

# 論 文 要 旨

## Type II/III cell composition and NCAM expression in taste buds

(味蕾におけるⅡ型・Ⅲ型の細胞構成およびNCAMの発現)

小柳 江梨子

### 【序論および目的】

味覚は食行動を調節する情報として重要で、一般に、甘味・うま味・適度な塩味はエネルギーや恒常性維持に必要な栄養素を、苦味・酸味は有害物を意味している。味覚の末梢感覚器である味蕾は、50~100個の味細胞で構成され、舌の茸状乳頭(fungiform papillae: FF)・葉状乳頭(foliate papillae: FL)・有郭乳頭(circumvallate papillae: CV)、および、軟口蓋(soft palate: SP)に分布している。味細胞は上皮幹細胞から常に新しく生み出され、およそ10~14日の周期でターンオーバーしているが、味覚を正常に保つために味蕾の恒常性が維持されなければならない。

味細胞は、電子顕微鏡で観察される形態的特徴に基づいてⅠ型・Ⅱ型・Ⅲ型に分類され、味蕾内に最も多いのはⅠ型で、次いでⅡ型が多く、Ⅲ型は最も少ないとされてきた。その後、甘味/うま味/苦味を受容する細胞がⅡ型、酸味を受容する細胞がⅢ型に含まれていること、また、Ⅱ型とⅢ型の一部は忌避性の高濃度塩味の検出にも関与することが明らかにされた。一方、Ⅰ型の大部分はグリア様細胞であるが、近年、その一部は嗜好性の低濃度塩味を受容することが報告された。また、Ⅲ型細胞はⅡ型細胞からの入力を受けて間接的に甘味/うま味/苦味にも応答すると考えられていたが、Ⅲ型細胞の約半数は、これらの味質に直接応答することが示された。このように、味細胞の多様な機能の解明が進んでおり、その解析に用いる分子マーカーの重要性が高まっている。また、各分子マーカーの発現の重なり/分離のパターンの詳細な解析は、味細胞の分化や細胞系譜の解明に繋がると期待できる。

現在、Ⅲ型細胞マーカーとして様々な分子が用いられている。その中で神経細胞接着因子(neural cell adhesion molecule: NCAM)は、Ⅲ型細胞で特異的に発現することが報告された最初の分子で、現在もⅢ型細胞マーカーとして多用されている。しかし、NCAMの発現パターンの解析は、その殆どがCVの味蕾で行われており、他の領域では十分に調べられていない。さらに、我々の先行研究の結果から、Ⅱ型細胞でもその分化の初期段階にNCAMが一過性に発現することが示唆されていた。そこで本研究では、味蕾のホールマウント免疫染色を行って、FF・CV・SPの味蕾におけるNCAMの発現を詳細に解析した。

### 【材料および方法】

C57BL/6J マウス(9~20週齢)の舌と軟口蓋を摘出後、味蕾をホールマウントで解析するために酵素処理を行って上皮を剥離し、FF・CV・SP領域を切り出した。これを用いて、まず、Ⅱ型細胞において甘味・うま味・苦味の細胞内情報伝達を担う3型イノシトール三リン酸受容体(inositol triphosphate receptor type 3: IP3R3)と、Ⅲ型細胞において酸の酸味を受容に必須の4型炭酸脱水酵素(carbonic anhydrase type 4: CA4)に対する二重免疫染色を行って、これらの分子の細胞型マーカーとしての信頼性を検証するとともに、各味蕾におけるⅡ型・Ⅲ型の細胞構成を解析した。次に、これらのマーカーにNCAMを加えて三重染色を行い、NCAMを発現する細胞型を解析した。染色後、共焦点レーザー顕微鏡(Leica TCS SP8)で、上皮に含まれる味蕾を1つずつ基底部から味孔方向にZ-stack撮影した。三次元画像の構築にはImaris 3D Imageを用いた。細胞の計数にはFiji/ImageJのcell counterを用い、染色された細胞の形態と核染を確認しながら行った。統計解析にはIBM SPSS Statistics 26およびフリーソフトウェアRを用いた。有意差の有無の検定について、パラメトリックデータではone-way ANOVAおよびpost hoc Bonferroni testを、ノンパラメトリックデータではMann-Whitney U testをそれぞれ用いた。統計的に有意なレベルは $p < 0.05$ とした。

## 【結果】

IP3R3 と CA4 の発現が、解析した全ての味蕾 (SP : 233 個、FF : 123 個、CV : 281 個) で重ならず完全に分離することから、IP3R3 と CA4 はそれぞれ II 型および III 型細胞の特異的マーカーであると確認された。味蕾 1 個あたりの IP3R3(+) 細胞数の平均 (±標準偏差) は多い順に SP ( $22.5 \pm 7.3$ ) > FF ( $12.5 \pm 3.6$ ) > CV ( $10.0 \pm 3.6$ )、CA4(+) 細胞数は CV ( $5.9 \pm 2.3$ ) > SP ( $3.6 \pm 1.8$ ) > FF ( $1.7 \pm 1.1$ ) で、それぞれ FF・CV・SP の間で有意に異なっていた。個々の味蕾に含まれる II 型と III 型の細胞数の間には、CV で中程度の相関 (Pearson の相関係数  $r = 0.442$ ) があつたが、SP では相関は低く (0.279)、FF では有意な相関は見られなかった (-0.011)。

次に、三重免疫染色によって IP3R3・CA4 および III 型細胞マーカーとされている NCAM の発現を比較解析した。CA4(+) 細胞は全て NCAM(+) であつた。一方、NCAM(+) 細胞の大部分は CA4(+) で、CA4(-) の割合はそれぞれ CV 11.4% (90/791)、SP 22.2% (76/333)、FF 8.5% (9/106) であつた。NCAM(+) CA4(-) 細胞は、それぞれ CV 53.3% (65/122)、SP 60.0% (42/70)、FF 13.8% (8/58) の味蕾に存在し、味蕾 1 個当たりには CV 1~3 個、SP 1~4 個、FF 1~2 個含まれていた。また、それぞれの部位で、小さな味蕾から大きな味蕾に、偏りなく検出された。NCAM(+) CA4(-) 細胞は、CV において全て IP3R3(-) であつたが、SP と FF では IP3R3(+) の細胞、すなわち III 型細胞マーカーとされている NCAM と II 型細胞マーカーである IP3R3 を共発現する細胞が検出された。この NCAM(+) IP3R3(+) 細胞は、SP と FF の NCAM(+) CA4(-) 細胞のそれぞれ 83% (63/76)、67% (6/9) を占めていた。

この様に NCAM(+) CA4(-) 細胞の中には、III 型と II 型のマーカーを同時に発現する NCAM(+) IP3R3(+) 細胞が存在した。そのため、NCAM(+) CA4(-) 細胞を含む味蕾は、含まない味蕾と比較して、III 型あるいは II 型マーカーをそれぞれ単独で発現する細胞の数が少ないなど、細胞構成が異なる可能性がある。そこで、NCAM(+) CA4(-) 細胞を含まない味蕾群 (TB#1) と含む味蕾群 (TB#2) に分けて、個々の味蕾の CA4(+) 細胞、NCAM(+) 細胞、IP3R3(+) 細胞、IP3R3(+) NCAM(-) 細胞、そして IP3R3・CA4・NCAM で検出された細胞の総数を比較した。その結果、II 型マーカーを単独で発現する IP3R3(+) NCAM(-) 細胞と、III 型マーカーを単独で発現する CA4(+) 細胞の数には、TB#1 および TB#2 の間で差が検出されなかった。一方、NCAM(+) CA4(-) 細胞を含む残りの細胞群 [NCAM(+) 細胞、IP3R3(+) 細胞、マーカーで検出された細胞の総数] では、TB#1 よりも TB#2 で多い傾向がみられた。これは、味蕾内で NCAM(+) CA4(-) 細胞の存在は、付加的であり、II 型・III 型の細胞構成を変化させないことを示している。

## 【結論および考察】

個々の味蕾に含まれる II 型および III 型細胞の割合は、FF・CV・SP 各部位に特有の値をとると考えられてきた。しかし本研究で、II 型細胞と III 型細胞の数は味蕾ごとに大きくばらついており、特に FF や SP では両者の相関が極めて低いことが明らかになった。II 型細胞と III 型細胞の割合の多様性は、味蕾の幹細胞・前駆細胞の性質を反映していると考えられる。また、味蕾が、味細胞のターンオーバーによって細胞を更新する過程で、それぞれ一定の構造を保っているのではなく、その大きさと細胞構成をダイナミックに変化させている可能性を示しており、味覚機能の恒常性はその総和として維持されていると推測される。

一方、SP と FF における NCAM(+) IP3R3(+) 細胞の存在が明らかになり、NCAM は III 型細胞のマーカーとして適切でないことが示された。我々の先行研究で得られた「CV の味蕾 II 型細胞は、Mash1 (mammalian achaete-scute homolog 1) と NCAM を一過性に発現した細胞に由来する」という結果に基づけば、SP と FF に存在する NCAM(+) IP3R3(+) 細胞は後に II 型へ成熟分化すると推測される。しかし、機能的に成熟した細胞である可能性も否定できず、その性質を明らかにするには更なる研究が必要である。

( Cell and Tissue Research, 2021, IN PRESS )