

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19791210

研究課題名（和文） 顔面神経障害へのゲノム解析アプローチに関する研究

研究課題名（英文） Molecular analysis for facial nerve damage

研究代表者 寺岡 正人（TERAOKA MASATO）

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40444749

研究成果の概要：

顔面神経には種々の原因により多様な程度の障害が生じるが、障害程度の差により回復過程は異なる。顔面神経麻痺の新たな程度診断法として、顔面神経の支配筋である表情筋の変化に着目した。本研究では実験動物の顔面神経に「切断と挫滅」という2種類の障害を負荷し、その後生ずる遺伝子発現の変化を経時的に観察した。その結果、切断と挫滅で表情筋に発現する遺伝子に差異のあることを明らかにし、臨床応用への可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	450,000	3,550,000

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：顔面神経、表情筋、遺伝子発現、マイクロアレイ、網羅的解析、診断マーカー、リアルタイム PCR

1. 研究開始当初の背景

急性の末梢性顔面神経麻痺は、耳鼻咽喉科の日常臨床において最も頻繁に遭遇する末梢神経疾患の一つであり、一般に頭部外傷や腫瘍などによるものを除けば、麻痺の予後は概して良好である。しかし高度麻痺例の中には保存的治療で回復せず、麻痺後遺症が残ることも少なくなく、このような予後不良例をいかに早期に検出し適切に治療するかが大きな課題となっている。現在、顔面神経麻痺

の予後診断には主に顔面運動評価法と電気生理学的診断法が用いられているが、いずれも麻痺程度や神経変性程度を評価しているに過ぎず、高度麻痺例の予後診断には適さない。そこで著者は顔面神経障害後にみられる顔面表情筋の変化に着目した。もし顔面神経障害の程度や時期により表情筋の遺伝子発現に差があるとすれば、これを指標とした顔面神経麻痺の病態診断に応用できる可能性がある。

2. 研究の目的

顔面神経障害後の表情筋における RNA 発現を解析し、早期に神経損傷程度の判別が可能かを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験動物には 10 週齢、雄のウィスター系ラットを用いた。右側の耳後部を切開して側頭骨外で顔面神経を露出、茎乳突口から約 5mm の部位に次のいずれかの障害を加えた。すなわち、神経を完全に切断し末梢側を 5 mm にわたって切除した神経切断モデル（以下、切断群）と、マイクロ持針器を用いて 10 分間圧迫を加えた神経挫滅モデル（以下、挫滅群）の 2 種類を作製した。さらに神経を露出するだけで切断や挫滅などの障害を加えない sham operation を行ったものをコントロールとした（以下、コントロール群）。これらの処置後、経時的に眼瞼やヒゲの動きを肉眼的に観察し、表情運動の評価を行った。また、処置後 7 日目には神経障害程度の定量的評価として Electroneurography (ENoG) を測定した。ついでマイクロアレイ法を用いて顔面表情筋における遺伝子発現を検討した。その結果をもとに、障害後早期に発現する 3 種の RNA に着目して、定量評価を行うとともに、in situ hybridization 法を用いて顔面表情筋における RNA 発現の局在を検討した。

4. 研究成果

(1) 顔面運動の評価

両群とも処置直後より眼瞼やヒゲの動きが消失し、完全麻痺を呈した。切断群では 28 日を過ぎても表情運動が回復しなかったのに対し、挫滅群は 10 日目頃より徐々に表情運動が回復し、平均 17.6 ± 2.8 日で治癒に至った。ENoG 値は処置後 7 日目の切断群で 0%、挫滅群で $5.8 \pm 2.4\%$ であった。

(2) 顔面表情筋における RNA 発現のマイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析の結果、計 26,835 個のラット遺伝子の発現データを得た。切断群、挫滅群のコントロール群に対する変化割合が 2 倍以上増加した RNA の数は、検査時期によらず切断群は挫滅群よりも多く、その差は 28 日目で最も顕著であった。

