

機関番号：24601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20610004

研究課題名（和文）嗅覚系における神経幹細胞の嗅細胞への分化と個性獲得の分子機構

研究課題名（英文）Generation, differentiation and integration of neural stem cells into neural circuits in the adult olfactory system

研究代表者

坪井 昭夫 (TSUBOI AKIO)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20163868

研究成果の概要（和文）：嗅細胞は生涯を通して再生されるという神経細胞の中でもユニークな性質を持っており、多様で高感度な匂い感覚がどのようにして生じるのかを研究することは極めて重要である。本研究では先ず、マウスの嗅粘膜を分散した細胞から、ニューロスフェア（嗅神経幹細胞を含む）を形成させ、分化誘導した結果、TuJ1抗体とGFAP抗体で染色される細胞が得られたので、少なくともニューロンとアストロサイトに分化する能力があると考えられる。また嗅細胞と同様に、嗅球の介在ニューロンは、胎生期のみならず成体時においても、常に神経新生や新たな神経回路が生じるというユニークな特徴を持っている。そこで次に、片鼻を閉じた新生仔マウスに関して、レンチウイルスを用いてGFPで標識された嗅球介在ニューロンの形態を調べた結果、鼻を閉じた側のニューロンでは、鼻を開いた側に比べて樹状突起の伸展が未発達であり、シナプス密度も減少していることが判明した。

研究成果の概要（英文）：Olfactory sensory neurons are generated from neural stem cells (NSCs) throughout life. Neurosphere assays are standard studying these NSCs in normal tissues. To isolate NSCs from the mouse olfactory epithelium, we made neurospheres from the olfactory mucosa by a serum-free culture system. Then, we succeeded to differentiate those to olfactory neurons and astrocytes in media, not supplemented with mitogens such as EGF and FGF. Further, olfactory bulb (OB) interneurons are also generated from NSCs throughout the life. Next, by using the lentiviral system, we have analyzed the sensory input-dependent development of OB interneurons. We injected the lentivirus (*CMV promoter-gapEYFP* gene) into the SVZ at neonatal stage, followed by naris occlusion. We found that the odorant-induced activity is necessary for the dendrite elongation and dendrite arborization of OB interneurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：幹細胞医・生物学

キーワード：嗅覚神経系

1. 研究開始当初の背景

嗅細胞は生涯を通して再生されるという神経細胞の中でもユニークな性質を持っており、多様で高感度な匂い感覚がどのようにして生じ、再生されるのかを研究することは極めて重要である。本研究では、嗅神経幹細胞が如何にして嗅細胞へ分化し、その個性を獲得するのかを理解するため、マウスの嗅粘膜を分散した細胞から、ニューロスフェア（嗅神経幹細胞を含む）を形成させ、これらの細胞から嗅細胞に分化誘導させる *in vitro* 系の確立を目指した。また本研究では、嗅細胞と同様に、生涯を通して再生される嗅球介在ニューロンについても解析した。

2. 研究の目的

(1) 嗅粘膜由来のニューロスフェアから嗅細胞を分化誘導する系の確立

我々は風邪、軽度な頭部打撲や老化などの原因で嗅覚障害になると、ガス漏れや焦げ臭などの異臭を感知できなくなり、事故に繋がる可能性がある。そこで、嗅覚障害の再生治療の基盤を作るために、マウスの嗅粘膜を分散した細胞群から、それぞれニューロスフェア（嗅神経幹細胞を含む）を形成させ、更にこれらの細胞群を分散した後、嗅細胞に分化誘導する *in vitro* 系を確立することを目指した。

(2) 快・不快な匂い環境下における新生ニューロンの解析

嗅細胞や嗅球の介在ニューロン（顆粒細胞・傍糸球細胞）は、胎生期のみならず成体時においても、常に、神経新生や新たな神経回路が生じているというユニークな特徴を持っている（図1）。また生後、脳内の神経回路は、外界からの刺激に反応して適切な回路に修正されること（可塑性）が知られてい

る。更に、正常のマウスにおいては、ケージ内に遊具等を多く入れた刺激 enriched な環境で、海馬における神経新生が増加し、またアルツハイマーやパーキンソン病のモデルマウスにおいては、その症状の進行が遅延することが知られている。このように、環境からの刺激が、正常時及び病態時の脳において重要なことが解る。そこで本研究では、嗅覚系をモデルとして、快・不快な匂いの環境下における脳における新生ニューロンの動態を解析した。嗅覚系においては、特定の匂い分子は特定の神経細胞のみを活性化するので、刺激とそれに反応する神経細胞の対応が明確であり、従来の刺激 enriched な環境での実験に比べて、より精密な実験を行うことが可能である(図1)。

