

「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生理学教室 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

- [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
 - (B) Huタンパク質による神経幹細胞の分化制御機構の解明
 - (C) 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
 - (D) modifierによるNotch signalingの微細な調節
 - (E) 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
- [2] ES細胞より分化誘導した神経細胞のFACSによる分離・培養・移植
- [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

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

神経幹細胞に強く発現するMusashi1 (Msi1)蛋白質は*m-numb*、*pleiotrophin*を含む下流標的mRNAの翻訳制御を行う因子であることを明らかにしてきた。本年度、我々はMusashiを介する翻訳調節のメカニズムを解明のために、TAP (Tandem Affinity Purification) 法を用いてMsi1に結合する共役な蛋白質の濃縮・精製を行い、MALDI-TOF MS法で二種の蛋白質を解析した。その結果、Poly(A) Binding Protein 1 (PABP1)、*IGF2* mRNA Binding Protein (IMP)が同定された。PABPは、mRNAのpoly(A)鎖に結合し、さらに翻訳開始複合体の中心的分子eIF4Gと結合することにより、5' -capを介した翻訳を促進することが知られている。そのPABPに対してMsi1は、eIF4Gと競合して結合することにより、PABPとeIF4Gとの結合を積極的に解除または弱めていることを試験管内の結合実験で明らかにした。基本翻訳分子ネットワーク内でのMsi1の位置づけが明らかになったことにより、*m-numb*の翻訳を抑制することで見出されたMsi1の翻訳調節能について作用メカニズムの一部を解明することができた。IMPは、mRNAの輸送・翻訳調節に関わる因子として知られているが、現在Msi1の機能との相関について調べているところで

ある。Musashi蛋白質の機能をマウス個体レベルで調べるために*musashi1*, *musashi2*それぞれ単独で欠損したマウス二種および二重欠損マウスの解析を行っている。本年度、*musashi2*のみ欠損したマウス個体において、温度知覚異常・痛覚異常があることを見出した。さらに、末梢神経の伝達異常を原因として疑い、dorsal root ganglia (DRG)における神経束の繊維走行異常があることを発見した。現在、*musashi2*欠損マウスにおいて発現量変化が起きている下流標的遺伝子の同定作業を進めており、候補遺伝子として*stathmin*を考えている。また、神経束の繊維走行異常が細胞内自律的な効果によるものか道標細胞の変化などが考えられる細胞非自立的な効果によるものかの検証を進めている。

(B) Huタンパク質による神経幹細胞の分化制御機構の解明

神経特異的RNA結合タンパク質Huは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が、その詳細な分子機構は不明であった。昨年までに我々は生化学的手法を用いてRNA結合タンパク質であるhnRNPK、NF45、methyltransferaseの1つであるSKB-1など5つの蛋白質がHuと複合体を形成することを明らかにした。これらの蛋白質複合体がどのように転写後調節に関わるのか、その分子メカニズムを明らかにするためより詳細な解析を行った。in vivo およびin vitroにおけるPull-down assayによりhnRNPKがRNAを介さず直接Huに結合し、そのHu結合ドメインがKH2ドメインとKH3ドメインの間のspacer regionのRG-rich配列であることが明らかとなった。次に我々はHuの標的mRNAと考えられている細胞周期抑制因子p21の翻訳調節機構をモデルとしてHuとhnRNPKの機能的関係を解析した。Huは転写後レベルでp21の発現を促進することが知られているが、p21 mRNA 3' UTRにはHu結合配列以外にhnRNPK結合コンセンサス配列が存在することがわかった。これらのRNA配列との結合実験およびレポーターアッセイを行ったところ、hnRNPKは非常に特異的かつ高親和性にp21 mRNA 3' UTRに結合し、p21 mRNAの翻訳を抑制することが明らかとなった。さらに神経分化誘導モデルであるマウス神経芽腫株N1E-115を用いた実験により、Huの神経分化誘導作用、増殖抑制作用およびp21発現促進作用をhnRNPKが発現量依存的に相殺することがわかった。これらの結果から、hnRNPK1はHuに結合してその機能を抑制するアンタゴニストとしての働きがあることが示された。これはin vivoにおいてもこれらの2つのRNA結合タンパク質が共役して神経分化のスイッチングを行っているという可能性を示唆しており、現在我々は生体内におけるHuとhnRNPKの機能的相互作用を確認するため、マウス胎児脳-電気穿孔法による詳細な解析を行っている。一方HuD欠損マウスの解析により、このマウスが正常に出生するが運動失調、下肢の反射異常、体重増加不良を示し、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を明らかにした。このマウス胎児由来神経幹細胞を用いてneurosphere assay を行ったところ、ノックアウトマウスにおいてneurosphere形成能が優位に上昇している上、神経への分化能が低下していることが明らかとなった。さらに胎児および成体マウスにおいてBrdU/IdU二重標識実験を行った結果、脳室周囲領域においてquiescentな細胞の数が減少し、分裂し

