

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462870

研究課題名(和文) マウス味蕾におけるエストロゲンの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of estrogen in mouse taste transduction

研究代表者

豊島 邦昭 (TOYOSHIMA, KUNIAKI)

九州歯科大学・歯学部・名誉教授

研究者番号：10112559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は味蕾における味覚情報伝達におけるエストロゲンの機能に注目して、エストロゲンの合成酵素の1つであるアロマトラーゼのノックアウトマウス(ArK0)を使用して、味蕾におけるエストロゲンの機能を検索した。ArK0マウスでは、甘味の味覚感受性の低下が認められた。また、味蕾におけるエストロゲンレセプターの発現を検索したところ、ER とGPR30が味蕾細胞の一部で発現が認められ、味蕾細胞間の情報伝達にもエストロゲンが関係していることが推測された。

研究成果の概要(英文)：It has become evident that non-gonadal tissues, such as neurons and glial cells in the brain, are able to synthesize steroid hormone. Recently, we have shown that steroidogenic enzymes expressed in the taste bud cells. However, the exact function of steroid hormones in the taste organ remains unknown. In this study, we have demonstrated that aromatase knockout mice show reduced response to sweet. And we have shown that localizations and patterns of expression of ER and GPR30 in mouse taste buds. These results suggest estrogen may play an important role for transduction of taste stimuli.

研究分野：解剖学

キーワード：味蕾 エストロゲン 伝達物質

1. 研究開始当初の背景

近年、高齢化や様々な生活習慣病等の疾病の増加にともなって、味覚障害(異常)が重要な課題となってきた。味覚障害を訴える患者は、この10年間で約3倍以上に増加し、最近の調査では、全国で年間24万人以上に増加しているとの報告がある。味覚は、味蕾が味物質やイオンを直接受容することによって生じる。味覚からの情報は、食物摂取、咀嚼、唾液分泌ならびに言語形成等の重要な口腔機能に直接反映する。味蕾が受容する味覚情報は、口腔内に入ってくるすべての物質をモニターし、有害物質が体内に入らないように弁別するとともに忌避行動を誘発することができる。すなわち、味覚は生体にとって重要な警告系としての役割をもつ重要な感覚である。味覚障害の原因解明や予防法、治療法の開発は、歯科医療の重要な課題の一つと考えられる。そのためには、味蕾の細胞生物学的特性や味覚情報伝達機構を理解することが重要である。

最近我々は、ラットの一部の味蕾細胞が、チトクローム P450 scc、チトクローム P450 aromatase をはじめとした性ステロイド生合成酵素群を発現することを、RT-PCR、Western immunoblot、免疫組織化学法によって初めて発見し、報告してきた。特にこれら性ステロイド生合成酵素群を発現する味蕾細胞が、gustducinなどを指標とした味覚受容細胞(2型細胞)に発現することは、性ステロイド(エストロゲン)が味覚情報伝達に重要な役割をもつことを、強く示唆するものと考えられた(Toyoshima et al., 2007)。

2. 研究の目的

近年、乳癌の治療に使用されるアロマターゼ阻害剤より味覚異常を引き起こすことが、報告されており、アロマターゼにより合成される性ステロイド(エストロゲン)が味蕾における味覚情報伝達に重要な働きを演じていることが推測される。しかしながら、味覚研究において性ステロイド(エストロゲン)の味覚情報伝達における機能についての研究は、我々の研究グループ以外では行われていない。本研究ではこれまでの我々の研究をさらに発展させて、味蕾における性ステロイド(エストロゲン)の機能の解明を目的として、アロマターゼノックアウト(ArKO)マウスを使用して、味覚情報伝達や味蕾細胞の分化におけるエストロゲンの機能の検索を試みる。

3. 研究の方法

(1) チトクローム P450 アロマターゼノックアウトマウス(ArKO)の味蕾の形態変化

ArKOマウスの有郭乳頭味蕾の形態的变化を検索する。

ArKOマウスの有郭乳頭味蕾における味蕾細胞のマーカ(gustducin, PLC β 2, NCAM, AADC)の発現を野生型マウスと比較検討する。

味受容体(T1R1, T1R2, T1R3, T2R)の発現をArKOマウスと野生型マウスの味蕾でRT-PCR, *in situ* Hybridizationを用いて比較検討する。

(2) ArKOマウスの味覚感受性の変化

2ポトルテストでArKOマウスが各味覚に対する感受性の変化が生じているのかどうかを検索する。

ArKOマウスの摂食量の比較

野生型マウスとArKOマウスで摂食量と体重増加の比較を行う。さらに、粉末飼料にショ糖・キニーネを配合して、野生型マウスとの摂食量の比較を行う。

(3) ArKOマウスにおける摂食関連因子の発現変化の検索

糖・脂質代謝に係るFGF15, FGF21, レプチンなどの摂食関連因子の発現をArKOマウスと野生型マウスの味蕾でRT-PCR, *in situ* Hybridizationを用いて比較検討する。

(4) アロマターゼ阻害剤による味覚感受性の変化検索

マウスにアロマターゼ阻害剤を投与し、2ポトルテストで味覚感受性の変化が見られるか検索する。

アロマターゼ阻害剤を投与したマウスの味蕾の形態変化の検索

アロマターゼ阻害剤投与マウスの有郭乳頭味蕾における味蕾細胞のマーカ(gustducin, PLC β 2, NCAM, AADC)の発現を対照群マウスと比較検討する。

味受容体(T1R1, T1R2, T1R3, T2R)の発現をアロマターゼ阻害剤投与マウスと対照群マウスの味蕾で比較検討する。

(5) 味蕾におけるエストロゲン受容体の発現の検索

味蕾におけるエストロゲン受容体の発現を検索する。

味蕾で発現が認められたエストロゲン受容体と味蕾細胞のマーカ(gustducin, PLC β 2, NCAM, AADC)と2重染色して、味蕾の細胞型での発現を確認する。

味蕾で発現が認められたエストロゲン受容体を免疫電顕で、発現している細胞型の確認と発現部位を検索する。

(6) エストロゲン投与によるArKOマウスへの影響を検索する

エストロゲンを投与したArKOマウスの甘味・苦味・うま味の感受性の変化を検討する。

エストロゲン投与ArKOマウスと未処置ArKOマウスの味蕾細胞のマーカ(gustducin, PLC β 2, NCAM, AADC)の発現

を対照群マウスと比較検討する。
味受容体(T1R1, T1R2, T1R3, T2R)の発現をエストロゲン投与 ArK0 マウスと未処置 ArK0 マウスの味蕾で比較検討する。

4. 研究成果

味覚情報伝達におけるエストロゲンの機能について検索するために、初めにエストロゲンの合成酵素であるアロマターゼノックアウトマウス(ArK0)の有郭乳頭味蕾の構造変化について検索を行った。ArK0 の味蕾では、味蕾における細胞型の比率や微細構造の変化については大きな差は認められなかった。しかし 型細胞と神経終末の間で観察されるシナプス下槽様の構造物が、ArK0 の味蕾では野生型マウスに比べ出現率が低下しているのが観察された。また、T1R, T2R 等の 型細胞で発現する味覚受容体の発現も ArK0 と野生型では変化は観察されなかった。これらのことから、味蕾におけるエストロゲンの作用は、味蕾細胞の分化や形態維持には、機能していないことが示唆された。

2 ボトルテストを利用して、ArK0 における味覚感受性の変化を検索した。5 基本味(甘味・うま味・苦味・酸味・塩味)の感受性の差を調べると、うま味と苦味は若干飲水量が野生型と比較して減少したが、有意差は認められなかった。甘味に対しては、野生型と比較して有意に減少が認められた。しかしながら、酸味と塩味に関しては、野生型との間で差は認められなかった。このことから、アロマターゼによって合成されるエストロゲンが味覚の情報伝達、特に甘味の情報伝達に關与していることが示唆された。

味蕾内におけるエストロゲンの情報伝達経路を検索するために、味蕾におけるエストロゲンレセプターの発現を検索した。RT-PCR, 免疫染色で ER α の発現が味蕾細胞と神経線維に観察された。また、GPR30 も味蕾細胞での発現が認められた。(図1)これらの結果から、エストロゲンは味覚情報伝達だけでなく、味蕾内における細胞間情報伝達にも關与していることが推測された。

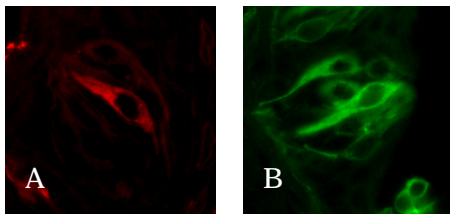


図1：味蕾における ER α (A)と GPR30(B)の発現

アロマターゼの阻害剤の1つであるタモキシフェンを投与して、ArK0 と同様の味覚感受性の変化が見られるかどうかを検索した。2 ボトルテストによる結果では、甘味に対する感受性が、低下していたが有意差は認められなかった。

ArK0 にエストロゲンを投与して、味覚感受性の回復がみられるか検討したが、エストロ

ゲン投与による甘味感受性の回復はみられなかった。

これまでの結果から、味蕾におけるエストロゲンの機能は味覚の情報伝達における重要な役割を演じていることが推測された。

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11件)

Oda M, Tanaka T, Yamashita Y, Kito S, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Nishimura S, Habu M, Kodama M, Uehara M, Kaneuji T, Kokuryo S, Miyamoto I, Yoshiga D, Seta Y, Tominaga K, Yoshioka I, Morimoto Y.: Identification of peripheral vessels in oral and maxillofacial regions on magnetic resonance angiography obtained using a balanced steady-state free-precession sequence with a time-spatial labeling inversion pulse and using fresh blood imaging. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 116(6):791-7, 2013.

豊野孝, 瀬田祐司, 片岡真司, 鬼頭文恵, 豊島邦昭. "絶食条件下での味蕾における味覚情報伝達系に関わる分子の発現調節." 日本味と匂学会誌 20(3): 223-224. 2013.

Yamamoto N, Yamashita Y, Yoshiga D, Ishikawa A, Matsuo K, Miyamoto I, Oda M, Tanaka T, Kito S, Seta Y, Takahashi T, Koga H, Kawano K, Morimoto Y.: Occurrence of silk stitch abscess after surgery in patients with oral squamous cell carcinoma. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 18(4):e701-5, 2013.

Kotani T, Toyono T, Seta Y, Kitou A, Kataoka S, Toyoshima K.: Expression of synaptogyrin-1 in T1R2-expressing type II taste cells and type III taste cells of rat circumvallate taste buds. Cell Tissue Res. 353(3):391-8, 2013.

Kito S, Koga H, Kodama M, Habu M, Kokuryo S, Yamamoto N, Oda M, Nishino T, Zhang M, Matsuo K, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Seta Y, Yoshiga D, Kaneuji T, Nogami S, Yoshioka I, Yamashita Y, Tanaka T, Miyamoto I, Kitamura C, Tominaga K, Morimoto Y.: Variety and complexity of fluorine-18-labelled fluoro-2-deoxy-D-glucose accumulations in the oral cavity of patients with oral cancers. Dentomaxillofac Radiol. 42(7):20130014, 2013.

Nagai Y, Osawa K, Fukushima H, Tamura Y, Aoki K, Ohya K, Yasuda H, Hikiji H, Takahashi M, Seta Y, Seo S, Kurokawa M, Kato S, Honda H, Nakamura I, Maki K, Jimi E.: p130Cas, Crk-associated substrate,

plays important roles in osteoclastic bone resorption. J Bone Miner Res. 28(12):2449-62, 2013.

Yoshioka I, Tanaka T, Habu M, Oda M, Kodama M, Kokuryo S, Kito S, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Seta Y, Fukudome Y, Tominaga K, Sakoda S, Morimoto Y.: Criteria and limitations for selecting a sagittal split ramus osteotomy for patients with skeletal mandibular prognathism and open bite. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 115(4):455-65, 2013.

Shiiba S, Tanaka T, Sakamoto E, Oda M, Kito S, Ono K, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Seta Y, Imamura Y, Nakanishi O, Inenaga K, Morimoto Y.: Can the neurovascular compression volume of the trigeminal nerve on magnetic resonance cisternography predict the success of local anesthetic block after initial treatment by the carbamazepine? Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 117(1):e15-21, 2014.

Kito-Shingaki A, Seta Y, Toyono T, Kataoka S, Kakinoki Y, Yanagawa Y, Toyoshima K.: Expression of GAD67 and Dlx5 in the Taste Buds of Mice Genetically Lacking Mash1. Chem. Senses, 39(5):403-414:2014.

Kokabu, Lowery, Toyono, Seta, Hitomi, Sato, Enoki, Okubo, Fukushima, Yoda: Muscle regulatory factors regulate T1R3 taste receptor expression. Biochem Biophys Res Commun. 468: 568-573, 2015.

Hitomi S, Ono K, Miyano K, Ota Y, Uezono Y, Matoba M, Kuramitsu S, Yamaguchi K, Matsuo K, Seta Y, Harano N, Inenaga K. Novel methods of applying direct chemical and mechanical stimulation to the oral mucosa for traditional behavioral pain assays in conscious rats. Journal of Neuroscience Methods: 239: 162-169, 2015.

〔学会発表〕(計19件)

Seta Y, Kito-Shingaki A, Toyono T, Kataoka S, Kakinoki Y, Yanagawa Y, Toyoshima K.: Expression of GAD67 and Dlx5 in the Taste Buds of Mice Genetically Lacking Mash1. The 11th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception. Fukuoka Oct31-Nov 2.

Toyono T, Seta Y, Kito-Shingaki A, Kataoka S, Toyoshima K.: The food deprivation increase the expression levels of sweet/umami receptors, T1R family in mouse circumvallate taste buds. The 11th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste

and Olfactory Perception. Fukuoka Oct31-Nov 2.

