

「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)

「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
 - (F) 神経幹細胞の未分化維持機構の解析
- [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。昨年度、我々はMsi1に結合する共役蛋白質の濃縮・精製を行い、MALDI-TOF MS法でPoly(A) Binding Protein 1 (PABP1)を同定した。PABP1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PABP1に対してMsi1は、自身のC末端側の約15アミノ酸を介してPABP1のeIF4G結合部位(PABP1のN末部位)に結合し、eIF4GとPABP1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。今年度は、試験管内におけるchimera RNAを用いた実験で、Msi1による翻訳抑制を受ける標的RNAには少なくとも「Musashi1結合配列」、「poly(A) tail」が必須なことが判明した。よって、Msi1が発現している神経幹細胞では、Msi1によりsequence特異的に選択されたmRNAが、poly(A) tailを介した基本翻訳分子群の活性阻害により翻訳制御されていることの示唆を得た。これらのことより、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。またMusashi蛋白質の機能を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単独欠損マウスの個体の解析を行ったところ、観察されていた温痛覚異常の原因がMusashi2蛋白質の結合する下流標的RNAの一つであるpleiotrophin(ptn)が同定された。通常、ptnのmRNAに結合したMusashi2が転写後の発現を上昇させるが、musashi2欠損マウスではこの発現量が減少することによって症状が出現することが明らかになった。この標的の結合特異性や結合部位などを分子生物学的に、また背側神経節dorsal root ganglia (DRG)における組織学的な異常を検証している。

(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

RNA結合蛋白質Huによる転写後調節を介した神経分化誘導能は、どのようなタイミングでどの遺伝子群に対して行われているのか詳細な解析はなされていなかった。今回、Hu蛋白質が神経芽細胞腫N1E-115細胞の分化誘導能、細胞周期抑制作用及びcdkインヒビターp21遺伝子の発現促進作用を持つ事を明らかにした。p21の発現はDMSO誘導による細胞分化において3'非翻訳領域を介した転写後調節により制御されており、Hu複合体構成分子の一つhnRNP Kもまたp21の3'非翻訳領域に結合しp21の翻訳を抑制することを見出した。p21のsiRNAを用いた実験により、p21がHuの下流遺伝子として分化誘導及び細胞周期の停止に関わっていることを示し、このHu-p21経路がhnRNP Kと拮抗していることがわかった。これらの結果により、2つのRNA結合蛋白質HuとhnRNP Kのp21の転写後調節を介した拮抗作用が、細胞の増殖から神経分化へのタイミングをコントロールしていることが示唆された。一方、HuDノックアウトマウスは胎生期に三叉神経の発達に異常が認められる上、成体マウスは失調様運動障害を呈し、野生型に比べ寿命が短いことが明らかとなった。またNeurosphere法によりマウス胎児脳からの神経幹細胞を特異的に経代培養し、その分裂能および分化能を解析した結果、野生型と比較してノックアウトマウス由来神経幹細胞は自己複製能の増強が見られ、逆に神経分化能が低下していることが明らかとなった。さらにBrdU/IdU二重標識法によりマウス胎児大脳皮質における分裂細胞プロファイルを詳細に調べたところ、ノックアウトマウスにおいては分裂休止細胞の数が減少し、逆にゆっくりと分裂する細胞が増加しており、in vivoにおいてもHuDが細胞周期を抑制し神経分化を促進する機能を持つことが示された。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

1) Notchシグナルは哺乳類神経幹細胞の未分化状態の維持に寄与することが示されているが、分化に際してどの様にその活性が制御されるかについての詳しいメカニズムは明らかでなかった。我々哺乳類神経幹細胞のモデルとして選んだショウジョウバエ成虫型神経幹細胞の系では、幼虫初期は1 Notchシグナルの活性により対称分裂による自己増殖を繰り返すが、幼虫後期になって発現が上昇してくる α -AdaptinがNumbと共役してNotchタンパク質をエンドサイトーシスにより分解し始めることによりNotchシグナルを抑制し、ニ

ニューロン・グリアへの細胞分化を促進するという時間的調節機構の存在が必須であることはすでに我々が明らかにしていたが、本年度我々はMARCOMというFLP recombinaseを用いた細胞特異的遺伝子組換えを起こすことにより、組換えを起こした細胞及びその娘細胞からなるクローン内で遺伝子の機能解析を行うことができNotch及びその調節遺伝子の細胞特異的な機能を明らかにすることが出来た。更にNotch及びその調節遺伝子の発現は幼虫後期に神経上皮から成虫型ニューロblastへ転換する際にも空間的に厳密に制御されており対称分裂を繰り返す神経上皮で高く、神経上皮から転換し非対称性分裂をする成虫型ニューロblastからは徐々に減少していくのに対して、 α -Adaptinは神経上皮では発現が弱く転換した成虫型ニューロblastで発現が強いことや、 α -Adaptin、Numbの突然変異体では転換した成虫型ニューロblastにおいてもNotchの発現が減少せず高いレベルに保たれている事なども明らかにした。更に神経上皮から成虫型ニューロblastの転換にadherence junction複合体の構成要素が関与しているという知見も得た。

2) 成虫型ニューロblastにおいて特異的にGAL4を発現させることにより、ランダムに挿入されたGal4結合配列の下流に位置する未知の遺伝子Xが成虫型ニューロblastで過剰発現するようにした機能獲得型の突然変異体のスクリーニングを300系統行ったところ、幼虫期一蛹期致死になるもの50系統のうちの5割に成虫型ニューロblastの異常が認められ、細胞の増殖・分化を促進するものと阻害するものの両方が得られた。過剰発現によって成虫型神経幹細胞の増殖が促進されるものの一つはRNA結合モチーフを持ちスプライシングを調節すると考えられているSRタンパク質をコードしており、その機能欠失型では逆に神経幹細胞の増殖が著しく阻害されていた事からこのSRタンパク質には神経幹細胞の増殖を促進する機能があると考えられた。SRタンパク質はhnRNP Kなどの他のRNA結合タンパク質と共に複合体を形成することも知られており、それらと共に神経幹細胞特異的なスプライシングを統合的に調節している可能性が示唆された。

(D) modifierによるNotch signalingの微細な調節

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。昨年までに我々は生体内でのNotch signalingを理解する第一段階として、活性化状態の可視化を行った。活性化Notch1を特異的に認識する抗体を用いて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、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。また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)には不活性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、特許出願を考慮しておりますので、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）。

また生体内でのNotch signalingの意義を明らかにするため、現在In vivo Electroporation法を用いた機能的解析も行っており、Notch及びNumb, Adaptinといったmodifierが未分化維持や細胞の運命決定に与える影響を詳細に解析している。

(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：

大脳新皮質の投射ニューロンは脳室帯（VZ）に誕生し、そこから放射状に移動して所定の層に配置されると考えられてきました。今回、神経板が現れる時期の新皮質においては、VZに限らず、脳室下帯(SVZ)から中間体(IMZ)にかけての領域において、盛んなニューロン産生がみられることを明らかにしました。新皮質に皮質板が現れるE13のマウス大脳のスライスを培養し、DiIで標識されたprogenitor cell (P)の細胞動態をタイムラプスに記録した。VZにおいてはPの分裂に伴って2個のPが誕生するケースならびにニューロン(N)とPが産生されることが確認されたが、同時に、Pの一部がSVZ/IMZにおいて細胞分裂を起こすことが観察された。詳しく調べた結果、このようなPはVZからSVZ/IMZへとbasal process中を細胞核が移動し、ついでこの部において均等細胞分裂を起こしてニューロンのみを産生することが判明した。これまで非脳室帯での細胞分裂はグリア細胞、ないし血管内皮細胞の誕生を示すとされてきましたが、実際には非脳室帯においてもニューロンが産生されること、また、早期の大脳壁では急速な皮質板の発達に呼応して、CPにより近い部位において誕生することにより、より効率よくニューロンを供給しているものと想像される。

