

200400086B

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「神経幹細胞を用いた神経変性疾患の治療に関する研究」

平成 15 年度 ～ 平成 16 年度

総合研究報告書

主任研究者 高坂 新一

平成 17 (2005) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告書

| | |
|--|----|
| 神経幹細胞を用いた神経変性疾患の治療に関する研究 | 1 |
| 高坂 新一(国立精神・神経センター神経研究所) | |
| (資料1) NMDA 受容体を介した神経幹細胞の増殖分化の調節 | 7 |
| 高坂 新一(国立精神・神経センター神経研究所) | |
| (資料2) G-蛋白質共役型受容体による神経系前駆細胞の制御機構解析 | 11 |
| 和田 圭司(国立精神・神経センター神経研究所) | |
| (資料3) 神経栄養因子による内在性神経幹細胞の賦活化とその応用 | 14 |
| 古川 昭栄(岐阜薬科大学分子生物学) | |
| (資料4) 神経幹細胞の新たな分化誘導法の開発 | 18 |
| 島崎 琢也(慶應義塾大学医学部生理学) | |
| (資料5) 成体霊長類の神経幹細胞の特性に関する研究 | 22 |
| 久恒 辰博(東京大学大学院先端生命科学) | |
| (資料6) ES 細胞移植による中枢神経機能再生 | 25 |
| 高橋 淳(京都大学大学院医学研究科脳神経外科) | |

| | |
|--------------------------|----|
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 29 |
|--------------------------|----|

| | |
|------------------------|----|
| III. 研究成果の刊行物・別刷 | 37 |
|------------------------|----|

I . 総合研究報告書

神経幹細胞を用いた神経変性疾患の治療に関する研究

主任研究者 高坂新一 国立精神・神経センター神経研究所

研究要旨: 本研究においては、再生医療における移植細胞として有用と考えられるES細胞の分化誘導法に関する研究、内在性神経幹細胞の賦活化に関する研究および霊長類を用いた神経幹細胞に関する研究に焦点を当てて研究を推進した。

ES細胞の分化誘導法に関しては、レチノイン酸と活性型ソニックヘッジホックを利用して、菱脳から脊髄において領域特異的に分化してくる運動ニューロンなどの特異的なニューロンを効率的に分化させるシステムを確立した。また、DNAマイクロアレイを用いて、神経幹細胞の発生ポテンシャルの時系列的変化の制御に、細胞分裂・DNA複製や遺伝子発現の epigenetic 制御に関わる遺伝子群が関与している可能性を見出した。さらに、Sox1-GFP knock-in ES細胞を用いて、神経分化誘導後に神経系細胞のみを選択することで、移植後の腫瘍の形成確率を低下させることに成功した。

内在性神経幹細胞の賦活化に関する研究については、NMDA 受容体阻害剤がもたらす神経幹細胞の増殖亢進作用に、神経幹細胞の維持に重要な働きを担っている *Hes* 遺伝子の発現が深く関与していることを明らかにした。また、胎生期の神経系前駆細胞に対して、種々の GPCR リガンドを添加し生理活性薬剤のスクリーニングを行った結果、神経系前駆細胞の増殖や運動性を制御できる薬剤を同定した。成体の神経系前駆細胞における GPCR の網羅的発現解析を行い、特異的に高発現している GPCR を同定した。さらに、ユビキチンシステムの構成分子 UCH-L1 を利用して、ヒトの病態に近い加齢依存的パーキンソン病の新規モデル動物を作出し、GPCR 作用薬剤の治療効果評価系を確立した。

霊長類を用いた神経幹細胞に関する研究については、カニクイザルのES細胞から高率にドーパミン産生ニューロンを誘導し、その細胞をパーキンソン病モデルカニクイザルの脳に移植することによって、ドーパミン産生ニューロンの生着と神経症状の改善を得ることに成功した。一方、カニクイザルの中大脳動脈閉塞モデルにおいて、プロモデオキシウリジンをを用いて分裂細胞を標識した結果、閉塞後海馬および側脳室領域での細胞分裂が有意に高まることがわかった。また、海馬や嗅球におけるニューロン新生の亢進も確認できた。

和田圭司 国立精神・神経センター 部長
古川昭栄 岐阜薬科大学神経分子生物学 教授
島崎琢也 慶応義塾大学生理学 助手
久恒辰博 東京大学大学院先端生命科学 助教授
高橋 淳 京都大学大学院医学研究科脳神経外科講師

経回路網を再構築させることを最終目標とする。この目標を遂行するため、1)移植細胞として有用と考えられるES細胞の分化誘導法に関する研究、2)内在性神経幹細胞の賦活化に関する研究、3)霊長類を用いた神経幹細胞に関する研究、に焦点を当てて研究を推進することとした。

A. 研究目的

パーキンソン病を代表とする神経変性疾患では、脳内の特定の部位におけるニューロンが変性脱落することにより重篤な機能障害が生じることが知られている。現在、神経変性疾患の治療としては、主に薬剤を中心とした対象療法が行われているが、治療効果には限界があるのが現状である。このような状況下、多分化能を有する神経幹細胞を脳内に移植し、特定のニューロンや神経回路網を再構築させる再生療法が注目を集めている。さらに、最近、神経幹細胞は胎児のみならず成体の脳内にも存在していることが判明した。そこで、本研究班は、神経幹細胞の増殖分化機構に関する基礎的知識を深めるとともに、神経幹細胞を脳内に移植する、あるいは内在性の神経幹細胞を賦活化しニューロンの新生を促進することにより、神経変性疾患で損傷された神

B. 研究方法

個々の研究方法に関しては、添付した分担研究報告書を参照されたい。

C. 研究結果および考察

1. ES細胞の分化誘導法に関する研究

1) 発生期の菱脳から脊髄において領域特異的に分化してくる運動ニューロンなどの特異的なニューロンおよびそれらの前駆細胞を、レチノイン酸と活性型ソニックヘッジホックを利用して、マウスES細胞より効率的に分化させるシステムを確立した。

2) マウスES細胞による、in vitro での中枢神経系の発生再現系を利用したDNAマイクロアレイ解析によって、神経幹細胞の発生ポテンシャルの時系列的変化の制御に、細胞分裂・DNA複製や遺伝子発現の epigenetic 制御に関わる遺伝子群が関与している

可能性を見出した。

3) マウス ES 細胞から神経系細胞を誘導しマウス脳に移植したところ、約半数の例で腫瘍形成がみられ、その原因は未分化 ES 細胞の混入であった。そこで、Sox1-GFP knock-in ES 細胞を用いて、神経分化誘導後に神経系細胞のみを選択してマウス脳内に移植したところ、これらの細胞は脳内でニューロンに分化し、腫瘍形成は認められなかった。ヒト ES 細胞においても、神経幹細胞は Sox1 を発現し、未分化 ES 細胞は Sox1 を発現していないことが報告されているため、この方法は臨床にも応用できる可能性があると考えられる。

2. 内在性神経幹細胞の賦活化に関する研究

1) NMDA 受容体阻害剤の *in vivo* 投与系を用いて、NMDA 受容体が胎児のみならず成体における神経幹細胞の増殖を制御していることを確認した。胎児期の神経幹細胞の増殖亢進の分子機構として、神経幹細胞の維持に重要な働きを担っている *Hes1*、*Hes5* 遺伝子の発現が深く関与していることが判明した。一方、子宮内電気穿孔遺伝子導入法を用いて EGFP の発現ベクターを脳室帯の細胞に導入後、EGFP の蛍光シグナルを指標に大脳皮質切片におけるタイムラプス解析を行った結果、NMDA 受容体阻害剤による幼弱ニューロンの細胞移動の遅延が、主に脳室帯から中間帯への移動の遅延および中間帯における異常な迷走によるものであることがわかった。

2) マウス胎生期脳由来神経系前駆細胞の GPCR 大量遺伝子解析データを元に、培養系へ種々の GPCR リガンドを添加し生理活性薬剤のスクリーニングを行った。その結果、神経系前駆細胞の増殖や運動性を制御できる薬剤を同定した。また、成熟個体脳由来の神経系前駆細胞における GPCR の網羅的発現解析を行い、特異的に高発現している GPCR を同定した。ユビキチンシステムの構成分子 UCH-L1 を利用して、ヒトの病態に近い加齢依存的パーキンソン病の新規モデル動物を作出し、GPCR 作用薬剤の治療効果評価系を確立した。

3. 霊長類を用いた神経幹細胞に関する研究

1) カニクイザルの ES 細胞をマウス頭蓋骨由来のフィーダー細胞 (PA6) 上で培養することによって、高率にドーパミン産生ニューロンを誘導することが出来た。その細胞をパーキンソン病モデルカニクイザルの脳に移植することによって、ドーパミン産生ニューロンの生着と神経症状の改善を得ることに成功した。

2) カニクイザルの中大脳動脈閉塞モデルにおいて、プロモデオキシウリジンを用いて分裂細胞を標識した結果、閉塞後海馬および側脳室領域での細胞分裂が有意に高まることがわかった。また、海馬や嗅球におけるニューロン新生の亢進も確認できた。

