

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2018～2021

課題番号：18KK0448

研究課題名（和文）ヒト嗅粘膜組織を用いた神経性嗅覚障害の病態の解明

研究課題名（英文）Pathophysiology of neurogenic olfactory dysfunction

研究代表者

西島 大宣（Nishijima, Hironobu）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50704938

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間：12ヶ月

研究成果の概要（和文）：ヒトの嗅覚障害は原因が不明であり、嗅覚機能および嗅覚器の状態を正確に把握できる方法はない。本研究では嗅粘膜を特異的に標識する蛍光プローブを確立し、嗅粘膜の状態を直接観察し把握できることを明らかにした。ヒトの嗅粘膜に優位に発現しているCYP2A6およびGGTという2つの酵素を抽出し、その基質であるCoumarinおよびgGlu-HMRGという2つの分子に着目をした。これらは嗅粘膜の支持細胞で代謝され、その代謝産物が蛍光を発する性質を利用し、嗅粘膜を特異的に描出した。さらに嗅粘膜障害モデルでの検討では、これらのプローブは無神経化した嗅上皮は描出しないが、再生した嗅粘膜は描出をした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらのプローブが将来的にヒトでの応用が可能となった場合、内視鏡下の観察により嗅粘膜の状態を観察できるようになる。このことは嗅覚障害の疾患分類そのものを変え、嗅覚診療の大きな変換点となる可能性がある。さらにこの嗅粘膜特異的プローブにより嗅粘膜を直接可視化できるようになることは、耳鼻咽喉科診療で行われている内視鏡下鼻副鼻腔手術や頭蓋底手術等での有用性も期待される。

研究成果の概要（英文）：Olfactory epithelium (OE) undergoes degeneration in disorders such as age-related olfactory dysfunction. However, methods for real-time in vivo detection of OE and assessment of total extent in the nasal cavity are unavailable. We identified two fluorescence probes for rapidly detecting and evaluating the entire extent of mice OE with topical application. Taking advantage of the differential expression of the enzymes cytochrome p450 (CYP) and -glutamyltranspeptidase (GGT) in OE relative to respiratory epithelium, we utilized the conversion of coumarin (a substrate of CYP) and gGlu-HMRG (a substrate of GGT) by these enzymes to form metabolites with fluorescent emissions in the duct and sustentacular cells of neuron-containing OE. In depleted and regenerated OE model, the emission of these probes remained absent in respiratory metaplasia but appeared in regenerated OE. These substrates could be used to monitor OE degeneration and follow regenerative response to therapeutic interventions.

研究分野：鼻科学

キーワード：嗅粘膜 蛍光プローブ 嗅覚障害

1. 研究開始当初の背景

嗅覚は五感の一つであり、食事や花の香りの賞味など生活の質を豊かにする役割だけでなく、火災や腐敗物の察知など安全にも直結する感覚である。さらに近年では嗅覚障害が死亡率と相関するというデータや、神経変性疾患の初期症状であるというデータが多数報告され、嗅覚は生命活動の指標の一つであると提唱されている。

嗅覚受容機構は、マウスをモデル生物として用いて分子レベルで少しずつ解明されてきている。しかしヒトの嗅覚障害に目を向けると、ウイルス感染後の嗅覚障害や加齢性嗅覚障害など診療でしばしば遭遇するにも関わらず、その分子レベルでの病態は不明であり、エビデンスの確立した薬物治療はない。このヒトの嗅覚障害の病態生理が不明である最大の理由として、嗅覚機能および嗅覚器の状態を正確に把握できる方法が無いことが挙げられる。研究レベルでは functional MRI や脳磁図などによる嗅覚の他覚的な評価が試みられているが、設備や時間的な制約から日常臨床に使用できるものではない。臨床で可能な嗅覚の検査は、「決められた匂いを嗅ぎ、複数の選択肢の中から答えを選ぶ」という主観的な認知感覚に依存した検査だけである。そのため認知機能の低下した患者や小児に対して行うことは難しく、また文化的な背景により認知できる香りも異なるため、世界的に統一された嗅覚検査法は存在しない。これは他の感覚器における他覚的検査、例えば視覚における網膜の光干渉断層撮影 (OCT) や聴覚の聴性脳幹反応 (ABR)、歪成分耳音響放射検査 (OAE) 等と比較すると著しく立ち遅れている。そのため現在の嗅覚障害の診断分類は、感冒後嗅覚障害、外傷後嗅覚障害など、嗅覚障害を引き起こした原疾患と、それによる障害部位の推測によるにすぎない。

嗅粘膜の状態を知るためには組織生検を行うしかないが、ヒトの嗅粘膜は鼻腔の深部に位置し、生検に伴う嗅覚障害も懸念されるため、実際には行われていない。また嗅覚の機能が障害された際には、匂いのリハビリという嗅覚トレーニング以外にほとんど治療法がなく、その治療効果も十分とは言えない

2. 研究の目的

本研究では、将来的な嗅覚障害の病態解明および新規の治療法の確立をめざし、まずは嗅粘膜の状態を客観的に把握することを目的とした。嗅粘膜の状態を評価することができれば嗅覚障害の診断及び治療評価が大きく進歩すると考えた。

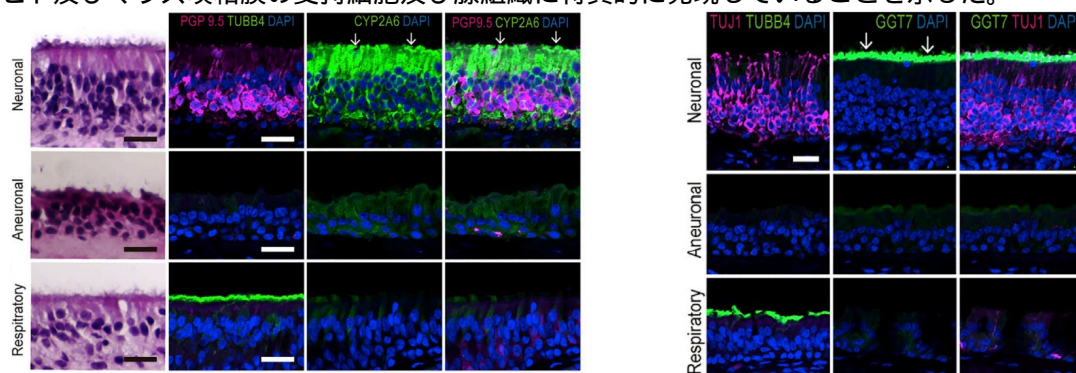
ヒトの嗅粘膜は組織採取が難しく、実際の患者で行うことは困難である。この研究ではヒトの嗅粘膜のサンプルが十分にある Harvard medical school の Holbrook 博士及び、その共同研究者であり、嗅粘膜の再生におけるエキスパートである Tufts 大学の Schwob 博士と共に共同研究として行われた。

3. 研究の方法

嗅粘膜を特異的に標識するために、まず鼻腔の呼吸粘膜と嗅粘膜を比較し、嗅粘膜に特異的な物質を探索した。既報のヒトの鼻腔粘膜の網羅的遺伝子解析のデータより、嗅粘膜に特異的に発現している分子を抽出していった。そしてこれらの分子の基質を調べることで、嗅粘膜特異的なプローブとなりうる候補を探索した。

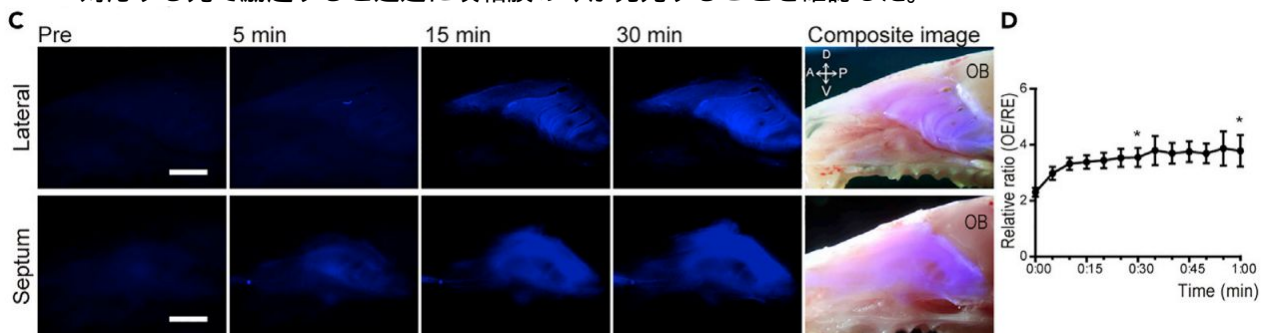
4. 研究成果

ヒトの鼻腔粘膜の網羅的遺伝子発現解析のデータから、呼吸粘膜と比較して嗅粘膜に優位に発現している cytochrome p450-2A6 (CYP2A6) および γ -glutamyltranspeptidase (GGT) という2つの酵素に着目をした。まず免疫染色とシングルセル遺伝子発現解析から CYP2A6 及び GGT がヒト及びマウス嗅粘膜の支持細胞及び腺組織に特異的に発現していることを示した。



(図) ヒトの嗅上皮 (OE) に特異的に発現する CYP2A6 及び GGT7

次に CYP2A6 及び GGT の酵素の基質である Coumarin (天然香料) および gGlu-HMRG という 2 つの分子は、その代謝産物が蛍光を発する性質を持つことから、これら基質を嗅粘膜に噴霧し、対応する光で励起すると迅速に嗅粘膜のみが発光することを確認した。



(図) クマリンを鼻粘膜に噴霧すると嗅粘膜のみを描出する。

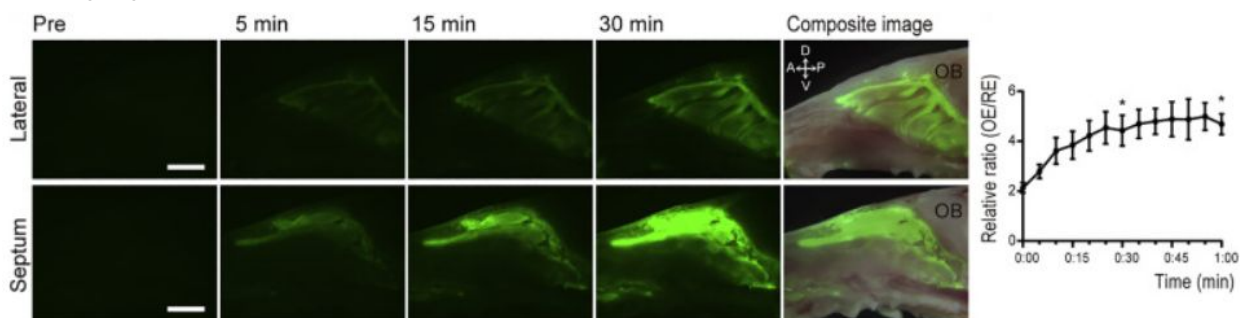
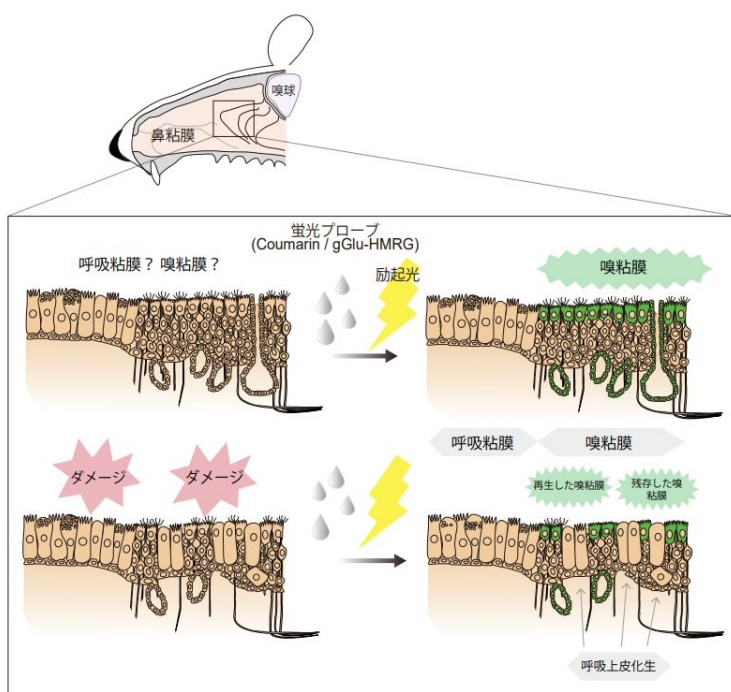


図) gGlu-HMRG を鼻粘膜に噴霧すると嗅粘膜のみを描出する。

さらにマウスの嗅粘膜障害モデルを用いた検討では、これらのプローブは無神経化した嗅上皮は描出しないが、再生した嗅粘膜では蛍光を発し、嗅粘膜の状態を直接観察して把握・評価できることを明らかにした。また手術にて摘出されたヒトの鼻粘膜の組織においてもこれらのプローブは嗅粘膜のみを描出することを確認した。

これらのプローブが臨床応用につながれば、内視鏡下の観察により生検をせずに嗅粘膜の状態を観察できるようになる可能性がある。このことは分子病態に基づく嗅覚障害の疾患分類の確立につながり、嗅覚診療の大きな変換点となる可能性があると考えている。さらに本プローブにより嗅粘膜を直接可視化できるようになることは、内視鏡下鼻副鼻腔手術 (ESS) や頭蓋底手術での嗅粘膜の温存にも役立つと考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishijima Hironobu, Zunitch Matthew J., Yoshida Masafumi, Kondo Kenji, Yamasoba Tatsuya, Schwob James E., Holbrook Eric H.	4. 巻 25
2. 論文標題 Rapid fluorescent vital imaging of olfactory epithelium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104222 ~ 104222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.104222	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔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 西嶋 大宣, 吉田 昌史, 近藤 健二, 山嵜 達也
2. 発表標題 蛍光プローブによる嗅粘膜の迅速イメージング
3. 学会等名 日本鼻科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤 健二, 西嶋 大宣, 山嵜 達也
2. 発表標題 Computational Fluid Dynamicsを用いた気導性嗅覚障害の病態生理の解析
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 嗅粘膜における α -glutamyl transpeptidaseの役割
2. 発表標題 西嶋 大宣, 近藤 健二, 韓 冰, 上羽 瑠美, 菊田 周, 吉原 晋太郎, 山嵜 達也
3. 学会等名 日本鼻科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西島 大宣, 吉田 昌史, 近藤 健二, 山嵜 達也
2. 発表標題 蛍光プローブによる嗅粘膜の迅速イメージング
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会学術講演会
4. 発表年 2021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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ホルブルック エリック (Holbrook Eric)	ハーバード大学・Department of Otolaryngology・Associate Professor	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	シュワブ ジェームス (Schwob James)	タフツ大学・Developmental, Molecular & Chemical Biology・Professor	

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			
米国	Harvard Medical School			
米国	Tufts University			