

## Bone morphogenetic protein (BMP) シグナリングと成体脳における神経細胞新生

東京女子医科大学医学部病理学（第一）

カワグチ モトコ シバタ ノリユキ コバヤシ マキオ  
川口 素子・柴田 亮行・小林 槇雄

（受理 平成22年12月27日）

## Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signaling and Neurogenesis in the Adult Brain

Motoko KAWAGUCHI-NIIDA, Noriyuki SHIBATA and Makio KOBAYASHI

Department of Pathology, Tokyo Women's Medical University School of Medicine

The postnatal mammalian brain continues neurogenesis throughout life at two major neurogenic regions, the subventricular zone (SVZ) lining the lateral ventricle and the hippocampal dentate gyrus. In the SVZ, a group of slow-dividing cells with astrocytic features represent neural stem cells, which generate committed precursor cells. The majority of these generate neuroblasts, which predominantly colonize the olfactory bulb to supply interneurons in rodents. Maintenance of neural stem cells and their niche requires multiple actions of environmental factors mediated by a number of evolutionarily conserved signaling pathways. The signals of the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily, consisting of the canonical TGF- $\beta$ /activin pathway and the bone morphogenetic protein (BMP) branch pathway, is collectively involved in central nervous system patterning, growth, and differentiation during embryogenesis. Here, we review in vivo evidence for the role of TGF- $\beta$ /BMP signaling during neurogenesis in the postnatal brain.

**Key Words:** adult neurogenesis, BMP signaling, immunohistochemistry, Smad4, subventricular zone

## はじめに

ヒトを含む哺乳類の成体脳には神経幹細胞が存在し、側脳室周囲の脳室下帯や記憶に関連する海馬歯状回などの特定領域で、神経幹細胞による神経細胞の新生が一生に亘って続くことが明らかにされつつある<sup>1)</sup>。これらの新生神経細胞は、既存の神経細胞ネットワークに組み込まれて記憶や学習といった脳の高次機能に深く関与している。また、アルツハイマー病、てんかん、脳梗塞、外傷などに伴って神経細胞が脱落すると、脳室下帯において神経幹細胞が一過性に活発化して、新生神経細胞の供給源としての役割を果たす<sup>2)</sup>。以上を踏まえて、神経幹細胞や神経前駆細胞を用いた治療法の開発を目的として、これらを単離、増殖ならびに分化させて移植するという病巣修復や再生医療への応用に向けた研究も進みつつある。

近年、神経細胞新生において骨形成蛋白 bone morphogenetic protein (BMP) および形質転換成長

因子 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) を介する細胞内情報伝達経路の関与が注目されている<sup>3)</sup>。BMP ならびに TGF- $\beta$  はもともと、胎児発生、骨形成および組織恒常性維持に必須な多機能蛋白としての性質が調べられてきた。この BMP/TGF- $\beta$  シグナリングと神経細胞新生との関連が注目されるようになったのは、これらの蛋白分子が脳内の神経細胞新生の主要な部位である脳質下帯に強く発現しており<sup>4)</sup>、成体脳の神経細胞新生において、特にグリア細胞産生を促進するという報告に始まる<sup>5)</sup>。胎生期や成体脳における BMP シグナリングの役割は、conditional knockout (CKO) mouse を始めとする新しい研究手法を用いて徐々に解明されつつある<sup>3)</sup>。本稿では、神経細胞新生と BMP シグナリングに焦点を絞り、著者らの研究知見を紹介しながら、最新の研究事情を概説する。

## 成体脳における神経細胞の新生

側脳室周囲の脳室下帯には、多分化能と自己複製

能をもつ神経幹細胞が存在し、その多くは神経前駆細胞を経て幼弱な神経細胞を生涯に亘り供給すると考えられている<sup>6)</sup>。この幼弱な神経細胞は、rostral migratory stream (RMS) と呼ばれるアストロサイトの突起で構成されたトンネル構造によって導かれるように移動し、最終的に嗅球へ達した後、介在性ニューロンに分化して既存のネットワークに組み込まれる。また、一部の神経幹細胞は、グリア前駆細胞を経てアストロサイトやオリゴデンドロサイトへ分化する (Fig. 1)。

