

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16863

研究課題名（和文）全脳透明化により見えてくる嗅覚中枢再生の道筋

研究課題名（英文）A route of reproduction of the olfactory field by brain transparency

研究代表者

中村 有加里（NAKAMURA, Yukari）

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：80769117

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：脳において神経新生が見られるのは海馬と嗅球のみと言われている。嗅球の神経新生は側脳室から細胞が発生し、あるルートを通って嗅球内に運ばれる。その動態を立体的に捉えることで、より明瞭な神経新生のメカニズムを知る事が出来る。今回の研究期間において、マウスの脳を500 $\mu$ m厚で全体を透明化し、その中に見られる神経芽細胞のみを免疫染色で描出した。立体的に、神経芽細胞が側脳室から嗅球へ螺旋状に移行していく姿を確認する事ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後の研究目標として、嗅神経芽細胞の神経新生を促進する事で、嗅覚の再生につながる可能性について検討を予定しているため、促進因子の投与と非投与との変化を明らかにすることが必要となる。今回の研究成果は、神経新生の動態を立体的に行う事により、その投与、非投与での差を一目瞭然とできる可能性があると考えられる。この研究により、認知症の前駆症状とも言われる嗅覚障害の改善から、認知症予防につながる可能性を考えている。

研究成果の概要（英文）：In the brain, neurogenesis is seen only hippocampus and olfactory bulb. Neuroblasts occur lateral ventricle, and carry from there to olfactory bulb. We can know the clear neuropoietic mechanism more by catching the change three-dimensionally. During this study period, we transparentized 500 $\mu$ m thickness in the brain of mouse and depicted only a neuroblast seen in that by immunostaining. We confirmed the figure that a neuroblast shifted from lateral ventricle to olfactory bulb in a spiral three-dimensionally.

研究分野：嗅覚

キーワード：脳透明化 嗅覚中枢再生 嗅神経芽細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

嗅覚系では末梢の嗅神経でも中枢の嗅球でも神経の再生が起こっていることが知られており、齧歯類と中心とした成体の脳室下層や海馬においても神経新生が見られることがわかっている。近年アルツハイマー病をはじめとした神経変性疾患の初期症状として嗅覚障害が挙げられており、神経新生の異常と神経変性疾患発症の因果関係があるのではないかと考えられている。そのため、中枢での神経新生が、神経変性疾患の発症に関与しているとするならば、その調節により発病予防や治療にもつながることが可能となると考えた。これまでの研究で、神経芽細胞が RMS という経路を通り嗅球へ到達する経路の描出を蛍光染色で行う事に成功した。しかし、これまでの上記のような切片を用いた観察では、RMS の 2 次元的な形態しか観察する事はできず、RMS 形態の全貌の観察やダイナミックな動態観察には適していなかった事が課題として挙げられた。そこで、今回脳透明化技術を用いた細胞観察を行う事とした。

### 2. 研究の目的

本研究は、神経新生における脳室下層から嗅球への神経芽細胞の移行を明視化し、嗅神経が障害を受けた後の再生時に神経芽細胞がどのような動態を示すか、また神経栄養因子などの調節因子の発現がどのように見られているかを明らかにすることを目的とする。

本研究では、まず、RMS における神経芽細胞の動態を脳の透明化により明視化する。そして、末梢の嗅神経に実験的に変性を生じさせ、再生時における動態の変化を観察する。さらに、嗅球における各種神経栄養因子が、どの部位で産生され、嗅神経の再生時にどのように産生量に変化するかを観察する。本研究で成果が見られた場合、マウスのみならずヒトへの応用も可能であると考えられる。ヒトにおける嗅球のニューロン新生の基本機構はマウスと同じであるため、ヒトのニューロン新生機構の解明につながる可能性がある。

### 3. 研究の方法

成体マウス脳室内に、GFP 遺伝子を搭載したレンチウイルスを投与し、投与翌日に脳全体を透明化し、脳室から嗅球に至る RMS を視覚化させる。

マウス脳は 3 種混合麻酔による深麻酔下に経心性に 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定施行の後、脳摘出し 4%パラホルムアルデヒドで浸漬した。

今回の研究では、脳を 500  $\mu\text{m}$  厚に矢状断スライスし、脳透明化を実行した。

透明化の方法は以下を用いた。

- (1) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に室温下に 30 分浸漬させる。
- (2) メタノールに変更し -20 ~ -30 °C で一晩浸漬させる。
- (3) 透明化処理施行 (RAP-FIX、5%中性ホルマリン/5% Triton X-100/1% KOH) し、一晩以上浸漬させる。
- (4) pH6 Buffer に切片を入れ、約 15 分間 80-90 °C で加温処理を行う。
- (5) 免疫染色を施行、二晩浸漬させる。
- (6) 高屈折率性マウント液で透徹後、共焦点レーザー顕微鏡下で観察

今回の研究では、免疫染色は一次抗体に抗 Doublecortin 抗体 (abcam, ab207175)、二次抗体に Alexa594 抗 Rabbit IgG 抗体 (abcam, ab150080)、核染色には Hoechst33342 (Invitrogen, H3570) を用いた。

メチマゾールをマウスに腹腔内投与させて嗅細胞の変性を起こし、嗅粘膜を脱落させる。嗅細胞再生時における RMS を遊走する神経芽細胞の発現および嗅球までの移行の変化を、前述の透明化処置を行った脳を用い、神経芽細胞を蛍光染色で発現させ観察する。また、嗅神経再生時における神経栄養因子の脳内での産生量および分布の変化を、免疫組織化学的に観察する。

### 4. 研究成果

マウスの脳を 500  $\mu\text{m}$  厚毎に切片を作成して全体を透明化し、その中に見られる神経芽細胞のみを免疫染色で描出した。立体的に、神経芽細胞が側脳室から嗅球へ RMS 内を螺旋状に移行していく姿を確認する事ができた。

また、神経新生促進因子の一つである IGF-1 の投与を行い経時的に神経芽細胞の動態を確認したところ、神経新生が促進され嗅球内に到達する速度を早めている可能性が示唆された。今後更に定量評価での変化を確認していく予定である。

神経新生因子の IGF-1 が投与後脳内へ移行しているかどうか、また受容体と結合し作用しているかどうかについては、透明化処理と並行し今回行うことは叶わなかったが、5  $\mu\text{m}$  の薄切切片による免疫染色では IGF-1 を経鼻投与する事によって脳内へ移行しており、嗅球内では顆粒層や糸球体層に IGF-1 の発現を認めた事、および同箇所にも広くリン酸化された IGF-1 レセプターの活性化を認める事を明らかとした。

今後の課題としては、神経新生促進因子の投与による変化を薄切標本ではなく透明化脳処理

を施した標本での立体的評価を行い、投与群、非投与群との差を明らかとすることである。

更に、嗅覚障害を来した状態での IGF-1 投与が神経新生にもたらす作用についても、今後検討の余地が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村 有加里
2. 発表標題 IGF-1の経鼻投与による脳内新生ニューロン移動に対する促進効果の検討
3. 学会等名 第37回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukari Nakamura
2. 発表標題 Promoting the neuron neogenesis in the brain by nasal administration of IGF-1
3. 学会等名 Rhinoworld
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 中村 有加里
2. 発表標題 IGF-1の経鼻投与による脳内新生ニューロン移動促進効果の検討
3. 学会等名 第52回日本味と匂い学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村 有加里
2. 発表標題 経鼻的投与したIGF-1の脳内神経芽細胞遊走へ及ぼす影響
3. 学会等名 第120回日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----