

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：23903
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2013～2015
課題番号：25462650
研究課題名(和文) アンプリコンベクターを用いた顔面神経麻痺の新たな治療の開発

研究課題名(英文) HSV amplicon vector to treat facial nerve palsy

研究代表者
村上 信五 (Murakami, Shingo)
名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80157750
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞増殖因子を組み込んだHSVアンプリコンベクターは現在作成中である。次にBell麻痺と糖尿病の関係を調べるため、以下の実験を行った。ストレプトゾトシン(STZ)を投与して糖尿病を誘導したところ、糖尿病マウスの耳介を擦過した場合のみ、HSV-1の再活性を認め、顔面神経麻痺を認めた。HSV-1 DNAを顔面神経麻痺マウスの顔面神経より検出し、HSV-1カプシドを膝神経節付近に観察した。以上の結果より、糖尿病によりT細胞が減少し、宿主の免疫低下によりHSV-1の再活性化が引き起こされやすくなり、顔面神経麻痺を発症したと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Bell's palsy is highly associated with diabetes mellitus (DM). Diabetes mellitus was induced with streptozotocin injection in only mice that developed transient facial nerve paralysis with HSV-1. Recurrent facial palsy was induced after HSV-1 reactivation by auricular scratch. After DM induction, the number of CD3+ T cells decreased by 70% in the DM mice, and facial nerve palsy recurred in 13% of the DM mice. HSV-1 DNA was detected in the facial nerve of all of the DM mice with palsy, and HSV-1 capsids were found in the geniculate ganglion using electron microscopy. These results suggested that HSV-1 reactivation in the geniculate ganglion may be the main causative factor of the increased incidence of facial paralysis in DM patients.

研究分野：顔面神経麻痺

キーワード：顔面神経麻痺 単純ヘルペスウイルス アンプリコンベクター

1. 研究開始当初の背景

1. 研究の学術的背景

顔面神経麻痺は致死の疾患ではないが、顔が歪み表情を失うため、患者の精神的苦痛、社会生活におよぼす影響は大きい。病因は多様であるが Bell 麻痺(約 60%)と Hunt 症候群(約 15%)がその大半を占める。近年ステロイド薬や抗ウイルス薬の開発と投与方法の検討により、急性末梢性顔面神経麻痺の治療成績は飛躍的に向上してきた。しかし、予後が比較的良好である Bell 麻痺においても 5%の患者は完治せず病的共同運動や拘縮などの後遺症を残し、また Hunt 症候群においては、約 30%の患者は完治しない。ステロイド薬や抗ウイルス薬は麻痺発症数日以内に生じる神経の浮腫や変性を防止するための薬物であり、発症から 2 週間以上経過した症例に対しては十分な効果は期待できない。それ以降は神経再生をめざした治療が必要となるが、臨床的に使用できる神経再生促進薬なるものは未だ開発されていない。

近年、遺伝子導入の手段としてアプリコンベクターが注目されてきている。HSV-1 由来のアプリコンベクターは、HSV-1 と同様の envelope をもつため HSV-1 と様々に細胞に感染することができ、効率よく遺伝子導入できることが報告されている。また、アプリコンベクター自身はウイルスゲノムを有せず、ベクターそのものの安全性は確保されている。さらに、アプリコンベクター内には HSV-1 ゲノム相当(150kbp)の遺伝子が直列に搭載されるため、例えば 7kbp の DNA プラスミドをアプリコンプラスミドに搭載した際には 20 回以上繰り返した遺伝子が増幅できる。HSV-1 アプリコンベクターを用いてマウス固形腫瘍を治療する研究は、すでに応用されているが、今回我々は神経再生を目的としてアプリコンベクターを作成したいと考えている。

2. 研究の目的

顔面神経の再生を促進させると同時に後遺症を残さないような新たな治療法の開発が望まれている。Bell 麻痺の主病因と考えられている単純ヘルペスウイルス(HSV)は神経親和性と神経傷害性を相持つ増殖性ウイルスである。そのウイルスから神経傷害性を除去して神経親和性のみを残した HSV ベクターや HSV の外殻だけを保持し、ゲノムを持たない HSV アプリコンベクターを用いて神経栄養因子を増殖させ、遺伝子導入する治療方法が可能になってきている。本研究は神経栄養因子を HSV アプリコンベクターを用いて増殖させ、障害された顔面神経に投与することで、より効果的な神経再生方法を樹立し、ひいては、後遺症を残さない顔面神経麻痺の新規治療法の開発を目的としている。

3. 研究の方法

マウスの肝臓を摘出し、肝細胞の DNA を抽

出する。PCR にて増幅させ、肝細胞増殖因子(HGF)の cDNA を得る。HSV-1 アプリコンプラスミド(pHGEX)を制限酵素にて切断し、作成した HGF cDNA を挿入する。その後マウス HGF を挿入できたアプリコンプラスミドをクローニングする。具体的には大腸菌に感染させ、カナマイシン配合培地にて培養する。アプリコンプラスミドにはカナマイシン耐性遺伝子が組み込んであるため、アプリコンプラスミドの導入された大腸菌のみコロニーを形成する。コロニーをそれぞれピックアップし、それぞれのコロニーから DNA を抽出する。PCR にて目的遺伝子が増幅されているコロニーを選択し、同様にもう一度クローニングをする。

得られたアプリコンプラスミドを HSV-1 に組み込みアプリコンベクターを作成し、HSV-1 HF10 を感染させる。HF10 が増殖する際にアプリコンベクターの増殖に必要なタンパク質も供給されるため、アプリコンベクターも HF10 の増殖中にパッケージングされる。培養上清を採取し、凍結、融解を繰り返した後に低速遠心にて細胞の debris を取り除き、分注して -80 で保存する。アプリコンベクターの遺伝子発現を確認するため、ベクターを Vero 細胞に感染させ、蛋白の発現を ELISA で確認する。

顔面神経麻痺モデルマウスの回復が促進されるかを確認するため、まずは損傷神経上に投与する。治癒の経過をスコア、ビデオなどにて毎日経過を観察し、治癒が回復されるのか確認する。

またウイルス性顔面神経麻痺の回復が改善されるかを検討する。HSV-1 KOS 株をマウス耳介に擦過投与して顔面神経麻痺モデルマウスを作成し、このモデルマウスの治癒が促進されるのかを検討する。

次に組織学的にも治癒が促進されているのか確認する。具体的には経時的にマウスを過麻酔して、心室内に 4%パラホルムアルデヒドを注入して内固定し、頭頸部を剥皮して摘出する。6%EDTA・2Na にて脱灰して連続凍結切片を作成する。顔面神経核を含む頭部切片を

Kluver-Barrera 法で染色し、顔面神経核のニューロン数を測定する。また、顔面神経の損傷部位を含む頸部の切片を作成し、顔面神経の変性や再生を観察する。

4. 研究成果

マウス肝細胞の DNA を抽出し、肝細胞増殖因子の cDNA を得た。シークエンスを確認して、制限酵素で切断し、HSV アプリコンプラスミド(pHGEX)に組み込んだ。カナマイシン存在下にてクローニングを行い、いくつかの候補を得た。PCR で HGF を増幅し、いくつかの候補を得た。何度か試みたが、安定した DNA が得られなかったため断念した。その後、米国より商用の HGF cDNA が見つかったため、購入した。シークエンスは確認されているた

め、現在 HSV アンプリコンプラスミドに組み込んでいるところである。

次にモデルマウスを用いて糖尿病と顔面神経麻痺の関係を検討した。HSV-1 KOS 株を耳介に投与して顔面神経麻痺を発症し、自然治癒したマウスをストレプトゾトシンで糖尿病とした。耳介を再度擦過したところ、13%のマウスが顔面神経麻痺を引き起こし 16%のマウスが脳炎をおこして死亡した。麻痺中のマウスの側頭骨内顔面神経を採取したところ、PCR で HSV-1 DNA が、電子顕微鏡で膝神経付近に HSV-1 粒子が観察された。ストレプトゾトシンを投与したマウスの脾細胞を検討したところ、CD3 陽性 T 細胞が減少していた。以上の結果より、糖尿病により T 細胞が減少し、宿主の免疫低下により HSV-1 の再活性化が引き起こされやすくなり、顔面神経麻痺を発症したと考えられた。以上の結果は論文にまとめて発表した。

また、顔面神経挫滅モデルマウスを作成し、各成長因子の効果を検討した。成長因子は塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2)、肝細胞増殖因子 (HGF)、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF)、神経成長因子 (NGF) の各蛋白を用いた。各成長因子を生体吸収性ハイドロゲルに含有させて、圧迫神経上に留置した。どの成長因子も顔面神経麻痺モデルマウスの回復を促進したが、HGF、FGF-2 を用いた群が GDNF、NGF を用いた群よりも促進した。各治療後のマウス頭部を採取し、脱灰し切片を作成して組織学的に検討したところ、HGF、FGF-2 で再生神経の増多が認められた。

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)

Quantitative analysis of facial palsy using a three-dimensional facial motion measurement system. Katsumi S, Esaki S, Hattori K, Yamano K, Umezaki T, Murakami S. *Auris Nasus Larynx*. 2015 Aug;42(4):275-83. 査読有
10.1016/j.ani.2015.01.02

Facial nerve palsy after reactivation of herpes simplex virus type 1 in diabetic mice. Esaki S, Yamano K, Katsumi S, Minakata T, Murakami S. *Laryngoscope*. 2015 Apr;125(4):E143-8. 査読有
10.1002/lary.24994

Cytokine modulation by IL-35 in mice with allergic rhinitis. Yokota M, Suzuki M, Nakamura Y, Ozaki S, Murakami S. *Am J Rhinol Allergy*. 2015 Jul-Aug;29(4):251-6. 査読有
10.2500/ajra.2015.29.4188

A Technique for Preoperative Identification of the Facial Nerve Mandibular Branch Using a Nerve Stimulator. Ijichi K, Adachi M, Hamajima Y, Murakami S. *J Craniofac Surg*. 2015 Jul;26(5):1660-2. 査読有
10.1097/SCS.0000000000001644

⑤Cell-cycle distribution and Thymidilate Synthase (TS) expression correlate with 5-FU resistance in head and neck carcinoma cells. Ijichi K, Adachi M, Ogawa T, Hasegawa Y, Murakami S. *Anticancer Res*. 2014 Jun;34(6):2907-11. 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24922653>
PMID:24922653

Selection of therapeutic treatment with alternating chemoradiotherapy for larynx preservation in laryngeal carcinoma patients. Ijichi K, Hanai N, Kawakita D, Ozawa T, Suzuki H, Hirakawa H, Kodaira T, Murakami S, Hasegawa Y. *Jpn J Clin Oncol*. 2014 Nov;44(11):1063-9. 査読有
10.1093/jjco/nyu131

High fibrinogen in peripheral blood correlates with poorer hearing recovery in idiopathic sudden sensorineural hearing loss. Kanzaki S, Sakagami M, Hosoi H, Murakami S, Ogawa K. *PLoS One*. 2014 Aug 28;9(8):e104680. 査読有
10.1371/journal.pone.0104680

Oncolytic viral therapy with a combination of HF10, a herpes simplex virus type 1 variant and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for murine ovarian cancer. Goshima F, Esaki S, Luo C, Kamakura M, Kimura H, Nishiyama Y. *Int J Cancer*. 2014 Jun 15;134(12):2865-77. 査読有
10.1002/ijc.28631

Interaural Difference of Wave V Predicting Postoperative Hearing in Gardner-Rbertson Class II Acoustic Neuroma Patients. Aihara N, Murakami S, Takemura K, Yamada K. *J Neurol Surg B Skull Base*. 2013 Oct;74(5):274-8. 査読有
10.1055/s-0033-1348024

Optimal duration of macrolide treatment for chronic sinusitis after endoscopic sinus surgery. Nakamura Y, Suzuki M, Yokota M, Ozaki S, Ohno N, Hamajima Y, Nakayama M, Hashiba M, Murakami S. *Auris Nasus Larynx*. 2013 Aug;40(4):366-72. 査読有
10.1016/j.anl.2012.09.009

Efficacy of gemcitabine and cetuximab combination treatment in head and neck squamous cell carcinoma. Maseki S, Ijichi K, Nakanishi H, Hasegawa Y, Ogawa T, Murakami S. 査読有
Mol Clin Oncol. 2013 Sep;1(5):918-924.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2464927>
PMID:24649271

Enhanced antitumoral activity of oncolytic herpes simplex virus with gemcitabine using colorectal tumor models. Esaki S, Goshima F, Kimura H, Murakami S, Nishiyama Y. *Int J Cancer*. 2013 Apr 1;132(7):1592-601.
査読有 110.1002/ijc.27823

Math1, retinoic acid, and TNF-synergistically promote the differentiation of mucous cells in mouse middle ear epithelial cells in vitro. Nakamura Y, Komori M, Yamakawa K, Hamajima Y, Suzuki M, Kim Y, Lin J. *Pediatr Res*. 2013 Sep;74(3):259-65.
10.1038/pr.2013.103

〔学会発表〕(計 3 件)

Efficiency of facial nerve decompression, transmastoid approach vs transmastoid approach and middle cranial fossa approaches. Yamano K, Katsumi S, Esaki S, Murakami S
12th International Facial Nerve Symposium, Boston, (USA), 2013

Treatment for Bell's palsy associated with diabetes mellitus. Esaki S, Katsumi S, Yamano K, Murakami S
12th International Facial Nerve Symposium, Boston, (USA), 2013

Quantitative analysis of facial paralysis using a three-dimensional facial motion measurement system. Katsumi S, Esaki S, Yamano K, Murakami S
12th International Facial Nerve Symposium, Boston, (USA), 2013

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 信五 (Murakami, Shingo)
名古屋市立大学・医学研究科・教授
研究者番号: 80157750

(2) 研究分担者

飛田 秀樹 (Hida, Hideki)
名古屋市立大学・医学研究科・教授
研究者番号: 00305525

濱島 有喜 (Hamajima, Yuki)
名古屋市立大学・医学研究科・講師
研究者番号: 30343403

江崎 伸一 (Esaki, Shinichi)
名古屋市立大学・医学研究科・助教
研究者番号: 20620983