

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 23 年 6 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23791897

研究課題名（和文） 質量分析計を利用した嗅覚障害の病態解明

研究課題名（英文） Pathologic Elucidation of Olfactory Disorder Using Mass Spectrometry

研究代表者 土井 清司（DOI KIYOSHI）

神戸大学大学院医学研究科 助教

研究者番号：00379380

研究成果の概要（和文）：嗅神経細胞は終生にわたり再生を繰り返すユニークな特徴があり、その再生過程には、様々な因子が関与している。本研究では、嗅神経細胞の再生過程における遺伝子レベルでの動態を観察した。その結果、神経栄養因子 BDNF は、再生過程初期では嗅上皮で機能しており、再生過程晩期では嗅球で関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The olfactory receptor neurons have an unusual characteristic of continuous neurogenesis throughout its lifetime. We observed a dynamic state of gene in the regeneration process of olfactory receptor neurons. From this observation, it was suggested that BDNF, that is known as a neurotrophic factor participates to the olfactory regeneration process at early phase in the olfactory epithelium and at late phase in the olfactory bulb.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

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：嗅覚障害、マイクロアレイ・BDNF

## 1. 研究開始当初の背景

嗅神経細胞は終生にわたり再生を繰り返すという非常にユニークな特徴を持つ神経細胞である。嗅神経細胞の再生過程には、様々な神経栄養因子が関与していることが解明されている。これらの神経栄養因子は、将来、新たな嗅覚障害の治療薬の確立に必要なもの

のと考えている。そこで、各因子が再生過程において役割を担うタイミングや部位について、さらに明確にすることに着眼をした。

## 2. 研究の目的

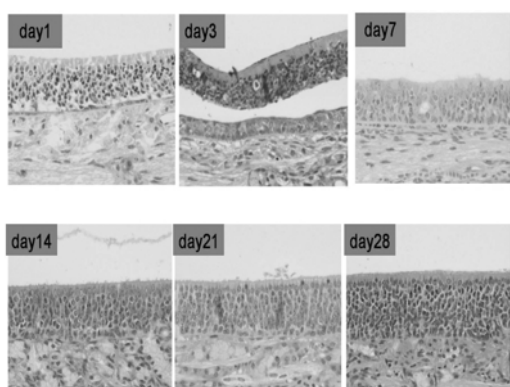
神経栄養因子を含む様々な因子が、嗅神経細胞の再生過程に発現している。これらの因子

の発現状況を網羅的な遺伝子解析（マイクロアレイ法）と質量分析計を利用した代謝産物の包括的解析を経時的に行うことにより、嗅神経細胞の再生過程における関連因子の発現状況をダイナミックな変動を捉えることを実施する。変動状況から再生過程において重要度の高い神経栄養因子を選び出す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 嗅覚障害モデルの作成

若齢の Balb/C マウスにメチマゾール 100mg/kg を腹腔内投与すると、嗅上皮には再生のもとになる基底細胞を残しながら速やかに脱落する。その後、基底層より再生が始まり、約4週間で元の嗅上皮の状態にまで回復する。(図1) この障害モデルを利用して、嗅上皮および嗅覚一次中枢である嗅球の組織を計画されたスケジュール（メチマゾール投与 12 時間後・1・3・7・14・21・35・42 日後）で採取を行ない、解析用の検体とした。

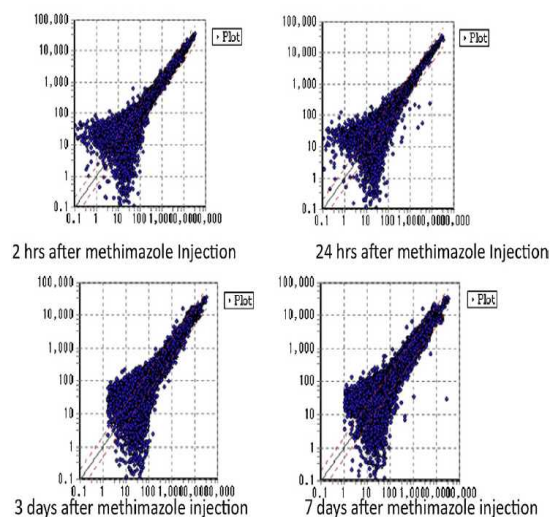


(図1) 嗅覚障害モデルにおける嗅上皮の再生過程

チマゾール投与直後から基底層上で上皮脱落が始まる。3 日目には上皮は完全に脱落すると同時に、基底層から再生が始まる。しだいに上皮内の細胞数は増加していき、28 日には正常と同様な状態に回復する。

#### (2) 網羅的な遺伝子解析

嗅覚障害モデルと健常コントロールより嗅球・嗅上皮を採取し、マイクロアレイ解析を用いて全RNAを抽出し、抽出されたmRNAの発現量の変化の解析を行った。(12 時間後、1・3・7 日後の解析データを図2に示す)



(図2) 嗅球組織のマイクロアレイ解析

横軸は健常コントロール群・縦軸は障害モデル群のmRNA発現量の比を表す。

#### (3) real-time RT-PCR

マイクロアレイでの解析で、選別された遺伝子を対象に real-time RT-PCRを行い、特異的にDNAの定量を行った。また、その変化と嗅神経細胞の成熟段階との関連を明らかにするために、成熟した嗅神経細胞のマーカーである OMP と未成熟な嗅神経細胞のマーカーである TrkB についても、同様に経時的な変化を確認した。

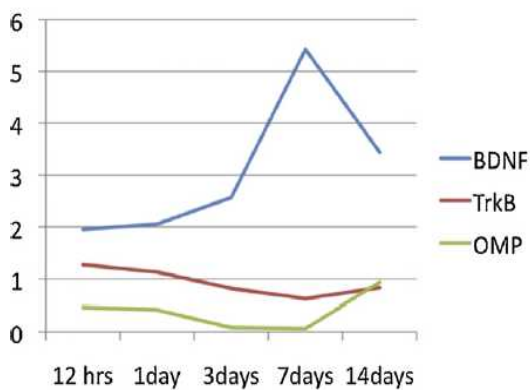
### 4. 研究成果

#### (1) マイクロアレイによる解析

嗅球組織において抽出された遺伝子のうち、

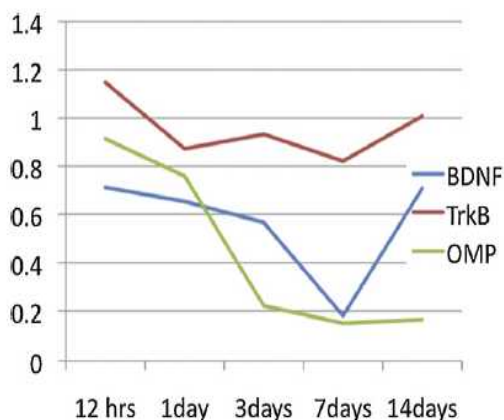
メチマゾール投与後 12 時間、1・3・7・14 日目の過程で 809 種類の遺伝子が 2 倍以上の変化を認めていた。一方で嗅上皮においては、同期間に 1312 種類の遺伝子が 2 倍以上の変化を認めていた。

これらの結果の中から、神経栄養因子の 1 つである BDNF (brain-derived neurotrophic factor) がよりダイナミックな変化を認めた。(図 3) (図 4)



(図 3) 嗅上皮における BDNF の変化

BDNF, TrkB, OMP の転写 RNA の変化 (マイクロアレイ法) 縦軸:mRNA 転写の発現度合の比。横軸:メチマゾール投与からの日数



(図 4) 嗅球における BDNF の変化

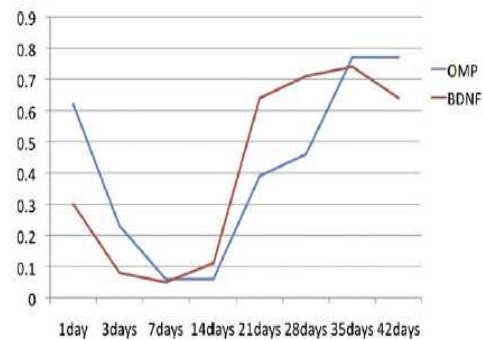
BDNF, TrkB, OMP の転写 RNA の変化 (マイクロアレイ法) 縦軸:mRNA 転写の発現度合の比。横軸:メチマゾール投与からの日数

## (2) real-time PCR での確認

BDNF の経時的な変化を RT-PCR 法での解析を追加して検討した。(図 5)

マイクロアレイ法に検討結果と同様な変化であった。BDNF の mRNA は、メチマゾール投与後の 7 日目までに有意な減少を示し、その後増加し始める。OMP の mRNA も同様な変化を示し、

BDNF の mRNA レベルの変化の方が、OMP よりも先行した動きであった。



(図 5) RT-PCR による BDNF, OMP の RNA 転写の変化 (嗅球)

本実験において、嗅上皮および嗅球の再生過程の遺伝子レベルでの変動が詳細に観察された。それらの結果を検討した上で、嗅神経の再生に有意な変動を認めた遺伝子を選出した。神経栄養因子である BDNF 遺伝子の発現は、再生過程初期の嗅上皮において、劇的な増加を認めた後に減少をしていった。一方で、嗅球での BDNF 遺伝子の変化は、再生過程初期で劇的に減少を認めた後に、徐々に増加していった。この結果により BDNF は、再生過程初期では嗅上皮で機能しており、再生

過程晩期では嗅球で関与することが示唆された。これらの結果は、将来的に嗅覚障害に対する新たな治療法（再生）に向けた実験系を確立する際に治療候補因子の選出のための貴重な情報となりうると考えられた。

## 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 2 件)

1) Uranagase A, Katsunuma S, Doi K, Nibu K: BDNF expression in olfactory bulb and epithelium during regeneration of olfactory epithelium, *Neurosci Lett* 516(1): 45-9, 2012.

2) Fujio H, Doi K, Hasegawa S, Kobayakawa T, Nibu K: Evaluation of card-type odor identification test for Japanese patients with olfactory disturbance, *Ann Otol Rhinol Laryngol* 121(6):413-8, 2012.

[学会発表] (計 1 件)

Uranagase A, Nibu K, Doi K, Katsunuma S: BDNF expression in olfactory bulb and epithelium during regeneration of olfactory epithelium. 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology -Head and Neck Surgery, Kobe, 2011. 12. 8-9.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

土井 清司 (DOI KIYOSHI)

神戸大学大学院医学研究科 助教

研究者番号：00379380