

原 著

# 慢性脊髄圧迫における神経成長因子の役割

—運動神経細胞との関係について—

獨協医科大学 脳神経外科学

刀川 優一

**要 旨** 慢性脊髄圧迫によるミエロパチーにおいて、運動神経細胞における内因性神経成長因子の変化およびその役割について、未だ不明な点が多い。本研究では、ラットの慢性脊髄圧迫モデルにおける運動神経細胞のbrain-derived neurotrophic factor (BDNF) と nerve growth factor (NGF) の変化を調べ、その役割について考察した。慢性脊髄圧迫モデルは、ラットの頸椎の椎弓下（第5・6頸椎）に徐々に拡張するポリマーシートを挿入し作成した。そして、圧迫部分の運動神経細胞におけるBDNFとNGFの発現について調べた。圧迫開始25週後、運動神経細胞におけるBDNF陽性細胞数の増加および細胞一つあたりの $\beta$ NGFの減少が観察された。これらの結果より慢性脊髄圧迫におけるBDNFの増加は運動神経細胞の生存能力を刺激することによる運動麻痺を改善し、NGFの減少は運動神経細胞のアポトーシスに寄与する可能性が示唆された。

**Key Words** : 慢性脊髄圧迫, ミエロパチー, BDNF, NGF, 運動神経細胞

## 緒 言

急性の脊髄損傷や脊髄変性疾患における脊髄運動神経での神経成長因子の役割について、数多くの研究が行われており、脊髄前角における運動神経細胞でのbrain-derived neurotrophic factor (BDNF) の役割や機能が明らかにされている。そして、BDNFは運動機能の悪化を遅らせること<sup>1,2)</sup>、出生前期における運動神経細胞の生存維持や運動神経細胞自身がBDNFのmRNAを発現することなどが明らかにされている<sup>3)</sup>。また、新生ラットの神経軸索断端へのBDNFの投与が、神経細胞死を減少させることも示されている<sup>4)</sup>。一方、脊髄運動神経細胞における内因性のnerve growth factor (NGF) は、神経細胞の生存や分化に関してtyrosine kinase receptor A (Trk A) を介し生存を促進する役割をはたす一方、p75 neurotrophin receptor (p75<sup>NTR</sup>) を介し神経細胞死を誘導するといわれている<sup>5-10)</sup>。しかし、脊髄運動神経細胞における内因性のNGFの役割は未だ不明な点が多く、これまでに成獣の慢性脊髄圧迫における運動神経細胞の

NGFに関する報告はない。

軽度な慢性脊髄圧迫は、前角細胞の減少と機能障害により不可逆的で進行性の運動麻痺を生じることが知られている<sup>11-13)</sup>。過去の慢性脊髄圧迫モデルを用いた報告では、進行性の脊髄前角細胞数の減少が圧迫開始9週後より始まり、17週後より強制運動能力の悪化が観察されることが報告されている<sup>13)</sup>。

本研究では、慢性脊髄圧迫モデルにおける脊髄運動神経細胞のNGFとBDNFの発現の変化について調べ、その役割について考察した。

## 対象および方法

### 1. 対象

本研究は、獨協医科大学倫理委員会の承認（実験許可番号：218）を得た後に、獨協医科大学動物実験指針に従って行った。対象は、雄性的体重335～420 gの成獣Wistar系ラット（日本チャールズリバー、横浜、日本）20匹で、回転車付のケージ（SN451, Shinano Manufacturing Ltd., Tokyo, Japan）の中で自由に運動、飲水のできる環境で飼育された。

