

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：34517

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16464

研究課題名（和文）ヒト苦味受容細胞を用いた新規バイオセンサの開発と医薬品の苦味評価

研究課題名（英文）Development of a novel biosensor using cells with hTAS2R and evaluation of bitterness of drugs

研究代表者

小島 穂菜美 (Kojima, Honami)

武庫川女子大学・薬学部・助教

研究者番号：20779243

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）：本研究ではヒトの味受容反応により近づけることを目的にヒト苦味受容細胞を用いたバイオセンサの開発に取り組んだ。

HEK293細胞にhTAS2RとしてTAS2R10およびTAS2R14の遺伝子配列を持つプラスミドベクターをトランスフェクションし、安定的な培養細胞を樹立した。また、センサチップの基盤として既存の高分子支持体であるポリ塩化ビニルを用い、支持体の電導性を高めるために酸化鉄を含有させた支持体を製作した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

苦味物質によっては従来の味覚センサと反応しにくい物質も存在するため、ヒト官能試験の実施が不可欠であり、その試験結果と味覚センサの測定結果との相関性を考慮することが必要である。しかし、倫理的な観点から、ヒト官能試験を行うことのできない医薬品や新規開発医薬品などが存在するため、新規バイオセンサはヒト官能試験の代替法としても利用可能である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have worked on the development of a biosensor using cells with hTAS2R in order to bring it closer to the human taste receptor response.

Plasmid vectors with TAS2R10 and TAS2R14 gene sequences as hTAS2R were transfected into HEK293 cells, and stable cultured cells were established. Polyvinyl chloride, an existing polymer support, was used as the base of the sensor chip of taste sensor, and a support containing iron oxide was fabricated to enhance the conductivity of the support.

研究分野：臨床薬学

キーワード：バイオセンサ 苦味受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医薬品は苦味を呈するものが多く、ときとして患者の服薬アドヒアランスに影響する。そのため、薬物自体や製剤としての苦味を含めた味を正しく評価し、服用し易い医薬品をつくることは重要である¹⁾。Food and Drug Administration (FDA):アメリカ食品医薬品局は臨床試験の際に、プラセボとの味の盲検性について味覚センサーの利用推進を提唱しており、現在、味覚センサーは全世界の医薬品メーカーや大学等で多く活用され²⁾、当講座においても味覚センサーを用いた種々の医薬品の定量的苦味測定技術が確立されている^{3,4)}。しかし、苦味物質によっては味覚センサーと反応しにくい物質も存在する。現在の味覚センサーは生体膜を模倣した人工脂質膜を味物質の受容部に用いて²⁾ *in vitro* で評価する系であるが、生体内では、呈味物質が味蕾の味細胞にある味覚受容体に結合することで知覚するため、全ての味受容反応を厳密に評価しているとは言い難いのが現状である。そのため、ヒト官能試験の実施が不可欠であり、その試験結果および味覚センサーの測定結果との相関性を考慮することが必要となってくる。しかし、倫理的な観点からヒト官能試験を行うことのできない医薬品や新規開発医薬品などが存在する⁵⁾。ヒト官能試験の代替法としても利用可能で、従来の方法に比べてよりヒトの味受容反応に近い評価法を確立させることが課題となっている。さらに、その評価法を確立させ、さまざまな医薬品の苦味を評価することによって、新規苦味受容体阻害剤の開発等の苦味抑制技術の発展に貢献し、患者の服薬アドヒアランス、QOLの向上が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトの味受容反応により近い新規味覚センサー膜としてバイオセンサを作製し、医薬品の苦味を評価することを目的とする。

苦味受容体および膜電位依存性プロトンチャネルを共発現させた細胞、そして膜電位を電極部に伝える役割を担う導電性高分子の poly (3,4-ethylenedioxythiophene)-poly (styrenesulfonate) : (PEDOT-PSS) を用いたゲル膜を使用してバイオセンサを作製する。本バイオセンサの特徴は2点あり、1点目は苦味受容反応に関わる細胞を作製し、それを用いてバイオセンサとして使用することである。バイオセンサとして機能させるためには電位の変化が必要であり、そのために苦味物質が結合する苦味受容体だけではなく、その後の神経伝達に関わる膜電位依存性プロトンチャネル (Voltage-sensordomain only protein1; VSOP1)も必要であるため共発現させた細胞を作製する。苦味受容反応によって生じた活動電位を利用して、苦味を評価する。2点目は、膜電位を電極部に伝えるための基材として、PEDOT-PSSを使用することである。PEDOT-PSSは、良好な導電性を示し、湿潤環境において安定で生体毒性がない⁶⁾。さらに、細胞の形状を維持させるために PEDOT-PSS はゲル化させる。PEDOT-PSS を用いた導電性シルクゲル膜は、皮膚や生体内組織に貼り付ける生体信号計測として開発が進んでおり、生体親和性の高さから細胞がこの膜の表面に自発的に接着化する傾向や、長期培養時に導電性の変化が少なく安定であるとの報告がある⁷⁾。これらの利点を有する PEDOT-PSS を用いた導電性シルクゲル膜を使用して、膜電位の測定に活用する。

以上2点を併せることにより、従来の方法に比べて、よりヒトの苦味受容反応に近い新規味覚センサーであるバイオセンサを作製し、医薬品の苦味を評価することによって、苦味抑制技術の発展に貢献し、患者の服薬アドヒアランス、QOLの向上が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 苦味受容体および膜電位依存性プロトンチャネル共発現細胞の作製

まず、FRT サイトが組み込まれている Flp-In-293 細胞に $G\alpha$ および VSOP の遺伝子配列をもつ pcDNA5/FRT 発現ベクターおよび pOG44 (FRT リコンビナーゼ) を Polyethylenimine (PEI) によりトランスフェクションし、Flp-In-293 細胞のゲノム DNA の特定部位に $G\alpha$ および VSOP の遺伝子を挿入した。Flp-In-293 細胞は zeocin 耐性遺伝子をもつが、FRT サイトに正しく組換えが起こると zeocin 耐性遺伝子が破壊され、その代わりに pcDNA5/FRT 由来の hygromycin 耐性が有効となる。そのため、トランスフェクション後の Flp-In-293 細胞を hygromycin 耐性 / zeocin 感受性スクリーニングすることにより安定発現細胞を得た。次いで、ヒト苦味受容体についても同様の手順を踏んだ。ヒト苦味受容体は 25 種類のサブタイプが存在するが、その中でも従来の味覚センサーの出力と相関性が確認された hTAS2R10 および hTAS2R14 を本研究では選択した。ヒト苦味受容体は、N 末端の細胞外領域が極端に短く、受容体単独では細胞膜への局在化が困難であるため、N 末端にシグナルペプチドとしてマウスロドプシンの N 末端 38 アミノ酸残基を hTAS2R10 または hTAS2R14 に連結させた。それぞれの遺伝子配列を pcDNA3.1 (G418r) にサブクローニングし、PEI を用いて $G\alpha$ /VSOP/ Flp-In-293 細胞にトランスフェクションし、トランス

フェクション後の細胞は G418 耐性スクリーニングを行った。

(2) 苦味受容体および膜電位依存性プロトンチャネルの発現確認

(1) でスクリーニングした細胞においてヒト苦味受容体がタンパク質として発現しているかを確認するために ABC 法による免疫染色を行った。

ヒト苦味受容体にはその上流にマウスロドプシンを融合させているため、このマウスロドプシンに対する抗体を一抗体次、ビオチン標識ユニバーサル抗体を二次抗体として行った。

(3) ポリ塩化ビニル膜を用いたバイオセンサの作製

申請時は PEDOT-PSS をセンサチップの基盤とする予定であったが、計画を変更し、従来の味覚センサーの高分子支持体として用いられているフィルム状のポリ塩化ビニル (PVC) をセンサチップの基盤とすることとした。PVC フィルムは、従来のものと導電性を高めるために酸化鉄 (Fe_3O_4) を添加した PVC/ Fe_3O_4 フィルムの 2 種類を作製した。PVC フィルムは、PVC をクロロホルムで溶解し、溶解後の溶液をシャーレに流し込み、3 日間乾燥させることで作製した。PVC/ Fe_3O_4 フィルムについては、PVC クロロホルム溶液に Fe_3O_4 を分散させ、PVC フィルムと同様に溶液をシャーレに流し込み、3 日間乾燥させることで作製した。乾燥後のフィルムは $1\text{ cm} \times 1.5\text{ cm}$ サイズにカットし、 37°C で 1 時間、Poly-L-Lysine 溶液中に浸し、コーティングした。その後、コーティングされたフィルム上で細胞を培養し、コンフルエント状態のフィルムを医療用アロンアルファでセンサプロブの表面に接着し、バイオセンサとした。

(4) バイオセンサを用いた膜電位の測定と医薬品の苦味評価

膜電位の測定では、まずバイオセンサを培養用培地に浸しておき、次に苦味物質が含まれるサンプルに浸し、苦味物質が膜に接触する前と接触した後の膜電位の変化を使用する。定量的な苦味受容反応を評価するために、3 段階の濃度 (0.01 mM、0.1 mM、1 mM) に設定した苦味標準物質 (キニーネ塩酸塩) のサンプルを用いて測定を行っているところである。

4. 研究成果

苦味受容体および膜電位依存性プロトンチャネル共発現細胞における VSOP の発現は、zeocin 感受性テストにより確認した。また、ヒト苦味受容体の発現については ABC 法による免疫染色により確認し、その結果を図 1 に示す。

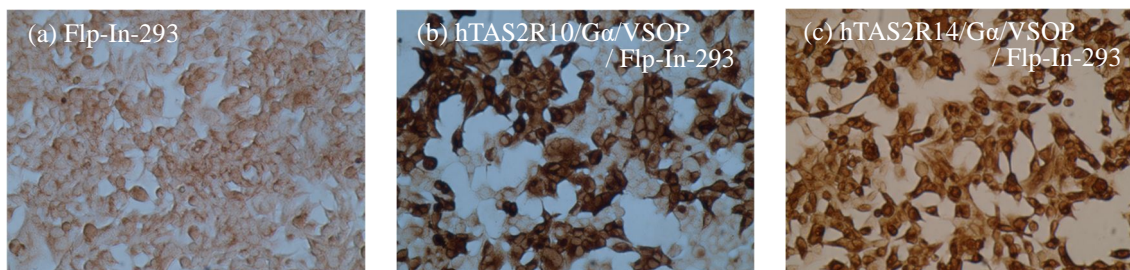


図 1. 免疫染色によるタンパク質発現の確認

図 1 より、トランスフェクションを行っていない (a) と比較してヒト苦味受容体をトランスフェクションした (b)、(c) において濃い発色が観察されたため、(b)、(c) の細胞ではヒト苦味受容体を発現していることが確認された。

現在、カルシウムイメージングおよび膜電位の測定を進めている段階であるため、引き続き本研究を遂行する。

【引用文献】

- 1) 内田享弘, *YAKUGAKU ZASSHI*, 2014, **134**, 317-323
- 2) 都甲潔, *日本味と匂学会誌*, 2016, **23**, 95-102
- 3) Uchida T *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2003, **55**, 1479-1485
- 4) Tokuyama E *et al.*, *Chem Pharm Bull.*, 2009, **57**, 382-387
- 5) 原田努 他, *YAKUGAKU ZASSHI*, 2014, **134**, 325-331
- 6) 手島哲彦, *NTT 技術ジャーナル*, 2016, 36-39
- 7) Teshima T *et al.*, *Adv. Funct. Mater.*, 2016, **26**, 8185

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Honami Kojima, Saeri Ikegami, Shiho Nakamura, Haruka Nishikawa, Tamami Haraguchi, Miyako Yoshida, Minoru Ozeki, Ikuo Kawasaki, Takahiro Uchida | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Preparation and Evaluation of Poly- γ -Glutamic Acid Hydrogel Mixtures with Basic Drugs or Acidic Drugs: Effect on Ease of Swallowing and Taste Masking | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Pharm. & Pharmacol. | 6. 最初と最後の頁 427-444 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4236/pp.2019.1010035 | 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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 西川知花、小島穂菜美、中村思穂、池上咲枝里、吉田都、内田享弘 |
| 2. 発表標題 薬物混合 -ポリグルタミン酸ハイドロゲルの苦味抑制効果および分子間相互作用解析 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第140年会 |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------|---------|
|---------|---------|