

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390331

研究課題名（和文）運動神経信号付加は本当に起こっているのか？
～顔面表情筋 mRNA 発現変化を捉える～

研究課題名（英文）Dynamic change of Myogenin in denervated rat mimetic muscle: Does the neural repair repress its expression?

研究代表者

山本 有平（YAMAMOTO YUHEI）

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70271674

研究成果の概要（和文）：顔面表情筋内の Myogenin mRNA 発現は完全麻痺にあたる脱神経により増加し、不全麻痺においては中等度の増加が認められた。また、その直後に端々神経縫合再建もしくは端側神経縫合再建を行う事で減少を認めた。その変化は実際に顔面表情筋に再生軸索が到達し、表情筋運動に変化が現れる以前であり、顔面表情筋における Myogenin 発現は顔面神経麻痺の術後早期における予後判定の評価に有用であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Myogenin expression in facial mimetic muscles would be accumulated by denervation rapidly, and repressed by nerve repair. Myog expression level of mimetic muscle, just after nerve repair, will help surgeon to predict the post-operative prognosis for facial palsy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：形成外科

キーワード：顔面神経不全麻痺，神経信号付加，端側神経縫合，リアルタイム PCR, Myogenin

1. 研究開始当初の背景

我々は顔面神経麻痺に対する表情筋運動の再建方法のひとつとして顔面神経と舌下神経間に端側神経縫合を用いた **Inter Positional Nerve Graft (IPNG)** を応用した再建を行ってきたが、基礎研究においては神経トレーサーによる入力経路の研究が進む一方で、顔面表情筋の変化を遺伝子レベルで捉えることが神経入力の有効性を評価するうえで必要と考えられた。そこで、2008年

に寺岡，羽藤らが明らかにした，神経傷害後に顔面表情筋内で変化する mRNA について定量することで，顔面神経麻痺の予後，手術適応，手術効果の判定に応用できると考えられた。

2. 研究の目的

(1) ラットの陳旧性顔面神経不全麻痺モデルの作成。

(2)ラットの急性および陳旧性神経麻痺モデルの表情筋 RNA 発現の比較。

(3)ラットの陳旧性顔面神経不全麻痺モデルへの IPNG 手術による介入。

(4)(2)による表情筋の変化, 神経入力の変化を RNA 発現の定量により評価する。

3. 研究の方法

(1)ラット顔面神経完全麻痺・不全麻痺モデルを作成する。

(2)ラット顔面神経麻痺モデルに対し, 同側の舌下神経と顔面神経を用いた各種神経再建を行う。

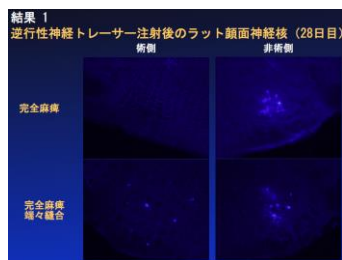
(3)逆行性神経トレーサーによる軸索再生の評価と表情筋運動回復の評価(スコア化)を行う。

(4)顔面表情筋における Myogenin mRNA の発現を経時的に測定する。

(5)手術による介入で Myogenin mRNA の発現に差を生じるか調べる。

4. 研究成果

顔面神経麻痺・不全麻痺を再現した動物モデルに手術介入を行い, 顔面表情筋における分子生物学的因子の及び表情筋運動の評価を行い, 神経損傷および再建術後の信号付加を証明する研究を行った。過去の研究より Myogenin(Myog)をターゲットとして研究を開始した。

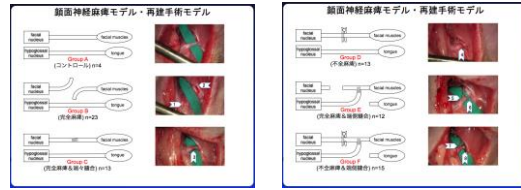


本研究ではまずラットの顔面神経に対する完全麻痺およびそれに対する端々神経縫合再建モデルを作成した。トレーサー

により再建後顔面神経核から表情筋までの軸索の連続性を確認した。

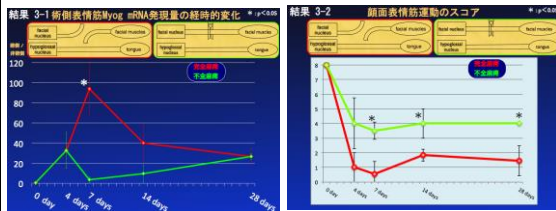
更に各期間の表情筋内で Myog mRNA 発現を RT-PCR により定量的に解析し, 顔面神経麻痺を起こしたラット顔面表情筋内に発現する Myog mRNA の増減は, 手術介入の有無で相違を認めることを確認した。次にラット顔面神経において6種類のモデルを作成した。すなわち(1)コントロールモデル, (2)完全麻痺モデル, (3)完全麻痺に対する端々神経縫合再建モデル, (4)不全麻痺モデル, (5)完全麻痺に対する端側神経縫合再建モデル, そして

(6)不全麻痺に対する端側神経縫合再建モデルを作成した(下図)。それぞれのモデルにおいて Myog mRNA 発現を Real time RT-PCR による時系列で定量評価し, 更に運



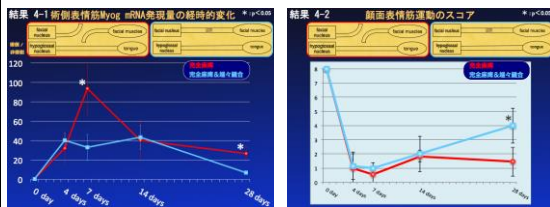
動スコアを評価した。

術側表情筋 Myog mRNA の発現量の変化を完全麻痺モデルと不全麻痺モデルで比較した。上段はそれぞれのモデルのシェーマ, 下が myog 発現の相対値の推移を示す。4 日目において同様に上昇した Myog は 7 日目において完全麻痺で上昇, 不全麻痺では低下を認め, 有意差を認めました。その後 28 日目において, 2 つのモデルの myog 発現はほぼ同値に終息した(下図)。



同様の 2 つのモデルにおいて表情筋運動のスコアを比較した。7 日目以降で完全麻痺モデルではスコアが 0~2 の低い値で推移し, そして不全麻痺モデルでは 3~5 の中程度の不全麻痺を示す値で推移した(上図)。

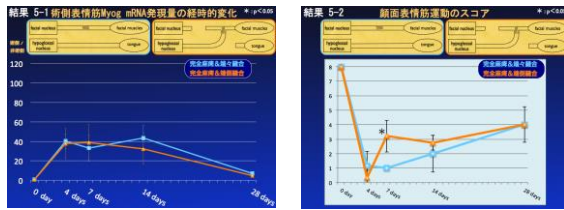
mRNA の変化を完全麻痺モデルとそれに対する端々神経縫合モデルで比較した。4 日目までは同等の上昇を示しますが, 7 日目において端々神経縫合モデルでは Myog 発現の更なる上昇を認めず, 完全麻痺群との間に有意差が存在した。一方 28 日目においては端々神経縫合を行ったモデルで, 有意に Myog 発現の低下が認められた(下図)。



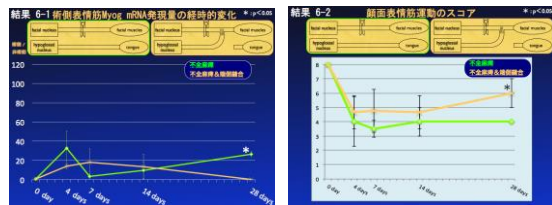
同様の 2 つのモデルにおけるスコアは 7 日目までに両者で低下するものの, 端々神経縫合モデルにおいてはその後上昇を認め, 28 日目において完全麻痺に比べて有意に上昇していた(上図)。

mRNA の変化を完全麻痺モデルに対する端々神経縫合と端側神経縫合で比較した。myog 発現は両者とも 4 日目まで上昇した後

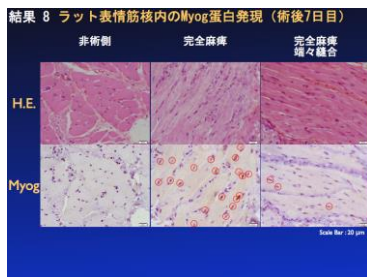
は上昇せず、緩やかに減少を示し、28 日目にはほぼ同様の値まで低下していた（下図）。



同様の2つのモデルにおけるスコアは 4 日目では有意差を認めず、7 日目において端側縫合でのスコアに有意差を認めたが、28 日目に向けては緩やかに上昇し 28 日目で中等度の不全麻痺と判断されるほぼ同等のスコアを示した（上図）。 mRNA の変化を不全麻痺とそれに対する端側神経縫合で比較した。28 日目において端側神経縫合モデルの発現が不全麻痺モデルに対し有意に低下していた（下図）。



同様の 2 つのモデルにおけるスコアは 途中有意差を認めず、28 日目において端側神経縫合モデルが不全麻痺に対し有意に上昇していた（上図）。 更に顔面表情筋の筋細胞核内に合成される myog蛋白の発現についても解析を行った。写真はそれぞれ術後7日目の顔面表情筋である。上段がHE染色、下段はMyog蛋白がDABにより染色されている（下図）。 左が非術側、中央が完全麻痺モデル、そして右が完全麻痺への端々縫合モデルである。非術側では染色された核がほとんど存在しないのに対し、完全麻痺モデルにおいては多くの核が染色され、端々神経縫合再建モデルにおいては完全麻痺モデルに比べ少数の核が染色されているのが分かる（下図）。



結果の総括として、
(1) 本実験で作製したラットの顔面神経麻痺の再建モデルにおいて軸索再生を脳幹レベルで確認した（術後 28 日目）。

(2) 顔面神経麻痺モデルと不全麻痺モデルにおいて、過去に報告された表情筋スコアの再現性を確認できた。

(3) 脱神経により顔面表情筋における Myog mRNA 発現は上昇し、その後の神経再建により発現は低下することが示された。

(4) 術後 7 日目の不全麻痺モデルにおいて Myog mRNA 発現は完全麻痺モデルに比べ有意に低下していた。

(5) 完全麻痺に手術介入を行ったモデルにおいて Myog mRNA 発現は介入を行わないモデルに比べて有意に低下していた（術後 28 日目）。

(6) 完全麻痺に手術介入を行ったモデルにおいて手術方法（端側/端々）による Myog mRNA 発現に差は認められなかった。

(7) 不全麻痺に端側神経縫合再建を行ったモデルにおいて Myog mRNA 発現は再建を行わないモデルに比べて有意に低下していた（術後 28 日目）。

これらの結果より、今回の研究において、ラット顔面神経の完全・不全麻痺モデルと、それらに対する神経縫合再建モデルを用いて、麻痺/再建後の神経信号入力変化を分子生物学的に捉えることに成功した。また、Myog は顔面神経麻痺の重症度判定、および神経再建術後早期における予後判定因子として重要な役割を果たしており、臨床における治療法選択に重要な役割を果たす可能性が示された。

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)

- [学会発表] (計 3 件)
- ① 蕨 雄大, 顔面神経麻痺による神経信号入力変化を RNA で捉える-顔面表情筋 mRNA 発現の定量的評価- (第 3 報), 第 21 回日本形成外科学会基礎学術集会, 2012 年 10 月 4 日, 猪苗代 リステル猪苗代
 - ② 蕨 雄大, 顔面神経麻痺による神経信号入力変化を RNA で捉える-顔面表情筋 mRNA 発現の定量的評価- (第 2 報), 第 20

回日本形成外科学会基礎学術集会，2011
年10月6日，東京 ハイアットリージェ
ンシー東京

- ③ 蕨 雄大，顔面神経麻痺による神経信号
入力変化を RNA で捉える-顔面表情筋
mRNA 発現の定量的評価- (第1報)，第19
回日本形成外科学会基礎学術集会，2010
年9月16日，横浜 東京ビックサイト

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 有平 (YAMAMOTO YUHEI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70271674

(2) 研究分担者

関堂 充 (SEKIDOU MITSURU)
筑波大学・人間総合科学研究科・教授
研究者番号：60284410

羽藤 直人 (HATOU NAOTO)
愛媛大学・医学部附属病院
研究者番号：60284410

古川 洋志 (FURUKAWA HIROSHI)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究番号：00399924

小山 明彦 (OYAMA AKIHIKO)
北海道大学・大学病院・講師
研究番号 70374486

舟山 恵美 (FUNAYAMA EMI)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：10533630

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

