

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31日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591859

研究課題名(和文) 顔面神経核の逆行性変性阻止への末梢性、中枢性グリアの作用と軸索再生機序の解明

研究課題名(英文) a role of glial cells in the central nervous system to prevent retrograde degeneration of the facial nucleus and a mechanism for axonal regeneration

研究代表者

長谷川 光広 (HASEGAWA MITSUHIRO)

藤田保健衛生大学・医学部脳神経外科・教授

研究者番号：70218460

研究成果の概要(和文)：

顔面神経核から末梢のターゲットまでの軸索損傷モデルを作製し、顔面神経 motoneuron の逆行性変性現象のメカニズムとその阻止効果を検討した。損傷後1か月において末梢損傷ではわずかな motoneuron が緩徐に脱落するのみに対し、脳幹内軸索損傷は急速に重篤な逆行性変性を急速に來し、3%弱のみの生存となる。各種移植操作、薬剤投与による阻止を試みたところ、自家末梢神経移植操作で8倍、造血因子であるエリスロポイエチン投与で3倍の生存率を得たが、他の移植操作や薬剤では有効な効果は得られなかった。細胞死の機構としてアポトーシスの関与が推測されているが、我々の脳幹内損傷モデルではNOの関与は示唆されるが、アポトーシスの関与を支持する所見はえられなかった。さらに多剤での神経細胞脱落阻止作用を検討することが中枢神経変性阻止、再生につながるものと思われる。

研究成果の概要(英文) : Axonal injury models throughout the facial nerve from brainstem to the target was utilized to analyze the mechanism of retrograde motoneuron degeneration and seek the preventing factors against the neuronal loss. Peripheral injury induced little motoneuron degeneration, but brainstem injury showed massive and rapid degeneration resulting in only 3% neuronal survival on day 28. Peripheral nerve autograft induced 8-times axonal survival and erythropoietin 3-times, but no other neuroprotective factors found so far. Nitric oxide was supposed to be related to the mechanism of neuronal loss but apoptosis was not. The neuroprotective mechanism for retrograde degeneration might give us the cue for CNS regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	780,000		
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：facial motoneuron, retrograde degeneration, axonal injury, brainstem, glial cell

1. 研究開始当初の背景

末梢神経では軸索損傷後、軸索の再生機構がただちに働き、機能回復が期待される。すなわち損傷部位より末梢軸索のワーラー変性に引き続き末梢性グリアであるシュワン細胞の活動が活発になり再生機構にはいる。これにはシュワン細胞遊走促進作用をもつガレクチン-1 (Fukaya K, Hasegawa M et al, J Neuropathol Exp Neurol 2003) 等、さまざまな因子が関与する。一方で中枢神経の損傷では Waller 変性によりまず傍絞輪部の中枢性グリア (乏突起膠細胞) 細胞突起の変化に始まり (Hasegawa M et al, Brain Res 1988)、遠位側軸索が変性する。加えて損傷部から中枢側の神経細胞体に向かって逆行性変性が引き起こされると急激に神経細胞が脱落することによりこの経路は消失してしまうので、その後の再生は期待できない。軸索損傷により引き起こされる逆行性変性の程度は、個体の成熟度や軸索の切断部位によって大きく異なる特徴があることがわかった。すなわち、幼弱ラットでは末梢性軸索損傷により逆行性変性で多くの神経細胞は死に至るものの、成熟ラットではほとんどの神経細胞は死を免れ軸索を再伸長する (Snider WD et al J Neurobiol 1992, Mattsson P et al Brain Res Bull 1999)。一方、成熟ラットの中枢側軸索損傷においては、神経細胞の変性は末梢側軸索損傷に比して重篤である (Dai CF et al Am J Otol 2000, Mattsson P et al Brain Res Bull 1999)。すなわち中枢側軸索損傷後1ヶ月で約7割の神経細胞が細胞死に至るが、このモデルは、脳槽内で顔面軸索を切断するもので手技が困難で再現性に乏しい。我々は定位脳的にラット脳幹内の顔面神経軸索を背側から切断することにより、成熟動物で顔面神経核の逆行性変性をきたすモデルを確立した。この定位脳的脳幹内顔面神経軸索切断モデルでは、術1か月後でわずか数%の顔面神経細胞生存率しか示さず、神経移植、筋移植、造血因子投与等の操作が神経保護作用があるとする予備実験の結果を得た。これらにより、逆行性神経変性のメカニズムの詳細とこれにかかわる中枢グリア、末梢グリアの反応、ならびに各種移植操作に対する反応等を詳細に検討することは、中枢神経再生への有用な知見が得られると考えられた。

