

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791921

研究課題名(和文) 筋萎縮性側索硬化症における嚥下障害の病態の解明 - モデルマウスを用いて -

研究課題名(英文) The elucidation of the pathogenesis of dysphagia in amyotrophic lateral sclerosis - Using model mice -

研究代表者

斉藤 敦志 (Saito, Atsushi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80573633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：ALSモデルマウスの延髄においては、アストロサイトやミクログリアなどグリア細胞の発現が野生型と大きく異なることが明らかになった。また延髄の腹側にある舌下神経核のニューロンでは神経細胞死をきたすが、背側にある迷走神経背側核のニューロンは細胞死を免れることが明らかになった。グリア細胞の局在の違いが、ALSにおける運動神経選択的神経細胞死と関連があるものと考えた。

研究成果の概要(英文)：In the medulla oblongata of ALS model mice, neuronal cell death in neurons of the hypoglossal nucleus in the ventral part were observed, but the neuronal cell death was escaped in the neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve in the dorsal part. The motor neurons in the ALS model mice after the onset were more severely damaged by axonal injury than the motor neurons in the wild-type mice and pre-onset mice.

The degree of gliosis reflected the progression of the pathology of ALS (amyotrophic lateral sclerosis). These results suggest that the difference in the localization of glial cells such as Iba1 (ionized calcium binding adapter molecule 1), Mac2 (macrophage specific marker 2) and GFAP (glial fibrillary acidic protein)-positive glial cell is associated with the selective motor neuronal cell death in ALS.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：嚥下障害 ALS

1. 研究開始当初の背景

嚥下障害の原因は、加齢、脳血管障害や神経変性疾患、頭頸部手術後など様々であるが、神経変性疾患による嚥下障害は進行性であり治療に難渋することが多い。神経変性疾患の中でも筋萎縮性側索硬化症(ALS)では、嚥下と関連のある延髄の舌下神経核や疑核の運動ニューロンが選択的に変性し、重篤な嚥下障害をきたす。

ALS における誤嚥対策としては気管切開術を行うことが多いが、病気の進行とともに嚥下障害が進行し、誤嚥による肺炎をきたすリスクが高くなっていく。その場合には喉頭全摘術や喉頭気管分離術などの誤嚥防止手術が選択されることもある。しかし各々の手術の適応や、手術を行う最適の時期について明確な基準がないのが現状である。

ALS は運動ニューロンが選択的に障害される予後不良の致死性神経変性疾患であるが、ほとんどの患者は家族歴を持たない孤発性であり原因不明である。しかしながら、一部の家族性患者でスーパーオキシドジスムターゼ 1(SOD1)の突然変異を有し、さらに変異 SOD1 を遺伝子導入したトランスジェニックマウスが優れた疾患モデルマウスの表現型を呈したことから、本マウスを用いた研究成果が急速に臨床応用されつつある。近年この SOD1 トランスジェニックマウスが口腔期の嚥下障害を呈することが明らかになった。しかしその研究内容は行動実験が中心で、組織学的、分子生物学的な詳細な解析はされていない。

我々はこれまでに延髄に存在する迷走神経背側核や疑核、舌下神経核をターゲットにして研究に取り組んできた。副交感神経節前神経細胞である迷走神経背側核と、運動神経細胞である舌下神経核は同じレベルで隣接して存在している。迷走神経背側核内に局在する副交感神経節前神経細胞は、軸索損傷を

受けた際、舌下神経核の運動神経細胞に比べ強い傷害を受けることが報告されている。我々はその機構の背景には、軸索損傷後の神経変性や神経再生の役割を持つ成長因子が関与している可能性があると考えた。これらの成長因子の中で脳に豊富に存在し、神経傷害時に放出され栄養因子として働く FGF1(fibroblast growth factor 1)に注目し、FGF1 の発現が舌下神経核に比べ迷走神経背側核では低いことを報告した。また軸索切断後に迷走神経背側核と舌下神経核の神経細胞においてアセチルコリン合成酵素(ChAT)のスプライスバリエーションの出現パターンが異なることを明らかにしてきた。

このように軸索損傷では傷害を受けやすい迷走神経背側核の副交感神経細胞であるが、ALS においてはほとんど神経細胞死をきたさないことは興味深い。ALS では選択的に細胞死をきたし神経切断ではほとんど傷害を受けない舌下神経核の運動神経細胞と、ALS では細胞死を免れ神経切断では傷害を受けやすい迷走神経背側核の副交感神経細胞を比較することは、ALS における選択的運動神経細胞死を解明する大きな手掛かりとなると考える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ALSモデルマウスを用いて、嚥下・咀嚼に関わる脳幹の運動神経核や、その支配筋である咀嚼筋や舌、咽頭喉頭の筋組織にどのような変化が経時的に起こっているのかを明らかにし、ALSにおける嚥下障害の病態を明らかにすることにある。ALSモデルマウスの自然経過を詳細に検討することにより、気管切開術や誤嚥防止手術の時期を決定する助けになると考える。このように組織学的に経時的な変化を調べるような研究は、モデル動物でのみ可能であり、病理解

剖では不可能である。またALSにおいて延髄の舌下神経核での選択的運動神経細胞死のメカニズムを明らかにすることにより、ALSにおける嚥下障害に対する治療にもつながるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) ALS モデルマウスの舌下神経核と迷走神経背側核のニューロンにおける経時的变化

ALS モデルマウスの脳幹の病理学的解析を行うため、SOD1 トランスジェニックマウスを用いて、嚥下・咀嚼障害と関連のある脳幹の運動神経核(舌下神経核・迷走神経背側核)の経時的な神経変性変化を検討した。

Rotarod 計測、握力計による四肢の麻痺の出現を基準に、低発現型 G93A 型 SOD1 トランスジェニックマウスの若年(12 週齢)、四肢麻痺発症前(20 週齢)、発症後(38 週齢)を用いた。深麻酔下に灌流固定を行い脳幹を採取し、クライオスタットにて厚さ 20 μ m の凍結切片を作成した。

脳幹については、舌下神経核、迷走神経背側核において Nissl 染色、choline acetyltransferase(ChAT)抗体を用いた免疫染色により、ALS の進行によって各神経核でどの程度神経細胞死をきたすか比較検討した。

(2) ALS モデルマウスの延髄におけるグリア細胞の変化

ALS が進行するとグリオシスをきたし、グリオシスの程度は ALS の病態の進行度を反映している。グリオシスを評価するため、アストロサイト抗体(glial fibrillary acidic protein; GFAP)、ミクログリア抗体(Iba1, Mac2)を用いて、アストロサイトーシス、ミクログリオシスについて経時的变化を検討した。

(3) ALS モデルマウスにおける軸索損傷による傷害性の比較

また SOD1 トランスジェニックマウスの迷走神経と舌下神経を切断し、軸索切断後の迷走神経背側核、舌下神経核において、神経細胞傷害の経時的变化を検討した。また正常マウスにおいても同様の神経切断を行い、軸索損傷後の各神経核での傷害の受けやすさについて ALS モデルマウスとの比較を行った。

同様の SOD1 トランスジェニックマウス(発症前と発症後)と正常マウスを用いて、深麻酔下に片側の舌下神経または迷走神経を頸部で切断した。切断後 3, 7, 14, 28, 56 日後に灌流固定を行い同様に Nissl 染色と ChAT 抗体を用いた免疫染色により、舌下神経核、迷走神経背側核における陽性細胞をカウントし、経時的な運動神経傷害を検討した。

4. 研究成果

(1) ALS モデルマウスの舌下神経核と迷走神経背側核のニューロンにおける経時的变化

Nissl 染色と ChAT 抗体(choline acetyltransferase)による免疫組織化学法を行い、延髄の舌下神経核と迷走神経背側核のニューロンの経時的变化について検討した。発症後のマウスでは舌下神経核のニューロンで、ChAT の染色性の低下を認めた。一方迷走神経背側核のニューロンでは野生型、発症前、発症後のいずれにおいても、ChAT の染色性の低下は認めなかった。また発症前にはみられなかった空胞変性が、発症後には延髄舌下神経核周辺に認めるようになった。ALS モデルマウスの延髄において、腹側にある舌下神経核のニューロンでは神経細胞死をきたすが、背側にある迷走神経背側核の二

ニューロンは細胞死を免れることが明らかになった。

(2) ALS モデルマウスの延髄におけるグリア細胞の変化

アストロサイト抗体 GFAP(glial fibrillary acidic protein)とミクログリア抗体 Iba1(ionized calcium binding adapter molecule 1)と Mac2(macrophage specific marker 2)を用いて免疫組織化学法を行い、延髄におけるグリア細胞の経時的変化について検討した。発症前延髄背側に限局していた GFAP 陽性アストロサイトが、発症後には延髄全体で認められるようになった。また Iba1 陽性のミクログリアは、発症前延髄全体に存在し、発症後には舌下神経核周囲で増加した。一方発症前にはほとんど認められなかった Mac2 陽性のミクログリアが、発症後には舌下神経核を含めた延髄腹側に出現していた。野生型マウスでは、グリア細胞の局在の大きな変化は認めなかった。

このようにグリオシスの程度は ALS の病態の進行度を反映している。GFAP や Iba1、Mac2 のグリアの局在の違いが、ALS における運動神経選択的神経細胞死と関連があるものと考えた。

(3) ALS モデルマウスにおける軸索損傷による傷害性の比較

Nissl 染色と ChAT 抗体 (choline acetyltransferase)による免疫組織化学法を行い、延髄の舌下神経核のニューロンの経時的変化について検討した。

発症前・発症後・野生型の全てのマウスで、舌下神経結紮後 3 日目には舌下神経核のニューロンにおいて ChAT の染色性の低下を認め、7 日目には ChAT 陽性ニューロンはほとんど消失した。その後 ChAT 陽性ニューロンは増加し、28 日目には発症前・野生型のマウスでは、ChAT 陽性ニューロンはさらに増加し、

非切断側に比べ約 80%のニューロンが ChAT 陽性になったが、発症後のマウスでは ChAT 陽性ニューロンの回復率が低かった。

以上より ALS モデルマウスでは、発症前や野生型マウスと比べて、軸索損傷時に舌下神経核のニューロンが損傷を受けやすいことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

現時点ではなし

6. 研究組織

(1)研究代表者

斉藤 敦志 (Saito Atsushi)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：23791921

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし