

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09714

研究課題名（和文）神経栄養因子を用いた顔面神経再生治療における病的共同運動の検討

研究課題名（英文）Investigation of Synkinesis in Facial Nerve Regeneration Therapy Using Basic Fibroblast Growth Factor

研究代表者

山田 啓之（Hiroyuki, Yamada）

愛媛大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00403808

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では高度顔面神経麻痺モデルを用い、咀嚼運動時の患側の閉瞼運動とBlink Reflex検査で病的共同運動が出現していることを証明した。またレーザードップラ振動計を用い世界で初めてモデル動物を使ったアブミ骨筋性耳鳴の客観的評価に成功した。それらの原因であるMisdirectionの定量評価として、透明化技術を用いた二光子励起顕微鏡による3次元解析を行った。その結果Misdirection ratioは平均90.5%、Double-labeled cell ratioは平均16.45%であった。本研究によって顔面神経麻痺後遺症の基礎研究における新たな解析方法を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顔面神経は多くの表情筋を支配し複雑で様々な表情を作る。表情は非言語コミュニケーションの1つとされ円滑な社会的生活を営むために必要である。しかし、高度顔面神経麻痺に陥るとMisdirectionが生じ、眼瞼を動かすと同時に口角が動き、自然な表情が作れなくなる。また顔面神経はアブミ骨筋も支配しているためMisdirectionにより食事や閉眼時にアブミ骨筋が収縮し耳鳴が生じる。上記のような後遺症のため患者の社会的生活が損われる。本研究は顔面神経麻痺の後遺症に対する基礎研究において新たな解析方法を示すことができた。これらの方法により今後、益々後遺症克服に向けた研究が推進されると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we utilized a severe facial nerve paralysis model to demonstrate the occurrence of synkinesis during chewing movements on the affected side, as well as the emergence of synkinesis in Blink Reflex testing. Additionally, we successfully achieved the first objective evaluation of stapedial tinnitus in an animal model using a laser Doppler vibrometer. Quantitative assessment of misdirection was conducted through three-dimensional analysis using two-photon excitation microscopy. The results revealed an average Misdirection ratio of 90.5% and an average Double-labeled cell ratio of 16.45%. This study introduces novel analytical methods for fundamental research on the sequelae of facial nerve paralysis.

研究分野：耳科学

キーワード：顔面神経麻痺 病的共同運動 神経過誤支配 再生医療 アブミ骨筋性耳鳴 二光子励起顕微鏡 Misdirection

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

顔面神経は24種類もの表情筋を支配し、複雑で多様な表情を作り出す。表情は非言語コミュニケーションの一環として、円滑な社会生活を営むために必要不可欠である。しかし、高度な顔面神経麻痺に陥ると、以前に眼輪筋を支配していた神経が口輪筋を支配する、またその逆も生じる。これにより、口角と同時に眼瞼が同時に動くようになり、自然な表情が作れなくなる。また、顔面神経はアブミ骨筋も支配しているため、Misdirectionが生じると食事時や閉眼時にアブミ骨筋が収縮し、耳鳴(アブミ骨筋性耳鳴)を引き起こす。これらの現象により、患者の社会生活が大きく損なわれる。一方、近年では神経栄養因子を用いた再生医療の研究が進んでいるが、再生軸索の数のみを検討し、正しい神経支配の再獲得についての研究はほとんど行われていない。

2. 研究の目的

神経が損傷を受けると、末梢側ではWaller変性が生じ、その後、Schwann細胞がBünger bandを形成する。神経障害部位から発芽した成長円錐はBünger bandに導かれて目的臓器へ到達する。一方、神経栄養因子の投与により神経再生が促進されるが、その支配が乱れ、Misdirectionが増加する可能性が示唆されている。しかし、従来の神経栄養因子投与による再生医療の研究では、再生軸索数をコントロール群(主に無投薬群)と比較するのみで、Misdirectionの定量や病的共同運動の発現率についての研究は行われていない。また、基礎実験では動物モデルを用いるため、アブミ骨筋性耳鳴の有無を客観的に捉えることができなかった。一方、我々はこれまでMisdirectionの定量評価や病的共同運動の発症に関する基礎研究を行い、Misdirectionが病的共同運動の発症に関与していることを証明してきた。この成果はThe Laryngoscope (Yamada H, et al. 2010) に報告し、世界的にも注目を集めている。

そこで本研究では、国内で臨床使用が可能な神経栄養因子を鼓室内に徐放投与し、Misdirectionの定量評価と病的共同運動やアブミ骨筋性耳鳴の発現率を検討する。本研究の目的は「高度顔面神経麻痺に対する神経栄養因子投与による再生医療が病的共同運動に及ぼす影響を検討する」ことにある。