Seta Y, Kito-Shingaki A, Toyono T, Kataoka S, Kakinoki Y, Yanagawa Y, Toyoshima K.: Expression of GAD67 and Dlx5 in the Taste Buds of Mice Genetically Lacking Mash1. International Symposium on Oral Education and Research in Kitakyushu Kitakyushu Jan 25.

鬼頭 文恵、瀬田 祐司、豊野 孝、片岡 真司、柿木 保明、豊島 邦昭: 味蕾 3 型細胞分化における Mash1 による GAD67 発現調節、歯科基礎医学会 岡山 9 月 20 日~22 日.

瀬田祐司、豊野孝、片岡真司、豊島邦昭: マウス味蕾における Mash1 による AADC と GAD67 の発現制御 九州歯科学会 北九州 5 月 18 日~19 日.

豊野孝、瀬田祐司、小谷武司、片岡真司、鬼頭文恵、豊島邦昭: ラット味蕾における消化管ホルモン ガストリンの発現 九州歯科学会 北九州 5 月 18 日~19 日.

豊野孝、瀬田祐司、小谷武司、片岡真司、豊島邦昭: 絶食条件下での味蕾における味覚情報伝達系に関わる分子の発現調節 日本味と匂学会 仙台 9 月 5 日~9 月 7 日.

瀬田祐司、豊野孝、片岡真司、豊島邦昭: マウス味蕾 型細胞の分化における Mash1 の機能について 日本解剖学会 下野 3 月 27 日~29 日.

豊野孝、瀬田祐司、片岡真司、豊島邦昭: 筋細胞分化におけるうま味受容体 T1R1 遺伝子の発現制御機構の解析 日本解剖学会 下野 3 月 27 日~29 日.

Seta Y, Kito-Shingaki A, Toyono T, Kataoka S, Kakinoki Y, Yanagawa Y, Toyoshima K.: The functional analysis of Mash1 in mouse taste bud cell differentiation using Cre-loxP system.. International Symposium on Oral Education and Research in Kitakyushu Kitakyushu Jan 24.

瀬田祐司、豊野孝、片岡真司、豊島邦昭: Cre-lox リコンビナーゼ系による成体マウス味蕾における Mash1 の機能解析 九州歯科学会 北九州 5 月 18 日~19 日.

豊野孝、瀬田祐司、片岡真司、豊島邦昭: 筋芽細胞株 C2C12 におけるアミノ酸(うま味)受容体 T1R1 遺伝子のプロモーター領域の解析 味と匂学会 静岡 10 月 2 日~4 日.

瀬田祐司、豊野孝、片岡真司、豊島邦昭: Cre-lox リコンビナーゼ系による成体マウス味蕾における Mash1 の機能解析 歯科基礎医学会学術大会 福岡 9 月 25 日~27 日.

瀬田祐司、豊野孝、片岡真司、中富満城、豊島邦昭: Cre-lox リコンビナーゼ系による成体マウス味蕾における Mash1 の機能解析 日本解剖学会全国学術集会 神戸 3 月 21 日~23 日.

Seta Y, Toyono T, Kataoka S, Nakatomi

M: The functional analysis of Mash1 in mouse taste bud cell differentiation using Cre-loxP system. The 13th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception. Fukuoka Nov3-4.

Toyono T, Hirata Y, Kataoka S, Nakatomi M, Seta Y: Cis element analysis of umami (amino acids) receptor, T1R1 gene in C2C12 cells. The 13th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception. Fukuoka Nov3-4.

瀬田祐司: Mash1 による味蕾細胞の分化制御 第 57 回 日本顕微鏡学会 九州支部総会 福岡 11 月 21 日.

豊野孝、瀬田祐司、片岡真司、中富満城、豊島邦昭: 筋芽細胞株 C2C12 におけるアミノ酸(うま味)受容体 T1R1 遺伝子の転写活性化領域の解析 九州歯科学会総会 5 月 23 日 北九州.

瀬田祐司、豊野孝、片岡真司、中富満城、木部琴乃: Cre-loxP によるマウス味蕾 3 型細胞における Mash1 の機能解析 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 新潟 9 月 11-13 日.

〔図書〕(計 1 件)

豊島邦昭、瀬田祐司: 口腔組織・発生学、第 9 章 4 . 舌, 医歯薬出版、2014.

〔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:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
<http://www2.kyu-dent.ac.jp/depart/2kaibu/Site/HOME.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

豊島 邦昭 (TOYOSHIMA KUNIAKI)
九州歯科大学・歯学部・名誉教授
研究者番号: 10112559

(2)研究分担者

瀬田 祐司 (SETA YUJI)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 90291616

豊野 孝 (TOYONO TAKASHI)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 10311929

片岡 真司 (KATAOKA SHINJI)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 80364149

(3)連携研究者

()

研究者番号: