正常成獣ラット腰髄, 後根神経節における BDNF と TrkB の発現

久留米大学整形外科

眞 島 武・永 田 見 生
佐 藤 公 昭・安 藤 則 行
津 留 美智代

久留米大学医療センター

志 波 直 人・梅 津 祐 一
岩 崎 敏 展

Expression of BDNF and TrkB in Normal Adult Rat Spinal Cord and Dorsal Root Ganglion

Takeru Mashima, Kensei Nagata, Kimiaki Sato,
Noriyuki Ando, and Michiyo Tsuru

Department of Orthopaedic Surgery, Kurume University School of Medicine

Naoto Shiba, Yuichi Umezu, and Toshinori Iwasaki

Rehabilitation Center Affiliated to Kurume Medical Center,
Kurume University School of Medicine, Fukuoka, Japan

Expression of BDNF and full-length TrkB in normal adult rat spinal cord and dorsal root ganglion was examined by immunohistochemistry. Rats were fixed with Zamboni's fixative followed by cryosectioning of the lumbar spinal cord and dorsal root ganglion (DRG). Anti-BDNF and anti-TrkB-fl antibodies were applied. Slides were observed under dark field microscopy. Axon terminal fibers in the dorsal horn of the spinal cord show strong immunoreactivity to anti-BDNF antibody. Many cells in the ventral horn of the spinal cord are immunostained with anti-TrkB-fl antibody. Some small to medium cells in the DRG were stained with anti-BDNF or anti-TrkB-fl antibody. These results suggest distribution of BDNF and TrkB protein in the spinal cord and DRG.

Key words : BDNF (Brain-derived neurotrophic factor, 脳由来神経栄養因子), TrkB (Tropomyosin related kinase B, トラックB), immunohistochemistry (免疫染色)

は じ め に

脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor, 以下 BDNF) には, その高親和性レセプターとしてトラック B (Tropomyosin related kinase B, 以下, TrkB) が存在する。TrkB にはチロシンキナーゼ活性を有する細胞内ドメインを持つ full-length

TrkB (以下, TrkB-fl) と, 細胞内ドメインを持たない truncated TrkB (以下, TrkB-t) とがある¹⁾。しかし, それらの神経組織, 特に脊髄と後根神経節における局在と動態の関係は明らかではない。今回, 我々は, スプラーク・ドンリュウラット (以下 SD ラット) において免疫組織化学的に BDNF と TrkB-fl の腰髄と後根神経節における発現を検討した。

図1 ラット腰髄横断面における a) BDNF, b) TrkB-fl の蛍光反応像.
ラット後根神経節における c) BDNF, d) TrkB-fl の蛍光反応像.

対象と方法

1. ラットの固定

対象動物は正常成獣雄性 SD ラット（約 10 週齢，体重約 450g）である。ジエチルエーテル経鼻麻酔後，ネブタール 1.0 ml 腹腔内投与した。0.1M リン酸緩衝液（pH7.6，以下 PB）200 ml にて脱血し，ゼンボン固定液 1,000 ml（4%パラホルムアルデヒド，15%ピクリン酸）にて還流固定した。腰髄と後根神経節を取り出し，30%スクロース加 PB に 24 時間置換した。神経組織を凍結し，クリオスタットにて厚さ 5 μ m の連続切片を作成し，スライドガラスに載せ，乾燥させた後，免疫染色を施行した。

2. 免疫組織染色

まず，スライドガラスに載せ乾燥させた組織を 0.01M リン酸緩衝生理的食塩液（pH7.6，以下，PBS），50%エタノール，PBS にて洗浄した。次に，6 段階にわたって組織に試薬を滴下し，充分反応させ，PBS にて洗浄した。試薬の内容，濃度（希釈），反応時間を以下に挙げる。1）10%正常ヤギ血清，1 時間。2）一次抗体（0.2 μ g/ml），24 時間。3）二次抗体（200 倍希釈），1 時間。4）horseradish peroxidase（以下 HRP，200 倍希釈），1 時間。5）タイラマイド試薬（200 倍希釈），5 分。6）フルオレセイン（200 倍希釈），1 時間。一次抗体として，ゾウにより作成された抗 BDNF 抗体³⁾と抗 TrkB-fl 抗体（Santa Cruz 社，カタログ番号，SC-12）を使用した。試薬の溶媒として 0.1%Tween 20 と 0.05% blocking reagent を含む PBS を使用した。HRP，タイラマイド試薬，blocking reagent は，タイラマイドキット（PerkinElmer Life Sciences 社）の付属試薬である。

結 果

図 1，2 はそれぞれ，ラットの腰髄横断面における BDNF と TrkB-fl の蛍光反応像である。一次感覚神経線維の脊髄進入部と灰白質後角神経線維終末において BDNF に対する免疫反応を認める。灰白質後角，レクスト分類では I，II 層を除く領域から前角にかけての細胞において TrkB-fl に対する免疫反応を認める。図 3，4 はそれぞれ，後根神経節における BDNF と TrkB-fl の蛍光反応像である。小型から中

型の神経細胞において BDNF と TrkB-fl に対する免疫反応を認めるが，BDNF 陽性細胞はごく少数である。大型細胞では BDNF と TrkB-fl の免疫反応は認めない。

考 察

マイケルらの報告では脊髄における BDNF は，電顕的に神経線維終末に局限していた³⁾。ゾウらの報告では，TrkB-fl は脊髄腹側角運動神経細胞に発現するという⁴⁾。諸家の報告により BDNF は後根神経節において小型から中型の神経細胞に存在すると報告されている^{2,3,5)}。我々の得た実験結果はこれらと一致しており，BDNF と TrkB-fl の局在を示していると思われる。後根神経節では TrkB-fl 蛋白の局在については我々の検索の限りでは報告がなく，慎重な検討が必要である。

ま と め

1) 腰髄では，一次感覚神経線維の脊髄進入部と灰白質後角神経線維終末において BDNF に対する免疫反応を認めた。灰白質後角から前角の細胞において TrkB-fl に対する免疫反応を認めた。

2) 後根神経節では，小型から中型の神経細胞において BDNF と TrkB-fl に対する免疫反応を認めた。

参 考 文 献

- 1) 古川美子：ニューロトロフィン。CLINICAL NEUROSCIENCE. 13 (7) : 35-39, 1995.
- 2) Kashiba, H., et al. : Relationship between BDNF and trk-expressing neurons in rat dorsal root ganglion : an analysis by in situ hybridization. NeuroReport, 8 : 1229-34, 1997.
- 3) Michael, G.J., et al. : Nerve Growth Factor Treatment Increase Brain-Derived Neurotrophic Factor Selectively in TrkA-Expressing Dorsal Root Ganglion Cells and in Their Central Terminations within the Spinal Cord. J of Neurosci., 17 (21) : 8476-90, 1997.
- 4) Zhou, X.F., et al. : Distribution of TrkB tyrosine kinase immunoreactivity in the rat central nervous system. Brain Research, 622 : 63-70, 1993.
- 5) Zhou, X.F., et al. : Endogenous brain-driven neurotrophic factor is anterogradely transported in primary sensory neurons. Neuroscience, 74 : 945-51, 1996.