



BDNF expression in olfactory bulb and epithelium during regeneration of olfactory epithelium

浦長瀬, 昌宏

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2012-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5645

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005645>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

BDNF expression in olfactory bulb and epithelium
during regeneration of olfactory epithelium

嗅上皮再生時における嗅球嗅上皮内 BDNF mRNA 発現の検討

浦長瀬昌宏 勝沼紗矢香 土井清司 丹生健一

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
外科系講座耳鼻咽喉科頭頸部外科分野

(指導教員：丹生健一教授)

浦長瀬 昌宏

背景

嗅神経細胞は終生再生を繰り返し、再生する度に、その軸索を嗅球内の糸球体まで伸ばしている。従って、嗅神経細胞が再生する度に、嗅上皮や嗅球内でも様々な変化が起こっていると考えられ、嗅神経細胞の再生において様々な神経栄養因子が重要な役割を果たしていると報告されている。第一選択の抗甲状腺薬として一般臨床に用いられているメチマゾールを腹腔内に投与すると、嗅上皮が速やかに脱落し、2-3週間で嗅上皮が再生することが知られている。今回、我々は、嗅神経細胞の再生機構解明を目的として、このメチマゾール投与嗅神経細胞障害モデルを用いて、嗅神経細胞の障害・再生時における嗅上皮嗅球内の遺伝子変化を網羅的に解析した。有意な変化がみられた遺伝子の中から神経栄養因子 BDNF に着目し、BDNF が嗅神経細胞再生時に嗅上皮と嗅球でどのように変化するかを検討した。

実験方法

メチマゾール投与嗅神経細胞障害モデルを用いて、嗅神経細胞の障害・再生時における嗅球内の遺伝子変化を検討した。6週齢の Balb/C マウスにメチマゾール 100mg/kg を腹腔内投与し、投与後1日、3日、7日、14日、21日、28日、35日、42日で、各群10匹ずつの嗅球を採取した。メチマゾール投与量と同量の生理食塩水を投与した群(10匹)をコントロールとした。採取した嗅上皮、嗅球から mRNA を抽出しマイクロアレイを用いた解析により各群の mRNA の発現の程度を算出し、嗅神経細胞の再生に関与する遺伝子の検討を行った。その結果、神経栄養因子のひとつで、分化や神経細胞の維持に関わる BDNF に着目した。また、成熟した嗅神経細胞の細胞体や軸索、糸球体などに存在するタンパク質である OMP (olfactory marker protein) は、メチマゾール投与の過程でその発現が安定していた。そのため、BDNF との比較に OMP を用い、BDNF と OMP それぞれの mRNA の嗅球における発現を RT-PCR で確認した。

結果

メチマゾール投与後の嗅上皮にマイクロアレイ解析をおこなった結果、投与後1日、3日、7日、14日のいずれかで、1263遺伝子で発現が2倍に、49遺伝子で2分の1に変化した。BDNF mRNA および OMP mRNA は、嗅上皮が障害されると著明に発現が低下し、嗅上皮の再生とともに発現を回復した。TrkB (比較的成熟した嗅神経細胞の細胞体や軸索などに発現する BDNF の受容体) の mRNA は、大きな変化はみられなかった。メチマゾール投与後の嗅球にマイクロアレイ解析をおこなった結果、投与後1日、3日、7日、14日のいずれかで、760遺伝子で発現が2倍に、49遺伝子で2分の1に変化した。BDNF と OMP の mRNA は、嗅上皮が障害されると著明に発現が低下した。TrkB の mRNA は、あまり変化がみられなかった。メチマゾール投与後、BDNF の mRNA は嗅球で嗅上皮よりはるかに発現が高かった。

確認のため、RT-PCR を施行したところ、嗅球における BDNF mRNA は、嗅上皮が障害されるとメチマゾール投与後 7 日目まで著明に発現が低下し、14 日目で降急速に増大した。OMP は BDNF とほぼ同じような変化を示したが、BDNF の変化が OMP に先行していた。この結果は、メチマゾール投与後 14 日まで解析したマイクロアレイの結果と一致していた。

