

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10020

研究課題名(和文)インプラント治療における味覚変化メカニズムの解明

研究課題名(英文)Taste alteration in dental implant treatment

研究代表者

辻村 麻衣子(羽下麻衣子)(Tsujiura, Maiko)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授

研究者番号：60535219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：味覚に関わる組織は、歯科治療の影響を受ける可能性がある。本研究では、味覚受容器の味蕾に着目し、インプラント埋入前に行われることが多い抜歯による変化を検索した。抜歯したラット(抜歯群)と抜歯せずに全身麻酔薬とその拮抗薬の投与のみ行ったラット(非抜歯群)の有郭乳頭周囲に対して生化学的手法と組織学的手法による解析を行った結果、抜歯群と非抜歯群で差があるタンパク質が存在したが、味細胞のマーカーとして用いられるタンパク質に関しては明確な差がみられなかった。一方で、未処置のラットを用いて味細胞の特性を検索し、味細胞の細胞型の細分化につながる情報を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

味覚はおいしく食べるために必要な感覚であるため、味覚の変化はQOL(生活の質)に深く関わる。味覚を受容する味細胞の新たな特性を明らかにした本研究結果は、味覚に関する非常に重要な情報であり、味覚障害への新規のアプローチにつながる可能性がある。また、抜歯による味蕾の変化に関する情報は、インプラント治療などの歯科治療の予後向上の一助となるかもしれない。このように、味覚障害と歯科治療の予後という2つの観点から、本研究の学術的意義及び社会的意義は大きいといえる。

研究成果の概要(英文)：Dental treatment possibly changes the tissues related to taste. Before the dental implant placement, teeth are often extracted; therefore, the information about taste alteration after tooth extraction is important for the prognosis of dental implant treatment. This study examined the alteration in taste buds after the tooth extraction. In male Wistar rats, the upper molars were extracted bilaterally (test group). Some rats were only anesthetized without the tooth extraction (control group). The small blocks of tongue containing circumvallate papillae were harvested from rats of both groups after the healing period, and assessed by means of biochemistry and histology. Many proteins including taste cell makers didn't change dramatically after the extraction. On the other hand, we observed taste cells that have the characteristics of both Type II cells and Type III cells in rats without any surgeries, which suggested new subtypes of taste cells.

研究分野：口腔組織学

キーワード：歯科インプラント 抜歯 味覚 有郭乳頭 味蕾

1. 研究開始当初の背景

歯科の臨床では、抜歯やその他の外科処置などの後に味覚障害が起こることがある。味覚受容器である味蕾が抜歯後に変化するという報告 (Hsu JC et al., Acta Odontol Scand. 2014, 72:880-6) がみられることから、抜歯やインプラント埋入などの外科的歯科治療により、味蕾をはじめとする味覚に関わる組織が変化し、味覚障害が生じる可能性があると考えられるが、その詳細は解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、インプラント埋入前に行われることが多い抜歯に着目し、味覚に関わる組織の抜歯による変化を生化学的手法や組織学的手法を用いて検索することで、インプラント治療における味覚変化メカニズムの一端を解明することである。

3. 研究の方法

本研究では、Wistar 系雄性ラットを用いて、以下の実験を行った。なお、本研究は日本歯科大学新潟生命歯学部動物実験倫理審査委員会の審査を受け、承認されている (承認番号 217)。

(1) タンパク質発現・相対定量解析

5週齢ラット6匹の上顎臼歯をすべて抜去した (抜歯群)。また、別の5週齢ラット6匹には抜歯を行わず、抜歯群と同様の全身麻酔薬と拮抗薬の投与のみ行うコントロールとした (非抜歯群)。4週後、両群のラットを安楽死させ、舌の有郭乳頭とその周囲組織を一塊として採取 (図1)、凍結し、以下のように iTRAQ® 試薬を用いたタンパク質発現・相対定量解析を行った (アンテグラル株式会社に委託)。

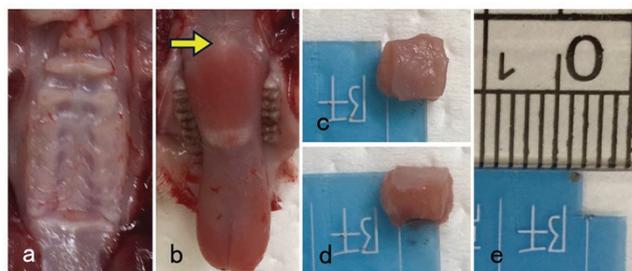


図1 抜歯4週後の抜歯窩周囲 (a)、ブロック採取部位 (b)、採取したブロック (c, d) とスケール (e) 抜歯窩は肉眼的に治癒している。採取した小さなブロックは、舌の有郭乳頭 (矢印) と周囲の組織であり、上皮組織とともにそれ以外の組織を多く含んでいる。

凍結サンプルを溶解し、タンパク質を抽出した。TCA 沈殿・再溶解し、タンパク質定量 (BCA法) および電気泳動を実施した (必要なタンパク質量の確保を確認した) 後、抜歯群のサンプル6検体、非抜歯群のサンプル6検体をそれぞれ、同じタンパク質量ずつ混合した。酵素消化・ラベル化試薬により標識されたペプチドを SCX によって6分画、精製し、各フラクションを LC-MS/MS 分析に供した。得られたデータをタンパク質データベースで検索し、同定されたタンパク質リスト・比較定量値をまとめた。さらに、味細胞と関連するタンパク質の一部については、データベースを変更し、指定タンパク質のみのデータベースを作成して、再解析を実施した。

(2) 免疫組織化学的解析

未処置のラットを灌流固定して、茸状乳頭を含むパラフィン切片と有郭乳頭を含む凍結切片作製した。これらの切片に、味細胞のⅡ型細胞とⅢ型細胞のマーカーとされているタンパク質で、(1)の実験で検出された vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP 2) と検出されなかった数種類の味細胞のマーカーに対する免疫染色を施し、染色条件を決定した。

① 7週齢で上顎臼歯をすべて抜去したラットと7週齢で全身麻酔薬と拮抗薬のみ投与したコントロールのラットを2週後に安楽死させ、両ラットから有郭乳頭を含む舌組織を採取した。採取した試料を浸漬固定し、作製した凍結切片に VAMP 2 と味細胞であるⅢ型細胞のマーカーとされている neural cell adhesion molecule (NCAM) の蛍光二重免疫染色を施した。

② 5週齢ラットの上顎臼歯をすべて抜去した（抜歯群）。また、一部のラットは、コントロールとして、抜歯せずに全身麻酔薬とその拮抗薬の投与のみを行った（非抜歯群）。4週後、両群のラットを灌流固定し、有郭乳頭を含む舌の一部を採取した。採取した舌のブロックからパラフィン切片を作製し、NCAM などに対する免疫染色を行った。

③ 未処置の7-8週齢ラットを灌流固定し、有郭乳頭を含む舌の一部を採取した。採取した試料から凍結切片を作製し、NCAM、VAMP2と味細胞であるII型細胞のマーカーとされているgustducinの抗体を用いて、蛍光多重免疫染色を行った。

4. 研究成果

タンパク質発現・相対定量解析 実験方法（1）の成果

抜歯後、1週ごとに4週まで測定した体重を2元配置分散分析したところ、安楽死させた4週まで両群とも経時的に体重が増加していたが、両群間に差はなかった。

解析では、2400以上のタンパク質が同定された。非抜歯群と比較して抜歯群が少ないタンパク質と多いタンパク質がほぼ半数ずつであった。特に大きく変化したタンパク質（表1）に注目すると、抜歯後に大きく減少したタンパク質は象牙質形成に関わるホスホホリンのほか、細胞の恒常性に関わるタンパク質が多く、逆に抜歯後に大きく増加したタンパク質は代謝に関わり、エネルギーを作るタンパク質が多いように思われた。抜歯後、一部のタンパク質が分解され減少すると連動して、タンパク質分解抑制に関わるタンパク質が増加することも推測された。抜歯後1か月の段階では、創傷治癒のために、エネルギーを作り出し、肉芽組織や骨組織の形成を行うように変化しているのかもしれない。このような変化は、全身的である可能性も、抜歯窩と比較的近接している組織のみに影響が波及している可能性も考えられる。

