

(血管内皮細胞核は形態により同定し計測から除外)。さらに嗅神経の神経束の断面積を画像解析ソフトで計測することにより OEC の分布密度を計算し、これが加齢によりどのように変化するかを検討した。

C. 結果

1. 嗅上皮の形態学的変化

まず嗅上皮の厚さについては 10 日齢 > 90 日齢 > 16 ヶ月齢であった (図 1 上)。若い群では嗅上皮の部分的な変性はほとんど見られなかったのに対し、16 ヶ月齢群では部分的に嗅上皮層が極端に薄くなっている部位や広範囲に変性して呼吸上皮に置き換わっている部分も存在し、これはヘマトキシリン・エオジン染色でも確認可能であったが抗 OMP 抗体染色により極めて明瞭に描出された (図 2)。またこのような呼吸上皮の内部に孤立したごく少数の嗅神経細胞が残存している部分もあった (図 2 下右)。

抗 OMP 抗体による免疫染色においては、10 日齢群では嗅上皮内の OMP 陽性嗅神経層の下層に多層の OMP 陰性細胞層が存在し、これは幹細胞層 (Globose basal cell 層) および幼若嗅神経細胞層と考えられた。これと比較し 90 日齢以降の群では OMP 陽性嗅神経細胞層の下層は薄かった (図 1 下)。また、抗 OMP 抗体による染色強度は 16 ヶ月群 > 90 日群 > 10 日群であった (図 1 下)。

2. 嗅上皮の細胞動態の変化

10 日齢群において BrdU 陽性細胞は次のような細胞動態を示した (図 3 左)。まず BrdU 投与後 2 時間では、BrdU 陽性細胞は嗅上皮の基底層および最表層の支持細胞層に位置していた。BrdU 投与後 1~3 日目では個々の BrdU 染色がやや薄く、または核内の小顆粒状になり、陽性細胞数はやや増加した。また、BrdU 陽性細胞の一部がやや表層に移動したが、明らかな OMP との 2 重陽性を示す細胞は確認できなかった。5 日目では OMP 染色性を示す BrdU 陽性細胞が出現し、7 日目ではこの 2 重陽性細胞の数が増加した。ただし、この 2 重陽性細胞の全 OMP 陽性細胞に占める割合は非常に小さく、多くとも 1 割以下であると考えられた。14 日目ではごく一部の基底層の陽性細胞を除いてほとんど全ての BrdU 陽性細胞が OMP 陽性細胞となったが、BrdU 陽性細胞の総数は 7 日目に比べ大きく減少した。28 日目は 14 日目よりさらに BrdU 陽性細胞数が減少していた。

3 ヶ月齢群、16 ヶ月齢群においては、BrdU 陽性細胞数が 10 日齢群に比べて大きく減少していたが、OMP との 2 重陽性を示す細胞の出現過程については 10 日齢群とほぼ同様の所見であった (図 3 中、右)。

3. Bowman 腺の分布変化

ヘマトキシリン・エオジン染色および PAS 染色では染色のコントラストの問題で Bowman 腺の同定はやや困難であったが、アルシアンブルー染色では非常に明瞭に Bowman 腺が描出された (図 4 上)。同染色による観察では、上皮下に占める Bowman 腺の断面積が 10 日齢群、90 日齢群に比べ 7 ヶ月齢群で増加する傾向が認められた (図 4 下)。16 ヶ月群では個体差が大きく、210 日群とほぼ同程度の個体が存在する一方、それよ

りかなり減少している個体もあった。

4. OEC の分布密度

個体間における鼻構造のバリエーションと薄切の角度の個体差を考慮し、形態計測は S4 切片において鼻中隔の上端から嗅上皮の下端までの部分に限定して行った。同部における単位上皮長あたりの OEC のカウント数は 10 日齢群と 16 ヶ月齢群ではほぼ 2 倍の差 (前者 > 後者) があった。現在図 5 に示す手法を用いて軸索束の断面積を解析中である。

D. 考察

1. 嗅神経細胞の細胞動態と加齢との関係について

再生系である嗅神経細胞の維持量は①幹細胞の分裂能 (新生細胞の数) ②新生細胞が成熟嗅神経細胞へ分化するまでの時間 (分化スピード) ③成熟嗅神経細胞の寿命、の 3 つの因子によって規定される。加齢した動物の嗅上皮は本研究 1 の結果に示されるとおり菲薄化し、単位嗅上皮面積あたりの嗅神経細胞数が減少していることから、加齢変化は上記の 3 つの因子の各々またはいずれかに影響を与えていることがわかる。これらのうち①に関しては加齢に伴い新生細胞数の減少が生じることがすでに先行研究で明らかとなっているが、②③に関しては現在のところ加齢による影響は明らかではない。

本研究 2 はこの点を明らかにするために計画されたものである。現在のところまだ定性的な解析しか終了していないが、BrdU を取り込んだ新生細胞が OMP 陽性となるまでの時間経過は 10 日齢群と 16 ヶ月齢群で大きな差異は認められず、②嗅神経への分化のスピードは加齢変化で大きな影響を受けていないことが推察される。現在細胞の定量的カウントを行いより詳細な検討を加えているところである。

③については、新生細胞の消失率によって単純に成熟嗅神経細胞の寿命を算定することは出来ない。というのも嗅神経維持機構に関する現在の学説では、嗅神経細胞は嗅球から神経栄養因子の競争をしており、うまくシナプスを形成して安定した供給を受けたものが生き残り、シナプスの形成に失敗した神経は死滅するという仕組みが有力視されている。この説に従うと安定した成熟嗅神経細胞の平均寿命は当然新生細胞のそれより長いはずであるからである。もし各年齢で成熟嗅神経細胞の量がほぼ一定値に制御されていると仮定すれば、脱落して行く成熟嗅神経細胞の数とほぼ同数の新しい成熟嗅神経細胞が誕生していると考えられる。従って③を評価するためには新たに誕生する成熟嗅神経の数と死滅する成熟嗅神経の数を評価する必要がある。現在これを評価するための実験を計画中である。

2. 加齢に伴う Bowman 腺の分布変化に関して

Bowman 腺は嗅上皮に存在する分泌腺であり、嗅上皮を覆う粘液の産生を行っている。嗅素はこの粘液に溶解して初めて嗅覚受容体に受容されうることから、Bowman 腺は嗅覚の維持に非常に重要な役割を果たしていると想像され、また同腺の機能不全による嗅覚障害という病態が存在する可能性があるが、残念ながら

Bowman腺の分泌物質や分泌の制御機構、発生期から老化に至る細胞動態などに関してはほとんど解明されていない。

本研究ではBowman腺の機能解明のための第一段階として、発生期から老化に至るBowman腺の形態学的変化を検討した。preliminaryな結果ではあるが、マウスBowman腺の単位嗅上皮長あたりの断面積は生後に増大を示すことが分かった。ただしこの結果は腺の数の増大または腺の肥大のいずれによっても説明でき、どちらに（または両者に）基づくものであるかは明らかでない。この点を明らかにするために現在切片の3次元再構築によるBowman腺の立体構造の解析を計画中である。

3. 加齢によるOECの分布密度の変化に関して

OECは一次嗅覚路の全長に分布する嗅神経のグリア系細胞である。近年OECが様々な神経栄養因子を分泌しているらしいこと、また脊髄損傷に対して軸索の伸張をサポートする極めて特異な能力があることなどが明らかとなり、再生医学の分野で特に注目されている。これらの機能は嗅上皮が生体内で持つ唯一の神経細胞再生系であることと密接な関係があることは容易に想像される。従って、加齢に伴う嗅神経の細胞動態の変化に関与する因子としてOECの変化を合わせて評価することは不可欠なことであると考え、現在このような観点での研究は行われていない。

本研究3はこの点を追究するための第一歩として計画されたものである。まだ解析途上であり一定の傾向がつかめる段階に達していないが、方法としてはすでに確立しており近日中に結果が出る見込みである。

