

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11378

研究課題名(和文) bFGFの声帯麻痺に伴う筋萎縮予防・筋再生に対する臨床応用へ向けた基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research for clinical application of bFGF for prevention of muscle atrophy and muscle regeneration associated with vocal cord paralysis

研究代表者

後藤 多嘉緒 (Goto, Takao)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20735930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：声帯麻痺後の甲状披裂筋萎縮の予防、再生を目指し、bFGFの効果をラットを用いて検証した。

萎縮の予防投与として麻痺1日後、萎縮後の再生効果として麻痺1か月後に薬剤を局所投与した。薬剤としては高用量(2000 µg/10 µL)または低用量(200 µg/10 µL)のbFGF、controlとして生食10 µLを用いた。投与時期によらず、投与1～2か月後にて高用量bFGF投与群のみcontrol群に比較し有意な萎縮改善効果が認められた。背景機序として、短期的には筋衛星細胞、筋芽細胞の賦活化が、長期的には上喉頭神経のsproutingにより甲状披裂筋の神経支配の回復が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

声帯麻痺による嚙声に対する治療として、一般には喉頭枠組み手術や声帯内注入術が行われる。それらの治療に加えて、近年bFGFを麻痺声帯に注射することで、嚙声が改善するという報告が散見されるようになったが、基礎的な研究が不十分で、その背景機序は不明なままであった。本研究の結果より、bFGFの麻痺声帯への注射による背景機序が明確となり、本治療が普及するための礎となると考える。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of bFGF in rats to prevent and regenerate atrophy of the thyroarytenoid muscle after vocal cord paralysis.

The drug was administered topically 1 day after paralysis to prevent atrophy and 1 month after paralysis to regenerate the muscle after atrophy. High dose (2000 µg/10 µL) or low dose (200 µg/10 µL) of bFGF was used as the drug, and 10 µL of saline was used as the control. Regardless of the time of administration, only the high-dose bFGF group showed significant improvement in atrophy compared to the control group after 1 to 2 months of treatment.

The background mechanism was thought to be the activation of muscle satellite cells and myoblasts in the short term and the restoration of innervation of the thyroid lanceolate muscle by sprouting of the superior laryngeal nerve in the long term.

研究分野：喉頭

キーワード：甲状披裂筋 声帯麻痺 bFGF 筋芽細胞 神経再生

1. 研究開始当初の背景

声帯麻痺の治療として、本邦では披裂軟骨内転術や甲状軟骨形成術と、声帯内注入術といった声帯内方移動術による代償治療が一般的である。声帯の内方移動術により、患者の発声機能が改善する一方で、脱神経に基づく甲状披裂筋の萎縮の持続が、機能改善治療の限界となっている。神経筋弁移植術により、甲状披裂筋の萎縮の改善が報告されているが、手術操作の煩雑さや、改善に1年程度の期間を要することから、一部の施設での施行に留まる。手術治療は侵襲を伴うことから、既往症や併存症によっては治療の適応にならないことや、体力の低下した患者には施行しにくい。基礎体力の低下した高齢者や合併症を有する患者に声帯麻痺が生じた場合、呼吸機能や嚥下機能が不十分で嚔声や嚥下障害がさらに悪化する可能性がある。諸機能が低下している状態の患者に対しても施行可能な、声帯麻痺に対する低侵襲で簡便かつ効果の高い治療方法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

声帯麻痺後の筋萎縮予防や筋再生治療をめざし、塩基性線維芽細胞増殖因子 basic fibroblast growth factor (bFGF, 商品名フィブラスト)に着目した。bFGFは、血管新生作用、線維芽細胞の増殖作用、筋芽細胞の増殖作用、神経分化・生存・再生作用といった多彩な作用をもった成長因子である。近年、声帯粘膜の粘弾性が低下する病態に対して、粘膜固有層浅層の組織再生を目的とした bFGF の声帯内注入の有用性が報告されている (Hirano et al. 2004, 2005)。しかし、声帯麻痺症例に対して筋組織をターゲットとした bFGF を用いた基礎的研究はなされていなかった。一般に筋の再生は、筋線維の周囲に存在する筋衛星細胞と呼ばれる未分化な骨格筋幹細胞が担う。筋衛星細胞が活性化され、筋芽細胞となり、筋芽細胞は増殖を繰り返し、その後互いに融合することで多核の筋管細胞へ分化し、そして筋管細胞は最終的に横紋構造を持つ筋線維に成熟し筋再生が完了するといわれている。bFGF は *in vitro* にて筋芽細胞に作用し、その増殖、分化抑制をもたらす、その後増殖因子がなくなると分化を開始するといわれている (Yoshida et al. 1996)。

また、甲状披裂筋の支配神経の中心は反回神経であるが、反回神経は喉頭内において上喉頭神経との吻合があるため、甲状披裂筋は一部上喉頭神経にも支配されると考えられている。実際、反回神経切断後も甲状披裂筋内においては神経筋接合部が散見される。bFGFには神経分化・再生作用があり、反回神経以外の神経支配を増強する可能性がある。

声帯麻痺症例に対する安全で効果的な bFGF の臨床応用 にむけて、bFGF の筋増生の分子生物学的機序の解明と、至適投与量・タイミングを検証する必要がある。

3. 研究の方法

【声帯麻痺モデル作成】

Sprague Dawley ラット、10週令オスに対して、腹腔内麻酔後頸部外切開を行い、左反回神経を露出し切断、断端を結紮し、左声帯麻痺モデルを作成した。

【投与時期、薬剤】

声帯麻痺による筋萎縮が生じる前からの萎縮予防効果をみた声帯麻痺後1日後(早期群)または、筋萎縮が生じてからの再生効果をみた声帯麻痺後28日後(1M群)において、薬剤を経口的に左声帯内に投与した。薬剤としては高用量の bFGF (2000ng/10 μ L)、低用量の bFGF (200ng/10 μ L)、および control として生食を使用した。

薬剤を投与後 day1, 7, 14, 28, 56 において喉頭組織を採取し、声帯冠状断切片を作成した。各群について6匹ずつ作成した。

【甲状披裂筋面積評価】

声帯膜様部中央付近にて、甲状披裂筋の筋線維面積を合計し、甲状披裂筋の断面積とした。切断部位により面積は増減するため、健側比(麻痺側面積/健側面積)にて評価した。

【筋衛星細胞、筋芽細胞の経時的変化】

筋衛星細胞の活性化を評価するため、Pax7+筋衛星細胞および MyoD+筋芽細胞について蛍光免疫染色にて評価した。筋線維当たりの陽性細胞数にて評価した。

【神経筋接合部数評価】

プレシナプス、ポストシナプスの代表的構造であるシナプス小胞およびアセチルコリンレセプターについて、それぞれ Synaptophysin, CHRNB (Cholinergic Receptor Nicotinic Beta) に対する蛍光免疫染色を行い、共陽性となる部位について神経筋接合部として同定した。甲状披裂筋内における神経筋接合部数の健側比(麻痺側における神経筋接合部数/健側における神経筋接合部数)にて評価した。

4. 研究成果

【甲状披裂筋面積評価】

甲状披裂筋面積の健側比は、高用量 bFGF 群のみで day28, 56 において、control 群の 0.5 程度に

比べ早期群、1 M群ともに0.8~1.0程度まで有意に改善がみられた。低用量 bFGF 群では control に対して有意差は見られなかった。

【筋衛星細胞、筋芽細胞の動態】

甲状披裂筋面積で有意な改善がみられた、高用量 bFGF 群と control 群にて評価を行った。投与時期によらず、Pax7+筋衛星細胞は day1 を、MyoD+筋芽細胞は day7-14 をピークに増加していた。

【神経筋接合部数】

甲状披裂筋面積で有意な改善がみられた、高用量 bFGF 群と control 群にて評価を行った。投与時期によらず、神経筋接合部数は day28,56 で有意な増加がみられた。早期群では day28,56 ともに健側比 0.3 程度であったが、1M 群では day56 において 0.8 程度まで増加していた

【bFGF の甲状披裂筋萎縮改善の機序】

麻痺早期または麻痺後 1 か月においても高用量 bFGF を甲状披裂筋内に注射することで、短期的には筋衛星細胞、筋芽細胞の賦活化、長期的には神経筋接合部数の増加により麻痺声帯における甲状披裂筋の萎縮が改善されると考えられた。

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 Goto Takao, Ueha Rumi, Sato Taku, Fujimaki Yoko, Nito Takaharu, Yamasoba Tatsuya	4. 巻 -
2. 論文標題 Single, high-dose local injection of bFGF improves thyroarytenoid muscle atrophy after paralysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lary.27887	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takao Goto, Rumi Ueha, Taku Sato, Takaharu Nito, Tatsuya Yamasoba
2. 発表標題 Effects of bFGF injection on atrophied vocal muscles after paralysis
3. 学会等名 第119回日本耳鼻咽喉科学会総会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 後藤多嘉緒、上羽瑠美、佐藤拓、山内彰人、藤巻葉子、二藤隆春、山岨達也
2. 発表標題 声帯麻痺に伴う筋萎縮への塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）早期投与の効果の検討
3. 学会等名 第32回日本喉頭科学会総会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤多嘉緒、上羽瑠美、佐藤拓、山内彰人、藤巻葉子、二藤隆春、山岨達也
2. 発表標題 反回神経切除後の甲状披裂筋への高用量bFGF単回投与による神経筋接合部変化
3. 学会等名 第123回日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会総会学術講演会
4. 発表年 2022年

〔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
研究分担者	上羽 瑠美 (Ueha Rumi) (10597131)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	二藤 隆春 (Ni to Takaharu) (60334372)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	

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