

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09525

研究課題名(和文)オルガノイドを用いた味蕾細胞分化における外的因子・内的因子の機能検索

研究課題名(英文)The functional study of intrinsic and extrinsic factors in differentiation of taste bud cells using organoids.

研究代表者

瀬田 祐司 (Seta, Yuji)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：90291616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：味覚は生物にとって、生体の恒常性維持に重要な役割を演じている感覚であり、味覚は口腔や咽頭に散在する味蕾と呼ばれる感覚器において受容されている。1つの味蕾は50から100個の細胞によって構成されていて、味蕾を構成する細胞は微細構造的に4種類の細胞に分類されている。周囲の舌上皮細胞から味蕾細胞への分化制御機構については、未だに解明されていない。本研究では、遺伝子改変マウス及びオルガノイドを使用して、味蕾細胞の分化について転写因子の機能を中心に検索を行った。その結果、転写因子Mash1を発現している細胞は、味蕾の型細胞だけでなく、一部の型細胞にも分化する事が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの我々の研究で、味蕾細胞の分化には神経細胞の分化に関わる転写因子が関与していることが示唆してきた(Seta et al., 1999, 2011)。しかしながら、有郭乳頭上皮から味蕾細胞への分化の制御機構・特に味蕾内の各細胞型への分化・運命決定に関わる内的因子・外的因子の影響については、不明な点が多く、味蕾の各細胞型の細胞生物学特性を検索するために解明すべき点が多く残されている。本研究で、味蕾細胞の分化制御機構が明らかになれば、味覚異常などの疾患の原因究明並びに治療法の開発に寄与することが期待することができる。

研究成果の概要(英文)：Mammalian taste bud cells have a limited lifespan and differentiate type I, II, and III cells from basal cells (precursor cells). However, little is known regarding the cell lineage within taste buds. In this study, we investigated the cell fate of Mash1-positive precursor cells utilizing the transgenic mice and organoid to explore the differentiation of taste bud cells. We found that Mash1-expressing cells differentiated into taste bud cells that expressed type III cell markers, but did not differentiate into most of type II cell marker-positive cells. Additionally, we found that Mash1-expressing cells could differentiate into PLCb2-positive cells, which have a shorter lifespan compared with type III cell markers -positive cells. These results suggest that Mash1-positive precursor cells could differentiate into type III cells, but not into most of type II cells, in the taste buds.

研究分野：細胞生物学

キーワード：味蕾 オルガノイド 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

味覚は生物にとって食物の栄養性(甘味、うま味)・毒性(苦味)・腐敗度(酸味)・塩濃度などの識別に働き、生体の恒常性維持に重要な役割を演じている感覚であり、味覚は口腔や咽頭に散在する味蕾と呼ばれる感覚器において受容されている。1つの味蕾は50から100個の細胞によって構成されていて、味蕾を構成する細胞は微細構造的に4種類の細胞に分類されている。4種類の味蕾細胞の中で、2型細胞は甘味、うま味、苦味を受容し、3型細胞は酸味と塩味を受容していることが推測されている。味蕾内において、各細胞型は 型細胞が約50%・ 型細胞が約40%・ 型細胞が約10%とほぼ一定の比率に保たれており、基底細胞から各細胞型への分化・運命決定には厳密な制御が存在することが想像される。

味蕾は周囲の舌上皮細胞から分化し、上皮と神経の両方の性質を合わせ持つ細胞集団である。これまでの我々の研究で、味蕾細胞の分化には神経細胞の分化に関わる転写因子が関与していることが示唆されてきた(Seta et al., 1999,2011)。味蕾の形態の維持には、神経の支配が必要であり、培養条件下において、味蕾を研究対象とすることは不可能とされてきた。近年、オルガノイドを使用することで、様々な組織での幹細胞の動態や組織構築のメカニズムを検索することが可能になってきた。最近の研究で、有郭乳頭の上皮から味蕾細胞を含むオルガノイドの作製が報告されており、オルガノイド培養法を利用して、味蕾細胞の培養が出来る可能性が示唆されてきた。しかしながら、有郭乳頭上皮から味蕾細胞への分化の制御機構・特に味蕾内の各細胞型への分化・運命決定に関わる内的因子・外的因子の影響については、不明な点が多く、味蕾の各細胞型の細胞生物学特性を検索するために解明すべき点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では舌上皮幹細胞から味蕾細胞への分化・運命決定の制御機構の解明を目的として、遺伝子改変マウスと舌上皮オルガノイドを用いて味蕾細胞分化に関わる外的及び内的因子の検索ならびにその機能の解明を試みる。

3. 研究の方法

本研究では味蕾細胞への分化制御機構の解明を目的として、味蕾幹細胞の同定ならびに分化に関わる外的因子の検索と機能解析を行う。本研究では研究期間内に下記の実験を行い、味蕾細胞への分化制御機構の解明を試みる。

1. 味蕾幹細胞の局在とその細胞系譜の検索

Lgr5-Cre^{ERT2}-GFP マウスと CAG-floxed-tdTomato マウスを交配させ、Lgr5-Cre^{ERT2}-GFP /CAG-floxed-tdTomato マウスを作製する。

で作製したマウスにタモキシフェンを投与して、有郭乳頭溝上皮内での Lgr5 発現細胞の動態を検索する。

で作製したマウスにタモキシフェンを投与して、味蕾における Lgr5 発現細胞の系譜を味蕾細胞のマーカー(型 : gustducin, PLCβ2, 型 : AADC, CA4, SNAP25, NCAM) を用いて検索する。

味蕾における Wnt, BMP, SHH などの味蕾細胞の分化に関係する外的因子のレセプターの発現を検索し、これらのレセプターが味蕾のどの細胞型に発現しているのかを検索する。

Lgr5-Cre^{ERT2}-GFP マウスと CAG-floxed-DTA マウスを交配させ、Lgr5-Cre^{ERT2}-GFP /CAG-floxed-DTA マウスを作製する。

で作製したマウスにタモキシフェンを投与して、有郭乳頭溝上皮内での味蕾を含めた有郭乳頭溝上皮細胞の分化における影響を検索する。

2. 味蕾細胞の分化に関わる外的因子の検索

Lgr5-Cre^{ERT2}-GFP マウスの有郭乳頭溝上皮から Lgr5 発現細胞を単離し、オルガノイドを作製する。

オルガノイド内の細胞分化を味蕾細胞のマーカーを用いて検索する。

オルガノイド培養培地に添加する外的因子の検討。味蕾細胞の分化に必要な因子 (EGF/Noggin/R-spondin1)のほかに、Wnt, BMP, SHH などの味蕾細胞の分化に関係する外的因子をそれぞれ添加し、基本培地との差を味蕾細胞マーカーの発現により検討する。

さらに外的因子添加群と基本培地のオルガノイドにおける遺伝子発現の差を PCR-array を利用して検索する。

外的因子のシグナル伝達系の阻害剤投与によるオルガノイドにおける味蕾細胞マーカー発現への影響を検索する。

3. 舌上皮オルガノイドにおける LGR5・Mash1 発現細胞の細胞系譜の検索

Lgr5-Cre^{ERT2}-GFP マウス, Mash1-Cre^{ERT2} マウスと CAG-floxed-DTA マウスを交配させ、Lgr5-Cre^{ERT2}-GFP / Mash1-Cre^{ERT2}/CAG-floxed-DTA マウスを作製する。

Lgr5-Cre^{ERT2}-GFP / Mash1-Cre^{ERT2}/CAG-floxed-DTA マウスの有郭乳頭溝上皮から Lgr5 発現細胞を単離し、オルガノイドを作製する。

で作製したオルガノイドに、培地にタモキシフェンを添加することで LGR5・Mash1 発現細胞を変性させ、味蕾細胞の分化にどのような影響が見られるのかを検索する。