資料 5

図 1

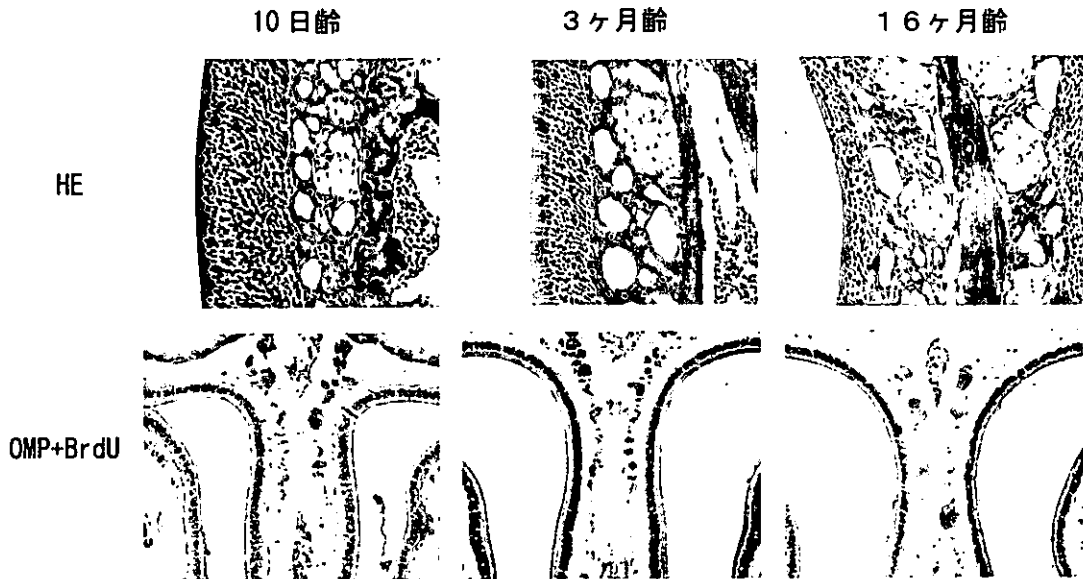


図 2



図 3

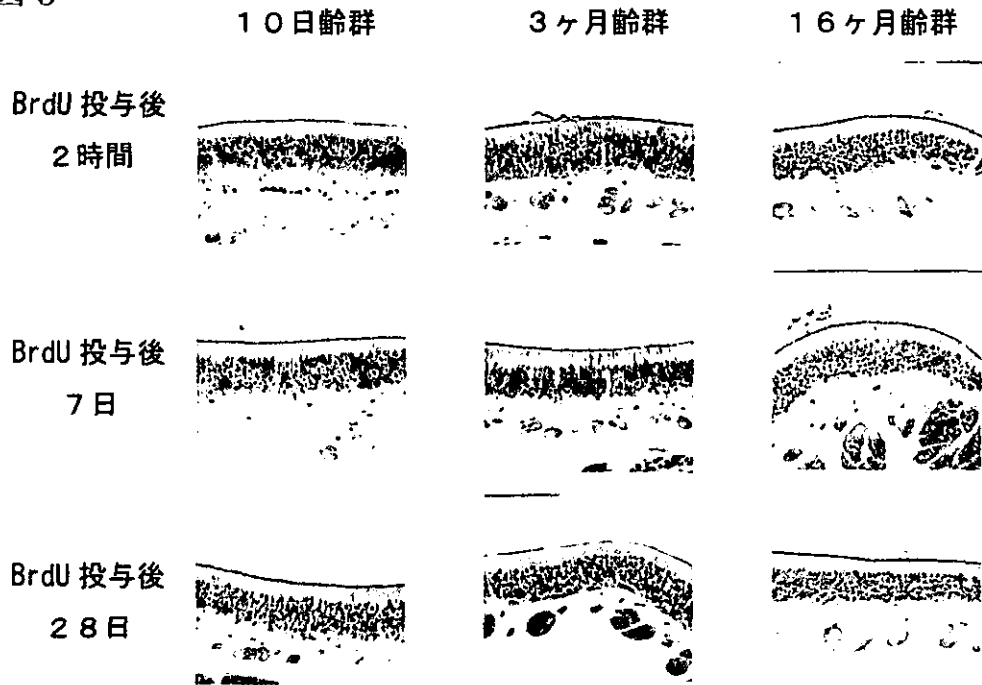


図 4

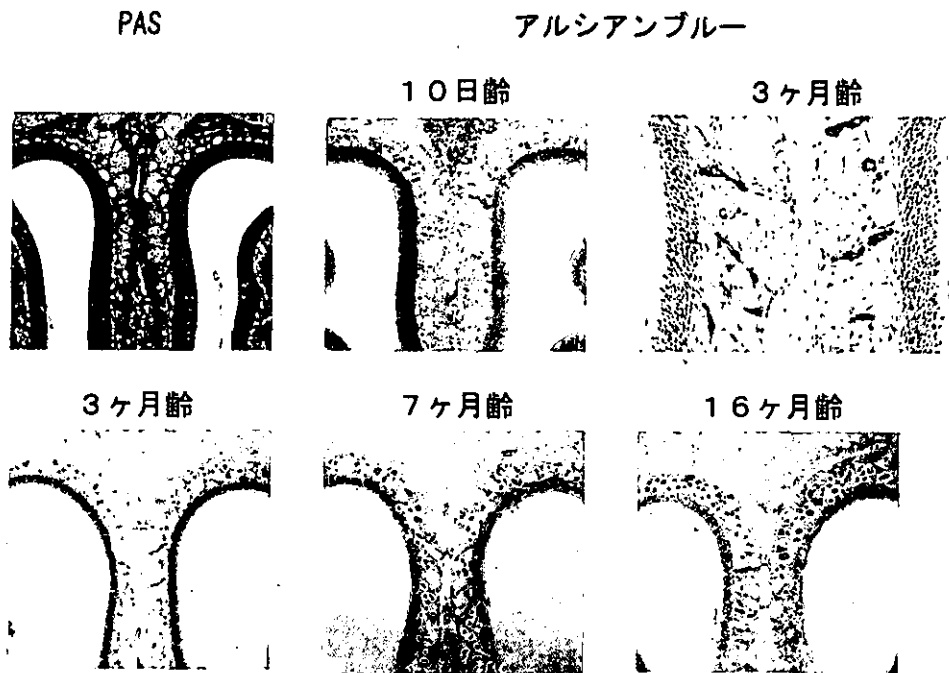
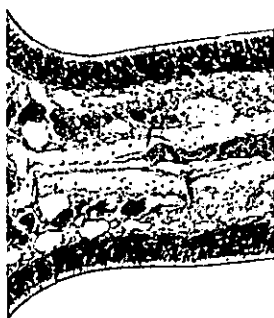
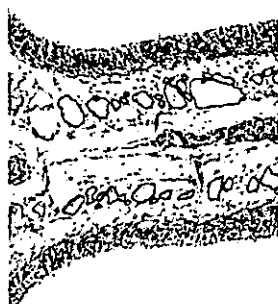


図 5

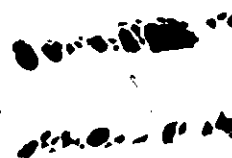
元画像



トレース



面積測定



(平成15年度 総括研究報告書)

厚生労働省科学研究費補助金 長寿科学総合研究事業

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

嗅球除去後の嗅上皮粘膜における遺伝子発現の検索

—嗅上皮の細胞死および再生過程にかかわる遺伝子—

分担研究者 石橋敏夫 社会保険中央病院 部長

研究協力者 藤城芳徳 NTT 東日本関東病院 医員

研究要旨：嗅神経細胞は終生にわたり4週前後の周期でアポトーシスによる細胞死をおこし新しい細胞と生まれ変わっていく。嗅神経細胞のアポトーシスならびに再生のメカニズムを理解するために、cDNA microarray を用いて嗅球除去後のラット嗅上皮とコントロール粘膜の遺伝子発現パターンの比較を行った。

A. 研究目的

哺乳類の嗅上皮は主に嗅覚受容体細胞から構成され、これらの細胞は軸索を嗅球に伸ばしている。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転写因子、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、嗅覚上皮の細胞死および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)のウィスターラット(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。12時間、24時間、3日後、7日後に3匹ずつラット犠牲にし、嗅上皮をそれぞれ採取し、-70度で凍結保存した。コントロールには正常のラット嗅上皮を用いた。

CDNA microarrayによる嗅上皮粘膜における遺伝子発現の検索

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とそれぞれ一晩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、12 時間、24 時間の嗅上皮およびそれぞれのコントロールの嗅上皮粘膜における遺伝子の発現を Atlas rat cDNA expression arrays によって解析

した結果をそれぞれ、表 1, 2, 3, 4 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、あるいは原減弱のものをそれぞれリストアップした。

D. 発表論文

Ishibashi T, Shinogami M, Ishimoto S, Nibu K, Suzuki M, Kaga K. Identification of dual specificity phosphatases induced by olfactory bulbectomy in rat olfactory neuroepithelium. Brain Res.902 2001: 205-11.

experimental		control	
12		C	
vs.			
Normalization		Thresholds	
method	coefficient	ratio	difference
global (sum)	0.64	1.69	8

表5: 嗅球除去後12時間後の嗅覚上皮における遺伝子発現の変化

Array lot#
1050916
Atlas Array
Atlas Rat 1.2 Array

#	coordinate	Spot Intensity		Ratio	Difference	RATIO ? = weak signal (low trust)		Gene
		C	12			UP	DOWN	
1	A01c	15	3	Down	-12			leukocyte common antigen precursor (LCA); CD45 antigen; T200; PTPRC
2	A01i	128	67	0.52	-61	1.9		integral membrane protein E16 (TA1); L-type amino acid transporter 1
3	A05m	27	11	0.41	-16	2.5		interferon regulatory factor 1 (IRF1)
4	A06e	19	11	0.58	-8	1.7		? Lim-2; embryonic motor neuron topographic organizer, HOMEODOMAIN PROTEIN LIM-2 (LIM/HOMEODOMAIN PROTEIN LHX5); G2/M-specific cyclin B1 (CCNB1)
5	A06m	12	21	1.75	9	1.8		? G1/S-specific cyclin D2 (CCND2); vin-1 proto-oncogene
6	A07b	20	11	0.55	-9	1.8		? cathepsin E
7	A08h	19	9	0.47	-10	2.1		? DCC; netrin receptor; immunoglobulin gene superfamily member; former tumor suppressor protein candidate
8	A11g	18	9	0.50	-9	2.0		phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
9	A14k	84	48	0.57	-36	1.7		G protein-activated inward rectifier potassium channel 4 (GIRK4); inward rectifier potassium channel subfamily J member 5 (KCNJ5); heart KATP channel; KATP-1; cardiac inward rectifier (CIR); KIR3.4
10	B05b	113	56	0.50	-57	2.0		ISK slow voltage-gated potassium channel protein; mink potassium channel; KCNE1
11	B05c	48	21	0.44	-27	2.3		potassium channel RB-IRK2, inward rectifier
12	B06c	127	68	0.54	-59	1.9		sodium-hydrogen exchange protein-isoform 2 (NHE-2)
13	B07j	26	13	0.50	-13	2.0		sodium/chloride neurotransmitter transporter
14	B08k	189	109	0.58	-80	1.7		ATPase, copper-transporting, Menkes protein
15	B10k	72	34	0.47	-38	2.1		annexin I (ANX1); lipocortin I; calpactin II; chromobindin 9; P35; phospholipase A2 inhibitory protein
16	B13c	41	17	0.41	-24	2.4		SYNAPTOTAGMIN XI; membrane trafficking protein
17	B13d	173	73	0.42	-100	2.4		mitochondrial carnitine O-palmitoyltransferase 1 liver isoform (CPT 1-L)
18	C05c	25	14	0.58	-11	1.8		? cytochrome P-450 2J3
19	C07k	17	9	0.53	-8	1.9		aldehyde dehydrogenase 2, retinaldehyde-specific
20	C08f	156	84	0.54	-72	1.9		cytosolic thymidine kinase (TK1)
21	C08k	2291	1265	0.55	-1026	1.8		adenylate kinase 3
22	C08l	21	12	0.57	-9	1.7		? apolipoprotein B mRNA editing protein (APOBEC-1); REPR
23	C13d	19	10	0.53	-9	1.9		galanin precursor (GALN; GAL)DD
24	D01n	32	71	2.22	39	2.2		glucagon receptor precursor (GL-R)
25	D03n	29	51	1.76	22	1.8		calcium-independent alpha-tetrotoxin receptor
26	D04j	13	23	1.77	10	1.8		fibroblast growth factor 10 precursor (FGF10)
27	D14l	127	264	2.08	137	2.1		macrophage migration inhibitory factor (MIF)
28	E01e	29	58	2.00	29	2.0		bone morphogenetic protein 4
29	E02h	13	23	1.77	10	1.8		bone morphogenetic protein 2
30	E02i	17	30	1.76	13	1.8		? cocaine/amphetamine-induced rat transcript, CART
31	E05n	6	15	Up	9	Up		gastric inhibitory polypeptide precursor (GIP; glucose-dependent insulinotropic polypeptide)
32	E06e	149	290	1.95	141	1.9		Jak2 tyrosine-protein kinase; Janus kinase 2
33	E07j	24	44	1.83	20	1.8		c-Jun N-terminal kinase 2 (JNK2); stress-activated protein kinase alpha (SAPK-alpha)
34	E07m	14	25	1.79	11	1.8		GSK-3 alpha; glycogen synthase kinase-3 alpha;
35	E10e	12	22	1.83	10	1.8		? CamK I; calcium/calmodulin-dependent protein kinase type I + CaM-like protein kinase
36	E10g	7	15	Up	8	Up		Mak; male germ cell-associated kinase; highly expressed at and after meiosis
37	E10i	26	54	2.08	28	2.1		cyclin-dependent kinase 5 (CDK5); tau protein kinase II (TPKII) catalytic subunit; PSSALRE kinase
38	E11f	23	39	1.70	16	1.7		wee1 tyrosine kinase
39	E11h	14	25	1.79	11	1.8		guanine nucleotide-binding protein G(O) alpha subunit (GNAO; GNAO)
40	E13l	11	21	1.91	10	1.9		Rab-3a ras-related protein
41	E14e	19	34	1.79	15	1.8		phospholipase C delta 1 (PLC delta-1); PLC-III
42	F01j	55	101	1.84	46	1.8		? Ca2+-independent phospholipase A2
43	F02j	8	18	2.25	10	2.3		calretinin
44	F03k	20	34	1.70	14	1.7		14-3-3 protein epsilon; PKC inhibitor protein-1; KCIP-1; mitochondrial import stimulation factor L subunit
45	F04k	9	25	2.78	16	2.8		neuromodulin; axonal membrane protein GAP43; PP48; B-50; protein F1; calmodulin-binding protein P-57
46	F05f	9	26	2.89	17	2.9		? chloride channel RCL1
47	F05h	4	12	Up	8	Up		PDGF-associated protein
48	F05j	21	40	1.90	19	1.9		nitric oxide synthase 1
49	F06h	13	26	2.00	13	2.0		neuroendocrine protein 7B2 precursor; secretogranin V; SGNE1
50	F08l	13	38	2.92	25	2.9		

#	coordinate	Spot Intensity		Ratio	Difference	RATIO		Gene
		C	12			UP	DOWN	
51	F07g	20	39	1.95	19	2.0		mast cell protease 8 precursor (RMCP-8) + mast cell protease 9 precursor (RMCP-9) + mast cell protease 10 precursor (RMCP-10)
52	F08k	12	21	1.75	9	1.8		metalloendopeptidase meprin beta subunit
53	F09g	11	30	2.73	19	2.7		cathepsin L
54	F09l	16	34	2.13	18	2.1		proteasome component C3
55	F09m	6	14	Up	8	Up		? proteasome component C8
56	F09n	3	12	Up	9	Up		? proteasome subunit RC6-1
57	F10j	5	13	Up	8	Up		? proteasome beta subunit precursor; macropain beta; multicatalytic endopeptidase complex beta; proteasome chain 3; RN3; PSMB4
58	F10n	6	17	Up	11	Up		? tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)
59	F11e	30	51	1.70	21	1.7		tissue carboxypeptidase inhibitor (TCI)
60	F12d	23	41	1.78	18	1.8		Tyrosine phosphatase-like protein; negative regulator of PTPases in neuronal tissues, RAT PHEOCHROMOCYTOMA-DERIVED PROTEIN
61	F12n	4	12	Up	8	Up		TYROSINE PHOSPHATASE-LIKE PROTEIN (EC 3.1.3.48)
62	F13m	3	17	Up	14	Up		? G protein coupled receptor 1
63	F13n	19	74	3.89	55	3.9		calponin, acidic
64	F14l	23	45	1.96	22	2.0		cofilin
65	G11	412	1420	3.45	1008	3.4		fibroblast growth factor receptor-activating protein 1 (FGF receptor-activating protein 1; FRAG1)
66	G15	23	81	3.52	58	3.5		polyubiquitin
								hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT)

? = weak signal (low trust)

experimental control

表6: 喉球除去後24時間後の嗅覚上皮における遺伝子発現の変化

24		vs.	C	
Normalization			Thresholds	
method	coefficient		ratio	difference
global (sum)	0.87		1.69	8

Array lot# 表4

1050916

Atlas Array

Atlas Rat 1.2 Array

coordinate	Spot Intensity		Ratio	Difference	RATIO ? = weak signal (low trust)		Gene
	C	24			UP	DOWN	
A02f	75	147	1.96	72	2.0		ecto-ATPase precursor; cell-CAM 105 (C-CAM 105); ATP-dependent taurocolate-carrier protein; GP110
A02j	5	13	Up	8	Up		? cadherin; proton-driven peptide transporter
A03i	5	13	Up	8	Up		? CD8, 37 kDa membrane protein, thymocyte
A03n	18	35	1.94	17	1.9		CD 30L receptor; lymphocyte activation antigen CD30; Ki-1 antigen; CD30 precursor
A04c	26	51	1.96	25	2.0		interleukin-6 receptor alpha precursor (IL-6R-alpha; IL6R)
A04g	65	134	2.06	69	2.1		CD28, T-cell surface antigen
A05a	12	23	1.92	11	1.9		glutamyl aminopeptidase A
A05i	29	56	1.93	27	1.9		CREB active transcription factor; transcription activator protein
A07e	15	27	1.80	12	1.8		G2/M-specific cyclin G (CCNG)
A07f	51	108	2.12	57	2.1		cyclin-dependent kinase 2 alpha (CDK2-alpha) + cyclin-dependent kinase 2-beta (CDK2-beta)
A07h	65	127	1.95	62	2.0		GAK; cyclinG-associated kinase
A07i	11	20	1.82	9	1.8		? M-phase inducer phosphatase 2 (MPI2); cell division control protein 25 B (CDC25B)
A08c	8	17	2.13	9	2.1		? growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 (GADD45)
A09b	148	324	2.19	176	2.2		plasma kallikrein (rPK)
A10f	100	203	2.03	103	2.0		Wilms' tumor protein (WT1); tumor suppressor
A10m	39	78	2.00	39	2.0		cysteine-rich protein 2 (CRP2); ESP1
A11a	11	28	2.55	17	2.5		fos-related antigen 1 (FOSL1; FRA1)
A11i	38	71	1.87	33	1.9		c-kit proto-oncogene
A12b	5	13	Up	8	Up		? Crk adaptor protein (CRK-II alternative splice variant); proto-oncogene c-crk
A12f	58	115	1.98	57	2.0		c-raf proto-oncogene; raf-1
A12h	181	332	1.83	151	1.8		fyn proto-oncogene; p59fyn
A13b	168	294	1.75	126	1.8		Sky proto-oncogene; Tyro3; Rse; Dtk
A14a	2	10	Up	8	Up		? multidrug resistance protein (MRP)
A14d	64	149	2.33	85	2.3		microsomal glutathione S-transferase (GST12; MGST1)
A14h	31	53	1.71	22	1.7		liver carboxylesterase 10 precursor; carboxylesterase ES-10; PI 6.1 esterase; ES-HVEL
B01c	22	40	1.82	18	1.8		cytochrome P450 VII (CYP7); cholesterol 7-alpha-monooxygenase; cholesterol 7-alpha-hydroxylase
B02c	15	29	1.93	14	1.9		glucose transporter type 1 (erythrocyte/brain)
B02e	21	49	2.33	28	2.3		glucose transporter 3
B04n	11	21	1.91	10	1.9		inward rectifier potassium channel subfamily J member 2 (KCNJ2); RBL-IRK1
B05j	9	18	2.00	9	2.0		? calcium channel, alpha 1 beta
B05i	11	21	1.91	10	1.9		potassium channel drk1, delayed rectifier
B05n	9	17	1.89	8	1.9		? potassium channel, voltage gated, KV3.4; RAW3; KCNC4
B06h	30	69	2.30	39	2.3		chloride channel ClC-7
B07i	11	20	1.82	9	1.8		? sodium dependent sulfate transporter
B08c	18	37	2.06	19	2.1		kidney oligopeptide transporter; peptide transporter 2 (PEPT2); kidney H+/peptide cotransporter; SLC15A2
B08g	37	64	1.73	27	1.7		sodium/hydrogen exchange protein 3
B09n	25	46	1.84	21	1.8		vacuolar ATP synthase 16-kDa proteolipid subunit; ATP6C; MVP; ATPL
B13d	173	67	0.39	-106	2.6		SYNAPTOTAGMIN XI; membrane trafficking protein
B14g	400	227	0.57	-173	1.8		nonspecific lipid-transfer protein precursor (NSL-TP); sterol carrier protein 2 (SCP2); sterol carrier protein X (SCPX)
B14h	80	46	0.58	-34	1.7		adipocyte fatty acid-binding protein (AFABP; FABP4); adipocyte lipid-binding protein (ALBP)
C01m	251	126	0.50	-125	2.0		rab13, ras related GTPase
C02b	96	169	1.76	73	1.8		cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA synthase (HMG-CoA synthase; HMGCS1); 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase
C02c	40	69	1.73	29	1.7		type 1 hexokinase (HK1); brain hexokinase
C02n	141	59	0.42	-82	2.4		cytochrome c oxidase subunit Vb & VIa precursor (COX5B)
C04n	29	14	0.48	-15	2.1		serine phospholipid-specific phospholipase A; PS-PLA1 precursor
C05n	39	20	0.51	-19	1.9		arachidonate 5-lipoxygenase (EC 1.13.11.34); 5-lipoxygenase (5-LO)
C06j	131	56	0.43	-75	2.3		cytochrome P450 17 (CYP17); P450C17; CYPXVII; steroid 17-alpha-hydroxylase/17.20 lyase
C06n	235	119	0.51	-116	2.0		cytochrome P-450 19; aromatase
C07k	17	7	0.41	-10	2.4		? cytochrome P-450 2J3
C07n	80	42	0.53	-38	1.9		2-arylpropionyl-CoA epimerase; alpha-methylacyl-CoA racemase

coordinate	Spot Intensity		Ratio	Difference	RATIO		Gene
	C	24			UP	DOWN	
C08f	156	85	0.54	-71		1.8	aldehyde dehydrogenase 2, retinaldehyde-specific
C08j	41	23	0.56	-18		1.8	thymidylate synthase (TYMS; TS)
C08k	2291	1004	0.44	-1287		2.3	cytosolic thymidine kinase (TK1)
C08l	21	8	0.38	-13		2.6	adenylate kinase 3
C08e	25	14	0.56	-11		1.8	glutathione synthetase (GSH synthetase; GSH-S; GSS); glutathione synthase
C09g	9	28	3.11	19	3.1		dopa/tyrosine sulfotransferase
C11d	58	30	0.52	-28		1.9	60S ribosomal protein L44; L36A
C11e	152	80	0.53	-72		1.9	40S ribosomal protein S12
C11f	19	11	0.58	-8		1.7	? ribosomal protein S4
C11g	97	51	0.53	-46		1.9	ribosomal protein L11
C11h	213	113	0.53	-100		1.9	ribosomal protein L13
C11k	101	48	0.48	-53		2.1	S19; 40S ribosomal protein S19
C11l	111	54	0.49	-57		2.1	60S ribosomal protein L21
C11m	275	137	0.50	-138		2.0	60S ribosomal protein L19 (RPL19)
C11n	24	14	0.58	-10		1.7	40S ribosomal protein S11
C12h	9	21	2.33	12	2.3		bcl-2-associated death promoter (BAD)
C13n	33	17	0.52	-16		1.9	RET ligand 2 (RET2)
C14k	24	14	0.58	-10		1.7	Ret4 Eph-related receptor tyrosine kinase; ephrin type-A receptor 3; EphA3; similar to Etk1
D01e	6	16	Up	10	Up		? LCR-1; putative chemokine and HIV coreceptor homolog; G protein-coupled receptor
D01h	116	197	1.70	81	1.7		G-protein coupled receptor, putative, GPR41
D03c	9	21	2.33	12	2.3		D(2) dopamine receptor
D03l	26	78	3.00	52	3.0		neuromedin K receptor (NKR); neurokinin B receptor; NK-3 receptor (NK-3R)
D04g	10	21	2.10	11	2.1		? thyroid stimulating hormone receptor
D06i	5	13	Up	8	Up		? 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4; 5-HT4L
D07l	165	327	1.98	162	2.0		melanocortin receptor 4
D09h	23	49	2.13	26	2.1		glutamate receptor 3 precursor (GLUR-3; GLUR-C; GLUR-K3)
D10a	4	14	Up	10	Up		? gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, beta 1 subunit
D12e	11	22	2.00	11	2.0		PKC-eta; protein kinase C eta type
D13f	15	32	2.13	17	2.1		heat-stable enterotoxin receptor precursor; intestinal guanylate cyclase (GUCY2C; GUC2C); STA receptor
E01d	6	14	Up	8	Up		? vascular endothelial growth factor D (VEGF-D)
E02b	35	80	2.29	45	2.3		bone morphogenetic protein 3
E02c	7	16	Up	9	Up		? transforming growth factor, beta 1
E03k	7	16	Up	9	Up		? C-type natriuretic peptide precursor (CNP; NPPC)
E05i	47	81	1.72	34	1.7		Insulin-like growth factor binding protein 1 precursor (IGFBP-1; IBP-1)
E05n	6	20	Up	14	Up		cocaine/amphetamine-induced rat transcript, CART
E09k	4	14	Up	10	Up		? phosphorylase kinase, alpha subunit
E14a	14	24	1.71	10	1.7		guanine nucleotide-binding regulatory, alpha subunit
F01h	12	24	2.00	12	2.0		phospholipase C gamma 1 (PLC gamma-1); PLC-II; PLC-148
F02c	100	54	0.54	-46		1.9	interferon inducible protein 10
F02g	99	56	0.57	-43		1.8	PI4-K; phosphatidylinositol 4-kinase (230 kDa)
F03a	108	60	0.56	-48		1.8	adenylyl cyclase 4
F03l	23	39	1.70	16	1.7		Calcineurin B subunit, CALCINEURIN B SUBUNIT ISOFORM 1 (PROTEIN PHOSPHATASE 2B REGULATORY SUBUNIT).
F04d	19	11	0.58	-8		1.7	? cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory chain
F05d	23	46	2.00	23	2.0		presenilin 2 (PSEN2; PSNL2; PS2); homolog of the Alzheimer's disease susceptibility gene
F08b	21	12	0.57	-9		1.7	ADP-ribosylation factor 6 (ARF6)
F08g	65	36	0.55	-29		1.8	phospholipase A-2-activating protein (PLAP)
F07c	204	99	0.49	-105		2.1	urokinase-type plasminogen activator precursor (UPA); U-plasminogen activator
F07d	16	7	0.44	-9		2.3	? dipeptidyl aminopeptidase related protein (DPP8)
F07l	40	22	0.55	-18		1.8	trypsinogen 4
F07m	128	40	0.31	-88		3.2	granzyme M precursor (GZMM); MET-ASE; natural killer cell granular protease; RNK-MET-1
F08e	331	99	0.30	-232		3.3	angiotensin converting enzyme (ACE; somatic; dipeptidyl carboxypeptidase I; kininase II
F08i	285	101	0.35	-184		2.8	membrane-type matrix metalloproteinase MT3-MMP
F08n	51	20	0.39	-31		2.5	stromelysin 3; matrix metalloproteinase 11 (MMP11)
F09d	34	14	0.41	-20		2.4	cathepsin K
F09l	16	5	Down	-11			? proteasome component C3
F10k	23	13	0.57	-10		1.8	ATPase, proteasomal, liver, TBP1
F10l	21	11	0.52	-10		1.9	proteasome subunit C5

