

論文の内容の要旨

論文題目 タバコ煙と加齢が嗅神経上皮の恒常性維持に及ぼす影響に関する実験的研究

氏 名 上 羽 瑠 美

[序論]

嗅覚は、食餌の探知や外敵の察知、危険の感知、同種個体間での異性の認識など、種の維持のために重要な五感の一つである。哺乳類における嗅覚システムは、中枢神経系の一部でありながら、神経新生と退行神経細胞の置換という高い再生能力を有する極めてユニークな調節機構で、生理的状态においても神経細胞のターンオーバーが絶え間なく起こっている。嗅覚は、鼻腔の後上部に位置する末梢嗅覚受容体（嗅神経細胞 **olfactory receptor neurons**: ORNs）を含む嗅粘膜と、前頭葉底部にある終脳の先端に位置する嗅球で構成される嗅覚系によって調節される。嗅粘膜は嗅神経上皮と粘膜固有層から成り、嗅神経上皮は、表層より支持細胞、嗅神経細胞、基底細胞から構成される。哺乳類の嗅神経上皮において、嗅神経細胞（ORN）は様々な前駆細胞・未熟嗅神経細胞の段階を経て、成熟する。嗅神経上皮の最深層に存在するのが基底細胞で、前駆細胞としての機能を有し、初期嗅神経前駆細胞は転写制御因子の **SOX2** を発現する。**SOX2** は、神経幹細胞を含む幹細胞群に広く発現する転写因子で、未分化状態で細胞を維持する役割を果たす。嗅神経上皮においても前駆細胞に発現し、嗅神経細胞系の恒常性を調節している。

嗅覚障害の原因は、環境要因や上気道感染、外傷、加齢など多々あり、分子生物学的手法の進歩により嗅覚受容の分子機構の解明は進んでいるが、一方で、嗅覚障害の病態生理はあまり解明されておらず、治療法は十分確立していない。予防を含めた治療法の開発に向けて、病態生理の詳細な解明が必要である。そこで、本研究では嗅覚に影響を与える環境要因の代表的な二つの因子として、外因性の「喫煙」と、内因性の「加齢」による嗅覚障害の病態生理を明らかにすることを目的として、まずタバコ煙による嗅神経上皮の細胞動態の変化を解析し、嗅覚障害に対する予防や治療法に繋がる分子機構の解明を目指した。次に、加齢マウスを用いて、生理的状态の嗅神経上皮における嗅神経前駆細胞から成熟 ORNs までの嗅細胞系への加齢による影響を組織学的に解析し、加齢に伴う嗅覚障害の背景にあると推測される神経栄養因子や成長因子、炎症性サイトカインに関して遺伝子解析を行うことで、加齢性による嗅覚障害の背景にある分子機構を解明することを目標とした。

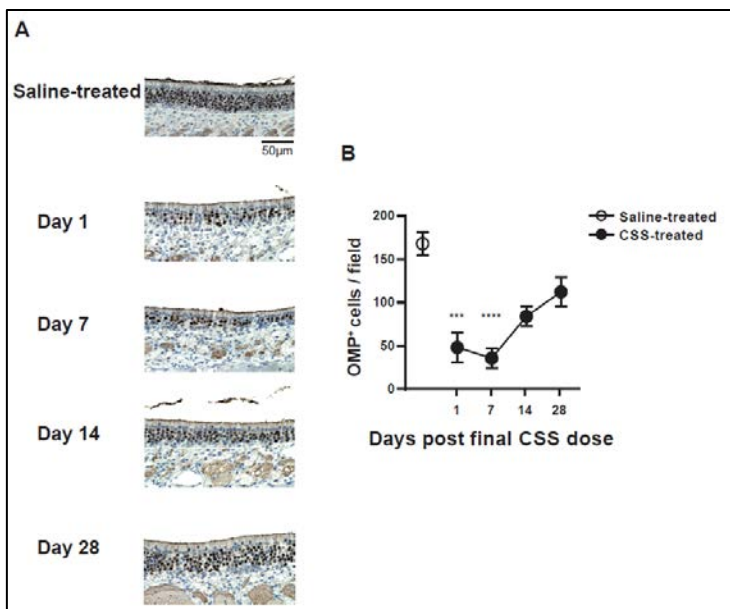
[研究① タバコ煙による嗅上皮及び嗅覚への影響に関する組織学的・分子生物学的検討]

・方法

C57BL/6 マウス (8 週齢) にタバコ煙溶液 (cigarette smoke solution: CSS) を点鼻吸入させ、喫煙モデルを作製した。CSS 最終投与日を Day0 とし、Day1,7,14,28 の鼻腔組織を免疫組織学的、分子生物学的に解析した。成熟 ORNs を抗 OMP 抗体、嗅神経前駆細胞を抗 SOX2 抗体、分裂細胞を抗 Ki67 抗体、アポトーシス細胞には抗 cleaved caspase-3 (Cas3) 抗体を用いて同定した。また、嗅覚行動実験で嗅覚機能を検査し、リアルタイム RT-PCR 法で各タイムポイントの鼻粘膜中の IL-1b と IL-6 mRNA 発現を定量評価した。

・結果

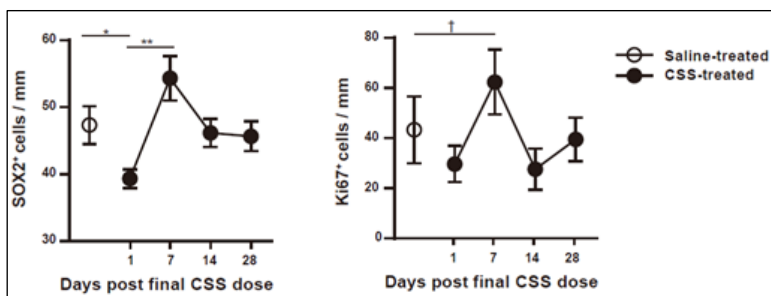
OMP+成熟嗅細胞数は、CSS 投与後、Day7 をピークに低下し、その後 Day28 までに徐々に回復した。行動実験では、CSS 最終投与後 Day1, 7 では匂い物質に対する反応が乏しかったが、Day14 では匂い物質に反応し、OMP+細胞数変化と同様の傾向を示した。



A: 嗅神経上皮における OMP+成熟 ORNs の免疫染色像。生理食塩水投与対照群と、CSS 最終投与後の各群において。

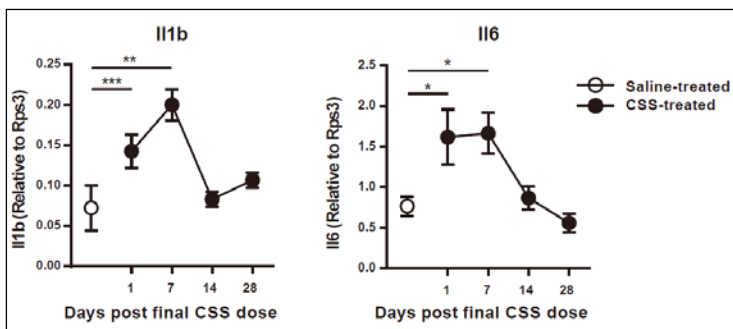
B: 各群における一視野あたりの OMP+成熟 ORNs 数 (n = 6). ***, P < 0.001, ****, P < 0.0001, 生理食塩水投与対照群と比較。

SOX2+嗅神経前駆細胞と Ki67+分裂細胞は CSS 投与直後 (Day1) には減少していたが、Day7 では増加に転じ、Day14 では定常状態になった。Cas3+アポトーシス細胞は Day14 まで増加傾向を認めたが細胞数が少なく、計測比較には適さなかった。経時的に、嗅覚前駆細胞の減少と分化増殖の低下に続いて、成熟嗅覚細胞数が減少することが明らかになった。



SOX2+嗅神経前駆細胞数、及び基底層 Ki67+分裂細胞数の経時的変化 (n = 6). *, P < 0.05; **, P < 0.01 (SOX2). †, P < 0.05 (Ki67).

鼻粘膜中の IL-1b と IL-6 mRNA 発現は、CSS 投与によって Day1-7 まで有意に上昇し、その後 Day14 以降は対照群と同レベルまで低下した。



嗅神経上皮中 IL-1b と IL-6 の mRNA 発現。

(n = 4-6, *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001)

[研究② 加齢がマウス嗅上皮の細胞動態と周囲環境に及ぼす影響の分子生物学的検討]

・ 方法

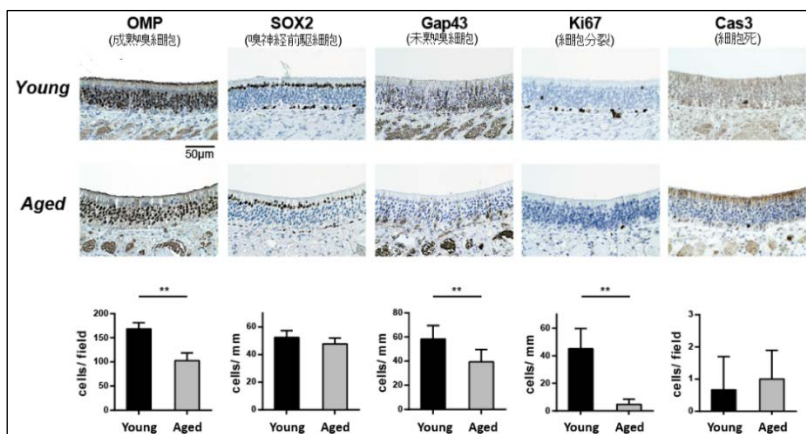
若齢マウス (8 週齢) と加齢マウス (16 月齢) を用いて、生理的状态の嗅神経上皮における嗅神経前駆細胞から成熟 ORNs までの嗅神経細胞系への加齢による影響を組織学的に解析し、加齢に伴う嗅覚障害の背景にあると推測される神経栄養因子や成長因子、炎症性サイトカインに関して遺伝子発現解析 (マイクロアレイ・リアルタイム RT-PCR) を行った。

・ 結果

マウスの嗅神経上皮において、SOX2+嗅神経前駆細胞数や Cas3+アポトーシス細胞数は若齢群と加齢群で差を認めず、Ki67+分裂細胞や Gap43+未熟 ORNs, OMP+成熟 ORNs の数は、加齢群で減少した。

マイクロアレイ解析により、炎症性サイトカインの一つである IL-6 の遺伝子発現の上昇と、軸索損傷後の反応に関わる遺伝子群や細胞分裂や生存および神経新生を調節する伝達経路関連遺伝子群、成長因子への反応に関連する遺伝子群の発現低下を認めた。

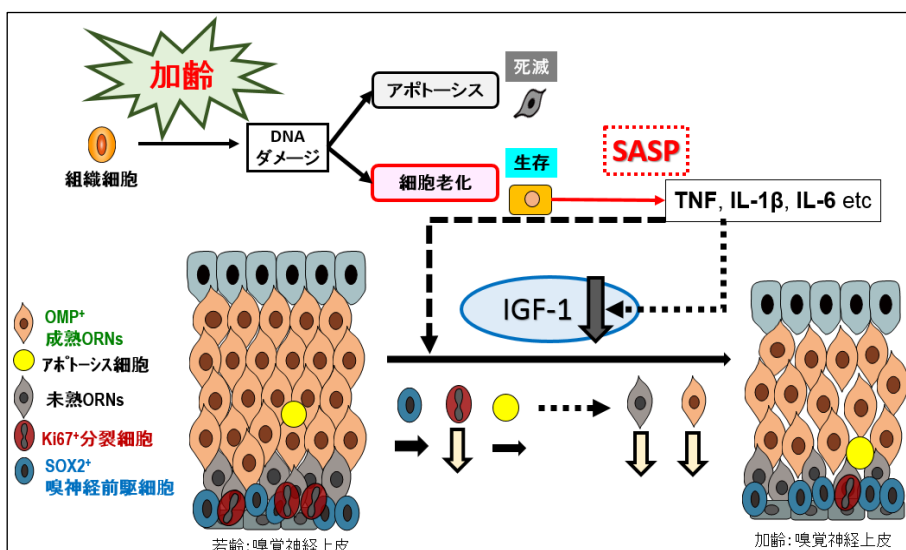
リアルタイム RT-PCR により、鼻粘膜中の BDNF や GDNF, NT-3, NT-5, IGF-1 と炎症性サイトカイン (TNF, IL-6) の各 mRNA 発現を、若齢群と加齢群で定量比較した結果、マイクロアレイの結果と同様に、加齢群で IGF-1 の mRNA 発現量の低下と IL-6 の mRNA 発現量の増加を認めた。



各細胞数の若齢群と加齢群との比較

[考察]

嗅神経上皮は、嗅神経前駆細胞や未熟 ORNs, 成熟 ORNs などから構成され、嗅覚神経系における再生過程を担っている。一生を通して十分な神経ニューロン数を維持するために、細胞死した ORNs は分裂中や成熟過程の嗅神経前駆細胞に置き換わる。この細胞動態のバランスが崩れると、臨床的な嗅覚低下の原因になる。本研究では、タバコ煙と加齢による嗅神経上皮への影響に関して、マウスモデルを用いて検証した。喫煙により、嗅神経前駆細胞の減少と細胞死によって成熟 ORNs 数が減少し、それに伴って嗅覚機能障害が生じることを解明した。さらに、炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6) の増加を認め、嗅神経上皮においてタバコ煙によって炎症反応や免疫応答が誘導されることで、ORNs や嗅神経前駆細胞が障害される可能性が示唆された。加齢による嗅神経上皮への影響に関して、加齢マウスの嗅神経上皮では、若齢マウスと比較して分裂細胞や ORNs 数が低下しており、加齢に伴う嗅覚機能低下の組織学的背景であると考えられた。また、炎症性サイトカインの上昇と IGF-1 の低下による神経新生および増殖・分化の抑制が分子生物学的背景にあることが明らかになった。嗅神経上皮においても加齢により細胞老化した細胞から、炎症性サイトカインが分泌される現象 (SASP: senescence associated secretory phenotype) が生じることが示唆され、炎症性サイトカインにより IGF-1 の神経系へのシグナル伝達を阻害することで、嗅覚神経上皮における SOX2⁺前駆細胞の細胞分裂が低下し、未熟 ORNs と成熟 ORNs の細胞数も低下すると考えられる。喫煙や加齢による ORNs の低下が加齢性嗅覚障害の原因と考えられることから、喫煙および加齢による嗅覚障害に対して、“炎症性サイトカインの抑制”や“嗅神経前駆細胞から ORNs までの増殖分化、成熟過程の促進”が治療戦略となりうると期待される。



加齢による嗅神経上皮環境への影響