

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390463

研究課題名（和文） 喉頭神経制御機構の解明とその障害への対応に関する総合的研究

研究課題名（英文） Systematical investigations on the neurological control and its disorder of the larynx

研究代表者

久 育男（HISA YASUO）

京都市立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：50181087

研究成果の概要（和文）：喉頭の神経制御機構とその障害における現状での重要課題として考えられた、脳幹発声領域、嚥下関連ニューロンの投射経路、マウス喉頭におけるアクアポリン発現とその制御、脳幹神経細胞における TDP-43 の異常局在の機序について、現時点で考えられる手法を駆使して解明した。

研究成果の概要（英文）：Important subjects on the neurological control and its disorder were clarified with present highest manners. Clarified matters were as follows ; brainstem vocalization area, axonal projections of medullary swallowing neurons, regulation of aquaporins in the larynx and transient redistribution of TDP-43 in brainstem motor neurons after axonal ligation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

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：喉頭 神経機構 嚥下 発声 アクアポリン TDP-43

1. 研究開始当初の背景

喉頭は、系統発生的には気道防御のために発生したが、進化によって発声器官としての機能も有するようになった。また、ヒトにおいては直立歩行に伴う喉頭下垂のため、嚥下運動における喉頭の存在が極めて重要となった。その結果、喉頭機能における神経制御は複雑なものとなり、その障害は嚥下、呼吸といった生命の維持に関わる基本的な機能が損なわれるばかりでなく、社会生活を営むうえで必要不可欠な発声にも多大な影響

を及ぼす。本研究の目的は、基礎系研究機関の有機的な協力を得ることによって、喉頭の神経制御機構に関する現在における重要な問題点を体系的に解明することにある。

2. 研究の目的

(1) マウス喉頭におけるアクアポリン発現とその制御の解明

喉頭の重要な機能として、発声、呼吸、嚥下などが挙げられるが、これらの機能を保持するためには喉頭粘膜が湿潤に保たれてい

る必要がある。また、気道防御の観点からも粘膜の乾燥は気道感染を引き起こすため臨床で大きな問題となる。喉頭腺による粘液分泌は喉頭粘膜の湿潤維持に重要な役割を担っている。喉頭腺分泌の低下及び過多はこれら喉頭の機能に障害をもたらし、様々な症状を呈する。一方で近年、声帯粘膜自体に水分の透過性があり、発声などの機能維持に関与しているとの報告がある。このような腺分泌や粘膜の水分透過性には様々な分子が関与しているが、その機能分担について詳細は明らかになっておらず、今後の研究の発展が期待されている。本研究において我々は水分子チャンネル・アクアポリンに着目し、喉頭における発現を解析し、喉頭分泌および声帯粘膜の保湿における役割について検討を行った。アクアポリンは細胞膜に存在し、水分子を選択的に透過させるチャンネルである。これまでに哺乳類では Aqp1 から 13 までが同定されている。生体内での機能としては主に腎臓における再吸収や気道、唾液分泌などが知られている。またアクアポリン 4 は脳浮腫などに影響するとも報告されている。気道においてこれまで Aqp1 から 5 の発現が報告されており、気道分泌、水の吸収などに関与しているとされている。しかし喉頭領域におけるアクアポリンの発現や役割については一部のサブタイプについて羊などの動物を用いた実験で若干の報告があるものの、解明されていない部分が多い。我々は喉頭・気管の浮腫及び分泌、粘膜の保湿にアクアポリンが関与していると考えており、喉頭におけるアクアポリンの分布とその発現制御を解明することで、喉頭分泌における役割を解明するための基礎データを構築することを目的に本実験を開始した。喉頭分布と迷走神経による支配の仕組みを解明することで喉頭・気管疾患の制御に結びつけることができると考えている。

(2) 脳幹発声領域の解明

脳幹は発声運動の生成及び制御に重要な役割を担っている。特に中脳中心灰白質は発声のゲートと呼ばれ、中脳中心灰白質の刺激により発声運動が誘発される。その神経ネットワークとしては、中脳中心灰白質から後疑核への投射、さらに喉頭運動ニューロンへの投射が主要な経路とされている。これまで発声のメカニズムについて様々な検討がなされてきたが、その多くはサルやネコなどの大動物が用いられてきた。しかし、近年そうした動物の使用が困難になってきており、小動物による実験系の確立が求められている。本研究の目的は脳幹における発声メカニズムの解析にモルモットを代用することが出来ることを示すことである。

(3) 嚥下関連ニューロンの投射経路の解明

嚥下は時間的空間的に非常に高い再現性

をもって駆動される運動であり、その運動は脳幹のパターンジェネレータが生成、制御している。嚥下パターンジェネレータは主に延髄に存在するとされ、これまでその神経ネットワークの解析が試みられてきた。しかし、組織学的解析、あるいは電気生理学的解析のみでは嚥下に特化した神経ネットワークを解明することは出来ない。本研究の目的は嚥下運動に関連したニューロンの投射を直接見ることによってその神経ネットワークの一部を明らかにすることである。

(4) 脳幹神経細胞における TDP-43 の異常局在の機序

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に出現する細胞質内封入体の主要構成タンパクは長らく不明であったが最近 TAR DNA binding protein 43 (TDP-43) という核内タンパクであることが同定された。TDP-43 の細胞質への異常局在、ユビキチン封入体と共存、異常リン酸化などが ALS の病態に関与していると考えられている。現在 TDP-43 の核外脱出や細胞質内封入体は ALS の病理学的特徴となっているが、その機序や意義は不明である。軸索流障害が ALS の病態に関与するとの報告があり、純粋な運動神経である舌下神経を用いて TDP-43 の異常局在の機序について検討した。

3. 研究の方法

(1) マウス喉頭におけるアクアポリン発現とその制御の解明

動物は 8-10 週齢の雄 C57BL/6 マウスを使用した (加齢モデルについては 50 週齢の個体を使用)。ペントバルビタールによる深麻酔下に 4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定を行い、喉頭を摘出、16 時間の後固定後を行った。15 μ m 厚の凍結切片を作成し、免疫組織化学法に供した。一次抗体として抗アクアポリン 1-9 抗体、2 次抗体として FITC を使用した。一次抗体反応は 4°C にて 3 日間行った。二次抗体反応は室温にて 1 時間反応させた。封入した切片は共焦点 LASER 顕微鏡にて同条件で観察、記録した。迷走神経切断実験は同じくペントバルビタール投与による深麻酔下に右迷走神経を頸静脈孔直下で切断し、同様の方法で灌流固定した後に喉頭を摘出した。迷走神経節断後の生存期間は 1 週間-4 週間とした。各実験を n=3-5 で行った。

(2) 脳幹発声領域の解明

ウレタン麻酔下のモルモットを用い、発声モニターとして甲状披裂筋、甲状輪状筋、外腹斜筋、横隔膜に電極を留置し筋電図を記録、マイクを設置し音声を記録した。中脳中心灰白質から系統的に脳幹に電極を刺入し電気刺激を行い、発声の有無、刺激閾値について記録した。また、ガラス電極にグルタミン酸アゴニストである D, L-homocysteic acid (DLH) 及び GABA アンタゴニストである

Bicuculline methiodide (BIC) をそれぞれ満たし、電気刺激にて発声が誘発される部位に化学刺激を行った。実験終了後摘出した脳幹組織をホルマリン固定し連続切片を作製、実験中に通電によりマーキングした部位を基準に組織の再構成を行い、刺激部位の同定を行った。また、ウレタン麻酔下のモルモットを使用し、上述の如く筋電図電極を留置した状態に加え、上喉頭神経外枝、腹筋神経、横隔神経に電極を留置し、中脳中心灰白質の電気刺激により発声を誘発した。その後、筋弛緩剤を投与し、人工呼吸管理を行った状態で同部位を電気刺激し、その際の神経電図を記録した。