4. 研究成果

味蕾を構成する細胞は、舌上皮細胞から供給されることがわかっているが、味蕾の幹細胞の局在は不明である。そこで有郭乳頭の乳頭溝に存在する Lgr5 発現細胞の動態を Lgr5-Cre^{ERT2}-GFP マウスを用いて検索した。その結果、Lgr5 陽性幹細胞の一部は、味蕾細胞となり、味蕾細胞のマーカーと共発現の検索の結果、Lgr5 陽性幹細胞はすべての味蕾細胞型に分化しうることがわかった。また、Lgr5-Cre^{ERT2}-GFP マウスと CAG-floxed-DTA マウスを交配させ、Lgr5-Cre^{ERT2}-GFP /CAG-floxed-DTA マウスにおいて、タモキシフェン投与により、味蕾の大きさ・細胞数の減少が認められ、全ての細胞型の減少が確認された。有郭乳頭上皮の厚さも減少し、Lgr5 陽性幹細胞は味蕾だけでなく、舌上皮への細胞供給を行っていることが示唆された。さらに味蕾における Wnt, BMP, SHH などの味蕾細胞の分化に関係する外的因子のレセプターの発現とこれらのレセプターが味蕾のどの細胞型に発現しているのかについて検索を行った。有郭乳頭上皮から抽出した RNA を用いて RT-PCR により、レセプターの発現を検索した結果、PTCH1, Frizzled-1, 2, LRP5, 6 の発現が認められた。

味蕾で発現する転写因子 Mash1 の機能を、遺伝子改変マウスを用いて検索した。これまでの我々の研究で、Mash1 は味蕾の 型細胞の分化に関与していることが示唆さ

れているが、その他の細胞型の分化にも関与しているのを検討した。まず Mash1-CreERT2 マウスと CAG-floxed-tdTomato マウスを交配させ、Mash1-CreERT2/CAG-floxed-tdTomato を作製した。このマウスにタモキシフェンを投与することで、味蕾内の Mash1 発現細胞の動態を検索した。これまでの Mash1 ノックアウトマウスで得られた結果と同様に、味蕾における多くの Mash1 発現細胞は 型細胞のマーカ―(AADC, CA4)と局在が一致していた。また、 型細胞のマーカ―(gustducin, PLCb2)を発現する味蕾細胞の中にも tdTomato 陽性細胞(Mash1)が認められた。このことは味蕾細胞の分化の初期に発現する Mash1 は、これまでの我々の Mash1 ノックアウトマウスで得られた知見に加えて、 型細胞の分化にも関与していることが示唆された。しかしながら、 型細胞の多くは tdTomato 陰性であり、 型細胞の分化には Mash1 が関与する細胞と別の転写因子が関与する細胞があることが推測された。さらに、タモキシフェンの投与したマウスで tdTomato 陽性細胞(Mash1)の動態を計時的に観察すると、tdTomato 陽性 型細胞は tdTomato 陽性 型細胞よりも早期に消失していることが確認された。このことは、 型細胞に比べ 型細胞の更新サイクルが短いことが推測された。

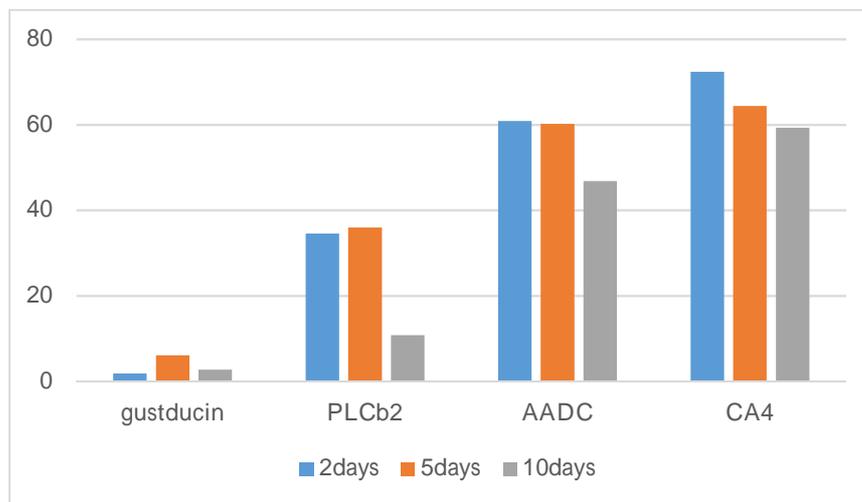


図1：タモキシフェン投与後 tdTomato 陽性細胞と味蕾細胞マーカ―と共発現

次に味蕾で発現する転写因子 Mash1 の機能を、味蕾オルガノイドを用いて検索した。Mash1-CreERT2/CAG-floxed-tdTomato(MT)の有郭乳頭上皮から作成した味蕾オルガノイドで、Mash1 発現細胞の味蕾細胞マーカ―の発現を検索すると、遺伝子改変マウスの結果と同様に、味蕾オルガノイドにおいても tdTomato 陽性細胞(Mash1)の多くは 型細胞のマーカ―(AADC, CA4)を発現していることが確認された。また 型細胞のマーカ―(gustducin, PLCb2)を発現する tdTomato 陽性細胞(Mash1)も確認することが出来た。さらに Mash1-CreERT2/CAG-floxed-DTA(MD)マウスを作製し、妊娠マウスにタモキシフェンを投与することで、Mash1 発現細胞を変性させて遺伝子及び味蕾細胞のマーカ―の発現変化を検索した。その結果、タモキシフェン投与後 10 日のマウスから作製したオルガノイドでは、MD マウスオルガノイドはコントロールマウスオルガノイドと比較して 型細胞のマーカ―(PLCb2)・ 型細胞マーカ―(AADC)の遺伝子発現は減少したが、 型細胞のマーカ―(NTPDase2)の発現には変化は見られなかった。MD マウスオルガノイドにおける 型細胞のマーカ―(gustducin)と 型細胞のマーカ―(CA4)の発現を免疫染色で確認したが、コントロールマウスオルガノイドと比較して、これらのマーカ―を発現するオルガノイドが顕著に減少しているのが観察された。オルガ

