

厚生科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

老化に伴う嗅覚障害に対する治療法の開発に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 丹生健一

平成14（2002）年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
老化に伴う嗅覚障害に対する治療法の開発に関する研究	1
丹生健一	
II. 分担研究報告	
1. 嗅上皮再生への神経成長因子の効果に関する研究	2
丹生健一 石田春彦	
(資料1) 図1: 老化による嗅上皮の菲薄化	
2. 嗅球の老化による変化に関する研究	4
森 憲作	
(資料2) 図2: nestin-GFPトランスジェニックマウスによる内因性信号の光学的観察	
3. 老人性嗅覚障害に関する研究	6
竹内直信	
4. 嗅上皮の老化による変化に関する研究	7
太田 康	
5. 嗅神経細胞のアポトーシスに関する研究	8
石橋敏夫	
(資料3) 図3: 嗅球切断4時間後のMAPキナーゼフォスファターゼ遺伝子群の発現誘導	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	10
IV. 研究成果の刊行物・別刷	11

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）
総括研究報告書

老化に伴う嗅覚障害に対する治療法の開発に関する研究

主任研究者 丹生健一 神戸大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：老化による嗅覚障害の治療法を開発するための第1段階として、本年度は高齢者の嗅覚障害の実体調査、老化による嗅覚系の変化、老化による嗅覚障害モデルとなるマウスの検討、嗅上皮の器官培養法の開発を行なった。その結果、高齢者では原因が明らかでない嗅覚障害の割合が多く従来治療法による治癒率も低いこと、老化による嗅覚系の変化は主に嗅上皮で見られること、老化促進モデルマウスSAM1が嗅上皮の老化モデルとして有望なこと、nestin-GFPマウスが嗅覚中枢老化の研究に有用なこと、老化による嗅覚系の変化が主に嗅覚受容体の存在する嗅上皮に認められ、嗅覚の一次中枢の変化が少ないこと、Millicellを用いたマウスの器官培養法が有望であることなどが明らかとなった。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

石田春彦	神戸大学病院	講師
森憲作	東京大学大学院	教授
竹内直信	東京大学大学院	講師
太田康	自治医科大学	講師
石橋敏夫	社会保険中央病院	部長

A. 研究目的

嗅覚障害は、栄養面、衛星面、安全面、QOLなど、様々な面への影響を及ぼす。特に高齢者においてはその影響は大きく、これからの高齢化社会においては解決すべき重要な課題である。現時点ではステロイドの点鼻以外に有効な治療法はなく、治癒率も思わしくない。本研究は高齢者の嗅覚障害に対する新たな治療法の開発を目指して計画された。

B. 研究方法

1. 老人性嗅覚障害の実体調査
東京大学・自治医科大学・神戸大学の耳鼻咽喉科嗅覚外来において高齢者嗅覚障害の原因・問題点・治療効果などの実体調査を行なった。

2. マウスin vivoモデルによる研究
1) 正常マウスおよびnestin-GFPトランスジェニックマウス、セマフォリン3A遺伝子欠損マウスにて老化による嗅覚系の変化を検討した。
2) 老化促進マウスモデルSAM1の嗅覚系老化モデルとしての有用性を検討した。
3. マウスin vitroモデルによる研究
マウス嗅上皮の器官培養による治療薬の効果を研究するために、効果的な器官培養法を検討した。

(倫理面への配慮)

患者様への検査・治療においては十分な説明の下に同意を得て行ない得られた結果のデータ管理には細心の注意を払っている。また治療上必要がなく研究のために必要な検査は当研究計画には含まれていない。動物実験・遺伝子組み替え実験については各施設の動物実験または遺伝子組み替えに関する倫理委員会の承認を受けて行なっている。

