

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791603

研究課題名（和文） 骨髄細胞を用いた嗅覚神経細胞の再生に関する研究

研究課題名（英文） Regeneration study of olfactory epithelium and olfactory bulb using bone marrow cells

研究代表者

吉延 潤子 (YOSHINOBU JUNKO)

岡山大学・医学部・技術専門職員

研究者番号：80448224

研究成果の概要（和文）：本研究では、鼻科領域における再生治療の確立を目指し、骨髄細胞を用いた嗅覚組織再生の促進について検討した。その結果、嗅球組織再生時においてバルプロ酸（抗てんかん薬）は転写活性化を促し、神経細胞産生能力を回復させる可能性を有することが示唆された。またサイトカイン投与は長期的な嗅覚障害に対して有効であることが示唆されたが、骨髄細胞の神経細胞への分化誘導については新たな因子の検討が必要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted to promote regeneration of olfactory organ with the aim to establish the regenerative therapy in rhinology, using bone marrow cells. As a result, valproic acid (antiepileptic drug) promoted transcriptional activation in regeneration of olfactory bulb, and it was suggested that valproic acid had possibility to recover neuronal cell-producing capacity. Also, the use of cytokine is effective for long-term olfaction disorder. However, it was suggested about the differentiation instruction to the neuronal cells of the bone marrow cells that the examination of a new factor was necessary.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：再生医学、細胞・組織、シグナル伝達、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

近年、幹細胞を用いた再生研究は目覚ましく進展しており、特に安全面(免疫拒絶反応、腫瘍化等)・倫理面の問題から、骨髄(幹)細胞を用いた再生治療が最も実用化に近いと考えられている。骨髄幹細胞による治療は、先進医療として既に実用化(血管再生)され

ているもの、臨床試験として実施(脊髄損傷、肝硬変など)されているもの等、今後より多くの疾患に普及すると考えられる。

鼻科領域では、嗅覚神経細胞の重度な損傷による鼻粘膜性嗅覚障害や中枢性嗅覚障害といった治療の困難な疾患がある。このような疾患においては、ガス臭や腐敗臭といった

身体への危険信号を感知できず、日常生活に支障をきたし、患者の QOL(生活の質)は著しく低下する。その為、新たな治療法の開発が望まれているが、治療法はまだ確立されていないのが現状である。

代表者らは、これまでに嗅覚組織における骨髄細胞の分化能について検討したところ、骨髄細胞は嗅覚組織細胞への分化能を有することを報告している(Brain Res, 1052 (2005)10-15)。続いて、嗅覚障害やサイトカイン投与による骨髄細胞の嗅覚組織への生着率について検討したところ、骨髄細胞が積極的に生着していることも報告している(Rhinology, 2010 Jun;48(2):228-32)。このように、外的因子によって骨髄細胞の嗅覚組織への生着率増加が判明し、骨髄(幹)細胞を用いた再生治療の可能性を見出している。

また代表者らは、これまでに嗅上皮発生時、再生時におけるノッチシグナルの関与について検討したところ、分化が進むにつれてノッチシグナルは抑制されていくことを報告しており(Acta Oto-Laryngologica, 126 (2006)498-502, Jpn. J. Rhinol, 44(2005)114-118)、再生時に関与するシグナル等を人為的に制御することによって、骨髄細胞の嗅覚神経細胞への分化促進を積極的に行える可能性が見出されている。

以上の研究結果より、サイトカインで積極的に骨髄細胞を嗅覚組織に生着させ、シグナル制御剤等で嗅覚神経細胞への分化を促進させることができれば、嗅覚組織の再生がより実現可能になることが期待される。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では骨髄細胞を用いた嗅覚組織再生の促進を行い、鼻科領域における再生治療の確立を目指す。そこで、嗅覚組織の中でも再生が困難である嗅球の神経細胞の産生促進に重点を置き、下記の3点を目的として研究を行った。

(1)発生時、嗅覚障害時におけるノッチシグナル等の動向と骨髄細胞の関与について検討する。

①発生時におけるノッチシグナル等の動向を検討するために、胎生期から成熟期にか

けての嗅覚組織において各種抗体を用いた免疫染色を行い、組織学的観察を行う。

②嗅覚障害時におけるノッチシグナル等の動向及び骨髄細胞の関与について検討するために、GFP (Green Fluorescence Protein) マウス骨髄細胞移植動物を用いた嗅覚障害モデルマウスの嗅覚組織において、各種抗体を用いた免疫染色を行い、組織学的観察を行う。

