

The Expression of Na⁺, K⁺-ATPase, Sodium-Proton Exchanger (NHE) and Glucocorticoid Receptor in the Olfactory

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9492

ラット嗅覚障害モデルでの嗅上皮における Na^+ , K^+ -ATPase, Na^+ - H^+ exchanger, グルココルチコイドレセプターの発現に関する研究

金沢大学医学部医学科耳鼻咽喉科学講座 (主任: 古川 亙教授)

寺 西 重 和

嗅覚障害は従来その重要性が認識されにくい面があったが、生活の質を求める現代において徐々に重要視されてきている。臨床的に、鼻汁分泌過多とともに嗅覚が低下することはしばしば経験され、原因として嗅粘膜の炎症性腫脹による気流の障害が考えられるが、その他に嗅上皮性変化として、嗅上皮を覆う粘液 (嗅粘液) の量的な変化とともに粘液の性状の変化による嗅覚障害 (嗅液性嗅覚障害) の存在の可能性が推察される。嗅粘液の電解質濃度はほぼ一定に保たれていると考えられているが、その維持や調整の機構については、従来ほとんど報告されていない。本研究では、その嗅粘液の電解質濃度の維持や調整の機構について検討をした。正常ラットの嗅上皮におけるイオン恒常性維持機構として、ナトリウムポンプである Na^+ , K^+ -ATPase (sodium, potassium-adenosine triphosphatase) を免疫組織化学的染色法により、またナトリウム・プロトン交換輸送体 (sodium-proton exchanger, NHE) を定量的PCR法により検索した。さらに、唾液腺や腎臓においては唾液や尿の電解質調節に Na^+ , K^+ -ATPaseが重要な役割を果たしており、ステロイドがその活性を制御していることと見られていること、また臨床的にもステロイド投与は嗅覚障害に対する重要な治療法であることから、グルココルチコイドレセプターの発現を免疫組織化学的染色法により検索をした。さらに、硫酸亜鉛を点鼻した嗅覚障害モデルでも同様に検討した。正常ラットでは、 Na^+ , K^+ -ATPaseはBowman腺の腺管で最も強く発現が見られ、そのほかにBowman腺の腺房細胞や嗅細胞でも発現が見られた。またNHEの発現では検索した5つのアイソフォームのうちNHE-1が、嗅上皮でその生理的役割が期待できる量のmRNAの発現が確認された。また、グルココルチコイドレセプター抗体は支持細胞の鼻腔側の細胞質で最も強く見られ、そのほかに支持細胞の基底側面の細胞質でも発現が見られた。嗅覚障害モデルでは、嗅上皮の回復過程において嗅上皮の再生とともに Na^+ , K^+ -ATPaseやグルココルチコイドレセプターも再生することが観察され、これは行動学的な観点でも嗅刺激性行動観察法により嗅覚障害の改善が確認された。以上の結果から、嗅粘液の電解質の維持や調節に Na^+ , K^+ -ATPaseやNHE-1が関与し、さらにグルココルチコイドレセプターの制御を受けている可能性が示唆された。

Key words olfactory mucosa, Na^+ , K^+ -ATPase, sodium-proton exchanger-1 (NHE-1), glucocorticoid receptor, olfactory dysfunction

緒 言

嗅覚は視覚、聴覚、味覚、触覚とともに人間の五感のなかの一つである。しかし、嗅覚が視覚や聴覚のようにヒト社会生活に必要なコミュニケーションの手段になることは稀であり、またその障害も他人には理解されにくいことから、その重要性は認識されにくい面があった。しかし、嗅覚障害によってガス漏れ、火災や食品の腐敗に気づきにくいなど、直接生命や身体に影響を及ぼすことさえあり、また日常生活上も食欲の低下、調理意欲の低下を招き¹⁾、嗅覚の重要性は生活の質を求める現代においてますます重要視されてきている。

嗅覚障害²⁾の原因 (表1) をまとめた三輪の報告³⁾によれば、

545例中、鼻副鼻腔疾患が29%と最も多く、次いで感冒罹患後が22%、頭部外傷が15%、頭蓋内疾患が5%、薬物、有毒物質によるものが2%となっている。しかしながら、嗅覚受容器の末梢や中枢に明らかな異常の見出せない、特発性や原因不明に分類されるものが26%もあり、その病態には不明な点が多いのが実情である。

嗅覚障害に対する治療法は、原因となる疾患が特定できればその治療を行うのが原則である。しかしながら、感冒罹患後や特発性などの原因のはっきりしない例では、その原因に対する特異的治療は困難である。このような症例の多くには初期治療としてステロイド剤の点鼻や内服が行われており⁴⁾、その有効性も既に報告されている^{4)~7)}。ステロイドには多種多様の薬理

平成12年9月20日受付, 平成12年11月10日受理

Abbreviations: Ct, threshold cycle; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Na^+ , K^+ -ATPase, sodium, potassium-ATPase; NHE, Na^+ - H^+ exchanger; PFA, paraformaldehyde

Table 1. Classification of olfactory dysfunctions that complicate diseases

Olfactory dysfunctions	Cause diseases
Respiratory smell disorders	Allergic rhinitis Chronic sinusitis Hypertrophic rhinitis
Peripheral smell disorders	Chronic sinusitis Post common cold Drug induced
Combined smell disorders	
Central smell disorders	Head injury Intracranial disease

作用があるが、嗅覚障害に対するステロイド療法⁹⁾はそのうちの強力な抗炎症作用を期待した治療法とされる。しかし、炎症所見の見られない嗅覚障害例でもステロイド療法により嗅覚障害の改善するものが散見され、単なる抗炎症作用以外の作用機序が働いていることも考えられる。

臨床的に、感冒罹患時やアレルギー性鼻炎時に鼻汁分泌過多とともに嗅覚が低下することはしばしば経験される。原因として嗅上皮の炎症によるニオイ物質の伝搬障害が考えられるが、その他に嗅上皮の存在する嗅裂が開放している症例では、嗅覚受容の最末梢に位置する嗅上皮を覆う粘液(嗅粘液)の量的な変化とともに、粘液の性状の変化による嗅覚障害(嗅液性嗅覚障害)の存在の可能性が推察される。嗅粘液の生理的役割として、嗅上皮にかかる浸透圧調整やウイルス感染を防ぐための免疫系を有し、またその電解質濃度はほぼ一定に保たれていると考えられている。そのNa⁺イオン濃度は50~60 mMで、呼吸上皮を覆う粘液の128~150 mMとは大きく異なっていると報告されている⁹⁾¹⁰⁾。嗅上皮においてNa⁺イオン濃度が低く保たれていることは、内耳蝸牛の内リンパ液と同様に嗅覚受容に何らかの役割を果たしている可能性が推測される。この嗅粘液の電解質濃度の維持や調整の機構については、従来ほとんど報告されていない。

一般に、イオンの恒常性維持機構として他の組織で知られているものに、イオンポンプ(ion pump)とイオン交換輸送体(ion exchanger)が挙げられる。

細胞内環境を維持するのに最も重要なイオンポンプはナトリウムポンプであり、Na⁺イオンとK⁺イオンの能動輸送を行っている。Na⁺、K⁺-ATPase (sodium, potassium-ATPase)は細胞膜のナトリウムポンプに存在し、その細胞内イオン環境(低ナトリウム、高カリウム)を維持する機能を担っている酵素である。またナトリウム・プロトン交換輸送体(Na⁺-H⁺ exchanger, NHE)は細胞膜に存在する膜蛋白で、細胞外のNa⁺イオンと細胞内のH⁺イオンを1対1で交換し¹¹⁾、細胞内pHの調整、細胞の容積の調節、細胞を介してのNa⁺イオンの吸収などの働きを持っている¹²⁾¹³⁾。

本研究は、嗅粘液の電解質の濃度調節維持機構の点から嗅上皮におけるNa⁺、K⁺-ATPaseとNHEの発現¹⁴⁾を検討し、また嗅覚障害におけるステロイドの作用機序を考察するために、グルココルチコイド受容体の発現についても併せて検討した。

対象および方法

I. 免疫組織化学染色による検討

1. 対象

生後4~5週齢の体重100~150 gのWistar系雄性ラット(日本チャールスリバー、横浜)を各群4匹、対照4匹の計24匹を使用した。動物の取り扱いには金沢大学医学部附属動物実験施設の動物実験指針に従い、動物に苦痛を与えぬように十分に配慮をした。

2. 組織採取

組織採取にあたり、ペントバルビタール(ネンブタール®, 大日本製薬、大阪)の100 mg/kg腹腔内投与による麻酔後、開胸して経心的に灌流固定を行った。灌流液には0.01 M PBSを、固定液には4%パラホルムアルデヒド(paraformaldehyde, PFA) PBS溶液を使用した。灌流固定後組織採取のため断頭し、24時間PFA固定液にて固定した後12%EDTA水溶液にて脱灰、アルコール上昇系列にて脱水後d-リモノン(Hemo-De®, 藤沢薬品工業、大阪)で透徹した後パラフィン包埋し、マイクロームにて前額断方向の厚さ2 μmの切片を作製した。

3. 免疫組織化学的検討

免疫染色はデキストランポリマー法にてスライドガラス上で行った。パラフィン切片は脱パラフィンした後、3%過酸化水素水にて10分間内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した。非特異的反応を阻害するために、1%ウシ血清アルブミン加Tris-HCl(50 mM tris-buffered saline)を10分間反応させた後、一次抗体を24時間反応させた。一次抗体はウサギ抗ラットNa⁺、K⁺-ATPase β-1抗体(Upstate Biotechnology Inc, Lake Placid, USA)、ウサギ抗ヒトグルココルチコイドレセプター抗体(Affinity bioreagents, Inc, Golden, USA)をそれぞれ100倍、200倍希釈で使用した。二次抗体として、パーオキシダーゼ標識デキストラン結合ヤギ抗ウサギIgG抗体(ダコ・ジャパン、京都)を使用し、30分間反応させた後30% 3, 3'-ジアミノベンチジン四塩酸塩(3,3'-diaminobenzidine) 過酸化水素加Tris-HClにて3~10分間発色反応を行った。対比染色として、マイヤーヘマトキシリン溶液(和光純薬工業、大阪)にて30秒間後染色した。

4. 嗅刺激性行動観察法¹⁵⁾¹⁶⁾

嗅覚障害の評価のために、行動学的観察方法としてシクロヘキシミド(cycloheximide)を利用した嗅刺激性行動観察法を行った。

シクロヘキシミド水溶液はラットにとって特有のニオイと不快な味を持つとされ、ラットは一度その味を経験するとシクロヘキシミド水溶液の持つニオイを記憶し、その後はそのニオイを嗅いだだけでシクロヘキシミド水溶液を忌避するようになる¹⁷⁾ため、駆鼠剤として用いられている薬剤である。

ラットは12時間毎の昼夜周期で通常の固形飼料を任意に与えたが、ラットを渴の状態にするために48時間絶飲させた後、ラット飼育ケージに0.01%シクロヘキシミド水溶液の入った給水瓶と蒸留水を入れた給水瓶を備えた。この飼育ケージにラットを1匹ずつ入れ、ラットがどちらの給水瓶から飲水するかを、10分間以内の観察時間で各ラット最高10試行ずつ調べた。観察中も渴の状態にするために、給水瓶の先端に口をつけると直ぐに給水瓶を取り外して、ラットには1回に極少量の水分しか飲めないようにした。1回毎にGellermann系列¹⁸⁾に従って規

則性のないように、右、左、左、右、左、左、右、右、右、左の順序でシクロヘキシミド水溶液の入った給水瓶の位置を替えた。蒸留水を飲んだ場合を正解とし、シクロヘキシミド水溶液を飲んだ場合を誤りとした。理論的には完全に嗅覚を失った動物での正答率は50%となる。以上を第1回目の学習とした。第1回目の学習終了後、ラットに十分な飲水をさせた後、給水瓶を外し水分を与えないようにして48時間後に同様の実験を行い、第2回目とした。学習を完全なものとするために、誤りが出なくなるまでこれを繰り返し、どのラットも3~4回の学習で最終的に誤りが出なくなった。嗅刺激性行動の観察は条件を一定にするために、すべて17時から20時の間に脱臭装置のある中で行った。

5. 嗅覚障害モデルの作製

シクロヘキシミド水溶液による学習終了後24時間に、5%硫酸亜鉛水溶液を点鼻した。点鼻にあたっては、ラットを仰臥位にして頭部を固定し、1 ml注射器に20 ゲージ留置針(サーフロー®, テルモ, 東京)の外套針を接続し、両側鼻腔にそれぞれ0.2 mlずつ点鼻した。硫酸亜鉛水溶液が十分に嗅上皮に達するために、10分間仰臥位のままにした。

6. 組織採取

上記の方法に従って作製した嗅覚障害ラットを、硫酸亜鉛水溶液点鼻後2, 5, 8, 14, 21日目に、対照群と同様にしてパラフィン切片を作製した。

II. 定量的PCR法¹⁶⁾による嗅上皮におけるNHE発現の検討

1. 対象

生後6~8週齢の体重180~220 gのWistar系雄性ラット(日本チャールスリバー, 横浜)を3匹使用した。

2. 嗅上皮の採取

ラットはペントバルビタール(ネンブタール®, 大日本製薬, 大阪)の100 mg/kg腹腔内投与による麻酔後、開胸して経心的に灌流固定を行った。灌流液には氷冷PBSを、固定液にはmRNAの崩壊を防ぐために氷冷アセトン(和光純薬工業)を使用した。灌流固定後、組織採取のため頭部を摘出して正中で離断し、鼻中隔面から嗅上皮を摘出した。採取した組織の一部は後固定の後パラフィン包埋して、通常のHE染色を行い、嗅上皮であることを組織学的に確認しておいた。また嗅上皮と同時に、腎臓、小腸、大腸、脳、心臓、脾臓も摘出した。摘出した組織は液体窒素内で急速凍結され、次の実験開始まで-80℃の

冷凍庫内で保存された。

3. mRNAの抽出とcDNAの作製

保存された組織は、それぞれ20~50 mgをQuickPrep® Micro mRNA Purification Kit (Amersham pharmacia biotech, Piscataway, USA)を用いてmRNAを抽出した。その概要は、グアニジウムチオシアネート(guanidinium thiocyanate)とN-ラウロイルサコシン(N-lauroyl sacosine)を含む緩衝液中で組織を超音波にて(UR-20P, トミー精工, 東京)破碎した後、オリゴ(dT)セルロース(oligo(dT)-cellulose)にm-RNAを吸着させた。その後、高塩濃度緩衝液(high-salt buffer, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.5M NaCl, pH7.5)と低塩濃度緩衝液(low-salt buffer, 10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl)で各5回洗浄し、遠心した後、400 µlの溶出緩衝液(elution buffer, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)でmRNAを溶出させた。

ここで得られた溶液はDNAの混入を防ぐため、DNase I(宝酒造, 大津)で処理した。すなわち180 µlのmRNA液に、20 µlの10X DNase I緩衝液[0.5 M Tris緩衝液, (pH7.5) 0.1 mM MgCl₂, 1 mM ジチオトレイトール, 50 µl/ml 仔牛血清アルブミン], 5 µlのDNase I (5 units/µl), 5 µlのRNase 阻害剤(宝酒造, 大津)を加えて37℃で30分間処理した。続いてフェノール抽出し、2.5 M酢酸カリウム(pH 7.5)を加えて95%エタノールで30分以上、-20℃で沈殿させた。その沈殿を50 µlのRNase除去水で溶解した。

そのmRNA溶液はFirst-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham pharmacia biotech)にてcDNAに逆転写した。概略はmRNA溶液にランダムヘキサデオキシヌクレオチド(random hexadeoxynucleotides), マウス由来逆転写酵素(Murine reverse transcriptase)を加え、37℃, 1時間反応させ、最後に90℃, 5分間にて逆転写酵素を失活させた。

4. 定量的PCR法

1) プローブとプライマーの選択

先に得られた、cDNA溶液はβ-アクチンのプライマー(Promega, Madison, USA)にて通常のPCR法を40サイクル行い、体細胞DNAの混入によるバンドが出現しないことを確認したうえで使用した。

定量的PCR法は、ABI Prism 7700 sequence detection system (PE Applied Biosystem, Foster, USA)を用いた。遺伝子発現の内蔵性コントロールとしては、グリセロールデヒドロリン酸脱水素酵素(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,

Table 2. Primers and Probes

NHE	Forward primer	Reverse primer	Probe
1	5'-CACAGTTCCTGGACCACCTTCT-3'	5'-CTTCCAGTGATGGTGGCCATA-3'	5'-(5-carboxyfluorescein [FAM]) -ACAGGCATCGAGGACATCTGTGGTCA -(N,N,N,N'-tetramethyl-6 carboxyrhodamine[TAMRA])
2	5'-GTACTCAATTTGCAGCCAGG-3'	5'-TAGGCTGGTGGGCTTTCTTT-3'	5'-(FAM-CAGGCGCTTCTTGGCAGATCAGTTCT-TAMRA)
3	5'-TGAGGATGAGAAGCAGGACAAG-3'	5'-GCCCAGCTTAGCCGACTTAAG-3'	5'-FAM-AGATCTTCCACAGGACCATGCGGA-TAMRA-3'
4	5'-GAATCCACAGGTAACCCATGCT-3'	5'-CAAATCTTCTCCACCATGGCC-3'	5'-FAM-TTGGCTGCTGCAATTCCTCCTGTG-TAMRA-3'
5	5'-GCTCGAGTCTTTAAGTCCACCA-3'	5'-CTTCTTCTTATGGCCGGTCTTG-3'	5'-FAM-TTTCACCAAGAGCAAACCTCGACCC-TAMRA-3'

GAPDH) の発現を指標とした (TaqMan® Rodent GAPDH Control Reagents, PE Applied Biosystem)。

NHEの遺伝子配列は、インターネットでEntrez-Nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez>) からダウンロードした。NHEの遺伝子で各アイソフォームで遺伝子配列の特異性が高いC末端側から700-800 bpの塩基配列を用いて、パーソナルコンピュータでPrimer Express (PE Applied Biosystems) を用いてプライマーとプローブを選択した(表2)。使用したプライマーは宝酒造(大津)から、プローブはパーキンエルマージャパン(浦安)からそれぞれ購入した。

