

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域「生物の発生・分化・再生」

研究課題

「幹細胞システムに基づく中枢神経系の発生・再生研究」

## 研究終了報告書

研究期間 平成 12年 11月～平成 17年 10月

研究代表者：岡野 栄之

(慶應義塾大学医学部、教授)

## 1 研究実施の概要

### 本研究プロジェクト開始前の状況

研究代表者(岡野)は、戦略的基礎研究「脳を知る」プロジェクト(1996-2000年)にて「脳神経系を構成する細胞の多様性の形成機構」に関する研究に研究代表者として従事し、哺乳類のみならず、無脊椎動物(ショウジョウバエと線虫)を含めたモデル生物系を用いた研究を展開した。その過程で、哺乳類神経発生過程において、細胞の多様性のもとになる細胞である神経幹細胞に興味と研究対象が集中して行った。神経幹細胞から多くの個性を持ったニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトが、いかに発生してくるかという問題は、発生生物学の領域において、古くから現在に至る challenging な魅力的な研究テーマであるのみならず、脳科学において神経系の高次機能の構造的な基盤(hardware)の一端を明かにするという意味で非常に注目される研究テーマである。これに加え、神経幹細胞は上述したような多分化能および未分化状態で増殖するという自己複製能力という特異な性質を持つが故、神経変性疾患や損傷した中枢神経系を修復する切り札としても、大きな注目を集めていた。また当時(1)神経幹細胞の prospective な同定と分離法、(2) *in vivo* repopulation assay が欠如するため、神経系の幹細胞生物学は、造血系に比べてはるかに遅れをとってきた。にもかかわらず、いくつかのブレイクスルーにより、ここ数年間において神経系の幹細胞生物学は飛躍的に進歩した。我々は以下の点において、神経系における幹細胞生物学の進展に大きく貢献したものと自負している。

(a) **神経幹細胞の選択的マーカーMusashi1の同定とそれを用いた解析**:我々が同定したRNA結合性蛋白質であるMusashi1は、脊椎動物において種間を越えて構造と発現パターンがよく保存された神経幹細胞を含む未分化な神経系前駆細胞のマーカー分子であることを明らかにした(Sakakibara et al., 1996; Sakakibara and Okano, 1997; Kaneko et al., 2000)。さらにこのことを利用し、成人脳内に神経幹細胞/神経系前駆細胞が側脳室周辺の上皮細胞層および脳室下帯に存在することを世界に先駆けて報告した(Pincus et al., 1998)。またマウスのMusashi1分子に対する抗体は、ほ乳類より中枢神経系の再生能力の優れた下等脊椎動物においても神経幹細胞/神経系前駆細胞を免疫組織学的に同定する tool としても注目されている。

(b) **神経幹細胞の prospective な同定と分離法の確立**:造血系幹細胞は、細胞表面マーカーに対するモノクローン抗体を組み合わせることにより、生きた状態で prospective に同定し、セルソーター(FACS, Fluorescent Activated Cell Sorter)により効率よく分離することが可能となっている。これにより造血系の幹細胞生物学は長足に進歩した。(生きた状態で分離しなければ、当然その生物活性は

調べられず、移植による損傷した組織の修復もできない!) 一方中枢神経系では、NIH の Ronald McKay 博士らが開発した抗Nestin 蛋白質(中間径フィラメント)に対する抗体や申請者らが開発してきた抗 Musashi1 蛋白質抗体が、固定した細胞や組織において免疫組織学的に神経幹細胞 / 神経系前駆細胞を同定するための tool として評価されているものの、両蛋白質は細胞質に局在(細胞表面抗原ではない)するため、これらの抗体を用いたセルソーターによる生きた状態での神経幹細胞の分取は不可能である。また、この目的に用いることのできる神経幹細胞特異的な表面抗原とそれ(ら)に対するモノクローン抗体は、現時点では available ではない(計画実験の項を参照)。そこで申請者らは、神経幹細胞活性を可視化し、生きた状態での濃縮・分離を可能にするため、神経幹細胞に選択性の高い発現を誘導するネスチン遺伝子のエンハンサーの制御下に蛍光分子である Green Fluorescent Protein (GFP)を発現させるレポーター遺伝子 (nestin-EGFP)の神経系への導入 (transgenic 法、lipofection 法による transfection、viral vector による導入)を行った。この結果、transgenic マウスのようなモデル系 (Kawaguchi et al., 2001)のみならず、成人脳 (Roy et al., 2000a,b)からも、nestin-EGFP レポーターに由来する蛍光強陽性細胞として、遺伝子神経幹細胞を生きた状態で濃縮・分離することが可能となった。

このような研究経過を踏まえ、本研究プロジェクトでは、以下の点を中心的課題として取り組んだ:

**(a)必要な細胞の分離:**本研究においては、神経幹細胞のみならず、ニューロンのみを作る中間の前駆細胞やドーパミン作動性ニューロンをふくむ特定のサブセットのニューロンを生きた状態で prospective に同定し、濃縮・分離することを目標の一つとした。また、nestin-EGFP レポーター遺伝子を用いて可能となってきた神経幹細胞の分離についても、神経幹細胞の表面抗原に対する特異抗体の調製を行うことにより、より簡便、迅速、高率な方法をする技術を開発することを目指した。こうした方法論の開発は、神経幹細胞から特定のニューロンが分化して行く時の細胞系譜やその遺伝子発現の変化を追跡することを容易にするとともに、胚性幹細胞(ES 細胞)や神経幹細胞から特定のニューロンを誘導する条件を、細胞が生きた状態で real time で検討することを可能にするとともに、他の細胞が混在した培養状況から「欲しい」細胞のみを分取することを可能にする上で重要である。

**(b)幹細胞からの必要な細胞の誘導:**神経変性疾患の最終病態の多くが、特定のニューロンの選択的な細胞死である(例えばパーキンソン病では中脳黒質のドーパミン作動性ニューロンが変性・脱落する)ため、これらの疾患の根治療法として充分量の純度の高い特定ニューロンあるいはそれを生み出す前駆細胞を損傷部位に移植することが有効であると期待される。現時点では、このような治療法は開発されておらず、欧米での特定の医療機関では胎児脳の特定の部分由来の細胞をドナーと

した移植療法が行われている。現行の胎児脳をドナーとした移植治療は確かに有効ではあるが、パーキンソン病を例にすると、1人の患者治療に5~10体もの胎児が必要であるという。このため現行の移植療法には、倫理的問題とドナー不足が指摘されている。この点を考慮すると、今後未分化な状態で増殖可能である神経幹細胞あるいは胚性幹細胞から、in vitro で特定ニューロンを誘導し、選択を行うことが極めて重要となる。

このような目標を達成するために立案・実施したプロジェクト、およびその展開から生まれたプロジェクトの各々についてその成果の概要を以下に記す：

(1) 神経幹細胞の未分化状態の維持・多分化能の維持と分化の制御機構

(A) 神経幹細胞に強く発現する RNA 結合蛋白質 Musashi ファミリーの機能解析

神経幹細胞に強く発現する Musashi1 (Msi1)蛋白質が *m-numb*, *pleiotrophin* を含む下流標的 mRNA の翻訳制御を行う因子であることを明らかにした。

(B) 神経幹細胞の長期維持機構に関する研究

in vitro で神経幹細胞の増殖活性を持つ分子として分泌性レクチン Galectin-1 を同定した。その成体脳に於ける機能を詳細に解析し脳室下層および海馬歯状回における幹細胞・前駆細胞の増殖に関与することを明らかにした。

(C) Hu タンパク質による神経幹細胞の分化制御機構の解明

Hu 蛋白質が神経芽細胞腫 N1E-115 細胞の分化誘導能、細胞周期抑制作用及び cdk インヒビター p21 遺伝子の発現促進作用を持つ事を明らかにした。HuD ノックアウトマウスの解析により、細胞周期を抑制し神経分化を促進する機能を持つことが示された

(D) ショウジョウバエ成虫型神経幹細胞をモデルとした幹細胞生物学

ショウジョウバエ幼虫脳のニューロブラストの増殖と分化における Notch シグナルの機能と制御機構を明らかにした。さらに、強制発現によってニューロブラストの増殖に異常を生じる遺伝子のスクリーニングを行い、その結果 RNA のスプライシング調節に関与する SR 蛋白質などを同定した。

(E) Notch signaling の神経幹細胞における役割の解析

活性化 Notch1 を特異的に認識する抗体および新たに開発した Notch シグナルを可視化する

レポーターシステムを用いてマウス胎生初期の脳における Notch1 の活性化パターンを解析し、神経幹細胞を含む増殖性の未分化な細胞集団および神経幹細胞からアストログリアへの分化過程において活性化することを明らかにした。

#### (F) 神経幹細胞の未分化維持機構の解析

Gab1 は、神経幹細胞の自己複製および分化に関与しているサイトカインレセプターの gp130、そして mitogen である EGF のレセプターの下流で働くシグナル伝達分子であり、MAP kinase 経路および PI3-kinase 経路の活性化に関与していることが知られている。この Gab1 のノックアウトマウスの表現型を解析結果から、Olig2 陽性神経系前駆細胞の EGF シグナル依存的な自己複製には、Gab1 を介した PI3K-Akt 経路の活性化が必須であることなどが示唆された。

#### (G) 胚生期大脳皮質領域における神経幹細胞・放射状グリアの形態と役割に関する解析

放射状グリアという名で呼ばれる細胞は、特徴的な形態をもつものの、決して均一ではなく、時期や中枢神経系内の部位において異なる性質を有しており、「神経幹細胞」としての性質をもっている場合もあれば、持っていない場合もある。胎生期のマウスの大脳皮質領域においては、「放射状グリア」は、神経幹細胞としての性質を有しており、「放射状グリア」からニューロンが出来ることを示すことができた。

#### (H) 大脳壁における神経幹細胞の分裂様式とニューロン産生ならびにその移動について

神経板が現れる時期の新皮質においては、VZ に限らず、脳室下帯(SVZ)から中間体(IMZ)にかけての領域において、盛んなニューロン産生がみられることを明らかにした。皮質ニューロンの誕生時期に依存した層特異的な細胞移動について解析し、Reelin シグナルが leading process の伸長ならびに nuclear translocation を positive に制御している可能性が示唆された。

#### (I) 大脳皮質神経細胞の層特異的運命決定の機構

大脳皮質では 6 層に対応して、少なくとも 6 種類のクラスの異なるニューロン種が存在する。大脳壁で、このような一連の形質の異なるニューロンが断続的に誕生してくる分子機構は、ほとんど不明である。ショウジョウバエでの神経芽細胞から一連のタイプの異なるニューロンの誕生の機構を参考に検討した。発達期の大脳皮質細胞に発現する POU ホメオドメイン転写因子、Brn1 と Brn2 のダブル KO マウスを作成したところ、大脳皮質の層特異的ニューロンの発生と分

化に異常が伴うことを示した。

## (2) ES 細胞より分化誘導した神経細胞の FACS による分離・培養・移植

マウス ES 細胞からの神経幹細胞の分化誘導および選択的培養・増殖法を確立し、さらにレチノイン酸による ES 細胞由来神経系前駆細胞の分化程度や領域特異性の決定に関して解析した。その結果、我々の開発した in vitro での ES 細胞からの神経系分化・誘導系における神経幹細胞の時系列および領域特異的な分化能の変化が、実際の中枢神経系の発生過程の変化をよく模倣していることを見いだした。そこで DNA マイクロアレイ解析(2万2千遺伝子)による時系列特異的な遺伝子発現プロファイリングを行い、興味深い遺伝子を複数同定した。一方、これまでの研究成果を生かし、カニクイザルおよびヒト ES 細胞より神経幹細胞を分化誘導し、霊長類神経発生を in vitro で再構成するシステムの開発を試み、培養条件の詳細に違いが見られたものの、マウス ES 細胞と同様の神経誘導および神経幹細胞の選択的培養が可能になった。

## (3) 神経幹細胞、中間前駆細胞、特定タイプのニューロンの選択的分離法の確立

神経系前駆細胞に発現している *nestin* 遺伝子のエンハンサー制御下に改変 YFP である蛍光物質”d4-Venus”を導入した Nestin-d4-Venus 遺伝子改変マウスを作製した。Nestin-d4-Venus は、従来の YFP と比較して蛍光強度が強く、迅速に発光し、かつ半減期も短い。よって、*nestin* 遺伝子のプロモーター/エンハンサーからの発現をより正確に模倣した蛍光活性が得られるようになった。Fluorescence activated cell sorter (FACS)を利用した解析により d4-Venus 陽性細胞画分には自己複製能と多分化能を有する神経幹細胞が濃縮されることが確認された。

## 2 研究構想及び実施体制

### (1) 研究構想

本研究は、神経幹細胞から特定のニューロンを含む神経系を構成する多様な細胞集団が発生・分化していくかを明らかにするとともに、この知見を踏まえて、神経幹細胞あるいは胚性幹細胞から特定の細胞の分化誘導法を開発し、多種類の神経変性疾患の新しく有効な治療法の基礎を構築することを目標とした。この目標を達成する上で、神経分化制御因子の機能解析を行うとともに、神経幹細胞、中間前駆細胞、特定種のニューロンの同定・分離法を確立することが必要であると考え以下のような研究を計画・実行した。

## 1. GFP レポーター遺伝子を用いた神経前駆細胞および特定のニューロンの分離:

神経幹細胞には神経系を構成する様々な細胞を産み出す能力がある。その分化過程は複雑であり、複数の中間段階の前駆細胞が関与すると考えられているがその詳細は解明されていない。造血幹細胞から様々な血液細胞への分化系譜は、各々の細胞に特異的に発現する細胞表面抗原を認識する抗体とフローサイトメトリーを用いた細胞分類法によって明らかにされてきた。申請者らは、こうした免疫学的手法を神経系を構成する細胞の分化系譜の研究に取り入れるべく検討を行ってきた。既に述べたように、*Nestin-EGFP* トランスジーンを用いて神経幹細胞を生きたまま同定・分離する技術を開発した (Roy et al., 2000a, b; Kawaguchi et al., submitted)。また神経系細胞の分化系譜の様々な細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体のスクリーニングが進行中である項目 参照。本研究では、さらに、*Nestin-EGFP* と同様のアプローチを用いてより分化能が制限された前駆細胞及び成熟したニューロンを同定・分離することを目指した研究を進めるものである (Figure-1)。

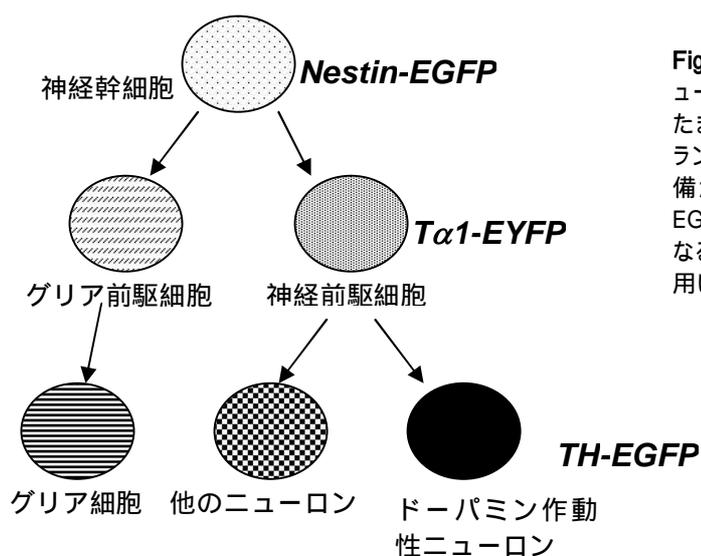


Fig-1. 神経幹細胞から成熟ニューロンへ到る分化系譜を生きたまま解析するために用いるトランスジーン。いずれも既に準備が完了しているものである。EGFPとEYFPは蛍光波長が異なるので、フローサイトメトリーを用いて識別が可能である。

### (a) *Tα1-EYFP* レポーター遺伝子を用いた神経前駆細胞の分離:

神経系の細胞はニューロンとグリアの二つに大別される。神経系の様々なニューロンは神経前駆細胞と呼ばれるニューロンに共通の母細胞から分化すると考えられている。しかしながら神経前駆細胞の良いマーカーがないために、その性質については十分に解析されていない。我々はニューロンへ運命決定した増殖性の細胞に発現することが知られている *Tα1-tubulin* 遺伝子のプロモーター領域の制御下で enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) を発現するトランスジェニックマウス

(*Ta1-EYFP*)を作出した(未発表データ)。同マウスの胎仔脳の切片を解析したところ、脳室壁に存在する増殖中の細胞(Ki67 抗原陽性)と移動中の未熟なニューロン( $\beta$ III-tubulin 陽性)にEYFPの発現を認めた。本研究では増殖性の神経前駆細胞を濃縮するために、前述した *Nestin-EGFP* マウスと *Ta1-EYFP*を交配し、セルソーターを用いてEGFP/EYFP二重陽性細胞の集団を回収する予定である。また、脳室壁を構成する細胞の膜表面に特異的に発現する Prominin の抗体を用いて染色し Prominin/EYFP 二重陽性の細胞を回収することによって、ニューロンへ運命が決定した直後の細胞集団のみを分離することができるものと考えている。分離した細胞を培養後ニューロンのマーカーの抗体を用いて染色し、ニューロンのみを産み出す性質を有することを確認する。

#### (b) TH-GFP レポーター遺伝子を用いたドーパミン作動性ニューロンの濃縮・分離:

神経系では様々な表現型を示すニューロンが各々固有の機能を発現している。ニューロンの分化系譜を明らかにするためには、こうした各々のタイプのニューロンを生きたまま同定し分離することが必要である。中脳黒質に分布するドーパミン作動性ニューロンは、線条体へ投射して錐体外路系を介した運動機能の調節に関与している。このドーパミン作動性ニューロンに発現する *tyrosine hydroxylase (TH)*遺伝子のプロモーターの制御下でEGFPを発現するトランスジェニックマウス(*TH-EGFP*)からセルソーターを用いてEGFP陽性細胞を回収することにより、ドーパミン作動性ニューロンを効率良く濃縮することに成功した(未発表データ)。同様の手法を用いて他のニューロンを分離することが可能である。例えば運動ニューロンには *Islet-1* 遺伝子のプロモーター(項目 III-(a)参照)、コリン作動性ニューロンには *choline acetyltransferase* 遺伝子のプロモーターが利用できる。

こうして神経幹細胞から様々なニューロンが産生される分化系譜を生きたまま分離し、培養あるいは移植実験に用いて解析できるようになれば、神経系を構成する細胞の分化制御機構に関する我々の理解を造血系の研究に匹敵するレベルにまで引き上げることが可能になると期待している。また、このような細胞分離技術は様々な神経疾患の細胞移植療法に役立つ可能性がある。例えば、前述したドーパミン作動性ニューロンが変性するパーキンソン病患者に対し神経幹細胞の移植による治療法が検討されている。動物実験結果の報告によると、移植した神経幹細胞は主にグリア細胞に分化するため治療効果が低い。そこでニューロンのみを産み出す神経前駆細胞あるいはドーパミン作動性ニューロンそのものを前述した方法で分離し、移植に用いるという戦略が可能である。また、神経幹細胞を、*in vitro* でドーパミン作動性ニューロンに分化誘導する方法が報告されている。しかしながら最終的なドーパミン作動性ニューロンの含有率は低く、そのまま移植に用いることは困難で

ある。大量培養によって得た細胞集団の中のドーパミン作動性ニューロンを前述した方法を用いて濃縮すれば移植のためのドナー細胞として用いることができるだろう。またここで開発した TH-GFP レポーター遺伝子は、ES 細胞からのドーパミン作動性ニューロンの誘導条件の検討や、誘導後の分離にも有効な strategy であると考えられる。

## II. 細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体を用いた神経幹細胞の分離

我々が開発した nestin-EGFP レポーターを用いた神経幹細胞の分離方法は、幹細胞の濃縮度に限界があること(Kawaguchi et al., submitted)、さらに幹細胞の回収率がレポーターの遺伝子導入効率に依存している(Roy et al., 2000a,b)ため、今後改良の余地がある。ここでは、さらに簡便かつ効率よい神経幹細胞の分離法の確立を行う。

(a) 細胞特異的な表面抗原に対するモノクローナル抗体の作製:すでに申請者は、神経幹細胞を豊富に含む細胞塊(neurosphere)を免疫抗原とし、神経幹細胞特異的な表面抗原に対する抗体の作製を試みた。樹立したハイブリドーマ 509 クローンのスクリーニングを行い興味深い性質を示す抗体産生クローンを複数取得した。例えば No.413 が認識する抗原は胎生期脳の脳室帯に局限して存在

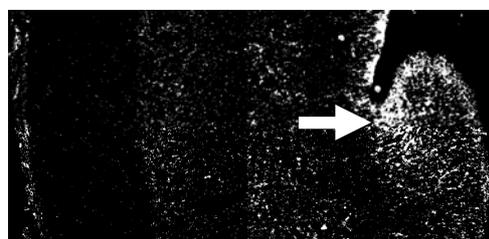


Fig-II. モノクローナル抗体 No.413 を用いたマウス胎仔脳の切片の染色。脳室帯(矢印)が特異的に染色される。

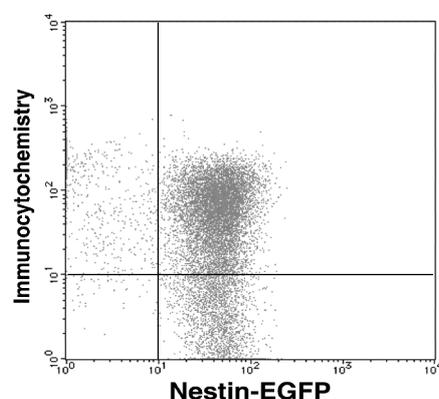


Fig-III. モノクローナル抗体 No.413 を用いて Nestin-EGFP マウス胎仔由来脳細胞を染色し FACS で解析した。EGFP 強陽性細胞が強く染色されている。

し(Figure-II)、また Nestin-EGFP 強陽性の細胞集団の細胞表面に発現すること(Figure-III)を既に明らかにした。今後さらにスクリーニング規模を拡大し、より神経幹細胞に特異的な抗体を作製する。同時に、神経前駆細胞あるいは様々な成熟神経細胞の細胞表面マーカーを特異的に認識する抗体を取得する。

(b) **モノクローナル抗体を用いた細胞の分離**: 作製した抗体単独、または、N-CAM や N-Cadherin、Notch1 などの既知の細胞表面マーカーに対する抗体と組み合わせ、FACS により特定の細胞が単離できるかどうか検討する。単離した細胞を培養し、自己複製能と多分化能を調べる。さらに各々抗体がヒト細胞に対しても同様に用いることができるかどうか検討する。

(c) **神経幹細胞特異的な表面抗原の同定**: 抗原分子として細胞膜表面に局在するタンパク質は、神経幹細胞の性質を特異づけるような、シグナル伝達に関わる受容体蛋白質や細胞接着を制御する蛋白質が含まれることが予想される。そこで、抗原分子をコードする遺伝子を以下の手順で単離する。マウス胎仔神経系の cDNA ライブラリーを COS7 細胞に導入する。上記のスクリーニングで得られたモノクローナル抗体を用いてこの細胞を生きのまま染色し、FACS を用いて陽性細胞を単離する。あるいは、イムノパニング法によって抗体に親和性を有する細胞を分離する。これらの細胞より、プラスミド DNA を抽出し、その構造を決定する。

(d) **抗原分子の機能解析**: 抗原分子の構造決定の結果、既知の受容体分子が同定された場合は、その受容体に結合するリガンド分子との相互作用の結果生じる受容体の活性化とその下流のシグナル伝達のメカニズムと、神経細胞の分化における意義について解析を行う。未知の受容体様分子が同定された場合は、ドミナントネガティブ及び恒常的活性化変異体を作製し、神経系培養細胞に強制発現することによってその機能を解析する。さらに、受容体に結合するリガンド分子及び細胞内領域に結合するシグナル分子を同定する。さらに、構造解析の後、免疫組織化学および *in situ* hybridization によって各発生ステージにおける神経系における発現パターンを解析する。さらに、アデノウイルスベクター等を用いて、初代培養細胞に強制発現させ、神経細胞の分化に対する影響を調べる。

### III. 胚性幹細胞 (ES cell) からの特定神経細胞の分化誘導とこの系を用いた発生制御遺伝子の機能解析

神経幹細胞は胎仔及び成体より分離され得るが、そのヒトへの臨床応用、すなわち神経変性疾患や傷害に対する移植治療を倫理的、技術的側面から検討した場合、細胞の供給等、他の移植治療以上の制約が予想される。さらに、これら幹細胞より生産される神経細胞のサブタイプは、それら

が分離された部位や発生時期に依存した特異性を示す傾向があることも指摘されており、汎用性が少ない可能性も存在する。特に筋萎縮性側索硬化症 (ALS) において変性が起きる運動ニューロンや小脳変性症において変性しているプルキンエ細胞等、発生の極初期のみで生産されるニューロンを生産することのできる神経幹細胞はまだ同定されていない。しかしながら、常に一定の供給が可能な ES 細胞より多様な神経および神経幹細胞が分離されれば、これらの問題は解決され得る。そして、最近 ES 細胞の分化系を用いてグリア細胞が分離精製され、それらをミエリン形成不全のラットの脊髄に移植すると、その中のオリゴデンドロサイトがミエリン形成を行うことが報告された。このことは、ES 細胞由来の神経系細胞が実際に *in vivo* で機能し得ることを示している。更に、種々の液性因子が様々な神経細胞の分化や領域特異性を制御し得ることが既に報告されている故、それらを利用して *in vitro* で ES 細胞から様々なタイプの神経幹細胞やニューロンの生産する試みも始まっている。これらの研究から得られる情報は、移植治療と併に、内在性の幹細胞を利用した薬学的治療の可能性をも広げるものと考えられる。ES 細胞の未分化性は LIF などのサイトカインによって保たれ、浮遊凝集培養によって未分化状態を脱し、レチノイン酸による刺激多くの神経系細胞が分化誘導される事が知られていられるが、その処理によって ES 細胞の性質を胚後部に特異的な方向に誘導する故に、分化したニューロンは脊髄に存在する運動ニューロンが主であり、依然として神経系以外の細胞種も誘導する。また、神経幹細胞の分化も促す。この事を踏まえて、我々は以下のような戦略によって ES 細胞から特定のニューロンを生産・分離するシステムを構築し、ES 細胞の特定神経変性疾患の治療応用への礎としたい。

**(a) ES 細胞からの種々の神経幹細胞およびニューロンの分化誘導とその FACS による分離精製:** 図に示したように、様々な分泌性因子の添加や間質細胞等との共培養によって幹細胞および特定のニューロンを誘導分化させるシステムをまず構築する。具体的には、ES 細胞を神経系に誘導する因子として知られている Noggin 存在下で Embryoid Body (EB) を形成させ、そこから特定の細胞系譜の誘導および選択的培養に必要と考えられている液性因子の添加によって必要な系譜の前駆細胞を得て分化させる。様々なタイプのニューロンは、それぞれのサブタイプに特異的な遺伝子のプロモーター制御下で GFP 遺伝子を発現させ、その蛍光を利用した FACS によって分離精製する。具体的には、脊髄の運動ニューロンおよび末梢神経に特異的な Isl-1、ドーパミンニューロンに特異的な Tyrosine hydroxylase (TH)、あるいはプルキンエ細胞に特異的な L7 遺伝子のプロモーター制御化で EGFP を発現するベクターを ES 細胞に導入した後分化誘導させ、それぞれのニューロンを FACS により分離精製する。分離したニューロンは疾患モデル動物等に移植してその機能を検定する。

(b) 中枢および末梢神経系の分化誘導因子の探索: ES 細胞と共培養する間質細胞からは様々な分化誘導因子が分泌されるが、その誘導因子を探索・クローニングしたい。誘導因子を分泌している細胞の mRNA より得られた cDNA よりレトロウイルスベクターライブラリを作成し、ES 細胞に感染・発現させることによって機能的発現クローニングを行う。

(c) 神経系における発生制御遺伝子群の機能解析: RNA 結合因子である *musashi*, *hu*, Notch シグナル関連遺伝子である *notch1*, *deltex*, *numb*, そして細胞型特異的転写因子である *oligo2* および *MNR2* など神経系前駆細胞の増殖・分化に関与していると考えられる遺伝子群の神経系発生の様々な段階における機能を、それぞれの遺伝子そのものあるいは RNA ステムループを利用した RNAi をテトラサイクリン依存的に発現するベクターを ES 細胞に導入し、*in vitro* 分化系あるいはキメラマウス作成による *in vivo* 分化系においてステージ特異的に誘導発現させることによって解析する。以上の研究は移植治療へ応用だけでなく、様々なタイプのニューロンの発生機構の解明や、それらのニューロンを標的とした薬剤の開発に大きく寄与するものと考えられる。

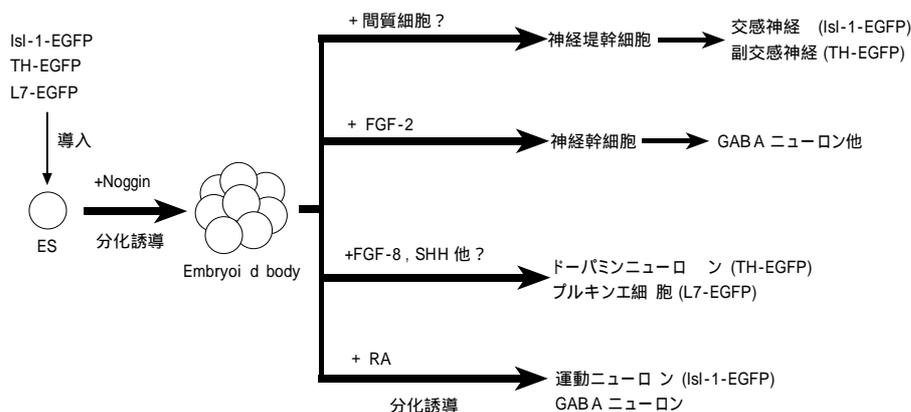


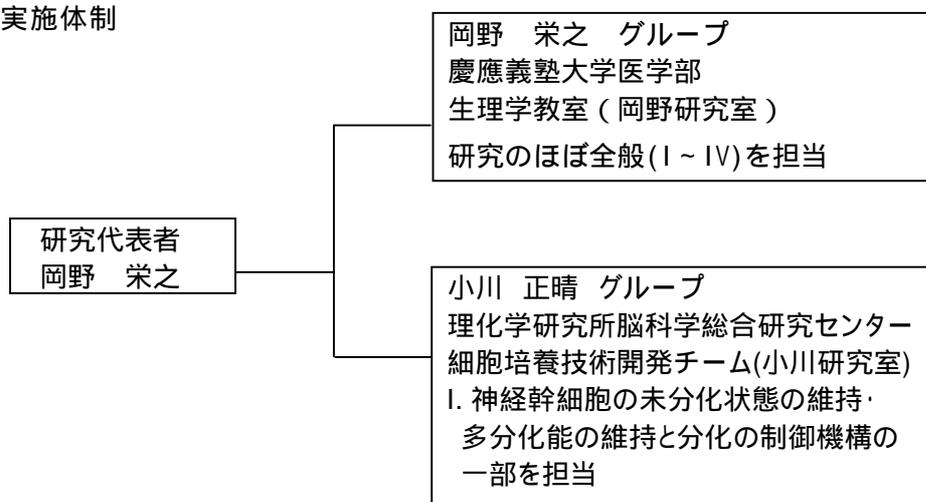
Fig.-IV. ES 細胞からの特定のニューロンの生産 Isl-1、TH および L7 遺伝子のプロモーター制御化で EGFP を発現するベクターを導入した ES 細胞は Noggin 存在下で EB を形成することにより神経系へ誘導し、さらに様々な液性因子によって様々なタイプのニューロンへと分化させた後 FACS により分離する。分離したニューロンは疾患モデル動物等に移植してその機能を検定する

#### IV. 神経疾患モデル動物への細胞移植

神経幹細胞は胎仔及び成体より分離され得るが、そのヒトへの臨床応用、すなわち神経変性疾

患や傷害に対する移植治療の技術開発と効果の確認を行う。具体的には、6OHDA 注入によるパーキンソンモデルラット、頸髄損傷ラットおよびコモンマーモセットモデル、および変異型 SOD1 による筋萎縮性側索硬化症モデルラットなどを用いて研究を行う。

(2)実施体制



### 3 研究実施内容及び成果

#### 3.1 慶應義塾大学 岡野 栄之グループ (研究のほぼ全般)

##### (1)研究実施内容及び成果

##### I. 神経幹細胞の未分化状態の維持・多分化能の維持と分化の制御機構

##### I-(A) 神経幹細胞に強く発現する RNA 結合蛋白質 Musashi ファミリーの機能解析

###### < 狙いと実験計画 >

Musashi 蛋白質は、ショウジョウバエにおいて神経前駆細胞の非対称成分裂の責任因子として発見され、線虫・ホヤなどの無脊椎生物からマウス・ヒトをはじめとする高等脊椎生物の神経系幹細胞に強い発現が観察される蛋白質ファミリーである。Musashi 蛋白質は、哺乳類では二種類 (Musashi1、Musashi2)、ショウジョウバエでは一種類 (d-Musashi) が存在している (Musashi2 遺伝子の同定については、後述する)。これらの蛋白質の機能を解析するために、哺乳類の Musashi1、Musashi2 については、ノックアウトマウスの作成・解析および生化学的機能解析を行う。また、ショウジョウバエの d-Musashi については、遺伝学的手法と生化学的手法を絡めて、神経系前駆細胞の非対称性分裂に対する役割を解析する。

###### < 実施内容 >

ノックアウトマウス作成による Musashi ファミリーの機能の個体レベルでの解析:我々は、相同組み替え法により *musashi1* 遺伝子を欠損したノックアウトマウスを作成し、そのマウス由来の神経幹細胞の性質を調べた。類似した機能を有すると考えられる Musashi2 も神経幹細胞に発現しているため、*musashi1* 遺伝子欠損マウス由来の神経幹細胞を *musashi2* 遺伝子の発現を抑制するアンチ

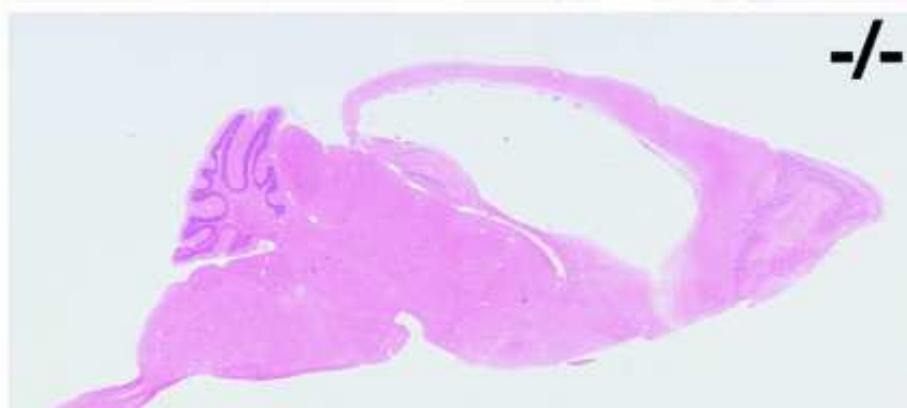


図1. Musashi1 ノックアウトマウスで見られる水頭症 (Sakakibara et al., 2002)

センス核酸アナログを含む培地にて神経幹細胞選択的培養(ニューロスフェア法)したところ、神経幹細胞の増殖能が著しく低下することを発見した。

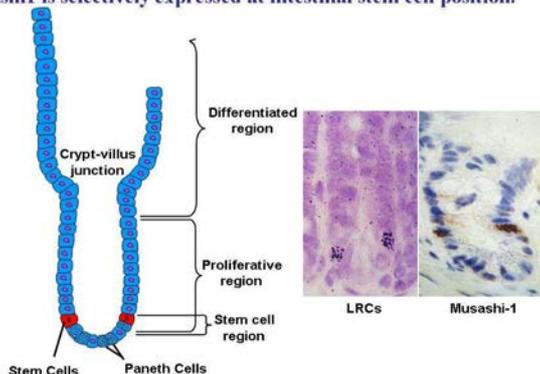
*musashi1* 遺伝子、*musashi2* 遺伝子が単独で欠損したマウスは、

それぞれ、中脳水道閉塞に起因する水頭症(一定頻度で発症、重篤な個体は出生後に死に至

る(図1)、成長障害と考えられる体重増加遅滞の表現型を呈する。Musashi1, Musashi2は、重複して発現しているため、胎生期の神経幹細胞・成体の神経幹細胞の性質に変化が軽微または代償されているために観察されなかった。

**Musashi1 の中枢神経系以外における発現とその役割**:小腸においては、HES1 陽性である crypt の幹細胞に Musashi1 が強く発現していることが明らかとなった(Potten et al., 2003)。現在、上皮性の幹細胞における Musashi1 の役割について、上流のシグナルによる発現制御と蛋白質の機能の両側面から解析を行っている。

Musashi1 is selectively expressed at intestinal stem cell position.



**図 2. 腸管上皮における幹細胞システムと MUSASHI-1 蛋白質の発現**

Potten らのこれまでの解析により、マウス小腸においては陰窩(crypt)の先端から4-6番目の位置の細胞が、幹細胞であることが明らかになってきている[53]。この腸管上皮幹細胞は、他の成体の組織幹細胞と同様にゆっくりとしか分裂しないことが明らかになっており、いったんトリチウムチミジンで標識されるとその標識を長期間保持し、Label Retaining Cell(LRC)として同定することが可能であった。RNA 結合性蛋白質 MUSASHI-1 は、この幹細胞ポジションの LRC で選択性高く発現していることが明らかになった(Potten et al., 2003)。

**神経幹細胞の自己複製能と分化を制御する因子としての Musashi1 と Notch シグナルの役割の解析**:神経幹細胞に強く発現している RNA 結合性タンパク質である Musashi1 が、神経幹細胞の自己複製能を正に制御していることが以下の実験結果から明らかになった。Musashi1 の神経系幹細胞における役割を推定するために、Musashi1 蛋白質が結合し制御していると考えられる下流標的 RNA の同定を試みた。Musashi1 組み換え蛋白質が結合する RNA のコンセンサス配列を *in vitro* の SELEX 法により明らかとし、その結合特性をゲルシフト法等により検討したところ、Msi1 は特定の RNA 配列 (G/A)UnAGU, n=2 or 3 に強く結合することが明らかとなった ( $K_d = \sim 10^{-9}$  M)。興味深いことに、このコンセンサス配列は Musashi1 と同様に神経系の前駆細胞に発現し細胞系譜の形成に関与しているとされる *m-Numb* mRNA の 3'-UTR に存在することが明らかとなった。さらに *in vitro* の系である filter binding assay 等により、これらの mRNA の 3'-UTR は Musashi1 と相互作用することが確認された。さらに NIH-3T3 細胞に *musashi1* 遺伝子を導入し、免疫沈降後、沈降物中に *m-numb* mRNA が存在するかどうかを検討した結果、Musashi1 と *m-numb* mRNA は *in vivo*(細胞内)で複合体

を形成していることが明らかとなった。また、Musashi1 はリボソーム分画にも存在すること、Luciferase 活性をレポーターとして用いた assay により、Musashi1 は m-Numb の発現を翻訳レベルで抑制していることが明らかとした。m-Numb は細胞内において、Notch シグナルのアンタゴニストであるため、Musashi1 は m-Numb の翻訳抑制を介して Notch シグナルを活性化しているものと予想された。そこで、*Hes1*-luciferase レポーター活性を指標に、活性化型 Notch とともに NIH3T3 に導入した外来性 Musashi1 による Notch シグナルへの影響を検討したところ、外来性 Musashi1 は Notch シグナルを活性化させることが明らかとなった。Notch シグナルは、神経幹細胞の生存と自己複製能に必須の役割をしているため、Musashi1、Musashi2 の機能的ノックアウト(上記の項1に記載)によりニューロスフェア形成効率の低下、すなわち神経幹細胞の生存と自己複製能が低下することは、これによく説明できる。

Musashi1 は、細胞の未分化状態および増殖活性を促進すると考えられる Notch シグナルの阻害因子 m-Numb の mRNA に結合してこれらの遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。Notch シグナルは細胞の分化・増殖を規定する重要な因子であり、Musashi1 は Notch シグナルを正に制御している働きを有するものと考えられる (図3)。

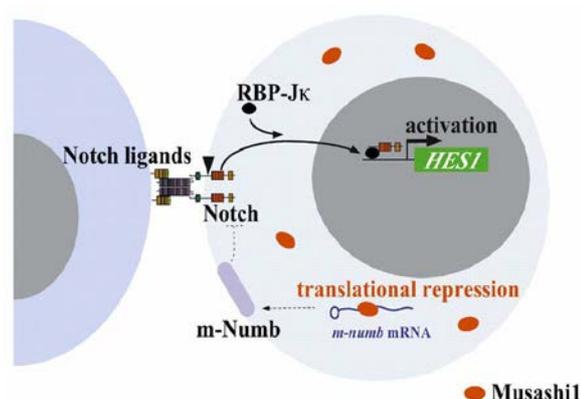


図3. ほ乳類神経幹細胞における Musashi1 の役割:mNumb の翻訳抑制による Notch シグナルの活性化 (Imai et al., 2001; Okano et al., 2002)

ショウジョウバエ Musashi の機能解析:ショウジョウバエの神経系において非対称性分裂の責任因子である d-Musashi 蛋白質の機能を明らかにするために、我々は下流標的配列および下流遺伝子の同定を試みた。その結果、神経系への細胞分化を抑制する転写因子をコードする *tramtrack69* 遺伝子の 3'非翻訳領域に d-Musashi 蛋白質認識配列が多数存在し、その部分の RNA に強く結合

することが明らかになった。さらに、*tramtrack69* 遺伝子の mRNA・蛋白質の発現解析、および *d-musashi* 変異体、*tramtrack69* 変異体を用いた遺伝学解析によって、d-Musashi 蛋白質は *tramtrack69* 遺伝子の発現を翻訳レベルで抑制することによって IIb 神経前駆細胞へと細胞の運命を導いていることが明らかとなった。

ショウジョウバエの神経系において外感覚器の神経母細胞(SOP)は非対称性分裂を起こし、二つの娘細胞 IIa 細胞(非神経二次前駆細胞)、IIb 細胞(神経二次前駆細胞)を生じる。我々は、この非対称性分裂の責任因子の一つである d-Musashi 蛋白質の機能を明らかにするために、下流標的配列および下流遺伝子の同定を試みた。その結果、神経細胞分化を抑制する転写因子をコードする *tramtrack69* 遺伝子の 3'非翻訳領域に d-Musashi 蛋白質認識配列が多数存在し、その部分の RNA に強く結合することが明らかにした。さらに、*tramtrack69* 遺伝子の mRNA・蛋白質の発現解析、および *d-musashi* 変異体、*tramtrack69* 変異体を用いた遺伝学解析によって、d-Musashi 蛋白質は *tramtrack69* 遺伝子の発現を翻訳レベルで抑制することによって、SOP が非対称性分裂をして生じる娘細胞の一つである IIb 神経前駆細胞への細胞運命を内在的に規定していることが示された。

また、Musashi は非対称性分裂時の細胞極性に従って、非対称な蛋白質修飾がなされている可能性を示す知見を得た。上述の通り、IIb 細胞において Musashi 蛋白質は *tramtrack69* の翻訳抑制を起こすが、IIa 細胞においては自身の蛋白質は存在するにも関わらず *tramtrack69* の翻訳抑制は起きていなかった。このため、Musashi 蛋白質の RNA 結合に寄与する機能ドメインを詳細に調べたところ、Musashi の RNA 結合ドメインの活性に必須なアミノ酸配列近傍に Protein Kinase C(PKC)のリン酸化サイトがあり、リン酸化による RNA 結合能の「スイッチ」であると推測した。このリン酸化サイトは種を越えて Musashi 蛋白質に保存されており、実際に PKC リコンビナント酵素によってマウス Musashi1 はリン酸化を受けることが確認されたが、種間で相同な Musashi のアミノ酸配列と、ショウジョウバエとマウスの PKC の機能類似性から考えてショウジョウバエの Musashi 蛋白質も PKC の基質であると考えられた。遺伝学的には *aPKC* の機能獲得型変異体と *twins*(PP2A)の機能欠失型変異体は *musashi* の機能欠失型変異体のショウジョウバエ個体の表現型と類似した表現型を呈し、*aPKC* 機能欠失型変異体は *musashi*機能欠失型変異体と相補的な表現型を示した。さらに、*aPKC* は SOP の非対称性分裂後は IIa 細胞側に発現が偏ることから IIa 細胞における Musashi のリン酸化翻訳後修飾による機能制御が考えられた。

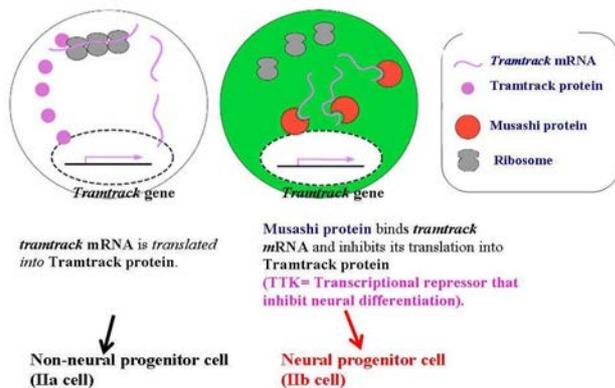


図4. Musashi 蛋白質による *ttk69* mRNA の翻訳制御と SOP 非対称性分裂の制御 (Okabe et al., 2001)

### Musashi-1 結合蛋白質の同定と Musashi-1 蛋白質による翻訳制御機構の解明

我々は Msi1 に結合する共役蛋白質の濃縮・精製を行い、MALDI-TOF MS 法で Poly(A) Binding Protein 1 (PABP1)を同定した。PABP1 は、mRNA の poly(A)鎖に結合し、さらに翻訳開始複合体の中心的分子 eIF4G と結合することにより、5'-cap を介した翻訳を促進することが知られている。その PABP1 に対して Msi1 は、自身のC末端側の約15アミノ酸を介して PABP1 の eIF4G 結合部位 (PABP1 のN末部位) に結合し、eIF4GとPABP1 の結合を積極的に解除または弱めていることを試験管内の結合実験で明らかにした。また、試験管内における chimera RNA を用いた実験で、Msi1 による翻訳抑制を受ける標的 RNA には少なくとも「Musashi1 結合配列」、「poly(A) tail」が必須なことが判明した。よって、Msi1 が発現している神経幹細胞では、Msi1 により sequence 特異的に選択された mRNA が、poly(A) tail を介した基本翻訳分子群の活性阻害により翻訳制御されていることの示唆を得た。これらのことより、Msi1 の翻訳調節能について作用メカニズムの一部を解明することができた。

### Musashi-2 蛋白質の同定およびその機能解析

脊椎動物における第2の MUSASHI 遺伝子を見だし、MUSASHI-2 と名付けた[39]。MUSASHI-2 蛋白質は、RNA 結合ドメインにおいて、MUSASHI-1 蛋白質と90%以上のアミノ酸レベルでの相同性を示していた。中枢神経系における発現パターンも神経幹・前駆細胞において強く発現するという点で MUSASHI-1 とよく似ており、お互いに重複した役割を果たすものと予想された。しかしながら、相違点は中枢神経系内において、MUSASHI-2 は一部のニューロンにおいて発現が持続するという点と(図5)、中枢神経系以外の臓器でもその発現量がほぼ一定であるという点である(Sakaibara et al., 2001)。

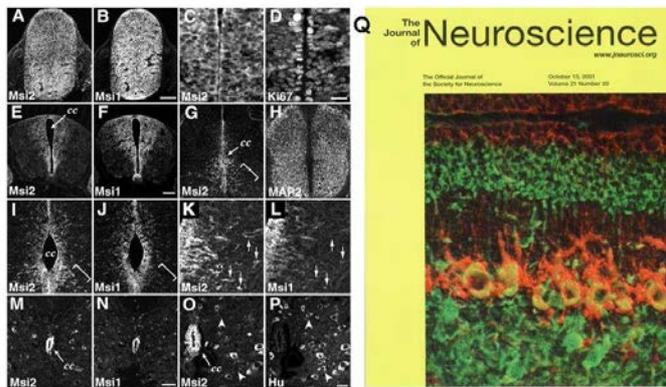


図 5. マウス中枢神経系における MUSASHI-1 蛋白質、MUSASHI-2 蛋白質の発現 A/B, C/D, E/F, G/H, I/J, K/L, M/N, O/P の組み合わせは、免疫二重染色の組み合わせを示す。図中には、使用された一次抗体を示している。A/B, E10 脊髄。C/D, E10 脊髄の脳室周囲部の拡大像。MUSASHI-2 蛋白質が、Ki67 陽性の増殖性の神経上皮細胞において発現していることを示す。E/F, E12 脊髄。G-L, E14 脊髄。K/L, I/J で示された領域の拡大図。M/N, 成体脊髄。O/P, M/N で示された領域の拡大図。成体脊髄において、MUSASHI-1 蛋白質、MUSASHI-2 蛋白質ともに、中心管周囲の上皮細胞に発現していることがわかる。Q 生後 (p7) 小脳における MUSASHI-2 蛋白質の発現(Sakakibara et al., 2001)。

また Musashi 蛋白質の機能を個体レベルで調べるために *musashi1*, *musashi2* それぞれ単独で欠損したマウス、および二重欠損マウスの解析を行ったところ、2重変異体は Postnatal 0 で致死になり、生後も神経前駆細胞の増殖とニューロン新生が継続する海馬歯状回が低形成を示した。また、大脳皮質において層構造の乱れおよび細胞数の減少などの異常が観察された。Musashi 遺伝子ファミリーの神経幹細胞および前駆細胞維持に関する機能的重複性を示していると考えられる。

*musashi2* 単独欠損マウスの個体の解析を行ったところ、野生型と同程度の寿命を持ち、先天性水頭症を発症しないため、Msi2 単独での水頭症への関与は薄いことが分かった。しかし、成体まで成長する *msi2* 遺伝子欠損マウスは野生型に比べて有意に体重増加が不良であり、感覚神経障害や運動神経障害を伴うことが観察されたため、中枢神経から末梢神経まで詳細な解析を行った。その結果、背側神経節(Dorsal Root Ganglia; DRG)の発達不全のために脊髄との線維連絡が低下していることが明らかとなった。また、RNA 結合蛋白質である Msi2 の標的遺伝子の解析を行ったところプライオトロピン(Pleiotrophin; Ptn)が同定され、ptn の mRNA の 3' 非翻訳領域に特異的に結合し、その発現を転写後調節していることが明らかになった。

*msi1* 遺伝子欠損マウスの先天性水頭症は、中脳水道付近に存在している神経幹細胞の分化・増殖制御の異常による。*msi1* 遺伝子欠損マウスでは、Notch シグナルを負に制御する mNumb のような標的遺伝子の発現抑制が解除され、結果的に Notch シグナルが抑制されることによって神経幹細胞の

未分化性が維持できなくなり、分化が早期に進行することで、中脳水道付近に異常なポリープ様構造物が形成されるのだと考えている。今年度、相同性の高い Msi2 の標的 mRNA を探索したところ Ptn が同定され、ptn mRNA の 3' 非翻訳領域への結合や、ptn の翻訳を調節している事実が生化学的に明らかになった。ほとんどすべての個体が成体まで生き残る *msi2* 遺伝子欠損マウスは、先天性水頭症の症状が確認されないものの、DRG の発分化異常による成長不良や感覚・運動神経障害をきたすことが観察されたことから、個体発生過程における Ptn を介した Msi2 独自の関与が示唆された。

これらの結果と、*msi1* および *msi2* 遺伝子の二重欠損マウスでは重度な中脳水道閉塞症状を呈することを考え合わせると、標的遺伝子である mNumb や Ptn の発現異常が、先天性水頭症発症を増悪させる因子の一つである可能性が示唆された。Msi1 および Msi2 蛋白質は、それぞれ時期および空間特異的にいくつかの標的遺伝子を調節し、先天性水頭症の発症機序に協調的に関与していることが考えられた。

#### I-(B) 神経幹細胞の長期維持機構に関する研究

近年再生医学的見地から成体の臓器幹細胞の存在が注目されているが、その自己複製機構は未だ不明な点が多い。近年、再生能力に乏しいと考えられてきた成体の中枢神経系でも、側脳室周囲と海馬歯状回に存在する神経幹細胞から、機能的な神経新生が起きている事が明らかにされた。また、神経幹細胞を刺激することで、失われた神経機能を再生できる事も明らかになった。しかしながら、胎児型の未分化な神経細胞の増殖・分化については、盛んに解析が行われているものの、成体型の神経幹細胞の自己複製機構についての解析は乏しく、その責任分子は不明確な点が多い。成体神経幹細胞の自己複製の制御因子を同定することは、発生学的見地からだけでなく、神経幹細胞の本質的な生理学的意義の理解と同時に、将来神経幹細胞の研究で得られた知見を、臨床治療に応用する際にも非常に重要であると考えられる。

まず我々は、任意の遺伝子の神経幹細胞における機能を、精密に定量・解析できる技術を開発した (Sakaguchi et al., 2005)。そしてそれを応用し、神経幹細胞の自己複製を制御する因子を探索した。

まず、成体臓器それぞれに存在する幹細胞には、共通の自己増殖メカニズムが存在するという知見に着目した。そして、Stroma 細胞の一種である OP9 細胞株が、成体型の造血幹細胞を増殖させ得ることをヒントに、神経幹細胞をも非常に効率よく増殖させられることを見出した。そして、OP9 培養上清から、近年開発された質量分析計による蛋白質の発現差解析法を用いて、その責任因子を Galectin-1 と同定した。

Galectin-1 は、分子量 14.6kDa の分泌性の蛋白質で、ある種の糖鎖配列に選択的な結合性を有するレクチンである Galectin Family の一つであり、その生理機能の多くは、主に糖鎖を介した分子間相互作用の調節である。そのため、特異的な受容体に結合して細胞内にシグナルを伝達する一般的な増殖因子とは、その性質が大きく異なる。我々は、成体型の神経幹細胞と骨髄造血幹細胞に Galectin-1 が高発現していることを見出したが、ほぼ同時期に複数の研究グループによって皮膚幹細胞、皮膚色素性幹細胞、間葉系幹細胞にも Galectin-1 が高発現している、ということが明らかになった。しかしながら、いずれの幹細胞においても Galectin-1 の機能についての報告は無かった。そこで、成体に存在する神経幹細胞における Galectin-1 の役割を明らかにするため、Galectin-1 組換え蛋白質のマウス脳内投与や、ニューロスフェア法および Galectin-1 knock out (KO)マウスなどを用いた解析を行った。まず、Galectin-1 の神経幹細胞に対する増殖効果には、その糖鎖に対する結合が重要であることを明らかにした。次に、Galectin-1 を成体側脳室内に投与すると、神経幹細胞の存在する側脳室周囲における未分化な細胞が増殖した。そして、それらの増殖細胞における細胞系譜マーカーの発現パターン解析(表 1)から、神経幹細胞が約 2 倍に増加した事が明らかになった。

さらに、成体の Galectin-1 KO マウスの脳を解析し、側脳室周囲と海馬歯状回両方において、神経幹細胞の数が約半分に減少していることを見いだした。尚、Galectin-1KO マウスは、その発生過程において特に大きな異常がないことが知られている。これらの事実を総合して、Galectin-1 は成体神経幹細胞に発現しており、その自己複製を促進する因子である、という結論に至った。

一方で我々は、東京医科歯科大学と共同で、これまで難治とされていた神経疾患の、未分化な神経細胞を活性化することによる治療方法を研究してきた。その過程で我々は、中大脳動脈一過性梗塞モデル動物の、梗塞巣付近(図 2)と神経幹細胞が集簇している部位で、神経系前駆細胞がその増殖に伴って Galectin-1 の発現を上昇させることを発見した。そこで、梗塞後の脳内で持続的に Galectin-1 を作用させるために、ヒト培養細胞にウイルスベクターによってヒト Galectin-1 遺伝子を導入し、その移植による脳虚血治療効果を判定した。すると細胞のみの移植に比較して、運動(図 3)および感覚機能を改善させられることが判明した。すなわち、Galectin-1 は内在性の中枢神経再生因子として機能し、それをさらに増強することで亜急性期の脳梗塞治療に有効である事が示唆された。

### I-(C) Hu タンパク質による神経幹細胞の分化制御機構の解明

脊椎動物の神経系の発生過程では神経幹・前駆細胞が増殖して細胞数を増やした後、細胞周期を離脱して神経細胞へと分化し始めるが、この細胞分裂 / 神経分化のスイッチングを調節するメカニズムに関しては不明な点が多い。神経幹・前駆細胞の分裂 / 分化スイッチングは非常に短い時間内に進行し、その過程では細胞分裂に関わる因子の発現が減少もしくは停止し、かわって神経分化に必要な多くの因子の発現が上昇してくる。興味深いことにこれら因子の発現が極めて同調的に増減することが観察されており、これらのことから細胞分裂または神経分化に関わる一群のタンパク質の発現を統合的に制御することによって分裂 / 分化スイッチングのタイミングを決定している調節機構の存在が予想されている。近年、複数のタンパク質の発現を同調的に制御する機構として、転写調節より鋭利にタンパク質の発現制御を可能にする転写後調節機構の重要性が注目されている。mRNA の非翻訳領域に含まれる制御配列の情報、ひいてはその配列に結合するタンパク質がそれぞれの遺伝子産物の生成・消去のタイミングや発現場所を調節していると考えられているが、未だその詳細なメカニズムは不明である。

我々は、ある特定の配列を非翻訳領域に含む複数の mRNA の発現を正または負に制御することによって細胞分裂および神経分化プロセスを調節する RNA 結合タンパク質 Hu ファミリーに注目し機能解析を行ってきた。肺小細胞癌に伴う自己免疫性傍腫瘍性脳脊髄症(PND)の標的抗原として同定された Hu タンパク質ファミリーは、神経細胞特異的な発現パターンを示す一群の RNA 結合タンパク質で、ショウジョウバエの神経細胞の分化と維持に必須のタンパク質である ELAV と高い相同性があることから、哺乳類の神経系の発生および維持においても重要な機能を持つのではないかと考えられてきた。また神経細胞様の遺伝子発現パターンを特徴とする肺小細胞癌の全例において癌組織に Hu の発現がみられることから、その発癌機構にも関与していることが示唆されてきた。Hu タンパク質ファミリーは神経細胞特異的に発現する HuB HuC HuD およびユビキタスに発現する HuA からなる。三つの神経特異的 Hu タンパク質は極めて相同性の高いアミノ酸配列を共有することから同じ標的を制御していると考えられており、それらの発現は脊椎動物の神経発生過程において、神経幹・前駆細胞が分裂を停止し神経細胞へ分化し始める初期の段階で上昇し、成熟神経細胞においても維持される (Okano HJ et al. J Neurosci. 1997)。これまでに我々の研究グループは PC12 細胞を使った神経分化モデルを用いて、Hu タンパク質の過剰発現が NGF(神経成長因子)の添加なしに神経様細胞への分化を誘導することを見いだした。またマウス胚への電気穿孔法による Hu 遺伝子の導入実験によって、生体内で Hu タンパク質が神経系の重要な分化促進因子として機能していることを証明した (Akamatsu et al. PNAS 1999)。これらの知見は Hu が神経分化に関わる複数の因子の時間的、空

間的発現を統合的に調節している可能性を強く示唆しており、我々は Hu タンパク質が結合する標的 mRNA の同定、および Hu による転写後発現調節機構の分子メカニズムの解明を目指した研究を進めてきた。

Hu は CDK 抑制因子 p21、p27 など細胞周期の制御に関わる因子、および GAP43、NF-M、Tau など神経分化に関わる因子の発現を転写後調節により促進することが報告されている。これらの知見から、Hu が細胞周期の制御と神経分化プロセスのそれぞれの過程に関わる複数の標的因子の発現を制御することにより、分裂 / 分化のスイッチングを統合的に管理する指揮者のような役割を担っていることが予想された。我々はその分子機序を解明するため、Hu と複合体を形成する因子の精製および同定を試みた。組み換えアデノウイルスによる Hu 強制発現系を用いて培養細胞および培養神経幹細胞から Hu と複合体を形成する因子の精製を試み、少なくとも3つのタンパク質が全長 Hu と RNA 非依存的に結合することを明らかにした。質量分析を行った結果、Hu に結合するタンパク質は hnRNPK (RNA 結合タンパク質)、NF45 (RNA 結合タンパク質複合体サブユニット)、Skb-1 (メチル基転移酵素) であり、hnRNPK および NF45 は Hu に直接結合していることが確かめられた。hnRNPK は翻訳抑制因子として知られており、15-LOX の発現を抑制することにより赤芽球の分化を制御することが報告されている。これらの因子の細胞周期および神経分化に与える影響について神経芽細胞腫株 N1E-115 細胞を用いて調べた結果、hnRNPK は Hu に結合するのみならず、Hu の細胞周期抑制機能および神経分化促進機能の両方を量依存的に阻害することが明らかとなった。さらに Hu の下流標的分子であり Hu によりタンパク質発現が促進されることが知られる CDK 抑制因子 p21CIP1 mRNA の翻訳に対しても、hnRNPK はその 3' 非翻訳領域の CU rich 配列に特異的に結合し、翻訳に対し抑制的に働くことが示された。また p21 に対する siRNA を用いた実験により、p21 が Hu の下流遺伝子として分化誘導及び細胞周期の停止に深く関わっていることが示され、この Hu-p21 経路が hnRNPK により量依存的に抑制されることがわかった。これらの結果により、2つの RNA 結合蛋白質 Hu と hnRNPK が p21 の転写後調節を介して拮抗的に働いて、細胞の増殖から神経分化へのタイミングをコントロールしていることが示唆された (Yano et al. JBC 2005)。

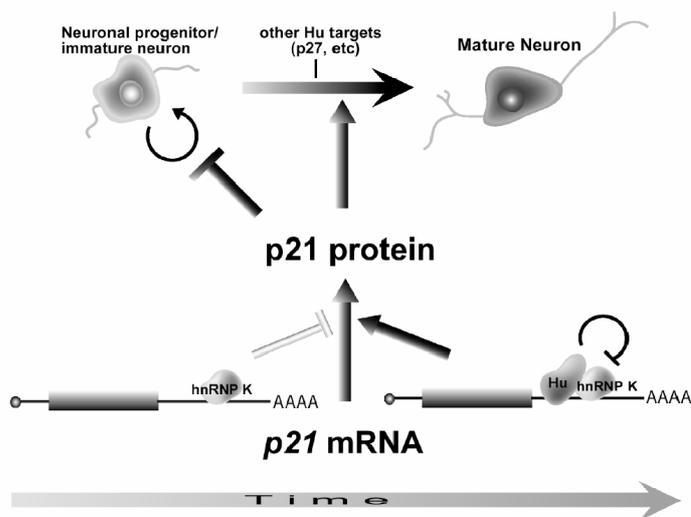


図 6. Hu/p21 経路による神経分化  
調節メカニズム

また我々は遺伝子改変動物を用いて Hu タンパク質ファミリーの in vivo における機能解析を行ってきた。HuD ノックアウトマウスは胎生期に三叉神経の発達に異常が認められる上、成体マウスは姿勢反射の異常をはじめとする失調様運動障害を呈し、野生型に比べ寿命が短いことが明らかとなった。また Neurosphere 法によりマウス胎児脳からの神経幹細胞を特異的に経代培養し、その分裂能および分化能を解析した結果、野生型と比較してノックアウトマウス由来神経幹細胞は自己複製能の増強が見られ、逆に神経分化能が低下していることが明らかとなった。さらに BrdU/IdU 二重標識法によりマウス胎児大脳皮質における分裂細胞プロファイルを詳細に調べたところ、ノックアウトマウスにおいては分裂休止細胞の数が減少し、逆にゆっくりと分裂する細胞が増加しており、in vivo においても Hu が細胞周期を抑制し神経分化を促進する機能を持つことが示された (Akamatsu et al. PNAS 2005)。しかし HuD ノックアウトマウスの中枢・末梢神経系において著しい解剖学的異常が観察されるわけではなく、神経系の発達段階で HuD と相同性の高い HuB および HuC が機能補完をしている可能性が高いと考えられる。今後 Hu ファミリーの in vivo における機能を解明していくためには、HuB および HuC ノックアウトマウスを作成もしくは入手し、さらに二重もしくは三重ノックアウトマウスの作成および解析を行う必要である。当研究室では HuB ノックアウトマウスを作成し、現在解析中である。ホモ接合体マウスは発生過程後期 (発生 18 日付近) において致死であり、大脳皮質の発育が不良であることが明らかとなっている。HuB ノックアウトマウスにおいても、HuD ノックアウトマウスの解析に用いられた手法を使い、HuB の細胞分裂・神経分化過程における機能解析を行っていく。また米国ロックフェラー大学の共同研究グループから HuC ノックアウトマウスをすでに入手しており、今後 HuD/C および HuB/C 二重ノックアウトマウスを作成して解析を進めることによって、神経細胞における Hu タンパク質ファミリーの機能の全貌を明らかにしていく。Hu タンパク質について、個体レベルで

の遺伝子導入やノックアウトマウスを含めた in vivo での機能解析を行っているのは当研究室と共同研究機関であるロックフェラー大学のみであり、すでに遺伝子改変動物の交換・解析方法の分担等が決められている。それぞれ得意とする独自の実験系を有する上、強固な協力体制が築かれているという点で、他のグループの追従を許さないと考えられる。

#### I-(D) ショウジョウバエ成虫型神経幹細胞をモデルとした幹細胞生物学

神経幹細胞の形態・極性・分裂・分化の制御機構を分子レベルで明らかにするためには動物種・細胞種の違いに拘らずに細胞レベルで類似した分裂・分化様式をする系を探してそれらの系で明らかになっている分子経路・分子機構を相互に参照しながら研究を進め基本原理に到達することが効率的である。例えばショウジョウバエの末梢感覚神経細胞 (SOP:sensory organ precursor)は哺乳類の膵臓や内耳のような神経細胞・非神経細胞が入れ子になって存在する系に近く、Notch シグナルの関与を始めとする分子メカニズムのアナロジーが既に証明されてきている。我々が哺乳類神経幹細胞の未分化性の維持・神経系細胞への分化の機構を明らかにするためのモデル系として選んだのは、これまでもっともよく研究されてきたショウジョウバエ胚の中樞神経系ではなく、幼虫の視覚原基(OPC:Optic Proliferation Center)の神経上皮幹細胞である。

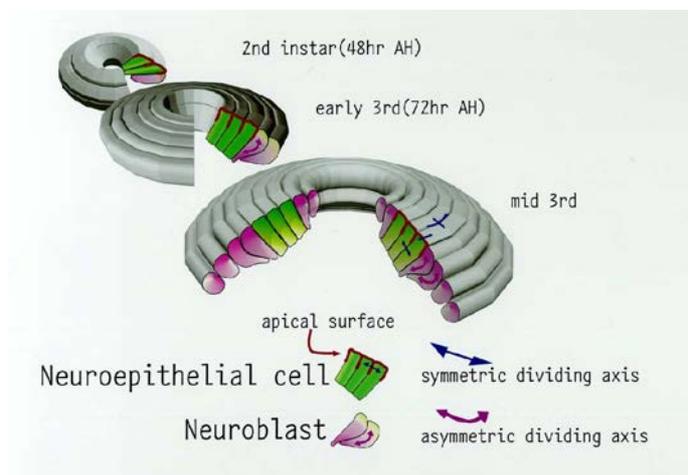


図7. ショウジョウバエ幼虫脳における神経上皮細胞とニューロブラスト

我々の研究で、OPC 神経上皮幹細胞が胚期に頭部領域からの陥入によって生じた上皮の褶曲したシート中に存在し、胚後期にいったん分裂を止め静止期に入った後で、幼虫初期に再活性化され上皮細胞としての apical-basal 極性を保ったまま対称分裂により細胞増殖を活発に行い神経幹細胞領域を拡大し(左図)、その後、シートの端から球状の成虫型ニューロブラスト(哺乳類の神経前駆細胞に相当)へと細胞形態・極性を変換し、同時に分裂軸が90°回転することにより今度は非対

称分裂を行うようになり(図 8.参照) ニューロン・グリアを分化させることが明らかになっている。

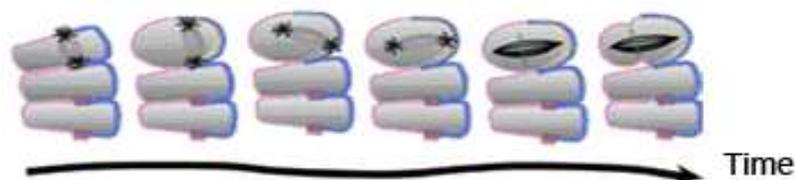


図 8. 発生過程における上皮幹細胞・前駆細胞の分裂軸の回転

こうした上皮から非上皮細胞への形態・極性・分裂様式の「転換 (conversion)」は、最初から非対称分裂をしてニューロン・グリアを生じるショウジョウバエ胚期の腹部胚ニューロブラストでは起こらないもので、むしろ哺乳類神経上皮に存在する幹細胞の極性変換・細胞分裂様式に近いことからモデル系として適していると考えた。しかしながらこのショウジョウバエ幼虫視覚原基神経上皮幹細胞は、細胞のサイズは極めて小さい上に、神経幹細胞の一般的な特徴でもあるが、細胞周期が非常に長く M 期のマーカーである PH3 などで容易に染色されないためにこれまでその存在そのものが認識されておらず同定が遅れており、来年度より共同実験を行うことになっている米国 UCSF 大学の Hartenstein 博士らの古典的な組織学的解析をのぞけば十分な細胞レベルでの解剖学的解析、さらには遺伝学的解析がほとんどおこなわれていなかった。我々はそうした OPC 神経上皮幹細胞に焦点を当て、コンフォーカル顕微鏡を用いた三次元的微細な観察をおこない、さらに tubulin-GFP を用いて分裂装置を可視化して live imaging で連続的に観察する方法も確立し、これまで困難であった幼虫 OPC 神経上皮幹細胞の形態変化・細胞分裂・細胞分化の詳細を継時的に明らかにすることに成功した。さらには幹細胞の未分化性の維持に広く関わるものが種々の動物、組織で明らかになってきている Notch シグナルがその修飾因子 Numb や -Adaptin と共に OPC 神経上皮幹細胞において自己増殖性の維持、及びニューロン・グリアへの分化へのスイッチに重要な働きをしていることを示した(昨年度報告)。

## I-(E) Notch signaling の神経幹細胞における役割の解析

### (E)-1: modifier による Notch signaling の微細な調節:

哺乳類神経幹細胞の増殖・分化の制御に Notch signaling が深く関与していることは明らかとなっているが、その Notch signaling 自体が、さらに m-numb, musashi1 などの modifier と呼ばれる修飾因子によってコンテキスト依存的に微細に調節されている可能性が高い。我々は、哺乳類中枢神経系を用いてそれら修飾因子の寄与を解析を行った。

< 実施内容 >

哺乳類中枢神経系における m-numb の関与: 哺乳類中枢神経系において Notch signalling の antagonist としての m-Numb タンパク質の発現パターンは比較的早くから解析されていたが、isoform が複数存在する上に、抗体そのものの特異性に問題があることや antagonist であるはずの m-numb のノックアウトマウスの表現型が Notch signalling の欠失突然変異と同じ表現型を示すことなどが理由で、はっきりとした結論が出ていなかった。そこで我々は、それぞれの isoform を識別できる抗体をまず作製し、少なくとも2つの発現様式の異なる isoform が存在し、機能的にも異なる 増殖促進効果と分化促進効果 という可能性を見いだした。4つの isoforms が知られている mNumb の局在を調べたところ、mNumbの short form は内分泌細胞の分化に伴って upregulateされるのに対して、long form は downregulate されることから mNumb は splicing form 特異的な機能を果たしている可能性が考えられた。

#### (E)-2: Notch シグナル活性化状況の可視化の試み

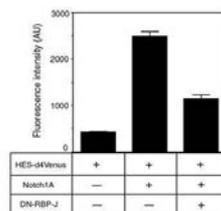
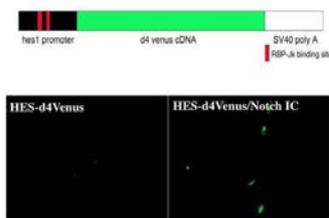
活性化型 Notch1 特異抗体を用いた解析: Notch signaling の活性化は細胞の未分化維持に必須であり、その発現及び活性化パターンは未分化な細胞を反映していると考えられる。しかし生体内での詳細な発現部位及び活性化部位は不明であった。そこで我々は生体内での Notch signaling を理解する第一段階として、活性化状態の可視化を試みた。細胞内ドメインが切断された Notch1 蛋白質 (活性化 Notch1) を特異的に認識する抗体を用いた免疫組織化学によりマウス胎生初期の脳における Notch1 の活性化パターンを解析したところ、Notch1 の活性化は脳室周囲に存在する Nestin 陽性の放射状グリアの一部においてのみ認められ、Mash1 及び Ngn2 といった proneuronal bHLH 因子の発現が陽性のニューロン前駆細胞や成熟したニューロンには検出されなかった。BrdU 標識実験により、活性化 Notch1 が検出される細胞の大半が増殖能を有することが明らかとなった。更に、Notch1 の活性化と細胞周期との関係を詳細に解析したところ、Notch1 は主に DNA 合成期(S 期)において活性化し分裂期(M 期)には不活化されていることが明らかになり、細胞周期に依存して調節されている可能性が示唆された。これらの結果より、Notch1 は、神経幹細胞を含む増殖性の未分化な細胞集団において活性化することが明らかとなった。次に、胎生後期及び生後のマウス脳における Notch1 の活性化パターンを検討した。胎生後期においても Notch1 は放射状グリア様の細胞に強く発現していた。Notch1 の活性化は、Glutamine synthetase 陽性/GFAP 陰性の幼若なアストロサイトにおいても認められたが、GFAP 陽性の成熟アストロサイトにおいては殆ど検出されなかった。これらの結果から、Notch1 がアストロサイト分化の初期過程において一過性に活性化し何らかの機能を果たしていることが示唆された(Tokunaga et al., 2004)。

ii) レポーター遺伝子を用いた Notch シグナル活性化の Live イメージング: 前述の活性化型 Notch1 特異抗体を用いた免疫染色は、固定した標本を用いたものであり、生きた細胞における Notch シグナルの活性化状況をモニターするものではない。そこで我々は Notch シグナルの標的遺伝子 *hes1* プロモーターおよび Notch シグナルの下流転写因子 RBP-J の結合配列制御下に改変型 YFP (Yellow Fluorescent Protein) 蛋白 Venus の DNA 配列を結合した遺伝子を持つレポーターシステムを作成した。さらにタンパク質の不安定性に関する PEST 配列を Venus に結合させ (dVenus)、半減期の短いレポーターも同時に作成し、Notch シグナルの活性化の on/off をより精妙に感知する手法を確立した。このレポーター遺伝子を胎生 14 日目のマウス胎児に電気穿孔法を用いて導入すると Notch の活性化は未分化神経幹細胞において選択的に生じていることが分かった (図 12)。さらに、神経幹細胞の増殖能、自己複製能を評価するニューロスフェア法により、Notch シグナルの活性化が神経幹細胞の未分化維持能、多分化能に相関していることが明らかとなった。さらに、胎生後期より産生されるアストロサイトの分化と Notch シグナルの活性化との関係を調べたところ、Notch シグナルの活性化は成熟したアストロサイトには観察することができなかった。さらに、出生後直後のマウスに活性化 Notch を電気穿孔法により脳に導入するとアストロサイトの成熟が遅れることが分かった。しかしながら、Notch シグナルの活性化を阻害する  $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤で処理すると神経幹細胞からアストロサイト分化は阻害されることから、Notch シグナルはアストロサイト分化に関しては神経幹細胞からアストロサイトへの初期誘導においては重要であるが、成熟にはむしろ阻害的であり、さらに Notch シグナルの活性化の度合いが低下することがアストロサイトの成熟に必要であることが示唆された (Kohyama et al., 2005)。

