

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：44701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12343

研究課題名(和文)3次元培養による味細胞スフェロイドの樹立とin vitro実験系の開発

研究課題名(英文)Development of a novel taste cell culture system

研究代表者

井上 和彦(INOUE, Kazuhiko)

和歌山信愛女子短期大学・その他部局等・講師

研究者番号：30363641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：食品や薬物などの味は、舌の味蕾にある味細胞で感知する。そのため、味細胞を使えば、甘味、苦味、酸味、塩味、うま味など、味を感知するメカニズムを解明したり、これらの味を生み出す元となる物質を探索したりするのに役立つと考えられる。しかしながら、味細胞を単離して培養する方法はまだ確立されていない。そこで、一般的な平面(2次元)ではなく、立体的(3次元)に味細胞を培養することで、味細胞の機能を維持したまま培養する新たな方法を試みた。

研究成果の概要(英文)：We can sense the taste through taste cells in the taste bud of the tongue. It is thought that taste cells are useful for elucidating mechanisms for sensing taste such as sweet, bitter, sour, salty, and umami taste, and searching for substances from which these taste are produced. However, the methods for isolation and culture of taste cells have not yet been established. Therefore, we tried to find a new method to cultivate taste cells while maintaining their function by culturing in a stereoscopic (three dimensional) condition rather than a plane (two dimensional).

研究分野：栄養生化学、機能性食品、薬用食品学

キーワード：味細胞 3次元培養 スフェロイド

1. 研究開始当初の背景

- (1) 舌の味蕾にある味細胞に、食品や薬物に含まれる呈味物質が作用することによって、味を感じることができる。
- (2) 味細胞は味覚の研究に有用なツールであるが、味蕾から単離して培養すると生存率が著しく減少し、味細胞そのものを研究に利用することが難しかった。
- (3) ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウシ等で味蕾から味細胞を単離して培養する方法が報告されている。しかしながら、同じ初代培養細胞でも神経細胞や血管内皮細胞のような誰にでも容易にできる確立された方法ではない。また、株化された味細胞も存在しない。
- (4) 味細胞の機能や、味細胞を用いた新規呈味物質の探索には、細胞本来の性質を保持したまま、長期間安定して培養できる方法の開発が期待されていた。

2. 研究の目的

味細胞の3次元培養を行い、スフェロイド様の味細胞（味細胞スフェロイド）の樹立を目指す（下図）。



さらに味細胞を用いた in vitro 実験用プラットフォームを開発するため、次の項目を明らかにする。

- (1) 味細胞スフェロイド樹立のための条件（培地、添加因子、培養器材など）を検討し、最適な組み合わせを決定する。
- (2) 味細胞スフェロイドを構成する細胞の種類の特異性や、受容体およびイオンチャネルの発現を調べる。各細胞の特異的マーカーで免疫染色を行い、味細胞スフェロイドを構成する細胞の種類を同定する。
- (3) 味細胞スフェロイドに、グルコース（甘味）、キニーネ（苦味）、酢酸（酸味）、塩化ナトリウム（塩味）、グルタミン酸ナトリウム（うま味）を添加し、細胞内カルシウムイオン濃度、ATP 産生量、活動電位などを測定する。非添加群と比較して味細胞スフェロイドの機能を調べる。

3. 研究の方法

(1) 味細胞の単離

- ・ ヒトの葉状乳頭を擦って味細胞を回収し^①、コラゲナーゼ等の酵素で処理して、味細胞を単離する。
- ・ マウスの茸状乳頭^②、ラットの有郭乳頭^③をそれぞれコラゲナーゼ等の酵素で処理して、味細胞を単離する。

(2) 3次元培養による味細胞スフェロイドの樹立

- ・ 単離した味細胞をハンギングドロップ、ナノカルチャープレート、磁性ナノ粒子の3つの器材で培養する（下図）。

① ハンギングドロップ

ディッシュに培地の液滴をぶら下げるように保持し、その中でスフェロイドを形成させる。

② ナノカルチャープレート

ディッシュ底面にナノサイズの格子を敷き詰め、その上でスフェロイドを形成させる。

③ 磁性ナノ粒子

無毒性の磁性ナノ粒子を培地に添加して細胞に取り込ませる。ディッシュ上部に磁石を置き、磁力によって細胞を浮上させ、スフェロイドを形成させる。

- ・ 安定的に味細胞スフェロイドを樹立するための培地、添加因子の組み合わせを決定する。

(3) 味細胞スフェロイドの性質

- ・ 味蕾内部の味細胞は Type I、II、III、IV の4種類に分けられる（下表）。

| | 特異的マーカー | 受容体・イオンチャネル |
|----------|---------------------|---|
| Type I | GPR120 | - |
| Type II | gustducin PLC-β2 | T1R2/T1R3 (甘味) T2R (苦味) T1R1/T1R3 (うま味) |
| Type III | GAD67 | PKD2L1/PKD1L3 (酸味) |
| Type IV | LGR5 | ENaC (塩味) |

各細胞の特異的マーカーで免疫染色を行い、味細胞スフェロイドを構成する細胞の種類を同定する。

- ・ Type I～IVの各細胞で、基本五味(甘味、苦味、塩味、酸味、旨味)を認識する受

容体・イオンチャネルの発現を、免疫染色およびウェスタンブロッティングで明らかにする。

- 上述した特異的マーカーや味覚受容体の発現を、平面（2次元）で培養した味細胞で調べ、味細胞スフェロイドとの違いを比較する。

- 上述したナノカルチャープレート上で培養したスフェロイドは、透過型電子顕微鏡で形態が観察できるため、味細胞スフェロイドの形態観察を行う。

(4) 味細胞スフェロイドの機能

- 味細胞スフェロイドの味物質に対する応答性を確認する。

① 甘味、苦味、旨味

T1R1、T1R2、T1R3、T2RはGタンパク質共役型受容体である。受容体の活性化により、細胞内カルシウムイオン濃度が増加し、細胞外にATPが放出される。味細胞スフェロイドに呈味物質（グルコース、キニーネ、グルタミン酸ナトリウム）を添加した時の細胞内カルシウムイオン濃度をFLIPRで、培地中のATP濃度をELISAでそれぞれ測定する。

② 酸味、塩味

PKD2L1、PKD1L3はプロトンチャネル、ENaCはナトリウムチャネルである。味細胞スフェロイドに呈味物質（酢酸、塩化ナトリウム）を添加し、パッチクランプ法で活動電位を測定する。

- 上述した味物質に対する応答性を平面（2次元）で培養した味細胞で調べ、味細胞スフェロイドとの違いを比較する。

4. 研究成果

(1) 味細胞の単離

- 文献^①を参考に、研究代表者自身の味細胞の単離を試みた。しかしながら、細胞は全く回収できなかった。ボランティアを募り、人数を増やして回収する方法も考えたが、臨床研究倫理委員会への申請や準備に時間を要すること、ヒト味細胞を用いた研究は世界でもほとんど報告例が無いことなどの理由から、ヒト味細胞の単離を断念した。

- 文献^②、^③を参考に、マウスとラットの味細胞の単離を試みた。ヒトと異なり、味蕾が存在する乳頭を直接コラゲナーゼ処理できるため、細胞の回収量は増加し

た。

- 研究が遂行しやすいという利点を考慮し、以後はマウスとラットの細胞を用いることにした。

(2) 3次元培養

- マウスの茸状乳頭から単離した細胞、およびラットの有郭乳頭から単離した細胞を、接着性を高めるために底面をコラーゲンでコーティングしたディッシュ（2次元）、ハンギングドロップ（3次元）、ナノカルチャープレート（3次元）、磁性ナノ粒子（3次元）の各培養器材で培養した。

- 培地はDMEM、 α -MEM、RPMI1640、F-12の4種類を、ウシ胎児血清は5%、10%、20%と濃度を変えて最適な培養条件を検討した。

- コラーゲンコーティングディッシュでは、培養2日目まで細胞はほとんど死滅した。培地や血清濃度を変えても、細胞の状況は改善しなかった。

- ハンギングドロップ、ナノカルチャープレート、磁性ナノ粒子で培養すると、いずれも細胞塊が確認できた。しかしながら、培養を継続してもそれらの細胞塊が増殖する様子は見られなかった。

- また、培地や血清濃度を変えても、細胞塊の様子に大きな変化は見られなかった。

- 申請時は研究期間を平成27～28年度の2年間に設定していたが、進行が遅れていたため、さらに1年間の延長を申請し、認可された。

- 延長した期間では、単離した味細胞を含む細胞集団から味細胞の割合を高め、その後でハンギングドロップ、ナノカルチャープレート、磁性ナノ粒子で培養する計画を立てた。

- 具体的には、味細胞を特異的マーカーに対する抗体で標識し、フローサイトメトリーで解析し、味細胞のみを分取することにした。

- この時点で研究代表者が所属先を変更することになった。異動先では研究を継続するためのセットアップに大半の時間を要したため、結果的にフローサイトメトリーの解析は実施できなかった。

- 味覚の研究者とコンタクトを取り、味細

胞の培養についてのコツやヒントを教えてくださいただけのよう依頼した。しかしながら、どの方も一様に、味細胞の培養は難しいので、詳しくはわからないという回答だった。

- 類似した研究として、マウスの有郭乳頭に存在する Lgr5 (幹細胞マーカー) 陽性細胞が、味細胞に分化することが判明した^④。また、味蕾周辺の Lgr5 陽性細胞から味蕾オルガノイドの構築方法も報告されている^⑤。
- 単離した細胞に Lgr5 陽性細胞が含まれていると仮定して、味細胞に分化する培養条件で3次元培養を実施すれば、味細胞スフェロイドが樹立できたかもしれない。
- あるいは、生体由来の味蕾ではなく、Lgr5 陽性細胞から構築した味蕾オルガノイドをコラゲナーゼなどの酵素で処理し、単一になった細胞を培養すれば、味細胞の培養方法を確立できるかもしれない。

<引用文献>

- ① Onoda K, Hirai R, Takao K, Kokubun S, Ikeda M. Patients with hypogeusia show changes in expression of T2R taste receptor genes in their tongues. *Laryngoscope*. 121(12)、2011、2592-2597.
- ② Qin YM, Shi JQ, Zhang GH, Deng SP, Wang TH. A reliable method to obtain cells of taste buds from fungiform papillae of mice. *Acta Histochem*. 112(1)、2010、107-112.
- ③ Kishi M, Emori Y, Tsukamoto Y, Abe K. Primary culture of rat taste bud cells that retain molecular markers for taste buds and permit functional expression of foreign genes. 106(1)、2001、217-225.
- ④ Yee KK, Li Y, Redding KM, Iwatsuki K, Margolskee RF, Jiang P. Lgr5-EGFP marks taste bud stem/progenitor cells in posterior tongue. *Stem Cells*. 31(5)、2013、992-1000.
- ⑤ Ren W, Lewandowski BC, Watson J, Aihara E, Iwatsuki K, Bachmanov AA, Margolskee RF, Jiang P. Single Lgr5- or Lgr6-expressing taste stem/progenitor cells generate taste bud cells ex vivo. *Proc Natl Acad Sci*

U S A. 111(46)、2014、16401-16406.

5. 研究組織

- (1) 研究代表者
井上 和彦 (INOUE, Kazuhiko)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：30363641