

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：34303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293350

研究課題名(和文) 喉頭神経機構とその破綻への対応

研究課題名(英文) Neuronal networks controlling laryngeal movements and management of its impairment

研究代表者

久 育男 (HISA, Yasuo)

京都学園大学・健康医療学部・教授

研究者番号：50181087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：延髄腹側呼吸ニューロン群および傍顔面神経核呼吸ニューロン群は非呼吸性喉頭運動についてもその制御に影響を与えていることが示唆された。また、咳、嚥下についてはその中心的な神経ネットワークが傍顔面神経核呼吸ニューロン群のレベルよりもより尾側に存在していることが明らかになった。ステロイドホルモンは声帯・気管・食道の線維芽細胞に対して、受容体を介して作用し、細胞外基質発現に影響を与えることが示された。線維芽細胞は部位によりステロイドホルモンに対して様々な反応性を有することが示された。また、マウス迷走神経運動核における性ホルモン受容体陽性細胞の分布と性差、その免疫組織学的特性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Our investigation showed that the respiratory neuron groups including the ventral respiratory group and the retrotrapezoid/parafacial respiratory group in the medulla oblongata play a role in the regulation of the non-respiratory laryngeal movements such as vocalization, coughing, and swallowing. Furthermore, this study suggested that the kernel neural networks involving coughing or swallowing could be located within the medulla caudal to the retrotrapezoid/parafacial respiratory group. We also clarified the role of steroid hormones in the functional expression of fibroblasts in the vocal folds regarding production of extracellular matrix. In addition, the immunohistochemistry combined with injection of the retrograde tracer into the larynx demonstrated the specific features of immunopositive neurons for the sex steroid hormone receptor in the dorsal motor nucleus of the vagus.

研究分野：医歯薬学

キーワード：喉頭の神経機構 premotor neuron 疑核・迷走神経背側核 ステロイドホルモン

1. 研究開始当初の背景

喉頭本来の機能は気道防御であるが、進化によってヒトにおいては発声器官としての役割が非常に重要になっている。また、直立歩行に伴う喉頭下垂のため、嚥下運動における喉頭が存在が極めて重要となった。その結果、喉頭機能における神経制御は複雑なものとなり、その障害は嚥下、呼吸といった生命の維持に関わる基本的な機能が損なわれるばかりでなく、社会生活を営むうえで必要不可欠な発声にも多大な影響を及ぼす。しかし、その神経制御機構の仕組みに関してはいまだ不明な点が多い。研究代表者は、喉頭の自律神経支配を系統的に解明して以来、四半世紀の間この問題に取り組み、多くの新知見を報告してきた。しかし、研究手法の進歩に伴い、新たな問題点が提起されるとともにそれへの対応が必要となっている。本研究ではこれまで積み重ねてきた実績と研究手法のうえに、新たな手法を駆使して当たるといふ、他に例を見ない学術的背景を有する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、喉頭の神経制御機構とその破綻に関する重要な問題点を体系的に解明することにある。

喉頭運動ニューロンを制御するニューロンは、呼吸、咳、発声、嚥下等の運動を制御する役割を担っているが、その機能を解析した報告は少ない。本研究では、喉頭運動ニューロンを制御するニューロンが存在するといわれる延髄の呼吸ニューロン群に対し、その多様な非呼吸性喉頭運動を制御する神経システムを明らかにすることを目的とする。

声帯は、思春期の声変わりや声帯癒痕がグルコルチコイド投与により改善することなどが示すようにステロイドホルモンの重要な標的と考えられる。本研究では、声帯の線維芽細胞とそれに隣接した気管・食道の線維芽細胞に対するステロイドホルモンの作用を比較し、その機序を明らかにする。

迷走神経運動核における性ホルモン受容体（アンドロゲン受容体（AR）、エストロゲン受容体（ER））の発現の分布や性差、免疫組織学的特性、その臓器（気管・食道）支配を明らかにする。

3. 研究の方法

非動化モルモットを用いて、反回神経、上喉頭神経、横隔神経、腹筋神経の神経活動を記録した。中脳中心灰白質刺激により発声を誘発、上喉頭神経を刺激し嚥下を誘発、気管あるいは反回神経を刺激し咳を誘発した。その際の延髄腹側呼吸ニューロン群、傍顔面神経核呼吸ニューロン群のニューロン活動を記録、解析した。また、脳幹切断による咳、嚥下関連神経活動の変化を記録した。

