

軸索切断後の迷走神経核および舌下神経核の神経細胞と グリア細胞における p38 MAP kinase の発現

奈良県立医科大学第一病理学教室

下川原 立 雄, 山 田 英 二, 榊 井 勝 也,
榎 本 泰 典, 井 上 和 也, 市 島 國 雄

EXPRESSION OF p38 MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN (MAP) KINASE IN THE NEURONS AND THE GLIAL CELLS OF THE DORSAL MOTOR NUCLEUS OF THE VAGUS NERVE AND THE HYPOGLOSSAL NUCLEUS AFTER AXOTOMY

TATSUO SHIMOKAWARA, EIJI YAMADA, KATSUYA MASUI,
YASUNORI ENOMOTO, KAZUYA INOUE and KUNIO ICHIJIMA

First Department of Pathology, Nara Medical University

Received December 14, 2001

Abstract: Mitogen-activated protein (MAP) kinase cascades are activated in response to various extracellular stimuli. p38 MAP kinase is one of the MAP kinase family and is activated in response to various extracellular stimuli such as proinflammatory cytokines and environmental stresses. To obtain information about the role of the p38 MAP kinase in the neurons and the glial cells after axotomy, we investigated changes of p38 MAP kinase expression in the dorsal motor nucleus (DMN) of the vagus nerve and the hypoglossal nucleus after axotomy in adult rats using in situ hybridization and immunohistochemical techniques. Expression of p38 MAP kinase mRNA was observed in the cytoplasm of the neurons in control rats, and showed no marked changes after axotomy. Three days after axotomy, however, expression of p38 MAP kinase mRNA was observed in the cytoplasm of perineuronal microglia in both nuclei. Immunohistochemical analysis revealed expression of p38 MAP kinase in the cytoplasm and nuclei of neurons in both nuclei in control rats. The stronger expression of activated p38 MAP kinase was observed in the DMN of the vagus nerve than in the hypoglossal nucleus. After axotomy, the expression of p38 MAP kinase, inactive and active, was reduced in the nuclei of neurons in both nuclei, while perineuronal microglia showed increased expression in their cytoplasm and nuclei. These findings indicate that the reduction of the expression of p38 MAP kinase, inactive and active, influences the transcription factors, and plays an important role in retrograde neuronal reactions. Moreover, the increased expression of p38 MAP kinase in the perineuronal microglia may be related to microglial cell reactions and retrograde neuronal reactions.

Key words : axotomy, p38 mitogen-activated protein kinase, vagus nerve, hypoglossal nerve, in situ hybridization

緒 言

成熟神経細胞は軸索が損傷されると、その中枢側では逆行性反応もしくは軸索反応といわれる変化がおこる^{1, 18)}。このとき神経細胞の代謝にも様々な変化がおこっており、ラットの神経細胞では軸索切断後に protein kinase C (PKC) isozyme の免疫反応の増強²⁹⁾や、細胞膜の phosphotyrosine の免疫反応の増強が認められる^{13, 28)}。Mitogen-activated protein (MAP) kinase は様々な細胞外刺激によって活性化されるセリン/スレオニンキナーゼで、細胞内シグナル伝達の中核を担っている。この MAP kinase family の一つである ERK1 の mRNA とタンパクは軸索切断後の神経細胞で発現の増強が認められることから、軸索切断後の神経細胞の逆行性反応における細胞内シグナル伝達に関与していると考えられている¹⁹⁾。さらに、MAP kinase family によって活性化される種々の核内転写因子も、軸索切断後様々な発現の変化をおこすことが報告されている^{9, 10, 11, 12, 14)}。しかし、軸索切断後の神経細胞における逆行性反応に関しては未だ不明な点が多い。

p38 MAP kinase は、MAP kinase family の一つであり、サイトカインやストレスなどの外界からの刺激によって活性化される²¹⁾。細胞内では MAP kinase kinase (MKK) 3, MKK6^{22, 25)}や MKK4 によって^{8, 8)}特異的に活性化され、次いで activating transcription factor-2 (ATF-2) などの核内転写因子を活性化することが知られている^{21, 22, 24)}。軸索切断後の神経細胞において、ATF-2 の発現が減弱することが報告されているが^{5, 12, 23)}、これまでに ATF-2 の活性化因子である p38 MAP kinase に関して、神経細胞における局在や軸索切断後の逆行性反応における経時的変化を調べた報告は少ない。