ている細胞の数が増加していることが観察された。これらの結果から、HuDがin vivoにおいて細胞分裂を抑制しさらに神経分化を誘導していることが強く示唆された。現在HuB欠損マウスについても同様の解析を行っている。

(C) 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-Notch signaling
を中心として

Notch シグナルは哺乳類神経幹細胞の未分化状態および自己増殖性の維持に関与することが示唆されているが、他の増殖シグナルとどのように協調して働くか、また神経幹細胞が分化する際には、そうした増殖シグナルがどのような機構で抑制されるのか等については明らかでない。我々が着目しているショウジョウバエ視覚原基の成虫型ニューロブラストは哺乳類神経幹細胞同様に、対称分裂を行う増殖期の後に非対称分裂を行ってニューロン・グリアを分化させる分化期が続くという点でこうした問題を明らかにするモデル系として適していると考えている。Notchの機能欠損型および機能獲得型の突然変異体を用いた遺伝学的解析によりNotchは対称分裂を行っている増殖期にも、非対称分裂を行っている分化期にも成虫型ニューロブラストが増殖能を維持するために必要・十分であることを見いだした。しかし、一方で神経前駆細胞 (GMC:ganglion mother cell) においてはNotchの活性が抑制されなければニューロンやグリアに分化できない事も明らかになった。さらに非対称分裂期には成虫型ニューロブラストにおいて aPKCやMiranda (細胞運命決定因子を運ぶと考えられる) タンパク質がそれぞれapical側、basal側に局在し、それらが娘細胞に非対称に分配されることで自己を複製しつつも神経前駆細胞を同時に産生するが、NotchがないとaPKCやMirandaが本来なら対称分裂をするべき時期に早急に非対称分配にされてしまうことからNotchは増殖期にaPKCやMirandaの対称な局在を維持するのに必要であることが示唆された。

以上のことと我々が既に明らかにしている幼虫後期になってはじめて発現を開始する α -adaptinとNumbとの共役作用によりNotchを分解することが増殖期から分化期への転換に必要であるということを考え合わせると以下のようなモデルが考えられる。

Notchは成虫型ニューロブラストの増殖と細胞運命決定因子の均一な分布に必要であり、幼虫後期 (分化期) になると、アダプター分子Numbとの結合を介して α -Adaptinが、おそらくエンドサイトーシスによりNotchタンパク質を分解に導くことによってダウンレギュレートし、その結果として細胞運命決定因子が神経前駆細胞へと非対称に分配されるため、その細胞は一回だけ分裂をしてニューロン・グリアへと分化すると考えられる。

(D) modifierによるNotch signalingの微細な調節

昨年までにMusashi 1及びNumbによるNotch signalingの制御機構を遺伝学的、生化学的手法により明らかとしてきた。Notch signalingの活性化は細胞の未分化維持に必須であり、その発現及び活性化パターンは未分化な細胞を反映していると考えられる。しかし生体内での詳細な発現部位及び活性化部位は不明であった。そこで我々は生体内でのNotch signalingを理解する第一段階として、活性化状態の可視化を試みた。細胞内

