

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03090

研究課題名(和文)におい刺激、無刺激が認知、情動ならびに嗅覚機能に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of odor stimuli and no stimuli on olfactory function as well as cognition and emotion

研究代表者

三輪 高喜 (MIWA, Takaki)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：20229909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,720,000円

研究成果の概要(和文)：嗅神経の変性あるいは嗅球の欠失による嗅覚中枢の変化ならびに認知と情動に及ぼす影響をマウスを用いて観察した。嗅神経が変性により、嗅球の傍系球体細胞の新生が減少し、それは嗅神経の再生後も続くことが組織化学的に判明した。嗅球の除去により、不安様行動が引き起こされるとともに、アルツハイマー病モデルマウスでは更に認知機能の低下が起こることが、行動学的研究で証明された。アルツハイマー病モデルマウスでは、嗅球除去により1年後の海馬におけるアミロイド沈着がより高度となった。以上の結果から、嗅覚の低下は嗅覚中枢の再生にも影響を及ぼし、アルツハイマー病の進行を早める可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嗅覚障害の治療として毎日複数回、においを嗅ぐ嗅覚刺激療法の有効性が知られている。一方、嗅覚の低下は認知症やフレイル、サルコペニアなどの加齢に伴う生体の変化に関わることも知られるようになってきた。本研究では、嗅覚刺激がなくなる状態を人為的に作製し、その後の認知や情動に及ぼす影響ならびに嗅覚中枢での可塑性について動物を用いて検討した。その結果、末梢の嗅覚障害により、中枢の嗅覚系の再生ニューロンにも変性が及ぶことが組織化学的に証明され、情動や記憶に影響が及ぶことが行動学的に証明された。したがって嗅覚低下あるいは脱失は、においがわからないということだけではなく、中枢神経にも影響が及ぶことが推測された。

研究成果の概要(英文)：We observed the effects of olfactory nerve degeneration or bulb deletion on the olfactory center and on cognition and emotion in mice. Histochemical examination revealed that olfactory nerve degeneration resulted in decreased neogenesis of periglomerular neurons in the olfactory bulb, which persisted after olfactory nerve regeneration. In all mice, behavioral studies demonstrated that removal of the olfactory bulb caused anxiety-like behavior. In Alzheimer's disease model mice, the removal also lead to further cognitive decline and resulted in more severe amyloid deposition in the hippocampus one year later. These results suggest that olfactory loss may also affect the regeneration of the olfactory central pathway and hasten the progression of Alzheimer's disease.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：嗅覚障害 アルツハイマー病 嗅覚刺激療法 MRI モデルマウス アミロイド沈着 気分障害

### 1. 研究開始当初の背景

においの刺激が嗅覚を生じさせることは動物におけるいにしえからの常識であるが、その受容機構と伝導経路が解明されてきたのは20世紀後半からである。一方、におい刺激が嗅覚以外にもさまざまな作用を有する可能性が示唆されるようになってきた。例えば、嗅覚障害患者ににおい刺激を与える嗅覚刺激療法により、障害の回復率が向上する。一方、におい刺激の減少、すなわち嗅覚障害が認知症やフレイルの発生と密接な関連を有するとの報告も数多く見られるようになった。しかし、におい刺激がいかに嗅覚機能の回復に働くのか、認知機能にも良い影響を与えるのか、逆に嗅覚低下により中枢がどのような影響を受けるのかという点についてはまだわかっていなかった。

### 2. 研究の目的

におい刺激がどのような機序で嗅覚障害を改善させるのか、におい刺激により認知症が改善するのか、逆ににおい刺激の減少、途絶が中枢にどのような影響を及ぼすかなどの解明を目的に本研究を企図した。これらのうち、前半のにおい刺激が及ぼす影響については、十分な解答を得るに至らなかったため、ここでは後半のにおい刺激の途絶による中枢への影響について報告する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 嗅覚障害による認知、情動への影響

アルツハイマー病 (AD) モデルマウス (3xTg-AD) と野生型マウスを用い、非可逆的な嗅覚脱失モデルとして、両側嗅球を吸引除去した。嗅球除去による嗅覚機能の消失は、マウスが嫌う 2 MT による忌避行動の消失により確認した。モリス水迷路、新規物体識別、コンテキスト恐怖学習を施行し、認知機能を評価し、嗅覚正常マウスと無嗅覚マウスとを比較した。一定期間の行動観察後に脳組織を摘出し、海馬を含めた嗅覚系における組織化学的变化を観察した。

#### (2) 嗅神経障害による嗅球内神経細胞の変化

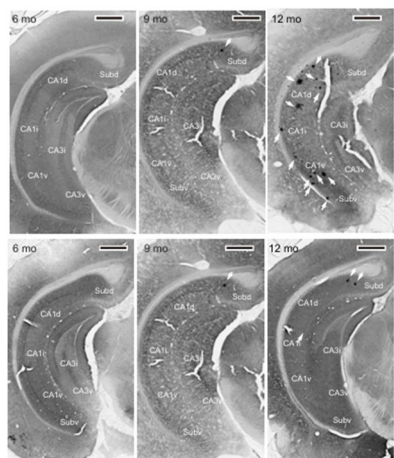
マウスにおいて鼻腔内から嗅球へ伸びる嗅神経は、軸索切断や阻害薬投与後直ちに変性脱落し、その後、約4週間で回復することが知られている。嗅覚系では、嗅神経のほか、嗅球内の傍系球体細胞や海馬細胞が成熟後も再生する。側脳室前方の脳室下帯で発生した新生細胞は、吻側移動流 (RMS) を通って嗅球まで到達した後、傍系球体細胞と顆粒細胞に分化する。傍系球体細胞は嗅球において、嗅覚伝導に対して抑制や調節などの機能を有している。マウス腹腔内に嗅神経阻害薬であるメチマゾールを投与し、嗅神経の可逆的変性を生じさせた後、変性、再生時における嗅球系球体ならびに RMS を通過する新生細胞と傍系球体細胞の変化を経時的に観察した。組織学的観察は、メチマゾール投与前 (対照) 投与3日後、7日後、14日後、28日後に鼻粘膜と全脳を摘出して観察した。全脳摘出4時間前と2時間前に分裂細胞の指標である EdU を投与し、摘出脳組織は連続切片を作成した。鼻粘膜と嗅球系球体は、成熟嗅細胞の指標である olfactory marker protein (OMP) の抗体を用いて観察し、脳組織における RMS を通過する新生細胞は、分裂細胞の指標である doublecortin ならびに EdU の抗体を用いて免疫組織学的に観察し、定量化した。

### 4. 研究成果

#### (1) 嗅覚障害による認知、情動への影響

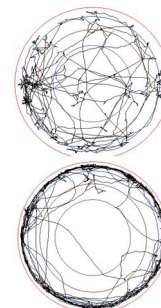
3xTg アルツハイマー病 (AD) モデルマウスを使用し、除嗅球を施して行動解析を続けた。AD モデルおよび野生型マウスの両者で、嗅球除去により不安様

図2



行動が引き起こされた (図1: オープンフィールド試験による歩行軌跡の解析; 辺縁部に偏るほど不安傾向が強い; 上段はシャーム例で下段は除嗅球 3xTg マウス)。モリス水迷路試験による認知テストでは、認知機能がもともと低下している AD マウスにおいて除嗅球による一層の認知機能低下を検出するため、プール周囲の視覚的キューを拡張するなどの処置を行った。その結果、一部の指標において悪化が認められた。嗅球除去により、より一層の認知機能低下が起こっていると解釈できる。海馬におけるアミロイド沈着の組織学的検索については、当初は十分な同定が行えなかったため、平行して除嗅球を行わない 3xTg マウスにおいて生後6か月から12か月を超えて系統的に調べたところ、沈着の月次進行に雌雄差があること、オスでは12か月

図1



まで待たなければ検討可能なほどの十分な沈着が確認できないことが判明した(図2:上段メス、下段オス 3xTg マウスの海馬とその周辺におけるアミロイド沈着、それぞれ 6/9/12 月齢で調べた; 原典 Ono et al, 2024)。すなわち、除嗅球が沈着に及ぼす促進的影響を調べるため、当初の実験で半年余り程度生存させて組織検索を行っていたのは時期尚早であった。そこで 12 か月齢となるのを待って検索したところ、除嗅球による沈着の高濃度化が確認できた(図3:上段、除嗅球 3xTg マウス;下段、シャーム 3xTg マウス、沈着はいずれも海馬 CA1 に隣接する海馬台 Subiculum に集積していたが、除嗅球例で高密度だった)。嗅覚障害が AD や他の認知症状を呈する神経疾患と関連し、そのマーカーとして有用であることが臨床的に繰り返し報告されている。その解釈として、疾患による神経回路の障害が嗅覚同定や嗅覚識別能低下をもたらすと解釈されている。これに対し、先行する嗅覚ロスが AD 進行を早める可能性を本研究で打ち出したことになる。

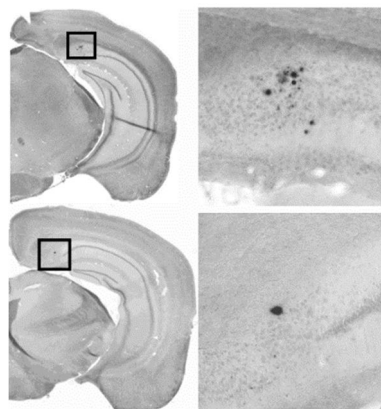


図3

## (2) 嗅神経障害による嗅球内神経細胞の変化

嗅粘膜において抗 OMP 抗体陽性の嗅神経細胞は、メチマゾール投与後減少し、28 日後には投与前と同等に増加、回復した。嗅球系球体はメチマゾール投与 3 日後に縮小し、系球体における OMP 陽性軸索線維は萎縮した。系球体の面積についても通常のサイズの系球体は経過とともに減少し、系球体内の OMP 陽性細胞数も嗅上皮における嗅細胞が回復した 28 日目においても減少を続けた(図4、図5)。

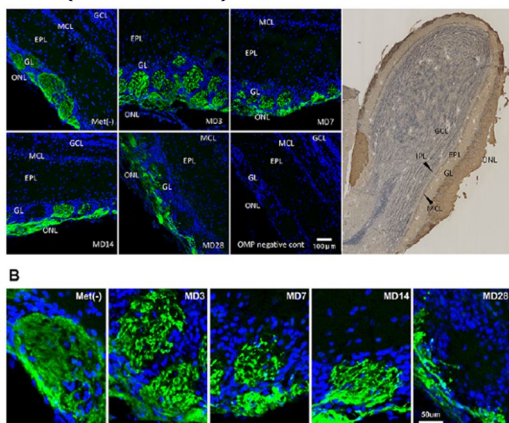


図4 嗅球系球体 OMP 陽性線維

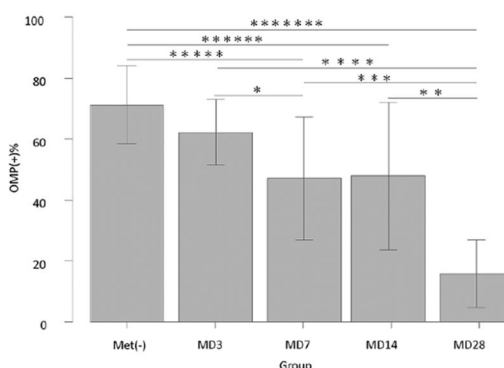


図5 系球体 OMP 陽性率

脳の矢状断切片で脳室前方から RMS 内を通過し S 字状のカーブを描いて嗅球に連続する抗ダブルコルチン抗体陽性神経芽細胞が観察され、その内部に抗 EdU 抗体陽性新生細胞が観察された(図6)。RMS の面積はメチマゾール投与 3 日後に減少し、28 日後まで回復しなかった。RMS 内の抗 EdU 抗体陽性新生神経細胞もメチマゾール投与 3 日後には著明に減少したが、7 日後からは増加したが、28 日後まで投与前と同等となるまでは回復しなかった(図7)。

