

平成21年5月31日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006－2008
 課題番号：18390458
 研究課題名（和文） 嗅神経細胞再生の分子機構解明と嗅覚再生医療に関する研究
 研究課題名（英文） Study on molecular biological mechanism of regeneration of olfactory receptor neurons and regeneration medicine of olfaction
 研究代表者
 丹生 健一（NIBU KEN-ICHI）
 神戸大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：20251283

研究成果の概要：

嗅神経細胞の障害による嗅覚障害の新たな治療法開発を目指して、嗅神経細胞の再生における分子機構の解明を進めるとともに、様々な再生医療の可能性を検討した。分子機構解明の研究では、DNA マイクロアレイを用いて、嗅上皮の再生過程における遺伝子発現を解析。新規遺伝子 *Fezf1* が嗅上皮内での嗅神経細胞の配列に重要であることを示した。治療法についての研究では、アデノウイルスベクターが嗅神経細胞のみならず、嗅球への遺伝子産物導入にも有効であることを示し、Cre/loxP システムを用いて、*Bcl-2* 遺伝子の導入により、嗅神経細胞のアポトーシスを抑制できることを示した。更に、bFGF の鼻腔内局所投与により、嗅神経細胞の前駆細胞である球状基底細胞の増殖をみることで、骨髄間質幹細胞を鼻腔内に直接投与することにより、嗅上皮内に移植することができることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2007年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：医学

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：嗅覚 嗅神経 嗅上皮 再生 骨髄間質幹細胞 bFGF DNA マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

加齢・感冒・外傷・薬剤・喫煙など様々な原因により嗅覚の低下が生じることはよく知られている。嗅覚の低下は、それ自体が即、生命に関わるのではないため軽視されがちであるが、「匂い」は五感の中でも様々な感情や記憶と最も密接に関連した感覚であり、

「ヒト」が「人」らしく生きる上で非常に重要な機能である。高齢者において更に、栄養・衛生・安全面にも大きな影響を及ぼし、これから迎える高齢化社会において嗅覚障害はますます重要な問題となる。我々はこれまでの研究において、嗅覚受容体を有する嗅神経細胞の分化と再生のメカニズムを明らかにしてきたが、

本研究ではこれまでの成果をもとに嗅神経細胞の分化および再生の遺伝子メカニズムを更に深く解明するとともに、新たな治療法を開発することを目標として計画した。

2. 研究の目的

(1) 嗅神経細胞再生の分子機構に関する研究

① DNA マイクロアレイによる研究

メチマゾールによる嗅上皮再生モデルを用いて、DNA マイクロアレイで全遺伝子の発現を調べ、嗅上皮の障害過程・再生過程に関与する遺伝子を解明する。

② 嗅神経特異的新規遺伝子についての研究

共同研究を行っている内匠ら（大阪バイオサイエンス研究所）が同定した嗅上皮に特異的に発現する新奇遺伝子が、嗅上皮の発生・嗅神経細胞の分化再生に果たす役割を解析する。

(2) 嗅神経細胞再生治療に関する研究

① 遺伝子治療の研究

従来のアデノウイルスベクターを用いた各種神経栄養因子の遺伝子導入に加え、Cre/loxPシステムを用いたアポトーシス抑制関連の遺伝子導入を試み、嗅覚障害の治療効果を検討する。

② 骨髄間葉系幹細胞による再生医療の研究

経鼻腔的または経静脈的に骨髄間葉系幹細胞を移植し、嗅神経再生治療の可能性を検討する。

③ サイトカイン局所投与による嗅上皮再生

bFGF、NGF 等各種サイトカインを鼻腔に直接投与し、嗅上皮の再生を促進する可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス嗅上皮アポトーシスモデルを用いた嗅上皮再生分子機構の検討

抗甲状腺薬メチマゾールの投与により、嗅神経細胞は瞬く間に一斉にアポトーシスにより消滅し、嗅上皮基底膜上に残された幹細胞からの再生が始まる。この再生にはマウスではおよそ3週間を要し、様々な遺伝子が関与していると考えられる。嗅球に発現する全遺伝子群をマイクロアレイにより解析した。

(2) 新奇遺伝子ノックアウトマウスによる研究

共同研究を行っている内匠らは嗅上皮に特異的に発現する新奇遺伝子を同定した。本研究では内匠らが作成した本遺伝子のノックアウトマウスを用いて、本遺伝子が嗅上皮の発生・嗅神経細胞の分化再生に果たす役割を形態学的に解析した。

(3) 遺伝子治療の研究

従来のアデノウイルスベクターを用いた各種神経栄養因子の遺伝子導入に加え、従来のウイルスベクターでは導入困難であったアポトーシス抑制遺伝子群をCre/loxPシステムを用いて導入し、嗅覚障害の治療効果を検討した。具体的には、予め鼻腔内にアデノウイルスベクターを投与して目的遺伝子を十分に嗅神経細胞において発現させておき、続いてマウスの嗅球を除去し、嗅球除去後の嗅神経細胞の状態を免疫組織化学ならびにTUNEL法を用いて形態学的に検討した。

(4) 骨髄間葉系幹細胞による再生医療

神経細胞への分化傾向を持つ骨髄間質細胞NRGを、BrdUを含んだ培養液中で培養。BrdUでラベルされた骨髄間質細胞を1) マウス尾静脈から全身投与、2) マウス鼻腔へ局所投与、の二つの方法で投与し、1) 移植した骨髄幹細胞が生着するか否か、2) 生着した骨髄間質細胞が嗅神経系細胞へと分化したか否かを検討した。

(5) サイトカイン局所投与による嗅上皮再生

若年および老化マウスに、経鼻腔的にbFGFを局所投与し、嗅神経細胞再生への効果を検討した。

4. 研究成果

(1) DNA マイクロアレイによる解析

メチマゾール投与12時間後、24時間後、3日後、7日後、14日後の嗅球のRNAを採取し、DNAマイクロアレイにより、各時期におけるマウス全遺伝子発現の変化を調べた。その結果、236の遺伝子が、いずれかの時期でマイクロアレイレベルで4倍以上の変動がみられた（投稿準備中）。

(2) 新規遺伝子 *Fezf1* の役割

新規遺伝子 *Fezf1* 欠損マウスでは、嗅神経細胞

胞の軸索が嗅球に到達できないため、嗅上皮中の嗅神経細胞の配列が大きく乱れることを示した①。

(3) 遺伝子治療の研究

LacZ をレポーター遺伝子として組み込んだアデノウイルスベクターを鼻腔に投与し、遺伝子発現の部位と期間を調べた。ベクターは狙い通り嗅神経細胞に取り込まれ、既に報告されているように、細胞内で組み込んだ遺伝子から作られた色素が嗅神経細胞内に観察され、更にこの色素は軸索を通じて嗅覚の一次中枢である嗅球まで運ばれることを示し、ウイルスベクターが嗅神経細胞のみならず嗅球へのドラッグデリバリーシステムとしても有用であることを報告した。

これらの結果から、続いて、アデノウイルスベクターに各種神経栄養因子や細胞死を抑制する遺伝子 bcl-2 を組み込んで、嗅球除去による嗅神経細胞障害モデルの鼻腔に投与し、その効果を検討した。bcl-2 遺伝子投与群において嗅神経細胞のアポトーシスを抑制する傾向が認められた③。

(4) 骨髄間葉系幹細胞による再生医療

BrdU でラベルされた NRG は嗅球に多数認められ嗅上皮内にも認められた。投与した細胞の約 1% 以上が嗅上皮に生着しており、蛍光免疫染色法により、これらの細胞は球状基底細胞に分化していることが確認できた(投稿準備中)。

(5) サイトカイン局所投与による嗅上皮再生

特に高齢マウスにおいて、bFGF 投与群では嗅神経細胞の前駆細胞である球状基底細胞の有意な増加がみられ、bFGF の嗅神経細胞再生への有効性が示唆された②。

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 14 件)

①Watanabe Y, Inoue K, Yamamoto A, Nakai N, Nakatani J, Nibu K, Sato N, Iiboshi Y, Yusa K, Kondoh G, Takeda J, Terashima T, Takumi T. *Fezf1* is required for penetration of the basal lamina by olfactory axons to promote olfactory development J Comp Neuro 2009 515:565-584

Refereed

②Nishikawa T, Doi K, Ochi N, Katsunuma S, Nibu K. Effect on olfactory epithelium of intranasal administration of basic fibroblast growth factor. Neuroreport 20:764-769, 2009 Refereed

③Keita K, Sakai N, Doi K, Kawamitsu H, Fujii M, Sugimura K, Nibu K. Functional MRI of regional brain responses to “pleasant” and “unpleasant” odors Acta Otolaryngologica in press Refereed

④Kondo K, Watanabe K, Sakamoto T, Suzukawa K, Nibu K, Kaga K, Yamasoba T. The distribution and severity of spontaneous lesions in neuroepithelium and Bowman45-49, 2008's glands in mouse olfactory mucosa: age-related progression. Cell Tissue Res 2009 335:489-503 Refereed

⑤丹生健一 嗅覚の加齢とアンチエイジング Ant-Aging Medicine 4:625-628, 2008 査読有

⑥丹生健一 土井清司 西川 匡 越智尚樹 感覚器の再生医療 嗅覚の再生医療—嗅上皮の再生に向けて 医学のあゆみ 226:991-995, 2008 査読有

⑦丹生健一 嗅覚研究の進歩—嗅神経細胞の再生医療— 日本耳鼻咽喉科学会会報 111:45-49, 2008 査読有

⑧黒野祐一 丹生健一 鼻副鼻腔の組織修復 日本鼻科学会誌 47:59-60, 2008 査読有

⑨土井清司 嗅覚器の解剖学 神経内科 66:317-321, 2007. 査読有

⑩土井清司 丹生健一 呼吸性嗅覚障害 ENT/er 3:6, 2007 査読有

⑪土井清司 丹生健一 嗅上皮の発生・再生 JOHNS 23:693-697, 2007 査読有

⑫Watanabe K, Kondo K, Takeuchi N, Nibu K, Kaga K. Age-related changes in cell density and proliferation rate of olfactory ensheathing cells in lamina propria of postnatal mouse olfactory mucosa. Brain Res. 2006 1116:82-92 Refereed

⑬Doi K, Nibu K, Okado H, Terashima T. Bcl-2 expression mediated by Cre/loxP system in olfactory epithelium. Neurosci Lett. 2006 339:67-70 Refereed

⑭堅田敬太 丹生健一 Functional MRI を用いたニオイの研究 頭頸部自律神経 20:55-56, 2006 査読有

[学会発表] (計 10 件)

①越智尚樹 西川 匡 土井清司 丹生健一 骨髄間質幹細胞移植による嗅神経細胞の再生 第109回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 大阪 2008.5.15.

②Nishikawa T, Nibu K, Ochi N. Effect of bFGF on olfactory epithelium. 12th congress of the International Rhinologic Society. 2007.12.5 Venice, Italy.

③Ochi N, Nibu K, Doi K, Nishikawa T. Local Injection of Bone Marrow Derived Stem Cells into Nasal Cavity Is Useful for Regeneration of Olfactory Receptor Neurons. 12th congress of the International Rhinologic Society. 2007.12.5 Venice, Italy.

④西川 匡, 丹生健一, 土井清司, 越智尚樹 ヒト繊維芽細胞産生因子(bFGF)点鼻によるマウス嗅上皮の変化に関する免疫組織学的検討 第46回日本鼻科学会総会・学術講演会 宇都宮 2007.9.27

⑤越智尚樹 西川 匡 土井清司 丹生健一 骨髄間質幹細胞移植による嗅神経細胞の再生 第46回日本鼻科学会総会・学術講演会 宇都宮 2007.9.27

⑥近藤健二 渡辺健太 丹生健一 山嵜達也 加齢に伴うマウス嗅上皮の変性の進行 第108回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 金沢 2007.5.17

⑦丹生健一 シンポジウム 嗅覚研究・臨床の進歩 嗅神経細胞の再生 第108回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 金沢 2007.5.17

⑧堅田敬太 坂井信之 丹生健一 2種類のおい刺激に対するにおい中枢の反応 第45回日本鼻科学会 四日市 2006.9.21

⑨Doi K, Nibu K. Bcl-2 expression mediated by Cre/loxP system in olfactory epithelium.

25th International Symposium on Infection and Allergy of the Nose. 2006.6.12, Tampere, Finland

⑩Katada K, Nibu K. Functional magnetic resonance imaging study of human olfaction. 25th International Symposium on Infection and Allergy of the Nose. 2006.6.12, Tampere, Finland

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹生 健一 (NIBU KEN-ICHI)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20251283

(2) 研究分担者

寺島 俊雄 (TERASHIMA TOSHIO)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20101892

土井 清司 (DOI KIYOSHI)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00379380

(3) 連携研究者

森 健作 (MORI KENSAKU)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60008563