

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：14501
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21591838
 研究課題名（和文）軸索再生阻害因子の抑制による顔面神経再生の誘導

 研究課題名（英文）Facial nerve regeneration by suppression of axon growth inhibition signals

 研究代表者
 谷口 理章 （TANIGUCHI MASAOKI）
 神戸大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：60346195

研究成果の概要（和文）：

本研究では神経再生を阻害する細胞外基質であるプロテオグリカンを分解することで、ラットの顔面神経切断・再縫合後の機能回復がより促進されることが示された。しかしながらその回復効果は正常側の4割程度にとどまり不十分であることも示された。リハビリテーション効果を有するマッサージを追加することで、神経機能の回復は6割程度に上昇したが、完全回復には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

The present study demonstrated enhanced recovery of the rat facial nerve function after transection and suturing of the facial nerve by degradation of proteoglycan by chondroitinase injection. The degree of the recovery was, however, only up to 40% of the normal side. Manual stimulation in combination with the chondroitinase injection resulted in additional recovery of about 20%.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：実験脳外科学、顔面神経再生、軸索再生阻害因子、プロテオグリカン

1. 研究開始当初の背景

（1）末梢神経は中枢神経と比較して再性能

が高いことが知られているが、頭蓋底腫瘍の術後などの臨床例において、その程度は必ず

しも十分とはいえない。とくに顔面神経などの脳神経は末梢神経に分類されながら、その回復の時期は遅く、また程度も不完全で、その後の機能障害が生活水準の低下をもたらすことをしばしば経験する。このような観点から顔面神経の再生機序を解明し、より高いレベルの機能回復を得ることを目的とした研究は以前より多数なされてきた。その多くは栄養因子の投与や生体活性を備えたartificial conduit の作成といったアプローチがとられてきたが、効果には限界があり、これらをもってしても依然顔面神経の完全な再生を得るにはいたっていない。

(2) 近年、中枢神経系の再生過程においてはミエリンに局在する複数の因子が軸索再生を阻害していることが示された。現在までMAG、Nogo、Ompg、RGM、CSPG といった蛋白が同定され、軸索再生阻害因子と呼ばれているが、その作用を抑制すると、中枢神経系においても相応の神経再生が誘導されることが明らかとなっている。末梢神経系においてはもともと神経細胞が再生能を有していることから、これらの因子の関与は少ないものと従来考えられていたが、近年末梢神経の再生においてもこれらの因子の関与を示唆する実験結果が報告されている。これらの結果は軸索再生阻害因子が末梢神経においてもその再生を阻害し、結果として機能回復が不十分に終了する一因となっている可能性を示していると考えられた。

(3) また近年、ラットにおける頬髭のマッサージが顔面神経切断・再縫合後の効果的な神経筋単位の再構築を促し、著明な機能回復をもたらすと報告がなされた。このことはリハビリテーション効果が顔面神経機能の回復として現れたものと考えることができ、軸索阻害因子の制御に加えて、相乗効果が期待できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では末梢神経である顔面神経においても軸索再生阻害因子がその再生過程に関与していることを明らかにし、阻害因子の制御が新たな顔面神経損傷治療の手段となりうることを示す。このため、まず各種軸索再生阻害因子 (MAG、Nogo、Ompg、RGM、CSPG) について、顔面神経損傷時の発現が誘導されることを示す。この際、各因子ごとに誘導の程度、部位、誘導される細胞種について、その違いを明らかにする。次に誘導された軸索再生阻害因子を選択的に抑制することで、顔面神経の再生が促進されることを組織学的および機能的な側面から明らかにする。最後に臨床応用を念頭において、軸索再生阻害因子の制御を効率よく行うための条件を明らかにする。すなわち、阻害因子の制御は受容体拮抗蛋白、中和抗体、蛋白分解酵素などの局所投与で行うが、これらを投与するタイミングや至適量を明らかにすることを目的とした。さらに軸索再生阻害因子を制御した群に頬髭のマッサージを加え、リハビリテーション効果の上乗せが、更なる機能回復につながるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 軸索再生阻害因子の末梢神経再生過程における関与を検討するため、予備実験として手術顕微鏡下に雌成体ラットの坐骨神経を切断・縫合するモデルを作成し、手術後7日目に神経を採取し、軸索再生阻害因子であるMAG、RGM、プロテオグリカンの免疫染色を行った。その後顔面神経を頭蓋外で切断し、直後に再縫合するモデルを作成し、MAG、RGM、プロテオグリカンについて発現変化を免疫組織学的に検討した。

(2) 次にプロテオグリカンの顔面神経再生

障害への関与を検討すべく、一側顔面神経切断後にコンドロイチナーゼを1U吻合部に注入し、すぐに縫合するモデルを作成した。その後頬髭の運動を一週間ごとに術後二ヶ月までビデオ撮影を行った。顔面神経の再生の程度は、非手術側を基準とした頬髭の運動幅の回復程度で評価し、コンドロイチナーゼ処理を行っていない群をコントロールとした。

(3) さらに各群に頬部のマッサージ刺激を一日約10分づつ週5回施行する群を追加し、コンドロイチナーゼ処理+マッサージ群、コンドロイチナーゼ処理のみの群、マッサージのみの群、切断吻合処置のみの群の4群間で頬髭運動の回復程度を比較検討した。

(4) 手術後二ヶ月目にラットを屠殺し、両側顔面神経を採取し、吻合部から1mmおよび5mmの切片でHE染色、GAP43およびプロテオグリカンの免疫染色を行い、再生神経の数を各群で比較検討した。

4. 研究成果

(1) プロテオグリカンは非手術側において神経基底膜に主として認められ、手術側では髄鞘も含めて軸索を取り囲むように比較的強い染色を認めた。一方でRGMは手術側で血管周囲結合織および神経周膜において染色を認めるものの、非手術側に比して有意な変化は認められなかった。MAGも同様に髄鞘に認めるが、手術側・非手術側で有意な差は認められなかった。

(2) ビデオによる頬髭の運動評価はラットの興奮状態などにより大きく左右され、定量化は困難であったが、おおまかにその回復程度はコンドロイチナーゼ処理+マッサージ群(C+M)、コンドロイチナーゼ処理のみの群(C)、マッサージのみの群(M)、切断吻合処置のみの群(sham)でそれぞれ正常側の約6割、4割、3割、3割程度であり、いずれの群でも完全回

復には至らなかった。

(3) GAP43の定性的評価では、切断吻合処置のみの群と、マッサージのみの群ではGAP43陽性神経の数に大きな差は認められず、コンドロイチナーゼ処理のみの群で若干増加し、コンドロイチナーゼ処理+マッサージ群でさらに増加する傾向を認めた。

以上より、プロテオグリカンは顔面神経再生に抑制的に作用し、これをコンドロイチナーゼで分解処理することで、神経再生が促進される可能性が示唆された。しかしながらその回復程度は依然として完全ではないが、マッサージ刺激を追加することで、回復の上乗せ効果が期待できることが示唆された。

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] (計1件)

① Masaaki Taniguchi, Amami Kato, Takuyu Taki, Takashi Tsuzuki, Toshiki Yoshimine, Eiji Kohmura Microsurgical maneuver under the side-viewing endoscope in the treatment of skull base lesions. Skull Base 2011;21:115-122 査読あり

[学会発表] (計2件)

① 谷口 理章 他、頭蓋底腫瘍に対する縮小開頭下手術、第16回日本脳腫瘍の外科学会、2011年9月10日、横浜

② 谷口理章 他、再発頭蓋底脊索腫および髄膜腫に対する治療戦略、第21回日本頭蓋底外科学会、2009年7月3日、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 理章 (TANIGUCHI MASA AKI)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60346195

(2) 研究分担者

甲村 英二 (KOHMURA EIJI)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：30225388

近藤 威 (KONDOH TAKESHI)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：50273769