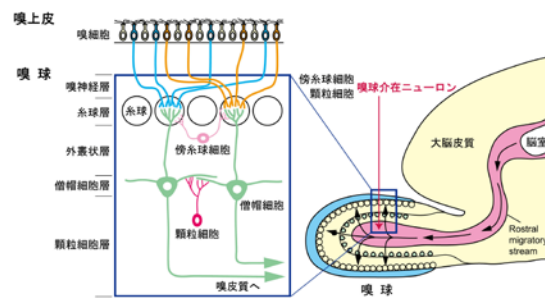


図1 マウス嗅覚系における一次神経回路（嗅球介在ニューロンの新生過程）

3. 研究の方法

(1) 嗅粘膜由来のニューロスフェアから嗅細胞を分化誘導する系の確立

ニューロスフェア法を簡単に述べると、嗅粘膜をディスペーゼ処理した後、嗅上皮と固有層に分離し、コラゲナーゼ処理して分散させた細胞群をそれぞれ、ホルモンや分裂促進因子を含む無血清培地で培養する。約2週間培養するとニューロスフェアが形成されるので、これらの細胞群を分散した後、上記無血清培地から分裂促進因子を除いて培養すると分化が誘導される。

(2) 快・不快な匂い環境下における新生ニューロンの解析

本研究では、匂い刺激による神経活動を遮断する目的で、マウス新生仔の片側鼻孔を閉塞し、3週間飼育した後に、嗅球介在ニューロンの発達を形態学的に解析した。また、新生された嗅球介在ニューロンの発達を可視化するために、*GFP* 遺伝子を搭載したレンチウイルスを新生仔の側脳室に注入して、片側鼻孔を閉塞した後、3週間飼育した。この実験において、樹状突起の伸展や枝分かれなど嗅球介在ニューロンの形態に対する影響を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 嗅粘膜由来のニューロスフェアから嗅細胞を分化誘導する系の確立

これまで、固有層由来のニューロスフェアを用いて分化誘導を行った結果、TuJ1 (class III β -tubulin) 抗体と GFAP (glial fibrillary acidic protein) 抗体で染色される細胞が得られたので、少なくともニューロンとアストロサイトに分化する能力があると考えられる。今後は、マウスの嗅粘膜由来のニューロスフェア (嗅神経幹細胞を含む) を、再生途上の野生型マウスの嗅上皮に移植することにより、嗅細胞へ分化するかどうかを検討する。

(2) 快・不快な匂い環境下における新生ニューロンの解析

匂い刺激による神経活動を遮断するため、マウス新生仔の片側鼻孔を閉塞し、3週間そのまま飼育した。そのマウスの嗅覚器を観察したところ、鼻孔を閉塞した側の嗅球が顕著に縮退していることが判った (図2)。この原因を知るため、鼻孔閉塞マウスの嗅球切片を作製し、チロシン水酸化酵素の抗体を用い

て免疫染色した。その結果、鼻孔閉塞による嗅球の縮退は、傍糸球細胞などの介在ニューロンの減少に因ることが判明した。

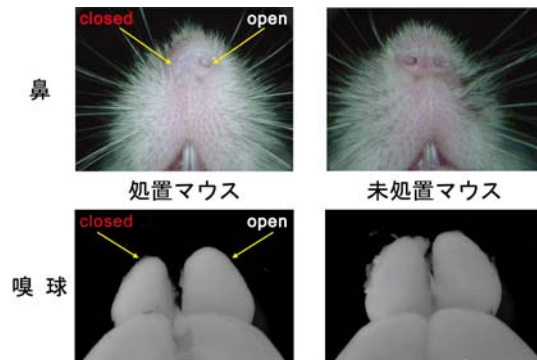


図2 鼻孔閉塞 (神経活動の遮断) による嗅球の縮退

そこで次に、鼻孔閉塞した側の嗅球において、*GFP* 遺伝子を搭載したレンチウイルスをマウス脳室に注入して、3週間後に *GFP* を指標として新生された介在ニューロンの動態を観察した (図3)。その結果、鼻孔閉塞した側の嗅球において、顆粒細胞や傍糸球細胞の数が減少しており、それら細胞の樹状突起の長さやスパイン数などの質的な低下も認められた (図4)。

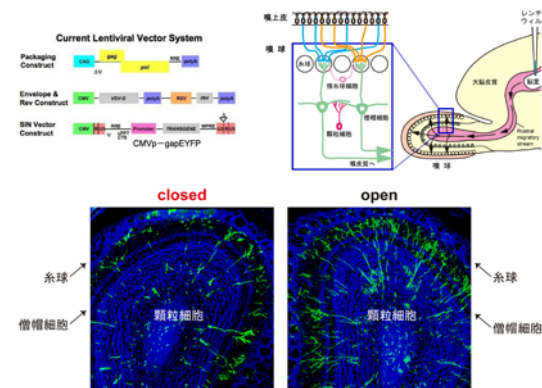


図3 脳室へレンチウイルスを導入した後、鼻孔閉塞すると閉塞側の嗅球において介在ニューロンの数が減少する

本研究により、鼻孔閉塞による嗅球の縮退 (介在ニューロンの減少) は、嗅細胞の神経活動の低下に起因することが示された。これは、嗅球介在ニューロンの産生や、既存の嗅神経回路への新たな介在ニューロンの付加が神経活動依存的であることを示唆している。今後の研究により、匂い刺激による神経