2. 研究の目的

脳幹内運動神経 (例えば顔面神経、舌下神経) の軸索損傷は、患者にとって永続的な機能障害をもたらす。すなわち、末梢神経組織内における顔面神経損傷は臨床的にも神経吻合が可能でこの手技によ

り軸索再生をもたらし、顔面神経の機能回復が充分期待できる一方、第四脳室底あるいは脳幹内では顔面神経経路の軽微な損傷により顔面神経機能の不可逆的な機能障害を引き起こし患者に多大な不幸をもたらす。実験的には中枢神経の再生をめざして、neurotrophins、neural cytokine、接着因子などのいわゆる神経成長栄養因子が、また一方で多彩な潜在能力を持つさまざまな幹細胞の治療への応用の可能性が報告されているが、損傷 motoneuron の機能回復に関しては、いまだ治療への breakthrough が得られていない。本研究では、以下の項目に特に重点を置き、中枢神経細胞の変性を予防し、再生を促すメカニズムを究明することを目的とした。

(1) 脳幹内顔面神経軸索損傷により引き起こされる逆行性神経細胞変性の重症度とそのメカニズムの検討

成熟ラット顔面神経核の逆行性変性モデルを確立し、軸索損傷部位の違いによる神経細胞の変性、脱落とグリア細胞の反応を経時的に比較検討することで逆行性変性の機構の詳細をさぐる。顔面神経軸索を茎乳突孔出口部で切断した末梢損傷モデル、同部位で引き抜き末梢モデルより神経核側の錐体骨内で損傷を加えた引き抜き損傷モデル、定位脳的に脳幹内顔面神経膝部を切断した脳幹内損傷モデルを作製し、神経細胞の変化と生存率、周辺のグリア細胞の反応を検討する。顔面神経軸索損傷後、神経細胞体の周辺ではグリアの反応が惹起され瘢痕形成と trophic factor の産生、oligodendrocyte による軸索伸長抑制、マイクログリアの反応、マクロファージの貪食、末梢神経組織からの Schwann 細胞の侵入と軸索伸長作用等、それぞれの細胞に付随する細胞外マトリックスの作用や trophic factor の複雑なネットワークの関与が予想される。

逆行性神経細胞変性のメカニズムの評価
幼弱動物の軸索損傷後の逆行性神経細胞変性のメカニズムの一つとしてアポトーシスが知られている。脳幹から 0.5 mm の末梢軸索損傷で顔面神経核にアポトーシスが見られることが報告された (Mattsson, J Neurosurgery 2006) が、より損傷が重度であることが想定される脳幹内損傷では全く手がかりがない。

(2) 自家末梢神経移植による神経保護作用

軸索損傷が神経細胞体から遠いほど神経細胞死が起こりにくいことにより、切断部位よりも遠位の神経組織が放出するニ

ユーロトロフィンやサイトカイン、各種成長因子などの神経栄養因子がなんらかの輸送機構により細胞体に運搬されることで保護作用を示すと考えられている。シュワン細胞脳幹内移植による顔面神経核の神経保護作用の解明は臨床的に脳幹損傷の治療に大きな貢献が期待できるものである。

(3) 自家筋組織移植による神経保護作用
Zompaら J Neurotrauma, 1997、Banks ら Int. J. Dev. Biol., 2002、Arceら J Neuroscience, 1998, らの報告から、筋組織には物理的支持組織としての働きのみならず、筋組織培養の上清や筋組織からいまだ同定されない神経成長維持因子の存在が想定されている。

(4) 造血因子エリスロポエチン投与による神経保護作用の評価
逆行性神経細胞変性を誘発する因子として、GDNF, BDNF等の神経成長栄養因子とその受容体の欠落、アポトーシス因子、フリーラジカル等が推測され、フリーラジカルに属する一酸化窒素 (NO) は神経細胞においても生成され、神経伝達物質様作用、細胞内セカンドメッセンジャーとしての役割等を有している。erythropoietin, (EPO) は、造血作用のほか神経の発生と発達、脳の恒常性の維持を担っていると考えられており、特に顔面神経に関しては、産生されたNOが細胞死を誘発する一方、神経保護作用的側面も報告されている。遺伝子組み換えヒトエリスロポエチン (recombinant human EPO, rhEPO) の投与による脳脊髄虚血や外傷後の神経細胞死抑制作用が本モデルで確認されれば臨床治療につながるものである。

(5) CaブロッカーであるNimodipineが、顔面神経核の生存を促進する (Mattssonら、J Neurosurgery 1999)。さらに強い生存維持促進薬剤の同定、評価は急務である。神経自己防御機構として働く細胞内cAMPを増加させ、保護作用のみか再生作用を併せ持つとされるHFGの産生を促すとされるシロスタゾールの効果の有無を検討した。

3. 研究の方法

実験モデルの作成

定位脳装置に固定したラットの頭頂部正中に約4cmの皮膚切開を加え、右後頭骨に7mm×20mmの骨窓を設けた(図1a)。ブレグマから尾側に10mm、腹側に8mm、正中から1mm外側に存在する脳幹内の顔面神経膝部に向かい、水平から45度下方の角度に固定したマイクロメスを、横静脈洞の損傷を避け、経小脳的に切断した(図1b)。完全顔面神経軸索切断



図1a

がえられたことは、麻酔覚醒後手術翌日まで損傷側の頬髭に全く動きが見られないことで確認した。術後わずかでも損傷側の頬髭に動きが見られた場合には、不完全損傷として対象より除外した。

Brain stem injury model

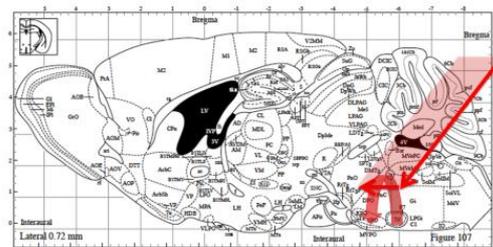


図1b

生存細胞数のカウント

各手技の2週、4週後に灌流固定ののちに、固定包埋し、20μmの厚さに薄切し、ニッスル染色で顔面神経核における顔面神経細胞の生存率を計測した。ニッスル染色後、Hottingerら³⁰⁾の方法に基づいて、グリア系細胞を除外し、核と核小体が明染される直径20μm以上の細胞を生存神経細胞としてカウントした。

自己末梢神経組織、自己筋組織移植

大腿から坐骨神経、後頸部より僧帽筋の一部を5-10mm長採取し、自己移植組織とした。いずれも定位脳的脳幹内軸索損傷作成後に、同部位から2mm深部まで切断部に向かって3分かけて緩徐に挿入した。

エリスロポエチン投与

rhEPOを、500単位/kg、5000単位/kg、10000単位/kgをそれぞれ手術の24時間前、手術直後、以後24時間ごとに連日腹腔内投与した。

シロスタゾール投与

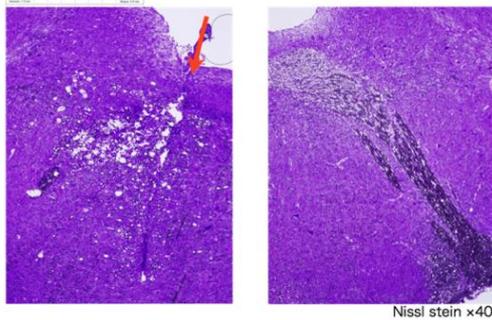
軸索損傷モデルラットに0.03%および0.1%濃度のシロスタゾール混合飼料を2週間投与し、ニッスル染色で顔面神経核における顔面神経細胞の生存率を計測した。

神経逆行性変性の評価

神経細胞逆行性変性過程におけるNOの関連をNADPH-diaphorase染色を用いて検討した。アポトーシスはTUNEL法を用いて、検討した。

4. 研究成果

各実験群の顔面神経細胞生存率の概要
脳幹内軸索の切断とその末梢のワーラー変性を確認した(図2)。術後7日目における顔面神経細胞生存率は末梢損傷群で100%、引図2



き抜き損傷群で95%であるのに対し脳幹内損傷群では31%で、脳幹内軸索損傷により有意に低下した ($p < 0.01$)。末梢神経脳幹内移植群で術後7日で44%、28日で20%の生存率であり、移植操作により逆行性変性は有意に抑制された ($p < 0.01$)。術後28日目では、末梢損傷群で90%であるのに対し、引き抜き損傷群で50%、脳幹内損傷群で2.3%と有意に生存率が低下した ($p < 0.01$) (図3a-e)。

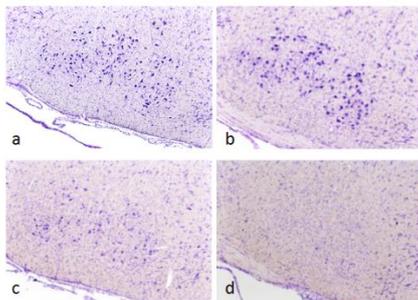


図3 a-d. a;コントロール、b;末梢遠位損傷、c;末梢近位損傷、d;脳幹内軸索損傷

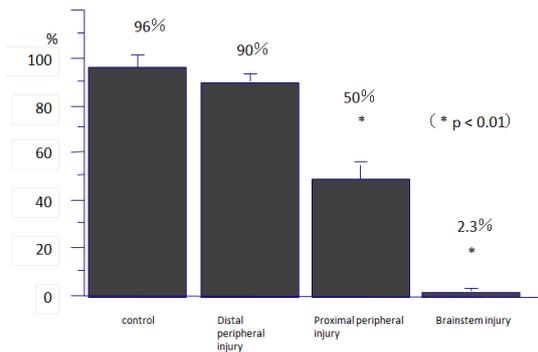


図3e

周辺のグリア細胞には明らかな変化は見られなかった。以上より、顔面神経軸索損傷後の神経細胞の生存には、神経核周辺のグリアの関与は軽微で、損傷部位よりも末梢に存在するシュワン細胞が脳幹内の損傷においても神経細胞死の抑制に大きく関与していることが示唆された。

末梢神経脳幹内移植群で術後7日で44%、28日で20%の生存率であり、移植操作により逆行性変性は有意に抑制され ($p < 0.01$)、末梢シュワン細胞が脳幹内でも大きな神経保護作用を示した(図4)。

Survival rate of facial motoneuron (%) on day 28

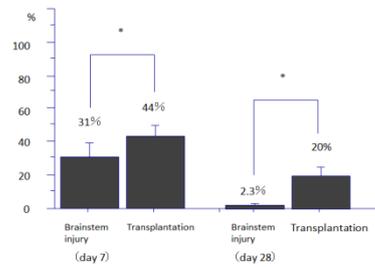


図4

筋組織移植では14日で42%、28日で6.8%の生存率を示し、損傷早期においては、自家筋移植操作が末梢神経移植群より変性抑制効果が見られたものの、28日ではコントロールと有意な差は見られなくなった。これは筋組織からの neurotrophic factors が神経保護並びに生存維持に働くものの筋組織そのものの血流不足から早期に変性に陥ることが一因と考えられた(図5)。

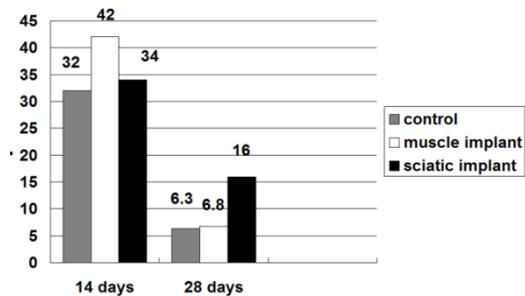


図5

エリスロポエチン投与による神経保護効果とNADPH-diaphorase陽性細胞の発現変化
正常組織では星状膠細胞膜がEPO陽性、顔面神経細胞膜がEPO-R陽性、かつそれぞれの細胞はNADPH-diaphorase陰性であった。EPO投与による生存神経細胞は、第7病日で61%、第14病日で43%、第28病日で8.2%と有意に増加した (Figure)。顔面神経軸索損傷により、顔面神経核周辺にEPO陽性星状膠細胞が集積した。一方、生存顔面神経細胞に占める

NADPH-diaphorase陽性細胞の比率は、第4病日で20%、第7病日で47%、第14病日で99%、第28病日で91%であった。rhEPOを連日腹腔内投与（5000U/kg）することにより、NADPH-diaphorase陽性顔面神経細胞の比率は有意に低下し、第7病日で35%、第14病日で75%、第28病日で81%であった。以上の結果より、ラット顔面神経脳幹内損傷軸索に対して外因性rhEPOが、顔面神経細胞の逆行性変性、脱落を抑制することがわかった。これは、脳幹内損傷顔面神経細胞の逆行性変性・脱落にNOによる酸化ストレスが関与し、外因性rhEPOがこれを抑制することにより神経保護作用を示すことが推察された（図6）。

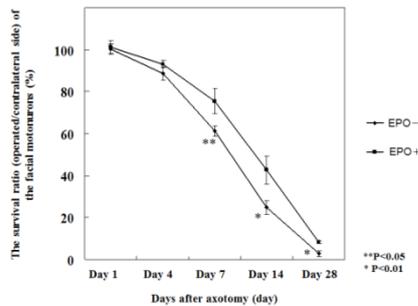


図 6

シロスタゾール投与

今回の検討した2週間投与では顔面神経細胞の生存率はコントロール 27%、0.03%群 31%、0.1%群で26%であった（図7）。

臨床的には各群において髭の動きに程度の

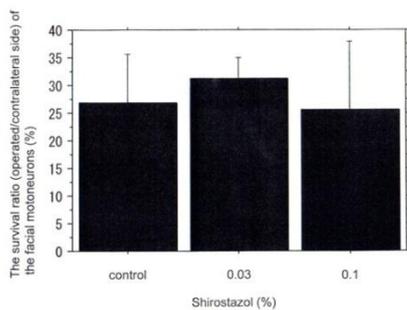


図 7

差は確認できなかった。生存細胞数に各群で差は見られず、神経保護作用はないものと推察された。しかしながら顔面神経麻痺による摂餌量が悪く神経損傷モデルで本薬剤の摂取量は不十分であった可能性があり、cAMPの増加、HGFの産生を促すとされるシロスタゾールの神経保護作用の方向があることから、本モデルでのさらに厳密な評価には強制経口摂取等の投与方法の検討が必要と思われる。

細胞死のメカニズム

脳幹内顔面神経軸索損傷モデルではapoptotic bodyや、TUNEL陽性細胞は1-4週を通じて確認できず、逆行性変性にアポトーシスの関与は確認できなかった。脳幹から0.5 mmの顔面神経損傷で、末梢神経部分の軸索損傷に相当の検討（Mattssonら、J Neurosurgery, 2006）ではアポトーシスの関与が示唆されており、我々の結果と相違がみられた。脳幹内の損傷はより軸索損傷が重症で、末梢からのneurotrophic factorが枯渇することで細胞死が急速に進むために変化を把握できない可能性は否定できないものの、アポトーシスとは全く異なった経路で細胞死を迎える可能性を否定できない。

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17件）

- ① A Kondo, M Hasegawa et al A proposal for standardized analysis of the results of microvascular decompression for trigeminal neuralgia and hemifacial spasmActa Neurochir (Wien). 2012 査読有
- ② 長谷川光広 顔面神経の治療は？—神経血管减压術の立場から— Journal of Otolaryngology, Head and Neck Surgery 27(10), 1579-1581, 2011 査読有
- ③ Hirose Y, Hasegawa M, Yoshida K, 他8名. Whole genome analysis from microdissected tissue revealed adult supratentorial grade II-III gliomas are divided into clinically relevant subgroups by genetic profile. Neurosurgery. 69(2):376-90, 2011 査読有
- ④ 長谷川光広 無症候性脳腫瘍の治療方針 日本がん検診・診断学会誌, 17(3):251-4, 2010. 査読有
- ⑤ Fujisawa H, Hasegawa M, Ueno M. Clinical features and management of five patients with supratentorial subependymoma. J Clin Neurosci 17(2):201-204, 2010 査読有
- ⑥ 長谷川光広 Hemifacial spasmに対する脳神経减压術-基本手技とピットフォール- 脳神経外科速報 20(5) 526-531, 2010 査読無
- ⑦ H Shima, M Hasegawa, 他6名, Ocular dominance affects magnitude of dipole moment: An MEG study NeuroReport 21(12), 817-821, 2010 査読有
- ⑧ 長谷川光広 脳腫瘍摘出術の現状と展望日本外科系連合学会誌 34(4), 676-677, 2009 査読有
- ⑨ Hayashi Y, Hasegawa M, 他5. Intracranial

extension of meibomian gland carcinoma with pagetoid changes. J Clin Neurosci. 16(4):568-70. 2009 査読有

[学会発表] (計26件)

- ① Hasegawa M, Anatomy and surgery for para-clinoid region and cavernous, WFNS Educational Course 2011.12.12, 2011, Hanoi, Vietnam
- ② M Hasegawa, Strategy for dissection of tumor capsule from the critical neural and vascular structures in skull base meningiomas, Third International MASSIN Congress 2011, July 13-15, Seattle, USA
- ③ 長谷川光広、廣瀬雄一ほか、頭蓋底髄膜腫における腫瘍被膜と周辺重要脳組織の剥離操作, 日本頭蓋底外科学会 2011.6.16-17、大阪 Hasegawa M,
- ④ Contemporary management of vestibular schwannomas based on surgical pathology and experimental study, The first Conference on Cerebellopontine Angle Region Micro-Dissection and Micro-Surgical Technique, 2011, 05.28, Shanghai, China
- ⑤ Hasegawa M, Yoshida K, Hirose Y, et al., Surgical pathology of brain-tumor interface for epi- and subpial meningioma dissection 第29回日本脳腫瘍病理学会 2011.5.20-21 東京
- ⑥ M Hasegawa, Strategy for dissection of tumor capsule from the critical neural and vascular structures in meningioma surgery - clinicopathological analysis, 8th Asian Congress of Neurological Surgeons 2010, 11.23 Kuala Lumpur, Malaysia
- ⑦ M Hasegawa Strategy for dissection of tumor capsule from surrounding neural and vascular structures in skull base meningiomas BASECON 2010, 12th Annual Conference of Skull base Surgery Society of India 2010, 10.09 Trivandrum, India
- ⑧ 長谷川光広、廣瀬雄一、吉田耕一郎ほか、頭蓋底髄膜腫における剥離操作、第15回日本脳腫瘍の外科学会 2010, 10.01、大阪
- ⑨ M Hasegawa K Yoshida S Nagahisa, et al, Surgery for orbital cavernous angioma a role of skullbase surgery The 4th Harbin International Neurosurgical Conference 2010, 07.1 Harbin, China
- ⑩ 長谷川光広、吉田耕一郎、安達一英ほか、脳神経減圧術における必須事項と無駄、第13回日本脳神経外科減圧術学会 2011, 1.20 広島
- ⑪ 長谷川光広、廣瀬雄一、川瀬司ほか、眼窩内腫瘍性病変の外科的治療戦略と機能温存

日本脳神経外科学会第69回学術総会 2010, 10.27 福岡

- ⑫ 長谷川光広、Transpetrosal approach: 微小外科解剖と基本手技日本脳神経外科学会第69回学術総会 2010, 10.29 福岡
- ⑬ Hasegawa M, Posterior transpetrosal approach The 3rd Quadrennial Meeting of The World Federation of Neuro-Oncology jointly with The 6th Meeting of The Asian Society for Neuro-Oncology (ASNO) 2009, May 11-14, Yokohama
- ⑭ 長谷川光広 髄膜腫の手術—手術アプローチの選択・工夫— 第七回福岡脳脊髄治療懇話会 2009/09/24 福岡

[図書] (計8件)

- ① 長谷川光広 錐体斜台髄膜腫の治療戦略 ビジュアル脳神経外科7 2012
- ② 長谷川光広 片側顔面れん縮、今日の治療指針 2012, 792
- ③ 長谷川光広 眼窩先端部腫瘍 NS NOW No.15 傍鞍部病変の手術 (塩川芳昭編)、pp162-171, 2011
- ④ 長谷川光広、吉田耕一郎、長久伸也ほか、頭蓋底髄膜腫における剥離操作 脳腫瘍の外科第15巻(大畑建治編) pp112-117, 2011
- ⑤ Hasegawa M Foramen magnum meningioma Essentials of the Practice of Neurosurgery (ed Kalangu K), 2010, pp 187-193
- ⑥ 長谷川 光広 脳腫瘍摘出術の現状と展望 日本外科系連合学会誌 34(4), 676-677, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川光広 (HASEGAWA MITSUHIRO)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：70218460