

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09892

研究課題名(和文) 味蕾基底細胞の再定義：「細胞型分化の解明」と「味蕾オルガノイド評価系の確立」

研究課題名(英文) Reexamination of taste bud basal cells: mechanisms of cell type differentiation and methods for evaluating taste organoids.

研究代表者

三浦 裕仁 (Miura, Hirohito)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授

研究者番号：80353936

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)：口腔の味蕾は、舌の有郭乳頭・葉状乳頭・茸状乳頭と軟口蓋に分布する。味蕾の中で味孔まで伸びる細胞は、Ⅰ型、Ⅱ型、Ⅲ型の3種類に分類される。個々の味蕾に含まれるⅡ型細胞の割合は、舌の乳頭や軟口蓋など部位間で違いがあるが、部位内では、どの味蕾もほぼ一定であると考えられていた。本研究では、ホールマウント免疫染色を用いて、各部位の個々の味蕾に含まれるⅡ型とⅢ型細胞の数を解析し、その数と割合が味蕾間で大きく異なっていることを明らかにした。この結果は、味蕾のターンオーバーにおいて、新たに供給される3種類の細胞型の割合は、これまで想定されていたように一定ではなく、大きく変動している可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、新型コロナウイルスで味覚障害を発症し、その症状が長く続くケースが数多く報告されている。味覚障害を生じると、食べる喜びは失われ、食欲も著しく減退する。食による健康維持のため、味覚を正常に保つ意義は大きい。味覚受容器である味蕾の細胞は次々と置き換わっており、その異常は味覚障害を生じる。しかし、味蕾の細胞のターンオーバーのメカニズムには不明な点が多い。その解明は味覚障害の予防法、治療法の開発に重要である。本研究は、味蕾の細胞がターンオーバーするとき、味蕾に新たに供給される3種類の細胞型の割合は、これまで想定されていたように一定ではなく、大きく変動している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In the oral cavity, taste buds are located in the circumvallate, foliate, and fungiform papilla on the tongue and also on the soft palate. Elongate cells extending to the taste pore in the buds are classified into three cell types: Type I, II, and III. The proportion of these cell types among buds is assumed to be roughly constant within respective taste regions while different between taste regions. In the present study, the numbers of Type II and III cells in individual taste buds were analyzed by whole-mount immunohistochemistry, and it was found that the numbers and ratios of these cell types ranged widely among buds in respective regions. This result suggests that the supply of each cell type may change much rather than be as constant as previously assumed among taste buds during the turnover of taste bud cells.

研究分野：口腔生理学

キーワード：味覚 細胞分化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

味覚受容器である味蕾は、50~100 個ほどの細胞の集団で、平均すると 10~14 日で次々と新しい細胞に置き換わっている (ターンオーバー)。味蕾を生み出す幹細胞は周囲の上皮と共通で、味蕾の周囲に分布する。味蕾周囲で最終分裂を終え、味蕾細胞への分化が決定した細胞は、細胞増殖・分化誘導因子である Sonic hedgehog (Shh) を発現する味蕾基底細胞となり、その後 Shh の発現を失って、I, II, III 型の 3 種類の味蕾細胞に分化する<sup>1)</sup>。I 型細胞は塩味受容細胞、II 型細胞は甘味、うま味、苦味の受容細胞、III 型細胞は酸味受容細胞を含んでいる。また、I 型細胞はグリア細胞に類似した性質を持っており、周囲の細胞や神経線維に巻き付く複雑な構造で、II 型細胞が放出する神経伝達物質 (ATP) を分解する。

口腔の味蕾は、舌の茸状乳頭、葉状乳頭、有郭乳頭と、軟口蓋に分布する。いずれの部位の味蕾も I 型細胞が最も多く、次に II 型細胞が多く、III 型細胞が最も少ない。ただし、細胞型の割合は、部位によって異なり、III 型細胞は、有郭乳頭で多く、茸状乳頭、軟口蓋では少ない。これまで、細胞型の割合は各部位の中ではどの味蕾でもほぼ同じで、細胞のターンオーバーにおいて、各細胞型は味蕾基底細胞から一定の割合で供給されると考えられてきた。しかし、味蕾の細胞型の割合は、個々の味蕾の細胞を解析した結果ではなく、それぞれの部位に存在する各細胞型を集団としてまとめて解析した結果に基づいて算出されていた。そのため、有郭乳頭、軟口蓋など各部位で味蕾を構成する細胞型の割合が味蕾間で、実際に、どの程度揃っているかは不明であった。

近年、味蕾の幹細胞を培養して作製したオルガノイドに、I, II, III 型細胞それぞれに選択的な分子を発現する 3 種類の細胞型が分化すると報告された<sup>2)</sup>。この味蕾細胞分化は遺伝子の発現パターンと I, II, III 型細胞が分化する割合で、各部位の味蕾の性質をどのように反映しているか評価できると考えられる。しかし、個々の味蕾を構成する細胞型の割合の均一性が検証されていないため、これまで報告されている細胞型の割合を指標にして、オルガノイドを評価できるか、疑問があった。