(3) 顔面表情筋における RNA 発現の定量評価

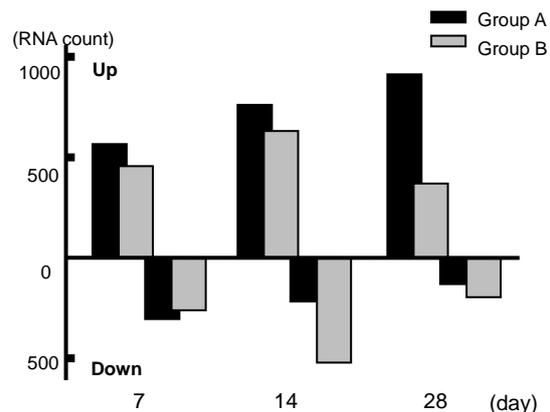
マイクロアレイ解析の結果より、myogenin (Myog)、vesicle-associated membrane protein 2 (Vamp2)、insulin-like

growth factor binding protein 6 (Igfbp6) の 3 種類の RNA を選択し、その発現を定量化した。いずれも、切断群での発現増加は挫滅群よりも著しく、7、14 日目において統計学的に有意差を認めた。

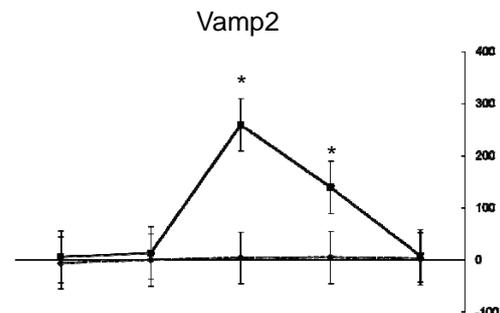
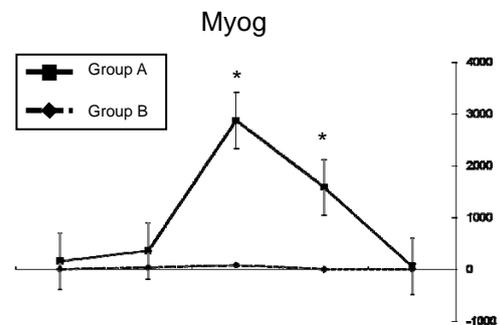
(4) 顔面表情筋における RNA 発現の局在

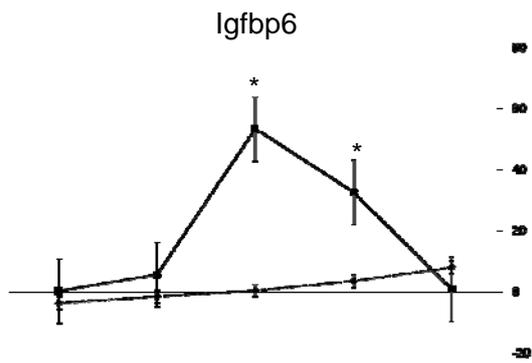
処置後 7 日目の切断群では、Myog の RNA 発現増加は顕著であり、顔面表情筋の筋線維辺縁に強い放射線活性がみられ、筋衛星細胞での発現増加が示唆された。

顔面表情筋における RNA 発現のマイクロアレイ解析

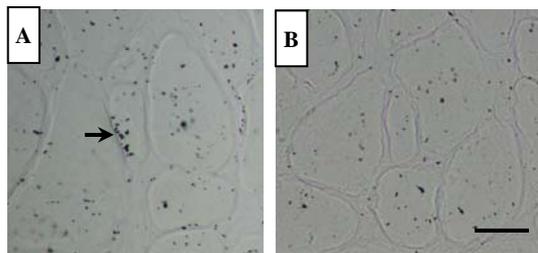


顔面表情筋における RNA 発現の定量評価





顔面表情筋における RNA 発現の局在



近年の分子生物学的技術の進歩に伴い、神経障害に伴う遺伝子やタンパク質発現に関する知見が集積し、臨床応用に向けた研究が進められている。本研究では顔面神経に「切断と挫滅」という 2 種類の障害を加え、その支配筋である顔面表情筋に発現する遺伝子の変化を解析した。その結果、処置後 1 週目の電気生理検査でいずれも高度障害と評価されたものの、両者の遺伝子発現には大きな差異のあることが分かった。麻痺の予後は挫滅群の方が切断群よりも有意に良好であることから、遺伝子解析は予後診断に応用できる可能性がある。

