

「生物の発生・分化・再生」
平成 12 年度採択研究代表者

岡野 栄之

(慶應義塾大学医学部 教授)

「幹細胞システムに基づく中枢神経系の発生・再生研究」

1. 研究実施の概要:哺乳類の中枢神経系は、以下のような素過程を経て step-wise に進行していく
 - (1) 神経幹細胞の未分化状態・多分化能の維持と分化の制御機構
 - (2) 胚性幹細胞からの特定ニューロンの in vitro 分化誘導と選択的分離
 - (3) 神経幹細胞、中間前駆細胞、特定タイプのニューロンの選択的分離法の確立
 - (4) 神経疾患モデル動物への細胞移植による細胞補充とニューロンネットワーク再建による機能修復の試み
 - (5) その他の研究

2. 研究実施内容

- (1) 神経幹細胞の未分化状態・多分化能の維持と分化の制御機構
- (A) 神経幹細胞に強く発現する RNA 結合蛋白質 Musashi ファミリーの機能解析(岡野):
<狙いと実験計画>

発生期の神経系においては、活発に自己増殖して多分化能を有する神経前駆細胞が存在する。様々な種類の神経細胞、グリア細胞からなる神経系組織は、神経幹細胞の時間的・環境的な要素に対応した非対称性分裂・対称性分裂によって生まれ、それらはネットワークを構成し、機能を発揮するようになる。本研究は、神経幹細胞に発現している遺伝子群について網羅的な解析を行い、神経幹細胞が未分化状態で維持されるメカニズム、特定の細胞への分化制御メカニズムを解明することを目的としている。将来的には、内在性神経幹細胞の活性化による神経再生の誘導につなげることを目標としている。その研究の一環として、RNA 結合蛋白質 Musashi ファミリーについて解析を行っている。Musashi 蛋白質は、ショウジョウバエにおいて神経前駆細胞の非対称性分裂の責任因子として発見され、線虫・ホヤなどの無脊椎生物からマウス・ヒトをはじめとする高等脊椎生物の神経系幹細胞に強い発現が観察される蛋白質ファミリーである。Musashi 蛋白質は、哺乳類では二種類(Musashi1、Musashi2)、ショウジョウバエでは一種類(d-Musashi)が存在している。これらの蛋白質の機能を解析するために、哺乳類の Musashi1、Musashi2 については、ノックアウトマウスの作成・解析および生化学的機能解析を行う。また、ショウジョウバエの d-Musashi については、遺伝学的手法と生化学的手法を絡めて、神経系前駆細胞の非対称性分裂に対する役割を解析する。

<実施内容>

1) 我々は、相同組み替え法により *musashi1* 遺伝子を欠損したノックアウトマウスを作成し、そのマウス由来の神経幹細胞の性質を調べた。類似した機能を有すると考えられる Musashi2 も神経幹細胞に発現しているため、*musashi1* 遺伝子欠損マウス由来の神経幹細胞を *musashi2* 遺伝子の発現を抑制するアンチセンス核酸アナログを含む培地にて神経幹細胞選択的培養(ニューロスフェア法)したところ、神経幹細胞の増殖能が著しく低下することを発見した。

musashi1 遺伝子、*musashi2* 遺伝子が単独で欠損したマウスは、それぞれ、中脳水道閉塞に起因する水頭症(一定頻度で発症、重篤な個体は出生後に死に至る)、成長阻害と考えられる体重増加遅滞の表現型を呈する。Musashi1, Musashi2 は、重複して発現しているため、胎生期の神経幹細胞・成体の神経幹細胞の性質に変化が軽微または代償されているために観察されなかった。そこで我々は、交配により *musashi1* 遺伝子、*musashi2* 遺伝子が欠損した二重変異マウスを作成した。その個体について、胎生期の発生段階の脳神経系を組織化学的手法で解析したところ、大脳皮質・海馬において層構造の乱れおよび細胞数の減少などの異常が観察された。この二重変異マウスは出生前後に死亡する。

2) 我々は、神経幹細胞の自己複製能と分化を制御する因子として、Musashi1 と Notch シグナルの役割の解析を行った。

神経幹細胞に強く発現している RNA 結合性タンパク質である Musashi1 が、神経幹細胞の自己複製能を正に制御していることが以下の実験結果から明らかになった。Musashi1 の神経系幹細胞における役割を推定するために、Musashi1 蛋白質が結合し制御していると考えられる下流標的 RNA の同定を試みた。Musashi1 組み換え蛋白質が結合する RNA のコンセンサス配列を in vitro の SELEX 法により明らかとし、その結合特性をゲルシフト法等により検討したところ、Musashi1 は特定の RNA 配列(G/A)UnAGU, n=2 or 3 に強く結合することが明らかとなった(Kd=10⁻⁹ M)。興味深いことに、このコンセンサス配列は Musashi1 と同様に神経系の前駆細胞に発現し細胞系譜の形成に関与しているとされる m-Numb mRNA の 3'-UTR に存在することが明らかとなった。さらに in vitro の系である filter binding assay 等により、これらの mRNA の 3'-UTR は Musashi1 と相互作用することが確認された。さらに NIH-3T3 細胞に *musashi1* 遺伝子を導入し、免疫沈降後、沈降物中に *m-numb* mRNA が存在するかどうかを検討した結果、Musashi1 と *m-numb* mRNA は in vivo(細胞内)で複合体を形成していることが明らかとなった。また、Musashi1 はリボソーム分画にも存在することと、luciferase 活性をレポーターとして用いた assay により、Musashi1 は m-Numb の発現を翻訳レベルで抑制していることが明らかとした。m-Numb は細胞内において、Notch シグナルのアンタゴニストであるため、Musashi1 は m-Numb の翻訳抑制を介して Notch シグナルを活性化しているものと予想された。そこで、Hes1-luciferase レポーター活性を指標に、活性化型 Notch とともに NIH3T3 に導入した外来性 Musashi1 による Notch シグナルへの影響を検討したところ、外来性 Musashi1 は Notch シグナルを活性化させることが明らかとなった。Notch シグナルは、神経幹細胞の生存と自己複製能に必須の役割をしているため、Musashi1、Musashi2 の機能的ノックアウト(上記の項1に記載)によりニューロスフェア形成効率の低下、すなわち神経幹細胞の生存と自己複製能が低下することは、これでよく説明できる。

Musashi1 は、細胞の未分化状態および増殖活性を促進すると考えられる Notch シグナルの

阻害因子 m-Numb の mRNA に結合してこれらの遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。Notchシグナルは細胞の分化・増殖を規定する重要な因子であり、Musashi1はNotchシグナルを正に制御している働きを有するものと考えられる。

3) ショウジョウバエの神経系において非対称性分裂の責任因子である d-Musashi 蛋白質の機能を明らかにするために、我々は下流標的配列および下流遺伝子の同定を試みた。その結果、神経系への細胞分化を抑制する転写因子をコードする *tramtrack69* 遺伝子の 3' 非翻訳領域に d-Musashi 蛋白質認識配列が多数存在し、その部分の RNA に強く結合することが明らかになった。さらに、*tramtrack69* 遺伝子の mRNA・蛋白質の発現解析、および *d-musashi* 変異体、*tramtrack69* 変異体を用いた遺伝学解析によって、d-Musashi 蛋白質は *tramtrack69* 遺伝子の発現を翻訳レベルで抑制することによって IIIb 神経前駆細胞へと細胞の運命を導いていることが明らかとなった。

(B) 神経幹細胞の維持機構の解明(岡野):

<狙いと実験計画>

哺乳動物の中枢神経系幹細胞は個体の発生初期から成体に至るまでその一生を通して、中枢神経系の様々な場所に存在し、様々なタイプのニューロンやグリア細胞を生産することによって中枢神経系の構築および機能維持に関与していると考えられている。しかしながら、これらがどのようにして維持され、その数が調節されているのかそのメカニズムの詳細はよく分かっていない。これまで、我々は IL-6, LIF, CNTF などの IL-6 ファミリーに共通のレセプターサブユニットである gp130 を介するシグナルが、特に生後から成体にかけての神経幹細胞の自己複製を促進していることを見出している。そこで、この gp130、そして神経幹細胞の mitogen である EGF のレセプターの下流で働くシグナル伝達分子であり、MAP kinase 経路の活性化に関与している Gab1 の欠失変異体マウスにおける神経幹細胞の動態を含めた中枢神経系発生の異常を解析することによって、神経幹細胞の長期維持機構の本質に更にせまることを目的とした研究を行っている。

<実施内容>

Gab1 のホモ欠失変異体 (*gab^{-/-}*) は胎生16日目までに胎盤の発達異常により死亡してしまう故に、まず、胎生14日目の線条体における神経幹細胞の数を neurosphere 法によって野生型と比較したところ、顕著な差は見られなかったが、EGF に対する反応性は消失していた。また、この時期に現れ始めるオリゴデンドロサイト前駆細胞の数が減少していた。しかしながら、ニューロンの分化および生存に変化は見られなかった。さらに、ヘテロ欠失変異体 (*gab^{+/-}*) の成体の側脳室周囲に存在している神経幹細胞の数を、これも neurosphere 法によって調べたところ、野生型に比べて約80%その数が増加していた。また、gp130 を介したシグナルによってその発現が亢進される GFAP の発現は生後7日目の脊髄および成体脳でも低下していた。一方、これまで ubiquitous に発現すると考えられていた Gab1 の中枢神経系の発生過程における発現を組織免疫化学染色によって確かめたところ、驚いたことに神経幹細胞が最も多く存在すると考えられる脳室周囲での発現が、生後2日目までは非常に低く、それ以外の領域で強く発現していた。しかしながら、生後19日目および成体においては脳室周囲に強く発現していた。これらのことは、Gab1 が主に生後から成体に至るまでの神経幹細胞の維持に負に作用しており、胎生期では主にオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化増殖あるいは生存に必要であることを示唆している。

(C) Hu タンパク質による神経幹細胞の分化制御機構の解明(岡野):

<狙いと実験計画>

神経細胞は、多能性の神経幹細胞から神経細胞のみを産み出す中間的前駆細胞(神経前駆細胞)を経て特定の神経細胞へ分化すると考えられている。神経前駆細胞は多能性神経幹細胞よりも効率よく神経細胞へ分化するため、神経幹細胞の分化過程を人為的に制御する技術を開発すれば、高い効率で神経前駆細胞を得ることができ、神経再生療法を大きく臨床応用に近づけることができる。神経疾患に対する細胞移植療法の確立を目標に、神経幹細胞から神経細胞への細胞分化制御メカニズムを分子レベルで解明していく。我々はこの研究の一環として神経幹細胞の増殖から神経分化へのスイッチングとそのタイミングを転写後調節によって制御していると考えられている神経特異的 RNA 結合タンパク質 Hu の機能解析を行った。RNA 結合タンパク質による転写後調節によってタンパク質の発現を制御する合理性は、極めて急激な発現オン・オフが可能であること、複数の標的の発現を同調して統合的に制御できること、核から離れたところで(たとえば神経樹状突起など)局所的な刺激に対しての発現制御による迅速な応答を可能にすることなどが考えられる。我々はすでに、PC12 細胞を使った神経分化モデルとマウス胚への電気穿孔法による Hu 遺伝子の導入実験によって、Hu タンパク質が in vivo における神経系の重要な分化促進因子であることを明らかにしてきた。次のステップとして、生化学的手法及び遺伝学的手法を駆使して Hu タンパク質ファミリー(HuB, HuC, HuD)の多角的な機能解析を行った。

- 1) Hu の下流遺伝子の検索: Hu が神経分化に関わる複数の因子の時間的、空間的発現を統合的に調節していると考え、Hu タンパク質が結合する基質 RNA の配列を同定することで、in vivo において Hu タンパク質が発現制御する下流遺伝子を解明し、神経幹細胞からニューロンへの分化過程に関わる調節因子群ネットワークを明らかにする。
- 2) Hu するタンパク質の検索 in vivo において Hu と複合体を形成するタンパク質群を同定することにより、Hu による転写後調節の分子機構を明らかにする。さらに Hu タンパク質と、Hu と相反する機能、つまり神経幹細胞の自己複製能を正に制御し神経幹細胞からニューロン系列への commitment を抑制している Musashi タンパク質との相互関係も探求する。
- 3) HuD, HuB 欠損マウスの作製とその解析 Hu タンパク質の哺乳類個体神経発生での機能をさらに詳細に解析するために、神経特異的な Hu ファミリーである HuB, HuD の欠損マウスを作製した。このマウスの神経分化を、免疫組織学的手法、初代培養を用いた細胞生物学的手法を用いて解析する。
- 4) HuB タンパク質の腫瘍細胞における機能: Hu タンパク質は元来、肺小細胞癌に強く発現する抗原分子として同定された。Hu タンパク質は、神経芽細胞腫や Ewing 肉腫といった神経堤由来の腫瘍にも強く発現することが知られている。我々はこれまでに神経堤由来の褐色細胞腫細胞株である PC12 細胞に対して、Hu タンパク質が細胞分裂を停止させ神経分化誘導を促進することを明らかにしたが、小児の固形腫瘍である神経芽細胞腫では細胞死を誘導することを明らかにした。この分子メカニズムを解明することにより、Hu 蛋白質の正常細胞分化、腫瘍細胞における増殖調節機能を検討する。

