

マウス有郭乳頭における活性酸素合成酵素(Nox)の発現

奥羽大学大学院歯学研究科口腔組織構造生物学専攻

柏 原 祥 顕

(指導教員：渡 邊 弘 樹)

Immunohistochemical Localization of Nox in Mouse
Circumvallate papillae

Department of Cell Biology and Oral Histology,
Ohu University, Graduate School of Dentistry

Yoshiaki Kashiwabara

(Director : Hiroki Watanabe)

Abstract

Recently it has been reported that reactive oxygen plays an important role in several physiological processes. Reactive oxygen is generated by reactive oxygen-synthesizing enzymes (Nox). Different homologs are expressed depending on the organs, tissues, and cells, and investigation of the types and functions of enzymes expressed in various tissues is underway. We immunohistochemically investigated expression and localization of the Nox family in a mouse circumvallate papillae.

In the epithelium of the circumvallate papilla, Nox 1, 2, 3, and 4, Noxo1, and Noxa1 were expressed. In the papilla, Nox 2 was more weakly expressed in the lateral than in the upper part, and Nox 3 was not expressed. In the epithelium of the upper part of the papilla, Nox 1, 3, and 4, Noxo 1, and Noxa 1 were weakly positive in the basal cell layer, positive in the prickle cell layer, strongly positive in the granule cell layer, and negative in the cornified layer. Nox 2 was negative in the basal cell and cornified layers and locally positive in a part of the prickle cell layer and granule cell layer. In the taste buds, Nox 1, 2, 3, and 4, Noxo 1, and Noxa 1 were expressed; the Nox expression pattern varied with the cell type. In type II cells, Nox 1, 3, and 4, Noxo 1, and Noxa 1 were expressed. In type III cells, Nox 2, besides Nox 1, 3, and 4, Noxo 1, and Noxa 1, were specifically expressed, unlike in other taste bud cells.

In the mouse circumvallate papilla, Nox is always expressed, suggesting the generation of reactive oxygen. Of note, Nox signaling may be involved in the biological defense and cornification mechanisms in the upper epithelium of the circumvallate papillae and transmission of information on taste in the taste buds.

Key words: NADPH oxidase, Nox, reactive oxygen, circumvallate papillae, immunohistochemistry

和文抄録

近年、活性酸素は様々な生理学的過程で重要な役割をもつことが報告されている。活性酸素は活性酸素合成酵素（Nox）によって産生される。この酵素は器官、組織や細胞によって発現するホモログが異なることから、様々な組織において発現する酵素の種類と、その機能に関して検索が進められている。我々は、マウス有郭乳頭におけるNoxファミリーの発現と局在を免疫組織化学的に検索した。

有郭乳頭の上皮にはNox1,2,3,4およびNox1, Nox2の発現が観察されたが、Nox2は乳頭上部に比べ、側方では反応性が減弱する傾向を示し、Nox3の発現はみられなかった。乳頭上部上皮における反応は、Nox1,3,4およびNox1, Nox2では基底細胞層で弱陽性、有棘細胞層で陽性、顆粒細胞層では強陽性と増強したが、角化層では陰性であった。また、Nox2の反応は基底細胞層、角化層では陰性であったが、有棘細胞層の一部から顆粒細胞層に陽性反応が局限していた。味蕾ではNox1,2,3,4およびNox1, Nox2の発現が観察され、細胞種によりNoxの発現パターンは異なっていた。II型細胞ではNox1,3,4およびNox1, Nox2の発現がみられたが、III型細胞ではNox1,3,4およびNox1, Nox2に加えて、他の味蕾の細胞ではみられなかったNox2が特異的に発現していた。

マウス有郭乳頭ではNoxが常に発現しており、活性酸素が産生されていることが示唆された。特に、有郭乳頭の上部上皮では生体防御や角化の過程に、味蕾では味覚情報の伝達にNoxを介したシグナルが関連する可能性が本研究より示された。

キーワード: NADPH oxidase, Nox, 活性酸素, 有郭乳頭, 免疫組織化学

緒 言

舌背粘膜には様々な形態の舌乳頭が存在し，その上皮には種々の味覚を受容する味蕾が多数存在する。舌乳頭に関しては，その数や分布状況および組織構造などに差異がみられることが詳細にわたって報告されており，また舌乳頭の形成過程には多くの細胞増殖因子が関与するとされている¹⁻³⁾。味蕾は舌乳頭上皮のみならず，口腔粘膜や咽頭粘膜の上皮にも存在し，100個程度の細胞からなる球状の組織構造物であり⁴⁾，味蕾の構成細胞は光顕的に，味細胞，支持細胞，基底細胞の3種に分類される⁵⁾。このうち味物質を受容する味細胞は電子顕微鏡観察において，神経線維とのシナプス形成の有無により2種類に分類される。すなわち，シナプスを形成しない味細胞をII型細胞，シナプスを形成する味細胞をIII型細胞と呼ぶ⁴⁾。なお味蕾の支持細胞はI型細胞，基底細胞はIV型細胞と呼ばれている⁴⁾。種々の味物質を受容する味細胞と神経線維とのシグナル伝達機構については未だ充分には解明されておらず，現在も研究が進められている。加えて，舌乳頭の形態形成についても，細胞増殖因子の発現のみでは不十分である。

活性酸素は生体内の数多くの細胞で常に産生されており，細胞増殖^{6,7)}や細胞分化^{8,9)}の調節，アポトーシスの誘導^{10,11)}などに関与している。しかし，活性酸素の機能は，活性酸素を産生する細胞や組織によって異なっており，好中球やマクロファージでは異物や細菌の処理¹²⁾，精子ではその運動性の亢進¹³⁾，甲状腺ではホルモン産生¹⁴⁾など多様な働きが報告されている。活性酸素合成酵素であるNADPH oxidase (Nox)は複数のタンパク質からなる複合体であり，構成するタンパク質の違いにより，現在のところNox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5および

dual oxidase (DUOX) 1, 2 の 7 種類のホモログが存在する^{15,16)}ことが判明している。それら Nox の発現状況は、生体の細胞や組織・臓器ごとに異なっており^{15,16)}、様々な細胞・組織について発現する Nox の種類とその機能に関しての検討が現在も進められている。これら Nox の中で Nox1 は、消化管の上皮細胞に発現し、局所における感染防御に関与しており、活性酸素合成が亢進する際には他の Nox よりも著明に活性酸素が産生するとされている¹⁷⁾。さらに Nox1 は、血管平滑筋細胞にも発現し血液循環にも関与しており¹⁸⁾、その他各種シグナル伝達分子として働き、細胞増殖にも関与している^{15,16)}。Nox2 は病原菌に対する食細胞の防御反応^{15,16)}に、Nox3 は耳石形成^{15,16,19)}などにそれぞれ関与し、Nox4 は恒常的に少量の活性酸素を産生していると考えられ、多くの細胞・組織で発現しており、特に血管内皮細胞で高い発現がみられる²⁰⁾。なお、Nox1 と Nox3 を介した活性酸素の合成には、Nox organizer 1 (Noxo1) および Nox activator 1 (Noxa1) の共発現が必要であると報告されている^{15,21)}。

有郭乳頭は口腔内ガス環境にさらされ、生体防御との関連も深いことから、有郭乳頭において Nox が機能していることが推察される。また、有郭乳頭上皮に存在する味蕾では細胞の分化やシグナル伝達に、Nox が関与する可能性が考えられる。しかし現在まで、有郭乳頭と味蕾における活性酸素合成酵素の分布と種類、さらにはその動態について詳細に検討した報告はみられない。そこで本研究では、マウス有郭乳頭における活性酸素の産生とその機能を解明する目的で、各 Nox の発現と局在を免疫組織化学的に検索した。

材料および方法

1. 実験動物

実験動物には8週齢，雄性 C57BL/6NCrl 系マウス（日本チャールズ・リバー，横浜）を用いた。購入後，実験動物用固形飼料（オリエンタル酵母工業，東京）と水を自由に摂取させ，奥羽大学実験研究施設内（室温 23℃，湿度 65%）で飼育した。なお，飼育は奥羽大学動物実験委員会の承認（動物実験許可番号：平成 26 年度第 2014-25 号）を得て，奥羽大学動物実験規程を遵守して行った。

2. 試料作製方法

マウスにペントバルビタールナトリウム (50mg/kg) で腹腔内麻酔を行った後，開胸し左心室より生理食塩水を灌流した。4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (pH6.2) で灌流固定後，舌を摘出した。さらに，同液にて摘出した舌を 4℃ 24 時間浸漬固定し，パラフィンに包埋，ミクロトームにて厚さ 5 μ m の連続切片を作製した。切片は組織学的観察のためにヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色を行い，光学顕微鏡にて観察した。

3. 免疫組織化学的染色

パラフィン切片を脱パラフィン後，0.3% H_2O_2 含有メタノール溶液にて 15 分間処理し，内因性ペルオキシダーゼを不活性化した。次いで 10% 正常ヤギ，ウサギ血清 (VECTASTAIN® Elite ABC Kit, VECTOR Lab. Inc., USA) を用いて 1 時間，ブロッッキング処理を行い，その後一次抗体を反応させた。

本研究では一次抗体として，抗ヒト Nox1 ウサギポリクローナル抗体 (bs-3682R, Bioss Inc., MA, USA) (希釈倍率 1:500)，抗ヒト Nox1 ウサギポリクローナル抗体 (600-401-899, Rockland Inc., PA, USA) (希釈倍率 1:500)，抗マウス Nox1 ウサギポリクローナル抗体 (sc-22764,

Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA)(希釈倍率 1:500), 抗ヒト Nox2 ウサギポリクローナル抗体(bs-3889R, Bioss Inc., MA, USA) (希釈倍率 1:500), 抗ヒト Nox3 ウサギポリクローナル抗体(bs-3683R, Bioss Inc., MA, USA) (希釈倍率 1:500), 抗ラット Nox4 ウサギポリクローナル抗体(bs-3684R, Bioss Inc., MA, USA) (希釈倍率 1:1000), ならびに味蕾Ⅱ型細胞を識別するために抗ラット gustducine ヤギポリクローナル抗体(sc-26890, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) (希釈倍率 1:1000) およびⅢ型細胞を標識するため抗ヒト synaptosomal-associated protein-25 (SNAP-25) ヤギポリクローナル抗体(AP16359PU-N, Acris Antibodies Inc., CA, USA) (希釈倍率 1:2000) を用いた。各一次抗体は室温にて, 18 時間反応させた。

次に, 二次抗体としてビオチン標識抗ウサギ・ヤギ抗体もしくはビオチン標識抗ヤギ・ウサギ抗体(VECTASTAIN® Elite ABC Kit, VECTOR Lab. Inc., USA) を室温にて 1 時間, その後ペルオキシターゼ標識ストレプトアビジン (VECTASTAIN® Elite ABC Kit, VECTOR Lab. Inc., USA) を 1 時間室温で反応させた。

3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (ダコ・ジャパン, 東京) にて発色を行い, 5% methyl green (武藤化学薬品, 東京) にて核染後, 光学顕微鏡にて観察を行った。また, 切片の洗浄および抗血清の希釈には 0.05M Tris 塩酸緩衝液(pH7.6)を用いた。免疫染色の陰性対照として, 一次抗体の代わりに正常ウサギまたはヤギ血清(DAKO Corp., CA, USA)を用いて同様の反応を行った。

一方, 各種 Nox 抗体と味細胞マーカーの二重免疫染色については, 10% 正常ロバ血清(sc-2044, Santa Cruz

Biotechnology Inc., CA, USA)を用い1時間ブロッキング処理を行い、各抗体の希釈倍率を1:200とした抗体混合液を室温にて、18時間反応させた。次いで、Alexa Fluor 555 標識抗ウサギ・ロバ抗体 (bs-0295D-A555, Bioss Inc., MA, USA) (希釈倍率 1:100) と Alexa Fluor 488 標識抗ヤギ・ロバ抗体 (bs-0294D-A488, Bioss Inc., MA, USA) (希釈倍率 1:100) の抗体混合液を暗室内にて2時間室温で反応させ、封入後直ちに蛍光顕微鏡にて観察した。

結 果

1. 有郭乳頭における各 Nox の局在

有郭乳頭は円柱状の形態を呈しており、乳頭上部の上皮は角化していたが、側方上皮は非角化で上皮内には味蕾が複数存在していた (図 1)。

Nox1 の陽性反応は有郭乳頭の上皮から粘膜固有層の広範囲にみられ、特に乳頭上部の上皮で陽性反応が強くなる傾向を示した (図 2 -a)。乳頭上部の上皮において、基底細胞層、有棘細胞層および顆粒細胞層に Nox1 陽性反応がみられたが、角化層は Nox1 陰性であった。粘膜固有層では、多くの線維芽細胞と血管内皮細胞に Nox1 陽性反応が観察された (図 3 -a)。

Nox01 と Nox1 の反応はいずれも Nox1 の反応と類似しており、有郭乳頭の上皮と粘膜固有層に Nox01 と Nox1 の陽性反応がみられた (図 2 -b,c)。有郭乳頭上部の上皮における Nox01 の強陽性反応は、基底細胞層から顆粒細胞層にみられ、角化層は Nox01 陰性であった。(図 3 -b)。有郭乳頭上部の上皮における Nox1 陽性反応は、Nox01 陽性反応と同様に基底細胞層、有棘細胞層および顆粒細胞層に観察されたが、その反応強度は Nox01 に比べ弱かった (図 3 -c)。一方、粘膜固有層では多くの線維

芽細胞と血管内皮細胞に Nox1 陽性反応と Nox1 の陽性反応が観察された (図 3 -b,c)。

Nox2 の反応は、有郭乳頭の上部の上皮では陽性反応がみられたが、乳頭側方の上皮では弱陽性であり、乳頭全体の粘膜固有層でも陽性反応が観察された (図 2 -d)。乳頭上部の上皮における Nox2 の反応は、基底細胞層と角化層で陰性であり、有棘細胞層の一部から顆粒細胞層に陽性反応が限局していた。粘膜固有層では線維芽細胞と血管内皮細胞に Nox2 陽性反応がみられた (図 3 -d)。

Nox3 の陽性反応は、有郭乳頭の上部上皮に限局しており、側方上皮では陰性であった (図 2 -e)。乳頭上部の上皮における Nox3 の反応は、基底細胞層では弱陽性であったが、有棘細胞層では陽性、顆粒細胞層では強陽性を呈しており、角化層と粘膜固有層では、陰性であった (図 3 -e)。

Nox4 の陽性反応は、有郭乳頭の上部の上皮のみならず側方上皮においても観察され、粘膜固有層でも弱陽性反応がみられた (図 2 -f)。乳頭上部の上皮における Nox4 の反応は、Nox3 と同様の傾向を示し、基底細胞層で弱陽性、有棘細胞層で陽性、顆粒細胞層では強陽性であったが、角化層では陰性であった。粘膜固有層に分布する血管内皮細胞や線維芽細胞でも Nox4 陽性反応が観察された (図 3 -f)。乳頭上皮における免疫染色所見のまとめを表に示す (表 1)。

2. 味蕾における各 Nox の局在

有郭乳頭の側方には、多くの細胞から構成された球状を呈する味蕾が数多く配列していた (図 1, 4)。味蕾は細胞質が明調で円形の核を有する味細胞、細胞質が暗調で扁平な核の支持細胞、味蕾の基底側にみられる基底細胞の 3 種類の細胞から構成されていた (図 4 -i)。

Nox1 の反応は，味細胞の多くに陽性反応がみられたが，基底細胞と支持細胞では陽性反応はほとんど観察されなかった（図 4 -a）。Nox01 の反応は，味細胞と支持細胞では陽性を呈し，基底細胞でも陽性を示す細胞が散在していた（図 4 -b）。Nox1 の反応は，Nox1，Nox01 の反応に比べ陽性を示す細胞は少なく，一部の味細胞で陽性であった（図 4 -c）。Nox2 の反応は，味蕾では陽性を示す細胞は少なく，一部の味細胞に限局していた（図 4 -d）。Nox3 の反応は，Nox1 と類似しており，味細胞と支持細胞に陽性反応がみられたが，その反応性は強く観察された（図 4 -e）。Nox4 の反応は，他の Nox の反応とは異なり，味蕾を構成する味細胞，支持細胞，基底細胞すべてに陽性反応がみられた（図 4 -f）。II 型細胞を標識する *gustducine* を用いた免疫染色では，味蕾内に陽性を示す細胞がみられた（図 4 -g）。さらに，III 型細胞を標識する SNAP-25 を用いた免疫染色でも同様に，陽性を示す細胞が味蕾内に観察された（図 4 -h）。

3. II 型，III 型細胞における各 Nox の局在

II 型，III 型細胞のマーカーを用い，各 Nox の発現を二重免疫染色により検索した（図 5 ～ 8）。

抗 *gustducine* 抗体を用いた二重免疫染色では，*gustducine* と Nox1 を共発現する細胞が観察されたが，一部の細胞では共発現がみられず，Nox1 のみ陽性であった（図 5 -a）。*gustducine* と Nox01 を共発現する細胞も少数観察され，共発現がなく Nox01 のみを発現する細胞が数多くみられた（図 5 -b）。これに対して Nox1 では，*gustducine* と Nox1 を共発現する細胞も観察され，共発現せずに Nox1 のみを発現する細胞は少なかった（図 5 -c）。Nox2 の反応は Nox1 の反応とは異なり，*gustducine* と Nox2 を共発現する細胞は観察されなかった（図 6 -d）。

Nox3 と gustducine を共発現する細胞は観察されたが、一部の細胞では共発現がみられず、Nox3 のみ陽性であった (図 6 -e)。gustducine と Nox4 を共発現する細胞も観察されたが、共発現しない Nox4 のみを発現する細胞が数多くみられた (図 6 -f)。

