

学位論文

Doctor's Thesis

論文名：

神経発生における骨形成因子群の機能とその分子機構の解析

(Analysis of functions of bone morphogenetic proteins in the developing nervous system and their molecular mechanisms.)

著者名：柳澤 亮

Makoto Yanagisawa

指導教官名：田賀哲也教授（転写制御学分野）

審査委員名：宮本英七教授（神経生化学講座）

大久保博晶教授（神経発生学分野）

田中英明教授（神経分化学講座）

栗原裕基教授（細胞識別学分野）

2002年3月

-目次-

1) 要旨	... 4
Summary	... 6
2) 発表論文リスト	... 8
3) 謝辞	... 12
4) 略号	... 14
第一章 研究の背景と目的	
第一節 神経発生と神経幹細胞	... 16
第二節 骨形成因子群とその信号伝達経路	... 16
第三節 BMP 群の神経発生における役割	... 18
第二章 材料と方法	
(1) 神経上皮細胞の培養	... 20
(2) reverse transcription-polymerase chain reaction	... 20
(3) 免疫細胞化学染色	... 23
(4) ルシフェラーゼアッセイ	... 23
(5) PC12 細胞の培養	... 24
(6) レトロウイルスおよびアデノウイルスの作製	... 24
(7) 活性化 p38 キナーゼの検出	... 25
(8) 免疫共沈法	... 26

第三章 結果

第一節 BMP による未分化神経上皮細胞の系譜制御とその分子機構

- (1) 神経上皮細胞における BMP 群とその受容体の発現 ... 27
- (2) BMP 群による神経上皮細胞のニューロン分化抑制とアストロサイト
分化促進 ... 28
- (3) BMP 群による神経上皮細胞の系譜転換 ... 29
- (4) BMP 群と IL-6 ファミリーサイトカインによる相乗的アストロサイト
分化誘導 ... 30
- (5) アストロサイト分化における BMP 特異的信号伝達の必要性 ... 33

第二節 BMP2 による PC12 細胞の神経様突起伸長機構の解明

- (1) BMP2 による PC12 細胞の TAK1-p38 キナーゼ経路依存性神経様突起伸長 ... 34
- (2) BMP2 による I-Smad の発現誘導 ... 36
- (3) PC12 細胞の BMP2 誘導性神経様突起伸長と p38 キナーゼ活性化の I-Smad
による抑制 ... 37
- (4) I-Smad と TAK1-TAB1 複合体の結合 ... 38

第四章 考察

- 第一節 BMP 群による未分化神経上皮細胞の系譜制御とその分子機構 ... 40
- 第二節 BMP2 による PC12 細胞の神経様突起伸長機構の解明 ... 44

結語	... 48
引用文献	... 51
図	... 60

1) 要旨

脳・神経系は、多分化能と自己複製能をもつ前駆細胞、神経幹細胞から生み出されたニューロンやグリア細胞（アストロサイトやオリゴデンドロサイト）などの多細胞群から構成される。骨形成因子（BMP）群は神経幹細胞の系譜制御に関与するサイトカインの一つと位置づけられており、神経発生において様々な機能を持つことが知られている。本研究では、BMP 群の神経発生に及ぼす作用とその分子機構を解明する一助として、①BMP 群による未分化神経上皮細胞の系譜制御とその分子機構の比較検討、および②BMP2 による PC12 細胞の神経様突起伸長機構の解明を試みた。

まず、①については、中枢神経幹細胞が盛んに増殖していることが知られる神経上皮細胞の培養系を用いて、BMP2、BMP4 および BMP7 が等しく神経上皮細胞のニューロン分化を阻害し、アストロサイト分化を誘導することを見出した。BMP2 と白血病細胞株増殖阻止因子（LIF）による神経上皮細胞の刺激が、それぞれの下流の転写因子 Smad 群と signal transducer and activator of transcription 3（STAT3）ならびに転写共役因子 p300 から成る複合体形成を経て、相乗的なアストロサイト分化を誘導することがこれまでに報告されているが、この作用が BMP2、BMP4 および BMP7 のうち任意の BMP と、LIF の属するインターロイキン 6 ファミリーの任意のサイトカインとの間で認められる共通の作用であることを示唆するデータを得た。

次に②については、神経冠由来の褐色細胞腫株で末梢ニューロン様の分化をすることが示されている PC12 細胞を用いて、BMP2 がその下流の信号伝達系の一つ

TAK1-p38 キナーゼ活性化経路を介してこの細胞に神経様突起伸長を誘導することを明らかにした。BMP2 はもう一つの信号伝達経路 Smad 転写因子活性化経路を介して抑制性 Smad (I-Smad) の発現を誘導するが、I-Smad を PC12 細胞に導入することにより、BMP2 による TAK1-p38 キナーゼ経路の活性化と、その結果誘導される神経様突起の伸長が抑制されることを見出した。I-Smad はこれまで Smad 経路特異的な阻害タンパク質として知られてきたが、この結果は I-Smad の持つ BMP 信号伝達経路全体に対する阻害分子としての機能を提唱するものである。

BMP 群の神経発生における作用についてはこれまでに多くの報告がなされているが、現象の提示にとどまるものがその大半を占める。本研究により BMP 群の中枢神経系および末梢神経系における作用とその分子機構の一端が解明されたが、このような研究により BMP 群の神経発生における作用とその分子機構の解明が今後さらに進展することが期待される。

Summary

The nervous system is organized by neuronal and glial cells generated from common precursors called neural stem cells during development. Fate decision of the precursors is regulated by cell-intrinsic programs as well as extrinsic cues from surrounding environment. Bone morphogenetic proteins (BMPs) are known as such extrinsic cues and exhibit a variety of functions during development of the nervous system. As the first step to elucidate developmental roles of BMP signaling in the nervous system, molecular mechanisms of ① BMPs-mediated modulation of neuroepithelial cell fate and ② BMP2-induced neurite outgrowth in PC12 cells were analyzed.

Regarding the subject ①, it has been previously reported that BMP2 has a potential to repress neurogenesis and induce astrocytogenesis of neuroepithelial cells which are known to include central nervous system stem cells. In this study, BMP4 and BMP7, in addition to BMP2, were also found to be expressed in neuroepithelial cells and repress neurogenesis and induce astrocytogenesis of neuroepithelial cells. It was furthermore suggested that any combination of interleukin-6 cytokine family members and either of the three BMPs (BMP2, BMP4 and BMP7) comparably induces synergistic astrocyte differentiation of neuroepithelial cells via complex formation of respective transcription factors called signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and Smads,

bridged by transcriptional coactivator p300.

As for the subject ②, BMP2 has been reported to induce neurite outgrowth in PC12 cells, a line of neural crest-derived pheochromocytoma cells which has been shown to exhibit neuron-like differentiation. BMP2-induced neurite outgrowth was found in the present study to be mediated via activation of a TAK1-p38 kinase pathway. BMP2 is known to induce expression of inhibitory Smad (I-Smad) via an ordinary Smad activation pathway. Overexpression of I-Smad in PC12 cells was found here to repress the activation of TAK1-p38 kinase pathway, leading to the inhibition of neurite outgrowth. Although I-Smad has been shown to function as a specific inhibitor for the Smad activation pathway, above described results indicate that I-Smad also functions as an inhibitor for the other BMP signaling pathway, the TAK1-p38 kinase cascade.

2) 発表論文リスト

1. Makoto Yanagisawa, Takumi Takizawa, Wataru Ochiai, Atsumi Uemura, Kinichi Nakashima and Tetsuya Taga.

Fate alteration of neuroepithelial cells from neurogenesis to astrocytogenesis by bone morphogenetic proteins.

Neuroscience Research., in press.

2. Makoto Yanagisawa, Kinichi Nakashima, Takumi Takizawa, Wataru Ochiai, Hirokazu Arakawa and Tetsuya Taga.

Signaling crosstalk underlying synergistic induction of astrocyte differentiation by BMPs and IL-6 family of cytokines.

FEBS Letters, 489: 139-143 (2001).

3. Makoto Yanagisawa, Kinichi Nakashima, Kohsuke Takeda, Wataru Ochiai, Takumi Takizawa, Masaya Ueno, Makiko Takizawa, Hiroshi Shibuya and Tetsuya Taga.

Inhibition of BMP2-induced, TAK1 kinase-mediated neurite outgrowth by Smad6 and Smad7.

Genes to Cells, 6: 1091-1100 (2001).

4. Wataru Ochiai, Makoto Yanagisawa, Takumi Takizawa, Kinichi

Nakashima, Tetsuya Taga.

Astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells involving cardiotrophin-1-induced activation of STAT3.

Cytokine, 14: 264-271 (2001).

5. Takumi Takizawa, Makoto Yanagisawa, Wataru Ochiai, Kiyoshi Yasukawa, Takahiko Ishiguro, Kinichi Nakashima, Tetsuya Taga.

Directly linked soluble IL-6 receptor-IL6 fusion protein induces astrocyte differentiation from neuroepithelial cells via activation of STAT3.

Cytokine, 13: 272-279 (2001).

6. Kinichi Nakashima, Takumi Takizawa, Wataru Ochiai, Makoto Yanagisawa, Tatsuhiro Hisatsune, Masato Nakafuku, Kohei Miyazono, Tadimitsu Kishimoto, Ryoichiro Kageyama and Tetsuya Taga.

BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98: 5868-5873 (2001).

7. Takumi Takizawa, Kinichi Nakashima, Masakazu Namihira, Wataru Ochiai, Atsumi Uemura, Makoto Yanagisawa, Naoyuki Fujita, Mitsuyoshi Nakao, and Tetsuya Taga.

DNA Methylation Is a Critical Cell-Intrinsic Determinant of Astrocyte Differentiation in the Fetal Brain

Developmental Cell, 1: 749-758 (2001)

8. Makoto Yanagisawa, Kinichi Nakashima, Hirokazu Arakawa, Kazuhiro Ikenaka, Kanji Yoshida, Tadamitsu Kishimoto, Tatsuhiro Hisatsune and Tetsuya Taga.

Astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells by interleukin-11 via activation of a common cytokine signal transducer, gp130, and a transcription factor, STAT3.

Journal of Neurochemistry, 74: 1498-1504 (2000).

9. Tetsuya Taga, Kinichi Nakashima and Makoto Yanagisawa.

Regulation of cell fate in the developing brain by synergistic signaling between STAT3 and Smad1.

In *Molecular Target for Hematological Malignancies and Cancer*, (Niho, Y., eds.) pp. 125-131, Kyushu University Press, Fukuoka (2000).

10. Makoto Yanagisawa, Kinichi Nakashima and Tetsuya Taga.

STAT3-mediated astrocyte differentiation from mouse fetal neuroepithelial cells by mouse oncostatin M.

Neuroscience Letters, 269: 169-172 (1999).

11. Kinichi Nakashima, Makoto Yanagisawa, Hirokazu Arakawa, Naoki, Tatsuhiro Hisatsune, Masahiro Kawabata, Kohei Miyazono and Tetsuya Taga.

Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science*, 284: 479-482 (1999).

12. Kinichi Nakashima, Makoto Yanagisawa, Hirokazu Arakawa and Tetsuya Taga.

Astrocyte differentiation mediated by LIF in cooperation with BMP2. *FEBS Letters*, 457: 43-46 (1999).

13. Kinichi Nakashima, Stefan Wiese, Makoto Yanagisawa, Hirokazu Arakawa, Naoki Kimura, Tatsuhiro Hisatsune, Kanji Yoshida, Tadamitsu Kishimoto, Michael Sendtner and Tetsuya Taga.

Developmental requirement of gp130 signaling in neuronal survival and astrocyte differentiation.

Journal of Neuroscience, 19: 5429-5434 (1999).

3) 謝辞

本研究は田賀哲也教授（熊本大学転写制御学）のご指導の下で行われました。東京医科歯科大学時代から、常に研究の遂行に最高の環境を用意し、惜しみなく学習の場を与え、また洞察に富んだご助言を賜りましたことに深謝いたします。

中島欽一助教授（熊本大学転写制御学）には実験の開始からの長きにわたり、多大な、かつ惜しみないご協力をいただきました。分子生物学および神経生物学についての知識・技術をまったく欠いた状態から、ここまで導いて下さいましたことに感謝いたします。

滝沢琢己先生（群馬大学小児科・熊本大学転写制御学）並びに落合和君（熊本大学転写制御学）には、共に実験をさせていただくなど実験全般においてさまざまご協力をいただきました。信久幾夫助手（熊本大学転写制御学）並びに荒川浩一先生（群馬大学小児科学）とは、神経上皮細胞培養系の確立の際に共に実験をさせていただきました。また信久幾夫助手には研究環境の整備など細部に渡ってサポートしていただきました。滝沢牧子先生（群馬大学第三内科・熊本大学転写制御学）並びに上野将也助手（金沢大学がん研究所）にはレトロウイルスベクターの作製をはじめとして、様々な示唆を、加えて上野将也助手には刺激を、いただきました。植村篤実先生（熊本大学小児科・転写制御学）には神経上皮細胞の培養の際にご協力をいただきました。沖田圭介君（熊本大学転写制御学）、中村祐子さん、渡部良太郎君、斉藤京子さん、野口夕紀さん並びに金子郁さんには日頃から様々な面で実験の

サポートをしていただきました。

一條秀憲教授（東京医科歯科大学分子情報伝達学）並びに武田弘資助手（東京医科歯科大学分子情報伝達学）には PC12 細胞を用いた実験の際、アデノウイルスベクターはじめとした材料から実験の構成に関する有益なご助言まで、さまざまなご協力を賜りました。

宮園浩平先生（癌研究会癌研究所）、川畑正博先生（癌研究会癌研究所）並びに今村健志先生（癌研究会癌研究所）には Smad6 cDNA をご供与いただくとともに、BMP 信号伝達系に関して様々なご助言をいただきました。澁谷浩司教授（東京医科歯科大学分子細胞生物学）並びに木村直紀先生（中外製薬株式会社筑波研究所）からは TAK1 cDNA を、山之内製薬株式会社からは BMP2 を、Genetics Institute 社からは BMP4 を、Kuber Sampath 博士（Creative BioMolecules）からは BMP7 を、東ソ一株式会社からは IL-6/sIL6-R をご供与いただきました。日本学術振興会からは研究資金の援助を賜りました。

本研究は、以上の多くの方々の惜しみないご協力とご好意のもとで行われ、それによりはじめて成立したものです。心からお礼申し上げます。

最後に全面的な援助を惜しまず、常に支えてくれました両親と妹に感謝します。

4) 略号

BMP ; 骨形成因子 (bone morphogenetic protein)

Co-Smad ; common-partner Smad

DN-STAT3 ; 優性抑制型 STAT3

G3PDH ; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GFAP ; グリア繊維酸性蛋白質 (glial fibrillary acidic protein)

GFP ; green fluorescent protein

HLH ; ヘリックス・ループ・ヘリックス

IL- ; インターロイキン (interleukin)

IRES ; internal ribosome entry site

I-Smad ; 抑制性 Smad (inhibitory Smad)

LIF ; 白血病細胞株増殖阻止因子 (leukemia inhibitory factor)

MAP2 ; 微小管結合蛋白質 2 (microtubule-associated protein 2)

MAPK ; mitogen activated protein kinase

MAPKK ; MAPK kinase

MAPKKK ; MAPK kinase kinase

MKK ; mitogen-activated protein kinase kinase

Neo^r ; ネオマイシン耐性遺伝子

NGF ; 神経成長因子 (nerve growth factor)

OP-1 ; osteogenic protein-1

R-Smad ; receptor-regulated Smad

RT-PCR ; reverse transcription-polymerase chain reaction

sIL-6R ; 可溶性 IL-6 受容体

STAT3 ; signal transducer and activator of transcription 3

TAB1 ; TAK1 binding protein 1

TAK1 ; TGF- β -activated kinase 1

TAK1KN ; キナーゼ不活性型 TAK1

TGF- β ; transforming growth factor- β

第一章 研究の背景と目的

第一節 神経発生と神経幹細胞

脳・神経系は、ニューロンやグリア細胞（中枢神経系においてはアストロサイトやオリゴデンドロサイト）といった多細胞群から構成されるが、発生過程においてこれらの細胞群が緻密に連携することによりその形態や機能の形成が完遂される。近年になり、これらの細胞群が、多分化能と自己複製能をもつ共通の細胞、すなわち神経幹細胞から生み出されることが明らかになり、注目を集めている (McKay, 1997; Temple & Alvarez-Buylla, 1999; Gage, 2000)。神経幹細胞が多分化能を維持した状態で自己複製を行う仕組みや、各種細胞群へ分化する細胞系譜決定の仕組みを解明することは、生物学的に大変興味深く、かつ幹細胞を用いた再生医学への応用も期待される重要な研究テーマである。神経幹細胞の細胞系譜の決定は、エピジェネティック修飾などの細胞内在性のプログラムに加え、増殖分化因子などの外来性の刺激が制御していると考えられているが、この仕組みがどのような細胞内外因子によりいかなるシグナル伝達経路を経て制御されているかについては未解決な点が多い。サイトカイン群は、その神経幹細胞の細胞系譜を制御する外来性の刺激の一つとしてあげられる。

第二節 骨形成因子群とその信号伝達経路 (図 1)

骨形成因子 (bone morphogenetic protein, BMP) 群は、transforming growth

factor- β (TGF- β) スーパーファミリーに属する一群のサイトカインで、異所的な骨形成誘導能から同定された経緯をもつ。しかし、現在では神経系をはじめとする様々な部位で発現し、骨形成以外にも幅広い作用を示すことが明らかにされている (Heldin ら、1997)。

BMP の受容体はともにセリン/スレオニンキナーゼ活性をもつ I 型と II 型の受容体から構成される。BMP が II 型受容体に結合すると、I 型受容体が活性化され、さらに活性化された I 型受容体により細胞内の転写因子が活性化される。この転写因子を Smad というが、BMP により活性化される Smad には Smad1、Smad5 および Smad8 があり、これらの Smad を receptor-regulated Smad (R-Smad) と総称する。活性化された R-Smad が common-partner Smad (Co-Smad) ともよばれる Smad4 と複合体を形成した後、核へ移行し、標的遺伝子の発現を誘導することにより、BMP の生物学的活性は発揮されるが、この一連の信号伝達経路は Smad 経路と呼ばれている。Smad ファミリー分子には R-Smad と Co-Smad に加え、inhibitory Smads (I-Smads) と呼ばれる Smad 経路を阻害する Smad も存在しており、Smad6 および Smad7 から構成される。

BMP の下流の信号伝達経路には Smad 経路の他に、TGF- β -activated kinase 1 (TAK1)-p38 キナーゼ経路を介した mitogen activated protein kinase (MAPK) 経路も存在することが知られている (Yamaguchi ら、1999; Kimura ら、2000)。この経路は MAPK kinase kinase (MAPKKK) の TAK1、MAPK kinase (MAPKK) の MKK3/6 (mitogen-activated protein kinase kinase 3/6)、MAPK の p38 キナーゼから構成される。TAK1 はアダプター蛋白の TAK1 binding protein 1 (TAB1) と複合体を形成しており、この複合体形成は TAK1 の活性化に必要とされる (Shibuya

ら、1996)。

第三節 BMP 群の神経発生における役割

BMP の神経発生における役割については、多数の報告がある。発生過程の中枢神経系においては、神経幹細胞は脳室周辺に存在すると考えられている (McKay, 1997; Temple & Alvarez-Buylla, 1999; Gage, 2000)。BMP はこの脳室周辺細胞にアストロサイト分化 (Gross et al., 1996) とニューロン分化抑制 (Lim ら、2000) を誘導することが報告されている。さらに未分化神経前駆細胞を含む胎生期終脳由来の神経上皮細胞を BMP2 で刺激した場合、BMP2 がインターロイキン (interleukin, IL-) 6 ファミリーのサイトカインの 1 つ、白血病細胞株増殖阻止因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) と協調して、相乗的なアストロサイト分化を誘導することや、神経上皮細胞の分化系譜をニューロン分化の方向からアストロサイト分化の方向へと転換することも知られている (Nakashima ら、1999c; 2001)。

末梢神経系における神経幹細胞は、発生過程において神経管から遊出した神経堤細胞中に含まれる (Stemple & Anderson, 1992; Morrison ら、1999) が、BMP には神経堤細胞から自律神経へのニューロン分化誘導作用が見出されている (Shah ら、1996; Reissmann ら、1996; Schneider ら、1999; Morrison ら、1999)。さらにこの他には、神経堤細胞の神経管からの遊出や、分化後の上頸神経節ニューロンの樹状突起伸長を促進するとの報告もなされている (Sela-Donenfeld & Kalcheim, 1999; Lein ら、1995; Guo ら、1998)。

前述のように、近年になり中枢および末梢神経系幹細胞の単離・培養法や各細胞

系譜への分化誘導系の確立が報告されているが、それらは現象の提示である場合が多く、その分子基盤についての報告は数少ない。信号伝達経路や標的遺伝子など、BMPの神経発生への作用の基盤となる分子機構もまた例外ではなく、上記の作用がどのような機構による制御されているのか、その多くは解析されていない。本研究ではその解決の一助として、①BMP 群による未分化神経上皮細胞の系譜制御とその分子機構の比較検討、および②末梢神経様分化モデルとしての PC12 細胞を用いた BMP2 による神経様突起伸長機構の解明を試みた。

第二章 材料と方法

(1) 神経上皮細胞の培養

未分化神経上皮細胞は、胎生 14.5 日目の ICR マウス胎仔の終脳から、Nakashima ら (1999a, c) の手法で単離・培養した。すなわち、髄膜を除去したマウス胎仔終脳をピペティングにより機械的に分散させ、10 ng/ml の 塩基性繊維芽細胞増殖因子 (R&D systems) を 添加した N2/DMEM/F12 培地 (25 µg/ml インシュリン、100 µg/ml アポトランスフェリン、20 nM プロゲステロン、100 µM ブトレッシンおよび 30 nM 亜セレン酸ナトリウム含有 DMEM/F12 培地) に懸濁させ、ポリ-L-オルニチン/フィブロネクチンコートした 90mm ディッシュ (Nunc) 上で培養した。4 日間培養後、細胞を同様にコートしたチェンバースライド (0.4 x 10⁵細胞/well、Nunc) ないし 12-well プレート (0.65 x 10⁶細胞/well、Nunc) にまき直し、後述の各種アッセイに用いた。

(2) reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RT-PCR は Yanagisawa ら (1999) の手法に準じて行った。細胞から総 RNA を Isogen (ニッポンジーン) で抽出後、Superscript II reverse transcriptase (Gibco BRL) で cDNA を合成し、合成された cDNA を template として PCR を行った。温度条件は 95°C・2 分間の後、94°C・20 秒、60°C・20 秒、72°C・1 分間のサイクルを 30 回 (BMP 受容体に関しては 36 サイクル) 繰り返し、最後に 72°C で 3 分間維持する条件で行った。用いたプライマーを以下に示す。

BMP2

5'- CCAGGTTAGTGA CTCAGAACAC -3',

5'- TCATCTTGGTGCAAAGACCTGC -3'

BMP4

5'- TAGCAAGAGTGCCGTCATTCC -3',

5'- CCAGTCTCGTGTCCAGTAGTCG -3'

BMP7

5'- CGATTT CAGCCTGGACAACG-3',

5'-CCTGGGTACTGAACACGG -3'

ALK2

5'- TCGATGGAGTAATGATCCTTCC -3',

5'- CCGTGATGTTCTGTTACACC -3'

ALK3

5'- CAGACTTGGACCAGAAGAAGCC -3',

5'- ACATTCTATTGTCTGCGTAGC -3'

ALK6

5'- AAGAAGATGACTCTGGAATGCC -3',

5'- ATCCACACCTCGCCATAGCG -3'

BMPR II

5'- GCTTCGCAGAATCAAGAACG -3',

5'- GTGGACTGAGTGGTGTGTTGTG -3'

TGF- β 1

5'- CCGGAGAGCCCTGGATACC -3',

5'- AGAGGGCAAGGACCTTGCTG -3'

T β R I

5'- GGTCTCTGCTTTGTCTCAGTC -3',

5'- AGACTGGACCAGCAATGACAG -3'

T β R II

5'-CGGTCAAGGTTCCACAGCTGTGC-3',

5'- GGTCGTCCTCCAGGATGATGGCA-3'

Smad2

5'-GTCGTCCATCTTGCCATTCAC-3',

5'-GTTGTGTCCCACTGATCTACC-3'

Smad3

5'-TGCTGGGTTGGAAGAAGGGC-3',

5'-TGTTGAAGGCAAACCTCACAGAG-3'

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)

5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC -3',

5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3'

Smad6

5'- GACCAGGCTGTCAGCATTTTC -3',

5'- TGAGTAGGATCTCCAGCCAAC -3'

Smad7

5'- AGCTCAATTCGGACAACAAGAG -3',

5'- GCTGTTGAAGATGACCTCCAG -3'

(3) 免疫細胞化学染色

免疫細胞化学染色は Nakashima ら (1999a, b) の手法に従って行った。チェンバースライドにまき直した神経上皮細胞を 80 ng/ml の BMP2 (山之内製薬)、BMP4 (Genetics Institute)、BMP7 (Kuber Sampath 博士 (Creative BioMolecules) より供与)、TGF- β (R&D Systems)、LIF (R&D Systems)、IL-6/sIL-6R (東ソー) で 2-6 日間刺激した後、4%パラホルムアルデヒド含有 PBS で固定し、3%ウシ胎仔血清および 0.1% TritonX-100 を含有した PBS でブロッキングした上で、免疫細胞化学染色を行った。一次抗体は、アストロサイト検出用としては抗グリア繊維酸性蛋白質 (glial fibrillary acidic protein、GFAP) ポリクローナル抗体 (1: 2000、DAKO) を、ニューロン検出用としては抗微小管結合蛋白質 2 (microtubule-associated protein 2、MAP2) モノクローナル抗体 (1:500、SIGMA) を用いた。二次抗体としては、ローダミン標識抗ラビット IgG 抗体 (1: 200、CHEMICON)、FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (1: 100、Jackson ImmunoResearch Laboratory) を用いた。核染色は Bisbenzimidazole H33258 fluorochrome trihydrochloride (Nacalai tesque) を用いて行った。

(4) ルシフェラーゼアッセイ

12-well プレートにまき直した神経上皮細胞に、レポーターコンストラクトと内

部標準コンストラクトをトランスフェクションした。レポーターコンストラクトとしては、ルシフェラーゼ遺伝子が GFAP 遺伝子ないし Id1 遺伝子のプロモーター領域により制御された GF1L-pGL3 (Nakashima ら、1999b) ないし -1575Id1-Luc (Nakashima ら、2001) を用いた。内部標準コンストラクトとしては、ルシフェラーゼ遺伝子がヒト伸張因子 1 α 遺伝子のプロモーター領域により制御された pEF-Rluc を用いた。トランスフェクションの翌日、各サイトカイン (80 ng/ml) で 8 時間刺激後、細胞を溶解させ、溶解物中のルシフェラーゼ活性をピッカジーンデュアルルシフェラーゼアッセイシステム (東洋インキ) を用いて測定した。測光には MicroLumat LB96P luminometer (WALLAC BERTHOLD) を用いた。

(5) PC12 細胞の培養

褐色細胞腫由来細胞株 PC12 細胞は、RIKEN Cell Bank (Tsukuba, Japan) から入手し、5%ウシ胎児血清および 5%ウマ血清含有 DMEM で培養した。サイトカインによる神経様突起伸長を評価する際は、細胞を 1%ウマ血清含有 DMEM で培養し、BMP2 (40 ng/ml) ないし神経成長因子 (nerve growth factor、NGF、10-20 ng/ml、R&D Systems) で 6 日間刺激した後、細胞の直径以上の長さの突起をもつ細胞をカウントした。p38 キナーゼ阻害剤処理を行う場合は、1 μ M の SB203580 (Calbiochem) をサイトカイン刺激の前日に添加した。

(6) レトロウイルスおよびアデノウイルスの作製

組み替えレトロウイルスベクターは、internal ribosome entry site (IRES) とネオマイシン耐性遺伝子 (Neo^r) をもつレトロウイルスベクター pMIN を構築し、

そのクローニングサイトに目的蛋白をコードする cDNA を挿入することで作製した。レトロウイルスは、これらのベクターを 293T 細胞由来レトロウイルスパッケージング細胞 PlatE 細胞 (Morita ら、2000) にトランスフェクションすることで培養液中に産生させた。PlatE 細胞は、通常は 10%牛胎児血清、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ピューロマイシンおよび 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ プラスチジン含有 DMEM で培養し、トランスフェクション前日に抗がん剤除去のため、培地を 10%ウシ胎児血清含有 DMEM に置換した。レトロウイルスの感染は、I 型コラーゲンでコートしたディッシュ上にまき直した PC12 細胞をレトロウイルスと 24 時間培養することで行った。感染した PC12 細胞は 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のジェネティシン (GibcoBRL) を培地に添加することで選択した。

組み替えアデノウイルスは Saitoh ら (1998) の手法にしたがい、作製した。感染は、オルニチン/フィブロネクチンコートしたディッシュ上にまき直した PC12 細胞とアデノウイルスを感染多重度 150 PFU/cell で 24 時間培養することにより行った。サイトカイン刺激は感染後 24 時間で開始した。

(7) 活性化 p38 キナーゼの検出

p38 キナーゼの活性化を検出するため、PC12 細胞を 1%ウマ血清含有 DMEM で培養した後、50 ng/ml の BMP2 で 1 時間、ないし 500 nM の H_2O_2 で 10 分間、刺激した。刺激した PC12 細胞は可溶化緩衝液 (0.5% NP40, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM pAPMSF, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinine, 2 mM sodium orthovanadate, 5 mM EDTA) で可溶化し、その可溶化物を SDS-PAGE で分離した後、ウェスタンブロットによる解析を行った。一次抗体としては抗リン酸化 p38

キナーゼ特異抗体 (Cell signaling technology)、抗 p38 キナーゼ抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 FLAG M2 抗体 (Sigma) および抗 GFP 抗体 (Medical & Biological Laboratories) を用いた。

(8) 免疫共沈法

PlatE 細胞に発現コンストラクトとして PCS-FLAG-TAB1、 HA-TAK1-pEF、 FLAG-Smad6-pcDEF3、 FLAG-Smad7-pcDEF3、 Myc-Smad6-pcDEF3 および Myc-Smad7-pcDEF3 をトランスフェクションし、翌日、上記の可溶化緩衝液で可溶化し、可溶化物を抗 Myc 抗体 (Upstate Biotechnology) および protein A Sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech) と 2 時間、4°C でインキュベートした。その後、上清を lysis buffer で洗浄した後、ビーズに吸着している免疫複合体を SDS-PAGE で分離し、Western-blot による解析を行った。一次抗体としては抗 HA 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 FLAG M2 抗体および抗 Myc 抗体を用いた。

第三章 結果

第一節 BMP 群による未分化神経上皮細胞の系譜制御とその分子機構

(1) 神経上皮細胞における BMP 群とその受容体の発現

BMP 群の中樞神経系発生へ及ぼす作用を調べるため、ここでは胎生 14.5 日目の ICR マウスの終脳から単離した神経上皮細胞をその材料として用いた。この時期の神経上皮細胞は、BMP2 刺激により、その系譜を制御させられることが明らかにされている (Nakashima ら、1999bc; 2001)。しかし、発生期の脳神経系で発現している BMP は BMP2 のみではなく、BMP4 および BMP7 などその発現が示されている (Furuta ら、1997; Ebendal ら、1998)。そこで BMP2 と、BMP4 および BMP7 の作用の比較検討を試みるため、まず神経上皮細胞におけるこれら BMP の発現を RT-PCR で確認した。

その結果、図 2 に示すように、ここで調べた 3 種類の BMP (BMP2、BMP4 および BMP7) すべての発現が実際に確認された。BMP ファミリーのメンバーはさらに、osteogenic protein-1 (OP-1) グループ、BMP2 グループおよび growth differentiation factor-5 グループの 3 つのグループに分類される (Ebendal ら、1998)。ここで調べた 3 種類の BMP のうち、BMP2 と BMP4 は BMP2 グループに属し、BMP7 は OP-1 グループに属するが、その I 型受容体として前者は ALK3 と ALK6 を、後者は ALK2 を主に用いる (ten Dijke ら、1994; Macias-Silva ら、1998)。これら I 型受容体の発現を、上記と同様に RT-PCR

で調べたが、神経上皮細胞において ALK2、ALK3 および ALK6 が発現していることが確認された。また、II 型受容体である BMPR II についてもその発現が認められた。以上のことから、胎生 14.5 日目のマウス終脳由来神経上皮細胞では、BMP2、BMP4 および BMP7 と、それらの受容体コンポーネントが発現していることが確認され、これらの BMP が何らかの作用を発揮する可能性が示唆された。

(2) BMP 群による神経上皮細胞のニューロン分化抑制とアストロサイト分化促進

BMP の神経発生に及ぼす作用の一つとして、胎児期の嗅上皮細胞や成体の脳室周辺細胞のニューロン分化を抑制することが知られている (Shou ら、1999; Lim ら、2000)。胎生 14.5 日目の神経上皮細胞には神経幹細胞をはじめとして未分化な前駆細胞が含まれるが、BMP2 はこれら神経上皮細胞のニューロンへの分化を抑制することが報告されている (Nakashima ら、2001) ことから、BMP4 および BMP7 も同様のニューロン分化抑制能をもつかどうかを調べた。方法としては、神経上皮細胞を各 BMP で 2 時間刺激した後、BMP 非存在下で 2 日間培養し、ニューロンをマーカー蛋白である MAP2 に対する免疫細胞化学染色で検出した。Nakashima ら(2001) の報告に見られるように、BMP2 は神経上皮細胞中の MAP2 陽性細胞の数を著しく減少させた (図 3)。BMP4 および BMP7 の場合も同様の作用が認められ(図 3)、これらここで用いた 3 種類の BMP すべてがニューロン分化抑制能をもつことが明らかにされた。

ニューロン分化抑制能に加え、BMP2 がアストロサイト分化を促進することも報告が成されている (Gross ら、1996)。この現象は IL-6 ファミリーサイトカインの一つ LIF の存在下で相乗的に誘導される (Nakashima ら、1999c)。そこで神経上皮細胞を BMP で 4 時間刺激した後、LIF 存在下で 2 日間培養し、アストロサイトをそのマーカー蛋白である GFAP に対する免疫細胞化学染色で検出した。この系において、BMP2、BMP4 および BMP7 による神経上皮細胞中のアストロサイト数の著しい上昇が認められた (図 4)。以上の結果から、ここで用いた 3 種類の BMP はすべて同様に、ニューロン分化抑制能とアストロサイト分化誘導能をもつことが示された。

(3) BMP 群による神経上皮細胞の系譜転換

IL-6 ファミリーサイトカインの非存在下では、2 日間の BMP2 刺激はアストロサイトの分化を誘導できないが、その刺激の期間を 4 日間ないし 6 日間に延長すると、その間に神経上皮細胞により分泌され、また培養液中に蓄積される内因性の IL-6 ファミリーサイトカインとの協調作用で、BMP2 単独でもアストロサイト分化が誘導されるようになる (Nakashima ら、1999b)。BMP4 および BMP7 の場合も、6 日間の単独刺激により神経上皮細胞のアストロサイト分化が誘導されるかどうかを調べた。図 5 に見られるように、BMP2 同様、BMP4 および BMP7 もまた 6 日間刺激により神経上皮細胞中の GFAP 陽性アストロサイト数の著しい増加を誘導した。この現象は、MAP2 陽性細胞数の著しい減少を伴っていた。過去の報告において、BMP2 が神経上皮細胞の分化の方向を二

ニューロンの系譜からアストロサイトの系譜へと転換することが報告されており (Nakashima ら、2001)、これらの知見と併せると、この結果は BMP2 同様、BMP4 および BMP7 が神経上皮細胞の系譜転換を誘導していることを示唆している。

ニューロン分化においては、Mash1 や Neurogenin といった神経誘導性の塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 因子が重要であることがこれまでに明らかにされている (Kageyama & Nakanishi、1997; Guillemot、1999)。BMP2 は神経誘導性 bHLH 因子の作用を阻害する HLH 因子 (Id1、Id3 および Hes5) の発現を介して、神経上皮細胞の系譜転換を誘導する (Nakashima ら、2001) ことから、BMP による Id1 遺伝子のプロモーター領域の活性化をルシフェラーゼアッセイにより解析した。その結果、BMP2、BMP4 および BMP7 による Id1 遺伝子のプロモーター領域の活性化が認められた (図 6)。また、アストロサイトのマーカー蛋白である GFAP 遺伝子のプロモーターも、BMP2 と同様に、BMP4 および BMP7 によっても活性化されることが見出された (図 6)。この結果から、BMP4 および BMP7 は、BMP2 と同様にその標的遺伝子のプロモーター領域を活性化しうることが確認された。

(4) BMP 群と IL-6 ファミリーサイトカインによる相乗的アストロサイト分化誘導

前述のように、これまで BMP2 が IL-6 ファミリーサイトカインの LIF と協調的に作用して、神経上皮細胞の相乗的なアストロサイト分化を誘導することが

報告されている (Nakashima ら、1999c)。BMP4 もまた同様の作用をもつことが明らかにされている (Nakashima ら、1999b) が、BMP2 グループ以外の BMP や、LIF 以外の IL-6 ファミリーサイトカインによって相乗的なアストロサイト分化が誘導されるかどうかについては、わかっていない。そこで OP-1 グループに属する BMP7 が、IL-6 とともに相乗的なアストロサイト分化を誘導するかどうかを検討した。方法としては、神経上皮細胞をサイトカイン非存在下、ないし BMP7 または IL-6 の単独添加、あるいは BMP7 と IL-6 の同時添加で 2 日間培養し、GFAP に対する免疫細胞化学染色によりアストロサイト分化を検出した。なお、IL-6 刺激の際には、同時に可溶性の IL-6 受容体 (sIL-6R) を添加した。図 7A に見られるように、BMP7 や IL-6 の単独刺激の場合では、サイトカイン非存在下の場合と同様、GFAP 陽性細胞は検出されなかった。しかし、BMP7 と IL-6 の同時刺激では、GFAP 陽性のアストロサイトが認められ、相乗的なアストロサイト分化が誘導されることが示された (図 7A)。

BMP2 と LIF による相乗的なアストロサイト分化においては、それぞれの信号伝達経路の下流で機能する R-Smad (Smad1、Smad 5 および Smad 8) と STAT3 が必須であることが報告されている (Nakashima ら、1999c)。BMP7 と IL-6 による相乗的なアストロサイト分化誘導においても、R-Smad と STAT3 が必須であるかどうかを明らかにするため、R-Smad および STAT3 の機能を抑制した条件下で、BMP7 と IL-6 による GFAP 遺伝子プロモーターの活性化をルシフェラーゼアッセイにより測定した。R-Smad および STAT3 の機能の抑制は、Smad 経路の活性化を阻害する I-Smad の一つ Smad6 および活性化に必須のリン酸化を受けるチロシン残基をフェニルアラニンへ置換した優性抑制型 STAT3 (DN-

STAT3、Minami ら、1996) を神経上皮細胞に導入することで行った。図 7B に見られるように、ベクターのみ (vehicle) を導入した神経上皮細胞では、BMP7 ないし IL-6 の単独刺激の場合でも GFAP 遺伝子プロモーターの活性化が認められたが、BMP7 と IL-6 の同時刺激の場合には、単独の場合よりも著しい相乗的な活性化が認められた。これに対し、Smad6 を導入した神経上皮細胞では、IL-6 単独刺激による GFAP 遺伝子プロモーターの活性化は著しい影響を受けなかったが、BMP7 単独刺激による活性化が著しく減少するとともに、BMP7 と IL-6 の同時刺激による相乗的活性化もまた著しく減少した (図 7B)。DN-STAT3 を導入した神経上皮細胞の場合は、BMP7 ないし IL-6 の単独刺激による GFAP 遺伝子プロモーター領域の活性化も、BMP7 と IL-6 の同時刺激による相乗的活性化も、強く抑制された (図 7B)。この結果から、BMP2 と LIF の場合と同様、BMP7 と IL-6 による相乗的 GFAP 遺伝子プロモーターの活性化には、それぞれの信号伝達経路の下流で機能する転写因子 Smad と STAT3 が必須であることが証明された。

BMP2 と LIF による相乗的アストロサイト分化の分子機構としては、Smad1 と STAT3 が転写共役因子 p300 を介して複合体を形成することで相乗的作用をもたらすことが提唱されている (Nakashima ら、1999c)。先ほどの結果から、BMP7 と IL-6 による相乗的アストロサイト分化にも R-Smad と STAT3 が必須であることが証明されたが、この場合も p300 を介した R-Smad と STAT3 の複合体形成が重要であるかどうかを解析した。p300 はそのアミノ末端側で STAT3 と、カルボキシル末端側で Smad1 と結合し、Smad1-p300-STAT3 複合体の形成を完遂する (Nakashima ら、1999c)。そこで STAT3 ないし Smad1

の一方とのみ結合し、複合体形成を阻害する 2 種類の欠失変異体（それぞれ 1-682 および 1737-2414）を神経上皮細胞に導入し、BMP7 と IL-6 による GFAP 遺伝子プロモーターの活性化を測定した。図 7B と同様に、ベクターのみ（vehicle）を導入した神経上皮細胞では BMP7 と IL-6 の同時刺激による相乗的な GFAP 遺伝子プロモーターの活性化が認められた（図 7C）。しかし p300(1-682) ないし p300(1737-2414) を導入した神経上皮細胞では、BMP7 と IL-6 の同時刺激による相乗的な GFAP 遺伝子プロモーターの活性化は抑制された（図 7C）。以上の結果から、BMP2 と LIF の場合と同様に、BMP7 と IL-6 による相乗的 GFAP 遺伝子プロモーターの活性化、さらにはそれに付随したアストロサイト分化には、R-Smad と STAT3 が必須であり、p300 を介した R-Smad と STAT3 の複合体形成が関与することが示唆された。

(5) アストロサイト分化における BMP 特異的シグナルの必要性

BMP は TGF- β スーパーファミリーに属するが、そのメンバーはすべてその下流の信号伝達経路として Smad 経路を活性化する（Heldin ら、1997）。神経上皮細胞は TGF- β とその受容体コンポーネント（T β R I および T β R II）に加え、その下流で機能する R-Smad（Smad2 および Smad3）を発現する（図 8A）ことから、TGF- β もまた神経上皮細胞のアストロサイト分化を誘導するかどうかを調べた。これまでの報告（Nakashima ら、1999b）および図 4 と同様に、神経上皮細胞を LIF ないし BMP7 で 6 日間刺激した場合、GFAP 陽性のアストロサイトの分化が誘導された（図 8B）。しかし、同一の条件下でも TGF- β では

アストロサイトの分化が認められなかった (図 8B)。BMP 群も TGF- β と同様に下流の転写因子として R-Smad を活性化するが、BMP 群が Smad1、Smad5 および Smad8 を活性化するのに対し、TGF- β は Smad2 および Smad3 を活性化する (Heldin ら、1997)。この知見と、BMP にアストロサイト分化誘導能が認められる一方、TGF- β には認められないという結果から、アストロサイト分化においては BMP 特異的シグナルが必要であることが明らかにされた。

第二節 BMP2 による PC12 細胞の神経様突起伸長機構の解明

(1) BMP2 による PC12 細胞の TAK1-p38 キナーゼ経路依存性神経様突起伸長

中枢神経系の発生における BMP 群の主な機能としてはニューロン分化の抑制とアストロサイト分化の誘導が、これまでの報告 (Gross ら、1996; Lim ら、2000; Nakashima ら、1999bc; 2001) と本研究により明らかにされている。一方、末梢神経系においては、BMP 群は神経堤細胞の神経管からの遊出 (Seldonefeld & Kalcheim, 1999)、神経堤細胞の自律神経への分化誘導 (Shah ら、1996; Reissmann ら、1996; Schneider ら、1999; Morrison ら、1999) や上頸神経節ニューロンの樹状突起伸長 (Lein ら、1995; Guo ら、1998) などニューロンの分化と成熟を促進する作用が主に認められる。そこで次に、BMP 群の末梢神経系における作用とその基盤となる分子機構の解明の一助として、末梢神経分化のモデル細胞である褐色細胞腫由来細胞株 PC12 細胞における

