

201208037A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業(創薬総合推進研究事業)

第16番染色体16p13.11内、新規脳発生関連miR-484の遺伝子改変  
マウスによる神経発達疾患モデル動物の確立

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 藤谷昌司

平成25(2013)年 5月

# 目 次

I. 総括研究報告		
第16番染色体16p13.11内、新規脳発生関連miR-484の遺伝子改変マウスによる神経発達疾患モデル動物の確立	-----	1
藤谷昌司		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	10
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	11

創薬基盤推進研究事業(創薬総合推進研究事業)  
総括研究報告書

第16番染色体16p13.11内、新規脳発生関連miR-484の遺伝子改変マウスによる神経発達疾患  
モデル動物の確立

研究代表者 藤谷 昌司 大阪大学・金沢大学・浜松医科大学・  
連合小児発達学研究所 助教  
研究分担者 なし

研究要旨

近年、精神疾患により医療機関にかかる患者数は大幅に増加しており、特に、統合失調症患者は入院患者数の大半を占め、医療費への負担は、年々その割合を増している。にもかかわらず、有効な治療法は未だに開発されておらず、統合失調症を初めとする神経発達疾患の新規治療法の開発研究に社会的要請が年々高まってきている。

また一方で、分子生物学、神経科学の進歩により、神経発達疾患のモデル動物において、そのシグナル異常を動物個体内で改善することで、行動学的改善が認められることが報告され、神経発達疾患のモデル動物を用いた分子生物学的治療法の開発が可能であることが確認されつつある。

申請者はその遺伝子変異が神経発達疾患の原因となる第16番染色体短腕16p13.11に着目して、新規の脳発生関連遺伝子miR-484を見いだした。

この研究の目的は、miR-484の遺伝子改変マウスを作成し、行動学的解析を行うことで16p13.11遺伝子異常に関連する神経発達疾患モデル動物として確立することである。

そこで、神経幹細胞特異的にmiR-484を*in vitro*で低下させる方法を確認し、miR484発現低下トランスジェニックマウスの作成を試みた。条件特異的に目的遺伝子を発現可能とするCALSシステムは、Cre recombinaseの存在下で、GFPをレポーターとして動物個体内でも正しく作動することが確認された。そして、神経幹細胞特異的にノックダウンするために、Nestin-Creマウスと交配し、ダブルトランスジェニックマウスを作成した。ダブルトランスジェニックマウスをNissl染色により解剖学的に検討したが、各器官形成、皮質の厚み、層構造、脳梁の厚み等の解剖学的構造に特に顕著な異常は認められなかった。

しかし、予備的に行った、オープンフィールドテストで不安を伴わない、多動傾向を示し、注意欠陥多動性障害のモデル動物と同様の表現型を観察することができた。

今後は、miR-484の過剰発現マウスを早急に作成し、過剰発現及び、発現低下遺伝子改変マウスにおける行動学的解析を行っていく予定である。

## A. 研究目的

近年、精神疾患により医療機関にかかる患者数は大幅に増加しており、特に、統合失調症患者は入院患者数の大半を占め、医療費への負担は、年々その割合を増している。にもかかわらず、有効な治療法は未だに開発されておらず、統合失調症を初めとする神経発達疾患の新規治療法の開発研究に社会的要請が年々高まってきている。

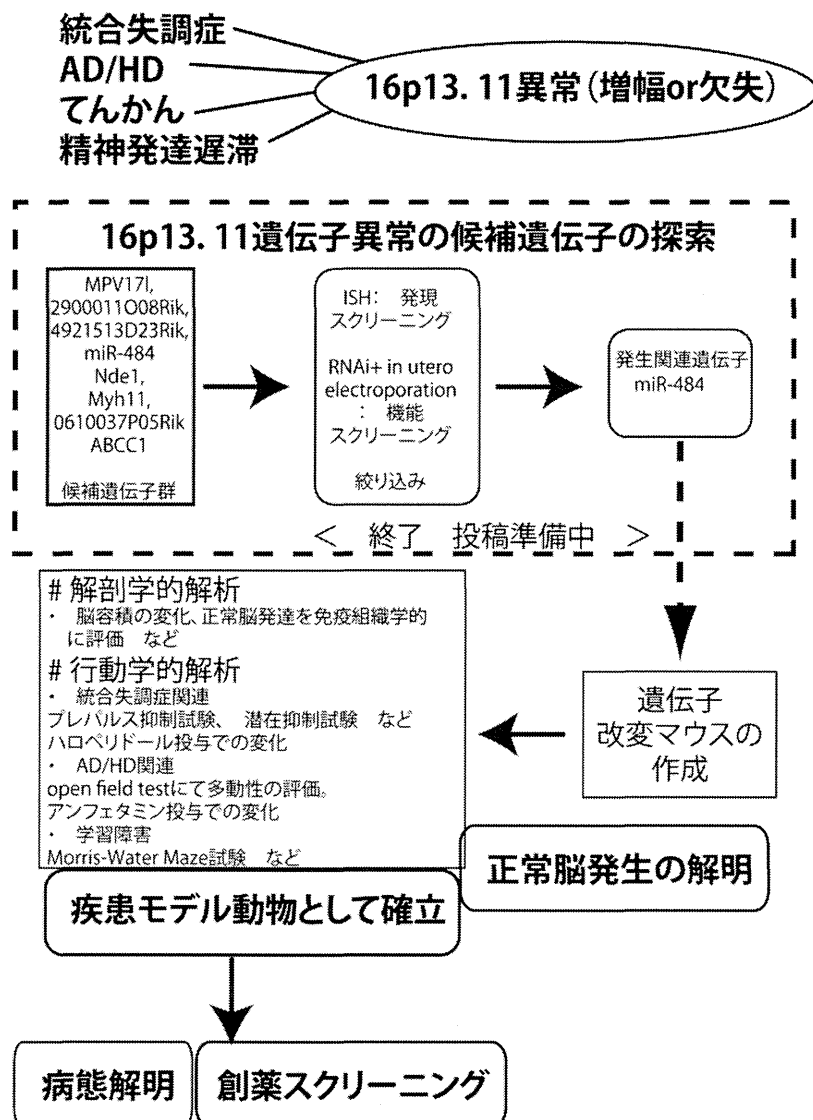
また一方で、分子生物学、神経科学の進歩により、神経発達疾患のモデル動物において、そのシグナル異常を動物個体内で改善することで、行動学的改善が認められることが報告され、神経発達疾患のモデル動物を用いた分子生物学的治療法の開発が可能であることが確認されつつある。

申請者はその遺伝子変異が神経発達疾患の原因となる第16番染色体短腕16p13.11に着目して、新規の脳発生関連遺伝子 miR-484 を見いだした。この研究の目的は、miR-484 の遺伝子改変マウスを作成し、行動学的解析を行うことで16p13.11 遺伝子異常に関連する神経発達疾患モデル動物として確立することである。

現在申請者は、16p13.11に着目して研究を行っているが、この部位は注意欠陥多動性障害、てんかん、統合失調症、精神発達遅滞などの神経発達疾患と関連する重要な遺伝子座である。そこで申請者は、その部位に、病気の原因となる脳発生に関連する候補遺伝子があると仮定した。そして、個々の遺伝子の時系列に沿った発現解析を行い、RNAi と子宮内胎児脳電気穿孔法による in vivo における機能解析を行った。その中で、出生前後の発達期の神経新生に重要と考えられる、miR-484 を見いだした。そこで、申請者は新規の脳発生関連遺伝子である miR-484 が神経発達疾患の原因候補遺伝子であると仮定し、具体的には以下の目標について明らかにしていきたいと考えている。

○24年度：miR-484 の条件特異的遺伝子改変マウスの作成と、その脳の発生的、解剖学的異常の有無の解析

○24～25年度：神経発達疾患に関連した行動学的解析を行うことによる特異的疾患モデル動物としての確立が可能かどうかの解析。



## B. 研究方法

トランスジェニックマウス作製にあたり、in vitro 実験を行うことで、発現プラスミドが適切にできているかどうかを検討した。また、今回の研究の目的とは必ずしも合致しないが、microRNA484のターゲット分子が発見されつつあるので、それについても一部報告する。

### 1 In vitro 実験法

#### 1.1 神経細胞培養法

胎生14日から16日のマウス胎児より、髄膜を切離した皮質のみを単離し、トリプシンで37°C30分間処理する。10%FBS含有DMEMにてトリプシンを不活性化し、ピペティングにより神経細胞を完全に分離する。トリパンブルー染色にて生細胞と死細胞を染め分け、生細胞のみを、ポリLリシンコートされた培養皿に播種し培養する。

#### 1.2 遺伝子導入法(nucleofection)

神経細胞に、遺伝子導入する際には、電気穿孔法nucleofection法を用いた。1.1で単離培養した皮質神経細胞を $5 \times 10^6$ 個用いた。Mouse Neuron Nucleofector solution 100  $\mu$ lに神経細胞を再懸濁し、更にプラスミドを2  $\mu$ g~3  $\mu$ g懸濁し、キューベットに入れ、電気穿孔を行なった後に、培養液中に播種した。4時間から16時間後に無血清培地に交換し、1, 2日培養した。

#### 1.3 RT-PCR法

microRNA-484のmature 配列を特異的に認識するとされるプライマーを用いた。サンプルは1.2で遺伝子導入した皮質神経細胞から、トリゾール試薬、RNeasy kitを用いてRNAを採取し、逆転写を行なった後に、上記のプライマーを用いてPCRを行い、PCR産物が50bpと大変小さいために、3.5%ゲルを用いて電気泳動し、バンドを確認した。

