

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592742

研究課題名(和文) 基底細胞から味蕾へ：コンディショナル遺伝子改変による分化とターンオーバーの解明

研究課題名(英文) Cell differentiation from basal cell to taste bud: Conditional recombination approach

研究代表者

三浦 裕仁 (Miura, Hirohito)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：80353936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：味覚受容器である味蕾は30～100個の長く伸びた細胞と基底部にある少数の丸い形の細胞とからなる。味蕾の基底細胞は進化的に保存されたシグナル分子であるShhを発現している。本研究では、細胞種特異的な遺伝子組換えを誘導し、LacZあるいはEGFPのマーカートンパク質の発現によってShhを発現する細胞を遺伝的に標識した。マーカー分子の発現解析により、Shh発現基底細胞は、(1)分裂終了細胞であること、(2)グリア様のType I、甘味/うま味/苦味受容細胞のType II、酸味受容細胞のType IIIの全ての細胞種に分化することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Taste buds, the peripheral sensory organ for gustation, are comprised of 30-100 elongate cells and a small number of ovoid cells situated in the basal region. The basal cells in taste buds selectively express Shh, an evolutionarily conserved signaling molecule. In this study, the Shh-expressing basal cells were genetically labeled with the expression of LacZ or EGFP marker protein by inducible gene recombination. Analysis of marker expression revealed (1) Shh-expressing cells are postmitotic, (2) Shh-expressing basal cells give rise to all three functional cell types in taste buds, type I (glia-like), type II (sweet, umami and bitter sensing) and type III (sour sensing) cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：味覚 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

食物の味を受容する味蕾は、口腔内では舌の3種類の味覚乳頭(有郭乳頭・葉状乳頭・茸状乳頭)と軟口蓋に存在する。各部の味蕾は基本的に同様の構造で、いずれも基底部から味孔まで伸長する3種類の細胞(I, II, III型細胞)と基底部の丸い細胞(基底細胞)を含んでいる。I型細胞はグリア細胞の性質を持つ細胞、II型細胞は甘味/苦味/うま味の受容、III型細胞は酸味の受容を担当する細胞である。これらの味蕾細胞は、生涯、次々と新しい細胞に置き換わっており(ターンオーバー)、未分化な前駆細胞から分化する。このターンオーバーの異常は味覚障害を生じると考えられており、味蕾細胞の分化・ターンオーバーのメカニズムの解明は味覚障害の予防や治療に重要な知見をもたらすと期待される。

味蕾の伸長した細胞が味受容機能を持つものに対して、味蕾の基底細胞は未分化な細胞と考えられており、新しい味蕾細胞を生み出す幹細胞である可能性が指摘されていた。私達は、これまでに、様々な細胞の増殖・分化の誘導に關与する分泌性シグナル分子である Sonic hedgehog (Shh)が、味蕾では、基底細胞に選択的に発現していることを明らかにした。さらに BrdU 投与と実験を行って、味蕾基底部の Shh を発現する細胞には、BrdU を核に取り込む増殖中の細胞は見られないことを報告した。増殖細胞は味蕾周囲の上皮の基底層に限局していた。さらに、取り込まれた BrdU を追跡したところ、Shh を発現する細胞は一過性に出現し、別の細胞に分化する可能性が明らかになった。

これまでの結果は、味蕾周囲で増殖する細胞が増殖を停止して、Shh を発現する味蕾基底細胞となり、さらに味蕾内の伸長した細胞が分化することを示唆していた。しかし、実際に、Shh を発現する基底細胞から味蕾内のどの細胞種が分化するか、また、味蕾周囲を取り囲む上皮細胞も生ずるかは不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究は、口腔内の各部の味蕾の基底部で Shh を発現する細胞の性質の解析を進め、味蕾内のどの細胞種に分化するかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Shh 発現細胞の標識

Cre/loxP システムを用いて、Shh を発現する味蕾基底細胞に選択的にマーカー分子を発現する遺伝子組換えを誘導するために、以下の3種類のマウスを利用した。

ShhCreERT2 マウス：Shh 遺伝子座にタモキシフェン誘導型の Cre リコンビナーゼ (CreERT2)がノックインされているマウス。Shh 発現細胞に選択的に CreERT2 が発現する。投与したタモキシフェンが CreERT2 のエストロゲン結合ドメインに結合すると、CreERT2 は核に輸送され、ゲノム中の loxP で挟まれた配列が切り出される。

Rosa26R LacZ マウス：Cre リコンビナーゼによって loxP で挟まれた STOP 配列が切り出されると LacZ (β-galactosidase)を発現する。

CAG-CAT-EGFP マウス：Cre リコンビナーゼによって loxP で挟まれた CAT 配列が切り出されると CAG プロモーターの支配下で蛍光タンパク質 EGFP が発現する。