マイクロアレイ・RT-PCR の結果を検証するため、嗅球と嗅上皮における BDNF、OMP と TrkB の発現を免疫染色にて確認した。嗅上皮では、メチマゾール投与直後、OMP 陽性の嗅神経細胞は消失したが、投与後 7 日目から OMP 陽性の嗅神経細胞が出現した。メチマゾール投与直後、TrkB 陽性の嗅神経細胞は減少したが、嗅上皮再生開始時から発現しており、OMP 陽性の嗅神経細胞の増加に先立って TrkB 陽性の嗅神経細胞が増加した。嗅球では、OMP は糸球体に発現した。OMP 陽性細胞は、メチマゾール投与後糸球体の萎縮にあわせて減少し、メチマゾール投与後 7 日目から徐々に増加した。TrkB 陽性の細胞は、メチマゾール投与に関係なく、嗅球に存在しなかった。

考察

BDNF は神経の成長と分化に関わる代表的な神経栄養因子のひとつである。BDNF は、嗅球と嗅神経の両方で産生され、軸索終末に供給されていると考えられている。しかし、BDNF と BDNF mRNA は同定が難しく、これまでは、報告によってその局在は大きく異なっていた。

嗅球における BDNF mRNA は、著明に発現が低下し、メチマゾール投与により嗅上皮が障害されると、投与後 7 日目まで著明に発現が低下し、14 日目で降急速に増大した。また、嗅球での OMP mRNA の発現は、BDNF mRNA と同様に変化したが、BDNF mRNA の変化のほうが先んじていた。

この実験結果から、次のような仮説が考えられる。メチマゾールにより嗅神経が障害された後、再生した嗅神経の軸索が嗅球に到達するまでは、嗅上皮由来の BDNF が嗅神経再生に関わる。嗅神経の軸索が嗅球に到達すると、嗅球が BDNF を産生しはじめ、嗅球と結合した軸索を通じて、BDNF が嗅神経に供給され、嗅神経の成熟を促す。そして、嗅神経の成熟により、嗅神経で OMP が発現するようになる。

メチマゾール投与直後から、嗅上皮での TrkB の発現が持続していることは、嗅神経再生のすべての過程で BDNF が必要であることを示唆している。しかし、嗅神経細胞再生の初期にはまだ神経軸索が嗅球まで達していないため、BDNF は嗅上皮から供給されていると考えられる。また、嗅球で産生される BDNF mRNA の発現が、嗅上皮で産生されるものより、はるかに高いこと、嗅神経細胞の軸索が嗅球と結合してから嗅球で発現される BDNF mRNA が急速に増大することは、嗅球に嗅神経細胞が結合した後、嗅神経細胞に供給される BDNF は、おもに嗅球で産生されていることを示している。以上から、嗅上皮由来の BDNF は嗅神経細胞再生の初期に、嗅球由来の BDNF は嗅神経細胞再生の後期に重要な役割を果たしていると考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2276号	氏 名	浦長瀬 昌宏
論文題目 Title of Dissertation	嗅上皮再生時における嗅球嗅上皮内 BDNF mRNA 発現の検討 BDNF expression in olfactory bulb and epithelium during regeneration of olfactory epithelium		
審査委員 Examiner	主 査 錦織 千鶴 Chief Examiner 副 査 寺島 俊雄印 Vice-examiner 副 査 甲村 英之 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

嗅神経細胞は終生再生を繰り返し、再生する度に、その軸索を嗅球内の糸球体まで伸ばしている。従って、嗅神経細胞が再生する度に、嗅上皮や嗅球内でも様々な変化が起こっていると考えられ、嗅神経細胞の再生において様々な神経栄養因子が重要な役割を果たしていることが報告されている。抗甲状腺薬であるメチマゾールを腹腔内に投与すると、嗅上皮が速やかに脱落し、2-3週間で嗅上皮が再生することが知られている。今回、申請者達は、嗅神経細胞の再生機構解明を目的として、このメチマゾール投与嗅神経細胞障害モデルを用いて、嗅神経細胞の障害・再生時における嗅上皮嗅球内の遺伝子変化を網羅的に解析し、有意な変化がみられた遺伝子の中から神経栄養因子 BDNF に着目し、BDNF が嗅神経細胞再生時に嗅上皮と嗅球でどのように変化するかを検討した結果、以下のことを明らかにした。

①嗅上皮のマイクロアレイ解析では、メチマゾール投与後1日、3日、7日、14日のいずれかで、1263遺伝子で発現が2倍に、49遺伝子で2分の1に変化した。BDNF mRNA および OMP mRNA は、嗅上皮が障害されると著明に発現が低下し、嗅上皮の再生とともに発現を回復した。TrkB（比較的成熟した嗅神経細胞の細胞体や軸索などに発現する BDNF の受容体）の mRNA は、大きな変化はみられなかった。

②嗅球のマイクロアレイ解析では、メチマゾール投与後1日、3日、7日、14日のいずれかで、760遺伝子で発現が2倍に、49遺伝子で2分の1に変化した。BDNF と OMP の mRNA は、嗅上皮が障害されると著明に発現が低下した。TrkB の mRNA は、あまり変化がみられなかった。メチマゾール投与後、BDNF の mRNA は嗅球で嗅上皮よりはるかに発現が高かった。

③確認のため、RT-PCR を施行したところ、嗅球における BDNF mRNA は、嗅上皮が障害されるとメチマゾール投与後7日目まで著明に発現が低下し、14日目以降急速に増大した。OMP は BDNF とほぼ同じような変化を示したが、BDNF の変化が OMP に先行していた。この結果は、メチマゾール投与後14日まで解析したマイクロアレイの結果と一致していた。

④嗅球と嗅上皮における BDNF、OMP と TrkB の発現を免疫染色にて確認したところ、嗅上皮では、メチマゾール投与直後、OMP 陽性の嗅神経細胞は消失したが、投与後7日目から OMP 陽性の嗅神経細胞が出現した。メチマゾール投与直後、TrkB 陽性の嗅神経細胞は減少したが、嗅上皮再生開始時から発現しており、OMP 陽性の嗅神経細胞の増加に先立って TrkB 陽性の嗅神経細胞が増加した。嗅球では、OMP は糸球体に発現した。OMP 陽性細胞は、メチマゾール投与後糸球体の萎縮にあわせて減少し、メチマゾール投与後7日目から徐々に増加した。TrkB 陽性の細胞は、メチマゾール投与に関係なく、嗅球に存在しなかった。

嗅球における BDNF mRNA は、著明に発現が低下し、メチマゾール投与により嗅上皮が障害されると、投与後7日目まで著明に発現が低下し、14日目以降急速に増大した。また、嗅球での OMP mRNA の発現は、BDNF mRNA と同様に変化したが、BDNF mRNA

の変化のほうが先んじていた。

この実験結果から、申請者達は以下のような仮説を立てた。メチマゾールにより嗅神経が障害された後、再生した嗅神経の軸索が嗅球に到達するまでは、嗅上皮由来の BDNF が嗅神経再生に関わる。嗅神経の軸索が嗅球に到達すると、嗅球が BDNF を産生しはじめ、嗅球と結合した軸索を通じて、BDNF が嗅神経に供給され、嗅神経の成熟を促す。そして、嗅神経の成熟により、嗅神経で OMP が発現するようになる。

メチマゾール投与直後から、嗅上皮での TrkB の発現が持続していることは、嗅神経再生のすべての過程で BDNF が必要であることを示唆しているが、嗅神経細胞再生の初期にはまだ神経軸索が嗅球まで達していないため、BDNF は嗅上皮から供給されていると考えた。また、嗅球で産生される BDNFmRNA の発現が、嗅上皮で産生されるものより、はるかに高いこと、嗅神経細胞の軸索が嗅球と結合してから嗅球で発現される BDNFmRNA が急速に増大することは、嗅球に嗅神経細胞が結合した後、嗅神経細胞に供給される BDNF は、おもに嗅球で産生されていることを示している。以上から、嗅上皮由来の BDNF は嗅神経細胞再生の初期に、嗅球由来の BDNF は嗅神経細胞再生の後期に重要な役割を果たしていると考えた。

以上のことより、本研究は、嗅神経細胞の再生における重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。