

令和 4 年 10 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18922

研究課題名（和文）HIF-PH阻害剤を用いた顔面神経麻痺治療～神経再生促進と表情筋萎縮防止の二刀流

研究課題名（英文）Facial nerve regeneration using Dimallyl Glycine in a rat model

研究代表者

三浦 隆洋（MIURA, Takahiro）

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：90829433

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：HIFは酸素供給量を増加させる作用のみならず、様々な役割を担うとされている。本研究ではこのHIFの分解を阻害するHIF-PH阻害剤に着目した。HIF-PH阻害剤であるDMOG（Dimallyl Glycine）を用いて軸索再生効果ならびに表情筋の萎縮予防効果の検討を行った。ラットモデルを用いた臨床に基づく髭の動きの評価ではコントロール群に比べて顔面神経麻痺の改善が認められた。また有意差は確認できなかったが、DMOG投与群において表情筋の萎縮が低い傾向が認められた。また軸索再生においてもDMOG投与群の方が効果がある傾向が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、再生医療や人工神経（軸索再生誘導チューブ）をはじめとする自家神経移植に代わる様々な神経が研究開発されてきている。しかし一方で、これらの技術はあくまでも自家組織移植を置換することを目標とし研究されているものの、現状は自家神経移植を超越するものではない。顔面神経麻痺に対する神経移植において成績改善を得るためには、再生医療を含めた移植神経そのものの開発だけでなく、移植後の様々な変化を捉え神経再生を促す⁺の要素を見いだすことが不可欠である。そのような背景の中でHIF-PH阻害剤は人工神経などに付加することで成績改善をもたらす有効な一つの選択肢となりうる。

研究成果の概要（英文）：HIF is said to play various roles as well as increasing oxygen supply. In this study, we focused on HIF-PH inhibitors that inhibit the degradation of HIF. Using DMOG (Dimallyl Glycine), which is a HIF-PH inhibitor, we investigated the axon regeneration effect and the effect of preventing facial muscle atrophy. A clinical based evaluation of whisker movement showed improvement in facial nerve paralysis compared to the control group. Although no significant difference could be confirmed, the atrophy of facial muscles tended to be lower in the DMOG-administered group. In addition, the DMOG-administered group tended to be more effective in axonal regeneration.

研究分野：形成外科

キーワード：顔面神経麻痺 軸索再生 低酸素応答 末梢神経

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

今までに顔面神経損傷における HIF-1 の治療効果を検証した報告は無い。末梢神経麻痺モデルを用いた HIF-1 の基礎研究として、HIF-1 ノックアウトマウスを用いた坐骨神経麻痺に対する研究があり、HIF-1 の下流に位置する VEGFA を介した経路だけでなく別の経路からも軸索再生が誘導される可能性が示唆された¹。しかし、末梢神経損傷における HIF-1 の治療効果を調べた研究はこの一編のみである。

また、HIF-1 ノックアウトマウスでは、筋芽細胞の増殖や筋繊維の再生が遅延する事が報告された²。神経移植モデルにおいて軸索再生には時間を要するため、その間に筋の廃用性委縮・線維化が進んでしまう。HIF-1 の発現増加に伴って nerve のみならず muscle の再生・保護によりさらなる顔面神経麻痺治療効果の改善が期待できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

HIF は酸素供給量を増加させる作用のみならず、様々な役割を担うとされている。本研究ではこの HIF の分解を阻害する HIF-PH 阻害剤に着目した。われわれは、顔面神経麻痺に対する神経移植モデルにおいて軸索再生促進および表情筋における筋再生・保護の観点から HIF-1 による効果を解明する事を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) DMOG の軸索再生促進効果の検討

顔面神経の branch の処理

Wistar ラット 10 週齢(各群 n=10)に対して行った。セボフルランによる吸入麻酔下に以下の手順で実施した。当初予定していた顔面神経本幹における 1cm の欠損を作り神経移植を行うモデルは不可能だった。そのため、他研究でも報告があるモデルに習い、顔面神経本幹を用いず、その枝である Buccal branch を用いたモデルへの変更を行った。

