

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390388

研究課題名(和文) 嗅上皮と嗅球の再生機構解明に関する網羅的研究

研究課題名(英文) Comprehensive Study on Regeneration of Olfactory Epithelium and Bulb

研究代表者

丹生 健一 (Ken-ich, Nibu)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20251283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：障害された嗅上皮に対する新たな治療法の開発のために、嗅上皮と嗅球の再生について包括的な研究を行った。マイクロアレイ法を用いて、嗅上皮と嗅球の再生過程において有意に高い発現がみられた神経栄養因子を同定した。これらの神経栄養因子を障害を受けた嗅上皮に局所投与したところ、再生が促進されることが確認できた。嗅上皮は嗅神経と支持細胞によりモザイク構造を形成されているが、この形成にカドヘリンやネクチンなどの細胞接着因子が貢献していることを証明した。

研究成果の概要(英文)：To develop a treatment strategy for degenerated olfactory epithelium and bulb, we performed a comprehensive study on regeneration of olfactory epithelium and bulb. First, we studied the gene expression during the degeneration and regeneration process of olfactory epithelium and bulb, using microarray. We found that over expression of several neurotrophic factors during regeneration process of olfactory epithelium and bulb. Next, we showed that topical application of these neurotrophic factors to the degenerated olfactory epithelium accelerated the regeneration of olfactory epithelium. Finally, we demonstrated that cell adhesion molecules, cadherin and nection have critical roles on the development of there-dimensional structure of olfactory epithelium composed of olfactory receptor neurons and supporting cells.

研究分野：耳鼻咽喉科頭頸部外科

キーワード：嗅神経 嗅上皮 神経栄養因子 細胞接着因子

1. 研究開始当初の背景

嗅神経細胞は鼻副鼻腔疾患・中枢性疾患・喫煙・感染・薬剤・加齢など様々な原因により障害され、加齢とともに減少していく。現在、嗅神経細胞の障害による嗅覚障害に対しては、ステロイドの局所投与を中心とした治療が行われているが無効例も多い。しかし、嗅神経細胞には皮膚や粘膜上皮のように終生再生を繰り返すという感覚細胞としては極めて特異な性質を持っており、再生医療実現の可能性が高い臓器である。このような背景から我々はこれまで嗅覚障害の新たな診断法・治療法の開発を目指して研究してきた。

-嗅神経細胞再生のメカニズム-

これまで我々はNeuroD (Nibu. Cell Tissue Res 1999, Nibu. Neuroreport 2001)やNotch(Doi. Neurosci Lett 2006)などのbHLH型転写因子が嗅神経細胞の発生および再生に関与していることを示し、FEZ1が嗅神経細胞の軸索の誘導や嗅上皮の層構造形成に重要な役割を持っていることを発見した (Watanabe Y. J Comp Neurol 2009)。

これらの成果から、bFGFが嗅神経細胞の前駆細胞である基底細胞の増殖を促すことを *in vitro* (Nibu. Biochem Biophys Res Commun 2000)および *in vivo* (Nishikawa. NeuroReport 2009)で示すとともに、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療の可能性を報告した (Doi. Ann Otol Rhinol Laryngol 2005, Doi. Neurosci Lett 2006)。更に、全身投与あるいは局所投与した骨髄間質幹細胞が嗅粘膜内に生着し、基底細胞へと分化する可能性を示した(Ochi N. Ann Otol Rhinol 2010)。しかし完全に成

熟した嗅神経細胞を再生するまでには至っていない。

-嗅神経細胞再生への嗅球の役割-

嗅球は嗅覚の一次中枢として嗅覚受容体で認識された匂いの情報を処理する重要な役割を担っていることはよく知られているが、嗅球は嗅神経細胞の軸索を通して神経栄養因子や成長因子を嗅神経細胞に供給し、嗅神経細胞の増殖や分化、維持に関与していると考えられている。また、最近、生後脳においても側脳室前方上衣下層(SVZ)から終生、新生ニューロンが絶えず作り出され、分裂しながら rostral migratory stream(RMS)と呼ばれる長い経路を通して嗅球へと移動し、最終的に顆粒球細胞および傍系球体細胞に分化することが明らかとなった。これらのことから、嗅球の再生機構解明が嗅神経細胞再生メカニズムの鍵を握っていると期待され、嗅上皮と嗅球とを一体として研究することが重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究計画は嗅上皮と嗅球の再生メカニズムを解明し、嗅覚障害に対する新たな治療法を開発することを目標としている。

