

末梢神経の変性および再生過程における低親和性神経成長因子受容体 (low affinity nerve growth factor receptor) の発現

森定 ゆみ

末梢神経障害の際、Schwann 細胞が低親和性神経成長因子受容体 (nerve growth factor receptor : NGFR) を発現する契機を検索するために、ラットの坐骨神経に切断障害および圧迫挫滅障害を加え、その末梢部で凍結標本を作成し、免疫組織化学的に低親和性 NGFR とリン酸化ニューロフィラメント (phosphorylated neurofilament : P-NF), macrophage を同定し、エポキシ包埋ブロックの光顕ならびに電顕的観察と比較した。

切断障害では、2 日目免疫組織化学的にはコントロールと同様、NGFR は染色されず、P-NF が軸索に一致して染色された。電顕的には軸索内細胞骨格が崩壊し、一部の髄鞘の層板解離が始まった。3 日目 NGFR が一部で陽性となり、P-NF で染色されない軸索が認められた。以後、NGFR は次第に染色性を増し、P-NF の染色性は低下した。電顕的には Schwann 細胞の中で髄鞘の崩壊が進行し、吸収消化されていった。macrophage は 5 日目に初めて免疫組織化学的に同定された。

圧迫挫滅障害では、7 日目免疫組織化学的に NGFR の染色性が低下し、P-NF の染色性が上昇した。同日、電顕的に軸索の sprouting や Schwann 細胞が再生軸索を取り巻き、髄鞘再生を開始しているのが認められた。

低親和性 NGFR 発現の契機は、従来、Schwann 細胞が軸索との接触を失うこととされてきたが、今回の結果では低親和性 NGFR は Schwann 細胞の崩壊軸索の吸収、髄鞘の消化開始を契機として発現され、髄鞘再生開始で消失した。

低親和性 NGFR は、Schwann 細胞から軸索への神経成長因子の受け渡しに関与していることが示唆され、Waller 変性における Schwann 細胞の積極的役割が目撃された。

(平成 5 年 8 月 16 日採用)

Expression of Low Affinity Nerve Growth Factor Receptors in the Rat Sciatic Nerve after Axotomy

Yumi Morisada

It is well known that axotomy of peripheral nerves induces expression of low affinity NGFR (nerve growth factor receptors) on the Schwann cell surface. The purpose of this study was to determine what makes Schwann cells express low affinity NGFR.

We axotomized the sciatic nerves of adult male Sprague-Dawley rats (B. W. 220-280g) by transection to prevent regeneration, or by crushing to permit subsequent axonal regeneration. At 1, 2, 3, 5, 7, 9, 14, 21, 28 days after axotomy, the nerves were removed under anesthesia. For immunohistochemical examination, the nerves were fixed with phosphate-buffered 2% paraformaldehyde and 0.03% glutaraldehyde and frozen in dry ice and acetone. Cryostat sections were immunostained with anti-low affinity NGFR antibody (192 IgG), anti-phosphorylated neurofilament antibody (SMI 31), and anti-monocyte/macrophage antibody (ED-1) by the avidin-biotin peroxidase complex method. For light and electron-microscopic examination, the nerves were fixed with 4% glutaraldehyde and 2% osmium tetroxide, and embedded in epoxy resin. Semithin sections were stained with 1% toluidine blue. Ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate.

In the distal portion of the axotomy, at two days after transection or crushing, no staining with 192 IgG was detectable. Immunohistochemical localization of SMI 31 showed the staining of axons to be the same as that in the control and at one day after axotomy. At the same time, electron-microscopically the cytoskeleton in almost all the axons were seen to dissolve, leaving behind only granular and amorphous debris. At three days after transection, some portions expressed low affinity NGFR, and some axons were not detectable with P-NF. At the same time, electron-microscopically, myelin lamellae in the Schwann cells began to disintegrate. Thereafter, as the expression of low affinity NGFR increased, the expression of P-NF decreased, and myelin debris became more degenerated and gradually disappeared. Axonal regeneration began at five days after crushing and remyelination began at seven days. Immunohistochemical expression of low affinity NGFR began to decrease at seven days.

Absorption of degenerated axons or digestion of myelin by Schwann cells causes them to express low affinity NGFR. Axotomy induces the digestion of old myelin, the production of NGF (nerve growth factor) and the expression of low affinity NGFR by Schwann cells, which results in transference NGF to regenerating axons by low affinity NGFR. The present results impressed the positive role of Schwann cells in Wallerian degeneration. (Accepted on August 16, 1993) *Kawasaki Igakkaishi* 19(3): 155-167, 1993

Key Words ① NGFR ② Schwann cells ③ Wallerian degeneration
④ Regeneration

はじめに

神経線維に障害が加わると、障害部の末梢で既存の軸索および髄鞘が崩壊し、Waller 変性が生じる。その後、軸索が障害部の中枢から末梢

に向かって順調に伸長し、標的組織に到達すれば、その神経は機能を回復する。

一方、神経細胞が成長分化し、生存し続けるためには神経栄養因子と総称される液性因子が重要な役割を果たしている。その代表が神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) である。

NGFは、1950年代から1960年代にかけて、Levi-Montalcini と Hamburger¹⁾ によって、交感神経細胞の成長分化を促す因子として同定された。その後、線維芽細胞成長因子²⁾、インターロイキン³⁾、インスリン⁴⁾ などにも神経栄養因子としての作用が認められた。また、NGF に構造が類似した BDNF (brain-derived neurotrophic factor)⁵⁾、NT-3 (neurotrophin-3)⁶⁾ などが同定され、NGF ファミリーとしてまとめられた。最近、中毒性末梢神経障害における NGF の予防効果が報告され⁷⁾、これらの神経栄養因子が神経系のさまざまな場面に果たす役割に関心が集まっている。

末梢神経を切断するとその末梢側の Schwann 細胞は NGF を産生するとともに、低親和性神経成長因子受容体 (nerve growth factor receptor: NGFR) を細胞膜に発現する⁸⁾。今回、著者はラットの坐骨神経に切断障害と圧迫挫滅障害を加え、末梢神経の Waller 変性および軸索再生過程で、凍結標本を作成し、免疫組織化学的に低親和性 NGFR と軸索の構成成分であるリン酸化ニューロフィラメント (phosphorylated-neurofilament: P-NF)、macrophage を染色同定するとともに、エポン包埋ブロックの準超薄切片、超薄切片で光顕的ならびに電顕的にその変化を観察し、Schwann 細胞の低親和性 NGFR 発現の契機について考察したので報告する。

材料と方法

材料として、7-8 週齢 (体重 220-280 g) の Sprague-Dawley ラット、雄を用いた。ペントバルビタール (35-40 mg/100 g 体重) 麻醉下で、同ラットの右坐骨神経に M. obturator internus の腱の位置で切断障害および圧迫挫滅障害を加え、それより末梢を検索した。

切断障害は同部位を眼科用剪刀で切断し、中枢切断端を上方に折り返した。神経線維とそれを取り巻く周膜の連続性を絶つことにより、中枢から末梢への軸索再生を阻止した状態で、

Waller 変性を観察するためである。圧迫挫滅障害は、同部位を幅 1mm のピンセットで強く圧迫挫滅した。神経線維は切断されるが、周膜の連続性が保たれることにより、軸索再生が観察できるからである。左坐骨神経はコントロールとした。障害を加えた後、1, 2, 3, 5, 7, 9, 14, 21, 28 日目に灌流固定で神経を摘出した。圧迫挫滅障害は障害部から 1cm までを検索した。免疫組織化学的検索は坐骨神経を 2% パラホルムアルデヒドと 0.03% グルタルアルデヒドを含む 0.1M リン酸緩衝液で灌流固定後摘出し、同固定液に 1 晩浸漬した。ドライアイス・アセトンで凍結後、クリオスタットで 3-4 μ m に薄切し、抗低親和性 NGFR 抗体 (192 IgG, Boeringer)、抗 P-NF 抗体 (SMI 31, Sternberger Monoclonal Inc)、抗ラット monocyte/macrophage 抗体 (ED-1, Serotec) を Avidin-biotin peroxidase complex 法で染色した。

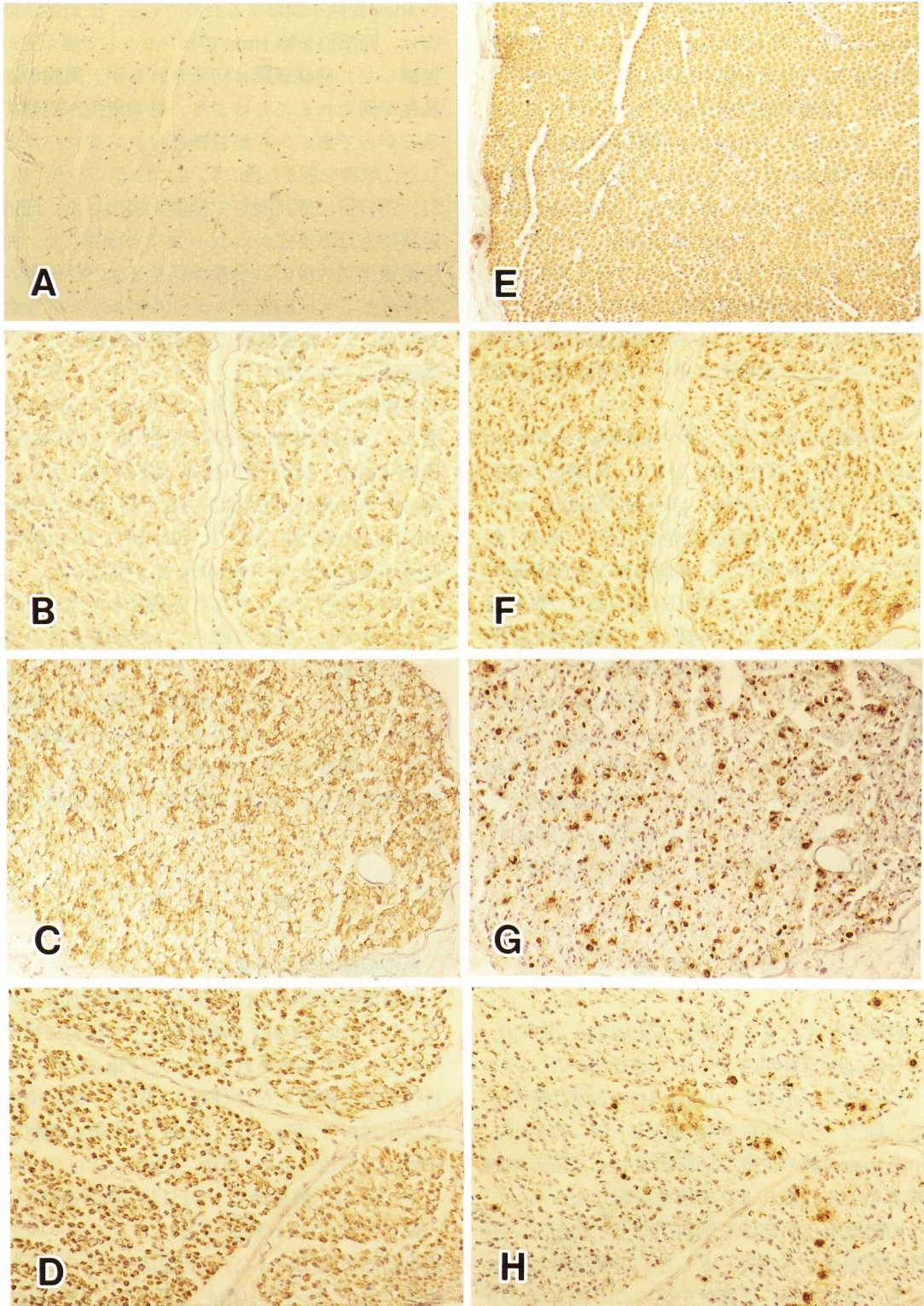
エポン包埋ブロックは坐骨神経を 4% グルタルアルデヒド固定に続き、2% 四酸化オスミウムで後固定し、エタノール、プロピレンオキサライドで脱水、エポキシ樹脂に包埋した。準超薄切片を 1% トルイジンブルー染色し光顕的に観察し、超薄切片を 2% 酢酸ウラニル・クエン酸鉛重染色し、JEM-2000EX II で電顕的に観察した。

結 果

免疫組織化学的所見

切断障害における NGFR は、障害を加えていないコントロールおよび障害後 1, 2 日目の神経ではまったく染色されなかった (Fig. 1 A)。3 日目初めて陽性となり (Fig. 1 B)、7 日目染色性が上昇した (Fig. 1 C)。14 日目小型の細胞に一致して染色された (Fig. 1 D)。

P-NF は、障害後 1, 2 日目の神経で軸索に一致して染色され (Fig. 1 E)、コントロールと差は認められなかった。3 日目軸索の一部が染色されなくなった (Fig. 1 F)。7 日目以降、endoneurium に顆粒状に染色された (Fig. 1



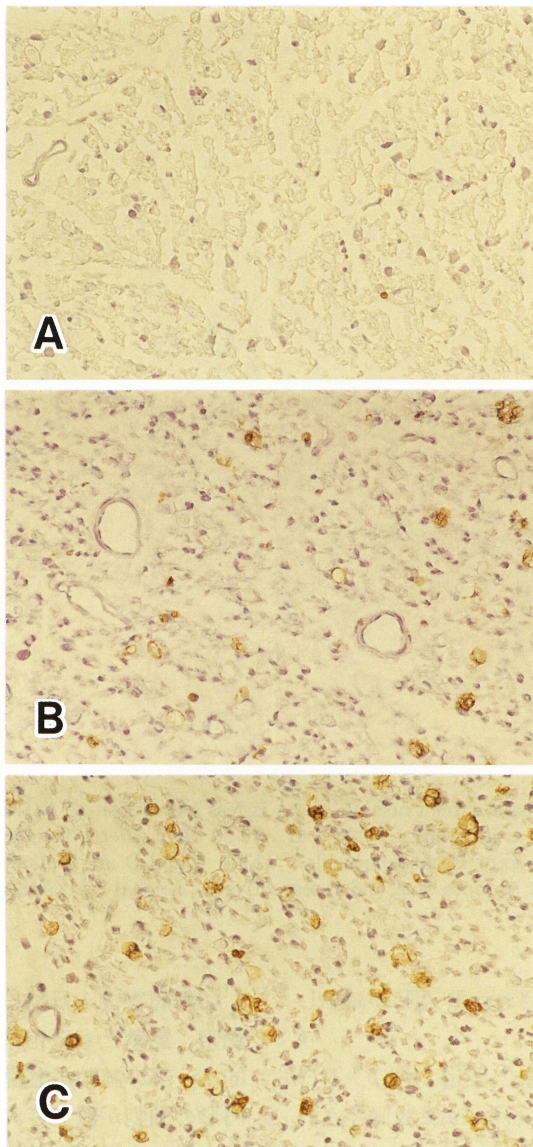


Fig. 2. Immunohistochemical localization with anti-monocyte/macrophage antibody (ED-1). **A.** At three days after transection, no staining is detectable. $\times 260$. **B.** At five days after transection, some macrophages are detectable. $\times 260$. **C.** At 14 days after transection, macrophages reaches their maximal size and number. $\times 260$.

← **Fig. 1.** Immunohistochemical localization of NGFR (**A, B, C, D**) and P-NF (**E, F, G, H**) in the distal portion of the rat sciatic nerve after transection. Cryostat sections were stained with anti-low affinity NGFR antibody (192 IgG) and anti-P-NF antibody (SMI 31). **A.** At two days after transection, no staining with 192 IgG is detectable, as was the case in the control and at one day after transection. $\times 130$. **B.** At three days, low affinity NGFR is expressed in some portions. $\times 130$. **C.** At seven days, the expression of NGFR increases. $\times 130$. **D.** At 14 days, the expression of NGFR reaches the maximal level in the nerves we investigated. $\times 130$. **E, F, G, H** are immunostainings with SMI 31 in sections adjacent to those of **A, B, C, D** respectively. **E.** A section immunostained with SMI 31 shows the staining of axons. $\times 130$. **F.** No axons are stained with SMI 31. $\times 130$. **G** and **H** show a gradual decrease in the expression of P-NF. $\times 130$.

