

哺乳動物の神経分化を制御する  
転写因子ネットワーク

課題番号：12470025

平成 12 年度～平成 14 年度科学研究費補助金  
(基盤研究(B)(2)) 研究成果報告書

平成 15 年 3 月

研究代表者 影山 龍一郎  
(京都大学ウイルス研究所教授)

## は し が き

脳神経系の構築過程を理解することは、高齢化とともに増えている脳神経疾患の原因解明や治療法の開発に必要不可欠である。本研究では、神経分化過程を制御する転写因子ネットワークについて解析を行い、3年間で合計 33 編の学術論文を発表した。この成果によって神経幹細胞を増やしたり、ある特定のニューロンを大量につくるための遺伝子群が明らかになった。特に、現在のところ有効な治療法の無い失明患者に対して、まったく新しい根本的治療法となりうる網膜再生の分子基盤を開拓した。さらに、難聴患者に対する根本的治療法となりうる内耳有毛細胞再生の分子基盤を築いた。本研究成果は、21世紀型革新的先端ライフサイエンス技術開発プロジェクト（トランスレーショナルリサーチ：視覚聴覚）に応用されている。一方、我々が同定した転写因子 Hes1 や Hes7 が発生の進行を制御する生物時計であることがわかった。特に、Hes1 はいろいろな細胞で2時間を刻んでおり、多くの発生過程が2時間単位で制御されていることが示唆された。この成果は「発生の時間生物学」という新たな分野を切り開いたもので、今後、この分野の発展が期待される。

## 研究組織

研究代表者：影山龍一郎（京都大学ウイルス研究所・教授）

## 交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成12年度	4,600	0	4,600
平成13年度	4,200	0	4,200
平成14年度	3,600	0	3,600
総計	12,400	0	12,400

## 研究発表

### (1)学会誌等

Tomita, K., Moriyoshi, K., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R. (2000) Mammalian *achaete-scute* and *atonal* homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system. **EMBO J.** **19**, 5460-5472.

Hojo, M., Ohtsuka, T., Hashimoto, N., Gradwohl, G., Guillemot, F. and Kageyama, R. (2000) Glial cell fate specification modulated by the bHLH gene *Hes5* in mouse retina. **Development** **127**, 2515-2522.

Bae, S.-K., Bessho, Y., Hojo, M., and Kageyama, R. (2000) The bHLH gene *Hes6*, an inhibitor of *Hes1*, promotes neuronal differentiation. **Development** **127**, 2933-2943.

Hirata, H., Ohtsuka, T., Bessho, Y., and Kageyama, R. (2000) Generation of structurally and functionally distinct factors from the bHLH gene *Hes3* by alternative first exons. **J. Biol. Chem.** **275**, 19083-19089.

Nakamura, Y., Sakakibara, S., Miyata, T., Ogawa, M., Shimazaki, T., Weiss, S., Kageyama, R., and Okano, H. (2000) The bHLH gene *Hes1* as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells. **J. Neurosci.** **20**, 283-293.

Jensen, J., Pedersen, E.E., Galante, P., Hald, J., Heller, R.S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F. Serup, P. and Madsen, O.D. (2000) Control of endodermal endocrine development by HES-1. **Nature Genet.** **24**, 36-44.

Kageyama, R., Ohtsuka, T., and Tomita, K. (2000) The bHLH gene *Hes1* regulates differentiation of multiple cell types. **Mol. Cells** **10**, 1-10.

Cau, E., Gradwohl, G., Casarosa, S., Kageyama, R., and Guillemot, F. (2000) *Hes* genes

regulate sequential stages of neurogenesis in the olfactory epithelium. **Development** **127**, 2323-2332.

Sawada, K., Konishi, Y., Tominaga, M., Watanabe, Y., Hirano, J., Inoue, S., Kageyama, R., Blum, M., and Tominaga, A. (2000) Goosecoid suppresses cell growth and enhances neuronal differentiation of PC12 cells. **J. Cell Sci.** **113**, 2705-2713.

Ito, T., Udaka, N., Yazawa, T., Okudela, K., Hayashi, H., Sudo, T., Guillemot, F., Kageyama, R., and Kitamura, H. (2000) Basic helix-loop-helix transcription factors regulate the neuroendocrine differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium. **Development** **127**, 3913-3921.

Zheng, J.L., Shou, J., Guillemot, F., Kageyama, R., and Gao, W.-Q. (2000) *Hes1* is a negative regulator of inner ear hair cell differentiation. **Development** **127**, 4551-4560.

Wakabayashi, N., Kageyama, R., Habu, T., Doi, T., Morita, T., Nozaki, M., Yamamoto, M., and Nishimune, Y. (2000) A novel cis-acting element regulates HES-1 gene expression in P19 embryonal carcinoma cells treated with retinoic acid. **J. Biochem.** **128**, 1087-1095.

