

高齢者の末梢神経障害における 再生・修復関連因子の研究

(H10-長寿-122)

平成10年度厚生科学研究費補助金長寿科学総合研究事業

研究報告書

平成11年3月

主任研究者 祖父江 元

(名古屋大学医学部教授)

高齢者の末梢神経障害における 再生・修復関連因子に関する研究

祖父江元 (名大神経内科, 教授)

ヒトの各種のニューロパチー 81 例において, 神経栄養因子とその受容体の発現を検討した. 神経栄養因子 mRNA は末梢神経障害の病変局所で増加した. 神経栄養因子は軸索障害型, 脱髄型障害それぞれのニューロパチーで増加し, 受容体は軸索障害の程度とよく相関した. 高齢者のニューロパチーでも同様であった. この疾患での発現レベルの変化は病態と強く関連していると考えられ, 神経栄養因子の臨床応用に際して基礎となるものと思われた.

A. 研究目的

神経栄養因子(NTF)は胎生期に神経細胞の生存維持や分化誘導に働き, 成熟期・老齢期でも神経突起の伸展やapoptosisの抑制に重要な役割を果たしている. 特に末梢神経系では, 神経修復・再生を促進しシナプス再形成を制御している. NTFには成長因子やcytokineなど多くがあるが, ここではneurotrophin, GDNFとneuropoietic cytokineのCNTF, IL-6, LIFについて触れる. 近年のgene targetingなどの研究により感覚神経細胞, 自律神経細胞, 運動神経細胞に特異的なNTFがあり, さらに後根神経節ではmodality別の感覚細胞のsubsetsとNTFとの関係が明らかになっている. NGF-TrkA系は小型細胞に, BDNF-TrkB系は中型細胞に, NT-3-TrkC系は大型細胞を栄養している. また胎生期にNT-3からBDNFに, 生後NGFからGDNFに反応性が変換することも知られている. 一方, 脊髄運動神経細胞には主としてBDNF, GDNFとCNTFが栄養作用を持ってい

る. しかし, 高齢者の末梢神経障害の病変局所でNTFとその受容体がどのような動態を示すのかは必ずしも十分に解明されてはいない.

B. 研究方法

ニューロパチーはChurg-Strauss症候群, 多発性動脈炎などの血管炎32例, GBS(Guillain-Barre症候群)CIDP(慢性炎症性脱髄性多発神経炎)27例, シェーグレン症候群, FAP(Familial amyloidotic polyneuropathy)を含むその他のニューロパチー22例の計81例と対照は7例である. 生検腓腹神経におけるNGF, BDNF, NT-3と受容体(p75, TrkA, TrkB, TrkC), GDNFと受容体(Ret, GDNFR- α), CNTF, IL-6, LIFと受容体(gp130, CNTR α , LIFR β , IL-6R α)それぞれのmRNAsの発現レベルをRT-PCR法により定量した. RT反応の後, PCRを $[a\text{-}^{32}\text{P}]dCTP$ のinternal labelingで行ないPCR産物をnondenaturing polyacrylamide gelにて電気泳動した. mRNAレベルはBAS2000を用いて

測定し cyclophilin mRNA に対する相対比として発現量を求めた。RT-PCR法における定量性はPCRのcycle数とtotal RNA量について解析し、特異性についてはRT-PCR産物の制限酵素切断により得られる産物のサイズにより検討した。また、digoxigenin-labeled probeを用いてin situ hybridization (ISH)を行ないその局在を検討した。

C. 研究結果

ニューロバチーでは、NGF、BDNF、NT-3、GDNF、IL-6、LIF mRNAsはいずれも程度の差はあれ障害組織内で上昇を示したが、CNTFは減少した。疾患特異性は見られなかった。受容体mRNAではp75、GDNFR- α 、CNTFR α 、LFR β 、IL-6R α 、gp130は障害神経組織で一般的に増加したが、TrkB、TrkCは減少しTrkA、Retの発現は認めなかった。神経栄養因子mRNAsは軸索障害を主体とするChurg-Strauss症候群、多発性動脈炎などの血管炎、脱髄病変を主体とするGBS/CIDP、両者のニューロバチーで上昇が見られたが、p75、GDNFR- α mRNAsは軸索障害型での増加が著明であった。p75、GDNFR- α mRNAsの発現量について、組織学的所見より得られた軸索変性、節性脱髄の程度と多変量解析を行なうとp75、GDNFR- α mRNAsの発現レベルは軸索病変の程度と有意な正の相関を示した。またISHでは、p75、GDNFR- α mRNAは変性した軸索周囲のSchwann細胞に局在したが、NGF、GDNF mRNAsは検出限界以下であった。

D. 考察

比較的新しく発見された神経栄養因子のGDNFとその受容体GDNFR- α はニューロバチーで増加し、GDNFR- α は軸索病変の程度と相関した。また、ニューロバチーの病変局所において神経栄

養因子NGF、BDNF、NT-3が増加し高親和性受容体trkB、trkCが減少し、さらに低親和性受容体p75の発現が軸索病変の程度と相関することを報告した。Schwann細胞にはtrkB、trkCのtruncated formは存在するが、tyrosine kinase domainを持つtrkB、trkC、trkAは見られない。GDNF-RET系でもGDNFの機能的受容体のRETは検出されなかった。Schwann細胞のp75と神経細胞のtrkA系との関係と同様に、損傷神経部でSchwann細胞のGDNFR- α が増加したGDNFを捕捉し再生軸索末端の機能的受容体RET-GDNFR- α に提供することによって、神経再生が促進されると考えられる。このようにGDNFR- α の発現には軸索-Schwann細胞interactionが重要であるが、GDNFの発現誘導には他の因子の関与が考えられる。p75、GDNFR- α の発現はともに軸索-Schwann細胞 interactionに関係するが、両者の発現レベルの間に相関関係はなくそれぞれ独立した調節機構が働いているものと思われる。

近年のgene targetingなどの研究により、後根神経節の感覚神経細胞ではmodality別の感覚細胞の subsetsと神経栄養因子との関係が明らかにされた。NGF-TrkA系、GDNF-RET系は小径線維を持つ小型細胞を、NT-3-TrkC系は大径線維を持つ大型細胞を栄養している。末梢神経障害を末梢神経の線維ごとに詳細に検討することにより、個々の神経栄養因子の特異的な機能が解明される可能性がある。

また、これらの発現動態はラット軸索切断モデルの結果と類似していたが、発現調節機序はそれぞれ異なっていると思われた。神経栄養因子により神経細胞体や神経突起、Schwann細胞に存在する特異的受容体を介して末梢神経の修復・再生が促進されることが期待できる。病変局所に充分量の外因性の神経栄養因子を補充す

ることに神経栄養因子治療の意義があると考えられる。

E. 結論

神経栄養因子mRNAは末梢神経障害の病変局所で増加した。神経栄養因子は軸索障害型、脱髄型障害それぞれのニューロパチーで増加し、また特にp75, GDNFR- α は軸索障害の程度とよく相関した。この疾患での発現レベルの変化は病態と強く関連していると考えられ、神経栄養因子の臨床応用に際して基礎となるものと思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sobue G, Yamamoto M et al. Expression of mRNAs for neurotrophins (NGF, BDNF, and NT-3) and their receptors (p75, Trk, TrkB, and TrkC) in human peripheral neuropathies. *Neurochem. Res.* 23: 821-829, 1998.
- 2) Yamamoto M, Li M et al. Expression of low-affinity neurotrophin receptor p75 in the peripheral nervous system of human neuropathies. *Acta Neuropathol.* 95: 597-604, 1998.
- 3) Yamamoto M, Mitsuma N et al. Expression of GDNF and GDNFR- α mRNAs in human peripheral neuropathies. *Brain Res.* 809: 175-181, 1998.
- 4) Mitsuma N, Yamamoto M et al. Expression of GDNF receptors (RET and GDNFR- α) mRNAs in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res.* in press
- 5) Yamamoto M, Mitsuma N et al. Expression of GDNF and GDNFR- α mRNAs in muscles of patients with motor neuron diseases. *Neurochem. Res.* in press

2. 学会発表

- 6) 瀧間典雅, 山本正彦他: 筋萎縮性側索硬化

- 症におけるGDNFおよびGDNF受容体 mRNAsの発現. 第39回日本神経学会総会, 京都, 1998. 5
- 7) 山本正彦, 瀧間典雅他: 運動ニューロン疾患の筋組織におけるGDNFおよびGDNF受容体 mRNAsの発現. 第39回日本神経学会総会, 京都, 1998. 5
 - 8) 山本正彦, 瀧間典雅他: 末梢神経障害におけるGDNFおよびGDNF受容体(RET, GDNFR- α) mRNAsの発現. 第39回日本神経学会総会, 京都, 1998. 5

研究成果の刊行に関する一覧

刊行書籍または雑誌名	刊行年	刊行書店名	執筆者
Hum Mut 11: 109-113 Clustering of CMT 1A duplication breakpoints in a 700 bp interval of the CMT 1A - REP repeat.	1998	Wiley-liss,Inc	祖父江 元
Neuroscience 82(3): 641-651 Nerve growth factor maintains regulation of intracellular calcium in neonatal sympathetic neurons but not in mature or aged neurons.	1998	Elsevier Science Ltd	祖父江 元
Neurochem Res 23(6): 821-829 Expression of mRNAs for neurotrophins (NGF, BDNF, and NT-3) and their receptors (p75 ^{NGFR} , Trk, and TrkC) in human peripheral neuropathies.	1998	Plenum Publishing Co	祖父江 元
J Neuro Sci 154: 66-71 Clinicopathological features of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy in childhood.	1998	Elsevier Science Ltd	祖父江 元
Muscle & Nerve : 805-808 Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy with diffuse and massive peripheral nerve hypertrophy : distinctive clinical and magnetic resonance imaging features.	1998	John Wiley & Sons, Inc	祖父江 元
Biochem Biophys Res Com 248: 93-97 Accelerated formation of N-(carboxymethyl) lysine, an advanced glycation end product, by glyoxal and 3-Deoxyglucosone in cultured rat sensory neurons.	1998	Academic Press	祖父江 元
Acta Neuropathol 95: 641-648 Tissue distribution of pathological lesions and Hu expression in Paraneoplastic sensory neuronopathy.	1998	Springer-Verlag	祖父江 元
Acta Neuropathol 95: 597-604 Expression of low-affinity neurotrophin receptor p75 ^{NTR} in the peripheral nervous system of human neuropathies.	1998	Springer-Verlag	祖父江 元
Brain Res 793: 321-327 Differential temporal expression of mRNAs for ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF), interleukin-6 (IL-6), and their receptors (CNTFR α , LIFR β , IL-6R α and gp130) in injured peripheral nerves	1998	Elsevier Science Ltd	祖父江 元
Ann Neurol 44(2): 249-254 Nuclear inclusions of the androgen receptor protein in spinal and bulbar muscular atrophy	1998	the American Neurological Association	祖父江 元
Am J Pathol 153(3): 695-701 Nonneural nuclear inclusions of androgen receptor protein in spinal and bulbar muscular atrophy	1998	American Society for Investigative pathology	祖父江 元

研究成果の刊行に関する一覧

<p>Brain Res 794: 313-319 NGF prevention of neurotoxicity induced by cisplatin, vincristine and taxol depends on toxicity of each drug and NGF treatment schedule: In vitro study of adult rat sympathetic ganglion explants</p>	1998	Elsevier Science Ltd	祖父江 元
<p>Neurol 51: 882-884 CAG repeat number correlates with the rate of brainstem and cerebellar atrophy in Machado-Joseph disease</p>	1998	American Academy of neurology	祖父江 元
<p>Biochem Biophys Res Com 252: 145-150 Caspase-3 cleaves the expanded androgen receptor protein of spinal and bulbar muscular atrophy in a polyglutamine repeat length-dependent manner</p>	1998	Academic Press	祖父江 元
<p>Brain Res 809: 175-181 Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and GDNFR-α mRNAs in human peripheral neuropathies</p>	1998	Elsevier Science Ltd	祖父江 元
<p>Nat Genet 20: 143-148 A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome)</p>	1998	Nature America Inc	祖父江 元
<p>Brain Res 810: 274-278 Differential signaling cascade of MAP kinase and S6 kinase depends on 3', 5'-monophosphate concentration in Schwann cells: correlation to cellular differentiation and proliferation</p>	1998	Elsevier Science Ltd	祖父江 元
<p>Brain Res 820: 77-85 Expression of GDNF receptor (RET and GDNFR-α) mRNAs in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis.</p>	1999	Elsevier Science Ltd	祖父江 元
<p>Brain 122: 427-439 Clinicopathological features of Churg-Strauss syndrome-associated neuropathy</p>	1999	Oxford University Press	祖父江 元

19980248

報告書続きページは「研究成果の刊行に関する一覧」にある雑誌論文の
コピーが掲載されている