

機関番号：15101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592017

研究課題名(和文) 咽喉頭における温度受容の組織学的検討

研究課題名(英文) histological investigation of thermosensitivity in the laryngopharynx.

研究代表者

三宅 成智 (MIYAKE NARITOMO)

鳥取大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60464278

研究成果の概要(和文)：

咽喉頭における温度受容の詳細は明らかとなっていない。本研究は、カプサイシン受容体(VR1; vanilloid receptor type 1)を代表とする TRP(transient receptor potential)ファミリーの受容体がこれに関与しているのではと発想し、その VR1、PV5、PM8 について、ラットの後根神経節、三叉神経で免疫染色を行い、分布を調べた。ラットの後根神経節や三叉神経における免疫染色で VR1 や TRPM 陽性神経細胞が存在した。

研究成果の概要(英文)：

It is not investigated in detail about thermosensitivity of laryngopharynx. We guess transient receptor potential (TRP) family receptors have an intimate involvement in thermosensitivity of laryngopharynx. Most famous receptor is vanilloid receptor type 1(VR1) that is known as capsaicin receptor.

We use immunostaining method with VR1, PV5 and PM8 in dorsal root ganglion and trigeminal nerve of Rat. We found VR1 and TRPM positive neuron cell in dorsal root ganglion and trigeminal nerve.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：温度受容、免疫染色、VR1、TRPM8、TRPM5

1. 研究開始当初の背景

生物は極端な高温・低温下ではその温度感覚に加えて痛みを感じるとさ

れる、咽喉頭の温度感覚を考察することは、咽喉頭の機能や疾患を考える上では非常に重要と考えられる。例えば

放射線治療後など、感覚低下を来した患者では感覚低下を理由に嚥下障害が起きる。このリハビリテーションの一環に、アイシングや温度を利用したものもあるが、咽喉頭における温度受容の詳細は明らかとなっていない。

温度受容が主として末梢感覚神経もしくは中枢神経で行われていることは容易に想像できるが、どのようなメカニズムで起こっているかは長い間謎であった。近年、末梢感覚神経に特異的に発現する温度受容体遺伝子がクローニングされ、それらが同じ TRP スーパーファミリーに属するイオンチャネルであることが判明して注目を浴びている。

最初に発見され、最も先行する研究が多いのが、所謂カプサイシン受容体で、vanillidreceptor subtype 1 (VR1) と命名された。現在では、他の 5 つのサブタイプとともに TRP サブファミリー TRPV を形成するために、TRPV1 と分類されている。

TRPV1 は後根神経節の小径の細胞（おそらく無髄の C 線維の細胞体）に発現することが、遺伝子レベル、蛋白質レベルで確認されており、痛みや熱がポリモーダル受容器と呼ばれる C 線維で受容され伝達されるとする概念に一致する。

TRP(transient receptor potential) ファミリーの受容体のうち、VR-1 は先行研究が多く、TRP ファミリーに

関連する研究の基礎となるものである。同じ頭頸部領域については、TRPV-5 は内耳での報告がある。また、TRPM8 については三叉神経節(TG)で発現しているという先行研究がある。

咽喉頭における温度受容のメカニズムについては、現在のところ詳細にわかっていない。

2. 研究の目的

咽喉頭の温度受容機構を明らかにすることで、嚥下障害や咽頭アレルギーの病因や治療法についての考察が行えるかもしれない。また、頭頸部領域で患者数が非常に多いが病態の明らかでない病気に咽頭異常感症がある。逆流性食道炎や咽頭逆流の症状と考えられることもあるが、患者により痛みやかゆみ、温熱感などを訴えることもある。咽喉頭の温度受容がこれらに関与している可能性がある。

極端に熱いもの、極端に冷たいものに触れたとき人間は痛みを感じる。すなわち、咽喉頭における温度受容を詳細に検討することで、咽頭の痛みについても検討できるかもしれない。また、放射線治療や化学療法ではその感覚障害が非常に問題となるが、温度受容を調べることにより、放射線障害や化学療法後のリハビリテーションに際して有用な方法を検討できるかもしれない。

今回我々は、カプサイシン受容体(VR1; vanilloid receptor type 1)を代表とする TRP(transient receptor potential)ファミリーの受容体が咽頭の温度受容機構に大きく