活動依存的な嗅球介在ニューロンの動態が明らかにされるのみならず、病態脳における新たな神経細胞の産生による再生医療など臨床医学的な応用にも繋がると期待される。

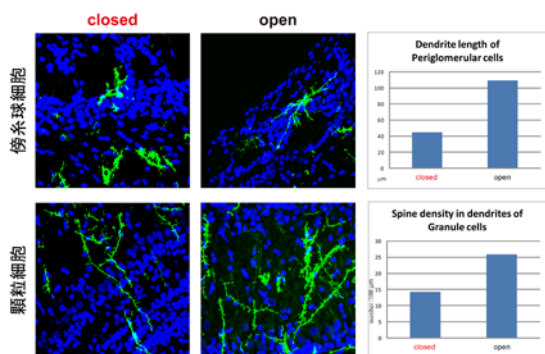


図4 脳室へレンチウイルスを導入した後、鼻孔閉塞すると閉塞側の嗅球において介在ニューロンの質が低下する

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6件)

(欧文論文、査読有)

- ① **Tsuboi A**, Imai T, Kato H, Matsumoto H, Igarashi K, Suzuki M, Mori K and Sakano H: Two highly homologous mouse odorant receptors encoded by tandemly linked *MOR29A* and *MOR29B* genes differently respond to phenyl ethers. **European Journal of Neuroscience** **33**: 205-213 (2011).
- ② Takeuchi H, Inokuchi K, Aoki M, Suto F, **Tsuboi A**, Matsuda I, Suzuki M, Aiba A, Serizawa S, Yoshihara Y, Fujisawa H and Sakano H: Sequential arrival and graded secretion of Sema3F by olfactory neuron axons specify map topography at the bulb. **Cell** **141**: 1056-1067 (2010).
- ③ **Takahashi H**, **Yoshihara S**, Nishizumi H and **Tsuboi A**: Neuropilin-2 is required for the proper targeting of ventral glomeruli in the mouse olfactory bulb. **Molecular and Cellular Neuroscience** **44**: 233-245 (2010).

- ④ Horii-Hayashi N, Tatsumi K, Matsusue Y, Okuda H, Okuda A, Hayashi M, Yano H, **Tsuboi A**, Nishi M, Yoshikawa M and Wanaka A.: Chondroitin sulfate demarcates astrocytic territories in the mammalian cerebral cortex. **Neuroscience Letters** **483**: 67-72 (2010).

(和文総説)

- ⑤ 高橋弘雄、**坪井昭夫**：脳における匂い感覚地図の形成メカニズム
Foods & Food Ingredients Journal of Japan 第216巻 第2号 pp.100-106 (2011).
- ⑥ 高橋弘雄、吉原誠一、**坪井昭夫**：脳における匂い感覚地図の形成メカニズム
AROMA RESEARCH 第11巻 第3号 pp.224-229 (2010).

[学会発表] (計18件)

(国際学会・一般講演)

- ① **Yoshihara S**, Nishimura N, **Takahashi H**, Mori K and **Tsuboi A**: The dendrite arborization of olfactory bulb interneurons in an odor-evoked activity-dependent process. **Keystone Symposia: Adult Neurogenesis**, Taos, New Mexico, USA (2011).
- ② **Yoshihara S**, Nishimura N, **Takahashi H**, Mori K and **Tsuboi A**: The dendrite arborization of olfactory bulb interneurons in an odor-evoked activity-dependent process. The 8th International Symposium on "Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception" Kyushu University Station-I and II Collaborative Research, Fukuoka, Japan (2010).
- ③ **Tsuboi A**, **Takahashi H**, Mori K and **Yoshihara S**: Activity-dependent development of olfactory bulb interneurons

upon the neural circuit formation.

EMBO/EMBL Symposium: Structure and Function of Neural Circuits, EMBL, Heidelberg, Germany (2010).

