

平成 30 年 4 月 25 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860053

研究課題名(和文) 嗅覚関連システムを用いたドーパミン神経細胞の脆弱性解析

研究課題名(英文) The vulnerability of dopaminergic neurons via olfactory transport pathway

研究代表者

笹島 仁 (SASAJIMA, Hitoshi)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：00374562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病では、運動障害に先んじて嗅覚障害が現れるが、その機序には不明な点が多い。一方、嗅覚輸送と呼ばれる鼻腔を介した脳への物質輸送は、環境毒物の脳内送達経路として危惧される。本研究では、鼻腔を介した環境毒物吸収による中枢ドーパミン神経細胞の損傷を解析した。マウス鼻腔内へ投与されたミトコンドリア呼吸鎖阻害剤ロテノン(ROTN)は、嗅覚輸送により嗅球へ送達され、嗅球ドーパミン神経変性による嗅覚異常を惹起した。また、鼻腔内に投与されたロテノンは、黒質緻密部においてもドーパミン神経細胞の神経突起退縮を誘導した。これらは環境毒物の嗅覚輸送が、嗅球のみならず広範な脳領域における神経変性の原因となりうることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：In Parkinson's disease, most of patients suffer dysosmia prior to motor symptoms. However, the etiology of this dysosmia has not been fully understood yet. Via the olfactory transport pathway, environmental chemicals can directly reach to the brain. Therefore the olfactory transport is concerned as one of vulnerable pathways for brain against environmental toxins. In this study, we investigated dopaminergic neurodegeneration that mediated by olfactory transport of neurotoxin. Intranasally administered rotenone induced dopaminergic neurodegeneration in the olfactory bulb of mice. Indeed, olfactory functions were attenuated by rotenone. Further analysis revealed that intranasal administration of rotenone also induced neurite degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra. Our findings suggest that olfactory transport of environmental toxins induces neurodegeneration, and that olfactory dysfunction may be induced as an earliest symptom caused by inhaled neurotoxins.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：パーキンソン病 ドーパミン神経 神経変性 環境毒物 嗅覚輸送 嗅覚障害 嗅球 黒質緻密部

1. 研究開始当初の背景

進行性中枢神経変性疾患の発症過程では、特定の脳領域あるいは特定の神経細胞集団が変性・脱落するが、その機構には未だ不明な点が多い。黒質緻密部ドパミン神経細胞の変性を責任病変とするパーキンソン病では、ミトコンドリア品質管理に関わる遺伝子の変異が家族性パーキンソン病の原因となりうるということが報告されている(Exner et al, 2012)。また、ミトコンドリア呼吸鎖複合体阻害剤をモデル動物へ持続投与すると、ドパミン神経細胞に特異的な細胞死を誘導し、パーキンソン病様徴候を呈する(Exner et al, 2012)。ミトコンドリア機能異常は、不完全な電子伝達反応による活性酸素増大を介して細胞死を誘導すると考えられている。一方、ドパミンはその分解過程において活性酸素を生じること、一部のドパミン代謝物は細胞毒性を有することから、ドパミン神経変性の要因の一つと考えられている。ミトコンドリアストレスとドパミン代謝機構は、共にドパミン神経細胞に内在する脆弱点であり、両者の相互作用はドパミン神経細胞特異的な細胞死をもたらすと考えられる。

孤発性パーキンソン病の発症トリガーは依然として不明であるが、危険因子の一つとして環境毒物への暴露が示唆されている(Tanner et al, 2011)。嗅神経を介して鼻腔内の化学物質を直接、脳へ送達する嗅覚輸送経路は、吸入された環境毒物に対する脳の脆弱点として危惧されるが、中枢神経変性との関連においては不明な点が多い。嗅覚輸送において鼻腔内の化学物質は、脳脊髄液ならびに嗅覚の一次中枢である嗅球へ送達される(図1)。多くのパーキンソン病患者における最初期徴候は嗅覚異常であることは、環境中化学物質の嗅覚輸送と中枢神経変性の関連を示唆するが、その詳細は不明である(Doty et al, 2008)。

