

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791196
 研究課題名（和文） 骨髄幹細胞を用いた嗅球神経細胞の再生研究
 研究課題名（英文） Regeneration study of olfactory bulb neurons using bone marrow stem cells
 研究代表者
 吉延 潤子（YOSHINOBU JUNKO）
 岡山大学・医学部・技術専門職員
 研究者番号：80448224

研究成果の概要（和文）：現在の医療では回復が困難な重度嗅覚障害の新たな治療法として、近年著しく進展している骨髄（幹）細胞を用いた再生治療が期待されている。本研究では、嗅上皮と比べ再生が難しいとされる嗅球組織の再生において、骨髄細胞を用いた再生治療の可能性を見出すことを目的とした結果、再生治療は嗅上皮障害だけでなく嗅球障害においても有効な治療法となりうる可能性が示唆された。また、サイトカイン（たんぱく質性因子）を用いることで再生治療の有効性をより高められる可能性も示唆された。

研究成果の概要（英文）：The regenerative therapy using bone marrow stem cells progressing remarkably in late years is expected as a new therapy for severe olfaction disorder that recovery is difficult by the current medical care. This study was conducted to examine the efficacy of the regenerative therapy using bone marrow cells in regeneration of olfactory bulb said to be more difficult than olfactory epithelium. As a result, it was found that the regenerative therapy using bone marrow cells had potential as a new therapy for not only the disorder of olfactory epithelium but also the disorder of olfactory bulb. Also, it was suggested that the use of cytokine raised efficacy of the regenerative therapy more.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：再生医学、細胞・組織、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

嗅覚は直接生命維持に関与する機能ではないが、重度な嗅覚障害の場合、飲食物の腐

敗臭やガス臭等の身体への危険信号を感知できず、日常生活に支障をきたす可能性がある。また、軽度な嗅覚障害においても、飲食

物の匂いの識別が困難になったり、味覚が鈍感になったりすることにより、精神的ストレスを伴うことから患者の QOL(生活の質)は著しく低下する。

嗅覚障害が軽度である場合、薬剤投与等によって回復が見込める。しかしながら、嗅上皮細胞や嗅球に及ぶ障害が重度である場合、回復を見込める治療法はほとんどなく、このような嗅覚障害に対する新たな治療法の開発が切望されている。

近年、骨髄幹細胞を用いた再生研究は目覚ましく進展しており、血管再生など、既に先端医療として実施されているものもある。鼻科領域における再生研究は報告されつつあるが、治療法としてはまだ確立されていないのが現状である。しかしながら、重度な嗅覚障害に対する新たな治療法として、この再生治療への期待は大きく、より多くの研究報告が望まれる。

代表者らは、これまでに GFP (Green Fluorescence Protein) マウス由来の骨髄を致死量の放射線を照射したマウスに移植したところ、GFP マウス由来の骨髄細胞が嗅上皮細胞に分化していることを報告 (Brain Research, 1052 (2005) 10-15) している。この報告から、骨髄細胞が嗅上皮細胞に分化可能であり、嗅覚障害の治療において骨髄幹細胞を用いた再生治療の可能性を見出している。

さらに代表者らは、GFP マウスを用いた骨髄移植実験の後、嗅覚組織障害を与えたところ、嗅上皮組織中だけでなく、嗅球組織中にも GFP マウス由来の骨髄細胞を観察している。

嗅球は脳の一部であり、嗅上皮細胞のように定期的な再生は繰り返しておらず、嗅上皮細胞と比べ、その再生は困難であると考えられている。しかしながら、嗅球神経細胞の再生が可能となれば、脳の神経細胞再生にもつ

ながるため、その期待は非常に大きい。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では再生が難しいとされる嗅球組織障害マウスの嗅覚機能回復を目指し、嗅覚障害に再生治療という新たな治療の可能性を見出すために、下記の5点を目的として研究を行った。

(1) 骨髄細胞の嗅球構成細胞への分化能について明らかにする。

嗅覚組織障害後における、骨髄細胞の嗅球組織への関与を検討するために、GFP マウスを用いた骨髄移植、及び嗅覚組織障害を起こしたマウス嗅球組織切片を作製し、各種抗体を用いた免疫染色を行い、組織学的観察を行う。

(2) 嗅覚組織障害時における移植骨髄細胞の経時的变化について明らかにする。

嗅覚組織障害後の経時的变化に伴った骨髄細胞の動向を検討するために、GFP マウスを用いた骨髄移植、及び嗅覚組織障害を施したマウスを作製し、嗅覚組織障害から経時的にマウス頭部組織を摘出する。続いて、抗 GFP 抗体を用いた免疫染色を行い、組織学的観察を行う。

