

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16697

研究課題名（和文）苦味物質が及ぼすケモカイン受容体を介した免疫細胞遊走への影響

研究課題名（英文）The effect of bitter taste substances on immune cell migration

研究代表者

小林 大地（Kobayashi, Daichi）

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：50805752

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）：苦味受容体（Tas2R）は口腔内の味蕾細胞などに発現し、口腔内に侵入してきた苦味物質を認識することが知られている。近年の解析から Tas2R が口腔外にも発現することが見出され、その機能的意義が注目されている。申請者はマウス好中球に Tas2R126, Tas2R135, Tas2R143 が発現することを見つけ出し、その機能的意義を検討した。申請者らは Tas2R126/143 シグナリングがケモカイン依存的な好中球遊走を亢進させることを明らかにした。さらに、好中球遊走亢進に ROCK-MLC2 経路が関わることを見つけ出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「良薬は口に苦し」は孔子が遺した言葉であり、古くから人々は苦い薬には良い治療効果があることと信じてきた。一方、医療現場では患者が薬の苦味を不快に感じ、苦味が原因で患者は服薬を中断することがあり、医療問題の一つとされている。このため、苦味成分が治療に有効であることを見つけ出すことは、苦味による服薬中断の予防につながる。

本研究により、特定の苦味受容体のシグナリングが生体防御に関わる好中球遊走を促進させることを見出し、新たな免疫賦活経路を発見した。本研究を進展させることで、苦味成分を用いた感染症予防法確立につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：It is well accepted that bitter taste receptors, Tas2Rs, are expressed in taste bud cells to detect bitter taste substances in the oral cavity. Growing evidence indicates that Tas2Rs are also expressed extraorally, including in airway smooth muscle cells, intestinal tuft cells, and immune cells. However, the roles of Tas2Rs in the extra-oral cells remain uncertain. We found that Tas2R126, Tas2R135, and Tas2R143 are expressed in mouse neutrophils. We also found that Tas2R126/143 signaling enhances chemokine-induced neutrophil migration through ROCK-MLC2 dependent pathway.

研究分野：免疫学、食品科学

キーワード：苦味受容体 好中球 細胞遊走 生体防御

## 1. 研究開始当初の背景

「良薬は口に苦し」は孔子が遺した言葉であり、古くから人々は苦い薬には良い治療効果があると信じてきた。一方、医療現場において患者は薬の苦味を不快に感じ、苦味が原因で服薬を中断することがあり、近年の大きな問題とされている。このため、苦味成分が治療に有効であることを科学的に証明し、社会的な理解を得ることは苦味による服薬の中断を予防することにつながる。本研究では苦味物質が免疫細胞遊走にどのような影響を及ぼすかを複数の苦味物質や遺伝子改変マウスを用いて解析する。

## 2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、苦味物質が免疫細胞遊走にどのような影響を及ぼすか? である。第二の目的は、苦味物質が及ぼす免疫細胞遊走への影響について、その分子機構を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### A. 苦味物質が及ぼす免疫細胞遊走への影響

- (1) 免疫細胞に発現する苦味受容体 (Tas2R) を ImmGen データベース並びに、RT-PCR 法を用いて解析を行い、免疫細胞に発現する苦味受容体を明らかにする。
- (2) 上記-1 に基づいて、既知の Tas2R アゴニストが免疫細胞遊走・浸潤にどのような影響を及ぼすかを transwell assay・ザイモサン誘導性の腹膜炎モデルマウスにより検討する。

### B. 苦味物質が及ぼす免疫細胞遊走の分子機構

- (1) 免疫細胞遊走制御に関わる分子に対する阻害剤を用いて、苦味物質による免疫細胞遊走への影響が消失するかを解析する。
- (2) 免疫細胞遊走制御に関わる分子の活性化をフローサイトメトリー (FCM) 法により解析し、苦味物質による免疫細胞遊走制御機構の分子機構を明らかにする。

## 4. 研究成果

### A. 苦味物質が及ぼす免疫細胞遊走への影響

まず、免疫細胞における Tas2R 発現を ImmGen を用いて、網羅的に検索を行った。36 種類の Tas2R について解析が可能であったが、この内 Tas2R126, Tas2R135, Tas2R143 がマウス好中球に発現する情報が得られた。次に、好中球、T 細胞、B 細胞、およびマクロファージをセルソーターにより単離し、RT-PCR 法により Tas2R126/135/143 の発現を解析したところ、好中球に Tas2R126, Tas2R135, Tas2R143 が発現することが裏付けられた。

次に、既知の Tas2R126/135/143 アゴニストを用いて、これらアゴニストがケモカイン CXCL2 依存的な好中球遊走にどのような影響を及ぼすかを検討した。その結果、Tas2R135 アゴニストは好中球遊走に大きな影響を及ぼさなかったが、Tas2R126 アゴニスト並びに、Tas2R126/143 アゴニストは好中球遊走を亢進させた。さらに、Tas2R126/143 アゴニストはザイモサン誘導性の腹腔への好中球浸潤を亢進させた。

次に、Tas2R126/143 以外の off-target について検討した。G-CSF 依存的に好中球様細胞へと分化する 32Dcl3 細胞を用いて細胞遊走アッセイを行ったところ、Tas2R126/143 アゴニストは好中球様細胞遊走を亢進させなかった。そこで、32Dcl3 および好中球様細胞における Tas2R126/135/143 発現を RT-PCR 法により評価した。その結果、これら細胞では Tas2R126/135/143 が発現していないことが示唆された。

そこで、32Dcl3 細胞に Tas2R126/143 を強制発現させ、細胞遊走アッセイを行うことを試みた。これまでに、Tas2R の強制発現系は通常受容体発現系と比較して困難であり、Tas2R の N 末端にラットソマトスタチン受容体 3 の 44 アミノ酸 (SSTR3) を修飾させる必要がある。そこで、SSTR3-Flag (or V5) Tas2R を発現するプラスミドを構築し、HEK293T 細胞に一過性に強制発現させた。その結果、一過性に Tas2R126, Tas2R135, Tas2R143 が発現することが確認された。次に、これら Tas2R を安定発現する株について、レトロウイルスを用いて検討したが、安定発現株を得ることができなかった。

次に、Tas2R126/135/143 を欠損するマウスの樹立を試みた。Tas2R126/135/143 は第 6 染色体上でクラスターを形成し、このクラスター周辺・内部には他の CDS が確認されない。そこで、CRISPR-Cas9 法を用いて、これら 3 つの欠損マウス (TKO) 樹立を試みた。その結果、ヘテロ・ホモ欠損マウスの産仔が確認できた。次に、ホモ欠損マウス由来の好中球を用いて、Tas2R126/143 アゴニストによる好中球遊走亢進が消失するかを検討した。ホモ欠損マウス由来の好中球では Tas2R126/143 アゴニストによる好中球遊走亢進が消失した。一方、ヘテロ欠損マウス由来の好中球では Tas2R126/143 アゴニストによる好中球遊走亢進が消失しなかった。これらのことから、Tas2R126/143 シグナリングが好中球遊走促進に関わるということが *in vitro* で裏付けられた。一方予想に反して、ザイモサン誘導性の腹腔への好中球動員は、Tas2R126/143 アゴニストがホモ欠損

マウスにおいても好中球動員を行進させた。このため、in vivo での現象については Tas2R126/143 アゴニストの off-target が関わることを示唆された。

#### B. 苦味物質が及ぼす免疫細胞遊走の分子機構

これまでに、Tas2R シグナリングに ROCK やミオシン軽鎖 (MLC) の活性化が関わることで知られており、免疫細胞の遊走において ROCK-MLC2 経路が重要な役割をはたすことが報告されている。そこで、Tas2R126/143 アゴニストによる好中球遊走の亢進に ROCK が関わるかを ROCK 阻害剤を用いて検討した。その結果、ROCK 阻害剤は Tas2R126/143 アゴニストによる好中球遊走亢進を完全に抑制した。これらのことから、ROCK の関与が示された。

次に、MLC2 の活性化を抗リン酸化 MLC2 抗体を用いて、FCM 法により解析を行った。ケモカイン CXCL2 単独刺激と比較して、Tas2R126/143 アゴニストを前処理し、CXCL2 で刺激した好中球では MLC2 の活性化程度が亢進していた。また、MLC2 活性化の亢進は ROCK 阻害剤により完全に消失した。同様に、Tas2R126/135/143 ホモ欠損マウス由来の好中球では Tas2R126/143 アゴニストによる CXCL2 依存的な MLC2 の活性化亢進が消失していた。一方、Tas2R126/143 アゴニスト単独では MLC2 の活性化は確認されなかった。これらのことから、Tas2R126/143 シグナリングによる好中球遊走に ROCK-MLC2 経路の関与が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kobayashi Daichi, Watarai Tomoya, Ozawa Madoka, Kanda Yasuhiro, Saika Fumihiro, Kiguchi Norikazu, Takeuchi Arata, Ikawa Masahito, Matsuzaki Shinsuke, Katakai Tomoya	4. 巻 13
2. 論文標題 Tas2R signaling enhances mouse neutrophil migration via a ROCK-dependent pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.973880	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 Kobayashi Daichi, Umemoto Eiji, Miyasaka Masayuki	4. 巻 68
2. 論文標題 The role of extracellular ATP in homeostatic immune cell migration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Opinion in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 102331 ~ 102331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.coph.2022.102331	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 Kobayashi Daichi, Sugiura Yuki, Umemoto Eiji, Takeda Akira, Ueta Hisashi, Hayasaka Haruko, Matsuzaki Shinsuke, Katakai Tomoya, Suematsu Makoto, Hamachi Itaru, Yegutkin Gennady G., Salmi Marko, Jalkanen Sirpa, Miyasaka Masayuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Extracellular ATP Limits Homeostatic T Cell Migration Within Lymph Nodes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 786595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.786595	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 該当する
1. 著者名 Hayasaka Haruko, Yoshida Junichi, Kuroda Yasutaka, Nishiguchi Akihiro, Matsusaki Michiya, Kishimoto Kei, Nishimura Hitoshi, Okada Mari, Shimomura Yuki, Kobayashi Daichi, Shimazu Yoshihito, Taya Yuji, Akashi Mitsuru, Miyasaka Masayuki	4. 巻 113
2. 論文標題 CXCL12 promotes CCR7 ligand-mediated breast cancer cell invasion and migration toward lymphatic vessels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1338 ~ 1351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15293	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 Kurowarabe Kaoru, Endo Masataka, Kobayashi Daichi, Hayasaka Haruko	4. 巻 28
2. 論文標題 CXCL12-stimulated lymphocytes produce secondary stimulants that affect the surrounding cell chemotaxis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101128 ~ 101128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101128	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 Saika Fumihiro, Matsuzaki Shinsuke, Kobayashi Daichi, Ideguchi Yuya, Nakamura Tomoe Y., Kishioka Shiroh, Kiguchi Norikazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Chemogenetic Regulation of CX3CR1-Expressing Microglia Using Gi-DREADD Exerts Sex-Dependent Anti-Allodynic Effects in Mouse Models of Neuropathic Pain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 925-925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2020.00925	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 Daichi Kobayashi, Norikazu Kiguchi, Fumihiro Saika, Shiroh Kishioka, Shinsuke Matsuzaki	4. 巻 525
2. 論文標題 Insufficient efferocytosis by M2-like macrophages as a possible mechanism of neuropathic pain induced by nerve injury.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and biophysical research communications	6. 最初と最後の頁 216-223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.032	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4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小林大地
2. 発表標題 苦味物質による免疫応答制御機構
3. 学会等名 日本食品免疫学会 第18回学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林 大地, 渡井 友也, 小澤 まどか, 神田 泰洋, 雑賀 史浩, 木口 倫一, 松崎 伸介, 片貝 智哉
2. 発表標題 苦味物質は ROCK シグナリングを増強させ好中球遊走を促進する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会. ワークショップ. 統合的な栄養学研究で紡ぐ次世代栄養学
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 大地, 任田 篤正, 小澤 まどか, 神田 泰洋, 竹内 新, 雑賀 史浩, 木口 倫一, 松崎 伸介, 片貝 智哉
2. 発表標題 苦味受容体を介した好中球遊走促進機構
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daichi Kobayashi, Norikazu Kiguchi, Fumihiro Saika, Shiroh Kishioka, Shinsuke Matsuzaki
2. 発表標題 Efferocytosis mediated anti-inflammatory responses are restricted at the site of peripheral nerve injury
3. 学会等名 第17回 国際免疫学会2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Reserachmap  <a href="https://researchmap.jp/kobayashi1988/published_papers">https://researchmap.jp/kobayashi1988/published_papers</a>          2021年度 日本薬理学会 年会優秀発表賞</p>
--

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
---------	---------