皮質ニューロンは誕生時期に依存して層特異的な細胞移動を示す。このことを詳しく分析すべく、蛍光タンパク質遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを作成し、E12-E12.5にかけて選択的に標識された新生ニューロンの移動を、スライス培養下に調べた。ニューロンはSVZ/IZでbipolar shapeとなり、ついでleading processが外表面へと伸長、接着し、その中を核がtranslocationして、いったん外表面に近い位置に移動した。ついで、核は下降して深層部へと移動した。一方、reeler mouseでは、leading processが外表面に達せず、また細胞体の移動も途中で停止することが示された。Reelinシグナルがleading processの伸長ならびにnuclear translocationをpositiveに制御している可能性が示唆された。

(F) 神経幹細胞の未分化維持機構の解析

神経幹細胞の自己複製および分化に関与しているサイトカインレセプターのgp130、そして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

路およびPI3-kinase経路の活性化に関与していることが知られているGab1の神経幹細胞の増殖・分化における役割を明らかにするために、これまで、Gab1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の解析を行ってきた。その結果、これまでに、1. Gab1はEGF依存性の神経幹細胞の増殖に必須であり、その欠失は、発生期にEGF依存性のグリア細胞の発生を低下させる。2. 成体脳の神経新生部位である側脳室周辺部位では、gp130依存した神経幹細胞の維持に負に制御することなどを明らかにしてきた。そして今回新たに、gab1が、マウス胎仔脊髄腹側pMNドメインにおいて、bHLH型転写因子の1種であるOlig2を発現する幹細胞を含む神経系前駆細胞の、EGFシグナル選択的な増殖に必須であることを明らかにした。このOlig2陽性前駆細胞は、in vitroにおいては、EGFシグナルによって、増殖のみならず未分化性も維持され、神経系前駆細胞のもう1つのmitogenとして知られるFGF-2存在下での培養と比較しても、特にオリゴデンドロサイト前駆細胞への分化が抑制されていた。また、Olig2は、少なくとも胎仔終脳神経幹細胞においては、その自己複製を促進することが知られていることから、gab1は、胎仔期脊髄においてはOlig2の上流において神経幹細胞の自己複製に正に働いているものと思われる。さらに、このOlig2陽性前駆細胞に対するEGF刺激において、Gab1欠損によって影響を受けるシグナル伝達経路を調べたところ、MAP kinase経路には変化が見られず、PI3-kinase-Akt経路のみが反応性を失っていたことから、Olig2陽性前駆細胞のEGFシグナル依存的な自己複製には、Gab1を介したPI3K-Akt経路の活性化が必須であることが示唆された。

[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

我々は、これまでに、マウスES細胞からの神経幹細胞の分化誘導および選択的培養・増殖法を確立し、さらにレチノイン酸によるES細胞由来神経系前駆細胞の分化程度や領域特異性の決定に関しての詳細が明らかにしてきた。そして、これらの結果は、我々の開発したin vitroでのES細胞からの神経系分化・誘導系が、実際の中枢神経系の発生をよく模倣していることを示唆していた。具体的には、神経幹細胞の時系列および領域特異的な分化能の変化が類似していた。そこで、特に、幹細胞の時系列特異的な分化能の変化を制御するメカニズムを解明するために、DNAマイクロアレイ解析（2万2千遺伝子）による時系列特異的な遺伝子発現プロファイリングを行った。マウスES細胞より胚様体(EB)形成を介して選択的に増殖させた1次neurosphereとそれを継代した2次neurosphereよりmRNAを抽出し解析を行ったところ、1次neurosphereで有意に発現の高い遺伝子を618個、2次neurosphereで有意に発現の高い遺伝子を840個同定した。また、これらの遺伝子のうち、マウス胎仔11日目と新生仔の側脳室周囲細胞の比較プロファイリングでも同様な発現変化が認められたものは、それぞれ199個および244個であった。これらは、細胞周期関連因子、転写因子、クロマチン再構成因子、分泌因子、細胞接着因子、シグナル伝達分子等、様々な種類の遺伝子を含んでおり、現在、特にepigeneticな遺伝子発現制御に関与すると思われる因子を中心に機能解析を進めている。一方、これまでの研究成果を生かし、カンクイザルおよびヒトES細胞より神経幹細胞を分化誘導し、霊長類神経発生をin vitroで再構成するシステムの開発を試み、培養条件の詳細に違いが見られたものの、マウスES細胞

と同様の神経誘導および神経幹細胞の選択的培養が可能になった。

[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

当研究室では、以前より神経系前駆細胞に発現している*nestin*遺伝子のエンハンサー制御下にEnhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)を導入した遺伝子改変マウスを利用し、生きたまま神経系未分化細胞を単離する試みがなされてきた(Kawaguchi A, et al: *Mol Cell Neurosci* 17: 259-73 (2001))。しかしながら、従来レポーターとして汎用されてきたGFPやその改変体の多くは非常に安定なタンパク質であるために残存の蛍光活性を排除できなかった。そこで我々は、レポーターとして改変YFPである蛍光物質”d4-Venus”を導入した*Nestin-d4-Venus*遺伝子改変マウスを作製した。*Nestin-d4-Venus*は、従来のYFPと比較して蛍光強度が強く、迅速に発光し、かつ半減期も短い。よって、*nestin*遺伝子のプロモーター/エンハンサーからの発現をより正確に模倣した蛍光活性が得られるようになった。組織免疫染色により*Nestin-d4-Venus*遺伝子改変マウスでは、従来の*Nestin-EGFP*遺伝子改変マウスと比較して、発生期で神経幹細胞の局在が知られている脳室周囲(VZ)においてより限局した発現パターンを示した。また、これらの細胞は分化したニューロンのマーカーである β -tubulinIII陰性であった。さらにFluorescence activated cell sorter (FACS)を利用した解析によりd4-Venus陽性細胞画分には自己複製能と多分化能を有する神経幹細胞が濃縮されることが確認された。大脳皮質の形成は、神経管の内側から外側まで放射状に伸びている神経幹細胞(放射状グリア細胞)が対称、あるいは非対称に分裂しニューロンあるいはグリア細胞を産生することによって行われる。この放射状グリア細胞の細胞体はVZの中で細胞周期依存的に上下していることが知られている。すなわち、DNAの複製が行われるS期には軟膜側に移動するのに対して、細胞が分裂するM期には脳室側へと移動する。チミジンの類似体であるbromodeoxyuridineやiododeoxyuridineがDNA複製の際に取り込まれることを利用して細胞周期と、VZの中での*Nestin-d4-Venus*の発現強度の相関を組織免疫染色により確認したところ、d4-Venusの発現はG1からS前期において特に強く、G2、M期においては減衰していることが明らかとなった。放射状グリアの細胞突起は、M期において一旦無くなるか、細くなることは古くから知られており、中間径フィラメントを構成する*nestin*遺伝子の発現が直後のG1期に顕著に上昇することは、放射状グリアが構造を保つ上で非常に重要であると考えられる。

3. 研究実施体制

- 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細胞培養技術開発チーム チームリーダー)
- 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