しかしながら、虚血巣に近接した線条体および大脳皮質においてはニューロンの新生を確認できなかった。

4. 脊髄損傷モデルラットを用いた研究

胸髄を T10 で完全切断した脊髄損傷ラットの患部に FGF-2 を投与することにより、運動機能が著明に改善することを見出した。この運動機能の改善は、吻側から尾側へと損傷患部を越えて再生する皮質脊髄路や中脳脊髄路の下降性線維が多数検出されたことから、軸索再生に基づく回復であると考えられた。FGF-2 の薬理作用として、脊髄損傷後に起こるアポトーシスを抑制するとともに、軸索の伸展を促進する分子を発現することが示唆されているフィブロネクチン陽性細胞を増殖させることがわかった。また、脊髄半切断モデルにおける 4-メチルカテコールの運動機能回復効果にも、FGF-2 が関与していることが示唆された。以上、FGF-2 は軸索再生の促進を伴う優れた脊髄損傷修復効果を示すことが判明した。

D. 結論

ES 細胞の分化誘導法については、マウス ES 細胞より効率的にニューロンおよびその前駆細胞を分化させるシステムを確立した。さらに、神経分化誘導後に神経系細胞のみを選択する技術を確立し、移植後の腫瘍形成を高率で抑制することに成功した。内在性神経幹細胞の賦活化に関する研究については、NMDA 受容体が神経幹細胞の分化・成熟過程に関与していることが判明した。また、マウス胎児における神経系前駆細胞の増殖や運動性を制御できる薬剤を取得した。さらに、成熟脳由来神経系前駆細胞において高レベルで特異的に発現している GPCR を同定した。霊長類を用いた神経幹細胞に関する研究については、カニクイザル ES 細胞の培養法を確立し、パーキンソン病モデルカニクイザルに移植した結果、有意な神経症状の改善がみられた。また、カニクイザルの中大脳動脈閉塞モデルにおいて、閉塞後海馬および側脳室領域における細胞分裂および海馬や嗅球におけるニューロン新生の亢進が確認できた。

E. 研究発表

1. 論文発表

Hirasawa, T., Ohsawa, K., Imai, Y., Ondo, Y., Uchino, S. and Kohsaka, S.: Visualization of microglia in living tissues by using Iba-1EGFP transgenic mice. *J. Neurosci. Res.* 2005, in press

Azuma, N., Tadokoro, K., Asaka, A., Yamada, M., Yamaguchi, H., Handa, H., Matsushima, S., Watanabe, T., Kohsaka, S. Kida, Y., Shiraiishi, T., Ogura, T., Shimamura, K. and Nakafuku, M.: The Pax6 isoform bearing an alternative spliced exon promotes the development of the neural retinal structure. *Hum. Mol. Genet.* 14, 735-745, 2005

- Kamitori, K., Tanaka, M. and Kohsaka, S.: Receptor related to tyrosine kinase RYK regulates cell migration during cortical development. *BBRC330*, 439-445, 2005
- Nakajima, K., Tohyama, Y., Kurihara, T. and Kohsaka, S.: Axotomy-dependent urokinase induction in the rat facial nucleus: possible stimulation of microglia by neurons. *Neurochem Int.* 46, 107-116, 2005
- Akazawa, C., Nakamura, Y., Sango, K., Horie, H. and Kohsaka, S.: Distribution of the galectin-1 mRNA in the rat nervous system; its transient upregulation in rat facial motor neurons after facial nerve axotomy. *Neurosci.* 125, 171-178, 2004
- Akazawa, C., Tsuzuki, H., Nakamura, Y., Sasaki, Y., Ohsaki, K., Nakamura, S., Arakawa, Y. and Kohsaka, S.: The upregulated expression of sonic hedgehog in motor neurons after rat facial nerve axotomy. *J. Neurosci.* 24, 7923-7930, 2004
- Suzuki, T., Hide, I., Ido, K., Kohsaka, S., and Inoue, K., Nakata Y.: Production and release of neuroprotective TNF by P 2X7 receptor-activated microglia. *J. Neurosci.* 24, 1-7 2004
- Ohsawa, K., Sasaki, Y., Kohsaka, S. and Imai, Y.: Macrophage/Microglia-specific protein Iba1 binds to fimbria and enhances its action-bundling activity. *J. Neurochem.* 88, 844-856, 2004
- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Michael W. Salter and Inoue, K.: P2X₄ receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424, 778-83, 2003
- Sasaki, Y., Hoshi, M., Akazawa, C., Nakamura, Y., Tsuzuki, H., Inoue, K. and Kohsaka, S.: Selective expression of G_{i/o}-coupled ATP receptor P2Y₁₂ in microglia in rat brain. *Glia* 44, 242-250 2003
- Hirasawa, T., Wada, H., Kohsaka, S. and Uchino, S.: Inhibition of NMDA receptors induces delayed neuronal maturation and sustained proliferation of progenitor cells during neocortical development. *J. Neurosci. Res.* 74, 676-687, 2003
- Harada, T., Harada, C., Wang, Y.L., Osaka, H., Amanai, K., Tanaka, K., Takizawa, K., Setsuie, R., Sakurai, M., Sato, Y., Noda, M. and Wada, K.: Role of ubiquitin carboxy terminal hydrolase-L1 in neural cell apoptosis induced by ischemic retinal injury *in vivo*. *Am. J. Pathol.* 164, 59-64, 2004
- Kwon, J., Wang, Y.L., Setsuie, R., Sekiguchi, S., Sato, Y., Sakurai, M., Noda, M., Aoki, S., Yoshikawa, Y. and Wada, K.: Two closely related ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes function as reciprocal modulators of germ cell apoptosis in cryptorchid testes. *Am. J. Pathol.* 165, 1367-1374, 2004
- Noda, M., Yasuda, S., Okada, M., Higashida, H., Shimada, A., Iwata, N., Ozaki, N., Nishikawa, K., Aoki, S. and Wada, K.: Recombinant human 5-HT_{5A} receptors stably expressed in C6 glioma cells couple to multiple signal transduction pathways. *J. Neurochem.* 84, 222-232, 2003
- Osaka, H., Wang, Y.L., Takada, K., Takizawa, S., Setsuie, R., Li, H., Sato, Y., Nishikawa, K., Sun, Y.J., Sakurai, M., Harada, T., Hara, Y., Kimura, I., Chiba, S., Namikawa, K., Kiyama, H., Noda, M., Aoki, S. and Wada, K.: Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neurons. *Hum. Mol. Genet.* 12, 1945-1958, 2003
- Hashimoto, M., Nitta, A., Fukumitsu, H., Nomoto, H., Shen, L. and Furukawa, S.: Inflammation-induced GDNF improves locomotor function after spinal cord injury. *NeuroReport*, 2005, in press
- Hashimoto, M., Nitta, A., Fukumitsu, H., Nomoto, H., Shen, L., Furukawa, S.: Involvement of glial cell line-derived neurotrophic factor in activation processes of rodent macrophages. *J Neurosci Res.* 79, 476-487, 2005
- Nitta, A., Nishioka, H., Fukumitsu, H., Furukawa, Y., Sugiura, H., Shen, L., and Furukawa, S.: Hydrophobic dipeptide, Leu-Ile, protects against neuronal death by inducing BDNF and GDNF synthesis. *J Neurosci Res.* 78, 250-258, 2004
- Kinukawa, H., Jikou, T., Nitta, A., Furukawa, Y., Hashimoto, M., Fukumitsu, H., Nomoto, H., Furukawa, S.: cAMP/protein Kinase A signal attenuates Ca²⁺-induced fibroblast growth factor-1 synthesis in rat cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* 77, 487-497, 2004
- Ito, H., Nomoto, H., Furukawa, Y., Furukawa, S.: Neurotrophins facilitate production of choline acetyltransferase and tyrosine hydroxylase in cultured mouse neural stem cells independently on their neuronal differentiation. *Neurosci. Lett.* 339, 231-234, 2003
- Ito, H., Nomoto, H., Furukawa, S.: The growth arrest of PC12 cells by nerve growth factor is dependent on phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt pathway via p75 neurotrophin receptor. *J. Neurosci. Res.* 72, 211-217, 2003
- 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 and sensory neuron-specific expression. *Dev. Biol.* 278, 587-606, 2005
- 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.* 275, 124-142, 2004
- Ishibashi, S., Sakaguchi, M., Kuroiwa, T., Yamasaki, M., Kanemura, Y., Shizuko, I., Shimazaki, T., Onodera, M., 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.* 78, 215-223, 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, 258-270, 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.* 363, 33-37, 2004
- Mikami, Y., Okano, H., Sakaguchi, M., Nakamura, M., Shimazaki, T., Okano, H., Kawakami, Y., Toyama, Y., Toda, M. Implantation of dendritic cells in injured adult spinal cord results in activation of endogenous neural stem/progenitor cells leading to de novo neurogenesis and functional recovery. *J. Neurosci. Res.* 76, 453-465, 2004
- 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.* 76, 265-276, 2004
- Kokuzawa, J., Yoshimura, S., Kitajima, H., Shinoda, J., Kaku, Y., Iwama, T., Morishita, R., Shimazaki, T., Okano, H., Kunisada, T., Sakai, N.: Hepatocyte growth factor promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem cells from mouse embryos. *Mol. Cell Neurosci.* 24, 190-197, 2003
- Shimazaki, T.: Biology and clinical application of neural stem cells. *Horm. Res. Suppl.* 3, 1-9, 2003
- Matsumura, N., Yoshida, N., Ohta, A., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.: Neural precursor cells from adult mouse cerebral cortex differentiate into both neurons and oligodendrocytes. *Cytotechnology* 43, 19-25, 2003
- Muramatsu, D., Sato, Y., Hishiyama, S., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.: Transplantation of GABAergic neurons into adult mouse neocortex. *Exp. Neurol.* 2005, in press
- Imura, T., Kanatani, S., Fukuda, S., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.: Layer-specific production of nitric oxide during cortical circuit formation in postnatal mouse brain. *Cerebral Cortex* 15, 332-340, 2005
- Yoshida, M., Fukuda, S., Tozuka, Y., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.: Developmental shift in bidirectional functions of taurine-sensitive chloride channels during cortical circuit formation in postnatal mouse brain. *J. Neurobiol.* 60, 166-175, 2004
- Sato, Y., Koketsu, D., Ageyama, N., Ono, F., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.: Successful retrograde transport of fluorescent latex nanospheres in the cerebral cortex of the Macaque Monkey. *Experimental Animal* 53, 383-386, 2004
- Koketsu, D., Mikami, A., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.: Non-renewal of neurons in the cerebral neocortex of adult Macaque monkeys. *J. Neurosci.* 23, 937-942, 2003
- Fukuda, S., Kato, F., Tozuka, Y., Yamaguchi, M., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.: Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J. Neurosci.* 23, 9357-9366, 2003
- Yoshida, N., Hishiyama, S., Yamaguchi, M., Hashiguchi, M., Miyamoto, Y., Kaminogawa, S., Hisatsune, T.: Decrease in expression of $\alpha 5 \beta 1$ integrin during neuronal differentiation of cortical progenitor cells. *Exp. Cell Res.* 287, 262-271, 2003
- Okada, H., Miyakawa, N., Mori, H., Mishina, M., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.: NMDA receptors in cortical development are essential for the generation of coordinated increases in $[Ca^{2+}]_i$ in "Neuronal Domains. *Cerebral Cortex* 13, 749-757, 2003
- Kishi, Y., Takahashi, J., Koyanagi, M., Morizane, A., Okamoto, Y., Horiguchi, S., Tashiro, K., Honjo, T., Fujii, S., Hashimoto, N.: Estrogen promotes the differentiation and survival of dopaminergic neurons derived from human neural stem cells. *J. Neurosci. Res.* 79, 279-286, 2005
- Takagi, Y., Takahashi, J., Saiki, H., Morizane, A., Hayashi, T., Kishi, Y., Fukuda, H., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Ideguchi, M., Hayashi, H., Imazato, T., Kawasaki, H., Suemori, H., Omachi, S., Iida, H., Itoh,