### 2. 研究の目的

本研究は、味蕾が存在する部位ごとに、ほぼ一定であるとされている個々の味蕾の細胞型の構成比を再検討し、味蕾基底細胞から味蕾への細胞供給のメカニズムの一端を解明することを目的とする。また、味蕾細胞の細胞増殖・分化メカニズムの解明を進めるために、線維芽細胞増殖因子 Fgf の味蕾における発現を解析した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 個々の味蕾を構成する細胞型の解析：II 型細胞と III 型細胞

細胞型の解析は、ホールマウント免疫染色法で行なった。コラゲナーゼとエラスターゼを上皮下に注入し、味蕾を含む領域の口腔上皮(有郭乳頭、茸状乳頭、軟口蓋)を剥離して、細胞型に選択的に発現する分子に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行なった。染色結果は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、味蕾の長軸方向、基底部から味孔部に向かって 0.5~1  $\mu\text{m}$  間隔で、連続断面像として取得した。その後、画像解析ソフトの Fiji と Imaris を用いて、味蕾の三次元像を作成し、個々の味蕾に含まれる II 型細胞と III 型細胞を計数した。この方法は、組織切片を用いる方法とは異なり、個々の味蕾に含まれる細胞の形態と数を正確に解析できる。しかし、I 型細胞は、極めて薄く伸びた細胞質が周囲の細胞に巻きつき、複雑に入り組んだ構造をしているため、この方法でも解析は極めて難しかった。そこで、本研究では、II 型と III 型細胞に限定して解析を行った。

II 型細胞の検出：3 型 IP3 受容体(IP3R3)に対する抗体を用いた。IP3R3 はノックアウトマウスの解析から、甘味・苦味・うま味、いずれの味を受容する II 型細胞にも必須のタンパク質であることが示されているため、信頼性の高いマーカー分子である。

III 型細胞の検出：4 型炭酸脱水酵素(CA4)と神経接着分子(NCAM)に対する抗体を用いた。CA4 は炭酸の酸味を受容するのに必須のタンパク質で III 型細胞に選択的に発現する。しかし、すべての III 型細胞で発現するかは明らかではない。一方、NCAM は III 型細胞を検出するために最も古くから用いられているマーカー分子で、有郭乳頭では他のマーカー分子よりも多くの III 型細胞を検出できる。しかし、有郭乳頭以外での細胞型特異性の解析は十分には行われていない。

そこで、本研究では、まず、III 型細胞マーカーの CA4、NCAM が、II 型細胞マーカーの IP3R3 と完全に異なる細胞で発現するかを三重蛍光染色で検討した。その後、有郭乳頭、茸状乳頭、軟口蓋の個々の味蕾に含まれる II 型細胞と III 型細胞の数を解析した。

#### (2) 味蕾および味蕾周囲上皮で発現する Fgf の解析

Fgf シグナルは、さまざまな細胞の増殖・分化、細胞機能のホメオスタシスに重要な役割を果たす。これまで、味覚乳頭の形成における Fgf の解析は行われているが、成熟した味蕾で発現する Fgf についてはほとんど情報がない。本研究では、有郭乳頭とその周囲の上皮から RNA を抽出して RT-PCR を行い、味蕾を含む有郭乳頭に強く発現する Fgf を検索した。さらに、*in situ* hybridization を行なって、発現の局在を解析した。

#### 4. 研究成果

##### III 型細胞マーカーの検討：

有郭乳頭、茸状乳頭、軟口蓋、いずれの部位の味蕾でも、IP3R3 と CA4 は完全に異なる細胞で発現しており、共発現はみられなかった。この結果は、IP3R3 は II 型細胞、CA4 は III 型細胞に特異的であるという従来の知見を支持している。CA4 を発現する細胞のほとんどは NCAM を発現しており [有郭乳頭 100% (701 NCAM(+)/CA4(+) cells /701 CA4(+) cells); 茸状乳頭 97% (97/100); 軟口蓋 98.9% (267/270)]、III 型細胞の大部分は CA4 と NCAM を共発現することが確認された。

一方、NCAM を発現する細胞には、CA4 を発現しない細胞が比較的多くみられ [有郭乳頭 11.4% (90 NCAM(+)/CA4(-) cells / 791 NCAM(+) cells); 茸状乳頭 8.5% (9/103); 軟口蓋 22.2% (76/343)]、茸状乳頭と軟口蓋では、その多くが IP3R3 を発現していた [有郭乳頭 0% (0 NCAM(+)/IP3R3(+) cells / 90 NCAM(+)/CA4(-) cells); 茸状乳頭 50% (6/12); 軟口蓋 79.7% (63/79)]。この結果は、NCAM が厳密には III 型細胞に特異的ではなく、茸状乳頭と軟口蓋では III 型細胞マーカーとして使えないことを示している。同時に、II 型と III 型細胞の中間的な性質を持つ細胞の存在を示しており、この細胞の機能と分化段階の解析が重要である。

##### 個々の味蕾に含まれる II 型細胞と III 型細胞の解析：

前項の解析結果に基づき、II 型細胞は IP3R3、III 型細胞は CA4 の発現で検出した。各部位の個々の味蕾で IP3R3 を発現する細胞の数は平均すると、軟口蓋が最も多く  $22.5 \pm 7.3$  個、次いで茸状乳頭で  $12.5 \pm 3.6$  個、有郭乳頭が最も少なく  $10 \pm 3.6$  個であった。一方 CA4 を発現する細胞は、有郭乳頭で最も多く  $5.9 \pm 2.3$  個、次いで軟口蓋で  $3.6 \pm 1.8$  個、茸状乳頭で  $1.7 \pm 1.1$  個であった。

味蕾に含まれる IP3R3(+)細胞 (II 型細胞)と CA4(+)細胞 (III 型細胞) の数の相関を解析すると、有郭乳頭ではピアソンの相関係数  $r = 0.442$  ( $p < 0.001$ )と弱い相関がみられたものの、茸状乳頭と軟口蓋の味蕾では  $r$  は 0.3 未満で、いずれの部位でも細胞型の比率は一定ではなく大きくばらついていた。この結果は、味蕾へ各細胞型が一定の割合で供給されるという従来の考え方ではうまく説明できない。味蕾細胞の分化には Shh、Wnt、BMP、Notch などさまざまなシグナル系が関与すると考えられている。味蕾細胞のターンオーバーでは、これらのシグナルの微妙な変化によって、個々の味蕾における細胞型の供給量は変化しており、一定ではない可能性がある。

##### 味蕾で発現する Fgf：

「有郭乳頭の上皮 (味蕾を含む)」と「有郭乳頭の周囲の上皮 (味蕾を含まない)」を RT-PCR で解析したところ、22 種類の Fgf のうち、Fgf 1, 9, 13, 14, 20 が有郭乳頭の上皮で強く発現していた。これらの Fgf の発現を *in situ* hybridization で解析したところ、Fgf 1 はほぼすべての味蕾細胞と味蕾のすぐ周囲の上皮に強く発現していた。Fgf 1 は細胞の増殖や細胞死の調節に関与する分子で、味蕾でも重要な役割をもつ可能性がある。また、Fgf 13 と 14 の発現は味蕾内の一部の細胞に検出された。これらの分子は、神経細胞の興奮性の調節に関与することが知られている。今後、これらの分子を発現する味蕾の細胞型と機能の解析が重要である。

##### < 参考文献 >

1. Miura H, Scott JK, Harada S, Barlow LA: Sonic hedgehog-expressing basal cells are general post-mitotic precursors of functional taste receptor cells. *Dev Dyn* 243(19): 1286-1297 (2014)
2. Ren W, Lewandowski BC, Watson J, Aihara E, Iwatsuki K, Bachmanov A, Margolskee RF, Jiang P: Single Lgr5- or Lgr6-expressing taste stem/progenitor cells generate taste bud cells *ex vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(46): 16401-16406 (2014)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Eriko Koyanagi-Matsumura, Hirohito Miura, Mitsuru Saito, Shuitsu Harada	4. 巻 385(3)
2. 論文標題 Type II/III cell composition and NCAM expression in taste buds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 557-570
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-021-03452-5	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 Eriko Koyanagi-Matsumura, Hirohito Miura, Mitsuru Saito, Shuitsu Harada	4. 巻 2(1)
2. 論文標題 Taste bud-associated expression of fibroblast growth factors in the circumvallate papillae in adult mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of South Kyushu Dental Society	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三浦裕仁
2. 発表標題 正常な味覚が維持されるしくみ：味蕾細胞のターンオーバー
3. 学会等名 第30回日本産業衛生学会全国協議会 シンポジウム4（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦裕仁、小柳江梨子、原田秀逸
2. 発表標題 味蕾細胞分化の制御機構
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会 メインシンポジウム1(味覚の新知見：発生から認知、行動表出まで)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 口腔生理学 味覚研究  
[http://w3.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/physiol/oralphysiology/taste\\_unit.html](http://w3.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/physiol/oralphysiology/taste_unit.html)

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
研究分担者	小柳 江梨子 (Koyanagi Eriko) (20791700)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教  (17701)	
研究分担者	原田 秀逸 (Harada Shuitsu) (60128452)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員  (17701)	
研究分担者	山中 淳之 (Ymanaka Atsushi) (80343367)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授  (17701)	

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
---------	---------