### BMP シグナリングの基本的な経路

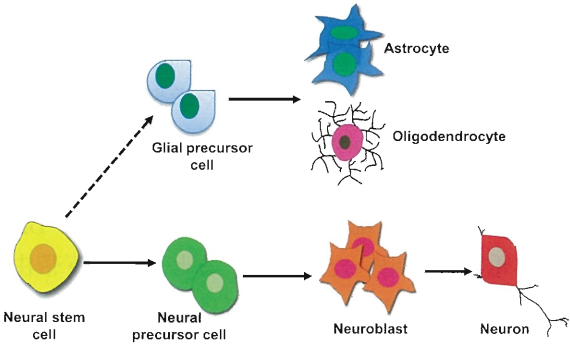
BMP は TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属するサイトカインであり、これまでに 20 種類以上のアイソフォームが同定されている<sup>7)</sup>。代表的な BMP である BMP2/4 は、細胞外アンタゴニストである Noggin により、その受容体との結合が厳密に制御されている。BMP シグナリングは、標的細胞膜上に発現局在する I 型と II 型の特異的受容体 BMPR を介して伝達される。これらの受容体は膜貫通蛋白であり、細胞質側にセリン・スレオニンキナーゼ構造を有する。II 型受容体は I 型受容体を基質とするリン酸化反応を、I 型受容体は転写調節因子 Smad1, Smad5 および Smad8 を基質とするリン酸化反応を、それぞれ触媒する。リン酸化修飾を受けた Smad1/5/8 (p-Smad1/5/8) は Smad4 と三量体複合体を形成して核内に移行した後、各種遺伝子のプロモーター領域に存在する Smad binding site に結合することにより、遺伝子の転写を制御する (Fig. 2)。

### 成体脳における BMP シグナリング

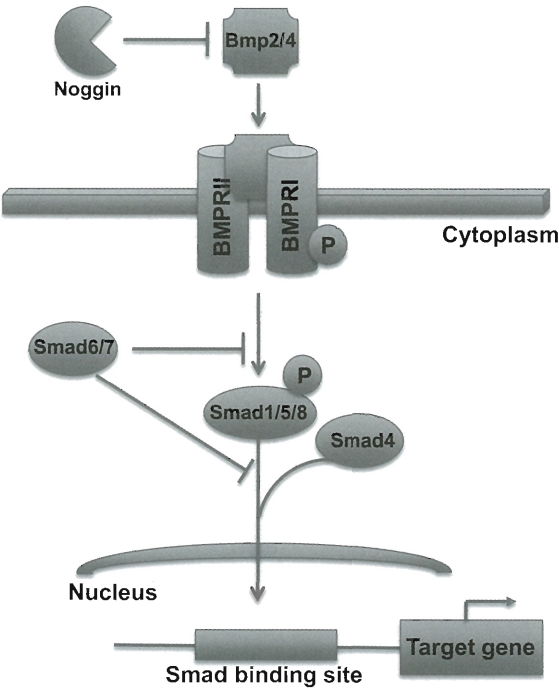
マウスの脳では、脳室下帯を中心に 4 種類の BMP (BMP2, BMP4, BMP6, BMP7) および 3 種類の BMPR (BMPR Ia, BMPR Ib, BMPR II) を発現しており<sup>4)8)</sup>、また、これらの制御因子である Noggin および Id3 も共存している<sup>8)</sup>。これらのうち、BMPR Ia は広範囲に分布しているのに対し、BMPR Ib および BMPR II は脳室下帯に局限している<sup>9)</sup>。我々は最近、BMP シグナリングの活性化を反映する p-Smad1/5/8 が、野生型成体マウス脳の脳室下帯と線条体の細胞核に発現することを確認している。また、p-Smad1/5/8 が核内へ移行する際に必須とされる Smad4 の発現が脳室下帯に局限しており、大脳皮質や海馬を含む他の部位ではほとんど検出されない。これらの観察結果は、脳室下帯での神経細胞新生において担っている BMP シグナリングの特別な機能を窺わせる (Fig. 3)。