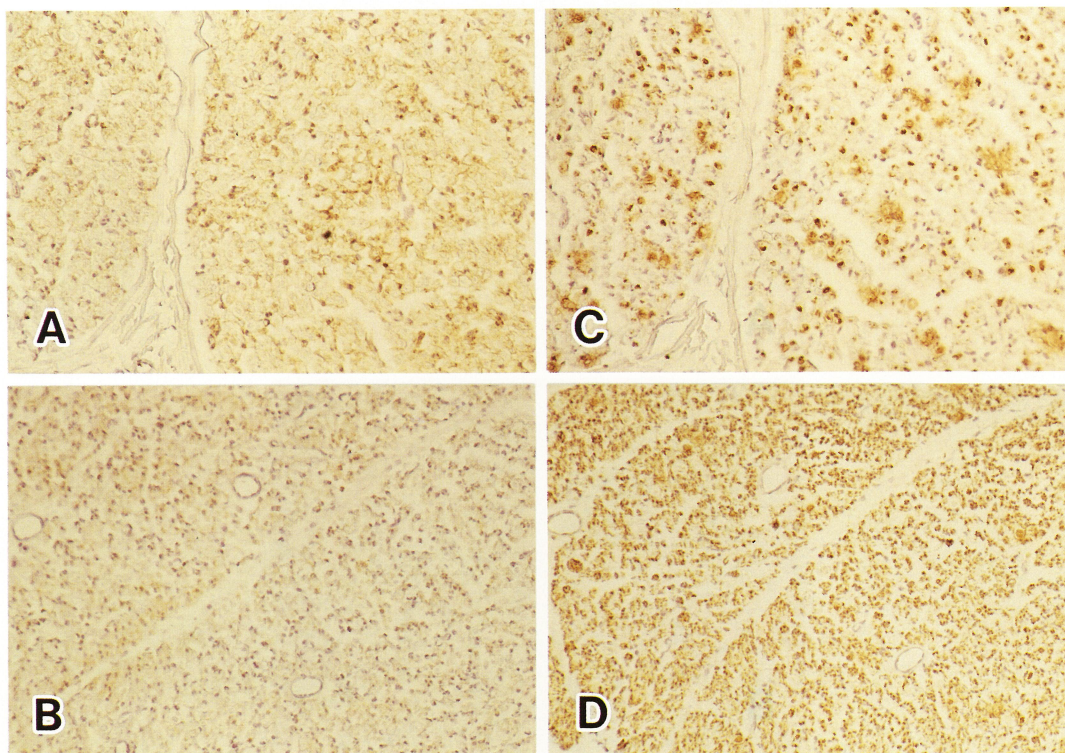


Fig. 3. A. At seven days after crushing, there is less expression of NGFR than in the nerves at seven days after transection. $\times 130$. B. At 28 days after crushing, the expression of low affinity NGF receptor is not detectable. $\times 130$. C and D are immunostained with SMI 31 in sections adjacent to those of A and B respectively. Axonal regeneration is advancing. $\times 130$.

G). 14日目顆粒状に染色されるP-NFが減少した(Fig. 1 H).

ED-1は3日目まで陰性で(Fig. 2 A), 5日目初めてED-1陽性のmacrophageは同定された(Fig. 2 B). 14日に数, 大きさともピークに達し(Fig. 2 C), 以後減少していった.

圧迫挫滅障害ではNGFRの染色性は, 切断障害と同様に3日目, 5日目と増し, 7日目低下した(Fig. 3 A). 28日目ほとんど染色されなくなった(Fig. 3 B).

P-NFの染色性は, 障害後5日目まで減少し, 7日目局所的に染色性が上昇した(Fig. 3 C). 28日目染色性が増すとともにびまん性に配列が整っていった(Fig. 3 D).

エポキシ包埋標本の光顕ならびに電顕所見

切断障害後1日目は光顕的ならびに電顕的に軸索, 髓鞘とも変化は乏しかった. 2日目光顕的に一部の髓鞘が虚脱した. endoneuriumには円形の細胞が散見された(Fig. 4 A). 電顕的には大径, 小径有髄神経とも軸索のニューロフィラメントや微小管が不鮮明となった(Fig. 4 B). 光顕で認められた円形細胞の一部は基底膜を持ち, 縦断像で髓鞘を消化しつつあるSchwann細胞であることが示された(Fig. 4 C, D). また, 基底膜がなく, 細い突起トリボゾームやミトコンドリアに富む胞体を持つ細胞が認められた(Fig. 4 E). 3日目電顕的に既存の髓鞘は層板間が解離し始めた(Fig. 5 A). 5日目endoneuriumにライソゾームに富む細胞が出現した(Fig. 5 B). 7日目既存の髓鞘の層板間解離が進み, 崩壊髓鞘の一部が胞体の外に放出されつ