### 2 トランスジェニックマウス作製

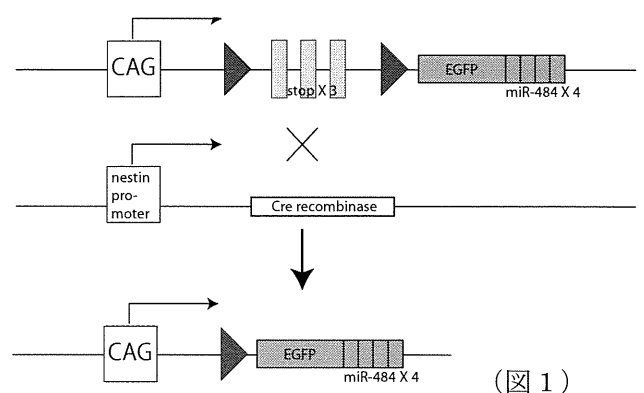
#### 2.1 条件特異的遺伝子改変マウスの作成(過剰発現)

子宮内胎児脳電気穿孔法によるin vivo機能解析スクリーニングにより、発達期の神経幹細胞の分化、細胞移動を制御する因子として、miR-484が見いだされた。現在そのターゲット分子を探索中であるが、一般的にマイクロRNAは、複数のターゲットmRNAを持つと考えられている。従って、胎生致死を避けるために、非特異的な初期胚からの過剰発現ではなく、条件特異的に過剰発現並びに、発現を低下させることが必要であると考えられる。そこで、Cre-loxpシステムを利用し、CAG promoter下に発現を誘導できるベクターを受精卵にインジェクションすることでトランスジェニックマウスを作成する。最終的には、nestin Cre

マウスとの交配により、神経幹細胞特異的miR-484過剰発現マウスを作成し、解剖学的検討を行う。特に、統合失調症モデル動物としては、脳体積の低下などが報告され(Neuron 2007 Clapcoteら)皮質の厚みや、神経細胞密度といった解剖学的な発現異常を検討する。

#### 2.2 条件特異的遺伝子改変マウスの作成(発現低下)

次に、内在性のmiR-484の発現を低下させるために、マイクロRNA吸着性GFP融合蛋白発現を行う。(Nat Biotech 2007 Nat Methods 2009 Genterら)この方法の優れているところは、複数の遺伝子座から発現するマイクロRNAであっても、全て吸着して、低下させることが可能であることである。また、トランスジェニックマウスを作成する方法と全く同等に簡便に作成することができるため、条件特異的ノックアウトマウスよりも優先して、作成すべきと考えられた(図1)。



### 3. 解剖学的解析法

#### 3.1 GFP免疫染色法によるCALSLシステムの確認

(図1)に示されるとおりstop配列をloxpで挟み込んでいるため、Creを発現させないと目的遺伝子の発現確認ができない。従って、Nestin-Creマウスと交配させることにより、脳内特異的にCALSLシステムが適切に働いているかを確認する。

具体的には、目的配列はGFPのmRNAと融合されているため、GFP蛋白が脳内で発現すると考えられる。

産まれてきたトランスジェニックマウスを、4% PFAで灌流固定し、30%スクロースにて凍結防止を行い、OCTコンパウンドに包埋し、組織を凍結した後、クライオスタットにて40  $\mu$ m厚に薄切し、凍結浮遊切片をスライドにのせ、GFPに対する免疫染色を行った。

#### 3.2 Nissl染色法

また、解剖学的に脳構造を解析するために、Nissl染色を行い、切片の写真をKEYENCE BD-9000にて取得し、写真を専用のソフトウェアを用いて連結した。

弱拡大の一枚の写真として層構造などを比較検討した。

#### 4. 行動学的解析法

##### 4.1 オープンフィールドテスト

解析装置は、小原医科産業株式会社製。40cm X 40cmのフィールドを、防音箱で取り囲み、フィールドの真上にカメラを設置し、全自動でマウスの動きをデータ化する。実験箱内部には特異点になるような障害物や突起などがない。また、光量は70ルクスに統一して実験を行った。

少なくとも直前の30分間は、70ルクスとなるような実験用の別の箱内で、マウスの状態を安定化させる。その後、被験体を実験箱の中央に置き、実験をスタートする。新規条件におびえている場合には壁際に滞在することが多く、アクティビティーが高いものでは中央部を行き来する。1試行は10分間行った。行動距離・平均速度・軌跡・リアリング(立ち上がり)・回転行動(右回り/左回り)・無動時間・中心部滞在割合を算出した。

#### 5. Luciferase assay

理論上は、たくさんのターゲット分子が同定されるが、動物種間の保存性が重要であると考えられたため、霊長類、齧歯類等の哺乳動物に共通して *in silico* でターゲットする遺伝子の 3'UTR 配列を取得した。特に、microRNA-484 は、下等生物には発現が認められず、霊長類や齧歯類のみにしか存在しないため、より脳が高等に発達した動物において発現する分子の発現制御に重要な役割を果たす可能性がある。従って、マウスのみには理論上ターゲットしない場合は、除外し、その遺伝子群の中で、ターゲットとしての可能性が高い(スコアが高い)ものから順番に20種類の遺伝子の3'UTR配列を luciferase assay 用発現ベクターにクローニングし、miR484 の過剰発現下において、luciferase 活性が低下するものを探りスクリーニングした。

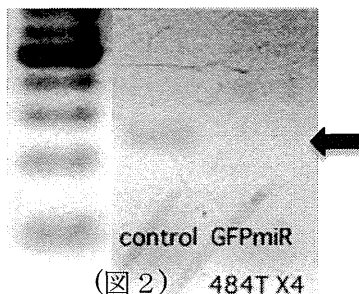
### C. 研究結果

#### 1. トランスジェニックマウス作製

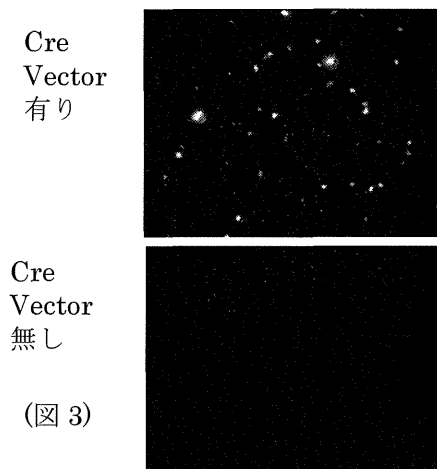
(図1)で示されるとおり、Cre-Loxp システムが *in vivo* において有効に働くことを確認するために、まず GFP と共に発現させることができる、発現低下遺伝子改変マウスを作成することを優先して行った。

(図2)で示されるとおり、胎生15日齢のマウスの皮質より単離培養した皮質神経細胞に、nucleofector を用いて遺伝子導入を行い、コントロールベクターと GFPmiR484T X4 発現ベクターをそれぞれ過剰発現した。皮質神経細胞には microRNA-484 が発現していることから、1レーン目で確認されるとおり、microRNA-484 の PCR バンドが 40bp ~ 6

0bpの間にはっきりと認められるが、一方、miR-484 を吸着させることが期待される(Nat Biotech 2007 Nat Methods 2009 Genter ら) GFP-miR484TX4 を発現させることにより、miR-484 の PCR バンドが消失していることが確認されている。このことにより、この発現プラスミドを脳内で過剰発現することにより、miR-484 の発現を条件特異的に低下させることができると考え、この発現ベクターを用いてまずトランスジェニックマウスを作成した。

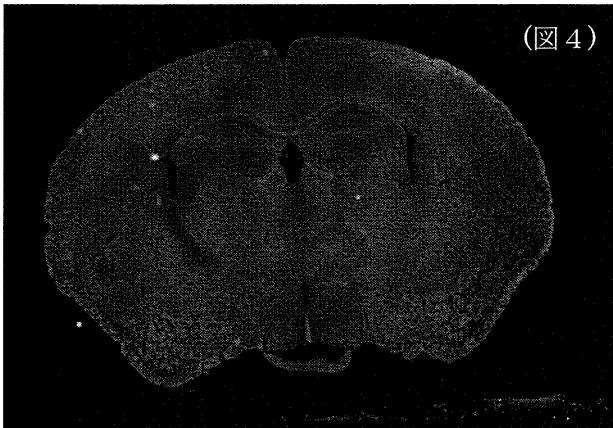


また、図3に示されるとおり、皮質神経細胞に Cre ベクターの遺伝子導入の有り無しにより、GFP の発現が明瞭にコントロールされていることが確認されている。



2. In vivo における CALSL システムの正常な作動の確認

Nes-Cre +/+::CALSL GFP484TX4 Tg/+  
シングルトランスジェニック



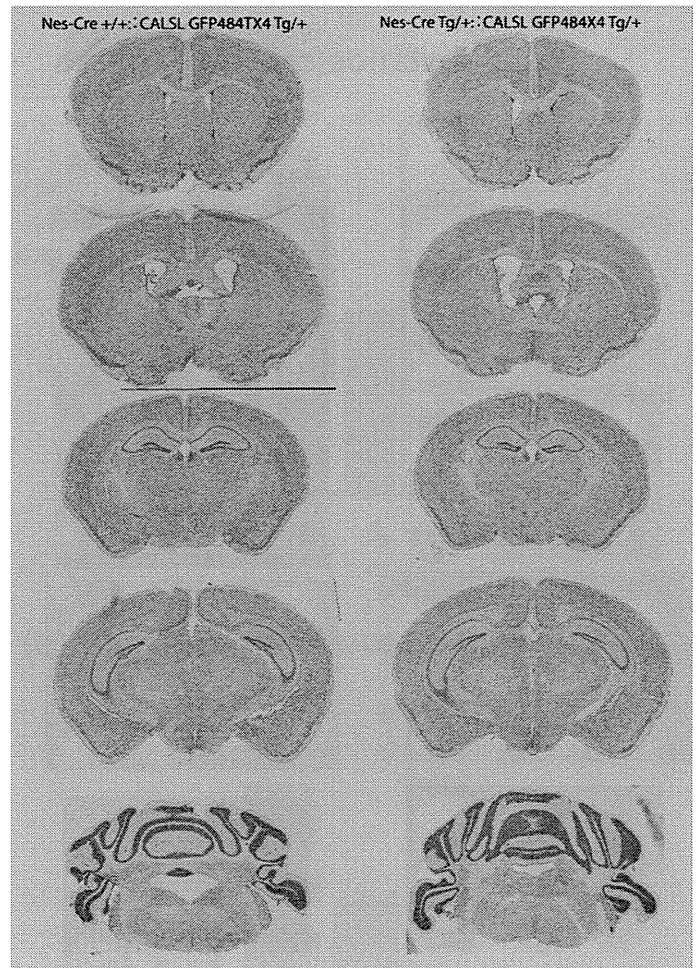
Nes-Cre Tg/+::CALSL GFP484X4 Tg/+  
ダブルトランスジェニック