<実施内容>

- 1) Hu タンパク質が結合し制御していると考えられる下流標的 RNA を同定するため SELEX 法が適用され、Hu タンパク質が UGUUUGU の繰り返し配列に高い親和性で結合することが明らかになった。さらに SELEX 法を改良し、新生児マウス cDNA を使って新規に作製された SELEX ライブラリーによる検索を試みた結果、現在までに Hu タンパク質に高親和性に結合する3つの遺伝子配列 (p27Kip1 の5'UTR, PhospholipaseA2 の3'UTR, GAS41 の3'UTR) を同定した。実際にその全ての配列が UGUUUGU の繰り返し配列を含み、フィルター結合アッセイなどにより、これらの RNA に Hu が高親和性に結合することが確認された ($K_d=1.4 \times 10^{-9} \text{M}$)。Hu の標的候補として特に p27Kip1 5'UTR に絞って解析した結果、Hu はこの RNA に高親和性に結合し、その下流の遺伝子の発現を転写後調節によって促進していることがルシフェラーゼレポーター遺伝子を使った実験により明らかとなった。また、Hu タンパク質を培養細胞で過剰発現させると p27 のタンパク質発現が増加する事も確認された。Hu は細胞周期抑制因子である p27 のタンパク質発現を促進することによって、神経幹細胞から神経細胞への非可逆的な分化方向を決定付ける機能を担っているのではないかと考えられる。
- 2) 組み換えアデノウイルスによる Hu 強制発現系を使って培養細胞 (293T 細胞, Saos-2 細胞および培養神経幹細胞) から Hu と complex を形成する因子の精製を試み、75kd のタンパク質が全長 Hu タンパク質と結合することを示した。MALDI-TOF MASS による質量分析の結果、このタンパク質がポリ A 結合タンパク質であることが明らかとなり、Hu が mRNA 翻訳機構の重要な構成因子と直接結合して、翻訳制御因子として機能している可能性が考えられるようになった。さらに転写後調節によって神経分化を抑制する RNA 結合タンパク質 Musashi1 と、神経分化を促進する Hu の相互作用を解析するため、これらのタンパク質を培養細胞に過剰発現させたところ、互いに結合してヘテロ複合体をつくることがわかった。またマウス E14 胎児脳抽出液において抗 Hu 抗体を使った免疫共沈を行った結果、Musashi1 と Hu が in vivo でも複合体を形成していることが明らかとなった。実際、発達中のマウス中枢神経系でも分化途上の神経細胞がこの2つの RNA 結合タンパク質を同時に発現している時期が一過性にあることが免疫二重染色法による組織解析により明らかであり、神経幹細胞の増殖から神経分化へのスイッチングとそのタイミングが、これらふたつの RNA 結合タンパク質の相互作用によって調節されている可能性が示唆される。
- 3) 神経特異的 Hu ファミリーのうち、HuD および HuB を欠損するマウスを作製した。HuD 欠損マウスは正常に出生するが、運動失調、下肢の反射異常、体重増加不良を示す。発生過程の器官構築に大きな異常は認めないが、神経細胞のマーカーである Neurofilament を用いた免疫染色では HuD 欠損マウスは胎生10日目においては、第5、第8、第9脳神経の発生が野生型よりも遅延することが明らかになった。HuD は全てのニューロンに発現するが、特定の部位でのみ神経発生が遅延することから、他の Hu ファミリーと協調的に神経分化を促進していると考えられる。一方、早期の神経前駆細胞に強く発現すると考えられる HuB の欠損マウスは、現在、ホモ個体の作成中でその効果を検討している。この HuB 欠損マウスは、HuB 遺伝子領域に GFP をノックインしてあるため、これらのヘテロもしくはホモマウスから採取した細胞を GFP 蛍光強度によりソーティングし、神経細胞の前駆細胞と考えられる細胞を濃縮できると考えられる。

4) 白質を過剰発現させた神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞は細胞死を示す。これらの細胞では分化マーカーである Bcl-2 は予想に反して減少を示していた。抗細胞死効果を持つ Bcl-2 の減少が腫瘍細胞の細胞死感受性を高めたと考えた。Bcl-2 は、mRNA に Hu 蛋白質との親和性が高いとされる AU-rich 配列を持つ。この AU-rich 配列を持つ UTR(非翻訳領域)部分と、HuB 蛋白質との結合を UV-crosslink 法で調べたところ、HuB 蛋白質は Bcl-2 の mRNA の AU-rich 配列を持つ部分に特異的に結合した。一方、HuB を導入した SH-SY5Y 細胞から免疫沈降法で濃縮した HuB 蛋白複合体から、RT-PCR 法を用いて Bcl-2 の mRNA を検出することができた。すなわち in vitro, in vivo の両方で HuB は bcl-2 の mRNA に結合することが証明された。HuB は転写後調節機構を介して Bcl-2 の発現を抑制していると考えられる。現在、 β グロビン遺伝子の下流に、Bcl-2 の UTR 部分(AU-rich を含む UTR1,UTR2、含まない UTR3)を融合させた NIH-3T3 細胞株をそれぞれ樹立した。これらの細胞に HuB を導入した場合のレポーターである β -グロビン RNA の定量を RNase protection 法を用いて検討している。一方で、神経芽細胞腫モデルマウスへの HuB の導入を行っている。ヌードマウスに SH-SY5Y 細胞を腹腔内投与し、生着させることに成功した。これらのモデルマウスに HuB を発現するアデノウイルスを導入し、細胞死効果を検討する予定である。

(D) ショウジョウバエ成虫型神経幹細胞をモデルとした幹細胞生物学(岡野):

