

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10667

研究課題名(和文) 遺伝性運動異常疾患における嚥下障害とその改善

研究課題名(英文) The study of dysphagia on model mice for motor dysfunction

研究代表者

立谷 大介 (Tachiya, Daisuke)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：20814263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、運動障害モデルマウスとしてdtマウス及びSMNマウスを対象として嚥下機能に対する影響を形態的に明らかにした。これらのマウスにおいては舌根・軟口蓋・咽頭・喉頭が小さく、それらに付随する筋肉も変性していた。さらに舌根や喉頭における軟骨形成や舌骨の石灰化が不十分であった。これらの遺伝子異常の影響が神経系にとどまらず、骨・筋などの運動器系にも広く影響を及ぼすと考えられた。またSMNマウスの三叉神経節は小さく、感覚ニューロンが減少していた。SMNマウスでは特に摂食に関わる口腔における感覚ニューロンに変性が生じ、これらの粘膜における感覚の伝達が障害され、摂食困難をもたらすと推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、dtマウスやSMNマウスでは、上顎骨、下顎骨、舌、咽頭、喉頭を含む頭頸部の大きさが小さく、筋肉や軟骨形成、或いは骨の石灰化が不十分である可能性が示唆された。さらに、これらのマウスでは三叉神経節の感覚ニューロンに変性が生じている可能性が示唆された。したがって、遺伝性の運動機能に障害をもたらす疾患においては口腔感覚に異常が生じ、摂食困難をもたらすと推測される。この三叉神経節における変化により、頭頸部の発達が憎悪している可能性も考えられる。三叉神経節における感覚ニューロンの変性を抑制することができれば、摂食障害を改善し嚥下機能にも改善をもたらすことができるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Histochemical and immunohistochemical methods were performed on model mice for motor dysfunction; dystonin-knockout (dt) mouse and survival motor neuron (SMN) mice. At gross anatomical level, the head and neck were small in dt and SMN mice compared to wild type mice. The size of the maxilla, mandible, tongue, pharynx and larynx in dt mice was smaller than in wildtype mice. And, the maxilla, mandible, lingual root and larynx were soft and fragile. The development of the cartilage and bone in these regions is probably disrupted by the mutations. In addition, the size of the trigeminal ganglion (TG) in SMN mice severely decreased. At a microscopic level, the number of sensory neurons in the TG of SMN mice. In this study, it is suggested that the possibility of dysfunction in food intake and swallowing in dt and SMN mice. The dysfunction may be due to nerve damages, muscular atrophy and hypocalcification in the head and neck regions.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：運動障害 摂食嚥下障害

## 1. 研究開始当初の背景

嚥下機能は現在の超高齢社会において生活を営む上で、あるいは生活の質(QOL)の向上という点からも重要な機能の1つである。嚥下機能が損なわれると、食事摂取量の低下や、低栄養状態、脱水を喚起し、誤嚥性肺炎の原因ともなる。特に75歳以上の後期高齢者においては様々な疾患によりその約3割に嚥下障害を有し、その障害の原因究明や機能回復は超高齢社会を迎えた我が国の急務である。臨床的には摂食・嚥下機能を改善する方法として、ペースト食の利用や摂取ペース管理のほか、味覚や嗅覚刺激を利用する方法などが行なわれている。嚥下機能は様々な器官が関わる複雑な機構によっておこるものであり、口腔・咽頭などの筋だけでなく、神経系も重要な役割を担っている。嚥下障害の原因は、炎症・加齢性変化による舌や咽頭の傷害や神経異常による障害などさまざまなものが知られている。そこで、本申請者らは、これまでに口腔・咽頭領域を支配する知覚神経に注目し、逆行性トレーサーを用いて、支配ニューロンの役割について報告してきた。

一方、本申請者らは様々な疾患についてその病状を研究してきた。ヒトの難病の一つである、脊髄性筋萎縮症(Spinal Muscular Atrophy)はその発症する時期により、Ⅰ型～Ⅳ型に分類されている。乳幼児期に発症するⅠ型やⅡ型では筋の発達遅滞がみられ、四肢の筋肉も発達しにくいことが知られている。頭頸部においては、摂食障害や嚥下障害が起こることが知られているが、その病状や原因については解明されておらず、治療法も未だ確立していない。近年の研究により、いくつかの原因遺伝子が発見され、遺伝子改変した脊髄性筋萎縮症モデル動物(SMNマウス)が数種作られている。また、日本全国で500人程度が有すると言われる遺伝性ジストニアのモデルマウスと考えられる dystonin knockout (dt)マウスにおいては、筋の固有感覚受容ニューロンに細胞死が生じ、その結果、筋失調による四肢の運動障害が生じる。これら dt マウスや SMN マウスを用いた研究が様々なアプローチで研究されているが、摂食嚥下機能に関する報告は見当たらない。dt マウスや SMN マウスの摂食嚥下機能の改善を目的とすることで、原因の究明・治療法の確立やヒトへの応用にもつながると考えられた。