今回我々は、軸索切断後の神経核における p38 MAP kinase の関与および局在を調べるために、軸索切断後 degenerative な変化を起こす迷走神経背側運動核^{2, 3, 16, 26, 27)}と、regenerative な変化を起こす舌下神経核^{2, 3, 27)}における p38 MAP kinase の mRNA とタンパクの発現を、それぞれ in situ hybridization 法と免疫染色法を用いて検索した。

対象と方法

1. RNA probe の合成

Acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC)法によってラット脳から細胞内の全 RNA を抽出した。さらに、Oligotex™-dT30 (Roche, Japan)を用いて mRNA を単離し、この mRNA から first strand

cDNA synthesis kit (Amersham, International Plc., England)を用いて first strand cDNA を合成した。この cDNA をテンプレートとして、polymerase chain reaction (PCR)法によって p38 MAP kinase cDNA の 535 番目から 890 番目のヌクレオチドに相補的な p38 MAP kinase cDNA 断片を増幅し、次いでこれを pcDNA II™ vector (Invitrogen Corporation, USA)に挿入してさらに p38 MAP kinase cDNA 断片を増幅した。DIG RNA labeling kit (SP6/T7) (Boehringer Mannheim Corp., USA)を用いて in vitro transcription 法を行い、p38 MAP kinase cDNA 断片から mRNA を転写し、非ラジオアイソトープ標識薬である Digoxigenin で標識した p38 MAP kinase sense RNA probe と antisense RNA probe を合成した¹⁵⁾。

2. 手術手技

成熟 Wistar rat を、エーテル麻酔のもと、頸部で迷走神経と右舌下神経を切断した²⁹⁾。迷走神経および舌下神経を切断した後 1, 3, 5, 7, 14, 28 日後(各 3 匹)および 1, 3, 5, 7, 14 日後(各 3 匹)に、前者では in situ hybridization、後者では免疫染色を行った。

3. In situ hybridization

Pentobarbital による麻酔を行い、各グループ 3 匹の動物を用いた。左心室から 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.2)で希釈した 4 % paraformaldehyde で灌流固定を行った後、脳幹を摘出し翌日まで 4 °C、4 % paraformaldehyde に入れて固定し、脱水、パラフィン包埋した。迷走神経背側運動核と舌下神経核とを含むように厚さ 6 μm で薄切を行い、3-aminopropyl-trimethoxysilane コートしたスライドにのせ、翌日まで 43 °C に保温してパラフィン標本を作成した。標本のパラフィンを除去し、PB で再水をし、0.2 N HCl で処理した後、10 mg/ml proteinase K (Sigma, St. Louis, MO, USA)で 20 分間、37 °C で処理し、4 % paraformaldehyde で 10 分間固定した。

0.1 M triethanolamine (pH 8.0)で希釈した 0.25 % acetic anhydride に 10 分間入れた後、プレハイブリダイゼーション溶液で 3 時間、50 °C でインキュベートしてから、プレハイブリダイゼーション溶液に digoxigenin で標識した 250 ng の RNA probe と 10 % Dextran sulfate を加えた溶液で翌日まで 50 °C でインキュベートした。このように RNA probe をハイブリダイゼーションさせた後、切片を 2 × SSC で希釈した 50 % formaldehyde で 30 分間、55 °C で処理し、次いで結合していない RNA

probeを分解するため0.5 M NaCl, 10 mM Tris (pH 8.0), 1mM EDTA で 20 μ g/ml としたRNase A で 30 分間, 37°C で処理し, 2 \times SSC で 1 回, 0.2 \times SSC で 2 回各 20 分間, 55°C で洗浄した。標本を Tris-buffered saline (0.1 M Tris HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl) に入れて, alkaline phosphatase で標識した digoxigenin 抗体 (Boehringer Mannheim) を 500 倍に希釈して 1 時間, 37°C でインキュベートした。Tris-buffer で洗浄し, nitroblue tetrazolium (NBT, Boehringer Mannheim) と 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate を 1 M Tris-buffer に加えたものを発色液として加えて, 2-4 時間後 0.01 M Tris-HCl (pH 8.0) に EDTA を加えたもので 5 分間標本を洗浄し反応を停止させた。標本を乾燥させ Crystal/Mount (Bio-medica, CA, USA) に封入した。対照として, 手術を行ったが軸索を切断していない動物 2 匹を用いて行った。

