

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18461

研究課題名（和文）味蕾オルガノイド培養系を用いた味蕾細胞の分化制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanisms regulating differentiation of taste bud cells using taste organoid culture system

研究代表者

松山 佳永（Matsuyama, Kae）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：10848360

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：新生仔マウスの初期発生味蕾と味蕾オルガノイドを用いて、Ascl1発現細胞系譜を検索した。Ascl1発現細胞は初期発生味蕾と味蕾オルガノイドにおいてII型およびIII型細胞マーカーを発現したが、II型細胞の共発現率はIII型細胞よりも低かった。Ascl1発現細胞を欠損させた味蕾オルガノイドでは、II型細胞とIII型細胞の生成が抑制されることが明らかになった。これらの結果は、Ascl1発現前駆細胞がIII型と一部のII型味細胞に分化する可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

味蕾の発生、恒常性の維持には複数のシグナル伝達経路が関わるということが報告されているものの、詳細なメカニズムは不明なままである。本研究により、転写因子Ascl1がIII型細胞だけでなく一部のII型細胞の分化過程で発現することが明らかになった。食生活は栄養学的側面だけでなく、精神的健康にも大きく影響する。QOLが重要視される現代において、味蕾の発生過程における生物学的プロセスを解き明かすことは、味覚障害の病態解明、さらには治療法の開発に貢献すると考える。

研究成果の概要（英文）：We examined an Ascl1-expressing cell lineage using circumvallate papillae (CVP) of newborn mice and taste organoids, which allow studying the differentiation of taste bud cells in fine detail ex vivo. Using lineage-tracing analysis, we observed that Ascl1 lineage cells expressed type II and III taste cell markers both CVP of newborn mice and taste organoids. However, the coexpression rate in type II cells was lower than that in type III cells. Furthermore, we found that the generation of the cells which express type II and III cell markers was suppressed in taste organoids lacking Ascl1-expressing cells. These findings suggest that Ascl1-expressing precursor cells can differentiate into both type III and a subset of type II taste cells.

研究分野：口腔組織学

キーワード：味蕾 オルガノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体にとって味覚は生命の維持に必須な栄養素(甘味、うま味)を取り込むためのシステムであり、塩濃度の識別に働き、また腐敗物(酸味)や毒物(苦味)などを選別して摂取しないための防衛機能を有した感覚である。味覚の受容器である味蕾は周囲の上皮から分化した味蕾細胞により構成される。味蕾細胞は微細構造的に主に4種類(- 型)に分類され、形態的ならびに機能的側面から各細胞型に特有の性質をもつ。加えて、味蕾内において、細胞は生涯にわたり常にターンオーバーを繰り返しているにもかかわらず、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、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。味蕾の発生、恒常性の維持にはWntシグナルやShhシグナル、インスリンシグナル、BMPなど、複数のシグナル伝達経路が関わるということが報告されているものの、詳細なメカニズムは不明なままである。

神経細胞の分化に関わる転写因子Achaete-scute complex-like 1 (Ascl1)が型細胞の分化、機能発現に関与していることが明らかになっている (Seta et al., J Comp Neurol, 2003, Kito-Shingaki et al., Chem Senses, 2014)。しかし、成体マウスにおいてAscl1発現細胞を欠失しても、分化を遂げる型細胞が存在し (Takagi et al., Anat Sci Int, 2018)、その分化動態は未解明な点が多い。

味覚に関する研究は、味覚受容体の同定をはじめ、味覚受容機構の解明を中心に行われてきたが、味蕾の維持や構成する細胞群の分化に関しては、依然として不明な点が多い。その要因として、味蕾は神経の支配を失うと、形態を維持できずに消失することから、味蕾細胞の培養が困難であることが大きく影響していた。近年、急速に発展しているオルガノイド研究では、幹細胞から複雑な組織構造の構築が可能になった。オルガノイドは、生体内の組織に極めて類似した構造体で、なおかつ機能性を有し、生体の環境を再現することができる。このことから、組織発生や再生医療、がん治療法の開発など、さまざまな分野で研究手段として注視されている。味蕾においても、オルガノイドの作製法が確立されており、培養条件下で機能性を有する味蕾細胞の観察が可能になっている (Ren et al., Proc Natl Acad Sci, 2014)。味蕾オルガノイドを作製することにより、舌上皮から各細胞型味蕾細胞へと分化を厳密に制御する、分子メカニズムを解明できると推測している。

2. 研究の目的

そこで、本研究では遺伝子改変マウスと味蕾オルガノイドを用いて、味蕾細胞の分化におけるAscl1の役割の詳細を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Ascl1^{CreERT2}/CAG-floxed-tdTomato* マウスを用いて実験を行った。このマウスにタモキシフェン(Sigma-Aldrich)を投与すると、Ascl1発現細胞の細胞質でタモキシフェンとERT2が結合し、ERT2-Creの癒合タンパクが核内へと移行してtdTomatoの発現が起きる。胎生期にCre活性の誘導を行うために妊娠母獣へタモキシフェンを投与した(100mg/kg)。初期発生味蕾の形成期である胎齢18日目に、フィーディングニードルを用いてタモキシフェンを経口投与し、生後7日目の新生仔から舌を採取して有郭乳頭の免疫染色を行った。

(2) *Ascl1^{CreERT2}/CAG-floxed-tdTomato* マウスの有郭乳頭から、味蕾オルガノイドを作製した。培地に 4-ヒドロキシタモキシフェン(Sigma-Aldrich)を添加することにより、*Ascl1* 発現細胞に *tdTomato* を発現させた(1 μ l/ml)。培養 20 日目の成熟味蕾オルガノイドを用いて免疫染色を行った。切片の作製には iPGell (GenoStaff)を用いた。