2) ABI PRISM 7700による定量的PCR法

本法では96穴プレート内の各ウエルでそれぞれプライマーとプローブの存在下にPCR反応を行い、PCR反応の進展にともない、5'ヌクレアーゼ活性をもったTaqポリメラーゼがプローブを分解する。そのときプローブの分解前ではアルゴンレーザー光線にて励起されるリポーターの6-カルボキシフルオロセイン(6-carboxyfluorescein)の蛍光が、6-カルボキシテトラメチルローダミン(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine)の蛍光によって打ち消されるが、PCR反応の進行とともにプローブが分解され蛍光シグナルが増加することによりPCR産物の生成をモニターする。このようにして各ウエルについてPCRの反応回数と、PCR生成物の量を反映する蛍光強度を記録する。これにより得られたPCR増幅曲線から、PCR産物が指数関数的に増幅する最初のサイクル数を閾値サイクル(Threshold cycle, Ct)とし、このCt値は対象とする遺伝子のPCR反応開始前の初期量を反映する。これにより各サンプルの遺伝子のコピー数の相対値が求められる。これを発現が各組織で一定した発現をする遺伝子、すなわち β -アクチンやグリセロアルデヒドリン酸脱水素酵素(GAPDH)遺伝子の発現量で標準化することにより、各遺伝子の発現状態が比較可能になる。

ABI Prism 7700を用いたPCR反応は、以下の条件で行った。各ウエルには、cDNAサンプル、10 X Taqman緩衝液(5 μ l)、各200 μ M dATP, dCTP, dGTPと400 μ M dUTP, 5 mM MgCl₂, AmpliTaq Gold 1.25単位、AmpEraseウラシルN-グリコシラーゼ(uracil N-glycosylase, UNG) 0.5単位(PE Applied Biosystem)を加え、プライマーを300 nM、プローブを200 nMの濃度になるようにして全量を50 μ lとした。サーマルサイクラーは50℃、2分間、95℃、5分間の後、50サイクルの95℃、15

秒、60℃、1分間の増幅を行った。

各サンプルの遺伝子のコピー数の比較を容易にするために、腎のmRNAを1倍、4倍、16倍、64倍、256倍に希釈し、標準曲線を作成した。1つのmRNAサンプルは一回の計測について3ウエルにて行われ、日を変えて3回計測して、各個体の平均値と標準偏差を求めた。各部位ごとの比較を容易にするために、腎におけるそれぞれの計測値をNHE/GAPDH=1として計算した。

成 績

I. 正常ラットにおける観察

1. 正常ラットのHE染色

正常ラットの鼻粘膜嗅部は嗅上皮と粘膜固有層から成り、嗅上皮は嗅細胞、支持細胞、基底細胞から構成されていた。嗅上皮下の粘膜固有層内にはBowman腺の腺房細胞が認められた(図1)。

2. Na⁺, K⁺-ATPase抗体の発現様式

正常ラットの嗅上皮を、Na⁺, K⁺-ATPase抗体を一次抗体とする免疫染色にて観察した(図2)。嗅上皮のなかで最も強く発現

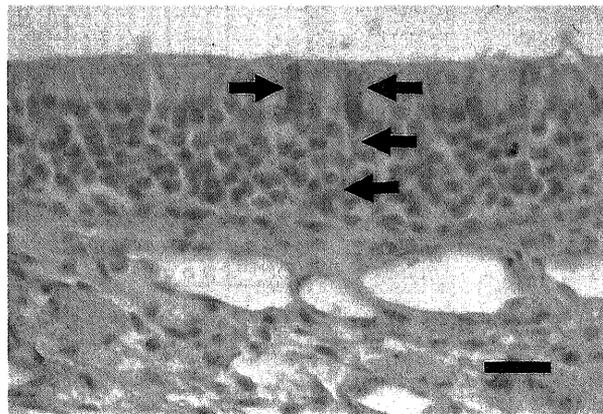


Fig. 2. Na⁺, K⁺-ATPase staining of normal olfactory epithelium. Ductal cells of the Bowman's gland showed strong immunoreactivity (black arrows). Scale bar indicates 20 μ m.

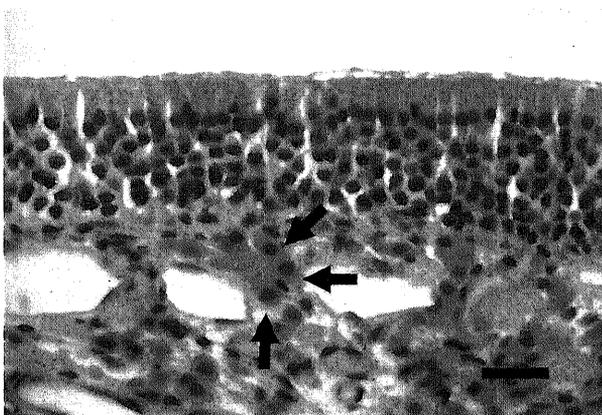


Fig. 1. Normal olfactory epithelium in the control rat. Black arrows indicate acinar cells of Bowman's gland. (Hematoxylin-Eosin stain) Scale bar indicates 20 μ m.

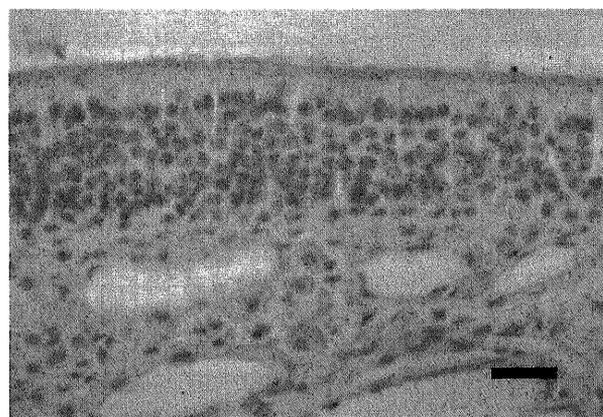


Fig. 3. Glucocorticoid receptor staining of normal olfactory epithelium. The cytoplasm of the olfactory supporting cell facing to the nasal cavity showed strong immunoreactivity. Scale bar indicates 20 μ m.

Table 3. Summary of immunohistochemically expression in control rats

Location	Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	Glucocorticoid receptor
Supporting cell		
Apical surface	-	++
Basolateral surface	-	+
Olfactory cell	+	-
Bowman's gland		
Duct	++	-
Acinar cell	+	-

Expression was graded. ++, strong; +, weak; -, faint or absent.

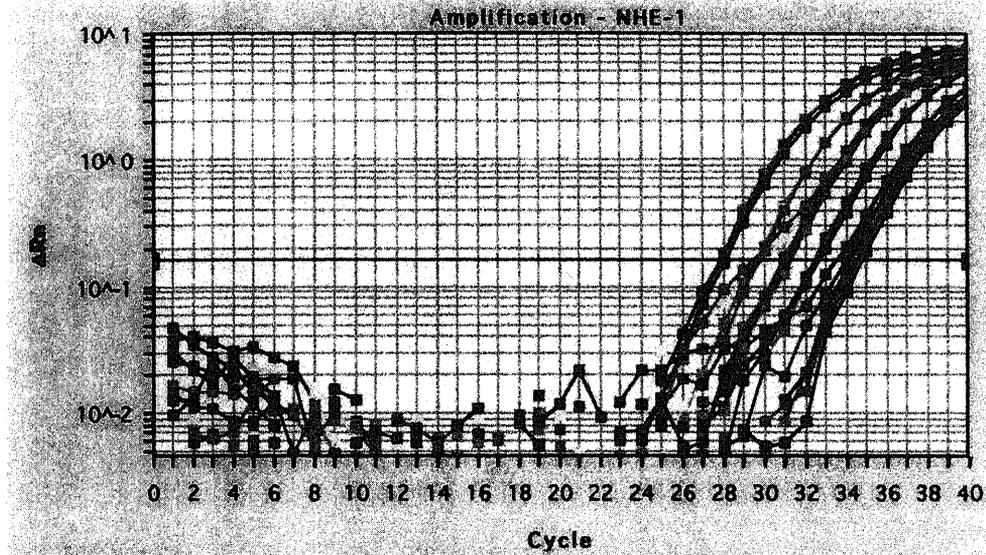


Fig. 4. Amplification plots for quantitative RT-PCR reactions with the starting sodium/proton exchanger (NHE) gene copy number. Changes in normalized reporter signal (ΔR_n) are plotted vs. cycle numbers.

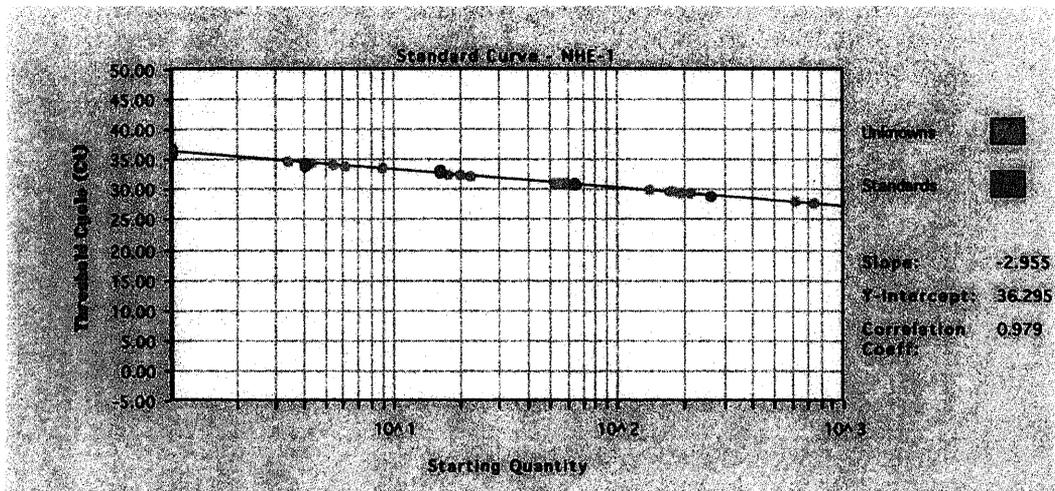


Fig. 5. Standard curve plotting log starting copy number vs. Ct (threshold cycle). The black dots represent the data for standard samples plotted in duplicate and the red dots the data for unknown genomic DNA samples plotted in triplicate.

