

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18274

研究課題名（和文）グリア細胞に焦点を当てたマウス顔面神経切断モデルの検討

研究課題名（英文）Examination of Mouse Facial Nerve Transection Model Focusing on Glial Cells

研究代表者

高相 裕司（TAKASO, YUJI）

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：00866444

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000円

研究成果の概要（和文）：神経傷害に対するNicotinamide adenine dinucleotide（NAD<sup>+</sup>）の作用につきNAD<sup>+</sup>濃度の高いCD38ノックアウトマウス並びにNAD<sup>+</sup>前駆体を投与し濃度を高めたモデルを用いて検討を行なった。神経切断後の顔面神経核では神経保護効果は認めなかったが、末梢神経の変性が遅延した。このことから、NAD<sup>+</sup>濃度が高いことは神経傷害から神経を保護する作用があり、NAD<sup>+</sup>前駆体を投与することでもその効果が得られることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以前からNicotinamide adenine dinucleotide（NAD<sup>+</sup>）の神経変性に対する保護効果は指摘されていたが、今回は末梢神経においても同様の効果を認めることがわかり、また投薬での人為的なNAD<sup>+</sup>濃度の上昇でもその効果が得られることがわかった。これにより神経傷害後にNAD<sup>+</sup>濃度を高めるような治療が神経変性を抑制する可能性が示唆され、神経傷害後の新たな治療法の開発につながる事が考えられる。

研究成果の概要（英文）：The effect of Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) on nerve injury was investigated using a CD38 knockout mouse with a high NAD<sup>+</sup> concentration and a model in which the concentration was increased by administering a NAD<sup>+</sup> precursor. No neuroprotective effect was observed in the facial nerve nucleus after nerve transection, but degeneration of peripheral nerves was delayed. From this, it was found that a high concentration of NAD<sup>+</sup> has an effect of protecting nerves from nerve injury, and that the effect can be obtained by administering a NAD<sup>+</sup> precursor.

研究分野：顔面神経

キーワード：顔面神経 CD38 NAD<sup>+</sup> 神経変性

## 1. 研究開始当初の背景

顔面神経軸索切断は外傷や手術によって起こる末梢運動ニューロンの損傷であり、神経再建などが行われるが、その治癒率は低く、患者の審美的、心理的影響が大きい。顔面神経軸索切断後、顔面神経核では神経細胞死が、末梢神経ではワラー変性が起こるが、その際に活性化されるアストロサイトやミクログリア、マクロファージといった炎症細胞が様々な炎症性分子を放出し、神経障害に影響を与えているとされている。

CD38 は nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) を cyclic adenosine diphosphate-ribose (cADPR) に変換する膜関連酵素である。CD38 の欠損で NAD<sup>+</sup> は保護され、神経変性や神経炎症が抑制されることが報告されている。実際 CD38 欠損マウスでは神経炎症や脱髄が抑制されたとの報告がある。また、ワラー変性遅延マウスでは NAD<sup>+</sup> 合成酵素の活性が上昇していたり、NAD<sup>+</sup> の前駆体である nicotinamide ribose (NR) を投与したマウスでは難聴や脊髄神経変性が抑制されたとの報告があるなど、CD38 欠損と NAD<sup>+</sup> の神経変性抑制効果が注目されている。しかし今なお CD38 欠損と NAD<sup>+</sup> の神経変性抑制効果については明らかになっていない部分が多い。

## 2. 研究の目的

この研究では CD38 の欠損と NAD<sup>+</sup> の補充が顔面神経核における神経細胞死やグリア細胞活性化、顔面神経末梢側における神経変性、脱髄、炎症細胞集積に与える影響につき解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) モデル、標本作成

野生型及び CD38 欠損マウスは ICR マウスを用いた。NR 投与マウスは野生型マウスに NR を顔面神経切断前 1 週間より連日腹腔内投与することで作成した。麻酔にて十分に除痛したのち、左耳後部を切開し顔面神経を本幹で切断して顔面神経切断モデルを作成した。灌流固定を行ったのちにマウスの脳、顔面神経を取り出し、凍結切片を作成して染色を行うことで標本作成した。