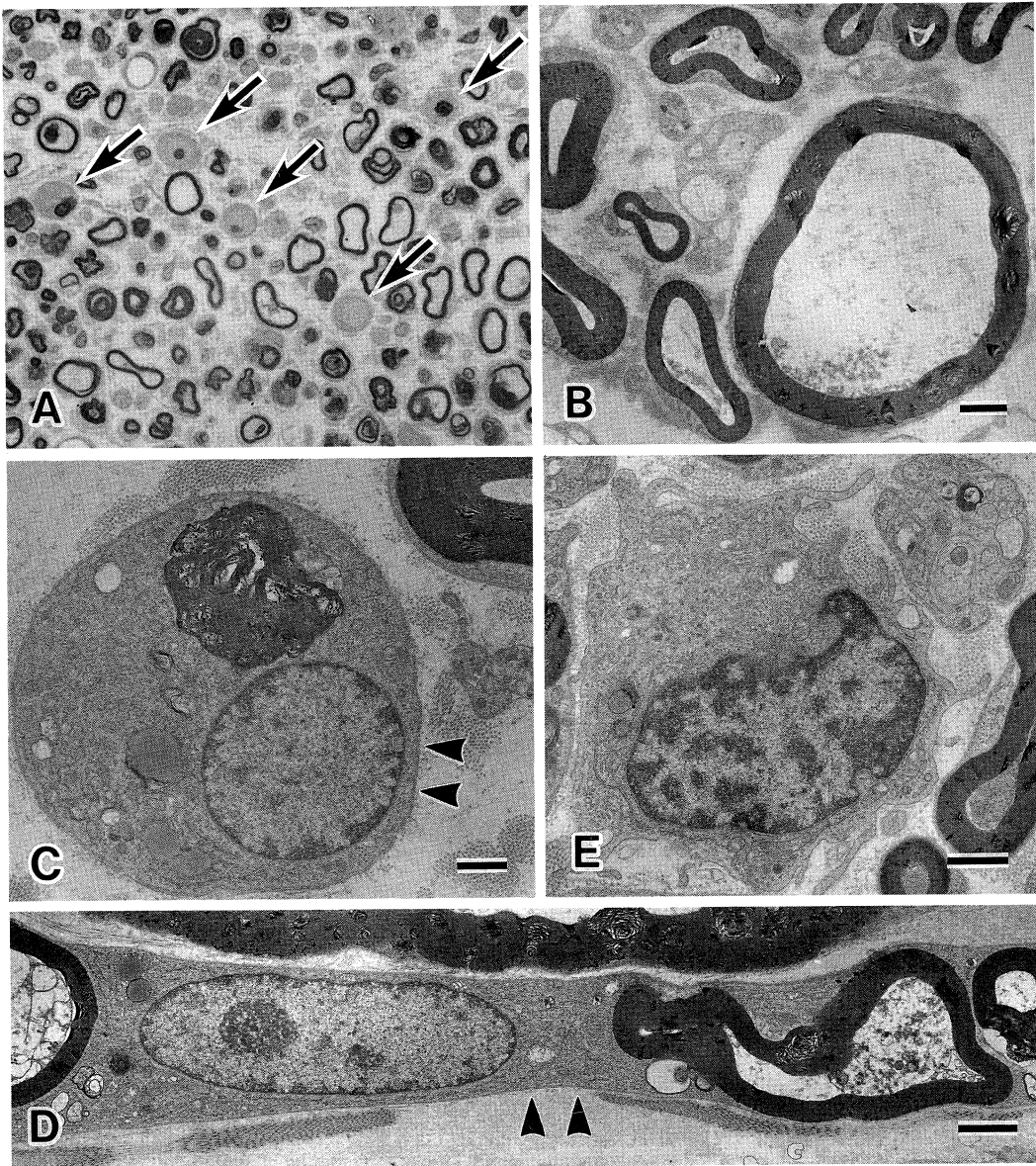


Fig. 4. **A.** At two days after transection, a light micrograph shows some round cells (arrows) in the distal portion of the sciatic nerve. $\times 500$. **B.** An electron micrograph shows that the cytoskeleton of almost all the axons has dissolved, leaving behind only granular and amorphous debris. Bar $2 \mu\text{m}$. **C.** The round cells in the endoneurium have a basement membrane (arrow heads). Bar $1 \mu\text{m}$. **D.** A longitudinal section shows the round cells are parts of Schwann cells which have a basement membrane (arrow heads) digesting their myelin. Bar $2 \mu\text{m}$. **E.** At the same time, there are some cells in which ribosomes are rich, having small processes but no basement membrane. Bar $1 \mu\text{m}$.