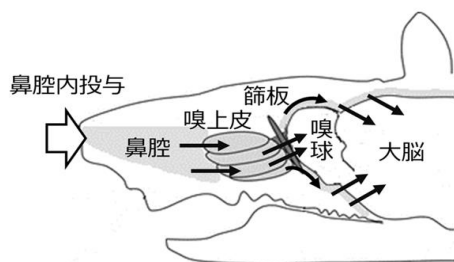


図1. 嗅覚輸送経路の模式図。鼻腔内化学物質は、嗅神経を介して能動的に嗅球へ、あるいは受動的拡散を経て脳脊髄液へ送達されると考えられている。

2. 研究の目的

嗅球は脳内で最もドパミン神経細胞密度が高く、嗅覚輸送により常に外界脅威に晒されている脳領域である。嗅球ドパミン神経細胞の詳細な機能については依然として不明な点が多いが、介在神経として嗅覚情報の上

位中枢への出力に影響を与えるものと考えられている。本研究では、ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤であるロテノン Maus 鼻腔内へ投与することで、嗅覚輸送を介した中枢神経変性が惹起しうるか検討した。具体的には、鼻腔内に投与されたロテノンが、(1) 嗅球へ送達されうるか、(2) 嗅球においてドパミン神経変性を誘導するか、(3) 中枢性嗅覚異常の原因となるか、(4) 他の脳領域へ神経変性をもたらすかという点について調べた。

3. 研究の方法

(1) 鼻腔内ロテノンの脳内への嗅覚輸送

Maus の片側鼻腔内へロテノンを反復投与し、両側それぞれの嗅球におけるミトコンドリアストレスを、マーカー遺伝子となる Park2、PINK1 の mRNA 発現量を定量することで評価した。

(2) ロテノンによる嗅球ドパミン神経変性

片側の Maus 鼻腔内へロテノンを反復投与した後、ドパミン神経細胞マーカーであるチロシンヒドロキシラーゼに関し、嗅球での mRNA 発現量、タンパク質発現量のそれぞれを解析した。また抗チロシンヒドロキシラーゼ抗体を用いた免疫組織染色により、嗅球におけるドパミン神経細胞数の変化を解析した。嗅球における細胞死の指標としては、アポトーシス促進因子である Bax の mRNA 発現量を解析した。

(3) ロテノン投与による嗅覚機能への影響

嗅覚機能に対するロテノン投与の影響を調べるために、エアフロー型 Y 字迷路を用いて、Maus が酪酸臭に対して示す忌避反応を評価した。また、ロテノン投与後の嗅球機能への影響を調べるため、嗅球における出力神経である僧帽細胞の電気生理学的特性の変化を観察した。

(4) 黒質緻密部ドパミン神経細胞への影響

Maus 脳スライスにおける抗チロシンヒドロキシラーゼ抗体染色像を画像解析することで、黒質緻密部ドパミン神経細胞における鼻腔内ロテノン投与の影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 鼻腔内ロテノンの脳内への嗅覚輸送

片側鼻腔内へのロテノン反復投与は、両側それぞれの嗅球における Park2、PINK1 の mRNA 発現量を増加させた。このことは、鼻腔から嗅球へ嗅覚輸送されたロテノンが、嗅球にてミトコンドリアストレスを誘導していること、且つその影響は脳内で拡散しうることを示唆した。

(2) ロテノンによる嗅球ドパミン神経変性

ロテノン投与後の Maus 嗅球では、ドパミン

神経細胞マーカーであるチロシンヒドロキシラーゼの mRNA、タンパク質それぞれの発現量が減少していた (図 2)。また、同じくドパミン神経細胞マーカーである VMAT2 の mRNA 発現量も減少していた。このとき、アポトーシス促進因子 Bax の mRNA 発現量は一過的な増加を示し、嗅球におけるアポトーシス誘導が示唆された。嗅球スライスを用いた免疫組織染色の結果、嗅球におけるドパミン神経細胞が顕著に減少していた。これらは、鼻腔から嗅覚輸送されたロテノンが、嗅球においてドパミン神経細胞の変性を誘導したことを示した。

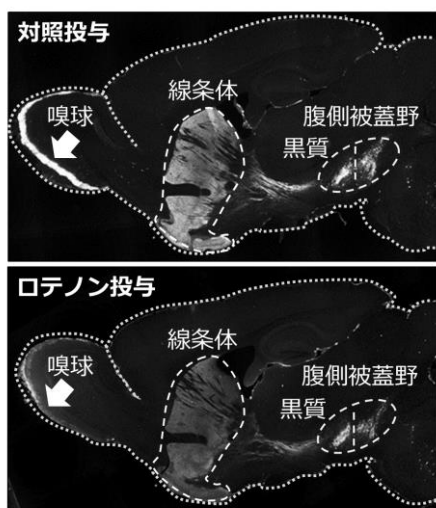


図 2. マウス脳矢状断切片の抗チロシンヒドロキシラーゼ染色像。ロテノン投与マウスでは、嗅球糸球体層におけるドパミン神経細胞マーカーのシグナル強度は顕著に減弱した。また、線条体における黒質線条体入力に関してもシグナル強度は減弱していた。

(3) ロテノン投与による嗅覚機能への影響
エアフロー型 Y 字迷路により観察されたマウスの酪酸臭に対する忌避反応は、ロテノン投与後に減弱していた。スライスパッチクランプ法により嗅球の僧帽細胞の電気生理学的特性を調べたところ、同細胞に対する介在神経由来と考えられる抑制性シナプスの自発的入力に変化が見られた。嗅球ドパミン神経細胞が嗅覚情報処理に果たす役割には不明な点が多いが、鼻腔内ロテノン投与による嗅球ドパミン神経変性は、僧帽細胞の出力特性に影響を及ぼし、嗅覚機能異常を惹起することが示唆された。

(4) 黒質緻密部ドパミン神経細胞への影響
中脳スライスにおける抗チロシンヒドロキシラーゼ抗体染色像では、黒質緻密部ドパミン神経細胞の神経突起退縮が黒質網様部にて観察された。すなわち、鼻腔内に投与されたロテノンは黒質ドパミン神経にも細胞毒性を発揮していることが示唆された。これら知見は、環境中毒物の嗅覚輸送は、中枢神経変性を誘導している脳の脆弱点のひとつであることを示した。

<引用文献>

- ① Exner N, Lutz AK, Haass C, Winklhofer KF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *EMBO J.* (2012) **31**; 3038–3062.
- ② Tanner CM, Kamel F, Ross GW, et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect.* (2011) **119**; 866–872.
- ③ Doty RL. The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? *Ann Neurol.* (2008) **63**; 7–15

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Miyazono S, Hasegawa K, Miyazaki S, Sakakima H, Konno S, Meguro S, Sasajima H, Noguchi T, Osada K, Kashiwayanagi M: Etizolam attenuates the reduction in cutaneous temperature induced in mice by exposure to synthetic predator odor. *European Journal of Pharmacology* (2018) **824**; 157–162. (査読有)
doi: 10.1016/j.ejphar.2018.02.015
- ② Sasajima H, Miyazono S, Noguchi T, Kashiwayanagi M: Intranasal Administration of Rotenone to Mice Induces Dopaminergic Neurite Degeneration of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* (2017) **40**; 108–112. (査読有)
doi: 10.1248/bpb.b16-00654
- ③ Sasajima H, Miyazono S, Noguchi T, Kashiwayanagi M: Intranasal administration of rotenone in mice attenuated olfactory functions through the lesion of dopaminergic neurons in the olfactory bulb. *NeuroToxicology* (2015) **51**; 106–115. (査読有)
doi: 10.1016/j.neuro.2015.10.006
- ④ 笹島仁: ミトコンドリア阻害による新規中枢性嗅覚障害モデルマウスとドパミン神経変性の評価. *旭川医科大学研究フォーラム* (2015) **15**; 58–59. (査読無)
- ⑤ Noguchi T, Sasajima H, Miyazono S, Kashiwayanagi M: Similar rate of information transfer on stimulus intensity in accessory and main olfactory bulb output neurons. *Neuroscience letters* (2014) **576**; 56–61. (査読有)
doi: 10.1016/j.neulet.2014.05.058
- ⑥ Utsugi C, Miyazono S, Osada K, Sasajima H, Noguchi T, Matsuda M, Kashiwayanagi M: Hard-diet feeding recovers neurogenesis in the subventricular zone and olfactory functions of mice impaired by soft-diet feeding. *PLoS One* (2014) **9**; e97309. (査読有)

有)
doi: 10.1371/journal.pone.0097309

[学会発表] (計 16 件)

- ① 笹島仁, 野口智弘, 宮園貞治, 柏柳誠: ドパミン代謝とミトコンドリア機能障害の合成神経毒性に対するハーブ由来抗酸化成分カルノシン酸、ロズマリン酸の効果. 日本味と匂学会第 51 回大会, 神戸市. 2017 年 9 月
- ② 宮園貞治, 長谷川楓, 宮崎世理, 榊間光理, 野口智弘, 笹島仁, 今野駿, 目黒さおり, 長田和実, 柏柳誠. 抗不安薬エチゾラムのオオカミ尿由来のピラジン誘導体によるマウス皮膚温度低下の抑制. 日本味と匂学会第 51 回大会, 神戸市. 2017 年 9 月
- ③ Miyazono S, Osada K, Sasajima H, Noguchi T, Kashiwayanagi M: Innate fear responses to predator odor, pyrazine analogs, driven by a dual olfactory system in mice. 第 40 回 日本神経科学会, 千葉市. 2017 年 7 月
- ④ 柏柳誠, 宮園貞治, 野口智弘, 笹島仁, 長田和実: 鼻腔内投与した薬物の脳血管関門を介さない脳機能への作用. 第 96 回北海道医学大会生理系分科会, 札幌市. 2016 年 9 月
- ⑤ Sasajima H, Miyazono S, Noguchi T, Kashiwayanagi M: Intranasal rotenone administration to mice induces the degeneration of dopaminergic neurons in the olfactory bulb and the substantia nigra. 17th International Symposium on Olfaction and Taste. Yokohama. 2016 年 6 月
- ⑥ Noguchi T, Sasajima H, Miyazono S, Kashiwayanagi M: Ion-channel mechanisms specializing firing patterns of olfactory and vomeronasal sensory neurons. 17th International Symposium on Olfaction and Taste. Yokohama. 2016 年 6 月
- ⑦ Miyazono S, Osada K, Sasajima H, Noguchi T, Kashiwayanagi M: The main olfactory and vomeronasal systems modulate fear of predator wolf odor, pyrazine analogs. 17th International Symposium on Olfaction and Taste. Yokohama. 2016 年 6 月
- ⑧ 野口智弘, 笹島仁, 宮園貞治, 柏柳誠: マウス嗅神経におけるリズム-興奮性統合による情報処理強化. 第 93 回 日本生理学会大会, 札幌市. 2016 年 3 月
- ⑨ 野口智弘, 笹島仁, 宮園貞治, 柏柳誠: Robustness of rate code to changes in stimulus cycle, in olfactory sensory nerves of mice. 日本味と匂学会第 49 回大会, 岐阜市. 2015 年 9 月
- ⑩ 宮園貞治, 笹島仁, 野口智弘, 長田和実, 柏柳誠: マウスにおける主嗅覚系および鋤鼻系を介した天敵臭ピラジン類に対する恐怖反応の制御. 日本味と匂学会第 49 回大会, 岐阜市. 2015 年 9 月

- ⑪ 野口智弘, 笹島仁, 宮園貞治, 柏柳誠: マウス嗅神経の発火頻度符号は刺激の周波数変化に対して頑健性を示す. 第 95 回北海道医学大会 生理系分科会, 旭川市. 2015 年 9 月
- ⑫ 笹島仁, 宮園貞治, 野口智弘, 柏柳誠: マウス鼻腔内へのロテノン投与による嗅球・黒質ドパミン神経への影響. 第 7 回北海道味覚嗅覚研究会, 旭川市. 2015 年 4 月
- ⑬ 野口智弘, 笹島仁, 宮園貞治, 柏柳誠: 入力周波数に依存した嗅神経発火パターン. 第 7 回北海道味覚嗅覚研究会, 旭川市. 2015 年 4 月
- ⑭ 宮園貞治, 笹島仁, 野口智弘, 長田和実, 柏柳誠: 主嗅覚・鋤鼻経路を介したオオカミ尿に含まれるピラジン類に対する恐怖反応. 第 7 回北海道味覚嗅覚研究会, 旭川市. 2015 年 4 月
- ⑮ 笹島仁, 宮園貞治, 野口智弘, 柏柳誠: マウス鼻腔内へのロテノン投与による嗅球内ドパミン神経および黒質緻密部ドパミン神経への影響. 日本味と匂学会第 48 回大会, 静岡市. 2014 年 10 月
- ⑯ 野口智弘, 笹島仁, 宮園貞治, 柏柳誠: 頻回刺激時におけるマウス嗅神経の発火特性. 日本味と匂学会第 48 回大会, 静岡市. 2014 年 10 月

[その他]

ホームページ等

<http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/physi2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹島 仁 (SASAJIMA, Hitoshi)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00374562