N., Nakatsuji, N., Sasai, Y., Hashimoto, N.: Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J. Clin. Invest.* 115, 102-109, 2005

Horiguchi, S., Takahashi, J., Kishi, Y., Morizane, A., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Tsuji, M., Tashiro, K., Honjo, T., Fujii, S., Hashimoto, N.: Neural precursor cells derived from human embryonic brain retain regional specificity. *J. Neurosci. Res.* 75(6), 817-824, 2004

Toda, H., Tsuji, M., Nakano, I., Kobuke, K., Hayashi, T., Kasahara, H., Takahashi, J., Mizoguchi, A., Houtani, T., Sugimoto, T., Hashimoto, N., Palmer, TD., Honjo, T., Tashiro, K.: Stem cell-derived neural stem/progenitor cell supporting factor (SDNSF) is an autocrine/paracrine survival factor for neural stem/progenitor cells. *J. Biol. Chem.* 278(32), 35491-35500, 2003

2. 学会発表

平澤孝枝、大澤圭子、今井嘉紀、内野茂夫、高坂新一: 「Iba1-EGFP トランスジェニックマウスの作製; ミクログリアの可視化技術の開発. 第27回日本神経科学・第47回日本神経化学合同大会、大阪、9.21, 2004

高坂新一: 「神経再生の分子機構の解明をめざして」第26回日本生物学的精神医学界、第34回日本神経精神薬理学会合同年会、教育講演、横浜、7.23, 2004

高坂新一: 「神経の再生修復をめざして」神経組織の成長・再生・移植研究会、第19回学術集会、岐阜、6.19.2004

星雅人、佐々木洋、赤澤智宏、高坂新一: 「ラット顔面神経軸索損傷後における SH3 binding domain glutamic acid rich protein like 3 (SH3BGRL3)の発現上昇」第19回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会、岐阜 6.19, 2004

Kohsaka, S., Ohsawa, K., Sasaki, Y., Honda, S., Imai, Y. and Inoue, K.: "Activation of Microglia by Extracellular ATP through Gi/o-coupled P2Y12 receptor." The 6th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry, Hong Kong, Feb 4-7, 2004

高坂新一: 「ニューロン機能を制御するミクログリア」第76回日本生化学会大会 大会教育セミナー、横浜、10.16, 2003

大澤圭子、高坂新一: 「ATPのミクログリアへの多彩な作用」第46回日本神経化学会大会シンポジウム「神経系における細胞外ATP機能の多様性」、新潟、9.24, 2003

高坂新一: 「ラット顔面神経切断により発現上昇する

4回膜貫通型蛋白質の解析」第46回日本神経化学会大会ミニシンポジウム「神経再生」、新潟、9.24, 2003

高坂新一: 「パーキンソン病の治療に向けた神経再生医療の現状」第3回千葉パーキンソン病フォーラム、千葉、7.3, 2003

Nishimoto, M., Ohashi, H., Hara, Y., Ayukawa, K., Kudo, K., Abe, T., Aoki, S. and Wada, K.: "Identification of novel regulatory mechanisms of neural progenitor cells via G-protein coupled receptors. 34rd Annual Meeting, San Diego, USA, Oct. 8, 2004

Noda, M., Kariura, Y., Amano, T., Manago, Y., Nishikawa, K., Aoki, S. and Wada, K.: "Expression and function of bradykinin receptors in microglia." Gordon Research Conference. Ventura, USA, Feb 24, 2003

Kariura, Y., Nishikawa, K., Aoki, S., Wada, K. and Noda, M.: "Expression and function of bradykinin receptor in microglia. The third international symposium on the study of brain function." Fukuoka, Japan, May 9, 2003

Hara, Y., Nishimoto, M., Ayukawa, K., Ohohashi, H., Kudo, Y., Abe, T., Aoki, S. and Wada, K.: "Analysis of expression profiles of G-protein coupled receptor genes in neural stem cells." 33rd Annual Meeting, New Orleans, USA, Nov. 8, 2003

Jikou, T., Fukumitsu, H., Furukawa, S.: "Administration of FGF-2 into the transected spinal cord enhances axonal regeneration and improves locomotion activity in adult rats." The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Niigata, 9, 24-26, 2003

Hayakawa, Y., Nishida K., Hirano, T., Shimazaki, T., Okano, H.: "Gab1 mediates EGF signal inducing selective proliferation of Olig2-expressing neural progenitor cells in the developing spinal cord." Keystone Symposia, Stem Cells (B3), Banff, Alberta, Canada, February, 2005

Okada, Y., Shimazaki, T., Sobue, G., Okano, H.: "Generation of motor neurons from mouse embryonic stem cells: analysis of ES cell-derived neural cells." Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, San Diego, USA, October 2004

Okada, Y., Shimazaki, T., Sobue, G., Okano, H.: "Generation of motor neuron progenitors from mouse embryonic stem cells." Keystone Symposia, Stem Cells (B2), Colorado, USA, January, 2004

Shimazaki, T., Hayakawa, Y., Nishida, K., Hirano, T., Okano, H.: "Roles of Gab1 in the self-renewal and

differentiation of neural stem cells.” 6th IBRO World Congress of Neuroscience, Prague, Czech Republic, July 14, 2003

島崎琢也、岡野栄之:「ES 細胞由来神経幹細胞らの様々なタイプのニューロンの分化」第26回神経科学大会、名古屋、7. 24, 2003

久恒辰博:「成体脳のニューロン新生における初期分化過程の解析」第 27 回日本神経科学大会、大阪、2004

戸塚祐介、福田諭、吉田美香、宮本有正、久恒辰博:「海馬歯状回における GABAergic system による成体ニューロン新生の促進」第27回日本神経科学大会、大阪、2004

