

Genes With Positive Evidence of Linkage			
Candidate Gene	Mean <sup>a</sup>	P-values <sup>b</sup>	NPLscore <sup>c</sup>
CRYAB (Crystallin, alpha B)	0.553	0.016	1.834
BMP4 (bone morphogenetic protein 4)	0.549	0.035	2.230
PRG1 (proteoglycan 1)	0.541	0.040	0.710
TGFb3 (transforming growth factor, beta 3)	0.545	0.041	1.304
OPN (osteopontin)	0.541	0.044	1.147
PTH1R (parathyroid hormone receptor 1)	0.545	0.045	1.000
IGF1 (insulin-like growth factor 1)	0.536	0.049	0.878

<sup>a</sup> Mean proportion and <sup>b</sup>P-value were determined by SIBPAL  
<sup>c</sup> NPL score was calculated by GENEHUNTER

図4. 骨代謝関連遺伝子およびマイクロアレイ解析により有意差 (P < 0.05) が認められた遺伝子

その他の連鎖の認められた遺伝子に関して、SNPを獲得し、haplotypeを構築してhaplotype頻度の比較を患者、対照で行い Common Disease である OPLLの原因遺伝子を追究していかねばならない。

#### E. 結論

我々は骨代謝関連遺伝子の近傍のマイクロサテライトマーカーを利用して、連鎖解析を行った。

骨代謝に関連する既知の遺伝子(66個)、およびマイクロアレイによる候補遺伝子(24個)のうち、SIBPALによる解析では7つのマーカーにおいて連鎖を認めた。

GENEHUNTERによる解析においては、NPLscoreが2.2以上のものは、BMP4から1.3Mbの位置にあるD14S276のみであった。

今後、我々はBMP4を含めその他の連鎖の認められた遺伝子に関して、SNPを獲得し、haplotypeを構築して関連解析を進めていく。

#### [参考文献]

- 1) Ho NC, Jia L, Driscoll CC, Gutter EM, Francomano CA 2000 A Skeletal Gene Database. *J Bone Miner Res* **15** : 2095-2122.
- 2) Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prevost MC, Faure A, Chateau D, Chapon F, Tome F, Dupret JM, Paulin D, Fardeau M 1998 A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet* **20** : 92-95.
- 3) Klemenz R, Frohli E, Steiger RH, Schafer R, Aoyama A 1991 Alpha B-crystallin is a small heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **88** : 3652-3656.
- 4) Lander E, Kruglyak L 1995 Genetic dissection of complex traits: guidelines for

interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* **11** : 241-247.

#### F.

##### 1. 論文発表

H. Mori, H. Ikegami, Y. Kawaguchi, S. Seino, N. Yokoi, J. Takeda, I. Inoue, Y. Seino, K. Yasuda, T. Hanafusa, K. Yamagata, T. Awata, T. Kadowaki, K. Hara, N. Yamada, T. Gotoda, N. Iwasaki, Y. Iwamoto, T. Sanke, K. Nanjo, Y. Oka, A. Matsutani, E. Maeda and M. Kasuga. (2001) Association of the Pro12-Ala substitution in peroxisome proliferator-activated receptor g2 both with resistance to development of diabetes and with impairment of insulin secretion and disease severity in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* (In press).

Maeda, S., Ishidou, Y., Koga, H., Taketomi, E., Ikari, K., Komiya, S., Takeda, J., Sakou, T., and Inoue, I. 2001. Functional impact of human collagen  $\alpha 2$  (XI) gene polymorphism in pathogenesis of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J. Bone. Miner. Res.* In press.

Aihara, Y., Onda, H., Teraoka, H., Yokoyama, Y., Seino, Y., Kasuya, H., Hori, T., Tomura, H., Inoue, I., Kojima, I., and Takeda, J. 2001. Assignment of SLC17A6 (alias DNPI), the gene encoding brain/pancreatic islet-type Na<sup>+</sup>-dependent inorganic phosphate cotransporter to human chromosome

11p14.3. *Cytogenet. Cell Genet.* In press.

Havelka, S., Koga, H., Maeda, S., Inoue, I., Vesela, A., Pavelkova, A., Halman, L., and Ruzicova, S. 2001. Are diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) and ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine (OPLL) genetically related? *Annal. Rheum. Dis.* In press.

Yabe, I., Sasaki, H., Yamashita, I., Tashiro, K., Tatei, A., Suzuki, Y., Kida, H., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Hokezu, Y., Nagamatsu, K., Oda, T., Ohnishi, A., Inoue, I., and Hata, A. 2001. Predisposing chromosome of spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) in Japanese. *J. Med. Genet.* In press.

Nishigori, H., Tomura, H., Kanamori, M., Yamada, S., Kikuchi, N., Sho, K., Tonooka, N., Onigata, K., Inoue, I., Kojima, I., Yamagata, K., Yang, Q., Matsuzawa, Y., Kohama, T., Miki, T., Seino, S., Kim, M., Choi, H., Moore, D., Takeda, J. 2001. Mutations in the small heterodimer partner gene are associated with mild obesity in Japan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 575-580.

Takeoka, S., Unoki, M., Onouchi, Y., Doi, S., Fujiwara, H., Miyatake, A., Fujita, K., Inoue, I., Nakamura, Y., and Tamari, M., 2001. Amino-acid substitutions in the IKAP gene product significantly increase risk for bronchial asthma in children. *J. Hum. Genet.* 46, 57-63.

Maeda, S., Koga, H., Matsunaga, S., Numasawa, T., Takeda, J., Harata, S., Sakou, T., Inoue, I. 2001. Gender-specific haplotype association of collagen  $\alpha 2$  (XI) gene in ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J. Hum. Genet.* 46, 1-4.

Aihara, Y., Mashima, H., Onda, H., Hisano, S., Kasuya, H., Hori, T., Yamada, S., Tomura, H., Yamada, Y., Inoue, I., Kojima, I., Takeda,

J. 2000. Molecular cloning of a novel brain-type  $\text{Na}^+$ -dependent inorganic phosphate cotransporter. *J. Neurochem.* 74, 2622-2625.

## 2. 学会発表

古島弘三, 猪狩勝則, 前田真吾, 下小野田一騎, 古賀公明, 小宮節郎, 原田征行, 井ノ上逸朗  
後縦靭帯骨化症の候補遺伝子解析  
第15回日本整形外科学会基礎学術集会:京都国際  
会館 2000/9/28-29

Candidate Approach Identifying Susceptible Gene for Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the Spine  
K. Furushima, K. Ikari, S. Maeda, H. Koga, S. Komiya, K. Shimo-onoda, S. Harata, I. Inoue  
The Orthopaedic Research Society,  
February 25-28, 2001 San Francisco

Gene Mapping of Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the Spine by Genome Screen and association study  
K. Ikari, K. Furushima, S. Maeda, H. Koga, S. Komiya, S. Harata, I. Inoue  
The Orthopaedic Research Society,  
February 25-28, 2001 San Francisco

Candidate Approach Identifying Susceptible Gene for Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the Spine  
K. Furushima, K. Ikari, S. Maeda, H. Koga, S. Komiya, K. Shimo-onoda, S. Harata, I. Inoue  
American Society of Bone and Mineral Research,  
September 22-26, 2000 Toronto

Mapping of Major Susceptibility Locus for Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the Spine to Chromosome 21q by Genome-Wide Linkage Analysis  
K. Ikari, K. Furushima, S. Maeda, H. Koga, S. Komiya, K. Shimo-onoda, S. Harata, I.

Inoue  
American Society of Bone and Mineral  
Research,  
September 22-26, 2000 Toronto

The Alteration of mRNA Expression of  
Candidate Genes for Ossification of the  
Posterior Longitudinal Ligament of the  
Spine during Normal Human Osteoblast  
Differentiation.

