

〈原著論文〉

氣息性嘔声の治療のためのマウス声門閉鎖不全モデルの検討

田所 宏章, 雑賀 太郎, 原 浩貴

川崎医科大学耳鼻咽喉・頭頸部外科学

抄録 嘔声は、炎症や腫瘍性病変以外にも老化や筋疾患に伴う声帯筋萎縮や反回神経麻痺などによって発症する。うまく発声できないことはコミュニケーション能力の極端な低下を意味し、Quality of life (QOL) を著しく低下させる。その病態は疾患によって異なるが、声門閉鎖不全により発声時に生じる声門間隙の残存があると氣息性嘔声を生じる。氣息性嘔声の治療は、保存的治療から外科治療まで様々なものが存在するが専門性が高く限られた施設のみで治療される現状で、治療を受けられる患者が限定される問題がある。そのためさらに低侵襲で復元性の高い治療や汎用性の高い治療が望まれる。再生医療をふくめた新規治療の開発を進めるためには、まず声門閉鎖不全を生ずるマウスモデルの確立が必要である。

本研究では、C57BL/6マウスを用いて神経原性の声門閉鎖不全モデルとしての反回神経麻痺モデルと、加齢性の声門閉鎖不全モデルの2つのモデル動物を作成し、内喉頭筋を含む声帯の評価を行うことでマウスにおける声門閉鎖不全のメカニズムがヒトと同一であるかどうかを解明することを目的とした。また筋肉の過形成を抑制する分子である Myostatin (以下, Mstn) を標的とし、変異 Mstn を過剰発現することで全身性に筋過形成を来すマウス (以下, 変異 Mstn tg マウス) を用いて内喉頭筋を含む声帯の評価を行い、Mstn 阻害の臨床応用の可能性についても検討した。

反回神経麻痺モデルマウスについては、健側と比較して麻痺側では有意に甲状披裂筋萎縮が認められ、声門閉鎖不全のメカニズムはヒトと同一でありモデルとして有効であると考えられた。加齢マウスを用いた検討では、内視鏡で、声帯萎縮と弓状変化を確認出来た。甲状披裂筋萎縮はみられず声帯粘膜の萎縮とコラーゲン線維の増加が確認され、加齢に伴うヒト声帯の萎縮と同様の形態学的所見を呈することから加齢に伴う声門閉鎖不全のモデルとして有用であると考えた。変異 Mstn tg マウスの内喉頭筋においては有意な筋肉量・筋線維の増大はなかったが、傍声帯間隙の脂肪が減少しており、喉頭内においても脂肪代謝に影響があることが明らかになった。

doi:10.11482/KMJ-J202147147 (令和3年10月15日受理)

キーワード: 喉頭, マウスモデル, 加齢, 反回神経麻痺, 評価法

緒言

嘔声は、様々な原因によって発症する。原因は急性喉頭炎などの炎症性疾患や声帯ポリープ、声帯結節などの声帯粘膜に生ずる炎症性の

腫瘍性病変による声帯の粘膜波動の不良、加齢に伴う声帯萎縮や反回神経麻痺による発声時の声門閉鎖不良などがある。会話によるコミュニケーションは日常生活の根幹をなしていること

別刷請求先

原 浩貴

〒701-0192 倉敷市松島577

川崎医科大学耳鼻咽喉・頭頸部外科学

電話: 086 (462) 1111

ファックス: 086 (462) 1199

Eメール: harahiro@med.kawasaki-m.ac.jp

から、ひとたび嗄声をふくむ音声障害を起こした場合には、患者の Quality of life (QOL) は著しく低下する。

嗄声は、聴覚印象評価によって、粗造性、気息性、無力性、努力性に分類される。このうち、もっとも発生頻度の多い粗造性嗄声は主に炎症により声帯粘膜波動が不良となって生ずる。このため、治療は声の衛生指導に加えて消炎及び炎症性腫瘍の切除を行うことで完了することが多く、治療法はほぼ確立している。しかし次に多く見られる気息性嗄声に対する治療法はいまだに確立しているとは言い難い。反回神経麻痺による声門閉鎖不全が原因の場合には音声外科によるアテロコラーゲンや自家脂肪の声帯内注入術や喉頭形成術が行われている¹⁾が、現在、本邦における音声外科医は100名程度であることから、音声外科医不在の地域では治療を受けられない患者がいるという問題がある。また加齢に伴う声帯の萎縮が原因の声門閉鎖不全や、声門閉鎖不全とともに粘膜固有層浅層が欠損した状態である声帯溝症²⁾では確立された治療法はない。

このような現状を鑑み、我々は気息性嗄声の原因となる声門閉鎖不全を来す疾患に対し、より汎用性が高く低侵襲な治療として積極的に内喉頭筋を肥大させ声門閉鎖不全を解消させるとともに声帯筋の筋力を増強することを考えている。

今後、新規治療の開発を進めるためには、まず声門閉鎖不全を生ずる動物モデルの確立が必要である。従来、反回神経麻痺や声帯の萎縮に関する動物モデルは、イヌ、ネコ、ラット、ウサギなどが用いられてきた³⁻⁹⁾。再生医療を含む新規治療を考える際、マウスモデルは必須であるが、マウスはサイズが小さいことから声帯を含めた喉頭の研究にはほとんど用いられてこなかった。しかし近年、トランスジェニックマウスを用いた喉頭の発生学的研究が報告されヒトとマウスの喉頭及び声帯の構造と機能（呼吸、発声、嚥下）の類似性も明らかにされてきた¹⁰⁻¹²⁾。マウスはヒトと同様に喉頭を使って発

声し基本周波数は100-120,000Hzであること、内喉頭筋である甲状披裂筋が声門閉鎖を制御し周波数を調節していることが示されている¹³⁾。そこで本研究では、C57BL/6マウスを用いて神経原性声門閉鎖不全モデルとしての反回神経麻痺モデルと、加齢性声門閉鎖不全モデルの2つのモデル動物を作成し、内喉頭筋を含む声帯の評価を行うことでマウスにおける声門閉鎖不全のメカニズムがヒトと同一であるかどうかを解明することを目的とした。また筋肉の過形成を抑制する分子である Myostatin (以下、Mstn) を標的とし、変異 Mstn を過剰発現することで全身性に筋過形成を来すマウス (以下、変異 Mstn tg マウス)¹⁴⁾を用いて内喉頭筋を含む声帯の評価を行い、Mstn 阻害の臨床応用の可能性についても検討した。