### 2. 脊髄圧迫モデル

Kimら<sup>13)</sup>の方法に従って、ペントバルビタール25 mg/kgの腹腔内投与と3%ハロセンの吸入麻酔による深

平成17年10月7日受付, 平成17年11月28日受理

別刷請求先: 刀川優一

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880

獨協医科大学 脳神経外科学

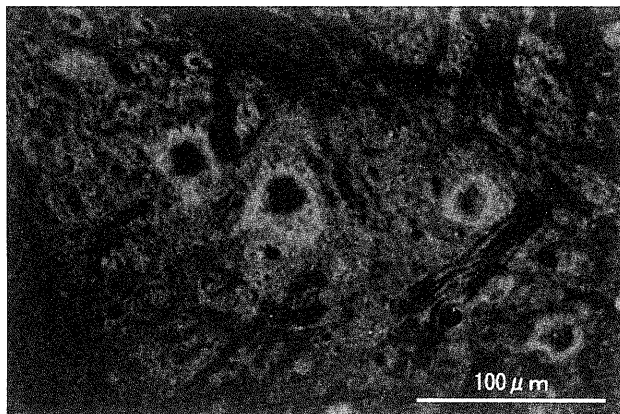


図 1a 15週の対照群の頸髄前角の運動神経細胞のNGF蛍光染色。

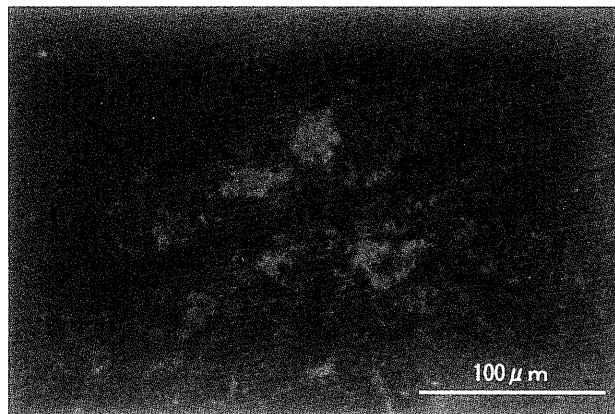


図 1b 15週の圧迫群の頸髄前角の運動神経細胞のNGF蛍光染色。対照群と比較すると輝度はやや低下している。

麻酔下で、第5・6頸椎の椎弓と硬膜間にポリマーシート (0.7×3.0×5.0 mm) を挿入、圧迫群 (10匹) はそのまま留置し、対照群 (10匹) は留置せずに閉創した。圧迫群では、留置されたポリマーシートが24時間後にもとの体積の230%に達し、慢性的な脊髄圧迫が発生する。

### 3. BDNF およびNGFの発現の評価

各群とも処置15週と25週後に5匹づつ、ペントバルビタール40 mg/kgの腹腔内投与による深麻酔下に第5・6頸髄を取り出し、免疫組織学的検討を行った。頸髄の取り出しは、経心的に0.1MPBSを流し、続いて0.2%ピクリン酸入りの4%パラホルムアルデヒドを流して固定した後に行った。取り出した頸髄は、4℃で一晩0.2%ピクリン酸入りの4%パラホルムアルデヒドで固定し、その後20%スクロース液にて4℃で一晩処置、包埋し、-80℃で保存した。厚さ14 μmの切片を一匹につき5枚づつ作成し、0.2%アジ化ナトリウム入り0.1 M トリス塩酸 (pH 7.6) で一週間処置した。

その後、NGF発現の評価は、1%正常ヤギ血清と20%正常ウマ血清の入った0.01MPBSで1時間遮断し、一次抗体 (anti-βNGF (rabbit polyclonal antibody; Chemicon, California, US)) を0.02%アジ化ナトリウムと0.3%トリトンX-100入り0.02 MPBS (PBST) で4000倍に希釈し、6時間以上の間隔をあけて3回反応させることによって行った。

BDNF発現の評価は、NGFと同様の液を用いて一次抗体 (anti-BDNF (rabbit polyclonal antibody; Chemicon, California, US)) を500倍に希釈して一度だけ反応させた。その2日後、15分ずつ3回0.01 MPBSで洗浄し、二次抗体 (F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-rabbit IgG-Alexa 488; invitrogen, California, US) を1.5%正常ヤギ血清入りPBSTで500倍に希釈し、4.5時間反応させ

た。その後、0.1 M トリス塩酸 (pH 7.6) で5分ずつ3回洗浄した。

尚、一次抗体を除いたものを陰性コントロールとし、後根神経節を陽性コントロールとした。

### 4. 定量解析

CCDカメラ (Nikon Eclipse E800, Nikon Inc, Tokyo, Japan) 付き顕微鏡 (Olympus DP70) を用いて、免疫染色によって得られた標本の画像を取り込み、コンピュータ・ソフト・ウェア (Scion Image v.Beta 4.0.2, Scion, Maryland, US) により解析した。測定は、本研究の主旨を知らされていない2人によって行われた。BDNFおよびNGFの発現の強さを評価するために、陽性を示した細胞の輝度をグレースケール (0 (最低) - 255 (最高)) を用いて評価し、下記の式により背景の平均輝度を除いたものを輝度と定義した。

$$\text{輝度} = ((\text{運動神経細胞の平均輝度} / \text{ピクセル}) - (\text{背景の平均輝度} / \text{ピクセル})) \times \text{運動神経細胞の面積 (ピクセル)}$$

$$1 \text{ ピクセル} = 0.75 \times 0.75 \mu\text{m}^2$$

そして、一匹につき5切片の陽性細胞の合計数 (個) と細胞1つ当たりの平均輝度を計算し、圧迫群と対照群のデータを比較した。

### 5. 統計解析

全てのデータは平均値±標準誤差で表し、両群間の比較はMann-Whitney's U testを用い、各群間の時間経過の比較には反復測定一分散分析法を用いて (Post-hoc テストとしてSheffe's testを用い)、危険率5%未満を有意差ありとした。統計ソフトはSPSS (v11.5, Chicago, US) を使用した。

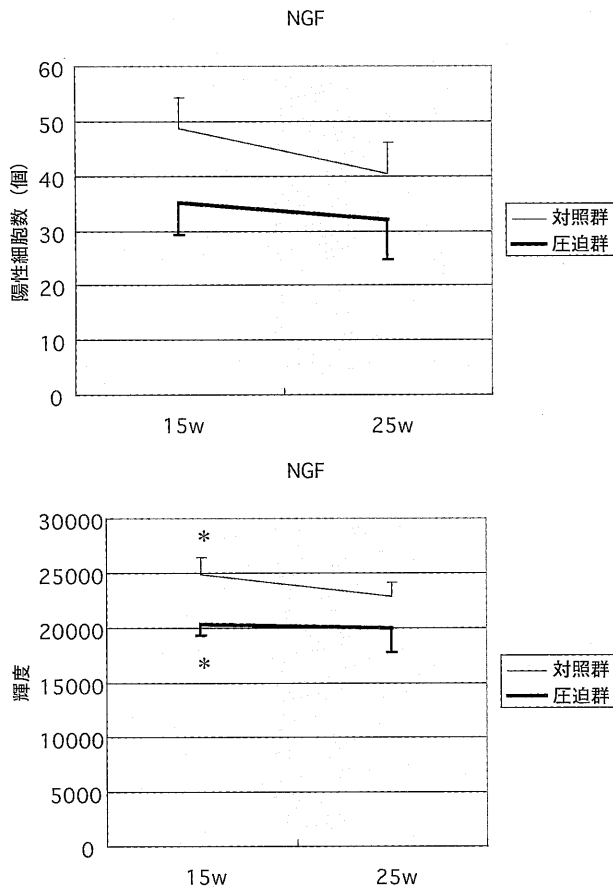


図2 NGF蛍光染色の一匹あたり(5切片分)の運動神経細胞の陽性細胞数(個)と運動神経細胞一つあたりの平均輝度。\*:輝度では15週の圧迫群で対照群と比較して有意に低下していた( $p < 0.05$ )。

## 結果

### 1. NGF陽性運動神経細胞(図1, 図2)

図1a(対照群), b(圧迫群)は処置15週後の脊髄前角の免疫染色を示すが, 核の部分が黒く抜けた直径が約 $30\ \mu\text{m}$ の運動神経細胞が, 対照群では複数観察されるが, 圧迫群では1つだけしか観察することができない。また, 対照群と比較して圧迫群では, その神経細胞の輝度が明らかに低下しているのがわかる。処置15週後の対照群と圧迫群の平均輝度は,  $25 \times 10^3 \pm 15 \times 10^2$ ,  $20 \times 10^3 \pm 11 \times 10^2$ であり, 陽性細胞1つあたりの平均輝度では圧迫群で有意(危険率5%未満)に低下していた(図2)。処置25週後においても, その有意差は認められなかったものの, 圧迫群で輝度の低下が認められた。陽性細胞数ではいずれの時期においても, 有意差は見られなかったが, 対照群と比較して圧迫群で減少していた。また, 各群内の陽性細胞数の時間的変化はみられなかった。

