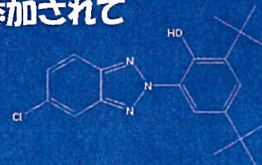


17年度
2-(3',5'-Di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-
chlorobenzotriazole (DBHCB)

(CAS No. 3864-99-1)

- DBHCBは紫外線吸収剤として使われている。
- DBHCBは低揮散性で、耐溶抽出性、耐ガス退色性に優れており、ポリオレフィン、ポリ塩化ビニル、ポリカーボネート、ポリウレタン、種々のペンキ等に使われている。
- 紫外線吸収剤はポリマーの劣化防止、紫外線による食品の品質低下防止のために食品包装材に添加されている。



17年度
DBHCBのラット新生児への直接投与試験の結果

♂ ♀
肝増重量及び比重量↑

肝細胞肥大、好酸性顆粒状変化、グリコーゲン減少、
単細胞壊死

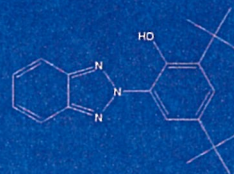
AST↑、ALAT↑、ALP↑、総ビリルビン↑

6週齢ラットを用いた反復投与試験では、雄にのみ毒性が認められたが、
離乳前のラットを用いた試験では毒性発現の雌雄差は認められなかった

18年度

Z-(Z'-Hydroxy-3',5'-di-tertbutylphenyl) benzotriazole (HDBB, CAS No. 3846-71-7)

- ・ プラスチックの紫外線吸収剤として用いられている。
- ・ 不飽和ポリエステル、塩化ビニル、ポリアクリル酸、ポリアミド樹脂への練りこみ、工業用塗料およびデジタル印刷用途に使われている。
- ・ H17年11月18日に行われた薬事・食品衛生審議会、化学物質審議会及び中央環境審議会において「継続的に摂取される場合には、人の健康を損なうおそれがある」可能性が示され(第一種特定化学物質)、製造、輸入及び使用が行われるべきではない



HDBBの5週齢ラットにおける28日反復投与毒性

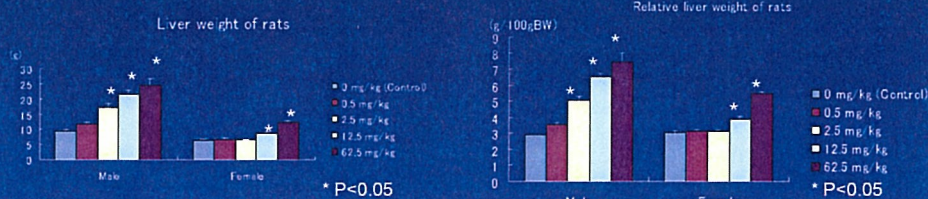
実験方法

- ・ HDBB (純度: 100%) をコーン油に懸濁した。
- ・ 5週齢のCrj:CD(SD) IGSラットに
0, 0.5, 2.5, 12.5, 62.5 mg/kg bw/dayを強制経口投与した。
28日間反復投与
回復群: 14日間の回復期間後と殺 (0及び62.5 mg/kg bw/day)

HDBBの5週齢ラットにおける28日間反復投与毒性試験の結果

	♂	♀
0.5 mg/kg bw/day	肝細胞肥大、胆管増生 A/G比↑	影響なし
2.5 mg/kg bw/day	肝重量↑、肝細胞肥大 胆管増生 空胞変性 A/G比・グルコース↑	影響なし
12.5 mg/kg bw/day	肝重量↑、肝障害 心筋肥大・変性 A/G比・グルコース・ALT・ALP ↑	肝重量↑ 肝障害(胆管増生なし) 心筋肥大・変性
62.5 mg/kg bw/day	肝障害、心筋肥大・変性 甲状腺ろ胞細胞肥大 尿管上皮肥大 肝重量↑ A/G比・グルコース・ALT・ALP・AST ↑	肝障害、心筋肥大・変性 甲状腺ろ胞細胞肥大 尿管上皮肥大 肝重量↑ A/G比・グルコース・Tchol・TGL ↑
NOAEL	< 0.5 mg/kg bw/day	2.5 mg/kg bw/day

HDBBの5週齢ラットにおける28日間反復投与毒性試験の結果 (肝臓重量)



雄：2.5 mg/kg以上で肝臓重量増加
雌：12.5 mg/kg以上で肝臓重量増加

HDBBの新生児ラットへの直接投与毒性試験

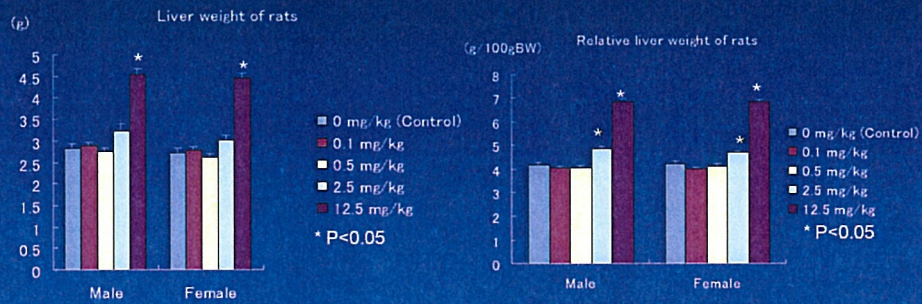
実験方法

- ・ HDBB (純度: 100%) をコーン油に懸濁した。
- ・ 生後4日のCrI:CD (SD) ラットに
0, 0.5, 2.5, 12.5 mg/kg bw/dayを強制経口投与した。
5母体/群、1母体当たり♂♀各4匹の児 (♂♀雄各20匹/群)
♂: 生後4-21日に直接強制経口投与し、生後22日に剖検した
♀: 生後4-21日に直接強制経口投与し、生後22日に剖検した

HDBBの新生児ラットへの直接投与毒性試験の結果

	♂	♀
0.5 mg/kg bw/day	影響なし	影響なし
2.5 mg/kg bw/day	肝相対重量↑ 肝細胞分裂像頻度上昇 肝細胞核の大小不同/核小体肥大	肝相対重量↑ 肝細胞分裂像頻度上昇 肝細胞核の大小不同/核小体肥大
12.5 mg/kg bw/day	肝重量↑ AST/ALP/BUN ↑ アルブミン↑ CPK↓ 肝細胞肥大 好酸球性顆粒状変化 グリコーゲン減少	肝重量↑ AST/ALP/LDH ↑ アルブミン↑ TGL↓ 肝細胞肥大 好酸球性顆粒状変化 グリコーゲン減少
NOAEL	0.5 mg/kg bw/day	0.5 mg/kg bw/day

HDBBのラットにおける新生児投与毒性試験の結果 (肝臓重量)



雄：2.5 mg/kg以上で肝臓相対重量増加
雌：2.5 mg/kg以上で肝臓相対重量増加

H19年度の研究計画

- HDBBの毒性影響発現について、雌雄の去勢ラットを用いた検討
- HDBB/代謝物の血中濃度の測定
- DBHCB/代謝物の血中濃度の測定

神経幹細胞系譜制御における化学物質の影響に関する研究

分担研究者 中島 欽一 奈良先端科学技術大学院大学 教授

研究要旨

本研究は神経幹細胞系譜制御に対する化学物質影響の分子基盤解明を目的としている。化学物質の中でもレチノイン酸(RA)とバルプロ酸(VPA)に焦点を絞り、その神経幹細胞分化における作用および作用機序の解明を目指す。本年度の研究では、1) RA が ES 細胞の早期アストロサイト分化を誘導する際に、アストロサイト特異的遺伝子プロモーターの脱メチル化が生じること、2) その過程にヒストンメチル化酵素 G9a が関与するらしいこと、3) VPA が損傷脊髄において移植神経幹細胞由来ニューロンの突起伸長を促進することなどを見出した。

A. 研究目的

本研究は化学物質の神経幹細胞系譜制御における影響の分子基盤の解明を目的とする。特に催奇形成を有するビタミン A(レチノイン酸)や明確な奇形を伴わない状況で自閉症を誘発するバルプロ酸の機能に着目する。マウス胚性幹細胞(ES 細胞)や胎子および成体神経幹細胞を用いた予備的実験では、レチノイン酸(RA)が神経幹細胞からアストロサイトへの分化時期を早めること、バルプロ酸(VPA)が成体神経幹細胞のニューロンへの分化を促進することなどを明らかにしている。このような作用及び作用機序を明らかにすることにより、化学物質の子どもの脳神経系への影響を予想・考察する上で基盤となる知見が集積できると考える。

B. 研究方法

生体内の発生過程において神経幹細胞はニューロンへの分化がアストロサイトへの分化に先行する。本分担研究者らはマウス ES 細胞を用い、血清非存在下に浮游培養することで上記現象を再現できる *in vitro* の系を確立している。ES 細胞を血清非存在下に4日間浮游培養した場合、胎生初期～中期の神経幹細胞に相当する神経幹細胞様細胞が誘導されるため、アストロサイト誘導性サイトカイン LIF で刺激した場合にもアストロサイトへの分化は観察されない。しかしこの4日間の浮游培養中に RA を添加する

ことで、LIF に応答したアストロサイトへの分化が見られるようになることが予備的実験において明らかになっている。分担研究者はこれらの結果と自身のこれまでの研究結果とを合わせて、このアストロサイト早期分化能獲得に DNA メチル化というエピジェネティックなゲノム修飾の関与を想定している。そこで本研究では DNA のメチル化状態が RA によって実際に変化を受けることを bisulfite シークエンスなどによって検討する。変化を受けている場合は分子生物学や細胞生物学の技術や知識を駆使しそのメカニズム解明に臨む。VPA に関しては成体神経幹細胞のニューロン分化を促進することが分かっているものの胎子神経幹細胞に対する影響については不明である。そこで本研究では胎子神経幹細胞に対する影響を成体神経幹細胞に対するそれと比較するとともに、マイクロアレイによる遺伝子発現解析などを足掛りとしてその作用機序解明も試みる。

(倫理面への配慮)

本研究は奈良先端科学技術大学院大学の動物倫理委員会の規定に基づき行うものである。

C. 研究結果

1. ES細胞から神経系細胞への分化におけるRAの影響:
我々は RA が ES 細胞からの早期アストロサイト分化を

誘導するという結果を得ている。さらに我々はアストロサイト特異的遺伝子 GFAP プロモーターの転写因子 STAT3 結合配列は、神経幹細胞がアストロサイトへの分化能を獲得する胎生後期に脱メチル化を受けることを報告している。そこで RA 処理した ES 細胞においてこの STAT3 結合配列を含む周辺領域のメチル化を調べたところ、コントロールと比較して脱メチル化が促進されていることが分かった。またクロマチン免疫沈降法による解析から RA 刺激に応じて維持型 DNA メチル基転移酵素 Dnmt1 の GFAP プロモーターへの結合が減弱することがわかった。一方、Dnmt1 遺伝子欠損 ES 細胞では GFAP プロモーターは低メチル化状態にあり、アストロサイトへの早期分化が見られることも明らかにした。以上の結果から、RA による ES 細胞の早期アストロサイト分化誘導機構における Dnmt1 の関与が考えられる。またヒストンメチル化酵素 G9a 遺伝子欠損 ES 細胞においては、RA で刺激した場合にも全くアストロサイトへの分化が誘導されないことも見出している。

2. 神経幹細胞分化における VPA の影響:

我々は昨年度の研究で、VPA が成体ラット神経幹細胞の場合と同様にマウス胎生期神経幹細胞のグリア細胞(アストロサイトとオリゴデンドロサイト)への分化を抑制しつつニューロンへの分化を促進することを示した。また、経時的に VPA 処理した神経幹細胞から抽出した RNA を用いマイクロアレイ解析からは、ニューロン軸索伸長阻害タンパク質遺伝子の発現抑制が観察されている。これに対応して本年度は、損傷脊髄において移植細胞由来ニューロンの軸索伸長が VPA 投与により促進されることを明らかにした。

D. 考察

1. ES 細胞から神経系細胞への分化における RA の影響:

本年度の研究から RA による ES 細胞からの早期アストロサイト分化誘導過程において、「Dnmt1 のアストロサイト特異的遺伝子プロモーターへの結合減弱による脱メチル化促進」というメカニズムが推察された。また G9a 遺伝子欠損 ES 細胞では RA による早期アストロサイト分化誘導が観察されないことから、今後は DNA メチル化とヒストンメチル化双方のエピジェネティックな観点から RA の作用機

序解明に臨む。

2. 神経幹細胞分化における VPA の影響:

本年度の研究から、VPA は損傷脊髄において移植幹細胞のニューロン分化を誘導できると共に、軸索伸長も促進できることがわかった。今後はこの作用が損傷脊髄機能修復に寄与できるかどうかということも含めてその作用機序を解明する。

E. 結論

本研究によって RA や VPA が神経幹細胞分化制御に様々な影響を及ぼすことが明らかとなった。今後はそのメカニズムを詳細に解析することで、生物学的に興味深い発見や、ひいては化学物質の子どもの脳神経系への影響を予想・考察する上で基盤となるような概念の提示を目指したい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

滝沢琢己、中島欽一、組織間細胞の分化と DNA のメチル化、佐々木裕之、エピジェネティクス、シュプリンガー・フェアラーク東京(株)、東京(2004) 135-145

2) 雑誌

(#, Shared correspondence, *, Equal first authorship)

Ohno, M., Kohyama, J., Namihira, M., Sanosaka, T., Takahashi, J.A., Hashimoto, N. & Nakashima, K. Neuropoietin induces neuroepithelial cells to differentiate into astrocytes via activation of STAT3. *Cytokine, in press.*

Kubota, A., Nishida, K., Nakashima, K. & Tano, Y. (2006) Conversion of mammalian Muller glial cells into a neuronal lineage by in vitro aggregate-culture. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 514-520

Setoguchi, H., Namihira, M., Kohyama, J., Asano, H.,

Sanosaka, T. & Nakashima, K. (2006) Methyl-CpG binding proteins are involved in restricting differentiation plasticity in neurons. *J Neurosci Res* 84, 969-979

Suzuki, A., Raya, A., Kawakami, Y., Morita, M., Matsui, T., Nakashima, K., Gage, F.H., Rodriguez-Esteban, C. & Izpisua Belmonte, J.C. (2006) Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 10294-10299

Suzuki, A., Raya, A., Kawakami, Y., Morita, M., Matsui, T., Nakashima, K., Gage, F.H., Rodriguez-Esteban, C. & Belmonte, J.C. (2006) Maintenance of embryonic stem cell pluripotency by Nanog-mediated reversal of mesoderm specification. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3 Suppl 1, S114-S122

Barkho, B.Z., Song, H., Aimone, J.B., Smrt, R.D., Kuwabara, T., Nakashima, K., Gage, F.H. & Zhao, X. (2006) Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cells Dev* 15, 407-421

Abematsu, M., Smith, I. and Nakashima, K. (2006) Mechanisms of neural stem cell fate determination: extracellular cues and intracellular programs. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, 1, 267-277

*Muotri, A.R., *Nakashima, K., Toni, N., Sandler, VM. and Gage, F.H. (2005) Development of functional human embryonic stem cell-derived neurons in mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 18644-18648

Yanagisawa, M., Nakashima, K., Ochiai, W., Takizawa, T., Setoguchi, T., Uemura, A., Takizawa, M., Nobuhisa, I. and Taga, T. (2005) Fate redirection of hippocampal astrocytes toward neuronal lineage by aggregate culture. *Neurosci. Res.* 53, 176-182

Shimozaki, K., Namihira, M., Nakashima, K. and Taga, T. (2005) Stage- and site-specific DNA demethylation during

neural cell development from embryonic stem cells. *J. Neurochem.* 93, 432-439

2. 学会発表

(国内学会)

浅野弘嗣[○]、波平昌一、神山淳、青沼真、佐野坂司、中島欽一: レチノイン酸による胎生期神経幹細胞のアストロサイト分化制御機構の解明、日本分子生物学会 2006 フォーラム、名古屋国際会議場、2006年12月6-8日

佐野坂司[○]、波平昌一、浅野弘嗣、神山淳、相崎健一、五十嵐勝秀、菅野純、中島欽一: 神経幹細胞の多分化能獲得制御に関する遺伝子群の検索。日本分子生物学会 2006 フォーラム、名古屋国際会議場、2006年12月6-8日

高塚絵理子[○]、神山淳、徳永暁憲、波平昌一、岡野栄之、中島欽一: BMP シグナルによる神経幹細胞の新規ニューロン分化制御メカニズムの解析。日本分子生物学会 2006 フォーラム、名古屋国際会議場、2006年12月6-8日

大野誠[○]、神山淳、波平昌一、佐野坂司、高橋潤、橋本信夫、中島欽一: 新規 IL-6 ファミリーサイトカイン Nueropoietin による神経幹細胞のアストロサイト分化誘導。日本分子生物学会 2006 フォーラム、名古屋国際会議場、2006年12月6-8日

精松昌彦[○]、辻村啓太、瀬戸口啓夫、神山淳、波平昌一、井尻幸成、米和徳、小宮節郎、五十嵐秀勝、菅野純、中島欽一: ヒストン脱アセチル化阻害剤による神経幹細胞分化制御機構の解明と損傷脊髄再生治療への応用。日本分子生物学会 2006 フォーラム、名古屋国際会議場、2006年12月6-8日

神山淳[○]、高塚絵理子、山下徹、波平昌一、岡野栄之、澤本和延、中島欽一: 成体脳におけるメチル化DNA結合蛋白質を介した神経系細胞分化可塑性制御機構。日本分子生物学会 2006 フォーラム、名古屋国際会議場、2006年12月6-8日

波平昌一[○]、神山淳、佐野坂司、浅野弘嗣、田賀哲也、中島欽一：隣接細胞により誘導されるエピジェネティクス変動を介した神経幹細胞の多分化能獲得機構の解析。日本分子生物学会2006フォーラム、名古屋国際会議場、2006年12月6-8日

波平昌一、神山淳、田賀哲也、中島欽一[○]：未成熟ニューロンが誘導する胎生中期神経幹細胞のアストロサイト分化能獲得機構。日本分子生物学会2006フォーラム、名古屋国際会議場、2006年12月6-8日(シンポジウム、口頭)

辻村啓太[○]、瀬戸口廣貴、精松昌彦、神山淳、波平昌一、中島欽一：メチル化DNAタンパク質 MeCP2 による神経幹細胞分化制御機構の解析と損傷神経機能修復への応用。日本分子生物学会2006フォーラム、名古屋国際会議場、2006年12月6-8日(口頭)

中島欽一[○]：神経系細胞の分化制御とエピジェネティクス。千里ライフサイエンスセミナー ブレインサイエンスシリーズ第19回、千里ライフサイエンスセンタービル、2006年10月24日

中島欽一[○]：細胞外シグナルと細胞内プログラムのクロストークによる神経幹細胞分化の制御機構。NAIST バイオ COE 研究成果発表シンポジウム、東証ホール、2006年9月16日

中島欽一[○]、神山淳、波平昌一：DNAメチル化による神経系細胞分化制御。第3回 Neuroscience Frontier Research Conference (NEFRE)、ホテル ヴィラホンテータヌ汐留、2006年7月29日-30日

中島欽一[○]、神山淳、田賀哲也、波平昌一：Notch シグナル活性化による神経幹細胞のアストロサイト分化能獲得機構。第29回日本神経科学大会、国立京都国際会館、2006年7月19-21日

桑原知子[○]、Gene Teo、藁科雅岐、中島欽一、Jenny Hsieh、Fred H Gage：成体脳内で神経新生を促進する小さなモジュレーターRNA の発現制御機構。第29回日本神経科学大会、国立京都国際会館、2006年7月

19-21日(シンポジウム、口頭)

田中裕一[○]、戸塚祐介、松村大、中島欽一、久恒辰博：成体大脳新皮質に存在する nestin 陽性細胞のニューロン分化能に関する研究。第29回日本神経科学大会、国立京都国際会館、2006年7月19-21日

神山淳[○]、波平昌一、中島欽一：メチル DNA 結合タンパク質による中枢神経系細胞分化可塑性制御、第83回日本生理学会大会、群馬県民会館、2006年3月28-30日(シンポジウム、口頭)

神山淳、黒見靖、瀬戸口廣貴、波平昌一、中島欽一[○]：メチル化 DNA 結合タンパク質による神経系細胞分化可塑性制御機構の解析、第28回日本分子生物学会年会、JAL リゾート シーホークホテル福岡、2005年12月7日-10日

瀬戸口廣貴[○]、波平昌一、青沼真、神山淳、中島欽一：メチル化 DNA 結合タンパク質による神経系細胞分化可塑性制御、第28回日本分子生物学会年会、JAL リゾート シーホークホテル福岡、2005年12月7日-10日

波平昌一[○]、神山淳、青沼真、瀬戸口廣貴、田賀哲也、中島欽一：Notch シグナルによる発生段階依存的な神経幹細胞成熟機構の解析、第28回日本分子生物学会年会、JAL リゾート シーホークホテル福岡、2005年12月7日-10日

青沼真[○]、波平昌一、瀬戸口廣貴、神山淳、中島欽一：レチノイン酸と LIF による神経幹細胞の相乗的アストロサイト分化誘導、第28回日本分子生物学会年会、JAL リゾート シーホークホテル福岡、2005年12月7日-10日

波平昌一、神山淳、田賀哲也、中島欽一[○]：Accelerated demethylation in an astrocyte specific gene promoter mediated by Notch-signaling、第48回日本神経科学会(福岡)大会、JAL リゾート シーホークホテル福岡、2005年9月28日-30日

久保田亨[○]、中島欽一、西田幸二、田野保雄：

Mammalian Müller glial cells can be converted to a neuronal lineage、第48回日本神経科学会(福岡)大会、JAL リゾート シーホークホテル福岡、2005年9月28日-30日

中島欽一[○]:神経発生とエピジェネティクス。精神遅滞研究ワークショップ、国立精神・神経センター研究所、2005年9月24日

中島欽一[○]:神経幹細胞系譜制御機構とその応用。第2回安曇野循環器フォーラム、信州大学医学部附属病院、2005年9月10-11日

Fred.H.Gage[○], 桑原知子, Jenny.Hsieh, Hoonkyo Suh, 中島欽一, Chichung Lie: Epigenetic Regulation of Adult Neurogenesis . 第28回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2005年7月26-28日

波平昌一[○]、青沼真、瀬戸口廣貴、神山淳、田賀哲也、中島欽一: NotchシグナルによるDNA脱メチル化を介した神経幹細胞系譜制御機構の解析。第28回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2005年7月26-28日

瀬戸口廣貴[○]、波平昌一、青沼真、神山淳、中島欽一: メチル化DNA結合タンパク質によるアストロサイト分化制御機構の解析。第28回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2005年7月26-28日

中島欽一[○]:神経幹細胞の分化制御メカニズムとその応用。第10回NAIST産学連携フォーラム、関西経済連合29階会議室、2005年7月7日

中島欽一[○]:エピジェネティクスが関与する神経系細胞分化制御。大阪大学蛋白質研究所セミナー、大阪大学吹田キャンパス内蛋白質研究所一階講堂、2005年6月27-28日

神山淳、黒見靖、波平昌一、Jenny.Hsieh, F.H. Gage, 中島欽一[○]:DNA methylation regulating neural cell fate specification. The 58 Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology, Omiya Sonic City, Saitama, Japan, June

15-17, 2005

波平昌一、神山淳、田賀哲也、中島欽一[○]:神経幹細胞多分化能獲得機構の解析。日本発生生物学会第38大会。仙台国際センター、2005年6月1-4日

中島欽一[○]:神経幹細胞分化とエピジェネティクス。創生応用医学研究セミナー、東北大学、2005年6月1日

波平昌一[○]、田賀哲也、中島欽一:発生段階依存的な神経幹細胞成熟機構の解析。第3回幹細胞シンポジウム、淡路夢舞台国際会議場、2005年4月21-23日

精松昌彦[○]、鹿川哲史、福田信治、小宮節郎、中島欽一、田賀哲也:bFGFによる胎生期神経上皮細胞の背腹軸運命決定機構。第3回幹細胞シンポジウム、淡路夢舞台国際会議場、2005年4月21-23日

中島欽一[○]: エピジェネティクスが関与する神経幹細胞分化制御。第4回成体脳ニューロン新生懇談会、順天堂大学医学部、2005年2月5日

(国際学会)

Nakashima, K[○]: Differentiating neurons confer a potential to differentiate into astrocyte on neural stem cells. The 8th NAIST-KRIBB-KK Joint Symposium. KOREA UNIVERSITY, Seoul, November 10, 2006 (oral)

Namihira, M[○]., Shetoguchi, H., Kohyama, J., Asano, H., Sanosaka, T., and Nakashima, K: Methyl-CpG-binding proteins involved in restricting differentiation plasticity in neurons. NEUROSCIENCE2006, Georgia World Congress Center, Atlanta, October 14-18, 2006

Fukuda, S[○]., Abematsu, M., Mori, H., Yanagisawa, M., Kagawa, T., and Nakashima, K: Novel SOCS3-mediated negative feedback regulation involving BMP-Smad signaling in astrocyte development.

NEUROSCIENCE2006, Georgia World Congress Center, Atlanta, October 14-18, 2006

Namihira, M., Kohyama, J., Taga, T., and Nakashima, K.
○ : Notch signal-induced DNA demethylation switching
the differentiatonal potential of neural stem cells. The 5th
JBS Symposium, Nagano, March 1-3, 2006 (oral)

Namihira M.○, Kohyama J., Aonuma M., Setoguchi H.,
Taga T. and Nakashima K. : Notch-induced acceleration of
DNA demethylation implicated in fate specification of
neural stem cells. KEYSTONE SYMPOSIA, January 19 -
24, 2006

Nakashima K.○: Notch signal-mediated DNA
demethylation regulation the differentiatonal potential of
neural stem cells. NAIST-CDB International Symposium,
NARA-KEN NEW PUBLIC HALL, December 1-2,
2005

Aonuma M.○, Namihira M., Setoguchi H., Kohyama J. and
Nakashima K. : Retinoic acid cooperates with LIF to induce
astrocyte differentiation of embryonic neural stem cells.
NAIST-CDB International Symposium, NARA-KEN
NEW PUBLIC HALL, December 1-2, 2005

Namihira M.○, Kohyama J., Taga T. and Nakashima K. :
Notch-induced DNA demethylation involved in fate
determination of neural stem cells. Society for
Neuroscience 35th Annual Meeting, Washington
Convention Center, November 12-16, 2005

Tanaka T.○, Matsumura N., Muramatsu D., Nakashima K.
and Hisatsune T. : Nestin-positive progenitor cells in adult
neocortex. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting,
Washington Convention Center, November 12-16, 2005

Hsieh J.○, Jesseberger S., Clemenson D., Kuwabara T.,
Mejia E., Nakashima K. and Gage F.H. : Modulation of
activity-induced neurogenesis: a new mechanism how
antiepileptic drugs control seizures? Society for
Neuroscience 35th Annual Meeting, Washington
Convention Center, November 12-16, 2005

Smrt R.D.○, Eaves J., Barkho B., Zhao C., Kuwabara T.,
Nakashima K., Gage F.H. and Zhao X. : Function of

MeCP2 in postnatal neurogenesis and neuronal maturation.
Society for Neuroscience 35th Annual Meeting,
Washington Convention Center, November 12-16, 2005

Abematsu M., Namihira M., Nakashima K., Kagawa T. and
T. Taga○: 3rd International Symposium on Basic
Helix-Loop-Helix Genes. Regulators of Normal
Development and Indicators of Malignant Transformation,
Rome, Italy, May 9-10, 2005

Nakashima K.○: Epigenetic modification involved in fate
determination of neural stem cells. Korean Society of
Medical Biochemistry and Molecular Biology, Korea, May
13, 2005

Namihira M.○, Taga T. and Nakashima K. : Indication of
DNA demethylation-regulation fate switch of neural
presursors in mouse fetal brain. KEYSTONE SYMPOSIA,
February 10 - 15, 2005

Kuromi Y.○, Kohyama J., Namihira M., Gage F.H., and
Nakashima K. : Plasticity of neural cells restricted by
methyl-CpG binding proteins. KEYSTONE SYMPOSIA,
February 10 - 15, 2005

Nakashima K.○: Epigenetic modification regulating fate
specification of neural stem cells. NAIST21st Century
COE International Symposium, NARA-KEN NEW
PUBLIC HALL, January 17-19, 2005

Kuromi Y.○, Kohyama J., Namihira M., Gage F.H. and
Nakashima K. : Neural cell plasticity regulated by
methyl-CpG binding proteins. NAIST21st Century COE
International Symposium. January 17-19, 2005

