

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462579

研究課題名(和文) 嗅神経切断後のTNF- 阻害薬による嗅神経の機能的再生促進法の確立

研究課題名(英文) Tumor necrosis factor-alpha antagonist suppresses local inflammatory reaction and facilitates olfactory nerve recovery following injury

研究代表者

宮村 朋孝 (Miyamura, Tomotaka)

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：20581838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに外傷性嗅覚障害モデルマウスを用いて、嗅神経切断後の神経再生が局所炎症の程度に依存することと、炎症急性期にステロイド薬やIL-6受容体抗体を用いた抗炎症治療を施行すれば、嗅覚回復が良好になることが報告されている。Tumor necrosis factor- (TNF-) は炎症に関与するサイトカインであり、今回はマウスの嗅神経切断後にTNF- 阻害薬であるエタネルセプトが嗅覚回復に寄与するかを調べた。その結果、エタネルセプト投与により嗅神経再生が有意に促進され、嗅覚機能も有意に回復した。よって、TNF- 阻害薬も外傷性嗅覚障害の治療薬として有用である可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated if TNF-alpha antagonist, etanercept is useful for functional recovery in the olfactory system following injury. We made a model of severe injury by performing olfactory nerve transection using a rigid stainless steel blade in transgenic (OMP-tau-lacZ) mice. Etanercept was injected intraperitoneally just after the nerve transection. Histological assessment of recovery within the olfactory bulb was made at 5, 14, 42 and 70 days after injury. X-gal staining was used to label the degenerating and regenerating olfactory nerve fibers and immunohistochemical staining to detect the presence of reactive astrocytes and macrophages. Etanercept-injected animals showed significant smaller areas of injury-associated tissue, less astrocytes and macrophages, and an increase in regenerating nerve fibers in a dose-dependent manner. These findings suggest that TNF-alpha antagonist can be useful as a therapeutic drug for olfactory dysfunction by head injury.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：嗅覚

1. 研究開始当初の背景

近年、嗅覚に関する基礎研究がめざましく進歩しており、この分野からはその研究成果により 2004 年には Axel 博士、Buck 博士というノーベル医学生理学賞受賞者を輩出しているほどである。この発展に伴い、耳鼻咽喉科領域においても嗅覚障害患者の数とこの診療に取り組む施設が年々増加しており、嗅覚障害に対する医療の重要性が高まっている。これまで嗅覚障害は予後が悪いというイメージを持たれてきたが、本来嗅神経は他の脳神経とは異なり、強い再生能力を備えていて、鼻副鼻腔炎が原因の炎症性嗅覚障害の改善率は 70~80% と実は高いことも報告されている (小林正佳・他: 日耳鼻 108: 986-995, 2005)。その一方で、嗅神経の物理的損傷が原因である外傷性嗅覚障害の予後は悪く、交通外傷が原因の嗅覚障害の改善率は 10~50% と低い (小林正佳: JOHNS 25: 1343-1349, 2009) (図 1)。

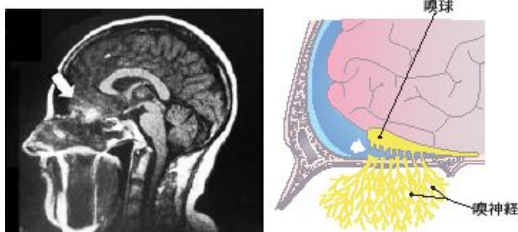


図1 頭部外傷後の嗅覚脱失例の脳MRI所見(左図・矢印が傷害箇所)と頭部外傷時の嗅神経切断のシエマ(右図)

外傷性嗅覚障害の予後改善を目的として、マウスなどの実験動物の嗅神経を切断して外傷性嗅覚障害モデルを作製し、その神経再生に注目した研究報告がある。その中でも、Kobayashi と Costanzo (Chem Senses 34: 573-580, 2009) は、嗅神経切断後の神経再生が局所傷害の重症度と炎症の強度に依存すること、またこの局所炎症に対して傷害急性期

にステロイド薬投与による消炎治療を施行すれば、マクロファージなどの炎症細胞浸潤とグリア瘢痕形成を抑制し、嗅神経再生が促進されることを明らかにしている。しかし、実際の臨床応用を想定した場合、現在救急医療の現場では、脊髄損傷例は別として、頭部外傷の管理、治療ガイドラインに、ステロイド薬の使用は推奨されておらず、むしろステロイド薬による感染や他の副作用を懸念する意見が多いので、ステロイド薬による外傷性嗅覚障害治療は困難と考えられる。

近年、ステロイド薬に代わる抗炎症物質として、TNF- 阻害薬が注目されている。TNF- 阻害薬は、マクロファージなどから産生、放出される炎症性サイトカインであるTNF- に結合して、その作用を阻害することにより炎症反応を抑制する。最近、TNF- 阻害薬であるエタネルセプト(エンブレル®)は関節リウマチや若年性特発性関節炎などの難治性炎症性疾患の治療薬として医療保険適用も認可されている。また、神経学的分野においては、マウスの脊髄切断後に傷害局所でさまざまな炎症性サイトカインのカスケード反応により生じる神経組織損傷を抑制し、脊髄再生が促進されたという報告がある (Esposito1 and Cuzzocrea. Trends Pharmacol Sci 32: 107-115, 2011)。

現時点でTNF- 阻害薬を用いた嗅神経系の再生を研究した報告はまったくない。しかし、上記の研究背景を考慮すると、外傷性嗅覚障害の治療にTNF- 阻害薬を応用すれば、局所炎症が抑制され、外傷例嗅覚障害例の嗅覚改善率と予後の向上が理論的に可能と期待できる。

2. 研究の目的

今回の研究は、外傷性嗅覚障害モデル動物を用いて、嗅神経切断後の嗅神経再生促進にTNF- 阻害薬が有効であるかどうかを明らかにする。具体的には、TNF- 阻害薬が、嗅神経切断後に生じる局所炎症を抑制して、再生

嗅神経が嗅球の糸球体を再支配するのを促進するかどうかを、コントロールと比較して組織学的に調べた。また、嗅球を再支配した嗅神経系が機能的回復を成しているかどうかについても、まず電気生理学的手法を用いて神経伝導の回復を確認し、さらに実験動物に対するにおいの嫌悪学習手段を用いた行動学的実験を行い、実際に嗅神経切断後に低下した嗅覚機能が、高い改善率で機能回復するかどうかを確認した。

3. 研究の方法

まず最初に、嗅神経再生の組織学的検討を施行した。

実験動物として、組織学的に嗅神経を容易に視覚的に確認可能な遺伝子組み換えマウスである OMP-tau-lacZ マウスを用いた。マウスにペントバルビタールを腹腔内注射して全身麻酔し、固定器で固定した。前頭開頭を行い、嗅球と篩板を露出させて、ステンレスカッターを一側の篩板と嗅球との間に挿入して嗅神経を切断した(図2)。対側はコントロールとして神経切断を行わずにおいておいた。止血後、閉頭し、動物を覚醒させた。

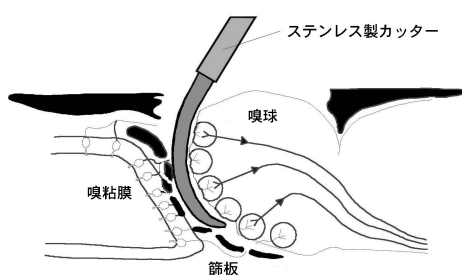


図2 嗅神経切断実験のシエーマ

手術直後に、TNF- 阻害薬であるエタネルセプトを腹腔内注射した。低用量、高用量の2種類の投与群とコントロールとして生食投与群の3群を設けた。

術後5日目、14日目、42日目、70日目に、それぞれマウスをパラホルムアルデヒドで還流固定し、頭部骨をEDTAで脱灰後、組織切片を作成し、各種染色を行い、CCDカメラでデジタル画像化し、嗅神経の再生、グリア瘢痕形成、炎症マーカーとしてマクロファージの局所浸潤などの程度を定量化して測定した。なお、嗅神経の確認にはX-Gal染色にて嗅神経と嗅球の糸球体を可視化した。グリア瘢痕と組織全体の確認にはニュートラルレッド染色を用いた。またグリア瘢痕内の活性化星状膠細胞の確認には抗GFAP抗体を用いた免疫染色を行った。マクロファージの確認にはマクロファージ特異的な抗CD68抗体で免疫染色を行い、確認した。

次に、行動学的実験による嗅覚検査で嗅覚機能の回復について検証を施行した。まず、マウスに0.1%ナラマイシン(シクロヘキサミド)水溶液を用いて味覚を利用したにおい条件付けの嫌悪学習を行った。嫌悪学習に成功したマウスに対して、嗅神経切断とその後のエタネルセプト投与を行い、経日的にナラマイシンに対する忌避行動の程度を確認し、嗅覚機能の回復の有無を確認した。

最後に、TNF- 阻害薬による嗅神経再生促進を電気生理学的に検証した。全身麻酔下で嗅神経切断手術とエタネルセプト投与をOMP-tau-lacZマウスに施行し、術後100日目に同様にマウスに麻酔し、固定器に固定し、再開頭した。鼻骨も一部削開し、鼻腔を露出させ、鼻腔の嗅粘膜に刺激電極を当て、嗅球内に記録電極を挿入し、神経の電場電位(Field potential)記録を行い、神経伝導の回復の有無を確認した。

4. 研究成果

TNF- 阻害薬は嗅神経切断後の局所でマクロファージの浸潤とグリア瘢痕形成を投与量

依存性に抑制した。そして、その抑制に比例して、嗅神経再生が促進されたのを組織学的に確認した。

行動学的実験では、生食投与のコントロール群は嗅覚機能回復が不十分であったのに対して、エタネルセプト投与群は有意に嗅覚機能の回復が認められた。

電気生理学的実験では、生食投与のコントロール群は神経伝導の回復が不十分であったのに対して、エタネルセプト投与群は有意に神経伝導の回復が認められた

以上から、TNF- 阻害により、嗅覚は神経の形態的再生だけではなく、機能的再生も促進されることを明らかにした。

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 2 件)

Mohammed Omar Al Salihi, Masayoshi Kobayashi, Kengo Tamari, Tomotaka Miyamura, Kazuhiko Takeuchi. Tumor necrosis factor- antagonist suppresses local inflammatory reaction and facilitates olfactory nerve recovery following injury. Auris Nasus Larynx 44: 70-78, 2017. (査読有り)

Mohammed Omar Al Salihi, 小林正佳、玉利健悟、宮村朋孝、竹内万彦. TNF- 阻害薬を用いた局所炎症制御による外傷性嗅覚障害後の嗅神経再生促進. 日本味と匂学会誌 21: 473-476, 2014. (査読有り)

[学会発表](計 3 件)

小林正佳. 神経性嗅覚障害の治療法開発. 第 118 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演

会(招待講演). 2017年5月18日. 広島市.

Mohammed Omar Al Salihi, Masayoshi Kobayashi, Kengo Tamari, Tomotaka Miyamura, Kazuhiko Takeuchi. Tumor necrosis factor- antagonist suppresses inflammatory reaction and facilitates olfactory nerve recovery following injury. 第33回ISIAN-第15回IRS-第4回PARS 2014合同学会. 2014年11月20日~11月24日アラブ首長国連邦ドバイ市.

Mohammed Omar Al Salihi, 小林正佳、玉利健悟、宮村朋孝、竹内万彦. TNF- 阻害薬を用いた局所炎症制御による外傷性嗅覚障害後の嗅神経再生促進. 日本味と匂学会第48回大会. 2014年10月3日~10月5日. 静岡市.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

宮村 朋孝 (MIYAMURA, Tomotaka)

三重大学・大学院医学系研究科・リサーチ
アソシエイト

研究者番号：20581838

(2)研究分担者

小林 正佳 (KOBAYASHI, Masayoshi)

三重大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80343218

玉利 健悟 (TAMARI, Kengo)

三重大学・教養教育機構・特任講師(教育
担当)

研究者番号：90585176

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()