関与しているのではと発想し、TRPファミリー、特に低温 (TRPM8) と高温 (VR-1) の温度受容を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

まず後根神経節における VR1 や TRPM 陽性神経細胞の存在や密度分布について、免疫組織化学的な解明を行う。同様に、咽喉頭粘膜および神経節 (三叉, 舌咽, 迷走神経節) において、VR1 や TRPM 陽性神経細胞の関与する神経線維があるか、密度分布はどうかといった命題につき免疫染色で明らかとする。また咽喉頭に VR1 や TRPM 陽性神経が存在すれば、逆行性トレーサーを使用し同部の所属神経節の多重染色を行い VR1 や TRPM の咽喉頭における神経ネットワーク関与について検討する。

Wistar Rat を安楽死した後、経心的に還流・固定する。咽喉頭領域の粘膜組織および後根神経節や三叉神経を採取する。

15% sucrose 液で数日間、脱ホルマリン化した後、クライオスタットで 20 μ m の切片作成を行う。これに VR1 および TRPM 抗体での免疫染色を施行する。手法は下記の通りである。

①抗原賦活化 (0.1% Trypsin 溶液 (or Papain 溶液) 10分)

②1次抗体 (2日~4日)

- ・ VR-1
- ・ TRPV-5 (R-17)
- ・ TRPV-5 (P-15)
- ・ TRPM8

③2次抗体 (2時間)

④ABC液 (1時間)

⑤DAB-N液で発色

これを詳細に検討し、各粘膜組織および神経節における陽性神経線維および神経節細胞の同定と、分布を明らかにし、VR1 や TRPM のネットワークを検討する。

4. 研究成果

Wistar Ratの後根神経節と三叉神経節における免疫染色を行った。

VR1は、後根神経節と三叉神経節のいずれでも染色され、存在が明らかであった (1st Ab: VR1 (1/1000), 2nd Ab: anti-Rabbit IgG (1/1000)).

TRPM8は、後根神経節で染色された (1st Ab: TRPM8 (1/125), 2nd Ab: anti-Rabbit IgG (1/1000)).

しかし、三叉神経節では染色されなかった。先行する文献では、TGの神経細胞のうち、30%程度が染色されているという報告があったため、濃度を変えるなど条件を変えて行っているが染色が得られなかったため、改めて濃度条件を初め、還流固定から見直し実験を再度行っている。

TRPV 5 (R-17) は、三叉神経節1枝, 2枝, 3枝領域いずれも染色された (1st Ab: TRPV-5(R-17) (1/250), 2nd Ab: anti-Goat IgG (1/1000)). しかし、後根神経節では染色されなかった。

抗体試薬を変えて、TRPV 5 (R-15) でも同様に染色を行った。三叉神経節1枝, 2枝, 3枝領域いずれも染色された (1st Ab: TRPV-5(R-15) (1/250), 2nd Ab: anti-Goat IgG (1/1000)). しかし、後根神経節ではこの抗体でも染色されなかった。

今回、TRPV-5は三叉神経節で染色された。蒐集し得た文献では過去に報告はない。

TRPM5は味蕾細胞に発現し、味覚の温度依存性に関わることが明らかになっている。今回示された、三叉神経での発現にどのような意義があるか、今後も実験を続け考察を深めたいと考えている。

咽喉頭粘膜においても、VR1やTRPM8陽性神経細胞が見られないかを調べたが、現時点では存在が明らかにされなかった。神経細胞での発現とその染色の観察から考察すると、神経終末ひいては咽喉頭の粘膜での染色は、非常に高い実験精度が要求されるものと考えてる。

今後、引き続き染色条件を変えていながら、咽喉頭粘膜におけるVR1, TRPM8陽性細胞の有無とその神経機構について、免疫組織学的な手法で明らかにしていく予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

第 112 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演
2011 年 5 月 19 日 国立京都国際会館(京都)

発表者：三宅 成智、河本 勝之、北野 博也

演題名：三叉神経節、後根神経節における

TRP チャネルの免疫組織学的検討

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 成智 (MIYAKE NARITOMO)

鳥取大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60464278

(2) 研究分担者

河本 勝之 (KAWAMOTO KATSUYUKI)

研究者番号：50304217

鳥取大学・医学部・助教

北野 博也 (KITANO HIROYA)

研究者番号：20153108

鳥取大学・医学部・教授

(3) 連携研究者

なし