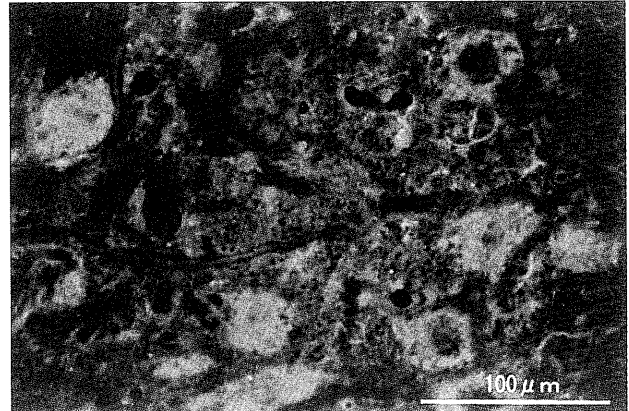


図3a 15週の対照群の頸髄前角の運動神経細胞のBDNF蛍光染色。

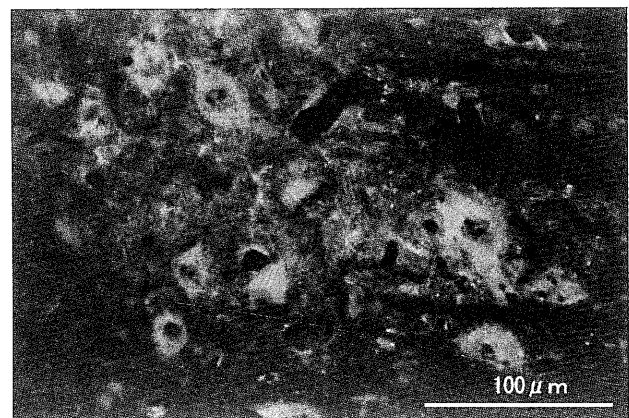


図3b 15週の圧迫群の頸髄前角の運動神経細胞のBDNF蛍光染色。

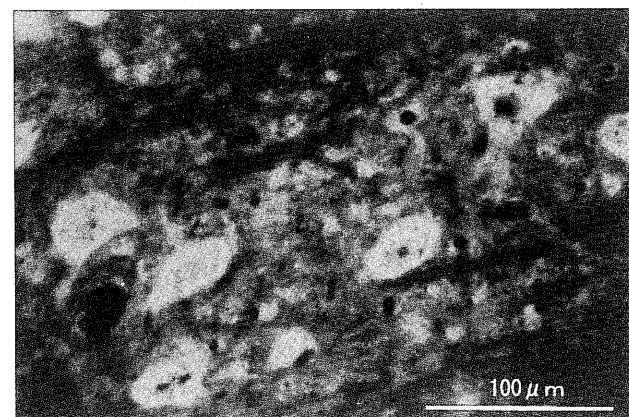


図3c 25週の圧迫群の頸髄前角の運動神経細胞のBDNF蛍光染色。他の群と比較して陽性細胞数は増加している。

### 2. BDNF陽性運動神経細胞(図3, 図4)

図3a(対照群), b(圧迫群)は処置15週後の脊髄前角の免疫染色を示すが, 核の部分が黒く抜けた大型の運動神経細胞が, 対照群では複数観察されるが, 圧迫群で

はその数が減少している。図3cは、圧迫群における処置25週後の脊髓前角の免疫染色を示すが、明るい大型の運動神経細胞が複数確認できる。対照群の処置15週後と25週後の陽性細胞数の平均は、それぞれで $45 \pm 8.0$ ,  $39 \pm 9.1$ であり、時間的变化は観察されなかった。一方、圧迫群の処置15週後と25週後の陽性細胞数の平均は、それぞれ $24 \pm 3.1$ ,  $42 \pm 4.3$ であり、25週後の陽性細胞数は15週後のそれと比較して有意に増加していた(危険率5%未満)。また、有意差はなかったものの処置後15週では、対照群と比較して圧迫群の陽性細胞数が減少している傾向を示した。陽性細胞1つあたりの平均輝度では、各群間、時間経過ともに有意な差は認められなかった。

### 考 察

既報告では、今回の実験で使用した圧迫群のラットは、運動神経細胞数が9週後では20.3%、25週後には35.5%と進行性に減少することが知られている<sup>13)</sup>。つまり、今回の実験では、処置後25週の脊髓圧迫ラットのBDNF陽性の運動神経細胞数は、15週のものと比較すると著しく増加していたことになる(図4)。一方、BDNF陽性運動神経細胞の輝度は、15週と25週のそれぞれの両群間、各群(対照群、圧迫群)の時間経過で変化はなかった(図4)。BDNFの変化がないのは、輝度はBDNFの濃度を反映し、運動神経細胞自体のBDNF濃度がプラトーに達していたためと考えられる。また、対照群と比較すると15週の圧迫群ではBDNF陽性細胞の数は減少し、これは圧迫群の運動神経細胞の減少と類似していた(図4)。