**神経幹細胞の自己複製を正に制御する Notch シグナルを可視化することにより、神経幹細胞の分離を試みる①。**

**Hes1p-d4Venus: Visualization of Notch signaling**

- ・ Hes1 プロモーター (約 300bp) の制御下に改変型 EYFP である Venus 蛋白質が発現する。
- ・ 新規蛍光物質 Venus は蛍光強度が高く、発光団を形成する時間が短い。
- Reporter として機能する。



**図 9. Notch シグナル可視化のために構築した *Hes1* promoter-d4Venus レポーター遺伝子** 同レポーター遺伝子が、外来性の活性化型 Notch1 および RBP-J 依存性に応答することが示されている (右下) (Kohyama et al., 2005)。

これらのことから我々が開発した Notch レポーターシステムにより中枢神経系のみならず、他の臓器・組織においても各発生段階における生理的な Notch シグナルの活性化部位およびその役割を生きたままの細胞、組織で解析することが可能となった。

神経幹細胞の自己複製を正に制御するNotchシグナルを可視化することにより、神経幹細胞の分離を試みる②。

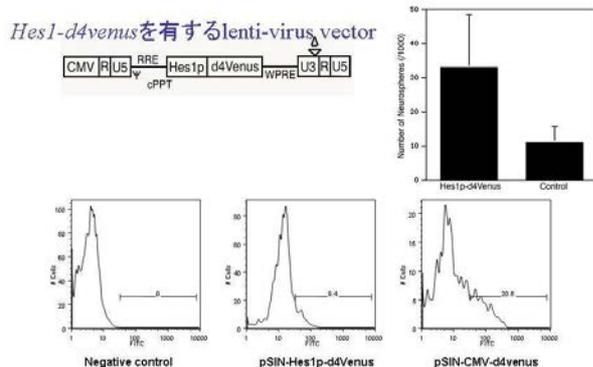


図 10. *Hes1* promoter-d4Venus レポーター遺伝子を有するレンチウイルスベクターを導入したマウス胎生期の前脳の細胞から、Venus 陽性細胞をセルソーターにより分取(下)すると、陽性細胞が選択的にニューロスフェアを形成する(右上)ことが明らかとなった。以上より、Notch1 シグナルがより強く活性化している細胞において選択的に神経幹細胞の自己複製が起きていることが示された(Kohyama et al., 2005)。

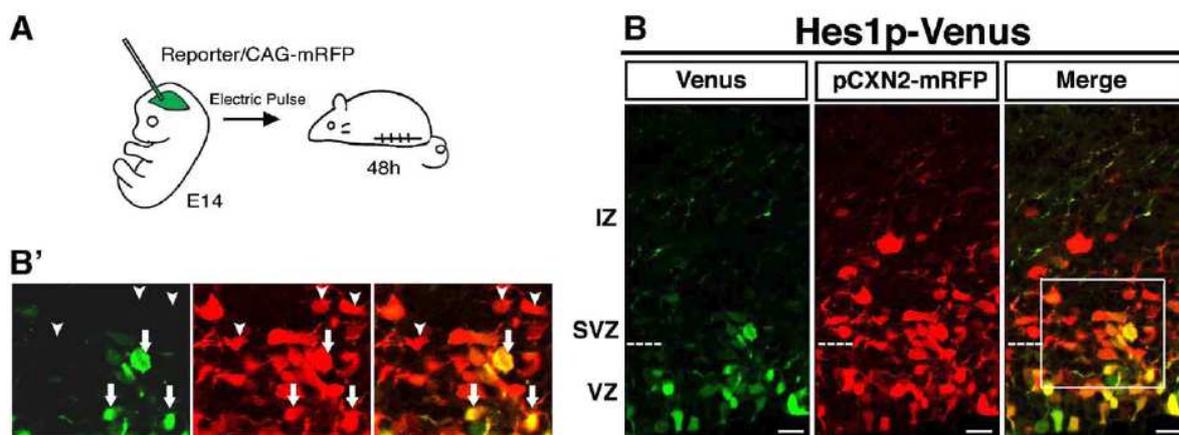


図 12. マウス胚に脳室に Notch シグナルで活性化される *Hes1* プロモーター制御下で Venus を発現するレポーター遺伝子を導入して 48 時間後に固定し脳切片を蛍光顕微鏡で観察したところ ventricular zone に強いシグナルが認められた(レポーター導入細胞は mRFP(赤)で標識されている。上図 Kohyama et al 2005)。

### I-(F)神経幹細胞の未分化維持機構の解析

哺乳動物の中枢神経系幹細胞は個体の発生初期から成体に至るまでその一生を通して、中枢神経系の様々な場所に存在し、様々なタイプのニューロンやグリア細胞を生産することによって中枢神経系の構築および機能維持に関与していると考えられている。しかしながら、これらがどのようにして維持され、その数が調節されているのかそのメカニズムの詳細はよく分かっていない。これまで、

我々は IL-6, LIF, CNTF などの IL-6 ファミリーに共通のレセプターサブユニットである gp130 を介するシグナルが、特に生後から成体にかけての神経幹細胞の自己複製を促進していることを見出している。そこで、この gp130、そして神経幹細胞の mitogen である EGF のレセプターの下流で働くシグナル伝達分子であり、MAP kinase 経路や PI3-kinase-Akt 経路の活性化に参与している Gab1 の欠失変異体マウスにおける神経幹細胞の動態を含めた中枢神経系発生の異常を解析することによって、神経幹細胞の長期維持機構の本質に更にせまることを目的とした研究を行った。

Gab1 のホモ欠失変異体 (*gab1<sup>-/-</sup>*) は胎生16日目までに胎盤の発達異常により死亡してしまう故に、まず、胎生14日目の線条体における神経幹細胞の数を neurosphere 法によって野生型と比較したところ、神経幹細胞の mitogen の1つである FGF2 存在下の培養では顕著な差は見られなかったが、EGF に対する反応性は消失していた。しかしながら、ニューロンの分化および生存に変化は見られなかった。さらに、ヘテロ欠失変異体 (*gab1<sup>+/-</sup>*) の成体の側脳室周囲に存在している神経幹細胞の数を、これも neurosphere 法によって調べたところ、野生型に比べて約80%その数が増加していた。一方、これまで ubiquitous に発現すると考えられていた Gab1 の中枢神経系の発生過程における発現を組織免疫化学染色によって確かめたところ、驚いたことに神経幹細胞が最も多く存在すると考えられる脳室周囲での発現が、生後2日目までは非常に低く、それ以外の領域で強く発現していた。しかしながら、生後19日目および成体においては脳室周囲に強く発現していた。

次に、Gab1 のホモ欠失変異体 (*gab1<sup>-/-</sup>*) 胎生12日目の脊髄腹側 pMN ドメインにおいて、bHLH 型転写因子の1種である Olig2 を発現する幹細胞を含む神経系前駆細胞の数を野生型と比較したところ有意に低下していた。また、脊髄における細胞増殖を BrdU の取り込みにより測定したところ、*gab1<sup>-/-</sup>* 胎仔では有意な低下が観察された。しかしながら、TUNEL 法によって検出されるアポトーシスには変化が見られなかった。また、この Olig2 陽性前駆細胞は、Gab1 欠損下では線条体の神経幹細胞と同様に EGF 依存的な増殖はほとんど見られず FGF2 依存的な増殖は正常であった。また、EGF シグナルによって増殖のみならず未分化性も維持され、FGF2 存在下での培養と比較しても、特にオリゴデンドロサイト前駆細胞への分化が抑制されることが明らかとなった。したがって、Olig2 は、少なくとも胎仔終脳神経幹細胞においては、その自己複製を促進することが知られていることから、Gab1 は、胎仔期脊髄においては Olig2 の上流において神経幹細胞の自己複製に正に働いているものと思われる。さらに、この Olig2 陽性前駆細胞に対する EGF 刺激において、Gab1 欠損によって影響を受けるシグナル伝達経路を調べたところ、MAP kinase 経路には変化が見られず、PI3-kinase-Akt 経路のみが反応性を失っていたことから、Olig2 陽性前駆細胞の EGF シグナル依存

的な自己複製には、Gab1 を介した PI3K-Akt 経路の活性化が必須であることが示唆された。そこで、レンチウイルスベクターを用いて活性型 Akt を胎生12日目の *gab1*<sup>-/-</sup> 脊髄細胞に導入したところ、EGF 依存的な Olig2 陽性前駆細胞の増殖が回復した。最後に、胎生14日目の脊髄を CNTF 存在下で単層培養し、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトの分化を観察したところ、*gab1*<sup>-/-</sup> 細胞は野生型に比べてアストロサイトの分化マーカーである S100 と GFAP の発現、オリゴデンドロサイトの分化マーカーである PLP の発現が亢進していた。以上の結果をまとめると、Gab1 がオリゴデンドロサイト前駆細胞や神経幹細胞を含めた神経系前駆細胞の PI3-kinase-Akt 経路を介した EGF シグナル依存的な自己複製に必要であり、その一方でアストロサイトおよびオリゴデンドロサイトの分化あるいは成熟を抑制するということが明らかになった。

我々の研究で、Gab1 は EGF シグナルの下流因子として神経系前駆細胞の増殖制御には関与しているが、FGF2 シグナルの伝達には関与していないことを示した一方で、最近、同じファミリーメンバータンパク質である Gab2 や FRS2 が FGF2 シグナルの下流因子として MAP kinase 経路や PI3-kinase-Akt 経路を活性化して神経系前駆細胞の増殖や生存を制御していることが示されている。これらのことは、複数の成長因子シグナルが相違した細胞内情報伝達因子を介するものの、最終的に相同のシグナル伝達経路を活性化することによって、神経系前駆細胞の増殖・自己複製を制御していることを示唆している。しかしながら、前述したように、我々の研究では、少なくともマウス胎仔脊髄の Olig2 陽性前駆細胞の未分化性維持においては、EGF シグナルと FGF2 シグナルとで作用が相違しており、今後、この違いを生み出していると思われる細胞内シグナル伝達機構の相違点の詳細を明らかにする必要がある。

## 1. 「神経幹細胞の未分化状態の維持・多分化能の維持と分化の制御機構」に関する類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

中枢神経系の再生医学研究の中で、基礎幹細胞研究を指向するこの領域は、世界的にみても質の高い研究が多い。しかしながら、多くの研究は、Sonic Hedgehog, Wnt, Notch という既知のシグナルの神経幹細胞制御における役割を検討するものがほとんどである。この状況下で、我々は、Musashi ファミリー、Hu ファミリーを中心とした解析、ショウジョウバエ成虫型神経幹細胞をモデルとした幹細胞生物学といった極めてオリジナリティーの高い研究展開を示している。Musashi については、ここ 2~3 年は、海外からの実験試料のリクエストも急増し、流行を作り得たという感も強い。Musashi については、関連特許も多く申請した。また、ショウジョウバエの遺伝学を駆使した幹細胞

生物学も、生殖系列で始まったばかりであり、神経系では、我々がパイオニアであることを自負している。また Galectin-1 の神経幹細胞に対する作用に関しては、全く我々のみが解析する originality の高い部分である。今後、我々のこのストラテジーから見い出された神経幹細胞の制御機構が神経再生戦略とどう結びついていくかが重要なテーマとなるであろう。また、我々のように ショウジョウバエの神経遺伝学の成果を神経系の再生医学に結び付けていく研究グループは世界でも稀であると思う。

## II. ES 細胞より分化誘導した神経細胞の FACS による分離・培養

多くの神経変性疾患では、特定タイプのニューロンが変性・脱落する。本研究ではこれらを試験管内で分化誘導し大量調整する技術を開発を行った。神経幹細胞の核は全能性を有しているものの、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) において変性が起きる運動ニューロンや、小脳変性症において変性しているプルキンエ細胞等、発生の初期段階でのみで生産されるニューロンを神経幹細胞から試験管内で誘導することは、実際的には困難であることが経験的に判ってきていた。そこで、ES 細胞からの特定ニューロンの分化誘導法を確立と選択的な分離を試みた。単に分化誘導するのみならず、自ら樹立してきた選択的細胞分離法と組み合わせた技術開発を行い、疾患モデルへ移植するための細胞を調整することができる点が本研究の特色であった。

### II-(A): ES 細胞由来神経幹細胞の分化誘導

Embryoid Body (EB) の形成を介した ES 細胞から分化誘導と選択的培養法 (neurosphere 法) によって得られた神経幹細胞を含む神経系前駆細胞は、in vitro で分化させるとそのほとんどがニューロンになり、Isl-1 および ChAT を発現する運動ニューロンを含むコリン作動性ニューロンと GAD67 を発現する GABA 作動性ニューロンを含んでいることが分かった (図 13)。そして、これら ES 細胞由来神経前駆細胞をマウス新生仔および「成体脳の海馬に移植したところ in vitro と同様にニューロンに分化し、その中にはコリン作動性ニューロン、ドーパミン作動性ニューロンおよび GABA 作動性ニューロンが多く含まれていることが分かった。そして、この神経幹細胞の選択的培養時に sonic hedgehog を加えたところ、in vitro でのコリン作動性ニューロンの分化効率が 50% 程度まで上昇させることができた。また、この EB 由来の神経系前駆細胞は、継代培養を繰り返すと次第にグリア細胞へ分化できるようになっていった。

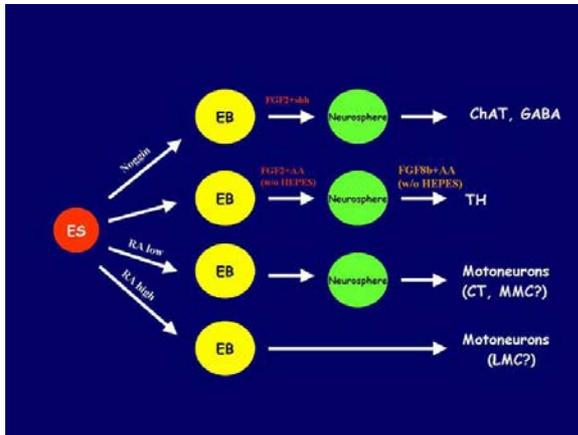


図 13. 胚性幹細胞から特定ニューロン産生法の開発  
 マウス胚性幹細胞から、神経系細胞になりやすい種々の条件下で選択的誘導を試み胚様体 EB 形成 (黄色) を誘導し、そこから神経幹様細胞 (緑色) をニューロスフェア法により選択的に増殖させ、前脳型アセチルコリン作動性ニューロン、運動ニューロン神経および GABA 作動性ニューロンの製造法 (分化誘導法) の開発に成功した。

## II-(B): レチノイン酸による ES 細胞由来神経系細胞における領域特異性の制御

様々な濃度のレチノイン酸(RA)存在下で EB を形成し、神経系細胞の分化段階、あるいは胚の前後軸、背腹軸に沿った遺伝子群の発現を解析した。その結果、RA は濃度依存的に神経系の後方を促し、(図 14)さらに背腹軸の形成にも影響を与えていた。(図 15)また、sonic hedgehog(Shh)やそのシグナルの阻害剤である cyclopamine の投与実験によって、この RA による背腹軸の決定制御は活性型 Shh の発現制御を介していたことが明らかになった。

このように、RA や Shh を用いることによって、ES 細胞より、様々な領域特異性を持った神経系細胞を効率良く分化誘導できることが明らかになった。

図 14

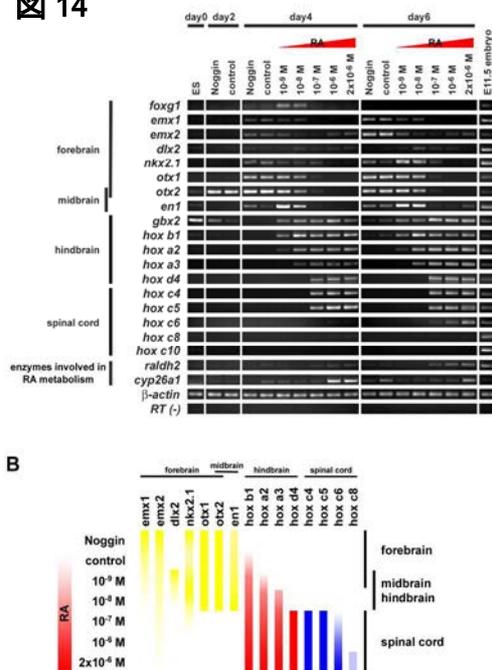


図 14. ES 細胞由来細胞のレチノイン酸依存的後方化

マウス ES 細胞由来の胚様体(Embryoid Body)をレチノイン酸あるいは神経誘導因子 Noggin で処理し、中枢神経系の前後軸に沿ったマーカー遺伝子群(前方から後方へかけて、*bf1-hoxc10* の順)の発現を解析したもの。コントロール群(未処理)と Noggin 処理群においては前脳および中脳マーカーが発現し、低濃度のレチノイン酸処理群では中脳および後脳マーカーが発現し、高濃度のレチノイン酸処理群では脊髄のマーカーの発現が誘導される(Okada et al., *Dev. Biol.*, 2004)。

図 15

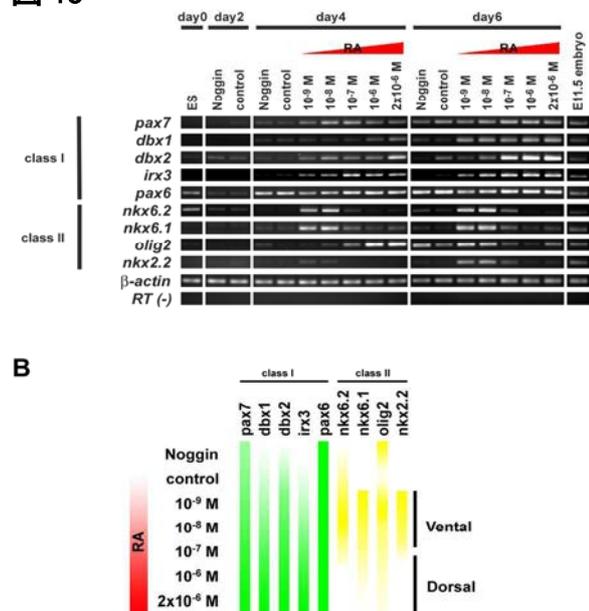


図 15. ES 細胞由来細胞分化におけるレチノ

イン酸の背腹軸情報への影響(Okada et al.,

*Dev. Biol.*, 2004)

## II-(C) 神経幹細胞の時系列特異的な分化能の変化の制御

前述の通り、我々はマウス ES 細胞からの神経幹細胞の分化誘導および選択的培養・増殖法を確立し、さらにレチノイン酸による ES 細胞由来神経系前駆細胞の分化程度や領域特異性の決定に関しての詳細が明らかになってきた。そして、これらの結果は、我々の開発した in vitro での ES 細胞からの神経系分化・誘導系が、実際の中枢神経系の発生をよく模倣していることを示唆していた。具体的には、神経幹細胞の時系列および領域特異的な分化能の変化が類似していた。そこで、特に、幹細胞の時系列特異的な分化能の変化を制御するメカニズムを解明するために、DNA マイクロアレイ解析(2万2千遺伝子)による時系列特異的な遺伝子発現プロファイリングを行った。マウス ES 細胞より胚様体(EB)形成を介して選択的に増殖させた1次 neurosphere とそれを継代した2次 neurosphere より mRNA を抽出し解析を行ったところ、1次 neurosphere で有意に発現の高い遺伝子を 618 個、2次 neurosphere で有意に発現の高い遺伝子を 840 個同定した。また、これらの遺伝子のうち、マウス胎仔11日目と新生仔の側脳室周囲細胞の比較プロファイリングでも同様な発現変化が認められたものは、それぞれ 199 個および 244 個であった。これらは、細胞周期関連因子、転写因子、クロマチン再構成因子、分泌因子、細胞接着因子、シグナル伝達分子等、様々な種類の遺伝子を含んでおり、現在、特に epigenetic な遺伝子発現制御に関与すると思われる因子を中心に機能解析を進めている。

## II-(D) 霊長類 ES 細胞の神経分化法の開発

マウスでの研究成果を生かし、カニクイザル、マーモセットおよびヒト ES 細胞より神経幹細胞を分化誘導し、霊長類神経発生を in vitro で再構成するシステムの開発を試みた。その結果、培養条件の詳細に違いが見られたものの、マウス ES 細胞と同様の神経誘導および神経幹細胞の選択的培養が可能になった(図 16~18)。

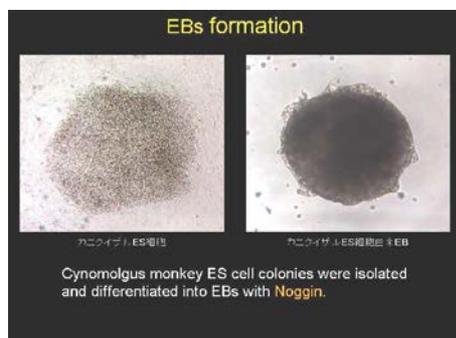


図 16. カニクイザル ES 細胞(左)及びそれに由来した胚様体(EB)(右)



図 17. カンクイザル ES 細胞由来胚様体から誘導したニューロスフェア

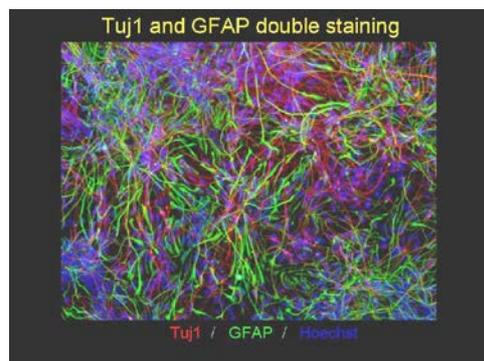


図 18. カンクイザル ES 細胞由来胚様体から誘導したニューロスフェアを分化誘導して得られたニューロン(赤)及びアストロサイト(緑)

## II. 「ES 細胞より分化誘導した神経細胞の FACS による分離・培養」に関する類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

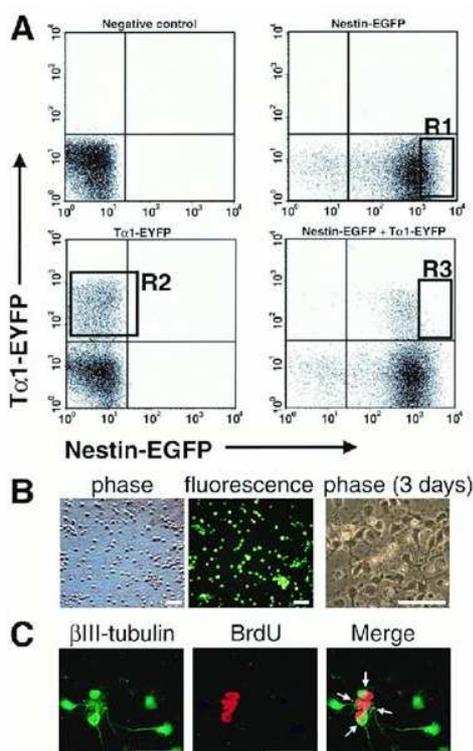
ES 細胞からの各種神経細胞の誘導法の開発は、極めて競争の激しい研究テーマである。この状況下で、ES 細胞からの前脳型アセチルコリン作動性ニューロンの誘導に成功しているのは、我々のグループが最初である(特許取得:特許第 3660601 号)。競争の激しいドーパミン作動性ニューロン、運動ニューロンの誘導についても、我々のグループは新規の誘導法を開発することに成功している。また、ドーパミン作動性ニューロン(正確には、チロシン水酸化酵素発現細胞)を TH-GFP というレポーターを用いて生きた状態で純化することに成功し、この発明を特許申請している。

## III. 神経幹細胞、中間前駆細胞、特定タイプのニューロンの選択的分離法の確立

中枢神経系では、神経幹細胞-神経前駆細胞-幼弱ニューロン-特定ニューロンという系譜を経て分化が進行するが、比較的解析の進んでいる血球系とは異なり、分離のよりどころとなる細胞表面マーカーが不明なために、脳組織よりこれらの細胞を直接分離する方法が未だ確立できていない。そのため特定の個性を持ったニューロンへの分化誘導機構に関しては、十分な研究がなされているとは言えない。本研究ではこれらの問題をクリアーすることを目的とし、特定タイプのニューロンを選択的

に分離する方法を確立する。

**III-(A): GFP レポーター遺伝子を用いた分離技術:** ニューロンは、多能性を持つ神経幹細胞からニューロンのみを産み出す中間的前駆細胞(ニューロン前駆細胞)を経て特定のニューロンへ分化すると考えられている。ニューロン前駆細胞は多能性神経幹細胞よりも効率よく成熟型ニューロンへ分化するため、神経疾患の細胞移植療法への応用が期待される細胞と言える。しかしながら、このニューロン前駆細胞に特異的に発現する細胞表面マーカーがないため、従来この細胞を生きたまま同



**図 19. Tα1-EYFP と *nestin*-EGFP レポーターを用いたニューロン系にコミットした神経前駆細胞の分離**

A. Tα1-EYFPと*nestin*-EGFPレポーターを用いたDual Colorフローサイトメトリーのパターン。上段左は対照群野生型マウス、上段右は*nestin*-EGFPマウス、下段左はTα1-EYFPマウス、下段右は、*nestin*-EGFP, Tα1-EYFP ダブルトランスジェニックマウス由来の胎生期脳の細胞のDual Colorフローサイトメトリーのパターン。

B. 分取したTα1-EYFP単独陽性細胞(R2分画)は、培養下で分裂能を持たず、培養開始3日後にはニューロン様の形態を示した。

C. 分取したTα1-EYFP, *nestin*-EGFP二重陽性細胞(R3分画)は、培養下で分裂能を示し試験管内でBrdUを取り込み、ニューロンへ分化しニューロンのマーカーであるβIII-tubulin陽性となることが示された。このことにより、Tα1-EYFP, *nestin*-EGFP二重陽性細胞として、ニューロン系にコミットした神経前駆細胞を生きた状態で分離してることが可能となった。

定・分離することは不可能であった。我々はニューロン前駆細胞を可視化し生きたまま分離することを目的として、蛍光波長の異なる2つの GFP 変異体 EGFP と EYFP を、ニューロン分化初期過程の互いに重複した異なる時期に発現する2つの遺伝子 Nestin と Tα1 の制御下で発現するトランスジェニックマウスを作成した。*Nestin*-EGFP は、多能性神経幹細胞で最も強く発現し、ニューロンまたはグリアへの分化と共にその発現が低下した。一方、Tα1-EYFP は増殖性のニューロン前駆細胞と幼弱なニューロンだけに発現し、多能性神経幹細胞とグリア細胞には発現しないことが明らかになった。*Nestin*-EGFP と Tα1-EYFP の両方を有するトランスジェニックマウスの胎仔神経系組織より、EGFP/EYFP 二重陽性細胞を FACS によって分離し解析したところ、効率よく分裂してニューロンのみに分化的ことが明らかになった(Sawamoto et al., 2001c)。こうしたニューロン前駆細胞の分離法

はニューロン分化制御機構の研究や新たな神経疾患治療法の開発に役立つものと考えられる。

### III-(B): Nestin-d4-Venus マウスの作成と解析:

当研究室では、以前より神経系前駆細胞に発現している *nestin* 遺伝子のエンハンサー制御下に Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)を導入した遺伝子改変マウスを利用し、生きたまま神経系未分化細胞を単離する試みがなされてきた(Kawaguchi A, et al: *Mol Cell Neurosci* 17: 259-73 (2001))。しかしながら、従来レポーターとして汎用されてきた GFP やその改変体の多くは非常に安定なタンパク質であるために残存の蛍光活性を排除できなかった。そこで我々は、レポーターとして改変 YFP である蛍光物質“d4-Venus”を導入した Nestin-d4-Venus 遺伝子改変マウスを作製した。Nestin-d4-Venus は、従来の YFP と比較して蛍光強度が強く、迅速に発光し、かつ半減期も短い。よって、*nestin* 遺伝子のプロモーター/エンハンサーからの発現をより正確に模倣した蛍光活性が得られるようになった。組織免疫染色により Nestin-d4-Venus 遺伝子改変マウスでは、従来の Nestin-EGFP 遺伝子改変マウスと比較して、発生期で神経幹細胞の局在が知られている脳室周囲 (VZ) においてより限局した発現パターンを示した。また、これらの細胞は分化したニューロンのマーカーである  $\alpha$ -tubulin 陰性であった。さらに Fluorescence activated cell sorter (FACS) を利用した解析により d4-Venus 陽性細胞画分には自己複製能と多分化能を有する神経幹細胞が濃縮されることが確認された。大脳皮質の形成は、神経管の内側から外側まで放射状に伸びている神経幹細胞(放射状グリア細胞)が対称、あるいは非対称に分裂しニューロンあるいはグリア細胞を産生することによって行われる。この放射状グリア細胞の細胞体は VZ の中で細胞周期依存的に上下していることが知られている。すなわち、DNA の複製が行われる S 期には軟膜側に移動するのに対して、細胞が分裂する M 期には脳室側へと移動する。チミジンの類似体である bromodeoxyuridine や iododeoxyuridine が DNA 複製の際に取り込まれることを利用して細胞周期と、VZ の中での Nestin-d4-Venus の発現強度の相関を組織免疫染色により確認したところ、d4-Venus の発現は G1 から S 前期において特に強く、G2、M 期においては減衰していることが明らかとなった。放射状グリアの細胞突起は、M 期において一旦無くなるか、細くなることは古くから知られており、中間径フィラメントを構成する *nestin* 遺伝子の発現が直後の G1 期に顕著に上昇することは、放射状グリアが構造を保つ上で非常に重要であると考えられた。

III-(C): Side Population 法を用いた分離技術: 一方で、当研究室では Hoechst 33342 という DNA に結合する色素を用い、抗体を使用しない新たな幹細胞純化法を試みている。Hoechst 33342 は、Bisbenzimid というクラスに属する蛍光色素で、細胞透過性が非常に高く、そのため生きた細胞に

細胞を固定することなく取り込まれる。また、単一の色素でありながら UV で励起された時に、405nm および 600nm の蛍光を発し、骨髄細胞染色では通常の Cell Cycle アッセイで見られる G0/G1 および S/G2 の分画の他に、G0/G1 よりもさらに暗い部分に非常に特異なパターンを持つ Hoechst 陰性の細胞集団が存在する。この細胞群は Linear な細胞集団からやや横にずれて突出した形で存在することから Side Population Cells(以下 SP 細胞)と名付けられた。

骨髄中に存在する最も未熟な細胞はこの SP 細胞中に存在することがすでに報告されているが、当研究室ではこの方法を用いて神経幹細胞の同定への可能性を調べた。SP 細胞は骨髄だけでなく様々な臓器で同等の細胞分画が存在しており、特に神経系では当研究室で作製した *nestin*-EGFP トランスジェニックマウスを用い、神経幹細胞が終生存在する線条体細胞について解析を行ったところ、SP 細胞は胎児性神経幹細胞を多く含む *nestin*-EGFP 強陽性細胞および、*nestin*-EGFP 弱陽性細胞にまたがって存在していることが明らかになった。また各種細胞表面マーカーとの関係を調べ、特に成体における神経幹細胞分画(CD24<sup>low</sup>/PNA<sup>low</sup>)に SP 細胞が完全に含まれることを見いだした。さらに線条体・大脳皮質・海馬それぞれについて SP 細胞をソーティングし、神経系を中心とした各種細胞マーカー(βIII tubulin, GFAP, Musashi1, etc.)に対する抗体で染色したところ、未分化な神経系細胞で発現している Notch1 が、どの発生段階においても約60%の細胞で発現されていた。以上の結果より、Hoechst33342 用いた神経 SP 細胞分離法は多能性を持つ神経幹細胞を分離する非常に有用な手段であることが示唆され、現在その機能について検討を始めている。

### III-(D): 骨髄由来細胞の神経分化の検討

#### i) 骨髄間質細胞における神経幹細胞選択的 *nestin* 遺伝子の発現

Nestin 蛋白質は神経幹細胞のマーカー蛋白質として知られているが、血管内皮細胞をはじめとする中胚葉系の一部の細胞でも発現がみられるため、骨髄由来の細胞において Nestin 蛋白質の発現が認められても中枢神経系未分化細胞であることの指標にはならない。*nestin* 遺伝子の3つのイントロンのうち、第2イントロンエンハンサーは神経幹細胞に選択的に発現を誘導する。我々が開発した

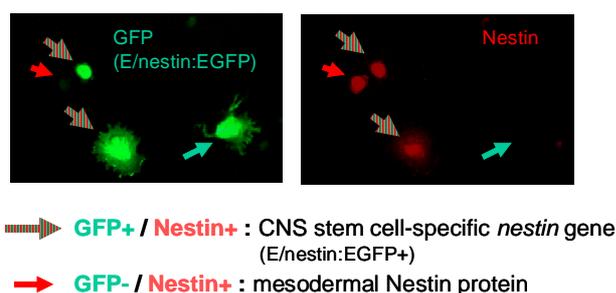
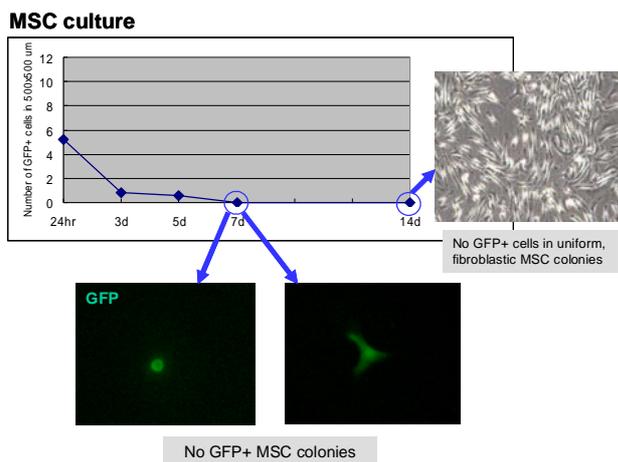


図20. マウス骨髄間質細胞における神経幹細胞選択的*nestin*遺伝子の発現。Left: 神経幹細胞選択的*nestin*遺伝子発現細胞(green)。Right: Nestin蛋白質発現細胞(red)。

*nestin* 遺伝子のセカンドイントロンエンハンサーの制御下で蛍光物質の GFP を発現させるレポーター遺伝子を導入した前述のトランスジェニックマウス (*nestin*-EGFP マウス(Kawaguchi et al, 2001))を用いることにより、GFP の発現の有無から間葉系 Nestin 蛋白質陽性細胞と、神経幹細胞選択的 *nestin* 遺伝子発現細胞を同定、選別することを可能にした(図-20)。後述する培養条件により、骨髄間質細胞において、神経幹細胞に選択的な遺伝子発現を誘導することが可能であった。

## ii) BMP antagonist による骨髄間質細胞の神経幹細胞選択的 *nestin* 遺伝子の発現誘導

骨髄間質細胞は、*in vitro* での細胞接着の性質を利用して、骨髄細胞から選択的に培養増殖される。骨髄間質細胞は多能性 (multipotential) を有することが知られ、間葉系幹細胞としての性質を持つ。GFP の発現を指標とすることにより、細胞を固定することなく、培養骨髄間質細胞における神経幹細胞選択的 *nestin* 遺伝子の発現を prospective に観察した。培養開始 24 時間後に、接着細胞として骨髄間質細胞が分離されるが、この時点ではごく一部の細胞に神経幹細胞選択的 *nestin* 遺伝子の発現が観察される(図 21)。しかし、骨髄間質細胞の増殖期になるとその発現は徐々に失われ、GFP 発現細胞にコロニー形成はみられなかった。培養 14 日後には、骨髄間質細胞は繊維芽細胞様の単一の形態を示すコロニーを形成するが、GFP の発現はみられず、骨髄間質細胞の増殖により神経幹細胞選択的 *nestin* 遺伝子の発現が失われた。



**図21.** GFPで可視化されたマウス骨髄間質細胞における神経幹細胞選択的 *nestin* 遺伝子の発現。骨髄間質細胞の増殖に伴い、GFPの発現が失われる。

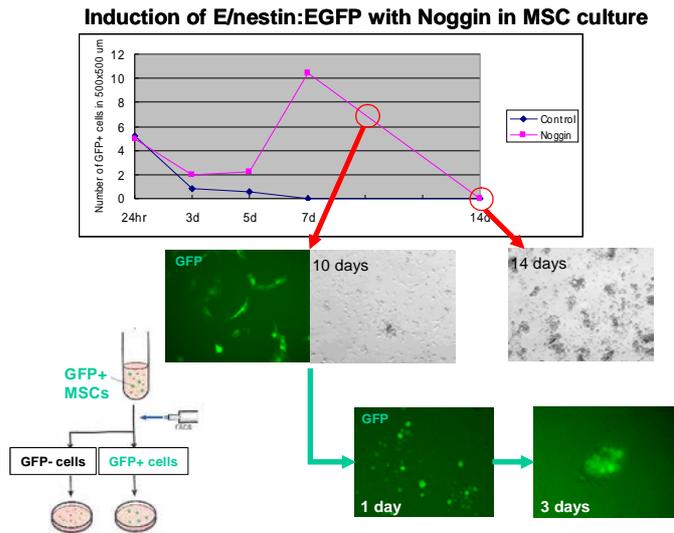


図22. マウス骨髄間質細胞における神経幹細胞選択的 *nestin* 遺伝子の発現誘導。BMP antagonist (Noggin), bFGF, IGF-1の添加により、GFPの発現細胞数が増加した。GFP陽性細胞をセルソーターにて分離し、神経幹細胞増殖培地にて培養。Neurosphere様の細胞塊を形成するが、増殖能は認められなかった。