C. 研究結果

1. 高齢者の嗅覚障害は若年者と比較し原因が明らかでないものが多く、また治癒率が低い傾向が見られた。
2. マウス嗅上皮では老化により嗅上皮の菲薄化、嗅上皮面積の減少、嗅上皮におけるアポトーシスの増加などが認められた。
3. nestin-GFPトランスジェニックマウスは嗅神経細胞の軸索ならびに嗅覚系の一次中枢である嗅球の研究に有用であることセマフォリン3A遺伝子欠損マウスにより嗅神経細胞軸索誘導にセマフォリン3Aが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。
4. 老化促進モデルマウスSAM1は正常マウスと比較し早期より形態学的に嗅上皮の老化が見られた。
5. Millicellを用いた培養方法がマウス嗅上皮の器官培養に有用であった。

D. 結果

1. 高齢者の嗅覚障害は末梢性のものが主であると考えられた。
2. SAM1マウスならびにnestin-GFPマウスは嗅覚系の老化研究に有用であった。
3. Millicellを用いたマウス嗅上皮器官培養法はin vitroでの嗅覚治療薬開発に有用であると期待される。

E. 研究発表：各分担研究者報告書参照

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

老化に伴う嗅覚障害に対する治療法の開発に関する研究

主任研究者 丹生健一 神戸大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：老化による嗅覚障害の治療法を開発するための第1段階として、本年度は老化による嗅覚障害モデルとなるマウスの検討、嗅上皮の器官培養法の開発を行なった。その結果、老化促進モデルマウスSAM1が嗅覚の老化モデルとして有望なこと、老化による嗅覚系の変化は主に嗅覚受容体の存在する嗅上皮にみとめられ、嗅覚の一次中枢である嗅球の変化は少ないこと、Millicellを用いたマウスの器官培養法が有望であることが明らかとなった。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

石田春彦 神戸大学病院 講師

A. 研究目的

本研究は高齢者の嗅覚障害に対する新たな治療法の開発を目指して計画された。本年度は第1段階として嗅覚系老化モデルをin vivoおよびin vitroで確立することを目標とした。

B. 研究方法

1. 正常マウスによる研究
正常マウスの胎生期から生後2年までの嗅上皮を免疫組織学的ならびに形態学的に観察し老化による変化を検討した。

2. マウスin vivoモデルによる研究
老化促進マウスモデルSAM1および対照群としてback groundであるAKRマウスの嗅上皮を各週齢で比較検討し、嗅覚系老化モデルとしての有用性を検討した。

3. マウスin vitroモデルによる研究
マウス嗅上皮の器官培養による治療薬の効果を研究するために、効果的な器官培養法を検討した。

（倫理面への配慮）

動物実験については神戸大学医学部動物実験施設倫理委員会の承認を受けて、規則に基づき行なっている。

C. 研究結果

1. マウス嗅上皮では老化により嗅上皮の菲薄化、嗅上皮面積の減少が認められた。一方、嗅覚の一次中枢である嗅球の形態学的変化はほとんど認められなかった。
2. 老化促進モデルマウスSAM1は正常マウスと比較し早期より形態学的に嗅上皮の老化が見られた。
3. Millicellを用いた培養方法がマウス嗅上皮の器官培養に有用であった。

D. 考察

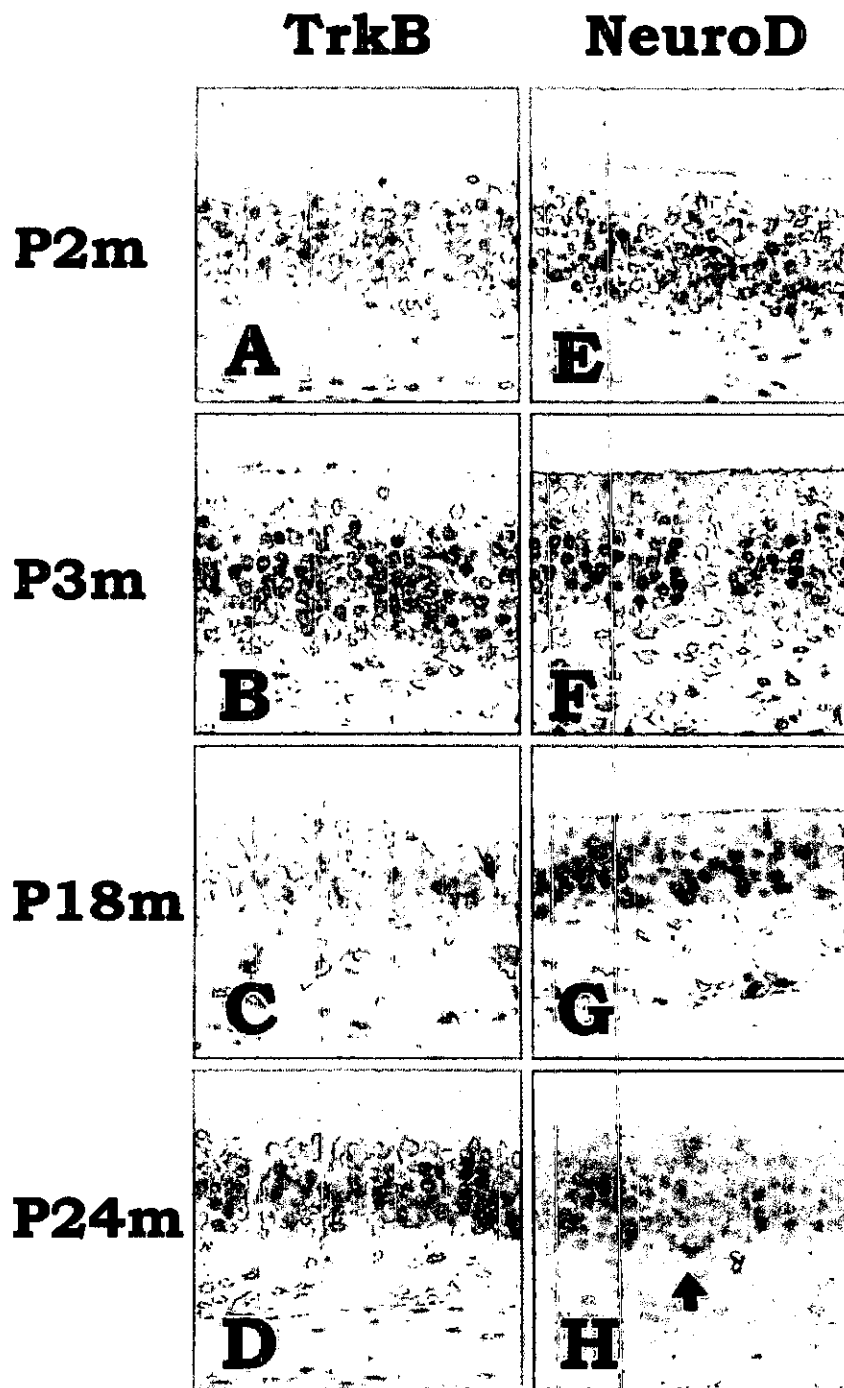
1. 老化による嗅覚系の形態学的変化は主に末梢レベルのものであり嗅上皮の再生治療が高齢者嗅覚障害の治療のターゲットとなると考えられた。
2. SAM1マウスは早期より嗅上皮老化変化を形態学的に示し嗅覚系の老化モデルとして有用であると考えられた。
3. Millicellを用いたマウス嗅上皮器官培養法はin vitroでの治療薬開発研究に有用であると考えられた。

E. 研究発表

論文

Nibu K: Structure and Function of Olfactory Neuroepithelium. Microscopic Research and Technique, in press

Nibu K, et al: Expression of NeuroD and TrkB in developing and aged mouse olfactory epithelium. Neuroreport 2001 12 1615-9