(3) 嚙下関連ニューロンの投射経路の解明

非動化モルモットを用い、嚙下の誘発のために上喉頭神経内枝に、嚙下のモニターのために舌下神経甲状舌骨筋枝、迷走神経咽頭枝、反回神経、横隔神経に電極を留置した。上喉頭神経内枝を電気刺激し、嚙下を誘発、その際の神経活動を順行性トレーサーを含むガラス微小電極で記録した。上喉頭神経刺激により誘発された嚙下に対応して発火頻度が変化するニューロンを嚙下関連ニューロンと定義し、孤束核から網様体を経て疑核に至る領域の嚙下関連ニューロンを記録した。記録後、神経細胞に電気泳動にてトレーサーを注入し、実験終了後連続切片を作製、免疫染色にて細胞形態、及び軸索走行や投射先を解析した。

(4) 脳幹神経細胞における TDP-43 の異常局在の機序

実験には成体 C57B1/6 マウスを用いた。イソフルレンによる深麻酔下に頸部正中切開し右舌下神経を露出、6-0 絹糸にて結紮した。術後 1, 5, 7, 14, 28 日の生存期間をおいた後、灌流固定し舌下神経核を含む脳幹延髄を 20 μ m に薄切し TDP-43, importin β , ChAT 抗体を用いて免疫組織化学法を行った。また TDP-43 と ChAT、TDP-43 と importin β の 2 重染色も Alexa488, 594 を 2 次抗体に使用し行った。染色細胞数を顕微鏡下に計測した。次に術後 0, 7 日の脳幹延髄を 10 μ m に薄切し Laser capture microdissection にて左右の舌下神経核神経細胞を単離した。Picopure RNA isolation kit (Arcturus) を用いて total RNA を抽出し、PrimeScript RT reagent Kit (Takara) を用いて cDNA に逆転写した。内部コントロールとして actin を用いた。インターカレーター法にて TDP-43, importin β , actin のプライマーペアを用いてリアルタイム PCR を行った。さらに術後 7 日の正常側をコントロールとし結紮側の舌下神経核細胞内の TDP-43 mRNA 発現を観察するために in situ hybridization を行った。RNA プローブ合成には pcDNA3 ベク

ターの T7 と SP6 プロモーター間に TDP-43 の 580bp 断片を挿入し、マウス TDP-43 プライマーペアを使用した。プラスミドはアンチセンスプローブには BamHI を、センスプローブには XhoI を用いて直鎖化した。アンチセンスプローブには SP6RNA ポリメラーゼ、センスプローブには T7RNA ポリメラーゼを使用し DIG ラベルされたプローブを作成した。NBT と BCIP による酵素抗体法にて発色させた。次にヒト神経芽細胞腫の cell line である SHSY-5Y 細胞で siRNA を用いて importin β をノックダウンした。FuGene を用いて蛍光標識した TDP-43EGFP を transfection し、Hoechst33342 でカウンターステイン後に共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。次に、結紮側、正常側の舌下神経を採取し、組織溶解液に SDS サンプルバッファーを加え 95°C で 5 分変性させた。10~20% ポリアクリルアミドゲル、PVDF 膜を使用した。抗 TDP-43, importin β , actin, GAPDH 抗体を用いて各々のタンパク発現量を、抗 LC3 抗体を用いてオートファゴソームの形成を調べるためウエスタンブロット法を行った。Enhanced chemiluminescence detection kit (West Pico) を用いて可視化し、濃度分析を Image J ソフトウェアを用いて定量した。また、舌下神経核を含む脳幹延髄組織のミクロソーム分画を採取し TDP-43, LC3, calnexin 抗体を用いて発現量を調べた。

