

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19080

研究課題名（和文）味覚の再生に向けた改良型味蕾オルガノイドの作製と移植技術の開発

研究課題名（英文）Exploration of taste bud stem cells and development of improved taste bud organoids for taste regeneration

研究代表者

藤田 恭平（Fujita, Kyohei）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：10835383

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：舌表面にある味蕾は味覚感知に必要な不可欠なものであるが、生理的な条件下でのその維持機構は未だ不明である。本研究では、舌上皮細胞のscRNA-seqと多色細胞系譜追跡により、味蕾幹細胞の探索、解析を行なった。舌上皮細胞を単離し、scRNA-seqを行なった結果、遺伝子Xを新規味蕾幹細胞マーカー遺伝子として同定した。

また、遺伝子X陽性細胞の系譜追跡から舌上皮基底部分から味蕾へのクラスター形成を確認することができた。さらにこの細胞を単離し、マトリゲル内で培養することでオルガノイドを形成させることに成功した。以上から、舌上皮基底部分に存在するX陽性細胞が、味蕾形成のための幹細胞であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

味覚障害に悩まされる患者は年間約20万人を超える。その原因は様々であるが、抗がん剤の副作用などによる味蕾の障害によるものが多いことも知られている。味蕾は味覚を完治する数種類の味細胞を含んでいるため、味蕾の再生は味覚障害の治療法の一つになり得る。味蕾の再生には、元となる幹細胞が重要であるが、これまでその存在は知られてこなかった。本研究によって舌上皮に存在する幹細胞を新規に同定し、またその幹細胞由来のオルガノイドの形成に成功した。今後はこのオルガノイドを用いた、移植などの味覚障害の再生治療法の確立が進むと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Taste buds on the tongue's surface are essential for taste perception, but their maintenance mechanism under physiological conditions is still unknown. In this study, we performed scRNA-seq and multicolor lineage tracing of tongue epithelial cells to identify taste bud stem cells.

The results of scRNA-seq of tongue epithelial cells identified gene X as a novel taste bud stem cell marker gene. Lineage tracing of the X-positive cells confirmed a cluster from the basal part of the tongue epithelium to the taste buds. Furthermore, we succeeded in forming an organoid from a single X-positive cell. These results indicate that X-positive cells in the basal portion of the tongue epithelium are the stem cells for the formation of taste buds.

研究分野：発生生物学

キーワード：味蕾 幹細胞 scRNA-seq オルガノイド 細胞系譜追跡

1. 研究開始当初の背景

味蕾は味覚に欠かせないもので、舌後部見られる有郭乳頭や葉状乳頭、前部に散在する茸状乳頭など、舌全体に存在する。有郭乳頭や葉状乳頭には多数の味蕾が含まれているが、茸状乳頭に存在する味蕾は1個だけという部位による違いもある。味蕾のターンオーバーは速いことが知られているが、味覚機能は生涯にわたって維持されることから、味蕾内の味細胞を長期的に維持する幹細胞の存在が以前より想定されてきた。しかし、味蕾の集団維持の正確なメカニズムは詳細には分かっていない。

2. 研究の目的

味覚は舌上皮に存在する味蕾内の味細胞で味情報が受容される。本研究は抗がん剤の副作用などで消失または減少した味蕾を再生させ、味覚の再生に繋げる治療法の開発を最終目標としている。本研究は、味蕾幹細胞を同定し、その細胞を用いてより多くの味細胞を含む味蕾オルガノイドの新規作製法の確立、およびオルガノイドの舌上皮への移植技術の開発を行う事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 舌上皮細胞の scRNA-seq 解析

舌上皮に存在する幹細胞を同定するため、Sox2-GFP マウスを用いて舌上皮基底部の細胞群を可視化した。GFP 陽性細胞を得るために、dispase を用いて8週齢マウスの舌組織から上皮を剥離し、TrypLE™ Express 処理によって単一上皮細胞の懸濁液を得た。その後、SH800S セルソーターを用いて1細胞分取をおこなった。その際、7-AAD 染色による死細胞除去をおこなっている。得られた細胞から10x 社プラットフォームの Chromium を用いてライブラリー調製を行い、scRNA-seq をおこなった。シーケンスデータの2次解析として、Seurat を用いた次元削減とクラスタリング、StemID2 による幹細胞クラスターの推定、Metascape による gene ontology 解析、また Monocle3 と STREAM による擬似時間解析をおこなった。

(2) 細胞系譜追跡とオルガノイド作製

scRNA-seq 解析によって同定した幹細胞マーカー遺伝子 X に対し、X-EGFP マウスと X-CreERT2 マウスをそれぞれ作製した。X-EGFP マウスの舌上皮から EGFP 陽性細胞をセルソーターで分取し、24-well plate に1,500 cells/well の細胞密度でマトリゲルに包埋し、37℃、5%CO₂ 下でオルガノイド培養をおこなった。

また、X-CreERT2 マウスと Rosa26-ralbow マウスと掛け合わせ (X^{CreERT2;rbw})、タモキシフェン (1 mg/40g) によって舌上皮に存在する X 陽性細胞を標識し、長期間の細胞系譜追跡をおこなった。

4. 研究成果

Sox2 陽性舌上皮細胞の scRNA-seq の結果、4,478 個の細胞を14個のクラスターに分類した。これらのクラスターのうち、Ki-67、Pcna、Top2a の発現様式から、舌上皮の比較的分化した細胞集団が属すると思われるクラスターを除き、サブクラスタリングをおこなった。その結果、8個のクラスターに分類し直され、例えばクラスター7の細胞は、味細胞前駆細胞マーカー遺伝子である *Lgr6* 陽性

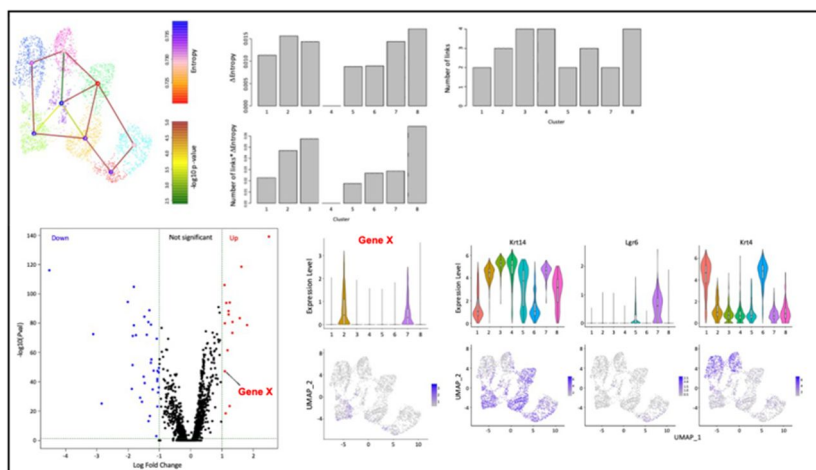


図1 Sox2 陽性舌上皮細胞の scRNA-seq 解析結果

である、クラスター1、5、6は、分化マーカーである *Krt4* と *Krt13* の発現量が高い舌上皮の分化細胞に富み、これらのクラスターでは汎幹細胞マーカー遺伝子として考えられている *Krt14* の発現量は少なかったことなどが確認された (図1)。

次に、StemID2 アルゴリズムを用いて、幹細胞を含むクラスターの予測を試みた。同定された各クラスターの有意なリンク数と、トランスクリプトームの均一性を反映するトランスクリプ

トーム・エントロピーを算出した。リンク数と Entropy を掛け合わせることで、StemID スコアを導出した (図 1)。StemID 解析は、次の 2 つの概念に基づいて行われた：第一に、多能性の度合いが最も高い幹細胞は、他のクラスターへの有意なリンク数に対応する可能性がある、第二に、多能性幹細胞の転写産物は分化した細胞よりも均一である可能性があり、集団の中では複数の状態の偏りが共存して多様な成熟細胞種を生み出し、高いエントロピーをもたらす可能性がある。StemID2 アルゴリズムにより、クラスター 2、3、8 は、これらのサブクラスターの中で最も高い StemID スコアを持つことが示された。

これら 3 つのクラスターの特徴を比較するため、各クラスターの遺伝子特徴を抽出し、遺伝子オントロジー解析を行った。Metascape のヒートマップでは、クラスター 3 および 8 で発現が上昇した遺伝子に対して、“epidermis development”、“epithelial cell differentiation”に関連する機能用語が有意に濃縮されており、クラスター 2 の発現が上昇した遺伝子に対しては“negative regulation of epithelial cell proliferation”が高い濃縮度を示していることがわかった。また、クラスター 2 における各遺伝子の発現量をクラスター 3、8 における発現量と比較した (図 1)。その結果、クラスター 2 において発現量が有意に上昇した遺伝子の一つとして Gene X を得ることができました。我々は過去にこの遺伝子が他組織の幹細胞に特異的に発現していることを突き止めており、これらの結果は、Gene X が舌上皮の幹細胞でも発現していることを強く示唆するものであるため、以降の解析では Gene X に焦点を当てた。

次に、Gene X、*Krt14*、*Lgr6* の発現量の変化を調べるため、Gene X 陽性細胞に富むクラスター 2 を軌跡のノードとした疑似時間解析を STREAM プログラムを用いて行った (図 2)。Gene X 陽性幹細胞からの軌跡は、2 つの枝：*Krt14*/*Lgr6* 陽性味細胞と *Krt4*/*Krt13* 陽性分化上皮細胞に分かれた。また、別の疑似時間解析法である Monocle3 では、*Krt14* の発現量の上昇に伴い *Lgr6* の発現量が増加するのに対し、Gene X の発現量は時間とともに徐々に減少することがわかった。

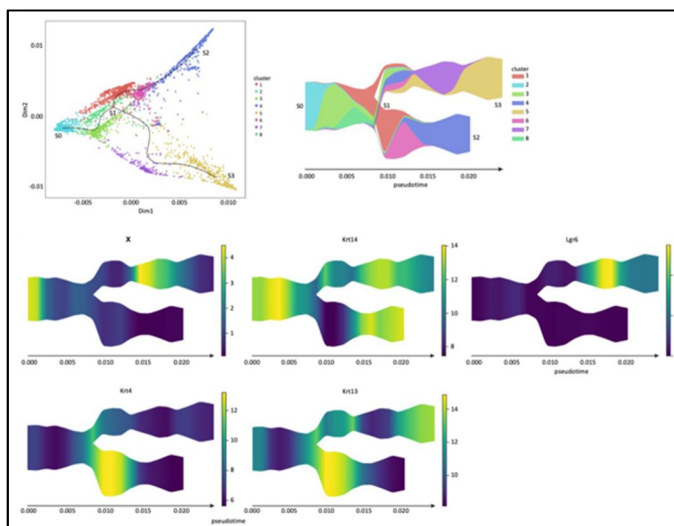


図 2 疑似時間解析によるマーカー遺伝子の発現推移

Gene X が幹細胞マーカーとしての候補に挙げたことから、X 陽性細胞の性質を *in vitro/in vivo* で検証した。X^{CreERT2;rbw} マウスを用いた単一細胞レベルでの細胞系譜追跡をおこなった結果、糸状乳頭と茸状乳頭の間の基底部分近に X 陽性細胞の存在が確認され、その子孫細胞によって茸状乳頭と隣接する糸状乳頭の両方を占有するクラスターが生じることも確認できた (図 3)。このクラスターはその後長期間にわたって観察することができた。さらに、X-EGFP マウスから EGFP 陽性細胞をセルソーターで分取し、オルガノイドを作製することにも成功した。これらの結果から、茸状乳頭に隣接する上皮基底部分に存在する X 陽性細胞が、舌上皮に存在する茸状乳頭と糸状乳頭の両方を長期的に維持する多能性幹細胞として機能していることが示された。

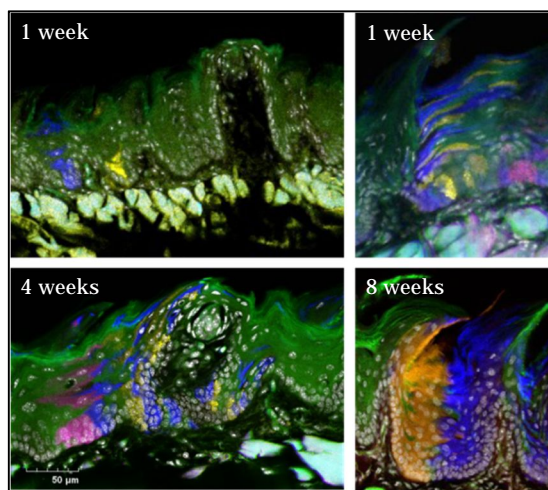


図 3 X^{CreERT2;rbw} マウスを用いた細胞系譜追跡

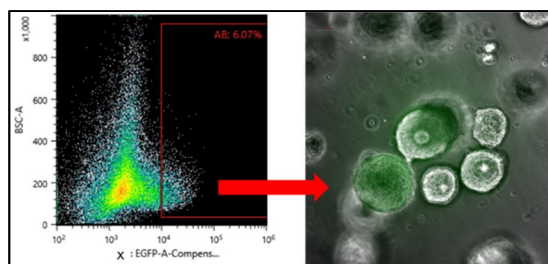


図 4 単一 X-EGFP 細胞由来のオルガノイド

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishigaki Kazuhiko, Kumano Keiki, Fujita Kyohei, Ueno Hiroo	4. 巻 11
2. 論文標題 Cellular basis of omentum activation and expansion revealed by single-cell RNA sequencing using a parabiosis model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13958
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-93330-5	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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 慧介, 田中 準一, 相澤 怜, 吉田 真子, 松浦 徹, 藤田 恭平, 田中 麻友, 上野 博夫, 美島 健二, 山本 松男
2. 発表標題 多色細胞系譜追跡法を用いた歯肉接合上皮細胞のクローナリティ解析
3. 学会等名 第63回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田真子, 藤田恭平, 高野洋志, 八尾良司, 上野博夫
2. 発表標題 舌・食道上皮幹細胞の可視化を目的としたレポーターマウスの新規作出
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------