<狙いと実験計画>

哺乳類中枢神経系に存在する神経幹細胞はそれを取り巻く内在性及び外因性の因子の作り出す微小環境に反応して自己増殖を行いながらニューロン・グリを分化させていくと考えられている。再生医学的な観点からはこの微小環境をいかに作り出して内在性あるいは移植した神経幹細胞の増殖・分化を促進できるかが重要なポイントである。

一方、ショウジョウバエ成虫型神経幹細胞は胚期に神経外胚葉から分離して生じ、2令後期になって再び活性化されるまで分裂を休止しているが、その後自己増殖を繰り返しながら成虫脳の90%を構成する神経系細胞を生み出すという点で、これまで主に解析されてきた胚神経幹細胞とは大きく異なる。

これらの現象に共通のメカニズムとして、自己増殖の開始には、グリアや脂肪体などから分泌される液性因子や網膜神経の軸索末端から分泌される Hedgehog タンパク質が重要だということなどが少しずつ明らかになってきている。そこで、ショウジョウバエ成虫型神経幹細胞の再活性化から分化へと向かわせる新規因子を遺伝学的手法を用いて明らかにすることにより、哺乳類神経幹細胞の増殖分化の制御機構に共通する一般的メカニズムを明らかにすることを目的とする。

<実施内容>

1) L4-UAS- misexpression system を用いた新規遺伝子の検索:

我々は成虫型神経幹細胞で特に強く GAL4 を発現する系統を用いることにより、染色体上の様々な部位に挿入された UAS 配列を介し未知の遺伝子を強制的に発現させ、その表現型を解析することで神経幹細胞の増殖・分化に関わる可能性のある新規遺伝子を同定するというスクリーニングを開始した。これまでに行った第一次スクリーニングで、成虫型神経幹細胞の増殖・分化をそれぞれ促進するもの及び抑制するものを単離することができたので、現在はそれらのさら

に詳細な表現型の解析をおこなっており、順次、原因遺伝子の同定へと進めていく予定である。

2) 成虫型神経幹細胞の増殖・分化に対する Notch signaling の関与:

すでに哺乳類神経幹細胞の自己複製能と分化を制御する因子として Notch signaling 及び我々が同定した musashi1 遺伝子などが関与することが明らかとなっているが、ショウジョウバエ成虫型神経幹細胞においてそれらがどのように関与しているか全く明らかになっていない。そこで A) で同定される新規因子との相互作用を明らかにすることを念頭に置いて、まず、成虫型神経幹細胞におけるこれらの既知の因子の関与を明らかにした。哺乳類神経幹細胞で見られたように Notch signaling は、成虫型神経幹細胞の増殖に必須であり、Notch の antagonist として知られる numb がその増殖促進作用を拮抗的に抑制することがわかった。

(E) modifier による Notch signaling の微細な調節(岡野):

<狙いと実験計画>

前述のように少なくとも哺乳類神経幹細胞の増殖・分化の制御に Notch signaling が深く関与していることは明らかとなっているが、その Notch signaling 自体が、さらに m-numb, musashi1 などの modifier と呼ばれる修飾因子によってコンテキスト依存的に微細に調節されている可能性が高い。我々は、哺乳類中枢神経系を用いてそれら修飾因子の寄与を解析すると共に、遺伝子発現のパターンが極めて神経系細胞に酷似していながら、細胞系譜の追跡が容易な膵臓の islet の内分泌細胞を用いることで、単一細胞レベルでの Notch signaling の調節機構の解析が可能になると期待される。

<実施内容>

1) 哺乳類中枢神経系における m-numb の関与:

哺乳類中枢神経系において Notch signaling の antagonist としての m-Numb タンパク質の発現パターンは比較的早くから解析されていたが、isoform が複数存在する上に、抗体そのものの特異性に問題があることや antagonist であるはずの m-numb のノックアウトマウスの表現型が Notch signaling の欠失突然変異と同じ表現型を示すことなどが理由で、はっきりとした結論が出ていなかった。そこで我々は、それぞれの isoform を識別できる抗体をまず作製し、少なくとも2つの発現様式の異なる isoform が存在し、機能的にも異なる一増殖促進効果と分化促進効果一という可能性を見いだした。

2) 哺乳類膵臓における numb, musashi の機能解析:

Musashi1 ノックアウトマウスが中枢神経系において水頭症を示すことは報告済みだが、今年度は膵臓の islet の内分泌細胞の分化に着目して表現型を解析した。膵臓においても神経系細胞と同様に Notch signaling による抑制を受けるが、最終的に neurogenin3 を発現するようになった細胞から内分泌細胞が生じる。内分泌細胞は、さらにグルカゴンを産生する alpha 細胞、インシュリンを産生する beta 細胞など4種類の細胞に分化するが、Musashi1 のノックアウトマウスでは、alpha 細胞の減少及び beta 細胞の増加が見られたことから、内分泌細胞の分化機構に関与している可能性が示唆された。

(F) 核移植による胎仔大脳皮質神経幹細胞の全能性(小川):

<狙いと実験計画および実施内容>

大脳皮質の投射ニューロンは、脳室に面する脳室帯に誕生し、その後、脳表面に向けて垂直方

向に移動し、神経板の中で分化する。マウス大脳では投射ニューロンはE11からE17にかけて誕生する。このように胎生中期の大脳壁は、脳室側の増殖帯と神経板の分化層の2局化した領域を備えているとみなすことができる。胎生中期の大脳壁を神経板下(subplate)で二分し、低密度培養によって、それぞれにおける細胞系譜を調べたところ、神経板側の細胞はそのほとんどが既にニューロンへとコミットされているのに対して、脳室側からは stage に依存して、数%の割合で神経幹細胞が存在していることを先に明らかにしてきた。今回、遊離した細胞から核を抜き出し、除核卵に移植して体細胞クローンができるか調べた。脳室側の遊離細胞から取り出した核では、約 70 例中 5.8%に正常なクローンマウスが誕生した。この成功例の割合は、これまでの体細胞核移植の成功率をはるかに凌ぐものであり、またES細胞の場合よりも高率であった。一方、神経板側の細胞から取り出した核では、ほとんど正常なマウスは誕生しなかった(約 400 例中 1 例(0.2%)において正常なマウスが誕生した)。これらの核移植の結果は、マウス胎生中期の大脳壁の神経幹細胞核は、全能性を保有していることを示している。今後、ニューロスフェア培養法で確立された胎生神経幹細胞ならびに成体からの神経幹細胞に対しても、核移植実験を行って、全能性の有無を検索してみる。

Reference: Yamazaki,Y., Makino,H., Hamaguchi-Hamada, K., Hamada,S., Sugino,H., Kawase,E., Miyata,T., Ogawa,M., Yanagimachi,R., Yagi,T. (2001) Assessment of the developmental totipotency of neural cells in the cerebral cortex of mouse embryo by nuclear transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98, 14022-14026.