抗 SNAP-25 抗体を用いた二重免疫染色の結果では、SNAP-25 と Nox1 を共発現する細胞が観察され、ごく一部の細胞が Nox1 のみ陽性を示した (図 7 -a)。Nox1, Noxa1 も同様の反応を示し、SNAP-25 と Nox1, Noxa1 を共発現する細胞が観察され、Nox1, Noxa1 のみを発現する細胞はわずかであった (図 7 -b,c)。Nox2 の反応は Nox1 の反応とは異なり、SNAP-25 と Nox2 を共発現する細胞が観察されたが、Nox2 のみを発現する細胞はみられなかった (図 8 -d)。Nox3 と SNAP-25 の反応では、共発現する細胞と Nox3 のみ発現する細胞が存在していた (図 8 -e)。SNAP-25 と Nox4 を共発現する細胞が Nox3 と同様に観察され、共発現しない Nox4 のみを発現する細胞もみられた (図 8 -f)。味蕾における免疫染色の所見のまとめを表に示す (表 2)。

考 察

舌乳頭は、口腔内ガス環境にさらされ、口腔細菌感染の侵襲も受け易く、生体防御との関連も深い。さらに、マウス舌乳頭は角化重層扁平上皮であることから、細胞増殖や細胞分化の過程を観察するのに好都合である。また、味蕾のⅢ型細胞は、神経線維とシナプスを形成することから、シグナル伝達機構を解析するモデルとなる。

活性酸素合成酵素である Nox は、7 種類あると報告されている^{15,16)}が、Nox1 と Nox3 を介した活性酸素の合成には Noxa1 および Nox1 の発現が必要であることが判明

している^{15,21)}。本研究結果において、Nox1とNox3の発現部位とNox01, Noxa1の発現部位は一致していた。このことは、有郭乳頭において発現するNox1,3でもNox01, Noxa1を介して、活性酸素を産生することを証明する結果である。また、Nox1とNox01, Noxa1が有郭乳頭の各部位で発現していたことから、Nox1により多量の活性酸素が常に産生されており、活性酸素が有郭乳頭の何らかの機能に関連することが伺われた。本研究では、Nox1,3以外にも各Noxの発現が観察され、それらの局在には以下に述べるような差異がみられた。

まず、有郭乳頭の上皮組織における各Noxの発現は、有郭乳頭の特に出部の上皮組織に共通して観察された。有郭乳頭上皮は角化重層扁平上皮で構成され、各層におけるNoxの発現を検索した結果、いずれのNoxも角化層では陰性であった。しかし、各Noxの発現は基底細胞層では弱陽性を示し、有棘細胞層から顆粒細胞層にかけて徐々に強陽性を示す傾向がみられた。これらの結果から、有棘細胞層から顆粒細胞層に移行するのに伴いNoxが数多く発現し、活性酸素が多量に産生している可能性が伺われた。有郭乳頭上部は口腔に面しており、口腔細菌などの侵襲を受け易い環境にある。また、ヒト表皮細胞と歯肉上皮細胞を用いた研究では、それらの細胞にNox1,2,4の発現が観察され、かつそれぞれの細胞内に食細胞型のNox2と複合体を形成するタンパクであるRac1, p67^{phox}も出現することが報告²²⁾されている。本研究結果において、より表層に近い顆粒細胞でNoxの発現が増強していたことは、活性酸素の産生が、口腔細菌の侵入に対しての防御反応に関与するという可能性が考えられる。

また、これまで mitochondrial transcription factor A

(TFAM) ノックアウトマウスを用いた実験²³⁾から、表皮細胞内では、ミトコンドリアから産生される活性酸素が分化調節の重要なメディエーターであると報告されている。加えて、Nox1が表皮細胞の形質転換の一端を担うという報告²⁴⁾や活性酸素が表皮細胞の分化を促進するという報告²⁵⁾もみられる。有郭乳頭上皮においても、各Noxの発現は有棘細胞層から顆粒細胞層にかけて反応性が増強しており、側方より上部で各Noxが強発現していた。これらのことから有郭乳頭上皮細胞においてNoxは、基底細胞から有棘細胞、顆粒細胞、角化細胞への分化を調節し、角化の過程にも関与している可能性が伺われた。

これまでに、血管における活性酸素の機能に関しては数多くの報告^{18,26-28)}がみられる。血管内皮細胞が産生する活性酸素の機能は血管周囲の平滑筋細胞を収縮させ、血流量を調節すると報告^{18,27)}されている。有郭乳頭に分布する血管内皮細胞にNox1, 2, 4の発現が観察されたことは、この微小循環の血流調節に関与するものと考えられる。また近年、血管内皮細胞の産生する活性酸素は、血管新生に重要な役割をもつことが報告^{26,28)}されている。それらの報告では活性酸素はVEGF²⁶⁾やangiopoietin-1²⁸⁾の産生を亢進し、血管内皮細胞の増殖分化・移動を引き起こし、血管新生が生ずることが示されている。加えてVEGFの産生に関しては、血管内皮細胞のオートクライン/パラクライン作用だけでなく、周囲の線維芽細胞からも産生されることが検出されている²⁹⁾。本研究において、有郭乳頭粘膜固有層の線維芽細胞、血管内皮細胞にNox1, 2, 4が発現したことは、乳頭内における血管の恒常性維持のみならず血管新生にも活性酸素が関与していることを示唆している。

現在まで生体の各器官・組織で発現するNox種に関し

て数多く報告されている。Nox は 7 種類存在するが，中でも Nox3 に関しての報告は少ない。Nox3 を高発現する器官としては内耳^{15,16,19)}があげられ，発現は低いものの胎児期の腎臓³⁰⁾や脳¹⁹⁾でも Nox3 が発現するといわれている。Nox3 以外の Nox は，Nox3 と比較して多くの細胞・組織で発現が観察されている^{15,16)}。本研究では有郭乳頭の上部の上皮に Nox3 の発現がみられ，特に側方の上皮に存在する味蕾の細胞に限局した。本研究の結果より，生体における数少ない Nox3 の発現部位として，味蕾が加えられる結果が得られた。

本研究では，有郭乳頭を観察することで，味蕾における活性酸素の産生とその機能について検討した。その結果 Nox4 の発現は味蕾を構成するすべての細胞にみられたのに対して，他の Nox は一部の細胞に限局しており，特に Nox2 の発現は味蕾の 1 種の細胞にのみ発現が限局していた。さらに，味細胞の II 型，III 型細胞に対するそれぞれのマーカーを用いて免疫組織化学的染色を施し，加えて蛍光二重染色により Nox を発現する細胞種を同定した。その結果，II 型細胞においては，Nox2 を除くすべての Nox の発現が観察されたのに対して，III 型細胞では検索したすべての Nox 種の発現が観察された。味蕾を構成する細胞のうち，IV 型細胞では Nox4 と Nox01 だけが発現していた。Nox を介した活性酸素の産生は，生体の数多くの細胞で確認されており，その多くは細胞の増殖，分化に関連することが報告^{6~9)}されている。IV 型細胞の機能は I ~ III 型細胞への分化であることから，この過程に Nox4 を介した活性酸素の産生が必要とされるのではないかと思われる。

味蕾を構成する細胞の中で，味覚を受容する II 型，III 型細胞にのみ Nox1 の発現が観察された。これまで Nox1

をノックアウトしたマウスは、刺激感受性の低下がみられることが報告³¹⁾されている。この報告と本研究結果から考えると、Nox1は味蕾において味覚情報の感受性を高めるために、味細胞に特異的に発現する可能性が考えられる。また、II型細胞には苦味、甘味、旨味の受容体が存在すること、III型細胞には酸味、塩味の受容体が存在することが知られている^{4,32)}。ただし、神経線維とシナプスを形成するのはIII型細胞であり、II型細胞ではシナプスは形成されない。現在のところII型細胞で受容された味覚情報は、ATPを介して伝達されることが考えられている^{4,32)}。本研究では、II型細胞とIII型細胞でNoxの発現が異なり、Nox2はIII型細胞にのみ発現していた。この結果からII型細胞に比べ、III型細胞ではより多量の活性酸素が産生されていることが示唆される。この活性酸素の機能については、II型細胞、III型細胞が受容した味覚情報の伝達に寄与するものと推察される。II型細胞よりIII型細胞で多種のNoxの発現が確認されたことは、神経線維とシナプス形成をもつIII型細胞では、II型細胞より多くの活性酸素が必要とされるためではないかと思われる。

このように味蕾では、Noxを介して活性酸素が産生され、味蕾の各細胞の機能に活性酸素が深く関連するものと考えられる。本研究から味蕾を構成するすべての細胞でNoxが発現しており、それぞれ固有のNox発現パターンを示すことが明らかとなった。

結 論

マウス有郭乳頭におけるNoxの発現とその局在について免疫組織化学的に検索し、以下の結論を得た。

1. 有郭乳頭の上皮にはNox1, 2, 3, 4およびNox01,

Nox1 の発現が観察されたが、Nox2 は乳頭上部に比べ、側方では反応性が減弱する傾向を示し、Nox3 は乳頭側方で発現はみられなかった。

2. 乳頭上部の上皮組織における反応は Nox1, 3, 4 および Nox01, Nox1 では、基底細胞層で弱陽性、有棘細胞層で陽性、顆粒細胞層では強陽性と増強したが、角化層では陰性であった。また、Nox2 の反応は、基底細胞層、角化層では陰性であったが、有棘細胞層の一部から顆粒細胞層に陽性反応が局限していた。