4. 研究成果

(1) マウス喉頭におけるアクアポリン発現とその制御の解明

a. 声帯粘膜におけるアクアポリン発現

声帯粘膜には AQP1, 4 および 5 の発現が認められた。AQP1 は膜様部全長にわたって粘膜下層の線維芽細胞を中心に発現していた。AQP4 は前交連を中心に声帯前方部を中心に上皮の基底側に発現していた。発現は声帯後方に向かって徐々に減弱し、声帯膜様部後方ではわずかな発現を認めるのみであった。AQP5 は声帯膜様部全長の上皮管腔側に発現を認めた。他のサブタイプについては声帯粘膜には発現していなかった。AQP1 と AQP5 は気道上皮の水透過性に重要であるとされ、声帯粘膜においても同様の機能を担っていると推測される。

b. 声帯突起における発現低下

声帯膜様部においてはこれらの AQP1, 4 および 5 の発現は認められず、同部位における水分透過性が機能していないことが示唆された。

c. 声門下、声門上および気管上皮における発現

気道の偽重層（多列線毛）上皮における発現は声帯粘膜と類似しており、AQP1 は粘膜下層の線維芽細胞、AQP4 は気道上皮基底層、

AQP5 は気道上皮の管腔側に発現を認めた。AQP5 は線毛上皮には発現せず、非線毛上皮にのみ発現していた。

d. 粘膜下腺における発現

喉頭粘膜下腺において AQP2, 3, 5, 6, 7, 8 の発現が認められた (AQP9 は喉頭のいずれの部位にも発現を認めなかった)。いずれのサブタイプも声門上部、喉頭室、声門下に分布する粘膜下腺のすべてに発現を認めている。またいずれも粘膜下腺の管腔側に発現していた。

e. 迷走神経切断によるアクアポリン発現の変化

右迷走神経切断後の喉頭アクアポリン発現を同様に免疫組織化学法にて調べた。切断直後、1 週間後および 2 週間後では左右差が認められなかったが、3 週間後、4 週間後の個体では声門下喉頭腺 AQP5 の発現に切断側と非切断側において差が認められた。すなわち切断側 (右) の粘膜下腺では非切断側 (左) に比較して明らかにアクアポリンの発現は減弱していた。これは粘膜下腺に発現する AQP2 以外の他のアクアポリンについても同様の結果であった。一方で声帯上皮および呼吸上皮における発現には左右差が認められなかった。この結果は粘膜下腺のアクアポリンは副交感神経の活動に依存することが示された。粘膜下腺の AQP5 は副交感神経活動による気道分泌に関与していることが知られている。喉頭粘膜下腺のアクアポリンは主に副交感刺激による喉頭分泌に関与しているのではないかと考察した。一方で声帯上皮のアクアポリンは副交感神経活動には依存していないことから、副交感神経活動と関係なく気道の湿潤に関与しているのではないかと考えている。

f. 加齢によるアクアポリン発現の低下

50 週齢のマウスにおいて粘膜下腺のアクアポリン発現 (AQP3, 5 および 8) が顕著に低下していることが示された。一方で声帯粘膜、気道上皮のアクアポリン発現は低下していなかった。加齢に伴う嗄声発症の原因として声帯の構造的な変化を指摘する報告がなされているが、喉頭腺におけるアクアポリン発現の低下による粘膜の湿潤維持の低下が関係している可能性もあると考えている。

本研究において喉頭粘膜の湿潤維持に喉頭粘膜および喉頭腺のアクアポリンが重要な役割を担っている可能性が示唆された。また加齢に伴う喉頭腺アクアポリン発現の低下は嗄声のみでなく気道防御の維持にも影響をもたらしている可能性も考えられる。今後この研究を進展させることで、喉頭疾患の病態病理解明につなげることを目指している。

(2) 脳幹発声領域の解明

電気刺激による発声領域は中脳中心灰白質

から背外側被蓋、橋腹側の網様体、延髄の腹側を通り疑核レベルまで連続して観測された。一方化学刺激による発声領域は中脳中心灰白質、傍腕核近傍、橋背側網様体で観測された。これらの結果はネコ、サルで観測された発声領域と類似しており、発声メカニズムの類似性を示唆する結果となった。

