritomi H.</u> , Minematsu K, Naito H	Association between signal hyperintensity on T1-weighted MR imaging of carotid plaques and ipsilateral ischemic events.	<i>AJNR</i>	28 287-292	2007
Okazaki S, Oomura M, Konaka K, Simode A, <u>Naritomi H.</u>	Paradoxical Cerebral Embolism Causing Internal Carotid Artery Occlusion.	<i>Epub</i>	46 678-681	2007
Toratani N, Moriwaki H, Hyon B, <u>Naritomi H.</u>	Isolated Hemifacial Sensory Impairment with Onion Skin Distribution Caused by Small Pontine Hemorrhage.	<i>Eur Neurol</i>	59 192-194	2008
Nakajima M, Kimura K, Shimode A, Miyashita F, Uchino M, <u>Naritomi H.</u> , Minematsu K.	Microembolic signals with in 24 hours of stroke onset and diffusion-weighted MRI abnormalities.	<i>Cerebrovasc Dis</i>	23 282-288	2007
Taguchi A, Wen Z, Myojin K, Yoshihara T, Nakagomi T, Nakayama D, Tanaka H, Soma T, Stern DM, <u>Naritomi H.</u> , Matsuyama D.	Granulocyte colony-stimulating factor has a negative effect on stroke outcome in a murine model.	<i>Europ J Neurosci</i>	26 126-133	2007
Okazaki S, Oomura M, Konaka A, Shimode A, <u>Naritomi H.</u>	Right atrium pressure critically determines the size of paradoxical cerebral infarction.	<i>Internal Medicine</i> in press.		2007
<u>Naritomi H.</u> , Fujita T, Ito S, Ogiwara T, Shimada K, Shimamoto K, Tanaka H, Yoshiike N.	Design and baseline characteristics of an observational study in Japanese patients with hypertension: Japan Hypertension Evaluation with Angiotensin II Antagonist Losartan Therapy (J-HEALTH).	<i>Hypert Res</i>	30 807-814	2007

Okazaki S, Moriwaki H, Minematsu K, <u>Naritomi H.</u>	Extremely Early Computed Tomography Signs in Hyperacute Ischemic Stroke as a Predictor of parenchymal Hematoma.	<i>Cerebrovasc Dis</i>	25 241-246	2007
Innis RB, Cunningham VJ, Delforge J, Fujita M, Gjedde A, Gunn RN, Holden J, House S, Huang SC, Ichise M, <u>Iida H.</u> Ito H, Kimura Y, Koeppe RA, Knudsen GM, Knuuti J, Lammertsma AA, Laruelle M, Logan J, Maguire RP, Mintun MA, Morris ED, Parsey R, Price JC, Slifstein M, Sossi V, Suhara T, Votaw JR, Wong DF, Carson RE.	Consensus nomenclature for in vivo imaging of reversibly binding radioligands.	<i>J Cereb Blood flow Metab</i>	27 1533-1539	2007
Kudomi N, Watabe H, Hayashi T, <u>Iida H.</u>	Separation of input function for rapid measurement of quantitative CMRO2 and CBF in a single PET scan with a dual tracer administration method.	<i>Phys Med Biol</i>	52 1893-1908	2007
Shimamura M, Sato N, Sata M, Kurinami H, Takeuchi D, Wakayama K, Hayashi T, <u>Iida H.</u> Morishita R.	Delayed Postischemic Treatment With Fluvastatin Improved Cognitive Impairment After Stroke in Rats.	<i>Stroke</i>	38 3251-3258	2007
Sohlberg A, Watabe H, <u>Iida H.</u>	Fully 3D SPECT reconstruction with transmission-dependent scatter correction.	<i>Ann Nucl Med submitted</i>		2007
(飯田秀博):研究協力者:銭谷勉	マイクロSPECTを用いた小動物イメージングの定量的機能評価 Quantitative Functional Imaging of Small Animals Using MicroSPECT.	<i>Medical Imaging Technology</i>	26 14-20	2008
Beppu K, Kaneko Y, Kadokawa J-i, <u>Mori H.</u> Nishikawa T.	Synthesis of Sugar-Polysiloxane Hybrids Having Rigid Main-Chains and Formation of their Nano Aggregates.	<i>Journal</i>	39 1065-1070	2007
Fukuyama N, Jujo S, Ito I, Shizuma T, Myojin K, Ishiwata K, Nagano M, Nakazawa H, <u>Mori H.</u>	Kurozu moromimatsu inhibits tumor growth of Lovo cells in a mouse model in vivo.	<i>Nutrition</i>	23 81-86	2007