### (2) 染色方法と評価項目

顔面神経核では神経細胞はニッスル染色で、グリア細胞は免疫組織化学にて、抗 ionized calcium-binding adapter molecule 1 (iBa-1) 抗体でミクログリア、抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) でアストロサイトの評価を行った。一方、顔面神経断端遠位部では神経変性については免疫組織化学にて抗 3-tubulin 抗体で軸索、抗 myelin basic protein (MBP) 抗体で髄鞘を評価し、炎症細胞については、抗 iba-1 抗体でマクロファージ、抗 Gr-1 抗体で好中球の評価を行った。さらに顔面神経核、顔面神経における NAD<sup>+</sup> 濃度の測定を行った。

### (3) 比較検討を行う項目

野生型マウスにおいて顔面神経切断後の顔面神経核ならびに顔面神経断端遠位部の変化  
CD38 欠損マウス、NR 投与マウスの顔面神経切断後の変化ならびに野生型マウスとの比較  
CD38 欠損マウス、NR 投与マウスの NAD<sup>+</sup> 濃度と野生型マウスとの比較

## 4. 研究成果

### (1) 野生型マウスにおける顔面神経切断後の変化

神経細胞数は顔面神経切断後より減少傾向を認めた。顔面神経断端遠位部では顔面神経切断後に軸索、髄鞘のいずれも変性し始め、7 日目で変性はほぼ完成していた。

### (2) CD38 欠損マウスにおける顔面神経切断後の変化

#### 顔面神経核での変化

神経細胞数は CD38 欠損マウスは切断後より神経細胞数の減少を認めたが野生型マウスと同程度であった。グリア細胞については顔面神経切断後ミクログリア数の増加を認め、CD38 欠損マウスでは野生型マウスと比較し有意に少なかった。アストロサイトも顔面神経切断後に数の増加を認めたが、CD38 欠損マウスと野生型マウスではその程度は同程度であった

#### 顔面神経断端遠位部での変化

軸索、髄鞘について CD38 欠損マウスでは顔面神経切断後 3 日目、7 日目でその変性の遅延を認め、有意な神経変性の遅延を認めた。炎症細胞について、マクロファージは顔面神経切断後数の増加を認めたが CD38 欠損マウスでは、野生型マウスと比較し有意に少なかった。好中球は顔面神経切断後より 1 日目で数の増加を認め、その後減少したが、CD38 欠損マウスと野生型マウスではその程度は同様であった。

### (3) NR 投与マウスにおける顔面神経切断後の変化

#### 顔面神経核での変化

神経細胞数は NR 投与マウスにおいても切断後より神経細胞数の減少を認め、NR 非投与マウ

スと同程度であった。グリア細胞については、ミクログリア、アストロサイトいずれも顔面神経切断後、NR 投与マウスは非投与マウスと同様の変化を認めたが、NR 投与マウスと非投与マウスではその程度は同程度であった。

#### 顔面神経断端遠位部での変化

軸索、髄鞘について NR 投与マウスでは切断後 3 日目、7 日目でその変性の遅延を認め神経変性の有意な遅延を認めた。炎症細胞について、マクロファージ、好中球いずれも顔面神経切断後、NR 投与マウスは非投与マウスと同様の変化を認め、その程度は同程度であった

#### (4) 顔面神経核及び顔面神経断端遠位部における局所 NAD<sup>+</sup>濃度の変化

顔面神経核、顔面神経断端遠位部ともに CD38 欠損マウスの NAD<sup>+</sup>濃度は野生型と比較し高値であった。また、NR 投与により NAD<sup>+</sup>濃度は顔面神経核、顔面神経断端遠位部ともに有意な上昇が得られた。

今回得られた結果からは、CD38 欠損マウス、NR 投与マウスでは顔面神経切断後の顔面神経核と神経断端遠位部にて NAD<sup>+</sup>濃度の上昇が見られ、いずれのモデルにおいても顔面神経切断後の神経変性抑制が見られたため、NAD<sup>+</sup>が神経変性抑制因子となることが示唆された。このことから、CD38 阻害剤や NR 投与を併用することで顔面神経切断後の新たな治療法の開発につながると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 高相 裕司	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 Report	6. 最初と最後の頁 17795
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高相 裕司
2. 発表標題 マウス顔面神経切断モデルにおける末梢神経変性に対するCD38の役割
3. 学会等名 第43回日本顔面神経学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高相 裕司
2. 発表標題 顔面神経切断モデルによるグリア細胞の 変化と顔面神経の変性への影響の検討
3. 学会等名 第121回日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高相 裕司
2. 発表標題 マウス顔面神経切断モデルにおける神経変性に対するCD38の検討
3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------