

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670723

研究課題名(和文)末梢神経過誤再生に対する新しい治療法の開発

研究課題名(英文)The development of new treatments for peripheral nerve misdirected regeneration

研究代表者

塩谷 彰浩(Shiotani, Akihiro)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・教授)

研究者番号：80215946

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):反回神経切断モデルに対するPGAコラーゲンチューブ(ナーブリッジ)の単独使用による治療効果に関して、直接神経縫合した群と比較検討を行い、PGAコラーゲンチューブ単独使用による有髄神経の再生本数および喉頭筋萎縮予防効果を確認し、報告した。神経再生がPGAコラーゲンチューブ(ナーブリッジ)を用いることで改善しているにも関わらず、機能改善が起こらない原因は、反回神経の過誤再生が起こっているものと思われた。過誤再生を克服するため、PGAコラーゲンチューブを足場として感覚、自律神経の再生阻害を考えると考えられる阻害薬を投与し、チューブ単独使用群と比較し検討した。

研究成果の概要(英文):Nerbrige is a novel polyglycolic acid (PGA) tube filled with collagen fiber. It is biocompatible and commercially available with governmental approval in practical use in Japan. Recurrent laryngeal nerve (RLN) axotomy model was established by left RLN transection in adult Sprague-Dawley rats. The cut ends of RLN were bridged using Nerbrige with a 1mm gap (tube treatment group), or sutured directly (sutured control group). In 15weeks after treatment, better nerve regeneration was observed in tube treatment group. However, recovery of vocal fold movement was not observed in both groups. PGA-Collagen Tube has the potential not only to promote RLN regeneration, but also to be a scaffold of these combination therapies by administration of drugs into tube. Now, we try to recover the vocal fold motion in RLN axotomy model using PGA-Collagen Tube with sensory nerve axon outgrowth inhibitory factor.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：末梢神経再生 過誤再生 反回神経麻痺 反回神経切断 神経再生誘導チューブ 筋電図 逆行性トレースー PGA-コラーゲンチューブ

1. 研究開始当初の背景

末梢神経の再生能力は比較的強いと言われているが、末梢神経再生の最大の問題は神経の過誤再生である。頭頸部領域においても、ウイルス感染や術後損傷による反回神経麻痺や顔面神経麻痺、耳下腺術後の耳介側頭神経の過誤再生による Frey syndrome など過誤再生が問題となることは多い。今日まで末梢神経の再生の研究は数多くおこなわれステロイドホルモンや抗コリン薬を用いた薬物療法や神経吻合術などの治療も行われている。しかしながら、過誤再生の問題は根本的には克服できておらず、神経が再生しているにも関わらず過誤再生することにより麻痺が改善しない場合が多い。

特に運動神経線維、感覚神経線維、自律神経線維が混在し、運動神経も声門開大筋支配線維と声門閉鎖筋線維が混在する反回神経切断障害は治療が難しいといわれている。末梢神経における過誤再生が起こる原因として、運動神経線維に感覚神経線維、自律神経が迷入することによる過誤再生、運動神経線維同士での非選択的再生による過誤再生が考えられる。(図1)

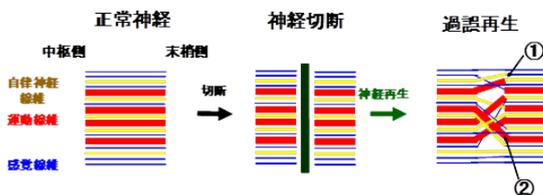


図1 過誤再生イメージ図

① 運動神経線維に感覚神経線維、自律神経が迷入することによる過誤再生

② 運動神経線維同士での非選択的再生による過誤再生

この過誤再生は切断創部でまず起こっており、創部に薬物治療、細胞治療、遺伝子治療などを行うことが最も有効な過誤再生の治療の手段と考えられる。近年、神経切断部の欠損を補填するのに人工神経が研究されてきており、我が国でも近年、ポリグルコール酸とブタ真皮由来のコラーゲンより構成される国内初の神経再生誘導チューブ (Nerbridge®) (PGA-C チューブ) が、末梢神経再建への薬事承認を受け、主に感覚神経における末梢神経断裂・欠損部に対し臨床応用されている。