Fukuyama N, Tanaka E, Tabata Y, Fujikura H, Hagihara M, Sakamoto H, Ando K, Nakazawa H, <u>Mori H.</u>	Intravenous injection of phagocytes transfected ex vivo with FGF4 DNA/ biodegradable gelatin complex promotes angiogenesis in a rat myocardial ischemia/reperfusion injury model.	<i>Basic Res Cardiol</i>	102 209-216	2007
Igarashi T, Araki S, <u>Mori H.</u> , Takeda S.	Crystal structures of catrocollastatin/VAP2B reveal a dynamic, modular architecture of ADAM/adamalysin/reprolysin family proteins.	<i>FEBS Lett</i>	581 2416-2422	2007
Kawada T, Kitagawa H, Yamazaki T, Akiyama T, Kamiya A, Uemura K, <u>Mori H.</u> , Sugimachi M.	Hypothermia reduces ischemia- and stimulation-induced myocardial interstitial norepinephrine and acetylcholine releases.	<i>J Appl Physiol</i>	102 622-627	2007
Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T, Li M, Zheng C, Shishido T, <u>Mori H.</u> , Sugimachi M.	Angiotensin II attenuates myocardial interstitial acetylcholine release in response to vagal stimulation.	<i>Am J Physiol Heart Circ Physiol</i>	293 H2516-2522	2007
Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T, Shishido T, Shimizu S, Mizuno M, <u>Mori H.</u> , Sugimachi M.	Regional difference in ischaemia-induced myocardial interstitial noradrenaline and acetylcholine releases.	<i>Auton Neurosci</i>	137 44-50	2007
Kuroko Y, Yamazaki T, Tokunaga N, Akiyama T, Kitagawa H, Ishino K, Sano S, <u>Mori H.</u>	Cardiac epinephrine synthesis and ischemia-induced myocardial epinephrine release.	<i>Cardiovasc Res</i>	74 438-444	2007
Myojin K, Taguchi A, Umetani K, Fukushima K, Nishiura N, Matsuyama T, Kimura H, Stern DM, Imai Y, <u>Mori H.</u>	Visualization of intracerebral arteries by synchrotron radiation microangiography.	<i>AJNR Am J Neuroradiol</i>	28 953-957	2007
Obata H, Sakai Y, Ohnishi S, Takeshita S, <u>Mori H.</u> , Kodama M, Kangawa K, Aizawa Y, Nagaya N.	Single Injection of a Sustained-release Prostacyclin Analog Improves Pulmonary Hypertension in Rats.	<i>Am J Respir Crit Care Med</i>	177 195-201	2008

Sagae M, Sato E, Tanaka E, <u>Mori H</u> , Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Sato S, Takayama K, Onagawa J, Ido H.	Intense clean characteristic flash x-ray irradiation from an evaporating molybdenum diode.	<i>Opt. Eng.</i>	46 (026502) 1-7	2007
Sato E, Germer R, Obara H, Tanaka E, <u>Mori H</u> , Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Izumisawa M, Ichimaru T, Takahashi K, Sato S, Takayama K.	Novel monochromatic x-ray generators and their applications to high-speed radiography (6279).	<i>SPIE</i>	6279 (627906) 1-12	2007
Sato E, Sagae M, Tanaka E, <u>Mori H</u> , Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Sato S, Ichimaru T, Takayama K.	High-sensitive radiography system utilizing a pulse x-ray generator and a night-vision CCD camera (MLX) (Proc).	<i>SPIE</i>	6279 (627941) 1-6	2007
Sato E, Tanaka E, <u>Mori H</u> , Kawakami H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Izumisawa M, Takahashi K, Sato S, Takayama K, Onagawa J.	K-edge magnification digital angiography using a 100- μ m-focus tungsten tube.	<i>Opt. Eng.</i>	46 (026503) 1-6	2007
Sukmawan R, Yada T, Toyota E, Neishi Y, Kume T, Shinozaki Y, <u>Mori H</u> , Ogasawara Y, Kajiya F, Yoshida K.	Edaravone preserves coronary microvascular endothelial function after ischemia/reperfusion on the beating canine heart in vivo.	<i>J Pharmacol Sci</i>	104 341-348	2007
Takeda S, Igarashi T, <u>Mori H</u> .	Crystal structure of RVV-X: An example of evolutionary gain of specificity by ADAM proteinases.	<i>FEBS Lett.</i>	581 5859-5864	2007
Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Shinozaki Y, <u>Mori H</u> , Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F.	Important role of endogenous hydrogen peroxide in pacing-induced metabolic coronary vasodilation in dogs in vivo.	<i>J Am Coll Cardiol</i>	50 1272-1278	2007
Yada T, Shimokawa H, Morikawa K, Takaki A, Shinozaki Y, <u>Mori H</u> , Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F.	Role of Cu, Zn-SOD in the Synthesis of Endogenous Vasodilator Hydrogen Peroxide during Reactive Hyperemia in Mouse Mesenteric Microcirculation in Vivo.	<i>Am J Physiol Heart Circ Physiol</i>		2007

