

嗅覚路における神経栄養因子受容体発現の発達加齢
および嗅糸切断にともなう変化 trkグループによる
高親和性結合を利用した免疫組織化学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9125

嗅覚路における神経栄養因子受容体発現の発達加齢 および嗅糸切断にともなう変化

—trk グループによる高親和性結合を利用した免疫組織化学的研究—

金沢大学医学部耳鼻咽喉科学講座 (主任: 古川 侃教授)

堀 川 勲

嗅覚伝導路における神経栄養因子を特定する目的で、神経栄養因子受容体発現の発達加齢および嗅神経切断にともなう変化をみるため、高親和性受容体であるタイロシンプロテインカイネースの trk グループに対する抗体3種類を用いて免疫組織化学的に検索した。本研究ではマウスの嗅上皮と嗅球を観察対象にし、胎生、新生児、成熟および老年期におよぶ各発達段階での変化を調べ、さらに成熟マウスにおいて嗅神経切断後の変化も経時的に調べた。その結果、trk グループに対する抗体3種類 (trk, trkB, trkC) のうち、胎生14日から老年期までの全期間を通じて発現を認めたのは、神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) 高親和性受容体に相当する trk であった。胎生期と出生直後では嗅細胞の細胞体とその軸索とに trk の発現が見られ、成熟するにつれて細胞体での発現は低下し、軸索だけにみられるようになった。老年期には trk の発現は減少した。嗅糸切断例では切断後7日目から14日目に嗅細胞に trk の発現の増加が認められた。さらにコルヒチン処理を施した正常成熟マウスでは、嗅細胞の細胞体や嗅球の傍糸球体細胞に trk の蓄積が認められた。以上の結果から、NGF 高親和性受容体は嗅細胞と傍糸球体細胞で産生され、嗅覚伝導路の発達、成熟、生存維持と神経障害時の伝導路の再建等に関与していると考えられる。したがって嗅覚伝導路における神経栄養因子としては、NGF が最も重要な役割を演じていると推察された。

Key words NGF family, trk group, immunohistochemistry, olfactory bulb, olfactory epithelium

神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) は1954年、Cohen らによって発見され¹⁾、交感神経節細胞や後根神経節細胞の分化、発達、生存維持に重要な役割を果たしていることが明らかになった^{2,3)}。さらに、この NGF は脳内の嗅球、海馬、新皮質にも存在し⁴⁻⁶⁾ 前脳基底部のコリン作動性ニューロン群である対角帯 (水平部、垂直部)、中隔野、マイネルト基底核の生存維持に必須であることが明らかになった。ところで嗅球には NGF 蛋白のみならず mRNA も豊富に存在することが判明しており^{4,7-9)}、嗅球における NGF 蛋白の存在意義として、前脳基底部の対角帯水平部のコリン作動性ニューロンの生存に関与しているものと考えられている¹⁰⁾。しかし著者は予備実験としてラットで嗅球除去を行い、対角帯水平部のコリン作動性ニューロンにアセチルコリンエステラーゼ染色を行って詳細に検討した結果、1ヶ月後においても同部のコリン作動性ニューロンの減少を認めなかった (未発表)。これに対して海馬へ投射線維を送っている対角帯垂直部のコリン作動性ニューロンは、その伝導路である脳弓の破壊によって90%のニューロンが細胞死を起こすことはよく知られている。そこで嗅球で合成される NGF はこれまで推定されている対角帯水平部のコリン作動性ニューロンの生存に関与するのではなく、嗅細胞の生存に関与するのではないかとこの想定のもとに、嗅細胞が神経成長因子

受容体 (nerve growth factor receptor, NGFR) を発現しているかどうかを調べるために本研究を計画した。

嗅細胞は日常的に変性と再生 (新性) を繰り返し、障害により変性に陥った後も再生するという特徴を持つ神経細胞であることから、NGF と何らかの関係を持つ可能性があると考えられ、嗅細胞における NGFR の発現に関する研究が行われてきた。これまで行われてきた嗅覚系における NGFR の研究は、低親和性 NGFR に対する抗体を用いた免疫組織化学法によるものや、低親和性 NGFR の mRNA を用いた分子生物学的手法によるものがほとんどであった。しかし、低親和性 NGFR は NGF 以外の栄養因子、すなわち脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) やニューロトロピン-3 (neurotrophin-3, NT-3) に対する受容体として共通のものであることが Rodriguez-Tébar ら^{11,12)} および Hempstead ら¹³⁾ により判明し、低親和性 NGFR の発現のみではどの栄養因子が関与しているのか決定できなかった。

最近、高親和性 NGFR の一部をコードしている遺伝子が、1986年に Martin-Zanca らによって報告された結腸癌由来のオンコジーンである *trk* のカルボキシル基末端側半分のチロシンキナーゼドメインを含む領域に対応するプロトオンコジーンであることが判明した¹⁴⁻¹⁸⁾。さらにこの *trk* プロトオンコジーン

平成6年12月16日受付、平成7年2月16日受理

Abbreviations: BDNF, brain-derived neurotrophic factor; EPL, external plexiform layer; GL, glomeruli; NGF, nerve growth factor; NGFR, nerve growth factor receptor; NT-3, neurotrophin-3; OE, olfactory epithelium; ONL, olfactory nerve layer; PBS, phosphate-buffered saline; PFA, paraformaldehyde

に極めて相同性の高い *trkB*, *trkC* 遺伝子が発見され, *trk* (A) 遺伝子産物 (p140^{trkA}) は NGF と, *trkB* 遺伝子産物 (p145^{trkB}) は BDNF と, *trkC* 遺伝子産物 (p145^{trkC}) は NT-3 と結合することが判明した^{18)~21)}. 現在は従来から知られていた低親和性 NGFR (p75) と p140^{trkA} が結合して高親和性 NGFR を形成し, p75 と p145^{trkB} が結合して高親和性脳由来神経栄養因子受容体 (brain-derived neurotrophic factor receptor, BDNFR) が形成されと考えられている²¹⁾. 最近この *trk* (A), *trkB*, *trkC* 遺伝子産物に対する抗体が開発された. そこで今回著者は, これらの抗体を用いて神経栄養因子の高親和性受容体がマウス嗅覚伝導路の発達, 成熟, 老化において経時的にどのように発現するかを免疫組織学的手法により観察, 検討した. さらに嗅球が嗅上皮への栄養因子供給源であるとの仮定に基づき嗅糸切断後の嗅細胞の再生過程における受容体の発現についても検討した.

材料および方法

I. 嗅覚伝導路の発達, 成熟, 老化過程観察のための標本作製

実験材料は ddy-コンベンショナルマウス (静岡県実験動物農業協同組合, 浜松) を使用した. なお胎齢は雌雄液における精子発見日を胎生 0 日として, 生後日齢は出生日を生後 0 日として算定した. 成熟マウスは生後約 10 週の雄を用い, 老化マウスは生後 2 年以上経過した雄を用いた.

標本採取のために胎生 14, 16, 18 日, 生後 1, 10 日および成熟, 老化マウスを各 3 匹用いた. なお, 灌流液には 0.01M リン酸緩衝液 (0.01M phosphate-buffered saline, PBS), 固定液には 4% パラホルムアルデヒド (4% paraformaldehyde, PFA) を使用した.

胎生 14, 16, 18 日の標本採取は, それぞれの日数での妊娠マウスの母体にペントバルビタール (ネンブタール[®], ダイナボット, 大阪) を腹腔内投与し, 麻酔下に開胸し経心的に灌流固定後, 子宮内から胎児を取り出し頭部を摘出して行った.