以上の結果から、鼻腔内の嗅上皮の嗅神経細胞は傷害後 28 日で回復するものの、系球体や RMS を含めた中枢の細胞はある程度の回復は見られるものの、傷害 28 日後でも十分な回復が得られなかったことが証明された。したがって、嗅神経の障害により、一見、嗅神経は回復しているように見えても、中枢へのおい刺激の伝導は長期間続くことが予想される。人間の嗅神経の再生はマウスなどのげっ歯類よりも長くかかるとされており、嗅覚障害の中枢への影響も長期に渡ることが想像された。

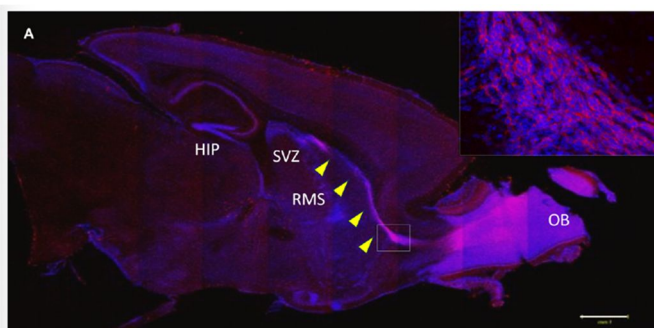


図6 マウス全脳矢状断標本

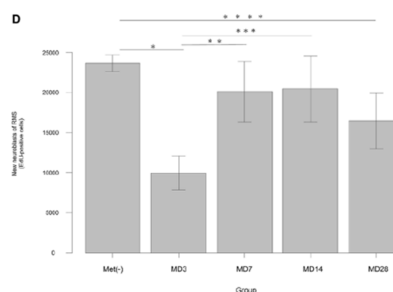


図7 RMS 内の EDU 陽性率

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishikura T, Shiga H, Nakamura Y, Kanitani T, Ishigaki Y, Miwa T	4. 巻 12
2. 論文標題 Olfactory regeneration with nasally administered murine adipose-derived stem cells in olfactory epithelium damaged mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 765-765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells12050765	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Patel ZM, Holbrook EH, Doty RL, Duffy VB, Goldstein BJ, Gudis DA, Haehner A, Higgins TS, Hopkins C, Huart C, Hummel T, Jitaroon K, Kern RC, Khanwalkar AR, Kobayashi M, Kondo K, Lane AP, Lechner M, Leopold DA, Levy JM, Marmura MJ, Mclelland L, Miwa T, et al	4. 巻 12
2. 論文標題 International consensus statement on allergy and rhinology: Olfaction.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int Forum Allergy Rhinol	6. 最初と最後の頁 327-680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/alr.22929.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kobayashi M, Miwa T, Mori E, Shiga H, Tsuzuki K, Okutani F, Hayama M, Akazawa H, Nakamura Y, Suzuki M, Matsuwaki Y, Ogino E, Shikina T, Ikeda K, Hyo Y, Kashiwagi T, Kondo K, Shibata M, Ueno T.	4. 巻 50
2. 論文標題 Efficacy of tokishakuyakusan and mecobalamin on post-infectious olfactory dysfunction: A prospective multicenter study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2023.04.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hernandez AK, Landis B, Altundag A, Fjaeldstad AW, Gane S, Holbrook EH, Huart C, Konstantinidis I, Lechner M, Macchi A, Portillo Mazal P, Miwa T, Philpott CM, Pinto JM, Poletti SC, Vodicka J, Welge-Luessen A, Whitcroft KL, Hummel T.	4. 巻 85
2. 論文標題 Olfactory Nomenclature: An Orchestrated Effort to Clarify Terms and Definitions of Dysosmia, Anosmia, Hyposmia, Normosmia, Hyperosmia, Olfactory Intolerance, Parosmia, and Phantosmia/Olfactory Hallucination	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec	6. 最初と最後の頁 312-320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000530211	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Demura T, Okuno T, Miwa T, Iritani O, Nakano H, Yamamoto J, Shiga H, Kodera K, Morimoto C, Demura N, Morimoto S.	4. 巻 23
2. 論文標題 Sarcopenia and decline in appendicular skeletal muscle mass are associated with hypoperfusion in key hubs of central autonomic network on 3DSRT in older adults with progression of normal cognition to Alzheimer's disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Geriatr Gerontol Int.	6. 最初と最後の頁 16-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ggi.14515	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 三輪高喜	4. 巻 22
2. 論文標題 高齢者に多い耳鼻咽喉科疾患	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 鼻アレルギーフロンティア	6. 最初と最後の頁 94-100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 三輪高喜	4. 巻 274
2. 論文標題 嗅覚の老化とアンチエイジング	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ENTONI	6. 最初と最後の頁 25-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 三輪高喜	4. 巻 282
