

令和元年6月25日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11175

研究課題名(和文) 遺伝子導入による顔面神経軸索再生の試み

研究課題名(英文) Regeneration of facial nerve axon by gene transfer.

研究代表者

岡本 昌之 (Okamoto, Masayuki)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・講師

研究者番号：90464057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：DISC1を強発現した神経細胞においては、軸索長は69.1 μm であり、コントロールの神経細胞と比べて(平均55.2 μm)有意に軸索の長さが長くなることを確認した。Endo-binding protein3(EB3)を用いて可視化した微小管重合動態においては、DISC1の強発現においても、有意な変化は認められなかったが、DISC1の発現量増加によって微小管先端における微小管安定化分子の機能亢進がおり、その結果として軸索伸長を促進したということを示唆していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顔面神経麻痺の治療において、麻痺が高度な場合は早期に適切な治療を行っても治癒に至らない症例や後遺症が残る症例が存在する。このような高度麻痺例の予後改善のためには神経障害部位においてワーラー変性を来した神経の新たな軸索伸展および再髄鞘化を促すことが重要である。軸索伸展において重要な働きをするタンパクであるDISC1を遺伝子導入によって顔面神経軸索再生治療を行えるようになれば、顔面神経麻痺の治療率向上に寄与するものとなる。

研究成果の概要(英文)：It was confirmed that the axon length of DISC1 overexpressing neuron was significantly longer as compared control neurons. In microtubule dynamics visualized using Endobinding protein-3(EB3), no significant change was observed by DISC1 overexpression. It was thought that the increase in the expression level of DISC1 resulted in the enhancement of the function of the microtubule stabilizing molecule at the tip of the microtubule, and as a result, it was suggested that axonal elongation was promoted.

研究分野：顔面神経

キーワード：顔面神経麻痺 軸索伸長 DISC1

1. 研究開始当初の背景

顔面神経高度麻痺症例においては早期に適切な治療を行っても治癒に至らない症例が存在する。麻痺の残存や、病的共同運動、拘縮などの後遺症はいったん発症すると完治は困難であり、症状が終生持続する。患者にとって顔面の後遺症は、その後の人生において、対人関係や性格にも影響を与えることが予想され、重要な問題となることが多い。顔面神経麻痺に対する治療成績の向上を目指して基礎研究、臨床研究がなされているが、これらの後遺症に悩まされている患者は今なお多く存在する。一人でも多くの顔面神経麻痺患者を治癒へと導くために、神経再生効果の高い新たな治療法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

高度顔面神経麻痺に対する治療としてこれまでに、手術により減荷した神経周囲に神経成長因子 (bFGF) 嗅上皮を留置する方法によって、一定の効果が得られたことが報告されている。これまで顔面神経麻痺に治療において、神経軸索伸長に必要な分子についての検討された報告は少ない。今回我々は軸索伸長に必要な分子を細胞レベルで検討を行い、それらの分子を発現調整することによって、障害神経のすみやかな再生を促すことを目的とした。

Disrupted in schizophrenia-1 (DISC1) は統合失調症の原因遺伝子の一つであり、Ndel1, Lis1, DBZ などの分子と複合体を形成し、中心体からの微小管制御に関わっている。この DISC1 分子を制御することによって、微小管重合 (軸索伸長) を促進させ、損傷した軸索がより早期に再生するようになれば麻痺改善率、後遺症の発症を減少させることができると考えている。

3. 研究の方法

(1) 子宮内エレクトロポレーション法によってマウス胎児の側脳室に遺伝子発現ベクターを導入し、脳室帯で生まれたニューロンが成熟、移動して大脳皮質を形成する時期における DISC1 の機能を解析する。

(2) 軸索伸長に関わる分子 (DISC1) をノックダウン、もしくは強制発現することによって神経細胞の形態の変化、軸索伸長の変化を検討する。

(3) 培養神経細胞を用いて軸索伸長にかかわる分子と EB3 を共発現させることにより、神経細胞内の微小管重合の様子を経時的に観察し、軸索伸長の速度に関して検討する。

4. 研究成果

(1)

子宮内エレクトロポレーション法によってマウス脳室帯に EGFP 結合 DISC1 発現ベクターを導入すると、大脳皮質構成ニューロンの移動がコントロールにくらべて早くなるという結果を得た。一方、DISC1 RNAi ベクターにより DISC1 をノックダウンするとその移動が大脳皮質の intermediate zone にて停止する結果となり、胎生期大脳皮質構成ニューロンの移動 (神経突起の伸長と中心体からの微小管制御による核の移動) において

DISC1 は必須の分子であることが確認された。

(2)

