

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592176

研究課題名（和文） 顆粒球コロニー刺激因子による嗅覚再生の研究

研究課題名（英文） olfactory regenerative medicine by granulocyte-colony stimulating factor

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

研究成果の概要（和文）：

G-CSF（顆粒球コロニー刺激因子）の早期投与が嗅上皮に骨髄由来細胞の取り込み率を高めるために適切であることが統計的に有意差を持って示された。また、GFP（緑蛍光蛋白）とOMP（嗅覚マーカー蛋白）などで2重免疫染色された細胞がレシピエントマウスの嗅上皮で認められ、骨髄由来細胞が嗅組織の幹細胞として嗅上皮に取り込まれことを示していた。これらのことから、嗅覚障害後のG-CSFの早期投与は骨髄細胞を介した嗅覚再生医療に効率的であることが示唆される。

研究成果の概要（英文）：

A statistical analysis demonstrated significantly that the early administration of G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) was appropriate to increase the engraftment rate of bone marrow-derived cells into the olfactory epithelium. Moreover, cells with double-immunostaining for GFP (green fluorescence protein) and OMP (olfactory marker protein) and so on were found in the olfactory epithelium of recipient mice, which suggested that bone marrow-derived cells are engrafted as stem cells of the olfactory tissue. Thus, the early administration of G-CSF after insult to the olfactory tissue is suggested to be effective to olfactory regenerative medicine using bone marrow cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：嗅細胞、再生、骨髄移植、G-CSF、メチマゾール、嗅組織幹細胞

1. 研究開始当初の背景

骨髄細胞は、取り込まれた組織の微小環境に応じて細胞系譜を超えて分化することが知られている。我々も、GFPマウス（ドナー）の骨髄細胞を放射線照射で免疫寛容にしたレシピエントマウスへ経静脈的に移植すると、ドナー骨髄由来細胞が嗅上皮に取り込まれ、嗅細胞の特徴を有するのを報告した (Tsuji-giwa, Nishizaki, et al. Brain Res, 2005)。しかし、骨髄細胞を利用した再生医療、ここでは嗅覚再生に対する臨床応用を考えると骨髄由来細胞の嗅上皮への取り込み率は十分とはいえなかった。

最近、心筋や脳の虚血障害に対して顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF) を投与することにより、障害された機能の回復が促進されたとの報告がある。虚血障害に対するG-CSFの作用機序として、G-CSFが骨髄から造血幹細胞を末梢循環中に動員して、血管新生を促進するという説 (Deindl 2006)、G-CSFが心筋細胞、神経細胞のアポトーシスを抑制して組織保護に働くという説 (Harada 2005, Solaroglu 2006) がある。また、G-CSFは造血幹細胞だけではなく間葉系幹細胞も末梢循環中に動員する作用をもつとの報告がある (Kawada 2004)。これらのことから、作用機序にかかわらずG-CSF投与により、神経細胞に類似した嗅細胞の障害による非呼吸性嗅覚障害の回復を促進することができるのではないかという発想に到った。また、G-CSFは薬剤承認を受けているので、臨床応用を考える上で有利である。

2. 研究の目的

骨髄細胞は、微小環境に応じて組織特異的な細胞に分化する可塑性をもつと考えられる。我々は、レシピエントマウスに移植され

たドナー骨髄由来細胞が嗅細胞の特徴を有することを報告している。しかしながら、その取り込み率は低く、臨床応用を考えると実用的なレベルには達していない。このため、心筋障害や脳虚血障害に対して有効性が報告されているG-CSFを嗅覚障害後に投与して骨髄由来細胞の嗅上皮への取り込み率が上昇するか否かを観察する。この現象が観察されれば、嗅覚障害の回復がG-CSF投与により促進される可能性を示すもので、現在のところ有効な治療手段がない嗅上皮障害による非呼吸性嗅覚障害に対してG-CSFの臨床応用への提案となり、最終的には多くの嗅覚障害患者に福音をもたらすことが期待される。

3. 研究の方法

放射線照射を行い免疫寛容状態にしたレシピエントマウス (C57BL/6) に GFP マウスの骨髄移植を行い、骨髄再構築後のレシピエントマウスへメチマゾールを投与して嗅上皮障害を惹起させた。G-CSF 投与群と非投与群 (コントロール) に分け、さらに嗅覚障害後における G-CSF の最も適切な投与時期を検討するために G-CSF 投与群をグループ I (メチマゾール投与後 2 日後に初回投与)、II (同 5 日後)、III (同 8 日後) に分類した。G-CSF 投与群では 2 回目の投与を初回投与から 3 日間後に行った。G-CSF 投与群でドナー骨髄由来細胞のレシピエントマウス嗅上皮に取り込まれる率がグループ間およびコントロール群に比較して増加するか否かを統計的に解析した。

また、嗅細胞の寿命は約 1 カ月で、嗅覚組織の恒常性を維持するためには移植された骨髄由来細胞が嗅覚組織の幹細胞として取り込まれる必要がある。移植骨髄由来細胞が嗅覚組織の幹細胞として取り込まれたか否かを検討するため、レシピエントマウスの嗅

上皮中にドナーマーカーの発現を免疫染色し、さらに成熟嗅細胞のマーカーである OMP (olfactory marker protein)、基底細胞のマーカーであるサイトケラチン、幼若嗅細胞のマーカーである GAP-43 (growth associated protein-43) との蛍光 2 重免疫染色を施行した。

4. 研究成果

ドナー骨髄由来細胞を示す GFP 陽性細胞が対照群を含む各グループのレシピエントマウスの嗅上皮で観察された (図 1)。

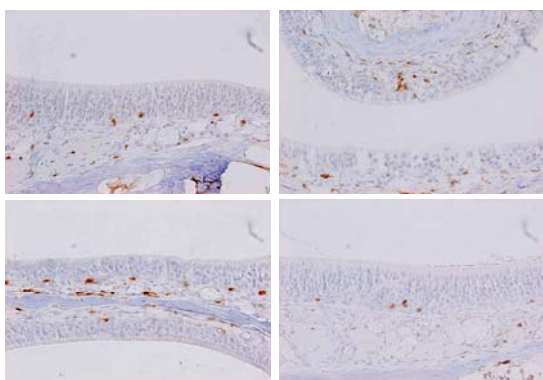


図 1 嗅上皮における GFP 陽性細胞
左上 コントロール群、右上グループ I
左下グループ II、右下 グループ III

グループ I、II、III および対照群の取り込み率の平均値と標準偏差は、それぞれ $0.562 \pm 0.015\%$ 、 $0.505 \pm 0.078\%$ 、 $0.315 \pm 0.133\%$ と $0.360 \pm 0.055\%$ であった。G-CSF の投与群では、嗅上皮の障害後の早期に G-CSF 投与を行う群で嗅上皮への骨髄由来細胞の取り込み率が増加していた。one-way ANOVA による分散分析では群間に平均値の有意差 ($P = 0.0002$) を示した。シェッフエ検定、post hoc テストでは、グループ I と III ($P = 0.0008$) および対照群 ($P = 0.008$)、さらに II 群と III 群 ($P = 0.0088$) の間に有意差が認められた (図 2)。

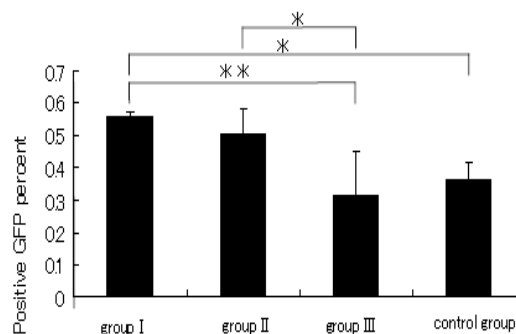


図 2 グループによる取り込み率の平均値
* $P < 0.01$ ** $P < 0.001$

GFP と OMP、GAP43 やサイトケラチンの二重染色では、嗅上皮における GFP 陽性細胞の一部が、OMP、GAP43 もしくはサイトケラチン (図 3) で 2 重染色された。このことはドナー骨髄由来細胞が嗅組織を構成する嗅細胞および基底細胞に分化したことを意味し、嗅組織幹細胞として取り込まれたことを示唆する。

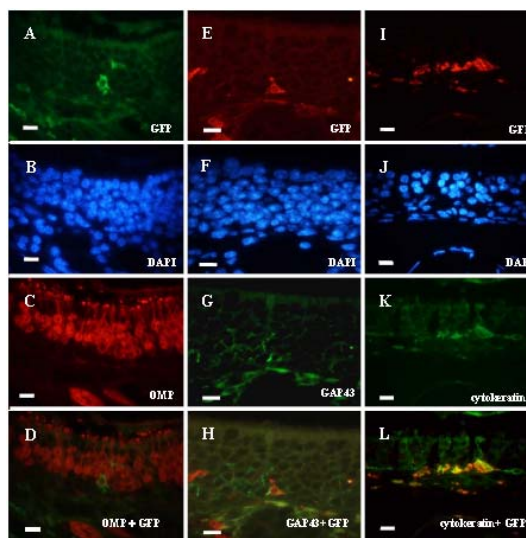


図 3 蛍光免疫染色
最上段 GFP 染色、2 段目 DAPI 染色、3 段目 左から OMP、GAP43、サイトケラチン染色、最下段 左から GFP と OMP、GAP43、サイトケラチンの蛍光 2 重染色

本実験によって、G-CSF が骨髄細胞の嗅上皮への取り込みを促進させることが示され、

G-CSF 投与が嗅覚障害の治療の一つとなる可能性を有し、骨髄細胞を介した再生医療により嗅覚障害の臨床応用への道筋を開くものと期待される。また、G-CSF はすでに承認された薬剤であることから嗅覚障害に対する G-CSF の臨床治験は倫理的な制約が少ないと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

① 野田洋平、西崎和則、吉延潤子、折田頼尚、嗅球における移植骨髄細胞の役割、日鼻科、査読無、50 巻、2011、331

② 西崎和則、嗅組織と再生医療、耳鼻咽喉科臨床、査読有、104 巻、2011、309-315

③ Nishizaki K, Yoshinobu J, Tsujigiwa H, Orita Y, Yamada M, The early administration of granulocyte colony-stimulating factor increases the engraftment of transplanted bone marrow-derived cells into the olfactory epithelium damaged by methimazole、査読有、48 巻、2010、228-232

④ Orita S, Yoshinobu J, Orita Y, Tsujigiwa H, Kakiuchi M, Nagatsuka H, Nomiya S, Nagai N, Nishizaki K、Am J Rhinol Allergy、査読有、23 巻、2009、135-138

〔学会発表〕 (計 2 件)

① 野田洋平、西崎和則、吉延潤子、折田頼尚、嗅球における移植骨髄細胞の役割、第 50 回日本鼻科学会、平成 23 年 12 月 2 日、岡山

② Nishizaki K、Olfactory Tissue and Regeneration Medicine、41th Congress of the Korean Rhinologic Society、2011/3/13、Seoul

〔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/kyukaku2012.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

小野田 友男 (ONODA TOMOO)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：20420482

吉延 潤子 (YOSHINOBU JUNKO)

岡山大学・医学部・技術職員

研究者番号：80448224

(3) 連携研究者