

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791951

研究課題名（和文） 顔面神経麻痺に対する臨床応用が可能な遺伝子治療の開発

研究課題名（英文） Targeted gene transfer into rat facial muscles by nanosecond pulsed laser-induced stress waves.

研究代表者

栗田 昭宏 (KURITA AKIHIRO)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：50327623

研究成果の概要（和文）：

レーザー誘起応力波”というレーザー照射による衝撃波を用いた導入法で、プラスミド遺伝子導入する。ラットの顔面神経麻痺モデルに対して上記の技術を適用した。治療効果や安全性を確認し、今後の臨床応用への可能性につき検証した。

研究成果の概要（英文）：

we successfully demonstrated gene transfer into the facial muscle by applying LISWs. This technique enables site-specific, safe, and convenient gene transfer. We plan to study the therapeutic effect of facial nerve regeneration based on this technique.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

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：遺伝子治療、レーザー、顔面神経

1. 研究開始当初の背景

顔面神経は表情筋を司る運動神経であるが、炎症性、特発性、外傷性などで麻痺が生じ、麻痺が残存すると著しい Quality of Life の低下が生じる。臨床的にはこれら難治例に対して、再生医療の観点から遺伝子治療に期待が持たれる。従来、神経筋疾患に対するウィルスベクターを用いた動物実験での遺伝子治療の報告があり、ラットの顔面神経障害モデルにおいても、アデノウィルスを用いた GDNF、BDNF、TGF β などの栄養因子、成長因子の遺伝子治療の効果の報告がある。(Sakamoto ら J Neurosci Res 2003) しかし従来のウィルスベクターによる治療は、発がん性、免疫応答など有害事象の可能性から、顔面神経麻痺の様な生命予後に関係しない疾患には適応しづらい。そこで、安全性の高い非ウィルス遺伝子導入法に着目した。物

理的な遺伝子治療としてレーザーを使用する方法である。“レーザー誘起応力波：Laser induced Stress Waves”というレーザー照射による衝撃波を用いた導入法で、プラスミド遺伝子を安全に任意の組織に導入することができる。本学にその技術があり、今までに皮膚、脳、前頸骨筋などで導入が確認できている。(Ogura ら 2004, Satoh ら 2005, Aizawa ら 2008) 従来の物理的な遺伝子導入法（エレクトロポレーション、超音波）との違いは、組織障害が軽微、皮膚切開せずに深部へ浸透する、空間的自由度が極めて高いことである。低侵襲であり様々な部位の組織に適応できるため、顔面筋を含め臨床応用に近い遺伝子導入技術であると考え

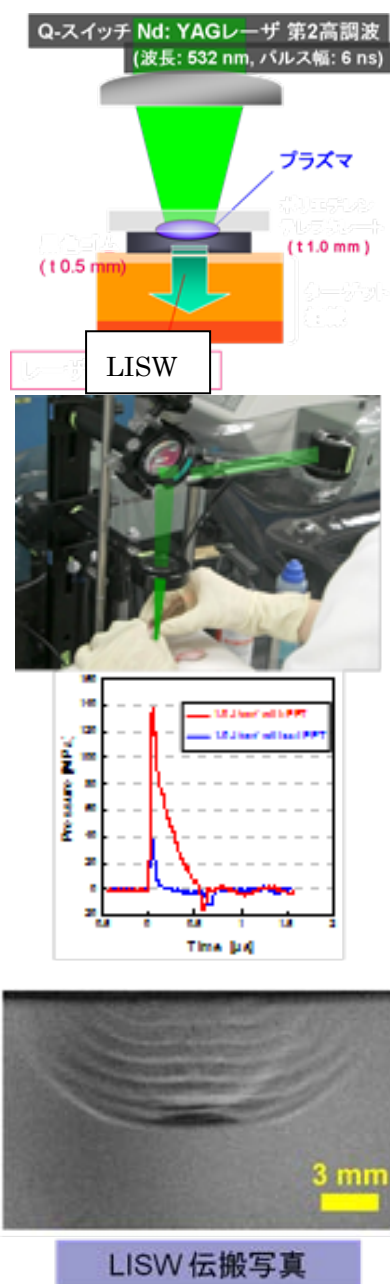
2. 研究の目的

今回、レーザー誘起応力波：Laser induced

Stress Waves 遺伝子導入技術を用いて、ラットの顔面神経麻痺モデルに対して遺伝子治療を行い、顔面運動の評価、組織学的・電気生理学的な評価で治療効果と安全性を確認し、今後の臨床応用への可能性につき検証した。

3. 研究の方法

レーザー誘起応力波 (LISW) につき詳述する。下記は LISW の発生原理 (左) とセッティング (中央上)、応力波の特性 (中央下) 応力波の伝播様式 (右) を示している。導入する遺伝子はプラスミド DNA を使い、目的の組織に注射する。この状態で、LISW を作用させるとその応力波 (陽圧波) により細胞内に取り込まれ、遺伝子が発現する。



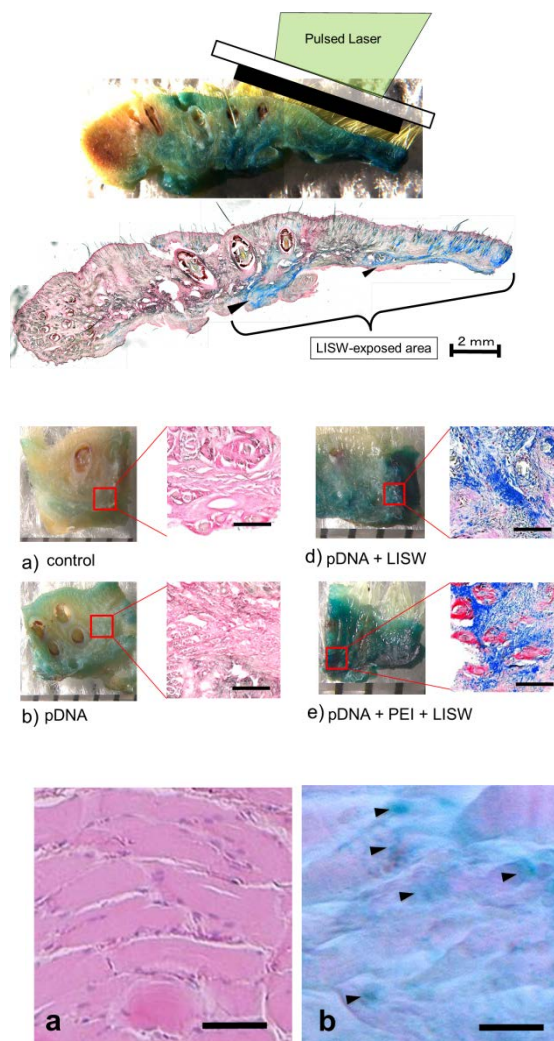
この方法は、レーザーエネルギーを極めて圧力の高い一発の陽圧波に変換するところが特徴である。

レーザーの直接照射では、培養細胞などの細胞単位は表層の組織にしか適応できない。しかし応力波に変換することにより、組織内を深部へ伝播していく。拡散による減弱の様式は、レーザーターゲットの直径によるが、大きな面で照射すると波の中央部分は深部まで減弱せずに浸透していく。

前脛骨筋の実験では、6 mmの深部まで遺伝子の導入が可能であった。顔面筋では皮膚切開をせずに3-5mmの深部に適応することが可能である。LISWは物理刺激によるため、照射エネルギー、照射径等のパラメーターで導入効率が変わってくる。また、プラスミドDNAによる発現は、宿主のゲノムに取り込まれず一過性の発現となるため、発現した蛋白は数週間しか持続しない。従って、至適なレーザー条件での経時的な発現量、タンパク量の変化を測定した。

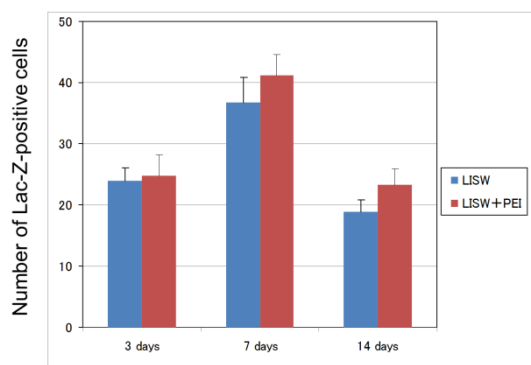
4. 研究成果

我々は顔面筋へのレポーター遺伝子 (lac-Z) の導入につき検討し、レーザー照射部位に特異的に遺伝子が発現していることを確認した。X-Gal 染色後のマクロ所見では、レーザー照射部位に特異的に、遺伝子の発現を認めた。表皮から約4 mm程度まで遺伝子の発現がみられますが、明らかな組織傷害は認めなかった。LISWによる遺伝子導入の各条件の所見であるが、コントロールと、プラスミド注射のみでは明らかな発現を認めなかった。