対象と方法

実験動物

実験には2か月齢、18か月齢の C57BL/6 マウスのオスおよび18か月齢の変異 Mstn tg マウスのオスを用いた。マウスはコンベンショナルエリアの環境で生育した。実験動物は川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (No.18-073, 19-021, 19-049, 20-123)、川崎医科大学動物実験指針に基づいて研究を実施した。

反回神経麻痺モデルは2か月齢の C57BL/6 マウスを用いて作製した。麻酔は三種類混合麻酔薬 (塩酸メドミジン + ミダゾラム + 酒石酸ブトルフェール) を使用した。塩酸メドミジン 0.3 mg/kg, ミダゾラム 4 mg/kg, 酒石酸ブトルフェール 5 mg/kg となるように生理食塩水で希釈した混合液を、マウス体重 10 g あたり 0.1 ml 腹腔内に投与し疼痛刺激に対して反射が起こらないことを確認してから処置した。全身麻酔下に仰臥位で頸部正中を皮膚切開し、気管を伴走する右側反回神経のみを選択的に切断した (図1A)。覚醒後は通常通りの飼育をおこなった。

加齢モデルはマウスの発育成長を検討した報告¹⁵⁾に基づき、本研究では C57BL/6 マウスの

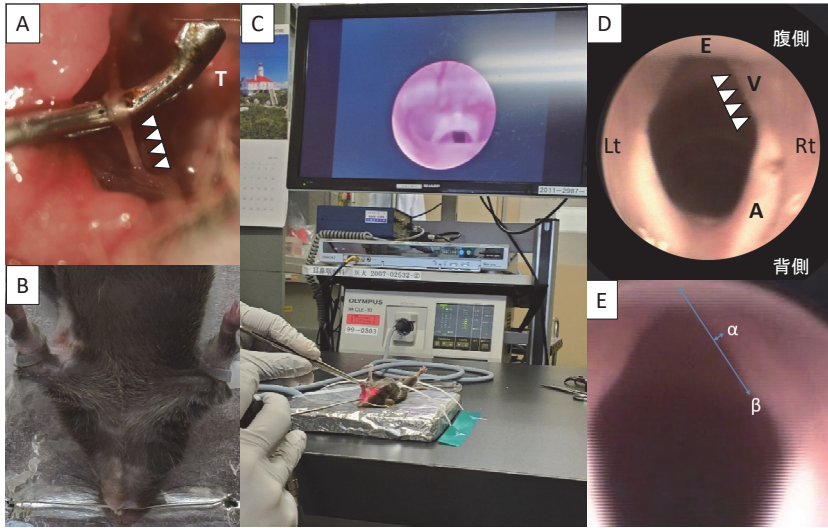


図1 実験方法

- A) 反回神経処理の風景. T: 気管の右側を走行する反回神経を同定し切離を行う.
 B) マウスの固定方法. 切歯にワイヤーをかけて頭部を固定し, 四肢は牽引固定を行う.
 C) 内視鏡の挿入方法. 舌を上方へ牽引し喉頭を展開しながら経口腔的に内視鏡を挿入する. 実際の観察風景.
 D) 内視鏡写真. 矢頭が声帯を示す (A: 披裂軟骨, E: 喉頭蓋, V: 声帯, Lt: 左, Rt: 右)
 E) 内視鏡による検討方法. 安静呼吸時における声帯の弓状彎曲が最も深い部分の長さ (α) と, その時点での声帯突起と前連合を結ぶ声帯膜様部の長さ (β) を測定し除算することで評価する.

オスの2か月齢を若年群, ヒトで加齢性の声門閉鎖不全が見られるようになる50歳代後半に相当する18か月齢を加齢群として比較した. なおマウスにおいては, 18~24か月齢が, ヒトの56~69歳に相当し, ほとんどのバイオマーカーに老齢変化が検出される¹⁶⁾. また, 18か月齢のC57BL/6マウスのオスを野生型として18か月齢での変異 Mstn tg マウスのオスにおける声帯構造との比較もおこなった.

評価方法

1. 内視鏡画像による評価

全身麻酔後, 体位は仰臥位で四肢を牽引し, 切歯にワイヤーをかけて頭部を固定 (図1B) して内視鏡を挿入した. 観察時は舌を鑷子で前上方へ牽引し, 硬性内視鏡 (STORZ 社製 HOPKINS® Telescopes 30° (直径: 1.9 mm, #1232CA)) を経口腔的に喉頭へ挿入して声門を観察し, 動画記録を行った (図1C). 加齢モデルでは声帯萎縮の程度を内視鏡を用いて評価

した (図1D). 声帯萎縮の評価は, 菊池らの方法¹⁷⁾ に従い, 安静呼吸時における最大吸気時の声帯の弓状彎曲が最も深い部分の長さ (α) と, その時点での声帯突起と前連合を結ぶ声帯膜様部の長さ (β) を測定し除算した値を声帯萎縮率として評価した (図1E). 反回神経麻痺モデルでは作製後1か月に同様の方法で喉頭所見を確認した.

2. 組織学的評価

1) 組織標本の作製

2か月齢, 18か月齢のC57BL/6マウスのオスおよび18か月齢の変異 Mstn tg マウスのオスはそれぞれ二酸化炭素を用いて安楽死させた後, 喉頭を摘出した. 反回神経麻痺モデルマウスでは2か月齢で反回神経切断処理を行い, 3か月齢の時点で二酸化炭素を用いて安楽死させた後, 喉頭を摘出した. 摘出した喉頭を4%パラホルムアルデヒド固定後パラフィンに包埋し, 滑走式マイクロトームを用いて3 μ m厚の冠状断

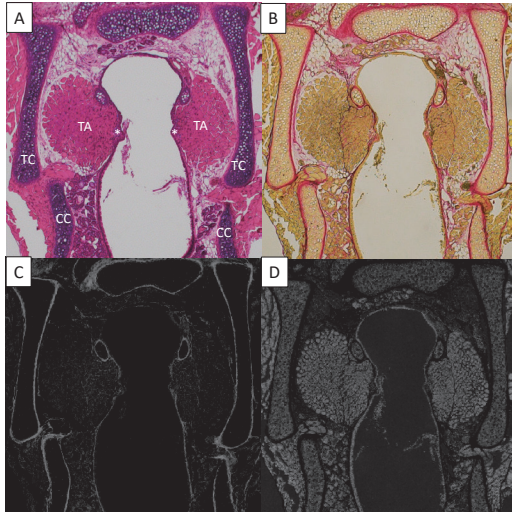


図2 検討方法（組織学的検討）

- A) 喉頭冠状断（HE染色）（TA: 甲状披裂筋, TC: 甲状軟骨, CC: 輪状軟骨, *: 声帯粘膜）.
 B) 喉頭冠状断（SR染色）.
 C) SR染色を行った喉頭冠状断切片をImage-Jにて画像解析し、コラーゲン線維にフォーカスを当てた画像.
 D) SR染色を行った喉頭冠状断切片をImage-Jにて画像解析し、甲状披裂筋にフォーカスを当てた画像.

