

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791966

研究課題名(和文) 味蕾内ネットワーク機構に関与する軸索誘導分子の機能解明

研究課題名(英文) Expression of netrin-1 in the mouse taste buds.

## 研究代表者

片岡 真司 (KATAOKA, SHINJI)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80364149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： 味覚の末梢受容器である味蕾は、常に多様な刺激を受ける舌上皮に存在しているために約10日の短い周期で味蕾を構成する細胞が入れ替わる。この味細胞と味覚情報を伝える味神経はシナプスによって接続しているが、この接続も10日間程度で改変が行われていると考えられる。この過程は未解明である。今回の研究では神経軸索を誘導する分子に着目し、その分子群の味蕾における発現や発現パターンを発育期、成体のマウスを用いて調べた。

研究成果の概要(英文)： Here we investigated the expression of axon guidance molecule netrin-1 and its receptor DCC in mouse taste buds at both the nucleotide and protein expression levels.

研究分野：解剖学

キーワード：味蕾 軸索誘導分子

### 1. 研究開始当初の背景

味蕾細胞は、味蕾内で約 10 日間という短い周期で置き換わっていくために味蕾細胞のアポトーシスによる細胞 味神経間の接続切断や新生してくる細胞との新たな接続は、成熟した味蕾においても常に繰り返しおこなわれている。このような状況から軸索誘導分子 Netrin 1 とその受容体 DCC が味蕾内ネットワーク機構を制御する重要な因子として関与している可能性が推測された。神経系で軸索誘導分子 Netrin 1 は軸索誘導に関与する他に、上皮組織で Netrin1 の非存在下でアポトーシスシグナルを伝達し、存在下では生存シグナルを活性化する機能をもつことが知られている。これらアポトーシスと Netrin-1 の関連性についても検討した。

### 2. 研究の目的

味蕾における軸索誘導分子、特に成熟期の味蕾における研究は、ほとんどなされていない。本研究は味蕾内の軸索誘導分子を特定し、味蕾内ネットワーク機構の重要な制御因子である軸索誘導能、さらにアポトーシス制御能への関与を検討する。味蕾の形成期においても軸索誘導分子の発現については未解明な部分も多いのでこれも解析をおこなう。

本研究は味蕾内で発現する Netrin1 をはじめとした軸索誘導分子を特定し、味蕾内ネットワーク機構の重要な制御因子である軸索誘導能、さらにアポトーシス制御能への関与を検討する。味蕾の形成期においても軸索誘導分子の発現については未解明な部分も多いのでこれも解析をおこなう。

### 3. 研究の方法

1. 軸索誘導分子およびその受容体の発現、局在の解析を RT-PCR、in situ hybridization 法、免疫組織化学を用いておこなった。

2. 味蕾に発現する軸索誘導分子による味蕾細胞へのアポトーシス制御能の検討は TUNEL 法を用いたアポトーシス細胞検出でしらべた。味蕾のアポトーシスは、有郭乳頭味蕾に接続する舌咽神経への損傷によっておこなわれた。

### 4. 研究成果

軸索誘導分子 Netrin-1 の発現は RT-PCR、免疫組織化学、in situ hybridization を用いて調べた。その結果、味蕾細胞に Netrin-1 が特異的に発現することがわかった (図 1、図 2)。また味蕾の形成段階にある幼若なマウスにおいても Netrin-1 が発現することが明らかになった。RT-PCR、in situ hybridization においても味蕾での Netrin-1 発現が認められた。

図 1 マウス有郭乳頭での Netrin-1 の発現 (成体・低倍)

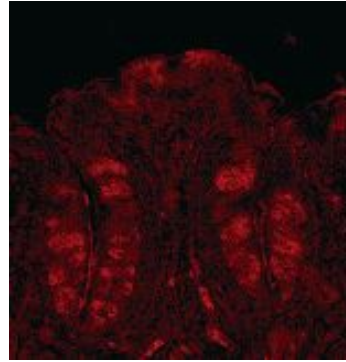
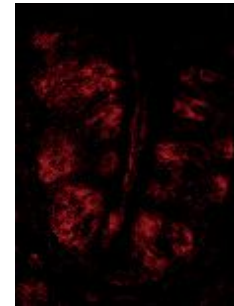
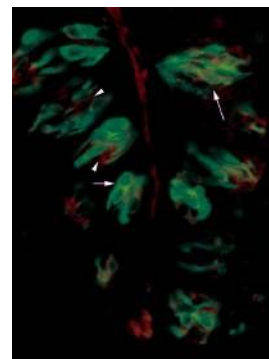


図 2 マウス有郭乳頭での Netrin-1 の発現 (成体・高倍)



