

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K16919
 研究課題名(和文) 異嗅症モデルマウスを用いた嗅細胞の投射異常と継時的修復メカニズムに関する研究

研究課題名(英文) Axon mistargeting and changes over time of olfactory sensory neurons with dysosmia model mice.

研究代表者
 村井 綾 (Murai, Aya)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：00780834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：当教室ではマウスを用いてにおいを感知する細胞である嗅細胞の神経の枝を切断し、においの障害やその回復についての研究を行っている。あるにおいが正しくそのにおいとして認知するにはにおいの神経伝達がただしく配線されている必要がある。しかし、高度な障害を受けた嗅細胞は細胞自体が再生しても正しく配線されない。正しい配線を導くためにもとの軸索を保存する、または軸索を導くためのたんぱく質の投与を行ったが、配線異常が改善されることはなかった。軸索に障害を与えた後、経時的に観察したところ、完全に正しいネットワークが再生されていないが、障害後長期の観察を行うと再生軸索の伸長は改善傾向であった。

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、再生した先の配線がうまくいかなければ、情報は正しく伝達されない。今までの実験結果から、成長の過程で組まれた綿密な神経ネットワークは重度の障害をうけると神経細胞が再生したとしてももとのネットワークを再現できないのではないかと考える。現在多数の研究で神経細胞の再生が試みられている。今後、再生した神経細胞の正しいネットワーク再構築が必要ではないかと考える。嗅細胞は自己再生能力があり、神経細胞自体の回復が可能なので、ネットワークの再構築に重点を置いた研究が可能である。今期の研究により時間経過とともにネットワークが改善することがわかり、なぜ改善するのかその解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：We research olfactory disorder and therapy using the mouse injured the olfactory nerve axon. The normal smell sense is required correct olfactory nerve network. But, the olfactory sensory neurons(OSN) damaged severely, the olfactory nerve formed incorrect network even the olfactory sensory neurons recover. We tried the several research, for example, the axons of OSN maintain for guidance of the new axon and administration of axon guidance. But these researches are not going well. So, we observe change over time of OSN axons in the olfactory bulb, the regenerated network is not perfect. But the OSN axons 19 weeks after injury are more promoted than 6 weeks.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：嗅覚障害 再生医療 軸索ガイダンス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

嗅覚の異常を訴えて耳鼻咽喉科を受診する患者は少なくない。嗅覚障害の原因としては慢性副鼻腔炎や感冒など鼻腔疾患による気導制嗅覚障害が多く、原疾患の治療とともに回復することが多い。しかし、嗅細胞性や中枢性の嗅覚障害は臨床上難治性である症例を認める。中でも頭部外傷による嗅細胞性神経障害は匂いを感じない無嗅症から匂いを固有の匂いとは違って感じる異嗅症を呈することが多い。異嗅症のメカニズムを解明するため我々は嗅細胞軸索を物理的に切断した外傷性嗅覚障害モデルマウスを作成、嗅細胞を広範に障害すると新生した細胞が投射異常を起こすことを明らかにした (Murai, et al, 2016)。なぜ再生した嗅細胞軸索は投射異常を起こすのか、また投射異常の改善を目的とした研究が必要とされている。

2. 研究の目的

異嗅症のメカニズムの一つとして、嗅細胞を広範に障害すると新生した細胞が投射異常を起こすことが考えられるが、投射異常を回復させる要因はあきらかになっていない。本研究では、投射異常のおこるメカニズムや投射異常の回復、予防を目的に研究を行う。

(1) 嗅細胞の障害の違いによる投射異常の違い：軸索切断と嗅上皮に強い障害を惹起するメチマゾール腹腔内投与による障害では嗅上皮の基底細胞のどの段階から再生するかが異なっているという報告がある。そこで障害方法の違いによる投射異常の違いを観察し、投射異常のメカニズムを検討する。また嗅球における新生嗅細胞の軸索の投射を長期間観察することで投射の修復過程に違いがあるのかを観察する。

(2) 投射異常の予防：通常のターンオーバーでは、消失する嗅細胞軸索の相互関係が保存されており、それをたどって新生嗅細胞軸索が伸長するため、正常な投射が維持される。そこで軸索切断による嗅細胞軸索の損傷後その軸索を保存することで投射異常が予防できるかを確認する。

(3) 投射異常の回復：胎生期に嗅球上の系球体地図形成に重要な軸索ガイダンス因子を鼻腔内投与することにより、新生嗅細胞の軸索が前方に偏移する投射異常が修復されるか可能性を検討する。

嗅覚障害後に嗅球における新生嗅細胞の軸索伸展を観察し、修復のメカニズムを解明することは異嗅症だけではなく、他の神経過誤支配によって惹起される疾患に対する将来の再生医療に役立つと考えられる

3. 研究の方法

(1) 嗅細胞の障害の違いによる投射異常の違い

OMP-GFP マウス(成熟嗅細胞のマーカーに GFP が蛍光ラベルされた系)と MOR29AB マウス(嗅覚受容体 MOR29A に CFP、MOR29B に YFP が蛍光ラベルされた系)の嗅細胞を、軸索切断、メチマゾール全身投与の2つの方法で障害する。障害6週間~4か月後に新生した嗅細胞の軸索の投射の様子を観察する。共焦点レーザーを用いて、新生系球体の投射位置や形態を詳細に検討する。また、Nrp1 染色を用いて嗅球上の前後軸の投射異常が時間経過とともに修復されるか否かを検討する。

(2) 投射異常の予防

Wlds 変異(Wallerian degeneration slow)という神経細胞軸索の Wallerian degeneration が2週間遅れる遺伝子換えマウスの系を用いて、軸索切断を行い、42日後に嗅上皮および嗅球を観察する。

(3) 投射異常の回復

OMP-GFP マウスと MOR29AB マウスに軸索切断後、軸索ガイダンス因子のひとつである Semaphorin3A を頭蓋内投与もしくは鼻腔内投与し、障害42日後に同様に嗅球を観察し、軸索の投射位置を観察する。

4. 研究成果

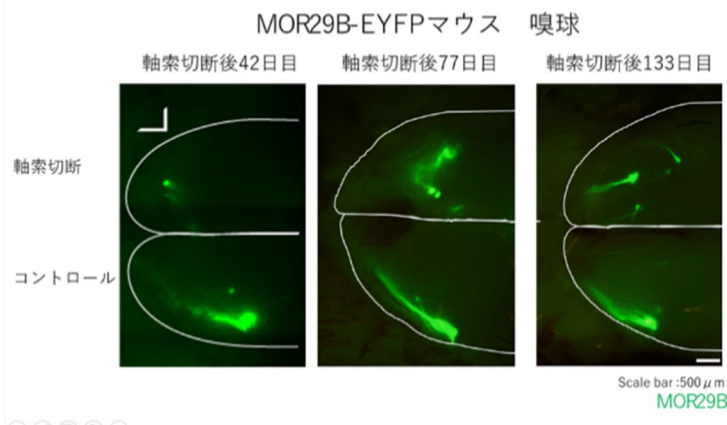
(1) 嗅細胞の障害の違いによる投射異常の違いを観察した。軸索切断群、メチマゾール投与群ともに嗅細胞障害42日後に嗅球上における再生した軸索の投射異常をみとめた。そのため、今後の研究は軸索切断を障害モデルとして実施した。

(1) 嗅細胞障害後の長期観察

軸索切断後、42日、77日、133日後に嗅球に投射した再生嗅細胞軸索を実体蛍光顕微鏡にて観察した。42日目には前方に投射していた再生嗅細胞軸索は77日、133日後にはやや後方に投射していた(図)。しかし、完全な投射位置の改善には至らなかった。

そこで嗅細胞のターンオーバーが自然に繰り返されるだけでは投射異常の改善には至らなかったため、予防について検討した。

図 1



(2)障害された嗅細胞軸索の保存

Wilds マウスに軸索切断を行い、3日、7日、14日後に嗅上皮を観察したところ、Wild type のマウスと比較しても軸索変性の遅れを観察できなかった。さらに42日後に嗅球を観察すると、新生したNrp1陽性軸索は嗅球の前方に投射しており、正常な投射関係を再現することができなかった(未発表)。嗅細胞の軸索の障害はwallerian degenerationによる変性ではなくネクロシスが関連しているのではないかと考えた。予防が困難であったため、投射異常を正常化するためほかの方法を検討した。

(3)軸索ガイダンス因子の投与

発達期には嗅細胞軸索はNeuropilin1を受容体、Semaphorin3Aをリガンドとする軸索ガイダンス因子の濃度勾配により嗅球における投射先のおおまかな前後軸が選別される。Semaphorin3Aは発達期をすぎると消失するが、嗅細胞に発現しているNrp1受容体は成人マウスになっても発現されている。そこで、嗅球の前方にSemaphorin3Aを吸着させたビーズを設置したが、嗅細胞障害42日後に嗅球を観察したところ、再生嗅細胞系球体は投射位置の改善を認めないどころか、コントロールに比較して軸索伸長が阻害されていた。Semaphorin3Aの本来の機能は軸索伸長を反発させる因子である。おそらく発達期には軸索伸長を阻害する濃度より低濃度で発現することによりNrp1受容体と反発性に働き、軸索を嗅球の後方へと導く作用があるのではないかと考えている。このSemaphorin3Aを阻害するたんぱく質が報告されており、現在投与を行い投射異常について検討中である。

高度な嗅細胞障害をうけると再生軸索は投射異常を起こす。時間経過とともにその投射は改善されゆくものの、完全には回復できない。今後ターンオーバーを促進するまたは軸索ガイダンス因子の発現方法を検討し、軸索投射異常の正常化をめざす

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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村井 綾
2. 発表標題 嗅細胞障害後の投射異常の経時的変化
3. 学会等名 第58回日本鼻科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----