

神経幹細胞の新たな分化誘導法の開発

分担研究者: 島崎琢也 慶應義塾大学医学部 生理学

研究要旨: ES 細胞から、哺乳動物中枢神経系の発生を再現し、様々な領域および時系列特異性を持つ神経幹細胞を分化誘導するシステムを開発し、そのメカニズムを明らかにする第一歩として、その過程における遺伝子発現のプロファイリングも行った

A. 研究目的

ES 細胞は、その多能性と無限増殖能が故に、神経再生を目指した研究および医療技術開発に重要なツールになりつつある。我々、この ES 細胞から、哺乳動物中枢神経系の発生を再現することによって、様々なタイプの神経細胞を自在に分化誘導するシステムの開発を目的として、本研究を行っている。

B. 研究方法

マウスES細胞は10%ウシ胎仔血清(FBS)を含むGMEM 培地中で維持し、分化実験を行った。まず、分散した ES 細胞より浮遊培養系(10%FBS/a-MEM)によってクローナルに胚様体(EB)を形成させ、その際に様々な濃度のレチノイン酸(RA)、あるいは BMP2/4 のマスキング因子である Noggin タンパク質存在下を添加し、6日までに分散接着培養を行い最終分化を、あるいは、無血清の分散浮遊培養系により、neurosphere の形成を観察した。また、RT-PCR 法、ウエスタンブロット、および免疫細胞化学染色によって各種細胞系譜マーカーあるいは中枢神経系の各領域に特異的な遺伝子の発現を解析した。さらに、EB 由来1次 neurosphere を継代培養し、2 次 neurosphere を得た。そして、それぞれより mRNA を抽出し DNA マイクロアレイ解析を行った。また、それらの結果を、実際のマウス神経発生における、神経幹細胞の時系列特異的な変化と比較するために、マウス胎仔11日目と新生仔の側脳室周囲細胞からも mRNA を抽出し、同様にマイクロアレイ解析を行った。

C. 研究結果

1) ES 細胞よりレチノイン酸を用いて様々な領域特異性を持った神経幹細胞を自在に分化誘導でき

るシステムの開発

まず、RAのEBの三胚葉の分化に対する影響を各種マーカーの発現量の変化を指標にして解析してみたところ、RAの濃度依存的に、ES細胞の未分化マーカーである oct-3/4 や内・中胚葉系のマーカーである pdx1, gata4, brachyryr そして nkx2.5 の発現が時間とともに低下した。また、上皮のマーカーである ck-17 や神経系前駆細胞(NPC)のマーカーである Sox1 は低濃度(10^{-9} – 10^{-7} M)の RA で発現がピークに達し、それ以上の濃度ではそれぞれ発現が低下した。そして、neurosphere 形成によって確認される NPC の出現頻度も同様に低下した。一方、神経前駆細胞に特異的に発現する *ngn2* や、分化したニューロンマーカーである β III tubulin およびアストロサイトのマーカーである GFAP の発現とそれらを発現する細胞の数は RA の濃度依存的に上昇した。

次に、EB中の神経系細胞の領域特異性が、RAによってどのように制御されるのかを知るために、まず、前後軸について、胚の前脳から脊髄に至るまでのそれぞれの領域に特異的な発現を示す、様々なホメオボックス型転写因子群の、様々な RA 濃度における発現パターンを解析した。その結果、RA 非存在下では、前脳から中脳にかけてのマーカーが主に発現していたのが、RA 濃度を上げるにしたがって、菱脳から脊髄のマーカーの発現が上昇し、前脳・中脳のそれらは消失していった。またこれらの EB を分化させ、体性運動ニューロンのマーカーである HB9 と菱脳に特異的な内臓性運動ニューロンのマーカーである Phox2B の免疫染色を行ったところ、Phox2B 陽性ニューロンは低濃度(10^{-9} – 10^{-7} M)の RA 存在下で形成された EB のみから分化し、HB9 陽性ニューロンは、逆に高濃度($>10^{-6}$ M)の RA 存在下で形成された EB から分化したニューロンに多く出現した。次に、

背腹軸について、特に胚の菱脳から脊髄にかけて背腹軸に沿った特異的な発現を示す転写因子群の発現パターンを同様に解析した。その結果、低濃度 (10^{-9} – 10^{-8} M) の RA では、腹側、特に sonic hedgehog(shh)によって発現が上昇する classII 遺伝子群 (nkx6.1, nkx6.2, olig2, nkx2.2) の発現が強く、RA 濃度を上げていくにしたがって、それらの発現は著しく低下していき、逆にそれらよりも背側に発現し、shh に反応性が無いか、もしくは発現が低下する classI 遺伝子群 (Pax7, dbx1, dbx2, irx3) の発現が上昇した。そこで、RA によって shh の発現が制御されているのではないかと考え、shh 遺伝子とタンパク質の発現を解析した結果、驚いたことに、shh 遺伝子とその全長タンパク質の発現は RA 濃度依存的に上昇したものの、その活性型タンパク質である shh-N(自己分解で生成される N 末端側 24–197aa) は低濃度 (10^{-9} – 10^{-8} M) の RA 存在下のみで検出された。そこで、この RA による背腹軸の領域下の制御を、shh シグナルの修正によって変化させられるかどうかを、外因性の shh-N および shh シグナルの阻害剤である cyclopamine の添加実験によって確かめた。その結果、高濃度 ($>10^{-7}$ M) の RA 存在下でも、shh-N の添加によって classII 遺伝子群の発現は上昇し、逆に、低濃度 (10^{-9} – 10^{-8} M) の RA 存在下であっても、cyclopamine の添加によってそれらの発現は著しく低下した。

2) ES 細胞由来神経幹細胞の時系列特異的な分化能の変化を制御する遺伝子群の同定

我々は、本研究の中で、EB 由来1次 neurosphere がほとんどニューロンに分化し、それを継代した2次 neurosphere がニューロンとグリアの両方に分化することを発見した。このような、神経幹細胞の時系列特異的な分化能の変化は、実際の中枢神経系発生でも起こっており、我々の開発した ES 細胞からの神経幹細胞分化誘導システムが、in vivo に近いものであることを示唆している。そこで、このような神経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。その結果、EB 由来1次 neurosphere で有意に発現の高い遺伝子を 617 個、2次 neurosphere で有意に発現の高い遺伝子を 838 個同定した。そして、それらの内訳は以下の通りであった。まず、それぞれで最も多かったグループは、機能未知の遺伝子群で、51% および 47% であった。1次 neurosphere と2次 neurosphere の間で最も大きな違

いを示した既知遺伝子群のグループは、細胞分裂、DNA 複製に関連した遺伝子群やクロマチン再構成因子など、遺伝子発現の epigenetic 制御に関わる遺伝子群であり、これらは1次 neurosphere で発現が高いものの13%を占めていたのに対し、2次 neurosphere ではほとんど見られなかった。一方、分泌因子、膜レセプター・リガンドおよび細胞内情報伝達因子等のシグナル伝達関連因子などの占める割合は、2次 neurosphere で発現が高い遺伝子群で高かった。また、これらの傾向は、マウス胎仔11日目と新生仔の側脳室周囲細胞を比較した場合も同様であり、それぞれの比較で同様な発現変化を示した遺伝子は、発生初期と後期でそれぞれ 199 個および 244 個であった。

3) 霊長類 ES 細胞からの神経幹細胞の分化誘導法の確立

まず、カニクイザル ES 細胞から、EB 形成を 6–36 日間行い分化させ、神経幹細胞の分化誘導時期を、そのニューロンやグリアへの分化能を指標に解析したところ、EB 形成 6 日目よりニューロン分化能が検出され、12 日目以降より GFAP 陽性のラジアルグリア様細胞の分化が見られた。そして、neurosphere 法によって、神経幹細胞の分化誘導時期を確認したところ、EB 形成 12–18 日目がそのピークであった。また、ヒト ES 細胞の分化誘導系においても同様の結果が得られた。しかしながら、このようにして形成された1次 neurosphere は、マウス ES 細胞–EB からのそれと違って、GFAP 陽性のラジアルグリア様細胞への分化が見られた。

D. 考察

1) 様々な領域特異性を持った神経幹細胞の分化誘導

これまで、RA を用いた ES 細胞の神経系細胞への分化誘導はいくつか報告されているが、いずれにおいても、神経系前駆細胞の分化程度や領域特異性の決定に関する詳細は解析されていなかった。本研究は、これらの詳細が、自在に必要なタイプのニューロンを得るためには重要であるという考えのもとに進められ、その結果、以下の事が明らかになった。1. RA は濃度依存的に ES 細胞の神経系への分化を促進するが、同時に幹細胞を含めた神経系前駆細胞のニューロンやグリアへの分化も促進する。2. ES 細胞から EB を形成する際に、RA は濃度依存的に神経系の前後軸を菱脳から脊髄領域に後方化させる。3. RA は、EB の前後軸だけでなく、shh 依存

性の背腹軸の決定にも、shhおよび shh-N の発現を制御することによって関与する。これらの知見は、RA と shh-N を用いることによって、ES 細胞から菱脳から脊髄にかけての前後軸および背腹軸の決定をコントロールしつつ幹細胞を含む様々な神経系細胞を分化誘導できることを示している。

2) 神経幹細胞の時系列特異的な分化能の変化

哺乳類の神経発生において、これまでに、発生初期にはニューロン発生のみが起こり、続いてグリアの発生が始まること、そして、ニューロン発生そのものについても、時系列特異的にそのサブタイプが変化することが知られてきたが、これらのメカニズムに関してはほとんど何も分かっていない。本研究の、ES 細胞を利用した中枢神経系の in vitro 再現系を使って得られた、遺伝子発現プロファイリングデータは、これらのメカニズムの解明の出発点となるものであると考えられる。特に、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の発現が、初期神経幹細胞で特に高いという事実の発見は、それらのコンポーネントに共通した因子が存在するという、これまでの知見から見て、非常に興味深いものであり、神経幹細胞の発生ポテンシャルの時系列的変化の制御機構の解明と応用に向けて、新たな第一歩であると考えられる。

3) 霊長類 ES 細胞の可能性

霊長類 ES 細胞で、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ことは、今後、ヒト中枢神経系の発生の研究およびその応用に向けた新たな展開を期待させるものである。

E. 結論

1. 本来、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、RA と shh-N 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が示唆された。

3. 霊長類 ES 細胞においても、マウス ES 細胞と同様な神経誘導・神経幹細胞培養系が確立された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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, HJ, 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. 60, Suppl. 3, 1-9, 2003

2. 学会発表

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か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

他多数

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

(資料5)

成体霊長類の神経幹細胞の特性に関する研究

分担研究者 久恒辰博 (東京大院・先端生命科学)

研究要旨:サル類(カニクイザル)においても、成体脳内に神経幹細胞が存在することが立証された。この細胞から海馬あるいは嗅球において、ニューロンが新しく生み出されていることが証明された。さらに、医療応用上大変興味深いことに、脳梗塞後のカニクイザルにおいて、ニューロンの再生へと至る過程が顕著に誘導されていることが見出された。

A. 研究目的

大人の脳内においても、新たにニューロンが生み出されている現象(成体脳のニューロン新生)が見出されて久しい。高齢社会が一段と進行するわが国において、この現象を利用した再生医療工学に人々の期待は高まっている。パーキンソン病や脳梗塞などの脳疾患に対する再生医療においては、疾病により傷害された特定ニューロンを、内在性神経幹細胞を利用して補えばよいのである。具体的に再生医療への展開を考えた場合、脳内のあらゆる箇所、とくに黒質、線条体、大脳皮質などにおいても「脳障害時に、ニューロン再生を誘導しうる治療処置条件を特定」することが強く求められている。

本研究では、主に非ヒト霊長類モデル動物であるカニクイザルを用いて、神経幹細胞の挙動について解析を行った。まずは、健常時において神経幹細胞が存在し分裂する部位を特定し、そしてニューロンの新生が認められる脳内領域を同定した。脳障害時においては、これらの神経幹細胞が活性化されることが示唆されている。そこで、カニクイザルにおける脳梗塞モデル(中大脳動脈閉塞モデル)を本研究に導入し、脳虚血後に誘導される神経幹細胞の分裂促進、ならびにニューロン新生の程度を定量的に解析することで、内在性神経幹細胞を利用した再生医療への布石となる基礎データの収集を進めた。