3. 乳頭粘膜固有層では Nox1, 2, 4 および Nox01, Nox1 に陽性を示す線維芽細胞と血管内皮細胞が数多く観察されたが、Nox3 陽性を示す細胞はみられなかった。

4. 味蕾では Nox1, 2, 3, 4 および Nox01, Nox1 の発現が観察され、細胞種によりその発現パターンは異なっていた。

5. II 型細胞では Nox1, 3, 4 および Nox01, Nox1 の発現がみられたが、III 型細胞では、Nox1, 3, 4 および Nox01, Nox1 に加えて、他の味蕾の細胞ではみられなかった Nox2 が特異的に発現していた。

以上のことから、マウス有郭乳頭では Nox が常に発現して、活性酸素が産生されていることが示唆された。特に、有郭乳頭の上部上皮では生体防御や角化の過程に活性酸素が関連している可能性が示された。加えて、味蕾では味覚情報の伝達に Nox2 が関与していると考えられた。

本論文の要旨は、第 118 回日本解剖学会総会・学術集会（平成 25 年 3 月 高松）、第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会（平成 25 年 9 月 岡山）、第 119 回日本解剖学会総会・学術集会（平成 26 年 3 月 下野）、日本解剖学会第 50 回東北・北海道連合支部学術集会（平成 26 年

9月 福島), 第58回奥羽大学歯学会(平成26年11月郡山)において発表した。

参考文献

1) Kim J. Y., Cho S. W., Lee M. J., Hwang H. J., Lee J. M., Lee S. I., Muramatsu T., Shimono M., Jung H. S. : Inhibition of connexin 43 alters Shh and Bmp-2 expression patterns in embryonic mouse tongue. *Cell Tissue Res.* **320** ; 409-415 2005.

2) Uchida N., Kanazawa M., Suzuki Y., Takeda M. : Expression of BDNF and TrkB in mouse taste buds after denervation and in circumvallate papillae during development. *Arch Histol Cytol.* **66** ; 17-25 2003.

3) Chou H. C., Chien C. L., Lu K. S. : The distribution of PGP9.5, BDNF and NGF in the vallate papilla of adult and developing mice. *Anat Embryol.* **204** ; 161-169 2001.

4) Chaudhari N., Roper S. D. : The cell biology of taste. *J Cell Biol.* **190** ; 285-296 2010.

5) De Lorenzo A. J. : Electron microscopic observations on the taste buds of the rabbit. *J Biophys Biochem Cytol.* **4** ; 143-150 1958.

6) Patil S., Bunderson M., Wilham J., Black S. M. : Important role for Rac1 in regulating reactive oxygen species generation and pulmonary arterial smooth muscle cell growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **287** ; L1314-1322 2004.

7) Mander P. K., Jekabsone A., Brown G. C. : Microglia proliferation is regulated by hydrogen peroxide from NADPH oxidase. *J Immunol.* **176** ; 1046-1052 2006.

8) Schröder K., Wandzioch K., Helmcke I., Brandes

R.P. : Nox4 acts as a switch between differentiation and proliferation in preadipocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **29** ; 239-245 2009.

9) Mandal C. C., Ganapathy S., Gorin Y., Mahadev K., Block K., Abboud H. E., Harris S. E., Ghosh-Choudhury G., Ghosh-Choudhury N.: Reactive oxygen species derived from Nox4 mediate *BMP2* gene transcription and osteoblast differentiation. *Biochem J.* **433** ; 393-402 2011.

10) Zhou L. J., Zhu X. Z. : Reactive oxygen species -induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide. *J Pharmacol Exp Ther.* **293** ; 982-988 2000.

11) Tateishi Y., Sasabe E., Ueta E., Yamamoto T. : Ionizing irradiation induces apoptotic damage of salivary gland acinar cells via NADPH oxidase 1-dependent superoxide generation. *Biochem Biophys Res Commun.* **366** ; 301-307 2008.

12) Leto T. L., Adams A. G., de Mendez I. : Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91** ; 10650-10654 1994.

13) Bánfi B., Molnár G., Maturana A., Steger K., Hegedűs B., Demaurex N., Krause K. H. : A Ca^{2+} -activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem.* **276** ; 37594-37601 2001.

14) De Deken X., Wang D., Many M. C., Costagliola S., Libert F., Vassart G., Dumont J. E., Miot F.: Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem.* **275** ; 23227-23233 2000.

15) Bedard K., Krause K. H. : The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* **87** ; 245-313 2007.

16) Katsuyama M., Matsuno K., Yabe-Nishimura C. : Physiological roles of NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme. *J Clin Biochem Nutr.* **50** ; 9-22 2012.

17) Kawahara T., Teshima S., Oka A., Sugiyama T., Kishi K., Rokutan K. : Type I *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide stimulates toll-like receptor 4 and activates mitogen oxidase 1 in gastric pit cells. *Infect Immun.* **69** ; 4382-4389 2001.

18) Matsuno K., Yamada H., Iwata K., Jin D., Katsuyama M., Matsuki M., Takai S., Yamanishi K., Miyazaki M., Matsubara H., Yabe-Nishimura C. : Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. *Circulation.* **112** ; 2677-2685 2005.

19) Bánfi B., Malgrange B., Knisz J., Steger K., Dubois-Dauphin M., Krause K. H. : NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem.* **279** ; 46065-46072 2004.

20) Ago T., Kitazono T., Ooboshi H., Iyama T., Han Y. H., Takada J., Wakisaka M., Ibayashi S., Utsumi H., Iida M. : Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation.* **109** ; 227-233 2004.

21) Cheng G., Ritsick D., Lambeth J. D. : Nox3 regulation by NOXO1, p47^{phox}, and p67^{phox}. *J Biol Chem.* **279** ; 34250-34255 2004.

22) Chamulitrat W., Stremmel W., Kawahara T., Rokutan K., Fujii H., Wingler K., Schmidt H.H., Schmidt R. : A

constitutive NADPH oxidase-like system containing gp^{91phox} homologs in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* **122** ; 1000-1009 2004.

23) Hamanaka R. B., Glasauer A., Hoover P., Yang S., Blatt H., Mullen A. R., Getsios S., Gottardi C. J., DeBerardinis R. J., Lavker R. M., Chandel N. S. : Mitochondrial reactive oxygen species promote epidermal differentiation and hair follicle development. *Sci Signal.* **6** ; ra8 2013.

24) Chamulitrat W., Schmidt R., Tomakidi P., Stremmel W., Chunglok W., Kawahara T., Rokutan K. : Association of gp91phox homolog Nox1 with anchorage-independent growth and MAP kinase-activation of transformed human keratinocytes. *Oncogene.* **22** ; 6045-6053 2003.

25) Kennedy L. H., Sutter C. H., Leon Carrion S., Tran Q. T., Bodreddigari S., Kensicki E., Mohny R. P., Sutter T. R. : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated production of reactive oxygen species is an essential step in the mechanism of action to accelerate human keratinocyte differentiation. *Toxicol Sci.* **132** ; 235-249 2013.

26) Yamagishi S., Nakamura K., Matsui T., Inagaki Y., Takenaka K., Jinnouchi Y., Yoshida Y., Matsuura T., Narama I., Motomiya Y., Takeuchi M., Inoue H., Yoshimura A., Bucala R., Imaizumi T. : Pigment epithelium-derived factor inhibits advanced glycation end product-induced retinal vascular hyperpermeability by blocking reactive oxygen species-mediated vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem.* **281** ; 20213-20220 2006.

27) Wójcicka G., Bełtowski J., Jamroz A. : Oxidative

stress in hypertension. *Postepy Hig Med Dosw.* **31** ; 183-193 2004.

28) Harfouche R., Malak N. A., Brandes R. P., Karsan A., Irani K., Hussain S. N. : Roles of reactive oxygen species in angiotensin-1/tie-2 receptor signaling. *FASEB J.* **19** ; 1728-1730 2005.

29) Nakanishi M., Sato T., Li Y., Nelson A. J., Farid M., Michalski J., Kanaji N., Wang X., Basma H., Patil A., Goraya J., Liu X., Togo S., L Toews M., Holz O., Muller K. C., Magnussen H., Rennard S. I. : Prostaglandin E2 stimulates the production of vascular endothelial growth factor through the E-prostanoid-2 receptor in cultured human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **46** ; 217-223 2012.

30) Kikuchi H., Hikage M., Miyashita H., Fukumoto M. : NADPH oxidase subunit, gp91^{phox} homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene.* **254** ; 237-243 2000.

31) Ibi M., Matsuno K., Shiba D., Katsuyama M., Iwata K., Kakehi T., Nakagawa T., Sango K., Shirai Y., Yokoyama T., Kaneko S., Saito N., Yabe-Nishimura C. : Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain. *J Neurosci.* **28** ; 9486-9494 2008.

32) Niki M., Yoshida R., Takai S., Ninomiya Y. : Gustatory signaling in the periphery: detection, transmission, and modulation of taste information. *Biol Pharm Bull.* **33** ; 1772-1777 2010

図表の解説

図 1 : マウス有郭乳頭の H-E 染色像

有郭乳頭の上部は角化重層扁平上皮で覆われ、側方の上皮に多数の味蕾 (white arrowhead) が観察される。

図 2 : 有郭乳頭における各 Nox 抗体による免疫染色像

a : Nox1, b : Nox01, c : Nox01, d : Nox2, e : Nox3,
f : Nox4 bar=100 μ m

Nox1, Nox01 および Nox01 の反応は、有郭乳頭の上皮と粘膜固有層に陽性反応が広くみられる。Nox2 の反応は、乳頭上部の上皮と粘膜固有層で陽性反応がみられるものの、乳頭側方の上皮では弱陽性である。Nox3 の反応は、乳頭上部の上皮に陽性反応が限局しており、側方上皮では陰性である。Nox4 の反応は、有郭乳頭上部の上皮のみならず側方の上皮においても陽性反応が観察され、粘膜固有層では反応性は弱い。

図 3 : 有郭乳頭上部上皮における各 Nox 抗体による免疫染色像

a : Nox1, b : Nox01, c : Nox01, d : Nox2, e : Nox3,
f : Nox4 bar=50 μ m

乳頭上部上皮における反応は、Nox1, Nox01, Nox01, Nox3, Nox4 と同様であり、角化層 (black arrowhead) では陰性であるが、基底細胞層、有棘細胞層、顆粒細胞層で陽性を示す。しかし、Nox2 では反応性は弱く、基底細胞層では陰性、有棘細胞層の一部から顆粒細胞層に陽性反応が限局している。また、粘膜固有層では、Nox3 以外の Nox (Nox1, Nox01, Nox01, Nox2, Nox4) の陽性反応が血管内皮細胞 (asterisk) と線維芽細胞 (black arrow) にみられる。

図 4 : 有郭乳頭味蕾における各 Nox 抗体と抗味細胞マーカーによる免疫染色像および H-E 染色像

a : Nox1, b : Nox1, c : Nox1, d : Nox2, e : Nox3,
f : Nox4, g : gustducine (Ⅱ型細胞のマーカ―),
h : SNAP-25 (Ⅲ型細胞のマーカ―) i : H-E 染色
bar=50μm

味蕾における Nox4 の反応は, すべての構成細胞が陽性を呈しているのに対して, Nox1, Nox1, Nox2 の反応は, 一部の細胞に限局している (black arrow)。Nox1, Nox3 の反応は, 味蕾の多くの細胞が陽性を示している (black arrow)。味蕾内に gustducine (Ⅱ型細胞のマーカ―) および SNAP-25 (Ⅲ型細胞のマーカ―) に陽性を示す細胞が観察される。H-E 染色により味蕾を構成する味細胞 (white arrowhead), 支持細胞 (black arrowhead), 基底細胞 (white arrow) が観察される。

図 5 : 味蕾における Nox1, Nox1, Nox1 抗体と抗 gustducine 抗体との二重免疫染色像

a₁ : Nox1(red), b₁ : Nox1(red), c₁ : Nox1(red),
a₂, b₂, c₂ : gustducine(green), a₃, b₃, c₃ : Merge(yellow)
bar=50μm

gustducine と Nox1, Nox1, Nox1 を共発現する細胞 (white arrow) が観察される。また, Nox1 のみ陽性を示す細胞が味蕾内に数多くみられ, Nox1, Nox1 にのみ陽性を示す細胞は少ない。

図 6 : 味蕾における Nox2, Nox3, Nox4 抗体と抗 gustducine 抗体との二重免疫染色像

d₁ : Nox2(red), e₁ : Nox3(red), f₁ : Nox4(red),
d₂, e₂, f₂ : gustducine(green), d₃, e₃, f₃ : Merge(yellow)
bar=50μm

gustducine と抗 Nox3, Nox4 を共発現する細胞 (white arrow) が観察される。しかし, Nox2 と gustducine を共発現する細胞はみられない。

図 7 : 味蕾における Nox1, Nox1, Nox1 抗体と抗 SNAP-25 抗体との二重免疫染色像

a₁ : Nox1(red), b₁ : Nox1(red), c₁ : Nox1(red),
a₂, b₂, c₂ : SNAP-25(green), a₃, b₃, c₃ : Marge(yellow)
bar=50μm

SNAP-25 と Nox1, Nox1, Nox1 を共発現する細胞 (white arrow) が観察される。また, Nox1, Nox1, Nox1 にのみ陽性を示す細胞が味蕾内に散在している。

図 8 : 味蕾における Nox2, Nox3, Nox4 抗体と抗 SNAP-25 抗体との二重免疫染色像

d₁ : Nox2(red), e₁ : Nox3(red), f₁ : Nox4(red),
d₂, e₂, f₂ : SNAP-25(green), d₃, e₃, f₃ : Marge(yellow)
bar=50μm

SNAP-25 と Nox3, Nox4 を共発現する細胞 (white arrow) が観察される。また, Nox3, Nox4 にのみ陽性を示す細胞がみられたのに対して, Nox2 ではすべての Nox2 陽性細胞が SNAP-25 陽性を示している。

表 1 : 有郭乳頭上部上皮における各 Nox の発現

表 2 : 有郭乳頭味蕾における各 Nox の発現

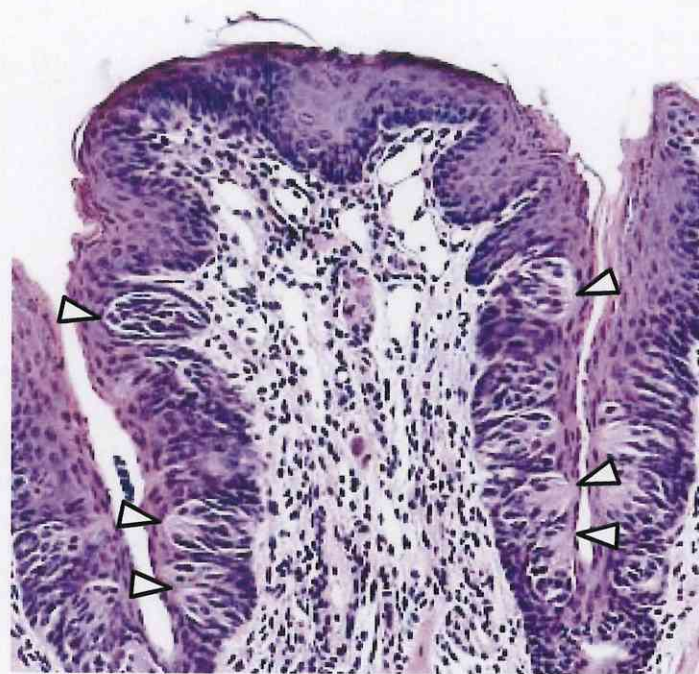


図1：マウス有郭乳頭のH-E染色像

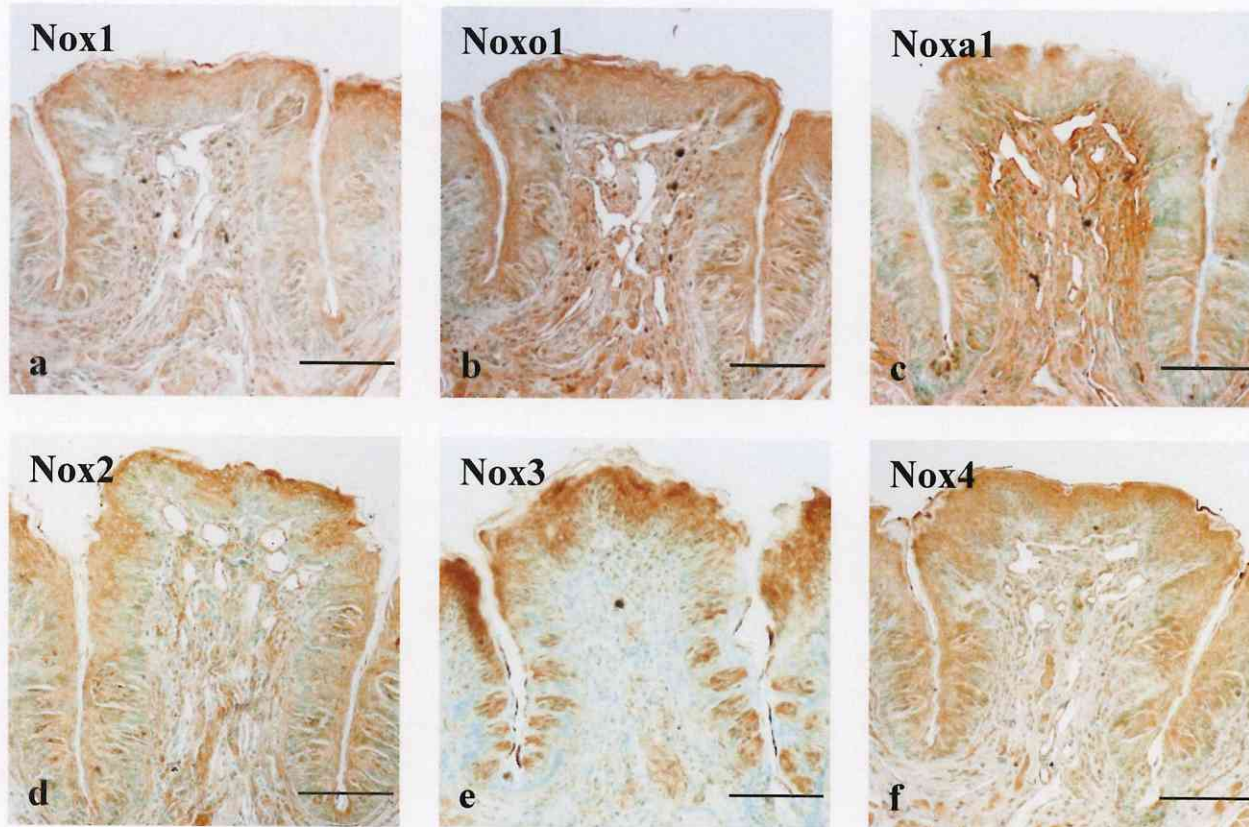


図 2 : 有郭乳頭における各Nox抗体による免疫染色像

a : Nox1, b : Noxo1, c : Noxa1, d : Nox2, e : Nox3, f : Nox4 bar = 100 μ m

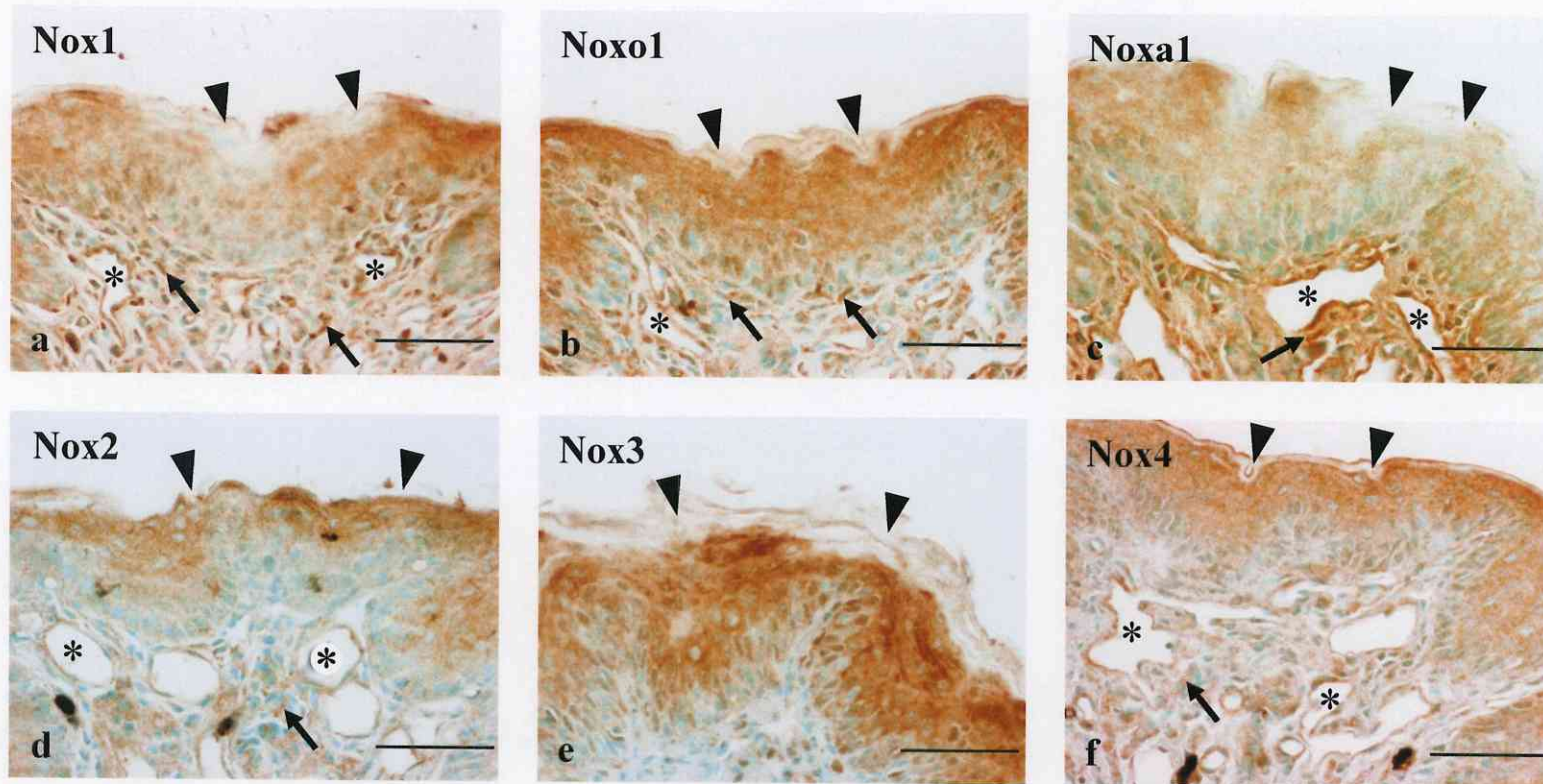


図 3 : 有郭乳頭上部上皮における各Nox抗体による免疫染色像

a : Nox1, b : Noxo1, c : Noxa1, d : Nox2, e : Nox3, f : Nox4 bar = 50 μ m

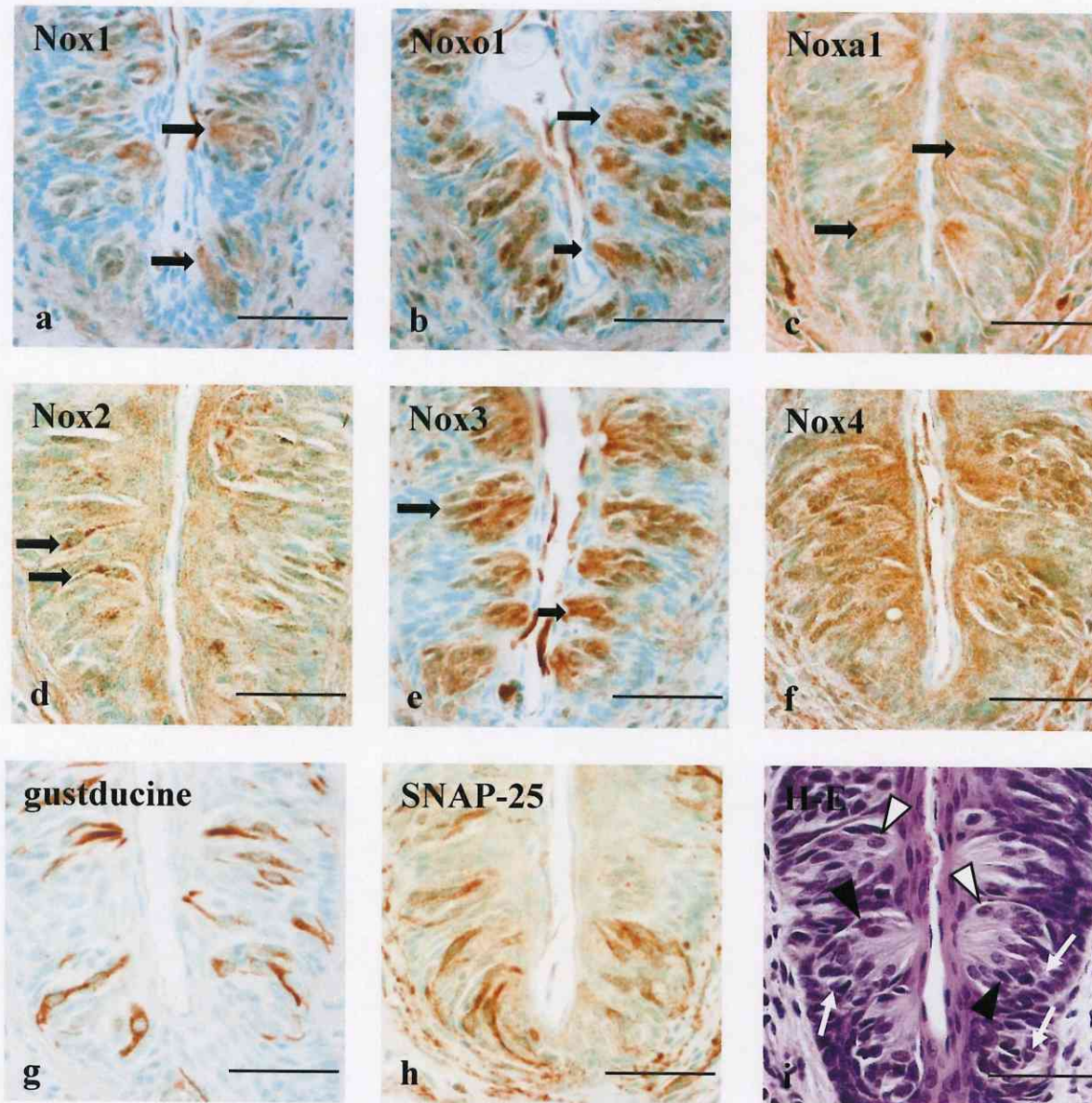


図 4 : 有郭乳頭味蕾における各Nox抗体と抗味細胞マーカーによる免疫染色像およびH-E染色像
 a : Nox1, b : Nox1, c : Nox1, d : Nox2, e : Nox3, f : Nox4, g : gustducine (Ⅱ型細胞のマーカー) ,
 h : SNAP-25 (Ⅲ型細胞のマーカー) , i : H-E bar = 50μm

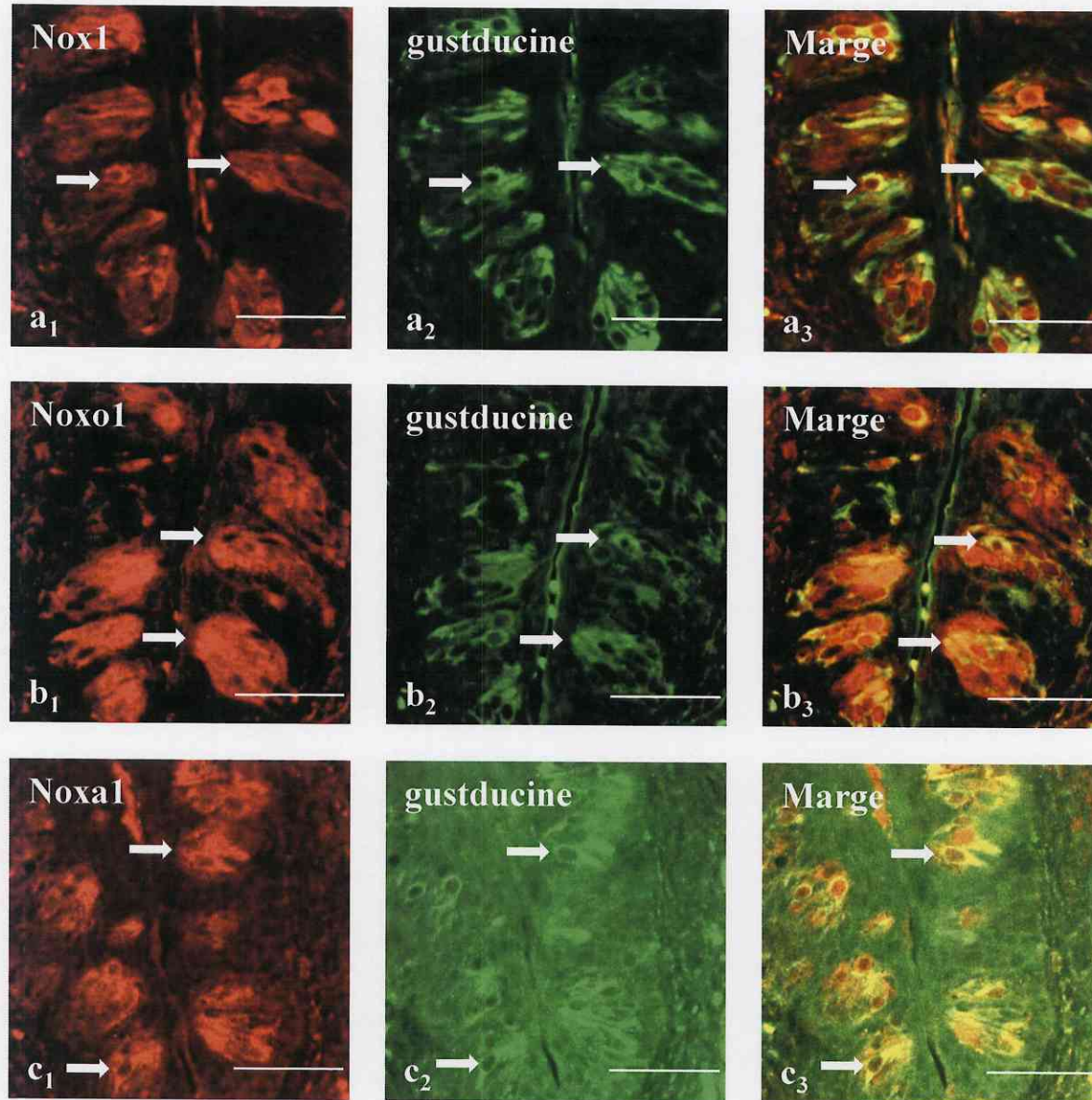


図5：味蕾におけるNox1, Noxo1, Noxa1抗体と抗gustducine抗体との二重免疫染色像

a₁ : Nox1(red), b₁ : Noxo1(red), c₁ : Noxa1(red), a₂, b₂, c₂ : gustducine(green), a₃, b₃, c₃ : Marge(yellow) bar = 50μm

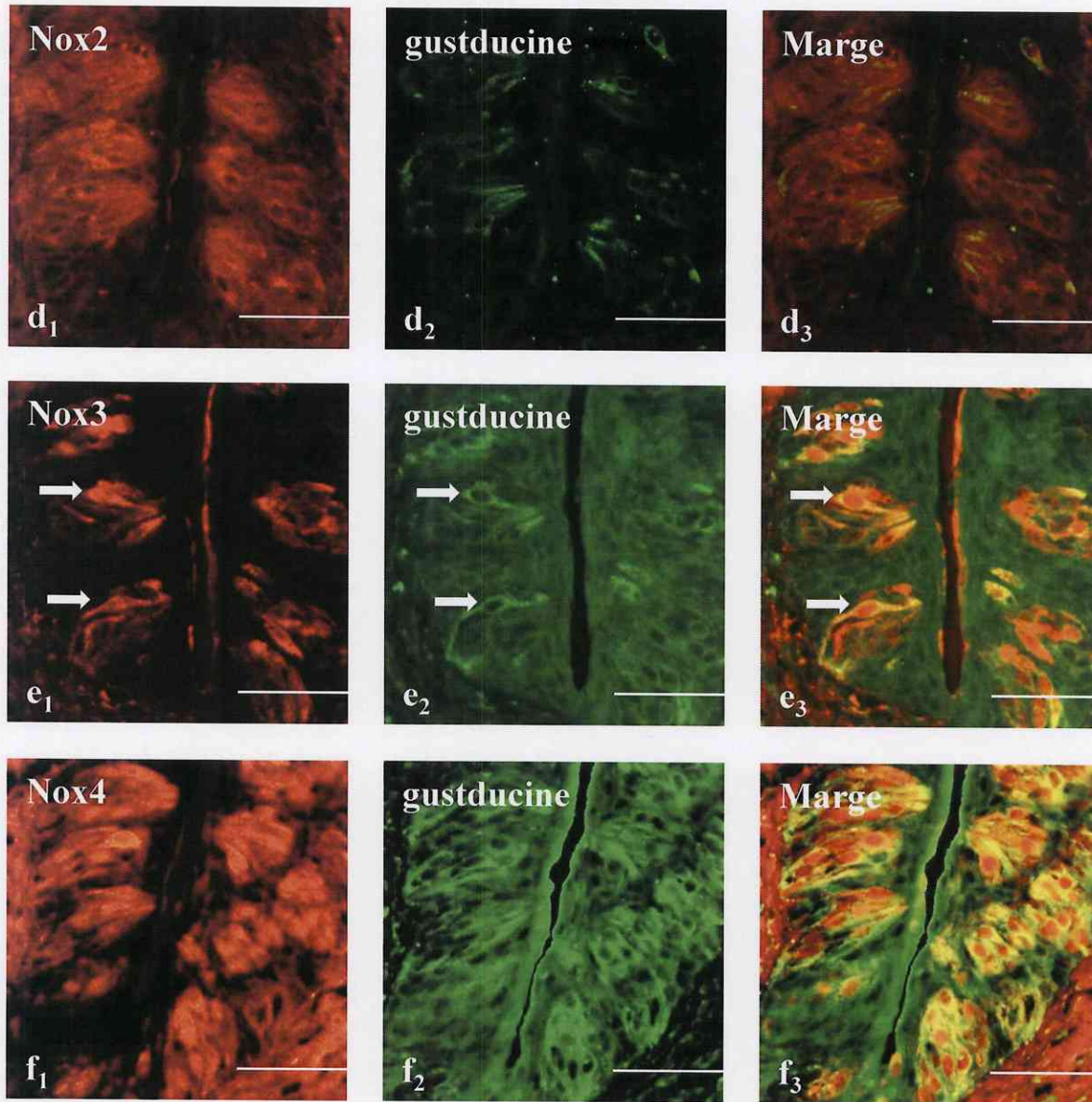


図6：味蕾におけるNox2, Nox3, Nox4抗体と抗gustducine抗体との二重免疫染色像

d₁ : Nox1(red), e₁ : Nox1(red), f₁ : Nox1(red), d₂, e₂, f₂ : gustducine(green), d₃, e₃, f₃ : Marge(yellow) bar = 50µm

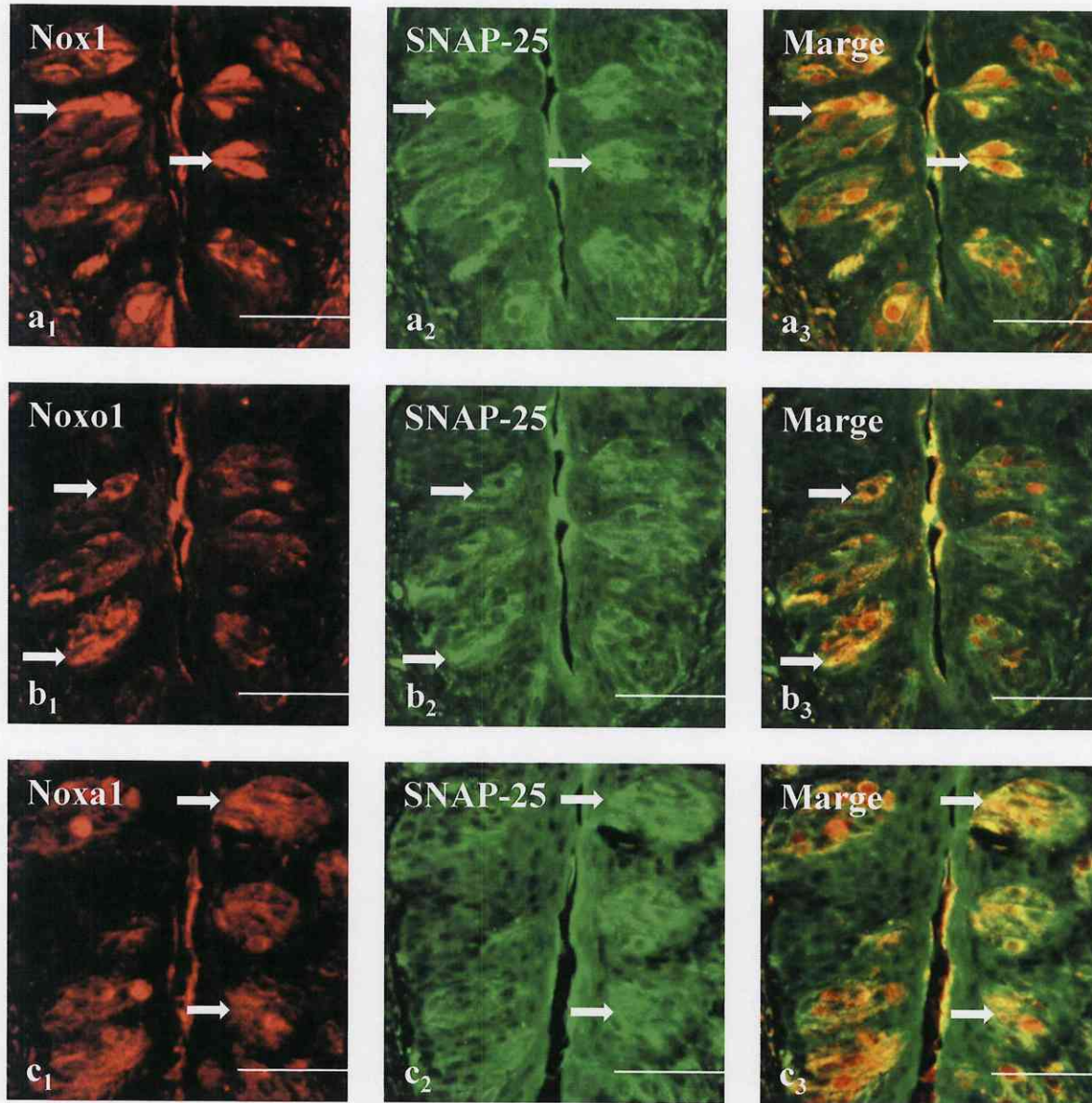


図 7 : 味蕾におけるNox1, Noxo1, Noxa1抗体と抗SNAP-25抗体との二重免疫染色像

a₁ : Nox1(red), b₁ : Noxo1(red), c₁ : Noxa1(red), a₂,b₂,c₂ : SNAP-25(green), a₃,b₃,c₃ : Marge(yellow) bar = 50μm

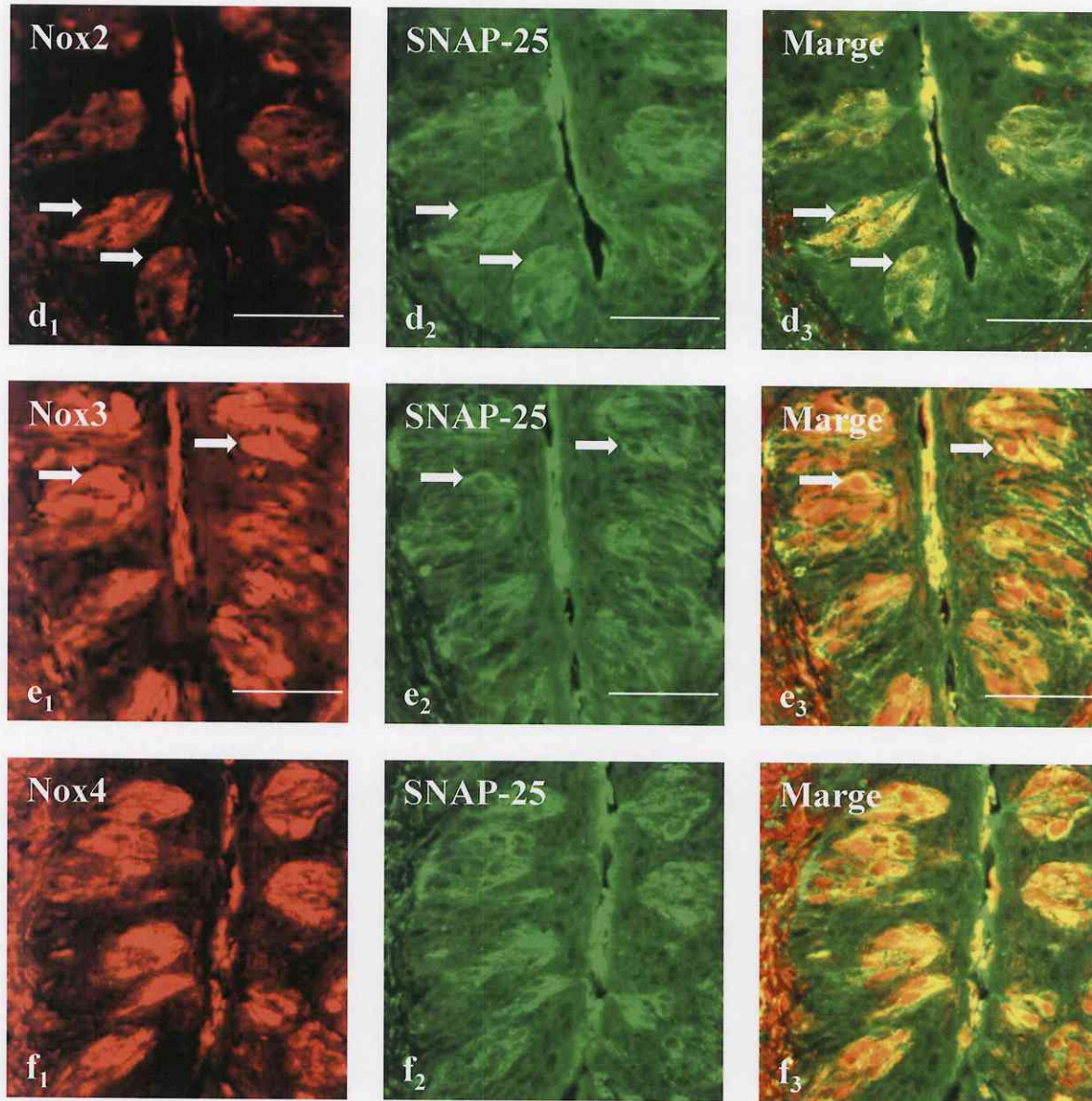


図 8 : 味蕾におけるNox2, Nox3, Nox4抗体と抗SNAP-25抗体との二重免疫染色像

d₁ : Nox1(red), e₁ : Nox1(red), f₁ : Nox1(red), d₂,e₂,f₂ : SNAP-25(green), d₃,e₃,f₃ : Marge(yellow) bar = 50μm

	Nox1	Nox01	Nox1	Nox2	Nox3	Nox4
角化層	—	—	—	—	—	—
顆粒細胞層	+	++	+	+	++	++
有棘細胞層	+	++	+	+	+	+
基底細胞層	+	++	+	—	±	±

表 1 : 有郭乳頭上部上皮における各Noxの発現

— : 陰性, ± : 弱陽性, + : 陽性, ++ : 強陽性

	Nox1	Nox01	Noxa1	Nox2	Nox3	Nox4
味細胞 (Ⅱ型細胞)	+	+	+	-	++	+
味細胞 (Ⅲ型細胞)	+	+	+	+	++	+
支持細胞 (Ⅰ型細胞)	-	+	-	-	++	+
基底細胞 (Ⅳ型細胞)	-	+	-	-	-	+

表 2 : 有郭乳頭味蕾における各Noxの発現

- : 陰性, + : 陽性, ++: 強陽性