ドメインが切断されたNotch1 蛋白質（活性化Notch1）を特異的に認識する抗体を用いた免疫組織化学によりマウス胎生初期の脳におけるNotch1の活性化パターンを解析したところ、Notch1の活性化は脳室周囲に存在するNestin陽性の放射状グリアの一部においてのみ認められ、Mash1及びNgn2といったproneuronal bHLH因子の発現が陽性のニューロン前駆細胞や成熟したニューロンには検出されなかった。BrdU標識実験により、活性化Notch1が検出される細胞の大半が増殖能を有することが明らかとなった。更に、Notch1の活性化と細胞周期との関係を詳細に解析したところ、Notch1は主にDNA合成期(S期)において活性化し分裂期(M期)には不活化されていることが明らかになり、細胞周期に依存して調節されている可能性が示唆された。これらの結果より、Notch1は、神経幹細胞を含む増殖性の未分化な細胞集団において活性化することが明らかとなった。次に、胎生期後期及び生後のマウス脳におけるNotch1の活性化パターンを検討した。胎生後期においてもNotch1は放射状グリア様の細胞に強く発現していた。Notch1の活性化は、Glutamine synthetase陽性/GFAP陰性の幼若なアストロサイトにおいても認められたが、GFAP陽性の成熟アストロサイトにおいては殆ど検出されなかった。これらの結果から、Notch1がアストロサイト分化の初期過程において一過性に活性化し何らかの機能を果たしていることが示唆された。

現在、Notch signalingの標的遺伝子であるHes1遺伝子のプロモーター制御下でGFPを発現するレポーターベクター及びそのトランスジェニックマウスを作製し、より詳細な解析を行っている（尚、この下線部の研究結果につきましては、特許出願を考えておりますので、その公開については、出願まで見合わせていただけましたら幸いです。詳細については、岡野までお問い合わせ下さい）。

(E) 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：大脳皮質原基の前駆細胞の多くは脳室面で分裂する（surface-dividing cells = SD cells）。この事実がニューロン移動や「エレベーター運動」などの分子機構探究の前提となってきた。しかし脳室面ではなく、前駆細胞層とその外側を占めるニューロン層との境界にあたる箇所、つまり深部で分裂する前駆細胞もある。従来そうした非脳室面分裂細胞（non-surface-dividing cells = NSD cells）はグリア産生の役割で語られてきた。そしてその形態、細胞周期依存的運動については、多数派でありかつ細胞標識が容易な SD cells に関するとは対照的に、全く謎であった。今回、胎生13-14日マウスを用いて、その生きた大脳壁をスライス培養し、NSDの時空間的な実態を検証してみた。第一に、この謎多き NSD cells がニューロン産生の重要な担い手である（脳室面分裂に比べて娘細胞2つともがニューロンである頻度がきわめて高い）ことをまず突き止めた。ニューロンにとって脳室面からはるばる移動する手間が省かれ、脳室面に向かうSD cellsにとって渋滞させられる心配がないという組織構築上の効率性が明らかになった。第2に、それら NSD cells が脳室側突起の虚脱・消失により深部の分裂位置を確保することを見出した。この不可逆的形態変化は分裂前数時間に認められたのでS期の終わりからG2期に相当し、「どこで分裂するか」及び「いかなる娘細胞

を産生するか」という前駆細胞にとって極めて重要な決定が S 期までに進行あるいは完了することが分った。NSD cells と SD cellsの分子マーカー発現の比較、細胞周期依存的発現をする転写因子の検索、強制発現実験などによって、前駆細胞がいかなる娘細胞をつくるかという運命決定イベントと細胞体運動とが、細胞周期進行中に強く関連していることが判明した。

[2] ES細胞より分化誘導した神経細胞のFACSによる分離・培養・移植

① マウスES細胞由来成熟ドーパミンニューロンの移植によるパーキンソン病モデルラットの機能回復：

前年度までに、マウスES細胞の分化系から、FACSによって分離したドーパミンニューロンを産生する能力のあるES細胞由来神経前駆細胞を、6-OHDAを用いて作製したパーキンソンモデルラットの線条体へ移植し治療効果を行動的に解析したが、期待された十分な治療効果は得られなかった。そして、その原因を調べるために、移植細胞の宿主脳内における増殖・分化等について組織学的に解析を行ったところ、移植した前駆細胞の分化が不十分で、治療に必要な量のドーパミンニューロンが得られていなかったことが分かった。そこで、Kawasakiら(2000)によって開発された、ストローマ細胞の一種であるPA6上でES細胞を直接分化させる方法(SDIA法)によって、TH-eGFP遺伝子を導入したES細胞をin vitroで12日間という長期にわたり分化させることによって得たeGFP陽性の成熟ドーパミンニューロンだけをFACSによって精製しようとしたところ、多くのeGFP陽性は死細胞画分に検出されたものの、生細胞うちの数パーセントを占める画分を回収された。そして、それらをパーキンソン病モデルラットの線条体に 1×10^5 cells移植した。その結果、1個体辺り平均100のドーパミンニューロンの生着が観察され、アンフェタミンローテーションテストによる行動解析によると、平均15%程度の症状改善が見られた。尚、同様の方法で分化させた細胞をTH-eGFPによる精製を行わずに、同様に移植したところ、8例中6例でtumorの発生が確認された。以上の結果より、ES細胞よりドーパミンニューロンを分化誘導し、パーキンソン病の移植治療に利用する際に、TH-eGFP遺伝子導入とFACSによる精製を行うことは、機能回復および安全性の面において、非常に有効であることが示唆された。

② RAによるES細胞由来神経系細胞における領域特異性の制御：

様々な濃度のRA存在下でEBを形成し、神経系細胞の分化段階、あるいは胚の前後軸、背腹軸に沿った遺伝子群の発現を解析した。その結果、RAは濃度依存的に神経系の後方を促し、さらに背腹軸の形成にも影響を与えていた。また、sonic hedgehog(Shh)やそのシグナルの阻害剤であるcyclopamineの投与実験によって、このRAによる背腹軸の決定制御は活性型Shhの発現制御を介していたことが明らかになった。このように、RAやShhを用いることによって、ES細胞より、様々な領域特異性を持った神経系細胞を効率良く分化誘導できることが明らかになった。

[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

これまでに、*nestin*遺伝子内にある、神経幹細胞/前駆細胞に選択的なエンハンサー

の制御下でEGFP (enhanced green fluorescent protein) を発現するトランスジェニックマウスを作製し、EGFP発現強度の高い細胞群を採取することで、神経幹細胞を効果的に濃縮できることを明らかにしてきた。さらに、変異型YFP (d4-Venus) を用い、同様のトランスジェニックマウスを作製したところ、*nestin*-EGFPに比べ*nestin*-d4-Venusはより未分化な神経系細胞をだけで発現していることが明らかとなった。そこで、*nestin*-d4-Venusマウスを用いれば、より未分化な細胞群だけを単離しようと期待される。一方、胎児期の神経幹細胞は細胞が大きく、これらの細胞は分裂期(SG₂M期)にいたることがHoechstの取り込み実験からわかった。さらに、造血系などでは、Hoechst33342の取り込みが少ない細胞として幹細胞 (SP細胞) が単離されている。そこで、胎児期の神経系SP細胞に関して調べたところ、約80%は未分化な細胞のマーカであるNotch1陽性であったが、神経幹細胞を濃縮している分裂期にいる比較的大きな細胞とは一致せず、また、*nestin*-EGFP強陽性細胞とも一致はしないことがわかった。ここまでの経緯から、神経幹細胞をより高効率に単離するには、細胞表面マーカーによる細胞分類法の樹立が必要であると考えた。そこで、神経幹細胞・特定の神経系細胞それぞれに対する分子マーカーを同定することを目的として、モノクローナル抗体の作製を行った。約6,000のハイブリドマクローンから、*nestin*-EGFPマウスを用いたFACSにより、細胞表面を認識する抗体を効率よくスクリーニングした。胎児期においてはradial gliaこそ神経幹細胞であるといわれているため、胎児脳切片の染色パターンを検討し、抗原分子クローニングを行い、*ephrinB1*であることがわかった。現在、他の抗体の解析・抗原分子のクローニングを進めると共に、特に*ephrinB1*がradial gliaの分裂や細胞移動機構をどのように制御しているのかということを中心に研究を進めている。

またマウス骨髄中に存在する造血系幹細胞を選択的に分離する方法を開発し、Hoechst low CD34(-) c-Kit(+) Sca-1(+) Lineage markers (Lin: 成熟血球細胞マーカー)(-)細胞を致死量放射線照射マウスに移植することにより90%以上の確立で正着するほぼ純化された造血系幹細胞の分離に成功した (*Immunity*, 2004 Jan;20(1):87-93)。この系を用い、非造血系細胞への分化能を検討したところ、間質、脂肪、軟骨等、間葉系細胞への分化能は認められず、造血系特異的な分化能を持つことが示唆された。その一方、未だその本態が明らかではない非造血系幹細胞 (間葉系幹細胞) の分離法開発に取り組み、現在までのところ、CD34(-) CD29(+) Lin(-)という細胞集団中に間葉系細胞への分化能を持つ幹細胞群が高頻度に含まれていることが明らかとなっている。

3. 研究実施体制

- ①岡野栄之 研究グループ (慶応義塾大学医学部/生理学教室)
- ②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
- ①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)
- ②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. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

I. 原著論文（岡野チーム）

- Tonchev, A.B., Yamashima, T., Zhao, L., and Okano, H.: Differential proliferative response in the postischemic hippocampus, temporal cortex and olfactory bulb of adult primates. *Glia* 42: 209-224 (2003)
- Tonchev, A.B., Yamashima, T., Zhao, L., Okano, H.J. and Okano, H.: Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Mol. Cell. Neurosci.* 23: 292-301 (2003)
- Kuo, H-C., Pau, F.K.Y., Yeoman, R.R., Mitalipov, S.M., Okano, H. and Wolf, D.P.: Differentiation of monkey embryonic stem cells into neural lineages. *Biology of Reproduction* 68: 1727-1735 (2003)
- Kayahara, T., Sawada, M., Takaishi, S., Fukui, H., Seno, H., Fukuzawa, H., Suzuki, K., Hiai, H., Kageyama, R., Okano, H., and Chiba, T.: Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Letter* 535, 131-135 (2003)
- Sasaki, T., Kitagawa, K., Sugimura, S., Omura-Matsuoka, E., Tanaka, S., Yagita, Y., Okano, H., Matsumoto, M. and Hori, M.: Implication of Cyclooxygenase-2 on Enhanced Proliferation of Neural Progenitor Cells in the Adult Mouse Hippocampus After Ischemia. *J. Neurosci. Res.* 72: 461-471 (2003)
- Nakamura, Y., Yamamoto, M., Oda, E., Yamamoto, A., Kanemura, Y., Hara, M., Suzuki, A., Yamasaki, M. and Okano, H.: Expression of tubulin beta II in neural stem/progenitor cells and radial fibers during human fetal brain development. *Lab Invest.* 83: 479-489 (2003)
- Yuasa, Y., Okabe, M., Yoshikawa, S., Tabuchi, K., Xiong W-C., Hiromi, Y. and Okano, H.: *Drosophila* homeodomain protein REPO controls glial differentiation by cooperating with ETS and BTB transcription factors. *Development* 130: 2419-2428 (2003)
- Uchida, K., Okano, H., Hayashi, T., Mine, Y., Tanioka, Y., Nomura, T. and Kawase, T.: Grafted swine neuroepithelial stem cells can form myelinated axons and both efferent and afferent synapses with xenogeneic rat neurons. *J. Neurosci. Res.* 72: 661-669 (2003)
- Kokuzawa, J., Yoshimura, S., Kitajima, H., Shinoda, J., Kaku, Y., Iwama, T., Morishita, R., Shimazaki, T., Okano, H., Kunisada, T. and Sakai, N.:

Hepatocyte growth factor promotes proliferation and neural differentiation of neural stem cells from mouse embryos. *Mol. Cell. Neurosci.* 24: 190-197 (2003)