S. Maeda, K. Ikari, H. Furushima, K.  
Shimo-onoda, H. Koga, S. Matsunaga, K.  
Yone, S. Harata, S. Komiya, I. Inoue  
American Society of Bone and Mineral  
Research,  
September 22-26, 2000 Toronto

Genome-Wide Linkage Analysis for  
Ossification of the Posterior Longitudinal  
Ligament of the Spine with Evidence for  
Linkage to a Region on Chromosome 21  
K. Ikari, K. Furushima, S. Maeda, H. Koga,  
J. Takeda, S. Harata, I. Inoue  
Spine Across the Sea,  
July 23-27, 2000 Hawaii

Pathogenesis of Ossification of the Posterior  
Longitudinal Ligament of the Spine  
S. Maeda, H. Koga, Y. Ishidou, I. Inoue  
Spine Across the Sea,  
July 23-27, 2000 Hawaii

Genome-wide linkage study for ossification  
of the posterior longitudinal ligament of the  
spine reveals a major susceptibility locus on  
chromosome 21q.  
K. Furushima, K. Ikari, S. Maeda, H. Koga,  
J. Takeda, S. Harata, I. Inoue  
Annual Clinical Genetics Meeting,  
March 9-12, 2000, Palm Springs

# 脊柱靱帯骨化症におけるTGF-β 1 遺伝子多型の解析

大河 昭彦 (千葉大学整形外科), 山崎 正志 (千葉大学整形外科),  
相庭 温臣 (千葉大学整形外科), 池田 義和 (千葉大学整形外科),  
後藤 澄雄 (千葉大学整形外科), 守屋 秀繁 (千葉大学整形外科)

KEYWORDS=ossification of the spinal ligaments, TGF-β 1, polymorphism

## 【研究要旨】

【目的】骨粗鬆症との相関が指摘されている TGF-β 1 遺伝子の一塩基多型について, case-control studyにより脊柱靱帯骨化症への遺伝的関与を検討した。【方法】脊柱靱帯骨化症例:162例と, controlとして非骨化症症例:94例から genomic DNAを抽出し, TGF-β 1 遺伝子の T29C (Leu 10 Pro) 多型について, SSCP法を用いて各症例の genotypeを決定し, genotypeの頻度, allele頻度と脊柱靱帯骨化との相関を, カイ 2 乗検定により検討した。【結果】TGF-β 1 遺伝子の T29C (Leu 10 Pro) 多型において両群間の allele頻度に有意な差はみられず, 相関はみられなかった。

【はじめに】脊柱靱帯骨化症の成因には, 多因子の遺伝的要因と, 局所のメカニカルファクターや代謝などの環境要因の双方が関わりと考えられるが, 詳細は未だ不明である。

TGF-β は骨形成における局所の成長因子のひとつであり, 骨軟骨形成において重要な役割を果たす。これまで我々は, 脊柱靱帯骨化症において靱帯骨化移行部から離れた領域の後縦靱帯が抗 TGF-β 抗体に陽性であり, 非骨化症後縦靱帯にはみられない所見であること<sup>1)</sup>, 靱帯骨化症由来培養靱帯細胞は TGF-β 1 添加に反応して基質合成が亢進すること<sup>2)</sup>を報告した。

TGF-β 1 遺伝子の遺伝子多型については, これまで骨塩量あるいは骨粗鬆症との相関が示されており<sup>3) 4) 5)</sup>, 特に T29C (Leu 10 Pro) 多型において, CC genotypeは TC, TTの genotypeに比べて血中 TGF-β 1 濃度が高く, 骨塩量が多いことが報告されている<sup>3)</sup>。

今回, この骨代謝に関わる TGF-β 1 遺伝子多型が脊柱靱帯骨化症に関与するかを検討するため, case-control studyによる相関解析を行った。

【方法】脊柱靱帯骨化症症例:162例と, コントロールとして非骨化症症例:94例を用いて解析を行った。非骨化症症例は, OPLL発症年齢に達しているが脊柱靱帯骨化のないことが X-Pにて確認されたものとした。これらの症例の末梢血から genomic DNA

を抽出し, 解析に用いた。

TGF-β 1 遺伝子の T29C (Leu 10 Pro) 多型を含む 177bp の PCR を作製し, PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)法を用いて解析した。primerは, forward : 5'-ACCACACCAGCCCTGTTC-3' reverse : 5'-CACCAGCTCCATGTTCGATAG-3'を用いた。各症例の genotypeを決定し, genotypeの頻度, allele頻度と脊柱靱帯骨化の有無について, カイ 2 乗検定により相関を検討した。

【結果】T29C多型における脊柱靱帯骨化症および非骨化症症例の genotypeの頻度, allele頻度, および allele頻度の検定結果を表 1 にしめす。骨化症には T alleleが多い傾向にあったが, 両群間の allele頻度に統計学的な有意差はみられなかった。

【考察】今回の研究結果では, TGF-β 1 遺伝子の T29C (Leu 10 Pro) 多型と脊柱靱帯骨化の有無について, 有意な相関はみられなかった。また, 罹患椎体数, 骨化高位, 男女別, についても相関の検討を行ったが, 相関はみられなかった。したがって, TGF-β 1 遺伝子の T29C (Leu 10 Pro) 多型は脊柱靱帯骨化症の発生に関与しないという結果が得られた。

【結語】TGF-β 1 遺伝子の T29C (Leu 10 Pro) 多

genotype	TT	TC	CC
OSL	37	81	44
non - OSL	15	45	34
allele	T	C	
OSL	155	169	
non - OSL	75	113	
<b>p value</b>	<b>0.0814</b>		

表1 TGF- $\beta$ 1 遺伝子 T29C 多型の解析結果

型と脊柱靱帯骨化の有無について、有意な相関はみられなかった。

〔参考文献〕

- 1) 山崎正志, 茂手木博之, 中島文毅, 池田義和, 金 民世, 後藤憲一郎, 後藤澄雄, 守屋秀繁: 頰椎後縦靱帯骨化症例における TGF- $\beta$  の局在と役割. 厚生省特定疾患 脊柱靱帯骨化症調査研究班 平成7年度研究報告書
- 2) 金 民世, 後藤澄雄, 山崎正志, 寺門 淳, 茂手木博之, 後藤憲一郎, 守屋秀繁, 藤村真示: 培養脊柱靱帯細胞に対する TGF- $\beta$  1 の作用. 厚生省特定疾患 脊柱靱帯骨化症調査研究班 平成6年度研究報告書
- 3) Yamada Y, Miyauchi A, Goto J, Takagi Y, Okuizumi H, Kanematsu M, Hase M, Takai H, Harada A, Ikeda K : Association of a polymorphism of transforming growth factor- $\beta$  1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women. J Bone Miner Res 13 : 1569-75, 1998.
- 4) Langdahl B, Knudsen J, Jensen H, Gregersen N, Eriksen E : A sequence variation : 713-8delC in the transforming growth factor-beta 1 gene has higher prevalence in osteoporotic women than in normal women and is associated with very low bone mass in osteoporotic women and increased bone turnover in both osteoporotic and normal women. Bone 20(3) : 289-94, 1997
- 5) Bertoldo F, D' Agruma L, Furlan F, Colapietro

F, Lorenzi M, Maiorano N, Iolascon A, Zelante L, Locascio V, Gasparini P : Transforming growth factor-beta1 gene polymorphism, bone turnover, and bone mass in Italian postmenopausal women. J Bone Miner Res 15 (4) : 634-9, 2000

## II

# 脊髄の可塑性と脊髄機能

# リポフェクチン法を用いた圧迫損傷脊髄に対する 神経栄養因子遺伝子の導入

内田 研造 (福井医科大学医学部整形外科), 馬場 久敏 (福井医科大学医学部整形外科),  
前沢 靖久 (福井医科大学医学部整形外科), 小久保安朗 (福井医科大学医学部整形外科),  
久保田 力 (福井医科大学医学部整形外科), 米 和徳 (福井医科大学医学部整形外科),  
中原 真二 (福井医科大学医学部整形外科)

KEYWORD= 脊髄損傷, 遺伝子治療, 神経栄養因子, ベクター

## 【研究要旨】

〔目的〕 リポフェクチン法により損傷脊髄に神経栄養因子発現ベクターを導入, その脊髄内発現動態を免疫組織学的に調べること。

〔方法〕 神経栄養因子発現ベクターである BDNF-Myc-His/pIRES-EGFP vector を作製した。Wistar Rat (14—16 週齢) の脊髄不全損傷モデルを作製し, ベクターを損傷部位へ投与し, 抗 BDNF 抗体, 抗 GFAP 抗体による蛍光免疫染色で評価した。

〔結果〕 抗 BDNF 抗体陽性細胞は損傷後増加, 以後プラトーとなっており, 損傷後 5 日では全 GFP 陽性細胞が抗 BDNF 抗体陽性となっていた (陽性率 100%)。抗 GFAP 抗体陽性細胞も同様に損傷後 5 日で増加し 8 日目では GFP 陽性細胞よりも有意に増加, 14 日では GFP 陰性細胞が約 55% を占めていた。