<岡野栄之チーム>

- Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Shimazaki T, Mihara M, Ohsugi Y, Iwamoto Y, Yoshizaki K, Kishimoto T, Toyama Y, Okano H.: Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. **J Neurosci Res** 15;76(2):265-76(2004)
- Yamashita T, Tonchev BA, Seki T, Sawamoto K, Okano H: Vascular adventitia generates neuronal progenitors in monkey hippocampus after ischemia. **Hippocampus** 14: 861-875(2004)
- Ohba H, Chiyoda T, Endo E, Yano M, Hayakawa Y, Sakaguchi M, Darnell RB, Okano HJ, Okano H.: Sox21 is a repressor of neuronal differentiation and is antagonized by YB-1. **Neurosci Lett** 1;358(3):157-60(2004)
- Mikami Y, Okano H, Sakaguchi M, Nakamura M, Shimazaki T, Okano HJ, Kawakami Y, Toyama Y, Toda M: Implantation of dendritic cells leading to de novo neurogenesis and functional recovery. **J Neurosci Res** 15;76(4):453-65 (2004)
- Ohba H, Chiyoda T, Endo E, Yano M, Hayakawa Y, Sakaguchi M, Darnell RB, Okano HJ, Okano H.: Sox21 is a repressor of neuronal differentiation and is antagonized by YB-1. **Neurosci Lett** 1;358(3):157-60(2004)
- Mikami Y, Okano H, Sakaguchi M, Nakamura M, Shimazaki T, Okano HJ, Kawakami Y, Toyama Y, Toda M: Implantation of dendritic cells leading to de novo neurogenesis and functional recovery. **J Neurosci Res** 15;76(4):453-65(2004)
- Ozawa Y, Nakao K, Shimazaki T, Takeda J, Akira S, Ishihara K, Hirano T, Oguchi Y, Okano H: Downregulation of STAT3 activation is required for presumptive rod photoreceptor cells to differentiate in the postnatal retina. **Mol Cell Neurosci** ;26(2):258-70(2004)
- Sakaguchi H, Yaoi T, Suzuki T, Okano H, Hisa Y, Fushiki N.: Spatiotemporal patterns of Musashi1 expression during inner ear development. **Neuroreport** 29;15(6):997-1001(2004)
- Tokunaga A, Kohyama J, Yoshida T, Nakao K, Sawamoto K, Okano H: Mapping spatio-temporal activation of Notch signaling during neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse brain. **J Neurochem** ;90(1):142-54 (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)
- Sakuragawa N, Kakinuma K, Hatada S, Kikuchi A, Okano H, Uchida S, Kamo I, Yokoyama Y: Human Amnion Mesenchyme Cells Express Phenotype of Neuronal Progenitor Cells. **J Neurosci Res** 15:78(2):208-14(2004)
 - Ishibashi S, Sakaguchi, M., Kuroiwa, T., Shimazaki, T., Okano, H, Mizusawa, H.: Human neural stem/progenitor cells, expanded in long-term neurosphere culture, promote functional recovery after focal ischemia in Mongolian gerbils. **J Neurosci Res** 15:78(2):215-23(2004)
 - Uchida K, Mukai, M., Okano, H., Hayashi, T., Kawase, T.: Possible origin of the astroblastoma: A novel concept based on experimental findings from clinical material and a review of the literature. **Neurosurgery** ;55(4):977-8 (2004)
 - Unezaki, S., Nishikawa, M., Okuda-Ashitaka, E., Masu, Y., Mukai, M., Kobayashi, S., Sawamoto, K., Okano, H. and Ito, S.: Characterization of isoforms of MOVO zinc finger protein, a mouse homologue of Drosophila Ovo, as transcription factor. **Gene** 7:336(1):47-58(2004)
 - Kawada H, Fujita J, Kinjo k, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, Muguruma Y, Itabashi Y, Ikeda Y, Ogawa S, Okano H, Hotta T, Ando K, Fukuda K: Non-hematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. **Blood** 1;104(12):3581-7 (2004)
 - Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H: Retinoic acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. **Dev Biol** 1;275(1):124-42 (2004)
 - Kawaguchi A., Ogawa M., Saito K., Matsuzaki F., Okano H, Miyata T.: Differential expression of Pax6 and Ngn2 between pair-generated cortical neurons. **J Neurosci Res.** 15:78(6):784-95 (2004)
 - Hori K, Ito M., Fuwa TJ, Okano H., Baron M, Matsuno K.: Deltex induces an accumulation of the vesicular Notch protein and activates Suppressor of hairless-independent Notch signaling in Drosophila. **Development** 131(22):5527-37. (2004)
 - Watanabe K, Nakamura M, Iwanami A, Fujita Y, Kanemura Y, Toyama Y, 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** 26(2-4):275-87(2004)
- Clarke, R.B., Spence, K., Anderson, E., Howell, A., Okano, H. and Potten, C.S.: A putative human breast stem cell population is enriched for steroid receptor-positive cells. **Dev Biol** 15:277(2):443-56 (2005)
 - Sakaguchi M, Sawamoto K, Shimazaki T, Kitamura T, Shibuya A, Okano H.: A method for gene transfer, single isolation and in vitro assay for neural stem cells. **Inflammation and Regeneration** 25: 50-54 (2005)
 - Uemura O, Okada Y, Ando H, Guedj M, Higashijima S, Shimazaki T, Chino N, Okano H, Okamoto H: Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *Isl1* gene for motor neuron and sensory neuron-specific expression. **Dev Biol** 15:278(2):587-606(2005)
 - Hishikawa K, Marummo T, Miura S, Nakanishi A, Matsuzaki Y, Shibata K, Kohike H, Komori T, Hayashi M, Nakaki T, Nakauchi H, Okano H, Fujita T. Leukemia inhibitory factor induces multi-lineage differentiation of adult stem-like cells in kidney via kidney-specific cadherin 16. **Biochem Biophys Res Commun** 4:328(1):288-91 (2005)
 - Suzuki K, Fukui H, Kayahara T, Sawada M, Seno H, Hiai H, Kageyama R, Okano H, Chiba T: *Hes1*-deficient mice show precocious differentiation of Paneth cells in the small intestine. **Biochem Biophys Res Commun.** 4:328(1):348-52(2005)
 - Kitagawa A, Nakayama T, Takenaga M, Matsumoto K, Tokura Y, Ohta Y, Ichinohe M, Yamaguchi Y, Suzuki N, Okano H, Igarashi R: Lecithinized brain-derived neurotrophic factor promotes the differentiation of embryonic stem cells in vitro and in vivo. **Biochem Biophys Res Commun.** 25:328(4):1051-7(2005)
 - Hirota Y, Takahashi K, Ueda R, Okano H: Transmembrane protein Tincar is expressed and involved in the development of *Drosophila* photoreceptor cells. **Development, Genes and Evolution** ;215(2):90-6(2005)
 - Iwanami A, Yamane J, Katoh H, Nakamura M, Momoshima S, Ishii H, Tanioka Y, Tamaoki N, Nomura T, Toyama Y, Okano H: Establishment of Graded Spinal Cord Injury Model in a Non-human Primate: the Common Marmoset. **J Neurosci Res** 16:80(2):172-181(2005)
 - Iwanami A, Kakneko, S., Nakamura, M., Kanemura, Y., Mori, H., Kobayashi, S., Yamasaki, M., Momoshima, S., Ishii, H., Ando, K., Tanioka, Y., Tamaoki, N., Nomura, T, Toyama, Y, Okano H: Transplantation of human neural stem/progenitor cells promotes functional recovery after spinal

