

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07759

研究課題名(和文) 喉頭の化学受容細胞 - 神経複合体による呼吸防御反射機構の解明

研究課題名(英文) Contribution of laryngeal chemoreceptor cells-nerve endings complex to respiratory defense reflex

研究代表者

山本 欣郎 (Yamamoto, Yoshio)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：10252123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：喉頭の化学受容細胞 - 神経複合体の形態と機能を明らかにするために、免疫組織化学、カルシウムイメージングおよび呼吸反射実験を行った。喉頭粘膜のGNAT3陽性化学受容細胞は、孤在性に分布するもの、味蕾様の細胞集塊を形成するものに大別でき、P2X3陽性神経終末が接するのが観察された。生理学的には、キニーネにより一過性の細胞内Ca²⁺の上昇が記録され、喉頭粘膜へのキニーネによる刺激によって分時呼吸回数が減少した。この呼吸抑制反射は、両側の前喉頭神経切断により消失した。以上の結果から、喉頭の化学受容細胞は少なくとも苦み刺激で反応し、前喉頭神経を介して呼吸抑制反射を行う感覚受容器として働くことがわかった。

研究成果の概要(英文)：To clarify morphology and physiology of chemoreceptor cell-nerve ending complex in the laryngeal mucosa, immunohistochemistry, Ca²⁺ imaging and electrophysiological analysis were performed. In the present study, GNAT3-immunoreactive (ir) chemoreceptor cells were observed in the laryngeal mucosa as the solitary chemoreceptor cells (SCC) and the taste bud-like chemosensory cell clusters (CC). The SCC were mainly observed in the mucosa covered with epiglottic and arytenoid cartilages, and the CC were observed in the epiglottis and aryepiglottic fold. The GNAT3-ir cells were attached with the P2X3-ir nerve endings. By calcium imaging, some epithelial cells in the laryngeal mucosa evoked intracellular Ca²⁺ by 10 mM quinine. Application of quinine to the laryngeal mucosa decreased respiration frequency. It is suggested that the laryngeal chemosensory cell-nerve ending complex involve with perception of chemical substances in the laryngeal cavity to evoke the reflex for respiratory depression.

研究分野：獣医解剖学

キーワード：喉頭 呼吸抑制 化学受容細胞 免疫組織化学 カルシウムイメージング 電気生理学

1. 研究開始当初の背景

喉頭は下部気道の起始部にある発声を司る器官であるが、吸気中の侵害物質、薬物などの化学物質、内圧の変化等を受容する感覚受容器を有しており、発咳、無呼吸、声門閉鎖、呼吸数の増加等のさまざまな生体防御反射を誘起する。喉頭は咽頭交差の直下に位置しており、誤嚥を防御する反応においてもこれらの感覚受容器が果たす役割は大きい。

申請者は、免疫組織化学や電子顕微鏡を用いた形態学的な解析により、上皮下葉状神経終末、自由神経終末、化学受容細胞 - 神経複合体などの複数の感覚神経終末を報告してきた。このうち、化学受容細胞 - 神経複合体は、喉頭粘膜にある化学受容細胞と受容した刺激を伝達する求心性神経終末で構成される感覚受容器である。化学受容細胞 - 神経複合体には、味蕾様の形態を呈する化学受容細胞集塊と孤在性化学受容細胞があり、喉頭蓋や声門裂周辺に多く分布することを報告してきた。

近年の報告で、喉頭粘膜における化学受容細胞には味蕾様構造中の化学受容細胞、孤在性化学受容細胞のいずれにおいても型細胞における味覚受容信号伝達分子 (GNAT3、TRPM5 等) の存在が証明され、喉頭の化学受容細胞が味細胞と類似することが報告された。ところが、舌の味蕾では塩味を型細胞、甘味、苦味、うま味を型細胞、酸味を型細胞が受容するとされているのに対し、喉頭において舌の味蕾のようなサブタイプの報告はない。また、味蕾様構造と孤在性化学受容細胞に機能的差異があるかもわかっていない。

また、喉頭の感覚神経を興奮させる化学物質として、水、二酸化炭素、細菌由来の化学物質などが挙げられており、化学受容細胞の関与が想像されるが、これらの刺激に対する化学受容細胞の反応性は不明である。

さらに、舌味蕾の型細胞では ATP が刺激伝達分子として働き、周囲の感覚神経終末を非シナプス性に興奮させて中枢に刺激を伝達することが報告されている。しかしながら、喉頭の化学受容細胞 - 神経複合体における刺激伝達機構や神経伝達機構は全く報告がなく、それぞれの刺激がどのような呼吸反射を誘起するののかも不明である。

2. 研究の目的

本研究では、凍結切片およびホールマウント標本と免疫組織化学を併用した形態学的手法で喉頭粘膜に存在する化学受容細胞の形態と分布を明らかにするとともに、化学受容細胞に分布する感覚神経支配を明らかにする。さらに、化学受容細胞の至適刺激を探索し、喉頭化学受容細胞に起因する反射の詳細を明らかにする。これらの解析から、喉頭粘膜の化学受容細胞の機能を解明し、化学物

質に対する呼吸防御反射における喉頭化学受容細胞 - 神経複合体の機能的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 喉頭化学受容細胞の形態学的解析

材料として、Wistar ラット (8 週齢、オス) を用いた。4%パラホルムアルデヒドで喉頭を固定し、クリオスタット切片またはホールマウント標本を以下の抗体を用いて蛍光抗体法により染色した。作成した標本は、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、化学受容細胞の免疫組織化学的特性、形態、分布および神経支配を解析する。さらに、比較のために気管においても同様の検索を行った。

使用した抗体：GNAT3、phospholipase C, 3-subunit (PLC)、SNAP25、villin、doublecortin-like kinase 1 (DCLK1)、cytokeratin 18 (CK18)、P2X2 型 ATP 受容体、P2X3 型 ATP 受容体、calcitonin gene-related peptide (CGRP)、substance P (SP)、espin

(2) 喉頭化学受容細胞のカルシウムイメージング

ラットから喉頭を採取し、マイクロスライサーを用いて厚さ 200 μm のスライスを作成した。スライスにカルシウム指示薬 (Fluo-4, AM) を取り込ませた後、共焦点顕微鏡上の灌流チャンバに設置した。細胞の蛍光強度を経時的に記録することにより、10mM キニーネ塩酸塩を 1 分間灌流した際の細胞内 Ca^{2+} の変動を記録した。

(3) 喉頭化学受容細胞により生じる反射の電気生理学的検索

ラットをウレタンで麻酔し、気管カニューレを設置し、フローヘッドを介してスパイロメトリーアンプに接続して呼吸流速変化を記録した。また、同時に横隔膜の筋電図を記録した。喉頭を刺激溶液 (キニーネ) で灌流した際の呼吸パターン変化を解析した。

4. 研究成果

喉頭粘膜の化学受容細胞は、舌味蕾の型細胞のマーカーである GNAT3 および PLC に対して陽性反応を示し、孤在性に分布するもの (図 1A, B) 味蕾様の細胞集塊を形成するもの (図 1C) に大別できた。このうち、孤在性化学受容器は喉頭蓋軟骨および披裂軟骨を覆う粘膜に多く、側方に向かう 2-3 本の細長い突起を有するもの (図 1A) と側方の突起に乏しいもの (図 1B) が存在した。味蕾様構造は 2-14 個の GNAT3 陽性化学受容細胞が含まれていた。これらの細胞は舌味蕾で観察されるような紡錘形ではなく、孤在性化学受容細胞と類似の複数の長い突起を有する複雑な形をしていた。味蕾様構造における GNAT3 陽性化学受容細胞の頂上部突起は一カ所に集まっていたが、舌味蕾で認められる味孔は存在しなかった。孤在性化学受容細胞、味蕾様構造内の化学受容細胞のいずれも、短く細い

espin 陽性の頂上部突起によって喉頭腔に面していた。GNAT3 陽性細胞の分布は、側方突起を有する孤立性化学受容細胞は喉頭蓋、披裂軟骨小角突起の部分に多く、側方突起に乏しいは声帯突起の部分に多かった。また、味蕾様構造は喉頭蓋辺縁部および披裂喉頭蓋ヒダに多く観察された(図2)。