4. 免疫染色法

Pentobarbital 麻酔のもと, 各グループ 3 匹ずつ左心室から 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) で希釈した 4% paraformaldehyde で灌流固定を行った。脳幹を摘出し, 6 時間, 4°C で同じ 4% paraformaldehyde で固定を行った。組織は 20% sucrose を加えた PBS に 48 時間入れた後, 液体窒素で凍結させ, cryostat で 20 μ m の厚さに薄切して切片を作成した。次いで p38 MAP kinase (1:4000, Santa Cruz Biotech. Inc. CA, USA) に対するウサギの抗体でインキュベートした。活性化型 p38 MAP kinase の免疫染色はウサギのポリクローナル抗体 (1:500, New England Biolabs, Inc. MA, USA) を用いた。一次抗体はフリーフローティング法で 4°C, 2 日間行い, biotin 化した二次抗体と horse radish peroxidase を結合させた streptavidin (DAKO LSAB 2 Kit for use on Rat specimens, DAKO Corp. CA, USA) で室温にてインキュベートした。最後に 3,3'-diaminobenzidine を用いて発色させた。対照として, 手術を行ったが軸索を切断していない動物 2 匹を用いて行った。

結 果

1. In situ hybridization

In situ hybridization の結果, 対照ラットにおいて迷走神経核と舌下神経核の両方で, 神経細胞の胞体に陽性シグナルを認めた。これらの陽性シグナルは, 軸索切断 28 日目まで両神経核とも経時的变化を認めなかった (Fig.1-a)。

また, 軸索切断 3 日後, 神経細胞周囲に集簇するミクログリアに陽性シグナルを認めた (Fig. 1-b, c)。これら

の陽性シグナルは軸索切断後 7 日目まで強く保たれたが, 軸索切断後 14 日目, 28 日目に減弱傾向がみられた。p38 MAP kinase に対する sense RNA プローベを用いた場合は, 両神経核とも神経細胞およびグリア細胞に陽性シグナルを認めなかった。

2. 免疫染色法

2.1 p38 MAP kinase

p38 MAP kinase に対する抗体を用いた免疫染色の結果, 対照ラットでは両神経核の神経細胞の胞体と核に弱い陽性反応を認めた。軸索切断後, 両神経細胞の核の陽性反応は減弱, 消失した (Fig. 2-a, b)。

軸索切断 3 日後, 神経細胞周囲に集簇するミクログリアに陽性反応が認められた。軸索切断後 7 日目, これらのミクログリアの陽性反応は増強した (Fig. 2-a, b)。

2.2 活性化型 p38 MAP kinase

p-p38 MAP kinase の抗体を用いると, 対照ラットの迷走神経核では神経細胞の核に強い陽性反応を認め, 胞体には弱い反応を認めた。また, 舌下神経核では神経細胞の核に弱い陽性反応を認めたが, 胞体では陽性反応を認めなかった。軸索切断後, 神経細胞の陽性反応は軸索切断 5 日目までは変化を認めなかったが, 7 日目以降核の陽性反応が減弱傾向を示した (Fig. 3-a)。

軸索切断 3 日後, 両神経核とも神経細胞周囲のミクログリアに陽性反応を認めた。これらの反応は主に胞体にみられたが, 一部のミクログリアの核にも弱い陽性反応を認めた。軸索切断後 7 日目まではこれらの陽性反応に変化はみられなかったが, 軸索切断後 14 日目に胞体の陽性反応は減弱した (Fig. 3-b, c)。

以上の結果を各神経核における神経細胞とミクログリアについて Table 1, 2 にまとめた。

考 察

In situ hybridization の結果, 対照ラットの迷走神経核と舌下神経核において神経細胞の胞体に陽性シグナルを認めた。これは p38 MAP kinase の mRNA が両神経細胞の胞体で常時発現されていることを示している。免疫染色の結果から, 非活性化型 p38 MAP kinase は両神経核の神経細胞の胞体と核に陽性反応を認め, 活性化型 p38 MAP kinase は迷走神経核では胞体と核に, 舌下神経核では核のみに陽性反応を認めた。これは p38 MAP kinase のタンパクも常時発現され, その一部が活性化されていることを示している。以上から, p38 MAP kinase は両神経核の神経細胞において常時発現し, 様々