現代社会の高齢化による嚥下機能の異常や脊髄性筋萎縮症における嚥下障害が大きな問題であることから、dt マウスや SMN マウスを用いて、嚥下機能に関わる筋並びに感覚神経や運動神経の異常を詳細に解明することで嚥下障害の原因を究明することができると考えられる。さらには、現在行われている、ペースト食の利用や摂取ペースの管理ならびに味覚、嗅覚、温度感覚など各種感覚刺激を行うことで、嚥下障害を軽減できると考えられた。

## 2. 研究の目的

本申請における学術的な特色は

- ・ dt マウスや SMN マウスの嚥下異常に着目し解析を行う点
- ・ 味覚、嗅覚、温度刺激などの各種感覚刺激を組み合わせて嚥下異常を軽減させる条件を検討できる点があげられる。

本研究は上記のように世界で初めて遺伝性ジストニアや脊髄性筋萎縮症における嚥下異常に着目した研究で、これらのモデルマウスを用いた嚥下機能改善を目的とした研究である。これまで十分に解明されていなかった筋萎縮症や筋失調症における嚥下機能に対する病的変化の影響、また嚥下機能に対する各種感覚刺激の改善効果を評価することができる点にこの研究の大きな意義があると考えられた。さらなる応用研究が進むと、筋萎縮症や筋失調症における嚥下異常の改善にとどまらず、他疾患や高齢者における嚥下機能低下への治療応用にも繋がるのが想定される。近年特に問題になっている難病や超高齢社会への対応という観点からも基礎的、臨床的な意義にとどまらず、医療、介護の分野に至るまで社会的意義は非常に大きいと思われた。

## 3. 研究の方法

本研究ではまず dt マウスや SMN マウス、並びにコントロールマウスを用いて、嚥下にかかわる筋萎縮と機能を解析する。具体的には、嚥下にかかわる筋を採取し、組織切片を作成し、免疫染色にてタンパク、レセプターや神経伝達物質の発現を解析する。次に、嚥下に関わると考えられる咽頭周囲の感覚神経に注目し、末梢神経終末の分布や形状異常について検討した。感覚刺激に関連があると思われる TRPV1(カプサイシン受容体)、TRPV2(圧受容体)、TRPV4(温刺激受容体)、TRPM8(冷刺激受容体)を有する知覚神経について免疫染色し、その分布状態を調査した。さらには、それらの運動を支配或いは感覚調整する延髄や大脳における神経細胞の変性を確認する。次にそれぞれのマウスについて一定量を摂食させ、嚥下までの時間を測定した。様々な温度の食物や味覚を刺激する食物を用いて、摂食・嚥下機能の改善の見られる条件を解明する至適条件を

解明後、咽頭喉頭領域の知覚に関わる求心性神経線維が入射する動物の迷走神経の下神経節や嚥下の制御に関わる大脳、脳幹の各領域の試料を採取して組織切片を作成し、免疫染色を行った。

#### 4. 研究成果

本研究は、運動障害患者における嚥下障害の原因究明とその改善を目指す目的で行われている。そのモデルマウスとして3種類のモデル、dt マウス及びSMN マウスを対象としているが、それらの運動障害モデルマウスは生後3週以上、生存することが困難である。この原因は、呼吸筋の運動麻痺以外に咀嚼・嚥下機能低下による栄養失調、誤嚥による肺炎などが考えられる。一方、マウスにおける生後2-3週は離乳の時期でもある。したがって咀嚼、嚥下機能がそれまでと比較して飛躍的に向上する時期でもあるため、その発達程度については個体差が大きいのではないかと予想された。そこで本研究の第一段階として、ワイルドタイプマウスにおける舌根・軟口蓋後部・咽頭・喉頭筋の大きさや筋線維の太さ、さらには、protein gene product 9.5 (PGP9.5)の免疫染色による運動神経終板の分布について詳細に調べた。

生後2週におけるワイルドタイプマウスでは舌・軟口蓋・咽頭・喉頭における筋組織はエオシンに濃染していた。ヘマトキシリンで染色された核は筋線維に散在し、成熟マウスと比較して筋肉の大きさや筋線維の太さは小さいものの、細胞核の分布やエオシン染色性などの組織所見において大きな差は認められなかった。さらにPGP9.5を含む神経線維は筋肉において太い神経線維の束に認められ、それらが枝分かれして筋線維に付着し紡錘形の運動終板を形成しているのが観察された。成熟マウスと生後2週マウスの神経線維の密度に明らかな差は認められなかったが、生後2週マウスの方が運動終板における神経終末の枝分かれが少なかった。また、生後2週におけるマウスの筋肉や筋線維の形態、染色性、運動終板の分布に明らかな個体差は認められなかった。以上の結果は、嚥下困難を有する運動障害モデル動物の舌、咽頭、喉頭における筋肉の形態や神経分布の変化を明らかにするために、離乳の時期である生後2週のワイルドタイプマウスにおいて個体差が少ないという事実を明らかにすることができた。

肉眼的な所見により、dt マウス及びSMN マウスにおいては舌根・軟口蓋後部・咽頭・喉頭が、ワイルドタイプマウスに比べ小さく、それらに付随する筋肉も薄く透けて見えるほどで、筋肉が変性している可能性が高い。さらに舌根や喉頭などもワイルドタイプマウスに比べ柔らかく、軟骨の形成や舌骨の石灰化が不十分である可能性も示唆された。これらの発達不良は嚥下障害の原因にもなると予想され、今後の分析対象を軟骨や骨にまで拡大する必要があると考えられた。一方、中枢神経に属する脳・脊髄を実態顕微鏡下で観察すると、ワイルドタイプマウスに比べ、これらのミュータントマウスではそれらの大きさが小さく神経系の発達にも影響が認められた。これらの所見により、神経系の発達障害による嚥下困難がもたらされる可能性も示唆された。

また摂食嚥下は、三叉神経・舌咽神経・迷走神経・舌下神経による感覚と運動の情報伝達及び調節により行われる。食物の形状や匂いを確認後、口腔で咀嚼し食塊を形成してから咽頭に移動させるまでの時期を食物摂取の咀嚼期と呼ぶが、この咀嚼期における口腔粘膜へのさまざまな刺激に対する感覚が延髄や橋を含む脳に伝達され、次なる舌根・咽頭・軟口蓋、或いは喉頭蓋の運動である嚥下の口腔期や咽頭期へと連続する。したがってSMN マウスにおいては特に口腔粘膜における感覚神経や三叉神経節、さらには咽頭・喉頭感覚神経や舌咽神経節・迷走神経節に対するSMN 遺伝子異常の影響について調べた。まずワイルドタイプマウスとSMN マウスの三叉神経節の感覚ニューロンの細胞体の数や大きさについて明らかにした。肉眼的にはワイルドタイプマウスに比べSMN マウスの三叉神経節は幅・厚さ・長さともに小さかった。それを反映するようにSMN マウスの三叉神経節ニューロンの総数は大きく減少していた。SMN マウスの三叉神経節では感覚ニューロンが減少していた。またSMN マウスの三叉神経節では大型のニューロンが明らかに減少していた。さらに咽頭及び喉頭、特に喉頭蓋における粘膜の上皮下及び上皮内の感覚神経にもSMN マウスでの減少が認められた。

さらに摂食及び嚥下に関わる大脳、脳幹の各領域の試切片を作製し、ニッスル染色や免疫染色を行ったがワイルドタイプとdt マウスやSMN マウスで明らかな差異は認められなかった。

これらの所見から、ジストニンの遺伝子異常では、その影響が神経系にとどまらず、骨・筋などの運動器系にも広く影響を及ぼすことが明らかとなった。またSMN の遺伝子異常でも装用の示唆が得られたが、特に摂食・嚥下に関わる口腔・咽頭・喉頭における感覚ニューロンに変性が生じ、これらの粘膜における感覚の伝達が障害され、摂食困難や嚥下障害をもたらすと推測された。運動ニューロンに対するSMN の遺伝子異常の影響については今後の課題である。

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 Atsumi Keiichiro, Yajima Takehiro, Tachiya Daisuke, Kokubun Souichi, Shoji Noriaki, Sasano Takashi, Ichikawa Hiroyuki, Sato Tadasu	4. 巻 64
2. 論文標題 Sensory neurons in the human jugular ganglion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tissue and Cell	6. 最初と最後の頁 101344 ~ 101344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tice.2020.101344	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
研究分担者	市川 博之 (Ichikawa Hiroyuki) (20193435)	東北大学・歯学研究科・教授  (11301)	
研究分担者	佐藤 匡 (Sato Tadasu) (40637964)	東北大学・歯学研究科・助教  (11301)	
研究分担者	矢島 健大 (Yajima Takehiro) (40779550)	東北大学・歯学研究科・助教  (11301)	

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