

博士論文

カロリー制限が嗅神経上皮の恒常性維持に
与える影響についての研究

岩村均

カロリー制限が嗅神経上皮の恒常性維持に
与える影響についての研究

耳鼻咽喉科

指導教員:山嵜 達也 教授

岩村 均

目次

1.	要旨	4 ページ
2.	緒言	5 ページ
3.	研究	7 ページ
4.	結果	17 ページ
5.	考察	20 ページ
6.	結論	25 ページ
7.	謝辞	26 ページ
8.	参考文献	27 ページ
9.	図.表	32 ページ

要旨

マウス嗅神経上皮におけるカロリー制限(CR)の効果を細胞動態及び遺伝子発現の変化から評価した。8週齢の雄性 C57BL/6J マウスに対し、対照食又は 36%カロリー制限食で非障害状態及び嗅粘膜毒性物質メチマゾールによる障害状態での嗅神経上皮細胞の再生過程を比較した。3ヵ月時点で嗅覚受容体ニューロン及び増殖性基底細胞数は CR 食群で有意に少なく、障害後の増殖性基底細胞数も少なかった。障害後 2ヵ月の嗅神経上皮の再生は CR 食群で回復が悪かった。DNA マイクロアレイ及び qPCR の遺伝子発現解析の結果、IL-6, Cxcl1 の発現が CR 食群で上昇した。CR は嗅神経上皮再生に不利益と考えられた。

緒言

ヒトでは嗅覚は五感の中でも最も軽視されがちな感覚であるが、すべての動物にとって重要な感覚であり、ニオイは摂食行動、探索行動、性行動、家族内行動や天敵といった他個体の認識を行う上で、極めて重要な意味を持っている。

哺乳類の嗅覚系の末梢化学受容器である嗅粘膜は鼻腔の後上部に位置する。図1に示すように嗅粘膜は嗅神経上皮と粘膜固有層に分けられ、嗅神経上皮は支持細胞、嗅神経細胞、基底細胞の層に分けられる。嗅神経上皮最表層には長円形の核をもった支持細胞の層があり、その下方には嗅神経上皮の大部分を占める、様々な分化段階にある嗅神経細胞の層がある。双極性ニューロンである嗅神経細胞は嗅覚の化学受容細胞として機能しており、その樹状突起の先端は嗅粘膜上に突出して嗅小胞を形成し、ここから嗅線毛が放射状に伸びている。この嗅線毛上に匂い受容体が発現しており、嗅素の受容を行う。一方中枢側へは軸索が嗅球に投射し、そこでシナプスを形成して嗅覚中枢に信号を伝達する。嗅上皮最深層には基底細胞層があり、基底細胞層の細胞は基底膜に密着し扁平な形をした水平基底細胞とそのすぐ表層にあり球形をした球状基底細胞に分類される。嗅神経上皮の下層である粘膜固有層には嗅粘膜を覆う粘液を産生するBowman腺や血管、嗅神経の神経束が存在する。

嗅神経上皮は中枢神経系の一部でありながら生後も神経新生がおこるという特異な性質を有しており、嗅覚受容体ニューロン(ORN)が恒常的に細胞死と新生を繰り返す。生理的状态においても絶えず神経細胞のターンオーバーが起こっているが、細菌・ウイルス感染や薬剤投与による障害時にはこの機能が賦活化されて上皮が再生される[1-6]。神経再生は、嗅神経上皮の基底層

にある球状基底細胞が分裂して、新生細胞が産生されることにより開始される。新生細胞は嗅神経上皮の表層に向かって遊走しながら分化し、増殖の過程では、細胞が嗅神経上皮の表層に向かって移動し始め、未成熟 ORN に分化し最終的には嗅覚マーカータンパク質(OMP)を発現する成熟 ORN となる[3, 5, 7, 8]。新しく生成された嗅神経細胞は軸索を嗅球に向けて伸長し、シナプスを形成する[5, 9-11]。このような ORN の再生能力は、嗅覚を維持するのに必須と考えられている。

嗅神経上皮の恒常性維持機構は、局所的及び全身的要因によって調節を受ける。最近の研究では、生存している嗅神経上皮細胞や死滅した嗅神経上皮細胞に由来するシグナル分子が、嗅神経上皮再生の最も重要な部分を構成する基底細胞の増殖にフィードバックし、局所的に嗅神経上皮の恒常性を調節していることが明らかになった[12-16]。さらに神経前駆細胞の分化及び生存は、成長因子と神経栄養因子によって誘導される[14, 17-19]。しかし、内分泌、代謝状態の影響については、基底細胞増殖と甲状腺ホルモン[20-22]やエストロゲン[23, 24]との関連性以外はあまり知られていない。

カロリー制限(CR)は、必要不可欠な栄養素の欠乏を伴わずにカロリー摂取量を自由摂取の 60～80%に減少させるための系統的な介入法である。CR は、遺伝子発現の変化、酸化ストレスの減少、代謝の減少、DNA 修復能力の上昇といった様々な影響を及ぼす[25-30]。また、寿命を延長し、加齢に関連する病理学的変化の発生を遅らせる[29, 31-34]。細胞動態については、細胞増殖速度の低下が特徴であり、ケラチノサイト、肝細胞、乳腺上皮細胞、脾臓 T 細胞、前立腺細胞などの多くの種類の細胞の代謝回転速度は、CR 開始後数週間で 30～50%減少し、その効果は CR 介入期間全体で持続する[35-37]。臓器別では腸管で CR が自己複製能を増強し腸幹細胞数が

増加するように正の効果を認めるものに対し[38]、精子のように CR が生殖能低下をもたらすように負の効果を認めるものがある[39]。一方、神経系での CR の効果としては、海馬の歯状回や脳室下帯(SVZ)において、ニューロン新生の賦活化を起こすことが知られており、神経組織では CR が他の組織と異なる働きを持つ可能性が示唆されている[40-42]。

嗅神経上皮での CR の効果としては、臭化メチルガスによる損傷後の嗅上皮再生及び嗅神経伝導路の再生を阻害し嗅上皮から呼吸上皮への置換を増大させることが知られている[4]。また、嗅球の後方部分は、CR によって障害後の嗅神経の再投射が低下する[11]。しかし、CR が非障害時の嗅神経上皮の細胞動態に及ぼす効果や粘膜損傷後の再生様式に与える影響及びその背景にある分子メカニズムについては不明な点が多い。

そこで本研究では、CR のマウス嗅神経上皮細胞動態に対する効果を組織学的及び遺伝子発現の観点から評価した。非障害状態及び嗅粘膜毒性物質であるメチマゾールによる嗅神経上皮障害後の嗅神経上皮の細胞動態や組織学的回復について、対照食または CR 食を摂取したマウスで比較した。また、嗅神経上皮組織の DNA マイクロアレイ及び定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)解析により、対照食群と CR 食群の嗅神経上皮における mRNA 発現プロファイルを比較した。

方法

実験動物

埼玉実験動物(日本・埼玉)から入手した 8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを使用した。受領後、マウスを 12 時間の明/暗サイクル下、温度制御された環境で、硬材の床敷を敷き詰めたポリカーボネ

オート製ケージに個別に収容した。マウスを無作為に対照食群と CR 食群に分けた。対照食群では、正常カロリー食(BioServ、ニュージャージー州フレンチタウン)用 F053 Dustless 12 Precision Pellets を 104kcal /週(28 ペレット/週)で給餌した。各マウスの給餌スケジュールは、月曜日に 8 ペレット、水曜日に 8 ペレット、金曜日に 12 ペレットとした。CR 食群では、カロリー制限食用の F05314 Dustless Precision Pellet(BioServ)を 67 kcal/週(18 ペレット/週)でマウスに給餌し、対照食群と比較して 36%カロリー制限となるようにした[43]。各マウスの給餌スケジュールは、月曜日に 5 ペレット、水曜日に 5 ペレット、金曜日に 8 ペレットとした。F05314 ペレットはタンパク質、ビタミン、ミネラルが豊富に含まれ、栄養不良を避けるために、各マウスが 1 週間に摂取するこれらの成分の量は対照食群と CR 食群で同等とした[44]。このような CR の給餌プロトコルはマウスにおいて、寿命を延ばし、癌の発生率を低減させることが判明している[26, 44]。CR マウスは毎回ペレットを完食した。全てのマウスはボトル入りの水道水を自由に摂取した。マウスの体重は毎週測定した。いずれの動物も屠殺の時点で明らかな全身疾患を認めなかった。すべての手順は東京大学動物実験委員会による承認を受け(実験承認番号医-P14-044)、米国国立衛生研究所の実験動物の管理と使用に関する指針(National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)に則り施行され、実験動物の苦痛を最小限にするよう努めた。

実験プロトコル

8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを使用して下記 4 つの実験群で検討した。

- ① 正常な嗅神経上皮の形態及び細胞動態に対する CR の短期的効果を評価するために、8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに対照ペレット(n=7)又は CR ペレット(n=7)のいずれかを 1 カ

月間給餌した後、屠殺して組織学的分析を行った。先行研究から1ヶ月のCRが長期のCRとほぼ同程度の全身の代謝変化が生じる[26, 45-48]こと、嗅神経上皮のターンオーバーサイクルが1ヶ月のため1ヶ月の期間を採用した。(図2a)

- ② 中長期的効果を評価するために、マウスに对照ペレット(n=7)及びCRペレット(n=7)のいずれかを3ヶ月間給餌し、その後、同様に屠殺して組織学的分析を行った。この実験プロトコルを図2bに示す。

嗅神経上皮の障害惹起には嗅粘膜毒性物質である抗甲状腺薬メチマゾール(methimazole)を用い、障害後の嗅神経上皮の組織学的回復過程におけるCRの影響による変化を検討した。

メチマゾールはチオウレイレン系薬剤の一つであり、ヒトでの副作用として嗅覚低下や嗅覚脱失が報告されている[49]。動物実験ではメチマゾールの腹腔内投与により嗅神経上皮障害が起きることが知られている[50-52]。メチマゾールの嗅神経上皮毒性は、フラビン含有モノオキシゲナーゼ(flavin-containing monooxygenase)によってメチマゾールが代謝された際に生成されるスルフィン酸やスルフェン酸などの反応性の中間代謝産物によると考えられている[50]。他に実験的に嗅神経上皮を障害させる方法として、嗅球摘出[1, 53, 54]、嗅神経切除[6, 55, 56]、硫酸亜鉛の鼻腔内灌流[2, 57, 58]、臭化メチルガスの吸入[4, 59]などの方法が知られているが、本研究では、(1)障害が用量依存性で再現性があり可逆性である、(2)十分量投与することで嗅神経上皮全体に均一な障害を起こすことができる、(3)投与方法が容易であり安定して行える、の3点の理由より、メチマゾールによる嗅神経上皮障害を選択した。

- ③ 嗅神経上皮のメチマゾールによる障害後の細胞増殖制御に対するCRの影響を評価する

ため、対照ペレット(n=5)又は CR ペレット(n=5)のいずれかで 1 ヶ月間マウスを飼育し、その後、リン酸緩衝食塩水(PBS)、pH7.4 に溶解したメチマゾール(80 mg/kg; Sigma-Aldrich Japan、日本・東京)をマウスに腹腔内注射した。過去の研究によれば、同用量は非致死量であり、嗅神経上皮のほぼ全ての領域で ORN の変性を誘発することができる[5]。また、嗅神経上皮細胞の再生の開始時期で、基底細胞増殖の制御が 1 週間でピークに達するため [5]、1 週間の時点で評価とした。

メチマゾール投与から 1 週間後にマウスを固定した。この実験プロトコルを図 2c に示した。

- ④ 嗅神経上皮の中長期的回復に対する CR の効果を評価するために、マウスを対照ペレット(n=7)又は CR ペレット(n=7)で 1 ヶ月間維持し、その後、上記のとおりメチマゾールを腹腔内注射した。メチマゾール投与後、対照食群及び CR 食群のマウスにそれぞれ対照ペレットと CR ペレットを引き続き給餌し、メチマゾール投与後 2 ヶ月でマウスを固定した。この実験プロトコルを図 2d に示した。

