

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591986

研究課題名（和文） 嗅上皮由来組織幹細胞を用いた嗅覚障害治療の開発における基礎的研究

研究課題名（英文） frontier treatment for anosmia using olfactory stem cell

研究代表者

濱島 有喜 (HAMAJIMA YUKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30343403

研究成果の概要：

胎児マウス嗅上皮粘膜より、組織幹細胞を取り出した。浮遊細胞は球状な neuro-sphere を形成し、12 ヶ月以上継代することが出来た。マウス骨髄からも同様に sphere を形成する培養細胞が分離できたが、2 ヶ月程すると、細胞はアポトーシスを起こし、消失していったのに対し、鼻粘膜由来の細胞は 15 ヶ月継代することができた。これらの細胞から RNA を抽出し、RT-PCR にて神経系マーカーの発現をみると、Musashi1、Nestin、などの神経幹細胞を示唆する遺伝子の発現を認めた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

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：嗅覚障害、組織幹細胞、嗅上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

嗅覚障害は、日常診療において頻繁に遭遇する疾患であるが、治療に難渋する場合も多い。ステロイド剤の点鼻治療や亜鉛補充療法などが主体であるが、薬物治療には限界があり、十分に満足できる治療は現在のところ無いといって良い。そこで、我々は嗅覚障害の新たな治療法を開発していきたい。

嗅細胞は嗅裂の上方部分に存在し、神経細胞の中では数少ない再生可能な細胞で

あるにもかかわらず、実際には一度障害を受けた嗅細胞は、機能を元通りに回復することは困難である。組織中には、分化した上皮細胞と基底細胞が存在しているが、その中には、組織幹細胞も存在し、基底細胞、上皮細胞への分化再生と、両細胞の維持に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで組織幹細胞を嗅粘膜より取り出し、組織幹細胞を増殖させ、分化誘導したうえで、嗅裂に移植することが出来れば、嗅覚機能再生において、画期的な治療になりう

る可能性がある。申請者は、嗅粘膜由来組織幹細胞を用いた嗅細胞の機能再生を申請し、平成17年度若手Bを授与された。その科研費を利用して、昨年嗅粘膜由来の組織幹細胞の分離、培養に成功し、この組織幹細胞がRT-PCRにて、Sox1,2 Pax6, Musashi1, GFAP, nestinの発現を確認し、神経幹細胞であることを証明した。またこの組織幹細胞が6ヶ月間培養でき、その期間中、上記の遺伝子発現が保たれることを見出した。(論文投稿中)申請者は一昨年までミネソタ州立大学で、蝸牛における組織多能幹細胞の研究をしており、マウス胎児の蝸牛にmultipotentな幹細胞が存在し、胎児の蝸牛を取りだし、増殖因子で培養することで、組織幹細胞のセルラインを確立することができた。(論文投稿中)現在は骨髄由来の多能幹細胞を利用する方法が数多く報告されているが、神経再生の観点から今後の臨床応用を考えると、組織幹細胞は、より分化した前駆細胞として存在していると考えられ、多能幹細胞を神経幹細胞まで分化させる必要がなく、また、採取も容易にできる。嗅覚の治療を行う上でも、組織幹細胞の利用がより有効な治療になると考えられる。また、幹細胞の持つ特性である多能性や、幹細胞から放出される成長因子等は、神経障害の治療にも応用できると考えられる。よって嗅覚障害のみならず、顔面神経麻痺や、味覚異常などの末梢神経障害にも広く応用できる可能性を潜んでいる。

2. 研究の目的

(1) 組織幹細胞が嗅上皮細胞へ分化しうるか

セルラインとして確立した組織幹細胞に、math1(athol)などの転写因子を形質導入する。また、レチノン酸、ビタミンB12、へパリンと共培養し、この幹細胞がどのような変化をするか、RT-PCRにて確認する。免疫染色、Western blotでは、徳島大学生理学教室樋田教授より供与されたOlfactory Major Protein(OMP)を利用し、蛋白レベルでも発現を確認したい。また形質導入後、上皮細胞への分化が確認されれば、cDNA microarrayにより、幹細胞がどのようなシグナルを受けて嗅上皮へ分化するか検討する。

(2) 嗅上皮の機能再生が可能であるか
当科では、アレルギー性鼻炎モデルマウスにおいて、好酸球浸潤が嗅裂に浸潤し、このマウスが嗅覚障害を認めることを発見した。(論文投稿中)このモデルマウスと、硫酸亜鉛点鼻にて嗅覚障害を生じたマウスを用いて、幹細胞が嗅上皮に分化しうるか観察する。BrdUにて標識した組織幹細胞

をモデルマウスの嗅裂に注入し、1,2,4,6週間後に断頭。組織切片を作成し、免疫染色を施行する。標識細胞の局在を確認する。また行動解析、嗅電図を施行し、 γ 波の出現を検討して、嗅覚機能の再生の有無を確認する。

(3) 嗅覚障害原因ウイルスの同定とウイルス感染嗅覚障害モデルマウスの作成
日常臨床では、感冒後の嗅覚障害が最も頻度が高く、何らかのウイルス感染が原因と考えられる。当大学では嗅覚外来で、鼻粘膜よりスメアを採取し、PCRを施行して、原因ウイルスを検索する。数多く検出されたウイルスをマウスの鼻腔に投与し、嗅電図、行動解析にて嗅覚障害の程度を検討する。

3. 研究の方法

(1) 組織多能幹細胞の分化の検討

組織幹細胞のセルラインに、math1, HES, Notch 等の転写因子を形質導入する。また、成長因子(BDNF, GDNF)、レチノン酸、ビタミンB12、へパリンなどと共培養し、幹細胞が嗅上皮細胞に分化するか検討する。RT-PCR, 免疫染色、Western blot で OMP などの発現を確認する。形質導入および共培養後、cDNA microarray (申請備品)をすることにより、幹細胞がどのようなシグナルを受けて嗅上皮へ分化するか検討する。

(2) 組織幹細胞の局在の確認

BrdU で標識した嗅粘膜由来組織幹細胞を、当科で作成したアレルギー性鼻炎モデルマウスの嗅裂に注入する。また硫酸亜鉛を用いて作成した嗅覚障害マウスにも同様に投与し、組織幹細胞の局在、嗅上皮への分化の有無を観察する。移植後、1,2,4,6週間後にマウスを断頭し、嗅裂を摘出、周囲の骨を取り除き、4%パラフォルムアルデヒドにて固定後、メタノールにて脱水、キシレンで置換、パラフィンにて胞埋、5 μ mの切片を作成。BrdU1次抗体で蛍光免疫染色を行い光学顕微鏡で生着部位を確認する。また、嗅細胞マーカー(OMP)と蛍光二重染色を行い、組織幹細胞由来の嗅素を同定する(申請備品)。嗅裂は非常に小さな組織であるため、切片を多数作ることに限界があり、蛍光多重染色はこの問題を解決する手段として、非常に有効である。

(3) 嗅覚障害を誘発するウイルスの検索
外来に受診する患者様の鼻汁スメアを採取し、感冒の原因となるライノウイルスなどのプライマーを作成し、ウイルスPCRにて原因ウイルスの検索を行う。

(4) 嗅覚機能の再生

嗅覚障害は感冒後に生じることが最も多く、ウイルス感染が原因ではないかと考えられ

る。数多く検出されたウイルスをマウスへ感染させ、嗅覚障害が誘発されるか、嗅電図、行動解析にて検討する。

アレルギー性鼻炎モデルマウスを作成し、行動解析にて嗅覚障害を確認したのち、組織幹細胞を嗅裂に注入し、酢酸の回避行動などの行動パターンが変化するか観察する。また嗅電図をとり、 γ 波を解析して嗅覚障害の有無を検討する。硫酸亜鉛点鼻にて作成した嗅覚障害マウスにも同様に施行し、比較検討する。

4. 研究成果

妊娠マウスをケタミン、キシラジンにて麻酔後、胎児を取りだし、イソジンにて消毒後、断頭して脳組織を取り除き、嗅裂を含むように鼻粘膜を取り出した。ペニシリン・ストレプトマイシンを含んだ生理食塩水にて組織を洗浄後、0.25%トリプシンにて組織を37℃にて15分間留置し、細胞を分離させ、ナイロンメッシュにて骨などの不要組織を除去し、回収した細胞に成長因子を加えた培養液で継代した。ディッシュに付着する細胞と浮遊する細胞を分離し、浮遊細胞を継代した。浮遊細胞は球状な neuro-sphere を形成し、12ヶ月以上継代することが出来た。マウス骨髄からも同様に sphere を形成する培養細胞が分離できたが、2ヶ月程すると、細胞はアポトーシスを起こし、消失していったのに対し、鼻粘膜由来の細胞は15ヶ月継代することができた。これらの細胞からRNAを抽出し、RT-PCRにて神経系マーカーの発現をみると、Musashi1、Nestin、などの神経幹細胞を示唆する遺伝子の発現を認めた。今後は、嗅上皮細胞に分化する可能性があるか Math1、Id1、Hes1などのベクターを細胞に導入したり、ビタミン B12 や細胞分化の最終段階で必要であることが内耳有毛細胞のセルラインで解ってきているレノ酸を培養液に添加することで、OMP (olfactory major protein) などの遺伝子が発現するか検討する。またこの細胞を BrdU にて標識後、正常マウスと嗅覚障害モデルマウスの鼻粘膜に注射し、OMP の発現が生じるか検討したい。

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19件)

- ① 小児気管支異物摘出における工夫 森田真理、濱島有喜、渡邊暢浩、村上信五 小児耳 30 (1) :42-46, 2009 査読有
- ② Directed differentiation of mouse cochlear neural progenitors in

vitro. Lin J, Feng L, Hamajima Y, Komori M, Burns TC, Fukudome S, Anderson J, Wang D, Verfaillie CM, Low WC. Am J Physiol Cell Physiol. 2009 Mar;296(3):C441-52. Epub 2008 Dec 17. 査読有

- ③ Type and severity of patulous Eustachian tube Nakazawa M, Inagaki A, Hamajima Y, et al, Nagoya med J, 49:167-178, 2008 査読有
- ④ Identification of Id1 in acquired middle ear cholesteatoma Zhang Q, Hamajima Y, Zhang Q, Lin J, Arch Otolaryngology-HNS 134(3):306-310, 2008 査読有
- ⑤ 【異物 初期対応から摘出まで】耳鼻咽喉科領域の異物 摘出術の実際 渡邊暢浩, 濱島有喜, 稲垣彰 ENTONI 96号:15-21, 2008 査読有
- ⑥ Cochlear stem cells/progenitors and degenerative hearing disorders Lin J, Feng L, Fukudome S, Hamajima Y, Huang T, Levine S, Curr Med Chem. ;14(27):2937-43. 2007 査読有
- ⑦ Expression of Syk is associated with nasal polyp in patients with allergic rhinitis. Hamajima Y, Fujieda S, Subaga H, Yamada T, Moribe K, Watanabe N, Murakami S, Auris Nasas Larynx, Mar;34(1):49-56. 2007 査読有
- ⑧ Id1 Induces the Proliferation of Cochlear Sensory epithelial cells via the NF- κ B/Cyclin D1 Pathway in vitro. Ozeki M, Hamajima Y, Feng L, Ondrey F, Schlentz E, Lin J, J neurosci Res. Feb 15;85(3):515-24. 2007 査読有
- ⑨ Pneumococcal Peptidoglycan-Polysaccharides Induce the Expression of IL-8 in Airway Epithelial Cells via NF- κ B, NF-IL6, and/or AP-1 dependent mechanisms. Tsuchiya K, Toyama K, Tsuprun V, Hamajima Y, Kim Y, Ondrey F, Lin J, Laryngoscope, Jan;117(1):86-91. 2007 査読有
- ⑩ スギ花粉症における第二世代抗ヒスタミン薬の有用性の検討 濱島有喜、中村善久、大野伸晃、大橋卓、服部綾、高木繁、村上信五 診療と新薬、44(2), 2007 査読有
- ⑪ 好酸球中耳炎 update 渡邊暢浩、濱島有喜、中村善久、村上信五 ENTONI、73:51-57, 2007 査読有
- ⑫ スギ花粉症における第二世代抗ヒスタミン薬の臨床効果 藤枝重治、山田

- 武千代、濱島有喜、他 日鼻誌
46(1):18-28, 2007 査読有
- ⑬ マクロライド系抗菌薬クラリスロマイシンの鼻茸への移行性 羽柴基之、濱島有喜、他 耳展 50:2:89-94, 2007
査読有
- ⑭ 好酸球中耳炎 update 3. 乳突洞削開術と鼓室形成術 渡邊暢浩、濱島有喜、中村善久、村上信五、ENTONI 73:51-57, 2007 査読有
- ⑮ スギ花粉症における第二世代抗ヒスタミン薬の有用性の比較検討 濱島有喜、中村善久、他 診療と新薬 44(2):177-186, 2007 査読有
- ⑯ スギ花粉症に対する第二世代抗ヒスタミン薬の効果 大野伸晃 濱島有喜 大橋卓 村上信五 耳鼻咽喉科免疫アレルギー 25 巻 2 号:213-214、2007
査読有
- ⑰ 【花粉症治療のアップデート】受療行動を高める薬剤選択 今野昭義, 榎本雅夫, 濱島有喜, 久保伸夫 MEDICO 38 巻 2 号:51-62, 2007 査読有
- ⑱ 中耳杯細胞分化の制御因子 中村善久, 濱島有喜, 村上信五 耳鼻咽喉科免疫アレルギー 25 巻 2 号:71-72、2007
査読有
- ⑲ 3D Accu-i-tomo(小照射野コーンビームCT)の耳科手術支援機器として利用 村上信五, 濱島有喜, 稲垣彰 耳鼻咽喉科展望 50 巻 5 号:359-361、2007
査読有

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱島 有喜 (HAMAJIMA YUKI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：30343403

(2) 研究分担者

飛田 秀樹 (HIDA HIDEKI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00305525

(3) 連携研究者