BMP2 の作用と信号伝達経路を解析した。

PC12 細胞は NGF 刺激により神経様突起を伸長することが広く知られているが、BMP2 もまた PC12 細胞の神経様突起伸長を誘導する (Iwasaki ら、1996; 1999)。この現象には MAPK である p38 キナーゼが関与する (Iwasaki ら、1999) ことが報告されているものの、神経様突起伸長を誘導する信号伝達経路や標的遺伝子の詳細は明らかにされていない。そこで、BMP2 刺激により神経様突起の伸長を誘導する信号伝達経路を明らかにすることを試みた。対照溶媒 DMSO 存在下で、PC12 細胞を BMP2 ないし NGF で 6 日間刺激したところ、NGF より効果は弱いものの、BMP2 によっても神経様突起の伸長が認められた (図 9)。しかし、p38 キナーゼ特異的阻害剤の SB203580 の存在下では、NGF によっても神経様突起の伸長が認められたものの、BMP2 によっても認められなかった (図 9)。この結果から、Iwasaki ら (1999) の報告の通り、BMP2 は p38 キナーゼの活性化を介して PC12 細胞の神経様突起伸長を誘導していることが確認された。

BMP2 による PC12 細胞の神経様突起伸長において p38 キナーゼを活性化する MAPKK としては、MKK6 が報告されている (Iwasaki ら、1999) が、その上流の MAPKKK は明らかにされていない。BMP2 の下流で機能する MAPKKK としては TGF- β -activated kinase 1 (TAK1) が知られている (Yamaguchi ら、1995; Kimura ら、2000) ため、BMP2 による PC12 細胞の神経様突起の伸長における TAK1 の関与を調べた。方法としては、図 10A に示したような IRES 配列 と Neo^r をもつレトロウイルスベクター (pMIN) にキナーゼ不活性型 TAK1 (TAK1KN) を挿入したもの (TAK1KN-pMIN) を PC12 細胞に感染させ、ジ

エネティシンでレトロウイルス感染細胞のみを選択した後、BMP2 ないし NGF で 6 日間刺激を行った。その結果、Neof のみを発現している PC12 細胞は NGF および BMP2 により神経様突起の伸長が誘導されたが、TAK1KN を発現している細胞では NGF によっては神経様突起の伸長が認められたものの、BMP2 によっては認められなかった (図 10BC)。なお、TAK1KN の発現の確認はウエスタンブロットによる解析で行った (図 10D)。以上の結果から、BMP2 は TAK1-p38 キナーゼ経路を活性化することにより、PC12 細胞の神経様突起伸長を誘導することが示唆された。

(2) BMP2 による I-Smad の発現誘導

BMP2 による PC12 細胞の神経様突起伸長に関与する信号伝達経路が明らかにされたので、次にこの経路の標的遺伝子を同定することを試みた。前節で触れたように、ニューロン分化においては、Mash1 などの神経誘導性 bHLH 因子が重要であることがこれまでに明らかにされている (Kageyama & Nakanishi, 1997; Guillemot, 1999)。また、NGF 誘導性の神経様突起伸長に関しては、Rho ファミリーの低分子量 GTP 結合蛋白質である Rac1 や Cdc42 が関与していることが報告されている (Lamoureux ら、1997; Daniels ら、1998; Chen ら、1999)。そこで、BMP2 刺激により PC12 細胞においてこれらの遺伝子の発現が誘導されるかどうかを、RT-PCR により調べたが、発現の誘導は認められなかった (data not shown)。従って BMP2 が、Rac1 や Cdc42 の活性化に関与する可能性は残るものの、これらの遺伝子の発現を誘導することで神経様突起の

伸長を誘導する可能性は否定された。

I-Smad (Smad6 および Smad7) は、Smad 経路を阻害する作用をもつ Smad 分子種で、BMP の標的遺伝子であることが知られている。この Smad6 および Smad7 の発現が PC12 細胞においても誘導されるかどうか調べたところ、BMP2 刺激によりその発現がすみやかに誘導された (図 11A)。この発現の誘導は p38 キナーゼ特異的阻害剤の SB203580 の存在下でも認められた (図 11B) ことから、PC12 細胞において BMP2 は Smad 経路を介して I-Smad の発現を誘導することが示された。

(3) PC12 細胞の BMP2 誘導性神経様突起伸長と p38 キナーゼ活性化の I-Smad による抑制

BMP2 刺激により PC12 細胞における I-Smad の発現が誘導されることから、BMP2 誘導性の神経様突起伸長への I-Smad の関与を調べた。PC12 細胞への I-Smad の導入は、図 9 と同様にレトロウイルスベクター (図 12A) を用いて行い、その発現はウェスタンブロットによる解析により確認した (図 12B)。図 12CD に見られるように、Neo^rのみを発現している PC12 細胞は NGF および BMP2 により神経様突起の伸長が誘導された。一方、Smad6 ないし Smad7 を発現している PC12 細胞では、BMP2 による神経様突起の伸長が著しく抑制されていた。NGF 誘導性の神経様突起伸長は Smad6 ないし Smad7 によって抑制されなかったことから、神経様突起伸長の I-Smad による抑制は、BMP2 誘導性のものに特異的であることが示された。

これら結果を受けて、I-Smad が Smad 経路だけでなく、TAK1-p38 キナーゼ経路をも阻害することで、BMP2 誘導性の神経様突起伸長を抑制しているものと仮定した。それを証明するため、I-Smad の過剰発現下での BMP2 による p38 キナーゼの活性化の検出を試みた。I-Smad の導入には、高い感染効率と発現強度をもつアデノウイルスベクターを用いた。具体的な方法としてはアデノウイルスベクターで green fluorescent protein (GFP)、Smad6 ないし Smad7 を導入した PC12 細胞を、BMP2 ないし過酸化水素で刺激した後、溶解させ、ウェスタンブロットによる解析でリン酸化 p38 キナーゼを検出することで、p38 キナーゼの活性化を評価した。コントロールとして GFP を発現させた PC12 細胞では、BMP2 および過酸化水素によって p38 キナーゼの活性化が認められた(図 13)。しかし、Smad6 ないし Smad7 を発現させた PC12 細胞では、BMP2 による p38 キナーゼの活性化が抑制されていた。過酸化水素による p38 キナーゼの活性化は Smad6 および Smad7 の発現による影響を受けなかったことから、Smad6 および Smad7 の作用は BMP2 誘導性の p38 キナーゼ活性化に特異的なものであると考えられる。BMP2 誘導性の神経様突起伸長における p38 キナーゼの必要性(図 9 および Iwasaki ら、1999) から考察して、以上の結果は I-Smad が p38 キナーゼの活性化を抑制し、さらには神経様突起の伸長を抑制することが示唆していると思われる。

(4) I-Smad と TAK1-TAB1 複合体の結合

マウスハイブリドーマ MH60 細胞において、BMP2 は TAK1 を介してアポト

ーシスを誘導するが、Smad6 の導入により TAK1 伝達性のアポトーシスが阻害されることが報告されている (Kimura ら、2000)。その分子機構として、Smad6 が TAK1 と物理的に結合することにより TAK1 の活性化を阻害することが証明されているため、Smad7 もまた Smad6 と同様に TAK1 と結合するかどうかを調べた。方法としては PlatE 細胞中で HA 標識した TAK1 と FLAG 標識した Smad6 ないし Smad7 を発現させ、抗 HA 抗体で免疫沈降を行い、免疫沈降物を抗 FLAG 抗体で解析する免疫共沈法で行った。その結果、Kimura ら、(2000) の報告に見られるように、Smad6 は TAK1 との結合が認められた (図 14A)。一方、Smad7 は TAK1 と結合しなかった (図 14A)。TAK1 はアダプター蛋白の TAK1 binding protein 1 (TAB1) と複合体を形成することにより活性を制御されている (Shibuya ら、1996) ため、次に Smad6 および Smad7 と TAB1 の結合を調べた。方法としては TAK1 と同様に、FLAG 標識した TAB1 と Myc 標識した Smad6 ないし Smad7 を発現させ、免疫共沈法により解析した。図 14B に見られるように、Smad6 は TAK1 に加え、TAB1 とも結合した。さらに Smad7 もまた TAB1 と結合することが認められた。以上の結果から I-Smad による TAK1-p38 キナーゼ経路の抑制は、おそらく I-Smad と TAK1-TAB1 複合体の結合によるものであることが示唆された。

第四章 考察

第一節 BMP 群による未分化神経上皮細胞の系譜制御とその分子機構

本研究は BMP の神経発生における機能と、その基盤となる信号伝達経路や転写因子などの分子機構を解明することを目的としており、まず中枢神経系における機能を対象として解析を行った。胎児期の神経上皮には未分化な細胞が多く含まれ、これらの細胞は BMP2 刺激によりその系譜を制御されることが明らかにされている (Nakashima ら、1999bc; 2001)。しかし、発生期の脳神経系で発現している BMP は BMP2 のみではなく (Furuta ら、1997; Ebendal ら、1998)、BMP2、BMP4 および BMP7 とその I 型受容体コンポーネント (ALK2、ALK3 および ALK6) および II 型受容体コンポーネント (BMPRII) の発現が神経上皮細胞において認められたことから、これら 3 種類の BMP が神経上皮細胞へ及ぼす作用を比較検討した。

BMP 群の神経発生に及ぼす作用として、ニューロン分化の抑制が知られている (Shou ら、1999; Lim ら、2000) が、マウス胎仔未分化神経上皮細胞中のニューロン前駆細胞もまた、BMP2 の作用を受け、ニューロン分化が抑制されることが報告されている (Nakashima ら、2001)。BMP4 および BMP7 のニューロン分化抑制能を調べたところ、これらの BMP も BMP2 と同様のニューロン分化抑制能をもつことが明らかにされた。BMP2 のニューロン分化抑制能は、神経誘導性 bHLH 因子の作用を阻害する HLH 因子 Id1、Id3 および Hes5 の発現誘導を介して発揮される (Nakashima ら、2001)。BMP4 および BMP7 による Id1 遺伝子プロモ-

ターの活性化をルシフェラーゼアッセイにより測定したところ、BMP2 と同程度の活性化誘導が検出された。BMP2 および BMP4 が BMP サブファミリー内の BMP2 グループに属するのに対し、BMP7 は OP-1 グループに属する (Ebendal ら、1998) が、ここで用いた 3 種類の BMP はすべて下流の R-Smad として Smad1、Smad5 および Smad8 を活性化することで標的遺伝子の発現を誘導する。したがって、本研究では Id1 遺伝子のプロモーターのみについてしか活性化を確認していないが、BMP4 および BMP7 が BMP2 と同様の転写因子を活性化することから、BMP4 と BMP7 は Id1 に加え Id3 および Hes5 の発現も誘導し、これによりニューロン分化抑制能を発揮していることが予測される。また、BMP2 には IL-6 ファミリーサイトカインと協調してアストロサイト分化を誘導する作用もある (Nakashima ら、1999c) が、BMP4 および BMP7 もまた BMP2 同様、IL-6 ファミリーサイトカインと協調してのアストロサイト分化誘導能をもつことが確認された。BMP2 はアストロサイト分化誘導に付随してアストロサイトのマーカーである GFAP 遺伝子のプロモーターを活性化するが、BMP4 および BMP7 刺激によってもプロモーターの活性化が誘導された。Nakashima ら (2001) によると、BMP2 は神経上皮細胞の分化の方向をニューロンの系譜からアストロサイトの系譜へと転換すると報告されており、この報告と併せると、BMP2、BMP4 および BMP7 はすべてニューロン分化抑制能とアストロサイト分化誘導能、さらには細胞系譜転換能を保持していることが示唆され、これら 3 種類の BMP が同様の作用を示すことが提唱される。したがって、発生段階の脳神経においてこれらの BMP のいずれもが中枢神経細胞の系譜を制御している可能性があり、実際の生体内における中枢神経細胞の系譜制御への関与は BMP の時間的および空間的発現パターンによって決定

されることが考察される。

BMP2 は IL-6 ファミリーサイトカインの LIF と協調的に作用して神経上皮細胞のアストロサイト分化を誘導する (Nakashima ら、1999c) ことが知られてきていたが、この相乗的なアストロサイトへの分化は BMP2 と LIF だけでなく、BMP7 と IL-6 によっても誘導されることが本研究において証明された。BMP7 は BMP2 や BMP4 と同じく BMP サブファミリーに属するが、BMP2 および BMP4 が BMP サブファミリー内の BMP2 グループに属するのに対し、BMP7 は OP-1 グループに属している (Ebendal ら、1998)。また LIF と IL-6 はどちらも細胞膜上の信号伝達物質である gp130 を活性化するが、LIF が LIF 受容体と gp130 のヘテロ二量体の形成を誘導するのに対し、IL-6 は gp130 のホモ二量体の形成を誘導することで、細胞内へ信号を伝達する (Taga、1996; Taga & Kishimoto、1997)。こういった相違点にもかかわらず、BMP7 と IL-6 が、BMP2 と LIF の場合と同様の相乗的なアストロサイト分化を誘導しうることから、相乗的なアストロサイト分化誘導は BMP2 と LIF の組み合わせに特異的な作用ではなく、BMP サブファミリーと IL-6 ファミリーに属するサイトカインに共通の作用であることが提唱される。最近になり、LIF と IL-6 以外の IL-6 ファミリーサイトカインであるカルジオトロフィン-1 も BMP2 と共に相乗的なアストロサイト分化を誘導することが報告されており (Ochiai ら、2001)、相乗的なアストロサイト分化が BMP サブファミリーと IL-6 ファミリーに属するサイトカインによる共通の作用であるという概念はこのことから支持される。

BMP2 と LIF による相乗的なアストロサイト分化誘導の分子機構としては、転写共役因子 p300 を介した R-Smad と STAT3 の複合体形成と、それによる標的遺

伝子の相乗的な発現の誘導が報告されている (Nakashima ら、1999c)。BMP7 と IL-6 による相乗的アストロサイト分化誘導における R-Smad-p300-STAT3 複合体形成の関与を GFAP 遺伝子プロモーターの活性化を測定することで評価したところ、BMP7 と IL-6 による相乗的な GFAP 遺伝子プロモーター領域の活性化は優性抑制型の STAT3、Smad6 および p300 欠失変異体の導入により抑制され、BMP7 と IL-6 の場合においても Smad-p300-STAT3 複合体形成が必須であることが示唆された。先ほど述べたように LIF は LIF 受容体と gp130 のヘテロ二量体の形成を誘導するのに対し、IL-6 は gp130 のホモ二量体の形成を誘導するという異なった様式をとるが、どちらも下流の転写因子としては STAT3 を活性化する (Taga、1996; Taga & Kishimoto、1997)。BMP に関しては、BMP2 と BMP7 は異なるグループに属するものの、どちらも下流の転写因子としては Smad1、Smad5 および Smad8 を活性化する (Heldin ら、1997; Ebendal ら、1998)。一方、BMP 刺激によるものとは異なる R-Smad 分子種 (Smad2 および Smad3) を活性化する TGF- β はアストロサイト分化を誘導できないことが本研究において見出されており、これらの結果からアストロサイトの分化誘導に関しては、BMP 群および IL-6 ファミリーサイトカインにそれぞれ特異的な下流の転写因子である R-Smad (Smad1、Smad5 および Smad8) および STAT3 の活性化と、それらの p300 を介した複合体形成が重要であることが考察される。