(3) *Ascl1^{CreERT2}/CAG-floxed- neo-diphtheria toxin A(DTA)*マウスを用いて実験を行った。このマウスにタモキシフェンを投与すると、ジフテリア毒素の効果により *Ascl1* 発現細胞に細胞死が誘導される。(1)と同様に妊娠母獣へタモキシフェンを経口投与し、生後 7 日目の新生仔から舌を採取した。有郭乳頭上皮から全 RAN を抽出後、cDNA を合成した。PrimeTime Gene Expression Master Mix (Integrated DNA Technologies)および Eco Real-Time PCR System (Illumina Inc.)を用いてリアルタイム RT-PCR 法による解析を行った。

(4) *Ascl1^{CreERT2}/CAG-floxed-DTA* マウスおよび *Ascl1^{CreERT2}* マウスの有郭乳頭から、味蕾オルガノイドを作製した。(2)と同様に培地に 4-ヒドロキシタモキシフェンを添加することにより Cre 活性の誘導を行った。培養 20 日目の成熟味蕾オルガノイドを用いて whole-mount の免疫染色を行った。味蕾細胞を含むオルガノイドコロニーの計数を行い、コントロール (*Ascl1^{CreERT2}*) と比較検証した。

4 . 研究成果

(1) タモキシフェンを投与した *Ascl1^{CreERT2}/CAG-floxed-tdTomato* マウスの新生仔では有郭乳頭上皮に *tdTomato* を発現する細胞を認めた。1 つの有郭乳頭あたり、5 程度の *tdTomato* 発現細胞を認め、それらは乳頭溝の上部に位置していた。免疫染色を行い、*tdTomato* 発現細胞、各味細胞マーカー陽性細胞を計数後、共発現率を算出した。*tdTomato* 発現細胞の多くは III 型細胞マーカー (Car4, 77.8%; AADC, 82.5%)を発現した。II 型細胞マーカー における共発現率は III 型細胞マーカー よりも小さい値を示した (*gustducin*, 36.0%; PLC 2, 38.5%)。

(2) 培養条件下にて *Ascl1* 発現細胞を追跡するために、*Ascl1^{CreERT2}/CAG-floxed-tdTomato* マウスから味蕾オルガノイドを作製した。成熟味蕾オルガノイド内では *tdTomato* 発現細胞を多数認めた。免疫染色より、*tdTomato* 発現細胞の多くは III 型細胞マーカー (Car4, AADC)を発現し、一部は II 型細胞マーカー (*gustducin*, PLC 2)を発現していた。I 型細胞マーカー (NTPDase2)を発現する *tdTomato* 発現細胞は認められなかった。

(3) *Ascl1* をロックアウトマウスは生後 24 時間以内に死亡するため、*Ascl1^{CreERT2}/CAG-floxed-DTA* マウスを使用した。タモキシフェンを投与した *Ascl1^{CreERT2}/CAG-floxed-DTA* マウスの新生仔では同腹仔コントロールと比較して、有郭乳頭上皮における *Ascl1* の発現量が有意に減少し、*Ddc*(AADC)および *Plcb2* の発現量も減少したが有意差を認めなかった。また、*Entpd2*(NTPDase2)の発現量に変化を認めなかった。

(4) *Ascl1^{CreERT2}/CAG-floxed-tdTomato* マウスを用いて、*Ascl1* 発現細胞を欠く味蕾オルガノイドを作製した。コントロールとして *Ascl1^{CreERT2}* マウスを使用し、両群とも培地に 4-ヒドロキシタモキシフェンを添加した。免疫染色を行うと、Car4 陽性細胞を含むオルガノイドコロニーの数は、コントロールと比較して減少した。*gustducin* 陽性細胞を含むオルガノイドコロニーの数

も同様に、コントロールと比較して減少した。

以上より、初期発生味蕾および味蕾オルガノイドにおいて、Ascl1 発現前駆細胞は III 型細胞だけでなく、一部の II 型細胞にも分化することが示唆された。今後は、味蕾における Ascl1 の機能を調節する因子について解析を進めていく予定である。

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 0件）

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 -
2. 論文標題 Msx1 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 -
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 Hsu Chia-Chien, Seta Yuji, Matsuyama Kae, Kataoka Shinji, Nakatomi Mitsushiro, Toyono Takashi, Gunjigake Kaori K., Kuroishi Kayoko N., Kawamoto Tatsuo	4. 巻 383
2. 論文標題 Mash1-expressing cells may be relevant to type III cells and a subset of PLC 2-positive cell differentiation in adult mouse taste buds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	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 Matsuyama Kae, Takai Shingo, Shigemura Noriatsu, Nakatomi Mitsushiro, Kawamoto Tatsuo, Kataoka Shinji, Toyono Takashi, Seta Yuji	4. 巻 392
2. 論文標題 Ascl1-expressing cell differentiation in initially developed taste buds and taste organoids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 631 ~ 641
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-023-03756-8	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Matsuyama, K., Kataoka, S., Toyono, T. and Seta, Y.
2. 発表標題 Differentiation of Ascl1-expressing precursor cells in taste buds
3. 学会等名 Asia-Pacific Conference in Fukuoka（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kae Matsuyama, Shinji Kataoka, Takashi Toyono, Yuji Seta
2. 発表標題 Differentiation of Mash1-expressing precursor cells in taste buds
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022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
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松山 佳永, 川元 龍夫, 瀬田 祐司
2. 発表標題 3D培養システムを用いた味細胞分化におけるMash1の機能解析
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会 & 第5回国際会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松山 佳永, 片岡 真司, 中富 満城, 豊野 孝, 瀬田 祐司
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/第98回日本生理学会大会 合同大会
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
---------	---------