

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16840

研究課題名（和文）嗅上皮再生機序の解明と薬剤効果検証のための嗅上皮再生モデルの作製

研究課題名（英文）Establishment of an olfactory epithelia regeneration model to elucidate the mechanism of olfactory epithelial regeneration and to validate drug effects

研究代表者

石川 正昭（Masaaki, Ishikawa）

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：10813743

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では目的は嗅覚再生機序解明と再生法開発のための研究モデルとして3層構造を保持した嗅上皮組織の培養法確立を試みた。初めに嗅上皮を構成する、支持細胞、嗅神経、基底細胞の蛍光免疫染色法による検出条件を確立した。次に嗅神経マーカータンパク質OMPプロモーター下でGFPを発現するOMP-GFPマウスを導入し、ICRマウスとOMP-GFPマウスの新生児マウスの鼻中隔を用いて嗅上皮組織培養の条件検討を行った。検討の結果、嗅神経細胞が死滅し、組織幹細胞である基底細胞が生存する条件が確認され、嗅神経物理的損傷モデルが確立された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嗅覚の再生機序の解明と再生促進のための研究モデルとして、マウスなどの実験動物と嗅上皮初代培養が用いられているが、前者では継時的観察や嗅神経から嗅球への軸索伸長とシナプス形成に関する検討が難しく、後者は生体の組織構築を反映していないという不備がある。そこで本研究では、生体で見られる複数の細胞種による3層構造を保持した状態の嗅上皮組織を長期間培養できる培養法を検討し、薬剤処理などによる障害からの再生過程を詳細かつ継時的に観察できる培養系の検討を試み、物理的損傷モデルを確立した。本モデルを用いることで層構造再生に必要な因子の探索が可能であり、嗅上皮再生治療薬の探索に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to establish a long-term culture method of olfactory epithelial tissue that retains its three-layer structure as a research model for elucidating the mechanism of olfactory regeneration and developing a regeneration method. First, we established the conditions for the detection of supporting cells, olfactory nerve, and basal cells, which constitute the olfactory epithelium, by fluorescence immunostaining. Next, we introduced OMP-GFP mice, which express GFP under the promoter of olfactory nerve marker protein OMP. Then the nasal septum of newborn mice of ICR mice and OMP mice were used for examination of conditions for olfactory epithelial tissue culture. As a result, we confirmed the conditions under which olfactory neurons die and basal cells which is tissue stem cells survive, by this result, an olfactory nerve physical damaged model was established.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：嗅上皮 嗅神経 層構造 軸索伸長 OMP 組織培養

1. 研究開始当初の背景

嗅覚再生と促進は耳鼻科にとって重要な課題である。嗅覚は鼻腔の粘膜の鼻粘膜嗅部、嗅上皮で感知される。嗅上皮は3層から成り、嗅上皮の表層を構成する支持細胞、中間層を構成する嗅神経細胞、基底層を構成する基底細胞がある(図1)。匂いの刺激を伝える嗅神経細胞は双極性ニューロンで、末梢側は鼻腔に樹状突起を伸ばし、この突起上にあるレセプターに匂い物質が結合する。中枢側は軸索が頭蓋内の篩板の孔を通して嗅球に伸び、情報を伝達する。嗅神経細胞は中枢神経としては例外的に再生能を持っており、嗅上皮が障害され表層・中間層の細胞が細胞死を起こして脱落すると、基底細胞のうち、球形基底細胞の一部が分裂し、分化して嗅神経細胞となり失われた嗅神経を補充する。嗅上皮は約一か月で再生するが、障害の度合いや原因によって再生しない例や再生しても匂いの認識に異常をきたす異臭症などの症状も報告されている。これらの治療法を開発するためには再生機序の解析と治療薬の開発が必要である。

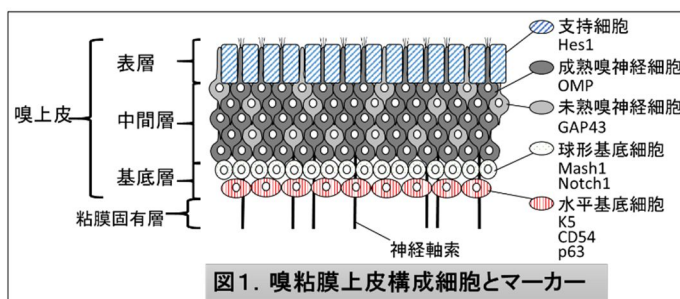


図1. 嗅粘膜上皮構成細胞とマーカー

嗅覚障害と嗅上皮再生の研究は動物モデルを中心に行われてきた。嗅球切除、鼻毒性を有する薬剤の投与などの方法により障害モデルが作成され、再生過程の組織学的解析や再生時に発現・機能する遺伝子群の同定による再生メカニズムの解析や、増殖因子などによる再生促進の検討が行われている。動物モデルではサンプリング時のみの定点観察となる上、嗅覚障害では嗅上皮組織だけではなく嗅球への軸索伸長とシナプス形成の異常も考えられるが、この部分の経時的解析も困難である。嗅神経細胞初代培養での研究も行われているが、single cell 培養 (Markopoulou et al., 2008) などであり、嗅上皮特有の3層構造を示す報告はなく、他臓器の研究では初代培養では生体でみられる平面極性が再現されないという報告もあることから (Vladar et al., 2015) 初代培養のみでは解析が不十分であると考えられた。

そこで本研究では上記2つのモデルの不備を補完するため、詳細な再生メカニズムの解析や薬剤効果の検証をリアルタイムで行える嗅上皮-嗅球組織培養系の確立を目指した。これらの学術的背景から、この研究課題の核心をなす学術的「問い」は「嗅上皮再生過程を in vitro で再現できるモデルをどのように作製するか？」であると考えた。

そこで本研究では上記2つのモデルの不備を補完するため、詳細な再生メカニズムの解析や薬剤効果の検証をリアルタイムで行える嗅上皮-嗅球組織培養系の確立を目指した。

これらの学術的背景から、この研究課題の核心をなす学術的「問い」は「嗅上皮再生過程を in vitro で再現できるモデルをどのように作製するか？」であると考えた。

2. 研究の目的

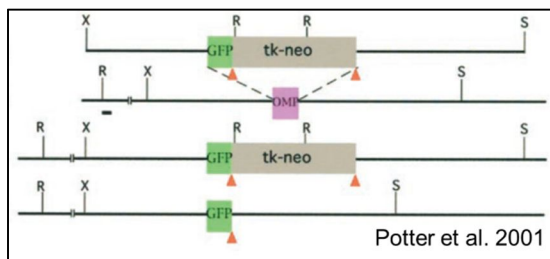
本研究の目的は、複数種の構成細胞による3層構造を保った状態の嗅上皮組織と嗅球組織を培養し、嗅上皮再生機序の解明と薬剤効果の検証が可能な嗅上皮再生モデルを作製する事である。本研究では生体組織の細胞組成と相互作用を保持し、しかも培養細胞に準じた経時的・高解像度の解析が可能な組織培養モデルを用いて解析・検証を行うという独自のアプローチにより、初代培養や固定組織サンプルからは見いだせなかった嗅上皮再生に関する新たな学術的知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、嗅上皮を長期培養できる組織培養法を検討し、さらに物理的損傷などによる組織障害からの再生過程を in vitro で再現するための培養条件の検討を行った。

(1) OMP-GFP マウスの導入

培養条件の検討に用いる動物数を減らすため、OMP 遺伝子を GFP で置き換えた OMP-GFP マウス (Potter et al., 2001, 右図) を The Jackson Laboratory より導入し実験に用いられるよう繁殖させ一部はホモ化した。