- Ishizuya-Oka, A., Shimizu, K., Sakakibara, S.I., Okano, H. and Ueda, S.: Thyroid hormone-upregulated expression of Musashi-1 is specific for progenitor cells of the adult epithelium during amphibian gastrointestinal remodeling. *J Cell Sci.* 116: 3157-3164 (2003)
- Kanuka, H., Kuranaga, E., Hiratou, T., Igaki T., Nelson B., Okano, H. and Miura, M.: Cytosol-endoplasmic reticulum interplay by Sec61alpha translocon in polyglutamine-mediated neurotoxicity in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 11723-11728 (2003)
- Baker, H., Kobayashi K, Okano H. and Saino-Saito S. : Cortical and striatal expression of tyrosine hydroxylase mRNA in neonatal and adult mice. *Cell Mol Neurobiol.* 23: 503-518 (2003)
- Tamaki, T., Akatsuka, A., Okada, Y., Matsuzaki, Y., Okano, H. and Kimura, M.: Growth and differentiation potential of main- and side-population cells derived from murine skeletal muscle. *Exp. Cell Res.* 291: 83-90 (2003)
- Miyanomori, Y., Kobayashi, H., Imai, T., Watanabe, M., Nagata, T., Uesugi, S., Okano, H. and Katahira, M.: Origin of higher affinity to RNA of the N-terminal RNA-binding domain than that of the C-terminal one of a mouse neural protein, musashi1, as revealed by comparison of their structures, modes of interaction, surface electrostatic potentials, and backbone dynamics. *J. Biol. Chem.* 278: 41309-41315 (2003)
- Yoshida, T., Tokunaga, A., Nakao, K. and Okano, H.: Distinct expression patterns of splicing isoforms of mNumb in the endocrine lineage of developing pancreas. *Differentiation* 71: 486-495 (2003)
- Hu, Q.D., Ang B.T., Karsak., M., Hu, WP., Cui, X.Y., Duka, T., Takeda, Y., Chia, W., Natesan, S., Ng, YK., Ling, EA., Israel, A., Maciag, T., Small, D., Trifonova, R., Kopan, R. and Okano, H., Nakafuku, M., Chiba, S., Hirai, H., Schachner, M., Pallen, C.J., Watanabe, K. and Xiao, Z.C. : F3/Contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. *Cell* 115: 163-175 (2003)
- Murata, J., Murayama, A., Horii, A., Doi, K., Harada, T., Okano, H. and Kubo, T. : Expression of Musashi1, a neural RNA-binding protein, in the cochlear of young adult mice. *Neurosci. Lett.* 354: 201-204 (2004)
- Matsuzaki, Y., Kinjo, K., Mulligan, R.C. and Okano, H. : Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cell.

Immunity 20: 87-93 (2004)

- Ieda, M., Fukuda, K., Kimura, K., Hisaka, Y., Kawaguchi, H., Shimoda, K., Takeshita, E., Okano, H., Kurihara, Y., Kurihara, H., Ishida, J., Fukamizu, A., Salamone, L., Howard, J.F. and Ogawa, S.: Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic nerve innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J. Clin. Invest.* 113: 876-884 (2004)
- Okada, S., Nakamura, M., Mikami, Y., Ohsugi, Y., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Toyama, Y. and Okano, H.: Blockade of interleukin-6 receptor ameliorates functional recovery in spinal cord injury. *J. Neurosci Res.* 76: 265-276 (2004)
- Ohba, H., Chiyoda, T., Endo, E., Yano, M., Hayakawa, Y., Sakaguchi, M., Darnell, R.B., Okano, H.J., Okano, H.: Sox21 is a repressor of neuronal differentiation and is antagonized by YB-1. *Neurosci. Lett.* 358: 157-160 (2004)
- Sakaguchi H., Yaoi T., Suzuki T., Okano H., Hisa Y. and Fushiki N.: Spatiotemporal patterns of Musashi1 expression during inner ear development. *Neuroreport* 15: 997-1001 (2004)
- Watanabe, K., Nakamura, M., Iwanami, A., Fujita, Y., Kanemura, Y., Toyama, Y. and Okano, H.: Comparison between fetal spinal cord- and forebrain-derived neural stem/progenitor cells as a source of transplantation for spinal cord injury. *Dev. Neurosci.* in Press (2004)
- Yamashima, T., Tonchev, B.A., Seki, T., Sawamoto, K. and Okano, H.: Vascular adventitia generates neuronal progenitors in monkey hippocampus after ischemia. *Hippocampus* in press (2004)
- Mikami, Y., Okano, H., Sakaguchi, M., Nakamura, M., Shimazaki, T., Okano, H.J., Kawakami, Y., Toyama, Y. and Toda, M.: Implantation of dendritic cells in the injured adult spinal cord results in activation of the endogenous neural/progenitor cells for de novo neurogenesis and axonal regeneration, leading to functional recovery. *J. Neurosci Res.* 15:76(2):265-76. (2004)
- Ozawa, Y., Nakao, K., Takeda, J., Akira, P., Gruss, P., Hirano, T., Oguchi, Y. and Okano, H.: Down-regulation of STAT3 activation is required as an intrinsic factor to complete rod receptor differentiation. *Mol. Cell. Neurosci* in press (2004)
- Yoshizaki T, Inaji M, Kouike H, Shimazaki T, Sawamoto K, Ando K, Date I, Kobayashi K, Suhara T, Uchiyama Y, Okano H.: Isolation and transplantation of dopaminergic neurons generated from mouse embryonic stem cells. *Neurosci*

