

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 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592061

研究課題名（和文） 味蕾幹細胞ニッチのパラダイム転換

研究課題名（英文） Paradigm - shift of the stem cell niche of taste buds cells

研究代表者

太田 正人 (OTA MASATO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：70313228

研究成果の概要（和文）：

もともと口の粘膜や唾液を分泌する腺などにもなりうる上皮性幹細胞が、口の中の舌や上あごの奥や喉の周りにある味を感じる細胞をずっと作り続けている可能性が示唆された。この幹細胞は、特徴的な特徴として、細胞の増殖の速度がとてもゆっくりであること、また、数個の遺伝子を持っていることを確認した。また、このような遺伝子を持つ口の粘膜の細胞は、歯の根を作る幹細胞としても重要な役割を果たす可能性も示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The epithelial stem cells that originally have been thought to make glands that secrete saliva and mucous membranes of the mouth. Here, we suggest that these stem cells also make cells feeling the taste in the mouth that locate around the tongue, back part of the upper jaw and throat. We observed that these cells have the very slow rate of cell growth and the expression of several genes that is known as characteristic feature of the stem cells. Further, the cells of the mucosa of the mouth with such genes was also suggested to play an important role as a stem cell to make the tooth roots.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
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	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：機能系歯科学

科研費の分科・細目：機能系歯科学

キーワード：(1) 味蕾幹細胞 (2) BrdU 標識長期維持細胞 (3) 遺伝子群の検索 (4) Hes1 (5) Meis2

1. 研究開始当初の背景

(1) 一つの味蕾には、味細胞のほか、構造維持や分泌などの機能を持った（味細胞と明らかに異なる）支持細胞などの40～120個程度の異なるタイプの細胞が

含まれている。

(2) 古典的な研究結果から提唱されている味蕾幹細胞のモデルでは、『味蕾基底部の基底細胞が味蕾の幹細胞であり、基底細胞から様々な細胞が分化してくる。』

そして、味蕾の細胞はおよそ2週間程度で置き換わりつつ、生涯にわたり維持されていく』と信じられてきた。しかし、他の組織の組織幹細胞で明らかにされた共通特性を味蕾の基底細胞は具していないことが研究によって明らかにされてきた。

(3)われわれは、マウスを用いた先行研究において、味前駆細胞ではいくつかの遺伝子群が味細胞分化マーカーの転写調節領域に共通しており、それらが味細胞の分化調節に関与することを示唆する結果を得ていた。よって、この細胞分化調節に関わる可能性のある遺伝子群に注目し、味蕾における味細胞の幹細胞の維持に関わる可能性を遺伝子破壊マウスを用いて解析を行っていた。

2. 研究の目的

(1)本研究においては、味蕾を形成する口腔上皮幹細胞(味蕾幹細胞)特有の組織幹細胞の維持領域を同定し、味蕾幹細胞が維持されるニッチの分子機構を解析することによる味蕾幹細胞ニッチのパラダイムシフトを目的とする。

(2)口腔上皮幹細胞の維持に関わる遺伝子群が、口腔領域の他の器官(歯、唾液腺)などの発生や維持に関わる可能性について検討し、上記のニッチの普遍性や特異性について検討し、味蕾幹細胞ニッチの機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)マウス新生児に対し、生後3日から生後14日まで、BrdUを1日2回持続的に投与する。その後、マウスの舌を8週間後まで毎週サンプリングして、茸状乳頭、有郭乳頭について組織学的な解析によりBrdU長期維持細胞の分布パターンを解析する。

(2)これらの標本において、分化制御に関連する転写因子群との共発現の可能性について組織学的に解析する。

(3)苦み物質に対する忌避行動を行動学的解析手法を用いて解析し、組織学的な結果との相関性を検討する。

(4)インフォーマティクスの手法を用いて候補遺伝子を絞り込み、その遺伝子のノックアウトマウスの舌における表現型を解析することにより分子の発現調節機構の解析を行う。

4. 研究成果

2010年度においては、味蕾を形成する口腔上皮幹細胞(味蕾幹細胞)特有の組織幹細胞の維持領域を同定するため、野

生型マウス新生児に対し、生後3日から生後14日まで、BrdUを1日2回持続的に投与する。その後、マウスの舌を8週間後まで毎週サンプリングして、茸状乳頭、有郭乳頭について組織学的な解析を行ない、BrdU標識長期維持細胞(BrdU-LRCs)の標識と同定を行なった。1)味蕾幹細胞の維持に関わる微小領域として、茸状乳頭だけでなく、有郭乳頭に注目し、BrdU長期維持細胞の同定をおこなった。その結果、細胞代謝の活発な細胞群が有郭乳頭を構成する細胞群の大半を占めているが、有郭乳頭基底部でエブネル腺の接合部に近い領域に、BrdU長期維持細胞が局在し、維持されていることを発見した。また、この領域はHes1遺伝子を発現していることをin situ hybridization法を用いて確認した。味蕾幹細胞の維持に関わる特異的遺伝子群の検索として抽出された候補群の遺伝子にHes1は含まれており、この領域が味蕾幹細胞である可能性が高い。また、観察結果から、エブネル腺も同一の幹細胞に由来する可能性が示唆され、この領域の組織幹細胞として重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

2011年度は1)京都大学影山研究室で作成されたHes1 flox/+マウスを分与してもらい、上皮特異的にノックアウトマウスを作成できるK14-Creマウスと交配することにより、味蕾上皮でのHes1遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスを作成する。2)作成されたHes1コンディショナルノックアウトマウスの表現型の解析として、最適化されたBrdU標識長期維持細胞(BrdU-LRCs)の標識条件と同定条件を用いて、Hes1コンディショナルマウスにおけるBrdU長期標識および標識細胞追跡実験を行う予定であった。しかし、2011年3月に発生した東日本大震災によって東京医科歯科大学にて飼育していた遺伝子改変マウスの飼養にトラブルが発生し、また、様々な実験機器や保管していたサンプルの廃棄および再収集に手間取った。このような状況から、京都大学から譲渡予定の遺伝子改変マウスについても、同様の理由で譲渡を受けられなかった。これらの解析については、今後の課題として引き続き取り組む予定である。

また、Hes1タンパク質に対する特異抗体を用いて、ニッチ領域における発現や局在パターンを検討したところ、このタンパク質自身が細胞質と核をシャトリングされることによって制御されている可能性が示唆された。その機構についても培養細胞を用いて解析する予定である。

一方、歯根の形成過程において、ヘルトビッチ上皮鞘(HERS)の細胞において、Chd3、

VIP, HES1, Ectodinなどの遺伝子が発現しており、歯根の伸長に重要な役割を果たすことが示唆された。また、Ectodin と相互作用する受容体Lrp4や分泌性蛋白質BMP4なども歯根の伸長に関与することが示唆された。これらの遺伝子群やタンパク質の機能と幹細胞のバイオロジーについては今後の課題として取り組む予定である。

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)

1. [雑誌論文] (計 6 件)

①Xu J, Kawashima N, Fujiwara N, Harada H, Ota MS, Suda H. Promotional effects of vasoactive intestinal peptide on the development of rodent Hertwig's epithelial root sheath. *Congenit Anom (Kyoto)*. 査読有、Vol.52、No.3、2012、162-7.

②Fujioka-Kobayashi M, Ota MS, Shimoda A, Nakahama K, Akiyoshi K, Miyamoto Y, Iseki S. Cholesteryl group- and acryloyl group-bearing pullulan nanogel to deliver BMP2 and FGF18 for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 査読有、Vol.3、No.30、2012、7613-20.

doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01419.x.

