

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17938

研究課題名(和文)末梢味覚器におけるインスリンシグナルの機能の解明

研究課題名(英文) Insulin signals in peripheral taste tissue

研究代表者

高井 信吾 (TAKAI, SHINGO)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：30760475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、インスリンとその下流分子に着目し、その末梢味覚器における働きを探索した。インスリンレセプターはマウス味蕾に広く発現しており、また、マウス味蕾幹細胞を高濃度のインスリンを含む培地で培養すると、コロニーに含まれる味細胞の数、味細胞マーカーmRNA発現が有意に減少することがわかった。さらに、インスリンシグナリングの下流に存在し、細胞分裂や生存の調節に重要な働きを持つことが知られるmTOR経路を薬理的に阻害すると上述のインスリンの効果は打ち消された。以上の結果は、インスリン-mTOR経路が味細胞の分化/増殖調節に大きく関わる可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

味細胞は絶えずターンオーバーを繰り返しながらその構造的恒常性を保っているが、その調節メカニズムには未だ不明な点が多い。本研究では体内のエネルギーホメオスタシス維持に重要なホルモンであるインスリンが、味蕾幹細胞から味細胞に成熟する過程でその分化・増殖に影響を及ぼすことを明らかにした。昨今、様々な生活習慣病、特に肥満、糖尿病が世界的に深刻な問題となっている中、本研究は得られた結果は過食、糖尿に伴う高インスリン血症が、末梢味覚器の恒常性維持に悪影響をもたらすという新たな病態生理学的モデルの存在を提示する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on insulin and its downstream molecules. In RT-PCR and immunohistochemical analysis, insulin receptor is widely expressed through the taste cells. The experiments with using taste bud organoid, a 3-dimensional taste stem cell culture, revealed that the number of taste cells and mRNA expression levels of taste cell markers in the organoid colonies were significantly decreased in an insulin concentration-dependent manner. Mammalian Target Of Rapamycin (mTOR), which is downstream of insulin signaling and is known as an important regulator of cell proliferation and survival, was expressed in the gustatory and non-gustatory epithelium of mice and Lgr5-positive taste stem cells. Application of mTORC1 inhibitor increased of taste cell generation in organoid colonies. These results suggest that insulin-mTOR pathway may be involved in regulating the differentiation/proliferation of taste cells.

研究分野：生理学

キーワード：味覚 インスリン オルガノイド

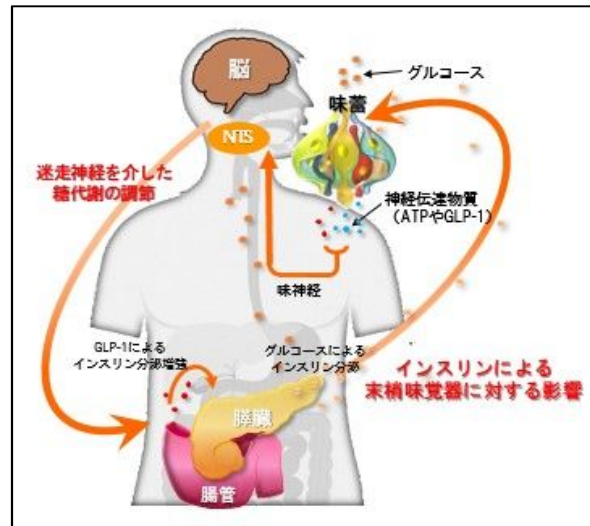
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

味蕾に含まれる個々の味細胞は絶え間なくターンオーバーを繰り返しているが、味蕾としての機能的/構造的恒常性は常に維持されている。この味細胞のターンオーバーは、全身の栄養状態や種々のケミカルメディエーターなど様々な要因に影響を受けることが予想されるが、その調節メカニズムには不明な点が多い。これまでに、申請者が所属するグループや他のグループの研究結果から、口腔と消化器系にはホルモンやそのレセプター等様々な共通した機能分子群が発現していることが示されてきた。これらの分子が正常な末梢味覚器の恒常性を保つのに重要な役割を果たしている可能性が浮上している。また 2013 年、有郭乳頭味蕾の幹細胞が乳頭基底部に存在する leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor (Lgr5)陽性細胞群であることが同定された。さらに翌年、この幹細胞を種々の成長因子や細胞外基質を含む培地で 3 次元培養することで、生体と同様の味細胞に分化させることが可能であることが報告された。本研究では、この培養系を所属研究室でも立ち上げ、味蕾におけるインスリンシグナリングの機能に着目して研究を展開した。

2. 研究の目的

味細胞に発現するホルモンは多数報告があるが、哺乳類のエネルギー代謝機構の中で最も重要な働きを持つインスリンの味覚器における機能はほとんど解明されていない。全身の糖代謝制御におけるキー分子であるインスリンが、味覚に影響に関与する可能性は十分にあり、インスリンシグナリングの末梢味覚器における機能解明は極めて重要な意義を持つと考えられる(下図)。現在、世界的に様々な生活習慣病、特に肥満や高血圧、糖尿病が深刻な問題となっており、これに付随して、1960年代から、糖尿病患者における味覚変調を指摘した報告は多数ある。しかし、その成因には不明な点が多く、詳細な解析が不足している。糖尿病を含むこれら生活習慣病の根本的な予防と治療には、食事を含む生活習慣への介入が不可欠であり、それには我々の味覚がどのように恒常性を維持しているか、またどのようにその恒常性が破綻するかを理解する必要がある。本研究ではインスリンとその下流分子が哺乳類の味覚器に何らかの影響を与えると仮定し、その末梢味覚器における働きの探索を開始した。



3. 研究の方法

・マウス味覚器におけるインスリンとその関連分子の発現探索

RT-PCR、抗体を用いた免疫組織染色によりマウス味覚器におけるインスリンおよびそのレセプター、関連分子の発現を探索した。

・マウス味蕾幹細胞の 3 次元培養系を用いた味細胞発生におけるインスリンの効果の探索

マウス有郭乳頭組織を採取し、種々の成長因子 (wnt3a, R-spondin, Noggin, EGF 等) やマトリゲル、また様々な濃度のインスリンを含む培地で三次元培養を行ない、経時的なコロニーサイズの計測や、味細胞の分化を観察した。また、20 日後にコロニーを採取し、味細胞の分化・増殖

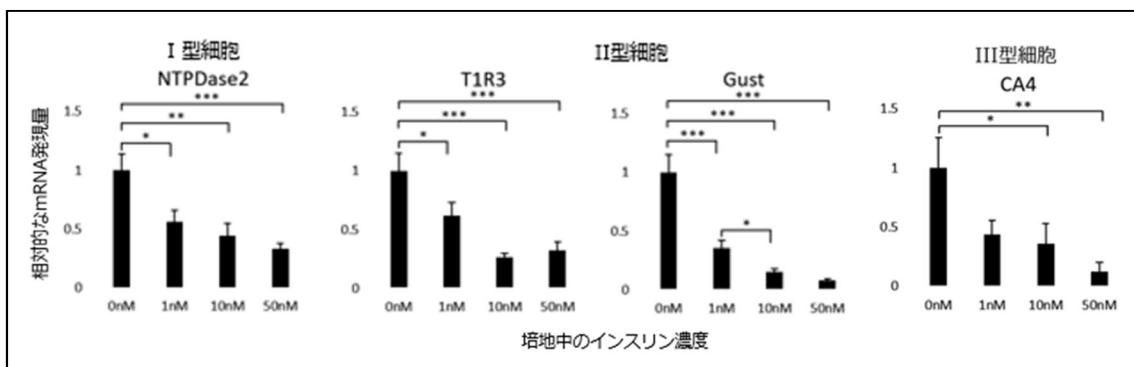
を免疫組織染色、味細胞関連マーカー分子 mRNA の定量 RT-PCR にて評価した。

・マウス味細胞分化・増殖における mTOR の働きの探索

マウスの舌組織を用いて、インスリンによって活性化され、細胞の生存や増殖のコントロール因子である mechanistic target of rapamycin (mTOR)の発現と、分布を RT-PCR と免疫組織染色にて調べた。また、上述の味細胞 3 次元培養系を用いて、薬理的に mTOR を阻害した際の味細胞の分化・増殖の変化を調査した。

