

学位論文題名

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～

学位論文内容の要旨

【背景と目的】顔面神経不全麻痺に対する治療は主に対称性と自然な表情形成の回復を目的とする。これまでさまざまな外科的治療方法が考案されてきたが、そのひとつとして我々は神経端側縫合を用いた“neural supercharge”という概念を提唱し報告した。これは顔面神経と舌下神経に神経間置移植 interpositional nerve graft (IPNG) を行ない、新たな神経ネットワークを作成し、治療対象となる顔面表情筋への神経信号の増幅をはかるものである。我々は逆行性トレーサーを用いた動物実験を行い、流入型神経端側縫合により舌下神経と顔面神経による顔面表情筋の二重支配を証明した。しかし、表情筋を運動させるに十分な神経信号が達しているのか、表情筋の変性が再支配後にどの程度生じているかは明らかではなく、神経信号入力の有効性を評価する事が不可欠と考えられた。顔面神経麻痺発症に伴う、表情筋の脱神経支配、更に神経端側縫合を介した神経軸索再生による、神経再支配を表情筋 mRNA の発現解析をすることにより経時的に捉え、神経信号付加を証明することを目的とした。

【対象と方法】Wistar系オスのラットを6つのグループに分けた。それぞれのグループは何も処置を施さない control 群 (Group A), 顔面神経本幹を切断し、顔面神経完全麻痺の状態にした cut 群(Group B), 顔面神経本幹を切断直後、中枢側切断面と末梢側切断面を端々縫合することで顔面神経完全麻痺後の端々縫合再建を行った cut & suture 群(Group C), 顔面神経本幹を絞扼することにより顔面神経不全麻痺の状態にした clip 群(Group D), 顔面神経本幹を切断直後、末梢側で切断した同側の舌下神経の中枢端を顔面神経本幹の末梢側に端側縫合することで顔面神経完全麻痺後の端側縫合再建を行った cut & inflow 群(Group E), 顔面神経本幹を絞扼後 Group E と同様に同側の舌下神経を端側縫合することで、顔面神経不全麻痺後の端側縫合再建を行った clip & inflow 群(Group F)とした。手術の後、4, 7, 14, 28 日目において顔面神経麻痺スコアにより表情筋の状態を評価した。術前及び術後 4,7,14,28 日目においてそれぞれの Group のラットを両側の whisker pad にあたる筋肉を採取しコントロールである左側（非術側）に対する右側（術側）顔面表情筋の RNA 発現量を経時的に比較した。

【結果】顔面表情筋麻痺スコアに関しては 0 day においては術前評価であるため全てのグループでスコアは 8 であった。また、Group A においては全ての期間においてスコアは 8 であった。Group B においてスコアは 0～2 と完全麻痺もしくは高度の麻痺を示した。Group

Cにおいては手術直後に完全麻痺もしくは高度の麻痺を示したが、28日目に向けてスコアの増加を認め28日目には中等度の麻痺を示した。Group Dにおいては手術直後に中等度の麻痺を示し、その後は28日目まで大きな変化を認めなかった。Group Eにおいては手術直後に完全麻痺若しくは高度の麻痺を示したが、その後28日目にかけてスコアは増加し、28日目では中等度の麻痺を示した。Group Fにおいては手術直後に中等度の麻痺を示したが、その後28日目にかけてスコアは増加した。Myogenin RNA発現の経時的変化はGroup Bにおいては手術後7日目まで急激に増加し、その後は28日目まで減少傾向であった。Group Cにおいては術後4日目までは上昇を示したが、その後14日目までは明らかな増減を示さず、14日目以降は減少した。Group BとGroup CにおけるMyogenin発現量は7日目と28日目で有意差を示した。Group Dにおいては手術後4日目まで増加を示したが7日目にかけて減少し、28日目にかけて再び増加した。Group BとGroup Dにおいては術後7日目においてMyogenin発現量に有意差を認めた。Group EにおいてGroup Eとほぼ同様のMyogenin発現の経過であった。Group Fにおいては手術後7日目までに軽度の増加を示したが、その後28日目にかけて減少傾向であった。Group DとGroup Fにおいては術後28日目においてMyogenin発現量に有意差を認めた。

【考察】手術後28日目における顔面神経麻痺スコアとMyogenin発現の経時的変化は負の相関を示し、顔面神経完全麻痺と顔面神経不全麻痺、そしてそれらに対する再建術により顔面表情筋において発現するMyogeninは変化し顔面表情筋に対する神経信号入力変化を反映している可能性が考えられた。また、Group BとGroup Cすなわち完全麻痺と完全麻痺に対する端々神経縫合を行ったグループの比較において、再生する神経軸索が標的となる顔面表情筋に達する以前より、将来において軸索が顔面表情筋に達するか否か、すなわち術後における神経信号の再開の可能性を術後早い時点で予測する指標となる可能性が示唆された。本研究により術後28日目における顔面表情筋におけるMyogenin発現量は顔面神経麻痺の状態を反映している可能性が示唆された。また、術後7日目の顔面表情筋におけるMyogenin発現量が顔面神経麻痺に対する神経縫合による手術の予後を予測する指標になる可能性が示唆され、臨床において形成外科医が直面する困難の一助になると考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	岩崎	倫政
副査	教授	山本	有平
副査	教授	生駒	一憲
副査	准教授	飛騨	一利

学位論文題名

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～

申請者は以下の内容について発表した。

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 発現が増減し、手術介入の有無で相違を認めた。次にラットの不全麻痺モデル、完全麻痺端側神経縫合再建モデル、そして不全麻痺端側神経縫合再建モデルを作成し、Myog mRNA 発現と運動スコアを評価した。

結果、脱神経により発現は上昇し、神経再建により低下した。不全麻痺において発現は完全麻痺に比べ低下した。完全麻痺に手術介入を行うと Myog 発現は低下した。完全麻痺対し手術方法による発現に差は認められなかった。そして不全麻痺に端側神経縫合再建を行うと発現は低下した。これらよりラット顔面神経の完全・不全麻痺モデルと神経縫合再建で、Myog を指標として神経信号入力変化を捉えたと判断した。また、表情筋 Myog 発現は神経損傷直後に重症度判定指標となり、再建後早期の予後判定指標となると推測された。不全麻痺に対する端側神経縫合再建の有用性、完全麻痺に対する端々・端側神経縫合再建の両者が有用であることが示された。

発表の後、以下の如く質疑応答がされた。

生駒教授から麻痺における障害の回復と Myog 発現の減少はどちらが先かの確認があった。それに対して申請者は信号の変化の後、発現の変化が起こる旨回答した。次に表情筋への電気刺激が神経の改善に繋がるのか質問があった。それに対して、電気刺激による Myog 発現減少と、再開した神経信号入力による発現減少は別の側面である旨回答した。更に不全麻痺での神経についての質問があった。それに対して髄鞘は保たれているが、一部

の神経軸索が挫滅している旨回答した。続いて完全麻痺でスコアが“0”ではない点について質問があった。それに対して、完全麻痺の表情筋において筋肉の震えがスコア化されている為である旨回答した。加えて再建を行った際に脳における変化について質問があった。それに対して、臨床で再建後リハビリが必須であり、その際に運動と脳の活動のすりあわせが起こり、機能のシフトが行われている可能性がある旨回答した。最後に今回の研究の結果の臨床応用が可能かの質問があった。それに対して、現時点では生検が必要である旨回答した。次に飛騨准教授から異常な協同運動等の有無について質問があった。それに対して、明らかな協同運動を認めなかった旨回答した。次に、不全麻痺の絞扼の強さについての質問があった。それに対してスコアの結果から一定であると判断した旨回答した。更に、経過観察のエンドポイントを28日目とした理由と、より長期の研究について質問があった。これに対し、電気泳動により判断したこと、今回の研究では発症直後と再建直後の解析を目的としているが、長期の変化にも興味がある旨回答した。続いて再建後早期に予後を判定出来る発現について質問があった。これに対し、再生する軸索先端のグロースコーンにケモカインなどが作用し、それによりグロースコーンから自身を表情筋に誘導する二次的因子が神経線維を伝って表情筋に達し、Myog 発現変化が生じると推測する旨回答した。最後に今後の研究の方向性について質問があった。それに対し、前述の因子を用いて軸索誘導が出来る可能性がある旨回答した。続いて主査の岩崎教授からモデル作成時に端々神経縫合と端側神経縫合の縫合位置の差について質問があった。これに対し、再建の効果が現れる期間が変動しても、結果に大きな変動はでないと推測する旨回答した。更に、Myog mRNA 発現の低下は表情筋のバイアビリティも示す指標である可能性について質問があった。それに対して、そのような2面性を持っていると考えられ、完全麻痺と不全麻痺で Myog 発現が収束することがそれを示唆している旨回答した。最後に山本教授より他に指標となる遺伝子等が存在するかの質問があった。それに対し、過去に耳鼻科領域で網羅的に評価から他にも変化した因子が存在した旨回答した。

この論文はこれまで内容を発表した。国内の学会において高く評価され、顔面神経麻痺・不全麻痺の重症度判定、神経信号入力変化、そして再建術後早期の予後判定に関する基礎および臨床研究結果に有用な新知見を付与するものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。