

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 31 年 2 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861370

研究課題名（和文）炎症を標的とした嗅覚障害治療法の確立

研究課題名（英文）The establishment of therapeutic methods for olfactory disorders with a focus on inflammation

研究代表者

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、炎症物質と嗅覚障害の新しい治療法確立を目的とし、まずは、生きたヒト嗅細胞を用いて、ホールセルパッチクランプ法による解析データを、既に多数報告されているイモリ嗅細胞のデータと比較した。そして、炎症物質の投与により、どのような影響を受けるかを確認した。また、炎症制御が外傷性嗅覚障害に対する効果もマウスを用いて検討も行った。

その結果、ヒト嗅細胞の基礎的データを得ることが出来たが、炎症物質の影響を確認できなかった。これはヒト嗅細胞が他の動物種と比べて極めて極めて組織が脆弱であるためだろう。しかし、本研究は外傷性嗅覚障害マウスに有効な物質を複数見つけ、今後の臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to establish new therapeutic methods for inflammatory substances in olfactory disorders. First, we analyzed data obtained by the whole-cell patch-clamp method using living human olfactory cells. As a result, we have reported many new olfactory cell findings. Subsequently, we confirmed the reactions caused by inflammatory substance administration. Inflammation control was also examined and its effects on traumatic olfactory disorder in mice.

As a result, preliminary results on human olfactory cells were obtained, but the influence of inflammatory substances could not be confirmed. This is probably because human olfactory cells are extremely fragile compared to other animal species. However, this study discovered multiple effective substances in traumatic olfactory-impaired mice, which are expected to be applied clinically in the future.

研究分野：生理学

キーワード：電気生理学 嗅覚 炎症

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、それはこの分野から 2004 年に Axel、Buck 博士というノーベル生理学医学賞を輩出していることから明らかである。数ある嗅覚研究の一環として、におい物質を受容する嗅細胞の嗅覚シグナルトランスダクションに関する研究も盛んに取り組み、そのメカニズムが徐々に解明されている (Kurahashi and Menini, 1997、Takeuchi et al., 2003)。

しかし、これら多くの研究はロブスター (Ruben et al., 2004、Anderson et al., 1985)、イモリ (Kurahashi, 1989、Kawai et al., 1997、Takeuchi et al., 2009)、マウス (Lagostena et al., 2003)、ラット (Okada et al., 1994) など下等動物を対象にしており、我々がもっとも知りたいヒトにおける嗅細胞の細胞内情報伝達機構の研究はこれまでにほとんど報告がない。ヒトの嗅細胞は、イモリなど下等動物の研究により報告されてきた嗅覚情報伝達機構とメカニズムは基本的には同じと考えられる。しかし、ヒトの嗅細胞は他の動物と比べて大きさが異なる上、同じ哺乳類で比べても、ネズミの嗅細胞数は約 1000 なのに対して、ヒトの嗅細胞数は約 350 と数にも差があることから、嗅覚受容体数も異なり、その結果知覚できるにおいの種類が異なると考えられる。

臨床医療分野においても嗅覚障害に対する関心が高まっており、耳鼻咽喉科や神経内科で嗅覚障害の専門診療を行う施設が増加している (小林正佳・他: 日耳鼻, 2005)。特に近年ではアルツハイマー病と嗅覚障害の関連も指摘されており、この診断、治療は重要度を増している。嗅覚障害の発症原因は多岐にわたるが、におい物質受容体を有する嗅細胞がニューロンであるにもかかわらず、他の神経組織とは異なり、外的環境に連続している鼻腔内の空気に直接晒されているという特殊性が考えられる。ただし、外的環境からの刺激やそれにより生じる炎症、あるいは外的環境から暴露される薬物が、どのように作用し、どのような病態メカニズムでもって嗅覚障害を発症するのかについては、いまだ明らかにされていない。

嗅覚の分子メカニズムは嗅細胞内の cAMP 濃度の上昇によって嗅覚シグナルトランスダクションが駆動するが、皮膚、血管など他の組織では炎症物質としてよく知られるプロスタグランジン (PG) E₂ が EP 受容体を介して細胞内 cAMP 濃度を変化させる。また、嗅細胞の cilia には cAMP の分解酵素としてホスホジエステラーゼ (PDE) が集まっており (Cygnar and Zhao, 2009)、PG と PDE の作用が cAMP を介して嗅覚発生機構の調節をしていると考えられる (Boccaccio et al., 2006)。中枢の PDE 濃度がアルツハイマー病と関連すると報告 (Sabayan et al., 2011) も

あり、PDE の異常が嗅覚障害として症状化されているかも知れない。

2. 研究の目的

本研究では、炎症関連物質と嗅覚障害の新しい治療法確立を目的とし、まずは、生きたヒト嗅細胞を用いて、ホールセルパッチクランプ法の電気生理学的解析が可能かどうかについて調べた。また、その結果を既に多数報告されているイモリ嗅細胞のデータと比較し、実験法の確立を目指した。その後、PG により、この系がどのような影響を受けるかを確認し、嗅覚障害発症のメカニズムを明らかにしようと試みた。

また、本研究に派生して、炎症制御が嗅覚障害、特に外傷性嗅覚障害に対し、どのような効果を示すかもマウスを用いて in vivo による検討も行った。

3. 研究の方法

嗅細胞はヒトの組織を用いるため、三重大学耳鼻咽喉・頭頸部外科学の協力の元、また、同大学倫理委員会に申請、認証を得た。そして、鼻腔内の手術を施行する患者から同意を得て、嗅上皮の生検、摘出を行い、Ringer 液 (mM): 110 NaCl, 3.4 KCl, 3 CaCl₂, 1 MgCl₂, 2 HEPES, 10 グルコース, 1 ピルビン酸, 10 ppm phenol red に浸し、冷蔵保存した。

1. 組織学的検討

電気生理実験を行う際、嗅上皮から嗅細胞を単離したものをを用いる。そこで、単離されたヒト嗅細胞がどのような形状か確認する。まず、0.1% コラゲナーゼを用いて、ヒト嗅上皮を酵素処理し、細胞を単離した。その後、4% パラホルムアルデヒドにて単離細胞を固定し、抗 Olfactory marker protein (OMP) 抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) の染色を加えて、二重蛍光染色によって嗅細胞の同定を行った。

この方法はイモリの組織にも同様にを行い、ヒト嗅細胞の形態との比較を行った。

2. 電気生理学的検討

嗅細胞を倒立顕微鏡下で視認し、組織学的検討で同定した形状と類似した細胞のみから、膜電流の解析を Whole cell 記録の状態で行った。細胞はコンカナバリン A を塗布したリングル液が入った薬液還流皿に撒き、アース線を入れた。ガラス電極には K⁺ solution (mM): 119 KCl, 1 CaCl₂, 5 EGTA, 10 HEPES を充填した。膜電流は内向き電流と外向き電流を解析し、外向き電流に関しては、20 mM tetraethyl ammonium (TEA) を含んだ Na blocking 溶液 (in mM): 110 塩化コリン, 3.7 KCl, 3 HEPES, 13 グルコース、

1 ピルビン酸, 10 ppm phenol red を還流し、膜電位の変化を記録した。

この方法はイモリの組織にも同様に言い、ヒト嗅細胞のデータとの比較を行った。

さらに、炎症性物質としてプロスタグランジン E2 を $1\mu\text{M}$ 投与した。

3. 炎症制御による in vivo マウスの検討

本実験に派生して、マウスを用いて炎症を制御することで嗅細胞の再生を確認する実験も行った。外傷性嗅覚障害モデルとして、マウスを開頭し、湾曲したステンレス、もしくはタングステンプレートにて嗅神経を切断、炎症制御を行う薬剤を腹腔注射した。

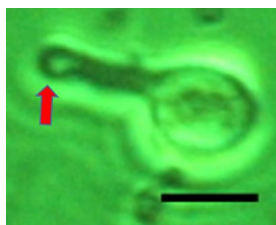
その後、5、14、42、100 日で 4%ホルムアルデヒド溶液による灌流固定し、組織学的検討を行った。

4. 研究成果

1. 組織学的検討

酵素処理されたヒト嗅上皮から単離された細胞を倒立顕微鏡で確認すると、2 つの種類の特徴的な細胞と円形の細胞がみとめられた。円形の細胞は単離の際に生じた何かの細胞ではあるが、特徴がないため、どのような細胞かはわからなかったが、2 種の細胞について嗅細胞(図 1A)と呼吸上皮細胞(図 1B)と考えられる。

図 1 A



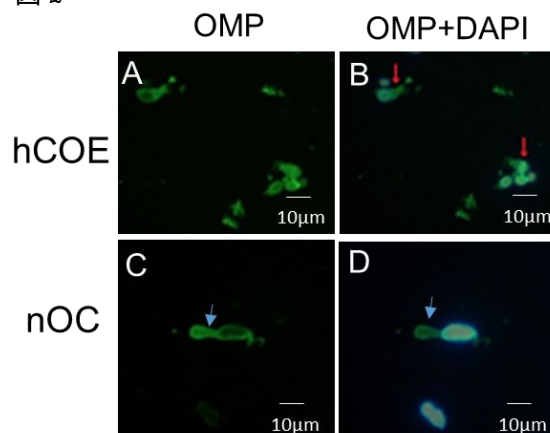
B



アンダーバーは $10\mu\text{m}$ であり、赤い矢印は特徴的な構造を示す。A の細胞は嗅細胞に特徴的な樹状突起のノブであり、中には cilia が確認できた。B は呼吸上皮細胞の特徴で流動する線毛がみとめられた。

さらに詳細にヒト嗅細胞 (hCOE) を同定するべく、二重蛍光染色を行った (図 2)。嗅細胞特異的タンパク質である OMP が発現している細胞を示す (図 2A)。核染色に用いられる DAPI との二重染色によって、A のタイプの細胞に OMP の発現がみとめられた (図 2B)。この結果は同様の手法で染色したイモリ嗅細胞 (nOC) でもみとめられ、ヒト嗅細胞の特徴はイモリ嗅細胞とほぼ変わらない形状であることが示唆された (図 2C, D)。しかし、大きさについては全ての細胞でイモリ嗅細胞よりも小さいことが明らかになった。

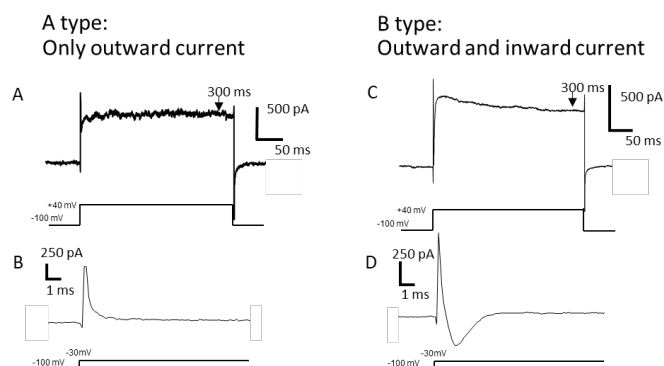
図 2



2. 電気生理学的検討

電圧固定下で -100 mV から 40 mV まで脱分極パルスを与え、膜電流を記録した (図 3)。

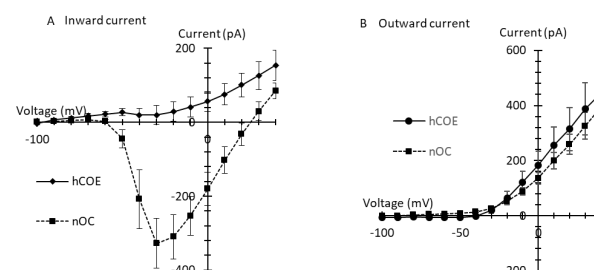
図 3



記録に成功したヒト嗅細胞 14 個の内、外向き電流のみ記録できた細胞が 13 個 (図 3A, B)、内向き電流も記録できた細胞は 1 個だった (図 3C, D)。我々は外向き電流のみ記録された細胞を A type、内向き電流も記録された細胞を B type と名付けた。図 3B, D はそれぞれ、脱分極パルスをかけた前後の図 3A, C の拡大図である。

ヒト嗅細胞の内向き電流、外向き電流の解析結果を電流 電圧曲線 (I-V 曲線) で記載し、同条件で記録した 7 個のイモリ嗅細胞の I-V 曲線を重ねた (図 4)。

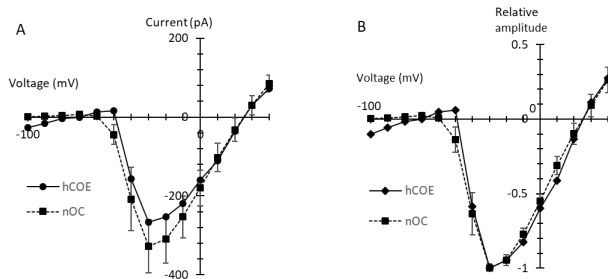
図 4



平均値をプロットした結果、イモリ嗅細胞は全て内向き電流が記録されたため、大きな内向き電流がみとめられるが、ヒト嗅細胞は内向き電流が1個だったためほとんどみられなかった。外向き電流に関してはイモリ嗅細胞に比べてほとんど変わりはなかった。

そこで、B type1 個の記録だけ抽出し、I-V 曲線をイモリ嗅細胞のものと重ねた(図5A)。ほとんど重なることがみられる。

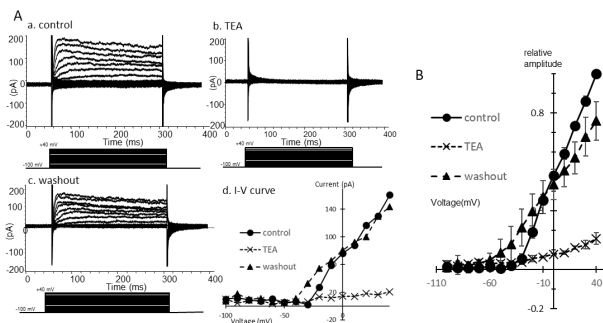
図 5



さらに、内向き電流の最大値を-1 とし、相対値として、重ねた(図5B)。すると、ほぼ一致した。この結果から、ヒト嗅細胞とイモリ嗅細胞の内向き電流の結果はほとんど変わらず、また、細胞内外の溶液の電解質組成が同条件であることから、内向き電流を構成するチャネルの種類や構成、性質はほぼ同じである可能性がある。内向き電流に関しては、今後、数は多くなればさらに詳細な解析が可能であろう。

次に、ヒト嗅細胞の外向き電流に関して、基本的な性質が同じかどうかについては、ほぼ一致していたため、内向き電流のチャネル構成と同じく、外向き電流のその構成も類似している可能性が高いが、より詳細に調べるため、3 個の細胞から遅延性整流性 K⁺電流を特異的にブロックする TEA を用いて、薬理学的効果を調べた(図6)

図 6



TEA の投与によって著しい抑制作用がみとめられ、その後 washout するとほとんど変わりにく回復した、可逆性がみとめられた(図6Aa-c)。I-V 曲線でも同様の傾向が認められた(図6Ad)。TEA 効果を見る実験を行った3 個の細胞の平均値をプロットした結果でも

ほぼ同様の傾向が認められた(図6B)。

この結果はイモリ嗅細胞をはじめ、多くの動物種でも同様の傾向がみとめられるため、外向き電流を構成するチャネルの性質もまた、ヒト嗅細胞と同様である可能性が示唆された。

ヒト嗅細胞を用いた本研究において、同様の方法で行うと、イモリ嗅細胞では内向き電流、外向き電流双方がほぼそろって記録されるが、ヒト嗅細胞ではほとんど内向き電流が記録されなかった。つまり、単離されたヒト嗅細胞の電気生理研究は大変技術的な要求が高いことがわかった。

我々はヒト嗅細胞特有の問題ととらえ、ヒト嗅上皮が漬かっているリンゲル液の酸素化処理(バブリング)や、哺乳動物でよく用いられる酵素処理をパパイニンにするなどしたが、結果は変わらなかった。

内向き電流は、Na⁺チャネルや Ca²⁺チャネルといった陽イオンを細胞内に入れることによって生じるが、活動電位の立ち上りを構成するものであり、細胞の活動性を調べるためには重要である。

しかし、本研究においては、1 個の細胞しか記録できず、ゆえに多くの研究計画が進まない結果となってしまった。

また、当初予想していたヒト嗅細胞内シグナル系における匂いの応答(受容器電位)に炎症物質が作用するという仮説についても同様で、ヒト嗅細胞において匂い物質応答性が確認できず、その効果を確認することが出来なかった。

この成果に関しては、現在さらに詳細に調べ、論文投稿準備中である。

3. 炎症制御による in vivo マウスの検討

ヒト嗅上皮を用いた電気生理実験は患者の同意を得て手術中に生検し実験を行うため、技術的、倫理的ハードルが高く、炎症制御による嗅覚障害の治療モデルを模索し、三重大学医学系研究科小林准教授に協力を得て、派生した研究も行った。つまり、外傷性嗅覚障害モデルマウスの炎症制御による治療法の確立である。

小林らの研究手法を用いて、抗炎症作用がある HMGB1、TNF の投与により、嗅神経の回復を確認することが出来た。また、抗炎症作用を外傷後、いつ処置するかについて効果的な期間も明らかにし、これについては共著であるが、学術誌に掲載した。

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 4 件)

Tamari K, Takeuchi H, Kobayashi M, Takeuchi K, Kurahashi T, Yamamoto T. Electrical Properties of Cells from

Human Olfactory Epithelium. Auris Nasus Larynx.2019 (acceptable) 査読あり

Kobayashi M, Tamari K, Al Salihi MO, Nishida K, Takeuchi K. Anti-high mobility group box 1 antibody suppresses local inflammatory reaction and facilitates olfactory nerve recovery following injury. J Neuroinflammation. 2018 Apr 26;15(1):124. 査読あり

Kobayashi M, Tamari K, Kitano M, Takeuchi K. A Time Limit for Initiating Anti-Inflammatory Treatment for Improved Olfactory Function after Head Injury. J Neurotrauma. 2018 Feb 15;35(4):652-660. 査読あり

Al Salihi MO, Kobayashi M, Tamari K, Miyamura T, Takeuchi K. Tumor necrosis factor- α antagonist suppresses local inflammatory reaction and facilitates olfactory nerve recovery following injury. Auris Nasus Larynx. 2017 Feb;44(1):70-78. 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

Electrical Properties of Cells from Human Olfactory Epithelium. The 95th Annual meeting of the physiological society of Japan. 2018

Comparison of ionic currents between human and newt olfactory epithelial cells. the 17th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT). 2016

〔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

玉利 健悟 (TAMARI, Kengo)

三重大学教養教育機構 特任講師

研究者番号 : 90585176

(2)研究分担者

なし

研究者番号 :

(3)連携研究者

なし

研究者番号 :

(4)研究協力者

小林 正佳 (KOBAYASHI, Masayoshi)