

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20231

研究課題名(和文)喫煙性嗅覚障害の分子機序と嗅上皮再生環境の解明

研究課題名(英文)Molecular and cellular bases for cigarette smoke-induced impairments of olfactory neurogenesis

研究代表者

上羽 瑠美(Ueha, Rumi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10597131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではタバコ煙溶液(CSS)を用いて喫煙モデル動物を作製し、嗅覚障害及び回復過程の機序や背景を検証した。高齢者の嗅覚障害に喫煙が与える影響も検証した。CSS投与により嗅上皮の嗅覚前駆細胞を障害し、成熟嗅神経細胞の低下と嗅覚障害が生じること、炎症性サイトカインが関与していることを明らかにした。また、CSS投与により嗅上皮再生が遅延すること、その機序として、嗅覚前駆細胞の分裂・分化過程を障害することによる成熟嗅神経細胞への分化抑制とIGF-1の低下があることを解明した。さらに、加齢モデルへのCSS投与により、嗅神経細胞の細胞死が亢進し、嗅覚障害遷延化に繋がることが示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喫煙は嗅覚障害の主な原因の一つであるが、障害のメカニズムや禁煙による障害の改善に関する機序の多くは未解明であった。本研究では、タバコ煙溶液(CSS)による喫煙モデルマウスを用いてタバコ煙による嗅神経上皮障害のメカニズムを、次に、障害後の嗅神経上皮再生過程におけるCSSによる回復抑制の機序を解明した。さらに、加齢による嗅神経上皮への影響を詳細に解明した上で、加齢モデルではCSS投与による嗅神経上皮障害は持続すること及びその分子生物学的背景を報告した。本研究により、タバコ煙誘導性の嗅覚障害に関する機序の一部が解明され、炎症性サイトカイン抑制や細胞死の抑制が治療のターゲットであることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Exposure to cigarette smoke is a major cause of olfactory dysfunction. However, the underlying mechanisms, by which cigarette smoke impairs the regenerative olfactory receptor neurons (ORNs), remain unclear. To investigate whether cigarette smoke induces olfactory epithelial (OE) injury and olfactory dysfunction, we developed a mouse model of smoking with cigarette smoke solution (CSS). Then, we investigated the influence of cigarette smoke on ORN regeneration following methimazole-induced ORN injury. In addition, we elucidated the aging and smoking effects on the OE and olfaction. Our results suggest that ORN progenitors are targets of CSS-induced impairment of the OE, and that CSS impairs regeneration of ORNs by suppressing the development of immature ORNs from ORN progenitors, at least partly by reducing IGF-1 in the nasal mucosa. In aged mice, increasing ORN death may result in continued reduction in the number of mature ORNs and olfactory dysfunction.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：タバコ煙 嗅神経上皮 嗅覚障害 加齢 嗅粘膜

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

嗅覚は生命維持に直結した感覚であると同時に、健康で文化的な生活を送るのに必要な感覚である。本邦では、嗅覚障害患者数が増加しているが、治療法は十分確立しておらず、予防治療法の開発に向けて、病態生理の詳細な解明が現在求められている。

嗅覚に影響を与える環境要因の代表的な因子として、外因性の「喫煙」や「炎症」、内因性の「加齢」が挙げられる。タバコ煙はヒトが日常生活で曝露される重大な酸化ストレス源であり、鼻領域では慢性的な鼻炎、副鼻腔炎の発症や悪化に関与する。喫煙は嗅覚障害発症のリスクファクターで、タバコ煙が嗅覚に関与する様式として1. 慢性鼻副鼻腔炎の粘膜炎症を増悪させることで気流の通過を悪化させ、呼吸性嗅覚障害が起こる、2. タバコ煙の組織障害作用により嗅神経系が直接影響を受け、神経性嗅覚障害がおこる、3. 1と2が相乗して作用する、等の仮説が考えられる。しかし、それら病態の分子機構の詳細は未だ解明されていない。

超高齢化社会であり、呼吸器感染症や喘息、鼻炎などのアレルギー疾患の患者数は年々増加していることから、嗅覚障害に対する研究として、タバコ煙と上気道炎症との相互的な影響を解明することは非常に意義が深い。