以上の結果をまとめると、BMP サブファミリーに属するサイトカインは未分化神経上皮細胞に作用して、ニューロン分化を抑制するとともに、IL-6 ファミリーサイトカインと協調してアストロサイト分化を誘導し、その細胞系譜をニューロン性からアストロサイト性へと転換することが明らかにされた。BMP による神経

上皮細胞の系譜制御機構のモデル図を図 15 に示した。

第二節 BMP2 による PC12 細胞の神経様突起伸長機構の解明

これまでに BMP2 が PC12 細胞の神経様突起伸長を誘導することが報告されていた (Iwasaki ら、1996; 1999) が、本研究ではこの現象が TAK1-p38 キナーゼ経路を介していることが明らかにされた。BMP2 刺激により発現が誘導される遺伝子としては I-Smad の Smad6 および Smad7 が見出された。BMP2 の下流の信号伝達経路としては Smad 経路 (Heldin ら、1997) と TAK1-p38 キナーゼ経路 (Yamaguchi ら、1999; Kimura ら、2000) が報告されているが、I-Smad は Smad 経路の特異的な阻害蛋白として知られている。転写因子と MAPK 経路を活性化するサイトカインとしては BMP の他に IL-6 ファミリーサイトカインがあげられる (Taga & Kishimoto、1997)。IL-6 もまた MAPK 経路を介して NGF 処理した PC12 細胞の神経様突起伸長を促進するが、下流の転写因子である STAT3 は MAPK 経路活性化によって惹起される神経様突起伸長を抑制する作用をもつことが報告されている (Ihara ら、1997)。これに類して、「BMP2 による神経様突起伸長は下流の転写因子 R-Smad により抑制されているが、BMP2 により発現が誘導された I-Smad が Smad 経路を阻害することで TAK1-p38 キナーゼ経路の活性化が増強され、さらには神経突起の伸張が促進される」という分子機構を仮定した。しかしこの仮定とは逆に、BMP2 誘導性の神経様突起伸長は、I-Smad の導入により著しく抑制された。BMP2 刺激による p38 キナーゼの活性化もまた I-Smad の強制発現により抑制されたことから、この BMP2 誘導性の神経様突起伸

長に対する I-Smad の効果は、TAK1-p38 キナーゼ経路の阻害を介していることが示唆された。I-Smad は Smad 経路の特異的阻害蛋白であると考えられてきた (Heldin ら、1997) が、今回の結果は I-Smad の TAK1- p38 キナーゼの阻害蛋白としての側面を示すものである。これに加え近年、I-Smad が TGF- β ないし BMP の受容体と E3 ユビキチンリガーゼ Smurf の結合を仲介し、受容体の分解を促進することで、TGF- β ないし BMP の信号伝達を阻害するという知見も報告されている (Kavsak ら、2000; Ebisawa ら、2001)。PC12 細胞においては I-Smad の導入による BMP 受容体タンパク質量の減少は認められなかったものの、I-Smad がいくつかの機構を介して、TGF- β スーパーファミリーに属するサイトカインの信号伝達系全般を抑制的に制御する蛋白であることが示唆される。ここで提唱された I-Smad による BMP 信号伝達経路の抑制機構のモデル図を図 16 に示す。

上記のように本研究において、I-Smad が TAK1-p38 キナーゼ経路を抑制することを示したが、さらに I-Smad が TAK1-TAB1 複合体に結合することも見出された。この I-Smad と TAK1-TAB1 複合体の結合から、I-Smad による TAK1-p38 キナーゼ経路の抑制をもたらす分子機構がいくつか推察される。まず、TGF- β 受容体や BMP 受容体の場合にみられる (Kavsak ら、2000; Ebisawa ら、2001) ように、I-Smad が TAK1-TAB1 複合体と E3 ユビキチンリガーゼの Smurf の結合を仲介することで、TAK1-TAB1 複合体の分解を促進し、下流の信号伝達を抑制するという機構が考えられる。次に I-Smad が TAK1 ないし TAB1 に結合することで、TAK1-TAB1 複合体の形成を阻害するという機構があげられる。しかし、I-Smad の過剰発現下においても、BMP 受容体の減少や TAK1-TAB1 複合体の形成阻害は認められなかった (data not shown)。Kimura ら (2000) は Smad6

が TAK1 と結合し、TAK1 の活性化を阻害することを見出したが、その分子機構として、Smad6 が TAK1 の触媒領域をマスキングすることやコンフォメーションを変化させることにより TAK1 の活性を阻害することを考察している。PC12 細胞においても、I-Smad が同様の分子機構により TAK1-p38 キナーゼ経路を阻害していることが予測される。

PC12 細胞において BMP2 刺激により I-Smad の発現が誘導されることが見出されたが、この現象は p38 キナーゼ特異的阻害剤の存在下でも認められたことから、Smad 経路を介していることが示された。これまでに、BMP 刺激により I-Smad の発現が誘導され、その I-Smad が活性化されている Smad 経路を阻害するというネガティブフィードバック機構の存在が報告されている (Afrakhte ら、1998; Takase ら、1998)。しかし、前述のように I-Smad は Smad 経路だけでなく BMP 信号伝達全般を抑制することが明らかにされたため、このネガティブフィードバック機構が Smad 経路だけでなく BMP 信号伝達全般に対して機能していることが示唆される。本研究および Iwasaki ら (1996) の報告において、BMP2 により神経突起伸長を誘導される PC12 細胞の出現頻度は、NGF によるものよりも小さいことが認められている。この BMP2 の神経様突起伸長誘導能の低さは、BMP2 により発現が誘導された I-Smad が TAK1-p38 キナーゼ経路を抑制するネガティブフィードバック機構が原因である可能性がある。また、Hayashi ら (2001) は、本研究および Iwasaki ら (1996) の報告と異なり、BMP2 単独刺激では PC12 細胞の神経様突起伸長が誘導されないと報告している。Hayashi ら (2001) は BMP2 刺激を 3 日間ないし 4 日間で行っているが、本研究では 6 日間で行っており、この比較的長い刺激期間により神経様突起の伸長が誘導されうると考えられる。こ

のように BMP2 による神経様突起伸長において比較的長い刺激期間が必要とされるのは、ネガティブフィードバック機構のため TAK1-p38 キナーゼ経路が抑制されていることによるのかもしれない。

これまでのところ、生体内での生理的条件下において、本研究により明らかにされた I-Smad の BMP 信号伝達全体に対する抑制作用は見出されていない。しかし、上頸神経節ニューロンの樹状突起伸長が BMP (BMP2、BMP6 および BMP7) により促進されることが報告されている (Lein ら、1995; Guo ら、1998)。この現象と BMP2 誘導性の神経様突起伸長の類似性から、BMP2 誘導性の上頸神経節ニューロンの樹状突起伸長もまた TAK1-p38 キナーゼ経路を介しており、I-Smad の発現誘導によるネガティブフィードバック機構が存在している可能性も示唆される。

結語

脳・神経系は、多分化能と自己複製能をもつ一種類の細胞、神経幹細胞 (McKay, 1997; Temple & Alvarez-Buylla, 1999; Gage, 2000) から生み出されたニューロンやグリア細胞 (アストロサイトやオリゴデンドロサイト) などの多細胞群が、発生過程において緻密に連携することによりその形態や機能の形成が完遂される。神経幹細胞の細胞系譜の決定は、細胞内在性のプログラムに加え、外来性の刺激により制御されていると考えられている。BMP はそれら外来性の刺激の 1 つであり、神経発生において様々な機能を持つことが知られている。本研究では、BMP の神経発生に及ぼす作用の分子機構を解明する一助として、①BMP による未分化神経上皮細胞の系譜制御とその分子機構の比較検討、および②BMP2 による PC12 細胞の神経様突起伸長機構の解明を試みた。

その結果を概略すると、まず①BMP による未分化神経上皮細胞の系譜制御とその分子機構の比較検討については、

1. BMP 群 (BMP2、BMP4 および BMP7) は等しく、神経上皮細胞のニューロン分化抑制能を保持する
2. BMP 群は IL-6 ファミリーサイトカインと協調してアストロサイト分化を誘導する

ことが見出された。これまで神経上皮細胞に対するニューロン分化抑制能とアストロサイト分化誘導能は、BMP2 が有する機能と認識されてきたが、本研究によりこれらニューロン分化抑制能およびアストロサイト分化誘導能が、広く BMP サブファミリーに属するサイトカイン全般に保持されるものであることが明らかにされた。

したがって、実際の発生段階における脳神経中枢神経細胞の系譜制御への関与はこれら個々の BMP の時間的および空間的発現パターンによって決定されることが考察される。また、BMP 群の属する TGF- β スーパーファミリーサイトカインの一つ、TGF- β にはこれらの作用が認められないため、以上の作用は BMP 群に特異的なものであると考えられる。

次に②BMP2 による PC12 細胞の神経様突起伸長機構の解明については

1. BMP2 は TAK1-p38 キナーゼ経路を介して PC12 細胞に神経様突起伸長を誘導する
2. BMP2 は I-Smad 発現を速やかに誘導する
3. I-Smad は BMP2 による TAK1-p38 キナーゼ経路の活性化さらには神経様突起伸長を抑制する

ことが確認された。これまで I-Smad は Smad 経路特異的な阻害蛋白として知られてきたが、本研究の結果は、Smad 経路のみならず TAK1-p38 経路をも含めた BMP 信号伝達経路全体に対する I-Smad の阻害蛋白としての機能を示している。さらに BMP2 が I-Smad の発現を誘導することから、PC12 細胞において BMP 信号伝達に対するネガティブフィードバック機構が機能することも示唆された。I-Smad による TAK1-p38 キナーゼ経路抑制の分子機構の詳細は明らかではないが、I-Smad が TAK1-TAB1 複合体と結合することから、I-Smad が TAK1 の触媒領域をマスキングすることや TAK1-TAB1 複合体のコンフォメーションを変化させることによりその活性を阻害することが推察される。

BMP は神経発生において幅広い作用を示すことが知られているが、それらは現象の提示にとどまるものが多い。神経幹細胞は近年、その生物学分野における基礎的

な面に加え、パーキンソン病治療などの難治性神経疾患への臨床応用面からも注目を集めているが、BMP の作用機構の解明は神経幹細胞の系譜制御の点からも非常に重要である。特に臨床応用面においては移植した神経幹細胞をグリア細胞ではなくニューロンに分化させる必要性があるが、今回見出された中枢神経系未分化神経上皮細胞に対する BMP のニューロン分化抑制能を BMP の機能を阻害する分泌蛋白 (Noggin、Chordin や Follistatin) で阻害することにより、効率の良いニューロン分化を誘導できる可能性もある。しかし、BMP の神経発生における作用機構については詳細が解明されているとは未だ言いがたい。例をあげると、BMP は中枢神経系の神経発生を抑制するのに対し、末梢神経系では神経発生 (分化から成熟まで) を誘導するが、この差異がいかなる機構によりもたらされるかについては全くわかっていない。本研究は中枢神経系および末梢神経系における BMP の作用機構の解明を目的として前述のような知見を得たが、こうした研究により BMP の神経発生における作用とその分子機構の解明が今後さらに進展することが期待される。

引用文献

Afrakhte, M., Moren, A., Jossan, S., Itoh, S., Sampath, K., Westermark, B., Heldin, C. H., Heldin, N. E. & ten Dijke, P. (1998) Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF- β family members. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 505-511.

Chen, X. Q., Tan, I., Leung, T. & Lim, L. (1999) The myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase is involved in the regulation of neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 274, 19901-19905.

Daniels, R. H., Hall, P. S. & Bokoch, G. M. (1998) Membrane targeting of p21-activated kinase 1 (PAK1) induces neurite outgrowth from PC12 cells. *EMBO J.* 17, 754-764.

Ebendal, T., Bengtsson, H. & Soderstrom, S. (1998) Bone morphogenetic proteins and their receptors: potential functions in the brain. *J. Neurosci. Res.* 51, 139-146.

Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T. & Miyazono, K. (2001) Smurf1 interacts with transforming growth factor- β type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J. Biol. Chem.* 276,

12477-12480.

Guillemot, F. (1999) Vertebrate bHLH genes and the differentiation of neuronal fates. *Exp. Cell Res.* 253, 357-364.

Furuta, Y., Piston, D. W. & Hogan, B. L. (1997) Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. *Development* 124, 2203-2212.

Gage, F. H. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287,1433-1438.

Gross, R. E., Mehler, M. F., Mabie, P. C., Zang, Z., Santschi, L. & Kessler, J. A. (1996) Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* 17, 595-606.

Guo, X., Rueger, D. & Higgins, D. (1998) Osteogenic protein-1 and related bone morphogenetic proteins regulate dendritic growth and the expression of microtubule-associated protein-2 in rat sympathetic neurons. *Neurosci. Lett.* 245,131-134.

Hayashi, H., Ishisaki, A., Suzuki, M. & Imamura, T. (2001) BMP-2 augments FGF-induced differentiation of PC12 cells through upregulation of FGF receptor-1

expression. *J. Cell. Sci.* 114,1387-1395.

Heldin, C. H., Miyazono, K. & ten Dijke, P. (1997) TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465-471.

Ihara, S., Nakajima, K., Fukada, T., Hibi, M., Nagata, S., Hirano, T. & Fukui, Y. (1997) Dual control of neurite outgrowth by STAT3 and MAP kinase in PC12 cells stimulated with interleukin-6. *EMBO J.* 16, 5345-5352.

Iwasaki, S., Hattori, A., Sato, M., Tsujimoto, M. & Kohno, M. (1996) Characterization of the bone morphogenetic protein-2 as a neurotrophic factor. Induction of neuronal differentiation of PC12 cells in the absence of mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* 271, 17360-17365.

Iwasaki, S., Iguchi, M., Watanabe, K., Hoshino, R., Tsujimoto, M. & Kohno, M. (1999) Specific activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway and induction of neurite outgrowth in PC12 cells by bone morphogenetic protein-2. *J. Biol. Chem.* 274, 26503-26510.

Kageyama, R. & Nakanishi, S. (1997) Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 659-665.

Kavsak, P., Rasmussen, R. K., Causing, C. G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G. H. & Wrana J. L. (2000) Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF β receptor for degradation. *Mol. Cell.* 6, 1365-1375.

Kimura, N., Matsuo, R., Shibuya, H., Nakashima, K. & Taga, T. (2000) BMP2-induced apoptosis is mediated by activation of the TAK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6. *J. Biol. Chem.* 275, 17647-17652.

Lamoureux, P., Altun-Gultekin, Z. F., Lin, C., Wagner, J. A. & Heidemann, S. R. (1997) Rac is required for growth cone function but not neurite assembly. *J. Cell. Sci.* 110, 635-641.

Lein, P., Johnson, M., Guo, X., Rueger, D. & Higgins, D. (1995) Osteogenic protein-1 induces dendritic growth in rat sympathetic neurons. *Neuron* 15, 597-605.

Lim, D. A., Tramontin, A. D., Trevejo, J. M., Herrera, D. G., Garcia-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. (2000) Noggin Antagonizes BMP Signaling to Create a Niche for Adult Neurogenesis. *Neuron* 28, 713-726.

Macias-Silva, M., Hoodless, P. A., Tang, S. J., Buchwald, M. & Wrana, J.L. (1998)

Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J. Biol. Chem.* 273, 25628-25636.

McKay, R. (1997) Stem cells in the central nervous system. *Science* 276, 66-71.

Minami, M., Inoue, M., Wei, S., Takeda, K., Matsumoto, M., Kishimoto, T. & Akira, S. (1996) STAT3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93, 3963-3966.

Morita, S., Kojima, T. & Kitamura, T. (2000) Plate-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Therapy* 7, 1063-1066.

Morrison, S. J., White, P. M., Zock, C. & Anderson, D. J. (1999) Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* 96, 737-749.

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

Nakashima, K., Wiese, S., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Yoshida, K., Kishimoto, T., Sendtner, M., & Taga, T. (1999a) Developmental requirement of gp130 signaling in neuronal survival and astrocyte differentiation. *J. Neurosci.* 19, 5429-5434.

Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H. & Taga, T. (1999b) Astrocyte differentiation mediated by LIF in cooperation with BMP2. *FEBS Lett.* 457, 43-46.

Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K. & Taga, T. (1999c) Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* 284, 479-482

Ochiai, W., Yanagisawa, M., Takizawa, T., Nakashima, K. & Taga, T. (2001) Astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells involving cardiotrophin-1-induced activation of STAT3. *Cytokine* 14: 264-271.

Reissmann, E., Ernsberger, U., Francis-West, P. H., Rueger, D., Brickell, P. M. & Rohrer, H. (1996) Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in

developing sympathetic neurons. *Development* 122, 2079-2088.3.

Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K. & Ichijo, H. (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* 17, 2596-2606.

Schneider, C., Wicht, H., Enderich, J., Wegner, M. & Rohrer, H. (1999) Bone morphogenetic proteins are required in vivo for the generation of sympathetic neurons. *Neuron* 24, 861-870.

Sela-Donenfeld, D. & Kalcheim, C. (1999) Regulation of the onset of neural crest migration by coordinated activity of BMP4 and Noggin in the dorsal neural tube. *Development* 126, 4749-4762.

Shah, N. M., Groves, A. K. & Anderson, D. J. (1996) Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGF β superfamily members. *Cell* 85, 331-34

Shibuya, H., Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Tonegawa, A., Gotoh, Y., Ueno, N., Irie, K., Nishida, E. and Matsumoto, K. (1996) TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF- β signal transduction. *Science* 272, 1179-1182.

Shou, J., Rim, P. C. & Calof, A. L. (1999) BMPs inhibit neurogenesis by a mechanism involving degradation of a transcription factor. *Nat. Neurosci.* 2, 339-345.

Stemple, D. L. & Anderson, D. J. (1992) Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* 71, 973-985.

Taga, T. (1996) Gp130, a shared signal transducing receptor component for hematopoietic and neuropoietic cytokines. *J. Neurochem.* 67, 1-10.

Taga, T. & Kishimoto, T. (1997) Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 797-819.

Takase, M., Imamura, T., Sampath, T. K., Takeda, K., Ichijo, H., Miyazono, K. & Kawabata, M. (1998) Induction of Smad6 mRNA by bone morphogenetic proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 26-29.

Temple, S & Alvarez-Buylla, A. (1999) Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9,135-141.

ten Dijke, P., Yamashita, H., Sampath, T. K., Reddi, A. H., Estevez, M., Riddle, D. L., Ichijo, H., Heldin, C. H. & Miyazono, K. (1994) Identification of type I

receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J. Biol. Chem.* 269, 16985-16988.

Yamaguchi, K., Nagai, S., Ninomiya-Tsuji, J., Nishita, M., Tamai, K., Irie, K., Ueno, N., Nishida, E., Shibuya, H. & Matsumoto, K. (1999) XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J.* 18, 179-187.

Yanagisawa, M., Nakashima, K., Arakawa, H., Ikenaka, K., Yoshida, K., Kishimoto, T., Hisatsune, T. & Taga, T. (2000) Astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells by interleukin-11 via activation of a common cytokine signal transducer, gp130, and a transcription factor, STAT3. *J. Neurochem.* 74,1498-1504.

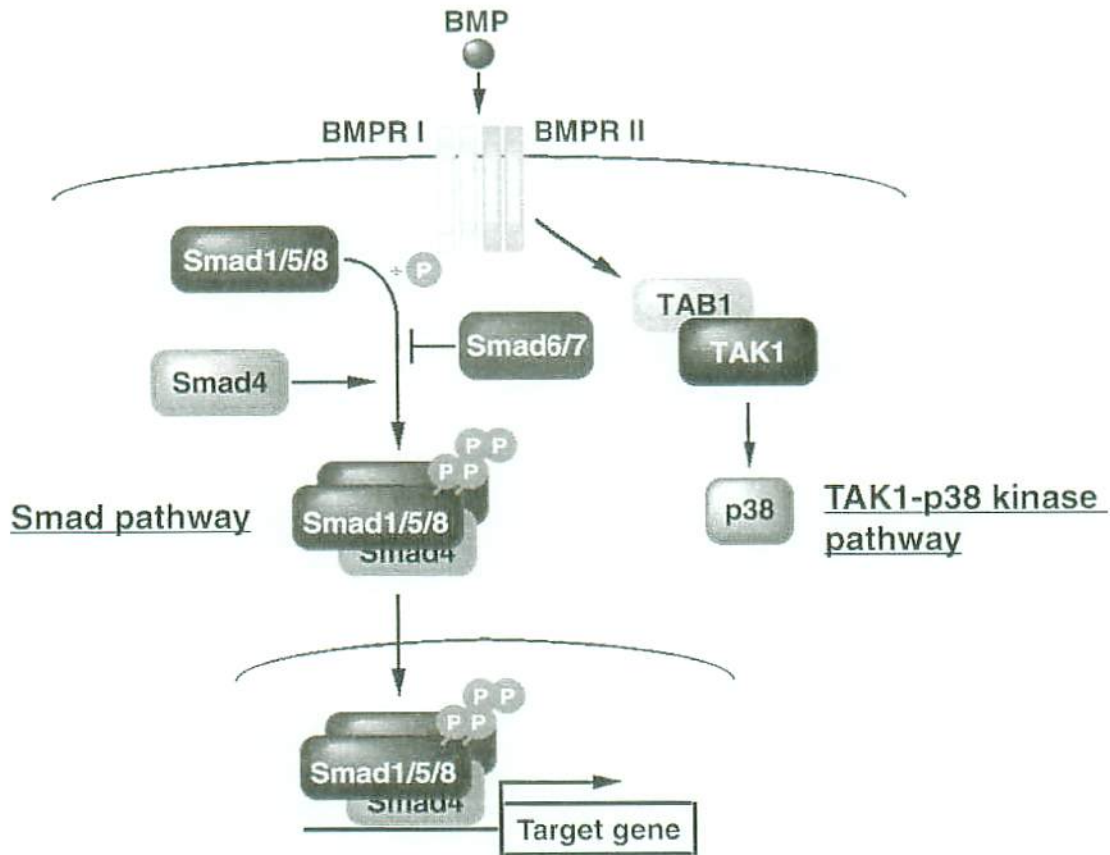
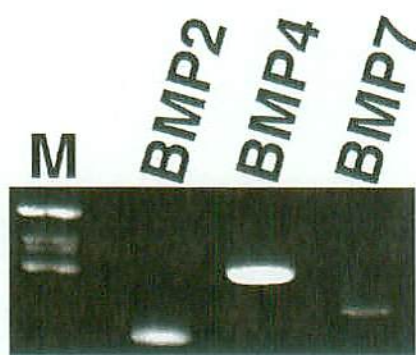


図1 BMPの信号伝達経路

BMPはその受容体複合体の活性化を介して、転写因子R-Smad (Smad1、Smad5およびSmad8) を活性化する。活性化されたR-SmadはCo-Smad (Smad4) と複合体を形成後、核内へ移行し標的遺伝子の発現を誘導する。この経路をSmad経路 (Smad pathway) と呼ぶ。I-Smad (Smad6およびSmad7) は、この経路を阻害するSmad分子種である。BMP下流の信号伝達経路としてはMAPKの一つであるp38キナーゼを活性化するTAK1-p38キナーゼ経路 (TAK1-p38 kinase pathway) も存在する。

BMPs



BMPR I & II



図2 未分化神経上皮細胞におけるBMPとそのI型受容体の発現

未分化神経上皮細胞におけるBMP（BMP2、BMP4およびBMP7）とそのI型受容体（ALK2、ALK3およびALK6）およびII型受容体（BMPR II）の発現をRT-PCRにより検出した。Mは分子量マーカを示す。

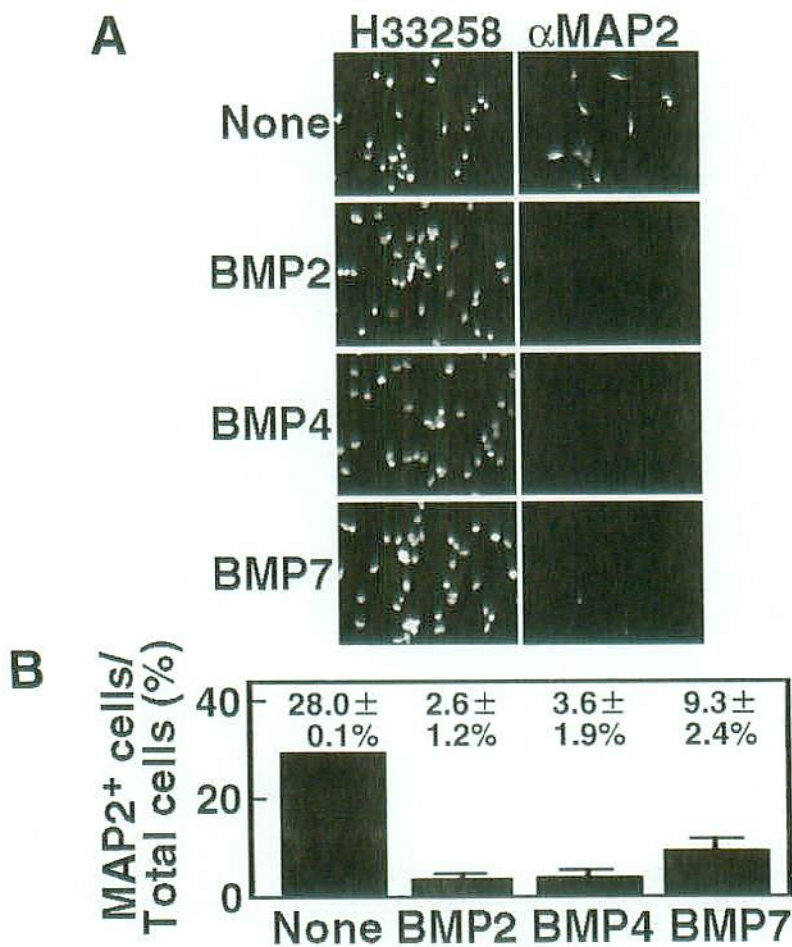


図3 BMPによる神経上皮細胞のニューロン分化抑制

(A) 神経上皮細胞を各BMPで4時間刺激した後、サイトカイン非存在下で2日間培養し、抗MAP2抗体を用いた免疫細胞化学染色を行った(右側)。左側にはH33258による核染色の結果を示した。

(B) 全細胞中に占めるMAP2陽性細胞の割合を示した。

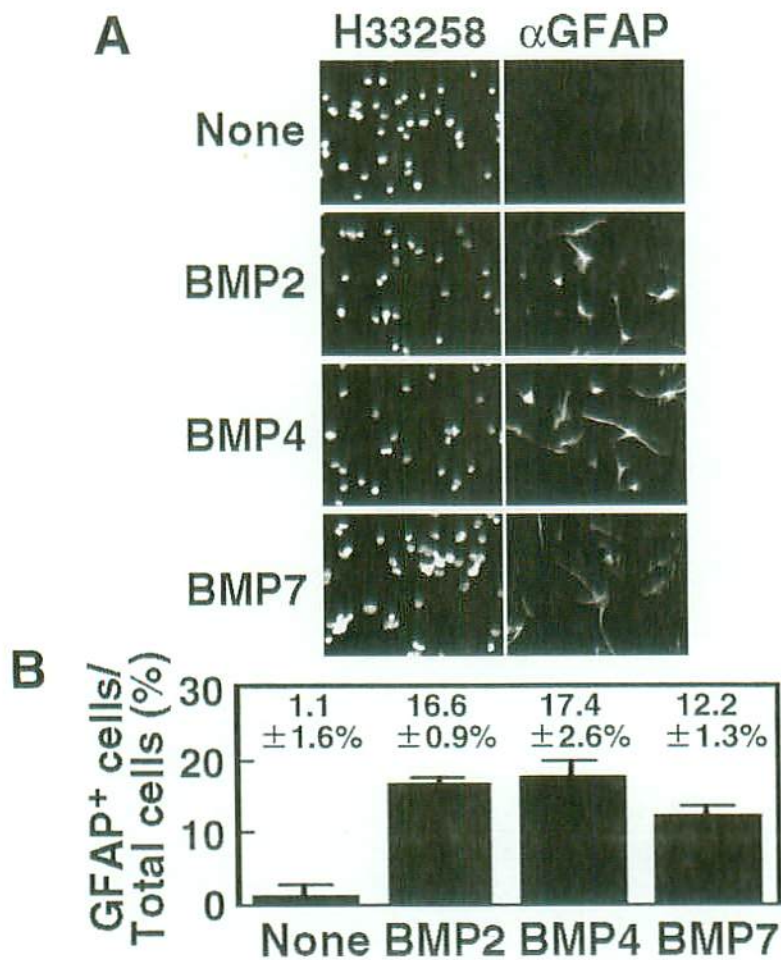


図4 BMPによる神経上皮細胞のアストロサイト分化誘導

(A) 神経上皮細胞を各BMPで4時間刺激した後、LIF存在下で2日間培養し、抗GFAP抗体を用いた免疫細胞化学染色を行った（右側）。左側にはH33258による核染色の結果を示した。（B）全細胞中に占めるGFAP陽性細胞の割合を示した。

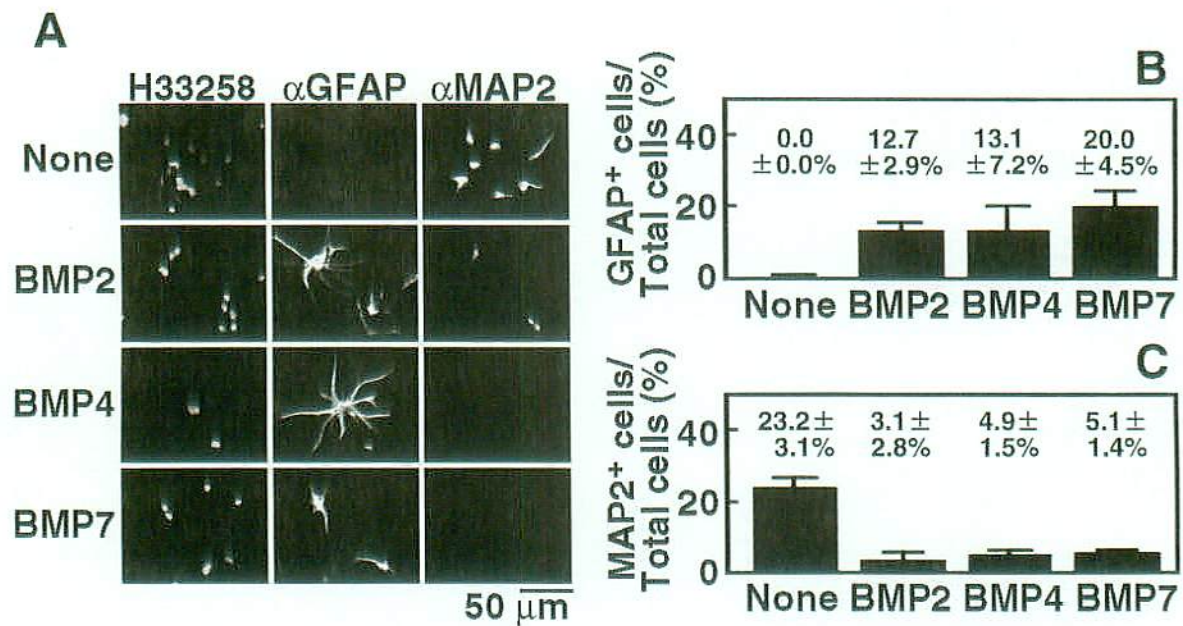


図5 BMPによる神経上皮細胞の分化転換

(A) 神経上皮細胞を各BMPで6日間刺激した後、H22358、抗MAP2抗体および抗GFAP抗体を用いた三重染色を行った。全細胞中に占めるMAP2陽性細胞の割合を(B)に、GFAP陽性細胞の割合を(C)に示した。

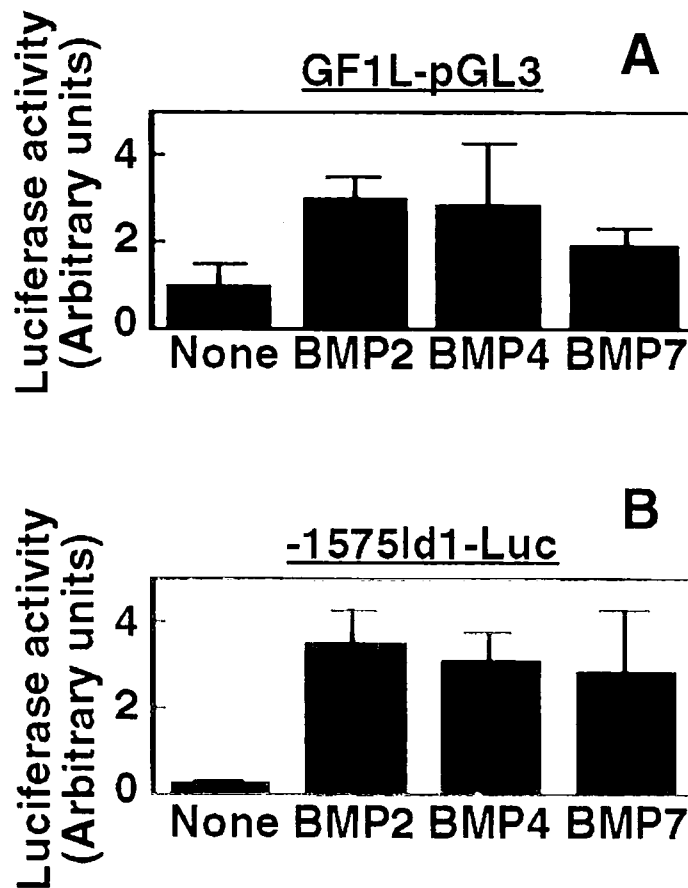


図6 BMPによるGFAP遺伝子およびId1 遺伝子プロモーター活性化

BMPによるGFAP遺伝子およびId1 遺伝子の発現誘導を評価するため、神経上皮細胞に (A) GFAP遺伝子および (B) Id1 遺伝子のレポーターコンストラクト (それぞれGF1L-pGL3および-1575Id1-Luc) をトランスフェクションし、各BMPで8時間刺激した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

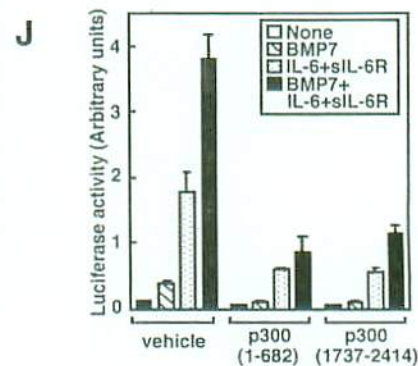
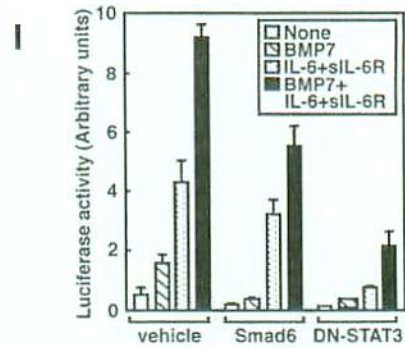
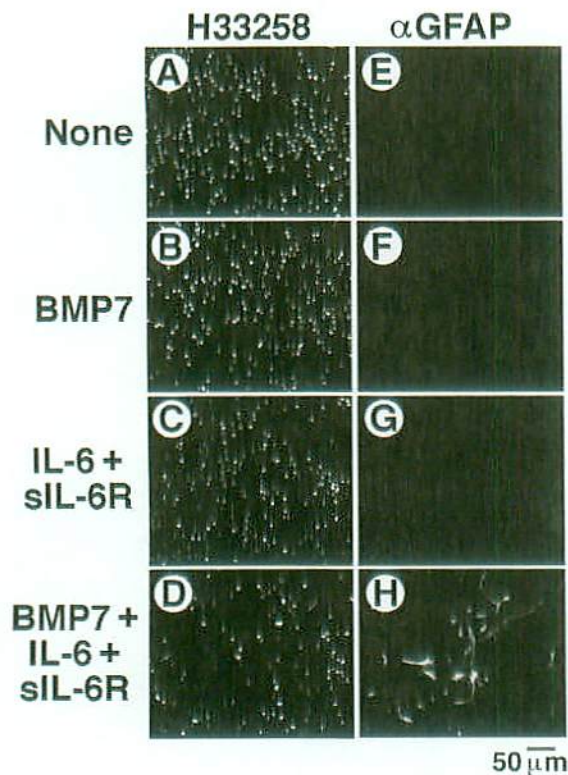


図7 BMP7とIL-6による相乗的アストロサイト分化誘導

BMP7とIL-6による相乗的アストロサイト分化誘導を検出するため、神経上皮細胞を、(A、E) サイトカイン非存在下、(B、F) BMP7存在下、(C、G) IL-6存在下、(D、H) BMP7とIL-6の同時存在下で2日間培養した後、GFAPに対する免疫細胞化学染色を行った。IL-6刺激の際には、可溶性IL-6受容体 (sIL-6R) も添加した。(A-D) はH33258による核染色の結果を、(E-H) はGFAPに対する免疫細胞化学染色の結果を示す。(I、J) BMP7とIL-6による相乗的アストロサイト分化誘導における、それぞれの下流の転写因子SmadおよびSTAT3、転写共役因子p300の関与を調べるため、(I) I-Smad (Smad6)、優性抑制型STAT3 (DN-STAT3)、ないし (J) 変異型p300 (1-682および1737-2414) を導入した上で、GFAP遺伝子のプロモーター領域活性化をルシフェラーゼアッセイにより測定した。

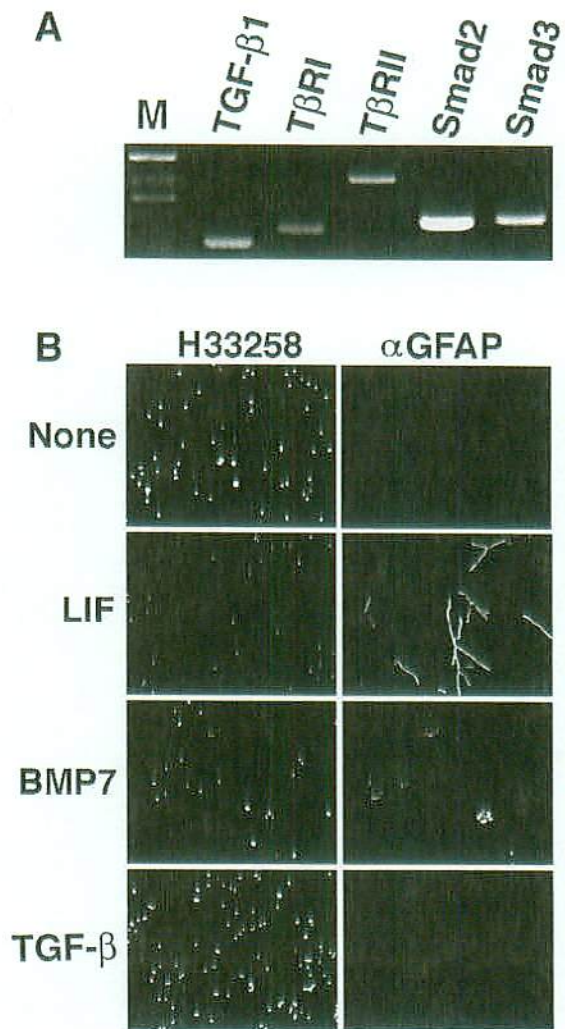


図8 アストロサイト分化におけるBMP特異的シグナル伝達の必要性

(A) 神経上皮細胞におけるTGF- β およびその受容体 (T β RIとT β RII)、下流で活性化される転写因子Smad2およびSmad3の発現をRT-PCRにより確認した。(B) 神経上皮細胞をサイトカイン非存在下、LIF存在下、IL-6存在下、BMP7存在下ないしTGF- β 存在下で6日間培養した後、GFAPに対する免疫細胞化学染色を行った。それぞれ左側のパネルはH33258による核染色の結果を、右側のパネルはGFAPに対する免疫細胞化学染色の結果を示す。

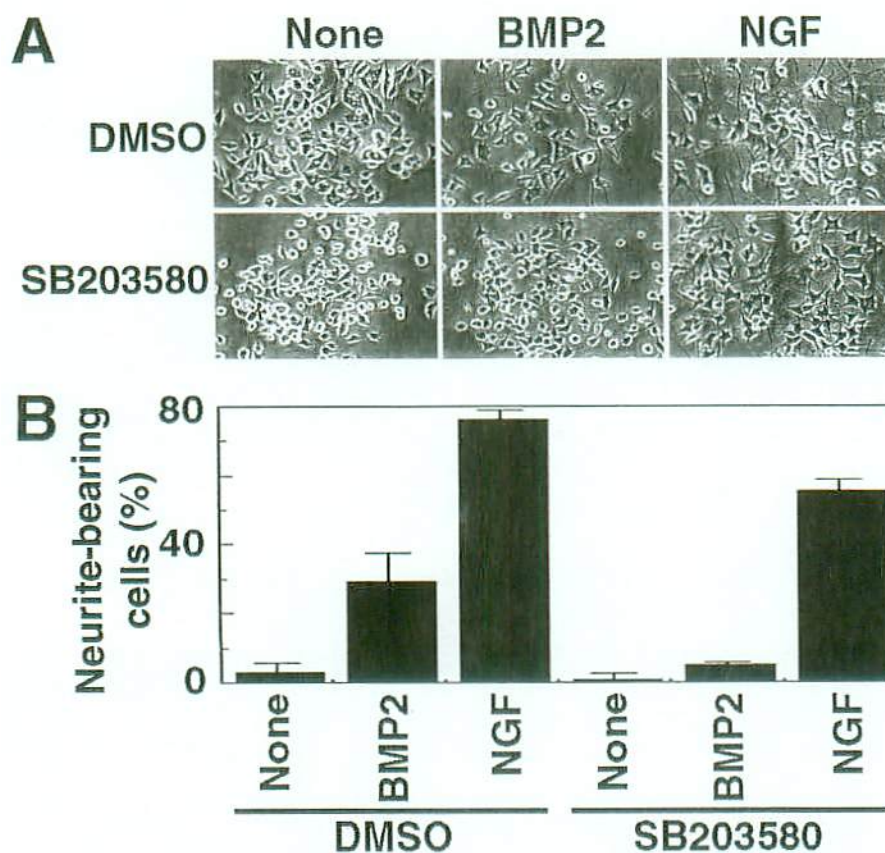


図9 BMP2によるPC12細胞のp38キナーゼ依存性神経様突起伸張

BMP2によるPC12細胞の神経様突起伸張へのp38キナーゼの関与を検討するため、対照溶媒DMSOないしp38特異的阻害剤（SB203580）存在下で、PC12細胞をBMP2ないしNGFで6日間刺激した。（A）は顕微鏡での観察の結果を、（B）は全細胞中に占める神経様突起陽性細胞の割合を示す。

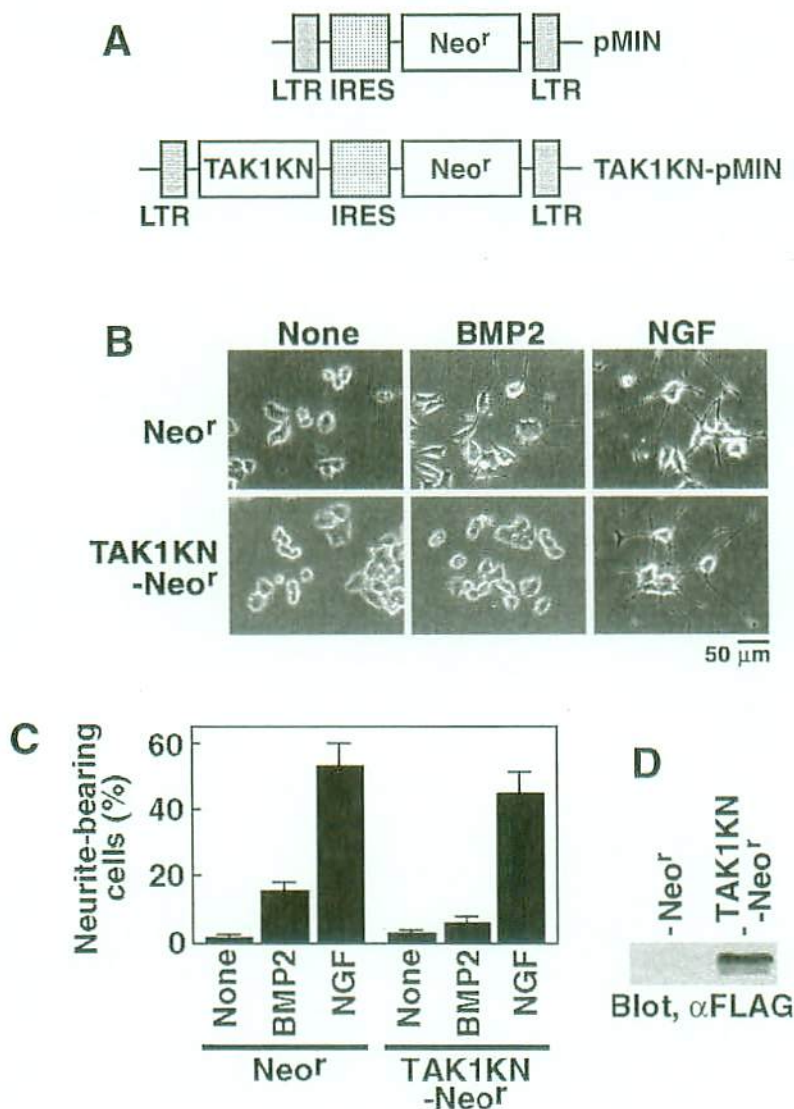


図10 BMP2によるPC12細胞のTAK1-p38キナーゼ経路依存性神経様突起伸張

BMP2によるPC12細胞の神経様突起伸張へのTAK1の関与を検討するため、PC12細胞にpMINベクター (A) でネオマイシン耐性遺伝子 (Neo^r) を、またはTAK1KN-pMINベクター (A) でNeo^rとキナーゼ不活性型TAK1 (TAK1KN) を導入し、ジェネティシンで選択後、BMP2ないしNGFで6日間刺激した。(B) は顕微鏡での観察の結果を、(C) は全細胞中に占める神経様突起陽性細胞の割合を示す。TAK1KNの発現の確認はTAK1KNに付加したFLAGタグに対するウエスタンブロットにより解析した (D)。