組織固定および標本作製

ケタミン(100 mg/kg)とキシラジン(9 mg/kg)を筋肉内注射してマウスを深麻酔し、次いで、10%中性緩衝ホルマリン(Muto Kagaku、東京・日本)を用いた心臓灌流によって固定し、断頭屠殺した。その後、26 ゲージ針を装着した 1 ml のシリンジを用いて、同じ固定液で鼻腔を局所的に灌注した。この手順では、嗅神経上皮への機械的損傷を最小限に抑えるために、針の先端を後鼻孔から 3 mm 以内に挿入し、鼻腔を穏やかに洗浄した。下顎を除去し頭部の皮を剥ぎ、同じ固定液に室温で 1 週間浸漬してさらに固定し、その後 10%エチレンジアミン四酢酸(EDTA、pH7.0)中に室温で 2 週間浸漬して脱灰した。脱灰後、標本を洗浄しエタノール系列で脱水しパラフィンに包埋した。嗅

球の前端レベルの連続冠状切片(厚さ 4 μ m)を MAS コートスライド(松浪硝子、日本・大阪)上にマウントした。その後、これらの切片にヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色と免疫組織染色を観察した。

免疫組織染色

一次抗体

抗 OMP 抗体染色

OMP 抗体(544-10001、Wako chemical USA、バージニア州リッチモンド)は、マウス及びラット嗅球のウエスタンブロット解析で OMP に相当する分子量 19kD の単一バンドを認識するヤギポリクローナル抗体である[60]。同抗体は、げっ歯類の嗅神経上皮の成熟した嗅神経細胞を免疫標識する[3, 8, 61]。

抗 Ki67 抗体染色

マウスモノクローナル抗 Ki67 抗体(BD Biosciences(カリフォルニア州サンノゼ)から購入;クローン B56、#550609)は、ヒト Ki67 タンパク質の Ki67 モチーフと呼ばれる高度に保存された 22 アミノ酸配列を用いて作製された。この抗体は、ヒト細胞のウエスタンブロット解析で 345 kD と 395 kD の 2 つのバンドを検出する。これらのバンドは選択的スプライシングを受ける Ki67 のアイソフォームの分子量と一致する[62]。この抗体は、細胞周期のすべての活動段階で発現する細胞増殖関連核抗原を認識し、免疫組織化学的解析では、凍結組織切片とパラフィン包埋組織切片のいずれにおいても B56 は MIB 1 と同じ染色パターンを示すことが実証されている。

抗 Caspase3 抗体染色

ウサギポリクローナル抗切断型 Caspase 3 抗体(Cell Signaling Technology より購入)は、ヒト Caspase 3 の Asp175 に隣接する合成 KLH 結合ペプチド(CRGTELDCGIETD)に対して作製されたものである。Caspase 3 は、哺乳動物組織のアポトーシスの明確に定義されたマーカーである [63] 。この抗体は 17~19 kD の断片を認識するが、ヒト及びマウスの細胞株ホモジネートのウエスタンブロットでは完全長の Caspase 3 を認識しない(製造元のデータシートによる)。

抗 IL-6R 抗体染色

ウサギポリクローナル抗インターロイキン 6 受容体 α (IL-6R α) 抗体(GeneTex から購入)は、マウス IL-6R α の 351 から 460 のアミノ酸残基を含む領域に相当する免疫原に対して作製された。この抗体は、マウス脳組織ホモジネートのウエスタンブロットで 50 kD のバンドを認識する(製造元のデータシートによる)。

ウサギポリクローナル抗 IL-6R β (gp130 としても知られる)抗体(Bioss から購入)は、マウス IL-6R β 由来する KLH 結合合成ペプチドに対して作製された。

免疫組織化学

OMP、Caspase 3、IL-6 α 、IL-6 β の免疫染色では、脱パラフィンを行った切片を 10 mM クエン酸緩衝液(pH6.0、Dako Cytomation Japan、日本・京都)に浸漬し、抗原賦活化を目的として 20 分間、121°C でオートクレーブした。Ki67 の免疫染色では、脱パラフィンを行った切片を抗原賦活化溶液(S1700、Dako Cytomation Japan、日本・京都)に浸漬し、同様にオートクレーブした。

抗原賦活化後、非特異的な抗体結合を減らすため、4%ウシ胎児血清(Invitrogen、日本・東京)、0.1% Triton-X 100、0.1%アジ化ナトリウムを含む PBS(pH7.4)ブロッキング液と共に切片を室温で 1 時間インキュベートしてブロッキングを行い、次いで、ヤギ抗 OMP 抗体(同ブロッキング溶液で 1:

5000 希釈)、抗 Ki67 抗体(同ブロッキング溶液で 1:500 希釈)、抗切断型 Caspase 3 抗体(同ブロッキング溶液で 1:400 希釈)、抗 IL-6R(同ブロッキング溶液で 1:400 希釈)、抗 gp130(同ブロッキング溶液 1:400 希釈)のいずれかの抗体溶液と共に 4°Cで一晩インキュベートした。PBS(pH7.4)で数回洗浄後、用いた各一次抗体に対応するように、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合抗ヤギ IgG 又は抗ウサギ IgG 二次抗体(Simplestain MAX-PO, (G)and (R), ready-to-use、ニチレイ、日本・東京)と共に切片を室温で 30 分間インキュベートした。PBS(pH 7.4)でさらに洗浄後、ジアミノベンジジン(DAB)(Simplestain DAB, ready-to-use、ニチレイ、日本・東京)を用いて免疫反応を行った。蒸留水で洗浄後、切片をヘマトキシリンで染色し、次いで脱水してスライドにマウントした。一次抗体を反応から省いたものを陰性対照とした。一次抗体を省いた場合明らかな染色は認められなかった。

嗅神経上皮の定量解析

上記の免疫組織染色した切片を、明視野照明下で顕微鏡(Nikon E800、Nikon、日本・東京)を用いて観察した。

Ki67、Caspase 3、OMP の各陽性細胞が標識された嗅神経上皮細胞を定量的に分析した。標本間の変動を制御するために、前後軸に沿って以下の 3 領域の鼻中隔嗅神経上皮で分析を行った(図 3)。

レベル 1: 第 2 篩骨甲介がその前端に現れる切片

レベル 2: 嗅球の前端を通る切片

レベル 3: 前後軸で嗅球の中央を通る切片

各実験群の OMP 陽性細胞とメチマゾール投与から 1 週間時点の Ki67 陽性細胞を計数するた

めに、レベル1、レベル2、レベル3のそれぞれの領域で、鼻中隔嗅神経上皮の1か所、3か所(背側、中央、腹側)、2か所(腹側及び背側)の異なる顕微鏡視野を40倍の対物レンズを装着したデジタル顕微鏡カメラ(AxioCam、Carl Zeiss)を用いて無作為に撮像した(図2)。各視野の幅は350 μm 、鼻中隔嗅神経上皮の上皮長は、レベル1、2、3の各領域切片それぞれで約0.5、2、1 mmであったため、この手順で鼻中隔嗅神経上皮の全長の約半分を分析したことになる。非障害状態で1ヵ月及び3ヵ月時点のKi67陽性及びCaspase 3陽性細胞の評価は各陽性細胞数が少ないこともあり、両側鼻中隔嗅神経上皮の全長に沿って細胞を計数した。計数の重複を避けるために、各レベルで少なくとも50 μm 離れた2つの切片から、レベル1、2、3の各データを取得した。画像解析ソフトウェア(Microanalyzer、Poladigital Japan)を用いて、各顕微鏡画像上で各抗原が標識され嗅神経上皮細胞の数を手動で計数した。計測者には計測している個体が特定できない形(blind)で行った。

各レベルで計数した細胞数を切片全体で平均し、嗅神経上皮長1mmあたりの各群の標本の平均±標準誤差として表した。

画像提示

明視野照明下の顕微鏡(E800、Nikon、日本・東京)を用いて染色切片を検鏡し、デジタル顕微鏡カメラ(AxioCam、Carl Zeiss、日本・東京)を用いて撮影した。Adobe Photoshop(日本・東京)で画像をデジタル処理したが、明るさ、コントラスト、カラーバランスのみを調整した。

DNA マイクロアレイ解析

8週齢の雄性C57BL/6Jマウスを使用した。対照又はCR条件下のいずれかで3ヵ月間維持したマウスの嗅神経上皮を対象に、遺伝子発現プロファイルを解析した。各条件下の2匹の動物か

ら左右の嗅粘膜を採取し、合計 4 つのサンプルを取得した後、NucleoSpin RNA キット(Takara Biotechnology、日本・滋賀)を用いて製造元の指示に従って全 RNA を単離した。Agilent SurePrint G3 Mouse Gene Expression 8x60K Array platform(Agilent、米国カリフォルニア州サンタクララ)を用いて、DNA マイクロアレイ解析を行った。GENESPRING GX 7.1 ソフトウェア(Agilent Technologies、米国カリフォルニア州サンタクララ)を用いてデータを正規化した。ベースラインを超えるシグナル閾値を全試料の中央値に対して適用し、75 パーセンタイルシフトに対して正規化した。DAVID v6.7(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)を用いて機能アノテーション解析を実施し、発現の変化を評価した。

定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)

NucleoSpin RNA キット(Takara Biotechnology)を用いて、8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを、対照又は CR 条件下のいずれかで 3 ヶ月間維持した嗅神経上皮の全 RNA を単離し、製造元の説明書に従って Prime Script RT Master mix(Takara Biotechnology)を用いて一本鎖 cDNA へ逆転写した。SYBR® Premix Ex Taq™ II(Takara Biotechnology)と ABI prism 7500 Sequence Detector system(Thermo Fisher Scientific K.K.、日本・神奈川)を用いて、qPCR(SYBR Green Assay、Applied Biosystems、米国カリフォルニア州フォスターシティ)を行った。

インターロイキン 6(IL-6)のフォワードプライマーとして 5'-CAACGATGATGCACTTG CAG-3'、リバープライマーとして 5'-CTCCAGGTAGCTATGGTACTCCAG-3'、ケモカイン(C-X-C モチーフ)リガンド 1(Cxcl1)のフォワードプライマーとして 5'-TGCACCCAAACCGAAGTC-3'、リバープライマーとして 5'-GTCAGAAGCCAGCGTTCACC-3'、ケモカイン(C-C モチーフ)リガンド 2(Ccl2)のフォワードプライマーとして 5'-AGCAGCAGGTGTCCCAAAGA-3'、リバープライマーとして 5'-

GTGCTGAAGACCTTAGGGCAGA-3'、

グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ(Gapdh;ハウスキーピング)のフォワードプライマーとして 5'-TGTGTCCGTCGTGGTCTGA-3'、リバープライマーとして

5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'を使用した。比較 Ct($2^{-\Delta\Delta CT}$)法(群あたり n=4)を利用して、標的遺伝子の Ct 値と GAPDH の Ct 値の差(ΔCt)として遺伝子発現レベルを算出した。

統計解析

SPSS 統計ソフトウェア(SPSS、米国イリノイ州シカゴ)を用いて、データを統計的に評価した。対照食群(n=5)と CR 食群(n=5)との Ki67、OMP 陽性細胞数の差異を対応のない t 検定(n=5)を用いて比較した。各結果を平均±標準誤差として記載した。p<0.05 値を統計的に有意とみなした。

結果

体重

実験開始時の対照食群及び CR 食群のマウスの平均体重は、それぞれ 21.6 ± 0.3 g 及び 21.5 ± 0.4 g で有意差はなかった。非障害状態では、カロリー介入を始めてから 1 ヶ月時点で、対照食群及び CR 食群のマウスの平均体重は、それぞれ 22.7 ± 0.7 g 及び 19.7 ± 0.3 g で有意差を認めた(図 4a)。3 ヶ月時点では、対照食群及び CR 食群のマウスの平均体重は、それぞれ 39.6 ± 1.0 g 及び 29.6 ± 0.4 g で有意差を認めた($p < 0.05$) (図 5a)。

生理的状态での CR の影響(嗅神経上皮の形態と細胞動態の比較)

まず、非障害条件下の嗅神経上皮の形態と細胞動態に対する短期(1 ヶ月)及び中長期(3 ヶ月)CR の効果を評価した。1 ヶ月時点で、1mm あたりの鼻中隔嗅神経上皮の OMP 陽性細胞数を ORN 数として比較した結果、対照食群と CR 食群の各レベルの ORN 数に有意差は認めなかった(図 4 b b' b'' b''' b'''' b''''' c c' c'' c''' c'''' c''''' d d' d'')。1mm あたりの Ki67 陽性細胞を増殖性基底細胞数として比較した結果、CR 食群と対照食群で有意差は認めなかった(図 4 e e' e'' e''' e'''' e''''' f f' f'')。一方 3 ヶ月時点で、1mm あたりの ORN 数は CR 食群のレベル1領域で有意に少なかったが(図 5 b b' c c' d)、レベル 2(図 5 b'' b''' c'' c''' d')及びレベル 3(図 5 b'''' b''''' c'''' c'''''' d'')では群間に有意差はなかった。1mm あたりの増殖性基底細胞数は、レベル 1(図 5 e e' f)で対照食群と CR 食群で有意差がなく、レベル 2(図 5 e'' e''' f')やレベル 3(図 5 e'''' e''''' f'')の CR 食群で対照群に比べ有意に減少していた。

1mmあたりの Caspase 3 陽性のアポトーシス細胞数は非常に少なかった。嗅神経上皮全長に沿って、最大でも数個の陽性細胞しか認めなかった。1ヵ月又は3ヵ月のいずれの時点でも、対照食群と CR 食群で有意な差はなかった。

嗅神経上皮障害後の再構築における CR の影響

次に、メチマゾール投与による障害状態で嗅神経上皮細胞増殖の制御に対する障害後超短期(1週間)CR の効果を調べた。

図 6 に示すとおり、メチマゾール投与後 7 日目時点で、嗅神経上皮全体が化学的に損傷され、OMP 陽性の ORN を粘膜に認めなかった(図 6a, a')。高倍率で観察した結果、未分化の 3~5 細胞層の上皮が基底膜を覆っていた(図 6b ,c)。対照食群と CR 食群のいずれにおいても、1mm あたりの Ki67 陽性細胞数が非障害の対照食群に比べて著しく増加したが(図 4f,6d)、この増殖度はレベル 1 と 2 の CR 食群では対照食群に比べて少なかった(図 6d、d')。レベル 3 では、対照食群と CR 食群で統計的な有意差はなかった(図 6d'')。

メチマゾールによる障害後嗅神経上皮の組織学的再生に対する CR の効果をさらに調べた。図 7 に示すとおり、障害後 2 ヶ月時点の対照マウスの 1mm あたりの ORN 数は、非障害の同週齢(3 ヶ月齢)マウスよりも少なかった(図 4d 及び図 6d)。レベル 1 及びレベル 2 では、対照食群のマウスと比較して CR 食群のマウスでは ORN 数が有意に減少した(図 7a a' a'' a''' b b' b'' b''' c c')。

DNA マイクロアレイによる発現差の比較

CR による嗅神経上皮の変化の背景にある分子メカニズムを調べるために、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを比較した。対照食群と比較して CR 食群では、181 遺伝子(全発現遺伝子の 0.31%)及び 72 遺伝子(全発現遺伝子の 0.12%)の発現がそれぞれ誘導(2 倍超)又は抑制(1/2 倍未満)されたことが明らかになった。DAVID の一連のオンラインツールを用いて、発現に差のあった遺伝子を遺伝子オントロジー(GO)解析の生物学的プロセスカテゴリーに割り当てた。表 1 に上位 10 の Gene Ontology タームを示す。障害への反応、血液凝固、炎症反応、創傷治癒などの炎症性変化が含まれることが明らかになった。これらの遺伝子名を表 2 に列挙する。これらの結果から、嗅神経上皮において CR で炎症が誘発されたと考えられた。

炎症関連遺伝子の qPCR 解析

DNA マイクロアレイ解析の結果を確認するために、嗅神経上皮において炎症性変化に関与する遺伝子で発現に 2 倍以上または 1/2 倍以下の発現差があった遺伝子を qPCR で測定した。qPCR 解析の結果でも、対照食群と比較して CR 食群で IL-6 及び Cxcl1 が有意に増加することが明らかになった(図 8)。

メチマゾールが阻害するフラビン含有モノオキシゲナーゼ(Fmo1、Fmo2)、また他臓器で CR での発現の上昇が報告[64, 65]されている P450(CYP2A5)の発現には差がなかった(図 9)。その他の遺伝子の発現の変化を表 3 に示した。

考察

嗅覚はすべての動物にとって重要な感覚であり、ニオイは摂食行動、探索行動、性行動、家族内行動などきわめて重要な意味を持っている。また、嗅神経細胞は生涯にわたり再生を繰り返す特異な性質をもっている。

本研究では、非障害及び障害条件下における CR の嗅神経上皮の形態及び細胞動態及び嗅神経上皮での遺伝子発現への影響を調べた。

生理的状态での CR の影響

非障害条件下では、CR の 1 ヶ月時点での ORN 数及び増殖性基底細胞数は、対照食群と CR 食群で有意差がなかった。しかし、CR3 ヶ月時点では、対照食群よりも CR 食群で ORN 数及び増殖性基底細胞数が有意に減少した。これらの結果は、非障害条件下では、CR において嗅神経上皮の構造や細胞動態への変化発現に時間がかかることを示唆した。非障害条件下では、ORN の寿命は 1 ヶ月以上と推定され[66, 67]、CR は ORN の細胞死を誘導しないため(Caspase 3 細胞は増加しない)、短期 CR 下では解剖学的構造が安定していると考えられた。一方、3 ヶ月経過すると、ORN が寿命で脱落するが、CR 食群では基底細胞の増殖による新たな ORN の供給が少ないために、3 ヶ月時点の ORN 数の維持が十分ではなかったと考えられた。

しかし、細胞動態に対する CR の効果は嗅神経上皮全体で均一ではなかった。前後軸に沿ってみた場合、効果は後部よりも前部で影響が高かった。

嗅神経上皮障害後の再構築における CR の影響

次に、メチマゾールによる化学的障害後の嗅神経上皮の細胞構造の回復に CR がどのような影響を及ぼすかを検証した。メチマゾール投与後 1 週間時点で増殖性基底細胞数が CR 食群で有意に減少し、増殖能が低下したことが示唆された。

さらに、メチマゾールによる障害後の嗅神経上皮の組織学的再生に対する CR の効果を調べた。障害後 2 ヶ月時点における対照食群の ORN 数は、非障害の同週齢と変わらず、完全に回復していた。メチマゾール投与 2 ヶ月後の ORN 数と嗅神経上皮の厚みは対照食群よりも CR 食群で有意に少なかった。これらのことから、嗅神経上皮の再生は、CR により悪化すると考えられた。

今回の結果は、臭化メチルガスの吸入によるラットの嗅神経上皮障害モデルで、CR により嗅神経上皮再生が悪化することを示した Schwob ら[4, 11] の研究結果と合致する。Schwob らの研究によると、CR 条件下では、初期の粘膜病変の重症度が増すことにより、再生中に嗅神経上皮の呼吸上皮化が増加した[4]。また、CR 食群では再生過程終了時に、嗅球の後部は対照食群と比較して嗅神経の再投射が低下した[11]。種の違い(ラットとマウス)や嗅神経上皮を障害する方法の違い(疎水性ガスの吸入と親水性分子の腹腔内投与)にも関わらず、今回の研究では先行研究と同様、CR 下で障害後の嗅上皮の再生が悪化するという結果が得られた。Schwob らの報告では、対照食群よりも CR 食群の方が嗅神経上皮の化学的障害の程度は高度であり、これが CR 群において嗅神経上皮再生が不完全となる原因としている。しかし、今回の結果では、メチマゾール投与 7 日後時点で、嗅神経上皮全体が化学的に損傷を受けており、形態学的には障害の程度について明らかな群間差はみられなかった。

CR 下における嗅神経上皮再生の低下の原因として以下の2つの可能性がある。1 つ目は、CR

下ではメチマゾールによって分裂可能な基底細胞の脱落が増加したことや細胞毒性によって分裂能が失われた細胞が増加したことで障害がより高度になった可能性があると考ええる。対照食群とCR食群において嗅神経上皮の初期変性について形態学的には明らかな違いはなかったが、基底細胞の増殖数はCR食群で少なかったことから、基底細胞の細胞障害がCR食群でより高度であり、そのため新生神経細胞の供給が不十分となり、嗅神経上皮の再生が不完全になった可能性である。2つ目は、基底細胞が嗅神経上皮の障害に応答して増殖を制御するための臨界期があり、この時期にCRで基底細胞増殖が抑制された結果、新たな神経細胞の供給が不十分になるという可能性があると考えた[5]。

CRによりシトクロムP450やフラビン含有モノオキシゲナーゼの発現増加が誘導され[64][65]、化合物の代謝時により多くの細胞毒性中間体が生成することが知られているが[68, 69]、今回のDNAマイクロアレイの結果ではP450(CYP2A5)及びFMO(Fmo1, Fmo2)の発現は変化しなかったことから、CRによる薬物代謝酵素の発現の変化の影響は少ないと考えられた。

細胞動態に対するCRの効果は嗅神経上皮全体にわたって均一ではなかった。前後軸に沿った3つの切片のうち、前部切片におけるORN数は、非障害及び再生時の両方において、対照食群よりもCR食群の方が一貫して少なかった。一方、対照食群と比較したCR食群における増殖性基底細胞数の変化は、実験条件に応じて容易に変動した。このメカニズムは不明であるが、嗅神経上皮のCRに対する感受性が前後軸によって違う可能性が考えられた。

メチマゾールによる障害実験から非障害状態だけでなく障害状態でも基底細胞の増殖能の低下がCRにより誘導されることが示され、これは、肝臓、皮膚、腸管などの他の多くの器官でCR下において細胞増殖が抑制されるという過去の研究[35, 37, 38, 70]と一致した。これは、CRにより末

稍嗅覚系では CR が有益性のないことを示唆する。これは、拒食症患者で嗅覚が低下する知見と一致する[44, 71-73]。

DNA マイクロアレイ及び qPCR の遺伝子発現解析

CR による嗅上皮再生能低下の背景因子を探るため、対照条件下と CR 条件下で嗅神経上皮での遺伝子発現プロファイルを比較した。DNA マイクロアレイや qPCR 解析の結果、炎症性サイトカインである IL-6 や Cxcl1 が CR 食群で上昇していた。一般的に、CR は全身性の炎症過程を抑制し血清 IL-6 を減少させることが知られており[74, 75]、今回の結果とは一致しない。DNA マイクロアレイ解析と qPCR の結果では IL-6 が CR で有意に増加しており、これは、嗅神経上皮が CR に対して他の臓器と異なる生物学的反応を示すことを示唆した。詳細なメカニズムは不明であるが免疫機能及び内分泌の変化により生じた可能性があると考ええる。免疫組織化学的分析では、嗅覚粘膜において IL-6R α 及び β が存在することが確認されており、上昇した IL-6 が実際に嗅神経上皮に作用することが予想される。

IL-6 は幹細胞の老化を誘導し、細胞増殖を抑制する[36, 76-79]。IL-6 の上昇は、CR に関連した細胞増殖の低下に加えて、非障害条件下及び障害後の基底細胞の増殖抑制にも関連する可能性がある。他の炎症誘発性サイトカインの一種である TNF α の誘導により、基底細胞の増殖抑制が誘導され、嗅神経上皮の変性が誘導されるという報告があり[80, 81]、それと同様に、IL-6 が嗅神経上皮で基底細胞の増殖を抑制する役割を持つことが予想された。

一方、免疫組織化学では、IL-6R は嗅神経上皮細胞に局在しており、嗅球摘出後 3~4 日で一過性に上昇し、嗅球摘出後に一過性に ORN 軸索においても発現すると報告されている[82]。こ

れは、IL-6 が嗅神経上皮におけるニューロン再生に関与していることを示唆している。今回の結果のみからは、CR 食群の嗅神経上皮における IL-6 の上昇が、障害に応答した二次的な変化であるという可能性を排除することはできない。このため、IL-6 への介入によるさらなる評価が必要である。

本研究にはいくつか限界がある。1 つ目は、行動実験によりマウス嗅覚の定量化を行わなかったことである。2 つ目は、嗅覚中枢系の細胞変化を評価しなかったことである。脳室下帯で新たなニューロンが生じ、未熟な神経細胞が嗅球に移動し、嗅球で細胞が顆粒細胞に分化し、嗅覚シグナル伝達に関与するようになる[83-86]。CR によってその神経細胞の動態が影響を受ける可能性がある。今後の考察として、これらの評価を行う必要があると考えられた。

結論

嗅神経上皮の恒常性維持における CR の効果を調べた本研究において、CR は長期的に基底細胞の増殖や ORN 数を低下させ、化学的障害後の上皮再生を不完全にさせることが判明した。CR 時に炎症性サイトカイン発現上昇が嗅粘膜で誘導され、これが ORN 数の低下と基底細胞の増殖抑制に影響すると考えられた。一般的に他の多くの器官で CR は継続的な細胞分裂の生じない組織の維持に有益と考えられている。しかし今回の結果から、興味深いことに嗅神経上皮などの機能維持のために継続的な細胞増殖が必要な臓器において CR が有害に働く可能性があることを示唆した。

謝辞

本研究を終えるに臨み、御校閲、御指導を賜りました指導教官である山唄達也・東京大学耳鼻咽喉科学教室教授に謹んで深謝いたします。また本研究において具体的に研究の計画、手順を御指導いただきました近藤健二先生に深謝いたします。また、当研究室の母里義郎さん、倉澤由香里さん、宮澤晃一さん、露崎敦子さん、田中治子さん、臼倉絵美さんにも御助力いただき、心から感謝申し上げます。

参考文献

1. Carr, V.M. and A.I. Farbman, *Ablation of the olfactory bulb up-regulates the rate of neurogenesis and induces precocious cell death in olfactory epithelium*. Exp Neurol, 1992. **115**(1): p. 55-9.
2. Ducray, A., et al., *Recovery following peripheral destruction of olfactory neurons in young and adult mice*. Eur J Neurosci, 2002. **15**(12): p. 1907-17.
3. Schwob, J.E., K.E. Szumowski, and A.A. Stasky, *Olfactory sensory neurons are trophically dependent on the olfactory bulb for their prolonged survival*. J Neurosci, 1992. **12**(10): p. 3896-919.
4. Schwob, J.E., S.L. Youngentob, and R.C. Mezza, *Reconstitution of the rat olfactory epithelium after methyl bromide-induced lesion*. J Comp Neurol, 1995. **359**(1): p. 15-37.
5. Suzukawa, K., et al., *Age-related changes of the regeneration mode in the mouse peripheral olfactory system following olfactotoxic drug methimazole-induced damage*. J Comp Neurol, 2011. **519**(11): p. 2154-74.
6. Suzuki, Y. and M. Takeda, *Basal cells in the mouse olfactory epithelium after axotomy: immunohistochemical and electron-microscopic studies*. Cell Tissue Res, 1991. **266**(2): p. 239-45.
7. Calof, A.L., et al., *Neurogenesis and cell death in olfactory epithelium*. J Neurobiol, 1996. **30**(1): p. 67-81.
8. Verhaagen, J., et al., *Neuroplasticity in the olfactory system: differential effects of central and peripheral lesions of the primary olfactory pathway on the expression of B-50/GAP43 and the olfactory marker protein*. J Neurosci Res, 1990. **26**(1): p. 31-44.
9. Costanzo, R.M., *Comparison of neurogenesis and cell replacement in the hamster olfactory system with and without a target (olfactory bulb)*. Brain Res, 1984. **307**(1-2): p. 295-301.
10. Cummings, D.M., et al., *Pattern of olfactory bulb innervation returns after recovery from reversible peripheral deafferentation*. J Comp Neurol, 2000. **421**(3): p. 362-73.
11. Schwob, J.E., et al., *Reinnervation of the rat olfactory bulb after methyl bromide-induced lesion: timing and extent of reinnervation*. J Comp Neurol, 1999. **412**(3): p. 439-57.
12. Schwob, J.E., et al., *Stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: Taking poietic license*. J Comp Neurol, 2017. **525**(4): p. 1034-1054.
13. Bauer, S., et al., *Leukemia inhibitory factor is a key signal for injury-induced neurogenesis in the adult mouse olfactory epithelium*. J Neurosci, 2003. **23**(5): p. 1792-803.
14. Gokoffski, K.K., et al., *Feedback Regulation of Neurogenesis in the Mammalian Olfactory Epithelium: New Insights from Genetics and Systems Biology*, in *The Neurobiology of Olfaction*, A. Menini, Editor. 2010: Boca Raton (FL).
15. Jia, C., A.R. Cussen, and C.C. Hegg, *ATP differentially upregulates fibroblast growth factor 2 and transforming growth factor alpha in neonatal and adult mice: effect on neuroproliferation*. Neuroscience, 2011. **177**: p. 335-46.
16. Simpson, P.J., et al., *Atrial natriuretic peptide type C induces a cell-cycle switch from proliferation to differentiation in brain-derived neurotrophic factor- or nerve growth factor-primed olfactory receptor neurons*. J Neurosci, 2002. **22**(13): p. 5536-51.

17. Kawauchi, S., et al., *Molecular signals regulating proliferation of stem and progenitor cells in mouse olfactory epithelium*. Dev Neurosci, 2004. **26**(2-4): p. 166-80.
18. McCurdy, R.D., et al., *Regulation of adult olfactory neurogenesis by insulin-like growth factor-I*. Eur J Neurosci, 2005. **22**(7): p. 1581-8.
19. Moon, C., et al., *Leukemia inhibitory factor promotes olfactory sensory neuronal survival via phosphoinositide 3-kinase pathway activation and Bcl-2*. J Neurosci Res, 2009. **87**(5): p. 1098-106.
20. Lema, S.C. and G.A. Nevitt, *Evidence that thyroid hormone induces olfactory cellular proliferation in salmon during a sensitive period for imprinting*. J Exp Biol, 2004. **207**(Pt 19): p. 3317-27.
21. Paternostro, M. and E. Meisami, *Selective effects of thyroid hormonal deprivation on growth and development of olfactory receptor sheet during the early postnatal period: a morphometric and cell count study in the rat*. Int J Dev Neurosci, 1989. **7**(3): p. 243-55.
22. Paternostro, M.A. and E. Meisami, *Essential role of thyroid hormones in maturation of olfactory receptor neurons: an immunocytochemical study of number and cytoarchitecture of OMP-positive cells in developing rats*. Int J Dev Neurosci, 1996. **14**(7-8): p. 867-80.
23. Nathan, B.P., M. Tonsor, and R.G. Struble, *Acute responses to estradiol replacement in the olfactory system of apoE-deficient and wild-type mice*. Brain Res, 2010. **1343**: p. 66-74.
24. Nathan, B.P., M. Tonsor, and R.G. Struble, *Long-term effects of estradiol replacement in the olfactory system*. Exp Neurol, 2012. **237**(1): p. 1-7.
25. Barja, G., *Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism?* Biol Rev Camb Philos Soc, 2004. **79**(2): p. 235-51.
26. Dhahbi, J.M., et al., *Temporal linkage between the phenotypic and genomic responses to caloric restriction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(15): p. 5524-9.
27. Hursting, S.D., et al., *Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans*. Annu Rev Med, 2003. **54**: p. 131-52.
28. Masoro, E.J., *Overview of caloric restriction and ageing*. Mech Ageing Dev, 2005. **126**(9): p. 913-22.
29. Padovani, M., et al., *Distinct effects of calorie restriction and exercise on mammary gland gene expression in C57BL/6 mice*. Cancer Prev Res (Phila), 2009. **2**(12): p. 1076-87.
30. Swindell, W.R., *Genes and gene expression modules associated with caloric restriction and aging in the laboratory mouse*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 585.
31. Hursting, S.D., et al., *Calories and carcinogenesis: lessons learned from 30 years of calorie restriction research*. Carcinogenesis, 2010. **31**(1): p. 83-9.
32. Masoro, E.J., *Caloric restriction-induced life extension of rats and mice: a critique of proposed mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(10): p. 1040-8.
33. Roth, G.S., D.K. Ingram, and M.A. Lane, *Caloric restriction in primates and relevance to humans*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **928**: p. 305-15.
34. Si, H. and D. Liu, *Dietary antiaging phytochemicals and mechanisms associated with prolonged survival*. J Nutr Biochem, 2014. **25**(6): p. 581-91.

35. Bruss, M.D., et al., *The effects of physiological adaptations to calorie restriction on global cell proliferation rates*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **300**(4): p. E735-45.
36. Hong, D.S., L.S. Angelo, and R. Kurzrock, *Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics*. Cancer, 2007. **110**(9): p. 1911-28.
37. Lok, E., et al., *Calorie restriction and cellular proliferation in various tissues of the female Swiss Webster mouse*. Cancer Lett, 1990. **51**(1): p. 67-73.
38. Yilmaz, Ö.H., et al., *mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake*. Nature, 2012. **486**: p. 490.
39. Partridge, L., D. Gems, and D.J. Withers, *Sex and death: what is the connection?* Cell, 2005. **120**(4): p. 461-72.
40. Newton, I.G., et al., *Effects of aging and caloric restriction on dentate gyrus synapses and glutamate receptor subunits*. Neurobiol Aging, 2008. **29**(9): p. 1308-18.
41. Park, J.H., et al., *Calorie restriction alleviates the age-related decrease in neural progenitor cell division in the aging brain*. Eur J Neurosci, 2013. **37**(12): p. 1987-93.
42. Kumar, S., et al., *Interactive effect of excitotoxic injury and dietary restriction on neurogenesis and neurotrophic factors in adult male rat brain*. Neurosci Res, 2009. **65**(4): p. 367-74.
43. Someya, S., et al., *Effects of caloric restriction on age-related hearing loss in rodents and rhesus monkeys*. Curr Aging Sci, 2010. **3**(1): p. 20-5.
44. Pugh, T.D., R.G. Klopp, and R. Weindruch, *Controlling caloric consumption: protocols for rodents and rhesus monkeys*. Neurobiol Aging, 1999. **20**(2): p. 157-65.
45. Cao, S.X., et al., *Genomic profiling of short- and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10630-5.
46. Selman, C., et al., *Coordinated multitissue transcriptional and plasma metabolomic profiles following acute caloric restriction in mice*. Physiol Genomics, 2006. **27**(3): p. 187-200.
47. Yoshikawa, K., et al., *The human olfactory cleft mucus proteome and its age-related changes*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 17170.
48. Mulligan, J.D., A.M. Stewart, and K.W. Saupe, *Downregulation of plasma insulin levels and hepatic PPARgamma expression during the first week of caloric restriction in mice*. Exp Gerontol, 2008. **43**(3): p. 146-53.
49. Hallman, B.L. and J.W. Hurst, *Loss of taste as toxic effect of methimazole (tapazole) therapy; report of three cases*. J Am Med Assoc, 1953. **152**(4): p. 322.
50. Genter, M.B., et al., *Olfactory toxicity of methimazole: dose-response and structure-activity studies and characterization of flavin-containing monooxygenase activity in the Long-Evans rat olfactory mucosa*. Toxicol Pathol, 1995. **23**(4): p. 477-86.
51. Brittebo, E.B., *Metabolism-dependent toxicity of methimazole in the olfactory nasal mucosa*. Pharmacol Toxicol, 1995. **76**(1): p. 76-9.
52. Sakamoto, T., et al., *Methimazole-induced cell death in rat olfactory receptor neurons occurs via apoptosis triggered through mitochondrial cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway*. J Neurosci Res, 2007. **85**(3): p. 548-57.
53. Schwob, J.E., *Neural regeneration and the peripheral olfactory system*. Anat Rec, 2002. **269**(1): p.

33-49.

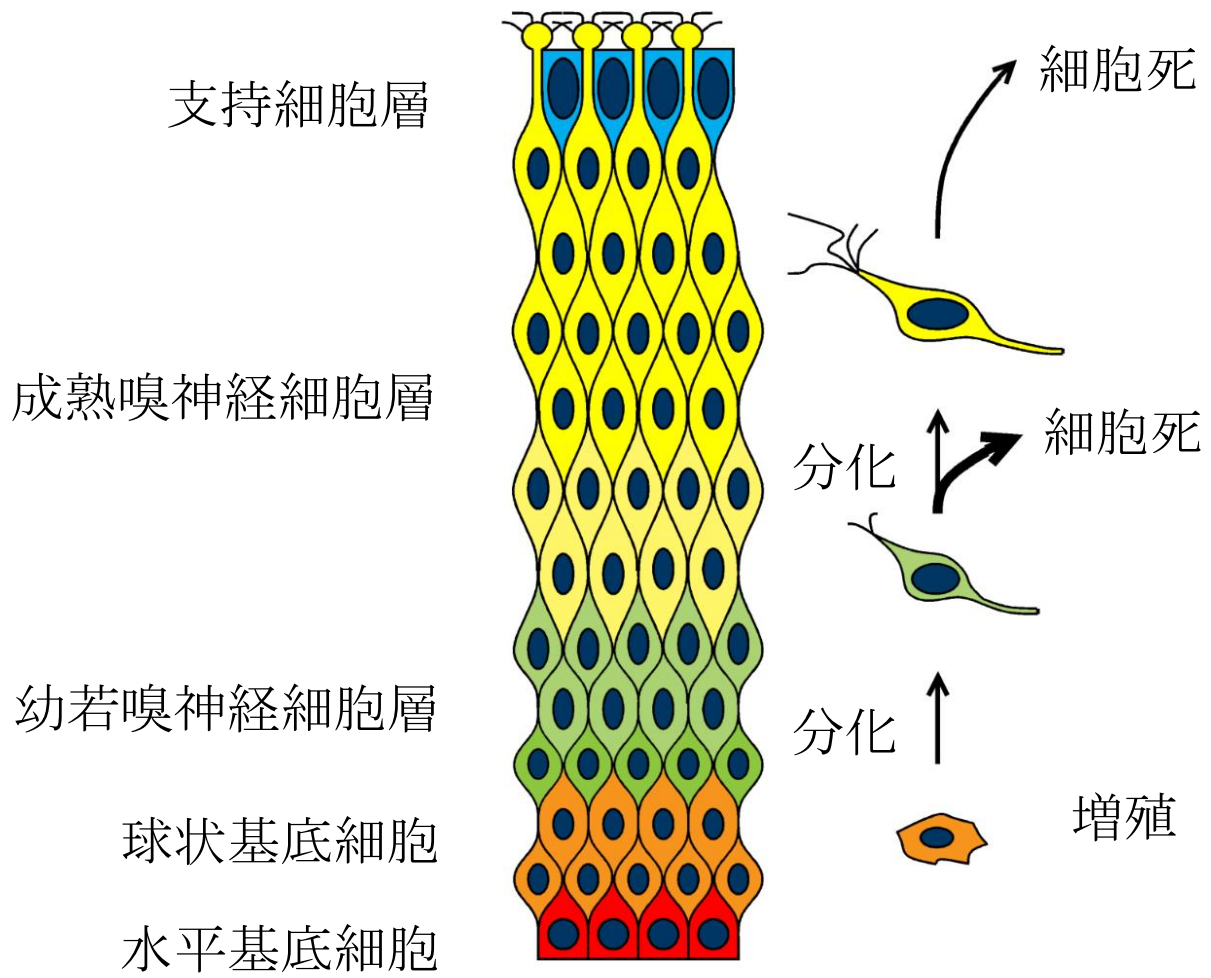
54. Costanzo, R.M. and P.P. Graziadei, *A quantitative analysis of changes in the olfactory epithelium following bullectomy in hamster*. J Comp Neurol, 1983. **215**(4): p. 370-81.
55. Graziadei, P.P. and G.A. Graziadei, *Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons*. J Neurocytol, 1979. **8**(1): p. 1-18.
56. Costanzo, R.M., *Neural regeneration and functional reconnection following olfactory nerve transection in hamster*. Brain Res, 1985. **361**(1-2): p. 258-66.
57. Matulionis, D.H., *Ultrastructural study of mouse olfactory epithelium following destruction by ZnSO₄ and its subsequent regeneration*. Am J Anat, 1975. **142**(1): p. 67-89.
58. Williams, S.K., T. Gilbey, and S.C. Barnett, *Immunohistochemical studies of the cellular changes in the peripheral olfactory system after zinc sulfate nasal irrigation*. Neurochem Res, 2004. **29**(5): p. 891-901.
59. Hurtt, M.E., et al., *Degeneration and regeneration of the olfactory epithelium following inhalation exposure to methyl bromide: pathology, cell kinetics, and olfactory function*. Toxicol Appl Pharmacol, 1988. **94**(2): p. 311-28.
60. Baker, H., M. Grillo, and F.L. Margolis, *Biochemical and immunocytochemical characterization of olfactory marker protein in the rodent central nervous system*. J Comp Neurol, 1989. **285**(2): p. 246-61.
61. Kondo, K., et al., *Distribution and severity of spontaneous lesions in the neuroepithelium and Bowman's glands in mouse olfactory mucosa: age-related progression*. Cell Tissue Res, 2009. **335**(3): p. 489-503.
62. Schluter, C., et al., *The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins*. J Cell Biol, 1993. **123**(3): p. 513-22.
63. Ribera, J., V. Ayala, and J.E. Esquerda, *c-Jun-like immunoreactivity in apoptosis is the result of a crossreaction with neoantigenic sites exposed by caspase-3-mediated proteolysis*. J Histochem Cytochem, 2002. **50**(7): p. 961-72.
64. Fu, Z.D. and C.D. Klaassen, *Short-term calorie restriction feminizes the mRNA profiles of drug metabolizing enzymes and transporters in livers of mice*. Toxicol Appl Pharmacol, 2014. **274**(1): p. 137-46.
65. Rossner, R., M. Kaeberlein, and S.F. Leiser, *Flavin-containing monooxygenases in aging and disease: Emerging roles for ancient enzymes*. J Biol Chem, 2017. **292**(27): p. 11138-11146.
66. Kondo, K., et al., *Age-related changes in cell dynamics of the postnatal mouse olfactory neuroepithelium: cell proliferation, neuronal differentiation, and cell death*. J Comp Neurol, 2010. **518**(11): p. 1962-75.
67. Mackay-Sim, A. and P.W. Kittel, *On the Life Span of Olfactory Receptor Neurons*. Eur J Neurosci, 1991. **3**(3): p. 209-215.
68. Chou, M.W., et al., *Effect of caloric restriction on the induction of hepatic cytochrome P-450 and Ah receptor binding in C57BL/6N and DBA/2J mice*. Drug Chem Toxicol, 1993. **16**(1): p. 1-19.

69. Qin, L.Q., et al., *One-day dietary restriction changes hepatic metabolism and potentiates the hepatotoxicity of carbon tetrachloride and chloroform in rats*. *Tohoku J Exp Med*, 2007. **212**(4): p. 379-87.
70. Hsieh, E.A., et al., *Dynamics of keratinocytes in vivo using HO labeling: a sensitive marker of epidermal proliferation state*. *J Invest Dermatol*, 2004. **123**(3): p. 530-6.
71. Fedoroff, I.C., et al., *Olfactory dysfunction in anorexia and bulimia nervosa*. *Int J Eat Disord*, 1995. **18**(1): p. 71-7.
72. Rapps, N., et al., *Olfactory deficits in patients with anorexia nervosa*. *Eur Eat Disord Rev*, 2010. **18**(5): p. 385-9.
73. Roessner, V., et al., *Olfactory deficits in anorexia nervosa*. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2005. **255**(1): p. 6-9.
74. Spaulding, C.C., R.L. Walford, and R.B. Effros, *Calorie restriction inhibits the age-related dysregulation of the cytokines TNF-alpha and IL-6 in C3B10RF1 mice*. *Mech Ageing Dev*, 1997. **93**(1-3): p. 87-94.
75. Tajik, N., et al., *Effect of diet-induced weight loss on inflammatory cytokines in obese women*. *J Endocrinol Invest*, 2013. **36**(4): p. 211-5.
76. Kuilman, T., et al., *Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network*. *Cell*, 2008. **133**(6): p. 1019-31.
77. O'Hagan-Wong, K., et al., *Increased IL-6 secretion by aged human mesenchymal stromal cells disrupts hematopoietic stem and progenitor cells' homeostasis*. *Oncotarget*, 2016. **7**(12): p. 13285-96.
78. Sarkar, D. and P.B. Fisher, *Molecular mechanisms of aging-associated inflammation*. *Cancer Lett*, 2006. **236**(1): p. 13-23.
79. Ueha, R., et al., *Reduction of Proliferating Olfactory Cells and Low Expression of Extracellular Matrix Genes Are Hallmarks of the Aged Olfactory Mucosa*. *Front Aging Neurosci*, 2018. **10**: p. 86.
80. Lane, A.P., et al., *A genetic model of chronic rhinosinusitis-associated olfactory inflammation reveals reversible functional impairment and dramatic neuroepithelial reorganization*. *J Neurosci*, 2010. **30**(6): p. 2324-9.
81. Turner, J.H., et al., *Tumor necrosis factor alpha inhibits olfactory regeneration in a transgenic model of chronic rhinosinusitis-associated olfactory loss*. *Am J Rhinol Allergy*, 2010. **24**(5): p. 336-40.
82. Nan, B., et al., *Leukemia inhibitory factor, interleukin-6, and their receptors are expressed transiently in the olfactory mucosa after target ablation*. *J Comp Neurol*, 2001. **435**(1): p. 60-77.
83. Kornack, D.R. and P. Rakic, *The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(8): p. 4752-7.
84. Lois, C. and A. Alvarez-Buylla, *Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain*. *Science*, 1994. **264**(5162): p. 1145-8.
85. Luskin, M.B., *Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone*. *Neuron*, 1993. **11**(1): p. 173-89.

86. Pencea, V., et al., *Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain*. *Exp Neurol*, 2001. **172**(1): p. 1-16.

图表

圖1



☒ 2

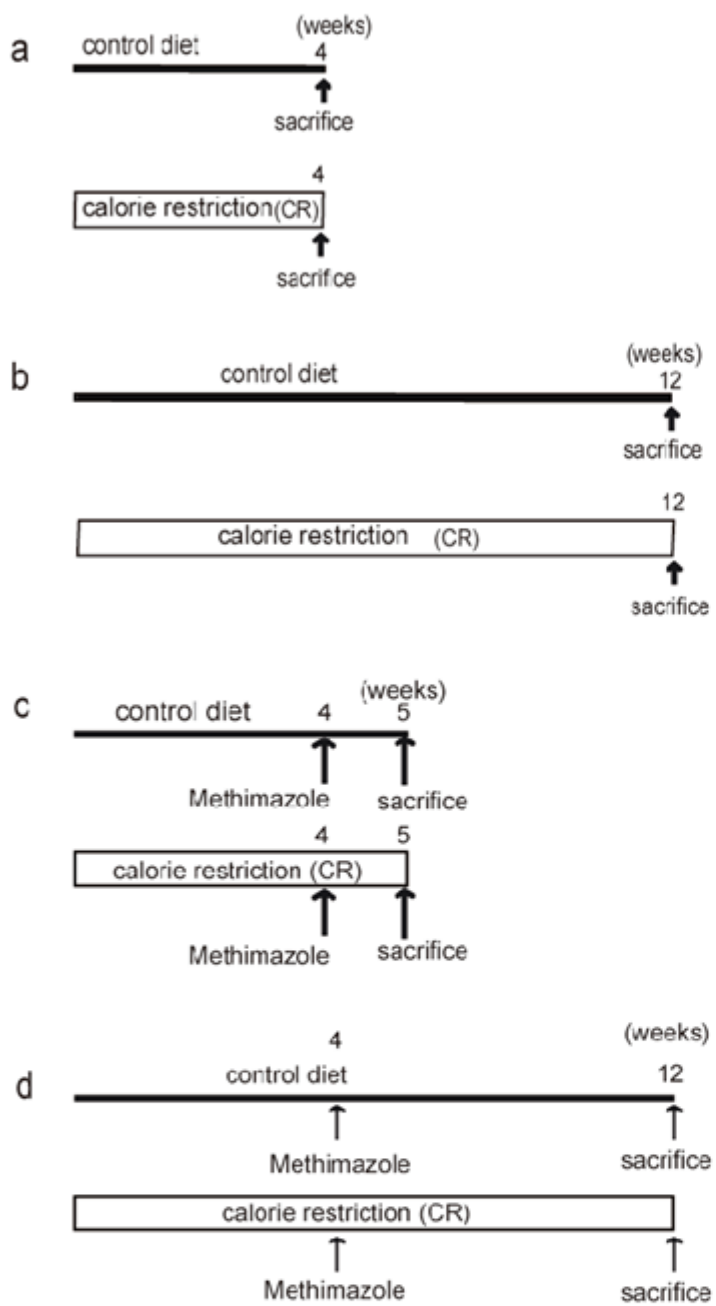
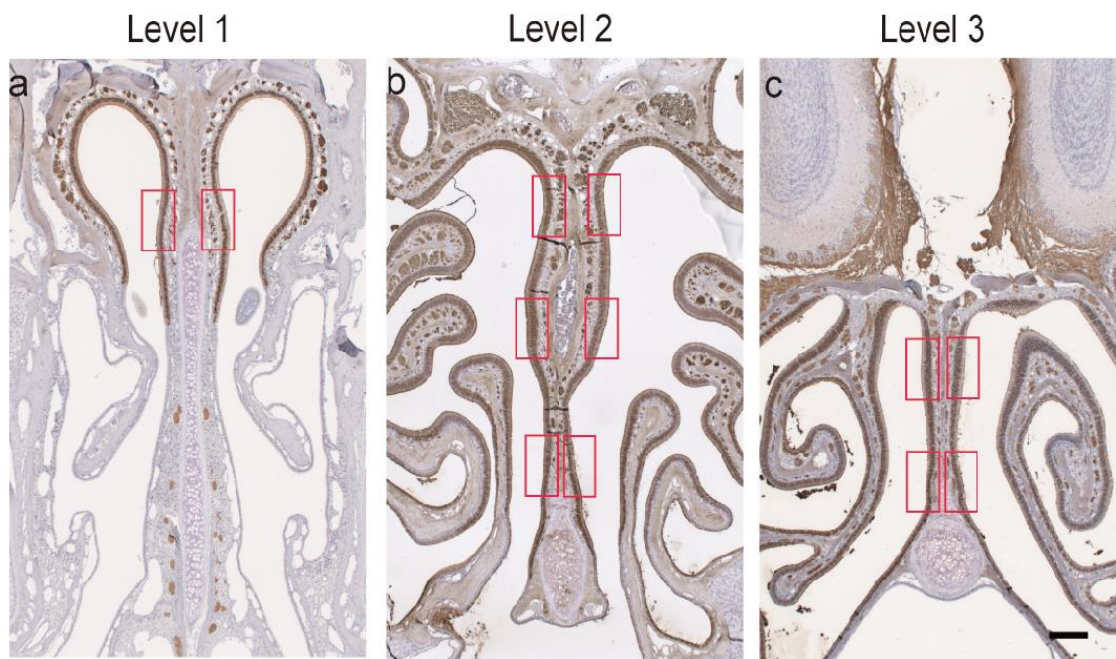


