

平成21年 4月20日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18799002

研究課題名（和文） 加齢変化が嗅上皮の構造、細胞動態及び傷害後の再生能に及ぼす影響の分子生物学的解析

研究課題名（英文） An analysis of age-related changes in the structure, cell dynamics and neuroepithelial regeneration of olfactory mucosa

研究代表者

近藤 健二（KONDO KENJI）

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 40334370

研究成果の概要：

マウス嗅上皮における変性部位の割合は加齢に伴って増加し、また高度変性部位の割合も増加した。また上皮下の Bowman 腺の形態異常も加齢に従って増加し、特に嗅上皮の変性部位の上皮下に高頻度で認められた。生理的加齢に伴って基底細胞の増殖と嗅上皮のアポトーシスの頻度はともに減少したが、前駆細胞から成熟嗅神経細胞に分化するまでの時間経過はほぼ一定であった。さらに嗅上皮傷害モデルマウスの解析では嗅上皮の再生能力が加齢変化とともに低下し、これは細胞の分化過程の遅延ではなく前駆細胞の増殖能の低下による可能性が高いと考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	300,000	3,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：嗅神経細胞、加齢変化、再生

1. 研究開始当初の背景

嗅上皮の不可逆的な傷害によると思われる難治性の嗅覚障害例は臨床統計上ほとんどが中～高年層であることから、加齢変化は嗅覚障害の成因に関わる大きな要素であると考えられている。これらの中には明らかな誘因のないケースも多く、これは嗅上皮の機能低下が生理的加齢変化で生じるいわゆる老年性退行変性であることを示唆しているが、一方幅広い年齢層で生じるはずの感冒後の嗅覚障害が実際には中～高年層に集中していることから、加齢は嗅神経細

胞の傷害因子に対する抵抗性や嗅上皮の支持組織による神経細胞の保護機能、さらに傷害後の再生能にも影響を及ぼしていることが推測される。従って老化と関連したヒトの嗅覚障害の病態生理的理解、及びこれに対する効果的な治療法の開発のためには、老化した嗅上皮組織が生理的条件のみならず様々な病的条件下でとり得る細胞動態、およびその背後にあるメカニズムを詳細に検討することが必要不可欠であるが、これらの機構に関する分子レベルでの解明はほとんど進んでいない。

2. 研究の目的

この点に鑑み、本研究では(1)生理的加齢変化による嗅上皮の変化を形態学的、及び細胞動態の面から明らかにするとともに、(2)嗅上皮の傷害因子に対する反応性に加齢が及ぼす影響を検討し、また(3)嗅上皮の老化関連病態の発症機構を人為的に制御することにより嗅覚障害の重症化を防止する治療法の可能性を探る、ことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)加齢変化に伴うマウス嗅上皮変性の頻度と分布、変性の程度の検討

生後10日、1ヶ月、3ヶ月、5ヶ月、7ヶ月、11ヶ月、16ヶ月の各日月齢雌ICRマウス(各群10-30匹)をそれぞれ固定、鼻部のパラフィン切片を作成し、H-E染色にて組織構築を観察した。また同切片に抗olfactory marker protein(OMP)抗体及び抗 β III tubulin抗体による免疫染色を施し、各年齢群において嗅上皮全体に占める変性部位の割合、及び変性の程度を定量的に解析した。

(2)加齢マウスの嗅上皮変性部位の上皮下にみられるBowman腺の変化

上記の各年齢マウス切片にH-E染色、抗OMP抗体による免疫染色及びHID-ALB染色を行ってBowman腺の形態異常とその嗅上皮変性部位との空間的相関、分泌粘液の組成の変化を検討した。

(3)老化した嗅上皮における嗅神経細胞の細胞動態の解析

10日から16か月の各年齢マウスに細胞増殖マーカーであるプロモデオキシウリジン(BrdU)を腹腔内投与し、段階的に時間において(投与後2時間から3ヶ月までの9段階)固定、切片を作成し、これを抗BrdU抗体と抗OMP抗体で2重染色し、BrdUを取り込んだ細胞が神経分化する時間経過を追跡した。また、上記の各年齢マウス切片にTUNEL染色と抗OMP抗体による免疫染色の2重染色を行って、単位上皮長あたりのアポトーシスの数およびそのOMP陽性細胞層との位置関係を検討した。

(4)嗅上皮傷害モデルマウスにおいて加齢変化が嗅上皮の再生過程に及ぼす影響の検討

10日齢、3ヶ月齢、16ヶ月齢のマウスにメチマゾールを腹腔内投与して嗅粘膜障害を惹起させ、投与後1日から3ヶ月までの計10時点で各群数匹ずつ固定、鼻腔組織試料を作成した。切片にH-E染色及び抗OMP抗体、抗 β tubulin抗体、抗Ki-67抗体による免疫染色をそれぞれ施し、染色パターンの変化を年齢別に検討し

た。

(5)嗅粘膜における性ホルモン受容体の発現の検討、およびエストロゲンによる嗅粘膜の保護機能に関する検討

生後10日から16ヶ月の各年齢マウス鼻部切片にエストロゲン α 受容体、エストロゲン β 受容体、プロゲステロン受容体、アンドロゲン受容体に対する抗体で免疫染色を行い発現を検討した。また生後2カ月の雌マウスを正常卵巢群、卵巢摘出群、卵巢摘出+エストロゲン投与群、の3群、雄マウスをエストロゲン非投与群、エストロゲン投与群の2群に分け飼育を開始した。エストロゲン投与群では週1回持続型エストロゲン製剤の筋注を行い、それ以外の群では溶剤であるゴマ油のみの筋注を行って飼育した。

(6)加齢に伴う嗅粘膜への酸化ストレス物質の蓄積の検討

過酸化脂質の細胞内蓄積であるリポフスチンの嗅粘膜における分布を生後10日齢から16ヶ月齢の各年齢マウスの鼻腔試料を用いて組織学的に検討した。

4. 研究成果

(1)加齢変化に伴うマウス嗅上皮変性の頻度と分布、変性の程度の検討

嗅上皮の変性は5ヶ月齢及びより高齢のマウスで認められた。年齢とともに嗅上皮全体に占める変性部位の割合は増加し、また高度変性部位の割合も増加した。抗OMP抗体で可視化される変性部位において、 β III tubulin陽性細胞は増加している部位と減少している部位があった。この結果は障害程度が神経幹細胞に及んでいない場合は成熟嗅神経の脱落のシグナルがフィードバックされて神経新生が亢進するが、障害が高度となり幹細胞にも及んでいる場合は神経新生能自体が低下することを示唆していると考えられた。

(2)加齢マウスの嗅上皮変性部位の上皮下にみられるBowman腺の変化

Bowman腺の形態異常は加齢に従って増加し、特に嗅上皮の変性部位の上皮下に高頻度で認められた。また正常のマウス鼻粘膜ではHID-ALB染色により呼吸上皮の粘液は青色(シアロムチン等)、嗅部の粘液は黒紫色(スルフォムチン等)に染色されるが、Bowman腺の変性部位では時に青色の染色が認められた。これらの結果より加齢変化に伴う嗅粘膜の傷害では上皮下の嗅覚支持組織にも変性が加わっていること、またBowman腺の変性により嗅粘液の組成が変化する可能性が示された。

(3) 老化した嗅上皮における嗅神経細胞の細胞動態の解析

加齢に伴って単位上皮長あたりの BrdU 投与後 2 時間の BrdU 陽性細胞数、すなわち基底細胞の分裂活性は低下した。その後の BrdU 陽性細胞の数の時間経過は各年齢群で同様の傾向を示したが、若年齢群の方が長期間 BrdU 陽性細胞が上皮に残存する傾向にあった。また BrdU 投与後に初めて BrdU と OMP の 2 重陽性細胞が出現するのはいずれの群も投与後 7 日目で差がなかった。アポトーシスの検討においては単位上皮長あたりの TUNEL 陽性細胞の数は年齢とともに減少した。また加齢に伴って TUNEL 陽性細胞は OMP 陽性細胞層下層に局限していく傾向がみとめられた。これらの結果から生理的加齢に伴って基底細胞の増殖とアポトーシスの頻度がともに減少していくが、神経前駆細胞から成熟嗅神経細胞に分化するまでの時間経過は加齢によって変化せずほぼ一定であることが示された。また加齢に伴って成熟嗅神経細胞層の細胞の入れ替わりが減少することが示唆され、これは加齢に伴って成熟嗅神経細胞の寿命がのびる可能性を示していると考えられた。

(4) 嗅上皮傷害モデルマウスにおいて加齢変化が嗅上皮の再生過程に及ぼす影響の検討

いずれの群もメチマゾール投与 1 日後に嗅上皮はほぼ完全に破壊され、成熟嗅神経細胞は脱落した。10 日齢群では約 1 ヶ月で嗅上皮はほぼ完全に再生したのに対し、16 ヶ月齢群では 3 ヶ月後もコントロール群と比較し嗅上皮は薄く、また変性の残存領域も多く認められた。いずれの年齢群もメチマゾール投与後の時間経過で Ki-67, β tubulin, OMP の順に陽性細胞が増加し、各分子マーカー陽性細胞の出現パターンには明らかな年齢による差は認めなかった。これらの結果より、嗅上皮の再生能力が加齢変化とともに低下し、これは細胞の分化過程の遅延よりむしろ増殖能の低下による可能性が示唆された。

(5) 嗅粘膜における性ホルモン受容体の発現の検討、およびエストロゲンによる嗅粘膜の保護機能に関する検討

免疫染色による検討により、嗅粘膜にエストロゲン受容体、プロゲステロン受容体の発現が認められた。前者はボウマン腺と嗅神経に、後者は一部の領域の支持細胞に発現が認められた。エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体の発現は認められなかった。

エストロゲンによる嗅粘膜の保護機能の検討については現在 4 ヶ月が経過しており、今後さらに 5 ヶ月飼育ののち嗅覚行動実験を行って固定、嗅粘膜の変性の程度や酸化ストレス物質の蓄積の程度を組織学的に評価する予定である。

(6) 加齢に伴う嗅粘膜への酸化ストレス物質の蓄

積の検討

リボフスチンは 3 か月齢以降のマウス嗅部の背内側に主として分布しており、特に支持細胞の基底層に蓄積していた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 8 件)

1. Kondo K, Watanabe K, Sakamoto T, Suzukawa K, Nibu K, Kaga K, Yamasoba T: Distribution and severity of spontaneous lesions in the neuroepithelium and Bowman's glands in mouse olfactory mucosa: age-related progression. *Cell Tissue Res* 335: 489-503, 2009、査読有
2. Ushio M, Nakaya M, Kondo K, Suzuki M, Yamasoba T. Modified nasal specula and flexible holder for endoscopic nasal surgery. *Laryngoscope* 118: 1293-4, 2008、査読有
3. Nakaya M, Kondo K, Kaga K: Immunohistochemical study of m1-m5 muscarinic receptors and nNOS in human inferior turbinate mucosa. *Acta Otolaryngol Suppl* 559: 103-7, 2007、査読有
4. Watanabe K, Kondo K, Yamasoba T, Kaga K: Age-related change of the axonal diameter of the olfactory nerve in mouse lamina propria. *Acta Otolaryngol Suppl* 559: 108-112, 2007、査読有
5. Watanabe K, Kondo K, Takeuchi N, Okano H, Yamasoba T: Musashi-1 expression in the postnatal mouse olfactory epithelium. *Neuroreport* 18: 641-644, 2007、査読有
6. Sakamoto T, Kondo K, Kashio A, Suzukawa K, Yamasoba K: Methimazole-induced cell death in rat olfactory receptor neurons occurs via apoptosis triggered through mitochondrial cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway. *J Neurosci Res* 85: 548-557, 2007、査読有
7. Watanabe K, Kondo K, Takeuchi N, Nibu K, Kaga K. Age-related changes in cell density and the proliferation rate of olfactory ensheathing cells in the lamina propria of postnatal mouse olfactory mucosa. *Brain Res* 1116: 82-92, 2006、査読有
8. Yamasoba T, Kondo K: Supporting cell proliferation after hair cell injury in mature guinea pig cochlea in vivo. *Cell Tissue Res* 325: 23-31, 2006、査読有

(学会発表)(計 7 件)

1. 近藤健二、丹生健一、竹内直信：マウス嗅上皮の基底細胞から成熟嗅神経細胞への分化過程及び分化速度の解析：生理的加齢変化における検討．第45回日本鼻科学会、2006年9月21 - 23日、三重
2. 近藤健二、渡辺健太、丹生健一、山岨達也：生理的加齢変化により進行するマウス嗅上皮の変性．第108回日本耳鼻咽喉科学会、2007年5月17 - 19日、金沢
3. 近藤健二、渡辺健太、鈴川佳吾、山岨達也：加齢マウスの嗅上皮変性部位の上皮下に見られる Bowman 腺の変化．第46回日本鼻科学会、2007年9月27日 - 29日、宇都宮
4. 近藤健二：加齢による嗅覚障害の特徴．感覚器シンポジウム、2008年3月7日、東京
5. 近藤健二、渡辺健太、坂本幸士、鈴川佳吾、山岨達也：加齢マウスの嗅上皮変性部位の上皮下にみられる Bowman 腺の変化．第109回日本耳鼻咽喉科学会、2008年5月15 - 17日、大阪
6. 近藤健二、渡辺健太、坂本幸士、鈴川佳吾、丹生健一、山岨達也：加齢マウスの嗅上皮変性部位の上皮下にみられる Bowman 腺の変化．日本味と匂い学会、2008年9月17 - 19日、富山
7. 近藤健二、鈴川佳吾、金谷佳織、坂本幸士、渡辺健太、山岨達也：嗅粘膜における性ホルモン受容体の発現と分布に関する免疫組織学的検討．第47回日本鼻科学会、2008年25 - 27日、名古屋

(図書)(計 1 件)

1. 近藤健二：嗅覚とアンチエイジング．アンチエイジング医学の基礎と臨床、MEDICALVIEW、361-363 頁、2008

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 健二(KONDO KENJI)
東京大学医学部附属病院・講師
研究者番号 40334370