Cigarette Smoke-induced Cell Death Causes Persistent Olfactory Dysfunction in Aged Mice

タバコ煙による細胞死誘導により、 加齢マウスでの嗅覚障害が持続する

Rumi Ueha, Kenji Kondo, Shu Kikuta, Tatsuya Yamasoba

Department of Otolaryngology, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

上羽 瑠美, 近藤 健二, 菊田 周, 山嵜 達也

東京大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

1. はじめに

喫煙による嗅覚障害のメカニズムとし、我々はこれまでにタバコ煙溶液 (cigarette smoke solution: CSS) 投与により嗅上皮のSOX2⁺ 嗅覚前駆細胞を障害し、OMP⁺ 成熟嗅神経細胞 (ORNs) の低下と嗅覚障害が生じることを示し、炎症性サイトカインのIL-1 β とIL-6が関与していることを明らかにした¹⁾(図1)。さらに、MET (メチマゾール) による嗅上皮障害モデルを用いて、CSS投与により嗅上皮再生が遅延すること、そしてその機序として、嗅覚前駆細胞の分裂・分化過程を障害することによる成熟ORNsへの分化抑制とInsulin-like growth factor-1 (IGF-1) の低下を明らかにしてきた²⁾(図2)。

本研究では、加齢嗅神経上皮におけるタバコ煙の影響を検証することを目的とし、高炎症状態である「加齢」

マウス³⁾を用いて、嗅細胞系への加齢による影響を組織学的解析および遺伝子解析を行うことで、嗅覚障害の背景に迫った。さらに加齢と喫煙に伴う嗅覚障害の背景にある分子機構を検証した⁴⁾。

2. 方法

C57BL/6マウス (60週齢) にCSSを点鼻吸入させ、喫煙モデルを作製した。対照群には生食を点鼻投与した。CSS最終投与日をDay 0とし、Day 1, 7, 14, 28に成熟ORNs, 嗅覚前駆細胞, 未熟ORNs, 分裂細胞, アポトーシス細胞の細胞数と、抽出した鼻粘膜mRNA中の炎症性サイトカイン (Il1b, Tnf, Il6) を対照群と定量比較した。さらに、Day 7, 14, 28に嗅覚行動実験にて匂い物質への反応時間を計測した。

図1 CSSによる嗅神経上皮障害の機序

図2 MET障害モデルを用いたCSSによる嗅神経上皮障害再生後遅延の機序

図3 A, B. 加齢マウスにおけるCSS投与後の成熟ORNs数の推移, C. 匂い刺激に対する反応

3. 結果

- ① 加齢モデルではCSS投与により成熟ORNs数が減少し、投与中止後も減少傾向が続く
OMP⁺成熟嗅細胞数は、対照群と比較してDay 1で有意に低下し、その後もDay 28までに緩徐に減少した（図3-A, B）。
- ② 加齢群ではCSS投与による嗅覚障害が投与終了後も持続する
CSS最終投与後Day 1, 7, 14, 28に施行した行動実験では、どのポイントでも匂い刺激に反応しなかった（図3-C）。
- ③ CSS最終投与後のアポトーシス亢進が加齢モデル

CSS投与後嗅神経上皮再生を障害する

CSS最終投与後1日目に基底層の細胞分裂（Ki67⁺）が増加したが、7日目にはSOX2⁺嗅覚前駆細胞、Ki67⁺分裂細胞、Cas3⁺アポトーシス細胞がともに増加した。14日目ではSOX2⁺嗅覚前駆細胞、Ki67⁺分裂細胞は対照群と差がなくなったが、アポトーシス細胞は増加傾向が続いていた。CSS投与後のアポトーシス増加が成熟ORNs数の減少に関与すると考えられた。

- ④ 高炎症状態の加齢モデルにおいて炎症性サイトカインの増加は限定的である

*Tnfr*はCSS投与後Day 1, 7で有意に上昇した一方で、*Il1b*はもともとの高炎症状態を維持し、*Il6*はCSS投与後からDay 28まで有意に低下していた（図4）。

図4 鼻粘膜中の炎症性サイトカインの推移

図5 加齢マウスにおけるCSS投与後のONRs数バランス

4. 考察・まとめ

本研究で、タバコ煙曝露は加齢マウスの嗅神経細胞の細胞死を亢進させることで嗅神経細胞数が減少させ、嗅覚障害遷延化に繋がることを示した。つまり、タバコ煙長期間暴露による細胞死の亢進は、嗅神経細胞の高い再生能を凌駕することを示唆しており（図5）、その効果はタバコ煙曝露後28日でも持続することが判明した。細胞死の誘導には炎症性サイトカインが一役を担っているとされ、本研究でもCSS投与後の*Tnf*の上昇を認めた。*Tnf*は嗅神経前駆細胞や嗅神経上皮の恒常的な再生を抑制することから、CSS投与後の嗅神経上皮再生遅延も説明可能である。しかしながら、*Il6*はCSS投与後から著明に発現低下していた。*Il6*に関してはアポトーシスを抑制して細胞増加を誘導し組織保護の機能を有するという説から、障害後の組織再生を抑制するという説など、様々な役割を担っていると想定されることを考慮すると、CSS投与後嗅神経上皮においては、組織保護的な役割を有する可能性が考えられた。

本研究では、タバコ煙誘導性の嗅覚障害に関する機序の一部を解明し、*Tnf*抑制や細胞死の抑制が治療のターゲットである可能性を明らかにした。嗅覚刺激は嗅神経上皮から嗅球、大脳皮質へ投射されることから、CSSによる嗅覚への影響に関して、嗅神経上皮のみならず嗅覚中枢への影響に関する検証も必要である。

本稿はFrontia in Aging Neuroscience (<https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00183>)に掲載されている内容を要約して記載した。

参考文献

- 1) Ueha R, Ueha S, Kondo K, et al : Damage to olfactory progenitor cells is involved in cigarette smoke-induced olfactory dysfunction in mice. *Am J Pathol* 2016 ; 186 : 579-586.
- 2) Ueha R, Ueha S, Sakamoto T, et al : Cigarette smoke delays regeneration of the olfactory epithelium in mice. *Neurotox Res* 2016 ; 30 : 213-224.

- 3) Ueha R, Shichino S, Ueha S, et al : Reduction of proliferating olfactory cells and low expression of extracellular matrix genes are hallmarks of the aged olfactory mucosa. *Front Aging Neurosci* 2018. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00086>.
- 4) Ueha R, Ueha S, Kondo K, et al : Cigarette smoke-induced cell death causes persistent olfactory dysfunction in aged mice. *Front Aging Neurosci* 2018. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00183>.