

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 丹生健一

平成15（2003）年 4月

研究報告書目次

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. 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	-----	4
石田春彦		
(資料1) SAM1マウスとAKRマウスの嗅上皮		
(資料2) Notchファミリーの嗅上皮における発現		
(資料3) 嗅上皮特異的遺伝子ONSGの発現		
2. 老化に伴う嗅球の変化に関する研究	-----	8
森 憲作		
(資料4) 正常マウスとSemaphorin欠損マウスの嗅球「におい地図」		
3. 高齢者嗅覚障害に関する臨床的研究	-----	10
竹内直信		
4. ステロイドの嗅上皮に与える影響に関する臨床的研究	-----	11
太田 康		
(資料5) ステロイド投与群と非投与群の嗅上皮		
5. 嗅神経細胞のアポトーシスと増殖の分子機構に関する研究	-----	13
石橋敏夫		
(資料6) DNA microarrayにより増減が検出された遺伝子一覧表		
6. 高齢者嗅覚障害に関する臨床的研究	-----	27
阪上雅史		
(資料7) 嗅覚外来における年齢別原因		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	31

研究報告書

厚生労働省科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
（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 耳鼻咽喉・頭頸部外科 教授

研究要旨 老化に伴う嗅覚障害の治療法の開発に関する研究の一環として、今年度は1) 高齢者嗅覚障害の実体調査、2) マウス老化モデルの検討、3) 嗅神経細胞のアポトーシスと再生の分子機構の解明、4) 老化に伴う嗅球の変化に関する研究、5) 嗅上皮の発生・分化・増殖の分子機構の解明、6) ステロイドの嗅上皮に与える影響についての検討、7) bFGF の嗅神経細胞再生への治療効果の検討を行った。その結果、1) 高齢者では嗅上皮の加齢変化による嗅覚障害が多いこと、2) 嗅球では、類似した匂い分子毎にグループ分けされた「におい地図」が存在すること、3) 嗅上皮の発生に Notch シグナルファミリーを介した抑制型 bHLH 型転写因子が関与していること、4) 現在唯一の治療薬として用いられているステロイドは、嗅神経細胞の増殖を抑制しアポトーシスを誘導すること、が明らかとなった。最終年度である平成15年度は、1) bFGF を含めた種々の成長因子の治療効果の in vivo レベルでの検討、2) 新規に同定した嗅神経細胞特定遺伝子 ONSG の機能解明、3) 嗅球における「におい地図」の老化による変化の検討、4) 高齢者嗅覚障害の治療成績と問題点、を中心に研究を行う。

分担研究者氏名・所属機関および所属機関における職名		
石田春彦	神戸大学大学院	助教授
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
阪上雅史	兵庫医科大学	教授

A 研究目的 嗅覚は栄養摂取、衛生管理、安全確保、QOLなどの様々な面で重要な役割を果たしている。特に高齢者においては嗅覚障害の与える影響は大きく、これからの高齢化社会において解決すべき重要な問題である。しかしながら、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。こうした背景から、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、昨年度に引き続き高齢者の嗅覚障害の実体調査、嗅覚系の老化モデルマウスの開発を行うとともに、本来の機能として繰り返し再生する機能を持つ嗅神経細胞の発生、分化、アポトーシスの分子機構、嗅覚の一次中枢である嗅球の機能解明、また、現在用いられている唯一の治療薬であるステロイド剤の作用機序、標的治療薬として市販化されたgrowth factor:bFGFの嗅覚障害治療薬としての可能性 について検討した。

B 研究方法 1. (老人性嗅覚障害の実体調査) 本年度は、兵庫医科大学耳鼻咽喉科阪上雅史教授を新たに分担研究者として迎え、同耳鼻咽喉科嗅覚外来ならびに東京大学耳鼻咽喉科嗅覚外来における高齢者の嗅覚障害患者の病態と治療効果について、嗅覚機能検査、内視鏡検査、画像診断、鼻腔通気度検査などにより検討した。2. (マウス老化モデル) 昨年度一年間に採取した老化促進モデルマウス SAM1 ならびに SAM1 の back ground である AKR マウスの標本を用いて、嗅上皮の老化における変化を検討した。3. (マウス嗅上皮における嗅神経細胞のアポトーシスと再生の分子機構) マウス嗅球を除去することにより嗅神経細胞にアポトーシスと引き続く神経再生を誘導し、1176 個のラット遺伝子の cDNA がスポットされた cDNA microarray を用いて、嗅球除去後のラット嗅覚上皮とコントロール粘膜における各種遺伝子の発現パターンの比較を行った。4. (老化に伴う嗅球の変化) 正常ラットならびに Semaphorin3A ノックアウトマウスを用いて、構造が異なる 200 種類のにおい刺激による内因性信号を光学的測定法により記録し、嗅球外側の「におい地図」を作成した。5. (嗅上皮の発生・分化・増殖の分子機構) 胎勢期から生後9週までのマウス嗅上皮標本を用い、研究協力者が新規に同定した遺伝子を含め、神経の発生、分化、

増殖に關与する遺伝子群の発現を検討した。6. (ステロイドの嗅上皮に与える作用機序) 現在唯一の嗅覚障害治療薬として用いられているステロイドの作用機序は明らかではない。そこで正常マウスにステロイドを全身投与し、嗅神経細胞に与える影響を検討した。7. (bFGFの嗅神経細胞再生への治療効果) 昨年、代表的growth factorの一つであるbFGFの局所投与薬が褥創治療薬として市販化された。嗅糸切断による嗅上皮障害モデルに、このbFGFを局所投与を行い、その効果を検討した。

C 結果と考察 1. (老年性嗅覚障害の実体調査) 平成7年から平成14年までに兵庫医科大学耳鼻咽喉科嗅覚外来を受診した嗅覚障害患者は552例で、内、60歳代136例、70歳代80例、80歳以上が14例であった。若年者では慢性副鼻腔炎、頭部外傷後嗅覚障害が多く、中高年者では感冒罹患後嗅覚障害が増加している。さらに60歳以上では原因不明例の割合が増加していた。また東京大学嗅覚外来での検討では、高齢者嗅覚障害は、重症例が多く、治療に対して抵抗する症例が多かった。平成15年度は更に症例を集めて検討する予定である。2. (マウス老化モデル) 老化促進モデルマウスSAM1は正常マウスAKRに比べ、生後3ヶ月頃より、嗅神経細胞の増殖能が低下する傾向がみられ、嗅上皮の老化モデルとして有用であると考えられた。3. (マウス嗅上皮における嗅神経細胞のアポトーシスと再生のメカニズムの解明) 嗅球除去後3日目、7日目の遺伝子の発現をAtlas rat cDNA expression arraysによって解析した。コントロールのシグナルと1.7倍以上の増強あるいは減衰したものをリストアップしている(分担研究報告参照)。平成15年度はこれらの遺伝子についてその意義を解析する予定である。4. (老化に伴う嗅球の変化) 個々の糸球は分子構造の類似した1群のにおい分子により活性化されること、におい分子応答が似ている糸球群は嗅球外側の特定の領域に集合し、糸球クラスターを形成していること、これらの配置は一定で個体間で保存されていること、が判明した。また、軸索ガイダンス分子の一つであるSemaphorin 3Aが欠損したマウスでは、こうした「におい地図」の構造が大きく変動していることも見いだした。現在、嗅糸切断モデルと高齢ラットを持ちいて「におい地図」の変化を検討している。

