

鋤鼻神経細胞の発生と再生

Development and Regeneration of the Vomeronasal Chemosensory Neurons

代表研究者 東京工業大学生命理工学部生体機構学科助手 長田俊哉

Department of Biological Sciences, Faculty of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology
Toshiya OSADA

The vomeronasal system plays an important role in various behaviors mediated by conspecific chemical signals. Chemosensory neurons in the vomeronasal epithelium are bipolar. They detect chemical signals in the external environment and send sensory information to the AOB. Chemosensory neurons in the vomeronasal organ as well as those in the olfactory epithelium are unique in that they undergo continuous neurogenesis and replacement throughout the life span of the animal. Neurogenesis also occurs following injury and neuronal degeneration in the sensory epithelium. Newly generated neurons have the capacity to develop axon processes that reestablish connections with the olfactory bulb. We have developed culture system where we can observe neurogenesis and replacement of the vomeronasal neurons.

研究目的

鋤鼻系は嗅覚系とともに、神経発生の研究モデルとして注目されている。鋤鼻神経細胞は外界と直に接している細胞なので、有害物質などによって損傷も受けやすい。このため成体になった後も、前駆細胞から神経細胞に分化し置き換わっていく能力が備わっていると考えられている。新しく置き換わった神経細胞は、上皮表面に外

界に接する感覚性の樹上突起をのばす。さらに、嗅覚系による研究では、神経細胞が軸索を再びターゲットである主嗅球に投射することによる機能的な回復もみられる。同じ匂いレセプターを発現している神経細胞は、嗅球の同じ糸球体に投射すると考えられており、この実験系は軸索ガイダンスの機構解明にも重要である。生理的な条件でも上皮では神経発生がおこ

なわれているが、より明確な神経発生を観察するために嗅細胞の標的である嗅球を取り除いてしまったり (bulbectomy)、嗅細胞からの軸索を切断する (axotomy) 外科的処理を行う方法がある。鋤鼻器官も嗅上皮も左右一対あるので、片側を外科的に処理し、もう片方をコントロールとして実験ができるという利点がある。嗅上皮での再生実験によると、外科的処理をしてから4、5日目にほとんどの神経細胞が死滅した後、7から10日目に新生した神経細胞の劇的増加がみられる。嗅神経細胞の主嗅球への投射は術後10日前後から始まる。20日から25日前後で、ほぼ主嗅球への投射が完了し、この時期は行動学的研究による機能的回復時期とよく対応している。これらの研究は、脳障害や脳手術後の嗅覚機能回復のための臨床学的な視点で行われており、さらに再生しない神経細胞の代わりに嗅神経細胞の移植を考えるなど、嗅覚系以外の臨床学的研究にもつながるものと期待されている。さらに基礎的研究として、鋤鼻神経細胞の変成や再生を生きのまま直接観察するために、これらを培養系で再現できるような方法が必要である。軸索束の変成や再生をきちんと培養系で制御できるようになれば、鋤鼻系にとどまらず、神経系の研究に大きく寄与できるものと期待される。

研究経過

鋤鼻上皮は、支持細胞、神経細胞とその前駆細胞の3種類の細胞群からなる。成体では、支持細胞と神経細胞は独立に制御されていると考えるのが今のところ一般的になっている。発生の初期の段階で、鋤鼻上皮上に支持細胞と神経細胞の共通の幹細胞が存在するのか、またあるならどの段階まで存在しているのかなどは、全くわかっていない。形態学的に支持細胞、神経細胞は、ラットでは胎生15日ではすでにはっきり区別ができる。成体でも神経細胞の再生が行われることから、その前駆細胞は存在しているはずだが、詳細な分布などについてもまだよくわかっていない。鋤鼻上皮は生まれてから約1月で成体と同じ形態をとり発生が一段落つく。鋤鼻上皮の神経細胞や支持細胞は嗅上皮のそれらとかなり似た形態を示すが実際いろいろ調べてみるとかなり違いがあることがわかった。

鋤鼻神経細胞は動物の一生涯にわたり神経発生がおこなわれ新しい神経細胞に置き換わっていく。再生中の鋤鼻上皮は大きく分けて3つのステージに分けることができる。最初のステージでは、軸索を切断された鋤鼻神経細胞が逆行性に細胞死をおこす。次は前駆細胞が増殖して上皮上の細胞数が増え上皮の厚さも回復してくるステージである。これ以降の段階は細胞数や上皮の厚さはほぼ一定のま

ま、神経細胞の成熟が行われる。鋤鼻神経細胞の数を定量的に調べてみると、再生のパターンは、嗅上皮の場合とよくにている。どちらも、6日前後で細胞数が激減し、上皮の厚さも薄くなる。その後細胞数が回復していくが、もとの上皮の厚さには戻らない。これは急激な細胞数の激減により、上皮が収縮してしまいもとの厚さには戻れなくなったものと推察される。軸索切断後6日目以降上皮の厚さはほぼ一定であった。

鋤鼻上皮を酵素処理して小さな塊にして培養すると、上皮の両端が融合した中心に上皮表面があるドーナツ上の細胞塊が形成される。同様の細胞塊は嗅上皮の培養でも報告されており、マイクロノーズと呼ばれている。鋤鼻上皮のマイクロノーズからは軸索が伸びてきて、培養後数日以内に一つのマイクロノーズから何本もの軸索束が観察された。軸索束の表面にはオルファクトリーシュワンセル様の細胞が表面を覆っていた。軸索束がある程度の長さになると、伸展をやめ、マイクロノーズは安定状態になる。培養後10日から2週間立つと、軸索束に変成が起こり、マイクロノーズから脱落した。その後4、5日立つと再びマイクロノーズから軸索束が形成された。そして、マイクロノーズは軸索束の変成と再生を数カ月にわたり繰り返した。さらに安定期にあるマイクロノーズの軸索束を全て切断すると、数日後

に新しく再生した軸索束が観察された。

研究成果

鋤鼻上皮でおこっている軸索の変成及び再生を培養系で再現することに成功した。さらに、軸索切断後に見られる軸索再生も培養系で、再現することができた。マイクロノーズを電子顕微鏡で観察すると、支持細胞、神経細胞があり、感覚性の鋤鼻上皮と考えると問題ないと思われる。マイクロノーズの神経細胞はほとんど全て、未成熟な形態をとっており、成熟した神経細胞が見られない。これは、成熟を誘導する因子がなく、未成熟のまま細胞死をおこし、次々に神経細胞が幹細胞より分化しているものと考えられる。ただ、電顕による観察では、分裂細胞の数は予想していた数に比べかなり少ないので、もしかすると、未成熟な神経細胞の軸索が本来のターゲットのない培養系では、成熟できず、軸索を変成させて、新たな軸索を伸ばしている可能性も否定できない。いずれにしろ、今回開発した培養系を使えば、鋤鼻神経の神経発生のかなりの部分が解明されるものと期待される。

今後の課題と発展

マイクロノーズ培養法により、鋤鼻上皮の形態を保持したまま培養系での観察ができるようになった。研究当初は、細胞をバラバラにして培養

を試みたが、細胞密度が低いと培養が上手く行かず、密度が高いと塊を作ってしまうので、ある程度の塊のまま繊維芽細胞をフィーダーレイヤーとして用いることにより培養に成功した。今後は、マイクロノーズ培養法を使って、幹細胞の増殖因子、神経細胞への

分化因子を調べたい。さらに嗅球由来の鋤鼻神経細胞成熟誘導因子の単離も試みたい。また培養系で軸索束の變成がどのようにしておこるのか、再生はどのようにして制御されているのか是非調べてみたい。

発表論文リスト

- 1) Toshiya Osada, Hideo Arakawa, Masumi Ichikawa, and Atsushi Ikai (1997) Atomic force microscopy of histological sections using a new electron beam etching method. *J. Microsc.* (in press)
- 2) 長田俊哉、猪飼篤(1996)： 鋤鼻嗅覚神経細胞の発生と再生。蛋白質核酸酵素(特集 鋤鼻嗅覚神経系、長田俊哉 編) 41, 2070-2076
- 3) M. Ishii, T. Osada, J. Gliemann, and A. Ikai (1996) Neurite-promoting effect of α 2-macroglobulin in rat cerebral cortex is mainly associated with α 2-macroglobulin receptor. *Brain Research* 737, 269-274.
- 4) M. Ichikawa and T. Osada (1995) Morphology of vomeronasal organ cultures from fetal rat. *Anat. Embryol.* 191, 25-32.
- 5) J. Yoshida, T. Osada, Y. Mori, and M. Ichikawa (1995) Differential binding patterns of three antibodies (VOBM1, VOBM2, and VOM2) in the rat vomeronasal organ and accessory olfactory bulb. *Cell and Tissue Research* 281, 243-248.
- 6) T. Osada, M. Ichikawa, and R. M. Costanzo (1995) Is nestin a marker for chemosensory precursor cells? *Brain Research*. 683, 254-257.
- 7) M. Ichikawa, T. Osada (1995) Coculture of the vomeronasal organ. *Anat. Embryol.* 192, 415-424.