なおラットの髭の動きは Buccal branch 及び Marginal branch による二重支配を受けており、髭の動きの評価において、両者の神経の切断または損傷が必要になる。本研究では Marginal branch は全て7ミリの長さで切除し結紮、Buccal branch を用いて DMOG 投与による軸索再生効果の検討を行う事とした。吸入麻酔下に耳介前部から下顎縁に皮膚切開を行い、顔面神経の Buccal branch 及び Marginal branch を露出させた。

Cut&Suture モデルの作成

DMOG の軸索再生能を評価する上で、神経移植では2箇所神経縫合が必要となるため、より操作による影響が大きくなると考えられた。したがって本研究の目的における DMOG の効果の検討において神経縫合の数を減らすことで手技による結果への影響を減少させることを考えた。それに伴い神経移植ではなく神経の1箇所を切断して再度縫合する Cut&Suture モデルを使用した。従って顔面神経の Marginal branch を7ミリのマージンを取って切除し、さらに Buccal branch の1箇所を切断して同部位を再縫合し、その部位へ DMOG の投与の有無による軸索再生促進効果の評価を行なった。

DMOG の軸索再生促進効果及び濃度による促進効果の評価

コントロール群として生理食塩水を投与した群を作成し評価を行なった。また DMOG は局所投与とし、MedGel®を用いて徐放投与とした。MedGel®は、京都大学再生医科学研究所田畑泰彦教授の研究成果を基に開発されたゼラチンベースの生理活性物質の徐放用ハイドロゲルである。MedGel®はゼラチンに架橋をかけて 水不溶化させたもので、静電的相互作用力などを中心とする分子間相互作用により生理活性物質を保持し、約 2 週間かけて 徐々に徐放する仕組みとなっている。これにより物質を選択的かつ持続的に作用させる事ができる。

また DMOG は、1,2,5,10mg/ml の 4 つの濃度で投与を行い、濃度による軸索再生効果の差についても同時に検討を行なった。

(2) 評価法

髭の動きの評価

ハイスピードカメラを用いて髭の動きを録画し、動画解析ソフトを用いて健側に対する患側(麻痺側)の角速度の変化の割合を掲示的に評価することで改善の程度を評価した。

Facial Palsy Score(%)= 患側のひげの動き / 健側のひげの動き × 100(%)

再生軸索数の評価

神経縫合部から2ミリ遠位側で、以下の染色を行い軸索再生の程度の評価を行なった。

筋萎縮の評価

表情筋の萎縮程度は、マツソトリクローム染色や免疫染色を用いた評価を実施する。DMOG 投与における周囲環境の改善並びに筋萎縮の予防効果を期待しており、マツソトリクローム染色並びに CD31、SMA による免疫染色を行い比較検討した。

4. 研究成果

1、結果と考察

(1) 髭の動きの評価

DMOG 投与群 (1mg/ml, 2mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml) 及び生理食塩水投与群の5群における実際のラットの髭の動きを用いた Facial Palsy Score の比較検討を行った。特に DMOG は 5mg/ml の濃度で良好な結果を示した。

術後4週以降、コントロール群である生理食塩水投与群と比較して、DMOG5mg/ml 投与群で優位に顔面神経麻痺の改善を認めた(fig.1)。

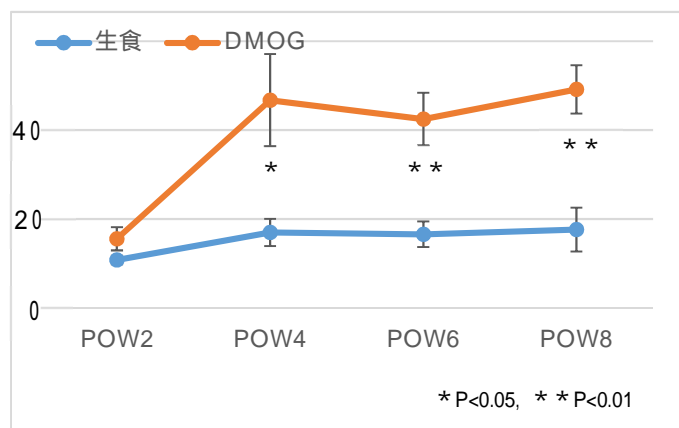


Fig.1 DMOG(5mg/ml)投与群とコントロール群での Facial Palsy Score の比較

(2) 神経の病理学的評価

再生軸索数については、トルイジンブルー染色による評価を行った。トルイジンブルー染色においては、

DMOG5mg/ml 投与群において軸索再生が促進されている傾向にあったが、今回施行した個体からは明らかな優位差を認める事はできなかった。Cut &

Suture による損傷が小さいことから優位な差が出なかった可能性や、神経縫合手技による影響による結果のばらつきが影響した可能性が考えられた。

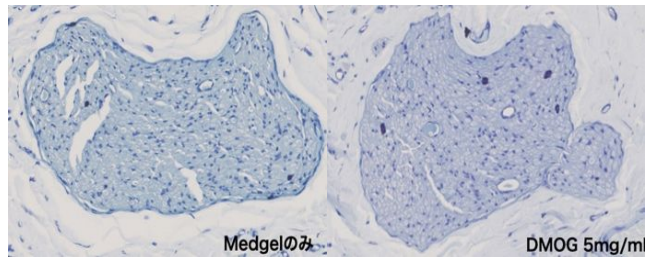


Fig.2 軸索再生促進効果の評価(トルイジンブルー染色)

(3) 筋萎縮の評価

筋萎縮の評価を行うべく、ラットの表情筋を採取し、マッソントリクローム染色および周囲環境の改善として新生血管の増加が期待されると予想されたため、CD 31、SMA による評価を行った。麻痺の回復の程度に伴う筋萎縮

程度差が生じることが予想されたが、DMOG 投与群と非投与群に明らかな差を認めることはできなかった。

軸索評価同様に Cut &

Suture によるモデルのため回復が早いこと、神経損傷

部から筋組織までの距離が近いなどの問題から優位差を認めることができなかった可能性が考えられた。

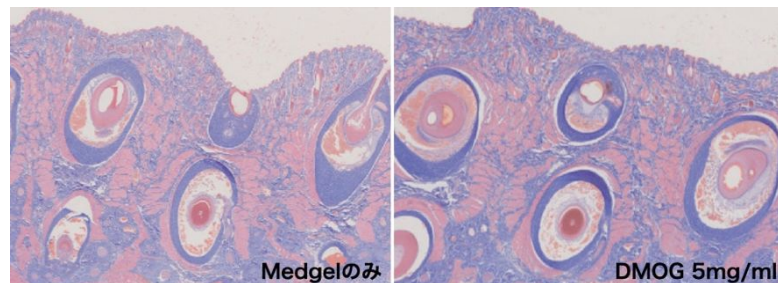


Fig.3 筋萎縮予防効果の検討(マッソントリクローム染色)

< 引用文献 >

Cho Y, Shin JE, Ewan EE, Oh YM, Pita-Thomas W, Cavalli V. Activating Injury-Responsive Genes with Hypoxia Enhances Axon Regeneration through Neuronal HIF-1. *Neuron*. 2015;88(4):720-734.

Scheerer N, Dehne N, Stockmann C, et al. Myeloid hypoxia-inducible factor-1 is essential for skeletal muscle regeneration in mice. *J Immunol*. 2013;191(1):407-414.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三浦隆洋
2. 発表標題 顔面神経麻痺のラットモデルによる新たな評価法確立とハイブリッド神経の開発に向けて
3. 学会等名 第40回北大形成外科アカデミー
4. 発表年 2020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
---------	---------