そこで、骨髄間質細胞の培養条件下で、液性因子の添加により神経幹細胞選択的 *nestin* 遺伝子の発現の誘導を試みた。Bone morphogenetic protein (BMP)の antagonist である Noggin は、ES 細胞を中枢神経系へ分化誘導するほか、神経幹細胞からの新生ニューロンの産生を促進するなどの作用が知られている。Noggin のほか、神経幹細胞の増殖因子である bFGF、そして IGF-1 を添加した培養条件にて、骨髄間質細胞の約 2%に神経幹細胞に選択的な *nestin* 遺伝子の発現を示す GFP 陽性細胞を誘導することに成功した(図 22)。しかし培養を継続すると、骨髄間質細胞の接着性が失われ、細胞増殖はみられず培養 14 日後には GFP の発現も喪失した。そのため、骨髄間質細胞に対する GFP の発現誘導効果が認められる時期を選択し、培養 10 日後に GFP 陽性細胞をセルソーターにより分離、抽出した。この神経幹細胞選択的 *nestin* 遺伝子を発現している GFP 陽性骨髄間質細胞を、神経幹細胞増殖培地(Neurosphere 法)にて培養した。GFP の発現を保ったまま、培養 3 日後には neurosphere 様の細胞塊を形成したが、増殖能は認められず徐々に GFP の発現は消失した。この neurosphere 様の細胞には、自己複製能や中枢神経系多分化能はみられなかった。すなわちこの実験から、骨髄間質細胞の基本的性質である細胞接着性と、神経幹細胞の非接着性細胞としての性質が、細胞の生存・増殖においては相反していることが示唆された。

### iii) 骨髄細胞中の神経幹細胞選択的 *nestin* 遺伝子の発現

骨髄間質細胞は、*in vitro* において細胞接着性により分離培養される。一方、血球系多分化能を有する造血幹細胞は、骨髄細胞中から密度勾配により分離される単核球に含まれる。骨髄間質細胞に限らず、骨髄細胞中の各分画における神経幹細胞選択的 *nestin* 遺伝子の発現を、トランスジェ

ニックマウスから採取した骨髄細胞を用いて、GFP の蛍光強度を指標にセルソーターを用いて検討した。

**III-(F): 神経幹細胞特異的抗原の同定とモノクローナル抗体の作製:** 神経幹細胞特異的に発現している表面抗原を認識するモノクローナル抗体ライブラリーを作成するために、神経幹細胞が濃縮された細胞群をラットに免疫し、得られたモノクローナル抗体を FACS と免疫組織化学染色によってスクリーニングしたところ、神経幹細胞を特異的に認識すると思われる抗体を産生するハイブリドーマを 10 クローン得た。さらに、上記の細胞群から mRNA を抽出、cDNA ライブラリーを作成し、現在これらを使って、COS 細胞を使った発現クローニング法によって神経幹細胞に特異的な細胞表面抗原遺伝子の単離を行ったところ、radial glia を染色する抗体の一つが既知の膜タンパク質 (特許申請を考慮しているため、分子名は記載できません) を特異的に認識していることを確認した。

### III 「神経幹細胞、中間前駆細胞、特定タイプのニューロンの選択的分離法の確立」に関する類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

細胞表面抗原に対する抗体を用いて神経幹細胞を予期的(prospective)に同定、分離する研究は、Stanford大学のIrving Weissmanらが抗AC133抗体を用いたヒト神経幹細胞の濃縮(Uchida et al., PNAS, 2000)などの研究が発表され、競争が厳しいところである。しかし、関連した研究の多くが既知の表面抗原分子に対する抗体を用いて、その組み合わせにより神経幹細胞を濃縮するというものがほとんどであり、しかも神経幹細胞の維持、分化制御といった観点からの解析に乏しかった。この状況下で、我々は神経幹細胞を豊富に含んでいると考えられる細胞集団をラットに免疫することにより、多数のモノクローン抗体を分離した。この中で、*nestin*-GFPの蛍光強度と相関のある免疫染色能のあるモノクローン抗体をスクリーニングするとともに、得られたモノクローン抗体の認識するエピトープをコードするcDNAを単離とその解析を行った。この中のひとつは、放射状グリアの細胞表面に発現している既知の膜蛋白質であった。前述したように特許申請を考えているため、分子名をここに記載することはできないが、神経幹細胞の制御機構を解明する上で興味深いシグナル関連分子であり、神経幹細胞研究の新展開につながりものと期待できる。

### **IV. 神経疾患モデル動物への細胞移植による細胞補充とニューロンネットワーク再建による機能修復の試み**

**IV-(A):マウス ES 細胞由来前脳型神経前駆細胞の記憶障害モデル動物への移植** ES 細胞から分化誘導される神経幹細胞の in vivo における分化能を検定するとともに、コリン作動性ニューロンの変性による記憶障害の治療への有効性も確かめた。具体的には、上記の in vitro でコリン作動性を効率的に生産できる神経前駆細胞の培養系を用い、そこで得た神経系前駆細胞を、イボテン酸によって中隔核のコリン作動性ニューロンを変性脱落させ記憶障害を起こしたマウスの海馬に移植した(図 23)。記憶障害の程度は水迷路テストにより検定した。その結果、分化生着したニューロンのほとんどはコリン作動性ニューロンであり、記憶障害も回復させることが分かった。

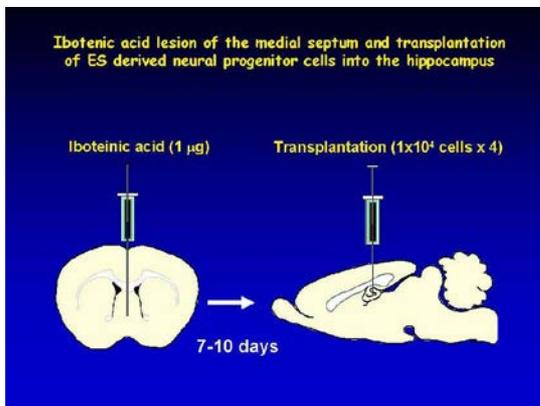


図 23. マウス中隔核に神経毒であるイボテン酸を注入し、記憶障害モデルを作成した。同動物にマウス ES 細胞由来前脳型神経前駆細胞を移植し、空間学習能力等の認知能力が回復するかどうか確認を行った。

**IV-(B): マウス ES 細胞由来成熟ドーパミンニューロンの移植によるパーキンソン病モデルラットの機能回復**

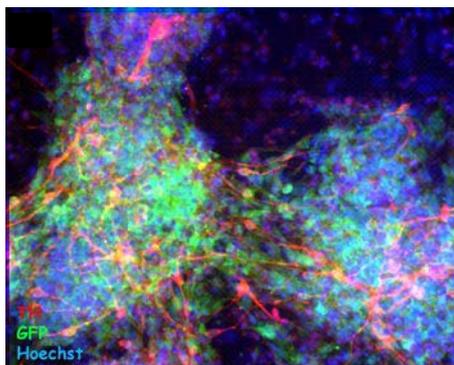


図 24. TH-eGFP 遺伝子を導入した ES 細胞

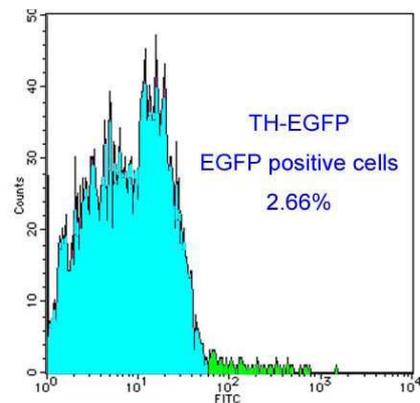


図 25. TH-GFP 陽性細胞の分取

(Yoshizaki et al., 2004)

上記の ES 細胞の EB 形成を介した neurosphere 法による神経前駆細胞の選択的培養からのドーパミン作動性ニューロンの分化系は、ドーパミン作動性ニューロンの in vitro での長期生存維持が難しいことが判明した故、細胞移植のソースとなる成熟ドーパミン作動性ニューロンを Kawasaki ら(2000)によって開発された、ストローマ細胞の一種である PA6 上で ES 細胞を直接分化させる方法(SDIA 法)によって、TH-eGFP 遺伝子を導入した ES 細胞を in vitro で 12 日間分化させることによって得た(図 24)。

次に、これらの細胞のうち、eGFP 陽性の成熟ドーパミン作動性ニューロンだけを FACS によって精製しようとしたところ、多くの eGFP 陽性は死細胞分画に検出されたものの、生細胞うちの数パーセントを占める画分(図 25)を回収し、パーキンソン病モデルラットの線条体に  $1 \times 10^5$  cells 移植した。その結果、1 個体辺り平均 100 のドーパミンニューロンの生着が観察され(図 26)、アンフェタミンローテーションテストによる行動解析によると、平均 15% 程度の症状改善が見られた。尚、同様の方法で分化させた細胞を TH-eGFP による精製を行わずに、同様に移植したところ、10 例中 4 例で tumor の発生が確認された(図 27)。

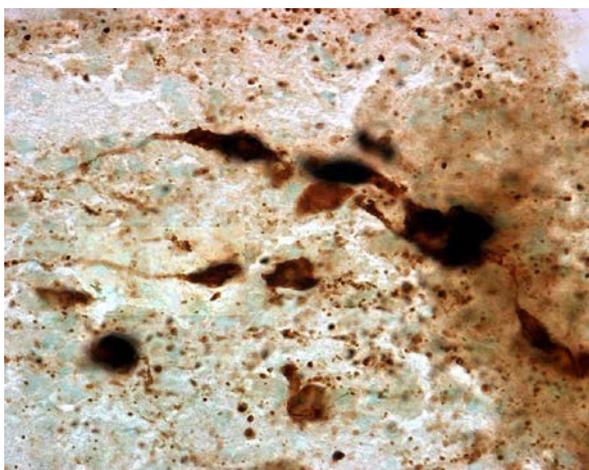


図 26 生着した ES 細胞由来ドーパミンニューロン



図 27. SDIA 法によって分化誘導したものの、TH-eGFP細胞をセルソーターによって分取しなかったES細胞由来細胞集団を移植することによって生じた腫瘍塊

以上の結果より、ES 細胞よりドーパミン作動性ニューロンを分化誘導し、パーキンソン病の移植治療に利用する際に、TH-eGFP 遺伝子導入と FACS による精製を行うことは、機能回復および安全性の面において、非常に有効であることが示唆された (Yoshizaki et al., 2004)。

#### **IV-(C):マウス ES 細胞由来運動神経前駆細胞の ALS モデル動物への移植の試み**

(実験方法)「II. ES 細胞より分化誘導した神経細胞の FACS による分離・培養」でも関連した記載を行ったように、我々はマウス ES 細胞から胚様体(Embryoid Body: EB)を経て、多能性神経幹細胞を含む未分化神経系前駆細胞の集合であるニューロスフェアを形成させる培養法を確立してきた。この方法に準拠し、我々は、マウス胚性幹細胞(ES 細胞)から運動ニューロンとその前駆細胞を誘導する培養法を確立した。本研究では、EB 形成時に後方化因子であるレチノイン酸(RA)を作用させることにより、ES 細胞由来の神経系前駆細胞に後方の領域特異性を付与し、神経管後方より発生する運動ニューロンとその前駆細胞を高率に生み出すニューロスフェアの誘導法を確立を試みた。まず、RA を用いて EB から高率にニューロスフェアを誘導する培養系の確立を行った。これらの解析は、RT-PCR 法やウェスタンブロット法などの分子生物学的手法、免疫染色法を用いて行う。さらに誘導した細胞の *in vitro* での性質を、細胞培養や電気生理学的手法を用いて明らかにする。さらに、*in vivo* での細胞の生着とその動態を確かめる。特に ALS モデル動物である変異型 SOD1(G93A)トランスジェニックラット:mSOD1 ラット)の腰髄へ ES 細胞由来神経系前駆細胞を移植し、免疫染色法により移植細胞の性質を、さらに運動機能の改善についても解析した。ALS モデルラットに関しては、治療効果判定法がまだ十分に確立されていないため、我々の研究室独自の運動機能解析法(治療効果判定法)を開発した。

(研究結果と結論):まず、様々な濃度の RA を用いて EB を形成させ、RT-PCR 法、western blot 法、免疫染色法により種々の遺伝子の発現パターンの解析を行った。RA は濃度依存的に神経分化と後方化を促し、低濃度の RA を用いた時に形成される EB 中に、Nestin 陽性、Sox1 陽性の、未分化神経系前駆細胞が多く含まれ、これらの細胞が中脳、後脳の領域特異性を持つことが明らかとなった。そこで低濃度の RA を用いて形成させた EB を分散し、線維芽細胞増殖因子(bFGF)存在下で浮遊培養させたところ、高率にニューロスフェアを形成させることに成功した。この一次ニューロスフェアは接着培養で分化させるとニューロンを多く生み出し、一方で一度継代した二次ニューロスフェアからはニューロンおよびグリアを生み出すことが明らかとなった。この結果は *in vivo* の中枢神経の発生をよく模倣していることから、中枢神経発生モデルとしても有用であると考えられた。さらに、低濃度の RA を用いて誘導したニューロスフェアからは、運動ニューロンやその前駆細胞のマーカーである

HB9 陽性の細胞が高率に誘導された。このようにして誘導したニューロンは、電気生理学的手法(パッチクランプ法)を用いて解析すると活動電位が記録され、さらに、筋芽細胞株由来の myotube と共培養すると *in vitro* で  $\alpha$ -BTX により標識される neuromuscular junction を形成した。また EGFP で標識した ES 細胞由来の神経系前駆細胞を、発症前の mSOD1 トランスジェニックラットの腰髄に移植したところ、生着し NeuN 陽性のニューロンに分化した。また、その一部は Choline acetyl transferase(ChAT)陽性のコリン作動性ニューロンに分化していた。これらの結果から、ES 細胞由来の前駆細胞が *in vivo* で機能的な運動ニューロンに分化できる可能性が示唆された。

また、細胞治療による治療効果判定のために、ALS ラットの運動機能解析法を開発した。ALS ラットは多様な表現型を示すが、体重測定、Inclined plane test、3次元自動運動機能解析装置、独自に開発した motor score などにより、再現性のよい統一かつ客観的な評価法を確立することができた。ES 細胞から低濃度レチノイン酸を用いて高率にニューロスフェアを誘導することができた。誘導したニューロスフェアからは、運動ニューロンとその前駆細胞のマーカーである HB9 を高率に発現し、電気生理学的に活動電位を発するニューロンが誘導された。さらにこれらのニューロンと myotube とのコンタクトも認められたことから、機能的な運動ニューロンとその前駆細胞を、*in vitro* でマウス ES 細胞から高率に誘導できる培養法を確立できたと考えられた。さらに、これらの細胞を ALS ラットの腰髄に移植したところ、生着しコリン作動性ニューロンを含むニューロンに分化したことから、生体内でも機能的な運動ニューロンに分化し得ると考えられた。今後、さらに移植方法を改良するとともに、細胞を移植した ALS モデルラットの運動機能の改善についても解析していく予定である。また、ヒト ES 細胞を用いて同様の実験を行い、ヒト ES 細胞を用いた ALS における運動ニューロンの再生および、細胞治療法を開発していく予定である。

マウス ES 細胞から運動ニューロンとその前駆細胞を高率に誘導する方法を確立した。また、これらの細胞は *in vivo* でもコリン作動性ニューロンを含むニューロンに効率に分化できることが示された。運動ニューロンの機能解析、ALS の病態解析、および薬剤スクリーニングなどを *in vitro* で行うためのモデルとして、またヒト ES 細胞へ同様の手法を応用することにより、ALS における再生医学への応用が期待される。

**IV-(D):ヒト神経幹細胞移植によるスナネズミ虚血モデルの治療に関する解析** ヒト神経幹細胞 Neural Stem Cells(NSC)は、長期間培養することによって増殖させることができるため、慢性期脳梗塞患者の神経学的機能の改善のための応用が期待されている。脳梗塞の治療への応用の可能性を検討するために、我々はヒト神経幹細胞・前駆細胞 Neural Stem /Precursor Cells(NSPC)が濃縮さ

れたニューロスフェアを70週以上の長期間に渡って培養した後に、虚血4日後のスナネズミ脳の障害部位に移植し、感覚運動と認知機能を4週に渡って評価した。NSPC を移植された動物では、培地のみを注入した動物と比較して、神経学的機能の改善が明瞭に認められた。NSPC を移植した動物の障害部位の体積は、培地のみを注入した動物に比べ、著しく小さいことを明らかにした。移植された NSPC の約8%が主として梗塞部位の周辺に生着し、MAP2, GFAP または NG2 を発現していることを確認した。以上の結果から、長期培養後の NSPC は、虚血後のスナネズミ脳内で移動し、ニューロンおよびアストロサイトに分化し、神経学的機能を改善させる能力を保持しているものと考えられた(Ishibashi et al., 2004)。

#### **IV. 「神経疾患モデル動物への細胞移植による細胞補充とニューロンネットワーク再建による機能修復の試み」に関する類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ**

前述したように、ES 細胞から前脳型アセチルコリン作動性ニューロンの誘導法は、我々のグループしか成功していない。さらに我々は、前脳型アセチルコリン作動性ニューロンが集中して存在する神経核である中隔核に神経毒であるイボテン酸を注入することによって作成した記憶障害モデル動物に、前脳型アセチルコリン作動性ニューロンを作る能力のある 神経前駆細胞を移植することにより、移植された細胞は、宿主海馬内で前脳型アセチルコリン作動性ニューロンに分化し、宿主海馬 CA2-CA3 領域のニューロンとシナプスを形成し、モーリス水迷路を用いた解析により、同動物の空間学習能力が回復していることを示すことに成功した。このことは、認知能力の低下も再生医学研究の題材となりうることを示している。

また、CREST のほかにそれ以外の研究費でもサポートされている題材ではあるが、我々はヒト脊髄損傷の前臨床研究系の開発を目的として、コモンマーモセットを用いた霊長類の脊髄損傷モデルの確立を行い、ヒト神経幹細胞移植による機能回復に成功し、世界的にも大きな注目を集めた。

#### **(2)研究成果の今後期待される効果**

##### **1. 神経幹細胞の未分化状態の維持・多分化能の維持と分化の制御機構**

###### **(A) 神経幹細胞に強く発現する RNA 結合蛋白質 Musashi ファミリーの機能解析**

ショウジョウバエ、マウスのモデル生物系を用いて研究することにより、Musashi 蛋白質の細胞内機能が明らかとなってきた。また、結合配列をもとにした下流標的遺伝子のスクリーニングにより神経幹細胞(または神経系前駆細胞)の性質にどのように寄与しているのかが一部ではあるが明らかとなった。また、神経系の幹細胞だけではなく、小腸、乳腺などの幹細胞においても Musashi1 が発現していることが明らかとなった。それぞれの組織における特有の標的遺伝子は現在のところ定かではないが、

小腸においては HES1 陽性である crypt の幹細胞に Musashi1 が強く発現していることが明らかとなり、本研究で明らかにした様に Musashi1 が発現している細胞で Notch シグナルが活性化していることを示すことができた。これらを踏まえ、Musashi1 は小腸などの組織幹細胞の良いマーカーとなることから幹細胞を用いた組織修復医療を将来的に見据えたよい tool になることが期待される。また、Musashi1 はグリオーマなどの脳腫瘍細胞にも強発現しており、発現量のレベルが悪性度と比例していることを示した。*musashi1* が癌の原因遺伝子である事実は現在のところ無いが、Musashi1 の発現を指標に悪性細胞の生存・増殖を障害する様な技術の確立できるのではないかと期待している。このように、Musashi 蛋白質についての基礎研究の成果は、実用面に応用できる可能性が高く、医療の現場と強固に手を組み、基礎研究の社会的還元も行っていく考えである。同時に、我々の研究チームは今後も Musashi について発生・分化の観点から以下の様に発展的な基礎研究に専念する予定である。

継続的研究として、ショウジョウバエの Musashi について引き続き研究を行う。幼虫期ショウジョウバエ中枢神経系の optic proliferation center に存在する上皮様幹細胞とその幹細胞から生み出される neuroblast (神経芽細胞) において、Musashi の過剰発現を行うと未分化な細胞が増殖する表現型を示し、幹細胞 (前駆細胞) の性質・増殖に関与していることが推測されている。この組織の幹細胞は、胎生期ほ乳類中枢神経系の神経幹細胞と同様の自己保存的な分裂様式を示している細胞であり (本研究チーム中尾未発表データ)、胎生期ほ乳類の神経管において神経幹細胞が分裂して娘細胞を生み出す様式に近い。そこで、このショウジョウバエ神経上皮組織における Musashi の機能を遺伝学的を用いて解析し、そこで得られた知見を *musashi1,2* のノックアウトマウスの神経幹細胞の挙動と比較対比させる。

さらに、我々は Musashi の翻訳抑制について作用メカニズムの探求を掘り下げる。Musashi1 結合蛋白質の一つが poly(A) binding protein (PABP) であることをつきとめ、基本翻訳因子 complex の中枢に存在する eIF4G と PABP の相互作用を阻害していることを明らかにしているが、Musashi1 は 5' cap 構造結合蛋白質 eIF4E の結合蛋白質にも結合することも新たに明らかにしていく。このことは配列特異的な RNA 結合蛋白 Musashi1 が Musashi1 結合配列を有する mRNA の 5' cap 構造に依存した翻訳を「選択的に」「強固に」停滞させることを意味する。また、この 5' cap 構造に依存した翻訳は、栄養因子由来の細胞生存シグナル、低酸素あるいは放射線などの刺激によって影響を受けるが、下流において種々の kinase、initiation factor 群が厳密に制御しているものである。まさに最終点において翻訳制御が遺伝子発現のゲートキーパーとなっている。Musashi1 は *m-numb*, *pleiotropin* などの下流標的 mRNA に結合していると同時に翻訳制御因子と相互作用して幹細胞における翻訳を制御し

ているが、このほかの下流標的遺伝子を同定することで、mRNA 転写の gene tip 解析では明らかにできない神経幹細胞内の制御された蛋白質発現 profile を明らかにしたいと考えている。

最後に、複数のモデル生物系を用いて神経幹細胞における Musashi 蛋白質ファミリーの機能解析を以上のように行い、発生生物学、分子生物学、神経科学、幹細胞生物学、再生医療などの複数の領域に働きかける成果をあげることが目標としたい。

#### (B) 神経幹細胞の長期維持機構に関する研究

生体の糖鎖分子群は、極めて多彩でありその機能的意義は未知の点が多い。幹細胞研究においても、それに特異的に発現する糖鎖分子や、なんらかの糖鎖構造を介した組織微小環境との相互作用が重要視されてきている。しかしながら、遺伝子や蛋白機能の研究に比較すると、その機能は未解明な点が多い。機能解明を妨げる原因の一つとして、生体内の糖鎖構造は、非常に複雑で結晶化が困難であり、またその配列はゲノムに直接コードされていないため、現在でも直接的な研究が困難な点が挙げられる。一方で糖鎖分子は、その構造を特異的に認識するレクチンと対になってその機能を発揮する事が多く、これまで種々のレクチンを用いて、糖鎖構造の予測やその機能的意義が研究されてきた。今回我々の研究により、レクチン-糖鎖結合が、幹細胞の自己複製過程に重要な役割を果たす事が示唆された。今後 Galectin-1 の認識する神経幹細胞上の糖鎖構造を詳細に解析する事により、糖鎖分子構造の持つ生体機能の解明に貢献できる可能性が高い。

また、Galectin-1 は、複数の臓器幹細胞に高い発現がみられるため、神経だけに限らず種々の幹細胞の自己複製に深く関与している可能性がある。よって本研究を契機に、幹細胞に共通な自己複製機構を解明できる可能性がある。

一方、Galectin-1 は、脳虚血時に神経幹細胞やその周囲で発現が上昇するため、中枢神経の障害に於ける組織自己修復の機構という観点からも、今後の機能的意義の解析が重要である。本研究を進める事で将来、神経幹細胞の自己複製の解明および中枢神経再生手法の開発の両方に貢献できる可能性がある。

また、同研究に付いては、特許出願済みであり、バイオ関連企業への licensing も完了している。

#### (C) Hu タンパク質による神経幹細胞の分化制御機構の解明

脊髄損傷、脳血管障害などの神経外傷・疾患に対して現在のところ有効な治療法はなく、有効かつ安全な新しい治療法の開発は社会的急務である。これらの障害に対して神経再生療法の実現が期待されているが、臨床応用に至るまでにはいくつかの問題を克服しなくてはならない。我々は細胞移植療法の前臨床試験として脊髄損傷モデル動物への神経幹細胞移植実験を行い詳細な研究デー

タを収集してきた。その結果、脊髄損傷動物モデルへの神経幹細胞移植が動物の運動機能を有意に改善することが近年の研究によって示された。移植に用いられる胎児脳由来神経幹細胞の分離・培養法はすでに確立されており (Neurosphere 法)、ヒト神経幹細胞の長期継代培養の技術も信頼のおけるものとなってきた。しかし長期継代を繰り返した幹細胞は神経細胞を生み出す能力が低下する結果、神経細胞に分化する細胞の割合が激減し、一方グリア細胞に分化する割合が増加することが知られており、細胞移植療法実現のためには弊害となっている。我々はこれまでの研究結果から、神経幹細胞の分化過程を人為的に制御して効率よく神経細胞やオリゴデンドロサイトを得ることができれば移植による治療効果が大きくなる可能性があるという考えに至った。そしてこれらの問題を解決するためには、神経幹細胞の分化過程を制御して目的とする細胞を高い効率でしかも大量に供給する技術の開発が必要とされている。ところで神経細胞は、多能性の神経幹細胞から神経細胞のみを産み出す中間的前駆細胞 (神経前駆細胞) を経て特定の神経細胞へ分化すると考えられている。神経前駆細胞は多能性神経幹細胞よりも効率よく神経細胞へ分化するため、分化プロセスを人為的に操作して高い効率で神経前駆細胞を得ることができれば神経再生療法を大きく臨床応用に近づけることができる。我々は、神経幹細胞の増殖から神経分化へのスイッチングとそのタイミングを転写後調節によって制御している神経特異的 RNA 結合タンパク質 Hu ファミリーの解析を突破口に、神経の発生・分化の調節メカニズムの一端を明らかにしていきたいと考えている。そしてそこで得られる知見をもとに細胞工学の技術を駆使して神経分化過程を人為的に制御する技術・薬剤を開発することを目的に研究を進めていきたいと考えている。またこれらの技術は脊髄損傷のみならず、脳血管障害、パーキンソン病など細胞移植治療が有効である可能性のある疾患についても応用可能であり、神経疾患に対する神経再生療法の臨床応用実現に資するものであると考えられる。

#### (D) ショウジョウバエ成虫型神経幹細胞をモデルとした幹細胞生物学

今後は、こうして確立した、哺乳類の神経幹細胞同様の発生・細胞分裂・分化様式をするショウジョウバエ幼虫 OPC の神経上皮幹細胞をモデル系として神経幹細胞の 1) 休止期からの分裂の再活性化機構、2) 対称分裂能の維持機構 3) 対称分裂から非対称分裂への転換機構 (分裂軸の回転、細胞の形態変化を含む) 4) 非対称分裂能の維持機構 5) 分化の制御機構に関わる遺伝子群をこれまでに行った遺伝学的手法に加えて分子生物学的手法によって遺伝子発現プロファイルを元に単離したあとで、それらの詳細な差次的遺伝子発現パターンをこれまでに確立した解剖学・免疫組織学的手法を用いて時間・空間的に記載する。さらにそうして得られたショウジョウバエ遺伝子群のマウスホモログも単離し、その機能を明らかにすることによって、神経幹細胞 (neural stem cells) の増殖・分

化を制御する普遍的分子機構に迫ることを目指すものである。

具体的には、これまでに行った機能欠失型点突然変異体及び機能獲得型突然変異体のスクリーニングによって既に得られているショウジョウバエ幼虫の OPC 神経上皮幹細胞(neuroepithelial stem cells; NESCs) 及びそれから転換して生じる成虫型ニューロブラスト(postembryonic neuroblasts; pNBs)に異常を生じた突然変異体の機能解析をさらに進める。

中でも特に興味深いのは、我々の研究室でこれまでにショウジョウバエの末梢神経感覚母細胞(SOP: sensory organ precursors)からの非対称な分化に際してグリアへの分化へと導く転写抑制因子 trametrack(ttk)を翻訳後抑制することで神経分化へと導く RNA 結合タンパク質 musashi がマウス脳においては神経幹細胞・前駆細胞の存在する脳室周囲で高レベルの発現を示し、その未分化性の維持に関与することを明らかにしてきたが、ショウジョウバエ OPC の神経上皮幹細胞から分化する系においてマウス脳と同様、神経幹細胞・前駆細胞で発現し、その増殖を促進することがわかった。さらに UAS のランダムな挿入により misexpression を起こす機能獲得型突然変異体のスクリーニングで得られたうちの 하나가 ttk でその misexpression により神経幹細胞・前駆細胞の増殖が抑制され OPC のサイズが小さくなる。Ttk は cdc25 の転写を抑制することも他の系で明らかになっており、その ttk を Musashi が翻訳後抑制する機構がここでも働いているとするとこれらの表現型を説明できると言う点で大変興味深い結果でありさらに詳細な解析を行う予定である。

また、サブトラクション法やディファレンシャル・ディスプレイ法などにより、神経上皮幹細胞特異的または神経前駆細胞特異的に発現している遺伝子群を単離し UCLA 大学の Haternstein 博士らと共同で発生段階を時間軸と空間ごとに示した三次元的な差次的遺伝子発現モデルを作成する。それらの遺伝子群の機能解析を行う。さらに、それらのマウスホモログの単離と哺乳類網膜組織培養系やマウス胚をアッセイ系としたマウスホモログの機能解析を行う。

こうした研究によって、これまで非対称分裂のモデルとしてしか貢献することのなかったショウジョウバエ胚神経幹細胞に加えて、再活性化・対称分裂といった現象をも含む新たな研究系を提供することになり遺伝学的解析が容易なモデル系として他動物種の幹細胞の増殖分化制御機構にも通じる普遍的原理を導き出すのに貢献しようと考えている。

#### Notch signaling の神経幹細胞における役割の解析

現在 Hes1 promoter-d4Venus レポーター、TP1- d4Venus レポーター遺伝子を有するトランスジェニックマウスの作成にすでに成功しているが、同マウスを用いて個体レベルでの発生過程、成体内における Notch シグナル活性化状況の可視化を行い、幹細胞維持との関連について詳細に検討す

る。

また Notch シグナル関連分子について、Deltex, Numb, NRSF の機能解析を進め、context に依存した Notch シグナルの役割、特に神経幹細胞の自己複製および分化制御の分子レベルでの解明を目指したい。

さらに同レポーターの開発は特許申請を行い、バイオ関連企業への licensing も進めており、創薬研究への応用が期待できる。

### 神経幹細胞の未分化維持機構の解析

成長因子刺激の下流で働く細胞内情報伝達経路は複数存在し、それぞれが複雑なクロストークを行いながら様々なタンパク質の機能変化および遺伝子発現の制御を行い、最終的に細胞の変化をもたらす。これまで、様々な成長因子刺激による様々な細胞種の変化に関与する細胞内情報伝達経路とその付随分子に関する研究が行われてきたが、その多くは限られた系における個別の経路あるいは分子の限られた役割に関したものであり、同様の細胞内情報伝達経路を刺激する相違した成長因子がいかに細胞に対して相違した変化をもたらすかに関しては報告が非常に少ない。本研究で得られた成果は、この今まで本格的には追及されてこなかった細胞内情報伝達システムの機能に関する極めて素朴な疑問に答えるための足がかりとなるものであり、今後その詳細が明らかにされていくことが期待される。そして、その事が、多細胞生物において in vivo では様々な外部刺激を同時に受ける個々の細胞が、いかに生体のホメオスタシスを保つために適切な判断を下すのかというシステム制御の全容の解明につながっていくものと考えられる。また、神経系前駆細胞の増殖・分化におけるその様な制御システムの詳細が明らかになれば、それらを外部からコントロールすることによる中枢神経系の再生というアプローチがより容易なものとなっていくであろう。

## II. ES 細胞より分化誘導した神経細胞の FACS による分離・培養

ES 細胞は無限の自己複製能と個体の全ての種類の細胞に分化する多分化能を保持しているがゆえに、再生医学や薬剤開発への応用が期待されている。中枢神経系疾患の治療においても、ES 細胞、特にヒト ES 細胞研究に対する将来的な期待は大きい。なぜならば、通常手に入れることが難しい正常ヒト神経系細胞を無限に生産することが理論上可能であり、細胞移植治療のみならず、種特異性がそのスクリーニングにおいて大きな問題となる薬剤開発に特に有用だと考えられるからである。実際、近年ヒト ES 細胞を含めた ES 細胞からの神経系細胞の様々な分化誘導系が多数報告されており、今後のさらなる進展が期待されている。その一方で、脊椎動物の中枢神経系発生や成体中枢

神経系におけるニューロン新生、そしてシナプス可塑性を含めた神経再生能力などに関する研究も着実に進展しており、今後、これらの研究とヒト ES 細胞を利用したヒト神経系細胞の研究の融合が神経再生研究に新たな展開をもたらすことが期待されている。今回我々が行った、主にマウス ES 細胞を中心とした神経分化系およびドーパミン作動性ニューロンの FACS を用いた精製法の開発成果も、このような大きな流れに組み込まれるものであり、今後ヒト ES 細胞においても更なる開発を行い、その応用可能性を広げることによって、神経変性疾患の予防および治療法の開発に大きな進展が期待できる。また、同研究については、特許が承認され、これをベースとした製薬企業との共同研究も進められている。

### III. 神経幹細胞、中間前駆細胞、特定タイプのニューロンの選択的分離法の確立

すでに樹立したモノクローン抗体の認識するエピトープを発現クローニング法により同定を進め、神経幹細胞の prospective な同定法の brush up を行うとともに、神経幹細胞制御の分子機構の解析を進めたいと考える。またこのような解析によって得られた知見は、ヒト神経幹細胞の prospective な同定・分離に用いることができ、中枢神経系を標的とした再生医療に用いることの出来る質の高い細胞の調整方法の開発に繋がるものと考え。また骨髄からの神経幹細胞様細胞の誘導に関する研究は、将来的な自己細胞を用いた中枢神経系の再生医療に応用することが出来ると期待できる。

### IV. 神経疾患モデル動物への細胞移植による細胞補充とニューロンネットワーク再建による機能修復の試み

本項目の疾患ごとの達成をまとめるならば図 28 の通りになる。ここで達成度の高かったパーキンソン病、脊髄損傷、脳虚血については、比較的近い将来の臨床応用を視野に入れて準備を進める。ア

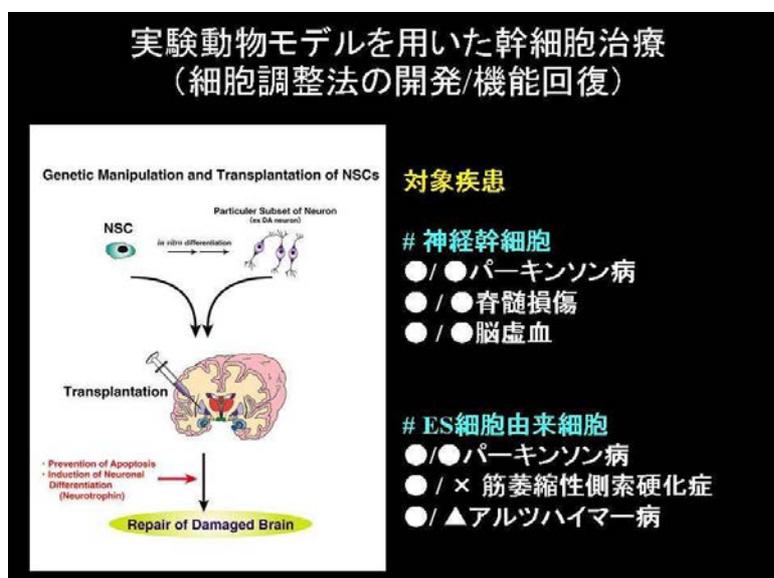


図 28. 実験動物モデルを用いた神経疾患の幹細胞治療の達成状況

ルツハイマー病については、イボテン酸の中隔核への注入モデルという比較的特殊なモデル動物への効果を認めることができたが、アミロイド沈着モデル等、より一般的な同疾患モデル動物を用いた細胞移植の効果の基礎的検討を行う必要があると考えられる。また ALS(筋萎縮性側索硬化症)の場合、ES細胞を in vitro および in vivo において運動神経細胞に分化させることには成功したが、ALS モデル動物へ移植したものの延命効果や運動能の改善は認められなかった。今後移植され、宿主脊髄内に分化・生存した運動神経細胞の適切な繊維連絡、シナプス形成を誘導する革新的な技術が必要となるであろう。また、今後始まる SORST 研究の一環として、コモンマーモセットを用いた発生工学的実験手法を開発し、霊長類の神経疾患モデル動物を開発し、それらを用いた再生医学的研究を展開したい。これは、まさに世界で only one の研究となる自負を持っている。

### 3.2 理化学研究所脳科学総合研究センター 細胞培養技術開発チーム 小川 正晴グループ (項目 I の一部)

#### (1)研究実施内容及び成果

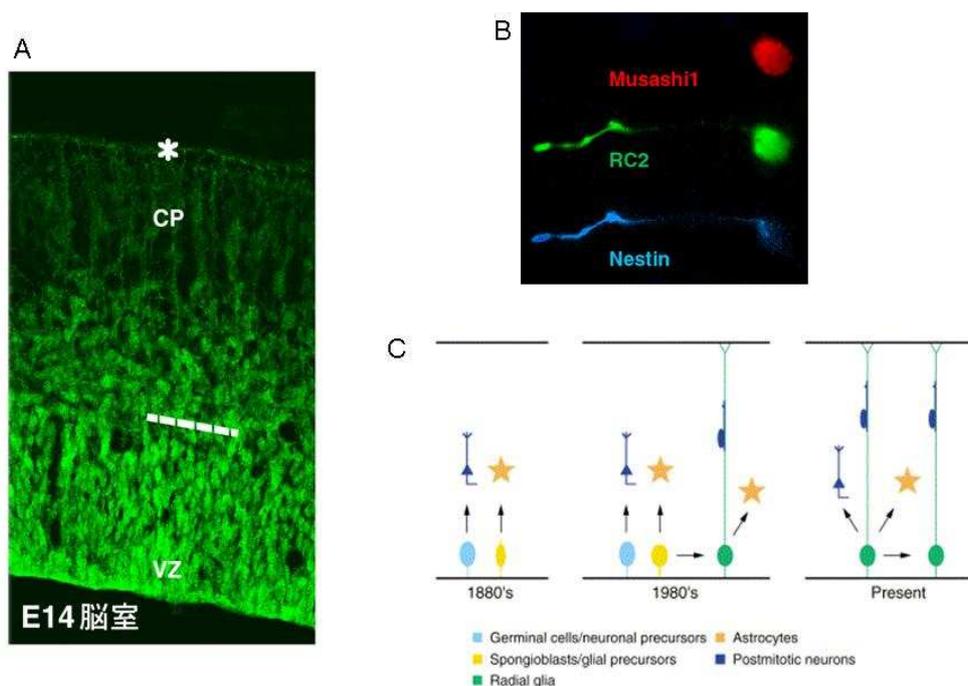
##### I. 神経幹細胞の未分化状態の維持・多分化能の維持と分化の制御機構

##### I-(G): 胚生期大脳皮質領域における神経幹細胞・放射状グリアの形態と役割に関する解析

(岡野グループとの共同研究)

神経幹細胞からのニューロンとグリアの分化において、以前よりニューロンとグリアの共通の前駆細胞が神経管内に存在するかどうかは、存在するとする一元説と、存在しないとする二元説という対立する学説が唱えられてきたが、細胞分化のタイミングから言えば、ニューロン分化が先行するというコンセンサスが得られている。しかしながら、逆説的ではあるが、ニューロン産生期において、胎生期のマウスの大脳皮質領域においては、「放射状グリア」という細胞が存在していることが古くから知られていた。この放射状グリアとは、脳室周囲に細胞体を有し、脳表面まで長い突起を伸ばす細胞として定義される。放射状グリアは、ニューロン産生期には、ニューロンの細胞移動のための足場を作っており、ニューロン産生が終了した胎生期後期にはもっぱらアストログリアを産み出すグリア系の前駆細胞としての働きを持つものであると長年信じられていた。しかしながら、岡野グループが作成した *nestin*-EGFP マウスの胎生期の大脳皮質領域を観察すると、ニューロン産生期においても放射状グ

リアがEGFP強陽性であることに気付いた(Kawaguchi et al., 2001)(**図 29A**)。また、興味深いことに放射状グリアのマーカーと言われる RC2 の陽性細胞のほとんどが MUSASHI-1, Nestin 三重陽性であることが明らかとなった(Kaneko et al., 2000)(**図 29B**)。これらのことは、放射状グリアは神経幹細胞としての性質を有することを示唆している。この点につき、我々は検討を加え、この仮説をよりsolidな形で証明することができた(Miyata et al., 2001)。これまでの知見との整合性を考えると、放射状グリアという名で呼ばれる細胞は、特徴的な形態をもつものの、決して均一ではなく、時期や中枢神経系内の部位において異なる性質を有しており、「神経幹細胞」としての性質をもっている場合もあれば、持っていない場合もある。胎生期のマウス的大脑皮質領域においては、「放射状グリア」は、神経幹細胞としての性質を有しており、「放射状グリア」からニューロンが出来てくることを示すことができた。尚、*Neuron* 誌に3年前に発表したこの論文は、同誌の解説論文(**図 29 C**)で詳しく紹介され、すでに100回以上引用されている。



**図 29. 神経幹細胞としての放射状グリア**

現在では大脑皮質領域において、「放射状グリア」は、ニューロン産生を終えると、アストログリア産生に転じ、その後何故かその細胞の突起の丈を減じ、生後あるいは成体脳においても、神経幹細胞は脳室周囲部位において存在し続けるものと理解されているが、*nestin*-EGFP マウスの胎生後期から生後までの GFP 陽性細胞の形態をみるとこの点がよく理解できる(**図 30**)。

A: *nestin*-EGFP マウスの大脳皮質領域。放射状グリアの放射状ファイバーが GFP 陽性であるため、放射状グリアが *nestin*-EGFP 強陽性であり、かつ神経幹細胞活性を有している可能性を、私達が最初に思いつききっかけとなったデータのの一つである(Kawaguchi et al., 2001)。

B: マウス胎生14日目の大脳皮質領域の初代培養細胞の中に観察される、突起を伸ばし、典型的な放射状グリア細胞と考えられる細胞。放射状グリアのマーカーRC2 を発現するのみならず、神経幹前駆細胞マーカーである MUSASHI-1 や Nestin を発現している(Kaneko et al., 2000)。

C: 脊椎動物胎生期中枢神経系(神経管)におけるニューロンとグリアの分化に関する考え方の変遷。右:19世紀末の、His による、神経管にはニューロンのみを作る前駆細胞(Germinal cells/neuronal precursor:水色)、グリアのみを作る前駆細胞(Spongioblast/glial precursors:黄色)の二種類の細胞系譜上、性質の異なる前駆細胞が存在しているという二元説。中:1980年代におけるRakic らによる考え方。やはり神経管脳室周囲部(ventricular zone)においては、ニューロンのみを作る前駆細胞と、グリアのみを作る前駆細胞が共存しており、形態学的に脳室周囲部に細胞体を有し、脳表層まで突起を伸ばす固有の特徴的な形態を有する放射状グリアという名の細胞が存在していることを実証するが、この細胞は一種のグリアの前駆細胞であり、胎生後期にもっぱらアストログリアを作るものと考えられていた。右:現在では、放射状グリアには、ニューロンとグリア系の両方の細胞を産生し、自己複製する神経幹細胞としての性質が備わっていることが明らかになってきている(Miyata et al., 2001)。

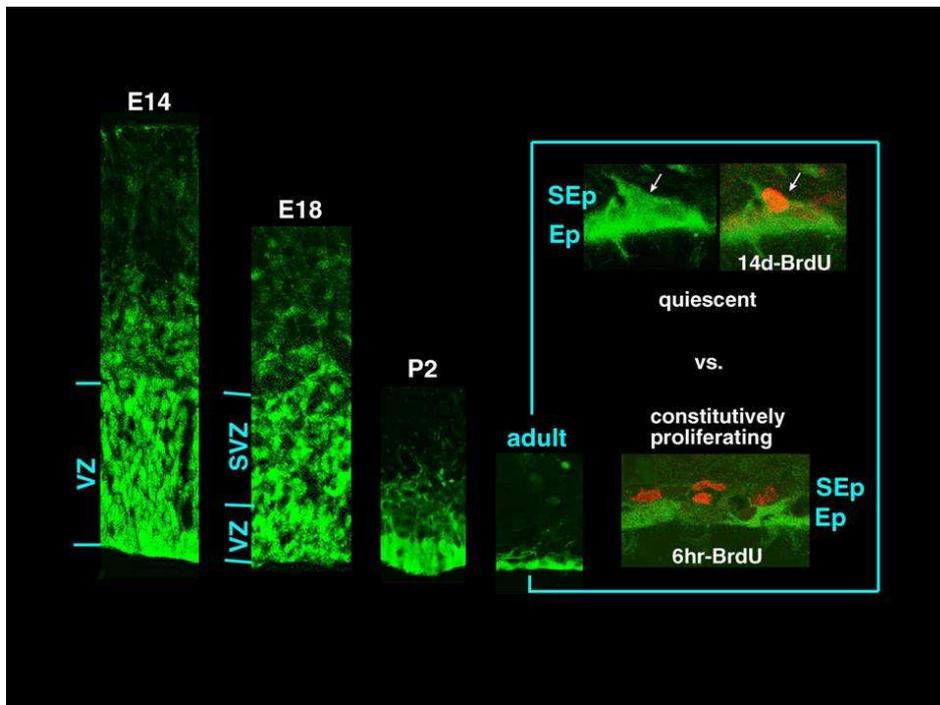


図 30. *nestin*-EGFP レポーターから見た神経発生過程における神経幹細胞の形態変化

マウス胎生期においてニューロン産生が活発な E14 の時点においては、神経幹細胞活性の強い *nestin*-EGFP 陽性細胞は、脳室周囲に豊富に存在し、少なくともその一部は、その突起を脳表面まで伸ばす放射状グリアとして存在している。しかしながら胎生後期以降は、*nestin*-EGFP 陽性細胞は、その数と細胞の丈のいずれもが減少し、成体では、脳室に面する1~2層の細胞のみが陽性となる。この脳室周囲の細胞において、活発に分裂する transit amplifying cell (右下段) は、*nestin*-EGFP を発現しておらず、14 日間の間に飲水中に入れた BrdU でやっとならびに標識される脳室下帯でゆっくりと分裂する細胞において、*nestin*-EGFP が発現していることが明らかとなった(Kawaguchi et al., 2001)。

### I-(H): 大脳壁における神経幹細胞の分裂様式とニューロン産生ならびにその移動について

#### <狙いと実験計画>

I-(G)をさらに発展させた解析を行う。大脳壁でのニューロン産生とその初期移動については、従来、radial glial guidance 説で説明されてきた。しかし、この概念が矛盾することが近年明かにされ、新たな正しい概念が待ち望まれている。

<実施内容> 大脳壁における神経上皮細胞(P)からニューロン(N)が発生する細胞分裂とこれに引き続けておこるニューロンの初期移動の細胞機構を、大脳皮質のスライス培養系を用いて調べた。(なを、今日では radial glial cells が神経上皮細胞そのものであることが実証されている)。培養条件を改良することによって、より長期にまた、P N+P 分裂をより確実に記録することが可能になった。その結果、初期の皮質では、新生ニューロンは親の basal process を引き継いで誕生し、この process の中を核が移動する translocation のモードで移動することを確証した。新生した P は新たな basal process を軟膜側へと急速に伸長し、軟膜面に接着した後に再度細胞分裂相に入り新たな姉妹細胞を誕生させた。また多くの例で、親の basal process と子の basal process が遊離して存在した。このことは、ニューロンの移動が他細胞の radial glial fiber(今日では、basal process)に依存しないことを示している。これらの結果は、basal process を持つ神経幹細胞(P)からその process を受け継いだ N と、そうでない P が誕生すること(自己再生的である、細胞形態から非対称分裂)。N は親の basal process の方向に規定されて translocation のモードで移動すること。誕生した P は、新たな basal process を再生し、その再生位置に規定されて、次世代のニューロンの移動が規定されることを示している。今回の研究から、従来の radial glial guidance 説と全く異なった移動の概念を提出した。

大脳新皮質の投射ニューロンは脳室帯(VZ)に誕生し、そこから放射状に移動して所定の層に配置されると考えられて来た。今回、神経板が現れる時期の新皮質においては、VZ に限らず、脳室下帯(SVZ)から中間体(IMZ)にかけての部域において、盛んなニューロン産生がみられることを明らかに

した。新皮質に皮質板が現れる E13 のマウス大脳のスライスを培養し、Dil で標識された progenitor cell (P)の細胞動態をタイムラプスに記録した。VZ においてはPの分裂に伴って2個の P が誕生するケースならびにニューロン(N)とPが産生されることが確認されたが、同時に、Pの一部がSVZ/IMZにおいて細胞分裂を起こすことが観察された。詳しく調べた結果、このようなPはVZからSVZ/IMZへとbasal process 中を細胞核が移動し、ついでこの部において均等細胞分裂を起こしてニューロンのみを産生することが判明した。これまで非脳室帯での細胞分裂はグリア細胞、ないし血管内皮細胞の誕生を示すとされてきましたが、実際には非脳室帯においてもニューロンが産生されること、また、早期の大脳壁では急速な皮質板の発達に呼応して、CPにより近い部位において誕生することにより、より効率よくニューロンを供給しているものと想像される。また皮質ニューロンは誕生時期に依存して層特異的な細胞移動を示す。このことを詳しく分析すべく、蛍光タンパク質遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを作成し、E12-E12.5 にかけて選択的に標識された新生ニューロンの移動を、スライス培養下に調べた。ニューロンはSVZ/IZでbipolar shapeとなり、ついでleading processが外表面へと伸長、接着し、その中を核がtranslocationして、いったん外表面に近い位置に移動した。ついで、核は下降して深層部へと移動した。一方、reeler mouseでは、leading processが外表面に達せず、また細胞体の移動も途中で停止することが示された。Reelinシグナルがleading processの伸長ならびにnuclear translocationをpositiveに制御している可能性が示唆された。

#### **I-(I): 大脳皮質神経細胞の層特異的運命決定の機構**

< 狙いと実験計画および実施内容 >

**(I)-1: POU ホメオドメイン転写因子、Brn1 と Brn2 のダブル KO マウスの解析**: 大脳皮質は6層構造からなっている。各層ごとに、それぞれ形態および機能が異なるニューロンが配置されている。またそれらのニューロンの誕生する時期も特定され、早く生まれるものから順に6層へと配置する。Brn1 と Brn2 両方の欠損では、5-2層の細胞の誕生と分化に異常がみられた。単独の欠失ではほとんど異常がみられず、これは、同じ細胞で両転写因子が発現することから、一方の機能がもう一方のもので保障されることによると考えられる。ショウジョウバエでは、一連の転写因子(ほ乳類 POU 因子のホモログも含まれる)の制御された発現によって、神経芽細胞から経時的に異なった神経細胞が誕生することが知られている。ほ乳類の大脳皮質においても、その原基での、このような一連の転写因子の時・空間的に制御された発現が、6層構造を形成するニューロン群の数と個性化に関係していることが示唆された。

**(I)-2: Reelin signal cascade と cdk5/p35 のクロストーク**: 中枢神経系の多くのニューロンの空間配置

が Reelin-Dab1(reelin signal cascade)ならびに Cdk5/p35 によって制御されている。また Cdk5/p35 は reelin signal cascade の下流に直接に関与している可能性が指摘されてきた。今回、橋・延髄部における各種の神経核の空間配置について検索した。これまでに大脳、小脳では皮質ニューロンの空間は位置に両者が協調して関与していることをあきらかにしてきた。Reelin が欠損するリーラーマウス、Dab1 の欠損するヨタリマウス、ならびに Cdk5/p35 欠損マウスを使い、橋・延髄部における各種の神経核の空間配置を調べてみた。多くの神経核は正常な位置に発達するが、共通して顔面神経核ならびに下オリーブ核の細胞配置に異常がみられた。とくに Cdk5 欠損マウスでは顔面神経核ニューロンが、誕生した位置から移動せずに分化することをあきらかにした。

## (2)研究成果の今後期待される効果

大脳新皮質の6層構造の構成素子である錐体細胞及び spiny stellate cell といったグルタミン酸作動性の興奮性ニューロンにはどれほどのサブタイプがあるのかについては、分類学的研究ですら十分に終わったとは言えないのが現状である。加えて大脳新皮質の深層部から表層部までを構成する各種ニューロン(第VI~II層)は、胎生期に皮質の神経前駆細胞が幾重にも分裂することでおおよそ時間軸に順じて産生されていくことは知られているが、この分子メカニズムについても全く明らかにされていない。

そこで、本研究グループは、皮質ニューロンの多様性の分子基盤の包括的に理解することを最終的な目標としてまず初めに分子サブタイプマーカーの確立を目指している。すなわち層特異的あるいは特定層の一部のニューロンに発現する遺伝子を多数同定した。現在はこれらの遺伝子を特異的に発現するニューロンについてその投射形式及び細胞形態等についての特異性を解析することにより分子サブタイプマーカーの確立をすすめている。

また確立した分子マーカーについては、随時各種ミュータントマウスの解析へ適用している。すなわち特定ニューロンの発生に特異的に異常を呈するミュータントを見いだすことで特定ニューロンの発生制御因子の同定を行っている。これまでの我々の成功例としては、特定の転写因子のターゲティングマウスの解析への適用があり、同転写因子が後期脳室帯および脳室下帯の progenitor において表層部ニューロン(第IV~II層)の発生に機能している制御因子であることを世界で初めて明らかにすることができた。この発見に伴いさらに Brn-1 及び Brn-2 の上流あるいは下流の遺伝子発現制御機構を明らかにしていくことによって幹細胞システムにもとづく大脳新皮質ニューロンの多様性の分子基盤が明らかにされていくことが期待される。

また、大脳皮質のニューロンの層特異的な運命決定メカニズムの解明は、虚血などにより失われた

大脳皮質ニューロンの補充を目的とした再生医学応用の観点からも、非常に重要な知見を与えるものとして期待される。

#### 4 研究参加者

##### 岡野 栄之 研究グループ

| 氏名          | 所属                    | 役職(身分)    | 研究項目                           | 参加時期                       |
|-------------|-----------------------|-----------|--------------------------------|----------------------------|
| 岡野 栄之       | 慶應義塾大学大学院医学系研究科       | 教授        | 神経幹細胞およびES細胞に関する研究全般           | 平成12年12月<br>～<br>17年10月31日 |
| 岡野 James 洋尚 | 慶應義塾大学大学院医学系研究科       | 助教授       | 神経幹細胞の細胞表面抗原に対するモノクローン抗体の分離    | 平成13年1月<br>～<br>17年10月31日  |
| 澤本 和延       | 慶應義塾大学大学院医学系研究科       | 特別研究助教授   | 神経分化制御因子の機能解析                  | 平成15年4月<br>～<br>17年10月31日  |
| 赤松 和土       | University of Toronto | 助手        | 神経疾患モデル動物への細胞移植                | 平成12年12月<br>～<br>16年3月31日  |
| 伊谷(松崎) 有未   | 慶應義塾大学大学院医学系研究科       | 特別研究助教授   | 多能性幹細胞の分離とその機能解析               | 平成13年9月<br>～<br>17年10月31日  |
| 澤井(中尾) 啓子   | 慶應義塾大学大学院医学系研究科       | 助手        | 神経分化制御因子の機能解析                  | 平成12年12月<br>～<br>17年10月31日 |
| 島崎 琢也       | 慶應義塾大学大学院医学系研究科       | 助手        | ES細胞のin vitroでの分化誘導と誘導された細胞の分離 | 平成12年12月<br>～<br>17年10月31日 |
| 今井 貴雄       | 慶應義塾大学大学院医学系研究科       | 助手        | 神経分化制御因子の機能解析                  | 平成12年12月<br>～<br>17年10月31日 |
| 小野(織原) 美奈子  | 慶應義塾大学大学院医学系研究科       | CREST 研究員 | 神経分化制御因子の機能解析                  | 平成16年7月<br>～<br>17年10月31日  |
| 徳永 暁憲       | 慶應義塾大学大学院医学系研究科       | 研究員       | 神経分化制御因子の機能解析                  | 平成12年12月<br>～<br>17年9月30日  |
| 廣田 ゆき       | 慶應義塾大学大学院医学系研究科       | 特別研究員     | 神経分化制御因子の機能解析                  | 平成12年12月<br>～<br>17年10月31日 |
| 村山 綾子       | 名古屋大学医学部              | 助手        | 神経幹細胞の細胞表面抗原に対するモノクローン抗体の分離    | 平成12年12月<br>～<br>17年10月31日 |
| 吉田 哲        | 熊本大学発生医学研究センター        | 研究員       | 神経分化制御因子の機能解析                  | 平成12年12月<br>～<br>16年3月31日  |
| 藤田 裕子       | 慶應義塾大学大学院医学系研究科       | 特別研究助手    | 神経分化制御因子の機能解析                  | 平成15年4月<br>～<br>16年4月30日   |
| 深見 伸一       | 慶應義塾大学大学院医学系研究科       | CREST 研究員 | 神経分化制御因子の機能解析                  | 平成15年4月<br>～<br>17年10月31日  |
| 飯島 崇利       | 慶應義塾大学大学院医学系研究科       | 特別研究助手    | 神経分化制御因子の機能解析                  | 平成12年12月<br>～<br>17年10月31日 |

|        |                        |           |                                   |                                     |
|--------|------------------------|-----------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 吉崎 崇仁  | 慶應義塾大学大学院医学系研究科        | 特別研究助手    | ES 細胞の in vitro での分化誘導と誘導された細胞の分離 | 平成 12 年 12 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日 |
| 岡田 洋平  | 慶應義塾大学大学院医学系研究科        | 特別研究助手    | ES 細胞から運動ニューロンへの分化誘導              | 平成 13 年 9 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 野村 良知  | 慶應義塾大学大学院医学系研究科        | 研究補助員     | 神経幹細胞の細胞表面抗原に対するモノクローン抗体の分離       | 平成 12 年 12 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日 |
| 矢野真人   | 慶應義塾大学大学院医学系研究科        | 特別研究員     | 神経分化制御因子の機能解析                     | 平成 13 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 鳥谷 真佐子 | 慶應義塾大学大学院医学系研究科        | CREST 研究員 | 神経分化制御因子の機能解析                     | 平成 13 年 4 月<br>～<br>17 年 8 月 31 日   |
| 早川 佳芳  | 岐阜大学大学院医学研究科           | 助手        | 神経分化制御因子の機能解析                     | 平成 13 年 4 月                         |
| 芝田 晋介  | 慶應義塾大学大学院医学系研究科        | 助手        | 神経分化制御因子の機能解析                     | 平成 13 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 坂口 昌徳  | 慶應義塾大学大学院医学系研究科        | 助手        | 神経分化制御因子の機能解析                     | 平成 13 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 岩波 明生  | 慶應義塾大学大学院医学系研究科        | 助手        | 脊髄損傷治療開発に関する研究                    | 平成 13 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 金子 慎二郎 | Harvard Medical School | 研究員       | 脊髄損傷治療開発に関する研究                    | 平成 13 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 松本 有史  | 慶應義塾大学大学院医学系研究科        | 特別研究助手    | ALS に対する幹細胞治療の研究                  | 平成 14 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 神山 淳   | 慶應義塾大学大学院医学系研究科        | 大学院生 D4   | 神経発生と再生における Notch シグナルの研究         | 平成 14 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 砂堀 毅彦  | 慶應義塾大学大学院医学系研究科        | 特別研究助手    | 幹細胞分離に関する研究                       | 平成 14 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 岡田 誠司  | 慶應義塾大学大学院医学系研究科        | 大学院生 D4   | 脊髄損傷治療開発に関する研究                    | 平成 14 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 多田 敬典  | 慶應義塾大学大学院医学系研究科        | 大学院生 D3   | PND 疑いの患者で検出された自己抗体が認識するエピトープの同定  | 平成 14 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 田 亮介   | 慶應義塾大学大学院医学系研究科        | 大学院生 D4   | 神経分化制御因子の機能解析                     | 平成 15 年 11 月<br>～<br>16 年 3 月 31 日  |
| 藤岡 正人  | 慶應義塾大学大学院医学系研究科        | 大学院生 D3   | 神経分化制御因子の機能解析                     | 平成 15 年 10 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日 |
| 山下 徹   | 慶應義塾大学大学院医学系研究科        | 大学院生 D3   | 神経分化制御因子の機能解析                     | 平成 15 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |

|        |                 |           |                          |                                     |
|--------|-----------------|-----------|--------------------------|-------------------------------------|
| 山根 淳一  | 慶應義塾大学大学院医学系研究科 | 大学院生 D3   | 脊髄損傷治療開発に関する研究           | 平成 15 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 金子奈穂子  | 慶應義塾大学大学院医学系研究科 | 大学院生 D3   | 神経分化制御因子の機能解析            | 平成 16 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 安達 一英  | 慶應義塾大学大学院医学系研究科 | 大学院生 D2   | 神経分化制御因子の機能解析            | 平成 15 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 河原 裕憲  | 慶應義塾大学大学院医学研究科  | 大学院生 D2   | Musashi 遺伝子の機能解析         | 平成 14 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 仲 勇人   | 慶應義塾大学大学院医学研究科  | 大学院生 D2   | 神経分化制御因子の機能解析            | 平成 16 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 原 央子   | 慶應義塾大学大学院医学研究科  | 大学院生 D2   | 神経分化制御因子の機能解析            | 平成 16 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 小島 拓郎  | 慶應義塾大学大学院医学系研究科 | 研究生       | Musashi 遺伝子の機能解析         | 平成 14 年 4 月<br>～<br>16 年 10 月 31 日  |
| 榊原 伸一  | 獨協医科大学          | 講師        | Musashi 遺伝子の機能解析         | 平成 14 年 4 月<br>～<br>16 年 3 月 31 日   |
| 中村 雅也  | 慶應義塾大学大学院医学研究科  | 助手        | 脊髄損傷治療開発に関する研究           | 平成 14 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 戸田 正博  | 慶應義塾大学大学院医学研究科  | 助手        | 神経分化制御因子の機能解析            | 平成 14 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 棚木 弘和  | 慶應義塾大学大学院医学研究科  | 助手        | 脊髄損傷治療開発に関する研究           | 平成 14 年 4 月<br>～<br>16 年 3 月 31 日   |
| 渡辺 航太  | 慶應義塾大学大学院医学研究科  | 助手        | 脊髄損傷治療開発に関する研究           | 平成 14 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 三上 裕嗣  | 慶應義塾大学大学院医学研究科  | 助手        | 骨髄損傷に対する樹状細胞移植による免疫治療の開発 | 平成 14 年 4 月<br>～<br>16 年 3 月 31 日   |
| 並木 淳   | 慶應義塾大学大学院医学研究科  | 助手        | 神経幹細胞による神経再生             | 平成 14 年 2 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 小沢 洋子  | 慶應義塾大学大学院医学研究科  | 助手        | 神経疾患モデル動物への細胞移植          | 平成 13 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日  |
| 金城 謙太郎 | 慶應義塾大学大学院医学研究科  | 研究員       | 多能性幹細胞の分離とその機能解析         | 平成 14 年 2 月<br>～<br>16 年 3 月 31 日   |
| 小川 祐人  | 慶應義塾大学大学院医学研究科  | 助手        | 脊髄損傷治療開発に関する研究           | 平成 15 年 10 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日 |
| 何 小萍   | 慶應義塾大学大学院医学研究科  | CREST 技術員 | 神経分化制御因子の機能解析            | 平成 16 年 4 月<br>～<br>17 年 3 月 31 日   |

|       |                |           |                       |                                    |
|-------|----------------|-----------|-----------------------|------------------------------------|
| 幸池 浩子 | 慶應義塾大学大学院医学研究科 | CREST 技術員 | 神経分化制御因子の機能解析         | 平成 13 年 4 月<br>～<br>17 年 2 月 28 日  |
| 宮尾 幸代 | 慶應義塾大学大学院医学研究科 | 技術員       | 神経幹細胞の培養              | 平成 14 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日 |
| 小森 拓也 | 慶應義塾大学大学院医学研究科 | CREST 技術員 | 多能性幹細胞の分離とその機能解析      | 平成 15 年 4 月<br>～<br>15 年 3 月 31 日  |
| 半野 陽子 | 慶應義塾大学大学院医学研究科 | CREST 技術員 | 神経発生の制御機構の解析          | 平成 13 年 7 月<br>～<br>16 年 3 月 31 日  |
| 高橋 美和 | 慶應義塾大学大学院医学研究科 | 技術員       | ショウジョウバエを用いた神経幹細胞の解析  | 平成 15 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日 |
| 中村 志穂 | 慶應義塾大学大学院医学研究科 | 技術員       | 神経発生の制御機構の解析          | 平成 15 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日 |
| 直井 紀枝 | 慶應義塾大学大学院医学研究科 | 研究補助員     | 実験動物の飼育、管理、研究データ集積・解析 | 平成 13 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日 |
| 渡辺 恵子 | 慶應義塾大学大学院医学研究科 | 研究補助員     | 実験動物の飼育、管理等           | 平成 13 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日 |
| 平山 昭代 | 慶應義塾大学大学院医学研究科 | チーム事務員    | 事務全般                  | 平成 13 年 4 月<br>～<br>17 年 10 月 31 日 |

**小川 正晴グループ(大脳皮質形成機構の研究)**

| 氏名    | 所属                    | 役職                          | 担当する研究項目             | 参加時期                              |
|-------|-----------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| 小川 正晴 | 理化学研究所<br>脳科学総合研究センター | 細胞培養技術<br>開発チーム・チ<br>ームリーダー | 神経幹細胞の分化の制御機構の解<br>析 | 平成 13 年 4 月～<br>17 年 10 月         |
| 宮田 卓樹 | 名古屋大学大学院医学系研究科        | 教授                          | 神経幹細胞の分化の制御機構の解<br>析 | 平成 13 年 4 月～<br>17 年 10 月         |
| 宮下 英将 | 理化学研究所                | CREST 研究員                   | 神経幹細胞の分化の制御機構の解<br>析 | 平成 15 年 4 月<br>～<br>16 年 3 月 31 日 |

## 5 成果発表等

### (1)論文発表 (130件)

1. Toda M, Iizuka Y, Yu W, Imai T, Ikeda E, Yoshida K, Kawase T, Kawakami Y, Okano H, Uyemura K. : Expression of the neural RNA-binding protein Musashi1 in human gliomas. *Glia* 34 , 1-7 (2001)
2. Mori H, Sakakibara S, Imai T, Nakamura Y, Iijima T, Suzuki A, Yuasa Y, Takeda M, Okano H. : Expression of mouse igf2 mRNA-binding protein 3 and its implications for the developing central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 64, 132-143 (2001)
3. Murata T, Nagaso H, Kashiwabara S, Baba T, Okano H, Yokoyama KK. : The *hiiragi* gene encodes a poly(A) polymerase, which controls the formation of the wing margin in *Drosophila melanogaster*.. *Dev.Biol.* 233: 137-147 (2001)
4. Okabe M, Imai T, Kurusu M, Hiromi Y, Okano H. : Translational repression determines a neuronal potential in *Drosophila* asymmetric cell division. *Nature* 411, 94-98, (2001)
5. Sawamoto K, Yamamoto A, Kawaguchi A, Yamaguchi M, Mori K, Goldman SA, Okano H. : Direct isolation of committed neuronal progenitor cells from transgenic mice coexpressing spectrally distinct fluorescent proteins regulated by stage-specific neural promoters. *J. Neurosci. Res.* 65, 220-227 (2001)
6. Sawamoto K, Nakao N, Kakishita K, Ogawa Y, Toyama Y, Yamamoto A, Yamaguchi M, Mori K, Goldman SA, Itakura T, Okano H. : Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a nestin-GFP transgene. *J. Neurosci.*21, 3895-3903 (2001)
7. Imai T, Tokunaga A, Yoshida T, Hashimoto M, Mikoshiba K, Weinmaster G, Nakafuku M, Okano H.: The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its mRNA. *Mol.Cell Biol.* 21, 3888-3900 (2001)
8. Sawamoto K, Nakao N, Kobayashi K, Matsushita N, Takahashi H, Kakishita K, Yamamoto A, Yoshizaki T, Terashima T, Murakami F, Itakura T, Okano H.: Visualization, direct isolation, and transplantation of midbrain dopaminergic neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 98, 6423-6428 (2001)
9. Uchida M, Hanai S, Uematsu N, Sawamoto K, Okano H, Miwa M, Uchida K.: Genetic and functional analysis of PARP, a DNA strand break-binding enzyme. *Mutat Res* 477, 89-96 (2001)
10. Ishida Y, Nakamoto H, Imai H, Suzuki S, Okano H, Suzuki H.: Heme oxygenase-1 regulates vascular tone of the peritoneum undergoing peritoneal dialysis. *Advances in Peritoneal Dialysis* 17, 15-19 (2001)
11. Li RY, Baba S, Kosugi I, Arai Y, Kawasaki H, Shinmura Y, Sakakibara SI, Okano H, Tsutsui Y.: Activation

- of murine cytomegalovirus immediate-early promoter in cerebral ventricular zone and glial progenitor cells in transgenic mice. *Glia* 35, 41-52 (2001)
12. Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, Takasawa Ki, Miyata T, Okano H, Hori M, Matsumoto M.: Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke* 32, 1890-1896 (2001)
  13. Miyata T, Kawaguchi A, Okano H, Ogawa M.: Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 31, 727-741 (2001)
  14. Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, Taga T, Okano H, Hata J, Umezawa A.: Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation* 68, 235-244 (2001)
  15. Keyoung HM, Roy NS, Benraiss A, Louissaint A Jr, Suzuki A, Hashimoto M, Rashbaum WK, Okano H, Goldman SA.: High-yield selection and extraction of two promoter-defined phenotypes of neural stem cells from the fetal human brain. *Nature Biotech.* 19, 843-850 (2001)
  16. Kanemura Y, Mori K, Sakakibara S, Fujikawa H, Hayashi H, Nakano A, Matsumoto T, Tamura K, Imai T, Ohnishi T, Fushiki S, Nakamura Y, Yamasaki M, Okano H, Arita N.: Musashi1, an evolutionarily conserved neural RNA-binding protein, is a versatile marker of human glioma cells in determining their cellular origin, malignancy, and proliferative activity. *Differentiation* 68, 141-152 (2001)
  17. Sakakibara S, Nakamura Y, Satoh H, Okano H.: RNA-binding protein Musashi2: developmentally regulated expression in neural precursor cells and subpopulations of neurons in mammalian CNS. *J. Neurosci.* 21, 8097-8107 (2001)
  18. Yamamoto N, Yamamoto S, Inagaki F, Kawaichi M, Fukamizu A, Kishi N, Matsuno K, Nakamura K, Weinmaster G, Okano H, Nakafuku M.: Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. *J.Biol.Chem.* 276, 45031-45040 (2001)
  19. Saunders PT, Maguire SM, Macpherson S, Fenelon MC, Sakakibara S, Okano H.: RNA binding protein Musashi1 is expressed in sertoli cells in the rat testis from fetal life to adulthood. *Biology of Reproduction* 66, 500-507 (2002)
  20. Uchida M, Hanai S, Uematsu N, Sawamoto K, Okano H, Miwa M, Uchida K.: Overexpression of poly(ADP-ribose) polymerase disrupts organization of cytoskeletal F-actin and tissue polarity in Drosophila. *J. Biol. Chem.* 277, 6696-6702 (2002)
  21. Matsuno K, Ito M, Hori K, Miyashita F, Suzuki S, Kishi N, Artavanis-Tsakonas S, Okano H.: Involvement of a proline-rich motif and RING-H2 finger of Deltex in the regulation of Notch signaling. *Development*

- 129, 1049-1059 (2002)
22. Takasawa K, Kitagawa K, Yagita Y, Sasaki T, Tanaka S, Matsushita K, Ohstuki T, Miyata T, Okano H, Hori M, Matsumoto M.: Increased proliferation of neural progenitor cells but reduced survival of newborn cells in the contralateral hippocampus after focal cerebral ischemia in rats. *J. Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22, 299-307 (2002)
  23. Iwai Y, Hirota Y, Ozaki K, Okano H, Takeichi M, Uemura T.: DN-cadherin is required for spatial arrangement of nerve terminals and ultrastructural organization of synapses. *Mol.Cell.Neurosci.* 19, 375-388 (2002)
  24. Shibata M, Yamawaki T, Sasaki T, Hattori H, Hamada J, Fukuuchi Y, Okano H, Miura M.: Upregulation of Akt phosphorylation at the early stage of middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res.* 942, 1-10 (2002).
  25. Shu HJ, Saito T, Watanabe H, Ito JI, Takeda H, Okano H, Kawata S: Expression of the Musashi1 gene encoding the RNA-binding protein in human hepatoma cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 293, 150-154 (2002)
  26. Cuadrado A, Garcia-Fernandez LF, Imai T, Okano H, Munoz A.: Regulation of tau RNA maturation by thyroid hormone is mediated by the neural RNA-binding protein musashi-1. *Mol.Cell.Neurosci.* 20, 198-210 (2002)
  27. Shamloula HK, Mbogho MP, Pimentel AC, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Hyatt V, Okano H, Venkatesh TR.: *rugose (rg)*, a *Drosophila* A kinase anchor protein, is required for retinal pattern formation and interacts genetically with multiple signaling pathways. *Genetics* 161, 693-710 (2002).
  28. Yagita Y, Kitagawa K, Sasaki T, Miyata T, Okano H, Hori M, Matsumoto M.: Differential expression of Musashi1 and nestin in the adult rat hippocampus after ischemia. *J. Neurosci.Res.* 69, 750-756 (2002)
  29. Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Nakamura M, Bregman BS, Koike M, Uchiyama Y, Toyama Y, Okano H.: Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J. Neurosci.Res.* 69, 925-933 (2002)
  30. Murayama A, Matsuzaki Y, Kawaguchi A, Shimazaki T, Okano H.: Flow cytometric analysis of neural stem cells in the developing and adult mouse brain. *J. Neurosci.Res.* 69, 837-847 (2002)
  31. Johansson CB, Lothian C, Molin M, Okano H, Lendahl U.: Nestin enhancer requirements for expression in normal and injured adult CNS. *J. Neurosci.Res.* 69, 784-794 (2002)

32. 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 (2002)
33. Kuranaga E, Kanuka H, Igaki T, Sawamoto K, Ichijo H, Okano H, Miura M.: Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in *Drosophila*. *Nature Cell Biol.* 4, 705-710 (2002)
34. Sakakibara S, Nakamura Y, Yoshida T, Shibata S, Koike M, Takano H, Ueda S, Uchiyama Y, Noda T, Okano H.: RNA-binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 99: 15194-15199 (2002)
35. Hirota Y, Sawamoto K, Okano H .: tincar encodes a novel transmembrane protein expressed in the Tinman-expressing cardioblasts of *Drosophila*. *Mech. Dev.* 119: S 279-283 (2002)
36. Potten CS, Booth C, Tudor GL, Booth D, Brady G, Hurley P, Ashton G, Clarke R, Sakakibara S, Okano H.: Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1. *Differentiation* 71: 28-41 (2003)
37. Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, Okano H.: Differential proliferative response in the postischemic hippocampus, temporal cortex, and olfactory bulb of young adult macaque monkeys. *Glia* 42: 209-224 (2003)
38. Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, Okano HJ, Okano H.:Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Mol.Cell.Neurosci.*23: 292-301 (2003)
39. Kuo HC, Pau KY, Yeoman RR, Mitalipov SM, Okano H, Wolf DP.: Differentiation of monkey embryonic stem cells into neural lineages. *Biology of Reproduction* 68: 1727-1735 (2003)
40. Kayahara T, Sawada M, Takaishi S, Fukui H, Seno H, Fukuzawa H, Suzuki K, Hiai H, Kageyama R, Okano H, Chiba T.:Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Letter* 535, 131-135 (2003)
41. Sasaki T, Kitagawa K, Sugiura S, Omura-Matsuoka E, Tanaka S, Yagita Y, Okano H, Matsumoto M, Hori M.: Implication of cyclooxygenase-2 on enhanced proliferation of neural progenitor cells in the adult mouse hippocampus after ischemia. *J. Neurosci. Res.* 72: 461-471 (2003)

42. Nakamura Y, Yamamoto M, Oda E, Yamamoto A, Kanemura Y, Hara M, Suzuki A, Yamasaki M, Okano H.: Expression of tubulin beta II in neural stem/progenitor cells and radial fibers during human fetal brain development. *Lab Invest.* 83: 479-489 (2003)
43. Yuasa Y, Okabe M, Yoshikawa S, Tabuchi K, Xiong WC, Hiromi Y, Okano H.: Drosophila homeodomain protein REPO controls glial differentiation by cooperating with ETS and BTB transcription factors. *Development* 130: 2419-2428 (2003)
44. Uchida K, Okano H, Hayashi T, Mine Y, Tanioka Y, Nomura T, Kawase T.: Grafted swine neuroepithelial stem cells can form myelinated axons and both efferent and afferent synapses with xenogeneic rat neurons. *J. Neurosci. Res.* 72: 661-669 (2003)
45. Kokuzawa J, Yoshimura S, Kitajima H, Shinoda J, Kaku Y, Iwama T, Morishita R, Shimazaki T, Okano H, Kunisada T, Sakai N.: Hepatocyte growth factor promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem cells from mouse embryos. *Mol. Cell. Neurosci.* 24: 190-197 (2003)
46. Ishizuya-Oka A, Shimizu K, Sakakibara S, Okano H, Ueda S.: Thyroid hormone-upregulated expression of Musashi-1 is specific for progenitor cells of the adult epithelium during amphibian gastrointestinal remodeling. *J Cell Sci.* 116: 3157-3164 (2003)
47. Kanuka H, Kuranaga E, Hiratou T, Igaki T, Nelson B, Okano H, Miura M.: Cytosol-endoplasmic reticulum interplay by Sec61alpha translocon in polyglutamine-mediated neurotoxicity in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 11723-11728 (2003)
48. Baker H, Kobayashi K, Okano H, Saino-Saito S.: Cortical and striatal expression of tyrosine hydroxylase mRNA in neonatal and adult mice. *Cell Mol Neurobiol.* 23: 507-518 (2003)
49. Tamaki T, Akatsuka A, Okada Y, Matsuzaki Y, Okano H, Kimura M.: Growth and differentiation potential of main- and side-population cells derived from murine skeletal muscle. *Exp. Cell Res.* 291: 83-90 (2003)
50. Miyanoiri Y, Kobayashi H, Imai T, Watanabe M, Nagata T, Uesugi S, Okano H, Katahira M.: Origin of higher affinity to RNA of the N-terminal RNA-binding domain than that of the C-terminal one of a mouse neural protein, musashi1, as revealed by comparison of their structures, modes of interaction, surface electrostatic potentials, and backbone dynamics. *J. Biol. Chem.* 278: 41309-41315 (2003)
51. Yoshida T, Tokunaga A, Nakao K, Okano H.: Distinct expression patterns of splicing isoforms of mNumb in the endocrine lineage of developing pancreas. *Differentiation* 71: 486-495 (2003)
52. Hu QD, Ang BT, Karsak M, Hu WP, Cui XY, Duka T, Takeda Y, Chia W, Sankar N, Ng YK, Ling EA, Maciag T, Small D, Trifonova R, Kopan R, Okano H, Nakafuku M, Chiba S, Hirai H, Aster JC, Schachner

- M, Pallen CJ, Watanabe K, Xiao ZC.: F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. *Cell* 115: 163-175 (2003)
53. Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Shimazaki T, Mihara M, Ohsugi Y, Iwamoto Y, Yoshizaki K, Kishimoto T, Toyama Y, Okano H.: Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. *J. Neurosci Res.* 76: 265-276 (2004)
  54. Yamashima, T., Tonchev, B.A., Seki, T. Sawamoto, K. and Okano, H.: Vascular adventitia generates neuronal progenitors in monkey hippocampus after ischemia. *Hippocampus* 14: 861-875 (2004)
  55. Matsuzaki, Y., Kinjo, K., Mulligan, RC. and Okano, H. : Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cells. *Immunity* 20: 87-93 (2004)
  56. Murata J, Murayama A, Horii A, Doi K, Harada T, Okano H, Kubo T.: Expression of Musashi1, a neural RNA-binding protein, in the cochlear of young adult mice. *Neuroscience Letter* 354: 201-204 (2004)
  57. Ieda M, Fukuda K, Hisaka Y, Kimura K, Kawaguchi H, Fujita J, Shimoda K, Takeshita E, Okano H, 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. Clin. Invest.* 113: 876-884 (2004)
  58. Ohba H, Chiyoda T, Endo E, Yano M, Hayakawa Y, Sakaguchi M, Darnell RB, Okano HJ, Okano H.: Sox21 is a repressor of neuronal differentiation and is antagonized by YB-1. *Neurosci. Lett.* 358: 157-160 (2004)
  59. Mikami, Y., Okano, H., Sakaguchi, M., Nakamura, M., Shimazaki, T., Okano, H.J., Kawakami, Y., Toyama, Y. and Toda, M.: Implantation of dendritic cells leading to de novo neurogenesis and functional recovery. *J. Neurosci Res.* 76: 453-465 (2004)
  60. Ozawa Y, Nakao K, Shimazaki T, Takeda J, Akira S, Ishihara K, Hirano T, Oguchi Y, Okano H.: Downregulation of STAT3 activation is required for presumptive rod photoreceptor cells to differentiate in the postnatal retina. *Mol.Cell.Neurosci* 26: 258-270 (2004)
  61. Sakaguchi H, Yaoi T, Suzuki T, Okano H, Hisa Y, Fushiki N.: Spatiotemporal patterns of Musashi1 expression during inner ear development. *Neuroreport* 15: 997-1001 (2004)
  62. Tokunaga A, Kohyama J, Yoshida T, Nakao K, Sawamoto K, Okano H: Mapping spatio-temporal activation of Notch signaling during neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse brain. *J. Neurochem.* 90: 142-154 (2004)

63. Yoshizaki T, Inaji M, Kouike H, Shimazaki T, Sawamoto K, Ando K, Date I, Kobayashi K, Suhara T, Uchiyama Y, and Okano H: Isolation and transplantation of dopaminergic neurons generated from mouse embryonic stem cells. *Neurosci. Lett.* 363: 33-37 (2004)
64. Sakuragawa N, Kakinuma K, Hatada S, Kikuchi A, Okano H, Uchida S, Kamo I, Yokoyama Y: Human Amnion Mesenchyme Cells Express Phenotype of Neuronal Progenitor Cells. *J. Neurosci Res.* 78: 208-214 (2004)
65. Ishibashi, S., Sakaguchi, M., Kuroiwa, T., Shimazaki, T., Okano, H. and Mizusawa, H.: Human neuronal stem cells improve sensorimotor and cognitive impairment in Mongolian gerbils after ischemia. *J. Neurosci. Res.* 78: 215-223 (2004)
66. Uchida, K., Mukai, M., Okano, H., 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)
67. Unezaki, S., Nishikawa, M., Okuda-Ashitaka, E., Masu, Y., Mukai, M., Kobayashi, S., Sawamoto, K., Okano, H. and Ito, S.: Characterization of isoforms of MOVO zinc finger protein, a mouse homologue of *Drosophila* Ovo, as transcription factor. *Gene* 336: 47-58 (2004)
68. Kawada H, Fujita J, Kinjo k, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, Muguruma Y, Itabashi Y, Ikeda Y, Ogawa S, Okano H, 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)
69. Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H: Retinoic acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* 275: 124-142 (2004)
70. Kawaguchi A., Ogawa M., Saito K., Matsuzaki F., Okano H. and Miyata T.: Differential expression of Pax6 and Ngn2 between pair-generated cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* 78: 784-795 (2004)
71. Hori K., Ito M., Fuwa T.J., Okano H., Baron M. and 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)
72. Watanabe K, Nakamura M, Iwanami A, Fujita Y, Kanemura Y, Toyama Y and Okano H: 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)
73. Clarke, R.B., Spence, K., Anderson, E., Howell, A., Okano, H. and Potten, C.S.: A putative human breast stem cell population is enriched for steroid receptor-positive cells. *Dev. Biol.* 277:443-456 (2005)

74. Suzuki S, Yamashita T, Tanaka K, Hattori H, Sawamoto K, Okano H and 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 (2005)
75. Sakaguchi M, Sawamoto K, Shimazaki T, Kitamura T, Shibuya A and Okano H.: A method for gene transfer, single isolation and in vitro assay for neural stem cells. *Inflammation and Regeneration* 25: 50-54 (2005)  
Hirota Y, Takahashi K, Ueda R, Okano H.: Transmembrane protein Tincar is expressed and involved in the development of *Drosophila* photoreceptor cells. *Development, Genes and Evolution* 215: 90-96, (2005)
76. Uemura O, Okada Y, Ando H, Guedj M, Higashijima S, Shimazaki T, Chino N, Okano H, Okamoto H: Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *isl1* gene for motor neuron and sensory neuron-specific expression. *Dev. Biol.* 278: 587-606, (2005)
77. Nakamura Y, Yamamoto M, Miyado K, Okano HJ, Fukagawa R, Higaki K, Yamasaki M, Okano H.: A novel marker for Purkinje cells, KIAA0864 protein. An analysis based on a monoclonal antibody HFB-16 in developing human cerebellum. *J Histochem Cytochem* 53: 423-430, (2005)
78. Nagato M, Heike T, Kato T, Yamanaka Y, Yoshimoto M, Shimazaki T, Okano H, Nakahata T: Prospective characterization of neural stem cells by flow cytometry analysis using combination of the surface markers. *J. Neurosci.Res.* 80: 456-466, (2005)
79. Hishikawa K, Marummo T, Miura S, Nakanishi A, Matsuzaki Y, Shibata K, Kohike H, Komori T, Hayashi M, Nakaki T, Nakauchi H, Okano H, 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)
80. Suzuki K, Fukui H, Kayahara T, Sawada M, Seno H, Hiai H, Kageyama R, Okano H, Chiba T: Hes1-deficient mice show precocious differentiation of Paneth cells in the small intestine. *Biochem Biophys Res Commun.* 328: 348-352, (2005)
81. Iwanami A, Yamane J, Katoh H, Nakamura M, Momoshima S, Ishii H, Tanioka Y, Tamaoki N, Nomura T, Toyama Y, Okano H.: Establishment of Graded Spinal Cord Injury Model in a Non-human Primate: the Common Marmoset. *J. Neurosci,Res.* 80: 172-181 (2005)
82. Iwanami, A., Kakneko, S., Nakamura, M., Kanemura, Y., Mori, H., Kobayashi, S., Yamasaki, M., Momoshima, S., Ishii, H., Ando, K., Tanioka, Y., Tamaoki, N., Nomura, T., Toyama, Y. and Okano, H.: Transplantation of human neural stem/progenitor cells promotes functional recovery after spinal cord injury in common marmoset. *J. Neurosci.,Res.* 80: 182-190, (2005)

83. Sasaki T, Iwata S, Okano HJ, Urasaki Y, Hamada J, Tanaka H, Dang NH, Okano H, Morimoto C: Nedd9 protein, a Cas-L homologue, is upregulated and may remodel neurons after transient global ischemia. *Stroke* 36: 2457-2462, (2005)
84. Crespel A, Rigau V, Coubes P, Rousset MC, de Bock F, Okano H, 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* 19: 436-450, (2005) .
85. Yano M, Okano HJ, Okano H: Involvement of Hu and hnRNP K in neuronal differentiation through p21 mRNA post-transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 280: 12690-12699, (2005) .
86. Islam MO, Kanemura Y, Tajria J, Mori H, Kobayashi S, Hara M, Yamasaki M, Okano H, Miyake J: Functional expression of ABCG2 transporter in human neural stem/progenitor cells. *Neurosci. Res.* 52: 75-82, (2005)
87. Akamatsu W, Fujiwara H, Mitsuhashi T, Yano M, Shibata S, Hayakawa Y, Okano HJ, Sakakibara S, Takano H, Takano T, Takahashi T, Noda T, Okano H.: RNA-binding protein HuD regulates neuronal cell identity and maturation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 102: 4625-4630, (2005)
88. Tamura M, Nakamura M, Ogawa Y, Toyama Y, Miura M and Okano H: Targeted expression of anti-apoptotic protein, p35, in oligodendrocytes reduces delayed demyelination and functional impairment after spinal cord injury. *Glia* 51: 312-321, (2005)
89. Yoda A, Kouike H, Okano H and Sawa H.: Components of the transcriptional Mediator complex are required for asymmetric cell division in *C. elegans*. *Development* 132: 1885-1893, (2005)
90. Kitagawa A, Nakayama T, Takenaga M, Matsumoto K, Tokura Y, Ohta Y, Ichinohe M, Yamaguchi Y, Suzuki N, Okano H, 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)
91. Pignatelli A, Kobayashi K, Okano H, Belluzzi O: Functional responses of dopaminergic neurons in the mouse olfactory bulb. *J. Physiol.* 564: 501-514., (2005)
92. Akasaka Y, Saikawa Y, Fujita K, Kubota T, Ishii T, Okano H, Kitajima M: Expression of a candidate marker for progenitor cells, Musashi-1, in the proliferative regions of human antrum and its decreased expression in intestinal metaplasia. *Histopathology*47: 348-356, (2005)
93. Uchida K, Momiyama T, Okano H, Yuzaki M, Koizumi A, Mine Y, Kawase T: Potential functional neural repair with grafted neural stem cells of early embryonic neuroepithelial origin *Neurosci. Res.* 53: 276-286, (2005)

94. Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, Tanaka T, Sugimura K, Fukami S, Itabashi Y, Hattori F, Shinazaki T, Ogawa S, Okano H and Fukuda K.: Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nature Biotech.* 23: 607-611, (2005)
95. Kambara H, Okano H, Chiocca A, Saeki Y: An oncolytic HSV1 mutant expressing ICP34.5 under control of a nestin promoter increases survival of animals, even when symptomatic from a brain tumor. *Cancer Research* 65: 2832-2839, (2005)
96. Yamashita T, Sawamoto K, Suzuki S, Suzuki N, Adachi K, Kawase T, Mihara M, Ohsugi Y, Abe K, Okano H: Blockade of IL-6 signaling aggravates ischemic cerebral damage in mice. *J. Neurochem.* 94: 459-468, (2005)
97. Matsuda Y, Wakamatsu Y, Kohyama J, Okano H, Fukuda K, Yasugi S: Notch signaling functions as a binary switch for the determination of glandular and luminal fates of endodermal epithelium during chicken stomach development. *Development* 132: 2783-2793, (2005)
98. Yoshimi K, Ren Y.-R., Seki T, Yamada M, Hayakawa H, Ooizumi H, Onodera M, Saito Y, Maruyama S, Okano H, Mizuno Y, Mochizuki H.: Possibility of neurogenesis in substantia nigra of parkinsonian brain. *Ann Neurol* 58: 31-40, (2005)
99. Mori A, Ueda T, Shimizu H, Yoshitake A, Hachiya T, Onoguchi K, Takakura H, Yoshitake M, Taguchi S, Cho Y, Inoue S, Kabei N, Okano H, Yozu R, Sasaki T: An Epidural Cooling Catheter Protects the Spinal Cord Against Ischemic Injury in Pigs. *Annals of Thoracic Surgery* 80: 1829-1833, (2005)
100. Islam MO, Kanemura Y, Tajria J, Mori H, Kobayashi S, Miyake J Hara M, Yamasaki M, Okano H.: Characterization of ABC transporter, ABCB1 expressed in human neural stem/progenitor cells. *FEBS Lett.* 579: 3473-3480, (2005)
101. Sasaki E, Hanazawa K, Kurita R, Akatsuka A, Yoshizaki T, Ishii H, Tanioka Y, Ohnishi Y, Suemizu H, Sugawara A, Tamaoki N, Izawa K, Nakazaki Y, Hamada H, Suemori H, Asano S, Nakatsuji N, Okano H, Tani K.: Establishment of novel embryonic stem cell lines derived from the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Stem Cells* 23:1304-1313, (2005)
102. Nakamura M, Okano H, Toyama Y, Dai HN and Bregman BS: Transplantation of embryonic spinal cord-derived neural stem cells support growth of suprapinal projections and functional recovery after spinal cord injury in neonate rat. *J. Neurosci Res* 81: 457-468, (2005)
103. Hishikawa K, Marumo T, Miura S, Nakanishi A, Matsuzaki Y, Shibata K, Ichiyangi T, Kohike H, Komori T, Takahashi I, Takase O, Imai N, Yoshikawa M, Inowa T, Hayashi M, Nakaki T, Nakauchi H, Okano H,

- Fujita T: Musculin/MyoR is expressed in kidney sidepopulation cells and can regulate their function. *J. Cell Biol.* 169: 921-928, (2005)
104. Sahara M, Sata M, Matsuzaki Y, Tanaka K, Morita T, Hirata Y, Okano H, Nagai R: Comparison of various bone marrow fractions in the ability to participate in vascular remodeling after mechanical injury. *Stem Cells* 23: 874-878., (2005)
105. Tonchev AB, Yamashima T, Sawamoto K., Okano H: Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. *J. Neurosci Res.* 81:776-788, (2005)
106. Jomphe C, Bourque MJ, Fortin GD, St-Gelais F, Okano H, Kobayashi K, Trudeau LE. Use of TH-EGFP transgenic mice as a source of identified dopaminergic neurons for physiological studies in postnatal cell culture. *J Neurosci Methods.* 146: 1-12, (2005)
107. Matsumoto T, Okamoto R, Yajima T, Mori T, Okamoto S, Ikeda Y, Mukai M, Yamazaki M, Oshima S, Tsuchiya K, Nakamura T, Kanai T, Okano H, Inazawa J, Hibi T, Watanabe M. Increase of bone marrow-derived secretory lineage epithelial cells during regeneration in the human intestine. *Gastroenterology.* 128:1851-1867, (2005)
108. Okada S, Ishii K, Yamane J, Iwanami A, Ikegami T, Iwamoto Y, Nakamura M, Miyoshi H, Okano HJ, Contag CH, Toyama Y, Okano H: In vivo imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury. *FASEB J.* 19:1839-41, (2005)
109. Tomita Y, Wakamatsu Y, Shibuya I, Matsumura K, Kawaguchi H, Hisaka Y, Matsuzaki Y, Osumi N, Ogawa S, Okano H and Fukuda K: Cardiac neural crest cells as dormant multipotent stem cells, identified as side population cells. *J. Cell Biol.* 170: 1135-1146, (2005)
110. Kohyama J, Tokunaga A, Fujita Y, Miyoshi H, Nagai T, Miyawaki A, Nakao K, Matsuzaki Y and Okano H: Visualization of spatio-temporal activation of Notch signaling: live monitoring and significance in neural development. *Dev. Biol.* 286: 311-325, (2005)
111. Kanuka, H., Kuranaga, E., Hiratou, T., Okano, H. and Miura, M.: *Drosophila* Caspase transduce Shaggy/GSK-3 activity in neural precursor development. *EMBO J* 24: 3793-3806, (2005)
112. Yamamoto S, Yoshino I, Shimazaki T, Murohashi M, Lax I, Okano H, Shibuya M, Sclegginger J, Gotoh N: Essential role of Shp2-binding sites on FRS2{alpha} for corticogenesis and for FGF2-dependent proliferation of neural progenitor cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 102: 15983-15988, (2005)
113. Suzuki T, Izumoto S, Wada K, Fujimoto Y, Maruno M, Yamasaki M, Kanemura Y, Shimazaki T, Okano H,

- Yoshimine T. Inhibition of glioma cell proliferation by neural stem cell factor. *J Neurooncol.* 74: 233-239, (2005)
114. Iijima T, Imai T, Kimura Y, Bernstein A, Okano HJ, Yuzaki M, Okano H. : RNA-binding protein HZF specifically binds to 3'-untranslated region of type1 *inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor* mRNA and is involved in its dendritic localization. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 102: 17190-17195, (2005)
115. Kaneko S, Nakamura M, Ogawa Y, Watanabe K, Iwanami A, Toyama Y, Okano H: Regenerative medicine for the central nervous system. –Transplantation of neural stem cells into the injured spinal cord- Journal of Japan Medical Association 48: 68-80 (2005)
116. Okano H, Kawahara H, Toriya M, Nakao K, Shibata S, Takao I: Function of RNA binding protein Musashi-1 in stem cells. *Exp. Cell Res.*306: 349-356 (2005)
117. Okano H, Okada s, Nakamura M, Toyama Y: Neural Stem Cells and Regeneration of Injured Spinal Cord. *Kidney International* 68: 1927-1931 (2005)
118. Nakamura M, Okada S, Toyama Y, Okano H: Role of IL-6 in spinal cord injury in a mouse model. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 28: 197-204 (2005)
11. 総説論文
1. Okano, H., Hirano, T. and Balaban, E.: Learning and memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 12403-12404 (2000)
2. Okano, H. and Goldman, S.A.: Identification and selection of neural progenitor cells. *NeuroScience News* 3, 27-31(2000)
3. Hisahara S, Takano R, Shoji S, Okano H., Miura M: Role of caspase-1 subfamily in cytotoxic cytokine-induced oligodendrocyte cell death. *J Neural Transm Suppl* 58, 135-142 (2000)
4. Okano, H., Yoshizaki, T., Shimazaki, T. and Sawamoto, K.: Isolation and transplantation of Dopaminergic Neurons and Neural Stem Cells. *Parkinson & Related Disorders.*9, 23-28 (2002)
5. Okano, H., Imai, T. and Okabe, M.: Musashi: a translational regulator of cell fates. *J. Cell Sci.* 115, 1355-1359 (2002)
6. Okano, H.: The stem cell biology of the central nervous system. *J. Neurosci. Res.*69, 698-707 (2002)
7. Okano, H.: Neural stem cells: progression of basic research and perspective for clinical application. *Keio J.*

*Med.*51. 115-128 (2002)

8. Okano, H., Ogawa, Y., Nakamura, M., Kaneko, S., Iwanami, A., Toyama, A.: Transplantation of neural stem cells into the spinal cord after injury. *Seminar in Cell & Developmental Biol.* 14. 191-198 (2003)
9. Okano H. : Making and repairing the mammalian brain: Introduction. *Semin Cell Dev Biol.* 14:159 (2003)
10. Okano, H.: Neural stem cells as therapeutic agents for CNS injuries and disorders. *International Congress Series* 1810, 1-6 (2003)
11. Hisahara, S., Okano, H., Miura, M.: Caspase-mediated oligodendrocyte cell death in the pathogenesis of autoimmune demyelination. *Neurosci. Res.* 46, 387-397 (2003)
12. Okano H, Kawahara H, Toriya M, Shibata S, Takao I: Function of RNA binding protein Musashi-1 in stem cells. Submitted to *Exp. Cell Res.* 306, 349-356 (2005)

(2)口頭発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

招待、講演 (国内 122 件、海外 21 件)

その他発表 (国内 191 件、海外 36 件)

13 年度

国内学会

1. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):神経幹細胞の同定分離法の確立と神経再生への挑戦, 第 90 回日本病理学会春期総会 ワークショップ(東京)H13.4.6
2. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):幹細胞システムによる中枢神経系の再生医学,第 11 回 LCS 研究会 シンポジウム(臓器再生の基礎と臨床—肺疾患の再生治療への展望—)(東京)H13.4.6
3. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):神経幹細胞の同定・分離法の確立と神経再生への挑戦,第 5 回 DNA 治療研究会(松山)H13.4.27
4. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST)神経幹細胞:神経疾患治療への戦略:第 42 回日本神経学会総会, 特別(招待)講演(東京)H13.5.11
5. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):神経再生と脳移植, 第 97 回日本精神神経学会総会 シンポジウム(未来医療における精神医学への期待)(大阪)H13.5.11
6. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):神経幹細胞の同定・分離法の確立と神経再生への挑戦, 第 6 回東京肝臓シンポジウム(幹細胞—再生医療へ向けて)(東京)H13.5.26

7. 川口綾乃、岡野栄之(阪大/院/医、JST.CRET):第54回日本細胞生物学会大会,胎生期神経幹細胞の同定とその細胞極性の解析(岐阜),H13.5.30
8. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):神経幹細胞,その生物学と医療応用:第49回日本輸血学会総会 ミレニアム・シンポジウム:輸血医学と再生医療(東京)H13.6.1
9. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):幹細胞生物学の将来的臨床応用の可能性について-神経幹細胞を中心に-,第42回日本哺乳動物卵子学会 特別講演(東京)H13.6.1
10. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):神経幹細胞について,脳腫瘍レビュー'01(東京)H13.6.2
11. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):神経幹細胞の同定・分離法の確立と神経再生への挑戦,第28回日本トシキコロジー学会学術年会 教育講演(東京)H13.6.10
12. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):神経幹細胞:その同定・分離法の開発と移植による神経機能回復の試み,第43回日本老年医学会学術集会 老年医学会 Aging Science Forum(大阪)H13.6.15
13. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):神経幹細胞の同定・分離法の確立と神経再生への挑戦,第19回日本神経治療学会総会 特別講演(東京)H13.6.28
14. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):幹細胞システムを用いた中枢神経系の再生医学,74回日本内分泌学会総会 特別講演(横浜)H13.6.30
15. 赤松和土、岡野栄之(慶大/医/生理、JST.CRET):Hu proteins are tumor suppressors, not differentiation in neuronal cells:第14回国際生物学会(京都)H13.7.10
16. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):幹細胞システムを用いた中枢神経系の再生医学,第2回ミレニアムプロジェクト「がん・ゲノム・脳」合同シンポジウム(横浜)H13.7.11
17. 廣田ゆき、岡野栄之(阪大/院/医、JST.CRET):マウス培養神経上皮細胞中での分子発現タイムテーブル,第14回国際生物学会(京都)H13.7.12
18. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):神経幹細胞を用いた中枢神経系の再生医学,第5回ウーターフロント脳神経外科カンファレンス 特別講演(鴨川)H13.7.29
19. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):幹細胞システムを用いた神経再生の試み,第38回日本臨床分子医学会(札幌)H13.8.3
20. 今井貴雄、岡野栄之(慶大/医/生理、JST.CREST):Musashi1による転写後調節はNotchシグナルを活性化する,第3回日本RNAミーティング(神戸)H13.8.3

21. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST): 幹細胞システムを用いた中枢神経系の再生医学, 第20回 消化器病態生理勉強会 特別講演(東京)H13.8.4
22. 廣田ゆき、岡野栄之(阪大/院/医、慶大/医/生理、JST.CRET)光受容細胞分化に関与する新規遺伝子の同定と解析、ショウジョウバエ研究会(三島)H13.8.9
23. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST): 神経幹細胞の同定・分離法の確立と神経再生への挑戦, 第29回日本小児神経外科学会 教育講演(静岡)H13.9.7
24. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST): 神経幹細胞を用いた中枢神経系の再生医学, 第22回脊髄シンポジウム(東京)H13.9.8
25. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST): 神経幹細胞を用いた中枢神経系の再生医学, 第1回岐阜シンポジウム「再生医学と創薬」(岐阜)H13.9.13
26. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST.CREST): 神経幹細胞とドーパミンニューロンの分離と移植, 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会(京都)H13.9.26-28
27. 飯島崇利、岡野栄之(阪大/院/医、慶大/医/生理、JST.CREST): 小脳purkinje細胞における樹状突起へのmRNA輸送機構, 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会(京都)H13.9.26-28
28. 岡野James洋尚、岡野栄之(慶大/医/生理、JST.CREST): 神経特異的RNA結合蛋白質Huの機能解析(京都)第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会(京都)H13.9.26-28
29. 徳永暁憲、岡野栄之(阪大/院/医、慶大/医/生理、JST.CREST): Notch signal 調節因子 Mouse Numb の神経分化に対する効果(京都)第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会(京都)H13.9.26-28
30. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST): 幹細胞システムを用いた中枢神経系の再生医学, 第7回東北パーキンソン病治療研究会 特別講演(盛岡)H13.10.20
31. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST)幹細胞システムを用いた中枢神経系の再生医学: 第60回日本脳神経外科学会総会(岡山)H13.10.24
32. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST): 神経幹細胞と中枢神経系再生への挑戦: 日本蘇生学会第20回大会 特別講演(金沢)H13.10.26
33. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST): 神経幹細胞の同定・分離法の確立と神経再生への挑戦: 第24回東海プロスタグランディン研究会 特別講演(名古屋)H13.10.27

34. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):幹細胞システムを用いた中枢神経系再生医療への挑戦, 第51回日本アレルギー学会総会 教育講演(福岡)H13.10.27
35. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):神経幹細胞の同定・分離法の確立と神経再生への挑戦:第49回日本ウイルス学会学術集会 教育講演(大阪)H13.11.18
36. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):幹細胞システムを用いた中枢神経系の再生医学:第26回医学系倫理委員会連絡会議 (大阪)H13.12.7
37. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST)幹細胞と中枢神経系の再生医学:第11回神経科学の基礎と臨床 特別講演(大阪)H13.12.8
38. 廣田ゆき、岡野栄之(阪大/院/医、慶大/医/生理、JST.CREST):ショウジョウバエ光受容細胞分化における新規膜貫通型蛋白質の機能の解析、第24回日本分子生物学会年会(横浜)H13.12.9-12
39. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST.CREST):幹細胞システムを用いた中枢神経系の再生医学、第24回日本分子生物学会年会(横浜)H13.12.9
40. 飯島崇利、岡野栄之(阪大/院/医、慶大/医/生理、JST.CREST):IP3receptor type 1 mRNAの3末端非翻訳領域に結合する遺伝子産物と小脳purkinju細胞における樹状突起へのmRNA局在機構、第24回日本分子生物学会年会(横浜)H13.12.9-12
41. 鳥谷真佐子、岡野栄之(阪大/院/医、慶大/医/生理、JST.CREST):脊髄動物タイプのショウジョウバエ成虫型ニューロブラストの増殖・分化に関わる新しい因子の探索、第24回日本分子生物学会年会(横浜)H13.12.9-12
42. 徳永暁憲、岡野栄之(阪大/院/医、慶大/医/生理、JST.CREST):中枢神経におけるNotch signal調節因子m-numbの機能解析、第24回日本分子生物学会年会(横浜)H13.12.9-12
43. 吉田哲、岡野栄之(阪大/院/医、慶大/医/生理、JST.CREST):膵臓発生におけるRNA結合蛋白質Musashi-1,2の解析、第24回日本分子生物学会年会(横浜)H13.12.9-12
44. 岡野 James 洋尚、岡野栄之(慶大/医/生理、JST.CREST):神経特異的 RNA 結合蛋白質 Hu の機能解析、第24回日本分子生物学会年会(横浜)H13.12.9-12
45. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):神経幹細胞の分離と臨床応用への展望, 第16回Transfusion Medicine Conference (T.M.C)(東京)H14.1.26
46. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):中枢神経系の再生医学, 第20回Cytoprotection研究会(京

都)H14.2.1

47. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):神経幹細胞について,第5回 Clinical Conference on Parkinson's Disease (CCPD)(千葉)H14.2.23
48. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):幹細胞システムによる中枢神経系の再生医学,第75回日本薬理学会年会(熊本)H14.3.14
49. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):中枢神経系の再生医学 日本薬理学会 第122年会シンポジウム「脳科学と分子認識・捕捉」(千葉)H14.3.26
50. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST) Isolation and transplantation of Dopaminergic Neurons and Neural Stem Cells. 第79回日本生理学会大会 IUPS Symposium (Neural Regeneration and Functional Recovery)(広島)H14.3.28

#### 国際学会

51. Hideyuki Okano (Dept of physiol, Keio Univ Sch Med, CREST・JST): Neural stem cell: its prospective identification and self-renewal. 14<sup>th</sup> International Congress of Developmental Biology, Kyoto, 2001
52. Hideyuki Okano (Dept of physiol, Keio Univ Sch Med, CREST・JST): Transplantation of Neural Stem Cells/ Dopaminergic Neuron for Parkinsonism Model Animals. Sixth International Symposium on the "Treatment of Parkinson's Disease" Kobe, September 29, 2001
53. Hideyuki Okano (Dept of physiol, Keio Univ Sch Med, CREST・JST): Neural Stem Cells: Basic Biology and the Prospects of Brain Repair. Joint Meeting 18<sup>th</sup> Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry (ISN) and 32<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society for Neurochemistry (ASN) ( Buenos Aires) August 30, 2001
54. Hideyuki Okano (Dept of physiol, Keio Univ Sch Med, CREST・JST): Functional recovery of the spinal cord injury model by the transplantation of neural stem cells. 2002 Gordon Research Conference on Myelin. Ventura, (USA) February 6, 2002
55. Hideyuki Okano (Dept of physiol, Keio Univ Sch Med, CREST・JST): Transplantation of FACS-sorted mesencephalic neural progenitor cells and dopaminergic neurons into a rat model of Parkinson's disease. Cellular and Molecular Treatments of Neurological Disease. Cambridge, (USA) March, 2002

14年度

国内学会

56. 金城謙太郎、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理・内科、JST、CREST) : 骨髄間葉系多能性幹細胞純化の試み 第一回日本再生医療学会(京都)H14.4.18
57. 島崎琢也、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST、CREST) : ES 細胞を用いた神経再生 第1回日本再生医療学会(京都)H14.4.18
58. 岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST、CREST) : 中枢神経系の再生医学 第1回日本再生医療学会(京都)H14.4.19
59. 岩波明生、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理・整形、JST、CREST) : サル脊髄損傷に対するヒト神経幹細胞移植後の画像ならびに病理組織学的検討 第1回日本再生医療学会(京都)H14.4.19
60. 金子慎二郎、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理・整形、JST、CREST) : サル脊髄損傷に対するヒト神経幹細胞移植後の運動機能評価 第1回日本再生医療学会(京都)H14.4.19
61. 村山綾子、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST、CREST) : 中枢神経系における SP 細胞の解析 第55回日本細胞生物学会(横浜)H14.5.21
62. 金城謙太郎、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理・内科、JST、CREST) : 骨髄多能性幹細胞純化の試み 第35回日本発生生物学会(横浜)H14.5.23
63. 鳥谷真佐子、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、阪大 / 院医 / 機能形態、JST、CREST) : 脊髄動物タイプのシヨウジョウバエ成虫型ニューロブラストの増殖・分化に関わる新しい因子の検索 第35回日本発生生物学会(横浜)H14.5.23
64. 岡田洋平、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、名大 / 院医 / 神経内科、JST、CREST) : マウス ES 細胞から運動ニューロンへの分化誘導の試み 第43回日本神経学会総会(札幌)H14.5.31
65. 岡野洋尚、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST、CREST) : 神経特異的 RNA 結合蛋白質 Hu の機能解析 第2回先端医科学へのアプローチ研究会(三島)H14.6.15
66. 三上裕嗣、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理・整形、JST、CREST) : 脊髄損傷マウスへの樹状細胞移植による神経機能回復 神経組織の成長・再生・移植研究会(東京)H14.6.22
67. 岡田洋平、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、名大 / 院医 / 神経内科、JST、CREST) : マウス ES 細胞から運動ニューロンへの分化誘導の試み 第25回日本神経科学大会(東京)H14.7.7
68. 芝田晋介、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST、CREST) : 哺乳類の神経発生における RNA 結合蛋白質 Musashi の機能解析 第25回日本神経科学大会(東京)H14.7.9

69. 早川佳芳、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):神経幹細胞の維持と分化における Gab1 の役割  
第25回日本神経科学大会(東京)H14.7.9
70. 飯島崇利、岡野栄之(慶大/医/生理、阪大/院医/機能形態、JST、CREST):IP3 receptor type 1  
mRNA の3'末端非翻訳領域に結合する遺伝子産物と小脳Purkinje 細胞における樹状突起へのmRNA  
局在化機構 第45回日本神経化学会大会(札幌) H14.7.16
71. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):Strategies toward their potential therapeutic application in to  
spinal cord injury model.第45回日本神経化学会大会(札幌) H14.7.17
72. 芝田晋介、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):Roles of Musashi Family in mammalian 第45回  
日本神経化学会大会 (札幌) H14.7.18
73. 村山綾子、岡野栄之(慶大/医/生理、阪大/院医/機能形態、JST、CREST):Flow cytometric  
analysis of neural stem cells in the developing and adult mouse brain 第45回日本神経化学会大会 (札  
幌) H14.7.18
74. 早川佳芳、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):Roles of Gab1 in the maintenance and  
differentiation in neural stem cells 第45回日本神経化学会大会(札幌) H14.7.18
75. 芝田晋介、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):Roles of Musashi Family in mammalian nervous  
development 第45回日本神経化学会大会(札幌) H14.7.18
76. 金子慎二郎、岡野栄之(慶大/医/生理・整形、JST、CREST):脊髄損傷の治療と再生医療/神経幹細胞  
移植を中心として 第134回日本獣医学会 (岐阜)H14.9.19
77. 岩波明生、岡野栄之(慶大/医/生理・整形、JST、CREST)中枢神経系の再生医学の現状と将来 第  
134回日本獣医学会 (岐阜)H14.9.19
78. 三上裕嗣、岡野栄之(慶大/医/生理・整形、JST、CREST):損傷脊髄に対する樹状細胞移植—内在性  
神経幹細胞の反応性に着目して—第17回日本整形外科学会基礎学術集会(青森) H14.10.1
79. 矢野真人、岡野栄之(慶大/医/生理、阪大/院医/機能形態、JST、CREST):神経特異的 RNA 結合  
蛋白質 Hu の機能解析 日本生化学会(京都)H14.10.16
80. 金子慎二郎、岡野栄之(慶大/医/生理・整形、JST、CREST):サル脊髄損傷に対するヒト胎児脊髄由  
来神経幹細胞移植後の組織学的評価 第17回日本整形外科学会基礎学術集会(青森) H14.10
81. 三上裕嗣、岡野栄之(慶大/医/生理・整形、JST、CREST):樹状細胞移植による脊髄損傷後の神経機  
能回復 第7回グリア研究会(東京)H14.11.30

82. 芝田晋介、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):哺乳類の神経発生における神経系特異的 RNA 結合蛋白質 Musashi の機能解析厚生労働科学研究特定疾患対策研究事業「先天性水痘症」調査研究班平成14年第2回班会議 H14.12
83. 吉田哲、岡野栄之(慶大/医/生理、阪大/院医/機能形態、JST. CREST): 腭臓発生における Numb family による細胞運命の決定機構 日本分子生物学会(横浜)H14.12.11
84. 廣田ゆき、岡野栄之(慶大/医/生理、阪大/院医/機能形態、JST. CREST):シヨウジヨウバエ dorsal vessel 発生における新規膜貫通型蛋白質 日本分子生物学会(横浜)H14.12.11
85. 鳥谷真佐子、岡野栄之(慶大/医/生理、阪大/院医/機能形態、JST. CREST): シヨウジヨウバエ成虫型ニューロプロストにおける Notch シグナリングの機能解析 日本分子生物学会(横浜)H14.12.11
86. 岡野洋尚、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST): 神経系に発現する RNA 結合蛋白質の機能解析 特定領域「RNA 情報網」第1回合同班会議(三島) H15.1.10
87. 佐藤俊朗、岡野栄之(慶大/医/生理・消化器内科、JST. CREST):腸管上皮における side population 細胞の分離と機能解析 第2回日本再生医療学会(神戸)H15.3.11
88. 伊谷(松崎)有未、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST): Side population-DNA dye による幹細胞純化の試み 第2回日本再生医療学会(神戸)H15.3.11
89. 渡辺航太、岡野栄之(慶大/医/生理・整形、JST. CREST):ラット胎児脊髄由来神経幹細胞の3次元培養法の確立 第2回日本再生医療学会(神戸)H15.3.11
90. 岡田誠司、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST): 急性期脊髄損傷に対する IL-6 レセプター抗体の効果 第2回日本再生医療学会(神戸)H15.3.12
91. 岩波明生、岡野栄之(慶大/医/生理・整形、JST. CREST): 損傷部脊髄内セマフォリン 3A 阻害剤による損傷脊髄の再生 第2回日本再生医療学会(神戸)H15.3.12
92. 金城謙太郎、岡野栄之(慶大/医/生理・血液内、JST. CREST):骨髄間葉系多能性幹細胞純化の試み 第2回日本再生医療学会(神戸)H15.3.12
93. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):中枢神経系の幹細胞生物学と再生医学 第2回日本再生医療学会(神戸)H15.3.12

国際学会

94. Hideyuki Okano: Role of neural RNA binding protein Musashi-1 in Neural Stem Cells Gordon Conference "Neural Development"(アメリカ) 2002.8.18-23
95. Hirotaka J Okano, Hiroyuki Takahashi, Masato Yano, Masatoshi Watanabe, Takahiko Kato, Hideyuki Okano: FUNCTIONAL AND EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM IN 5'UTR OF HUMAN Cold Spring Harbor Meeting: Translational Control(アメリカ) 2002.9.12
96. Takao Imai, Hideyuki Okano: Neural RNA-binding protein Musashi is involved in neuronal cell fate decision through the post-transcriptional regulation Cold Spring Harbor Meeting: Translational Control(アメリカ) 2002.9.12
97. Shimazaki Takuya, Yoshihito Yoshizaki, Yohei Okada, Hideyuki Okano, Yoshihito Matsumoto, Seigo Nagao: DIFFERENTIATION AND FUNCTION OF CHOLINERGIC NEURONS GENERATED BY ES-DERIVED NEURAL STEM CELLS The 12th International Conference of the International Society of Differentiation Lyon(フランス) 2002-9.15
98. Hideyuki Okano: Neural stem cells as therapeutic agents for CNS injuries and disorders 脳梗塞と老年痴呆の分子病態解明と画期的治療法開発に関する国際シンポジウム(岡山) 2002.10.20
99. Yuji Mikami, Maahiro Toda, Masaya Nakamura, Masanori Sakaguchi Hideyuki Okano, Yoshiaki Toda, Yutaka Kawakami: ADMINISTRATION OF DENDRITIC CELLS PROMOTE FUNCTIONAL RECOVERY AFTER SPINAL CORD INJURY IN ADULT MICE (アメリカ) 2002.11.3
100. Ayako Murayama, Yumi Matsuzaki, Ayano Kawaguchi Takaki Miyata, Masaharu Ogawa, Takuya Shimazaki, Hideyuki Okano: Flow cytometric analysis of neural stem cells in the developing and adult mouse brain Society for Neuroscience 32nd annual meeting (アメリカ) 2002.11.6
101. Shinsuke Shibata, Shin-ichi Sakakibara, Tetsuo Noda, Hideyuki Okano: ROLES OF MUSASHI FAMILY IN MAMMALIAN NERVOUS DEVELOPMENT The 12th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience (神戸) 2002.11.19
102. Yoshika Hayakawa, Keigo Nishida, Toshio Hirano, Takuya Shimazaki, Hideyuki Okano: Roles of Gab1 in the maintenance and differentiation in neural stem cells The 12th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience(神戸) 2002.11.19
103. Hideyuki Okano: Stem cell biology and regeneration of the central nervous system. 5th Annual Symposium on Japanede-American Beckman Frontiers of Science(アメリカ) 2002.12.7

15年度  
国内学会

104. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):脳再生医学とは？, 平成15年度交詢社医療シリーズ公開講座(東京)H15.4
105. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):再生医療、細胞治療, 第89回日本消化器病学会総会・特別講演, (大宮) H15.4.
106. 岩波明生, 岡野栄之(慶大/医/整形・生理、JST. CREST):神経幹(前駆)細胞移植による損傷脊髄の再生, 第108回日本解剖学会, (福岡)H15.4.
107. 金子慎二郎, 岡野栄之(慶大/医/整形・生理、JST. CREST):損傷部脊髄内 Semaphorin3A 阻害剤による損傷軸索の再生, 第10回脊髄末梢神経研究会, (東京)H15.4.
108. 中村雅也, 岡野栄之(慶大/医/整形・生理、JST. CREST):損傷部グリア瘢痕組織切除による脊髄内サイトカイン発現の変化, 第32回日本脊椎脊髄病学会, (福岡)H15.4.
109. 渡邊航太, 岡野栄之(慶大/医/整形・生理、JST. CREST):胎児脊髄由来神経幹細胞の三次元培養法の確立, 第32回日本脊椎脊髄病学会, (福岡) H15.4.
110. Sawamoto, K., Wichiterle, H., Tessier-Lavigne, M., Alvarez-Buylla, A.: Mechanisms of neuroblast migration in the adult mouse subventricular zone. 第56回日本細胞生物学会大会(シンポジウム「in vivo あるいは organotypic culture における神経細胞の追跡」). (大津) H15.5.
111. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):中枢神経系における幹細胞の制御機構, 日本分子生物学会第3回春期シンポジウム市民セミナー・学術講演, (米子) H15.5.
112. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):神経幹細胞:その分化制御と細胞治療, 第44回日本神経学会総会シンポジウム, (横浜) H15.5.
113. 岡田洋平, 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):マウス ES 細胞を用いた神経系細胞の誘導, 第44回日本神経学会総会, (横浜)H15.5.
114. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):幹細胞生物学と再生医学, 東村山医師会・学術講演会(再生医学シリーズ第2弾・基礎・神経編), (東京)H15.5.
115. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):脊髄再生,第3回(NPO)日本せきずい基金せきずい再生研究促進市民セミナー, (横浜)H15.6.
116. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):神経系の再生, 第6回日本組織工学会プレナリーレクチャー, (東京)H15.6.

117. 渡辺航太、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):ラット胎児由来神経幹細胞の3次元培養法の確立, 神経組織の成長・再生・移植研究会第18回学術集会, (東京)H15年6月
118. 早川佳芳、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):神経幹細胞の維持と分化におけるGab1の役割, 神経組織の成長・再生・移植研究会第18回学術集会, (東京)H15.6.
119. 吉崎崇仁、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):胚性幹細胞より誘導されたドーパミン作動性ニューロンのパーキンソン病モデルラットへの移植, 神経組織の成長・再生・移植研究会第18回学術集会, (東京)H15.6.
120. 内田耕一、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):ヒト成体神経幹細胞の乳児 astroblastoma からの分離培養と生物学的特徴, 神経組織の成長・再生・移植研究会第18回学術集会, (東京)H15.6.
121. 岡田洋平、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):マウス ES 細胞から運動ニューロン誘導の試み, 神経組織の成長・再生・移植研究会第18回学術集会, (東京)H15.6.
122. 棚木弘和、岡野栄之(慶大/医/整形・生理、JST、CREST):遺伝子導入シュワン細胞を応用したハイブリッド型人工神経, 神経組織の成長・再生・移植研究会第18回学術集会, (東京)H15.6.
123. 岩波明生、岡野栄之(慶大/医/整形・生理、JST、CREST):サル脊髄損傷に対するヒト神経幹細胞移植の有効性の検討, 神経組織の成長・再生・移植研究会第18回学術集会, (東京)H15.6.
124. 金子慎二郎、岡野栄之(慶大/医/整形・生理、JST、CREST):損傷部脊髄内Semaphorin 3A 阻害剤による損傷軸索の再生, 神経組織の成長・再生・移植研究会第18回学術集会, (東京)H15.6.
125. 岡田誠司、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):急性期脊髄損傷に対するIL-6レセプター抗体の効果, 神経組織の成長・再生・移植研究会第18回学術集会, (東京)H15.6.
126. 松本義人、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):てんかん治療を目的としたES細胞からのGABA神経細胞の分化誘導, 神経組織の成長・再生・移植研究会第18回学術集会, (東京)H15.6.
127. 新堂敦、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):キンドリングモデルマウスに対する神経幹細胞より分化誘導したGABA神経細胞の移植, 神経組織の成長・再生・移植研究会第18回学術集会, (東京)H15.6.
128. 岡田洋平、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):マウス ES 細胞から運動ニューロン誘導の試み, 神経組織の成長・再生・移植研究会第18回学術集会, H15.6.(東京)
129. 澤本和延, Wichterle, H., Tessier-Lavigne, M., and Alvarez-Buylla, A. :脈絡叢由来 Slit 蛋白質と脳脊髄

- 液流による成体マウス脳内におけるニューロブラストの移動方向の制御、第18回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会、(東京)H15.6.
130. 砂堀 毅彦、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):Nestin-d4-Venusトランスジェニックマウスの解析、第36回日本発生生物学会、(札幌) H15.6.
131. 廣田 ゆき、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):シヨウジョウバエ dorsal vessel 発生における新規膜貫通型蛋白質 Tincar の機能解析、第36回日本発生生物学会、(札幌) H15.6.
132. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):中枢神経系の再生医学、動物実験の果たす役割-21世紀の展望-吉田富三博士生誕100周年記念・日本学会議シンポジウム、(東京)H15.7.
133. Hideyuki Okano:Regenerating the central nervous system, 第26回日本神経科学大会モーニングレクチャー、(名古屋)H15.7.
134. 島崎琢也、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):ES細胞由来神経幹細胞からの様々なタイプのニューロンの分化、第26回日本神経科学大会シンポジウム、(名古屋)H15.7.
135. 岩波明生、岡野栄之(慶大/医/整形・生理、JST. CREST):損傷部脊髄内 Sema3A 阻害剤による損傷軸索の再生、第26回日本神経科学大会、(名古屋)H15.7.
136. 岡田誠司、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):脊髄損傷に対するIL-6レセプター抗体の効果、第26回日本神経科学大会、(名古屋)H15.7.
137. 川口綾乃、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):Asymmetric retention of Pax6 and Ngn2 in clonally generated cortical neuron pairs in vitro, 第26回日本神経科学大会、(名古屋)H15.7.
138. 芝田晋介、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):哺乳類の神経発生におけるRNA結合蛋白質Musashiの機能解析、第26回日本神経科学大会、(名古屋)H15.7.
139. 植村修、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):進化的に保存されているIslet-1遺伝子の脊髄運動神経における転写制御、第26回日本神経科学大会、(名古屋)H15.7.
140. 岡田洋平、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):マウスES細胞から運動ニューロン誘導の試み、第26回日本神経科学大会、(名古屋)H15.7.
141. 早川佳芳、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):神経幹細胞の維持と分化におけるGap1の役割、第26回日本神経科学大会、(名古屋)H15.7.
142. 金子慎二郎、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):損傷部脊髄内 Semaphorin 3A 阻害剤による

- 損傷軸索の再生(Axonal Regeneration after Administration of Semaphorin 3A Inhibitor into the Injured Spinal Cord, 第 26 回日本神経科学大会, (名古屋)H15.7.
143. 渡辺航太、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST): Type 1 Collagen を用いたラット胎児由来神経幹細胞三次元培養法の確立, 2003 年 7 月, 第 26 回日本神経科学大会, (名古屋)H15.7.
144. Sawamoto, K., Wichterle, H., Tessier-Lavigne, M., and Alvarez-Buylla, A.: A novel mechanism of neuronal migration in the adult mouse brain. 第 26 回日本神経科学大会, (名古屋)H15.7.
145. 岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST): 中枢神経系の再生医学, 信州大学医学部第三内科開講 30 周年式典, (松本)H15.7.
146. 岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST): 幹細胞生物学と中枢神経系の再生医学, 第 21 回内分泌・代謝学サマーセミナー, H15.7.(箱根)
147. 岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST): 幹細胞生物学と中枢神経系の再生医学, 第 11 回セルサイクル研究会, H15.8.(福岡)
148. 岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST): 幹細胞生物学と中枢神経系の再生医学, 第 5 回中国四国脳卒中研究会, H15.9.(香川)
149. 岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST): 幹細胞移植による神経再生, 第 12 回日本組織適合性学会シンポジウム, H15.9.(軽井沢)
150. 岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST): 中枢神経系再生医学, 第 53 回科学講演会, H15.9.(東京)
151. 岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST): 神経系における幹細胞制御機構: 神経遺伝学から再生医学へ, 第 75 回日本遺伝学会大会・特別記念講演, H15.9.(仙台)
152. 大場宏幸、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST): 神経幹細胞に発現する転写因子 Sox21 の解析, 第 46 回日本神経化学会, H15.9.(新潟)
153. 金子慎二郎、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST): 損傷部脊髄内 Semaphorin3A 阻害剤による損傷軸索の再生, 第 46 回神経化学会, H15.9.(新潟)
154. 大場宏幸、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST): Histological and biochemical study of Sox21 transcriptionalfactor, 第 46 回神経化学会, H15.9.(新潟)
155. 大場宏幸、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST): 神経幹細胞に発現する転写因子 Sox21 の解析, 第 46 回日本神経化学会, H15.9.(新潟)

156. 澤本和延、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):Hynek Wichterle, Marc Tessier-Lavigne, Arturo Alvarez-Buylla. 成体マウスおよびサル脳室下層における新生ニューロンの移動, 第46回神経化学会, H15.9.(新潟)
157. 岡田誠司、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):Bblockade of Interleukin-6 Receptor Suppresses Reactive Astrogliosis and Ameliorates Functional Recovery in Experimental Spinal Cord Injury. , 第46回神経化学会, H15.9. (新潟)
158. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):中枢神経系の再生医学-脊髄損傷を中心として-, 2003年度NPO再生医療推進センター第2回講演会, H15.10.(京都)
159. 並木淳、岡野栄之(慶大/医/救急・生理、JST、CREST):骨髄間質細胞における神経選択的 nestin 遺伝子の発現誘導. 第4回日本分子脳神経外科学会, H15. 9.(東京)
160. 中村雅也、岡野栄之(慶大/医/整形・生理、JST、CREST): 整形外科領域における基礎研究と臨床の接点. 損傷の再生と機能修復, 第52回東日本整形災害外科学会 シンポジウム, H15.9.(東京)
161. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):幹細胞生物学と中枢神経系の再生医学, 第19回形態科学シンポジウム(日本学会議解剖学研究連絡委員会), H15.10.(和歌山)
162. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):幹細胞と再生医学, 第4回IBD基礎検討会・特別講演, H15.10.(さいたま)
163. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):中枢神経系の幹細胞生物学と再生医学, 第8回金沢神経科学シンポジウム, H15.10.(金沢)
164. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):神経再生の新戦略, 第15回日本脳循環代謝学会総会・教育講演, H15.10.(大阪)
165. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):「再生医療の未来ー神経細胞をよみがえらせるー」, 前橋市医師会卒後研修会, H15年10月(前橋)
166. 金子慎二郎、岡野栄之(慶大/医/整形・生理、JST、CREST):損傷部脊髄内 Semaphorin3A 阻害剤による損傷軸索の再生第8回グリア研究会, H15年10月(名古屋)
167. 金子慎二郎、岡野栄之(慶大/医/整形・生理、JST、CREST):霊長類サル脊髄損傷モデルの確立, 第18回日本整形外科学会基礎学術集会, H15年10月(北九州)
168. 渡辺航太、岡野栄之(慶大/医/整形・生理、JST、CREST):Type 1 Collagen を用いたラット胎児由来神

- 経幹細胞三次元培養法の確立, 第18回日本整形外科学会基礎学術集会, H15年10月(北九州)
169. 岩波明生、岡野栄之(慶大/医/整形・生理、JST. CREST):損傷部脊髄内セマフォリン3A阻害剤による損傷軸索の再生, 第18回日本整形外科学会基礎学術集会, H15年10月(北九州)
170. 岡田誠司、岡野栄之(慶大/医/整形・生理、JST. CREST):脊髄損傷に対するIL-6レセプター抗体の治療効果について, 第18回日本整形外科学会基礎学術集会, H15年10月(北九州)
171. 山根淳一、岡野栄之,(慶大/医/整形・生理、JST. CREST):損傷程度の異なる霊長類サル脊髄損傷モデルの確立,第18回日本整形外科学会基礎学術集会, H15年10月(北九州)
172. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):「再生医療の未来」へ新駆細胞をよみがえらせるへ, 横須賀市医師会学術講演会, H15年11月(横須賀)
173. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):幹細胞と再生医学, 弁理士のための先端科学技術セミナー第2回バイオ研修カリキュラム, H15年11月(東京)
174. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):中枢神経系の再生医学, 第3回京滋神経変性疾患研究会・特別講演, H15年11月(京都)
175. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):中枢神経系の再生医学, 第24回日本炎症・再生医学会・教育講演, H15年11月(京都)
176. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):Self-renewal of neural stem cells and CNS repair, 第24回日本炎症・再生医学会・シンポジウム, H15年11月(京都)
177. 山下徹、澤本和延、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):虚血脳における新生ニューロンの挙動, 第24回日本炎症・再生医学会, H15年11月(京都)
178. 岡田誠司、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):脊髄損傷に対するIL-6レセプター抗体の効果について, 第24回日本炎症再生医療学会, H15年11月(京都)
179. 中村雅也、岡野栄之(慶大/医/整形・生理、JST. CREST):損傷脊髄に対する神経幹細胞移植療法の確立に向けて, 第24回日本炎症再生学会シンポジウム, H15年11月(京都)
180. 金子慎二郎、岡野栄之(慶大/医/整形・生理、JST. CREST):損傷部脊髄内Semaphorin3A阻害剤による損傷軸索の再生, 第38回日本脊髄障害医学会, H15年11月(名古屋)
181. 金子慎二郎、岡野栄之(慶大/医/整形・生理、JST. CREST):損傷部脊髄内セマフォリン3A阻害剤による損傷軸索の再生, 第38回日本脊髄障害医学会, H15年11月(名古屋)

182. 渡辺航太、岡野栄之(慶大/医/整形・生理、JST、CREST): ラット損傷脊髄に対するラット胎児前脳由来・脊髄由来神経幹細胞移植の比較, 第 38 回日本脊髄障害医学会, H15 年 11 月(名古屋)
183. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST): Musashi1: a translational regulator of cell fate, RNA 2003 Kyoto シンポジウム, H15 年 11 月(京都)
184. Masato Yano, Hiroataka James Okano, Hideyuki Okano: Biochemical study of neuronal RNA binding protein Hu, NA 2003 Kyoto シンポジウム, H15 年 11 月(京都)
185. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST): 脊髄再生研究の将来の展望, 「組織再生と機能回復」シンポジウム(国立身体障害者リハビリテーションセンター), H15 年 12 月(東京)
186. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST): 中枢神経系の再生医学, 日本薬学会関東支部学術講演会「バイオマテリアルと薬学の接点」, H15 年 12 月(横浜)
187. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST): 中枢神経系の幹細胞生物学と再生医学, 第 26 回日本分子生物学会年会シンポジウム, 2003 年 12 月(神戸)
188. 大石久美子, 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST), 澤斎: 細胞質分裂および非対称分裂を制御する新規遺伝子 *psa-2* の同定および解析, 第 26 回日本分子生物学会年会シンポジウム, H15 年 12 月(神戸)
189. 荒田幸信, 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST): *C.elegans* において、*psa-3/Meis* は、細胞極性を制御する Wnt シグナル経路と、位置 identity を与える *Hox-Pdx* によって制御され、娘細胞間の非対称な細胞運命の決定に関与する。 , 第 26 回日本分子生物学会年会, H15 年 12 月(神戸)
190. 内田真啓、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST): SWI/SNF 染色体構造変換複合体の構成因子をコードする *PSA-10* 及び *PSA-13* は線虫において非対称分裂を制御する, 第 26 回日本分子生物学会年会, H15 年 12 月(神戸)
191. 堀一也、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST): ショウジョウバエ *Deltex* は、Notch 受容体の膜動輸送と安定性を制御し、Su(H)非依存的に Notch 情報伝達系を活性化する。 , 第 26 回日本分子生物学会年会, H15 年 12 月(神戸)
192. Masanori Sakaguchi, Satoru Ishibashi, Toshihiko Kuroiwa, Shiwa Mieko, Rumi Wakatabe, Yu Fukase, Toshihiko Kadoya, Mitsujiro Osawa, Shin Kaneko, Takuya Shimazaki, Kazunobu Sawamoto, Okano HiroatakaJames, Toshio Kitamura, Hidenori Horie, Hidehiro Mizusawa, Hiromitsu Nakauchi, Hideyuki Okano: O3K-8 Galectin-1 is a key regulator of Neural Stem Cell proliferation, 第 26 回日本分子生物学会年会, H15 年 12 月(神戸)

193. 植村修、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):比較ゲノム情報学を用いた Islet-1 遺伝子の神経細胞サブタイプ特異的発現機構の解明, 第 26 回日本分子生物学会年会, H15 年 12 月(神戸)
194. 鳥谷真佐子、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):シヨウジヨウバエ幼虫神経幹細胞の分化における Notch シグナリング抑制の重要性, 第 26 回日本分子生物学会年会, H15 年 12 月(神戸)
195. 高橋美和、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):脊椎動物タイプのシヨウジヨウバエ成虫型ニューロプラストの増殖・分化に関わる新しい因子の検索, 第 26 回日本分子生物学会年会, H15 年 12 月(神戸)
196. Yoko Ozawa, Keiko Nakao, Takuya Shimazaki, Junji Takeda, Shizuo Akira, Katsuhiko Ishihara, Toshio Hirano, Hideyuki Okano:Downregulation of STAT3 activation contributes to triggering the differentiation of presumptive rod photoreceptor cells., 第 26 回日本分子生物学会年会, H15 年 12 月(神戸)
197. 多田敬典、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):神経系特異的新規ユビキチンリガーゼの機能解析, 第 26 回日本分子生物学会年会, H15 年 12 月(神戸)
198. 佐々木伸雄、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):Notch 情報伝達系を制御する新規 DExH-box 型 RNA ヘリカーゼ naruto の機能解析, 第 26 回日本分子生物学会年会, H15 年 12 月(神戸)
199. Hiroataka James Okano, Hiroyuki Ohba, Tatsuyuki Chiyoda, Eimy Endo, Masato Yano, Yosika Hayakawa, Hideyuki Okano:Analysis of Sox21, SoxB1 family transcriptional factor, in developing CNS.,第 26 回日本分子生物学会年会, H15 年 12 月(神戸)
200. 矢野真人、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):神経特異的 RNA 結合蛋白質 Hu の生化学的解析, 第 26 回日本分子生物学会年会, H15 年 12 月(神戸)
201. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):神経再生医療の未来, 第 3 回重粒子医科学センターシンポジウム(独立行政法人放射線医学総合研究所), H15 年 12 月(千葉)
202. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):中枢神経系の再生医学, 細胞治療セミナー・特別講演(自治医科大学), H16 年 1 月(栃木県南河内郡)
203. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):中枢神経系の幹細胞生物学と再生医学, 21 世紀 COE 先端研究セミナー, H16 年 1 月(伊勢原)
204. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):幹細胞生物学と中枢神経系の再生医学, 慶應義塾大学総合研究推進機構シンポジウム, H16 年 1 月(東京)

205. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):中枢神経の再生の現状と展望,第33回日本神経放射線学会・特別講演,H16年2月(大阪)
206. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):再生医療の課題と展望,特別講演会「21世紀の医療革命・再生医療についてー脊髄損傷治療を中心としてー」,H16年2月(東京)
207. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):神経幹細胞による再生医療,東京女子医科大学 21世紀COEプログラム講演会,H16年2月(東京)
208. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):中枢神経系の幹細胞生物学と再生医学,第3回日本再生医療学会総会・教育講演,H16年3月(千葉)
209. 金子慎二郎、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):損傷部脊髄内 Semaphorin3A 阻害剤による損傷軸索の再生,第3回日本再生医療学会総会シンポジウム,H16年3月(千葉)
210. 松崎有未、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):DNA Dye による造血幹細胞純化と間葉系細胞分化系譜の検討,第3回日本再生医療学会総会シンポジウム,H16年3月(千葉)
211. 島崎琢也、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):ES細胞を利用した神経再生の可能性,第3回日本再生医療学会総会シンポジウム,H16年3月(千葉)
212. 金村米博、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):ヒト神経幹細胞の国内供給体制の確立に向けて,第3回日本再生医療学会総会シンポジウム,H16年3月(千葉)
213. 小嶋篤浩、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):成体哺乳類における脊髄上衣細胞の免疫組織学的検討,第3回日本再生医療学会総会 H16年3月(千葉)
214. 矢口雅江、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):中枢神経損傷後のIL-12を用いた再生医療の試み,第3回日本再生医療学会総会 H16年3月(千葉)
215. 並木淳、岡野栄之(慶大/医/救急・生理、JST、CREST):骨髄由来の神経幹細胞選択的 nestin 遺伝子発現細胞,第3回日本再生医療学会総会,H16年3月(千葉)
216. 並木淳、岡野栄之(慶大/医/救急・生理、JST、CREST):神経幹細胞の分化に及ぼす外傷性脳損傷後の炎症性サイトカインの影響.第27回日本神経外傷学会 H16年3月(東京)
217. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):幹細胞の自己複製と細胞の癌化 -Cancer Stem Cell , Tokyo Cancer Forum 2004 , H16年3月(東京)
218. Hideyuki Okano(慶大/医/生理、JST、CREST):Self-renewal of neural stem cells and CNS-repair, 第

68 回日本循環器学会学術集会, H16 年 3 月(東京)

219. 岡野栄之(慶大 / 医 / 生理, JST. CREST): 幹細胞の性質と分化誘導法, 第 3 回日本再生医療学会総会・教育講演, H16 年 3 月(千葉)

220. 岡田洋平、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理, JST. CREST): ALS モデル動物と ES 細胞の運動神経分化、第一回コモンマーモセット研究会、H16 年 3 月(東京)

#### 国際学会

221. Hideyuki Okano : Self-renewal of neural stem cells and CNS repair, PRE-MEETING WORKSHOP: NEURAL STEM CELL BIOLOGY AND POTENTIAL THERAPEUTIC APPLICATION “AMERICAN SOCIETY FOR NEUROCHEMISTRY”, 2003 年 5 月(California, USA)

222. Hideyuki Okano: Attempts toward the stem cell therapy for spinal cord injuries, the 6<sup>th</sup> IBRO World Congress of Neuroscience, 2003 年 7 月(Prague, Czech Republic)

223. Hideyuki Okano: Stem cells for neurodegenerative diseases, <Stem cells: From Genetics to Cell Therapy> An International Symposium sponsored by the Tore Nilsson and Marcus Wallenberg foundation, 2003 年 9 月(Lund, Sweden)

224. Yuki Hirota, Kazunobu Sawamoto, Ryu Ueda, Hideyuki Okano : tincar encodes a Drosophila novel transmembrane protein required for the morphogenesis of eye and the function of dorsal vessel, New Horizons in Molecular Sciences and Systems: An Integrated Approach, 2003 年 10 月(名護)

225. Yuki Hirota, Masako Toriya, Keiko Nakao, Hideyuki Okano: Identification of the gene involved in the differentiation of the postembryonic neuroblast., 18th European Drosophila Research Conference, 2003 年 10 月(Goettingen, Germany)

226. Masako Toriya, Keiko Nakao and Hideyuki Okano: REGULATION OF NOTCH SIGNALING DURING PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF POSTEMBRYONIC NEUROBLASTS. 2003 Cold Spring Harbor Meeting on Neurology of Drosophila 2003 年 10 月(Cold Spring Harbor laboratory, USA)

227. Akio Iwanami, Shinjiro Kaneko, Masaya Nakamura, Sachiyo Miyao, Yoshiaki Toyama, Hideyuki Okano : Axonal regeneration by administration of semaphorin3A inhibitor in the injured spinal cord., 33th Annual meeting of Neuroscience, 2003 年 11 月(New Orleans, USA)

228. Seiji Okada, Masaya Nakamura, Yuji mikami, Yoshiyuki Ohsugi, Kazuyuki Yoshiaki, Toyama, Hideyuki Okano: Blockage of interleukine-6 receptor ameliorates functional recovery in spinal cord injury. The 33<sup>rd</sup> Annual Meetig of Society for Neuroscience 2003 年 11 月(New Orleans, USA)

229. Shinjiro Kaneko, Akio Iwanami, Masaya Nakamura, Akiyoshi Kishino, Hiroataka James Okano, Takeshi Ikegami, Miyao Sachiyo, Kaoru Kikuchi, Osamu Konishi, Chikao Nakayama, Kazuo Kumagai, Toru Kimura, Yoshinobu Sugiyama, Yoshio Goshima, Yoshiaki Toyama, Hideyuki Okano: Axonal Regeneration by Administration of Semaphorin3A inhibitor in the Injured Spinal Cord, The 21<sup>st</sup> Annual National Neurotrauma Society Symposium, 2003 年 11 月 (Biloxi, USA)
230. Takehiko Sunabori, Yumi Matsuzaki, Takeharu Nagai, Takaki Miyata, Akinori Tokunaga, Atsushi Miyawaki, Hideyuki Okano: Analysis of Nestin-d4-Venus transgenic mice, International Symposium of 21st Century COE Program, 2003 年 11 月 (横浜)
231. Hideyuki Okano: Regenerating the injured spinal cord, 5<sup>th</sup> IISong International Symposium, 2003 年 12 月 (Seoul, Korea)
232. Masaya Nakamura, Hideyuki Okano, Yuto Ogawa, Bregman, B.S., Yoshiaki Toyama: Transplantation of neural stem cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury in neonate rats, The 31th Annual Meeting of the Cervical Spine Research Society. Oral presentation, 2003 年 12 月 (Scottsdale, USA)
233. Akinori Tokunaga, Keiko Nakao, Hideyuki Okano: Expression patterns of Notch signaling in neural development, Keystone Symposia, 2004 年 1 月 (Colorado, U.S.A.)
234. Takehiko Sunabori, Yumi Matsuzaki, Takeharu Nagai, Takaki Miyata, Akinori Tokunaga, Atsushi Miyawaki, Hideyuki Okano: Visualizing Neural Stem Cells analysis of Nestin-d4-Venus transgenic mice, Keystone Symposia, 2004 年 1 月 (Colorado, U.S.A.)
235. Yohei Okada, Takuya Shimazaki, Gen Sobue, Hideyuki Okano: Generation of motor neuron progenitors from mouse embryonic stem cells, Keystone Symposia, 2004 年 1 月 (Colorado, U.S.A.)
236. Hideyuki Okano, Akio Iwanami, Shinjiro Kaneko, Masaya Nakamura, Yonehiro Kanemura, Hideki Mori, Satoshi Kobayashi, Mami Yamasaki, Suketaka Momoshima, Hajime Ishii, Kiyoshi Ando, Yoshikuni Tanioka, Norikazu Tamaoki, Tatsuji Nomura, Yoshiaki Toyama: Transplantation of Human Neural Stem/Progenitor Cells Promotes Functional Recovery after Spinal Cord Injury in Primates, the inaugural Clinical Trials Workshop – International Campaign for Cures of spinal cord injury Paralysis (ICCP), 2004 年 2 月 (Vancouver, Canada)
237. Masako Toriya, Keiko Nakao and Hideyuki Okano: REGULATION OF NOTCH SIGNALING DURING PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF POSTEMBRYONIC NEUROBLASTS. 45th Annual Drosophila Research Conference 2004 年 3 月 (Washington, DC, USA)

238. Keiko Nakao, Masako Toriya, Hideyuki Okano: Downregulation of NOTCH is required for the transition of postembryonic neuroblasts from proliferation to differentiation. ,45<sup>th</sup> Annual Drosophila Research Conference, 2004年3月 (Washington DC USA)

16 年度

国内学会

239. 岡野栄之(慶大/医/生理, JST. CREST): 骨髄由来の幹細胞臨床試験の医学的評価、研究対象者保護法制を考える会「再生医療の医学的評価: 骨髄と胎児由来の幹細胞臨床研究を例に」シンポジウム(科学技術文明研究所、くすりネット・くすり勉強会共催)、(東京)H16.4.3

240. 岡野栄之(慶大/医/生理, JST. CREST): 組織幹細胞の再生医療への応用—幹細胞の分離と自己複製—、第 92 回日本泌尿器科学総会、(大阪)H16.4.11

241. 岡野栄之(慶大/医/生理, JST. CREST): 中枢神経系の再生医学、第 108 回日本眼科学会総会シンポジウム、(東京)H16.4.16

242. 岡野栄之(慶大/医/生理, JST. CREST): 再生医学とリハビリテーション、日韓合同カンファランス 2004 プレカンファランスシンポジウム(日本リハビリテーション医学専門医会特別シンポジウム)・特別講演、(京都)H16.4.23

243. 岡野栄之(慶大/医/生理, JST. CREST): 幹細胞システムを用いた中枢神経系の再生医学、日本医科大学老人病研究所創立 50 周年記念シンポジウム、(東京)H16.5.8

244. 岡野栄之(慶大/医/生理, JST. CREST): 中枢神経系の再生医学、第 24 回日本脳神経外科コングレス総会(徳島)H16.5.14

245. Okano H. : Stem Cell Therapy of Injured CNS、 HFSP Fourth Annual Awardees Meeting(箱根)H16.5.18

246. 岡野栄之(慶大/医/生理, JST. CREST): 幹細胞と再生医学、第 9 回北海道粘膜病セミナー、(札幌) 2004.5.19

247. 岡野栄之(慶大/医/生理, JST. CREST): 幹細胞生物学が目指す脳の再生、国際バイオ EXPO 専門技術セミナー、H16 年 5 月 20 日(東京ビッグサイト・東京)

248. 岡野栄之(慶大/医/生理, JST. CREST): 幹細胞と再生医学、第 11 回皮膚創傷治癒フォーラム、(大阪)H16.6.26

249. 岡田誠司、岡野栄之(慶大/医/生理, JST. CREST): 脊髄損傷の幹細胞治療、第 81 回日本生理学会大会シンポジウム、(札幌)H16.6.2

250. 澤本和延、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST)、Arturo Alvarez-Buylla:成体脳室内の脳脊髄液流による新生ニューロンの移動制御、日本発生生物学会第 37 回大会ワークショップ、(名古屋)H16.6.5
251. 岡田洋平、島崎琢也、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):マウス ES 細胞から運動ニューロンへの分化誘導:ES 細胞由来神経系前駆細胞の特性の解析、日本発生生物学会第 37 回大会、(名古屋)H16.6.4
252. 岡田洋平、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):マウス ES 細胞から運動ニューロンへの分化誘導:ES 細胞由来神経系前駆細胞の特性の解析、第 45 回日本神経学会総会(東京)H16.5
253. 早川佳芳、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):Gab1 を介した EGF シグナルによる Olig2 陽性神経系前駆細胞の選択的な増殖、日本発生生物学会第 37 回大会(名古屋)H16.6.5
254. 神山淳、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):中枢神経における Notch シグナルの役割の解析、日本発生生物学会第 37 回大会(名古屋)H16.6.5
255. 廣田ゆき、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):Transmembrane protein Tincar is expressed during and involved in the development of Drosophila photoreceptor cells、日本発生生物学会第 37 回大会(名古屋)H16.6.5
256. 村山綾子、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):マウス胎児期の脳皮質形成における ephrinB1 の役割、日本発生生物学会第 37 回大会(名古屋)H16.6.5
257. 高橋美和、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):脊椎動物タイプのショウジョウバエ成虫型ニューロプラストの増殖・分化に関わる新しい因子の検索、日本発生生物学会第 37 回大会、(名古屋)H16.6.5
258. 鳥谷真佐子、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):ショウジョウバエ postembryonic ニューロプラストの増殖・分化における Notch シグナリングの調節、日本発生生物学会第 37 回大会、(名古屋)H16.6.8
259. 堀一也、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):ショウジョウバエ Deltex は、Notch 受容体の膜動輸送と安定性を制御し、Su(H)非依存的に Notch 情報伝達系を活性化する、日本発生生物学会第 37 回大会、(名古屋)H16.6.6
260. 升田博隆、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):ヒト子宮内膜幹細胞の同定と分離、第 77 回日本内分泌学会学術総会、(京都)H16.6.25
261. 岡野栄之:中枢神経系の再生、第 7 回日本組織工学会シンポジウム、(東京)H16.7.1
262. 藤田裕子、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):ヒト胎児由来神経幹細胞の特性と臨床応用へ向