4 . 研究成果

マウス舌より単離した茸状乳頭および有郭乳頭味蕾を用いた RT-PCR の結果、インスリン自体の mRNA は検出出来なかったが、インスリンレセプター (IR) はマウス味蕾を含む上皮 (茸状乳頭領域、有郭乳頭領域) において強い発現が見られた。マウス茸状乳頭、有郭乳頭を用いた免疫組織化学的解析では、IR は甘味感受性味細胞 (Tas1R3 陽性細胞) や酸味感受性味細胞 (GAD1 陽性細胞) を含む味蕾全体に広く発現していることがわかった。さらに、マウス味幹細胞を採取し 3 次元培養を行う味蕾オルガノイドを用いた実験の結果、培地中に添加したインスリン濃度依存的にオルガノイドコロニーに含まれる味細胞の数、各種味細胞マーカー mRNA の発現量が有意に減少することが明らかとなった (下図に一部を示す)。さらに、インスリンシグナリングの下流に存在し、細胞分裂や生存の調節に重要な働きを持つことが知られる mTOR の mRNA はマウス味覚上皮、非味覚上皮双方で発現が見られた。免疫染色、in situ hybridization の結果 mTOR の mRNA、タンパク質は Tas1R3 陽性細胞や GAD1 陽性細胞含む味細胞、また Lgr5 陽性の味幹細胞に広く発現していた。味蕾オルガノイドで、mTOR 経路を mTORC1 阻害剤であるラパマイシンにより薬理的に阻害すると、培地に加えたラパマイシン濃度依存的に味細胞の増加、および各種味細胞マーカー mRNA の発現量増加が見られた。以上の結果は、インスリン-mTOR 経路が味細胞の分化/増殖の調節に関わる可能性を示唆する。以上の結果の一部は、Takai et al., 2019 *PLoS One*, Takai et al., 2020 *Current Oral Health Reports* 等で学術論文としてまとめ、発表した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yoshida Ryusuke, Shin Misa, Yasumatsu Keiko, Takai Shingo, Inoue Mayuko, Shigemura Noriatsu, Takiguchi Soichi, Nakamura Seiji, Ninomiya Yuzo	4. 巻 8
2. 論文標題 The Role of Cholecystokinin in Peripheral Taste Signaling in Mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2017.00866	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Ryusuke, Takai Shingo, Sanematsu Keisuke, Margolskee Robert F., Shigemura Noriatsu, Ninomiya Yuzo	4. 巻 369
2. 論文標題 Bitter Taste Responses of Gustducin-positive Taste Cells in Mouse Fungiform and Circumvallate Papillae	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 29 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2017.10.047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Takai Shingo, Shigemura Noriatsu	4. 巻 1
2. 論文標題 Insulin Function in Peripheral Taste Organ Homeostasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Oral Health Reports	6. 最初と最後の頁 1~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s40496-020-00266-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirose Fumie, Takai Shingo, Takahashi Ichiro, Shigemura Noriatsu	4. 巻 10
2. 論文標題 Expression of protocadherin-20 in mouse taste buds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58991-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takai Shingo, Watanabe Yu, Sanematsu Keisuke, Yoshida Ryusuke, Margolskee Robert F., Jiang Peihua, Atsuta Ikiru, Koyano Kiyoshi, Ninomiya Yuzo, Shigemura Noriatsu	4. 巻 14
2. 論文標題 Effects of insulin signaling on mouse taste cell proliferation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0225190 ~ 0225190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0225190	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shigemura Noriatsu, Takai Shingo, Hirose Fumie, Yoshida Ryusuke, Sanematsu Keisuke, Ninomiya Yuzo	4. 巻 11
2. 論文標題 Expression of Renin-Angiotensin System Components in the Taste Organ of Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2251 ~ 2251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu11092251	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	M a r g o l s k e e R o b e r t F . (Margolskee Robert F.)	モネル化学感覚センター・Director and President	
研究協力者	J i a n g P e i h u a (Jiang Peihua)	モネル化学感覚センター・Associate Member	