(G) 大脳壁における神経幹細胞の分裂様式とニューロン産生ならびにその移動について(小川):
<狙いと実験計画および実施内容>

大脳壁におけるニューロン誕生と移動の細胞/分子レベルのメカニズムを調べるべく、マウス胎生中期の大脳壁スライス培養法を開発した。軟膜側から Dil でラベルされる radial cells の、細胞周期に伴う細胞形態の推移をタイムラプス記録した。まず、別の研究機関と前後して、これまで分化した細胞と捉えられてきた radial glial cells の多くが、progenitor cells ないし神経幹細胞であることを明らかにした。つぎに、progenitor cells は軟膜面に達する apical process を保持したまま脳室帯で細胞分裂すること。この際に、neuron (N)と progenitor cell (P)および P と P の誕生が観察され、いずれか一方の姉妹細胞に apical process が受け継がれた。N と P の誕生の際には、親の apical process は N に受け継がれ、この process の短縮、ならびに basal process の消失等に併せて、N が垂直方向に移動する様子が観察された。N と P ならびに P と P の誕生に併せて、親の apical process を受け継がなかった P 細胞からは、誕生と同時に、新しい apical process 伸長させ、1-2 日の間に軟膜面に達することが観察された。また P 細胞から P 細胞更に次世代の P 細胞の誕生が観察され、それに併せて、P 細胞の核のエレベーター運動が記録された。皮質の progenitor 細胞は apical process を消失ないし短縮して細胞分裂すると従来は考えられてきたが、実際には、apical process を保持したまま分裂するなど、神経幹細胞の細胞分裂様式に新たな知見を提起した。

References: Miyata,T., Kawaguchi,A., Okano,H., Ogawa,M. Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron*, 31, 727-741, 2001

発達脳における神経細胞の移動:新しいニューロン移動法とその原理

宮田卓樹、川口綾乃、岡野栄之、小川正晴: *生体の科学*, 52(3), 224-229, 2001

(H) Reelin signal cascade と cdk5/p35 のクロストーク(小川):

<狙いと実験計画および実施内容>

大脳皮質における投射ニューロンならびに小脳における Purkinje 細胞は、それぞれ脳室面で誕生した後、放射状に移動し、規則的な位置に配置される。この際に、特定細胞から分泌される細胞外基質分子 Reelin と投射ニューロンならびに Purkinje 細胞に発現する膜 Reelin receptors およびその細胞質のアダプター分子 Dab1 からなる Reelin シグナル伝達が重要な役割を担っている。これらの分子ならびにそれらをコードする遺伝子に異常があると、皮質ニューロンの配置が異常になる。しかし、Dab1 以降のシグナル伝達の機構は不明である。一方、Cdk5/p35 キナーゼ欠損マウスにおいて、リーラーマウス様の皮質構築異常が報告されている。そこで、Cdk5/p35 キナーゼが Dab1 の下流にある可能性が指摘されてきた。両者の関係を明らかにすべく、p35 と Reelin あるいは Dab1 の両者の欠損したミュータントマウスを作製し解析した。その結果、cdk5/p35 は Reelin シグナルの下流としては機能しないが、両者は共同的に皮質ニューロンの位置決定に機能することを明らかにした。

Reference: Ohshima, T., Ogawa, M., Veeranna, Hirasawa, M., Longenecker, G., Jshiguro, K., Pant, H.C., Brady, R.O., Kulkarni, A.B., and Mikoshiba, K. Synergistic contributions of Cdk5/p35 and Reelin/Dab1 to the positioning of cortical neurons in the developing mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 2764-2769(2001).

(2) 胚性幹細胞からの特定ニューロンの in vitro 分化誘導と選択的分離(岡野):

<狙いと実験計画>

多くの神経変性疾患では、特定タイプのニューロンが変性・脱落するため、本研究ではこれらを試験管内で分化誘導し、大量調整する技術を開発する。しかし、神経幹細胞の核は全能性を有しているものの、筋萎縮性側索硬化症(ALS)において変性が起きる運動ニューロンや、小脳変性症において変性しているプルキンエ細胞等、発生の初期段階でのみで生産されるニューロンを神経幹細胞から試験管内で誘導することは、実際的には困難であることが経験的に判ってきた。そこで、ES 細胞からの分化誘導法を確立し上記項目(2)で確立した分離技術を駆使し、選択的な分離を行う。単に分化誘導するのみならず、自ら樹立してきた選択的細胞分離法と組み合わせた技術開発を行なっている。

<実施内容>

ES 細胞由来神経幹細胞の分化誘導能の検定とそれを利用した特定神経変性疾患モデルマウスの治療: これまでに、Embryoid Body (EB)の形成を介した ES 細胞から分化誘導と選択的培養法(neurosphere 法)によって得られた神経幹細胞を含む神経系前駆細胞は、in vitro で分化させるとそのほとんどがニューロンになり、Isl-1 および ChAT を発現する運動ニューロンを含むコリン作動性ニューロンと GAD67 を発現する GABA 作動性ニューロンを含んでいることが分かった。そして、これら ES 細胞由来神経前駆細胞をマウス成体脳の海馬に移植したところ in vitro と同様にニューロンに分化し、その中にはコリン作動性ニューロンが多く含まれていることが分かった。そこで、コリン作動性ニューロンの分化効率をさらにあげるために、この神経幹細胞の選択的培

養時に sonic hedgehog を加えたところ、in vitro でのコリン作動性ニューロンの分化効率が 50% 程度まで上昇させることができた。

(3) 神経幹細胞、中間前駆細胞の選択的分離法の確立(岡野):

<狙いと実験計画>

中枢神経系では、神経幹細胞-神経前駆細胞-幼弱ニューロン-特定ニューロンという系譜を経て分化が進行するが、比較的解析の進んでいる血球系とは異なり、分離のよりどころとなる細胞表面マーカーが不明なために、脳組織よりこれらの細胞を直接分離する方法が未だ確立できていない。そのため特定の個性を持ったニューロンへの分化誘導機構に関しては、十分な研究がなされているとは言えない。本研究ではこれらの問題をクリアーすることを目的とし、特定タイプのニューロンを選択的に分離する方法を確立する。

<実施内容>

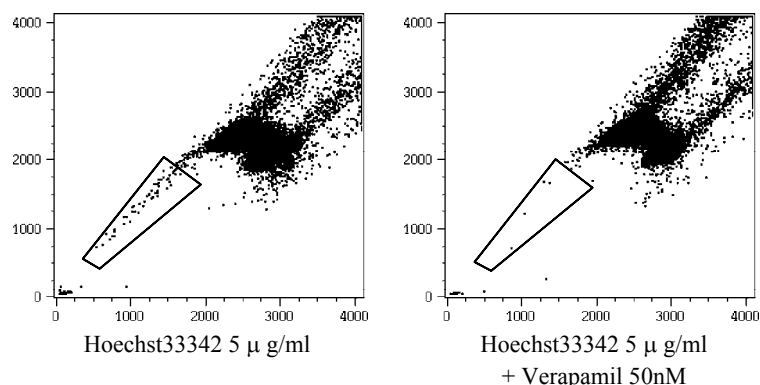
1) GFP レポーター遺伝子を用いた分離技術:

ニューロンは、多能性を持つ神経幹細胞からニューロンのみを産み出す中間的前駆細胞(ニューロン前駆細胞)を経て特定のニューロンへ分化すると考えられている。ニューロン前駆細胞は多能性神経幹細胞よりも効率よく成熟型ニューロンへ分化するため、神経疾患の細胞移植療法への応用が期待される細胞と言える。しかしながら、このニューロン前駆細胞に特異的に発現する細胞表面マーカーがないため、従来この細胞を生きたまま同定・分離することは不可能であった。我々はニューロン前駆細胞を可視化し生きたまま分離することを目的として、蛍光波長の異なる2つの GFP 変異体 EGFP と EYFP を、ニューロン分化初期過程の互いに重複した異なる時期に発現する2つの遺伝子 Nestin と T 1 の制御下で発現するトランスジェニックマウスを作出した。Nestin-EGFP は、多能性神経幹細胞で最も強く発現し、ニューロンまたはグリアへの分化と共にその発現が低下した。一方、T 1-EYFP は増殖性のニューロン前駆細胞と幼弱なニューロンのみに発現し、多能性神経幹細胞とグリア細胞には発現しないことが明らかになった。Nestin-EGFP と T 1-EYFP の両方を有するトランスジェニックマウスの胎仔神経系組織より、EGFP/EYFP 二重陽性細胞を FACS によって分離し解析したところ、効率よく分裂してニューロンのみに分化することが明らかになった。こうしたニューロン前駆細胞の分離法はニューロン分化制御機構の研究や新たな神経疾患治療法の開発に役立つものと考えられる。

2) NA 色素を用いた分離技術:

一方で、当研究室では Hoechst 33342 という DNA に結合する色素を用い、抗体を使用しない新たな幹細胞純化法を試みている。Hoechst 33342 は、Bisbenzimid というクラスに属する蛍光色素で、細胞透過性が非常に高く、そのため生きた細胞に細胞を固定することなく取り込まれる。また、単一の色素でありながら UV で励起された時に、405nm および 600nm の蛍光を発し、骨髄細胞染色では通常の Cell Cycle アッセイで見られる G0/G1 および S/G2 の分画の他に、G0/G1 よりもさらに暗い部分に非常に特異なパターンを持つ Hoechst 陰性の細胞集団が存在する。この細胞群は Linear な細胞集団からやや横にずれて突出した形で存在することから Side Population Cells (以下 SP 細胞) と名付けられた。

骨髄細胞の Hoechst33342 染色パターン



骨髄中に存在する最も未熟な細胞はこの SP 細胞中に存在することがすでに報告されているが、当研究室ではこの方法を用いて神経幹細胞の同定への可能性を調べた。SP 細胞は骨髄だけでなく様々な臓器で同等の細胞分画が存在しており、特に神経系では当研究室で作製した *nestin*-EGFP トランスジェニックマウスを用い、神経幹細胞が終生存在する線条体細胞について解析を行ったところ、SP 細胞は胎児性神経幹細胞を多く含む *nestin*-EGFP 強陽性細胞および、*nestin*-EGFP 弱陽性細胞にまたがって存在していることが明らかになった。また各種細胞表面マーカーとの関係を調べ、特に成体における神経幹細胞分画 (CD24^{low}/PNA^{low}) に SP 細胞が完全に含まれることを見いだした。さらに線条体・大脳皮質・海馬それぞれについて SP 細胞をソーティングし、神経系を中心とした各種細胞マーカー (III tubulin, GFAP, Musashi1, etc.) に対する抗体で染色したところ、未分化な神経系細胞で発現している Notch1 が、どの発生段階においても約60%の細胞で発現されていた。以上の結果より、Hoechst33342 用いた神経SP細胞分離法は多能性を持つ神経幹細胞を分離する非常に有用な手段であることが示唆され、現在その機能について検討を始めている。

(3) 神経疾患モデル動物への細胞移植による細胞補充とニューロンネットワーク

ワーク再建による機能修復の試み (岡野) :

<狙いと実験計画>

(2)(3)の実験により分離した神経幹細胞、神経前駆細胞、特定のニューロンを下記のような各種神経変性疾患のモデル動物の損傷部位へ移植し、機能修復のための tactics を検討する。

1. 記憶障害マウス
2. パーキンソン病/ 6-OH ドーパミン投与ラット
3. 筋萎縮性側索硬化症モデルマウス

<実施内容>

ES 細胞由来神経幹細胞を利用した特定神経変性疾患モデル動物の治療

1) *in vivo* におけるコリン作動性ニューロンの分化と記憶障害マウスの機能回復: ES 細胞から分化誘導される神経幹細胞の *in vivo* における分化能を検定するとともに、コリン作動性ニューロンの変性による記憶障害の治療への有効性も確かめた。具体的には、上記の *in vitro* でコリン作動性を効率的に生産できる神経前駆細胞の培養系を用い、そこで得た神経系前駆細胞を、イボ

テン酸によって中隔核のコリン作動性ニューロンを変性脱落させ記憶障害を起こしたマウスの海馬に移植した。記憶障害の程度は水迷路テストにより検定した。その結果、分化生着したニューロンのほとんどはコリン作動性ニューロンであり、記憶障害も回復させることが分かった。

2) ES 細胞由来のドーパミン作動性ニューロンの精製と移植によるパーキンソン病モデル動物の治療:ES 細胞をストローマ細胞の一種である PA-6 細胞をフィーダー層として無血清培地で培養すると、ドーパミン作動性ニューロンが効率良く分化誘導できることが知られているが、我々はこの ES 細胞由来ドーパミン作動性ニューロンの精製とパーキンソン病モデルラットへの移植を試みている。具体的には、ES 細胞に、ドーパミン作動性ニューロンに発現している Tyrosinhydroxykase 遺伝子のプロモーター制御下で GFP 遺伝子を発現するベクターを導入し、実際にドーパミン作動性ニューロンに特異的に GFP を発現する ES 細胞系統を樹立し、分化誘導後 FACS で精製分離し、モデルラットに移植する。現在までにドーパミン作動性ニューロンに選択性高く GFP を発現する細胞系統がいくつか得られており、これらを使って移植実験を行なっている。これらの他に、現在我々は運動ニューロンを効率的に生産する神経幹細胞を ES 細胞より *in vitro* 分化誘導するシステムの開発も行っており、これらの細胞を運動ニューロンが変性脱落疾患である ALS のモデル動物胎仔へ移植することによって、*in vivo* での機能検定も行う予定である。

(4) その他の研究(岡野):

小脳 Purkinje 細胞における樹状突起への IP₃ receptor type 1 mRNA 局在化機構

<狙いと実験計画>

神経系細胞では、その神経突起上に種々の特定の mRNA が局在していることが報告されている。これらは局所的な刺激に対して、発現制御による迅速な応答を可能にすることでシナプスの可塑性をはじめ、ニューロンの構造的、機能的極性を構築すると推測されている。そしてこれらの mRNA の輸送には mRNA の持つ 3'末端非翻訳領域(3'UTR)が深く関わっていることがこれまで示されてきた。我々は特に、小脳 Purkinje 細胞において樹状突起に局在化する事が知られる IP₃R1(IP₃ receptor type 1) の mRNA に注目し、その mRNA 局在化機構の分子メカニズムを明らかにすることによって、神経系において観察される mRNA 局在化という現象の生理的意義を解明する。

<実施内容>

我々は IP₃R1 mRNA の 3'UTR とその配列に結合する因子が mRNA の局在化に重要な役割を果たしているのではないかと考え、放射線ラベルされた IP₃R1 3'UTR 配列をプローブとしてマウス小脳ライブラリーの expression library screening を行った。その結果、三つの Zinc Finger C2H2 motif をもつ遺伝子が同定され、後に Bernstein らによって血球系細胞からクローニングされた hzf (Hematopoietic Zinc Finger) と同一遺伝子であることがわかった。UV cross-link assay により Hzf タンパク質は IP₃R1 mRNA の 3'UTR 配列に特異的に結合することが確認され、引続きより詳しい結合配列の検索をおこなっている。hzf は脳と精巣に強く発現し、中枢神経系においては小脳 Purkinje 細胞の細胞質および樹状突起、海馬ニューロンなどに発現が認められ、その発現パターンは IP₃R1 と高い類似性を示している。共同研究として Bernstein らが作成した hzf 欠損マウスの中枢神経系における解析を進めた結果、Purkinje 細胞の樹状突起での IP₃R1 mRNA が減少している個体が存在していることが *in situ* hybridization 法によって明らかとなった。さらにこのマウスでは ataxia

様の神経症状も観察されることから、神経細胞における mRNA 局在化機構と LTD および瞬目反射などの高次機能現象との関連についても現在解析を進めている。

3. 研究実施体制

岡野栄之研究グループ(慶応義塾大学医学部/生理学教室)

研究題目:神経幹細胞、中間前駆細胞、特定タイプのニューロンの選択的分離法の確立

島崎琢也研究グループ(大阪大学大学院医学系研究科/神経機能解剖学教室)

*9月より慶應/岡野栄之研究グループと統合

小川正晴 研究グループ(理化学研究所 脳科学総合研究センター)

研究題目:核移植による胎仔大脳皮質神経幹細胞の全能性

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Toda, M., Iizuka, Y., Yu, W.-J., Ikeda, E., Yoshida, K., Imai, T., Kawase, T., Kawakami, Y., Okano, H. and Uyemura, K.: Expression of the neural RNA-binding protein Musashi1 in human gliomas. *Glia* 34, 1-7 (2001)
- Mori, H., Sakakibara, S., Imai, T., Nakamura, Y., Iijima, T., Suzuki, A., Yuasa, Y., Takeda, M. and Okano, H.: Expression of mouse igf2 mRNA-binding protein 3 and its implication in the developing central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 64, 132-143 (2001) (*H. Okano is the corresponding author in this paper)
- Murata, T., Nagaso, H., Watanabe, S., Okano, H. and Yokoyama, K.: The *hiiragi* gene encodes a poly(A) polymerase, which controls the formation of the wing margin in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 233: 137-147 (2001)
- Okabe, M., Imai, T., Kurusu, M., Hiromi, Y. and Okano, H.: Translational repression determines a neuronal potential in *Drosophila* asymmetric cell division. *Nature* 411, 94-98, 2001 (*H. Okano is the corresponding author in this paper)
- Sawamoto, K., Yamamoto, A., Kawaguchi, A., Yamaguchi, M., Mori, K., Goldman, S.A. and Okano, H.: Visualization and direct isolation of neuronal progenitor cells by dual-color flow cytometric detection of fluorescent proteins. *J. Neurosci. Res.* 65, 220-227 (2001) (*H. Okano is the corresponding author in this paper)
- Sawamoto, K., Nakao, N., Kakishita, K., Ogawa, Y., Toyama, Y., Yamamoto, A., Yamaguchi, M., Mori, K., Goldman, S.A., Itakura, T. and Okano, H.: Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a nestin-GFP transgene. *J. Neurosci.* 21, 3895-3903 (2001) (*H. Okano is the corresponding author in this paper)
- Imai, T., Tokunaga, A., Yoshida, T., Hashimoto, M., Weinmaster, G., Mikoshiba, K., Nakafuku, M. and Okano, H.: The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates the *m-numb* gene expression by interacting with its mRNA. *Mol. Cell Biol.* 21,

3888-39000 (2001)

(*H. Okano is the corresponding author in this paper)

