

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 16 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592603

研究課題名(和文) 脱神経後声帯筋線維のアポトーシスと筋衛星細胞のアポトーシス抑制に関する基礎研究

研究課題名(英文) Modulation of satellite cells activity and MyoD in rat thyroarytenoid muscle after reinnervation

研究代表者

熊井 良彦 (Yoshihiko, Kumai)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：00555774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：脱神経群、神経縫合群とも処置後3日、1週でM-cadherin、MyoDの発現増加が見られた。脱神経群では処置後5週まで発現増加が持続していたが、神経縫合群ではいずれもShamと同等まで発現が低下していた。また、脱神経群では神経筋接合部の再生が見られなかったものの、神経縫合群では処置後3週で神経筋接合部の再生が見られ、筋断面積は5週で回復を認めた

研究成果の概要(英文)：The expression levels of mRNAs encoding M-cadherin and MyoD in the TA muscle of the DNV group were significantly higher ($p<0.01$) than in the control throughout the study period. These mRNA levels in the ANS group were significantly higher ($p<0.01$) at 1week than in the controls, but fell to control levels at 3weeks. In the ANS group, recovery of muscle area and NMJ structure occurred by 3 weeks. These data suggested that NMJ formation following reinnervation might prompt recovery of M-cadherin and MyoD mRNA expression to the quiescent level of SCs.

研究分野：Laryngology

キーワード：satellite cell

1. 研究開始当初の背景

一側性声帯麻痺は、発声時に声門間隙が生じるために気息性嘔声となり、患者の生活の質を著しく損なう疾患である。声帯麻痺の原因としては反回神経の傷害によることが多く、長期間の脱神経状態のため声帯筋の萎縮、線維化が生じる。当教室では声帯麻痺に対して、頸神経ワナを用いて神経再支配を促すことで声帯筋の萎縮を改善したことを報告した。しかし、神経再支配の効果は脱神経期間が長期間になるほどその神経再支配の効果は減弱することが分かっている。

筋再生を促す新たなアプローチを開拓するため、我々は筋衛星細胞と MyoD というタンパクに着目した。

筋衛星細胞は筋組織の幹細胞であり筋の修復、再生に働いている。通常は静止状態で存在しているが、筋組織が損傷された際に活性化し、細胞分裂を始め増殖、分化して新たな筋線維が生じる。

また、Muscle regulatory factor である MyoD も筋組織特有のタンパクの発現を調節する転写因子として筋再生過程に重要な役割を担っている。MyoD も筋が損傷された際に発現増加することが知られている。

筋の損傷だけではなく、支配神経の脱神経後にも筋衛星細胞の活性化、MyoD の発現上昇が起こることが知られている。我々のグループでも、ラット甲状披裂筋において反回神経の脱神経後に筋衛星細胞の活性化、MyoD の発現上昇が生じることを報告している。

2. 研究の目的

今回の研究では、脱神経後、および神経再支配過程において、筋衛星細胞がどのような活性化動態を示すか、また筋線維全体での MyoD の発現動態について、神経筋接合部の再生と甲状披裂筋の筋断面積の経過と合わせて比較検討した。

3. 研究の方法

(1) 対象

メスの 8 週令 Wistar 系ラット (n=132) を使用した。

脱神経群 (n=60): 左反回神経切断のみを行った。

神経縫合群 (n=60): 左反回神経切断後、即時に神経吻合を行った。

コントロール群 (n=12): 左反回神経を周囲組織より剥離する Sham 手術を施行した。

各群はさらに評価時期 (処置後 3 日、1 週、3 週、5 週) に応じて 4 つのサブグループに分けられた (脱神経群・神経縫合群: 各 n=15、コントロール群: 各 n=3)。

(2) 方法

各群のうちそれぞれ 20 個体 (各評価時期でそれぞれ 5 個体) で組織学的評価を行い、各群の残りの 40 個体 (各評価時期でそれぞれ 10 個体) と、コントロールの 12 個体 (各評価時期でそれぞれ 3 個体) の喉頭については、リアルタイム PCR にて mRNA の発現を評価した。

