

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 14 日現在

機関番号：32658

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26892026

研究課題名(和文) 味細胞の発生と再生を支える分子基盤の確立

研究課題名(英文) Establishment of a molecular platform of taste cell development and regeneration

研究代表者

岩槻 健 (Iwatsuki, Ken)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：50332375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：味細胞の幹細胞については最近明らかになったが、その幹細胞がどのように成熟した味細胞に分化するかは未だ謎である。本研究では、味幹細胞がどのように成熟味細胞になるかの分子メカニズムを明らかにする事を目的とした。まず、DNAマイクロアレイにより味蕾が含まれる舌上皮で発現が高い分子を調べ、その中で味細胞のマーカー以外の分子としてCD133を同定し、味蕾のオルガノイド培養系を用いてCD133がの発現パターンを調べた結果、CD133は味前駆細胞のマーカーであると同時に、味細胞分化に重要であると示唆された。本研究の成果は、皮膚や毛髪と同様、味細胞も移植の対象となりQOLの向上に役立つ事になると考えている。

研究成果の概要(英文)：It is clear that taste cells regenerate, while there had been a paucity of molecular and biochemical information of how taste stem cells turn into mature taste cells. We have done extensive screening of the gene expression analysis using DNA microarray analysis and found CD133 as one of the taste progenitor marker. To further analyze temporal expression of CD133 during taste cell differentiation, we have generated 3-D taste culture system and performed RNA-Seq analysis. We found that CD133 might be a candidate for taste progenitor cells since the expression pattern of CD133 mRNA resembles to the molecule which change their expression pattern from stem cell state to mature state. The knowledge gained from our present study will provide the foundation for future therapies to treat ageusia and dysgeusia patients for improvement of the quality of life.

研究分野：内胚葉の発生・分化

キーワード：発生 味細胞 幹細胞 三次元培養

1. 研究開始当初の背景

(1) 味細胞は 10~14 日で再生を繰り返す細胞であり、新しい細胞は常に味蕾周辺の味幹細胞から生じ、最終的に 5 種類 (甘味、うま味、苦味、塩味、酸味) の味質に反応する味細胞へ分化する。これまで我々は、再生医療に味幹細胞を利用する事を目標に、発生・再生に必要な因子の探索と味幹細胞の同定を行ってきた。しかし、味細胞分化メカニズムや細胞系譜に関する情報がないため、味幹細胞から成熟味細胞への分化誘導までの道筋はできていない。

(2) 加齢により皮膚や毛包細胞の細胞が消失するのと同様、味細胞の数も加齢とともに減少し、味覚感度の低下を招く事が分かっている。よって、高齢者に味覚障害が多く、食事の味付けが濃くなってしまいう理由の一つに、味細胞の消失や再生スピードの低下があると考えられる。味覚障害者は味気ない生活を強いられるだけでなく、過剰な塩分を摂取するなど不健康な食生活に陥りやすい。このような味覚障害に対する治療方法の開発は QOL の向上を目指す現代社会には欠かせず、一つのアイデアとして皮膚移植のように味細胞を補充する再生医療が考えられる。しかしながら味細胞は数が少ない上、採取も難しくドナー細胞が圧倒的に不足している現状がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は分化の途中段階にある味前駆細胞を同定し、どのようなステップを経て成熟味細胞へ分化するかを詳細に理解する事である。本研究期間内に、1) 味前駆細胞のマーカ候補の探索と、2) 味細胞分化における味前駆細胞候補マーカ候補の発現パターンの解析を行う。将来は、本研究結果をベースに研究を継続し、「味幹細胞から成熟味細胞の作製」手法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 舌上皮の有郭乳頭を含む部分と含まない部分より RNA をそれぞれ採取し、DNA マイクロアレイ解析を行い、味細胞画分のみ発現し、かつ味細胞マーカでない前駆細胞のマーカをリストから選び出す。選び出した前駆細胞マーカについて、RT-PCR や抗体染色など様々な方法でその発現を確認する。

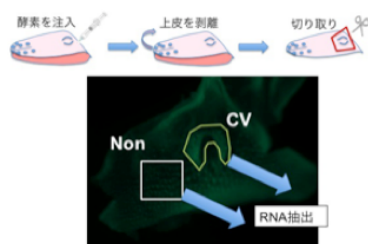


図-1 舌上皮の剥離とその後の RNA 抽出

(2) 味幹細胞のオルガノイド培養系を導入し、分化の途中段階での味前駆細胞マーカ候補の発現を調べる。

4. 研究成果

(1) DNA マイクロアレイの結果、有郭乳頭画分からは、既に報告されている味細胞関連分子が多く見出された。一方、既知の味細胞マーカ以外の分子の発現を調べたところ、CD133 を見出した。CD133 は有郭乳頭画分から取得した mRNA の中に存在したが (図-2、RT-PCR による発現解析)、有郭乳頭を含まない舌上皮からは発現が検出されない分子であった。CD133-LacZ マウスを用い、有郭乳頭周辺における β ガラクトシダーゼの活性を調べたところ、CD133 は幹細胞が存在するとされているトレンチ部分と味蕾内にその活性を確認した。このことから、CD133 陽性細胞は味幹細胞とは違い、味細胞への分化が進んだ前駆細胞である可能性がある。

