

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11354

研究課題名(和文) インスリンシグナルが嗅上皮障害後の再生過程に与える影響の検討

研究課題名(英文) The effects of insulin on maturation process of newly generated olfactory sensory neurons

研究代表者

菊田 周(kikuta, shu)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00555865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：嗅上皮障害後に新生する嗅細胞の分化・成熟過程にインスリンシグナルがどのような影響を及ぼすのかを検討した。その結果インスリンが欠乏した糖尿病マウスでは、嗅上皮障害後の再生が遅延することを明らかになった。障害後に新生した嗅細胞はインスリンシグナルに依存して分化、成熟するが、特に障害後8-13日目のインスリンシグナルが嗅上皮の修復に重要であった。今後、嗅上皮障害患者に対するインスリン点鼻投与による治療法の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嗅上皮障害後の再生過程に、インスリンシグナルが重要な役割を果たしていることが明らかになれば、嗅上皮障害患者に対する治療法の開発が期待できる。インスリン点鼻投与によって、新生した未熟な嗅神経を効率的に成熟嗅細胞に分化させることができると予想する。本研究は、嗅覚障害患者に対するインスリン点鼻補充療法の臨床応用へと展開するための基盤研究となる。

研究成果の概要(英文)：We examined in adult mice whether insulin signaling affected the dynamic incorporation of newly generated OSNs 7, 14, and 28 days following injury. Between days 7 and 28 post-injury, the STZ-administered diabetic mice showed remarkably fewer OSNs and mature OSNs, but more apoptotic OSNs than the control mice. Insulin administration to the STZ-administered diabetic mice during the period between 8 and 13 days post-injury promoted the recovery of the OE. These results indicate that insulin signaling is involved in homeostatic regeneration of the OE following injury, and that newly generated OSNs have a high susceptibility period to insulin signaling for their maturation between days 8 and 13 post-injury.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：嗅覚 インスリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

嗅細胞は、鼻腔内でウイルスや各種外来抗原に直接暴露されているため容易に障害を受ける。嗅上皮では毎日古くなった嗅細胞が死んでいき、その代わりに新しい嗅細胞が次々に産生される。したがって、既存の古い細胞が失われても、新しい細胞が失われた細胞の機能を補えば、嗅覚が一時的に失われてもいずれ元に戻ることが期待される。しかし、どのような因子が嗅上皮修復に重要な役割を果たしているのかは十分に解明されていない。

インスリンは糖代謝に関わるペプチドホルモンである。このホルモンは糖代謝に関わるのみでなく、血液脳関門を通過し、脳内にも移行し神経生存因子として機能することが明らかになりつつある。しかし、インスリンシグナルが嗅上皮において嗅細胞の細胞動態にどのような影響を与えているのかについては不明である。

2. 研究の目的

目的は新生嗅細胞の分化・成熟過程に、インスリンシグナルがどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることである。この目的達成のために、嗅上皮障害後に新生する未熟嗅細胞に注目し、インスリンシグナルが欠乏した状況での成熟過程を主に免疫組織学的手法によって観察する。

- ・新生嗅細胞は、インスリンシグナル依存的に再生・成熟する。

- ・嗅上皮障害後の新生細胞の機能代償は、インスリンシグナルが低下した糖尿病マウスにおいて破綻する。

- ・適切な時期にインスリンシグナルを受けないと、新生嗅細胞は成熟せずに細胞死に陥る。

3. 研究の方法

インスリン産生が低下した糖尿病マウスを用いて、嗅上皮障害後の再生過程を観察する。インスリンは膵臓細胞から産生されるため、この細胞を選択的に破壊するストレプトゾトシン(以下 STZ)を C57BL/6 マウスに投与する。糖尿病マウスあるいは正常マウス(コントロール)に対して、嗅毒性物質であるメチマゾール 75mg/kg を腹腔内に投与する。各時間経過後(メチマゾール障害後 3、7、14、28 日)、脳をパラホルムアルデヒドで還流固定し、骨脱灰後にパラフィン包埋する。嗅上皮冠状断を作製し、嗅上皮の厚み、嗅細胞数を糖尿病マウスと正常マウスで比較する。さらに、抗 OMP 抗体、抗カスパーゼ 3 抗体を用い、新生した嗅細胞の細胞動態を経時的に観察する。嗅上皮障害後の新生細胞の機能代償は、インスリンシグナルが低下した糖尿病マウスにおいて組織学的な嗅上皮の不完全再生の機能面への影響を検討するために、新生嗅細胞の匂い刺激に対する嗅球での c-fos 陽性細胞数を両群で比較する。抗カスパーゼ 3 抗体を用い、酵素抗体法によって障害後 7、14、28 日でのカスパーゼ 3 陽性細胞数を計測する。「新生する嗅細胞は、障害後 7 日以降にインスリンシグナルを受けないと細胞死に陥る」可能性を検討するために、「障害後 1-13 日目までのインスリン投与群」、「障害後 1-6 日目までのインスリン投与群」、「障害後 8-13 日目までのインスリン投与群」の 3 群を作成する。インスリンを 1 日 3 回、100 μ l / 回点鼻投与する。脳固定時期(障害後 14 日)は同じであるが、投与するタイミングを変えた 3 群において、嗅上皮の厚み、細胞数、成熟嗅細胞数を比較する。

4. 研究成果

- ・新生嗅細胞は、インスリンシグナル依存的に再生・成熟する。

糖尿病マウスでは、新生嗅細胞の産生によって嗅上皮が厚くなるが、その速度は遅く、障害後 14 日での嗅細胞数はコントロールマウスと比較して有意に少なくなっていた。障害後 28 日では糖尿病マウスの嗅上皮は薄く、嗅細胞数や OMP 陽性細胞数もコントロールマウスと比較して有意に少なくなっていた。Ki67 抗体を用いて、基底細胞の増殖能を検討すると、コントロール群ならびに糖尿病マウス両群において障害後 3 日をピークに徐々に低下していた。しかし、Ki67

陽性細胞数に両群で有意な差は検出されなかった。さらにカスパーゼ3抗体を用いて両群で陽性細胞数を比較した。糖尿病マウスでは障害後7日以降でカスパーゼ陽性細胞数がコントロール群と比較して有意に増加していた。OMP抗体とカスパーゼ3抗体との2重染色を行うと細胞死に陥るのは未熟な嗅細胞であった。したがって、新生嗅細胞はインスリンが不足した状況では、新生嗅細胞は成熟できずに細胞死に陥り、最終的に障害後の嗅上皮再生が不完全に終わると考えられる。

・嗅上皮障害後の新生細胞の機能代償は、インスリンシグナルが低下した糖尿病マウスにおいて破綻する。

糖尿病マウスにおける嗅上皮障害後28日での糸球層c-fos陽性細胞数はコントロール群と比較して有意に少なかった。

・適切な時期にインスリンシグナルを受けないと、新生嗅細胞は成熟せずに細胞死に陥る。障害後7日と14日でカスパーゼ3抗体陽性細胞がコントロールと比較して増加していた。「障害後1-13日目までのインスリン投与群」と「障害後8-13日目までのインスリン投与群」では、嗅上皮の厚みは同等であり、成熟嗅神経数も同程度であった。しかし、「障害後1-6日目までのインスリン投与群」では他の2群と比較して嗅上皮は薄く、成熟嗅神経数も有意に少なかった。新生嗅細胞は障害後8-13日目にインスリンに対する依存度が亢進し、この時期のインスリンは嗅神経の成熟に重要な役割を果たすと考えられる。

以上の結果からインスリンが欠乏した糖尿病マウスでは、嗅上皮障害後の再生が遅延することを明らかにした。障害後に新生した嗅細胞はインスリンシグナルに依存して分化、成熟するが、特に障害後8-13日目のインスリンシグナルが嗅上皮の修復に重要であった。今後、嗅上皮障害患者に対するインスリン点鼻投与による治療法の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tuerdi A, Kikuta S, Kinoshita M, Kamogashira T, Kondo K, Iwasaki S, Yamasoba	4. 巻 8
2. 論文標題 Dorsal-zone-specific reduction of sensory neuron density in the olfactory	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-35607-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kondo K, Baba S, Suzuki S, Nishijima H, Kikuta S, Yamasoba T.	4. 巻 20
2. 論文標題 InfraorbitalNerve Located Medially to Postoperative Maxillary Cysts: A Risk of EndonasalSurgery.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec	6. 最初と最後の頁 28-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000486372.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kikuta S, Horikiri K, Kanaya K, Kagoya R, Kondo K, Yamasoba T	4. 巻 4296195
2. 論文標題 Sinus-Related Symptoms May Accelerate the Progression of Chronic Maxillary	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Case Rep Otolaryngol	6. 最初と最後の頁 4296195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2017/4296195	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菊田 周、堀切教平、清水裕也、籠谷領二、上羽瑠美、近藤健二、山岨達也
2. 発表標題 インスリン点鼻投与による嗅上皮障害後の再生促進効果について
3. 学会等名 日本鼻科学会 学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊田 周
2. 発表標題 日本鼻科学会賞受賞記念講演「Longer latency of sensory response to intravenous odor injection predicts olfactory neural disorder」
3. 学会等名 第56回日本鼻科学会 総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔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	近藤 健二 (kondo kenji) (40334370)	東京大学・医学部附属病院・准教授 (12601)	