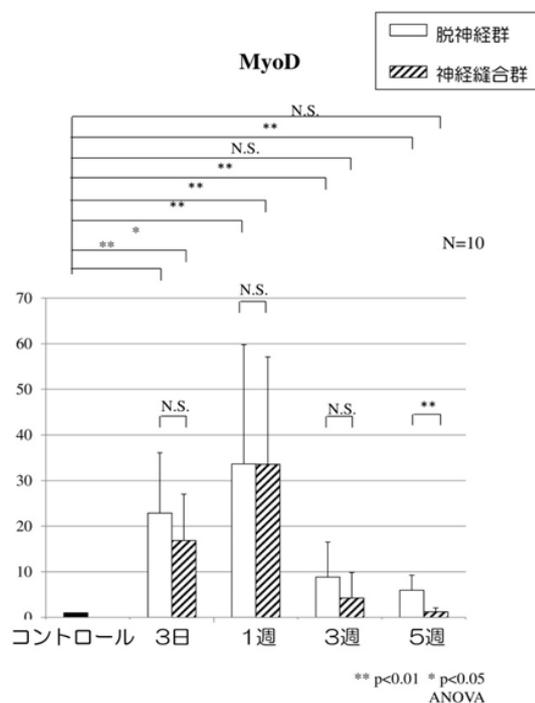
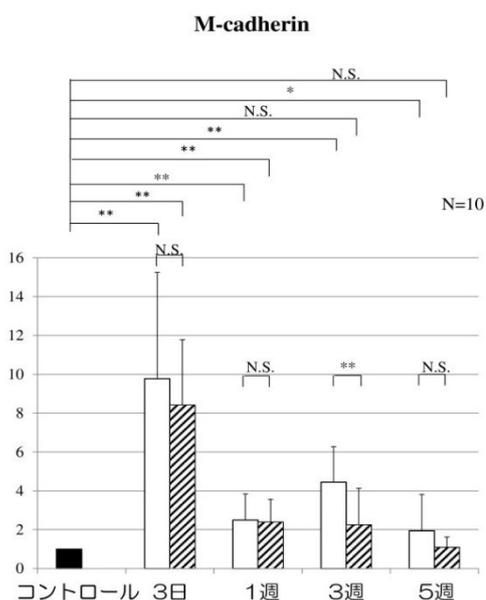
一次抗体には抗 M-cadherin 抗体 (Santa-Cruz 社)、抗 MyoD 抗体 (Santa-Cruz 社) を用いて M-cadherin、MyoD の発現を評価した。また、神経筋接合部の評価のため抗神経線維抗体 (Sigma-Aldrich 社)、抗シナプトフィジン抗体 (Dako 社)、アセチルコリン受容体を検知する rhodamine 標識 -bungarotoxin (Sigma-Aldrich 社) を用いてアセチルコリン受容体と神経終末の発現を評価した。さらに HE 染色を行い、甲状披裂筋の断面積を評価した。

リアルタイム PCR には、NucleoSpin® RNA/Protein kit (Macherey-Nagel 社) を用いたスピнкаラム法でトータル RNA を抽出し、SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Life Technologies 社) を用いて逆転写して相補的 DNA を作成した。GAPDH、MyoD、M-cadherin の mRNA 量の測定のため TaqMan® Gene Expression Assay (assay-ID: Rn01775763_g1, Rn01457527_g1, Rn01432568_m1: Applied Biosystems 社) を用いて PCR を行った。この

うち、GAPDH は内在性コントロールとして使用された。Taqman Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems 社)の手順に従い、4 μ L の相補的 DNA を含む 20 μ L の反応液を作成して PCR を行った。95 で 2 分間反応させて DNA を熱変性させたあと、40 サイクルの変性(95 15 秒)、アニーリング(62 10 秒)、延長(72 10 秒)反応を繰り返した。PCR 反応、増幅データの収集、解析には ABI 7900 HT platform (Applied Biosystems 社)を用いた。ターゲットの mRNA 発現量の相対評価のため CT 法を用いて計測した。

4. 研究成果

図 1 はリアルタイム PCR の結果を示している。両群において M-cadherin、MyoD とも処置後 3 日、1 週でコントロールと比較し有意に発現が増加していた。脱神経群では処置後 5 週まで M-cadherin、MyoD とも有意に増加した状態を維持していた。一方、神経縫合群では処置後 3 週以降で M-cadherin、MyoD ともコントロールと同等まで発現が減少していた。



免疫染色でも、リアルタイム PCR の結果と同様の結果であった。M-cadherin の染色では筋衛星細胞の活性化を反映していると思われる、M-cadherin 強陽性の筋衛星細胞の集簇を処置後 1 週まで両群で認めた。脱神経群では処置後 5 週まで M-cadherin 強陽性細胞の集簇が見られたが、神経縫合群では処置後 3 週以降では染色強陽性の細胞集簇は見られなかった。MyoD の染色では、脱神経群では処置後 5 週まで MyoD 陽性細胞を多数認めたが、神経縫合群では処置後 3 週以降では MyoD 陽性細胞はほとんど見られなくなっていた。

図 2

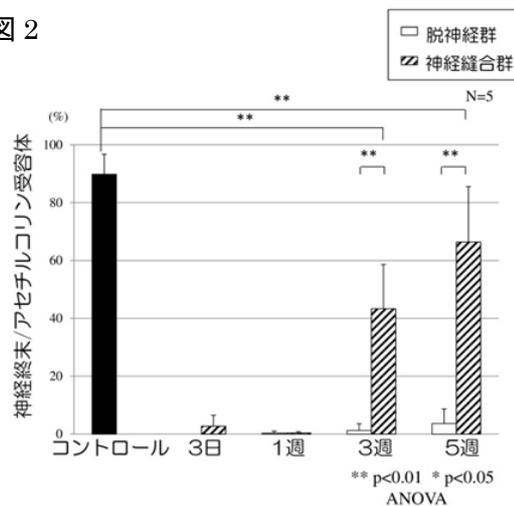


図 2 は染色結果をもとに、アセチルコリン受容体に対して神経終末が重なりあう部分の

割合を測定し、神経筋接合部の再生の程度を評価した結果である。神経縫合群では処置後3週以降で神経筋接合部の再生が生じていたが、脱神経群では再生は見られなかった。

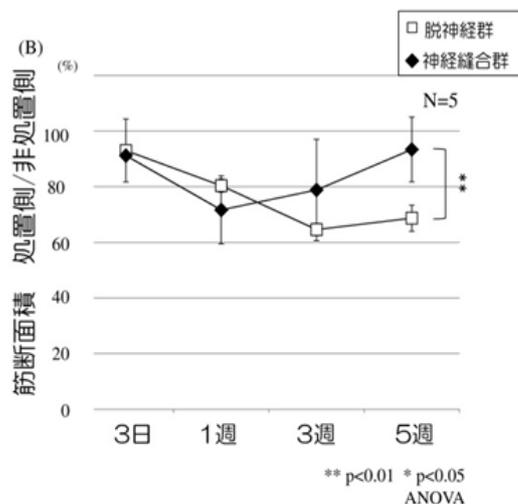


図3では甲状披裂筋の筋断面積の結果を示す。神経縫合群では処置後3週以降で筋断面積が回復傾向であったが、脱神経群では筋断面積は減少したまま回復を認めなかった。

(2) 考察

脱神経群では筋衛星細胞の活性化、MyoDの発現上昇が処置後5週まで持続していた。脱神経の状態でも筋衛星細胞は活性化し、増殖、分化して筋線維の新生が起こることが知られている。しかし、新生された筋線維は神経支配なしでは成熟せず、収縮能の乏しい不毛な筋再生となる。脱神経後にはこうした不毛な筋再生を繰り返すことにより筋衛星細胞の浪費が生じる。

一方、神経縫合群では神経筋接合部の再生に伴い、活性化した筋衛星細胞の鎮静化とMyoDの発現の正常化が見られた。これは運動神経からの刺激が入ることにより筋線維の成熟、有効な筋再生が生じるため、筋再生に必要な筋衛星細胞の活性化とMyoDの発現上昇といった反応が落ち着いたためと考えられる。

当初の計画では、脱神経後に筋衛星細胞がアポトーシスを生じやすいという報告をもと

に、筋衛星細胞のアポトーシスを抑制することで筋の再生を促すという構想を立てていた。研究を進めるに従い、脱神経された筋では有効な筋再生が生じる可能性が低く、神経再支配の条件下に筋再生を促す方が有意義ではないかという考えに至った。そのため、今回は脱神経群と神経縫合群での筋衛星細胞とMyoDの動態を見ることで両群の差について評価し、上記の結果を得た。

今回の結果で見られた神経再支配過程で神経筋接合部の再生と同時期に筋衛星細胞とMyoDの発現が平常状態に戻るというのは非常に興味深い所見であり、神経再支配過程での筋再生を促すにあたって、新たなターゲットとなりうると考えられる。具体的には筋衛星細胞の脱活性化やMyoDの発現減少が生じる時期に合わせて筋衛星細胞の活性化やMyoDの発現を惹起する成長因子などを投与することで筋再生の期間を延長させ、より効率的に筋萎縮からの回復を促すことができると考えられる。

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 件)

[学会発表](計 5 件)

Kodama H, Kumai Y, Nishimoto K, Yumoto E, Modulation of Satellite Cells in Rat Thyroarytenoid Muscle Following Denervation and Immediate Reconstruction of Recurrent Laryngeal Nerve

20th World Congress of the International Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (IFOS)

2013.6.1-5、韓国(ソウル) COEX Convention)

児玉晴香、熊井良彦・西本康兵・湯本英二
反回転神経切断再建後の甲状披裂筋内の筋衛星細胞の動態

第65日本気管食道科学会総会・学術講演会
2013.10.31-11.1、東京(品川プリンスホテル)

Kodama H, Kumai Y, Nishimoto K, Yumoto E,

Modulation of MyoD-positive satellite cells and myocytes

following recurrent laryngeal nerve regeneration、18th World Congress for Bronchoesophagology(WCBE 2014)

2014.4.13-16

京都(国立京都国際会館)

児玉晴香、熊井良彦、西本康兵、湯本英二
反回神経切断再建後の甲状披裂筋内の MyoD
陽性筋衛星細胞および MyoD 陽性筋細胞核の
動態

第115回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会

2014.5.14-17

福岡(ヒルトン福岡シーホーク)

Kumai Y, Modulation of Myogenesis in
Response to Rat Laryngeal Reinnervation、
13th Asia-Oceania ORL-HNS Congress

2015.3.19-22

台湾、Taipei

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊井良彦(Kumai Yoshihiko)

研究者番号: 00555774

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: