

論 文 要 旨

**Expression of the basal cell markers of taste buds
in the anterior tongue and soft palate of the mouse
embryo**

〔 マウス胎仔の舌前方部と軟口蓋における
味蕾基底細胞マーカーの発現 〕

中 山 歩

【序論および目的】

哺乳類の味蕾では新しい味細胞が味蕾基底部の未分化な基底細胞から絶えず生み出され、その寿命は平均して10-14日である。また、味神経が切断されると味蕾は消失するから、味蕾の維持には味神経支配が必須である。味蕾基底細胞の性質を分子レベルで明らかにすることは、味蕾の形態と機能を維持し味覚を正常に保つメカニズムを知る上で極めて重要である。さらに、胎生期の味蕾の分化、成熟の過程と比較すればこの味蕾のターンオーバーのメカニズムを明らかにできると期待される。しかし、胎生期の味蕾基底細胞の発達過程は明らかになっていない。そこで、本研究では胎生期における味蕾基底細胞の発達過程と味蕾の分布パターン形成の関連性に注目して、味蕾基底細胞マーカー遺伝子として Shh (細胞増殖・分化誘導因子), Prox1 (ホメオドメイン型転写因子), Mash1 (bHLH 型転写因子) を用い、舌前方部と軟口蓋で味蕾基底細胞が胎生期のいつから分化を開始するかを解析した。特に、口腔内に分布する味蕾のうち軟口蓋味蕾は出生直後に既に機能していることが明らかになっているので、胎生期の軟口蓋の Shh のスポット数と成体の味蕾数を比較し、味蕾分布パターンの決定時期を検討した。さらに、味蕾基底細胞分化への神経支配の関与を調べるために、神経細胞マーカー PGP9.5 を用いて神経支配の開始時期の解析を行った。

【材料および方法】

マウス (C57BL/6J) : 胎生 11.5-16.5 日および成マウスを用いた。

- ・ 味蕾基底細胞の分化開始時期の解析 : Shh と Prox1 のプローブを用いたホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。Shh, Prox1, Mash1 が同じ領域で発現しているかを確かめるために切片の二重蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。
- ・ 軟口蓋味蕾の分布パターンの決定時期の解析 : 成マウスの軟口蓋味蕾を抗 gustducin 抗体を用いたホールマウント免疫染色で可視化し、マウス胎仔の軟口蓋領域の Shh スポット数と比較した。
- ・ 味蕾基底細胞分化への神経支配の関与の解析 : 抗 PGP9.5 抗体と抗 Shh 抗体を用いた免疫染色で Shh 発現スポットへの神経の到達時期を解析した。

【結 果】

- ・ 味蕾基底細胞の分化開始時期 :

茸状乳頭領域では、Shh は胎生 11.5 日に舌上皮に広く発現していたが、Prox1 はほとんど検出されなかった。胎生 12.5 日から Shh と Prox1 のスポット状の発現が認められ、こ

これらの発現はほぼ重なっていた。Mash1 を発現する細胞は、胎生 14.5 日から検出された。

軟口蓋領域では、胎生 14.5 日から Shh と Prox1 は Geschmacksstreifen (GS) 領域に帯状の発現と、GS 領域より咽頭側でのスポット状の発現が認められ、これらの発現はほぼ重なっていた。胎生 15.5 日では、スポット数は増加したが、正中部の癒合線上には発現は認められなかった。胎生 16.5 日では、正中部の癒合線上にも発現が認められた。Mash1 を発現する細胞は、胎生 15.5 日から検出された。

・軟口蓋味蕾の分布パターンの決定時期：

胎生期の軟口蓋領域で、GS 領域の Shh の発現は帯状になっており、個々の味蕾の原基として区別することはできないが、GS より咽頭側のスポット状の発現は個々の味蕾の原基に対応していると予想された。そこで、胎生期の Shh を発現するスポット数と成体の軟口蓋味蕾の分布パターンを比較し、味蕾の分布パターンがいつ完成するかを検討した。胎生 14.5 日での Shh を発現するスポットの数は、15.5 日では 2 倍以上に増加した。胎生 16.5 日では、胎生 15.5 日での Shh を発現するスポットの数とほぼ同じであった。成体の軟口蓋の GS より咽頭側では、1 個の味蕾が独立して存在するだけでなく、2-4 個の味蕾が集まって島状に存在していた。胎生 15.5 日、16.5 日の Shh を発現するスポット数は、成体の軟口蓋における GS 以外の味蕾の数より少なかったが、島状に分布する味蕾の集団の数とはほぼ同じであった。

