

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11360

研究課題名(和文) 嗅覚トレーニングによる再生嗅細胞軸索の嗅球系球体におけるシナプス形成に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of olfactory training on synapse formation between regenerative olfactory neuron axons and glomeruli in the olfactory bulb

研究代表者

西崎 和則 (Nishizaki, Kazunori)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・特命教授

研究者番号：90180603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は長年嗅覚障害を研究し、正常な嗅覚機能には、再生された嗅覚細胞による嗅球嗅覚マップの復元が必要で、軸索切断などの深刻な嗅覚細胞損傷後に嗅覚マップが歪められ、嗅覚細胞と二次ニューロン間のシナプス結合が減少することを明らかにしました。嗅覚マップを正常化するために、軸索切断後のマウスに嗅覚トレーニングを試みました。嗅覚訓練群は5つのにおいを嗅ぎ、対照群のマウスは生理食塩水を嗅ぎました。嗅上皮の厚さで、嗅覚訓練群と対照群の間に有意差を認めました。私たちは、嗅覚トレーニングが軸索切断後の嗅覚細胞の再生を助け、嗅覚細胞再生の促進が嗅球の歪んだ嗅覚マップを正常化できると考えました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞が再生しても、神経回路が正しく再生しなければ、神経伝達の機能回復にはつながらない。嗅細胞は障害を受けても回復するが、神経回路形成異常で難治性の嗅覚障害が残る。嗅覚トレーニングは臨床的に有効であるとされる様々な報告がなされているが、メカニズムの全容解明には至っていない。今回嗅細胞の回復が促進されていたことにより嗅覚トレーニングのメカニズムの一端が分かったのではないかと考える。神経回路形成の正常化は神経変性疾患の治療やこれからの感覚神経細胞再生にも応用できると考えている。

研究成果の概要(英文)：We have been studying sensorineural hearing loss for many years, but correct olfactory function requires the restoration of olfactory maps in the olfactory bulb by regenerated olfactory sensory neurons (OSNs). Our previous report showed that after severe damage to OSN, such as axotomy, the olfactory map was distorted and synaptic connections between OSNs and secondary neurons were reduced. To normalize the olfactory map, we attempted sensory training in mice after axotomy. The sensory training group sniffed five odors, and the control mouse sniffed saline. The thickness of the olfactory epithelium makes a significant difference between the olfactory training group and the control group. We believed that olfactory training aids in the regeneration of OSN after axotomy, and that promoting OSN regeneration can normalize the distorted olfactory map of the olfactory bulb.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：嗅覚障害 再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

当教室では嗅細胞性嗅覚障害に対して嗅細胞再生による再生医療の可能性を検討している。嗅細胞の再生は、骨髄移植によって、ドナー由来マーカーと嗅細胞のマーカーである OMP に 2 重染色される細胞を嗅上皮に観察し、骨髄移植による嗅細胞再生の可能性を示した。再生した嗅細胞が正常な機能を持つには嗅球に存在する僧帽細胞と正しくシナプス形成が必須である。感覚細胞が再生、情報伝達を行うには感覚細胞自体の再生のみならず、上位ニューロンとのシナプス形成による正しいネットワークの再建が必要である。嗅細胞は特異な感覚神経細胞であり、生涯ターンオーバーを繰り返し、障害を受けても再生する。通常のターンオーバーでは、再生した嗅細胞軸索は消失する嗅細胞軸索をたどって嗅球上の神経回路を維持する。しかし嗅細胞に高度な障害が加わると再生した嗅細胞軸索は投射異常を起こし、嗅球において 2 次ニューロンとシナプス形成する糸球体の退縮がみられる。異嗅症はこれら投射異常と 2 次ニューロンとの結合性低下を原因の一つとして発症すると考えられる。マウスの嗅細胞の軸索を切断した外傷性嗅覚障害モデルを用いて、嗅覚トレーニングによる再生嗅細胞軸索の嗅球糸球体におけるシナプス形成に及ぼす影響を検討した。

2. 研究の目的

神経細胞が再生しても、神経回路が正しく再生しなければ、神経伝達の機能回復にはつながらない。嗅細胞は障害をうけても回復するが、神経回路形成異常で難治性の嗅覚障害が残る。再生した嗅細胞が投射異常を起こさないもしくはおこしても回復し、本来の糸球体マップが維持できるように種々の実験を行った。

