

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592506

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) Age-related olfactory dysfunction: cellular and molecular analyses

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：カロリー制限により加齢に伴う嗅粘膜変性が悪化した。またカロリー制限は傷害後の嗅神経組織の再生を悪化させ、その背景に基底細胞の分裂能低下があることが示唆された。Poly(I:C)経鼻投与により感冒罹患後嗅覚障害のモデルマウスを作成し、本モデルにおいて嗅粘膜に浸潤する好中球、特にその放出するエラストラーゼが嗅神経上皮の主要な組織傷害因子であることが示唆された。エストロゲンはERを介して鼻粘膜の恒常性維持に関与していることが示唆された。FAT-1マウスは嗅粘膜傷害後の神経組織再生が対照群に比べて良好であり、生体内脂肪酸組成が嗅粘膜傷害後の再生過程に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：1. Caloric restriction exacerbated the age-related neuroepithelial degeneration in the mouse olfactory mucosa and also worsened the regeneration of the olfactory neuroepithelium after injury. The downregulation of proliferative activity in neuroepithelium by caloric restriction appeared to play an important role in the pathogenesis. 2. The immune model of postviral olfactory disorder (PVOD) was developed in mice using Poly(I:C), a synthetic analog of viral double-stranded RNA. The analyses suggested that the secondary damage caused by the neutrophil-mediated innate immune response plays an important role in the pathogenesis of PVOD. 3. The analyses of estrogen receptor beta (ERbeta)-deficient mice suggested that estrogen plays a role in the homeostasis of the olfactory mucosa through ERbeta. 4. FAT-1 mice demonstrated better neuroepithelial regeneration after injury, suggesting that the tissue fatty acid is associated with the regeneration of the olfactory neuroepithelium.

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：鼻科学 嗅覚障害 加齢変化 カロリー制限 エストロゲン 感冒罹患後嗅覚障害 FAT-1マウス

## 1. 研究開始当初の背景

嗅覚を司る末梢感覚器である嗅神経上皮は終生にわたって神経細胞自体が新生と脱落を繰り返すという哺乳類の他の神経系には見られない細胞動態を持っている。さらに新生神経細胞はその発現するにおい受容体の種類によってほぼ正確に特定の糸球体に再投射し、嗅覚生理機能を回復することが先行研究で示されている。この特性は外界に直接露出し損傷を受けやすいという組織の特性と生物の生存に不可欠な嗅覚の維持を両立するために備わっていると考えられる。

一方このような高い再生能があるにもかかわらず、臨床的には難治性の嗅覚障害をしばしば経験する。嗅覚はヒト社会においてはガス漏れや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の風味、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り、これを喪失した嗅覚障害患者は健常人には理解しにくい悩みを抱えて生活している。これらの難治性の嗅覚障害例は統計上ほとんどが中～高年層であり、このことは上記の嗅神経上皮に生来備わった高い神経回路の再構築能が加齢変化で不完全になることを強く示唆しているが、この背景にある分子メカニズムはまだ十分解明されていない。

申請者らは近年の解析により、加齢によって嗅神経上皮の変性が進行し、また高率に上皮下の支持組織の変性も加わること(Kondo et al. Cell Tissue Res 2009)、基底細胞層で神経幹細胞マーカーMusashi-1 陽性細胞の数が減少すること(Watanabe et al. Neuroreport 2007)、嗅神経細胞の細胞新生、細胞死とも減少して結果的に維持量が減少するが神経細胞への分化の時間過程は変化が無いこと(Kondo et al. J Comp Neurol 2010; Watanabe et al. Brain Res 2006)、また嗅粘膜傷害後の神経上皮の再生が不完全になること、等を明らかにしてきた。これらの知見は嗅粘膜の恒常性維持機構が加齢による影響を受けることを如実に示している。しかしながら、嗅粘膜傷害が惹起される分子メカニズム、再生過程において神経細胞新生、軸索伸長の賦活化の背景にある分子メカニズムの詳細、またこれらが加齢により受ける影響はいかなるものか、神経上皮変性を介入により防止することが可能か、などヒトの嗅覚障害の臨床に即した面では多くの疑問が解決されずに残されている。

## 2. 研究の目的

本研究ではこれらの更なる課題に取り組むことによって嗅神経上皮における神経回路再生のメカニズムとその加齢変化の病態生理を明らかにし、加えて増殖因子や抗加齢作用物質の投与を行うことによって上記の老化関連病態の発症機構を人為的に予防、または治療できるか否かの可能性を検討することを目的とした。具体的には下記に記すプロジェクト

