

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10005

研究課題名(和文) 多能性幹細胞より味細胞への分化誘導法の開発；味蕾オルガノイド共培養を用いて

研究課題名(英文) Development of a method for inducing differentiation of pluripotent stem cells into taste cells; using taste bud organoid co-cultures

研究代表者

川村 文彦 (KAWAMURA, FUMIHIKO)

京都大学・医生物学研究所・特定助教

研究者番号：10757074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：五感のひとつである味覚を司るのは味細胞である。これまでに多能性幹細胞から味細胞を分化誘導した報告はなかった。申請者は先行研究において、マウスES細胞から味細胞マーカーを発現する分化細胞を作製した。本研究では分化誘導効率を上げるために、Sox2を薬剤誘導性Tet-onシステムを用いて分化段階特異的に強制発現させた。蛍光レポーターでもSox2発現も確認でき、今までより多くの味細胞マーカー陽性細胞を作製できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞レベルの味覚研究を行うには大量の味細胞が必要となる。今まではマウスやサルなどの実験動物から味蕾オルガノイドを作製していたが、分裂回数や供給量には限界がある。多能性幹細胞から味細胞を分化誘導できれば、味覚研究全般が大幅に進展すると考えられる。社会実装できる可能性も高い。本研究ではマウスES細胞より効率的に味細胞マーカー陽性細胞を作製できた。これは、ヒトES細胞やヒトiPS細胞にも応用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Taste cells are responsible for the sense of taste, one of the five senses. There has been no report of induction of differentiation of taste cells from pluripotent stem cells.

In a previous study, the applicant generated differentiated cells expressing taste cell markers from mouse ES cells. In the present study, Sox2 was forced to be expressed in a differentiation stage-specific manner using a drug-inducible Tet-on system in order to increase the efficiency of differentiation induction. We were also able to confirm Sox2 expression by a fluorescent reporter and generated a larger number of cells positive for the gustatory cell marker than ever before.

研究分野：再生医療

キーワード：味蕾オルガノイド 分化誘導 多能性幹細胞 味覚再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

味細胞は舌上皮の茸状乳頭、有郭乳頭、葉状乳頭にある味蕾に存在し、10日前後のサイクルで脱離・再生される。味細胞にはナトリウムチャンネル ENaC を発現する Type1、甘味、旨味、苦味を受容する type2、酸味、塩味を受容する type3 の三種類があり味覚を司っている (Chandrashekar J, *Nature* 2006)。味蕾の分化・維持には Shh や Sox2 遺伝子が重要な役割を果たし (Miura H, *Mech.Dev.*2001、Okubo T, *Gene & Dev.* 2006)、また味蕾基底部に存在する Lgr5、Lgr6 陽性細胞が三種類の味細胞に分化する幹・前駆細胞であることが知られている (W Ren, *PNAS* 2014)。これらマーカー遺伝子の発現から単離した細胞を培養することで味蕾オルガノイドが形成されるが、作成されたオルガノイド中の味細胞の割合はごく僅かで、より効率の高い味細胞の培養法の開発が望まれる。また成体から幹細胞採取に頼った培養法では大量に味細胞を生産することに向かない。

2. 研究の目的

味細胞を大量生産する目的で、申請者は多能性幹細胞から味細胞の分化誘導法を開発している。これは多能性幹細胞を内胚葉に分化誘導し、更に成体幹細胞由来のマウス味蕾オルガノイドとの共培養を行うことで、味細胞マーカーを発現する細胞に分化誘導する方法である。申請者の前所属講座 (関西医科大学) では蛍光標識マウスを使用した多色細胞系譜追跡法 (Yanai H, *J. Gastroenterol* 2013) によって、舌上皮細胞、味蕾細胞は食道上皮細胞と同じく内胚葉起源であることを見出した。

申請者の開発した味細胞分化法は味細胞の内胚葉起源説を支持し、またマウス味蕾オルガノイドから味細胞の分化を促す物質が分泌されていることを示唆する。多能性幹細胞からの味細胞分化誘導法の進展によって、味細胞の分化経路を再現し、また味細胞を分化誘導する物質を発見することで、味細胞の分化起源・原理を明らかにすることが本研究における目的である。

3. 研究の方法

味細胞の誘導効率の向上

- 1 本研究におけるマウス ES 細胞から前方前腸への誘導法は、肺泡オルガノイドを分化した報告を参考にしている (Yamamoto Y, *Nat Method* 2017)。この他にも内胚葉の誘導法は甲状腺や胃、肝臓、小腸、大腸などが報告されている。よって、様々な添加物による誘導スクリーニングを行ない、より高効率な味細胞誘導法を検討する。また、共培養する細胞も IPP 由来の味蕾オルガノイドに加えて、外胚葉や中胚葉、神経細胞など複数の共培養系を検討する (Koike H, *Nature* 2019)。

- 2 胚発生初期の舌上皮において、Sox2 が高発現している領域では味細胞への分化が促進されることが報告されている (Okubo T, *Gene and Dev* 2006)。本研究でも誘導された味細胞マーカー陽性細胞は、すべて Sox2 を発現していた。対照的に、Sox2 発現のない細胞には味細胞マーカーは全く見られなかった。Sox2 のプロモータには Sox2 自身が作用することが知られているので (Fujita K, *The FEBS journal* 2014)、一時的な Sox2 の強制発現により内在性の Sox2 発現を促すことが期待される。

そこで Tet-on システムを用い、分化誘導の各段階でドキシサイクリン依存的に外来性 Sox2 を発現させることを計画している。これによって内在性 Sox2 発現を促す。分化誘導時にライブイメージングで確認できるよう、蛍光レポーターもマウス ES 細胞に導入する。味細胞分化への影響を検証する。

作成した味細胞の機能試験

本研究では分化誘導細胞に対して免疫染色による味細胞マーカーの発現を確認したが、今後は qRT-PCR による転写発現量も解析する。また、5 味に対する味細胞受容体の発現量も確認する。味細胞は味質を受容すると細胞内カルシウム濃度が変化する。これを蛍光指示薬によるカルシウムイメージング法で定量化することができる。本研究でも分化誘導した味細胞に味質を添加し、受容体や細胞内のシグナル伝達の機能性を解析する。

マウス味蕾オルガノイドから分泌される味細胞誘導因子の特定

味蕾オルガノイドと共培養した背側前方前腸細胞と、単独培養した背側前方前腸細胞を single cell RNA-seq で比較解析し、味細胞分化を引き起こす誘導遺伝子を特定する。

共培養を用いない分化誘導法の確立

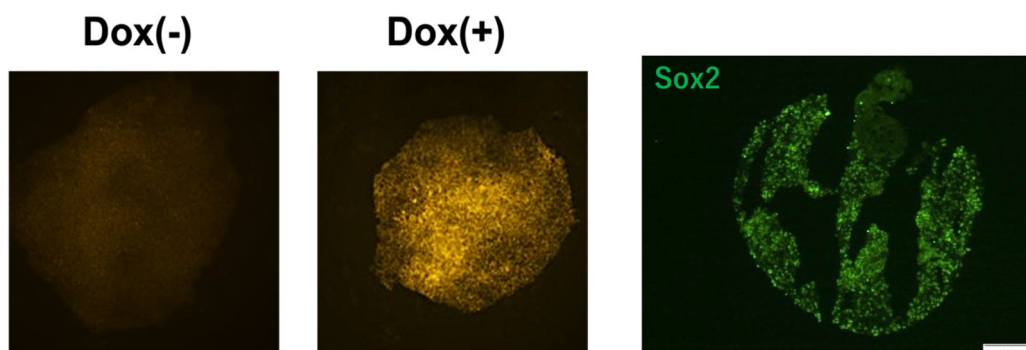
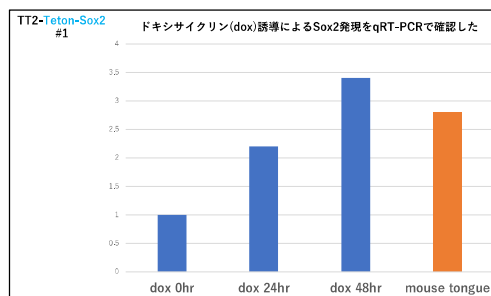
成長因子やサイトカイン、低分子化合物の添加によって特定した誘導遺伝子の発現を再現し、他の細胞との共培養を必要としない誘導法を確立する。