(3) サイトカインを用いた骨髄細胞の取り込み率増加について明らかにする。

骨髄幹細胞を動員させる作用をもつサイトカインを用いて、骨髄細胞の嗅球への生着率増加を検討するために、GFP マウスを用いた骨髄移植及び嗅覚組織障害後に、サイトカインを投与し、マウス頭部組織を摘出する。続いて、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行い、GFP 陽性細胞についてサイトカイン未投与群と比較する。

(4) サイトカイン投与群及び未投与群における移植骨髄細胞の嗅球構成細胞への分化動

向について明らかにする。

(3)で作製した各条件下でのマウス嗅球組織切片を用いて、抗 GFP 抗体と各種抗体(嗅球構成細胞の同定抗体)との蛍光 2 重免疫染色を行い、組織学的観察を行う。

(5)嗅覚組織障害後の回復過程において、嗅上皮と嗅球での経時的变化の差異について明らかにする。また、同時に移植骨髄細胞の経時的变化についても、嗅上皮と嗅球での差異を明らかにする。

GFP マウスを用いた骨髄移植、及び嗅覚組織障害を施したマウスを作製し、嗅覚組織障害から経時的にマウス頭部組織を摘出する。続いて、嗅上皮及び嗅球組織切片を用いて、各種抗体を用いた免疫染色を行い、組織学的観察を行う。

3. 研究の方法

(1)骨髄細胞の嗅球構成細胞への分化能に関する解析。

①：骨髄移植と嗅覚組織障害モデルマウス

野生型 (C57BL/6) マウスに致死量の X 線 (10Gy) を照射し、培地 (HBSS) で調製した GFP トランスジェニックマウス由来骨髄細胞 (1×10^7 個/200 μ l) を尾静脈から移植した。次に、薬物投与 (メチマゾール: 50mg/Kg) による嗅覚組織障害から 1 カ月後、マウス頭部を摘出し、4%PFA (パラホルムアルデヒド) 固定、10%EDTA 脱灰処理を施した。その後脱水 (エタノール)、中間処理 (キシレン) の後、パラフィン処理を施してマウス嗅球組織切片 (4 μ m) を作製した。

②：組織学的観察による分化能解析

①で作製したマウス嗅球組織切片を用いて、各種抗体による免疫組織化学的染色を行った。嗅球構成細胞の同定には、抗 TBX21 抗体 (投射細胞: 僧帽細胞、房飾細胞)、抗 ARX 抗体 (抑制性介在神経細胞: 傍糸球細胞、顆

粒細胞)、抗 GFAP 抗体 (グリア細胞)、抗 Iba1 抗体 (ミクログリア細胞) を用い、抗 GFP 抗体との蛍光 2 重免疫染色を行った。

(2) 嗅覚組織障害時における移植骨髄細胞の経時的变化に関する解析。

GFP マウス由来骨髄細胞移植を行った後、薬物投与による嗅覚組織障害から 2、5、10、30 日後にマウス頭部組織を摘出した。(1)-①と同様の定法にてマウス嗅球組織切片を作製し、抗 GFP 抗体を用いた免疫染色による組織学的観察を行った。

(3) サイトカインを用いた骨髄細胞の取り込み率増加に関する解析。

GFP マウス由来骨髄細胞移植を行った後、薬物投与による嗅覚組織障害から 2 日後 (1 回目)・6 日後 (2 回目) にサイトカイン (G-CSF, G-CSF + SCF, SCF) および溶媒のみ (Control) を投与した。サイトカイン投与量 (2 回分) は、G-CSF: 1mg/kg, SCF: 250 μ g/kg とし、未投与群では溶媒のみを投与した。

サイトカイン及び溶媒のみの投与から 2 カ月後にマウス頭部組織を摘出し、(1)-①と同様の定法にてマウス嗅球組織切片を作製した。続いて抗 GFP 抗体を用いた免疫染色を行い、嗅球組織内での GFP 陽性細胞をカウントした。そして単位面積あたりの陽性細胞数を算出し、サイトカイン投与群、サイトカイン未投与群において統計ソフトを用いた解析を行った。

(4) サイトカイン投与群及び未投与群における移植骨髄細胞の嗅球構成細胞への分化動向に関する解析。

(3)で作製した各サイトカイン条件下での嗅球組織切片を用いて、抗 GFP 抗体と各種抗体 (神経細胞同定抗体: TBX21, Arx、グリア細胞同定抗体: GFAP, Iba1) との蛍光 2 重免疫染色を行った。

(5) 嗅覚組織障害後の回復過程における、嗅上皮と嗅球での経時的変化の差異に関する解析。

GFP マウス由来骨髄細胞移植を行った後、薬物投与による嗅覚組織障害から 2、5、10、30 日後にマウス頭部組織を摘出した。(1)-①と同様の定法にてマウス嗅上皮組織切片および嗅球組織切片を作製し、各種抗体(抗 OMP 抗体、抗 GFP 抗体)を用いた免疫染色を行い、障害からの経時的変化について組織学的観察を行った。