生後 1 日の標本採取は, 氷塊上で低温麻酔後, 開胸し, 4%PFA 5ml にて灌流固定後, 頭部を摘出して行った.

生後 10 日, および成熟, 老化マウスの標本採取は, ペントバルビタール腹腔内投与による麻酔後, 開胸し, 経心的に灌流固定後, 鼻中隔面の嗅粘膜と嗅球を摘出して行った.

その後, 4%PFA にて 4~8 時間の後固定を施行し, 次いで 25% ショ糖加リン酸緩衝食塩水にて 1 晩浸透後, 標本を OCT コンパウンド (Tissue-Tek, Elkhart, U. S. A) に包埋し, -20 度で凍結した後, クライオスタットで 10 μ m の連続切片を作製した.

II. コルヒチン処理モデルの作製

コルヒチンがラットの交感神経におけるアミノ酸貯留顆粒の軸索輸送を遮断することを Dahlström が証明している²²⁾. また Pioro らはコルヒチンが成熟ラットの小脳におけるプルキンエ繊維の NGFR 免疫反応を増強したことから, 中枢神経系においても軸索の物質輸送を遮断することを報告している²³⁾. そこで今回, 高親和性受容体の産生部位を同定するために, コルヒチンを成熟マウスに投与した. コルヒチン 1mg/kg を成熟雄マウスの腹腔内に注射し, 24 時間後に前述と同様の方法で嗅上皮と嗅球の凍結切片を作製した.

III. 嗅糸切断マウスの作製

ペントバルビタール 100mg/kg を成熟雄マウスの腹腔内に注射した後, 補助麻酔として頭皮下に 1% 塩酸リドカイン (キシロカイン[®]) を約 0.2ml 注射した. 頭部に正中皮膚切開を入れ, 顕微鏡下にマイクロドリルを用いて前頭骨の最前方で開頭し, 両側嗅球の上面全体を露出させ, その前方, 側方, 下方に沿って耳手術用のピンを用いて, 篩板から頭蓋内に入る嗅糸を切断した. 切断後は皮膚を絹糸にて縫合し術創を閉鎖した. 嗅糸切断後 1, 3, 7, 14, 21, 28 日目にそれぞれ嗅上皮と嗅球を採取し, 前述のごとく凍結切片を作製した.

IV. 免疫組織化学的検討

免疫染色はアビジン-ビオチン-複合体 (avidin biotin peroxidase complex, ABC) 法にてスライドガラス上で行った.

凍結切片を 0.3% トライトン X 加リン酸緩衝食塩水 (PBS with 0.3% Triton-X100, 0.3% PBST) に 1~2 日間つけた後, 0.3% 過酸化水素水加メタノールにて 10 分間因子ペルオキシダーゼ活性を阻止した. 続いて非特異的反応を阻止するため 2% 正常ヤギ血清を 30 分間反応させた後, 1 次抗体を 48 時間反応させた. 1 次抗体には抗 *trk* (763) 抗体, 抗 *trkB* (794) 抗体, 抗 *trkC* (798) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA) を 50 倍に希釈して使用した. 2 次抗体としてビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (200 倍希釈, TAGO IMMUNOCHEMICALS, Inc., Camarillo, CA, USA) を使用し, 45 分間反応させた後, 3, 3' ジアミノベンチジン四塩酸塩溶液 (3,3-diaminobenzidine, DAB) にて 7~15 分間発色反応を行った.

成 績

I. 正常発達過程における観察

抗 *trk* (763), 抗 *trkB* (794), 抗 *trkC* (798) 抗体を用いて免疫染色を行った結果, 全期間を通じて強い染色が認められたのは抗 *trk* (763) 抗体であった. 抗 *trkB* (794) と抗 *trkC* (798) 抗体

Table 1. Summary of the *trk* expression in developing mouse olfactory tract

Region	Objects	Expression of <i>trk</i> in						
		E14	E16	E18	P1	P10	Adult	Colchicine treated
Olfactory epithelium	Olfactory cells	+	+++	++	+	+	+	+++
	Lamina propria							
	Axonal bundles	++	+++	++	+	++	++	+++
	Nerve layer	-	-	+	+	++	++	+++
Olfactory bulb	Glomeruli	-	-	+	+	++	+	+++
	Periglomerular cells	-	-	-	-	+	-	++

E, embryonic day; P, postnatal day.

Expression was graded: +, strong; ++, moderate; +, weak; ±, faint; -, absent; nd, not determined.

は特定の時期、特定の部位にごくわずかに染色されるにすぎなかった。

1. trk の発現様式 (表1)

1) 嗅上皮

trk の発現は胎生14日から生後10日までは嗅細胞の細胞体と嗅細胞の軸索からなる粘膜固有層の嗅神経線維束に認められた。最も強く trk の発現を認めたのは、胎生16日であった (図1A)。生後1日では鼻腔側の嗅細胞から trk の発現が消失し、基底膜側に発現が偏っていた (図1B)。生後10日以降、嗅細胞の細胞体での trk の発現は徐々に減少していった。成熟嗅上皮では、染色される嗅細胞数が胎生後期や出生初期に比べ減少し (図1C)、老年嗅上皮では成熟期より染色される嗅細胞数はさらに減少し、まばらに認められるのみだった (図1D)。重要な所見として粘膜固有層では嗅神経線維束が全期間を通じて常に強い発現を示した。

2) 嗅球

trk の発現は胎生18日から老年期まで認められた。嗅神経線維層と糸球体層に染色を認めた。嗅神経線維層は全期間を通じて、常に trk の発現を示した。糸球体層は胎生18日ではまだ明確な円形の糸球体は認められないが、嗅神経線維層と外叢状層との間にわずかに識別できる薄い層状の糸球体層が存在し、その部位に一致して trk が発現していた (図2A)。生後1日以降

は糸球体層は厚くなり、明瞭に識別、染色された (図2B)。成熟期は生後10日と同様であるが、嗅神経線維層と、大型で円形を呈する糸球体に一致して trk の発現が認められた (図2C)。老年期では成熟期に比べると免疫染色性は低下していた (図2D)。

trk の発現を要約すると胎生期から出生直後においては嗅細胞の細胞体と、嗅細胞の軸索成分からなる領域 (粘膜固有層の嗅神経線維束、嗅球の嗅神経線維層および糸球体層) の両者に強く認められるのに対して、成熟期や老年期においては細胞体では減弱し、嗅細胞の軸索成分を含む領域に強い発現を認めた。

2. trkB の発現様式

1) 嗅上皮

全期間を通じて嗅上皮と粘膜固有層の嗅神経線維束いずれにも trkB の発現は認められなかった (図3)。

2) 嗅球

嗅上皮と同様に trkB の出現は認められなかった。

3. trkC の発現様式

1) 嗅上皮

全期間を通じて嗅上皮と粘膜固有層の嗅神経線維束いずれにも trkC の染色は認められなかった (図4A)。

2) 嗅球

胎生18日から生後3日にかけて糸球体層、外叢状層、僧帽細胞

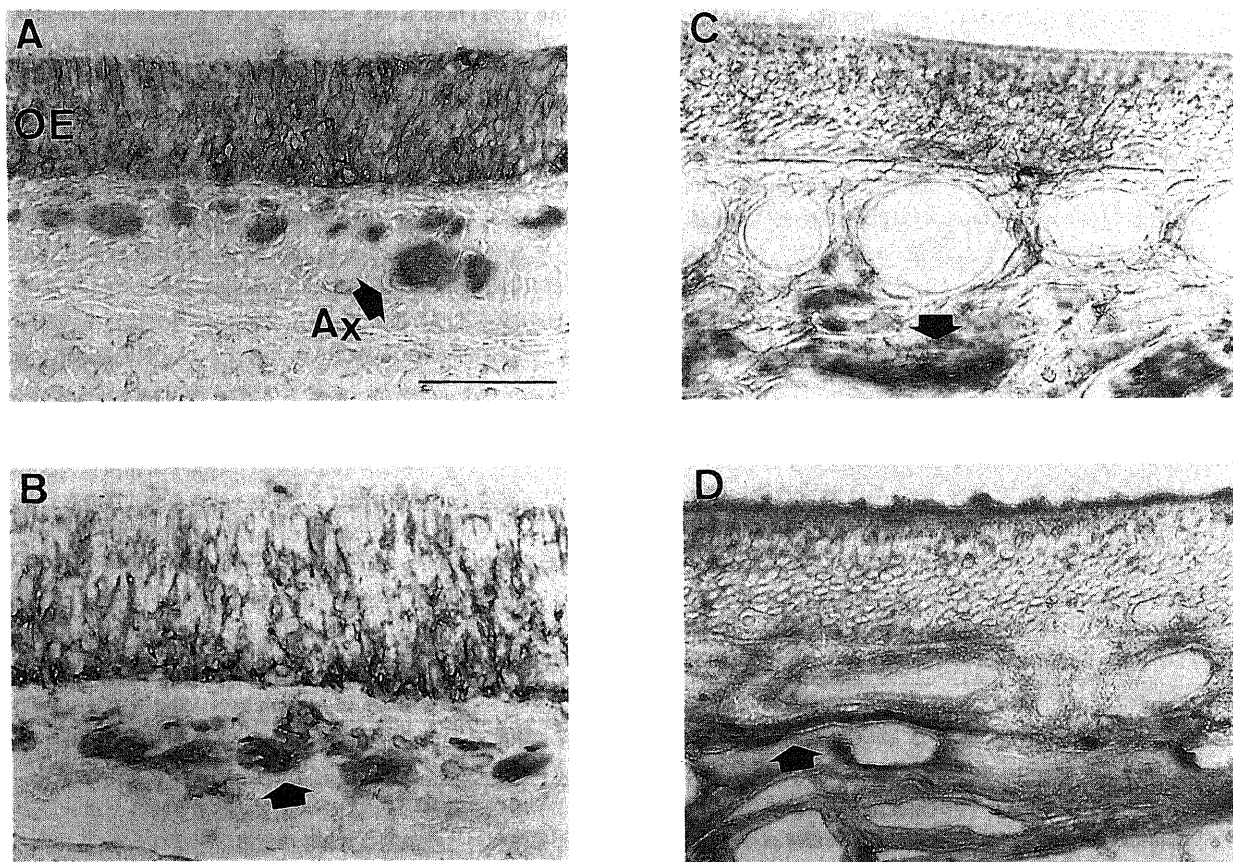


Fig. 1. Photomicrographs of coronal frozen sections through olfactory epithelia, immunohistochemically stained for anti-trk antibody in E16 (A), P1 (B), adult (C), and aged (D) mice. Olfactory epithelium of E16 mouse contains a lot of olfactory receptor cells with trk immunoreactivity (A). Arrows indicate axonal bundles (Ax) with trk immunoreactivity. Note the difference in staining of immunoreactive olfactory receptor cells from E16 (A) to aged (D) mouse. OE, olfactory epithelium. Bar in (A) indicates 50 μ m for (A)~(D).

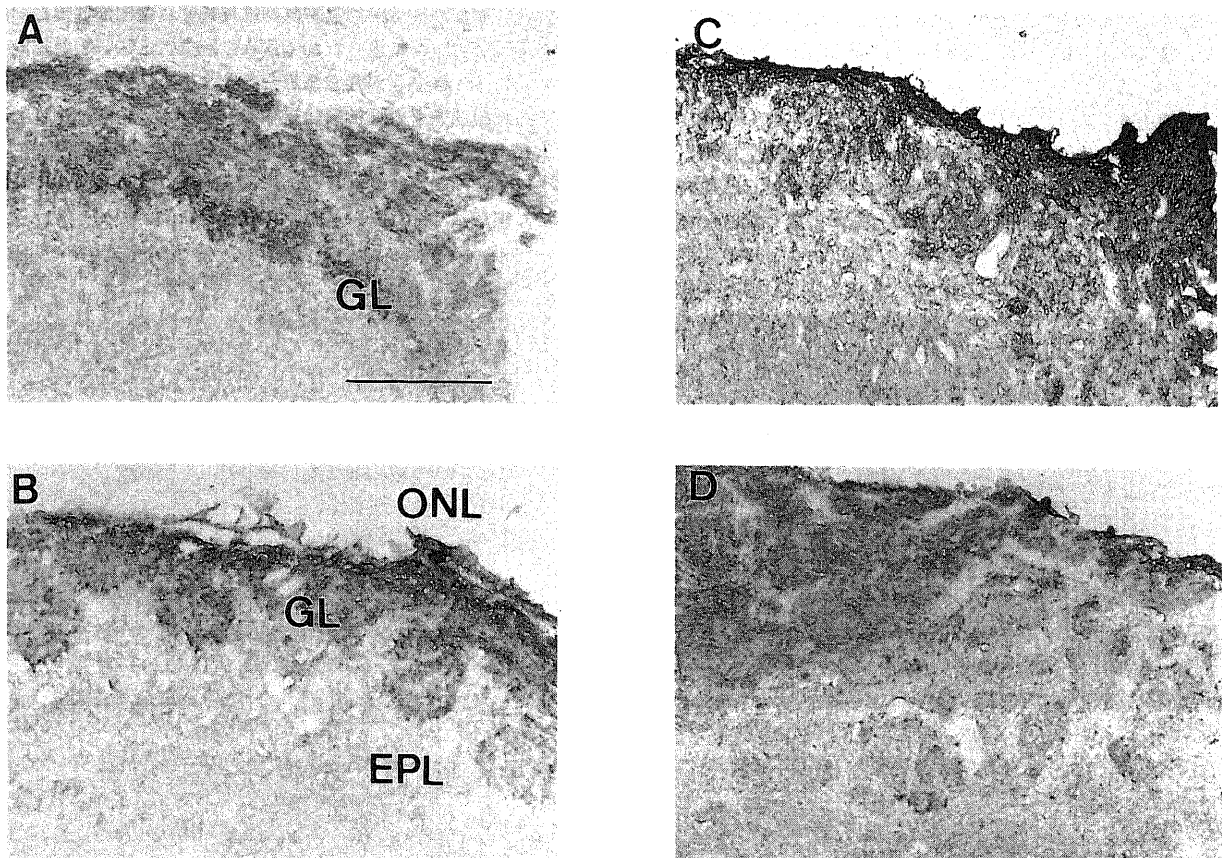


Fig. 2. Photomicrographs of coronal sections through olfactory bulbs, immunohistochemically stained for anti-trk antibody in E18 (A), P10 (B), adult (C), and aged (D) mice. Note that trk immunoreactivity of olfactory nerve layer and glomeruli from E18 (A) to aged mouse (D). ONL, olfactory nerve layer; GL, glomeruli; EPL, external plexiform layer. Bar in (A) indicates 100 μ m for (A)~(D).

