

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：13301
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：18K06501
研究課題名（和文）NAD代謝系に注目した中枢性脱髄の病態解明と治療への応用

研究課題名（英文）The role of NAD in demyelinating disease

研究代表者
服部 剛志（Hattori, Tsuyoshi）
金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：50457024
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：CD38という分子が欠損したマウスにおいては、脳内のNAD+量が増加するため神経炎症が抑制され、中枢神経の脱髄が軽減されることが明らかとなった。また、脳内のNAD+を増加させる効果を持つNRやアピゲニンという化合物を投与することにより神経炎症が軽減されることも明らかとなった。これらの結果より、脳においてNAD+を増加させる効果を持つ化合物が、多発性硬化症などの脱髄疾患のみならず、神経炎症に関連する神経変性疾患やうつ病などの治療標的となる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
脳の中の炎症（神経炎症）を起こすメカニズムにおいてグリア細胞に発現するCD38とNAD+という分子が重要であることが明らかとなった。また、NAD+を増加させる化合物を用いることにより神経炎症を制御することが可能であることが明らかとなったため、今後、これらの知見が脱髄疾患のみならず神経変性疾患等の神経炎症関連疾患における治療へとつながる可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：Deletion of CD38 attenuated Cuprizone-induced neuroinflammation and demyelination by increasing brain NAD+ level. Compounds which increase brain NAD+ level such as apigenin and NR suppressed neuroinflammation. Therefore, NAD+-boosting compounds might be possible therapeutic molecules not only for demyelinating diseases such as Multiple Sclerosis but also for other neuroinflammation-related diseases such as neurodegenerative diseases and depression.

研究分野：神経解剖学

キーワード：脱髄 神経炎症 アストロサイト ミクログリア 多発性硬化症 グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

ミエリンは神経軸索を覆い、神経伝達を高速にする役割を持つが、脱髄疾患などにより中枢神経のミエリンが破壊(脱髄)されると、運動、感覚、認知機能の障害を引き起こす。この脱髄において、グリア細胞(アストロサイト、ミクログリア)の活性化が脱髄促進因子として重要であるが、それらを標的とした治療法は開発されていない。

CD38は、脳においてNAD⁺の主要な消費酵素である。NAD⁺は酸化還元反応の補酵素であり、代謝、炎症、老化等において重要な役割を持つことが知られている。申請者は、CD38遺伝子欠損(KO)マウスを用いた脱髄疾患(クプリゾン投与)モデルを作成し、CD38の欠損によりグリア細胞の活性化が顕著に抑制され、脱髄が軽減されること可能性を見出した。よって私たちは、CD38によるNAD⁺量の制御機構が、グリア細胞活性化とそれに続く中枢性脱髄に重要であると考えに至った。

2. 研究の目的

以下の研究を行うことにより、NAD⁺の中枢性脱髄における役割と分子機構を明らかにし、治療標的としての可能性を明らかにする。

- CD38の中枢性脱髄における役割の解析
- NAD⁺による中枢性脱髄及び神経炎症への治療効果の検討
- CD38及びNAD⁺のグリア細胞活性化における役割の解析

3. 研究の方法

CD38の中枢性脱髄における役割の解析

野生型及びCD38KOマウスに対しクプリゾン(0.4%)混餌投与(5週間)を行い、脳内NAD⁺濃度の測定を行い、白質(脳梁)における脱髄、グリアの活性化をqPCRと組織免疫染色にて評価する。(脱髄マーカー:MBP,CNP, グリア活性化マーカー:GFAP,Iba1, サイトカイン [TNF α , IL6, CXCL10など])

NADによる中枢性脱髄及び神経炎症への治療効果の検討

- 1) 野生型マウスへのクプリゾン(0.4%)混餌投与(5週間)と同時にNAD⁺及びその前駆体であるNR(Nicotinamide ribonucleotide:500mg/kg)を経口投与し(5週間連日)、脳におけるNAD⁺濃度の測定、脳の白質(脳梁)における脱髄の解析、神経炎症の解析を行った。
- 2) 野生型及びCD38KOマウスにNADを増加させる効果を持つNR(400mg/kg)及びapigenin(40mg/kg)を1週間連続投与し、LPS(リポ多糖)誘導性の神経炎症モデルを作成する。同マウスの脳内NAD⁺量の測定、神経炎症の解析、グリア細胞の活性化の解析、炎症による神経障害の解析をqPCR、組織免疫染色にて行う。