③Date Y, Yokoyama Y, Kondo H, Kuroda S, Ohya K, Ota MS, Iseki S, Kasugai S. Restricted expression of chromatin remodeling associated factor Chd3 during tooth root development. *J Periodontol Res*. Vol.47、No.2、2012、180-7. doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01419.x.

④Ohazama A, Haworth KE, Ota MS, Khonsari RH, Sharpe PT. Ectoderm, endoderm, and the evolution of heterodont dentitions. *Genesis*. 査読有、Vol.48、No.6、2010、382-9

doi:10.1002/dvg.20634

⑤Ohazama A, Porntaveetus T, Ota MS, Herz J, Sharpe PT. Lrp4: A novel modulator of extracellular signaling in craniofacial organogenesis. *Am J Med Genet A*. 査読有、Vol.152A、No.12、2010、2974-83.

doi: 10.1002/ajmg.a.33372. Review.

⑥Ohazama A, Blackburn J, Porntaveetus T, Ota MS, Choi HY, Johnson EB, Myers P, Oommen S, Eto K, Kessler JA, Kondo T, Fraser GJ, Streelman JT, Pardiñas UF, Tucker AS, Ortiz PE, Charles C, Viriot L, Herz J, Sharpe PT. A role for suppressed incisor cuspal

morphogenesis in the evolution of mammalian heterodont dentition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有、Vol.107、No.1、2010、92-7.

[学会発表] (計 19 件)

(海外: 4 件)

①Ota MS, Kaneko Y, Kondo K, Ogishima S, Tanaka H, Kondo T. Combined in silico and in vivo analyses reveal role of Hes1 in taste cell differentiation. *HSDB symposium 2012*. 11.26-27

②Lee JW., Ota MS., Fujiwara N., Yonezawa T., Date Y., Harada H., Iseki S., Seo HJ., Jeon WB., Cha BY.1, Nagai K., Woo JT. Biological effects of cyclic diarylheptanoids on tooth root formation. *The 10th Tooth Morphogenesis and Differentiation 1-4 September 2010 Berlin*.

③Ota MS., Nakahara T., Ohazama A., Schmidt-Ullrich R., Kanri Y., Kozawa Y., Aoba T., Sharpe P. T., Kondo T., Iseki S. The role of Wnt signaling for patterning of molar tooth roots in mammals. *The 10th Tooth Morphogenesis and Differentiation 1-4 September 2010 Berlin*.

④Date Y., Ota MS., Yokoyama Y., Iseki S., Kasugai S. Genome-wide screening of key molecules for tooth root development *The 10th Tooth Morphogenesis and Differentiation 1-4 September 2010 Berlin*.

(国内: 14 件)

①太田正人: Shh-Fgf18 regulate tooth root-periodontal tissue unit. *Frontier meeting*平成24年2月18日 東京

②太田正人、井関祥子: Shh-Fgf loop regulate tooth root-periodontal tissue development. 第45回日本発生生物学会 平成24年5月28-29日、神戸

③太田正人: Shh-FGF経路を介した歯根・歯周組織ユニットの発生機構. サテライトシンポジウム「歯根・歯周組織ユニットのセレンテイピティ」第54回歯科基礎医学会学術大会・総会、平成24年9月14日、郡山

④太田正人、井関祥子: Shh-FGF経路を介した歯根・歯周組織ユニットの発生機構. 日本生化学会総会 平成24年12月16日、福岡

⑤小林真左子、太田正人、下田麻子、秋吉一成、宮本洋二、井関祥子: 新規徐放性ナノゲルを用いたFGF18によるBMP2依存的な骨修復能の改良 第31回日本炎症・再生医学会 平成23年6月2-3日 京都

⑥太田正人. Biological effects of natural products on tooth root formation.」平成22年度戦略的研究基盤形成支援事業研究集会. 2011年2月20-21日、東京.

⑦太田正人:長寿マウスの上顎切歯に特有の加齢現象について サテライトシンポジウム「エナメル質研究の温故知新-新たな展開を期して」第53回歯科基礎医学会学術大会・総会、2011年9月30日、岐阜.

