

機関番号：13601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791353

研究課題名 (和文) 嗅覚機能回復と脳のリモデリング

研究課題名 (英文) Brain neural circuit remodeling in the Olfactory system

研究代表者 川岸 久太郎
(KAWAGISHI KYUTARO)
信州大学・医学部・助教

研究者番号：40313845

研究成果の概要 (和文) : 嗅球から大脳への皮質投射経路が障害を受けた場合の神経回路再生を明らかとするため、外側嗅索の傷害実験を行い、ラットの外側嗅索の障害では生後2日のラットでは外側嗅索切断後も嗅覚機能が回復することが明らかとなった。一方生後12週の成獣ラットでは外側嗅索切断後、嗅覚機能は回復しなかった。また、嗅覚機能の回復は生後7日から14日までの間の障害であれば再生すると考えられた。これらのことより、新生児ラットでは脳の可塑性が存在し、障害を受けた神経回路の再生が起こり、機能も維持できることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) : Recovery of olfaction following the lateral olfactory tract (LOT) transection was examined in developing and adult animals. After complete LOT transection was made in P2 neonatal rats and 12w adult rats, olfactory discriminative ability was tested. Olfaction was well preserved in the P2 rat group, but not in the 12w adult rat group. These data indicate that neonatal rat brain has neural plasticity after brain injury resulting in re-establishment of olfactory neural circuit and preservation of olfactory function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：神経再生・神経機能再生・嗅覚

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害は日本および欧米で死因の第3位を占め、死亡に至らない場合も、恒久的な神経障害を残すなど多くの問題を抱えている。このため、発症の予防研究や、発症後の神経障害の改善（機能回復）に関する多くの研究が行われている。

特に中枢神経の障害後の機能回復に関する研究では、ヒトの中枢神経系でも存在が明らかになった神経幹細胞 (Neurogenesis in the adult human hippocampus. Eriksson P. et al. Nat Med. 1998 Nov;4(11):1313-7) を用いた研究が盛んに行われており、障害で死滅した神経細胞を神経幹細胞の増殖を促して新

生した神経細胞で補う方法などが試みられている。

神経細胞の増殖と並び、機能回復の研究で課題になるのは、新たに増殖した細胞が再び正常と同じような機能を持つかという点であり、こちらは神経増殖の研究と比して進んでいるとは言い難い。

嗅球は神経幹細胞が側脳室周囲から **Rostral Migratory Stream : RMS** を通り移動し、生涯を通して供給される部位として、中枢神経系の神経幹細胞の増殖・分化と機能回復についてのモデル部位として研究されている。

このような状況のもと、新生時期に嗅球を除去された場合は、再生した嗅神経が前脳増大部に進入し、嗅覚機能が維持されるという研究が近年報告された。(Olfaction in olfactory bulbectomized rats, Slotnick B. et al. *J Neurosci.* 2004 Oct;24(41):9195-2000) 嗅覚情報は、嗅上皮(嗅神経)⇒嗅球⇒外側嗅索⇒嗅皮質と嗅覚神経系を經由して処理される。そのため、両側嗅球を除去すると一般に動物は無嗅覚となる。しかし、上述の研究においては嗅球を除去した腔に前脳が突出し、その部位に嗅神経が進入することが報告された。

我々もラットで嗅球除去を行い、3ヶ月後にシクロヘキシミドを用いて嗅覚機能を調べた結果、すべての動物で嗅覚機能が維持されていることを確認できた(5匹中4匹: 0.01%シクロヘキシミド識別可能;1匹 0.1%シクロヘキシミド識別可能)。組織学的に検索した結果、再生嗅神経は嗅球除去2週後に嗅球除去後の嗅索に進入し、4週間後には多数のシナプス形成の場である糸球体様構造が確認された。

しかし、この追試験では Slotnick らの報告とは異なり突出した前頭部への嗅神経のシナプス形成よりも嗅索部へのシナプス形成がより多く認められた。嗅索は **RMS** を通して常に神経幹細胞が送り込まれている部位であり、神経幹細胞に由来するニューロンが新たな神経回路形成に直接的に関与することが考えられる。

また同報告では嗅神経の伸長と前脳部との結合について報告しているのみで、脳内の嗅覚に関する神経回路については言及していない。したがって、嗅覚機能が回復した場合、神経幹細胞由来の新しい神経細胞が神経回路を構成しているのかが明らかになっていない。

これらのことより、中枢神経系の障害後の機能回復に関連して、再生した嗅神経からの嗅覚情報はどのように嗅皮質に神経連絡す

るか、すなわち新たな神経回路がどのように再構成されるかという点はまだ明らかになっていない点を本研究では明らかにしようとしていた。

2. 研究の目的

本研究において明らかにしようとしている点は、再生した嗅神経からの嗅覚情報はどのように嗅皮質に神経連絡するか、すなわち新たな神経回路がどのように再構成されたかである。

嗅索には、ニューロン分化能を有する神経幹細胞が大量に存在し、嗅球除去動物でも再生した糸球体様構造の周囲には多数の神経幹細胞が確認される。神経幹細胞に由来するニューロンが、新たな神経回路形成に直接的に関与する可能性は大きいものと考えられる。

(1) 神経幹細胞からの細胞新生だけでなく、軸索に障害を受けた神経細胞の機能回復も神経回路形成に関し不明な点が多いため、軸索損傷後の神経回路再生と機能の獲得についても明らかにする。

(2) また、嗅覚機能の回復は成獣では起こらないことが我々の研究で明らかになっている。このため、生後何日までこのような嗅覚機能回復が起こるかを明らかにし、週齢による脳の可塑性の違いを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)

① 麻酔下に新生児ラット(生後2日:P2)及び生後12週(12w)のアダルトラットの左外側嗅索を切断する。

② 切断後、左側の嗅皮質に神経トレーサー(FB:Fast Blue)を注入し、外側嗅索が完全切断されているかの指標とする。

③ 4週間後に右嗅球を吸引除去する。

④ 外側嗅索切断側の嗅覚機能を確認するために0.01%シクロヘキシミド溶液を用いて、嗅覚機能を確認する。

⑤ 麻酔下に左側の嗅皮質に神経トレーサー(FG:Fluoro-Gold)を注入し、嗅皮質へ投射する Long distance neurons を標識する。

⑥ 還流固定後に脳(嗅索・嗅皮質)を採取して、連続組織切片を作成する。

⑦ 切片を顕微鏡下に観察しFB陰性、FG陽性であることを確認し、外側嗅索完全切断後に神経回路網が再生しているかを確認する。

(2)

① 麻酔した生後7日(P7)および14日(P14)の左外側嗅索を切断する。

② 切断後、左側の嗅皮質に神経トレーサー(FB:Fast Blue)を注入し、外側嗅索が完全切断されているかの指標とする。

③ 4週間後に麻酔下に左側の嗅皮質に神経

トレーサー (FG:Fluoro-Gold) を注入し、嗅皮質へ投射する Long distance neurons を標識する。

④還流固定後に脳 (嗅索・嗅皮質) を採取して、連続組織切片を作成する。

⑤切片を顕微鏡下に神経トレーサーを観察し、外側嗅索完全切断後に神経回路網が再生しているかを確認する。

4. 研究成果

(1) 0.01%シクロヘキシミド溶液を用いて、嗅覚機能を確認すると、嗅覚正常なラットでは学習期に数度間違っシクロヘキシミド溶液を吸引することがあるが、その後ほぼ100%の割合でシクロヘキシミド溶液を避け、通常の水を飲むようになる。(図1)

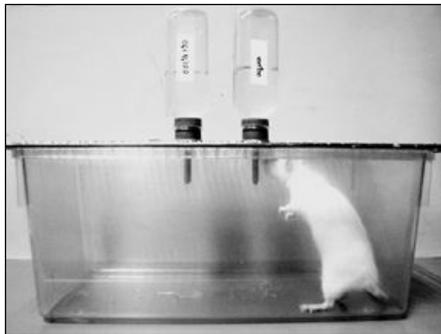


図1: 通常の水とシクロヘキシミド溶液のボトルを置き、嗅覚機能検査を行う。嗅覚正常ラットではシクロヘキシミド溶液を避け、通常の水を嗅ぎ分ける。

逆に両側の嗅球を除去すると、嗅覚は存在しえず、ラットはにおいをかぐことができない為、無作為に吸飲しようとして、水を飲む回数(正答率)は約50%となる。

今回の研究の結果、新生児期(P2)に外側嗅索を切断したラットは正常の嗅覚をもった動物と同じほぼ100%の嗅ぎ分けを行った。

一方、生後12週(12w)で外側嗅索切断を行ったラットでは約50%の正答率となり、無嗅覚動物と同じ正答率となった。(図2)

この結果、生後2日で外側嗅索を切断したラットでは嗅覚機能が存在し、生後12週(12w)で外側嗅索切断を行ったラットでは嗅覚機能が存在しないことが明らかとなった。

さらに嗅覚機能が存在する生後2日で外側嗅索を切断したラットで、外側嗅索を切断が完全になされているかと、切断後に梨状葉と嗅球の間に神経回路が再生されているかを明らかにするために顕微鏡による神経トレーサーの確認を行った結果、嗅覚機能が存在するラットでも外側嗅索は完全に切断されており、神経回路が再生していることが明らかとなった。(図3)

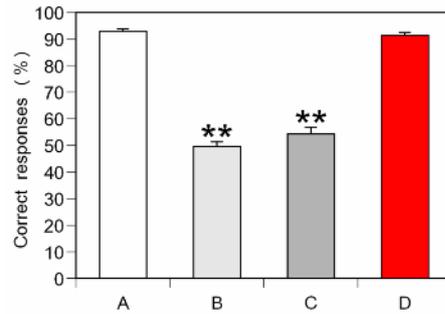


図2: シクロヘキシミドによる嗅覚検査の正答率。A:Control (Adult R-OB(-)), B: Adult R-OB(-) & L-OB(-), C:Adult L-LOT t & R-OB(-), D:Neonatal L-LOT t & R-OB(-)

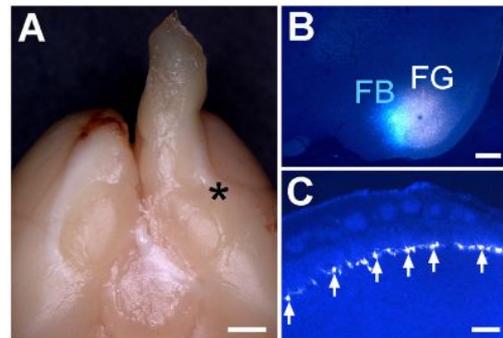


図3: 顕微鏡による神経トレーサーの確認。A: アスタリスクが外側嗅索切断部位、B: 神経トレーサー注入部位、C: 嗅球。FB 陽性細胞がなく(完全切断)、FG 陽性細胞が多数認められる(神経回路の再生)

(2) 生後7日(P7)に左外側嗅索を切断した動物では、切断5週間後に組織学的検索を行ったところ、FB 陽性細胞がなく(完全切断)、FG 陽性細胞が多数認められる(神経回路の再生)動物が認められた。(図4)

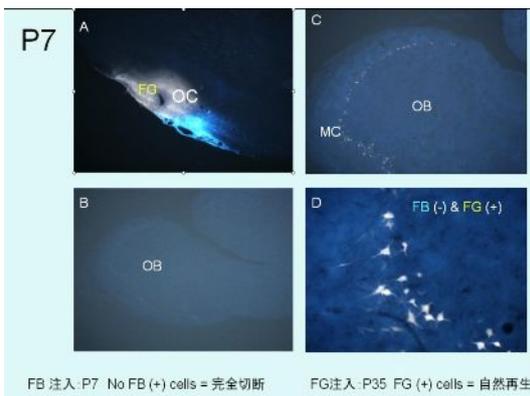


図4: P7 ラットの組織像。A: 神経トレーサー注入部位、B: 右側嗅球 (FB, FG ともに陰性)、C: 左側嗅球、D: 左側嗅球拡大像。D ではFB 陽性細胞がなく(完全切断)、FG 陽性細胞が多数認められる(神経回路の再生)。OB=嗅球、MC=僧房細胞

生後 14 日 (P14) に左外側嗅索を切断した動物では、切断 5 週間後に組織学的検索を行ったところ、FB 陽性細胞がなく (完全切断)、また FG 陽性細胞も全く認められず、神経回路の再生がないことが明らかとなった。(図 5)

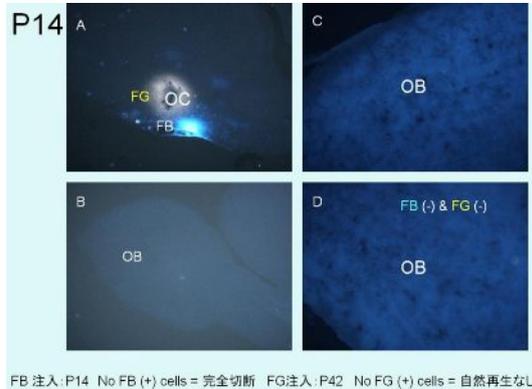


図 5 : P14 ラットの組織像。A : 神経トレーサー注入部位、B : 右側嗅球 (FB, FG ともに陰性)、C : 左側嗅球 (FB, FG ともに陰性)、D : 左側嗅球拡大像。D では FB 陽性細胞がなく (完全切断)、FG 陽性細胞も認められず、神経回路の再生が起こっていない。OB=嗅球

これらの結果、ラットの外側嗅索の障害では生後 2 日のラットでは外側嗅索切断後も嗅覚機能が回復することが明らかとなった。一方生後 12 週の成獣ラットでは外側嗅索切断後、嗅覚機能は回復しなかった。

また、嗅覚機能の回復は生後 7 日から 14 日までの間の障害であれば再生すると考えられた。

これらのことより、新生児ラットでは脳の可塑性が存在し、障害を受けた神経回路の再生が起こり、機能も維持できることが明らかとなった。

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 Kawagishi K, Moriizumi T. et. al. Determination of functionally essential neuronal population of the olfactory epithelium for nipple search and subsequent suckling behavior in newborn rats.

Brain Research, 査読有, 1267 巻, 2009, pp50-57

[学会発表] (計 2 件)

① 川岸 久太郎 他 7 名

軸索切断による嗅球僧房細胞の細胞死の検討

第 88 回日本生理学会・第 166 回日本解剖学会 合同大会, 2011 年 3 月 30 日,

Journal of Physiological Sciences 抄録号誌上開催

② Kyutaro Kawagishi et. al.

NEURONAL POPULATION OF THE OLFACTORY EPITHELIUM FOR NIPPLE SEARCH AND SUBSEQUENT SUCKLING IN NEWBORN RATS.

IUPS (国際生理学会), 2009 年 7 月 31 日, 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川岸 久太郎 (KAWAGISHI KYUTARO)

信州大学・医学部・助教

研究者番号 : 40313845