

令和元年5月28日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11252

研究課題名(和文) 反回神経過誤再生に対する新しい治療法の開発

研究課題名(英文) New treatment strategy to prevent misdirection in recurrent laryngeal nerve regeneration.

研究代表者

富藤 雅之 (Tomifuji, Masayuki)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・病院耳鼻咽喉科科・講師)

研究者番号：80327626

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)：反回神経再生においては過誤再生による声帯運動障害が見られる。感覚神経再生阻害作用を持つTrkA阻害薬投与で運動神経と感覚・自律神経間の過誤神経再生を抑制した場合の、声帯運動改善効果を検討した。ラット反回神経切断モデルを用い、1mmの間隔をあけた神経再生誘導チューブ架橋群(チューブ単独群)、TrkA阻害薬をチューブ投与して架橋した群(TrkAi群)を作製し、15週後に喉頭運動、反回神経の形態学的評価、喉頭筋の萎縮および電気生理学的評価を行った。神経再生チューブ単独群で6.7%、TrkA阻害剤群で44%に声帯運動回復を認めた(P=0.037)。また神経の形態学的、電気生理学的な改善を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

反回神経再生治療における神経過誤再生という問題点に対して一部の感覚神経再生を阻害して運動神経間の再生を促すという手法を用いて声帯運動回復の可能性を高めうることを示した。単純な神経架橋よりは喉頭運動の改善、電気生理学的な改善を認めており、部分的な神経再生が可能であった。一方運動神経間の過誤再生には本法をもってしても根本的な解決法を提示するには至っておらず、更なる治療法の開発が待たれる。

研究成果の概要(英文)：In the regeneration process of injured recurrent laryngeal nerve, misdirected regeneration leads to vocal cord immobility. In this study, TrkA inhibitor which has the effect to prevent sensory nerve regeneration, was administered to prevent misdirection between motor neuron and sensory/autonomic neuron. Vocal cord movement and electrophysiological improvement were evaluated.

Rat laryngeal nerve was cut and nerve ends were bridged by a collagen tube (tube only group). As a treatment group, nerve cut ends were bridged by a collagen tube which was immersed with TrkA inhibitor (TrkAi group). Fifteen weeks later, laryngeal movements, morphological evaluation of recurrent laryngeal nerve, atrophy of laryngeal muscle and electrophysiological evaluation were conducted. Vocal cord movements were improved in 6.7% of tube only group and in 44% of TrkAi group (p=0.037). Morphological and electrophysiological improvements were also observed.

研究分野：喉頭科学

キーワード：反回神経麻痺 神経再生 過誤再生 自律神経 感覚神経 TrkA阻害剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

反回神経再生治療は多くの研究が行われているが、特に神経切断例では神経が形態学的に再生しても十分な機能改善に至らないことが多い。

十分な機能改善に至らない原因として、神経線維再生不良、脱神経に伴う運動神経細胞死、運動終板の変性、筋組織の萎縮変性、過誤再生の問題が挙げられる⁽¹⁾。～に関して、我々は遺伝子治療や神経再生チューブを用いた治療の改善効果の報告をしてきたが⁽²⁻⁴⁾、いまだが解決できておらず、声帯の合目的な協調運動を得るまでの改善には至っていない。本研究では過誤再生に対する治療法を開発することを目的とした。

2. 研究の目的

反回神経は運動神経線維と感覚神経線維・自律神経線維から構成されており⁽⁵⁾、運動神経同士の間誤再生と運動神経に感覚・自律神経が迷入する過誤再生が存在すると考えられるが、今回は運動神経線維と感覚・自律神経線維の過誤再生に着目した。この過誤再生を予防する為に運動神経の再生を阻害せず、感覚・自律神経再生のみ選択的に阻害する因子となりうる TrkA 阻害薬を神経再生誘導チューブ内へ投与し、運動神経線維と感覚・自律神経線維の過誤再生を阻害することにより、運動神経同士の再生を期待するというモデルを構築した。神経再生誘導チューブ治療単独群と TrkA 阻害剤投与群との間で治療効果の比較検討を行った。

3. 研究の方法

ラットを用いて、左反回神経を切断した後、1 mmの間隔をあけた神経再生誘導チューブ架橋群(チューブ単独群)、TrkA 阻害薬を神経再生誘導チューブに投与して架橋した群(TrkAi 群)を作製し、15 週後に喉頭運動、反回神経の形態学的評価、喉頭筋の萎縮および電気生理学的評価を行った。加えて、過誤再生の評価を行うために、神経トレーサーを喉頭筋(甲状披裂筋(閉鎖筋)、後輪状披裂筋(開大筋))へ治療後 14 週に投与する群もそれぞれ作製し、治療後 15 週に感覚神経、自律神経の一次ニューロンが存在する迷走神経節および運動神経の一次ニューロンの存在する疑核における逆行性標識細胞を評価した。

4. 研究成果

喉頭運動はチューブ単独群では 15 例中 1 例(6.67%)、TrkAi 群では 16 例中 7 例(43.75%)で喉頭運動が見られた。(図 1)

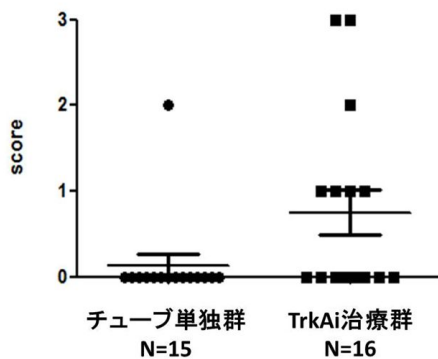


図 1 スコアは声帯運動なし 0、少し動く 1、動いているが左右差ある 2、ほぼ正常運動 3

形態学的には有髄神経線維再生本数および有髄神経線維径の有意な改善を認め(図 2)、電気生理学的には活動電位の振幅において有意な改善を認めた(図 3)。

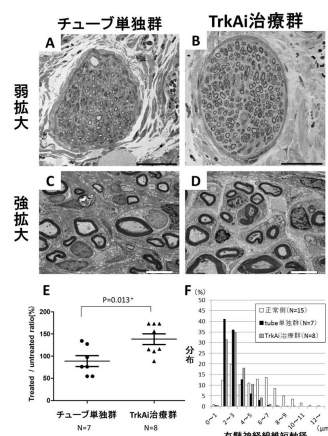


図 2 A, B 反回神経断面図、C, D 強拡大、E 反回神経有髄神経数の両群の比較、F 反回神経末梢

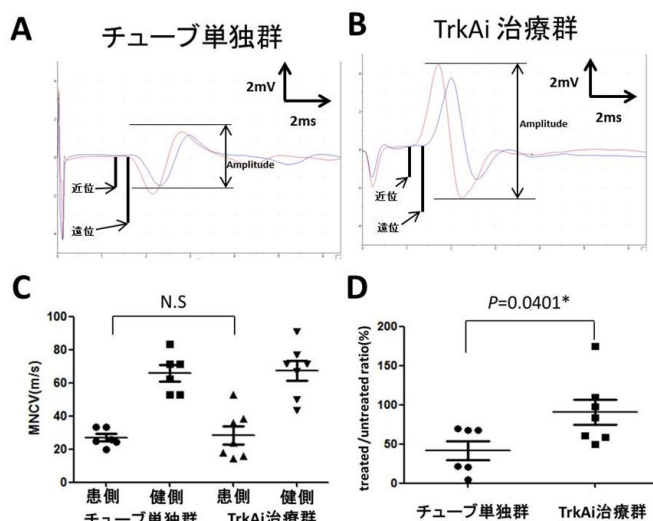


図3 A, チューブ単独群の反回神経刺激による患側の後輪状披裂筋の筋電図(赤:近位刺激活動電位、青:遠位刺激活動電位) B, TrkAi 治療群の反回神経刺激による患側の後輪状披裂筋の筋電図 C, 神経伝導速度の比較 D, 活動電位の振幅比較

呼吸性同期筋電図においては、TrkAi 群 (N=7) では、同期は完全でないものの2例で、呼吸に一部同期する有効な活動電位が確認できた。過誤再生の評価に関しては、迷走神経節では、TrkAi 群において逆行性標識細胞の総数が減少を認めた。疑核においては、標識細胞のObex(中心管が背側に開存する所、門)からの吻尾側の広がり、TrkAi 群ではコントロール群、チューブ単独群と比較して有意に吻側へ分布が移動していた。特に疑核の運動ニューロンは唯一の声門開大筋である後輪上披裂筋を支配する吻側 1500 μm 付近の標識細胞が TrkAi 群では多く標識されており、喉頭運動の改善は後輪上披裂筋ニューロンの回復が寄与したものと示唆された。

神経再生誘導チューブ単独の治療効果は有髄神経の再生本数の増加と喉頭筋萎縮予防効果に寄与するものと考えられているが、神経再生チューブ単独では喉頭運動が改善しない理由としては、感覚神経が運動神経に迷入したことが一因として挙げられている⁽⁶⁾。感覚・自律神経の再生機構は NGF が TrkA レセプターに作用することで促されることが知られている。今回用いた阻害剤は再生有髄神経線維数を減少させることなく、迷走神経節における逆行性標識細胞を減少させたことから、NGF-TrkA の反応を阻害することで選択的に感覚・自律神経再生を阻害し、結果的に運動神経と感覚・自律神経の過誤再生を阻害したと考えられる。

喉頭運動に関しては、TrkAi 群で有意に患側喉頭の動きの回復を認めており、喉頭の動きの回復率は 44%であった。ただし、TrkAi 群の1例で、奇異性運動を認めており、TrkA 阻害薬の治療だけでは運動神経線維同士の過誤再生は治療されていないことが推測される。この結果は、呼吸性同期筋電図の結果においても同期している症例が少なかった理由と考えられる。このため、喉頭運動の完全な回復を目指すのであれば、この運動神経同士の過誤再生を克服する必要がある。

今回の実験では運動神経に感覚神経が迷入する過誤再生に対する治療は TrkA 阻害薬を用いることで効果的な治療効果を得ることができた。今後の課題として運動神経同士の過誤再生を克服するために、運動神経や各喉頭筋に対する神経栄養因子等の運動神経に対するメカニズムを解明し、目的の運動神経線維を目的の筋へ誘導することが挙げられる。

- 1) Shiotani A, Saito K, Araki K, Moro K, Watabe K. Gene therapy for laryngeal paralysis. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*. 2007;116(2):115-22.
- 2) Moro K, Shiotani A, Watabe K, Takeda Y, Saito K, Mori Y, et al. Adenoviral gene transfer of BDNF and GDNF synergistically prevent motoneuron loss in the nucleus ambiguus. *Brain Res*. 2006;1076(1):1-8.
- 3) Shiotani A, O'Malley BW, Jr., Coleman ME, Alila HW, Flint PW. Reinnervation of motor endplates and increased muscle fiber size after human insulin-like growth factor I gene transfer into the paralyzed larynx. *Human gene therapy*. 1998;9(14):2039-47.
- 4) Araki K, Shiotani A, Watabe K, Saito K, Moro K, Ogawa K. Adenoviral GDNF gene transfer enhances neurofunctional recovery after recurrent laryngeal nerve injury. *Gene*

Ther. 2006;13(4):296-303.

- 5) Gacek RR, Lyon MJ. Fiber components of the recurrent laryngeal nerve in the cat. The Annals of otology, rhinology, and laryngology. 1976;85(4 Pt 1):460-71.
- 6) Suzuki H, Araki K, Matsui T, Tomifuji M, Yamashita T, Kobayashi Y, et al. Value of a novel PGA-collagen tube on recurrent laryngeal nerve regeneration in a rat model. Laryngoscope. 2015.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Araki K, Suzuki H, Uno K, Tomifuji M, Shiotani A. Gene Therapy for Recurrent Laryngeal Nerve Injury. Genes. Vol 9, 2018,E316. 10.3390/genes9070316 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

鈴木 洋、荒木 幸仁、田中 雄也、宇野 光祐、富藤 雅之、塩谷 彰浩. 声帯運動回復を高率に認めた反回神経障害の新規治療戦略. 日本気管食道科学会, 2018

荒木 幸仁. 反回神経障害に対する機能回復を目指した再生治療戦略. 日本喉頭科学会総会・学術講演会, 2019.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
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

研究代表者氏名：富藤 雅之

ローマ字氏名：Tomifuji Masayuki

所属研究機関名：防衛医科大学校

部局名：医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・耳鼻咽喉科学

職名：講師

研究者番号(8桁): 80327626

(1)研究分担者

研究分担者氏名：荒木 幸仁

ローマ字氏名：Araki Koji

所属研究機関名：防衛医科大学校

部局名：医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・耳鼻咽喉科学

職名：准教授

研究者番号(8桁): 70317220

研究分担者氏名：塩谷 彰浩

ローマ字氏名：Shiotani Akihiro

所属研究機関名：防衛医科大学校

部局名：医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・耳鼻咽喉科学

職名：教授

研究者番号(8桁): 80215946

(2)研究協力者

研究協力者氏名：鈴木 洋

ローマ字氏名：Suzuki Hiroshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。