で連続薄切標本を作製した。切片をクリアプラスにて脱パラフィン化し、70%~99%アルコールを用いて親水化を行ない、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色と Sirius Red (SR) 染色を行った。HE 染色には Hansen のヘマトキシリン溶液と 0.5% Eosin 水溶液を用いた。99%アルコールとキシレンで脱水・透徹を行った後、マリノールで封入し組織学的評価を行った（図2A）。SR 染色は飽和ピクリン酸のろ過液45 mL + 1% Sirius Red 液 5 mL の混合液を用いて15分間染色したのち濾紙で溶液を吸着後に乾燥させ、キシレンを滴下して切片になじませた後マリノールを用いて封入し組織学的評価を行った（図2B）。

2) 組織の計測法

HE 染色を行った組織標本を顕微鏡下で観察しマウスの声帯粘膜および甲状披裂筋の断面積を画像解析ソフト（Image-J (NIM: ImageJ ver 1.52a)）にて測定した。腹側から背側までの全

スライスのうち、中央の3スライスを選出し、該当部位の面積を平均して算出した。さらに組織学的に加齢性変化を確認するため、SR 染色した組織標本も、同様に中央の3スライスを選出し Image-J を用いて画像解析を行い甲状披裂筋と声帯粘膜内のコラーゲン線維量を算出し各群で比較した（図2C, D）。また、傍声帯間隙とよばれる甲状披裂筋外側から甲状軟骨内軟骨膜までの範囲における脂肪組織の断面積も計測した。

解析方法

反回神経麻痺モデルにおける健側と患側の筋断面積・声帯粘膜面積・声帯萎縮率および加齢モデルマウス、変異 Mstn tg マウスにおける声帯粘膜面積・筋断面積・声帯粘膜と甲状披裂筋に占めるコラーゲン線維の割合に対しては t 検定、若年・加齢・変異 Mtsn tg の3群間の傍声帯間隙の脂肪組織の比較検討では Tukey - Kramer 検定を用いて解析した。解析ソフトは StatMate V[®] を用いた。 $p < 0.05$ をもって有意とした。

結果

反回神経麻痺モデルマウス、加齢モデルマウス、変異 Mstn tg マウスの順に結果を示す。

反回神経麻痺モデルマウスにおける声帯評価

内視鏡で確認したところ、処置側の声帯麻痺を認めた。また麻痺側の声帯は肉眼的に萎縮しているのが確認された（図3A, B）。内視鏡画像から計測した声帯の萎縮率比較では、麻痺側の声帯は有意に萎縮率が高かった（表1）（ $p < 0.05$ ）。

組織学的には、健側の筋断面積は $21.12 \pm 1.77 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ 、反回神経麻痺側の筋断面積は $15.72 \pm 2.48 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ であった。反回神経切断によって甲状披裂筋が有意に萎縮していた（ $p < 0.05$ ）（図3C, D）。声帯粘膜の面積は健側と麻痺側で差を認めなかった。

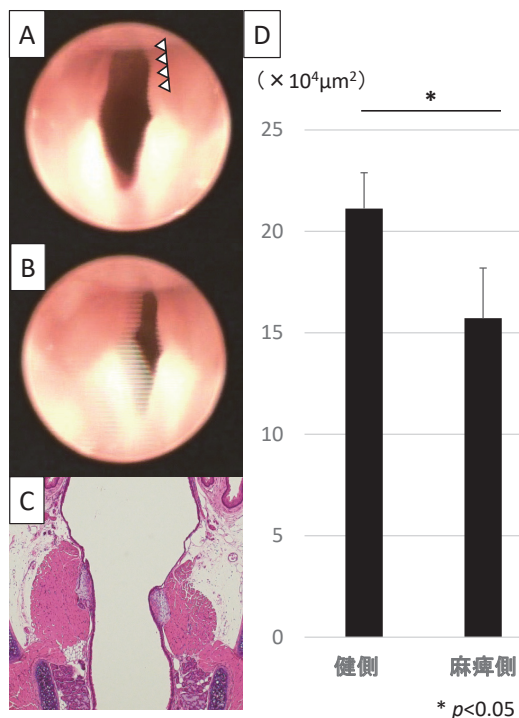


図3 反回神経モデルマウスの両側声帯の比較
 A) 安静吸気時の喉頭内視鏡写真. 矢頭: 麻痺側では健側と比較して肉眼的に声帯の萎縮が認められた.
 B) 安静呼気時の喉頭内視鏡写真.
 C) 喉頭冠状断 (HE 染色). 麻痺側では神経原性的の内喉頭筋萎縮を認めた. 声帯粘膜には左右差なし.
 D) 健側と麻痺側の甲状披裂筋断面積の比較. 麻痺側では有意に筋断面積が小さかった.

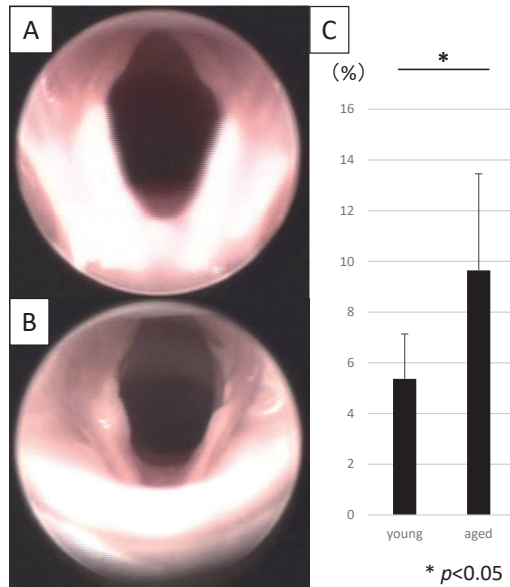


図4 若年群と加齢群マウスの内視鏡所見
 A) 若年群の喉頭内視鏡写真.
 B) 加齢群の喉頭内視鏡写真.
 C) 若年群と加齢群での内視鏡画像による声帯萎縮率の比較. 加齢群では若年と比較して有意に弓状変化が大きかった.

表1 反回神経麻痺モデルにおける筋断面積・声帯粘膜面積・声帯萎縮率

部位	部位	
	健側 (n=6)	処置側 (n=6)
筋断面積 (μm^2)	$21.12 \pm 1.77 \times 10^4$	$15.72 \pm 2.48 \times 10^4$ *
声帯粘膜面積 (μm^2)	$1.06 \pm 0.19 \times 10^4$	$1.08 \pm 0.21 \times 10^4$
声帯長 (pixel)	490.91 ± 113.59	511.21 ± 124.69
彎曲の深さ (pixel)	24.45 ± 6.50	35.54 ± 9.69 *
声帯萎縮率 (%)	5.03 ± 1.10	7.75 ± 0.88 *

(* $p < 0.05$, *t* 検定)

表2 喉頭内視鏡による加齢モデルマウスの声帯萎縮率

モデル	モデル	
	若年マウス (n=8)	加齢マウス (n=8)
声帯長 (pixel)	185.53 ± 37.47	188.00 ± 50.87
彎曲の深さ (pixel)	9.88 ± 3.32	16.78 ± 3.66 *
声帯萎縮率 (%)	5.37 ± 1.77	9.65 ± 3.81 *

(* $p < 0.05$, *t* 検定)

加齢モデルマウスにおける声帯評価

内視鏡所見では若年群と比較して加齢群では声帯の萎縮が認められた (図4A, B). 内視鏡

画像から計測した声帯の萎縮率比較では若年群に対して加齢群は有意に萎縮率が大きかった ($p < 0.05$) (表2, 図4C).

表3 加齢モデルマウスにおける筋断面積・声帯粘膜面積・コラーゲン線維の割合

	モデル	
	若年マウス (n=8)	加齢マウス (n=8)
甲状披裂筋面積 (μm^2)	$18.46 \pm 5.48 \times 10^4$	$29.04 \pm 2.69 \times 10^4$ *
甲状披裂筋におけるコラーゲン線維の割合 (%)	6.46 ± 3.55	9.28 ± 4.25
声帯面積 (μm^2)	$1.25 \pm 0.25 \times 10^4$	$0.63 \pm 0.18 \times 10^4$ *
声帯におけるコラーゲン線維の割合 (%)	6.94 ± 2.33	62.47 ± 23.59 *

(* $p < 0.05$, t 検定)

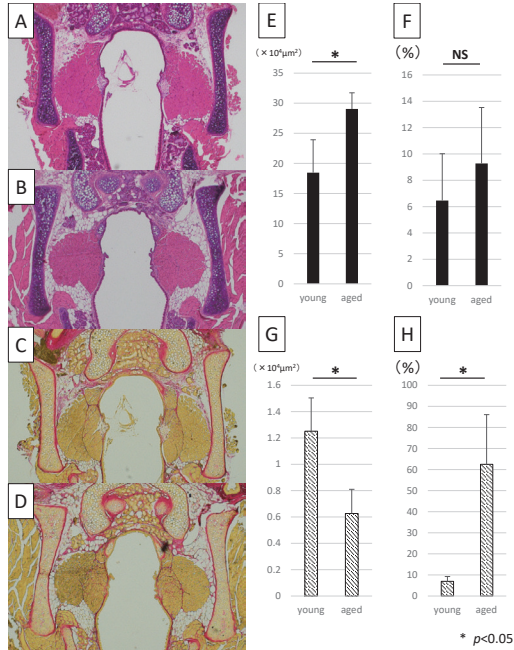


図5 若年群と加齢群マウスの組織所見の比較

- A) 若年群の喉頭冠状断切片画像 (HE 染色). 甲状披裂筋は甲状軟骨内軟骨膜と接しており傍声帯間隙の脂肪はほとんどない。
- B) 加齢群の喉頭冠状断切片画像 (HE 染色). 声帯粘膜の萎縮および甲状披裂筋と甲状軟骨内軟骨膜との間(傍声帯間隙)に多数の脂肪組織が見られる。
- C) 若年群の喉頭冠状断切片画像 (SR 染色).
- D) 加齢群の喉頭冠状断切片画像 (SR 染色). 傍声帯間隙に多数の脂肪組織が見られる。
- E) 甲状披裂筋断面積の比較. 若年群と比較すると加齢群では有意に筋断面積が大きかった。
- F) 甲状披裂筋におけるコラーゲン線維の比率の比較. 加齢群で若干割合が高かったが有意差は認めなかった。
- G) 声帯粘膜断面積の比較. 若年群と比較すると加齢群では有意に声帯粘膜断面積が小さかった。
- H) 声帯粘膜に占めるコラーゲン線維の比率の比較. 若年群と比較すると加齢群ではコラーゲン線維の占める割合が大きかった。

組織学的検討では、若年群の甲状披裂筋の断面積は $18.46 \pm 5.48 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ 、加齢群では $29.04 \pm 2.69 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ であり、若年群と比べて

加齢群で有意に大きかった ($p < 0.05$) (表3, 図5A, B, E). コラーゲン線維の甲状披裂筋に占める割合の比較では、若年群が $6.46 \pm 3.55\%$ であったのに対して、加齢群は $9.28 \pm 4.25\%$ と若干の増加を示したが有意差は認められなかった (表3, 図5C, D, F).

声帯粘膜の面積は若年群が $1.25 \pm 0.25 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ であったのに対して加齢群では $0.63 \pm 0.18 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ と有意差を持って粘膜の萎縮が認められた ($p < 0.05$) (表3, 図5A, B, G). また声帯粘膜におけるコラーゲン線維の割合は若年群が $6.94 \pm 2.33\%$ であったのに対して加齢群は $62.47 \pm 23.59\%$ と有意に高い割合を示した ($p < 0.05$) (表3, 図5C, D, H). さらに、傍声帯間隙の脂肪組織の断面積も加齢群で有意に増大していた ($p < 0.05$) (表5, 図7).

変異 *Mstn tg* マウスにおける声帯評価

変異 *Mstn tg* の加齢群 (18か月齢) の甲状披裂筋断面積は $33.26 \pm 7.62 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ 、野生型の加齢群 (18か月齢) の甲状披裂筋断面積は $29.04 \pm 2.69 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ であり、変異 *Mstn tg* 群が大きい傾向を示したものの両者間に有意差は認められなかった (表4, 図6A, B, E). 甲状披裂筋内に占めるコラーゲン線維の割合の比較では、野生型加齢群の $9.28 \pm 4.25\%$ に対し、変異 *Mstn tg* 加齢群は $12.92 \pm 10.58\%$ であり、両者間に有意差は認められなかった (表4, 図6C, D, F).

また、声帯粘膜の面積は、野生型の加齢群で $0.63 \pm 0.18 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ 、変異 *Mstn tg* 群では $0.47 \pm 0.08 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ と両群間に明らかな差は認められなかった (表4, 図6A, B, G). 一方、声帯粘膜におけるコラーゲン線維の割合は加齢群で $62.47 \pm 23.59\%$ 、変異 *Mstn tg* 群で $55.99 \pm$

表4 変異 Mstn tg マウスにおける筋断面積・声帯粘膜面積・コラーゲン線維の割合

	モデル	
	加齢マウス (n=8)	変異 Mstn tg マウス (n=8)
甲状披裂筋面積 (μm^2)	$29.04 \pm 2.69 \times 10^4$	$33.26 \pm 7.62 \times 10^4$
甲状披裂筋におけるコラーゲン線維の割合 (%)	9.28 ± 4.25	12.92 ± 10.58
声帯面積 (μm^2)	$0.63 \pm 0.18 \times 10^4$	$0.47 \pm 0.08 \times 10^4$
声帯におけるコラーゲン線維の割合 (%)	62.47 ± 23.59	55.99 ± 10.05

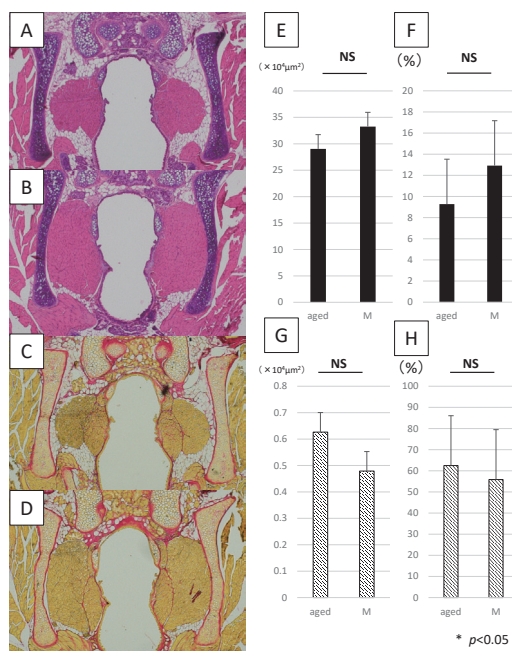
(* $p < 0.05$, t 検定)

図6 加齢群マウスと変異 Mstn tg 群マウスにおける声帯評価

- A) 加齢群の喉頭冠状断切片画像 (HE 染色). 傍声帯間隙に脂肪組織が見られる.
- B) 変異 Mstn tg 群の喉頭冠状断切片画像 (HE 染色). 加齢マウスと異なり傍声帯間隙に脂肪組織は見られない.
- C) 加齢群の喉頭冠状断切片画像 (SR 染色). 傍声帯間隙に脂肪組織が見られる.
- D) 変異 Mstn tg 群の喉頭冠状断切片画像 (SR 染色). 傍声帯間隙に脂肪組織は見られない.
- E) 甲状披裂筋断面積の比較. 加齢群と変異 Mstn tg 群では有意差はないが変異群で増大傾向を認めた.
- F) 甲状披裂筋におけるコラーゲン線維の比率の比較. 加齢群と変異 Mstn tg 群の間に有意差は認めなかった.
- G) 声帯粘膜断面積の比較. 加齢群と変異 Mstn tg 群の間に有意差は認めなかった.
- H) 声帯粘膜に占めるコラーゲン線維の比率の比較. 変異 Mstn tg 群で声帯に占めるコラーゲン線維の割合が減少していたが, 加齢群と比較して有意差は認めなかった.

10.05% と両群間に有意差は認めないものの, 変異 Mstn tg 群で減少する傾向がみられた (表4, 図6C, D, H). さらに, 傍声帯間隙の脂肪組織の断面積は, 野生型加齢群と比較して有意に減少しており ($p < 0.05$), 若年群との比較でも減少する傾向が見られた (表5, 図7).

考察

本研究では, 気息性嘔声の原因となる声門閉鎖不全を来す疾患に対する新規治療の開発のために, マウスモデルを作成することを目的とした. 神経原性の声門閉鎖不全モデルとしての反回神経麻痺モデルと, 加齢性の声門閉鎖不全モデルの2種類のマウスモデルを用いて, マウスにおける声門閉鎖不全のメカニズムがヒトと同一であるかどうかを検討した. また変異 Mstn tg マウスの声帯の評価も行い, 野生型との比較検討から Mstn 阻害の臨床応用の可能性についても検討した.

これまでに加齢に伴うマウス内喉頭筋の変化や反回神経麻痺モデルマウスの内喉頭筋の変化について検討した報告は, ほとんどない¹⁸⁻²⁰⁾. 特に加齢マウスの声帯粘膜の面積や甲状披裂筋の断面積を計測した報告はなく, 加齢マウスにおける声門閉鎖不全のメカニズムがヒトと同一であるかどうかという視点から行われた研究報告は見られない. さらに変異 Mstn tg マウスの声帯の組織学的特徴については我々が涉猟した限り国内外いずれからも報告はみられない. 本研究で得られた知見は初の報告と考えられる.

反回神経麻痺モデルについては, 内視鏡画像所見では, 健側と比較して麻痺側では有意に声帯萎縮率が増加していた. 組織学的には甲状披裂筋の萎縮が認められ, 声帯粘膜の面積は変化

表5 若年・加齢・加齢筋肥大マウスにおける傍声帯間隙脂肪断面積

傍声帯間隙の脂肪 (μm^2)	モデル		
	若年マウス (n=8)	加齢マウス (n=8)	変異Mstn tg マウス (n=8)
	$1.25 \pm 0.25 \times 10^4$	$6.30 \pm 3.20 \times 10^4$	$1.71 \pm 0.65 \times 10^4$

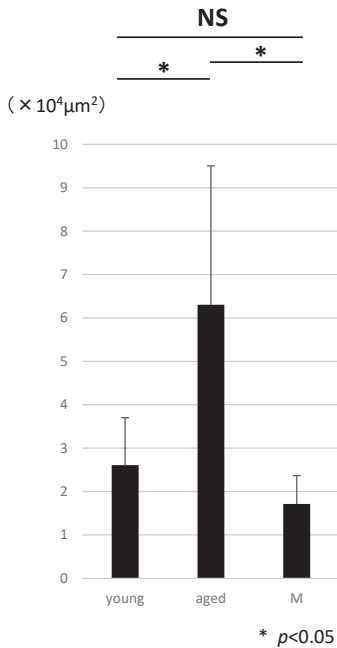
(* $p < 0.05$, Tukey-Kramer 検定)

図7 若年・加齢・変異 Mstn tg マウスの3群間比較傍声帯間隙の脂肪組織断面積の比較. 加齢群は他の2群に比べて有意に脂肪組織断面積が大きかった. 変異 Mstn tg 群は若年群よりも脂肪組織断面積が小さかった.

していなかった. したがって内視鏡画像所見でみられた声帯の萎縮は組織学的には甲状披裂筋萎縮に伴うものであり, 反回神経麻痺における声門閉鎖不全は反回神経切断による神経原性の甲状披裂筋萎縮が主体であることが示された. ヒト反回神経麻痺による声門閉鎖不全の機序も, 神経原性の甲状披裂筋の萎縮によることがわかっており, 声帯粘膜の容積や構造変化はみられない²¹⁾. ヒトと同様の所見で有り, 本マウスモデルは反回神経麻痺に伴う声門閉鎖不全モデルとして有用であると考え.

加齢モデルマウスを用いた検討では, 内視鏡

画像所見では, 加齢群において声帯の弓状変化が確認され, 声帯萎縮率も有意に増加していた. これに対し組織学的には, 若年群と加齢群における甲状披裂筋の断面積の平均は加齢群で大きく, 一方で声帯粘膜の面積は加齢群で減少していた. また声帯粘膜内のコラーゲン線維の割合は加齢群で増加していた.

これらの結果から, 加齢群でみられた内視鏡画像所見上の声帯の萎縮は, 組織学的には声帯粘膜の容積の減少とコラーゲン線維の増加が影響しており, 加齢に伴う声門閉鎖不全の原因と考えられた. ヒトの場合, 加齢に伴う声帯の萎縮は生理的萎縮(老人性萎縮)であり, 声帯粘膜と筋層の容積は重複して減少するが, 特に声帯粘膜固有層浅層の容積の減少が大きく関与する. この構造変化は声帯粘膜固有層浅層にコラーゲンが蓄積しエラスチンが減少することにより生じ²²⁾, 声帯の硬化と萎縮を引き起こし, 声門閉鎖不全を生ずる. またヒト甲状披裂筋の断面積は50歳代まで増大し, 有意な減少を示すのは80歳以降であるとされている²³⁾. すなわち, ヒトにおける加齢性の声門閉鎖不全は, 80歳未満では声帯粘膜の構造変化が主体と考えられる. 従って本研究で設定した加齢モデルマウスは, ヒトの56歳以上70歳未満に相当する月齢であり, 甲状披裂筋の断面積の減少も伴っておらず, 声門閉鎖不全の機序は声帯粘膜の容積の減少とコラーゲン線維の増加が主体であると考えられることから, 80歳未満のヒトに見られる加齢性の声門閉鎖不全のモデルとなり得ると考えた.

さらに今回の結果から, 声門閉鎖不全にともなう氣息性嗄声の治療を考えた場合, 治療のターゲットを神経原性の甲状披裂筋萎縮の予防

や再生におく場合は、本研究で作成した2か月齢の反回神経麻痺マウスモデルを使用することが妥当であるが、声帯粘膜の容積や構造変化をとまなう年齢である50代後半以降に生じた反回神経麻痺をターゲットにする場合は加齢モデルマウスとして妥当性を確認した18か月齢のマウスを用いて反回神経麻痺モデルを作成すると、より実臨床に近いモデルになると考える。

加齢に伴うマウス声帯および内喉頭筋の変化について、Hiranoらによる2か月齢と20か月齢のマウス喉頭の比較では、加齢群では粘膜固有層においてヒアルロン酸が減少し、コラーゲンは増加していた²²⁾。また、平滑筋マーカーである α SMA陽性の筋線維芽細胞は両群で腺管や血管近傍に存在していたが、声帯筋においては加齢マウスにのみ存在していた¹⁸⁾。我々の検討では18か月齢の時点で加齢により声帯粘膜の容積の減少とコラーゲン線維の増加が見られた。Senescence accelerated prone mouse model という加齢促進マウスでの検討においては野生型と比べて、コラーゲン1遺伝子が有意に増加し、ヒアルロン酸が減少しており、声帯筋における α SMA陽性細胞の増加がみられており、Hiranoらと類似の結果が得られている¹⁹⁾。また加齢モデルラットを用いた声帯粘膜の再生医療に関する研究も散見され、今後、加齢モデルマウスを用いて、bFGF (basic fibroblast growth factor) などの効果も検証していきたい。

変異 Mstn tg マウスは、老化しても全身の筋量が減らず、同週齢の野生型と比べ、筋肉量が増加している。既報では下肢筋肉において過形成していることは確認されている²⁴⁾が、これまでに変異 Mstn tg マウスの内喉頭筋を含む声帯の評価を行った報告はない。すでにヒトの Mstn 変異も報告されており、骨格筋量と筋力が増大し脂肪量は少ないとされている²⁴⁾が喉頭の所見は確認されていない。内喉頭筋においても筋肉量が増加しているのであれば、たとえば甲状披裂筋の Mstn を阻害することで甲状披裂筋萎縮に伴う声門閉鎖不全を改善し気息性嚔声の治療となりうると考え、本研究にて検討

した。今回の研究で、Mstn tg マウスの内喉頭筋は野生型加齢マウスと比較し有意な甲状披裂筋の筋線維の肥大は見られず、声帯粘膜の容積やコラーゲン線維の割合も有意差を認めなかった。しかし、興味深いことに傍声帯間隙とよばれる甲状披裂筋外側から甲状軟骨内軟骨膜までの範囲における脂肪組織の断面積は野生型加齢マウスより有意に減少しており、若年群との比較でも減少する傾向が見られた。Mstn を阻害すると、骨格筋量の増大とともに、皮下脂肪と内臓脂肪の量の劇的な低下が見られ、骨格筋内脂肪蓄積も低下する。その機序は未だに解明されていないが、骨格筋量が増えエネルギーをより効率的に消費するため二次的に脂肪代謝が亢進する機構、あるいは全身の脂肪酸代謝や糖代謝が変化する機構が想定され、Mstn 阻害によりレプチンの低下や脂肪分化に必須の転写因子である C/EBP α や PPAR γ の mRNA の低下も報告されている²⁵⁾。本モデルの結果では喉頭内脂肪組織にも体脂肪低下と同様な変化が生じているものと考えられる。ヒト傍声帯間隙の脂肪組織が、成長や加齢とともにどのように増加するかについては報告がみられないが、Mstn 阻害により同脂肪組織を減少させるとともに、広がった間隙に甲状披裂筋の肥大を誘発することが可能であれば、声門閉鎖力を向上させる可能性もあり、新規治療を考える上で重要な手がかりとなるかも知れない。

本研究にはいくつかの limitation がある。まず内喉頭筋の筋肉量・脂肪変性を評価するための方法について、当初は組織学的検討を軸位断で実施していたが、筋腹の断面積を評価する方法が最も客観的と考えられたため、冠状断での検討に切り替えた。さらに、より客観的なデータを得るため、マイクロ CT を用いた検討も試みた。マイクロ CT にて撮影した画像を DICOM データに変換し、Osirix[®] にインポートしたのちに、喉頭内の関心領域 (軸位断における甲状軟骨内腔外縁をトラッキングしたもの) の体積を計測することで測定した。内喉頭筋の容積を得るうえでは最良の方法と予想したが、

撮影した画像データから筋の容積を算出するための抽出の方法に検討の余地があり、検者の主観による影響を除外出来なかった。喉頭のCT値から筋肉・脂肪の質量を計算することが可能となればマウス喉頭であっても正確な測定が可能となると考えられるため、今後の検討課題である。

本研究で使用した野生型のC57BL/6マウスのオスでは、22か月齢をこえると生存率が急激に低下することが知られており¹⁶⁾、変異Mstn tgマウスを含め18か月を加齢マウスとして使用した。ヒトでは甲状披裂筋の断面積が有意な減少を示すのは80歳以降であるとされていることから、超高齢者を対象とした治療を考える場合には、今後はヒト80歳に相当する30か月齢以降での検討を行う必要がある。その場合は飼育条件を含め十分な準備が必要になる。また加齢の表現型を確認するうえで、局所のヒアルロン酸や免疫染色での α SMA・NOSの発現などは確認出来ていない。

さらに変異Mstn tgマウスについては、18か月齢のみでの観察しか行えておらず、若年および成熟月齢で甲状披裂筋のみならず下肢筋の筋肥大の観察を加えること、骨格筋の加齢性変化としてみられる筋サテライト細胞数の減少²⁶⁾の有無など検討する必要がある。今後はこれらについてさらに研究を進めていきたいと考えている。

謝 辞

実験の実施に際してはバイオイメージングユニット・医用生物研究ユニットの皆様のご協力をいただきました。また実験動物を提供していただいた神経内科学、リウマチ・膠原病学に感謝いたします。

利益相反開示

本論文に関して、開示すべき利益相反関連事項はありません。

引用文献

1) 兵頭政光：音声障害の診断と治療。日耳鼻会報。

2010; 113: 818-821. doi: 10.3950/jibiinkoka.113.818.

- 2) 高野真吾, 後藤多嘉緒, 田山二朗：声帯溝症の治療方法に関する検討。喉頭。2012; 24: 6-12. doi: 10.5426/larynx.24.6.
- 3) 河村裕二：反回神経麻痺における神経筋接合部の変性・再生過程の研究 イヌ後輪状披裂筋の観察。日気管食道会報。1988; 39: 249-259. doi:10.2468/jbes.39.249.
- 4) 平野滋：声帯瘢痕治療の現状と可能性－再生医学的アプローチの可能性－。喉頭。2004; 16: 96-101. doi: 10.5426/larynx1989.16.2_96.
- 5) Hirano S, Bless DM, Rousseau B, Welham N, Montequin D, Chan RW, Ford CN: Prevention of vocal fold scarring by topical injection of hepatocyte growth factor in a rabbit model. *Laryngoscope*. 2004; 114: 548-556. doi: 10.1097/00005537-200403000-00030.
- 6) Kumai Y, Ito T, Matsukawa A, Yumoto E: Effects of denervation on neuromuscular junctions in the thyroarytenoid muscle. *Laryngoscope*. 2005; 115: 1869-1872. doi: 10.1097/01.mlg.0000177076.33294.89.
- 7) Miyamaru S, Kumai Y, Ito T, Yumoto E: Effects of long-term denervation on the rat thyroarytenoid muscle. *Laryngoscope*. 2008; 118: 1318-1323. doi: 10.1097/MLG.0b013e31816f693f.
- 8) Bless DM, Welham NV: Characterization of vocal fold scar formation, prophyllaxis, and treatment using animal models. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010; 18: 481-486. doi: 10.1097/MOO.0b013e3283407d87.
- 9) Kobayashi T, Mizuta M, Hiwatahi N, Kishimoto Y, Nakamura T, Kanemaru SI, Hirano S: Drug delivery system of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel for restoration of acute vocal fold scar. *Auris Nasus Larynx*. 2017; 44: 86-92. doi: 10.1016/j.anl.2016.04.005.
- 10) Marques MJ, Ferretti R, Vomero VU, Minatel E, Neto HS: Intrinsic laryngeal muscles are spared from myonecrosis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 2007; 35: 349-353. doi: 10.1002/mus.20697.
- 11) Thomas LB, Joseph GL, Adkins TD, Andrade FH, Stemple JC: Laryngeal muscles are spared in the dystrophin deficient mdx mouse. *J Speech Lang Hear Res*. 2008; 51: 586-595. doi: 10.1044/1092-4388(2008/042).
- 12) Thomas LB, Stemple JC, Andreatta RD, Andrade FH: Establishing a new animal model for the study of

- laryngeal biology and disease: an anatomic study of the mouse larynx. *J Speech Lang Hear Res.* 2009; 52: 802-811. doi: 10.1044/1092-4388 (2008/08-0087).
- 13) Lungova V, Thibeault SL: Mechanisms of larynx and vocal fold development and pathogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2020; 77: 3781-3795. doi: 10.1007/s00018-020-03506-x.
- 14) Nishi M, Yasue A, Nishimatu S, Nohno T, Yamaoka T, Itakura M, Moriyama K, Ohuchi H, Noji S: A missense mutant myostatin causes hyperplasia without hypertrophy in the mouse muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 293: 247-251. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00209-7.
- 15) 茨木弟介, 野村晋一: ICR-JCL 系マウスの発育成長に関する研究(1)外形態の Biometry. *実験動物.* 1967; 16: 1-11.
- 16) Flurkey K, Currer JM, Harrison DE: Chapter 20 - Mouse Models in Aging Research. In: *The Mouse in Biomedical Research 2nd Edition* (Fox JG, Barthold SW, Davisson MT, Newcomer CE, Quimby FW, Smith AL eds.). Amsterdam, Netherlands, Academic Press. 2007. pp637-672.
- 17) 菊池淳: 声帯の弓状変化の定量的評価と各種パラメーターについての臨床的検討. *喉頭.* 2005; 17: 1-6. doi: 10.5426/larynx1989.17.1_1.
- 18) Abdelkafy WM, Smith JQ, Henriquez OA, Golub JS, Xu J, Rojas M, Brigham KL, Johns MM: Age-related changes in the murine larynx: initial validation of a mouse model. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2007; 116: 618-622. doi: 10.1177/000348940711600810.
- 19) Kolachala VL, Torres-Gonzalez E, Mwangi S, Kelly P, Brigham KL, Pavlath GK, Rojas M, Johns MM: A senescence accelerated mouse model to study aging in the larynx. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010; 142: 879-885. doi: 10.1016/j.otohns.2009.12.037.
- 20) Kaba S, Nakamura R, Yamashita M, Katsuno T, Suzuki R, Tateya I, Kishimoto Y, Omori K: Alterations in macrophase polarization in injured murine vocal folds. *Laryngoscope.* 2019; 129: E135-E142. doi: 10.1002/lary.27523.
- 21) 佐藤公則: 声帯萎縮の病理組織学. *音声言語医学.* 2002; 43: 432-437. doi: 10.5112/jjlp.43.432.
- 22) Hirano M, Kurita S, Sakaguchi S: Ageing of the vibratory tissue of human vocal folds. *Acta Otolaryngol.* 1989; 107: 428-433. doi: 10.3109/00016488909127535.
- 23) 佐藤秩子, 田内久: ヒト声帯筋の加齢変化についての微計測的研究. *日本老年医学会雑誌.* 1982; 19: 26-32. doi: 10.3143/geriatrics.19.26.
- 24) Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, Braun T, Tobin JF, Lee SJ: Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med.* 2004; 350: 2682-2688. doi: 10.1056/NEJMoa040933.
- 25) Lin J, Arnold HB, Della-Fera MA, Azain MJ, Hartzell DL, Baile CA: Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 291: 701-706. doi: 10.1006/bbrc.2002.6500.
- 26) Brack AS, Bildsoe H, Hughes SM: Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy. *J Cell Sci.* 2005; 118: 4813-4821. doi: 10.1242/jcs.02602.

〈Regular Article〉

A mouse model of glottal closure for the treatment of breathlessness and hoarseness

Hiroaki TADOKORO, Taro SAIKA, Hirotaka HARA

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Kawasaki Medical School

ABSTRACT In addition to inflammatory and neoplastic lesions, hoarseness can also be caused by vocal fold muscle atrophy and recurrent nerve palsy associated with aging and muscle diseases. The inability to speak well leads to a drastic decrease in communication ability and quality of life (QOL). The pathogenesis differs depending on the disease, but the residual glottal gap caused by inadequate glottal closure during vocalization results in hoarseness. There are various treatments for hoarseness, ranging from conservative to surgical treatment, but they are highly specialized and are only available at limited facilities, limiting the number of patients who can receive treatment. Therefore, minimally invasive, highly restorative, and highly versatile treatments are desired. To develop new therapies, including regenerative medicine, the establishment of a mouse model of glottic atresia is necessary.

In this study, we created two models of glottic insufficiency in C57BL/6 mice: a neurogenic model of recurrent nerve palsy and an age-related model of glottic insufficiency. The purpose of this study was to clarify whether the mechanism of glottal closure in mice is the same as that in humans. In addition, we targeted myostatin (Mstn), a molecule that inhibits muscle hyperplasia, and evaluated the vocal folds, including the internal laryngeal muscle, in mice overexpressing mutant Mstn (mutant Mstn tg mice). This mutation causes systemic muscle hyperplasia and allows investigation of the possible clinical application of Mstn inhibition, which was also examined.

In the mouse model of recurrent nerve palsy, significant atrophy of the lamina propria muscle was observed on the paralyzed side, compared with the healthy side, suggesting that the mechanism of glottic insufficiency is the same as in humans and that this would be an effective model. The mechanism of glottic atrophy in mice is the same as that in humans, also making it a useful model. In the case of mutant Mstn tg mice, there was no significant increase in muscle mass or muscle fiber numbers in the endolaryngeal muscle. Further, in the endolaryngeal muscles, there was no significant increase in muscle mass or muscle fiber numbers; however, there was decreased fat in the paralaryngeal gap, indicating that laryngeal fat metabolism is also affected.

(Accepted on October 15, 2021)

Key words : Larynx, Mouse model, Aging, Recurrent laryngeal nerve paralysis, Myostatin

Corresponding author
Hirotaka Hara
Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery,
Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki,
701-0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111
Fax : 81 86 462 1199
E-mail : harahiro@med.kawasaki-m.ac.jp