

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18457

研究課題名(和文) 味蕾オルガノイドを用いた味細胞極性獲得メカニズムの解明

研究課題名(英文) Research and development of taste bud organoid with cell polarity

研究代表者

高井 信吾 (Takai, Shingo)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：30760475

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)：本研究は、味蕾幹細胞の3次元培養技術である「味蕾オルガノイド」、および味細胞のトランスクリプトーム解析を軸に、味細胞の極性や性質を決定する要因を探索するものである。味蕾オルガノイドコロニー中で観察される味細胞の頂端部には微絨毛のマーカ分子であるvillinが発現していることがわかった。これはコロニー中で味細胞は細胞極性(味孔側と基底膜側)を獲得していることを示唆する。また、味細胞のトランスクリプトーム解析においては、FACSとBD Rhapsodyを組み合わせたトランスクリプトーム解析により、茸状乳頭と有郭乳頭の2型味細胞における特異的な発現遺伝子を見出し、学術論文として発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、味細胞の3次元培養系における味細胞の配向と、味細胞の遺伝子発現に着目し実験を開始した。その結果、3次元培養コロニー中の成熟味細胞の頂端側にはvillinが発現しており、細胞がコロニー内部に埋没していても味細胞は極性を獲得していることがわかった。また、個々の味細胞の性質を探索するために、単一トランスクリプトーム解析を試みた結果、世界に先駆けて舌前方部に存在する茸状乳頭に含まれる特定の味細胞群の収集とその遺伝子発現の網羅解析に成功した。本研究は味細胞培養技術の改善、および味細胞の性質を決定する遺伝子発現に関する基礎的知識を提供する。

研究成果の概要(英文)：In this study, I explored the factor which provides cell polarity and specific character to the taste cells, by using a 3-dimensional taste stem cell culture "taste bud organoid" and single-cell transcriptome analysis. In the taste bud organoid colonies, many taste cells expressed villin at the end of the cells, even the cells were embedded deeply inside the colony. That implies the taste cells acquire cell polarity during their maturation process, regardless of the exposure to the outside environment. In addition, the high-throughput single-cell RNA sequencing, combined with FACS was performed on Gnat3-GFP-expressing transgenic mice, which can identified type II taste cells with fluorescent label. The data indicated the startling heterogeneity in single-cell taste cell gene expression profiles, contributing to our fundamental knowledge of the characterization of -gustducin-expressing taste cells.

研究分野：生理学

キーワード：味細胞 オルガノイド FACS RNAシーケンス

1. 研究開始当初の背景

これまでの味覚研究では、5基本味(甘味、うま味、苦味、塩味、酸味)に対する特異的な受容体(T1R2+T1R3:甘味、T2Rs:苦味、ENaC:塩味、OTOP1、PKDs:酸味、T1R1+T1R3:うま味)が特定されてきた。この様な受容体は基本的に味孔側に発現し、食物中の味物質により活性化する。受容体の活性化により脱分極した味細胞は神経伝達物質を放出し、基底側に接続する神経線維を興奮させることで中枢へと味覚情報を伝達する。これに関して、

味細胞は、味蕾の基底側に存在する前駆/幹細胞から分化、成熟して味孔から微絨毛を出し、特定の味神経と接続することではじめて機能する。しかし、味細胞が幹細胞から分化・成熟する過程で、いつどのようにして極性、機能を獲得するかに着目した研究はこれまでにない。

味蕾は舌上皮に散在して存在しており、その数の少なさや脆弱性から、個々の味細胞の性質の違いを生み出す遺伝子発現を網羅的に探索した研究はほとんどなされてこなかった。

2. 研究の目的

過栄養や不適切な食習慣に起因する様々な生活習慣病、特に肥満や高血圧、糖尿病が世界的に深刻な問題となっている。これらの疾病の根本的な予防と治療には、食事を含む生活習慣への介入が不可欠であり、それには我々の摂食行動や食嗜好性が味覚を通じてどのように形成されるかを理解する必要がある。しかし、味覚における細胞レベルの解析は非常に困難であり、これまでにあまり研究が進んでいない。その理由として、ヒトに味覚が近いモデル動物であるマウスの味覚器のサイズが小さいこと、味細胞自体の数が少ないこと、また、上皮より単離すると短時間で死滅するという脆弱性が主な技術的な足かせとなっていることが挙げられる。解析に耐えうる数の味細胞を生きたまま回収し、個々の細胞の遺伝子発現を探索することができれば、味覚の生理を理解する上で非常に大きなアドバンテージとなる。

また、味蕾幹細胞を含む細胞群をマウス舌有郭乳頭周囲より採取し、様々な成長因子を含む培地で3次元培養することで、分化した成熟味細胞を含むコロニーを作製することができる。このコロニーは味蕾オルガノイドと呼ばれ、味覚研究の進展に大きく寄与することが期待される技術である。味蕾オルガノイドのコロニーは生体の味蕾よりもサイズが大きく、1ヶ月以上の味細胞培養が可能であるため、実験試料として扱いやすい。現在、味蕾オルガノイドは、世界で唯一の味細胞の培養系であるが、まだその研究は始まったばかりであり、改善すべき点を多く有することも事実である。現状、最大の問題点は、オルガノイドは生体の味蕾と異なり、細胞極性を欠いている点である。現在報告されているオルガノイドでは、生体内の味蕾で観察されるような細胞極性は保たれておらず、四方八方を向いた味細胞を含む細胞塊といった状態を脱していない。味蕾オルガノイドと生体の味蕾に含まれる味細胞の極性の違いに着目し、味細胞の極性獲得に寄与する遺伝子の解明を目指した。

3. 研究の方法

単一味細胞に発現する遺伝子の網羅解析を行うためには、解析対象の細胞サンプルが十分なRNA量を含み、かつサンプル中の生細胞の割合が高いことが求められる。これまでの技術では特定の味細胞を迅速かつ正確に回収することは難しく、網羅解析が進んでこなかった。本研究では、ハイスループットscRNA-Seqとフローサイトメトリー(FCM)を組み合わせ、マウス茸状乳頭および有郭乳頭の-gustducin(甘味・うま味・苦味の受容に關与するGタンパク質)発現型味細胞におけるトランスクリプトーム解析を試みた。GFP発現細胞の回収にはBD FACSAria™セルソーターを、その後BD Rhapsodyシステムを用いて可及的に迅速にcDNA合成を行った。得られたcDNAはイムノジェネティクス株式会社が開発した独自技術であるTAS-Seq法を用いて、total cDNAを増幅した。

これとは別に、味細胞極性と機能の獲得メカニズムを探索するために、味蕾オルガノイド培養を行った。B6マウスもしくは特定の味細胞をGFPでラベルしたマウス有郭乳頭を含む組織を採取し、酵素処理にてシングルセル化した後、4%マトリゲル、および各種成長因子(Wnt3a、R-spondin、Noggin、EGFなど)を含む培地で20日間培養した。20日後にコロニーの形態には多様性があり、味細胞を含むもの、含まないもの、細胞の配列に極性があるもの、ないものと様々なコロニーが観察される。II型味細胞にGFPが発現する遺伝子改変マウスの舌組織を用いて作製した味蕾オルガノイドを共焦点レーザー顕微鏡下で観察することで、GFP発現味細胞の配向を目視で観察し、種々の形態を持つ単一コロニーを分取した(図1)。分取したコロ

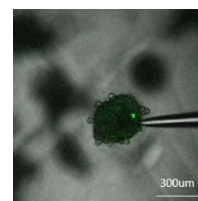
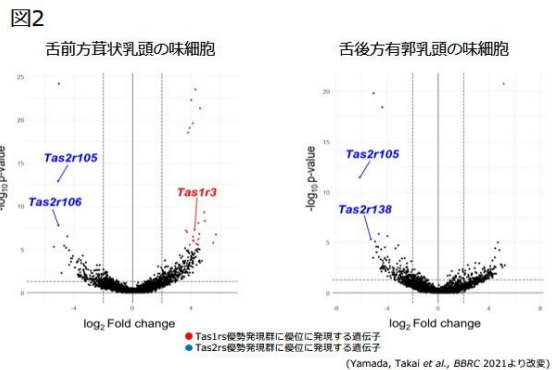


図1

ニーを用いて免疫組織化学的解析を行った。

4. 研究成果

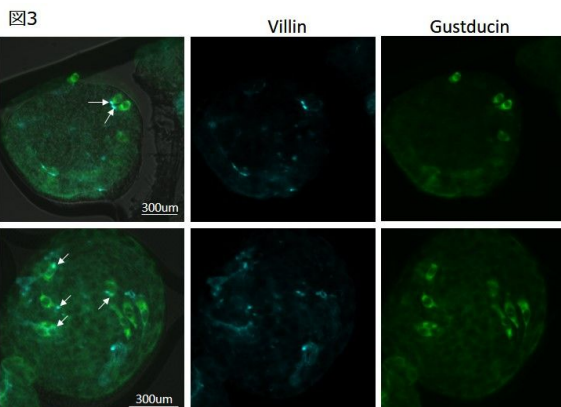
FCMを用いたセルソーティング (FACS) にて回収した *-gustducin* 陽性細胞を用いたシングルセルトランスクリプトーム解析では、*Tas1rs* (甘味、うま味受容体) の発現量が多い群を *Tas1rs* 優勢発現群、*Tas2rs* (苦味受容体) の発現量が多い群を *Tas2rs* 優勢発現群とし、それぞれの細胞群の遺伝子発現を比較した。その結果、各々の群において多数の発現変動遺伝子が検出された (図2)。さらに、クラスター解析の結果より、舌前方部茸状乳頭味蕾および後方部有郭乳頭味蕾の *-gustducin* 発現細胞において発現パターンが異なる遺伝子を多数発見した。さらに、CVに比べてFPで発現が促進された遺伝子群には、上皮細胞の分化や上皮組織の発生に関与する遺伝子が含まれていた。



また、共焦点レーザー顕微鏡下分取したオルガノイドコロニーを用いて免疫染色を行った結果、細胞配列の極性の有無に関わらずコロニー中の味細胞の頂端部には微絨毛のマーカ分子である *villin* が発現していることがわかった (図3、矢印部)。これは細胞塊の中で味細胞は細胞極性 (味孔側と基底膜側) を獲得していることを示唆する。一方、成熟味細胞マーカーである *Krt8* を発現しているが、*villin* を発現していない細胞のみを含むコロニーも見られた。さらに、味神経の細胞体を含む膝神経節を摘出し、培養することを試みた。

2次元培養した神経細胞にカルシウムインジケータを取り込ませ、刺激溶液 (ATP) を灌流させることで、単一の神経細胞の細胞内カルシウム濃度の上昇を観察することに成功した。この味神経細胞と味蕾オルガノイドの共培養を試みたが、オルガノイドの細胞配列に変化は見られなかった。オルガノイドを用いた実験に関しては培養に用いる試薬の世界的な供給不足、および配向性を持つコロニーの出現が予想以上に少なく、予定通りの進行が困難な部分があった。

本研究で得られた実験結果の一部を、学術論文 (原著論文2報、総説1報) として発表した。また、結果の一部を The 18th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT2020)、日本味と匂学会第55回大会、第62、63回歯科基礎医学会大会にて発表した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Osaki Ayana, Sanematsu Keisuke, Yamazoe Junichi, Hirose Fumie, Watanabe Yu, Kawabata Yuko, Oike Asami, Hirayama Ayaka, Yamada Yu, Iwata Shusuke, Takai Shingo, Wada Naohisa, Shigemura Noriatsu	4. 巻 21
2. 論文標題 Drinking Ice-Cold Water Reduces the Severity of Anticancer Drug-Induced Taste Dysfunction in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8958 ~ 8958
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21238958	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 TAKAI Shingo, SHIGEMURA Noriatsu	4. 巻 59
2. 論文標題 The Role of Insulin Signaling in Mammalian Peripheral Taste Tissue: From Taste Modulation to Maintenance of Taste Bud Homeostasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 KAGAKU TO SEIBUTSU	6. 最初と最後の頁 122 ~ 129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1271/kagakutoseibutsu.59.122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Yu, Takai Shingo, Watanabe Yu, Osaki Ayana, Kawabata Yuko, Oike Asami, Hirayama Ayaka, Iwata Shusuke, Sanematsu Keisuke, Tabata Shoji, Shigemura Noriatsu	4. 巻 557
2. 論文標題 Gene expression profiling of -gustducin-expressing taste cells in mouse fungiform and circumvallate papillae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 206 ~ 212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.04.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高井 信吾、渡邊 雄、Robert F. Margolskee、Peihua Jiang、二ノ宮 裕三、重村 憲徳
2. 発表標題 オルガノイド培養系を用いた味細胞分化メカニズム解明への新たなアプローチ
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会 メインシンポジウム3 「発生から再生への挑戦」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shingo Takai, Yu Watanabe, Robert F. Margolskee, Peihua Jiang, Yuzo Ninomiya, Noriatsu Shigemura
2. 発表標題 Insulin-mTOR signaling may regulate mouse taste cell generation
3. 学会等名 The 18th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高井 信吾、岩田 周介、實松 敬介、重村 憲徳
2. 発表標題 体内の栄養状態を反映したマウス味細胞のmechanistic target of rapamycin (mTOR) 活性化
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高井 信吾、岩田 周介、實松 敬介、重村 憲徳
2. 発表標題 Mechanistic target of rapamycin (mTOR) expression in mouse taste bud cells
3. 学会等名 日本味と匂学会第55回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------