

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 620 号	学位申請者	小柳 江梨子	
審査委員	主査	松口 徹也	学位	博士 (歯学)
	副査	佐藤 友昭	副査	田松 裕一
	副査	山中 淳之	副査	嶋 香織

主査および副査の5名は、令和3年5月21日、学位申請者 小柳 江梨子 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 味蕾の幹細胞はどこに存在するか。ケラチノサイトの幹細胞とは別か。

(回答) 味蕾の幹細胞は Lgr5、Lgr6 を発現する細胞に含まれ、味蕾の外側にある。味蕾のごく近傍のケラチノサイトは味蕾と共通の幹細胞から形成されるが、舌全体に広く分布するケラチノサイトの幹細胞は別で、Bmi1 (+) を発現する。

質問2) Lgr5、Lgr6 は腸管の幹細胞マーカーであり細胞系譜はよく解析されているが、味蕾では解析されているか。

(回答) 味蕾でも解析されており、味蕾およびその周囲の細胞が Lgr5 発現細胞に由来することが明らかにされている。

質問3) 味蕾を維持するメカニズムは分かっているか。

(回答) Sonic hedgehog (Shh) シグナルが重要な役割を担っている。私達は、味蕾基底細胞特異的な Shh の発現を見だし、Shh が味蕾を維持する中心的なシグナル分子であるという仮説を提唱した。最近、Shh シグナルを阻害すると味蕾が小さくなり味覚障害が生じること、Shh を舌上皮で異所性に発現すると味神経に依存せずに味蕾が形成されることが報告された。さらに、味神経も Shh を発現しており、味蕾の維持には味蕾基底細胞と味神経の Shh が必要であることが明らかにされている。

質問4)  $\beta$  カテニンを安定化するとII型細胞が増え、Shh の過剰発現でもII型細胞を増加させるが、III型細胞は変わらないとある。Wnt と Shh のシグナルは各領域の細胞構成比の形成において相互に関係しているか。

(回答) マウス味蕾幹細胞を含む領域における  $\beta$  カテニンのコンディショナルノックアウトは、Shh (+) 基底細胞を減少させ、味蕾を消失させると報告されており、Shh シグナルが正常に機能するために Wnt シグナルが必要である。

質問5) 味細胞の分類の基となった電子顕微鏡で観察される色調の違いは何故生じるか。それはどの程度の違いか。

(回答) 細胞質の電子密度の違いだが、原因は明らかでない。II型とIII型の差は小さく、当初は共に明細胞とされた。

質問6) 味細胞間の情報伝達はあるか。II型・III型細胞の味刺激に対する「直接的な応答」、「間接的な応答」とは何か。

(回答) 直接的な応答とは、味を受容した細胞自体が応答することである。間接的な応答とは、味を受容した細胞から情報を受け取って別の細胞が応答する、細胞間情報伝達を介する応答である。III型には甘味・うま味・苦味に応答する細胞もあるが、これはII型から情報を受け取って生じる間接的な応答であるとする説があった。その後、II型が神経伝達物質として ATP を放出し直接味神経に情報を伝えていること、2020年にはIII型のおよそ半数が複数の味に直接応答することが明らかになり、最近では直接的な応答が注目されることが多い。しかし、III型は神経伝達レベルの低濃度 ATP に応答することが示されており、間接的な応答が否定されたわけではなく、味細胞間の情報伝達も重要である。

質問7) 味蕾は、細胞が集まることで高次の機能を有するのではなく、単に味細胞の集合した「場」と考えてよいか。

(回答) 細胞型ごとに独立した味質の情報伝達メカニズムが明らかになり、独立性に注目すると味蕾は単に細胞が集まる「場」に見えるかも知れない。しかし、I型は、II型が放出した ATP を分解し、支持細胞としての役割も担う。また、味細胞間の情報伝達もあり、正常な味受容機能には味蕾の形成が重要であると考えられる。さらに、味神経と味細胞の連絡は、1本の神経線維が複数の味細胞を支配し、軸索反射のような現象も観察されているので、単なる「場」以上の機能を有すると考えている。

質問8) 味蕾の大きさは含まれる細胞の数を反映していると考えて良いか。領域によって差はあるか。

(回答) 味蕾の大きさと細胞数は直線的な関係にある。軟口蓋の味蕾は大きく、茸状乳頭の味蕾は小さい傾向がある。

質問9) I型細胞を解析しなかったのは、何故か。

(回答) 個々のI型細胞を正確に識別できるマーカーがなく、解析できなかった。

質問10) 一般に IP3 受容体は多くの細胞に発現するが、IP3 受容体が限られた細胞にしか検出されなかったのは何故か。

## 最終試験の結果の要旨

(回答) IP3 受容体のサブタイプの一つである IP3R3 は、RNAseq 解析でも味蕾の II 型細胞に特異的に発現していることが明らかにされている。今回の解析で用いた抗 IP3R3 抗体は特異性が高く、他の IP3 受容体は検出されなかった。

質問 11) II 型・III 型細胞の構成が大きくばらついていることは、味受容にも影響すると考えられるか。

(回答) 細胞構成が異なる味蕾は味質ごとに感受性に差がある可能性があり、興味深い。例えば、CA4 を発現する III 型細胞を持たない味蕾は、酸味の受容ができない可能性がある。

質問 12) II 型・III 型細胞の数が少なかった味蕾は小さな味蕾か。それとも IP3R3 や CA4 を発現しない細胞が多い味蕾か。

(回答) IP3R3 と CA4 の染色像から推測される味蕾のおおよその輪郭から、小さな味蕾であると考えられるが、味蕾 1 個に含まれる細胞の総数を解析して確認する必要がある。

質問 13) 個々の味蕾に含まれる II 型・III 型細胞の数は大きくばらついているが、領域としては一定の割合を維持している。その制御機構はどのように考えられるか。

(回答) 1 つの味蕾に細胞を供給する幹細胞は数個と見積もられている。造血幹細胞には休止期があることや、精巣の幹細胞は造精子数を周期的に変化させることが明らかにされている。もし、味蕾の幹細胞から供給される細胞数と細胞型にも周期性が存在するならば、味蕾の大きさと細胞構成は刻一刻と変動する。また、幹細胞の周期が味蕾間でずれていれば個々の味蕾の細胞構成は味蕾間で大きく異なると考えられる。それでも、味蕾が存在する各領域全体としては、血液細胞の割合が一定であるのと同様に、細胞型の構成比を一定の割合で保つことができると考えられる。今後、そのメカニズムを解明していきたい。

質問 14) NCAM(+)CA4(-)細胞で味孔まで伸長する細胞は見つかったか。NCAM(+)CA4(-)細胞が成熟細胞のサブタイプとして働き、味の受容や支持細胞の役割をする可能性はないか。

(回答) 有郭乳頭では味孔まで伸びる細胞があった。未解析であるため明らかでないが、NCAM(+)CA4(-)細胞は全ての味蕾に含まれてはいないため、普遍的な支持細胞としての機能を有する成熟細胞とは考えにくい。

質問 15) II 型細胞も NCAM(+)細胞から分化することを証明するには、どのような細胞系譜解析が必要か。NCAM<sup>Cre</sup>ERT2 マウスは存在しているか。

(回答) 直接証明するには、NCAM<sup>Cre</sup>ERT2 マウスを利用した細胞系譜解析が最も有効であるが、このマウスに関する論文は見付けられない。しかし、私たちの先行研究の「NCAM と Ascl1 の発現が大部分一致する」、「Ascl1(+)細胞から III 型と II 型細胞が分化する」という結果は、NCAM(+)細胞から II 型細胞も分化することを示唆している。

質問 16) 細胞分化を経時的に観察する手立てはないか。

(回答) 各細胞型に特異的に発現する遺伝子を蛍光標識する遺伝子改変マウスを作製し、定期的に麻酔下で共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察する方法が考えられる。分布密度が低い茸状乳頭であれば毎回同じ味蕾を観察できる。

質問 17) マウスの研究であるが最終的にヒトと結びつけられるか。

(回答) 苦味受容体のサブタイプの違いなどはあるが、これまでに明らかにされた味細胞の細胞内情報伝達系や味蕾の維持機構は共通であり、マウスを用いた研究で得られた結果のほとんどはヒトに適用可能であると考えられる。

質問 18) この研究テーマのゴールは何か。例えば、味覚障害の治療に結びつけていくのか。

(回答) 味蕾を正常に維持するメカニズムに関する知見は、味覚障害の治療の基盤となると考えている。今後は味細胞の分化早期に発現する転写因子、II 型は Pou2f3、III 型は Mash1 を用いて基底細胞から II 型・III 型細胞の細胞系譜を明らかにしたい。従来、個々の味蕾は細胞がターンオーバーしても大きさと細胞構成はあまり変動せず、一定に維持されているという考えが有力であった。しかし、今回、味蕾の大きさと細胞構成の大きなばらつきが明らかとなり、これらがターンオーバーによって大きく変動している可能性が示された。本研究の結果は、味覚機能の恒常性について、個々の味蕾レベルではなく、各領域に含まれる味蕾の総数として捉えることの重要性を示していると考えている。

質問 19) COVID-19 の味覚障害の発症機構について、味蕾に関する知見があれば、教えてください。

(回答) COVID-19 を引き起こす SARS-CoV-2 は、スパイクタンパク質を宿主細胞にあるアンジオテンシン変換酵素 (ACE2) に結合させ、宿主細胞のセリンプロテアーゼ TMPRSS2 によってスパイクタンパク質を切断させて感染する。II 型・III 型細胞は ACE2 を発現するが、TMPRSS2 は発現していないため感染は考えにくい。I 型は ACE2 及び TMPRSS2 の発現は不明である。一方、Lgr5 を発現する味蕾幹細胞は ACE2 と TMPRSS2 を発現しており、SARS-CoV-2 は味蕾幹細胞に感染し、味覚障害を生じている可能性がある。また、味蕾周囲の上皮の炎症は味蕾幹細胞の細胞供給を低下させることが知られているが、味蕾周囲の上皮細胞には高レベルに ACE2 が発現しているため、周囲上皮に感染して炎症を生じさせる可能性もある。一方、味神経には ACE2 と TMPRSS2 は発現していないため、感染は考えにくい。

以上の質疑応答の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有していると認め、博士(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。