

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18591901  
 研究課題名(和文) 嗅覚障害をもたらす嗅粘膜上皮のアポトーシス誘導経路とその抑制に関する解析  
 研究課題名(英文) Analysis of apoptotic pathway in olfactory receptor neurons which causes olfactory disturbance and inhibition of apoptotic cell death  
 研究代表者  
 坂本 幸士 (SAKAMOTO TAKASHI)  
 東京大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：50323548

研究成果の概要：メチマゾールによる嗅粘膜細胞障害は、免疫染色・TUNEL 染色・カスパーゼ活性のアッセイ・ウエスタンブロットによる細胞質分画のチトクロム c の定量の結果からミトコンドリア経路によるアポトーシスであることが示唆された。この障害はカスパーゼ 3・9 阻害剤の投与、強力な Bcl-xL 活性を有する合成蛋白 PTD-FNK 投与により抑制された。さらに、障害細胞では 8-OHdG、4-HNE、活性化 p38 MAPK の発現が亢進していたことからメチマゾールによる嗅粘膜細胞のアポトーシスは酸化ストレスの増加 p38 MAPK の活性化によって生じていることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,400,000	0	2,400,000
2007年度	600,000	180,000	780,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	330,000	3,830,000

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：嗅覚、嗅細胞、アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

嗅粘膜上皮は神経細胞という終末分化した細胞にもかかわらず、再生能力を有するという点で、他の終末分化細胞と異なる特徴を有している。それゆえ嗅粘膜上皮は再生過程に関しては、数々の研究が行われているが、嗅粘膜上皮障害、すなわち細胞死に関しては、未だ詳細な研究はなされていない。

臨床の場では嗅覚障害は感冒、ヘルペスウイルス感染、頭部外傷、加齢、薬剤の副作用により生じ、通常の治療手段としてはステロイド剤の点鼻・内服、ビタミン B12 内服などが用いられる。保存的治療が有効でない場合は、他に有効な治療手段がないのが現状であり新しい治療法の開発が待たれる。

## 2. 研究の目的

本研究では薬剤性嗅覚障害のモデルとして鼻毒性を有する薬物投与によって嗅粘膜障害を誘発し、細胞死の様式がアポトーシスかネクローシスであるかを検討する。また、アポトーシス誘発経路の詳細も検討し、その経路に応じたアポトーシス阻害剤の投与により形態的・機能的に嗅粘膜障害が抑制されるか否かを検討する。臨床で応用しうる嗅覚障害治療薬開発のための基礎的データの確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) メチマゾールによる嗅粘膜上皮のアポトーシスの誘導経路の検討：

対象はSDラットとする代表的な鼻毒性薬剤としてメチマゾールを用いる。メチマゾール300mg/kgを腹腔内投与し、24時間後に鼻腔組織を採取する。ホルマリン固定・脱灰後、パラフィン包埋鼻腔冠状断切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色、TUNEL染色、活性化カスパーゼ3・8・9抗体を用いた免疫染色で評価する。鼻腔組織の一部は蛋白を抽出し、細胞質分画のカスパーゼ3・8・9活性を蛍光光度計を用いて測定する。また細胞質分画中のチトクロムcの量をウエスタンブロットにより定量する。

### (2) カスパーゼ阻害剤投与によるメチマゾール誘発性嗅粘膜上皮のアポトーシスの抑制効果の検討：

対象はSDラットとする。メチマゾール投与30分前に(1)の結果に基づきカスパーゼ3阻害剤(Ac-DEVD-CHO)、カスパーゼ8阻害剤(Ac-IETD-CHO)、カスパーゼ9阻害剤(Ac-LEHD-CHO)を腹腔内投与し、メチマゾール投与24時間後に鼻腔組織を採取し(1)と同様の項目を評価する。

### (3) PTD-FNK投与によるメチマゾール誘発性嗅粘膜上皮のアポトーシスの抑

### 制効果の検討：

強力なBcl-xL活性を有するPTD-FNK投与によってメチマゾール誘発性の嗅粘膜上皮障害が抑制されるか否かを検討する。対象はSDラットとする。メチマゾール投与30分後にPTD-FNKを投与し、メチマゾール投与24時間後に鼻腔組織を採取する。ヘマトキシリン・エオジン染色、TUNEL染色、活性化カスパーゼ3・8・9抗体を用いた免疫染色で評価する。

### (4) メチマゾールによる嗅粘膜上皮細胞障害と酸化ストレス、mitogen activated protein kinase (MAPK)カスケードとの関連性の検討：

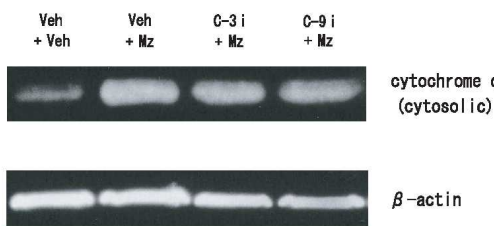
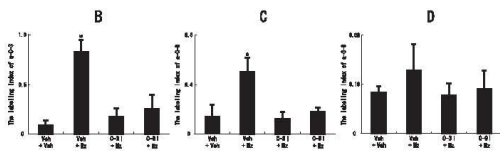
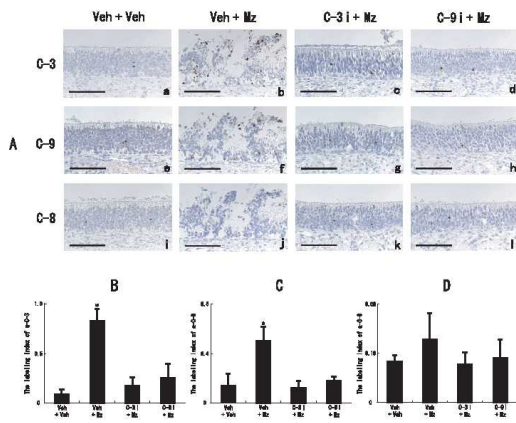
mitogen activated protein kinase (MAPK)カスケードは酸化ストレスを含む様々なストレスにより活性化されるキナーゼでありc-jun N terminal kinase (JNK)、p38 MAPK、extracellular signal-regulated kinase (ERK)の3つの要素で構成される。対象はSDラットとする。メチマゾール投与24時間後に鼻腔組織を採取しDNAの酸化の指標8-OHdG、脂質の酸化の指標である4-HNEに対する抗体を用いた免疫染色でメチマゾールによる嗅粘膜障害と酸化ストレスの関係を検討する。さらに、酸化ストレスとアポトーシスとの間を媒介するMAPKカスケードを明らかにするために活性化型(リン酸化型)JNK、p38 MAPK、ERKに対する抗体を用いた免疫染色を行う。

## 4. 研究成果

### (1) メチマゾールによる嗅粘膜上皮のアポトーシスの誘導経路の検討：

メチマゾールによる障害細胞はヘマトキシリン・エオジン染色で核の濃縮象を認めた。また、障害細胞に一致して活性化カスパーゼ3・9の発現亢進、TUNEL陽性染色性を認めた。カスパーゼの活性はカスパーゼ3・9で亢進しており、ウエスタンブロットでは細胞

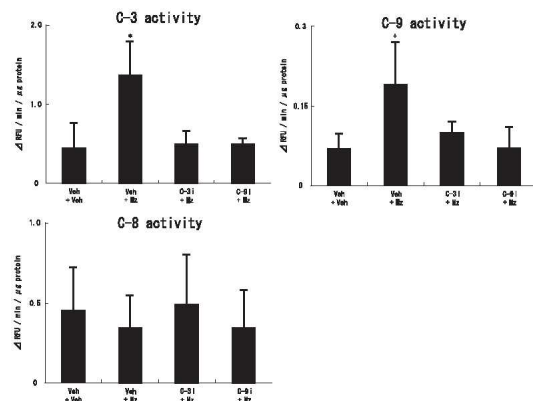
質分画中のチトクロム c の量は増加していた。これらの結果からメチマゾールによる嗅粘膜上皮の障害はミトコンドリアから細胞質へのチトクロム c の放出、カスパーゼ 9 活性化、カスパーゼ 3 活性化という intrinsic pathway で誘導されるアポトーシスによることが示された。鼻毒性薬剤による嗅粘膜上皮の障害はネクローシスによるとの説が有力であるが、本研究により初めて intrinsic pathway で誘導されるアポトーシスによることが示された。このことは嗅粘膜上皮の障害の抑制を試みる際に基になる重要な基礎データと考えられる。



(2) カスパーゼ阻害剤投与によるメチマゾール誘発性嗅粘膜上皮のアポトーシスの抑制効果の検討：

(1) の結果に基づいてメチマゾール投与前

にカスパーゼ 3 阻害剤(Ac -DEVD -CHO)、カスパーゼ 9 阻害剤(Ac -LEHD -CHO)を腹腔内投与し(1)と同様の項目について評価した。カスパーゼ 3・9 投与群ではヘマトキシリン・エオジン染色では嗅粘膜上皮の整合性が保たれていた。活性化カスパーゼ 3・9 の発現、TUNEL 陽性染色性はコントロール群と同程度であった。カスパーゼ 3・9 の活性もコントロール群と同程度でありウエスタンブロットによる細胞質分画中のチトクロム c の量もコントロール群と同程度であった。これらの結果からメチマゾールによる嗅粘膜上皮の障害はカスパーゼ 3 阻害剤、カスパーゼ 9 阻害剤投与により同程度に抑制されることが示された。アポトーシスはカスパーゼ依存性経路とカスパーゼ非依存性経路によって誘導されることが知られているが、この研究の結果はメチマゾールによる嗅粘膜上皮の障害はカスパーゼ依存性経路によってもたれられカスパーゼ非依存性経路が関与していないことを示している。また、カスパーゼ阻害剤が薬剤性嗅粘膜上皮障害の急性期の治療薬となりうる可能性を示唆しており意義深いと考えられる。



(3) PTD-FNK 投与によるメチマゾール誘発性嗅粘膜上皮のアポトーシスの抑制効果の検討：

PTD -FNK 1mg/kg、5mg/kg 腹腔内投与によりヘマトキシリン・エオジン染色による細胞剥

離像、活性化カスパーゼ 3・9 の発現、TUNEL 陽性染色性は容量依存性に抑制されメチマゾールによる嗅粘膜上皮細胞障害は PTD-FNK 投与に抑制されることが示された。PTD-FNK は強力な Bcl<sub>xL</sub> 活性を有しておりミトコンドリアからのチトクロム c の放出を抑制する働きを有している。この研究の結果より intrinsic pathway のより上流を抑制することでも嗅粘膜上皮のアポトーシスを効率的に抑制できることが示された。PTD-FNK の PTD ドメインは分子量の大きな蛋白質も効率的に細胞内に導入する性質があり、将来的には PTD-FNK の局所投与（点鼻）による急性期の嗅覚障害の治療薬につながりうる基礎データと考えられる。

（4）メチマゾールによる嗅粘膜上皮細胞障害と酸化ストレス、mitogen activated protein kinase (MAPK)カスケードとの関連性の検討：

免疫染色による評価からメチマゾールによる障害細胞に一致して 8-OHdG、4-HNE の発現亢進を認め、障害細胞には酸化ストレスが増大していることが示された。一方、障害細胞には活性化型（リン酸化型）p38 MAPK の発現が亢進していたが、活性化型（リン酸化型）JNK と ERK の発現はコントロール群と差は認められなかった。これらの結果からメチマゾールによる嗅粘膜上皮細胞のアポトーシスはミトコンドリア経路のより上位に酸化ストレスによる p38 MAPK の活性化経路が関与していることが示された。このことは p38 MAPK 阻害剤の投与により嗅粘膜上皮細胞障害が抑制しうる可能性を示唆しており、嗅覚障害の急性期の治療に発展する可能性がある。アポトーシスをより上位の経路で抑制することは抑制効果を最大限に高めるという意味でも合理的であり、本研究のいくつかの基礎データがより安全で効果的な嗅覚障害

の急性期の治療薬の開発に結びつきうる可能性があることを考えると、先駆的で独創性が高いと考えられる。

#### 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 3 件)

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. 2009 Mar; 335(3): 489-503. 査読有

Kashio A, Sakamoto T, Suzukawa K, Asoh S, Ohta S, Yamasoba T. A protein derived from the fusion of TAT peptide and FNK, a BCL-XL derivative, prevents cochlear hair cell death from aminoglycoside ototoxicity in vivo. J Neurosci Res. 2007 May 15;85(7):1403-12. 査読有

Sakamoto T, Kondo K, Kashio A, Suzukawa K, Yamasoba T. 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. 2007 Feb 15;85(3):548-57.

査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

坂本幸士、アポトーシス抑制蛋白質 PTD-FNK による薬剤性嗅上皮障害抑制の試み、東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム 2008、2008 年 9 月 23 日、東京大学安田講堂

坂本幸士、抗甲状腺剤メチマゾール投与によって誘発されるラット嗅細胞障害の障害様式に関する検討、日本鼻科学会、2007 年 9 月 29 日、栃木県総合文化センター

6 . 研究組織

(1)研究代表者

坂本 幸士 ( SAKAMOTO TAKASHI )

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 50323548

(2)研究分担者

(3)連携研究者