

C. 研究結果

エンドサイトーシスされた野生型L1は、トランスフェリン陽性の初期エンドソームに到達したが、変位型L1 (L1SA、L1SE)の一部はトランスフェリン陰性の細胞内小胞へとエンドサイトーシスされた (図1)。また、CKIIの薬理的阻害剤 (5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole, DRB) 存在下では、野生型L1の一部はトランスフェリン陰性の細胞内小胞へとエンドサイトーシスされた (図2)。以上の結果から、CKIIによるL1細胞内領域リン酸化は、L1のエンドサイトーシス経路の制御に関与することが示された。

次に、CKIIによるL1細胞内領域リン酸化の軸索伸長

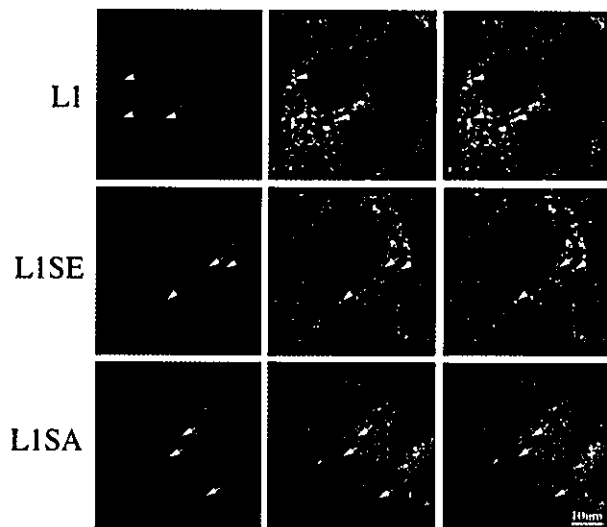


図1：CKIIリン酸化部位アミノ酸変異のL1エンドサイトーシス経路への影響。Hela細胞内にエンドサイトーシスされた野生型L1あるいは変異型L1 (赤) およびトランスフェリン (緑) の局在を示す免疫蛍光像。スーパーインポーズ画像 (右列) では、トランスフェリン陽性エンドソームに存在するL1は黄色で示される。

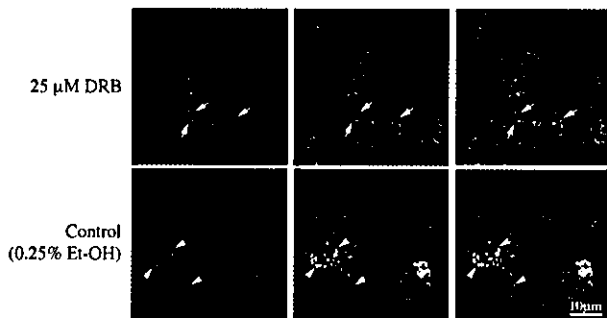


図2：CKII酵素活性阻害のL1エンドサイトーシス経路への影響。DRB存在下あるいは非存在下で、Hela細胞内にエンドサイトーシスされた野生型L1 (赤) およびトランスフェリン (緑) の局在を示す免疫蛍光像。スーパーインポーズ画像 (右列) では、トランスフェリン陽性エンドソームに存在するL1は黄色で示される。

における機能的意義を解析した。脊髄後根神経節神経細胞をL1基質あるいはラミニン基質上に培養し、それぞれL1依存性あるいはインテグリン依存性の軸索伸長能を定量した。DRB投与によるCKII酵素活性阻害は、L1依存性軸索伸長を有意に抑制したが、インテグリン依存性軸索伸長には影響をおよぼさなかった (図3)。また、L1SAを過剰発現する神経細胞は、野生型L1を過剰発現する細胞と比較してL1依存性軸索伸長能が有意に低下していた (図4)。以上の結果から、CKIIによるL1細胞内領域リン酸化は、L1依存性軸索伸長に重要な役割を担うことが示された。

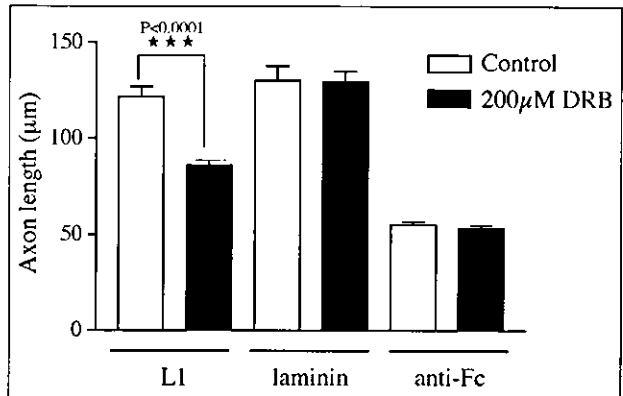


図3：CKII酵素活性阻害の軸索伸長への影響。DRB存在下あるいは非存在下で、脊髄後根神経節神経細胞をL1基質・ラミニン基質・anti-Fc基質 (接着分子をコートしない対照群) に培養し、軸索突起の長さを定量した。平均値±標準誤差 (n=100) を示す。

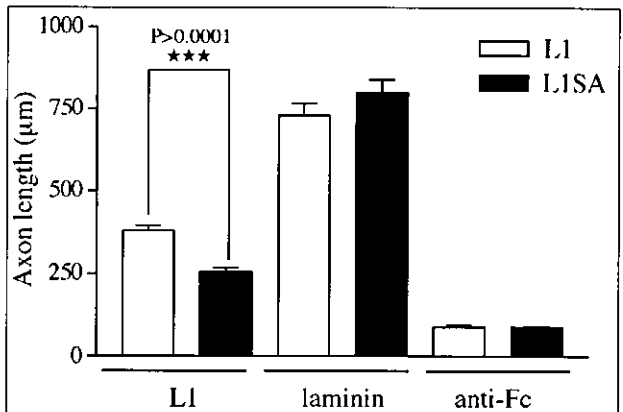


図4：CKIIリン酸化部位アミノ酸変異の軸索伸長への影響。野生型L1あるいは変異型L1 (L1SA) を過剰発現した脊髄後根神経節神経細胞をL1基質・ラミニン基質・anti-Fc基質 (接着分子をコートしない対照群) に培養し、軸索突起の長さを定量した。平均値±標準誤差 (n=150) を示す。

D. 考察

伸長過程にある軸索突起先端部 (成長円錐) では、L1はアクチン線維と連結することにより細胞表面を後方に

移動し、成長円錐中心部～後部でエンドサイトーシスされ、細胞内小胞輸送を介して成長円錐先端縁形質膜にリサイクルされる (Kamiguchi and Lemmon, 2000; Nishimura et al., 2003)。このようなL1のエンドサイトーシスとリサイクルは、成長円錐の接着性の極性維持および軸索伸長に必須である (Kamiguchi and Yoshihara, 2001; Kamiguchi, 2003)。L1細胞内領域にはクラスリンアダプター分子AP2との結合領域 (YRSL配列) が存在し (Kamiguchi et al., 1998b)、YRSL配列とAP2の結合は細胞表面から細胞内へのL1の取り込みを誘起する (Long et al., 2001)。YRSL配列下流に隣接するセリン残基 (1181番目) はCKIIによりリン酸化されるが、その機能的意義は不明であった。昨年度の研究により、1181番目のセリン残基のリン酸化を阻害すると、エンドサイトーシスされたL1が正常な輸送経路から逸脱し、かつL1による軸索伸長活性が減弱することが示された。よって、CKIIによるL1細胞内領域リン酸化は、L1エンドサイトーシス経路選択過程および軸索伸長に重要な役割を担うことが明らかになった。本研究により、L1依存性軸索伸長の分子機構およびL1細胞内領域遺伝子変異による軸索路形成異常のメカニズムの一端が解明された。

E. 結論

CKIIによるL1細胞内領域セリン残基のリン酸化/脱リン酸化は、L1エンドサイトーシス経路を制御し軸索伸長に関与することが示された。

F. 文献

- 1) Kamiguchi H (2003) The mechanism of axon growth: what we have learned from the cell adhesion molecule L1. *Mol Neurobiol* 28:219-228.
- 2) Kamiguchi H, Lemmon V (1997) Neural cell adhesion molecule L1: signaling pathways and growth cone motility. *J Neurosci Res* 49:1-8.
- 3) Kamiguchi H, Lemmon V (2000) Recycling of the cell adhesion molecule L1 in axonal growth cones. *J Neurosci* 20:3676-3686.
- 4) Kamiguchi H, Yoshihara F (2001) The role of endocytic L1 trafficking in polarized adhesion and migration of nerve growth cones. *J Neurosci* 21:9194-9203.
- 5) Kamiguchi H, Hlavin ML, Yamasaki M, Lemmon V (1998a) Adhesion molecules and inherited diseases of the human nervous system. *Annu Rev Neurosci* 21:97-125.
- 6) Kamiguchi H, Long KE, Pendergast M, Schaefer AW, Rapoport I, Kirchhausen T, Lemmon V (1998b) The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *J Neurosci* 18:5311-5321.
- 7) Long KE, Asou H, Snider MD, Lemmon V (2001) The role of endocytosis in regulating L1-mediated adhesion. *J Biol Chem* 276:1285-1290.
- 8) Nishimura K, Yoshihara F, Tojima T, Ooashi N, Yoon W, Mikoshiba K, Bennett V, Kamiguchi H (2003) L1-dependent neuritogenesis involves ankyrinB that mediates L1-CAM coupling with retrograde actin flow. *J Cell Biol* 163:1077-1088.
- 9) Schaefer AW, Kamiguchi H, Wong EV, Beach CM, Landreth G, Lemmon V (1999) Activation of the MAPK signal cascade by the neural cell adhesion molecule L1 requires L1 internalization. *J Biol Chem* 274:37965-37973.
- 10) Schaefer AW, Kamei Y, Kamiguchi H, Wong EV, Rapoport I, Kirchhausen T, Beach CM, Landreth G, Lemmon SK, Lemmon V (2002) L1 endocytosis is controlled by a phosphorylation-dephosphorylation cycle stimulated by outside-in signaling by L1. *J Cell Biol* 157:1223-1232.
- 11) Wong EV, Schaefer AW, Landreth G, Lemmon V (1996) Casein kinase II phosphorylates the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurochem* 66:779-786.

L1CAM遺伝子改変マウスにおける中枢神経系発達異常に関する研究

京都府立医科大学大学院医学研究科 分子病態病理学

伊東 恭子 伏木 信次

研究要旨

神経細胞接着分子L1は、その細胞外領域で、様々な細胞外リガンドと結合することにより、その細胞接着機能を発揮する。6番目のIgドメインはL1同士のホモフィリック結合、integrinとのヘテロフィリック結合に関与するドメインとして重要な機能を担っている。さて、われわれはL1のドメインごとの機能を個体レベルで解析するために、cre loxpアプローチを用いて、L1遺伝子のexon 12、13、14を選択的に消去し、その結果、L1-L1ホモフィリック結合部位のひとつであるL1蛋白の6番目のIgドメインのみを欠如したノックインマウス（以下、L1-6Dマウスと略す）を作成し、解析を行った。

129/Svを遺伝背景としたL1-6Dマウス(129-L1-6D)の脳は、肉眼的、組織学的に形態学的異常は見られず、皮質脊髄路、皮質視床路および視床皮質路、網膜視蓋路の走行路、投射は正常に形成され、軸索ガイダンス、束形成は正常に進行したと考えられた。一方、C57BL/6を遺伝背景としたL1-6Dマウス(B6-L1-6D)では、高頻度(>40%)に水頭症、皮質下白質の減少、皮質脊髄路の低形成、視床正中の交連線維の異常をきたすことが見出された。また、B6-L1-6Dと129-L1-6Dの2系統で遺伝子型ごとの出生率を比較検討すると、B6-L1-6Dでは-/-Y: +/Y: -/+ : +/+ = 6% : 41% : 23% : 30%、129-L1-6Dでは、各々24% : 33% : 27% : 16%であり、L1-6Dマウスの出生率はB6-L1-6Dで低下し、胎生致死に陥ることが示唆された。

A. 研究目的

神経細胞接着分子L1は、主として発生期の中核及び末梢神経系組織に発現し、神経細胞の遊走、軸索伸長とガイダンスなど神経発生過程において重要な役割を担っている^{1,2,3,4}。L1は細胞外領域で、様々な細胞外リガンドと結合することにより、その細胞接着機能を発揮する。中でも6番目のIgドメインはL1同士のホモフィリック結合^{5,6}、integrinとのヘテロフィリック結合に関与するドメインとして重要な機能を担っている^{7,8,9}。我々は、L1遺伝子のexon 12、13、14を消去することによりL1蛋白の細胞外に位置する6番目のイムノグロブリン(Ig)ド

メインのみを欠如したマウス(6D)を異なる遺伝背景(129/Sv、C57BL/6)で作成した¹⁰。本研究は、遺伝背景の異なる6Dマウスの中核神経系発生過程を、胎生期から成獣に至るまで時空間的に詳細に解析し、L1遺伝子異常に基づく水頭症発症のメカニズムを明らかにしようとするものである。

B. 研究方法

1. 6Dマウスの作成

cre loxpアプローチを用いて、L1遺伝子のexon 12、13、14を選択的に消去し、その結果、L1-L1ホモフィリック結合部位のひとつであるL1蛋白の6番目のIgドメインの

みを欠如したノックインマウス(6D)を作成した。FACS analysisでは、6Dマウスからの脾臓リンパ球は、L1の6番目のイムノグロブリン(Ig)ドメインを欠如しているが、L1の他の重要なドメインは正常に発現していた。コントロールとして、Ioxp サイトを有するが、正常に6番目のIgドメインを発現したマウスを用いた。6Dマウスは129/SvJあるいはC57BL/6Jを遺伝背景として、5-10世代のどし交配を行った。

2. 肉眼的、組織形態学的検索

a. 成マウス脳(8週齢)：

4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、脳および脊髄神経を摘出、数時間の後固定後、一部はパラフィン包埋し5 μ m連続切片を作成、他は10 μ m凍結切片を作成した。形態学的解析に関して、通常のヘマトキシリンエオジン染色、ニッスル染色に加え、免疫組織化学的染色を施行した。免疫組織化学は、神経細胞の分化、シナプス形成の指標として、Neurofilament、Tau1、MAP2、Synaptotagmin、Calbindin、Parvalbumin、Calretininを、特定のニューロトランスミッターを発現した神経細胞への分化を見る指標として、Tyrosine hydroxylase、Substance P、CGRP、Neuropeptide Y、GluR2/3を、アストログリアの指標としてGFAPを用いた。大脳、海馬、視床、基底核、脳幹、小脳、脊髄神経に関して詳細に検索した。

3. DiIおよびDiAによる軸索標識

a. 皮質脊髄路

成マウス(8週齢)は麻酔下に、皮膚切開、頭蓋骨に骨窓を開け、一側の運動領皮質にごく少量のDiIクリスタルを注入、他側の運動領皮質に同量のDiAを注入後、皮膚を縫合した。術後6-8週間して動物を灌流固定後、脳、脊髄神経を摘出し、ピプラトームにて70-100 μ m切片を作成し蛍光顕微鏡で観察した。

b. 皮質視床路、および視床皮質路

成マウス(8週齢)は灌流固定後、脳を摘出、視床背側核あるいは後頭葉視覚領にごく少量のDiIクリスタルを注入、37℃で、固定液中に放置し、2-4週間後にピプラトームにて100 μ m切片を作成し蛍光顕微鏡で観察した。

c. 網膜視蓋路

成マウス(8週齢)は麻酔下に固定し、一側の網膜側頭部に0.01 μ lのDiI溶液を注入、術後1週間後に動物を灌流固定後、脳を摘出し、ピプラトームにて100

μ mの矢状断切片を作成し蛍光顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

1. 肉眼的、組織形態学的検索

129/Svを遺伝背景とした6Dマウス(以下、129-L1-6Dと略す)の脳は、肉眼的に正常構造を示し、水頭症、小脳低形成は見られなかった。組織学的には、大脳皮質の層構造、海馬、基底核、視床、脳幹諸核、小脳、脊髄神経に異常は見られなかった。免疫組織化学的にも、大脳皮質神経細胞の樹状突起、軸索の発達、GABA作動性ニューロンの分布、海馬錐体細胞の軸索、樹状突起の形態、脳幹のドーパミン作動性ニューロンの分布、小脳プルキンエ細胞の樹状突起発達、脊髄後根神経節細胞の軸索投射は正常であった。大脳白質、脳梁、交連線維、内包、延髄錐体、脊髄上行および下行路は正常に形成されていた。

C57BL/6を遺伝背景としたL1-6Dノックインマウス(以下、B6-L1-6Dと略す)では、高頻度(>40%)に水頭症、皮質下白質の減少、皮質脊髄路の低形成、視床正中の交連線維の異常をきたすことが見出された。B6-L1-6Dでは、大脳皮質の6層構造は形成されており、第2層から第4層までの小型ないし介在神経細胞の数は正常であるが、第5層、6層の大型錐体神経細胞は対照に比して有意な減少を示した。

さらに継代を繰り返し、B6-L1-6Dと129-L1-6Dの2系統で遺伝子型ごとの出生率を比較検討すると、B6-L1-6Dでは-/Y : +/Y : -/+ : +/+ = 6% : 41% : 23% : 30%、129-L1-6Dでは、各々24% : 33% : 27% : 16%であり、L1-6Dマウスの出生率はB6-L1-6Dで低下し、胎生致死に陥ることが示唆された。

2. DiIおよびDiAによる軸索標識

129-L1-6Dの脳では、皮質脊髄路、皮質視床路および視床皮質路、網膜視蓋路の走行路、投射には異常がなく、軸索ガイダンス、束形成は正常と考えられた。B6-L1-6Dでは、皮質脊髄路の低形成をみるが、錐体交叉は正常に形成されていた。

D. 考察

129-L1-6Dマウスの脳は、神経細胞構築、投射伝導路は正常に形成されており、脳形成過程における神経細胞遊走、軸索のガイダンスと伸長が正常に発達していることを示した。一方、B6-L1-6Dマウスでは、高度の水頭症、皮質脊髄路の低形成をみるが、錐体交叉は正常に形成さ

れる。以上の観察事実から、L1第6番Igドメインは水頭症の原因に関与するが、皮質脊髓路の交叉に関わる軸索ガイダンスには直接関与がないと考えられる。さらに、バックグラウンドとなっているマウスの系統を反映した表現型の違いは、導入されたL1遺伝子変異が表現形質の異常として現れるかどうかを規定する、いわゆる modifier genes の存在を推定させるものであり¹¹⁾、今後の分子遺伝学的研究が期待される。

E. 結論

神経細胞接着分子L1蛋白の細胞外に位置する6番目のイムノグロブリン(Ig)ドメインのみを欠如したマウス：B6-L1-6Dでは、高度の水頭症、皮質脊髓路の低形成、胎生致死に陥ることが示された。L1遺伝子変異と水頭症の発生病理を明らかにするために、胎生期脳発達を詳細に検索することが必須である。

付記：

本研究は米国Miami大学医学部The Miami Project to Cure Paralysis、Vance Lemmon教授との共同研究である。

F. 文献

- 1) Lemmon V, Farr K, Lagenaur C (1989) L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron* 2: 1597-1603.
- 2) Drazba J, Lemmon V (1990) The role of cell adhesion molecules in neurite outgrowth on Mueller cells. *Dev Biol* 113: 755-765.
- 3) Kamiguchi H, Hlavin ML, Yamasaki M, Lemmon V (1998) Adhesion molecules and inherited diseases of the human nervous system. *Annu Rev Neurosci* 21:97-125.
- 4) Haney CA, Sahenk Z, Lemmon V, Roder J, Trapp BD (1999) Heterophilic binding of L1 on unmyelinating sensory axons mediates Schwann cell adhesion and is required for axonal survival. *J Cell Biol* 146: 1173-1183.
- 5) Kenwrick S, Watkins A, De Angelis E (2000) Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. *Hum Mol Genet* 9:879-86.
- 6) De Angelis E, Brummendorf T, Cheng L, Lemmon V, Kenwrick S (2001) Alternative use of a mini exon of the L1 gene affects L1 binding to neural ligands. *J Biol Chem* 276:32738-42.
- 7) Ruppert M, Aigner S, Hubbe M, Yagita H, Altevogt P (1995) The L1 adhesion molecule is a cellular ligand for VLA-5. *J Cell Biol* 131:1881-91.
- 8) Montgomery AM, Becker JC, Siu CH, Lemmon VP, Cheresch DA, Pancook JD, Zhao X, Reisfeld RA (1996) Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3. *J Cell Biol* 132:475-85.
- 9) Yip PM, Zhao X, Montgomery AM, Siu CH (1998) The Arg-Gly-Asp motif in the cell adhesion molecule L1 promotes neurite outgrowth via interaction with the alphavbeta3 integrin. *Mol Biol Cell* 9: 277-90.
- 10) Itoh K, Cheng L, Kamei Y, Fushiki S, Kamiguchi H, Gutwein P, Stoeck A, Arnold B, Altevogt P, Lemmon V (2004) Brain development in mice lacking L1-L1 homophilic adhesion. *J Cell Biol* 165:145-154.
- 11) Nadeau JH (2001) Modifier genes in mice and humans. *Nat Rev Genet* 2: 165-74.

神経接着因子L1CAM遺伝子異常を有するヒト神経幹細胞/ 前駆細胞における細胞接着能異常の検討

産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門¹

名古屋市立大学大学院医学研究科 生殖・遺伝医学講座 生殖・発生医学分野² 理化学研究所・脳科学総合研究センター³
慶應義塾大学医学部・生理学教室⁴ 国立病院機構大阪医療センター 臨床研究部⁵・脳神経外科⁶

金村 米博^{1,5} 正札 智子¹ 森 英樹¹ 種村 光代² 上口 裕之³
岡野 栄之⁴ 鈴森 薫² 山崎 麻美^{5,6}

研究要旨

現在でも根治的治療法が存在しないX連鎖性劣性遺伝性水頭症(X-linked hydrocephalus;以下XLH)の神経機能の修復・再生を目指すための基礎研究として、L1CAM遺伝子異常を有する症例の病理解剖標本より樹立されたヒト神経幹細胞/前駆細胞(human neural stem/progenitor cells;以下hNSPC)を用いて、その分子生物学的特徴を解析した。倫理委員会承認の元、21週齢の剖検胎児大脳組織より樹立されたL1CAM遺伝子異常(intron 6 ; 694+6 g→a)を有するhNSPC(以下XLH-hNSPC)とコントロールとして正常hNSPCとの細胞接着能の比較を実施した。XLH-hNSPCではコントロールと比較して、細胞外マトリックスのfibronectin, lamininに対する接着能の低下が見られ、それにはintegrin $\alpha 2, \alpha 3, \alpha 6, \alpha v, \alpha 5 \beta V$ が関与している可能性が示唆された。これらXLH-hNSPCにおける接着能の異常はXLH発症に何らかの関連性を有している可能性が示唆された。

