

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462577

研究課題名(和文) 嗅覚入力が生じた新生嗅細胞の成熟過程に及ぼす影響の検討

研究課題名(英文) The effects of olfactory sensory inputs on maturation process of newly generated olfactory sensory neurons

研究代表者

菊田 周 (Kikuta, Shu)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00555865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：新生嗅細胞の分化・成熟過程に、嗅覚入力があるどのような影響を及ぼすのかを検討した。嗅上皮障害後の再生過程を観察すると、障害後14日以降で、鼻閉側の嗅上皮が薄く、嗅細胞数や成熟嗅細胞数も開放側と比較して減少していた。さらに新生細胞の成熟は、嗅覚入力期間ではなく、障害後7-14日の嗅覚入力に依存することを明らかにした。閉塞後再開放側の嗅球背側領域の匂い刺激に対する神経活動は、開放側と比較して低下しており、嗅覚入力遮断による嗅上皮障害後の組織学的な不完全再生は、嗅覚機能面にも影響を及ぼすことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We examined whether olfactory sensory deprivation affected the dynamic incorporation of newly generated OSNs 3, 7, 14, and 28 days post-injury in adult mice. No significant differences in the numbers of olfactory marker protein (OMP)-positive mature OSNs or apoptotic OSNs were observed between the deprived and non-deprived sides 0-7 days post-injury. However, between days 7 and 28, the sensory deprived side showed markedly fewer OSNs and mature OSNs but more apoptotic OSNs than the non-deprived side. Intrinsic functional imaging of the dorsal surface of the olfactory bulb at day 28 revealed that responses to odor stimulation were weaker in the deprived side compared with those in the non-deprived side. These results indicate that in the adult OE sensory deprivation disrupts compensatory OSN regeneration following injury and that newly generated OSNs have a critical time window for sensory input-dependent survival 7-14 days post-injury.

研究分野：嗅覚生理

キーワード：耳鼻咽喉科 嗅覚障害 嗅神経

1. 研究開始当初の背景

生涯にわたり再生を繰り返す嗅細胞は、様々な要因によって、その生存ならびにその成熟過程が影響を受ける。発達期では、新生嗅細胞の成熟に関わる因子の1つは嗅覚入力であり、嗅覚入力が増断されると嗅細胞は成熟せずに、細胞死に陥る。しかし、成体において、新生した未熟嗅細胞の分化・成熟過程に嗅覚入力がかどのように関わるのかについては十分に解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新生嗅細胞の分化・成熟過程に嗅覚入力がかどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることである。この目的達成のために、嗅上皮障害後に新生する嗅細胞に注目し、その成熟過程における、嗅覚入力依存的な細胞動態の変化を主に免疫組織学的手法によって観察する

3. 研究の方法

C57BL/6 (10週齢) マウスに対して、嗅毒性物質であるメチマゾール75mg/kgを腹腔内に投与する。メチマゾールによる嗅上皮障害後6時間以内に、ケタミンならびにラボナールによる麻酔を行い、内腔を充填したシリコンチューブをマウス一側鼻腔に挿入し、片鼻閉マウスを作製する。各時間経過後 (メチマゾール障害後3、7、14、28日) 脳をPFAで還流固定し、骨脱灰後にパラフィン包埋する。5 μ mの厚みで嗅上皮冠状断を作製 (各切片が最低500 μ m離れた鼻中隔3切片を選択) し、嗅上皮の厚み、嗅細胞数、支持細胞数を鼻閉側と開放側で比較する。さらに、抗Olfactory Marker Protein (OMP) 抗体、抗Ki67抗体、抗tubulin抗体、抗Caspase3抗体を用い、酵素抗体法によって、新生した嗅細胞の細胞動態な

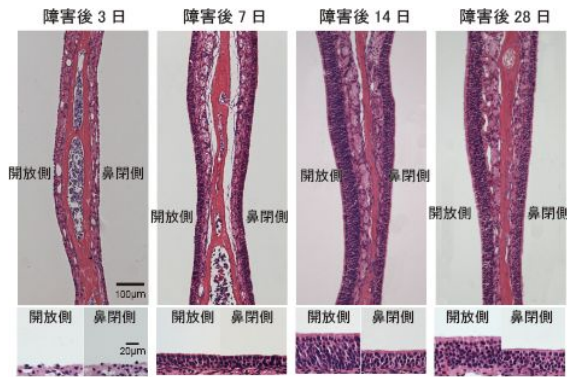
らびに基底細胞の分裂能を経時的に観察する。抗Caspase3抗体を用い、酵素抗体法によって障害後7日、14日、28日でのCaspase3陽性細胞数を計測する。嗅細胞の細胞死阻害のため、メチマゾール投与1週間後からCaspase3阻害剤 (80mg/kg) を隔日で腹腔内投与する。Caspase3阻害剤投与群と投与なし群 (10%DMSO) において、Caspase3陽性細胞数を開放側と鼻閉側で比較する。メチマゾール障害後28日後のマウスを用いて機能イメージング解析を行う。ケタミン、ラボナール麻酔を行い、体温をモニターしながら、マウス前頭骨をダイヤモンドバーで薄く削り、嗅球背側部を露出させる。705nmの赤外線刺激による、Oxy-HbならびにDeoxy-Hbの吸光係数の相違を利用して、CCDカメラで嗅球の匂い刺激に対する神経活動を観察する。匂い刺激は、オルファクトメーターを用い (100ml/分の流量、5秒間刺激)、嗅球背側領域を活性化する2-methylbutyric acidならびにtrimethylthiazolineをミネラルオイルで10%に希釈して使用する。鼻閉後再開放側と鼻閉側で匂い刺激に対する神経応答を、定量的に比較する

4. 研究成果

研究期間全体を通して次の4点を明らかにした。

1. 新生嗅細胞は、嗅覚入力依存的に再生・成熟する。

嗅毒性物質であるメチマゾールを投与し、投与後早期にシリコンチューブをマウス一側鼻腔に挿入し、片鼻閉マウスを作成した。新生した嗅細胞の再生過程を組織学的に観察した。嗅上皮障害後の再生過程を継時的に観察すると、障害後14日以降で鼻閉側の嗅上皮が薄く、鼻閉側の嗅細胞数、成熟嗅細胞数が開放側と比較して減少していた (下図)。



障害後 3、7、14、28 日後の嗅上皮 (H-E 染色)

障害後 14 日以降で鼻閉側嗅上皮は薄く、細胞数も少ない。

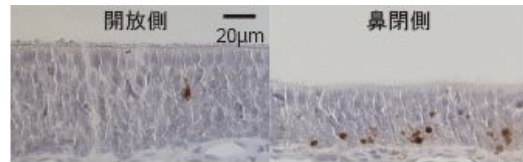
2. 適切な時期に嗅覚入力を受けないと、新生嗅細胞は成熟せずに細胞死に陥る。

抗カスパーゼ3抗体を用い、酵素抗体法によって障害後7、14、28日でのカスパーゼ3陽性細胞数を計測すると、鼻閉側嗅上皮でのカスパーゼ3陽性細胞数は障害後7日では開放側と比較して差はなかったが、障害後14日以降で、開放側と比較して増加していた。「新生する嗅細胞は、障害後7日以降に嗅覚入力を受けないと細胞死に陥る」可能性を検討するために、「障害後0-7日目までの鼻閉群」と「障害後7-14日目までの鼻閉群」の2群を作成した。脳固定時期（障害後14日）、鼻閉期間（7日間）は同一であるが、鼻閉するタイミングを変えた2群において、嗅上皮の厚み、細胞数、OMP陽性細胞数を開放側と鼻閉側で比較した。障害後すぐに鼻閉を開始した群では、開放側と鼻閉側で嗅細胞数に変化を認めなかった。しかし、障害7日目以降に鼻閉した群では、鼻閉側の嗅細胞数が開放側と比較して有意に減少していた。さらにカスパーゼ3陽性細胞数は鼻閉側で有意に増加していた。障害後の新生細胞の成熟は、嗅覚入力期間ではなく、障害後7-14日の嗅覚入力に依存することを明らかにした。

