

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861358

研究課題名(和文) 感冒後嗅覚障害の病態生理解明と治療への応用

研究課題名(英文) Investigation of the pathophysiology of postviral olfactory disorder and its application to treatment

研究代表者

金谷 佳織 (Kanaya, Kaori)

東京大学・医学部附属病院・臨床登録医

研究者番号：90456129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス性嗅覚障害の病態生理については不明な点が多く詳細は不明である。本研究ではウイルスに対する宿主免疫応答に伴う二次的な組織傷害および傷害後の組織再生に焦点を当て解析した。ウイルス感染に関与するToll-like receptor 7の人工リガンドを経鼻投与したが炎症細胞浸潤や嗅上皮の傷害は認められなかった。

メチマゾール腹腔内投与による嗅上皮傷害後の組織再生に関してマクロファージ枯渇モデルマウスを作成し解析した結果、マクロファージ枯渇群において組織再生が不良であり、マクロファージが嗅上皮再生に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of postviral olfactory disorder(PVOD) has not been clarified. In this study, we focused on the secondary damage of olfactory neuroepithelium caused by host immune responses and the regeneration of olfactory neuroepithelium after the tissue damage caused by methimazole. Intranasal administration of TLR7 ligands didn't induce the inflammatory cells infiltration and the olfactory neuroepithelial damage. In macrophage depletion model mice, the olfactory neuroepithelial regeneration was incomplete. It was suggested that macrophages were deeply involved in the regeneration of the olfactory neuroepithelium.

研究分野：医歯薬学

キーワード：嗅粘膜 マクロファージ

### 1. 研究開始当初の背景

上気道ウイルス感染後に発症する嗅覚障害である感冒後嗅覚障害は嗅覚障害の臨床統計において慢性鼻副鼻腔炎による嗅覚障害に次いで原因の第2位を占める重要疾患である。慢性鼻副鼻腔炎による嗅覚障害の多くが嗅裂の物理的な閉塞による呼吸性障害であり、適切な薬物治療や手術療法で改善が期待できるのに対し、感冒後嗅覚障害は嗅神経組織自体の傷害であり、多くの患者で改善には時間を要し、少なからぬ例が恒久的な嗅覚低下や異嗅症などの後遺症を残す。感冒後嗅覚障害は特に更年期以降の女性に多く発症するという疫学的特徴があり、日本社会の急速な高齢化と相まって感冒後嗅覚障害の克服は嗅覚医学上の重要な課題のひとつとなってきた。嗅粘膜は神経上皮であるとともに気道上皮でもあり、様々な外的傷害因子に絶えず暴露される中で機能を一定に保つために恒常的に神経細胞の脱落・再生を行うという特異な性質を有している。しかしこのような高い再生能がありながら感冒後嗅覚障害の発症のメカニズムについてはこれまで少数のヒト検体を用いた臨床研究や実験動物を用いた形態学的研究が散見されるのみであり、病態生理の分子メカニズムに踏み込んだ系統的な研究は行われてこなかった。我々はこれまでウイルス感染における免疫モデルのひとつとして使用される Poly(I:C)を用いて嗅上皮傷害モデルを作成し宿主免疫応答に伴う嗅上皮傷害について解析を行ってきた。

### 2. 研究の目的

本研究ではウイルス感染モデルの一つとして用いられる Toll-like receptor (TLR)7 の人工リガンドを用いて嗅上皮における免疫応答・組織学的変化を解析することを目的とする。また嗅上皮傷害後の組織再生におけるマクロファージの関与についての解析を行い、臨床応用可能な治療法の開発に貢献することを目標とする。

### 3. 研究の方法

(1) TLR7 を介した嗅上皮免疫応答および嗅上皮変性の検討

3ヶ月齢 ICR マウスに TLR7 の人工リガンドである Loxoribine、Resiquimod を 24 時間毎に 3 日間点鼻投与し、初回点鼻後 3 日目、9 日目にホルマリン固定しパラフィン切片を作成。嗅上皮への炎症細胞浸潤、形態学的変化について解析した。

(2) 嗅上皮傷害後の組織再生におけるマクロファージの役割

Clodronate-liposome (CLD) を腹腔内および点鼻投与しマクロファージ枯渇モデルマウスを作成。枯渇状態を維持するため 3 日毎に投与を継続した。またコントロールとして PBS-liposome を投与した群を作成した。メチ

