

平成 30 年 9 月 12 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10319

研究課題名(和文)逆行性神経細胞変性の機構解明に基づいた神経再生因子の同定

研究課題名(英文) Factors for prevention of retrograde neuronal degeneration of facial nerve somata

研究代表者

長谷川 光広 (Hasegawa, Mitsuhiro)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：70218460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳幹内、脳槽内軸索損傷による逆行性顔面神経細胞変性ラットで、種々の因子の変性抑制効果を解析した。末梢神経移植が顔面神経細胞の脱落を約20%抑制するが、Caチャンネルブロッカーの Pregabalin ( $\alpha 2$  リガンド) 投与が同様の作用を有し、同時に活性化型マクログリアの出現を抑制することが判明した (Moriya-S et al, J Neurosurg, Sci, 2017)。免疫反応の惹起の関与が想定されたため免疫抑制剤 FK506を投与したところ同様に逆行性変性を軽減させた。現在、作用機序の詳細に関し、アポトーシス関連因子、マクロファージ、マクログリアの動向を解析中である。

研究成果の概要(英文)：Mechanism for prevention of retrograde degeneration of facial motor neuron in the facial nucleus was analyzed by our novel intra-brainstem and intracisternal rat facial nerve injury models. As peripheral nerve graft into brainstem prevented the retrograde degeneration, Pregabalin (PGB), which is a Ca blockers ( $\alpha 2$  ligand), delayed the retrograde degeneration of the facial neuron in the intracisternal facial nerve avulsion model. The total viable neuron count was significantly greater in the PGB group than in the Control group. Furthermore, CD11b/c immunostaining showed that CD11b/c-positive cells, suggestive of activated microglia, were observed only in the control group (Moriya-S et al, J Neurosurg, Sci, 2017). Intraperitoneal injection of an immunosuppressive agent FK506, also suppressed the retrograde degeneration of facial motor neuron. Accordingly, immune process might play an important role for the retrograde degeneration of facial motor neurons.

研究分野：脳神経外科

キーワード：facial nucleus retrograde degeneration rat facial nerve avulsion injury

1. 研究開始当初の背景 末梢神経における軸索損傷後の微小環境は、軸索の再生機構がただちに働き、機能回復を期待しうる。すなわち損傷部位より末梢軸索のワーラー変性に引き続き末梢性グリアであるシュワン細胞の活動が活発になり再生機構にはいる。これにはシュワン細胞遊走促進作用を有するガレクチン-1 (Fukaya K, Hasegawa M et al, J Neuropathol Exp Neurol 2003) 等の種々の因子が関与する。一方で中枢神経の損傷時には Waller 変性により直ちに傍絞輪部の中枢性グリア( 乏突起膠細胞 ) 細胞突起の変化が始まり Na channel の変化とともに( Hasegawa M et al, Brain Res 1988 )、遠位側軸索が変性する。さらに損傷部から中枢側の神経細胞体に向けて逆行性変性過程が引き起こされることで、急激に神経細胞が脱落しこの経路は神経細胞から軸索末端までが消失に向かう。この逆行性神経細胞変性の程度は、個体の成熟度や索軸の切断部位によって大きく異なる特徴がある。すなわち、幼弱ラットでは末梢軸索損傷に続く逆行性変性のために神経細胞は死に至るものの、成熟ラットでは末梢神経細胞は死を免れ軸索を再伸長する。一方、成熟ラットの中枢軸索切断に引き続き起こる神経細胞の変性程度は末梢軸索損傷に比して重篤であり、損傷後 1 ヶ月で約 7 割の神経細胞が細胞死に至る。我々は定位脳的に脳幹内の顔面神経軸索を背側から切断することにより、成熟動物で顔面神経核の逆行性変性をきたすモデルを確立し、その詳細を検討している。顔面神経細胞生存率は第 7 病日で約 30%、4 週後ではわずか 3%と、激しい顔面神経核の逆行性変性を引き起こす。これまでの我々の予備実験から、軸索切断の部位( 脳幹内、脳槽内、茎乳突孔部、末梢部 ) により、逆行性変性による顔面神経核の脱落率が大きく異なることが判明し、その比較により神経細胞周辺に存在し中性グリアのひとつであるアストログリアの諸々反応のみでなく、軸索切断部位より中枢側の末梢性グリアの存在が大きく関与すること、脳幹内末梢神経移植操作により神経細胞の変性が阻止されること( Mashitani T, Hasegawa M et al, Neurotrauma Res 2001)、筋組織の移植により部分的に変性が阻止されること( Mohammed R, Hasegawa M, et al, 2004) から、シュワン細胞から放出される神経栄養因子の関与が予想されている。さらに、造血因子であるエリスロポイエチン(EPO)が中枢神経系にも内在し、神経細胞にレセプターを有し、EPO を外的に投与することにより顔面神経核の逆行性変性を抑制しうること

(Higashi R, Hasegawa M et al, Neurotrauma Res 2004)、これには NO 抑制作用が関与している可能性がある。さらには、testosterone 等の gonadal steroid (Coers S et al)、CD3+ T リンパ球(Ha GK et al)の関与、Ca 拮抗剤の代表である nimodipine が末梢性軸索部位での顔面神経軸索損傷後の神経細胞の変性抑制効果と末梢軸索の再生促進効果の可能性が示されている( Mattson-P et al, J comp Neurol, 2001 )。加えて、疼痛治療薬として開発された pregabalin は Ca チャンネルの 2 選択性に高い親和性を示し( Kavoussi R)、CA イオンの流入を押さえるとともに、マイクログリアの活性を抑え、脊髄損傷の修復作用を持つとされている。一方、細胞死には、アポトーシス オートファジー ネクロシスの 3 つの型があるが、逆行性変性によるニューロンの細胞死では、アポトーシスの関与は取りざたされているもの( Mattson-P et al, 2006)、我々の系ではアポトーシスの関与は証明できず、これらの矛盾はこれまでの実験系では再現性に乏しく、複雑な様相を呈している可能性が推察される。また、免疫抑制剤が neural stem and progenitor cells の生存に作用すること( Sachewsky-N, et al, Dis Model Mech. 2014)、脳虚血再灌流障害に効果を示すこと( Ishii-T, et al FASEB J. 2013)等、中枢神経に対する免疫抑制剤の保護効果が報告されつつある。pregabalin の持つ免疫抑制作用がマイクログリアの活性を抑えている可能性があること、免疫抑制剤として知られる Tacrolimus (FK506) は、FK506 binding protein さらにカルシニューリンに結合し NFAT(nuclear factor of activated T cells) の脱リン酸化反応を阻害することにより、IL-2 等のサイトカインの発現を抑制し、細胞傷害性 T 細胞の分化増殖を抑制、細胞性ならびに体液性免疫の両方を抑制するとされる。神経系ではラット脊髄損傷モデル、脳虚血モデル( Zawadzka, 2012, Noto 2004)において tacrolimus が神経保護作用をもつこと、アポトーシス抑制効果としてミトコンドリアから細胞質内へのチトクローム C の移動を抑制すること、脊髄損傷モデルにおいて、GAP-43 (growth associated protein 43)の発現を促進する等( Madsen, 1998)が報告されている。既に以下の多数の因子の関与が我々の予備実験で推定されている。A) 末梢神経組織; 脳幹内への末梢神経移植により 20%の神経脱落を抑制しうる( Mashitani T, Hasegawa M et al, 2001)、B) エリスロポイエチン; 造血

