



Title	Expression of $\beta$ -calcitonin gene-related peptide in axotomized rubrospinal neurons and the effect of brain derived neurotrophic factor
Author(s)	Fukuoka, Tetsuo
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3143879">https://doi.org/10.11501/3143879</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	ふく 岡 哲 男
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 7 6 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成10年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科外科系専攻
学 位 論 文 名	Expression of $\beta$ -calcitonin gene-related peptide in axotomized rubrospinal neurons and the effect of brain derived neurotrophic factor (軸索切断後の赤核脊髄路ニューロンにおける $\beta$ -カルシトニン遺伝子関連ペプチドの発現とそれに対するbrain derived neurotrophic factor の影響)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉 矢 生 人  (副査) 教 授 遠 山 正 彌    教 授 三 木 直 正

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

一般に成熟した哺乳類において、中枢神経内に細胞体を持ち軸索を末梢組織に伸ばしている extrinsic neuron (EXN) は軸索を切断されても再生するが、軸索も中枢神経内に投射している intrinsic neuron (INN) は再生しない。赤核脊髄路ニューロン (RSN) は INN の一つであるが、最近、軸索切断後に細胞骨格タンパクや growth-associated protein (GAP)-43 等の軸索再生に必要な遺伝子発現を増加させることが分かった。

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) はカルシトニン遺伝子由来のペプチドで、脊髄や脳の運動神経細胞 (MON) においてアセチルコリン (Ach) と共存し、神経筋接合部の Ach レセプターに対して Ach と相乗的に働いている。CGRP にはこれとは全く別の遺伝子由来のよく似たペプチドがあり、前者を  $\alpha$ -CGRP、後者を  $\beta$ -CGRP と呼ぶ。両者は脊髄や脳の MON における量的発現が異なっているが、これらの神経細胞の軸索を切断すると、 $\beta$ -CGRP mRNA は減少若しくは変化しないのに対し、 $\alpha$ -CGRP mRNA は増加することから、 $\alpha$ -CGRP は軸索再生に関与している可能性が指摘されている。しかし、これまで軸索切断後の発現の変化が調べられたのは、EXN においてだけである。

そこで我々は軸索が再生しない INN である RSN において、軸索切断後の CGRP 発現の変化を免疫組織化学法及び *in situ* hybridization (ISH) 法を用いて調べた。又、このニューロンは brain derived neurotrophic factor (BDNF) 投与によって GAP-43 の発現を増加させることから、BDNF によって軸索再生が促される可能性がある。そこで BDNF 投与が CGRP の発現に変化を及ぼすかどうかについても調べた。

#### 【方法】

雄性 SD 系ラットを使って、ペントバルビタール麻酔下に頸部脊髄を露出し、C2 レベルで片側の側索を切断して、RSN の軸索を切断した。

免疫組織化学；側索切断14日後に5匹のラットを4%パラホルムアルデヒドで経心臓的に灌流し、中脳を取り出してクライオスタットで30  $\mu$ m の浮遊切片を作り、anti-CGRP polyclonal 抗体を反応させた後 DAB 反応で発色させた。

ISH；側索切断4, 7, 14, 28, 56日後に各々3匹ずつ断頭し、脳を取り出してクライオスタットで16  $\mu$ m の切片

を作成。α-又はβ-CGRP mRNA に対する oligonucleotide probe を<sup>35</sup>S でラベルしたものを使って autoradiography で可視化した。

BDNFの影響;10匹のラットで側索切断7日後に軸索を切断された側の赤核近傍に30Gのカニューラを挿入し、BDNF(500ng/ml)若しくはコントロールとして0.1M phosphate-buffered salineを1μl/hで7日間投与した後、断頭した。その後は上記ISH法と同様に調べた。

#### 【成績】

コントロール側の赤核ではCGRPもα、β-CGRP-mRNAも検出されなかった。軸索切断側の赤核ではニューロンの萎縮のために一切片内に含まれるニューロンの数が時間と共に反対側の約60%に減少すると同時に免疫組織化学上CGRPの発現がみられた。ISHではβ-CGRP mRNAが優位に発現しており、4日後で軸索を切断された側の約18%のRSNに発現がみられ、その後ゆっくりと減少していった。BDNF投与は軸索切断後のRSNの萎縮を完全に回復させたが、CGRP mRNAの発現には有意な変化を及ぼさなかった。

#### 【総括】

今回の研究で軸索を切断されたRSNにおいてβ-CGRPの発現が誘導されたことから、β-CGRPは障害を受けたRSNにおいて何らかの働きを持っていることが示唆された。軸索切断後にβ-CGRPが優位に増加する例は今回のRSNが最初の報告である。RSNは軸索切断直後は軸索の発芽がみられ、一部は移植した末梢神経に連絡する等、軸索再生の潜在的能力は有しているが、成熟ラットでは完全に再生することは無い。もし、β-CGRPがα-CGRPに比べて再生促進作用が弱いとすると、α-CGRP発現が充分誘導されないことが、RSNが軸索を再生できない理由の一つとして考えられる。しかし、α-CGRPとβ-CGRPはいずれも37個のアミノ酸から成り、ラットではその内1つが異なっているだけで、両者の機能的違いについては殆ど報告が無い為、β-CGRPはα-CGRPの代替物質である可能性もある。これから他のINNやEXNでの軸索切断後のCGRP発現の変化を調べることで、この問題は解決されるであろう。

今回の実験ではBDNFの局所投与ではCGRP mRNAの発現に有意な変化は見られなかった。最近、BDNFは胎生ラットの脊髄運動ニューロンにおいてはα-CGRPを増加させ、β-CGRPを減少させるが、成熟ラットにおいては効果はないことが報告された。今回の結果も、成熟に伴うBDNF感受性の低下を反映しているのかもしれない。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、運動神経細胞の軸索の再生に関連すると考えられているカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)が中枢神経に内在し、完全な軸索の再生が起こらない赤核脊髄路ニューロンにおいても発現誘導されることを免疫組織化学法を用いて示し、更にそれが、これまで発現誘導が報告されているαタイプではなく、βタイプ優位であることをin situ hybridization法を用いて示した。更にbrain derived neurotrophic factorを局所投与すると、軸索切断後の赤核細胞の高度な萎縮は完全に抑えられても、そのCGRP発現には有意な変化が起こらないことを示した。

上記の研究結果は中枢神経に内在するニューロンの軸索切断後に神経ペプチドの発現が変化することを示した最初の報告であると共に、構造的にはCGRPを発現していない細胞で、βタイプ優位なCGRP発現誘導が起こることを証明した最初の研究である。この研究結果はこれまでα-CGRPでしか行われてこなかったこのペプチドの神経機能の解析に一石を投じるものであり、神経傷害後の軸索再生においてβ-CGRPの役割を検討する必要性を示唆するものである。

以上のことから、本研究は学位の授与に値するものとする。