額野大輔、古市泰久、前田雅志、松岡信也、宮本有正、久恒辰博:「脳虚血後の霊長類海馬における新生ニューロンの増加」第27回日本神経科学大会、大阪、2004

福田諭、戸塚祐介、宮本有正、久恒辰博:「成体マウス海馬歯状回におけるカイン酸投与後のネスチン陽性細胞の動態」第27回日本神経科学大会、大阪、2004

Hisatsune, T.: “Adult neurogenesis in intact and injured primate brains.” 16th International Congress of the IFAA, Kyoto, Aug 22-27, 2004

Fukuda, S., Tozuka, T., Hisatsune, T.: “Excitability of nestin-positive progenitor cells in adult dentate gyrus.” 16th International Congress of the IFAA, Kyoto, Aug. 22-27, 2004

Muramatsu, D., Fukuda, S., Tozuka, Y., Ide, Y., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.: “Lineage analysis of nestin-positive progenitor cells in the adult dentate gyrus.” 34th annual meeting of society for neuroscience, San Diego, Oct 23-27, 2004

松村直人、大田綾、村松大、宮本有正、久恒辰博: “Lineage potential of cycling cells from adult cerebral cortex.” 第26回日本神経科学大会、名古屋、7. 23-25, 2003

大田綾、額野大輔、松村直人、宮本有正、久恒辰博: “Nestin-positive progenitor cells proliferate in the adult mouse cerebral neocortex.” 第26回日本神経科学大会、名古屋、7. 23-25, 2003

Tozuka, Y., Fukuda, S., Yoshida, M., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.: “Earliest electrical connections

between proliferating neuronal progenitors and mature circuit through GABAergic system in adult dentate gyrus.” 33rd annual meeting of society for neuroscience, New Orleans, Nov. 8-12, 2003

高橋 淳ら:「ES 細胞からのドーパミン神経誘導と移植条件の最適化」、第 63 回脳神経外科学会総会、名古屋、10. 8, 2004

Fukuda, H., Takahashi, J. et al.: “FACS selection of neural precursor cells from embryonic stem cell-derived heterogeneous graft attenuates tumor formation in the mouse brain.” 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, Oct.23. 2004

高木康志、高橋 淳ら:「霊長類 ES 細胞由来ドーパミン産生神経細胞の霊長類パーキンソン病モデルへの移植」第 62 回脳神経外科学会総会、仙台、10. 3, 2004

Takagi, Y., Takahashi, J., et al.: “Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cell-derived neural progenitors survive and function in a primate model of Parkinson’s disease.” 33rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, Nov. 9. 2003

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

1)【発明の名称】ユビキチンC末端水解酵素変異体遺伝子導入動物
【特許出願人】科学技術振興事業団、国立精神・神経センター総長
【発明者】小坂仁、和田圭司、青木俊介、望 月秀樹、王玉来
【出願日】2003.8.27

2)【発明の名称】”A screening method of drug for treatment of neuropathic pain.”
【出願人】(財)ヒューマンサイエンス振興財団 TLO

3)【発明の名称】「マクロファージ系細胞の活性化抑制物質のスクリーニング方法」
【出願人】(財)ヒューマンサイエンス振興財団 TLO

4)【発明の名称】マクロファージ系細胞の活性化抑制物質のスクリーニング方法
【出願人】(財)ヒューマンサイエンス振興財団
【出願日】2005. 2. 21 (国際出願)

NMDA 受容体を介した神経幹細胞の増殖分化の調節

分担研究者 高坂新一 国立精神・神経センター神経研究所

研究要旨: NMDA 受容体阻害剤の *in vivo* 投与系を用いて、NMDA 受容体が胎児のみならず成体における神経幹細胞の増殖を制御していることを確認した。胎児期の神経幹細胞の増殖亢進の分子機構として、神経幹細胞の維持に重要な働きを担っている *Hes1*、*Hes5* 遺伝子の発現が深く関与していることが判明した。一方、子宮内電気穿孔遺伝子導入法を用いて EGFP の発現ベクターを脳室帯の細胞に導入後、EGFP の蛍光シグナルを指標に大脳皮質切片におけるタイムラプス解析を行った結果、NMDA 受容体阻害剤による幼弱ニューロンの細胞移動の遅延が、主に脳室帯から中間帯への移動の遅延および中間帯における異常な迷走によるものであることがわかった。

A. 研究目的

NMDA 受容体は、中枢神経系における主要な興奮情報伝達を担うイオンチャンネル型受容体であり、その発現は脳の発生過程のかなり早い時期から既に観察されるものの、機能については未だ十分に解明されていない。そこで、本研究では、神経幹細胞の分化・成熟期における NMDA 受容体の機能解明を目的とする。

B. 研究方法

1) 子宮内電気穿孔実験

ジエチルエーテルによる麻酔下、妊娠マウスから子宮を取り出し、ガラスマイクロピペットを用いて 2 μ l のプラスミド DNA (5 μ g/ μ l) を子宮の上から胎児の脳室内に注入後、34 mV、70-80 mA で4回のパルス電流を流し、脳室帯の細胞にプラスミド DNA を導入した。その後、子宮を母親マウスの腹腔内に戻し、一定期間飼育後、遺伝子を導入した胎児または新生児より脳を取り出し、組織染色およびタイムラプス解析を行った。

2) 脳組織切片の作製

脳を摘出し、4%PFA 中 4℃にて一晩、さらに 20% ショ糖中 4℃にて一晩震盪し固定した脳組織を OCT Compound に包埋後、ドライアイス上で凍結した。凍結した脳組織から、クリオスタットを用いて 14 μ m の脳組織切片を作製した。成体のマウスについては、麻酔下 4%PFA にて灌流固定後脳を摘出した。

3) 組織染色

脳組織切片を PBS で洗浄後、0.1% TritonX-100 および 3% ヤギ血清/PBS 中で 20 分処理した。一次抗体/3%BSA を加え 4℃で一晩または室温で 1 時間静置後、PBS にて洗浄した。同様に、二次抗体と

反応後、Perma fluor を用いてスライドガラス上にマウントし、蛍光顕微鏡下で観察した。

4) タイムラプス解析

子宮内電気穿孔法により遺伝子を導入した胎児の脳を摘出し、マイクロームを用いて約 200 μ m の大脳皮質切片を作製した。37℃で 10%CO₂ に調製したチャンバー内に脳切片を固定し、タイムラプス用共焦点顕微鏡下で経時的に蛍光シグナルを検出した。

5) *in situ* hybridization

脳組織切片を 0.1% Tween20/PBS で洗浄し、ジゴキシゲニン標識 cRNA プローブと 65℃で一晩反応させた後、抗ジゴキシゲニン抗体を用いて発現シグナルを検出した。

(倫理面への配慮)

全ての実験は国立精神神経センター実験動物委員会の定める規定に従った。

C. 研究結果

1) NMDA 受容体阻害剤の *in vivo* 投与実験系の確立

これまでに、胎生 17 日齢のラット大脳皮質から調製した初代培養細胞および培養切片に、NMDA 受容体の阻害剤である D-APV (100 μ M) を投与することで、脳発達期の NMDA 受容体が神経細胞の成熟ならびに神経幹細胞の増殖制御に関与していることを見出した。しかし、これらの *in vitro* の実験系では、限られた領域の限られた時期しか解析できない。そこで、本研究では、個体を対象として、胎児から成体までの脳を幅広く解析できる *in vivo* の実験系を構築した。NMDA 受容体の阻害剤を腹腔内に投与するため、PBS に溶解する MK-801 と ketamine を選択し、

各々の阻害剤における有効濃度を検定した。有効性の判断は、これまでの他研究グループの報告に従い、経時的な BrdU のパルスラベル後(50 mg/kg で腹腔内投与)、阻害剤非投与のコントロールラットと比較し、脳室帯および海馬歯状回における BrdU 陽性細胞数の有意な増加を指標とした。その結果、MK-801 は 1 mg/kg、ketamine は 50 mg/kg で有効であることが判明した。さらに、今後の実験計画を見据え、マウスにおける *in vivo* 実験系、ならびにより副作用を軽減した新規 NMDA 受容体阻害剤である CNS-1102 (cerestat) の至適投与条件を検討した。その結果、3 mg/kg の CNS-1102 が有効であることを確認した。