また、これまでの研究から、成体哺乳動物の大脳新皮質部位においても分裂中の未熟な細胞が多数存在することが認められている。これらの未熟な細胞にある種の処置を施すことで神経幹細胞として機能しうることも期待されている。そこで、将来的には、大脳新皮質部位において神経の再生を可能とするために、げっ歯類モデルを用いた基盤研究を行った。

B. 研究方法

霊長類における神経幹細胞の挙動を解析するために、3-5才のニホンザルおよびカニクイザルを使

用した(京大・霊長研、三上章允教授との共同研究)。分裂細胞を標識するために核酸アナログであるプロモデオキシウリジンをサルに投与し、この4週間後に、還流固定しサルから脳を取り出した。そして、抗体組織染色によりサル脳内におけるニューロン新生を評価した。

病態時におけるニューロン新生の状態を解析するために、中大脳動脈を閉塞するサル脳梗塞モデルを使用した(藤沢薬品工業との共同研究)。分裂細胞を標識するために核酸アナログであるプロモデオキシウリジンをサルに投与し、この4週間後に還流固定の後サルから脳を取り出し、抗体組織染色により、脳梗塞後のサル脳内におけるニューロン新生の程度を評価した。

また、げっ歯類モデルとして、成体脳内で神経幹細胞を特定するために、ネスチン遺伝子の制御下にGFPを発現する遺伝子改変マウス(東大院医、山口正洋博士より供与)を使用した。成体海馬でのネスチン陽性細胞の生理膜特性を解析するためにGFP-ガイドパッチクランプ法を開発した(慈恵医大、加藤総夫博士との共同研究)。成体大脳皮質に存在するネスチン陽性細胞の分化特性を解析するために、ネスチン陽性細胞の*in vitro*培養系を開発した。

(倫理面への配慮)

全ての動物試験は、所属施設の倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

成体霊長類(カニクイザル)の脳内における神経幹細胞の挙動ならびにニューロン新生の程度を明らかにするために、プロモデオキシウリジンを投与したサルを用いた抗体組織染色を行った。健常状態のサル脳内において、海馬あるいは側脳室領域で、神経幹細胞の分裂が認められ、海馬および嗅球において新生ニューロンの存在が確認された。大脳新皮

質部位においても分裂細胞は多く認められたが、ニューロン新生を示す証拠は得られなかった。

中大脳動脈を閉塞した後のサル脳内において、海馬あるいは側脳室領域での細胞分裂が通常の4倍以上となり、また新生するニューロンの数も海馬においては4倍、嗅球においては20倍になった。また、本モデルにおいて、障害部周辺の脳室周囲領域に、未熟ニューロンの出現が観察され、脳障害により霊長類においてもニューロン新生がある程度誘導されていることが示唆されたが、脳虚血巣に近接した線条体および大脳皮質において、ニューロンの新生は認められなかった。

本研究では、げっ歯類モデルを用いて、成体脳内で神経幹細胞から新しいニューロンが生まれる過程を追跡することに成功した。成体海馬の歯状回においては、ラジアルグリア様の神経幹細胞より、自然誘発的に PSA-NCAM 陽性のニューロン前駆細胞が生み出され、その後機能的なニューロンへと分化成熟していくことが見出された。

また、成体大脳新皮質部位においても、極めて驚くことに、ネスチンを発現する分裂細胞が相当な頻度で存在していることが見出した。この細胞は、海馬の場合とは異なり、ラジアルグリア様というよりはむしろオリゴデンドロサイト前駆細胞としての性質を併せ持っていた。このネスチン陽性細胞を *in vitro* 系で培養することにより、ニューロンが自然誘発的に分化誘導されることを認めた。さらに、この分化誘導はニューラル bHLH 転写因子の遺伝子導入により、顕著に促進されることを見出された。

D. 考察

本研究において、非ヒト霊長類モデルであるマカクザル(カニクイザルやニホンザルなど)においても、成体脳内で神経幹細胞が分裂し、ニューロンを生み出していることが立証された。病態モデルを用いた研究の結果から、脳障害時には成体脳内に存在する神経幹細胞が活性化されニューロン新生の程度が飛躍的に上昇することが見出された。そして、通常ニューロン新生が認められる海馬と嗅球に加え、脳虚血巣の周囲においても、ニューロン新生へといったプロセスが誘導されている証拠が得られた。そのため、内在性神経幹細胞を利用した変性脳疾患の治療が近い将来現実化することは想像に難くない。