coordinate	Spot Intensity		Ratio	Difference	RATIO		Gene
	C	24			UP	DOWN	
F11d	21	7	0.33	-14		3.0	metalloproteinase inhibitor 3 precursor; tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3)□□
F11e	30	13	0.43	-17		2.3	tissue carboxypeptidase inhibitor (TCI)
F11i	31	11	0.35	-20		2.8	plasminogen activator inhibitor 2A
F11j	18	10	0.56	-8		1.8	? type I procollagen C proteinase enhancer protein
F12d	23	11	0.48	-12		2.1	Tyrosine phosphatase-like protein; negative regulator of PTPases in neuronal tissues, RAT PHEOCHROMOCYTOMA-DERIVED PROTEIN
F12l	56	17	0.30	-39		3.3	TYROSINE PHOSPHATASE-LIKE PROTEIN (EC 3.1.3.48)
F13c	49	25	0.51	-24		2.0	proteinase activated receptor 2 precursor (PAR-2)
F13e	19	9	0.47	-10		2.1	? probable G protein-coupled receptor RTA
F13g	59	14	0.24	-45		4.2	ovalbumin upstream promoter gamma nuclear receptor rCOUPg
F13h	200	112	0.56	-88		1.8	Ear-3; V-erbA related protein; COUP-TFI transcription factor
F13i	44	15	0.34	-29		2.9	1D-myo-inositol-trisphosphate 3-kinase A (ITPKA); inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase (IP3 3-kinase; IP3K)
F13j	22	7	0.32	-15		3.1	ezrin; cytovillin; villin 2 (VIL2); p81
F13n	19	7	0.37	-12		2.7	cofilin
F14k	34	19	0.56	-15		1.8	Sca1; spinocerebellar ataxia type 1
F14l	23	11	0.48	-12		2.1	fibroblast growth factor receptor-activating protein 1 (FGF receptor-activating protein 1; FRAG1)
G47	501	126	0.25	-375		4.0	40S ribosomal protein S29 (RPS29)

3		vs.		C	
Normalization		Thresholds			
method	coefficient	ratio	difference		
global (sum)	1.14	1.69	8		

表3: 喉球除去後3日後の喉覚上皮における遺伝子発現の変化

Array lot#

1050916

Atlas Array

Atlas Rat 1.2k Array

#	coordinates	Spot Intensity		Ratio	Difference	RATIO		Gene
		C	3			UP	DOWN	
1	A01c	15	3	Down	-12			leukocyte common antigen precursor (LCA); CD45 antigen; T200; PTPRC
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)
3	A02f	75	27	0.36	-48		2.8	ecto-ATPase precursor; cell-CAM 105 (C-CAM 105); ATP-dependent tauocolate-carrier protein; GP110
4	A03b	23	13	0.57	-10		1.8	T-cell receptor CD3 zeta subunit
5	A04g	65	12	0.18	-53		5.4	CD28, T-cell surface antigen
6	A05c	11	3	Down	-8			? Myc-Max-interacting tumor suppressor (MXI1)
7	A07h	65	21	0.32	-44		3.1	GAK; cyclinG-associated kinase
8	A08b	148	58	0.39	-90		2.6	plasma kallikrein (rPK)
9	A09n	28	80	2.86	52	2.9		apolipoprotein D
10	A12d	373	133	0.36	-240		2.8	casein kinase II beta subunit (CKII; CSNK2B; CK2N); phosphoin
11	A12e	16	7	Down	-9			? Pim-1 proto-oncogene
12	A12f	58	13	0.22	-45		4.5	c-raf proto-oncogene; raf-1
13	A13i	342	174	0.51	-168		2.0	neurofibromin; neurofibromatosis protein type 1 (NF1); GTPase stimulatory protein
14	A13m	284	492	1.73	208	1.7		heat shock 70-kDa protein (HSP70)
15	B01a	13	4	Down	-9			? P450 1B1; C3H cytochrome P450; CYP1B1
16	B01c	22	5	Down	-17			cytochrome P450 VII (CYP7); cholesterol 7-alpha-monooxygenase; cholesterol 7-alpha-hydroxylase
17	B01e	20	34	1.70	14	1.7		cytochrome P450 1A2 (CYP1A2); P450-D; P448 + cytochrome P450 ISF/BNF-G
18	B03a	144	30	0.21	-114		4.8	sodium channel SHRSPHD, beta subunit, epithelial
19	B05c	48	9	0.19	-39		5.3	ISK slow voltage-gated potassium channel protein; mink potassium channel; KCNE1
20	B05i	15	6	Down	-9			? calcium channel, L-type, dihydropyridine-sensitive, alpha 2 subunit
21	B07i	231	114	0.49	-117		2.0	Glut and Glut-R glutamate transporter
22	B08f	116	47	0.41	-69		2.5	sodium/hydrogen exchange protein 1
23	B09f	193	92	0.48	-101		2.1	taurine transporter
24	B09i	42	21	0.50	-21		2.0	Na+/K+ ATPase alpha 1 subunit
25	B10f	15	5	Down	-10			? potassium-transporting ATPase beta subunit (ATP4B); proton pump; gastric H+/K+ ATPase beta subunit
26	B10k	72	35	0.49	-37		2.1	ATPase, copper-transporting, Menkes protein
27	B12h	2	10	Up	8	Up		? myelin proteolipid protein (PLP); DM-20; lipophilin
28	B12i	20	11	0.55	-9		1.8	? synapsin 2A
29	B13c	41	20	0.49	-21		2.0	annexin I (ANX1); lipocortin I; calpactin II; chromobindin 9; P35; phospholipase A2 inhibitory protein
30	B13i	44	19	0.43	-25		2.3	synaptotagmin IV (SYT4)
31	B14c	14	55	3.93	41	3.9		epidermal fatty acid-binding protein (E-FABP); cutaneous fatty acid-binding protein (C-FABP); DA11; FABP5
32	B14g	400	703	1.76	303	1.8		nonspecific lipid-transfer protein precursor (NSL-TP); sterol carrier protein 2 (SCP2); sterol carrier protein X (SCPX)
33	B14n	11	3	Down	-8			? syntaxin 4 (STX4)
34	C01f	23	100	4.35	77	4.3		fatty acid binding protein, brain
35	C02c	40	6	Down	-34			type 1 hexokinase (HK1); brain hexokinase
36	C02j	258	458	1.77	198	1.8		testis fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphate (testis 6PF-2-Kfru-2,6-P2ase); 6-phosphofructo-2-kinase; fructose-2,6-bisphosphatase
37	C03m	202	59	0.29	-143		3.4	glucose-6-phosphate dehydrogenase
38	C04a	106	58	0.55	-48		1.8	mitochondrial ATP synthase D subunit, ATP5H
39	C05c	25	11	0.44	-14		2.3	mitochondrial carnitine O-palmitoyltransferase I liver isoform (CPT I-L)
40	C07c	57	30	0.53	-27		1.9	cytochrome P450 2A3 (CYP2A3); coumarin 7-hydroxylase
41	C07d	24	9	0.38	-15		2.7	cytochrome P450 3A1 (CYP3A1); P450-PCN1
42	C07e	9	1	Down	-8			? cytochrome P450 2C7 (CYP2C7); P450F; PTF1
43	C07j	34	15	0.44	-19		2.3	cytochrome P-450 4F4
44	C09i	15	5	Down	-10			? glutamic acid decarboxylase (GAD65)
45	C10a	22	12	0.55	-10		1.8	calmodulin (CALM; CAM)
46	C10g	78	46	0.59	-32		1.7	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2
47	C12e	63	25	0.40	-38		2.5	mitochondrial elongation factor G precursor (MEF-G)
48	C13d	19	33	1.74	14	1.7		apolipoprotein B mRNA editing protein (APOBEC-1); REPR