・味蕾基底細胞分化への神経支配の関与：

茸状乳頭領域では、胎生 14 日で上皮基底膜に神経が到達することが明らかにされている。軟口蓋領域では、胎生 14.5 日で Shh を強く発現する上皮細胞の基底膜には神経が到達していたが、Shh を弱く発現する上皮細胞には神経は到達していなかった。胎生 15.5 日では、ほとんどの Shh を発現する上皮基底膜に神経が到達し、一部は上皮内へ侵入していた。胎生 16.5 日では、Shh を発現する上皮にはより多くの神経線維が侵入していた。

【結論と考察】

・味蕾基底細胞の分化開始時期：

茸状乳頭領域では胎生 12.5 日で、軟口蓋領域では胎生 14.5 日で Shh と Prox1 の共発現する細胞のクラスターが認められたことより、味蕾分布パターン形成開始時に Shh を発現するスポットが出現する段階で味蕾基底細胞の分化が始まると考えられる。

・軟口蓋味蕾の分布パターンの決定時期：

Shh を発現するスポット数が胎生 15.5 日から一定となったことより、味蕾の分布パターンは、胎生 15.5 日には決定されると考えられる。また、Shh を発現するスポット数が、成体の GS 以外の味蕾の数より少なかったが、島状に分布する味蕾の集団の数 (1-4 個の味蕾からなる) とはほぼ同じであったことより、複数の味蕾が Shh を発現する 1 つのスポットから分化すると考えられる。

・味蕾基底細胞分化への神経支配の関与：

Shh と Prox1 は神経が到達する以前から発現していたのに対し、Mash1 は神経が上皮に到達した後に発現していたことより、味蕾基底細胞は神経に依存せずに分化を開始するが、Mash1 の発現開始は、神経に依存する可能性がある。

・結論：

味蕾基底細胞の分化の開始は神経に依存しないと考えられるが、味蕾の細胞分化が神経に依存せずどこまで進行するかは明らかでない。より長期にわたって培養する方法を確立して、Mash1 の発現の神経依存性や味蕾の細胞分化について解析を進めることが必要である。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 44 号	学位申請者	中山 歩
審査委員	主査	松口 徹也	学位 博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	宮田 篤郎	副査 中村 典史
	副査	佐藤 友昭	副査 松山 孝司

Expression of the basal cell markers of taste buds in the anterior tongue and sort palate of the mouse embryo

(マウス胚の舌前方部および軟口蓋における味蕾の基底細胞マーカーの発現)

哺乳類の味蕾では新しい味細胞が味蕾基部細胞から絶えず生み出され、その寿命は平均して 10-14 日である。また、味神経切断により味蕾は消失することから、味蕾の維持には味神経支配が必須である。味蕾基底細胞の性質を分子レベルで明らかにすることで、味蕾の形態と機能を維持し味覚を正常に保つメカニズムを解明できる。さらに、胎生期の味蕾の分化、成熟の過程と比較すれば味蕾のターンオーバーのメカニズムを明らかにできる。本研究は胎生期における味蕾基底細胞の発達過程と味蕾の分布パターン形成の関連性に注目して、舌前方部と軟口蓋で味蕾基底細胞の分化開始時期を調べた。材料には C57BL/6J の胎生 11.5-16.5 日目および成獣マウスを用い、味蕾基底細胞マーカー遺伝子の Shh (細胞増殖・分化誘導因子)、Prox1 (ホメオドメイン型転写因子)、Mash1 (bHLH 型転写因子) について、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション、および、切片の二重蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。また、成獣マウスの軟口蓋味蕾を、抗 gustducin 抗体を用いたホールマウント免疫染色で可視化し、マウス胎仔の軟口蓋領域の Shh のスポット数と比較し、軟口蓋味蕾の分布パターン決定時期を調べた。さらに、神経細胞マーカー PGP9.5 の抗体を用いて神経支配の開始時期を調べた。

