

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25年 3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591884

研究課題名（和文） RNA解析による顔面神経麻痺の超早期予後診断法の開発－表情筋針生検材料を用いて－

研究課題名（英文） RNA expression in facial muscle following damage to the facial nerve
-As a tool of early prognostic diagnosis-

研究代表者

羽藤 直人 (Hato Naohito)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：60284410

研究成果の概要（和文）：

顔面神経障害の程度や時期により表情筋の遺伝子発現に差があるとするれば、これを指標とした顔面神経麻痺の病態診断に応用できる可能性がある。本研究では、実験動物の顔面神経に「切断と挫滅」という2種類の障害を負荷し、その後に生ずる遺伝子発現の変化を経時的に観察した。マイクロアレイ解析の結果から、Myogenin、Vesicle-associated membrane protein 2、Insulin-like growth factor binding protein 6の3種のRNAを選択し、その発現を定量化した。いずれも、切断群での発現増加は挫滅群よりも著しく、7、14日目において統計学的に有意差を認めた。麻痺の予後は挫滅群の方が切断群よりも有意に良好であることから、遺伝子解析は予後診断に応用できる可能性がある。特にMyogeninは反応特異性に優れていた。今後は、臨床応用を念頭に、研究を継続予定である。

研究成果の概要（英文）：

This study investigated and identified differentially expressed facial muscle genes in rats with facial nerve damage. Two types of adult Wistar rats: 1) the main trunk of the facial nerve was transected (Group A) and 2) the main trunk was compressed for ten minutes (Group B) were used for the analysis. Global gene expressions of facial muscles were analyzed using a micro-array system. A total of 26,835 RNA molecules were examined. Myogenin mRNA expression increased to the highest level at 7 days after denervation, thereafter it gradually decreased in Group A. Vesicle-associated membrane protein 2 and insulin-like growth factor binding protein 6 expression increased at 7 and 14 days in Group A.

The gene expression was different depending on the degree of the facial nerve damage. Therefore, we concluded that analysis of the facial muscle profile gene expression could be a possible diagnostic tool for use in as the prognosis after facial nerve injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：顔面神経、神経挫滅、マイクロアレイ法、RNA解析

1. 研究開始当初の背景

急性の末梢性顔面神経麻痺は、耳鼻咽喉科の日常臨床において最も頻繁に遭遇する末梢神経疾患の一つであり、一般に頭部外傷や腫瘍などによるものを除けば、麻痺の予後は概して良好である。しかし高度麻痺例の中には保存的治療で回復せず、麻痺後遺症が残ることも少なくなく、このような予後不良例をいかに早期に検出し適切に治療するかが大きな課題となっている。現在、顔面神経麻痺の予後診断には主に顔面運動評価法と電気生理学的診断法が用いられているが、いずれも麻痺程度や神経変性程度を評価しているに過ぎず、高度麻痺例の予後診断には適さない。

2. 研究の目的

我々は顔面神経障害後にみられる顔面表情筋の変化に着目した。もし顔面神経障害の程度や時期により表情筋の遺伝子発現に差があるとするれば、これを指標とした顔面神経麻痺の病態診断に応用できる可能性がある。本研究では、実験動物の顔面神経に「切断と挫滅」という2種類の障害を負荷し、その後に生ずる遺伝子発現の変化を経時的に観察し、発現した遺伝子の役割や研究成果の臨床

応用への可能性について考察した。

3. 研究の方法

実験動物には10週齢、雄のウィスター系ラットを用いた。右側の耳後部を切開して側頭骨外で顔面神経を露出、茎乳突口から約5mmの部位に次のいずれかの障害を加えた。すなわち、神経を完全に切断し末梢側を5mmにわたって切除した神経切断モデル（以下、切断群）と、マイクロ持針器を用いて10分間圧迫を加えた神経挫滅モデル（以下、挫滅群）の2種類を作製した。さらに神経を露出するだけで切断や挫滅などの障害を加えないsham operationを行ったものをコントロールとした（以下、コントロール群）。これらの処置後、経時的に眼瞼やヒゲの動きを肉眼的に観察し、表情運動の評価を行った。また、処置後7日目には神経障害程度の定量的評価としてElectroneuronography (ENoG)を測定した。ついでマイクロアレイ法を用いて顔面表情筋における遺伝子発現を検討した。その結果をもとに、障害後早期に発現する3種のRNAに着目して、定量評価を行うとともに、in situ hybridization法を用いて顔面表情筋におけるRNA発現の局在を検討した。

4. 研究成果

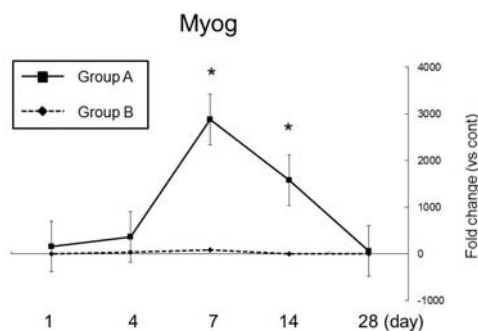
1) 顔面運動の評価

両群とも処置直後より眼瞼やヒゲの動きが消失し、完全麻痺を呈した。切断群では28日を過ぎても表情運動が回復しなかったのに対し、挫滅群は10日目頃より徐々に表情運動が回復し、平均 17.6 ± 2.8 日で治癒に至った。ENoG値は処置後7日目の切断群で0%、挫滅群で $5.8 \pm 2.4\%$ であった。

2) 顔面表情筋における RNA 発現のマイクロアレイ解析

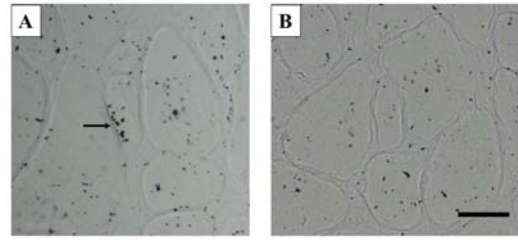
マイクロアレイ解析の結果、計26,835個のラット遺伝子の発現データを得た。切断群、挫滅群のコントロール群に対する変化割合が2倍以上増加したRNAの数は、検査時期によらず切断群は挫滅群よりも多く、その差は28日目で最も顕著であった。

3) 顔面表情筋における RNA 発現の定量評価
マイクロアレイ解析の結果より、myogenin (Myog)、vesicle-associated membrane protein 2 (Vamp2)、insulin-like growth factor binding protein 6 (Igfbp6)の3種類のRNAを選択し、その発現を定量化した。いずれも、切断群での発現増加は挫滅群よりも著しく、7、14日目において統計学的に有意差を認めた。



4) 顔面表情筋における RNA 発現の局在
処置後7日目の切断群では、MyogのRNA発現増加は顕著であり、顔面表情筋の筋線維辺

縁に強い放射線活性がみられ、筋衛星細胞での発現増加が示唆された。



考察

本研究では顔面神経に「切断と挫滅」という2種類の障害を加え、その支配筋である顔面表情筋に発現する遺伝子の変化を解析した。その結果、処置後1週目の電気生理検査でいずれも高度障害と評価されたものの、両者の遺伝子発現には大きな差異が認められた。早期のRNA発現の増加は、MyogやVamp2が神経切断後の筋衛星細胞において発現が増加すること、またIgfbp6はIGF1を介して筋衛星細胞を活性化させることなどから、表情筋における代償反応と考えることができる。一方、神経挫滅によりRNA発現に変化がみられなかったことは、生理学的な神経変性のみでは筋衛星細胞の活動性は変化しないことを意味している。本研究で得られた遺伝子発現変化のデータに基づいて、顔面神経麻痺患者から障害早期に針生検などで顔面表情筋を少量採取し、RT-PCR法を用いてRNA発現量を定量することで、それをマーカーとした神経障害程度の診断に応用できる可能性がある。

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〕（計2件）

1. Teraoka M, Hato N, Takahashi H, Komobuchi H, Sawai N, Okada M, Hakuba N. Myogenin expression in facial muscle following damage to the facial nerve. Acta Otolaryngol 132(7), 2012, 783-787. 査読有り

2. 羽藤直人. Bell 麻痺、Hunt 症候群. Clinical Neuroscience 28. 2010, 338-339. 査読有り

〔学会発表〕（計4件）

1. Hato N MD, Nota J MD, Komobuchi H MD, Teraoka M MD, Yamada H MD, Gyo K MD, Yanagihara N MD and Tabata Y* PhD, Delayed Decompression Surgery for Severe Facial Nerve Paralysis using bFGF in a Gelatin Hydrogel. The 9th International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery. 2012年06月03日～2012年06月07日 長崎

2. 羽藤直人、能田淳平、菰渕勇人、澤井尚樹、寺岡正人、暁 清文, Bell 麻痺に対する再生促進顔面神経減荷手術. 第35回 日本顔面神経研究会 2012年05月31日-2012年06月01日. 福島

3. Hato N. Facial Nerve Decompression Surgery with Gelatin Containing bFGF, AAO-HNS, 2011.9.14, 米国、サンフランシスコ

4. 羽藤直人. 側頭骨骨折への対応：顔面神経障害を中心に. 顔面神経研究会. 2010年5月28日. 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽藤 直人 (Hato Naohito)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：60284410

(2) 研究分担者

脇坂 浩之 (Wakisaka Hiroyuki)
愛媛県立医療技術大学保健科学部・教授
研究者番号：30304611