Table 4. Relative abundance of NHE-1, NHE-2, NHE-3, NHE-4, and NHE-5 message normalized to GAPDH

Site	NHE-1	NHE-2	NHE-3	NHE-4	NHE-5
Olfact	0.51±0.053	0.57±0.27	0.0089±0.00011	0.27±0.13	4.3±1.0
Kidney	1.0±0.045	1.0±0.20	1.0±0.19	1.0±0.04	1.0±0.36
Small int.	3.8±0.23	180±2.7	5.0±1.1	0.44±0.070	160±5.0
Colon	5.0±0.53	40±4.0	0.16±0.046	0.022±0.015	33±4.7
Brain	1.3±0.16	4.0±1.1	0.047±0.00061	12±0.46	290±31
Heart	7.3±2.0	1.3±0.84	0.028±0.014	4.4±2.7	230±38
Spleen	3.5±0.22	3.6±0.89	0.11±0.036	30±0.8	410±16

GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Olfact, olfactory epithelium; Small int, small intestine. Values are $\bar{x} \pm SD$ of 3 independent observations.

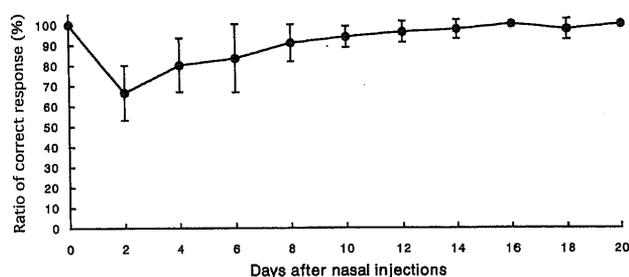


Fig. 6. Mean percentage of correct response in olfactory epithelia damaged rats that were made irrigation with zinc sulphate. Test means the training of rats to discrimination between a 0.05% cycloheximide solution and distilled water. Data are given as $\bar{x} \pm SD$.

を認めたのは、Bowman腺の腺管であった。そのほかにBowman腺の腺房や上皮下の嗅神経束で発現を認めた(表3)。

3. グルココルチコイドレセプター抗体の発現様式

正常ラットの嗅上皮を、グルココルチコイドレセプター抗体を一次抗体とする免疫染色にて観察した(図3)。嗅上皮のなかで最も強く発現を認めたのは支持細胞の鼻腔側の細胞質で、支持細胞の側面でもそれより弱い発現を認めた(表3)。

4. 嗅上皮におけるNHEの発現

各計測において良好なPCR反応が計測された(図4)。これらの増幅曲線から、腎のmRNAを希釈して便宜的に作成した標準曲線は、Ct値と初期量との間に良好な相関関係を示した(図5)。これにより得られた各部位ごとの計測値を表4に示す。

NHE-1は心臓において最も発現が高く腎の7.3倍で、最低の嗅上皮の0.51倍に対して14倍であった。NHE-2は最高が小腸で腎の180倍、最低が嗅上皮の0.57倍で320倍の差があった。NHE-3では最高が小腸で腎の5.0倍、最低が嗅上皮の0.0089倍で560倍の差であった。NHE-4では最高が脾臓の30倍で、最低が大腸の0.022でその差は1,400倍であった。NHE-5は最高が脾臓の410倍で、最低が腎で1倍でその差は410倍であった。

以上の結果から、NHE-1は比較的発現の差が少なく各臓器における差が最低であった。NHE-2, 3, 4, 5は最高と最低の差が大きく、臓器特異的な発現様式が観察された。嗅上皮においてはNHE-1以外のNHE-2, 3, 4, 5の発現は非常に低く、積極的な生理的役割を果たしているとは考えにくい結果であった。

II. 嗅覚障害モデルにおける嗅刺激性行動観察(図6)

硫酸亜鉛水溶液点鼻前は学習により100%の正答率であったが、点鼻によりどのラットでも正答率の低下が見られ嗅覚障害が引き起こされていた。点鼻後2日目では平均66.5%と最も悪い正答率であったが、その後は4日目に80.0%、6日目に83.3%、8日目に90.8%、10日目に93.8%と徐々に正答率が上昇し、14日目に97.5%、16日目に100%と、嗅覚は硫酸亜鉛点鼻前の状態とほぼ同様に回復した。

III. 嗅覚障害モデルにおける組織観察

1. HE染色

正常群(図7A)に比べ、硫酸亜鉛水溶液点鼻後2日目では嗅上皮は脱落しており、基底細胞は非連続的に残存していた。粘膜固有層には血管の拡張が見られた(図7B)。5日目では、基底細胞は連続的になり、再生嗅上皮細胞が密になって増殖が見られたが、支持細胞はまだ見られなかった。Bowman腺もほとんど見られなかった(図7C)。8日目になると、再生した支持細胞も見られるようになり、またBowman腺も再形成された(図7D)。14日目になると、嗅細胞の層数がやや少ないもののその他は正常群と変わらなかった(図7E)。21日目では正常群と変わりはなかった(図7F)。

2. 免疫組織化学染色

1) Na⁺, K⁺-ATPase抗体

Na⁺, K⁺-ATPase抗体は正常群ではBowman腺の腺管で強く染色されていた(図8A)が、嗅上皮の脱落した硫酸亜鉛水溶液点鼻後2日目では残存した基底細胞のほか上皮下の嗅神経束で染色が見られた(図8B)。点鼻後5日目で再生嗅上皮細胞が見られるようになると、再生嗅上皮細胞でも染色された(図8C)。点鼻後8日目で支持細胞が見られるようになってくると、Bowman腺の腺管で染色が認められるようになった(図8D)。点鼻後14日目以降でも腺管への染色は認められた(図8E, F)。

2) グルココルチコイドレセプター抗体

グルココルチコイドレセプター抗体は正常群で支持細胞に強く染色されていた(図9A)が、支持細胞の脱落している硫酸亜鉛水溶液点鼻後2日目では残存基底細胞に染色が見られ(図9B)、5日目ではほとんど染色陽性細胞は観察されなかった(図9C)。点鼻後8日目で支持細胞が再生されるようになると、支持細胞遊離面で染色されるようになった(図9D)。点鼻後14日目、21日目では、染色傾向は正常群と同じであった(図9E, F)。

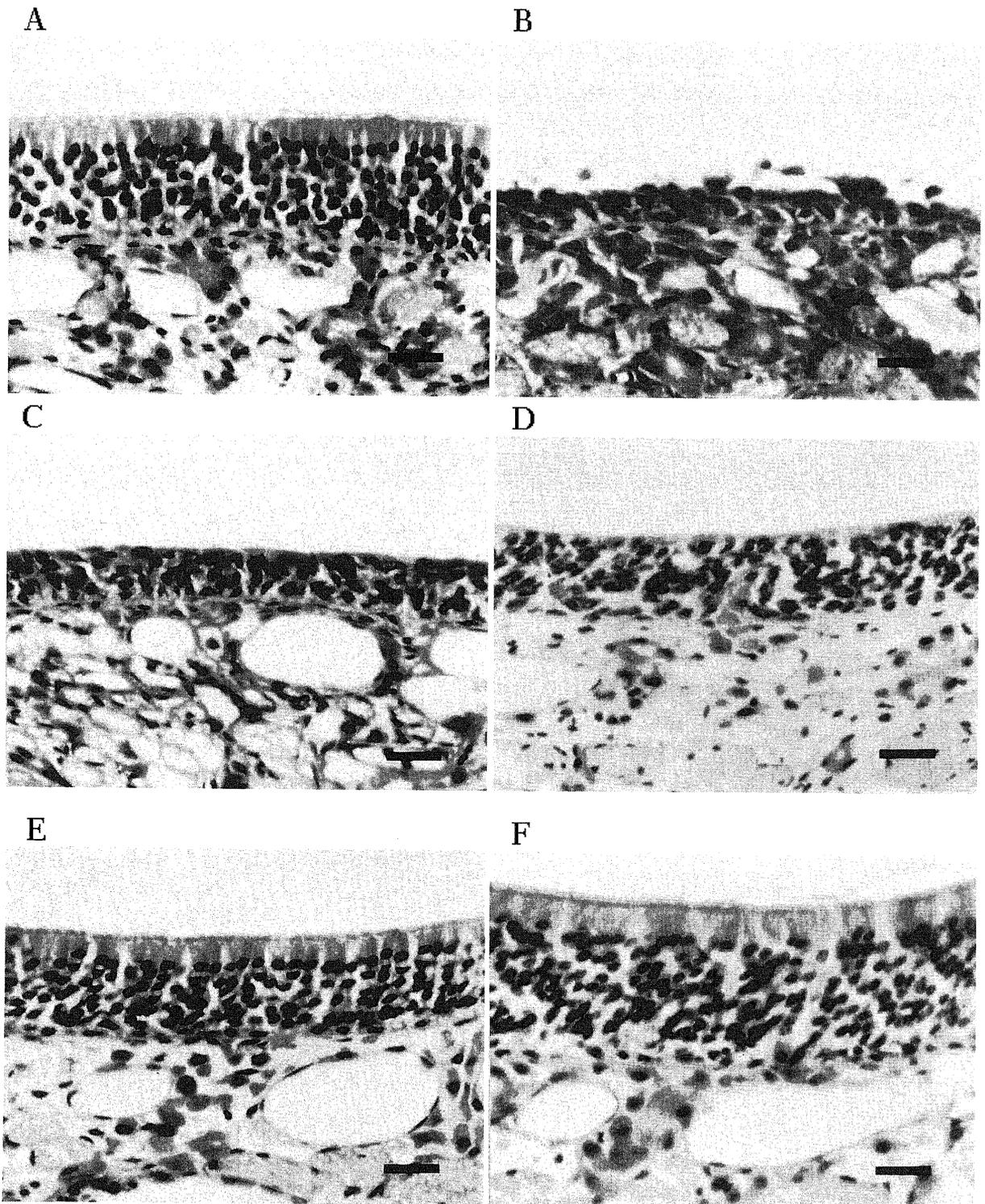


Fig. 7. Photomicrographs of sections through olfactory epithelia in control rat (A), and damaged rat, 2 (B), 5 (C), 8 (D), 14 (E), 21 days (F) after damaged with zinc sulphate, stained with hematoxylin-eosin. Scale bars indicate $20\ \mu\text{m}$.

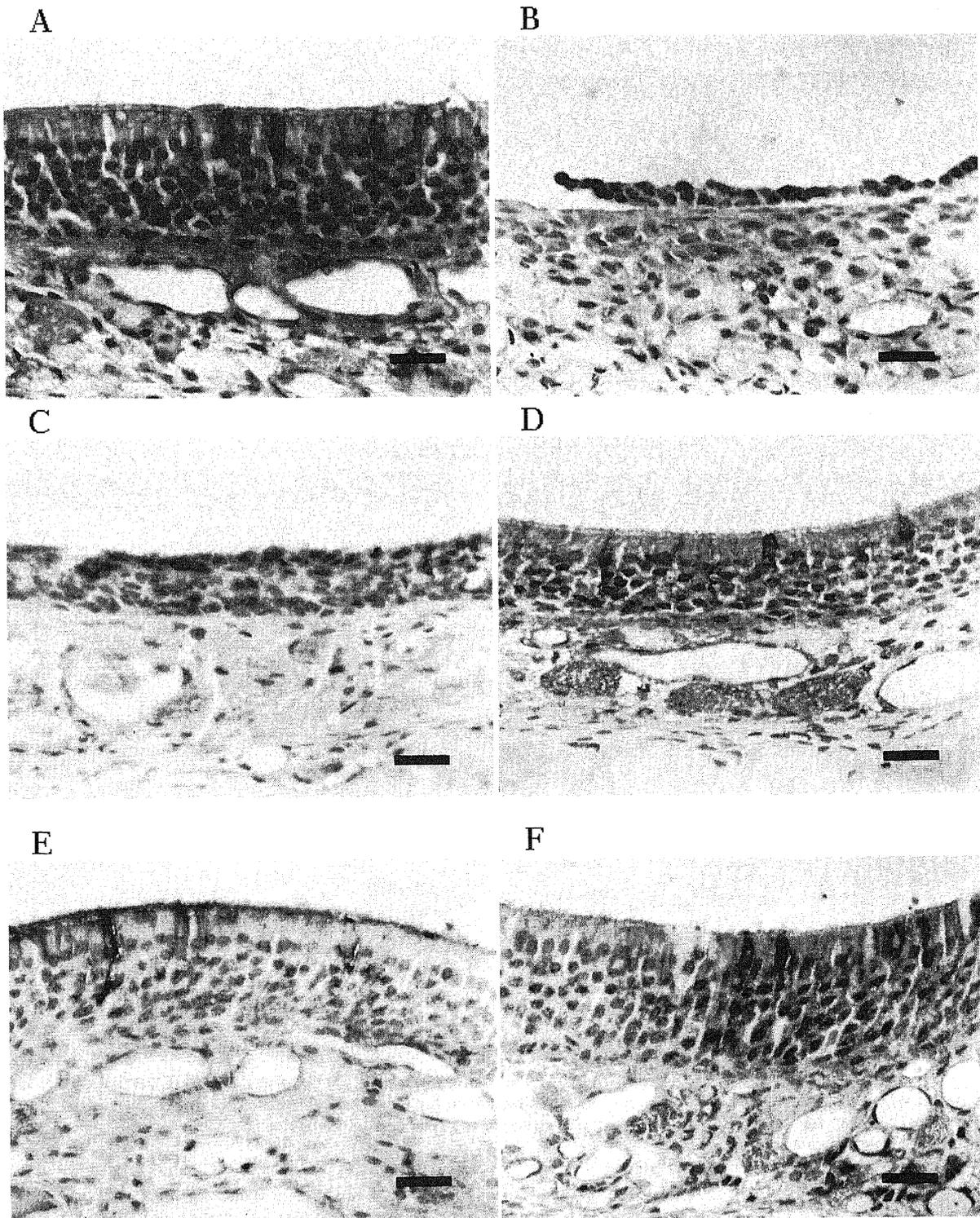


Fig. 8. Photomicrographs of sections through olfactory epithelia in control rat (A), and damaged rat, 2 (B), 5 (C), 8 (D), 14 (E), 21 days (F) after damaged with zinc sulphate, immunohistochemically stained for Na⁺, K⁺-ATPase β -1 antibody. Note the increased Na⁺, K⁺-ATPase immunoreactivity in ducts of Bowman's gland, with the progress in recovery of olfactory epithelium in damaged with zinc sulphate. Scale bars indicate 20 μ m.

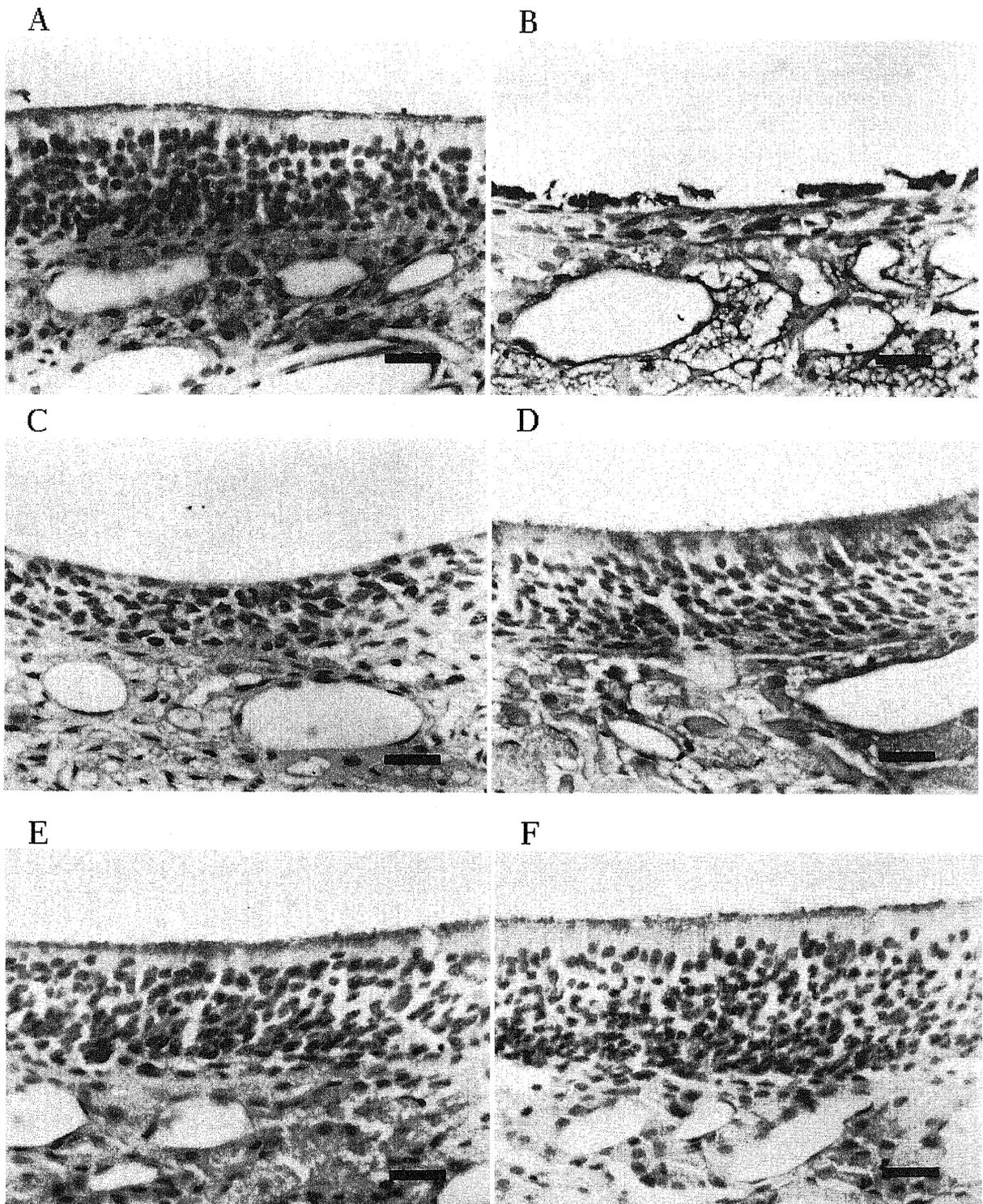


Fig. 9. Photomicrographs of sections through olfactory epithelia in control rat (A), and damaged rat, 2 (B), 5 (C), 8 (D), 14 (E), 21 days (F) after damaged with zinc sulphate, immunohistochemically stained for glucocorticoid receptor antibody. Note the increased glucocorticoid receptor immunoreactivity in supporting cells, with the progress in recovery of olfactory epithelium in damaged with zinc sulphate. Scale bars indicate 20 μ m.

考 察

ニオイを呈する化学物質の数は20万種とも言われており、その構造は多種多様である。嗅上皮の表面は通常数 μ mから

100 μ mの厚さの粘液層に覆われており、ニオイ分子は粘液層に一旦溶けないと嗅細胞に達しない。嗅細胞の先端の嗅小胞から遊離面に数多くの嗅線毛が伸びているが、ニオイ分子は粘液層内の嗅線毛膜あるいは嗅小胞膜で受容される。嗅上皮には多

数のBowman腺が存在し、その腺管は嗅細胞の間に散在しており、ここから嗅粘液が分泌されている¹⁹⁾。嗅細胞がニオイ刺激を受けると嗅細胞膜にある種々のイオンチャンネルを通してイオン交換が起きるとされているが、ニオイ刺激後のイオンの状態を元に回復させる恒常性維持機構が嗅上皮に備わっていないと推定される。

Na⁺, K⁺-ATPaseは全ての動物細胞の細胞膜に存在するが、特に腎臓と脳で最も強く発現し²⁰⁾ATPを分解して細胞内Na⁺イオンと細胞外K⁺イオンの能動輸送を行い、細胞内イオン環境(低ナトリウム, 高カリウム)を維持する機能を担っている酵素である。また腎臓, 腸管, 腺などの組織の細胞では、この他にイオンの能動輸送を活発に行うことによりイオン, 水などの吸収, 分泌に貢献していると考えられている²¹⁾。Na⁺, K⁺-ATPaseは2つのサブユニットから成り、分子量約10万の α 鎖と分子量約5.5万の糖蛋白質である β 鎖がほぼ1:1の割合で結合している²²⁾²³⁾。cDNAクローニングの研究から、広い動物種にわたって α 鎖には $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ の3種のアイソフォームが、 β 鎖には $\beta 1$, $\beta 2$ の2種のアイソフォームが存在することが明らかとなっている²⁰⁾²⁴⁾が、その中で $\beta 1$ サブユニットは比較的多くの組織に存在している。Na⁺, K⁺-ATPaseの機能に関する部位はほとんど α 鎖に存在する²²⁾²⁵⁾が、 β 鎖はNa⁺, K⁺-ATPaseの活性発現には必要不可欠で、 α 鎖と結合して α 鎖の構造を安定化し、その細胞膜への輸送に関与していると推定されている²⁶⁾²⁷⁾。気道上皮のイオン輸送についてはこれまで主に気管を用いて研究が進められてきた^{28)~32)}。気管のイオン輸送は上皮細胞の基底側膜に存在するNa⁺, K⁺-ATPaseによって惹起され、主にNa⁺イオンが吸収, Cl⁻イオンが分泌され、この吸収, 分泌の比率によって上皮を介しての浸透圧差が生じ、管腔への水分の供給をもたらすことが明らかにされている²⁹⁾。嗅上皮では嗅粘液はBowman腺から分泌されるので、気道への水分供給の点では同じ気道上皮でも相違が見られる。

唾液腺や腎臓でのNa⁺再吸収, K⁺排出は、全身性コルチコステロイドによってNa⁺, K⁺-ATPaseの活性を調節することにより制御されているとの報告^{33)~36)}がある。唾液腺の腺房細胞においては、Na⁺, K⁺-ATPaseは唾液の分泌初期や腺管内でのNa⁺イオン濃度調節に必要とされており³⁷⁾、更にコルチコステロイドがこのNa⁺, K⁺-ATPase活性を調節し、唾液のイオン含有量を変化させるとされる。唾液腺の腺房細胞の基底側面に沿って存在するNa⁺, K⁺-ATPase³⁸⁾の作用によって腺房細胞から腺管内に原唾液が分泌され、これが腺管を通過する間に腺管細胞の基底側面に沿って存在するNa⁺, K⁺-ATPaseの作用によりNa⁺の再吸収とK⁺の排出がなされる³⁷⁾。更に、唾液腺にはグルココルチコイドレセプターが多く存在し³⁹⁾、Na⁺, K⁺-ATPase活性がステロイドによって制御されていることも知られている⁴⁰⁾。また腎臓においては、Na⁺, K⁺-ATPase活性増加とNa⁺の再吸収増加作用がほぼ一致して近位尿細管, 髓質ヘンレ系蹄太い上行脚で見られている。

今回の結果により、このことと同様に嗅上皮においてもステロイドがNa⁺, K⁺-ATPaseの活性を調節し、嗅粘液の電解質組成

を制御している可能性が示唆された。Na⁺, K⁺-ATPase $\beta - 1$ 抗体がBowman腺の腺管や腺房細胞で染色されており、この考えを裏付けるものと思われる。しかしながら今回の検討では、Bowman腺の腺房細胞が腺管ほど強く染色されなかったのは、Na⁺, K⁺-ATPaseが腺房細胞には腺管ほど多く存在しないとか、腺房細胞と腺管は機能が違うので α 鎖量と β 鎖量の割合の変化がある可能性などが考えられる。過去の報告でも、Na⁺, K⁺-ATPaseの α 鎖蛋白質量と β 鎖蛋白質量の割合は必ずしも1:1ではなく、組織, 細胞によっては α 鎖過剰の場合⁴¹⁾⁴²⁾や β 鎖過剰の場合⁴³⁾⁴⁴⁾がある。よって、今後Na⁺, K⁺-ATPaseの他のサブユニット抗体での検討の必要性もあると思われた。

グルココルチコイドは、一般に他のステロイドホルモンと同様に単純拡散により細胞膜を通過したのちグルココルチコイドレセプターと結合、この結合物が核内に移動し特定のDNA鎖(glucocorticoid response element)と結合し⁴⁵⁾、遺伝子を活性化させてm-RNAや蛋白を合成してグルココルチコイドの作用を発現する⁴⁶⁾とされている。従って、レセプターとの結合は作用発現に不可欠な第一段階であり、そのホルモン作用は標的細胞中のグルココルチコイドレセプター数及び親和性によって規定されるので、レセプターの増減はグルココルチコイドの作用発現に大きな影響を及ぼしている。

今回の研究によりグルココルチコイドレセプターが嗅上皮に多数存在することが確認されたことから、グルココルチコイドの嗅上皮における作用機序として、このレセプターを介するNa⁺, K⁺-ATPaseなどの活性調節機構の存在の可能性が示唆された。しかしながら支持細胞そのものではNa⁺, K⁺-ATPaseの発現は弱く、また支持細胞から腺房や腺管細胞に対してどのような情報伝達が行われるかは、現在のところ全く不明である。

NHEは細胞膜に存在する蛋白で、細胞外のNa⁺イオンと細胞内のH⁺イオンを1対1で交換する¹¹⁾が、イオン輸送の駆動力にはNa⁺, K⁺-ATPaseによって作り出された細胞内外のNa⁺イオン濃度勾配を用いている。その役割は現在まで判明しているものでは、細胞内pHの調整、細胞の容積の維持、細胞の増殖・分裂に際しての活性化⁴⁷⁾、細胞を介してのNa⁺の吸収などである¹²⁾¹³⁾。また、NHEには現在までにNHE-1からNHE-5までの5種類のアイソフォームの存在が明らかにされている。NHE-1は全ての細胞に普遍的に存在し、上皮性細胞では基底側膜に存在し⁴⁷⁾、細胞内pHを維持するハウスキーピング的な働きをしていると考えられている。一方NHE-2, NHE-3は腸管や腎の上皮性細胞の管腔側に多く発現し、Na⁺の吸収に積極的に関与している⁴⁸⁾⁴⁹⁾ものと考えられている。NHE-4は胃や腎以外に子宮や脳, 骨格筋でも比較的多く発現が報告されており、腎では集合管の高浸透圧下でのNa⁺イオンの再吸収を司っており、特殊な条件下で働く特に分化したアイソフォームである⁵⁰⁾。NHE-5は脳, 脾臓, 肺での高発現が報告されており、神経系での特異的役割が示唆されている⁵¹⁾⁵²⁾が詳細な機能については不明である。

今回の我々の検索の結果からは、NHE-1が他の組織と比較してやや低めではあるが、生理的な役割を期待できる発現が確認された。他のアイソフォームは発現の高い臓器に比して発現が100倍以下で、何らかの生理的な機能が期待できるほどの発現はみられなかった。NHE-2, NHE-3に関しては嗅上皮がNa⁺イオンなどの電解質の再吸収にかかわる臓器ではないことから妥当な結果であると考えられる。NHE-4やNHE-5については

脳での高発現も報告されている⁵²⁾が、嗅上皮は知覚の一次ニューロンが存在するところなので、脳とは発現様式が異なっているものと考えられる。

NHE-1の嗅覚上皮での発現は、内耳の蝸牛における外有毛細胞⁵³⁾、前庭の暗細胞⁵⁴⁾、内リンパ嚢の上皮細胞⁵⁵⁾での発現が確認されていることと類似しており、興味深いものである。すなわち、NHE-1はこれら感覚器細胞の恒常性の維持に働いていることが推測される。そのいずれもが、細胞に対するアミロライド負荷やH⁺負荷実験からNHE-1の発現を推定している。このことは、今回の我々の嗅上皮の結果と一致して興味深い。

今回の我々のNHEの検索は、定量的PCR法によった。この方法は測定感度が高く、測定範囲が広いので、最近本法を利用したm-RNA定量実験の報告が多くされるようになってきている⁵⁶⁾⁵⁷⁾。従来の標準法であるノーザンブロット法に比して、少量のm-RNA量で測定が可能であることや、放射性同位元素を使わなくてもよいという利点があげられる⁵⁶⁾⁵⁷⁾。今回の我々の測定結果は、種々の臓器において過去の報告とよく一致した。また各個体における3回の測定値のばらつきは小さく、再現性の高い測定であったと言える。特異的なプライマーとプローブを組み合わせて使用し、またそれぞれのNHEのアイソフォームで特異性の高い領域の配列をターゲットにしたため、嗅上皮以外の臓器では過去のRNaseプロテクションアッセイとの結果ともよく一致した。

今回の検索によってNHE-1の発現が確認されたが、これは嗅上皮全体での発現であり、嗅細胞、支持細胞、基底細胞、Bowman腺細胞などが混在している。今後は、特異抗体が入手可能となれば局在を検討する必要があると思われる。

また、われわれはこの蛋白が嗅上皮を覆う粘液の組成の維持に関与している可能性を考えている。今後は様々な嗅上皮の傷害モデルを用いたり、いろいろな薬剤の投与下におけるNHE-1の発現の変化を検討し、その生理的機能を解明していきたい。今回の研究では硫酸亜鉛点鼻による嗅覚障害モデルを作製し、正常群のほかに嗅覚障害群でもNa⁺、K⁺-ATPaseとグルココルチコイドレセプターの発現を検討した。障害群では点鼻障害後の嗅上皮の再生とともに嗅覚障害は改善したが、それは嗅刺激行動観察により裏付けられた。また同時に免疫組織化学染色によって、Na⁺、K⁺-ATPaseとグルココルチコイドレセプターも点鼻障害により一旦見られなくなったが、嗅上皮の再生とともに再び見られるようになった。つまり今回の結果より、嗅上皮障害後に嗅上皮の再生に伴ってNa⁺、K⁺-ATPaseとグルココルチコイドレセプターも同時に再生し、また嗅覚障害も改善していく過程が観察された。よって嗅上皮には、形態的な再生のみならず嗅粘液の分泌や調整維持の面でも再生能力があることが推察された。

結 論

嗅粘液の性状の異常による嗅覚障害の存在を推定し、電解質濃度の維持や調節機構についてラットの正常群と硫酸亜鉛点鼻による嗅覚障害モデルで検討をした。イオンの恒常性維持機構としてNa⁺、K⁺-ATPaseとNHE-1について、またNa⁺、K⁺-ATPaseを制御すると考えられているグルココルチコイドのレセプターについて、嗅上皮での発現を観察し次の結果を得た。

1. 正常ラットの嗅上皮では、Na⁺、K⁺-ATPase抗体はBowman腺の腺管で最も強く発現が見られ、そのほかに

Bowman腺の腺房細胞や嗅細胞でも発現が見られた。

2. 正常群の嗅上皮で、グルココルチコイドレセプター抗体は支持細胞の鼻腔側細胞質で最も強く見られ、そのほかに支持細胞の基底側面でも発現が見られた。

3. 定量的PCR法により、嗅上皮においてNHE-1は生理的役割が期待できる発現が確認された。

4. 硫酸亜鉛を点鼻し、嗅覚障害モデルを作製した。嗅上皮の回復過程において、嗅上皮の再生とともにNa⁺、K⁺-ATPaseやグルココルチコイドレセプターも再生された。行動学的な観点でも、嗅覚障害の改善が確認された。

以上の結果より、嗅粘液の調整維持機構としてNa⁺、K⁺-ATPaseやNHE-1が作用をし、それをグルココルチコイドが制御している可能性が推定され、今後ステロイド投与によるこれらの蛋白の発現の変化を検討する必要があると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御鞭撻を賜りました恩師古川 仵教授ならびに、終始直接の御教示、御指導を頂きました金沢大学医学部耳鼻咽喉科学講座西村俊郎博士に深甚なる謝意を表します。また貴重な御助言を賜りました金沢大学医学部耳鼻咽喉科学講座三輪高喜博士、石丸正博士に深謝いたします。最後に本研究に御協力を頂きました金沢大学医学部耳鼻咽喉科学講座の皆様にも深く感謝いたします。

文 献

- 1) 三輪高喜. 嗅覚障害. アレルギーの臨床 18: 935-940, 1998
- 2) 古川 仵, 三輪高喜. 嗅覚障害—最近の話題(その2)—. 耳鼻 37: 571-577, 1994
- 3) 斉藤淳一, 鎌田英男, 前原良路, 亀井民雄. 感冒後嗅神経障害のステロイド内服治療例の検討. 日鼻誌 35: 156, 1996
- 4) 古田 茂. 嗅覚障害. 耳喉頭頸 69: 85-89, 1997
- 5) 洲崎春海. 嗅覚障害とその治療. 総合臨床 44: 2503-2504, 1995
- 6) 金子 達. 嗅覚障害の診断と治療—特に高齢者について—. 耳鼻と臨床 38: 173-179, 1992
- 7) 浅賀英世. 嗅覚障害の治療—ステロイド剤の懸垂頭位による点鼻療法—. 耳喉頭頸 62: 745-748, 1990
- 8) Mygind N. Effects of corticosteroid therapy in non-allergic rhinosinusitis. Acta Otolaryngol (Stockh) 116: 164-166, 1996
- 9) Bronstein AA, Leont'ev VG. Sodium and potassium content in the mucus of the olfactory lining of vertebrates. Zh Evol Biokhim Fiziol 8: 580-585, 1972
- 10) Joshi H, Getchell ML, Zielinski B, Getchell TV. Spectrophotometric determination of cation concentrations in olfactory mucus. Neuroscience Lett 82: 321-326, 1987
- 11) Noel J, Pouyssegur J. Hormonal regulation, pharmacology, and membrane sorting of vertebrate Na⁺/H⁺ exchanger isoforms. Am J Physiol 268: C283-C296, 1995
- 12) Mahnensmith RL, Aronson PS. The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. Circ Res 56: 773-788, 1985
- 13) Roskopf D, Dusing R, Siffert W. Membrane sodium-proton exchange and primary hypertension. Hypertension 21: 607-617, 1993
- 14) Kern RC, Kerr TP, Getchell TV. Ultrastructural localization of Na⁺/K⁺-ATPase in rodent olfactory epithelium. Brain Research 546: 8-17, 1991

