

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18931

研究課題名(和文) ラットにおける神経移植術後の筋組成の変化の確認及びその臨床応用への試み

研究課題名(英文) Changes of muscle fiber composition after selective nerve innervation in rats

研究代表者

渡部 紫秀 (WATANABE, Shiho)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：30793252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋はtype1線維(遅筋)とtype2線維(速筋)から構成されている。我々は陳旧性顔面神経麻痺の患者に対する表情筋再建の経験から、筋体の性質は支配神経の特性によるのではないかと推察した。本研究では、SDラットを用いて咬筋神経-舌下神経縫合モデル、咬筋神経切断モデルを作成した。コントロール群を含めて3群で、術後2か月時点での咬筋の組織学的評価と遺伝子発現解析を行った。その結果、組織学的評価では縫合群においてtype2線維からtype1線維への形質転換を認めた。また遺伝子発現解析では縫合群においてミトコンドリアの生合成を促進するPerm1の発現亢進が確認され、仮説は支持された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

陳旧性顔面神経麻痺は表情筋麻痺により、患者の人生の質を著しくおとしめるものである。遊離筋移植術は移植した筋体そのものを収縮させる革新的な治療法であるが、本来の神経支配を失った移植筋体が術後にどのように運動機能を再獲得するかはわかっていない。申請者はその機序として移植筋が再支配される運動神経の特性によって影響を受け、筋体の形質転換が生じているのではないかと考えた。今回、舌下神経により神経再支配を受けた咬筋筋線維の特性が神経支配に従って変化したと解釈できた。本結果は、今後顔面神経麻痺の外科治療を行なっていく上で、より適した神経力源の選択に寄与することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscles include type 1 (slow-twitch muscle) and type 2 (fast-twitch muscle) fibres. Based on our experience in the domain of mimetic muscle reconstruction in patients with facial nerve paralysis, we speculated that the nature of a muscle may be determined by characteristics of the innervating nerve.

In this study, we developed a masseteric-hypoglossal nerve suture model and a masseteric nerve transection model using Sprague Dawley rats. We performed histological evaluation and gene expression analysis of the masseteric muscle, 2 months postoperatively in three groups of rats, including in a control group. Histological evaluation showed that type 2 fibres were transformed into type 1 fibres in the suture group. Additionally, gene expression analysis revealed increased expression of Perm1, which enhances mitochondrial content and function, in the suture group, which supports our hypothesis.

研究分野：形成再建外科

キーワード：顔面神経麻痺 神経再支配

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

陳旧性顔面神経麻痺は表情筋麻痺により、患者の人生の質を著しくおとしめるものである。遊離筋移植術は移植した筋体そのものを収縮させるため、投薬治療や神経再建のみでの加療が困難となった陳旧性顔面神経麻痺の患者にとって革新的な治療法であるが、本来の神経支配を失った移植筋体が術後にどのように運動機能を再獲得するか、そのメカニズムを示した報告は少ない。

遊離筋移植術の際の神経力源としてしばしば健側顔面神経が用いられてきたが、その再生軸索のみでは移植筋の十分な収縮が得られないことが問題視され、近年では神経力源として患側咬筋神経の有用性が多く報告されるようになった。

しかし自験例において、咬筋神経は移植筋に強い収縮をもたらす半面、安静時の筋緊張の維持は得られないことが多いことを経験した。そこで移植筋の神経力源として患側咬筋神経に加えて健側顔面神経を付加する double innervation 法を行い、時間経過とともに移植筋の筋緊張が維持されるようになり、筋体の動きがより正常の表情筋に近づく症例を経験した。

申請者はそのメカニズムとして移植筋の特性が再支配される運動神経の特性によって影響を受け、筋体の形質変換が生じているのではないかと考え、本研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、支配神経の変化に伴う筋体の特性変化を明らかにすることであった。

一般的に骨格筋は遅い運動や持続的な筋緊張に寄与する遅筋 (Type1) 瞬発的な運動を司る速筋 (Type2) その中間の特性を持つ中間筋に分類される。これらは Myosin ATPase に対する安定性の差を元に分類されるが、特に Type2 においてはさらに Type2A、Type2B、Type2X に細分化される。本研究では、ラットの咬筋の筋線維の type 分類がその運動神経支配を変えることにより変化するか否かを検証した。もし変化が起きているならば、同様の変化が、遊離筋移植術によって移植された筋体にも起きていることが予想されるからである。

3. 研究の方法

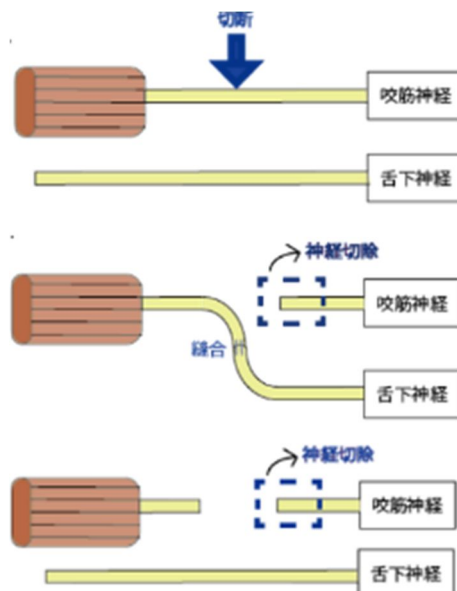
オスの Sprague Dawley (SD) ラットを用いて実験を行った。

ラットの咬筋の浅層は Type2 のみから構成されることがわかっている。舌下神経は舌を支配し、舌筋は Type1 と Type2 の両方から構成されるとされる。本研究では、以下の3つのグループを作成した。

Group1 : コントロール群

Group2 : 咬筋神経の遠位断端を舌下神経の近位断端と端々縫合し、咬筋神経近位断端を神経切除する群

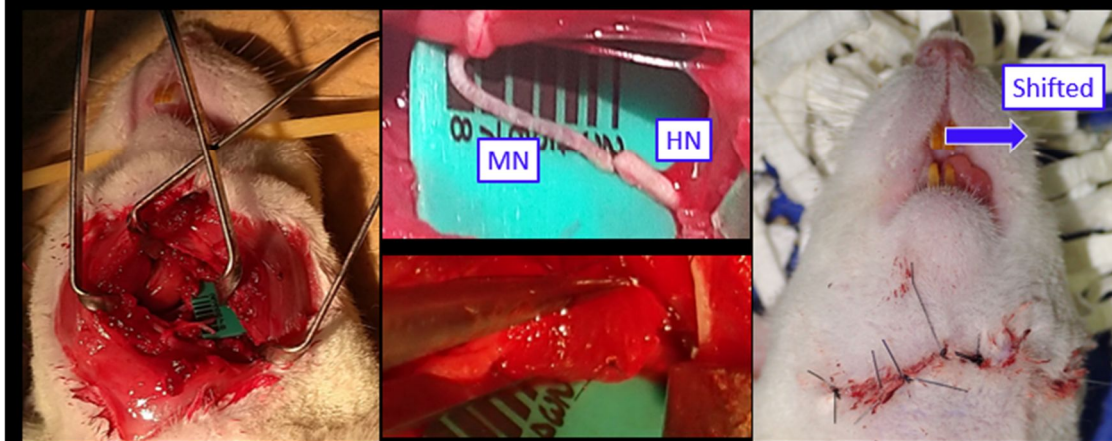
Group3 : 咬筋神経の近位断端を切除して神経再支配を予防し、神経縫合を行わない群



上記3群に対して、術後2か月で咬筋浅層を採取し、凍結標本を作成した。標本を薄切し、免疫組織化学染色を施して筋線維のtypeを同定した。同定に際しては、1次抗体としてtype1, type2a, type2bを同定する3抗体(BAF8, SC71, BFF3; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, US)を、2次抗体としてAlexa Flour 555(Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US)を用いて蛍光免疫染色を行った。観察は共焦点レーザー走査型顕微鏡(FLUOVIEW FV3000; Olympus, Tokyo, Japan)を使用した。

Type2X筋線維については、いずれの抗体も陽性とならなかった場合に発現したと判断した。

Materials and Methods



また、マイクロアレイ(Affirmatrix Clariom S Rat; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US)による遺伝子発現解析を行い、各群における筋線維の遺伝子発現について検討を行った。

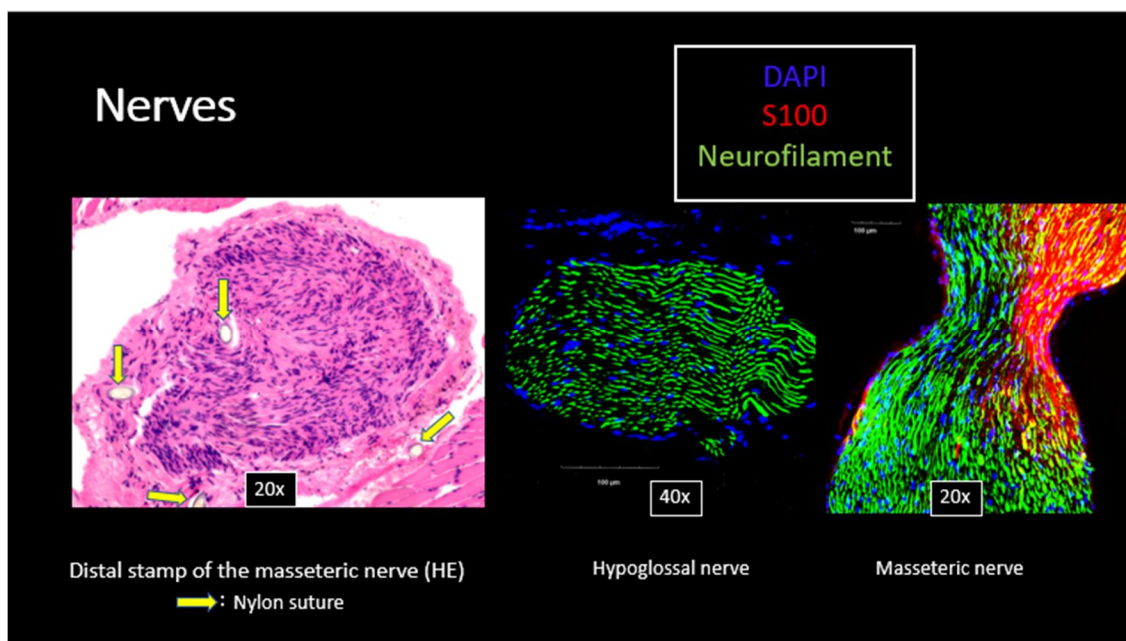
図：実際の手術写真。

4. 研究成果

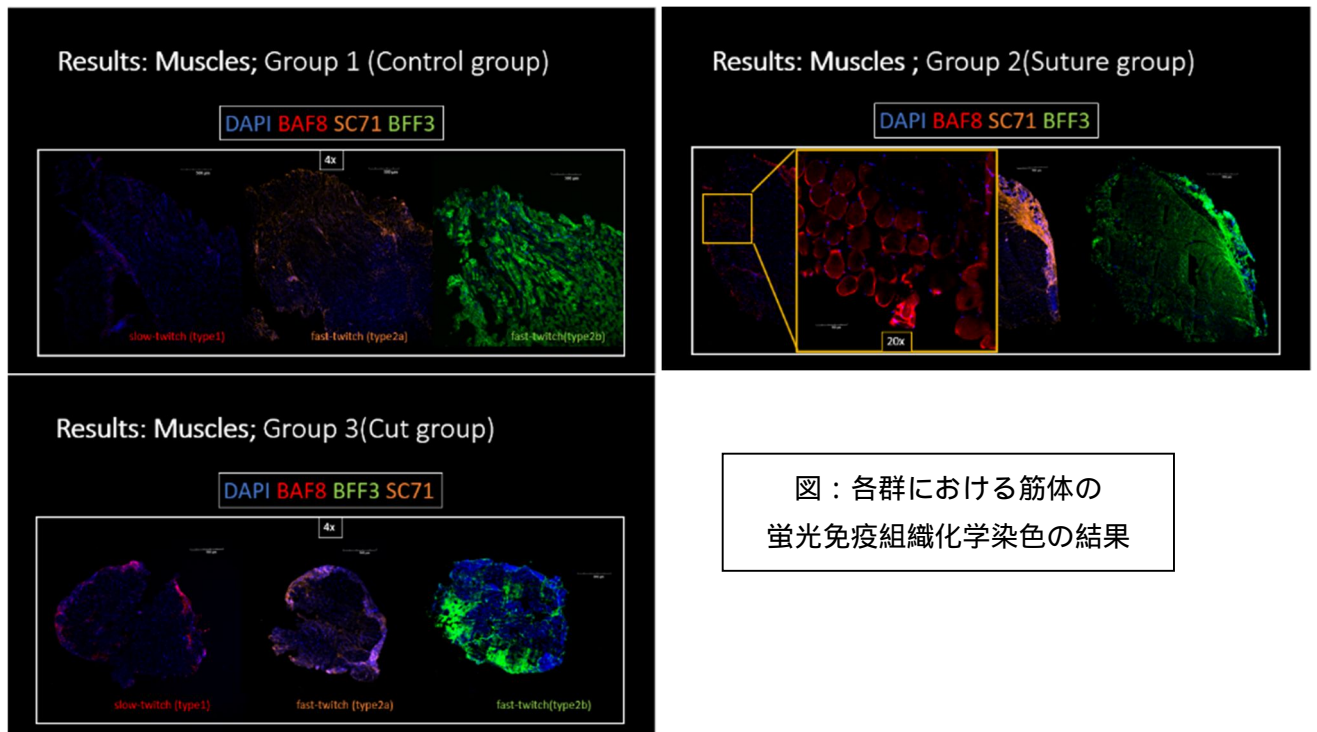
総検体数は16(Group1: n= 6, Group2: n= 6, Group3: n= 4)であった。

組織学的検討

舌下神経と咬筋神経の縫合部で組織切片を作成したところ、神経軸索の再生を確認することができた。



筋体については、Group1(コントロール群)では type2a もしくは 2b からのみ構成されていた。それに対し、Group2(舌下神経と咬筋神経を縫合した群)では一部に type1 の筋線維が確認された。Group3(咬筋を切断した群)では、いずれの抗体にも反応を示さない領域が認められ、type2X への変化を来したと考えられた。



マイクロアレイ

マイクロアレイの結果、縫合群 (Group2) で Perm1 遺伝子の発現亢進を認めた。Perm1 遺伝子は骨格筋のエネルギー代謝および収縮機能に重要な役割を果たす遺伝子である。Perm1 は骨格筋におけるミトコンドリアの生合成を促進し、その遅筋的形質転換に寄与するため、今回縫合群において発現が亢進したことで、咬筋が舌下神経の支配を受けたことにより遅筋的な性質が付与されたと考えている。咬筋神経の切断したのみの筋体でも筋線維の type 変化が起きたことから、神経支配を変化させることで筋体の形質変換が起きたと考えられた。

5. 今後の展望

ラットの神経再支配までに 4-21 か月必要とする報告もあり、今後は観察期間を延長し、n 数を増やしたうえで筋電図等を用いたより詳細な検討を行うことで、最終的には本研究を、実際の顔面神経麻痺手術における double innervation technique の有効性を裏付けるものとする。

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 1件）

1. 発表者名 Shiho Watanabe
2. 発表標題 Changes of muscle fiber composition after selective nerve innervation.
3. 学会等名 9th EURAPS Research Council Meeting (国際学会)
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
---------	---------