图 3



4

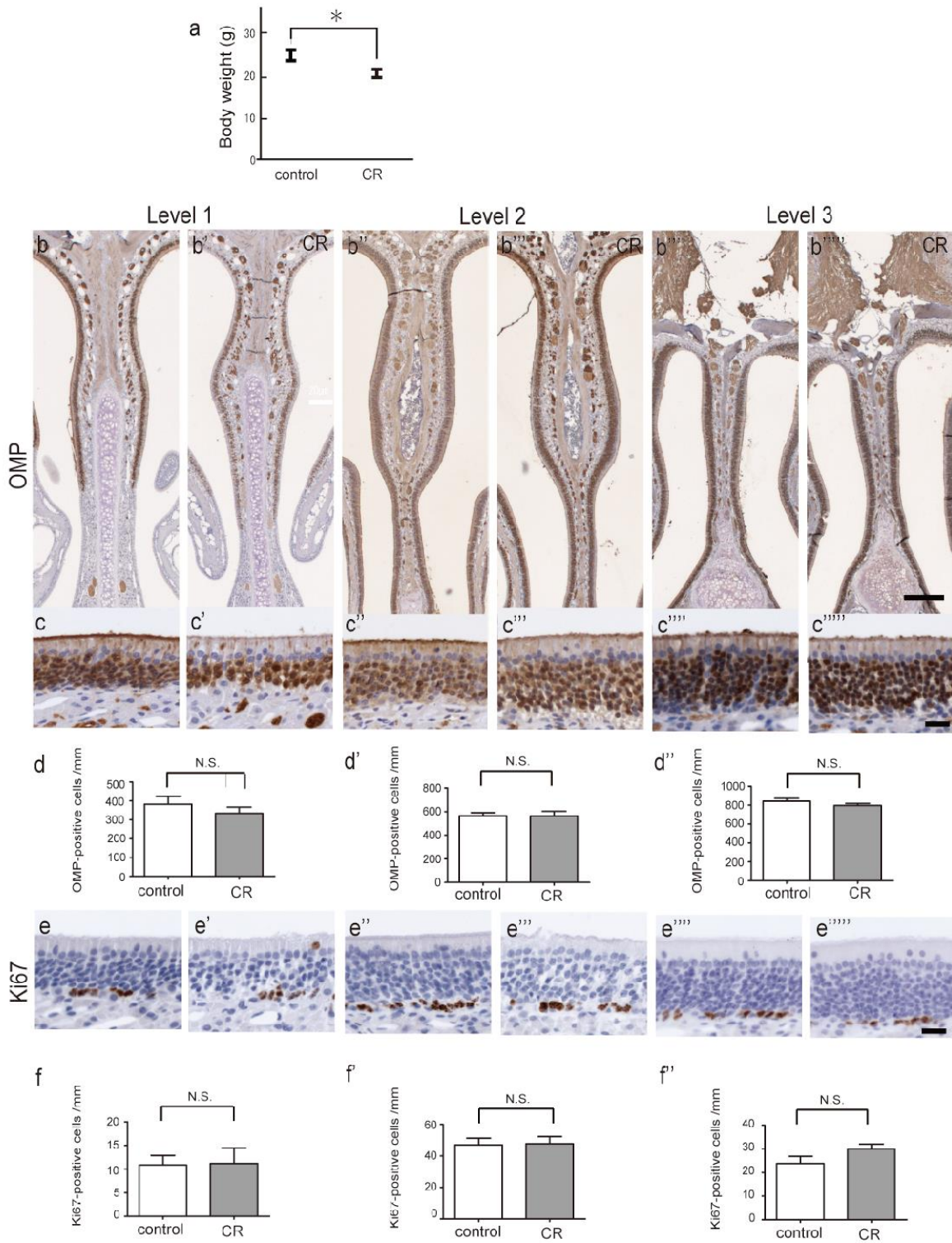


图 5

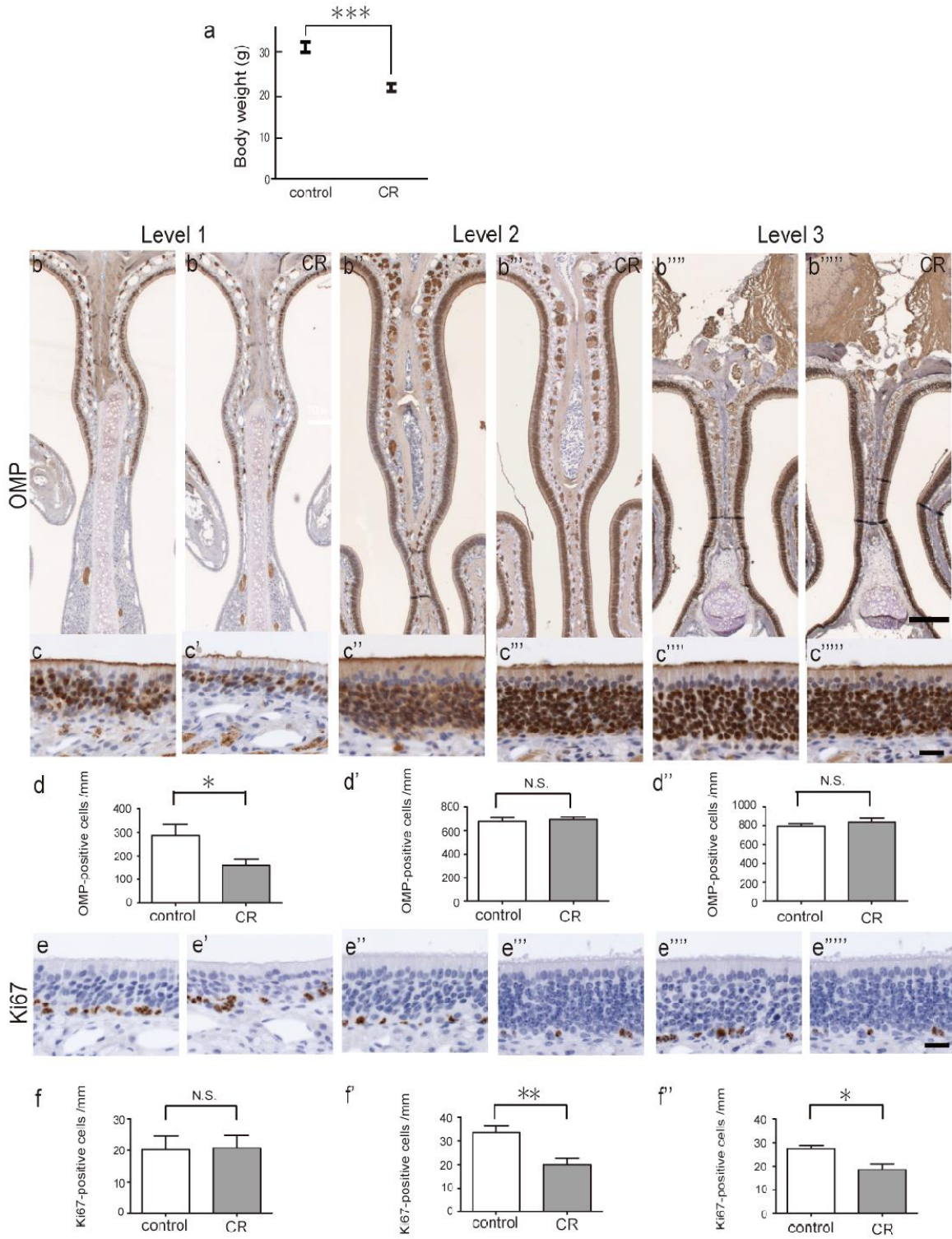


图 6

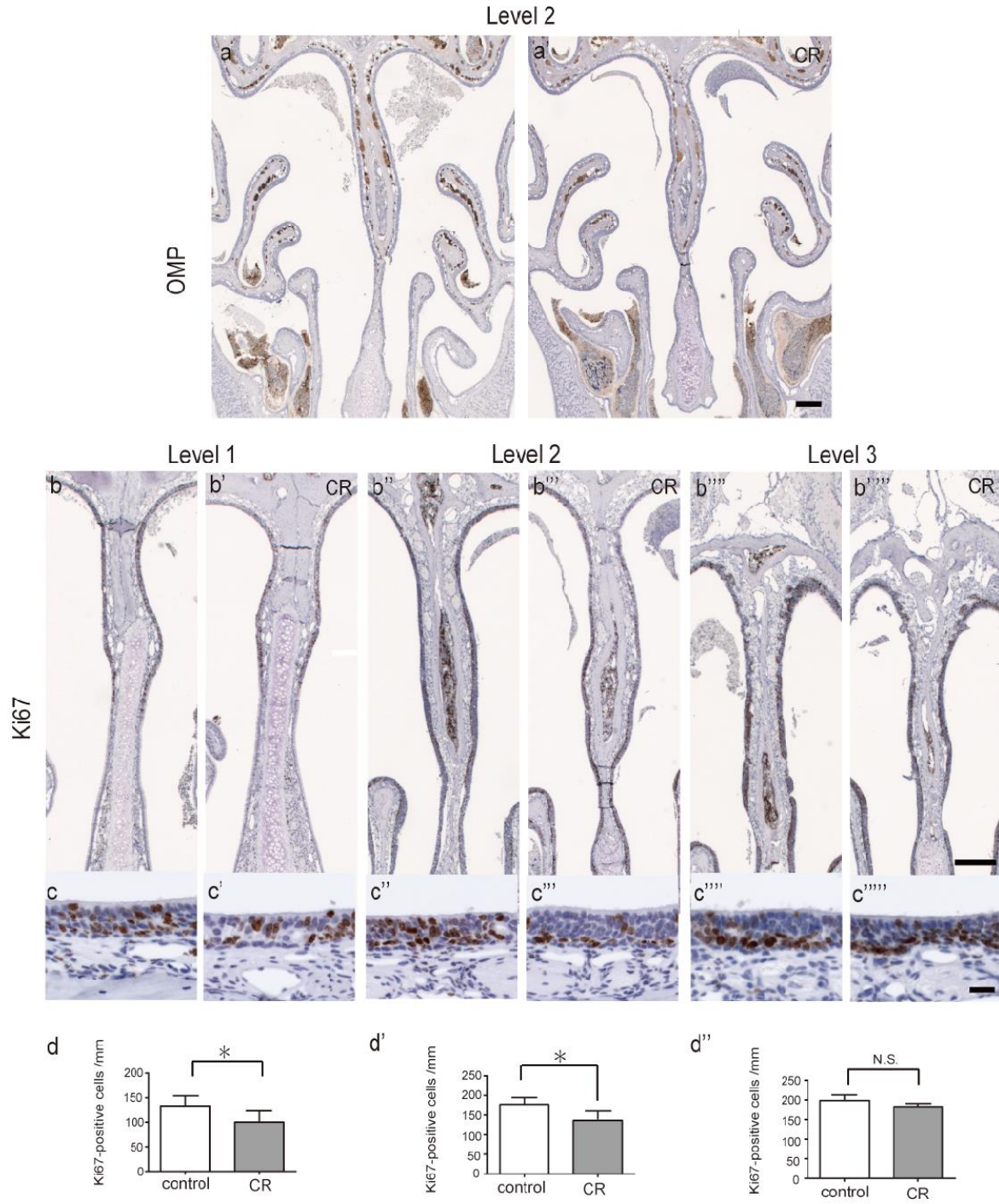


图 7

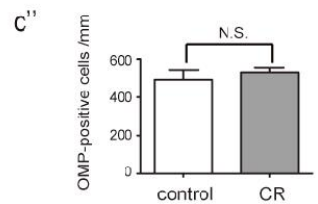
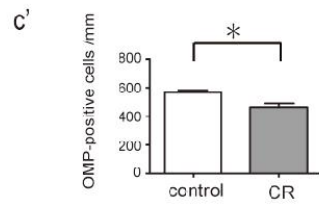
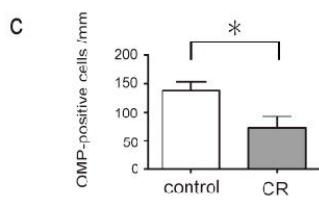
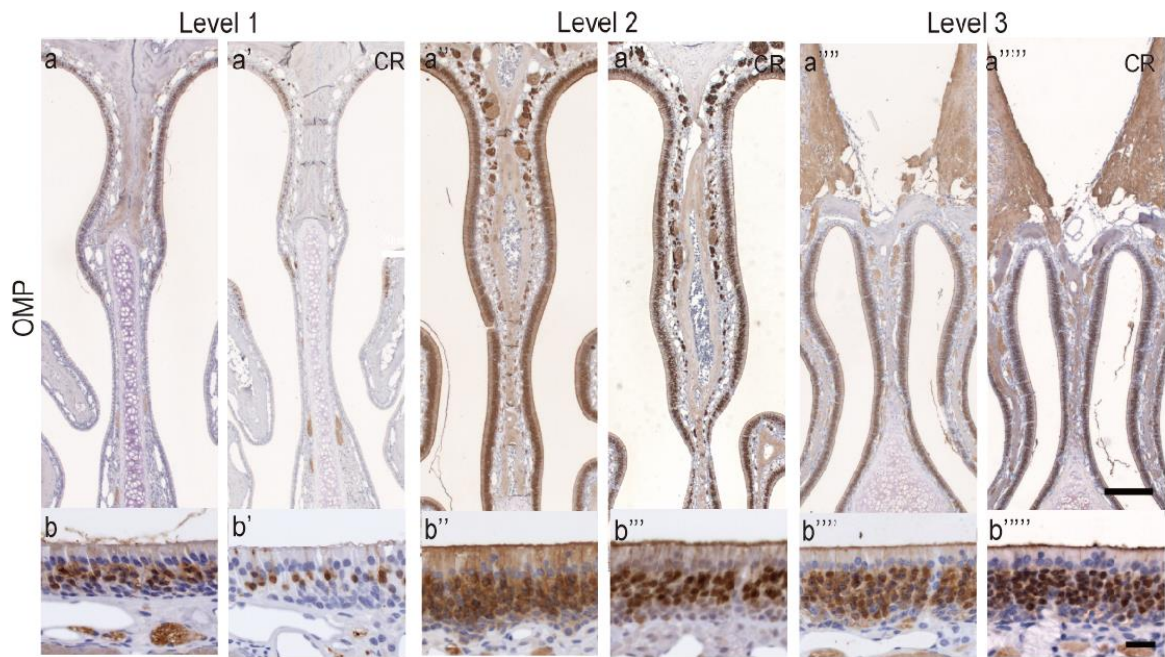
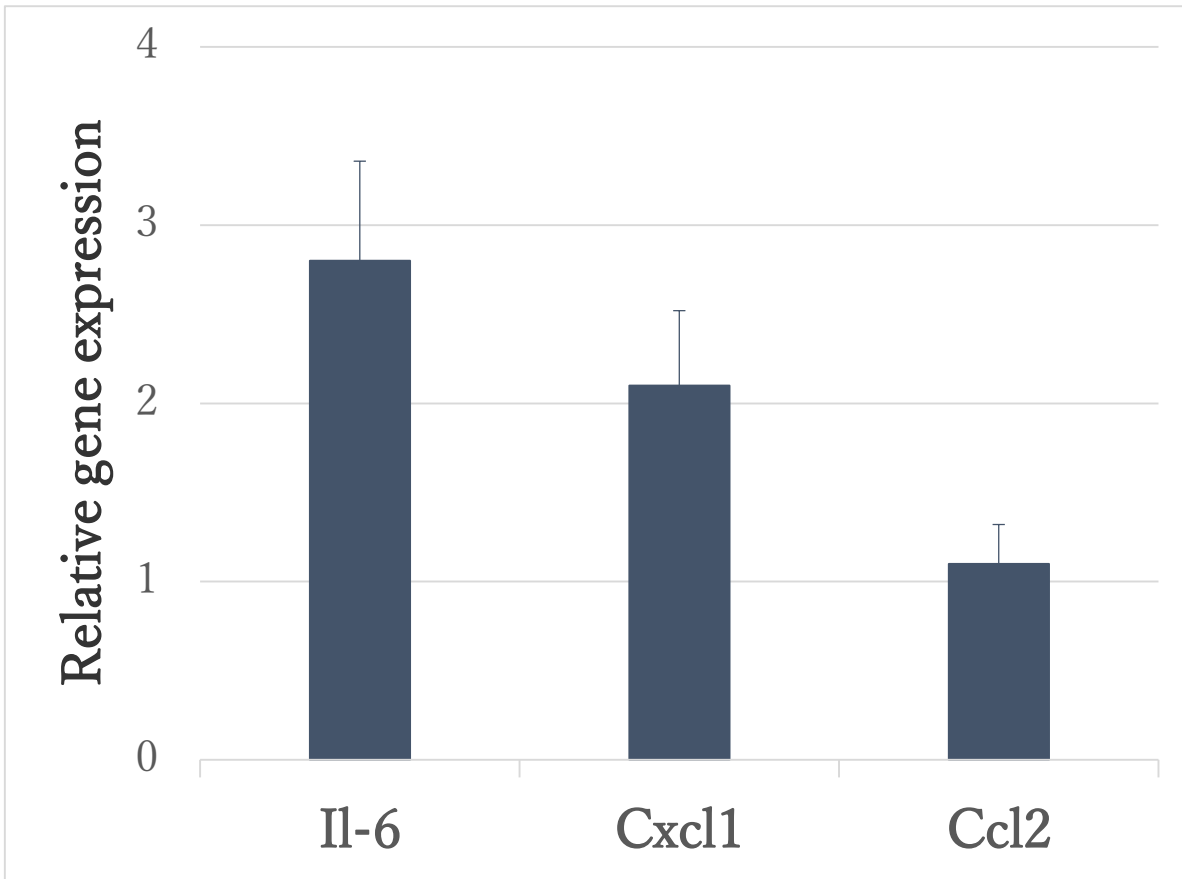


Figure 8



☒ 9

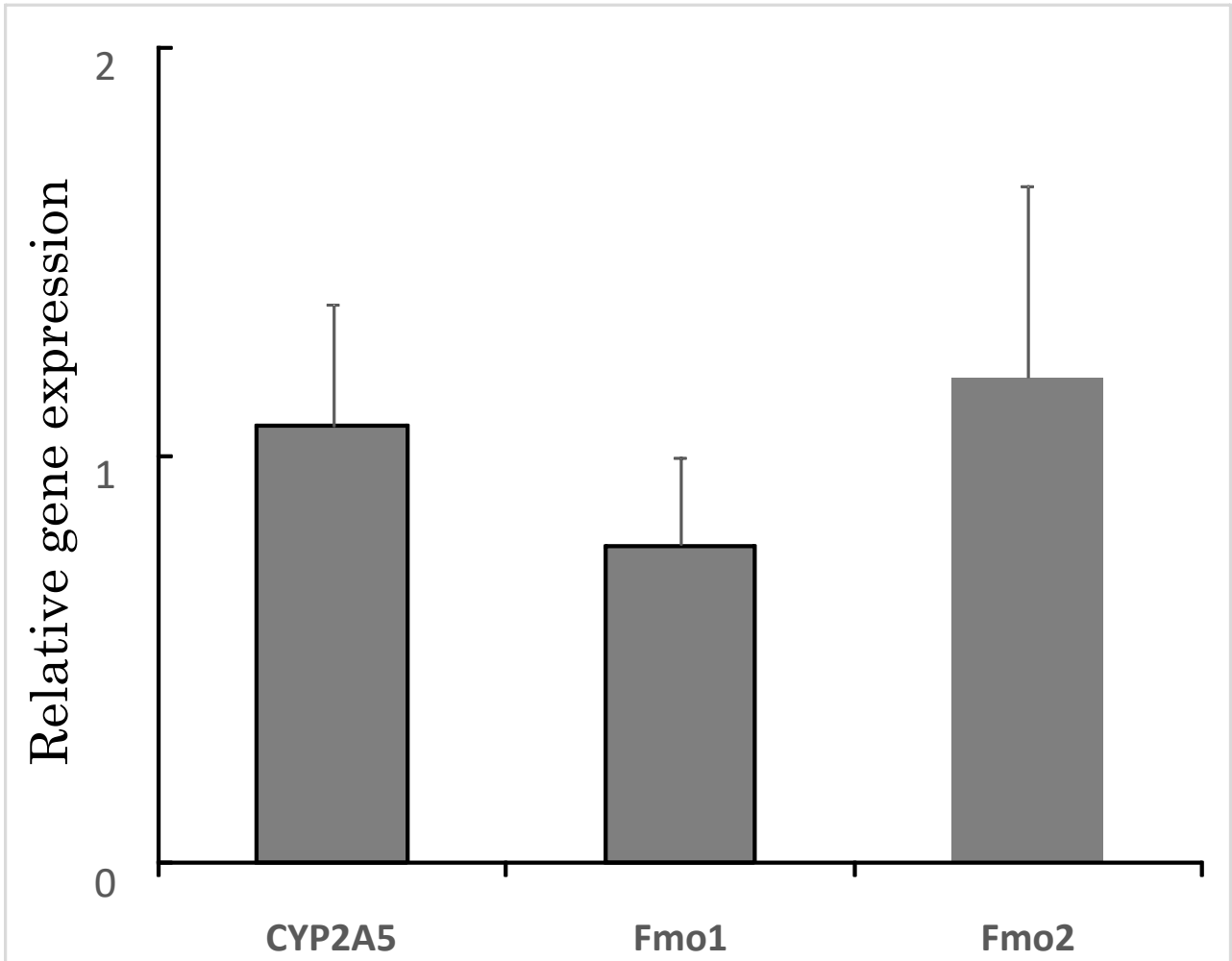


表 1

BP: biological process; FDR: false discovery rate.

Category		Term	<i>p</i> -value	FDR (Benjamini)
BP	GO:0009611	Response to wounding	5.3E-08	2.9E-05
BP	GO:0007596	Blood coagulation	3.1E-04	8.0E-02
BP	GO:0050817	Coagulation	3.1E-04	8.0E-02
BP	GO:0007599	Hemostasis	3.2E-04	5.7E-02
BP	GO:0006954	Inflammatory response	6.0E-04	7.8E-02
BP	GO:0050878	Regulation of body fluid levels	7.6E-04	8.0E-02
BP	GO:0042060	Wound healing	1.8E-03	1.5E-01
BP	GO:006959	Humoral immune response	2.0E-03	1.4E-01
BP	GO:0006952	Defense response	4.5E-03	2.7E-01
BP	GO:0006955	Immune response	6.0E-03	3.0E-01

表 2

General category	Biological process	Gene	Symbol	Fold increase
Wounding	Response to wounding	Chemokine (C–C motif)ligand 2	<i>Ccl2</i>	2.68
		Chemokine (C–X–C motif)ligand 1	<i>Cxcl1</i>	4.26
		Chitinase 3-like 4	<i>Chi3l4</i>	5.1
		Interleukin-6	<i>Il6</i>	13.50
		Coagulation factor X	<i>F10</i>	0.33
		Complement component factor I	<i>Cfi</i>	2.64
		Complement factor D (adipsin)	<i>Cfd</i>	2.29
		Glycoprotein 1b, alpha polypeptide	<i>Gp1ba</i>	0.23
		Glycoprotein 5 (platelet)	<i>Gp5</i>	0.18
		Glycoprotein 6 (platelet)	<i>Gp6</i>	0.45
Inflammation	Inflammatory response	Chemokine (C–X–C motif)ligand 2	<i>Cxcl2</i>	2.68
		Chemokine (C–X–C motif)ligand 1	<i>Cxcl1</i>	4.26
		Chitinase 3-like 4	<i>Chi3l4</i>	5.1
		Complement component factor I	<i>Cfi</i>	2.64
		Complement factor D (adipsin)	<i>Cfd</i>	2.29
		Interleukin-6	<i>Il6</i>	13.50
Others		Taste receptor, type 2v	<i>Tas2r124</i>	2.78
		Olfactory receptor 92	<i>Olf92</i>	0.34
		Dopachrome tautomerase	<i>Dct</i>	11.9
		Tryptophan hydroxylase 1	<i>Tph1</i>	5.49
		Somatostatin	<i>Sst</i>	0.25

表 3

Gene	Symbol	Expression	
Chemokine (C-C motif) ligand 2	<i>Ccl2</i>	-	
Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	<i>Cxcl1</i>	CR ↑	*
Chitinase 3-like 4	<i>Chi3l4</i>	CR ↑	*
Interleukin-6	<i>Il6</i>	Control ↑	*
Coagulation factor X	<i>F10</i>	-	
Complement component factor I	<i>Cfi</i>	-	
Complement factor D (adipsin)	<i>Cfd</i>	CR ↑	*
Glycoprotein 1b, alpha polypeptide	<i>Gp1ba</i>	-	
Glycoprotein 5 (platelet)	<i>Gp5</i>	-	
Glycoprotein 6 (platelet)	<i>Gp6</i>	-	
Flavin-containing monooxygenase 1	<i>Fmo1</i>	-	
Flavin-containing monooxygenase 2	<i>Fmo2</i>	-	
Term 1	<i>Term 1</i>	-	
Tif 1	<i>Tif 1</i>	-	
Ppbp	<i>Ppbp</i>	-	
CYP2A5	<i>CYP2A5</i>	-	

図表の説明

図1 嗅神経上皮の再生様式

嗅神経上皮は支持細胞、嗅神経細胞、基底細胞の3種の細胞種よりなる。基底細胞は嗅神経上皮の基底層に存在する。支持細胞は嗅神経上皮の表層に核を有し、細胞体の基部は基底層まで伸びている。嗅神経上皮の最下層には神経幹細胞能を有する基底細胞が存在する。基底細胞から分化した新生嗅神経細胞は、嗅神経上皮の表層に遊走しながら幼若な嗅神経細胞となり、さらに軸索を嗅球に向けて伸長する。その細胞はさらに表層に遊走し、最終的に嗅線毛を発現し、嗅球に軸索をシナプス結合させた成熟嗅神経細胞となる。生成された嗅神経細胞は幼若な段階でも成熟した段階でも細胞死を起こす。

図2 実験プロトコル

a: マウスに对照ペレット(n=7)またはCRペレット(n=7)のいずれかを1ヶ月間与えた後、屠殺して組織学的分析を行った。b: マウスに对照ペレット(n=7)またはCRペレット(n=7)のいずれかを3ヶ月間与えた後、屠殺して組織学的分析を行った。c: マウスに对照ペレット(n=5)またはCRペレット(n=5)のいずれかを1ヶ月間与えた後、嗅粘膜毒性物質メチマゾール(80mg/kg体重)を腹腔内注射した。メチマゾール投与の1週間後にマウスを屠殺して組織学的分析を行った。d: マウスに对照ペレットまたはCRペレットを1ヶ月間与え、次いで、メチマゾールを投与した。メチマゾール投与後2ヶ月間、对照マウスには对照ペレットを与え続け、CRマウスにはCRペレットを与え続け、メチマゾール投与後2ヶ月時点で全てのマウスを屠殺して組織学的分析を行った。

図3 嗅上皮の評価に用いた代表的な切片像(抗OMP抗体染色)

OMP 免疫染色による嗅神経上皮の顕微鏡写真。各パネルの赤い長方形(幅 350 μ m)は、細胞数分析に使用した領域である。a:レベル 1 の切片は、第 2 篩骨甲介の前端が現れる位置である。嗅神経上皮の長さが短いため各鼻中隔粘膜に1つの高倍率の顕微鏡像を選択した。b:レベル 2 の切片は、嗅球の前端を通る深さで、各鼻中隔粘膜に3切片(腹側、中部、及び背側)の顕微鏡像を選択した。c:レベル 3 の切片は、前後軸に沿って嗅球の中央を通る深さで、2切片の顕微鏡像(腹側と背側)を選択した。(bar=0.2mm)

図4 非障害状態における嗅神経上皮の形態と細胞動態に対する短期間(1 か月)CRの影響

a: 各群のマウスの 1 ヶ月平均体重。 CR食群のマウスの平均体重は対照食群より有意に低かった。
* $p < 0.05$ 。 b-f: 組織学的分析。対照マウス(b、c、e、b'、c'、e'、b''、c''、e''、b'''、c'''、e''')及びCRマウス(b'、c'、e'、b''、c''、e''、b'''、c'''、e''')における鼻中隔の嗅神経上皮の顕微鏡写真。レベル 1 (b、b'、c、c'、e、e')、レベル 2 (b''、b'''、c''、c'''、e''、e''')、及びレベル 3 (b''''、b''''、c''''、c''''、e''''、e''''')。b-b''''(低倍率)及びc-c''''(高倍率)の切片はOMP抗体により免疫染色され、e-e''''内の切片は抗Ki67抗体により免疫染色されている。d-d''及びf-f''のグラフは、対照食群とCR食群との間の、各レベルでの 1mmあたりのOMP及びKi67陽性細胞数の比較。各レベルにおいて、1mmあたりのOMP陽性細胞数(d-d'')またはKi67陽性細胞数(f-f'')に関して群間に有意差はなかった。N.S.: 有意差なし。(bar=b:0.2mm、c e:20 μ m)

図5 非障害状態における嗅神経上皮の形態と細胞動態に対する中長期(3か月)CRの影響

a:3ヵ月時点における各群のマウスの平均体重。CR食群のマウスの平均体重は対照食群より有意に低かった。*** $p < 0.001$ 。b-f:組織学的分析。対照マウス(b、c、e、b^{''}、c^{''}、e^{''}、b^{'''}、c^{'''}、e^{'''})及びCRマウス(b[']、c[']、e[']、b^{'''}、c^{'''}、e^{'''}、b^{''''}、c^{''''}、e^{''''})における鼻中隔の嗅神経上皮の顕微鏡写真。レベル1(b、b[']、c、c[']、e、e['])、レベル2(b^{''}、b^{'''}、c^{''}、c^{'''}、e^{''}、e^{'''})、及びレベル3(b^{''''}、b^{''''}、c^{''''}、c^{''''}、e^{''''}、e^{''''})を示す。b-b^{''''}(低倍率像)及びc-c^{''''}(高倍率像)の切片は抗OMP抗体による免疫染色、e-e^{''''}内の切片は抗Ki67抗体による免疫染色。d-d[']及びf-f[']のグラフは、対照食群とCR食群との間の、各レベルでの1mmあたりのOMP及びKi67免疫陽性細胞数の比較。CR食群では、レベル1では1mmあたりのOMP陽性細胞数、レベル2と3では1mmあたりのKi67陽性細胞数は有意に減少した。* $p < 0.05$ 。** $p < 0.01$ 。N.S.:有意差なし。(bar=b:0.2 1mm、ce:20 μ m)

図6 チマゾールによる嗅神経上皮障害後の嗅上皮再生に対するCRの影響(障害後1週間)

a:抗OMP抗体により免疫染色された、レベル2の対照(a)及びCR(a['])マウスの嗅神経上皮の顕微鏡写真。嗅神経上皮全体が障害を受けており、ORNは粘膜に残存しなかった。b-d細胞増殖の組織学的解析。対照マウス(b、c、b^{''}、c^{''}、b^{'''}、c^{'''})及びCRマウス(b[']、c[']、b^{'''}、c^{'''}、b^{''''}、c^{''''})の鼻中隔の嗅神経上皮の顕微鏡写真。レベル1(b、b[']、c、c['])、レベル2(b^{''}、b^{'''}、c^{''}、c^{'''})及びレベル3(b^{''''}、b^{''''}、c^{''''}、c^{''''})。b-b^{''''}(低倍率像)とc-c^{''''}(高倍率像)の切片の抗Ki67抗体による免疫染色。d-d[']内のグラフは、対照食群とCR食群の間の、各レベルでの1mmあたりのKi67陽性細胞数の比較。1mmあたりのKi67陽性細胞数は、対照食群及びCR食群の両方において、非障害

群と比較して大きく増加した(図.3f-f''及び5d-d''と比較)が、レベル1及び2のCR群では有意に増加が低かった。* p<0.05。 N.S. :有意差なし。(bar=a b:0.2 1mm、c:20 μ m)

図7 メチマゾールによる嗅神経上皮障害後の嗅上皮再生に対するCRの影響(障害後2ヵ月)

a~c:組織学的解析。メチマゾール障害後2ヵ月の対照マウス(a、b、a'、b'、a''、b'')及びCRマウス(a'、b'、a'''、b'''、a''''、b''''')。レベル1(a、a'、b、b')、レベル2(a''、a'''、b''、b''')及びレベル3(a''''、a''''、b''''、b''''')の組織像を示す。a-a''''(低倍率像)とb-b''''(高倍率像)は、抗OMP抗体による免疫染色。c-c''のグラフは、対照食群とCR食群の間の、各レベルでの1mmあたりのOMP陽性細胞数の比較。CR食群の11mmあたりのOMP陽性数は、対照食群と比較してレベル1及びレベル2で有意に減少した。* p<0.05。 N.S. :有意差なし。(bar=a:0.2 1mm、c:20 μ m)

図8 qPCRによるケモカイン発現差の比較

qPCRによる、対照マウスとCRマウス間のIL-6、ケモカイン(C-X-Cモチーフリガンド1(Cxcl1)、及びケモカイン(C-Cモチーフリガンド2(Ccl2)のmRNA発現の比較。y軸は、マイクロアレイハイブリダイゼーション及びqPCR増幅における対照に対するCRの平均シグナル強度比を示す。DNAマイクロアレイ及びqPCRともに同様の結果を示す。データは平均値±標準誤差として示した(n=4)。* p<0.05。

図9 qPCRによるP450及びFMOの発現差の比較

qPCRによる、対照マウスとCRマウス間のP450(CYP2A5)、Fmo1、Fmo2のmRNA発現の比較。

y 軸は、qPCR 増幅における対照に対する CR の平均シグナル強度比を示す。データは平均値±標準誤差として示した(n=4)。* p<0.05。

表1 CR での DNA マイクロアレイでの嗅神経上皮の発現プロファイル

DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを比較した。対照食群と比較して CR 群では、181 (0.31%) 遺伝子及び 72 (0.12%) 遺伝子がそれぞれ誘導 (2 倍超) 又は抑制 (1/2 倍未満) された。DAVID の一連のオンラインツールを用いて、発現に差のあった遺伝子を遺伝子オントロジー (GO) 解析の生物学的プロセスカテゴリーに割り当て上位 10 の Gene Ontology タームを示す。

表2 嗅神経上皮での代表的な炎症及び創傷治癒に関する遺伝子の発現差

DNA マイクロアレイ解析における結果をもとに嗅神経上皮での代表的な炎症及び創傷治癒に関する遺伝子の発現差を示した。

表3 CR での qDNA での嗅神経上皮の発現プロファイル

DNA マイクロアレイ解析の結果で誘導 (2 倍超) 又は抑制 (1/2 倍未満) された遺伝子を選定し、qPCR を用いてそれらの遺伝子発現を比較した。Cxcl1、Chi3l4、Cfd は CR 群で発現が有意に上昇し、Il6 は対照食群で発現が有意に上昇した。* p<0.05。 -:有意差なし。