2. 研究の目的

本研究では以下のことを目的として検証を行った。

(1) 検証1：タバコ煙が嗅覚に及ぼす影響を検証するため、動物モデルを作製し、嗅覚と組織への影響を検証し、関与する分子メカニズムを組織学的かつ分子生物学的に解析すること。

(2) 検証2：喫煙が嗅上皮障害回復過程に与える影響を組織学的、分子生物学的に検証し、さらに、喫煙が嗅上皮恒常性維持のための神経栄養環境に与える影響(特に **Insulin-like growth factor-1 : IGF-1** の関与) に関して検証すること。

(3) 検証3：高炎症状態である「加齢」のマウスを用いて、嗅細胞系への加齢による影響を組織学的および遺伝子学的に解析すること、さらに加齢と喫煙に伴う嗅覚障害の背景にある分子機構を検証すること。

3. 研究の方法

A) 検証1.

① モデル動物作製と組織採取

C57BL/6 マウス (8 週齢) にタバコ煙溶液 (cigarette smoke solution: CSS、シミックバイオケミカル社、日本) を 20 回点鼻吸入させ、喫煙モデルを作製した。CSS 最終投与日を Day0 とし、Day1,7,14,28 に鼻腔組織を摘出した。(図 1-A)

② CSS 投与終了後の各種細胞数の検証

冠状断で嗅上皮の切片を作製した。

(図 1-B,C) 成熟嗅細胞は抗 OMP 抗体、嗅覚前駆細胞は抗 SOX2 抗体、分裂細胞は抗 Ki67 抗体、アポトーシス細胞は抗 caspase-3 抗体により免疫組織染色を行い、細胞数を計測した。

③ 嗅覚行動実験

CSS 投与終了後 Day1,7,14 に嗅覚行動実験にて匂い物質への反応を検証した。

④ 炎症性サイトカイン測定

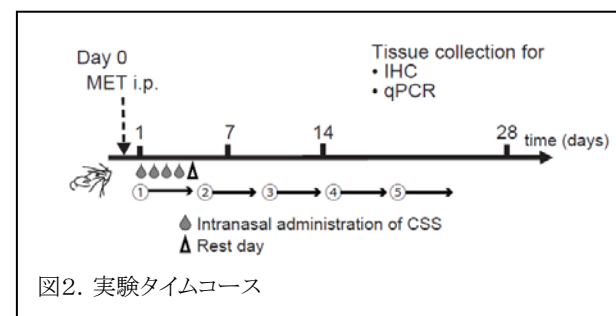
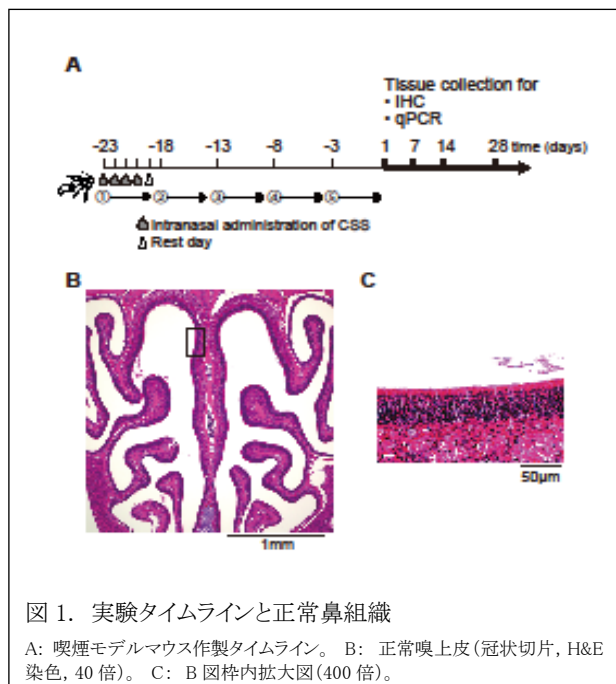
各タイムポイントで生食還流後の鼻粘膜を採取し、mRNA を抽出後相補的 DNA を合成し qRT-PCR 法で IL-1 β と IL-6 発現の定量評価を行った。

B) 検証2.