Ohno, N., Izawa, A., Hattori, M., Kageyama, R., and Sudo, T. (2001) dlk inhibits stem cell factor-induced colony formation of murine hematopoietic progenitors: Hes-1-independent effect. **Stem Cell** **19**, 71-79.

Satow, T., Bae, S.-K., Inoue, T., Inoue, C., Bessho, Y., Hashimoto, N., and Kageyama, R. (2001) The bHLH gene *hes2* promotes gliogenesis in mouse retina. **J. Neurosci.** **21**, 1265-1273.

Ito, T., Udaka, N., Ikeda, M., Yazawa, T., Kageyama, R., and Kitamura, H. (2001) Significance of proneural basic helix-loop-helix transcription factors in neuroendocrine differentiation of fetal lung epithelial cells and lung carcinoma cells. **Histology & Histopathology** **16**, 335-343.

Bessho, Y., Miyoshi, G., Sakata, R., and Kageyama, R. (2001) *Hes7*: a bHLH-type repressor gene regulated by Notch and expressed in the presomitic mesoderm. **Genes to Cells** **6**, 175-185.

Hatakeyama, J., Tomita, K., Inoue, T., and Kageyama, R. (2001) Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type. **Development** **128**, 1313-1322.

Nakashima, K., Takizawa, T., Ochiai, W., Yanagisawa, M., Hisatsune, T., Nakafuku, M., Miyazono, K., Kishimoto, T., Kageyama, R., and Taga, T. (2001) BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **98**, 5868-5873.

Zine, A., Qui, J., Aubert, A., Therianos, S., Guillemot, F., Kageyama, R., and de Ribaupierre, F. (2001) Hes1 and Hes5 activities are required for the normal development of the hair cells in the mammalian cochlea. **J. Neurosci.** **21**, 4712-4720.

Ohtsuka, T., Sakamoto, M., Guillemot, F., and Kageyama, R. (2001) Roles of Notch signaling in expansion of neural stem cells of the developing brain. **J. Biol. Chem.** **276**, 30467-30474.

Hirata, H., Tomita, K., Bessho, Y., and Kageyama, R. (2001) *Hes1* and *Hes3* regulate maintenance of the isthmic organizer and development of the mid/hindbrain. **EMBO J.** **20**, 4454-4466.

Bessho, Y., Sakata, R., Komatsu, S., Shiota, K., Yamada, S., and Kageyama, R. (2001) Dynamic expression and essential functions of *Hes7* in somite segmentation. **Genes & Dev.** **15**, 2642-2647.

Inoue, C., Bae, S.-K., Takatsuka, K., Inoue, T., Bessho, Y., and Kageyama, R. (2001) *Math6*, a bHLH gene expressed in the developing nervous system, promotes neuronal differentiation. **Genes to Cells** **6**, 977-986.

Haruta, M., Kosaka, M., Kanegae, Y., Saito, I., Inoue, T., Kageyama, R., Nishida, A., Honda, Y., and Takahashi, M. (2001) Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. **Nature Neurosci.** **4**, 1163-1164.

Inoue, T., Hojo, M., Bessho, Y., Tano, Y., Lee, J.E., and Kageyama, R. (2002) *Math3* and *NeuroD* regulate amacrine cell fate specification in the retina. **Development** **129**, 831-842.

Akiba, T., Kuroiwa, N., Shimizu-Yabe, A., Iwase, K., Hiwasa, T., Yokoe, H., Kubosawa, H., Kageyama, R., Dahrington, G.J., Mori, M., Tanzawa, H., and Takiguchi, M. (2002) Expression and regulation of the gene for arginase I in mouse salivary glands: requirement of CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  for the expression in the parotid gland. **J. Biochem.** **132**, 621-627.

Hirata, H., Yoshiura, S., Ohtsuka, T., Bessho, Y., Harada, T., Yoshikawa, K., and Kageyama, R. (2002) Oscillatory expression of the bHLH factor *Hes1* regulated by a negative feedback loop. **Science** **298**, 840-843.

Hatakeyama, J. and Kageyama, R. (2002) Retrovirus-mediated gene transfer to retinal explants. **Methods** **28**, 387-395.

Kunisato, A., Chiba, S., Nakagami-Yamaguchi, E., Kumano, K., Saito, T., Masuda, S., Yamaguchi, T., Osawa, M., Kageyama, R., Nakauchi, H., Nishikawa, M., and Hirai, H. (2003) HES-1 preserves purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo. **Blood** **101**, 1777-1783.

Kayahara, T., Sawada, M., Takaishi, M., Fukui, H., Sano, H., Fukuzawa, H., Suzuki, K., Hiai, H., Kageyama, R., Okano, H., and Chiba, S. (2003) 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.

Bessho, Y., Hirata, H., Masamizu, Y., and Kageyama, R. (2003) Periodic repression by the bHLH factor *Hes7* is an essential mechanism for the somite segmentation clock. **Genes & Dev.** **17**, in press.