- 15) Omura K, Takagi SF. On the mechanism of the repellent action of Naramycin to rats. *Gunma J Med Sci* 10: 217-227, 1961
- 16) 木村恭之, 上出文博, 宮崎為夫, 梅田良三. マウスの嗅刺激性行動に関する研究—防鼠剤ナラマイシンを使用して—. *耳鼻臨床* 80: 469-475, 1987
- 17) 小村京子, 高木貞敬, 原田 紀. ラットのナラマイシン忌避の機序について. *北関東医学* 11: 207-217, 1961
- 18) Gibson UEM, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research* 6: 995-1001, 1996
- 19) DeLong RE, Getchell TV. Nasal respiratory function-vasomotor and secretory regulation. *Chem Senses* 12: 3-36, 1987
- 20) Levenson R. Isoforms of the Na,K-ATPase: family members in search of function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 123: 1-45, 1994
- 21) Imai Y. Physiology of salivary secretion. *Frontier of Oral Physiology II*. Edited by Kawamura S, p184-206, Karger, Basel
- 22) Lingrel JB, Kuntzweiler T. Na⁺,K⁺-ATPase. *J Biol Chem* 269: 19659-19662, 1994
- 23) Mercer RW. Structure of the Na,K-ATPase. *Int Rev Cytol* 137C: 139-168, 1993
- 24) Schmalzing G, Ruhl K, Gloor SM. Isoform-specific interactions of Na,K-ATPase subunits are mediated via extracellular domains and carbohydrates. *Proc Natl Acad Sci* 94: 1136-1141, 1997
- 25) Orlowski J, Lingrel JB. Tissue-specific and developmental regulation of rat Na,K-ATPase catalytic α isoform and β subunit mRNAs. *J Biol Chem* 263: 10436-10442, 1988
- 26) Lutsenko S, Kaplan JH. An essential role for the extracellular domain of the Na,K-ATPase β -subunit in cation occlusion. *Biochemistry* 32: 6737-6743, 1993
- 27) Jaisser F, Jaunin P, Geering K, Rossier BC, Horisberger JD. Modulation of the Na,K-pump function by β subunit isoforms. *J Gen Physiol* 103: 605-623, 1994
- 28) Welsh MJ, Widdicombe JH. Pathways of ion movement in the canine tracheal epithelium. *Am J Physiol* 239: F215-F221, 1980
- 29) Olver RE, Davis B, Marin MG, Nadel JA. Active transport of Na⁺ and Cl⁻ across the canine tracheal epithelium in vitro. *Am Rev Respir Dis* 112: 811-815, 1975
- 30) Al-Bazzaz FJ. Regulation of salt and water transport across airway mucosa. *Clin Chest Med* 7: 259-272, 1986
- 31) Phipps RJ, Nadel JA, Davis B. Effect of alpha-adrenergic stimulation on mucus secretion and on ion transport in cat trachea in vitro. *Am Rev Respir Dis* 121: 359-365, 1980
- 32) Marin MG, Davis B, Nadel JA. Effect of acetylcholine on Cl⁻ and Na⁺ fluxes across dog tracheal epithelium in vitro. *Am J Physiol* 231: 1546-1549, 1976
- 33) Funder JW. Aldosterone action. *Ann Rev Physiol* 55: 115-130, 1993
- 34) Wang ZM, Yasui M, Celsi G. Glucocorticoids regulate the transcription of Na⁺-K⁺-ATPase genes in the infant rat kidney. *Am J Physiol* 267: C450-C455, 1994
- 35) Rayson BM, Edelman IS. Glucocorticoid stimulation of Na-K-ATPase in superfused distal segments of kidney tubules in vitro. *Am J Physiol* 243: F463-F470, 1982
- 36) Lee YC, Lin HH, Tang MJ. Glucocorticoid upregulates Na-K-ATPase α - and β -mRNA via an indirect mechanism in proximal tubule cell primary cultures. *Am J Physiol* 268: F862-F867, 1995
- 37) Cook DI, Van Lennep EW, Roberts ML, Young JA. Secretion by the major salivary glands. In Johnson LR, ed. *Physiology of the Gastrointestinal tract*, p1061-1117, Raven Press, New York, 1994
- 38) Iwano T, Akayama M, Yamamoto A, Omori K, Kumazawa T, Tashiro Y. Quantitative immunoelectron microscopic localization of (Na⁺, K⁺)ATPase in rat parotid gland. *J Histochem Cytochem* 35: 871-879, 1987
- 39) Antakly T, Zhang C, Sarrieau A, Raquidan D. Cell-specific expression of the glucocorticoid receptor within granular convoluted tubules of the rat submaxillary gland. *Endocrinology* 128: 617-622, 1991
- 40) Sheppard K, Funder JW. Type I receptors in parotid, colon, and pituitary are aldosterone selective in vivo. *Am J Physiol* 253: E467-E471, 1987
- 41) Geering K, Theulaz I, Verrey F, Hauptle MT, Rossier BC. A role for the β -subunit in the expression of functional Na⁺-K⁺-ATPase in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 257: C851-C858, 1989
- 42) Omori K, Omori K, Tashiro Y. Induction of Na,K-ATPase by NGF in PC12 cells. *Jpn Physiol* 42 (Suppl): S33, 1992
- 43) McDonough AA, Azuma KK, Lescale-Matys L, Tang MJ, Nakhoul F, Hensley CB, Komatsu Y. Physiologic rationale for multiple sodium pump isoforms. *Ann N Y Acad Sci* 671: 156-169, 1992
- 44) Omori K, Omori K, Morimoto T, Takada T, Akayama M, Yoshimori T, Sabatini DD, Tashiro Y. Expression, localization, and function of an N-terminal half fragment of the rat Na,K-ATPase β -subunit in HeLa cells. *J Biochem* 109: 267-275, 1991
- 45) Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56: 335-344, 1989
- 46) Jensen EV, DeSombre ER. Mechanism of action of the female sex hormones. *Ann Rev Biochem* 41: 203-230, 1972
- 47) Sardet C, Franchi A, Pouyssegur J. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na⁺/H⁺ antiporter. *Cell* 56: 271-280, 1989
- 48) Dudeja PK, Rao DD, Syed I, Joshi V, Dahdal RY, Gardner C, Risk MC, Schmidt L, Bavishi D, Kim KE, Harig JM, Goldstein JL, Layden TJ, Ramaswamy K. Intestinal distribution of human Na⁺/H⁺ exchanger isoforms NHE-1, NHE-2, and NHE-3 mRNA. *Am J Physiol* 271: G483-G493, 1996
- 49) Collins JF, Honda T, Knobel S, Bulus NM, Conary J, DuBois R, Ghishan FK. Molecular cloning, sequencing, tissue distribution, and functional expression of a Na⁺/H⁺ exchanger (NHE-2). *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3938-3942, 1993
- 50) Bookstein C, Musch MW, DePaoli A, Xie Y, Villereal M, Rao MC, Chang EB. A Unique sodium-hydrogen exchange isoform (NHE-4) of the inner medulla of the rat kidney is induced by hyperosmolarity. *J Biol Chem* 269: 29704-29709, 1994

- 51) Klanke CA, Su YR, Callen DF, Wang Z, Meneton P, Baird N, Kandasamy RA, Orłowski J, Otterud BE, Leppert M, Shull GE, Menon AG. Molecular cloning and physical and genetic mapping of a novel human Na⁺/H⁺ exchanger (NHE5/SLC9A5) to chromosome 16q22.1. *Genomics* 25: 615-622, 1995
- 52) Attaphitaya S, Park K, Melvin JE. Molecular cloning and functional expression of a rat Na⁺/H⁺ exchanger (NHE5) highly expressed in brain. *J Biol Chem* 274: 4383-4388, 1999
- 53) Ikeda K, Sunose H, Takasaka T. Effects of protein kinase C on the Na⁺-H⁺ exchanger in the cochlear outer hair cell. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 116: 828-832, 1996
- 54) Wangemann P, Liu J, Shiga N. Vestibular dark cells contain the Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 in the basolateral membrane. *Hear Res* 94: 94-106, 1996
- 55) Wu D, Mori N. Evidence for the presence of a Na⁺-H⁺ exchanger in the endolymphatic sac epithelium of guinea-pigs. *Pflugers Arch* 436: 182-188, 1998
- 56) Bieche I, Olivi M, Champeme MH, Vidaud D, Lidereau R, Vidaud M. Novel approach to quantitative polymerase chain reaction using real-time detection: application to the detection of gene amplification in breast cancer. *Int J Cancer* 78: 661-666, 1998
- 57) Preudhomme C, Revillion F, Merlat A, Hornez L, Roumier C, Duflos-Grardel N, Jouet JP, Cosson A, Peyrat JP, Fenaux P. Detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia (CML) using a 'real time' quantitative RT-PCR assay. *Leukemia* 13: 957-964, 1999

The Expression of Na⁺, K⁺-ATPase, Sodium-Proton Exchanger (NHE) and Glucocorticoid Receptor in the Olfactory Epithelium of Experimental Olfactory Dysfunction Rat Models. Shigekazu Teranishi, Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **109**, 330 — 342 (2000)

Key words olfactory mucosa, Na⁺, K⁺-ATPase, sodium-proton exchanger-1 (NHE-1), glucocorticoid receptor, olfactory dysfunction

Abstract

Although olfactory dysfunction has not been well recognized as a serious impairment of quality of life of the patients, more and more attentions are paid to this impairment because people wants better quality of life. It is often observed that patients with hypersecretion of nasal mucous complaint decreased olfaction in clinical setting, not only inflammatory mucosal swelling disturbs the air flow containing odor to reach the olfactory epithelium, but also the quality and quantity of the nasal mucous might at least in part cause the olfactory dysfunction. Electrolyte concentration of the olfactory mucous is supposed to be under a strict regulation, few mechanisms have been reported about the olfactory mucous electrolytes. This study was done to elucidate the mechanism of regulation of olfactory mucous electrolytes. We studied the expression of Na⁺, K⁺-ATPase immunoreactivity in the olfactory mucosa immunohistologically, and the expression of sodium-proton exchanger (NHE) was estimated by the quantitative real time polymerase-chain reaction. Glucocorticoid receptor expression was also studied immunohistologically, because steroids were reported to regulate the expression of Na⁺, K⁺-ATPase in the kidney, and the salivary gland and steroids are one of very effective medicines in clinical olfactory dysfunction cases. In normal rats, strong Na⁺, K⁺-ATPase immunoreactivity was observed in the ductal cells of Bowman's gland and weak immunoreactivity was observed the acinal cells of the gland and olfactory cells. With quantitative PCR method, among 5 isoforms we studied, NHE-1 mRNA was expressed at an significant amount in the olfactory epithelia. Glucocorticoid receptor immunoreactivity was observed in the cytoplasm of the olfactory supporting cells that face nasal cavity and weak expression was observed basolateral cytoplasm of the supporting cells. In the rat models of injured olfactory epithelia, the expression of Na⁺, K⁺-ATPase and glucocorticoid receptor were well restored after the injury that was agreed with histological findings of olfactory epithelia and also behavior observation of rat olfaction. These results strongly suggests Na⁺, K⁺-ATPase, NHE-1 and glucocorticoid receptor might contribute to the regulation of electrolytes concentration of the olfactory mucus.