CD38及びNAD⁺のグリア細胞活性化における役割の解析

- 1) 培養アストロサイト及びミクログリアに対し、siRNAを用いてCD38の発現抑制を行い、LPSによる活性化の程度をqPCRにて解析を行った。
- 2) 培養アストロサイト及びミクログリアに対し、NAD⁺及びNAD⁺を増加させる効果を持つNR、apigenin、78c(CD38の阻害剤)を添加し、LPSによる活性化への影響の解析を行った。また、これらの細胞においてNAD⁺の活性化制御シグナルへの影響の解析も行った。

4. 研究成果

CD38の中枢性脱髄における役割の解析

脳内のNAD⁺濃度は野生型及びCD38KOマウスにおいて、クプリゾン投与により有意ではないが軽度の増加が認められた。しかしながら、CD38KOマウスにおいてはクプリゾン投与に関係なく、NAD⁺濃度は顕著に高く野生型の3倍程度であった。CD38KOマウスにおけるクプリゾン誘導性脱髄は、野生型の20%程度であり、顕著に減少していた(図1)。更に、CD38KOマウスにおいてはグリア細胞の活性化、炎症性サイトカインの発現

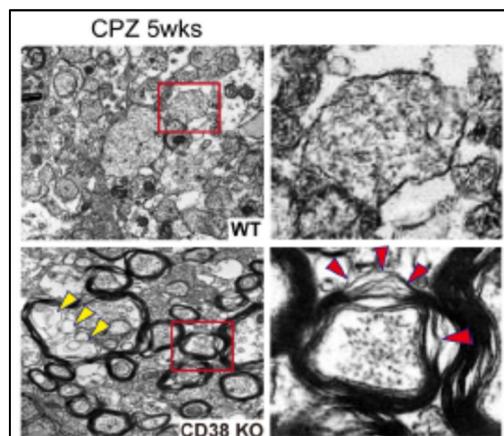


図1 野生型マウスにおいてはクプリゾン(CPZ)投与により脳梁のミエリン構造が破壊されているが(上段)、CD38KOマウスにおいてはミエリン構造が保たれている(下段矢頭)。

量が顕著に減少していたが、クプリゾンによるオリゴデンドロサイトの細胞死に関しては変化が認められなかった。これらの結果より、CD38 が欠損すると脳において NAD⁺濃度が増加し、グリア細胞の活性化及び神経炎症が抑制される、そして、クプリゾンによって誘導される脱髄が軽減されることが明らかとなった。

NAD⁺による中枢性脱髄及び神経炎症への治療効果の検討

- クプリゾン投与マウスに対し NAD⁺及び NR の投与を行ったマウスは、2~3 週間後において死亡するケースが多く見られた、投与途中における脳の解析を行ったが、脳における脱髄や神経炎症その他の異常な所見は見られなかった。一部、消化管において異常な所見を認めるマウスがいたため中枢神経ではなく、末梢の臓器において予期できない異常による臓器障害が起きた可能性が考えられる。中枢性脱髄を評価するための十分な数のマウスが得られなかったため、実験の中止を行った。

- NR 及び apigenin の 1 週間の投与により、野生型マウスにおいては脳内の NAD⁺レベルの顕著な上昇が認められたが、CD38KO マウスの NAD⁺レベルはそれらの 2 倍以上であった。

NR 及び apigenin の投与により、海馬における炎症性サイトカインの発現は顕著に減少し、グリア細胞の活性化も顕著に抑制された(図 2)。さらに、炎症により引き起こされる神経障害も NR 及び apigenin により軽減が認められた。これらの結果より、NR 及び apigenin は 1 週間の投与で脳内の NAD⁺レベルを上昇させ、LPS 誘導性の神経炎症を抑制し、それによる神経障害も軽減する効果を持つことが明らかとなった。

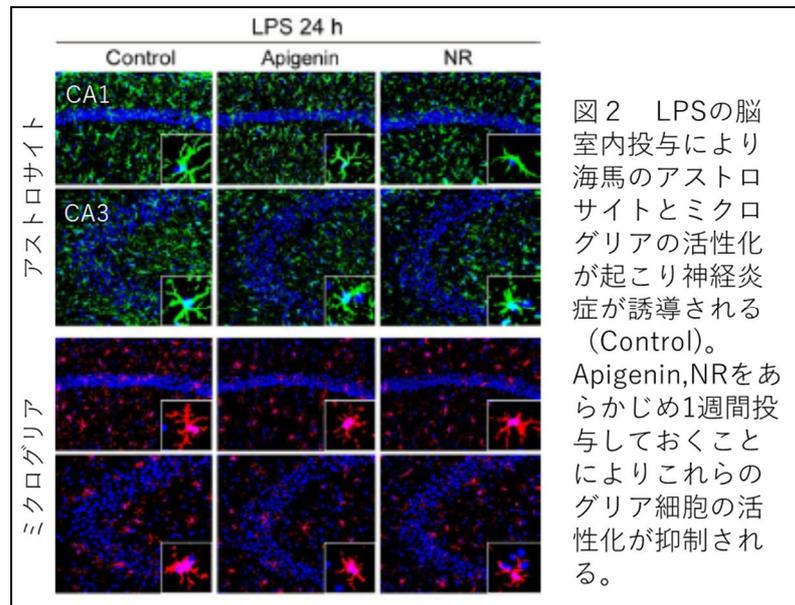


図 2 LPSの脳室内投与により海馬のアストロサイトとミクログリアの活性化が起こり神経炎症が誘導される (Control)。Apigenin, NRをあらかじめ1週間投与しておくことによりこれらのグリア細胞の活性化が抑制される。

CD38 及び NAD⁺のグリア細胞活性化における役割の解析

- CD38 の発現抑制を行った培養アストロサイト、ミクログリアともに IL6, IL1b, TNFα などの炎症性サイトカインの発現の顕著な減少が認められた。
- 培養ミクログリアにおいては 78c, apigenin, NAD⁺, NR すべての化合物において顕著な炎症性サイトカインの発現減少が認められた。特に Apigenin は Il6 と Nos2 の発現を他の化合物より強く抑制し、NAD⁺は TNFα の発現を強く抑制した。培養アストロサイトにおいてもこれらの化合物はサイトカインの発現を抑制したが、その程度はミクログリアと比較すると弱かった。更に、ミクログリアにおいては、これらの化合物は活性化シグナルである NF-κB シグナルを抑制し、一方、STAT3 シグナルに関しては影響が見られなかった。

これらの結果より、ミクログリア、アストロサイトにおいて NAD⁺は NF-κB シグナルを抑制する事により両細胞の活性化を抑制することが明らかとなった。

本研究成果の概要 (図 3)

脱髄進行時及び神経炎症時のミクログリア及びアストロサイトにて CD38 の発現は増加し、その結果 NAD⁺量が減少することにより、グリア細胞の活性化、神経炎症が促進され、脱髄が進行することが明らかとなった (Jureepon et al., Front Cell Neurosci, 2019)。

アピゲニンと NR の投与により脳における NAD⁺量が増加し、グリア細胞の活性化は抑制され、神経炎症の抑制とそれに伴う神経障害の軽減化が起きることが明らかとなった (Jureepon et al., J of Neurochem, 2021)。

NAD⁺はアストロサイト及びミクログリアの量グリア細胞において Nf-κB シグナルを抑制する事により LPS による活性化を抑制する効果を持つことが明らかとなった (Jureepon et al., J of Neurochem, 2021)。

上記の結果より、NAD⁺の量を中枢神経内において増加させることが神経炎症抑制の鍵となることが明らかとなった。神経炎症は、脱髄疾患のみならずアルツハイマー病などの神経変性疾患、老化、うつ病などの精神疾患においても病態を悪化させる因子と考えられている。今後は、これらの疾患におけるNAD⁺やCD38の治療標的としての可能性を明らかにしていく必要があると考えられる。また、NAD⁺によるグリア細胞活性化制御メカニズムについても明らかにしていきたい。