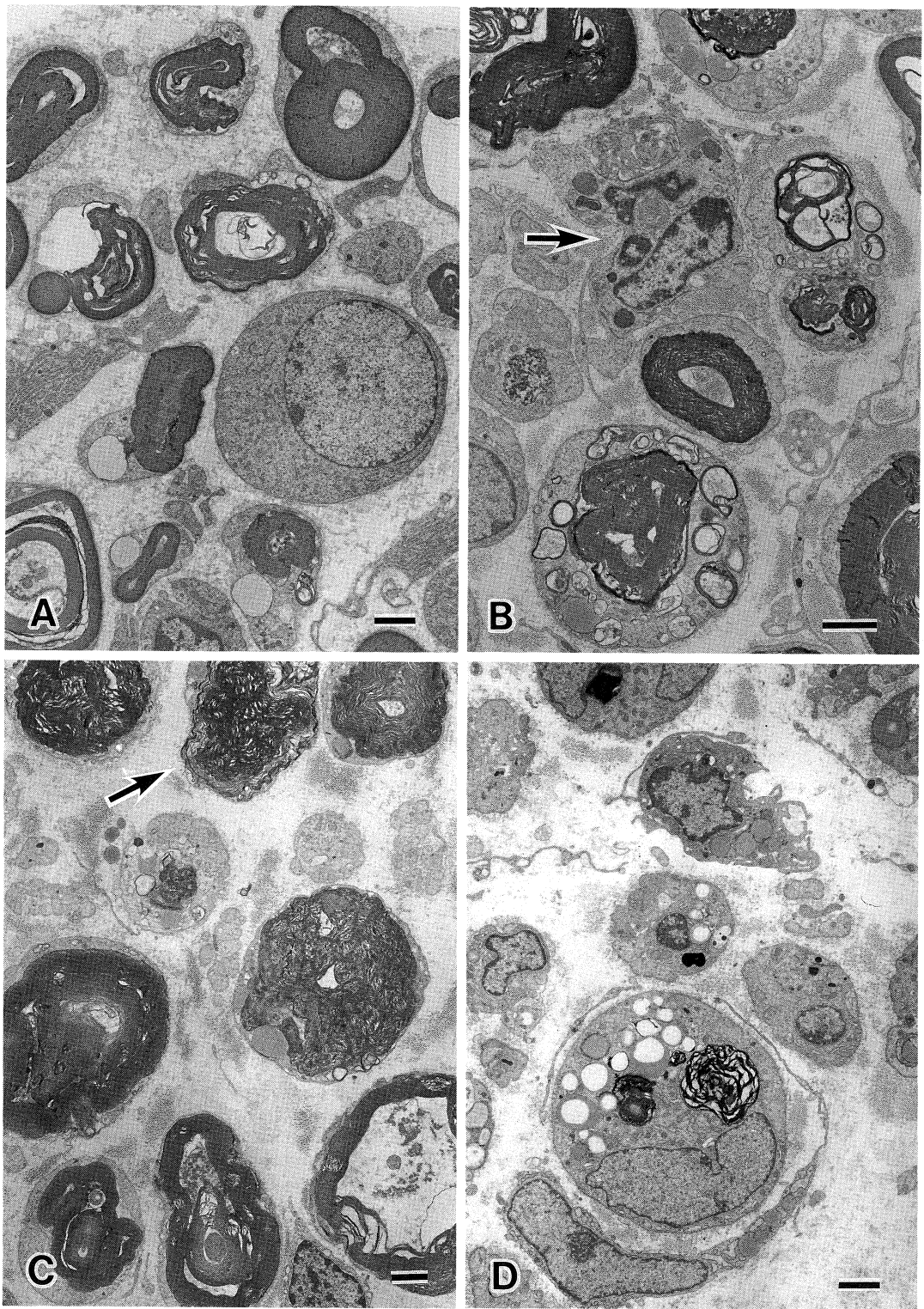


Fig. 5

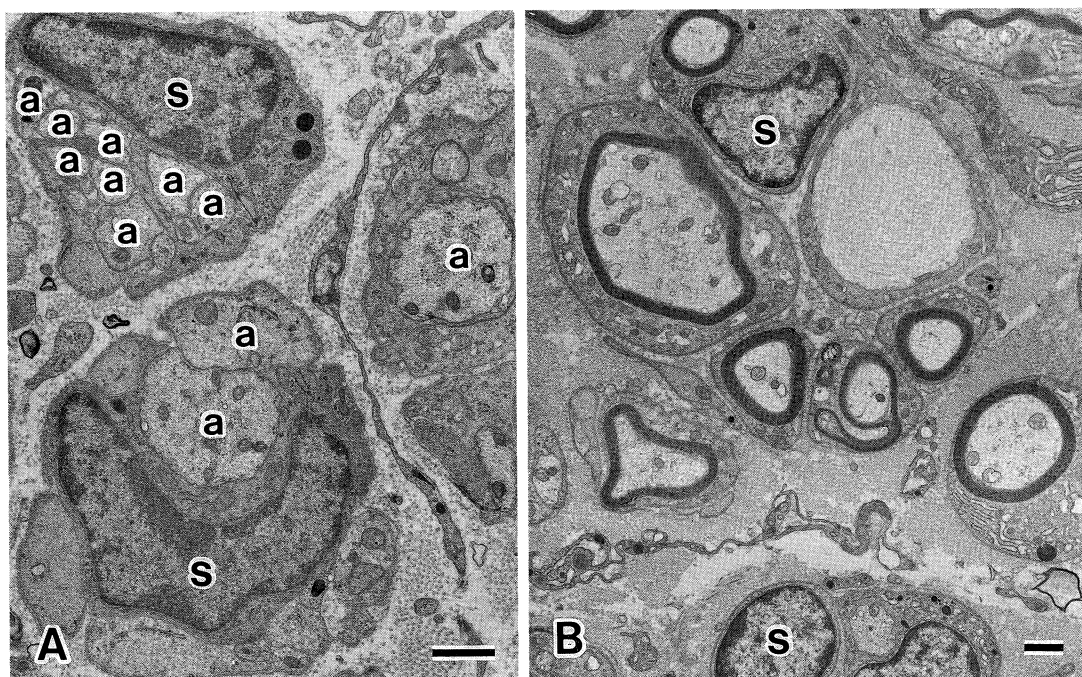


Fig. 6. Ultrastructures of transverse sections of the sciatic nerves after crushing. A. At seven days, axons (a) are regenerated. Some Schwann cells (s) begin remyelination. Bar $1 \mu\text{m}$. B. At 14 days after crushing, axons and myelin have regenerated. Bar $1 \mu\text{m}$.

つあった (Fig. 5 C). 14日目崩壊髄鞘の大部分は吸収され, Schwann細胞や線維芽細胞の胞体内には脂肪滴が目立った (Fig. 5 D).

圧迫挫滅障害後3日目までは切断障害と同様の経過で既存の軸索, 髄鞘とも崩壊した. 5日目軸索の集簇像 (sprouting) が出現し, 軸索再生が明らかとなった. 7日目軸索の周囲を Schwann細胞の突起が取り囲み, 髄鞘再生が始まった (Fig. 6 A). 14日目菲薄な髄鞘を持つ線維が増加した (Fig. 6 B). 28日目髄鞘は厚みを増し, 再生がほぼ完成した.

以上のラットの坐骨神経の切断障害および圧迫挫滅障害における低親和性 NGFR 発現と macrophage の出現の経過を Figure 7 に示した. 軸索の細胞骨格の崩壊と圧迫挫滅障害における

軸索再生, 髄鞘再生を併記した.

考 察

今回, ラットの坐骨神経に切断障害と圧迫挫滅障害を加え, Waller変性および軸索再生過程で経時的に NGFR を免疫組織化学的に同定し, エポソ包埋ブロックによる光顕的ならびに電顕的所見と比較した.

ラットの坐骨神経に切断を加えると, その末梢では2日目電顕的にほとんどすべての軸索でニューロフィラメントなどの細胞骨格が崩壊し, 不定形の崩壊産物のみとなった. 既存の髄鞘は一部が虚脱した. 3日目既存の髄鞘は層板間で解離しはじめた. また, 免疫組織化学的に低親

← Fig. 5. Ultrastructures of transverse sections of the sciatic nerves after transection. A. At three days after transection, myelin lamellae have disintegrated. Bar $2 \mu\text{m}$. B. At five days, cells rich in mitochondria and lysosomes are found (arrow). Bar $2 \mu\text{m}$. C. At seven days, almost all lamellae of the myelin have separated. Some Schwann cells have released myelin debris (arrow head). Bar $2 \mu\text{m}$. D. At 14 days, myelin debris has disappeared. Schwann cells and fibroblasts are the major component of the nerves. Bar $2 \mu\text{m}$.

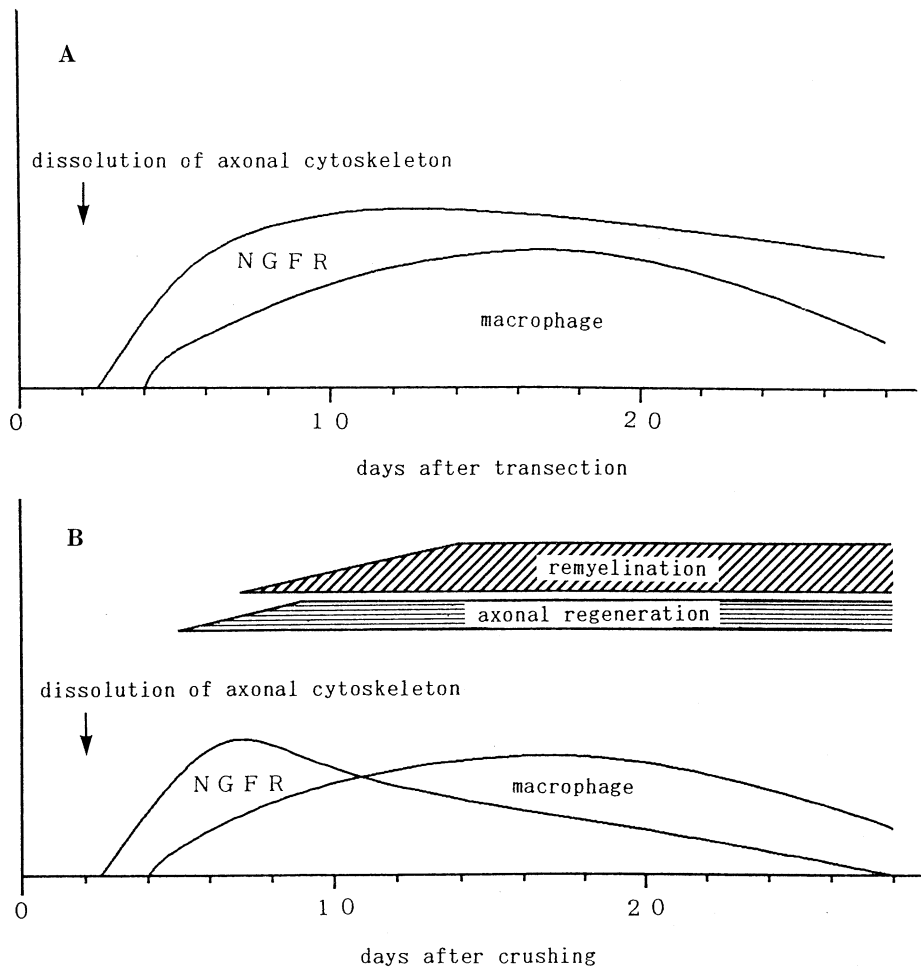


Fig. 7. The time course of the changes in expressions of low affinity NGFR and macrophages. **A.** After transection to prevent regeneration. **B.** After crushing to permit subsequent axonal regeneration. Expression of NGFR begins at absorption of degenerated axons or digestion of myelin, and is decreased at beginning of remyelination.

和性 NGFR が陽性となった。以後、層板解離した髄鞘は Schwann 細胞の胞体内で崩壊が進み、消化された。同時に低親和性 NGFR の染色性は上昇していった。Schwann 細胞で消化しきれなかった髄鞘は endoneurium に吐き出された。5 日目免疫組織学的に macrophage が同定された。28 日目崩壊した髄鞘はほとんど吸収され、神経組織は Schwann 細胞と線維芽細胞が主体となった。

圧迫控減障害における低親和性 NGFR は切断障害の場合と同様、3 日目、5 日目で染色性が

上昇し、7 日目から染色性が低下した。電顕的には 5 日目軸索の sprouting が明らかとなり、7 日目 Schwann 細胞が再生軸索を取り囲み、一部で髄鞘再生を開始した。7 日目免疫組織学的に P-NF が局所的に染色性が上昇したのは軸索の sprouting を示唆した。

Heumann ら⁹⁾ は、NGFRmRNA の定量的、経時的変化を検討している。NGFRmRNA は 3 日目増加が明らかとなって 7 日目まで増加した。軸索再生がなければそのまま高値を保ち、再生が生じるとそれに応じて低下した。今回の免疫

組織化学的検索結果は Heumann らの定量的結果と一致するものであった。

切断障害および圧迫挫滅障害 2 日目電顕的にはほとんどすべての神経線維でニューロフィラメントを含む軸索の細胞骨格は消失し、軸索内には不定形の崩壊産物だけが観察された。しかし、同日、免疫組織化学的に P-NF は軸索内に同定された。抗 P-NF 抗体 (SMI 31) はニューロフィラメントの崩壊産物も検出していた。3 日目の P-NF が染色されない軸索は崩壊したニューロフィラメントが Schwann 細胞により吸収されたためと推定された。また、切断障害 5 日目以降の endoneurium に顆粒状に染色される P-NF は macrophage に取り込まれたものを反映していると推測された。

従来、Schwann 細胞が低親和性 NGFR を発現する契機は軸索との接触を失うこととされていた^{8),10)}。Waller 変性においてニューロフィラメントは、障害 2 日目同時にほとんどの軸索で形態学的に崩壊し、3 日目から漸増していく低親和性 NGFR の発現の直接の契機になるとは考え難い。NGFR の発現には軸索が崩壊するだけでなく、Schwann 細胞による吸収消化が必要と考えられた。

切断障害および圧迫挫滅障害後 3 日目髄鞘の層板間の解離がみられ、Schwann 細胞の中で髄鞘の消化が開始された。この時期、macrophage は免疫組織化学的に検出されなかった。以後、髄鞘崩壊が進むにつれて、低親和性 NGFR の発現が増した。髄鞘の構成成分のうち、髄鞘層板が解離したとき露出または放出された成分がシグナルとなって、Schwann 細胞が低親和性 NGFR を発現する可能性も推測された。

今回の結果では、低親和性 NGFR の発現は、切断障害および圧迫挫滅障害後 3 日目、免疫組織化学的に軸索内の P-NF の染色性が低下し、電顕的に髄鞘の層板解離が認められる時期と一致した。低親和性 NGFR の発現の契機としては Schwann 細胞による軸索の吸収過程と髄鞘の崩壊過程が重要視された。

圧迫挫滅障害後、7 日目一部の Schwann 細

胞が再生軸索を取り囲み髄鞘再生を開始する時期と前後して低親和性 NGFR の染色性は低下した。再生が完成すると低親和性 GFR は消失した。

NGF は交感神経系、知覚神経系の神経細胞では、虹彩^{11),12)}、皮膚の上皮細胞¹³⁾といった標的組織で産生され、軸索内に取り込まれたあと、NGFR と結合して逆行性の軸索流に乗って細胞体に運ばれ、同神経細胞の成長、分化、維持作用を発揮する^{10),14)}。このような生物活性を介在するのは高親和性 NGFR、trk 因子であることが明らかになった¹⁵⁾。NGF ファミリーに属する NGF、BDNF、NT-3 はそれぞれ trk¹⁵⁾、trkB¹⁶⁾、trkC¹⁷⁾ といった特異的な高親和性 NGFR によって作用が発揮される。一方、低親和性 NGFR は NGF と結合しても、高親和性 NGFR ほどの生物活性を発現しない。

NGF 依存性の交感神経節細胞などでは高親和性、低親和性 NGFR の両者が存在しているが¹¹⁾、末梢神経障害の場合、Schwann 細胞は低親和性 NGFR のみを細胞膜に発現することが知られている^{8),18),19)}。Schwann 細胞が NGF を産生していることが明らかとなり²⁰⁾、Schwann 細胞の低親和性 NGFR は自らが産生した NGF を伸展してきた軸索に受け渡す役割が推定されている。今回の結果は、この受け渡しの役割を支持するものである。

従来、Schwann 細胞の役割は軸索との関係で決定され、特に Schwann 細胞が軸索との物理的接触を失うことが契機として重要視されていた。今回の結果からは、Schwann 細胞が軸索と接触を失うだけでなく、Schwann 細胞による軸索の崩壊産物の吸収または髄鞘の消化が低親和性 NGFR の発現を導く契機となることが示唆された。

以上から、Schwann 細胞は軸索障害時に古い髄鞘を消化吸収するとともに、NGF を産生し、再生軸索に NGF を受け渡す役割を果たしていると考えられ、Waller 変性および軸索再生における Schwann 細胞の積極的役割が注目された。

概要は、第33回日本神経病理学会総会(1992年5月14日、新潟)にて発表した。ご指導いただいた川崎医科大学神経病理学教室 調輝男教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Levi-Montalcini R, Hamburger V : A diffusible agent of mouse sarcoma, producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *J Exp Zool* 123 : 233—278, 1958
- 2) Walicke P, Cowan WM, Ueno N, Baird A, Guillemin R : Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 3012—3016, 1986
- 3) Kamegai M, Nijijima K, Kunishita T, Nishizawa M, Ogawa M, Araki M, Ueki A, Konishi Y, Tabira T : Interleukin 3 as a trophic factor for central cholinergic neurons in vitro and in vivo. *Neuron* 2 : 429—436, 1990
- 4) Recino-Pinto E, Rechler MM, Ishii DN : Effects of insulin, insulin-like growth factor-II, and nerve growth factor on neurite formation and survival in cultured sympathetic and sensory neurons. *J Neurosci* 6 : 1211—1219, 1986
- 5) Barde Y-A, Edgar D, Thoenen H : Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1 : 549—553, 1982
- 6) Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde Y-A : Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344 : 339—341, 1990
- 7) Apfel SC, Arezzo JC, Lipson LA, Kessler JA : Nerve growth factor prevents experimental cisplatin neuropathy. *Ann Neurol* 31 : 76—80, 1992
- 8) Taniuchi M, Clark HB, Schweitzer JB, Johnson EM Jr : Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves : ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties. *J Neurosci* 8 : 664—681, 1988
- 9) Heumann R, Lindholm D, Bandtlow C, Meyer M, Radeke MJ, Misko TP, 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 macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 4 : 8735—8739, 1984
- 10) Sobue G, Yasuda T, Mitsuma T, Ross AH, Pleasure D : Expression of nerve growth factor receptor in human peripheral neuropathies. *Ann Neurol* 24 : 64—72, 1988
- 11) Ebendal T, Olson L, Seiger A, Hedlund K-O : Nerve growth factors in the rat iris. *Nature* 286 : 25—28, 1980
- 12) Heumann R, Thoenen H : Comparison between the time course of changes in nerve growth factor protein levels and those of its messenger RNA in the cultured rat iris. *J Biol Chem* 261 : 9246—9249, 1986
- 13) Davies AM, Bandtlow C, Heumann R, Korsching S, Rohrer H, Thoenen H : Timing and site of nerve growth factor synthesis in developing skin in relation to innervation and expression of the receptor. *Nature* 326 : 353—358, 1987
- 14) Heumann R, Korsching S, Scott J, Thoenen H : Relationship between levels of nerve growth factor (NGF) and its messenger RNA in sympathetic ganglia and peripheral target tissues. *EMBO J* 3 : 3183—3189, 1984
- 15) Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV : High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350 :

678—683, 1991

- 16) Squinto SP, Sitt TN, Aldrich TH, Davis S, Bianco SM, Radziejewski C, Glass DJ, Masiakowski P, Furth ME, Valenzuela DM, DiStefano PS, Yancopoulos GD : trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell* 65 : 885—893, 1991.
- 17) Soppet D, Escandon E, Maragos J, Middlemas DS, Reid SW, Blair J, Burton LE, Stanton BR, Kaplan DR, Hunter T, Nikolics K, Parada LF : The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell* 65 : 895—903, 1991
- 18) DiStefano PS, Johnson EM Jr : Nerve growth factor receptors on cultured rat Schwann cells. *J Neurosci* 8 : 231—241, 1988
- 19) Yasuda T, Sobue G, Mokuno K, Kreider B, Pleasure D : Cultured rat Schwann cells express low affinity receptors for nerve growth factor. *Brain Res* 436 : 113—119, 1987
- 20) Bandtlow CE, Heumann R, Schwab ME, Thoenen H : Cellular localization of nerve growth factor synthesis by in situ hybridization. *EMBO J* 6 : 891—899, 1987