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし

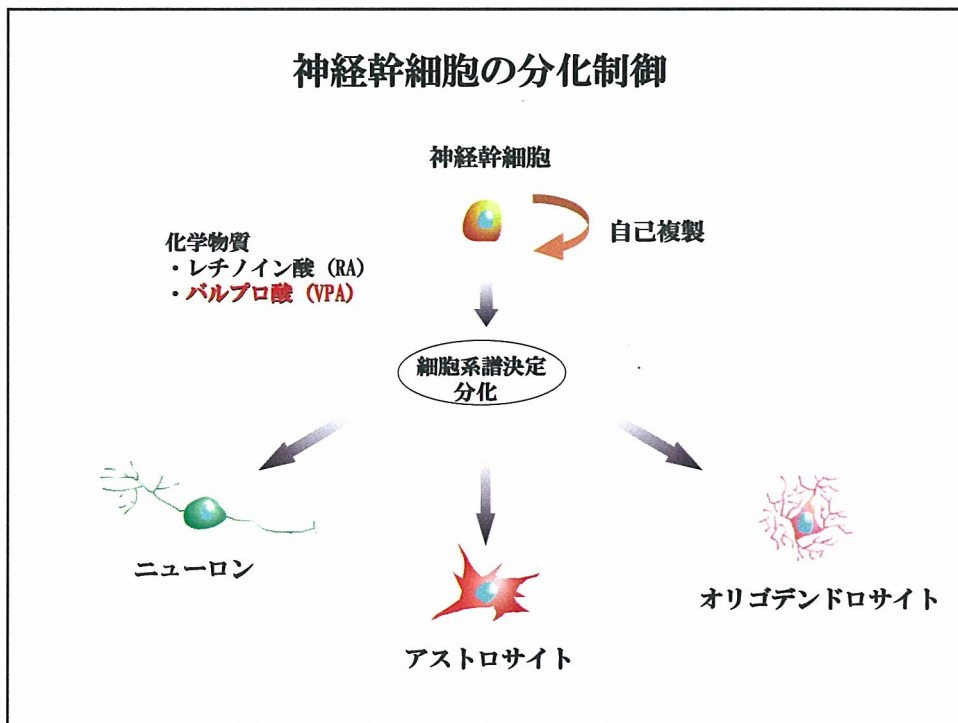
2. 実用新案登録

なし

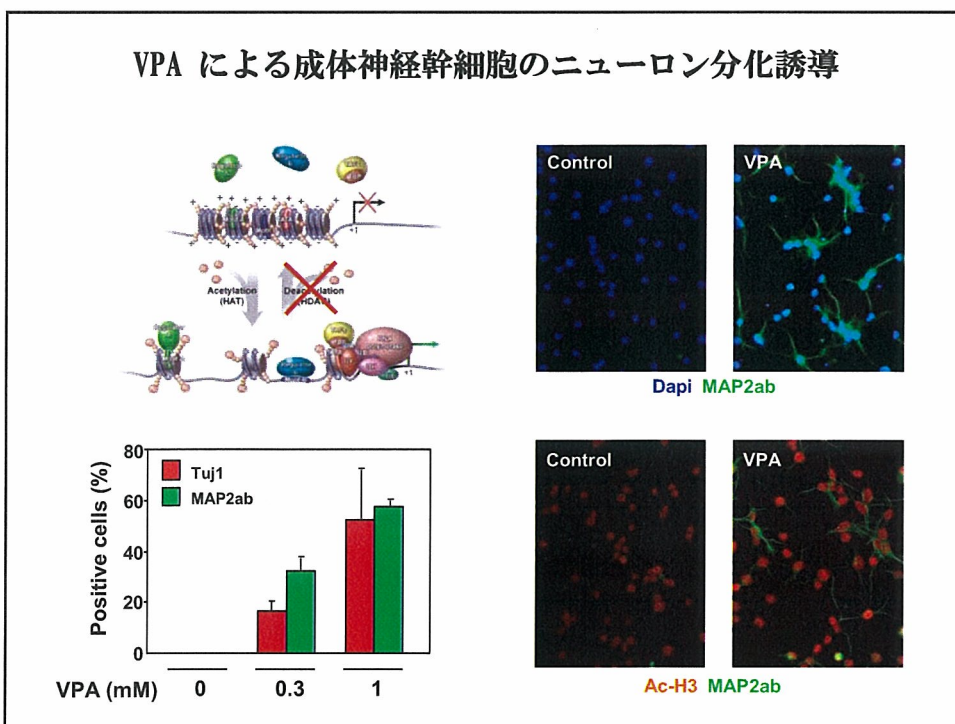
3. その他

第4回 日本分子生物学会三菱化学奨励賞受賞

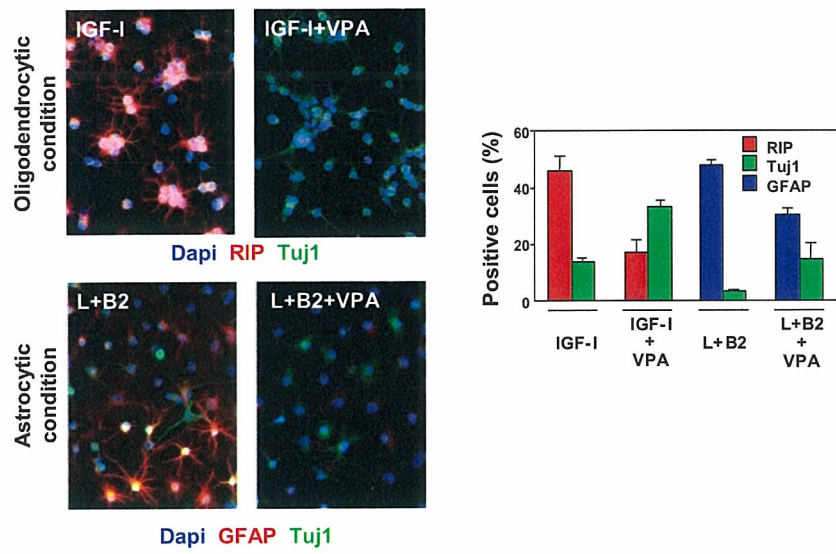
神経幹細胞の分化制御



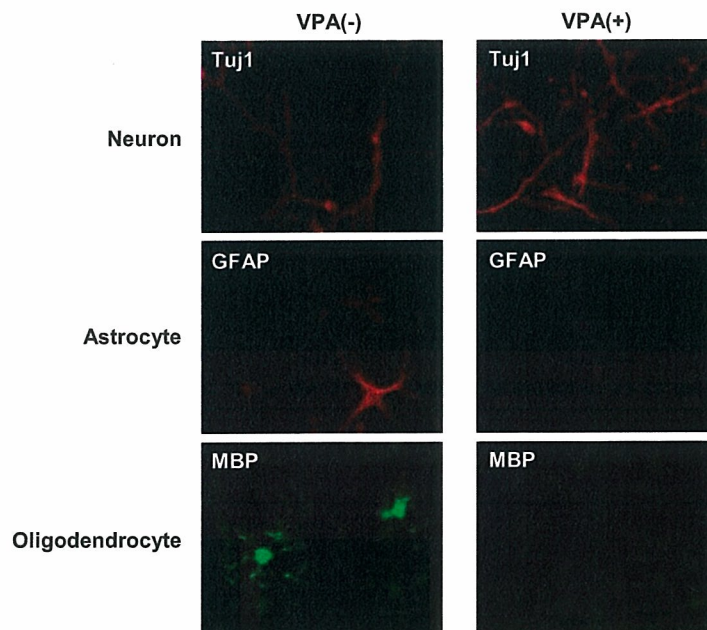
VPA による成体神経幹細胞のニューロン分化誘導



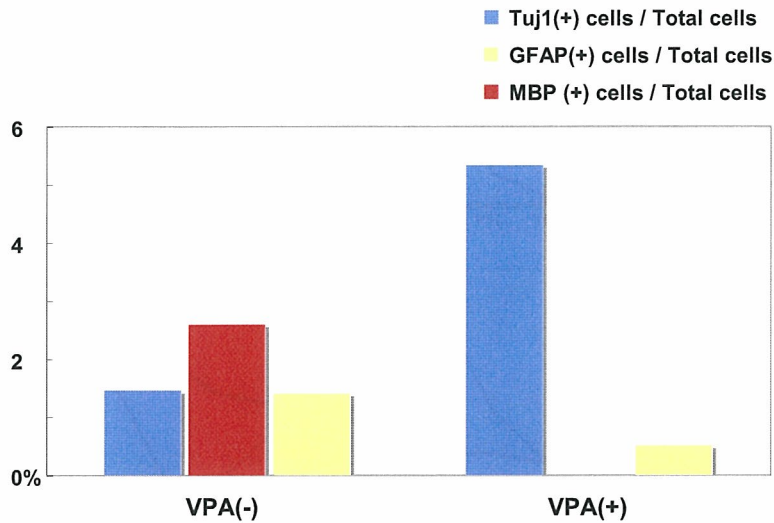
VPA による成体神経幹細胞のグリア細胞分化抑制



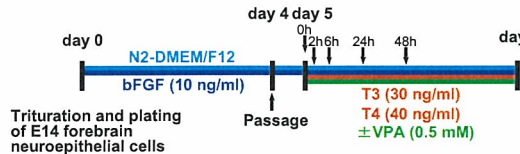
VPA による胎生期神経上皮細胞の分化制御



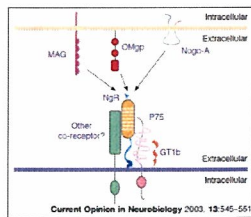
胎生期神経上皮細胞の各細胞分化における VPA の影響



バルプロ酸存在下及び非存在下における遺伝子発現解析

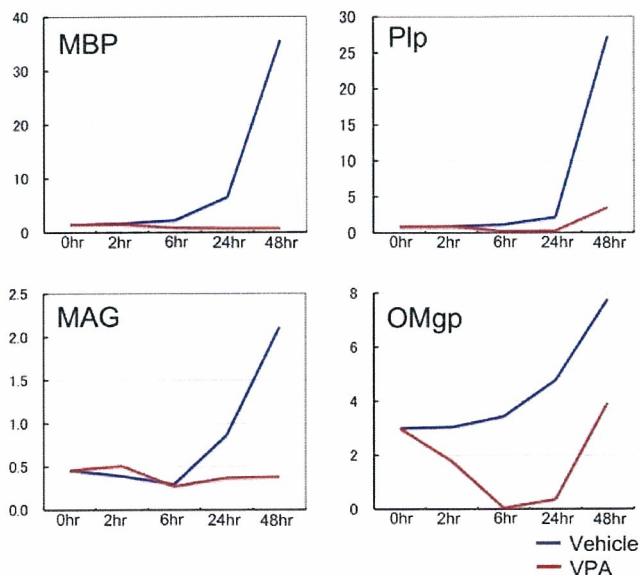


軸索伸張阻害タンパク質群



Gene	Vehicle		Vehicle		Vehicle		Vehicle		VPA		VPA		VPA		VPA	
	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	
Common	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	Raw	
Mao	1.4983	1.6782	2.2493	6.7174	15.001	1.4983	1.4863	0.8531	0.7359	0.7615	48.0741	myelin basic protein				
Mao	0.3595	0.3405	0.5168	1.7995	3.7111	0.3595	0.2018	0.2211	0.0603	0.2133	48.0196	myelin basic protein				
Mao	0.5297	0.4932	0.7730	1.9403	13.8078	0.5297	0.5891	0.2928	0.1923	0.2492	29.8620	myelin basic protein				
A0214604	0.2145	0.4188	0.4214	1.0729	13.6555	0.2145	0.2878	0.1561	0.1392	0.5892	28.4587	Mus musculus transcribed sequences				
2610024A01Rk	0.1970	0.2566	0.2029	0.5561	2.1827	0.1970	0.1274	0.1418	0.2040	0.2270	14.8022	RIKEN cDNA 2610024A01 gene				
Plxn-3	0.2977	0.3207	0.3243	0.6522	2.1616	0.2977	0.2153	0.1233	0.1865	0.3209	14.8028	plxn-3				
Plxn-3	0.2886	0.4195	0.3461	0.8324	2.3748	0.2886	0.4605	0.1276	0.0899	0.2717	10.9482	plxn-3				
Pip	0.9711	0.9233	1.1454	2.7518	25.7628	0.9711	0.9230	0.2161	0.2955	2.6278	3.8198	proteolipid protein (myelin)				
Cxcl1	1.0972	2.4382	2.3234	12.0251	4.4214	1.0972	2.5884	1.3970	1.6737	0.6318	7.8393	procollagen, type III, alpha 1				
Pip	1.0820	0.7365	0.8821	2.2216	10.2174	1.0820	0.9291	0.4838	0.3048	2.6209	7.2591	proteolipid protein (myelin)				
A1832930	0.3054	0.2949	0.4978	0.7994	1.3270	0.3054	0.2238	0.0949	0.2140	0.6877	6.1882	S100 protein, beta polypeptide, neural				
Mag	0.4591	0.3834	0.2988	0.6852	2.1120	0.4591	0.5109	0.2738	0.3725	0.2831	5.5126	myelin-associated glycoprotein				
C15h2b	0.6816	0.7985	0.8234	1.2831	2.6291	0.6816	0.8458	0.4296	0.4712	0.5029	5.2572	tyrosinase specific protein beta				
0510021018Rk	0.9792	0.7408	1.1078	1.4489	2.2071	0.9792	0.8224	0.5484	0.9852	0.4001	0.5088	RIKEN cDNA 0510021018 gene				
9620013A20Rk	0.2426	0.2109	0.2247	0.4358	2.1522	0.2426	0.1832	0.2352	0.0175	0.6700	4.7018	Mus musculus 12 days embryo spinal ganglion cDNA				
S100b	0.0745	0.2126	0.2519	0.6687	2.4387	0.0745	0.0512	0.0241	0.0533	0.1664	4.4588	S100 protein, beta polypeptide, neural				
Csh-2	0.7129	0.3290	0.5168	0.7510	4.1514	0.7129	0.4455	0.2421	0.3530	0.9203	4.4442	cerebellin 2 precursor protein				
Csh-1	0.7884	0.7287	0.8623	1.4005	5.1554	0.7884	0.7437	0.1950	0.6233	1.1807	4.3204	procollagen, type IX, alpha 1				
Gatad1	1.2564	1.0805	1.0792	2.0270	4.2840	1.2564	1.1285	0.2895	0.5183	1.0989	4.1817	galactosyltransferase				
S100b	0.4264	0.5202	0.4766	1.0464	0.8469	0.4264	0.4168	0.1523	0.2466	0.4188	4.1187	RIKEN cDNA 2200002121 gene				
1320007C21Rk	0.0264	0.6597	0.9618	1.5853	2.1221	0.0264	0.6919	0.2814	0.5645	0.8590	4.1001	---				
Fndc5	0.1460	0.1687	0.1348	0.7810	2.2165	0.1460	0.1870	0.0960	0.3310	0.7995	4.0297	RIKEN cDNA 1500001L03 gene				
Pf4	0.1037	0.2779	0.4458	0.9406	4.2213	0.1037	0.0658	0.0488	0.0833	1.7458	3.5680	RIKEN cDNA 1700112M14 gene				
Actc1	0.2328	0.4504	0.2903	0.7288	2.4789	0.2328	0.4516	0.1907	0.1837	0.7220	3.4233	actin, alpha, cardiac				
Pf4e	0.7783	0.9288	1.1780	2.2383	7.2771	0.7783	0.8199	0.4059	0.6049	1.0272	3.2423	prostaglandin G2 synthase (cann)				
Csh-2	0.4283	0.7481	0.9153	2.1238	10.1113	0.4283	0.8186	0.0509	1.0739	3.3782	1.1857	procollagen, type IX, alpha 2				
Gsdm2	0.2808	0.3709	0.4065	1.8939	4.8164	0.2808	0.3754	0.0833	0.5508	1.2865	2.8968	RIKEN cDNA 9130017L10 gene				
A041783	1.2524	1.3788	1.1203	2.0855	7.0106	1.2524	0.9279	0.4788	0.5920	2.3572	2.5427	expressed sequence AU041783				
A041783	0.5852	0.7829	0.5886	0.8891	3.7243	0.5852	0.5114	0.2112	0.3201	1.4914	2.4972	expressed sequence AU041783				
Csh-3	0.6944	0.6858	0.8602	1.8448	7.8413	0.6944	0.4358	0.2704	0.7272	2.3117	2.2072	procollagen, type IX, alpha 3				
Thra	0.2972	0.3023	0.5545	2.4122	10.1818	0.2972	0.4572	0.2999	0.6023	4.4111	2.1558	Urydyl Hormone responsive SPOT14 homolog				
Om	1.9917	1.2487	1.2854	0.7131	1.2450	1.9917	1.7858	0.0262	0.3530	1.2111	1.9758	aldol-dehydroxy myelin glycoprotein				

