

本研究では、この細胞死回避の機序を更に詳細に検索するために、経時的な超微形態学的変化について検索し、光顕所見との比較検討により、細胞死のプロセスを歩む ALS 脊髄前角細胞に対して、HGF 治療による完全回復の病理組織学的正当性の確立にある。

B. 研究方法

脊髄、肝臓、腎臓、心臓の各臓器の経時的病理組織学的解析には、ALS SOD1 トランスジェニックマウス：G1H-G93A マウスを使用し、対照にはそれぞれの同時期の同胞を用いた。G1H-G93A マウスにおいて、神経症状発症前の生後 90 日齢、神経症状発症時の生後 100 日齢、神経症状進展期の生後 110 日齢、終末期に相当する生後 120 日齢の 4 時点で臨床症状および組織所見を解析した。また、同一日齢の同胞も解析した。マウスは体重 1 Kg 当たり 1 ml のペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射にて、麻酔を施行した。完全に麻酔下にあることを確認した後、開腹・開胸を行い、左心室・大動脈経由にて、37 °C の生理的食塩水の灌流にて全身臓器の血液を完全に除去する。

光学顕微鏡的形態および超微形態の解析には、全身臓器血液の完全除去後、直ちに 4°C 4% パラホルムアルデヒド・0.1M カコジル酸緩衝液 (pH7.3) にて灌流固定した後、脊髄、肝臓、心臓、腎臓の各臓器を取り出した。取り出された各臓器組織はそれぞれパラフィン包埋し、パラフィンブロックを作製した後、マイクロトームにてパラフィン切片とする。

パラフィン切片は、HE 染色法を施すと同時に、HGF/pcMet システムの検索として免疫組織化学的解析を施行した。即ち、rabbit polyclonal anti-rat HGF antibody と rabbit polyclonal anti-c-Met phosphospecific antibody の精製ポリクローナル抗体を使用し、ABC 法との組み合わせで、DAB 発色にて可視化した。

超微形態学的解析には、全身臓器血液の完全除去後、直ちに、4°C 2.5% グルタルアルデヒド・0.1M カコジル酸緩衝液 (pH7.3) にて急速に 5 分間灌流固定した後、次に 4°C 5% グルタルアルデヒド・0.1M カコジル酸緩衝液 (pH7.3) にて 15 分間灌流する。その後、脊髄、肝臓の各臓器を取り出

し、4°C 5% グルタルアルデヒド・0.1M カコジル酸緩衝液 (pH7.3) 内に再び、60 分間浸潤固定する。固定された各臓器は、十分にリンスした後に、目標部位を切り出す。切り出された組織は 4°C 1% 四酸化オスミウムにて、180 分間固定を行う。1% 四酸化オスミウム固定後組織は、エポキシ樹脂：エポン (エポック 812) に包埋し、エポンブロックを作製する。まず、光顕用に検索するためにエポンブロックから、1 μm 厚の切片を作製して、トルイジンブルー染色を施す。1 μm 厚トルイジンブルー染色下で病巣を固定した後に、同部位をウルトラマイクロトーム (MT2-B, Sorvall, USA) にて、超薄切片化して、電子顕微鏡 (Hitachi H-300, Tokyo, Japan) 下にて観察した。

C. 研究結果

1. 光顕的病理組織的所見

1) 同胞における光顕的組織像：すべての日齢を通じて、脊髄組織は正常脊髄組織所見そのものであった。肝臓・腎臓・心臓の各臓器の組織所見においても、すべての日齢を通じて、全く異常なく正常組織所見であった。

2) 神経症状発症前の生後 90 日齢の時点における病理組織変化：脊髄組織では、脊髄前角細胞数には変化がみられないが、軽度ながら脊髄前角細胞胞体内やニューロピルに空胞病理所見 (vacuolation pathology) を認めた。肝臓組織では、空胞形成を伴う水腫状変性肝細胞 (swollen hydropic hepatocyte) と好酸性暗肝細胞 (dark eosinophilic hepatocyte) とが混在した変性像を示した。この日齢では、swollen hydropic hepatocyte の数のほうが dark eosinophilic hepatocyte の数に比べ多数認められた。腎臓組織では、極く軽度ではあるが、尿管上皮に肝細胞と同様な空胞形成を伴う swollen hydropic change がみられた。心臓では、swollen hydropic change を呈する心筋細胞を認め、肝臓と腎臓と同質の病理変性所見を呈した。

3) 神経症状発症時の生後 100 日時点における病理組織変化：脊髄組織では、著明な vacuolation pathology を認め、脊髄前角細胞胞体内やニューロピルに多数の空胞が見られた。残存した脊髄前角細胞はやや小型化を示し、脊髄前角細胞数自体はわず

かながら減少傾向を示した。肝臓組織では、依然として、swollen hydropic hepatocyte と dark eosinophilic hepatocyte とが混在した変性所見を示したが、生後90日齢の肝臓組織に比べ、両タイプの変性細胞の占める割合が変化していた。即ち、swollen hydropic hepatocyte の数の占める割合が減少し、dark eosinophilic hepatocyte 数の割合が増加した。また、swollen hydropic hepatocyte および dark eosinophilic hepatocyte のいずれにも空胞形成が認められたが、その空胞の大きさは、90日齢時点の空胞と比較すると、大きさが減少し、小型化していた。腎臓組織では、空胞を伴う swollen hydropic change を示す尿細管上皮細胞の数が増加し、一部には、好酸性が強調され、細胞丈が減少し、小型化を示した腎尿細管上皮（小型好酸性腎尿細管上皮:small-sized eosinophilic cell）も認めた。そのため、尿細管腔は拡大していた。心臓では、生後90日齢の心臓に比べ、swollen hydropic change を呈する心筋細胞数は減少したものの、依然、swollen hydropic change を呈する心筋細胞を認めた。

4) 生後120日齢の終末期における病理組織変化: 脊髄組織では、脊髄前角細胞は高度に変性・脱落・消失し、反応性アストロサイトの増生と高度のグリオシスを認めた。同時に、封入体病理所見 (inclusion pathology) としては、Lewy body-like hyaline inclusion と astrocytic hyaline inclusion との両封入体を多数認めた。また vacuolation pathology としては、脊髄前角細胞胞体内やニューロピルに多くの空胞を依然認めた。注目すべき所見は、肝臓、腎臓、心臓の各臓器組織においては、脊髄組織とは対照的に、swollen hydropic change や eosinophilic change 等の変性所見はほとんど認められず、肝細胞、腎尿細管上皮、心筋線維はほぼ正常組織所見に復していた。

2. HGF/pcMet システムの調節機構の免疫組織化学的解析

1) 同胞における HGF/pcMet システムの免疫組織化学的解析: 脊髄組織における HGF の免疫組織学的解析では、すべての日齢を通じて、ほとんどすべての脊髄前角細胞は HGF を発現し、その発現レベルは多

少の variation を伴いながら、免疫組織化学的には HGF 発現は同定可能のレベルであった。HGF の受容体である活性型リン酸化 cMet (pcMet) の免疫組織学的解析では、HGF とは対照的に、すべての日齢を通じて、すべての脊髄前角細胞は pcMet の発現を認めなかった。肝臓・腎臓・心臓の各臓器の HGF/pcMet システムの免疫組織化学的解析では、肝細胞、腎尿細管上皮、心筋細胞では、すべての日齢を通じて、HGF 及び pcMet の発現は認めなかった。

2) 神経症状発症前の生後90日齢の時点における HGF/pcMet システムの免疫組織化学的解析: HGF の免疫組織学的解析では、ほとんどすべての脊髄前角細胞は、HGF を正常脊髄前角細胞と同一レベルで発現し、その発現様式、発現強度は同胞脊髄における正常脊髄前角細胞と同一であった。cMet 受容体の活性化の指標であるリン酸化 cMet (pcMet) の発現についても、脊髄前角細胞では全く認められなく、同胞脊髄における正常脊髄前角細胞と同一所見であった。しかし、生後90日齢の肝臓の HGF 発現については、発現強度の variation を有しながら、一部の swollen hydropic hepatocyte および dark eosinophilic hepatocyte に HGF 陽性所見が認められた。HGF の発現様式は HGF 陽性細胞と HGF 陰性細胞とが入り交じったモザイク染色様式を示した。HGF の活性型受容体である pcMet の肝臓における発現についても、HGF 発現様式と同一であった。即ち、生後90日齢の肝臓では、一部の肝細胞に HGF/pcMet システムの up-regulation 機構が認められた。腎臓では、一部の尿細管上皮に HGF 及び pcMet の発現が認められ、肝臓と同様に、heterogeneity を示しながらも、HGF/pcMet システムの up-regulation 機構が認められた。心臓でも、肝臓・腎臓と同様に、heterogeneity を示しながらも、一部の心筋細胞に HGF/pcMet システムの up-regulation 機構が認められた。

3) 神経症状発症時の生後100日時点における HGF/pcMet システムの免疫組織化学的解析: 生後100日齢の時点では、ほとんど全ての脊髄前角細胞において HGF と pcMet の強発現がみられ、高度の HGF/pcMet システムの up-regulation 機構を認めた。この時期の肝臓では、dark eosinophilic hepatocyte と swollen hydropic hepatocyte との両細胞の一部に HGF と pcMet との強発現があり、強発現している

細胞と発現していない細胞とが入り交じったモザイク様式の発現パターンが著しく強調された。即ち、生後100日齢の肝臓においては、heterogeneityを示しながら、HGF/pcMet システムの高度の up-regulation 機構が認められた。腎臓では、swollen hydropic change と small-sized eosinophilic change とを示す両タイプの尿管管上皮細胞と糸球体内のメザンギウムの一部の細胞群においては、HGF/pcMet システムを up-regulate させていた。心臓でも、肝臓・腎臓と同様に、生後90日齢の心筋細胞に比べ、一部の心筋細胞には、heterogeneityを示しながら、より高度のHGF/pcMet システムの up-regulation が認められた。

4) 生後120日齢の終末期におけるHGF/pcMet システムの免疫組織化学的解析：脊髄組織では、一部の脊髄前角細胞はHGF/pcMet システムの破綻を示すものの、依然として多くの脊髄前角細胞はHGF/pcMet システムを up-regulate させつづけていた。注目すべき所見は、肝臓、腎臓、心臓の各臓器においては、正常組織所見に復するに従い、脊髄組織とは対照的に、HGF/pcMet システムの発現レベルは低下しはじめ、ほぼ正常状態であるHGF/pcMet システムの発現停止状態を示した。即ち、生後120日齢では肝臓、腎臓、心臓は正常組織像を示し、HGF と pcMet との発現はほとんど認めなかった。

3. 脊髄における超微形態学的組織所見

1) 同胞における超微形態学的病理組織像：すべての日齢を通じて、電子顕微鏡で観察する限りにおいて、脊髄の前角細胞においては、超微形態学的病理組織所見には全く異常は認められず、正常所見であった。

2) 神経症状発症前の生後90日齢の時点における超微形態学的病理組織像：脊髄前角細胞数には、変化がみられない。脊髄前角細胞の細胞体、樹状突起、軸索に極く少数の vacuolation が認められた。

3) 神経症状発症時の生後100日齢の時点における超微形態学的病理組織像：脊髄前角細胞数はやや減少している。脊髄前角細胞の細胞体、樹状突起、軸索に大小不同の多数の vacuolation が認められた。このため、1 μ m 厚トルイジンブルー染色 semi-thin section では、光顕的には vacuolation

が神経細胞体とニューロピルに顕著に認められる像として捉えられた。核周囲の vacuolation は、rough ER が拡大していた。また mitochondria の outer membrane と inner membrane 間が主に拡大して、vacuolation を形成していた。初期には rough ER 由来が目立つが、経過と共に mitochondria 由来の vacuolation が増加してゆき、これが vacuolation pathology の主体となっている。

4) 生後120日齢の終末期における超微形態学的病理組織像：脊髄前角細胞はほとんど消失している。多数の Lewy body-like hyaline inclusion (LBHI) と astrocytic hyaline inclusion (Ast-HI) とが認められた。LBHI も Ast-HI もともに約 15-25nm 径の granule-coated fibril から成っていた。LBHI は、樹状突起内に多数認められ、時に神経細胞体内に典型的LBHI として同定された。軸索内にはまれではあるが認められることもあった。多数の反応性アストロサイトと共に、Ast-HI を胞体内に有する多数のアストロサイトも同定された。この終末期には inclusion pathology が主体であるが、vacuolation pathology もみられ、主に mitochondria 由来の vacuolation が主に神経樹状突起内に多数みられた。即ち、脊髄前角細胞の超微形態学的病理像は、vacuolation pathology と inclusion pathology であり、この両者の特徴的病理所見を伴いながら、前角細胞は消失していた。細胞内小器官に焦点をあててみると、vacuolation pathology は、rough ER と mitochondria の破綻を意味する。Inclusion pathology は、granule-coated fibril から成る inclusion が形成されることによって、細胞内小器官が物理的な圧迫等によって障害を受けていた。

4. 肝における超微形態学的組織所見

1) 同胞における超微形態学的組織像：すべての日齢を通じて、電子顕微鏡で観察する限りにおいて、肝臓の肝細胞における超微形態学的組織所見には全く異常なく、正常組織所見であった。

2) 神経症状発症前の生後90日齢の時点における超微形態学的病理組織変化：光顕上、HE 染色で同定した空胞形成を伴う swollen hydropic hepatocyte と dark eosinophilic hepatocyte の両者は、1 μ m 厚トルイジンブルー染色 semi-thin section にて

も安易に同定できた。Swollen hypropic hepatocyte は、超微形態学上は、肝細胞質内に多量の細胞内液が貯留している像で、細胞内小器官は多量の細胞内液の中に浮かんでいると表現できる像を示した。細胞内小器官そのものには超微形態学的には、病的所見は認められず、正常細胞内小器官の像を示していた。Swollen hypropic hepatocyte の細胞膜には異常はなかった。核そのものの像にも異常はなく、核膜も正常であった。Dark eosinophilic hepatocyte は、超微形態学上は、全体にやや小型の肝細胞で、細胞質内マトリックスが減少していて、細胞内小器官は、そのために密接に局在していた。超微形態学的には、細胞小器官そのものには病的所見はなく、正常構造を保っていた。ただ、細胞内小器官の高密度局在が、光顕上、HE 染色では、dark eosinophilic 像を示した。

3) 神経症状発症時の生後 100 日齢の時点における超微形態学的病理組織変化：細胞内液が多量に貯留し、細胞自体が腫大を示す swollen hypropic hepatocyte の数が減少していた。逆に、細胞内小器官が蜜に局在していて、HE 染色上、dark eosinophilic hepatocyte と同定される細胞の数が増加していた。超微形態学的には、生後 100 日齢でみられた swollen hypropic hepatocyte と dark eosinophilic hepatocyte は、生後 90 日齢で観察された swollen hypropic hepatocyte と dark eosinophilic hepatocyte と同一であった。

4) 生後 120 日齢の終末期の時点における超微形態学的病理組織変化：1 μ m 厚トルイジンブルー染色 semi-thin section で観察する限り、swollen hypropic hepatocyte や dark eosinophilic hepatocyte は、ほとんど観察されず、多くは正常肝細胞の細胞組織像を示していた。正常肝細胞として、1 μ m 厚トルイジンブルー染色 semi-thin section で同定された肝細胞の超微形態学的組織所見は、細胞内マトリックスには、極く少数の細胞内液の貯留を認めるのみで、この所見は病的所見とは認められなかった。また、肝細胞の細胞膜および核には著変は認められなかった。細胞内小器官の形態そのものにも著変は認められなかった。