Lett. 3;363(1):33-7. (2004)

(小川チーム)

原著論文

<英文>

- Nakahara J., Takemura M., Gomi H., Tsunematsu K., Itohara S., Asou H., Ogawa M., Aiso S. and Tan-Takeuchi K.: Role of radial fibers in controlling the onset of myelination. *J. Neurosci. Res.* 72, 279-289 (2003)
- Saito K., Kawaguchi A., Kashiwagi S., Yasugi S., Ogawa M. and Miyata T.: Morphological asymmetry in dividing retinal progenitor cells. *Dev. Growth & Differentiation* 45, 219-229, 2003
- Nakahara J., Tan-Takeuchi K., Seiwa C., Gotoh M., Kaifu T., Ujike A., Inui M., Yagi T., Ogawa M., Aiso S., Takai T., and Asou H.: Signaling via immunoglobulin Fc receptors induces oligodendrocyte precursor cell differentiation. *Dev. Cell*, 4, 1-20, 2003
- Kikkawa S, Yamamoto T, Misaki K, Ikeda Y, Okado H, Ogawa M, Woodhams PL, Terashima T. Missplicing resulting from a short deletion in the reelin gene causes reeler-like neuronal disorders in the mutant shaking rat Kawasaki. *J Comp Neurol.* 2003;463(3):303-15.
- Inoue K, Ozaki S, Ito K, Iseda T, Kawaguchi S, Ogawa M, Bae SC, Yamashita N, Itohara S, Kudo N, Ito Y.: Runx3 is essential for the target-specific axon pathfinding of trkc-expressing dorsal root ganglion neurons. *Blood Cells Mol Dis.* 2003;30(2):157-60.
- Yamasaki, K., Joh, K., Ohta, T., Masuzaki, H., Ishimura, T., Mukai, T., Nikawa, N., Ogawa, M., Wagstaff, J. and Kishino, T.: Neurons but not glial cells show reciprocal imprinting of sense and antisense transcripts of *Ube3a*. *Human Mol. Genetics*, 12(8), 837-847, 2003.
- Michishita, M., Ikeda, T., Nakashiba, T., Ogawa, M., Tashiro, K., Honjo, T., Doi, K., Itohara, S. and Endo, S.: A novel gene, *Btcl1*, encoding CUB and LDLa domains is expressed in restricted areas of mouse brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306 (2003) 680-686
- Nakai, S., Sugitani, Y., Sato, H., Ito, S., Miura, Y., Ogawa, M., Nishi, M., Jishage, K., Minowa, O., and Noda, T.: Crucial roles of *Brn1* in distal tubule formation and function in mouse kidney. *Development* 130, 4751-4759, 2003
- Jossin, Y., Ogawa, M., Metin, C., Tissir, F., and Goffinet A.M.: Inhibition of Src family kinases and non-classical Protein Kinases C induce a reeler like malformation of cortical plate development. *J. Neurosci.* 23, 9953-9959,

2003

- BMPR 1A signaling is necessary for hair follicle cycling and hair shaft differentiation in mice. Yuhki, M., Yamada, M., Kawano, M., Iwasato, T., Itohara, S., Yoshida, H., Ogawa, M., Mishina, Y. Development 131, 1813-1824, 2004
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T., Ogawa, M.: Asymmetric production of surface-dividing and non-surface dividing cortical progenitor cells. Development, in press

<和文>

- 斉藤加奈子、川口綾乃、倉持浩、小川正晴、宮田卓樹：スライス培養による脳原基のタイムラプス断面視、図・写真で観る発生・再生実験のマニュアル、安田國雄編集、メデイカルドウ、pp. 82-91. (2003)
- 杉谷善信、小川正晴、野田哲生：大脳皮質の発生-細胞の運命決定・産生・移動・配置の諸機構、蛋白質核酸酵素 49(3), 247-254, 2004

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：3件（研究期間累積件数：14件（脳を知る含む）