

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11607

研究課題名(和文) 運動障害疾患モデルマウスにおける嚥下障害とその改善

研究課題名(英文) Swallowing dysfunction and improvement in motor disorder model mice

研究代表者

市川 博之 (Ichikawa, Hiroyuki)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：20193435

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)：ジストニアや筋委縮症モデルマウスにおいては、摂食嚥下に関わる舌根・軟口蓋後部・咽頭・喉頭に付着する筋肉も薄く、一部の筋線維が変性していた。特に嚥下に関わる喉頭筋の一部は筋線維が委縮しエオジンに濃染するとともに細胞核が筋線維内で密集していた。これらの筋線維における運動終板に大きな変化は観察されず運動ニューロンに大きな変性は認められなかった。一方、ジストニアモデルマウスの咽頭・喉頭蓋における粘膜上皮下の神経線維が減少していることが観察された。熱や酸のセンサーであるカプサイシン受容体TRPV1の発現が三叉神経・舌咽神経・迷走神経の感覚ニューロンやそれらの終末に少なくなっていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、運動障害モデルマウスにおける舌根・軟口蓋後部・咽頭・喉頭部での筋肉量の減少や筋線維の萎縮が見られたものの、それらを支配する運動終板に大きな変化は観察されなかった。しかし、これらの組織における粘膜上皮の神経線維やTRPV1が減少していることから、一部の感覚神経に変性が生じている可能性が考えられた。これらの結果は、運動障害疾患における摂食・嚥下に関わる感覚ニューロン、特に、熱、酸及びカプサイシンセンサーの重要な役割を示唆すると同時に、それらの変性が摂食困難や嚥下障害をもたらすと推測される。このような所見は現在までに報告がなく、今後の研究の新たな方向性を示すものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The histological profile of swallowing-related tissues was investigated in dystonia model (dt) mice and muscular atrophy model (dmu) mice. The size of some muscles and their fibers were reduced in the soft palate, epiglottis and pharynx of these mutant mice. Immunohistochemistry for PGP 9.5 was also performed on the soft palate, epiglottis and pharynx of dt and dmu mice. PGP 9.5-immunoreactive (IR) motor endplates were abundant in muscles of the swallowing-related organs of these mutant mice. In dt mice, however, PGP 9.5-IR nerve fibers were dramatically reduced in the epithelium of soft palate, epiglottis and pharynx. In addition, the deficiency of dysonin decreased the number of TRPV1 (heat, acid and capsaicin sensor)-IR nerve fibers in these tissues. The present data indicates degeneration of sensory nerve fibers and reduction of TRPV1 expression in trigeminal, glossopharyngeal and vagal sensory ganglia.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：嚥下障害 ミュータントマウス ジストニア 筋委縮症 運動ニューロン 感覚ニューロン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 嚥下機能は現在の高齢化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、また誤嚥性肺炎の原因となる。特に75歳以上の後期高齢者においてはその約3割にこの障害が存在し、その障害の原因究明や機能回復は高齢化社会を迎えた我が国の急務である。嚥下障害の器質的原因は、腫瘍、炎症、外傷、加齢性変化により舌や咽頭・喉頭の構造の傷害である。機能的な原因は、筋肉、神経に障害がある。嚥下障害の半数以上は、機能的な原因である脳卒中や脳神経系の異常により生じる。嚥下運動は延髄孤束核や疑核による反射や大脳皮質や基底核による反射調節によって成り立つ。神経筋疾患においては、これらの神経の異常により咽喉頭部における筋力・筋緊張低下や不調和をもたらされる。

(2) 研究代表者は、現在まで運動障害疾患モデルマウスについて研究してきた。筋失調症(dt)マウスや筋委縮症(dmu)マウスは、体肢に運動麻痺が認められるが、嚥下機能に関する病態については、全く不明である。我々はdtマウスの体肢の筋感覚を伝えるニューロンに細胞死が生じ、dmuマウスの運動ニューロンが変性していることを明らかにした。さらに近年dtマウスでも脊髄の運動ニューロンの細胞死や変性が認められることが報告されている。そして我々はdmuマウスの脊髄運動ニューロンではc-Fosやc-Junなどの神経活性因子が異常に発現することやグリア細胞の活性が過剰になることを報告した。これらの結果から、研究代表者は、dtマウスやdmuマウスにおける運動麻痺が神経変性や過剰興奮と関係しているという示唆を得た。一方、これらのマウスにおける嚥下に関する研究は皆無で、軟口蓋・舌根・咽頭・喉頭における筋の委縮や嚥下に関わる運動ニューロンの変性についても調べられていない。また筋失調症や筋委縮症における嚥下反射に関わる感覚ニューロンの変性や機能不全についても明らかにされたことはない。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、上記の2種類の運動障害疾患マウス、筋失調症(dt)マウスと筋委縮症(dmu)マウスにおける嚥下障害に関する病態とその原因を明らかにするために1. 嚥下に関わる筋の変性や委縮を確認し2. それらの運動を支配する運動ニューロンの変性を検討し3. 嚥下に関わる粘膜感覚を受容する感覚ニューロンの変性の有無を調べることである。特に粘膜におけるさまざまなセンサーを刺激することは嚥下障害を改善することが報告されている。脳梗塞発症後に氷を用いた嚥下リハビリテーションにより改善が認められる。また嚥下困難を有する患者に対してカプサイシントローチが有効であることが報告されている。本研究ではカプサイシン、熱、酸に対するセンサーであるthe transient receptor potential cation channel subfamily V member 1(TRPV1)にも着目し、このセンサーの分布を運動障害疾患モデルマウスで明らかにしようとするものである。嚥下反射の入り口である粘膜の感覚センサーの発現が低下しているか否か、即ちある種の感覚が鈍磨しているのか、このような疑問を明らかにするとともにより有効な別の刺激は何かを検討し嚥下困難の改善に役立てることが可能であると思われる。

(2) 本研究は世界で初めて筋失調症や筋委縮症のモデルマウスの嚥下に関わる筋肉やそれらを支配する運動ニューロンや粘膜を支配する感覚ニューロンについて調べるもので、学術的に非常に重要である。さらに本研究で、これらの筋やニューロンに変性が生じているとすれば、筋肉やニューロンの保護や刺激作用を有する物質を投与することにより、嚥下機能を改善することができるとも予想される。また最近、アルツハイマー病モデルマウスに、毒性がなく脳血管液関門を通過するコレラトキシンB(CTB)を担体として神経栄養因子を結合させた薬剤の投与により認知症状が改善されるという報告も行われた。本研究により効果が予想される物質をCTBなどの担体と結合させ、経口或いは静脈内投与することが可能になれば、運動障害疾患における筋肉や運動、或いはニューロンの変性を予防、或いは治療するのみならず、高齢者における嚥下機能低下のメカニズムを明らかにするとともに、その予防や治療にも寄与できると考えられ、臨床的な意義も大きく社会への波及効果が高い研究でもありと考えている。

### 3. 研究の方法

(1) dtマウス及びdmuマウスにおける嚥下に関わる筋(嚥下筋)の委縮について

1. 生後14日のワイルドタイプマウスとミュータントマウスを4%ホルムアルデヒドにて固定する(Kothary博士・Côté博士らのグループにより行われ、屠殺後東北大学に輸送される予定である)。舌根・軟口蓋後部・咽頭・喉頭筋を一塊にして取り出し、凍結切片を作成する。一部の筋の同定は、数枚の切片では困難なため、連続切片を作成し、筋委縮を明らかにするためにHE染色を行う。HE染色を行った切片では、舌筋・口蓋筋・咽頭筋・喉頭筋における筋線維の観察を行う。分析には形態計測用分析ソフトを用いて、筋線維の幅や筋線維における細胞核の密度(筋線維の細胞核数/筋線維の面積)を調べ、それぞれの筋でワイルドタイプマウスとdtマウス及びdmuマウスを比較する。筋の委縮が認められる場合には、筋線維の幅は小さくなり、細胞核の密度が増加すると考えられる。

(2) 生後14日のワイルドタイプマウスとdtマウス及びdmuマウスを4%ホルムアルデヒドにて固定する。舌根・軟口蓋後部・咽頭・喉頭筋を一塊にして取り出し、凍結切片を作成する。一部の筋の同定は、数枚の切片では困難なため、連続切片を作成し、protein gene product 9.5(PGP9.5)やTRPV1による免疫染色を行う。これらの切片では、舌筋・口蓋筋・咽頭筋・喉頭

筋における運動終板や舌・口蓋・咽頭・喉頭の粘膜における PGP9.5 や TRPV1 陽性神経線維の観察を行う。分析には形態計測用分析ソフトを用いて、粘膜上皮の長さに対する神経線維の長さを調べ、それぞれの筋や粘膜でワイルドタイプマウスと dt マウス及び dmu マウスを比較する。

#### 4. 研究成果

(1) 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2種類のモデル、dt マウス及び dmu 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。一方、粘膜上皮の神経線維の分布については、上皮内、或いは上皮内に PGP9.5 或いは TRPV1 陽性神経線維が観察された。これらの神経線維は口腔、咽頭喉頭部、喉頭の境界領域に豊富に観察され、他の領域では比較的稀であった。特に軟口蓋の最後端、咽頭喉頭部の上方、喉頭の入り口には多くの神経線維が観察され、嚥下反射における感覚刺激の重要性が、これらの組織学的所見からも示唆された。これらの神経線維の分布は成熟マウスと比較しても大きな差は認められなかった。また明らかな個体差も認められなかった。

(2) 運動障害を示す dt マウス及び dmu マウスにおいては、摂食嚥下に関わる舌根・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、それらに付着する筋肉も薄く、一部の筋線維が委縮していた。特に dmu マウスにおいては、嚥下の際に喉頭の運動に関わる筋の一部に大きな影響が観察された。このミュータントマウスでは、これらの筋線維はエオジンに濃染し、細胞核が筋線維内で密集している像も観察された。したがって筋委縮症における嚥下障害においては筋、特に喉頭の運動に関わる筋線維の変性が原因であることが示唆された。しかしながら PGP9.5 の免疫染色の結果、これらの筋線維における運動終板に大きな変化は認められなかった。このことから摂食嚥下に関わる筋肉を支配する運動ニューロンに大きな変性は認められないことが明らかにされた。一方、dt マウスの咽頭・喉頭蓋における粘膜上皮の PGP9.5 や TRPV1 陽性神経線維が減少していることが観察された。この所見から、嚥下反射に関わる舌咽神経・迷走神経の感覚ニューロンの一部に変性が生じている可能性が考えられた。またジストニアにおいては熱・酸・カプサイシンなどの刺激に対する鈍麻が嚥下困難をもたらす可能性も明らかにされた。運動障害疾患における摂食・嚥下に関わる感覚ニューロンの重要な役割を示唆すると同時に、それらの変性が摂食困難や嚥下障害をもたらすと推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Yajima Takehiro, Sato Tadasu, Shimazaki Kenichiro, Ichikawa Hiroyuki	4. 巻 96
2. 論文標題 Transient receptor potential melastatin-3 in the rat sensory ganglia of the trigeminal, glossopharyngeal and vagus nerves	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Neuroanatomy	6. 最初と最後の頁 116 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jchemneu.2019.01.005	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 -

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 無
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
連携研究者	佐藤 匡  (Sato Tadasu)  (40637964)	東北大学・歯学研究科・助教    (11301)	
連携研究者	矢島 健大  (Yajima Takehiro)  (40779550)	東北大学・歯学研究科・助教    (11301)	