In vitro 実験により確認されたベクターを大阪大学微生物病研究所発生工学研究会との共同研究により、C57BL6/NCr マウスの受精卵にインジェクションを行った。PCR 法によりトランスジーン の伝播を確認後、交配可能年齢になったことから、Nestin-Cre マウス (Tg/+ hemizygote) と交配させ、生後 1 カ月 齢のマウスを得た。4%PFA で灌流固定後、クライ オスタットにて薄切し、GFP に対する抗体により免 疫染色を行った。

(図 4) で示されるとおり、Nestin-Cre マウスとの ダブルトランスジェニックマウスの脳内においてのみ、GFP(緑色)が発現しており、特に Nestin の発現 が高い、神経幹細胞が豊富に存在する、脳室下帯領 域 (Subventricular Zone) および、顆粒細胞下帯領 域(Subgranular Zone)に GFP の発現が高く認めら れた。ただ、発達期から GFP が持続的に発現してい ると考えられ、強拡大では、皮質の神経細胞に GFP の発現は認められる。

D. 解剖学的解析 (Nissl 染色)



次に、Nissl 染色を用いて、解剖学的に解析を行った。

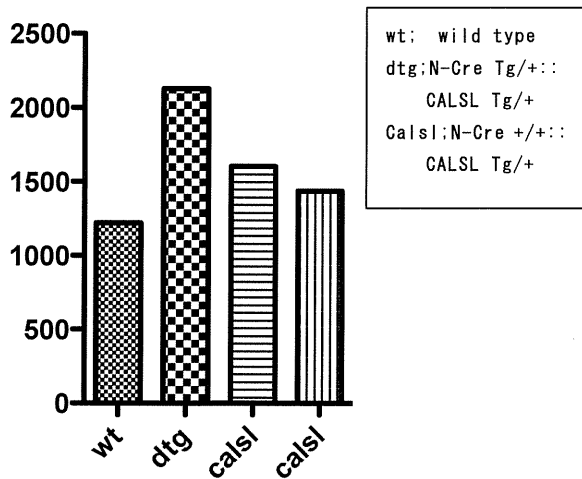
生後 1 カ月の時点での、

1. 皮質の層構造
2. 皮質の厚み, 細胞密度
3. 海馬の構造
4. 小脳の構造
5. 脳梁の厚み
6. 脳室の大きさ

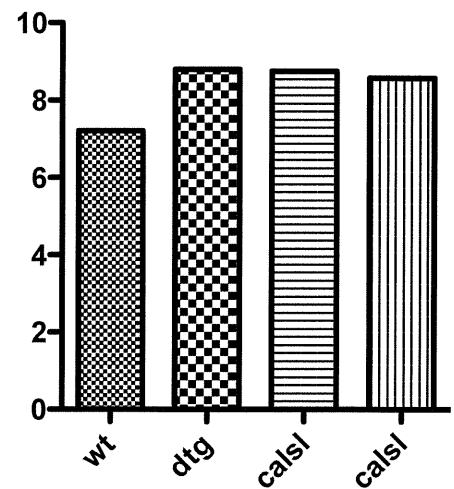
などに大きな変化は確認されなかった

E. 行動学的検査(オープンフィールドテスト)

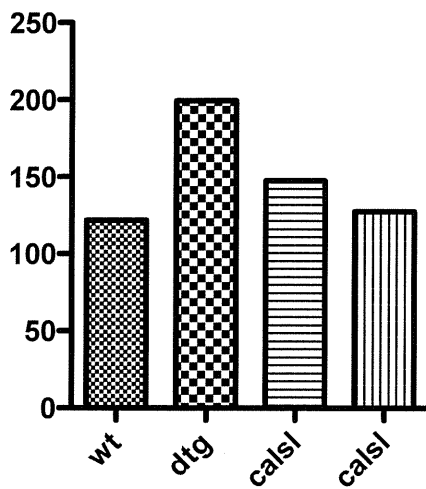
total distance(cm) for 10 mins



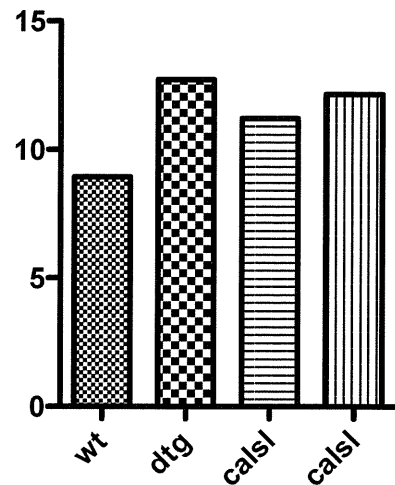
moving speed(cm/s)



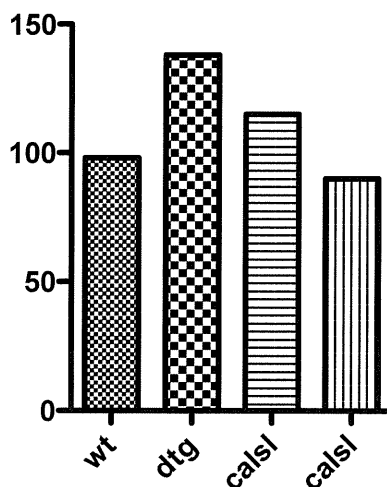
total movement duration(s)



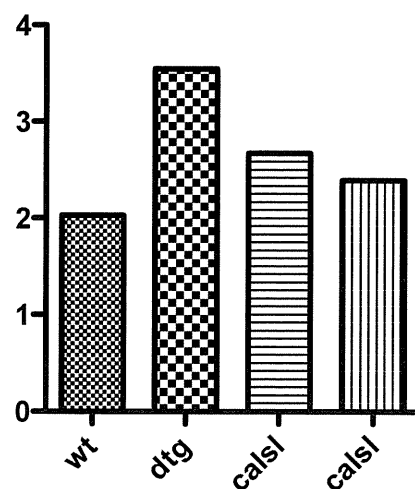
Distance Per Movement(cm)



Total movement episode No.

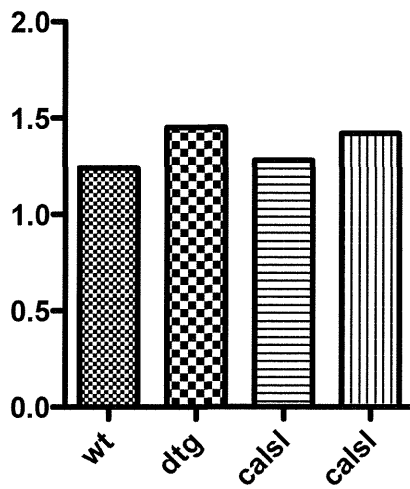


Average Speed(cm/s)

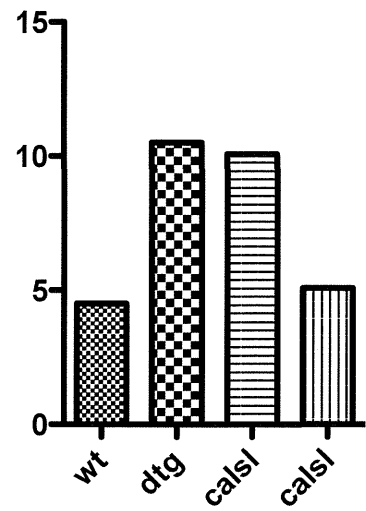




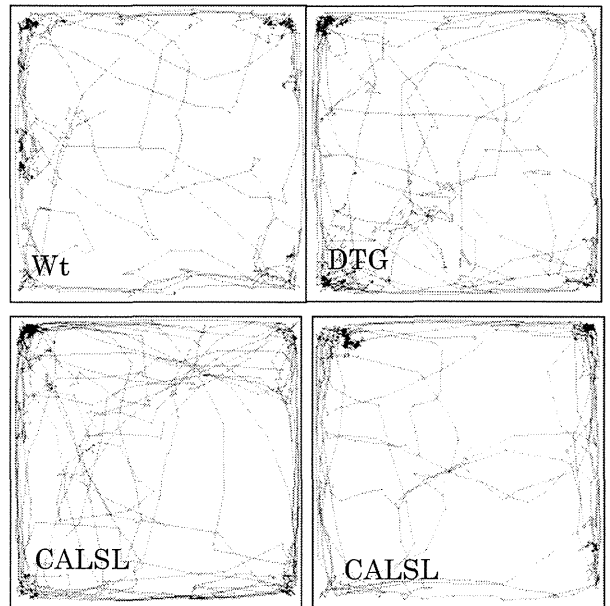
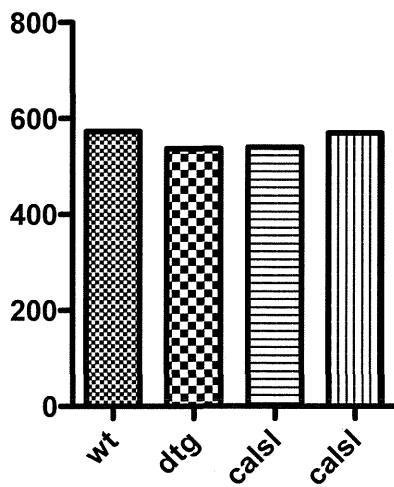
**Duration Per Movement(s)**