また、中脳中心灰白質の電気刺激を行い、音声及び甲状輪状筋、外腹斜筋、横隔膜の筋電図記録により発声運動を確認し、その状態で非動化し同部位の刺激を行ったところ、上喉頭神経外枝、腹筋神経、横隔神経の活動パターンは対応する筋活動パターンと同様であった。この結果により発声の非動化モデルがモルモットでも確立された。

以上の結果により、モルモットを用いた発声メカニズムはネコやサルと類似したものであり、非動化モデルを用いた神経ネットワークの解析が先行研究に基づいて発展出来る可能性を示した。

(3) 嚥下関連ニューロンの投射経路の解明
嚥下関連ニューロンは孤束核とその周囲の網様体だけでなく、より腹側の網様体に広く分布していた。その発火パターンは咽頭期に活動するニューロン、食道期に活動するニューロン、嚥下中に抑制されるニューロンに分類されたが、それぞれ延髄内に広範に分布していた。その投射経路は多様であったが、主に孤束核内の接続、孤束核から網様体への投射、対側網様体への投射、疑核等の運動核への投射が見られた。つまり、従来 孤束核とその周囲の網様体、疑核とその周囲の網様体で構成される嚥下ニューロングループが嚥下のリズム形成とその制御に重要な役割を担っていると提唱されてきたが、さらに複雑で延髄に広範囲に広がる嚥下関連ニューロンが嚥下の生成、制御に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

本研究結果は嚥下を生成、制御する神経ネットワークの一部を明らかにしたに過ぎないが、その多様性から従来考えられてきたものよりさらに複雑で広範囲に渡る神経ネットワークが嚥下運動を生成、制御している可能性が予想され、今後、嚥下パターンジェネレータの解析に一石を投じることを期待するものである。

(4) 脳幹神経細胞における TDP-43 の異常局在の機序

術後 7~14 日で著しく結紮側舌下神経核細胞の TDP-43 核染色性低下と ChAT 染色性低下を認めた。術後 14 日の核 TDP-43 陽性ニューロンをニッスル陽性ニューロンで割った割合は正常側 49%に対して結紮側では 9.7%であった。この TDP-43 の核染色性低下は ChAT の染色性低下と相関していた。さらに 28 日目では ChAT の染色性は正常側と比べ 80%の回復を認め、2 重染色では

ChAT 陽性ニューロンにおいて TDP-43 の核染色も回復していた。このことより TDP-43 核染色性変化はコリン作動性神経の機能回復を反映していると考えられる。リアルタイム PCR にてコントロール側と比べて TDP-43 mRNA 量は有意差がなかった。また in situ hybridization にてもコントロール側との有意差は認めなかった。このことより TDP-43 の核外脱出は転写抑制によるものではなく翻訳後の現象であると考えられた。importin β は免疫組織化学法にて術後 7 日目に結紮側での細胞質染色性が低下し、28 日目には染色性の回復を認めた。リアルタイム PCR にて術後 7 日の結紮側での mRNA 量の減少傾向を認めた。ヒト神経芽細胞腫の cell line である SHSY-5Y 細胞で siRNA を用いて importin β をノックダウンさせると TDP-43EGFP の核内移行が妨げられた。このことより TDP-43 の核内輸送に importin β が関与しており、軸索損傷にて核細胞質輸送障害が起ることによって TDP-43 の核内輸送が障害されると考えられる。ウエスタンブロット法により術後 2, 7, 28 日の末梢神経での TDP-43 と importin β の発現を調べた所、術後 7 日に結紮神経中枢側でコントロール側の約 5.29 倍の TDP-43 の著明な蓄積を認めた。importin β はリアルタイム PCR で mRNA は減少傾向にあったにもかかわらず、コントロール側の約 1.34 倍の軽度蓄積を認めたが、術後 28 日にはいずれも正常化していた。また脳幹延髄のミクロソーム分画に TDP-43 は存在した。結紮神経でのウエスタンブロット法にて結紮側で明らかに LC3-II の発現低下を認めた。このことより TDP-43 は核タンパクであるにも関わらず軸索輸送され、オートファジーの機能障害によって末梢に蓄積したと考えられる。ALS で高頻度に障害を受ける純粋な運動神経である舌下神経を結紮し、TDP-43 が運動ニューロンの軸索結紮によって核外脱出し、TDP-43 の核内局在は ChAT の発現と相関することを発見した。さらに TDP-43 は軸索結紮で末梢に蓄積することを明らかにした。その背景機序として軸索結紮による運動ニューロン内の importin β の発現の低下と、結紮部位におけるオートファゴソームの形成障害があると考えられた。以上のことより軸索流障害によって軸索のオートファジーが障害され TDP-43 の分解が抑制、また importin β の発現が抑制された結果 TDP-43 が核外脱出したと考えられた。本研究結果は、TDP-43 の異所性局在が軸索流障害に続いて二次的に生じ、一過性の異所性局在は神経再支配に影響を与えないことを初めて in vivo で証明するものである。さらに本研究結果は ALS の病態解明や治療法の発見において非常に重要な意味を持ち、TDP-43 との関連の報告がある前頭側頭葉変性症などの他

の神経変性疾患の病態機序の解明にも役立つ可能性がある。

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 4 件)

- ① Ahmed Mel-R, Bando H, Hirota R, Sakaguchi H, Koike S, El-Adawy AA, Kotby MN, Hisa Y. Localization and regulation of aquaporins in the murine larynx. *Acta Otolaryngol*, 査読有, 2012 Apr;132(4):439-46. Epub 2012 Jan 11.
- ② Sugiyama Y, Shiba K, Nakazawa K, Suzuki T, Umezaki T, Ezure K, Abo N, Yoshihara T, Hisa Y. Axonal projections of medullary swallowing neurons in guinea pigs. *J Comp Neurol*, 査読有, 519(11):2193-2211, 2011. 8.
- ③ Sugiyama Y, Shiba K, Nakazawa K, Suzuki T, Hisa Y. Brainstem vocalization area in guinea pigs. *Neurosci Res*, 査読有, 66(4): 359-365, 2010. 4.
- ④ Sato T, Takeuchi S, Saito A, Ding W, Bamba H, Matsuura H, Hisa Y, Tooyama I, Urushitani M. Axonal ligation induces transient redistribution of TDP-43 in brainstem motor neurons. *Neuroscience*, 査読有, 164(4): 1565-1578, 2009. 12.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Hisa Y. Localization of aquaporins in the murine larynx (poster). *Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum*. 2011 Sep 7; Bruges, Belgium.
- ② Hisa Y. Developments in Basic Neurolaryngology. Panel Discussion: Neurolaryngology. 12th Asia-Oceania ORL-HNS Congress. 2011 Mar 3; Auckland, New Zealand.
- ③ Hisa Y, Sugiyama Y, Shiba K. Vocal sites in guinea pig brainstem (poster). *Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum*. 2010 Aug 25; Budapest, Hungary.
- ④ Bando H, Ahmed ME, Nabieh AA, Nishio T, Hirota R, Kotby MN, Hisa Y. Aquaporins expression in the murine larynx (poster). *The 7th East Asian Conference on Phonosurgery*. 2010 Nov 26; Tokyo, Japan.
- ⑤ Hisa Y. Recent advances in basic neurolaryngology. Panel Discussion

102. Neural mechanism of phonation.
Voice 2010 The 4th World Voice Congress.
2010 Sep 9; Seoul, Korea.

- ⑥ Sugiyama Y, Suzuki T, Nakazawa K, Shiba K, Hisa Y. Brainstem vocalization regions in guinea pigs (poster). European Neuroscience. 2010 Jul 7 ; Amsterdam, The Netherlands.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久 育男 (HISA YASUO)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号 : 50181087

(2) 研究分担者

島田 剛敏 (SHIMADA TAKETOSHI)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号 : 302752

中野 宏 (NAKANO HIROSHI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号 : 00405309

(3) 連携研究者

なし

()

研究者番号 :