

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 5 月 2 7 日現在

機関番号：27102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2021

課題番号：21K21020

研究課題名（和文）水嚥下誘発反射における喉頭部味蕾様構造の機能解析

研究課題名（英文）The functional analysis of laryngeal taste bud like cells in water swallowing

研究代表者

徐 嘉鍵（Hsu, Chia-Chien）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：10908932

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,200,000 円

研究成果の概要（和文）： 嚥下（飲み込み）は栄養分の摂取における欠かせない機能である。水刺激により嚥下の受容機構は未解明であり、喉頭部味蕾様構造との関連性も不明であった。本研究は、味蕾様構造を含めた喉頭部粘膜での水受容分子の探索を目的とした。そこでCIC-3という塩化物イオンチャネルが有力候補として挙がってきた。蛍光免疫染色を行ったところ、CIC-3は喉頭部粘膜に発現して、味細胞のマーカーであるCK8との共発現がみられた。一方、実験動物では咽頭炎による嚥下機能が抑制され、味蕾様構造が消失した。本研究の結果により、喉頭部粘膜や味蕾様構造でのCIC-3が水刺激嚥下の誘発機序に関与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

誤嚥性肺炎は日本人死因の第6位であり、特に要介護高齢者は嚥下機能低下により誤嚥性肺炎リスクが高いとされ、嚥下機能の維持と回復は高齢者医療の最重要課題の一つである。加えて、咽頭炎にも嚥下障害を引き起こす要因として考えられる。本研究は、不明であった水刺激嚥下の受容機構に関する根本的な分子メカニズムの知見を提供することができる。さらに、咽頭炎が起因とした嚥下障害の発症機序を検討することに加え、嚥下機能の回復に関する新たな治療アプローチを提供することができる。

研究成果の概要（英文）： Swallowing is an essential function for nutrient intaking. The receptor mechanism of water-stimulated swallowing has not yet been elucidated, and its relevance to taste bud-like structures in the larynx is also unknown. The purpose of this study was to explore the receptor mechanism of water-stimulated swallowing in the laryngeal mucosa, including taste bud-like structures. The chloride ion channel, CIC-3, was identified as a promising candidate. Fluorescence immunostaining revealed that CIC-3 is expressed in the laryngeal mucosa and co-expressed with CK8, a marker of taste cells. Furthermore, swallowing function was suppressed and taste bud-like structures were lost in experimental animals due to pharyngitis. These results suggest that CIC-3 is involved in the triggering mechanism of water-stimulated swallowing in either or both the laryngeal mucosa and taste bud-like structures.

研究分野：生理学

キーワード：水嚥下 喉頭部 味蕾様構造 嚥下障害 咽頭炎

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1．研究開始当初の背景

誤嚥性肺炎は日本人死因の第6位であり、超高齢社会において大きな問題となっている（人口動態統計月報、2020）。特に要介護高齢者は嚥下機能低下により誤嚥性肺炎リスクが高いとされ、嚥下機能の維持や回復は高齢者医療の最重要課題の一つである。嚥下障害は脳血管疾患、神経変性疾患など器質的・機能的障害に起因するものに加え、加齢や薬剤服用および放射線治療による口腔乾燥症や咽頭炎なども原因として挙げられる（Colleen *et al.*, J Am Geriatr Soc, 2019）。

嚥下は随意的（皮質入力）だけでなく、咽頭・喉頭部への機械刺激，化学刺激および温度刺激により舌咽・上喉頭神経の興奮を介して反射的（感覚入力）にも惹起される運動である（山村，新潟歯学会誌，2013）。最近の知見では、喉頭部粘膜に存在する味蕾様構造には P2RY₁（ATP 受容体）を発現する神経線維が侵入しており、P2RY₁ コンディショナルノックアウトマウスにおいて水刺激嚥下が抑制されることが報告された（Prescott *et al.*, Cell, 2020）。喉頭部味蕾様構造での水受容後に ATP が神経伝達物質として放出され、神経末端に情報が伝達されて嚥下反射が誘発されることを示唆している。九州歯科大学生理学分野で行った先行研究では、ATP 受容体拮抗薬の前処理にて水嚥下反射が抑制されており、Cell 誌での研究報告と一致している。ゆえに、水受容に喉頭部の味蕾様構造が関与している可能性はかなり高いと考えていた。しかしながら、水受容の分子メカニズムに関しては未解明であった。

現在、想定される最も有力な水受容のメカニズムは、PKDL によるプロトン受容説と Cl⁻チャンネルによる Cl⁻脱抑制説の2つであった。ウレタン麻酔下ラットを対象に水嚥下測定実験を行ったところ、プロトン生成に関わる炭酸脱水酵素の阻害剤を投与しても嚥下運動は抑制されなかった。一方、Cl⁻チャンネル阻害で知られるカドミウムを投与したところ、Cl⁻による嚥下抑制が解除された。以上の実験結果から、後者の Cl⁻チャンネル脱抑制説の方が有力と考えられる。加えて、RT-PCR による網羅的発現解析により、Cl⁻チャンネルである CLC-3 が喉頭部に高発現していることを確認した。そのゆえ、CLC-3 は水刺激嚥下の受容分子としての役割を検証するために、喉頭部味蕾様構造でのタンパク発現確認と機能実験が必要であった。

2．研究の目的

本研究の目的は、咽頭・喉頭部における水受容分子候補として推定された CLC-3 を免疫組織化学法により同定することで、嚥下誘発時における味蕾様構造の生理学的機能を明らかにすることであった。さらに新規に開発した咽頭炎モデルラットを使って、咽頭炎により味蕾様構造の組織学的な変化を検討した。

3．研究の方法

実験 ： 喉頭部味蕾様構造における Cl⁻チャンネル発現解析

Wistar系雄性ラット（10週齢）を三種混合麻酔薬（ドミツール，0.375 mg/kg；ドルミカム，2 mg/kg；ベトルファール，2.5 mg/kg in saline, i.p）で麻酔した後、喉頭部を摘出した。さらに凍結切片を作成し、味蕾様構造における Cl⁻チャンネル候補の蛍光免疫染色を行った。また、味細胞マーカー（CK8）を用いて二重染色を行った。

実験 ： 咽頭炎モデルラットの開発と嚥下障害に伴う喉頭味蕾様構造の変化検討

同じく Wistar 系雄性ラットに対し、麻酔下で咽頭部を酢酸溶液（10 μl）で 30 秒処理し、咽頭喉頭炎を誘発させた。翌日に麻酔下でモデルラットの咽頭部に嚥下内視鏡を挿入し、水刺激による嚥下潜時と嚥下回数を測定した。実験 同様に喉頭部を採集した。喉頭部組織の変化を観察するため、H-E 染色を行った。

4. 研究成果

ラット喉頭部組織の薄切により喉頭蓋披裂ヒダ（アルテノイド）に味蕾様構造物を確認した（Fig 1）。蛍光免疫染色を行ったところ、CLC-3 の免疫陽性は咽頭・喉頭部粘膜上皮組織全体が確認された（Fig 2）。さらに味細胞のマーカである CK8 を用いて 2 重染色を行ったところ、CLC-3 と CK-8 との共発現傾向がみられた（Fig 3）。先行研究の実験結果を踏まえて、咽頭・喉頭部に存在する味蕾様構造および粘膜上皮の CLC-3 陽性細胞は水嚥下の誘発機序に関与する可能性が示された。

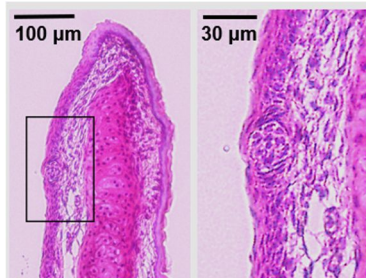


Fig 1

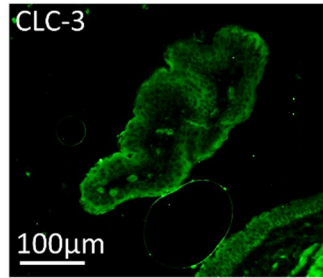


Fig 2

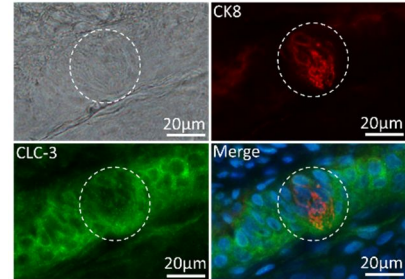


Fig 3

酢酸（AA）の塗布による咽頭炎モデルラットの作成において、咽頭部粘膜の炎症が内視鏡下で確認された。さらに、水嚥下測定実験を行ったところ、咽頭炎モデルラットは嚥下開始の潜時が有意に延長し、嚥下回数が有意に減少した（Fig 4,5; *, **, $P < 0.05$, 0.01 ）。咽頭炎により嚥下機能が抑制されていた。H-E 染色にて、咽頭喉頭部の上皮組織は剥離し、味蕾様構造物が消失していた（Fig 6）。このことは、粘膜上皮および味蕾様構造物のどちらか、もしくは両方での水受容が大きく阻害されていることに起因すると考えられた。

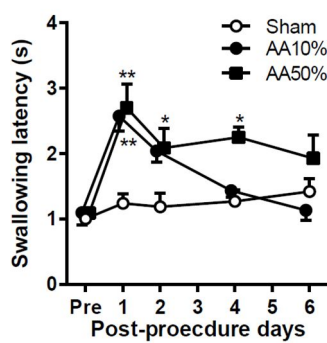


Fig 4

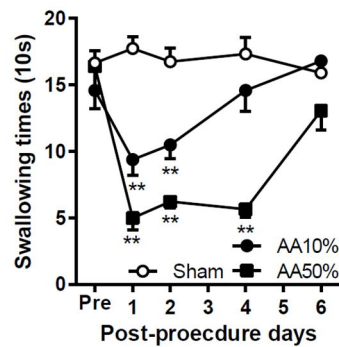
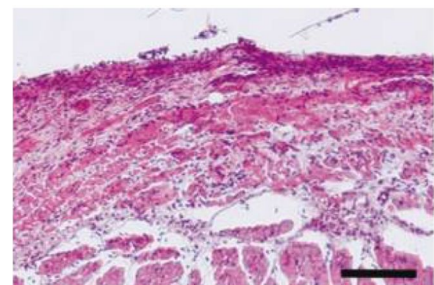


Fig 5



Scale bar: 100μm

Fig 6

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------