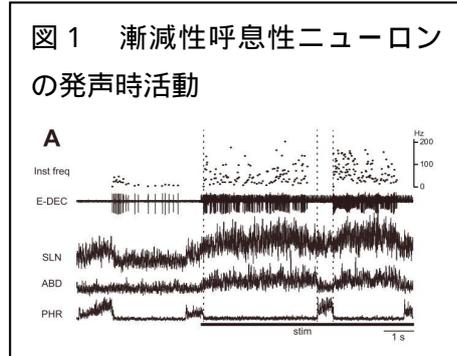
声帯・気管・食道の線維芽細胞を培養し、アンドロゲン受容体（AR）の発現を、免疫組織化学法での陽性率と real time RT-PCR 法

により比較した。

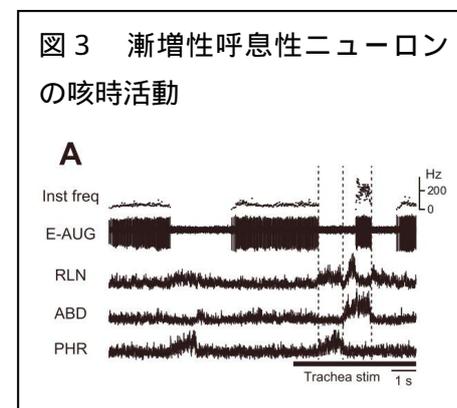
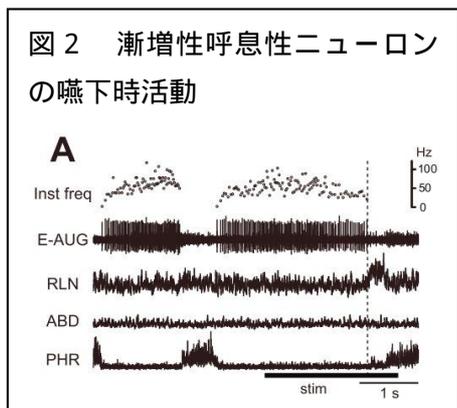
9 週齢雌雄マウスの NA・DMV における性ホルモン受容体（アンドロゲン受容体（AR）、エストロゲン受容体（ER））の発現を免疫組織化学的手法により明らかにした。

4. 研究成果

延髄腹側呼吸ニューロン群には様々なタイプの呼吸ニューロンが存在しており、それぞれに特徴的な非呼吸性運動制御様式を示した。発声時の呼吸ニューロン活動は呼吸時のそれとは異なり発声運動に同期して活動した（図 1）。

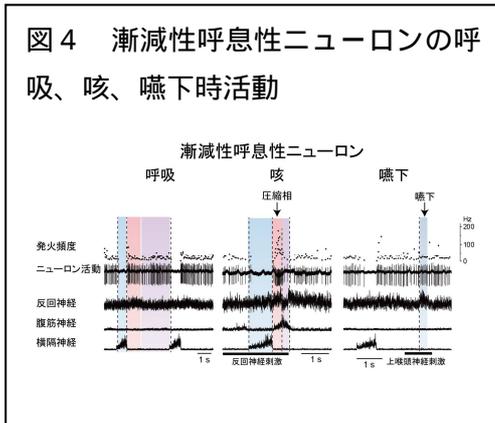


また、これらの呼吸ニューロンは嚥下（図 2）、咳（図 3）時にも同期した活動を示した。



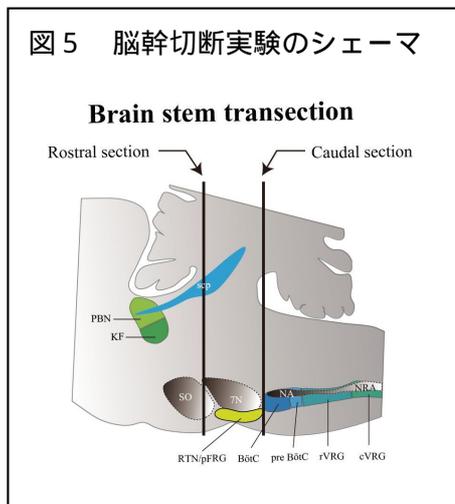
傍顔面神経核呼吸ニューロン群のニューロン活動については、延髄腹側呼吸ニューロンと同様に呼吸、咳、嚥下時に特徴的な活動パターンを呈した(図4)。

図4 漸減性呼吸性ニューロンの呼吸、咳、嚥下時活動



また、脳幹切断実験により(図5) 傍顔面神経核呼吸ニューロン群より尾側の延髄のみで咳、嚥下反射が惹起できる可能性が示唆された。

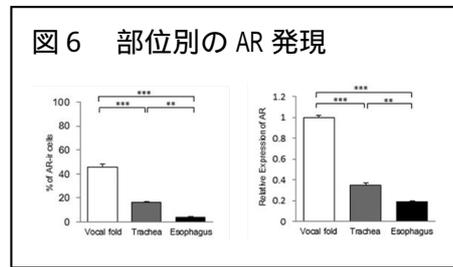
図5 脳幹切断実験のシエマ



これらの結果により、延髄腹側呼吸ニューロン群および傍顔面神経核呼吸ニューロン群は非呼吸性喉頭運動についてもその制御に影響を与えていることが示唆された。また、咳、嚥下についてはその中心的な神経ネットワークが傍顔面神経核呼吸ニューロン群のレベルよりもより尾側に存在していることが明らかになった。

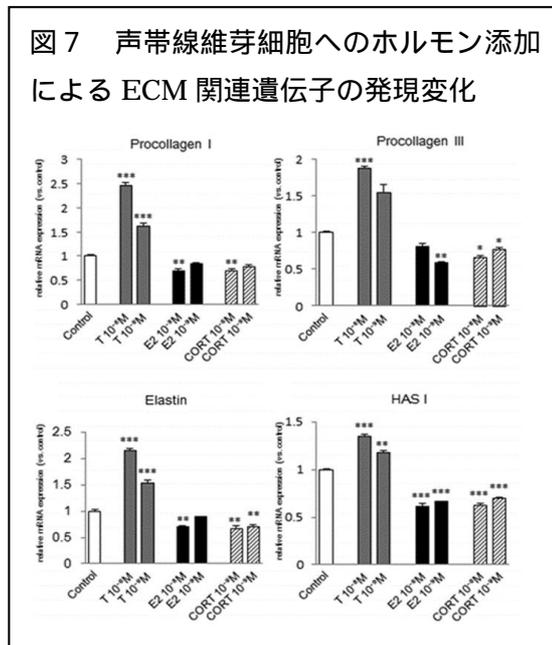
AR は声帯線維芽細胞で最も強い発現を認めた(図6)。

図6 部位別のAR発現



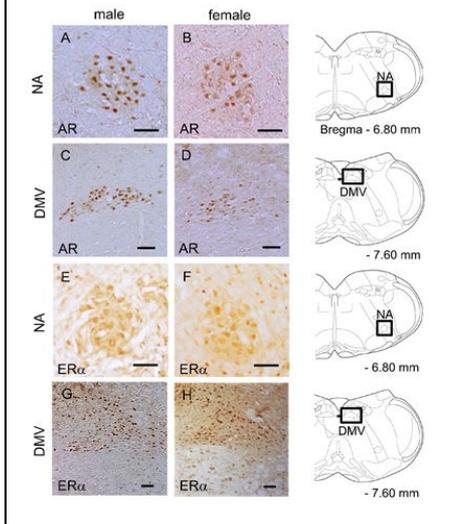
これら3種類の線維芽細胞に、濃度 10^{-8} ・ 10^{-9} M のテストステロン(T)、エストラジオール(E2)、コルチコステロン(CORT)を添加して48時間後に、ECM関連遺伝子(プロコラーゲンI・III・エラスチン・ヒアルロン酸合成酵素I)の発現をreal time RT-PCR法を用いて比較した。その結果、Tを添加した声帯線維芽細胞でのみ全てのECM関連遺伝子が増加した(図7)。

図7 声帯線維芽細胞へのホルモン添加によるECM関連遺伝子の発現変化



ステロイドホルモンは声帯・気管・食道の線維芽細胞に対して、受容体を介して作用し、ECM発現に影響を与えることが示された。また線維芽細胞は部位によりステロイドホルモンに対して様々な反応性を有することが示された。特に声帯線維芽細胞は気管・食道線維芽細胞に比べてARを強く発現しているためにTの強い影響を受けている可能性が示唆された。これらの結果は、声変わりや変声障害の基礎的解明につながるものと考えられた。

図8 マウス迷走神経運動核における性ホルモン受容体の発現とその性差



AR・ER はNAの吻側・DMVの一部に発現した(図8)。NA・DMVでは雄でより多数のAR陽性細胞を認め、DMVでは雌でより多数のER陽性細胞を認めた。また、NAでは受容体陽性細胞の大部分が choline acetyltransferase (ChAT) や calcitonin gene-related peptide (CGRP)が陽性であり、DMVでもその大部分がChAT陽性であった。次に、逆行性トレーサーであるコレラトキシンBサブユニット(CTb)を用いてその臓器支配について検討した。その結果、気管や食道を支配するNA・DMVの神経細胞の一部はARやERを発現し、臓器によって有意な差を認めなかった(図9・10)。

マウス迷走神経運動核における性ホルモン受容体陽性細胞の分布と性差、その免疫組織学的特性が明らかとなった。また、性ホルモンが直接受容体を介して迷走神経運動核に作用し、気管や食道の機能を同様に調節している可能性が示唆された。

図9 迷走神経運動核におけるARとCTb陽性細胞数と陽性率

	Number of neurons		Percentages (%)
	CTb and AR	CTb	AR/CTb
NA			
Tracheal	27.0±2.7	27.0±2.7	100
Esophageal	32.4±4.0	32.4±4.0	100
DMV			
Tracheal	2.2±0.7	4.2±0.7	53.3±13.3
Esophageal	2.2±0.8	4.2±1.0	50.3±16.8

図10 迷走神経運動核におけるERとCTb陽性細胞数と陽性率

	Number of neurons		Percentages (%)
	CTb and ERα	CTb	ERα/CTb
NA			
Tracheal	28.0±4.0	28.0±4.0	100
Esophageal	35.8±1.5	35.8±1.5	100
DMV			
Tracheal	2.2±0.7	4.4±0.5	47.7±14.6
Esophageal	1.6±0.4	3.8±0.6	39.3±11.0

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 4件)

Mukudai S, Ichi Matsuda K, Bando H, Takanami K, Nishio T, Sugiyama Y, Hisa Y, Kawata M. Expression of Sex Steroid Hormone Receptors in Vagal Motor Neurons Innervating the Trachea and Esophagus in Mouse. *Acta Histochem Cytochem* 査読有 49(1), 2016, 37-46

DOI: 10.1267/ahc.15037

Sugiyama Y, Shiba K, Mukudai S, Umezaki T, Sakaguchi H, Hisa Y. Role of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group in coughing and swallowing in guinea pigs. *J Neurophysiol* 査読有 114(3), 2015, 1792-1805

DOI: 10.1152/jn.00332.2015

Mukudai S, Matsuda KI, Nishio T, Sugiyama Y, Bando H, Hirota R, Sakaguchi H, Hisa Y, Kawata M. Differential responses to steroid hormones in fibroblasts from the vocal fold, trachea and esophagus. *Endocrinology* 査読有 156(3), 2015, 1000-1009

DOI: 10.1210/en.2014-1605

Sugiyama Y, Shiba K, Mukudai S, Umezaki T, Hisa Y. Activity of respiratory neurons in the rostral medulla during vocalization, swallowing, and coughing in guinea pigs. *Neurosci Res* 査読有 80, 2014, 17-31

DOI: 10.1016/j.neures.2013.12.004

〔学会発表〕(計 7件)

板東秀樹, Mohammed Elrabie Ahmed, 杉山庸一郎, 西尾健志, 久育男. ラット内喉頭筋における筋小胞体カルシウム ATPase の発現の検討. 日本喉頭科学会. 2016年3月3日; コングレコンベンションセンター(大阪市北区)

杉山庸一郎, 布施慎也, 椋代茂之, 西尾健志, 板東秀樹, 柴 啓介, 梅崎俊郎, 久育男. 傍顔面神経核呼吸ニューロン群における

咳,嚥下時活動.第28回日本喉頭科学会.2016年3月3日;コングレコンベンションセンター(大阪市北区)

Sugiyama Y, Mukudai S, Nishio T, Bando H, Shiba K, Umezaki T, Sakaguchi H. The contribution of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group to the regulation of coughing and swallowing in guinea pigs. 13th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology - Head and Neck Surgery. 2015 Dec 3; Hitotsubashi Hall, National Center of Sciences (Chiyoda-ku, Tokyo)

板東秀樹,アフマド モハメド・エルラビ,杉山庸一郎,西尾健志,廣田隆二,小池 忍,久 育男.ラット喉頭におけるブラジキニン受容体発現の検討(ポスター).第38回日本嚥下医学会.2015年2月7日;コラッセ福島(福島県福島市)

杉山庸一郎,棕代茂之,西尾健志,板東秀樹,廣田隆二,柴 啓介,梅崎俊郎,久 育男.非呼吸性喉頭運動におけるモルモット延髄呼吸ニューロンの活動様式.第115回日本耳鼻咽喉科学会.2014年5月17日;ヒルトン福岡シーホーク(福岡県福岡市)

杉山庸一郎,棕代茂之,西尾健志,板東秀樹,廣田隆二,柴 啓介,梅崎俊郎,久 育男.モルモットにおける脳幹発声時の延髄呼吸ニューロン群の活動様式.第26回日本喉頭科学会.2014年3月7日;ロワジーホテル那覇(沖縄県那覇市)

杉山庸一郎,棕代茂之,西尾健志,板東秀樹,廣田隆二,柴 啓介,梅崎俊郎,久 育男.モルモット延髄呼吸中枢における嚥下,咳活動制御様式.第37回日本嚥下医学会.2014年2月14日;学術総合センター橋講堂(東京都千代田区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久 育男 (HISA, Yasuo)
京都学園大学・健康医療学部・教授
研究者番号: 50181087

(2) 研究分担者

廣田 隆一 (HIROTA, Ryuichi)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号: 70405306

板東 秀樹 (BANDO, Hideki)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 50433272

(3) 連携研究者

()

研究者番号: