

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：10103

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09645

研究課題名（和文）匂い分子結合タンパク質の生理機構の解析と薬剤輸送キャリアーへの応用

研究課題名（英文）Analysis of the odorant binding protein function and application to drug delivery carrier

研究代表者

澤田 研（Sawada, Ken）

室蘭工業大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：50304308

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：匂い分子結合タンパク質の生理機構の解析では、匂い慣れにおいてスカベンジャーとして機能していることを見出した。匂い除去においてエンドサイトーシスにより嗅上皮内に取り込まれこのときCD36を介して細胞内に取り込まれこれに関与する本タンパク質のアミノ酸残基も同定した。このタンパク質を用いた脳への薬剤輸送系の確立において本タンパク質が嗅覚輸送により投与後10分で脳室全体に分布し3時間後には消化されていることが分かった。このタンパク質を用いた嗅覚障害マウスの治療において本タンパク質を薬剤キャリアーとして用いたとき用いてないときの1/3量で完治したことからこの方法は有効であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

匂い分子結合タンパク質が嗅覚において嗅神経細胞の匂い感度上昇に関与しているだけでなくエンドサイトーシスにより匂い分子の除去にも関与している分子機構を明らかにできた。脳への薬剤キャリアーとして本タンパク質が有効であることが分かったが、嗅覚障害以外の脳疾患の治療への応用を解析することは超高齢化社会の問題の1つである認知症・パーキンソン病の治療のきっかけになる可能性があると考えている。

研究成果の概要（英文）：Analysis of the physiological mechanism of odorant binding protein revealed that they function as scavengers. We also identified taken into the olfactory epithelium by endocytosis. this endocytosis need to CD36 protein. We also identified that two amino acid residues of odorant binding protein involved in this endocytosis. In establishing a drug delivery system for the brain using this protein, we found that this protein was distributed throughout the ventricles of the brain 10 minutes after administration by olfactory transport, and was digested 3 hours later. This method was found to be effective in the treatment of olfactory-impaired mice using this protein, as when this protein was used as a drug carrier, complete cure was achieved with one-third the dose of when it was not used.

研究分野：生化学 分子生物学

キーワード：匂い分子結合タンパク質 嗅覚輸送 ドラッグデリバリー 薬剤キャリアー

1. 研究開始当初の背景

匂い分子の受容に関わる嗅覚受容体の匂い分子選択性などの受容機構において不明な点がある。申請者は、粘液層の存在しないとき嗅覚受容体の匂い分子の受容感度の低下や結合する分子の選択性が変化することなどに注目し、嗅粘液層に存在する匂い分子結合タンパク質がこれらに関与していると考えた。また、嗅粘液層からの匂い除去機構にも関わっているとも考えた。このタンパク質は嗅覚において進化の過程で両生類以降の生物種では存在するが、その生理機能の詳しい解析は行われていない。匂い分子の構造と薬剤の構造が類似していることから本タンパク質を用いた薬剤輸送キャリアーへの応用を申請者は考えた。血液循環による薬剤投与は血液脳関門がある脳への輸送が困難である。そのため、中枢神経疾患の治療が困難となっている。本申請では嗅覚輸送による本タンパク質が薬剤輸送キャリアーとしての可能性を検討する。このためにアルツハイマー型認知症などの中枢神経系の疾患の初期症状である嗅覚障害に注目した。これまでに嗅覚障害に関する研究は少なく嗅覚障害だけのモデルマウスでの解析は行われていない。コロナウィルスの症状の嗅覚障害の病理的な解析にも貢献できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では匂い分子結合タンパク質の生理的役割を解明し、このタンパク質が脳への薬剤輸送キャリアーとしての可能性を検討する。

研究期間内には次のことを明らかにする。

(生理機能の解明) (1) 匂い受容に与える影響とその分子機構の解析 (2) 匂い受容後の本タンパク質の分布変化とその分子機構の解析。

(応用研究) 脳への本タンパク質の薬剤輸送キャリアーとしての可能性 (1) 嗅覚障害マウスの病理解析 (2) 本タンパク質をキャリアーとして用いたときの嗅覚障害マウスの治療効率を検討する。

3. 研究の方法

(生理機能の解明)

(1) 匂い受容に与える影響とその分子機構の解析

○必要性: Cp-Lip2 は Cp-Lip1 で示された嗅神経細胞の匂い受容感度上昇には関与していない。しかし、嗅組織の分布結果から匂い分子の除去機能をしていることが示唆されている。
○内容: Cp-Lip2 の生理的解析 Cp-Lip2 では匂い分子の除去機能が示唆されているためこの点を明らかにする。Cp-Lip2 の存在の有無により匂い刺激による嗅神経細胞の応答の違いを比較する。すでに除去機能を示唆する結果を得ているが、タンパク質と匂い分子の比率や時間依存的な変化について解析を行う。観察には、Ca²⁺イメージング法を用いて蛍光プローブとして Fluo4-AM を用いて共焦点レーザー顕微鏡で観察する。

(2) 匂い受容後の本タンパク質の分布変化とその分子機構の解析)

○必要性: Cp-Lip1 は匂い受容後に嗅上皮内全体に取り込まれ消化されていることが示されている。これはエンドサイトーシスであると考えられるためこの点を明らかにすることとその受容体を同定する必要がある。また、Cp-Lip2 ではほとんど知見が得られていない。

○内容: 匂い受容後の Cp-Lip2 の分布変化

両タンパク質に結合する匂い分子が飽和したケースにイモリを移し、時間経過 (5, 10 分) 後イモリを取り出し嗅組織切片を作成する。その後、これまで分布の解析に用いた抗体により時間依存的な分布変化を解析する。組織切片の調整はマイクロトームを用いる。観察は共焦点レーザー顕微鏡を用いる。

○内容: 匂い受容後の嗅上皮内への取り込み機構の解析

酸性の pH 感受性蛍光試薬であるアクリジンオレンジを用いて解析を行う。共焦点レーザー顕微鏡で観察する。すでにこの解析系を用いてエンドサイトーシスを示すデータが得られており詳細な時間・空間的解析や阻害剤を用いた解析を行う。

○内容: 嗅上皮内への取り込みに関わる受容体の同定とそれに関わる Cp-Lip1 タンパク質のアミノ酸残基の特定マウスで報告されているスカベンジャー受容体に注目してこれに対する抗体を用いて解析を行う。事前実験で匂い刺激後この受容体が嗅上皮内に取り込まれている結果が得られている。より詳細な解析を行うために本タンパク質との 2 重・3 重染色や時間依存的な解析を行う。機能に関わるアミノ酸は C 末端側にあることがこれまでの解析から分かっておりこの領域のペプチドを複数作成する。スカベンジャー機能を解析した系にこのペプチドを加え、このときスカベンジャーを阻害するペプチドが生理機能に関わる領域であると考えられる。次にこの領域内のアミノ酸配列を考慮し変異体ペプチドを作成し解析することで関与するアミノ酸を同定する。

(応用研究) 脳への本タンパク質の薬剤輸送キャリアーとしての可能性

○必要性：これまでにストレス負荷により作成した嗅覚障害モデルマウスから嗅覚障害のみがみられた場合も嗅上皮と海馬における細胞密度の低下がみられた。この影響には順番があるのかかを明らかにする必要がある。

○内容： 嗅覚障害マウスの病理解析 3 週間のストレス負荷条件かでは嗅覚障害のみが起こることが分かっている。そこでより短いストレス時間のマウスを調製し、行動学的解析と病理学的解析により解析を行うことで影響の順番などを検討する。嗅覚障害はペレット試験により解析し短期記憶に関しては Y 字迷路により解析する。病理解析は、細胞数は Propidium Iodide 染色を用いる。また、神経細胞数に関しては NeuN 抗体を用いて解析する。また、脳内の海馬以外の領域についても解析する。

○必要性： 薬剤輸送キャリアーとしての可能性を検討するためには治療に必要な薬剤量の減少を目安としてその有効性を評価する。申請者はこれまでに薬剤のみを投与した場合と薬剤と本タンパク質を混合して投与した場合の治療効果を比較した結果、本タンパク質が薬剤キャリアーとして利用できることを示した。しかし、個体数が 4 と少なく n 値を増やす必要がある。また、上記した結果は嗅覚障害のみのマウスの場合であるが、記憶障害も発症しているマウスでは検討していないのでこれに関しても解析する必要がある。

○内容： 本タンパク質をキャリアーとして用いたときの嗅覚障害マウスの治療効率を検討する。上記したように嗅覚障害のみのマウスにコントロールとして薬剤のみと本タンパク質との混合及び PBS のみを投与することで治療の有効性と副作用などを比較して解析する。これにより有用性の n 値を増やすことでよりキャリアーとしての可能性を確実なものにする。同様に嗅覚障害と記憶障害をもつモデルマウスを調製し、同様な方法で本タンパク質の有効性を検証する。使用する薬剤はヒトの嗅覚障害で治療に使うリンデロン液 (0.1%) (ベタメタゾンリン酸エステルナトリウム液) を用いる。薬剤は鼻腔内に投与することで嗅覚輸送により脳へ輸送する。

4. 研究成果

(生理機能の解明)

(1) 匂い受容に与える影響とその分子機構の解析

Cp-Lip2 は Cp-Lip1 で示された嗅神経細胞の匂い受容感度上昇には関与していない。しかし、嗅組織の分布結果から匂い分子の除去機能をしていることが示唆されている。Cp-Lip2 の生理的解析のため Ca²⁺イメージング法により解析した結果、Cp-Lip2 存在下では嗅神経細胞は匂い受容を示す細胞内の Ca²⁺濃度の上昇は観察できなかった。これは Cp-Lip2 に結合した匂い分子は嗅神経細胞では受容できていないことを意味している。

(2) 匂い受容後の本タンパク質の分布変化とその分子機構の解析) ○必要性： Cp-Lip1 は匂い受容後に嗅上皮内全体に取り込まれ消化されていることが示されている。これはエンドサイトーシスであると考えられるためこの点を明らかにすることとその受容体を同定する必要がある。また、Cp-Lip2 ではほとんど知見が得られていない。

匂い受容後の Cp-Lip2 の時間依存的分布変化を解析したところ時間依存的なタンパク質の分布に変化は見られなかった。その分布は嗅粘液層と嗅上皮組織内に分布していることが分かった。このため、このタンパク質は常時、嗅粘液層から匂い分子を除去しているスカベンジャーとして機能していることが分かった。

○内容： 匂い受容後の嗅上皮内への取り込み機構の解析

酸性の pH 感受性蛍光試薬であるアクリジンオレンジを用いて解析を行った結果、匂い刺激後 1 分程度で嗅上皮細胞内でアクリジンオレンジの蛍光が検出できた。その後、刺激 5 - 7 分にかけて最大蛍光の値を示すことが分かりその後は 3 分ほどかけて消光していった。これらの蛍光変化は一般的なエンドサイトーシスの様子とよく一致し、これまでに明らかにした Cp-Lip タンパク質の分布変化ともよく一致した。

○内容： 嗅上皮内への取り込みに関わる受容体の同定とそれに関わる Cp-Lip1 タンパク質のアミノ酸残基の特定

マウスで報告されているスカベンジャー受容体 CD36 に注目してこれに対する抗体を用いて解析を行った結果、Cp-Lip1 の挙動と完全に一致していた。つまり、Cp-Lip1 のエンドサイトーシスには CD36 が関与していることが分かった。つぎにエンドサイトーシスに関わるアミノ酸を同定するため、C 末端側の約 80 アミノ酸を 2 次構造をもとに 4 つのペプチドを作成した(ペプチド 1 93-109aa ペプチド 2 110-126aa ペプチド 3 127-147aa ペプチド 4 148-165aa)。スカベンジャー機能を解析した系にこのペプチドを加え、このときスカベンジャーを阻害するペプチドが生理機能に関わる領域であると考えられる。解析した結果、ペプチド 3 だけがスカベンジャー機能を阻害したことからこの領域が関与していることが分かった。この領域は 131 残基目が E と 134 残基目が K のアミノ酸残基を有していること 2 次構造が ヘリックス構造を考慮するとこの 2 つのアミノ酸残基はタンパク質の外側に配置されていることからスカベンジャーの取り込みに関与していると思われる。そこで、両アミノ酸残基が荷電を持たない変異体ペプチドとアミノ酸置換後も荷電を有しているペプチドを作成してスカベンジャー機能への影響を解析した結果、野生型と同じ荷電を持つペ

プチドではスカベンジャー機能の阻害が見られたが、荷電を持たないペプチドでは阻害は見られなかった。これらのことから、E131 と K134 がスカベンジャー機能に関与していると示唆された。

(応用研究) 脳への本タンパク質の薬剤輸送キャリアーとしての可能性

○必要性：これまでにストレス負荷により作成した嗅覚障害モデルマウスから嗅覚障害のみがみられた場合も嗅上皮と海馬における細胞密度の異常がみられた。この影響には順番があるのか否かを明らかにする必要がある。

○内容： 嗅覚障害マウスの病理解析 3 週間のストレス負荷条件かでは嗅覚障害のみが起こることが分かっている。そこでより短い 2 週間のストレス時間のマウスを調製し、行動学的解析と病理学的解析により解析を行った結果、行動学的には嗅覚障害は認められなかった。病理学的解析結果から嗅上皮の細胞密度が健常マウスと比較して有意な低下が見られたが、海馬においては異常は見られなかった。つまり、嗅覚障害には嗅上皮細胞数の密度低下だけでは発症せず海馬の異常が起こらないと発症しないことが分かった。

○必要性：薬剤輸送キャリアーとしての可能性を検討するためには治療に必要な薬剤量の減少を目安としてその有効性を評価する。申請者はこれまでに薬剤のみを投与した場合と薬剤と本タンパク質を混合して投与した場合の治療効果を比較した結果、本タンパク質が薬剤キャリアーとして利用できることを示した。しかし、個体数が 4 と少なく n 値を増やす必要がある。また、上記した結果は嗅覚障害のみのマウスの場合であるが、記憶障害も発症している マウスでは検討していないのでこれに関しても解析する必要がある。

○内容： 本タンパク質をキャリアーとして用いたときの嗅覚障害マウスの治療効率を検討する。上記したように嗅覚障害のみのマウスにコントロールとして薬剤のみと本タンパク質との混合及び PBS のみを投与することで治療の有効性と副作用などを比較して解析する。これにより有用性の n 値を増やすことでよりキャリアーとしての可能性を確実なものにする。同様に嗅覚障害と記憶障害をもつモデルマウスを調製し、同様な方法で本タンパク質の有効性を検証する。使用する薬剤はヒトの嗅覚障害で治療に使うリンデロン液(0.1%) (ベタメタゾンリン酸エステルナトリウム液)を用いる。薬剤は鼻腔内に投与することで嗅覚輸送により脳へ輸送する。上記のよう解析した結果、十分な n 値を解析できこのタンパク質が脳への薬剤キャリアーとして有効であることが示された。それは、このタンパク質をキャリアーとして用いたとき薬の投与量が通常の 1/6 で十分に完治できたが、この投与量にタンパク質を添加していないと全く治癒できなかった。従って、このタンパク質は脳への薬剤キャリアーとして有効であることが分かった。今後さらに詳細な研究により本タンパク質の薬剤キャリアーとしての有効性を明らかにしていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 林 真央、太田拓希、荒木 匠、金田春佳、遠藤翔太、細井鈴音、澤田 研	4. 巻 1
2. 論文標題 嗅覚障害モデルマウスを用いた匂い分子結合たんぱく質の薬剤キャリアーとしての可能性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本味と匂学会誌 第55回 proceeding集	6. 最初と最後の頁 33-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 荒木 匠、林 真央、太田拓希、細井鈴音、澤田 研	4. 巻 1
2. 論文標題 初期の嗅覚障害マウスでの病理学的解析と自然治癒の可能性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本味と匂学会誌 第55回 proceeding集	6. 最初と最後の頁 29-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林 真央、太田拓希、細井鈴音、横山実夢、阿部睦生、塚田健介、澤田 研
2. 発表標題 長期的な(20週間)慢性ストレスによるマウスの行動学のおよび病理学的解析
3. 学会等名 日本味と匂学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田拓希、林 真央、横山実夢、細井鈴音、塚田健介、阿部睦生、澤田 研
2. 発表標題 嗅覚および記憶障害モデルマウスの薬剤キャリアーを用いた治療の検討
3. 学会等名 日本味と匂学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 真央、太田拓希、荒木 匠、金田春佳、遠藤翔太、細井鈴音、澤田 研
2. 発表標題 嗅覚障害モデルマウスを用いた匂い分子結合たんぱく質の薬剤キャリアーとしての可能性
3. 学会等名 日本味と匂学会誌 第55回
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木 匠、林 真央、太田拓希、細井鈴音、澤田 研
2. 発表標題 初期の嗅覚障害マウスでの病理学的解析と自然治癒の可能性
3. 学会等名 日本味と匂学会誌 第55回
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------