

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462230

研究課題名(和文) 神経筋接合部を標的にした末梢神経再生

研究課題名(英文) Promotion of peripheral nerve regeneration targeted neuromuscular junction

研究代表者

若林 良明 (WAKABAYASHI, YOSHIAKI)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：00431916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Thy1-YFP Tgマウス腓骨神経切断モデルで運動神経の再生過程を可視化した。神経切断後の前脛骨筋内では数日以内にYFP陽性神経線維が消失し、2週以降にシュワン細胞が消失した。一方、神経筋接合部(NMJ)は、切断6週目でも残存していた。よって神経切断から再建までの期間を4週(4週群)と6週(6週群)に設定し、経時的に10週間観察した。その結果、4週群のほうが、運動機能の回復が良好であった。組織学的解析では、4週群のほうが6週群よりも約3倍のNMJが観察できた。本研究結果から神経切断4週と6週間でNMJ変性に関連した分子機序の違いが推察され、同分子の解明によって神経再生の促進が見込まれた。

研究成果の概要(英文)：In this study, motor axon denervation and regeneration in the tibialis anterior (TA) muscle was examined after peroneal nerve transection in Thy1-YFP transgenic mice. Peroneal nerve function index was calculated every 2 week after transection of left peroneal nerve. TA muscles were histologically evaluated with BTX as neuromuscular junction (NMJ) and S100 as Schwann cells. Motor axons were visualized with YFP. The transected nerves were repaired with wild-type allograft 4 weeks or 6 weeks after the transection. Without repair, YFP expressions were disappeared within 3 days, Schwann cells within 2 weeks, and BTX areas were remained until 6 weeks. Mice in 4-week repair group showed better motor function and more regenerated NMJs than 6-week repair group. There will be molecular differences of degeneration of NMJs in TA between 4 and 6-week repaired mice. Prevention of muscle atrophy and degeneration of NMJ should be needed to promote functional recovery after peripheral nerve injury.

研究分野：末梢神経外科

キーワード：神経再生 神経科学 末梢神経

1. 研究開始当初の背景

整形外科領域において末梢神経再生は、脊髄再生と並ぶ大きな目標である。過去にさまざまな工夫がなされ微小手術外科手技の発展によって神経束縫合が行われ比較的良好な成績が得られるようになった。しかし、高エネルギー損傷や創挫滅の強い症例では神経欠損部位が広く、神経断端が短縮してしまうために一次縫合できない症例がある。

我々は、2008年度から科研費によって「末梢神経損傷に対する低分子Gタンパク質発現制御を標的とした遺伝子治療法の確立」、さらに「神経栄養因子と上皮成長因子(EGF)受容体制御による末梢神経再生」について研究を継続してきた。前者の実験結果から末梢神経に軸索再生阻害因子を阻害する組換えアデノウイルスによる遺伝子導入と人工神経の併用によって人工神経のみと比較して約2倍ものミエリン軸索を持つ再生神経を得ることができた。しかし、本治療方法を用いても機能回復は不十分で、ラット足趾の拘縮や筋萎縮が残存するケースが多く認められていた。後者の研究課題においても足趾拘縮例が散見された。

よって末梢神経は再生しやすい環境とはいえ、神経損傷部位のみの制御では限界があり、運動神経の最終到達作用部位である神経筋接合部(NMJ)の変性ならびに萎縮筋の状況を理解し再生を促す新規手法の開発が重要と考えた。

2. 研究の目的

末梢神経は、中枢神経損傷と異なりシュワン細胞の増殖および再生軸索支持によって再生能を有しているが、損傷範囲が広範であれば再生に時間を有する。神経断裂が明らかなきは、外科的治療方法によって神経縫合あるいは架橋が必要となるが、損傷後の経過が長く神経縫合が遅れた場合には、神経筋接合部(NMJ)の変性および筋萎縮によって不可逆な機能障害が生じる。NMJはシュワン細胞・軸索終末・アセチルコリン受容体で構成されているが神経損傷に伴う変性と再生に注目した研究は少ない。本研究では、末梢神経損傷モデルを使用し、NMJの変性保護に注目し、神経損傷における神経再生ならびに拘縮予防の新規治療法の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

(1)Thy1-YFPトランスジェニックマウスを使用した腓骨神経切断モデルの作製：本マウスでは神経筋接合部(NMJ)の可視化が可能となっている(Feng G, et al., Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. Neuron. 2000)。

(2)腓骨神経再生：切断のみの切断群、4週後に近位切断端を展開して野生型allograftで再建した(AG4週)群、切断6週後同様に再建した(AG6週)群を作製した。

(3)運動機能テスト：神経縫合後2週間ごと

に後肢足底のビデオ撮影を行い、機能回復を定量化した。定量化には、足底の荷重面、足趾の開きを計測して sciatic nerve function index (SFI) と peroneal nerve function index (PFI) を算出した。

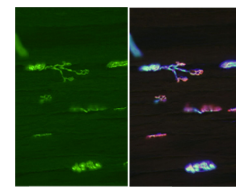
(4)神経切断、再建後の前脛骨筋(TA)、再生神経、NMJ、シュワン細胞の評価：Thy1-YFPマウスを用いて腓骨神経を露出させ分岐部で切断する。神経切断後は、前脛骨筋萎縮が経時的に進行していく。灌流固定後、神経縫合部を含んだTAを採取し、凍結切片を作製した。組織学的に軸索をYFP、NMJをbungarotoxin(BTX)Alexa 594で可視化し、S100抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、蛍光色素付き2次抗体でシュワン細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

(5)グリア細胞由来神経栄養因子GDNFおよびL型Caチャンネル作用薬(BayK8644)による神経筋接合部の保護効果：腓骨神経切断後に浸透圧性のミニポンプを用いて筋組織周囲にGDNFやBayK8644を3日間局所投与し、対照群と比較する。

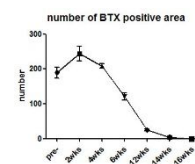
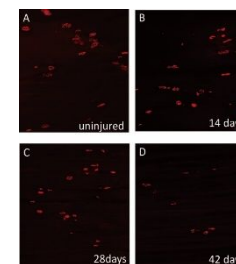
4. 研究成果

(1)Thy1-YFPトランスジェニックマウス腓骨神経切断モデル後の経時的変化

正常TA内では、YFPで軸索が可視化され、シュワン細胞は軸索に沿って局在し、NMJはBTXで可視化されている(右写真)。



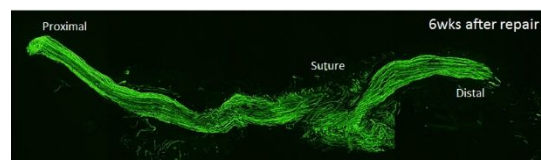
腓骨神経切断後のTA内のNMJを経時的にBTXで可視化して(右写真)、BTX数を定量すると切断2週でBTX陽性数が一時的に増加し、4週以降急速に低下していた(右グラフ)。



一方、YFP陽性線維は、損傷1日目から減少し、3日以降、陽性線維の観察はできなかった。S100は、損傷1週で観察されたものの2週以降はBTXと近接する部位が観察されなくなった。

(2)腓骨神経再建後の神経再生

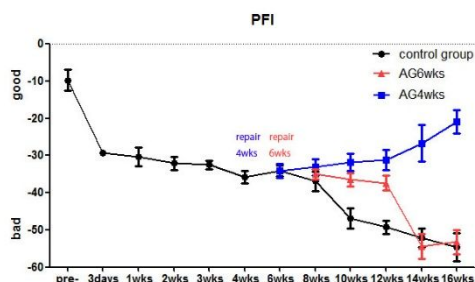
腓骨神経切断後、近位神経断端を見つけ、野生型allograftと縫合し、遠位断端をTA内に挿入した。4週、6週でallograft部分を含む腓骨神経を採取し、凍結切片を作製した。近位端からYFP陽性線維を認め、縫合部遠位までYFPを観察することができた(下写真)。



腓骨神経近位断端から遠位方向に神経再生が進行し allograft 内を通過して TA 内に再生していることが明らかとなった。

(3) 切断、再建後の運動機能の回復

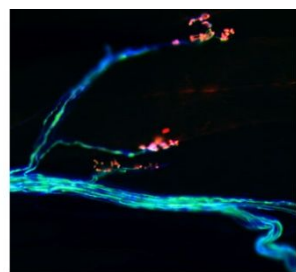
切断群の PFI は徐々に低下し、4 週以降プラトーとなり、10 週後さらに低下した。AG4 週群は徐々に足趾開排が改善し、再建 10 週で再建前より改善した。一方、AG6 週群は再建後 6 週まで再建前と変化なく 8 週で悪化した (下グラフ)。



よって神経機能を再獲得するためには6 週以前での神経再建を考慮する必要があった。

(4) 切断後の前脛骨筋 (TA)、腓骨神経再生、NMJ、シュワン細胞の組織学的評価

AG4 週、6 週ともに allograft 内に YFP 陽性線維が観察され筋内で BTX 陽性部と接していた (右写真: AG4 週群再建 12 週後の TA 内)。



YFP: axon / NMJ: BTX / Schwann cells: S100

TA 内の BTX 陽性数は切断前で平均 190 個、切断後 4 週で平均 209 個、6 週で 121 個、16 週では 0 であった。再建 10 週時では、AG4 週群平均 71 個、AG6 週群平均 31 個であった。

(5) グリア細胞由来神経栄養因子 GDNF および L 型 Ca チャネル作用薬 (BayK8644) による神経筋接合部の保護効果

現在、準備中となっている。

(6) まとめ

腓骨神経切断後の前脛骨筋では、数日中に神経線維が消失し、切断 2 週目までにシュワン細胞が消失していた。一方、NMJ は 4~6 週まで残存していることが明らかとなった。よって遅くとも 6 週までに神経再建する必要があると考えた。本研究では、神経切断後の再建までの期間を 4 週、6 週の 2 期間を設定した。その結果、切断 4 週して再建したほうが、足趾運動機能の回復が良好であった。神経切断 4 週と 6 週では TA 内の NMJ の残存数に差があり、NMJ が維持されている分子メカニズムの解明が示唆された。現在、神経栄養因子を含めた解析を進め、申請時の計画通り、脱神経による筋萎縮予防のため神経栄養因子、L 型 Ca チャネル作用薬投与の準備を行っている。

本研究成果から脱神経となった骨格筋内

でのアセチルコリン受容体は一定期間維持されているものの神経再建がない場合は 6 週以降には筋萎縮とともに消失してしまうことが明らかとなった。神経再支配を得るためには神経切断後 6 週以前での神経再建を考慮するか NMJ 数の減少を防ぐ手法が必須となる。

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 18 件)

1. 大沼 円, 太田 剛, 二村 昭元, 若林 良明, 大川 淳 Variable angle LCP volar Rim plate を用いた橈骨遠位端骨折の治療成績 DVR anatomic plate との比較日本手外科学会雑誌 (2185-4092) 33 巻 5 号 Page 674-677 (2017.02) 査読有
2. 能瀬 宏行, 若林 良明, 品田 春生, 浅野 浩司 成人肘頭骨折の手術治療における合併症とその対策 関東整形災害外科学会雑誌 (0389-7087)47 巻 5 号 Page312-316(2016.10) 査読有
3. 品田 春生, 若林 良明, 大川 淳 神経麻痺を合併した小児上腕骨顆上骨折の治療経験 骨折 (0287-2285)38 巻 3 号 Page557-560(2016.06) 査読有
4. 若林 良明, 宗田 大, 大川 淳 バレーボール女子Vプレミアリーグ選手の手指骨・関節外傷の治療経験 日本整形外科学会雑誌 (1340-8577)36 巻 2 号 Page146-150(2016.05) 査読有
5. 能瀬 宏行, 若林 良明, 品田 春生, 串田 淑久, 浅野 浩司 陳旧性副神経損傷 2 例の治療経験 関東整形災害外科学会雑誌 (0389-7087)47 巻 1 号 Page5-9(2016.02) 査読有
6. 加来 拓実, 若林 良明, 二村 昭元, 望月 智之 外傷後遅発性胸鎖関節頭側亜脱臼によって嚥下・呼吸困難をきたした 1 例 肩関節 (0910-4461)39 巻 3 号 Page866-868(2015.11) 査読有
7. 若林 良明, 柳下 和慶, 榎本 光裕, 小柳津 卓哉, 宗田 大, 大川 淳 早期診断・手術によりシーズン中の復帰を果たしたバレーボール女子Vリーグ選手の転位のない手舟状骨骨折の 1 例 日本整形外科学会雑誌 (1340-8577) 35 巻 3 号 Page215-218(2015.07) 査読有
8. 若林 良明, 二村 昭元, 石井 宣一, 藤田 浩二, 鈴木 英嗣, 大川 淳 手術治療を行った医原性末梢神経損傷の検討日本手外科学会雑誌 (2185-4092)31 巻 5 号 Page761-764(2015.02) 査読有
9. 大沼 円, 若林 良明, 二村 昭元, 藤田 浩二, 鈴木 英嗣, 大川 淳 術後に持続腕神経叢伝達麻酔を用いた肘・手指関節手術の治療経験 日本手外科学会誌

