

学位論文（課程博士）

内 容 要 旨

耳鼻咽喉・頭頸部外科学

村井 綾

平成 28 年 12 月申請

内 容 要 旨 目 次

主論文

Distorted Coarse Axon Targeting and Reduced Dendrite Connectivity Underlie
Dysosmia after Olfactory Axon Injury

(嗅細胞軸索損傷後の異嗅症は軸索投射の歪みと樹状突起との結合性の減少によって引き起こされる)

村井 綾、岩田 遼、藤本聡志、藍原周平、坪井昭夫、室山優子、斎藤哲一郎、
西崎和則、今井 猛

主 論 文

Distorted Coarse Axon Targeting and Reduced Dendrite Connectivity Underlie Dysosmia after Olfactory Axon Injury

(嗅細胞軸索損傷後の異嗅症は軸索投射の歪みと樹状突起との結合性の減少によって引き起こされる)

[緒言]

異嗅症は本来の匂いと異なった匂いとして認知する嗅覚障害の1つである。嗅細胞は感覚細胞であるが、生涯ターンオーバーを繰り返し、障害を受けても再生可能であるという特徴がある。しかしながら頭部外傷のように嗅細胞の軸索が切断されるような障害をうけると無嗅症や嗅覚減退をきたしたのちに、異嗅症を引き起こす(Yousem et al. 1996; Doty et al, 1997; Doty, 2009)。異嗅症には有効な治療法がなく、予後は不良である(London et al, 2008)が、患者のQOLに大きく関わり、異嗅症の治療法の確立のために分子学的、解剖学的メカニズムの解明が望まれている。

嗅細胞は1つの細胞につき1つの嗅覚受容体が発現し(Buck and Axel, 1991)、同じ嗅覚受容体を発現する嗅細胞の軸索同士が収斂し、嗅球上に糸球体地図を形成する。匂い情報は嗅球上で時空間的なパターンとして認識され、数多くの匂いの識別が可能となる。糸球体地図は発生期に主に2つの機構によって形成される。Neuropilin1 (Nrp1)とそのリガンドであるSemaphorin3A (Sema3A)により大まかな前後軸が決定し、Kirrel2/Kirrel3により嗅細胞と糸球体の1対1の関係が決定する。発生期に形成された糸球体地図は嗅細胞がターンオーバーを繰り返しても維持され、また感冒などによっておこる軽度な障害では糸球体地図は変化しない。異嗅症による嗅覚認識の異常は、糸球体地図の乱れによると考えられるが、その機序はいまだ完全に解明されているとはいえない。

そこで今回我々は嗅細胞の軸索を切断した(Costanzo, 2000; Christensen et al, 2001)異嗅症モデルマウスを作製し、軸索切断後の嗅覚系の分子学的、解剖学的変化を観察し異嗅症のメカニズムを解析した。

[材料(対象)方法]

マウス：

- ・OMP-GFP マウス (成熟嗅細胞のマーカーOMP (olfactory marker protein)に GFP をノックイン) (Potter et al. 2001)
- ・MOR29A/B マウス (2つの嗅覚受容体 MOR29A と MOR29B にそれぞれ CFP と YFP を蛍光標識) (Tsuboi et al. 2011)
- ・Thy1-YFP (僧帽細胞に YFP を蛍光標識)
- ・Thy1-GCaMP6f (僧帽細胞に Ca イオンが取り込まれると GFP が発現)

OMP-GFP のオスと ICD のメスを掛け合わせ、胎仔期に子宮内エレクトロポレーション法を実施した。

子宮内エレクトロポレーション法：僧帽細胞を標識するため胎生 12 日目に 2 μ l のプラスミド(pCAG-tdTomato)を側脳室に注入し、電気刺激を前後方向に与えた。

軸索切断：軸索切断は先行論文(Costanzo, 2000)を参考に行った。生後 8 週から 12 週のマウスにケタミン(80 μ g/g 体重)とキシラジン (7 μ g/g)を腹腔内投与し、前処置としてデキサメサゾン (0.1 μ g/g) とエンロフロキサシン (5 μ g/g)を皮下注射した。歯科用ドリルを用いて、嗅上皮と嗅球直上の鼻骨と前頭骨を削開し、篩板にそって眼科用マイクロメスを用いて、嗅細胞軸索を切断した。軸索切断後は皮膚縫合し、術後 5 日間デキサメサゾンとキシラジンを投与した。右側のみに軸索切断を行い、左を対照とした。

免疫染色：軸索切断後 7 日、14 日、42 日後に嗅球と嗅上皮を取り出した。16 μ m の凍結切片を作製。使用した一次抗体は抗 Neuropilin1 (Nrp1)抗体、抗 Kirrel2 抗体、抗 GFP 抗体。二次抗体には Alexa Fluor 488 と Alexa Fluor 555 を使用した。

透明化と樹状突起のトレーシング：Thy1-YFP および胎生 12 日目に子宮内エレクトロポレーション法を施行され誕生したマウスに対し、生後 8 週～12 週令で軸索切断を行い、14 日、21 日、42 日、84 日後に嗅球を取り出し、SeeDB2G で透明化した。共焦点レーザー顕微鏡(TCS SP8, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)で 3D イメージ画像を作製し、樹状突起を解析した。解析ソフトには Neurolusida (MBF bioscience, Williston, VT)を使用した。

Ca2+イメージング：Thy1-GCaMP6f のオスに軸索切断 42 日後、前頭骨を削開し、観察用の窓を作製した。4 種の匂いを鼻先で嗅がせ、2 光子レーザー顕微鏡(FV1000MPE, Olympus, Japan)、920 nm で励起したレーザーを使用して嗅球の反応を観察した。反応は基本の反応(F_0)に対する匂い負荷後の反応(ΔF)を $\Delta F/F_0$ で換算し、MATLAB (MathWorks, Natick, MA)で解析した。

[結果]

嗅細胞軸索切断後の匂い地図の異常

軸索切断後 14 日目には MOR29B の嗅細胞が存在する嗅上皮背側の嗅細胞が消失しているのを観察したが、42 日後には再生した嗅細胞を認めた。嗅覚受容体の 1 つである MOR29B の糸球体は本来嗅球の外側背側に形成されるが、軸索切断後には嗅球の前方に小さい糸球体様構造物を形成していた。次に発生期に糸球体地図の前後軸を決定する Nrp1 の発現を観察した。Nrp1 が高度に発現している嗅細胞は嗅球の後方に投射する。対照群では嗅球の最外側にある嗅神経層でしか Nrp1 陽性軸索は認められないが、軸索切断側では嗅球の前部の糸球体層に Nrp1 陽性軸索が認められた。

同一の嗅覚受容体を発現する嗅細胞が収斂する機構は保たれている

軸索切断群では糸球体内で Nrp1⁺の嗅細胞軸索と Nrp1⁺の嗅神経細胞がそれぞれ収斂し、糸球体構造物を形成していた。軸索末端の収斂にかかわる Kirrel2 は、対照群では糸球体ごとに Kirrel2 の発現レベルが異なっていたが、軸索切断群では 1 つの糸球体内に Kirrel2 の発現レベルの異なる糸球体様構造物が混在していた。しかし、Kirrel2 の発現レベルの同一な軸索が単一の糸球体様構造物に観察され、嗅細胞の軸索末端が特定の糸球体に収斂する機構は、温存されていると考えられた。

軸索切断後には僧帽細胞の樹状突起との結合性が減少する

僧帽細胞に蛍光標識したマウスを用いて、僧帽細胞の樹状突起と樹状突起末端の tuft 構造を観察した。対照群では 80～90%の僧帽細胞の樹状突起が糸球体内まで伸び、tuft 構造を形成していたが、軸索切断 21 日後では樹状突起の約半数に退縮や細小化がみられ、tuft 構造の形成が不完全であった。樹状突起の退縮や tuft の消失は軸索切断後 84 日経過しても回復がみられず、障害後嗅細胞が再生しても僧帽細胞に十分な匂い情報が伝わらない可能性が示唆された。

嗅球における軸索切断後の匂い応答の変化

Thy1-GCaMP6f マウスの軸索を切断 42 日後に嗅球の前方が反応する匂いであるブチリックアシッド、嗅球の背外側が反応する匂いアセトフェノン、バニリン、グアイヤコールの 4 種類の匂いを嗅がせ、2 光子顕微鏡を用いて嗅球の匂い応答を観察した。対照群では臭い匂いとよい匂いで反応する嗅球の領域が明確に分かれていたが、軸索切断群では区別が明確ではなく、全体的に匂いの応答が弱くなっていた。

[考察]

頭部外傷後の異嗅症については、Costanzo らが軸索切断後に再生した嗅細胞が投射異常を起こす可能性を示唆していたが、糸球体地図との関連性は解明されていなかった。今回我々は再生嗅細胞が嗅球の前方に投射異常を起こすことを分子学的、解剖学的に示した。

嗅球の糸球体地図は匂い情報の正確な伝達に不可欠であり、再生した嗅細胞が異なる匂いに反応する領域に投射異常を起こすということは異嗅症の原因の一つだと考えられる。

嗅細胞障害後の匂い応答の変化は Cheung ら(2014)が報告しているが、僧帽細胞の樹状突起の形態について詳細な報告の文献は渉猟した範囲では存在していない。従来、成熟したマウスの樹状突起の tuft 構造は変化しない(Mizrahi and Katz, 2003)とされていたが、我々の実験により軸索切断によりシナプス結合が形成されず、信号伝達が長期間遮断されると樹状突起が退縮することがあることがわかった。樹状突起の形態の維持には嗅細胞からの信号が必要であることが示唆され、嗅細胞が回復しても僧帽細胞樹状突起の再構築が困難であることが予想された。また、軸索切断後には、糸球体内で Kirrel2 の発現が異なる軸索が混在するという現象が見られ、匂い応答が弱くなる原因と考えられた。

軸索切断と通常のターンオーバーでは嗅細胞の再生過程に時間経過だけでなく、分子学的にも相違性が認められた。我々の観察では軸索切断後に Nrp1⁺軸索が嗅球の前方に投射異常を起こしているのが観察された。Nrp1 と Sema3A の濃度勾配を通して糸球体地図は発生期に形成され(Ma et al. 2014; Tsai and Barnea, 2014)、発生期以降ではターンオーバーで再生した嗅細胞は軸索の相互関係により正しい糸球体へと導かれる (Imai and Sakano, 2011)。軸索切断により広範に嗅細胞が消失すると新旧軸索の相互関係が失われ、また軸索ガイダンス因子が発現していない正しい糸球体へと投射できなくなり、これが異嗅症の発症機序ではないかと考えられた。

[結論]

異嗅症の機序を解明するため、嗅細胞の軸索を切断し嗅覚系の再生を観察した。軸索切断後には嗅細胞は再生したが、再生軸索の嗅球における前後軸の投射異常と対となる僧帽細胞の樹状突起の形態的变化が観察され、頭部外傷後の異嗅症との関連が示唆された。異嗅症の治療戦略として機能回復を念頭においた新生する嗅細胞の回復だけでなく機能の回復するための研究がのぞまれている。