

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18822

研究課題名（和文）におい刺激による嗅覚系ニューロン再生の検証、分子機構の解明と認知症治療への応用

研究課題名（英文）Verification of olfactory system neuron regeneration by odor stimulation, elucidation of molecular mechanism and application to dementia treatment

研究代表者

石倉 友子（ISHIKURA, Tomoko）

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：90769118

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）：マウスの空間の明暗に対する嗜好性質を組み込んだにおい刺激装置を開発し、忌避行動を観察した。嗅神経を障害する薬剤として知られているメチマゾールの腹腔投与で嗅上皮障害モデルを作成した後、4種のおい刺激を14日間実施・嗅覚改善の観察に行動実験を行った。におい刺激の有無で嗅覚忌避行動に有意差は認めなかったことから、次いで、皮下脂肪由来幹細胞の経鼻移植研究を行った。移植14日後に、嗅覚忌避行動回復促進と脂肪由来幹細胞移植群での嗅上皮の成熟嗅細胞増加を認めた。今回使用した脂肪由来幹細胞の細胞調整液上清に嗅覚機能に重要とされる神経成長因子の濃度の増加を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嗅覚と認知機能の関連が過去にも指摘されていることから、嗅覚機能維持・向上によって認知機能低下防止を図るべく嗅覚障害治療の治療方法を検討した。人への嗅覚刺激療法と同等のにおい刺激では明らかな嗅覚障害改善を確認できず、嗅覚刺激療法の効果を高める治療法として、脂肪由来幹細胞投与を挙げた。嗅上皮障害モデル動物での脂肪由来幹細胞の経静脈投与による嗅上皮再生促進が報告されてきたが、経静脈投与で懸念される侵襲・血栓形成リスクを払拭すべく経鼻投与を試行し、脂肪由来幹細胞の経鼻投与が嗅覚障害治療の選択肢となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We developed an odor stimulator that incorporates the preference properties of mice for light and dark spaces and observed avoidance behavior. After creating a model of olfactory epithelial damage by intraperitoneal administration of methimazole, behavioral experiments were conducted to observe the improvement of olfactory perception by administering four types of odor stimuli for 14 days. Since there was no significant difference in olfactory aversive behavior between the presence and absence of odor stimuli, we tried the intranasal transplantation study of subcutaneous fat-derived stem cells. After 14 days of transplantation, accelerated recovery of olfactory aversive behavior and an increase in mature olfactory cells in the olfactory epithelium were observed in the adipose-derived stem cell transplant group. The cell-conditioned supernatant of the adipose-derived stem cells used in this study showed an increase in the concentration of nerve growth factor.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：嗅覚障害

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

嗅覚系が末梢、中枢ともに再生することは旧知の事実である。末梢の嗅神経は常に変性と再生を繰り返しており、上皮内の基底細胞が幹細胞として再生に関与している。マウスなどのげっ歯類では、嗅神経を実験的に変性させても4週程度で嗅覚機能が回復するが、人ではその再生は遅く、感冒後嗅覚障害や外傷性嗅覚障害などの神経性嗅覚障害には有効な治療方法はなかった。近年、新たな治療法としてOlfactory Training (以下OT)の有効性を示す報告が散見されるようになったが、どのような機序をもって効果があるのかは明らかにされていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、におい刺激により嗅覚系ニューロンの再生が亢進するのか、さらにおい刺激により神経性嗅覚障害の有意な回復が得られるとすれば、どのようなメカニズムで回復するのかを実験動物を用いて組織化学的視点等から解析することである。嗅覚と認知機能の関連が過去にも指摘されていることから、嗅覚機能維持・向上によって認知機能低下防止を図るべく嗅覚障害治療の治療方法を検討した。

### 3. 研究の方法

マウスの空間の明暗に対する嗜好性質を組み込んだにおい刺激装置を開発し、マウスの嗅覚忌避行動を観察した。嗅神経を障害する薬剤として知られているメチマゾール(抗甲状腺薬)の腹腔投与で嗅上皮傷害モデルを作成した。メチマゾール投与後、人への嗅覚刺激療法として報告されている4種(バラ、ユーカリ、レモン、クローブ)の匂いを各種1分ずつ朝夕に嗅がせる形でにおい刺激を14日間実施・嗅覚改善の観察に行動実験を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 実験装置の開発

嫌悪臭からマウスは本能的に逃げることで自ら刺激を受けに行かない点、また嗅覚刺激を続けると嗅覚疲労を起こす点が実験時の問題点としてあげられた。その点を解決すべく、新しく、空間の明暗に対するマウスの嗜好性質を組み込んだ装置を開発した。嗅覚忌避行動にはマウスの嫌悪臭として酪酸を選択し酪酸を含んだ綿球を入れたエッペンチューブを暗室内に設置、行動実験から最適濃度を10%に設定した(図1、2)。

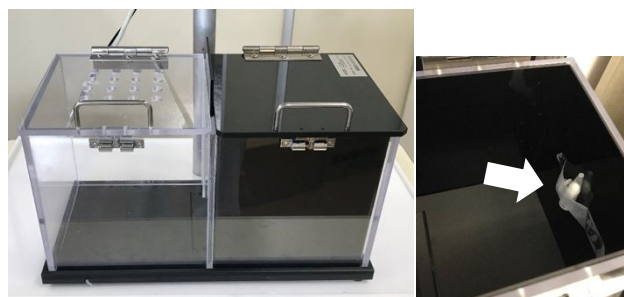


図1 嗅覚忌避行動観察装置

#### (2) 嗅覚刺激

におい刺激の有無でマウスを2群に分け、メチマゾール投与後、新生嗅細胞が成熟し始めるとされる障害後7日から、先に挙げた4種の匂いでのにおい刺激を14日間実施、酪酸に対する忌避行動を確認したが、開始7日後、14日後で2群の嗅覚忌避行動に有意差は認めなかった。

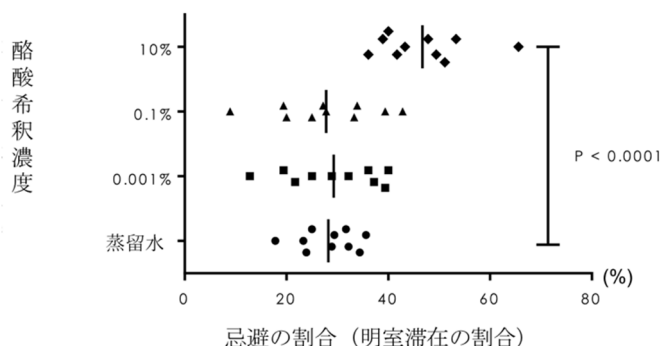


図2 嗅覚忌避行動観察装置濃度設定

#### (3) 皮下脂肪由来幹細胞経鼻移植

次いで、嗅覚刺激療法の効果を高める治療法の研究として、再生医療に着目し、皮下脂肪由来幹細胞の経鼻移植研究を開始した。

嗅上皮傷害モデル動物での脂肪由来幹細胞の経静脈投与による嗅上皮再生促進が報告されてきたが、経静脈投与では肺塞栓のリスクがあり臨床応用は困難であった。この問題を解決するため、嗅上皮傷害マウスにGFPマウス皮下脂肪由来幹細胞の経鼻移植を行った。

#### 脂肪由来幹細胞移植14日後の変化

経鼻投与14日後に脂肪由来幹細胞移植群で嗅覚忌避行動回復促進効果を認めた。同時点での免疫化学染色では、脂肪由来幹細胞移植群で嗅上皮の成熟嗅細胞の増加を明らかとした。また、鼻腔内にGFP陽性細胞は認めず、経鼻投与した脂肪由来幹細胞は14日以内に消失していると考えられた。

脂肪由来幹細胞移植 2 4 時間後の変化  
経鼻投与 2 4 時間後、脂肪由来幹細胞移植群で嗅粘膜上皮の再生に必要とされる球状基底細胞が増加しており、GFP 発現細胞は主に剥離した上皮に付着していた。

ELISA 解析  
脂肪由来幹細胞からは多数の神経栄養因子が細胞外に分泌されることが明らかとなっている。今回実験に使用した脂肪由来幹細胞の細胞調整液上清を ELISA で解析したところ、嗅覚機能に重要とされる神経成長因子の濃度が、コントロールと比較して増加していることが明らかとなった。

<参考文献>

Hummel T, et al.: Effects of olfactory training in patients with olfactory loss. Laryngoscope. 2009 Mar;119(3):496-9.  
Franceschini V, et al.: Transplanted human adipose tissue-derived stem cells engraft and induce regeneration in mice olfactory neuroepithelium in response to dichlobenil subadministration. Chem Senses. 2014 Sep;39(7):617-29.  
Choi R, Goldstein BJ: Olfactory epithelium: Cells, clinical disorders, and insights from an adult stem cell niche. Laryngoscope Investig Otolaryngol. 2018 Feb 6;3(1):35-42.  
素輪：末梢神経損傷に対する脂肪由来幹細胞移植治療の可能性 創傷 5(4):158-165, 2014  
Miwa T, et al.: Role of nerve growth factor in the olfactory system. Microsc Res Tech. 2002 Aug 1;58(3):197-203.

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 1件）

1. 発表者名 石倉 友子
2. 発表標題 嗅上皮傷害マウスにおける 脂肪幹細胞経鼻自家移植の検討
3. 学会等名 第38回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石倉 友子
2. 発表標題 脂肪幹細胞経鼻自家移植による 嗅覚再生医療の基盤研究
3. 学会等名 金沢医科大学医学会 第56回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoko Ishikura
2. 発表標題 TREATMENT WITH NASALLY ADMINISTERED ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS FROM GFP TRANSGENIC MICE IN OLFACTORY IMPAIRED MICE
3. 学会等名 The 20th Asian Research Symposium in Rhinology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石倉 友子
2. 発表標題 脂肪幹細胞経鼻移植の前臨床試験
3. 学会等名 第59回日本鼻科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020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
---------	---------