しかし、この神経再生誘導チューブの運動神経再生における効果については基礎・臨床ともにほとんど報告がない。また、この神経再生誘導チューブ (Nerbridge®) を Drug Delivery System (DDS) の一つとして用いた臨床試験はもちろん基礎実験も存在していないのが現状である。したがって、神経再生誘導チューブの反回神経切断モデルに対す

る単独使用による神経再生効果、機能回復効果を検討し、その上で薬物治療などの足場となりえるかを検討していくことが必要である。

また、様々な神経栄養因子 (NGF、BDNF、GDNF、NT-3/4/5、FGF、IGF-1 等) が末梢運動神経筋機構に対し再生促進効果、および軸索伸張効果があることが証明されてきており、これらの神経栄養因子は部位や再生時期などで発現量が異なっており、この栄養因子の発現量の差が過誤再生を生んでいる可能性も示唆されており、神経栄養因子を導入、阻害することで過誤再生のメカニズムの解明、及び、治療法を確立できると考えられる。

まず、運動神経線維に感覚神経線維、自律神経が迷入することによる過誤再生に関しては、反回神経再生までの間に運動線維以外の感覚神経線維、自律神経線維が迷入し支配してしまうため神経再生後も声門の開大、閉鎖の協調運動が改善しないと考えられる。運動神経の過誤再生にくわえて、知覚性および自律神経性の線維の過誤支配を克服するため、反回神経障害モデルを用いて感覚神経の軸索伸張を阻害するために感覚神経軸索伸張阻害因子と考えられる薬剤を用いて感覚神経の迷入による過誤再生を阻害することで克服を目指す。

2. 研究の目的

- I. ラット反回神経切断モデルを用いて運動神経および感覚・自律神経の過誤再生を評価する方法を確立する。
- II. 神経再生誘導チューブの単独による神経再生効果の検討を評価する。
- III. 神経再生誘導チューブを足場とし感覚神経軸索伸張阻害因子を用いた薬物治療の神経再生効果、運動回復効果を検討する。

3. 研究の方法

I. 反回神経過誤再生の確認：反回神経切断後声門開大筋および声門閉鎖筋に対し、2種類 の逆行性神経トレーサー (First blue (FB)、Diamidino Yellow Dihydrochloride (DY)) をそれぞれに注入し、反回神経の運動ニューロンの過誤再生を疑核にて確認し、その評価方法を確立する。また喉頭の感覚神経の終末である迷走神経節にて同様にトレーサーの評価を行い、過誤再生が評価可能かを検討する。また筋電図において両側の声門開大筋に筋電図の電極を刺入し、呼吸性の変動が測定可能かどうかを検討する。

II. 反回神経切断モデルに対する神経再生チューブ (Nerbridge®) の治療効果の検討：反回神経切断に伴う神経再生の改善を目的とした神経再生研究の一環として、反回神経切断神経切断モデルに対して治療薬投与の足場ともなる神経再生チューブ (Nerbridge®) を用いて神経再生実験を行っ

た。端々吻合群、および神経再生チューブ架橋群（断端間隔 1 mm）を作成し、切断 15 週間後の、喉頭の観察、形態学的・病理学的評価および電気生理学的評価を行った。

III. 神経再生チューブを足場とした TrkA 阻害薬の治療効果の検討：神経再生チューブ単独治療群、感覚神経軸索伸張阻害因子を神経再生チューブに投与して架橋した群（感覚神経阻害因子治療群）を作成し、同様に喉頭運動、反回神経の形態学的評価、喉頭筋の萎縮および電気生理学的評価を行った。加えて、過誤再生の評価を行うために、神経トレーサーを喉頭筋（甲状披裂筋（閉鎖筋）、後輪状披裂筋（開大筋））へ治療後 14 週に投与する群もそれぞれ作成し、治療後 15 週に感覚神経、自律神経の一次ニューロンが存在する迷走神経節および運動神経の一次ニューロンの存在する疑核における逆行性標識細胞を評価した。

