

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670750

研究課題名(和文) 定量的タンパク質発現解析を利用したミクロ解剖学アトラスの開発

研究課題名(英文) Micro-anatomy atlas using quantitative protein expression analysis

## 研究代表者

橋川 和信 (Hashikawa, Kazunobu)

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：90403237

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)：ラット脳よりmRNAを抽出し、PCR法によりラット(Wistar系)Hn-1遺伝子の一部を増幅した。塩基配列解析を行い、これが既知のHn-1遺伝子と相同であることを確認したのち、本PCR断片をプラスミドベクターに挿入、これを鋳型としてcRNAプローブを作成した。このcRNAプローブを用いて片側の顔面神経損傷後のラット脳切片に対してin situ hybridizationをおこなった。損傷側の顔面神経核領域および三叉神経核(手術操作による損傷と考えられる)におけるHn-1mRNAの発現が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Whole rat brain mRNA was extracted and amplified a part of the rat (Wistar rat) Hn-1 gene by the polymerase chain reaction. After performing the sequence analysis, we confirmed that this was known Hn-1 gene with homology. cRNA probe was constructed and in situ hybridization was performed for a rat brain slice after the unilateral facial nerve damage using this cRNA probe. Expression of Hn-1 mRNA was observed at facial nerve nucleus and trigeminal nerve nucleus on the damaged side.

研究分野：形成外科学

キーワード：顔面神経損傷 Hn-1

## 1. 研究開始当初の背景

形成外科を含む外科学の手術手技の歴史は解剖学と共に歩んできたといっても過言ではない。ここでいう解剖学とは主にマクロ解剖学である。古典的な解剖学による知見は科学技術の進歩した現在においてもなお、重要な知見をわれわれに与える。マクロ解剖学は数百年の歴史を有し、様々な解剖学書が刊行され、今日に至っている。マクロ解剖学とは、人体解剖における“標準”であり、部位によっては破格が多かれ少なかれ存在する。

近年では CT や MRI 撮影で得られた画像を 3 次元的に、立体的に描出する技術が発達した。これらにより個々の個体における解剖が事前に表現でき、いわばオーダーメイド医療の一翼を担う。とくに重要な神経や血管の解剖は末梢ほど、破格が多く、これらを術前に把握することは手術シミュレーションに大きく貢献し、最終的には手術の安全性に貢献している。

工学 / 医療技術の進歩に伴い、最近では外科学はミクロレベルでの治療に挑戦し始めた。これは光学顕微鏡技術の進歩とともに治療技術の研究開発の進歩をその基盤とする。口径 1mm 程度の動静脈の再吻合を前提とする皮弁移植術は半世紀程度前に確立された技術であり、現在は標準的な治療法として一部では定着している。また、マイクロサージャリーは末梢神経の縫合技術にも貢献している。損傷を受けた末梢神経は再縫合するだけでなく、他の部位から採取した神経の移植や、人工神経移植、あるいは他の運動神経に motor source を求めること、などの技術が基礎研究で進められ、医療へと応用されている。ただし、末梢神経は中枢神経に比して比較的単純な構造をとるとされているが、今なお、絶妙な構造で成り立つ神経ネットワークの解明は課題である。

マクロ解剖学に対峙する言葉としての“ミクロ解剖学”-神経束内での解剖学など (topology)- はあまり広く使われない。これは、まだミクロな外科学技術が標準的には及んでいないことを背景に、ニッチな研究領域として捉えられる傾向にあるからであろう。ゆえに、得られた知見を相互にフィードバックしあうためのバックグラウンドが形成されきっておらず、技術はまだまだ革新の余地を残している。

現在、既に行われているミクロな外科学技術を背景に、有効に活用出来る可能性のあるミクロ解剖学は主に脳神経 (顔面神経、三叉神経、舌下神経など広義の中枢神経系) 領域のマイクロサージャリーであろう。われわれ形成外科医が兼ねてより関与してきた領域として、顔面神経麻痺治療が挙げられる。その損傷形態 (腫瘍切除に伴うもの、外傷に伴うもの、ウイルス感染に伴うもの、原因不明なもの) によって治療方針が異なってくるが、外科治療としてはおおむね、その動力源 (モーターソース) を他の部位 (例えば対側の顔

面神経や同側の舌下神経、三叉神経など) に求めることが多い。しかし、動物実験モデルも限られており、未だ解明されていない現象も多い。例えば、舌下神経を直接、または移植神経を介して顔面神経に端側縫合する際に、顔面神経のどの部分に縫合すれば、麻痺している領域に対して最も効率的か、などは神経束内での topology が明らかとなれば、大きく前進する。

神経科学領域で topology を検索する試みはこれまでもなされてきた。その主たる物はトレーサー法である。神経核や筋肉等に存在する神経終末領域に微量注入された低分子化合物であるトレーサー物質は神経細胞体ないしは軸索、神経終末に取り込まれ、順行性ないしは逆行性に神経細胞内に分布し、これを検出することでネットワークの解析を行うことができる。本手法は脳科学領域においては神経核間のネットワークの解明に莫大な貢献をしてきた。古典的手法であるが現在も尚、重要な研究手法としての地位は揺るがない。一方で注入されたトレーサー物質はそこに存在する全ての軸索に取り込まれる訳ではなく、推測不能な割合での細胞の染色となるため、定量的解析が行えず、それゆえに、染色に漏れる領域が存在することが想定され、神経核内での微細な領域解析は行えない。

Hn-1 (hematological, and neurological-expressed sequence 1) は 1997 年に胎児の肝臓での発現が示され (Tang et al, 1997)、その後、成体では損傷を受けた運動神経の細胞に特異的に発現する事が明らかとなった (Zujovic et al, 2005)。この発現の up regulation は軸索が損傷されたというシグナルが神経細胞体に伝達されると速やかに開始される。本タンパク質の発現を神経核において検出する事で、

脳神経 (顔面神経等) 末梢枝の神経核レベルでのトポロジーの解明

手術操作による神経への損傷程度の検討

を行う事が出来る。われわれは Hn-1 をマーカーとして用いる事で神経核における 3 次元のトポロジーを解析し、さらにこれらの情報をマッピングする事で脳神経のミクロ解剖学をアトラス化する技術を確認する事ではないか、と考えた。

## 2. 研究の目的

前述の通り、トレーサー法ではトレーサー物質の取り込み率の不安定性から、全ての細胞を染色することができない。神経損傷マーカーとされる Hn-1 などといったタンパク質は、損傷を受けた細胞に特異的に発現することが示されている。

また、同時に臨床面においても、現在一般に使用されている CT や MRI 機器の画像処理技術を利用し、オーダーメイドでの微細な血管構築の 3 次元化に迫ることとした。

### 3. 研究の方法

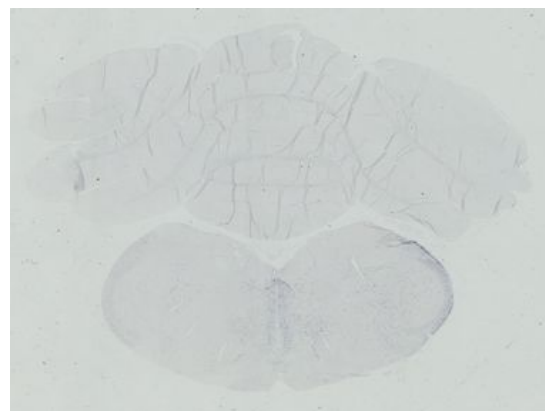
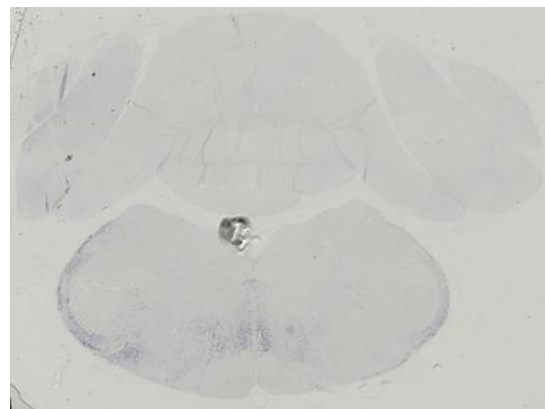
- (1) ラット脳からの total RNA 抽出  
深麻酔下にラットを安楽死させ、速やかに抜脳を行った。  
得られた脳サンプルは溶解液中でホモジェナイズを行った。その後は製造元のプロトコルに従い、遠心分離などを行い、total RNA を抽出した。分光高度計により一定量の RNA が抽出されていることを確認した。
- (2) ラット Hn-1 に対する cRNA プロープの作成  
ラット Hn-1 の塩基配列より PCR プライマーを設計した。プライマー配列は以下の通りである。  
F: 5' -CTTTGCGCCATGACCACTACCA-3'  
R: 5' -ACCTTGCAATACCAGGCAGCTT-3'  
RT-PCR の条件は次の通り行った。  
50 30分  
94 2分  
94 30秒 58.1 20秒 72 30秒  
を 35 サイクル、  
72 7分  
予測される長さのバンドを切り出し、ベクターにライゲーションを行い、プラスミド化した。プラスミドはコンピテントセル (E. coli) にトランスフォームし、アンピシリンと IPTG, X-gal を混和したアガロースゲル上に撒布した。  
プラスミドが挿入されていると考えられる大腸菌コロニーを採取し、培養、プラスミドの回収を行った。  
得られたプラスミドベクターは外注により塩基配列解析を行い、ラット Hn-1 遺伝子が挿入されていることを確認後、MCS 中の EcoRI および HindIII でプラスミドを消化し、直線化した。  
T3 および T7 RNA ポリメラーゼをもちいて、Digoxigenin 標識された cRNA プロープを作成した。スピカラムで精製し、回収、分光高度計により定量した。
- (3) ラット脳切片に対する in situ ハイブリダイゼーション  
ラットは深麻酔下におき、右室よりカニキュレを挿入し、脱血後、灌流固定を行った。上記と同様に脳を採取、ホルマリン固定後にパラフィンブロックとした得られた 4µm 厚のパラフィン切片を用いて in-situ ハイブリダイゼーションを行った。パラフィン切片はキシロカイン下降アルコール系列を用いて脱パラフィンおよび水和処理を行った。  
パラフィン切片を再度ホルマリンで固定後、RNase free の PBS 中で洗浄、protease K により細胞膜タンパク質の部分的消化を行った。cRNA プロープを混じた SSC pH4.5 中で 60、12 時間のハイブリダイゼーションを行った。  
PBS 中で洗浄後、Alp 標識された抗

digoxigenin 抗体を反応させ、NBT/BCIP を基質として発色反応を行った。  
水溶性封入材により封入を行い、光学顕微鏡で観察を行った。

### 4. 研究成果

- (1) ラット Hn-1 遺伝子の部分的塩基配列  
得られた塩基配列: RT-PCR により 1053bp のラット Hn-1 遺伝子断片が得られた。これらの塩基配列を解析した結果、既知のラット (Rattus norvegicus) Hn-1 の塩基配列と相同であった。

#### (2) 脳切片における Hn-1 アンチセンスプロープによる in situ hybridization



上2図はラット顔面神経本幹を手術的に切断後、5日目に抜脳し、組織切片を作成、in situ ハイブリダイゼーションを行ったものである。顔面神経本幹は茎乳突孔をでた部位において切断した。図に示すように損傷側の顔面神経核において Hn-1 の発現と考えられるシグナルと認められた(上2図)。また、中脳辺縁にも Hn-1 の発現が認められた。この領域は三叉神経脊髄核に該当する。手術操作により顔面神経末梢枝の切断を行う際に頸部操作により三叉神経支配領域への介達力により三叉神経の軸索も障害を受けた可能性が示唆された。

なお、最下図はネガティブコントロールである。

以上によりラット顔面神経核において、顔面神経末梢枝を損傷することにより Hn-1 の発現が非障害側に比して up-regulate されることが示唆された。

#### 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 10 件)

1. Sakakibara S, Hashikawa K, et al. Neural circuit analysis of axons regenerated by facial-hypoglossal nerve cross-link surgery. *Regen Ther.* 2015; 1: 86-90.

2. Akashi M, Hashikawa K, et al. CT Evaluation of Morphology of Transferred Fibula for Implant Placement in Reconstructed Mandible. *Implant Dent.* 2015;24:541-6

3. Akashi M, Hashikawa K, et al. Sequential evaluation for bone union of transferred fibula flaps in reconstructed mandibles: panoramic X-ray versus computed tomography. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44:942-7

4. Sakakibara S, Hashikawa K, et al. Three-dimensional venous visualization with phase-lag computed tomography angiography for reconstructive microsurgery. *J Reconstr Microsurg.* 2015; 31: 305-12.

5. Ishida Y, Hashikawa K, et al. Development of a novel method for decellularizing a nerve graft using a hypertonic sodium chloride solution. *Int J Artif Organs.* 2014; 37: 854-60.

6. Sakakibara S, Hashikawa K, et al. Intima/medulla reconstruction and

vascular contraction-relaxation recovery for acellular small diameter vessels prepared by hyperosmotic electrolyte solution treatment. *J Artif Organs.* 2014; 17: 169-77.

7. Nakayama-Takeda R, Hashikawa K, et al. Comparison of malignant skin tumor thickness and relative depth of invasion estimates from preoperative MR-microscopy and pathological evaluation. *Dermatol Surg.* 2013; 39: 1767-73.

8. Akashi M, Hashikawa K, et al. Preoperative MR angiography for free fibula osteocutaneous flap transfer. *Microsurgery.* 2013; 33: 454-9.

9. 橋川和信. 【顔面神経麻痺の治療 update】陳旧性顔面神経不全麻痺に対するクロスリンク型神経移植術. *PEPARS.* 2014; 92: 87-93.

10. 橋川和信. 【神経修復法 基本知識と実践手技】末梢神経縫合 端々縫合と端側縫合. *PEPARS.* 2013; 78: 16-22.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 1 件)

橋川和信. 顔面神経再建のエビデンスは? 池田勝久, 武田憲昭, 香取幸夫, 原淵保明, 丹生健一, 編. *EBM 耳鼻咽喉科・頭頸部外科の治療 2015-2016*. 東京: 中外医学社; 2015. pp. 639-643.

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

橋川 和信 (HASHIKAWA KAZUNOBU)  
神戸大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号: 90403237

##### (2) 研究分担者

野村 正 (TADASHI NOMURA)  
神戸大学・医学部附属病院・特命講師  
研究者番号: 30529566

榊原 俊介 (SAKAKIBARA SHUNSUKE)  
神戸大学・医学研究科・特定助教  
研究者番号: 50444592

高須 啓之 (TAKASU HIROYUKI)  
神戸大学・医学研究科・特定助教  
研究者番号：40566022