D. 考察

正常脊髄の HGF/活性型リン酸化 cMet (pcMet) システムの免疫組織化学的解析により、正常状態においては、脊髄前角細胞は HGF を一定レベル発現しているが、脊髄前角細胞における HGF の受容体である cMet はチロシン残基のリン酸化は受けていなく、活性型 pcMet は発現していなかった。即ち、正常脊髄前角細胞では、HGF の cMet を介するシグナルを細胞内に伝達していない状態にあることが判明し、HGF/pcMet システムを賦活化していないことが明らかとなった。

G1H-G93A マウスの神経症状発症時の生後 100 日時点においては、ほとんど全ての脊髄前角細胞において高度の HGF/pcMet システムの up-regulation 機構を認め、生後 120 日齢の終末期においてさえ、一部の脊髄前角細胞は HGF/pcMet システムの破綻を示すものの、多くの脊髄前角細胞はまだ HGF/pcMet システムを up-regulate させていた。この脊髄前角細胞における HGF/pcMet システムの解析結果は、ALS-G93A 変異 SOD1 ストレスに対して、細胞死回避のために内因性 HGF/pcMet システムを upregulate させていたことを意味する。しかし、最終的には脊髄前角細胞は HGF/pcMet システムの upregulation という内因性生存機構さえも振り切るかたちで、細胞死に至ってしまう。即ち、G1H-G93A マウスにおける脊髄前角細胞は、ALS-G93A 変異 SOD1 ストレスにより、最終的には細胞死を生ずる。しかし、ALS-G93A 変異 SOD1 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され、内因性生存機構の一つとしての HGF/pcMet システムの賦活化の存在を明らかにした。超微形態学的には、脊髄前角細胞は、ALS-G93A 変異 SOD1 ストレスにより、rough ER と mitochondria において、拡大するという形態的病的所見を呈しながら、rough ER と mitochondria の両者は障害を受ける。この病的変化は vacuolation pathology として認識されることが判明した。また、ALS-G93A 変異 SOD1 が aggregation を生じることにより、多数の granule-coated fibril が形成され、この形成により神経細胞内の constitutive protein の恒常性が障害される。また、granule-coated fibril 形成に基づく細胞内容積占居により、細胞内小器官への物理

学的圧迫等によって、細胞内小器官が障害されてゆく。この病的変化は inclusion pathology として認識されることが解明された。

G1H-G93A マウスにおける肝臓、腎臓、心臓の各臓器の経時的組織変化は、ほぼ画一的であり、肝臓、腎臓、心臓の各臓器の細胞は脊髄前角細胞より早期に一過性に変性像を示すものの、脊髄前角細胞が高度脱落した脊髄組織の荒廃を認める終末期にはほぼ正常組織像に復していた。この肝臓、腎臓、心臓の各臓器の細胞における HGF/pcMet システムの経時的変化をみてみると、まだ脊髄前角細胞が HGF/pcMet システムを upregulate させていない生後 90 日齢において、肝臓、腎臓、心臓の各臓器の細胞は ALS-G93A 変異 SOD1 ストレスに対して、HGF/pcMet システムを upregulate させていた。神経症状発症時の生後 100 日齢頃の肝臓、腎臓、心臓において、最も高度に HGF/pcMet システムを upregulate させていた。しかし、正常組織像に復するに従い HGF 及び pcMet の発現レベルが低下を認め、生後 120 日齢では、HGF/pcMet システムはほぼその発現を停止した正常状態に復していた。即ち、ALS-変異 SOD1 ストレスにより脊髄前角細胞は変性組織像を呈し、最終的には細胞死に至るが、肝臓、腎臓、心臓においては、一度は変性組織像を呈するものの、最終的にはほぼ完全に組織学的回復を呈した。超微形態学的には、肝細胞は、ALS-G93A 変異 SOD1 ストレスにより、初期には肝細胞内液の制御機構が障害される。このために肝細胞質内液の多量の貯留を来し、swollen hydropic hepatocyte としての病理像を形成する。やがて、肝細胞質内液貯留修復に伴い、肝細胞質内マトリックス減少を惹起し、肝細胞質内小器官が密に局在してしまうために、dark eosinophilic hepatocyte という病的所見を示す。しかし、やがて、超微形態的には、ほぼ正常の肝細胞の構造となる。即ち、一度は病的所見として swollen hydropic hepatocyte 及び dark eosinophilic hepatocyte の像を呈するが、最終的には超微構造学的にもほぼ完全回復を示す。この組織形態学的及び超微細構造学的完全回復機構の一つに内因性 HGF/pcMet システムの up-regulation 機構の存在を明らかにできた。一方、ALS-変異 SOD1 ストレスに対し、脊髄前角細胞は内因性生存機構として、HGF/pcMet システムの

up-regulation 機構を惹起し続けるが、この機構を振り切るかたちで細胞死に至る。本研究の結果は、細胞死のプロセスを歩む変性運動ニューロンへの HGF 治療の正当性に対する、組織形態学的及び超微細構造学的完全回復の病理組織的論拠たり得る。

E. 結論

筋萎縮性側索硬化症(ALS)のモデル動物であるヒト変異 SOD1 トランスジェニックマウスにおいては、ALS-変異 SOD1 ストレスにより脊髄前角細胞は変性組織像を呈し、最終的には細胞死に至るが、その過程において、ALS 脊髄前角細胞は内因性生存機構としての HGF/活性型リン酸化 cMet (pcMet) システムの up-regulation 機構を惹起させ、自らを守って生存し続けようとするが、この機構が破綻することにより細胞死に陥る。一方、肝臓、腎臓、心臓においては、一度は組織障害像を呈するものの、最終的にはほぼ完全に組織学的回復を呈する。特に、今回、超微形態学的解析を肝臓について詳細に検討したところ、肝細胞においては一時的には、超微構造学的異常を示すものの、最終的にはほぼ正常な組織超微形態像に回復していることを解明した。この組織形態学的及び超微細構造学的完全回復機構の一つに内因性生存機構としての HGF/pcMet システムの up-regulation 機構の存在を明らかにした。即ち、本研究の結果は、細胞死のプロセスを歩む ALS 脊髄前角細胞に対して、HGF 治療による組織形態学および超微細構造学的完全回復の病理組織学的正当性の論拠たり得る。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato S Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 2008; 115 (1): 97-114 (DOI 10.1007/s00401-007-0308-4).
- 2) Suzuki M, Sugimoto Y, Ohsaki Y, Ueno M, Kato S, Kitamura Y, Hosokawa H, Davies JP, Ioannou YA, Vanier MT, Ohno K, Ninomiya H

Endosomal accumulation of Toll-like receptor 4 causes constitutive secretion of cytokines and activation of signal transducers and activators in Niemann-Pick disease type C (NPC) fibroblasts: a potential basis for glial cell activation in the NPC brain

J Neuroscience 2007; 27(8): 1879-1891

3) Kitamura Y, Okazaki T, Nagatsuka Y, Hirabayashi Y, Kato S, Hayashi K

Immunohistochemical distribution of phosphatidylglucoside using anti-phosphatidylglucoside monoclonal antibody (DIM21)

Biochem Biophys Res Commun 2007; 362(2): 252-255.

4) Ishigaki A, Aoki M, Nagai M, Warita H, Kato S, Kato M, Nakamura T, Funakoshi H, Itoyama Y

Intrathecal delivery of hepatocyte growth factor from amyotrophic lateral sclerosis onset suppresses disease progression in rat amyotrophic lateral sclerosis model

J Exp Neurol Neuropathol 2007; 66(11):1037-1044

5) Yamagishi S, Koyama Y, Katayama T, Taniguchi M, Hitomi J, Kato M, Aoki M, Itoyama Y, Kato S, Tohyama M

An in vitro model for Lewy Body-like Hyaline Inclusion/Astrocytic Hyaline Inclusion: Induction by ER stress with an ALS-linked SOD1 Mutation.

PLoS One 2007; 2 (10): e1030

6) Fujiwara N, Nakano M, Kato S, Yoshihara D, Ookawara T, Eguchi H, Taniguchi N, Suzuki K

Oxidative modification to cysteine sulfonic acid of cys111 in human copper-zinc superoxide dismutase

J Biol Chem; Online Publish 2007; 282 (49): 35933-35944.

2. 学会発表

1) 加藤雅子, 加藤信介, 堀江 靖, 林 一彦. SOD1 遺伝子異常を伴う ALS モデル動物肝におけるレドックス関連酵素の発現について

第96回日本病理学会総会 (2007、3月13日-15日、東京)

2) 隅 寿恵, 新沢康英, 伊川正人, 松岡洋祐, 岡部 勝, 加藤信介, 衛藤昌樹, 辻本賀英, 佐古田三郎.

iPLA2 β ノックアウトマウスにおける臨床病理学的解析—INAD モデル動物の確立

第48回日本神経学会総会(2007、5月16日-18日、名古屋)

3) 加藤信介, 加藤雅子, 大浜栄作, 船越 洋, 角山圭一, 中村敏一, 青木正志, 糸山泰人, 平野朝雄.

ALS 及び ALS マウスの運動ニューロンにおける肝細胞増殖因子(HGF)・活性型受容体(pcMet)の発現機構: ALS 治療戦略の基盤研究

第48回日本神経病理学会総会学術研究会(2007、5月30-6月1日、東京)

4) 隅 寿恵, 山寺みさき, 長野清一, 深田 慶, 藤村晴俊, 加藤信介, 佐古田三郎. ミトコンドリア由来の空胞における copper chaperone for superoxide dismutase(CCS)の関与

第48回日本神経病理学会総会学術研究会(2007、5月30-6月1日、東京)

5) 加藤雅子, 加藤信介, 緒浜栄作. ヒト変異 SDS1 導入 ALS-トランスジェニックマウスにおける肝臓・腎臓・心臓における一過性組織変化からの回復機構の存在

第48回日本神経病理学会総会学術研究会(2007、5月30-6月1日、東京)

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ラット・サル損傷脊髄に対する肝細胞増殖因子の検討

分担研究者：中村雅也（慶應義塾大学整形外科）

共同研究者：北村和也、戸山芳昭（慶應義塾大学整形外科）

研究要旨

損傷脊髄に対してウイルスベクターを用いてHGFを持続的に供給したことにより、損傷後1週においてHGF群で対照群と比較して有意なCaspase-3活性の抑制、新生血管の増加が認められ、さらに損傷後6週では残存髄鞘面積および5HT陽性神経線維がHGF群で対照群と比較して有意に多く認められた。さらに、運動機能評価ではHGF群で対照群と比較して有意に良好な下肢運動機能の回復を認めた。HGFによる神経保護作用、軸索伸展作用、血管誘導・新生作用により内在性脊髄修復が促進され、脊髄損傷後に有意な機能回復が得られたものと考えられる。

A. 研究目的

肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor：HGF）は生体の様々な臓器に対し保護・自己修復・血管誘導作用等の多彩な作用を有し、ラットやマウスの肝硬変、慢性腎不全、肺線維症、虚血性心筋症モデルにおけるその治療効果が実証されてきた。近年では中枢神経系に対する作用も明らかとなっており、運動・感覚・自律神経細胞すべてを標的とする神経栄養作用や、神経幹細胞の増殖とニューロンへの分化を促進することが報告されている。本研究の目的は脊髄損傷に対するHGFの有効性を明らかにすることである。

B. 研究方法

1) 成体ラット第10胸髄部に圧挫損傷を作製し、脊髄内のHGFおよびその受容体であるc-Metについて損傷後経時的なm-RNA発現の変化をRT-PCR法で調べた。また同様にして血漿中および脊髄中のHGF蛋白濃度をELISA法で測定した。さらにはneuron、astrocyte、oligodendrocyteにおける損傷前後でのcMetおよびphospho-cMet発現の変化を免疫組織学的に検討した。2) 成体ラット第10胸髄部にHGFを発現するウイルスベクターを注入し、3日後に同部に圧挫損傷を作製した（HGF群 n=8）。対照群にはLacZ発現ウイルスベクターを注入し同様に脊髄損傷を作製した（LacZ群 n=8）。損傷後6週間にわたりBBB scoreを用いた運動機能評価を行い、損傷後1週・6週に組織学的検討を行った。3) 成体ラット第10胸髄部および成体コモンマーモセット第5頸髄部に圧挫損傷を作成し、直後より損傷部くも膜下腔にrecombinant human HGF (rh HGF)(対照群; PBS)を4週間投与した。運動機能評価はラットではBBB scoring scaleを、サルではBar-grip testとopen field scoring scaleを用いて行った。

C. 研究結果

1) ラット脊髄内のc-Met mRNA発現は損傷直後より急激に増加するのに対し（図1A）、HGF mRNA発現は損傷後緩やかに増加し2週後にピークに達した（図1B）。脊髄内HGF蛋白の発現もmRNA発現と同じ傾向を示し損傷後4週でピークに達した（図1C）。一方、血漿中では損傷後もHGF蛋白量はほぼ一定であった（図1D）。

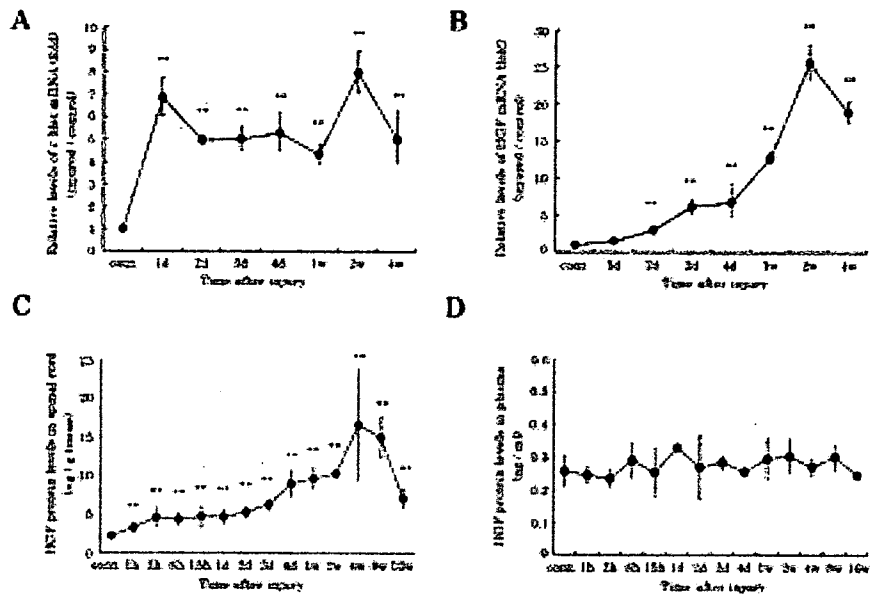


図 1

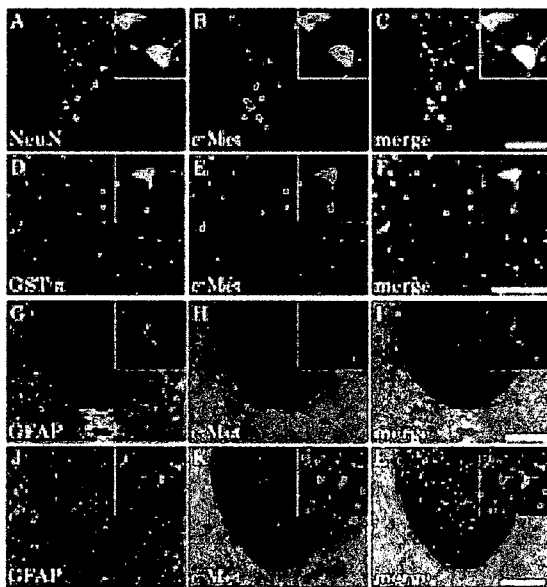


図 2

また、HGFの受容体であるc-METの発現は正常脊髄内ではneuron、oligodendrocyteにみられたが（図2、A-C,neuron,D-F,oligodendrocyte）、astrocyteにはみられなかった（図2G-I）。しかし、損傷後はastrocyteでもc-METの発現がみられた（図2J-L）。