培養細胞 (NIH3T3) 細胞に遺伝子発現ベクターを用いて DISC1 を強発現させると、突起を長く伸ばす細胞が多くみられることが確認された。マウス神経細胞をパパイン処理によって一つ一つばらにした初代培養ニューロンにおいても同様に DISC1 を強発現させると、72 時間後の観察において、EGFP のみを強発現させたコントロールニューロンに比べて、もっと長い神経突起 (軸索) の長さが有意に長くなるという結果を得た。

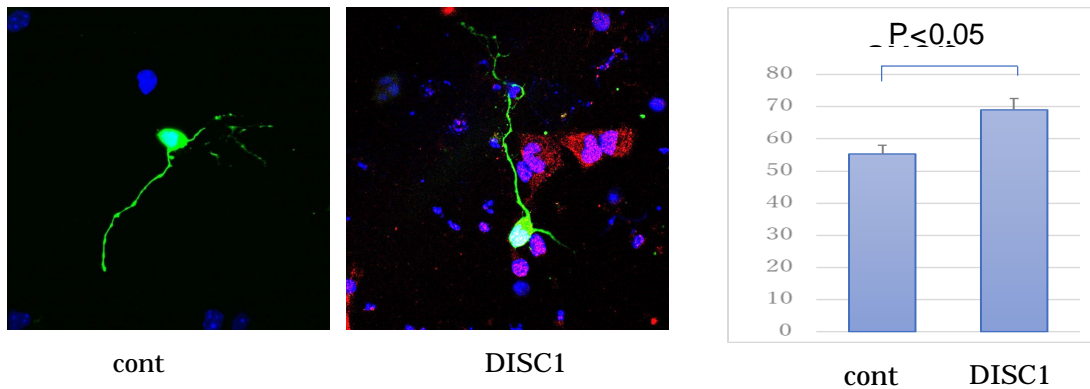


図 1 DISC1 強発現により軸索伸長が促進

(3)

神経細胞内における微小管の動きを可視化するために、微小管プラスエンドに高いアフィニティをもつ Endo-binding protein3(EB3)に EGFP を結合した発現ベクターを作成した。マウス由来の培養神経細胞に EB3-EGFP 発現ベクターと DISC1 発現ベクターを導入した。導入後 72 時間後に脳組織をパパイン処理にて細胞一つ一つに分離させて、培養神経細胞とし、微小管重合速度 (軸索伸長速度) を共焦点顕微鏡にて経時的に観察した。コントロールでの微小管重合速度は $0.088\mu\text{m}/\text{sec}$ であり、DISC1 を共発現させたものでは $0.084\mu\text{m}/\text{sec}$ であった。DISC1 の強発現によりマウス脳組織を構成する神経細胞の移動速度はこれまでの実験によって早くなることが確認されていたため、その細胞内の微小管重合速度事態が早くなっているものと考えていたが、予想に反し、有意差を認めなかった。

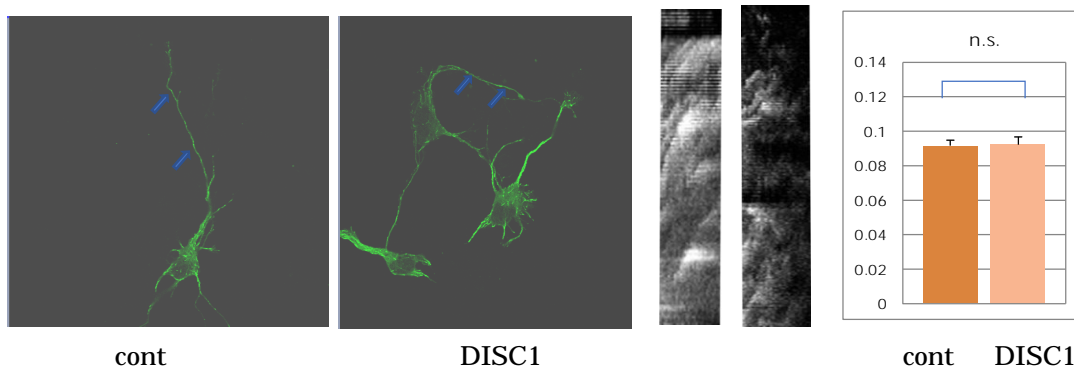


図 2 DISC1 強発現は微小管動態には有意な影響なし

微小管動態は DISC1 強発現では優位な差は認められなかったが、軸索伸長は促進された。このことは、DISC1 が過剰に発現されていると軸索伸長端において GSK3 を介した +TIPs

の機能亢進により微小管構造の安定化に傾いたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

岡本昌之 木村幸弘
軸索伸長に必要な DISC1 分子の検討
第 42 回日本顔面神経学会
2019 年 5 月 31 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：山田 武千代

ローマ字氏名：Yamada Takechiyo

所属研究機関名：秋田大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：70283182

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。