

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592550

研究課題名(和文) 骨髄移植による嗅覚中枢投射神経細胞の再生と嗅覚神経回路の再構築に関する研究

研究課題名(英文) A study on the regeneration of projective neurons in the olfactory bulb after bone marrow transplantation and the reconstruction of the olfactory neural circuit

研究代表者

西崎 和則 (Nishizaki, Kazunori)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：90180603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は間葉系幹細胞を含む骨髄を移植して、移植された骨髄由来細胞が嗅上皮嗅覚細胞に分化することと報告した。本研究でも、骨髄由来細胞が嗅球において小膠細胞に分化し、まれに僧帽/房飾細胞に分化することを観察した。僧帽/房飾細胞に対する分化転換がまれであるにもかかわらず、これらの結果は嗅球における中枢神経性嗅覚障害に対して骨髄移植を用いた再生医療の可能性を示している。さらに、中枢嗅覚路における神経回路の再構築の観察のために嗅球障害実験(N-methyl-D-aspartateによる嗅球灌流、メチマゾールの反復投与、加齢促進および促進因子の点鼻、嗅神経切断)を実施し、その有効性を検討した。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that transplanted bone marrow-derived cells differentiate into olfactory sensory cells after transplantation of bone marrow including mesenchymal stem cells. In the present study, bone marrow-derived cells differentiated not only into microglia cells, but also rarely into mitral / turfed cells. Despite its rare frequency of trans-differentiation to mitral/turfed cells, this study is thought to show the possibility of regeneration medicine using bone marrow transplantation for central olfactory disorders at the olfactory bulb. Moreover, we have performed a series of experiments using irrigation of the olfactory bulb with N-methyl-D-aspartate, repeated intraperitoneal methimazole injections, intranasal dripping of ageing or anti-ageing reagent, and the resection of the olfactory nerve to observe the reconstruction of neural circuit in the central olfactory pathway.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：嗅球 神経細胞再生 嗅覚神経路 骨髄移植

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞などを含んでいる骨髄細胞は肝細胞や神経細胞など多様な組織細胞に分化する能力を持つことが報告されている、再生医療の実用化を目的として研究されている胚性幹細胞やiPS細胞にはそれぞれ倫理的問題や発ガンの危険など実用化への問題を抱えているが、骨髄細胞にはこれらの問題がない。我々は、蛍光を発する骨髄細胞を移植して、骨髄細胞が嗅細胞に分化することを報告しているが、骨髄細胞を利用した再生医療による嗅覚障害の治療には解決されるべき多くの問題が残っている。

2. 研究の目的

この実験の目的は、側脳室前方上衣下層 (SVZ) に存在する神経幹細胞から再生分化した神経細胞が介在神経細胞として神経回路に組み込まれるダイナミックな神経組織である嗅球において、さらに高次嗅覚中枢に投射する僧帽細胞や房飾細胞 (以後、投射神経細胞) を再生させ、嗅覚神経回路が再構築される機序を解明し、中枢性嗅覚障害に対する再生医療の糸口をつけることである。

3. 研究の方法

1) 嗅覚組織障害を引き起こさせるメチマゾールを投与後、嗅球での神経細胞 (特に僧帽細胞などの投射細胞) の再生を免疫組織学的に検討する。

2) 嗅球に障害を与えて神経細胞の再生率を上昇させるため、神経興奮性作用をもつ N-methyl-D-aspartate による局所灌流、メチマゾールの腹腔内反復投与、老化促進因子であるエオタキシンおよび老化抑制因子である GDF11 を投与して、嗅覚の投射神経細胞の再生の有無および再生率 (投射神経細胞/神経膠細胞の比) が上昇するか否かを検討する。

3) 投射神経細胞が傍側脳室から嗅球までの吻側移動経路中のどこで再生するのか、及び嗅覚神経回路の再構築機序を解明する。

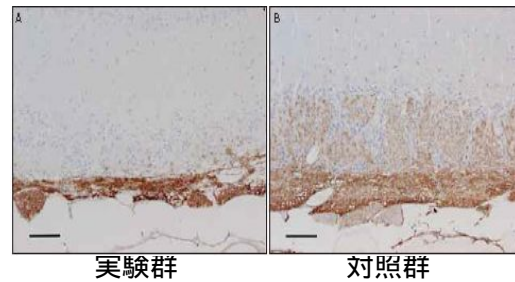
4) 嗅神経切断後、嗅球系球体レベルでの嗅覚神経回路の再構築の観察

4. 研究成果

A. 移植骨髄細胞の嗅球投射細胞 (僧帽細胞など) への分化

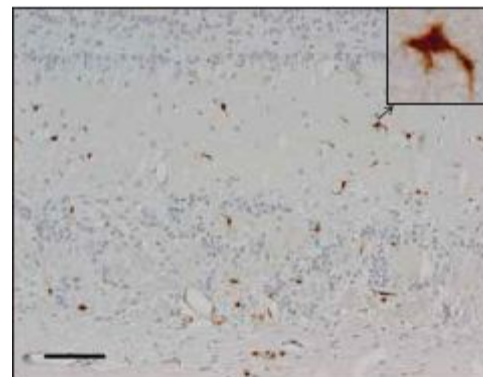
1) 嗅球におけるメチマゾール投与後の OMP 発現の変化

投与後 10 日目に OMP 発現は減弱し、萎縮した系球体層にわずかに認めるだけであった。



30 日目の嗅球の組織学的構造と OMP 発現は、対照群と同等まで回復していた。嗅球の OMP 発現の変化は、嗅上皮の変化より遅れていた。

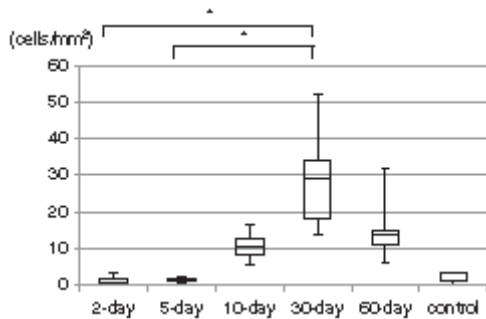
メチマゾール投与後 2 日目と 5 日目に、少数の球状の GFP 陽性細胞を系球体層で認めた。10 日目には、球状の GFP 陽性細胞は増加しており、少数の樹状突起構造を有する GFP 陽性細胞が系球体層と外顆粒層で認めた。30 日目に、樹状突起構造を有する GFP 陽性細胞は系球体層と外顆粒層で数多く出現していたが、球状の GFP 陽性細胞は減少していた。



60 日目には、樹状突起構造を有する GFP 陽性細胞も減少していた。

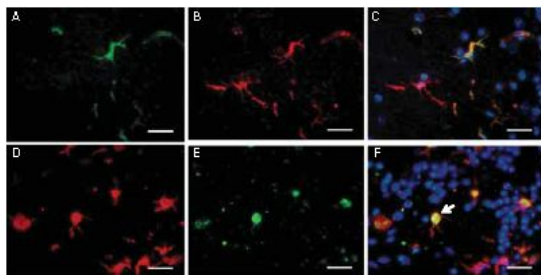
2) 嗅球の骨髄由来細胞の統計解析

全ての群の樹状突起構造を有する GFP 陽性細胞/mm² の平均と標準偏差は、それぞれ 1.32 ± 1.34 (Day2 群)、1.46 ± 0.07 (Day5 群)、10.72 ± 4.12 (Day10 群)、29.42 ± 15.12 (Day30 群)、15.62 ± 9.70 (Day60 群) と 2.04 ± 1.62 (対照群) であった。樹状突起構造を有する GFP 陽性細胞の数は、メチマゾール投与後 30 日目にピークに達し、その後減少していた。Kruskal-Wallis 検定では、群間の有意差を示した (P=0.0003)。Scheffe 検定では、Day30 群と Day2 群 (P=0.0230)、Day30 群と Day5 群 (P=0.0418) の間に有意差を示した。他の群間には、統計的有意性は認めなかった (P < 0.05)。



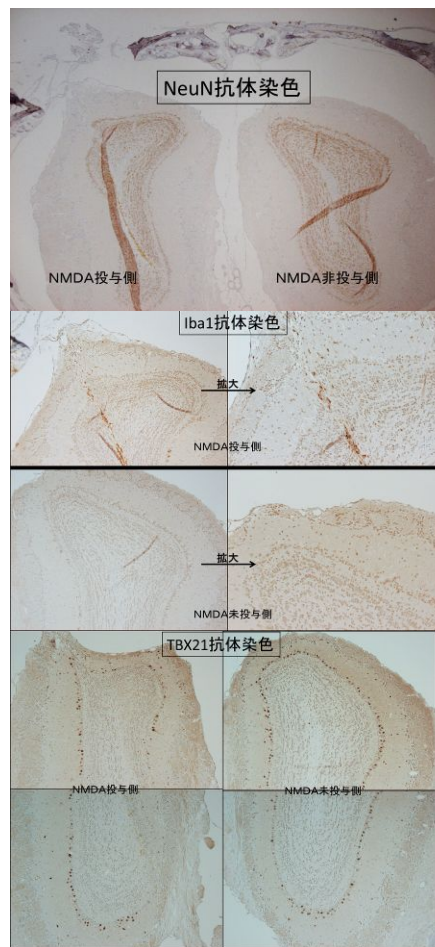
3) GFP と Iba1 または TBX21 との二重免疫染色

GFP と Iba1 または TBX21 との二重免疫染色では、多数の GFP 陽性 Iba1 陽性細胞が嗅球のすべての層で分布する一方で、わずかな GFP 陽性 TBX21 陽性細胞が僧帽細胞層で主に出現していた。GFP 陽性 TBX21 陽性細胞と GFP 陽性 Iba1 陽性細胞の比は、約 1 パーセントであった。



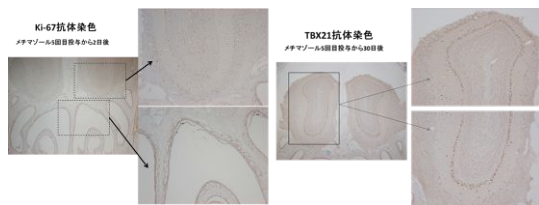
B. 嗅球障害を惹起するために用いた各手法の神経細胞に与える影響

1) N-methyl-D-aspartate による局所灌流野生型マウス (C57BL/6) の前頭骨 (右側の嗅球) をダイヤモンドバーにて削開し、ハミルトンシリンジを用いて NMDA (10mg/ml) 1.8 μl で嗅球を灌流、灌流後 3 週間後に組織を摘出し NeuN (成熟神経細胞)、Iba1 (マクロファージ/ミクログリア)、TBX21 (投射細胞) 抗体を用いた免疫染色を行った。シリンジ挿入部に Iba1 陽性細胞が多く、NeuN および TBX21 陽性細胞が少なく、その他の部位の変化は対照群と差はほとんど認められなかった。また、個体差が大きく安定的な結果が得られなかった。



2) メチマゾールの腹腔内反復投与 N-methyl-D-aspartate による嗅球灌流が安定した神経細胞死を引き起こさなかったため、メチマゾールの全身投与を反復することが安定的な影響を与えるかを検討した。聴覚組織と相違して、嗅組織はターンオーバーを起こす感覚組織である。メチマゾールを 3-5

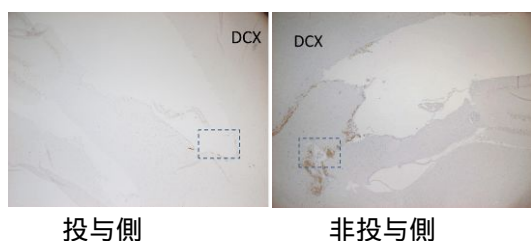
回投与後 2 日もしくは 30 日投与後に嗅球を摘出し、Ki-67 (細胞周期・増殖) と TBX21 で免疫染色を行った。



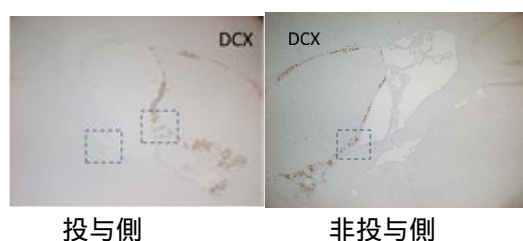
メチマゾールの反復投与によっても嗅組織への影響は単回投与と変わらなかった。このことから、嗅組織の再生の予備能力はかなり余裕があると考えられた。

3) エオタキシンおよび GDF11 の点鼻投与による神経細胞再生に与える影響

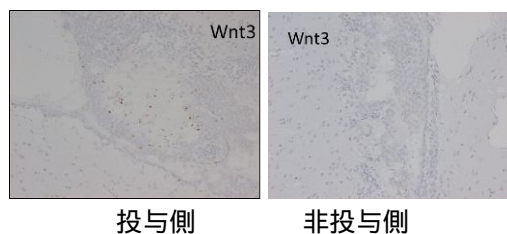
エオタキシンおよび GDF11 の点鼻投与
老化促進因子であるエオタキシン、老化抑制因子である GDF11 を連続点鼻投与することで、神経細胞の再生の場である傍側脳室から新生神経細胞が最終的に移動する嗅球までを吻側移動経路に沿って、免疫組織学的検討を行った。エオタキシン投与 (100 μ /ml) では、対照に比べて、DCX 陽性細胞 (新生神経細胞) が少なかった。



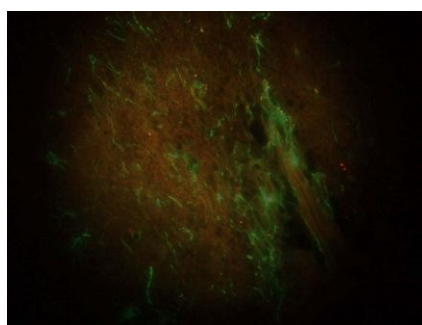
GDF11 投与 (4 μ /ml) では、対照に比べて、DCX 陽性細胞が多かった。



また、Wnt3 染色 (発生分化に関する蛋白) では投与側で非投与側に比べて染色性が高かった。



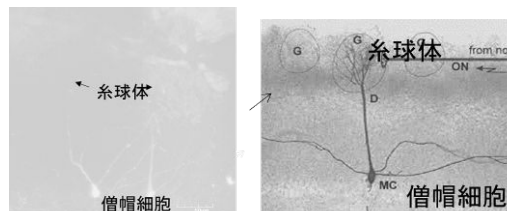
GFAP と Wnt3 の二重染色で Wnt3 が膠状細胞から分泌されていると考えられた。



GFFA (緑)、Wnt3 (赤)、2重染色 (黄緑)
エオタキシンもしくは GDF11 を骨髄移植に併用することで、新生神経細胞の再生率を制御でき骨髄細胞が傍側脳室領域から嗅球までの RMS において、どのように神経回路に取り込まれるかの機序の解明に貢献する可能性が考えられた。

4) 嗅神経切断

平成 26 年度から理化学研究所との共同研究を開始し、胎生 12 日で tdTomato 子宮内エレクトロポレーションを行ったマウスの嗅神経切断後 42 日に嗅球を蛍光顕微鏡で観察すると糸球体にレベルで嗅神経細胞だけではなく、僧帽細胞などの投射細胞から樹状突起にも対応 (1 つの嗅覚受容体および 1 つの僧帽細胞が特定の糸球体に収束の乱れが起こっていることが明らかになった。



異嗅覚症が、糸球体より中枢でも起こっている可能性が示唆された。この研究の成果は、平成 27 年 6 月に the 3rd Congress of

European ORL-HNSにて Murai A, Nishizaki K, Imai T : Defective pre-target axon sorting during olfactory map regeneration after olfactory nerve transections 発表予定。

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 1 件)

1) The engraftment and differentiation of transplanted bone marrow-derived cells in the olfactory bulb after methimazole administration.

Noda Y, Nishizaki K, Yoshinobu J, Orita Y, Tsujigiwa H, Yamada M.

Acta Otolaryngol. 133:951-956, 2013

査読 有

[学会発表] (計 2 件)

1) 第 9 回信越セミナー イブニングセミナー 特別講演、嗅覚の再生—臨床と実験、白馬、長野、2013/3/3

2) Nishizaki, K. Special Lecture, Experimental Olfactory Tissue Regeneration, 第 93 回台湾耳鼻咽喉科医学会 Taipei, Taiwan, 2012/11/11

[その他]

岡山大学耳鼻咽喉・頭頸部外科ホームページ
<http://www.okayama-u.ac.jp/user/jibika-1/kyukaku2015.pdf>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

西崎 和則 (NISHIZAKI KAZUNORI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 : 90180603

(2) 研究分担者

折田 頼尚 (ORITA YORIHISA)

岡山大学病院・助教

研究者番号 : 90362970

(3) 研究分担者

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