胎児脳と比較して、成体脳における BMP シグナリングの役割の全容はいまだ不明である。いくつかの報告によれば、成体脳では、BMP シグナリングがアストロサイトの分化促進とオリゴデンドロサイトの分化抑制に関与しているという。神経細胞特異的プロモーターにリンクさせて BMP4 を過剰発現させたマウスでは、胎生期 16 日から成体期に至るまで、側脳室周囲における S-100 $\beta$  陽性のアストロサイトの増生、新皮質におけるグルタチオン S トランスフェラーゼ陽性のオリゴデンドロサイトおよび海馬における 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) 陽性のオリゴデンドロサイトの脱落が観察される<sup>10)</sup>。Grinspan らは、培養系を用いてオリゴデンドロサイトの発達段階における BMP の役割を明らかにした<sup>11)</sup>。分化初期段階でのオリゴデンドロサイト前駆細胞に BMP2 および BMP4 を添加すると、A2B5 や GFAP を発現するアストロサイトへの誘導が起こり、成熟オリゴデンドロサイトのマーカーであるガラクトセレブロシドや髄鞘塩基性蛋白 myelin basic protein (MBP) の発現が低下する。オリゴデンドロサイトへの分化抑制は、他の実験系でも報告されている<sup>12)</sup>。すなわち、BMPR Ia をオリゴデンドロサイト前駆細胞特異的に除去した CKO マウスでは、CNPase 陽性、MBP 陽性のオリゴデンドロサイトが増加し、Smad4 を神経幹細胞特異的に除去した CKO マウスでは、CNPase 陽性のオリゴデンドロサイトが増加するという<sup>8)</sup>。Lim らは、成体マウスから分離された神経幹細胞と前駆細胞の培養実験系に BMP2 や BMP4 を添加すると、bIII-tubulin 陽性の神経細胞の産生が 10 分の 1 以下に減少することを明らかにした。一方、BMP アンタゴニストである Noggin は、アストロサイトの誘導を抑えると同時に、神経細胞の産生を 20% 近く増加させる。また、BMP7 の過剰発現は未熟神経細胞の産生を抑制し、Noggin の過剰発現は神経細胞の産生を促す<sup>9)</sup>。これら一連の研究知見は、成体マウス脳では総じて BMP シグナリングが、アストロサイトの産生促進とオリゴデンドロサイトおよび神経細胞の新生抑制に関与することを示唆している (Fig. 4)。

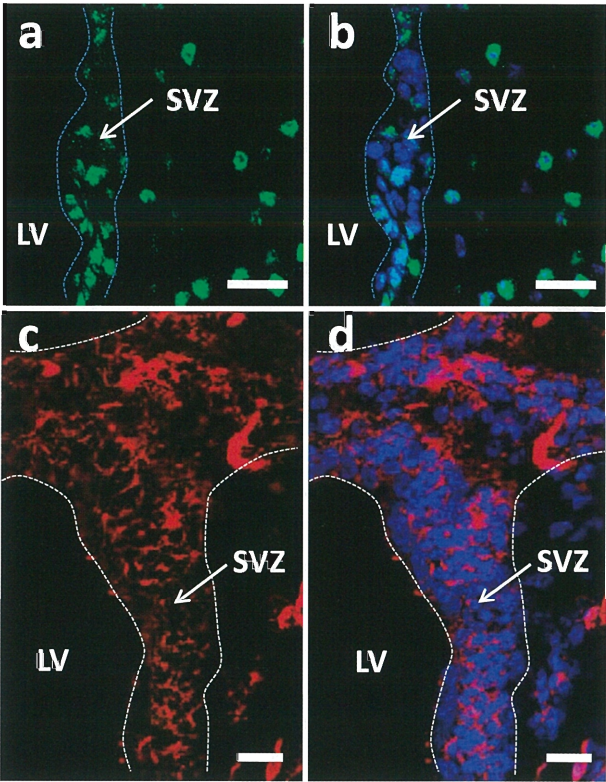
成体脳において、神経幹細胞は緩徐な細胞分裂能を有する。G<sub>1</sub>-S 期の制御蛋白である p53 と p21 は、成体脳における神経幹細胞と前駆細胞の増殖を制御することが報告されている<sup>13)</sup>。SVZ における細胞増殖の制御には、GABA や BMP を始めとするいくつかの因子が関わっている。BMP は神経幹細胞や前駆



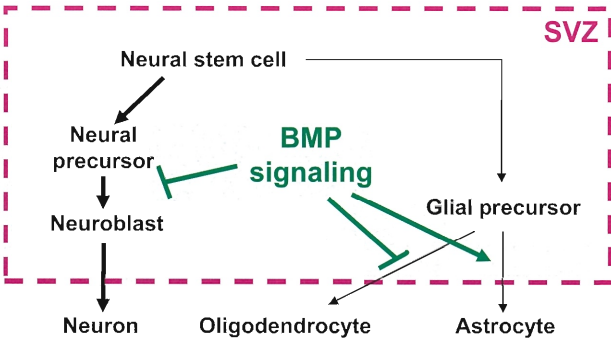
**Fig. 1** Schematic diagram of neural stem cell differentiation in the subventricular zone  
Several cell types including neural stem cells (NSCs), can differentiate into their progeny neuronal and glial precursor cells. Neuronal precursor cells migrate and become mature neurons via immature neurons upon arrival to final regions such as the olfactory bulb. Glial precursor cells can differentiate into astrocytes and oligodendrocytes.