Tateya, I., Nakagawa, T., Iguchi, F., Kim, T.S., Endo, T., Yamada, S., Kageyama, R., and Ito, J. (2003) Fate of neural stem cells grafted into injured inner ears of mice. **Neuroreport**, in press.

Bessho, Y., and Kageyama, R. (2003) Oscillations, clocks and segmentation. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, in press.

(2)口頭発表

Kageyama, R.: Regulation of cell differentiation by the bHLH oscillator Hes1 (Invited). British Societies for Cell and Developmental Biology Joint Spring Meeting. Warwick, UK. S6, 2003

Kageyama, R.: Regulation of cell differentiation by the bHLH oscillator Hes1 (Invited). International Symposium on "Development and Regeneration of the Nervous System". Okazaki. 2003

Kageyama, R.: Roles of bHLH and homeobox genes in retinal cell type specification (Invited). Gordon Research Conference. Newport, USA. 2002

Kageyama, R.: Neuron-glia cell fate decision regulated by bHLH genes (Invited). International Symposium on Regulation Networks of Eukaryotic Gene Expression. Tokyo. 2002

Kageyama, R.: bHLH genes in neural development (Invited). The 8<sup>th</sup> East Asian Joint Symposium on Biomedical Research. Tokyo. 2001

Kageyama, R.: bHLH genes in neural development (Invited). The Korea-Japan Joint Seminar, Recent Advances on Gene Therapy and Cell Therapy for the Functional Repair of Nervous System. Sogipo, Korea. 2001

Kageyama, R.: Neuron-glia cell fate decision regulated by bHLH genes (Invited). The 4<sup>th</sup> Annual Meeting of the Korean Society for Brain and Neural Sciences. Seoul, Korea. 2001

Bessho, Y., Sakata, R., Komatsu, S., Shiota, K., Yamada, S., and Kageyama, R.: *Hes7* is essential for somite segmentation (Invited). Segmentation Meeting. Nara. 2001

Hatakeyama, J., Tomita, K., Inoue, T., and Kageyama, R.: Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type. 14<sup>th</sup> International Congress of Developmental Biology. Kyoto. 2001

Ohtsuka, T., Sakamoto, M., Guillemot, F., and Kageyama, R.: Roles of Notch signaling in expansion of neural stem cells of the developing brain. 14<sup>th</sup> International Congress of Developmental Biology. Kyoto. 2001

Hirata, H., Tomita, K., Sakamoto, M., Bessho, Y., and Kageyama, R.: Requirement of *Hes1* and *Hes3* for maintenance of the isthmus organizer and development of midbrain and cerebellum. 14<sup>th</sup> International Congress of Developmental Biology. Kyoto. 2001

Bessho, Y., Miyoshi, G., Sakata, R., and Kageyama, R.: *Hes7* is regulated by Notch and expressed in the presomitic mesoderm. 14<sup>th</sup> International Congress of Developmental Biology. Kyoto. 2001

Tomita, K., Ohsawa, R., Moriyoshi, K., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R.: *Mash1* and *Math3* regulate neuronal versus glial fate determination in the CNS. 14<sup>th</sup> International Congress of Developmental Biology. Kyoto. 2001

Ito, T., Udaka, N., Guillemot, F., Kageyama, R., and Kitamura, H.: Expression of proneural basic helix-loop-helix factors, Notch receptors and Notch ligands in fetal lungs. 14<sup>th</sup> International Congress of Developmental Biology. Kyoto. 2001

Kageyama, R.: The Notch-Hes pathway and neural precursor cells (Invited). International Workshop on Stem Cell Biology and Cellular and Molecular Treatment. Tokyo. 2000

Kageyama, R.: bHLH genes in neural development (Invited). Symposium on Genetic Control of Cell Fates in the Brain and Gut. Copenhagen, Denmark. 2000

Kageyama, R.: bHLH genes in neural development (Invited). COE International Symposium on Molecular Bases of Neuronal Development and Neurodegenerative Disease. Nagoya. 2000

Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R.: *Hes1* and *Hes5* as Notch effectors in mammalian neuronal differentiation. Annual Meeting of Society for Developmental Biology. Boulder, USA. 2000

Kageyama, R.: Notch-Hes pathway in mammalian neural development (Invited). The 9th Symposium on Cell Differentiation. Seoul, Korea. 1999

Kageyama, R.: bHLH genes in neural development (Invited). International Symposium on Regulation Networks of Eukaryotic Gene Expression. Tokyo. 1999

Kageyama, R.: bHLH genes in neural development (Invited). International Symposium on Brain Pattern Formation. Sendai. 1999

Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R.: *Hes1* and *Hes5* as Notch effectors in mammalian neuronal differentiation. European Developmental Biologist Congress. Oslo, Norway. 1999

Kageyama, R.: bHLH genes in neural development (Invited). Japan-Canada Partnership in Neuroscience Workshop on Developmental Neurobiology. Kananaskis, Canada. 1998

Kageyama, R.: HLH transcription factors and neural development (Invited). 5th CGGH Symposium. Tsukuba. 1998

Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R.: *Hes1* and *Hes5* mediate mammalian Notch signalling. Mouse Molecular Genetics Meeting. Cold Spring Harbor, USA. 1998

影山龍一郎 : bHLH 因子群による神経分化制御。「転写調節機構」 - 「多元的情報伝達」  
合同シンポジウム、東京、1998.