4. 研究成果

(1) 骨髄細胞の嗅球構成細胞への分化能に関する解析。

TBX21, ARX, GFAP, Iba1 抗体について GFP 抗体とのダブルポジティブ細胞が確認された。この結果から、骨髄細胞の嗅球構成細胞への分化能が確認された。図 1 では Tbx21, Iba1 抗体と GFP 抗体との蛍光 2 重免疫染色像を示している。

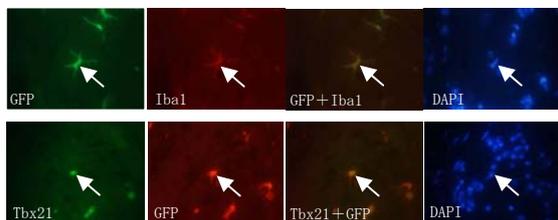


図 1

(2) 嗅覚組織障害時における移植骨髄細胞の経時的変化に関する解析。

嗅球での GFP 陽性細胞は、薬物投与から経時的に増加する傾向が認められた。また、GFP 陽性細胞は、嗅球の外側から内側組織に向かって経時的に増加する様子が観察された(図 2)。

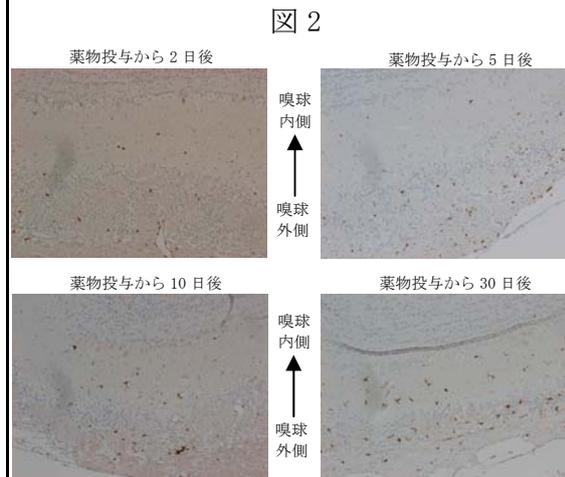


図 2

この結果から、嗅球障害時において、骨髄細胞は嗅球の外側組織へ優先的に取り込まれた後、内側組織に意向することが示唆された。

(3) サイトカインを用いた骨髄細胞の取り込み率増加に関する解析。

骨髄細胞の取り込み率検討の結果、G-CSF+SCF 投与群においてサイトカイン未投与群との有意差が認められた(図 3)。

サイトカイン投与による骨髄細胞取り込み率の検討

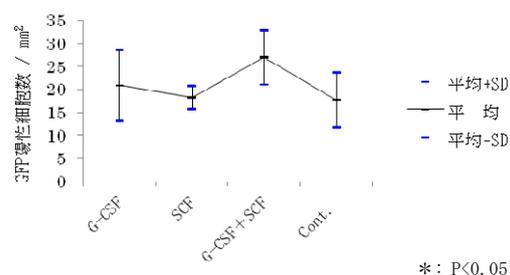


図 3

この結果から、G-CSF 及び SCF の単一投与より複合投与の方が骨髄細胞の取り込み率を増加させることが判明した。

(4) サイトカイン投与群及び未投与群における移植骨髄細胞の嗅球構成細胞への分化動向に関する解析。

GFP 陽性細胞は、TBX21 等の神経細胞同定抗体とのダブルポジティブが観察されたが、Iba1 等とのグリア細胞同定抗体とのダブル

ポジティブが非常に多く観察された。この結果から、骨髄細胞は神経細胞の修復等への積極的関与が示唆された。

(5) 嗅覚組織障害後の回復過程における、嗅上皮と嗅球での経時的変化の差異に関する解析。

薬物投与による障害から、経時的に嗅覚組織を観察したところ、薬物投与から2日後には嗅上皮組織で障害が観察され、5日後からは嗅上皮細胞層の再生が観察された。続いて30日後には嗅上皮組織の再生完了が観察された。一方、嗅球では薬物投与後初期では特に目立った障害は観察されなかったが、薬物投与の10日後から次第に嗅球組織内の糸球体委縮が観察され始め、30日後ではその様子が顕著に見られた(図4-A)。また、GFP陽性細胞も各組織の障害観察時に多く見られた(図4-B)。この結果から、嗅上皮と嗅球の組織障害は異なる時期に起こり、移植骨髄細胞の動向も各障害時期に伴うことが判明した。

図4-A：免疫染色(OMP抗体)

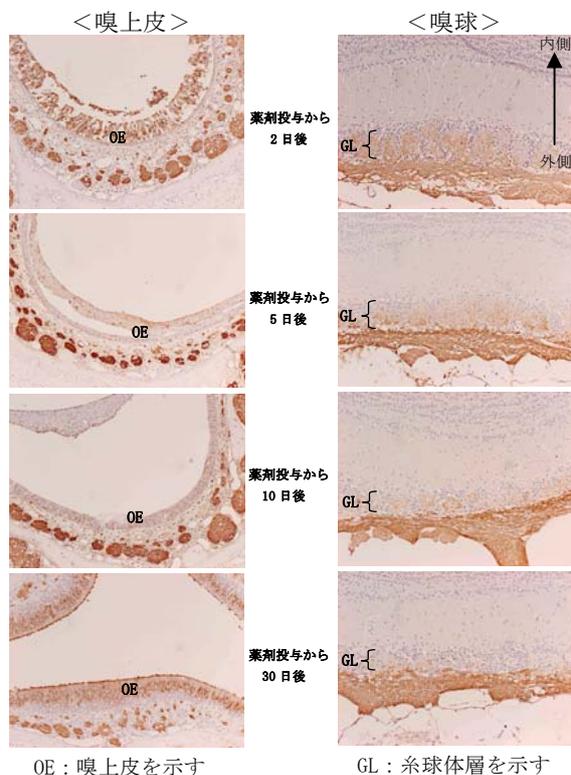
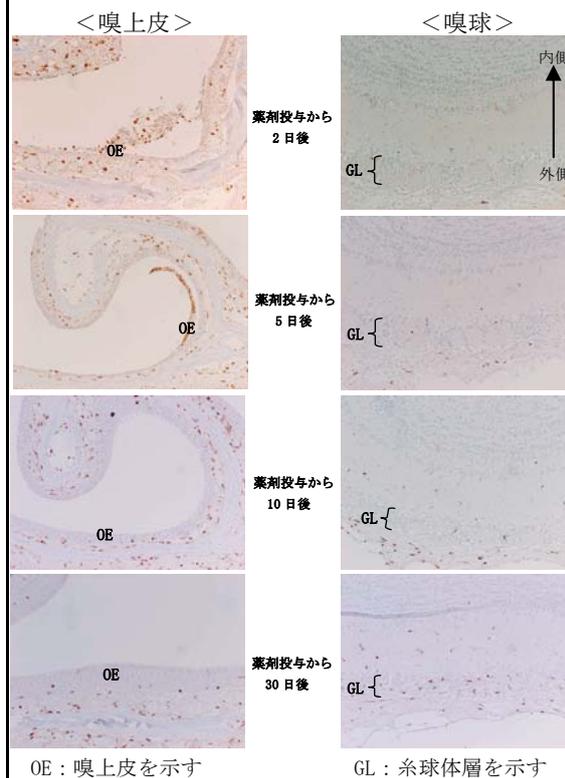


図4-B：免疫染色(GFP抗体)



OE：嗅上皮を示す

GL：糸球体層を示す

以上の成果より、骨髄細胞を用いた再生治療は、嗅上皮障害だけでなく嗅球障害についても新たな治療法となりうる可能性が見出された。また、サイトカイン複合投与や嗅上皮と嗅球の組織障害タイムラグを活用することで、再生治療の可能性がより高められることが示唆された。

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3件)

- ①Orita S, Yoshinobu J, Orita Y, Tsujigiwa H, Kakiuchi M, Nagatsuka H, Nomiya S, Nagai N, Nishizaki K.、Prolactin may stimulate proliferation in the olfactory epithelium of the female mouse.、Am J Rhinol Allergy.、査読有、23(2)、2009、135-8
- ②Orita Y, Tsujigiwa H, Nishizaki K, Teshima T, Yoshinobu J, Orita S, Takeuchi A, Takeda Y, Nagatsuka H, Nagai

N. 、

The engraftment of transplanted bone marrow - derived cells into the inner ear. 、
Eur Arch Otorhinolaryngol. 、査読有、
266(1)、2009、59-63

③Borkosky SS, Nagatsuka H, Orita
Y, Tsujigiwa H, Yoshinobu J, Gunduz
M, Rodriguez AP, Missana LR, Nishizaki
K, Nagai N. 、 Sequential expressions of
Notch1, Jagged2 and Math1 in molar tooth
germ of mouse. 、Biocell.、査読有、32(3)、
2008 、251-8

〔学会発表〕(計1件)

①吉延潤子、G-CSFを用いた嗅上皮傷害時における骨髄細胞の取り込み率の検討、第47回日本鼻科学会総会、平成20年9月26日、名古屋国際会議場

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉延 潤子 (YOSHINOBU JUNKO)
岡山大学・医学部・技術専門職員
研究者番号：80448224