〔総括〕 導入された遺伝子はその殆どが反応性アストロサイトに貪食され, BDNF 発現の増強効果に関与するものと考えられた。

## 【はじめに】

末梢神経の軸索再生に必須とされている神経栄養因子が脊髄においても神経再生の促進因子として作用することが明らかとなってきた。損傷を受けた脊髄組織においても損傷部およびその近傍部における神経細胞はその機能維持, 再生のために神経栄養因子を強く発現し<sup>1), 2)</sup>, 圧迫損傷により, 出現するグリア細胞が brain-derived neurotrophic factor (BDNF) を強く発現しその修復に関与していると報告した<sup>3)</sup>。即ち, 脊髄損傷の治療ではこれらの神経再生, および栄養因子を損傷部位に効率的, 選択的に神経回路再生に作用させることが不可欠である。このような観点より, 最近ベクター導入による遺伝子治療が注目され, 現在のところ, 導入効率の点からアデノ, レトロウイルスが注目されている一方で, 非ウイルスベクターの代表であるリポフェクチン法は抗原性の低さ, 安全性の面でウイルスベクターより優れていると考えられている。我々はリポフェクチン法 (図 1) により損傷部位に直接神経栄養因子発現ベクターを導入, その遺伝子の脊髄内発現動態を免疫組織学的に検索した。

## 【対象と方法】

### 1) 神経栄養因子発現ベクター作製

脳心筋炎ウイルス由来で減弱化した internal ribosome entry site (IRES), enhanced green fluorescent protein (EGFP) 配列を含む pIRES-EGFP vector に対して rat brain-derived neurotrophic factor (BDNF) cDNA の cloning を行い, BDNF-Myc-His/pIRES-EGFP vector を作製した (図 2)。

### 2) 損傷モデルラットの作製と IRES/GFP ベクター注入

14—16 週齢雄性 Wistar Rat (体重: 400-500 g) を用い, 麻酔下に Th8, Th9 椎弓切除を行い, 硬膜外より 60 g の重錘で 1 分間圧迫し脊髄不全損傷モデルを作製した。損傷直後ベクターをリポフェクチン用脂質試薬: Lipofectamine と混合 (lipofectin method), 損傷部位へマイクロシリンジで  $1 \mu\text{l min}^{-1}$  (total  $10 \mu\text{l}$ ) の髄内投与を行った。

### 3) 組織化学的観察

損傷直後, IRES/GFP ベクターを上記の方法で髄注した。24 hr, 3 day, 5 day, 8 day, 11 day, 14 day

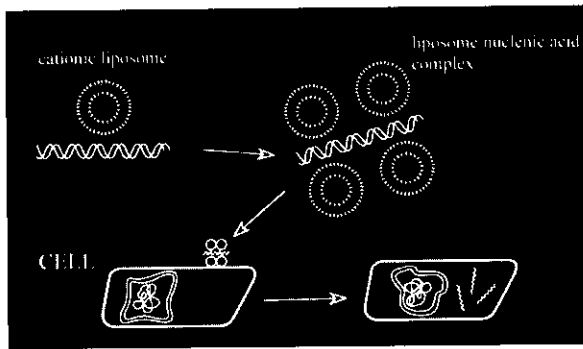


図 1. リポフェクティン法の原理

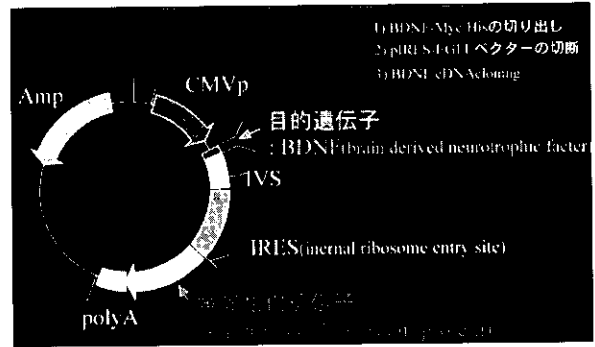


図 2. BDNF-Myc-His/pIRES-EGFP vector の構築

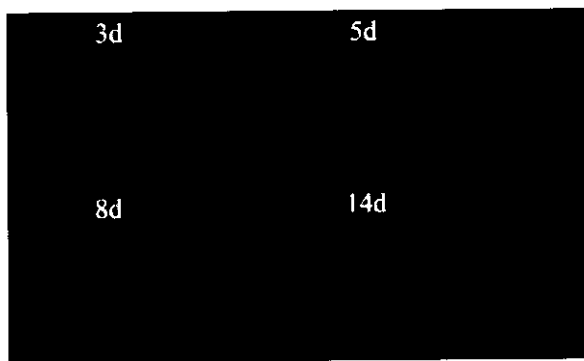


図 3. 導入され発現した BDNF  
GFP/t-BDNF

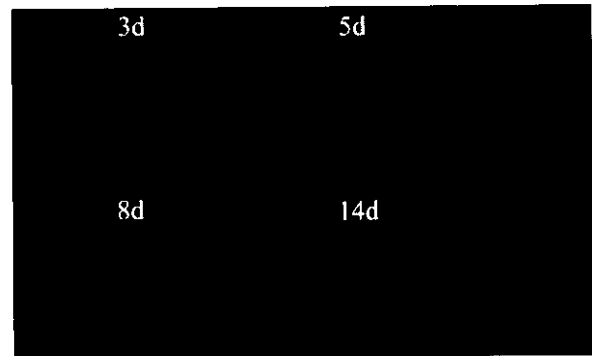


図 4. 損傷により発現したあるいは導入された BDNF  
BDNF

(各々  $n = 3$ ) 後に灌流固定を行い、凍結連続横断切片を作製した。HE 染色, 抗 BDNF 抗体, 抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体, 抗 Microtubule-Associated Protein 2a, b, c (MAP-2) を用い蛍光染色を行った。定量的評価として, 切片内の GFP 陽性細胞, 抗 BDNF 抗体陽性細胞, 抗 GFAP 抗体陽性細胞, 抗 MAP 抗体陽性細胞をカウントし評価した。ベクター注入単独群 (損傷なし) をコントロール群として評価した。

### 【結果】

注入された試薬 (GFP 陽性領域) は灰白質内に停滞しており, 経時的に減少していった。その周囲の灰白質, 白質には GFP 陽性細胞が散在しており, その数は損傷後 3, 5 日でピークでありその後減少していった (図 3)。それらの変化はコントロール群でも観察できたが明らかに損傷群で強かった。2) 抗 BDNF 抗体陽性細胞は損傷後増加, 以後プラトーとなっており, 損傷後 3, 5 日では全 GFP 陽性細胞が抗 BDNF 抗体陽性となっていた (陽性率 100%) (図 4, 5)。3) 抗 GFAP 抗体陽性細胞も同様に損傷後 3, 5 日で増加し 8 日目では GFP 陽性細胞よりも

意に増加, 14 日では GFP 陰性細胞が 45%~65% を占めていた。それに対し抗 MAP 抗体陽性細胞はほぼプラトーであった (図 6, 7)。

### 【考察】

脊髄が損傷をうけると損傷部位を中心に GFAP を強く発現する reactive astrocyte が出現しグリオオーシスが生じる<sup>4)</sup>。この変化は静止期 G0 にあった細胞周期 G1 期以降の結果であり, 神経栄養因子, サイトカインなどのリガンドを多数放出すると考えられている。一方, 脊髄損傷に対する BDNF, NT-3 など神経栄養因子投与がニューロンの生存維持, 軸索再生に有効であるとの報告が散見される<sup>5), 6)</sup>が, その作用機序についてはいまだ明らかでない。今回の結果より, 導入された BDNF 遺伝子は neuron, astrocyte の両方に導入された。そして, 5-7 日までに GFP, GFAP の発現はほぼ一致した発現カーブを示したことから, アストロサイトに多数導入されていることがわかった。しかしながら, 7 日以降 GFP に対し BDNF の増加が見られたことは, 遺伝子導入のない neuron あるいは増殖した reactive astrocyte の内因性 BDNF の発現によるも



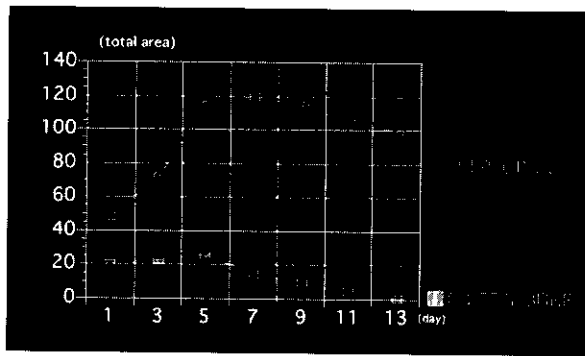


図5. GFP/t-BDNFおよびBDNF陽性細胞の経時的変化

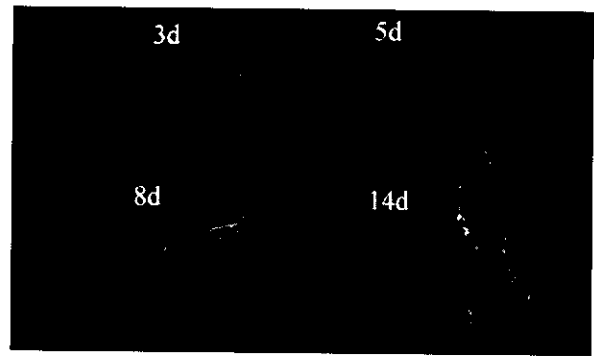


図6. reactive astrocyteの局在GFAP

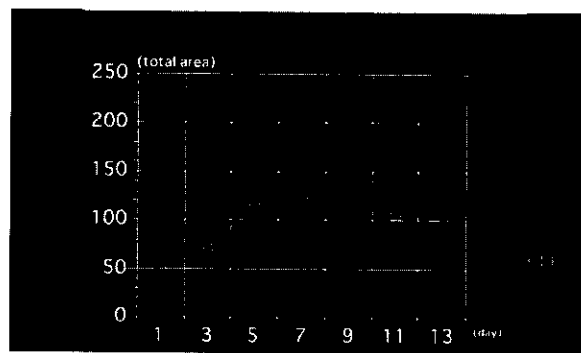


図7. GFP, MAP2およびGFAP陽性細胞の経時的変化

のと考えられた。7日以降、GFAPの増加は、1) 遺伝子が導入されなかったアストロサイトが増殖した、または2) 遺伝子導入されたアストロサイトが増殖する間に、導入遺伝子が脱落または希釈されたことが考えられた。リポフェクション法による脊髄組織への直接注入でもある程度の導入が可能であった。導入されたBDNF遺伝子は神経細胞、特に反応性アストロサイトに認められ、BDNF発現の増強効果に関与するものと考えられた。今回の検討では導入された遺伝子は、ニューロン、アストロサイトに導入されBDNF発現の増強効果に関与するものと考えられた。アストロサイト-ニューロンの細胞間情報伝達を考慮すれば、導入された遺伝子は神経細胞の生存維持と可塑性に寄与する可能性が実験的に示唆された。

[参考文献]

1) Baba H, Maezawa Y, Imura S, Kawahara N, Nakahashi K, Tomita K. Quantitative analysis of the spinal cord motoneuron under chronic compression: an experimental observation in the mouse. *J Neurol* 1996 ; 243 : 109-116.

2) Baba H, Maezawa Y, Uchida K, Imura S, Kawahara N, Tomita K, Kudo M. Three-dimensional topographic analysis of spinal accessory motoneurons under chronic mechanical compression: an experimental study in the mouse. *J Neurol* 1997 ; 244 : 222-229.

3) Uchida K, Baba H, Maezawa Y, Furukawa S, Furusawa Y, Imura S. Histological investigation of spinal cord lesions in the spinal hyperostotic mouse (twy/twy) : morphological changes in anterior horn cells and immunoreactivity to neurotrophic factors. *J Neurol* 1998 ; 245 : 781-793.

4) Ikuta F. The process of brain lesion repair and activity of astrocytes. In : Ikuta F (ed) *Neuropathology in brain research*. Elsevier, Amsterdam, 1991 ; 211-231.

5) Schnell L, Schneider R, Kolbeck R, Barde Y-A, Schwab ME. Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion.

Nature 1992 ; 367 : 170-173.

- 6) Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H, Barde Y-A. Brain-derived neurotropic factor prevents death of motoneurons in newborn rats after nerve section. Nature 1992 ; 360 : 170-173.

# 培養脊髄神経細胞，グリア細胞の機械的ストレスに対する生存活性に関する研究

内田 研造（福井医科大学医学部整形外科），馬場 久敏（福井医科大学医学部整形外科），  
前沢 靖久（福井医科大学医学部整形外科），小久保安朗（福井医科大学医学部整形外科），  
久保田 力（福井医科大学医学部整形外科）

KEYWORD=機械的ストレス，脊髄神経細胞，脊髄グリア細胞，神経栄養因子，生存活性

## 【研究要旨】

〔目的〕 機械的なストレスに対する細胞単独での生物学的活性の変化を調べるために，培養細胞に周期的牽引負荷を与えることができる細胞伸縮装置を用いて免疫組織化学的検討を行った。

〔方法〕 生後1—2日 Sprague-Dawley ラット脊髄細胞を用いた。細胞の機械的ストレスには FX-3000TM-Flexercell Strain Unit を使用した。刺激開始後，経時的に細胞マーカーおよび神経栄養因子（BDNF，NT-3）の double stain で評価した。

〔結果〕 GFAP 陽性細胞数，MAP2 陽性細胞数共に経時的に減少していった。抗 GFAP/BDNF 抗体陽性細胞，抗 GFAP/NT-3 抗体陽性細胞は6時間で増加していったが，抗 MAP2/BDNF 抗体陽性細胞，抗 MAP2/NT-3 抗体陽性細胞数は特に著明な変化はなかった。

〔総括〕 培養細胞下での機械的ストレスに対するアストロサイトが生存維持，機能修復に関与している可能性が示唆された。

## 【はじめに】

神経損傷における重篤な機能喪失は，損傷を受けた神経細胞が生存できず細胞死へ至ることに起因している。従って，損傷後に生じる神経細胞の細胞死を防ぐことができれば，機能損失を回避できると考えられるが，そのためには神経細胞自体がもつ損傷に対するメカニズムを理解しなければならない。特に，整形外科領域においては，後縦靭帯骨化症，頸椎症患者にみられる脊髄に対する圧迫，損傷などの機械的なストレスに対しての，神経組織，細胞群の変化についての知見はその治療に必須と考えられる。我々は過去に，慢性に圧迫を受ける脊髄組織を観察し，圧迫に対して，脱落，萎縮といった組織学的変化を伴いながらも，生き残った神経細胞は，その吻側尾側に再分布し，しかも soma size, dendritic tree 増大といった形態学的変化を報告してきた<sup>1) 2)</sup>。また神経細胞周囲のグリア細胞も Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3) を産生し，組織の修復，再生に関与している可能性を in vivo で証明した<sup>3)</sup>。しかし，組織に対する損傷圧迫は，組織の虚血および炎症など神経細胞周囲の環境の影響が生じていた

め，細胞単独での生物学的活性を知ることは不可能であり，細胞レベルでの機械的ストレスの変化を観察した報告はいまだ見受けられない。Flexercell strain unit は培養細胞に周期的牽引負荷を与えることができる細胞伸縮装置<sup>4)</sup>であり，筋肉細胞，血管内皮細胞，造骨細胞の mechanical signal のメカニズム解明に応用されている<sup>5)</sup>。

今回，我々はこの装置を用いて，脊髄神経細胞，グリア細胞の mechanical stress の応答に神経栄養因子その他の因子が関与しているかを in vitro で明らかにすることを目的とした。

## 【対象と方法】

a) 機械的ストレス下の脊髄神経細胞，グリア細胞の形態変化

生後1—2日 Sprague-Dawley ラットを Hanks' balanced salt solution (HBSS) 液中に摘出した。Hank 液排出後，5 ml の 0.25 % トリプシンと 5 滴の 0.2 % DNase 液を加え，37 °C で 30 分間保温した。培養液は Dulbecco's Modified Eagle Medium (MEM) で，これに 10 % 非働化ウマ血清，5 mg/ml グルコース，ペニシリン 100 U/ml，100 ug/ml スト