ノイドを用いた結果も遺伝子改変マウスの結果と同様の結果が得られたことから、味蕾オルガノイドが今後の味蕾細胞の細胞特性を検討するのに有用であることが確認された。

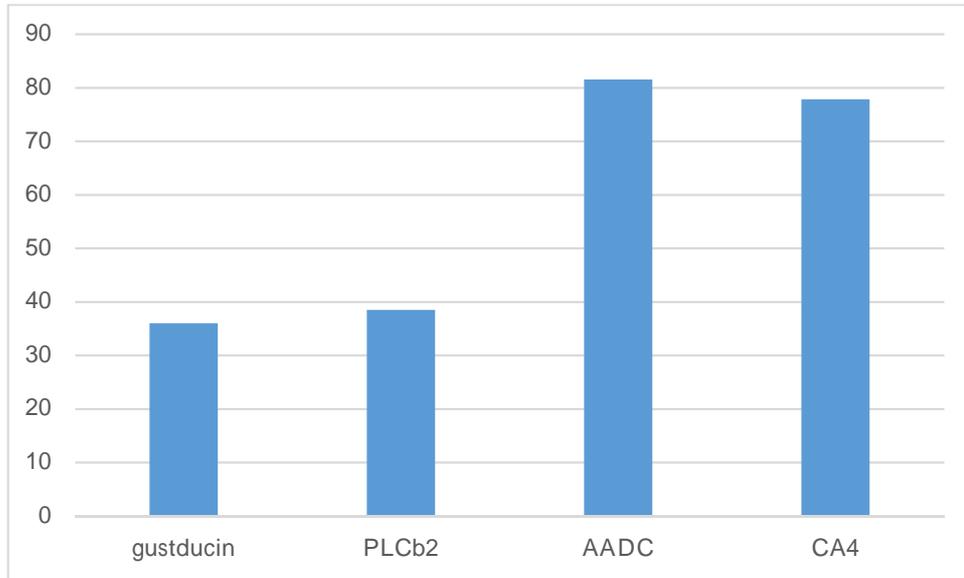


図2：オルガノイドにおける Mash1 発現細胞と味蕾細胞マーカーの発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9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 Hsu CC, Seta Y, Matsuyama K, Kataoka S, Nakatomi S, Toyono T, Gunjigake K, Kuroishi K, Kawamoto T	4. 巻 383
2. 論文標題 Mash1-expressing cells may be relevant to type III cells and a subset of PLCb2-positive cell differentiation in adult mouse taste buds.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res	6. 最初と最後の頁 667-675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-020-03283-w	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 Hirata Y, Toyono T, Kokabu S, Obikane Y, Kataoka S, Nakatomi M, Masaki C, Hosokawa R, Seta Y.	4. 巻 40
2. 論文標題 Kruppel-like factor 5 (Klf5) regulates expression of mouse T1R1 amino acid receptor gene (Tas1r1) in C2C12 myoblast cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 67-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.40.67	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 Hirata Y, Toyono T, Kokabu S, Obikane Y, Kataoka S, Nakatomi M, Masaki C, Hosokawa R, Seta Y.	4. 巻 40
2. 論文標題 Kruppel-like factor 5 (Klf5) regulates expression of mouse T1R1 amino acid receptor gene (Tas1r1) in C2C12 myoblast cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 67-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.40.67	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 -
1. 著者名 Takagi Hiroki, Seta Yuji, Kataoka Shinji, Nakatomi Mitsushiro, Toyono Takashi, Kawamoto Tatsuo	4. 巻 93
2. 論文標題 Mash1-expressing cells could differentiate to type III cells in adult mouse taste buds	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 422 ~ 429
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12565-018-0431-4	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 Kibe Kotono, Nakatomi Mitsushiro, Kataoka Shinji, Toyono Takashi, Seta Yuji	4. 巻 27
2. 論文標題 Hey1 and Hey2 are differently expressed during mouse tooth development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gene Expression Patterns	6. 最初と最後の頁 99 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gep.2017.11.004	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 Obikane Yui, Toyono Takashi, Kokabu Shoichiro, Matsuyama Kae, Kataoka Shinji, Nakatomi Mitsushiro, Hosokawa Ryuji, Seta Yuji	4. 巻 63
2. 論文標題 Myogenic differentiation 1 and transcription factor 12 activate the gene expression of mouse taste receptor type 1 member 1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 420 ~ 428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2021.08.005	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 Nakatomi Chihiro, Hitomi Suzuro, Yamaguchi Kiichiro, Hsu Chia-Chien, Seta Yuji, Harano Nozomu, Iwata Koichi, Ono Kentaro	4. 巻 133
2. 論文標題 Cisplatin induces TRPA1-mediated mechanical allodynia in the oral mucosa	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 105317 ~ 105317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2021.105317	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 Park Jinsil, Nakatomi Mitsushiro, Sasaguri Masaaki, Habu Manabu, Takahashi Osamu, Yoshiga Daigo, Matsuyama Kae, Kataoka Shinji, Toyono Takashi, Seta Yuji, Peters Heiko, Tominaga Kazuhiro	4. 巻 58
2. 論文標題 <i>Heterozygosity in Mice Enhances Susceptibility to Phenytoin-Induced Hypoxic Stress Causing Cleft Palate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Cleft Palate-Craniofacial Journal	6. 最初と最後の頁 697 ~ 706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1055665620962690	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 Mizuhara Masahiro, Kometani-Gunjigake Kaori, Nakao-Kuroishi Kayoko, Toyono Takashi, Hitomi Suzuro, Morii Aoi, Shiga Momotoshi, Seta Yuji, Ono Kentaro, Kawamoto Tatsuo	4. 巻 110
2. 論文標題 Vesicular nucleotide transporter mediates adenosine triphosphate release in compressed human periodontal ligament fibroblast cells and participates in tooth movement-induced nociception in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 104607 ~ 104607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2019.104607	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 -