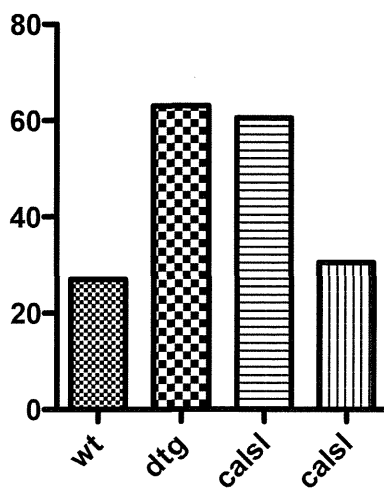
**Center Region(%)**



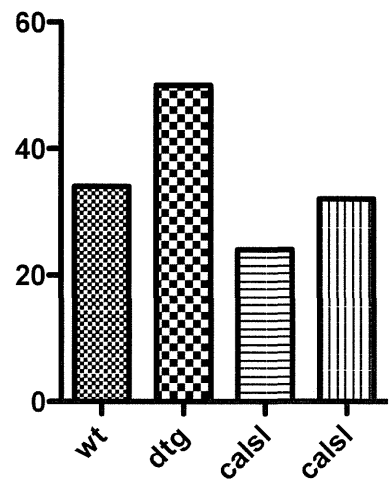
**Wall Side Time(s)**



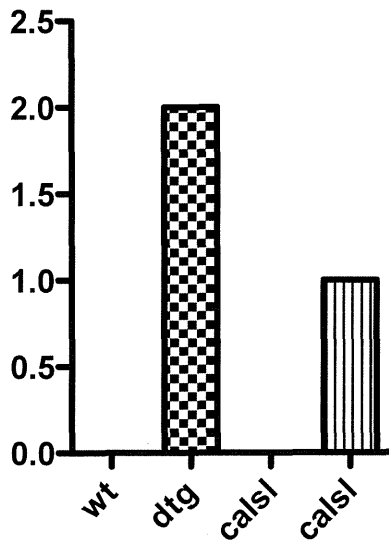
**Center Region Time(s)**



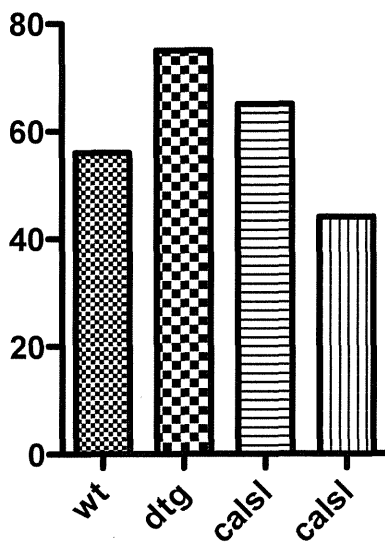
**total rearing number**



## total circling number



## total episode number

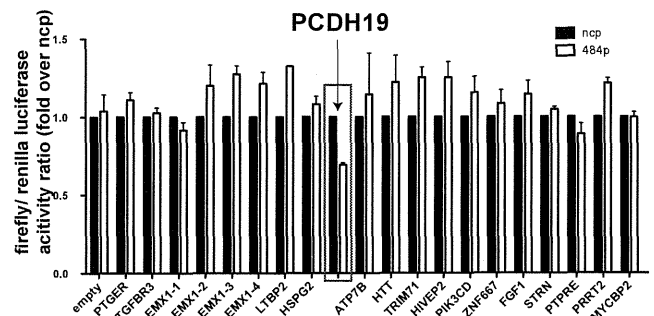


## F. ターゲット分子の探索

また、一方で、microRNA-484 のターゲット分子を探索した。Target scan ソフトウェアを用い、microRNA484 のターゲットと推測される遺伝子の 3'UTR 領域の遺伝子配列を検索した。

EMX1	NM_004097	empty spiracles homerbox 1
PGBD5	NM_024554	piggyBac transposable element derived 5
DCP1A	NM_018403	DCP1 decapping enzyme homolog A (S. cerevisiae)
ADD2	NM_001185054	adducin 2 (beta)
RNF14	NM_001201365	ring finger protein 14
STRN	NM_003162	stratin, calmodulin binding protein
ACVR1B	NM_004302	activin A receptor, type IB
MYCBP2	NM_015057	MYC binding protein 2
FOXO4	NM_001170931	forkhead box O4
TGFBR3	NM_001195683	transforming growth factor, beta receptor III
ZWILGH	NM_017975	Zwisch, kinetochore associated, homolog (Drosophila)
HTT	NM_002111	huntingtin
PTGER4	NM_000958	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)
HVEP2	NM_006734	human immunodeficiency virus type 1 enhancer binding protein 2
FGF1	NM_000900	fibroblast growth factor 1 (acktic)
FCRL5	NM_001195388	Fc receptor-like 5
PCDH19	NM_001105243	protocadherin 19
DISP2	NM_003519	dispatched homolog 2 (Drosophila)
PI4KB	NM_001198773	phosphatidylinositol 4 kinase, catalytic, beta
BTG4	NM_017589	B-cell translocation gene 4

理論上は、上記のように、たくさんのターゲット分子が同定されるが、動物種間の保存性が重要であると考えられたため、霊長類、齧歯類等の哺乳動物に共通して *in silico* でターゲットする遺伝子の 3'UTR 配列を取得した。特に、microRNA-484 は、下等生物には発現が認められず、霊長類や齧歯類のみにしか存在しないため、より脳が高等に発達した動物において発現する分子の発現制御に重要な役割を果たす可能性がある。従って、マウスのみには理論上ターゲットしない場合は、除外し、その遺伝子群の中で、ターゲットとしての可能性が高い（スコアが高い）ものから順番に 20 種類の遺伝子の 3'UTR 配列を luciferase assay 用発現ベクターにクローニングし、miR484 の過剰発現下において、luciferase 活性が低下するものをスクリーニングした。下記に示すとおり、PCDH19 が miR-484 のターゲットとして同定された。



これらのことにより、miR-484 は PCDH19 を制御することで皮質神経幹細胞（前駆細胞）の増殖及び分化を制御すると考えられた。（左図）

## D. 考察 及び 結論

### 1. Tg マウスについて

CALSL システムは、GFP の発現から明確なように、Cre recombinase の存在下で *in vivo* においても問題なく作動することが分かった。今後は、miR484 の発現に関して、より若い発達期における脳サンプルから、RNA を採取し、microRNA-484 の発現低下について確認を取る。

### 2. 解剖学的解析について

現時点では、明らかな解剖学的な差異は認められなかった。

#### 3. 皮質の層構造

#### 4. 皮質の厚み, 細胞密度

#### 4. 海馬の構造

#### 7. 小脳の構造

#### 8. 脳梁の厚み

#### 9. 脳室の大きさ

等に関して検討を行ったが、大きな異常を認めなかった。今後は、詳細な免疫染色法等によりまた、個体数を増やして検討を行う必要があると考えられた。

### 3. 行動学的検査

準備できた個体数が1匹ずつのため、あくまでも、予備的検討の域は出ない。しかし、この予備検討から興味深い結果が得られた。

生後1カ月齢の雄マウスを用いて、オープンフィールドテストを行ったところ、10分間の **total distance**, **total movement duration**, **total movement episode**, **rearing**(立ち上がり動作)の数、回転運動の数などの指標において、軒並み活動性が高いという結果が得られた。また、新規環境における不安の指標である、**center region time**, **center region(%)**には、コントロールマウスと変化を認めない。

このことにより、1カ月齢のダブルトランスジェニックマウスが不安傾向を見せずに、多動傾向を示している可能性がある。今後は、個体数を増加させることが必要である。

また、アンフェタミン投与によりこれらの活動性の上昇が低下するかどうかを検討し、AD/HD マウスモデルとして確立できるか、検討を行う。

(補足) PCDH19 について。

プロトカドヘリン19遺伝子は、先行論文にて報告されているとおり(Nature Genetics 2008) X染色体上にあり、その遺伝子変異により、女性にほぼ限局した、精神発達遅滞をしばしば伴う、てんかんを引き起こすことが分かっている、発達障害に関わりの深い遺伝子である。プロトカドヘリン19蛋白の機能は、いまだに不明であるが、その蛋白ドメインの構造から、カドヘリン・スーパーファミリーの一員であり、細胞-細胞接着に関与し、神経細胞の細胞移動など多彩な機能が推定される分子である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- “Improvement in protocol to generate homogeneous glutamatergic neurons from mouse embryonic stem cells reduced apoptosis.”