正常マウス嗅上皮の加齢による変化：加齢により嗅上皮は著明に萎縮する。

TrkB：神経栄養因子 BDNF のレセプター（成熟した嗅神経細胞に発現）

NeuroD：神経分化に関わる転写因子（分化中の嗅神経細胞に発現）

P：postnatal period, m: month

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

嗅球の老化による変化に関する研究

分担研究者 森 憲作 東京大学大学院 教授

研究要旨： 老化による嗅覚中枢系の変化を解明することを目的として本年度は第1段階として成体マウスの嗅球全体における「匂い地図」の空間配置様式をnestin-GFPトランスジェニックマウスおよびセマフォリン3A欠損マウスを用いて調べた。正常マウスでは嗅覚の一次中枢である嗅球には嗅覚の機能単位であるMolecular Feature Domainが嗅球全体にわたって存在し、どの方向においても一定の位置に決まった方向をもって配置されていること、セマフォリン3A欠損マウスでは嗅細胞の軸索の投射標的系球の空間的配置が大きく変化すること、が観察された。これらの結果より再生嗅神経細胞軸索ガイダンスにはセマフォリン3Aが重要な役割を担っていることが示唆された。

A. 研究目的

老化による嗅覚障害の治療法の開発に関する研究の一環として、老化による嗅覚中枢系の変化を解明することを目的として計画した。本年度は嗅球の「匂い地図」の老化に伴う変化を研究する第1段階として成体マウスの嗅球全体における「匂い地図」の空間配置様式を調べた。

B. 研究方法

1. 神経幹細胞に特異的に発現するnestinにGFPを組み込んだトランスジェニックマウスを作成し内因性信号の光学的測定法により嗅球内における嗅覚の機能単位の配置を解析した。
2. 匂い刺激による最初期遺伝子Zif268の発現をマッピングし嗅球内における嗅覚の機能単位の配置を解析した。
3. 再生嗅神経の嗅球への正確な投射には軸索ガイダンス分子セマフォリン3Aが必要であると予想されるため、セマフォリン3A遺伝子欠損マウスを用いて、「匂い地図」の形成におけるセマフォリン3A分子の役割を調べた。

(倫理面への配慮)

動物実験についてはPrinciples of laboratory animal care(NIH 86-23, 1985)に基づいて行なわれた。遺伝子実験については東京大学大学院医学系研究科の遺伝子実験倫理委員会の承認を受けて行なわれた。

C. 研究結果

1. 嗅球内の嗅覚の機能単位であるMolecular Feature Domainが嗅球全体にわたって存在し、どの個体においても一定の位置に決まった方向を持って配置されていることがわかった。
2. セマフォリン3A欠損マウスではニューロピリン(セマフォリンの受容体)を発現した嗅細胞の軸索の投射標的系球の空間的配置が大きく変化し嗅球の「匂い応答地図」にも大きな変動が見られた。

D. 考察

1. nestin-GFPトランスジェニックマウスを用いた内因性光学的測定法は嗅覚の一次中枢である嗅球の老化による変化を研究に有用であると思われた。
2. セマフォリン3Aが嗅細胞軸索の嗅球内の系球への投射に重要な役割を果たしていることが示唆された。

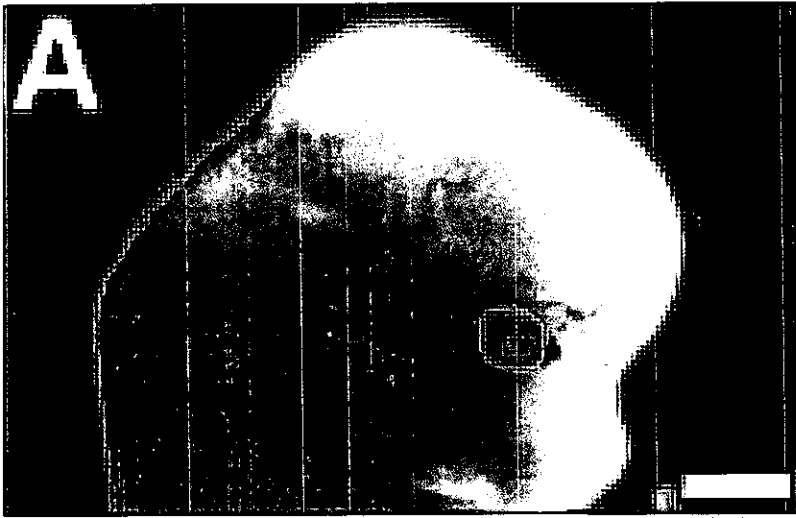
E. 研究発表

論文発表：

Inaki et al. Molecular feature domains with posterodorsal-anteroventral polarity in the symmetrical sensory maps of the mouse olfactory bulb: mapping of odorant-induced Zif-268 expression.

European Journal of Neuroscience, in press

他 出版物一覧参照



nestin-GFP transgenic mouse (胎勢 12.5 日マウス胎仔の頭部)

A : 顕微鏡下の像,

B : 蛍光顕微鏡下の像

Nestin の発現に一致して GFP の蛍光が中枢神経系全体に認められる

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

老人性嗅覚障害に関する研究

分担研究者 竹内直信 東京大学大学院 講師

研究要旨：老化による嗅覚障害の治療法を開発するための第1段階として、本年度は嗅覚外来を受診した嗅覚障害症例を調査し、高齢者の嗅覚障害の実体を解析した。若年者と比較し高齢者では原因疾患を伴わない嗅覚障害が多く、嗅上皮の老化による変性が主な原因であることが示唆された。また、現在唯一の治療法であるリンデロン点鼻の治療効果も高齢者では思わしくなく、新たな治療法開発の必要性が望まれる。

A. 研究目的

老化による嗅覚障害の治療法の開発への第1段階として、本年度はまず高齢者の嗅覚障害の実態調査を行なった。

B. 研究方法

東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科嗅覚外来を受診した症例を対象に、嗅覚機能検査、画像、内視鏡検査、鼻腔通気度検査などを行ない、病因、治療効果などを若年者と高齢者と比較検討した。

（倫理面への配慮）

患者様への検査・治療は十分な説明の下に同意を得て行なわれた。疾患の治療上必要のない検査または処置等は本研究では計画されていない。

C. 研究結果

平成13年度に東京大学附属病院耳鼻咽喉科嗅覚外来を受診した症例は52例であり、このうち65歳以上の高齢者は24例（46%）であった。若年者の嗅覚障害の原因が慢性副鼻腔炎や交通外傷などのように特定されるものが多いのに比べ、高齢者の場合にはパーキンソン病など明らかかなもの以外は原因不明な症例が多い傾向にあった。治療効果に関してもリンデロン点鼻に反応する症例は若年者に比べて少なかった。

D. 考察

高齢者は若年者と比較し、原因疾患が明らかでないものが多いことが示された。若年者では慢性副鼻腔炎やアレルギー性鼻炎など原因となる疾患が存在する症例が多く、原因疾患の治療が嗅覚機能の改善へとつながる症例が少なからず存在するが、高齢者ではこのような期待をあまり持てないことが明らかとなった。一方、マウスの嗅覚受容体が存在する嗅上皮ならびに嗅覚系の一次中枢である嗅球の形態学的研究から、老化による変化は主に嗅上皮の現れ、嗅球には変化が少ないことが主任研究者の丹生ならびに分担研究者の太田より今回報告されている。このことから高齢者の嗅覚障害は主に嗅上皮の老化による変性によるものであろうと推測される。嗅上皮性嗅覚障害に対する治療法は現在ステロイド剤であるリンデロンの点鼻が唯一の治療法である。ところが、今回の我々の調査で明らかになったように、高齢者の嗅上皮性嗅覚障害に対するリンデロン点鼻治療の成績は若年者に比べ思わしくはなく、新たな治療法の開発が必要である。

E. 研究発表

本年度は該当なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

嗅上皮の老化による変化に関する研究

分担研究者 太田 康 治医科大学 講師

研究要旨：加齢による嗅上皮の萎縮にアポトーシスがどのように関与しているかを把握するために、本年度はマウス嗅上皮におけるアポトーシスの状態をTUNEL法にて解析した。TUNEL陽性細胞は成熟マウスにおいてはほとんど嗅上皮に認められなかったが、老化マウスにおいては嗅上皮基底細胞層を中心に強く発現が認められた。老化による嗅上皮の形態学的変化はアポトーシスによる可能性が示唆され、アポトーシス阻害薬による嗅上皮の変性予防が期待される。

A. 研究目的

加齢による嗅上皮の萎縮にアポトーシスがどのように関与しているかを把握するために、まずマウスを用いて嗅上皮におけるアポトーシスの状態を調べた。

B. 研究方法

TUNEL法を用いて、成熟マウスと老化マウスの嗅上皮におけるTUNEL陽性細胞の発現を比較する。
(倫理面への配慮)
動物実験についてはPrinciples of laboratory animal care (NIH No. 86-23)に基づき行なっている。

C. 研究結果

TUNEL陽性細胞は成熟マウスにおいてはほとんど嗅上皮に認められなかったが、老化マウスにおいては嗅上皮基底細胞層を中心に強く発現が認められた。HE染色標本では成熟マウスでは基底層まで規定細胞の核がしっかりと存在しているのに対して、老化マウスにおいては基底層部分はEosinに染色される物質が存在し、所々に変形した核が認められた。

D. 考察

老化マウスにおいては、TUNEL陽性細胞が嗅上皮基底層を中心に強く発現しており、HE染色標本で同部分はEosinに染色される物質が存在し、所々に変形した核が認められた。以上から老化マウスの嗅上皮においては、アポトーシスが増加している可能性が考えられた。

E. 結論

老化マウスの嗅上皮においては、アポトーシスが増加している可能性が考えられる。今後は加齢による嗅上皮のアポトーシスの変化をより詳細に検討するとともにアポトーシス阻害薬による嗅上皮の変化などを検討していく。

E. 研究発表

発表：
嗅上皮の増殖動態—特に加齢との関係、
上皮成長因子との関係について—
第6回 北関東連合会

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

嗅神経細胞のアポトーシスに関する研究

分担研究者 石橋敏夫 社会保険中央病院 部長

研究要旨：老化による嗅覚障害へのアポトーシスの関与を調べるための第1段階として、嗅球除去による嗅上皮アポトーシスにおけるMAPキナーゼフォスファターゼ(MKP)遺伝子群の発現誘導を解析した。MKP1、MKP3ともに嗅球除去後4時間をピークに発現が誘導されることがわかった。これらの結果よりNGFなどの神経栄養因子によるシグナルが抑制されることでMKP1、MKP3の発現が誘導されアポトーシスが惹き起こされる可能性が示唆された。MKP阻害剤や抗MKP抗体はアポトーシスが抑制され嗅覚障害治療の一手段になることが期待される。

A. 研究目的

老化などの嗅覚障害には嗅細胞のアポトーシスなどにより嗅細胞の数の減少が関与している。我々は嗅上皮アポトーシスの阻止および再生を目指した遺伝子治療を考えている。そのための基礎実験として今年度は増殖因子や分化因子の刺激、様々な外部環境からのストレスによってその発現が誘導され増殖因子などのシグナル伝達を抑制することが知られているMAPキナーゼフォスファターゼ(MKP)遺伝子群に注目し、嗅上皮のアポトーシス過程におけるこれらの遺伝子の関与を検索することとした。

B. 研究方法

嗅球除去1時間後、4時間後のラットの嗅上皮を採取しtotal RNA抽出した。MKP遺伝子ファミリーのPTP領域で保存されているアミノ酸配列をもとに混合PCRプライマーを作成し、上記のRNAからMKP遺伝子群のフラグメントをRT-PCR法による増幅した。目的のサイズのフラグメントを精製し、pCRIIvectorにサブクローニングし塩基配列を決定した。さらに得られた遺伝子の嗅球除去後ラットの嗅上皮における発現誘導をノーザンブロット法によって検索した。

(倫理面への配慮)

動物実験についてはPrinciples of laboratory animal care(NIH 86-23, 1985)に基づき行なっている。

C. 研究結果

シークエンス解析を行なった23クローンのうちMKP1が21、MKP3が2得られた。ノーザンブロット法の結果MKP1、MKP3ともに嗅球除去後4時間をピークに発現が誘導されることがわかった。