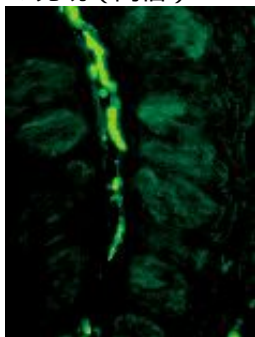
Netrin-1 陽性の味蕾細胞と他の味蕾細胞型のマーカーと二重免疫組織化学をおこなったところ 型細胞マーカーである PLC 2 陽性細胞とよく重なった (図 3)。一部、重なっていない Netrin-1 陽性細胞 (矢頭) は、味蕾の基底部に多かった。これらの細胞 (型細胞) は味蕾の基底細胞で、分化し、それら細胞は特有のマーカーを発現する。Netrin-1 は分化前の細胞から発現しており、それは分化後も引き続いている発現している可能性が示された。

図 4 マウス有郭乳頭での Netrin-1 (赤) と PLC 2 (緑) の二重免疫組織化学 (高倍)



また Netrin-1 への誘引性受容体である DCC についても検討を行った結果、味蕾にその発現がみられた (図 4)。

図 4 マウス有郭乳頭での Netrin-1 受容体 DCC の発現 (高倍)



またこれら味蕾での発現を味蕾の細胞型マーカーとの比較により検索をおこなっている。

味蕾の形成期において Netrin1 の発現を調べたところ、生後 0 日目ではまだ Netrin-1 陽性細胞は、ほぼ見られないが、5 日目では味蕾全体にわたって発現する Netrin-1 細胞が認められた。

軸索誘導分子 Netrin-1 のアポトーシスへの関与をしらべるために有郭乳頭味蕾細胞にアポトーシスを舌咽神経切断によりおこなわせた。神経切断直後には味蕾の数にほとんど変化がみられない。2 日後ぐらいより急速に細胞数が減少していった。アポトーシス細胞の検出には TUNEL 法を用い、Netrin-1 陽性細胞との比較を行っているが、細胞を特定できるように染色がうまくいっておらず、切片作成、染色法等の改善が必要な結果である。

#### 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)

[雑誌論文](計 6 件)

1.Expression of neuropeptide receptor mRNA during osteoblastic differentiation of mouse iPS cells.

Satomi Nagao, Tetsuya Goto, Shinji Kataoka, Takashi Toyono, Takaaki Joujima, Hiroshi Egusa, Hirofumi Yatani, Shigeru Kobayashi, Kenshi Maki  
Neuropeptides. 2014, 48(6):399-406

2.Expression of GAD67 and Dlx5 in the Taste Buds of Mice Genetically Lacking Mash1.  
Ayae Kito-Shingaki, Yuji Seta, Takashi Toyono, Shinji Kataoka, Yasuaki Kakinoki, Yuchio Yanagawa, Kuniaki Toyoshima  
Chem Senses. 2014, 39(5):403-14

3.Hemokinin-1 competitively inhibits substance P-induced stimulation of osteoclast formation and function.  
Aya Fukuda, Tetsuya Goto, Kayoko N

Kuroishi, Kaori K Gunjigake, Shinji Kataoka, Shigeru Kobayashi, Kazunori Yamaguchi  
Neuropeptides. 2013, 47(4):251-9.

4.Expression of synaptogyrin-1 in T1R2-expressing type II taste cells and type III taste cells of rat circumvallate taste buds.

Takeshi Kotani, Takashi Toyono, Yuji Seta, Ayae Kitou, Shinji Kataoka, Kuniaki Toyoshima  
Cell Tissue Res. 2013, 353(3):391-8.

5. Nerve Growth Factor Involves Mutual Interaction between Neurons and Satellite Glial Cells in the Rat Trigeminal Ganglion.

Sayaka Kurata, Tetsuya Goto, Kaori K Gunjigake, Shinji Kataoka, Kayoko N Kuroishi, Kentaro Ono, Takashi Toyono, Shigeru Kobayashi, Kazunori Yamaguchi  
Acta Histochem Cytochem. 2013, 46(2):65-73.

6. A2BR adenosine receptor modulates sweet taste in circumvallate taste buds.

Shinji Kataoka, Arian Baquero, Dan Yang, Nicole Shultz, Aurelie Vandenbeuch, Katya Ravid, Sue C Kinnamon, Thomas E Finger  
PLoS One. 2012, 7(1):e30032.

[学会発表](計 2 件)

1.片岡真司, Thomas E. Finger, 豊野孝, 瀬田祐司, 豊島邦昭, 後藤哲哉, 小林繁 "アデノシン受容体 A2B のマウス舌での発現." 第 72 回九州歯科学会総会・北九州・2012 年 5 月 19- 20 日

2.片岡真司, 豊野 孝, 瀬田祐司, 後藤哲哉, 小林 繁, 豊島 邦昭 "軸索誘導分子 Netrin-1 のマウス味蕾における発現" 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会・2013 年 3 月 28-30 日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

片岡 真司 (KATAOKA, Shinji)

九州歯科大学・歯学部歯学科・解剖学分  
野・助教

研究者番号：80364149

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：