図11 BMP2によるI-Smadの発現誘導

(A) PC12細胞をBMP2で刺激した後、細胞から回収した総RNAを鋳型にcDNAを合成し、I-Smad (Smad6およびSmad7) の発現をRT-PCRで検出した。(B) BMP2によるI-Smadの発現誘導へのTAK1-p38キナーゼ経路の関与を調べるため、p38キナーゼ特異的阻害剤のSB203580存在下でPC12細胞をBMP2刺激し、I-Smadの発現をRT-PCRで検出した。Mは分子量マーカを示す。

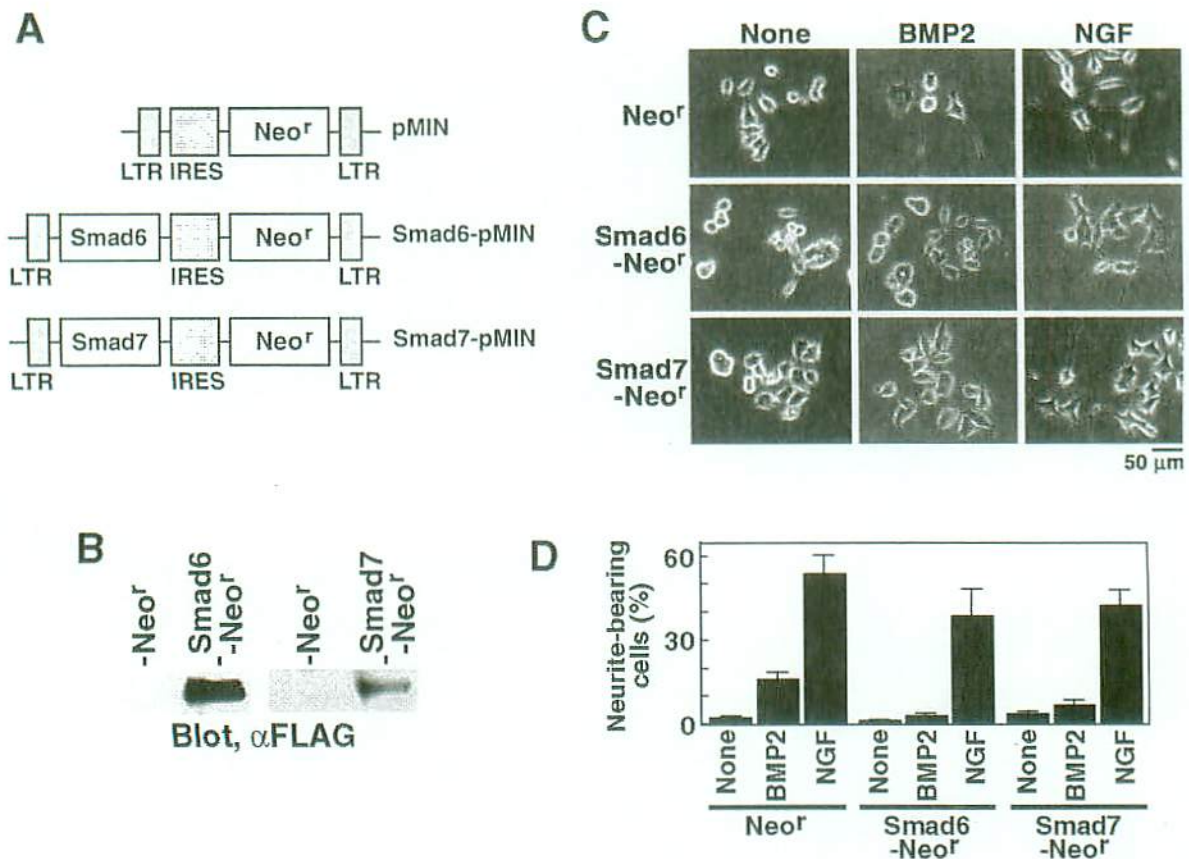


図12 I-SmadによるPC12細胞のBMP2誘導性神経様突起伸張の抑制
 BMP2によるPC12細胞の神経様突起伸張へのI-Smadの関与を検討するため、PC12細胞に (A) pMINベクターでネオマイシン耐性遺伝子 (Neor) を、Smad6-pMINベクターまたはSmad7-pMINベクターで NeorとそれぞれSmad6またはSmad7を導入し、ジェネティシンで選択後、BMP2ないしNGFで6日間刺激した。I-Smadの発現の確認は、I-Smadに付加したFLAGに対するウエスタンブロットによる解析で行った (B)。(C)は顕微鏡での観察の結果を、(D)は全細胞中に占める神経様突起陽性細胞の割合を示す。

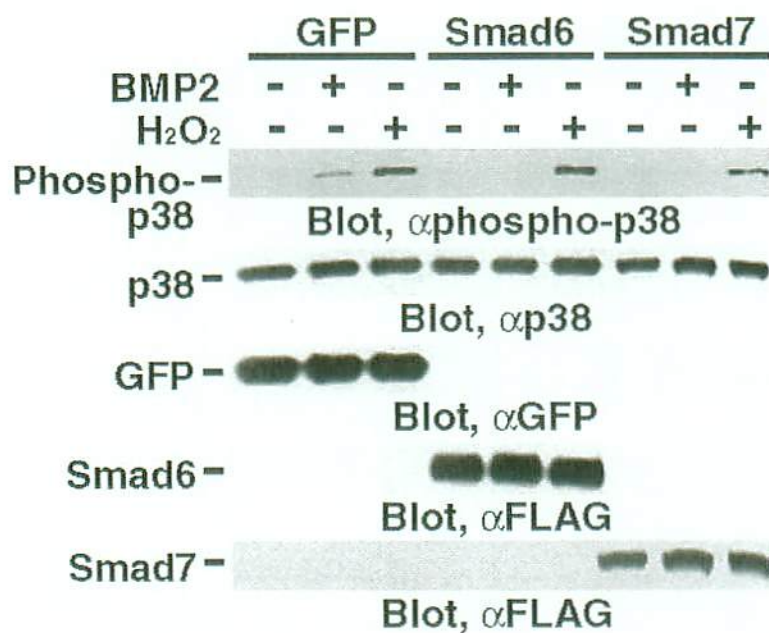


図13 I-Smadによるp38キナーゼ活性化の抑制

BMP2誘導性p38キナーゼ活性化へのI-Smadの関与を検討するため、アデノウイルスベクターでGFP、Smad6ないしSmad7をPC12細胞へ導入し、BMP2ないし過酸化水素で刺激した後、リン酸化38に対する抗体を用いたウェスタンブロットによる解析によりp38キナーゼの活性化を検出した。

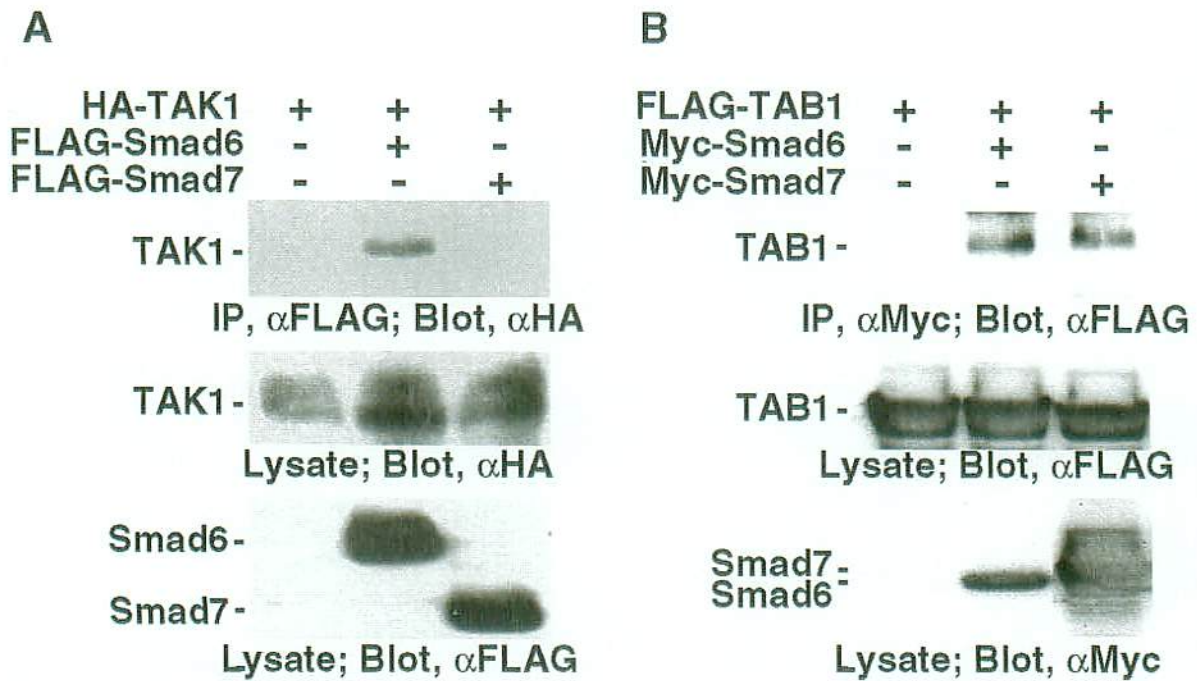


図14 I-SmadとTAK1-TAB1複合体の結合

(A) I-SmadとTAK1の結合を調べるため、PC12細胞にFLAG-Smad6ないしFLAG-Smad7とHA-TAK1を発現させ、免疫共沈の後、ウェスタンブロットによる解析を行った。(B) I-SmadとTAB1の結合を調べるため、PC12細胞にMyc-Smad6ないしMyc-Smad7とFLAG-TAB1を発現させ、免疫共沈の後、ウェスタンブロットによる解析を行った。

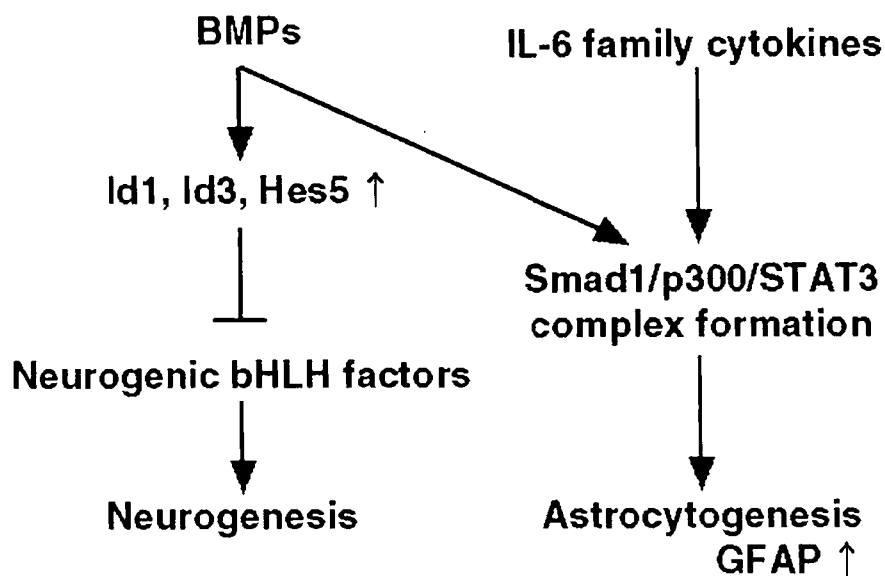


図15 BMPによる神経上皮細胞の系譜制御機構のモデル

BMPは、Id1、Id3やHes5といったHLH因子の発現を誘導するが、その結果、神経分化を誘導するbHLH因子の機能を抑制し、さらには神経分化を阻害する。一方において、IL-6ファミリーサイトカインと協調して、下流の転写因子Smad1およびSTAT3と転写共役因子p300の複合体形成を誘導することで標的遺伝子の発現を相乗的に促進し、アストロサイト分化を誘導する。

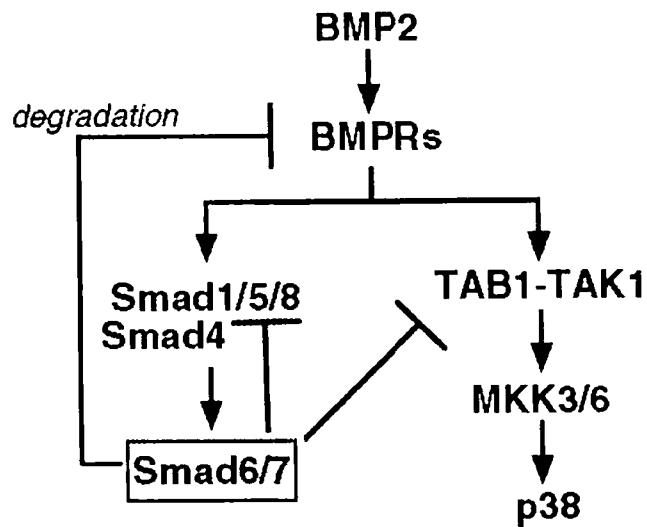


図16 I-SmadによるBMP信号伝達経路の抑制のモデル

BMP2はSmad経路を介してI-Smadの発現を誘導する。発現が誘導されたI-Smadは、Smad経路を抑制するが、おそらくTAK1-TAB1複合体と結合することにより、TAK1-p38キナーゼ経路も抑制する。I-Smadが受容体複合体とユビキチンリガーゼSmurfとの複合体形成を誘導し、受容体複合体の分解を誘導することも報告されている。