3. 嗅上皮障害後の組織学的な不完全再生は「未熟な新生嗅細胞の細胞死」によって引き起こされる。

カスパーゼ阻害薬を投与することで、嗅上皮

障害後の不完全な組織再生が、新生嗅細胞の細胞死によって引き起こされるかどうかを確認した。最初に細胞死に陥る細胞（カスパーゼ3陽性）の多くは未熟な嗅細胞であることを見出した（下図）。この未熟な嗅細胞の細胞死阻害のため、メチマゾール投与1週間後から、カスパーゼ阻害剤を隔日で腹腔内投与を行った。カスパーゼ阻害剤投与群と投与なし群（10%DMSO）において、カスパーゼ3陽性細胞数を開放側と鼻閉側で比較すると、鼻閉側の組織の不完全な再生が抑制されることを組織学的に確認した。



障害後 14 日嗅上皮、抗カスパーゼ3抗体 (DAB 発色)

鼻閉側嗅上皮でカスパーゼ3陽性細胞が増加していた。

(茶色；カスパーゼ3陽性細胞)

4. 嗅上皮障害後の新生細胞による機能代償は、嗅覚入力遮断によって破綻する。

メチマゾール障害後28日後のマウスを用い機能イメージング解析を行った。閉塞後再開側の嗅球背側領域の匂い刺激に対する神経活動は、開放側と比較して有意に低下していた。嗅覚入力遮断による嗅上皮障害後の組織学的な不完全再生が、嗅覚機能面にも影響を及ぼすことが示された。

以上の結果から 嗅上皮障害後の再生過程に、嗅覚入力が必要な役割を果たしていることが明らかになった。嗅覚刺激によって新生した未熟な嗅神経を効率的に成熟嗅細胞に分化させることができる可能性が示唆され、今後、嗅上皮障害患者に対して嗅覚刺激による治療法の開発が期待される。さらに嗅上皮障害後に新生した嗅細胞による組織修復ならびに機能代償に関わる神経機構の解明が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

1. Kikuta S, Matsumoto Y, Kuboki A, Nakayama T (他 18 名) Longer latency of sensory response to intravenous odor injection predicts olfactory neural disorder. *Scientific Reports* 13;6:35361, 2016 (査読有)
2. Nishijima H, Kondo K, Toma-Hirano M, Iwasaki S, Kikuta S, Fujimoto C, Ueha R, Kagoya R, Yamasoba T. Denervation of nasal mucosa induced by posterior nasal neurectomy suppresses nasal secretion, not hypersensitivity, in an allergic rhinitis rat model. *Lab Invest.* 96:981-93, 2016 (査読有)
3. Ueha R, Ueha S, Sakamoto T, Kanaya K, Suzukawa K, Nishijima H, Kikuta S (他 3 名) Cigarette Smoke Delays Regeneration of the Olfactory Epithelium in Mice. *Neurotox Res.* 30:213-24, 2016 (査読有)
4. Ueha R, Ueha S, Kondo K, Sakamoto T, Kikuta S, Kanaya K, Nishijima H, Matsushima K, Yamasoba T. Damage to Olfactory Progenitor Cells Is Involved in Cigarette Smoke-Induced Olfactory Dysfunction in Mice. *Am J Pathol.* 186:579-86, 2016 (査読有)
5. Kikuta S, Sakamoto T, Nagayama S, Kanaya K, Kinoshita M, Kondo K, Tsunoda K, Mori K, Yamasoba T. Sensory deprivation disrupts homeostatic regeneration of newly generated olfactory sensory neurons after injury in adult mice. *J Neurosci.* 35:2657-73, 2015 (査読有)
6. Shinya Y, Miyawaki S, Nakatomi H, Okano A, Imai H, Shin M, Sato K, Tsuchida T, Hayashi T, Terao Y, Numakura S, Morikawa T, Shibahara J, Kikuta S (他 6 名) Recurrent cerebral aneurysm formation and rupture within a short period due to invasive aspergillosis of the nasal sinus; pathological analysis of the catastrophic clinical course. *Int J Clin Exp Pathol.* 8:13510-22, 2015 (査読有)
7. Sakamoto T, Kikuta S, Kikkawa YS, Kinoshita M, Saito Y, Kobayashi K, Kakigi A, Suzuki M, Yamasoba T.: Prognostic factors for long-term hearing preservation after canal-tympanoplasty for congenital aural atresia. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 272:3151-6, 2015 (査読有)
8. Sakamoto T, Kikuta S, Kikkawa YS, Tsutsumiuchi K, Kanaya K, Fujimaki Y, Ueha R, Saito Y, Yamasoba T.: Differences in Postoperative Hearing Outcomes and Vertigo in Patients with Otosclerosis Treated with Laser-Assisted Stapedotomy versus Stapedectomy. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* ;77:287-93, 2015 (査読有)
9. Kagoya R, Kondo K, Baba S, Toma-Hirano M, Nishijima H, Suzukawa K, Kikuta S, Yamasoba T.: Correlation of basophil infiltration in nasal polyps with the severity of chronic rhinosinusitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 114:30-5, 2015 (査読有)
10. Baba S, Kagoya R, Kondo K, Suzukawa M, Ohta K, Yamasoba T. T-cell phenotypes in chronic rhinosinusitis with nasal polyps in Japanese patients. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 11:eCollection 2015 (査読有)
11. Suzuki S, Yasunaga H, Matsui H, Fushimi K, Kondo K, Yamasoba T. Complication rates after functional endoscopic sinus surgery: analysis of 50,734 Japanese

