

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591898

研究課題名(和文) ヒト嗅細胞における嗅覚情報伝達機構の解明

研究課題名(英文) Signal transduction system of human olfactory receptor cells

研究代表者

小林 正佳 (KOBAYASHI, Masayoshi)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80343218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ホールセルパッチクランプ法を用いた電気生理学的実験により、ヒト嗅細胞における嗅覚情報伝達機構を分子レベルで解明し、体内の神経系組織で唯一生体外に直接晒されている嗅神経細胞が、体外環境、特に嗅覚障害の原因と考えられている物理的、化学的变化に対して、どのように影響を受けるかを確認することを目的に本研究を施行した。

双極性細胞を中心に特徴的な細胞を顕微鏡用ビデオカメラを使用し撮影した。線毛はほとんど確認できなかったが樹状突起やその先端膨張部を確認した。

ホールセルパッチクランプ法で、ヒト嗅細胞から膜電流を記録することに成功した。ヒト嗅細胞が他の種の嗅細胞と同様の電位依存性を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To reveal signal transduction system of human olfactory receptor cells, we tried to record membrane potential of the olfactory receptor cells obtained from human using whole cell patch clamp method. We succeeded to record membrane potential of human olfactory receptor cells using the method and found that characteristics of the human olfactory receptor cells are similar to those of other animals that were reported previously.

研究分野：耳鼻咽喉科学

科研費の分科・細目：鼻科学

キーワード：嗅覚 嗅細胞 ヒト パッチクランプ 免疫染色

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 Axcel 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。数ある嗅覚研究の一環として、嗅細胞における嗅覚情報伝達機構に関する研究も盛んに取り組まれ、そのメカニズムが徐々に解明されてきている (Kurahashi and Menini. *Nature* 385: 725-729, 1997; Takeuchi et al. *J Gen Physiol*: 122: 255-264, 2003; 図 1)。しかし、これはあくまでも両生類などの下等動物における結果に過ぎず、ほ乳類、ひいては最終的にその解明が最も重要であるヒトにおける嗅細胞の嗅覚情報伝達機構は過去にまったく研究報告がなされていない。

基礎研究に引き続いて、臨床分野においても嗅覚障害に対する社会的関心が高まっており、耳鼻咽喉科を中心に嗅覚障害に取り組む施設が年々増加している (小林正佳・他: 日耳鼻 108: 986-995, 2005)。しかし、嗅覚障害の生じる詳細なメカニズムについてはすべて解明されていない。特に、嗅覚レセプターを有する嗅神経細胞は体内の神経系組織で唯一生体外に直接晒されているユニークな神経細胞であるが、これに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て、どのような病態メカニズムにより、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のが現状である。よって、ヒトにおける嗅細胞の嗅覚情報伝達機構の解明は、嗅覚障害の診療において、将来の治療戦略を進めるにあたり、必ず必要な基礎的知見となるものと考えられている。

2. 研究の目的

上記の疑問点を明らかにするために、我々はホールセルパッチクランプ法を用い

た電気生理学的実験により、ヒト嗅細胞における嗅覚情報伝達機構を分子レベルで解明し、体内の神経系組織で唯一生体外に直接晒されている嗅神経細胞が、体外環境、特に嗅覚障害の原因と考えられている物理的、化学的变化に対して、どのように影響を受けるかを確認し、嗅覚障害の原因メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

3-1 ヒト嗅粘膜採取

ヒトから採取した嗅細胞を対象とする。当院耳鼻咽喉・頭頸部外科で全身麻酔下あるいは局所麻酔下で手術摘出された患者の鼻粘膜組織から嗅細胞を採取した。

3-2 蛍光免疫組織学実験

組織実験は電気生理実験を同様の方法で単離後、スライドガラスにコンカナバリン A でコートし、細胞を撒き、すぐに 10%ホルマリン溶液に細胞周辺の溶液を交換し、10 分後 PBS に交換した。その後、PBS-T で 5 分間 3 回ウォッシュアウトし、ブロッキング溶液 (5% normal goat serum、1% bovine serum albumin、0.5% Triton X-100) で 30 分処理して、一次抗体として、rat anti-OMP (Olfactory marker protein) を 1:100 濃度で一晩冷蔵保存した。PBS-T で 5 分間 5 回洗浄後、goat anti-rat Alexa488 を 1:100 濃度で 1 時間室温保存し、PBS-T で 5 分間 5 回洗浄した。さらに、蛍光核染色が可能とされる DAPI を用いて、1:1000 濃度で 1 分保存し、PBS で 5 分間 5 回洗浄し、グリセリンで包埋しカバーガラスを掛けた。スライドガラスを蛍光顕微鏡下で観察した。本実験のコントロールとしてイモリ嗅粘膜を使用して同実験を試行した。

3-3 電気生理学研究

得られたヒト嗅粘膜を 0.1% コラゲナーゼで処理して嗅細胞を単離した。単離した嗅細胞を 0.1% コンカナバリン A でコーテ

リング、Ringer 液 (mM): 110 NaCl, 3.4 KCl, 3 CaCl₂, 1 MgCl₂, 2 HEPES, 10 グルコース, 1 ピルビン酸と 10 ppm phenol red に浸した薬液灌流用培養皿に塗布し、冷蔵庫にて保持した。その後、倒立顕微鏡下で培養皿内の嗅細胞と呼吸上皮細胞を区別し(図 1) 樹状突起と先端に膨らみを持つ嗅細胞のみを選択、電気生理実験を行った。実験はホールセルパッチクランプ法を用いて電圧固定下で -100 mV から 40 mV まで 10 mV ステップで脱分極パルスを与え、記録電極には標準内液(mM): 119 KCl, 5 CaCl₂, 5 EGTA, 10 HEPES と 10 ppm phenol red を入れ、細胞膜に発生する電流を記録した。記録中には K⁺チャンネルのブロッカーである、Tetraethylammonium (TEA)を灌流し、外向き電流の抑制性を調べた。

4. 研究成果

4-1 形態観察

双極性細胞を中心に特徴的な細胞をノマルスキ顕微鏡下で顕微鏡用ビデオカメラを使用し撮影した。端の線毛(cilia)はほとんど確認できなかったが樹状突起やその先端の膨張部も確認できるものもあった(図 1)。

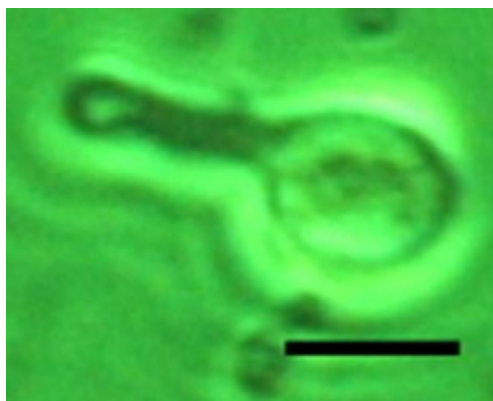


図 1 ヒト嗅細胞(バーは 10 μm)

4-2 蛍光免疫組織化学染色

嗅細胞特有のタンパク質である OMP 染色された細胞の形状は、概ね光学顕微鏡下

で区別した特徴と類似していた。また、イモリの嗅細胞においても同様の結果が認められたため、手技として不備はないと考えられる(図 2)。

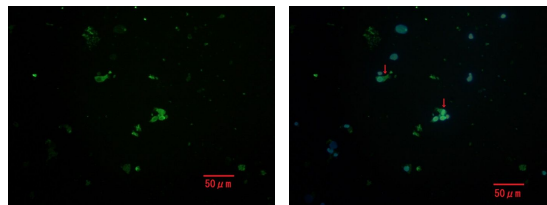


図 2 蛍光免疫組織学実験。左図: OMP 含有細胞。右図: DAPI 陽性細胞とのマージ図

4-3 膜電流解析

電流記録細胞数 n=7。7 例で outward が、1 例で inward も確認された。また、1 例では 1 mM の TEA を還流し、その抑制作用と washout 時の記録も行った。ただし、リーク電流が大きいため、I-V 曲線作成時には記録時の電極抵抗を用いて leak subtraction で補正を行った(図 3-5)。

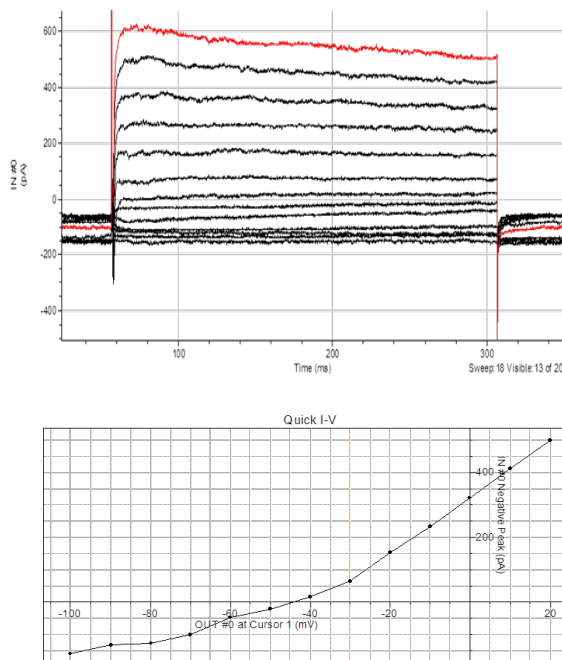


図 3 外向き電流の例

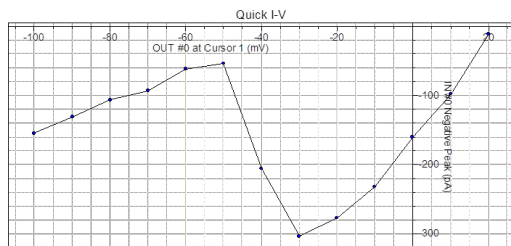
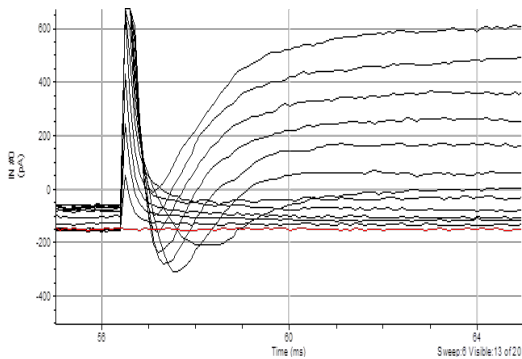


図4 内向き電流の例

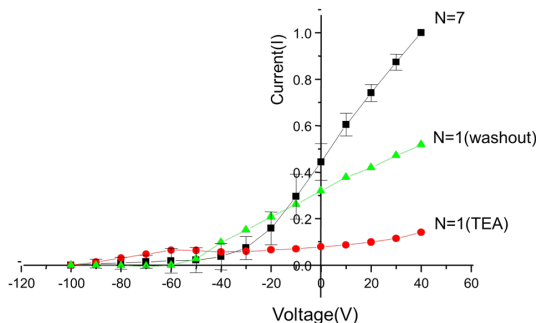


図5 外向き電流の I-V 曲線

4-4 結果の考察

ヒト嗅細胞を用いた電気生理学実験を行った報告は過去に無く、本研究は一定の成果を上げた。すなわち、嗅粘膜摘出後の安全性とヒト嗅細胞の性質が他の種の嗅細胞と同様の電位依存性を示した点である。

嗅粘膜摘出後、患者の嗅覚検査を行ったところ、改善されており、内視鏡下における嗅粘膜の一部摘出では嗅覚障害を示さない。これは、ヒトの嗅粘膜がパッチ状に分布している事に起因すると考えられる。

電気生理学実験において、本研究は電位依存性の一部を解明した。本法は他の種との

比較のために、嗅細胞単離で用いる酵素やその反応時間、細胞外液の組成や記録電極内容液の組成まで、イモリ嗅細胞での実験と同様にした。単離した嗅細胞を観察すると、樹状突起が伸びる形状と先端の膨らみが認められる細胞とそれ以外に分かれており、先行研究の結果と類似している(図1)。また、蛍光免疫染色によって、OMP含有細胞の構造が上記の特徴を示す結果であったため(図2)電気生理学実験において、嗅細胞のみを記録する際には、特徴による同定で十分だと考えられる。

ヒト嗅細胞の膜電流の特性として、内向き電流を構成するチャネル(Na⁺チャネルなど)は-40mVで開く点や、逆転電位が20mV以上であり、イモリ嗅細胞と同様の特性を示した。また、外向き電流を構成するチャネル(K⁺チャネルなど)も-40mVから開く。また、細胞内外のK⁺の組成によって起こる外向き電流が類似している点から、ヒト嗅細胞内の組成はイモリ嗅細胞のそれと類似している可能性を示唆した(図3)。

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)

Tamari K, Takeuchi H, Kobayashi M, Kurahashi T, Yamamoto T.

Suppression and recovery of voltage-gated currents after cocaine treatments of olfactory receptor cells.

Auris Nasus Larynx 40: 66-70, 2013.

doi: 10.1016/j.anl.2011.11.002.

(査読有)

玉利健悟 竹内裕子 小林正佳 倉橋

隆 山本哲朗

局所麻酔薬コカイン投与時の嗅細胞膜電流変化.

日本味と匂学会誌 17 : 427-430、2010.

(査読有)

[学会発表](計 5 件)

Tamari K, Takeuchi H, Kobayashi M, Kurahashi T, Yamamoto T

Effects of cocaine on the olfactory receptor cell function

Association for Chemoreception Sciences (AChemS) 2011年4月15日
St. Pete Beach, FL, USA

玉利健悟 竹内裕子 小林正佳 倉橋

隆 山本哲朗

嗅細胞の膜電流に対する塩酸コカインの影響

第 87 回日本生理学会大会 2010 年 5 月 21 日 盛岡市

小林正佳 玉利健悟 竹内裕子 倉橋

隆 山本哲朗 西田幸平 竹内万彦

塩酸コカインによる嗅細胞のNa⁺電流の抑制作用と安全性の検討

第 111 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2010 年 5 月 22 日 仙台市

小林正佳 玉利健悟 竹内裕子 倉橋

隆 山本哲朗 西田幸平 竹内万彦

嗅細胞の膜電流に対する塩酸コカインの影響

第 141 回日本耳鼻咽喉科学会東海地方部会連合講演会 2010 年 6 月 6 日 名古屋市

玉利健悟 竹内裕子 小林正佳 倉橋

隆 山本哲朗

局所麻酔薬コカイン投与時の嗅細胞膜

電流変化

日本味と匂学会第 44 回大会 2010 年 9

月 8 日 (水) ~9 月 10 日 北九州市

[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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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: 8 0 3 4 3 2 1 8

(2) 研究分担者

倉橋 隆 (KURAHASHI, Takashi)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号: 9 0 2 2 5 2 5 1

竹内 裕子 (TAKEUCHI, Hiroko)

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授

授

研究者番号: 1 0 3 2 4 8 2 3

山本 哲朗 (YAMAMOTO, Tetsuro)

三重大学・大学院医学系研究科・特任教授

授

研究者番号: 0 0 1 2 7 0 0 2

竹内 万彦 (TAKEUCHI, Kazuhiko)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：5 0 2 0 6 9 4 2

玉利 健悟 (TAMARI, Kengo)

三重大学・医学部・助教

研究者番号：9 0 5 8 5 1 7 6

(3)連携研究者

()

研究者番号：