#	coordinate	Spot Intensity		Ratio	Difference	RATIO		Gene
		C	3			UP	DOWN	
49	C14b	335	632	1.89	297	1.9		mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor (M6P/IGFR2)
50	C14k	24	6	Down	-18			Rek4 Eph-related receptor tyrosine kinase; ephrin type-A receptor 3; EphA3; similar to Etk1
51	D01b	77	136	1.77	59	1.8		platelet-derived growth factor receptor, alpha
52	D03d	8	20	2.50	12	2.5		D(4) dopamine receptor; D(2C) dopamine receptor
53	D04e	31	53	1.71	22	1.7		lutropin-choriogonadotropic hormone receptor
54	D05c	17	30	1.76	13	1.8		prostaglandin E2 receptor EP4 subtype
55	D08n	164	288	1.76	124	1.8		N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR1); glutamate receptor subunit zeta 1 precursor; NR1
56	D11b	19	7	Down	-12			acetylcholine receptor beta
57	D11n	23	39	1.70	16	1.7		neuropilin
58	D12f	14	28	2.00	14	2.0		coagulation factor II (thrombin) receptor (CF2R); thrombin receptor precursor
59	D14k	16	30	1.88	14	1.9		macrophage inflammatory protein-2 precursor
60	E01b	5	23	Up	18	Up		heparin-binding growth associated protein
61	E01i	28	12	0.43	-16		2.3	fibroblast growth factor 5 (FGF5); HBGF5
62	E02f	30	17	0.57	-13		1.8	cytokine-induced neutrophil chemoattractant 2, beta
63	E03h	20	9	0.45	-11		2.2	? muscle 6-phosphofructokinase (PFKM); phosphofructokinase 1; phosphohexokinase; phosphofructo-1-kinase A
64	E04g	26	15	0.58	-11		1.7	inhibin, beta A subunit
65	E05c	25	11	0.44	-14		2.3	interleukin-7 (IL-7)
66	E05e	21	12	0.57	-9		1.7	interleukin 13 precursor (IL-13); T-cell activation protein P600
67	E06f	59	25	0.42	-34		2.4	arrestin C
68	E07n	25	12	0.48	-13		2.1	c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3); stress-activated protein kinase beta (SAPK-beta)
69	E08j	34	19	0.56	-15		1.8	protein kinase C delta type (PKC-delta)
70	E09i	70	34	0.49	-36		2.1	casein kinase 1, gamma subunit, isoform 1
71	E11c	30	13	0.43	-17		2.3	HEP; LC-PTP protein-tyrosine phosphatase; hematopoietic protein-tyrosine phosphatase (HEPTP)
72	E12c	125	50	0.40	-75		2.5	protein phosphatase 2A, regulatory subunit B
73	E12d	63	36	0.57	-27		1.7	protein tyrosine phosphatase, striatum enriched
74	E12f	20	9	0.45	-11		2.2	? protein tyrosine phosphatase PTPase
75	E12n	23	13	0.57	-10		1.8	Rai A; GTP-binding protein
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
77	E13k	55	26	0.47	-29		2.1	guanine nucleotide-binding protein G(i)/G(s)/G(o) gamma-7 subunit (GNG7; GNGT7)
78	E14g	110	46	0.42	-64		2.4	Rab-3b ras-related protein
79	E14j	20	9	0.45	-11		2.2	? rab15, ras related GTPase
80	F01e	63	22	0.35	-41		2.9	RaiGDSB; GTP/GDP dissociation stimulator for a ras-related GTPase
81	F01g	42	23	0.55	-19		1.8	RIN1; interacts directly with Ras and competes with Raf1
82	F01h	12	4	Down	-8			? phospholipase C gamma 1 9PLC gamma-1); PLC-II; PLC-148
83	F02k	21	5	Down	-16			cAMP phosphodiesterase 4A; DPDE2; dunce Drosophila homolog E2
84	F02m	547	304	0.56	-243		1.8	DPDE3; cAMP-dependent 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D
85	F03c	14	4	Down	-10			? olfactory guanylyl cyclase D precursor (GUCY2D)
86	F03g	40	17	0.43	-23		2.4	Adenylyl cyclase (olfactive type) type III
87	F03k	20	4	Down	-16			calretinin
88	F03l	23	6	Down	-17			Calcineurin B subunit, CALCINEURIN B SUBUNIT ISOFORM 1 (PROTEIN PHOSPHATASE 2B REGULATORY SUBUNIT).
89	F03m	13	5	Down	-8			? NEURONAL CALCIUM SENSOR 1 (NCS-1))
90	F05a	58	22	0.38	-36		2.6	Crk-associated substrate (Cas); focal adhesion kinase substrate; p130
91	F05g	18	9	0.50	-9		2.0	? SHPS-1 receptor-like protein with SH2 binding site
92	F05j	21	10	0.48	-11		2.1	? PDGF-associated protein
93	F06f	81	34	0.42	-47		2.4	GAP-associated protein (p190).
94	F07m	128	19	0.15	-109		6.7	granzyme M precursor (GZMM); MET-ASE; natural killer cell granular protease; RNK-MET-1
95	F07n	181	92	0.51	-89		2.0	mast cell protease 1 precursor (RMCP-1)
96	F08l	45	18	0.40	-27		2.5	endothelin converting enzyme
97	F09d	34	11	0.32	-23		3.1	cathepsin K
98	F09g	11	27	2.45	16	2.5		cathepsin L
99	F10d	35	18	0.51	-17		1.9	proteasome subunit RC10-II
100	F10e	36	20	0.56	-16		1.8	proteasome subunit RC7-I
101	F12l	56	14	0.25	-42		4.0	proteinase activated receptor 2 precursor (PAR-2)
102	F13b	19	7	Down	-12			G protein coupled receptor, putative, GPR12
103	F13g	59	19	0.32	-40		3.1	ovalbumin upstream promoter gamma nuclear receptor rCOUPg
104	F13j	22	10	0.45	-12		2.2	ezzrin; cytovillin; villin 2 (VIL2); p81
105	F14d	17	6	Down	-11			? telomerase protein component 1 (TLP1)

#	coordinate	Spot Intensity		Ratio	Difference	RATIO		Gene
		C	3			UP	DOWN	
106	G31	15	6	Down	-9			? ornithine decarboxylase (ODC)
107	G43	9	17	1.89	8	1.9		? cytoplasmic beta-actin (ACTB)

? = weak signal (low trust)

N/C = not calculated due to manually-determined inconsistencies (signal bleeding, background, etc.) in one or both spots

表 4

7		vs.	C	
Normalization			Thresholds	
method	coefficient		ratio	difference
global (sum)	1.89		1.69	7

表 4 : 眼球除去後 7 日後の嗅覚上皮における遺伝子発現の変化

Array lot#

1050916

Atlas Array

Atlas Rat 1.2k Array

#	coordinate	Spot Intensity		Ratio	Difference	RATIO ? = weak signal (low trust)		Gene
		C	7			UP	DOWN	
1	A01c	15	34	2.27	19	2.3		leukocyte common antigen precursor (LCA); CD45 antigen; T200; PTPRC
2	A01i	128	58	0.45	-70		2.2	integral membrane protein E16 (TA1); L-type amino acid transporter 1
3	A02d	35	7	Down	-28			P-selectin precursor; granule membrane protein 140 (GMP-140); PADGEM; CD62P; leukocyte-endothelial cell adhesion molecule 3 (LECAM3)
4	A02f	75	18	0.24	-57		4.2	ecto-ATPase precursor; cell-CAM 105 (C-CAM 105); ATP-dependent taurocolate-carrier protein; GP110
5	A03l	22	52	2.36	30	2.4		MAL; T-lymphocyte maturation-associated protein; myelin protein MVP17
6	A04g	65	17	0.26	-48		3.8	CD28, T-cell surface antigen
7	A05a	12	3	Down	-9			? glutamyl aminopeptidase A
8	A05c	11	3	Down	-8			? Myc-Max-interacting tumor suppressor (MX11)
9	A05i	7	20	Up	13	Up		I-kB (I-kappa B) alpha chain; RLIF-1 gene product
10	A05n	9	17	1.89	8	1.9		? New England Deaconess transcription factor
11	A06i	69	39	0.57	-30		1.8	Id-3; DNA-binding protein inhibitor; HLH protein
12	A07b	20	11	0.55	-9		1.8	G1/S-specific cyclin D2 (CCND2); vin-1 proto-oncogene
13	A07f	51	28	0.55	-23		1.8	cyclin-dependent kinase 2 alpha (CDK2-alpha) + cyclin-dependent kinase 2-beta (CDK2-beta)
14	A07h	65	20	0.31	-45		3.3	GAK; cyclinG-associated kinase
15	A08a	4	13	Up	9	Up		? proliferating cell nuclear antigen (PCNA); cyclin
16	A08d	146	306	2.10	160	2.1		microglobulin; beta-2-microglobulin + prostaglandin receptor F2a
17	A08k	4	11	Up	7	Up		? ATPase, transitional endoplasmic reticulum
18	A09b	148	58	0.39	-90		2.6	plasma kallikrein (rPK)
19	A09g	36	20	0.56	-16		1.8	proteasome delta subunit precursor; macropain delta; multicatalytic endopeptidase complex delta; proteasome subunit Y; proteasome subunit 5; PSMB8
20	A09i	16	28	1.75	12	1.8		proteasome component C13 precursor; macropain subunit C13; multicatalytic endopeptidase complex subunit C13; PSMB8
21	A10e	34	17	0.50	-17		2.0	Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (VHL)
22	A10f	100	52	0.52	-48		1.9	Wlms' tumor protein (WT1); tumor suppressor
23	A10m	39	17	0.44	-22		2.3	cysteine-rich protein 2 (CRP2); ESP1
24	A10n	4	11	Up	7	Up		? Rb; pp105; retinoblastoma susceptibility-associated protein; tumor suppressor gene; cell cycle regulator
25	A11b	10	17	1.70	7	1.7		? p21; cip1; waf1
26	A12d	373	126	0.34	-247		3.0	casein kinase II beta subunit (CKII); CSNK2B; CK2N); phosphoin
27	A12e	16	7	Down	-9			? Pim-1 proto-oncogene
28	A12f	58	9	Down	-49			c-raf proto-oncogene; raf-1
29	A13b	168	295	1.76	127	1.8		Sky proto-oncogene; Tyro3; Rse; Dtk
30	A13g	42	20	0.48	-22		2.1	adenomatous polyposis coli protein (APC)
31	A13i	342	77	0.23	-265		4.4	neurofibromin; neurofibromatosis protein type 1 (NF1); GTPase stimulatory protein
32	A14d	64	34	0.53	-30		1.9	microsomal glutathione S-transferase (GST12; MGST1)
33	A14g	15	30	2.00	15	2.0		glutathione S-transferase P subunit; GST subunit 7 pi (GST7-7)
34	B01a	13	3	Down	-10			P450 1B1; C3H cytochrome P450; CYP1B1
35	B01c	22	3	Down	-19			cytochrome P450 VII (CYP7); cholesterol 7-alpha-monooxygenase; cholesterol 7-alpha-hydroxylase
36	B01f	30	17	0.57	-13		1.8	organic cation transporter 2 (OCT2)
37	B02e	21	9	Down	-12			glucose transporter 3
38	B03a	144	24	0.17	-120		6.0	sodium channel SHRSPhD, beta subunit, epithelial
39	B03c	554	295	0.53	-259		1.9	cyclic nucleotide-activated channel, olfactory
40	B04g	30	17	0.57	-13		1.8	sodium channel I
41	B05f	38	15	0.39	-23		2.5	voltage-dependent L-type calcium channel alpha 1D subunit (CACNA1D); L-type calcium channel alpha 1 polypeptide isoform 2 (CCHL1A2); rat brain class D (RBD); CACH3; CACN4
42	B06c	127	58	0.46	-69		2.2	potassium channel RB-IRK2, inward rectifier
43	B08f	116	47	0.41	-69		2.5	sodium/hydrogen exchange protein 1
44	B09c	42	17	0.40	-25		2.5	sodium/dicarboxylate cotransporter
45	B09d	15	3	Down	-12			sodium/calcium exchanger NCX3
46	B09e	209	83	0.40	-126		2.5	neurotransmitter transporter, sodium dependent
47	B09f	193	68	0.35	-125		2.8	taurine transporter
48	B09h	28	62	2.21	34	2.2		SYNAPTIC VESICLE PROTEIN 2B
49	B10b	124	54	0.44	-70		2.3	sodium/potassium-transporting ATPase beta 1 subunit (ATP1B1)

#	coordinate	Spot Intensity		Ratio	Difference	RATIO		Gene
		C	7			UP	DOWN	
50	B10f	15	3	Down	-12			potassium-transporting ATPase beta subunit (ATP4B); proton pump; gastric H+/K+ ATPase beta subunit
51	B10k	72	41	0.57	-31	1.8		ATPase, copper-transporting, Menkes protein
52	B11e	51	24	0.47	-27	2.1		urea transporter
53	B12l	20	11	0.55	-9	1.8		synapsin 2A
54	B14c	14	28	2.00	14	2.0		epidermal fatty acid-binding protein (E-FABP); cutaneous fatty acid-binding protein (C-FABP); DA11; FABP5
55	B14k	92	24	0.26	-68	3.8		synaptotagmin II
56	B14n	11	3	Down	-8			? syntaxin 4 (STX4)
57	C01a	6	13	Up	7	Up		? syntaxin 5 (STX5)
58	C01k	131	255	1.85	124	1.9		NEURODEGENERATION ASSOCIATED PROTEIN 1; downregulated by axotomy
59	C02c	40	3	Down	-37			type 1 hexokinase (HK1); brain hexokinase
60	C03m	202	64	0.32	-138	3.2		glucose-6-phosphate dehydrogenase
61	C05c	25	7	Down	-18			mitochondrial carnitine O-palmitoyltransferase I liver isoform (CPT I-L)
62	C05h	30	54	1.80	24	1.8		perilipin A/B (PER1A/PER1B); lipid droplet-associated proteins A/B
63	C06c	51	20	0.39	-31	2.5		fatty acid amide hydrolase
64	C07d	24	11	0.46	-13	2.2		cytochrome P450 3A1 (CYP3A1); P450-PCN1
65	C07f	49	22	0.45	-27	2.2		cytochrome P450 4A3 (CYP4A3); lauric acid omega-hydroxylase; P450-LA-omega 3
66	C07j	34	13	0.38	-21	2.6		cytochrome P-450 4F4
67	C08h	12	5	Down	-7			? mitochondrial adenylate kinase 2 (AK2); ATP/AMP transphosphorylase
68	C10i	8	17	2.13	9	2.1		? aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial, liver
69	C10k	15	7	Down	-8			? dopamine beta-hydroxylase
70	C10n	4	13	Up	9	Up		? nitric oxide synthase 3
71	C11a	4	11	Up	7	Up		? 17-kDa ubiquitin-conjugating enzyme E2 (UBE2B); ubiquitin-protein ligase; ubiquitin carrier protein; HR6B
72	C11d	58	122	2.10	64	2.1		60S ribosomal protein L44; L38A
73	C11e	152	272	1.79	120	1.8		40S ribosomal protein S12
74	C11f	19	39	2.05	20	2.1		ribosomal protein S4
75	C11g	97	170	1.75	73	1.8		ribosomal protein L11
76	C11j	46	102	2.22	56	2.2		ribosomal protein L12
77	C11k	101	175	1.73	74	1.7		S19; 40S ribosomal protein S19
78	C11l	111	206	1.88	95	1.9		60S ribosomal protein L21
79	C12a	30	51	1.70	21	1.7		40S ribosomal protein S17 (RPS17)
80	C12c	3	15	Up	12	Up		eukaryotic translation initiation factor 5 (EIF-5)
81	C12h	9	18	2.00	9	2.0		? bcl-2-associated death promoter (BAD)
82	C13a	3	11	Up	8	Up		? P2X purinoceptor 1; ATP receptor P2X1; purinergic receptor; RP-2 protein
83	C14b	335	686	2.05	351	2.0		mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor (M6P/IGF2R)
84	C14c	6	15	Up	9	Up		? platelet-derived growth factor alpha receptor (PDGFRa)
85	C14i	4	11	Up	7	Up		? transforming growth factor-beta II receptor precursor (TGF-beta II receptor; TGFBR2)
86	C14k	24	7	Down	-17			Ret4 Eph-related receptor tyrosine kinase; ephrin type-A receptor 3; EphA3; similar to Etk1
87	D01b	77	132	1.71	55	1.7		platelet-derived growth factor receptor, alpha
88	D01h	116	62	0.53	-54	1.9		G-protein coupled receptor, putative, GPR41
89	D02e	37	18	0.49	-19	2.1		estrogen receptor beta (ER-beta); ESR2; NR3A2
90	D03d	8	15	1.88	7	1.9		? D(4) dopamine receptor; D(2C) dopamine receptor
91	D03e	15	26	1.73	11	1.7		kappa-type opioid receptor (KOR-1)
92	D03i	5	15	Up	10	Up		delta-type opioid receptor (DOR-1); opioid receptor A
93	D03k	16	3	Down	-13			gastrin-releasing peptide receptor (GRP-R); GRP-preferring bombesin receptor
94	D05a	50	26	0.52	-24	1.9		prostaglandin E2 receptor EP2 subtype (PGE receptor EP2 subtype; PTGER2); prostanoid EP2 receptor
95	D05f	14	5	Down	-9			? prostaglandin E2 receptor EP3 subtype (PGE receptor EP3 subtype; PTGER3); prostanoid EP3 receptor
96	D05l	77	34	0.44	-43	2.3		5-hydroxytryptamine 1F receptor (5HT1F; HTR1F); serotonin receptor
97	D06c	311	126	0.41	-185	2.5		alpha 2C adrenergic receptor (ADRA2C); alpha 2C adrenoceptor
98	D06f	28	13	0.46	-15	2.2		somatostatin receptor 2
99	D06k	55	28	0.51	-27	2.0		cannabinoid receptor 1, neuronal
100	D07f	9	20	2.22	11	2.2		5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5B; 5HT5b
101	D10m	123	71	0.58	-52	1.7		acetylcholine receptor alpha
102	D11b	19	9	Down	-10			acetylcholine receptor beta
103	D11k	11	3	Down	-8			? transmembrane receptor UNC5H2
104	D11l	556	255	0.46	-301	2.2		glycine receptor, alpha 2A subunit, inhibitory
105	D11m	18	9	Down	-9			? NEURONAL PENTRAXIN RECEPTOR

#	coordinate	Spot Intensity		Ratio	Difference	RATIO		Gene
		C	7			UP	DOWN	
106	D12b	27	71	2.63	44	2.6		Non-processed neurexin II-beta major, NEUREXIN II-BETA-A PRECURSOR + Non-processed neurexin II-alpha, NEUREXIN II-ALPHA-B PRECURSOR
107	D12j	12	3	Down	-9			? glutamate metabotropic receptor 2 (mGluR2)
108	D14d	18	34	1.89	16	1.9		tumor necrosis factor alpha precursor (TNF-alpha; TNFA); cachectin
109	D14i	16	30	1.88	14	1.9		granulocyte colony stimulating factor
110	D14m	72	17	0.24	-55		4.2	platelet-derived growth factor A-chain (PDGF-A)
111	E02f	30	11	0.37	-19		2.7	cytokine-induced neutrophil chemoattractant 2, beta
112	E03h	20	11	0.55	-9		1.8	muscle 8-phosphofructokinase (PFKM); phosphofructokinase 1; phosphohexokinase: phosphofructo-1-kinase A
113	E03k	7	18	Up	11	Up		C-type natriuretic peptide precursor (CNP; NPPC)
114	E04f	38	73	1.92	35	1.9		corticotropin-releasing hormone
115	E06d	2	11	Up	9	Up		? early growth response protein 1 (EGR1); nerve growth factor-induced protein A (NGFI-A)
116	E06l	59	28	0.47	-31		2.1	arrestin C
117	E07n	25	13	0.52	-12		1.9	c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3); stress-activated protein kinase beta (SAPK-beta)
118	E09l	70	24	0.34	-46		2.9	casein kinase 1, gamma subunit, isoform 1
119	E10f	8	15	1.88	7	1.9		? CamK II; calcium/calmodulin-dependent protein kinase brain type II beta
120	E12c	125	51	0.41	-74		2.5	protein phosphatase 2A, regulatory subunit B
121	E12d	63	35	0.56	-28		1.8	protein tyrosine phosphatase, striatum enriched
122	E12f	20	7	Down	-13			protein tyrosine phosphatase PTPase
123	E13d	92	54	0.59	-38		1.7	transducin beta-2 subunit; GTP-binding protein G(i)/G(s)/G(t) beta subunit 2 (GNB2)
124	E13k	55	22	0.40	-33		2.5	guanine nucleotide-binding protein G(i)/G(s)/G(o) gamma-7 subunit (GNG7; GNGT7)
125	E14c	5	13	Up	8	Up		? GTP-binding protein (G-alpha-8), GUANINE NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN G(S), ALPHA SUBUNIT (ADENYLATE CYCLASE-STIMULATING)
126	E14e	19	34	1.79	15	1.8		Rab-3a ras-related protein
127	E14j	20	11	0.55	-9		1.8	rab15, ras related GTPase
128	E14m	78	24	0.31	-54		3.3	G protein, gamma 5 subunit
129	F01a	3	11	Up	8	Up		? rab4B, ras related GTPase
130	F01e	63	15	0.24	-48		4.2	RaiGDSB; GTP/GDP dissociation stimulator for a ras-related GTPase
131	F01g	42	5	Down	-37			RIN1; Interacts directly with Ras and competes with Raf1
132	F01h	12	5	Down	-7			? phospholipase C gamma 1 9PLC gamma-1); PLC-II; PLC-148
133	F01i	16	7	Down	-9			? phospholipase C gamma 2 (PLC gamma-2); PLC-IV
134	F02a	13	22	1.69	9	1.7		calcium-dependent phospholipase A2 precursor (PLA2); phosphatidylcholine 2-acylhydrolase (PLA2-10; PLA2G5)
135	F02e	16	7	Down	-9			? inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase receptor 1
136	F02h	121	51	0.42	-70		2.4	phospholipase C beta 3 (PLC-beta 3)
137	F02k	21	9	Down	-12			cAMP phosphodiesterase 4A; DPDE2; dunce Drosophila homolog E2
138	F03c	14	7	Down	-7			? olfactory guanylyl cyclase D precursor (GUCY2D)
139	F03g	40	22	0.55	-18		1.8	Adenylyl cyclase (olfactive type) type III
140	F03k	20	9	Down	-11			calretinin
141	F03l	23	3	Down	-20			Calcineurin B subunit, CALCINEURIN B SUBUNIT ISOFORM 1 (PROTEIN PHOSPHATASE 2B REGULATORY SUBUNIT)
142	F04m	9	20	2.22	11	2.2		mothers against DPP protein rat homolog 1 (MAD1)
143	F05e	10	20	2.00	10	2.0		presenilin 1 (PSNL1; PSEN1; PS1); S182 protein
144	F05g	18	7	Down	-11			SHPS-1 receptor-like protein with SH2 binding site
145	F06a	10	20	2.00	10	2.0		ADP-ribosylation factor 5 (ARF5)
146	F06d	23	9	Down	-14			protein kinase C-binding protein nei homolog 1
147	F06f	81	26	0.32	-55		3.1	GAP-associated protein (p190)
148	F06g	65	37	0.57	-28		1.8	phospholipase A-2-activating protein (PLAP)
149	F07l	40	75	1.88	35	1.9		trypsinogen 4
150	F07n	181	79	0.44	-102		2.3	mast cell protease 1 precursor (RMCP-1)
151	F08n	51	100	1.96	49	2.0		stromelysin 3; matrix metalloproteinase 11 (MMP11)
152	F09g	11	35	3.18	24	3.2		cathepsin L
153	F10a	10	18	1.80	8	1.8		proteasome iota subunit; macropain iota subunit; multicatalytic endopeptidase complex iota subunit; 27-kDa prosomal protein (PROS27); PSMA6
154	F10n	6	13	Up	7	Up		? tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)
155	F11a	4	13	Up	9	Up		? tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP2)
156	F12a	6	13	Up	7	Up		? leukocyte common antigen-related tyrosine phosphatase (LAR)
157	F12d	23	39	1.70	16	1.7		Tyrosine phosphatase-like protein; negative regulator of PTPases in neuronal tissues, RAT PHEOCHROMOCYTOMA-DERIVED PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE-LIKE PROTEIN (EC 3.1.3.48)
158	F12l	56	17	0.30	-39		3.3	proteinase activated receptor 2 precursor (PAR-2)
159	F13b	19	5	Down	-14			G protein coupled receptor, putative, GPR12

#	coordinate	Spot Intensity		Ratio	Difference	RATIO		Gene
		C	7			UP	DOWN	
160	F13c	49	20	0.41	-29		2.5	G protein coupled receptor 19
161	F13h	200	109	0.55	-91		1.8	Esr-3; V-erbA related protein; COUP-TFI transcription factor
162	F13m	3	13	Up	10	Up		calponin, acidic
163	F13n	19	34	1.78	15	1.8		cofilin
164	F14d	17	5	Down	-12			telomerase protein component 1 (TLP1)
165	F14k	34	15	0.44	-19		2.3	Sca1; spinocerebellar ataxia type 1
166	F14m	9	34	3.78	25	3.8		interferon induced protein
167	G27	33	64	1.94	31	1.9		glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)
168	G43	9	18	2.00	9	2.0		? cytoplasmic beta-actin (ACTB)

? = weak signal (low trust)

(平成15年度 総括研究報告書)

厚生労働省科学研究費補助金 長寿科学総合研究事業

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に関する研究

分担研究者 太田 康 自治医科大学耳鼻咽喉科 講師

研究要旨：コルヒチンを投与した傷害マウス嗅上皮において、アポトーシスが著明に誘発されていることが光学顕微鏡、タネル法での観察で判明した。アポトーシス抑制薬の一つであるカスパーゼ3抑制薬（DEVD-FMK）を投与中のマウスにコルヒチンを投与しても、誘発されるアポトーシスはごくわずかであった。カスパーゼ3抑制薬（DEVD-FMK）は嗅上皮におけるアポトーシスを抑制することが判明した。

A. 研究目的

嗅上皮は常に増殖しターンオーバーを繰り返している。そのため、つねにアポトーシスをおこしていることも知られている。とくに嗅上皮に傷害を与えたときはアポトーシスも増加する。逆にアポトーシスを抑制、コントロールできれば、嗅上皮の傷害の治療、すなわち嗅覚障害の治療方法に発展させられる可能性がある。今回コルヒチンを投与した傷害マウス嗅上皮にアポトーシス抑制薬の一つであるカスパーゼ3抑制薬（DEVD-FMK）を投与し、アポトーシスの抑制をタネル法、また光学顕微鏡で検討した。

B. 研究方法

1. コルヒチンの投与（アポトーシス群）

生後4週のICR雄マウスにコルヒチン0.04mgを腹腔内投与した。その2日後に4%パラホルムアルデヒドで還流固定、断頭、10%EDTA液で約1週間脱灰し、パラフィン包埋、0.4μmの切片を作成した。

2. DEVD-FMKの投与（アポトーシス抑制群）

DEVD-FMK0.03mgをコルヒチン投与前日から固定日まで4日間、1日1回腹腔内投与し、アポトーシス抑制群とした。以後、固定方法などは1と同じである。

3. アポトーシス群、アポトーシス抑制群をHE染色標本、タネル法で比較検討した。

C. 研究結果

光学顕微鏡による観察で、アポトーシス群のマウスにおいては、嗅上皮の基底層を中心にアポトーシスが多数認められた（図5、図6）。一方アポトーシス抑制群のマウスにおいてはアポトーシスはほとんど認められなかった（図7、図8）。

D. 考察

アポトーシス抑制薬の一つであるカスパーゼ3抑制薬（DEVD-FMK）の投与によって、アポトーシスが著明に抑制されることが判明した。嗅上皮におけるアポトーシスにはカスパーゼ3が関与していること、カスパーゼ3抑制薬（DEVD-FMK）はカスパーゼ3を抑制することによってアポトーシスを抑制していることが考えられた。

E. 結論

カスパーゼ3抑制薬（DEVD-FMK）は、嗅上皮において、コルヒチンで誘発されるアポトーシスを抑制することが判明した。

F. 論文発表

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