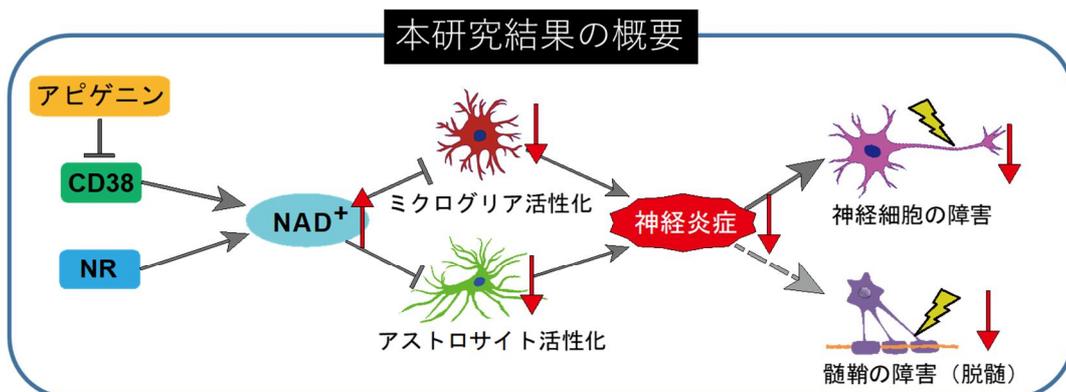


図3 CD38の阻害剤であるアピゲニンとNAD⁺の前駆体であるNRは脳内のNAD⁺を増加させる。NAD⁺はグリア細胞の活性化を抑制するため神経炎症が軽減される。神経炎症の軽減化によりその後の神経障害と髄鞘の障害も軽症化する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kogami Yuji, Tsuji Takahiro, Tsuji Chiharu, Yokoyama Shigeru, Furuhashi Kazumi, Lopatina Olga, Shabalova Anna, Salmina Alla B., Watanabe Yumi, Hattori Tsuyoshi, Nishimori Katsuhiko, Kodama Kota, Higashida Haruhiro	4. 巻 32
2. 論文標題 A monoclonal antibody raised against a synthetic oxytocin peptide stains mouse hypothalamic neurones	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 e12815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jne.12815	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shimizu Yu, Harashima Ai, Munesue Seiichi, Oishi Masahiro, Hattori Tsuyoshi, Hori Osamu, Kitao Yasuko, Yamamoto Hiroshi, Leerach Nontaphat, Nakada Mitsutoshi, Yamamoto Yasuhiko, Hayashi Yasuhiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Neuroprotective Effects of Endogenous Secretory Receptor for Advanced Glycation End-products in Brain Ischemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aging and disease	6. 最初と最後の頁 547 ~ 547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14336/AD.2019.0715	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takaso Yuji, Noda Masao, Hattori Tsuyoshi, Roboon Jureepon, Hatano Miyako, Sugimoto Hisashi, Brenner Charles, Yamamoto Yasuhiko, Okamoto Hiroshi, Higashida Haruhiro, Ito Makoto, Yoshizaki Tomokazu, Hori Osamu	4. 巻 10
2. 論文標題 Deletion of CD38 and supplementation of NAD+ attenuate axon degeneration in a mouse facial nerve axotomy model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 .
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-73984-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Roboon Jureepon, Hattori Tsuyoshi, Ishii Hiroshi, Takarada Lemata Mika, Nguyen Dinh Thi, Heer Collin D., O'Meally Denis, Brenner Charles, Yamamoto Yasuhiko, Okamoto Hiroshi, Higashida Haruhiro, Hori Osamu	4. 巻 0
2. 論文標題 Inhibition of CD38 and supplementation of nicotinamide riboside ameliorate lipopolysaccharide induced microglial and astrocytic neuroinflammation by increasing NAD +	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Noda Masao, Hatano Miyako, Hattori Tsuyoshi, Takarada-lemata Mika, Shinozaki Tomohiro, Sugimoto Hisashi, Ito Makoto, Yoshizaki Tomokazu, Hori Osamu	4. 巻 46
2. 論文標題 Microglial activation in the cochlear nucleus after early hearing loss in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 716 ~ 723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2019.02.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeichi Toshiaki, Hori Osamu, Hattori Tsuyoshi, Kiryu Kyoka, Zuka Masahiko, Kitamura Osamu	4. 巻 703
2. 論文標題 Pre-administration of low-dose methamphetamine enhances movement and neural activity after high-dose methamphetamine administration in the striatum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 119 ~ 124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2019.03.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchiya Kohsuke, Nakajima Shinsuke, Hosojima Shoko, Thi Nguyen Dinh, Hattori Tsuyoshi, Manh Le Thuong, Hori Osamu, Mahib Mamunur Rashid, Yamaguchi Yoshifumi, Miura Masayuki, Kinoshita Takeshi, Kushiyama Hiroko, Sakurai Mayumi, Shiroishi Toshihiko, Suda Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09753-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Roboon Jureepon, Hattori Tsuyoshi, Ishii Hiroshi, Takarada-Iemata Mika, Le Thuong Manh, Shiraishi Yoshitake, Ozaki Noriyuki, Yamamoto Yasuhiko, Sugawara Akira, Okamoto Hiroshi, Higashida Haruhiro, Kitao Yasuko, Hori Osamu	4. 巻 13
2. 論文標題 Deletion of CD38 Suppresses Glial Activation and Neuroinflammation in a Mouse Model of Demyelination	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2019.00258	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kogami Yuji, Tsuji Takahiro, Tsuji Chiharu, Yokoyama Shigeru, Furuhashi Kazumi, Lopatina Olga, Shabalova Anna, Salmina Alla B., Watanabe Yumi, Hattori Tsuyoshi, Nishimori Katsuhiko, Kodama Kota, Higashida Haruhiro	4. 巻 -
2. 論文標題 A monoclonal antibody raised against a synthetic oxytocin peptide stains mouse hypothalamic neurones	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jne.12815	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Higashida Haruhiro, Hashii Minako, Tanaka Yukie, Matsukawa Shigeru, Hattori Tsuyoshi, Hori Osamu, Shabalova Anna A., Gerasimenko Maria, Minami Kana, Yokoyama Shigeru, Munesue Sei-ichi, Harashima Ai, Yamamoto Yasuhiko, Salmina Alla B., Lopatina Olga	4. 巻 9
2. 論文標題 CD38, CD157, and RAGE as Molecular Determinants for Social Behavior	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 62 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9010062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Noda, M. Hatano, M. Hattori, T. Takarada-Iemata, M. Shinozaki, T. Sugimoto, H. Ito, M. Yoshizaki, T. Hori, O.	4. 巻 -
2. 論文標題 Microglial activation in the cochlear nucleus after early hearing loss in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2019.02.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeichi, T. Hori, O. Hattori, T. Kiryu, K. Zuka, M. Kitamura, O.	4. 巻 703
2. 論文標題 Pre-administration of low-dose methamphetamine enhances movement and neural activity after high-dose methamphetamine administration in the striatum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurosci Lett	6. 最初と最後の頁 119-124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2019.03.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 服部 剛志
2. 発表標題 神経及びグリア発達におけるCD38の役割
3. 学会等名 CD38研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部 剛志
2. 発表標題 アストロサイトCD38による神経発達と行動への影響
3. 学会等名 第9回自閉症研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部 剛志
2. 発表標題 アストロサイトCD38による髄鞘化と脱髄化のメカニズム
3. 学会等名 Neuro2019 第42回日本神経化学大会 第60回日本神経化学学会大会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部 剛志
2. 発表標題 脳発達と社会性行動におけるアストロサイトCD38の役割
3. 学会等名 第49回日本神経精神薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部 剛志
2. 発表標題 アストロサイトCD38による神経発達への影響
3. 学会等名 第20回 ORIGIN 神経科学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部 剛志、堀 修
2. 発表標題 アストロサイトCD38による神経発達制御機構
3. 学会等名 日本解剖学会 第78回中部支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 服部 剛志
2. 発表標題 脳発達におけるCD38の役割
3. 学会等名 Symposium on Neural Orchestration and Islet Biology (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 服部 剛志、堀 修
2. 発表標題 神経及びグリア発達におけるCD38の役割
3. 学会等名 第61回日本神経化学会大会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuyoshi Hattori, Stanislav M. Cherepanov, Shabalova Anna, Roboon Jureepon, Hiroshi Ishii, Mika Takarada-Iemata, Nguyen Thi Dinh, Hiroshi Okamoto, Yasuhiko Yamamoto, Haruhiro Higashida, Osamu Hori
2. 発表標題 The role of astrocytic CD38 for neuronal development
3. 学会等名 International Symposium on NEW FRONTIER in NEUROSCIENCE（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 服部 剛志
2. 発表標題 生後のグリア細胞発達におけるCD38の役割
3. 学会等名 第7回自閉症学研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学医薬保健研究域医学系 神経解剖学
<http://med03.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>
 金沢大学プレスリリース
<https://www.kanazawa-u.ac.jp/wp-content/uploads/2021/04/210428.pdf>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of Iowa	City of Hope National Medical Center	