3. 研究の方法

本研究では、我々が開発した顔面神経冷却麻痺モデル(モルモットの中耳骨胞を開放し、顔面神経管をスプレーフリーザーで5秒間冷却)を使用する。冷却後に処置を行わない無処置群と、塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor: bFGF)をゼラチンハイドロゲル(神経栄養因子の活性を保ちながら2週間徐放投与できるドラッグ・デリバリー・システム)に含浸させて顔面神経に投与するbFGF群を比較検討する。顔面神経管の開放は行わない。

本研究の評価は以下の通りである：

(1) **機能評価**：冷却後、毎週顔面神経麻痺スコアを評価した。スコアは瞬目反射(注射器で目に空気をかけ誘発)、鼻翼の動き、髭の動きの3点を評価し、動きの消失を0点、減弱を1点、正常を2点として合計6点とした。また、病的共同運動の評価として咀嚼運動時の病的共同運動を動画記録し、解析ソフトを用いて左右の瞼裂の面積を比較する瞼裂比(咀嚼運動時の患側瞼裂/安静時の患側瞼裂)を算出した。

(2) **電気生理学的評価**：冷却障害15週後にBlink Reflex検査を施行し、病的共同運動の客観的評価を行った。

(3) **アブミ骨振動の測定**：冷却障害15週後に非接触型のレーザードップラ振動計VibroOne VIO-130を用いて、Blink Reflex検査時のアブミ骨の振動を客観的に測定した。

(4) **組織学的評価**：冷却障害15週後に2種類のretrograde fluorescent tracerを眼輪筋と口輪筋に注入し、その2週後に脳幹組織を摘出し透明化の処置を行い、二光子励起顕微鏡を用いた顔面神経核の3次元解析を行った。

Misdirection ratio = 眼輪筋支配の亜核外のDiOで標識される細胞 / DiOで標識される全ての細胞 ×100

Double-labeled cell ratio = DiOとDiIの両方で標識される細胞 / 全ての細胞 ×100

4. 研究成果

顔面神経麻痺スコアでは、冷却直後に完全麻痺を確認した。障害後3～4週頃から回復が見られたものの、15週の時点でも麻痺は完全に治癒していなかった。また、瞼裂比の平均は0.59であり、Blink Reflex検査では口輪筋の収縮（S1波とS2波）が認められた（図1）。

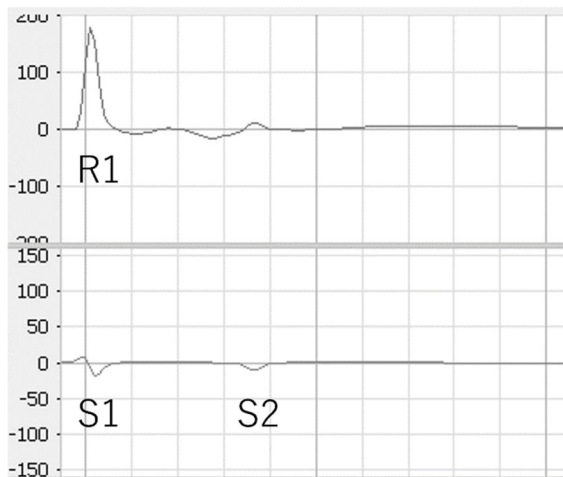


図1 冷却障害モデルの Blink Reflex 検査

上段は眼輪筋に装着した電極の波形を示しており、眼窩上神経の電気刺激により眼輪筋の収縮（R1波）が確認された。下段は口輪筋に装着した電極の波形を示し、眼窩上神経の電気刺激により口輪筋の波形（S1波およびS2波）が確認された。これにより、客観的に病的共同運動の発症が証明された。

さらに、非接触型レーザードップラ振動計を用いたアブミ骨振動の測定では Blink Reflex の刺激でアブミ骨が振動することを客観的にとらえることができた（図2）。

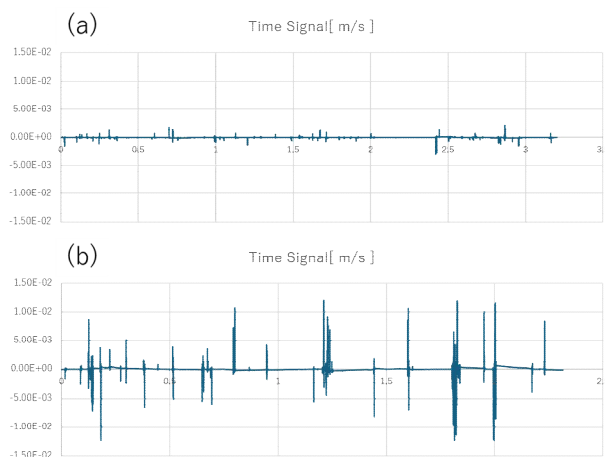


図2 Brink Reflex 検査によるアブミ骨振動

(a) 正常なモデルの結果では、わずかなノイズのみが確認された。(b) 冷却傷害後15週モデルでは、眼窩上神経の電気刺激によりアブミ骨が大きく振動することが観察された。

組織学的評価では正常の顔面神経核では眼輪筋を支配している細胞と口輪筋を支配している細胞は異なる亜核に存在するためその分布がきれいに分かれる（図3）。

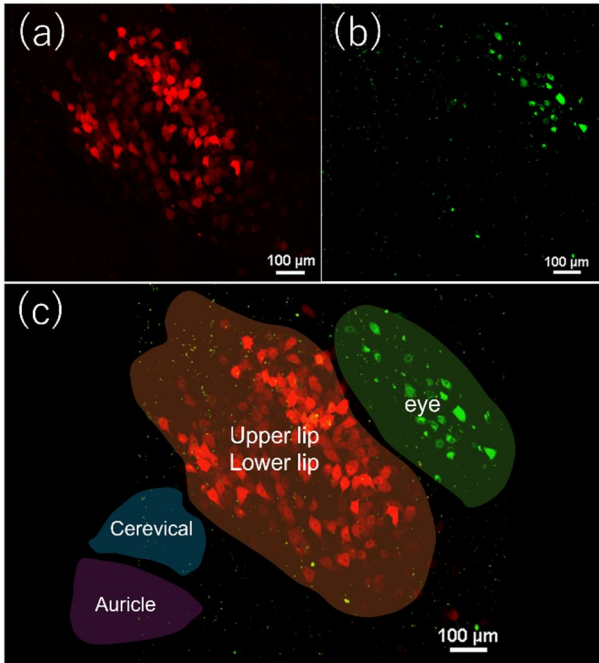


図3 正常の顔面神経核

(a)冷却障害後 15 週目に口輪筋に DiI (赤色) を投与した。投与 2 週後に脳幹を採取し、口輪筋を支配する細胞が集簇してしていることが確認された。

(b)DiO(緑色)を DiI と同様に眼輪筋に投与した。投与から 2 週後の観察で眼輪筋を支配する細胞を認めた。

(c)(a)と(b)を merge すると、それぞれの細胞が混じることなく局在を保って存在していた。

一方、冷却障害を行ったモデルでは眼輪筋を支配する神経細胞と口輪筋を支配する神経細胞の局在が乱れるようになる(図4)。Misdirection ratio は平均 90.5%であった。

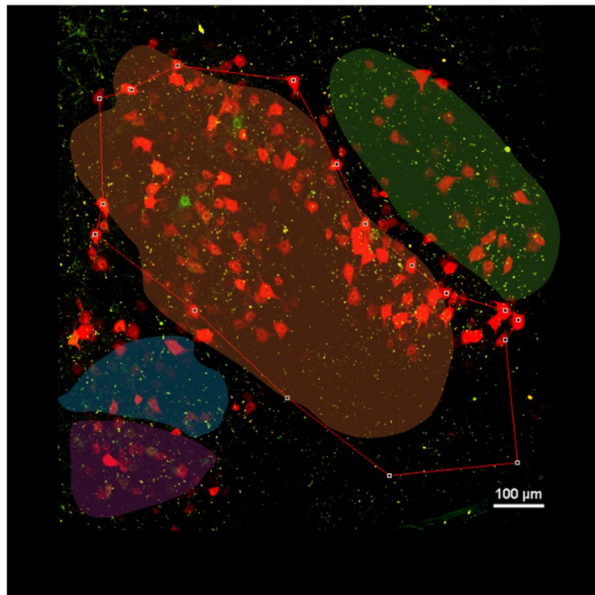


図4 冷却障害モデルの顔面神経核

DiI と DiO を merge すると眼輪筋を支配する神経細胞の減少と眼輪筋と口輪筋を支配する細胞の局在の乱れが認められた。

また局在を失った細胞の中には口輪筋に投与した DiI と眼輪筋に投与した DiO の両 tracer で標識される細胞を認めた(図5)。このようは Double-labeled cell ratio は平均 16.45%であった。

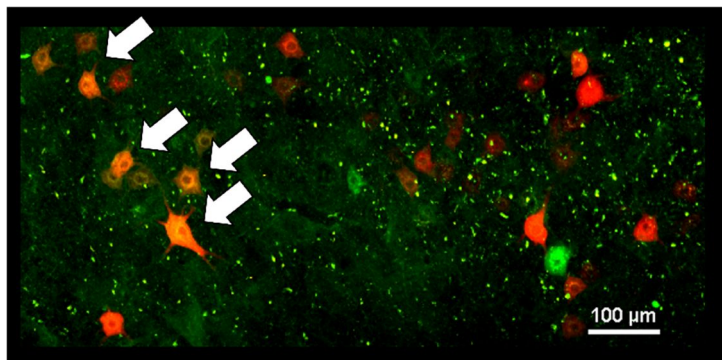


図5 Double-labeled cell

冷却障害のモデルの観察では、口輪筋に投与した DiI と眼輪筋に投与した DiO の両方に標識されている細胞を認めた。Merge するとオレンジに見える細胞が認められた(矢印)。

