

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17228

研究課題名（和文）人工味細胞を用いた味覚障害に対する漢方薬の作用機序の解明および治療応用

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of action of Kampo medicine for taste disorder and its therapeutic application using artificial taste cells

研究代表者

森 啓輔（Mori, Keisuke）

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：60774114

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：作製した人工味細胞を用いて柴朴湯、香蘇散、六君子湯の薬理作用を検証した。種々の濃度にてリアルタイムPCR法、ウエスタンブロットリング法を行い、さらにCa²⁺イメージングを行い、味覚応答の変化を検証したが、コントロール群と比較し、有意な変化は認めなかった。そのため実験の諸条件を変えたが有意な結果は認めていない。そこで漢方薬の変更を検討し、半夏瀉心湯、半夏厚朴湯、十全大補湯を用いてリアルタイムPCR法、ウエスタンブロットリング法、Ca²⁺イメージングを行い、味覚応答の変化を検証したがコントロール群と比較し、有意な結果は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

味覚障害は多様な原因があり治療に難渋する疾患である。いまだ完全な病因の解明には至っていない。今回の研究では治療法の1つである漢方薬の作用機序の解明および治療応用を目的とした。種々の実験を行ったが、明らかな解明には至らなかった。このことは漢方薬の作用機序の複雑さを示しており、今後更なる研究の進展が期待される。

研究成果の概要（英文）：The pharmacological effects of Sai-boku-to, Kososan, and Rikkunshito were examined using artificial taste cells. Real-time PCR and Western blotting were performed at various concentrations, and Ca²⁺ imaging was also performed to verify changes in the taste response. Therefore, we changed the conditions of the experiment, but did not find any significant results. We then considered changing the Kampo medication, and conducted real-time PCR, Western blotting, and Ca²⁺ imaging using Hange-Shashinto, Hange-Koubokuto, and Juzen-Taihoto to examine changes in taste response, but no significant results were obtained compared to the control group.

研究分野：歯科口腔外科

キーワード：人工味細胞 甘味受容体 うま味受容体 漢方薬

1. 研究開始当初の背景

味覚障害とは味がわかりにくい、わからないなどの症状であり、その患者の多くは甘さがわからない、だしの味がわからないなどの甘味やうま味に関する主訴が多い。その原因として、味細胞を含む舌局所の異常、糖尿病、高血圧、または中枢性神経障害、心因性、常用薬の副作用などと非常に複雑であると考えられており、これらの原因を検索するも、不明な場合が多い

2. 研究の目的

味覚障害に関しては器質的な原因や血中微量元素不足などの原因が明らかなもの以外は、原因不明とされており、その治療法についての報告もほとんどされていない。原因不明な味覚障害に対して治療に用いられる漢方薬に関しても、そのメカニズムは解明されておらず、臨床医による投薬内容などは異なり、統一した見解はない。そこで本研究では、味覚障害の治療に多くの施設で用いられている漢方薬を人工味細胞に作用させ、漢方薬の作用機序の解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 人工味細胞の樹立

マウス舌からの T1R1、T1R2、T1R3、TRPM5 の RNA を抽出し、プラスミド DNA を作製。作製した DNA を TRPM5 の DNA と共に培養細胞に遺伝子導入し、人工味細胞を作製。味覚受容体および TRPM5 の発現を確認

(2) 漢方薬作用下での味覚応答の変化

人工味細胞に対して漢方薬還流下で味物質（甘味物質またはうま味物質）を作用させ、小胞体からの Ca^{2+} 放出による細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を Ca^{2+} イメージング (Fluo 4-AM (Dojindo) λ_{ex} :485nm/ λ_{em} :535nm 測定) にて、また、リアルタイム PCR 法、ウェスタンブロッティング法を用いて検証した。

4. 研究成果

研究方法 (1) である。人工味細胞の樹立は予定通り遂行した。予定していたマウス舌から導入遺伝子 (T1R1, T1R2, T1R3, TRPM5) の RNA を抽出し、逆転写させるために RT-PCR を行い、cDNA を作製し、それを基にプラスミド DNA を精製し、HEK293 細胞に発現させ人工味細胞を樹立した。また、樹立した人工味細胞に対して siRNA を導入し機能的ノックダウン細胞を作製し、味刺激に対する応答減弱を確認し、得られた応答が甘味およびうま味物質特異的であることを確認した。

2019 年度より、研究方法 (2) に関しては漢方薬作用下で味覚応答の変化を検証した。漢方薬の濃度は $10 \mu M \sim 100 \mu M$ の範囲で作用させた。当初予定していた柴朴湯、香蘇散、六君子湯を $10 \mu M$ 、 $50 \mu M$ 、 $100 \mu M$ の濃度にて作用させ、味物質を作用させ Ca^{2+} イメージング、リアルタイム PCR 法、ウェスタンブロッティング法を行い、コントロール群と比較したが、有意な変化は認めなかった。そこで、使用する漢方薬を変更し、実験継続を行うも、コロナ禍で共通実験機器の使用が困難な時期もあった。

2020 年度より使用漢方薬を半夏瀉心湯、半夏厚朴湯、十全大補湯に変更し、それぞれの薬剤を $10 \mu M$ 、 $50 \mu M$ 、 $100 \mu M$ の濃度にて作用させた状態にて、前述した実験と同様の

味物質を作用させ Ca^{2+} イメージング、リアルタイム PCR 法、ウェスタンブロッティング法を行い、コントロール群と比較したが、有意な変化は認めなかった。

以上の結果から、今回の研究においては漢方薬で味覚受容体を直接的に作用させる現象は確認できなかった。このことから、漢方薬の作用機序は末梢の味覚受容体そのものではなく、その上流の味覚伝導経路のいずれかに作用している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------