

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791798

研究課題名(和文) 喉頭、気管ケミカルメディエーター受容体発現の日内変動の解析

研究課題名(英文) Circadian expression of receptors associated with chemical mediators in larynx and trachea

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ブラジキニン は代表的な発痛物質であると同時に浮腫の形成に関与していることが知られている。本研究においてラット喉頭における疼痛受容体の発現を免疫組織化学法およびreal-time PCRを用いて解析した結果、喉頭上皮および粘膜下末梢神経、節状神経節にB1およびB2受容体の発現を認めた。mRNAレベルで発現の昼夜差は認められたものの、統計学的に有意差は認められなかった。現在加齢に伴う発現の低下について検討を行っており、気道防御機構の加齢に伴う低下の原因究明につながる可能性があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Laryngeal symptom such as cough and hoarseness show difference between day and night. Bradykinin is known both as an inflammatory mediator and pain producing substance. It is also known as bradykinin mediate the dry cough in the patients on ACE inhibitor. Bradykinin receptor has two subtypes, B1 and B2 receptors. The distribution of Bradykinin receptors in the larynx has not been reported so far. We conducted a study for revealing the distribution of Bradykinin receptors in the larynx and the circadian change of them. Both B1 and B2 receptor are distributed in the superficial layer of the ciliated epithelium. Expression was very weak in the squamous epithelium of the vocal folds. Both B1 and B2 was distributed also in the sensory system of the larynx especially in the nodose ganglion and submucosal sensory fibers. As far as we studied, circadian change of Bradykinin expression was not observed in the rat larynx.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：ブラジキニン受容体 喉頭

1. 研究開始当初の背景

喉頭を含む気道疾患において咳嗽、喀痰、気道浮腫などの症状の制御は重要である。また、これらの症状の発現に昼夜差があることはよく知られている。夜間の咳嗽など症状増悪は患者の QOL を著しく下げただけでなく、呼吸困難を引き起こし、生命を脅かす危険性を有する。気管支喘息患者において末梢気道内径の日内変動が症状の増悪に関与していることは以前より指摘されているが、喉頭、気管疾患症状の昼夜差についてはこれまで原因が明らかにされていなかった。我々はこれまでにマウスを用いた実験によって喉頭、気管上皮、粘膜下腺に時計遺伝子が発現しており、ムスカリン性アセチルコリン受容体を介してムチン分泌の昼夜差をもたらしている可能性があることを報告している。しかし、咳嗽や喘鳴などの昼夜差は粘膜下腺分泌の昼夜差のみでは十分な説明がつかず、喉頭粘膜の過敏性や腫脹などにも昼夜差が存在することが考えられる。気管支喘息患者における気道径の日内変動は主に迷走神経の支配下にある気管支平滑筋の収縮の変動に起因する。一方、喉頭、気管など軟骨による枠組みを持つ中枢側の気道では平滑筋による気道内径の変動は少なく、粘膜の厚みが気道径を左右することになる。粘膜の腫脹にはケミカルメディエーターによってもたらされる血管透過性の亢進が強く関与している。また、咳嗽は喉頭、気管粘膜の感覚、侵害受容と関連しており、誤嚥性肺炎の防止にも関連する。

2. 研究の目的

我々はケミカルメディエーターの1つであるブラジキニンが気道炎症発現、咳嗽に受容であると考え、その受容体の発現に着目した。

ブラジキニンの受容体にはB1およびB2受容体が知られている。これまでの薬理学的研究でB2受容体は上皮や感覚神経系に恒常的に発現しブラジキニンの生理活性において中心的な役割を担っているのに対してB1受容体は炎症などによって発現を誘発されるとされている。一方で組織学的研究ではB1受容体B2受容体ともに感覚神経節などでの発現が同定されているが、喉頭粘膜および神経系においてその受容体であるB1受容体およびB2受容体の発現についてはこれまで解明されていない。

