

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890021

研究課題名(和文) 神経筋疾患モデルマウスを用いた嚥下障害に関する研究

研究課題名(英文) The study of swallowing disorder in neuromuscular disease mice model

研究代表者

佐藤 匡 (SATO, TADASU)

東北大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40637964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：神経筋疾患は筋肉や神経の機能不全や変性により運動がコントロールできなくなる疾患である。これらの疾患では不随意的に四肢の筋肉が緊張し、痙攣することにより手足の運動が障害されるものもある。一方、嚥下障害には様々な原因が知られているが、その一つに神経筋疾患などにおける運動障害があげられる。そこで、本研究では嚥下反射に関わる咽頭やその周囲における感覚神経の分布や由来について調べた。また、神経筋疾患モデルマウスにおいても、神経の変性について調べた。

研究成果の概要(英文)：The cause of muscle atrophy disease includes degeneration of nerves and/or muscles. The swallowing disorder is known to be derived from such disease. In this study, we examined the distribution and origin of sensory nerves in the pharynx. We also examined the neural degeneration in neuromuscular disease mice model.

研究分野：口腔解剖学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：神経筋疾患 嚥下障害

1. 研究開始当初の背景

神経筋疾患は筋肉や神経の機能不全や変性により運動がコントロールできなくなる疾患である。これらの疾患では不随意的に四肢の筋肉が緊張し、痙攣することにより手足の運動が障害されるものもある。以前からこの神経筋疾患にはさまざまな原因があると考えられてきたが、それらは特定されていなかった。1995年カナダのKotharyらは筋失調を示すマウスにおいて、ある蛋白の遺伝子に異常が存在することを発見し、ジストニンと名付けられた。ジストニン遺伝子をノックアウトしたマウスでは筋組織には異常が全く観察されなかった。しかし手足の筋肉の緊張や弛緩を感受するニューロンが消失していた。本申請者は、ジストニンノックアウトマウスにおいて感覚ニューロンだけではなく、運動ニューロンにも異常が生じてことを報告してきた。さらに、2001年カナダのKotharyらは筋失調を示す別のモデルマウス(dmuマウス)を報告した。dmuマウスでは筋肉が委縮していたが、神経には異常が見られないと考えられていた。本申請者は、dmuマウスにおいて筋の変性だけではなく、運動ニューロンにも異常が生じてことを報告してきた。

一方、嚥下機能は現在の高齢化社会において生活の質(QOL)の向上という点において非常に重要な機能の1つである。しかし高齢者の死因の上位には肺炎が含まれており、誤嚥性肺炎について問題視されている。実際、誤嚥性肺炎の患者の肺から口腔内の細菌が検出されるなど歯科においても重要度の高い問題である。嚥下機能の中心的役割を果たす嚥下反射は、筋肉だけではなく、舌骨や神経などが連携して起こることが知られている。嚥下障害時において、嚥下反射を改善する方法として、味覚や嗅覚刺激を利用する方法などが行なわ

れており、味覚刺激や嗅覚刺激がヒトの嚥下反射を改善することなどが報告されている。嚥下障害には様々な原因が知られているが、その一つに神経筋疾患などによる神経や筋肉の異常があげられる。

そこで、本研究では摂食・嚥下機能の異常は大きな問題となっていることから、神経筋疾患モデルマウスにおいて、嚥下反射に関わる筋並びに神経学的な異常を詳細に解明することで嚥下反射異常の原因を究明することができると考え、咽頭周囲における筋ならびに支配神経について検討することにした。

2. 研究の目的

本研究では、神経筋疾患モデルマウスを用いて、嚥下反射に関わる筋並びに支配神経の異常を検討し、嚥下障害のメカニズムを詳細に検討することを目的としている。しかしながら、現在にいたるまで、正常マウスや正常ラットにおける咽頭粘膜や咽頭筋の神経支配については報告が少なく、ほとんど明らかにはなっていない。そこで、本研究では、まず嚥下反射に関わる咽頭や周囲の粘膜における感覚神経の分布や由来について調べることにした。それと同時に、神経筋疾患モデルマウスとワイルドタイプマウスを用いて、嚥下反射に関わる筋肉並びに神経の異常について調べることにした。

3. 研究の方法

(1)正常ラットを用いて、嚥下反射に関わる咽頭やその周囲における感覚神経の分布や由来について調べる。

- ①動物を過剰麻酔でと殺したのち、Zamboni固定液で灌流固定を行う。灌流固定後、咽頭を中心に下部は食道・気管の上部を含むように切断し、上部は鼻腔の一部を含めて一塊にて取り出す。凍結切片を作成し、8~28℃の

冷刺激やメントールに対するセンサーである transient receptor potential melastatin-8 (TRPM8)、カプサイシンや 43°C以上の温度に対するセンサーである transient receptor potential cation channel subfamily V members 1 (TRPV1)、52°C以上の高温度に対するセンサーである transient receptor potential cation channel subfamily V members 2 (TRPV2)及び galanin に対する免疫染色を行う。

②動物の咽頭に逆行性トレーサーであるフルオロゴールドを投与し、3日間経過後、過剰麻酔でと殺したのち、Zamboni 固定液で灌流固定を行う。灌流固定後、迷走舌咽神経節を取り出し、凍結切片を作成する。TRPM8、TRPV1 及び TRPV2 に対する免疫染色を行う。

(2) 神経筋疾患モデルマウスとワイルドタイプマウスを用いて、嚥下反射に関わる筋肉並びに神経の異常について調べる。

神経筋疾患モデルマウスとワイルドタイプマウスを麻酔後、4%ホルムアルデヒドにて固定し、灌流固定を行う。脊髄、脊髄後根神経節、迷走舌咽神経節を取り出し、凍結切片を作成する。

これらの切片に細胞死のマーカーである Caspase や、運動ニューロンに含まれる choline acetyltransferase、痛みの伝達物質と考えられる substance P、calcitonin-gene-related peptide に対する免疫染色を行う。また、脊髄の切片にて、グリア細胞への影響を調べるため、アストロサイトのマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP)やマイクログリアのマーカーである Iba1 による免疫染色を行う。

4. 研究成果

まず、正常ラットにおいて TRPM8 を含む

神経線維は、軟口蓋の後部や咽頭と口腔との境界領域に豊富に観察された。これらの神経線維は粘膜上皮下で神経網を形成し、それらの一部は上皮内に侵入していた。一方、軟口蓋の前部・喉頭蓋・喉頭の粘膜には TRPM8 陽性神経線維はほとんど観察されなかった。また、咽頭周囲の小唾液腺や粘液腺の導管・喉頭蓋の喉頭側粘膜及び喉頭粘膜における上皮細胞に、TRPM8 の発現が認められた。さらに軟口蓋や咽頭における味蕾様構造にも TRPM8 を含む細胞が観察された。一方、TRPV1 については、TRPV1 を含む神経線維が咽頭粘膜に豊富に観察された。これらの神経線維は粘膜固有層に数多く認められ、それらの一部は上皮内に侵入していた。TRPV2 は上皮内や固有層の樹状細胞に認められたが、TRPV2 を含む神経線維の分布は不明であった。咽頭鼻部と喉頭部の境界部や軟口蓋にトレーサーを注入した結果、迷走神経上神経節や舌咽神経節、さらに迷走神経下神経節における感覚ニューロンが咽頭周囲の TRPM8、TRPV1 や TRPV2 を含む神経線維の由来であることが明らかとなった。

神経筋疾患モデルマウスでは、各種染色を試みた結果、脊髄後根神経節において caspase の発現が微増していた。しかしながら、迷走舌咽神経節では優位な差が認められなかった。さらに、脊髄において GFAP と Iba1 染色を行った結果、運動ニューロンが存在する脊髄の前核において GFAP の発現に変化が認められた。本申請者らは過去の報告で、神経筋疾患モデルマウスで運動ニューロンに変性が起きていることを報告してきたが、本研究ではさらに、周囲のグリア細胞へ影響が広がっていることが確認された。しかしながら、摂食にかかわる三叉神経系や末梢の組織については明らかにすることができなかった。今後、この神経筋疾患モデルマウスを用いてさ

らに検討していく予定である。

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5件)

- (1) Yu Endo, Noriaki Shoji, Yusuke Shimada, Eriko Kasahara, Tadasu Sato, Takashi Sasano and Hiroyuki Ichikawa. Prednisolone Induces Microglial Activation in the Subnucleus Caudalis of the Rat Trigeminal Sensory Complex. Cellular and Molecular Neurobiology. 34(1):95-100, 2014. (査読有)
DOI: 10.1007/s10571-013-9990-z
- (2) Toshihiko Suzuki, Tadasu Sato, Mitsuhiro Kano and Hiroyuki Ichikawa. The distribution of galanin-immunoreactive nerve fibers in the rat pharynx. Neuropeptides. 47(4):231-236, 2013 (査読有)
DOI: 10.1016/j.npep.2013.05.001
- (3) Rika Sasaki, Tadasu Sato, Takehiro Yajima, Mitsuhiro Kano, Toshihiko Suzuki and Hiroyuki Ichikawa. The distribution of TRPV1 and TRPV2 in the rat pharynx. Cellular and Molecular Neurobiology. 33(5):707-714, 2013 (査読有)
DOI: 10.1007/s10571-013-9938-3
- (4) Tadasu Sato, Masatoshi Fujita, Mitsuhiro Kano, Hiroshi Hosokawa, Teruyoshi Kondo, Toshihiko Suzuki, Eriko Kasahara, Noriaki Shoji, Takashi Sasano and Hiroyuki Ichikawa. The Distribution of Transient Receptor Potential Melastatin-8 in the Rat Soft Palate, Epiglottis, and Pharynx. Cellular and Molecular Neurobiology. 33(2):161-165, 2013 (査読有)
DOI: 10.1007/s10571-012-9888-1
- (5) Toshihiko Suzuki, Tadasu Sato and Hiroyuki Ichikawa. Osteocalcin- and Osteopontin-Containing Neurons in the Rat Hind Brain. Cellular and Molecular Neurobiology. 32(8):1265-1273, 2012 (査読有)
DOI: 10.1007/s10571-012-9851-1

[学会発表] (計5件)

- (1) 佐藤 匡、矢島 健大、狩野 充浩、鈴木 敏彦、市川 博之。ラット咽頭及びその周囲組織における TRPV1 と TRPV2 の分布 第55回歯科基礎医学会 学術大会・総会 平成25年9月20日(金)～22日(日) 岡山
- (2) 佐藤 匡、佐々木 里香、藤田 雅俊、狩

野 充浩、澤浦 亮平、鈴木 敏彦、市川 博之。ラット軟口蓋、喉頭蓋及び咽頭における TRPM8, TRPV1, TRPV2 の分布 日本解剖学会 第59回東北・北海道連合支部学術集会 平成25年9月14日(土)～15日(日) 札幌

- (3) Tadasu Sato, Rika Sasaki, Mitsuhiro Kano, Toshihiko Suzuki, and Hiroyuki Ichikawa. The distribution of TRPV1 and TRPV2 in the rat pharynx. ASahct2013 International of Symposium Anatomical Science for advance in health and clinical therapy 平成25年8月27日(水)～28日(木) 仙台
- (4) 佐藤 匡、藤田 雅俊、狩野 充浩、鈴木 敏彦、市川 博之。ラット軟口蓋、喉頭蓋及び咽頭における TRPM8 の分布 第54回歯科基礎医学会 学術大会ならびに総会 平成24年9月14日(金)～16日(日) 郡山
- (5) 藤田 雅俊、佐藤 匡、狩野 充浩、清水 良央、金高 弘恭、鈴木 敏彦、市川 博之。Dmu マウスにおける骨格筋及び運動ニューロンの変性 第54回歯科基礎医学会 学術大会ならびに総会 平成24年9月14日(金)～16日(日) 郡山

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 匡 (SATO TADASU)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：40637964