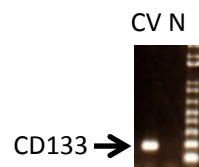


図-2

(2) 味蕾オルガノイドの培養を腸管オルガノイド培養法に倣って行い、味細胞へ分化誘導させる際に細胞内に起こる変化を、次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq にて解析した。まず、Lgr5-GFP マウスの有郭乳頭から GFP 陽性細胞をセルソーティングにより分取した後、オルガノイド培養を開始した。味蕾オルガノイドは腸管オルガノイドとは形状が異なり球体を呈していた。14 日間にわたり培養し、2 日おきに RNA をサンプリングした。その後、次世代シーケンサーにて転写産物を解読した。クラスター解析の結果、培養が進むに従い発現が抑制されるサブクラスター 1 と、逆に発現が上昇するサブクラスター 4 を見出した (図-3)。前者には、細胞周期や分裂に関係する分子が、後者には味覚や化学感覚に関係する分子がリスト化された。特に、後者からは味細胞に選択的に発現する味覚受容体をはじめ、味覚受容体からのシグナルを伝達する G タンパク質やその下流に存在するシグナル伝達因子などが見出され、味蕾オルガノイドが生体内での味細胞の再生モデルとして利用できる事が確認された。上記 (1) で着目した味前駆細胞のマーカ候補である CD133 について経日的な発現の変化を調べたところ、同分子はサブクラスター 4 に含まれる分子と同じ発現パターンを有しており、味前駆細胞のマーカである可能性が高い事が示唆された。

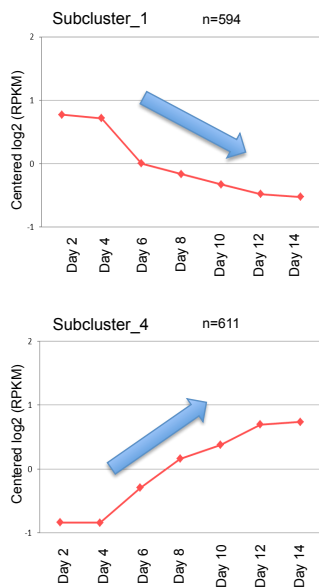


図-3 転写産物のクラスター解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- ① 大木淳子, 落合みやび, 山根拓実, 大石祐一, 栗飯原永太郎, 岩槻健, オルガノイド培養系を用いた消化管生体モデルの導入, 日本味と匂学会誌, 査読有, Vol. 2, 2015, 367-370
- ② Aihara E, Mahe MM, Schumacher MA, Matthis AL, Feng R, Ren W, Noah TK, Matsu-Ura T, Moore SR, Hong CI, Zavros Y, Herness S, Shroyer NF, Iwatsuki K, Jiang P, Helmrath MA, Montrose MH. Characterization of stem/progenitor cell cycle using murine circumvallate papilla taste bud organoid. *Scientific Reports*, 査読有, 5, 2015, 17185
- ③ 岩槻 健, 味覚とGPCR, 査読無し, フェルマシア別冊, Vol. 50, No. 9, 885-887 (2014)
- ④ 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 cell ex vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有, 111, 2014, 16401-16406

〔学会発表〕(計 13 件)

- ① 日本農芸化学会 2016 年度大会シンポジウム、「消化管研究の最前線:」三次元培養系を用いた消化管の機能解析」(平成 28 年 3 月、札幌)
- ② Hindgut Club Japan 2015、「消化管内分

泌細胞研究のための新しいツールの作出」(平成 27 年 12 月、東京)

- ③ Hindgut Club Japan 2015、「消化管上皮幹細胞および味蕾幹細胞の三次元培養」(平成 27 年 12 月、東京)
- ④ 味と匂学会第 49 回年会、「三次元幹細胞培養系を用いた味蕾および消化管の機能解析」(平成 27 年 10 月、岐阜)
- ⑤ 味と匂学会第 49 回年会、「オルガノイド培養系を用いた消化管生体モデルの導入」(平成 27 年 10 月、岐阜)
- ⑥ 第二回霊長類への展開に向けた幹細胞・発生・エピゲノム研究、「味幹細胞の同定とその培養」(平成 27 年 9 月、犬山)
- ⑦ 日本歯科放射線学会第 56 回学術大会・第 12 回定例総会ランチョンセミナー、「味覚受容体研究最前線消化管で感じる”味”とは?」(平成 27 年 6 月、仙台)
- ⑧ 第 68 回日本栄養・食糧学会中部支部大会、「味蕾および腸管幹細胞の三次元培養と機能解析」(平成 27 年 7 月、静岡)
- ⑨ 第 69 回日本栄養・食糧学会大会 (ACN2015 との合同開催)、「舌-腸-脳ネットワークによる栄養素認知」(平成 27 年 5 月、横浜)
- ⑩ 日本味と匂学会第 48 回大会、Characterization of the endoderm derived chemosensory cells (H26 年 10 月、清水)
- ⑪ The 12th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception、Multiple methods to characterize endoderm-derived tissues (H26 年 11 月、福岡)
- ⑫ 第 88 回日本薬理学会年会、Gustatory receptors in the mouth and the gastrointestinal tract (H27 年 3 月、名古屋)
- ⑬ 日本農芸化学会 2015 年度大会、Characterization of ex vivo expanded taste-like cells derived from small intestine (H27 年 3 月、岡山)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩槻 健 (IWATSUKI Ken)
東京農業大学・応用生物科学部・食品安全
健康学科・准教授
研究者番号：50332375

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：