

授与番号	甲第 356 号
------	----------

論文内容の要旨

Morphology and chemical characteristics of taste buds associated with P2X3-immunoreactive afferent nerve endings in the rat incisive papilla
—ラット切歯乳頭における P2X3 免疫反応性求心性神経終末に関連する味蕾の形態と化学的特徴—

(Journal of Anatomy 第 240 巻、第 4 号 688 頁～699 頁、令和 3 年 10 月)

伊藤 元

I. 研究目的

ラットの切歯乳頭には味蕾様の形態を呈する細胞集塊が存在する。このうち、一部の細胞には舌味蕾 II 型味細胞の味覚受容信号伝達分子 GNAT3 が発現することから、化学受容器である可能性が指摘されている。しかしながら、切歯乳頭の味蕾の細胞構成は不明である。また、舌の味蕾では P2X3 型 ATP 受容体を発現する感覚神経終末が化学情報を中枢へ伝えているが、切歯乳頭の味蕾における感覚神経支配は明らかではない。

本研究では、免疫組織化学法を用いて切歯乳頭における味蕾の細胞構成と P2X3 陽性神経終末の分布を解析した。また、トレーサー物質 Fast Blue (FB) を用いた逆行性トレーサー標識法により P2X3 陽性神経終末の起始神経節を特定し、切歯乳頭における味蕾の機能を考察した。

II. 研究方法

免疫組織化学法では、Wistar 系ラットを灌流固定後、切歯乳頭を採取した。凍結切片と粘膜ホルマウント標本を作製後、ENTPD2 (舌味蕾 I 型味細胞を標識)、GNAT3、PLC β 2、IP3R3 (II 型味細胞)、Syt1、SNAP25 (III 型味細胞)、P2X3 に対する抗体を用いて免疫染色した。標本は共焦点レーザー顕微鏡で撮影した。RT-PCR 法では、酵素消化により分離した上皮内の味蕾分布領域から total RNA を抽出後、舌味蕾味細胞マーカー分子の mRNA 発現を解析した。トレーサー標識法では、三種混合麻酔下で、切歯乳頭に FB を注入した。1 週間後、顔面神経膝神経節の凍結切片を作製し、免疫染色により FB 標識細胞における P2X3 陽性反応の局在を解析した。

III. 研究成績

1. 切歯乳頭の粘膜上皮内に GNAT3 陽性細胞を含む味蕾が認められた。味蕾は、切歯管開口部に限局し、切歯乳頭あたり 49.3 ± 5.6 個の味蕾が観察された。GNAT3 陽性細胞は紡錘形で、細長い細胞質突起を口腔側へ伸ばしていた。味蕾には、ENTPD2 陽性細胞、

GNAT3

陽性細胞および Syt1 陽性細胞が認められた。立体再構築像では、ENTPD2 陽性細胞が GNAT3

陽性細胞と Syt1 陽性細胞を包み込む形態を示し、舌味蕾細胞の形態と一致していた。

ENTPD2 陽性細胞 : GNAT3 陽性細胞 : Syt1 陽性細胞 = 66.1% : 28.1% : 5.8%であり、舌味蕾

細胞の割合と類似していた。また、GNAT3 陽性細胞は、II 型味細胞の味覚受容信号伝達

分子である PLC β 2 陽性反応および IP3R3 陽性反応を示した。

2. RT-PCR では、味蕾分布領域の抽出産物において舌味蕾 I 型味細胞マーカーである ENTDP2、

II 型味細胞マーカーである GNAT3、PLC β 2、IP3R3、TRPM5、III 型味細胞マーカーである Syt1、SNAP25 の mRNA 発現が認められた。

3. P2X3 陽性神経終末は、切歯乳頭の味蕾に進入後、蔦状あるいは杯状の末端部を形成して GNAT3 陽性細胞および SNAP25 陽性細胞に接していた。トレーサー実験では、顔面神経

膝神経節に FB 標識細胞が認められ、このうち 88.2% (15/17 細胞) に P2X3 陽性反応が認められた。

IV. 考察及び結論

切歯乳頭の味蕾は、細胞構成および免疫組織化学的特徴が舌味蕾と類似していることから、味物質を検知する化学受容器であることが示唆される。切歯乳頭の味蕾が受容した化学情報は、P2X3 陽性神経終末を介して顔面神経膝神経節へ伝達されている可能性がある。切歯乳頭の味蕾は口腔の最先端に位置することから、舌や軟口蓋の味蕾に先立って味物質を受容している可能性がある。

論文審査担当者

主査	千葉 俊美 教授	(口腔医学講座 関連医学分野)
副査	佐藤 健一 教授	(口腔顎顔面再建学講座 歯科麻酔学分野)
副査	横山 拓矢 准教授	(統合基礎講座解剖学講座 細胞生物学分野)

論文審査の結果の要旨

ラットの切歯乳頭には味蕾様の細胞集塊が存在する。このうち、一部の細胞には舌味蕾Ⅱ型味細胞の味覚受容信号伝達分子 GNAT3 が発現することから、化学受容器である可能性が指摘されている。しかしながら、切歯乳頭の味蕾の細胞構成は不明である。また、舌の味蕾が検出した化学情報は P2X3 型 ATP 受容体を発現する感覚神経終末によって中枢へ伝えられているが、切歯乳頭の味蕾における感覚神経支配は明らかではない。