を推進した。

(1) カロリー制限モデルマウスにおける嗅粘膜の解析-加齢性粘膜変性及びメチマゾール傷害後の嗅神経上皮の細胞動態に対するカロリー制限の効果

カロリー制限は長寿遺伝子の発現や酸化ストレスの軽減を介して哺乳動物において寿命、代謝疾患、循環器疾患、神経疾患などの様々な老化関連疾患の発症を抑える介入方法とされているが、一方カロリー制限は生体の細胞増殖を抑制し、創傷治癒が遅延するなどの負の効果も知られている。カロリー制限が再生系である嗅神経上皮にいかなる影響を与えるかはこれまで解析されていない。本研究ではカロリー制限下に加齢飼育されたマウスの嗅粘膜の変性を対照群と比較し、さらにメチマゾール嗅粘膜傷害動物モデルを用いて傷害後早期の嗅神経上皮の細胞増殖、及びほぼ再生過程が完了する傷害後3カ月の時点での成熟嗅神経細胞の量に対するカロリー制限の影響を比較解析した。

(2) Poly(I:C)点鼻投与による感冒罹患後嗅覚障害の動物モデルの作成と病態生理の解析

気道粘膜の一部でもある嗅粘膜は病原体や化学物質などの様々な外的傷害因子に絶えず曝露される。临床上ウイルス性上気道炎に伴い嗅覚障害が発症することが知られている(感冒罹患後嗅覚障害)が、ウイルス感染による嗅粘膜傷害の詳細なメカニズムについては十分に研究されていない。そこで今回ウイルス感染モデルの一つでToll-like receptor 3 (TLR3)の人工リガンドであるpoly (I:C)をマウスに点鼻投与し、嗅粘膜における免疫応答と神経上皮の細胞動態の経時的変化を組織学的な観点から検討した。

(3) エストロゲン 受容体ノックアウトマウスの解析

妊娠、生理周期など女性ホルモン状態の変化はヒトで鼻炎症状や嗅覚の変化を引き起こすことが知られている。また先行研究ではヒト及び実験動物の鼻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報告されている。これらの知見は鼻粘膜が女性ホルモンの標的臓器の一つであり、女性ホルモンが鼻粘膜の機能制御に関与している可能性を示している。本研究では生殖器外に広く分布が知られているエストロゲン受容体 (ER )の遺伝子欠損マウスの鼻腔組織所見を野生型マウスと比較検討した。

(4) 生体内脂肪酸組成が嗅粘膜傷害及びその再生過程に及ぼす影響の解析

EPA やDHA などのn-3 脂肪酸には古くから抗炎症作用や組織保護作用があることが知られている。そこで本研究ではn-3 脂肪酸の嗅神経上皮組織の保護作用について分子レベルでの解析を行う目的で、FAT-1マウスの解析を行った。FAT-1 マウスはn-3 脂肪酸合成酵素のトランスジェニックマウスで体内のn-3/n-6 脂肪酸バランスが高く維持されてお

り、体内で炎症が起こりにくく癌化に抵抗性であることが知られている (Kang JX, Nature 2004)。さらに末梢神経の傷害モデルでFAT - 1マウスは神経再生が促進されることが報告されている (Gladman et al. J Neurosci 2012)。同マウスにメチマゾールによる嗅粘膜傷害を惹起し、傷害過程、再生過程を対照群と比較した。

### 3. 研究の方法

(1) カロリー制限モデルマウスにおける嗅粘膜の解析-加齢性粘膜変性及びメチマゾール傷害後の嗅神経上皮の細胞動態に対するカロリー制限の効果

2か月齢のICRマウスを2群に分け、コントロール食 (28kcal/週) とカロリー制限食 (18kcal/週) を与え10ヶ月長期飼育したのち olfactory habituation-dishabituation test による嗅覚の評価を行い、灌流固定、断頭、頭部を脱灰し嗅粘膜の組織切片を作成した。切片にHE染色及び成熟嗅神経細胞のマーカーである抗olfactory marker protein (OMP)抗体染色を行い嗅神経上皮の変性の度合いを評価した。

次に生後2か月の雄C57BL6マウスを同じくコントロール群とカロリー制限群に割り付け、飼育1ヵ月後にメチマゾールを腹腔内投与して嗅粘膜傷害を惹起させた。一部は傷害後1週で固定し、残りは傷害後に2ヵ月飼育を継続し固定した。嗅粘膜組織切片を作成し、抗BrdU染色(細胞増殖)、抗活性化型カスパーゼ3染色(細胞死) および抗OMP染色を行って陽性細胞数の群間の比較を行った。

