



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 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	中菌, 彬
Description	配架番号 : 2775
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15456号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89999
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	NAKAZONO_Akira_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 中菌 彬

学位論文題名

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)

【背景と目的】

新型コロナウイルス感染症 (Corona virus 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アーゼ (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 により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。

【対象と方法】

北海道大学病院耳鼻咽喉科において、2020 年 1 月から 12 月までに鼻中隔彎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 発現は定量的 PCR で、タンパク質発現は免疫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。

【結果】

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。引き続き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、免疫ブロットング法では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は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TLR3アゴニストであり、ウイ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の感染の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の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。

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ー性鼻炎や鼻副鼻腔炎治療に汎用されている。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。