(2)サイトカインの効果時期について検討する。

これまでに、サイトカイン投与による骨髄動員効果はサイトカイン投与から2カ月後において有効性を持つことが確認されている。しかしながら、嗅覚障害には短期的なものから長期的に及ぶものまであり、サイトカインのより早期での効果を検討するため、GFP マウス骨髄細胞移植動物を用いた嗅覚障害モデルマウスを作製し、サイトカイン投与から1カ月後にマウス頭部組織を摘出する。続いて抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行い、GFP 陽性細胞についてサイトカイン未投与群と比較する。

(3)薬剤を用いた嗅覚組織における神経細胞の産生促進、及び骨髄細胞の神経細胞への分化誘導について検討する。

(1)の結果から嗅球組織再生時においてはノッチ・ウィントシグナルの関与は示唆されなかった為、近年、中枢神経の再生において神経細胞の産生促進が報告されているヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(バルプロ酸)に着目した。そこで、バルプロ酸、サイトカインを用いた嗅覚組織再生時における神経細胞の産生促進、及び骨髄細胞の神経細胞への分化誘導について検討するため、GFP マウス骨髄細胞移植動物を用いた嗅覚障害モデルマウスを作製し、各薬剤の投与後、マウス頭部組織を摘出する。続いて各種抗体を用いた免疫染色を行い、組織学的観察を行う。

3. 研究の方法

(1)発生時、嗅覚障害時におけるノッチシグナル等の動向と骨髄細胞の関与についての解析。

①：発生時におけるシグナル動向解析

胎生期から成熟期にかけての野生型マウス嗅覚組織切片を用いて、ノッチシグナル関連抗体(act-N1 等)、ウイントシグナル関連抗体(β -catenin 等)を用いた免疫組織化学的染色を行った。

②：嗅覚障害時におけるシグナル動向解析

GFP マウス骨髄細胞移植動物を用いた嗅覚障害モデルマウスの嗅覚組織切片を用いて、ノッチシグナル関連抗体(act-N1 等)、ウイントシグナル関連抗体(β -catenin 等)を用いた免疫組織化学的染色を行った。

(2) サイトカインの効果時期に関する解析。

①：骨髄移植と嗅覚障害モデルマウスの作製

GFP マウスをエーテル麻酔し、四肢より骨髄細胞を培地(RPMI)に採取した。GFP 骨髄細胞が 1×10^7 個/200 μ l匹となるように培地(HBSS)で調整し、X線照射(10Gy)した野生型マウス(C57BL/6)の尾静脈に移植した。嗅覚障害は、生理食塩水で調整したメチマゾール(50mg/kg)を腹腔内投与した。

②：サイトカイン投与及び未投与群における骨髄細胞の取り込み率に関する解析

①のメチマゾール投与から2日後、6日後にサイトカイン(G-CSF:1mg/kg+SCF:250 μ g/kg)及び溶媒のみ(未投与群)を投与(皮下投与)し、1ヶ月後にマウス頭部組織を摘出した。定法にてマウス嗅覚組織切片を作製し、抗GFP抗体を用いた免疫染色を行った。嗅球組織内でのGFP陽性細胞を算出し、サイトカイン投与群、サイトカイン未投与群において統計ソフトを用いた解析を行った。

(3) 薬剤を用いた嗅覚組織における神経細胞の産生促進、及び骨髄細胞の神経細胞への分化誘導に関する解析。

GFP マウス由来骨髄細胞移植を行った後、メチマゾール投与による嗅覚障害モデルマウスを作製し、バルプロ酸(100mg/kg, 腹腔内投与)投与群, バルプロ酸+サイトカイン(G-CSF+SCF)投与群, バルプロ酸・サイトカイン未投与(溶媒のみ)群に分け、各薬剤を投与した。バルプロ酸はメチマゾール投与から1日後に投与し、サイトカインは(2)と同様の

条件で投与した。

サイトカイン投与から2ヶ月後にマウス頭部組織を摘出し、定法にてマウス嗅覚組織切片を作製し、各種抗体(acetylated-HH4 (アセチル化ヒストン H4:ニューロン分化促進), HMGA1・2(DNA結合タンパク:ニューロン産生)等)を用いた免疫染色による組織学的観察を行った。また、各群において各種抗体(GFP+TBX21(投射細胞:僧帽細胞, 房飾細胞), GFP+Iba1(ミクログリア)等)を用いた蛍光二重免疫染色も行った。

4. 研究成果

(1) 発生時、嗅覚障害時におけるノッチシグナル等の動向と骨髄細胞の関与についての解析。

発生時での嗅球は、分化が進むにつれてact-N1陽性細胞(細胞分化の抑制を示す)は観察されなくなり、TBX21陽性細胞の局在と対照的な局在が観察された(図1)。また、 β -catenin陽性細胞(核内発現細胞は細胞分化の促進を示す)は、TBX21陽性細胞と類似した局在が観察された(図2)。

障害時での嗅球は、メチマゾール投与から30日後には嗅細胞の細胞死による軸索変性のため糸球体層の萎縮が観察され、それに伴い糸球体層付近のTBX21陽性細胞の減少が観察された(図3)。また、障害時におけるact-N1陽性細胞は観察されず、 β -catenin陽性細胞については障害の経時的変化に伴う変化は観察されなかった。

この結果から、嗅球組織再生時においてノッチ・ウイントシグナルの関与の可能性は非常に低いことが示唆された。

図1：免疫染色(胎生期13日目)

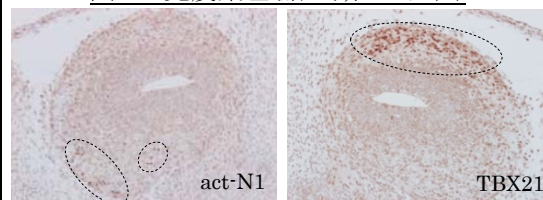


図2：免疫染色(胎生期18日目)

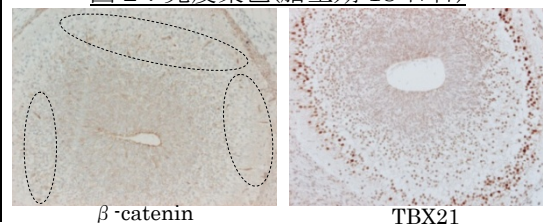
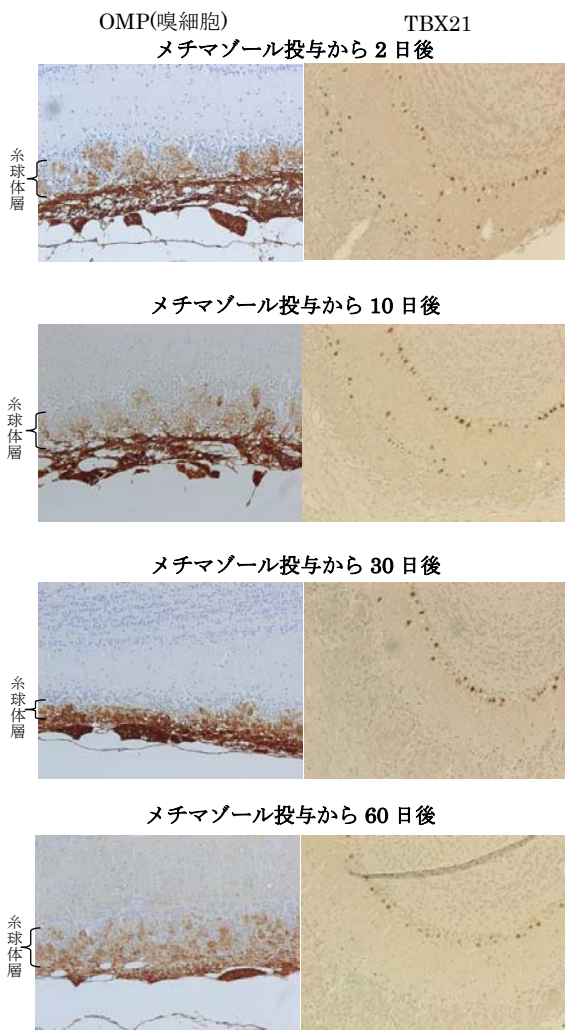


図 3 : 免疫染色(障害時)



(2) サイトカインの効果時期に関する解析。

サイトカイン投与から 1 カ月後では、サイトカイン投与群と未投与群との間で骨髄細胞の取り込み率に有意差は認められなかった。

この結果から、嗅覚組織においてサイトカインは長期的な骨髄動員効果を示すことから、長期に及ぶ嗅覚障害に対して有効であることが示唆された。

(3) 薬剤を用いた嗅覚組織における神経細胞の産生促進、及び骨髄細胞の神経細胞への分化誘導に関する解析。

バルプロ酸投与によって、嗅球においてはアセチル化された細胞の増加が観察されたのに対し、嗅上皮においてはアセチル化された細胞の減少が観察された(図 4)。

また、バルプロ酸投与によって、嗅球においては HMGA1 の発現増加が観察され、HMGA1

が核内発現している細胞も観察された(図 5)。さらに蛍光二重免疫染色によって、強発現している HMGA1 陽性細胞は、TBX21 とのダブルポジティブが確認された(図 6)。