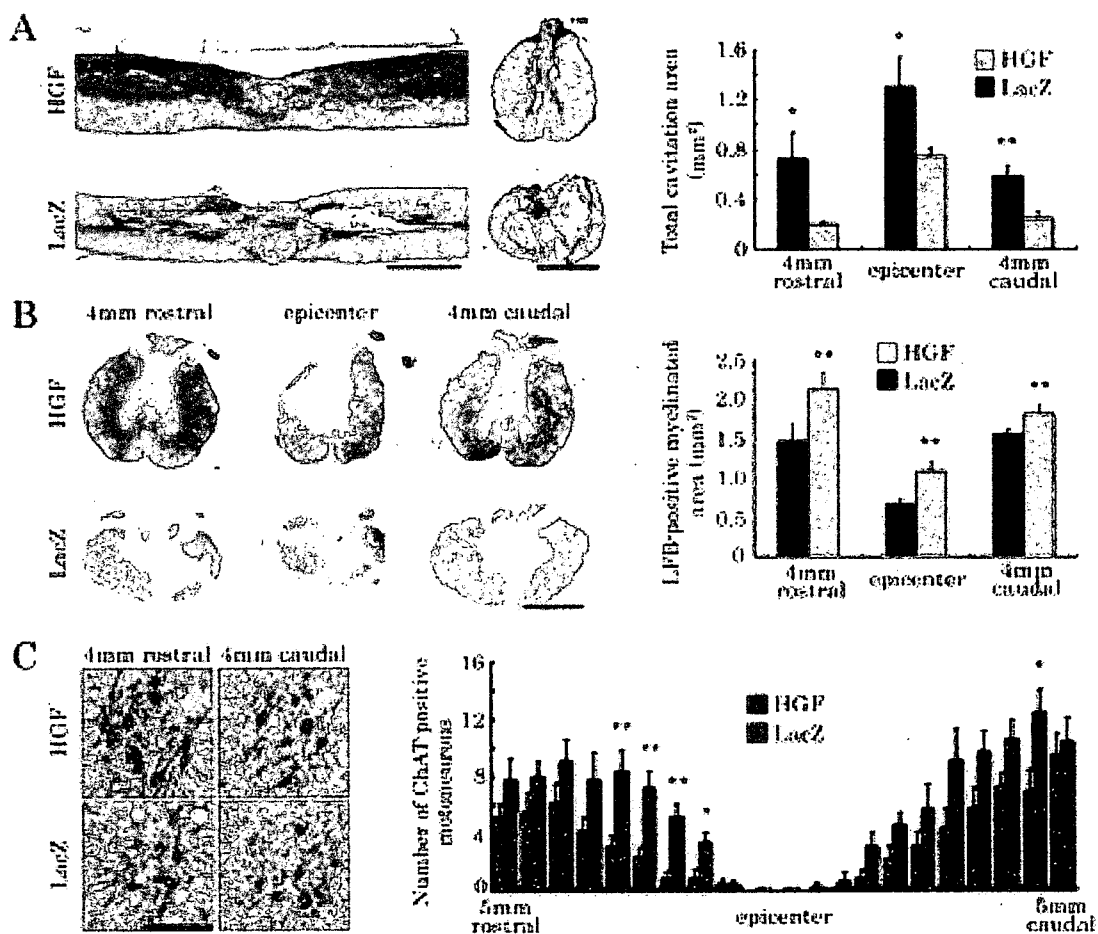


図3

損傷後6週のHE染色像より、HGF群において空洞形成が著明に縮小していた(図3A)。また髄鞘特異的な染色法であるLuxol fast blue (LFB)染色像より、LacZ群では損傷中心部から頭尾側4mmにわたって広範に脱髄しているのに対して、HGF群では損傷中心部においても髄鞘が有意に保たれていた(図3B)。さらに、脊髓前角部の運動ニューロンもHGF群において有意に多く生存していた(図3C)。

これらの結果にもとづき、損傷後急性期におけるHGFのニューロン・オリゴデンドロサイトに対する神経保護作用について検討した。損傷後急性期の脊髓では、2次損傷の波及に伴いニューロンやオリゴデンドロサイトはアポトーシスに陥り、神経細胞の死滅・脱落、脱髄による軸索変性が起こる。そこで、アポトーシスの最終的な核内シグナルとなるcaspase-3に注目し、Western blotting法により損傷脊髓内での活性型caspase-3発現量を定量したところ、両群ともに損傷後3日に最も多く活性型caspase-3が発現していたが、HGF群では有意にその発現が抑制されていた(図4A)。さらに免疫染色の結果より、活性型caspase-3を発現するニューロン、オリゴデンドロサイトがHGF群で減少していたことから(図4B)、HGFは損傷後急性期にニューロン、オリゴデンドロサイトのアポトーシスを抑制することでその生存を促進し、損傷範囲の縮小に寄与したものと考えられた。

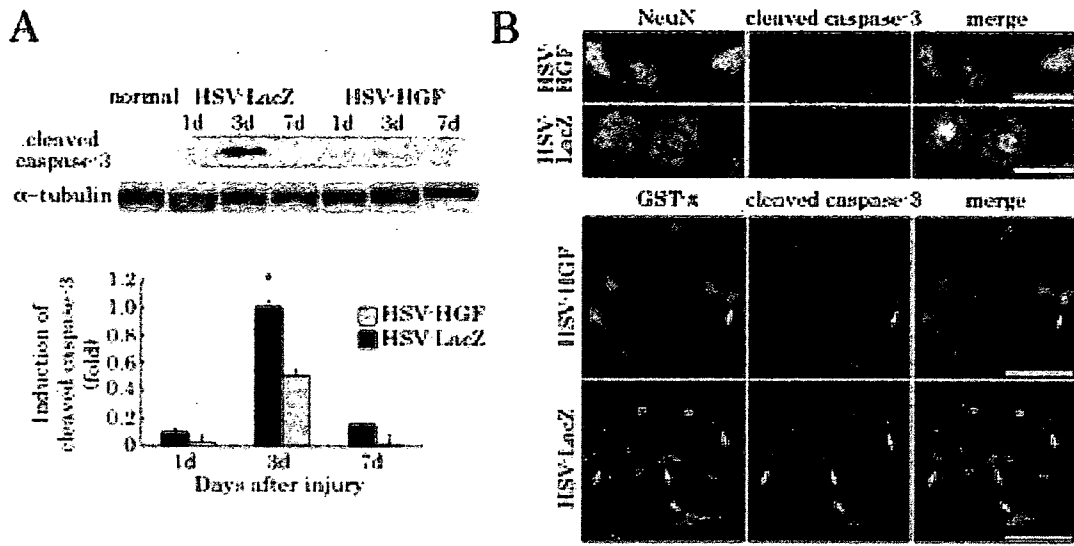


図4

HGFは様々な組織において強力な血管新生作用を有することがよく知られている。そこで、血管内皮細胞を認識する抗RECA-1抗体を用いて損傷後1週目の脊椎内の新生血管を免疫組織学的に検討した。その結果、両群において太い内径を有した新生血管が出現していたが(図5A)その数がHGF群で有意に増加していた(図5B)。

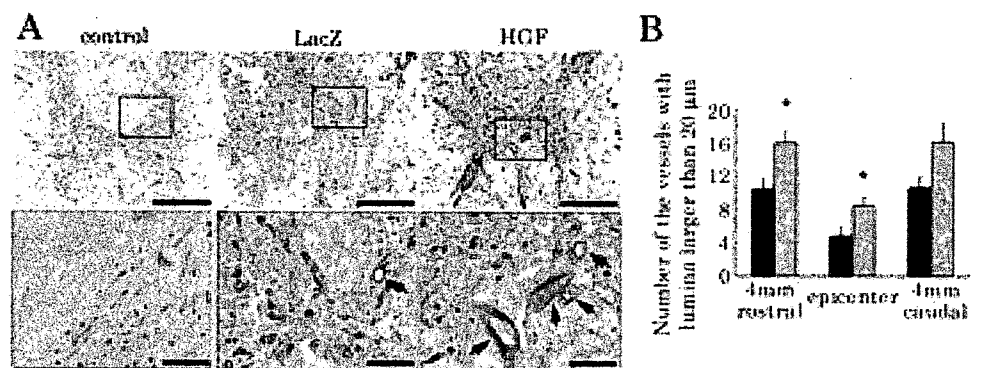


図5

さらに、5HT (セロトニン) 陽性のraphe-spinal serotonergic fiber (縫線核脊髄路の神経線維、以下セロトニン線維)の脊髄損傷後の再生にHGFが与える影響を検討した。抗5HT抗体を用いた免疫染色を行うと、損傷部より4mm尾側の脊髄においては、損傷後1週ではセロトニン線維が両群においてほとんど確認されなくなるが、損傷後6週になるとHGF群で有意に多くのセロトニン線維が損傷部尾側に分布していることが明らかとなった(図6A,B)。また興味深いことに、これらのセロトニン線維はHGFの受容体であるc-Metを発現しており(図6C)、一部の線維では再生軸索のマーカーであるGAP-43も発現していたことから(図6D)、HGFはセロトニン線維に直接作用しその再生を促進した可能性が示唆された。

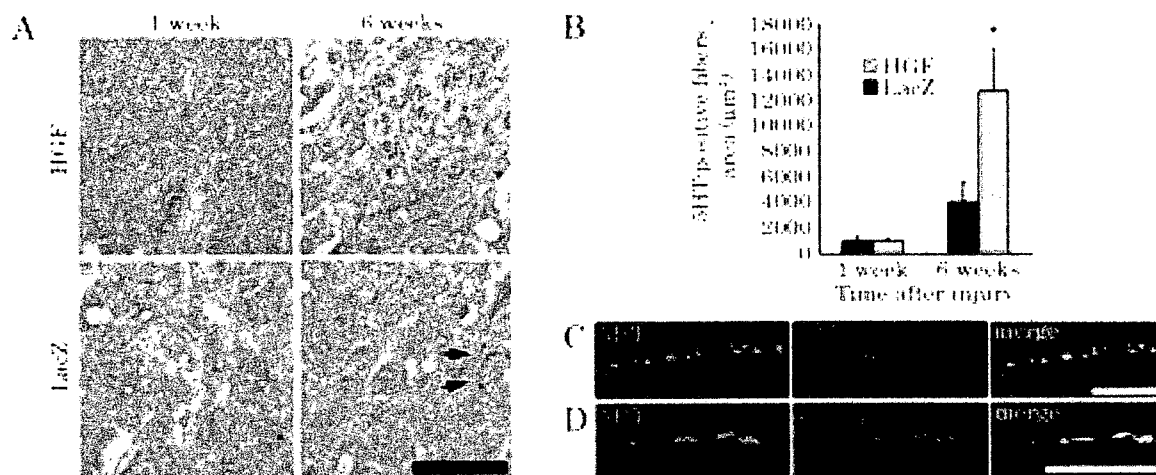


図6

BBB scoring scaleによる下肢運動機能評価では、両群ともに損傷後1日は0点であったが、その後HGF群で有意な改善がみられた(図7)。

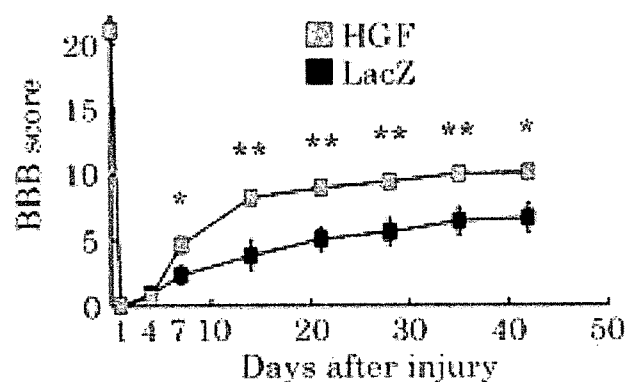


図7

D. 考察

損傷後急性期の脊髄内ではHGFの受容体であるc-Met発現の増加に対して、内在性HGFの供給が不足していることが明らかとなった。本研究では損傷脊髄にHGFが供給されたことで、損傷後1週のラット脊髄においてHGF群で対照群に比し、Caspase-3活性の抑制、新生血管の増加が認められ、さらに損傷後6週では髄鞘面積および5HT陽性神経線維がHGF群で対照群と比較して有意に多く認められた。その結果、運動機能評価ではHGF群で対照群と比較して有意に良好な機能回復を認めた。HGFによる神経保護作用、軸索伸展作用、血管誘導・新生作用により内在性脊髄修復が促進され、脊髄損傷後に有意な機能回復が得られたものと考えられる。

E. 結論

HGFは脊髄損傷後急性期の治療法となりうる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1.論文発表

- l Yamada M, Tanemura K, Okada S, Iwanami A, Nakamura M, Mizuno M, Ozawa M, Ohyama R, Kitamura N, Kawano M, Takeuchi KT, Ohtsuka C, Miyawaki A, Takashima A, Ogawa M, Toyama Y, Okano H, Kondo T. Electrical stimulation modulates fate determination of differentiating embryonic stem cells. *Stem Cells* 25:562-570, 2007
- l Watanabe K, Nakamura M, Okano H, Toyama Y. Establishment of Three- dimensional culture of neural stem/progenitor cells in collagen type-1 gel. *Rest Neurol Neurosci* 25: 109-117, 2007
- l Kitamura K, Iwanami A, Nakamura M, Yamane J, Watanabe K, Suzuki Y, Miyazawa D, Shibata S, Funakoshi H, Miyatake S, Coffin RS, Nakamura T, Toyama Y, Okano H. Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci Res* 85: 2332-2342, 2007
- l Fujiyoshi K, Yamada M, Nakamura M, Yamane J, Katoh H, Kitamura K, Kawai K, Okada S, Momoshima S, Toyama Y, Okano H. In vivo tracing of neural tracts in the intact and injured spinal cord of marmosets by diffusion tensor tractography. *J Neurosci* 27:44-448, 2007

2.学会発表

1. Nagoshi N, Shibata S, Nakamura M, Nagai Y, Okano JH, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H. Isolation and characterization of neural crest stem cells in adult rodent. 5th Annual meeting of International Society for Stem cell research (Boston, USA, 2007,6)
2. Kitamura K, Nakamura M, Funakoshi H, Nakamura T, Toyama Y, Okano H. Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury. 5th Annual meeting of International Society for Stem cell research (Boston, USA, 2007,6)
3. Nakamura M, Chiba K, Watanabe K, Tsuji T, Ishii K, Matsumoto M, Toyama Y. Clinical significance and prognosis of idiopathic syringomyelia. The 23rd annual meeting of the CSRS European section (Belgium, 2007,6)
4. Tsuji O, Nakamura M, Okano JH, Katoh H, Yamane J, Toyama Y, Okano H. Elucidating the mechanism behind functional recovery from spinal cord injury by inducing delayed and specific cell death of grafted neural stem cells. The 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, (San Diego, CA, USA, 2007.10)
5. Kitamura K, Nakamura M, Iwanami A, Yamane J, Funakoshi H, Toyama Y, Okano H. Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury; a trial from rodents to primates. The 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, (San Diego, CA, USA, 2007.10)
6. Mukaino M, Nakamura M, Yamada O, Morikawa S, Ohsugi Y, Matsuzaki Y, Liu H, Okano H. Anti IL-6 antibody treatment reduces the infiltration of hematogenous macrophages into the injured spinal cord. The 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, (San Diego, CA, USA, 2007.10)
7. Takagi T, Nakamura M, Yamada M, Hikishima K, Fujiyoshi K, Mukaino M, Okano JH, Momoshima S, Toyama Y, Okano H. Diffusion tensor tractography of peripheral nerve after contusive injury. The 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, (San Diego, CA, USA, 2007.10)
8. Nagoshi N, Shibata S, Nakamura M, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H. Multipotent neural crest-derived stem cells in bone marrow, dorsal root ganglia, and facial skin in adult rodent. The 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, (San Diego, CA, USA, 2007.10)
9. Fujiyoshi K, Yamada M, Nakamura M, Yamane J, Katoh H, Kitamura K, Kawai K, Okada S, Momoshima S, Toyama Y, Okano H: Diffusion tensor tractography enables in vivo tracing of neural tracts in the intact and injured spinal cord of marmosets. The 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, (San Diego, CA, USA, 2007.10)
10. Kitamura K, Nakamura M, Iwanami A, Yamane J, Funakoshi H, Toyama Y, Okano H. Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury; a trial from rodents to primates. Cervical Spine Research Society 35th Annual Meeting (San Francisco, CA, USA, 2007,12)
11. Fujiyoshi K, Yamada M, Nakamura M, Yamane J, Katoh H, Kitamura K, Kawai K, Okada S, Momoshima S, Toyama Y, Okano H: Diffusion tensor tractography enables in vivo tracing of neural tracts in the intact and injured spinal cord of marmosets. Cervical Spine Research Society 35th Annual Meeting (San Francisco, CA, USA, 2007,12)
12. Kumagai G, Nakamura M, Yamane J, Okada Y, Hagoshi N, Toh S, Okano H, Toyama Y:

Comparison between ES cell-derived primary and secondary neurospheres as a source of transplantation for spinal cord injury. Cervical Spine Research Society 35th Annual Meeting (San Francisco, CA, USA, 2007,12)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

該当なし

2.実用新案登録

出願日：2007.2.28

工業所有権の名称:脊髄損傷治療薬剤

発明者名（慶應）：岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也、岩波明生 北村和也

発明者名（共願先）：中村敏一、船越洋

出願人名（共願先）： クリングルファーマ株式会社（阪大ベンチャー）、国立大学法人大阪大学

PCT： PCT/JP/2007/053804

3.その他

該当なし

ヒトリコンビナント HGF 蛋白の髄腔内投与による ALS 治療法の開発

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。多くの神経栄養因子のなかでもこの様に変異 Cu/Zn SOD トランスジェニック動物による ALS モデルに対して明確な治療効果を示したものは少なく、この有効性を ALS 患者に臨床応用する意義と必要性がある。しかも、臨床応用の最も可能性の高いルートとしての髄腔内投与での効果が ALS ラットで確認されたので、霊長類（マーモセット）に対する髄腔内投与での安全試験を開始した。その後ヒトへの臨床試験を計画している。マーモセットによる ALS モデルは確立されていないので、HGF の臨床用量決定には慶応大学の岡野らが確立したマーモセットによる脊髄損傷モデルを用いる。現在、東北大学トランスレーショナルリサーチセンターと共に医師主導治験の準備を進めているが、GLP 基準を満たした安全性試験の施行が必要である。

ので、霊長類を用いて HGF の髄腔内長期投与による安全性を検証すると共に臨床用量の設定を行う。その後 ALS 患者少数例での臨床試験（治験）を行う。同時に HGF の治療効果の機序を明らかにする。

B. 研究方法

本研究グループによるこれまでの研究により私たちが開発した ALS ラットに対するリコンビナント HGF 蛋白髄腔内投与にて臨床的にも病理学的にも有効性が明らかになった。多くの神経栄養因子のなかでもこの様に変異 Cu/Zn SOD トランスジェニック動物による ALS モデルに対して明確な治療効果を示したものは少なく、この有効性を ALS 患者に臨床応用する意義と必要性がある。しかも、臨床応用の最も可能性の高いルートとしての髄腔内投与での効果が ALS ラットで確認されたので、霊長類（マ

分担研究者：青木正志

東北大学病院神経内科講師

研究協力者：割田 仁¹、水野秀紀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再生医学

³ 慶應義塾大学医学部生理学

A. 研究目的

進行性の運動ニューロンの選択的細胞死を惹起する筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対してわが国で発見された神経栄養因子である肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor、以下 HGF) を用いた治療法の臨床応用を目的にしている。すでに ALS ラットに対してリコンビナント HGF 蛋白の髄腔内持続投与で有効性を示した

一モセット) に対する髄腔内投与での安全試験を開始した。その後ヒトへの臨床試験を計画している。マーモセットによる ALS モデルは確立されていないので、HGF の臨床用量決定には慶応大学の岡野らが確立したマーモセットによる脊髄損傷モデルを用いる。

なお、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つつ利用動物数を極力減らすように努めた。

C. 研究結果 および D. 考察

1) 霊長類 (マーモセット) に対する髄腔内投与での安全試験

マーモセット第 5 頸髄レベルに圧挫損傷を作製し直後より同様にヒトリコンビナント HGF 蛋白(rhHGF)を 4 週間持続投与した。損傷後 12 週間までの間、異常行動ならびに MRI 像における腫瘍形成は一切認められなかった。したがって今のところ安全性での問題点は認めていないと考えている。

霊長類(マーモセット)に対するHGF髄腔内持続投与

I. 実験モデル

マーモセット 350-400g
GMP準拠のヒトリコンビナントHGF
髄腔内持続投与実験モデル

- ①HGFの有効性濃度の検討
脊髄損傷モデルに(70, 200, 400 μ g)の2週間投与
- ②HGFの安全性の検討(①の10倍量の大量投与)
正常マーモセットに(1.4, 4.0, 8.0mg)を4週間投与
(6ヶ月間の観察)

II. 評価

行動解析(BBB)
血液の生化学的検査、髄液および脊髄組織でのHGF濃度
MRI(7T)、病理組織学的検査

治験に必要な GMP 基準を満たしたヒト型リコンビナント HGF 蛋白は確保できているが、治験を開始するためには GLP 基準を満たしたカ

ニクイザルに対する髄腔内投与による安全性試験の施行が今後必要と想定される。

2) 治験に関するプロトコルの作成

臨床試験としては医師主導治験を計画しており、東北大学トランスレーショナルリサーチセンターと共にプロトコルの検討に入っている。シーズ開発戦略会議などを通じて、現在の問題点としては以下が指摘されている。

- ・ポンプを利用した薬剤の連続投与という形態が、安全性の確保に対する障害として懸念される。
- ・ポンプメーカー(メドトロニクス社)との共同研究という形がとれるかの交渉が大切である。
- ・髄腔内投与の場合はまず薬剤の動態を要求されるので、これにどのように対応するか。
- ・企業治験に持ち込むのが良策であるが企業の体力に依存するため、フェーズ 1・フェーズ 2A を探索的臨床試験として実施する方向性も検討すべきか。

E. 結論

東北大学トランスレーショナルリサーチセンターと共に医師主導治験の準備を進めているが、GLP 基準を満たした安全性試験の施行が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishigaki A, Aoki M, Nagai M, Warita H, Kato S, Kato M, Nakamura T, Funakoshi H, Itoyama Y.

- Intrathecal delivery of hepatocyte growth factor from amyotrophic lateral sclerosis onset suppresses disease progression in rat amyotrophic lateral sclerosis model. **J Neuropathol Exp Neurol** 2007; 66(11): 1037-44.
- 2) Yamagishi S, Koyama Y, Katayama T, Taniguchi M, Hitomi J, Kato M, Aoki M, Itoyama Y, Kato S, Tohyama M. An *in vitro* model for Lewy body-like hyaline inclusion/astrocytic hyaline inclusion: induction by ER stress with an ALS-linked *SOD1* Mutation. **PLoS ONE** 2007; 2(10): e1030.
- 3) Suzuki N, Motohashi N, Uezumi A, Fukada S, Yoshimura T, Itoyama Y, Aoki M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. NO production results in suspension-induced muscle atrophy through dislocation of neuronal NOS. **J Clin Invest** 2007; 117(9): 2468-76.
- 4) Sasaki S, Nagai M, Aoki M, Komori T, Itoyama Y, Iwata M. Motor neuron disease in transgenic mice with an H46R mutant *SOD1* gene. **J Neuropathol Exp Neurol** 2007; 66(6): 517-24.
- 5) Mizuno H, Warita H, Aoki M, Itoyama Y. Accumulation of chondroitin sulfate proteoglycans in the microenvironment of spinal motor neurons in ALS transgenic rats. **J Neurosci Res**, *in press*

2. 学会発表

- 1) 割田 仁 ほか, ALS モデルラット髄腔内へのコンドロイチン分解酵素持続投与, 第 48 回日本神経学会総会 2007. 5 名古屋
- 2) 水野秀紀 ほか, ALS モデルラット脊髄におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの変化, 第 48 回日本神経学会総会 2007. 5 名古屋
- 3) 青木正志 ほか, ALS モデルラット脊髄変性における内因性 HGF/c-Met 機構の意義, 第 48 回日本神経学会総会 2007. 5 名古屋
- 4) 割田 仁 ほか, 髄腔内成長因子投与による変異 *SOD1* 遺伝子導入ラット NG2 陽性神経前駆細胞の活性化, Neuro2007 [第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会合同学会] 2007. 9 横浜

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

原著論文

著者	論文タイトル	掲載誌名	巻頁		出版年
			巻	頁	
Sasaki S, Nagai M, Aoki M, Komori T, Itoyama Y, Iwata M	Motor neuron disease in transgenic mice with an H46R mutant SOD1 gene	J Neuropathol Exp Neurol	66	517-24	2007
Yamashita S, Yoshihisa Koyama Y, Katayama T, Taniguchi M, Hitomi J, Kato M, Aoki M, Itoyama Y, Kato S, Tohyama M	An in vitro model for Lewy Body-like Hyaline Inclusion/Astrocytic Hyaline Inclusion: Induction by ER stress with an ALS-linked SOD1 Mutation	PLoS One	2	e1030	2007
Ishigaki A, Aoki M, Nagai M, Warita H, Kato S, Kato M, Nakamura T, Funakoshi H, Itoyama Y	Intrathecal delivery of HGF from the ALS onset suppresses disease progression in a rat ALS model	J Neuropathol Exp Neurol	66	1037-44	2007
Mizuno H, Warita H, Aoki M, Itoyama Y.	Accumulation of chondroitin sulfate proteoglycans in the microenvironment of spinal motor neurons in ALS transgenic rats.	J Neurosci Res	in press		2008
Watanabe K, Nakamura M, Okano H, Toyama Y.	Three-dimensional culture of the neural stem/progenitor cells in type-I collagen gel: appropriate scaffold conditions for co-transplantation.	Restorative Neurology and Neuroscience.	25	109-117	2007

著者	論文タイトル	掲載誌名	巻		出版年
			頁		
Yamada M, Tanemura K, Ozawa M, Ohyama R, Kitamura N, Kawano M, Tan-Takeuchi K, Mizuno H, Okada S, Iwanami A, Nakamura M, Ishitsuka C, Nagai A, Miyawaki A, Takashima A, Ogawa M, Okano H, Kondoh T.	Electrical stimulation modulates fate determination of differentiating embryonic stem cells.	Stem Cells	25	562-570	2007
Hayakawa-Yano Y, Nishida K, Fukami S, Gotoh Y, Hirano T, Nakagawa T, Shimazaki T, Okano H.	EGF-signaling mediated by Gab1 is required for the spatiotemporally regulated proliferation of Olig2-expressing progenitors in the embryonic spinal cord.	Stem Cells	25	1410-1412	2007
Okano H, Sakaguchi M, Ohki K, Suzuki N, Sawamoto K.	Regeneration of the central nervous system using endogenous repair mechanisms.	J. Neurochem	102	1459-1465	2007
Okano H, Kaneko S, Okada S, Iwanami A., Nakamura M, Toyama Y.	Regeneration-based therapies for spinal cord injuries.	Neurochem. Int	51(2-4)	68-73	2007
Sakaguchi M, Imaizumi Y, Okano H.	Expression and function of galectin-1 in adult neural stem cells.	Cell Mol. Life Sci	64	1254-1258	2007
Kitamura K, Iwanami A, Nakamura M, Yamane J., Kota W, Suzuki Y, Miyakawa D, Shibata S, Funakoshi H, Miyatake S, Coffin R, Nakamura T, Toyama Y, Okano H.	Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury.	J Neurosci Res	85	2332-2342	2007

著者	論文タイトル	掲載誌名	巻頁	出版年
Adachi K, Mirzades Z, Sakaguchi M, Yamashita T, Nikolcheva T, Gotoh Y, Peltz G, Gong L, Kawase T, Alvarez-Buylla A, Okano H, Sawamoto K.	b-catenin signaling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone.	Stem Cells	25 2827-2836	2007
Fujiyoshi K, Yamada M, Nakamura M, Yamane J, Kato H, Kitamura K, Kawai K, Okada S, Momoshima S, Toayama Y, Okano H.	In vivo tracing of neural tracts in the intact and injured spinal cord of marmosets by diffusion tensor tractography.	J. Neurosci	27 11991-11998	2007
Appleyard SM, Marks D, Kobayashi K, Okano H, Low MJ, Andresen MC.	Visceral afferents directly activate catecholamine neurons in the solitary tract nucleus.	J. Neurosci	27 13292-13302	2007
Hirota Y, Oshima T, Iwasato T, Kulkarni AB, Mikoshiba K, Okano H, Sawamoto K..	Cyclin-dependent kinase 5 is required for neuroblast migration in the adult brain.	J. Neurosci.	27 12829-12838	2007
Ozawa Y, Nakao K, Shimazaki T, Shimura S, Kurihara T, Ishida S, Yoshimura A, Tsubota K, Okano H.	SOCS3 is required to temporally fine-tune photoreceptor cell differentiation.	Dev. Biol	303 591-600	2007
Masuda H, Maruyama T, Hiratsu E, Yamane J, Iwanami A, Nagashima T, Ono M, Ito M, Miyoshi H, Okano HJ, Okano H, Matsuzaki Y, Yoshimura Y.	Successful reconstruction of human endometrium from singly dispersed endometrial cells in the severe immunodeficient mouse: its potential application as endometriosis model.	Proc.Natl.Acad.Sci.USA	104 1925-1930	2007