- ④ **Tsuboi A, Takahashi H, Mori K and Yoshihara S:** Activity-dependent development of olfactory bulb interneurons upon the neural circuit formation. **Janelia Conference:** Form and function of the olfactory system, HHMI, Ashburn, USA (2010).
- ⑤ **Yoshihara S, Takahashi H, Mori K and Tsuboi A:** Activity-dependent development of olfactory bulb interneurons upon the neural circuit formation. **Cold Spring Harbor Asia Conference:** 1st Francis Crick Neuroscience Symposium, Suzhou Dushu Lake Conference Center, China (2010).
- ⑥ **Tsuboi A, Takahashi H, Sawamura M and Yoshihara S:** Molecular mechanism underlying the odor map formation in the mouse olfactory bulb. **Keystone Symposia:** Chemical Senses, Lake Tahoe, USA (2009).
- ⑦ **Yoshihara S, Takahashi H, Sawamura M and Tsuboi A:** Developmental analysis of olfactory bulb interneurons upon neural circuit formation with the lentiviral system **Keystone Symposia:** Chemical Senses, Lake Tahoe, USA (2009).
- ⑧ **Takahashi H, Yoshihara S, Sawamura M and Tsuboi A:** Molecular mechanisms underlying formation of the odor map in the mouse brain. **Keystone Symposia:** Axonal connections, Keystone Resort, USA (2009).
- ⑨ **Takahashi H, Yoshihara S and Tsuboi A:** Molecular mechanisms underlying formation of the odor map in the mouse brain. The 15th International Symposium on Olfaction and

Taste, San Francisco, USA (2008).

(国内学会・シンポジウム)

- ⑩ **Tsuboi A, Takahashi H and Yoshihara S:** Molecular mechanisms underlying formation of the odor map in the mouse brain. *In:* Symposium “Generation, maintenance and plasticity of neural circuits in the olfactory system”. **Neuroscience 2008**, Tokyo International Forum (2008).

(国内学会・一般講演)

- ⑪ 吉原誠一、西村信城、高橋弘雄、森憲作、坪井昭夫 : The dendrite arborization of olfactory bulb interneurons in an odor-evoked activity-dependent process. 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド (2010).
- ⑫ 吉原誠一、西村信城、高橋弘雄、森憲作、坪井昭夫 : **Activity-dependent development of olfactory bulb interneurons upon the neural circuit formation.** 第 33 回日本神経科学学会大会、神戸国際会議場 (2010).
- ⑬ 吉原誠一、西村信城、高橋弘雄、森憲作、坪井昭夫 : 神経活動依存的な嗅球介在ニューロンの発達機構の解明 第 57 回日本生化学会近畿支部例会、奈良先端科学技術大学院大学ミレニアムホール (2010).
- ⑭ **Yoshihara S, Takahashi H, Saito M, Yoshihara Y and Tsuboi A:** Activity-dependent development of olfactory bulb interneurons upon neural circuit formation. 第 43 回日本味と匂学会大会、旭川市民会館 (2009).
- ⑮ 吉原誠一、高橋弘雄、坪井昭夫 : 嗅球介在神経細胞の神経活動依存的な発達機構の解析 第 32 回日本神経科学学会大会、名

古屋国際会議場 (2009).

- ⑩ 高橋弘雄、吉原誠一、澤村正典、坪井昭夫：マウス匂い地図形成の分子機構の解析 第31回日本分子生物学会年会、神戸国際会議場 (2008).
- ⑪ 吉原誠一、高橋弘雄、坪井昭夫：エレクトロポレーションおよびレンチウイルスベクターを用いたマウス嗅覚神経回路形成機構の解析 第31回日本神経科学学会大会、東京国際フォーラム (2008).
- ⑫ 高橋弘雄、吉原誠一、坪井昭夫：マウス匂い地図形成の分子機構の解析 第31回日本神経科学学会大会、東京国際フォーラム (2008).

[図書] (計1件)

- ① **Tsuboi A** and Sakano H: Regulation of expression of odorant receptor genes. **THE SENSES: A COMPREHENSIVE REFERENCE** (*editors, Basbaum, A.I. et al.*) Vol. 4 (Olfaction & Taste) pp.545-552, **Academic Press** (2008).

[その他]

(新聞報道) (計3件)

- ① 坪井昭夫
嗅覚障害の再生治療法に道 — 遺伝子「ニューロピリン2」 — 医科大教授ら仕組み解明
毎日新聞 (奈良版) 平成22年4月11日
- ② 坪井昭夫
においを脳までナビ — 分子の働きを解明 — 県医大・坪井教授の研究室
奈良新聞 平成22年4月6日
- ③ 坪井昭夫
医療最前線 — 嗅覚の仕組みと疾患 —
毎日新聞 (奈良版) 平成20年1月29日

(ホームページ)

<http://www.naramed-u.ac.jp/~amrc-lab1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪井 昭夫 (TSUBOI AKIO)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：20163868

(2) 研究分担者

吉原 誠一 (YOSHIHARA SEIICHI)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：90360669
高橋 弘雄 (TAKAHASHI HIROO)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：20390685