1. マイクロアレイと質量分析計による嗅上皮・嗅球再生に関する遺伝子の網羅的解析

本研究では嗅上皮の再生に密接に関与する嗅球も同時に対象とし、全ての遺伝子を網羅的に解析することを計画している。嗅神経細胞障害モデルマウスを用いて、嗅神経細胞の再生過程において嗅球および嗅上皮に発現している遺伝子・代謝産物を、DNA マイクロアレイによる遺伝子解析と質量分析装置によるメタボローム解析により網羅的に検索し、嗅神経細胞ならびに嗅球再生の鍵となる遺伝子を探り出す。有意な変化

を示した遺伝子・蛋白・代謝経路を選びだし、候補となった各遺伝子や蛋白の嗅上皮および嗅球内における局在と動態を免疫組織化学およびISH法、動的変化をRT-PCR法にて解析し嗅上皮再生過程の分子機構を解明する。

2. 側脳室前方上衣下層由来新生ニューロンの動態観測

前述のように、側脳室前方上衣下層(SVZ)から終生、新生ニューロンが作り出され、RMSを通過して嗅球へと移動し、顆粒球細胞および傍系球体細胞に分化していることが知られている。本研究では、嗅神経細胞障害モデルマウスを用い、嗅上皮障害時にこれらの新生ニューロンがどのような動態を示し、どのような遺伝子を発現しているかを検討する。

3. 細胞接着因子の嗅神経細胞再生における役割解明

我々は細胞間接着因子をマーカーに用いて、嗅上皮の発生・再生過程では、嗅細胞と支持細胞が成熟するに伴って細胞の形を変化させ、頂端面側の細胞が再配列することを明らかにしてきた(未発表データ)。実は、このような細胞の運動や形態変化には、細胞接着分子が深く関与することが知られており(Togashi H. Science. 2011)。本研究では細胞間接着因子の中でも嗅神経細胞での発現が高いネクチン family に着目し、各種ネクチン KO(knockout)マウスを用いて構造異常を解析し、嗅上皮再生におけるネクチン family の役割を解明する。

4. 神経栄養因子のカクテル投与による嗅神経細胞再生医療の開発

申請者らのこれまでの研究ではbFGF投与の鼻腔内投与が、嗅神経細胞の前駆細胞である基底細胞を増加させること示した(Nishikawa. NeuroReport 2009)。本研究計画では、加齢マウスを対象に、

嗅神経細胞の分化と維持に関与すると考えられている神経栄養因子

BDNF(brain-derived neurotrophic factor)とbFGFをカクテルとして鼻腔内に局所投与することにより、成熟した嗅神経細胞の増殖させる可能性を検討する。

3. 研究の方法

【研究計画の要旨】

1. 嗅神経細胞障害モデルマウス・加齢マウスを用い、嗅神経細胞の再生過程において嗅球および嗅上皮に発現している遺伝子・蛋白・代謝産物を、DNAマイクロアレイと質量分析計により網羅的に検索し、嗅神経細胞ならびに嗅球再生の鍵となる遺伝子を探り出す。

2. 嗅神経細胞障害モデルマウスを用い、側脳室前方上衣下層から作り出させる新生ニューロンの嗅神経細胞再生への役割を検討する。

3. ノックアウトマウスおよび嗅神経細胞障害モデルマウスを用い、細胞接着因子の嗅上皮の発生および再生における役割を検討する。

4. 加齢マウスを用い神経栄養因子のカクテル投与による嗅上皮の再生医療の開発を行う。

1. 嗅神経細胞障害モデルにおける嗅球および嗅上皮の遺伝子・蛋白・代謝産物の解析

メチマゾール(または生理食塩水)をマウスの腹腔内に投与し、嗅神経細胞障害モデルとコントロールモデルを作成し、投与前、投与後12時間、1日後、3日後、5日後、7日後、14日後、21日後、28日後に安楽死させ鼻腔および嗅球を摘出する。

摘出した鼻腔および嗅球から組織切片を作成し、抗OMP抗体および抗GAP43抗体を用いた免疫組織染色を行い、それぞれのマウス個体において、メ

チマゾール投与により狙い通り嗅上皮の障害および再生が作りだされていることを確認する。

同じく、摘出標本の嗅粘膜および嗅球より total RNA、蛋白、代謝産物を抽出し、DNA マイクロアレイおよび質量分析装置により、各群におけるマウス全遺伝子の発現の変化、様々な代謝産物の変化を包括的・網羅的に測定する。

メタボローム解析において得られた代謝産物の動きから、嗅上皮の障害・再生過程における代謝経路を特定し、DNA マイクロアレイにおける遺伝子発現の動きと比較検討する。遺伝子レベル、代謝産物レベルで一致した動きがみられた Pathway を中心に、該当する遺伝子または蛋白の、各時期の嗅球における発現量の変化を、real-time PCR 法にて定量的に確認し、遺伝子の産物あるいは蛋白の嗅球における局在を in situ hybridization 法あるいは免疫染色法によって解析する。