因子である一方 NO 抑制作用も併せ持つエリスロポイエチン投与により、逆行性神経脱落を抑制可能であること、顔面神経核における NADPH の発現が相関する。C) ガレクチン群；ヒトレコンビナント galectin-1/ox 投与により損傷初期修復過程を促進して軸索再生に働き、macrophage と関連してシュワン細胞の遊走能を高める (Horie H, Hasegawa M, et al, J Neurosci, 1999)。D) 顔面神経核が galectin-1 を高発現し、損傷後には upregulate されることを in situ hybridization で確認している。E) 損傷後の反応性 Schwann 細胞がある種の条件下で中枢神経内に遊走しうる (Rosenbluth J, Hasegawa M, J Neurocytol, 1990)。Ca<sup>2+</sup>チャネル pregabalin と免疫抑制剤 FK506 の対マイクログリア作用に注目し、その作用機序を評価するものである。

## 2. 研究の目的

我々の確立した脳幹内定位的軸索損傷モデルならびに mild な損傷モデル (脳槽部損傷モデル) は、臨床的には第四脳室底腫瘍あるいは小脳橋角部腫瘍の患者を苦しめてきた機能回復が見こまれない顔面神経麻痺を再現したモデルに匹敵する。これまでに熟知した組織学的手法を用いて、未だ臨床的に再生困難のままである損傷顔面神経を再生させる治療法の糸口を見出すことを目標に、中枢神経の損傷からわずか 1 ヶ月のうちに起こる逆行性軸索変性ならびに神経細胞の変性の機構を、Ca<sup>2+</sup>チャネルと免疫抑制剤に注目して解明し、抑制機序と生存・再生促進因子を解明することで、中枢性顔面神経核逆行性変性の阻止のみならず損傷中枢神経を再生させる治療法の解明をめざす。

## 3. 研究の方法

### 実験モデルの作成

#### 脳幹内損傷モデル

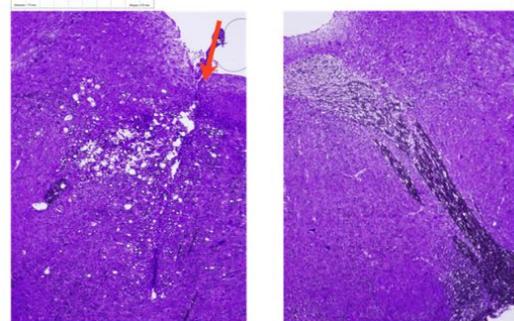
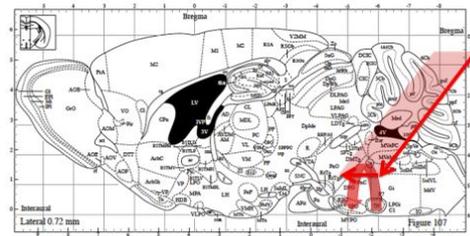
抱水クロラルによる全身麻酔下に定位脳装置に固定したラットの頭頂部正中に約4cmの皮膚切開を加え、右後頭骨に7mm×20mmの骨窓を設けた。プレグマから尾側に10mm、腹側に8mm、正中から1mm外側に存在する脳幹内の顔面神経膝部に向かい、水平から45度下方の角度に固定したマイクロメスを、横静脈洞の損傷を避け、

経小脳的に切断した。完全顔面神経軸索切断がえられたことは、麻酔覚醒後手術翌日まで損傷側の頬髭に全く動きが見られないことで確認できた。また、術後わずかでも損傷側の頬髭に動きが見られた場合には、不完全損傷として実験の対象より除外した。

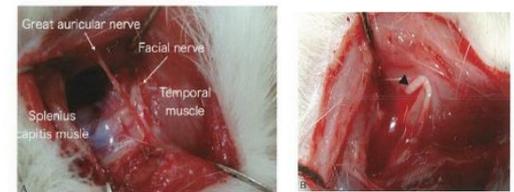
脳槽損傷モデル (抜き損傷モデル) 全麻下にラットの耳介後部に約2cmの皮膚切開