- 誌 (2185-4092)31 巻 5 号
Page747-751(2015.02) 査読有
10. Usami S, Okazaki M, Wakabayashi Y. Extensor Digiti Minimi Transfer for the Treatment of an Unstable Metacarpophalangeal Joint in Thumb Polydactyly Without Thenar Atrophy. *J Hand Microsurg*. 2015 Jun;7(1):110-1. doi: 10.1007/s12593-015-0176-4. Epub 2015 Jan 22. PubMed PMID: 26078517; PubMed Central PMCID: PMC4461626. 査読有
 11. 藤田 浩二, 若林 良明, 二村 昭元 重症手根管症候群に対する木森法による母指対立機能再建術の治療成績 日本手外科学会雑誌 (2185-4092)31 巻 3 号 Page256-259 (2014.12) 査読有
 12. 若林 良明, 二村 昭元, 藤田 浩二, 大沼 円, 鈴木 英嗣, 大川 淳 橈骨遠位端骨折用 Polyaxial Locking Plate 2 種の locking 機構の安定性の比較検討 日本手外科学会雑誌 (2185-4092) 31 巻 3 号 Page201-204(2014.12) 査読有
 13. Oh Y, Wakabayashi Y, Kurosa Y, Fujita K, Okawa A. Potential pathogenic mechanism for stress fractures of the bowed femoral shaft in the elderly: Mechanical analysis by the CT-based finite element method. *Injury*. 2014 Nov;45(11):1764-71. doi: 10.1016/j.injury.2014.08.037. Epub 2014 Aug 30. PubMed PMID: 25225173. 査読有
 14. Oh Y, Wakabayashi Y, Kurosa Y, Fujita K, Okawa A. Potential pathogenic mechanism for stress fractures of the bowed femoral shaft in the elderly: Mechanical analysis by the CT-based finite element method. *Injury*. 2014 Nov;45(11):1764-71. doi: 10.1016/j.injury.2014.08.037. Epub 2014 Aug 30. PubMed PMID: 25225173. 査読有
 15. 王 耀東, 黒佐 義郎, 福島 和之, 中村 香織, 若林 良明, 大川 淳 高齢者の下腿開放骨折に対する治療経験 骨折 (0287-2285) 36 巻 3 号 Page697-700 (2014.06) 査読有
 16. 橋本 淳, 若林 良明, 二村 昭元, 志村 治彦, 請川 円, 大川 淳 上肢手術の術前凝固検査値の検討 術中止血困難にて血友病と診断された症例の経験から 東日本整形災害外科学会雑誌 (1342-7784)26 巻 2 Page203-206 (2014.06) 査読有
 17. 若林 良明, 望月 智之, 林 将也, 宗田 大, 大川 淳 トップレベルラグビー選手 5 例の手根部外傷の治療経験 日本整形外科学会スポーツ医学会雑誌(1340-8577) 34 巻 2 号 Page179-183(2014.05) 査読有
 18. Oh Y, Wakabayashi Y, Kurosa Y, Ishizuki M, Okawa A. Stress fracture of the bowed femoral shaft is another cause of atypical femoral fracture in elderly Japanese: a case series. *J Orthop Sci*. 2014 Jul;19(4):579-86. doi:10.1007/s00776-014-0572-9. Epub 2014 May 1. PubMed PMID: 24789301. 査読有
- 〔学会発表〕(計 13 件)
1. 若林 良明 トップレベルバレーボール選手の手関節障害(傷害) バレーボール・スポーツ障害セミナー(招待講演) 2017 年 01 月 15 日~2017 年 01 月 15 日味の素ナショナルトレーニングセンター(東京都、北区)
 2. 三浦雄悟, 藤田浩二, 二村昭元, 若林良明, 大川淳 外傷性大腿神経断裂に対して両側腓腹神経移植を行った 1 例 東日本整形災害外科学会 2016 年 09 月 22 日~2016 年 09 月 23 日 ザ・プリンス箱根 芦ノ湖(神奈川県、箱根町)
 3. 若林 良明 デュプイトレン拘縮の治療-酵素注入療法と手術療法- みなと整形外科セミナー(招待講演) 2016 年 06 月 23 日~2016 年 06 月 23 日 横浜ベイシエラトン&タワーズ(神奈川県、横浜市)
 4. 若林 良明, 藤田 浩二, 鈴木 英嗣, 二村 昭元, 大川 淳 手根管症候群 診断から再建まで 手根管症候群の診断と診断・評価基準 第 59 回日本手外科学会学術集会(講演)2016 年 04 月 21 日~2016 年 04 月 22 日 広島国際会議場(広島県、広島市)
 5. 若林良明 手外科・上肢領域における保存的治療と手術療法の境界線 神奈川臨床整形外科医会学術講演会(招待講演) 2016 年 02 月 06 日~2016 年 02 月 06 日 ホテルプラム(神奈川県、横浜市)
 6. 鍋木 秀俊, 榎本 光裕, 伊奈 沙織, 平井 高志, 若林 良明, 横田 隆徳, 大川 淳 末梢神経損傷モデルにおける後根神経節でのカルシウムチャンネル 2 サブユニットの発現変化 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会 2015 年 10 月 23 日 富山国際会議場(富山県、富山市)
 7. M. Enomoto, H. Kaburagi, T. Hirai, Y. Wakabayashi, K.Yagishita, T. Yokota, A. Okawa A model of chronic pain from human prostate cancer cells implanted into the mouse tibia. The 45th annual meeting of the Society for Neuroscience 2015 年 10 月 18 日 シカゴ(米国)
 8. 若林良明 品田春生, 能瀬宏行, 二村 昭元, 大川淳 救急搬送された橈骨遠位端骨折の外傷重症度スコア(ISS)別の治療内容の分析 日本手外科学会学術

集会 2015年04月16日~2015年04月17日 京王プラザホテル(東京都、新宿区)

9. 若林良明 品田春生 能瀬宏行 Case Presentation: A case of compound distal radius and ulna fracture in elderly woman. Tokyo International Hand and Wrist Club 2014年11月22日~2014年11月22日 小田急ホテル センチュリーサザンタワー(東京都、新宿区)
10. M. Enomoto, M. Ukegawa, H. Kaburagi, T. Hirai, K. Yagishita, A. Okawa, Y. Wakabayashi An EGFR inhibitor induces Schwann cell proliferation and promotes functional recovery with remyelination in injured proneal nerve after end-to-side neurotomy The 44th annual meeting of the Society for Neuroscience 2014年10月19日~2014年10月19日 ワシントン DC(米国)
11. 若林良明 柳下和慶, 榎本光裕, 小柳津卓哉, 宗田大, 大川淳 早期診断・手術によりシーズン中の復帰を果たしたバレーボール女子Vリーグ選手の不顕性手舟状骨骨折の1例 2014年09月12日~2014年09月12日 第40回日本整形外科学会スポーツ医学会学術集会 虎ノ門ヒルズ森タワー(東京都、港区)
12. 若林良明 二村昭元, 藤田浩二, 請川円, 大川淳 橈骨遠位端骨折用 Polyaxial Locking Plate 2種のlocking機構の安定性の比較検討 第57回日本手外科学会学術集会(招待講演) 2014年04月17日~2014年04月17日 沖縄コンベンションセンター(沖縄県、宜野湾市)
13. 若林良明 二村昭元, 藤田浩二, 鈴木英嗣, 大川淳 手術治療を行った医原性末梢神経損傷の検討 第57回日本手外科学会学術集会 2014年04月17日~2014年04月17日 沖縄コンベンションセンター(沖縄県、宜野湾市)

〔図書〕(計 1 件)

若林良明 南江堂 臨床雑誌整形外科: 専門医試験をめざす症例問題トレーニング 神経・筋疾患(末梢神経麻痺を含む) 2016 6ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

東京医科歯科大学整形外科

<http://tmdu-orth.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

若林 良明 (WAKABAYASHI YOSHIAKI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号: 00431916

(2)研究分担者

榎本 光裕 (ENOMOTO MITSUHIRO)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 90451971

早乙女進一 (SOTOME SHINICHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号: 20401391

大川 淳 (OKAWA ATSUSHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 30251507