近年 iPS 細胞を用いた網膜再生プロジェクトをはじめ、感覚神経細胞の再生医療が盛んにおこなわれている。感覚神経が再生されるようになったのち、新生神経細胞の神経回路形成が期待通りのいかない可能性がある。神経回路形成の正常化は神経変性疾患の治療やこれからの感覚神経細胞再生にも応用できると考えている。

3. 研究の方法

使用したマウス：

- ・ OMP-GFP (成熟嗅細胞のマーカーOMP に GFP を蛍光標識した系) マウス
- ・ MOR29AB(嗅覚受容体 MOR29A に CFP、MOR29AB に YFP を蛍光標識した系)マウス
- ・ Goofy-Wlds(嗅細胞のプロモーターにワーラー変性が 2 週間遅れる遺伝子を組み込んだ)マウス

嗅細胞の障害：

マウスの前頭骨を削開し、嗅細胞軸索を篩板にそってマイクロナイフで物理的に切断。

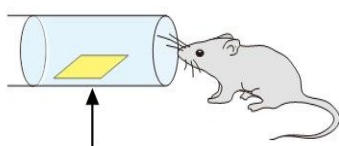
軸索切断後の神経軸索の経時的变化

軸索切断後 77 日目、133 日目に嗅上皮と嗅球を取り出し、観察した。

嗅覚トレーニング：

嗅細胞を障害、障害 14 日目から 28 日目まで嗅覚トレーニングを以下のような方法で実施した。

-フェニルエチルアルコール、メチルシクロペンテノロン、イソ吉草酸、 γ -ウンデカラクトン、スカトールの 5 種の嗅素を 5 分間ずつ臭い濾紙が入ったコニカルチューブをマウスの鼻にあてて嗅がせた(10 回/匹)。対照群のマウスには生理食塩水をしみこませた綿球を同様の方法で嗅がせた。軸索切断後 42 日目に嗅上皮および嗅球を観察した。



4. 研究成果

旧軸索の保存：

投射異常の予防のため変性する軸索の保存を目的として軸索変異を遅らせる遺伝子変異を組み込んだマウスの系をつかって、実験をおこなった。Wlds 変異はワーラー変性が 2 週間遅れる遺伝子系である。嗅細胞のプロモーターに Wlds 変異を組み込み(Goofy-Wlds マウス)、通常の OMP-GFP マウスと軸索切断後の嗅上皮と嗅球を比較検討した。軸索切断後 3 日、5 日、7 日で軸索変性の状態を経時的に観察したが、軸索変性の遅れは見られなかった。また 42 日目に嗅上皮と嗅球を観察を行ったが、嗅球での投射位置回復にはつながらなかった。嗅細胞軸索の切断はワーラー変性とは違った機序で変性、嗅細胞の消退をひき起こしているのだと考えられた。

軸索切断後の再生軸索の経時的変化

軸索切断後の投射異常の回避が困難であると考え、次に投射異常の正常化の検討をおこなった。そこで投射異常を起こした嗅細胞軸索は投射異常を越したまま再生を繰り返すのか、改善しつつターンオーバーを繰り返すのかを検討するため、軸索変性後軸索切断後 42 日目、77 日目、133 日目に新生嗅細胞軸索の伸長を観察した。

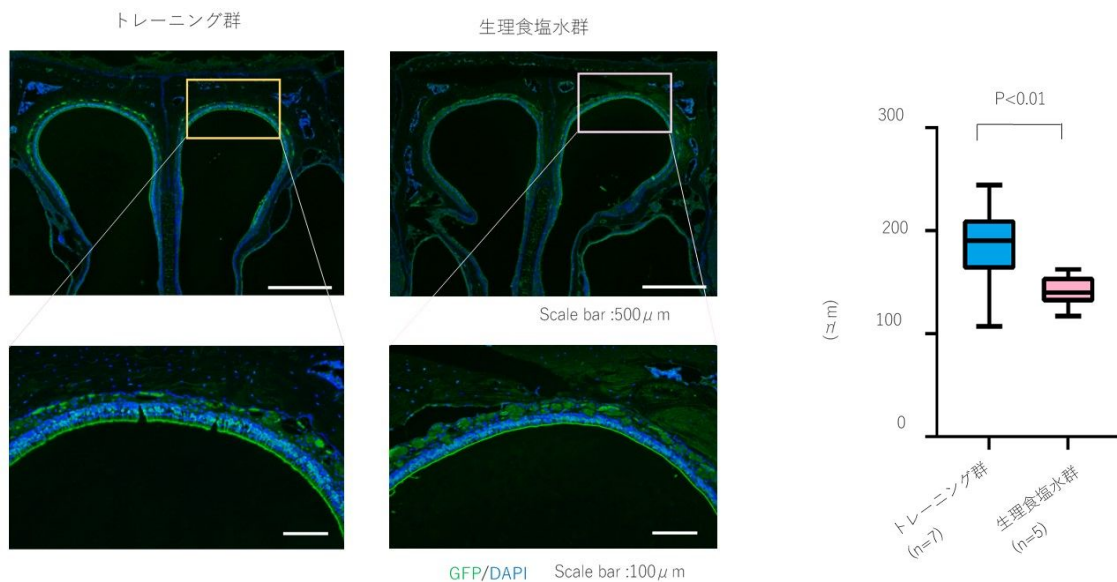
42 日目に比較して、77 日目、133 日目は新生軸索の伸長は伸びていた。これは Costanz らの軸索切断後長期のわたると徐々に投射異常は回復傾向という以前からの報告に矛盾ない結果であった。しかし、軸索切断をしていないコントロール側と比較すると、再生系球体様構造物が糸球体の正中に見られ、軸索伸長は促進されているものの完全に投射位置が回復したわけではなかった。77 日目、133 日目で同様の結果がえられたため、長期の観察は終了とした。

嗅覚トレーニング

軸索切断後投射異常を起こした再生嗅細胞軸索は何度も通常のターンオーバーを繰り返すと徐々に投射位置が改善傾向であることが分かった。そこで臨床では現在世界的に行われている嗅覚トレーニングをマウスに実施し、どのような影響を与えるか観察した。嗅覚トレーニングは臨床的には 1 日に 2 回バラ、ユーカリ、クローブ、レモンのにおいを患者が嗅ぎ、トレーニングを毎日行う。今回上記の方法のように 10 日のプロトコルで T&T オルファクトメーターに使用されている嗅素を用いて嗅覚トレーニングを実施した。原法とことなる嗅素を用いたのは、嗅素の再現性を保ち、分子学的解析を行えるよう、濃度が担保された単化合物で実験を行うためである。日本では T&T オルファクトメーターが比較的身近に入手できる濃度が均一な単化合物で遺伝学的嗅覚受容体の由来を含め嗅素の選択の幅が広く、基礎実験においては使用に適していると考えられる。MOR29AB マウスに上記の方法で嗅覚トレーニングを実施した。嗅上皮においてはコントロール群と比較して、OMP 陽性の嗅細胞すなわち成熟した嗅細胞が多くみられており、統計学的に有意に嗅上皮の厚さが厚くなっており、嗅細胞の再生促進が確認された。また、MOR29AB マウスの嗅球を確認したところ、糸球体の投射位置自体はコントロールと比較してあまり差がなかったが、嗅細胞自体の回復が促進されたためか、矮小化していた糸球体の大きさに回復傾向がみられた。

嗅覚障害に対する嗅覚トレーニングが有効である機序の一つとして、嗅細胞の再生促進が考えられた。

引き続き、嗅覚トレーニングによりなぜ嗅細胞のターンオーバー促進を認めるのか分子学的メカニズムの解明を行っていく予定である。また今回軸索切断をモデルとしたため、切断後 14 日後に嗅覚トレーニングを開始し、良好な結果を得られた。感冒後嗅覚障害のモデルとしてメチマゾール投与による嗅細胞障害を行うことがある。薬剤投与による嗅細胞は投与翌日よりかなり消失をみとめる。また、臨床的には外傷後嗅覚障害は重大な頭部外傷後のことが多く、嗅覚障害に対する治療はかなり遅れて始まることが多い。新型コロナウイルス感染をはじめとした上気道感染後の嗅覚障害や外傷後嗅覚障害に対する嗅覚トレーニングの開始時期や限界点、最適時期を基礎的に検討する予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西崎 和則
2. 発表標題 嗅覚障害に対する再生医療を目指して
3. 学会等名 第121回 日本耳鼻咽喉科学会総会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020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	村井 綾 (Murai Aya) (00780834)	岡山大学・大学病院・医員 (15301)	
研究分担者	高原 潤子 (Takahara Junko) (80448224)	岡山大学・医学部・技術専門職員 (15301)	

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
---------	---------