我々はブラジキニンB1およびB2受容体の喉頭気管における発現部位と発現の日内変動、加齢、神経障害などの疾患における発現の変化を調べた。

3. 研究の方法

動物はC57BL/6マウス(8-10週齢、雄)を用いた。概日リズム実験においてはマウスは12時間サイクルの明暗周期下で2週

間飼育し、2日間暗室で光の影響を除いた上で実験に供した。ペントバルビタールを用いた深麻酔下にマウスを灌流固定し、喉頭・気管を摘出し、摘出した喉頭・気管を後固定した後に、以下の実験に供した。

免疫組織化学法:

マウス喉頭・気管粘膜におけるブラジキニン受容体発現をタンパクレベルで調べるために免疫組織化学法を用いた発現の解析を行った。

自律神経切断マウスにおけるタンパク、mRNA発現の24時間リズムの変化

中枢からのシグナル伝達ルートを同定するために自律神経切断マウスを作成し、発現の変化を調べる。深麻酔下にマウスの片側の交感神経幹、迷走神経をそれぞれ切断し、7,14,21,28日の各生存期間の後にサンプルを採取した。

発現の24時間変動の解析

マウス喉頭・気管は4時間間隔で(CT0, 4, 8, 12, 16, 20, CT0-12:主観的昼, CT12-24:主観的夜)サンプリングする。二次抗体は蛍光抗体を使用し、LASER共焦点顕微鏡をもちいて観察、記録した。

4. 研究成果

免疫組織化学法による形態学的調査の結果、ブラジキニンB1およびB2受容体は喉頭、気管およびその神経系に広く分布することが判明した。

これまでの報告ではB1受容体は炎症時に誘導され、非炎症時は発現しないとされていたが、今回の研究の結果、B1受容体はいずれの組織においてもB2と同時に発現していることが示された。喉頭、気管上皮において線毛上皮を中心に広く発現していた。

声帯では扁平上皮には発現が認められなかったが(図2)移行部の多列円柱上皮では最表層に発現を認めた(図3)。粘膜下の血管内皮、漿液腺細胞にも発現を認めた。これらはブラジキニン受容体が喉頭、気管における浮腫の形成などに関与していることを示唆する。また粘膜下にはブラジキニン受容体陽性の神経線維が認められたが、声帯上皮では発現は認められなかった。ブラジキニン受容体は気道における侵害受容を担っていると考えられる。一方で声帯では上皮、粘膜下腺ともに発現は少なく、声帯部分においてはブラジキニン受容体を介した侵害受容は機能していない可能性が示唆された。

節状神経節においてもB1およびB2受容体の発現が認められた。上喉頭神経にコレラトキシンBをトレーサーとして注入した結果、喉頭を支配する節状神経細胞はすべてブラジキニン受容体B1,B2陽性であることが示された(図4)。

迷走神経切断による発現の変化を免疫組織化学法を用いて検討したが、喉頭上皮、節状神経ともに切断後の発現の変化は認めな

かった。

発現の昼夜差を免疫組織化学法で検証した結果、若干の日内変動を認めたものの現時点では有意差がなく、現在 mRNA レベルで発現の変化を検証するために real-time PCR を用いて喉頭、節状神経節におけるブラジキニン受容体 mRNA の定量を行っている。

また加齢に伴う変化についても老齢ラットを用いて研究を継続している。

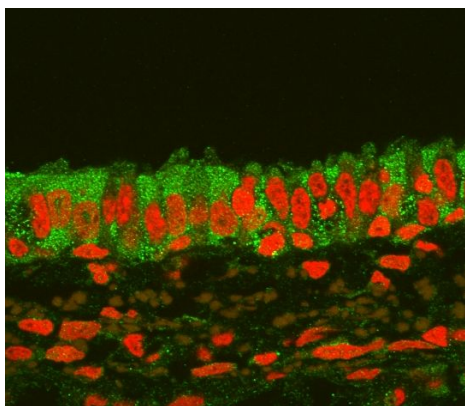


図1 ラット声門下上における B1 受容体の発現 (緑色)