しかしながら、本モデルにおいて、ニューロンの再生を示す所見は得られていない。今後は、げっ歯類モデルなどから得られた基盤データを活用し、脳障害を補填するニューロンの再生をさらに促す技術の開発に期待が寄せられる。例えば、ニューロン分化

を誘導促進する低分子薬剤の同定が進んでいけば、内在性神経幹細胞を利用した変性脳疾患の治療法の開発にいつそ道が開けることが大いに期待される。

E. 結論

サル病態モデル(中大脳動脈閉塞モデル)において、ニューロン再生の過程が誘導されていることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Muramatsu, D., Sato, Y., Hishiyama, S., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.: Transplantation of GABAergic neurons into adult mouse neocortex. *Exp. Neurol.* 2005, in press
- (2) 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
- (3) 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
- (4) 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
- (5) Matsumura, N., Yoshida, N., Ohota, A., Miyamoto, Y. Hisatsune, T.: Neural precursor cells from adult mouse cerebral cortex differentiate into both neurons and oligodendrocytes. *Cytotechnology* 43, 19-25, 2003
- (6) 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

- (7) 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
- (8) 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
- (9) 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
2. 学会発表
- (1) 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、SY17-04, 2004
- (2) 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、P2-135, 2004
- (3) 額瀨大輔、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、P2-139, 2004
- (4) 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ニ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、P2-161, 2004
- (5) Tatsuhiko Hisatsune :
 "Adult neurogenesis in intact and injured primate brains." 16th International Congress of the IFAA, Kyoto, Aug. 22-27, S63-5, 2004
- (6) Satoshi Fukuda, Tusuke Tozuka, Tatsuhiko Hisatsune:
 "Excitability of nestin-positive progenitor cells in adult dentate gyrus." 16th International Congress of the IFAA, Kyoto, Aug. 22-27, S46-2, 2004
- (7) Dai Muramatsu, Satoshi Fukuda, Yusuke Tozuka, Yoko Ide, Yusei Miyamoto, Tatsuhiko Hisatsune:
 "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
- (8) 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
- (9) 大田綾、額瀨大輔、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
- (10) Yusuke Tozuka, Satoshi Fukuda, Mika Yoshida, Yusei Miyamoto, Tatsuhiko Hisatsune:
 "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
- 他多数
- G. 知的財産権の出願・登録状況
 特になし

ES 細胞移植による中枢神経機能再生

分担研究者 高橋 淳 京都大学大学院医学研究科 脳神経外科

研究要旨:カニクイザル ES 細胞を PA6 というマウス頭蓋骨由来のフィーダーで培養することによって高率にドーパミン産生神経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、ドーパミン産生神経の生着と神経症状の改善を得ることに成功した。この霊長類モデルで得られた結果は ES 細胞由来神経系細胞の移植によって中枢神経機能の再生がヒトにおいても可能であることを示唆する。しかし、細胞移植の大きな問題点として腫瘍形成が挙げられる。事実、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。このように、神経系細胞のみを選択して移植することによって腫瘍形成は抑えられると考えられる。

A. 研究目的

神経難病に対する細胞移植療法において神経幹細胞や ES 細胞に対する期待がよせられている。我々は、ES 細胞由来神経系細胞の移植によるパーキンソン病治療法の開発を目指して研究を進めている。その際の神経分化誘導条件の最適化と細胞移植後の効果と安全性の評価を目的として以下の実験を行った。まず臨床応用を目指すにはヒトと同じ霊長類を用いた実験が必要不可欠である。そこで、カニクイザル ES 細胞から誘導したドーパミン産生神経をカニクイザルパーキンソン病モデル脳に移植し、行動解析を行った。次に、マウス ES 細胞を用いて細胞移植の問題点の一つである腫瘍形成を抑制するための方法を検討した。

B. 研究方法

(カニクイザル ES 細胞移植)

対象疾患は、すでに胎児神経組織移植で一定の成果が得られており、しかも動物モデルが確立しているパーキンソン病を選んだ。パーキンソン病は黒質から線条体に投射するドーパミン神経が脱落する

ために固縮や無動、振戦などが起こる病気である。

そこで、まず ES 細胞からのドーパミン神経誘導を試みた。すでに PA6 というマウス骨髄由来のフィーダー上で培養することによってマウス、サル ES 細胞からドーパミン神経が誘導されることは報告されていたが、我々はさらに FGF2 と FGF20 を作用させた。

つづいて、MPTP というドーパミン神経に特異的な神経毒を投与することによって、カニクイザルのパーキンソン病モデルを作成した。そして、上記方法でドーパミン神経へと誘導した細胞をモデルサルの脳(線条体)に移植し、神経症状と F-dopa の取り込み、移植細胞の生着と分化を評価した。

動物実験は、医学研究科の動物実験委員会の承認を得たのち、その指針に準拠して行った。

(腫瘍形成の抑制)

マウス ES 細胞を PA6 細胞という骨髄由来のフィーダー上で培養するとドーパミン産生神経が分化誘導される(SDIA 法)。これまでの実験で、PA6 細胞上で長期間培養し十分分化させたニューロンよりも、やや未分化な神経前駆細胞の移植の方が、脳内での生着が良いことが分かった。ところが、分化日数の少な

い ES 細胞移植では腫瘍形成が起こる。PA6 上では ES 細胞それぞれの分化段階は不均一であり、まだ未分化な ES 細胞が残っていることがその原因ではないかと考えられた。

ある性質を持った細胞群を選別する方法として FACS (fluorescence-activated cell sorting) という方法がある。我々は、その方法を用いて初期の神経系細胞を選別し (逆に言えば、未分化 ES 細胞を取り除き)、腫瘍形成が抑制できるかどうかを検討した。

C. 研究結果

(カニクイザル ES 細胞移植)

カニクイザル ES 細胞を PA6 の上で約 2 週間培養すると、多くの細胞が神経系細胞のマーカーである Musashi や NCAM を発現するようになった。この時点で、細胞を PA から剥がして FGF2 や N2 supplement を含む無血清培地で培養すると、細胞は sphere 状態で増殖した。

この sphere を 1 週間培養したのちにポリオルニチン/ラミニンでコートした培養皿にまき直し、FGF2 を除去した培地で培養すると、細胞は分化し、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトが出現した。さらに、TH (チロシン水酸化酵素) 陽性のドーパミン神経のみならず、ChAT 陽性のコリン神経、GABA 陽性の GABA 神経なども出現した。

この際、ドーパミン神経は全神経の約 8% であるが、sphere 培養の時期に FGF2 に加えて FGF20 も添加することによって、ドーパミン神経の割合は約 24% にまで増加した。この効果は FGF20 単独ではみられず、FGF2 と FGF20 の両方が必要であった。

カニクイザルのパーキンソン病モデルは MPTP を 0.4mg/kg ずつ繰り返し静脈注射することによって作成した。カニクイザルの姿勢、運動量、振戦などをスコア化し、スコアが悪化しはじめた時点で投与を中止してスコアが 3 か月以上安定したサルを実験に用いた。各サル毎に MRI を撮影して線条体の位置を確認し、両側に PA6 および FGF2/FGF20 で処理した ES 細胞を移植した (N=6)。コントロール群 (N=4) は培養液のみを注入した。移植には関わらなかった研究者が、移植群かコントロール群かを知らされずに各サルの症状のスコア化を行い、それらを経時的に比較検

討した。すると、移植群においては徐々にスコアの改善がみられるようになり、移植後 10 週目に有意な改善が認められた。14 週間まで観察したが、この改善は維持された。

その後、F-dopa の取り込みを PET にて評価した。コントロール群においては F-dopa の取り込みが低下しているのに対し、移植群においては有意な上昇がみられ、移植細胞がドーパミン神経として機能していることが確認された。

PET study 後にカニクイザルの灌流固定を行い、脳切片の染色を行った。移植に先立ち細胞を BrdU でラベルしたが、移植群の線条体において BrdU 陽性細胞の生着がみとめられた。さらに TH 陽性細胞や DAT (ドーパミントランスポーター) 陽性細胞も確認された。これらの多くは BrdU と共陽性であり、移植された ES 細胞由来のドーパミン神経であると考えられた。また、少なくとも 14 週間後の観察においては分裂細胞 (Ki67 陽性細胞) や腫瘍形成は認められなかった。

(腫瘍形成の抑制)

PA6 細胞上で 4 日、6 日、8 日培養した ES 細胞をマウス脳内に移植すると、その一部は脳内で TH 陽性のドーパミン産生神経に分化し、その数は 4 日培養した場合が最も多かった。しかし、いずれの条件でも約半数の例において腫瘍形成がみられた。その腫瘍の免疫染色では、腫瘍内の分裂細胞は未分化 ES 細胞マーカーを発現していることが分かった。つまり、未分化 ES 細胞が移植細胞の中に混じり、それが脳内で増殖し続けていると考えられる。

未分化 ES 細胞と神経幹細胞を区別するために神経幹細胞マーカー Sox1、Sox2、Nestin の発現を RT-PCR でみたところ、後 2 者は未分化 ES 細胞でも SDIA4 日後の ES 細胞でも発現がみられたのに対し、Sox1 は SDIA4 日後 ES 細胞でのみ発現がみられた。そこで、Sox1 を手がかりにして神経幹細胞を選別するために Sox1-GFP knock-in ES 細胞を用いて FACS を用いた。GFP 陰性 (Sox1 陰性) 細胞では、RT-PCR で Oct4 や Nanog などの未分化 ES 細胞マーカーの発現が認められた。これに対し、GFP 陽性 (Sox1 陽性) 細胞ではこれら ES 細胞マーカーの発現は認められず、中脳マーカーである En1 の発現が認められた。

さらにこの Sox1 陽性細胞を PA6 細胞上で再び培養すると10日後には Tuj1 陽性のニューロンへと分化し、その 22%は TH 陽性であった。次に Sox1(-)細胞をマウス脳内に移植し8週後に観察したところ、29 匹中 10 匹で細胞が生着し、そのうち 9 匹で腫瘍形成がみられた。これらの腫瘍は組織学的に teratoma であると考えられた。Sox1(+)細胞の移植では 39 匹中 23 匹で細胞が生着したが、腫瘍形成は認められなかった。生着した細胞の 90%以上は Tuj1 陽性で、TH 陽性細胞の平均値は 14.5 個であった。免疫不全(SCID)マウスの皮下に移植した実験において、Sox1(-)細胞の移植では 6 匹中 3 匹で teratoma の形成が見られたのに対し、Sox1(+)細胞の移植では腫瘍形成は認められなかった。

D. 考察

(カニクイザル ES 細胞移植)

移植の前に ES 細胞をフィーダーから剥がして sphere で培養することは、PA6 や非神経系細胞の混入を減らすことに有用である。また、FGF2/FGF20 によるドーパミン産生神経誘導法も有用であると思われる。今回の neurosphere 法では、SDIA 法によってドーパミン産生神経に分化し始めた前駆細胞が完全には成熟しきらずに sphere 内に存在していると考えられ、このことが脳内でのドーパミン産生神経生着につながったものと考えられる。

今回の移植では片側につき約 2100 個の TH 陽性細胞が生着していた。これは、大きさからの類推では、ヒトの患者さんへの胎児神経移植で効果の見られていた最低ラインの数字であった。が、スコア上では症状の改善がみられ、ES 細胞由来神経系細胞の移植では少なくとも胎児神経移植と同等の効果は期待できると思われる。しかし、細胞生着率は約 2%と低く、この改善が必要である。また、今回の実験では腫瘍形成は見られなかったが、腫瘍形成の有無をより長期の経過観察や免疫不全動物への移植で確認する必要がある。

(腫瘍形成の抑制)

過去の ES 細胞あるいは ES 細胞由来神経系細胞移植実験では、免疫反応の強い異種移植でも腫瘍形成が起こることが報告されている。未分化 ES 細胞

移植の同種移植では 400 個の移植でも腫瘍形成が観察されている。我々の方法では、Sox1(+)細胞は SCID マウスへの移植でも腫瘍を作らず、腫瘍形成抑制には有効であると考えられた。

ただ、FACS を行うと細胞に対するダメージが強く、細胞の生着率が下がる。また、Sox1(+)細胞は単に神経系細胞だというだけなので、これらをドーパミン産生神経に分化させるためには Shh, FGF8 あるいは BDNF などのサイトカインを添加する必要があると思われる。

E. 結論

カニクイザル由来 ES 細胞から成熟した中脳ドーパミン産生神経が誘導されること、この前駆細胞移植によってカニクイザルパーキンソン病モデルの行動が改善したことは、同じ霊長類であるヒトにもこの方法が適応できる可能性を示唆する。ただし、今回は約3か月という短期経過観察であるので、実際の臨床応用の前には1年以上の長期経過観察によって、その効果と安全性の検証が行われなければならない。と同時に、ヒト ES 細胞からの中脳ドーパミン産生神経誘導とその移植実験が必要である。

細胞移植の最大の問題点は腫瘍形成である。今回の結果から、ES 細胞(あるいは、それから誘導した神経系細胞)の移植における腫瘍形成の原因は未分化 ES 細胞の混入であり、神経幹細胞のみを選別して移植することにより腫瘍形成が防げることが明らかとなった。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ので、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

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

他多数

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 国立精神・神経センター
氏名 高坂 新一

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Nakajima, K. and Kohsaka, S.	Response of microglia to brain injury.	Helmut, K., Bruce R.R.	Neuroglia	Oxford University Press	New York USA	2004	443-453
Nakajima, K. and Kohsaka, S.	Microglia: Neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system.	Teruo Inoue	Current Drug Targets – Cardiovascular & Haematological Disorders	Bentham Science Publishers Ltd.		2004	65-84

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.		in press	2005
Kamitori, K., Tanaka, M. and Kohsaka, S.:	Receptor related to tyrosine kinase RYK regulates cell migration during cortical development	BBRC		in press	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., 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

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
Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, 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
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.	P2X ₄ receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury.	Nature	14;4 24	778-783	2003
Sasaki, Y., Hoshi, M., Akazawa, C., Nakamura, Y., Tsuzuki, H., Inoue, K. and Kohsaka, S.	Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y ₁₂ 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

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 国立精神・神経センター
氏名 和田 圭司

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Noda, M., Yasuda, S., Okada, M., et al.	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., et al.	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neurons.	Hum. Mol. Genet.	12	1945-1958	2003
Harada, T., Harada, C., et al.	Role of ubiquitin carboxy terminal hydrolase-L1 in neural cell apoptosis induced by ischemic retinal injury <i>in vivo</i> .	Am. J. Pathol	164	59-64	2004
Kwon, J., Wang, Y.L., et al.	Two closely related ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes function as reciprocal modulators of germ cell apoptosis in cryptorchid testes.	Am. J. Pathol.	164	1367-1374	2004
Manago, Y., Kanahori, Y. et al.	Potentiation of ATP-induced currents due to the activation of P2X ₂ receptors by ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1.	J. Neurochem.	in press		2005

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 岐阜薬科大学神経分子生物学
氏名 古川 昭栄

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
Yamada, Y., Shimizu, K., Nitta, A., Soumiya, H., Fukumitsu, H., Furukawa, S.	Axonal regrowth downregulates the synthesis of glial cell line-derived neurotrophic factor in the lesioned rat sciatic nerve.	Neurosci. Lett.	364	11-15	2004
Kinukawa, H., Jikou, T., Nitta, A., Furukawa, Y., Hashimoto, M., Fukumitsu, H., Nomoto, H., Furukawa, S.	cAMP/protein Kinase A signal attenuates Ca ²⁺ -induced fibroblast growth factor-1 synthesis in rat cortical neurons.	J. Neurosci. Res.	77	487-497	2004
Nitta, A., Nishioka, H., Fukumitsu, H., Furukawa, Y., Sugiura, H., Shen, L., Furukawa, S.	Hydrophobic dipeptide, Leu-Ile, protects against neuronal death by inducing BDNF and GDNF synthesis.	J. Neurosci. Res.	78	250-258	2004

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 慶應義塾大学医学部

氏 名 島崎 琢也

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
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.	60	1-9	2003

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 東京大学新領域創成科学
氏名 久恒 辰博

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 京都大学大学院医学研究科
氏名 高橋 淳

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
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(3)	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(1)	102-109	2005

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