ヒト多能性幹細胞からの味細胞誘導

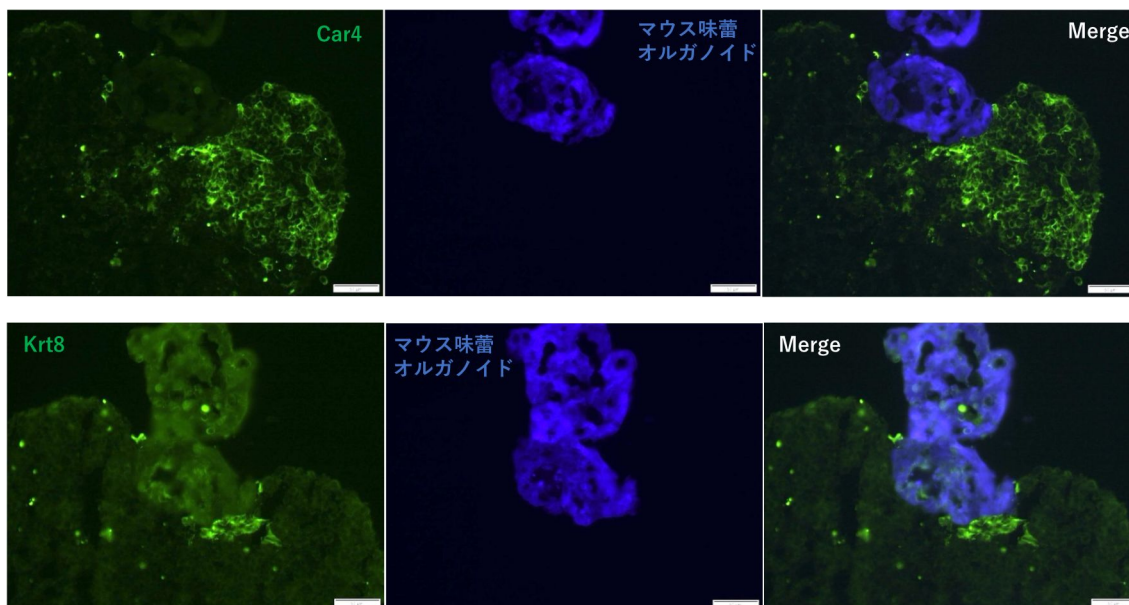
申請者はこれまでにマウス ES 細胞で確立した分化誘導法を応用して、ヒト iPS 細胞でも肝細胞や造血幹細胞を樹立した。味細胞でも同様にして、ヒトの相同な誘導遺伝子を特定し、ヒト iPS 細胞からの誘導法確立を目指す。

4. 研究成果

Tet-on システムで Sox2 を発現させるベクターをマウス ES 細胞に導入し、分化誘導の各段階でドキシサイクリン(Dox)依存的に外来性 Sox2 を発現させること成功した。さらに、その発現をライブイメージングできるように、蛍光レポーターも導入した。分化段階で Dox を添加すると蛍光が見え、qPCR と免疫染色によって内在性 Sox2 発現が促されたことを確認した。蛍光タンパクを発現している細胞を sorting してマトリゲル内で共培養分化誘導を行うと、今までより多くの味細胞マーカー陽性細胞を作製することができた。



また、マウス味蕾オルガノイドと前方前腸細胞塊を接着して共培養すると、接着した近傍から味細胞マーカー (Car4, Krt8) が発現した。これは、マウス味蕾オルガノイドから分泌された誘導因子が接着面付近の前方前腸細胞に分化を促したと考えられる。



しかしながらそれ以降の研究は、所属していた関西医科大学医学部実験病理学講座の上野博夫教授が退職し、講座が消滅して職を失ったため継続することが困難であった。

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 2件）

1. 著者名 Ooeda Keiko, Kubiura Ichimaru Musashi, Tsuji Saori, Okuyama Shota, Yamashita Mao, Mine Akari, Kawamura Fumihiko, Ueyama Takafumi, Tada Masako	4. 巻 8
2. 論文標題 A two dimensional multiwell cell culture method for the production of CYP3A4 expressing hepatocyte like cells from HepaRG cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmacology Research & Perspectives	6. 最初と最後の頁 e00652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prp2.652	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 Okuyama Shota, Kawamura Fumihiko, Kubiura Musashi, Tsuji Saori, Osaki Mitsuhiro, Kugoh Hiroyuki, Oshimura Mitsuo, Kazuki Yasuhiro, Tada Masako	4. 巻 8
2. 論文標題 Real time fluorometric evaluation of hepatoblast proliferation in vivo and in vitro using the expression of <i>CYP3A7</i> coding for human fetus specific P450	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmacology Research & Perspectives	6. 最初と最後の頁 e00642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prp2.642	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 川村文彦
2. 発表標題 iPS細胞から味細胞作製 -おいしさの見える化と味覚障害治療を目指して-
3. 学会等名 第10回超異分野学会本大会テクノロジースプラッシュ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川村文彦
2. 発表標題 ES/iPS 細胞より味細胞への分化誘導法の開発
3. 学会等名 第1回 JASTS 若手の会
4. 発表年 2022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
---------	---------