〔学会発表〕 計12件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Matsuyama K, Kataoka S, Nakatomi M, Toyono T, Seta Y
2. 発表標題 Mash1 cell lineage analysis using taste bud organoid culture
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徐嘉鍵、松山佳永、片岡真司、豊野孝、瀬田祐司、川元龍夫
2. 発表標題 Mash1発現細胞系譜の探索
3. 学会等名 日本味と匂い学会53回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Toyono, Yui Obikane, Kae Matsuyama, Shinji Kataoka, Mitsushiro Nakatomi, Ryuji Hosokawa, Yuji Seta
2. 発表標題 Functional analysis of Myod1 in the transcriptional regulation of mouse Tas1r1 gene.
3. 学会等名 The 18th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Toyono, Yui Obikane, Kae Matsuyama, Shinji Kataoka, Ryuji Hosokawa, Yuji Seta
2. 発表標題 Promoter analysis for human TAS1R1 umami receptor gene in the human fungiform taste cells
3. 学会等名 Asia-Pacific Conference in Fukuoka (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kae Matsuyama, Shinji Kataoka, Takashi Toyono, Yuji Seta
2. 発表標題 The analysis of Mash1- expressing cell lineage in taste bud organoids
3. 学会等名 Asia-Pacific Conference in Fukuoka (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊野 孝, 松山佳永, 片岡真司, 瀬田祐司
2. 発表標題 ヒト茸状乳頭味蕾細胞におけるうま味受容体TAS1R1遺伝子の転写調節機構の解析
3. 学会等名 日本味と匂い学会55回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松山佳永, 片岡真司, 豊野 孝, 瀬田祐司
2. 発表標題 味蕾細胞分化におけるMash1の役割
3. 学会等名 日本味と匂い学会55回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松山 佳永, 片岡 真司, 豊野 孝, 瀬田 祐司
2. 発表標題 味蕾オルガノイドにおけるMash1発現細胞系譜の検索
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 豊野孝, 松山佳永, 片岡真司, 瀬田祐司
2. 発表標題 味蕾細胞におけるうま味受容体TAS1R1遺伝子の転写制御機構の解析
3. 学会等名 日本解剖学会 第77回九州支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松山佳永, 片岡真司, 豊野 孝, 瀬田祐司
2. 発表標題 organoid培養系を用いた味蕾におけるMash1発現細胞系譜の探索
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Matsuyama K, Kataoka S, Nakatomi M, Toyono T, Seta Y
2. 発表標題 Mash1 cell lineage analysis using taste bud organoid culture.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Toyono, Yui Obikane, Kae Matsuyama, Shinji Kataoka, Mitsushiro Nakatomi, Ryuji Hosokawa, Yuji Seta
2. 発表標題 Functional analysis of Myod1 in the transcriptional regulation of mouse Tas1r1 gene.
3. 学会等名 The 18th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception. (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州歯科大学 解剖学分野 http://www2.kyu-dent.ac.jp/depart/2kaibou/Site/HOME.html

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
研究分担者	豊野 孝 (Toyono Takashi) (10311929)	九州歯科大学・歯学部・准教授 (27102)	
研究分担者	中富 満城 (Nakatomi Mitsushiro) (10571771)	産業医科大学・産業保健学部・准教授 (37116)	
研究分担者	小野 堅太郎 (Ono Kentaro) (40316154)	九州歯科大学・歯学部・教授 (27102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	片岡 真司 (Kataoka Shinji) (80364149)	九州歯科大学・歯学部・助教 (27102)	

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