

Title	鼻腔粘膜上皮細胞における新型コロナウイルス細胞侵入因子の発現制御機構に関する研究
Author(s)	中薗, 彬
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第15456号
Issue Date	2023-03-23
DOI	10.14943/doctoral.k15456
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/90042
Туре	theses (doctoral)
Note	配架番号:2775
File Information	NAKAZONO_Akira.pdf



学位論文

鼻腔粘膜上皮細胞における 新型コロナウイルス細胞侵入因子の 発現制御機構に関する研究

(Studies on the regulatory mechanism for gene expression of coronavirus-2019 cell entry factors in primary human nasal epithelial cells)

2023年3月

北 海 道 大 学

中薗 彬

学位論文

鼻腔粘膜上皮細胞における 新型コロナウイルス細胞侵入因子の 発現制御機構に関する研究

(Studies on the regulatory mechanism for gene expression of coronavirus-2019 cell entry factors in primary human nasal epithelial cells)

2023年3月

北 海 道 大 学

中薗 彬

目次

発	表	論	i文	E	I€	录 :	お	よ	U	R 4	学	슻	多	Ě	表	目	Ŧ	录	•	• •	••	•	••	•	• •	•	•	••	•	••	•	•••	•	• •	•	••	•	••	•	••	•••	•	•	•	• •	•	• •	•	••	1
要	旨	•	••	••	•	••	••	•	•••	•	• •	••	•	••	•	••	•	••	•	• •		•	••	•	• •	•	•	••	•	••	•	• •	•	• •	•	•••	•	•••	•	••	••	•	•	•	• •	•	••	• •	••	2
略	語	表	•	•••	•	••	• •	••		•	•	• •	•	•••	•		•	•••	•	• •	••	•	••	•	• •	•	•	••	•	••	•	• •	•	• •	•		•	••	•	••	• •	•	•	•	• •	•	• •	••	•••	5
緒	言	•	••	••	•	••	• •	••	•••	•	•	••	•	••	•	••	•	••	•	• •	••	•	••	•	• •	•	•	••	•	••	•	• •	•	• •	•	•••	•	••	•	••	••	•	•	•	• •	•	••		••	7
実	験	方	法	•	•	••	• •	• •		•	• •	••	•	••	•	••	•	••	•	• •		•	••	•	• •	•	•	••	•	••	•	• •	••	• •	•	•••	•	•••	•	••	••	•	•	• •	• •	•	••	••	•	10
実	験	結	果	•	•		• •	• •		•	• •	••	•		•	••	•		•	• •		•		•		•	•		•		•	• •	••	• •	•	••	•	• •	•		• •		•	•	• •	•	• •		•	25
考	察	•	••	••	•	••	• •	••		•	•	••	•	••	•	•••	•	••	•	• •		•	••	•	• •	•	•		•	••	•	• •	•	• •	•	•••	•	••	•	••	••	•	•	•	• •	•	••		•	47
結	論	•	••	••	•	••	• •	•		•	• •	••	•	••	•	••	•	••	•	• •		•	••	•	• •	• •	•	••	•	••	•	• •	• •	• •	•	•••	•	•••	•	••	••	•	•	• •	• •	•	••	••	•	50
謝	辞	•	•••		•		• •	• •		•	• •	••	•		•	••	•		•	• •		•		•		•	•		•		•		• •	• •	•	••	•	• •	•		• •		•	•	• •	•	• •		•	52
利	益	相	反	•	•	••	• •	• •	• •	•	•	••	•	••	•	••	•	••	•	• •		•	••	•	• •	•	•		•	••	•	• •	• •	• •	•	••	•	••	•	••	••	•	•	•	• •	•	••		•	53
参	考	文	献		•			••		•	•	••	•		•	••	•	••		• •		•		•		•	•		•		•		• •	• •	•		•	••	•			•	•	•	• •	•	• •		•	54

【発表論文目録および学会発表目録】

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Akira Nakazono, Yuji Nakamaru, Mahnaz Ramezanpour, Takeshi Kondo, Masashi Watanabe, Shigetsugu Hatakeyama, Shogo Kimura, Aya Honma, P.J. Wormald, Sarah Vreugde, Masanobu Suzuki, Akihiro Homma. Fluticasone propionate suppresses Poly(I:C)-induced ACE2 in primary human nasal epithelial cells.

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 11: article 655666. 2021.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Akira Nakazono, Masanobu Suzuki, Shogo Kimura, Aya Honma, Yuji Nakamaru, Mahnaz Ramezanpour, Sarah Vreugde, P.J. Wormald, Akihiro Homma.

鼻腔粘膜上皮細胞における新型コロナウイルス細胞侵入因子の発現制御機 構

第1回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会、2021年6月30日~2021 年7月2日、ホテル日航金沢、石川

Akira Nakazono, Masanobu Suzuki, Shogo Kimura, Aya Honma, Yuji Nakamaru, Akihiro Homma. 鼻腔粘膜上皮細胞での細菌・ウイルス結合受容体発現に対する自然免疫シ グナルの影響 第2回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会、2022年4月14日~2022 年4月16日、ホテルニューキャッスル、青森

【要旨】

背景と目的

新型コロナウイルス感染症(Coronavirus disease 2019;COVID-19)は、 いまや全世界における最大の懸案事項である。原因ウイルスである Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2(SARS-CoV-2)は肺や鼻副鼻 腔などの呼吸器のほか、心血管や消化管、肝臓、脳、腎臓、膀胱、精巣な ど多臓器にわたり感染する。その中でも鼻腔は SARS-CoV-2 の初期感染巣と されるだけでなく、個人間の感染拡大において「リザーバー」として機能 している可能性も考えられている。そのため鼻腔粘膜における SARS-CoV-2 の感染機構の解明は、局所における炎症制御のみならず、全身への炎症波 及や他者への飛沫感染を予防する点でも重要である。

SARS-CoV-2 が感染する際、宿主細胞表面のアンジオテンシン変換酵素 2 受容体(Angiotensin converting enzyme 2;ACE2) および II 型膜貫通型セ リンプロテーゼ(Transmembrane protease serine 2;TMPRSS2) を介し細胞 内に侵入することが判明している。SARS-CoV-2 表面の spike protein(S protein)が宿主細胞の ACE2 と結合し、TMPRSS2 によって切断されることに より細胞内へと侵入する。そのことから、ウイルスの侵入経路となる組織 における ACE2 と TMPRSS2 の発現量は、宿主の SARS-CoV-2 に対する感受性 および COVID-19 の重症度に関連すると想定されている。したがって、 SARS-CoV-2 の宿主細胞への侵入におけるこれらの重要なタンパク質は COVID-19 の治療戦略のターゲットになると考えられるが、鼻腔上皮におけ る ACE2 や TMPRSS2 の発現制御機構は未解明であった。

また COVID-19 に対する副腎皮質ステロイドの局所投与および全身投与に ついては議論がある。重症例においては副腎皮質ステロイドの全身投与が 死亡率の低下に寄与するものの、軽症例を含めた症例においては重症化率 の上昇などが懸念されている。副腎皮質ステロイドに関する研究のほとん どが臨床的な観点からであり、前述のように SARS-CoV-2 感染において重要 な治療ターゲットとなり得る ACE2 および TMPRSS2 に副腎皮質ステロイドが 与える影響は未解明であった。

本研究は、自然免疫活性化による鼻腔上皮における ACE2 および TMPRSS2 の発現の変化を評価すること、また鼻噴霧用ステロイド薬として汎用され るフルチカゾンプロピオン酸エステル(FP)が SARS-CoV-2 の細胞内侵入因 子に与える影響を評価することを目的として実施した。

<u>対象と方法</u>

北海道大学病院耳鼻咽喉科において、2020年1月から12月までに鼻中隔 弯曲症に対する手術加療を施行した7名の鼻腔粘膜上皮細胞を用いた。 TLR1-9の各アゴニストによる刺激およびFPによるACE2とTMPRSS2のmRNA およびタンパク質発現の変化を評価した。mRNA発現は定量PCRで、タンパ ク質発現はイムノブロッティング法および免疫蛍光細胞染色法で評価し た。

<u>結果</u>

鼻腔上皮細胞を TLR アゴニストで網羅的に刺激したところ、Poly(I:C)に よる TLR3 刺激によって ACE2 と TMPRSS2 の mRNA 発現が有意に亢進した (ACE2 36.21±11.60 倍、P < 0.001、TMPRSS2 5.60±2.43 倍、P < 0.01)。

Poly(I:C)刺激による ACE2 の mRNA 変化を経時的に評価したところ、 Poly(I:C)による刺激開始後 4、8、12、16、20、24 時間において有意な上 昇を認めた。同様に TMPRSS2 について評価したところ、4、8、12、16、20 時間において有意な上昇を認めた。引き続いて Poly(I:C)により誘導される ACE2 および TMPRSS2 の発現亢進に FP が与える影響を評価した。FP の投与 により 16、20、24 時間の時点において ACE2 は有意に抑制されたが、 TMPRSS2 では有意な変化を認めなかった。

mRNA において確認された ACE2 と TMPRSS2 の発現の変化をタンパク質発現 でも評価したところ、イムノブロッティング法では Poly(I:C)により ACE2 のタンパク質発現は 1.377±0.069 倍 (P < 0.01)に上昇し、FP によって 0.770±0.017 倍 (P < 0.001)に抑制された。一方、TMPRSS2 では Poly(I:C) による有意な変化を認めず (1.083±0.0394 倍、P = 0.213)、FP 投与によ ってもタンパク質発現の変化を認めなかった (0.946±0.0340 倍、P = 0.208)。免疫蛍光細胞染色法では Poly(I:C)により ACE2 のタンパク質発現 は 2.884±0.505 倍 (P < 0.05)に上昇し、FP によって 0.405±0.312 倍 (P < 0.01)に抑制された。一方で、TMPRSS2 のタンパク質発現量は Poly(I:C)に よる有意な増加を認めず (2.423±2.937 倍、P = 0.449)、FP による有意 な抑制を認めなかった (0.795±0.472 倍、P = 0.611)。

考察

本研究では、鼻腔上皮において TLR3 刺激により ACE2 の発現が有意に増加することが示された。また FP の投与によって、Poly(I:C)刺激により誘導される ACE2 の発現を抑制した一方で、TMPRSS2 の発現には影響を与えなかった。

SARS-CoV-2の細胞内侵入因子である ACE2 と TMPRSS2 の発現制御機構を解 明することは、COVID-19 に対する予防法や治療法に直結すると考えられ る。これまで下気道における ACE2 の発現に関する研究が多数認められるも のの、上気道における ACE2 の発現制御機構はほとんど解明されておらず、 本研究によって鼻腔上皮における ACE2 の発現は TLR3 アゴニストでありウ ィルス感染モデルとして頻用される Poly(I:C)の刺激により、有意に亢進す ることが明らかになった。今回得られた結果は、ウイルス感染による上気 道炎の予防や治療は、上気道炎の症状改善のみならず、続発する SARS-CoV-2 の感染リスクを低下させるという点で重要と考えられる。しかしながら、 Poly(I:C)刺激により誘導される ACE2 の発現が実際に SARS-CoV-2 感染リス

また、本研究では Poly(I:C)刺激により誘導される ACE2 の発現に対する FP の抑制効果が明らかとなった。FP は鼻噴霧用ステロイドとしてアレルギ 一性鼻炎や鼻副鼻腔炎治療に汎用さている。臨床的な観点からは、COVID-19 への副腎皮質ステロイドの投与に関しては、全身投与および局所投与の いずれにおいても議論がある。本研究により、急性上気道炎などの上気道 におけるウイルス感染罹患後に鼻噴霧用ステロイドを投与すると、続発す る SARS-CoV-2 への感染リスクを低下させる可能性が示唆された。

今後の検討課題として、Poly(I:C)刺激により SARS-CoV-2の細胞内侵入 因子である ACE2の発現亢進を明らかにしたものの、宿主細胞における ACE2 の発現亢進と SARS-CoV-2の感染性が関連するかについては未解明であるこ とが挙げられる。また、Poly(I:C)刺激により誘導された ACE2の発現に対 する FP による抑制が実際に SARS-CoV-2 への感染に対する予防効果を有す るかは不明であり、さらなる基礎研究および臨床研究が必要であると考え られる。

結論

鼻腔上皮の ACE2 の発現は Poly(I:C)刺激によって増加し、FP によって抑 制される。FP は SARS-CoV-2 の細胞侵入因子の発現を制御することで、 COVID-19 の感染予防に有益である可能性がある。

【略語表】

ACE2	Angiotensin converting enzyme 2
ANOVA	one-way Analysis of variance
BEGM	Bronchial epithelial cell growth medium
CD	cluster of differentiation
c DNA	complementary Deoxyribonucleic acid
COVID-19	Coronavirus disease 2019
Ct	Threshold cycle
CXCL10	Cysteine-X-Cysteine motif chemokine ligand 10
DAPI	4' 6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Deoxyribonucleic acid
EAACI	European Academy of Allergy and Clinical Immunology
dsRNA	Double-stranded Ribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum
FP	Fluticasone propionate
FSL-1	Fibroblast-stimulating lipopeptide-1
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HKLM	Heat-killed Listeria monocytogenes
IFN	Interferon
ΙκΒα	Inhibitor of Nuclear factor-kappa B $lpha$
IL	Interleukin
IRF	Interferon regulatory factor
LPS	Lipopolysaccharide
MMP	Matrix metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonucleic acid
n. s.	not significant
NF- k B	Nuclear factor-kappa B
NP-40	Nonidet P-40
ODN	Oligodeoxynucleotide
Pam3CSK4	Palmitoy1-3-cysteine-serine-lysine-4
PBS	Phosphate-buffered saline

PCR	Polymerase chain reaction
PNGase F	Peptide N-Glycosidase F
Poly(I:C)	Polyinosinic-polycytidylic acid
PVDF	Polyvinylidene difluoride
qPCR	quantitative Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute media
S protein	Spike protein
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
TBST	Tris-buffered saline with Tween® 20
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TLR	Toll-like receptor
TMPRSS2	Transmembrane protease serine 2
TNF	Tumor necrosis factor
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin

【緒言】

1. 新型コロナウイルス感染症

新型コロナウイルス感染症(Coronavirus disease 2019;COVID-19)は、 いまや全世界における最大の懸案事項である。原因ウイルスである Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) は肺や鼻副鼻 腔などの呼吸器のほか、心血管や消化管、肝臓、脳、腎臓、膀胱、精巣な ど多臓器にわたり感染する(Huang et al., 2020; Zhang et al., 2020b; Zou et al., 2020)。その中でも鼻腔は SARS-CoV-2 の感受性が高い臓器と 考えられている(Hou et al., 2020)。COVID-19 患者の半数以上において、 嗅覚障害や鼻閉といった鼻腔に関連した症状を認め(Paderno et al., 2020)、患者の鼻腔内からは高力価のウイルスが検出される(Zou et al., 2020)。また鼻腔は SARS-CoV-2 の初期感染巣とされ、個人間の感染拡大に おいて「リザーバー」として機能している可能性も考えられている(Hou et al., 2020)。そのため鼻腔粘膜における SARS-CoV-2 の感染機構を明らかに することは鼻腔の局所における炎症の評価のみならず、局所治療が感染効 率や全身への炎症波及、飛沫感染に与える影響を理解する上で重要であ る。

2. 新型コロナウイルスの細胞内侵入機構

SARS-CoV-2 が感染する際、宿主細胞表面のアンジオテンシン変換酵素 2 受容体 (Angiotensin converting enzyme 2;ACE2) および II 型膜貫通型セ リンプロテーゼ (Transmembrane protease serine 2;TMPRSS2) を介し細胞 内に侵入することが判明している (Hoffmann et al., 2020; Li et al., 2003)。SARS-CoV-2 は、その表面の spike protein (S protein) が宿主細 胞の ACE2 と結合し、TMPRSS2 により切断されることにより細胞内へと侵入 する (図 1、Hoffmann et al., 2020) 。その際、ACE2 の糖鎖が S protein との結合において重要とされている (Mehdipour and Hummer, 2021)。その ことから、ACE2 と TMPRSS2 の発現は宿主の SARS-CoV-2 に対する感受性およ び COVID-19 の重症度に関連すると想定されている (Bunyavanich et al., 2020)。実際に下気道における ACE2 と TMPRSS2 の発現レベルは、COVID-19 の重症度に相関することが明らかとなっている (Saheb Sharif-Askari et al., 2020b)。鼻腔上皮においても ACE2 と TMPRSS2 は高度に発現しており (Sungnak et al., 2020; Ziegler et al., 2020) 、それらが鼻腔における SARS-CoV-2 感染の感受性に相関しているとされている (Bunyavanich et al.

al., 2020)。したがってこれら SARS-CoV-2 の細胞内侵入因子は COVID-19 の治療戦略のターゲットになると考えられる(Wu et al., 2021)。

ACE2 の発現はインターフェロン (IFN) により誘導されること (Ziegler et al., 2020)、SARS-CoV-2 と細菌感染が 9.8-29.8%合併すること(Huang et al., 2020; Mirzaei et al., 2020; Zhang et al., 2020a)、COVID-19 と細菌感染の重複により死亡率が上昇すること(Silva et al., 2021)、そ してウイルス感染と細菌感染に対する自然免疫において重要な Toll 様受容 体 (TLR) が、COVID-19 においても重要な役割を担っている可能性などが指 摘されている(Khanmohammadi and Rezaei, 2021)。しかしながら鼻腔上皮 における自然免疫シグナルによる ACE2 や TMPRSS2 の発現への影響は未だ解 明されていなかった。



図 1. SARS-CoV-2 感染機構

SARS-CoV-2 表面の Spike protein が宿主細胞の ACE2 と結合、TMPRSS2 よって開裂し細胞膜と融合し、Genome RNA が宿主内に侵入し感染が成立する。

3. COVID-19 に対する副腎皮質ステロイド投与

COVID-19 に対する副腎皮質ステロイドは全身投与および局所投与いずれ においても議論がある(Halpin et al., 2020; Mishra and Mulani, 2021)。デキサメタゾンの全身投与が重症例において死亡率を有意に低下さ せた結果が報告(Group et al., 2021; Group et al., 2020)された一方 で、逆に死亡率の上昇や(Yang et al., 2020)、重症化率の上昇、入院期間 の延長(Yuan et al., 2020)、ウィルス排菌期間の延長 (Li et al., 2021)、副作用および合併症のリスクを高める(Group et al., 2021)とする報告もある。

局所投与に関しては、鼻噴霧用ステロイドの投与により COVID-19 による 入院や ICU への入床率、院内死亡率を低下させるという報告がある (Strauss et al., 2021)。また欧州アレルギー臨床免疫学会(The European Academy of Allergy and Clinical Immunology: EAACI) は、ア レルギー性鼻炎患者における鼻噴霧用ステロイド薬の投与に関して、くし ゃみによる飛沫感染のリスクを低下させる可能性から、SARS-CoV-2の流行 下においても継続的な使用を提言した(Bousquet et al., 2020)。一方で、 気管支喘息患者において吸入ステロイドは上気道感染のリスクを有意に上 昇させるという報告や(Yang et al., 2019)、鼻噴霧用ステロイドの投与に より、鼻腔における局所免疫の低下を生じる可能性も報告されている (Singanayagam et al., 2015)。

上記のように副腎皮質ステロイドの COVID-19 に対する報告のほとんどが 臨床的な観点からであり、SARS-CoV-2 の感染において重要な ACE2 や TMPRSS2 の発現に副腎皮質ステロイドがどのような影響を及ぼすかについて は未だ解明されておらず、その発現制御を解明することは重要と考えられ る。

4. 本研究の目的と概要

本研究の目的は、鼻腔上皮において、自然免疫シグナルによる SARS-CoV-2が宿主に侵入する際に非常に重要なタンパク質である ACE2 および TMPRSS2の発現への影響について明らかにすることである。また鼻噴霧用ス テロイド薬として汎用される FP が SARS-CoV-2の細胞内侵入因子に与える 影響についても解析することを目的とした。

具体的には、以下の検討を行った。健常成人より採取した鼻腔上皮細胞 を実験材料とし、網羅的な TLR 刺激による ACE2 および TMPRSS2 の mRNA や タンパク質の発現量の変化について、定量 PCR とイムノブロッティング 法、免疫蛍光細胞染色法により検討した。また TLR 刺激による ACE2 および TMPRSS2 の mRNA 発現の変化に FP が与える影響を、定量 PCR とイムノブロッ ティング法、免疫蛍光細胞染色法により評価した。 【実験方法】

1. 実験材料

以下に本研究で用いた実験装置、消耗品、実験試薬および抗体類を示 す。

<1> 装置類

培養器:ウォータージャケット付き CO₂インキュベータ (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)

PCR 装置:LifeECO Thermal Cycler (Hangzhou Bioer Technology, Hangzhou, China)

StepOne[™] Realtime PCR System (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) 微量分光光度計 : Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)

電気泳動槽:ミニプロティアン Tetra レディーゲルセル (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

タンク式ブロッティング装置:ミニトランスブロット®セル (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

- パワーサプライ: BP-T5 (バイオクラフト、東京)
- イメージング装置: ChemiDoc XRS Plus システム (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 超音波破砕装置: W-500P (Sonics & Materials, inc., Newtown, CT, USA)

ボルテックスミキサー:KR-8000 (フナコシ、東京)

遠心機: MDX-210(トミー精工、東京)

倒立型位相差培養顕微鏡:CK2(オリンパス、東京)

共焦点レーザー顕微鏡:LSM710 (ZEISS microscopy, Oberkochen, Germany)

<2> 消耗品

スライドガラス: MICRO SLIDE GLASS (松浪硝子工業、大阪) カバーガラス: MICRO COVER GLASS (松浪硝子工業、大阪) 細胞採取用ブラシ:ネオストブラッシュ (ネオストメディカル、東京) 遠沈管:50 ml コニカルチューブ (Corning Inc., Corning, NY, USA) 15 ml コニカルチューブ (Corning Inc., Corning, NY, USA) 1.5 ml マイクロチューブ (Corning Inc., Corning, NY, USA)

PCR 用チューブ: 0.2 ml PCR 8 連チューブ (日本ジェネティクス、東京)

ディッシュ:10 cm ディッシュ (Corning Inc., Corning, NY, USA)

コラーゲンコーティング T 75 フラスコ (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)

- 6 ウェルプレート (IWAKI、AGC テクノグラス、静岡)
- 24 ウェルプレート (IWAKI、AGC テクノグラス、静岡)

PCR 用マイクロプレート : MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)

- マイクロプレート用カバーフィルム: Optical Adhesive Cover (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)
- 電気泳動用ゲル:8-16% ミニプロティアン TGX[™] プレキャストゲル (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

転写用メンブレン: PVDF メンブレン (Millipore, Burlington, MA, USA)

<3> 試薬類

RPMI 1640 培地(ナカライテスク、京都)

BEGM[™](Bronchial Epithelial Cell Growth Medium) (LONZA, Basel, Swiss)

10×PBS(富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)

Fetal bovine serum (FBS; Corning Inc., Corning, NY, USA)

2.5 g/L トリプシン/1 mmo1/EDTA 溶液 (ナカライテスク、京都)

ペニシリン-ストレプトマイシン溶液(×100)(富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)

アムホテリシン B 懸濁液(富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)

コラーゲンタイプ I (KURABO、大阪)

Human TLR1-9 Agonist kit (Invivogen, San Diego, CA, USA)

フルチカゾンプロピオン酸エステル(Cayman chemical company, Ann Arbor, MI, USA)

JSH-23 (Abcam, Cambridge, MA, USA)

DMS0(富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)

ISOGEN (ニッポンジーン,東京)

クロロホルム(富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)

イソプロパノール(富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)

エタノール (富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)

メタノール(富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)

スキムミルク粉末(富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)

ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO, 大阪)

Nuclease-free water (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) Power SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) Trizma® base (Sigma Aldrich, ST. Louis, MO, USA) ドデシル硫酸ナトリウム (Sigma Aldrich, ST. Louis, MO, USA) 2-メルカプトエタノール (Sigma Aldrich, ST. Louis, MO, USA) ブロモフェノールブルーナトリウム (Sigma Aldrich, ST. Louis, MO, USA) Tween® 20 (Sigma Aldrich, ST. Louis, MO, USA) PNGase F (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 1× glycoprotein denaturing buffer(New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 10× GlycoBuffer2(New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 20% NP-40(New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 4' 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma, Aldrich, USA) Protein Block (Dako, Glostrup, Denmark) anti-fade mounting medium (Dako, Glostrup, Denmark)

※RPMI 1640 培地の調整

RPMI 1640 培地全量 500 ml より 60 ml 抜き取り破棄し、ペニシリン-ストレプトマイ シン溶液を 5 ml、アムホテリシン B 懸濁液を 5 ml そして FBS を 50 ml 混合し調整し た。各薬剤の最終濃度は、ペニシリン G は 100 units/ml、ストレプトマイシン硫酸 塩は 100 µg/ml、アムホテリシン B は 2.5 µg/ml、そして FBS は 10% (v/v) であ る。以下の本文中の RPMI 1640 培地は調整済みのものをさす。

※BEGM[™]培地の調整

BEGM[™]培地の全量 500 ml より 60 ml 抜き取り破棄し、ペニシリン-ストレプトマイシ ン溶液を 5 ml、アムホテリシン B 懸濁液を 5 ml そして FBS を 50 ml 混合し調整し た。各薬剤の最終濃度は、ペニシリン G は 100 units/ml、ストレプトマイシン硫酸 塩は 100 µg/ml、アムホテリシン B は 2.5 µg/ml、そして FBS は 10% (v/v) であ る。以下の本文中の BEGM[™]培地培地は調整済みのものをさす。

※TBST(Tris-buffered saline with Tween® 20)の調整

2-アミノ-2 ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 60.57 gを45 mlの塩酸、滅菌 蒸留水と混合し PH6.8 に調整した 1M トリス塩酸緩衝液(1M Tris-HC1) 500 mlを作 製した。5M 塩化ナトリウム 150 mlと 1M トリス塩酸緩衝液 100 ml、Tween®20を2.5 ml、そして合計 5,000 ml になるように滅菌蒸留水を混合し撹拌し TBST を作成した。

<4> 抗体類

抗 CD68 抗体 (mouse, monoclonal, PG-M1, DAKO, Glostrup, Denmark) 抗 ACE2 抗体 (rabbit, monoclonal, SN0754, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) 抗 TMPRSS2 抗体 (rabbit, monoclonal, ab92323, Abcam, Cambridge, United Kingdom)

ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗 GAPDH 抗体 (mouse, monoclonal, M171-7, MBL, 名古屋)

ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗ラビット抗体 (polyclonal, Promega, Madison, WI, USA)

Alexa Fluor® 488 標識 2 次抗体 (rabbit, Jackson ImmunoResearch Labs Inc., West Grove, PA, USA)

2. ヒト鼻腔上皮細胞培養

本研究は北海道大学病院倫理審査(019-0242)および Queen Elizabeth Hospital 倫理審査(HREC/15/TQEH/132)にて承認され、ヘルシンキ宣言、 北海道大学病院における「人を対象とした医学系研究に関する倫理指針」 に従って実施した。また被験者には実験について書面で説明し同意を得 た。

北海道大学病院耳鼻咽喉科において、2020年1月から2020年12月まで に鼻中隔弯曲症に対する手術加療を施行した7名の患者の鼻腔下鼻甲介粘 膜より鼻腔粘膜上皮細胞を採取した。具体的な方法としては、外鼻孔より 細胞採取用ブラシを挿入し下鼻甲介の表面をブラシ1本あたり前後に約10 往復させ、ブラシを合計5本用いて鼻腔粘膜上皮細胞を採取した。擦過し たブラシは直ちに RPMI 1640 培地を10 ml入れた50 mlコニカルチューブ に留置し、コニカルチューブの蓋がしまるようにブラシの持ち手部分を剪 刀で切断した。新たな50 mlコニカルチューブに RPMI 1640 培地10 mlを 入れ、RPMI 1640 培地中で下鼻甲介を擦過したブラシ2本ずつをお互いに 10 回打ち合わせた後、ブラシは破棄した。下鼻甲介を擦過後にブラシを留 置した50 mlコニカルチューブ中の RPMI 1640 培地10 mlを混合し合計 20 mlとした。50 mlコニカルチューブを 1700 rpm、4度で7分間遠心し、 上清を破棄した。得られたペレットを BEGM^M培地2 ml で穏やかにピペッテ ィングし、均一な細胞懸濁液とした。CD68 抗体を用いて、得られた細胞懸

濁液中の単球を除去した。具体的には、あらかじめ直径 10 cm ペトリディ ッシュに PBS 10 ml および CD68 抗体 20 µ1 を混合した溶液を入れ 37 度で 20 分間静置した後に CD68 抗体入り PBS を吸引除去し、CD68 抗体付着ペト リディッシュを作成した。細胞懸濁液を 50 ml コニカルチューブから 22 ゲ ージ針付き 2.5 ml シリンジで全量吸引し、CD68 抗体付着ペトリディッシュ に散布し、37度5% CO₂、湿潤環境で20分間培養した。その後、CD68 抗体 付着ペトリディッシュに散布した全量を、あらかじめ BEGM[™]培地 25 ml を入 れたコラーゲンコーティング T75 フラスコに全て播種し 37 度、5% CO₂、湿 潤環境で培養を開始した。翌日に BEGM[™]培地を全て吸引除去し、PBS 5 ml を投与し洗浄した後、新たな BEGM[™]培地 25 ml を投与した。以降は2日おき に PBS による洗浄および培地交換を行った。継代は、以下のように行っ た。70-90%コンフルエントになった細胞の培地を全て吸引除去し、PBS 5 mlを投与し洗浄した。PBSを吸引除去し、トリプシン EDTA 溶液を 2.5 ml 加えて、37度、5% CO₂、湿潤環境で静置した。細胞が底面から剥離したこ とを確認後、BEGM[™]培地を10 ml 加えて中和した。この細胞懸濁液を、あら かじめ BEGM[™]培地を分注していたディッシュに分注した。6 ウェルプレート やカバーガラスを留置した24ウェルプレートに細胞を播種する場合は、あ らかじめプレートやカバーガラスのコラーゲンコーティングを行った(表 なお鼻腔上皮細胞の継代は2回までに全ての実験を施行した。

表 1. コラーゲンコーティングプロトコール

1	コラーゲンタイプ I 3 mg/m1、500 µ1 を PBS 49.5 m1 で溶解し 0.03 mg/m1の
1	コラーゲン溶液を作成した
	6 ウェルプレートでは1 ウェルあたり 300 μl の、カバーガラスを留置した 24
2	ウェルプレートでは1ウェルあたり 100 µl のコラーゲン溶液をそれぞれ加
	え、37度、5% CO2、湿潤環境で 45 分静置した
ŋ	コラーゲン溶液を完全に取り除き、PBS 300 µ1 で 2回洗浄した後、各実験に
5	応じて細胞を播種した

3. 鼻腔上皮細胞の各試薬による刺激

あらかじめコラーゲンコーティングを行った 6 ウェルプレートに、1 ウェ ルあたり 6 × 10⁵ 個の鼻腔上皮細胞を刺激の 24 時間前に播種した。PBS 1 m1 で洗浄後、BEGM 培地 2 m1 に各 TLR アゴニストを混合し 24 時間にわたり 刺激した。また副腎皮質ステロイドとして FP や、NF-κB 転写活性阻害剤で ある JSH-23 を投与する場合は TLR 刺激の 1 時間前に投与した。刺激に用い た薬剤は、図の説明に特段の記載がない場合は下記の濃度で使用した(表 2)。

試薬名 濃度 Pam3CSK4 (TLR1/2 刺激) $1 \ \mu g/ml$ HKLM (TLR2 刺激) 10^8 cells/ml Poly(I:C) (TLR3 刺激) 10 µg/mlLPS (TLR4 刺激) $10 \ \mu g/m1$ Flagellin (TLR5 刺激) $10 \ \mu g/ml$ FSL-1 (TLR6/2 刺激) 1 µg/ml Imiquimod (TLR7 刺激) $10 \ \mu g/ml$ ssRNA40 (TLR8 刺激) $10 \ \mu g/m1$ ODN2006 (TLR9 刺激) 5 µM フルチカゾンプロピオン酸エステル 10 nM JSH-23 30 µM

表 2. 鼻腔上皮細胞の刺激に用いた試薬および濃度

4. 鼻腔上皮細胞の mRNA 発現の経時的な評価

あらかじめコラーゲンコーティングを行った 6 ウェルプレートに、1 ウェ ルあたり 6 × 10⁵ 個の鼻腔上皮細胞を刺激の 24 時間前に播種した。PBS 1 ml で洗浄後、BEGM 培地 2 ml に TLR3 アゴニストである Poly(I:C)を 10 μ g/ml の濃度で投与し、投与後 4、8、12、16、20、24 時間でサンプルを回 収した。また FP による mRNA の発現量変化を評価する際には、Poly(I:C)投 与の 1 時間前に BEGM 培地 2 ml に 10 nM の濃度で投与した。

5. total RNA の抽出および定量 PCR による mRNA の発現評価

RNA 抽出用試薬 ISOGEN を用いて鼻腔上皮細胞から total RNA を抽出した 後、RNA 濃度を Nanodrop 1000 spectrophotometer を用いて測定した。抽出 した total RNA 0.5 µg から ReverTra Ace qPCR RT Kit による逆転写反応に よって complementary DNA (cDNA) を合成した。これらの手順は下記に記載 したプロトコールに準じて施行した (表 3、表 4)。プライマーセット (表 5) と Power SYBR® Green PCR Master Mix を用いて、StepOne[™] Realtime PCR System にて ACE2 および TMPRSS2 の mRNA 量を定量化した。また NF-κB およ び IFN 経路の関与を評価する際に、TNF-α、IL-6、IFN-β、CXCL10 および IFNγについて mRNA を定量化した (表 6)。

内在性コントロールとして glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用いた。ACE2、TMPRSS2、TNF-α、IL-6、IFN-β、CXCL10、およ び IFN-γの発現量を各サンプルの GAPDH の発現量を用いて標準化し、対象サ ンプルの値に対する相対値として評価した。

表 3. Total RNA 抽出プロトコール

1	6 ウェルプレートに1ウェルあたり6 × 10 ⁵ の細胞を播種し、24 時間培養した
2	培養液を完全に取り除き、PBS 300 µ1 で 2 回洗浄した
3	実験に応じて各試薬で刺激した
4	培養液を完全に取り除き、PBS 300 µ1 で 2 回洗浄した
5	1 ウェルあたり ISOGEN を 500 μ1 加え細胞を溶解、細胞溶解液を 1.5 ml チュー
	ブに回収し、5分間室温で静置した
6	クロロホルムを 100 µ1 加えて、15 秒間震盪し 2 分間室温で静置した後、4 度
0	12,000 gで15分間遠心した
7	水相のみ新しい 1.5 ml チューブに回収した
8	イソプロパノールを 250 µ1 加え転倒混和し、5 分間室温で静置した後に 4 度
0	12,000 gで10分間遠心した
0	上清を破棄し、70%エタノールを 500 µ1 加え、ボルテックスミキサーで混合、
9	4度 7,500 gで5分間遠心した
10	上清を破棄し、風乾した
11	Nuclease-free waterを10 µl加え RNAを溶解した

表 4. cDNA 合成プロトコール

1	下記の反応溶液1を氷上で調整した
	• RNA 0.5 µg
	• Nuclease-free water up to 7 μl
2	反応溶液1を穏やかにピペッティングした
3	反応溶液1を以下のステップでPCR用の thermal cyclerを使用して実行した
	● 65℃ 5分間
4	反応溶液1を速やかに氷上で冷却した
5	下記の反応溶液2を氷上で調整した
	• 反応溶液 1 7 µl
	• 5 \times RT Buffer 2 µl
	• Enzyme Mix 0.5 µl
	• Primer Mix 0.5 μl
6	反応溶液2を穏やかにピペッティングした
7	反応溶液2を以下のステップでPCR用の thermal cyclerを使用して実行した
	● 37℃ 15 分間
	● 98℃ 5分間
8	4℃に冷却後、滅菌蒸留水で 20 倍に希釈し定量 PCR に使用した

表 5. 定量 PCR に用いたプライマー

プライマー名称	配 列
ACE2 (forward)	5' - CTCTACAGAAGCTGGACAGAAAC-3'
ACE2 (reverse)	5' -GAGCAGTGGCCTTACATTCA-3'
TMPRSS2 (forward)	5' -GGAGTGTACGGGAATGTGATG-3'
TMPRSS2 (reverse)	5' -GGACGAAGACCATGTGGATTAG-3'
TNF- $lpha$ (forward)	5' -GAGGCCAAGCCCTGGTATG-3'
TNF- α (reverse)	5' -CGGGCCGATTGATCTCAGC-3'
IL-6 (forward)	5' -ATGTAGCCGCCCCACACAGA-3'
IL-6 (reverse)	5' -ATTTGCCGAAGAGCCCCTCAG-3'
IFN- β (forward)	5' -AGGACAGGATGAACTTTGAC-3'
IFN- β (reverse)	5' -TGATAGACATTAGCCAGGAG-3'
IFN- γ (forward)	5' - TCGGTAACTGACTTGAATGTCCA-3'
IFN-γ (reverse)	5' - TCGCTTCCCTGTTTTAGCTGC-3'
CXCL10 (forward)	5' - GCTCTACTGAGGTGCTATGTTC-3'
CXCL10 (reverse)	5' - GGAGGATGGCAGTGGAAGTC-3'
GAPDH (forward)	5' -TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'
GAPDH (reverse)	5' -GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

表 6. 定量 PCR プロトコール

下記の反応溶液を調整した
• cDNA 5 µ1
• Power SYBR® Green PCR Master Mix 10 µl
● 各プライマーセット 0.8 µ1*
• Nuclease-free water total 4.2 µl
反応溶液を穏やかにピペッティングした
反応溶液を 96 ウェルプレートにアプライした後、専用のカバーフィルムを用い
て密封した
反応溶液を以下のステップで StepOne [™] Realtime PCR Systemを使用して実行し
た
• 95℃ 10 分間
● 95℃ 15 秒間 ← 10 井 くない
• 60℃ 1分間 40 サイクル
得られた各サンプルの Ct 値を用いて解析した

*プライマーセットの調製

各プライマーは forward プライマー(100 µM) 25 µl および reverse プライマー (100 µM) 25 µl、TE バッファー (0.1 M Tris、 10 mM EDTA-Na、 pH 8.0) 450 µlを混合し、十分に撹拌しプライマーセットを作成した。

6. イムノブロッティング法によるタンパク質の発現評価

あらかじめコラーゲンコーティングを行った 6 ウェルプレートに、1 ウェ ルあたり 6 × 10⁵ 個の鼻腔上皮細胞を刺激の 24 時間前に播種した。PBS 1 ml で洗浄後、BEGM 培地 2 ml に TLR3 アゴニストである Poly(I:C)を 10 µg/ml の濃度で混合し、28 時間にわたり刺激した。また FP によるタンパク 質発現の変化を評価する実験においては Poly(I:C) 投与の 1 時間前に 10 nM の濃度で刺激した。刺激後の細胞は下記プロトコールで回収した(表 7)。 回収した細胞は SDS サンプルバッファーで溶解したものと、糖鎖切断処理 を行ったものをそれぞれイムノブロッティング法で解析した。SDS サンプル バッファーでの溶解は回収した細胞のペレットに SDS サンプルバッファー (50 mM Tris-HCL(pH 6.8)、2-メルカプトエタノール(6% v/v)、ドデ シル硫酸ナトリウム (2% w/v)、グリセロール (10% v/v)、ブロモフェ ノールブルー (0.01% w/v))を 100 µ1 加え穏やかにピペッティングし た。各サンプルを 95℃で 5 分間煮沸した後、超音波破砕装置 W-500P により 細胞を破砕した。また PNGase F を用いた糖鎖切断処理は下記のプロトコー ルで行った (表 8)。

得られたサンプルをドデシル硫酸ナトリウムーポリアクリルアミドゲル 電気泳動(SDS-PAGE: sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) で展開した後、PVDF メンブレンに転写した。PVDF メン ブレンを 0.1%ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート含有トリ ス緩衝生理食塩水 (TBST: Tris-buffered saline with Tween® 20) で希釈 した5%スキムミルクを用い室温下に1時間震盪し、ブロッキング処理を行 った。PVDFメンブレンを TBST で3回洗浄した後、1次抗体として抗 ACE2 抗体、抗 TMPRSS2 抗体、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗 GAPDH 抗体を、TBST でそれぞれ 1:1,000 および 1:1,000、1:5,000 で希釈し、ハイ ブリバック内で PVDF メンブレンを密封の上、4℃で一晩にわたり震盪し た。PVDF メンブレンを TBST で 3 回洗浄した後、抗 ACE2 抗体および抗 TMPRSS2 抗体を付加した PVDF メンブレンを、TBST で 1:10,000 に希釈した ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗ラビット抗体を2次抗体とし て用い室温下に1時間震盪した。PVDFメンブレンを TBST で3回洗浄した 後、ECL western blotting substrate によって得られた化学発光シグナル を ChemiDoc XRS Plus システムを用いて検出した。

検出したバンドは ImageJ 1.50i (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて定量化した。ACE2 および TMPRSS2 の発現量を 各サンプルの GAPDH の発現量を内在性コントロールとして用いて標準化 し、コントロールサンプルの値に対する相対値として評価した。

1	6 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 6 × 10 ⁵ の細胞を播種し、24 時間培養した
2	培養液を完全に取り除き、1ウェルあたり PBS 300 µ1 で2回洗浄した
3	実験に応じて各試薬で刺激した
4	刺激に用いた試薬を含む培養液を完全に取り除き、1 ウェルあたり PBS 300 µ1
т	で2回洗浄した
5	1 ウェルあたりトリプシン EDTA 溶液 250 µl を加え 37 度 5% CO2、湿潤環境で 5
Ŭ	分間培養した
6	1ウェルあたり PBS で希釈した 10% FBS 1 ml でトリプシンを中和した後に、
0	穏やかにピペッティングし、細胞懸濁液を 1.5 ml チューブに回収した
7	4 度 300 g で 3 分間遠心した
8	上清を破棄し、細胞を回収した

表 7. イムノブロッティング用細胞回収プロトコール

表 8. PNGase Fによる糖鎖切断プロトコール

1	表7のプロトコールで得られた細胞に1× glycoprotein denaturing bufferを
	100 µ1 加え懸濁した
2	100 度で 10 分間煮沸した後に超音波破砕装置で破砕し、氷上で 1 分間静置した
3	4度 20000 rpm で 10 分間遠心し、上清を反応溶液 1 とした
4	下記の反応溶液2を調整した
	• 反応溶液 1 50 μl
	• 10 \times GlycoBuffer2 10 µl
	• 10% NP-40 10 µl
	• 滅菌蒸留水 30 µ1
	• PNGase F 5 μl
6	反応溶液2を穏やかにピペッティングした
7	反応溶液2を37度で1時間静置した
8	反応溶液 2 に 3×サンプルバッファー 35 µl を加え、イムノブロッティング用
	サンプルとした

7. 免疫蛍光細胞染色法によるタンパク質の発現評価

カバーガラスを留置しあらかじめコラーゲンコーティングを行った 24 ウ エルプレートに、1 ウェルあたり 1 × 10⁵ 個の鼻腔上皮細胞を刺激の 24 時 間前に播種した。 PBS 1 ml で洗浄後、BEGM 培地 2 ml に TLR3 アゴニストで ある Poly(I:C)を 10 μ g/ml の濃度で混合し、48 時間にわたり刺激した。ま た FP によるタンパク質発現の変化を評価する実験においては、Poly(I:C) 投与の 1 時間前に 10 nM の濃度で刺激した。刺激終了後、下記のプロトコ ールで免疫染色を行った(表 9)。得られた検体は共焦点レーザー顕微鏡 LSM710 で画像化し、画像解析ソフト ZEN Imaging Software (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) によって解析した。各レーザー波長のレーザー 強度および感度は非特異的な蛍光が感知されないように調整した。また ACE2 および TMPRSS2 の蛍光強度を 4'6-diamidino-2-phenylindole

(DAPI)の蛍光強度に対して標準化し定量化した。

表 9. 免疫蛍光細胞染色法プロトコール

1	あらかじめカバーガラスを留置した 24 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 1 ×
1	105の細胞を播種し、24時間培養した
2	培養液を完全に取り除き、1 ウェルあたり PBS 250 µ1 で 2 回洗浄した
3	実験に応じて各試薬で刺激した
	刺激に用いた試薬を含む培養液を完全に取り除き、1 ウェルあたり PBS 250 µ1
4	で2回洗浄後、1ウェルあたり PBS で希釈した 2.5%ホルマリンを 250 µ1 加え
	室温で10分静置し細胞を固定した
5	2.5%ホルマリンを完全に取り除き、1 ウェルあたり TBST 250 µ1 で 3 回洗浄
0	した
6	PBS で希釈した 1% SDS を 1 ウェルあたり 250 µ1 加え室温で 1 時間静置し細
0	胞膜透過処理を行った
6	1% SDS 完全に取り除き Protein Block を 1 ウェルあたり 250 µ1 加え室温で 1
0	時間静置しブロッキングを行った
7	Protein Blockを完全に取り除き、1 ウェルあたり TBST 250 μ1 で 3 回洗浄し
	た
8	一次抗体 (ACE2, TMPRSS2) をそれぞれ TBST で 1:100 に希釈し、1 ウェルあた
	り 250 μ1 加え、4 度で一晩静置した
9	一次抗体を希釈した TBST を完全に取り除き、1 ウェルあたり TBST 250 µ1 で 3
	回洗浄した
10	_ 次抗体として Alexa Fluor 488 標識 2 次抗体を TBST で 2 μg/ml に希釈し、1
10	_ 次抗体として Alexa Fluor 488 標識 2 次抗体を TBST で 2 μg/ml に希釈し、1 ウェルあたり 250 μl 加え、室温で 1 時間静置した
10	 —次抗体として Alexa Fluor 488 標識 2 次抗体を TBST で 2 μg/ml に希釈し、1 ウェルあたり 250 μl 加え、室温で 1 時間静置した —次抗体を希釈した TBST を完全に取り除き、1 ウェルあたり TBST 250 μl で 3
10	 —次抗体として Alexa Fluor 488 標識 2 次抗体を TBST で 2 μg/ml に希釈し、1 ウェルあたり 250 μl 加え、室温で 1 時間静置した ・次抗体を希釈した TBST を完全に取り除き、1 ウェルあたり TBST 250 μl で 3 回洗浄した
10 11 12	 -次抗体として Alexa Fluor 488 標識 2 次抗体を TBST で 2 μg/ml に希釈し、1 ウェルあたり 250 μl 加え、室温で 1 時間静置した
10 11 12	 -次抗体として Alexa Fluor 488 標識 2 次抗体を TBST で 2 µg/ml に希釈し、1 ウェルあたり 250 µl 加え、室温で 1 時間静置した
10 11 12 13	 一次抗体として Alexa Fluor 488 標識 2 次抗体を TBST で 2 µg/ml に希釈し、1 ウェルあたり 250 µl 加え、室温で 1 時間静置した 一次抗体を希釈した TBST を完全に取り除き、1 ウェルあたり TBST 250 µl で 3 回洗浄した DAPI を滅菌蒸留水で 200 ng/ml に希釈し、1 ウェルあたり 250 µl 加え室温で 30 分静置した DAPI を希釈した滅菌蒸留水を完全に取り除き、1 ウェルあたり TBST 250 µl で
10 11 12 13	 -次抗体として Alexa Fluor 488 標識 2 次抗体を TBST で 2 µg/ml に希釈し、1 ウェルあたり 250 µl 加え、室温で 1 時間静置した
10 11 12 13 14	 一次抗体として Alexa Fluor 488 標識 2 次抗体を TBST で 2 µg/ml に希釈し、1 ウェルあたり 250 µl 加え、室温で 1 時間静置した 一次抗体を希釈した TBST を完全に取り除き、1 ウェルあたり TBST 250 µl で 3 回洗浄した DAPI を滅菌蒸留水で 200 ng/ml に希釈し、1 ウェルあたり 250 µl 加え室温で 30 分静置した DAPI を希釈した滅菌蒸留水を完全に取り除き、1 ウェルあたり TBST 250 µl で 3 回洗浄した 封入剤 anti-fade mounting medium をスライドガラスに滴下し各カバーガラス
10 11 12 13 14	 二次抗体として Alexa Fluor 488 標識 2 次抗体を TBST で 2 µg/ml に希釈し、1 ウェルあたり 250 µl 加え、室温で 1 時間静置した 一次抗体を希釈した TBST を完全に取り除き、1 ウェルあたり TBST 250 µl で 3 回洗浄した DAPI を滅菌蒸留水で 200 ng/ml に希釈し、1 ウェルあたり 250 µl 加え室温で 30 分静置した DAPI を希釈した滅菌蒸留水を完全に取り除き、1 ウェルあたり TBST 250 µl で 3 回洗浄した 封入剤 anti-fade mounting medium をスライドガラスに滴下し各カバーガラス を封入した後、室温 4 度で一晩静置し、各サンプルは検鏡まで暗所で保管した
10 11 12 13 14 15	 二次抗体として Alexa Fluor 488 標識 2 次抗体を TBST で 2 µg/ml に希釈し、1 ウェルあたり 250 µl 加え、室温で 1 時間静置した 一次抗体を希釈した TBST を完全に取り除き、1 ウェルあたり TBST 250 µl で 3 回洗浄した DAPI を滅菌蒸留水で 200 ng/ml に希釈し、1 ウェルあたり 250 µl 加え室温で 30 分静置した DAPI を希釈した滅菌蒸留水を完全に取り除き、1 ウェルあたり TBST 250 µl で 3 回洗浄した 封入剤 anti-fade mounting medium をスライドガラスに滴下し各カバーガラス を封入した後、室温 4 度で一晩静置し、各サンプルは検鏡まで暗所で保管した 共焦点レーザー顕微鏡で画像を取得した

8. 統計学的手法

すべてデータは3回以上の独立した実験により得られた平均値±標準誤 差で表記した。データが正規分布または対数正規分布に当てはまるかは、 それぞれ Shapiro-Wilk 検定および Kolmogrov 検定により評価した。対数正 規分布に当てはまる場合は対数変換後に統計学的解析を行った。定量 PCR による遺伝子発現評価では両側 t 検定により比較した。また3群以上の比 較では1元配置分散分析 (one-way Analysis of Variance: ANOVA) により 比較し、Dunnett 検定により解析した。P 値が 0.05 未満を統計学的有意差 ありと判断した。すべての解析は統計解析ソフト JMP11 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。 【実験結果】

1. 鼻腔上皮細胞の ACE2 および TMPRSS2 の mRNA 発現に影響する TLR シグナ ルの網羅的検討

鼻腔上皮細胞における ACE2 および TMPRSS2 の mRNA の発現に関与する TLR シグナルについて、網羅的に検討した。各 TLR のアゴニストをそれぞれ投 与し、ACE2 および TMPRSS2 の mRNA 発現量を、定量 PCR 法を用いて測定し た。ACE2 の mRNA 発現量は、TLR3 アゴニストである Poly(I:C)刺激により有 意に増加した (36.212±11.600 倍、P < 0.0001、図 2A)。 TMPRSS2 も ACE2 同様に、mRNA 発現量が Poly(I:C)刺激により有意に増加した (5.598± 2.434 倍、P < 0.01、図 2B)。一方、TLR3 以外の刺激では ACE2 および TMPRSS2 の mRNA 発現量に有意な変化を認めなかった (図 2A、B)。



図 2. TLR1-9の刺激による鼻腔上皮細胞の ACE2 および TMPRSS2 の mRNA 発現変化

鼻腔上皮細胞を各 TLR アゴニストで 24 時間にわたり刺激した。TLR1/2 刺激 として Pam3CSK4 を、TLR2 刺激として HKLM を、TLR3 刺激として Poly(I:C) を、TLR4 刺激として LPS を、TLR5 刺激として Flagellin を、TLR6/2 刺激と して FSL-1 を、TLR7 刺激として Imiquimod を、TLR8 刺激として ssRNA40 を、TLR9 刺激として ODN2006 を、それぞれ用いた。それぞれの mRNA 発現量 を GAPDH の mRNA 発現量に対する相対値を解析し、それぞれの刺激により得 られたデータを、非刺激細胞での値をコントロールとして標準化した。デ ータは 3 回の独立した実験より得られた平均値±標準誤差である。図中の** は P < 0.01 を、***は P < 0.001 を示す。 A) 鼻腔上皮細胞の各 TLR 刺激による ACE2 の mRNA の発現量変化を示す。

B)鼻腔上皮細胞の各 TLR 刺激による TMPRSS2 の mRNA の発現量変化を示す。

2. NF-κB および IRF の標的遺伝子の発現制御に鼻腔上皮細胞 TLR シグナル が与える影響についての検討

TLR 刺激により NF- κ B を介した炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-6、IL-12 など)や、インターフェロン制御因子(IRF)を介しI型 IFN はじめとする サイトカイン (IFN- α 、IFN- β 、CXCL10 など) が産生される(Kawai and Akira, 2006; Toshchakov et al., 2002; Uematsu and Akira, 2007)。 L かし、このシグナル伝達の活性化は細胞腫により異なることが知られてい る(Cooksley et al., 2015)。そこで鼻腔上皮細胞の TLR 刺激が活性化する シグナル経路と標的遺伝子を明らかにするために、NF-κB標的遺伝子として TNF-αおよび IL-6 を、IRF を介するサイトカインとして IFN-Bおよび CXCL10 を、II 型 IFN として IFN-yの mRNA を、それぞれ定量 PCR 法を用いて 測定した。NF-κB標的遺伝子では、TLR3 刺激である Poly(I:C)刺激により TNF- α (101.65±26.85 倍、P < 0.001、図 3A) および IL-6 (215.85±34.82 倍、P < 0.001、図 3B)の mRNA の発現量は有意に増加した。Poly(I:C)以外 では、TLR1/2 刺激である Pam3CSK4 により TNF-α (5.97±0.70 倍、P < 0.01、図 3A) および IL-6 (4.43±0.83 倍、P < 0.05、図 3B) が、TLR6/2 刺激である FSL-1 により TNF-α (7.68±2.56 倍、P < 0.01、図 3A) および IL-6 (5.35±1.80 倍、P < 0.05、図 3B)の発現量は有意に増加した。また TLR5 刺激である Flagellin および TLR9 刺激である ODN2006 によって TNF-α (Flagellin; 7.048±3.18 倍、P < 0.01、0DN2006; 5.15±1.92 倍、P < 0.05、図 3A)の mRNA 発現量は有意に増加した。

IRF を介し産生されるサイトカインとしては、TLR3 刺激である Poly(I:C) 刺激により IFN-β(14.19±4.37 倍、P < 0.01、図 3C) および CXCL10 (7496.34±1862.24 倍、P < 0.001、図 3D)の mRNA の発現量は有意に増加 した。一方、II型 IFN である IFN-γの mRNA 発現量の有意な変化を認めなか った(図 3E)。





図 3. 鼻腔上皮細胞における TLR シグナルによる NF-κB および IRF の標的 遺伝子の mRNA 発現の変化

鼻腔上皮細胞を各 TLR のアゴニストで 24 時間にわたり刺激した。TLR1/2 刺激として Pam3CSK4 を、TLR2 刺激として HKLM を、TLR3 刺激として Poly (I:C)を、TLR4 刺激として LPS を、TLR5 刺激として Flagellin を、TLR6/2 刺激として FSL-1 を、TLR7 刺激として Imiquimod を、TLR8 刺激として ssRNA40 を、TLR9 刺激として ODN2006 を、それぞれ用いた。各 TLR アゴニストによる刺激後の各遺伝子の mRNA 発現量の、GAPDHの mRNA 発現量に対する相対値を計算し、それぞれの刺激により得られたデータを、非刺激細胞での値をコントロールとして標準化した。データは 5 回の独立した実験より得られた平均値±標準誤差である。図中の*は P < 0.05 を、**は P < 0.01 を、***は P < 0.001 を示す。 A)鼻腔上皮細胞の各 TLR 刺激による TNF- α の mRNA 発現量変化を示す。 B)鼻腔上皮細胞の各 TLR 刺激による IL-6 の mRNA 発現量変化を示す。

C)鼻腔上皮細胞の各 TLR 刺激による IFN-Bの mRNA 発現量変化を示す。

D)鼻腔上皮細胞の各 TLR 刺激による CXCL10 の mRNA 発現量変化を示す。

E)鼻腔上皮細胞の各 TLR 刺激による IFN-γの mRNA 発現量変化を示す。

3. Poly(I:C)の濃度変化による ACE2 および TMPRSS2 の mRNA 発現量の検討

異なる濃度の Poly(I:C)の刺激による ACE2 および TMPRSS2 の mRNA 発現量 の変化を、定量 PCR 法を用いて測定した。ACE2 の mRNA 発現量は Poly(I:C) 非投与群と比較して、0.1、1、10 µg/ml 全ての Poly(I:C)の投与濃度で有 意な増加を認めた(0.1 µg/ml 投与群;16.204±3.166 倍、P < 0.001、1 µg/ml 投与群; 19.264±2.651 倍、P < 0.001、10 µg/ml 群; 25.754±3.311 倍、P < 0.001、図 4A)。また Poly(I:C)を 10 µg/ml で投与した群は、1 µg/ml で投与した群と比較して有意に ACE2 の mRNA の発現量が増加した

(1.337±0.118 倍 vs 1 µg/ml 投与群、P < 0.05、図 4A)。一方、TMPRSS2
 の mRNA の発現量は Poly(I:C)を 10 µg/ml で投与した群でのみ有意な増加を
 認めた(4.307±0.867 倍、P < 0.05、図 4B)。



図 4. 鼻腔上皮細胞における Poly(I:C)の投与濃度による ACE2 および TMPRSS2 の mRNA 発現量の変化

鼻腔上皮細胞を Poly(I:C)で 20 時間にわたり刺激した。Poly(I:C)は 0.1、
1、10 µg/ml の濃度で投与した。Poly(I:C)をそれぞれの濃度で投与した細胞での mRNA 発現量を GAPDH の mRNA 発現量に対する相対値を計算し、それぞれの刺激により得られたデータを、Poly(I:C)非投与群での値をコントロールとして標準化した。データは 5 回の独立した実験より得られた平均値 ±標準誤差である。図中の*は P < 0.05 を、***は P < 0.001 を示す。
A)異なる濃度の Poly(I:C)投与による ACE2 の mRNA の発現量変化を示す。
B)異なる濃度の Poly(I:C)投与による TMPRSS2 の mRNA の発現量変化を示す。 4. FP が Poly(I:C)による ACE2 および TMPRSS2 の発現誘導に与える影響の 検討

鼻腔上皮細胞において、FP が Poly(I:C)による ACE2 および TMPRSS2 の mRNA 発現誘導に与える影響を定量 PCR 法を用いて検討した。Poly(I:C)によ る ACE2 の mRNA 発現誘導は、Poly(I:C)投与 FP 非投与群と比較して FP を 1 nM あるいは 10 nM で投与することにより有意に抑制された (FP 非投与群; 25.754±3.311 倍、FP 1 nM 投与群; 18.747±3.224 倍、P < 0.05、FP 10 nM 投与群; 14.941±3.465 倍、P < 0.05、図 5A)。一方、TMPRSS2 ではい ずれの濃度の FP の投与によっても有意な mRNA 発現量の変化を認めなかっ た (図 5B)



図 5. FP が Poly(I:C)による ACE2 および TMPRSS2 の発現誘導に与える影響 Poly(I:C)を 10 µg/ml で投与し鼻腔上皮細胞を 20 時間にわたり刺激した。 また FP を投与する群では Poly(I:C)投与の 1 時間前に投与した。FP は 0.1、1、10 nM で投与した。それぞれの群での mRNA 発現量を GAPDH の mRNA 発現量に対する相対値を計算し、それぞれの刺激により得られたデータ を、Poly(I:C)非投与かつ FP 非投与群での値をコントロールとして標準化 した。データは 4 回の独立した実験より得られた平均値±標準誤差であ る。図中の*は P < 0.05 を、n.s.は有意差なしを示す。
A) Poly(I:C)および異なる濃度での FP 投与による ACE2 の mRNA の発現量変 化を示す。
B) Poly(I:C)および異なる濃度での FP 投与による TMPRSS2 の mRNA の発現量 変化を示す。

5. FP による ACE2 および TMPRSS2 発現誘導抑制の時間的影響についての検 討

鼻腔上皮細胞の Poly(I:C)による ACE2 および TMPRSS2 の発現誘導の経時 的な変化を、定量 PCR 法を用いて測定した。また FP による ACE2 および TMPRSS2 の発現誘導抑制の時間的影響を、定量 PCR 法を用いて測定した。 Poly(I:C)による ACE2 の mRNA 発現量は Poly(I:C) 非投与群と比較して 4、 8、12、16、20、24 時間にわたり投与した各群において有意な増加を認めた

(図 6A)。また Poly(I:C)刺激による TMPRSS2 の mRNA 発現量は、
Poly(I:C)非投与群と比較して 4、8、12、16、20 時間にわたり投与した群で
で有意な増加を認めた(図 6B)。Poly(I:C)による ACE2 の mRNA 発現量の増加は、FP の投与により 16、20、24 時間にわたり Poly(I:C)を投与した群で
有意に抑制された(図 6A)。一方で、Poly(I:C)による TMPRSS2 の mRNA 発
現量の増加は、FP の投与によって有意な変化を認めなかった(図 6B)。



図 6. FP による ACE2 および TMPRSS2 発現誘導抑制の時間的変化 鼻腔上皮細胞を、Poly(I:C)を 10 µg/ml で 4、8、12、16、20、24 時間にわたり刺激した。また FP を投与する群では Poly(I:C) 投与の 1 時間前に 10 nM で投与した。それぞれの群での mRNA 発現量を GAPDHの mRNA 発現量に対する相対値を計算し、それぞれの刺激により得られたデータを、Poly(I:C) および FP 非投与群での値をコントロールとして標準化した。データは 5 回の独立した実験より得られた平均値±標準誤差である。Poly(I:C) 非投与群と Poly(I:C) 投与後、各時間との比較における P 値は*、**、***で示す。図中の*は P < 0.05 を、**は P < 0.01 を、***は P < 0.001 を示す。
P 値は # で示す。 図中の # は P < 0.05 を、n.s. は有意差なしを示す。
A) Poly(I:C) および FP 投与による ACE2 の mRNA 発現量の経時的な変化を示す。
B) Poly(I:C) および FP 投与による TMPRSS2 の mRNA 発現量の経時的な変化を

示す。

6. 鼻腔上皮細胞の TLR3 シグナル経路に対して FP が与える影響についての 検討

dsRNA である Poly(I:C)により TLR3 が刺激されると NF-κB を介した炎症 性サイトカイン(TNF-α、IL-6、IL-12 など)や、IRF を介し I 型 IFN をはじ めとするサイトカイン (IFN-α、IFN-β、CXCL10 など) が産生される (Matsumoto et al., 2011)。そこで鼻腔上皮細胞の TLR3 刺激が活性化する シグナル経路と標的遺伝子に対して FP が与える影響を明らかにするため に、NF-κB 標的遺伝子として TNF-αおよび IL-6 を、IRF を介するサイトカ インとして IFN-βおよび CXCL10 を、それぞれ定量 PCR 法を用いて測定し た。NF-κB 標的遺伝子では、FP 投与により TNF-α (0.488±0.394 倍 vs Poly(I:C) 投与群、P < 0.05、図 7A) および IL-6 (0.320±0.109 倍 vs Poly(I:C) 投与群、P < 0.05、図 7B) の mRNA 発現量は抑制された。一方、 IRF を介し産生されるサイトカインでは、FP 投与により IFN-β (0.910± 0.263 倍 vs Poly(I:C) 投与群、P = 0.567、図 7C) および CXCL10 (1.075± 0.331 倍 vs Poly(I:C) 投与群、P = 0.544、図 7D) の mRNA の発現量の変化 を認めなかった。



図 7. 鼻腔上皮細胞の Poly(I:C)および FP 投与による NF-κB および IRF 標 的遺伝子の mRNA 発現量の変化

TLR3 刺激として Poly(I:C)を 10 µg/ml で投与し鼻腔上皮細胞を 8 時間にわ たり刺激した。また、FP を投与する群では Poly(I:C) 投与の 1 時間前に 10 nM で投与した。それぞれの群での mRNA 発現量を GAPDH の mRNA 発現量に対 する相対値を解析し、それぞれの刺激により得られたデータを、Poly(I:C) および FP 非投与群での値をコントロールとして標準化した。データは 4 回 の独立した実験より得られた平均値±標準誤差である。図中の*は P < 0.05 を、**は P < 0.01 を、***は P < 0.001 を、n.s. は有意差なしを示す。

A)鼻腔上皮細胞の Poly(I:C)刺激および FP の同時投与による TNF-αの mRNA 発現量変化を示す。

B)鼻腔上皮細胞の Poly(I:C)刺激および FP の同時投与による IL-6 の mRNA
 発現量変化を示す。

C)鼻腔上皮細胞の Poly(I:C)刺激および FP の同時投与による IFN-βの mRNA 発現量変化を示す。

D)鼻腔上皮細胞の Poly(I:C)刺激および FP の同時投与による CXCL10 の mRNA 発現量変化を示す。

7. 鼻腔上皮細胞 TLR3 シグナルに対して NF-κB 阻害剤が与える影響につい ての検討

鼻腔上皮細胞の TLR3 刺激が活性化するシグナル経路と標的遺伝子に対し て NF- κ B 転写阻害薬である JSH-23 が与える影響を明らかにするために、 NF- κ B 標的遺伝子として TNF- α および IL-6 を、IRF を介するサイトカイン として IFN- β および CXCL10 を、それぞれ定量 PCR 法を用いて測定した。NF- κ B 標的遺伝子では、JSH-23 投与により TNF- α (0.269±0.0191 倍 vs Poly(I:C) 投与群、P < 0.001、図 8A) および IL-6 (0.167±0.0481 倍 vs Poly(I:C) 投与群、P < 0.05、図 8B) の mRNA 発現は抑制され、ACE2 の mRNA 発現においても有意に抑制された (0.692±0.0616 倍 vs Poly(I:C) 投与 群、P < 0.05、図 8C) 。一方、IRF を介し産生されるサイトカインでは、 JSH-23 投与により IFN- β (2.250±0.609 倍 vs Poly(I:C) 投与群、P = 0.106、図 8D) および CXCL10 (0.661±0.184 倍 vs Poly(I:C) 投与群、P = 0.174、図 8E) において mRNA の発現量の変化を認めず、TMPRSS2 の mRNA 発 現量においても有意な変化を認めなかった (3.856±4.260 倍 vs Poly(I:C) 投与群、P = 0.361、図 8F) 。



図 8. 鼻腔上皮細胞 TLR3 シグナルによる ACE2、TMRPSS2、NF-κB および IRF 標的遺伝子の mRNA 発現の NF-κB 阻害剤による変化

TLR3 刺激として Poly(I:C)を 10 μ g/ml で投与し ACE2 および TMPRSS2 の測 定では 20 時間にわたり、TNF- α 、IL-6、IFN- β および CXCL10 の測定では 8 時間にわたり鼻腔上皮細胞を刺激した。また JSH-23 を投与する群では Poly(I:C)投与の 1 時間前に 30 μ M で投与した。それぞれの群での mRNA 発 現量を GAPDH の mRNA 発現量に対する相対値を解析し、それぞれの刺激によ り得られたデータを、Poly(I:C)および FP 非投与群での値をコントロール として標準化した。データは 4 回の独立した実験より得られた平均値 ±標 準誤差である。図中の*は P < 0.05 を、**は P < 0.01 を、***は P < 0.001 を、n.s. は有意差なしを示す。

A) 鼻腔上皮細胞の Poly(I:C) 刺激および JSH-23 の同時投与による TNF-αの mRNA 発現量変化を示す。

B)鼻腔上皮細胞の Poly(I:C)刺激および JSH-23 の同時投与による IL-6 の mRNA 発現量変化を示す。

C)鼻腔上皮細胞の Poly(I:C)刺激および JSH-23 の同時投与による ACE2 の mRNA 発現量変化を示す。

D)鼻腔上皮細胞の Poly(I:C)刺激および JSH-23 の同時投与による IFN-βの mRNA 発現量変化を示す。

E)鼻腔上皮細胞の Poly(I:C)刺激および JSH-23 の同時投与による CXCL10 の mRNA 発現量変化を示す。

F)鼻腔上皮細胞の Poly(I:C)刺激および JSH-23 の同時投与による TMPRSS2 の mRNA 発現量変化を示す。

 8. 鼻腔上皮細胞 TLR3 刺激と FP 処理が ACE2 および TMPRSS2 のタンパク質

 発現量に与える影響についての検討

鼻腔上皮細胞の Poly(I:C)刺激および FP 処理が ACE2 および TMPRSS2 のタンパク質発現量に与える影響を、イムノブロッティング法および免疫蛍光 細胞染色法を用いて測定した。

まず、イムノブロッティング法でタンパク質発現量の変化について検討した。糖鎖切断を行わないサンプルを PVDF メンブレンに展開したところ、 ACE2 において明瞭なバンドが観察されず定量的な評価が困難であった(図 9A)。生体内において ACE2 は N 型糖鎖の修飾を受けていることから(Zhao et al., 2020)、糖鎖切断処理を行った後、イムノブロッティング法でサン プルを PVDF メンブレンに展開したところ明瞭なバンドが観察された(図 9B)。定量的な評価を行ったところ、Poly(I:C)刺激による ACE2 のタンパ ク質発現量は Poly(I:C)非投与群と比較して有意な増加を認め(1.377± 0.069 倍、P < 0.01、図 9C)、FP によりその増加は有意に抑制された

(0.770±0.017 倍 vs Poly(I:C)投与群、P < 0.001、図 9C)。一方で、
 TMPRSS2 のタンパク質発現量は Poly(I:C)による有意な増加を認めず

(1.083±0.0394倍 vs Poly(I:C)非投与群、P = 0.213、図 9D)、FP による有意な抑制を認めなかった(0.946±0.0340倍 vs Poly(I:C)投与群、P = 0.208、図 9D)。

引き続いて、免疫蛍光細胞染色法でタンパク質発現量の変化について検討した。蛍光強度を定量化したところ、Poly(I:C)刺激による ACE2 のタンパク質発現量は Poly(I:C)非投与群と比較して有意な増加を認め(2.884±0.505 倍 vs Poly(I:C)非投与群、P < 0.01、図 10A、B)、FP によりその増加は有意に抑制された(0.405±0.312 倍 vs Poly(I:C)投与群、P < 0.05、図 10A、B)。一方で、TMPRSS2 のタンパク質発現量は Poly(I:C)による有意な増加を認めず(2.423±2.937 倍 vs Poly(I:C)非投与群、P = 0.449、図 10C.D)、FP による有意な抑制を認めなかった(0.795±0.472 倍 vs Poly(I:C)投与群、P = 0.611、図 10C、D)。

А









図 9. イムノブロッティング法での鼻腔上皮細胞 TLR3 刺激と FP 処理による ACE2 および TMPRSS2 のタンパク質発現量の変化

Poly(I:C)を 10 µg/ml で投与し鼻腔上皮細胞を 28 時間にわたり刺激した。 また FP を投与する群では Poly(I:C)投与の 1 時間前に 10 nM で投与した。 得られた細胞を溶解しイムノブロッティング法により評価した。一部のサ ンプルは PNGase F による糖鎖切断処理した後にタンパク質を PVDF メンブ レンに展開した。それぞれの群でのタンパク質発現量を GAPDH のタンパク 質発現量に対する相対値を解析し、それぞれの刺激により得られたデータ を、Poly(I:C)および FP 非投与群での値をコントロールとして標準化し た。データは 4 回の独立した実験より得られた平均値±標準誤差である。 図中の**は P < 0.01 を、***は P < 0.001 を示す。 A)鼻腔上皮細胞の Poly(I:C)刺激および FP の同時投与し糖鎖切断処理を行 わなかったサンプルの ACE2、TMPRSS2 および GAPDH のバンドを示す。

B) 鼻腔上皮細胞の Poly(I:C) 刺激および FP の同時投与し、糖鎖切断処理を 行ったサンプルの ACE2、TMPRSS2 および GAPDH のバンドを示す。

C)鼻腔上皮細胞の Poly(I:C)刺激および FP の同時投与し、糖鎖切断処理を 行ったサンプルの ACE2 のタンパク質発現量の変化を示す。

D)鼻腔上皮細胞の Poly(I:C)刺激および FP の同時投与し、糖鎖切断処理を 行ったサンプルの TMPRSS2 のタンパク質発現量の変化を示す。





С	NC	Poly(I:C)	Poly(I:C)+FP
TMPRSS2	<u>, 50 µm</u> ,	<u>, 50 µm</u> ,	<u>, 50 µт</u> ,
DAPI	<u>. 50 μm</u> ,	<u>_50 μm,</u>	<u>, 50 µт,</u>
Merge	<u>, 50 µm</u> ,	<u>, 50 µm</u> ,	<u>, 50 µm,</u>

D



図 10. 免疫蛍光細胞染色法での鼻腔上皮細胞 TLR3 刺激と FP 処理による ACE2 および TMPRSS2 のタンパク質発現量の変化

Poly(I:C)を 10 µg/ml で投与し鼻腔上皮細胞を 48 時間にわたり刺激した。 また FP を投与する群では Poly(I:C)投与の 1 時間前に 10 nM で投与した。 各サンプルを、免疫蛍光細胞染色法により、抗 ACE2 抗体、抗 TMPRSS2 抗体 および DAPI で染色し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM710 で画像化した。それ ぞれのサンプルでの蛍光強度を DAPI の蛍光強度に対する相対値を解析し、 それぞれの刺激により得られたデータを、Poly(I:C)および FP 非投与群で の値をコントロールとして標準化した。データは 3 回の独立した実験より 得られた平均値±標準誤差である。図中の*は P < 0.05 を、**は P < 0.01 を、スケールは 50 µm を示す。

A)鼻腔上皮細胞の Poly(I:C)刺激および FP の同時投与した細胞を抗 ACE2 抗体および DAPI で染色した画像を示す。

B)鼻腔上皮細胞の Poly(I:C)刺激および FP の同時投与した細胞における ACE2 の蛍光強度の変化を示す。

C)鼻腔上皮細胞の Poly(I:C)刺激および FP の同時投与した細胞を抗 TMPRSS2 抗体および DAPI で染色した画像を示す。

D)鼻腔上皮細胞の Poly(I:C)刺激および FP の同時投与した細胞における TMPRSS2 の蛍光強度の変化を示す。

【考察】

本研究では、鼻腔上皮において自然免疫シグナル、特に TLR3 刺激により ACE2 の発現が有意に亢進することが示された。また鼻噴霧用ステロイドと して汎用される FP の投与によって、Poly(I:C)刺激により誘導される ACE2 の発現を抑制したが、TMPRSS2 の発現には影響を与えなかった。

SARS-CoV-2の細胞内侵入因子である ACE2 と TMPRSS2 の発現機構を解明す ることは COVID-19 に対する予防法や治療法に直結すると考えられる (Wu et al., 2021)。これまで下気道における ACE2 の発現に関する研究が中心に行 われていたが、上気道に関する研究はわずかに認めるのみであった。下気 道においては、Poly(I:C)や IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ 、TNF- α 、IL-6、IL- α/β などのサイ トカインによって ACE2 の発現は亢進することが報告されている (Ziegler et al., 2020)。またウイルス感染や喫煙によっても ACE2 発現が亢進する ことが明らかとなっている (Saheb Sharif-Askari et al., 2020a; Zhang et al., 2020b)。一方、2型炎症に関連するサイトカインは ACE2 の発現を 抑制することが報告されている (Jackson et al., 2020; Kimura et al., 2020)。そのため、2型炎症を惹起する代表的疾患である喘息患者において は COVID-19 の重症化リスクが低減する可能性が指摘されている (Matsumoto and Saito, 2020)。

ー方、これまで上気道における ACE2 の発現についてはほとんど解明され ていなかった。上気道である鼻腔と、下気道である気管における自然免疫 への反応は異なることが知られており(Cooksley et al., 2015)、前述した 下気道における自然免疫に対する ACE2 発現の変化が、そのまま上気道での 発現変化に当てはまるわけではないと考えられる。現在までのところ、上 気道においては IFN-γおよび 2 型炎症が ACE2 発現に影響を与えるという報 告しかない(Ziegler et al., 2020)。TMPRSS2 発現に関しては上気道と下気 道のいずれにおいてもアンドロゲンレセプターによる亢進するという報告 を認めるのみであり(Lin et al., 1999; Lucas et al., 2014)、SARS-CoV-2 の宿主への感染において重要なタンパク質でありながら、鼻腔上皮を含む 気道において自然免疫シグナルによりどのような変化をうけるかは解明さ れていなかった。

本研究によって、鼻腔上皮における ACE2 の発現は、過去に報告されている IL-6(Cooksley et al., 2015)や MMP1、MMMP9、MMP10、TIMP-1(Suzuki et al., 2018)、TSLP(Golebski et al., 2016)、IL-8、TNF-α(Ohkuni et al., 2011)などと同様に、Poly(I:C)刺激によっても有意に亢進することが明らかになった。Poly(I:C)は合成 2 本鎖 RNA (dsRNA) であり、ウイルスは

増殖の際に2本鎖 RNA 合成を誘導することから、ウイルス感染のモデルと して汎用されている(Jacobs and Langland, 1996)。Poly(I:C)刺激により 誘導される ACE2の発現が実際に SARS-CoV-2 感染リスクを増やすかについ ては、さらなる研究が必要であるが、ウイルス感染による急性鼻副鼻腔炎 などの上気道炎の予防や治療は鼻腔症状の改善のみならず、上気道におけ る SARS-CoV-2 の結合受容体である ACE2 の発現を抑制することで、続発す る SARS-CoV-2 の感染を予防する可能性がある。

本研究における明らかになった重要な点としては、Poly(I:C)刺激により 誘導される ACE2 の発現に対する FP の抑制効果である。臨床的な観点から は COVID-19 への副腎皮質ステロイドの全身投与に関しては議論がある (Mishra and Mulani, 2021; Russell et al., 2020; Veronese et al., 2020)。人工呼吸器管理を要するような重症例においてはデキサメタゾンの 全身投与が死亡率を有意に低下させるという報告や(Group et al., 2021)、入院後 28 日後の死亡率を有意に低下させるという報告がある (Group et al., 2020)。しかしながら、副腎皮質ステロイドの全身投与が 高い死亡率や入院期間の延長、細菌感染の合併と有意に関連があるという 報告や(Yang et al., 2020)、軽症及び中等症においては、高い重症化率や 入院期間の延長を認めたとの報告(Yuan et al., 2020)、酸素投与の必要が ない症例においては効果を認めず副作用および合併症のリスク高めるとい う報告(Group et al., 2021)、そして副腎皮質ステロイドの全身投与がウ イルス排菌期間の延長と関連する(Li et al., 2021)など有益ではないとの 報告もある。

鼻噴霧用ステロイドや吸入ステロイドなど副腎皮質ステロイドの局所投 与の COVID-19 に対する有効性に関しても議論があるのが現状である (Halpin et al., 2020)。気管支喘息に対する吸入ステロイド薬として汎用 されるシクレソニド吸入は SARS-CoV-2 のウイルス複製を防ぐことで、 COVID-19 に対して有益である可能性や(Matsuyama et al., 2020)、鼻噴霧 用ステロイドの投与により COVID-19 による入院や ICU への入床率、院内死 亡率を低下させるという報告がある(Strauss et al., 2021)。また欧州ア レルギー臨床免疫学会は、アレルギー性鼻炎患者における鼻噴霧用ステロ イド薬の投与に関して、免疫抑制がないことや、SARS-CoV-2 感染拡大の原 因となりうるくしゃみおよびそれに伴う飛沫の喀出を減らすことに繋がる ことから、SARS-CoV-2 の流行下においても継続的な投与を提言した (Bousquet et al., 2020)。一方で、気管支喘息患者において吸入ステロイ ドは上気道感染のリスクを有意に上昇させる(Yang et al., 2019)、ブデソ ニドは *in vitro*において自然免疫反応を低下させる可能性(Davies et al., 2011)、急性上気道炎を惹起する代表的なウイルスの一つであるライノウイルスにおいては、鼻噴霧用ステロイドの投与により、鼻腔における局所免疫の低下やウイルス力価の上昇を生じる可能性も報告されているため(Singanayagam et al., 2015)、鼻噴霧用ステロイド薬の COVID-19 への臨床的意義を明らかにするにはさらなる研究が必要である。

dsRNA である Poly(I:C)により TLR3 が刺激されると NF- κ B を介した炎症 性サイトカイン(TNF- α 、IL-6、IL-12 など)や、IRF を介し産生される I 型 IFN はじめとするサイトカイン (IFN- α 、IFN- β 、CXCL10 など) が産生され る(Kawai and Akira, 2006; Matsumoto et al., 2011)。興味深いことに、 鼻腔上皮おいて、FP は NF- κ B を介するサイトカインを抑制する一方で、IRF を介し産生されるサイトカインは抑制しなかった。

副腎皮質ステロイドは Inhibitor of NF-κBα (IκBα) の合成を増加させること(Auphan et al., 1995; Scheinman et al., 1995)、活性化され核内へと移行した NF-κBの DNA への結合を阻害すること(Mukaida et al.,

1994; Ray and Prefontaine, 1994)、NF-κBのDNAへの結合能を低下させる こと(De Bosscher et al., 1997)によりNF-κBを介する炎症性サイトカイ ンの産生を抑制する。一方、副腎皮質ステロイドによるIRFを介するI型 IFN 産生への影響は細胞種により異なると報告されている(Flammer et al., 2010)。本研究ではPoly(I:C)に誘導されたACE2のmRNAは、他のNF-κB標 的遺伝子と同様に、FPやNF-κB阻害剤で抑制された。このことから、ACE2 はNF-κB経路により制御をされていると考えられた。一方、Poly(I:C)によ って発現量が増加したTMPRSS2のmRNAはFPやNF-κB阻害剤によって抑制 されないことから、TMPRSS2の発現制御におけるNF-κBの関与は限定的と考 えられた。

今後の検討課題として、*in vitro*において Poly(I:C)刺激により SARS-CoV-2の感染において重要である ACE2の発現亢進を明らかにしたものの、 生体内におけるこれらの遺伝子発現の亢進と SARS-CoV-2 への感染性の関連 については未解明であることが挙げられる。また、Poly(I:C)刺激により誘 導された ACE2 に対する FP による抑制が、実際に SARS-CoV-2 の感染に対し て有益かは不明であり、さらなる基礎研究および臨床研究が必要であると 考えられる。

【結論】

- 1. 本研究全体から得られた新知見
 - 鼻腔粘膜上皮細胞では、TLR3 刺激である Poly(I:C)によって ACE2 および TMPRSS2 の mRNA の発現量が増加する。
 - Poly(I:C)による ACE2 の mRNA の発現量増加は、FP により抑制される。
 - 鼻腔粘膜上皮細胞の Poly(I:C)刺激により、ACE2 タンパク質の発現が 増加する。
 - Poly(I:C)による ACE2 のタンパク質の発現量増加は、FP により抑制される。

2. 新知見の意義

本研究により明らかになった知見の意義は、SARS-CoV-2の細胞内侵入因子 である ACE2 および TMPRSS2 の発現に自然免疫シグナルが与える影響を、上 気道において初めて明らかにした。また *in vitro* ではあるものの、鼻噴霧 用ステロイドとして頻用される FP が、TLR3 刺激による ACE2 の発現を抑制す ることから SARS-CoV-2 の感染予防に有用である可能性が考えられた。

3. 今後の研究展開と課題

本研究により得られた結果に基づいて、以下の研究を検討している。

ACE2 が Poly(I:C)で発現亢進することによる、SARS-CoV-2 の鼻腔上皮細胞への結合の変化についての検討

本研究において、Poly(I:C)が ACE2 の発現を亢進させることが明らかと なったが、亢進した ACE2 によりウイルスとの結合が増加するかについて検 討が必要と考えられる。具体的には、SARS-CoV-2 の S protein に蛍光タン パクを付加したプラスミドを作製し、遺伝子組み換えバキュロウイルス生 産系を用いてリコンビナントタンパク質を精製する。手術時に採取した鼻 腔上皮を Poly(I:C)で ACE2 発現を誘導する群とコントロールとして誘導し ない群に分け、蛍光タンパク質付加 S protein と ACE2 の共局在性を共焦点 レーザー顕微鏡で比較検討する。 ② 生体内において TLR3 刺激により ACE2 の発現が亢進するかの検討

本研究では *in vitro*の実験系において、Poly(I:C)が ACE2 の発現を亢進 させることを示したが、生体内においても TLR3 刺激、すなわち上気道炎な どのウイルス感染後に実際に ACE2 の発現が亢進するかについての検討が必 要であると考えられる。健常例をコントロールとして急性上気道炎などに 罹患している患者の鼻腔上組織において、ACE2 と TMPRSS2 の免疫組織染色 を行うことで評価する。

③ ウイルス感染後の患者におけるコロナ感染リスクのコホート研究

本研究では、Poly(I:C)により ACE2 の発現が亢進すること、その発現亢 進が FP により抑制されることが明らかとなったが、実際の SARS-CoV-2 感 染リスクに与える影響への評価が必要と考えられる。急性上気道炎などウ イルス感染後の患者と健常症例で、SARS-CoV-2 感染率や重症化に差がある かどうかについて評価する。またサブグループ解析として、アレルギー性 鼻炎に対して鼻噴霧用ステロイド常用の有無で感染率や重症化に差がある かについて評価する。本実験によって生体内における鼻噴霧用ステロイド が実際に SARS-CoV-2 の感染率や重症化に影響するかについて評価可能と考 える。

【謝辞】

本研究を行い、学位論文をまとめるにあたり、北海道大学大学院医学研究 院・生理系部門生化学分野医化学教室 教授 畠山鎮次先生、北海道大学大 学院医学研究院・耳鼻咽喉科頭頸部外科学教室 教授 本間明宏先生より多 くのご支援とご指導を賜りました。ここに深くお礼申し上げます。また、 研究に必要な実験手法や理論に関しましてご指導を戴きました北海道大学 大学院医学研究院・生理系部門生化学分野医化学教室 講師 渡部昌先生、 助教 近藤豪先生を始めとする同教室員の皆様、また臨床検体の採取や取 り扱いに関しましてご指導ご教授して下さった北海道大学大学院医学研究 院・耳鼻咽喉科頭頸部外科学教室 助教 鈴木正宣先生を始めとする同教室 員の皆様にも重ねてお礼申し上げます。

本研究の一部は、日本学術振興会科学研給助成事業(19K18718: 中薗 彬、17H06491、18K16871、18KK0444: 鈴木正宣, 20K18301: 本間あや、 20K09703: 中丸裕爾)、秋山記念生命科学振興財団(鈴木正宣、本間あ や)による助成により遂行されました。

【利益相反】

グラクソ・スミスクライン株式会社の 2015 年度 GSK ジャパン研究助成 (鈴木正宣)、サノフィ株式会社の Sanofi Japan research grant、 SNFS20190405014:本間明宏)による助成を受けました。

【参考文献】

Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmberg, A., and Karin, M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. Science *270*, 286-290.

Bousquet, J., Akdis, C.A., Jutel, M., Bachert, C., Klimek, L., Agache, I., Ansotegui, I.J., Bedbrook, A., Bosnic-Anticevich, S., Canonica, G.W., *et al.* (2020). Intranasal corticosteroids in allergic rhinitis in COVID-19 infected patients: An ARIA-EAACI statement. Allergy *75*, 2440-2444.

Bunyavanich, S., Do, A., and Vicencio, A. (2020). Nasal Gene Expression of Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Children and Adults. JAMA *323*, 2427-2429.

Cooksley, C., Roscioli, E., Wormald, P.J., and Vreugde, S. (2015). TLR response pathways in NuLi-1 cells and primary human nasal epithelial cells. Mol Immunol *68*, 476-483.

Davies, J.M., Carroll, M.L., Li, H., Poh, A.M., Kirkegard, D., Towers, M., and Upham, J.W. (2011). Budesonide and formoterol reduce early innate antiviral immune responses in vitro. PLoS One *6*, e27898.

De Bosscher, K., Schmitz, M.L., Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Fiers, W., and Haegeman, G. (1997). Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 13504-13509.

Flammer, J.R., Dobrovolna, J., Kennedy, M.A., Chinenov, Y., Glass, C.K., Ivashkiv, L.B., and Rogatsky, I. (2010). The type I interferon signaling pathway is a target for glucocorticoid inhibition. Mol Cell Biol *30*, 4564-4574.

Golebski, K., van Tongeren, J., van Egmond, D., de Groot, E.J., Fokkens, W.J., and van Drunen, C.M. (2016). Specific Induction of TSLP by the Viral RNA Analogue Poly(I:C) in Primary Epithelial Cells Derived from Nasal Polyps. PLoS One *11*, e0152808.

Group, R.C., Horby, P., Lim, W.S., Emberson, J.R., Mafham, M., Bell, J.L., Linsell, L., Staplin, N., Brightling, C., Ustianowski, A., *et al.* (2021). Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. N Engl J Med *384*, 693-704.

Group, W.H.O.R.E.A.f.C.-T.W., Sterne, J.A.C., Murthy, S., Diaz, J.V., Slutsky, A.S., Villar, J., Angus, D.C., Annane, D., Azevedo, L.C.P., Berwanger, O., *et al.* (2020). Association Between Administration of Systemic Corticosteroids and Mortality Among Critically Ill Patients With COVID-19: A Meta-analysis. JAMA *324*, 1330-1341.

Halpin, D.M.G., Singh, D., and Hadfield, R.M. (2020). Inhaled corticosteroids and COVID-19: a systematic review and clinical perspective. Eur Respir J *55*.

Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Kruger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T.S., Herrler, G., Wu, N.H., Nitsche, A., *et al.* (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. Cell *181*, 271-280 e278.

Hou, Y.J., Okuda, K., Edwards, C.E., Martinez, D.R., Asakura, T., Dinnon, K.H., 3rd, Kato, T., Lee, R.E., Yount, B.L., Mascenik, T.M.*, et al.* (2020). SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. Cell *182*, 429-446 e414.

Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., *et al.* (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. The Lancet *395*, 497-506.

Jackson, D. J., Busse, W. W., Bacharier, L. B., Kattan, M., O'Connor, G. T., Wood, R. A., Visness, C. M., Durham, S. R., Larson, D., Esnault, S., *et al.* (2020). Association of respiratory allergy, asthma, and expression of the SARS-CoV-2 receptor ACE2. J Allergy Clin Immunol *146*, 203-206 e203.

Jacobs, B.L., and Langland, J.O. (1996). When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to doublestranded RNA. Virology *219*, 339-349.

Kawai, T., and Akira, S. (2006). TLR signaling. Cell Death Differ *13*, 816-825.

Khanmohammadi, S., and Rezaei, N. (2021). Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19. J Med Virol *93*, 2735-2739.

Kimura, H., Francisco, D., Conway, M., Martinez, F.D., Vercelli, D., Polverino, F., Billheimer, D., and Kraft, M. (2020). Type 2 inflammation modulates ACE2 and TMPRSS2 in airway epithelial cells. J Allergy Clin Immunol *146*, 80-88 e88.

Li, T.Z., Cao, Z.H., Chen, Y., Cai, M.T., Zhang, L.Y., Xu, H., Zhang, J.Y., Ma, C.H., Liu, Y., Gao, L.J., *et al.* (2021). Duration of SARS-CoV-2 RNA shedding and factors associated with prolonged viral shedding in patients with COVID-19. J Med Virol *93*, 506-512.

Li, W., Moore, M.J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S.K., Berne, M.A., Somasundaran, M., Sullivan, J.L., Luzuriaga, K., Greenough, T.C., *et al.* (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. Nature *426*, 450-454.

Lin, B., Ferguson, C., White, J.T., Wang, S., Vessella, R., True, L.D., Hood, L., and Nelson, P.S. (1999). Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. Cancer Res *59*, 4180-4184.

Lucas, J.M., Heinlein, C., Kim, T., Hernandez, S.A., Malik, M.S., True, L.D., Morrissey, C., Corey, E., Montgomery, B., Mostaghel, E., *et al.* (2014). The androgen-regulated protease TMPRSS2 activates a proteolytic cascade involving components of the tumor microenvironment and promotes prostate cancer metastasis. Cancer Discov *4*, 1310-1325.

Matsumoto, K., and Saito, H. (2020). Does asthma affect morbidity or severity of COVID-19? J Allergy Clin Immunol *146*, 55-57.

Matsumoto, M., Oshiumi, H., and Seya, T. (2011). Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. Rev Med Virol *21*, 67-77.

Matsuyama, S., Kawase, M., Nao, N., Shirato, K., Ujike, M., Kamitani, W., Shimojima, M., and Fukushi, S. (2020). The Inhaled Steroid Ciclesonide Blocks SARS-CoV-2 RNA Replication by Targeting the Viral Replication-Transcription Complex in Cultured Cells. J Virol *95*.

Mehdipour, A.R., and Hummer, G. (2021). Dual nature of human ACE2 glycosylation in binding to SARS-CoV-2 spike. Proc Natl Acad Sci U S A *118*.

Mirzaei, R., Goodarzi, P., Asadi, M., Soltani, A., Aljanabi, H.A.A., Jeda, A.S., Dashtbin, S., Jalalifar, S., Mohammadzadeh, R., Teimoori, A., *et al.* (2020). Bacterial co-infections with SARS-CoV-2. IUBMB Life *72*, 2097-2111.

Mishra, G.P., and Mulani, J. (2021). Corticosteroids for COVID-19: the search for an optimum duration of therapy. The Lancet Respiratory Medicine *9*.

Mukaida, N., Morita, M., Ishikawa, Y., Rice, N., Okamoto, S., Kasahara, T., and Matsushima, K. (1994). Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. Journal of Biological Chemistry *269*, 13289-13295.

Ohkuni, T., Kojima, T., Ogasawara, N., Masaki, T., Fuchimoto, J., Kamekura, R., Koizumi, J., Ichimiya, S., Murata, M., Tanaka, S., *et al.* (2011). Poly(I:C) reduces expression of JAM-A and induces secretion of IL-8 and TNFalpha via distinct NF-kappaB pathways in human nasal epithelial cells. Toxicol Appl Pharmacol *250*, 29-38.

Paderno, A., Schreiber, A., Grammatica, A., Raffetti, E., Tomasoni, M., Gualtieri, T., Taboni, S., Zorzi, S., Lombardi, D., Deganello, A., et al. (2020). Smell and taste alterations in COVID-19: a cross-sectional analysis of different cohorts. Int Forum Allergy Rhinol 10, 955-962.

Ray, A., and Prefontaine, K.E. (1994). Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 752-756.

Russell, C.D., Millar, J.E., and Baillie, J.K. (2020). Clinical evidence does not support corticosteroid treatment for 2019-nCoV lung injury. The Lancet *395*, 473-475.

Saheb Sharif-Askari, F., Saheb Sharif-Askari, N., Goel, S., Fakhri, S., Al-Muhsen, S., Hamid, Q., and Halwani, R. (2020a). Are patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps at a decreased risk of COVID-19 infection? Int Forum Allergy Rhinol *10*, 1182-1185.

Saheb Sharif-Askari, N., Saheb Sharif-Askari, F., Alabed, M., Temsah, M.H., Al Heialy, S., Hamid, Q., and Halwani, R. (2020b). Airways Expression of SARS-CoV-2 Receptor, ACE2, and TMPRSS2 Is Lower in Children Than Adults and Increases with Smoking and COPD. Mol Ther Methods Clin Dev *18*, 1-6.

Scheinman, R.I., Cogswell, P.C., Lofquist, A.K., and Baldwin, A.S., Jr. (1995). Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. Science *270*, 283-286.

Silva, D.L., Lima, C.M., Magalhaes, V.C.R., Baltazar, L.M., Peres, N.T.A., Caligiorne, R.B., Moura, A.S., Fereguetti, T., Martins, J.C., Rabelo, L.F., *et al.* (2021). Fungal and bacterial coinfections increase mortality of severely ill COVID-19 patients. J Hosp Infect *113*, 145-154.

Singanayagam, A., Glanville, N., Bartlett, N., and Johnston, S. (2015). Effect of fluticasone propionate on virus-induced airways inflammation and anti-viral immune responses in mice. The Lancet *385*.

Strauss, R., Jawhari, N., Attaway, A.H., Hu, B., Jehi, L., Milinovich, A., Ortega, V.E., and Zein, J.G. (2021). Intranasal Corticosteroids Are Associated with Better Outcomes in Coronavirus Disease 2019. J Allergy Clin Immunol Pract *9*, 3934-3940 e3939.

Sungnak, W., Huang, N., Becavin, C., Berg, M., Queen, R., Litvinukova, M., Talavera-Lopez, C., Maatz, H., Reichart, D., Sampaziotis, F., *et al.* (2020). SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. Nat Med *26*, 681-687.

Suzuki, M., Ramezanpour, M., Cooksley, C., Li, J., Nakamaru, Y., Homma, A., Psaltis, A., Wormald, P.J., and Vreugde, S. (2018). Sirtuin-1 Controls Poly (I:C)-Dependent Matrix Metalloproteinase 9 Activation in Primary Human Nasal Epithelial Cells. Am J Respir Cell Mol Biol *59*, 500-510.

Toshchakov, V., Jones, B.W., Perera, P.-Y., Thomas, K., Cody, M.J., Zhang, S., Williams, B.R.G., Major, J., Hamilton, T.A., Fenton, M.J., *et al.* (2002). TLR4, but not TLR2, mediates IFN- β -induced STAT1 α / β -dependent gene expression in macrophages. Nature Immunology *3*, 392-398.

Uematsu, S., and Akira, S. (2007). Toll-like receptors and Type I interferons. J Biol Chem *282*, 15319-15323.

Veronese, N., Demurtas, J., Yang, L., Tonelli, R., Barbagallo, M., Lopalco, P., Lagolio, E., Celotto, S., Pizzol, D., Zou, L., *et al.* (2020). Use of Corticosteroids in Coronavirus Disease 2019 Pneumonia: A Systematic Review of the Literature. Front Med (Lausanne) *7*, 170.

Wu, J., Deng, W., Li, S., and Yang, X. (2021). Advances in research on ACE2 as a receptor for 2019-nCoV. Cell Mol Life Sci *78*, 531-544.

Yang, M., Zhang, Y., Chen, H., Lin, J., Zeng, J., and Xu, Z. (2019). Inhaled corticosteroids and risk of upper respiratory tract infection in patients with asthma: a meta-analysis. Infection *47*, 377-385.

Yang, Z., Liu, J., Zhou, Y., Zhao, X., Zhao, Q., and Liu, J. (2020). The effect of corticosteroid treatment on patients with coronavirus infection: a systematic review and meta-analysis. J Infect *81*, e13-e20.

Yuan, M., Xu, X., Xia, D., Tao, Z., Yin, W., Tan, W., Hu, Y., and Song, C. (2020). Effects of Corticosteroid Treatment for Non-Severe COVID-19 Pneumonia: A Propensity Score-Based Analysis. Shock *54*, 638-643.

Zhang, G., Hu, C., Luo, L., Fang, F., Chen, Y., Li, J., Peng, Z., and Pan, H. (2020a). Clinical features and short-term outcomes of 221 patients with COVID-19 in Wuhan, China. J Clin Virol *127*, 104364.

Zhang, Y., Geng, X., Tan, Y., Li, Q., Xu, C., Xu, J., Hao, L., Zeng, Z., Luo, X., Liu, F., *et al.* (2020b). New understanding of the damage of SARS-CoV-2 infection outside the respiratory system. Biomed Pharmacother *127*, 110195.

Zhao, P., Praissman, J.L., Grant, O.C., Cai, Y., Xiao, T., Rosenbalm, K.E., Aoki, K., Kellman, B.P., Bridger, R., Barouch, D.H.*, et al.* (2020). Virus-Receptor Interactions of Glycosylated SARS-CoV-2 Spike and Human ACE2 Receptor. Cell Host Microbe *28*, 586-601 e586.

Ziegler, C.G.K., Allon, S.J., Nyquist, S.K., Mbano, I.M., Miao, V.N., Tzouanas, C.N., Cao, Y., Yousif, A.S., Bals, J., Hauser, B.M., *et al.* (2020). SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. Cell *181*, 1016-1035 e1019.

Zou, L., Ruan, F., Huang, M., Liang, L., Huang, H., Hong, Z., Yu, J., Kang, M., Song, Y., Xia, J., *et al.* (2020). SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. N Engl J Med *382*, 1177-1179.