⑧太田正人、井関祥子:神経堤細胞特異的Meis2ノックアウトマウスにおける表現型解析 第53回歯科基礎医学会学術大会・総会、2011年10月2日、岐阜.

⑨馬場 麻人、寺島 達夫、太田正人、田畑 純、高野 吉郎:FGFRの象牙質形成における発現 第58回国際歯科研究学会日本部会(JADR)総会・学術大会、2011年11月20日、小倉.

⑩永山友子、中原貴、太田正人、春日井昇平、井関祥子:FGFシグナルの胎児マウス頭蓋冠骨芽細胞分化に与える影響 第30回日本炎症・再生医学会 平成22年8月5-6日 東京.

⑪Ota MS, Itoh N., Hiroki Kokubo H, Ohazama A, Kozawa Y, Saga Y, Sharpe PT, Kondo T, Nakahara T, Kanri Y, Aoba T, Iseki S: Wnt-signaling pathway is important for patterning of mammalian tooth roots in evolution and development. 第43回日本発生生物学会年会. 平成22年6月20-22日、京都.

⑫小澤幸重、馬場麻人、太田正人:歯の比較解剖学と再生医学との接点. 歯の比較解剖学と再生医学との接点. 第52回歯科基礎医学会学術総会. 平成22年9月20-22日、東京.

⑬馬場麻人、寺島達夫、太田正人、田畑純、高野吉郎. 象牙芽細胞におけるFGFRの発現. 第52回歯科基礎医学会学術総会. 平成22年9月20-22日、東京.

⑭太田正人、近藤香、井関祥子、近藤隆:マウス上顎切歯をモデルとした加齢にともなう遺伝子. 発現調節機構の改変の解析. 第33回日本分子生物学会年会. 平成22年12月7-10日、神戸.

〔図書〕(計 3 件)

①馬場麻人、太田正人、小澤幸重. 生物の適応放散における歯を中心とする顎顔面の器官形成と分節プラン. エナメル質比較発生懇話会記録. 11, 25, 2010.

②太田正人 哺乳類の臼歯の特徴に関する一考察:異型歯性歯列における上下顎に特異的な形態形成機構. エナメル質比較発生懇話会記録. 11, 78-85, 2010.

③太田正人、口のふしぎと歯のふしぎ(7) 味の好みが変わり、昔に比べて料理の味が濃く

なりました。何か理由がありますか? DH Style, 7, 2010.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: Pharmaceutical co, position for prevention and/or treatment of bone disease, functional food or health food comprising the composition, and pharmaceutical preparation comprising the composition as active ingredient.

発明者: Yonezawa Takayuki, Cha Byng-Yoon, Akazawa Hiroyuki, Truya Toshiaki, Woo Je-Tae, Ohta Masato

権利者: Yonezawa Takayuki, Cha Byng-Yoon, Akazawa Hiroyuki, Truya Toshiaki, Woo Je-Tae, Ohta Masato

種類: 11184774

番号: 11184.5-2101

出願年月日: 2011年12月5日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

* セミナー

①太田 正人. 天然化合物を用いた再生歯科医療. 大学院特別講義『細胞工学特論』、中部大学、2010年6月1日.

②太田正人: 中部大学セミナー 天然低分子化合物による歯根形成促進機能の分子機構 平成24年5月30日

③太田正人 明海大学大学院特別講義 苦味受容の発生の分子機構 平成23年9月26日

④太田 正人. 「上下顎臼歯に特異的な歯根パターンニングの規則性」. 第13回エナメル質比較発生懇話会、山梨、2010年7月10-11日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 正人 (OTA MASATO)

東京医科歯科大学・大学院歯学総合研究科・講師

研究者番号: 70313228

(2) 研究分担者

近藤 隆 (KONDOH TAKASHI)

独立行政法人理化学研究所・免疫アレルギーセン
ター・研究員

研究者番号：40333299