影山龍一郎 : bHLH 型転写因子と神経発生。第2回関西遺伝子医療研究会、大阪、1998.

影山龍一郎 : HLH 型転写因子による神経分化制御。スカイクラブ研究会冬期ミーティ  
ング、滋賀、1998.

- 影山龍一郎：bHLH 型転写因子による神経分化制御。京都大学ウイルス研究所学術講演会、京都、1998.
- 影山龍一郎：神経分化における Notch-Hes 経路について。生理学研究所研究会、愛知、1998.
- 富田江一、服部雅一、中村栄二郎、中西重忠、湊 長博、影山龍一郎：T-細胞分化における bHLH 因子 *HES1* の役割。第 21 回日本分子生物学会、神奈川、1998.
- 大塚俊之、石橋 誠、Gerald Gradwohl、中西重忠、François Guillemot、影山龍一郎：哺乳類神経発生における Notch シグナルの下流因子としての *Hes1*, *Hes5* の役割。第 21 回日本分子生物学会、神奈川、1998.
- 影山龍一郎：神経分化を制御する bHLH 因子ネットワーク。大阪大学蛋白質研究所セミナー「転写因子のかたち・機能と生命現象」、大阪、1999.
- 影山龍一郎：神経系の細胞分化の制御。第 25 回日本医学会総会、東京、1999.
- 影山龍一郎：Notch および bHLH 因子による神経分化制御。第 17 回内分泌代謝学サマナーセミナー、静岡、1999.
- 影山龍一郎：bHLH 因子による神経分化制御。第 10 回婦恋シンポジウム、群馬、1999.
- 影山龍一郎：bHLH 因子による神経分化制御。第 22 回三重脳神経疾患研究会、三重、1999.
- 影山龍一郎、北条雅人、大塚俊之、富田江一、Soo-Kyung Bae、佐藤徹、別所康全：bHLH 型転写因子による神経分化制御。第 22 回日本分子生物学会年会、福岡、1999.
- 影山龍一郎：転写因子による細胞分化制御。第 61 回京都内分泌同好会、京都、2000.
- 影山龍一郎：bHLH 因子による神経分化制御。第 30 回新潟神経学夏期セミナー、新潟、2000.
- 影山龍一郎：bHLH 因子による神経分化制御。公開シンポジウム「ポディープラン」、東京、2000.
- 富田江一、影山龍一郎：神経細胞とグリア細胞の分化における bHLH 型転写因子 *Math3* および *Mash1* の役割。第 33 回日本発生生物学会大会、高知、2000.
- 畠山淳、富田江一、影山龍一郎：神経発生における転写因子の役割と細胞特異性決定の分子メカニズム。第 33 回日本発生生物学会大会、高知、2000.
- 富田江一、影山龍一郎：bHLH 因子 *Math3* および *Mash1* による神経分化制御。第 72 回日本生化学会大会、横浜、2000.
- 大塚俊之、阪本昌美、影山龍一郎：中枢神経幹細胞の維持における *Hes1*・*Hes5* の役割。第 72 回日本生化学会大会、横浜、2000.
- 畠山淳、富田江一、影山龍一郎：神経発生における転写因子の役割と細胞特異性決定の分子メカニズム。第 72 回日本生化学会大会、横浜、2000.

