

氏名（本籍） <sup>ほん だ こうたろう</sup> 本田 耕太郎（東京都）  
学位の種類 博士（工学）  
学位記番号 甲第 919 号  
学位授与の日付 平成 28 年 9 月 30 日  
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
学位論文題目 **Studies on the nerve-dependent morphogenesis  
of mouse lingual papillae and taste buds**  
(マウス舌乳頭および味蕾形態発生の神経依  
存性に関する研究)

論文審査委員 (主査) 教授 友岡 康弘  
教授 西山 千春 教授 村上 康文  
教授 古市 貞一 教授 和田 直之  
日本女子大学大学院 理学研究科 教授 宮本 武典

## 論文内容の要旨

### 概略紹介

味蕾は味物質を受容する特殊感覚器官で、脊椎動物の摂食行動に欠かすことができない器官である。脊椎動物の生息場所や食生活と味蕾出現パターンおよび総数には進化的な関連性があり、特に哺乳類の味蕾は咽喉や口蓋、舌に存在する。舌表面は「舌乳頭」と呼ばれる特殊上皮構造により覆われており、外胚葉由来である舌前部(舌体)は糸状乳頭と茸状乳頭、内胚葉由来である舌後部(舌根)は有郭乳頭と葉状乳頭を有する。このうち糸状乳頭を除いた 3 種の乳頭は味蕾を保持している。味蕾は約 100 個の紡錘型細胞の集合体で、組織学的にはエオシンに難染色性(エオシン嫌性)を示す上皮細胞として観察できる。また味蕾は脳神経(味神経)によって神経支配を受けている。味蕾は味神経切断により約 10 日で消滅するため、味蕾維持は味神経支配依存的である。また味蕾を有する茸状、有郭乳頭も味神経支配の影響下で形態形成することが知られている。マウスにおいて、胎生 12.5 日目の舌上皮における舌乳頭原基マーカー Shh や Sox2 の発現パターンは味神経支配非依存的に決定することから、茸状乳頭と有郭乳頭の前基形成過程は上皮-上皮または上皮-間質相互作用によると考えられている。しかしこの時

期以降の乳頭形成は味神経支配の影響を受け進行する。また味神経支配を失わせたトランスジェニックマウスの解析結果によると、味蕾初期発生に限っては味神経支配非依存的な現象であることが示唆されている。

舌乳頭・味蕾発生メカニズムは舌上皮・間質・味神経の相互作用から成る複雑なプロセスを経ているが、これを生体内で解析することは困難である。そこで味神経支配を容易に除去できる舌器官培養がしばしば用いられてきた。しかし現在までの舌器官培養法は、2、3日間の短期培養が主であり、また味蕾を誘導できる舌器官培養法も存在しなかった。そこで本研究では舌を比較的長期培養し、味蕾を誘導可能な器官培養法の構築を目指した。

## 第1章 腎臓被膜下移植法による舌発生解析

神経支配非依存的な舌乳頭および味蕾形態形成を解析するために、舌発生過程を再現できる培養系構築を目指した。腎臓被膜下移植法は、血液供給量が豊富である特徴から異所的な器官培養法として用いられる手法である。胎生 15.5 日マウスから舌前部および舌後部の一部を切り出し、腎臓被膜下移植後 7 日間の後に舌発生を形態学的に解析した。舌前部の移植サンプルでは、舌上皮の大部分を占める糸状乳頭形態形成が進行しており、特徴的な基底層や角質化した突起を有していた。しかし茸状乳頭は形成されず、多層上皮内に味蕾形態は観察されなかった。舌後部の移植サンプルでは、本来中心部にひとつ存在する有郭乳頭が消失し、少数のサンプルでのみ縮退した有郭乳頭先端上皮が存在し、乳頭内部(上皮直下)には筋肉が形成されていた。神経細胞の舌発生に対する影響を解析するために、同様の胎生 15.5 日マウスより後根神経節(DRG)を採取し、舌後部と DRG を近接させたサンプルを腎臓被膜下へ移植した。7 日後にサンプルを回収し組織学的に解析すると、有郭乳頭溝の伸長が進行し、有郭乳頭内は結合組織に満たされていた。しかし培養後の有郭乳頭は味蕾を有していなかった。この結果から、胎生 15.5 日以降の糸状乳頭形成は神経非依存的に進行するが、有郭乳頭形成は神経由来液性因子依存的に進行すると示唆された。

## 第2章 *in vitro* 培養系による舌発生解析

第1章によって、舌発生に対する神経細胞の影響を培養系で解析可能であることが示された。より簡便に実験操作が可能な *in vitro* 培養法を構築し、さらなる解析を目指した。栄養供給性と組織形態安定性を考慮して、低融点アガロースゲル用いた舌包埋培養および静置培養を行ったが、舌上皮層剥離が見られたため培養法として不適で

あった。さらに栄養供給性を高めるために、歯胚再構成のために開発された器官原基法を用いてマウス胎仔舌発生を解析した。胎生 16.5 日胎仔マウスより舌前部および舌後部を採取し、培地として 10%ウシ胎児血清含有 DMEM(10%FBS 培地)を用いて培養した。その結果、腎臓被膜下移植と同様に、舌前部における糸状乳頭形成および有郭乳頭縮退が観察された。舌発生に対する神経細胞の影響を調べるために、胎生 16.5 日胎仔マウスの DRG を用いて胎仔舌と DRG の共培養を行ったところ、有郭乳頭形態形成の進行が観察された。しかし味蕾形態形成は見られなかった。細胞増殖促進因子および神経栄養因子を培地に添加し舌後部を単培養したが、有郭乳頭形成は見られなかった。この結果から、有郭乳頭形成は単純な細胞増殖によって進行せず、神経細胞由来液性因子が必要である可能性が示唆された。また舌器官培養における味蕾誘導には培養法のさらなる改良が不可欠であることが示唆された。

### 第 3 章 GSK3 $\beta$ 阻害剤 CHIR99021 を用いた舌発生解析

味蕾を有する舌乳頭上皮細胞は Wnt レセプターを有している。また成体マウス味蕾周辺の多層上皮層基底細胞において、味神経支配依存的な  $\beta$ -catenin 核局在が報告されている。Wnt シグナルと味蕾形態形成の関係を解析するために、 $\beta$ -catenin 分解を誘導する特異的リン酸化酵素である GSK3 $\beta$  に対する強力な阻害作用を持つ薬剤 CHIR99021 を舌器官培養に使用し、味神経支配非依存的な Wnt シグナル活性化が舌発生に及ぼす影響を解析した。

CHIR99021 を添加した 10%FBS 培地を使用して胎生 16.5 日舌前部を器官培養すると、糸状乳頭および茸状乳頭は消失し、多層上皮層の一部がエオシン嫌性な単層紡錘形上皮層へ形態変化していた。エオシン嫌性上皮細胞の性質を解析するために、成体舌上皮において味蕾マーカーとして用いられる CK8 と Sox2 の発現を免疫染色で調べたところ、エオシン嫌性上皮細胞が存在する領域に限り CK8 と Sox2 の両発現が見られ、一部のエオシン好性上皮細胞で Sox2 の発現が見られた。さらに多層上皮細胞マーカーである CK14 の発現を調べると、エオシン嫌性な細胞集団は CK14 陰性かつ Sox2 陽性であった。これらの結果から CHIR99021 の影響により味蕾が誘導されたと考えられた。また意外にも有郭乳頭周辺の、本来味蕾が存在し得ない多層上皮層にエオシン嫌性な紡錘型上皮細胞が見られた。これについて CK8、Sox2、CK14 の発現を調べると、エオシン嫌性な細胞集団が味蕾である可能性が示された。CHIR99021 による Wnt シグナル活性化状態を明らかにするために  $\beta$ -catenin の発現を解析すると、エオシン嫌性細胞であり、かつ CK14 陰性な細胞の一部に強い核内局在が見られた。さらにエオシン

嫌性細胞であり、かつ CK14 陽性でもある細胞の一部でも核内局在が見られた。これらの結果は、味蕾発生の際に引き起こされる CK14 から CK8 への細胞骨格変化は  $\beta$ -catenin の核局在と関連していることを示唆していた。

## 総括

本研究ではマウス胎仔舌乳頭および味蕾形態形成の神経依存性について解明するために、①除神経 ②DRG 由来液性因子 ③Wnt シグナル活性化 以上 3 つが舌発生に与える影響を解析した。その結果、①糸状乳頭は神経非依存的に形態形成する ②DRG 由来液性因子により有郭乳頭形態形成が進行する ③Wnt シグナル活性化は不特定の舌多層上皮を味蕾へ誘導する 以上 3 つの結果が示された。

舌乳頭および味蕾を支配する脳神経は脳と末梢を連絡する神経節を介している。発生学的にはこれら味覚性神経節は神経堤由来細胞と外胚葉性上鰓プラコード由来細胞の混合からなるが、DRG は神経堤由来細胞のみからなる。また味蕾を神経支配する神経突起は上鰓プラコード由来ニューロンであるとされ、神経堤由来細胞は神経節内の衛星細胞やシュワン細胞、非味覚性上皮の神経支配を担うと考えられている。本研究結果は、有郭乳頭の形態形成を誘導する液性因子は神経堤由来細胞が分泌する因子であることを示唆している。

舌器官培養において、CHIR99021 を用いた Wnt シグナル活性化が味蕾形成を誘導した。この結果は生体舌における神経支配依存的な Wnt シグナル活性化がマウス味蕾形成を制御していることを示唆した。また限られた少数の細胞でのみ  $\beta$ -catenin 核局在が観察されたことから、味蕾を構成する約 100 個の味細胞の発生が、同時多発的な細胞分化によるものではなく、ひとつずつ連続的に分化誘導されていると推測できる。本研究で開発した舌器官培養法により、さらに詳細に味蕾発生メカニズムを解析できると考える。

## 論文審査の結果の要旨

味蕾は味物質を受容する感覚器官で、摂食行動に欠かすことができない器官である。舌表面に糸状乳頭、茸状乳頭、有郭乳頭、葉状乳頭と呼ばれる構造が形成され、後三者に味蕾が形成される。味蕾は約 100 個のエオシン嫌性の上皮細胞からなる。茸状乳頭、有郭乳頭と共に味蕾の形態形成は神経支配を受けている。本研究では、神経支配を受けない器官培養系を確立し、その神経支配のメカニズム解析を目指した。

第一章では、神経支配非依存的な腎臓被膜下移植法を用いて、舌発生過程の再現を試みた。胎生 15.5 日マウスの舌前部と後部を成体マウスの腎臓皮下に移植し、7 日後に解析した。組織学的解析結果、舌前部において糸状乳頭形成は確認されたが、茸状乳頭は形成されず味蕾も形成されなかった。舌後部に老いては、発生途上であった有郭乳頭は消失又は縮退しており、味蕾形成は認められなかった。神経細胞の影響を解析するために、胎仔後根神経節 (DRG) を舌組織に隣接させて腎臓被膜下移植した。その結果、有郭乳頭形成に改善は認められたが味蕾形成は起こらなかった。以上の結果から、糸状乳頭形成は神経非依存的に進行するが、有郭乳頭形成は神経由来液性因子依存的に進行することが示唆された。

第二章においては、歯胚再構成のために開発された器官原基培養法を用いてマウス胎仔舌発生を解析した。胎仔より舌前部および舌後部を採取し、10%ウシ胎児血清含有 DMEM/F12 を用いて培養した。その結果、腎臓被膜下移植と同様に、糸状乳頭形成と有郭乳頭縮退が観察された。さらに胎仔 DRG を用いて共培養を行ったところ、有郭乳頭形態形成の進行が観察された。しかし味蕾形態形成は起こらなかった。

第三章においては、味神経支配非依存的な Wnt シグナル活性化が舌発生に及ぼす影響を解析した。味蕾を有する舌乳頭上皮細胞は Wnt レセプターを有している。また成体マウス味蕾周辺の多層上皮の基底細胞において、味神経支配依存的な  $\beta$ -catenin 核局在が報告されている。そこで  $\beta$ -catenin 分解を誘導する特異的リン酸化酵素である GSK3b に対する強力な阻害作用を持つ薬剤 CHIR99021 を舌器官培養に使用した。

CHIR99021 を添加して胎生 16.5 日舌前部を器官培養すると、糸状乳頭および茸状乳頭は消失し、多層上皮層の一部がエオシン嫌性な紡錘形へ形態変化していた。成体舌味蕾マーカー CK8 と Sox2 の発現を免疫染色で調べたところ、エオシン嫌性上皮細胞が存在する領域に限り CK8 と Sox2 の両発現が見られ、一部のエオシン好性上皮細胞で Sox2 の発現が見られた。さらに多層上皮細胞マーカー CK14 の発現を調べると、エオシン嫌性な細胞集団は CK14 陰性かつ Sox2 陽性であった。これらの結果から CHIR99021 の影響により味蕾が誘導されたと考えられた。

また意外にも有郭乳頭周辺の、本来味蕾が存在し得ない多層上皮層にエオシン嫌性な紡錘型上皮細胞が見られた。同様に解析すると、エオシン嫌性な細胞集団が味蕾である可能性が示された。CHIR99021 による Wnt シグナル活性化状態を明らかにするために  $\beta$ -catenin の発現を解析すると、エオシン嫌性細胞で、かつ CK14 陰性な細胞の一部に強い核内局在が見られた。さらにエオシン嫌性細胞で、かつ CK14 陽性でもある細胞の一部でも核内局在が見られた。これらの結果は、味蕾発生の際に引き起こされる CK14 から CK8 への細胞骨格変化は  $\beta$ -catenin の核局在と関連していることを示唆していた。

本研究ではマウス胎仔舌乳頭および味蕾形態形成において、①糸状乳頭は神経非依存的に形態形成する ②DRG 由来液性因子により有郭乳頭形態形成が進行する ③Wnt シグナル活性化は不特定の舌多層上皮を味蕾へ誘導する、以上 3 つの結果が示された。これらの研究結果は、舌乳頭・味蕾の発生研究を促進させ、特にその神経支配メカニズム解析に貢献し、独創性の高い研究であり、博士 (工学) にふさわしいと判断される。