

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11357

研究課題名(和文) 嗅粘膜移植と炎症制御による神経再生を併用する神経性嗅覚障害の新規治療法開発研究

研究課題名(英文) Development research for treatment of sensorineural olfactory dysfunction due to nerve regeneration induced by combination of olfactory epithelium transplantation and inflammation controlling

研究代表者

小林 正佳 (Kobayashi, Masayoshi)

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80343218

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)：嗅覚機能を喪失した嗅神経性嗅覚障害の機能回復は困難な例が多い。本研究は、嗅粘膜の移植と炎症制御による嗅神経再生促進を組み合わせることで、重症の神経性嗅覚障害の予後を向上させる新しい治療法開発のための基礎を確立する目的で施行した。嗅神経が可視化できる遺伝子組み換えマウスを用いて、嗅神経切断モデルと嗅粘膜脱落モデルを作製し、嗅粘膜が脱落した部分に嗅粘膜の移植と消炎治療を施行した。その結果、一部のみ生着細胞が確認できた。行動学的評価を用いた嗅覚検査を施行したが、これで嗅覚機能が回復した例は認められなかった。移植嗅細胞が嗅覚機能までもを發揮するにはさらなる方法の開発が必要であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究が成功すれば、現在臨床鼻科学領域で技術革新が目覚ましく進歩している鼻内内視鏡下前頭蓋底手術を応用し、ヒトにおいて経鼻腔的に頭蓋底骨(嗅裂天蓋)と硬膜を切除して、嗅球底部を露出させ、そこに嗅粘膜を移植することで、本研究の臨床的実用化を進めることが十分に可能であり、その臨床試験を経て、本研究成果に基づき新たな治療法の確立が可能であると考えられる。今後そのための研究方法の改良が望まれる。

研究成果の概要(英文)：It is difficult to restore the function of olfactory neurogenic olfactory dysfunction that has resulted in loss of olfactory function. This study was conducted to establish the basis for the development of a new treatment to improve the prognosis of severe neurogenic olfactory dysfunction by combining olfactory mucosa transplantation with the promotion of olfactory nerve regeneration through inflammation control. Using genetically modified mice, the researchers created an olfactory nerve transection model and an olfactory mucosa loss model, and performed olfactory mucosa transplantation and anti-inflammatory treatment in areas of olfactory mucosa loss. As a result, viable cells were found only in some of the areas. The patients underwent olfactory testing using behavioral assessment, but this did not restore olfactory function in any of the cases. Further development of methods will be necessary if the transplanted olfactory cells are to exhibit even olfactory function.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：嗅覚

## 1. 研究開始当初の背景

現代社会の高齢化による嗅覚障害患者の増加、またアルツハイマー病、パーキンソン病など中枢神経変性疾患の早期発見のための嗅覚障害診断の有用性などから、近年嗅覚障害に対する社会的、医療的関心が高まっている。

嗅覚障害は病態別に気導性( conductive )、嗅神経性( sensorineural )、中枢性( central )の3つに分類され、このうち慢性副鼻腔炎に代表される気導性嗅覚障害は、保存的あるいは手術的に適切な治療を受けることで70~80%例で嗅覚障害が改善する。(小林正佳・他：日耳鼻108：986-995, 2005)。その一方で、頭部顔面外傷や薬物暴露などによる嗅粘膜の広範な物理的、化学的損傷や、慢性副鼻腔炎が原因であってもポリープ形成などによる鼻腔の完全閉塞が10年以上継続している重症例で嗅覚が廃用となっている例では、従来の治療を施行しても嗅覚機能の回復が認められないことが多い。実際に、嗅神経の物理的損傷が原因である外傷性嗅覚障害の予後は悪く、交通外傷が原因の嗅覚障害の改善率は10~45%と低い(小林正佳：JOHNS 25：1343-1349, 2009)。

嗅粘膜の広範な損傷や廃用状態に対する抜本的な治療戦略研究として、嗅粘膜の同種移植に取り組んだ研究報告がある(Holbrook et al. Laryngoscope 111: 1964-1969, 2001; Yagi, Costanzo. Am J Rhinol Allergy 23: 239-243, 2009)。これらの報告によると、嗅粘膜を大脳内や嗅球内に移植して、その生着に成功している。しかし、問題点として、その成功率が低いことと、実際の臨床応用を前提に考えると、移植嗅粘膜は嗅素を受容するために鼻腔内に露出された状態でなければならないが、これらの報告では脳組織内に埋入して生着した段階までであり、臨床実用化に必要なこの課題を解決した報告はまだ皆無である。その理由として、移植嗅粘膜が嗅覚受容・情報伝達機能を再獲得するためには粘膜内の嗅細胞が軸索を伸長させて嗅球内に存在する嗅覚二次ニューロンとシナプス形成することが必要であるが、これが移植時に生じる局所炎症などのために阻害されていることが考えられる。

本研究代表者(小林)はこれまでに外傷性嗅覚障害の予後改善を目的として、マウスで外傷性嗅覚障害モデルを作製し、嗅神経切断後の神経再生が局所傷害の重症度と炎症の強度に依存することを明らかにし、この局所炎症に対して傷害急性期にステロイド薬投与で消炎治療を施行すれば、マクロファージなどの炎症細胞浸潤とグリア瘢痕形成を抑制し、嗅神経再生が促進されることを発見した(Kobayashi, Costanzo. Chem Senses 34: 573-580, 2009)。

さらに、実際の臨床応用を想定して、副作用の懸念があるステロイドの他に、関節リウマチなど難治性炎症性疾患の治療薬として臨床実用化されている抗IL-6受容体抗体(トシリズマブ)やTNF-阻害薬(エタネルセプト)でも同様の効果が得られることを明らかにした(Kobayashi, Tamari, et al. Neurosci Res 76: 125-132, 2013; Al Salih, Kobayashi, Tamari et al. Auris Nasus Larynx 44: 70-78, 2017)。

以上から、嗅粘膜移植と局所神経組織炎症制御の知識と技術を組み合わせることで、重症の嗅神経性嗅覚障害例に対して有効な治療法を開発できる可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

嗅覚受容器の存在する嗅粘膜の重度な損傷や廃用により嗅覚機能を喪失した嗅神経性嗅覚障害の予後は不良で、嗅覚機能回復は困難な例が多い。本研究では、嗅粘膜の移植と炎症制御による嗅神経再生促進を組み合わせることで、重症の神経性嗅覚障害の予後を向上させる新しい治療法開発のための基礎を確立する。

## 3. 研究の方法

嗅細胞が特異的に青色染色されて可視可能な遺伝子組換えマウス・OMP-tau-lacZマウス(図1)を用いて、2種類(手術的、化学的)の嗅粘膜除去マウスを作製する。

手術的嗅粘膜除去マウスは、マウスにペントバルビタールを腹腔内注射して全身麻酔し、固定器で固定する。鼻骨を外し、嗅粘膜を露出させ、嗅粘膜を剥離して吸引除去する。また前頭開頭も行い、嗅球と篩板を露出させ、テフロンカッターを嗅球と篩板の間に挿入して嗅球を温存しながら嗅神経も切断し(図3)、完全な嗅覚障害モデルマウスにする。手術後は閉頭し、動物を覚醒させる。

化学的嗅粘膜除去マウスは、メチマゾールを腹腔内投与して嗅粘膜を脱落させることで作製する。

どちらのモデルマウスも、組織学的評価だけでなく、電気生理学的実験と行動学的嗅覚検査実験も行い、介入前には正常であった嗅覚機能が介入後に嗅覚脱失状態となっていることを確認する。



図1 OMP-tau-lacZ マウスの頭部組織切片(水平断)。青色部分:嗅神経とその投射先である系球体。左側:コントロール。右側:嗅神経切断直後。

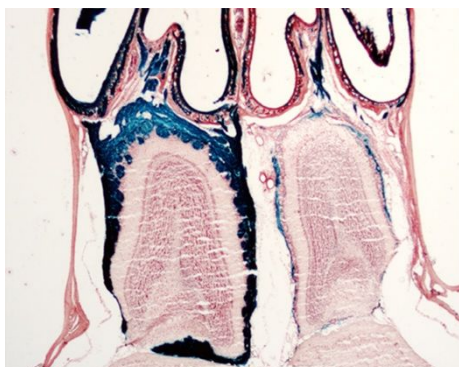


図2 嗅神経切断後14日目。右側の嗅球系球体へ投射する嗅神経が激減している。

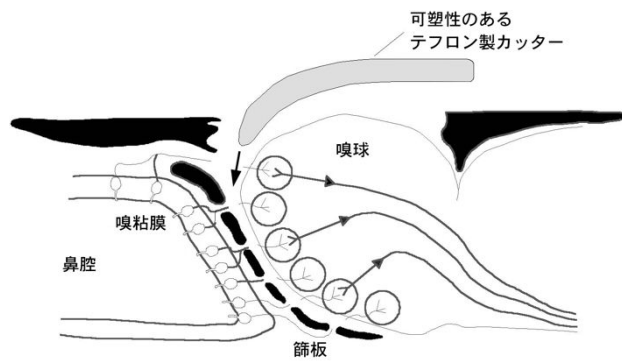


図3 嗅神経切断実験のシエーマ。  
柔らかいテフロンカッターで嗅球を  
温存しながら嗅神経を切断する。

行動学的嗅覚検査実験は、あらかじめマウスに0.1%ナラマイシン（シクロヘキサミド）水溶液を用いて条件付けの嫌悪学習を行う。次いで、嫌悪学習に成功したマウスに対して、上記介入後に忌避行動をしなくなるのを確認することで嗅覚脱失状態と判定する。

手術的嗅粘膜除去マウスの作製において、確実に嗅粘膜を除去するためには高度な手術手技を要するため、まずはOMP-tau-lacZマウスの特徴を活かして、上記手術後に6週間経過時点で動物を灌流固定し、頭部の組織学的標本作製して、神経再生を来す残存嗅粘膜がないかを検証するトレーニングを初段階として施行する。本研究計画遂行が可能な手術的嗅粘膜除去マウスの作製には、トレーニングに時間を要すると考えられる。

次に、作製法を確立した2種類の嗅粘膜除去OMP-tau-lacZマウスに、OMP-GFPマウスから採取した嗅粘膜を移植する。移植片はフィブリン糊で固定する。移植直後にステロイド薬（デキサメサゾン）、抗IL-6受容体抗体（MR16-1）、TNF-阻害薬（エタネルセプト）のどれかを腹腔内注射し、消炎治療を図る。よって、嗅粘膜除去法2種類×消炎治療法3種類＝6種類の組み合わせで実験を施行し、これらの中で至適な嗅覚機能回復条件を明らかにする。

移植嗅神経の生着再生は組織学的に頭部標本切片を作製して評価する。ドナーであるOMP-GFPマウスからの移植嗅細胞は蛍光顕微鏡下で緑色に発光し、レシピエントであるOMP-tau-lacZマウスの嗅細胞はX-gal染色で青色に染まる。よって、両者の嗅細胞は判別が可能であり、レシピエントの嗅細胞軸索による嗅球の神経再支配がなく、ドナーの嗅細胞軸索のみが嗅球を再支配していれば、組織学的移植再生が成功していると判定できる。この実験もトレーニングが必要であり、まず手技が容易な嗅球背側で生着のみを検証するパイロット実験を行い、その後、篩板を除去して嗅球腹側に移植する2段階実験とする。

嗅覚機能回復の評価は、電気生理学的実験と行動学的嗅覚検査実験で評価する。

#### 4．研究成果

以上の実験遂行の結果、一部のみ生着細胞が確認できた。行動学的評価で、嗅覚検査を施行したが、これで嗅覚機能が回復した例は認められなかった。

以上の結果から、嗅粘膜移植は消炎治療を併用することで過去の報告よりも生着性を向上することは可能と考えられるが、顕著な向上ではなく、また移植嗅細胞が嗅覚機能までもを発揮するにはさらなる方法の開発が必要であると考えられる。

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<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                     | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 西田 幸平<br><br>(Nishida Kohei)<br><br>(10456733) | 三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト<br><br><br>(14101) |    |
| 研究分担者 | 玉利 健悟<br><br>(Tamari Kengo)<br><br>(90585176)  | 三重大学・教養教育院・特任講師(教育担当)<br><br><br>(14101)  |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |