

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670740

研究課題名(和文) iPS細胞による嗅覚障害の再生医療への基礎研究

研究課題名(英文) An fundamental researches to the regenerative of the smell disturbance with induced pluripotent stem cells

研究代表者

藤枝 重治 (FUJIEDA, SHIGEHARU)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：30238539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：現在、嗅覚障害の回復は難しく、この数十年ほとんど進んでおらず、それゆえ現代医療の重点項目に挙げられている。本研究は多能性幹細胞(ES細胞・iPS細胞)からニューロスフェアを効率よく作製し移植することで、嗅覚障害マウスの嗅覚を戻すことを目的として実験を行った。マウスの胚性幹細胞およびiPS細胞から、FGF2を含む無血清培地による浮遊培養法によって、1次ニューロスフェアへの形成、さらに分散継代し2次・3次ニューロスフェアへの誘導も成功した。しかし嗅覚障害モデルに3次ニューロスフェアを移植したが、残念ながら、嗅覚反応の改善は認められなかった。その理由は、移植細胞の数が少ないためであると思われる。

研究成果の概要(英文)：The recovery from smell disturbance is difficult at present. The study on the disorder has hardly advanced for the last several decades and the disease is referred to as an important issue of modern medicine. The purpose of this research was to make a neurosphere from an embryonic stem cell and induced pluripotent stem cells efficiently and to cure the sense of smell of a mouse with smell disturbance by transplanting it. We succeeded in the formation of a primary neurosphere through the floating culture method which was the serum-free medium including FGF2. Furthermore, we dispersed and subcultured it and succeeded in the inducement to the second and third neurospheres. We transplanted the third neurosphere in a model with smell disturbance, but unfortunately the improvement of the sense of smell reaction was not recognized. The reason seemed to be that the number of transplant cells was too small.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ES細胞 iPS細胞 neurosphere 神経幹細胞 嗅覚 FGF2

1. 研究開始当初の背景

五感の一つでもある嗅覚は言うまでもなく重要な機能である。嗅覚を失えば食事の楽しみが失われ、行動力・意欲の減退、ひいては鬱症状の引き金になることもある。また、嗅覚障害と認知症の関連も報告されている。嗅覚障害の治療法の開発は、今後の高齢化社会を考えるうえで、医療費及び社会福祉費の削減にもつながる大きなテーマであると考えられる。嗅覚障害の原因は呼吸性嗅覚障害、嗅神経性嗅覚障害、外傷性嗅覚障害の3つに大別される。その中で嗅神経細胞がアポトーシスを起こす感冒罹患後嗅覚障害、嗅神経の断裂が起こった外傷性嗅覚障害、アルツハイマー病に先行する嗅神経性嗅覚障害の予後は極めて悲惨である。嗅覚障害の病態に関しては近年徐々に明らかになってきてはいるものの、治療に関しては原疾患の治療とステロイド点鼻、ビタミン B12 製剤の内服が依然主体であり、数十年前の水準で停滞してしまっている。さらに急性期に症状を改善できなければさらに予後は不良である。

しかし一方で、嗅神経は年齢に関係なく常に新しく作り変えられているという報告もある。嗅覚神経はむしろ脳神経系の中で唯一、絶えず再生する神経としても近年認識されている。ただ治療へのブレイクスルーには程遠いのが現実である。

2. 研究の目的

人間にとって匂いがわかることは重要な楽しみでもあり、その障害は認知症や高次機能障害との関連も指摘されている。現在、

嗅覚障害の回復は難しく、慢性期に移行すれば治療の可能性はほとんどなくなる。一方で嗅覚障害の治療法開発は、いろいろ行われているが、この数十年ほとんど進んでおらず、臨床の場での慢性嗅覚障害は治療を断念する風潮にあり、それゆえ現代医療の重点項目に挙げられている。本研究は多能性幹細胞 (ES 細胞・iPS 細胞) からニューロスフェアを効率よく作製し移植することで、嗅覚障害マウスの嗅覚を戻すことを目的とする。そして嗅覚障害者に対する新しい再生治療の土台を築きあげ、臨床応用の可能性を探る。

3. 研究の方法

株化されたマウス ES 細胞 (EBRTcH3) と株化マウス iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-20D-17) を使用した。

ES 及び iPS 細胞を Noggin・レチノイン酸を用いて胚葉体 (Embryoid body: EB) に分化させ、EB から 1 次ニューロスフェアへの分化誘導を行う。1 次ニューロスフェアへの分化誘導後、分散継代し 2 次・3 次ニューロスフェアへ誘導させる。2 次・3 次ニューロスフェアをマウスモデルに移植する。

9~14 週齢の Balb/C 系マウスに必須アミノ酸 tryptophan の代謝物である 3-methylindole を 0.4mg/gBW で腹腔内投与し、嗅覚障害モデルを作製する。また、遺伝子組み換えマウスである OMP-tau-lacZ マウスを吸入麻酔し全頭骨と鼻骨を削開し、嗅球と篩板の間を明視下に切断するという直接外傷モデルも作成する。いずれも嗅覚障害作製後 1 週間の時点

で移植を行う。ニューロスフェアの移植は、嗅裂部に行う。

移植後は感染予防のための抗菌剤投与を行い、継時的に匂い試験を施行し実際の嗅覚評価を行う。また、同時に移植後14日、28日の状態において組織固定を行い、光学顕微鏡・免疫染色法・電子顕微鏡による組織評価を行う。

4. 研究成果

マウスの胚性幹細胞およびiPS細胞から、FGF2を含む無血清培地による浮遊培養法(neurosphere法)によって、単一細胞由来の1次ニューロスフェアへの形成は、問題なく行えた。

その状態から分散継代し2次・3次ニューロスフェアへの誘導も成功した。3次ニューロスフェアまで分化誘導した結果、TuJ1抗体とGFAP抗体で染色される細胞が得られた。これは神経幹細胞の集簇であり、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。

しかし誘導されたニューロスフェアが少なく、作成効率の向上と安定化が必要であり、今後培養液、細胞密度、培地の変更が必須であった。

続いて9~14週齢のBalb/C系マウスに必須アミノ酸tryptophanの代謝物である3-methylindoleを0.4mg/gBWで腹腔内投与し、嗅覚障害モデルを作製した。また、遺伝子組み換えマウスであるOMP-tau-lacZマウスの嗅球と篩板の間を明視下に切断し直接外傷モデルも作成した。そして得られた3次ニューロスフェアを移植した。

しかし継時的に匂い試験を行ったが、反応には変化なく、組織学的にも変化が認められなかった。この原因は、移植した3次ニューロスフェアが少ないことによると判断した。今後、3次ニューロスフェアの効率的な誘導を行い、再度移植実験を行う必要がある。ただ今回の研究で、移植過程まで到達できることを確認できたのは、大変有意義であった。

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 0件)

[学会発表](計 0件)

[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

藤枝 重治 (FUJIEDA, SHIGEHARU)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：30238539

(2)研究分担者

菅野 真史 (KANNO, MASAFUMI)
福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号： 90444215

(3)連携研究者
なし