表1 同定されたタンパク質の抜粋（抜歯群/非抜歯群の値が<0.6、>1.7を抜粋）

Accession	Description	Abundance Ratio: (rat_test) / (rat_control)
抜歯後大きく減少したもの		
XP_006252722.1	nuclear receptor coactivator 4 isoform X1	0.383
XP_032774649.1	glutathione reductase, mitochondrial	0.422
NP_001102043.1	rab-like protein 6	0.449
AAB19309.1	phosphophoryn=peptide fragment 12-44	0.461
NP_001005762.1	vinexin	0.482
P10688.1	Phospholipase C-delta-1	0.534
Q0KL00.3	Membrane protein induced by beta-amyloid treatment	0.537
CAB01633.1	Collagen alpha1, partial	0.553
EDL97000.1	trefoil factor 2 (spasmolytic protein 1), isoform CRA_b	0.559
P97834.1	COP9 signalosome complex subunit 1	0.56
XP_032765903.1	transmembrane protease serine 13 isoform X1	0.565
抜歯後大きく増加したもの		
NP_001102310.1	signal recognition particle 68 kDa protein	1.72
NP_001019432.1	CCA tRNA nucleotidyltransferase 1, mitochondrial	1.77
Q8K3K4.1	Transforming growth factor beta repressible serpin	1.81
XP_006230381.1	apolipoprotein B receptor isoform X1	1.85
Q68FP2.1	Serum paraoxonase/lactonase 3	1.87
NP_599153.2	albumin precursor	1.92
Q9ER24.1	Ataxin-10	1.99
XP_032770851.1	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5 isoform X1	2.11
XP_003752852.1	mast cell protease 8-like	2.47
EDL77302.1	rCG25644, isoform CRA_c	2.51
Q64649.2	Phosphorylase kinase alpha M subunit	2.75
Q63598.2	Plastin-3	3.12

一方、この解析では味細胞のマーカとして用いられるタンパク質はほとんど検出できなかった。そのため、味細胞と関連するタンパク質の一部を指定し、そのタンパク質のみのデータベースを作成して再解析したが、再解析においても、検出感度外のタンパク質が多く、結果が出たタンパク質についても差がほとんどなかった(表2)。1回目の解析と再解析の両方で検出されたVAMP2についても、大きな差はみられなかった。抜歯により味蕾が変化すると報告(Hsu JC et al., Acta Odontol Scand. 2014, 72:880-6; Mostafa S et al., F1000Res. 2019, 8:1667)があることから、味蕾に存在する味細胞も抜歯で変化すると予想していたが、有郭乳頭を含む舌の一部を用いた今回の解析では味細胞のマーカとして用いられるタンパク質が検出不可能、あるいはほぼ差がないという結果であった。味細胞に含まれるタンパク質の変化の有無を明らかにできなかったのは、味蕾が存在する上皮組織以外の部分を多く含む試料(大部分が味蕾以外の組織)であったことが影響している可能性があると考え、味蕾におけるタンパク質の局在を観察する免疫組織化学的検索(実験方法(2))を進めることとした。

表2：再解析結果

Accession	Description	Abundance Ratio: (rat_test) / (rat_control)
NP_001004021.1	keratin, type I cytoskeletal 13	1.002
NP_036795.1	vesicle-associated membrane protein 2	0.85
NP_058917.1	sonic hedgehog protein precursor	1.118
NP_037270.1	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	0.947
参考: 1回目		
CAB43509.1	vesicle associated membrane protein 2B	0.943

免疫組織化学的解析 実験方法(2)①の成果

浸漬固定して作製した凍結切片にVAMP2とNCAMの免疫染色を施したところ、抜歯ラットと非抜歯ラットで同様に染色されているようにみられたが、味蕾の細胞に萎縮がみられ、特に抜歯後の試料で著しかったため、詳細な定性的評価は難しかった(図2)。灌流固定を行わず、浸漬固定のみ行った影響で細胞萎縮した可能性があると考え、灌流固定した試料を用いた実験(実験方法(2)②)を行うこととした。

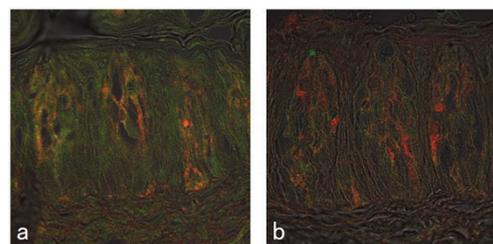


図2 抜歯ラット(a)と非抜歯ラット(b)のVAMP2(赤)とNCAM(緑)に対する蛍光二重免疫染色
どちらの群においても、細胞の萎縮がみられ、反応の比較は困難であった。

免疫組織化学的解析 実験方法(2)②の成果

数種類の抗体を試したところ、抜歯群と非抜歯群は同様に染色されていた。NCAMに関しては、はじめ抜歯群のみで細胞萎縮がみられ、反応が弱いようであったため、抜歯による影響と予想し、試料を追加したところ、両群の染色性に大きな違いは認められなかった(図3)。また、抜歯群のみで著しい細胞萎縮が生じると予想したが、非抜歯群でも細胞萎縮した試料が存在したので、本実験においては、抜歯が細胞萎縮に影響しているとは断定できず、試料作製過程や保存方法が影響している可能性が考えられた。

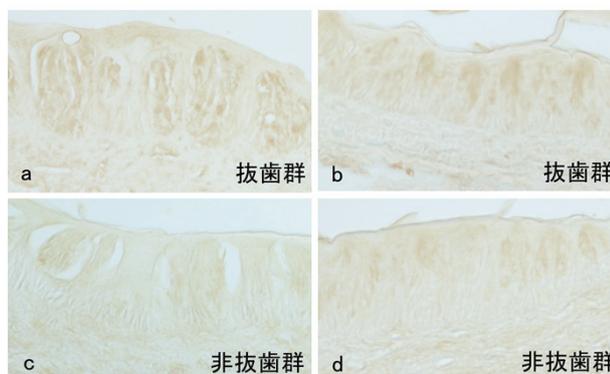


図3 抜歯群(a, b)と非抜歯群(c, d)のNCAMに対する免疫染色像

両群において、細胞が萎縮している試料(a, c)と萎縮していない試料(b, d)のどちらもみられた。また、染色性にも大きな違いは認められなかった。

上記の免疫組織化学的検索を進める過程において、抜歯の味蕾への影響を明らかにするには、味蕾の細胞自体が持つ特徴を調べる必要があると考え、未処置のラットを用いて、味蕾の細胞の特性を明らかにする実験（実験方法（2）③）を行うこととした。

免疫組織化学的解析 実験方法（2）③の成果

味蕾の細胞は形態学的にⅠ－Ⅳ型に分類されており、味細胞はⅡ型細胞とⅢ型細胞とされているが、本研究での蛍光多重免疫染色の結果、Ⅱ型細胞のマーカースとされているgustducinとⅢ型細胞のマーカースとされているNCAM、Ⅱ型細胞とⅢ型細胞のマーカースとされているVAMP2のすべての抗体に反応する細胞などがみられ、味細胞の細胞型に関する新知見を得ることができた。この結果をもとに作成した論文は、Odontologyに受理された（雑誌論文参照）。

本研究において、抜歯後の舌有郭乳頭付近の組織に含まれるタンパク質の変化などが確認されたが、その変化は大きいものではなかった。抜歯はインプラント埋入前にも行われることが多い代表的な口腔外科的処置であるが、これまで抜歯後の有郭乳頭周囲組織のタンパク質や味細胞に着目した本研究のような解析は行われていないため、本研究の結果はインプラント治療をはじめとする歯科治療の予後に関わる重要な情報といえる。しかし、試料における細胞の萎縮などを考慮すると、今後さらなる検証が必要である。

また、未処置のラットから採取した有郭乳頭の味蕾を免疫組織化学的に検討した結果、味細胞のⅡ型細胞とⅢ型細胞の両方の特徴を持つ細胞が確認され、味細胞に関する新規情報を得ることができた。味覚障害の原因の一つとして、味蕾の活発なターンオーバーに必須である亜鉛の欠乏が挙げられているように、味蕾やそこに存在する味細胞は味覚障害を考えるうえで、重要なターゲットといえる。味細胞自体の特徴は、抜歯やインプラント埋入後の味蕾の変化を解析する際の基礎ともなる。本研究の成果が、味覚障害やインプラント治療の予後向上への新たなアプローチにつながると期待している。

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 0件）

1. 著者名 Inoko Shuhei, Katagiri Hiroki, Tsujimura Maiko, Yoshie Sumio	4. 巻 -
2. 論文標題 The existence of cells exhibiting characteristics of both Type II and Type III cells in rat taste buds. An immunohistochemical and electron-microscopic study	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10266-024-00948-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	今井 あかね (Imai Akane) (60180080)	日本歯科大学新潟短期大学・その他部局等・教授 (43107)	
研究分担者	中原 賢 (Nakahara Ken) (20610257)	日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授 (32667)	

	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
研究協力者	猪子 修平 (Inoko Shuhei)		
研究協力者	片桐 浩樹 (Katagiri Hiroki)		

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
---------	---------