

# 論 文 要 旨

## ***Prox1* maintains taste bud structure via inhibition of apoptosis**

〔 *Prox1* はアポトーシスを抑制して味蕾の構造を維持する 〕

萩元 綾

### 【序論及び目的】

味覚の末梢感覚器である味蕾は、舌の茸状乳頭 (Fungiform papillae: FF)・有郭乳頭 (Circumvallate papillae: CV)・葉状乳頭 (Foliate papillae: FL)、および軟口蓋 (Soft palate: SP) に分布する。味蕾は 50~100 個の細胞で構成され、ターンオーバーしながら構造と機能を維持している。味蕾幹細胞は、*Keratin5* を発現する上皮基底部に存在し、味蕾とその周囲上皮の両方に細胞を供給する。味蕾には最終分裂を終えた細胞が供給されて、味蕾基底細胞 (IV 型細胞) となり、細胞増殖・分化を制御する分泌性因子 Sonic hedgehog (*Shh*) を発現する。*Shh*(+)細胞は成熟細胞 (I・II・III型) へ分化し、*Shh* の発現は消失する。寿命を迎えた味蕾細胞はアポトーシスにより除去される。

ホメオボックス型転写因子 *PROX1* は、味蕾内の全ての細胞で発現する唯一の転写因子である。味蕾細胞の分化過程において、*Prox1* は、味蕾基底細胞で *Shh* と同時に発現を開始する。*Shh* の発現は味蕾細胞の分化とともに消失するが、*Prox1* は味蕾細胞の寿命を通じて発現し続ける。この発現パターンから、*Prox1* は味蕾の維持において重要な役割を果たすと推測される。*Prox1* は、発生過程において、リンパ系・神経系・肝臓・膵臓など、様々な組織や臓器の形成に重要な役割を果たす。また、成体では、腸管幹細胞ニッチの維持や肝再生の促進のほか、腫瘍の形成に関与する。しかし、味蕾における *Prox1* の機能は未だ解明されていない。そこで、本研究では、*Prox1* ノックアウトが味蕾に及ぼす影響を解析し、味蕾における *Prox1* の機能の解明を試みた。

### 【材料及び方法】

*Prox1* 遺伝子を全身でノックアウトすると胎生致死となるため、*Keratin5*(+)細胞由来の細胞で選択的にノックアウトされるマウス (*Keratin5-Cre;Prox1<sup>fl/fl</sup>* マウス：以下、*Prox1* cKO マウス) を作製し、*K5-Cre;Prox1<sup>fl/+</sup>* マウス、*K5-Cre;Prox1<sup>+/+</sup>* マウス、野生型マウス (C57BL/6J) と比較解析した。

組織解析は、凍結切片に加えて、味蕾を周囲上皮と共に立体的に観察できるホールマウントを用いて免疫染色を行った。ホールマウント標本は、酵素処理により上皮を剥離して作製し、免疫染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡 SP8 で Z-stack 画像を取得し、画像解析ソフト Imaris で三次元画像を構築して解析した。統計解析には、KaleidaGraph ver 5.0.6 および R ver4.5.0 を用いた。統計的有意性は、Chi-squared test、Student's *t*-test、ANOVA (post hoc: Tukey's HSD test) を用いて評価した ( $\alpha = 0.05$ )。

### 【結果】

*Prox1* cKO マウスでは、*PROX1* の発現は消失し、味蕾は野生型より小さくなっていた。しかし、SP, FF, CV いずれの部位でも、味蕾の数と分布は野生型と変わらなかった。ホールマウント免疫染色により解析したところ、*Prox1* cKO マウスの味蕾には I・II・III型全ての細胞型が分化していたが、その全てに減少傾向が認められた。個々の味蕾に含まれる II・III型細胞数を解析したところ、*Prox1* cKO マウスでは II・III 型細胞とも野生型より有意に減少していた。I 型細胞は複雑な形態をしており、個々の細胞の同定が困難であるため定量はできなかった。画像解析ソフト Cellpose を用いて、CV の味蕾に含まれる細胞数を解析したところ、*Prox1* cKO マウスでは野生型の約半分に減少していた。成熟細胞が顕著に減少する一方で、未分化な味蕾前駆細胞である SHH(+)細胞の数には、野生型と比較して明らかな減少はみられなかった。

味蕾の三次元画像解析の過程で、*Prox1* cKO マウスの味蕾内の味孔側上部に、暗所として観察される卵円形の領域を発見した。この領域は、細胞型マーカーの免疫染色、核染色のいずれのシグナルも検出されず、非特異的なバックグラウンドシグナルも極めて低レベルであるために暗所として観察された。このような領域は、これまで

に報告がなく、新たに Dark void と命名した。Dark void は、近年新たに報告された細胞死の様式であるエレボース (暗黒の細胞死) や空胞変性で観察される組織像に類似していた。野生型マウスの味蕾を精査したところ、小型の Dark void が認められたが、その大きさと出現頻度は *Prox1* cKO マウスに比べて著しく小さかった。

*Prox1* cKO マウスで観察された味蕾細胞の減少は、味蕾のターンオーバーに異常が生じている可能性を示唆している。そこで、EdU (50 mg/kg 体重) をマウスに腹腔内投与し、細胞増殖能と味蕾細胞の寿命を解析した。まず、味蕾に細胞を供給する味蕾周囲上皮の増殖能を解析するため、EdU 投与後 2 時間で CV 上皮を回収し、ホールマウント免疫染色を行って、上皮に含まれる EdU(+)細胞数をカウントした。*Prox1* cKO マウスと野生型マウスの EdU(+)細胞数に有意差はなく、細胞増殖能に変化はないことが示された。

次に、味蕾細胞の寿命を比較するため、EdU 投与後 4, 8, 12, 16, 20, 28 日に CV 上皮を回収し解析した。味蕾に含まれる EdU(+)細胞数の平均値を算出し、経時変化をグラフ化したところ、野生型マウスでは、投与後 4~12 日は一定で、12 日以降に減少した。これは、1 回の EdU 投与で標識されて味蕾に入る細胞は 4 日までに全て味蕾に入り、12 日まで死なずに味蕾に留まり、その後、細胞死を迎えることを示していると考えられる。そのため、投与後 4 日の EdU(+)細胞数は、味蕾への細胞供給量の指標となる。野生型マウスと *Prox1* cKO マウスの投与後 4 日の EdU(+)細胞数に有意差はなかったが、*Prox1* cKO マウスの方がやや多い傾向であった。野生型マウスについて、EdU(+)細胞数の減少が開始した投与後 12 日を起点として、減衰曲線 ( $y = m1 \times e^{-m2x}$ ,  $m1: x = 0$  における推定初期値,  $m2$ : 減衰定数) を適用し、12 日以降の平均寿命を算出した。この値に、細胞が味蕾内に留まっていた投与後 4~12 日の 8 日間を加えると、味蕾細胞の平均寿命は、17.6 日と推定された。

一方、*Prox1* cKO マウスでは、EdU(+)細胞は投与後 4 日から減少し、投与後 12 日を境に二相性の減衰を示した。この減少パターンは、EdU 投与後 4~12 日と 12 日以降のそれぞれに減衰曲線を適用して近似することで、味蕾に入った後 12 日までに死ぬ細胞集団と、この期間を生き延びる細胞集団の 2 つを想定した単純なモデルによる説明が可能であった。このモデルに基づいて味蕾細胞の寿命を推定したところ、早く死ぬ細胞集団は 2.6 日、長く生きる細胞集団は 14.0 日となり、いずれも野生型と比較して寿命が短縮していた。

細胞死を解析するため、CV のホールマウント免疫染色を行い、アポトーシスマーカー Cleaved caspase-3 (CC3) を検出した。細胞の形態を示す CC3 シグナルは少なく、多くは断片化していたため、細胞数として定量するのは困難であった。そこで、Imaris の Surface ツールを用いて CC3 シグナルおよび NTPD2 シグナル (味蕾のマーカー) の体積をそれぞれ算出し、NTPD2 の体積に占める CC3 の体積の割合 (%) を比較した。その結果、*Prox1* cKO マウスの味蕾内の CC3 シグナルは野生型の約 2 倍に増加しており、細胞死が増加していることが明らかになった。

### 【結論及び考察】

味蕾において *Prox* 遺伝子をノックアウトすると、アポトーシスが增加し、味蕾細胞の寿命が短縮して、成熟した味蕾細胞が減少した。これらの結果は、*Prox1* がアポトーシスを抑制し細胞寿命を延長することで、味受容機能を担う成熟細胞数を一定に保っていることを示している。そのため、*Prox1* は、味蕾の構造的恒常性を保つことで、味覚感受性の維持に不可欠な役割を果たしていると考えられる。

*Prox1* 遺伝子ノックアウトは味蕾内の構造変化を引き起こし、従来の報告にはない Dark void が検出された。Dark void は、アポトーシス増加と細胞寿命の短縮に伴って形成されること、味蕾内で細胞死が生じる部位とされる味蕾上部に形成されること、エレボースや空胞変性に類似した組織像であることから、細胞死に関連する現象である可能性が高い。さらに、野生型マウスの味蕾でも低頻度で小さな Dark void が検出されたため、Dark void は、味蕾のターンオーバーにおける細胞死と細胞の除去機構の理解に新たな視座を提供する重要な知見であると考えられる。詳細な内部構造や細胞死様式の特定には、電子顕微鏡解析や免疫組織化学的検討が必要である。また、*Prox1* はアポトーシスに加えてフェロトーシスを抑制する機能があると報告されている。*Prox1* は、味蕾においてこれまでに報告のないフェロトーシスを含む複数の細胞死経路を制御する可能性がある。今後、single cell RNA-seq 解析を含む網羅的解析を行い、*Prox1* が味蕾における細胞死抑制に関与する分子カスケードを明らかにする必要がある。( Cell and Tissue Research, 2025, IN PRESS )