- けた取り組み、第 25 回日本炎症・再生医学会ワークショップ(東京)H16.7.13
263. 岡田誠司、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST) : Bioluminescence Imaging System を用いた移植神経幹細胞の in vivo imaging、第 25 回日本炎症・再生医学会、(東京)H16.7.14
264. 吉田悟、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST) : マウス角膜からの未分化細胞の分離・培養とその分化誘導に関する検討、第 25 回日本炎症・再生医学会、(東京)H16.7.14
265. 小沢洋子、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST) : 視細胞の分化調節機構—活性化 STAT3 による負の制御—、第 25 回日本炎症・再生医学会(東京)H16.7.14
266. 岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST) : 幹細胞と中枢神経系の再生医学、第 7 回日本病院脳神経外科学会、(八王子)H16.7.17
267. 岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST) : 中枢神経系と再生医学、第 19 回日本歯科心身医学会総会・学術大会(東京)H16.7.18
268. 岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST) : 神経幹細胞と中枢神経系の再生医学、バイオベンチャー・研究開発拠点整備事業公開セミナー(東京)H16.7.24
269. 岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST) : 脊髄再生、第 34 回新潟神経学夏期セミナー、(新潟)16.7.30.
270. 岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST) : 内因性神経幹細胞活性化因子、第 34 回新潟神経学夏期セミナー(新潟)16.7.30.
271. 岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST) : 抹消神経関連の再生、第 10 回糖尿病性神経障害を考える会、(東京)H16.8.20
272. 岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST) : 再生医療と神経変性疾患の治療戦略、厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業神経変性疾患に関する調査研究班平成 16 年度ワークショップ・特別講演、(東京)H16.8.27
273. 岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST) : 脊髄を中心とした神経系の再生医学、第 15 回日本末梢神経学会学術集会シンポジウム、(つくば)H16.8.28
274. 飯島崇利、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST) : IP3 receptor type1 mRNA の 3 末端非翻訳領域に結合し、その樹状突起への局在化及び小脳運動学習に関わる RNA 結合タンパク質 Hzf、第 27 回日本神経科学大会 / 第 47 回日本神経化学会大会・合同大会 Neuro2004 シンポジウム、(大阪)H16.9.21

275. 澤本和延、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST、CREST) : 成体マウス脳室下層におけるニューロブラストの移動方向の制御機構、第27回日本神経科学大会 / 第47回日本神経化学会大会・合同大会 Neuro2004 シンポジウム、(大阪)H16.9.22
276. 多田敬典、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST、CREST) : 神経特異的新規ユビキチンリガーゼの機能的解析、第27回日本神経科学大会 / 第47回日本神経化学会大会・合同大会 Neuro2004、(大阪)H16.9.22
277. 石井賢、岡野栄之(慶大 / 医 / 整形・生理、JST、CREST) : 脳虚血モデルにおける移植神経幹細胞の in vivo bioluminescence imaging、第27回日本神経科学大会 / 第47回日本神経化学会大会・合同大会 Neuro2004、(大阪)H16.9.22
278. 岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST、CREST) : 損傷脊髄の幹細胞治療、第27回日本神経科学大会 / 第47回日本神経化学会大会・合同大会 Neuro2004 シンポジウム、(大阪)H16.9.23
279. 芝田晋介、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST、CREST) : 哺乳類の神経発生における RNA 結合蛋白質 Musashi の機能解析、第27回日本神経科学大会 / 第47回日本神経化学会大会・合同大会 Neuro2004、(大阪)H16年9.23
280. 早川佳芳、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST、CREST) : Gab1 を介した EGF シグナルによる Olig2 陽性神経系前駆細胞の選択的な増殖、第27回日本神経科学大会 / 第47回日本神経化学会大会・合同大会 Neuro2004、(大阪)H16.9.22
281. 齋野—齋藤幸子、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST、CREST) : マウス大脳皮質および線条体のチロシン水酸化酵素 mRNA 発現細胞、第27回日本神経科学大会 / 第47回日本神経化学会大会・合同大会 Neuro2004、(大阪)H16.9.22
282. 矢野真人、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST、CREST) : 神経特異的 RNA 結合蛋白質 Hu の生化学的解析、第27回日本神経科学大会 / 第47回日本神経化学会大会・合同大会 Neuro2004、(大阪)H16.9.22
283. 山下徹、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST、CREST) : 脳虚血急性期に発現する IL-6 の神経細胞保護効果、第27回日本神経科学大会 / 第47回日本神経化学会大会・合同大会 Neuro2004、(大阪)H16.9.22
284. 池上健、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST、CREST) : ラット脊髄損傷モデルにおける Chondroitinase ABC の効果的な投与方法の検討、第27回日本神経科学大会 / 第47回日本神経化学会大会・合同大会 Neuro2004、(大阪)H16.9.22
285. 岡田洋平、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST、CREST) : マウス ES 細胞から運動ニューロンへの分化誘導、第27回日本神経科学大会 / 第47回日本神経化学会大会・合同大会 Neuro2004、(大阪)H16.9.23
286. Hideyuki Okano: Self-renewal of neural stem cells and CNS-repair, 自治医科大学 21 世紀 COE プログラム

ム国際シンポジウム、(栃木)H16.9.24

287. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):中枢神経系の幹細胞生物学と再生医学,第63回社団法人日本脳神経外科学会総会(名古屋)H16.10.8
288. 岡田誠司、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST); Transplantation of neuronal cells activated from embryonic stem cells in experimental spinal cord injury. 日本整形外科基礎学術集会(東京)H16.10.21
289. 岡野栄之:中枢神経系の再生医学,第28回星薬科大学大学院研究科助手会・大学院自治会合同セミナー(東京)H16.10.23
290. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):神経系RNA結合タンパク質 Musashi ファミリー機能解析,第1回インビトロジェン・シンポジウム「バイオサイエンスの最先端」(湘南)H16.10.30
291. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):成人脳における神経幹細胞の同定と中枢神経系の再生医学,第57回日本医師会設立記念医学大会(東京)H16.11.1.
292. Hideyuki Okano(慶大/医/生理、JST、CREST): Self-renewal of neural stem cells and CNS-repair,生理研カンファレンス・未来開拓国際シンポジウム “Adult neurogenesis in normal and pathological conditions”(岡崎)H16.11.12
293. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):中枢神経系と再生医学,第1回上智大学生命科学シンポジウム,(東京)H16.11.13
294. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):Self-renewal of neural stem cells and CNS-repair(神経幹細胞の自己複製と中枢神経系の修復),第17回内藤コンファレンス(湘南)H16.11.18
295. 徳永暁憲 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):CHARACTERIZING THE EFFECTS OF NOTCH SIGNALING DURING NEUROGENESIS AND GLIOGENESIS IN THE DEVELOPING MOUSE BRAIN 第17回内藤コンファレンス『幹細胞の維持と分化の分子基盤(1)』,(湘南)H16.11.18
296. Hideyuki Okano(慶大/医/生理、JST、CREST): Self-renewal of neural stem cells and CNS-repair, International Society for Heart Research (ISHR) The21st Annual Meeting of the Japanese Section(甲府)H16.11.24
297. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):中枢神経系の再生医学,第43回しもつけ整形懇話会,H16年11月24日(ホテル東日本宇都宮・宇都宮)
298. 岡野栄之、岡野ジェイムス洋尚(慶大/医/生理、JST、CREST):MUSASHI: a translational regulator of cell fate,第27回日本分子生物学会年会シンポジウム,H16年12月8日(神戸ポートアイランド・神戸)

299. 河原裕憲、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):神経系 RNA 結合タンパク質 Musashi1 の生化学的機能解析、第 27 回日本分子生物学会年会, (神戸)H16.12.8
300. 大石久美子、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST)澤斉:新規微少管結合タンパク質 RMD ファミリーの同定および解析、第 27 回日本分子生物学会年会, (神戸)H16.12.8
301. 荒田幸信、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST)澤斉:線虫の非対称分裂における娘細胞の特異性は、Wnt による細胞極性と Hox による位置 identity の統合により決定する。第 27 回日本分子生物学会年会, (神戸)H16.12.9
302. 渡邊忠由、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST)高橋淑子:体節中肺葉の分節境界形成における cMeso-1、EphA4 と Notch シグナルの関わり、第 27 回日本分子生物学会年会, (神戸)H16.12.9
303. 松崎有未、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):マウス骨髄造血系幹細胞と間葉系幹細胞の関連、第 27 回日本分子生物学会年会, (神戸)H16.12.9
304. 富岡武泰、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST)三浦正幸:TRAF タンパク質のキノコ体形態形成への関与、第 27 回日本分子生物学会年会, (神戸)H16.12.9
305. 神山淳、岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):中枢神経系における Notch シグナルの役割ー Notch シグナルの可視化の試みー、第 27 回日本分子生物学会年会ワークショップ(神戸)H16.12.11
306. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):神経幹細胞と中枢神経系の再生, 第 5 回阪大医療組織工学フォーラム(大阪)H16.12.15
307. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):幹細胞を用いた再生医療の現状と展望, 慶應関連薬剤部長会開催第 24 回学術講演会(東京)H17.1.8
308. Hideyuki Okano, Hiroataka James Okano(慶大/医/生理、JST. CREST):Musashi: a translational regulator of cell fate, 平成 17 年度 JBS バイオシンポジウム & 第 4 回転写研究会(草津)H17.1.11
309. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):『再生医療の未来』ー神経細胞をよみがえらせるー, 青葉区医師会学術講演会(横浜)H1.2.24.
310. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):中枢神経系の再生医学, 第 4 回神戸薬科大学ハイテク・リサーチ・シンポジウム特別講演(神戸)H17.2.26
311. 松崎有未・岡野栄之(慶大/医/生理、JST. CREST):造血幹細胞純化と間葉系細胞分化系譜の検討, 第 4 回日本再生医療学会総会シンポジウム(大阪)H17.3.1

312. 小澤洋子、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST) : 視細胞の分化調節機構—遺伝子導入を用いた、活性化 STAT3 による負の制御の解析—、第4回日本再生医療学会総会(大阪)H17.3.1
313. 升田博隆、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST) 吉村泰典: ヒト子宮内膜 side population 細胞の幹細胞特性解析, 第4回日本再生医療学会総会(大阪)H17.3.1
314. 岡田誠司、岡野栄之(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST) : 細胞移植療法研究における Bioluminescence Imaging System の有用性, 第4回日本再生医療学会総会(大阪)H17. 3.2

#### 国際学会

315. Hideyuki Okano(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST) : Self-renewal of Neural Stem Cells and CNS-Repair, Mammary Stem Cell Workshop, 2004.5.6 (London,U.K.)
316. Masanori Sakaguchi, Tetsuro Shingo, Satoru Ishibashi, Jyunichi Yamane, Toshihiko Kuroiwa, Takuya Shimazaki, Kazunobu Sawamoto, Hirotaka James Okano, Mieko Shiwa, Toshihiko Kadoya, Françoise Poirier, Masaya Nakamura, Hidehiro Mizusawa, Hiromitsu Nakauchi, and Hideyuki Okano: Function of galectin-1 in self-renewal of neural stem cells and CNS regeneration. 国際レクチン学会 (Kanagawa,)2004.5.23
317. M Sakaguchi, S Ishibashi, T Shingo, T Kuroiwa, T Shimazaki, K Sawamoto, HJ Okano, M Shiwa, T Kadoya, A Shibuya, H Nakauchi, H Mizusawa, F Poirier, H Okano(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST) : Galectin-1 regulates neural stem cell self-renewal, The 21st International Lectin Meeting, (Kanagawa Japan) 2004.5.26
318. Hideyuki Okano(慶大 / 医 / 生理、JST. CREST): Stem cells and Regeneration of Central Nervous System, Come with KI to Asia at Nobel Forum, Karolinska Institute, (Stockholm, Sweden) 2004.6.2
319. Hideyuki Okano : Self-renewal of Neural Stem Cells and CNS-Repair, the 15<sup>th</sup> international symposium on Molecular Biology of Hematopoiesis, (Tokyo,Japan) 2004.8.7
320. Hideyuki Okano : Self-renewal of Neural Stem Cells and CNS-Repair, 16<sup>th</sup> International Congress of the IFAA \*Symposium, Kyoto,Japan)2004.8.24
321. Sawamoto Kazunobu : Directional Migration of Neuroblasts in The adult subventricular Zone, 16<sup>th</sup> International Congress of the IFAA \*Symposium, (Kyoto Japan)2004.8.24
322. Masato YANO, Hirotaka James OKANO, Hideyuki OKANO: Two RNA binding proteins, Hu and hnRNPk involved in neuronal differentiation through *p21* mRNA posttranscriptional regulation,

- “TRANSLATIONAL CONTROL” cold spring harbor laboratory meeting (cold spring harbor,USA)  
2004.9.7-12
323. Seiji Okada, Masaya Nakamura, Yoshiyuki Ohsugi, Kazuyuki Yoshizaki, Yoshiaki Toyama, Hideyuki Okano: Blockage of interleukine-6 receptor ameliorates functional recovery in spinal cord injury. 43<sup>rd</sup> international spinal cord society annual scientific meeting (Athenes Grees)2004.9.27
324. Hideyuki Okano : Self-renewal of Neural Stem Cells and CNS-Repair,3<sup>rd</sup> Weimar Conference on Genetics \*invited speaker, (Weimar, Germany)2004.9.30
325. Hideyuki Okano : Self-renewal of Neural Stem Cells and CNS-Repair,Workshop –HEMA OSYGENASE AND OSIDATIVE STRESS-\*special invited lecture, (Catania, Italy)2004.10.3
326. Hirobumi Tada , Hirotaka J. Okano, Masaki Matsumoto, Keiichi I. Nakayama, Haruo Kashima, Hideyuki Okano : Analysis of Novel Ubiquitin Ligase, Potential Target Antigen of Paraneoplastic Neurologic Disorder, NEUROSCIENCE 2004 (The Society for Neuroscience’s 34<sup>th</sup> Annual Meeting), (San Diego, USA)2004.10.25
327. Yohei Okada, Takuya Shimazaki, Arifumi Matsumoto, Gen Sobue, Hideyuki Okano : Generation of motor neurons from mouse embryonic stem cells: analysis of ES cell-derived neural cells, NEUROSCIENCE 2004 (The Society for Neuroscience’s 34<sup>th</sup> Annual Meeting), (San Diego, USA)2004.10.25
328. Toru Yamashita, Kazunobu Sawamoto, Shigeaki Suzuki, Kazuhide Adachi, Masahiko Mihara, Yoshimasa Osugi, Koji Abe, Hideyuki Okano : NEUROPROTECTIVE EFFECT OF ENDOGENOUS IL-6 AFTER TRANSIENT MIDDLE CEREBRAL ARTERY OCCLUSION, NEUROSCIENCE 2004 (The Society for Neuroscience’s 34<sup>th</sup> Annual Meeting), (San Diego, USA)2004.10.25
329. Masanori Sakaguchi, Tetsuro Shingo, Satoru Ishibashi, Jyunichi Yamane, Toshihiko Kuroiwa, Takuya Shimazaki, Kazunobu Sawamoto, Hirotaka James Okano, Mieko Shiwa, Toshihiko Kadoya, <sup>4</sup> Françoise Poirier, Masaya Nakamura, Hidehiro Mizusawa, Hiromitsu Nakauchi, Hideyuki Okano : Function of galectin-1 in self-renewal of neural stem cells and CNS regeneration, NEUROSCIENCE 2004 (The Society for Neuroscience’s 34<sup>th</sup> Annual Meeting), (San Diego, USA) 2004.10.26
330. Akinori Tokunaga, Hideyuki Okano: CHARACTERIZING THE EFFECTS OF NOTCH SIGNALING DURING NEUROGENESIS AND GLIOGENESIS IN THE DEVELOPING MOUSE BRAIN, NEUROPROTECTIVE EFFECT OF ENDOGENOUS IL-6 AFTER TRANSIENT MIDDLE CEREBRAL ARTERY OCCLUSION, NEUROSCIENCE 2004 (The Society for Neuroscience’s 34<sup>th</sup> Annual Meeting), (San Diego, USA)2004.10.27
331. Seiji Okada, Ken Ishii, Junichi Yamane, Masaya Nakamura, Hirotaka James Okano, Yoshiaki Toyama,

- Hideyuki Okano : Bioluminescent imaging of transplanted neural progenitor cells in vivo, NEUROSCIENCE 2004 (The Society for Neuroscience's 34<sup>th</sup> Annual Meeting), (San Diego, USA)2004.10.23
332. Shinsuke Shibata, Shin-ichi Sakakibara, Takao Imai, Hirotsugu Okano, Hideyuki Okano : Roles of RNA-binding protein Musashi family in mammalian CNS development, NEUROSCIENCE 2004 (The Society for Neuroscience's 34<sup>th</sup> Annual Meeting), 2004.10.23
333. Takehiko Sunabori, Takeharu Nagai, Akinori Tokunaga, Hidenori Tabata, Takaki Miyata, Kazunori Nakajima, Atsushi Miyawaki, Yumi Matsuzaki, Hideyuki Okano : Visualizing Neural Progenitor Cells with a Destabilized Fluorescent Reporter Nestin-d4-Venus, NEUROSCIENCE 2004 (The Society for Neuroscience's 34<sup>th</sup> Annual Meeting), (San Diego, USA)2004.10.23
334. Seiji Okada, K. Ishii, Junichi Yamane, Masaya Nakamura, Hirotsugu J. Okano, Yoshiki Toyama, Hideyuki Okano : Bioluminescent imaging of transplanted neural progenitor cells in vivo for spinal cord injury, NEUROSCIENCE 2004 (The Society for Neuroscience's 34<sup>th</sup> Annual Meeting), 2004.10.23\*session (San Diego, USA)10/23-27
335. Murayama<sup>12\*</sup>, T. Shimazaki<sup>23</sup>, A. Kawaguchi<sup>4</sup>, T. Miyata<sup>1</sup>, H. Okano<sup>23</sup> The function of ephrin-B1 in radial glial cells 4th Asia Pacific Symposium on Neural Regeneration (大阪) 2004.12.7
336. Hideyuki Okano : Self-renewal of Neural Stem Cells and CNS-Repair, ISN Frontiers in Nephrology "Stem Cell and Regeneration of the Kidney"\*Opening Lecture, (Karuizawa, Nagano)2005.1.20

17 年度

国内学会

337. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):中枢神経系の再生医学、第93回日本泌尿器科学会総会・教育講演、(東京)H17.4.14
338. 岡田洋平、岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):ES細胞由来神経系前駆細胞の時間的・空間的特異性制御、第3回幹細胞シンポジウム(淡路)H17.4.21
339. 坂口昌徳、岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):成体の神経幹細胞における Galectin-1 の機能、第3回幹細胞シンポジウム、(淡路)H17.4.21
340. 升田博隆、岡野栄之、松崎有未(慶大/医/生理、JST, CREST):ヒト子宮内膜SP細胞の幹細胞特性解析、第3回幹細胞シンポジウム(淡路)H17.4.22
341. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):再生医学と幹細胞生物学、第104回日本皮膚科学会総会・

- 研修講習会(横浜) H17.4.23
342. 岡野栄之(慶大/医/生理, JST, CREST):中枢神経系の再生医学、第 5 回 Cardiovascular Frontier Conferenece、(東京) H17.4.23
343. 岡野栄之(慶大/医/生理, JST, CREST):中枢神経系の再生医学、第 46 回日本神経学会総会シンポジウム、(鹿児島) H17.5.25
344. 岡野栄之(慶大/医/生理, JST, CREST):再生医療の課題と展望、第 19 回日本外傷学会特別講演、(横浜) H17.5.26
345. 佐藤有紀、岡野栄之(慶大/医/生理, JST, CREST)高橋淑子:体節から背側大動脈への分化と移動を制御する空間パターンニング、日本発生生物学会第 38 回大会(仙台) H17.6.2
346. 浅井理恵子・岡野栄之(慶大/医/生理, JST, CREST)八杉貞夫:ニワトリおよびマウス消化器官の発生における Musashi-1 の発現、日本発生生物学会第 38 回大会、(仙台) H17.6.2
347. 堀一也、岡野栄之(慶大/医/生理, JST, CREST)松野健治:ショウジョウバエ Deltex は、Notch 受容体の膜動輸送と安定性を制御し、Su(H)非依存的に Notch 情報伝達系を活性化する。、日本発生生物学会第 38 回大会、(仙台) H17.6.2
348. 廣田ゆき・岡野栄之、澤本和延(慶大/医/生理・ブリヂストン, JST, CREST):cdk5 は成体マウスの脳室下帯—嗅球でのニューロブラストの移動に関与する、日本発生生物学会第 38 回大会、(仙台) H17.6.2
349. 渡邊忠由、岡野栄之(慶大/医/生理, JST, CREST)高橋淑子:cMesol 及び Notch の下流における Eph-ephrin シグナルによる体節中肺葉分節化誘導、日本発生生物学会第 38 回大会、(仙台) H17.6.4
350. 岡野栄之:再生医学とりハビリテーション、第 42 回日本リハビリテーション医学会学術集会、(金沢) H17.6.16
351. 岡野栄之(慶大/医/生理, JST, CREST):幹細胞と再生医療、第 14 回慶應義塾大学理工学部市民講座、(横浜) H17.6.18
352. Orihara-Ono, M, Toriya, M, Takahashi, M.-1, Nakao, K, Okano, H CONVERSION OF POSTEMBRYONIC NEURAL STEM CELLS FROM SYMMETRIC TO ASYMMETRIC DIVISION IN THE OUTER PROLIFERATION CENTER (OPC) OF THE LARVAL BRAIN ショウジョウバエ研究会第 7 回研究集会 (淡路) H17.7.8
353. 岡野栄之(慶大/医/生理, JST, CREST):中枢神経系の再生医学、第 25 回昭和大学神経研究会、(東京) H17.7.16

354. 岡田洋平、岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):ES細胞を用いた運動ニューロン再生、第28回日本神経科学大会シンポジウム、(横浜)H17.7.26
355. 浜之上誠、岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST)高松研:グライコミクスによる神経幹細胞精製法、第28回日本神経科学大会シンポジウム、(横浜)H17.7.26
356. 松本有史、岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):ALSモデルラットに対するES細胞由来神経系前駆細胞移植、第28回日本神経科学大会シンポジウム、(横浜)H17.7.26
357. 岡田誠司、岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):脊髄損傷に対する移植神経幹細胞の *in vivo* imaging、第28回日本神経科学大会シンポジウム、(横浜)H17.7.27
358. 稲次基希、岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST)大野喜久郎:6-OHDA ラットに対する胎仔脳移植のPET評価、第28回日本神経科学大会シンポジウム、(横浜)H17.7.27
359. 岡野栄之、岡野ジェイムス洋尚(慶大/医/生理、JST, CREST):Galectin-1:成体脳における神経幹細胞のニッチ因子、第28回日本神経科学大会シンポジウム、(横浜)H17.7.27
360. 石井賢、岡野栄之(慶大/医/整形・生理、JST, CREST)・Ennio A Chiocca・Ralph Weissleder・佐伯嘉修:神経幹細胞のフィブリングループを用いた3次元培養、第28回日本神経科学大会シンポジウム、(横浜)H17.7.28
361. 金村米博、岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):ヒト神経幹細胞/前駆細胞の生物学的特性の検討、第28回日本神経科学大会シンポジウム、(横浜)H17.7.28
362. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):神経疾患に対する再生医学、平成17年度第1回COEセミナー「体性幹細胞を用いた再生医療の最前線」(京都)H17.8.5
363. 島崎琢也、岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):サイトカインシグナルによる神経幹細胞の増殖・分化制御「生物の発生・分化・再生」第4回公開シンポジウム(東京)10.4
364. 岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):幹細胞システムを用いた中枢神経系の再生医学、第4回公開シンポジウム(東京)10.4
365. 今井貴雄、岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):The mechanism of translational repression mediated neural RNA-binding protein Musashi、「生物の発生・分化・再生」第4回公開シンポジウム(東京)10.4
366. 岡田洋平、岡野栄之(慶大/医/生理、JST, CREST):ES細胞由来神経幹細胞の時間的・空間的特異

性制御「生物の発生・分化・再生」第4回公開シンポジウム(東京)10.4

367. 坂口昌徳、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):成体の神経前駆細胞に於ける Galectin-1 の機能、第4回公開シンポジウム(東京)10.4
368. 織原一小野美奈子、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST): Conversion of postembryonic neural stem cells from symmetric to asymmetric division in the outer proliferation center of larval brain 第4回公開シンポジウム(東京)10.4
369. 深見伸一、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):神経幹/前駆細胞の未分化維持に關与する転写因子群の解析、第4回公開シンポジウム(東京)10.4
370. Masato YANO, Hideyuki OKANO (慶大/医/生理、JST、CREST): A role of Neuronal RNA binding protein Hu in neuronal differentiation 第4回公開シンポジウム(東京)10.4
371. 山下徹、岡野栄之(慶大/医/生理、JST、CREST):脳虚血後成体マウス線条体に出現する神経前駆細胞の起源、第4回公開シンポジウム(東京)10.4

#### 国際学会

372. Hideyuki Okano : Inflammation and Regeneration of Injured Spinal Cord: Effects of the Stem Cell Transplantation and Blockade of IL-6 Signarlin, 7<sup>th</sup> World Congress on Inflammation, 2005.8.22 \*session 8/20-8/24 (Melbourne, Australia)
373. Hideyuki Okano :Neural stem cells: adult neurogenesis and CNS-repair, 2005 SEOUL SYMPOSIUM ON STEM CELL RESEARCH, 2005.8.25\*session8/25-8/26 (Seoul, Korea)
374. Orihara-Ono Minako Keiko Nakao,Hideyuki Okano:CONVERSION OF POSTEMBRYONIC NEURAL STEM CELLS FROM SYMMETRIC TO ASYMMETRIC DIVISION IN THE OUTER PROLIFERATION CENTER (OPC) OF THE LARVAL BRAIN. Cold Spring Harbor Laboratory Meetings\*session10/4-10/10

### (3)特許出願

国内出願 (9件)

- 1 ) 出願日 : 2001.3.30  
発明の名称 : 胚性幹細胞からの神経幹細胞、運動ニューロンおよび GABA 作動性ニューロンの製造法  
発明者 : 岡野栄之 島崎琢也  
出願人名 : 科学技術振興事業団  
出願番号 : 2001-099074,  
PCT 出願 : 申請済 PCT/JP01/08703  
特許取得 : 2005.3.25 特許第 3660601 号
  
- 2 ) 出願日 : 2001.5.23  
発明の名称 : 神経系腫瘍治療剤  
発明者 : 岡野栄之 赤松和土  
出願人名 : 科学技術振興事業団  
出願番号 : 2001-155237,  
PCT 出願 : 申請済 PCT/JP01/08701
  
- 3 ) 出願日 : 2001.5.31  
発明の名称 : Musashi1 による Numb 蛋白質発現抑制剤  
発明者 : 岡野栄之 今井貴雄 徳永暁憲 吉田哲 御子柴克彦 中福雅人  
出願人名 : 科学技術振興事業団  
出願番号 : 2001-164412,  
PCT 出願 : 申請済 PCT/JP01/10231  
特許取得 : 2004.6.18 特許第 3566941 号
  
- 4 ) 出願日 : 2001.11.26  
発明の名称 : 脊髄損傷サルモデルの作成方法およびその利用  
発明者 : 岡野栄之 戸山芳昭 中村雅也 野村達次 谷岡功邦 安藤潔 金村米博  
出願人名 : 科学技術振興事業団

出願番号： 2001-364563

- 5 ) 出願日： 2001.12.9  
発明の名称： ムサシ蛋白質 2 遺伝子欠損動物  
発明者： 岡野栄之 榊原伸一 吉田哲 徳永暁憲 澤井啓子  
出願人名： 科学技術振興事業団  
出願番号： 特願 2002-118714
- 6 ) 出願日： 2002.1.11  
発明の名称： 記憶障害治療剤  
発明者： 岡野栄之 島崎琢也 長尾省吾 松本義人  
出願人名： 科学技術振興事業団(現：独立行政法人科学技術振興機構)50%  
学校法人慶應義塾 50%  
出願番号： 特願 2002-002433
- 7 ) 出願日： 2003.1.14  
発明の名称： 記憶障害治療剤スクリーニング法  
発明者： 岡野栄之 島崎琢也 長尾省吾 松本義人  
出願人名： 科学技術振興事業団 50%  
学校法人慶應義塾 50%  
出願番号： 特願 2003-6298  
PCT 出願： 無し

他 2 件

海外出願 (1件)

出願日： 2000.12.12  
発明の名称： A method for isolating and purifying multipotential neural progenitor cells  
発明者： 岡野栄之 STEVEN GOLDMAN  
出願番号： 仮出願 09/747/810  
PCT 出願： 無し

#### (4)受賞等

##### 受賞

平成13年9月26日 塚原仲晃記念賞

「神経幹細胞を用いた神経発生と再生の研究」

(財)ブレインサイエンス振興財団(受賞者氏名: 岡野栄之)

平成16年4月15日 ゴールドメダル「東京テクノフォーラム 21」賞

「成人脳における神経幹細胞の同定と、それを用いた中枢神経系の再生に関する研究」

東京テクノフォーラム 21(受賞者氏名: 岡野栄之)

平成16年10月3日 Distinguished Scientists Award

「Self-renewal of neural stem cells and CNS-repair」University of Catania School of Pharmacy(受賞者氏名: 岡野栄之)

平成16年11月1日 日本医師会医学賞

成体脳における神経幹細胞の同定と中枢神経系の再生医学」

日本医師会(受賞者氏名: 岡野栄之)

##### 新聞報道

1. 2001年1月1日掲載、毎日新聞、「新・神への挑戦 第一部 生命を再生する」
2. 2001年5月7日掲載、日経バイオテク誌「慶大など ES 細胞からのドーパミン産生神経細胞の単離に成功、動物への移植試験中」
3. 2001年5月11日掲載、朝日新聞、「ムサシたんぱく質 神経づくりを誘導」
4. 2001年5月15日掲載、山陽新聞、「神経できる仕組み解明 「ムサシタンパク質」が作用」
5. 2001年5月16日掲載、秋田さきがけ「神経ができるメカニズム ハエの実験で解明」
6. 2001年5月16日掲載、岐阜新聞「神経形成の仕組み解明 慶大などがハエで実験」
7. 2001年5月23日掲載、日本経済新聞 「再生医療 東西の雄 しのぎ削る」
8. 2001年5月28日掲載、高知新聞「神経のもと タンパク質発見」
9. 2001年6月1日掲載、日本経済新聞、「神経細胞の基をふやす遺伝子 「ムサシ」の働き確認」

10. 2001年6月19日掲載、朝日新聞、「再生医療見えてきた」
11. 2001年9月24日掲載、日本経済新聞、「ヒトのES細胞 慶大が研究方針」
12. 2001年9月25日掲載、日本経済新聞、「ヒト万能細胞研究 解禁」
13. 2001年12月10日掲載、日本経済新聞、「脊髄損傷治療に道 神経幹細胞サルに移植」
14. 2001年12月10日掲載、読売新聞、「神経幹細胞、胎児から移植 脊髄損傷のサル機能回復成功」
15. 2001年12月10日掲載、中日新聞、「神経幹細胞で脊髄損傷回復 慶大グループ」
16. 2001年12月10日掲載、山陽新聞、「脊髄損傷 神経幹細胞移植で回復 慶大グループ世界初成功」
17. 2001年12月10日掲載、岐阜新聞、「脊髄損傷、回復に成功」
18. 2001年12月10日掲載、北國新聞、「神経幹細胞移植 運動まひ回復 脊髄損傷 治療に道」
19. 2001年12月11日掲載、デーリー東北「脊髄損傷、神経幹細胞で機能回復」
20. 2001年12月10日掲載、北日本新聞「神経幹細胞移植で脊髄損傷が回復 世界初慶大グループ成功」
21. 2001年12月10日掲載、信濃毎日新聞「脊髄損傷治療に光 ヒト神経幹細胞分離 猿に移植実験」
22. 2001年12月10日掲載、東京新聞「神経幹細胞で脊髄損傷回復」
23. 2001年12月10日掲載、京都新聞「神経幹細胞移植 脊髄損傷を回復」
24. 2001年12月11日掲載、日本経済新聞「神経幹細胞で脊髄損傷回復 世界初、慶大グループ成功」
25. 2001年12月11日掲載、産経新聞「人間の神経幹細胞サルへ移植 損傷脊髄の機能回復」
26. 2001年12月11日掲載、朝日新聞「サルのせき髄、機能回復」
27. 2002年1月28日掲載、日経バイオテク誌「慶応大、東京女子医大 ヒト成人由来神経幹細胞株の作成に着手」
28. 2002年2月4日掲載、毎日新聞「移植治療で注目の「幹細胞」
29. 2002年5月1日掲載、日本経済新聞「アルツハイマーで喪失の神経細胞 ES細胞から作成」
30. 2002年7月12日掲載、日本経済新聞「慶大、ES細胞から神経細胞作る研究計画を承認」
31. 42) 2002年12月18日掲載、朝日新聞「水頭症の病因、マウスで特定 慶大医学部グループ」
32. 2002年12月23日掲載、日本経済新聞「幹細胞を効率分離慶大、各組織から再生医療へ応用」

33. 2003年3月11日掲載、朝日新聞「大阪城公園の土の中 脊髄神経回復促す「真菌」」
34. 2003年3月17日掲載、日経バイオテク誌「慶大 RNA 結合蛋白質が幹細胞の正常増殖とガン化の区別に関与を解明」
35. 2003年6月16日掲載、日本経済新聞「日本の実力派たち 慶応義塾大学医学部教授 岡野栄之さん (44)」
36. 2003年12月11日掲載、朝日新聞(総合面)「神経再生たんぱく質」
37. 2003年12月22日掲載、日経バイオテク誌「慶応大学 ガレクチン1が神経幹細胞の自己複製因子であることを発見」
38. 2004年1月14日掲載、朝日新聞「幹細胞の「ゆりかご」解明進む」
39. 2004年1月15日発行、日経バイオビジネス誌「2004年の針路を決める、この9人:岡野 栄之・慶應義塾大学医学部生理学教授 医療を変えるなら基礎研究。中枢神経の再生に全力」
40. 2004年1月21日掲載、朝日新聞「造血幹細胞 骨髄から完全分離 慶大、白血病治療に道」
41. 2004年1月23日掲載、日本経済新聞「造血幹細胞 骨髄から完全分離」
42. 2004年3月17日掲載、読売新聞(総合面)「アルツハイマーで消失 脳の神経細胞をES細胞から作成」
43. 2004年4月20日掲載、読売新聞「傷んだ神経の再生に光り ゴールドメダル賞受賞」
44. 2004年8月24日掲載 日本経済新聞「脳を究める 臨床にらみ基礎固め着々」
45. 2004年9月1日発行 Bio ベンチャー誌(羊土社)9-10月号「バイオベンチャーインタビュー: ES細胞の基礎研究から産学共同につながるアルツハイマー病治療薬開発の新たなストラテジー」
46. 2004年10月2日発行 日経BPムック「変革する大学」シリーズ 慶應義塾大学2004-2005「研究室最前線 III 医学部生理学 岡野 栄之教授:神経再生医療のフロントランナー」
47. 2004年11月25日掲載、朝日新聞「再生医療 定着のためのルール作りを」

その他

(5)その他特記事項

## 6 研究期間中の主な活動

### (2) 招聘した研究者等

| 氏名(所属、役職)          | 招聘の目的                | 滞在先   | 滞在期間                    |
|--------------------|----------------------|-------|-------------------------|
| Christopher Potten | セミナー開催・共同<br>研究打ち合わせ | 東京/大阪 | H13.7.13 ~ 16<br>(4日間)  |
| 田口 明子              | 共同研究の実験、<br>打ち合わせ等   | 東京    | H14.12.4 ~ 17<br>(14日間) |

## 7 結び



我々は、様々な実験手法を戦略的に組み合わせ多角的に研究を推進したことが、結果的に本研究プロジェクトの成功に結びついたと考えている。他分野にくらべ遅れをとってきた神経系における幹細胞生物学の発展に貢献することができたことは我々にとって幸運であったが、その過程で多くの人材を育成することができたことも大きな成果であったと信じている。新しい技術を導入し、新しい実験システムを確立して研究の土台としてきたが、それにもなつて多くの若い研究者たちが本プロジェクトに参加し、研究推進のために努力してくれた。彼らの貢献なくして本プロジェクトの成功はあり得なかった。この場を借りて本研究プロジェクトに参加してくれた全ての人々に感謝の意を表したい。また、当研究室が大阪大学から慶應義塾大学に移転するにあたって、CRESTの支援があったからこそ、研究を中断することなくスムーズに研究グループの移動をすることができた。あらためて感謝申し上げたい。