patients. Laryngoscope. 125:1785-91, 2015
(査読有)

12. Shin M, Kondo K, Hanakita S, Suzukawa K, Kin T, Shojima M, Nakagawa D, Saito N. Endoscopic transnasal approach for resection of locally aggressive tumors in the orbit. J Neurosurg. 123:748-59, 2015
(査読有)

14. Kanaya K, Kondo K, Suzukawa K, Sakamoto T, Kikuta S, Okada K, Yamasoba T.: Innate immune responses and neuroepithelial degeneration and regeneration in the mouse olfactory mucosa induced by intranasal administration of Poly(I:C). Cell Tissue Res. 357:279-99, 2014 (査読有)

15. Urata S, Ishimoto S, Kikuta S, Ichinose H, Takeuchi S.: Preliminary Study of the Safety of Seasonal Allergic Rhinitis Treatment in Railway Personnel. J Otol Rhinol. 3:3-6, 2014 (査読有)

16. Yoshihara S, Kondo K, Kanaya K, Suzukawa K, Baba S, Toma-Hirano M, Kikuta S, Iwasaki Y, Fujio K, Yamasoba T.: Tumour necrosis factor inhibitor-associated sinusitis. Rhinology 52:246-51, 2014 (査読有)

17. Sakamoto T, Kikkawa YS, Kikuta S, Kinoshita M, Ueha R, Suzukawa K, Kashio A, Kakigi A, Ito K, Suzuki M, Yamasoba T.: Favorable prognostic factors for long-term postoperative hearing results after canal tympanoplasty for congenital aural stenosis. Otol Neurotol. 35:966-71, 2014 (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

1) 菊田 周、久保木章仁、坂本幸士、金谷香織、上羽瑠美、西嶋大宣、近藤健二、山岨達也 Eosinophilic Cationic Proteinによる嗅細胞障害に対するインスリン点鼻投与の予

防効果 第55回日本鼻科学会総会・学術講演会、栃木県総合文化センター (栃木県・宇都宮市) 2016.10.13-15

2) 菊田 周、久保木章仁、松本 有、坂本幸士、金谷香織、和田翠、籠谷領二、西嶋大宣、平野真希子、吉川弥生、近藤健二、山岨達也 インスリン点鼻投与による嗅細胞の細胞死抑制効果 第117回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市) 2016.5.18-21

3) 菊田 周: アリナミンテストにおける新たな意義 (シンポジウム) 第 54 回日本鼻科学会学術講演会、広島国際会議場 (広島県・広島市) 2015 . 10.2

4) 菊田 周 嗅覚情報処理に関わる神経回路とその意義 電気学会嗅覚インタフェース調査専門委員会 東京工業大学すずかけ台キャンパス中本研究室内 (神奈川県・横浜市) 2014.8.28

[図書] (計 件)

なし

[産業財産権]

なし

出願状況 (計 件)

なし

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 1 件)

名称 : 嗅覚障害治療剤

発明者 : 久保木 章仁、菊田 周

権利者 : 久保木 章仁、菊田 周

種類 : 治療薬

番号：6035524

取得年月日：平成28年11月11日

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

菊田 周 (KIKUTA Shu)

東京大学・医学附属病院・助教

研究者番号：00555865

(2)研究分担者

近藤 健二 (KONDO Kenji)

東京大学・医学附属病院・准教授

研究者番号：40334370

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし