

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791598

研究課題名（和文）加齢性嗅覚障害の病態生理解明とその診断・治療法開発のための分子生物学的研究

研究課題名（英文）Molecular biological analyses of age-related olfactory dysfunction

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（和文）：

加齢に伴う嗅覚低下の病態生理の解明のため、生理的加齢動物及び傷害モデル動物を用いて嗅神経上皮の組織構築の変化を解析した。その結果、加齢に伴う嗅粘膜の変性の背景に基底細胞の分裂能の低下による神経新生能低下が主として関与していることが示唆された。また神経保護機能のある女性ホルモンであるエストロゲンに着目し、今後の解析のためエストロゲン欠乏マウスモデルの作成とエストロゲンβ受容体欠損マウスの繁殖飼育を行った。

研究成果の概要（英文）： We investigated the pathophysiology underlying age-related progression in degeneration of the olfactory mucosa using various mouse models and immunohistochemical methods. The analyses of mechimazole-induced neuroepithelial degeneration revealed that although mouse olfactory neuroepithelium retained the capacity to reconstitute neuroepithelium as well as innervate the olfactory bulb even in 16-month-old mice, the final anatomical recovery was less complete in 16-month-old mice compared with the younger mice. Cell kinetics analyses of the reconstituting neuroepithelium suggested that such a age-related decline in the capacity to reconstitute neuroepithelium is associated with its age-related decrease in proliferative activity after the neuroepithelial injury rather than changes in the process of neuronal differentiation.

We also prepared ovariectomized mice and bled estrogen receptor beta-knockout mice to examine the involvement of estrogen in the homeostasis of olfactory mucosa.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

嗅覚はヒト社会においてはガスや火災、腐敗臭の異臭の察知など生存に直結する感覚であると同時に、食事や酒の風味、香水、草花の香りの感知・賞味など健康で文化的な生活を送るために必要な感覚である。特に身体の活動性が低下した高齢者では嗅覚の QOL における重要性が若年者と比べて相対的に増しているが、一方逆に嗅粘膜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～高年齢層であり、日本社会の急速な高齢化と相まって嗅覚障害の克服は耳鼻咽喉科臨床の重要な課題の 1 つとなってきた。しかしながら、現時点では視覚障害、聴覚障害と比較して嗅覚障害は診断、治療面での立ち遅れが目立っている。この立ち遅れの大きな原因の 1 つとして、嗅粘膜傷害の病態生理やその防御機構が分子レベルでほとんど解明されていないことが挙げられる。高齢者の嗅覚障害の中には明らかな誘因のないケースも多く、これは嗅粘膜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うるはずの感冒後の嗅覚障害が実際には中～高年齢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粘膜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の理解、及びこれに対する効果的な治療法の開発のためには、老化した嗅粘膜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

本研究では(1)生理的加齢変化による嗅粘膜の変化を形態学的、及び細胞動態の面から明らかにするとともに、(2)嗅粘膜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)加齢変化及び嗅粘膜傷害に伴う遺伝子、蛋白発現変化の解析を行って、(4)嗅粘膜の傷害の程度と相関する液性因子を用いた嗅粘膜傷害の評価のための臨床診断検査法の開発や(5)嗅粘膜の老化関連病態の発症機構を人為的に制御する治療法の開発の可能性を探る、ことを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)加齢に伴うマウス嗅上皮の神経新生、分化過程及びアポトーシスの変化の解析  
10日齢から16ヶ月齢のマウスにBrdUを投与し、投与後2時間から90日後までの各時点で各群数匹ずつ固定、鼻腔組織試料を作成した。切片に抗OMP抗体と抗BrdU抗体による2重染色を行い、BrdU陽性細胞の分布の時間経過による変化、及び同細胞がOMPと2重陽性になる時間経過を年齢群間で比較した。また切片にTUNEL染色を行って、単位上皮長あたりのTUNEL陽性細胞の数を年齢群間で比較した。

(2)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2カ月の雌マウスを正常卵巣群、卵巣摘出群、卵巣摘出+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9ヶ月間飼育ののち固定、嗅粘膜の組織標本作製した。

(3)エストロゲンβ受容体ノックアウトマウスにおける嗅粘膜の変化の解析

嗅粘膜に強い発現が認められるエストロゲンβ受容体のノックアウトマウスを米国ジャクソン研究所から購入、輸入し遺伝子タイピングを行ってホモ欠損マウスを繁殖飼育した。

(4)嗅神経上皮再生過程に加齢変化が及ぼす影響の解析

抗甲状腺薬であるメチマゾールを投与し、嗅粘膜傷害モデルマウスを作成した。同モデルを用いた各年齢群の嗅上皮傷害モデルマウスを嗅上皮構成細胞のマーカーを用いて組織学的に解析し、再生過程における加齢の影響を分析した。

(5)上気道ウイルス感染後嗅覚障害の病態生理に関する実験的解析

ウイルス感染モデルとして用いられるPoly(I:C) (合成二本鎖RNA)をマウスに経鼻投与し、嗅粘膜に生じる免疫応答を各炎症細胞のマーカーを用いて免疫組織学的に解析した。また嗅神経上皮の変性とそれに引き続く再生過程を嗅上皮の構成細胞のマーカーを用いて解析した。さらに嗅覚機能の変化を嗅覚行動実験を用いて解析した。

(6)嗅粘膜におけるライソゾームの分布に関する免疫組織学的検討  
ライソゾーム膜に特異的に発現する LAMP-2 に対する免疫組織染色を用いて嗅粘膜におけるライソゾームの分布を検討した。

#### 4. 研究成果

(1)加齢に伴うマウス嗅上皮の神経新生、分化過程及びアポトーシスの変化の解析

加齢とともに単位上皮長あたりのBrdU陽性細胞数及びTUNEL陽性細胞は減少した。一方BrdUとOMPとの2重陽性細胞はいずれの年齢群でも投与後7日目に出現した。これらにより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は減少していくことが示された。一方神経細胞の分化過程は加齢によらずほぼ一定であることが示唆された。

(2)エストロゲンによる嗅粘膜の保護機能に関する検討

現在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中である。

(3)エストロゲンβ受容体ノックアウトマウスにおける嗅粘膜の変化の解析

現在12ヶ月齢に達した動物について順次嗅覚検査および組織採取を行っている。今後嗅粘膜の構造、嗅覚行動検査、加齢に伴う変化等を野生型とホモ欠損型で比較検討する計画である。

(4)嗅神経上皮再生過程に加齢変化が及ぼす影響の解析

メチマゾールを75mg/kgでマウスに腹腔内投与すると、嗅神経上皮が均一に基底層から脱落した。その後細胞増殖が賦活化され、神経上皮の再構築が起こった。

各年齢群の比較により、①高齢マウスも神経上皮や嗅球への軸索投射を再構築する能力を有しているが若齢マウスと比較すると組織再生は不完全に終わる、②傷害後に非傷害時と比較して基底細胞の増殖が賦活化される度合いは加齢によって低下しないが、単位上皮長あたりの増殖細胞の絶対数は加齢とともに減少する、③新生神経細胞の分化の時間過程及び再生軸索が嗅球に再投射するまでの時間は年齢にかかわらず一定である、等が明らかとなった。これらの知見から、加齢に伴う嗅粘膜の変性の背景に基底細胞の分裂能の低下による神経新生能低下が主として関与していることが示唆された。

(5)上気道ウイルス感染後嗅覚障害の病態生理に関する実験的解析

Poly(I:C)投与により嗅神経上皮の変性とそれに引き続く再生が約1カ月の経過で起こ

ること、またこの過程で嗅覚機能の低下と回復が組織学的変化に伴って生じることが示された。またその病態生理に免疫応答で粘膜に浸潤する好中球の二次的な組織傷害が関与している可能性が示された。

(6)嗅粘膜におけるライソゾームの分布に関する免疫組織学的検討

ライソゾームは支持細胞の基底層とボウマン腺に集積していた。この分布は過去に報告された加齢による細胞内酸化蓄積物であるリポフスチンや他の酸化ストレスマーカーの蓄積部位と一致し、さらに加齢に伴う嗅粘膜の変性の好発部位とも一致していた。

#### 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1件)

(1) Kondo K, Suzukawa K, Sakamoto T, Watanabe K, Kanaya K, Ushio M, Yamaguchi T, Nibu K, Kaga K, Yamasoba T: Age-related changes in cell dynamics of the postnatal mouse olfactory neuroepithelium: cell proliferation, neuronal differentiation and cell death. J Comp Neurol 518: 1962-1975, 2010, 査読あり

[学会発表] (計12件)

(1) 坂本幸士、金谷佳織、鈴川佳吾、近藤健二、山唄達也：アポトーシス抑制蛋白質PTD-FNK投与によるメチマゾール誘発性嗅上皮障害の抑制の試み、第49回日本鼻科学会学術講演会、2010年8月28日、札幌

(2) 鈴川佳吾、近藤健二、金谷佳織、坂本幸士、山唄達也：嗅上皮傷害モデルマウスにおける嗅上皮再生に及ぼす加齢の影響行動実験による比較、第49回日本鼻科学会学術講演会、2010年8月28日、札幌

(3) 近藤健二、金谷佳織、鈴川佳吾、坂本幸士、山唄達也：嗅粘膜におけるライソゾームの分布に関する免疫組織学的検討、第49回日本鼻科学会学術講演会、2010年8月28日、札幌

(4) 近藤健二：加齢に伴う嗅神経上皮の細胞動態の変化—細胞新生、神経分化、細胞死の解析(日本鼻科学会賞記念講演)、第49回日本鼻科学会学術講演会、2010年8月27日、札幌

(5) 鈴川佳吾、近藤健二、金谷佳織、坂本幸士、山嵜達也：マウス嗅上皮傷害後の再生過程における嗅神経の嗅球への再投射加齢による変化の検討。第111回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会、2010年5月22日、仙台

(6) 近藤健二：加齢に伴う嗅神経上皮の再生能低下の病態生理の検討、およびその予防治療法構築に関する研究（シンポジウム、招待講演）。第48回日本鼻科学会学術講演会、2009年10月1日、島根

(7) 遠藤麻世、金谷佳織、鈴川佳吾、吉田剛、牛尾宗貴、近藤健二：嗅覚障害の治癒に関する疫学的検討。第48回日本鼻科学会学術講演会、2009年10月1日、島根

(8) 坂本幸士、金谷佳織、鈴川佳吾、近藤健二、山嵜達也：鼻毒性薬剤メチマゾールによる嗅上皮傷害と酸化ストレス、MAPKカスケードとの関連性の検討。第48回日本鼻科学会学術講演会、2009年10月1日、島根

(9) 金谷佳織、近藤健二、鈴川佳吾、坂本幸士、山嵜達也：マウス嗅粘膜におけるendocytosis：経鼻腔投与と経静脈投与の比較。第48回日本鼻科学会学術講演会、2009年10月1日、島根

(10) 鈴川佳吾、近藤健二、坂本幸士、山嵜達也：嗅上皮における老化沈着物質リポフスチンの分布：年齢での比較。第48回日本鼻科学会学術講演会、2009年10月1日、島根

(11) 近藤健二：嗅覚における加齢変化（シンポジウム、招待講演）第2回東京アンチエイジングアカデミー、2009年5月27日、東京

(12) 近藤健二、鈴川佳吾、坂本幸士、山嵜達也：加齢に伴うマウス嗅上皮のアポトーシスの頻度と分布の変化の検討。第110回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会、2009年5月15日、東京

## 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

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし