

論 文 要 旨

Tamoxifen triggers a transcriptional switch from proliferation to differentiation in the circumvallate taste epithelium in mice

〔 タモキシフェンはマウスの有郭乳頭味蕾上皮の転写活性を
細胞増殖から細胞分化に転換する 〕

大浦 教仁

【序論及び目的】

味蕾は上皮由来の感覚器であり、周囲上皮と共通の幹細胞から継続的に細胞が供給され、恒常性が維持されている。味蕾に供給された細胞は、未分化な前駆細胞である味蕾基底細胞 (IV 型細胞) となり、その後、味受容機能を担う成熟細胞 (I・II・III 型細胞) へと分化する。機能を終えた成熟細胞は、細胞死によって除去される。

近年、RNA-seq 解析などの研究手法の進歩により、味蕾細胞のターンオーバーを制御する分子機構の解明が進んでいる。この中で、タモキシフェン (tamoxifen ; TAM) 投与により、マウス生体内で時期及び組織特異的に遺伝子組換えを誘導する Cre-loxP システムは、不可欠な研究ツールである。

一方で、TAM は、複数の臓器・組織において、細胞周期の抑制やミトコンドリア機能の低下などを引き起こすことが報告され始めている。しかし、味蕾及びその周囲上皮に対する TAM の直接的な影響については、ほとんど検討されていない。そのため、TAM 誘導型 Cre-loxP システムの実験結果が、遺伝子組換えによって生じたか、あるいは TAM 自体の作用であるかを厳密に区別することは困難であり、結果の解釈に混乱が生じる恐れがある。

そこで本研究では、TAM が味蕾及び周囲上皮に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、野生型マウスに TAM を単回投与し、味蕾細胞型マーカー発現、上皮細胞増殖、ならびに味蕾への細胞供給への影響を解析するとともに、遺伝子発現変化を網羅的に解析した。

【材料及び方法】

実験動物及び TAM 投与

TAM はエストロゲン受容体に作用するので、性周期の影響を避けるため、C57BL/6J 系統の雄マウスを用いた。TAM は、1~5 mg/20 g (体重) で腹腔内に単回投与した。TAM の影響は投与後 22 時間で解析した。

qPCR による味蕾細胞型マーカー発現解析

有郭乳頭上皮を剥離採取し、味蕾成熟細胞マーカー (I 型: *Entpd2*、II 型: *Tas1r3*、III 型: *Pkd2l1*) 及び未分化基底細胞マーカー (IV 型: *Shh*) の遺伝子発現量を、qPCR により測定した。

ホールマウント免疫染色による組織学的解析

有郭乳頭上皮のホールマウント免疫染色を行った。味蕾細胞の検出には以下の細胞型マーカーを用いた。II 型: IP3R3 と POU2F3、III 型: CA4、IV 型: SHH、I~III 型: KCNQ1、I~IV 型: PROX1。

EdU 標識による細胞動態解析

細胞動態解析として、TAM 投与後 22 時間に細胞周期 S 期の細胞を標識する 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) を投与した。上皮細胞の増殖への影響は EdU 投与 2 時間後に、また味蕾及び周囲上皮への細胞供給への影響は EdU 投与後 48 時間に、それぞれ EdU 陽性細胞数の定量を行って評価した。

統計解析

組織解析データには、t 検定と一元配置分散分析 (ANOVA、事後検定 Bonferroni 法) を用いた。

RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析

TAM 誘導型 Cre-loxP システムで一般的に用いられる TAM 3 mg/20 g (体重) を投与したマウス群と、対照群を用

いて RNA-seq 解析を行い、全遺伝子の発現変化を解析した。差次的遺伝子発現解析は DESeq2、特定の生物学的機能カテゴリーに属する遺伝子群の発現変化を GSEA 及び GO 解析で評価した。

【結果と考察】

1. TAM は味蕾細胞型マーカーの遺伝子発現に影響を及ぼす

結果：TAM 投与後 22 時間の qPCR 解析では、I・II・III 型すべての成熟細胞型マーカーの発現は TAM 用量依存的に上昇し、5 mg 投与群では対照群に比べて 1.4 倍以上に増加していた。一方、IV 型細胞マーカーの発現は低下し、5 mg 投与群では対照群の約 0.6 倍であった。対照群及び 5 mg 投与群のホールマウント免疫染色では、II 型細胞 (IP3R3) と III 型細胞 (CA4) のシグナルは互いに重ならず、異常は観察されなかった。さらに、II 型細胞数は、5 mg 投与群でも有意な増加は認められなかった。一方、IV 型細胞 (SHH) の数は、明らかに減少していた。

考察：qPCR で検出された成熟細胞型マーカーの発現上昇は、細胞数の増加ではなく、主として成熟細胞における転写活性の亢進を反映している可能性が示された。一方、発現が減少した SHH は、味蕾周囲上皮の増殖を促す分泌性の増殖因子であり、味蕾への細胞供給の維持に重要である。そのため、SHH の減少は周囲上皮の増殖を低下させる可能性がある。

2. TAM は味蕾と周囲上皮への細胞供給を抑制する

結果：TAM 投与後の周囲上皮の増殖能を評価するため、TAM 投与後 22 時間に EdU を投与し、2 時間後に EdU 陽性細胞数を定量した。その結果、EdU 陽性細胞数に有意な変化は認められず、この時点で、上皮細胞増殖能に明らかな影響は検出されなかった。さらに、EdU 投与 48 時間後に解析したところ、味蕾内の EdU 陽性細胞数は TAM 用量依存的に減少し、5 mg 投与群では対照群の 6%未満に低下していた。また、味蕾周囲上皮においても EdU 陽性細胞数の顕著な減少が認められた。

考察：TAM 投与後 22 時間では上皮細胞増殖能に明らかな変化は生じないが、その後の細胞周期進行の遅延や停止、G0 期への移行、あるいは生存に影響し、味蕾及び周囲上皮への細胞供給が減少した可能性を示唆している。

3. TAM は細胞周期を抑制し、分化を促進する方向に転写活性を転換する

結果：TAM の遺伝子発現への影響を網羅的に評価するため、一般的な投与量 3 mg 群と対照群で Bulk RNA-seq 解析を行った。GSEA 解析の結果、味覚情報伝達系遺伝子群の発現上昇が検出された。一方、GO 解析では、DNA 複製、ミスマッチ修復、ミトコンドリア ATP 合成など、細胞周期及びエネルギー代謝に関わる遺伝子群の有意な低下が認められた。また、上皮細胞分化及び神経関連経路の遺伝子群は有意に上昇していた。さらに、発現変動が大きい転写因子を検索したところ、細胞周期進行に重要な *Foxm1* の低下と、上皮細胞分化を促進する AP-1 複合体に属する *Fos* 及び *Fosb* の上昇が確認された。

考察：これらの結果は、TAM が味蕾及び周囲上皮において、細胞周期抑制と分化促進を同時に進行する転写活性の転換を誘導することを示している。また、その制御因子の候補として *Foxm1* と AP-1 が示された。

【結論】

本研究により、TAM は投与後 22 時間で、味蕾及び周囲上皮において、増殖抑制と分化促進を伴う転写活性の大きな転換を誘導することが明らかとなった。味蕾成熟細胞マーカーや味覚情報伝達系遺伝子群の発現上昇は機能的成熟を示唆する一方、SHH 陽性 IV 型細胞の減少と細胞周期・ミトコンドリア機能関連遺伝子群の抑制は、新規味蕾細胞供給の低下に対応すると考えられる。さらに、細胞周期進行に重要な *Foxm1* の低下と、上皮分化を促進する AP-1 転写因子群の活性化は、TAM が有郭乳頭上皮において増殖から分化への転写活性の転換を直接誘導し得る分子基盤を示唆している。TAM の影響は、Cre-loxP システムで一般的な投与量 3 mg でも顕著に観察されており、TAM は遺伝子組換え誘導に用いているが、味蕾の恒常性を改変し得る生理活性物質であると位置付けられる。

本研究は、味蕾研究において TAM を用いる際に TAM 自体の直接作用を考慮する必要性を示すとともに、*Foxm1* と AP-1 を中心とした味蕾維持機構の新たな制御ネットワークの重要性を提示する。