

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20284

研究課題名(和文) 低エストロゲンがマウス嗅上皮細胞に及ぼす影響に関する研究

研究課題名(英文) Study on the effect of low estrogen to olfactory epithelial in mice

研究代表者

山田 健太郎 (YAMADA, Kentaro)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：60722642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：メチマゾール投与6週後において卵巣摘出群および擬似手術群共にOMPとKi-67陽性細胞率は同程度まで回復した。またOMPとKi-67陽性細胞率はメチマゾール投与2週目において卵巣摘出群の方が有意に低かった。このことから卵巣摘出による低エストロゲン下でも嗅上皮は再生するが、障害早期においては再生遅延が生じる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：At the 6W after ip methimazole, OVX and Sham-ope groups recovered to the same OMP and Ki-67 positive cell rate. The OMP and Ki-67 positive cell rate was significantly lower in the OVX group at only 2W after ip methimazole. The olfactory epithelium also recover in the low estrogen state by ovariectomy. However, it was suggested that the low estrogen state delay the recover speed of the olfactory epithelium at an early stage after damage.

研究分野：嗅覚

キーワード：感冒後嗅覚障害 エストロゲン 嗅上皮

### 1. 研究開始当初の背景

国内外の研究から感冒は嗅覚障害原因の第2位であり中高年女性に多いことが明らかとなっている。さらに近年、更年期障害に適応がありエストロゲン様作用を有する当帰芍薬散の感冒後嗅覚障害に対する治療効果を示唆する後ろ向き臨床研究が我々の研究グループを中心に報告されている。しかし、なぜ感冒後嗅覚障害は中高年の女性に多いのか、なぜエストロゲン作用を有する漢方が効くのかは科学的に明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では低エストロゲン状態と嗅上皮再生の関係を解明するために卵巣摘出による閉経モデルマウスを用いて、メチマゾールの投与によって生じる嗅上皮変性からの再生過程がコントロール群とどのように異なるのかを検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 群の設定

8週齢のBALB/c雌性マウスを30匹使用した。卵巣摘出モデルについては8週齢で卵巣摘出術を受けた雌性BALB/cマウスを三協ラボサービス株式会社より15匹購入し使用した。対照群は同社で擬似手術を受けた雌性BALB/cマウスを15匹使用した。上記マウスを術1週間後に抗甲状腺薬メチマゾールを75mg/Kg腹腔内投与し嗅上皮傷害を生じさせた。嗅上皮傷害から2、4、6週後に卵巣摘出群、擬似手術群共に各5匹ずつ、計6群に分けて嗅上皮を観察した。また卵巣摘出後約5日程度でエストラジオールが測定以下になることが報告されている。

#### (2) 免疫染色

嗅上皮障害後の再生過程において成熟嗅細胞の発現を見るために olfactory marker protein (OMP) 染色、幼若な細胞の指標となるKi-67染色を行った。評価は嗅上皮の異なる3地点で100µmあたりの全細胞数中の染

色陽性細胞をカウントし陽性細胞率として平均値を算出した。

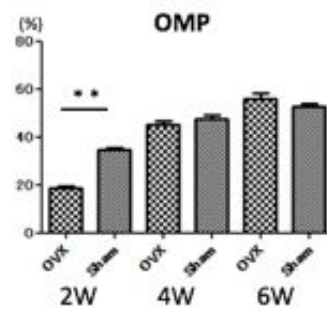
#### (3) 嗅球 NGF、BDMF 測定

嗅球における NGF (Nerve Growth Factor) が嗅細胞の再生、維持、発生に重要な役割を持つことが知られている。そこで嗅球 NGF とそのファミリーである BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) の卵巣摘出による変化並びに嗅上皮傷害による変化を調べた。前述の卵巣摘出(5匹)、擬似手術(5匹)施行3週後にマウスの嗅球を摘出し ELISA 法にて NGF と BDNF を測定した。また同様に卵巣摘出(5匹)、擬似手術(5匹)施行後1週後にメチマゾールを投与しさらに2週後に嗅球摘出し NGF、BDNF を測定した。

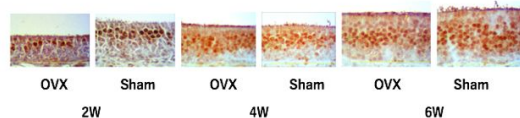
### 4. 研究成果

#### (1)

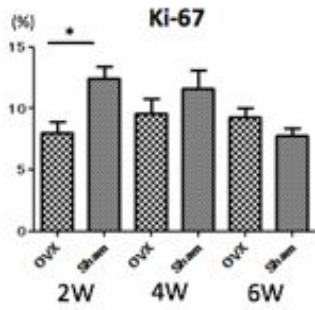
卵巣摘出群では擬似手術群に比べて嗅上皮傷害後2週目で OMP、Ki-67 陽性細胞率が有意に低い結果であった。しかし嗅上皮傷害後4、6週目では OMP、Ki-67 陽性細胞率に差は認めなかった。(図1、2)



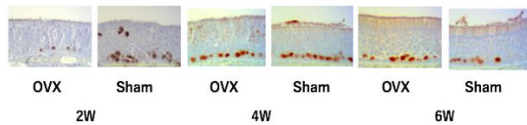
Mann-Whitney U \*\* : P < 0.01



(図1) 嗅上皮傷害後の OMP 発現



Mann-Whitney U \* : P < 0.05

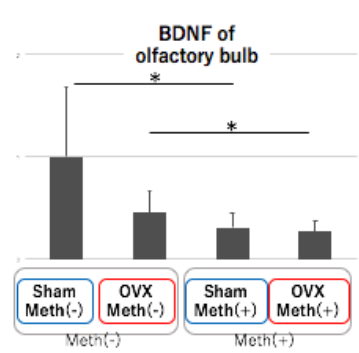
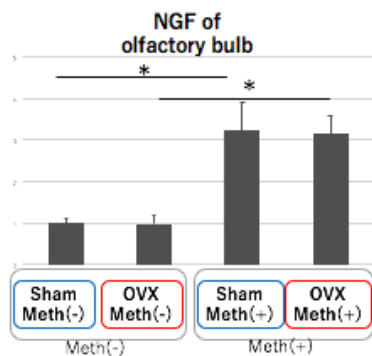


( 図 2 ) 嗅上皮障害後の Ki-67 発現

今回の実験では嗅上皮傷害モデルにおいて卵巣摘出による低エストロゲン下でも時間経過で嗅上皮は再生するが、傷害早期の段階では嗅上皮再生が遅延している可能性が示唆された。

( 2 )

嗅上皮傷害により卵巣摘出群、擬似手術群ともに嗅球 NGF は有意に増加、嗅球 BDNF は有意に低下を認めた。しかし同一時点では卵巣摘出群、擬似手術群間で有意差は認めなかった ( 図 3 )。



Mann-Whitney U \* : P < 0.05

( 図 3 ) 嗅球 NGF、BDNF の変化

この結果より嗅球 NGF、BDNF は嗅上皮傷害により影響を受けるが卵巣摘出による嗅上皮再生遅延には関与しない可能性が示唆された。また卵巣摘出によっても嗅球 NGF、BDNF が変化しないことが示された。

これまで女性ホルモンであるエストロゲンと嗅覚に関する研究では、エストラジオールが神経保護作用を有する APO-E との相互作用で嗅細胞の減少を抑制することが報告されており、エストロゲンと嗅上皮再生には関係があることが示唆されている。

今回の結果で卵巣摘出により嗅上皮傷害後の再生遅延が示唆されたが、その要因として嗅球レベルでの NGF、BDNF は関与しない可能性が示された。

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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 7 件 )

1 ) 2018 年 Congress of the European Rhinologic Society

Gender differences and influences to olfactory nerve regeneration by ovariectomy in mice

Kentaro Yamada, Hideaki Shiga, Hideaki Ninomiya, Takuya Noda, Takaki Miwa

2 ) 2018 年耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会  
卵巣摘出マウスにおける嗅上皮障害の嗅上  
皮再生に関する研究

山田健太郎、志賀英明、能田拓也、石倉友子、  
中村有加里、二宮英明、三輪高喜

3 ) 2017 年日本鼻科学会  
嗅神経性嗅覚障害の病態解明と治療への応  
用

山田健太郎、志賀英明、能田拓也、張田雅之、  
二宮英明、三輪高喜

4 ) 2017 年 Congress of the International  
Rhinologic Society

Effects of ovariectomy on regeneration of  
olfactory neuron in mice

Kentaro Yamada, Hideaki Shiga, Hideaki  
Ninomiya, Takuya Noda, Takaki Miwa

5 ) 2017 年耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会  
低エストロゲンがマウス嗅上皮に及ぼす影  
響に関する研究

山田健太郎、志賀英明、能田拓也、張田雅之、  
二宮英明、三輪高喜

6 ) 2016 年日本鼻科学会  
マウス嗅上皮障害後の再生における性差に  
関する研究

山田健太郎、志賀英明、能田拓也、張田雅之、  
二宮英明、三輪高喜

7 ) 2016 年 International Symposium on  
Olfaction and Taste

An investigation into the differences in  
damage of the olfactory epithelium between  
female and male mice after administration  
of methimazole

Kentaro Yamada, Hideaki Shiga, Hideaki  
Ninomiya, Jyunpei Yamamoto, Takuya Noda,  
Masayuki Harita, Yukari Nakamura, Tomoko  
Hiraba, Takaki Miwa

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

山田 健太郎 ( KENTARO, Yamada )

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 60722642