

	ひぐち	ゆたか
氏名	樋口	豊
学位	博士	(医学)
学位記番号	新大博(医)第1685号	
学位授与の日付	平成17年 9月20日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
博士論文名	The dynamics of precursor cells in the olfactory epithelium of juvenile and adult guinea pigs (モルモット嗅上皮内嗅細胞前駆細胞の分化に関する研究—幼若期と成熟期の比較)	
論文審査委員	主査 教授	牛木辰男
	副査 教授	高橋 姿
	副査 教授	車田正男

#### 博士論文の要旨

##### (目的)

脊椎動物の嗅上皮では正常状態においても嗅細胞はターンオーバーを行うことが知られている。嗅細胞の再生母細胞である嗅細胞前駆細胞は基底細胞であるといわれていたが、分裂細胞を標識する bromodeoxyuridine (BrdU) を用いた免疫組織化学的研究から嗅細胞前駆細胞は基底細胞直上に存在する細胞であることがわかっている。この嗅上皮における嗅細胞前駆細胞は個体の成長とともに減少するが、嗅細胞数自体は加齢による大きな変化がみられない。

本実験は嗅上皮内嗅細胞前駆細胞の経時的動態を幼若期と成熟期のモルモットを用いて比較し、また細胞のターンオーバーに深く関与すると考えられているアポトーシスについても観察を行い、嗅細胞前駆細胞の動態について検討した。

##### (対象と方法)

実験には幼若期群として生後約 2 週齢のモルモットを、成熟期群として生後約 6 カ月のモルモットを使用した。それぞれに BrdU を投与し、1 時間後から以後 1、5、7、14、21、28 日後に嗅上皮を採取した (n=3)。第二段階として未熟な神経細胞から成熟神経細胞に発現するとされる神経細胞マーカーである neural cell adhesion molecule (N-CAM) と成熟神経細胞のマーカー蛋白である protein gene product 9.5 (PGP9.5) を用いて免疫組織化学的二重染色を行い前駆細胞から成熟嗅細胞への分化の過程において加齢による差異があるかを検討した。また、嗅細胞の細胞死に関与すると考えられるアポトーシスについて TUNEL 法にてアポトーシス細胞を同定し、両群の嗅上皮内でその局在、数に差異があるかを観察した。

##### (結果)

幼若期群 : BrdU 標識細胞は投与 1 時間後では基底細胞直上に位置し、投与 1 日後か

ら増加する傾向がみられ、中間層に移動し N-CAM の発現も観察された。5 から 7 日後になると、基底層側から上皮層側まで広く散見され、更に PGP9.5 の発現もみられた。投与 14 日以降、標識細胞は減少し 28 日後においても基底細胞直上に留まる標識細胞もみられたが N-CAM、PGP9.5 とともに発現はみられなかった。

成熟期群：幼若期と同様に BrdU 標識細胞は投与 1 時間後では基底細胞直上にみられたが、1 日後においても中間層への移動は観察されず、標識細胞数も幼若期に比し少なく、N-CAM の発現もみられなかった。投与 5 日目を以降から、標識細胞は嗅細胞層下層に移動し始め N-CAM の発現も観察され、7 日目を以降には中間層に存在する標識細胞に PGP9.5 の発現もみられた。

両群での BrdU に標識された分裂細胞の推移をまとめると、投与 5 日目と 14 日目を以外、全経過を通して幼若期群において成熟期群より分裂細胞数が有意に多かった。またそれぞれの平均をみると幼若期では 1 日目、成熟期では 5 日目に分裂細胞数のピークがみられるが幼若期では 1 時間から 7 日後、成熟期では 1 時間から 21 日後の間に統計学的有意差はみられなかった。投与 28 日後において、成熟期嗅上皮には BrdU 標識細胞はほとんど観察されなかったのに対し、幼若期嗅上皮においては  $4.73 \pm 2.10$  個（視野：平均±標準偏差）認められた。

アポトーシス細胞の観察：嗅上皮において幼若期群、成熟期群ともに TUNEL 陽性細胞は 200 倍下の 1 視野に 2~3 個みられた。その局在についても基底層直上、中間層、表層に散在して認められ、特に一定の傾向は認めず両群でアポトーシス細胞の局在、数には差異はなかった。

#### （考察）

幼若期群において BrdU 標識細胞数は全経過を通して成熟期群より多い傾向にあり、投与直後から 7 日後までの間、標識細胞数の有意な増減が認められないことより、幼若期では幹細胞から分裂した娘細胞が嗅細胞層に移動を開始する時間は成熟期より早い、そのまま成熟嗅細胞にまで分化しない、もしくは幹細胞の状態のまま留まるものが成熟期に比べ多く、両者における分化過程に何らかの差異があること、未熟嗅細胞の時点における細胞死の存在も示唆された。

今回の実験では正常状態の成熟期と幼若期のモルモット嗅上皮を用い、TUNEL 法にてアポトーシス細胞の観察を行なったが、両群において TUNEL 陽性細胞数およびその分布ともに差異は見られなかった。

以上より幼若期、成熟期ともに嗅上皮において TUNEL 陽性細胞の存在は確認できたが、分裂活性が高く、分化の速度が早い幼若期においてもその数は少なく、嗅細胞のターンオーバーに果たすアポトーシスの果たす役割は少なくとも正常状態においては大きなものではないと考えられた。

以上より、幼若期では幹細胞からの分裂、分化速度が早い傾向がある一方、その後の過程においてはアポトーシスだけでは説明できない恒常性の維持機構の存在が推察された。

### 論文審査の要旨

脊椎動物の嗅上皮では正常状態でも嗅細胞の更新が行われることが知られている。また、最近はこの嗅細胞の前駆細胞が基底細胞の直上に存在することも明らかになっている。本研究では、幼若期（生後約2週齢）と成熟期（生後約6ヶ月）のモルモットに対し、bromodeoxyuridine (BrdU) を投与して嗅細胞前駆細胞を標識し、一方でTUNEL ((Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) 法でアポトーシス細胞を同定し、両者を比較した。その結果、BrdU 標識細胞は幼若期群では多いのに対して、アポトーシス細胞については幼若期群と成熟期群で差がないことが明らかになった。この結果は、幼若期では幹細胞からの分裂・分化が盛んであること、しかし細胞死を起こす嗅細胞の数はどちらも変わらないことを示している。また、幼若期においては、BrdU 標識細胞が完全に分化する前に数を減らす傾向にあり、嗅細胞が成熟前に細胞死を起こす可能性を示すものである。以上の所見は本研究で初めて明らかにされたもので、その解釈は難しいものの、今後の嗅上皮再生の研究に新たな視点を投げかけたことは意義深い。その点で本論文に学位論文としての価値を認める。