- 平田普三、大塚俊之、別所康全、影山龍一郎：bHLH 型転写因子 Hes3 には構造、機能の異なる2つのタイプが存在する。第72回日本生化学会大会、横浜、2000.
- 北条雅人、大塚俊之、橋本信夫、Gradwohl, Gerald、Guillemot, Francois、影山龍一郎：マウス網膜における bHLH 型遺伝子 Hes5 によるグリア細胞の分化決定。第72回日本生化学会大会、横浜、2000.
- Bae, Soo-Kyung、別所康全、北条雅人、影山龍一郎：The bHLH gene Hes6, an inhibitor of Hes1, promotes neuronal differentiation。第72回日本生化学会大会、横浜、2000.
- 影山龍一郎：bHLH 因子による神経分化制御。研究会「網膜の発生・分化・再生」、岡崎、2001.
- 影山龍一郎：神経細胞、内分泌細胞の分化の制御機構。第106回日本解剖学会全国学術集会、高知、2001.
- 影山龍一郎：bHLH 因子による神経分化制御。第54回日本細胞生物学会大会、岐阜、2001.
- 影山龍一郎：bHLH 因子による神経分化制御。第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会、京都、2001.
- 楯谷一郎、影山龍一郎、平田普三、大澤亮介、中川隆之、村井紀彦、伊藤壽一：内耳発生における bHLH 型転写因子の働きの解明と再生の試み。第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会、京都、2001.
- 平田普三、影山龍一郎：峡部オーガナイザーにおける bHLH 因子型転写因子の役割。第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会、京都、2001.
- 別所康全、三好悟一、阪田良一、影山龍一郎：体節形成に関与する新規 bHLH 型転写因子 Hes7 の単離と機能解析。第74回日本生化学会大会、京都、2001.
- 平田普三、富田江一、別所康全、影山龍一郎：bHLH 型転写因子 Hes1 と Hes3 は峡部オーガナイザーの維持、中脳と後脳の発生に必須である。第74回日本生化学会大会、京都、2001.
- 影山龍一郎：ニューロン・グリアの分化制御。第3回分子血液研究会、大阪、2001.
- 影山龍一郎：bHLH 因子による神経分化制御。日本生化学会北陸支部シンポジウム、金沢、2001.
- 須磨崎亮、塩尻信義、中内啓光、影山龍一郎：肝外胆管系の発生には bHLH 型の転写因子 Hes1 が必要である。第24回日本分子生物学会年会、横浜、2001.
- 井上智之、北条雅人、田野保雄、別所康全、Lee Jacqueline、影山龍一郎：bHLH 因子 Math3 と NeuroD による網膜神経細胞の分化制御。第24回日本分子生物学会年会、横浜、2001.
- 別所康全、阪田良一、小松克、塩田浩平、山田秀一、影山龍一郎：体節形成に関与する bHLH 型転写因子 Hes7 の機能解析。第24回日本分子生物学会年会、横浜、2001.

影山龍一郎：神経幹細胞からニューロン・グリアへの分化制御。第3回信州大学機器分析センター学術講演会、松本、2002。

影山龍一郎：bHLH 因子によるニューロン・グリアの分化制御。第75回日本薬理学会年会、熊本、2002。

影山龍一郎：神経幹細胞からニューロン・グリアへの分化制御。OBI セミナー、吹田、2002。

影山龍一郎：神経幹細胞からニューロン・グリアへの分化制御。「先端脳」ワークショップ、東京、2002。

影山龍一郎：The bHLH gene *Hes1* as a two-hour cycle biological clock. 第25回日本分子生物学会年会、横浜、2002。

平田普三、吉浦茂樹、大塚俊之、別所康全、原田崇広、吉川研一、影山龍一郎：2時間周期の時計遺伝子としての bHLH 型転写因子 *Hes1*。第25回日本分子生物学会年会、横浜、2002。

須磨崎亮、塩尻信義、磯山茂美、榊正幸、榊和子、中内啓光、影山龍一郎。膵臓と肝外胆管系の器官形成・分化を転写因子 *Hes1* が制御する。第25回日本分子生物学会年会、横浜、2002年12月11-14日。

### (3)出版物

Kageyama, R., Ohtsuka, T., and Tomita, K. (2000) bHLH genes in neural development. **Research Signpost: Recent Research Developments in Neurochemistry**. Vol. 3. Part I. pp1-8.

Kageyama, R., Hirata, H., and Hatakeyama, J. (2002) Retroviral vectors for gene delivery to dividing progenitor cells. In *Viral Vectors for Treating Diseases of the Nervous System* (Ed. D.S. Latchman). Academic Press. in press.

研究成果による工業所有権の出願・取得状況  
なし

## 研究成果

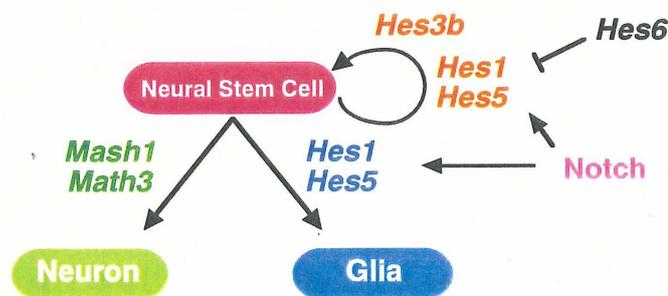
脳神経系の構築過程を理解することは、高齢化とともに増えている脳神経疾患の原因解明や治療法の開発に必要不可欠である。本研究では、神経分化過程を制御する転写因子を明らかにするとともに、神経系遺伝子の発現制御機構を解析した。神経分化過程は、(1)神経幹細胞の維持、(2)ニューロンの分化、(3)グリア細胞の分化という3つのステップに分けることができる。本研究では、これら3つのステップを制御する転写因子ネットワークを解明した。これらの研究成果は、脳神経系構築過程の理解につながり、脳神経疾患の原因解明や治療法開発に応用されることが期待される。

## サマリー

神経発生過程は、(1)神経幹細胞の維持、(2)ニューロンの分化、(3)グリア細胞の分化という3つのステップに分けることができる。本研究では、これら3つのステップを制御する転写因子ネットワークを明らかにした（サマリー図参照）。その結果、いずれのステップも以下のような bHLH 因子が中心的な役割を担うことが示された。また、ニューロンのサブタイプの決定には bHLH 因子のみでは不十分で、ホメオドメイン因子との組み合わせが重要だった。

神経分化を制御する bHLH 因子群

- (1) 神経幹細胞の維持 : *Hes1, Hes3b, Hes5*
- (2) ニューロンの分化 : *Mash1, Math3, Hes6*
- (3) グリア細胞の分化 : *Hes1, Hes5*



サマリー図：神経分化を制御する bHLH 因子ネットワーク

### (1) 神経幹細胞の維持

bHLH 因子 *Hes1* および *Hes5* は胎児脳において神経幹細胞に発現しているが、ニュー

ーロンには発現していない。レトロウイルスベクターを用いて Hes1 や Hes5 を神経幹細胞に強制発現させるとニューロンに分化せず、未分化状態に止まった (図 1、Hes1)。一方、Hes1 や Hes5 を発現しないコントロールウイルスを感染させた場合は、効率良くニューロンに分化した (図 1、CLIG)。また、エレクトロポレーション法で Hes1 や Hes5 を胎児脳に強制発現させると、細胞はニューロンに分化せず、すべて神経幹細胞の状態に止まった。したがって、Hes1 および Hes5 は神経幹細胞を維持する活性があることがわかった。同様に、Hes3b にも神経幹細胞を維持する活性があった。

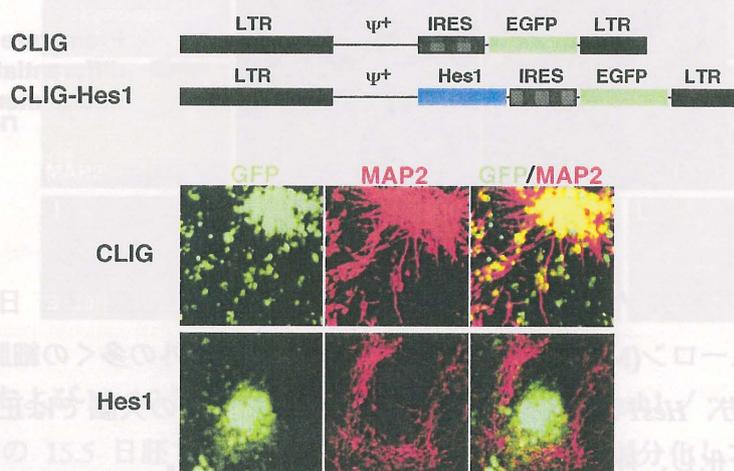
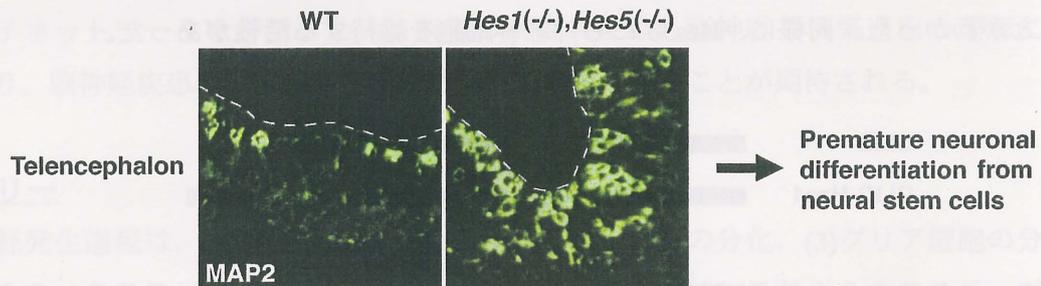


図 1 : レトロウイルスベクターによる Hes1 の強制発現。コントロールレトロウイルス CLIG が感染した細胞(GFP<sup>+</sup>)は効率良くニューロン(MAP2<sup>+</sup>)に分化したが、Hes1 を発現させるレトロウイルスが感染した細胞(GFP<sup>+</sup>)は未分化状態で止まっていた。

さらに、Hes1 および Hes5 の機能をしらべるために、Hes1-Hes5 ダブルノックアウトマウスを作製した。この変異マウスは、多くの場合、小さい脳をもつか、神経管閉鎖不全から無脳症になった。また、眼の発生も大きく障害されていた。この変異マウス脳では、神経幹細胞があまり維持されず、正常よりも早くニューロン(MAP2<sup>+</sup>)に分化した (図 2)。特に、神経管が閉鎖する前からニューロンへの分化が亢進して細胞増殖が低下しており、このために神経管閉鎖不全になることが示唆された。また、ニューロンへの分化を決定する bHLH 因子 Mash1 (後述) の発現が増加していた。これらの結果から、Hes1 や Hes5 はニューロン分化決定因子 Mash1 の発現を抑制することによって神経幹細胞を維持し、神経系形成を制御することが示された。

神経幹細胞の増殖能をしらべるためにニューロスフィア・アッセイを行った。その

結果、野生型マウス的大脑由来の細胞は bFGF や EGF 存在下で効率良くニューロスフィアを形成し、しかも大きく成長した。一方、Hes1-Hes5 ダブルノックアウトマウス由来の細胞はニューロスフィア形成能が著しく低下し、しかも小さなものしかできなかった。したがって、Hes1 および Hes5 は神経幹細胞の増殖・維持に必須の役割をもつことが示された。



**図 2** : Hes1-Hes5 ダブルノックアウトマウス的大脑領域。野生型 10.5 日胚では、大腦表層に 1 層のニューロン(MAP2<sup>+</sup>)が分化しているが、それ以外の多くの細胞はまだ、未分化である。一方、Hes1-Hes5 ダブルノックアウトマウス的大脑では正常よりも多くのニューロンが分化し、神経幹細胞の維持が阻害されている。

## (2) ニューロンの分化

bHLH 因子 Mash1 や Math3 は分化途中のニューロンに発現していた。これらの因子をレトロウイルスベクターを用いて発生途中の神経系に発現させたところ、ニューロンへの分化を促進するとともに、グリア細胞への分化を抑制した。すなわち、Mash1 や Math3 はニューロン分化決定因子として機能することがわかった。

次に、Mash1 ノックアウトマウスや Math3 ノックアウトマウスの神経系を解析した。いずれのノックアウトマウスも神経系に異常がみられたが、幅広い発現パターンに比べて、発生の遅い時期に局所的な異常がみられるのみであった。多くの領域で Mash1 と Math3 は共発現するので、次に Mash1-Math3 ダブルノックアウトマウスを作製した。その結果、中脳では Mash1 ノックアウトマウスや Math3 ノックアウトマウスでニューロンが形成されたが、Mash1-Math3 ダブルノックアウトマウスではニューロンは欠損していた (図 3)。さらに、野生型ではまだグリア細胞 (アストロサイト) の分化がみられない時期に、Mash1-Math3 ダブルノックアウトマウスでは多くの細胞がグリア細胞に分化していた (図 3)。すなわち、Mash1-Math3 ダブルノックアウトマウスでは本

来ニューロンに分化するべき細胞がグリア細胞に運命転換していた。以上から、Mash1 や Math3 はニューロンへの分化を促進するとともに、グリア細胞への分化を抑制することが明らかになった。

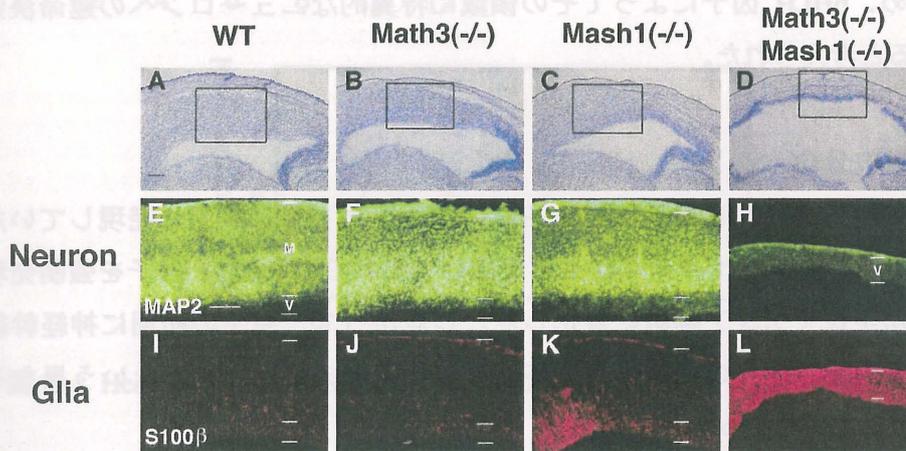


図 3 : Mash1 および Math3 変異マウスの中脳領域。野生型、Mash1 ノックアウト、Math3 ノックアウトの 15.5 日胚では多くのニューロン (MAP2<sup>+</sup>) が分化しているが、Mash1-Math3 ダブルノックアウトマウスではみられない。一方、野生型、Mash1 ノックアウト、Math3 ノックアウトマウスではグリア細胞(S100β<sup>+</sup>)はあまりできていないが、Mash1-Math3 ダブルノックアウトマウスでは数多く形成されている。

ニューロン分化が抑制されグリア細胞分化が亢進するという Mash1-Math3 ダブルノックアウトマウスの表現型は、Hes1 や Hes5 を強制発現したときの表現型とよく似ている。Hes1 や Hes5 は抑制因子で Mash1 や Math3 の活性を抑制することから、Hes1 や Hes5 を強制発現すると Mash1-Math3 ダブルノックアウトマウスと同じ状態をつくることが考えられた。おそらく、Hes1、Hes5 と Mash1、Math3 はお互いに拮抗的に作用して神経分化を制御することが示唆された。