からのマウスの交配により、ShhCreERT2; Rosa26R lacZ マウス、ShhCreERT2; CAG-CAT-EGFP マウスを作製して、タモキシフェンを投与した。

(2) 味蕾の細胞種の解析

各細胞種に特異的に発現する下記の分子に対する抗体を用いて免疫染色を行い、細胞種を同定した。

I型細胞：NTPDase2

II型細胞：PLC β2, Trpm5

III型細胞：Snap25

4. 研究成果

本研究では、まず、ShhCreERT2; Rosa26R LacZ マウスにタモキシフェンを投与した。タモキシフェンを2日間投与して2日後に LacZ の発現を解析したところ、LacZ の発現は Shh を発現する味蕾の基底部を中心に検出された。さらに、4日間投与して7日後に解析したところ、LacZ は味蕾内の伸長した細胞に観察され、味蕾基底部の Shh 発現細胞が味蕾内の伸長した細胞に分化することが示された。いずれの条件でも、LacZ の発現は味蕾内に限局して観察され、味蕾周囲の細胞には認められなかった。これは、味蕾基底部の Shh 発現細胞は、味蕾細胞に分化することが決定されている細胞であることを示している。

腹腔投与(1日1回4日間の投与後-1週間後に解析)および2種類の経口投与(8日間の投与後-1日後に解析、1日おきに16日間

投与後-10日後に解析)で LacZ の発現を比較したところ、腹腔投与に比べて経口投与では LacZ を発現する細胞を含む味蕾の割合が 2 倍から 4 倍まで上昇し、最も効率が高かった軟口蓋では約 50%の味蕾に LacZ を発現する細胞が見られた。しかし、いずれの方法でも LacZ 発現細胞は、それぞれ味蕾切片 1 つあたり約 1 個で単独の細胞として観察された。もし、味蕾基底部の Shh 発現細胞が分裂活性を持っていれば、LacZ を発現する細胞は分裂の結果、味蕾内に複数検出されると考えられる。今回得られた結果は、Shh 発現細胞がすでに増殖を終了している細胞であるという BrdU 投与実験で得られていた知見を支持していた。

ShhCreErt2; CAG-CAT-EGFP マウスでは、腹腔投与 (4 日間連続投与-1 週間後の解析) と長期経口投与 (21 日間連続投与後解析) で解析を行った。Rosa26R LacZ マウスに比べて味蕾の標識効率 (マーカー分子を発現する細胞を含む味蕾が得られる効率) は著しく高く、軟口蓋と茸状乳頭では、長期経口投与により 90%を越える味蕾に EGFP を発現する細胞が確認された。また、1 つの味蕾 1 にマーカー分子を発現する細胞の数も、長期経口投与では、軟口蓋で約 5 個、茸状乳頭で 3 個、有郭乳頭でも約 2 個まで増加した。これは、Rosa26R LacZ に比べて、CAG-CAT-EGFP で Cre/loxP システムが作用しやすいため、味蕾基底部の複数の Shh 発現細胞がマーカー分子の発現で標識されたためであると考えられる。

マーカー分子を発現する味蕾細胞の細胞種を免疫染色で解析した。II 型と III 型細胞は組織切片を用いて解析を行った。I 型細胞は薄く伸びて隣の細胞を取り囲んでいる場合が多く見られることに加えて、I 型細胞の同定に用いた NTPDase2 の発現が細胞膜に局限しているために、切片上で個々の I 型細胞を同定することは困難であった。そこで、酵素処理を行って味蕾を含む上皮を剥離し、細いガラス管で味蕾を回収した後、味蕾細胞を解離してスライドガラス上に貼り付けて免疫染色を行った。解析の結果、Shh を発現する細胞は、I, II, III 型全ての細胞種に分化することが明らかになった。

マーカー分子を発現する細胞の細胞種は、軟口蓋、有郭乳頭、茸状乳頭、いずれの味蕾でも I 型細胞が最も多く、約 50%が I 型細胞であった。次いで II 型細胞 (10~30%)、III 型細胞 (<8%)であった。この比率は、I 型が最も多く、次いで II 型、そして III 型の細胞という味蕾の細胞種の存在比の順番を反映していた。しかし、マーカー分子を発現する細胞中の III 型細胞の割合は、味蕾内の III 型細胞の存在比よりも小さく、いずれの領域に

おいても、その割合は III 型細胞の存在比の半分に満たなかった。近年、味蕾細胞のターンオーバー (細胞の置き換え) に関して、III 型細胞は II 型細胞に比べて 2 倍以上長い寿命を持つことが報告されている。これは、単位時間当たりに新しく生み出される III 型細胞が II 型細胞に比べて少ないことを示唆している。今回の実験で、マーカー分子を発現する味蕾細胞、すなわち Shh 発現細胞から新しく生み出された味蕾細胞の中で、III 型細胞が相対的に少なかったのは III 型細胞のターンオーバーが遅いためであると考えられる。

まとめ: 本研究により味蕾細胞のターンオーバーにおいて、1) 周囲で増殖した細胞が増殖を停止した後に Shh を発現する味蕾基底細胞となること、2) Shh を発現する基底細胞から味蕾内の I, II, III 型すべての細胞種が分化することが実証された。

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 3 件)

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. in press (2014) 査読有り
2. Tomonari H, Miura H, Ooki M, Nakayama A, Harada S: Diverse contributions of Tas1r2/Tas2rs within the rat and mouse soft palate to sweet and bitter neural responses. Neurosci Lett. 569: 63-67 (2014) 査読有り
3. Tomonari H, Miura H, Nakayama A, Matsumura E, Ooki M, Ninomiya Y, Harada S: $G\alpha$ -gustducin is extensively co-expressed with sweet and bitter taste receptors in both the soft palate and fungiform papillae but has a different functional significance. Chemical Senses. 37(3):241-251 (2012) 査読あり

[学会発表] (計 12 件)

1. 三浦裕仁, 中山歩, 友成博, 大木誠, 原田秀逸: Development of the basal cells in taste buds and taste cell differentiation, 第 91 回日本生理学会大会 シンポジウム, 2014 年 3 月 (鹿児島)
2. Miura M, Scott JK, Nakayama A, Harada S, Barlow LA: Shh-expressing basal cells are immediate precursors of Type I, II and III

- cells in taste buds. The 10th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory perception, 2012 年 11 月 (福岡)
3. Ooki M, Tomonari H, Nakayama A, Miura H, Harada S: Regional differences in gustatory responses to bitter substances between the soft palate and fungiform papillae. XVI International Symposium on Olfaction and Taste, 2012 年 6 月(スウェーデン, ストックホルム)
 4. Nakayama A, Miura H, Ooki M, Kusakabe Y, Harada S: Basal cell markers and Sox2 during taste bud development and maturation. XVI International Symposium on Olfaction and Taste, 2012 年 6 月(スウェーデン, ストックホルム)
 5. Miura H, Scott JK, Nakayama A, Harada S, Barlow LA: Shh-expressing basal cells are immediate precursors of Type I, II and III cells in taste buds. XVI International Symposium on Olfaction and Taste, 2012 年 6 月(スウェーデン, ストックホルム)
 6. Barlow LA, Scott JK, Miura H: Shh-expressing basal cells are immediate precursors of taste receptor cells. 35th Annual Meeting of Association for Chemoreception Sciences, 2012 年 4 月(米国, ハンチントンビーチ)
 7. Miura H, Tomonari H, Nakayama A, Matsumura E, Ooki M, Harada S: Regional differences in bitter taste signal transduction between the soft palate and fungiform papillae. The 9th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory perception, 2011 年 11 月(福岡)
 8. Nakayama A, Miura H, Ooki M, Kusakabe Y, Harada S: Basal cell markers of taste buds and Sox2 during taste bud development and maturation. The 9th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory perception, 2011 年 11 月(福岡)
 9. 大木誠, 三浦裕仁, 中山歩, Margolskee R, 二ノ宮裕三, 原田秀逸: 苦味物質に対する応答性および受容機構の口腔内部位差, 日本味と匂学会第 45 回大会, 2011 年 10 月(金沢)
 10. 中山歩, 三浦裕仁, 大木誠, 日下部裕子, 原田秀逸: 味蕾の発生・成熟過程における味蕾由来細胞マーカーと Sox2 の発現, 日本味と匂学会第 45 回大会, 2011 年 10 月(金沢)
 11. 日下部裕子, 進藤由美子, 河合崇行, 川本恵子, 三浦裕仁: レセプター型チロシンキナーゼ c-kit のマウス味蕾における発現様式, 日本味と匂学会第 45 回大会, 2011 年 10 月(金沢)
 12. 三浦裕仁, 友成博, 中山歩, 大木誠, 原田秀逸: 味蕾の細胞分化と機能の部位特性, 第 53 回基礎歯科医学会学術大会サテライトシンポジウム, 2011 年 9 月(岐阜)
- 〔図書〕(計 1 件)
1. 三浦裕仁: 味蕾を構成する細胞とその分化, JOHNS, 29: 225-25 (2013)
- 6 . 研究組織
- (1)研究代表者
三浦 裕仁 (MIURA HIROHITO)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授
研究者番号: 80353936
 - (2)研究分担者
原田 秀逸 (HARADA SHITSU)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 60128452

中山 歩 (NAKAYAMA AYUMI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 10398290

大木 誠 (OOKI MAKOTO)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 60596104