

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462818

研究課題名(和文) 味蕾細胞分化モデルの実証 / 増殖能を失った前駆細胞を増殖させる培養系の確立

研究課題名(英文) Mechanisms of taste bud cell differentiation/ Establishment of cell culture system from postmitotic taste bud precursor cells

研究代表者

三浦 裕仁 (Hirohito, Miura)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授

研究者番号：80353936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：味蕾細胞は、味蕾周囲上皮と共通の前駆細胞から分化する。Sox2は味蕾原基に発現して味蕾細胞に分化させる因子であると報告されている。しかし、Sox2の発現パターンの詳細は不明であった。本研究では、茸状乳頭、有郭乳頭、軟口蓋の味蕾発生過程で、Sox2の発現を味蕾原基で発現するProx1と共に解析した。味蕾原基の出現時にSox2は味蕾原基に局限していたのは、茸状乳頭領域だけで、その他の領域では上皮に広く発現していた。発生が進むと、Sox2は味蕾と味蕾周囲の細胞に局限した。この発現はSox2が、味蕾細胞へ分化を方向づける因子ではなく、「味蕾細胞と周囲の上皮細胞」両方の分化に關与することを支持している。

研究成果の概要(英文)：Taste bud cells are derived from bipotential progenitor cells that give rise to both taste bud cells and surrounding keratinocytes. Sox2 is reported to be expressed intensely in taste bud primordia and is proposed to regulate the differentiation of bipotential progenitor cells into taste bud cells. However, detailed expression of Sox2 remained unclear. In this study, Sox2 expression was examined together with Prox1, which marks taste bud primordia, during taste bud development in the fungiform (FF), circumvallate (CV) and soft palate (SP) areas. The intense Sox2 was restricted to taste bud primordia at the emergence of taste bud primordia only in the FF forming area but not in the other areas. The intense Sox2 was restricted to taste bud cells and surrounding cells in all areas examined as development progressed. The expression patterns support that Sox2 does not serve as a cell fate selector between taste bud cells and surrounding keratinocytes but rather contribute to them both.

研究分野：口腔生理学

キーワード：味覚 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

食物の味は、味蕾で受容される。口腔内の味蕾は、舌の茸状・葉状・有郭の3種類の味覚乳頭と軟口蓋に分布している。味蕾は50~100個程度の細胞の集団で、生涯にわたって、常に新しい細胞に置き換わっている(ターンオーバー)。ターンオーバーでは未分化な前駆細胞から様々な味の受容機能を持つ細胞が生み出されており、その異常は味覚障害を生じると考えられている。そのため、味蕾細胞の分化・ターンオーバー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できる。

私達は、様々な細胞・組織の発生分化に重要な役割を果たす分泌性誘導因子 Shh が味蕾の基底細胞で発現することを明らかにし、味蕾が形成される最も初期の段階の細胞(味蕾原基)では Shh とホメオボックス型転写因子 Prox1 が共発現することを明らかにした^{1,2)}。味蕾を生み出す前駆細胞は、味蕾細胞だけでなく味蕾周囲の細胞をも生み出す細胞(bipotential precursor cells)であることが明らかにされている。HMG ボックス転写因子 Sox2 は、味蕾原基に局限して強く発現し、その発現量に依存して前駆細胞を味蕾細胞への分化に方向づけ、味蕾周囲の細胞と分ける機能を持つと報告されていた³⁾。しかし、その発現パターンは十分に解明されておらず、Sox2 の機能の理解を難しくしていた。

一方、味蕾は上皮内に形成されるので、味蕾が正常に機能するためには、口腔内の味物質が味蕾細胞に到達する通路となる味孔という構造が重要である。味孔を形成する味蕾周囲の上皮は味蕾と共通の前駆細胞から生み出されると考えられており、味孔は味蕾の発生と共に形成される⁴⁾。ほ乳類の味蕾は味神経に依存してターンオーバーしており、味神経の支配を失った味蕾は約10日で消失する。味孔の形成もまた味神経に依存することが知られている⁵⁾。しかし、味蕾周囲上皮細胞に選択的に発現する分子や細胞分化に関する情報は殆どなかった。

2. 研究の目的

本研究は味蕾とその周囲の細胞を生み出す前駆細胞の解明を目的とした。

- (1) 味蕾の形成過程における Sox2 の詳細な発現パターンを明らかにして、味蕾細胞分化における Sox2 の機能を検討した。
- (2) 味神経依存的な遺伝子発現に着目して、味蕾と共通の前駆細胞から分化する味蕾周囲の上皮細胞について解明を進めた。

3. 研究の方法

(1) 味蕾原基および味蕾形成過程の解析

私達はこれまでに *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、転写因子 Prox1 が個体発生の過程では味蕾原基、成体の味蕾では味蕾基底細胞に強く発現することを明らかにした²⁾。一方、Sox2 は、Sox2 遺伝子座に EGFP 遺伝子が挿入された遺伝子組換えマウスを用いた解析によって、発生過程では味蕾原基、成体では味蕾全体に発現すると報告されていた³⁾。

本研究では、組織切片を作製し Prox1 と Sox2 に対する抗体を用いて、免疫染色法により解析した。また、味蕾とその外側の細胞の境界部を明確に示すために、味蕾の I 型細胞で発現する NTPDase2 に対する抗体を用いた。I 型細胞は、I, II, III 型と3種類に分類される味蕾細胞の中で味蕾に最も多く含まれている細胞種で、他の細胞種を取り囲むような形態をしているため、I 型細胞の免疫染色によって、組織切片上で味蕾の輪郭を検出することができる。

(2) 味神経に依存して発現する遺伝子の解析

マウスの有郭乳頭において、味神経(舌咽神経)に依存して発現する遺伝子を検出するために、ディファレンシャル・ディスプレイ(DD)法を用いた。

味神経を切断していないコントロールマウスと味神経を切断して10日が経過したマウスのそれぞれの有郭乳頭の上皮を剥離して total RNA を調製した。cDNA を合成した後、HIEROGLYPH kit (Genomyx) を用いて DD-PCR を行った。Beckman Coulter Fluorescence DD System を用いて、2種類の試料の間で発現量の異なる PCR バンドを回収した。pGEM-T ベクターにクローニングしてシーケンス解析を行い、RNA プローブを作製して *in situ* ハイブリダイゼーションを行い発現パターンを解析した。

4. 研究成果

(1) 味蕾形成過程における Sox2 の機能

マウス成体の味蕾の Prox1 の発現を、Prox1 と NTPDase2 の免疫染色と核染色の三重蛍光検出で解析した。その結果、NTPDase2 の発現によって示される味蕾内に含まれる細胞の核の殆どすべてに Prox1 の発現が検出された [(Prox1 陽性の核の数/解析した味蕾細胞の核の数); 有郭乳頭 (911/923), 茸状乳頭 (433/434), 軟口蓋 (675/679)]。

マウスの発生過程において、味蕾原基は、茸状乳頭では E12.5 (胎生 12.5 日)、軟口蓋では E14.5 に分泌性誘導因子 Sonic hedgehog (Shh) と Prox1 が共発現する細胞集団として形成される²⁾。そのため、Prox1 の免疫染色を用いれば、味蕾原基の細胞から成熟分化した味蕾細胞に到るまで全ての細胞を検出することができ、味蕾発生過程で味蕾細胞をその周囲の細胞から明確に区別することができる。そこで、Prox1 の発現を指標にして、味蕾発生過程における Sox2 の発現を詳細に解析した。

Sox2 と Prox1 の二重蛍光免疫染色を用いて味蕾原基の出現から味蕾形成過程を経時的に解析した。

舌の茸状乳頭形成領域では、E12.5 の味蕾原基の出現時には、Okubo ら³⁾が報告している通り Sox2 は Prox1 を発現する味蕾原基に局限して発現していた。しかし、E14.5 には、味蕾原基のすぐ近傍の上皮細胞にも Sox2 の強い発現が検出された。その後、味蕾が形成された後にも、Sox2 は味蕾内の細胞に加えて味蕾の周囲の細胞でも強く発現していた。

軟口蓋領域では、E14.5 に味蕾原基が出現する時点で、Sox2 は上皮の広い範囲に強く発現しており、味蕾原基に局限した発現は見られなかった。E16.5 では、Sox2 の強い発現は味蕾とその周囲の細胞に限定された。その後、茸状乳頭と同様に、味蕾形成後まで一貫して味蕾周囲の細胞にも Sox2 の強い発現が検出された。

多数の味蕾が高密度に形成される有郭乳頭の溝の上皮では、Prox1 を発現する細胞集団がスポット状に出現する P1.5 (生後 1.5 日) の段階で、Sox2 は軟口蓋の味蕾原基形成期と同様に上皮の広い領域で強く発現していた。また、味蕾が形成された後まで Sox2 は味蕾周囲の上皮細胞に強く発現していた。

まとめ: Sox2 は味蕾原基に局限して強く発現し、味蕾と味蕾周囲の細胞に共通の前駆細胞 (bipotential precursor cells) から味蕾細胞を分化させる転写因子であると報告されていた。しかし、本研究で Sox2 は、味蕾の発生過程において、一貫して味蕾周囲の細胞にも強く発現することが明らかになった。これは、Sox2 は味蕾とその周囲の細胞とを分ける分化因子ではなく、その両方を含む領域の形成に関与することを示唆している。

(2) 味神経に依存して発現する遺伝子の解析

舌咽神経は、有郭乳頭の味蕾を支配し、味蕾で受容した味覚情報を中枢に伝えている。舌咽神経は味蕾細胞のターンオーバーを誘

導して味蕾の構造を一定に保つためにも重要で、舌咽神経を切断すると味蕾は約 10 日で消失する。本研究では、舌咽神経を切断して 10 日目のマウスと神経を切断していないコントロールマウスから有郭乳頭上皮の RNA を抽出し、舌咽神経によって発現がコントロールされている遺伝子を検索した。

神経切断の前後で発現が異なる 40 種類の cDNA クローンをした結果、有郭乳頭の味蕾周囲上皮の上層部の味孔を含む領域に局限して Sprr2a が発現することが明らかになった。Sppr2a は、small proline-rich protein family の 1 つで、ケラチノサイトの分化において周辺帯の形成に関与する。近年、Sppr2a は p53 に依存する転写活性を抑制することにより、傷ついた上皮の修復過程の上皮間葉転換に関与すると報告されており、味蕾周囲上皮では味孔を形成・維持するための上皮のリモデリングに関与している可能性がある。

マウスの発生過程において、有郭乳頭では Sprr2a は P2.5 (生後 2.5 日) から検出され、味蕾の形成に伴って発現が開始した。また、舌咽神経切断後の有郭乳頭の味蕾消失過程では、Sppr2a の発現は神経切断後から徐々に失われ、約 10 日でほとんど検出されなくなった。

一方、舌咽神経によって発現が誘導される Sprr2a とは対照的に、発現が抑制される分子として Keratin13 が明らかになった。Keratin13 は、舌上皮の中層部に広く発現しているが、味蕾近傍では発現が殆ど検出されなかった。Keratin13 を発現しない味蕾周囲細胞もまた、味蕾形成にともなって P2.5 で検出された。

まとめ: 味蕾周囲細胞の分化に関する情報は極めて限られていた。本研究で新たに見いだした Sprr2a は、ケラチノサイトの最終分化に関与する分子で、味孔の形成と維持に関与している可能性がある。

<引用文献>

Miura H, Kusakabe Y, Harada S: Cell lineage and differentiation in taste buds. Arch Histol Cytol 69(4):209-225 (2006)

Nakayama A, Miura H, Shindo Y, Kusakabe Y, Tomonari H, Harada S: Expression of the Basal cell makers of taste buds in the anterior tongue and soft palate of the mouse embryo. J Comp Neurol 509(2):211-224 (2008)

Okubo T, Pevny LH, Hogan BLM: Sox2 is required for development of taste bud sensory cells. Genes Dev 20(19):2654-2659 (2006)

Harada S, Yamaguchi K, Kanemaru N, Kasahara Y: Maturation of taste buds on the soft plate of the postnatal rat. *Physiol Behav* 68:222-229 (2000)

Nosrat CA, Blomlöf J, ElShamy WM, Ernfors P, Olson L: Lingual deficits in BDMF and NT3 mutant mice leading to gustatory and somatosensory disturbances, respectively. *Development* 124:1333-1342 (1997)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Nakayama A, Miura H, Ooki M, Harada S: During development intense Sox2 expression marks not only Prox1-expressing taste bud cell but also perigemmal cell lineages. *Cell and Tissue Research* 359(3): 743-753 (2015) 査読有
DOI: 10.1007/s00441-014-2076-5

Miura H, Kusakabe Y, Hashido K, Hino A, Ooki M, Harada S: The glossopharyngeal nerve controls epithelial expression of Sprr2a and Krt13 around taste buds in the circumvallate papilla. *Neurosci Lett*. 580: 147-152 (2014) 査読有
DOI: 10.1016/j.neulet.2014.08.012

〔学会発表〕(計 2 件)

Miura H: Development and maintenance of taste epithelium: Taste buds and surrounding cells. Seoul Taste Meeting 2016, 2016 年 11 月 29 日 (ソウル、韓国) 招待講演

Miura M, Nakayama A, Kusakabe Y, Harada S: Development and maintenance of taste epithelium: Taste buds and surrounding cells. XVII International Symposium on Olfaction and Taste, 2016 年 6 月 5-9 日パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://w3.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/physiol/Miura/Miura.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 裕仁 (MIURA HIROHITO)
鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授
研究者番号: 80353936

(2) 研究分担者

原田 秀逸 (HARADA SHUITSU)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 60128452
平成 27 年 3 月 31 日まで参画

中山 歩 (NAKAYAMA AYUMI)
鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教
研究者番号: 10398290

大木 誠 (OOKI MAKOTO)
鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教
研究者番号: 60596104

(3) 連携研究者

日下部 裕子 (KUSAKABE YUKO)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門食品健康機能研究領域・ユニット長
研究者番号: 90353937