2. 側脳室前方上衣下層から作り出させる新生ニューロンの動態解析

側脳室前方上衣下層(SVZ)から終生作り出される新生ニューロンは、分裂しながら rostral migratory stream(RMS) と呼ばれる長い経路を通って嗅球へと移動し、最終的に顆粒球細胞および傍系球体細胞 に分化する。

1) BrdU 投与翌日メチマゾールをマウス腹腔内投与し、嗅神経細胞障害モデルを作成する。2) 投与前、投与後 1 2 時間、1 日後、3 日後、5 日後、7 日後、1 4 日後、2 1 日後、2 8 日後のマウスを安楽死させ鼻腔、嗅球と脳を一塊として摘出する。3) 冠状断連続切片を作成し、BrdU を抗 BrdU 抗体で標識し、嗅上皮の再生過程における RMS の動態を解析する。

3. 細胞間接着因子の嗅上皮の発生および再生における役割

我々のこれまでの研究においてネクチン family が嗅上皮に特徴的な発現パターンを示すことから、ネクチンが嗅細胞の発生 / 再生過程で重要な役割を担っている可能性が高いと考えている。

1) 各種ネクチン KO マウスの鼻腔の薄切標本と嗅上皮ホールマウント標本を用いて、層構造と嗅上皮頂端面の細胞配列を蛍光免疫染色の手法により観察する。また再生を誘導するモデルとして、抗甲状腺薬チアマゾール投与による嗅上皮再生モデルを作成することにより検証する。

2) こららの KO マウスを用いてメチマゾールによる嗅上皮再生モデルを作成し、再生過程による異常を同様の方法で観察する。

4. 神経栄養因子のカクテル投与による嗅上皮の再生医療の開発

加齢マウス(生後 6 ヶ月以上)に 6 週間連日、鼻腔より 6 週間 bFGF と BDNF を局所投与し、加齢により減少した嗅神経細胞の増加が得られるか検討する。期待した結果が得られなかった場合は腹腔内投与による効果を検討する。

4. 研究成果

1. 嗅上皮・嗅球再生に関する遺伝子の網羅的解析:

嗅神経細胞障害モデルマウスを用いて、嗅神経細胞の再生過程において嗅球および嗅上皮に発現している遺伝子を DNA マイクロアレイによる遺伝子解析により網羅的に検索した。bFGF と BDNF を始め劇的に増加する遺伝子を同定した。

2. 細胞間接着因子の嗅上皮の発生および再生における役割

ネクチンならびにカドヘリンのノックアウトマウスにより、細胞接着因子が嗅上皮の水平面のモザイク構造に重要な役割を果たしていることを証明した。(投稿準備中)

3. 神経栄養因子のカクテル投与による嗅上皮の再生医療の開発

bFGF NGF IGF BDNF の 4 剤併用局所投与 (カクテル療法) により、メチマゾール投与後の嗅神経細胞の有意な増殖を確認できた。今後は、老齢マウスを用いて加齢による嗅上皮の萎縮に対してカクテル療法の効果を確認中である。

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 7 件)

Fujita T, Nibu K. *et al*: A high-fat diet delays age-related hearing loss progression in C57BL/6J mice. PLoS One 2015;10:e0117547(査読有)

Yamashita D, Nibu K, *et al*: Neuroprotective effects of cutamesine, a ligand of the sigma-1 receptor chaperone, against noise-induced hearing loss J Neurosci Res. 2015;93:788-95 (査読有)

藤尾久美、丹生健一 他 嗅覚障害を初発症状と断定しえなかったパーキンソン病の 1 例, 日本耳鼻咽喉科学会会報, 2014;117:932-935 (査読有)

勝沼紗矢香、丹生健一. 嗅覚系の解剖と生理 (概説) 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 2013;85:

Fujio H, Nibu K, *et al*: Evaluation of card-type odor identification test for Japanese patients with olfactory disturbance. Ann Otol Rhinol Laryngol 2012;12:413-8 (査読有)

Uranagase M, Nibu K *et al*: BDNF expression in olfactory bulb and epithelium during

regeneration of olfactory epithelium. Neurosci Lett 2012;516:45-9 (査読有)

Fujita T, Nibu K. *et al* Increased inner ear susceptibility to noise injury in mice with streptozotocin-induced diabetes. Diabetes 2012;61:2980-6 (査読有)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

丹生 健一 (Ken-ichi Nibu)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号 : 20251283

(2) 研究分担者

勝沼紗矢香 (Sayaka Katsunuma)
神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号 : 80457043

(3) 連携研究者

高井 義美 (Yohimi Takai)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号 : 60093514