最近の報告では、24週のtwyマウスで、BDNFは、最も圧迫される部分(脊髓断面積が対照の50%以下)では対照群と比較してBDNFは低下し、その頭側と尾側(脊髓断面積が対照の50~100%)でBDNFの上昇がみられている<sup>12, 14)</sup>。このように、twyマウスとこの慢性脊髓圧迫モデルでの圧迫部分でのBDNFの発現レベルの違いは、脊髓の断面積の違いによって起こると考えられる。なぜなら、この圧迫群の脊髓断面積は、25週のもの是对照群の88%に減少し<sup>13)</sup>、一方、20週のtwyマウスは対照群の50%以下に減少し、さらに加齢と共に進行する<sup>11, 12, 14)</sup>。つまり、その20週以降のtwyマウスの圧迫部分はその程度が非常に強く、神経細胞自体の活性が維持できないため減少した可能性がある。また、24週のtwyマウスでBDNFの増加がみられた部分は、対照群の50~100%の断面積の部分であり、この25週の慢性脊髓圧迫モデルでの断面積(対照群の88%)と一致する。以上から長期の脊髓圧迫では、強い圧迫ではなく弱い圧迫

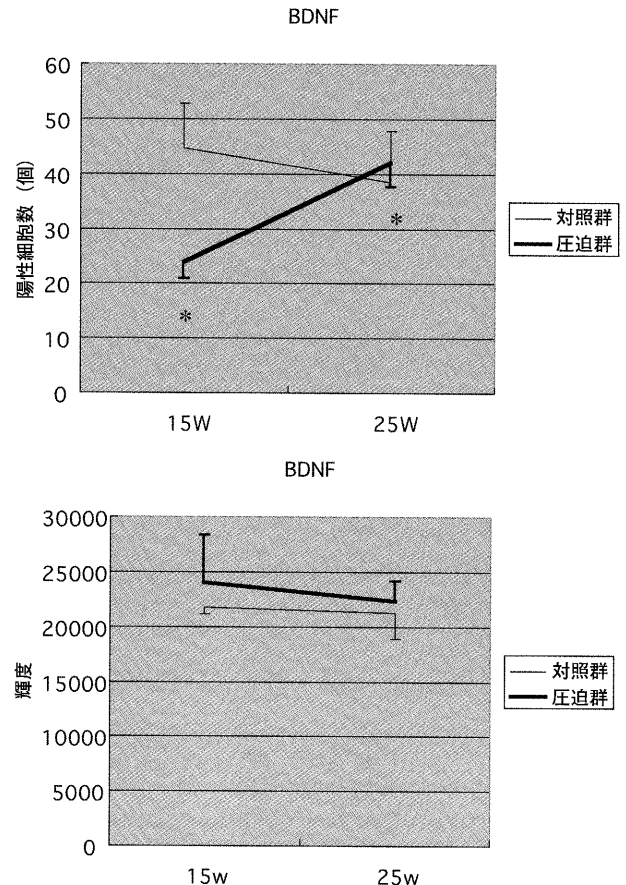


図4 BDNF蛍光染色の一匹あたり(5切片分)の運動神経細胞の陽性細胞数(個)と運動神経細胞一つあたりの平均輝度。\*:陽性細胞数は圧迫群において15週と比較して25週で有意に増加していた( $p < 0.05$ )。

が運動神経細胞のBDNFの増加を起こすと考えられる。

さらに、このtwyマウスは、生後18週頃から進行性に不可逆的な運動麻痺が始まり<sup>12, 14)</sup>、一方、今回のラットの慢性脊髓圧迫モデルは、圧迫より17週以降に不可逆的な運動麻痺が始まることが報告されている<sup>13)</sup>。これらより、20週以降のBDNFの時間変化は不可逆性の運動麻痺と重なっているか、運動麻痺がBDNFの上昇より先に起こると考えられる。これは、運動神経細胞自身がオートクリンもしくはパラクリンにて、その生存能力や成長を維持し慢性脊髓圧迫モデルにおける運動麻痺の進行を抑制していると考えられる。なぜなら、BDNFは強い損傷を受けた運動神経細胞の細胞死を妨げたり<sup>4, 15)</sup>、生き残った神経細胞の軸索の発芽を促したり<sup>15)</sup>、運動機能の悪化を遅らせることが知られており<sup>1, 2)</sup>、慢性脊髓圧迫モデルでの運動神経細胞にもあてはまると考えられる。

一方、BDNFとは対照的に頸髄圧迫モデルにおける

NGF ( $\beta$ NGF) は、15週の運動神経細胞で、細胞一つあたりの輝度が対照群より有意に減少していたが、他のどの群間でも有意差はなかった(図2)。これは、proNGFからmatureNGFへのプロセッシングを妨げmatureNGF ( $\beta$ NGF)を減少させproNGFを増加させているのかもしれない。例えば、脊髄の片側切除マウスでは、損傷部位でmatureNGFは検出されずproNGFが上昇し、さらに脊髄挫傷ラットではmatureNGFとproNGFの両方が上昇していた<sup>16)</sup>。同様に、Bennettら<sup>17)</sup>は、ラットの脊髄片側切断の後、NGFの有意な低下がみられたと報告しており、他の脊髄挫傷や離断では、損傷部やその上下でNGFの有意な増加が観察されたと報告している<sup>18~22)</sup>。そして、今回の実験では、15週の圧迫群で運動神経細胞のmatureNGF ( $\beta$ NGF)が減少していたためBeattieら<sup>16)</sup>やBennettら<sup>17)</sup>の脊髄片側切除のようにmatureNGFへのプロセッシングが減少し、かつproNGFが増加していたのかもしれない。そして、プロセッシング減少により相対的に増加したproNGFは、運動神経細胞においてp75<sup>NTR</sup>を通してアポトーシスの活性に寄与しているのかもしれない。なぜなら、proNGFはTrkAよりもp75<sup>NTR</sup>との親和性が高く、p75<sup>NTR</sup>を介するアポトーシスをmatureNGFよりも強く誘導する事が知られており<sup>23)</sup>、そのため圧迫群では進行性の運動神経細胞死が生じているのかもしれない<sup>13)</sup>。そして、細胞一つあたりのNGFの輝度が、25週で対照群との差がなくなったのは、BDNFの増加によりproNGFを介したアポトーシスの抑制が生じ、proNGFのプロセッシングが促進されてmatureNGF ( $\beta$ NGF)が相対的に増えたのかもしれない。

## 結 論

圧迫部分でのBDNFの増加は、脊髄の悪化した運動機能を修復するための代償的機序として働き、神経細胞の生存や調整に寄与している可能性が示唆された。一方、matureNGF ( $\beta$ NGF)の減少は、アポトーシスに寄与している可能性が考えられた。

**謝 辞** 稿を終えるにあたり終始ご指導、ご校閲を賜りました獨協医科大学脳神経外科教室金彪教授に深甚なる謝意を捧げます。また、御協力いただきました獨協医科大学脳神経外科教室員各位に深謝致します。

## 文 献

- 1) Ishiyama T, Ogo H, Wong, et al : Methionine-free brain-derived neurotrophic factor in wobbler mouse motor neuron disease : dose-related effects and comparison with the methionyl form. *Brain Res*, **944** : 195-199, 2002.
- 2) Mitsumoto H, Ikeda K, Klinkosz B, et al : Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF. *Science*, **265** : 1107-1110, 1994.
- 3) Henderson CE, Camu W, Mettling C, et al : Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. *Nature*, **363** : 266-27, 1993.
- 4) Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, et al : Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature*, **360** : 757-759, 1992.
- 5) Dechant G, Barde YA. : The neurotrophin receptor p75 (NTR) : novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nature Neurosci*, **5** : 1131-1136, 2002.
- 6) Ferri CC, Moore FA, Bisby MA. : Effects of facial nerve injury on mouse motoneurons lacking the p75 low-affinity neurotrophin receptor. *J Neurobiol*, **34** : 1-9, 1998.
- 7) Lowry KS, Murray SS, Coulson EJ, et al : Systemic administration of antisense p75 (NTR) oligodeoxynucleotides rescues axotomized spinal motor neurons. *J Neurosci Res*, **64** : 11-17, 2001.
- 8) Miller FD, Kaplan DR. : Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, **58** : 1045-1053, 2001.
- 9) Pehar M, Cassina P, Vargas MR, et al : Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis : implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, **89** : 464-473, 2004.
- 10) Sedel F, Bechade C, Triller A. : Nerve growth factor (NGF) induces motoneuron apoptosis in rat embryonic spinal cord in vitro. *Euro J Neurosci*, **11** : 3904-3912, 1999.
- 11) Baba H, Maezawa Y, Imura S, et al : Quantitative analysis of the spinal cord motoneuron under chronic compression : an experimental observation in the mouse. *J Neurol*, **243** : 109-116, 1996.
- 12) Uchida K, Baba H, Maezawa Y, et al : Increased expression of neurotrophins and their receptors in the mechanically compressed spinal cord of the spinal hypostotic mouse (twy/twy). *Acta Neuropathol (Berl)*, **106** : 29-36, 2003.
- 13) Kim P, Haisa T, Kawamoto T, et al : Delayed myelopathy induced by chronic compression in the rat spinal

- cord. *Ann Neurol*, **55** : 503-511, 2004.
- 14) Uchida K, Baba H, Maezawa Y, et al : Histological investigation of spinal cord lesions in the spinal hyperostotic mouse (twy/twy) : morphological changes in anterior horn cells and immunoreactivity to neurotropic factors. *J Neurol*, **245** : 781-793, 1998.
  - 15) Kishino A, Ishige Y, Tatsuno T, et al : BDNF prevents and reverses adult rat motor neuron degeneration and induces axonal outgrowth. *Exp Neurol*, **144** : 273-286, 1997.
  - 16) Beattie MS, Harrington AW, Lee R, et al : ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron*, **36** : 375-386, 2002.
  - 17) Bennett AD, Tagliatalata G, Perez-Polo R, et al : NGF levels decrease in the spinal cord and dorsal root ganglion after spinal hemisection. *Neuroreport*, **10** : 889-893, 1999.
  - 18) Murakami Y, Furukawa S, Nitta A, et al : Accumulation of nerve growth factor protein at both rostral and caudal stumps in the transected rat spinal cord. *J Neurol Sci*, **198** : 63-69, 2002.
  - 19) Brown A, Ricci MJ, Weaver LC. : NGF message and protein distribution in the injured rat spinal cord. *Exp Neurol*, **188** : 115-127, 2004.
  - 20) Bakhit C, Armanini M, Wong WL, et al : Increase in nerve growth factor-like immunoreactivity and decrease in choline acetyltransferase following contusive spinal cord injury. *Brain Res*, **554** : 264-271, 1991.
  - 21) Widenfalk J, Lundstromer K, Jubran M, et al : Neurotrophic factors and receptors in the immature and adult spinal cord after mechanical injury or kainic acid. *J Neurosci*, **21** : 3457-3475, 2001.
  - 22) Krenz NR, Weaver LC. : Nerve growth factor in glia and inflammatory cells of the injured rat spinal cord. *J Neurochem*, **74** : 730-739, 2000.
  - 23) Lee R, Kermani P, Teng KK, et al : Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, **294** : 1945-1948, 2001.

## The Role of Neurotrophins in Chronic Spinal Cord Compression

Yuichi Tachikawa

*Department of Neurosurgery Dokkyo University School of Medicine, Japan*

The regulation of intrinsic neurotrophic factor expression in mild spinal cord compression has not been investigated in detail, especially in regards to their effects on motoneurons in the myelopathy. Therefore, we investigated the levels of BDNF and NGF, in motoneurons of a rat chronic spinal cord compression model and control animals. The cervical myelopathy model reproduces progressive motor disturbance with delayed onset following sublaminal insertion of expanding polymer sheet at the C5-6 level. The immunofluorescent expression pattern of BDNF and NGF were examined in spinal segments C5-6 in spinal cord compression rats (15- and 25-week) and control rats. BDNF expression in motoneurons increased at the com-

pressed region in 25-week spinal cord compression rats. In contrast, the immunofluorescent intensity of  $\beta$ NGF per cell decreased at the compressed region in 15-week spinal cord compression rats compared with that of control groups. This decrease may be due to a decrease in the processing of proNGF, which promotes proNGF expression and decreases the levels of mature NGF. These results suggest that the upregulation of BDNF contributes to regeneration in motoneurons and an improvement of motor paresis. In contrast, NGF may induce motoneuron apoptosis.

**Key Words** : chronic spinal cord compression, myelopathy, BDNF, NGF, motor neuron