LISW を適応した群では、筋層に相当する部位に強く、発現を認めた。LISW は物理刺激によるため、照射エネルギー、照射径等のパラメーターで導入効率が変わってくる。また、プラスミド DNA による発現は、宿主のゲノムに取り込まれず一過性の発現となるため、発現した蛋白は数週間しか持続しない。従って、至適なレーザー条件での経時的な発現量測定した。

X-Gal 染色の経時的な変化を示す。顔面筋組織における遺伝子発現のピークは 7 日頃にあると推測された。その後 14 日にかけて発現量が減少した。発現は、筋の細胞核や筋線維、また筋衛星細胞に認めているものと思われる。



本研究成果をまとめると、

- ・ LISW により遺伝子が導入された。
- ・ 7 日頃が発現のピークであり、以後減弱する傾向がある。

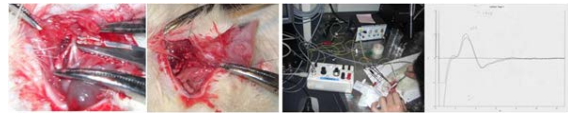
顔面神経麻痺モデルとして、遺伝子導入直前に、顔面神経本幹を切断したので筋線維は萎縮傾向認めるが、再生機転が働いたためか、遺伝子の発現は増強した印象を認めた。

医療用のレーザーと同じ波長のレーザーを用いて、皮膚切開を施行せずに、深部の顔面筋へ遺伝子導入が可能であった。顔面神経麻痺に対し、栄養因子の局所投与やウイルスベクターによる栄養因子の遺伝子治療の報告がある。LISW で治療遺伝子を顔面筋に導入することで、ベル麻痺、Hunt 症候群、外傷性の顔面神経麻痺の治療に応用できる可能性があると考えられた。

また本研究においては顔面神経麻痺モデルおよび評価法を確立した。神経傷害のモデルとして、永久麻痺では引き抜きモデル、一過性麻痺では挫滅モデル、切断後吻合モデルが考えられる。

神経回復の指標としては、過去の報告では一般に顔面神経運動スコア、髄鞘のカウント、神経伝導速度、筋電図の振幅等で判断している。本研究においては、これらの手技を標準化して実験モデルを確立した。筋電図で振幅、潜時、神経伝導速度を測定している。他の文献でも同様な評価法が多く、これらを追従す

る形で顔面神経麻痺モデルの評価法とすることができる。



今後の展望としては、治療蛋白を組み込んだプラスミド DNA+LISW、及びセンダイウイルスベクターで顔面筋に遺伝子導入を行い、蛋白の発現を免疫染色、ELISA等で確認する。顔面神経の機能評価は上述の様に、筋電図、神経伝導速度を測定する。組織学的には、再生顔面神経の髄鞘の太さ軸索の数、顔面筋の筋線維の太さ、血管新生、有害事象の有無などを調べる。臨床上的有用性の指標として、顔面運動スコアの改善度、回復までの日数、難治例の割合などを検討することなどがあげられる。

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 3 件)

1. 溝上大輔、田中伸明、栗田昭宏、松延毅、塩谷彰浩. 健康成人に発生した汎発性帯状疱疹を伴うハント症候群の 1 例. *Otol Jpn* 2012; 22: 53-57. 査読有
2. Tamura A, Matsunobu T, Kurita A, Shiotani A. Hemophagocytic syndrome in the course of sudden sensorineural hearing loss. *ORL*. 2012; 74: 211-214. 査読有
3. Kurita A, Matsunobu T, Satoh Y, Ando T, Sato S, Obara M, Shiotani A: Targeted gene transfer into rat facial muscles by nanosecond pulsed laser-induced stress waves. *J Biomed Opt.* 2011 Sep;16(9) (Epub ahead of print) 査読有

[学会発表] (計 1 件)

1. Kurioka T, Matsunobu T, Niwa K, Tamura A, Kurita A, Kawauchi S, Satoh Y, Sato S, Shiotani A. A novel animal model for studying blast injuries of the inner ear using Laser-Induced Shock Waves. 36th Annual Midwinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology. Feb. 16-20th, 2013. Baltimore, USA

〔図書〕（計 0 件）

〔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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗田 昭宏 (KURITA AKIHIRO)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：50327623