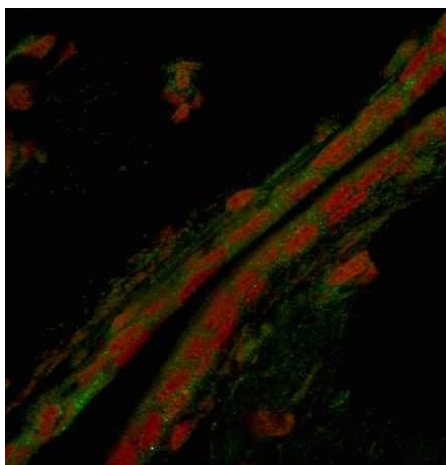


図2 声帯上皮における発現

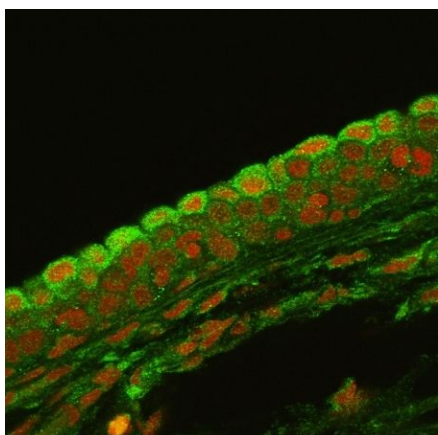


図3 声帯移行部における発現

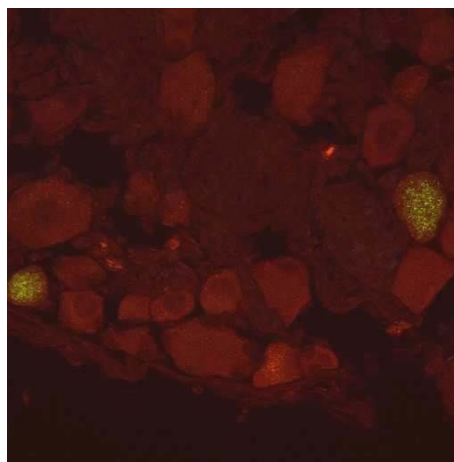


図4 節状神経節における B2 受容体の発現 (赤: B2 受容体、緑: コレラトキシン B)

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 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Bando H, Ahmed ME, Mukudai S, Sugiyama Y, Takeshi Nishio, Hirota R, Hisa Y. The expressions of aquaporins in the vocal fold epithelium. The 9th International Conference on Voice Physiology and Biomechanics, 2014 Apr 11; Salt Lake City.
2. Ahmed ME, Bando H, Hirota R, Ahmad AK, Fattah HA and Hisa Y. Localization of Bradykinin B1 and B2 receptors in the rat larynx. The 9th East Asian Conference on Phonosurgery, 2014 Nov 30, Taipei, Taiwan.
3. 板東秀樹, 椋代茂之, 杉山庸一郎, 西尾健志, 廣田隆一, 久 育男. 下咽頭収縮筋における筋小胞体カルシウム ATPase 発現の検討. 第 26 回日本喉頭科学会. 2014 年 3 月 7 日; 那覇.
4. 板東秀樹, モハメド エルラビ アフマド, 杉山庸一郎, 西尾健志, 廣田隆一, 久 育男. ラット喉頭におけるブラジキニン受容体発現. 第 66 回日本気管食道科学会. 2014 年 11 月 13 日; 高知.
5. 板東秀樹, モハメド エルラビ アフマド, 廣田隆一, 久 育男. ラット下咽頭収縮筋における筋小胞体カルシウム ATPase 発現の検討. 第 59 回日本音声言語医学会. 2014 年 10 月 9 日; 福岡.
6. 板東秀樹, モハメド エルラビ アフマド, 杉山庸一郎, 西尾健志, 廣田隆

一、小池 忍、久 育男・ラット喉頭
におけるブラジキニン受容体発現の検
討。第 38 回日本嚔下医学会。2015 年
2 月 7 日；福島。

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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 (Bando, Hideki)
京都府立医科大学・医学研究科・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：