HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | Gold-nanocluster-mediated microinflammation detection using a tissue clearing method and Molecular mechanism for SARS-CoV-2-specific CD4+ T cell activation in healthy people [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s) | NAIM, Fayrouz Shawky Abdelmoneim |
| Description | 配架番号：2777 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(医学) |
| Dissertation Number | 甲第15459号 |
| Issue Date | 2023-03-23 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/90002 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | NAIM_Fayrouz_review.pdf, 審査の要旨 |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　ﾌｪｲﾛｳｽﾞ ｼｬｳｷｰ ｱﾌﾞﾃﾞﾙﾓﾈｲﾑ ﾈｲﾑ

審査担当者　主査　教授　野　田　展　生
　　副査　教授　大　場　雄　介
　　副査　教授　氏　家　英　之

## 学 位 論 文 題 名

Gold-nanocluster-mediated microinflammation detection using a tissue clearing method and Molecular mechanism for SARS-CoV-2-specific $CD4^+$ T cell activation in healthy people
（組織透明化法を用いた金ナノクラスターによる微小炎症検出と健常人における SARS-CoV-2 特異的 $CD4^+$ T 細胞活性化の分子機構に関する研究）

ネイム博士課程学生(以下、申請者)が所属する研究室では、組織特異的な非免疫細胞において IL-6 を含む炎症性メディエーターによる NF-κB と STAT3 の同時活性化が、過剰な NF-κB の活性化(IL-6 アンプと呼称)を誘発し、様々な慢性炎症性疾患を誘導することを明らかにしてきた。また SARS-CoV-2 感染によって発症する COVID-19 が IL-6 アンプを介したサイトカインストームの誘導により重症化するという仮説論文を報告している。申請者は、炎症を主眼に二部構成で博士研究を進め、(1)健常人末梢血における SARS-CoV-2 反応性の CD4 T 細胞の免疫優位性の検討、および(2)金$(Au)_{13}$ナノクラスター($Au_{13}NC$)を用いた慢性炎症性疾患の潜在的な原因となる微小炎症の 3 次元的検出法の開発を行った。(1)の課題では、SARS-CoV-2 の構造(SP)・非構造(NSP)タンパク質を含む構成物を人工的に合成・精製し、感染履歴のない健常人由来のヒト末梢血単核細胞(PBMC)中の CD4 T 細胞のこれらタンパク質に対する反応性を調べ、SP よりも NSP により高く反応する結果を得た。本成果は他国と同様に、本邦の SARS-CoV-2 非感染者においても SARS-CoV-2 と HuCoV（風邪のコロナウイルス）の間で交差反応性を示す免疫記憶 T 細胞が既に存在しているというデータを支持するだけでなく、ワクチン開発時に標的とされる SP よりも NSP が効果的な標的分子となるうることを示唆した。(2)の課題では、ヒト多発性硬化症モデルとして知られる実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)モデルを用いて、$Au_{13}NC$ 投与法と脊髄透明化法の組合わせにより、微小炎症部位である第５腰髄にて $Au_{13}NC$ シグナルを 3 次元的に検出する手法を開発した。従来は 2 次元組織解析が中心であったが、本研究により炎症臓器を 3 次元イメージングで迅速に可視化する方法の有用性が示された。

第一部の質疑応答では、主査の野田教授より、CD4 T 細胞の反応性が SP よりも NSP に対して高いことについて、既存の他のウイルスワクチン開発に NSP が標的とされているかという質問があり、申請者は詳しくはわからないが SP が主に使われているだろうと回答した。また合成した NSP14, NSP15 の SDS-PAGE 上でのマルチバンド、低精製度による結果への悪影響について指摘があったのに対し、申請者は然るべきサイズでの検出を確認していると回答した。続いて副査の氏家教授より、COVID-19 回復患者の罹患時の状態について尋ねられ、重症化患者ではないことを回答した。次に、PBMC を採取した健常人のバックグランドについての質問があり、ワクチン未接種の段階、年齢は 25-30 歳であると回答した。さらに、同副査からは各々の NSP タンパク質に対する反応性について結論を出すことが重要であると指摘を受けたのに対し、申請者はそのためには今後検体

数を増やすことが重要であると回答した。続いて、副査の大場教授からはSARS-CoV-2亜系統間でのCD4 T細胞の反応性、特にSPに対する反応性の差異を調べていくことが重要であるとの指摘を受けた。また、なぜ無細胞系合成システムを採用したのかとの質問があり、申請者は簡便にタンパクを合成することが可能であるためと回答した。これに対して、同副査からは無細胞合成系では糖鎖修飾がないため、ネイティブなタンパク質の性状を反映していないという限界があり、CD4 T細胞がSPよりもNSPに対してより高い反応性を示す結論については議論の余地があるとの指摘も受けた。

第二部の質疑応答では、主査の野田教授より$Au_{13}NC$を選んだ理由について質問があり、申請者はサイズが非常に小さく、中枢神経系で形成される血管ゲートに流入できる可能性があることや、血液中でも安定であり、通常の蛍光標識抗体よりも蛍光消失しない利便性を回答した。$Au_{13}NC$の実サイズについては回答できなかったが、おそらくナノサイズであることを付け加えた。さらに、$Au_{13}NC$を用いて動物を生かした状態で微小炎症を検出することが可能かについての質問があり、申請者は材料に有害物質が含まれており試行したことがないと回答した。続いて副査の氏家教授からは、$Au_{13}NC$投与時間が２時間である理由について質問があった。申請者は、至適条件については研究室のスタッフが設定しており、彼らとの論議の上で本実験に適用したこと、また2時間以上だと検出できなかったこと、その原因として拡散があったかどうかは定かではないと回答した。また、passive transfer EAE(pEAE)モデルではactive EAE(aEAE)モデルと比較して$Au_{13}NC$の検出がクリアでないとの質問があり、申請者はaEAEでは臨床スコア3であるのに対してpEAEはスコア2であり、重症度の低さに起因している可能性について言及した。さらに、本実験については、抗CD4抗体や抗MHCII抗体を用いずに$Au_{13}NC$を用いる利点について副査の氏家教授と大場教授より質問があり、申請者は透明化技法を利用した染色工程では抗CD4抗体がワークしないこと、また$Au_{13}NC$によって微小炎症を早期に検出することが可能であると回答した。大場教授からは、Scale法などの他の透明化手法の活用の助言を受けるとともに、三次元画像データの掲載等を要請された。

この論文は、SPよりもNSPに高い反応性を示す免疫記憶T細胞がSARS-CoV-2非感染者に存在している事を示すとともに、微小炎症を3次元的に検出する手法を確立したという点において高く評価され，今後ワクチン開発や微小炎症検出法開発に向けた応用研究へと進展していくことが期待される。

審査員一同は，これらの成果を高く評価し，大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ，申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。