Yamazaki T, Akiyama T, Kitagawa H, Komaki F, <u>Mori H</u> , Kawada T, Sunagawa K, Sugimachi M.	Characterization of ouabain-induced noradrenaline and acetylcholine release from in situ cardiac autonomic nerve endings.	<i>Acta Physiol (Oxf)</i>	191 275-284	2007
Beppu K, Kaneko Y, Kadokawa J, Mori H, <u>Nishikawa T</u> .	Synthesis of Sugar-Polysiloxane Hybrids Having Rigid Main-Chains and Formation of Their Nano Aggregates.	<i>Polymer Journal</i>	39	
<u>Takagi M</u> , Umetsu Y, Fujiwara M, and Wakitani S.	High Inoculation Cell Density Could Accelerate the Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Chondrocyte Cells.	<i>J. Biosci. Bioeng.</i>	103 98-100	2007
Fujiwara M, Tsukada R, Tsujinaga Y, and <u>Takagi M</u> .	Fetal-calf-serum-free culture of Chinese hamster ovary cells employing fish serum.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i>	75 983-987	2007
<u>Takagi M</u> , Kitabayashi T, Ito S, Fujiwara M, and Tokuda A.	Noninvasive Measurement of Three-Dimensional Morphology of Adhered Chinese Hamster Ovary Cells Employing Phase-Shifting Laser Microscope.	<i>Journal of Biomedical</i> in press.	12	2007
Fujiwara M, Koizumi S, and <u>Takagi M</u> .	Effect of static pressure on intracellular pH of adhesive CHO cells.	<i>J. Biosci. Bioeng</i>	104 510-2	2007
Yoshihara T, Taguchi A, <u>Matsuyama T</u> , Shimizu Y, Kikuchi- <u>taura</u> 2 A, Soma T, Stern. D.M, Yoshikawa H, Kasahara Y, Moriwaki H, Nagatsuka K, Naritomi H.	Increase in Circulating CD34-Positive Cells in Patients with Angiographic Evidence of Moyamoya-like Vessels.	<i>J Cereb Blood Flow Metab</i> in press.	39 1065-1070	2007
Iso H, Shimoda S, and <u>Matsuyama T</u> .	Environmental change during postnatal development alters behavior, cognitions and neurogenesis of mice.	<i>Behavior. Brain Res</i>	179 90-98	2007
Myojin K, Taguchi A, Umetani K, Fukushima K, Nishiura N, <u>Matsuyama T</u> , Kimura H, Stern D.M, Imai Y, and Mori H.	Visualization of intracerebral arteries by synchrotron radiation microangiography.	<i>Am. J .Neurorad</i>	28 953-957	2007
Kitao Y, <u>Matsuyama T</u> , Takano K, Tabata Y, Yoshimoto T, Momoi T, Yamatodani A, Ogawa S, and Hori O.	ORP150/HSP12A protects dopaminergic neurons against MPTP/MPP+-induced neurotoxicity.	<i>Antioxid. Redox Sign</i>	9 589-595	2007

Imuta N, Hori O, Kitao Y, <u>Matsuyama T</u> , and Ogawa S.	Hypoxia-mediated induction of heme oxygenase type I and carbon monoxide release from astrocytes protects nearby cerebral neurons from hypoxia-mediated apoptosis.	<i>Antioxid. Redox Sign</i>	9 543-552	2007
Taguchi A, Wen Z, Myojin K, Yoshihara T, Nakagomi T, Nakayama D, Tanaka H, Soma T, Stern D.M, Naritomi H, and <u>Matsuyama T</u> .	Granulocyte Colony-Stimulating Factor Has a Negative Effect on Stroke Outcome in a Murine Model.	<i>Eur. J. Neurosci</i>	26 126-133	2007
Taguchi A, <u>Matsuyama T</u> , Nakagomi T, Shimizu Y, Fukunaga R, Tatsumi Y, Yoshikawa H, Kikuchi-Taura A, Soma T, Moriwaki H, Nagatsuka K, Stern D, Naritomi H.	Circulating CD34-Positive Cells Provides a Marker of Vascular Risk Associated with Cognitive Impairment.	<i>J Cereb Blood Flow Metab</i>		2007
<u>齋藤 敬</u>	神経インターフェース	応用物理 in press.	76	2007
共同研究 株式会社アテクト 代表者: <u>齋藤 敬</u>	細胞膜穿孔機能を有する高機能Scaffoldの量産商業化について、以下の共同研究を開始 課題名: 細胞への新規高効率遺伝導入技術の応用開発	予算規模 320万円		実施期間 平成19年度 (継続 予定)
Lin X, Ogiya M, Takahara M, Yamaguchi W, Furuyama T, <u>Tanaka H</u> , Tohyama M, Inagaki S.	Sema4D-plexin-B1 implicated in regulation of dendritic spine density through RhoA/ROCK pathway.	<i>Neurosci Lett</i>	428 1-6	2007
Yasuda S, <u>Tanaka H</u> , Sugiura H, Okamura K, Sakaguchi T, Tran U, Takemiya T, Mizoguchi A, Yagita Y, Sakurai T, De Robertis EM, Yamagata K.	Synaptic Activity-induced Protocadherin Arcadlin Regulates Dendritic Spine Number by Triggering N-Cadherin Endocytosis via TAO2b and p38 MAP Kinases.	<i>Neuron</i>	56 456-471	2007
Taguchi A, Wen Z, Myojin K, Yoshihara T, Nakagomi T, Nakayama D, <u>Tanaka H</u> , Soma T, Stern DM, Naritomi H, Matsuyama T.	Granulocyte colony-stimulating factor has a negative effect on stroke outcome in a murine model.	<i>Eur J Neurosci</i>	26 126-133	2007

掲載論文

Relationship between Detectability of Ischemic Lesions by Diffusion-Weighted Imaging and Embolic Sources in Transient Ischemic Attacks

Hisakazu Uno^a Akihiko Taguchi^a Hiroshi Oe^a Keiko Nagano^a
Naoaki Yamada^b Hiroshi Moriwaki^a Hiroaki Naritomi^a

Departments of ^aCerebrovascular Medicine and ^bRadiology, National Cardiovascular Center, Suita, Japan

Key Words

Diffusion-weighted imaging · Embolic sources · Transient ischemic attacks

Abstract

Background/Aims: The aim of this study is to clarify the relationship between lesion detectability by diffusion-weighted magnetic resonance imaging (DWI) and the etiology of transient ischemic attacks (TIAs). **Methods:** A retrospective study was performed on 72 patients with carotid TIAs who underwent DWI studies within 2 weeks after the last episode. **Results:** Lesions were detected in 24 of 72 patients (33%). The detectability of lesions was 12% (3/25) in the large-artery atherosclerosis (LA) group, 57% (8/14) in the cardioembolism (CE) group, 8% (1/13) in the small-artery occlusion (SA) group, and 60% (12/20) in the other etiology or undetermined etiology (UD) group. Detectabilities in the CE group and the UD group were higher than those in the LA and SA groups. Of 24 patients with DWI-positive lesions, 17 (71%) had embolic sources in the heart; 9 were classified in the UD group because they had embolic sources both in the heart and large artery. **Conclusion:** Ischemic DWI lesions in TIAs are most likely caused by a cardioembolic mechanism. In TIA patients showing lesions on DWI, heart disease should be surveyed as the possible embolic source.

Copyright © 2007 S. Karger AG, Basel

Introduction

According to the Ad Hoc Committee on classification of cerebrovascular disease of 1975, transient ischemic attacks (TIAs) are defined as ischemic cerebrovascular disease in which focal cerebral dysfunction resolves within 24 h [1]. It has been known for years that CT or T₁- and T₂-weighted magnetic resonance imaging (MRI) may occasionally depict small ischemic lesions in TIA patients [2–7]. More recently, diffusion-weighted imaging (DWI) has made it possible to demonstrate ischemic lesions in TIA patients with relatively high frequency [8]. Several studies have shown that the detectability of DWI lesions in TIA patients increases in correlation with the duration of TIA symptoms. However, clarification as to whether the detectability of DWI lesions is related to the etiology of TIA is still lacking. In the majority of previous studies reporting DWI detectability of TIA lesions, both types of TIAs – in the carotid artery territory and the vertebral artery territory – were included indiscriminately. This makes accurate evaluation of TIA duration difficult, since onset and end of symptoms are often obscure in a vertebral artery territory TIA. Therefore, we included only patients with carotid TIA in the present study, examining the relationship between the etiology of TIA and the detectability of DWI lesions.

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2007 S. Karger AG, Basel
0014-3022/08/0592-0038\$24.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/ene

Hiroaki Naritomi
Department of Cerebrovascular Medicine
National Cardiovascular Center
5-7-1 Fujishiro-dai, Suita 565-8565 (Japan)
Tel. +81 6 6833 5012, Fax +81 6 6835 5137, E-Mail hnaritom@hsp.ncvc.go.jp