



Effect of intranasal administration of neurotrophic factors on regeneration of chemically degenerated olfactory epithelium in aging mice

Fukuda, Yuriko

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2019-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7331号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007331>

※ 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

Effect of intranasal administration of neurotrophic factors on regeneration of chemically degenerated olfactory epithelium in aging mice

高齢マウス変性嗅上皮の再生に対する神経栄養因子の点鼻効果

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
耳鼻咽喉科・頭頸部外科学
(指導教員: 丹生 健一教授)

福田 有里子

論文の内容要旨

タイトル:

Effect of intranasal administration of neurotrophic factors on regeneration of chemically degenerated olfactory epithelium in aging mice

高齢マウス変性嗅上皮の再生に対する神経栄養因子の点鼻効果

【背景】

哺乳類の嗅上皮においては、終生再生を繰り返し、嗅神経細胞のターンオーバーが絶えず起こることにより、神経再生が生涯持続する。しかしながら加齢あるいは種々の外因により、この再生能は低下する。現在のところ、実地臨床において、鼻副鼻腔疾患による嗅覚障害ではステロイドによる軽快が期待できるが、加齢をはじめ他の嗅覚障害に対しては病態が解明されておらず、有効な治療法も見つかっていない。

嗅上皮再生過程における嗅神経細胞の分化、増殖、成熟には様々な転写因子や神経栄養因子が関与している。そこで今回我々は、神経栄養因子を局所投与(点鼻)することによる嗅上皮再生促進効果を検討した。

神経栄養因子としては以下の2つを候補として挙げた。

神経栄養因子 FGF (fibroblast growth factor) は他の神経系と同様、嗅上皮においてもその発生に重要な役割を果たしており、中でも FGF2 は成熟したげつ歯類の嗅上皮に発現しており、*in vitro*において幹細胞の増殖促進にかかわると言われている。IGF1 (insulin-like growth factor-1) は *in vitro*において前駆細胞から嗅上皮細胞への分化を促進し、成熟マウスにおいても嗅上皮の再生と維持に重要であることが報告されている。

また、これら神経栄養因子をより効果的に投与するため、局所投与においては徐放性に優れたゼラチンベースのハイドロゲルを用いた。

【方法】

<嗅上皮傷害モデルマウスの作成>

ICRマウス(7か月齢)に抗甲状腺薬メチマゾールの腹腔内投与を行い、嗅上皮傷害モデルを作成した。

<DNAマイクロアレイの解析実験: 嗅上皮再生に関わる因子の経時的変化>

メチマゾール投与後12時間、1、3、7、14日目のマウスの嗅上皮採取を行い、全ての細胞のRNAを抽出した。マイクロアレイの手法を用いコンピューター解

析を行い、メチマゾール投与後、嗅上皮の遺伝子の発現が経時にどのように変化するかを調べた。

＜嗅上皮傷害マウスへの神経栄養因子経鼻投与実験＞

メチマゾール投与後 3 日目に、FGF2 または IGF1 を徐放用ハイドロゲルに含浸させ、ミダゾラム、塩酸メデトミジン、ブトルファノールの腹腔内投与による麻酔下に経鼻投与した。コントロール群には生食を用いた。局所投与は 1 回のみで、片側（右側）鼻腔に行った。

メチマゾール投与後 18 日目に嗅上皮を採取し、嗅球を通る冠状断で鼻腔の薄切標本を作製した。免疫染色を行い、生食点鼻群、FGF2 点鼻群、IGF1 点鼻群における嗅上皮の厚さ、成熟嗅神経細胞数、幼若な嗅神経細胞数の比較を行った。なお、測定は個体ごとに鼻腔の同側嗅上皮の任意の 3 点で行った。One-way ANOVA の後、Tukey-Kramer の多重比較検定を行った。

【結果】

＜DNA マイクロアレイの解析実験：嗅上皮再生に関わる因子の経時的変化＞

メチマゾール投与後 12 時間、1 日目では嗅上皮における FGF2 の発現レベルはコントロール群（メチマゾールを投与していない群）との比が 1 よりも大きかった。3 日目になると発現レベルは 1 を下回り、この間に発現レベルが低下すると考えられた。FGF のレセプターは測定したすべての期間でコントロールより高い発現状態が持続した。IGF1 の発現レベルはメチマゾール投与後 1 日目から 14 日目までコントロール群との比が 1 よりも大きかった。3 日目の前後にピークがあると考えられた。IGF のレセプターの発現レベルは 7、14 日目で 1 よりも大きかった。以上より FGF2 と IGF1 は嗅上皮傷害後 7 日目以内に発現レベルが高くなり、嗅上皮における必要性が高まると考えられた。

＜嗅上皮傷害マウスへの神経栄養因子経鼻投与実験＞

FGF2 点鼻群、IGF1 点鼻群は、いずれもコントロール群と比較して、成熟嗅神経細胞を表す OMP (olfactory marker protein) 陽性細胞が増加し、嗅上皮の厚みが増大した。幼若な嗅神経細胞を表す GAP43 (growth associated protein 43) 陽性細胞の数については有意差を認めなかった。

点鼻は片側鼻腔を行ったが、全ての群で両側鼻腔の成熟嗅神経細胞数、上皮の厚さに有意な差を認めなかった。FGF2 点鼻群、IGF1 点鼻群間では、いずれの項目においても有意差を認めなかった。

【考察】

FGF2 および IGF1 はマウスの傷害嗅上皮において発現が亢進することが示された。これを高齢マウスの傷害嗅上皮へ経鼻的に投与することにより、基底細胞の増殖を促進し、未分化な嗅神経細胞から成熟した嗅神経細胞への分化を促進させる可能性が示唆された。徐放用ハイドロゲルの使用により、持続的な効果が確認された。FGF2 および IGF1 は他領域の再生医療において既に臨床応用されている。傷害された嗅上皮の再生を促進するという意味で、嗅覚障害の治療薬の有力な候補と考えられた。経鼻投与は外来耳鼻咽喉科において痛みもなく容易に行えると考えられる。臨床応用のためにはさらなる調査研究がなされるべきである。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2822 号	氏名	福田 有里子
論文題目 Title of Dissertation	<p>Effect of intranasal administration of neurotrophic factors on regeneration of chemically degenerated olfactory epithelium in aging mice</p> <p>高齢マウス変性嗅上皮の再生に対する神経栄養因子の点鼻効果</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 中村 亮成</p> <p>副査 Vice-examiner 梅本 亮介</p> <p>副査 Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

哺乳類の嗅上皮においては、終生再生を繰り返し、嗅神経細胞のターンオーバーが絶えず起こることにより、神経再生が生涯持続する。しかしながら加齢あるいは種々の外因により、この再生能は低下する。現在のところ、実地臨床において、鼻副鼻腔疾患による嗅覚障害ではステロイドによる軽快が期待できるが、加齢をはじめ他の嗅覚障害に対しては病態が解明されておらず、有効な治療法も見つかっていない。

嗅上皮再生過程における嗅神経細胞の分化、増殖、成熟には様々な転写因子や神経栄養因子が関与している。そこで申請者らは、神経栄養因子を局所投与(点鼻)することによる嗅上皮再生促進効果を検討した。

神経栄養因子としては以下の2つを候補として挙げた。

神経栄養因子FGF (fibroblast growth factor) は他の神経系と同様、嗅上皮においてもその発生に重要な役割を果たしており、中でもFGF2は成熟したげっ歯類の嗅上皮に発現しており、in vitroにおいて幹細胞の増殖促進にかかわると言われている。IGF1 (insulin-like growth factor-1) はin vitroにおいて前駆細胞から嗅上皮細胞への分化を促進し、成熟マウスにおいても嗅上皮の再生と維持に重要であることが報告されている。また、これら神経栄養因子をより効果的に投与するため、局所投与においては徐放性に優れたゼラチンベースのハイドロゲルを用いた。