5. (嗅上皮の発生・分化・増殖の分子機構) 神経幹細胞の未分化な性質の維持に關与すると考えられているNotchシグナル伝達系のうち、Notch1は胎勢12日頃から16日ごろまでは嗅上皮周囲の間葉組織に発現がみられ、生後は14日頃まで嗅上皮の基底膜に発現がみられた。Notch3は胎勢期には嗅上皮全体に淡い発現しか認められず、生後は第1日目より4週頃まで発現が認められた。Notch2の発現は認められなかった。これらの結果より、嗅上皮の発達にはNotchシグナルを介した抑制型bHLH転写因子が關与していることが示唆された。一方、我々の研究協力者が新規に同定した嗅上皮に特異的に発現する遺伝子ONSGについて、その発現を検討したところ、胎勢期には嗅上皮全体に発現がみられたが、生後は徐々に基底層付近の細胞に発現が限局することが明らかとなった。平成15年度は現在作成中のONSGノックアウトマウスを用いてその機能を解明する予定である。6. (ステロイドの嗅上皮に与える作用機序) TUNEL法により嗅上皮のアポトーシスを検討したところ、ステロイド非投与群ではアポトーシスは全く認められなかったが、ステロイド投与群では嗅上皮基底層にアポトーシスが認められた。すなわち嗅覚障害の治療に用いられているステロイド剤が、実は、嗅神経細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導していることが判明した。恐らく、ステロイド剤は嗅上皮周辺の炎症を押さえることにより、嗅神経細胞の再生を間接的に助けているものと考えられた。7. (bFGFの嗅神経細胞再生への治療効果) 現在摘出標本を処理中のため、平成15年度にその結果を検討する予定である。

D 結論 1. この2年間の実体調査から高齢者の嗅覚障害は明らかな原因疾患がないものが多いことが判明した。マウスおよびラットを用いた嗅上皮の加齢に伴う変性と考え合わせると、老化に伴う嗅覚障害は加齢による嗅上皮の機能低下が原因であるものが、主であると考えられた。2. 本年度で嗅覚の一次中枢である嗅球の「におい地図」がほぼ完成した。この糸球の地図形成には軸索ガイダンス分子の一つであるSemaphorin3Aが必要であることが判明した。3. 嗅上皮の発生・発達には神経分化促進型bHLH転写因子のみならず、抑制型のbHLH転写因子も重要な役割をもっていると考えられた。4. 現在、唯一の嗅覚障害治療薬として用いられているステロイド剤は、直接的にはむしろ嗅神経細胞の増殖を抑制しアポトーシスを誘導することが明らかとなった。このことよりステロイドは嗅上皮周辺の炎症を抑えることにより間接的に嗅神経細胞の再生が行われやすい環境を提供しているに過ぎないと考えられ、直接的に嗅神経細胞の再生を誘導する治療薬の登場が望まれる。5. 本研究の最終年度にあたる平成15年度は、1) 市販化されたbFGFをはじめ、種々の成長因子の治療効果をin vivoで検討する、2) アデノウイルスベクターならびにエレクトロポレーション法による神経成長因子遺伝子の導入法の効果を検討する、3) 新規に同定した嗅神経細胞特異的遺伝子ONSGの役割をノックアウトマウスを作成して検討する、4) 嗅球の老化に伴う変化、5) 高齢者の嗅覚障害の治療効果と問題点を中心に研究を行う予定である。

論文発表

1. Nibu K. Introduction to Olfactory Neuroepithelium, *Microsc Res Tech* 2002 58:133-4.
2. Inaki K, Takahashi, YK, Nagayama S, Mori K Molecular-feature domains with posterodorsal-anteroventral polarity in the symmetrical sensory maps of the mouse olfactory bulb: mapping of odourant-induced *Zif268* expression. *Eur J of Neurosci* 2002 15:1563-1574

3. Sugitani Y, Nakai S, Minowa O, Nishi M, Jishage K, Kawano H, Mori K, Ogawa M, Noda T Brn-1 and Brn-2 share crucial roles in the production and positioning of mouse neocortical neurons. *Genes and Development* 2002 16:1760-1765.
4. Nagao H, Yamaguchi M, Takahashi YK, and Mori K Grouping and representation of odorant receptors in domains of the olfactory bulb sensory map. *Microsc Res Tech* 2002 58:168-175
5. Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M and Gage FH Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*. 2002 130:391-399.
6. Taniguchi M, Nagao H, Takahashi YK, Yamaguchi M, Mitsui S, Yagi T, Mori K and Shimizu T Distorted odor maps in the olfactory bulb of semaphorin 3A deficient mice. *J. Neurosci.* 2003 23:1390-1397.
7. Treloar HB, Gabeau D, Yoshihara Y, Mori K and Greer CA Inverse expression of OCAM in a subset of olfactory axons and a subset of mitral/tufted cells in the developing rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 2003 458:389-403.
8. Mori K. Grouping of odourant receptors: odour maps in the mammalian olfactory bulb. *Biochem Soc Trans* 2003, 31:134-136.
9. Ohta Y and Ichimura K. High-dose glucocorticoids inhibit proliferation of rat olfactory epithelium. *Annal Otol Rhinol Laryngol* 2002 111 909-911.
10. Ishimoto S, Ishibashi T. Induction of growth factor expression is reduced during healing of typanic membrane perforations in glucocorticoid-treated rats. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002 111:947-953.
11. Ishimoto S, Ishibashi T. Direct application of keratinocyte growth factor, basic fibroblast growth factor and transforming growth factor- α during healing of tympanic membrane perforation in glucocorticoid-treated rats. *Acta Otolaryngol* 2002 122:468-473.
12. Fujii M, Fukazawa K, Kakayasu S and Sakagami M. Olfactory dysfunction in patients with head trauma. *Auris Nasus Larynx* 2002 29:35-40.
13. Fujii M, Fukazawa M, Hatta C, Yasuno H and Sakagami M. Olfactory acuity after total laryngectomy *Chemical Senses* 2002 27:117-121.