- cord injury in common marmoset. **J Neurosci Res** 16;80(2):182-190(2005)
- Akamatsu W, Fujiwara H, Mitsunashi T, Yano M, Shibata S, Hayakawa Y, Okano HJ, Sakakibara S, Takano H, Takano T, Takahashi T, Noda T, Okano H: RNA-binding protein HuD regulates neuronal cell identity and maturation. **Proc Natl Acad Sci USA** 22;102(12):4625-30(2005)
 - Sakatani T, Kaneda A, Iacobuzio-Donahue CA, Carter MG, Witzel SB, Okano H, Ko, MSH, Ohlsson R, Longo DL, Feinberg AP: Loss of imprinting of IgfII alter intestinal maturation and tumorigenesis in mice. **Science** 25;307(5717):1976-8(2005)
 - Yoda A, Kouike H, Okano H, Sawa H.: Components of the transcriptional Mediator complex are required for asymmetric cell division in *C. elegans*. **Development** ;132(8):1885-93(2005)

<小川正晴チーム>

- Yuhki, M., Yamada, M., Kawano, M., Iwasato, T., Itohara, S., Yoshida, H., Ogawa, M., Mishina, Y.: BMPR 1A signaling is necessary for hair follicle cycling and hair shaft differentiation in mice. **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** 131, 3133-3145, 2004
- Michishita, M., Ikeda, T, Nakashiba, T, Ogawa, M., Tashiro, K., Honjo, T, Doi, K. Itohara, S., Endo, S.: Expression of *Btcl2*, a novel member of *Btcl* gene family, during development of the central nervous system. **Dev. Brain Res.** 153, 135-142, 2004
- Nishimura, T., Sakudo, A., Nakamura, I., D-C, Lee, Taniuchi, Y., Saeki, K., Matsumoto, Y, Ogawa, M., Sakaguchi, S., Itohara, S., Onodera, T.: Cellular prion protein regulates intracellular hydrogen peroxide level and prevents copper-induced apoptosis. **B. B. R. C.**, 323, 218-222, 2004
- Differential expression of Pax6 and Ngn2 between pair-generated cortical neurons. Kawaguchi A., Ogawa M., Saito K., Matsuzaki F., Okano H., and Miyata T. **J. Neurosci. Res.** 78, 784-795, 2004

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：12件）