4. 研究成果

I. 反回神経過誤再生の評価法：

疑核における過誤再生の確認および検討：神経トレーサーを喉頭の閉鎖筋（甲状披裂筋）および開大筋（後輪状披裂筋）へ注入後、中枢の運動ニューロンを ChAT で免疫染色したのち、疑核における各筋へ注入したそれぞれのトレーサーの位置や数を評価できることを確認した。（図 2）

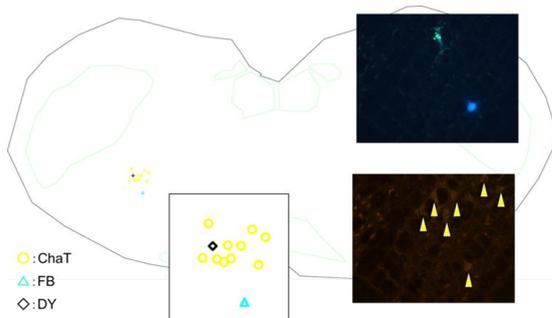


図 2 stereo investigator を用いて疑核の運動ニューロン（黄色：ChAT 後輪状披裂筋（開大筋）の運動ニューロン（青：FB）、甲状披裂筋（閉鎖筋）の運動ニューロン（黒：DY）位置関係を図示化した

迷走神経節におけるトレーサーの迷入の評価：迷走神経節の切片をすべて評価することで迷入の有無を確認するとともに総数を確認可能であった。（図 3）



図 3 迷走神経節の評価

上段は採取した迷走神経節、下段は逆行性トレーサーを迷走神経節で観察（左：弱拡大、右：強拡大）

筋電図による過誤再生の評価方法の検討：声門開大筋である後輪上披裂筋の筋電図を両側で測定することにより、呼吸性の同期の有無を確認できた。また、反回神経を切断部位の中核側および末梢側で刺激することで、神経伝導速度を測定することも可能であった。（図 4）

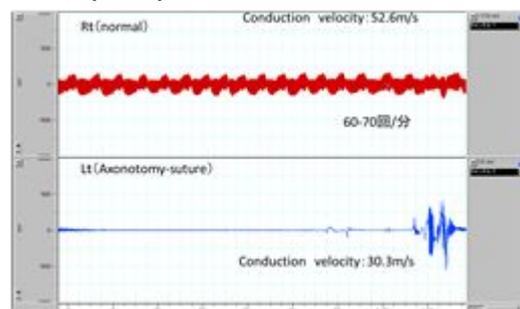


図 4 後輪状披裂筋の呼吸性同期筋電図。右側（正常側）は呼吸性に同期しているが、左側（切断吻合再生側）は呼吸性の動きは認めず、喉頭の呼吸に同期した声門の開大閉鎖運動が正常に行われていないことを確認した。また伝導速度も正常側に比べ再生側は遅延することが確認できた。

II. 反回神経切断モデルに対する神経再生誘導チューブ (Nerbridge®) の治療効果の検討：両群とも声帯運動の回復は認めず、電気生理学的評価においても有意な差を認めなかったが、形態学的評価では有髄神経線維数の増加と神経線維径の回復を神経再生チューブ群で認めた。（図 5）また喉頭筋萎縮は、神経再生チューブ群の方が軽度であった。（図 6）

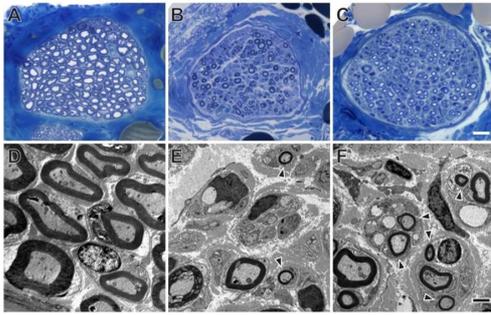


図 5 (A) 正常嚙神経末梢群 (B) 編々吻合群神経末梢群 (C) 神経再生チューブ架橋群 (D~F) 各電顕像。神経再生チューブ群の方が神経再生本数が多く観察できた。

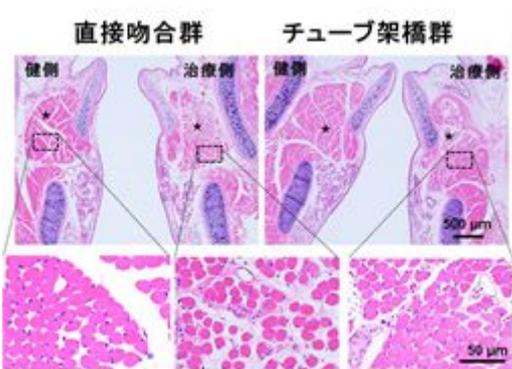


図 6 反回神経切断後 15 週後の神経再生チューブによる嚙頭筋の萎縮評価 ☆: 甲状被裂筋
直接吻合群の治療側と比較してチューブ架橋群の治療側の方が萎縮の程度が軽度であり、嚙頭筋萎縮予防効果を認める。

この結果から、神経再生チューブを使用することにより、喉頭運動は改善を認めなかったが、神経再生部位における肉芽形成の予防効果、喉頭筋の萎縮予防効果および神経再生促進効果を認め、実臨床においても有用性があるものと考えられた。また、これらの結果はボストンで行われた American Laryngological Association 's 2015 Spring Meeting にて報告し、The Laryngoscope に投稿し、採択された。(Suzuki H, Araki K, Matsui T, Tomifuji M, Yamashita T, Kobayashi Y, Shiotani A. Value of a novel PGA-collagen tube on recurrent laryngeal nerve regeneration in a rat model. Laryngoscope. 2015 Nov 3. [Epub ahead of print])

III. 神経再生誘導チューブを足場とし感覚神経軸索伸張阻害因子を用いた薬物治療の神経再生効果、運動回復効果の検討：チューブ単独群と比較して、麻痺側声帯の運動、反回神経の再生本数および神経線維径の改善

を認めた。電気生理学的にも伝導速度は両群で有意な差は認めなかったが、麻痺側喉頭筋の活動電位の振幅や呼吸性同期筋電図の同期の改善を認めた。今後はこの結果を報告するとともに、効果のメカニズムについて、神経トレーサーを用いて反回神経の運動ニューロンの中枢である疑核と感覚、自律神経のニューロンのある迷走神経節へのトレーサーの移行の程度を評価していく予定である。また、この研究は平成 28 年度の基盤 C (16K11252) において研究を継続していく予定である。

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 8 件)

Araki K, Mizokami D, Tomifuji M, Yamashita T, Ohnuki K, Umeda IO, Fujii H, Kosuda S, Shiotani A. Novel Indocyanine Green-Phytate Colloid Technique for Sentinel Node Detection in Head and Neck: Mouse Study. Otolaryngol Head Neck Surg. 査読あり Apr14;151(2),2014,279-285.

DOI:10.1007/s0045-013-2575-0

荒木 幸仁、塩谷 彰浩、大久保 啓介、嚙下手術(私の手術)「反回神経麻痺における誤嚥の外科的応用」BIOPEX 注入術、嚙下医学、査読なし、2 巻、2013、191-193
荒木 幸仁、塩谷 彰浩、【甲状腺・副甲状腺】術中反回神経モニタリング、耳鼻咽喉科・頭頸部外科、査読なし、85 巻、2013、562-567

Mizokami D, Araki K, Tanaka N, Suzuki H, Tomifuji M, Yamashita T, Inoue M, Hasegawa M, Shiotani A. Sendai virus transgene in a novel gene therapy for laryngotracheal disease. Laryngoscope. 査読あり,2013 Jul;123(7):1717-24.

DOI:10.1002/lary.23917.

Mizokami D, Araki K, Tanaka N, Suzuki H, Tomifuji M, Yamashita T, Ueda Y, Shimada H, Matsushita K, Shiotani A. Gene therapy of the c-myc suppressor far upstream element binding protein-interacting repressor by using Sendai virus delivery prevents tracheal stenosis. PLoS One. 査読あり,10(1),2015.

DOI:10.1371/journal.pone.0116279.

Mizokami D, Araki K, Tanaka N, Suzuki H, Tomifuji M, Yamashita T, Matsushita K, Shimada H, Shiotani A. Tacrolimus Prevents Laryngotracheal Stenosis in an Acute Injury Rat Model. Laryngoscope. 査読あり,125, 2015.

DOI:10.1002/lary.25178.

溝上大輔, 荒木幸仁, 塩谷彰浩. (基礎シンポジウム) 「喉を守る 喉頭・気管領域の研究 up to date ~若手喉頭科医による最新の知見」 センダイウイルスベクターを用いた気管狭窄の遺伝子治療. 喉頭, 査読あり, 27 巻 2 号, 2015, 51-58
Suzuki H, Araki K, Matsui T, Tomifuji M, Yamashita T, Kobayashi Y, Shiotani A. Value of a novel PGA-collagen tube on recurrent laryngeal nerve regeneration in a rat model. Laryngoscope. 査読あり, Epub ahead of print, 2015.
DOI: 10.1002/lary.25750.

〔学会発表〕(計 7 件)

Araki K, Mizokami D, Tomifuji M, Yamashita T, Shiotani A, Feasibility Animal study of Novel ICG Sentinel Node Detection technique in Head and Neck Region, 2013 AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXP, 2013.9.29 Vancouver, Canada

溝上大輔, 荒木幸仁, 田中伸明, 鈴木洋, 山下拓, 富藤雅之, 上田泰次, 島田英昭, 松下一之, 塩谷彰浩. 非伝播型 c-myc 転写抑制因子 FIR 搭載組換えセンダイウイルスベクターによる気管狭窄の遺伝子治療. 第 115 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 2014.5.14, 福岡.

溝上大輔, 荒木幸仁, 塩谷彰浩. 「喉を守る 喉頭・気管領域の研究 up to date ~若手喉頭科医による最新の知見」 センダイウイルスベクターを用いた気管狭窄の遺伝子治療. 第 27 回日本喉頭科学会. 2015.4.4.東京.

鈴木洋, 富藤雅之, 荒木幸仁, 塩谷彰浩. BIOPEX 声帯内注入術における披裂軟骨内転の工夫 高度声門閉鎖不良症例をいかに克服するか? . 第 27 回日本喉頭科学会総会・学術講演会. 2015.4.10.東京.

Suzuki H, Araki K, Matsui T, Tomifuji M, Yamashita T, Kobayashi Y, Shiotani A. Value of a Novel PGA-Collagen Tube on Recurrent Laryngeal Nerve Regeneration in a Rat Model. The American Laryngological Association 's 2015 Spring Meeting at COSM. 2015.4.21. Boston, MA, USA.

鈴木洋, 荒木幸仁, 宇都宮一步, 溝上大輔, 富藤雅之, 山下拓, 塩谷彰浩. 反回神経切断ラットモデルにおける神経再生誘導チューブ(Nerbridge®)の有用性. 第 116 回日本耳鼻咽喉科学会. 2015.5.22. 東京.

鈴木洋, 荒木幸仁, 富藤雅之, 塩谷彰浩. 反回神経麻痺の治療 基礎から臨床ま

で 第 26 回日本気管食道科専門医大会, 2016.2.21.東京
〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩谷 彰浩 (SHIOTANI, Akihiro)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授

研究者番号: 80215946

(2) 研究分担者

荒木 幸仁 (ARAKI, Koji)
防衛医科大学校・病院・講師

研究者番号: 70317220