

博士(医学) 佐藤友紀

## 論文題目

BMP2 expression in the adult rat brain

(成熟ラット脳における BMP2 の発現)

## 論文の内容の要旨

[はじめに]

Bone morphogenetic protein 2 (BMP2) は、transforming growth factor  $\beta$  superfamily に属する分泌蛋白であり、BMP 受容体を介して作用し、様々な生体内現象で重要な働きをすることが報告されている。一例として、中胚葉に BMP2 が作用すると、腹側化が促進される一方、中胚葉の予定背側領域では、BMP2 のアンタゴニストが、BMP2 の腹側化活性を阻害する結果として背側化が進行することが知られている。神経系の発生においても、神経系の各種細胞の分化に関わるなど、重要な働きを示すことが報告されており、発生初期における BMP2 の発現様式も詳細に検討されている。近年、成熟ラット中枢系においても BMP シグナルが重要な働きを持つことが報告されているが、BMP2 の発現についてはこれまで検討されてこなかった。よって、本研究では免疫組織化学法を用いて成熟ラット中枢神経系における BMP2 の発現を詳細に検討し、さらに当教室がすでに報告している BMP4 の発現と比較検討することとした。

[材料と方法]

生後 7 週齢の Wistar 雄ラットを用いた。ジエチルエーテルで麻酔したのち、経心臓的に 0.1 M リン酸緩衝液に 4 %のparaホルムアルデヒドと 0.2 %ピクリン酸を加えた溶液で灌流固定し、同溶液で 2 時間の固定後に、30 %ショ糖緩衝溶液で一晩処理した。その後凍結し、クライオスタットで 20  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作成した。免疫組織化学は常法に従った。一次抗体として、抗 BMP2 抗体 (サンタクルーズ社)を用いた。抗 BMP2 抗体の特異性を確認するため、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)、ウェスタンブロット、吸収試験を行った。

[結果]

BMP2 様免疫反応 (BMP2-like immunoreactivity、BMP2-IR) は、ラット脳全体に豊富に観察された。強い発現は、嗅球、大脳皮質、前交連、脳梁、対角帯、海馬、視床、視床下部、中脳、小脳、脳幹、脊髄などで観察された。BMP2-IR は、脳全体のほとんどのニューロンで発現が認められた。また、ニューロン以外にも、アストロサイトや上皮細胞などでも BMP2-IR の発現が認められた。

さらに詳細な観察を行ったところ、嗅球において、BMP2-IR は嗅神経の軸索にも検出された。また、嗅球の糸球体では、BMP2-IR の強陽性の糸球体と、弱陽性の糸球体が交互に存在するという非常に興味深い知見が認められた。

さらに、BMP2 と BMP4 の発現分布の比較では、BMP4 は大脳皮質や海馬の錐体細胞などの

樹状突起に豊富に発現するのに対して、BMP2 の発現は主に細胞体に局限していた。

#### [考察]

今回の研究により、BMP2 はこれまで想像されていた以上に成熟ラット中枢神経系全体に豊富に発現していることが明らかになった。ほとんどすべてのニューロンにおいて BMP2 が産生されており、*in vitro* の実験系において GABA 作動性ニューロンの分化・生存を調節することなどが報告されていることから、成体脳においても各々のニューロンのアイデンティティを規定するために、その分化状態を調節している可能性が示唆された。

また、BMP2 は嗅球における嗅神経の軸索にも検出された。このことは、嗅上皮に存在する嗅細胞で産生された BMP2 が軸索を輸送され嗅球に至っていることを示している。また、嗅神経の軸索は成熟ラットにおいても再生を繰り返し、ある特定の嗅球糸球体に投射することが知られており、BMP2-IR 強陽性の糸球体と、弱陽性の糸球体が交互に存在していたことは、それぞれの糸球体における BMP2 の発現強度が、嗅神経の軸索のターゲティングを調節しているという仮説を支持していると考えられた。

BMP2 と BMP4 の比較においては、BMP4 は大脳皮質や海馬の錐体細胞などの樹状突起に豊富に発現するのに対して、BMP2 の発現は主に細胞体に局限していた。このことは、BMP2 と BMP4 の細胞内の局在が異なることを示している。これまで BMP2 と BMP4 の作用の違いは明らかになっていないが、ニューロンにおいては BMP2 シグナリングと BMP4 シグナリングは、独立して制御されていることが示唆された。

#### [結論]

BMP2 はこれまで想像されていた以上に成熟ラット中枢神経系全体に豊富に発現していることが明らかになった。このことは、BMP2 が成熟ラット中枢神経系全体で重要な働きをしていることを示唆している。

### 論文審査の結果の要旨

Bone morphogenetic protein 2 (BMP2) は、transforming growth factor  $\beta$  superfamily に属する分泌蛋白であり、BMP 受容体を介して作用し、様々な生体内現象で重要な働きをするが、特に神経系の発生・分化においては重要である。したがって、発生初期における BMP2 の発現様式は詳細に検討されている。成熟ラット中枢神経系においても受容体の存在は知られており、BMP が重要な働きを持つことは想像できるが、BMP2 の発現についてはこれまで検討がない。

そこで、申請者は免疫組織化学法を用いて成熟ラット中枢神経系における BMP2 の発現を網羅的に解析した。雄性 Wistar 系ラット(7 週齢)をジエチルエーテル麻酔後、経心臓的に 4 %

パラホルムアルデヒドと0.2%ピクリン酸を0.1 Mリン酸緩衝液に加えた溶液で灌流固定し、同溶液で2時間の固定後に、30%ショ糖緩衝溶液で一晩処理し、20  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作成した。一次抗体（抗 BMP2 抗体、サンタクルーズ社）の特異性を、enzyme-linked immunosorbent assay、ウェスタンブロット、吸収試験で確認した。

BMP2 様免疫反応は、ラット脳全体に観察された。強い発現は、嗅球、大脳皮質、前交連、脳梁、対角帯、海馬、視床、視床下部、中脳、小脳、脳幹、脊髄などで観察された。また、三叉神経中脳路核の一次感覚神経を除くほとんどのニューロンで発現が認められたが、アストロサイトや上皮細胞でも発現があった。また、嗅球では強陽性と弱陽性の嗅細胞軸索が入力する糸球体が交互に存在する特徴的所見が認められた。さらに、BMP4 が樹状突起に主に発現するのに対し、BMP2 は主に細胞体に局限していた。

審査委員会では、申請者がこれまで部分的にしか検討がなされていない成熟ラット中枢神経系における BMP2 の発現を、網羅的かつ詳細に記述した点を高く評価した。

以上により、本論文は博士（医学）の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 福田 敦夫  
副査 中原 大一郎 副査 尾内 康臣