**Fig. 2** Schematic diagram of BMP signaling  
This begins with the binding of Bmp2/4 to the membrane-bound specific receptor. The ligand-receptor binding is strictly regulated by the antagonist Noggin. The receptor stimulation catalyzes the phosphorylation of the BMPRI domain to the activated form, which promotes Smad1/5/8 phosphorylation. Phosphorylated Smad1/5/8 binds to Smad4 and translocates from the cytosol into the nucleus, where the complex as well as other transcription factors bind to Smad binding site to regulate the expression of target genes. On the other hand, Smad6/7 inhibits BMP signaling.



**Fig. 3** Immunohistochemical observations of the phosphorylated active form of Smad1/5/8 (p-Smad1/5/8) and Smad4 in the subventricular zone (SVZ) adjacent to the lateral ventricle (LV) of wild-type mice  
Both p-Smad1/5/8 (a, b) and Smad4 (c, d) are localized in cells of the SVZ. Scale bar=20  $\mu$ m. Immunofluorescence method using Alexa fluor 488 (green), Alexa fluor 555 (red) and DAPI (blue).

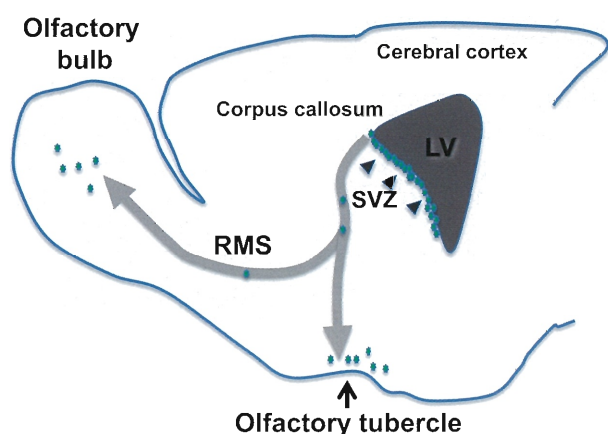


**Fig. 4** Schematic diagram indicating the role for BMP signaling in neural stem cell differentiation in the subventricular zone (SVZ)  
While BMP signaling positively regulates the differentiation from glial precursor cells to astrocytes, it negatively regulates the differentiation from glial precursor cells to oligodendrocytes as well as the maturation from neuronal precursor cells to immature neurons.

細胞において、腫瘍抑制遺伝子である phosphatase and tensin homologue (PTEN) を活性化する。PTEN は phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt 経路を抑制するため、PTEN が活性化すると、細胞周期を G<sub>1</sub> 期で停止させることにより神経前駆細胞の増殖を調節する<sup>14)</sup>。

#### BMP シグナリングと神経細胞の再生、移動および分布

脳室下帯と海馬歯状回の顆粒細胞層は、神経再生の場としてよく知られている。脳室下帯で新生した

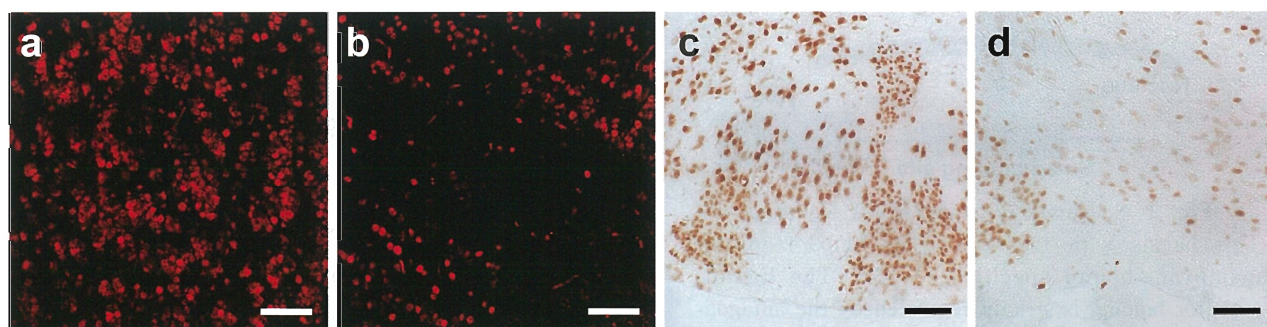


**Fig. 5** Schematic diagram of neuronal cell migration. A subset of immature neurons formed in the processes of adult neurogenesis at the subventricular zone (SVZ) adjacent to the lateral ventricle (LV) migrate toward the olfactory bulb through the main pathway rostral migratory stream (RMS) composed of astrocytic processes, whereas others migrate toward the olfactory tubercle through a copathway.

神経細胞は、嗅球に移動して嗅覚の神経回路に関与する。一方、海馬で新生した神経細胞は、既存の海馬神経回路に組み込まれて記憶や学習などの高次機能に関与する。Polysialic acid-neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) や doublecortin などの神経特異的のマーカーと細胞分裂能マーカーである BrdU との二重染色を用いた研究によると、脳室下帯由来の新生神経細胞は、嗅球だけではなく扁桃体、線条体および梨状回にも移動し、嗅球に移動する経路から別れた副経路を経由した神経細胞は、嗅結節に到達することが判明している<sup>15)</sup> (Fig. 5)。神経前駆細胞特異的 Smad4 除去 CKO マウスを用いた我々の解析では、成体期の嗅球と嗅結節の双方において NeuN で同定される成熟神経細胞が顕著に減少することが判明し (Fig. 6)、成体脳の神経新生における BMP シグナリングの関与が示唆された。

#### おわりに

BMP シグナリングが、胎児脳のみならず成体脳における神経幹細胞の分化、増殖および移動に関与する重要な機構であることを概説した。本稿で言及した数々の研究知見は、外傷や疾患に伴って喪失した神経細胞やグリアをいかに再生させるかという命題に対する答えの手がかりを与えてくれるであろう。BMP シグナリング機構の全容を理解することは、神経細胞新生を含む再生医療への道を切り開くものと期待される。



**Fig. 6** Immunohistochemical observations of the mature neuron-specific marker NeuN in the brain of Smad4 conditional knockout (CKO) mice and age-matched wild-type (WT) mice

It is evident that the number of mature neurons is significantly reduced in the granular cell layer of the olfactory bulb (a, b) and olfactory tubercle (c, d) of CKO mice (b, d) as compared to WT mice (a, c). Scale bar = a, b 50  $\mu$ m; c, d 100  $\mu$ m. Immunofluorescence method using Alexa fluor 555 shown in red (a, b) and immunoperoxidase method using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride shown in brown (c, d).



## 謝 辞

稿を終えるにあたり、貴重な御助言をいただいたテキサス大学 M.D. Anderson Cancer Center の古田泰秀先生に深謝申し上げます。

## 文 献

- 1) **Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM:** Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* **22**: 629-634, 2002
- 2) **Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G et al:** Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol* **75**: 321-341, 2005
- 3) **Johnson MA, Ables JL, Eisch AJ:** Cell-intrinsic signals that regulate adult neurogenesis in vivo: insights from inducible approaches. *BMB Rep* **42**: 245-259, 2009
- 4) **Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM et al:** Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* **28**: 713-726, 2000
- 5) **Fukuda S, Taga T:** Roles of BMP in the development of the central nervous system. *Clin Calcium* **16**: 781-785, 2006
- 6) **Doetsch F:** A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* **13**: 543-550, 2003
- 7) **Tsumaki N, Yoshikawa H:** The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**: 279-285, 2005
- 8) **Colak D, Mori T, Brill MS et al:** Adult neurogenesis requires Smad4-mediated bone morphogenetic protein signaling in stem cells. *J Neurosci* **28**: 434-446, 2008
- 9) **Zhang D, Mehler MF, Song Q et al:** Development of bone morphogenetic protein receptors in the nervous system and possible roles in regulating *trkC* expression. *J Neurosci* **18**: 3314-3326, 1998
- 10) **Gomes WA, Mehler MF, Kessler JA:** Transgenic overexpression of BMP4 increases astroglial and decreases oligodendroglial lineage commitment. *Dev Biol* **255**: 164-177, 2003
- 11) **Grinspan JB, Edell E, Carpio DF et al:** Golden Stage-specific effects of bone morphogenetic proteins on the oligodendrocyte lineage. *J Neurobiol* **43**: 1-17, 2000
- 12) **Samanta J, Burke GM, McGuire T et al:** BMPRIa signaling determines numbers of oligodendrocytes and calbindin-expressing interneurons in the cortex. *J Neurosci* **27**: 7397-7407, 2007
- 13) **Basak O, Taylor V:** Stem cells of the adult mammalian brain and their niche. *Cell Mol Life Sci* **66**: 1057-1072, 2009
- 14) **Groszer M, Erickson R, Scripture-Adams DD et al:** PTEN negatively regulates neural stem cell self-renewal by modulating G0-G1 cell cycle entry. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 111-116, 2006
- 15) **Bedard A, Levesque M, Bernier PJ et al:** The rostral migratory stream in adult squirrel monkeys: contribution of new neurons to the olfactory tubercle and involvement of the antiapoptotic protein Bcl-2. *Eur J Neurosci* **16**: 1917-1924, 2002