

令和元年6月5日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00923

研究課題名(和文) 咽頭・喉頭領域におけるTRPチャネルの生理学的機能の検討：「のどごし」と嚥下誘発

研究課題名(英文) Expression of TRP channels in the laryngeal and associated laryngopharyngeal regions, and their involvement in facilitation of swallowing reflex

研究代表者

安藤 宏 (Ando, Hiroshi)

松本歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：30312094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：咽頭・喉頭領域の感覚は、迷走神経の分枝の上喉頭神経に受容される。この神経において43℃以上の温度およびカプサイシンに活性化されるTRPV1チャネル、冷刺激やメントールに応答するTRPM8チャネル、冷刺激やマスタードに反応するTRPA1チャネルが発現していることを免疫組織学的方法により明らかにした。さらに、これらのチャネルの活性化物質であるカプサイシン、メントールおよびマスタード成分による咽頭・喉頭領域の刺激は、嚥下回数を顕著に増加させた。これらの結果から、上喉頭神経に発現するTRPV1、TRPM8およびTRPA1を介して、嚥下が誘発されることが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

飲食物を飲み込む時の咽頭・喉頭領域の感覚は上喉頭神経に受容される。この神経においてTRPV1、TRPM8およびTRPA1チャネルが発現することを明らかにした。さらに、咽頭・喉頭領域における感覚形成および嚥下誘発の神経機構の一端を明らかにすることができた。これは、「のど越しの感覚」や「おいしさ」を形成している重要な感覚受容機構の解明に役立ち、飲料や食品開発の発展に貢献できる。また、この領域の感覚は嚥下を誘発するための重要な感覚であり、この感覚受容機構の解明にもつながる。高齢化社会を迎えた日本が抱えている社会問題でもある嚥下障害を解決するための、摂食嚥下リハビリテーションや嚥下食開発に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：The larynx and associated laryngopharyngeal regions are innervated by the superior laryngeal nerve (SLN). Immunohistochemistry identified TRPV1, TRPM8 and TRPA1 on cell bodies of SLN afferents located in the nodose-petrosal-jugular ganglionic complex. Topical application of a TRPV1 agonist, capsaicin, and a TRPM8 agonist, menthol, in the SLN innervating regions, increased the SLN activities which were significantly attenuated by the prior topical application of TRPV1 and TRPM8 antagonists, respectively. In addition, application of TRPV1 and TRPM8 agonists facilitated the evoking of swallowing reflexes and the number of agonist evoked reflexes was significantly reduced by the prior application of respective antagonists. Furthermore, a TRPA1 agonist, allyl isothiocyanate, also facilitated the evoking of swallowing reflexes. These findings indicate that activation of TRPV1, TRPM8 and TRPA1 channels expressing in the SLN can facilitate the evoking of swallowing reflex.

研究分野：機能系歯科学

キーワード：嚥下 TRPチャネル 咽頭 喉頭 上喉頭神経 TRPV1 TRPM8 TRPA1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食べ物や飲み物を飲み込む時の感覚は、「のどごし」と呼ばれ、「おいしさ」を感じる重要な感覚であるとともに、「嚥下の誘発」に重要な感覚要素である。咽頭・喉頭領域の味覚応答は、舌領域とは異なる生理学的特徴をもっている。これまで申請者が所属する研究グループは、咽頭・喉頭領域は、4基本味に対する応答性はあまりよくないが、水やアルコールに高い興奮性を示すことを報告してきた。また、咽頭・喉頭領域でうま味や脂肪酸が受容されていることも報告している (Kitagawa et al. Nihon Yakurigaku Zasshi, 2015; 高辻他, JOHNS, 2013; Kitagawa et al. Neuroscience Lett, 2007)。このような舌とは異なる咽頭・喉頭領域の感覚応答特性が、飲食物の「おいしさ」や「のどごし」の感覚形成に関与していると考えられるが、飲食物が咽頭・喉頭領域を通過する時に生じる感覚モダリティー (種類) は明らかではない。

近年の分子生物学的研究の発展により、Transient receptor potential (TRP)チャネルファミリーの基本的な機能として、温度や飲食物に含まれる物質などで活性化されることが明らかにされた。これら TRP チャネル・ファミリーのうち、本研究では、私たちの食生活の中でもっとも「のどごし感覚」に重要であろうと推測される、43 以上の温度および唐辛子の成分(カプサイシン)や酸によって活性化する「TRPV1チャネル」、冷刺激やメントール刺激に応答する「TRPM8チャネル」に焦点をあて、「のどごし感覚」の形成に必要な温度や触・圧などの感覚受容の可能性を検討する。

また、研究代表者の所属する研究グループでは、これまでに咽頭・喉頭領域の機械刺激に対する嚥下誘発部位や酸刺激が嚥下反射を促進することを明らかにするなど、嚥下誘発機序の解明に関する研究を精力的に行っている (Takahashi et al. Neuroscience Lett, 2014; Mostafaezur et al. PLoS One, 2012; Takatsuji et al. Dysphagia, 2012)。嚥下障害患者にカプサイシンやメントールを与えると嚥下が改善されることが報告されているが、その神経メカニズムは明らかになっていない。嚥下誘発のための感覚形成に TRPV1 および TRPM8 チャネルが関与しているかどうかについても検討する。TRP チャネル・ファミリーには TRPV1 や TRPM8 以外にも多くのチャネルが含まれるため、別のチャネルについても同様な実験を行う。

従って、本研究で、(1)咽頭・喉頭領域に発現している TRP チャネルを同定すること、(2)発現している TRP チャネルの生理学的機能を明らかにすることができれば、「のどごし」の感覚解明につながると考えられ、「おいしさ」の理解を深めることができる。さらに、嚥下を誘発する感覚モダリティーの解明につながり、嚥下障害の改善に貢献できると考えられる。

2. 研究の目的

飲食物を飲み込む時の感覚は、「のどごし」や「嚥下の誘発」に重要であるが、どの感覚モダリティー (種類) が重要であるのかは明らかになっていない。これらの感覚には、温度やカプサイシン、メントール等に応答する Transient receptor potential (TRP)チャネルが関与していることが考えられる。本研究では、次の3点を明らかにする。

(1) 咽頭・喉頭領域における、TRP チャネルの発現

咽頭・喉頭領域を支配している上喉頭神経の感覚神経の細胞体が存在する神経節における TRP チャネルの発現分布を免疫組織学的に調べる。

(2) 咽頭・喉頭領域における、TRP チャネルの感覚神経応答への関与

咽頭・喉頭領域への水や味刺激に対する上喉頭神経の応答性が、TRP チャネルの阻害剤によ

りどのように影響されるかを調べることで、「のどごし」の感覚に必要な TRP チャンネルや刺激のモダリティーを検討する。

(3) TRP チャンネルの嚥下誘発への関与

咽頭喉頭領域への味刺激より誘発した嚥下の TRP チャンネル阻害剤による変調を調べることで、嚥下に関与する感覚モダリティーとその受容器となる TRP チャンネルを解明する。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織学的実験：上喉頭神経における TRP チャンネルの発現

実験動物は、ラットを用いた。TRP チャンネルのうち、高温やカプサイシン等で活性化される TRPV1 および低温やメントール等で活性化される TRPM8 チャンネル、低温やマスタードに応答する TRPA1 の発現を咽頭・喉頭領域を支配する上喉頭神経の感覚神経の細胞体が含まれる神経節において調べた。この神経節には上喉頭神経以外の、舌咽神経舌枝、舌咽神経咽頭枝、迷走神経咽頭枝、反回神経などの別の感覚神経の細胞体も含まれる。あらかじめこれらの神経を切断した後、咽頭・喉頭粘膜に逆行性トレーサーであるフルオロゴールド (FG) を注入し上喉頭神経の細胞体を染色・同定した。TRP チャンネルの抗体を用いた免疫染色を行い、FG との共存を観察した。また、有髄神経のマーカであるニューロフィラメント 200 (NF200) 抗体を用い、有髄神経か無髄神経かを識別した。これらはこの研究グループにより報告された方法 (Zakir et al. Plos One 2012) を用いた。

(2) 電気生理学的実験 1：TRP チャンネルを介した上喉頭神経の感覚応答

「咽頭・喉頭領域からの感覚神経活動に対する TRP チャンネルの阻害剤の作用」を調べるために、カプサイシン、メントール、生理食塩水や水に対する上喉頭神経応答を記録した。あらかじめ TRPV1 の阻害剤 (AMG9810 など)、TRPM8 の阻害剤 (AMTB など) を咽頭・喉頭領域への局所投与し、上記の溶液刺激への応答の変調を調べた。溶液刺激を投与した時の神経活動の記録をするための電気生理学的実験方法は、これまで申請者の研究グループにより報告された方法 (Mostafeezur et al. PLoS One, 2012; Kitagawa et al. Neuroscience Lett, 2007; Kitagawa et al. Am J Physiol, 2002) を用いた。

(3) 電気生理学的実験 2：TRP チャンネルを介した嚥下の誘発

「嚥下に関与する感覚モダリティー (種類) とその受容器となる TRP チャンネル」を解明するために、咽頭・喉頭領域への水あるいは各種刺激溶液等を注入し、嚥下を誘発させる。筋電図測定により一定時間内の嚥下回数を調べる。あらかじめ TRPV1 および TRPM8 等のアンタゴニストを咽頭・喉頭領域への局所投与し、各種溶液刺激による嚥下回数に対する変調を調べた。嚥下を誘発させるための電気生理学的方法は、これまでに申請者の研究グループにより報告された方法 (Kajii et al. Physiol Behav, 2002; Tsujimura et al. J Physiol, 2012) を用いた。

4. 研究成果

(1) TRPV1、TRPM8 および TRPA1 チャンネルの咽頭・喉頭領域を支配する感覚神経における発現

カプサイシンに反応する TRPV1、メントールに反応する TRPM8 (図 1)、ワサビやからしに含まれるアリルイソチアネートに反応する TRPA1 が、咽頭・喉頭領域を支配する上喉頭神経の感覚神経に発現していることを明らかにした。

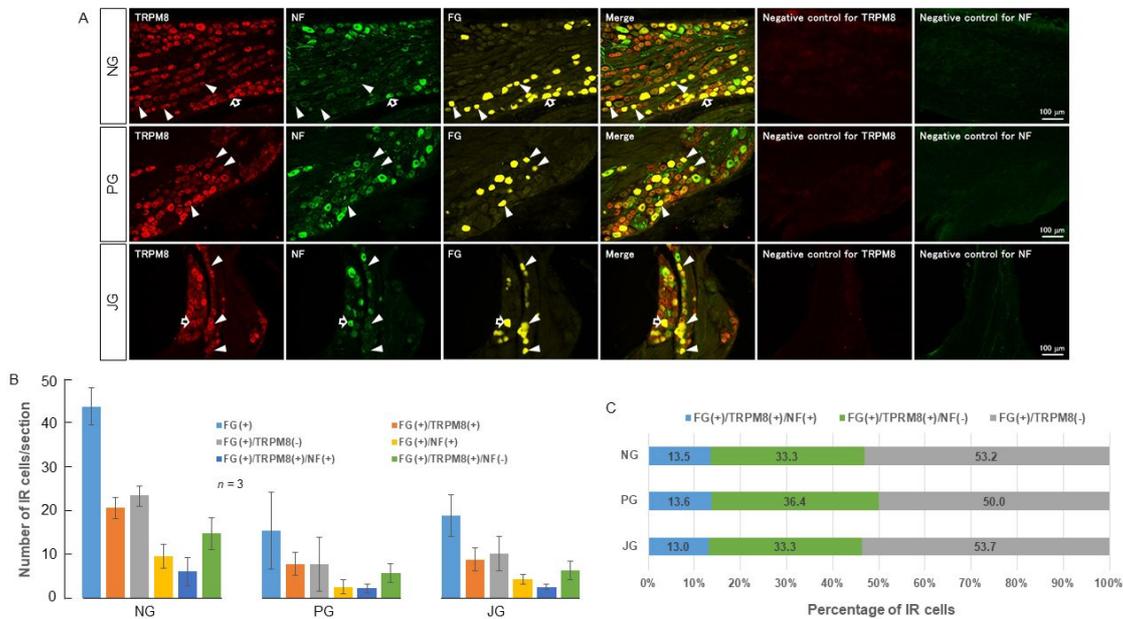


図1 上喉頭神経の神経節 NPJc における TRPM8 免疫陽性細胞

(A) 上喉頭神経の感覚神経の細胞体が含まれる神経節は nodose ganglion (NG)、petrosal ganglion (PG) および jugular ganglion (JG) の複合体 NPJc を形成する。上喉頭神経の感覚神経の細胞体を逆行性トレーサー FG で染色し、TRPM8 および有髄神経のマーカ NF200 との共存を調べた。白矢頭は無髄神経、黒矢印は有髄神経を示す。

(B)(C) TRPM8 陽性細胞はいずれの神経節にも観察され、このうち約3分の2は無髄神経、残りの3分の1が有髄神経であった。

(2) TRPV1、TRPM8 および TRPA1 チャンルの感覚神経応答および嚔下誘発機能への関与

咽頭・喉頭領域へ投与したカプサイシンやメントールに対する上喉頭神経の神経応答は、濃度依存的に生じた。これらの応答は、それぞれ TRPV1 と TRPM8 の阻害剤によりブロックされた。また、咽頭・喉頭領域へ投与したカプサイシン、メントールは、嚔下回数を促進し、この促進効果は、TRPV1、TRPM8 の阻害剤により減弱された。また、上喉頭神経を片側切断すると、カプサイシンやメントールによる嚔下の促進効果は減弱し、両側切断すると、この促進効果は消失した。加えて、アリルイソチオシアネートの咽頭・喉頭領域への投与によっても嚔下回数の促進が観察され、その効果は濃度依存的に生じた。

考察と今後の展望

咽頭・喉頭領域への化学刺激への感覚神経の応答や、この領域へ投与した化学物質による嚔下の促進効果に、上喉頭神経に発現する TRPV1、TRPM8 および TRPA1 チャンルが関与していることが示された。嚔下障害患者へ与えたカプサイシンやメントールは嚔下を改善する効果があることが報告されていたが、そのメカニズムは明らかになっておらず、嚔下誘発の神経機構の一端を明らかにすることができた。TRP チャンル・ファミリーには今回調べたチャンネル以外にも多くのチャンネルが含まれる。今後は、これらの別の TRP チャンルについて、上喉頭神経における発現や、チャンネルを活性化する飲食物に含まれる物質や温度、浸透圧変化などの検索、また、嚔下を誘発する感覚刺激の受容器となるかを調べる予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Hossain MZ, Ando H, Unno S, Masuda Y, Kitagawa J (2018) Activation of TRPV1 and TRPM8 channels in the larynx and associated laryngopharyngeal regions facilitates the swallowing reflex. *Int J Mol Sci*, **19**: 4113. (査読有)

Kamimura R, Hossain MZ, Unno S, Ando H, Masuda Y, Takahashi K, Otake M, Saito I, Kitagawa J (2018) Inhibition of 2-arachidonoylglycerol degradation attenuates orofacial neuropathic pain in trigeminal nerve-injured mice. *J Oral Sci*, **60**: 37-44. (査読有)

Ando H, Imamura Y, Tadokoro O, Hossain MZ, Unno S, Sogawa N, Kondo E, Kitagawa J (2017) Expression of calcium-binding proteins, calbindin D28k and calretinin, in the frog taste receptor structures. *Neurophysiology* **49**: 254-260. (査読有)

Hossain MZ, Shinoda M, Unno S, Ando H, Masuda Y, Iwata K, Kitagawa J (2017) Involvement of microglia and astroglia in modulation of the orofacial motor functions in neuropathic-pain rats. *JOB* **59**: 17-22. (査読有)

Zakir HM, Unno S, Ando H, Masuda Y, Kitagawa J (2017) Neuron-glia crosstalk and neuropathic pain: involvement in the modulation of motor activity in the orofacial region. *Int J Mol Sci* **18**: 2051-2068. (査読有)

〔学会発表〕(計 12 件)

安藤 宏 Hossain MZ, 海野俊平, 増田裕次, 北川純一. 咽頭・喉頭領域を支配する上喉頭神経における TRPV1、TRPM8 および TRPA1 チャネルの発現と嚥下の促進. 日本味と匂学会第 52 回大会. 2018 年.

Hossain MZ, Unno S, Ando H, Masuda Y, Kitagawa J. Involvement of TRP channels to facilitate the evoking of swallowing reflex. 第 60 回歯科基礎医学会学術大会. 2018 年.

Ando H, Hossain MZ, Unno S, Masuda Y, Kitagawa J. Expression of TRPV1, TRPM8 and TRPA1 channels in the superior laryngeal nerve innervating the laryngeal and associated laryngopharyngeal regions. 第 60 回歯科基礎医学会学術大会. 2018 年.

Hossain MZ, Unno S, Ando H, Masuda Y, Kitagawa J. Pharmacological approach to improve swallowing function: utilizing TRPV1 and TRPM8 channels to facilitate the evoking of swallowing reflex. 第 27 回神経行動薬理若手研究者の集い. 2018 年.

海野俊平, Hossain MZ, 安藤宏, 増田裕次, 北川純一. 上喉頭神経に発現する TRP チャネルが関与する生理機能の検討. 第 11 回三叉神経領域の感覚-運動統合機構研究会 2017 年.

安藤宏, Hossain MZ, 海野俊平, 増田裕次, 北川純一. 咽頭・喉頭領域における TRPV1 および TRPM8 の発現. 第 85 回松本歯科大学学会. 2017 年.

海野俊平, Hossain MZ, 安藤宏, 増田裕次, 北川純一. 咽頭・喉頭領域に発現する TRPV1 および TRPM8 の生理学的機能の解明. 第 85 回松本歯科大学学会. 2017 年.

Hossain MZ, 海野俊平, 安藤宏, 増田裕次, 北川純一. 咽頭・喉頭領域に発現する TRP チャネルとその生理学的機能の解析. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会. 2017 年.

安藤宏, Hossain MZ, 海野俊平, 増田裕次, 北川純一. 咽頭・喉頭領域を支配する上喉頭神経における TRPM8 の発現と機能. 日本味と匂学会第 51 回大会. 2017 年.

Hossain MZ, Unno S, Ando H, Masuda Y, Kitagawa J. Involvement of TRPM8 in mediating the superior laryngeal nerve activity and facilitating the triggering of swallowing reflex. Oral Neuroscience 2017. 2017 年.

Hossain MZ, Ando H, Unno S, Masuda Y, Kitagawa J. Immunohistochemical and electrophysiological evidence of activity of TRPV1 and TRPM8 in the superior laryngeal nerve innervating the laryngo-pharynx and associated laryngeal regions. 第 10 回三叉神経領域の感覚-運動統合機構研究会. 2016 年.

安藤宏, 増田裕次, 北川純一: 咽頭喉頭領域を支配する上喉頭神経における TRPV1 および TRPM8 チャネルの発現. 歯科基礎医学会学術大会. 2016 年.

〔図書〕(計 1 件)

北川純一, 海野俊平, Hossain MZ, 安藤宏, 増田裕次. S&T 出版. 口・鼻・耳の感覚メカニズムと応用技術(分担執筆: 口腔・咽頭・喉頭領域の感覚). 2018 年. pp. 3-15.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 今村 泰弘

ローマ字氏名: Imamura, Yasuhiro

所属研究機関名: 松本歯科大学

部局名: 歯学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 00339136

研究分担者氏名: 増田 裕次

ローマ字氏名: Masuda, Yuji

所属研究機関名: 松本歯科大学

部局名: 総合歯科医学研究所

職名: 教授

研究者番号(8桁): 20190366

研究分担者氏名: 北川 純一

ローマ字氏名: Kitagawa, Junichi

所属研究機関名: 松本歯科大学

部局名: 歯学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 50373006