神経障害後の支配筋における遺伝子発現の変化については、すでに四肢筋において研究が進み、マイクロアレイ法を用いた網羅的解析の結果が報告されている。Batt らは腓骨神経切断 1、3 ヶ月目の支配筋において、発現が変化した遺伝子を機能別に分類し、神経切断からの時期と遺伝子発現の関連について検討している。その結果、cell cycle

regulator および extracellular matrix components をコードする遺伝子の発現に差があり、これは神経切断後の不可逆的变化に関連していると述べている。Kostrominova らは支配神経切断 2 ヶ月目のヒラメ筋における遺伝子発現を詳細に検討している。神経切断後に有意な変化を認める 121 種類の遺伝子を同定し、その機能を探索したところ、増加した遺伝子の多くは「胎生期の骨格筋において強く発現し、大人になると減少する」遺伝子であると報告している。さらに神経切断後に電気刺激を加えると、これらの遺伝子の発現が著しく減少することを明らかにし、神経活動電位や筋収縮が遺伝子発現に影響すると指摘している。現在のところ、顔面神経において切断と挫滅の遺伝子発現に対する影響を比較した報告はなく、本研究が世界初と思われる。その結果、神経障害後は早期より表情筋の RNA 発現に変化がみられ、切断群は挫滅群よりも RNA 発現増加が顕著であった。また切断群で処置後 7、14 日目に有意に発現量が増加する RNA を同定することができた。これらの結果から、神経障害後早期より顔面表情筋における RNA 発現は変化すること、またその発現は障害の種類により差異のあることが明らかとなった。

今回の結果から、外傷や手術などで顔面神経が完全麻痺をきたした場合、神経が断裂しているか、挫滅に留まっているかで表情筋における RNA 発現に差異のあることが予想される。近年、ヒトの骨格筋より組織を採取し、MRFs や IGF1 の RNA 発現をマーカーとした遺伝子レベルの病態評価が報告されるようになってきた²⁴⁾²⁵⁾。本研究で得られた遺伝子発現変化のデータに基づいて、顔面神経麻痺患者から障害早期に針生検などで顔面表情筋を少量採取し、RT-PCR 法を用いて RNA 発現量を定量することで、それをマーカーと

した神経障害程度の診断に応用できる可能性がある。もし、このような方法で発症早期における高度麻痺例の病態診断が可能となれば、治療方針の決定に重要な情報を与えてくれる。すなわち、切断例のように自然回復の見込みが全くない例は手術治療の適応があり、できるだけ早期に神経吻合術や神経移植術などを受けるべきであろう。一方、挫滅例のように高度麻痺ではあるが回復しうる場合は保存的治療が優先され、手術は保存的治療で治らない例に限られるべきである。従来、このような判断は医師の経験に基づいて行われてきたが、表情筋の遺伝子検索が普及すればEBMに基づいた治療が可能となるわけで、早期の臨床応用が期待される。

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 寺岡正人 顔面神経高度麻痺モデルにおける表情筋での遺伝子発現 愛媛医学 28(2),50-56,2009 (査読あり)
- ② 寺岡正人、羽藤直人、暁清文 顔面神経障害後に生じる表情筋におけるRNA発現の変化 Facial nerve research 28, 68-70, 2008 (査読あり)
- ③ 寺岡正人、菰渕勇人、羽藤直人、暁清文 顔面神経障害後の表情筋における遺伝子発現変化 Facial nerve research 27, 120-122, 2007 (査読あり)

[学会発表] (計2件)

- ① 寺岡正人 顔面神経障害後に生じる表情筋におけるRNA発現の変化 第31回日本顔面神経研究会、2008年5月29日、(東京)
- ② 寺岡正人 顔面神経障害後の表情筋における遺伝子発現変化 第30回日本顔面神経研究会、2007年5月31日、(名古屋)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺岡 正人(TERAOKA MASATO)

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40444749

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：