2) NMDA 受容体阻害剤の神経幹細胞に対する増殖亢進の分子機構

胎児大脳皮質の培養切片を用いた *in vitro* の実験から、NMDA 受容体阻害剤の投与により脳室帯の *Hes1*、*Hes5* mRNA の発現が亢進することを見出し、Notch シグナル系の関与の可能性について報告した。そこで、*in vivo* の実験系を用いてその再現性を確認するとともに、さらなる解析を進めた。*in situ* hybridization 実験から、*Hes1*、*Hes5*、*Notch1* mRNA は、胎生 17 日齢で脳室帯に限局した発現が観察され、その後、脳の発達に従い発現が低下してくることを確認した。そこで、17 日齢の妊娠ラットにおいて、NMDA 受容体阻害剤を腹腔内に投与後経時的に胎児を取り出し、*in situ* hybridization 法にて *Hes1*、*Hes5*、*Notch1* mRNA の発現を解析した。その結果、胎生 18 日齢では、阻害剤投与および非投与両者の胎児において、*Hes1*、*Hes5* mRNA の発現に差は観察されなかったが、胎生 20 日齢および生後 1 日齢では、阻害剤を投与したラットで有意な *Hes1*、*Hes5* mRNA の発現亢進が確認された。一方、*Notch1* mRNA については、観察した全ての発達ステージで有意な差は検出されなかった。さらに、詳細に *Hes5* mRNA 発現細胞の局在を解析するため、*Hes5* プロモーターの下流に EGFP を挿入したベクター (*Hes5*-EGFP) を用いて、*Hes5* 発現細胞の可視化を試みた。15 日齢のマウス胎児の脳室帯の細胞に、子宮内電気穿孔法を用いて *Hes5*-EGFP ベクターを導入後、経時的に胎児の脳を摘出し、EGFP の蛍光シグナルを指標に *Hes5* 発現細胞の局在を解析した。その結果、NMDA 受容体阻害剤を投与したマウスにおいて、胎生 19 日齢で脳室帯に顕著な EGFP の蛍光シグナルが観察された。これらの細胞の多くは nestin 陽性細胞であったものの、一部 nestin 陰性細胞においてもシグナルが観察された。現在、*Hes5* 発現細胞のさらなる細胞種の同定、および NMDA 受容体の活性化と *Hes5* の発現との関連性を検討中である。

3) NMDA 受容体阻害剤が幼弱ニューロンの細胞移動におよぼす影響

胎児大脳皮質の培養切片を用いた *in vitro* の実験から、NMDA 受容体阻害剤を投与することで脳室帯から脳表面側への幼弱ニューロンの細胞移動が遅延することがわかっている。そこで、妊娠ラット(17 日齢)について、BrdU を腹腔内に投与した 2 時間後に NMDA 受容体阻害剤を投与し、その後経時的に胎児を取り出し BrdU 陽性細胞の位置を解析することで、幼弱ニューロンの移動を観察した。その結果、*in vitro* の実験と同様に、阻害剤を投与したラットの胎児では幼弱ニューロンの移動が遅延していた。さらに、細胞移動の詳細な解析を行うため、移動中の幼弱ニューロンを EGFP で可視化し、タイムラプス解析を行った。胎生 15 日齢のマウスの脳室帯の細胞に子宮内電気穿孔法を用いて EGFP 発現ベクターを導入し、2 日後に胎児の脳から大脳皮質切片を作製し EGFP の蛍光シグナルを経時的に観察した。その結果、阻害剤非投与の大脳皮質切片では、EGFP 発現細胞が脳室帯から中間帯、さらには皮質板の表層へとすみやかに移動するのに対して、EGFP 発現ベクター導入の 2 時間前に母親に阻害剤を投与した場合、脳室帯から中間帯への移動の遅延、さらには中間帯で迷走している多くの EGFP 発現細胞が観察された。一方、中間帯から皮質板表層への移動速度に関しては、阻害剤を投与したマウスにおいてもコントロールと有意な差は観察されなかった。

D. 考察

胎児の培養切片および初代培養細胞を用いた *in vitro* の実験の知見を再生医療に応用するにあたり、胎児のみならず成体での解析技術を確立することが必須となる。従って、まず個体に阻害剤を投与する *in vivo* の実験系を確立した。この実験系の確立により、解析時期および部位についての制限を減らすことができ、成体での解析も可能となった。

これまでに、NMDA 受容体の阻害剤を投与することで、神経幹細胞の分裂能が維持もしくは増加することを報告してきた。NMDA 受容体はニューロンで発現しており神経幹細胞では発現していないことが示唆されているため、阻害剤がもたらすこの作用は、ニューロンに発現している NMDA 受容体を介して神経幹細胞に働きかける間接的なものであると推測された。さらに、阻害剤の投与により、脳室帯における *Hes1*、*Hes5* mRNA の発現が亢進することを見出し、発現細胞の局在と細胞種の同定を行ったところ、*Hes* 発現細胞の多くは脳室帯に局在する nestin 陽性細胞であることが判明した。近年、この領域にある nestin 陽性細胞は、活性型 Notch1 発現細胞と Mash1 発現細胞に二別され、前者が主に放射状グリ

ア細胞、後者が神経前駆細胞であることがわかってきた。現在、Hes 発現細胞のさらなるキャラクター化を進めることで、Notch シグナル系の関与について解析している。

大脳皮質形成時、NMDA 受容体阻害剤を投与することで幼弱ニューロンの細胞移動が遅延することは報告されているものの、その分子機構は全くわかっていない。Behar らは、表層側から放出されるグルタミン酸が NMDA 受容体を介して幼弱ニューロンに対して“chemoattractant”として働くため、NMDA 受容体の機能が阻害されると幼弱ニューロンの移動速度が遅くなると推測しているが、本研究の結果からは、遅延の主な原因は移動速度の遅延よりもむしろ脳室帯および中間帯における細胞移動の初期過程にあると推測される。細胞移動の一つの機構として、幼弱ニューロンが放射状グリアの突起に沿って表層に移動する“locomotion 機構”が知られている。抗 nestin 抗体を用いて放射状グリアの形態を検討した結果、NMDA 受容体阻害剤を投与したマウスにおいても、コントロールとほぼ同等の突起を有していたことから、異常な迷走の原因は、放射状グリアの形態の異常ではなく、幼弱ニューロンと放射状グリアとの接着や脱接着の異常ではないかと推測される。近年、幼弱ニューロンと放射状グリアとの接着等に関与する分子として、微小管関連分子である Lis1 や doublecortin、また、アクチン制御分子である Filamin A 等、様々な分子が同定されており、これらの分子に変異が起こることで細胞移動の初期過程に異常が生じることがわかってきた。今後、これらの分子との関連性を検討することで、NMDA 受容体を介した細胞移動の分子機構が明らかにされることと思われる。

Hes1-EGFP、Hes5-EGFP は影山龍一郎教授(京都大)に供与いただいた。タイムラプス解析は仲嶋一範教授(慶応大)の指導のもと行った。

E. 結論

神経幹細胞の分化・成熟過程に NMDA 受容体が関与していることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hirasawa, T., Ohsawa, K., Imai, Y., Ondo, Y., Uchino, S. and Kohsaka, S.: Visualization of microglia in living tissues by using Iba-1EGFP transgenic mice. *J. Neurosci. Res.* 2005, in press

Azuma, N., Tadokoro, K., Asaka, A., Yamada, M., Yamaguchi, H., Handa, H., Matsushima, S., Watanabe, T., Kohsaka, S. Kida, Y., Shiraiishi, T., Ogura, T.,

Shimamura, K. and Nakafuku, M.:The Pax6 isoform bearing an alternative spliced exon promotes the development of the neural retinal structure. *Hum. Mol. Genet.* 14, 735-745, 2005

Kamitori, K., Tanaka, M. and Kohsaka, S.: Receptor related to tyrosine kinase RYK regulates cell migration during cortical development. *BBRC*330, 439-445, 2005

Nakajima, K., Tohyama, Y., Kurihara, T. and Kohsaka, S.: Axotomy-dependent urokinase induction in the rat facial nucleus: possible stimulation of microglia by neurons. *Neurochem Int.* 46, 107-116, 2005

Suzuki, T., Hide, I., Ido, K., Kohsaka, S., and Inoue, K., Nakata Y.: Production and release of neuroprotective TNF by P 2X7 receptor-activated microglia. *J. Neurosci.* 24, 1-7 2004

Ohsawa, K., Sasaki, Y., Kohsaka, S and Imai, Y.: Macrophage/Microglia-specific protein Iba1 binds to fibrin and enhances its action-bundling activity. *J. Neurochem.*88, 844-856, 2004

Akazawa, C., Nakamura, Y., Sango, K., Horie, H. and Kohsaka, S.: Distribution of the galectin-1 mRNA in the rat nervous system; its transient upregulation in rat facial motor neurons after facial nerve axotomy. *Neurosci.* 125, 171-178, 2004

Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Michael W. Salter and Inoue, K.: P2X₄ receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 14:424, 778-83, 2003

Sasaki, Y., Hoshi, M., Akazawa, C., Nakamura, Y., Tsuzuki, H., Inoue, K. and Kohsaka, S.: Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y₁₂ in microglia in ratbrain. *Glia* 44, 242-250 2003

Hirasawa, T., Wada, H., Kohsaka, S. and Uchino, S.: Inhibition of NMDA receptors induces delayed neuronal maturation and sustained proliferation of progenitor cells during neocortical development. *J. Neurosci. Res.* 74, 676-687, 2003

2. 学会発表

平澤孝枝、大澤圭子、今井嘉紀、内野茂夫、高坂

新一:

Iba1-EGFP トランスジェニックマウスの作製;ミクログリアの可視化技術の開発. 第 27 回日本神経科学・第 47 回日本神経化学合同大会、大阪、9.21, 2004

高坂新一:

神経再生の分子機構の解明をめざして. 第 26 回日本生物学的精神医学界、第 34 回日本神経精神薬理学会合同年会、教育講演、横浜、7.23, 2004

星雅人、佐々木洋、赤澤智宏、高坂新一:

ラット顔面神経軸索損傷後における SH3 binding domain glutamic acid rich protein like 3 (SH3BGRL3)の発現上昇. 第 19 回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会、岐阜 6.19, 2004

高坂新一:

神経の再生修復をめざして. 神経組織の成長・再生・移植研究会、第 19 回学術集会、岐阜、6.19.2004

Kohsaka, S., Ohsawa, K., Sasaki, Y., Honda, S., Imai, Y. and Inoue, K.:

Activation of Microglia by Extracellular ATP through Gi/o-coupled P2Y12 receptor. The 6th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry, Hong Kong, Feb 4-7, 2004

高坂新一:

ニューロン機能を制御するミクログリア. 第 76 回日本生化学会大会 大会教育セミナー、横浜、10.16, 2003

大澤圭子、高坂新一:

ATP のミクログリアへの多彩な作用. 第 46 回日本神経化学会大会シンポジウム「神経系における細胞外 ATP 機能の多様性」、新潟、9.24, 2003

高坂新一:

ラット顔面神経切断により発現上昇する4回膜貫通型蛋白質の解析. 第 46 回日本神経化学会大会ミニシンポジウム「神経再生」、新潟、9.24, 2003

高坂新一:

パーキンソン病の治療に向けた神経再生医療の現状. 第3回千葉パーキンソン病フォーラム、千葉、7.3, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

1)【名称】”A screening method of drug for treatment of neuropathic pain.”

【出願人】(財)ヒューマンサイエンス振興財団 TLO

2)【名称】「マクロファージ系細胞の活性化抑制物質のスクリーニング方法」

【出願人】(財)ヒューマンサイエンス振興財団 TLO

3)【名称】マクロファージ系細胞の活性化抑制物質のスクリーニング方法」

【出願人】(財)ヒューマンサイエンス振興財団

【出願日】2005. 2. 21 (国際出願)

(資料2)

G-蛋白質共役型受容体による神経系前駆細胞の制御機構解析

分担研究者 和田 圭司 国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第四部

研究要旨:マウス胎生期脳由来神経系前駆細胞の GPCR 大量遺伝子解析データを元に培養系へ種々の GPCR リガンドを添加し生理活性薬剤のスクリーニングを行った。その結果、神経系前駆細胞の増殖や運動性を制御できる薬剤を同定した。また成熟個体脳由来の神経系前駆細胞における GPCR の網羅的発現解析も行い特異的に高発現している GPCR を同定した。ユビキチンシステムの構成分子 UCH-L1 を利用してヒトの病態に近い加齢依存的パーキンソン病の新規モデル動物を作出し、GPCR 作用薬剤の治療効果評価系を確立した。

A. 研究目的

パーキンソン病等の神経難病は現在でも治療法が確立されておらず、移植幹細胞や脳内幹細胞の増殖ならびに分化を外的に投与した薬剤で制御する事が出来れば治療への道が開ける。G 蛋白質共役型受容体(GPCR)は神経伝達分子、ホルモンなど様々な生理活性分子の生体内シグナル伝達を担うヒトゲノム中最大のファミリー分子群である。医療に用いられる治療薬剤の半分以上が GPCR ファミリー分子を標的としていることから、GPCR は幹細胞制御による治療を考える上で効率の良いターゲット分子群である。本研究では胎仔脳ならびに成体脳に存在する神経幹細胞・前駆細胞に発現する GPCR を同定し、その特異的作用薬を用いて内在性神経幹細胞の増殖・分化・運動性を外的に制御する新しい難治性神経疾患の治療法開発に利用可能な薬剤の同定を目指した。

B. 研究方法

胎生14日マウス(C57/BL6J)の終脳から未分化な神経系細胞を分離して FGF 存在下で培養することで nestin 陽性の神経系前駆細胞を得た。神経系前駆細胞の GPCR 大量遺伝子発現解析データを元に培養系へ種々の GPCR リガンドを添加し、細胞生物学的手法により生理活性をスクリーニングした。一方6週齢の成体 C57/BL6J マウスから厚さ500 μ m の脳スライスをビブラトームにより作製しスライス上から顕微鏡下で成体神経幹細胞を含む微細領域を単離しニューロスフェア培養を行った。ニューロスフェア培

養には DMEM/F12 培地に、EGF と bFGF を添加して用いた。培養ニューロスフェアならびに脳スライスから切取した幹細胞を含む側脳室部位ならびに側脳室由来のニューロスフェアから、それぞれ定法により RNA を抽出し GPCR の遺伝子発現レベルを SYBR グリーン蛍光試薬を用いた RT-PCR 法によって定量することで 300 種類からなる GPCR 遺伝子の発現レベルを解析した。

(倫理的配慮)

動物を使用する研究計画はすべて国立精神・神経センター神経研究所動物実験倫理問題検討委員会で審議され承認を受けた。実際の動物使用に当たっては国の法律・指針並びに米国 NIH の基準を守り動物が受ける苦痛を最小限に留めた。ヒト標本を用いた研究は実施しなかった。

C. 研究結果

マウス胎児脳由来の神経系前駆細胞における GPCR 大量遺伝子発現解析によって神経系前駆細胞に高レベルで発現する GPCR を多数同定した。それら GPCR のリガンドの中から神経幹細胞・前駆細胞の制御に利用できる作用薬剤を同定した。PAC1 受容体作用薬 maxadilan は EGF・FGF による神経系前駆細胞の増殖を促進する活性を有し内在性前駆細胞の賦活化への応用が考えられた。 α 1アドレナリン受容体の作用薬 cirazolin, penirephrin は各種ストレスによる神経系前駆細胞の細胞死を抑制することが明らかになり移植幹細胞の生着率向上への応用が考えられた。エンドセリン B 受容体(ET_B-R) 作

用薬 IRL1620 ならびに BQ788 は神経系前駆細胞の運動性ならびに接着性を変化させる薬効を有し、脳内幹細胞の移動や空間配置を制御する事に利用出来る可能性が示唆された。

次に、成体脳を標的とした幹細胞制御技術の開発を目指して成体マウスの脳内の神経幹細胞・前駆細胞を標的とした研究を進めた。脳スライス上の様々な脳内領域(皮質、海馬、線条体、白質等)から形成されるニューロスフェアの数を解析した結果、側脳室前方部位(aLV 領域)から最も数多くのニューロスフェアが形成され、海馬、線条体、白質からもニューロスフェアが形成された。本実験において aLV 領域から得られたニューロスフェアは 8 世代以上(50 日間以上)の継代培養が可能でかつ神経系前駆細胞のマーカーである nestin 陽性であった。分化条件下においてはニューロン(tuj-1 陽性)とグリア細胞(GFAP 陽性)へ分化する能力を有している事が確認された。そこで、幹細胞を含む側脳室部位ならびに aLV 領域由来のニューロスフェアにおける 300 種類の GPCR 遺伝子発現プロファイルを決定した。その結果、成熟脳由来の神経系前駆細胞において高レベルかつ特異的に発現している GPCR を7種類同定する事が出来た。さらに胎児脳由来の神経系前駆細胞 GPCR 発現データとの比較より胎生期と成体脳に特異的に発現する GPCR がそれぞれ8種類ずつ同定できた。

一方、ユビキチンシステムの構成分子 UCH-L1 の I93M 変異型遺伝子を利用してヒトの病態に近い加齢依存的パーキンソン病の新規モデルとなる Tg マウスを作成し、GPCR 作用薬剤を利用した幹細胞制御による難治性神経疾患の治療効果評価系を確立した。

D. 考察

本研究により神経系前駆細胞の膜表面には多様な GPCR 分子群が発現し、かつ前駆細胞の動態制御に重要な役割を担っていることが明らかになった。また今回見いだされた GPCR の作用薬剤の中には既に他疾患に応用されている薬剤も含まれ、それらは比較的簡単に臨床レベルで適応外使用等によって応用可能であることから、本研究の GPCR を標的とした治療薬のスクリーニング手法は実際に臨床応用可能な薬剤を見つけだす為の近道として有効で

ある事が示された。

脳内の神経幹細胞や神経系前駆細胞を賦活化し難治性神経疾患に対する治療へ応用する為には、その生理的な特性を知ることが必須である。本研究から胎児脳ならびに成体脳由来の神経系前駆細胞において発現受容体を数多く同定することが出来た。これら GPCR 発現プロファイルデータは成体神経幹細胞の人為的な制御法を開発する上で今後重要な基礎データとなると考えられた。また、本研究から得られた知見は GPCR を細胞膜表面マーカーとして用いたセルソーター等による幹細胞精製法等にも応用が可能であると考えられた。さらに、本研究からは胎生期脳ならびに成体脳における神経系前駆細胞が発現する GPCR の違いが明らかになり、とりわけ成体脳において特異的に発現する GPCR は脳内幹細胞の未分化性の維持や増殖制御等に関与する可能性が示唆される。

一方、ヒトの病態に近い新しいパーキンソン病のモデル動物 I93MUCH-L1-Tg マウスの開発に成功し、本疾患モデル動物は今後 GPCR 作用薬による神経再生医療のヒトへの応用を考える上で有効な評価系であると考えられた。

E. 結論

本研究では神経難病に対する再生医療へ応用可能な GPCR 作用薬候補を実際に同定する事が出来た。またマウス成体脳内の特定の領域からピンポイントで神経系前駆細胞を単離し GPCR の発現プロファイルを決定した。その結果、成熟脳由来神経系前駆細胞において高レベルで特異的に発現している7種類の GPCR を同定する事が出来た。これら GPCR とその作用薬剤は神経幹細胞・前駆細胞の人為的な制御法の開発に今後応用できると考えられた。また本研究ではヒトの病態に近い加齢依存的パーキンソン病の新規モデル動物を作成し、GPCR 作用薬剤を利用した幹細胞制御による難治性神経疾患の治療効果評価系が確立出来た。

F. 研究発表

1. 論文発表

Harada, T., Harada, C., Wang, Y.L., Osaka, H., Amanai, K., Tanaka, K., Takizawa, K., Setsuie, R., Sakurai, M., Sato, Y., Noda, M. and Wada, K.:

Role of ubiquitin carboxy terminal hydrolase-L1 in neural cell apoptosis induced by ischemic retinal injury *in vivo*. Am. J. Pathol. 164, 59-64, 2004

Kwon, J., Wang, Y.L., Setsuie, R., Sekiguchi, S., Sato, Y., Sakurai, M., Noda, M., Aoki, S., Yoshikawa, Y. and Wada, K.: Two closely related ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes function as reciprocal modulators of germ cell apoptosis in cryptorchid testes. Am. J. Pathol. 165, 1367-1374, 2004

Noda, M., Yasuda, S., Okada, M., Higashida, H., Shimada, A., Iwata, N., Ozaki, N., Nishikawa, K., Aoki, S. and Wada, K.: Recombinant human 5-HT_{5A} receptors stably expressed in C6 glioma cells couple to multiple signal transduction pathways. J. Neurochem. 84, 222-232, 2003

Osaka, H., Wang, Y.L., Takada, K., Takizawa, S., Setsuie, R., Li, H., Sato, Y., Nishikawa, K., Sun, Y.J., Sakurai, M., Harada, T., Hara, Y., Kimura, I., Chiba, S., Namikawa, K., Kiyama, H., Noda, M., Aoki, S. and Wada, K.: Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neurons. Hum. Mol. Genet. 12, 1945-1958, 2003

2. 学会発表

Mika Nishimoto, Hiroki Ohashi, Yoko Hara, Koichi Ayukawa, Kimihisa Kudo, Toshiaki Abe, Shunsuke Aoki and Keiji Wada:

"Identification of novel regulatory mechanisms of neural progenitor cells via G-protein coupled receptors" 34rd Annual Meeting, San Diego, USA, Oct. 8, 2004

Mami Noda, M. Yukihiko Kariura, Taiju Amano, Yoshimasa Manago, Kaori Nishikawa, Shunsuke Aoki and Keiji Wada:

"Expression and function of bradykinin receptors in

microglia." Gordon Research Conference. Ventura, USA, Feb 24, 2003

Yukihiko Kariura, Kaori Nishikawa, Shunsuke Aoki, Keiji Wada and Mami Noda.:

"Expression and function of bradykinin receptor in microglia." The third international symposium on the study of brain function. Fukuoka, Japan, May 9, 2003

Yoko Hara, Mika Nishimoto, Koichi Ayukawa, Hiroki Ohashi, Yoshihisa Kudo, Toshiaki Abe, Shunsuke Aoki and Keiji Wada:

"Analysis of expression profiles of G-protein coupled receptor genes in neural stem cells." 33rd Annual Meeting, New Orleans, USA, Nov. 8, 2003

他多数

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

【特許出願番号】特願 2003-303370

【発明の名称】ユビキチンC末端水解酵素変異体遺伝子導入動物

【特許出願人】科学技術振興事業団、国立精神・神経センター総長

【発明者】小坂仁、和田圭司、青木俊介、望月秀樹、王玉来

【出願日】平成15年8月27日

神経栄養因子による内在性神経幹細胞の賦活化とその応用 —FGF-2による脊髄損傷修復効果とその作用機構—

分担研究者 古川昭栄 岐阜薬科大学分子生物学

研究要旨: 胸髄を T10 で完全切断した脊髄損傷ラットの患部に FGF-2 を投与すると運動機能が著明に改善した。吻側から尾側へと損傷患部を越えて再生する皮質脊髄路や中脳脊髄路の下降性線維が多数検出され、軸索再生に基づく回復であると考えられた。この効果は、脊髄に内在する線維芽細胞が FGF-2 の作用によって損傷患部で増殖し、軸索再生に適した環境をつくるためと推定された。その理由として FGF-2 で増殖する線維芽細胞は髄膜由来の線維芽細胞に比べ軸索伸展を阻害する分子の発現が少なく、促進する分子の発現が高いことがあげられる。今後は FGF-2 の臨床応用に向けた研究と、FGF-2 で誘導される線維芽細胞の特性を分子レベルで明らかにし、その知見を脊髄損傷修復に応用したい。

A. 研究目的

本研究は、中枢神経系に内在する神経幹細胞を賦活化して機能的なニューロンの回復、軸索を再生し、脊髄損傷の修復を助けることを目標としている。脊髄が損傷を受けると神経伝導路が途絶し、損傷部より下位の身体的機能が失われる。しかしヒトを含めた哺乳動物の脊髄は軸索再生能が低く、いったん受傷すると機能再建はきわめて困難となる。抜本的治療法の確立が切に望まれている。

本研究では、FGF-2 を脊髄損傷部に投与してその修復効果と作用機構を調べた。FGF-2 は神経幹細胞に対して強力な増殖作用を示すことから、脊髄内の神経幹細胞を増やしてその後の分化ニューロンを効率良く引き出すと考えたからである。このほかにも神経細胞に対する神経栄養作用や血管新生作用など、神経組織の再生に適した多様な活性をもつことも損傷修復効果を期待した理由である。

B. 研究方法

脊髄の全切断と FGF-2 の投与: FGF-2 は発現ベクターを組み込んだ大腸菌体抽出液からヘパリンカラムを用いて精製した。7 週齢の雌性 Wistar 系ラット

をバルビタール麻酔下、第 9 胸椎の椎弓を切除し、鋭利に第 10 胸髄を完全切断した。直後に FGF-2 (1 μ g/ μ l) を切断部前後 2 mm の範囲に 1 μ l ずつ 5 点投与した。術後、両後肢麻痺を確認した。脊髄の完全切断により自力排尿ができなくなるので 1 日 2 回、膀胱を刺激して排尿させた。

脊髄の半球切断と活性物質の投与: 前項同様に麻酔ラットの第 10 胸髄の左側半球を鋭利な刃物で切断した。皮膚を縫合し、後肢片側麻痺を確認し、その直後からラット腹腔内に 4-メチルカテコール (4 MC, 100 μ g/kg) を投与した。

運動機能の評価: BBB (Basso, Beattie and Bresnahan) 運動機能評価スケール (Basso et al., 1995) を用いて、脊髄全切断の動物は両後肢の運動機能を、左半分切断の個体は左後肢の運動機能を評価した。

逆行性軸索トレーサー法: 再生の有無の評価は、損傷 6 週後、損傷部位から 5 mm 尾側に 4 % fluorogold (FG) を 5 μ l 投与し、3 日後に灌流固定し、脳薄切片を蛍光観察した。

組織化学的解析: 4 % パラホルムアルデヒド液で経心的にラットを灌流固定し、組織を凍結包埋し

た。常法で処理後 25 μm の凍結薄切片化し、ヘマトキシリン染色、免疫染色、TUNEL 染色を実施した。脱水封入して共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。

RT-PCR 法: 逆転写反応は 42°C、1 時間、PCR 反応は変性 95°C、60 秒、アニーリング温度で 60 秒、鎖伸長を 68°C、45 秒で行った。

細胞培養: 脊髄の髄膜由来および FGF-2 誘導性の脊髄実質内線維芽細胞はそれぞれ 10 % 仔牛胎仔血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium で培養した。17 日齢ラット胎仔由来大脳皮質ニューロンは無血清で培養した。

C. D. 研究結果と考察

運動機能の改善: ラット脊髄を完全切断すると後肢運動機能が完全に失われる。しかし、損傷と同時に損傷近傍の組織内に FGF-2 を注入すると、以後明瞭に運動機能の回復が観察された。BBB スケールでは 1 週間後から回復がみられ、6 週までより顕著となった。対照群(損傷 PBS 投与群)では全く運動機能の回復は見られず 6 週までに約半数の個体が死亡した。傾斜板上で身体を支えることができる最大角度からも FGF-2 投与群は良好な回復を示した。

下降性神経路の軸索再生: 大脳皮質-脊髄路や中脳赤核-脊髄路の軸索再生は、損傷部尾側に FG を注入しその 3 日後に大脳皮質や赤核の蛍光を観察することによって評価した。脊髄非損傷群での蛍光陽性ニューロン数を 100 % とすると、対照群(PBS 投与群)では陽性ニューロンは 0 % であったが、FGF-2 投与群では約 20 % ものニューロンが陽性となった。FGF-2 投与群では、大脳皮質-脊髄路や中脳赤核-脊髄路のかなりの数の下向性線維が切断部を越えて吻側から尾側へ伸長したことを示している。

FGF-2 による脊髄内細胞死の抑制: FGF-2 はもともと神経細胞の生存維持作用をもつ神経栄養因子である。そこで細胞死抑制効果の点から FGF-2 による脊髄損傷修復効果を検討した。その結果 FGF-2 は、損傷後の脊髄内でアポトーシスに陥った

TUNEL 陽性細胞を有意に減少させ、神経細胞数の減少を食い止めた。すなわち FGF-2 による神経栄養因子としての細胞保護作用も脊髄損傷修復作用に寄与していることがわかる。

損傷部位における細胞増殖: 損傷部位では FGF-2 による著しい細胞増殖が観察された。当初、内在性神経幹細胞に対する FGF-2 の増殖刺激作用によるものと推定されたが、もともと損傷脊髄内にネスチン陽性細胞は非常に少なく、FGF-2 投与後でもこの傾向は変わらなかった。FGF-2 投与後の損傷組織内で増殖する細胞は、ネスチン陰性で、フィブロネクチン陽性かつ BrdU 取りこみ陽性細胞であり、いわゆる線維芽細胞に近い細胞であると考えられた。そこで FGF-2 誘導性線維芽細胞(FGF-2-induced fibroblasts: FIF)と名付け、その特性を調べた。

FIF 細胞の特性:

① 神経突起の足場に有利な遺伝子発現: 損傷部位の FIF 細胞の塊の中を多数の軸索が走行していることが観察され、軸索再生に好ましい環境が育っていると推定された。そこで FIF 細胞の特性の検討を行った。通常脊髄損傷部位では髄膜由来線維芽細胞(MDF 細胞)が移動、増殖するものの軸索再生は全く起こらない。その理由として MDF 細胞には神経突起を忌避、反駁するプロテオグリカン NG2 やセマフォリンが発現しているためと考えられている。しかし FIF は軸索再生を促進する性質をもつ。実際に NG2 の発現は低レベルであり、さらに軸索伸展を促進する neurocan のコアタンパク質の発現は逆に高くなっていた。そこで実際に FIF 細胞と MDF 細胞を培養して神経突起の足場としての適正を検討した。大脳皮質ニューロンを高密度の線維芽細胞の上で共培養すると FIF 上では MDF に比べて有意に長い軸索が形成された。しかし、細胞が低密度の場合にはこのような影響は認められなかった。さらに両細胞の培養後液を直接大脳皮質ニューロンに添加しても突起の長さに変化は認められないことから、細胞から分泌される液性因子の影響ではなく、細胞面上に発現する分子が軸索と相互作用する結果であると推

定された。

以上の結果は、FIF が中枢ニューロンの神経突起や軸索の足場として優れた性質を持つことを示している。

②起源: 健常脊髄内では数は決して多くないが、FIF 細胞は血管に沿った非血管組織に分布する。髄膜由来線維芽細胞が胎生期に実質内へ移動して特殊化したものか、神経系以外の体性幹細胞由来である可能性も考えられた。

③増殖性: 増殖に及ぼす FGF-2 と血清の効果を FIF と MDF 両細胞で比較した。その結果、MDF 細胞の増殖性は血清存在下で高いが FGF-2 の影響はそれほどではなく、IF 細胞の増殖性は血清による効果が弱く、FGF-2 による効果は著明に大きかった。血清による細胞増殖効果は血小板由来増殖因子 (PDGF)、インスリン様増殖因子 (IGF) などの作用と考えられるので、増殖因子に対する応答性はかなり異なることがわかる。すなわち、FIF は特別に FGF-2 に対する応答性の高い細胞であり、MDF とはこの点で大きく違っている。FGF 受容体の発現レベルの差と推定される。

今後、FIF 細胞の特性をさらに詳細に解析し、軸索再生の促進、脊髄損傷修復に生かしたいと考えている。

④FGF-2 による治療の有望性: 全切断は最も激しい脊髄の傷害であるが、慢性患者でも新しく全切断を作れば治療できる可能性があると考え、この損傷モデルの修復にこだわった。今のところ完全切断された哺乳動物の脊髄神経を再生する方法はない。唯一、嗅覚神経由来グリア細胞の移植によって画期的な軸索再生が起こせるようである。しかし移植に十分量のグリア細胞の確保が問題であり、ヒトの場合は不可能である。その点、本方法はまだまだ改善の余地があるが FGF-2 を投与するだけで手術は簡便であり、FGF-2 も組換え型が確保できる。FGF-2 による修復効果は非常に大きい。ヒトへの応用を視野に入れて検討する価値があると考えられる。

4-メチルカテコール (4MC) の脊髄損傷修復効果:

4MC は代表的な神経栄養因子であるニューロトロフィン (NGF、BDNF) の産生促進作用や培養神経細胞の MAP キナーゼの活性化など、神経栄養作用をもつ低分子物質であるため、組織に浸透して内在性神経幹細胞を活性化する可能性をもつ。神経細胞の生存維持活性を持つことはすでに報告している。

FGF-2 が効果を示した脊髄全切断モデルの腹腔に 4MC を投与したが、全く効果が認められなかった。そこで全切断よりも少しマイルドな実験条件が必要と考え、脊髄の半分を切断したラットに 4MC を投与し、障害側の後肢の運動機能の改善効果を調べた。その結果、4MC 投与群は PBS 投与群に比べて明らかに運動機能の回復を高めた。

4MC の作用機構として、BDNF 遺伝子ばかりでなく、本研究で強い再生効果が見出された FGF-2 遺伝子についても一過性に発現を促進することが明らかとなった。しかし誘導された FGF-2 は十分な量ではないためか全切断モデルの運動機能を回復させることはできなかったと考えている。

今後は作用機構の異なる神経栄養因子やその類似物質を組み合わせることにより、高い運動機能の回復効果を引き出すように検討する必要がある。

E. 結論

本研究により、FGF-2 は軸索再生の促進を伴う優れた脊髄損傷修復効果を示すことが判明した。この作用には損傷部で増殖する線維芽細胞 FIF が重要な役割を演じていると考えられた。この知見をさらに発展させれば真に臨床医学に貢献できる新規な治療法開発につながることを期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hashimoto, M., Nitta, A., Fukumitsu, H., Nomoto, H., Shen, L. and Furukawa, S.: Inflammation-induced GDNF improves locomotor function after spinal cord injury. NeuroReport, 2005, in press

Hashimoto, M., Nitta, A., Fukumitsu, H., Nomoto, H., Shen, L., Furukawa, S.: Involvement of glial cell line-derived neurotrophic factor in activation processes of rodent macrophages. *J Neurosci Res*, 79, 476-487, 2005

Nitta, A., Nishioka, H., Fukumitsu, H., Furukawa, Y., Sugiura, H., Shen, L., and Furukawa, S.: Hydrophobic dipeptide, Leu-Ile, protects against neuronal death by inducing BDNF and GDNF synthesis. *J Neurosci Res*, 78, 250-258, 2004

Kinukawa, H., Jikou, T., Nitta, A., Furukawa, Y., Hashimoto, M., Fukumitsu, H., Nomoto, H., Furukawa, S.: cAMP/protein Kinase A signal attenuates Ca²⁺-induced fibroblast growth factor-1 synthesis in rat cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* 77, 487-497, 2004

Ito, H., Nomoto, H., Furukawa, Y., Furukawa, S.: Neurotrophins facilitate production of choline acetyltransferase and tyrosine hydroxylase in cultured mouse neural stem cells independently on their neuronal differentiation.. *Neurosci. Lett.* 339, 231-234, 2003

Ito, H., Nomoto, H., Furukawa, S.: The growth arrest of PC12 cells by nerve growth factor is dependent on phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt pathway via p75 neurotrophin receptor. *J. Neurosci. Res.* 72, 211-217, 2003

2. 学会発表

Jikou, T., Fukumitsu, H., Furukawa, S.: Administration of FGF-2 into the transected spinal cord enhances axonal regeneration and improves locomotion activity in adult rats. The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry,

Niigata, 9, 24-26, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。