その結果、本研究で以下のことが明らかになった。

- 1) 茸状乳頭領域では、Shh は胎生 11.5 日目に広く発現していたが、Prox1 はほとんど検出されなかった。胎生 12.5 日目から Shh と Prox1 がほぼ重なってスポット状に発現した。Mash1 を発現する細胞は、胎生 14.5 日目から検出された。
- 2) 軟口蓋領域では、胎生 14.5 日目から Shh と Prox1 はほぼ重なって Geschmacksstreifen (GS) 領域に帯状に、GS 領域より咽頭側ではスポット状に発現した。Mash1 は、胎生 15.5 日目から検出された。Shh を発現するスポットの数は、15.5 日目には胎生 14.5 日目の 2 倍以上に増加し、胎生 16.5 日ではそれ以上は増加しなかった。成体の軟口蓋の GS より咽頭側では 1 個、あるいは 2-4 個の味蕾が集まって島状に存在していた。胎生 15.5 日目、16.5 日目の Shh スポット数は、成体の GS 以外の軟口蓋味蕾の数より少なかったが、島状に分布する味蕾の集団の数とはほぼ同じであった。
- 3) 茸状乳頭領域では、胎生 14 日目に上皮基底膜に神経が到達し、軟口蓋領域では胎生 15.5 日目にほとんどの Shh を発現する上皮基底膜に神経が到達し、一部は上皮内へ侵入していた。胎生 16.5 日目では、Shh を発現する上皮にはより多くの神経線維が侵入していた。

以上のことから、茸状乳頭領域では胎生 12.5 日目で、軟口蓋領域では胎生 14.5 日目で Shh と Prox1 の共発現する細胞のクラスターが認められたことより、Shh 発現スポットが出現する段階で味蕾基底細胞の分化が始まると考えられる。また、軟口蓋領域の味蕾の分布パターンは胎生 15.5 日の時期に決定され、複数の味蕾が 1 つの Shh 発現スポットから分化すると考えられる。Shh と Prox1 は神経が到達する以前から発現していたのに対し、Mash1 は神経が上皮に到達した後に発現することから、味蕾基底細胞は神経に依存しないで分化を開始するが、Mash1 の発現開始は神経に依存することが示唆された。

本研究は、胎生期の味蕾の分化、成熟の過程を、神経支配の関与を含めて味蕾成熟速度の異なる舌と軟口蓋で分子生物学的に調べたものであり、味蕾の機能の発達・維持に関して極めて興味深い結果を得ている。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 44 号		学位申請者	中山 歩
審査委員	主査	松口 徹也	学位	博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	宮田 篤郎	副査	中村 典史
	副査	佐藤 友昭	副査	松山 孝司

主査および副査の5名は、平成20年6月19日、学位申請者 中山 歩 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。

1) Q : 味蕾のターンオーバー時に味蕾全部が入れ替わっているのか。

A : BrdU 取り込み実験に基づく報告では I-III 型細胞および基底細胞の全てが入れ替わっているし、神経切断によって味蕾が消失するのは、味蕾の寿命が長くても数週間であることを示している。

2) Q : 胎生期のマウスのステージはどのように決めているのか。プラグが確認された日を0日としたのか。

A : 便宜的にプラグが確認された日の午前0時に交配したと考えている。そのため、プラグが確認された日の正午を胎生 0.5 日(0.5 dpc)としている。また、胎仔の指、口蓋部位の形態によって、ステージを確認している。

3) Q : in situ ハイブリダイゼーションの切片の厚みはどれくらいか。また、胚組織の凍結切片がきれいにできているが、切片を作るときの注意点を教示頂きたい。

A : 切片は、in situ ハイブリダイゼーションでは 5-8 μ m、神経線維を検出する PGP9.5 の免疫染色では 20 μ m の厚さで作製した。凍結切片は、OCT コンパウンドに包埋して凍結して作製した。胎仔の上皮組織の場合は、液体窒素で凍結すると標本がぼろぼろになり痛みが激しいので、ヘキサンにドライアイスを入れた bath を作って凍結した。この方法では、気化したガスが凍結過程に影響することが少なく、迅速に凍結することができるため組織の状態が比較的良好で、きれいな切片を作製することができる。

4) Q : Prox1 の発現開始は Shh とは違うのか。Shh のスポットの周囲で Shh の発現が抑制されるとのことだが、抑制のかかる範囲はどれくらいか。また、Shh が Shh を抑えるのであれば、もともとあった Shh のスポットも消えるのではないか。Shh とは別の因子が抑制に関与しているのではないか。

A : 茸状乳頭では写真で示したように、Prox1 は Shh が舌背部に広く発現した後にスポット状の発現になってから Shh と共発現するので、Prox1 発現の開始は Shh より遅れていた。Shh の抑制は濃度に依存することが報告されており、そのため写真で示したようなスポット状の分布を生じると考えている。

5) Q : 味蕾の細胞のターンオーバーと味蕾の発生とは異なるのか。

A : 味蕾のターンオーバーは神経に依存しており神経支配を失うと味蕾が消失するのに対して、味蕾の基底細胞の分化は神経に依存しておらず神経が上皮に到達する前に味蕾基底細胞が分化していた。つまり、味蕾の細胞のターンオーバーと味蕾の発生とは神経依存性という点で異なっていた。

しかし、味蕾の基底細胞は神経に依存せず、分化した時から味蕾が形成されて基底部に位置するようになるまで一貫して Shh, Prox1 を発現している。そのため、遺伝子発現という観点からは、味蕾の基底細胞は発生過程を通じて一定の性質を持っていると考えられる。

6) Q : ホールマウントの材料には顎骨も含まれているのか。軟口蓋部位の shrinkage 等の問題は起こらないのか。骨がある場合、切片作製に問題は生じないのか。また、骨を含むか否かが染色の違いを起こすことは無いのか。

A : 骨が形成される部位を含む材料を使っている。ただし、胎生 16.5 日目までは、骨形成は殆ど進んでおらず、切片作製には支障がなく、染色もうまくいっている。しかし、それ以降のステージでは、同じ条件でも Shh の in situ ハイブリダイゼーションがうまくいかなくなるので、骨が影響する可能性も否定できない。

7) Q : 成マウスの軟口蓋味蕾の解析に、胚の解析で用いた Shh の in situ ハイブリダイゼーションを使わなかった理由は何か。

A : 抗 gustducin 抗体を用いたホールマウント免疫染色で全ての味蕾をきれいに染色できることが分かっていたので、成マウスの解析にはホールマウント法を用いた。

8) Q : Shh の発現からどのような過程で Prox1, Mash1 が発現するのか。歯の発生では、外胚葉性の neural crest cell に由来する間葉細胞が上皮と相互作用して発生が進むと考えられている。味蕾の発生には neural crest cell の関与はないのか。

A : 茸状乳頭領域では Shh は茸状乳頭の分布の形成に関与する。したがって、Shh の発現のみでは基底細胞の分化とは言えない。Prox1 は成体味蕾で味蕾に特異的に発現するので、これをマーカーとして使用した。さらに Mash1 は III 型細胞に発現するから基底細胞からさらに分化した細胞のマーカーとして使用した。硬口蓋の口蓋ヒダにあるメルケル細胞は、neural crest cell 由来と考えられている。味蕾については、舌の味蕾は neural crest cell 由来ではなく上皮に由来するという報告があるので、軟口蓋の味蕾もおそらく舌の味蕾同様に上皮由来であると考えている。

9) Q : 神経が接続する際に、どのようなメカニズムで味蕾へ伸びて行き、味細胞と接続するのか。写真では胎生 16.5 日に味細胞側からも伸長していくようにも見えるが。

A : BDNF が神経の維持、形状に関与しており、味蕾への神経接続に関与しているという報告がある。分化の何れかの段階で BDNF が発現して神経を誘導していると考えている。ご指摘の写真で、味細胞側からも伸長しているように見えるのは、神経が湾曲していて次の切片にまたがっているために部分的に抜けているように見えているが、実際には連続した神経束である。

10) Q : 出生時には軟口蓋味蕾が成熟しているのに、味蕾基底部の発生段階では茸状乳頭味蕾の方が先行している。そうすると、受容器としての成熟は最終的な味蕾成熟の過程では逆転していることになるが、なぜなのか。

A : 器官発生の速度は舌先端部の方が軟口蓋よりも明らかに早く、胎生 15 日で比較すれば舌の基本的な形は完成しているが、軟口蓋はまだ開いた状態で未完成である。したがって、味蕾の発生・分化は器官形成に依存して軟口蓋よりも舌の方が早く始まるが、最終段階では軟口蓋の完成が他の部位よりも早いために成熟時期が早いのではと考えているが、さらに検討したい。

11) Q : Mash1 は III 型細胞に発現するが、II 型、I 型細胞の場合は基底細胞からの分化の経緯はどのようなになっているのか。

A : いずれの Cell type も基底細胞から分化すると考えられている。それぞれのタイプの細胞分化の相互関係については味細胞の系譜の問題であるが、今のところ明確な結論は出されていない。ただし、味蕾の形成過程で II 型および III 型細胞のマーカーとの共発現を解析した結果から、Mash1 は分化した III 型細胞に発現するだけでなく、II 型細胞の未成熟な段階つまり味覚受容体を発現する前の段階で一過性に発現すると考えられている。I 型細胞には、Mash1 の発現は関与しないと考えられている。

- 12) Q : Mash1 は神経が上皮に入ってから発現するというのは興味深いですが、Mash1 は味蕾の成熟にどのように働くのか。Mash1 KO で味蕾形成が阻害されたというような知見はあるか。
- A : Mash1 の発現は神経誘導に依存していると考えているが、その後、受容体をどのような機序で発現させるのかについては、今後の課題として研究を進めたい。Mash1 KO について報告は調べていない。
- 13) Q : 味覚神経を切断すると味蕾が消失するということだが、どのようなメカニズムか。
- A : 味覚神経切断後 10 日から 2 週間で基底細胞も含めて消失する。味蕾の細胞のターンオーバーが約 10 日なので、味蕾の消失に要する日数はそれに対応している。また、神経が再生すると味蕾が再生するが、味蕾の再生では、まず、基底細胞のマーカー分子が発現する。
- 14) Q : 結論のところ、今後、培養系を使って研究を進めると述べていたが、神経が必要な味蕾の分化について、in vitro の系で研究することができるのか。
- A : 培養条件を検討した結果、かなり良い状態で培養できるようになってきている。その内容については、現在、発表前の段階なので詳しく述べるのは差し控えさせて頂きたい。
- 15) Q : 茸状乳頭では胎性 12.5 日、軟口蓋では胎生 14.5 日に Shh と Prox1 が共発現するとのことだが、それ以前には共発現はないのか。
- A : 写真で示したように、ホールマウントで標本全体を調べて 12.5 日以前には Prox1 の共発現は認められなかった。まず Shh が発現し、その後に Prox1 が共発現する。その時期以前の共発現はない。
- 16) Q : 基底細胞が幹細胞のようなもので、それから I, II, III 型の全ての細胞が分化するのか。III 型から II 型細胞へと性質が変化するのか。I 型、II 型、III 型それぞれの基底細胞というものがあるのか。
- A : I, II, III 型細胞はいずれも基底細胞から分化すると考えられている。しかし、味蕾の細胞系譜に関しては現在議論がある所である。III 型細胞は味神経とシナプスを形成しており、シナプスを持たない II 型細胞が III 型細胞から分化するとは考えにくい。一方、Cell type に特異的な分子の発現の解析からは、II 型、III 型ともに Mash1 を発現する細胞から分化しており、III 型では成熟した段階でも Mash1 の発現が残っているのに対して、II 型では Mash1 の発現が失われるのではないかと考えられる。グリアの性質を持つ I 型細胞は II 型、III 型細胞とは別個に分化するのではないかと考えられる。
- 17) Q : 基底細胞は生涯残っていくものと考えられるのか。胎生期の基底細胞の Shh の発現は、adult でも生涯、検出できるのか。
- A : Shh と Prox1 を発現する基底細胞は、生涯、味蕾の基底部に存在している。ただし、BrdU の取り込みの実験の結果は、これらの基底細胞が味蕾の細胞のターンオーバーの過程で次々と置き換わっていることを示唆している。
- 18) Q : Shh は分泌性の誘導因子、Prox1, Mash1 は転写因子だが、これらの相互関係や誘導の関係にはどのようなことが知られているのか。
- A : Mash1 は、脳・神経管において Shh が腹側のニューロンの分化を誘導するときにも発現する分子で、Shh の誘導を受ける分子であると言える。しかし、Prox1 と Shh との関係については今のところ、知られていない。
- 19) Q : Geschmacksstreifen の Shh の帯状の発現は、Shh が周囲の発現を抑制するという考えと矛盾なく説明できるのか。また、有郭乳頭や葉状乳頭では Shh 発現はどうなるのか。
- A : Geschmacksstreifen は硬口蓋と軟口蓋の境界にある襞状構造であり、発生上硬口蓋襞との関連が考えられる。そのために、Geschmacksstreifen 以外の領域の Shh の作用とは異なる機序が働いて帯状になるのではないかと考えている。Mash1 の有郭乳頭における発現については現在解析を進めており、早い段階では有郭乳頭上部に強く発現するが、分化が進むと溝の部分に発現が移行することが明らかになっている。

以上の結果から、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・識見を有しているものと認め、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。