を加え、右顔面神経を露出し、周囲の結合組織から剥離した。マイクロ摂子で顔面神

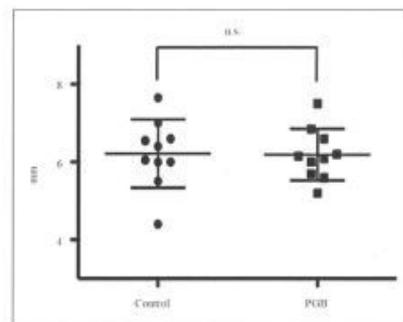
### Brain stem injury model



定位脳的脳幹内損傷モデルのHE染色

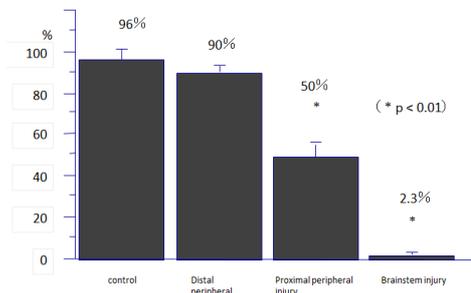


引き抜き損傷モデルの実際 (上; 引き抜き前、下; 引き抜き神経断端)



引き抜き損傷モデルにおける顔面神経の茎乳突孔から切断端までの距離

経を把持し末梢方向へ緩徐に牽引することで引き抜き損傷を作成した。引き抜かれた神経長は計測した。神経が引きぬかれると髄液が流出し、眼瞼の動きはただちに消失し、頬髭の動きが消失することが確認された。



損傷各群での生存顔面神経細胞数

引き抜き損傷モデルへの薬剤投与  
PGBを生理食塩水に溶かし、10mg/mLの濃度に調節したのち、術後15分、4、24、48時間後に1腹腔注射手技に30mg/kgの量を計4回投与とした。Controlは同量の生理食塩水を同様に腹腔投与を行った。Tacrolimusは生理食塩水に希釈し、1mg/kg/dayとし、総量150μLとした。術当日から7日間皮下投与を継続した。コントロール群には同量の生理食塩水を同様に7日間連日投与した。

#### 生存細胞数のカウント

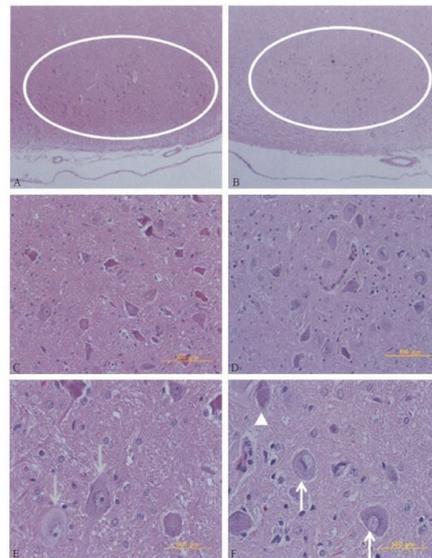
各手技の2週、4週後に灌流固定ののちに、固定包埋し、5μmの厚さに薄切し、ニッスル染色で顔面神経核における顔面神経細胞の生存率を計測した。ニッスル染色後、Hottingerら<sup>30)</sup>の方法に基づいて、グリア系細胞を除外し、核と核小体が明染される直径20μm以上の細胞を生存神経細胞としてカウントした。

#### 4. 研究成果

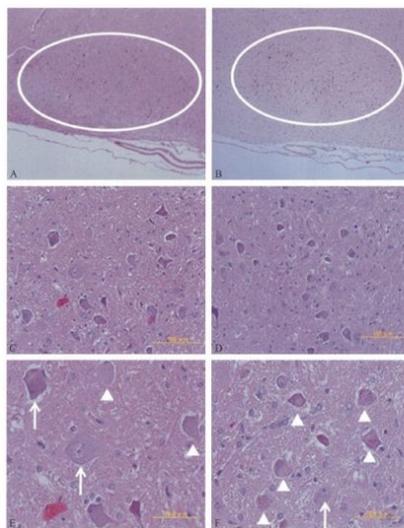
引き抜き損傷モデルでの再現性の検証  
引き抜かれた顔面神経の茎乳突孔から切断端までの距離を計測したところ、PGB投与群で $6.19 \pm 0.63$ mm、生理食塩水投与群で $6.22 \pm 0.83$ mmで引き抜き神経長に有意差はなかった。