A. 研究目的

XLHは、脳梁低形成(Corpus callosum hypoplasia)、精神運動発達遅滞(Retardation)、拇指内転屈曲(Adducted thumbs)、痙性対麻痺(Spastic paraplegia)、水頭症(Hydrocephalus)の代表的な臨床症状を呈するCRASH症候群の1である¹⁾。1992年にXLHの1家系に細胞接着因子L1CAM遺伝子異常が同定されてから、現在まで本邦例も含めて世界で140家系以上のL1CAM遺伝子異常を伴うXLH症例の報告は散見されるが、L1CAM遺伝子異常を伴うヒト神経系細胞の機能解析の報告は皆無である。

現在でも根治的治療法が存在しないXLHの神経機能の修復・再生を目指すための基礎研究として、既に樹立さ

れたL1CAM遺伝子異常を有するXLH hNSPC²⁾を用いて、その分子生物学的特徴を細胞接着能を中心に検討したので報告する。

B. 研究方法

医学倫理委員会の承認の元、共同研究施設である名古屋市立大学大学院医学研究科生殖・遺伝医学講座 生殖・発生医学分野(産婦人科)ならびに国立病院機構大阪医療センター臨床研究部が共同で樹立したL1CAM遺伝子異常(intron 6 ; 694+6 g→a)を有するXLH hNSPC²⁾を用いて研究を実施した。

1) 抗体、細胞外マトリックス

Pepsindigested type I collagenは新田ゼラチン社、ヒト血漿由来fibronectinならびにlaminin (Engelbreth-Holm-

Swarm murine sarcoma由来)はいずれもシグマ社より購入した。抗ヒトintegrin β 1(P4C10), α 2(P1E6), α 3(P1B5), α 4(P1H4), α 5(P1D6), α 6(NKI-GoH3), α v(LM609), α 5 β 1(JBS5)抗体、ならびに正常マウスIgG1はいずれもケミコン社より購入した。

2) XLH-hNSPC培養

XLH-hNSPCの培養は、neurosphere法を基本に、Kanemuraらの変法³⁾に従って実施した。培養液[DMEM/F-12(1:1;シグマ社),B27(インビトロジェン社),hLIF(10 ng/ml;ケミコン社),hFGF-2(20 ng/ml;インビトロジェン社),hEGF(20 ng/ml;インビトロジェン社),heparin, anti-mycotic anti-biothic(インビトロジェン社)]中で、37℃、5% CO₂の条件で浮遊培養した。得られた細胞(neurosphere)は、4~5日に一度、半量の培養液を交換して維持し、2週間に一度の割合で0.05%トリプシン溶液を用いて細胞継代を行った。

3) 細胞接着能評価

96ウェルプレートに抗ヒトintegrin抗体(腹水は1:500希釈、精製抗体は2 μ g/mL)、または細胞外マトリックス(collagen, fibronectin, laminin:それぞれ3 μ g/mL)をコートした。細胞をtrypsin-EDTA(インビトロジェン社)で単一細胞に分散し、DMEM/F-12(1:1)で2回洗浄後、1 mg/mL bovine serum albumin/DMEM/F-12(1:1)に懸濁し、1.5 \times 10⁴細胞/wellの細胞濃度でコート済み96ウェルプレートに播種した。37℃で1時間培養後、PBSで非接着細胞を洗浄除去し、細胞固定し、トルイジンブルー染色で細胞を染色し、その染色性を定量した。結果は4回の実験から算出した。

C. 研究結果

1) 細胞外マトリックスに対する接着性

XLH-hNSPCではコントロールhNSPCと比較して、3種類の細胞外マトリックスのいずれに対する接着性も低下していたが、その中でもfibronectinならびにlamininに対する接着性が大きく低下していた(図1)

2) 抗ヒトintegrin抗体に対する反応性

検討した8種類の抗ヒトintegrin抗体との反応性に関しては、XLH-hNSPCではコントロールhNSPCと比較して、抗integrin α 2, α 3, α 6, α v, α 5 β V抗体に対する反応性が大きく低下していた。このことは、integrin α 2, α 3, α 6, α v, α 5 β Vが、XLH-hNSPCの細胞接着能の低下に寄与していることを示唆するものと考えられた。(図2)

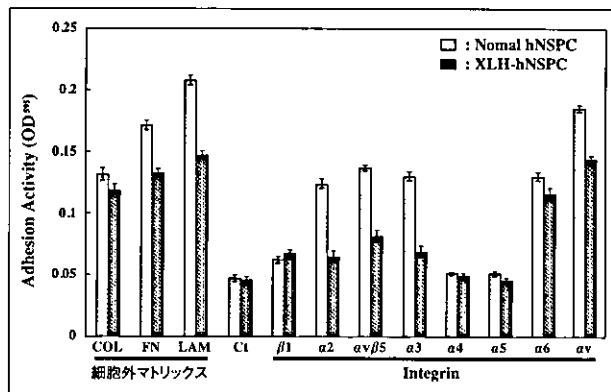


図1 XLH-hNSPCにおける細胞接着能の評価
COL; collagen, FN; fibronectin, LAM; laminin, Ct; control

D. 考察

今回の我々の検討の結果、XLH-hNSPCでは正常のhNSPCと比較して、細胞接着能に何らかの異常が生じている可能性が示唆された。昨年度報告したとおり、XLH-hNSPCではLICAM遺伝子のイントロン6の694+6g→aの1塩基異常はイントロン6のスプライスアウトを障害し、その結果、異常mRNAが合成され、不完全LICAMたんぱく質の発現と完全長LICAMたんぱく質の発現喪失に至ることが確認されている²⁾。これらの結果より、XLH-hNSPC並びにXLH-hNSPC由来細胞ではLICAM遺伝子の機能が喪失していると予想される。このLICAM遺伝子機能の喪失が細胞接着能異常にいたるメカニズムは现阶段では不明である。LICAMのhNSPCにおける発現の報告は殆どなく、その機能に関しても不明な点が多い。昨年度、報告したがXLH-hNSPCには不完全LICAMたんぱく質が明らかに発現しており、また正常のhNSPCと比較して細胞増殖速度に相違が見られる²⁾。今回、それらデータに加えてXLH-hNSPCにおける細胞接着能異常が示唆されたことから、正常LICAMが積極的にhNSPCで何らかの役割を担っており、その機能喪失がXLH-hNSPCの細胞特性に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。今後、hNSPCにおけるLICAMの役割に関する研究の必要性が示唆された。

E. 結論

XLH hNSPCの細胞接着能異常が示唆された。今後、XLH hNSPCの特性と水頭症発症との関連性について更なる検討を加えることは有意義であると考えられる。

F. 文献

- 1) Yamasaki M, Thompson P, Lemmon V. CRASH syndrome: mutations in L1CAM correlate with severity of the disease. *Neuropediatrics*:175-178, 1997.
- 2) 金村米博、正札智子、森英樹、種村光代、上口裕之、岡野栄之、鈴森薫、山崎麻美：神経接着分子L1CAM遺伝子異常を有するヒト神経幹細胞/前駆細胞の生物学的特性の解析。厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「先天性水頭症」調査研究班 平成15年度総括・分担研究報告書 pp16-18, 2004.
- 3) Kanemura Y, Mori H, Kobayashi S, Islam O, Kodama E, Yamamoto A, Nakanishi Y, Arita N, Yamasaki M, Okano H, Hara M, Miyake J. Evaluation of in vitro proliferative activity of human fetal neural stem/progenitor cells using indirect measurements of viable cells based on cellular metabolic activity. *J Neurosci Res.* 69:869-879, 2003.

小脳形成異常症における責任遺伝子の検索（続報）

大阪府立母子保健総合医療センター 企画調査部

岡本 伸彦

研究要旨

小脳形成異常を呈するヒトの疾病にはDandy-Walker症候群、Joubert症候群等が知られているが、我々は、昨年までの本研究班で小脳構造異常を呈する先天性疾患患者において候補遺伝子（*ZIC1*、*Engrailed-1・2*、*WNT1*）の変異の有無の検討を行ってきた。各遺伝子はそのノックアウトマウスにおいて小脳低形成を生じることが、現時点ではヒトにおいて有意な変異は同定されていない。本年度は従来の研究の継続とともに、*FGF8*遺伝子について解析を行った。また、最近のDandy-Walker症候群、Joubert症候群に関する外国の研究を概説する。

A. はじめに

小脳形成異常を呈するDandy-Walker症候群、Joubert症候群などについて、本研究班で*ZIC1*、*Engrailed-1*、*Engrailed-2*、*WNT1*について、遺伝子解析を行ってきたが有意な変異は同定できなかった^{1,2,3)}。これらの遺伝子は小脳発生に重要な役割を持ち、ノックアウトマウスでは小脳形成異常を呈することが報告されている。

2004年は、これらの疾患について、重要な報告があった。Joubert症候群同胞例において、Parisiらは、*NPHP1* 遺伝子のホモの欠失を同定した⁴⁾。この遺伝子はjuvenile nephronophthisisの責任遺伝子である。遺伝子産物はNephrocystinである。この遺伝子は2q13に座位する。Ferlandらは、Joubert症候群に多小脳回を合併し、常染色体性劣性遺伝を示す、サウジアラビアの家系について、Homozygosity mapping解析を行い、4個の候補遺伝子から、6q23に座位を持つ*AHI1*遺伝子異常を同定した⁵⁾。Dixon-Salazarらも、近親婚の3家系で*AHI1*遺伝子異常を同定した⁶⁾。*AHI1*遺伝子の産生する蛋白は「Jouberin」と命名された。この遺伝子は胎児の

hindbrain、forebrainに強く発現し、小脳と大脳皮質の発生に重要な役割を持つと考えられている。

Grinbergらは染色体3q2に座位を持つ*ZIC1*と*ZIC4*両遺伝子欠失とDandy-Walker症候群の関連を報告した⁷⁾。この報告により、*ZIC1*遺伝子がDandy-Walker症候群と関係することは証明されたが、Dandy-Walker症候群は病因的には複数の疾患の集合と考えられ、まだ一部が解明されたに過ぎないと考えられる。

今回、やはり小脳の発生に重要な因子である、*FGF8*について解析を行った。中脳-後脳境界域は、峡部(isthmus)と呼ばれる。この領域はorganiserとしての活性を持つ。ニワトリ胚で、峡部を間脳に移植すると中脳由来の視蓋を誘導し、後脳の後方に移植すると後脳としての分化とともに周囲に本来は後脳の前方から発生する小脳を誘導する。峡部では、*En-1*、*En-2*、*Pax-2*、*Pax-5*、*Pax-8*、*Wnt-1*、*FGF8*などの遺伝子が発現している。このうち*En-1*と*En-2*、*Pax-5*、*Wnt-1*のノックアウトマウスや*Pax-b* (*Pax-2*、*-5*、*-8*)突然変異のゼブラフィッシュは、峡部から発生する組織の全部あるいは一部が欠失する。従って、これらの遺伝子が峡部の発生に重

要であると考えられる。FGF8 タンパクを染み込ませたビーズを間脳に移植すると中脳を誘導することから、FGF8は峽部のorganiserとしての機能の役割の一部を持つと考えられている。Satoらは分泌性因子Fgf8のアイソフォームのうちFgf8aとFgf8bが峽部で発現していることを確認し、これらの遺伝子を異所的に強制発現させた。Fgf8aでは視蓋が肥大化するのに対し、Fgf8bを強制発現させると、視蓋から小脳が誘導された⁸⁾。Meyersらは、FGF8のノックアウトマウスを研究した⁹⁾。Nullの場合、胎性致死であるが、機能が一部保存されると、中脳後部、小脳の低形成がみられた。また、ゼブラフィッシュのace (acerebellar) はFgf8変異体である¹⁰⁾。

これらの事実より、FGF8は小脳の発生に重要な役割を持つ遺伝子であり、その異常により、小脳の異常を伴うヒトの疾病が生じることも予想される。FGF8とヒトの疾病との関連に関する研究は、過去にも行われている。FGF8は頭蓋縫合早期癒合と四肢異常を呈する患者群、Joubert症候群の患者群で責任遺伝子と想定しての研究が行われているが、否定された^{11,12)}。Dandy-Walker症候群について変異解析を行った。

B. 研究方法

Dandy-Walker症候群、原因不明の小脳形成不全などの小脳の先天異常を呈する患者を対象にした。インフォームド・コンセントを得た。末梢血リンパ球からDNAを抽出し、PCR法によって各遺伝子を増幅した。PCR産物を回収して直接シーケンスで塩基配列を決定した。ABI社のオートシーケンサーを用いた。

FGF8は6個のエクソンからなる。第1エクソンは1a、1b、1c、1dからなり、スプライスアイソフォームがある。第2、3エクソンは共通である。今回、第2・第3エクソン中心に解析を行った。プライマー・PCR条件はYoshiuraらの報告¹¹⁾に則った。

C. 結果

現在までに15例の解析を終了したが、有意な変異は同定されなかった。その他の遺伝子についても現在までのところ有意な変異は同定されておらず、検索対象、検索範囲の拡大を検討している。

D. 考察

Dandy-Walker症候群(DWS)は第4脳室の嚢胞状拡大、

小脳虫部低形成を特徴とするが、水頭症も伴う。小脳失調症状や精神運動発達遅滞、他の先天異常を合併する例や、小脳失調がめだたず予後良好な例等、臨床的にはかなり幅広いものを含んでいる。今回の解析ではFGF8遺伝子について検討したが、有意な異常は同定できなかった。FGF8異常がDWSの責任遺伝子になるという確証は得られなかった。Grinbergらは染色体3q2に座位を持つZIC1とZIC4両遺伝子欠失とDWSの関連を報告した。少なくとも一部のDWSは、この欠失によって発症すると考えられる。我々は、DWSにおいて、過去にZIC1遺伝子の変異の有無を解析したが、変異は同定できなかった^{1,2,3)}。ZIC1とZIC4両遺伝子欠失に関しては、FISH法やマイクロアレイを応用した解析によらなければ同定はできず、今後の検討が必要である。ZIC1とZIC4両遺伝子欠失例がDWSの病因のすべてを占めるわけではなく、DWSの責任遺伝子は複数存在することが予想される。EN、WNT1、FGF8異常モデル動物も小脳構造異常を呈することから、DWSあるいは類似病態の候補遺伝子の一部と予想される。これらの遺伝子のノックアウトマウスはヘテロでは異常がなく、ホモで異常が出現するため、ヒトの疾病としては常染色体性劣性遺伝形式が考えられる。

Joubert症候群は小脳虫部無形成ないし低形成、眼底コロボーマ、生下時からの低緊張、新生児期の呼吸異常(多呼吸)、異常眼球運動を呈する常染色体劣性遺伝性疾患である。Joubert症候群の一部は9q34.3に連鎖することが報告されているが、連鎖しない家系も存在し、遺伝的異質性が認められる。PellegrinoらはJoubert症候群患者18例におけるWNT1遺伝子変異を検索したが、異常は同定できなかった¹³⁾。BlairらはEN1、EN2、FGF8遺伝子について26例のJoubert症候群患者で検索を行い、異常はなかったと報告した¹²⁾。多数例の解析よりZIC1遺伝子がJoubert症候群の責任遺伝子ではないという報告もある。我々の研究でも2例のみであるが、Joubert症候群においてZIC1、EN、WNT1遺伝子の変異は同定されず、腎臓と神経系の発生に共通に関与する遺伝子や眼底コロボーマなど眼異常や呼吸異常を説明できる遺伝子が責任の可能性を予想した^{1,2,3)}。最近、このような条件を満たす2種類の責任遺伝子が同定された^{4,5,6)} AH11は胎児では脳と腎に発現し、成人では小脳に主に発現している^{5,6)}。この遺伝子は発現領域からJoubert症候群で錐体交差が完全でないために鏡像運動が生じる例がある

ことも説明できるという。

Joubert症候群の遺伝的異質性

- JBRT1 9q34.3 遺伝子不明
神経系以外の症状が少ない
- JBRT2 11 centromere付近
腎異常、眼異常多い
- JBRT3 6q23 *AHI1*
神経系以外の症状が少ない 多小脳回合併
- NPHP コロボーマ、多指、肝線維症、嚢胞性腎異形成症、ネフロン癆を伴う。

小脳の先天異常は病因的には異質なものであると考えられ、一部には*ZIC1*、*EN*、*WNT1*、*FGF8*遺伝子異常によるものも存在するとの仮説のもとに検討を続ける方針である。

E. 文献

- 1) 岡本伸彦、金村米博、山崎麻美「小脳形成異常症における*ZIC1*、*Engrailed-2*遺伝子異常の検索」難治性水頭症調査研究班 平成12年度研究報告書 p48-50, 2001.
- 2) 岡本伸彦、金村米博、山崎麻美「小脳形成異常症における遺伝子異常の検索 *WNT1*を主として」先天性水頭症の分子生物学的メカニズム解明と治療法開発に関する研究 平成13年度総括・分担研究報告書 p90-92, 2002.
- 3) 岡本伸彦、金村米博、山崎麻美 小脳形成異常症における責任遺伝子の検索 先天性水頭症に関する調査研究：分子遺伝子学アプローチによる診断基準・治療指針の策定と予防法・治療法の開発 平成14年度総括・分担研究報告書 p117-119, 2003.
- 4) Parisi MA, Bennett CL., Eckert ML. et al. The NPHP1 gene deletion associated with juvenile nephronophthisis is present in a subset of individuals with Joubert syndrome. *Am J Hum Genet* 2004;75: 82-91.
- 5) Ferland RJ, Eyaid W, Collura RV et al. Abnormal cerebellar development and axonal decussation due to mutations in *AHI1* in Joubert syndrome. *Nat Genet* 2004;36: 1008-1013. Note: Corrigendum: *Nat Genet* 2004;36:1126.
- 6) Dixon-Salazar T, Silhavy JL, Marsh SE, et al. Mutations in the *AHI1* gene, encoding joubertin, cause Joubert syndrome with cortical polymicrogyria. *Am J Hum Genet.* 2004;75:979-87.
- 7) Grinberg I, Northrup H, Ardinger H, Prasad C, Dobyns WB, Millen KJ. Heterozygous deletion of the linked genes *ZIC1* and *ZIC4* is involved in Dandy-Walker malformation. *Nat Genet* 2004;36:1053-5.
- 8) Sato T, Araki I, Nakamura H. Inductive signal and tissue responsiveness defining the tectum and the cerebellum. *Development* 2001;128:2461-9.
- 9) Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR. An *Fgf8* mutant allelic series generated by Cre- and FLP-mediated recombination. *Nat Genet* 1998;18:136-41.
- 10) Reifers F, Bohli H, Walsh EC et al. *Fgf8* is mutated in zebrafish acerebellar (*ace*) mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development* 1998;125:2381-95.
- 11) Yoshiura K, Leysens NJ, Chang J, et al. Genomic structure, sequence, and mapping of human *FGF8* with no evidence for its role in craniosynostosis/limb defect syndromes. *Am J Med Genet* 1997;72:354-62.
- 12) Blair IP, Gibson RR, Bennett CL, Chance PF. Search for genes involved in Joubert syndrome: evidence that one or more major loci are yet to be identified and exclusion of candidate genes *EN1*, *EN2*, *FGF8*, and *BARHL1*. *Am J Med Genet* 2002;107:190-6.
- 13) Pellegrino JE, Lensch MW, Muenke M, Chance PF. Clinical and molecular analysis in Joubert syndrome. *Am J Med Genet* 1997;72: 59-62.

研究成果の刊行に関する一覧

著者名	題名	書名(編集者名)	発行者名 (発行地名)	巻：頁 西暦年号
Masayuki, Tsuji. Inagaki, T. Kasai, H. Yamanouchi, Y. Kawamoto, K. Uemura, Y.	Solitary myofibromatosis of the skull : a case report and reveiw of literature	Child's Nerves System		20 : 366-369, 2004
稲垣 隆介	二分脊椎 顕在性二分脊椎症	Brain Nursing		20 : 867-875, 2004
稲垣 隆介	二分脊椎 潜在性二分脊椎症	Brain Nursing		20 : 974-977, 2004
河本 圭司 稲垣 隆介 塚崎 裕司 龍 堯志 植村 芳子 坂井田紀子 中嶋 安彬	植骨腫・良性骨芽細胞腫・骨肉腫	脳神経外科		32 : 549-556, 2004
大重 英行 稲垣 隆介 吉村 晋一 我妻 敬一 笠井 治文 今堀 巧 山内 康雄 河本 圭司 中野 崇秀 藤本 幸子 植村 芳子	新生児未熟型奇形腫の1例	小児の脳神経		29 : 355-359, 2004
稲垣 隆介	もやもや病	Brain Nursing		20 : 1268-1274, 2004
稲垣 隆介	シャント治療後の水頭症患者さんの長期予後と生活上の留意点	水頭症のてびき 財団法人 日本二分脊椎・ 水頭症研究振興財団		87-95, 2004
宇都宮英綱	画像診断に必要な脳脊髄の発生と発達	臨床指南小児神経放射線診断		20-37, 2004
高野 浩一 宇都宮英綱	脊髄・脊椎の先天奇形	臨床指南小児神経放射線診断		246-261, 2004
Fujii, A. Ohoshima, K. Hamasaki, M. Makimoto, Y. Haraoka, S. Utsunomiya, H. Okazaki, M. Kikuchi, M.	Differential expression of chemokines, chemokine receptors, cytokines and cytokine receptors in diffuse large B cell malignant lymphoma	INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY		24 : 529-538, 2004
Baba, Y. Nakajima, M., Utsunomiya, H. Tsuboi, Y	Magnetic resonance imaging of thoracic epidural venous dilatation in Hirayama disease	Neurology		62 : 1426-1428, 2004

著者名	題名	書名(編集者名)	発行者名 (発行地名)	巻 : 頁 西暦年号
Fujiki, F. Kusuhara, T. Yamada, T.				
Yahiro, T. Hirakawa, K. Iwaasa, M. Tsugu, H. Fukushima, T. <u>Utsunomiya, H.</u>	Pseudoaneurysm of the thacic radiculomedullary artery with subarachnoid hemorrhage	J Neurosurgery.		100 : 312-315, 2004
<u>宇都宮英綱</u>	全前脳胞症における全球脳の形態発生とMRI所見	脳神経外科ジャーナル		13(6) : 454-464, 2004
Okada, S. Nakamura, M. Mikami, Y. Shimazaki, T. Mihara, M. Ohsugi, Y. Iwamoto, Y. Yoshizaki, K. Kishimoto, T. Toyama, Y. <u>Okano, H.</u>	receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury.	J Neurosci Res		76 : 265-276, 2004
Yamashima, T. Tonchev, BA. Seki, T. Sawamoto, K. <u>Okano, H.</u>	Vascular adventitia generates neuronal progenitors in monkey hippocampus after ischemia.	Hippocampus		14 : 861-875, 2004
Matsuzaki, Y. Kinjo, K. Mulligan, RC. <u>Okano, H.</u>	Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cells.	Immunity		20 : 87-93, 2004
Murata, J. Murayama, A. Horii, A. Doi, K. Harada, T. <u>Okano, H.</u> Kubo, T.	Expression of Musashi1, a neural RNA-binding protein, in the cochler of young adult mice.	Neurosci Lett		354 : 201-204, 2004
Ieda, M. Fukuda, K. Hisaka, Y. Kimura, K. Kawaguchi, H. Fujita, J. Shimoda, K. Takeshita, E. <u>Okano, H.</u> Kurihara, Y. Kurihara, H. Ishida, J. Fukamizu, A. Federoff, HJ. Ogawa, S.	Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression.	J. Clinical Investigation		113 : 876-884, 2004

著者名	題名	書名(編集者名)	発行者名 (発行地名)	巻 : 頁 西暦年号
Ohba, H. Chiyoda, T. Endo, E. Yano, M. Hayakawa, Y. Sakaguchi, M. Darnell, RB. Okano, HJ. <u>Okano, H.</u>	Sox21 is a repressor of neuronal differentiation and is antagonized by YB-1.	Neurosci Lett		358 : 157-160, 2004
Mikami, Y. <u>Okano, H.</u> 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		76 : 453-465, 2004
Ozawa, Y. Nakao, K. Shimazaki, T. Takeda, J. Akira, S. Ishihara, K. Hirano, T. Oguchi, Y. <u>Okano, H.</u>	Downregulation of STAT3 activation is required for presumptive rod photoreceptor cells to differentiate in the postnatal retina.	Mol Cell Neurosci		26 : 258-270, 2004
Sakaguchi, H. Yaoi, T. Suzuki, T. <u>Okano, H.</u> Hisa, Y. Fushiki, N.	Spatiotemporal patterns of Musashi1 expression during inner ear development.	Neuroreport		15 : 997-1001, 2004
Tokunaga, A. Kohyama, J. Yoshida, T. Nakao, K. Sawamoto, K. <u>Okano, H.</u>	Mapping spatio-temporal activation of Notch signaling during neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse brain.	J Neurochem		90 : 142-154, 2004
Yoshizaki, T. Inaji, M. Kouike, H. Shimazaki, T. Sawamoto, K. Ando, K. Date, I. Kobayashi, K. Suhara, T. Uchiyama, Y. <u>Okano, H.</u>	Isolation and transplantation of dopaminergic neurons generated from mouse embryonic stem cells.	Neurosci Lett		363 : 33-37, 2004

著者名	題名	書名(編集者名)	発行者名 (発行地名)	巻：頁 西暦年号
Sakuragawa, N. Kakinuma, K. Hatada, S. Kikuchi, A. <u>Okano, H.</u> Uchida, S. Kamo, I. Yokoyama, Y.	Human Amnion Mesenchyme Cells Express Phenotype of Neuronal Progenitor Cells.	J Neurosci Res		78 : 208-214, 2004
Ishibashi, S. Sakaguchi, M. Kuroiwa, T. Yamasaki, M. Kanemura, Y. Ichinose, S. Shimazaki, T. Onodera, M. <u>Okano, H.</u> 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
Uchida, K. Mukai, M. <u>Okano, H.</u> 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 : 977-987, 2004
Unezaki, S. Nishikawa, M. Okuda-Ashitaka, E. Masu, Y. Mukai, M. Kobayashi, S. Sawamoto, K. <u>Okano, H.</u> Ito, S.	Characterization of isoforms of MOVO zinc finger protein, a mouse homologue of Drosophila Ovo, as transcription factor.	Gene		336 : 47-58, 2004
Kawada, H. Fujita, J. Kinjo, K. Matsuzaki, Y. Tsuma, M. Miyatake, H. Muguruma, Y. Itabashi, Y. Ikeda, Y. Ogawa, S. <u>Okano, H.</u> Hotta, T. Ando, K. Fukuda, K.	Non-hematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction.	Blood		104 : 3581-3587, 2004
Okada, Y. Shimazaki, T. Sobue, G. <u>Okano, H.</u>	Retinoic acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells.	Dev Biol		275 : 124-142, 2004

著者名	題名	書名(編集者名)	発行者名 (発行地名)	巻：頁 西暦年号
Kawaguchi, A. Ogawa, M. Saito, K. Matsuzaki, F. <u>Okano, H.</u> Miyata, T.	Differential expression of Pax6 and Ngn2 between pair-generated cortical neurons.	J Neurosci Res.		78 : 784-795, 2004
Hori, K. Ito, M. Fuwa, T.J. <u>Okano, H.</u> 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 : 5527-5537, 2004
Watanabe, K. Nakamura, M. Iwanami, A. Fujita, Y. <u>Kanemura, Y.</u> Toyama, Y. <u>Okano, H.</u>	Comparison between fetal spinal cord and forebrain-derived neural stem/progenitor cells as a source of transplantation for spinal cord injury.	Dev Neurosci		26 : 275-287, 2004
Clarke, R.B. Spence, K. Anderson, E. Howell, A. <u>Okano, H.</u> Potten, C.S.	A putative human breast stem cell population is enriched for steroid receptor-positive cells.	Dev Biol		277 : 443-456, 2005
Sakaguchi, M. Sawamoto, K. Shimazaki, T. Kitamura, T. Shibuya, A. <u>Okano, H.</u>	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. <u>Okano, H.</u> 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		278 : 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. <u>Okano, H.</u> Fujita, T.	Leukemia inhibitory factor induces multi-lineage differentiation of adult stem-like cells in kidney via kidney-specific cadherin 16.	Biochem Biophys Res Com		328 : 288-291, 2005

著者名	題名	書名(編集者名)	発行者名 (発行地名)	巻：頁 西暦年号
Suzuki, K. Fukui, H. Kayahara, T. Sawada, M. Seno, H. Hiai, H. Kageyama, R. <u>Okano, H.</u> Chiba, T.	Hes1-deficient mice show precocious differentiation of Paneth cells in the small intestine.	Biochem Biophys Res Commun.		328 : 348-352, 2005
Kitagawa, A. Nakayama, T. Takenaga, M. Matsumoto, K. Tokura, Y. Ohta, Y. Ichinohe, M. Yamaguchi, Y. Suzuki, N. <u>Okano, H.</u> Igarashi, R.	Lecithinized brain-derived neurotrophic factor promotes the differentiation of embryonic stem cells in vitro and in vivo.	Biochem Biophys Res Commun.		328 : 1051-1057, 2005
Suzuki, S. Yamashita, T. Tanaka, K. Hattori, H. Sawamoto, K. <u>Okano, H.</u> Suzuki, N.	Activation of cytokine signaling through Leukemia Inhibitory Factor Receptor (LIFR)/gp130 attenuates ischemic brain injury in rats.	J. Cerebral Blood Flow and Metabolism		in press
Nagato, M. Heike, T. Kato, T. Yamanaka, Y. Yoshimoto, M. Shimazaki, T. <u>Okano, H.</u> Nakahata, T.	Prospective characterization of neural stem cells by flow cytometry analysis using combination of the surface markers.	J Neurosci Res		in press
Hirota, Y. Takahashi, K. Ueda, R. <u>Okano, H.</u>	Transmembrane protein Tincar is expressed and involved in the development of Drosophila photoreceptor cells.	Development, Genes and Evolution		in press
Iwanami, A. Yamane, J. Katoh, H. Nakamura, M. Momomoshima, S. Ishii, H. Tanioka, Y. Tamaoki, N. Nomura, T. Toyama, Y. <u>Okano, H.</u>	Establishment of Graded Spinal Cord Injury Model in a Non-human Primate: the Common Marmoset.	J Neurosci Res		in press

著者名	題名	書名(編集者名)	発行者名 (発行地名)	巻：頁 西暦年号
Iwanami, A. Kakneko, S. Nakamura, M. <u>Kanemura, Y.</u> Mori, H. Kobayashi, S. <u>Yamasaki, M.</u> Momoshima, S. Ishii, H. Ando, K. Tanioka, Y. Tamaoki, N. Nomura, T. Toyama, Y. <u>Okano, H.</u>	Transplantation of human neural stem/ progenitor cells promotes functional recovery after spinal cord injury in common marmoset.	J Neurosci Res		in press
Sasaki, T. Iwata, S. Okano, HJ. Urasaki, Y. Hamada, J. Tanaka, H. Dang, NH. <u>Okano, H.</u> Morimoto, C.	Nedd9 protein, a Cas-L homologue, is upregulated and may remodel neurons after transient global ischemia.	Stroke		in press
Sakatani, T. Kaneda, A. Iacobuzio-Donahue, CA. Carter, MG. Witzel, SB. <u>Okano, H.</u> Ko, MSH. Ohlsson, R. Longo, DL. Feinberg, AP.	Loss of imprinting of IgfII alter intestinal maturation and tumorigenesis in mice.	Science		in press
Crespel, A. Rigau, V. Coubes, P. Rousset, MC. de Bock, F. <u>Okano, H.</u> Baldy-Moulinier, M. Bockaert, J. Lerner-Natoli, M.	Increased neurogenesis in human temporal lobe epilepsy: evidence for a new neurogenesis area, the fissura hippocampi.	Neurobiology of Disease		in press
Yano, M. Okano, HJ. <u>Okano, H.</u>	Involvement of Hu and hnRNP K in neuronal differentiation through p21 mRNA post- transcriptional regulation.	J Biol Chem		in press

著者名	題名	書名(編集者名)	発行者名 (発行地名)	巻:頁 西暦年号
Akamatsu, W. Fujiwara, H. Mitsuhashi, T. Yano, M. Shibata, S. Hayakawa, Y. Okano, HJ. Sakakibara, S. Takano, H. Takano, T. Takahashi, T. Noda, T. <u>Okano, H.</u>	RNA-binding protein HuD regulates neuronal cell identity and maturation.	Proc Natl Acad Sci USA		in press
Tamura, T. Nakamura, M. Ogawa, Y. Toyama, Y. Miura, M. <u>Okano, H.</u>	Targeted expression of anti-apoptotic protein, p35, in oligodendrocytes reduces delayed demyelination and functional impairment after spinal cord injury.	Glia		in press
Yoda, A. Kouike, H. <u>Okano, H.</u> Sawa, H.	Components of the transcriptional Mediator complex are required for asymmetric cell division in <i>C. elegans</i> .	Development		in press
Iwanami, A. Ogawa, Y. Nakamura, M. Kaneko, S. Sawamoto, K. Okano, HJ. Toyama, Y. <u>Okano, H.</u>	"Neural stem/progenitor cell transplantation for spinal cord repair; optimal timing of transplantation." Principle of Molecular Neurosurgery.	Prog. Neurol. Surg. (eds. Freese A, Simone FA, Leone P, Janson C),	Basel, Karger,	18:104-123, 2005
<u>Okamoto, N.</u> Del Maestro, R. Valero, R. Monros, E. Poo, P. <u>Kanemura, Y.</u> <u>Yamasaki, M.</u>	Hydrocephalus and Hirschsprung's disease with a mutation of LICAM.	J Hum Genet.		49:334-337, 2004
Harada, N. Hatchwell, E. <u>Okamoto, N.</u> Tsukahara, M. Kurosawa, K. Kawame, H. Kondoh, T. Ohashi, H. Tsukino, R. Kondoh, Y. Shimokawa, O. Ida, T. Nagai, T. Fukushima, Y. Yoshiura, K. Niikawa, N. Matsumoto, N.	Subtelomere specific microarray based comparative genomic hybridisation: a rapid detection system for cryptic rearrangements in idiopathic mental retardation.	J Med Genet.		41:130-136, 2004

著者名	題名	書名(編集者名)	発行者名 (発行地名)	巻 : 頁 西暦年号
Iwakoshi, M. <u>Okamoto, N.</u> Harada, N. Nakamura, T. Yamamori, S. Fujita, H. Niikawa, N. Matsumoto, N.	9q34.3 deletion syndrome in three unrelated children. 9q34.3 deletion syndrome in three unrelated children.	Am J Med Genet.		126 : 278-283, 2004
Harada, N. Visser, R. Dawson, A. Fukamachi, M. Iwakoshi, M. <u>Okamoto, N.</u> Kishino, T. Niikawa, N. Matsumoto, N.	A 1-Mb critical region in six patients with 9q34.3 terminal deletion syndrome.	J Hum Genet.		49 : 440-444, 2004
森 英樹 小林 哲 三宅 淳 <u>金村 米博</u>	神経幹細胞培養法	培養細胞実験ハンドブック (黒木登志夫・許南浩編)		254-259, 2004
三宅 淳 <u>金村 米博</u>	個人情報と産業	人体の個人情報 (宇都木 伸・菅野純夫・ 米本昌平編)		236-247, 2004
<u>金村 米博</u>	神経幹細胞分離用のモノクローナル抗体 大量培養など再生医療で応用期待	日経先端技術		63 : 3-4, 2004
<u>金村 米博</u>	神経機能の回復に有望な神経再生	AIST Today		4 : 14, 2004
<u>Kanemura, Y.</u> Mori, H. Nakagawa, A. Islam, MO. Kodama, E. Yamamoto, A. Shofuda, T. Kobayashi, S. Miyake, J. Yamazaki, T. Hirano, S. <u>Yamasaki, M.</u> Okano, H.	In vitro screening of epigenetic factors for human neural stem/progenitor cells proliferation using indirect measurement of total ATP content in viable cells.	Cell Transplantation.		in press
<u>金村 米博</u>	PROS vs CONS (論争・生命倫理) 中絶胎児の研究利用-是 or 非?-PROS-	人倫研プロジェクト News Letter		10 : 2-5, 2004
Islam, MO. <u>Kanemura, Y.</u> Tajria, J. Mori, H. Kobayashi, S. Hara, M. Yamasaki, M. <u>Okano, H.</u> Miyake, J.	Functional expression of ABCG2 transporter in human neural stem/progenitor cells.	Neurosci Res		in press