

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591922
 研究課題名（和文） 味覚障害患者の舌にみられる味覚受容体遺伝子発現の変化とその臨床的意義の解明
 研究課題名（英文） Changes in taste receptor gene expression in the tongue of patients with taste disorders and elucidation of their clinical significance
 研究代表者
 池田 稔（IKEDA MINORU）
 日本大学・医学部・教授
 研究者番号：30130420

研究成果の概要（和文）：舌における味覚受容体遺伝子の発現について、健常者と味覚低下例および自発性異常味覚例で比較検討した。味覚低下例で有意の発現率の低下がみられ、また自発性異常味覚例では有意の発現亢進がみられた。さらに、亜鉛欠乏のラットにおいて、受容体遺伝子の発現が有意に低下し、亜鉛の投与により発現の改善がみられた。また、このラットにおける遺伝子発現の変化を、*in situ* hybridizationにより形態学的に示した。味覚障害の発現機序に、受容体遺伝子の発現異常が関与するものと思われる。

研究成果の概要（英文）：We evaluated taste receptor gene expression in the tongue of healthy subjects in comparison with expression in subjects with hypogeusia or spontaneously abnormal taste. Expression rate was significantly decreased in subjects with hypogeusia, and significantly increased in those with spontaneously abnormal taste. Further, gene expression rate was significantly decreased in zinc-deficient rats, and this decreased rate was improved by administration of zinc. Changes in taste receptor gene expression in rats were morphologically shown by *in situ* hybridization. The mechanism of expression of taste disorder was considered to involve impaired expression of taste receptor genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：味覚・味覚障害・T2R・亜鉛欠乏

1. 研究開始当初の背景

(1) 1990年代に味覚にG蛋白質共役型受容体（G protein-coupled receptors, GPCR）が関与していることが報告され、ここ数年、味

覚に関する分子生物学的機構の研究は急速な進展をみせている。ヒトの味覚は甘味、塩味、酸味、苦味、旨味に分類される。それらの味質に対する味の受容機構については、塩味と

酸味ではイオンチャンネルが深く関与すると言われているが、甘味、苦味、旨味ではGPCRが関与しており、それらに関連した味覚受容体遺伝子(T1R, T2R)について、ラットやマウスなどにおいては多くの報告がなされている。しかしヒト、特に味覚障害患者におけるそれらの検討はこれまでのところ極めて不十分であった。

(2) 日本大学医学部生体機能医学系生理学分野では、ヒト健常者の舌組織におけるこれら味覚受容体、特に苦味に関連したT2R遺伝子の発現をRT-PCR法で検出する方法を開発してきた。この方法を用いて、申請者はこれまでに約50症例の味覚低下例と約25症例の自発性異常味覚症例の舌におけるT2R味覚受容体遺伝子の発現について検討を行ってきた。その結果、特に苦味の味覚低下例ではT2R遺伝子発現頻度が有意に低下することが示された。また、苦味の自発性異常味覚症例では逆にT2R受容体遺伝子の発現頻度が有意に亢進することが示されている。これらの結果は味覚障害の病態に、味覚受容体遺伝子発現の変化が関与することを示している。

2. 研究の目的

(1) 味覚障害は加齢とともに増加する疾患であり、本邦では社会の急速な高齢化に伴い、味覚障害の症例数が顕著な増加を示している。その症例数は1990年から2003年までの13年間で約1.8倍に増加していることが日本口腔・咽頭科学会の会員を対象に行った我々(池田)の調査で明らかになっており、味覚障害は現在十分な医学的対応を必要としている重要な感覚器障害のひとつである。増加する味覚障害患者に対応する臨床の現場では、味覚障害の発現機構の解明が求められている。

(2) 本研究では、味覚障害患者の舌における味覚受容体遺伝子の発現の特徴的な変化を検討し、味覚受容体遺伝子のレベルで味覚障害の発現機序を検討する。また、味覚障害の原因としてその重要性が広く知られている亜鉛の欠乏が、味覚受容体遺伝子の発現にいかなる影響をおよぼすのか、ラットを用いて厳密な基礎的検討を加える。

3. 研究の方法

(1) 味覚障害患者における検討

T2R系の味覚受容体遺伝子は苦味の受容体といわれているものであり、われわれはヒトの舌を擦過して、無痛、非観血的に標本を採取し、PCR法によってその増幅に成功してい

る。今回の研究では、PCR法で増幅に成功しているT2R系味覚受容体の舌における発現を指標に、味覚障害例の検討をすすめた。

〈組織採取〉 舌組織の採取はヒト舌の葉状乳頭付近に対して3-5回程度擦過して組織を採取する。採取後ただちにTRIzol(Invitrogen)を0.5ml加えてよく攪拌混和して-20℃に保存する。**〈RNA抽出〉** 採取した組織からTotal RNAを抽出する。得られたTotal RNAは10 μ lのDEPC Treated Water(Invitrogen)に溶かし、その濃度を測定した後、-80℃に保存する。**〈逆転写反応とPCRの実施〉** Total RNA 0.65 μ gをrandom primerとともに逆転写酵素SuperScript III(Invitrogen)を用いて逆転写反応を行い20 μ lのcDNA反応液とする。このcDNA反応液0.5 μ lをテンプレートにしてExTaq(Takara)を用いてPCRを施行する。**〈電気泳動と遺伝子発現の判定〉** 得られたPCR反応液よりアジレント社のAgilent 2100 Bioanalyzerを用いて、PCR産物の増幅量ならびにPCR産物のサイズを測定する。PCRは35サイクル行い、明瞭に現れるバンドを味覚受容体遺伝子発現とし、不明瞭なバンドは発現していないと判断する。

(2) ラットにおける味覚受容体遺伝子に対する亜鉛欠乏の影響：RT-PCRによる検討

亜鉛の欠乏は味覚障害の一つの重要な原因である。われわれは苦味の味覚受容体遺伝子であるTAS2Rsと塩味味覚受容体遺伝子であるENaCの発現が、亜鉛の欠乏およびその補充によりどのように影響されるのか、ラットの有郭乳頭部の上皮を用いて検討した。

対象：3週齢S-D系雄性ラットを36匹用いた。飼料として、正常飼料(7mg Zn/100g)と亜鉛欠乏飼料(<0.06mg Zn/100g)を用いた。

研究方法：12匹のラットを正常飼料で1カ月あるいは2カ月間飼育した。12匹を亜鉛欠乏飼料で同様の期間飼育した。さらに、12匹を亜鉛欠乏飼料で28日間飼育した後、亜鉛剤の投与を28日間行った。飼育期間が終了した時点で有郭乳頭部の上皮を摘出し、味覚受容体遺伝子の発現をRT-PCRで検討した。検討した受容体遺伝子はTAS2R40、TAS2R105、TAS2R107、TAS2R118、TAS2R121、TAS2R130、TAS2R136、TAS2R140および塩味受容体遺伝子であるENaCとした。

(3) ラットにおける味覚受容体遺伝子に対する亜鉛欠乏の影響：*in situ* hybridizationによる組織学的検討

正常SDラット8週齢オス5匹を正常飼料

(亜鉛含量 7mg/100g) で飼育し、「正常食ラット」とした。また、亜鉛欠乏飼料 (亜鉛含量 0.06mg/100g 以下) で 4 週間飼育した 8 週齢の SD ラットオス 5 匹を「亜鉛欠乏食ラット」とし、実験に用いた。ネンブタール麻醉下にラットをホルムアルデヒド固定液を用いて灌流固定し、有郭乳頭を摘出し、パラフィン包埋して厚さ約 4 μ m に薄切した。これらの組織切片を用いて *in situ* hybridization で味覚受容体遺伝子の発現を検討した。検討した遺伝子は、RT-PCR で舌有郭乳頭部の組織において発現が確認され、かつプライマー作成が可能であった TAS2R105、TAS2R118、TAS2R136、ENaC の 4 つの遺伝子である。味覚受容体遺伝子 TAS2R に対し、発色が最もよく認められた 2 切片を選別し、1 味蕾あたりの発色した細胞数を求め、正常食ラットと亜鉛欠乏食ラットの陽性細胞数の変化を比較検討した。

4. 研究成果

(1) 味覚障害患者における味覚受容体遺伝子発現の検討

24 例の健常者の舌から採取した検体を用いて、10 個の T2R 味覚受容体遺伝子の発現を検討した。健常者において 10 遺伝子のうち 6 種類の受容体遺伝子の良好な発現を認めた。一方、残りの 4 遺伝子の発現は比較的低率であった。

同様の味覚受容体遺伝子の発現を 40 例の味覚低下症例で検討した。その結果、健常者で発現の高かった 6 遺伝子において味覚低下例での有意な発現率の低下がみられた。味覚受容体遺伝子の発現低下は、味覚低下の発症機序に重要な関連性をもつものと思われた。

自発性異常味覚の 43 症例で味覚受容体遺伝子の発現の変化を検討した。健常者では発現が低率であった 3 つの遺伝子の発現率が、自発性異常味覚の例では有意に亢進していた。通常は発現の乏しい遺伝子の発現亢進が、自発性異常味覚の発症機序に何らかの関与を示しているものと思われる。

(2) ラットにおける味覚受容体遺伝子に対する亜鉛欠乏の影響：RT-PCR による検討

亜鉛欠乏はヒトにおける味覚障害の重要な原因となる。その機序の検討として、味覚受容体遺伝子の発現変化を、亜鉛欠乏ラットを作成して検討した。正常ラットの有郭乳頭部の上皮において味覚受容体遺伝子 TAS2R 及び ENaC (塩味受容体遺伝子) の発現を認めた。さらに、これらの遺伝子のうち TAS2R40、TAS2R107、TAS2R136 は亜鉛欠乏飼料で飼育したラットで有意に発現の低下を認めた。発現

の低下したこれら 3 つの遺伝子のうち、TAS2R107 は亜鉛剤を投与することで遺伝子の発現の有意な改善を示した。今回の検討で TAS2R 遺伝子の中に、亜鉛の欠乏により顕著な発現低下を示し、また、亜鉛の補充により良好に発現が改善する遺伝子が存在することが明らかとなった。われわれはこれらの遺伝子が亜鉛欠乏性味覚障害の発症機序、あるいは味覚障害の改善の機序に何らかの役割を果たしている可能性があるものと推察した。

(3) ラットにおける味覚受容体遺伝子に対する亜鉛欠乏の影響：*in situ* hybridization による組織学的検討

舌有郭乳頭における味覚受容体遺伝子発現を *in situ* hybridization を用いて検討した。正常ラットでは TAS2R105、TAS2R118、TAS2R136 は味蕾内の細胞に特異的に発現を認め、味蕾周辺の上皮細胞には発現を認めなかった。一方、ENaC は味蕾のみならず、その周囲の上皮細胞にも陽性細胞が認められた。また、亜鉛欠乏ラットでは検討した 3 つの TAS2R 受容体遺伝子全てで、1 味蕾あたりの陽性細胞数の顕著な減少が認められた。また、ENaC についても、亜鉛欠乏ラットにおいて、陽性細胞数の顕著な減少が観察された。本研究は、亜鉛欠乏により生じる味覚障害の発症機序に、味覚受容体遺伝子の発現低下が関与している可能性があることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Atsuo Ikeda, Hiroki Sekine, Kyoichi Takao, Minoru Ikeda, Expression and localization of taste receptor genes in the vallate papillae of rats: effect of zinc deficiency, *Acta Oto-Laryngologica*, 査読有, Apr 26, 2014 (投稿中)
- ② 池田 稔, 黒野 祐一、井之口 昭、武田 憲昭、愛場 庸雅、野村 泰之、阪上 雅史、プラセボ対照無作為化試験による亜鉛欠乏性または特発性味覚障害 219 例に対するボラプレジンク投与の臨床的検討、日本耳鼻咽喉科学会会報、査読有、116 巻 1 号、2013、17-26、https://www.jstage.jst.go.jp/article/jibiinkoka/116/1/116_17/_pdf

- ③ 池田稔、田中真琴、薬剤性味覚障害 疾患と病態生理、JOHNS、査読無、28 巻、2012、1797-1806
- ④ 池田稔、田中真琴、味覚、器官別機能と老化による病態 特集：高齢化社会と耳鼻咽喉科、JOHNS、査読無、28 巻、2012、1311-1314
- ⑤ 池田稔、加齢と味覚障害、日本口腔・咽頭科学会、査読無、25 巻、2012、133-138
- ⑥ 池田稔、田中真琴、池田篤生、味覚障害、特集：耳鼻咽喉科疾患の病態と診断・治療 (III)、医学と薬学、査読無、67 巻、2012、673-679、
<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ad6igyga/2012/006705/003&name=0673-0679j&UseID=133.43.80.5>
- ⑦ 平井良治、池田稔、臭覚・味覚はどのように発達するのか？、JOHNS、査読無、28 巻、2012、270-271
- ⑧ Hiroki Sekine, Kyoichi Takao, Koji Yoshonaga, Shinichiro Kokubun, Minoru Ikeda, Effects of zinc deficiency and supplementation on gene expression of bitter taste receptors (TAS2Rs) on the tongue in rats.、The Laryngoscope、査読有、122巻、2012、2411-2417
DOI : 10.1002/lary.23378
- ⑨ Hirai Ryoji, Takao Kyoichi, Onoda Keiko, Kokubun Shinichiro, Ikeda Minoru、Patients with phantogeusia show increased expression of T2R taste receptor genes in their tongues.、Annals of Otolaryngology, Rhinology, and Laryngology、査読有、121 (2) 巻、2012、
<http://search.proquest.com/docview/922765419/fulltextPDF?accountid=28224113-118>
- ⑩ Onoda Keiko, Hirai Ryoji, Takao Kyoichi, Kokubun Shinichiro, Ikeda Minoru、Patients with hypogeusia show changes in expression of T2R taste receptor genes in their tongues、The Laryngoscope、査読有、121 (12) 巻、2011、2592-2597
DOI: 10.1002/lary.22368
- ⑪ 池田 稔、関根大喜、舌のすべて 舌の生理と病態、ENTONI、査読無、134 巻、2011、1-7
- ⑫ 池田 稔、関根大喜、疾患から見たインフォームド・コンセントの実際・味覚障害、JOHNS、査読無、26 巻、2010、1943-1945
- ⑬ 池田 稔、小野田恵子、関根大喜、亜鉛欠乏、Clinical Neuroscience、査読無、28 巻、2010、1274-1275
- ⑭ 池田 稔、田中真琴、特集・味覚・嗅覚障害に対する診療戦略 味覚障害の治療、Monthly Book ENTONI、査読無、117 巻、2010、19-24
- [学会発表] (計 17 件)
- ① 池田 稔、シンポジウム「味覚のメカニズムと味覚障害—基礎から臨床への方向性を探る」味覚障害の原因と治療—臨床からのアプローチ、日本歯科医学会総会 分科会シンポジウム (歯科基礎医学会)、2012 年 11 月 9 日、大阪市
- ② 池田 稔、特別講演 味覚障害への対応、足立区耳鼻咽喉科医会学術講演会、2012 年 10 月 27 日、東京都
- ③ 池田篤生、関根大喜、田中真琴、高尾恭一、池田 稔、ラットの舌有郭乳頭部における味覚受容体遺伝子発現の局在と亜鉛欠乏による変化の検討、第 25 回日本口腔・咽頭科学会総会 学術講演会、2012 年 9 月 14 日、熊本県 熊本県立劇場
- ④ 関根大喜、高尾恭一、池田篤生、池田 稔、味覚受容体遺伝子の発現部位の検討、第 25 回日本口腔・咽頭科学会総会 学術講演会、2012 年 9 月 14 日、熊本県 熊本県立劇場
- ⑤ 田中真琴、高尾恭一、関根大喜、池田篤生、池田 稔、ラットの味覚受容体遺伝子発現に対するパクリタキセルによる影響の検討、第 25 回日本口腔・咽頭科学会総会 学術講演会、2012 年 9 月 14 日、熊本県 熊本県立劇場
- ⑥ 池田 稔、特別講演 味覚障害の臨床、第 192 回長久手会 (愛知医科大学耳鼻咽喉科)、2012 年 7 月 28 日、名古屋市
- ⑦ 関根大喜、高尾恭一、小野田恵子、池田篤生、池田 稔、亜鉛と味覚障害：味覚受容体遺伝子 (TAS2R) の発現に対する亜鉛欠乏の影響、第 23 回日本微量元素学会学術集会、2012 年 7 月 6 日、東京都砂防会館
- ⑧ 池田 稔、特別講演 味覚障害の臨床、平成 24 年度定例総会 岐阜県耳鼻咽喉科医会 第 58 回研修会、2012 年 6 月 17 日、岐阜市
- ⑨ 野村泰之、池田 稔、阪上雅史、味覚障害の診断と治療効果判定における濾紙ディスク法検査の有用性、第 113 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2012 年 5 月 11 日、新潟市 朱鷺メッセ (新

潟コンベンションセンター)

- ⑩ 田中真琴、関根大喜、高尾恭一、池田篤生、池田 稔、抗悪性腫瘍薬 (パクリタキセル) によるラットの味覚受容体遺伝子発現の変化の検討、第 113 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2012 年 5 月 11 日、新潟市 朱鷺メッセ (新潟コンベンションセンター)
- ⑪ 田中真琴、高尾恭一、関根大喜、池田 稔、抗悪性腫瘍薬 (パクリタキセル) 投与によるラットの味覚受容体遺伝子 (TAS2R family) 発現の変化、第 45 回日本味と匂学会、2011 年 10 月 7 日、金沢市 (石川県立音楽堂)
- ⑫ 平井良治、高尾恭一、小野田恵子、池田 稔、シンポジウム 「ヒト味覚研究の最前線」 味覚障害患者における苦味受容体遺伝子の発現について、第 45 回日本味と匂学会、2011 年 10 月 6 日、金沢市 (石川県立音楽堂)
- ⑬ 平井良治、池田 稔、シンポジウム 「味覚障害診療ガイドライン作成に向けて」 味覚障害の原因と分類、第 24 回日本口腔・咽頭科学会、2011 年 9 月 8 日、広島市 (ANAクラウンプラザホテル広島)
- ⑭ 関根大喜、池田 稔、亜鉛欠乏飼育期間によるラットの舌有郭乳頭部の味覚受容体遺伝子発現の変化、第 24 回日本口腔・咽頭科学会、2011 年 9 月 8 日、広島市 (ANAクラウンプラザホテル広島)
- ⑮ 池田 稔、ランチョンセミナー 「加齢と味覚障害」、第 24 回日本口腔・咽頭科学会、2011 年 9 月 8 日、広島市 (ANAクラウンプラザホテル広島)
- ⑯ 池田 稔、教育講演 「味覚検査」、第 60 回日本医学検査学会、2011 年 6 月 4 日、東京都 (東京国際ホール)
- ⑰ 池田 稔、味覚障害への対応、神戸地区耳鼻咽喉科医会総会・学術講習会、2010 年 11 月 27 日、神戸市

[図書] (計 1 件)

- ① 池田 稔、診断と治療社、耳鼻咽喉科・頭頸部外科研修ノート、2011、2

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 稔 (IKEDA MINORU)
日本大学・医学部・教授
研究者番号：30130420

(2) 研究分担者

高尾 恭一 (TAKAO KYOICHI)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：90187922

小野田 恵子 (ONODA KEIKO)

日本大学・医学部・兼任講師

研究者番号：00349995

関根 大喜 (SEKINE HIROKI)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：10398860

田中 真琴 (TANAKA MAKOTO)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：00526121

浅野 友規美 (ASANO YUKIMI)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：60535178

平井 良治 (HIRAI RYOJI)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：70409027

(3) 連携研究者

()

研究者番号：