(2) Poly(I:C)点鼻投与による感冒罹患後嗅覚障害の動物モデルの作成と病態生理の解析

3ヶ月齢雌ICRマウスにpoly (I:C)または生理食塩水(コントロール)を24時間毎に3日間点鼻投与し点鼻終了後1日、1週、3週の時点で灌流固定、頭部を摘出、脱灰し嗅粘膜組織パラフィン切片を作成した。切片を細胞増殖マーカーであるKi67、嗅神経上皮細胞のマーカーであるIII チュブリン、OMPに対する抗体で染色し陽性細胞数をカウントした。また組織の炎症細胞浸潤の評価のためLy-6G(好中球)、CD3(T細胞)、F4/80(マクロファージ)に対する抗体で染色し、陽性細胞数をカウントした。さらにPoly(I:C)投与前と投与後9日の時点でolfactory habituation-dishabituationテストを行い、嗅覚機能を評価した。

上記の解析から好中球による組織傷害の可能性が考えられたため、これを検証する目的で2つの阻害実験を行った。すなわち、まずPoly(I:C)投与前及び直後に好中球エラストラーゼ阻害薬であるシベレスタットを腹腔内投与し、Poly(I:C)投与後3日と9日で嗅粘膜組織切片を作成し、傷害の程度を評価した。またシクロフォスファミドをマウスに投与して好中球減少モデルマウスを作成し、

これにPoly(I:C)を点鼻投与して同じく嗅粘膜傷害の程度を比較した。

さらに好中球が放出する主要な組織傷害因子であるエラストラーゼそのものに嗅粘膜傷害性があるかどうかを検証するため、3ヶ月齢マウスにエラストラーゼ(4µg/µl)を24時間毎に3日間経鼻投与し、点鼻終了後3日目、9日目に固定、組織切片を作成し免疫組織学的検討を行った。

(3) エストロゲン受容体ノックアウトマウスの解析

米国ジャクソン研究所から購入した雌雄のERノックアウトマウスを交配、継代し、各個体を遺伝子タイピングし野生型とホモ欠損型を通常の動物実験施設環境で維持した。生後3か月と12か月の時点で鼻腔組織を採取しパラフィン切片を作成した。切片にH-E染色および抗Ki67抗体、抗OMP抗体による免疫染色を行って観察した。

(4) 生体内脂肪酸組成が嗅粘膜傷害及びその再生過程に及ぼす影響の解析

FAT-1マウスと野生型マウスにメチマゾールによる嗅粘膜傷害を惹起し傷害後4日、21日、2か月の時点で灌流固定、断頭し嗅粘膜組織の切片を作成した。組織を抗OMP抗体で染色し、傷害早期の組織損傷の程度を確認するとともに最終的な再生の度合いを野生型マウスと比較した。

### 4. 研究成果

(1) カロリー制限モデルマウスにおける嗅粘膜の解析-加齢性粘膜変性及びメチマゾール傷害後の嗅神経上皮の細胞動態に対するカロリー制限の効果

まず10か月の長期飼育によるカロリー制限群とコントロール食群の比較では、前者が後者に比較して嗅粘膜における神経変性が大きかった。

次に傷害モデルによる解析では、傷害後1週間の嗅粘膜基底層でBrdU陽性細胞数はカロリー制限群で有意に少なく、また傷害後2ヶ月の組織でカロリー制限群は有意に嗅神経上皮の変性部位が大きかった。

これらの結果より、カロリー制限により加齢に伴う嗅粘膜の変性が促進されること、傷害後のカロリー制限は最終的な組織の再生の度合いに影響を与えること、その背景に基底細胞の分裂能低下による傷害時の神経再生の低下があることが示唆された。今後DNAマイクロアレイ法を用いて、カロリー制限マウスの嗅粘膜でupregulateまたはdownregulateされる細胞サイクル、増殖因子などの遺伝子群を同定し、この情報からターゲットを絞り、カロリー制限による嗅神経上皮の基底細胞の増殖能低下の背景にある分子メカニズムの解析を進める予定である。

(2) Poly(I:C)点鼻投与による感冒罹患後嗅覚障害の動物モデルの作成と病態生理の解析

まずPoly(I:C)点鼻後の嗅粘膜への炎症細胞

胞浸潤について検討したところ、点鼻終了後1日の時点でコントロール群では炎症細胞をほとんど認めなかったのに対し poly (I:C) 点鼻群では好中球を主体とした著明な炎症細胞浸潤を認めた。嗅粘膜の形態学的変化として点鼻終了後1日目では構造的に明らかな変化は認めなかったが活性化型 caspase3 陽性細胞が増加しておりアポトーシスが誘導されていることが示唆された。点鼻終了後1週目には鼻腔嗅部の外側部を中心に成熟嗅神経細胞が減少しており同部位での基底細胞の増殖が著明に亢進し未熟嗅神経細胞の増加を認めた。そして3週間後にはほぼ正常の状態に回復していた。同様の検討を高年齢マウスを用いて行ったところ若年齢マウスと同様に点鼻終了後1日目に著明な炎症細胞浸潤を認めた。しかし若年齢マウスと異なり基底細胞での増殖反応は少なくむしろ上皮組織の細胞増殖が亢進していた。

Olfactory habituation-dishabituation による嗅覚機能評価では、Poly(I:C)投与後9日の時点で投与前に比べ有意な反応の低下を認め、嗅覚の低下が示唆された。

Poly(I:C)投与前後に好中球エラストラーゼ阻害薬であるシベレスタットを投与した群、及びシクロフォスファミド投与による好中球減少モデルマウスでは、Poly(I:C)投与による嗅神経上皮傷害が有意に低減されていた。またエラストラーゼそのものの点鼻投与では Poly(I:C)投与と同様の嗅神経上皮傷害が広範に惹起されていた。

以上のことより Poly(I:C)経鼻投与により嗅粘膜に浸潤する好中球、特にその放出するエラストラーゼが嗅神経上皮のウイルス性嗅覚障害における主要な組織傷害因子の1つであると考えられた。

現在本動物モデルの病態にかかわるシグナルをより厳密に検証するため、Poly(I:C)の自然免疫レセプターである TLR3 のノックアウトマウスを用いて、Poly(I:C)点鼻による組織傷害が抑止されるか否かを検証中である。

### (3) エストロゲン 受容体ノックアウトマウスの解析

3ヶ月齢ではホモ欠損型は野生型と比べ明らかな組織変化、細胞動態の変化は認められなかった。12ヶ月齢ではホモ欠損型において鼻粘膜呼吸部の粘膜固有層の肥厚と同部の細胞増殖、鼻腔への炎症細胞の滲出、線毛上皮の消失が野生型と比較し顕著であった。また鼻底部のリンパ組織である nasal-associated lymphoid tissue (NALT) の肥大が認められた。嗅粘膜においては呼吸部との境界領域において上記と同様の粘膜固有層の肥厚と細胞増殖の亢進が認められた。

以上の結果から、エストロゲンは ER を介して鼻粘膜の恒常性維持に関与していることが示唆された。本研究で認められた鼻腔所見はホモ欠損型マウスに鼻腔の反復感染

がある可能性を示唆する所見であるが、これは過去の報告でエストロゲンに抗炎症効果、感染防御効果があるとされている点と合致する。

### (4) 生体内脂肪酸組成が嗅粘膜傷害及びその再生過程に及ぼす影響の解析

メチマゾール投与による嗅粘膜傷害惹起後4日目ではコントロール、FAT-1ともOMP陽性細胞はほぼ全く残っておらず、初期段階の傷害の程度には差がないと判断された。メチマゾール投与後21日ではOMP陽性の成熟嗅神経細胞の数、および嗅神経線維の嗅球への投射量はいずれもFAT-1マウスの方が多かった。さらに投与後2か月の時点での最終的な再生の程度は鼻腔嗅部の背内側 (zone 1) の領域を中心にFAT-1の方が良好であった。今後これらの所見を追試すると同時に、嗅粘膜変性・再生過程における炎症細胞浸潤の評価、及び組織脂肪酸組成の変化を解析する予定である。

## 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2件)

1. Suzukawa K, Kondo K, Kanaya K, Sakamoto T, Watanabe K, Ushio M, Kaga K, Yamasoba T: Age-related changes of the regeneration mode in the mouse peripheral olfactory system following olfactotoxic drug methimazole-induced damage. *J Comp Neurol* 519:2154-2174, 2011
2. Kanaya K, Kondo K, Suzukawa K, Sakamoto T, Kikuta S, Okada K, Yamasoba T: Innate immune responses and neuroepithelial degeneration and regeneration in the mouse olfactory mucosa induced by intranasal administration of Poly(I:C). *Cell Tissue Res* (in press)

[学会発表](計14件)

1. 近藤健二、鈴木佳吾、山岨達也: 加齢に伴う嗅神経上皮の再生能低下の病態生理. 第11回日本抗加齢医学会総会(招待講演)、2011.5.27-29、京都
2. Kondo K: Age-related Changes of the Regeneration Mode in the Mouse Peripheral Olfactory System. 14th International Rhinologic Society and 30th International Symposium on Infection and Allergy of the Nose (招待講演)、2011.9.20-23、Tokyo
3. 近藤健二: 加齢による嗅神経上皮の細胞動態の変化. 日本味と匂い学会第45回大会(招待講演)、2011.10.5-7、金沢
4. 近藤健二、鈴木佳吾、金谷佳織、坂本幸士、馬場信太郎、藤本千里、山岨達也: エストロゲン受容体 欠損マウスにみら

- れる鼻腔病理所見. 第50回日本鼻科学会、2011.12.1-3、岡山
5. Kondo K: Age-related Changes of the Regeneration Mode in the Mouse Peripheral Olfactory System. 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery (招待講演), 2011.12.8-9, Kobe
  6. Kondo K, Kanaya K, Suzukawa K, Kikuta S, Sakamoto T, Yamasoba T. Immune responses and neuroepithelial degeneration induced by intranasal administration of Poly(I:C) in the mouse olfactory mucosa. 16th International Symposium on Olfaction and Taste, 2012.6.4-8, Stockholm
  7. Kanaya K, Kondo K, Suzukawa K, Sakamoto T, Yamasoba T: Immune response, neuroepithelial degeneration and regeneration induced by intranasal administration of Poly(I:C) in the mouse olfactory mucosa. 24th Congress of the European Rhinologic Society & 31<sup>st</sup> International Symposium of Infection & Allergy of the Nose, 2012.6.17-21, Toulouse
  8. 近藤健二、鈴川佳吾、岩村均、菊田周、坂本幸士、金谷佳織、山岨達也: 実験的カロリー制限はマウスにおいて加齢性の嗅粘膜変性を悪化させる. 第51回日本鼻科学会学術講演会、2012.9.27-29、千葉
  9. 金谷佳織、近藤健二、鈴川佳吾、菊田周、坂本幸士、山岨達也: Poly(I:C)経鼻投与により惹起される嗅上皮内好中球浸潤に対するアジスロマイシンの効果. 第51回日本鼻科学会学術講演会、2012.9.27-29、千葉
  10. Kondo K, Kanaya K, Suzukawa K, Kikuta S, Sakamoto T, Yamasoba T: Innate immune responses and neuroepithelial degeneration in the mouse olfactory mucosa induced by intranasal Poly(I:C). 45th meeting of Korean Rhinologic Society (招待講演), 2013.3.10, Seoul
  11. Kondo K, Kanaya K, Suzukawa K, Kikuta S, Sakamoto T, Yamasoba T: Immune models of postviral olfactory disorder. 20th International Federation of Otorhinolaryngological Societies World Congress(招待講演), 2013.6.1-5, Seoul
  12. Kondo K, Kanaya K, Suzukawa K, Kikuta S, Sakamoto T, Yamasoba T: Innate immune responses and neuroepithelial degeneration in the mouse olfactory mucosa induced by intranasal Poly(I:C). 16th Asian Research Symposium in Rhinology (招待講演), 2013.8.29-31, Tokyo
  13. 近藤健二: 嗅覚障害は治る: 感冒後嗅覚障害(臨床シンポジウム). 第52回日本鼻科学会学術講演会、2013.9.27、福井
  14. 岩村均、近藤健二、坂本幸士、菊田周、鈴川佳吾、金谷佳織、山岨達也: メチマゾール障害後の嗅神経上皮の細胞増殖に対するカロリー制限の影響. 第52回日本鼻科学会学術講演会、2013.9.27、福井
- [図書](計 0件)
- [産業財産権]  
出願状況(計 0件)
- 名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:
- 取得状況(計 0件)
- 名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:
- [その他]  
ホームページ等  
<http://www.h.u-tokyo.ac.jp/orl/>
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
- (3)連携研究者  
山岨 達也 (YAMASOBA TATSUYA)  
東京大学医学部附属病院・教授  
研究者番号: 60251302
- 鈴川 佳吾 (SUZUKAWA KEIGO)  
東京大学医学部附属病院・助教  
研究者番号: 50447398
- 牛尾 宗貴 (USHIO MUNETAKA)  
東京大学医学部附属病院・助教  
研究者番号: 70361483
- 金谷 佳織 (KANAYA KAORI)  
東京大学医学部附属病院・助教  
研究者番号: 90456129