- Sawamoto, K., Nakao, N., Kobayashi, K., Matsushita, N., Takahashi, H., Kakishita, K., Yamamoto, A., Yoshizaki, T., Terashima, T., Murakami, F., Itakura, T. and Okano, H.: Visualization and direct isolation of midbrain dopaminergic neurons expressing GFP. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 98, 6423-6428 (2001)
- (*H. Okano is the corresponding author in this paper)
- Uchida M, Hanai S, Uematsu N, Sawamoto K, Okano H, Miwa M, Uchida K.: Genetic and functional analysis of PARP, a DNA strand break-binding enzyme. *Mutat Res* 47, 89-96 (2001)
- Ishida Y., Nakamoto H., Imai H., Suzuki S., Okano H. and Suzuki H: Heme oxygenase-1 regulates vascular tone of the peritoneum undergoing peritoneal dialysis. *Advances in Peritoneal Dialysis* 17, 15-19 (2001)
- Li, R-Y, Baba, S., Kosugi, I., Arai, Y., Kawasaki, H., Shinmura, Y., Sakakibara, S. Okano, H. and Tsusui, Y.: Activation of murine cytomegalovirus immediate-early promoter in cerebral ventricular zone and glial progenitor cells in transgenic mice. *Glia* 35, 41-52 (2001)
- Yagita, Y., Kitagawa, K., Otsuki, T., Kuwabara, K., Mabuchi, T., Miyata, T., Okano, H., Hori, M., and Matsumoto, M.: Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke* 32, 1890-1896 (2001)
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., and Ogawa, M.: Asymmetric inheritance of radial glial fibers to neurons during corticogenesis in mice. *Neuron* 31, 727-741 (2001)
- Kohyama, J., Abe, H., Shimazaki, T., Koizumi, A., Nakashima, K., Taga, T., Okano, H., Hata, J. and Umezawa, A.: Brain from Bone: Efficient "meta-differentiation" of marrow stromal-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation* 68, 235-244 (2001)
- Keyoung, H.M., Roy, N.S., Benraiss, A., Louissaint, A. Jr., Suzuki, A., Hashimoto, K., Rashbaum, W.K., Okano, H and Goldman, S.A.: Prospective identification, selection and extraction of two distinct pools of neural stem cells from fetal human brain. *Nature Biotech.* 19, 843-850 (2001)
- Kanemura, Y., Mori, K., Sakakibara, S., Ohnishi, T., Fujikawa, H., Hayashi, H., Matsumoto, T., Imai, T., Ohnishi, T., Fushiki, S., Nakamura, Y., Yamasaki, M., Okano, H. and Arita, N.: Musashi1, an evolutionarily conserved neural RNA-binding protein is a versatile marker of human glioma cells in determining their cellular origin, malignancy and proliferative activity. *Differentiation* 68, 141-152 (2001)
- Sakakibara, S., Nakamura, Y., Satoh, H., and Okano, H.: RNA-binding protein Musashi2: developmentally regulated expression in neural precursor cells and subpopulation of neurons in mammalian CNS. *J. Neurosci.* 21, 8097-8107 (2001)
- Yamamoto, N., Matsunaga, E., Yamamoto, S., Kobayashi, D., Torii, M., Kawaichi, M., Kishi,

- N., Matsuno, K., Okano, H. and Nakafuku, M.: Deltex as a nuclear signal transducer downstream of the Notch receptor. *J.Biol.Chem.* 276, 45031-45940 (2001)
- Yamazaki, Y., Makino, H., Hamaguchi-Hamada, K., Hamada, S., Sugino, H., Kawase, E., Miyata, T., Ogawa, M., Yanagimachi, R., Yagi, T. (2001) Assessment of the developmental totipotency of neural cells in the cerebral cortex of mouse embryo by nuclear transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98, 14022-14026.
- Saunders, P.T.K., Maguire, S.M., Macpherson, S., Fenelon, M.C., Sakakibara, S. and Okano, H.: The RNA binding protein Musashi1 (Msi1) is expressed in the cytoplasm and nucleus of Sertoli cells in the rat testis from fetal life to adulthood. *Biology of Reproduction* 66, 500-507 (2002)
- Uchida M, Hanai S, Uematsu N, Sawamoto K, Okano H, Miwa M, Uchida K.: Overexpression of poly(ADP-ribose) polymerase disrupts organization of cytoskeletal F-actin and tissue polarity in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 277, 6696-6702 (2002)
- Matsuno, K., Ito, M., Hori, K., Miyashita, F., Suzuki, S., Kishi, N., Artravanis-Tsakonas, S. and Okano, H.: Involvement of a proline-rich motif and a RING-H2 finger in a function of Deltex as a regulator of Notch signaling. *Development* 129, 1049-1059 (2002)
- Takasawa, K.-I., Kitagawa, K., Yagita, Y., Sasaki, T., Tanaka, S., Ohtsuki, T., Miyata, T., Okano, H., Hori, M., and Matsumoto, M.: Increased proliferation of neural progenitor cells but reduced survival newborn cells in the contralateral hippocampus after focal cerebral ischemia in rats. *J. Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22, 299-307 (2002)
- Iwai, Y., Hirota, Y., Ozaki, K., Okano, H., Takeichi, M. and Uemura, T.: DN-cadherin-dependent synaptogenesis in the *Drosophila* visual system. *Mol.Cell.Neurosci.* 19, 375-388 (2002)
- Shamloula, H.K., Mbogho, M.P., Pimentel, A.C., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M.A., Hyatt, V., Okano, H. and Venkatech, T.R.: *rugose (rg)*, a *Drosophila* A kinase Anchor Protein (DAKAP), is required for required for retinal pattern formation and interacts genetically with multiple signaling pathways. *Genetics* in press
- Yagita, Y., Kitagawa, K., Sasaki, T., Miyata, T., Okano, H., Hori, T. and Matsumoto, M.: Musashi1 and Nestin as useful markers of neuronal progenitor cells in rat hippocampus after forebrain ischemia. *J. Neurosci.Res.* In press
- Ogawa, Y., Sawamoto, K., Miyata, T., Miyao, S., Watanabe, M., Toyama, Y., Nakamura, M., Bregman, B.S., Okano, H.: Transplanted neural progenitor cells differentiate into neurons in vivo and improve motor function after spinal cord contusion injury in rats. *J. Neurosci.Res.* In press
- Okano, H.: The stem cell biology of the central nervous system. *J. Neurosci.Res.* In press
- (2) 特許出願
 国内 5件
 国外 3件