

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592160

研究課題名(和文) 神経栄養因子と上皮成長因子(EGF)受容体制御による末梢神経再生

研究課題名(英文) An EGFR inhibitor induces Schwann cell proliferation and promotes functional recovery with remyelination in injured peroneal nerve after end-to-side neuroorrhaphy

研究代表者

若林 良明(WAKABAYASHI, YOSHIAKI)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：00431916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、培養シュワン細胞を用いてEGFR阻害薬(EGFRi)の働きを解析し、ラット腓骨神経切断モデルで腓骨神経切断端を脛骨神経に端側吻合する(ETS)縫合を用い、EGFRiの末梢神経再生における有用性を検討した。EGFRiの使用により、培養シュワン細胞の増殖活性と栄養因子の発現増加が観察された。さらにETS神経縫合後のEGFRi局所投与によって再生ミエリン数の増加と神経機能の早期改善が得られた。本研究結果によって末梢神経再生において神経縫合部へのEGFR阻害薬の局所投与が早期機能回復に有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tested whether the inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) regulates neurite extension in DRG neurons or Schwann cell (SC) proliferation in vitro and nerve regeneration in injured peroneal nerves after end-to-side neuroorrhaphy (ETS). The in vitro results showed that regeneration of neurites from explanted DRG neurons was not significantly accelerated by administration of EGFR inhibitor (EGFRi). In contrast, the number of SCs was increased with EGFRi treatment as shown by a viability assay. Rat peroneal nerve was cut and then ETS was performed 3 weeks later. EGFRi was infused by osmotic pump at the injury site for 7 days. After the surgery, motor score was increased significantly at 2 weeks and the amount of myelin in the peroneal nerve was increased significantly at 4 weeks in the EGFRi infusion group. These findings suggest that local administration of EGFRi has the potential to increase functional recovery after peripheral nerve injury.

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：神経再生 上皮成長因子受容体 神経栄養因子 末梢神経損傷

1. 研究開始当初の背景

整形外科領域において末梢神経再建は、脊髄再生と並ぶ大きな目標である。過去にさまざまな工夫がなされ微小手術外科手技の発展によって神経束縫合が行われ比較的良好な成績が得られるようになった。しかし、高エネルギー損傷や創挫滅の強い症例では神経欠損部位が広く、神経断端が短縮してしまうために一次縫合できない症例がある。断端を架橋するためにさまざまな方法が開発されている。我々の研究グループでは、キトサンチューブを生体材料として開発し応用している。しかし、人工神経単独では、神経再生に時間がかかるため軸索再生阻害因子としての Rho GTPase の制御を目的に組換えアデノウイルス投与の併用を用いて神経再生実験を行った。その結果、rac と rho の dominant negative タイプの遺伝子を組み合わせることで神経断端に感染させることによって人工チューブのみと比較して約2倍ものミエリン軸索を持つ再生神経を得ることができた (Enhancement of sciatic nerve regeneration by adenovirus-mediated expression of dominant negative RhoA and Rac1 Kusano K, Enomoto M, Wakabayashi Y, et al., Neurosci Lett 2011)。しかし、本治療方法を用いても機能回復は、不十分でラット足趾の拘縮や筋萎縮が残存するケースが多く認められ、架橋部位でのミエリン化した再生軸索は、運動神経線維よりも知覚線維優位であることが推測された。このように齧歯類での末梢神経損傷であっても十分な運動機能の再獲得は難しい。よって運動神経の再生メカニズムをより明らかにするには再生能の高い環境が必要である。

臨床例では、端々吻合可能な場合は、正確な神経縫合を行い、大きな欠損を伴う場合は、通常、縫合部の緊張を防ぐためにも遊離神経自家移植片を用いた神経再建が行われる。一方、神経断端を正常神経に吻合する端側吻合に関しては、顔面神経麻痺の治療に機能回復が得られたことが報告されている。しかし、同手法による神経発芽および再生のメカニズムはいまだ不明な部分が多い。よって端側吻合を用いた神経再生モデルで基礎研究を行うことは、新規に神経再生のメカニズムを明らかにして基礎研究での成果を臨床に発展・応用できる可能性がある。

2. 研究の目的

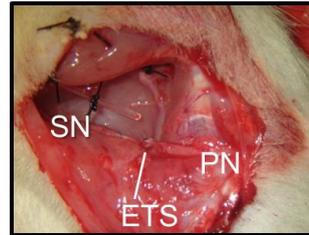
末梢神経は、中枢神経損傷と異なりシュワン細胞の増殖および再生軸索支持によって再生能を有しているが、損傷範囲が広範であれば再生に時間がかかり不可逆的な機能障害が残存する。よって神経軸索伸長およびシュワン細胞の活性を促し再生時間を短縮する必要がある。本研究では、ラットの末梢神経切断モデルを作製し、末梢神経断端に発現する上皮成長因子 (EGF) と受容体 (EGFR) に注目し、神経発芽のメカニズムを解析する。さらに切断神経端を正常神経に吻合するこ

とで側枝発芽を促し、末梢神経再生を促す積極的な方法を開発することが目的である。

3. 研究の方法

3-1 末梢神経損傷・再建モデルの作製

ラット坐骨神経遠位部を展開し腓骨神経を露出させ分岐部で切断する。切断から3週後、変性した腓骨神経を脛骨神経に縫合し再建する。切断によって起こるワラー変性後のシュワン細胞の影響を観察するために切断後3週で再建した。



3-2. 運動機能テスト

経時的に後肢足底のビデオ撮影とフットプリントテストを行い、機能回復を定量化した。定量化には、足底の荷重面、足趾の開きを計測して sciatic nerve function index (SFI) と peroneal nerve function index (PFI) を算出した。

3-3. 知覚テスト

神経縫合のホストである脛骨神経に対する知覚異常の有無を確認するために経時的に脛骨神経知覚領域にアセトンテスト (冷感)・熱刺激テスト (熱感)・von Frey テスト (アロディニア) を施行した。

3-4. 切断腓骨神経断端での EGF と EGFR の発現

シュワン細胞は、様々な神経栄養因子を分泌する。非損傷時、腓骨神経切断後3週で切断端の上皮成長因子 (EGF) および受容体 (EGFR) の発現を real-time PCR を用いて解析した。

3-5. ETS 後の EGFR 阻害薬治療の効果

成ラットの腓骨神経切断3週後に断端を脛骨神経 (TN) に端側 (end-to-side: ETS) 縫合した。EGFR 阻害薬 (EGFR1 群; AG1478 濃度 10 nM) もしくは溶媒 (対照群; DMSO) を浸透圧性のミニポンプを用いて1週間局所した。縫合後8週まで経時的に腓骨神経運動評価 (PFI) と知覚評価 (Acetone test・von Frey test・Heat response) を行った。

3-6. 組織学的評価

ETS 縫合後、経時的に腓骨神経のミエリン数評価 (toluidine blue 染色) を行い、各群で比較した。

3-7 シュワン細胞と培養後根神経節 (DRG) を用いた EGFR 添加による効果

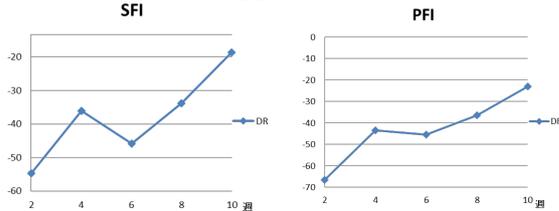
3-7-1 成ラット坐骨神経から単離したシュワン細胞 (10000 個/well) を培養し、培養液中に EGFR 阻害薬 (EGFR1 群; AG1478 濃度 10 nM) と溶媒 (対照群; DMSO) を添加した。培養3日目に Cell Counting Kit-8 を用いて細胞数を測定した。また、Real time-PCR 法で培養シュワン細胞での BDNF・GDNF・VEGF

の発現を比較した。

3-7-2成ラットから単離した腰部DRGを半割し、NGF含む培養液中にEGFR阻害薬(EGFR1群; AG1478 濃度 10nM)と溶媒(対照群; DMSO)を添加しコラーゲン担体上で培養した。培養10日目に-tubulin抗体により免疫染色し伸長した軸索長を計測した。

4. 研究成果

4-1. ETS後の後肢運動と知覚機能の回復

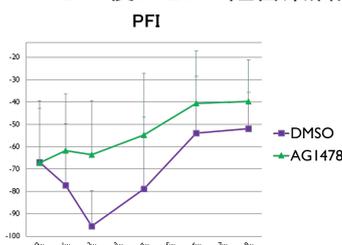


ETS後10週間で腓骨神経機能は回復した(上図)。SFIは、6週で機能低下が観察されたが、腓骨神経再生を観察しているので今後はPFIを用いて運動機能評価とした。知覚機能は、ETS後4週は、機械、冷感刺激に過敏となっていた。

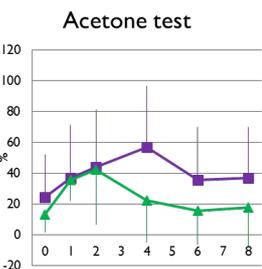
4-2 EGFおよびEGFR mRNAの腓骨神経切断断端での発現

EGFおよびEGFR mRNAは正常腓骨神経組織での発現はわずかで切断後3週経過した組織では正常組織と比較してそれぞれ約3倍、1.3倍の発現増加を認めた。神経切断に伴い変性が進行しEGFおよびEGFRが過剰に発現していた。

4-3 ETS後のEGFR阻害薬治療の効果

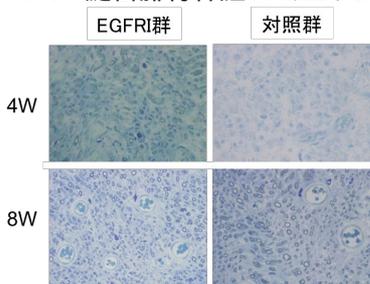


EGFR阻害薬を局所投与したほうが運動機能の回復が良好であった(上図)。



知覚テストでは冷感に対する過敏性がEGFR阻害薬を投与したほうが減少傾向にあった(左図)。

4-4 縫合腓骨神経のミエリン数の変化

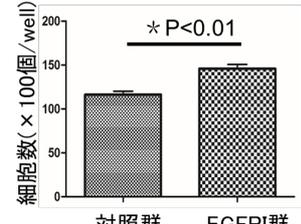


左図説明：EGFR1群のほうが再生ミエリンの数が多かった。

縫合した腓骨神経中央部の250x250μm²のエリアに含まれるミエリン数を計測した結果、EGFR阻害薬投与群では、縫合後4週で再生ミエリン数の有意な増加が観察された。

4-2 EGFR阻害薬による培養シュワン細胞の反応

増殖活性と栄養因子の発現：EGFR阻害薬添加群では、シュワン細胞数が有意に増加し(右図)、



BDNF, GDNF, VEGF

のmRNAの発現増強が認められた。

対照群を1とした場合、BDNFは4倍、GDNFは13倍、VEGFは70倍の発現であった。

4-3 EGFR阻害薬による培養後根神経節の反応

EGFR阻害薬添加群では、再生軸索がより伸長する傾向があったが有意差は得られなかった。

4-4 まとめ

末梢神経損傷環境では、EGFとEGFRの発現が増強していた。切断腓骨神経を3週経過した時点で脛骨に縫合(端側吻合:ETS)すると10週間で機能回復が得られた。ETS後にEGFRの発現を抑制するためにEGFR阻害薬を局所投与すると縫合2週間後からEGFR阻害薬投与群で有意に運動機能改善を認め、知覚機能も改善傾向であった。しかし、縫合後6週以上観察すると対照群とEGFR阻害薬投与群で運動、知覚機能に有意差が認められなくなった。このことは変性した腓骨神経切断端を脛骨神経に縫合しているにもかかわらず、縫合後一定期間を経ると神経再生が急速に起こるためと推測された。筋収縮には少数の運動神経線維の再生で比較的十分であり、ETS縫合後6週は機能回復に十分な期間であったと考えられた。今後は、神経再生が困難な環境下でEGFR阻害薬投与実験を継続していく予定である。また、in vitroの結果からEGFR阻害薬は、培養シュワン細胞の増殖活性を増強し、神経栄養因子であるBDNF、GDNFおよび血管内皮増殖因子VEGFの発現を増強させることが明らかとなった。本研究計画からETS後に投与したEGFR阻害薬は、主にシュワン細胞に作用して増加活性を示し、神経栄養因子の分泌や血管誘導によって末梢神経再生に必要なミエリン形成を促進し、軸索再生に寄与しているものと推測された。

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13件)