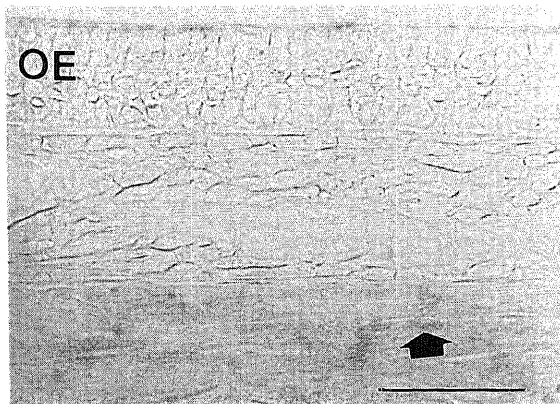


Fig. 3. Olfactory epithelium of adult mouse with trkB immunoreactivity. Note that trkB immunoreactivity in olfactory epithelium was absent. Arrow indicates axonal bundles with no trkB immunoreactivity. OE, olfactory epithelium. Bar indicates 50 μ m.

胞層に弱く染色を認めた以外は trkC の発現は認められなかった (図 4B). 嗅球最外層の嗅神経線維層はいずれの時期においても陰性であった。

Ⅱ. コルヒチン処理マウスにおける観察

1. trk

1) 嗅上皮

前述したように、成熟無処置マウスでは嗅細胞の細胞体は弱い染色性を示すのみであったが、コルヒチン処理によって嗅細胞の細胞体が明瞭に染色されるようになった。また、粘膜固有層の嗅神経線維束の染色性も増強した (図 5A)。

2) 嗅球

成熟無処置マウスと同様に嗅神経線維層と糸球体に trk の発現が認められた。興味深いことにコルヒチン処理によって新たに傍糸球体細胞が染色された (図 5B)。

2. trkB

1) 嗅上皮

成熟無処置マウスでは染色されなかった嗅神経線維束がコルヒチン処理後、新たに染色された。

2) 嗅球

成熟無処置マウスでは染色されなかった嗅神経線維層に新たに trkB の発現を認めた。

3. trkC

嗅上皮、嗅球共に、コルヒチン処理後に trkC の発現が増強

した所見は認められなかった。

Ⅲ. 嗅糸切断実験における観察

1. trk (表 2)

1) 嗅上皮

嗅糸切断後3日目には多くの嗅細胞が消失し嗅細胞層が4, 5層に減少したが, 7日目から徐々に回復し始め, 28日目には非切断群と変わらない約7層まで嗅細胞層が回復した。trk の

発現は嗅糸切断後7~14日目にかけて著明に増加し, 嗅細胞層が全層にわたって染色された(図 6A, B)。ことに再生嗅細胞の細胞体に trk の発現が強く認められた。細胞体の強い発現に対応して粘膜固有層の嗅神経線維束も trk の発現が増強していた。その後28日目にかけて染色される嗅細胞数は減少し, 正常嗅上皮とはほぼ同程度になった(図 6C)。

2) 嗅球

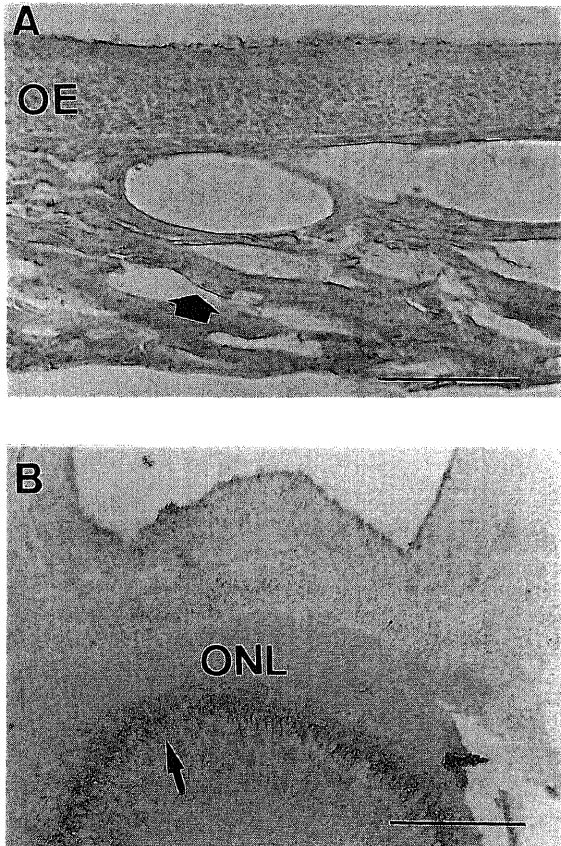


Fig. 4. Photomicrographs of coronal sections through olfactory epithelium in adult (A) and olfactory bulb in P3 mouse (B), immunohistchemically stained for anti-trkC antibody. Note that trkC immunoreactivity in olfactory epithelium (OE) of adult mouse was absent, but that trkC immunoreactivities in glomeruli, external plexiform layer, and mitral cell layer of E18 (↑) were present. Arrow in (A) indicates axonal bundles with no trkC immunoreactivity. ONL, olfactory nerve layer. Bar in (A) indicates 50 μ m and in (B) indicates 100 μ m.

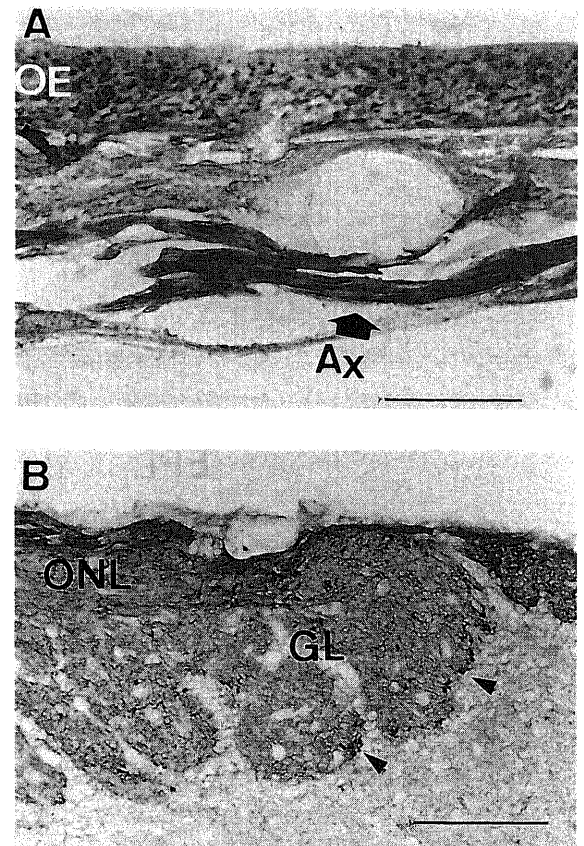


Fig. 5. Photomicrographs of coronal sections through olfactory epithelium (A) and bulb (B), immunohistchemically stained for anti-trk antibody in colchicine-treated adult mouse. Note the increased trk immunoreactivity in olfactory receptor cells and axonal bundles (Arrow indicates), and the new trk immunoreactivity in periglomerular cells (Arrowheads indicate). OE, olfactory epithelium; ONL, olfactory nerve layer; GL, Glomerulus. Bar in (A) indicates 50 μ m and in (B) indicates 100 μ m.

Table 2. Summary of the trk expression after olfactory nerve transection

Region	Objects	Day after olfactory nerve transection					
		1	3	7	14	21	28
Olfactory epithelium	Olfactory cells	+	+	+++	++	+	+
	Lamina propria	++	++	+++	+++	++	++
Olfactory bulb	Nerve layer			nd	nd	+++	++
	Glomeruli			+	+	+++	+
	Periglomerular cells			-	-	++	+

Expression was graded: +++, strong; ++, moderate; +, weak; ±, faint; -, absent; nd, not determined.

嗅糸切断後14日目まで嗅神経線維層は欠損したままで、その間糸球体はほとんど染色されなかった。21日目には薄い再生した嗅神経線維束が認められるようになり、この層と糸球体に強い *trk* の発現を認めた。傍糸球体細胞も所々染色された(図7A)。28日目にはさらに嗅神経線維層が厚くなったが、21日目

に比べ染色性は低下した。糸球体も非嗅糸切断マウスと同程度の染色性を示した(図7B)。

2. *trkB*

1) 嗅上皮

成熟無処置マウスでは染色されなかった粘膜固有層の嗅神経線維束が、嗅糸切断後1日目から21日目まで新たに染色された。嗅細胞は染色されなかった。

2) 嗅球

嗅糸切断後21日目に薄い嗅神経線維層に新たな染色を弱く認めた以外は染色されなかった。糸球体は全期間を通じて染色されなかった。

3. *trkC*

嗅上皮、嗅球ともに嗅糸切断後28日目まで *trkC* の発現は認められなかった。

考 察

NGF が中枢神経系にも存在することを Thoenen らが1985年に報告して以来^{24,25)}、脳内における神経栄養因子の局在や役割についての研究が数多くなされている^{4,17,18,26)~28)}。その結果、NGF は海馬、大脳皮質、嗅球に豊富に存在し、前脳基部のコリン作動性ニューロンに逆行輸送され、その生存維持に作用し

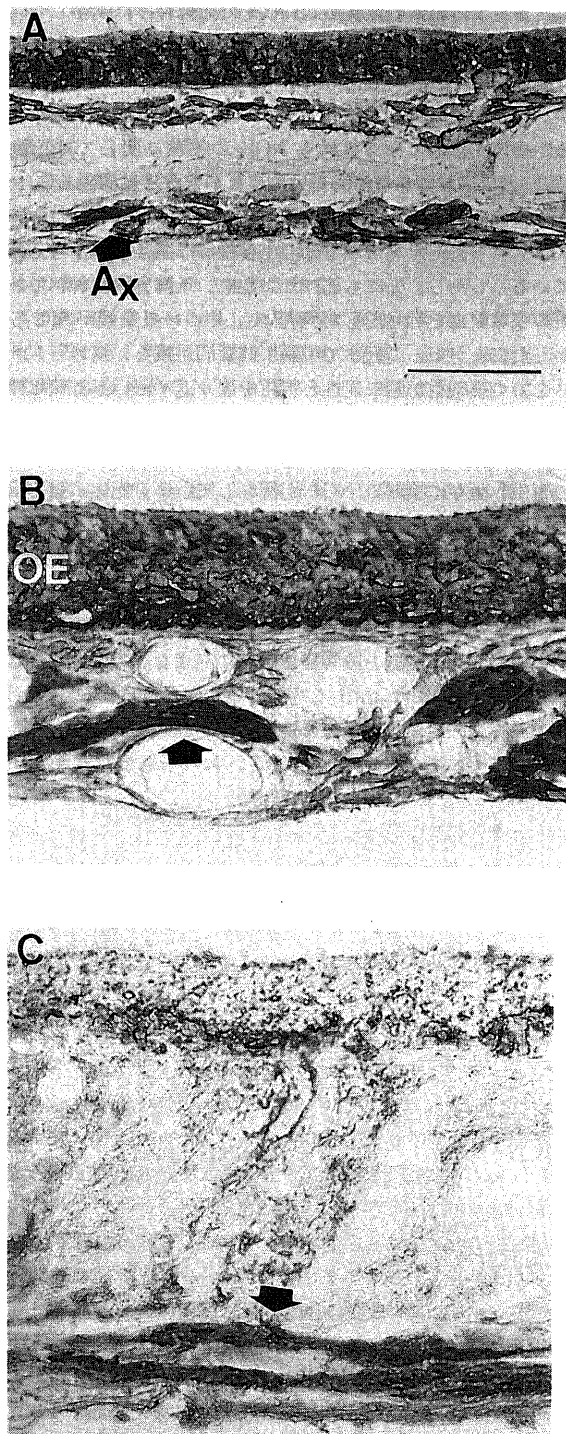


Fig. 6. Olfactory epithelia of 7 (A), 14 (B) and 28 days (C) after olfactory nerve transection. Note the increased *trk* immunoreactivity in olfactory receptor cells and axonal bundles of 7 and 14 days after transection. OE, olfactory epithelium. Bar in (A) indicates 50 μ m.

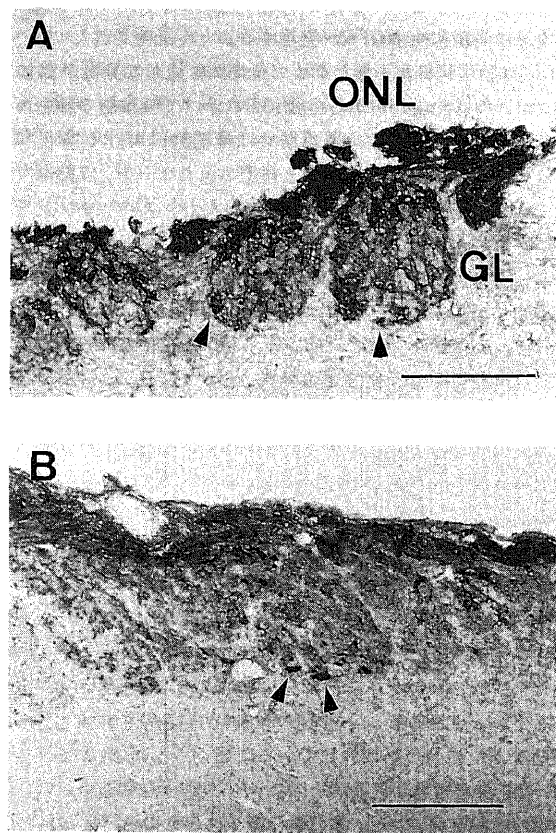


Fig. 7. Olfactory bulbs of 21 (A) and 28 (B) days after olfactory nerve transection. Note the increased *trk* immunoreactivity in olfactory nerve layer and glomeruli of 21 days after transection, and the new *trk* immunoreactivity in periglomerular cells of 21 and 28 days after transection (Arrowheads indicate). ONL, olfactory nerve layer; GL, Glomerulus. Bar in (A) and (B) indicates 100 μ m.

ていることが明らかにされている⁴⁰⁻⁴²。嗅球で合成される NGF はこれまで前脳基底部の対角帯水平部のコリン作動性ニューロンの生存維持に関与すると考えられていた¹⁰。

一方、低親和性 NGFR に関しては、低親和性 NGFR に対する抗体を用いた免疫組織化学的研究による成果が1980年代から次々と報告された。そのうち嗅上皮に関しては、成熟動物の嗅上皮では発現しないという報告²⁹⁻³¹と、嗅細胞体、樹状突起、軸索に発現するという報告³²に分かれている。粘膜固有層の神経線維束に関しては胎生期から生後初期にかけて発現し成熟期には発現しないという説^{29,31,33}と、成熟ラットにおいて発現を認めたという説³⁴に二分される。嗅球における発現に関して、Pioro らはコルヒチンをラット脳室に注入した後、僧帽細胞に NGFR が強く染色されたことから、僧帽細胞が NGFR の産生細胞であり、糸球体が染色される源であると考察している³⁵。その他、外叢状層と房飾細胞に NGFR 免疫反応があり、これらの神経細胞が糸球体の染色に貢献しているとの報告もある³⁶。また、Miwa らはマウス嗅糸切断後の低親和性 NGFR の発現を観察し、切断後7~35日目に嗅細胞、支持細胞そして基底細胞に陽性所見を認めている³⁷。

このように、これまでの研究はいずれも低親和性 NGFR に対する抗体を用いた免疫組織化学法によるもののみであり、高親和性 NGFR の発現を調べた研究はなかった。先に述べた理由から低親和性 NGFR の発現は必ずしも NGF との関係のみを示すものではない。著者の今回の実験により、初めて嗅上皮と嗅球に高親和性 NGFR が発現することが証明された。

trk は胎生14日から老年期まで全期間を通じて発現が認められたが、特に胎生16日から生後10日にかけて嗅細胞の細胞体で強く発現したことから、発達期では嗅細胞における高親和性 NGFR の合成が増加していると推察された。一方、成熟期では嗅細胞の細胞体の染色性は減弱していたが、コルヒチン処理を行い、軸索輸送をブロックすることにより、細胞体の trk 発現が増強されたことから、成熟期においても高親和性 NGFR は嗅細胞で産生されていることは明らかである。

一方、嗅糸切断実験では切断後7日から14日目に嗅細胞体および嗅神経線維に trk の発現を強く認め、21日目、28日目に経過するにつれて発現は減弱した。三輪は嗅糸切断後の嗅覚機能の回復を著者の実験と同種のマウスを用いて観察し、切断後28日で嗅覚機能は回復したと報告している³⁸。この結果から、切断後28日では大部分の嗅細胞は嗅球とのシナプス結合を完了するものと思われる。今回の実験結果に当てはめてみると、再生が完了しない時期に、嗅細胞における高親和性 NGFR の合成が増加しているものと考えられる。

発達期の嗅上皮と再生過程の嗅上皮に共通している点は、両者とも嗅球とシナプス結合を有しない未熟な嗅細胞が多く存在するという点である。今回の研究では、発達期、再生過程の両時期に trk の発現が増加していることから、未熟な嗅細胞に trk の発現が増加し、嗅球とのシナプス結合の完成すなわち嗅細胞の成熟と共に、trk の発現は減少するものと考えられた。

これらの現象と似たような関係が、末梢神経(坐骨神経)切断時の NGFR の動態にも認められる。要約すると、末梢神経を切断すると、切断端より末梢側のシュワン細胞で NGF と NGFR の合成が高まり、中枢側の切断端で NGFR の濃度が高まる。末梢側の NGF が中枢側の NGFR に受け渡され、NGF-NGFR 複合体の形で軸索を細胞体まで逆行輸送されると

NGF の作用により神経の再生がおこるが、神経が再生し、髄鞘の再生が完了すると NGF と NGFR は消失する³⁹⁻⁴¹。嗅細胞の場合、傷害を受けた嗅細胞は変性から細胞死に陥り、新たな嗅細胞の新生が活発化することによって再生が完了する。この時期に NGFR の発現が増強し、そして再生の完了すなわち嗅球とのシナプス結合により NGFR の発現が低下していることから、この時期の NGF および NGFR は末梢神経の再生と同様に、再生する軸索の伸展あるいはその方向付けに関与している可能性が考えられる。

嗅球内に NGF が豊富に存在していることは知られているが、その局在に関しては報告者によって若干の違いがみられる。また、嗅球で合成される NGF の役割に関しては、他の NGF 合成部位である海馬や大脳皮質がそれぞれ中隔野、マイネルト基底核等のコリン作動系ニューロンを栄養するのと同様に、ブローカー対角帯水平部の生存維持に関与すると考えられている。しかし、先にも述べたように、予備実験においてラットの嗅球除去を行っても対角帯ニューロンの変性が起こらなかったことから、これまでの説には疑問が残る。嗅球とシナプスを持つ嗅細胞が常に変性と再生を繰り返すという特殊な神経細胞であること、また今回の実験で嗅細胞に豊富に存在した trk が、成熟とともに嗅球で強く発現したことから、嗅細胞の再生、生存に嗅球の NGF が関与している可能性が強く示唆された。

今回の実験で trkB の発現はコルヒチン処理後及び嗅糸切断後の一時期に嗅神経線維束に発現を認めるのみであった。Deckner らは成熟ラットを用いて trkB の発現を免疫組織化学的に観察し、嗅細胞と嗅神経線維束に発現を認めたと報告しており⁴²、嗅細胞には trkB も存在するものと思われる。しかし、その発現の強さおよび量は今回の trk と比較すると少なく、嗅細胞の再生に関与する可能性は低いものと推定された。trkC に関してはこれまで嗅上皮では証明されていない。前述の Deckner らの報告では組織内固定細胞ハイブリダイゼーション法により trkC mRNA が嗅球の僧帽細胞と房飾細胞に発現したと報告されている⁴³。今回の実験でも発生段階において嗅球内に trkC の発現を認めており、嗅球内には trkC は存在するものと思われる。先にも述べたように、trkB は BDNF と、trkC は NT-3 とそれぞれ結合し、その機能を発揮することが知られている¹⁸⁻²¹。したがって、嗅細胞の再生において NGF の関与は強いものの、BDNF、NT-3 の関与は少ないものと思われた。しかし、嗅細胞の再生あるいは生存維持が NGF のみに依存するものなのか、あるいは NGF がそれらに不可欠なものであるかといった点に関しては、今回の免疫組織化学的な手法のみでは確定できず、さらに実験が必要であると思われる。

さて、今回の実験で先に述べた点とは別に興味深かった点は、嗅細胞と嗅球糸球体における trk の発現時期の違いである。発達過程においても、再生過程においてもいずれも、最初に嗅細胞における trk の発現が増強し、その発現が減弱するとともに糸球体での発現が増強していた。これは、NGFR が嗅細胞の成熟と共に嗅神経の軸索末端側により多く分布するようになることを意味しており、NGF 合成部位である嗅球に近い軸索成分に NGFR の強い発現が見られるという点で興味深い現象である。坂下は発達期における糸球体のシナプス密度を電子顕微鏡を用いて定量した⁴⁴。その結果、成熟ラットのシナプス密度を100%とした場合、胎生19日で6%、生後0日で16%そ

して生後10日では 57% であり、胎生後期から生後初期にかけて急速にシナプス密度が増加すると報告した。今回の結果でも生後1日が嗅細胞での *trk* の発現と嗅球での発現の境界期にあたり(表1), この時期がシナプスの形成に重要な時期と考えられた。また、嗅糸切断実験では切断後21日目に嗅細胞での *trk* の発現の減弱および糸球体での発現の増強をみた(表2)。Graziadei らのオートラジオグラフィーを用いた実験で嗅細胞のターンオーバーの周期は約30日と報告されている⁴⁶⁻⁴⁷。今回の実験では切断後約21日目にシナプス結合のピークがあり、28日目にはほぼ切断前の状態に回復しており、同様の結果であるものと考えた。

最後に、今回の実験において、コルヒチン処理を行った動物、嗅糸切断後21日目ならびに生後10日目に嗅球内の傍糸球体細胞に *trk* の発現を強く認めた。傍糸球体細胞における NGFR の発現は過去にも報告されており³⁰、嗅細胞の再生に何らかの関係を持つものと推察される。

今回の実験結果から嗅上皮と嗅球に高親和性 NGFR が発現していることが判明し、嗅覚伝導路の発達、成熟、機能維持と障害時の修復過程に NGF が関与している可能性が高いことが示唆されたことより、NGF を中心とする神経栄養因子の投与が嗅覚障害の治療法になりうる可能性が示唆された。高齢化社会の到来により、老化による嗅覚低下の問題は生活の質の向上の観点からも重要な問題であり、将来的に神経栄養因子が嗅覚障害患者へ臨床応用される場合、今回の実験結果は受容体の発現機転を通じて嗅覚伝導路における神経栄養因子の基礎的研究データを提示できたものと思われる。

結 論

マウス嗅覚伝導路における NGF ファミリーの受容体の発現を、高親和性受容体をコードしている *trk* グループの遺伝子産物に対する抗体を用いて免疫組織学的に検討し、以下の結果を得た。

1. 全期間を通じて染色を認めたのは *trk*, *trkB*, *trkC* のうち、*trk* であった。よって、嗅覚伝導路の発達、成熟、生存維持に NGF が神経栄養因子として関与している可能性があることが示唆された。

2. *trk* の発現は胎生14日から老年期まで認められた。嗅上皮では嗅細胞の細胞体と粘膜固有層の嗅神経線維束に、嗅球では嗅神経線維層、糸球体に染色を認めた。

3. 嗅細胞では胎生16日に最大の *trk* の発現を認め、以後生後10日にかけて減少し、さらに成熟期、老年期と加齢に従って発現嗅細胞数が減少した。糸球体では胎生18日から *trk* の発現を認めた。

4. 嗅糸切断後7~14日目に、再生嗅細胞の細胞体と嗅神経線維束に *trk* の発現の増強を認め、以後28日目まで減少した。糸球体では嗅糸切断後21日目に発現の増強を認めたが、28日目には非切断マウスと変わらないほど染色性が低下した。

5. 成熟マウスについてコルヒチン処理で軸索輸送を遮断した結果、嗅上皮では嗅細胞の細胞体と粘膜固有層の嗅神経線維束に *trk* の発現の増強が認められ、嗅球では傍糸球体細胞に新たな出現を認めた。

以上の結果より嗅覚伝導路の発達、成熟、生存維持と神経障害時の伝導路の再建に、NGF が最も重要な役割を演じていると推察された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御鞭撻を賜りました恩師古川 侃教授ならびに、終始直接の御教示、御指導を頂きました金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室三輪高喜博士、木村恭之博士に深甚なる謝意を表します。また貴重な御助言を賜りました金沢大学医学部解剖学第三講座森泉哲次助教授に深謝いたします。最後に本研究に御協力を頂きました金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室の皆様深く感謝いたします。

なお、本研究の一部は文部省科学研究費、金沢大学医学部老人医療基金によったことを付記する。

文 献

- 1) Cohen, S., Levi-Montalcini, R. & Hamburger, V.: A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcoma 37 and 180. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **40**, 1014-1018 (1954).
- 2) Levi-Montalcini, R. & Angeletti, P. U.: Nerve growth factor. *Physiol. Rev.*, **18**, 619-628 (1968).
- 3) Thoenen, H. & Barde, Y. -A.: Physiology of nerve growth factor. *Physiol. Rev.*, **60**, 1284-1335 (1980).
- 4) Whittemore, S. R. & Seiger, A.: The expression, localization and functional significance of β -nerve growth factor in the central nervous system. *Brain Res. Rev.*, **12**, 439-464 (1987).
- 5) Thoenen, H., Bandtlow, C. & Heumann, R.: The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: comparison with the periphery. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **109**, 145-178 (1988).
- 6) Ebendal, T.: Review Function and evolution in the NGF family and its receptors. *J. Neurosci. Res.*, **32**, 461-470 (1992).
- 7) Korsching, S., Auburger, G., Heumann, R. Scott, J. & Thoenen, H.: Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the correlate with cholinergic innervation. *EMBO J.*, **4**, 1389-1393 (1985).
- 8) Whittemore, S. R., Ebendal, T., Larkfors, L., Olson, L., Seiger, A., Stromberg, I. & Persson, H.: Developmental and regional expression of β nerve growth factor messenger RNA and protein in the rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83**, 817-821 (1986).
- 9) Maness, L. M., Kastin, A. J., Weber, J. Y., Banks, W. A., Beckman, B. S. & Zadina, J. E.: The neurotrophins and their receptors: Structure, function, and neuropathology. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **18**, 143-159 (1994).
- 10) Alter, A. C. & Bakhit, C.: Receptor-mediated transport of human recombinant nerve growth factor from olfactory bulb to forebrain cholinergic nuclei. *Brain Res.*, **541**, 82-88 (1991).
- 11) Rodriguez-Tébar, A., Dechant, G. & Barde, Y.-A.: Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron*, **4**, 487-492 (1990).
- 12) Rodriguez-Tébar, A., Dechant, G., Gotz, R. & Barde, Y.-A.: Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J.*, **11**, 917-922 (1992).

- 13) Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D. R., Parada, L. F. & Chao, M. V.: High-affinity NGF binding requires coexpression of *trk* proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature*, **350**, 678-683 (1991).
- 14) Martin-Zanca, D., Hughes, S. H. & Barbacid, M.: A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature*, **319**, 743-748 (1986).
- 15) 池内俊彦, 畠中 寛: 神経成長因子ファミリーと *trk* 遺伝子産物. *実験医学*, **10**, 126-131 (1992).
- 16) Kaplan, D. R., Martin-Zanca, D. & Parada, L. F.: Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of *trk* proto-oncogene product induced by NGF. *Nature*, **350**, 158-160 (1991).
- 17) Kaplan, D. R., Hempstead, B., Martin-Zanca, D., Chao, M. & Parada, L. F.: The *trk* proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science*, **252**, 554-558 (1991).
- 18) Klein, R., Jing, S., Nanduri, V., O'Rourke, E. & Barbacid, M.: The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell*, **65**, 189-197 (1991).
- 19) Soppet, D., Escandon, E., Maragos, J., Middlemas, D. S., Reid, S. W., Blair, J., Burton, L. E., Stanton, B. R., Kaplan, D. R., Hunter, T., Nikolics, K. & Parada, L. F.: The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the *trkB* tyrosine kinase receptor. *Cell*, **65**, 895-903 (1991).
- 20) Klein, R., Nanduri, V., Jing, S., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K. R., Reichardt, L. F. & Barbacid, M.: The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell*, **66**, 395-403 (1991).
- 21) Lamballe, F., Klein, R. & Barbacid, M.: *trkC*, a new member of the *trk* family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell*, **66**, 967-979 (1991).
- 22) Dahlström, A.: Effect of colchicine on transport of amine storage granules in sympathetic nerves of rat. *Eur. J. Pharmacol.*, **5**, 111-112 (1968).
- 23) Pioro, E. P. & Cuello, A. C.: Purkinje cells of adult rat cerebellum express nerve growth factor receptor immunoreactivity: light microscopic observation. *Brain Res.*, **455**, 182-186 (1988).
- 24) Thoenen, H., Bandtlow, C. & Heumann, R.: The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: Comparison with the periphery. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **109**, 145-178 (1988).
- 25) 畠中 寛: 脳の神経栄養因子. 神経栄養因子ものがたり, 第1版, 80-108頁, 羊土社, 東京, 1992.
- 26) Ayer-Lelievre, C., Olson, L., Ebendal, T., Seiger, A. & Persson, H.: Expression of the β -nerve growth factor gene in hippocampal neurons. *Science*, **240**, 1339-1341 (1988).
- 27) Hofer, M., Pagliusi, S. R., Hohn, A., Leibrock, L. & Barde, Y.-A.: Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.*, **9**, 2459-2464 (1990).
- 28) Maisonpierre, P. C., Belluscio, L., Friedman, B., Alderson, R. F., Wiegand, S. J., Furth, M. E., Lindsay, R. M. & Yancopoulos, G. D.: NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: Parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron*, **5**, 501-509 (1990).
- 29) Yan, O. Y. & Johnson, Jr. E. M.: An immunohistochemical study of the nerve growth factor receptor in developing rats. *J. Neurosci.*, **8**, 3481-3498 (1988).
- 30) Vickland, H., Kott, J. N., Bothwell, M. A. & Westrum, L. E.: Nerve growth factor receptor and the transplanted rat olfactory bulb. *Exp. Neurol.*, **115**, 137-141 (1992).
- 31) Vickland, H., Westrum, L. E., Kott, J. N., Patterson, S. L. & Bothwell, M. A.: Nerve growth factor receptor expression in the young and adult rat olfactory system. *Brain Res.*, **565**, 269-279 (1991).
- 32) Aiba, T., Mori, J. & Nakai, Y.: Nerve growth factor (NGF) and its receptor in rat olfactory epithelium. *Acta Otolaryngol (Stockh.)*, **506**, 37-40 (1993).
- 33) Miwa, T., Moriizumi, T., Sakashita, H., Kimura, Y., Donjyo, T. & Furukawa, M.: Transection of the olfactory nerves induces expression of nerve growth factor receptor in mouse olfactory epithelium. *Neurosci. Lett.*, **155**, 98-98 (1993).
- 34) Tayrien, M. W., Koh, S., Springer, J. E. & Loy, R.: Immunocytochemical localization of nerve growth factor (NGF) and NGF receptor in the rat olfactory bulb. *Anat. Rec.*, **214**, 133A (1986).
- 35) Pioro, E. P. & Cuello, A. C.: Distribution of nerve growth factor receptor-like immunoreactivity in the adult rat central nervous system. effect of colchicine and correlation with the cholinergic system-I. forebrain. *Neurosci.*, **34**, 57-87 (1990).
- 36) Gomez-Pinilla, F., Cotman, C. W. & Nieto-Sampedro, M.: NGF receptor immunoreactivity in rat brain: topographic distribution and response to entorhinal ablation. *Neurosci. Lett.*, **82**, 260-266 (1987).
- 37) 三輪高喜: マウス嗅糸切断後の行動学的ならびに組織学的変化に関する研究. 十全医会誌, **98**, 391-414 (1989).
- 38) Heumann, R., Lindholm, D., Bandtlow, C., Meyer, M., Radeke, M. J., Misko, T. P., Shooter, E. & Thoenen, H.: Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration. Role of macrophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 8735-8739 (1987).
- 39) Johnson, E. M. Jr., Taniuchi, M. & Distefano, P. S.: Expression and possible function of nerve growth factor receptors on Schwann cells. *Trends Neurosci.*, **11**, 239-304 (1988).
- 40) Johnson, E. M. Jr., Taniuchi, M. & Distefano, P. S.: Expression and possible function of nerve growth factor receptors on Schwann cells. *TINS*, **11**, 299 (1988).

- 41) 古川美子, 林 恭三: 神経系の成長栄養因子. 神経進歩, 34, 515-525 (1990).
- 42) Deckner, M.-L., Frisén, J., Verge, V. M. k., Hökfelt, T. & Risling, M.: Localization of neurotrophin receptors in olfactory epithelium and bulb. *Neuroreport*, 5, 301-304 (1993).
- 43) 坂下英雄: 嗅覚伝導路の発達. 十全医会誌, 102, 154-171 (1993).
- 44) Graziadei, P. P. C. & Monti Graziadei, G. A.: The olfactory systems: A model for the study of neurogenesis and axon regeneration in mammals. *In* W. Cotman (ed.), *Neuronal Plasticity*, 1st ed., p131-153, Raven Press, New York, 1978.
- 45) Graziadei, P. P. C. & Monti Graziadei, G. A.: Continuous nerve cell renewal in the olfactory system. *In* M. Jacobson (ed.), *Handbook of Sensory Physiology*, Vol 9, 1st ed., p55-83, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978.
- 46) Monti Graziadei, G. A. & Graziadei, P. P. C.: Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J. Neurocytol.*, 8, 197-213 (1979).
- 47) Monti Graziadei, G. A. & Graziadei, P. P. C.: Studies on neuronal plasticity and regeneration in the olfactory system: Morphologic and functional characteristics of the olfactory sensory neuron. *In* E. Meisami & M. A. B. Brazier (eds.), *Neural Growth and Differentiation*, 1st ed., p272-296, Raven Press, New York, 1979.

Topographical Expression of the Nerve Growth Factor Receptors in the Olfactory Pathways of Developing or Axotomized Mice: An Immunohistochemical Study Using the High-affinity Binding of Tyrosine Protein Kinases
Isao Horikawa, Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med Soc., 104, 206—215 (1995)

Key words NGF family, trk group, immunohistochemistry, olfactory bulb, olfactory epithelium

Abstract

Topographical expression of the nerve trophic factor receptors in the olfactory epithelium and the olfactory bulb was studied in the mouse immunohistochemically, using the high-affinity binding of the trk group of tyrosine protein kinases. We used three polyclonal antibodies against trk, trkB and trkC, that specifically recognized the nerve growth factor (NGF) receptor, the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) receptor and the neurotrophin-3 (NT-3) receptor, respectively. In the first series of experiments, the normal developmental changes were subsequently examined in embryonic (embryonic day (E) 14, E16, E18), neonatal (postnatal day (P)1, P10), adult and aged mice. Among the three antibodies used, trk immunoreactivity was the most prominent during all the developmental stages from 14 to the eldest. In the olfactory epithelium, the trk immunoreactivity peaked at E16 and gradually decreased postnatally. In the second series of experiments, possible regenerative or degenerative effects of axotomy were detected in adult mice whose olfactory nerve had been cut and who had survived for 1-28 days. In these mice, the trk immunoreactivity in regenerating cells and nerve of the olfactory epithelium was increased 7-14 days after axotomy, while the trk immunoreactivity in olfactory glomeruli was increased 21 days after axotomy. In the third series of experiments, some adult mice were pretreated with intraperitoneal injection of colchicine to block the axonal transport so that the receptor producing sites could be determined. In these colchicine-treated mice, the prominent trk immunoreactivity was seen in the olfactory cells and the periglomerular cells. Taken together with the present results, it is suggested that a high-affinity NGF receptor is produced in the olfactory cells and in the periglomerular cells and distributed to the whole structures for differentiation, growth, maintain and regeneration of the olfactory system. Among the three neurotrophic factors, i.e. NGF, BDNF, and NT-3, NGF may thus play the most important role in olfactory pathways.