

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09889

研究課題名(和文) 声帯上皮における接着分子発現と胃酸逆流による影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of adhesion molecule expression in vocal cord epithelium and the effect of laryngopharyngeal reflux

研究代表者

楯谷 一郎 (Tateya, Ichiro)

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：20526363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胃食道逆流症では、胃酸が食道へ逆流することにより、胸やけなどの不快な自覚症状を感じると共に、音声障害患者の最大50%に胃食道逆流症を認めることが報告されている。上皮組織は外部の刺激から粘膜固有層などの深層組織を保護する機能的バリアを有しており、特にタイト結合が機能的バリアの形成に重要な役割を担っていること、クローディンがタイト結合の接着構造形成を担い、タイト結合の形成に関わる主要なタンパク質であることが知られている。ラットを用いた本研究において、声帯にmRNA発現しているクローディンサブタイプが同定され、胃食道逆流症に起因する音声障害発生機序の一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食生活の変化により、本邦でも胃食道逆流症の患者は増加傾向であり、また音声障害患者の最大50%にGERDを認めることが報告されている。研究者らは声帯上皮の脆弱性がGERDによる音声障害に関与しているのではないかと考え、上皮のバリア機構で重要な役割を担うクローディンに着目し、そのサブタイプを解析した。その結果、声帯にmRNA発現しているクローディンサブタイプが同定され、GERDに起因する音声障害発生機序の一端が明らかとなった。GERDによる音声障害に対する治療法の開発につながる研究成果であり、その学術的意義・社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Gastric acid returns to the esophagus in gastroesophageal reflux disease (GERD), which causes heartburn and other unpleasant subjective symptoms. It has been reported that gastroesophageal reflux disease (GERD) is associated with up to 50% of voice disorders. Epithelial tissues have a functional barrier that protects deep tissues like the mucosal lining from stimuli from outside. Tight junctions are particularly important for the formation of the functional barrier. Additionally, claudin, a major protein, is involved in the formation of tight junctions by playing a role in the formation of tight junction adhesive structures. The current study found the claudin subtype in rats, which is an mRNA expressed in the vocal folds. This provides a potential mechanism for the development of voice disorders caused by gastroesophageal reflux disease.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：声帯 胃食道逆流症 咽喉頭逆流症 タイトジャンクション クローディン

1. 研究開始当初の背景

胃食道逆流症 (Gastro Esophageal Reflux Disease : GERD) では、胃酸が食道へ逆流することにより、胸やけなどの不快な自覚症状を感じる。GERD が耳鼻咽喉科疾患に影響を及ぼすことは以前から欧米で指摘されていたが、本邦でも生活環境の変化や食生活の欧米化などによりその発症が増えてきている。GERD は食道症候群と食道外症候群に分類されているが、食道外症候群では特に音声障害との関連が強く、声帯上皮の角化、潰瘍形成、肉芽形成、粘膜産生低下や、声帯溝症などを来し得ることが報告 (Lechien, et al. J Voice. 2017;31:733-752.) されており、音声障害患者の最大 50% に GERD を認めることが報告されている (Koufman, et al. Otolaryngol Head Neck Surg. 2000;123:385-388)。

上皮組織(図1)は外部の刺激から粘膜固有層などの深層組織を保護するため、機能的バリアを有する。上皮組織の細胞同士はタイト結合、接着結合、デスモソームからなる細胞間結合によって互いに接着し、深層組織と外界を分けているが、特にタイト結合が機能的バリアの形成に重要な役割を担っている。タイト結合は上皮の頂端側に位置し、隣り合う細胞同士を密着させて細胞間をシールして、組織の恒常性を維持・構築している。タイト結合はオクルディン、トリセルリン、クローディンから形成されるが、特にクローディンはタイト結合の接着構造形成を担い、タイト結合の形成に関わる主要なタンパク質であることが知られている。ク

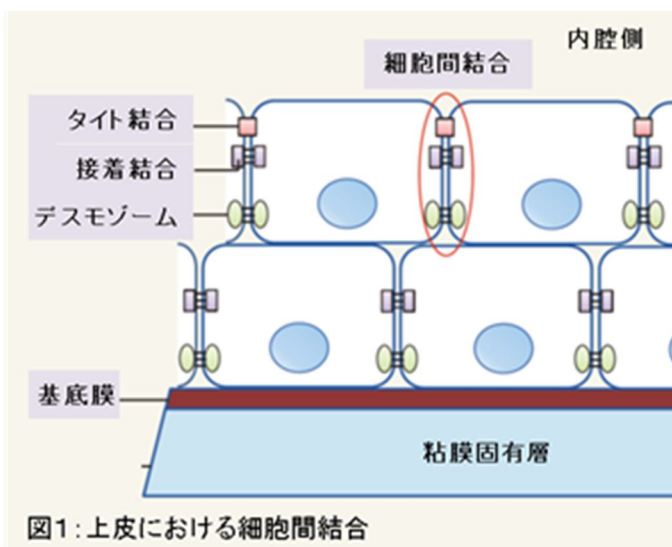


図1: 上皮における細胞間結合

ローディンには 20 以上のサブタイプが存在し、その組み合わせによって、タイト結合の特性が決定されている (Tsukita, et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001;2:285-293.)

声帯は数百 Hz の高周期で振動し音声を発生する組織であり、その表面は重層扁平上皮で覆われている。声帯上皮は喉頭内腔面に接しており、そのバリア構造により胃酸逆流を含む外的刺激から内部組織が守られていると考えられる。声帯上皮におけるタイト結合の存在は電子顕微鏡による研究 (Leydon, et al. Laryngoscope 2014;124:2764-2769.) により報告されているものの、構成タンパクの局在については我々 (Suzuki, et al. Laryngoscope 2018 Apr;128:E150-E156.) がオクルディンの局在を報告している (図2) 他には、クローディンを含め明らかにされていない。

申請者は以前の研究 (Suzuki, et al. Laryngoscope 2018;128:E150-E156.) において、声帯

切除後の上皮化過程における上皮バリア機能の回復過程を解析し、タイト結合の構成タンパクの一つであるオクルディンの発現解析を行った。以前から指摘はされていたもののその機序が不明であった GERD と音声障害との関連についても、同実験系を用いて機能解析を行い、さらにタイト結合の主要構成タンパクであるクローディンの発現パターンを調べれば、声帯上皮におけるバリア機能の解明や GERD から音声障害を生じる機序の一端を明らかにできるのではないかとこの着想に至った。

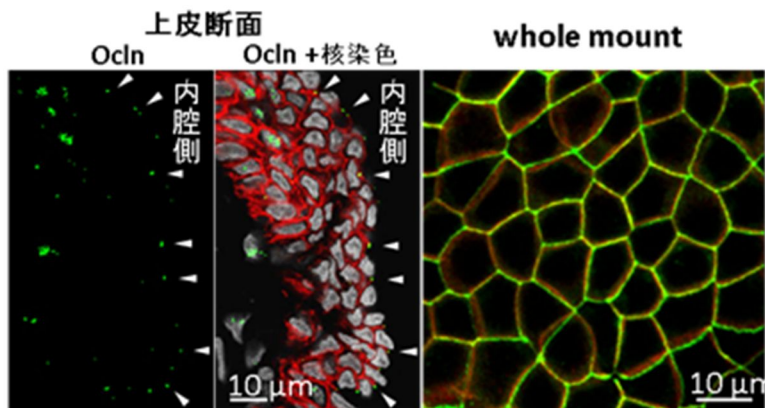


図2: ラット声帯上皮におけるオクルディン(Ocln)の発現

2. 研究の目的

本プロジェクトの最終目的は、正常声帯上皮において発現している接着分子、特にクロードインのサブタイプを同定してその発現部位を明らかにし、さらに胃酸による上皮バリアの傷害とその修復過程をクロードインの発現とバリア機能の両面から解析することで、GERD による音声障害の発生機序を明らかにし、声帯上皮におけるバリア機構を解明することにある。

3. 研究の方法

本研究では、次の2つのプロジェクトを実施した。1) 正常声帯上皮(ラット)においてどのクロードインサブタイプが発現しているか、さらにその局在を明らかにする。2) 声帯傷害後の上皮バリア機能の経時的変化を解析するための実験系を作成する。

1) 声帯上皮で発現しているクロードインサブタイプの同定

モデル動物としてはラットを用いた。人の声帯粘膜固有層は浅層、中間層、深層の3層から形成されていること、声帯の前後に黄斑部が存在していることなどの特徴を有している。ラット声帯は人と同様に3層の粘膜固有層と黄斑を有していること、犬などの大型動物に比べて遺伝情報が得やすいこと、ライフスパンが短いため、イヌ等に比べて相対的に短期間で実験を遂行することが可能であるのがその理由である。

ラット声帯上皮を顕微鏡下に採取し、RT-PCR によって声帯組織で発現しているクロードインサブタイプを同定した。正常のラット摘出喉頭から両側声帯を顕微鏡下に剥離して摘出してRNAを抽出し、cDNA を作製した。ラットクロードインサブタイプのプライマーを必要に応じてデザインし、PCR を行った。サブタイプに応じたコントロール臓器をポジティブコントロールとして電気泳動を行い、声帯上皮に発現するクロードインサブタイプを決定した。

2) ビオチン化試薬を用いた上皮バリア機能の作成

我々の以前の研究(Suzuki, et al. Laryngoscope 2018 ;128: E150-E156.)を元に、上皮バリア機能を解析する実験系を作成した。これはEZ-Link™ Sulfo-NHS-LCbiotin(以下ビオチン)化試薬を声帯に塗布し、ビオチン化試薬が上皮バリアを越えて浸透するか否かを解析することで、上皮バリア機能を機能的に評価するものである。

ビオチン溶液に摘出喉頭を 20 分間浸した後に凍結切片を作製し、蛍光標識したアビジンでラベルして評価し、正常声帯と損傷声帯でのバリア機構を解析した。

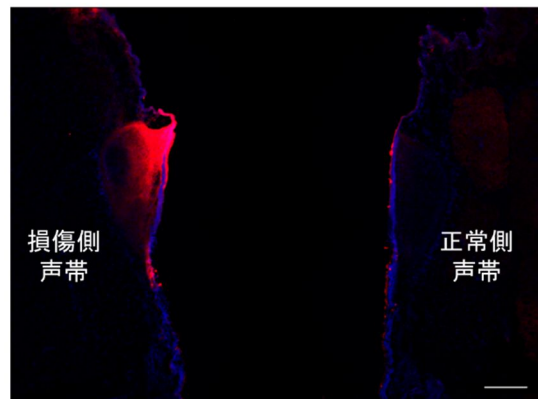
4. 研究成果

ラット正常声帯におけるクロードインサブタイプの mRNA 発現を RT-PCR 法によって解析し、クロードイン 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 17, 22, 23 の発現が確認された。

また、ビオチン化試薬を用いた上皮バリア機能解析モデルでは、正常の喉頭を Ca²⁺ 溶液を用いて処理したものはビオチンは上皮で防がれていた一方、正常喉頭を Ca キレート剤で処理したものと、損傷直後の喉頭を Ca²⁺ 溶液を用いて処理したものでは、ビオチンは上皮を越えて粘膜固有層まで浸透していた。Ca キレート処理によってバリア機能が破綻したのは、Ca 依存性に構造維持されるアドヘレンスジャンクションが破綻し、タイトジャンクションも同時に破綻したためと考えられた。以上の結果から、正常声帯ではタイトジャンクションによってビオチンの粘膜内への浸透が防がれており、声帯損傷によってタイトジャンクションが破綻し、ビオチンが粘膜内へ浸透することが推察された。

クロードインは臓器特異的に各サブタイプが発現しており、バリア機能を持つもの、チャネルを形成して透過性を与えるもの、サイズ選択的に分子輸送に関わるものなどが存在している。今回の研究で mRNA 発現が確認されたサブタイプのうち、クロードイン-1、-3、-4、-5、-8、-11 はバリア機能に関与することが知られており、また-7、-10、-17 はイオンチャンネル構成分子として関与することが知られている。発声の際、例えばヒトでは声帯が毎秒百回以上の規則的な粘膜振動を起こすことが知られており、声帯粘膜には振動に耐えうる構造が必要である。また、外界からの微生物や異物に絶えず曝されており、角質層のない声帯上皮はバリア機能がより重要な役割を果たしている。声帯においては、クロードイン-1、-3、-4、-5、-8、-11 がこれらのバ

図3



損傷側
声帯

正常側
声帯

リア機能を果たしていることが推察された。一方、酸バリアとして働くとされているクロードイン-18の発現は声帯上皮に認めなかった。胃食道逆流症による嘔声には、クロードイン-18がないことの脆弱性が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	楯谷 智子 (TATEYA TOMOKO) (10512311)	京都先端科学大学・健康医療学部・教授 (34303)	
研究分担者	樋渡 直 (HIWATASHI NAO) (10808778)	京都大学・医学研究科・客員研究員 (14301)	
研究分担者	岸本 曜 (KISHIMOTO YO) (80700517)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	勝野 達也 (KATSUNO TATSUYA) (90527665)	京都大学・医学研究科・研究員 (14301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	鈴木 良 (SUZUKI RYO)	京都大学・医学研究科・客員研究員 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------