【方法】

〈嗅上皮傷害モデルマウスの作成〉

ICRマウス(7か月齢)に抗甲状腺薬メチマゾールの腹腔内投与を行い、嗅上皮傷害モデルを作成した。

〈DNAマイクロアレイの解析実験：嗅上皮再生に関わる因子の経時的変化〉

メチマゾール投与後12時間、1、3、7、14日のマウスの嗅上皮採取を行い、全ての細胞のRNAを抽出した。マイクロアレイの手法を用いコンピューター解析を行い、メチマゾール投与後、嗅上皮の遺伝子の発現が経時的にどのように変化するかを調べた。

〈嗅上皮傷害マウスへの神経栄養因子経鼻投与実験〉

メチマゾール投与後3日目に、FGF2 またはIGF1 を徐放用ハイドロゲルに含浸させ、ミダゾラム、塩酸メドミジン、プロトルファノールの腹腔内投与による麻酔下に経鼻投与した。コントロール群には生食を用いた。局所投与は1回のみで、片側(右側)鼻腔を行った。

メチマゾール投与後18日目に嗅上皮を採取し、嗅球を通る冠状断で鼻腔の薄切標本を作製した。免疫染色を行い、生食点鼻群、FGF2 点鼻群、IGF1 点鼻群における嗅上皮の厚さ、成熟嗅神経細胞数、幼若な嗅神経細胞数の比較を行った。なお、測定は個体ごとに鼻腔の同側嗅上皮の任意の3点で行った。One-way ANOVA の後、Tukey-Kramer の多重比較検定を行った。

【結果】

<DNAマイクロアレイの解析実験：嗅上皮再生に関わる因子の経時的変化>

メチマゾール投与後12時間、1日目では嗅上皮におけるFGF2の発現レベルはコントロール群（メチマゾールを投与していない群）との比が1よりも大きかった。3日目になると発現レベルは1を下回り、この間に発現レベルが低下すると考えられた。FGFのレセプターは測定したすべての期間でコントロールより高い発現状態が持続した。IGF1の発現レベルはメチマゾール投与後1日目から14日目までコントロール群との比が1よりも大きかった。3日目の前後にピークがあると考えられた。IGFのレセプターの発現レベルは7、14日目で1よりも大きかった。以上よりFGF2とIGF1は嗅上皮傷害後7日目以内に発現レベルが高くなり、嗅上皮における必要性が高まると考えられた。

<嗅上皮傷害マウスへの神経栄養因子経鼻投与実験>

FGF2点鼻群、IGF1点鼻群は、いずれもコントロール群と比較して、成熟嗅神経細胞を表すOMP (olfactory marker protein)陽性細胞が増加し、嗅上皮の厚みが増大した。幼若な嗅神経細胞を表すGAP43 (growth associated protein 43)陽性細胞の数については有意差を認めなかった。点鼻は片側鼻腔を行ったが、全ての群で両側鼻腔の成熟嗅神経細胞数、上皮の厚さに有意な差を認めなかった。FGF2点鼻群、IGF1点鼻群間では、いずれの項目においても有意差を認めなかった。

【考察】

FGF2およびIGF1はマウスの傷害嗅上皮において発現が亢進することが示された。これを高齢マウスの傷害嗅上皮へ経鼻的に投与することにより、基底細胞の増殖を促進し、未分化な嗅神経細胞から成熟した嗅神経細胞への分化を促進させる可能性が示唆された。徐放用ハイドロゲルの使用により、持続的な効果が確認された。FGF2およびIGF1は他領域の再生医療において既に臨床応用されている。傷害された嗅上皮の再生を促進するという意味で、嗅覚障害の治療薬の有力な候補と考えられた。経鼻投与は外来耳鼻咽喉科において痛みもなく容易に行えると考えられる。臨床応用のためにはさらなる調査研究がなされるべきである。

本研究は、哺乳類の嗅上皮において、その再生過程を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった神経栄養因子による嗅上皮再生促進効果について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。