Nimura A, Fujishiro H, Wakabayashi Y, Imatani J, Sugaya H, Akita K. Joint capsule attachment to the extensor carpi radialis brevis origin: an

anatomical study with possible implications regarding the etiology of lateral epicondylitis. *J Hand Surg Am.* 2014 39(2):219-25. doi: 10.1016/j.jhsa.2013.11.036. 査読有 Shimura H, Wakabayashi Y, Nimura A. A novel closed reduction with extension block and flexion block using Kirschner wires and microscrew fixation for mallet fractures. *J Orthop Sci.* 2014 19(2):308-12. doi: 10.1007/s00776-013-0526-7 査読有 Wakasugi T, Shirasaka R, Kimura H, Wakabayashi Y. Flexor tendon rupture of the little finger caused by calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease of the pisotriquetrum joint. *Hand Surg.* 2013;18(3):413-5. doi: 10.1142/S0218810413720271. 査読有 上腕骨骨頭の骨軟骨損傷に対して試みた骨軟骨移植術 能瀬 宏行, 中川 照彦, 若林 良明 肩関節 37 巻 2 号 Page881-884(2013.09) 査読有 重症手根管症候群における第 2 虫様筋複合筋活動電位の有用性 鈴木 英嗣, 若林 良明, 二村 昭元, 大川 淳 日本手外科学会 雑誌 (2185-4092)30 巻 3 号 Page245-247(2013.12) 査読有 徒手整復不能であった PIP 関節掌側回旋脱臼の 1 例 文献的考察を中心に 菅田 祐美, 太田 剛, 若林 良明, 石突 正文 日本手外科学会雑誌(2185-4092)29 巻 6 号 Page786-789(2013.04) 査読有 豆状三角骨関節の変形性関節症による小指屈筋腱皮下断裂の 1 例 雨宮 正樹, 志村 治彦, 新井 嘉容, 奥田 直樹, 片山 隆之, 上小鶴 正弘, 若林 良明, 大川 淳 関東整形災害外科学会雑誌 (0389-7087)44 巻 3 号 Page71-75(2013.06) 査読有 【手の外科-最新的话题-】(Part2)臨床診断 上肢における患者立脚評価 若林 良明, 二村 昭元, 大川 淳 *Bone Joint Nerve*(2186-1110)3 巻 2 号 Page207-212(2013.04) 査読無 両側特発性手根管症候群の片側手術後における非手術側の臨床経過 鍋木 秀俊, 若林 良明, 二村 昭元, 平井 高志, 大川 淳 日本手外科学会 雑誌 (2185-4092)29 巻 5 号 Page470-472(2013.02) 査読有 Li W, Enomoto M, Ukegawa M, Hirai T, Sotome S, Wakabayashi Y, Shinomiya K, Okawa A. Subcutaneous injections of platelet-rich plasma into skin flaps modulate proangiogenic gene expression and improve survival rates. *Plast Reconstr Surg.* 2012 129(4):858-66. doi:10.1097/PRS.0b013e

3182450ac9. 査読有

手根管部における trigger wrist の治療 経験 志村 治彦, 太田 剛, 若林 良明, 二村 昭元 日本手外科学会雑誌 (2185-4092)29 巻 3 号

Page287-289(2012.12) 査読有

肘部管症候群の臨床評価における上肢障害評価表(DASH)の選択項目(スポーツ/芸術活動、仕事)の有用性の検討 若林 良明, 二村 昭元, 鍋木 秀俊, 大川 淳 日本手外科学会雑誌 (2185-4092)29 巻 3 号 Page184-187(2012.12) 査読有

【運動器疾患に対する最小侵襲手術】骨折手術 関節・近傍骨折 マレット骨折に対するマイクロスクリュー固定法 志村 治彦, 若林 良明, 二村 昭元, 佐藤 哲也 別冊整形外科 (0287-1645)59 号 Page179-182(2011.04) 査読無

(学会発表)(計 15 件)

若林 良明, 二村 昭元, 藤田 浩二, 鍋木 秀俊, 鈴木 英嗣, 請川 円 ヘバーデン結節に対する DIP 関節固定術の治療成績 第 28 回東日本手外科研究会 2014 年 2 月 東京

若林 良明 手・指の関節症の治療第 3 回 かずさ整形外科トライアングルフォーラム(招待講演)2013 年 12 月 木更津市 請川 円, 榎本 光裕, 鍋木 秀俊, 若林 良明, 大川 淳 EGF 受容体阻害薬を用いた末梢神経再生の促進 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013 年 10 月 千葉

若林 良明, 望月 智之, 林 将也, 宗田 大, 大川 淳 トップレベルラグビー選手の手根部外傷の治療経験 第 39 回日本整形外科スポーツ医学会学術集会 2013 年 9 月 名古屋市

鈴木 聡, 若林 良明, 吉村 英哉, 二村 昭元, 望月 智之, 宗田 大 HAGL 病変修復後の腋窩神経麻痺に対し神経剥離を施行した 1 例 第 40 回日本肩関節学会 2013 年 9 月 京都市

若林 良明, 川端 茂徳, 望月 智之, 加藤 剛, 古賀 大介, 吉井 俊貴, 高橋 誠, 宗田 大, 大川 淳 整形外科後期研修における大学・専門病院と一般病院の役割 -後期研修医の手術経験調査より-第 86 回日本整形外科学会学術総会 2013 年 5 月 広島

鈴木 英嗣, 若林 良明, 二村 昭元, 鍋木 秀俊, 大川 淳 重症手根管症候群における第 2 虫様筋複合筋活動電位の有用性についての電気生理学的検討 第 56 回日本手外科学会学術集会 2013 年 4 月 神戸 志村 治彦, 二村 昭元, 若林 良明, 大川 淳, 秋田 恵一 尺骨鉤状突起に付着する軟部組織の解剖学的検討 第 56 回日本手外科学会学術集会 2013 年 4 月 神戸

若林 良明, 二村 昭元, 鍋木 秀俊, 鈴木 英嗣, 大川 淳 手根管症候群の臨床評価における上肢障害評価表(DASH)の選択項目

(スポーツ/ 芸術活動、仕事)の有用性の検討 第 56 回日本手外科学会学術集会 2013 年 4 月 神戸

若林良明、二村昭元、鍋木秀俊、大川淳 肘部管症候群の臨床評価における上肢障害評価表(DASH)の選択項目(スポーツ/芸術活動、仕事)の有用性の検討 第 55 回日本手外科学会学術集会 2012 年 4 月 横浜

若林良明 VA-TCP を用いた橈骨遠位端骨折に対する治療 -Condylar Stabilizing 法の手術手技- 第 55 回日本手外科学会学術集会(招待講演)2012 年 4 月 横浜
若杉琢磨、白坂律郎、木村浩明、若林良明 Comparative Study of Early Functional Recovery And Postoperative Pain After Distal Radius Fracture Fixation, Volar Locking Plate Versus Micronail The 9th Congress of Asian Pacific Federation of Societies for Surgery of the Hand (APFSSH) 2012 年 10 月 バリ インドネシア

平井高志、榎本光裕、若林良明、横田隆徳、大川淳 Intrathecal shRNA-AAV9 inhibits target protein expression in the spinal cord and dorsal root ganglia of adult mice The 42th annual meeting of the Society for Neuroscience 2012 年 10 月 ニューオリンズ

榎本光裕、島田皓子、請川円 平井高志 若林良明 堀江正樹 大川淳 柳下和慶 Both treadmill exercise and swimming induce increase of neurotrophic factors and synaptic proteins at the chronic phase after spinal cord injury The 42th annual meeting of the Society for Neuroscience 2012 年 10 月 ニューオリンズ

若林良明 二村昭元 母指対立再建術を併施した手根管開放術前後の患者立脚型アウトカム 第 54 回日本手外科学会学術集会 2011 年 4 月 青森

〔図書〕(計 2 件)

若林良明 羊土社 臨床研修イラストレイテッド 第 1 巻 基本手技[一般処置] 改訂第 4 版 2011 5 ページ

若林良明 二村昭元 【上肢腱鞘炎の治療と予防指導】上腕骨外側上顆炎の診断と治療 M.B. Orthopaedics 2011 24 (1) 48-52

〔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

東京医科歯科大学整形外科

<http://www.tmd.ac.jp/med/orth/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若林 良明 (WAKABAYASHI YOSHIAKI)
東京医科歯科大学医歯学総合研究科講師
研究者番号: 00431916

(2) 研究分担者

榎本 光裕 (ENOMOTO MITSUHIRO)
東京医科歯科大学医学部附属病院講師
研究者番号: 90451971

大川 淳 (OKAWA ATSUSHI)
東京医科歯科大学医歯学総合研究科教授
研究者番号: 30251507