

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11377

研究課題名(和文) 顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)による顔面神経再生促進効果の検討

研究課題名(英文) Effect of Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) on promotion of facial nerve regeneration.

研究代表者

藤巻 葉子(Fujimaki, Yoko)

東京大学・医学部附属病院・病院診療医(出向)

研究者番号：80462894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：顆粒球コロニー刺激因子(granulocyte colony stimulating factor,以下 G-CSF)による顔面神経に対する再生促進効果を検証するため、ラットの顔面神経切除または切断縫合モデルを用いて機能学的、組織形態学的解析を試みた。12週後の顔面の動きの評価、筋電図におけるCMAP振幅値、ENoG値、髄鞘化軸索直径値を各群間で比較した。結果、すべての評価項目において、顔面神経切除群に比して切断縫合群で有意に回復が早く、その中でもG-CSF投与群で有意に回復が早かった。これにより、G-CSFには顔面神経再生促進効果があることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顔面神経麻痺は比較的発症頻度が高い疾患で、患者には肉体的、精神的苦痛となる。治療に副腎皮質ステロイドが使用されるが、神経再生促進を目指した新しい治療戦略が求められている。G-CSFは白血球増加作用、造血幹細胞の末梢への動員作用があり、血液疾患等に使用されているが、近年、中枢神経保護作用も報告され、脳梗塞、脊髄損傷等、神経疾患への応用研究がなされている。しかし末梢神経の研究は少なく、末梢性顔面神経麻痺への応用は乏しい限りでは報告されていない。本研究でG-CSFには顔面神経再生促進効果があることが明らかになった。G-CSFは既に臨床で使用され安全性が確認されており、早期臨床応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the regenerative effects of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on the facial nerve, we performed functional and histomorphometric analyses using rat models of facial nerve resection, or amputation and suture. After 12 weeks, evaluation of facial movements, CMAP amplitude values in electromyogram, ENoG values, and myelinated axon diameter values were compared among groups. Results showed that, in all evaluation items, recovery was significantly faster in facial nerve amputation and suture groups than in resection groups, especially in the G-CSF-treated groups. This indicated that G-CSF had an effect to promote facial nerve regeneration.

研究分野：医学

キーワード：顔面神経麻痺 G-CSF G-CSFR 再生促進 drug delivery system 筋電図

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

顔面神経麻痺は、耳鼻咽喉科医が遭遇する運動神経障害の中で特に頻度が高い疾患である。初期治療として副腎皮質ステロイドが投与され一定の効果はあるものの、ワラー変性後の神経の再生には非常に長い時間を要し、不十分な再生に終わる場合もあり、患者は顔面運動機能や美容の問題から精神的にも大きな負担を抱えて生活することになる。これに対し、神経再生の促進を目指した新しい治療戦略が求められている。G-CSF は分子量約 19KDa, 174 個のアミノ酸からなる糖蛋白質でサイトカインファミリーに属し、顆粒球産生を制御することで知られる。単球-マクロファージ、血管内皮細胞、線維芽細胞、骨髄間葉系細胞などで恒常的に産生されていると考えられるが、生理的には微量にしか検出されない。G-CSF の働きとしては白血球の増加作用、造血幹細胞の末梢への動員作用があり、血液疾患や抗がん剤投与後の白血球減少症に対して臨床の場で長年使用されている¹。これらの作用が最もよく知られているが、近年の研究では、血球系への作用の他に中枢神経保護作用も報告されており、脳梗塞、脊髄損傷等、神経疾患への応用研究がなされている¹⁻³。しかし中枢神経に関する報告が主であり、末梢神経についての検討は少ない。さらに末梢性顔面神経麻痺への応用については、渉猟しえた限りでは、未だ報告されていない。そこで我々は、顔面神経部分切除または切断縫合術後のラットを用いて G-CSF による顔面神経再生促進効果を検証することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ラットを用いて顔面神経傷害モデルを作成後、顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte-colony stimulating factor、以下 G-CSF) 製剤を投与し、G-CSF による神経再生促進効果を検証し、そのメカニズムを探究し、さらに臨床応用に向けての最適な投与方法、投与量、投与期間を検討することである。