本モデルで用いた冷却障害は障害程度が高度である。一般的な顔面神経麻痺の圧迫障害では、障害後10週で麻痺が治癒する(Yamada H, et al. 2010)。しかし、本モデルでは障害後15週でも麻痺が残存することが確認されている(Joko H, Yamada H et al, ANL2020)。そのため、重症

の顔面神経麻痺に対する治療開発の基礎研究にこのモデルを用いることが可能である。本研究では、この高度麻痺モデルを用いて、咀嚼運動時に患側の閉眼運動を確認し、電気生理学的検査のBlink Reflex検査で病的共同運動を示すS1波およびS2波を認め、本モデルで病的共同運動が出現していることを証明した。また、非接触型のレーザードップラ振動計を用いることで、Blink Reflex検査時のアブミ骨の振動を客観的に評価し、本モデルにおいてアブミ骨筋性耳鳴が生じている可能性が示唆された。これまで多くの顔面神経麻痺モデルが作製され様々な検討が行われてきたが、アブミ骨筋性耳鳴の可能性を示唆する客観的評価を行った報告はなく、本研究の結果は、顔面神経麻痺の後遺症の基礎研究において新たな検討方法を示したと言える。

モルモットの顔面神経核は6つの亜核に分かれており、眼輪筋はdorsolateral divisionに、口輪筋はintermediate divisionとmedio-intermediate divisionに存在する。そのため正常では図3のような局在を示す。一方、高度な冷却障害によってmisdirectionを生じると図4のようにその局在が乱れ、本モデルではMisdirection ratioは平均90.5%であった。過去の報告では側頭骨内顔面神経の圧迫障害では平均45.3%であり (Yamada H, et al. 2010)、本モデルでは圧迫障害より高いMisdirection ratioを示していた。一方、側頭骨外顔面神経を切断した麻痺モデルではMisdirection ratioは80~87%と報告されており (Fernandez E, et al. 1995, Choi D, et al. 2002)、本モデルのMisdirection ratioはこれらのモデルに近い値となっていた。さらに本モデルでは口輪筋と眼輪筋の両方を支配するDouble-labeled cell ratioは平均16.45%であった。側頭骨内顔面神経の圧迫障害では平均4.2% (Yamada H, et al. 2010)、側頭骨外顔面神経の切断障害では12~25%と報告されており (Choi D, et al. 2002)、本モデルのDouble-labeled cell ratioも切断モデルに近い値であった。

Sunderlandによる末梢神経障害の分類では 度は髄鞘の損傷、度は軸索変性、度は神経内膜の損傷、度は神経周膜の損傷、度は神経外膜の損傷とされている。末梢神経は一般的に神経周膜に包まれた複数の神経束をもち、支配筋に対する局在を持っているためMisdirectionが生じるのは上記の度以上の障害となる。しかし、顔面神経は側頭骨内では単一の神経束となっており、また各表情筋を支配する軸索は局在を示さず、ランダムに走行していると言われている。そのためSunderlandの度障害以上でMisdirectionが生じると考えられている。本モデルでは側頭骨内の圧迫障害モデルよりもMisdirection ratioとDouble-labeled cell ratioが高い値を示していたが、これは本モデルの障害程度が高度であるため神経内膜の障害が広範かつ高度であった可能性が考えられる。

本研究では摘出した脳幹から切片を作製せず、透明化の技術を用いて二光子励起顕微鏡で観察したことに特徴を有する。一般的には顔面神経核の観察には80 μmの切片を作製するが、細胞を二重に数えたり、局在が不鮮明になることが欠点として挙げられていた。そこで本研究では顔面神経核を切断することなく、また二光子励起顕微鏡を用いた3次元解析によって正確な細胞数と局在を把握することができた。しかし、一方で、本検討ではbFGFを投与したモデルについての検討が行えなかった。この理由として透明化がretrograde fluorescent tracerに影響し、当初、標識が十分にできず条件設定に時間を要したこと、また研究期間の大半がCOVID-19の影響下にあり、十分な時間を取ることができなかったことなどが挙げられる。bFGFを用いたモデルの検討は今後、益々臨床応用が期待されるの再生医療に対する新たな方向性を示すことが考えられるため重要な課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	脇坂 浩之 (Wakisaka Hiroyuki) (30304611)	愛媛県立医療技術大学・保健科学部・教授 (26301)	
研究分担者	木村 拓也 (Kimura Takuya) (40792502)	愛媛大学・医学部附属病院・専攻医 (16301)	

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