

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18737

研究課題名（和文）顔面神経損傷後の神経変性、筋萎縮の分子機構と防止に関する研究

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of neurodegeneration and muscle atrophy after facial nerve injury

研究代表者

関谷 真二（SEKIYA, SHINJI）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：50770591

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：顔面神経損傷において、神経を即時再建しなければ筋は急速に萎縮するのに対し、即時再建すると筋萎縮は抑制される。本研究課題では神経即時再建の際の未知のシグナルや因子を探求するのが目的である。今回、動物モデルを作成し、神経・筋接合部を形態学的に観察するとともに神経や筋に発現する遺伝子を網羅的に解析した。そして、両モデル動物の神経・筋における形態や遺伝子発現を比較することで、神経再生・変性に関する新たなシグナルや因子を検索した結果、その分子学的機構の一部を解明することが出来たと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顔面神経麻痺は多くの患者の生活の質を左右する重篤な疾患であり多くの患者が現在も悩まされている。今回神経即時再建を行った際の分子シグナルを探ることで今後の治療法の確立に応用できることを期待したい。

研究成果の概要（英文）：In facial nerve injury, muscle atrophy occurs rapidly if the nerve is not immediately reconstructed, whereas muscle atrophy is suppressed by immediate reconstruction. The purpose of this research project is to explore unknown signals and factors during immediate neuronal reconstruction. In this study, we created an animal model and observed the neuromuscular junction morphologically and comprehensively analyzed the genes expressed in nerves and muscles. By comparing the morphology and gene expression in the neurons and muscles of the two model animals, we were able to search for new signals and factors related to nerve regeneration and degeneration, and as a result, we were able to elucidate some of the molecular mechanisms.

研究分野：顔面神経麻痺

キーワード：顔面神経麻痺

1. 研究開始当初の背景

臨床経験において顔面神経を外傷もしくは腫瘍摘出術などで切断した際に顔面神経を即時再建した症例と切断し未再建症例で比べると、未再建症例では術直後は筋緊張を失い数週で速やかに筋体量の減少を伴うが、縫合症例では術直後から筋緊張が保たれ、その後も筋体量の維持が成されることを実感されることがある。しかしながら元来 waller 変性により切断後は切断部から神経筋接合部まで速やかに神経軸索は形質転化した修復シュワン細胞及びマクロファージなどにより分解されるため、縫合有無に関わらず筋緊張を保つ電気刺激は消失し、タンパク質や mRNA の終末への軸索輸送も失われるはずである。また神経の再支配が始まるのは早くても数週間は要し、直後から筋緊張が保たれる上記の臨床経験とは矛盾する。縫合により切断部から中枢へと軸索を介した逆行輸送にて何かしらのシグナルが送られ、筋体保護作用へシフトしている可能性がある。それに加え損傷後末梢軸索が分解されるまでの間、再建した神経縫合により神経核から神経終末部までの軸索輸送が一時的に保たれるのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

顔面神経を即時再建した症例と切断し未再建症例で比べると、未再建症例では術直後は筋緊張を失い数週で速やかに筋体量の減少を伴うが、縫合症例では術直後から筋緊張が保たれ、その後も筋体量の維持が成されることを実感されることがある。しかしながら元来 waller 変性により切断後は切断部から神経筋接合部まで速やかに神経軸索は形質転化した修復シュワン細胞及びマクロファージなどにより分解されるため、縫合有無に関わらず筋緊張を保つ電気刺激は消失し、タンパク質や mRNA の終末への軸索輸送も失われるはずである。また神経の再支配が始まるのは早くても数週間は要し、直後から筋緊張が保たれる上記の臨床経験とは矛盾する。縫合により切断部から中枢へと軸索を介した逆行輸送にて何かしらのシグナルが送られ、筋体保護作用へシフトしていること可能性がある。それに加え損傷後末梢軸索が分解されるまでの間、再建した神経縫合により神経核から神経終末部までの軸索輸送が一時的に保たれるのではないかと仮説を立てた。今回はそのメカニズムを明らかにすることが目的である。

メカニズムを明らかにすることにより神経再生、神経保護、筋肉拘縮保護などの治療の新たな可能性や裾野を広げていくことが可能になると考えている。

3. 研究の方法

本研究では、顔面神経を切断した後、即時神経再建する動物モデルと神経再建しない動物モデルを作成し、神経-筋接合部を形態学的に観察するとともに神経や筋に発現する遺伝子を網羅的に解析する。そして、両モデル動物の神経・筋における形態や遺伝子発現を比較することで、神経再生・変性に関する新たなシグナルや因子を検索し、その分子学的機構を解明することとした。

まずは神経筋接合部及び神経吻合部の経時的形態評価を行うべく顔面筋機能解析と神経筋接合部の形態学的検討を行った。神経再生の効果を検討するため、神経挫滅群、完全切離群の動物モデルを作成した。ラットの茎乳突孔より末端部の左側顔面神経本管を完全に切離後、切断群では神経の近位端、遠位端の間に断端縫合後シリコン板を留置した。即時再建群ではナイロン糸を用いて神経縫合を行った。偽手術では神経露出のみを行う群とした。

顔面筋の機能解析としてはマウスの髭の運動 (whisking) を解析し運動の振幅、角速度、周波数を計測し比較検討した。顔面筋の筋委縮性変化の評価顔面筋の筋委縮性変化の評価をする上で各群の口輪筋の筋全体の断面積と単一筋繊維の断面積を切片作成後 HE 染色にて評価を行った。

一方で神経接合部の観察においては作成切片にて染色行くと部分的な染色は得られるが神経の広がりや染色できない上に接合部の局在はばらつきがあり客観性のあるデータが得られなかったため今回 Whole mount 染色での広範囲の筋肉塊及び神経挫滅部の免疫染色を行った。

網羅的な遺伝子解析を行うためそれぞれの群で術後 1 週間後の検体をマイクロアレイを用いて網羅的に解析を行った。

4. 研究成果

まずは顔面神経麻痺の評価方法が確立していなかったため無料公開ソフトウェアとハイスピードカメラを用いた顔面神経麻痺の動物評価モデルを独自に作成した。顔面神経再生の評価のために、齧歯類においては髭の震え (whisker) を観察することが一般的である。しかしながら目視による麻痺スコアを用いた評価方法が多くの場合実施されているのが現状である。マウスの髭運動は、非常に速いため客観的かつ正確な評価を行うことは困難であったためである。近年では動画を撮像し動作解析を施行した報告もあるが、システムを構築

するには多大な労力と費用がかかる。そのため、すべての施設で容易に行える whisker 解析の評価手法を開発した。

またその正確性を客観的に評価するため神経筋接合部と今回得られた運動機能との関係を調べるべく顔面神経再建の後に免疫染色を行った。手術後 1 週間から手術 5 週間後の顔面筋を採取し、神経筋接合部後シナプスを α -bungarotoxin、神経線維を neurofilament 抗体で染色した。神経支配率は、得られたウィスカーの回復率との極めて強い相関を示した。このことは当評価法の客観性を裏付けるものと考えられた。

次にラット表情筋採取後免疫染色と電子顕微鏡にて神経即時再建群と切断群での表情筋や末梢神経の変化の観察を行った。まずは電子顕微鏡にて明らかに即時再建群で神経筋接合部の形態が保たれていることが分かった。同様に免疫染色でも神経即時再建群にてそれらの形態の一部において優位に変性が抑制されることが分かった。

またラットの表情筋を再建群、切断群、偽手術群のラットの表情筋を採取しマイクロアレイにて網羅的遺伝子解析を行った。パスウェイ解析を行い一部で有意な結果を得られた。今後は更なる解析を加えて報告していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shinji Sekiya, Akira Inagaki, Shingo Murakami, Shinichi Iwasaki	4. 巻 56
2. 論文標題 Novel method for evaluating mouse facial nerve function using commercial products and free software	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nagoya Medical Journal	6. 最初と最後の頁 201-210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------