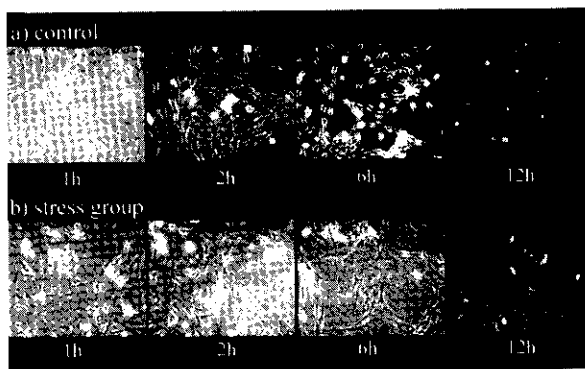


Figure. 1

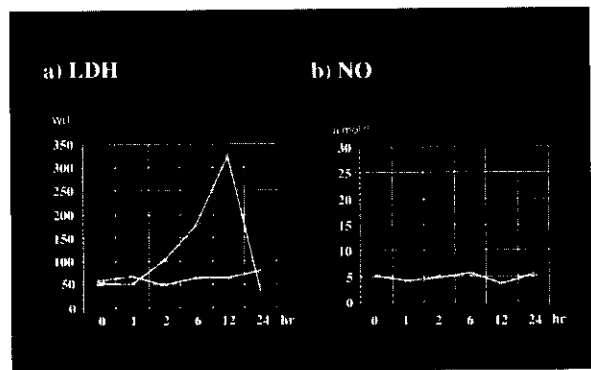


Figure. 2

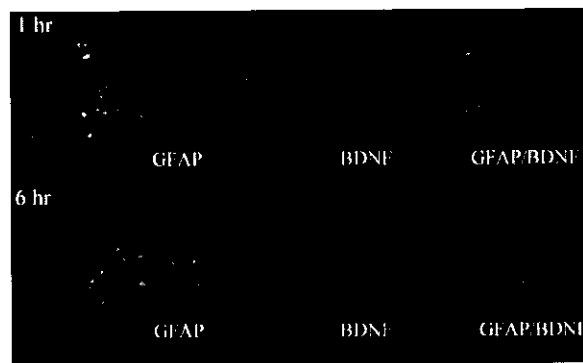


Figure. 3

レプトマイシンを添加し6日間培養した。細胞の機械的ストレスには FX-3000TM-Flexercell Strain Unit (Flexercell International Corporation, Hillsborough, NC) を使用した。細胞は  $3 \times 10^4$  /wellにて Flex I flexible bottomed plate (ストレス処置群), Flex II flexible control plate (コントロール群) に播種し, 5% CO<sub>2</sub> incubator内で機械的刺激を開始した。機械的ストレスはELLISら<sup>4)</sup>の報告を参考に1秒間伸展/弛緩(最大20%牽引)を継続的に加えた。刺激開始後, 経時的に(1, 2, 6, 24, 48時間)細胞形態を観察した。

#### b) 細胞障害の程度

細胞障害の指標として Hank 液中の nitric oxide (NO), Lactate dehydro-genase (LDH) を測定した。NOは Griess 法<sup>6)</sup> に準じ測定しそれぞれ経時的に観察した。

#### c) 免疫染色

細胞特異型マーカーとして, 神経細胞は, Microtubule-Associated Protein 2a, b, c (MAP-2) : mouse monoclonal antibody

(NeoMakers), アストロサイトは Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP) : rabbit polyclonal antibody (Sanbio) を用いて fluorescein (FITC) で識別, 抗 BDNF (santa cruz) は rhodamine で標識し, double stain で評価した。

#### 【結果】

##### a) 経時的形態変化と細胞障害の程度

neuron somaの縮小, 細胞膜の肥厚, 細胞間質の拡大が6時間以上のストレスで観察された (figure 1)。LDH, NO値もその形態変化とほぼ一致して6時間以降で高値を示した (figure 2)。

##### b) BDNF, NT-3 immunoreactivityの経時的変化

GFAP 陽性細胞数は経時的変化と共に減少していった。Double stainの結果では抗GFAP/BDNF抗体陽性細胞は6時間で陽性細胞が増加していた (figure 3)。

#### 【考察】

ELLISらは in vitroにおける細胞障害は膜の変形の程度により変化していると報告しているが<sup>4, 7)</sup>,

今回の結果では経時的変化でもLDH, NOという細胞障害が観察された。Ellisらの伸縮条件は伸縮率を30--70%にし, 50m秒のパルスで行っているが, これは生体内では存在し得ない条件であり, 今回我々は予備実験の結果より伸縮率15%, 伸縮回数が毎秒1回程度の比較的軽度なストレス条件を設定した。その結果ストレス開始後6時間で形態変化, 神経細胞より放出されるLDH活性の増加, NO活性の増加が観察された。中枢神経系におけるNOの機能的役割についてはシナプス可塑性, 細胞の増殖と活性化, 細胞死などが考えられているが<sup>8), 9)</sup>, アストロサイトの活性の増加を考えれば, 今回のNO値の変化はニューロン死の結果と推測される。しかし, 今後inducible type of nitric oxide synthase (i-NOS)などの検討も必要である。

今回の二重染色の結果では, 抗GFAP/BDNF抗体陽性細胞, 抗GFAP/NT-3抗体陽性細胞共に細胞障害が生じる前の6時間の時点でのimmuno-reactivityが増加していた。この変化は機械的ストレスに対して, 反応性アストロサイトがNeurotrophin発現を増加させていることを意味する。これは以前in vivoで報告した我々の結果<sup>3)</sup>と一致している。今回の結果より培養細胞下での機械的ストレスに対するアストロサイトが生存維持, 機能修復に関与している可能性が示唆された。

[参考文献]

- 1) 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 1996 ; 243 : 109-16.
- 2) Baba H, Maezawa Y, Uchida K, et al. Three-dimensional topographic analysis of spinal accessory motoneurons under chronic mechanical compression: an experimental study in the mouse. J Neurol 1997 ; 244 : 222-9.
- 3) 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 neurotrophic factors. J Neurol 1998 ; 245 : 781-793.
- 4) Ellis EF, Mckinney JS, Willoughby KA et al. A new model for rapid stretch-induced injury

of cells in culture : characterization of the model using astrocytes. J. Neurotrauma 1995 ; 12 : 325-39.

- 5) Albert JB, Mari T, Juro Y, et al. Mechanoreception at the cellular level : the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals. Biochem Cell Biol 1995 ; 73 : 349-65.
- 6) Colasanti M, Persichini T, Meneqgazzi M, et al. Induction of nitric oxide synthase mRNA expression. Suppression by exogenous nitric oxide. J Biol Chem 1995 ; 10 : 26731-3.
- 7) Rzigalinski BA, Weber JT, Willoughby KA, et al. Intracellular free calcium dynamics in stretch-injured astrocytes. J Neurochem 1995 ; 70 : 2377-85.
- 8) Nomura, Y and Kitamura Y. Inducible nitric oxide synthase in glial cells. Neurosci Res 1993 ; 18 : 103-107.
- 9) Goureau O, Hicks D, Courtois Y, et al. Induction and regulation of nitric oxide synthase in retinal muller glial cells. J Neurochem 1994 ; 63 : 310-317.

# 圧迫性脊髄損傷後 apoptosis に対する BDNF の効果

国府田正雄 (千葉大学医学部整形外科), 山崎 正志 (千葉大学医学部整形外科),  
池田 修 (千葉大学医学部整形外科), 橋本 将行 (千葉大学医学部整形外科),  
村上 正純 (千葉大学医学部整形外科), 守屋 秀繁 (千葉大学医学部整形外科)

KEYWORDS=spinal cord Injury, BDNF, apoptosis

## 【研究要旨】

[目的] 圧迫性脊髄損傷後 apoptosis に対する脳由来神経栄養因子 (BDNF) の効果を検討すること。[方法] ラット圧迫性脊髄損傷モデルに対し, 損傷直後・3日後より BDNF を髄腔内投与した。核染色・terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色にて apoptosis を検出し, TUNEL 陽性細胞の細胞種をマーカーとの二重染色で同定した。[結果] 損傷後早期の損傷部には TUNEL 陽性ニューロン・ミクログリア認め, 損傷後 1 週の頭・尾側に TUNEL 陽性オリゴデンドロサイトを認めた。損傷直後・3日後から BDNF を投与したラットではこの損傷後 1 週の白質の TUNEL 陽性細胞数が減少していた。[結論] BDNF は脊髄損傷後遅発性に生じるオリゴデンドロサイトの apoptosis を抑制する。

## A. 研究目的

脊髄損傷は外力による一次損傷と, それに引き続く一連の化学反応・虚血などにより組織障害が拡大する二次損傷からなる<sup>10, 34, 36)</sup>。Methylprednisolone 大量療法に代表される各種薬物療法の多くはそのターゲットを二次損傷の抑制においている<sup>4)</sup>。

近年, 脊髄損傷後のニューロン・グリア細胞に apoptosis がおこるとの報告が相次いでいる<sup>7, 13, 21, 23, 26, 28, 29, 38, 39)</sup>。なかでもオリゴデンドロサイトの apoptosis は遅発性に損傷部から離れた部位にも発生し, 脱髄の増悪の原因と考えられている<sup>1, 8, 13, 24, 35)</sup>。

我々は神経栄養因子のひとつである脳由来神経栄養因子 (BDNF) がラット圧迫性脊髄損傷モデルの行動学的回復を促進することを報告してきた。その作用の一つとして apoptosis を抑制している可能性につき検討することを目的とした。

## B. 研究方法

脊髄損傷モデル: 雄性ウィスター系ラット 8 週齢 (平均体重 200 g) を Halothene 麻酔下に Th8 椎弓切除し, 硬膜外より 50 g, 5 分間の圧迫を加え脊髄不全損傷モデルとした<sup>3)</sup>。