新たに bHLH 因子 Hes6 を同定したが、他の Hes 因子群と異なり、分化しつつあるニューロンに強く発現していた。Mash1 は他の bHLH 因子 E47 とヘテロダイマーを形成しプロモーターに作用するが、Hes1 はこのヘテロダイマー形成を抑制する。一方、Hes6 は Mash1-E47 ヘテロダイマーを抑制せず、むしろ Hes1 による抑制を阻害した。すなわち、Hes6 は Hes1 の機能を阻害し、Mash1 のはたらきを促進した。実際、レト

ロウイルスベクターを用いて Hes6 を強制発現させたところ、ニューロンへの分化が促進された。

ニューロンには多くのサブタイプが存在するが、bHLH 因子だけではこれらの多様なサブタイプの決定はできなかった。しかし、ホメオドメイン因子とともに共発現させると多様なサブタイプの決定が可能になった。おそらく、ホメオドメイン因子は領域特異性を決め、bHLH 因子によってその領域に特異的なニューロンへの運命決定が引き起こされると考えられた。

### **(3) グリア細胞の分化**

発生後期において、bHLH 因子 Hes1、Hes5、Hesr2 はグリア細胞に発現していた。生後の網膜細胞にレトロウイルスベクターを用いてこれらの bHLH 因子を強制発現させたところ、効率良くグリア細胞に分化した。したがって、発生の初期に神経幹細胞の維持に関わる因子が発生の後期においてグリア細胞形成にはたらくという異なる2つの活性を示すことがわかった。

以上の結果から、神経発生において bHLH 因子が中心的な役割を担うことが明らかになった。また、ニューロンのサブタイプの決定はホメオドメイン因子との協調的作用が重要であることが示された。今後、これらの研究成果は神経再生医療へ応用されることが期待される。

### **新たな Hes1 の機能：2 時間を刻む生物時計**

bHLH 因子 Hes1 の発現はいろいろな種類の細胞において2時間周期で増減を繰り返していた（オシレーション）（図4）。このオシレーションは Hes1 のネガティブフィードバックを介して自律的に起こった（図5）。すなわち、Hes1 は2時間周期の生物時計として機能することが明らかになった。この生物時計は2時間周期で進行する体節形成過程を制御することはわかったが、神経発生においてどのような役割をもつのかは今後の課題である。

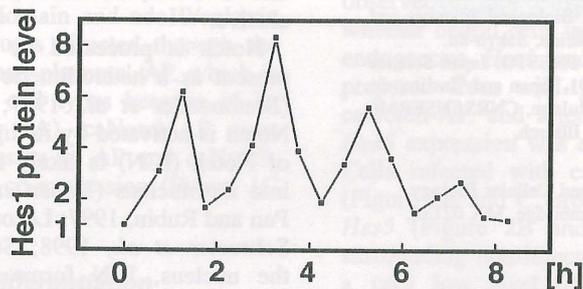
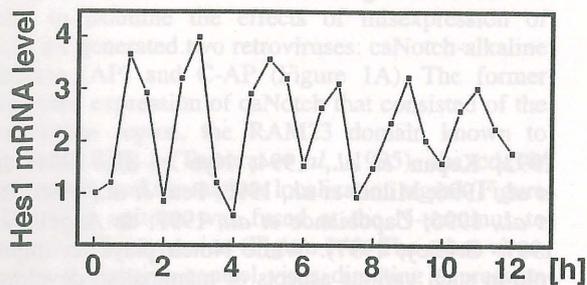


図 4 : Hes1 mRNA および蛋白の発現は 2 時間周期でオシレーションする。

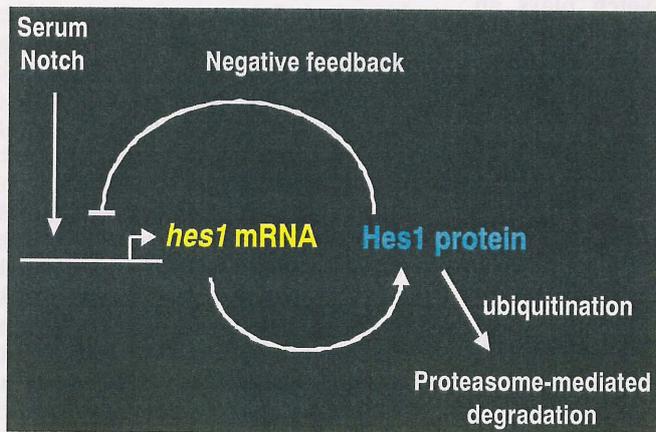


図 5 : ネガティブフィードバックを介した Hes1 オシレーションの分子機構。