マゾール腹腔内投与による嗅上皮傷害後 1 日目、14 日目、30 日目にホルマリン固定しパラフィン切片を作成した。またコントロールとして生食を腹腔内投与した群を作成した。HE 染色、抗 F4/80 抗体、抗 OMP 抗体、抗 Ki67 抗体による免疫染色を施し嗅上皮の形態学的変化、マクロファージの浸潤について検討を行った。またメチマゾール投与後 7 日目に嗅粘膜を採取しタンパク抽出を行い、マクロファージが分泌するとされる各種細胞増殖因子、神経栄養因子などについて ELISA 法を用いて定量解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) Loxoribine、Resiquimod を点鼻投与したが点鼻後 3 日目、9 日目のいずれの時点でも明らかな炎症細胞浸潤や嗅上皮の形態学的変化は認められなかった。投与量を増加したが変化は得られなかった。

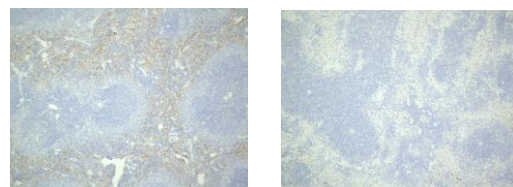
(2) Clodronate-liposome の腹腔内投与・点鼻投与により嗅上皮および脾臓のマクロファージが枯渇されているのが確認された。コントロール群、マクロファージ枯渇群においてメチマゾール投与後 1 日目の嗅上皮傷害の程度に明らかな差は認められなかった。メチマゾールによる嗅上皮傷害後の再生過程においてマクロファージ枯渇群では 14 日目、30 日目ともに OMP 陽性成熟嗅神経細胞が有意に少なく再生が不良であることが示された。また基底細胞において Ki67 陽性細胞は有意に減少しており細胞増殖も低下していることが示された。

細胞増殖因子、神経栄養因子、抗炎症因子に関して TGF $\alpha$ 、BDNF では有意差は認められなかった。NGF、IGF-1、IL-10 では有意差は得られなかったがマクロファージ枯渇群で減少している傾向が認められた。

以上の結果より嗅上皮傷害後の神経上皮再生においてマクロファージが強く関与していることが示された。

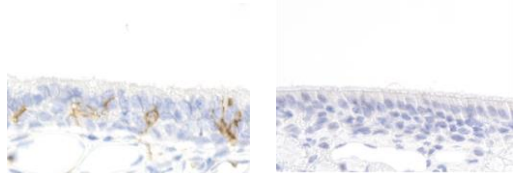
#### 脾臓マクロファージ (F4/80 染色)

PBS CLD

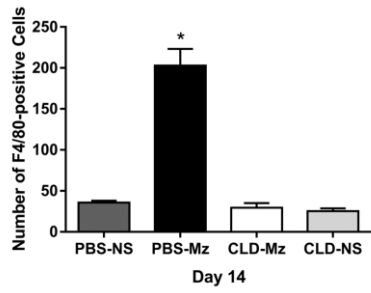


#### 嗅上皮内マクロファージ (F4/80 染色)

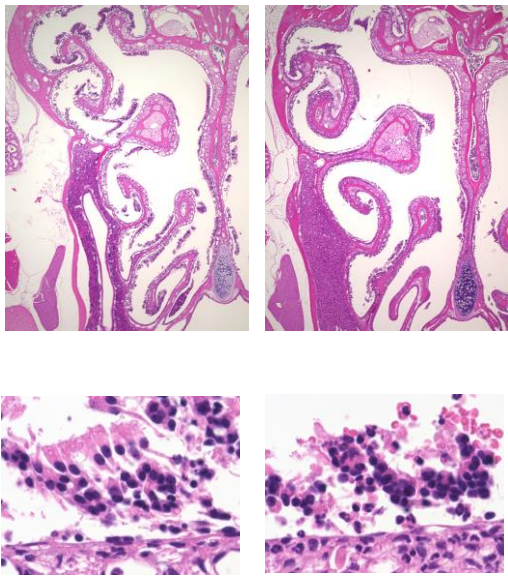
PBS CLD



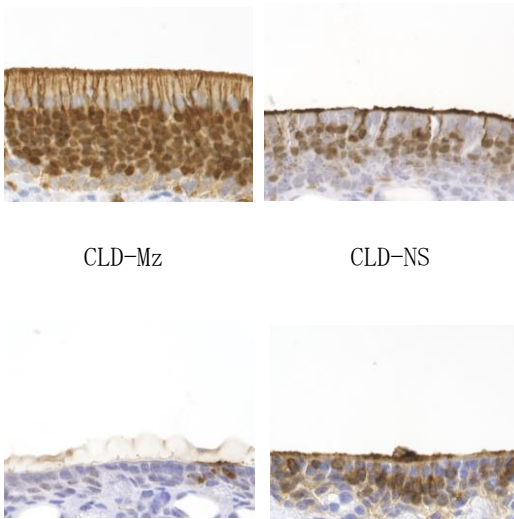
嗅上皮内マクロファージ数 (14日目)