図1. 喉頭粘膜の GNAT3 陽性化学受容細胞の形態

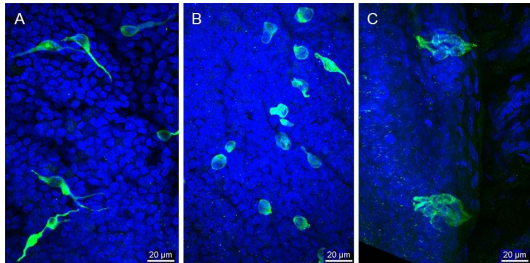
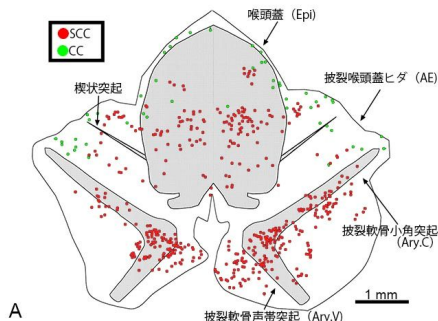
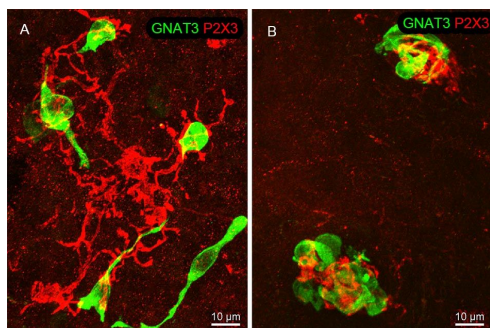


図2. 孤立性化学受容細胞 (SCC) および味蕾様構造 (CC) の分布



味蕾様構造では、GNAT3 陽性細胞間に舌味蕾の型細胞のマーカである SNAP25 陽性細胞が認められた。また、SNAP25 陽性反応は散在性の神経内分泌細胞にも認められた。神経支配の観察では、散在性化学受容細胞には P2X3 陽性神経終末が接しているのが観察された(図3A)。味蕾様構造では GNAT3 陽性化学受容細胞に加え、SNAP25 陽性細胞を取り囲むのが観察された(図3B)。

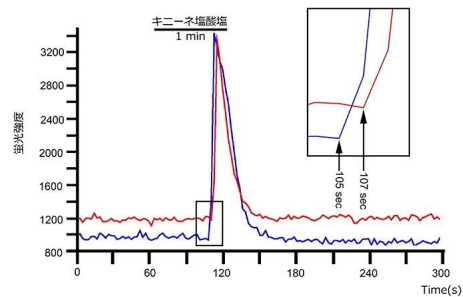
図3. 孤立性化学受容細胞および味蕾様構造における P2X3 陽性神経終末の分布



呼吸器の化学受容細胞に関する過去報告では、villin および CK18 により染色されることから、刷子細胞と同一視されていた。今回の結果では化学受容細胞の管腔に向かう突起が villin 陽性を示すものの、刷子細胞のマーカである DCLK1 に対する陽性反応は認められず、刷子細胞とは異なる細胞種であると結論した。また、化学受容細胞と刷子細胞の双方に CK18 は陽性反応が認められ、このことが両細胞を混同する原因となることがわかった。さらに、気管粘膜においても GNAT3 陽性化学受容細胞がまれに存在することがわかった。

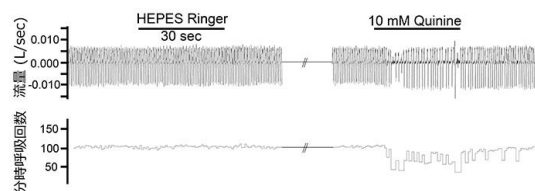
カルシウムイメージングでは、10 mM キニーネ塩酸塩による灌流開始後、 24.8 ± 10.0 秒後に喉頭粘膜の一部の上皮細胞で一過性の細胞内 Ca^{2+} の上昇が記録された(細胞数 90、標本数 3; 図4)。また、最初の反応の後、隣接細胞の細胞内 Ca^{2+} が 11.8 ± 9.8 秒後に上昇した。刺激終了後 30 秒後に元の値に戻った。

図4. 喉頭粘膜上皮細胞の細胞内カルシウムイオン変動



反射実験では、喉頭腔へ 10 mM キニーネ塩酸塩を灌流したところ(30 秒間) 顕著な呼吸抑制が認められ、分時呼吸回数が 118.9 ± 11.5 回から 85.6 ± 12.9 回に減少した(図5)。溶媒のみを灌流した場合、両側の前喉頭神経を切断して実験を行った場合は、同様の呼吸抑制は認められなかった。

図5. 喉頭粘膜へのキニーネによる呼吸抑制



以上の結果から、喉頭の化学受容細胞は喉頭粘膜に広く分布しており、喉頭腔からの刺激を受容した後に P2X3 陽性神経終末により、中枢へ情報を伝達する構造と考えられた。また、従来気道の化学受容細胞と刷子細胞の区別が不明確であったが、免疫組織化学的に類

似点はあるものの、全く異なる細胞であることを明らかにし、刷子細胞は化学受容に関わる可能性が低いことがわかった。また、味蕾様構造は孤在性化学受容細胞と散在性神経内分泌細胞の集合体として存在しており、舌の味蕾のように高度に組織化されたものではないことがわかった。生理学的には、化学受容細胞は少なくともキニーネ（苦み）で反応し、前喉頭神経を介して呼吸抑制反射を行う感覚受容器として働くことが示唆された。喉頭の化学受容細胞-神経複合体は、下気道の入口で異物に反応して呼吸を抑制することにより、誤嚥を防ぐ働きがあると考えられる。今後の課題として、型細胞に類似する味蕾様構造の SNAP25 陽性細胞と散在性神経内分泌細胞の感覚受容機能の有無の解析、苦み以外の刺激による反射反応の有無の解析等が挙げられる。

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2件)

1. Yamamoto, Y., Nakamuta, N. (2018)
Morphology of P2X3-immunoreactive nerve endings in the rat tracheal mucosa. J. Comp. Neurol. 526, 550-566. doi: 10.1002/cne.24351. (査読あり)
2. Yamamoto, Y., Ozawa, Y., Yokoyama, T., Nakamuta, N. (2018)
Immunohistochemical characterization of brush cells in the rat larynx. J. Mol. Histol. 49, 63-73. doi: 10.1007/s10735-017-9747-y. (査読あり)

[学会発表](計4件)

1. 増田遥香、中牟田信明、山本欣郎 (2017)
ラットの喉頭粘膜に存在する化学受容細胞の分布と形態. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会(長崎)3月.
2. 山本欣郎、増田遥香、小澤優子、中牟田信明 (2017) ラット喉頭粘膜における化学受容細胞の免疫組織化学的特性. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会(長崎)3月.
3. 山本欣郎、中牟田信明 (2018) ラット気管

粘膜の P2X3 陽性神経終末の形態 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会(武蔵境)3月.

4. 大越魁、中牟田信明、山本欣郎 (2018) ラット気管における刷子細胞の免疫組織化学的特徴. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会(武蔵境)3月.

[その他]
ホームページ等

岩手大学農学部研究室紹介(獣医解剖学研究室)

<http://www.agr.iwate-u.ac.jp/lab/%E7%8D%A3%E5%8C%BB%E8%A7%A3%E5%89%96%E5%AD%A6%E7%A0%94%E7%A9%B6%E5%AE%A4/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 欣郎 (YAMAMOTO, Yoshio)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号: 10252123