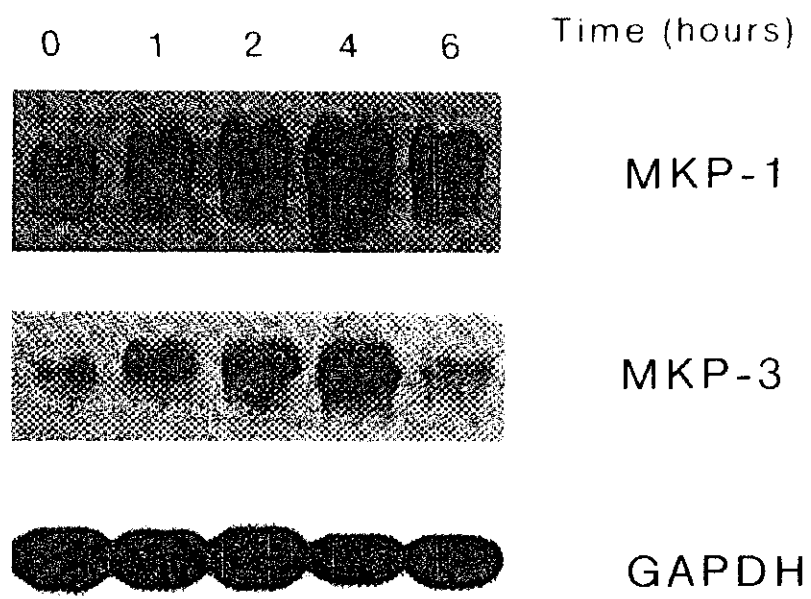
D. 考察

MKP遺伝子群は増殖因子によるシグナル伝達を抑制し、そのメンバーであるMKP3はPC12細胞においてNGF刺激によって特異的に発現が誘導され、NGFによるシグナル伝達を抑制していることが知られている。NGF除去により神経細胞のアポトーシスが誘導されることから、本報告で示した嗅球除去後のMKP1、MKP3の発現誘導はNGFなどの増殖因子によるシグナルが抑制されることで生じ、アポトーシスの引き金となっている可能性が示唆された。MKP阻害剤や抗MKP抗体はアポトーシスを抑制し増殖因子によるシグナル伝達を促進し嗅覚障害治療の一手段になることが期待される。

E. 研究発表

論文：

Ishibashi T, et al. Identification of dual specificity phosphatases induced by olfactory bulbectomy in rat olfactory neuroepithelium. Brain Research 2001 902:205-11



嗅球除去後のラット嗅上皮における MAP キナーゼフォスファターゼ(MKP)遺伝子群の発現。MKP1、MKP2ともに嗅球除去後4時間後をピークに発現の誘導が認められる。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nibu K	Structure and Function of olfactory neuroepithelium	Microscopic Research and Technique			in press
Nibu K et al	Expression of NeuroD and TrkB in developing and aged mouse olfactory epithelium	Neuroreport	12	1615-9	2001
Yoshihara Y et al.	Sniffing odors with multiple dendrites	Science	291	835-837	2001
Tatsura H et al.	Developing germ cells in mouse testis express pheromone receptors	FEBS letters	488	139-144	2001
Mizuno T et al	Molecular diversity in zebrafish NCAM family: Three members with different VASE usage and distinct localization	Molecular and Cellular Neuroscience	18	119-130	2001
Sawamoto K et al.	Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a nestin-GFP transgene	Journal of Neuroscience	21	3895-3903	2001
Inaki K et al.	Molecular feature domains with postero-dorsal-anteroventral polarity in the symmetrical sensory maps of the mouse olfactory bulb: mapping of odorant-induced Zif-268 expression	European Journal of Neuroscience			in press
Ishibashi T et al.	Identification of dual specificity phosphatases induced by olfactory bulbectomy	Brain Research	902	205-11	2001

20010277

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。