#### 各損傷群における逆行性変性の程度の比較

術後7日目における顔面神経細胞生存率は末梢損傷群で100%、引き抜き損傷群で95%であるのに対し脳幹内損傷群では31%で、脳幹内軸索損傷により有意に低下した( $p < 0.01$ )。術後28日目では、末梢損傷群で90%であるのに対し、引き抜き損傷群で50%、脳幹内損傷群で2.3%と有意に生存率が低下した( $p < 0.01$ )。周辺のグリア細胞には明らかな変化は見られなかった。以上より、顔面神経軸索損傷後の神経細胞の生存には、神経核周辺のグリアの関与は軽微で、損傷部位よりも末梢に存在するシュワン細胞が脳幹内の損傷においても神経細胞死の抑制に大きく関与していることが示



引き抜き損傷後2週における脳幹内顔面神経核(左 pregabalin 投与群、右コントロール群)



引き抜き損傷後4週における脳幹内顔面神経核(左 pregabalin 投与群、右コントロール群)

唆された。

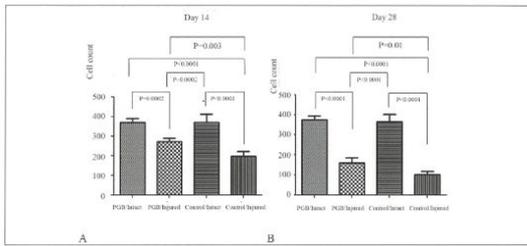
#### 各投与実験群の顔面神経細胞生存率の概要

##### PGB 投与実験

術後2週の正常側の生存顔面神経細胞数は $369.4 \pm 18.4$ に対し、患側は $271.4 \pm 14.9$ 、一方生理食塩水投与群では正常側 $369.2 \pm 38.0$ に対し、患側は $196.2 \pm 22.2$ であった。術後4週では、正常側の生存顔面神経細胞数は $375.4 \pm 17.6$ に対し、患側は $160.2 \pm 21.6$ 、一方生理食塩水投与群では正常側 $364.2 \pm 34.6$ に対し、患側は $102.62 \pm 13.4$ であった。

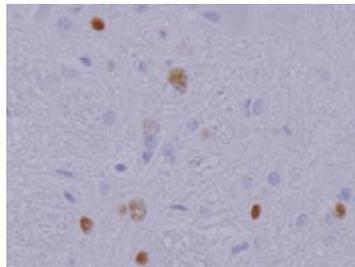
##### FK506 投与実験

投与 2 週後では健常側の生存神経細胞は  $366 \pm 33.97$  に対し 損傷側は  $298.25 \pm 50.16$ 、投与 4 週後では健常



引き抜き損傷後 2 週、4 週における pregabalin 投与・非投与での脳幹内顔面神経核の残存神経細胞数の比較

側は  $318.25 \pm 44.57$  に対し、損傷側は  $261.25 \pm 30.30$  であった。同一個体の健常側との比は 2 週、4 週ともに優位に投与群の脱落が抑えられていた。顔面神経核内で cleaved caspase 3 の反応性が見られた。



引き抜き損傷後 4 週における cleaved caspase 3 の免疫染色

#### 研究成果の考察

軸索損傷は神経細胞に多彩な変化を惹起する。その一つが順行性の軸索損傷である Wallerian degeneration と、逆行性に神経細胞体細胞体に変化する retrograde degeneration である。逆行性の顔面神経の変性は、動物種、年齢、損傷の程度、局在により様々であることが知られる。頭蓋内での軸索損傷がもっとも尾重篤であることは、動物でも臨床でも明かであり、その保護に対する薬物投与等の実験、機序の解明が必須であるが、これまで、特に小動物でのその実験手技の困難さが阻んでいた。今回の我々の実験系はこれを克服するものである。今回使用した pregabalin は神経障害性疼痛に汎用される代表的薬剤の一つで、シナプスに存在し、電位依存性 Ca チャンネルの 2 リガンドをブロックして、Ca の細胞内流入を抑制する機能が知られるが、除痛効果のほか、脊髄損傷モデルにおいての機能改善作用が報告されており、抗炎症効果 (Ha et al, 2008, 2011) 特にマイクログリアの活性抑制との関与が推察されている。本実験系でも同様の神経変性抑制効果が見られた

ことは、これまでの説を支持するものである。さらに追加実験中の免疫抑制剤である FK506 の投与でも、顔面神経細胞の逆行性変性を優位に抑制することから、変性神経細胞周囲のミクログリアの活性等に介入して抑制効果を示しているとする仮説を支持するものである。現在、アポトーシス関連因子の関与を検討している。

注：pregabalin 投与実験の要旨は Neuroprotective effects of pregabalin in a rat model of intracisternal facial nerve avulsion. Moriya S, Hasegawa M, Inamasu J, Kogame H, Hirose Y, Higashi R, Ito M, Imai F. *J Neurosurg Sci*. 2017 Oct;61(5): 495-503. doi: 10.23736/S0390-5616.16.03263-X.に報告した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計15件)

1. Adachi K, Hasegawa M, Tateyama S, Kawazoe Y, Hirose Y. Surgical strategy for and anatomical locations of petroapex and petroclival meningiomas based on evaluation of the feeding artery. *World Neurosurg*. 2018 May 16. pii: S1878-8750(18)31005-2. doi: 10.1016/j.wneu.2018.05.052. (査読有)
2. Moriya S, Hasegawa M, Inamasu J, Kogame H, Hirose Y, Higashi R, Ito M, Imai F. Neuroprotective effects of pregabalin in a rat model of intracisternal facial nerve avulsion. *J Neurosurg Sci*. 2017 Oct;61(5):495-503. doi: 10.23736/S0390-5616.16.03263-X. (査読有)
3. Nakae S, Kato T, Murayama K, Sasaki H, Abe M, Kumon M, Kumai T, Yamashiro K, Inamasu J, Hasegawa M, Kurahashi H, Hirose Y. Remote intracranial recurrence of IDH mutant gliomas is associated with TP53 mutations and an 8q gain. *Oncotarget*. 2017 Sep 15;8(49):84729-84742. doi: 10.18632/oncotarget.20951. eCollection 2017 Oct 17. PMID: 29156679 (査読有)
4. Adachi K, Hasegawa M, Hirose Y. Evaluation of Venous Drainage Patterns for Skull Base Meningioma Surgery. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2017 Oct 15;57(10):505-512. doi: 10.2176/nmc.ra.2016-0336. Epub 2017 Jun 5. PMID: 28579577 (査読有)
5. Nakae S, Murayama K, Sasaki H, Kumon M, Nishiyama Y, Ohba S, Adachi K, Nagahisa S, Hayashi T, Inamasu J, Abe M, Hasegawa M, Hirose Y. Prediction of genetic subgroups in adult supra tentorial gliomas by pre- and intraoperative parameters. *J Neurooncol*. 2017 Jan;131(2):403-412. doi: 10.1007/s11060-016-2313-8. Epub 2016 Nov 11 (査読有)

6. Hattori N, Hirose Y, Sasaki H, Nakae S, Hayashi S, Ohba S, Adachi K, Hayashi T, Nishiyama Y, Hasegawa-M, Abe M. World Health Organization grade II-III astrocytomas consist of genetically distinct tumor lineages. *Cancer Sci*. 2016 Aug;107(8):1159-64. doi: 10.1111/cas.12969. Epub 2016 Jun 22. (査読有)
7. Adachi K, Hayakawa M, Ishihara K, Ganaha T, Nagahisa S, Hasegawa-M, Hirose Y. Study of Changing Intracranial Venous Drainage Patterns in Petroclival Meningioma. *World Neurosurg*. 2016 Aug; 92:339-48. doi: 10.1016/j.wneu.2016.05.019. Epub 2016 May 14. (査読有)
8. Ganaha T, Inamasu J, Oheda M, Hasegawa-M, Hirose Y, Abe M. Subarachnoid hemorrhage caused by an undifferentiated sarcoma of the sellar region. *Surg Neurol Int*. 2016 Jul 7;7(Suppl 16):S459-62. doi: 10.4103/2152-7806.185775. eCollection 2016. (査読有)
9. Adachi K, Hayakawa M, Ishihara K, Ganaha T, Nagahisa S, Hasegawa-M, Hirose Y. Study of changing intracranial venous drainage patterns in petroclival meningioma. *World Neurosurg*. 2016 May 14. pii: S1878-8750(16)30293-5. doi: 10.1016/j.wneu.2016.05.019. (査読有)
10. Ohba S, Abe M, Hasegawa-M, Hirose Y. Intraparenchymal meningioma: clinical, radiological, and histological review. *World Neurosurg*. 2016 May 4. pii: S1878-8750(16)30227-3. doi: 10.1016/j.wneu.2016.04.098. [Epub ahead of print] Review. PMID: 27155381 (査読有)
11. Hasegawa-M, Nouri M, Nagahisa S, Yoshida K, Adachi K, Inamasu J, Hirose Y, Fujisawa H. Cerebellopontine angle epidermoid cysts: clinical presentations and surgical outcome. *Neurosurg Rev*. 2016 Apr;39(2):259-67. doi: 10.1007/s10143-015-0684-5. Epub 2015 Nov 14. PMID: 26566990 (査読有)
12. Adachi K, Hayakawa M, Sadato A, Hayashi-T, Maeda-S, Nagahisa-S, Hasegawa-M Modified Balloon Protection Technique for Preoperative Embolization of Feeder Arteries from Internal Carotid Artery Branches to Skull-Base Tumor. Technical Note *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg*. 2016 Mar;77(2):161-6. doi: 10.1055/s-0034-1543961. Epub 2015 Sep 10. (査読有)
13. Nakae S, Sasaki H, Hayashi S, Hattori N, Kumon M, Nishiyama Y, Adachi K, Nagahisa S, Hayashi T, Inamasu J, Abe M, Hasegawa M, Hirose Y. PCR-Based Simple Subgrouping Is Validated for Classification of Gliomas and Defines Negative Prognostic Copy Number Aberrations in IDH Mutant Gliomas. *PLoS One*. 2015 Nov 11;10(11):e0142750. doi: 10.1371/journal.pone.0142750. (査読有)
14. Hasegawa-M, Nouri M, Fujisawa H, Hayashi Y, Inamasu J, Hirose Y, Yamashita J. Efficacy of

monitoring patient's position during neurosurgical procedures: introduction of real-time display and record. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2015;55(4):305-10. doi: 10.2176/nmc.oa.2014-0256. Epub 2015 Mar 23. PMID: 25797776 (査読有)

15. Hasegawa M, Nouri M, Nagahisa S, Hayashi T, Adachi K, Hirose Y, Abe M. Neuroepithelial cyst of the fourth ventricle. *Childs Nerv Syst*. 2015 Jan;31(1):155-9. doi:10.1007/s00381-014-2478-4. Epub 2014 Jul 4. PMID: 24993126 (査読有)

〔学会発表〕(計0件)

〔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：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 藤田保健衛生大学 脳神経外科 教授 長谷川光広

(Hasegawa, Mitsuhiro)

研究者番号：70218460

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：