

総説特集 うま味研究会 公開シンポジウム

「うま味と脳：うま味が脳を育てる」-2

うま味感受性細胞作出の試み

岩槻 健

(東京農大 応用生物科学部・食品安全健康学科)

和食がユネスコの世界無形文化遺産に認定されるなど、食生活におけるうま味の重要性は世界に認識されつつある。和食の土台を支える味質であるうま味を、体の中で最初に検出するのはうま味受容体を有する味細胞である。これまで、*in vitro*にて味細胞を研究するための培養系の開発が試みられていたが、他の内胚葉由来の細胞培養が困難であったように、味細胞の培養系は確立することが困難であった。その結果、生体内と同様の性質を持つ味細胞培養系は存在しなかった。最近になり、我々は先行していた消化管幹細胞研究を参考に味幹細胞を同定し、続いて味幹細胞の三次元培養系を確立した。本総説では、味幹細胞に関する我々の最近の研究成果を紹介し、うま味感受性細胞の作出と同細胞を用いたうま味研究の将来像について述べたい。

キーワード：うま味受容体、TIR1、味幹細胞、味蕾オルガノイド、マウス

【はじめに】

“うま味”とは5つある基本味（うま味、甘味、苦味、塩味、酸味）の一つであり、魚、肉、野菜など、ほとんどの食材に多く含まれている。これまで我々日本人は、出汁に含まれるうま味を利用し、素材の味をうまく引き出し美味しく健康的な和食を編み出してきた。現在、和食はユネスコの世界無形文化遺産に指定され益々注目されている。

うま味は、他の味質と同様に舌上皮に存在する味蕾の中の10~14日で再生を繰り返す味細胞によって感知される。新たに生じる細胞は常に味幹細胞から生じ、最終的に5基本味に反応する味細胞へ分化する。5基本味のうち、うま味、甘味、苦味受容体はGタンパク質共役型受容体（GPCR）で構成されていることが分かっている。塩味、酸味についてはチャンネルが受容体になっているとの報告があるが、その全容はまだ明らかになっていない。最近、うま味や甘味の受容システムが消化管にも存在する

ことが報告され、その一部は口腔内に存在する味覚受容システムと類似点が多いことが分かってきた。もともと、進化の過程で消化管から舌が派生し、もともと栄養素や毒物のセンサーであった細胞が味細胞に変化していったと考えれば、味細胞と消化管の栄養センサー細胞が似ているのはごく自然なことである。舌上皮が腸管から続く内胚葉由来の組織であることは、内胚葉のマーカーを用いた追跡実験などで最近明らかになっている。消化管に存在していた化学受容細胞が味細胞に変化した結果、口腔内に入ってくる栄養素（うま味、甘味物質）に対しては飲み込む判断を下し、逆に毒物や腐敗物を吐き出させるよう脳に伝令する番人の役目を果たしていると考えられる。

【味蕾幹細胞の探索】

これまで、*in vitro*における味細胞の研究は、消化管の内分泌細胞株を擬似味細胞とみなして行われて

Generation of umami detecting cells

Ken Iwatsuki : Department of Nutritional Science and Food Safety, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502 ; TEL : 03-5477-2654 ; FAX : 03-5477-2458 ; E-mail : 204886@nodai.ac.jp

岩槻 健

きたが、消化管の細胞であることや呈味物質に対する応答性など実際の味細胞とはほど遠いため、新しい味細胞培養系が求められていた。しかし、味細胞の培養は技術的に困難であり、成功例はこれまでになかった。その理由として、味幹細胞の存在場所とその性質についてほとんど情報がないことが挙げられる。つまり、10年ほど前まで我々は味幹細胞を分取することも、幹細胞がどのようなマーカーを持っているのかも分からない状態であった。

我々が味細胞の幹細胞探索で苦戦を強いられていた頃、オランダの Clevers らのグループは2007年に Wnt/ β -catenin シグナルにより発現が亢進する分子として Lgr5 (Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5) を同定し、Lgr5 こそが消化管幹細胞マーカーであると発表した¹⁾。現在でも Lgr5 は消化管幹細胞の最も信頼できるマーカーとなっている。その2年後、同グループは消化管のクリプト(陰窩)を取り出し、マトリジェルに埋め込み Wnt3a、R-Spondin、Noggin、EGF を添加することで増殖するクリプトや分化した上皮細胞が得られる事を明らかにした²⁾。この三次元幹細胞培養法(オルガノイド培養法)が確立されたことで、これまで困難であった消化管上皮細胞ほぼ全ての培養が可能になった。

消化管の幹細胞研究にしばらく遅れて、我々も Lgr5 を指標に味幹細胞の探索に乗り出した。味蕾周辺で Lgr5 陽性細胞を探したところ、有郭乳頭の下部溝(トレンチ)と味蕾の基底部に Lgr5 の強い発現を見出した³⁾。Lgr5 の発現量はトレンチ部分の方がより多く、味蕾基底部分の方が少なかった。系譜追跡実験の結果より、トレンチ部分の細胞が徐々に味蕾に入り味細胞マーカーを発現すること、Lgr5 陽性細胞は全ての系列の味細胞に分化する事から、トレンチに存在する Lgr5 陽性細胞が味蕾の真の幹細胞で、味蕾基底部に存在する細胞は前駆細胞である可能性が高い。

【味蕾幹細胞の培養】

次に、消化管の先行研究をもとに、味蕾幹細胞のオルガノイド培養を試みた。まず、FACS により Lgr5-EGFP マウスのトレンチ部分から EGFP 陽性細胞を分取し、消化管と同様にマトリジェルに埋め込みオルガノイド培養を試みた。その結果、約1ヶ月後には増殖・分化しつづける球状のオルガノイドが

形成された⁴⁾。驚くべきことに、EGFP 陽性細胞 1細胞を出発材料としても、全ての味細胞系列に分化するオルガノイドが形成された。分化した味細胞は、舌上皮に存在する味細胞と細胞の形が酷似している一方、消化管のどの細胞とも形態は異なっていた。同オルガノイドのもう一つの特徴は、消化管オルガノイドのようなクリプト様構造が出現しないため、管腔構造を形成しない(図-1)。我々は、この味幹細胞由来のオルガノイドを“味蕾オルガノイド”と呼び、消化管オルガノイドと区別している。

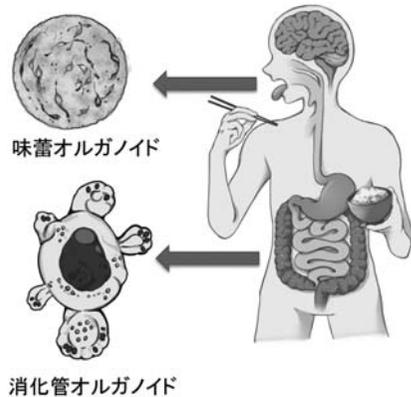


図1 味蕾オルガノイドと消化管オルガノイド

どちらも内胚葉由来のオルガノイドであるが、味蕾オルガノイドは球状構造を取り中は細胞で埋められている。一方、消化管オルガノイドは中空構造を形成し、クリプトが出芽するように増殖する。

【味蕾オルガノイドの分化における遺伝子発現解析】

味細胞は通常2週間で再生することが分かっているが、幹細胞からどのように成熟した味細胞が分化するかは全く分かっていない。そこで、Lgr5-EGFP マウスの味蕾周辺部より EGFP 陽性細胞を分取しオルガノイド培養を行い、培養開始から14日に到るまで2日おきに RNA を回収し、それらを次世代シーケンサーに供し転写産物を調べた(図-2)⁵⁾。味蕾オルガノイドで発現する遺伝子約1万4千個を k-means クラスタ解析(k=4~6)による分類では、培養を進めるに従い発現が亢進する遺伝子群を見出した。この遺伝子群には甘味受容体、うま味受容体、苦味受容体、Trpm5 など味覚に関わる遺伝子群として味細胞関連分子が多く含まれていた。また、これを裏付けるように免疫染色では、gustducin や CA4

うま味感受性細胞作出の試み

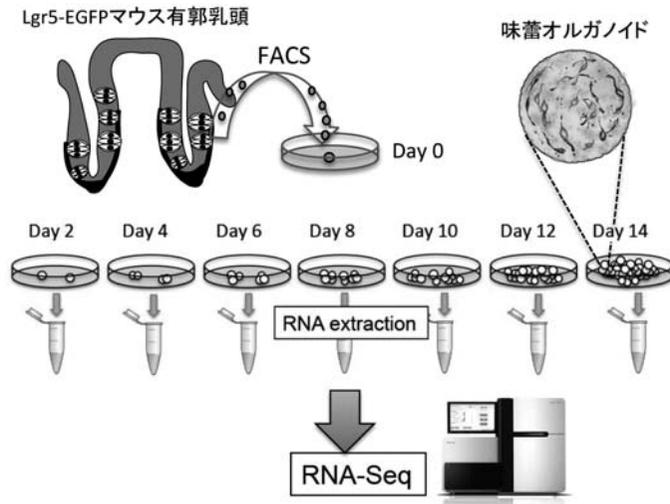


図2 味蕾オルガノイドを用いた味細胞分化メカニズムの解析

Lgr5-GFP マウス有郭乳頭より GFP 陽性細胞をセルソーターにより分取し、オルガノイド培養を開始する。14 日間にわたり 2 日おきにサンプリングし RNA を抽出しトランスクリプトーム解析を行う。このことにより、味幹細胞から成熟した味細胞になるまでの遺伝子発現の変化を追うことができる。

などの味細胞に選択的に発現する分子が培養 14 日目にかけて検出された。

以上のことから、味蕾オルガノイドは、味幹細胞から成熟した味細胞までほぼ全ての分化系列を含み、味細胞の発生・分化メカニズムを理解する上で理想的なモデルとなることが分かった。

【味蕾オルガノイドの味覚感受性】

味蕾オルガノイドは、味幹細胞と分化した味細胞を包含する細胞の集合体である事は明らかになった。次の疑問は、“味蕾オルガノイド内の味細胞は全ての味に反応するのであろうか?”ということである。我々はこれまでカルシウムアッセイ法により、作製した味蕾オルガノイドが甘味、苦味に反応することを報告している⁴⁾。うま味についても反応が得られることが確認されており、基本的に同オルガノイドはほとんどの味覚受容機構を備えていると考えられている。酸味、塩味受容についても解析が可能であると思われる。

【うま味感受性細胞の可視化】

味蕾オルガノイドには様々な呈味物質に反応する細胞が存在するが、将来的には特定の受容体を持った細胞に着目し、条件の違いによる応答性の変化や、

他の味細胞との相互作用の有無などを調べたいと思っている。これまでの方法だと、呈味物質に対する細胞の特異性や、反応が二次的か直接的かなどの判断ができない。今回はうま味細胞の可視化を試みることにした。うま味感受性のある細胞を特異的に染色する抗体の入手が困難なため、うま味受容体 T1R1 発現細胞をマークすることを目標に、T1R1 陽性細胞に蛍光標識したマウスの有郭乳頭より味蕾オルガノイドを作製した。その結果、蛍光標識された細胞が味蕾オルガノイド中に存在することが確認された。これまで、うま味物質に応答する細胞は T1R1 だけではないことが報告されているため、今後、蛍光で標識された細胞のうま味物質に対する反応性や相乗効果の有無などを調べていきたい。

【味蕾オルガノイドの改良】

今回、幹細胞と分化した細胞の双方が存在する味蕾オルガノイドを作製することに成功した。これは、生体内の味蕾で起こっている味細胞の再生をそのまま再現していると言える。しかし、まだ改善すべき点がいくつかある。一つ目は、同オルガノイドに方向性を持たせないといけない点である。通常の意味細胞は、味蕾の中で頂端 (apical) 側と基底膜 (basolateral) 側に末端を集約させるよう縦長に存在

岩槻 健

している。呈味物質は頂端側に発現する味覚受容体により検知され、味シグナルは基底膜側に侵入している味覚神経に伝達され中枢神経系（脳）へ運ばれる。しかしながら、味蕾オルガノイド内において分化した味細胞には方向性がなく、様々な向きで存在する。恐らく、幹細胞から分化した味細胞に変化する際には何らかの合図（キュー）が必要であると考えられる。我々は現在、生体内の味蕾と構造も似ている味蕾オルガノイドを形成させるような様々な方法を試みている。二つ目は、味蕾オルガノイドの品質管理である。iPS や ES 細胞を扱う際の問題と同じだが、培養を続けることにより味蕾オルガノイドも予期せぬ細胞に分化する可能性がある。そこで、今後は培養に用いる増殖因子などの生理活性物質の質や量について、細かく調べていく必要がある。

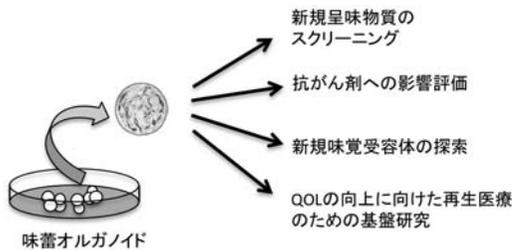


図3 味蕾オルガノイドを用いた研究の将来像

味蕾オルガノイドを作製することで、新規呈味物質や調味料の開発に貢献できると期待されている。また、抗がん剤の味細胞への影響解析や再生医療に向けた研究にも利用されることが期待される。

【味蕾オルガノイドを用いた将来像】

味蕾オルガノイドを用いた研究は、まだその黎明期にあり、同培養系を使つての研究成果はこれまでに3報しかない(2017年7月現在)。しかしながら、生体に近い培養系がない故に困難が伴う味細胞研究に新しい方法論を与える同培養系に寄せる期待は大きい。味蕾オルガノイドは今後、呈味物質に対する

味覚応答の解析、新規味覚受容体の探索、味細胞の老化研究、抗がん剤に対する感受性の研究などに利用されることが想定される他、再生医療への応用など様々な利用価値があると思われる(図-3)。特に、日本人が大切にしてきたうま味物質の探索・評価については、今後精力的に進められる事を期待する。げっ歯類と我々霊長類の間では、うま味物質に対する感受性の違いがあることが近年明らかとなっている。今後は、霊長類の味蕾オルガノイドを積極的に導入し、ヒトに近い性質の味細胞を用いて呈味物質の評価をするべきであろう。

文献

1. N. Barker, J. H. van Es, J. Kuipers, P. Kujala, M. van den Born, M. Cozijnsen, A. Haegebarth, J. Korving, H. Begthel, P. J. Peters, & H. Clevers: Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*, 449, 1003-1007 (2007).
2. T. Sato, R.G. Vries RG, H.J. Snippert, M. van de Wetering, N. Barker, D.E. Stange, J.H. van Es, A. Abo, P. Kujala, P.J. Peters, H. Clevers: Single *Lgr5* stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature*, 459, 262-265 (2009).
3. K. K. Yee, Y. Li, K. M. Redding, K. Iwatsuki, R. F. Margolskee, & P. Jiang: *Lgr5*-EGFP marks taste bud stem/progenitor cells in posterior tongue. *Stem Cells*, 31, 992-1000 (2013).
4. W. Ren, B. C. Lewandowski, J. Watson, E. Aihara, K. Iwatsuki, A. A. Bachmanov, R. F. Margolskee, & P. Jiang: Single *Lgr5*- or *Lgr6*-expressing taste stem/progenitor cells generate taste bud cells *ex vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 16401-16406 (2014).
5. W. Ren, E. Aihara, W. Lei, N. Gheewala, H. Uchiyama, R. Margolskee, K. Iwatsuki, P. Jiang: Transcriptome analyses of taste organoids reveal multiple pathways involved in taste cell generation. *Sci Rep*, 7, 4004 (2017)

<著者紹介>

岩槻 健 (いわつき けん)

1994年 名古屋大学農学部農芸化学科卒業

1991-1992年 米国コロラド州立大学分子細胞発生生物学科

1999年 東京大学大学院農学生命科学研究科応用動物科学科博士課程修了

2000-2002年 東京都臨床医学総合研究所 研究員

2003-2007年 米国マウント・サイナイ医科大学 日本学術振興会海外特別研究員・インストラクター

2007-2013年 味の素(株)イノベーション研究所 主任研究員

2014-至現在 東京農業大学 准教授



受賞歴

2013年 日本味と匂学会研究奨励賞