① モデル動物作製と組織採取

C57BL/6 マウス (8 週齢) に MET を腹腔内投与し (Day0)、嗅上皮障害モデルを作製した。MET 嗅上皮障害モデルに Day1 より CSS を点鼻吸入させ (タバコ群)、Day7, 14 にタバコ群と生食点鼻による対象群の鼻腔組織と嗅球を摘出した。(図 2)

② CSS 投与終了後の各種細胞数の検証



- ③ 嗅覚行動実験 (Day7,14)
- ④ 定量リアルタイム PCR (qRT-PCR) による BDNF, NT-3, GDNF, IGF-1 の測定
Day7, 14 に生食還流後の鼻粘膜と嗅球を採取し, mRNA を抽出後, 各神経栄養因子および成長因子の遺伝子発現の定量評価を行った。
- ⑤ IGF-1 の蛋白発現と定量評価
IGF-1 の蛋白発現を Western blot 法で確認し, ELISA にて定量比較を行った。
- ⑥ IGF-1 投与による嗅上皮再生抑制解除効果の検討
MET+CSS モデルマウスにおいて IGF-1 が嗅上皮再生過程に与える影響を検証するため, recombinant human IGF-1 (Mecasermin, rhIGF-1) を連日皮下投与し, 成熟嗅細胞数を生食皮下投与群と比較して評価した。

C) 検証 3.

① モデル動物作製と組織採取

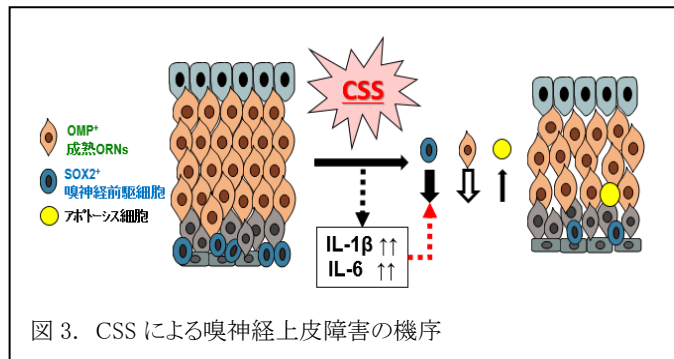
C57BL/6 マウス (60 週齢) に CSS を点鼻吸入させ, 喫煙モデルを作製した。CSS 最終投与日を Day0 とし, Day1,7,14,28 に鼻腔組織を摘出した。

- ② CSS 投与終了後の各種細胞数の検証
- ③ 嗅覚行動実験
- ④ 炎症性サイトカイン測定

4. 研究成果

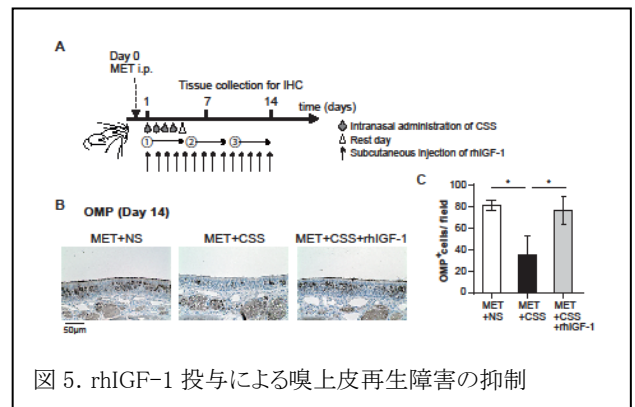
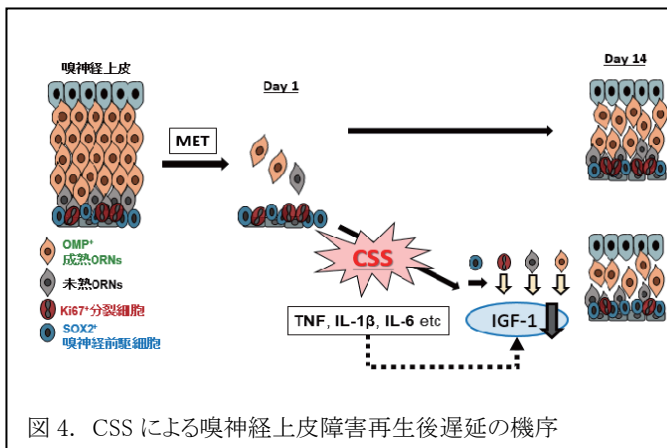
A) 検証 1.

CSS 投与により嗅上皮の SOX2+ 嗅覚前駆細胞を障害し, OMP+ 成熟嗅神経細胞 (ORNs) の低下と嗅覚障害が生じること, 炎症性サイトカインの IL-1 β と IL-6 が関与していることを明らかにした (American Journal of Pathology. 2016 : 図 3)



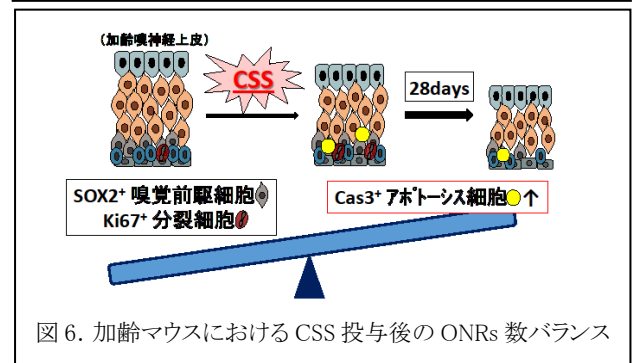
B) 検証 2.

MET (メチマゾール) による嗅上皮障害モデルを用いて, CSS 投与により嗅上皮再生が遅延すること, そしてその機序として, 嗅覚前駆細胞の分裂・分化過程を障害することによる成熟 ORNs への分化抑制と Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) の低下があることを解明した (Neurotoxicity research. 2016 : 図 4). さらに, MET 障害モデル CSS 投与群への rhIGF-1 投与により, 嗅上皮再生抑制が補完されることを示した (図 5).



C) 検証 3.

加齢モデルへの CSS 投与により, 嗅神経細胞の細胞死が亢進し, 嗅神経細胞数が減少し, 嗅覚障害遷延化に繋がることを示した (Frontia in Aging Neuroscience. 2018). つまり, タバコ煙長期間暴露による細胞死の亢進は, 嗅神経細胞の高い再生能を凌駕することを示唆しており (図 6), その効果は CSS 投与後も持続することを証明した。



*総括

本研究では, 長期 CSS 投与によって OMP+ 成熟嗅細胞が障害されるのみならず, 嗅上皮の嗅覚前駆細胞をも障害されることを初めて明らかにした。本研究により, 鼻腔の喫煙モデル動物の作製方法が確立され, 禁煙モデルとしても研究使用が可能であった。

検証 1 では、若齢モデルでの喫煙による嗅覚神経上皮への影響をまず検証した。CSS 投与によって嗅覚前駆細胞が障害され、嗅細胞の細胞死が増加した。正常状態において常に嗅上皮が有している強い分化再生能力よりも、連続 CSS 投与による嗅細胞への抑制的効果のほうがより強く作用することで、嗅上皮及び嗅覚障害が生じたと考えられ、炎症性サイトカインの関連が示唆された。

次に検証 2 では、障害後の嗅神経上皮再生過程への喫煙の影響を検証し、CSS 投与によって、MET による嗅上皮障害後の嗅上皮再生を遅延させることを明らかにした。その機序として、嗅覚前駆細胞の分裂及び分化過程を障害することで、成熟嗅細胞への分化が抑制され、嗅覚障害が持続すると考えられた。各種神経栄養因子や成長因子を抽出し定量評価した結果、タバコ煙による障害嗅上皮再生遅延には IGF-1 の低下が関与していることを示した。さらに、rhIGF-1 投与による嗅上皮再生障害への治療応用の可能性を見出した。

最後に検証 3 では、加齢モデルでの喫煙による嗅覚神経上皮への影響を検証した。加齢モデル嗅神経上皮も若齢モデルと同様に CSS により障害され成熟嗅覚神経細胞数が低下したが、若齢と異なり経時的に成熟嗅覚神経細胞数が回復せず、嗅覚障害が持続した。その背景として、高炎症反応による基底細胞層の細胞分裂が低下とアポトーシスの亢進が影響したと考えられ、喫煙や加齢による成熟嗅覚神経細胞数の低下が加齢性嗅覚障害の原因と考えられることから、喫煙および加齢による嗅覚障害に対して、“炎症性サイトカインの抑制”や“嗅神経前駆細胞から ORNs までの増殖分化、成熟過程の促進”が治療戦略となりうると思われる。

本研究では、タバコ煙誘導性の嗅覚障害に関する機序の一部を解明し、炎症性サイトカイン抑制や細胞死の抑制が治療のターゲットである可能性を明らかにした。今後の展望として、加齢性嗅覚障害や喫煙性嗅覚障害に対して IGF-1 を用いた治療方法の開発を進める予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Ueha R, Kondo K, Ueha S, et al. Dose-Dependent Effects of Insulin-Like Growth Factor 1 in the Aged Olfactory Epithelium. *Frontia in Aging Neuroscience*. 2018. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00385>.
2. Ueha R, Ueha S, Kondo K, et al. Cigarette Smoke-Induced Cell Death Causes Persistent Olfactory Dysfunction in Aged Mice. *Frontia in Aging Neuroscience*. 2018. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00183>.
3. Ueha R, Shichino S, Ueha S, et al. Reduction of proliferating olfactory cells and low expression of extracellular matrix genes are hallmarks of the aged olfactory mucosa. *Frontia in Aging Neuroscience*. 2018. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00086>.
4. Ueha R, Ueha S, Sakamoto T, et al. Cigarette Smoke Delays Regeneration of the Olfactory Epithelium in Mice. *Neurotoxicity research*. 2016; 30: 213-224.
5. Ueha R, Ueha S, Kondo K, et al. Damage to olfactory progenitor cells is involved in cigarette smoke-induced olfactory dysfunction in mice. *American Journal of Pathology*. 2016; 186: 579-586.

[学会発表] (計 10 件)

1. Ueha R (代表), Kondo K. Cigarette smoke-induced cell death causes persistent olfactory dysfunction in aged mice. 第 57 回日本鼻科学会 (2018.9.27-29), 旭川
2. Ueha R (代表), Kondo K. Cigarette smoke-induced cell death causes persistent olfactory dysfunction in aged mice. 64th American Rhinologic Society annual meeting. (2018.10.4-6), Atlanta, USA
3. 上羽瑠美 (代表), 近藤健二. 加齢による嗅粘膜細胞外基質への影響. 第 56 回日本鼻科学会(2017.9.28-30), 甲府
4. Ueha R (代表), Ueha S. Molecular and cellular bases for cigarette smoke-induced impairments of olfactory neurogenesis. IFOS, ENT world congress 2017, シンポジウム講演 (2017.6.24-28), Paris, France
5. 上羽瑠美 (代表), 近藤健二. 分子メカニズムに基づいた加齢性嗅覚障害の治療戦略. 第 17 回日本抗加齢医学会, シンポジウム講演 (2017.6.2-4), 東京
6. 上羽瑠美 (代表), 七野成之. 加齢がマウス嗅上皮環境に及ぼす影響の組織学的・分子生物学的解析. 第 119 回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2017.5.17-20), 広島
7. 上羽瑠美 (代表), 近藤健二. マウス嗅上皮再生過程にタバコ煙が及ぼす影響と IGF-1 の関与. 第 55 回日本鼻科学会(2016.10.13-15), 宇都宮
8. Ueha R (代表), Ueha S. Damage to olfactory progenitor cells is involved in cigarette smoke-induced olfactory dysfunction in mice. 70th Tobacco Science Research Conference (2016.9.18-21), Florida, USA
9. 上羽瑠美 (代表), 近藤健二. 加齢がマウス嗅上皮環境に及ぼす影響の解析—嗅覚前駆細胞, 成長因子とサイトカイン—. 第 16 回日本抗加齢医学会 (2016.6.9-11), 東京

10. 上羽瑠美 (代表), 近藤健二. タバコ煙が嗅上皮障害後再生に及ぼす影響に関する検証. 第117回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2016.5.19-21), 名古屋

[その他]

受賞 (計 2 件)

1. 2016 年, 優秀演題賞 (第 16 回日本抗加齢医学会)
2. 2018 年, The First Place in the Poster competition (64th American Rhinologic Society)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 : 上羽 悟史

ローマ字氏名 : Ueha Satoshi

研究協力者氏名 : 近藤 健二

ローマ字氏名 : Kondo Kenji

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。