

令和 5 年 4 月 26 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21036

研究課題名(和文)新型コロナウイルス感染による舌味覚障害発生のメカニズム解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of taste dysfunction caused by SARS-CoV-2 (COVID-19)

研究代表者

山本 徹 (Yamamoto, Toru)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：20707335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：新型コロナウイルス感染症は、初期症状や後遺症として味覚や嗅覚の喪失や変化を引き起こすことがあるが、詳細メカニズムは不明だった。本研究では、雄性SDラットを用い、SARS-CoV-2 recombinant proteinが味蕾細胞のアポトーシスと関連サイトカインTNF- α 発現を誘導するか検討した。SARS-CoV-2群では対照群に比べ味蕾細胞アポトーシス、TNF- α 陽性細胞数が有意に増加した。SARS-CoV-2タンパク質により惹起される感染・炎症応答と免疫細胞動員などの機序により味蕾細胞のアポトーシスが生じることが、COVID-19感染後の味覚障害に関与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はCOVID-19による味覚異常の機序の一端を明らかにすること、COVID-19に関する知見を蓄積することで有効な感染症対策に資することを目指しました。本研究結果から、SARS-CoV-2タンパク質により惹起される感染・炎症応答と免疫細胞動員などの機序により味蕾細胞のアポトーシス(細胞死)ならびに味蕾構造の退行性変化が生じることが、COVID-19感染後の味覚障害の一因として関与している可能性が考えられました。将来の新興感染症によるパンデミック発生時における味覚障害へ対応するための基礎的知見を集積できた点で大きな社会的意義を有すると考えられます。

研究成果の概要(英文)：Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infections can cause loss or alteration of taste and smell as early symptoms or sequelae, but the detailed mechanism behind this phenomenon remains unclear. Here, we investigated whether the SARS-CoV-2 spike protein induces taste cell apoptosis and expression of the apoptosis-related cytokine TNF- α in male Sprague-Dawley rats. TUNEL assay results revealed a significantly higher apoptosis index for taste cells in the SARS-CoV-2 group than for those in the control group. An immunohistochemistry analysis indicated significantly more TNF- α -positive cells in the SARS-CoV-2 group compared with the control group. These data suggest that the SARS-CoV-2 spike protein promotes taste cell apoptosis and the release of apoptosis-related cytokine TNF- α , implicating its contribution to the taste malfunction caused by coronavirus disease 2019 (COVID-19).

研究分野：麻酔科学、神経科学

キーワード：新型コロナウイルス COVID-19 SARS-CoV-2 味覚障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 患者において、発熱、咳、鼻水や鼻づまりなどの鼻症状がない状態での、嗅覚異常と味覚異常が報告されており、感染の初期症状として、注目されている。しかし、COVID-19 による味覚障害が、嗅覚異常の随伴により生ずるものなのか、それとも舌の味覚を感知する味蕾細胞への直接作用によるもののかなど、その詳細はまだ明らかではない。

本研究は COVID-19 による味覚異常の病態を解明すること、また味覚異常の回復に関する治療法の開発を目指すとともに、COVID-19 に関する知見を蓄積することで COVID-19 への有効な感染症対策に資することを目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、COVID-19 による味覚異常の病態を解明すること、また味覚異常の回復に関する治療法の開発を目指すことで、COVID-19 の病態解明に役立てる足がかりとすることである。体内への入り口である口腔は、鼻腔とともにまず先んじて感染する部位である。味覚障害は COVID-19 感染初期の重要な自覚症状のひとつであり、本研究計画により COVID-19 に関する知見を蓄積することは、今後の有効な COVID-19 感染症対策に資すると考える。

3. 研究の方法

(1) 味蕾における ACE2 受容体発現

雄性 6 週齢 Sprague Dawley ラットを使用した。三種混合麻酔下で灌流固定し、舌の組織切片を作製した。抗 ACE2 抗体を用いて免疫組織化学的検討を行った。

(2) SARS-CoV-2 recombinant spike protein の有郭乳頭味蕾への影響

麻酔下のラットに対し、SARS-CoV-2 recombinant spike protein を有郭乳頭に 30 分間塗布する SARS-CoV-2 群、生理食塩水群、舌咽神経切断群、不活性化 SARS-CoV-2 タンパク質群 (各群 n = 4) において介入 12 日後に灌流固定し組織切片を作製後、味蕾マーカー UEA- を用いて蛍光顕微鏡下に味蕾数・味蕾面積・DAPI 陽性味蕾細胞数を定量比較検討した。

(3) SARS-CoV-2 recombinant spike protein による味蕾細胞死 (アポトーシス) 誘導

SARS-CoV-2 群、対照群を処置後 48 時間後で灌流固定を行い組織切片を作製し、TUNEL assay を用いて SARS-CoV-2 recombinant spike protein による味蕾細胞死 (アポトーシス) 誘導について検討した。

(4) SARS-CoV-2 recombinant spike protein による TNF- α 誘導

SARS-CoV-2 群、対照群を処置後 48 時間後で灌流固定を行い組織切片を作製し、抗 TNF- α 抗体を用いて SARS-CoV-2 recombinant spike protein による味蕾における TNF- α 発現について検討した。

4. 研究成果

(1) 味蕾における ACE2 受容体発現 (Figure 1)

雄性 6 週齢 Sprague Dawley ラットの舌有郭乳頭における ACE2 受容体発現を免疫染色により

確認した。

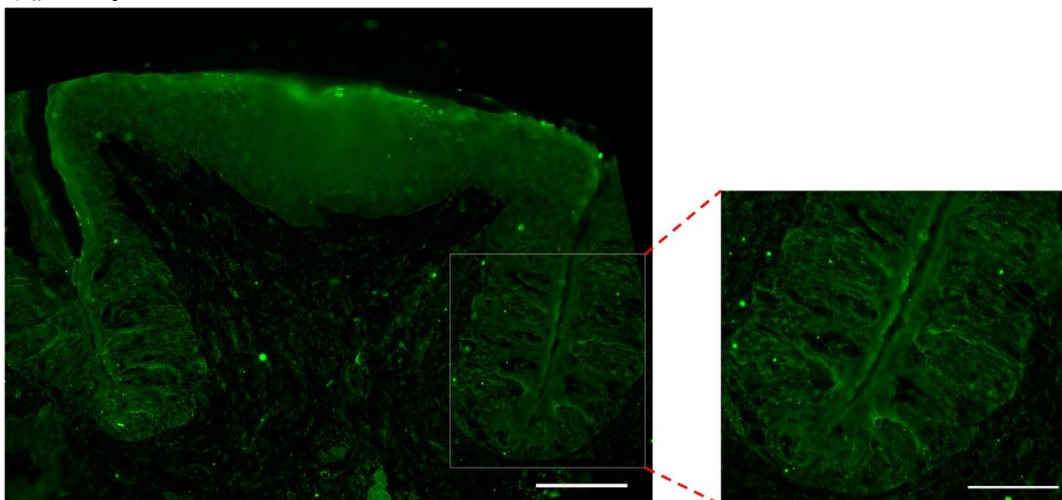


Figure 1. Expression of ACE2 receptor in rat taste buds of circumvallate papillae.

Primary: anti-ACE2 (21115-1-AP; Proteintech), 1:400. Secondary: Alexa Fluor 488 (The Jackson Laboratory), 1:500. Scale bar Z 100 mm (50 mm in the enlarged window).

(2) SARS-CoV-2 recombinant spike protein の有郭乳頭味蕾への影響 (Figure 2)

生食群と比較して SARS-CoV-2 群で味蕾数・味蕾面積・DAPI 陽性味蕾細胞数の有意な減少が観察されたが、不活性化 SARS-CoV-2 タンパク質群では観察されなかった。

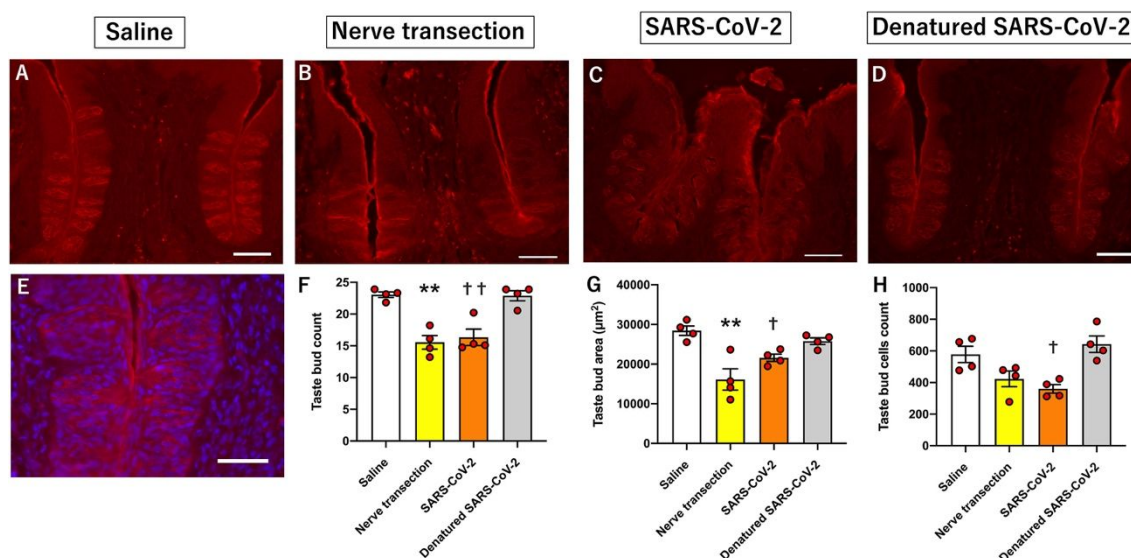


Figure 2. Histological changes in rat taste buds after application of SARS-CoV-2 proteins.

Application of SARS-CoV-2 recombinant spike and nucleocapsid proteins, but not SARS-CoV-2 proteins denatured by heat, decreased the taste bud number, taste bud area, and taste bud cell number. (A) Saline group; (B) Nerve transection group (C); SARS-CoV-2 protein group; (D) Denatured SARS-CoV-2 protein group. (E) Double staining of taste bud cells with UEA-I and DAPI. (F) Taste bud count; (G) Taste bud area; (H) Taste bud cells count 12 days after treatment. Scale bar Z 100 mm *, P < 0.05, **, P < 0.01, vs Saline group, one-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparison test, n = 4.

(3) SARS-CoV-2 recombinant spike protein による味蕾細胞死 (アポトーシス) 誘導 (Figure 3)

SARS-CoV-2群と対照群におけるアポトーシス細胞数の比較を行ったところ、対照群に比べ SARS-CoV-2群で有意にアポトーシス細胞数の増加を認めた。

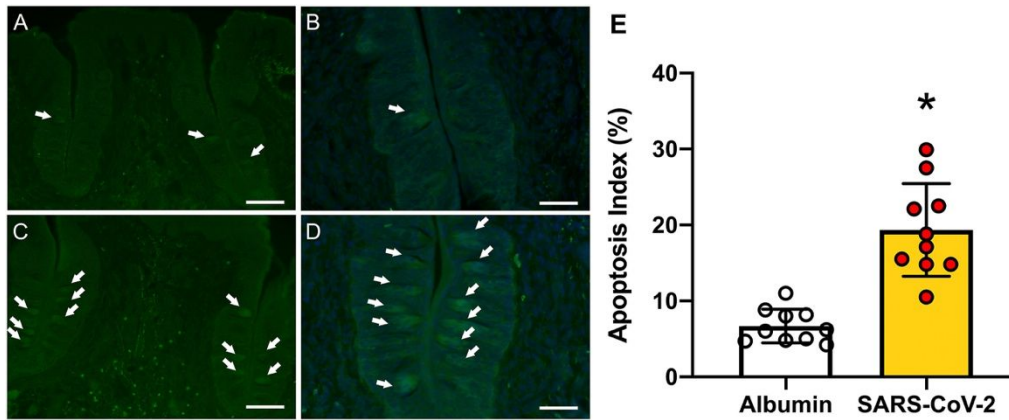


Figure 3. Cell apoptosis in rat taste buds of circumvallate papillae.

TUNEL staining of taste buds in the Albumin (control) (A, B) and SARS-CoV-2 (C, D) groups; arrows indicate TUNEL positive cells; scale bars = 100 μ m (A, C) or 50 μ m (B, D) (E): Apoptosis index in the Albumin and SARS-CoV-2 groups. *: $P < 0.05$ vs Albumin group, unpaired t -test; $n = 10$ /group.

(4) SARS-CoV-2 recombinant spike protein による TNF- α 誘導 (Figure 4)

SARS-CoV-2 群と対照群におけるアポトーシス細胞数の比較を行ったところ、対照群に比べてアポトーシスに關与するサイトカイン TNF- α 発現が SARS-CoV-2 群で有意に増加した。

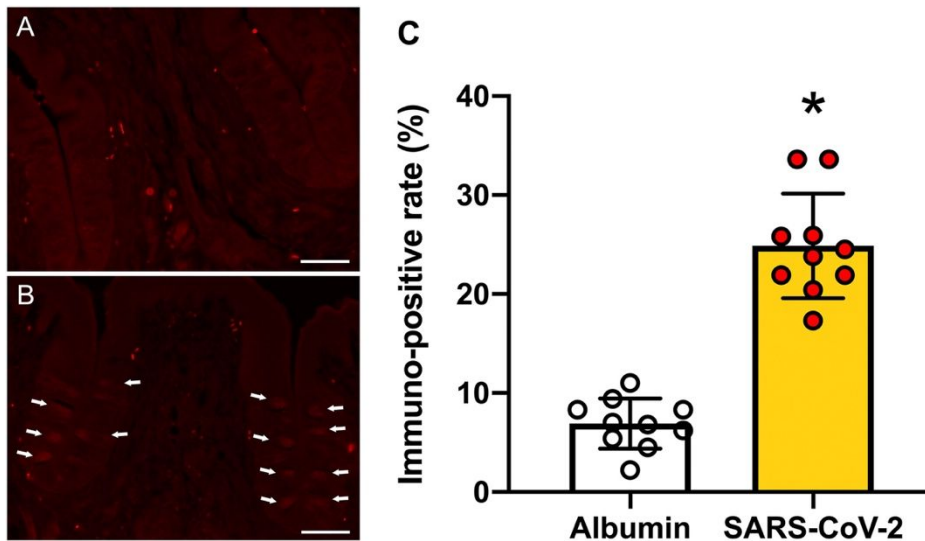


Figure 4. Immunohistochemical analysis of TNF- α in taste bud cells.

(A–B). Representative immunohistochemistry images of taste buds in the Albumin (control) (A) and SARS-CoV-2 (B) groups; arrows indicate immunoreactivity for TNF- α ; scale bar = 100 μ m (C): Percentage of TNF- α -positivity (%) among the cells in the Albumin and SARS-CoV-2 groups. *: $P < 0.05$ vs Albumin group, unpaired t -test; $n = 10$ /group.

以上の結果より、

SARS-CoV-2 タンパク質により惹起される感染・炎症応答と免疫細胞動員などの機序により味蕾細胞のアポトーシスならびに味蕾構造の退行性変化が生じることが、COVID-19 感染後の味覚障害の一因として關与している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Toru Yamamoto, Yuhei Koyama, Yuzo Imai, Emi Sawada, Naotaka Kishimoto, Kenji Seo	4. 巻 -
2. 論文標題 SARS-CoV-2 recombinant proteins-induced degeneration of taste buds in rat circumvallate papillae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences	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） 10.1016/j.jds.2022.03.009	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 該当する

1. 著者名 Yamamoto Toru, Koyama Yuhei, Ujita Tomoaki, Sawada Emi, Kishimoto Naotaka, Seo Kenji	4. 巻 18
2. 論文標題 SARS-CoV-2 recombinant spike protein induces cell apoptosis in rat taste buds	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences	6. 最初と最後の頁 428 ~ 431
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jds.2022.08.016	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本徹, 小山祐平, 今井有蔵, 氏田倫章, 沢田詠見, 岸本直隆, 瀬尾憲司
2. 発表標題 新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）組み換えタンパク質によるラット味蕾の退行性変化
3. 学会等名 第50回日本歯科麻酔学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本徹, 小山祐平, 岸本直隆, 瀬尾憲司
2. 発表標題 新型コロナウイルス感染症の後遺症としての味覚障害撲滅への挑戦
3. 学会等名 日本歯科医学会 第38回「歯科医学を中心とした 総合的な研究を推進する集い」
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
研究協力者	小山 祐平 (Koyama Yuhei)	新潟大学 (13101)	

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