BDNF 投与: 損傷直後に L3/4 椎弓間より, 浸透圧ミニポンプを用いて recombinant human BDNF を 12  $\mu$  g/day で 2 週間髄腔内に持続投与した

(BDNF 群)。コントロールとしてリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を同様に投与した (control 群)。一部のラットでは損傷後 3 日より BDNF 投与を開始した (delayed-BDNF 群)。

標本作製: BDNF 群, control 群とも損傷後 6 時間, 12 時間, 24 時間, 3 日, 1 週, 2 週で 4 % paraformaldehyde にて経心臓的に灌流固定後, 脊髄を損傷部・頭側・尾側それぞれ約 12 mm ずつ摘出し, 横断面パラフィン切片を作製した。Delayed-BDNF 群は損傷後 1 週で同様に標本作製した。

組織学的検討: apoptosis に特徴的なクロマチン凝集・分葉化を証明するため Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色・cresyl violet 染色・Hoechst33342 染色を行った。

apoptosis の生化学的特徴である DNA 断片化を証明するため, Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling (TUNEL) 法を行った。Terminal deoxynucleotidyl transferase を用いて断片化した DNA を digoxigenin (DIG) -11-UTP 標識し, 抗 DIG 抗体で検出した。

さらに TUNEL 陽性細胞の細胞種を同定するため, 細胞マーカーとの二重染色を行った。アストロサイトは抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) モノクローナル抗体, オリゴデンドロサイトは抗オ

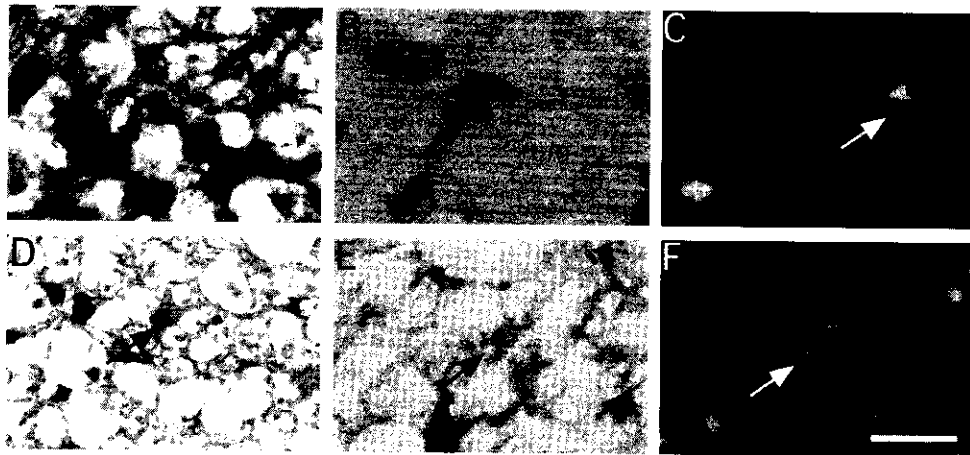


Fig. 1 脊髄損傷24時間後の損傷部 (A—C), 1週後の尾側 (損傷部より約12mm, D—F) の像を示す。H-E染色 (A, D)・cresyl violet染色 (B, E) およびHoechst 33342染色 (C, F) にて核クロマチンの濃染・分葉化を呈する apoptosis細胞が認められた。Bar = 20  $\mu$  m。

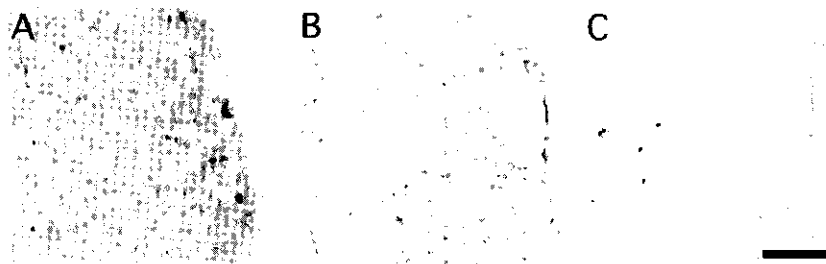


Fig. 2 損傷後1週の尾側 (損傷部より約12mm) 側索における TUNEL 染色像を示す。Control群 (A) に比べ、BDNF群 (B)・delayed-BDNF群 (C) では TUNEL 陽性細胞の数は減少していた。Bar = 100  $\mu$  m。

リゴデンドロサイトモノクローナル抗体 (RIP), ニューロンは抗 neuronal nuclei (Neu-N) モノクローナル抗体による免疫組織化学染色を, ミクログリアは tomato-lectin を用いた組織化学染色をそれぞれのマーカーとした。

細胞数計測と統計学的検討: 損傷後各時間経過で, 損傷部・頭側・尾側それぞれの横断面切片における TUNEL 陽性細胞数を計測した。各時間経過につき4匹ずつのラットを用い, 各部位4枚ずつ無作為に切片を選択した。BDNF群と control群, あるいは delayed-BDNF群と control群の間で TUNEL 陽性細胞数を比較し, Mann-Whitney U検定にて統計処理を行った。

### C. 研究結果

H-E染色・cresyl violet染色・Hoechst33342染色では, 損傷後24時間・3日では損傷部近傍にクロマチン濃染・分葉化を示す典型的 apoptosis細胞が数多く観察された (Fig. 1A, B, C)。この時期の損傷

部近傍では組織の損傷が著しく, 灰白質と白質の区別はつけ難かった。一方, 頭側・尾側では, 損傷後3日より apoptosis細胞が出現し, その数は1週には著明に増加した。損傷部と異なり, 組織形態は保たれ灰白質と白質の区別ははっきりしていたが, この時期 apoptosis細胞は頭・尾側では白質のみに観察された (Fig.1D, E, F)。

TUNEL 染色にてさらに詳細な検討を行った (Fig. 2A, Fig. 4)。損傷後6時間では, 損傷部のみに TUNEL 陽性細胞を認めた。損傷後12時間から24時間にかけて損傷部の TUNEL 陽性細胞数は徐々に増えたが, 頭・尾側では依然として TUNEL 陽性細胞を認めなかった。損傷後3日になると, 損傷部の TUNEL 陽性細胞数は著明に増加しピークとなった。頭・尾側にも少数の TUNEL 陽性細胞が出現した。損傷部の TUNEL 陽性細胞数は損傷後1週になると減少したが, 頭・尾側では逆に著明に増加した。頭・尾側とも TUNEL 陽性細胞は白質のみに認められた (Fig. 2A)。損傷後2週になると, 損傷

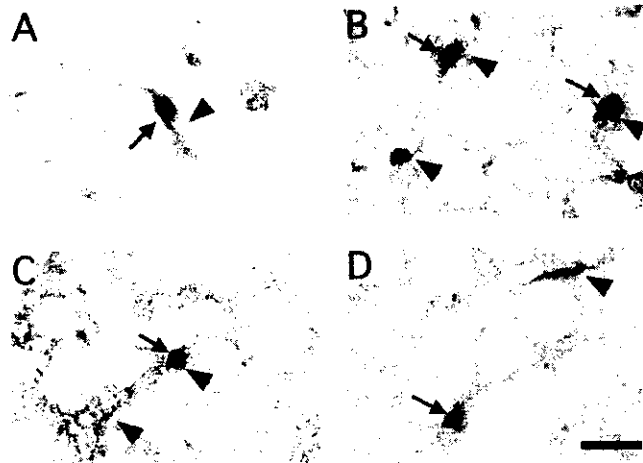


Fig. 3 TUNEL 染色と細胞マーカーの二重染色を示す。損傷後 24 時間の損傷部において TUNEL 染色・Neu-N 免疫染色両陽性ニューロン (A) および TUNEL 染色・tomato-lectin 染色両陽性ミクログリア (B) を認めた。損傷後 1 週の尾側では、TUNEL 染色・RIP 免疫染色両陽性オリゴデンドロサイト (C) を認めたが、GFAP 免疫染色陽性アストロサイトは TUNEL 染色陽性を呈するものは認められなかった (D)。矢印は TUNEL 染色陽性の核を、矢頭は細胞マーカーの陽性シグナルを示す。Bar = 20  $\mu$  m。

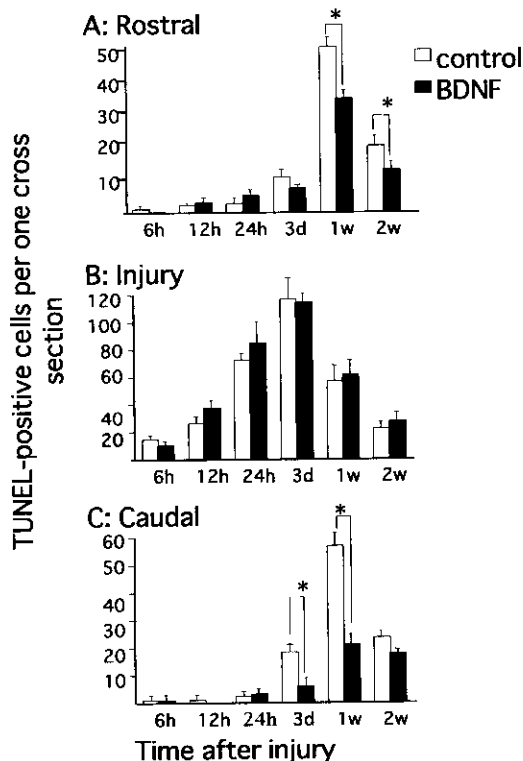


Fig. 4 脊髓横断面切片における TUNEL 染色陽性細胞数を、control 群・BDNF 群の間で比較した。損傷部においては全経過を通じて両群間に統計学的有意差は認めなかった (B)。頭側では損傷後 1 週・2 週に (A)、尾側では損傷後 3 日・1 週に (C)、それぞれ BDNF 群の TUNEL 染色陽性細胞数は control 群よりも有意に減少していた (\* $p < 0.001$ )。

部の陽性細胞数はさらに減少し、頭・尾側でもその数は減少した。

TUNEL 染色と細胞マーカーの二重染色の結果、TUNEL 染色・Neu-N 免疫染色両陽性のニューロンは損傷部で損傷後 24 時間に観察され (Fig. 3A)、TUNEL 染色・tomato-lectin 染色両陽性ミクログリアは損傷部で損傷後 24 時間から 3 日に多く観察された (Fig. 3B)。この時期、損傷部脊髄縁にわずかに残存した白質に TUNEL 染色と RIP 免疫染色両陽性のオリゴデンドロサイトが認められたが、GFAP 免疫染色との両陽性アストロサイトは認められなかった。損傷後 1 週の頭・尾側では、白質に TUNEL 染色・RIP 免疫染色両陽性のオリゴデンドロサイトを認めたが (Fig. 3C)、TUNEL 染色・GFAP 免疫染色両陽性アストロサイト (Fig. 3D)、TUNEL 染色・Neu-N 免疫染色両陽性のニューロン、TUNEL 染色・tomato-lectin 染色両陽性ミクログリアはいずれも認められなかった。よって頭・尾側において損傷後遅発性に apoptosis におちいっている細胞のほとんどはオリゴデンドロサイトであるといえた。

BDNF 群と control 群を比較すると、損傷部においては全経過を通じて統計学的有意差は認められなかった (Fig. 4B)。一方頭側において、BDNF 群では control 群に比して損傷後 1 週・2 週の時点で有意に TUNEL 陽性細胞数が減少していた (Fig. 4A)。尾側においても損傷後 3 日・1 週の時点で BDNF 群の TUNEL 陽性細胞数が有意に減少していた (Fig.



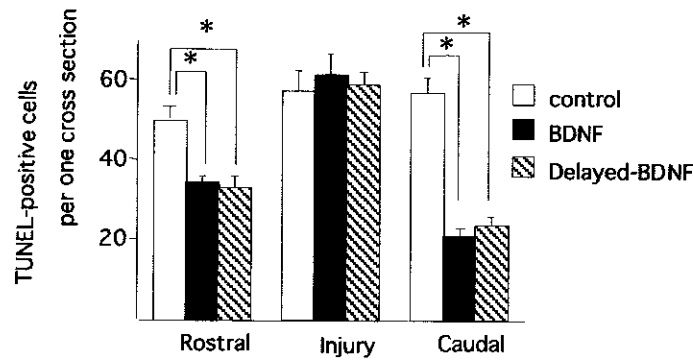


Fig. 5 脊髄損傷3日後より BDNF 投与を開始した delayed-BDNF 群の損傷後1週の時点での TUNEL 染色陽性細胞数を control 群・BDNF 群と比較した。損傷部では control 群と比べ有意差はなかったが、頭側・尾側においては delayed-BDNF 群の TUNEL 染色陽性細胞数は control 群と比べ有意に減少していた (\* $p < 0.001$ )。delayed-BDNF 群と BDNF 群の間には有意な差はなかった。

4C)。

損傷後3日より BDNF 投与を開始した delayed-BDNF 群における損傷後1週の時点での TUNEL 陽性細胞数を、BDNF 群・control 群と比較した (Fig. 5)。損傷部においては3群間に有意な差はなかった。一方、頭・尾側では delayed-BDNF 群は、BDNF 群と同様に、control 群と比べて TUNEL 陽性細胞数は有意に減少していた。Delayed-BDNF 群と BDNF 群の間には有意な差は認めなかった。

#### D. 考察

脊髄損傷後早期に損傷部ではニューロン・グリア細胞の apoptosis が起こり<sup>7, 13, 21, 23, 26, 28, 29, 38, 39</sup>、遅れて損傷部から離れた頭・尾側にオリゴデンドロサイトの apoptosis が出現する<sup>1, 8, 13, 24, 35</sup>。今回の検討でも二重染色の結果、ニューロン・ミクログリアの apoptosis は損傷後24時間から3日にかけて損傷部に認められ、オリゴデンドロサイトの apoptosis は遅発性に損傷部から離れた頭・尾側に認められた。諸家の報告とほぼ同様の所見といえる。

近年、脊髄損傷後 apoptosis に対する薬物療法の報告が散見されるようになった。Methylprednisolone<sup>18, 32</sup>、蛋白合成阻害剤 cycloheximide<sup>26</sup>、N-methyl-D-aspartate receptor 拮抗剤 MK-801<sup>38</sup>、GM-1 ガングリオシド<sup>18</sup>、カルバイン阻害剤 E-64-d<sup>33</sup>、カスパーゼ阻害剤 z-VAD<sup>25</sup> など、それぞれ損傷直後からの投与で、損傷部の apoptosis については一定の効果をあげているが、損傷部から離れた頭・尾側に遅発性におこるオリゴデンドロサイトの apoptosis に関してはいずれも検討されていない。また、損傷後遅れて投与したさい

の有効性についても報告はない。

脊髄損傷後急性期に BDNF 発現が著明に上昇することから<sup>16, 19</sup>、BDNF が神経保護的に作用していることが示唆される。実際 BDNF は神経根引き抜きモデル<sup>22, 30</sup> や脊髄半切モデル<sup>31</sup> において運動ニューロンの生存を助け、脊髄損傷モデルにおいても BDNF 投与<sup>17, 20</sup> あるいは BDNF 遺伝子を導入した線維芽細胞の移植<sup>27</sup> は運動機能を改善させる。しかし現在までのところ脊髄損傷後 apoptosis に対する BDNF の有効性については報告がない。今回の検討で、BDNF が損傷部から離れた頭・尾側のオリゴデンドロサイトの遅発性 apoptosis を抑制することが明らかになった。また、損傷後3日すぎからの投与でも有効であったことは BDNF の therapeutic time window を拡大し、臨床応用を考える上でより有利な点といえる。

BDNF は高親和性レセプター Trk B との結合を介してニューロンの生存に重要であるとされる phosphatidylinositol-3 (PI-3) kinase/Akt 系を活性化する<sup>12</sup>。また Akt は apoptosis の誘導に重要な役割を持つカスパーゼ 9 や Bcl-2 ファミリーの中でも apoptosis 促進的に働く BAD を直接リン酸化し、それらの機能を抑制する<sup>5, 9, 11</sup>。さらに最近 BDNF が MAP kinase 系を介して apoptosis 実行にかかわるカスパーゼ 3 の活性化を抑制することが明らかにされた<sup>14, 15</sup>。これらの所見はいずれも BDNF がニューロンの apoptosis を抑制することを示しているが、現在のところオリゴデンドロサイトの apoptosis を抑制するメカニズムについては不明である。オリゴデンドロサイトにも BDNF の高親和性レセプター Trk B 全長型の発現がみられ<sup>6</sup>、オリゴデンドロサ

イトの生存は Trk B の下流に位置する PI-3 kinase 系に依存性であることが報告されている<sup>2)</sup>。さらに In vitro で BDNF は ciliary neurotrophic factor のオリゴデンドロサイトに対する生存維持作用を増強することも明らかにされている<sup>37)</sup>。これらの所見から、BDNF が直接あるいは他の growth factor などを通じてオリゴデンドロサイトの生存を支持しうる可能性が示唆される。

## E. 結論

BDNF は圧迫性脊髄損傷後遅発性におこるオリゴデンドロサイトの apoptosis を抑制する。その効果は損傷直後からの投与のみならず、損傷後遅れて投与した場合にも認められる。脊髄損傷に対する臨床応用の可能性が期待される。

### [参考文献]

- 1) ABE, Y., YAMAMOTO, T., SUGIYAMA, Y., WATANABE, T., SAITO, N., KAYAMA, H., and KUMAGAI, T. (1999). Apoptotic cells associated with Wallerian degeneration after experimental spinal cord injury : a possible mechanism of oligodendroglial death. *J. Neurotrauma* 16, 945-952.
- 2) BARRES, B.A., SCHMID, R., SENDNER, M., and RAFF, M.C. (1993). Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development* 118, 283-295.
- 3) BLACK, P., MAKOWITZ, R.S., COOPER, V., et al. (1986). Models of spinal cord injury : part1, static load technique. *Neurosurg.* 19, 752-761.
- 4) BRACKEN, M.B., SHEPARD, M.J., COLLINS, W.F., et al. (1990). A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal cord injury study. *N. Engl. J. Med.*, 322, 1405-1411.
- 5) CARDONE, M.H., ROY, N., STENNICKE, H.R., et al. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.
- 6) CONDRELLI, D.F., SALIN, T., DELL'ALBANI, P., et al. (1995). Neurotrophins and their trk receptors in cultured cells of the glial lineage and in white matter of the central nervous system. *J. Mol. Neurosci.* 6, 237-248.
- 7) CROWE, M.J., SHUMAN, S.L., MASTERS, J.N., BRESNAHAN, J.C., and BEATTIE, M.S. (1995). Morphological evidence suggesting apoptotic nuclei in spinal cord injury. *Soc. Neurosci. Abstr.* 21, 232.
- 8) CROWE, M.J., BRESNAHAN, J.C., SHUMAN, S.L., MASTERS, J.N., and BEATTIE, M.S. (1997). Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat. Med.* 3, 73-76.
- 9) DATTA, S.R., DUDEK, H., TAO, X., MASTERS, S., FU, H., GOTOH, Y., and GREENBERG, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- 10) DE LA TORRE, J.C. (1981). Spinal cord injury. Review of basic and applied research. *Spine*, 6, 315-332.
- 11) DEL PESO, L., GONZALEZ-GARCIA, M., PAGE, C., HERRERA, R., and NUNEZ, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-689.
- 12) DOLCET, X., EGEA, J., SOLER, R.M., MARTIN-ZANCA, D., and COMELLA, J.X. (1999). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, but not extracellular-regulated kinases, is necessary to mediate brain-derived neurotrophic factor-induced motoneuron survival. *J. Neurochem.* 73, 521-531.
- 13) EMERY, E., ALDANA, P., BUNGE, M.B., et al. (1998). Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J. Neurosurg.* 89, 911-920.
- 14) HAN, B.H., DIOSTA, A., BACK, S.A., et al. (2000). BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol. Dis.* 7, 38-53.
- 15) HAN, B.H., and HOLTZMAN, D.M. (2000). BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J. Neurosci.* 20, 5775-5781.
- 16) HAYASHI, M., UEYAMA, T., NEMOTO, K., TAMAKI, T., and SENBA, E. (2000). Sequential mRNA expression for immediate early genes, cytokines, and neurotrophins in

- spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 17, 203-218.
- 17) HOUWELING, D.A., VAN ASSELDONK, J.T., LANKHORST, A.J., HAMERS, F.P., MARTIN, D., BAR, P.R., and JOOSTEN, E.A. (1998). Local application of collagen containing brain-derived neurotrophic factor decreases the loss of function after spinal cord injury in the adult rat. *Neurosci. Lett.* 251, 193-196.
- 18) HUANG, W., OBOH, A., MENNA, G., ZHAO, W., LEVY, A., and YOUNG, W. (1999). GM1 and methylprednisolone reduces apoptosis in spinal cord injury. *Natl. Neurotrauma Soc. Abstr.* 16, 997.
- 19) IKEDA, O., MURAKAMI, M., INO, H., et al. (2001). Acute up-regulation of BDNF expression resulting from experimentally-induced injury in the rat spinal cord. *Acta Neuropathol.* in press.
- 20) JAKEMAN, L.B., WEI, P., GUAN, Z., and STOKES, B.D. (1998). Brain-derived neurotrophic factor stimulates hindlimb stepping and sprouting of cholinergic fibers after spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 154, 170-184.
- 21) KATOH, K., IKATA, T., KATOH, S., HAMADA, Y., NAKAUCHI, K., SANO, T., and NIWA, M. (1996). Induction and its spread of apoptosis in rat spinal cord after mechanical trauma. *Neurosci. Lett.* 216, 9-12.
- 22) KISHINO, A., ISHIGE, Y., TATSUNO, T., NAKAYAMA, C., and NOGUCHI, H. (1997). BDNF prevents and reverses adult rat motor neuron degeneration and induces axonal outgrowth. *Exp. Neurol.* 144, 273-286.
- 23) LI, G.L., BRODIN, G., FAROOQUE, M., et al. (1996). Apoptosis and expression of bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55, 280-289.
- 24) LI, G.L., FAROOQUE, M., HOLTZ, A., and OLSSON, Y. (1999). Apoptosis of oligodendrocytes occurs for long distances away from the primary injury after compression trauma to rat spinal cord. *Acta Neuropathol.* 98, 473-480.
- 25) LI, M., ONA, V.O., CHEN, M. et al. (2000). Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and  $\alpha$ 3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience* 99, 333-342.
- 26) LIU, X.Z., XU, X.M., HU, R., et al. (1997). Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci.* 17, 5395-5406.
- 27) LIU, Y., KIM, D., HIMES, B.T., et al. (1999). Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function. *J. Neurosci.* 19, 4370-4387.
- 28) LOU, J., LENKE, L.G., LUDIWIG, F.J., and O'RIEN, M.F. (1998). Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord* 36, 683-690.
- 29) NAKAHARA, S., YONE, K., SAKOU, T., WADA, S., NAGAMINE, T., NIYAMA, T., and ICHIJO, H. (1999). Induction of apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) after spinal cord injury in rats : possible involvement of ASK1-JNK and  $\alpha$ 38 pathways in neuronal apoptosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 442-450.
- 30) NOVIKOV, L., NOVIKOVA, L., and KELLERTH, J.O. (1995). Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and blocks nitric oxide synthase expression in adult rat spinal motoneurons after ventral root avulsion. *Neurosci. Lett.* 200, 45-48.
- 31) NOVIKOVA, L., NOVIKOV, L., and KELLERTH, J.O. (1996). Brain-derived neurotrophic factor reduces necrotic zone and supports neuronal survival after spinal cord hemisection in adult rats. *Neurosci. Lett.* 220, 203-206.
- 32) RAY, S.K., WILFORD, G.G., MATZELLE, D.C., HOGAN, E.L., and BANIK, N.L. (1999). Calpeptin and methylprednisolone inhibit apoptosis in rat spinal cord injury. *Ann. New York Acad. Sci.* 860, 261-269.
- 33) RAY, S.K., MATZELLE, D.C., WILFORD, G.G., HOGAN, E.L., and BANIK, N.L. (2000). E-64-d prevents both calpain upregulation and apoptosis in the lesion and penumbra following spinal cord injury in rats. *Brain Res.*

867, 80-89.

- 34) SCHWAB, M.E. and BARTHOLDI, D. (1996). Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol. Rev.* 76, 319-370.
- 35) SHUMAN, S.L., BRESNAHAN, J.C., and BEATTIE, M.S. (1997). Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. *J. Neurosci. Res.* 50, 798-808.
- 36) TATOR, C.H., and FEHLINGS, M.G. (1991). Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J. Neurosurg.* 75, 15-26.
- 37) VEMURI, G.S., and McMORRIS, F.A. (1996). Oligodendrocytes and their precursors require phosphatidylinositol 3-kinase signaling for survival. *Development* 122, 2529-2537.
- 38) WADA, S., YONE, K., ISHIDOU, Y., NAGAMINE, T., NAKAHARA, S., NIYAMA, T., and SAKOU, T. (1999). Apoptosis following spinal cord injury in rats and preventative effect of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *J. Neurosurg.* 91, 98-104.
- 39) YONG, C., ARNOLD, P.M., ZOUBINE, M.N., et al. (1998). Apoptosis in cellular compartment of rat spinal cord after severe contusion injury. *J. Neurotrauma* 15, 459-472.