

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09847

研究課題名（和文）COVID-19の味覚障害発生機序の解明：ACE2-BDNF連関からのアプローチ

研究課題名（英文）Elucidation of the Mechanism of COVID-19-Induced Taste Disorders: An Approach Based on ACE2-BDNF Linkage

研究代表者

河田 亮（Kawata, Akira）

神奈川県立大学・歯学部・准教授

研究者番号：30329198

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：COVID-19の症状の1つとして味覚障害がある。申請者の研究では、味覚障害の原因がSARS-CoV-2の味細胞への感染による細胞代謝の異常が示唆された。本研究では、細胞や動物を用いて分子生物学にそのメカニズムの解明を目指した。本研究期間において細胞や動物を用いた実験では想定した結果が得られなかったため、COVID-19関連死が疑われた検体の舌組織で分析を行った。その結果、SARS-CoV-2感染者の舌粘膜中に、ACE2などのSARS-CoV-2感染促進因子やSARS-CoV-2のマーカーであるSタンパク質が確認できたことから、舌粘膜がSARS-CoV-2の感染経路になることが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

味覚障害がSARS-CoV-2の感染に基づく代謝障害であることが明らかになれば、COVID-19の診断基準に含まれるための基礎的背景を提供することとなり極めて高い波及効果が期待できると考えている。本研究ではSARS-CoV-2の味細胞への感染メカニズムの解明には至らなかったが、舌苔などを含む舌表面にSARS-CoV-2が存在することが示され、舌が唾液中のウイルスの最も強力な感染源の1つであることが示された。したがって、舌苔の除去は口腔内のウイルス減少にも有効であると考えられ、口腔ケアがSARS-CoV-2対策に貢献することが期待されることを証明した点で大きな社会的意義を有すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：One of the symptoms of COVID-19 is taste disorder, and the applicant's research clearly showed that taste cells can also be directly infected by SARS-CoV-2, suggesting that the cause of taste disorder is abnormal cellular metabolism due to infection of taste cells with SARS-CoV-2. The present study aimed to elucidate the mechanism in molecular biology using cultured cells and experimental animals. As the cell and animal experiments did not yield the expected results, tongue tissues from suspected COVID-19-related deaths were obtained and analysed. As a result, SARS-CoV-2 infection-promoting factors such as ACE2 and TMPRSS2, and S protein, a marker protein of SARS-CoV-2, were identified in the tongue mucosa of SARS-CoV-2 infected individuals, providing evidence that the tongue mucosa is a route of SARS-CoV-2 infection.

研究分野：神経組織学

キーワード：COVID-19 味覚障害 ACE2 TMPRSS2 Sタンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

欧州の多施設において軽症から中等症の COVID-19 患者 415 人に対して行ったアンケート調査の結果では、85.6%の人に嗅覚障害がみられ、88.0%の人に味覚障害がみられたと報告されている (Lechien et al. Eur Arch Otorhinolaryngol 2020)。新型コロナウイルスによる嗅覚・味覚障害は、神経自体の障害というより、神経周辺にある嗅細胞の支持細胞等への障害により、嗅神経の機能が阻害されている可能性が指摘されている (Alam et al. Eur J Neurol 2020)。味覚障害もこの嗅覚異常に伴う場合と味細胞に関連する障害の 2 つの可能性が指摘されてきた。しかし、細胞生物学的には、新型コロナウイルス (以下、SARS-CoV-2) 感染による味覚異常の発症メカニズムに不明な点が多く、その解明が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、COVID-19 の味覚障害が SARS-CoV-2 の感染による代謝異常の原因となっているのではないかという学術的な問いに応えるために、研究開始当初は味細胞培養細胞株および遺伝子改変動物を用いて分子生物学にそのメカニズムを明らかにすることを目的としていたが、培養細胞および実験動物を用いた実験系では、当初想定していた結果が得られなかったため、神奈川歯科大学附属神奈川剖検センターで COVID-19 関連死が疑われた検体から舌組織を入手し分析を行い、味蕾を含む舌粘膜が SARS-CoV-2 の感染経路となるのかを、SARS-CoV-2 感染者の舌粘膜における ACE2 や TMPRSS2 などの SARS-CoV-2 感染促進因子と SARS-CoV-2 の特異的抗原物質である S タンパク質の発現などを指標として明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

2021 年 5 月 17 日から 10 月 14 日まで、神奈川歯科大学附属神奈川剖検センターで COVID-19 関連死が疑われた剖検例 23 例を検討した。23 例の内訳は男性 17 例、女性 6 例で、年齢は 46 ~ 90 歳 (平均年齢 66.6 歳) であった。本研究は神奈川歯科大学研究倫理審査委員会 (No.734) の審査・承認を得た。各検体の舌の後部 1/3 を主な採取部位として剖検時に切除し、乳頭を可能な限り含むようにした。標本は 10%ホルマリン溶液で 24 時間以上固定した後、パラフィン包埋し、組織切片を作製した。

(1) 形態学的観察

各検体の組織切片をヘマトキシリン・エオジン染色 (H-E 染色) し、COVID-19 感染者の舌背粘膜の組織学的検討を行った。

(2) 免疫染色

各検体の組織切片に対し、SARS-CoV-2 感染促進因子である ACE2 や TMPRSS2、SARS-CoV-2 の特異的抗原物質である S タンパク質の抗体を用いて免疫組織化学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) 形態学的所見

舌の粘膜上皮は非常に厚い角質層を形成し、よく発達した系状乳頭を有していた (図 1A)。組織像は黒毛舌に類似していた。扁平上皮の表層は顕著な角化、細菌付着、剥離細胞を示したが、顆粒細胞は形成されなかった (図 1B)。有棘層の細胞の細胞質には、空胞化と鱗屑を示す細胞が含まれていた (図 1C)。基底細胞は有糸分裂の増加を示さなかった。一部の細胞には、封入体様の構造を示唆する明るい領域が認められた。舌の扁平上皮には異型は観察されなかった。

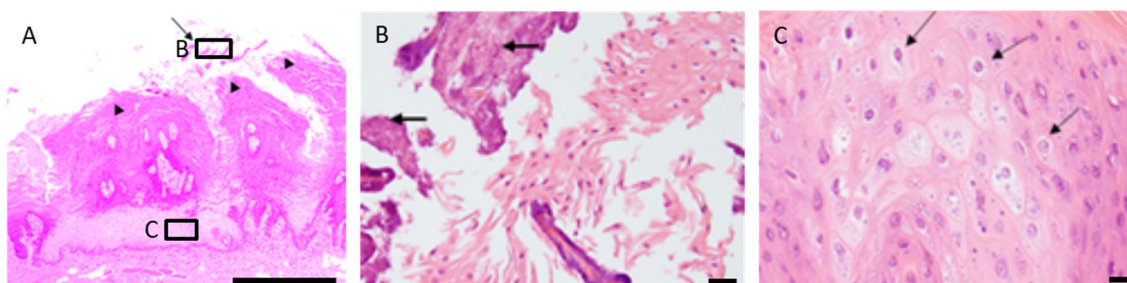


図 1 舌背粘膜の H-E 染色像

A: SARS-CoV-2 陽性死後標本の舌背のヘマトキシリン・エオジン染色 (H-E 染色)。舌粘膜上皮は

厚く角化し，発達した糸状乳頭を示した(矢頭)。B: 付着細菌細胞と脱落細菌細胞が観察された(矢印)。C: 細胞質封入体構造(矢印)および空胞化が有棘層細胞で観察された。
Scale bar = (A) 200 μm , (B) 50 μm , (C) 20 μm

(2)免疫組織化学的所見

ACE2 はすべてのサンプルにおいて，上皮内で一貫して発現していた(図 2A)。周囲の細胞より高発現の細胞が散在していた(図 2B)。ACE2 は細胞膜と細胞質に局在していた。TMPRSS2 は主に上皮の細胞膜に局在し，23 検体すべての上皮(角質層と舌苔を含む)に発現していた(図 3A)。上皮では ACE2 と TMPRSS2 が共発現し(図 2A, B, 図 3B, C)，S 蛋白(SARS-CoV-2 特異的抗原)は基底細胞と上皮表層に発現していた(図 4A)。明らかな S 蛋白陽性細胞は上皮下組織の毛細血管上皮細胞であった(図 4C)。高発現を示す細胞の一部には細胞質封入体が観察された(図 4B)。

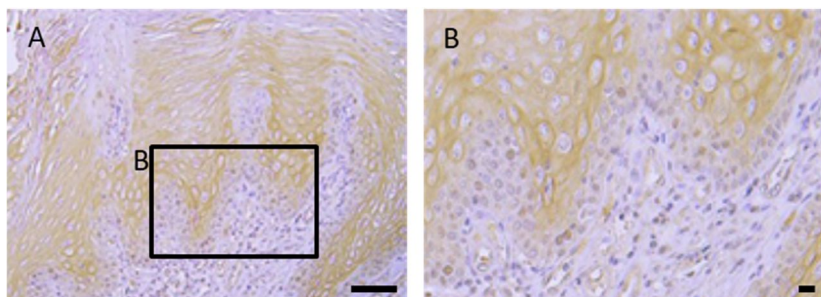


図 2 舌背粘膜の ACE2 免疫染色像
舌背上皮における SARS-CoV-2 関連蛋白の免疫組織化学的所見。ACE2 抗体による染色。
Scale bar = (A) 50 μm , (B) 20 μm

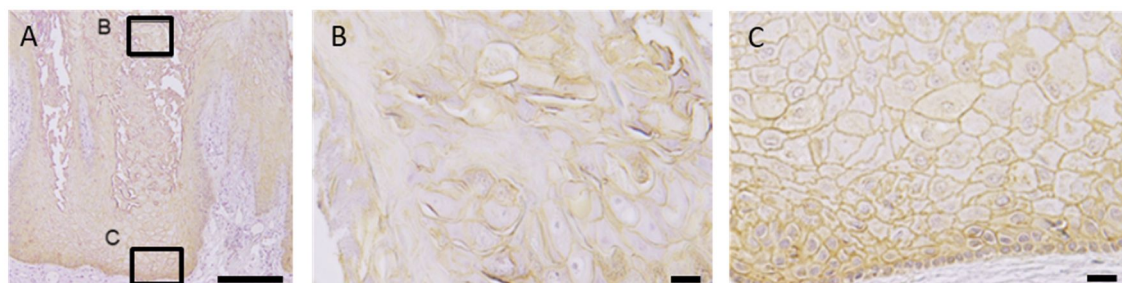


図 3 舌背粘膜の TMPRESS2 免疫染色像
A: 舌背上皮における SARS-CoV-2 関連蛋白の免疫組織化学的所見。TMPRESS2 抗体による染色。
B: 舌の角質層の拡大図。C: 舌の基底膜層の拡大図。
Scale bar = (A) 100 μm , (B) 20 μm , (C) 20 μm

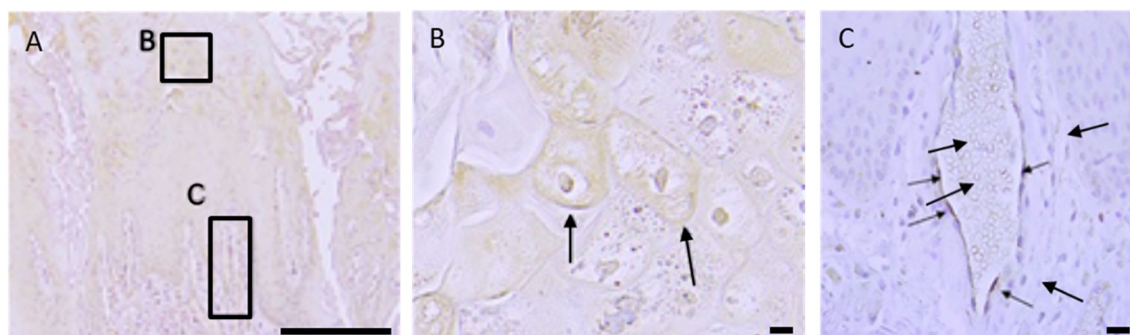


図 4 舌背粘膜の S-protein 免疫染色像
A: 舌背上皮における SARS-CoV-2 関連蛋白の免疫組織化学的所見。S-protein 抗体による染色。
B: 矢印は上皮細胞細胞質の陽性領域を示す。C: 矢印は血管内皮細胞の陽性領域を示す。
Scale bar = (A) 100 μm , (B) 20 μm , (C) 20 μm

本研究では、SARS-CoV-2 陽性死後検体から採取した舌組織の一部を分析した。壊死性変化や変性変化は観察されず、基底層と傍基底層で増殖活性が検出されたことから、検体は死後の変化に大きな影響を受けていないことが示された。SARS-CoV-2 感染者の舌粘膜中に細胞質封入体やSタンパク質が確認できたことから、舌粘膜がSARS-CoV-2の感染経路になることが証明された。坂口らは、ACE2が舌粘膜上皮の基底層や有棘層、それと特に上皮表面に強く発現していることを報告している。沢らも、ACE2は上皮の上部1/3に強く発現し、TMPRSS2が有棘層の細胞膜に局在することを報告している。本研究では、ACE2の発現が舌粘膜上皮の表層に強く認められ、TMPRSS2も同様に上皮表層に発現していた。さらにACE2とTMPRSS2は、その他の領域を含めた上皮全層に陽性所見が観察され、これまでの報告よりも両タンパク質の発現は広範囲であった。このようなSARS-CoV-2感染促進因子の組織所見の相違は、SARS-CoV-2の舌粘膜への感染により、炎症性サイトカインの発現が増加することが考えられる。なお本研究で使用した試料は、日本でオミクロン株が蔓延する以前に採取されたものである。オミクロン株とそれ以前の株とでは、侵入経路が異なることが示唆されている⁷⁾。オミクロン株が以前に流行していた株と同じ性質を示すかについては、さらなる研究が必要である。本研究では、舌苔などを含む舌表面にSARS-CoV-2が存在することが示され、舌が唾液中のウイルスの最も強力な感染源の1つであることが示された。舌苔は気道に吸引されると肺炎のリスクを高める。したがって、口腔ケアの際に舌苔を処理することは、その予防にとって重要である。舌苔の除去は口腔内のウイルス減少にも有効であると考えられ、口腔ケアがSARS-CoV-2対策に貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tamiya Jun, Sakaguchi Wakako, Nakagawa Kimiko, Yamamoto Toshiharu, Saruta Juri, Kubota Nobuhisa, Kawata Akira, Hasegawa Iwao, Hamada Nobushiro, Tsukinoki Keiichi	4. 巻 56
2. 論文標題 Detection of SARS-CoV-2 and Its Related Factors on the Mucosal Epithelium of the Tongue	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 29 ~ 37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.22-00089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河田 亮
2. 発表標題 COVID19 の味覚障害発生機序の解明
3. 学会等名 神奈川歯科大学学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	猿田 樹理 (Saruta Juri) (30454151)	神奈川歯科大学・歯学部・教授 (32703)	
研究分担者	杉本 昌弘 (Sugimoto Masahiro) (30458963)	慶應義塾大学・政策・メディア研究科(藤沢)・教授 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------