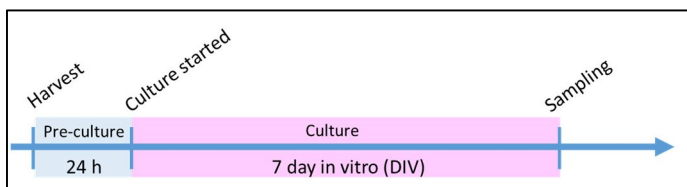
(2) 嗅上皮組織培養法の確立

採取後組織の評価法の確立

ICR P-0~2 マウスより嗅球を含めた鼻副鼻腔を採取し、組織を PFA で固定した後に 10 μm の厚みで切片を作成し、各種構成細胞を免疫染色法により確認した。WT マウスでも OMP-GFP マウスで得られたものと同じ結果が得られることを確認する為、OMP 抗体での染色法も検討した。

・培養条件の検討

ICR マウス及び OMP-GFP マウスの頭蓋骨より嗅球を含めた嗅上皮を 3 mm 幅で採取し、鼻尖側を上向きで well insert 内に留置し、in vitro で 48 時間、7 日間培養した。培地としては Neurobasal medium, DMEM などを用い、B27 などの添加物ありなしの条件で培地中に沈下、カルチャーインサートを用いた気液海面培養などを検討した。



・培養条件の評価

培養条件の評価法として、培養 2 日目、7 日目に組織を固定し、HE 染色による組織全体の形態、各細胞種のマーカータンパク質(図 1 参照) の免疫染色などによる評価を行い、培養前と同様の細胞組成と組織形態が保持されているか検討した。

(3) 嗅上皮障害モデルの確立

・障害条件の検討

48 時間の培養後、OMP 陽性細胞のみがまず死滅していたことから考察し、嗅上皮組織採取の際に嗅神経の中核へと連絡する軸索を切断しているため本モデルが in vivo における物理的損傷と同様の状況になっていることから、以降上記培養条件で培養された組織を嗅上皮障害モデルとして使用することとした。

・障害モデルの評価

(2) .と同じ評価法により基底細胞が生存していることを検討し、障害条件の評価を行う。

(4) 嗅上皮再生モデルの確立

・再生条件の検討

II で確立した障害モデルを継続して培養し、再生可能か検討する。再生しなければ、培養条件を再検討する。

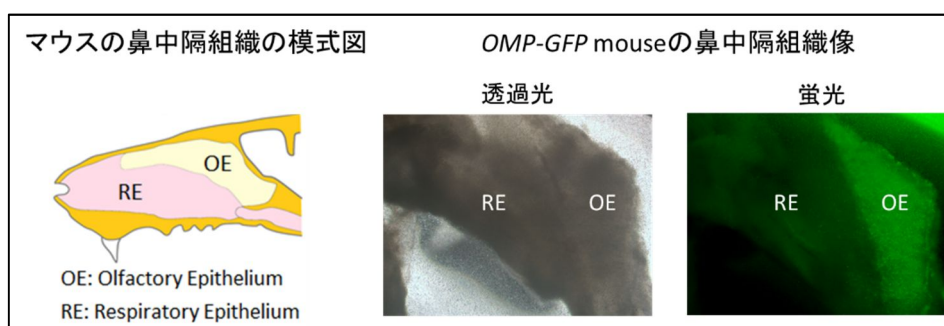
・再生モデルの評価

(2) .と同じ評価法により嗅上皮構成細胞の有無を検討し、再生条件の評価を行う。

4 . 研究成果

(1) OMP-GFP マウスの導入

導入、繁殖させた OMP-GFP マウスから鼻中隔を採取し、pre-culture 後に未固定の状態です倒立蛍光顕微鏡による観察を行った。結果下図のように嗅上皮領域(OE)で GFP のシグナルが検出され、OMP 陽性嗅上皮細胞の生存を未固定で検討可能な系が確立された。



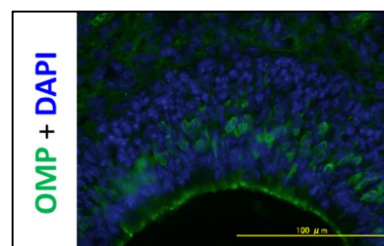
(2) 嗅上皮組織培養法の確立

・採取後組織の評価法の確立

ICR P-0~2 マウス組織における、嗅上皮マーカーOMP, 神経マーカー III-tubulin, 基底細胞マーカーP63 及び SOX2 等の染色条件を確立した。(右図に抗 OMP 抗体を用いた染色結果を示す。)

・培養条件の検討

OMP-GFP マウス嗅上皮を用い、培養条件を検討した結果、ある培養条件下で 48 時間培養後、OMP 陽性細胞がほぼ死滅し、III-tubulin, P63 及び SOX2 陽性細胞が生存していることが確認された。(下図) これらの結果から、培養開始後 48 時間で成熟嗅上皮細胞が死滅することが確認された。これは鼻中隔との接続を切断され、in vivo における障害モデルと同じ状況におかれたことから起こったと考えられた。そこで長期間培養として 7 日間の培養を試みたところ、SOX2 陽性基底細胞



胞のみが残り、支持細胞、嗅神経細胞が死滅した状態となっており物理的損傷後の *in vivo* 組織と同じ状態であった。

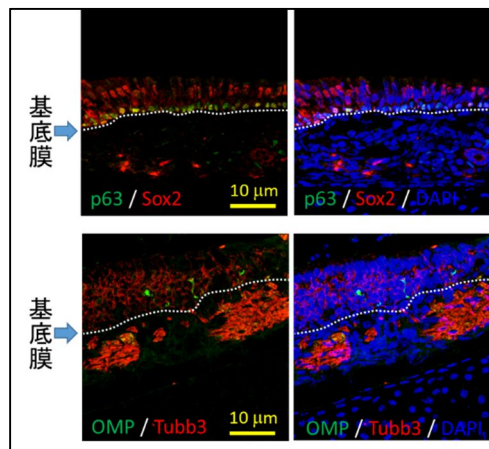
(3) 嗅上皮障害モデルの確立

上記、基底細胞のみが生存する状態は物理的損傷組織で見られるのと同様の状態であるため、本組織培養を物理的損傷モデルとみなし、再生モデル作製に使用している。

(4) 嗅上皮再生モデルの確立

・再生条件の検討

今後、(3)までで確立した障害モデルの長期培養条件を検討しており、再生モデル作製条件を検討していきたい。



嗅上皮の組織培養に関する報告はほとんどなく、嗅上皮培養の報告では細胞が組織から広く遊走してしまっているものなど (Pooley et al., 2015 他) 組織本来の形態や細胞構造、マーカー発現を維持していることを示したものは少ない。また嗅上皮組織培養を用いた障害・再生機構の解析に関する報告も未だ見られない。本研究で確立した基底細胞層のみを残す嗅上皮障害モデルを用いて嗅上皮層状構造の再生モデルが確立されれば、将来的には蛍光タンパク質を発現する様々なタイプのトランスジェニックマウス組織を用いることにより、様々なたんぱく質の嗅上皮再生時の発現や局在をリアルタイムに観察することができ、嗅覚再生メカニズムに関する知見を得るために強力なツールとなると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ueda Toshio, Sakamoto Tatsunori, Kobayashi Masayoshi, Kuwata Fumihiko, Ishikawa Masaaki, Omori Koichi, Nakagawa Takayuki	4. 巻 46
2. 論文標題 Optical coherence tomography for observation of the olfactory epithelium in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 230 ~ 237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anl.2018.08.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 桑田文彦
2. 発表標題 創薬研究を目指したマウス嗅上皮器官培養系の検討
3. 学会等名 第57回日本鼻科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumihiko Kuwata
2. 発表標題 Preservation of olfaction following Endoscopic Pituitary Surgery
3. 学会等名 European rhinology congress
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------