本研究では、舌味蕾味細胞を標識する各種抗体を用いた免疫組織化学法によって、切歯乳頭における味蕾の細胞構成を明らかにすることを第一の目的とした。また、P2X3 受容体の発現を指標として味蕾における感覚神経終末の分布を明らかにすると共に、逆行性トレーサー標識法によって神経終末の起始神経節を特定することを第二の目的とした。

GNAT3 陽性細胞を含む味蕾が切歯乳頭の両外壁に認められた。味蕾は切歯管開口部に局限していた。舌味蕾Ⅰ型およびⅢ型細胞を標識する ENTPD2 抗体および Syt1 抗体を加えた三重染色の結果、切歯乳頭の味蕾は 3 種類の各抗体陽性細胞によって形成されていた。各細胞の形態および比率は、舌味蕾の各種味細胞と類似していた。P2X3 抗体、GNAT3 抗体および舌味蕾Ⅲ型細胞を標識する SNAP25 抗体による三重染色の結果、P2X3 陽性神経終末は切歯乳頭の味蕾に進入後、蔦状・杯状の末端部を形成して GNAT3 陽性細胞および SNAP25 陽性細胞に接していた。Fast blue を用いた逆行性トレーサー標識法では、顔面神経膝神経節に Fast blue 標識細胞が認められ、大部分の標識細胞が P2X3 陽性反応を示した。

以上の成果から、切歯乳頭における味蕾の細胞構成および免疫組織化学的特徴は、舌味蕾と類似していることが明らかとなった。切歯乳頭の味蕾は、硬口蓋において味物質を検出する化学受容器として機能し、検出した化学情報は、P2X3 陽性感覚神経終末を介して顔面神経膝神経節へ伝達されている可能性がある。

本研究の手法と成果は、ヒトの味蕾では倫理的観点から実施困難である味細胞の化学的特性および味覚情報伝達機構に関する研究の発展に大いに貢献するものと考えられるため、学位論文に値すると評価した。

試験・試問結果の要旨

最初に本論文の目的、概要について説明がなされた。次いで研究方法、結果ならびにその考察と臨床的意義、今後の研究展開について試問した結果、いずれも適切かつ明瞭な回答が得られた。また、今後の研究に対しても意欲的であり、学位に値する学識と研究能力を備えているものと判定した。

主査・副査から多くの質問があり、下記のような質疑応答が行われた。

問：切歯乳頭の味蕾の数は、舌や軟口蓋の味蕾の数に比べて少ないのか多いのか？

答：舌には約 1000 個、軟口蓋には約 200 個味蕾があります。比較すると少ないですが、切歯乳頭は口腔内で最先端に位置するため舌や軟口蓋に先駆けて味覚情報を取得することに役立っているのではないかと考えます。

問：舌の味蕾と細胞型の割合が似ているという結果は、その働きも同様であるということの意味しているのか？

答：今回の結果、舌の味蕾と細胞型と形態が類似することから、情報伝達の部分では同じ働きをすると考えられます。存在位置が特異的であるため位置取りによって異なる働きを持つのではないかと考えます。

問：RT-PCR 法の結果、Ⅲ型細胞マーカーのバンドがほかに比べて薄いは何故か？

答：味蕾あたりの各陽性細胞数と割合を反映しているため、最も割合が低いⅢ型細胞マーカーのバンドが他と比較して薄く見えていると考えられます。

問：舌味蕾の細胞構成のスライドに 5-HT とあるが、Ⅲ型細胞の味覚伝達に 5-HT は関わっているのか？

答：Ⅲ型細胞は神経伝達物質を開口放出して味覚を伝達すると言われており、その神経伝達物質の候補の一つとして 5-HT が挙げられています。しかしながら、Ⅲ型細胞の神経伝達物質は確定していないため、今回は開口放出に関わる分子をⅢ型細胞のマーカー抗体として使用しました。

問：Ⅱ型細胞マーカーによる染色が多いが、今回の研究ではⅡ型細胞に注目した理由はあるのか？

答：舌味蕾Ⅰ型細胞およびⅢ型細胞の味覚伝達機構は確定しておりません。一方、Ⅱ型細胞の味覚伝達機構は比較的確立されているため、Ⅱ型細胞に関わる染色が多くなりました。また、複数のⅡ型細胞マーカー抗体を用いることで、舌味蕾Ⅱ型細胞と同

じ味覚伝達機構を持つ細胞の存在が切歯乳頭の味蕾にも言えると考えられます。

問：SNAP25 陽性細胞が P2X3 陽性神経終末に囲まれているという結果は、GNAT3 陽性細胞と同じく SNAP25 陽性細胞も ATP を放出していることを意味しているのか？

答：今回、感覚神経終末の免疫組織化学マーカー抗体として P2X3 型 ATP 受容体に対する抗体を使用し、実際に P2X3 陽性神経終末がⅢ型細胞を取り囲んでいました。しかしながら、Ⅲ型細胞には ATP をシナプス小胞に取り込むための主要蛋白、小胞型ヌクレオチド輸送体 VNUT が存在しないことを確認しているため、Ⅲ型細胞は少なくとも ATP を開口放出していないと考えています。一方で、Ⅲ型細胞は開口放出によって何らかの神経伝達物質を分泌することで感覚神経終末を興奮させることが知られています。そのため、感覚神経終末には ATP 受容体以外の神経伝達物質を受容する別の受容体が発現している可能性があります。

問：ヒトの切歯乳頭ではどうなのか？

答：ヒトの切歯乳頭には味蕾がないとされ、実際に切片上で確認しましたが味蕾はありませんでした。今回の研究は、切歯乳頭という特殊な位置に存在する味蕾に注目したものです。