

機関番号 : 24303

研究種目 : 若手研究 B

研究期間 : 2007 ~ 2010

課題番号 : 19791314

研究課題名 (和文) 顔面神経再生におけるプロテオリシス

研究課題名 (英文) Proteolysis in Facial Nerve Regeneration

研究代表者

沼尻 敏明 (NUMAJIRI TOSHIAKI)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号 : 20326234

研究成果の概要 (和文) :

Motopsin と運動神経機能との関連を調べるために、マウスの耳下腺前縁での顔面神経軸索損傷後における、顔面神経核での motopsin mRNA の発現を検索した。神経機能は3ヶ月間ヒゲの動きを見ることで評価した。ヒゲの動きは、損傷側で術後14日まで消失し、21から35日で徐々に回復を認めた。motopsin の発現は術後14日まで減少したが、21日までに著明に回復した。対照的に growth-associated protein-43 (GAP-43)は術後3日で発現が誘導された。これらの結果から、motopsin の発現は顔面神経運動機能の回復と関連していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) :

Motopsin is a trypsin-like serine protease which is strongly expressed in nucleus of motoneuron such as facial nucleus. Motopsin has a unique multi-domain serine protease, which has protease domain, kringle domain, and three scavenger receptor cysteine rich domain. We report the expression of motopsin mRNA level in facial nucleus after axotomy and during facial nerve regeneration. After transection axotomy of facial nerve, the transected nerves were caused with microsurgical immediate anastomosis to regenerate innervation. Motopsin and GAP-43 (growth associated protein-43) mRNA expression in facial nucleus were analysed by in situ hybridization, and it revealed that expression of motopsin mRNA was down-regulated at 14th day after axotomy, and that expression recovered with functional recovery of facial nerve. On the contrary, GAP-43 mRNA expression, as a regenerative marker, showed temporal induction until 3 weeks after axotomy, and then reduced with functional recovery. This suggests motopsin may have fundamental role in its motor function, and be possibly indispensable protease.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,500,000	450,000	3,950,000

研究分野：形成外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：顔面神経麻痺、Motopsin, Facial nerve injury, axotomy, GAP-43.

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、以前より中枢神経系におけるセリンプロテアーゼを同定し、モザイク型セリンプロテアーゼをコードする cDNA を分離してきたが、このプロテアーゼはクリングルドメイン、3つのスカベンジャーレセプターシステインリッチドメイン、そしてセリンプロテアーゼドメインから構成される。これはすべての運動神経核、大脳皮質、海馬、扁桃などで発現しているが、知覚神経では発現しない。このプロテアーゼは motopsin と命名され、Human Gene Nomenclature Committee により PRSS12 として指定された。motopsin は以前に Gschwend らが報告したプロテアーゼと同一である。

マウスの初期成長段階では motopsin mRNA は神経系の様々なところ、シュワン細胞前駆体、嗅上皮、三叉神経節、中脳、底板などで発現している。motopsin は神経の発生段階や可塑性において重要な役割を果たしている可能性があるが、中枢神経系での

motopsin の発現と神経機能との関連については全く知見がない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、顔面神経核で強く発現するセリンプロテアーゼ群の、顔面神経障害および再生における機能を明らかにすることである。具体的には、Transection axotomy による軸索損傷モデル、運動神経の移植モデル等における motopsin と neurosin、GAP-43 などの発現動態を in situ hybridization、免疫組織化学により明らかにする。また、運動神経の移植した場合の予後とプロテアーゼの発現動態との関連を検討し、当該プロテアーゼの臨床的意義を明らかにすることを計画した。

### 3. 研究の方法

成熟運動神経における motopsin の生理的機能を調べるため、motopsin の発現形態を顔面神経の軸索損傷モデルを用いて検討し

た。

20 匹のメスの ICR マウスを使用した。動物は 22 度の一定温度で飼育し、12 時間ごとにライトの点灯を行い食事と水を必要分与えられた。すべての実験は京都府立医科大学動物実験指針の規定の下に行われた。動物はペントバルビタールの腹腔内投与によって麻酔した。右顔面神経を耳下腺の前縁で切断し、直ちに 10-0 ナイロン糸を用いて顕微鏡下に神経縫合を行い修復した。傷害の程度と神経機能の回復については、ヒゲの運動機能スコアで評価した（スコア 0；全くヒゲの動きがないもの、スコア 1；少し動くもの、スコア 2；良く動くもの、スコア 3；左右差なく動くもの、としてスコア化した）。motopsin の発現を毎週、術後 84 日まで *in situ hybridization* により分析した。アンチセンス及びセンス RNA プローブを motopsin をエンコードする cDNA を使用して作成した。motopsin mRNA 発現の半定量的な分析は、発現比をすべての細胞数から割ることで計算した。傷害側の発現比は、motopsin mRNA を発現する細胞数を、健側の発現する細胞数で除したものとした。統計学的分析はノンパラメトリック Mann-Whitney U テストを用いた。なお実験では motopsin と同時に GAP-43 (Growth Associated Protein 43) の顔面神経核での発現も観察した。GAP-43 は特徴として、神経細胞の成長円錐に局在する蛋白質であり、発生期に高い発現を示すこと、また末梢神経の再生時にも高発現することが知られており、神経細胞の傷害、再生のマーカ―として利用されている。したがって今

回は再生のマーカ―として利用した。

#### 4. 研究成果

ヒゲの動きは術後 14 日後まで全く観察されなかった。ヒゲの動きは 21 から 35 日までに著明に回復した。その後 70 日で健側とほぼ同レベルにまで回復し、顔面神経の再神経支配を確認した。

GAP-43 mRNA は、傷害側の顔面神経核で術後 3 日目に誘導され、強い発現を 14 日まで続けた。GAP-43 mRNA の発現は 14 日以降徐々に減弱したが 21 日でもまだ明らかに増強していた。35 日から 84 日まで発現に左右差がなくなりほぼ同等となった。この GAP-43 の発現形態は以前の報告に一致しており、軸索損傷及び神経再生が確実に行われていることを確認した。

反対に軸索損傷側の顔面神経核での motopsin mRNA の発現は、7 日では健側と比して同等であった。しかし 14 日目では健側と比較して著明に motopsin mRNA 発現は減弱していた。14 日目での motopsin mRNA の患側での発現は、統計学的にも健側に比して減弱していた ( $p < 0.05$ )。21 日から 35 日までの間に徐々に、患側顔面神経核での motopsin mRNA 発現レベルは健側の発現と同等までに回復した。

この初期の motopsin mRNA 発現の回復以降は、左右で明らかな発現の差は見られなかった。患側での motopsin mRNA の発現は、末梢標的への再神経支配化と初期の回復期の間の一過性に低下し、視認されたヒゲの動きの回復に一致して誘導され、これらから神

経機能の回復は motopsin mRNA の再発現を伴っていることが示された。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

沼尻 敏明 (NUMAJIRI TOSHIAKI)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号： 20326234