

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861541

研究課題名(和文) 神経筋疾患における摂食嚥下障害メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study about mechanism of swallowing disorder in muscle atrophy disease

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) 2,900,000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。一方、摂食嚥下機能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における運動障害が知られている。そこで、本研究では、摂食嚥下機能に関わる口腔・咽頭やその周囲における筋の変性や神経への影響について調べた。また、中枢である脊髄におけるグリア細胞への影響についても調べた。

研究成果の概要(英文)：The cause of muscle atrophy diseases includes atrophy and degeneration of nerves and/or muscles. The swallowing disorder is known to be a severe symptom of these diseases. In this study, we examined the changes of muscle and nerves in the pharynx and oral structures in models of muscle atrophy diseases. We also examined the glial reaction in the spinal cord of the models.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：神経筋疾患

1. 研究開始当初の背景

神経筋疾患は筋肉、神経、或いは、その両方に生じる筋萎縮・運動神経や感覚神経の変性・筋線維や神経細胞の細胞死などにより運動機能が障害される疾患である。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ことが多い。その原因が神経にある場合には、その障害の部位によって中枢性と末梢性に分類される。一方、筋肉に原因があると考えられる場合にも、それらを支配する運動神経や感覚神経に変性が認められることもある。したがって、種々の神経筋疾患にはさまざまな原因があると考えられるものの、それらを特定することが困難なものも多かった。1995年カナダのKothary博士らは筋の運動失調を自然発症するマウスにおいて、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。しかし脊髄神経における感覚ニューロンの集合体である後根神経節において大型のニューロンが減少していることが明らかとなった。体肢の筋を調べてみると、筋紡錘が消失していた。これらの事実から、ジストニンノックアウトマウスでは、手足の筋肉の緊張や弛緩を感受する感覚ニューロンが消失し、筋肉の運動をコントロールできなくなっていることが推測された。以前から、本申請者は、この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。脊髄における運動ニューロンが萎縮や減少を示していた。さらに、2001年、Kotharyらは運動失調を示す別のモデルマウス(dmuマウス)を報告した。dmuマウスでは下肢の筋肉が萎縮し、歩行することができなくなり、生後数週間後に死に至る。

運動及び感覚神経には異常が見られないと考えられていた。しかし本申請者は、dmuマウスにおいて、下肢の筋だけでなく、上肢の筋にも変性が生じていることを明らかにした。これらの筋線維は萎縮を示し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行うとエオジンに過染されるとともに、それらを支配する運動ニューロンにも異常が生じていた。すなわち運動ニューロンの変性マーカーである calcitonin gene-related peptide (CGRP) の発現増強が神経終板や運動ニューロンの細胞体に認められることを報告してきた。いくつかの神経筋疾患では、グリア細胞から分泌されるサイトカインが病態を悪化するという報告もあり、この所見はdmuマウスにおける運動失調の原因メカニズムの特定に大きく貢献すると考えられた。

一方、摂食・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。嚥下機能の中心的役割を果たす嚥下反射は、舌、軟口蓋、咽頭、喉頭の感覚や運動、そして、それらを支配する筋肉や神経である。舌、軟口蓋、咽頭、喉頭蓋を含む喉頭における粘膜・筋肉を支配する神経は嚥下のメカニズムを明らかにするために非常に重要である。一方、多くの神経筋疾患では嚥下障害を伴う。この障害により、誤嚥性肺炎が生じ、死に至ることもまれではない。したがって、神経筋疾患モデル動物における舌、軟口蓋、咽頭、喉頭における筋肉の変性や、筋や粘膜を支配する神経の異常を明らかにすることは大変意義深いものと考えられる。

しかしながら、ラットやマウスにおける咽頭やその周囲構造の支配神経に関する報告は少なく、正常ラットにおいては、痛みの伝達物質と考えられる calcitonin gene-related peptide (CGRP)、8~28°C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℃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℃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)などの感覚神経の分布についてしか知られていない。

そこで、本研究では、神経筋疾患モデルマウスにおいて、嚥下反射に関わる筋やそれらを支配する神経の異常を詳細に解明することで摂食・嚥下反射機能不全の原因を究明することができると考え、口腔・咽頭周囲における筋やそれらの支配神経について検討することにした。また、脊髄においては運動ニューロン周囲のグリア細胞への影響について詳細に分析をすることにした。

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、摂食・嚥下反射に関わる筋並びに支配神経の異常を検討し、摂食・嚥下機能異常のメカニズムを詳細に検討することを目的としている。そこで、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、摂食・嚥下反射に関わる筋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) 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末梢の神経の異常について調べた。

①神経筋疾患モデルマウスとワイルドタイプマウスを過剰麻酔でと殺したのち、4%パラホルムアルデヒド固定液を用いて灌流固定を行う。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。口腔や咽頭以外の部位のコントロール部位として四肢の筋も取り出す。これらの組織を用いて、凍結切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色を行う。また、CGRP や Caspase に対する免疫染色を行い神経の変性や筋線維の細胞死についても検討を行う。

②上記で作成した切片を用い、口腔・咽頭・喉頭蓋の組織変化や筋・支配神経の異常を観察する。

(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、中枢神経の異常について調べた。

①神経筋疾患モデルマウスとワイルドタイプマウスを過剰麻酔でと殺した後、4%パラホルムアルデヒド固定液にて灌流固定を行った。固定後、脊髄、脊髄後根神経節、迷走及び舌咽神経節などを取り出し、凍結切片を作成した。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、痛みの伝達物質であり、運動ニューロンでは変性マーカーと考えられる CGRP に対する免疫染色を行った。また、脊髄の切片では、グリア細胞への影響を詳細に調べるため、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った。

②脊髄における運動ニューロンが存在する脊髄の前角における Iba1 や GFAP の発現変化を確認するとともに、その影響についても形態学的に計測を行った。すなわち、これらの物質を含む

グリア細胞の数や前角・中間質・後角の面積を算出し、分布密度を算出した。またそれぞれのグリア細胞が有する突起の長さを計測し、グリア細胞の反応性や運動ニューロンへの影響についても検討を加えた。

4. 研究成果

摂食嚥下機能に関わる口腔咽頭周囲や四肢の末梢組織について、各種染色を試み検討を行った。ヘマトキシリン-エオジン染色の結果、神経筋疾患モデルマウスではエオジンに濃染し、強い萎縮の認められる体肢の筋の筋線維において細胞死のマーカである caspase の発現が認められた。また、同じモデルマウスでも口腔及び頸部においては、舌骨と甲状軟骨を結ぶ甲状舌骨筋の筋線維に萎縮が認められ、エオジンに濃染していた。また免疫染色の結果、運動終板には CGRP の集積も観察された。しかしながら、他の口腔・咽頭・喉頭の筋に caspase の発現は認められなかった。

嚥下反射においては筋と神経により舌骨や喉頭軟骨・それらの関節や靭帯などが連携して運動する必要がある。甲状舌骨筋の萎縮により、それらの円滑な動きが困難になると考えられる。

神経筋疾患モデルマウスとワイルドタイプマウスの脊髄におけるグリア細胞の分布や形態について調べたところ、運動ニューロン周囲でアストロサイトが反応していること、一方、ミクログリアへの影響は少ないことを明らかにした。すなわち、神経筋疾患モデルマウスの嚥下に関わると考えられる頸髄では運動ニューロンの存在する前角のアストロサイト (GFAP 陽性グリア細胞) の数がワイルドタイプマウスと比べて、有意に増加していた。しかし、突起の長さに明らかな差は認められなかった。一方、下肢の筋などを支配する腰髄

では、アストロサイト (GFAP 陽性グリア細胞) の数も長さも有意に増加していた。しかしながら、頸髄においてはミクログリア (IBa1 陽性グリア細胞) の数やそれらの突起の長さにも明らかな差は認められなかった。

これらの頸髄におけるアストロサイトの分布や形態変化が、筋の萎縮に伴って2次的に生じているかどうかについては、本研究では明らかにすることができなかった。しかし、神経筋疾患モデルマウスにおいてもアストロサイトから分泌されるサイトカインが運動失調を増悪させる可能性があることを示唆することができた。

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1件)

Tadasu Sato, Masatoshi Fujita, Yoshinaka Shimizu, Hiroyasu Kanetaka, Leona W. G. Chu, Patrice D. Côté, Hiroyuki Ichikawa. Glial reaction in the spinal cord of the degenerating muscle mouse (Scn8admu). Neurochemical Research. 40:124-129, 2015. (査読有)

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