Ryosuke Fujiki,  
Akinobu Sato,  
Katsuhiko Hata,  
Fumi Tashiro,  
Noriko Yasuhara,  
Jun-ichi Miyazaki,  
Yoshihiro Yoneda,  
\* Masashi Fujitani,  
\* Toshihide Yamashita  
(\*: Co-Corresponding Authors)

### 2. 学会発表

1. 平成24年度CREST領域ミーティング  
「miR-484は神経幹細胞の分化・維持を制御する。」  
2015年3月13日  
○藤谷昌司、張素香、山下俊英
2. ISSCR(第10回国際幹細胞学会)  
「MINP REGULATES RADIAL MIGRATION RATE IN THE DEVELOPING NEOCORTEX」  
2012年6月13日~6月16日  
○Suxiang Zhang,  
Masashi Fujitani,  
Yamashita Toshihide

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

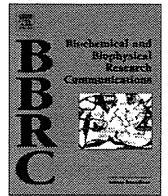
研究成果の刊行に関する一覧表

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
藤谷昌司、 原口清輝、 中川原章	第 8 章 第 3 節 神経芽腫	中村卓郎	疾患モデルの 作成と利用- がん	LEC	日本	2012	P626-63

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
Ryosuke Fujiki, Akinobu Sato, Katsuhiko Hata, Fumi Tashiro, Noriko Yasuhara, Jun-ichi Miyazaki, Yoshihiro Yoneda, Masashi Fujitani, Toshihide Yamashita	Improvement in protocol to generate homogeneous glutamatergic neurons from mouse embryonic stem cells reduced apoptosis	BBRC	430(2):	604-9	2013



## Improvement in protocol to generate homogeneous glutamatergic neurons from mouse embryonic stem cells reduced apoptosis

Ryosuke Fujiki<sup>a,b</sup>, Akinobu Sato<sup>a,b</sup>, Katsuhiko Hata<sup>a,b</sup>, Fumi Tashiro<sup>c</sup>, Noriko Yasuhara<sup>d</sup>, Jun-ichi Miyazaki<sup>c</sup>, Yoshihiro Yoneda<sup>d</sup>, Masashi Fujitani<sup>a,b,\*</sup>, Toshihide Yamashita<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Molecular Neuroscience, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

<sup>b</sup> JST, CREST, 5, Sanbancho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0075, Japan

<sup>c</sup> Division of Stem Cell Regulation Research, G6, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

<sup>d</sup> Biochemistry, Medical School, Osaka University, 1-3 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 November 2012

Available online 5 December 2012

#### Keywords:

ES-derived glutamatergic neuron

Neural progenitor cell

Survival

BDNF

bFGF

### ABSTRACT

Obtaining a homogenous population of central nervous system neurons has been a significant challenge in neuroscience research; however, a recent study established a retinoic acid-treated embryoid bodies-based differentiation protocol that permits the effective generation of highly homogeneous glutamatergic cortical pyramidal neurons from embryonic stem cells. We were able to reproduce this protocol regarding the purity of glutamatergic neurons, but these neurons were not sufficiently healthy for long-term observation under the same conditions that were originally described. Here, we achieved a substantial improvement in cell survival by applying a simple technique: We changed the medium for glutamatergic neurons from the original complete medium to commercially available SBM (the Nerve-Cell Culture Medium manufactured by Sumitomo Bakelite Co. Ltd.) and finally succeeded in maintaining healthy neurons for at least 3 weeks without decreasing their purity. Because SBM contains glial conditioned medium, we postulated that brain-derived neurotrophic factor or basic fibroblast growth factor is the key components responsible for pro-survival effect of SBM on neurons, and examined their effects by adding them to CM. As a result, neither of them had pro-survival effect on pure glutamatergic neuronal population.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

A significant problem in neuroscience had been the lack of relevant culture system that allows unlimited generation of defined populations of post-mitotic, process-bearing central nervous system (CNS) neurons. Embryonic stem (ES) cells [1,2] have created the possibility of generating infinite numbers of any types of CNS neurons, and several protocols have been developed for differentiation of ES cells into neurons [3,4]. However, neuronal cultures derived from ES cells contain a variety of neuronal subtypes as well as

neural precursor cells (NPCs) and non-neural cells, including glial cells.

Recent advances in culture techniques have overcome this issue. Bibel and co-workers revealed that their retinoic acid-treated embryoid bodies based protocol permits generation of a homogeneous population of glutamatergic cortical pyramidal neurons from ES cells [5,6]. The purity of this population reaches 90–95%, which is the highest for differentiation of glutamatergic neurons ever reported [7,8]. In our hands, this protocol was highly reproducible regarding the purity of ES cell-derived glutamatergic neurons, but these neurons did not survive longer than 2 weeks under the same conditions that were originally described [6]. In addition, we found that low-density culture of neurons resulted in low survival rate, but in order to assess axonal properties, synaptic transmission, and dendritic arborization of glutamatergic neurons, long-term low-density culture is required. Therefore, it is necessary to improve survival of these ES-derived neurons.

Here, we made a substantial improvement in cell survival by using a simple technique: We changed the medium for glutamatergic neurons from the original medium (complete medium, CM) to a commercially available medium (the Nerve-Cell Culture Medium from Sumitomo Bakelite Co. Ltd., SBM) and finally succeeded in

**Abbreviations:** CNS, central nervous system; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; ES cell, embryonic stem cell; NPC, neural progenitor cell; CA, cellular aggregate; N<sub>2</sub>M, N<sub>2</sub> medium; CM, complete medium; SBM, the Nerve-Cell Culture Medium from Sumitomo Bakelite Co. Ltd.; ICC, immunocytochemistry; TuJ1, neuronal class III  $\beta$ -tubulin; VGLUT1, vesicular glutamate transporter 1; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; PBS, phosphate-buffered saline.

\* Corresponding authors at: Department of Molecular Neuroscience, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. Fax: +81 6 6879 3669.

E-mail addresses: [masashi.fujitani@molneu.med.osaka-u.ac.jp](mailto:masashi.fujitani@molneu.med.osaka-u.ac.jp) (M. Fujitani), [yamashita@molneu.med.osaka-u.ac.jp](mailto:yamashita@molneu.med.osaka-u.ac.jp) (T. Yamashita).

keeping neurons healthy for at least 3 weeks without decreasing their purity below 98%.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Antibodies and reagents

The following reagents were used for culture of glutamatergic neurons: the Nerve-Cell Culture Medium (SBM, Sumitomo Bakelite Co. Ltd., Tokyo, Japan), recombinant human brain-derived neurotrophic factor (BDNF, Pepro Tech Inc., Rocky Hill, NJ, USA), and recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF, BD Bioscience, Bedford, MA, USA). All other reagents have been described previously [5,6]. For immunocytochemistry, the following antibodies were used: mouse monoclonal antibody to neuronal class III  $\beta$ -tubulin (Tuj1, 1:1000; Covance Laboratories, Inc., Berkeley, CA, USA); rabbit polyclonal antibodies to vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1, 1:1000, Synaptic System, Goettingen, Germany), and cleaved caspase-3 (1:200, Cell Signaling Technology, USA). Fluorescent Mounting Medium was purchased from DakoCytomation Inc., (USA). We used the following fluorescence-conjugated secondary antibodies: Alexa Fluor 488- or 568-conjugated goat anti-mouse IgG and goat anti-rabbit IgG (1:400, Invitrogen, USA).

### 2.2. Cell culture

The ES cell line we selected was E14TG2a (CRL-1821, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). ES-cell derived glutamatergic neurons were differentiated as previously described [5,6], until the stage where NPCs differentiated into neurons. We adjusted the CO<sub>2</sub> content in the incubators to maintain the pH of each culture medium at about 7.4, which made cells a little healthier. Specifically, we used the following conditions: ES cells in ES medium, cellular aggregates (CAs) in CA medium, neurons in complete medium (CM) with 10% CO<sub>2</sub>, NPCs in N<sub>2</sub> medium (N<sub>2</sub>M) with 7% CO<sub>2</sub>, and neurons in SBM with 5% CO<sub>2</sub>. The temperature of the incubators was kept constant at 37 °C.

We always once froze all of dissociated CAs, which were NPCs, and started all of our experiments from NPCs by thawing and plating them as originally described [5,6]. We plated the NPCs on glass coverslips in 24-well plates at a density of  $0.45 \times 10^6$  cells/well in all experiments, except to examine the purity of glutamatergic neurons, where we plated them at a density of  $0.9 \times 10^6$  cells/well. Glass coverslips were double coated with poly-dl-ornithine and laminin before use as originally described [6]. After culturing of NPCs in N<sub>2</sub>M for 2 days, we changed the medium to either CM, as used originally, or to SBM. The time schedule for treating cells either with CM or SBM and fixing treated cells for immunocytochemistry (ICC) is described in Fig. 1a. Because SBM consists of glial conditioned medium and might contain BDNF and bFGF, and CM does not, we hypothesized that these factors were responsible for the improved growth of cells in SBM. To test this hypothesis, we added BDNF and bFGF to CM and measured the effect on longevity and purity. The time schedule for treating cells with BDNF or bFGF and fixing the cells for ICC is described in Figs. 2a and 3a. We tested most of our cells for the presence of mycoplasma as originally recommended [6].

### 2.3. Immunocytochemistry and nuclear staining

Cells cultured on glass coverslips in 24-well plates were washed with phosphate-buffered saline (PBS). After transferring coverslips in new 24-well plates, we fixed cells with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (Wako Pure Chemical Industries, Japan) for

10 min. Cells were washed with PBS and incubated for 10 min in permeabilizing solution (PBS containing 0.2% Triton X). After three washes with PBS, cells were incubated for 1 h in blocking solution (PBS containing 5% bovine serum albumin and 0.05% Tween). Subsequently, cells were incubated with primary antibodies for 1 h at room temperature or overnight at 4 °C. After three washes with PBS, cells were incubated with fluorescence-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature or overnight at 4 °C. After three washes with PBS, nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (Invitrogen) or 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Dojindo, Japan). Coverslips were then rinsed three times with PBS and mounted on glass slides. The samples were viewed under an inverted light microscope equipped with epifluorescence and dry condenser for phase-contrast microscopy (DP70, Olympus, Tokyo, Japan) using a 10 $\times$  objective.

### 2.4. Detection of apoptosis

Hallmarks of apoptotic cell death include activation (cleavage) of caspases, condensation and fragmentation of nuclei, and formation of apoptotic bodies. We investigated caspase-3 activation by using ICC and examined extensive chromatin condensation and nuclear fragmentation using Hoechst staining. Neurons were analyzed for immunofluorescent labeling for neuronal marker Tuj1 (green) and for apoptotic marker cleaved caspase-3 (red), and nuclei were counterstained with Hoechst 33342 or DAPI (blue). We obtained 4 representative images per well randomly under the microscope with a 10 $\times$  objective, and counted all of the cells in those images for one experiment. We quantified the percentage of cleaved caspase-3-positive neurons (cleaved caspase-3<sup>+</sup> cells per all Tuj1<sup>+</sup> neurons) in each culture. More than 1500 cells were counted in each of three separate independent experiments to quantify cleaved caspase-3-positive cells.

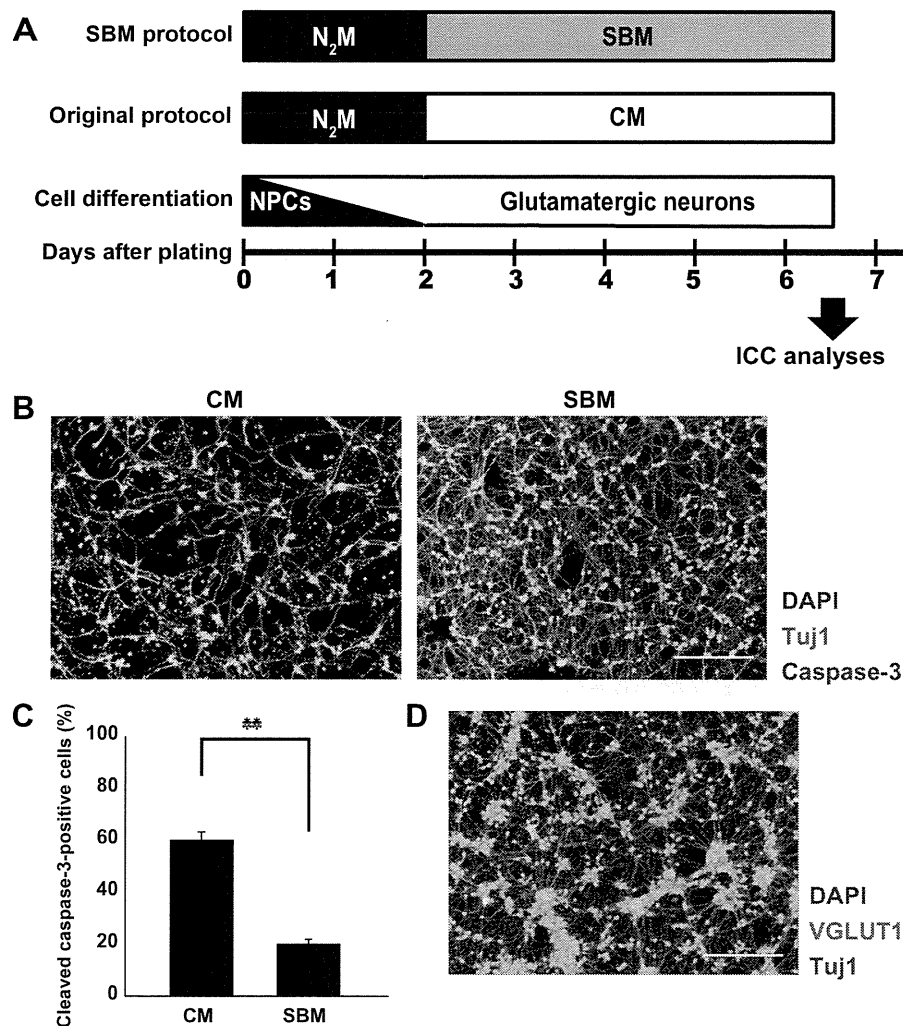
### 2.5. Statistical analysis

The quantitative data are expressed as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Statistical analysis of these values was performed using Student's *t* test. Values of *P* < 0.05 were considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. SBM remarkably prolonged the survival of ES cell-derived glutamatergic neurons without decreasing their purity

Bibel and co-workers recently established a differentiation protocol that generates highly homogeneous glutamatergic cortical neurons from ES cells [5,6]. This protocol was highly reproducible regarding the purity of ES cell-derived glutamatergic neurons in our hands, but these neurons did not survive longer than 2 weeks under the same conditions that were originally described [6]. We quantified apoptotic neurons by investigating caspase-3 activation by using ICC and found that 60% of the neurons underwent apoptosis within 6 d after plating (Fig. 1b, left). These apoptotic cleaved caspase-3-positive neurons also showed other hallmarks of apoptosis, including extensive chromatin condensation and nuclear fragmentation, as assessed by Hoechst staining (data not shown). In order to improve neuronal survival, we modified this protocol by changing the medium for glutamatergic neurons from CM to SBM 48 h after plating (SBM protocol, Fig. 1a). We continued to culture neurons in CM or SBM for 4 d and then examined caspase-3 activation by using ICC. SBM significantly decreased the percentage of cleaved caspase-3-positive cells from 60% to 20% (Fig. 1b and c); in addition, we verified that neurons remained healthy for at least



**Fig. 1.** SBM remarkably prolonged the survival of ES cell-derived glutamatergic neurons without decreasing their purity. Glutamatergic neurons were cultured in CM (original protocol) or SBM (modified protocol) from 48 h after plating, followed by investigation of caspase-3 activation by using ICC 4 d later. (A) Schematic illustration of SBM protocol. Scheme shows the part that we modified in the original protocol and how NPCs differentiate into glutamatergic neurons. (B) Representative images of neurons 6 d after plating, cultured in CM (left) or SBM (right). Neurons were analyzed for immunofluorescent labeling with the neuronal marker Tuj1 (green) and apoptosis marker cleaved caspase-3 (red). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 200  $\mu$ m. (C) Quantification of the percentage of cleaved caspase-3-positive neurons (cleaved caspase-3<sup>+</sup> cells per all Tuj1<sup>+</sup> neurons) 6 d after plating, cultured in CM or SBM. We obtained four representative images, and counted all of the cells in those images (more than 1500 cells) for one experiment. Note that SBM significantly decreased the percentage of cleaved caspase-3-positive cells from 60% to 20%. Values represent the mean  $\pm$  SEM of three separate experiments. \*\**P* < 0.05 by Student's *t* test. (D) A representative image of neurons 7 d after plating, cultured in SBM. Note that over 98% neurons are VGLUT1-positive. Neurons were analyzed for Tuj1 (red) and for glutamatergic neuron marker VGLUT1 (green). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 200  $\mu$ m.

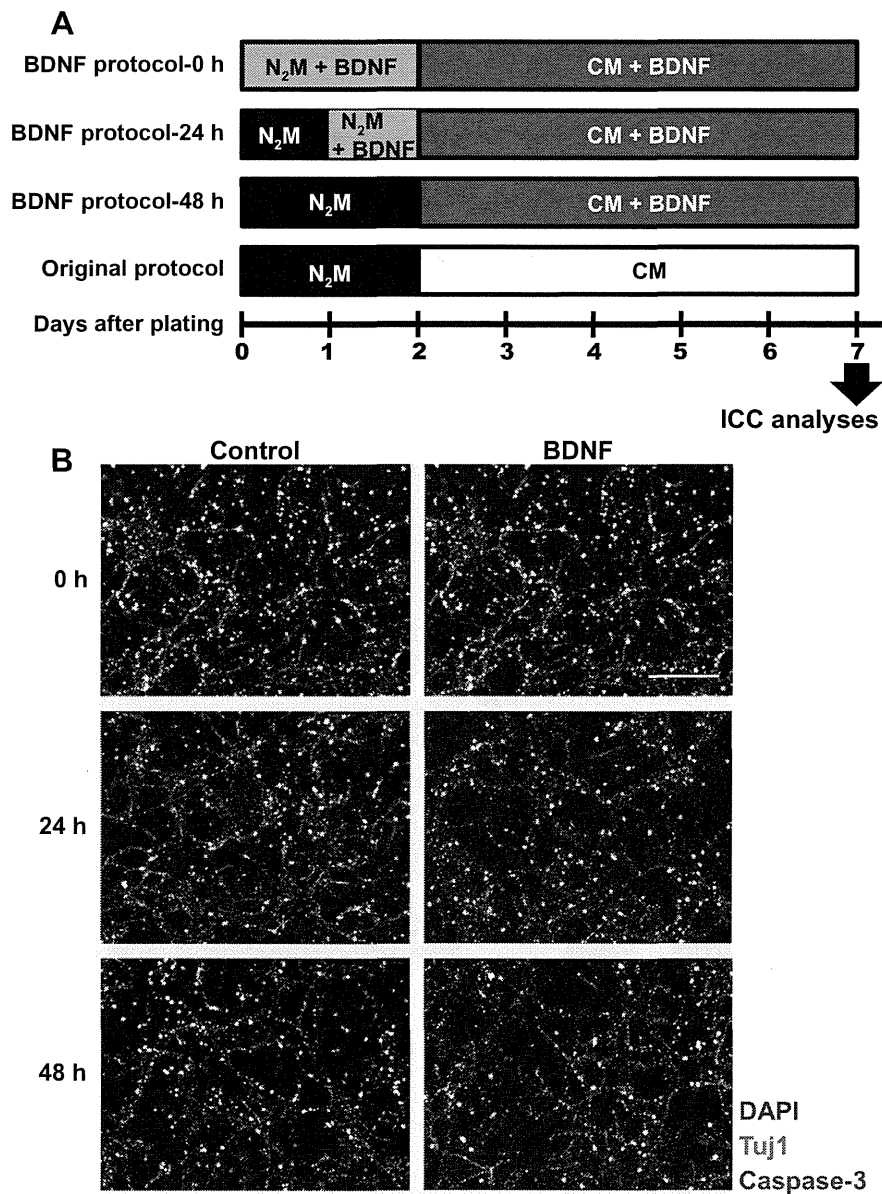
3 weeks. SBM contains glial conditioned medium, which might increase the number of non-neural cells. To confirm the purity of cultures grown in SBM, we measured the percentage of cells positive for the glutamatergic neuronal marker VGLUT1 by using ICC 7 d after plating. The purity of our ES cell-derived glutamatergic neurons was more than 98%, higher even than the purity of cultures grown in CM (90–95%) [5,6] (Fig. 1d).

### 3.2. Neither BDNF nor bFGF are responsible for the pro-survival effect of SBM on ES-glutamatergic neurons

SBM consists of glial conditioned medium which might contain both BDNF and bFGF. We postulated that BDNF, which is a potent neurotrophic factor secreted from astrocytes, is responsible for the pro-survival effect of SBM on glutamatergic neurons [9,10]. To test this hypothesis, we added BDNF (1, 10, 50, or 100 ng/ml) in N<sub>2</sub>M and CM just after plating and investigated caspase-3 activation 7 d later (Fig. 2a, BDNF protocol-0 h). Compared to the control, BDNF demonstrated no pro-survival effect on neurons (Fig. 2b,

upper panels). To optimize the timing of BDNF treatment, we added 50 ng/ml BDNF in N<sub>2</sub>M and CM or only in CM 24 or 48 h after plating, respectively, and investigated caspase-3 activation 7 d after plating (Fig. 2a, BDNF protocol -24 and -48 h). The BDNF protocol again had no pro-survival effect on neurons (Fig. 2b, middle and lower panels).

In order to enhance the survival of NPCs and neurons, we also added bFGF (1.3, 13.3, 133.3 ng/ml, or 1.3  $\mu$ g/ml) [11–13] in N<sub>2</sub>M and CM just after plating and investigated caspase-3 activation 6 d later (Fig. 3a, bFGF protocol-0 h). Compared to the control, despite remarkable dose-dependent induction of proliferation of non-neuronal glial-like cells, bFGF showed no pro-survival effect on neurons (Fig. 3b). In our culture system, almost all cells are NPCs of glutamatergic neurons just after thawing and plating and they are designed to differentiate into glutamatergic neurons within less than 48 h (Fig. 1a). To reduce proliferation of non-neuronal glial-like cells, we waited for 48 h for programmed differentiation of NPCs into neurons, and then, we added bFGF (2, 10, 100 ng/ml, or 1  $\mu$ g/ml) in CM 48 h after plating and investigated caspase-3



**Fig. 2.** BDNF showed no pro-survival effect on ES cell-derived glutamatergic neurons regardless of timing of addition to the medium. Glutamatergic neurons were cultured in N<sub>2</sub>M and CM, which were added BDNF (1, 10, 50, or 100 ng/ml) just after plating, followed by investigation of caspase-3 activation by using ICC 7 d later. Cells were also cultured in N<sub>2</sub>M and CM or only in CM, which were or was added 50 ng/ml BDNF 24 or 48 h after plating, respectively, followed by investigation of caspase-3 activation by using ICC 7 d after plating. (A) Schematic illustration of BDNF protocols. Scheme shows how we added BDNF into the medium. (B) Representative images of neurons 7 d after plating, treated with control (left) or BDNF (right). Cells were treated at 0 (upper panels), 24 (middle panels), or 48 h (lower panels) after plating. The representative image of neurons treated with 100 ng/ml BDNF is shown as that of BDNF protocol-0 h. Note that BDNF showed no pro-survival effects on neurons. Neurons were analyzed for immunofluorescent labeling of Tuj1 (green) and cleaved caspase-3 (red). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 200  $\mu$ m.

activation 5 d later (Fig. 3a, bFGF protocol-48 h). Compared to the control, although induction of proliferation of non-neuronal glial-like cells was remarkably down-regulated, bFGF showed no pro-survival effect on neurons (Fig. 3c).

These results indicate that the main player in the pro-survival effect of SBM on ES-glutamatergic neurons was neither BDNF nor bFGF.

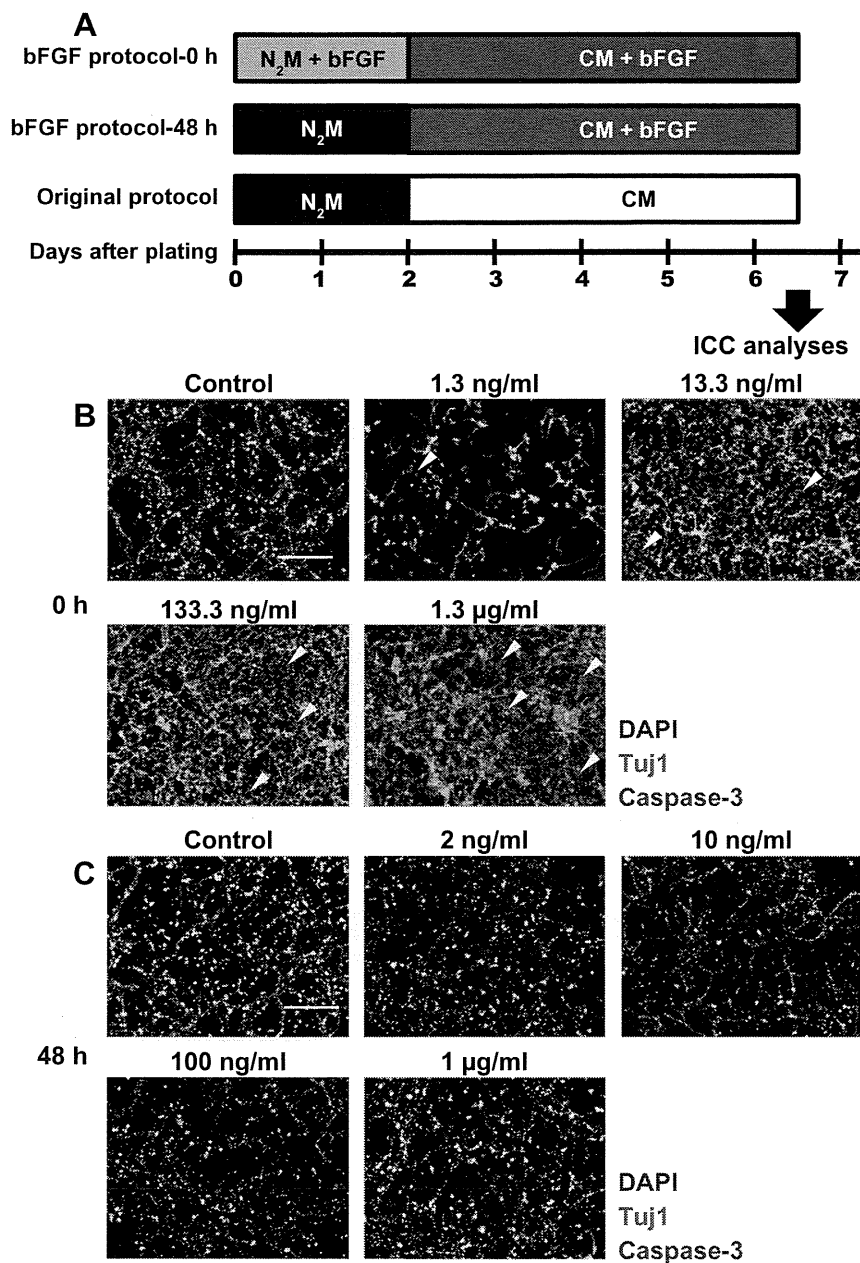
#### 4. Discussion

Bibel et al. recently established a sophisticated protocol in which a homogeneous population of glutamatergic cortical pyramidal neurons can be obtained by inducing differentiation from ES cells [5,6], but these neurons did not survive longer than 2 weeks under the original condition unlike regular mixed cortical

neuronal culture. In the present study, we made a substantial improvement in the original protocol. Our study revealed that changing the medium for glutamatergic neurons from the originally designated CM to commercially available SBM could robustly prolong the survival of glutamatergic neurons without decreasing their purity. Although we postulated BDNF [9,10] and bFGF [11–13] as the main players of the pro-survival effect of SBM on neurons, neither factor generated a pro-survival effect on neurons when it was added to CM, regardless of the timing. It is possible that a combination of BDNF and bFGF could have an additive effect [14], but the fact that each one on its own did not alter survival rate suggests that neither of them is a main player.

Considering the short survival of neurons in our system, we performed some recommended troubleshooting, including testing all of our cells for mycoplasma infection, which can influence





**Fig. 3.** bFGF showed no pro-survival effect on ES cell-derived glutamatergic neurons regardless of timing of addition to the medium. Glutamatergic neurons were cultured in  $N_2M$  and CM, which were added bFGF (1.3, 13.3, 133.3 ng/ml, or 1.3  $\mu$ g/ml) just after plating, followed by investigation of caspase-3 activation by using ICC 6 d later. Cells were also cultured in CM which was added bFGF (2, 10, 100 ng/ml, or 1  $\mu$ g/ml) 48 h after plating, followed by investigation of caspase-3 activation by using ICC 5 d later. (A) Schematic illustration of bFGF protocols. Scheme shows how we added bFGF into the medium. (B) Representative images of neurons treated with control or bFGF for 6 d from just after plating. Despite remarkable dose-dependent induction of proliferation of non-neuronal glial-like cells, bFGF showed no pro-survival effect on neurons. (C) Representative images of neurons treated with control or bFGF for 5 d from 48 h after plating. Although induction of proliferation of non-neuronal glial-like cells was remarkably low, bFGF showed no pro-survival effect on neurons. In (B) and (C), neurons were analyzed for immunofluorescent labeling of Tuj1 (green) and cleaved caspase-3 (red). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Non-neuronal cells are DAPI<sup>+</sup> Tuj1<sup>-</sup> glial-like cells indicated by white arrowheads. Scale bar: 200  $\mu$ m.

differentiation [6]. We also made several minor modifications that were not originally described but were better for neuronal survival, such as altering the  $CO_2$  content in the incubators to maintain the pH at 7.4. Another possible issue might be the difference in genetic background between our ES cell line, E14TG2, and the cell lines used in the original protocol [6]; however, E14TG2 is one of the established ES cell lines for general usage. Therefore, we conclude that homogeneity of neurons could be a biological cause of glutamatergic neuronal death.

Neurotrophic factors are released from several possible sources, including target tissues, neuronal networks, neurons themselves (autocrine), glial cells, blood vessels, and other organs within the

hormonal network. Our results show that neurotrophic factors from glia are the most powerful pro-survival factors for homogeneous populations of glutamatergic neurons and neither BDNF nor FGF showed a pro-survival effect against them. Another possible cause of death is that toxic factors released from the glutamatergic neurons themselves such as glutamate actually kill the cells. Regarding regular cortical neuronal culture, which is established without astrocytes, mixed neuronal culture with heterogeneous neurons also seems to facilitate glutamatergic neuronal survival. Based on these results, regardless of the source of the neurotrophic factors, a homogeneous population of glutamatergic neurons without trophic support undergoes spontaneous death.

What is the major neurotrophic factor for glutamatergic neurons? There might be many candidates other than BDNF and bFGF. Astrocytes release a variety of trophic factors both under normal conditions and after brain injury, and these are likely to influence neuronal survival and plasticity [9,15–18]. These trophic factors include, in addition to BDNF and bFGF, nerve growth factor (NGF) [19–21], leukemia inhibitory factor (LIF) [22], interleukin-6 (IL-6) [23,24], ciliary neurotrophic factor (CNTF) [18,19,25], vascular endothelial growth factor (VEGF) [16,26], glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) [27–29], insulin growth factor-1 (IGF-1) [30,31], and others [16,17], and some of their pro-survival effects are reported to be as powerful as that of BDNF and bFGF.

Although further studies are required to clarify the main player involved in the pro-survival effect of SBM on ES-derived glutamatergic neurons, this is the first report demonstrating a substantial improvement in the original protocol, allowing the generation of homogeneous glutamatergic neurons from mouse ES cells.

### Acknowledgments

We thank T. Ueda at DS Pharma Biomedical Co., Ltd., for his technical advice on ES cell culture and Dr. K. Morimoto at Osaka University for the technical advice on ICC.

### References

- [1] M.J. Evans, M.H. Kaufman, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature* 292 (1981) 154–156.
- [2] G.R. Martin, Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 7634–7638.
- [3] M.P. Stavridis, A.G. Smith, Neural differentiation of mouse embryonic stem cells, *Biochem. Soc. Trans.* 31 (2003) 45–49.
- [4] J. Rathjen, P.D. Rathjen, Mouse ES cells: experimental exploitation of pluripotent differentiation potential, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11 (2001) 587–594.
- [5] M. Bibel, J. Richter, K. Schrenk, et al., Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage, *Nat. Neurosci.* 7 (2004) 1003–1009.
- [6] M. Bibel, J. Richter, E. Lacroix, et al., Generation of a defined and uniform population of CNS progenitors and neurons from mouse embryonic stem cells, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 1034–1043.
- [7] C. Chatzi, R.H. Scott, J. Pu, et al., Derivation of homogeneous GABAergic neurons from mouse embryonic stem cells, *Exp. Neurol.* 217 (2009) 407–416.
- [8] D. Spiliotopoulos, D. Goffredo, L. Conti, et al., An optimized experimental strategy for efficient conversion of embryonic stem (ES)-derived mouse neural stem (NS) cells into a nearly homogeneous mature neuronal population, *Neurobiol. Dis.* 34 (2009) 320–331.
- [9] D.K. Binder, H.E. Scharfman, Brain-derived neurotrophic factor, *Growth factors* 22 (2004) 123–131.
- [10] K.D. Dougherty, C.F. Dreyfus, I.B. Black, Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury, *Neurobiol. Dis.* 7 (2000) 574–585.
- [11] K. Abe, H. Saito, Effects of basic fibroblast growth factor on central nervous system functions, *Pharmacol. Res.* 43 (2001) 30–312.
- [12] D.M. Araujo, C.W. Cotman, Basic FGF in astroglial, microglial, and neuronal cultures: characterization of binding sites and modulation of release by lymphokines and trophic factors, *J. Neurosci.* 12 (1992) 1668–1678.
- [13] D.W. Pincus, H.M. Keyoung, C. Harrison-Restelli, et al., Fibroblast growth factor-2/brain-derived neurotrophic factor-associated maturation of new neurons generated from adult human subependymal cells, *Ann. Neurol.* 43 (1998) 576–585.
- [14] K.C. Choi, D.S. Yoo, K.S. Cho, et al., Effect of single growth factor and growth factor combinations on differentiation of neural stem cells, *J. Korean Neurosurg. Soc.* 44 (2008) 375–381.
- [15] Y. Chen, R.A. Swanson, Astrocytes and brain injury, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23 (2003) 137–149.
- [16] I. Allaman, M. Bélanger, P.J. Magistretti, Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse, *Trends Neurosci.* 34 (2011) 76–87.
- [17] J.L. Ridet, S.K. Malhotra, A. Privat, et al., Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function, *Trends Neurosci.* 20 (1997) 570–577.
- [18] E. Yoles, E. Hauben, O. Palgi, et al., Neurons and astrocytes secrete factors that cause stem cells to differentiate into neurons and astrocytes, respectively, *Mol. Cell Neurosci.* 23 (2003) 414–426.
- [19] J.S. Rudge, R.F. Alderson, E. Pasnikowski, et al., Expression of Ciliary Neurotrophic Factor and the Neurotrophins–Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin 3 in Cultured Rat Hippocampal Astrocytes, *Eur. J. Neurosci.* 4 (1992) 459–471.
- [20] V.W. Wu, N. Nishiyama, J.P. Schwartz, A culture model of reactive astrocytes: increased nerve growth factor synthesis and reexpression of cytokine responsiveness, *J. Neurochem.* 71 (1998) 749–756.
- [21] M.R. Vargas, M. Pehar, P. Cassina, et al., Stimulation of nerve growth factor expression in astrocytes by peroxynitrite, *In Vivo* 18 (2004) 269–274.
- [22] L.R. Banner, N.N. Moayeri, P.H. Patterson, Leukemia inhibitory factor is expressed in astrocytes following cortical brain injury, *Exp. Neurol.* 147 (1997) 1–9.
- [23] N.J.V. Wagoner, J.W. Oh, P. Repovic, et al., Interleukin-6 (IL-6) production by astrocytes: autocrine regulation by IL-6 and the soluble IL-6 receptor, *J. Neurosci.* 19 (1999) 5236–5244.
- [24] M. Pizzi, I. Sarnico, F. Boroni, et al., Prevention of neuron and oligodendrocyte degeneration by interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor/IL-6 fusion protein in organotypic hippocampal slices, *Mol. Cell Neurosci.* 25 (2004) 301–311.
- [25] M. Sendtner, P. Carroll, B. Holtmann, et al., Ciliary neurotrophic factor, *J. Neurobiol.* 25 (1994) 1436–1453.
- [26] K. Jin, Y. Zhu, Y. Sun, et al., Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 11946–11950.
- [27] R.W. Oppenheim, L.J. Houenou, J.E. Johnson, et al., Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF, *Nature* 373 (1995) 344–346.
- [28] J.K. Sandhu, M. Gardaneh, R. Iwaszow, et al., Astrocyte-secreted GDNF and glutathione antioxidant system protect neurons against 6OHDA cytotoxicity, *Neurobiol. Dis.* 33 (2009) 405–414.
- [29] M. Pertusa, S. García-Matas, H. Mammari, Expression of GDNF transgene in astrocytes improves cognitive deficits in aged rats, *Neurobiol. Aging* 29 (2008) 1366–1379.
- [30] T. Yamaguchi, M. Sakurai, K. Abe, et al., Neuroprotective effects of activated protein C through induction of insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IGF-1 receptor, and its downstream signal phosphorylated serine-threonine kinase after spinal cord ischemia in rabbits, *Stroke* 37 (2006) 1081–1086.
- [31] K.B. Mackay, S.A. Loddick, G.S. Nave, et al., Neuroprotective effects of insulin-like growth factor-binding protein ligand inhibitors in vitro and in vivo, *J. Neurochem.* 23 (2003) 1160–1167.