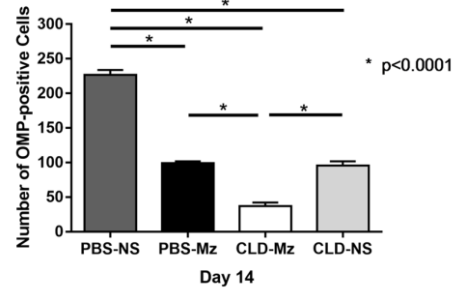
メチマゾール投与後 1 日目 (HE 染色)  
PBS-Mz                      CLD-Mz



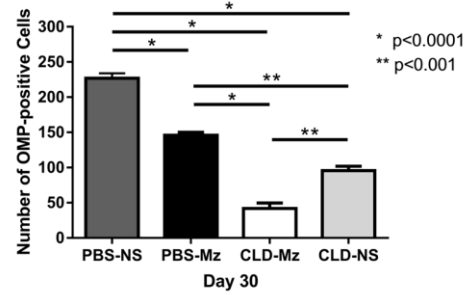
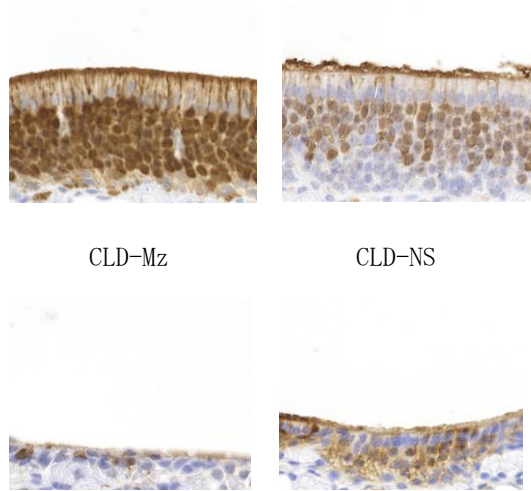
メチマゾール投与後 14 日目 (OMP 染色)  
PBS-NS                      PBS-Mz



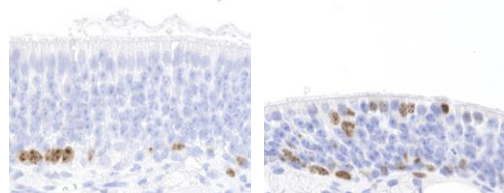
OMP 陽性成熟嗅神経細胞数



メチマゾール投与後 30 日目 (OMP 染色)  
PBS-NS                      PBS-Mz

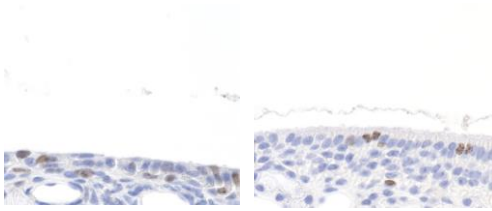


メチマゾール投与後 14 日目 (Ki67 染色)  
PBS-NS                      PBS-Mz

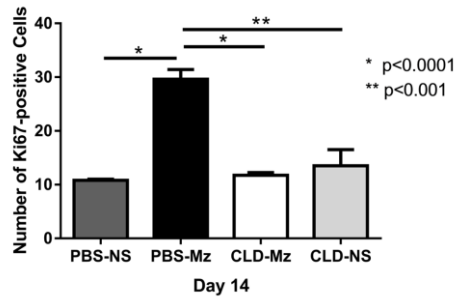


CLD-Mz

CLD-NS



Ki67 陽性細胞数



## 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)

[学会発表] (計1件)

金谷佳織、近藤健二、坂本幸士、菊田周、山嵜達也：嗅上皮傷害後の組織再生におけるマクロファージの役割. 日本鼻科学会、2016年10月、栃木県総合文化センター (栃木)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金谷 佳織 (KANAYA KAORI)

東京大学・医学部附属病院・臨床登録医

研究者番号：90456129