



Bone Marrow Stem Cell Transplantation to Olfactory Epithelium

越智, 尚樹

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5383

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005383>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Bone Marrow Stem Cell Transplantation to Olfactory Epithelium

嗅上皮への骨髄幹細胞移植

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻

耳鼻咽喉科頭頸部外科学

(指導教員：丹生 健一 教授)

越智 尚樹

はじめに

哺乳類の嗅覚受容器である嗅上皮は、上鼻甲介と鼻中隔に挟まれた嗅裂に存在し、GAP43 陽性の基底細胞より成る下層、OMP 陽性の成熟嗅神経細胞より成る中間層、支持細胞より成る上層の三層に大別される。嗅神経細胞は双極性神経細胞で、樹状突起は嗅上皮表層へ向かい、軸索は粘膜下層を嗅糸を形成して走行し、篩板を通過して嗅球へ向かう。樹状突起の先端にある嗅毛に嗅覚受容器が存在し、ここからのシグナルは軸索を通過して嗅覚の一次中枢である嗅球へ投射される。

嗅神経細胞は、他の神経細胞と異なり生涯再生するという特殊な能力を有しているが、感染や炎症、喫煙などの様々な障害因子により嗅覚は加齢とともに低下する。嗅覚障害の治療につながる可能性のある、嗅神経細胞に作用する様々な成長因子やアポトーシス抑制因子が報告されているものの臨床応用されておらず、現在ステロイド投与が嗅覚障害の唯一の治療法である。

Tsujigiwa らは、骨髄移植を行ったマウスの大腿骨に移植細胞が生着し、その後血行性に嗅上皮へ移行、生着して嗅神経細胞に分化したと報告したが、その生着率は臨床応用するには低過ぎる物であった。この報告を元に、我々は骨髄細胞ではなく神経細胞に分化する能力を持つマウス骨髄幹細胞 (NRG) を全身投与群、鼻腔局所投与群に分けて移植し、各群の嗅上皮への生着率を比較検討した。嗅球除去により嗅上皮を変性させ、上皮が再生し始める 1 週後に移植する事で生着率が上昇するか否かも検討した。

方法

次の 5 グループに分類した生後 6 週のオスのヌードマウス (Balb/C AJcl-nu/nu) に、核を BrdU でラベルした NRG を移植した。全身投与群は尾静脈より 1×10^7 個の NRG を静注し、局所投与群は両側鼻中隔粘膜下に 2.5×10^7 個ずつ合計 5×10^7 個の NRG を注入した。嗅球除去したグループは、嗅上皮が変性し萎縮する除去後 1 週に移植した。

グループ 1：嗅球除去、局所投与 (n=14)

グループ 2：嗅球除去、全身投与 (n=14)

グループ 3：嗅球温存、局所投与 (n=14)

グループ 4：嗅球温存、全身投与 (n=14)

グループ 5：左側のみ嗅球除去、全身投与 (n=8)

グループ 1、2、3、4 においては、移植後 1、2、3、4、5、6、7 週に 2 匹ずつ安楽死させ、冠状断の嗅上皮標本作製した。グループ 5 においては、嗅上皮の再生が完了する嗅球除去後 4 週 (移植後 3 週) で全て安楽死させ、同様の嗅上皮標本作製した。抗 BrdU 抗体による免疫染色にて移植細胞を同定し、抗 GAP43 抗体および抗 OMP 抗体による免疫染色にて移植細胞の分化度を評価した。

細胞数のカウントは、光学顕微鏡下 200 倍の視野で行った。生着率は、各マウス無作為に抽出した 4 視野中の BrdU 陽性細胞数および全ての細胞数をカウントして算出した。統計学的分析にはスチューデント t 検定を使用し、p 値 0.05 未満で有意差ありと判断した。

結果

嗅球を除去したグループ1およびグループ2において、移植後1週では基底細胞直上のみ BrdU 陽性細胞が見られたが、移植後3週では中間層にも見られるようになり、移植後5週以降では上層にも見られるようになった。一方で、嗅球を温存したグループ3および4においては移植後1週より全ての層で BrdU 陽性細胞が見られている。

嗅球除去により嗅上皮は変性し萎縮するが、萎縮が見られる移植後1週から3週において4視野中の BrdU 陽性細胞数は、嗅球温存群に比し嗅球除去群が有意に多かった(グループ1>グループ3、グループ2>グループ4)。嗅上皮の再生が完了する移植後4週以降では有意差は見られなかった。全身投与群(グループ2、グループ4)では観察期間中 BrdU 陽性細胞数が有意に増え続けていたのに対し、局所投与群(グループ1、グループ3)では有意差は無く横ばいであった。統計学的有意差は見られなかったものの、移植後1週から3週においては局所投与群(グループ1、グループ3)が、移植後4週以降は全身投与群(グループ2、グループ4)が BrdU 陽性細胞数が多い傾向にあった。

嗅球除去による嗅上皮変性が生着率に影響を与えるか否かを評価する為、左の嗅球のみを除去した群(グループ5)を作成し、嗅球除去後1週で全身投与によるNRG移植を行った。嗅上皮が再生する移植後3週で、無作為に抽出した各マウス4視野の合計で左右のBrdU陽性細胞数を比較したところ、有意に左側(嗅球除去側)が右側(コントロール側)よりも多かった。

生着細胞の分化度を評価する為、抗GAP43抗体および抗OMP抗体による2重免疫染色を行った。BrdU陽性細胞は、下層に見られるもののみならず中間層、上層に見られるものにおいてもGAP43陽性であり、OMPは陰性であった。

考察

骨髄幹細胞移植は患者自身の骨髄から採取し施行出来るため、臍帯血幹細胞移植に見られる拒絶反応も無く、i-PS細胞移植で行われるウイルス感染や遺伝子操作を必要としないため、最も安全な再生医療資源と言える。その為様々な施設で骨髄移植や骨髄幹細胞移植による再生医療の研究が行われており、血液細胞や肝細胞、心筋細胞などに分化したとの報告がある。Tsuji-giwaらは、放射線照射により骨髄抑制したマウスにGFPマウスから経尾静脈的に骨髄移植を行い(骨髄細胞 5×10^6 個)、移植後4週で骨髄がGFP陽性細胞にて再構築され、移植後6週で嗅上皮に生着し(生着率0.07%)、移植後1年で生着率は最高の0.15%に達し、生着した細胞は成熟嗅神経細胞に分化したと報告した。

この報告を元に、我々は更なる生着率の向上を目指し、骨髄移植ではなく神経細胞への分化能を持つ骨髄幹細胞のみを高濃度で移植した。前報告と同じ条件である嗅球温存、全身投与群(グループ4)の移植後6週の生着率は1.38%で、前報告よりおよそ20倍高い値となった。さらに、嗅上皮への生着が最初に確認されたのは移植後1週であり、前報告の6週よりかなり早期であった。これらの結果は、神経細胞への分化能を持つ幹細胞を使用し、骨髄細胞ではなく幹細胞のみを移植した事、移植した幹細胞数が多かった事が奏功

したものと考えられた。また、嗅球除去により変性した嗅上皮への生着細胞数が有意に多かったことから、障害された嗅上皮の再生に骨髄幹細胞移植が有効である事が示唆された。

移植後1週から3週までは局所投与群の生着率が全身投与群より高い傾向にあるが、移植後4週以降では逆転している事より、全身投与では当初血行性に一部が嗅上皮へ生着し、移植後4週で骨髄に生着した幹細胞が新たに血中へ安定的に幹細胞を供給し始めるものと考えられる。長期的には全身投与の方が生着率が高くなると予想されるが、他臓器への影響が心配される。一方、局所投与は内視鏡下に安全に行う事が出来、他臓器へ影響を与えるリスクも低いと思われる。観察期間中、投与方法による生着率の有意差は無く、局所投与も十分有効な手段と言える。

免疫染色の結果、GAP43は陽性であったがOMPは陰性であり、未熟な嗅神経細胞までは分化したものの、残念ながら成熟した嗅神経細胞までは分化していなかった事が判明した。この原因は不明であるが、昨今基底細胞から成熟嗅神経細胞に分化誘導する成長因子や神経系分化誘導因子が多数報告されており、これらを組み合わせて移植する事で解決出来る可能性がある。

結論

今回の研究で嗅上皮に生着した細胞は、未熟な嗅神経細胞までは分化したものの、成熟嗅神経細胞までは分化しなかった。様々な成長因子や神経系分化誘導因子を組み合わせて移植する事で、嗅覚障害の新しい治療が確立されるであろう。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2215号	氏 名	越 智 尚 樹
論文題目 Title of Dissertation	Bone Marrow Stem Cell Transplantation to Olfactory Epithelium 嗅上皮への骨髄幹細胞移植		
審査委員 Examiner	主 査 古 森 孝 英 Chief Examiner 副 査 根 本 昭 Vice-examiner 副 査 甲 村 英 二 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

はじめに

哺乳類の嗅覚受容器である嗅上皮は、GAP43陽性の基底細胞より成る下層、OMP 陽性の成熟嗅神経細胞より成る中間層、支持細胞より成る上層の三層に大別され、嗅神経細胞は、他の神経細胞と異なり生涯再生するという特殊な能力を有しているが、感染や炎症、喫煙などの様々な障害因子により嗅覚は加齢とともに低下するとされている。

Tsujigiwa らは、骨髄移植を行ったマウスの大腿骨に移植細胞が生着し、その後血行性に嗅上皮へ移行、生着して嗅神経細胞に分化したと報告したが、この報告を元に、申請者らは骨髄細胞ではなく神経細胞に分化する能力を持つマウス骨髄幹細胞（NRG）を全身投与群、鼻腔局所投与群に分けて移植し、各群の嗅上皮への生着率を比較検討した。また、嗅球除去により嗅上皮を変性させ、上皮が再生し始める1週後に移植する事で生着率が上昇するか否かも検討した。

方法

次の5グループに分類した生後6週のマウス（Balb/c AJcl-nu/nu）に、核をBrdU でラベルしたNRG を移植した。全身投与群は尾静脈より 1×10^7 個のNRG を静注し、局所投与群は両側鼻中隔粘膜下に 2.5×10^7 個ずつ合計 5×10^7 個のNRG を注入した。嗅球除去したグループは、嗅上皮が変性し萎縮する除去後1週に移植した。

グループ1：嗅球除去、局所投与（n=14） グループ2：嗅球除去、全身投与（n=14）

グループ3：嗅球温存、局所投与（n=14） グループ4：嗅球温存、全身投与（n=14）

グループ5：左側のみ嗅球除去、全身投与（n=8）

グループ1、2、3、4 においては、移植後1、2、3、4、5、6、7週に2匹ずつ安楽死させ、冠状断の嗅上皮標本を作製した。グループ5 においては、嗅上皮の再生が完了する嗅球除去後4週（移植後3週）で全て安楽死させ、同様の嗅上皮標本を作製した。また、抗BrdU抗体による免疫染色にて移植細胞を同定し、抗GAP43 抗体および抗OMP 抗体による免疫染色にて移植細胞の分化度を評価した。

結果

嗅球除去群において、移植後1週では基底細胞直上のみBrdU 陽性細胞が見られたが、移植後3週では中間層にも見られるようになり、移植後5週以降では上層にも見られるようになった。一方、嗅球温存群においては移植後1週より全ての層でBrdU 陽性細胞が見られた。

また、嗅球除去により嗅上皮は変性し萎縮するが、萎縮が見られる移植後1週から3週において、嗅球温存群に比し嗅球除去群の方が有意に細胞数が多かった。嗅上皮の再生が完了する移植後4週以降では有意差は見られなかった。全身投与群では観察期間中BrdU 陽性細胞数が有意に増え続けていたのに対し、局所投与群では有意差は無く横ばいであった。統計学的有意差は見られなかったものの、移植後1週から3週においては局所投与群が、移植後4週以降は全身投与群がBrdU 陽性細胞数が多い傾向にあった。

嗅球除去による嗅上皮変性が生着率に影響を与えるか否かを評価する為に、左の嗅球の

みを除去した群では、嗅上皮が再生する移植後3週で、左右のBrdU陽性細胞数を比較したところ、有意に左側（嗅球除去側）が右側（コントロール側）よりも多かった。

生着細胞の分化度を評価する為に、抗GAP43 抗体および抗OMP 抗体による2重免疫染色を行った結果は、BrdU 陽性細胞は、下層に見られるもののみならず中間層、上層に見られるものにおいてもGAP43 陽性であり、OMP は陰性であった。

考察

本研究では、Tsuji-giwaらの研究に比べて早期生着と生着率の上昇を認めたが、この理由としては、神経細胞への分化能を持つ幹細胞を使用した事、骨髓細胞ではなく幹細胞のみを移植した事、移植した幹細胞数が多かった事が奏功したものと考えられた。

また、嗅球除去により変性した嗅上皮への生着細胞数が有意に多かった事から、障害された嗅上皮の再生に骨髓幹細胞移植が有効である事が示唆された。

投与方法では、生着率の有意差がなかったことから、鼻腔局所投与は、尾静脈全身投与と同等に有効な投与方法と考えられ、他臓器に与えるリスクも低いことから、局所投与による自家移植で、より安全な臨床応用が可能となると考えられた。

免疫染色の結果、GAP43 は陽性であったがOMP は陰性であり、未熟な嗅神経細胞までは分化したものの、残念ながら成熟した嗅神経細胞までは分化していなかった事が判明したが、昨今基底細胞から成熟嗅神経細胞に分化誘導する成長因子や神経系分化誘導因子が多数報告されており、これらを組み合わせて移植する事で解決出来る可能性があると考えられた。

本研究は、嗅覚障害の治療法について、骨髓幹細胞移植の可能性を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった移植細胞の生着率や分化について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。