

機関番号：16301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591985

研究課題名 (和文) 顔面神経麻痺に対するウイルスベクターを用いた治療戦略の基礎的研究

研究課題名 (英文) Study of facial nerve paralysis in mice model by using virus vector

研究代表者

高橋 宏尚 (TAKAHASHI HIROTAKA)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90403807

研究成果の概要 (和文) : ラットの脊髄後根神経節から抽出した神経細胞を培養し、g E が欠損した HSV-1 を感染させた。そのウイルス動態を明らかにし、新しい顔面神経麻痺治療に使用できるウイルスベクターの候補として HSV-1 の g E 欠損株を見出した。この結果は、本変異ウイルスは神経細胞内へ長く停滞する特徴があり、今後のベクターを用いた神経成長因子の神経細胞への投与を行う足がかりになることが期待された。また既治療に用いられているステロイドや抗ウイルス剤であるアシクロビルを初感染顔面神経麻痺マウスに投与し、麻痺発現率や麻痺発現期間を検討した。また麻痺発症中の顔面神経組織を採取し、その病理組織学的検討を行い、麻痺抑制のメカニズムを明らかにした。抗ウイルス剤投与群では麻痺発現率、麻痺持続期間においてステロイドおよびコントロールと比較して有意に改善しており、本麻痺モデルにおいては、ウイルスの直接浸潤が麻痺発現に大きな役割を果たしていることが確認された。また臨床の場で用いられる抗ウイルス剤のモデル動物での効果を確認した。HSV-1 の g E に注目し、g E を欠損させた HSV-1 (以下 HSV g E mutant) をベクターになりうる候補と考え、培養神経細胞を用いてウイルスの伝播や拡がりに対する基礎実験を行った。具体的には生後3日のラットの脊髄後根神経節を摘出し神経細胞を分離後、神経成長因子を含む特殊な培養液を用いて3から5日間培養する。神経細胞から軸索が伸張してくる5日目にウイルスを感染させ、ウイルス構成蛋白、具体的にはエンベロープ上のグライコプロテインC、テグメント上の VP16 を蛍光染色し、神経細胞内及び軸索に出現する時期および部位を検討するで、HSV g E mutant は細胞から細胞へも伝播が障害されており、神経細胞間で大きな破壊を伴うことなく、神経に持続的に感染することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : In order to investigate the mechanism of Bell's palsy, we developed an animal model of facial nerve paralysis induced by the reactivation of herpes simplex virus type 1 (HSV-1). Eight weeks after recovery from facial nerve paralysis caused by inoculation with HSV-1, the mice were treated with auricular skin scratch at the site of the previous inoculation, or with intraperitoneal injection of anti-CD3 monoclonal antibody (mAb), or combination of both procedures. No mice developed facial nerve paralysis when they were treated with either auricular scratch or mAb injection alone. In contrast, 20% of mice developed facial nerve paralysis with the combined treatment. With one exception, no mouse treated with either auricular scratch or mAb injection showed HSV-1 DNA in their facial nerve tissue, whereas 4 out of 6 mice receiving both treatments showed HSV-1 DNA on day 10 after treatment. Histopathological findings showed the neuron degeneration in the geniculate ganglion and demyelination of the facial motor nerve in paralyzed mice. These findings suggest that a combination of stimuli, local skin

irritation and general immunosuppression, is essential for successfully inducing facial nerve paralysis in mice with latent HSV-1 infection.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：耳科学

#### 1. 研究開始当初の背景

末梢性顔面神経麻痺は脳神経麻痺の中で最も高頻度な疾患であり、非対称な顔貌が後遺症として残るため患者に与える苦痛は大きく、現代社会において課題の多い疾患である。末梢性顔面神経麻痺の中で最も多いベル麻痺の病因はこれまで不明であったが、その発症に単純ヘルペスウイルス1型（以下HSV-1）の再活性化が関与していることが明らかになってきた。しかし、麻痺の病因としてHSV-1の関与は明らかとなったが、早期診断の困難さなどから後遺症を残さない有効な治療は確立していないのが現状である。また、ベル麻痺は生命予後良好な疾患であるため、麻痺の発症機序や病態生理に関する臨床的研究には限界があり、動物モデルを用いた研究に頼らざるを得ない。申請者らは既に動物実験において、HSV-1初感染、再活性化による顔面神経麻痺モデルの作製に世界で初めて成功している。

このモデル動物は一側性、一過性に麻痺を来たし、ベル麻痺の臨床像に類似したモデル動物(図1)として世界的に注目を集めている。本モデルを用いた新しい治療法の試みや、現在行われている治療法の効果の検討は、臨

床的にも非常に有意義であると考えられる。

#### 2. 研究の目的

本研究の目的はベル麻痺に対する現在行われている治療法の有効性の比較と、新しい治療としてウイルスベクターを用いた神経成長因子の神経細胞内投与の可能性を検討することにある。

#### 3. 研究の方法

(1) HSVグライコプロテインEの細胞間・細胞-神経間拡散に関する基礎的検討

顔面神経麻痺に対する新しい治療法としてウイルスベクターを用いた神経成長因子などの神経内局在投与が様々な領域で注目されている。このベクターとして逆行性に軸索を上行するHSVは候補の一つと考えられている。このうちHSV-1のグライコプロテインE(以下gE)は、ウイルスが細胞から細胞へ、また細胞体から神経へ拡がるために必要と考えられている。申請者は、HSV-1のgEに注目し、gEを欠損させたHSV-1(以下HSV gE mutant)をベクターになりうる候補と考え、培養神経細胞を

用いてウイルスの伝播や拡がりに対する基礎実験を開始している。具体的には以下に示すウイルス動態を明らかにし、ベクターとしての可能性を検討する予定である。

#### 1) HSV gE mutant におけるウイルス構成蛋白の輸送に関する検討(免疫組織学的検討)

生後3日のラットの脊髄後根神経節を摘出し神経細胞を分離後、神経成長因子を含む特殊な培養液を用いて3から5日間培養する。神経細胞から軸索が伸張してくる5日目にウイルスを感染させ、以後申請備品である蛍光顕微鏡を用いてウイルス構成蛋白、具体的にはエンベロープ上のグライコプロテインC、テグメント上のVP16を蛍光染色し、神経細胞内及び軸索に出現する時期および部位を検討する。

#### 2) 感染神経細胞の病理組織学的検討

HSV gE mutant 感染後、経時的(7, 17, 24, 36時間後)に神経細胞を固定し病理組織学的検討を行う。病理組織学的には電子顕微鏡を用いた細胞レベルでのgE mutant の感染経路および細胞内増殖経路の解析を行う。

### 4. 研究成果

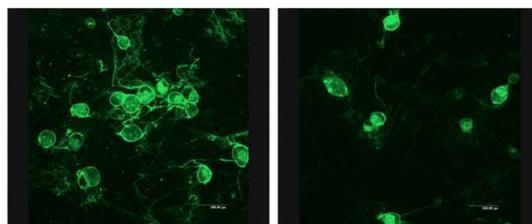
#### (1) HSV gE mutant におけるウイルス構成蛋白の輸送に関する検討

ラットの脊髄後根神経節から抽出した神経細胞を培養し、gEが欠損したHSV-1を感染させた。

そのウイルス動態を明らかにし、新しい顔面神経麻痺治療に使用できるウイルスベクターの候補としてHSV-1のgE欠損株を見出した。この結果は、本変異ウイルスは神経細胞内へ長く停滞する特徴があり、今後のベクターを用いた神経成長因子の神経細胞へ

の投与を行う足がかりになることが期待された。

また既治療に用いられているステロイドや抗ウイルス剤であるアシクロビルを初感染顔面神経麻痺マウスに投与し、麻痺発現率や麻痺発現期間を検討した。また麻痺発症中の顔面神経組織を採取し、その病理組織学的検討を行い、麻痺抑制のメカニズムを明らかにした。抗ウイルス剤投与群では麻痺発現率、麻痺持続期間においてステロイドおよびコントロールと比較して有意に改善しており、本麻痺モデルにおいては、ウイルスの直接浸潤が麻痺発現に大きな役割を果たしていることが確認された。また臨床の場で用いられる抗ウイルス剤のモデル動物での効果を確認した。今後のベクターを用いた神経成長因子の神経細胞への投与を行う足がかりになることが期待された。



コントロール

HSV-1 gE欠損株

図3 培養神経細胞上におけるウイルス構成蛋白の局在  
コントロールと比較してHSV-1 gE欠損株は神経細胞  
および軸索への拡がり抑制されている

#### (2) 感染神経細胞の病理組織学的検討

HSV-1のgEに注目し、gEを欠損させたHSV-1(以下HSV gE mutant)をベクターになりうる候補と考え、培養神経細胞を用いてウイルスの伝播や拡がりに対する基礎実験を行った。具体的には生後3日のラットの脊髄後根神経節を摘出し神経細胞を分離後、神経成長因子を含む特殊な培養液を用いて3から5日間培養する。神経細胞

から軸索が伸張してくる5日目にウイルスを感染させ、以後申請備品である蛍光顕微鏡を用いてウイルス構成蛋白、具体的にはエンベロープ上のグライコプロテインC、テグメント上のVP16を蛍光染色し、神経細胞内及び軸索に出現する時期および部位を検討する。HSV gE mutant は細胞から細胞へも伝搬が障害されており、神経細胞間で大きな破壊を伴うことなく、神経に持続的に感染することを明らかにした。この性質を用いて、顔面神経麻痺モデルにベクターとして投与し、麻痺持続期間や障害程度を検討した。

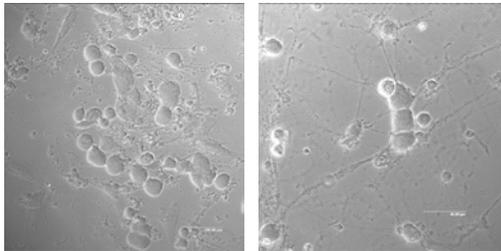


図1 培養した神経細胞(48時間後)  
培養細胞の90%以上はニューロンが占める。  
残り10%はシュワン細胞、線維芽細胞で構成される。  
培養後2日目よりニューロンよりアクソンが伸張する。

## 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] (18 件)

- ① Takahashi H, Hinohira Y, Hato N, Wakisaka H, et al, Clinical features and outcomes of four patients with invasive fungal sinusitis, *Auris Nasus Larynx*, 査読有, 38 (2), 2011, 289-94
- ② Wakisaka H, Yamada H, Motoyoshi K, Ugumori T, Takahashi H, et al, Incidence of long-term ipsilateral and contralateral ototoxicity following radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma., *Auris Nasus Larynx*, 査読有, 38 (1), 2010, 95-100
- ③ Yamada H, Hato N, Murakami S, Honda N, Wakisaka H, Takahashi H, Facial synkinesis after experimental compression of the facial nerve comparing intratemporal and extratemporal lesions, *Laryngoscope*. 120(5), 査読有, 2010, 1022-7.
- ④ 澤井尚樹, 羽藤直人, 寺岡正人, 高橋宏尚 他、顔面像センシング技術 OKAO

VISIONを用いた顔面神経麻痺の新しい客観的評価法の開発、*Facial Nerve Research*, 査読有, 29, 2010, 68-70

[学会発表] (計19件)

- ① 好酸球性副鼻腔炎手術症例の臨床的検討 高橋宏尚 能田淳平 暁 清文、日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2011年2月9日 大分
- ② 鼻アレルギー最近の知見 高橋宏尚、愛媛 onearway onedisease 研究会 2010年6月19日 愛媛
- ③ 花粉大量飛散期における患者満足度 高橋宏尚 2010年2月13日 喜多八幡浜耳鼻咽喉科講習会 愛媛
- ④ 患者満足度からみる花粉症の治療戦略 高橋宏尚 東予アレルギー疾患講習会 2010年1月30日 愛媛
- ⑤ 単純ヘルペスウイルス再活性化による顔面神経麻痺モデルにおける細胞性免疫の関与 高橋宏尚、脇坂浩之、羽藤直人 第27回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2009年2月13日 千葉

[図書] (計1件)

- ① 高橋宏尚, 比野平恭之、東京医学社、2007、JOHNS 22 (5)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 宏尚 (TAKAHASHI HIROTAKA)  
愛媛大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：90403807