

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390461

研究課題名（和文）喉頭神経調節の仕組みとその障害に関する体系的解明

研究課題名（英文）Systematical investigations on the laryngeal functions and disorders

研究代表者

久 育男（HISA YASUO）

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：50181087

研究成果の概要：喉頭神経調節の仕組みとその障害における現状での重要課題として考えられた、延髄における疑核異所性局在、喉頭神経系におけるアセチルコリン合成酵素の関与、喉頭神経系における神経栄養因子の関与、脳幹運動神経細胞における軸索損傷時の TDP43 の変化、そして、喉頭における概日リズムと時計遺伝子の関与について、現時点で考える手法を駆使して解明した。

交付額

（金額単位：円）

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2006 年度 | 8,700,000  | 2,610,000 | 11,310,000 |
| 2007 年度 | 2,700,000  | 810,000   | 3,510,000  |
| 2008 年度 | 2,600,000  | 780,000   | 3,380,000  |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 総計      | 14,000,000 | 4,200,000 | 18,200,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：喉頭、疑核運動神経細胞異所性局在、神経栄養因子、時計遺伝子、Fibroblast growth factor-1、TAR DNA binding protein 43、アセチルコリン基転移酵素、腺分泌

## 1. 研究開始当初の背景

喉頭の神経調節機構に障害が生じると、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、発声機能の障害は社会生活を営むうえで多大な影響を受ける。このことから、喉頭神経調節機構の解明とその障害時における対応に関する研究は、紀元 2 世紀の Galenos の時代から現在に至るまで喉頭科学のメインテーマあり、多くの研究がなされてきた。研究代表者も喉頭の自律神経支配を初めて系統的に解明し

て以来、四半世紀の間、この問題に取り組んできたが、未だ多くの疑問点が残されている。本研究の目的は、喉頭神経調節の仕組みとその障害における現状での重要課題を、国内基礎系研究機関の協力を適宜得るとともに、種々の技法を駆使することによって、体系的に解明することにある。

## 2. 研究の目的

(1) 延髄における疑核異所性局在の解明  
声帯運動を司る運動神経細胞は、疑核に存在

し、各内喉頭筋を支配する運動神経細胞の局在については我々の報告等によりほぼ確定された。しかし、疑核はその名が示すとおり、他の運動神経核に比し、その局在がきわめて曖昧である。そこで、発生学的にいかにか疑核が形成されるか、また、その形成異常によっておこされる障害を知ることを目的とする。

#### (2) 喉頭神経系におけるアセチルコリン合成酵素の関与の解明

既存の cChAT、pChAT、そして今回開発された cChATsp を用いて、喉頭の副交感神経系支配の詳細を明らかにし、神経損傷時における各種 ChAT の発現の変化を解析し、神経損傷時における喉頭のコリン作動性神経の動態を明らかにする。

#### (3) 喉頭神経系における神経栄養因子の関与の解明

神経細胞の生存・維持に関わる神経栄養因子を明らかにすることは、神経細胞死によって発症する神経変性疾患の病態解明と治療法の開発にとって不可欠である。ところが、喉頭神経系における神経栄養因子の局在に関する研究は現在のところ皆無である。そこで、喉頭神経系における FGF1 の局在を同定し、機能的役割を解明するとともに、障害モデルを作成したうえで、神経障害によってどのような影響を受けるかを明らかにする。

#### (4) 脳幹運動神経細胞における軸索損傷時の TDP43 の変化

TDP43 は ALS の病理マーカーとして注目されている。TDP43 の核外脱出は ALS の病理学的特徴であるが、その分子病態は不明である。そこで、延髄運動神経細胞における軸索損傷時の TDP43 の変化について検討した。

#### (5) 喉頭における概日リズムと時計遺伝子の関与の解明

地球上の多くの生物は地球の自転周期である 24 時間の環境変化に適応するため、体内時計を有している。喉頭炎やアレルギー性鼻炎など様々な疾病の症状の程度に昼夜差が存在すること、また逆に昼夜逆転など不規則な生活からこのような疾患が増悪することを経験することが多い。このような気道疾患の症状の増悪には自律神経系特に副交感神経系の関与が示唆される。そこで、喉頭における概日リズム形成の仕組みを、特に自律神経系に焦点を当て検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 延髄における疑核異所性局在の解明

SRK ラットのヘテロ親を交配し出生させ、生後 17~21 日齢の離乳期直前の SRK ラットを使用した。この時に表現型として SRK と

ヘテロ、ワイルドタイプ分けるのは困難なため、マウス・リーリンの遺伝子配列をもとに、プライマーを作成し、PCR 法にて SRK ラットの genotyping を行い分離した。内喉頭筋である輪状甲筋、甲状披裂筋、後輪状披裂筋、頸部食道、また腹部食道にそれぞれ HRP を注入し、2 日間の生存期間の延髄を含む全脳を摘出し、延髄の凍結連続切片を作成し組織化学的手法を用いて、疑核へ投射する運動神経細胞を同定した。

#### (2) 喉頭神経系におけるアセチルコリン合成酵素の関与の解明

迷走神経切断モデルを作成、迷走神経背側核における cChAT、pChAT および cChATsp の変化を免疫組織学的に解析した。一部は総 RNA の抽出、Laser Capture Microdissection を用いて単一細胞レベルの抽出を行い、迷走神経背側核における ChAT サブタイプの質的、量的な遺伝子発現に関して、定量的 RT-PCR 法にて検討した。

#### (3) 喉頭神経系における神経栄養因子の関与の解明

神経栄養因子である FGF1 の喉頭神経系における局在、密度を免疫組織学的に検討した。また、迷走神経背側核細胞をはじめとする副交感神経細胞における FGF1 の局在を検討した。

#### (4) 脳幹運動神経細胞における軸索損傷時の TDP43 の変化

軸索損傷下の延髄運動神経細胞における核輸送系の障害と TDP43 の核局在との関係、神経再生との関連について検討した。

#### (5) 喉頭における概日リズムと時計遺伝子の関与の解明

副交感神経系の神経受容体であるムスカリン性アセチルコリン受容体遺伝子発現の日内変動を mRNA、蛋白双方において解析し、さらに喉頭上皮内の時計遺伝子による制御のしくみの解明を試みた。また、喉頭のリズムが時計中枢である視交叉上核よりどのような経路でシグナルの伝達を受けているかを検討した。また、喉頭における時計遺伝子の発現と喉頭腺での粘液分泌のリズム発現について、wild-type マウス、mCry1-/-mCry2-/-ミュータントマウスおよび視交叉上核破壊マウスを用い、免疫組織化学法、Northern blot 法にて Per1、Per2、MUC5b の発現について解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 延髄における疑核異所性局在の解明

標識細胞は、第 4 脳室から延髄の腹外側部に散在して分布するのが観察され、延髄疑核の

運動神経細胞が、発生部位から疑核へ移動するにあたって、リーリン蛋白による誘導が不可欠であることを意味すると考えられた。この結果は、発生過程における疑核運動神経細胞群の構築を考える上で重要なものと考えられる。

#### (2) 喉頭神経系におけるアセチルコリン合成酵素の関与の解明

迷走神経切断後、迷走神経背側核に pChAT が発現することを見出した。非手術対照群の迷走神経背側核では、cChAT 陽性の神経細胞が認められたが、pChAT 陽性細胞は認めなかった。迷走神経切断後 7 日目に cChAT 陽性細胞はほとんど消失したが、多数の pChAT 陽性細胞が出現した。切断後 28 日目には、cChAT 陽性神経細胞数は再び増加したが、pChAT 陽性細胞数は減少した。こうした変化は、pChAT が軸索切断後の神経変性の病態に関与していることを示唆している。

#### (3) 喉頭神経系における神経栄養因子の関与の解明

迷走神経背側核細胞において、FGF1 と ChAT との共存率を調べた結果、8% に共存を認めるのみであった。一方、唾液核では 13%、仙骨副交感神経節では 18% の共存を認めた。このように、迷走神経背側核細胞で共存率の低いことは、これらの細胞の易傷症性の一つの原因であると考えられた。

#### (4) 脳幹運動神経細胞における軸索損傷時の TDP43 の変化

軸索輸送障害で TDP43 の核局在が障害され、この背景に TDP43 の軸索内蓄積と Importin 系を介した核細胞質輸送機能異常が関与する可能性が示された。TDP43 の異所性局在は可逆性であり、それ自体が ALS の運動ニューロン死の原因ではなく、他の何らかの機序の関与が推察された。

#### (5) 喉頭における概日リズムと時計遺伝子の関与の解明

上気道および下気道に末梢時計が存在し、迷走神経を介して、視交叉上核によって制御されることを明らかにした。また、喉頭粘膜、喉頭腺上皮細胞核に PER1、PER2 タンパクの時間特異的な発現を認めた。MUC5b タンパクの発現にも概日リズムを認め、喉頭腺分泌は、喉頭の時計遺伝子 Per1、Per2 によって制御されている可能性が示唆された。これらの結果は、喉頭疾患の時間特異的な発症に関与すると考えられ、今後の治療開発における重要な情報源となりうるものである。

#### 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 6 件)

- ① Saito A, Sato T, Okano H, Toyoda K, Bamba H, Kimura S, Bellier J-P, Matsuo A, Kimura H, Hisa Y, Tooyama I. Axotomy alters alternative splicing of choline acetyltransferase in the rat dorsal motor nucleus of the vagus nerve. *J Comp Neurol* (査読有) 513(2): 237-248, 2009. 3.
- ② Nishio T, Bando H, Bamba H, Hisa Y, Okamura H. Circadian gene expression in the murine larynx. *Auris Nasus Larynx* (査読有) 35(4): 539-544, 2008. 12.
- ③ 久 育男, 板東秀樹, 西尾健志, 馬場均. 気道時計遺伝子発現と迷走神経による制御. *耳展* (査読有) 51(5): 278-285, 2008. 10.
- ④ Saito A, Okano H, Bamba H, Hisa Y, Oomura Y, Imamura T, Tooyama I. Low expression of FGF1 (fibroblast growth factor-1) in rat parasympathetic preganglionic neurons. *Histol Histopathol* (査読有) 22(12): 1327-1335, 2007. 12.
- ⑤ Bando H, Nishio T, van der Horst GT, Masubuchi S, Hisa Y, Okamura H. Vagal regulation of respiratory clocks in mice. *J Neurosci* (査読有) 27(16): 4359-4365, 2007. 4.
- ⑥ Hirasugi K, Hisa Y, Setsu T, Terashima T. Ambiguous motoneurons innervating laryngeal and esophageal muscles are malpositioned in the Reelin-deficient mutant rat, Shaking Rat Kawasaki. *Acta Otolaryngol* (査読有) 127(2): 213-220, 2007. 2.

##### [学会発表] (計 7 件)

- ① Satoh T, Takeuchi S, Saitoh A, Hisa Y, Tooyama I, Urushitani M. Axonal strangulation induced peripheral accumulation and nuclear reduction of TDP43 in brainstem motor neurons. *Neuroscience* 2008 (The 38th Annual

- Meeting of the Society for Neuroscience). 2008 Nov 15; Washington DC, USA.
- ② Bando H, Nishio T, Hirota R, Bamba H, Okamura H, Hisa Y. Vagal regulation of respiratory clocks in mice. 15th World Congress for Bronchoesopagology. 2008 April 1; Tokyo, Japan.
- ③ Hisa Y. Symposium 4. Recent advances in head and neck surgery (chairperson). The International College of Surgeons of the 17th Joint Congress of Asia & Pacific Federations & the 53rd Annual Congress of the Japan Section. 2007 Jun 9; Kyoto, Japan.
- ④ Hisa Y, Bando H, Nishio T, Koike S, Bamba H. Circadian rhythm in the larynx and trachea under the control of molecular clock. Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum. 2006 Aug 30; Moscow, Russia.
- ⑤ Okano H, Toyoda K, Bamba H, Hisa Y, Oomura Y, Imamura T, Furukawa S, Kimura H, Tooyama I. Localization of fibroblast growth factor-1 in cholinergic neurons innervating the rat larynx (poster). The 7th Joint Meeting of the Histochemical Society & the Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry. 2006 Aug 24; Hawaii, USA.
- ⑥ Bando H, Nishio T, Okamura H, Hirota R, Bamba H, Hisa Y. Circadian rhythm in the laryngeal function under the control of molecular clock (poster). The 5th International Conference on Voice Physiology and Biomechanics. 2006 Jul 12; Tokyo, Japan.
- ⑦ Okano H, Toyoda K, Bamba H, Hisa Y, Oomura Y, Imamura T, Furukawa S, Kimura H, Tooyama I. Localization of fibroblast growth factor-1 (FGF1) in cholinergic neurons innervating the rat larynx (poster). The 7th Joint meeting of the Histochemical Society and the Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry. 2006 Aug 24; Hawaii, USA.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久 育男 (HISA YASUO)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号：50181087

### (2) 研究分担者

馬場 均 (BAMBA HITOSHI)  
京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号：30360035  
島田 剛敏 (SHIMADA TAKETOSHI)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：30275226

### (3) 連携研究者

なし