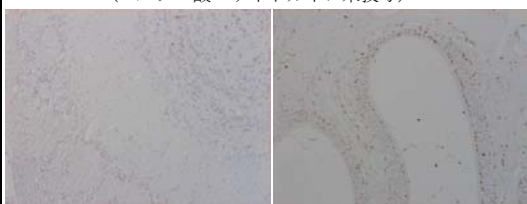
一方、嗅上皮においては、バルプロ酸投与によって、HMGA2 の発現減少が観察された(図 7)。

バルプロ酸投与群、バルプロ酸+サイトカイン投与群での嗅球組織における蛍光二重免疫染色(GFP+TBX21, Iba1)では、何れの群についても GFP 陽性細胞の殆どが Iba1 陽性細胞であった。

これらの結果から、嗅球組織再生時においてバルプロ酸投与は神経細胞の転写活性化を促し、神経細胞産生能力を回復させる可能性を有することが示唆された。また、バルプロ酸投与は骨髄細胞の神経細胞への分化誘導には直接的作用を有していないことが示唆された。

図 4 : 免疫染色(acetylated-HH4)

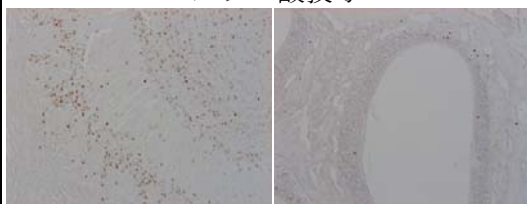
メチマゾールのみ投与
(バルプロ酸・サイトカイン未投与)



OB(嗅球)

OE(嗅上皮)

バルプロ酸投与

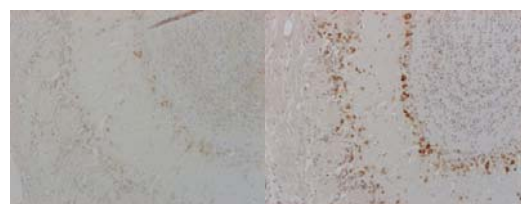


OB(嗅球)

OE(嗅上皮)

図 5 : 免疫染色(HMGA1)

メチマゾールのみ投与 バルプロ酸投与
(バルプロ酸・サイトカイン未投与)



OB(嗅球)

OB(嗅球)

図 6 : 蛍光二重免疫染色(HMGA1+TBX21)

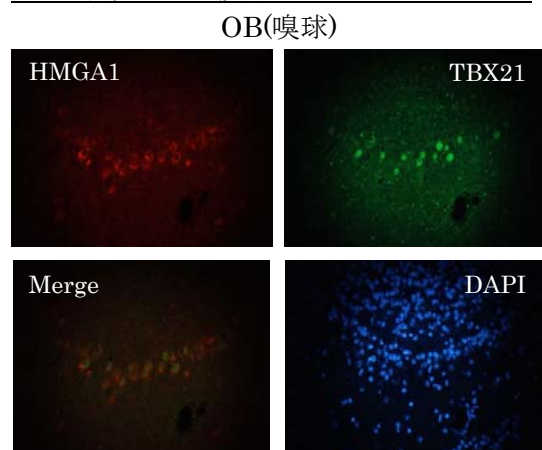
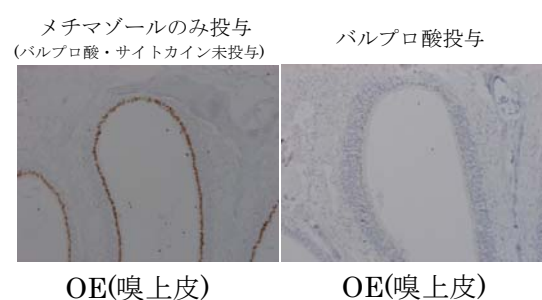


図 7 : 免疫染色(HMGA2)



以上の成果より、嗅覚組織再生を目指した神経細胞の産生促進において、バルプロ酸の利用は有効であることが示唆された。しかしながら、嗅球と嗅上皮では相反する作用が働いている可能性があり、さらなる検討が必要であると考えられた。また骨髄細胞の神経細胞への分化誘導を促す因子についても新たな検討の必要性が示唆された。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉延 潤子 (YOSHINOBU JUNKO)
岡山大学・医学部・技術専門職員
研究者番号：80448224