バルプロ酸によるオリゴデンドロサイト特異的遺伝子及び軸索伸展阻害タンパク質遺伝子の発現抑制



バルプロ酸 Valproic acid (VPA)

抗てんかん薬として古くから用いられている (安全性は確立されている)

HDAC inhibitorとしての機能 EMBO J., 2001, 20, 36734-41

神経系細胞の分化誘導作用 PNAS 2004, 101, 16659-64

ニューロン分化促進作用

アストロサイト及びオリゴデンドロサイト分化抑制作用

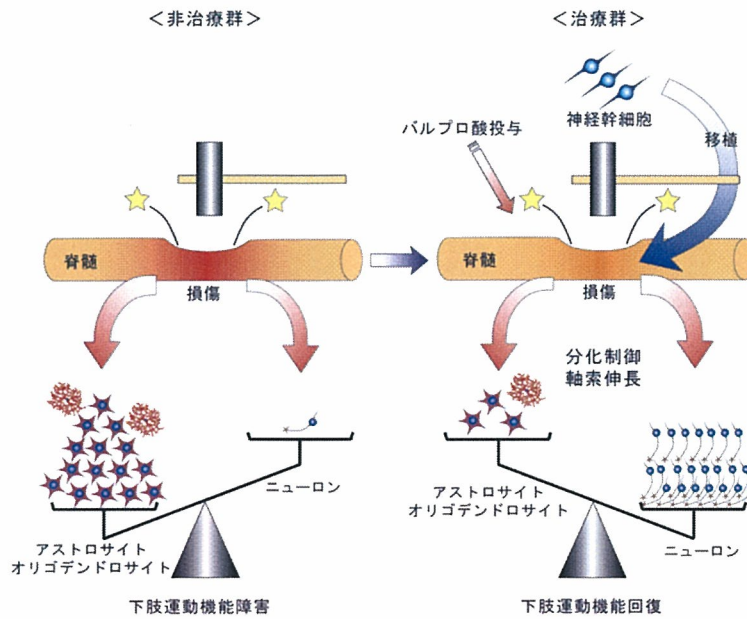
神経突起伸長作用 JBC 2001, 276, 31674-83

軸索伸展阻害タンパク質遺伝子発現抑制 This study

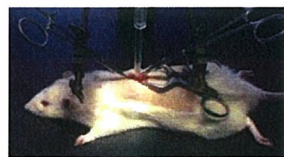
損傷脊髄が再生しにくい理由

1. 神経細胞自体の再生力が弱い
→ 移植神経幹細胞のニューロン分化促進、軸索伸長は可能か?
2. 神経細胞を取り巻く環境が再生に適していない
→ myelin inhibitorの軸索伸展阻害作用を抑制することはできないか?

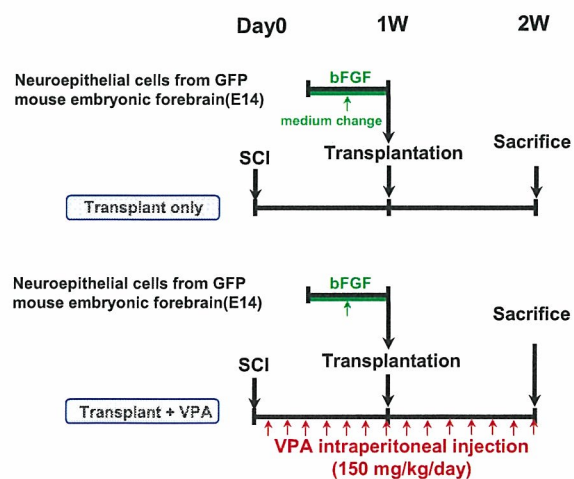
治療コンセプト



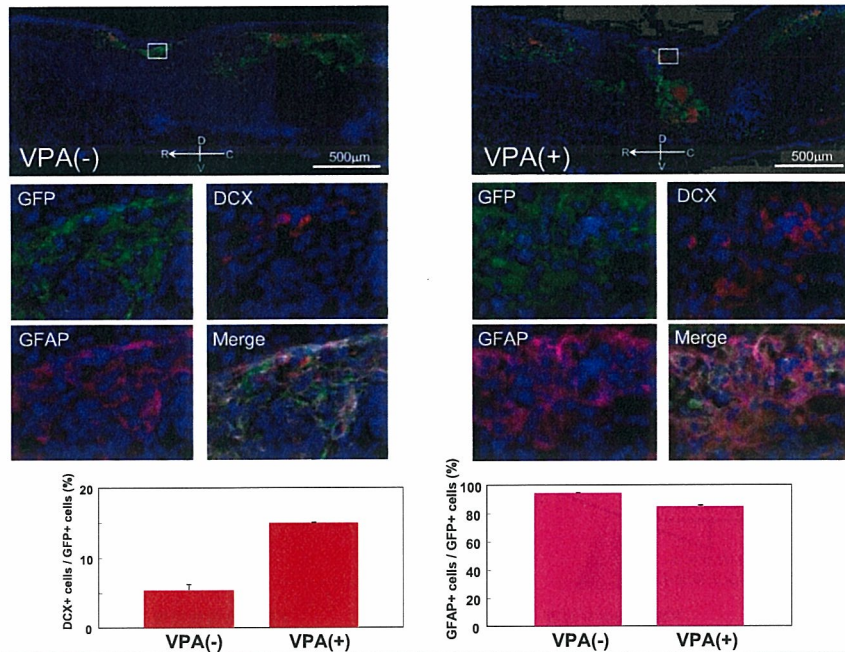
Schematic of VPA injection and transplantation paradigm



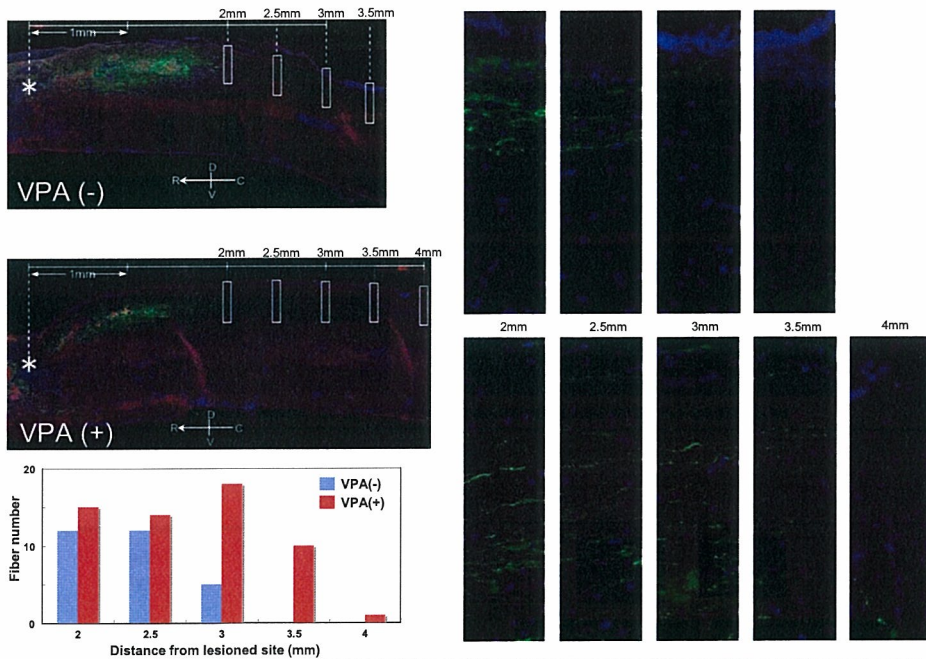
30 g, 1 min



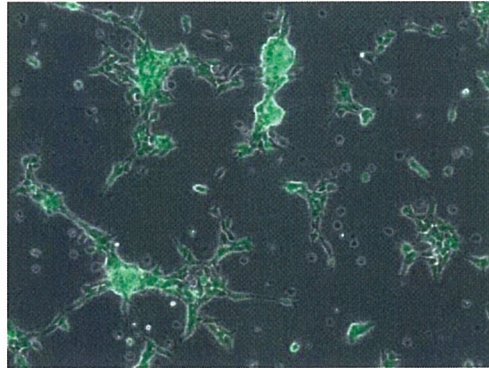
損傷脊髄内でのバルプロ酸による移植神経幹細胞のニューロン分化促進作用



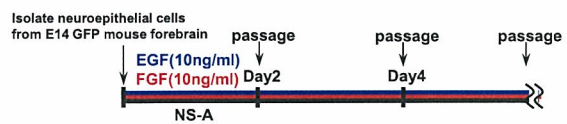
バルプロ酸による移植神経幹細胞由来細胞の突起伸長



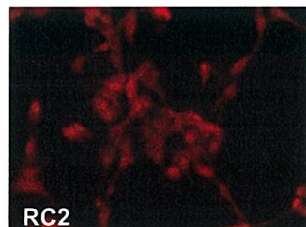
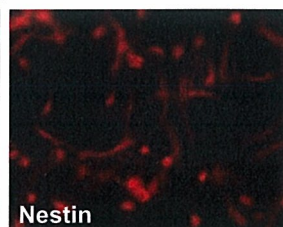
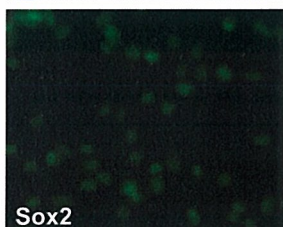
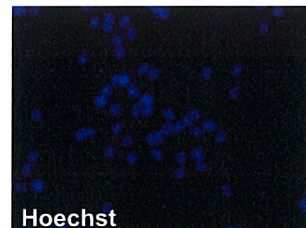
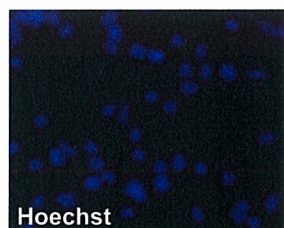
NS cells established from E14 GFP mouse telencephalon



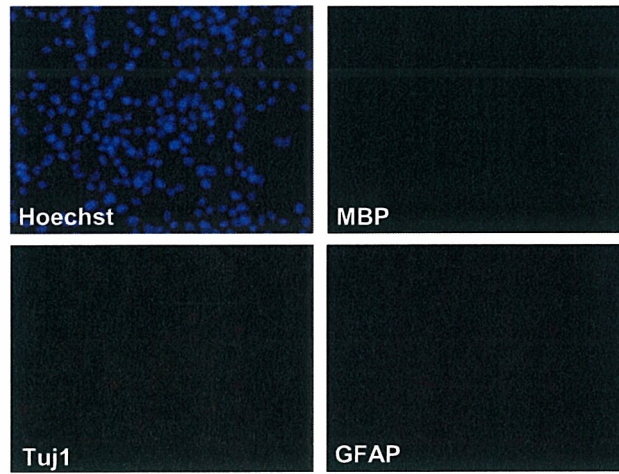
PLoS Biol. 2005 Sep;3(9):e283
**Niche-independent symmetrical self-renewal
of a mammalian tissue stem cell.**
Conti L, Pollard SM, Gorba T, Reitano E, Tokelli M, Biella G,
Sun Y, Sanzone S, Ying QL, Cattaneo E, Smith A.



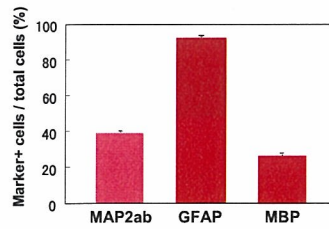
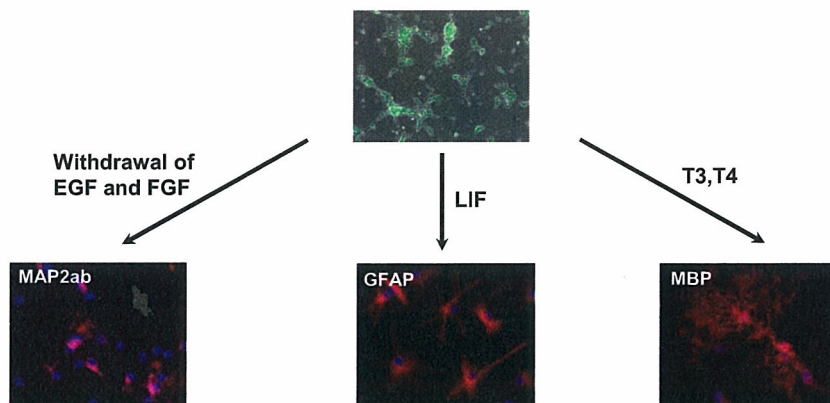
Maintenance of NS cells in an undifferentiated state (6 passages)



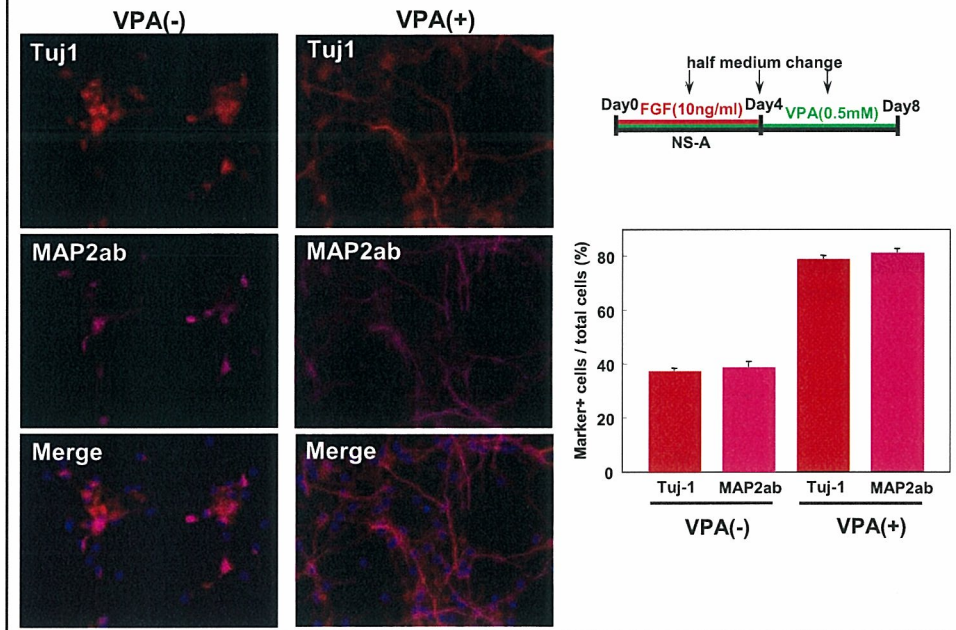
NS cells are negative for differentiated-cell markers



Multipotentiality of NS cells to differentiate into distinct neural cells



バルプロ酸によるニューロン分化促進と突起伸長



HDAC阻害活性を持たないバルプロミドはニューロン分化を促進しない