3. 研究の方法

SD Rat を用い、G-CSF 製剤はレノグラスチムを使用した。G-CSF 製剤は半減期が短いため、ドラッグデリバリーシステムである生体内吸収性ゼラチンハイドロゲル (MedGel[®]、和光純薬) を使用した。これは約 2 週間にわたり G-CSF を徐放する。左顔面神経を側頭骨外本管で処置した。顔面神経部分切除群は本管切断部から末梢側を 10mm 切除し、顔面神経切断縫合群は切断直後に神経上膜を端々縫合し、16G プラスチックカニューレ型穿刺針の外筒 1.5mm 長を縦割して縫合部に 3/4 周被せた。5 匹ずつ下記の 6 群を作成した。生理食塩水(210 $\mu\text{l}/\text{kg}$)、G-CSF (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ = 210 $\mu\text{l}/\text{kg}$ に調整)はゼラチンハイドロゲルに含浸し、背部皮下投与した。

- ① 神経を部分切除し、2、4 週後に生理食塩水を投与
- ② 神経を部分切除し、2、4 週後に G-CSF を投与
- ③ 神経を切断縫合し、2、4 週後に生理食塩水を投与
- ④ 神経を切断縫合し、2、4 週後に G-CSF を投与
- ⑤ 神経を切断縫合し、直後と 2 週後に生理食塩水を投与
- ⑥ 神経を切断縫合し、直後と 2 週後に G-CSF を投与

2, 4, 8, 12 週後に顔の動きの撮影・記録と筋電図検査を施行し、12 週後で顔面組織を採取した。

以下を評価項目とした。(1) 顔面の動きの評価: 眼瞼・鼻翼・口角・ひげの動き・安静時の対称性の 5 項目に対し、動きなし: 0 点、わずかに動きが認められる: 1 点、よく動くが健側よりは動きが弱い: 2 点、動きに左右差なし: 3 点として 4 段階評価し、合計の平均値を各群間で比較した(図 1)。(2) 筋電図 CMAP (複合筋活動電位) の振幅測定値: 左耳前部を開創し、切除または切断部より中枢側(茎乳突孔付近)に刺激電極を当て、導出マイナス電極は上口唇で正中から左側 2mm の箇所においた。刺激強度は最大刺激検査: MST として一律 2mA とし、1 回の計測につき 10 回加算し、計 5 回計測した。振幅の平均値を求め、群間で比較した。(3) 筋電図 ENoG 値: 12 週後の筋電図により得られた波形で左右の振幅値を求め、非切断側に対する切断側の振幅値の割合を%で表した数値を ENoG 値として各群間で比較した。

(4) 組織学的評価: 12 週後の顔面神経末梢側(頬枝)の組織に Klüver-Barrera (以下 KB) 染色を施行し、髄鞘化軸索直径値を計測し、平均値を群間で比較した。また眼輪筋と上唇挙筋における 12 週後の筋萎縮回復の様子を HE 染色により観察した。実験から得られた結果は、6 群で一元配置分散分析を施行、ライアンの方法による多重比較を行い、群間の有意差を判定した。さらにラットの左顔面神経本管を部分切除し、5 日後の顔面神経核と 14 日後のワーラー変性後の末梢顔面神経における G-CSF 受容体(G-CSFR) 発現の有無を確認するため、一次抗体として抗 G-CSFR 抗体を用いて蛍光染色を行った。

4. 研究成果

(1) 顔面の動きの評価(図 1, 図 2): G-CSF 投与の有無に関わらず、神経部分切除群①②に比べ神経切断縫合群③④で有意にスコア平均値が高かった($P < 0.01$)。切断縫合群では生理食塩水投与群③⑤に比べ G-CSF 投与群④⑥で有意にスコア平均値が高かった($P < 0.01$)。G-CSF 投与の時期の比較では処置 2 週後から投与した群④に比し、処置直後から投与した群⑥で有意にスコア平均値が高かった($P < 0.01$)。G-CSF 投与は早期から開始した方が効果が高いという結果になった。部分切除 2 群(生理食塩水投与群①と G-CSF 投与群②)間には有意差は認めなかった($p = 0.48$)。

(2) 筋電図 CMAP 振幅測定値の推移(図 3): 12 週後の振幅平均値で統計解析を行った。顔面の動きの評価と同様の傾向にあったが、部分切除群でも生理食塩水投与群①に比べ G-CSF 投与群②で振幅平均値が高く、有意差を認めた($P < 0.01$)

(3) 12 週後の ENoG 値の比較(図 4): 部分切除 2 群(生理食塩水投与群①と G-CSF 投与群②)間では有意差を認めなかった($p = 0.14$)が、他の群間に顔面の動きや振幅値と同様の有意差があった($P < 0.01$)

(4) 組織学的評価: 髄鞘化軸索直径値も振幅値と同様に各群間に有意差を認めた(図 5, 図 6)。各群 12 週後の眼輪筋と上唇挙筋での筋萎縮回復の程度を HE 染色で観察した結果(図 7, 図 8)、部分切除群①②では両筋が著明に萎縮していた。切断縫合群では部分切除群に比べ筋萎縮は軽度で、さらに G-CSF 投与群では、非切断側に近い筋量まで回復していた。左顔面神経本管を部分切除して 5 日後の顔面神経核と 14 日後の末梢顔面神経(頬枝)では、G-CSFR の発現が切除側において著明であった(蛍光染色)(図 9)。

顔面神経部分切除群と切断縫合群の比較では、視診、筋電図、および組織による評価項目において、切断縫合群で有意に回復が早かった。理由は軸索再生芽の伸長方向が迷うことなく決定さ

れるためと推測される。切断縫合 4 群においては、コントロール群に比べ、G-CSF 投与群で有意に回復が早かった。これにより、G-CSF には顔面神経再生促進効果があることが示された。そして神経機能の回復が早い群では筋委縮からの回復も早い傾向にあった。次に、G-CSF 投与時期については、神経切断縫合処置直後から G-CSF を投与した群⑥で最も回復が早かった。さらに2週後より投与した群④においてもコントロール群③に比して有意に回復が早かった。これにより投与が多少遅れても神経再生効果が期待できることがわかった。投与経路については、背部皮下注射で G-CSF の効果が確認できた。全身投与で効果が得られるので傷害部位を開創せずとも投与可能であり、発症より数日遅れてから、または追加投与が必要な場合でも同様に低侵襲で投与できる。神経損傷後の顔面神経核および末梢神経で G-CSFR の発現を確認した。これにより、顔面神経傷害に対して G-CSF が顔面神経核と末梢神経の双方に作用して効果を及ぼす可能性が示唆された。残念ながらこの研究期間中には最適な投与量の精査までは施行できなかった。

本研究により、G-CSF には、顔面神経傷害における神経再生促進効果があることが示された。G-CSF はすでに血液疾患などで临床上使用されており、安全性に関しては確認されている薬剤である。本研究で、その効果が示されたことにより、早期の臨床応用が期待できる。ただし、重症顔面神経麻痺後に生じる問題として病的共同運動がある。様々な薬剤で再生を促進することもできても、この問題を解決しない限りは重症症例において高い治療満足度は得られない。よって再生促進とともに、病的共同運動についても、より一層の研究が必要となるであろう。

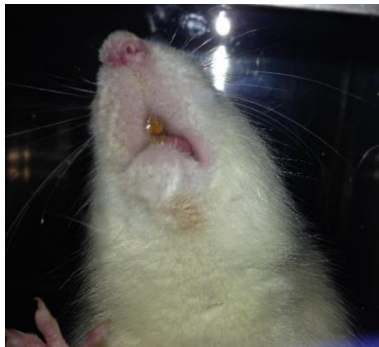


図1: SD ラット 左顔面神経麻痺

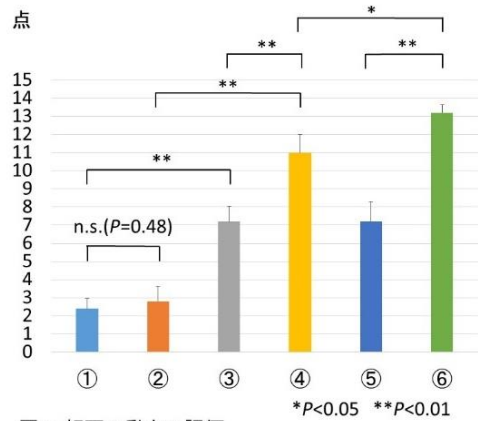


図2: 顔面の動きの評価

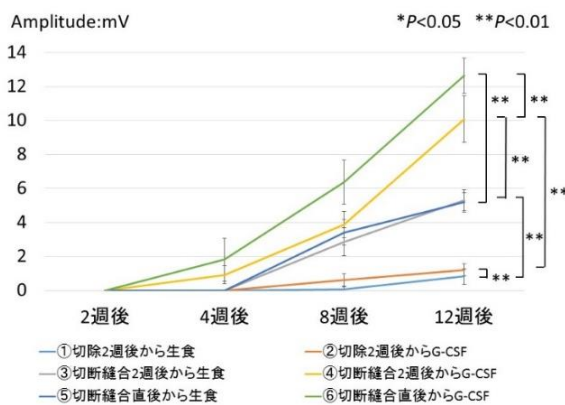


図3: 筋電図 CMAP 振幅測定値の推移

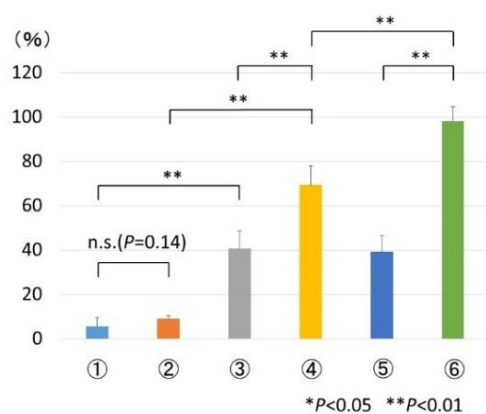


図4: ENoG値 (12週後)

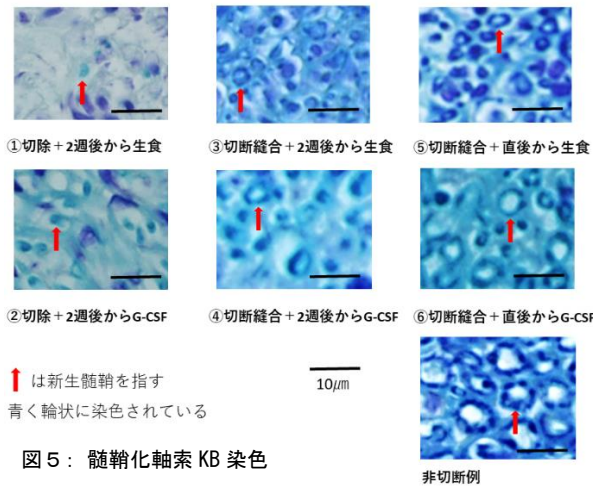


図 5： 髄鞘化軸索 KB 染色

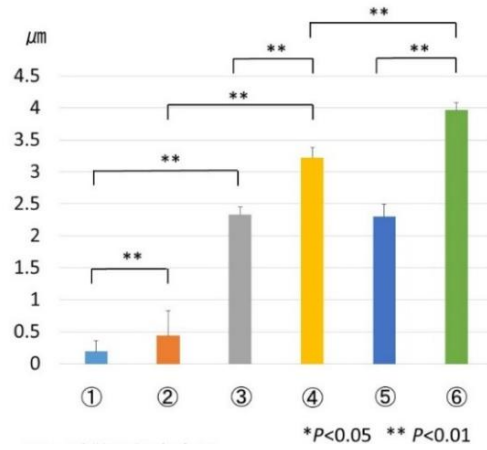


図 6： 髄鞘化軸索直径

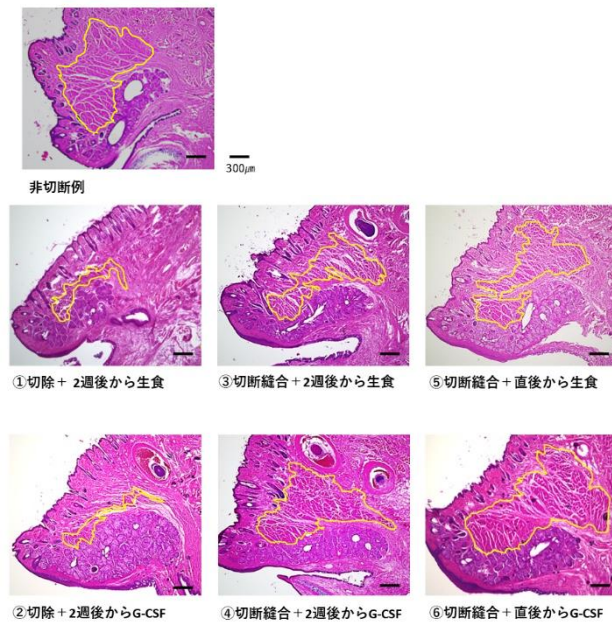


図 7： 眼輪筋 HE 染色

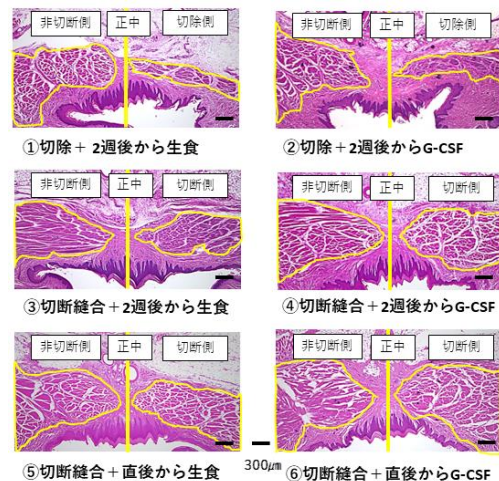


図 8： 上唇挙筋 HE 染色

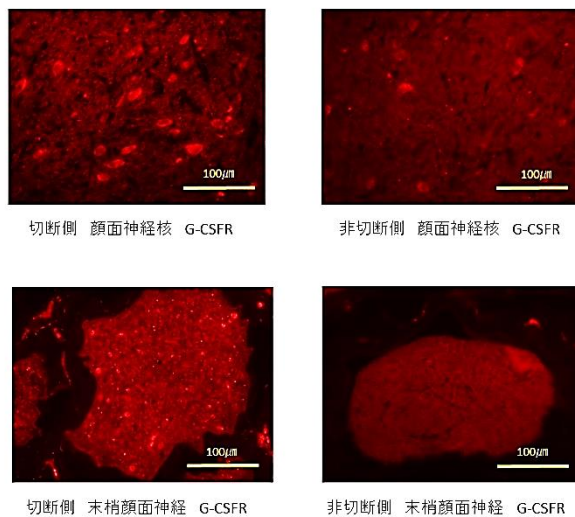


図 9： G-CSF 受容体 上段：顔面神経核 下段：末梢顔面神経（頬枝）蛍光染色

<参考文献>

1. 東條有伸, G-CSF の基礎と臨床: 医薬ジャーナル; 2013
2. Solaroglu I, etc, Anti-apoptotic effect of granulocyte-colony stimulating factor after focal cerebral ischemia in the rat. Neuroscience. 2006;143(4):965-74. 59.
3. Schneider A, etc., A role for G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) in the central nervous system. Cell cycle (Georgetown, Tex). 2005;4(12):1753-7

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	近藤 健二 (Kondo Kenji) (40334370)	東京大学・医学部附属病院・准教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関