

平成 22 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890073

研究課題名（和文） 嗅神経細胞の再生、および再生母細胞に関する組織学的研究

研究課題名（英文） Histological study of regeneration and stem cell of the olfactory neuron

研究代表者

野村 智幸 (NOMURA TOMOYUKI)

新潟大学医歯学総合病院・助教

研究者番号：90515652

研究成果の概要（和文）：匂いを感じ取る嗅神経細胞は、定期的に死と再生を繰り返す珍しい細胞であることが知られている。しかし、その元となる再生母細胞やその細胞が再生後に成長していく様子は、不明な点が多い。本研究では、マウスの嗅球（嗅神経細胞の線維が入力される脳組織）を除去したり、アルカリで標本を処理するなどの工夫を凝らすことによって、嗅神経細胞の変性・消失（死んでいく過程）と成長の様子を光学顕微鏡や走査電子顕微鏡を用いて詳細に観察することができた。

研究成果の概要（英文）：We know that the olfactory neuron cells which perceive the smell are unusual cells that regularly repeat death and regeneration. However, there are a lot of uncertain points of the stem cell and the morphological change in regenerative process. In the present study, the morphological changes in degenerative, disappearance (dying), and regenerative process of the olfactory neuron cells were able to be observed in detail by the light microscope and the scanning electron microscopy because I exercised my ingenuity of the removal of olfactory bulb (brain tissue to which the nerve fibers of olfactory neuron cells are input) and the processing the specimen with alkali, etc.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,330,000	399,000	1,729,000
2009年度	1,030,000	309,000	1,339,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

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：嗅神経細胞、再生母細胞、嗅球除去、アルカリ消化法、走査電顕

1. 研究開始当初の背景

嗅上皮に存在する嗅神経細胞は、正常状態においても常に turn over を行うこと、また、種々の要因による変性の後に再生することが古くから知られている。

組織学的にみると、嗅上皮は、基底細胞、嗅神経細胞、支持細胞、およびボウマン腺の導管細胞から構成されており、従来より嗅神経細胞の再生母細胞は嗅上皮の基底膜上に配列する基底細胞であると考えられている。また、この再生母細胞は多能性前駆細胞での性格をもち、嗅神経細胞以外の神経細胞や神経細胞以外の様々な細胞にも分化し得るとの報告がある。そのため、臨床的にも再生医療の幹細胞研究として嗅神経細胞の再生母細胞の研究が大いに期待される場所である。一方で、現在、嗅神経細胞の再生母細胞の単離回収が試みられているが、この細胞の正確な存在部位と形態は未だ不明な点が多く、嗅神経細胞の再生母細胞についての詳しい形態解析の必要性がますます高まっている。

申請者は、新潟大学大学院医歯学総合研究科(顕微解剖学教室)において、正常嗅上皮の微細形態について走査電子顕微鏡(走査電顕)によって解析し、光学顕微鏡(光顕)像や透過電子顕微鏡(透過電顕)像と比較することで嗅上皮の三次元的細胞構築を明らかにしてきた(Nomura T. *et al.*: Arch Histol Cytol. 67(2):159-70, 2004)。その過程で再生母細胞の同定は単純な形態解析では、難しいことに気がついた。したがって、現段階では再生母細胞について正確には同定できていない。

そこで、この問題を克服するために、本研究の予備実験として、マウスに嗅球除去術を

施して嗅神経細胞の再生を促進することで再生母細胞を同定しやすくする実験を行った。すなわち、この実験では、嗅球除去によって嗅神経細胞の再生母細胞は障害を受けないので、嗅球除去術後は、正常時に比べ嗅上皮全体における再生母細胞の占める割合が高くすることができる。

以上から本研究では、嗅球除去術を施した標本を形態解析することにより、術後嗅神経細胞の変性および分化成熟についての三次元的微細構造変化が明らかにし、嗅神経細胞の再生母細胞について解明できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、嗅球除去術後における嗅神経細胞の変性および分化成熟についての三次元的微細構造変化が明らかにし、さらに、免疫組織化学の手法を応用して分裂細胞を同定することで、嗅神経細胞の再生母細胞について解明する。

3. 研究の方法

雄 ddY マウス(4~6 週齢)に嗅球除去術を施し、術後 2 日、5 日、7 日のマウスを 2% グルタルアルデヒドにより固定(血管内灌流と鼻腔内注入による)し、鼻粘膜を摘出した。また、対照として嗅球除去術を行わない正常鼻粘膜を材料とした。

光顕: 1% オスミウム酸で後固定したものをエポン包埋し、準超薄切片をトルイジンブルーで染色後、光顕観察を行った。

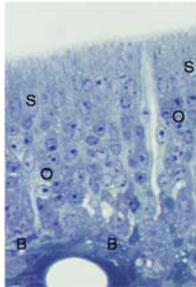
走査電顕: 60°C の 30% KOH で標本を 8 分間処理し、結合組織を消化除去した。その後実体顕微鏡下で微小解剖を行い、導電染色、脱水、臨界点乾燥後、金属コーティングを施して上皮側面および鼻腔面の走査電顕観察を行った。

・ 研究成果

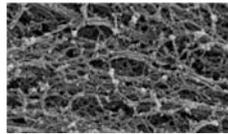
(1) 正常マウスの解析

光顕では、核や細胞の形、存在部位から嗅上皮が嗅細胞、支持細胞、基底細胞、そして嗅腺の導管から構成されることが確認できた(図1)。

走査電顕標本では、アルカリ消化法を用いる事により鼻腔面のみでなく、側面や基底面からの観察が可能となったため、種々の細胞が容易に区別できた。(図2、図3)



(図1)
O: 嗅細胞 S: 支持細胞
B: 基底細胞



(図2) 鼻腔面像
嗅小毛で覆われる



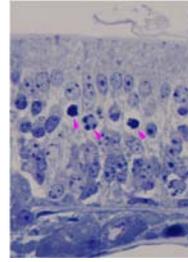
(図3) 側面像
樹状突起
軸索
*; 嗅細胞を黄色に着色

(2) 嗅球除去マウスの解析

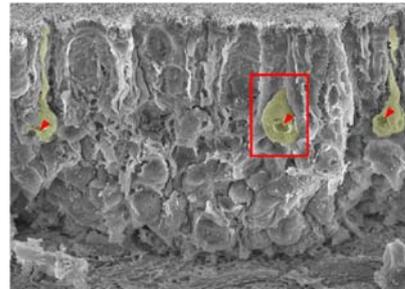
①術後2日目

光顕像では、上皮の中間層で成熟嗅細胞の核の変性が多く見られ、基底部の分裂細胞はあまり観察されなかった(図4)。

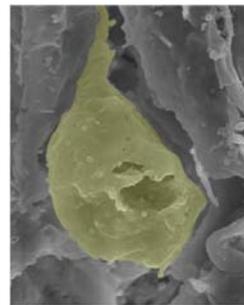
走査電顕像では上部の嗅細胞の細胞体に変性のために生じたと思われる特徴的な大小の陥凹が観察され、それらの変性細胞には樹状突起および嗅小胞がまだ残存していた(図5、図6)。



(図4)
成熟嗅細胞の核の変性が見られる(矢頭)



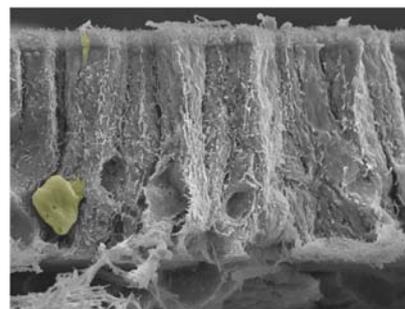
(図5) 変性過程の嗅細胞
樹状突起、嗅小胞は残存するが嗅細胞の細胞体に陥凹が見られる(矢頭)



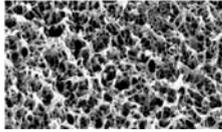
(図6) 拡大像
変性のために生じた特徴的な陥凹

② 術後5日目

光顕像および走査電顕像では、嗅細胞がほとんど消失し、上皮の丈は低くなっていた。個々の支持細胞は円柱状に変化していた(図7)。鼻腔面からの観察では嗅小毛、嗅小胞ともほとんど見られなかった(図8)。



(図8)
嗅細胞はほとんど消失し、残った嗅細胞も変性過程と考えられる

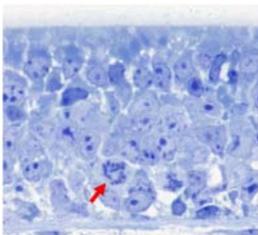


(図8) 鼻腔面像
嗅小毛、嗅小胞とも
見られない

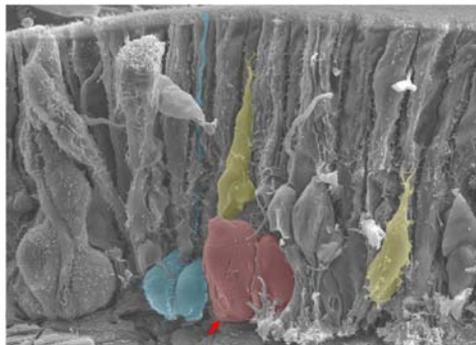
③術後7日目

光顕像では、上皮の下部に多くの嗅細胞が観察できた。また、基底部（基底細胞の一層上の部分）に分裂細胞を比較的多く認めた（図9）。

走査電顕像では上皮内に分裂細胞と考えられる基底部に存在する巨大な細胞が見られ（図10）、また、様々な成熟段階の未熟な嗅細胞が観察された（図11～18）。

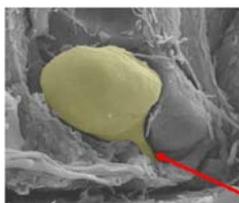


(図9)
上皮中間から下部に多くの未熟な嗅細胞の核と、基底部に分裂細胞（矢印）が見られる



(図10)

分裂細胞と考えられる巨大な細胞（矢印、赤く着色された細胞）

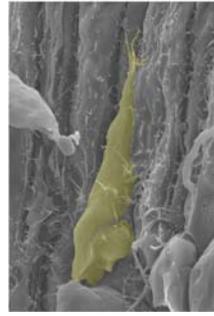


軸策

(図11) 嗅上皮基底部の拡大像

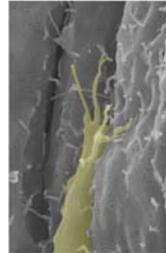
細胞体が横長の球形で、樹状突起は持たず軸策のみ基底面へ伸ばしている細胞

嗅細胞の分化過程は、樹状突起より先に軸策を出すことがわかる



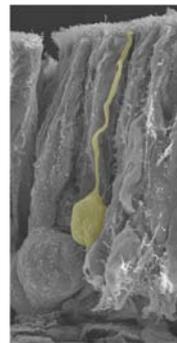
(図12)

樹状突起をもたず、細胞体が非常に細長く、先端が先細りして終わっている細胞



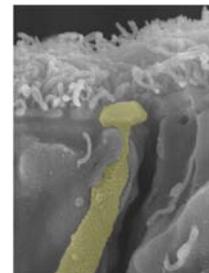
(図13) 図12の細胞の先端拡大像

先端部では何本もの細い突起を様々な方向に伸ばしている

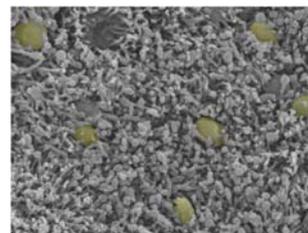


(図14)

樹状突起が鼻腔面へ伸び細胞体が球状になって、樹状突起と細胞体との区別がはっきりした細胞

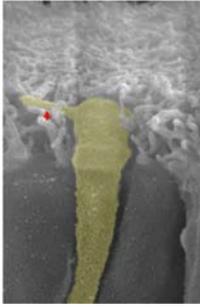


(図15) 先端拡大像
未熟な嗅小胞が形成されている

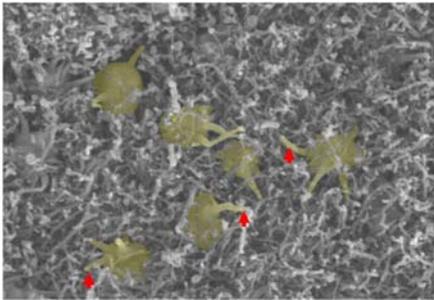


(図16) 鼻腔面像

鼻腔面に達した樹状突起は、丸い未熟な嗅小胞を形成しているが、まだ嗅小毛は出現していない



(図17)
更に変化して、嗅小胞は
より発達し、短い嗅小毛
を出し始める



(図18) 鼻腔面像
嗅小毛(矢印)が鼻腔面上を様々な方向へ広
がり始めている様子がわかる

(3) まとめ

嗅球除去後の嗅上皮をKOH消化法を用いてSEM観察することにより、変性および分化成熟する各過程の嗅細胞の経時的表面立体形態変化を知ることができた。

嗅球除去後2から5日目では嗅細胞は変性消失するが、7日目には嗅細胞が活発に分化成熟しており成熟の各段階の形態変化を解析できた。

基底細胞、分裂細胞それぞれを観察、分析することはできたが、再生母細胞とこれらの細胞との関係については十分な結果が得られなかった。

これは、時間的制約のために、これらの細胞の免疫染色、およびオスミウム浸軟法による観察・解析が不十分となってしまったためであり、今後も免疫染色、およびオスミウム浸軟法による観察・解析を続けることで、再生母細胞の解析が進むものと考える。

5. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 智幸 (NOMURA TOMOYUKI)
新潟大学医歯学総合病院・助教
研究者番号：90515652