

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10821

研究課題名(和文) 気道防御機構としての下咽頭・喉頭の機能解剖学的研究

研究課題名(英文) Role of SERCA genes in the function of larynx and hypopharynx

研究代表者

板東 秀樹 (Bando, Hideki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50433272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの喉頭および下咽頭において筋小胞体カルシウムATPase (SERCA) の発現を免疫組織化学法を用いて調べた。内喉頭筋では声門閉鎖に関わる甲状披裂筋と呼吸に関わる声門開大筋である後輪状披裂筋では発現パターンが異なる。甲状披裂筋では速筋型であるSERCA1が大半を占めたのに対して、後輪状披裂筋では遅筋に多いとされるSERCA2が約4割認められた。一方で嚥下に関わる筋群では甲状咽頭筋がSERCA1陽性筋線維で占められたのに対して、輪状咽頭筋では内側でSERCA2陽性筋線維が多く認められた。SERCAは発声、嚥下、呼吸において筋活動の持続性を決定する重要な要因であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that the SERCA may play important role to understand the laryngeal and hypo pharyngeal muscles functions. We investigated the distribution and expression of slow (MyHC I and SERCA2) and Fast (MyHC II and SERCA1) SERCA and MyHC in the laryngeal and hypo pharyngeal muscles. The immune-localization of Myosin, SERCA isoform and co-expression in individual muscle fibers of five intrinsic laryngeal muscles expression were tested in young and aged rats. The intrinsic laryngeal five muscles used were medial and lateral thyroarytenoid (MTA, LTA), lateral cricoarytenoid (LCA), Superior Cricothyroid (SCA), posterior cricoarytenoid (PCA), and cricothyroid (CT). The expression in hypo pharyngeal muscles (Thyroarytenoid muscle and Cricopharyngeal muscle) were also examined. The results indicate that SERCA plays important roles in phonation, respiration and deglutition.

研究分野：喉頭科学

キーワード：SERCA 発声障害 嚥下障害 声帯筋 下咽頭収縮筋

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会において誤嚥性肺炎対策は重要になりつつある。嚥下において下咽頭・喉頭の筋活動はそれぞれ食塊の移送と気道の防御というきわめて重要な役割を担っている。これらの機能の解明には各筋の特性を理解することが必須である。これまでの研究で下咽頭・喉頭の型筋線維、型筋線維の分布などは研究されてきたものの、四肢の筋と比較すると嚥下・発声筋は各筋の役割に不明な点が多い。

一般に筋の収縮・弛緩にはカルシウムの筋小胞体内への取り込みが不可欠であり筋小胞体カルシウム ATPase (SERCA)の役割が重要となる。SERCA は阻害因子 Phospholamban (PLN)と結合しており PLN がリン酸化されると SERCA が活性化され筋小胞体内にカルシウムイオンが取り込まれる。SERCA1 は型筋線維において SERCA2 が主に心筋、型筋線維において発現していることが知られている。これまでに心不全において SERCA2 の発現が低下することが知られており遺伝子治療のターゲットになっている。

下咽頭収縮筋は解剖学的に甲状咽頭筋と輪状咽頭筋に分かれており、甲状咽頭筋は食塊の駆出に参与し、輪状咽頭筋は上部食道括約筋 (UES) としての機能を有している。輪状咽頭筋は食道からの逆流を防ぐ一方で嚥下時には弛緩し食塊を通過させる。このような特性は嚥下中枢からの神経支配によって制御されているが、筋線維そのものの特性は不明な点が多い。これまでの研究によって甲状咽頭筋は型筋線維、輪状咽頭筋は型筋線維優位であると報告されている。しかし嚥下における機能的な違いや輪状咽頭筋の UES としての機能を説明するには至っていない。また嚥下障害の重要な要因である下咽頭収縮筋障害の病態について、これまで分子レベルで解析した研究報告はほとんどない。

また気道防御および発声呼吸に重要な筋群である内喉頭筋の筋線維の構成は甲状披裂筋、外側輪状披裂筋において型筋線維が多数を占め、後輪状披裂筋や輪状甲状筋では型筋線維の比率が高いとされているが SERCA の発現について調べた報告はない。

2. 研究の目的

本研究は発声障害、嚥下障害、誤嚥性肺炎の病態解明のため、喉頭および下咽頭の解剖学的、組織学的特性を検討することを主目的として行った。SERCA の内喉頭筋・下咽頭収縮筋における発現を詳細に調べることで、各筋の気道防御、発声、嚥下における役割の解明につなげることが出来ると考えている。

3. 研究の方法

ラットの下咽頭および喉頭の組織を用いた免疫組織化学法で SERCA タンパクの発現を調べた。8-10 週齢の Wistar 系ラット (雄) を深麻酔下に灌流固定を行い、喉頭、下咽頭、頸部食道を摘出、固定した後に凍結切片を作成し免疫組織化学法に供した。免疫組織化学法は一次抗体に抗 SERCA1、2a 抗体を用い、二次抗体に対応する蛍光標識抗体を用いた。標本は共焦点レーザー顕微鏡を用いて同条件下で観察記録した。対照としてラット下肢の長趾伸筋 (速筋) とヒラメ筋 (遅筋) を摘出して用いた。

4. 研究成果

下咽頭収縮筋における発現：

甲状咽頭筋において SERCA1 が優位に発現しており、SERCA2 はわずかな発現にとどまった。一方ヒトの輪状咽頭筋に相当する semicircular muscle では外側では SERCA1 が優位に発現していたが、内側では SERCA2 の発現が多く認められた。またこれら SERCA2 陽性筋線維のうち型ではなく型筋線維が多くを占めており、ヒトの骨格筋とは異なる特徴を示した。ヒト下咽頭収縮筋を調べた結果、甲状咽頭筋では SERCA1 陽性筋線維が、輪状咽頭筋では SERCA2 陽性筋線維がそれぞれ過半数をしめた。ヒトとラットでは発現比率に差を認めるものの、輪状咽頭筋部で SERCA2 陽性筋線維がより多く発現を認めた。これらの結果は semicircular muscle が UES としての機能をはたす上で、重要な意味合いを持っていることが示唆された。

内喉頭筋における発現：

ラット内喉頭筋の筋線維の構成は甲状披裂筋、外側輪状披裂筋において 2 型筋線維が多数を占め、後輪状披裂筋や輪状甲状筋では 1 型筋線維の比率が高かった。SERCA の発現は声門閉鎖筋である甲状披裂筋において SERCA1 陽性筋線維がほとんどを占めていた。しかし声帯筋において一部ではあるが SERCA2 陽性の筋線維を認めた。甲状披裂筋の外側部ではすべてが SERCA1 陽性の型筋線維であった。一方で声門開大筋である後輪状披裂筋では SERCA2 陽性筋線維の比率が高く、呼吸にともなう持続的な声門開大には SERCA2 の果たす役割が大きいと考えられた。外側輪状披裂筋も一定の比率で SERCA2 陽性筋線維を含んでおり、同じ閉鎖筋でも甲状披裂筋とはやや異なる組成であった。外側輪状披裂筋、後輪状披裂筋においては SERCA1、2 がともに発現する Hybrid 線維がみられた。一方で輪状甲状筋は SERCA1 陽性筋線維、SERCA2 陽性線維ともに認められたが、Hybrid 線維は認めなかった。後輪状披裂筋、外側輪状披裂筋と輪状甲状筋の発現の違いは、発生

学的な要因が関与していると考えられた。

現在これらの研究結果を2編の論文としてまとめており、下咽頭収縮筋における発現に関する論文は英文雑誌に掲載予定である。

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 1 件)

Ahmed El-rabie Mohammed, Hideki Bando et al. Differential isoform expression of SERCA and myosin heavy chain in hypopharyngeal muscles. Acta Otorhinolaryngologica Italica. 2018, in press. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

板東秀樹, Mohammed Elrabie Ahmed, 杉山庸一郎, 平野 滋. 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. 第118回日本耳鼻咽喉科学会, 2017.

板東秀樹, Mohammed Elrabie Ahmed, 布施慎也, 杉山庸一郎, 西尾健志, 平野 滋, 久 育男. 下咽頭収縮筋における筋小胞体カルシウムATPaseの発現. 第68回日本気管食道科学会 2016.

Bando H, Ahmed ME, Sugiyama Y, Nishio T, Hisa Y. Expressions of Sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPases in rat intrinsic laryngeal muscles (poster). 19th WCBIP/WCBE. 2016 May 11; Florence, Italy.

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発現. 第26回日本喉頭科学会. 2016.

〔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
板東 秀樹 (HIDEKI BANDO)

京都府立医科大学・耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室・助教

研究者番号: 50433272

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
()

研究者番号:

(4)研究協力者
()