2. 論文標題 嗅覚の加齢変化と生命へ及ぼす影響	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 714-719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iritani O, Okuno T, Miwa T, Makizako H, Okutani F, Kashibayashi T, Suzuki K, Hara H, Mori E, Omoto S, Suzuki H, Shibata M, Adachi H, Kondo K, Umeda-Kameyama Y, Kodera K, Morimoto S.	4. 巻 21
2. 論文標題 Olfactory-cognitive index distinguishes involvement of frontal lobe shrinkage, as in sarcopenia from shrinkage of medial temporal areas, and global brain, as in Kihon Checklist frailty/dependence, in older adults with progression of normal cognition to Alzheimer's disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Geriatr Gerontol Int.	6. 最初と最後の頁 291-298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ggi.14128.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 三輪高喜	4. 巻 130
2. 論文標題 嗅覚の加齢変化と生活、生命への影響	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 金沢大学十全医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 34-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Whitcroft KL, Altundag A, Balungwe P, Boscolo-Rizzo P, Fornazieri MA, Frasnelli J, Gane S, Gudziol H, Gupta N, Haehner A, Hernandez AK, Holbrook EH, Hopkins C, Hsieh JW, Huart C, Husain S, Kamel R, Kim JK, Kobayashi M, Konstantinidis I, Landis BN, Lechner M, Macchi A, Mazal PP, Miri I, Miwa T, et al	4. 巻 61
2. 論文標題 Position paper on olfactory dysfunction: 2023.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Rhinology	6. 最初と最後の頁 1-108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4193/Rhin22.483.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Makizako H, Nakai Y, Akaida S, Taniguchi Y, Miwa T, Morimoto S.	4. 巻 28
2. 論文標題 Association of olfactory and gustatory function with memory among community-dwelling independent older adults	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Ann Geriatr Med Res	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4235/agmr.23.0217.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Y, Miwa T, Shiga H, Sakata H, Shigeta D, Hatta T.	4. 巻 51
2. 論文標題 Histological changes in the olfactory bulb and rostral migratory stream due to interruption of olfactory input	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 517-524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2024.01.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 三輪高喜
2. 発表標題 嗅覚障害について知っておくべきこと
3. 学会等名 日本抗加齢医学会研修用講習会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三輪高喜
2. 発表標題 Olfactory dysfunction is related to frailty and cognitive dysfunction in the elderly
3. 学会等名 22nd International Congress of Nutrition in Tokyo (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三輪高喜
2. 発表標題 嗅覚障害 病態に基づいた診療アプローチ
3. 学会等名 第124回日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会総会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三輪高喜
2. 発表標題 嗅覚障害の神経基盤
3. 学会等名 第36回日本老年精神医学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 三輪高喜	4. 発行年 2023年
2. 出版社 ワールドプランニング	5. 総ページ数 346
3. 書名 精神科医のための認知症予防	

〔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	加藤 伸郎  (KATO Nobuo)  (10152729)	金沢医科大学・医学部・教授   (33303)	



## 6. 研究組織（つづき）

	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	志賀 英明  (SHIGA Hideaki)  (80436823)	金沢医科大学・医学部・准教授    (33303)	
研究分担者	中村 有加里  (NAKAMURA Yukari)  (80769117)	金沢医科大学・医学部・助教    (33303)	
研究分担者	石倉 友子  (ISHIKURA Tomoko)  (90769118)	金沢医科大学・医学部・助教    (33303)	
研究分担者	熊井 理美  (KUMAI Masami)  (10808091)	金沢医科大学・医学部・助教    (33303)	
研究分担者	山田 健太郎  (YAMADA Kentaro)  (60722642)	金沢医科大学・医学部・助教    (33303)	削除：2022年4月28日

## 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