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 耳鼻咽喉・頭頸部外科 教授
 分担研究者 石田春彦 神戸大学大学院 耳鼻咽喉・頭頸部外科 助教授

研究要旨 老化に伴う嗅覚障害の治療法の開発に関する研究の一環として、今年度は1) マウス老化モデルの検討、2) 嗅上皮の発生・分化・増殖の分子機構の解明、3) bFGFの嗅神経細胞再生への治療効果の検討を行った。その結果、1) 老化促進モデルマウス SAM1 は嗅上皮においても老化モデルとして有用であること、2) 嗅上皮の発生に Notch シグナルファミリーを介した抑制型 bHLH 型転写因子が関与していること、3) 嗅神経細胞に特異的に発現する遺伝子 ONSG を新規に同定した。本研究の最終年度となる平成15年度は1) bFGF を含めた種々の成長因子の治療効果の *in vivo* レベルでの検討、2) 新規に同定した嗅神経細胞特定遺伝子 ONSG の機能解明、3) アデノウイルスベクターとエレクトロポレーション法による嗅上皮への遺伝子導入を中心に研究を行う。

A 研究目的 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、本年度は、昨年度に引き続き嗅覚系の老化モデルマウスの開発を行うとともに、本来の機能として繰り返し再生する機能を持つ嗅神経細胞の発生、分化の分子機構の解明、昨年度に褥創治療薬として市販化された成長因子bFGFの嗅覚障害治療薬としての可能性を *in vivo* モデルを用いて検討した。

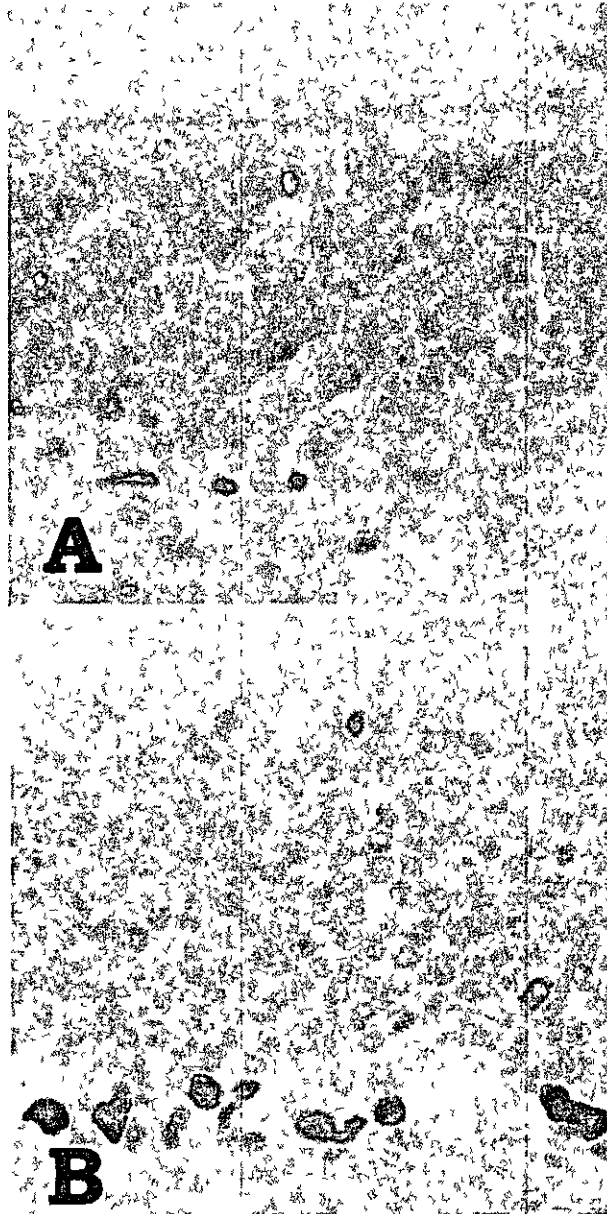
B 研究方法 1. (マウス老化モデル) 昨年度一年間に採取した老化促進モデルマウス SAM1 ならびに SAM1 の background である AKR マウスの標本を用いて、嗅上皮の老化における変化を検討した。2. (嗅上皮の発生・分化・増殖の分子機構) 胎勢期から生後9週までのマウス嗅上皮標本を用い、神経分化に抑制的に作用する bHLH 型転写因子を活性化させる Notch シグナルファミリーの発現、ならびに研究協力者が新規に同定した嗅上皮の progeni cell に特異的に発現する遺伝子の発現を検討した。3. (bFGF の嗅神経細胞再生への治療効果) 昨年、代表的 growth factor の一つである bFGF の局所投与薬が褥創治療薬として市販化された。嗅糸切断による嗅上皮障害モデルを作成し、このモデルに bFGF を局所投与を行い、嗅上皮の再生への効果を検討した。

C 結果と考察 1. (マウス老化モデル) 老化促進モデルマウス SAM1 は正常マウス AKR に比べ、生後3ヶ月頃より、嗅上皮の菲薄化みられ、嗅神経細胞の予備軍である GAP43 陽性の globose basal cell、globose basal cell から嗅神経

細胞への分化過程にある NeuroD 陽性細胞、分化した TrkB 陽性の嗅神経細胞、増殖能を示す PCNA 陽性細胞、ともに減少傾向がみられた。このことから、SAM1 マウスは嗅上皮の老化モデルとして有用であると考えられた。2. (嗅上皮の発生・分化・増殖の分子機構) 神経幹細胞の未分化な性質の維持に関与すると考えられている Notch シグナル伝達系のうち、Notch1 は胎勢12日頃から16日ごろまでは嗅上皮周囲の間葉組織に発現がみられ、生後は14日頃まで嗅上皮の基底膜に発現がみられた。Notch3 は胎勢期には嗅上皮全体に淡い発現しか認められず、生後は第1日目より4週頃まで発現が認められた。Notch2 の発現は認められなかった。これらの結果より、嗅上皮の発達には Notch シグナルを介した抑制型 bHLH 転写因子が関与していることが示唆された。一方、我々の研究協力者が新規に同定した嗅上皮に特異的に発現する遺伝子 ONSG について、その発現を検討したところ、胎勢期には嗅上皮全体に発現がみられたが、生後は徐々に基底層付近の細胞に発現が限局することが明らかとなった。平成15年度は現在作成中の ONSG ノックアウトマウスを用いてその機能を解明する予定である。3. (bFGF の嗅神経細胞再生への治療効果) 現在摘出標本を処理中のため、平成15年度にその結果を検討する予定である。

論文発表

Nibu K. Introduction to Olfactory Neuroepithelium, *Microsc Res Tech* 2002 58:133-4.

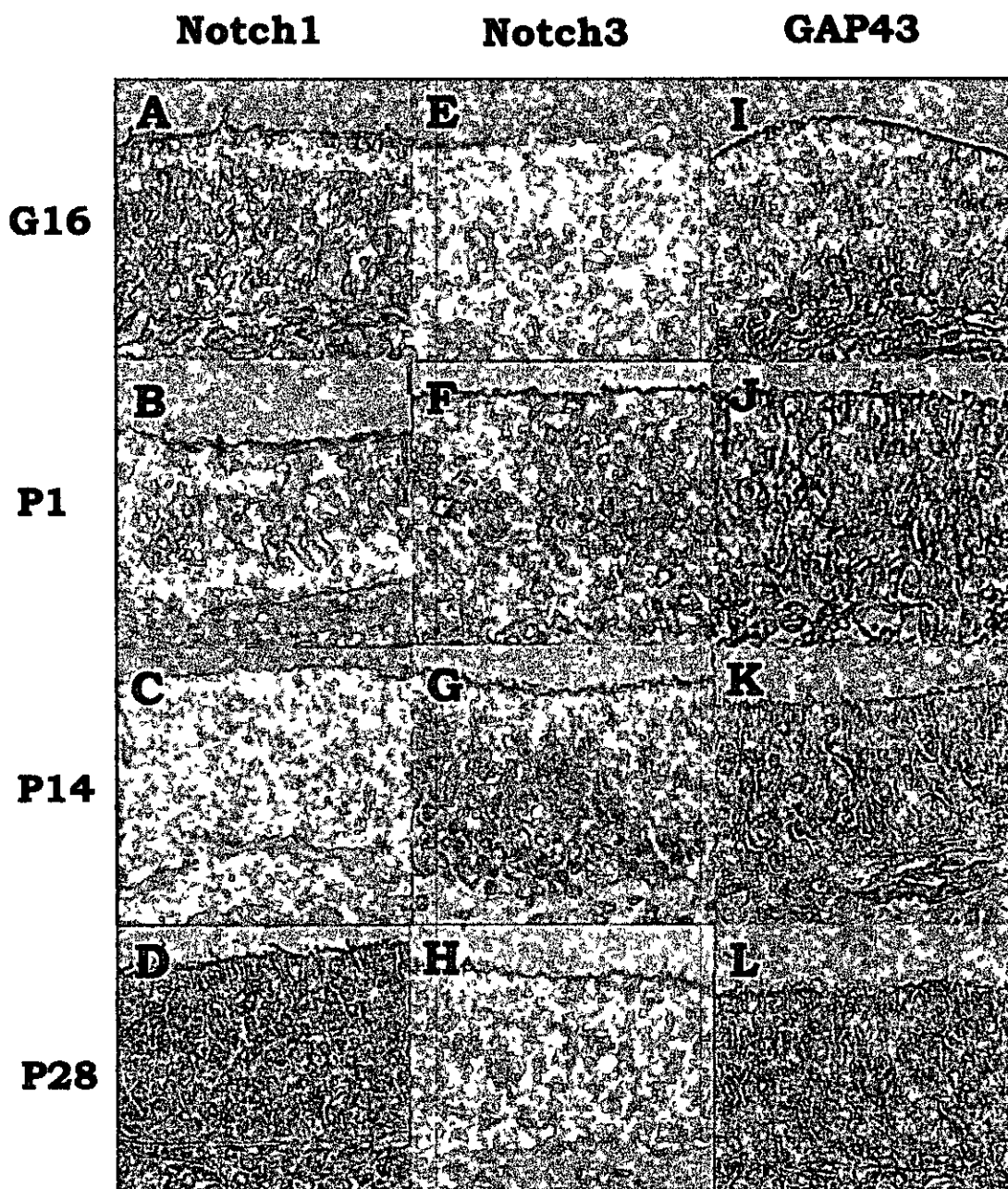


資料1 老化促進モデルマウスSAM1

生後20週のマウス嗅上皮 抗PCNA抗体による染色

A・SAM1マウス B・AKRマウス(コントロール)

SAM1マウスの嗅上皮では増殖能の低下がみられる



資料 2 嗅上皮におけるNotchファミリーの発現

厚生労働省科学研究費補助金 (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
嗅球の老化による変化

分担研究者 森 憲作 東京大学大学院分子生理学教室 教授

A 研究目的

嗅覚の第一次中枢である嗅球が、老化に伴いどのように機能変化するかを調べるための基礎研究として、成体の嗅球における機能地図「におい地図」を決定することは必須である。

B 研究方法

私達の研究チームはウレタン麻酔下のラットの嗅球の糸球群から、におい刺激により誘起される内因性信号を光学的測定法により記録した。嗅覚刺激には、分子構造が系統的に異なった200種類以上のにおい分子を用い、現在までに、嗅球外側地図の約60%の領域において「におい地図」の探索を終了した。

C 研究結果

(1) 個々の糸球は、分子構造の類似した1群のにおい分子により活性化されること、(2) におい分子応答特性が似ている糸球群は、嗅球外側地図の特定の領域に集合し、糸球クラスターやサブクラスターを形成していること、および(3) 糸球クラスターや糸球サブクラスターの空間的配置は一定で個体間で保存されていること、が判明した。さらに、実験結果の詳細な解析から嗅球の外側地図において、「におい分子受容体の受容サイトの構造」が体系的に表現されていることが明らかになった。このような嗅球の「におい受容サイト構造地図」が「においの識別」の基本になっていると考えられる。また、軸索ガイダンス分子の1つであるSemaphorin3Aが欠損したマウスでは、嗅球の「におい地図」が大きく変動していることも見い出した。

D 考察

現在、ラットの嗅球からの光学的測定法を用い、「受容サイト構造地図」の空間配置の詳細を決定するとともに、(1) 嗅神経切断後、およびその後の嗅神経再生後の「におい地図」の変化を測定する実験を進めている。また、上記の「におい地図」の基礎知識に基づき、老化に伴う「におい地図」の変化の時間経過について高齢ラットを用いて探索中である。

研究成果の刊行

1. Inaki K., Takahashi, Y. K., Nagayama, S., Mori K. (2002) Molecular-feature domains with posterodorsal-anteroventral polarity in the symmetrical sensory maps of the mouse olfactory bulb: mapping of odourant-induced Zif268 expression. *Eur. J. of Neurosci.*, 15, 1563-1574.
2. Sugitani Y., Nakai, S., Minowa, O., Nishi, M., Jishage, K., Kawano, H., Mori, K., Ogawa, M., and Noda, T. (2002) Brn-1 and Brn-2 share crucial roles in the production and positioning of mouse neocortical neurons. *Genes and Development*, 16, 1760-1765.
3. Nagao H., Yamaguchi, M., Takahashi, Y.K., and Mori, K. (2002) Grouping and representation of odorant receptors in domains of the olfactory bulb sensory map. *Microscopy Res. & Technique* 58, 168-175.
4. Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., and Gage, F.H. (2002) Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*. 130 (2), 391-399.
5. Taniguchi, M., Nagao, H., Takahashi, Y.K., Yamaguchi, M., Mitsui, S., Yagi, T., Mori, K. and Shimizu T. (2003) Distorted odor maps in the olfactory bulb of semaphorin 3A deficient mice. *J. Neurosci.*, 23, 1390-1397.
6. Treloar, H.B., Gabeau, D., Yoshihara, Y., Mori, K. and Greer, C.A. (2003). Inverse expression of OCAM in a subset of olfactory axons and a subset of mitral/tufted cells in the developing rat olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.*, 458, 389-403.
7. Mori, K. (2003) Grouping of odourant receptors: odour maps in the mammalian olfactory bulb. *Biochem. Soc. Trans.*, 31, 134-136.

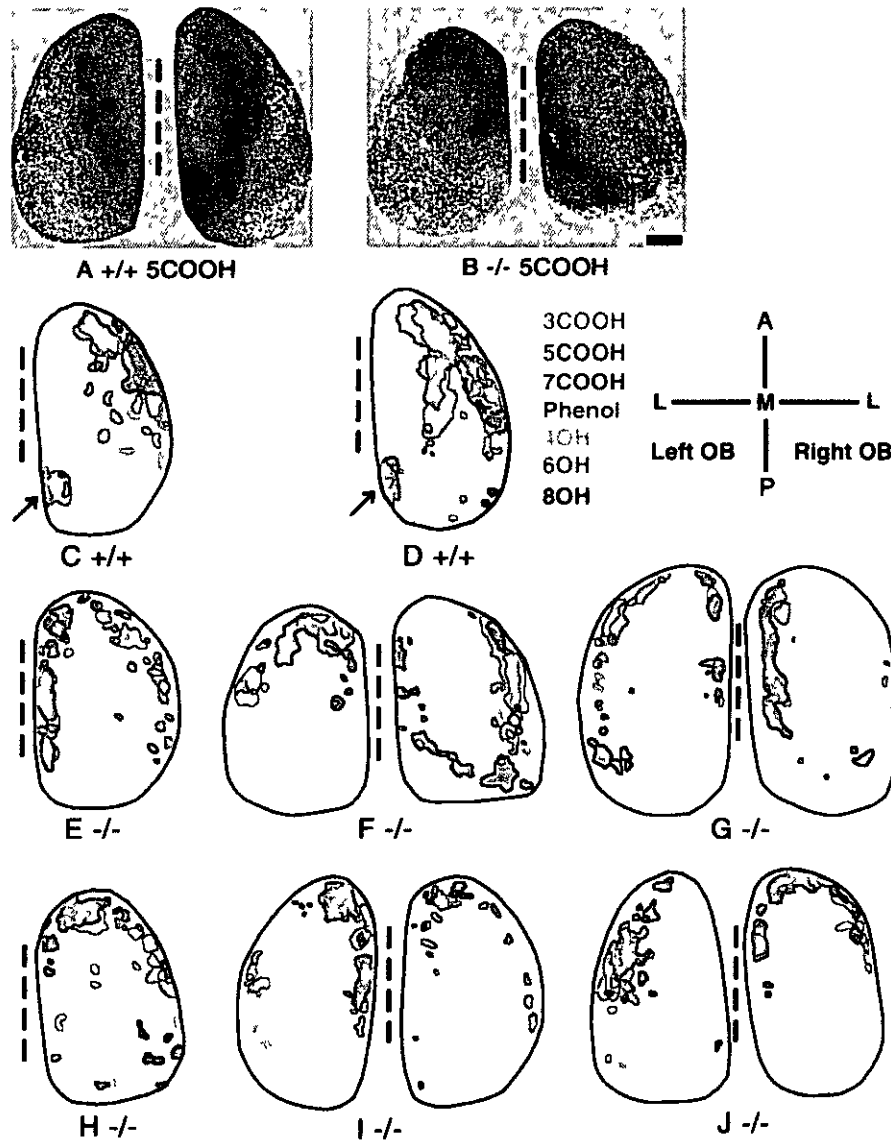


Figure 5 Optical imaging of intrinsic signals in response to odorant stimulation recorded from the dorsal surface of the OB of adult wild type and Sema3A deficient mice. *A B* Spatial distribution of the response to valeric acid (5COOH) stimulation recorded from the right and left OBs in an adult wild type mouse (*A +/+*) and a Sema3A deficient mouse (*B -/-*). *C-D* Spatial distribution of the optically recorded intrinsic signals in response to a homologous series of fatty acids and aliphatic alcohols. The areas of the activated glomeruli are enclosed by the colored circles. *C* and *D* show the fatty acid (red) phenol (green) and aliphatic alcohol (blue) responsive domains in two different adult wild type mice, whereas *E-J* show these domains in six different Sema3A deficient mice. In the wild type mice, the fatty acid responsive domains were consistently observed at the antero-central part of the dorsal OB. Fatty acids also activated a cluster of glomeruli at the posteromedial part (*C D* arrows). Aliphatic alcohols and phenol invariably activated glomeruli in the lateral domain. The Sema3A deficient OB showed an alteration in the spatial arrangement of the fatty acid, aliphatic alcohol, and phenol responsive domains. Dashed lines represent the midline separating the left and right OBs. Scale bar, 500 μ m. 3COOH, Propionic acid, 7COOH heptylic acid, 4OH, butyl alcohol, 6OH hexyl alcohol, 8OH octyl alcohol. A, anterior; L, lateral; P, posterior; M, medial.

厚生労働科学研究費補助金（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
老人性嗅覚障害

分担研究者 竹内直信 東京大学医学部耳鼻咽喉科 講師

A 研究目的

老人性嗅覚障害の特徴について臨床例から調査をすすめることにある。

B 研究方法

平成13年および14年の2年間に東大病院耳鼻咽喉科において嗅覚検査を実施した患者（新患）数は107名であったが、そのなかで65歳以上は42名（39%）であった。これらにつき原因、検査結果、治療効果について検討を加えた。

C 研究結果

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様に特定されることが多いのに比べ、高齢者の場合は感冒やパーキンソン病など明らかなもの以外は原因不明の症例が多く罹病期間もはっきりとしない傾向にあった。また副鼻腔CT検査において嗅裂や副鼻腔に異常を認める症例は少なく、嗅裂の閉塞があるものは3分の1に満たなかった。T&Tオルファクトメトリーやアリナミン静注試験ではスケールアウトの症例が多かった。治療はほぼ全例にリンデロンの点鼻を3ヶ月を1クールとして行っているが、改善したものは少なく不変例が多かった。

D 考察

嗅覚異常をいち早く認識し速やかに検査や治療に結びつけることが重要と考えるが、高齢者の中には潜在的な嗅覚障害患者が多数いると思われる。患者に対するアンケートでも味覚が落ちたことから嗅覚異常を認識する例も多く、嗅覚異常に対する啓蒙も必要である。

E 結論

高齢者の嗅覚障害は認識されないことが多く、認識された時点で治療を開始しても若年者に比べ効果が劣る傾向にあった。

研究発表、刊行物：昨年度はなし。

厚生労働科学研究費補助金（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

マウス嗅上皮におけるアポトーシスの検討 —ステロイドの影響について—

分担研究者 太田 康 自治医科大学大宮医療センター耳鼻咽喉科 講師

研究の要旨

ステロイド投与マウスの嗅上皮のタネル陽性細胞について検討したところ、非投与マウスに較べて増加していた。ステロイドは嗅上皮のアポトーシスを増加させていることが考えられる。

A 研究の目的

嗅覚障害におけるステロイド投与は一般的に行われる治療方法であるが、嗅上皮におけるステロイドの影響を組織学的に調べた報告は少ない。我々はマウス嗅上皮のタネル陽性細胞について、ステロイド投与群と非投与群とを比較検討した。

B 研究方法

30g成熟雄マウス5匹にドリアムシノロン（ケナコルトA）40mg/bodyを1回腹腔内投与し、1週後に4%パラホルムアルデヒドにて経心的に灌流固定を施行、10%EDTAにて脱灰し、その後断頭、パラフィン包埋、4 μ mの切片を作成した。コントロール群として、未投与の30g成熟マウス5匹を同様にして固定、切片を作製した。作成した切片をタネル法で染色し、2群間のタネル陽性細胞を比較、検討した。

C 研究結果

タネル陽性細胞は、ステロイド非投与群の嗅上皮にはほとんどみられなかったが、ステロイド投与群においては嗅上皮基底層付近に認められた。

D 考察

ステロイドの投与でアポトーシスは増加するといわれているが、嗅上皮における検討はなされていない。今回ステロイド投与マウスの嗅上皮においてタネル陽性細胞の増加がみられたことより、ステロイド投与で嗅上皮においてもアポトーシスが増加している可能性があると考えられる。老化マウスの嗅上皮においてもアポトーシスが増加していることが考えられる。今後、アポトーシス阻害薬をあわせて投与し、ステロイド投与マウス、あるいは老化マウスの嗅上皮のアポトーシスの抑制についても検討していきたい。

論文発表

Yasushi Ohta, et al.
High-dose glucocorticoids inhibit proliferation of rat olfactory epithelium
Annal Otol Rhinol Laryngol 111 909-911 2002.

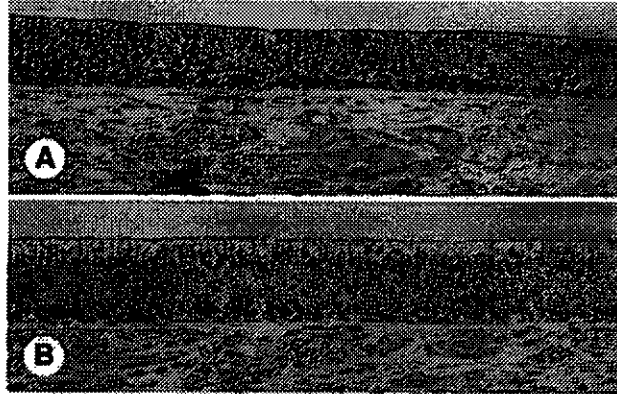


Fig 1. Olfactory epithelium of rats (diaminobenzidine and hematoxylin, original $\times 100$). **A)** Dexamethasone-negative (DEX-) group. **B)** Dexamethasone-positive (DEX+) group. Dark cells are Ki67-positive (Ki67+) cells.

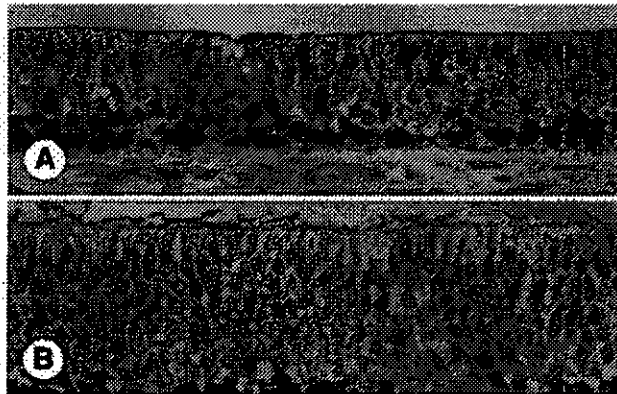


Fig 2. Olfactory epithelium of rats under high-power magnification (diaminobenzidine and hematoxylin, original $\times 400$). **A)** DEX- group. **B)** DEX+ group. Dark cells are Ki67+ cells.

厚生労働科学研究費補助金（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
嗅神経細胞のアポトーシス

分担研究者 石橋 敏夫 社会保険中央病院 耳鼻咽喉科部長
研究協力者 藤城 芳徳

A. 研究目的

嗅球除去を行うと、嗅覚上皮においていっせいにアポトーシスがおこり、ひきつづいて嗅覚上皮の再生がおこる。この再生の過程においては神経成長因子などの増殖因子やそれらの受容体の発現上昇や活性化が報告されているが、実際には嗅覚上皮の再生にはさらに多くの遺伝子が関与しているものと思われる。

生体内でさまざまな生物学的プロセス遺伝子の役割を理解するために重要なステップは、正常組織や病態組織における発現パターンの比較を行うことである。このような実験は、RT-PCR、RNaseプロテクションアッセイあるいはノーザンブロット解析を用いて行うことができる。しかし、このような方法を用いた場合、一度にごく少数の遺伝子にしか注目できない。今回われわれは、嗅覚上皮の再生に関与する数多くの遺伝子を同時に解析するために1176個のラット遺伝子のcDNAがスポットされたcDNA microarrayを用いて、嗅球除去後のラット嗅覚上皮とコントロール粘膜の発現パターンの比較を行った。

B. 対象と方法

・実験モデルの作成および嗅覚上皮の採取
成熟した9匹（体重230～250g）のウイスターラット（以後ラット）のオスを対象とした。嗅球除去に際してはペントバルビタールナトリウム（ネンブタール）を腹腔内投与（0.2ml/kg）を行い、全身麻酔を施行した後、清潔操作下に頭蓋骨の背側の正中縫線の両側に直径1mmの穴をあけ両側の嗅球を完全に除去した。3日後、7日後に3匹ずつラット犠牲にし、嗅球を完全に除去した。3日後、7日後を採取し、-70度で凍結保存した。コントロールには正常のラット嗅覚上皮を用いた。
遺伝子発現の検索にはAtlas rat cDNA expression arrays (rat 1. 2; clontech, Tokyo, Japan)を用いた。氷結した各標本からacid guanidinium-phenol-chloroform法によりtotal RNAを抽出し、mRNAは標準的なoligo dT法を用いて精製し、cDNAプローブはAtlas rat cDNA expression arrays kit(clontech, Tokyo, Japan)のcDNA Synthesis (CDS) Primer Mixを用いて

32PdATPのラベリングをおこなった。嗅球除去後、3日目、7日目の嗅上皮のRNAから作成した標識したプローブはAtlas arrays membraneとそれぞれ一晚ハイブリダイゼーションを行い、高いストリンジェンシーの洗浄を行った後、ホスフォイメージングを行った。

ストリッピングによりそれぞれのAtlas arrays membraneからcDNAプローブを除去した後、コントロールプローブで同様にハイブリダイゼーションを行い、ホスフォイメージングを行った。AtlasImage Softwareを用いて、検体とコントロールとのシグナルの強さの比を測定し、1.7倍以上のものをリストアップした。

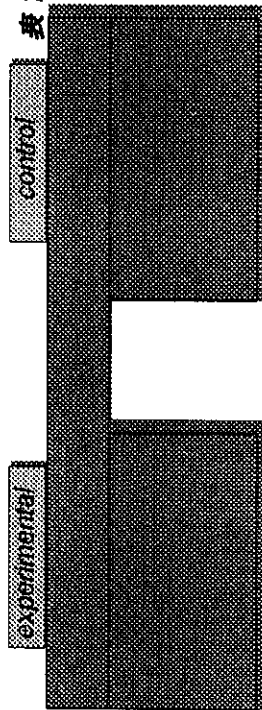
C. 結果

嗅球除去後、3日目、7日目の嗅上皮およびそれぞれのコントロールの嗅上皮における遺伝子の発現をAtlas rat cDNA expression arraysによって解析した結果を表1, 2に示す。AtlasImage Softwareを用いて、検体とコントロールとのシグナルの強さの比を測定し、1.7倍以上増強、あるいは減弱のものをリストアップした。

研究成果

- ・Ishimoto S, Ishibashi T.
Induction of growth factor expression is reduced during healing of tympanic membrane perforations in glucocorticoid-treated rats.
Ann Otol Rhinol Laryngol. 2002 Oct; 111(10): 947-53.
- ・Ishimoto S, Ishibashi T, Bottaro DP, Kaga K.
Direct application of keratinocyte growth factor, basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-alpha during healing of tympanic membrane perforation in glucocorticoid-treated rats.
Acta Otolaryngol. 2002 Jul; 122(5); 468-73.

表 1 : 膜球除去 3 日後の膜球上皮における遺伝子発現の変化



Array lot#

1050916

Atlas Array

Date (JP)

#REF!

Atlas Rat 1.2k Array

#	coordinate	Spot Intensity		Ratio	Difference	RATIO		Gene	Genbank #
		C	3			UP	DOWN		
1	A01c	15	3	Down	-12			leukocyte common antigen precursor (LCA); CD45 antigen; T200; PTPRC	M10072
2	A02d	35	13	0.37	-22	2.7		P-selectin precursor; granule membrane protein 140 (GMP-140); PADGEM; CD62P; leukocyte-endothelial cell adhesion molecule 3 (LECAM3)	L23088
3	A02f	75	27	0.36	-48	2.8		ecto-ATPase precursor; cell-CAM 105 (C-CAM 105); ATP-dependent taurocholate-carrier protein; GP110	M92848
4	A03b	23	13	0.57	-10	1.8		T-cell receptor CD3 zeta subunit	L08447
5	A04g	65	12	0.18	-53	5.4		CD28, T-cell surface antigen	X55288
6	A05c	11	3	Down	-8			? Myc-Max-interacting tumor suppressor (MXI1)	AF003008
7	A07h	65	21	0.32	-44	3.1		GAK; cyclinG-associated kinase	D38560
8	A09b	148	58	0.39	-90	2.6		plasma kallikrein (rPK)	M58590
9	A09n	28	80	2.86	52	2.9		apolipoprotein D	X55572
10	A12d	373	133	0.36	-240	2.8		casein kinase II beta subunit (CKII; CSNK2B; CK2N); phosvitin	L15619
11	A12e	16	7	Down	-9			? Pim-1 proto-oncogene	X63675
12	A12f	58	13	0.22	-45	4.5		c-raf proto-oncogene; raf-1	M15427

#	coordinate	Spot Intensity			Ratio	Difference	RATIO		Gene	Genbank #
		C	3	174			UP	DOWN		
13	A13i	342	174	0.51	-168		2.0	neurofibromin; neurofibromatosis protein type I (NF1); GTPase stimulatory protein	D45201	
14	A13m	284	492	1.73	208	1.7		heat shock 70-kDa protein (HSP70)	Z27118	
15	B01a	13	4	Down	-9			? P450 IB1; C3H cytochrome P450; CYP1B1	U09540	
16	B01c	22	5	Down	-17			cytochrome P450 VII (CYP7); cholesterol 7-alpha-monooxygenase; cholesterol 7-alpha-hydroxylase	J05460; J05509	
17	B01e	20	34	1.70	14	1.7		cytochrome P450 IA2 (CYP1A2); P450-D; P448 + cytochrome P450 ISF/BNF-G	K02422 + M26127	
18	B03a	144	30	0.21	-114		4.8	sodium channel SHRSPHD, beta subunit, epithelial	U35174	
19	B05c	48	9	0.19	-39		5.3	ISK slow voltage-gated potassium channel protein; mink potassium channel; KCNE1	M22412	
20	B05i	15	6	Down	-9			? calcium channel, L-type, dihydropyridine-sensitive, alpha 2 subunit	M86621	
21	B07i	231	114	0.49	-117		2.0	GluT and GluT-R glutamate transporter	U15098	
22	B08f	116	47	0.41	-69		2.5	sodium/hydrogen exchange protein 1	M85299	
23	B09f	193	92	0.48	-101		2.1	taurine transporter	M96601	
24	B09i	42	21	0.50	-21		2.0	Na+/K+ ATPase alpha 1 subunit	M28647	
25	B10f	15	5	Down	-10			? potassium-transporting ATPase beta subunit (ATP4B); proton pump; gastric H+/K+ ATPase beta subunit	M55655; J05565	
26	B10k	72	35	0.49	-37		2.1	ATPase, copper-transporting, Menkes protein	U08344	
27	B12h	2	10	Up	8	Up		? myelin proteolipid protein (PLP); DM-20; lipophilin	M11185	
28	B12i	20	11	0.55	-9		1.8	? synapsin 2A	M27925	
29	B13c	41	20	0.49	-21		2.0	annexin I (ANX1); lipocortin I; calpactin II; chromobindin 9; P35; phospholipase A2 inhibitory protein	M19967	
30	B13i	44	19	0.43	-25		2.3	synaptotagmin IV (SYT4)	L38247	

#	Spot Intensity		Ratio	Difference	RATIO		Gene	Genbank #
	coordinate	C			3	55		
31	B14c	14	55	41	3.93	3.9	epidermal fatty acid-binding protein (E-FABP); cutaneous fatty acid-binding protein (C-FABP); DA11; FABP5	U13253
32	B14g	400	703	303	1.76	1.8	nonspecific lipid-transfer protein precursor (NSL-TP); sterol carrier protein 2 (SCP2); sterol carrier protein X (SCPX)	M34728
33	B14n	11	3	-8	Down		? syntaxin 4 (STX4)	L20821
34	C01f	23	100	77	4.35	4.3	fatty acid binding protein, brain	U02096
35	C02c	40	6	-34	Down		type 1 hexokinase (HK1); brain hexokinase	J04526; J03228
36	C02j	258	456	198	1.77	1.8	testis fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose 2,6-biphosphate (testis 6PF-2-K/fru-2,6-P2ase); 6-phosphofructo- 2-kinase; fructose-2,6-bisphosphatase	M64797
37	C03m	202	59	-143	0.29	3.4	glucose-6-phosphate dehydrogenase	X07467
38	C04a	106	58	-48	0.55	1.8	mitochondrial ATP synthase D subunit; ATP5H	D10021
39	C05c	25	11	-14	0.44	2.3	mitochondrial carnitine O-palmitoyltransferase I liver isoform (CPT I-L)	L07736
40	C07c	57	30	-27	0.53	1.9	cytochrome P450 2A3 (CYP2A3); coumarin 7-hydroxylase	J02852
41	C07d	24	9	-15	0.38	2.7	cytochrome P450 3A1 (CYP3A1); P450-PCN1	M10161
42	C07e	9	1	-8	Down		? cytochrome P450 2C7 (CYP2C7); P450F; PTF1	M18335; J03509; M18774 U39206
43	C07j	34	15	-19	0.44	2.3	cytochrome P-450 4F4	M72422
44	C09i	15	5	-10	Down		? glutamic acid decarboxylase (GAD65)	X13817
45	C10a	22	12	-10	0.55	1.8	calmodulin (CALM; CAM)	U22424
46	C10g	78	46	-32	0.59	1.7	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2	L14684; L14683
47	C12e	63	25	-38	0.40	2.5	mitochondrial elongation factor G precursor (MEF-G)	

#	coordinate	Spot Intensity		Ratio	Difference	RATIO		Gene	Genbank #
		C	3			UP	DOWN		
48	C13d	19	33	1.74	14	1.7		apolipoprotein B mRNA editing protein (APOBEC-1); REPR	L07114
49	C14b	335	632	1.89	297	1.9		mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor (M6P/IGFR2)	U59809
50	C14k	24	6	Down	-18			Rek4 Eph-related receptor tyrosine kinase; ephrin type-A receptor 3; EphA3; similar to Eik1	U69278
51	D01b	77	136	1.77	59	1.8		platelet-derived growth factor receptor, alpha	Z14119
52	D03d	8	20	2.50	12	2.5		D(4) dopamine receptor; D(2C) dopamine receptor	M84009
53	D04e	31	53	1.71	22	1.7		lutropin-choriogonadotropic hormone receptor	M26199
54	D05c	17	30	1.76	13	1.8		prostaglandin E2 receptor EP4 subtype	U94709
55	D08n	164	288	1.76	124	1.8		N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR1); glutamate receptor subunit zeta 1 precursor; NR1	X63255
56	D11b	19	7	Down	-12			acetylcholine receptor beta	X74833
57	D11n	23	39	1.70	16	1.7		neuropilin	AF018957
58	D12f	14	28	2.00	14	2.0		coagulation factor II (thrombin) receptor (CF2R); thrombin receptor precursor	M81642
59	D14k	16	30	1.88	14	1.9		macrophage inflammatory protein-2 precursor	U45965
60	E01b	5	23	Up	18	Up		heparin-binding growth associated protein	M55601
61	E01i	28	12	0.43	-16	2.3		fibroblast growth factor 5 (FGF5); HBGF5	D64085
62	E02f	30	17	0.57	-13	1.8		cytokine-induced neutrophil chemoattractant 2, beta	D21095
63	E03h	20	9	0.45	-11	2.2		? muscle 6-phosphofructokinase (PFKM); phosphofructokinase 1; phosphohexokinase; phosphofructo-1-kinase A	U25651
64	E04g	26	15	0.58	-11	1.7		inhibin, beta A subunit	M37482
65	E05c	25	11	0.44	-14	2.3		interleukin-7 (IL-7)	AF010464
66	E05e	21	12	0.57	-9	1.7		interleukin 13 precursor (IL-13); T-cell activation protein P600	L26913

#	coordinate	Spot Intensity		Ratio	Difference	RATIO		Gene	Genbank #
		C	3			UP	DOWN		
67	E06i	59	25	0.42	-34		2.4	arrestin C	U03628
68	E07n	25	12	0.48	-13		2.1	c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3); stress-activated protein kinase beta (SAPK-beta)	L27128
69	E08i	34	19	0.56	-15		1.8	protein kinase C delta type (PKC-delta)	M18330
70	E09i	70	34	0.49	-36		2.1	casein kinase 1, gamma subunit, isoform 1	U22296
71	E11c	30	13	0.43	-17		2.3	HEP; LC-PTP protein-tyrosine phosphatase; hematopoietic protein-tyrosine phosphatase (HEPTP)	U28356
72	E12c	125	50	0.40	-75		2.5	protein phosphatase 2A, regulatory subunit B	M83298
73	E12d	63	36	0.57	-27		1.7	protein tyrosine phosphatase, striatum enriched	S49400; M65159 M33962
74	E12f	20	9	0.45	-11		2.2	? protein tyrosine phosphatase PTPase	L19698
75	E12n	23	13	0.57	-10		1.8	Ral A; GTP-binding protein	M17528
76	E13i	28	13	0.46	-15		2.2	guanine nucleotide-binding protein G(i) alpha 2 subunit (GNAI2); adenylate cyclase-inhibiting G alpha protein	L23219
77	E13k	55	26	0.47	-29		2.1	guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(s)/G(o) gamma-7 subunit (GNG7; GNGT7)	Y14019
78	E14g	110	46	0.42	-64		2.4	Rab-3b ras-related protein	M83679
79	E14j	20	9	0.45	-11		2.2	? rab15, ras related GTPase	L07925
80	F01e	63	22	0.35	-41		2.9	RalGDSB; GTP/GDP dissociation stimulator for a ras-related GTPase	U80076
81	F01g	42	23	0.55	-19		1.8	RIN1; interacts directly with Ras and competes with Raf1	J03806
82	F01h	12	4	Down	-8			? phospholipase C gamma 1 9PLC gamma-1); PLC-II; PLC-148	L27057
83	F02k	21	5	Down	-16			cAMP phosphodiesterase 4A; DPDE2; dunce Drosophila homolog E2	U09457
84	F02m	547	304	0.56	-243		1.8	DPDE3; cAMP-dependent 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D	L37203
85	F03c	14	4	Down	-10			? olfactory guanylyl cyclase D precursor (GUCY2D)	

#	coordinate	Spot Intensity		Ratio	Difference	RATIO		Gene	Genbank #
		C	3			UP	DOWN		
86	F03g	40	17	0.43	-23		2.4	Adenylyl cyclase (olfactive type) type III	M55075
87	F03k	20	4	Down	-16			calretinin	X66974
88	F03l	23	6	Down	-17			Calcineurin B subunit, CALCINEURIN B SUBUNIT ISOFORM 1 (PROTEIN PHOSPHATASE 2B REGULATORY SUBUNIT).	L03554
89	F03m	13	5	Down	-8			? NEURONAL CALCIUM SENSOR 1 (NCS-1))	L27421
90	F05a	58	22	0.38	-36		2.6	Crk-associated substrate (Cas); focal adhesion kinase substrate; p130	D29766
91	F05g	18	9	0.50	-9		2.0	? SHPS-1 receptor-like protein with SH2 binding site	D85183
92	F05j	21	10	0.48	-11		2.1	? PDGF-associated protein	U41744
93	F06f	81	34	0.42	-47		2.4	GAP-associated protein (p190).	M94721
94	F07m	128	19	0.15	-109		6.7	granzyme M precursor (GZMM); MET-ASE; natural killer cell granular protease; RNK-MET-1	L05175
95	F07n	181	92	0.51	-89		2.0	mast cell protease 1 precursor (RMCP-1)	U67915
96	F08l	45	18	0.40	-27		2.5	endothelin converting enzyme	D29683
97	F09d	34	11	0.32	-23		3.1	cathepsin K	AF010306
98	F09g	11	27	2.45	16	2.5		cathepsin L	Y00697
99	F10d	35	18	0.51	-17		1.9	proteasome subunit RC10-II	D21800
100	F10e	36	20	0.56	-16		1.8	proteasome subunit RC7-I	D21799
101	F12l	56	14	0.25	-42		4.0	proteinase activated receptor 2 precursor (PAR-2)	U61373
102	F13b	19	7	Down	-12			G protein coupled receptor, putative, GPR12	U12184
103	F13g	59	19	0.32	-40		3.1	ovalbumin upstream promoter gamma nuclear receptor rCOUPg	AF003926
104	F13j	22	10	0.45	-12		2.2	ezrin; cytovillin; villin 2 (VIL2); p81	X67788
105	F14d	17	6	Down	-11			? telomerase protein component 1 (TLP1)	U89282