



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)	中藺, 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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15456
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90042
Type	doctoral thesis
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 藺 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 藺 彬

目次

発表論文目録および学会発表目録	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 Ramezanzpour, 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 Ramezanzpour, 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。

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。

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、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。

【略語表】

ACE2	Angiotensin converting enzyme 2
ANOVA	one-way Analysis of variance
BEGM	Bronchial epithelial cell growth medium
CD	cluster of differentiation
cDNA	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
I κ B α	Inhibitor of Nuclear factor-kappa B α
IL	Interleukin
IRF	Interferon regulatory factor
LPS	Lipopolysaccharide
MMP	Matrix metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonucleic acid
n. s.	not significant
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NP-40	Nonidet P-40
ODN	Oligodeoxynucleotide
Pam3CSK4	Palmitoyl-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 (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., 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い。

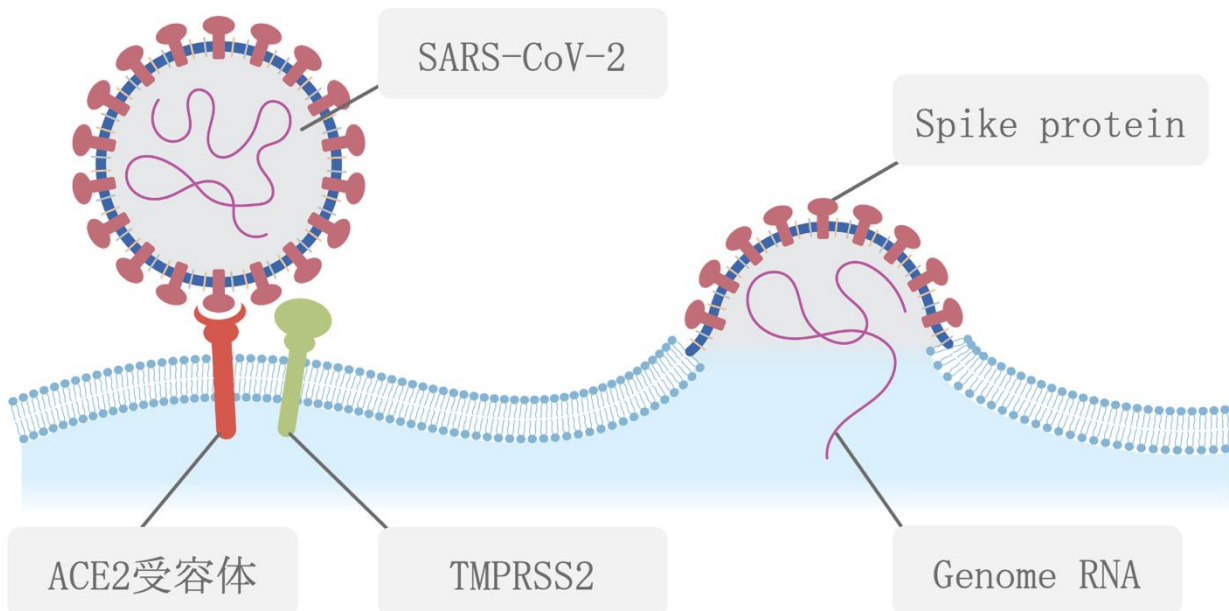


図 1. SARS-CoV-2 感染機構

SARS-CoV-2 表面の Spike protein が宿主細胞の ACE2 と結合、TMPRSS2 に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)

タンク式プロッティング装置：ミニトランスプロット®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)

超音波破碎装置：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 mmol/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)
DMSO (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)
10% NP-40 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
ECL western blotting substrate (Thermo Fisher, Waltham, 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-HCl) 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攪拌し 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™培地 2 ml で穏やかにピペティングし、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 μ l 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 1）。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/ml、500 μ l を PBS 49.5 ml で溶解し 0.03 mg/ml のコラーゲン溶液を作成した
2	6 ウェルプレートでは 1 ウェルあたり 300 μ l の、カバーガラスを留置した 24 ウェルプレートでは 1 ウェルあたり 100 μ l のコラーゲン溶液をそれぞれ加え、37 度、5% CO ₂ 、湿潤環境で 45 分静置した
3	コラーゲン溶液を完全に取り除き、PBS 300 μ l で 2 回洗浄した後、各実験に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 6×10^5 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- κ B 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）。

表 2. 鼻腔上皮細胞の刺激に用いた試薬および濃度

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

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 6×10^5 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- κ B 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 IFN- γ 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 μl 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 μl で 2 回洗浄した
5	1 ウェルあたり ISOGEN を 500 μl 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 μl 加えて、15 秒間震盪し 2 分間室温で静置した後、4 度 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 μl 加え転倒混和し、5 分間室温で静置した後に 4 度 12,000 g で 10 分間遠心した
9	上清を破棄し、70%エタノールを 500 μl 加え、ボルテックスミキサーで混合、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°C 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× 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°C 15 分間 • 98°C 5 分間
8	4°C 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- α (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' - TCGGTAAGTGAAGTGAATGTCCA-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

1	下記の反応溶液を調整した • cDNA 5 μl • Power SYBR® Green PCR Master Mix 10 μl • 各プライマーセット 0.8 μl* • Nuclease-free water total 4.2 μl
2	反応溶液を穏やかにピペッティングした
3	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
4	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°C 10 分間 • 95°C 15 秒間 • 60°C 1 分間  40 サイクル
5	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 μ M) 25 μ l および reverse プライマー (100 μ M) 25 μ l、TE バッファー (0.1 M Tris、10 mM EDTA-Na、pH 8.0) 450 μ l を混合し、十分に攪拌しプライマーセットを作成した。

6. イムノブロット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 6×10^5 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、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ト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 μ l 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、超音波破碎装置 W-500P により細胞を破碎した。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。

表 7. イムノブロッティング用細胞回収プロトコール

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、1 ウェルあたり PBS 300 μ l 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 μ l で 2 回洗浄した
5	1 ウェルあたりトリプシン EDTA 溶液 250 μ l を加え 37 度 5% CO ₂ 、湿潤環境で 5 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、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 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 μ l 加え懸濁した
2	100 度で 10 分間煮沸した後に超音波破碎装置で破碎し、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× GlycoBuffer2 10 μl • 10% NP-40 10 μl • 滅菌蒸留水 30 μl • 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 35 μ l 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 ウェルプレートに、1 ウェルあたり 1×10^5 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 1×10^5 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 250 μ l 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 250 μ l 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 μ l 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 μ l で 3 回洗浄した
6	PBS で希釈した 1% SDS を 1 ウェルあたり 250 μ l 加え室温で 1 時間静置し細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 μ l 加え室温で 1 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 μ l 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 μ l 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 μ l で 3 回洗浄した
10	二次抗体として Alexa Fluor 488 標識 2 次抗体を TBST で 2 μ g/ml に希釈し、1 ウェルあたり 250 μ l 加え、室温で 1 時間静置した
11	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 μ l で 3 回洗浄した
12	DAPI を滅菌蒸留水で 200 ng/ml に希釈し、1 ウェルあたり 250 μ l 加え室温で 30 分静置した
13	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 μ l で 3 回洗浄した
14	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
15	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 Kolmogorov 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)。

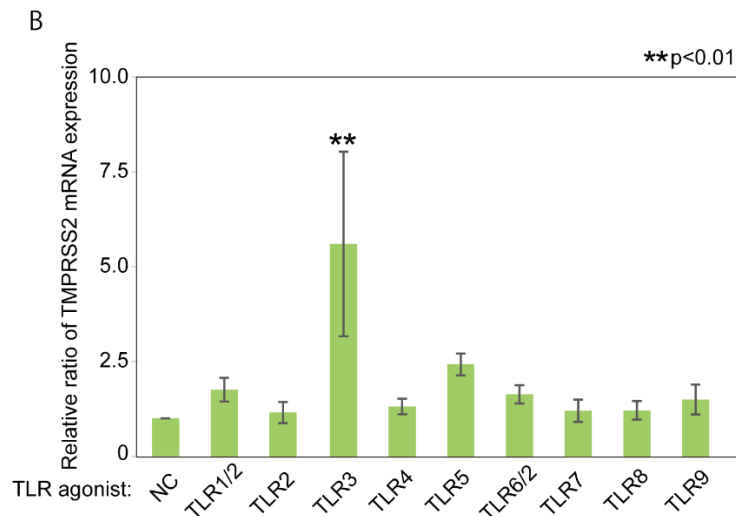
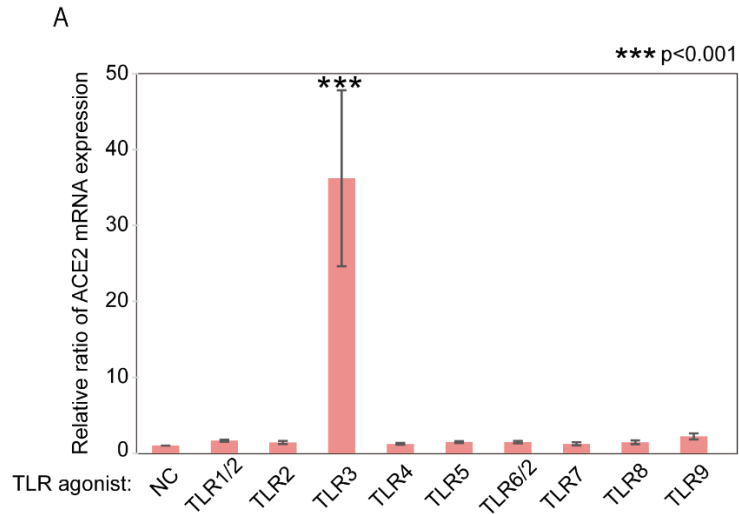


図 2. TLR1-9 の刺激による鼻腔上皮細胞の ACE2 および TMPRSS2 の mRNA 発現変化

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- κ B 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)。しかし、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- 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、II 型 IFN として IFN- γ の mRNA 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、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、 $P < 0.01$ 、ODN2006; 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)。

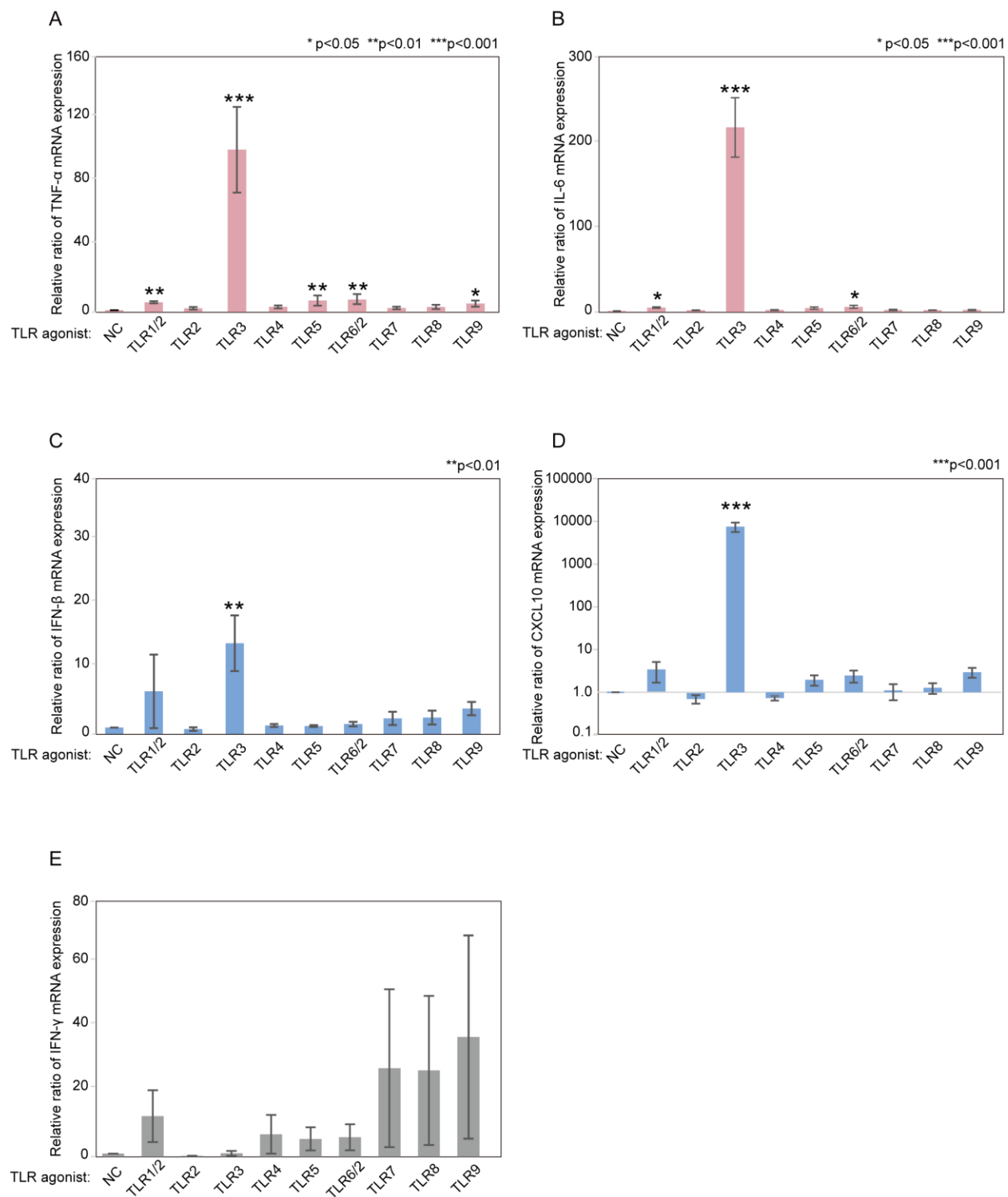


図 3. 鼻腔上皮細胞における TLR シグナルによる NF- κ B および IRF の標的遺伝子の mRNA 発現の変化

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 $\pm$ 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- β 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 $\mu\text{g/ml}$ 全ての Poly(I:C)の投与濃度で有意な増加を認めた (0.1 $\mu\text{g/ml}$ 投与群; 16.204 ± 3.166 倍、 $P < 0.001$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 投与群; 19.264 ± 2.651 倍、 $P < 0.001$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 群; 25.754 ± 3.311 倍、 $P < 0.001$ 、図 4A)。また Poly(I:C)を 10 $\mu\text{g/ml}$ で投与した群は、1 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ 投与群、 $P < 0.05$ 、図 4A)。一方、TMPRSS2 の mRNA の発現量は Poly(I:C)を 10 $\mu\text{g/ml}$ 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)。

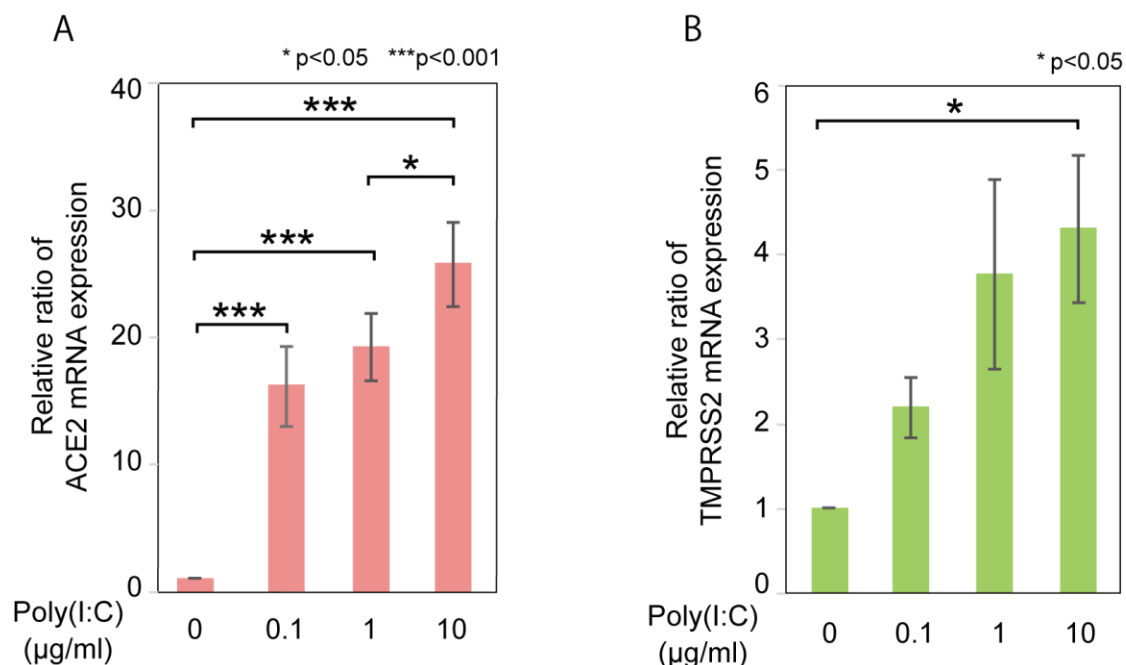


図 4. 鼻腔上皮細胞における Poly(I:C) の投与濃度による ACE2 および TMPRSS2 の mRNA 発現量の変化

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)。

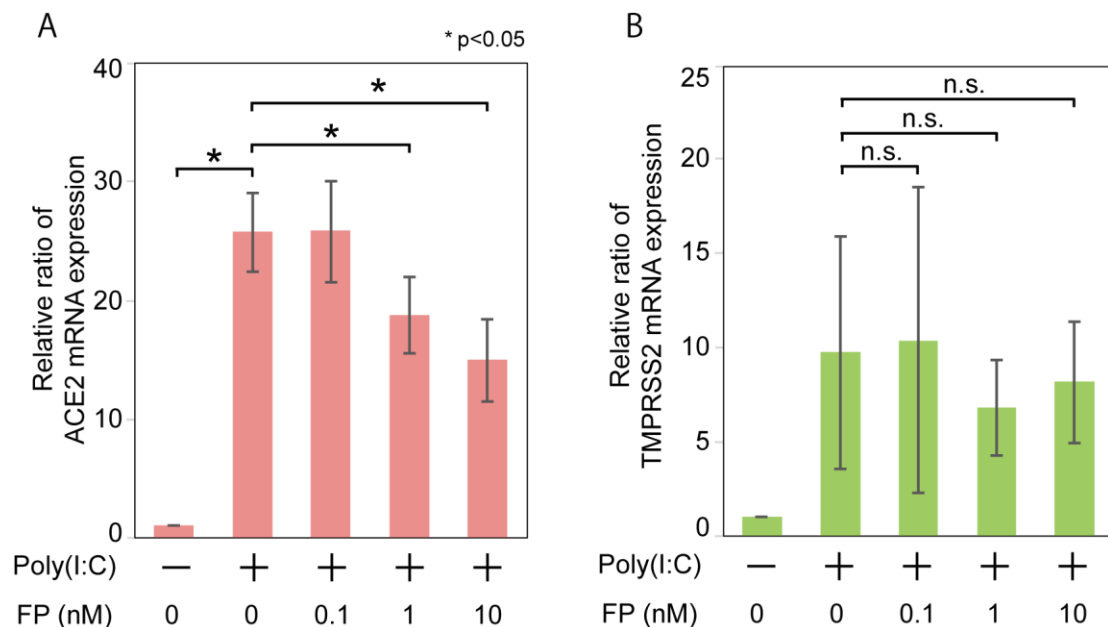


図 5. FP が Poly(I:C) による ACE2 および TMPRSS2 の発現誘導に与える影響
Poly(I:C) を 10 $\mu\text{g/ml}$ で投与し鼻腔上皮細胞を 20 時間にわたり刺激した。また FP を投与する群では Poly(I:C) 投与の 1 時間前に投与した。FP は 0.1、1、10 nM で投与した。それぞれの群での mRNA 発現量を GAPDH の mRNA 発現量に対する相対値を計算し、それぞれの刺激により得られたデータを、Poly(I:C) 非投与かつ FP 非投与群での値をコントロールとして標準化した。データは 4 回の独立した実験より得られた平均値 $\pm$ 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)。

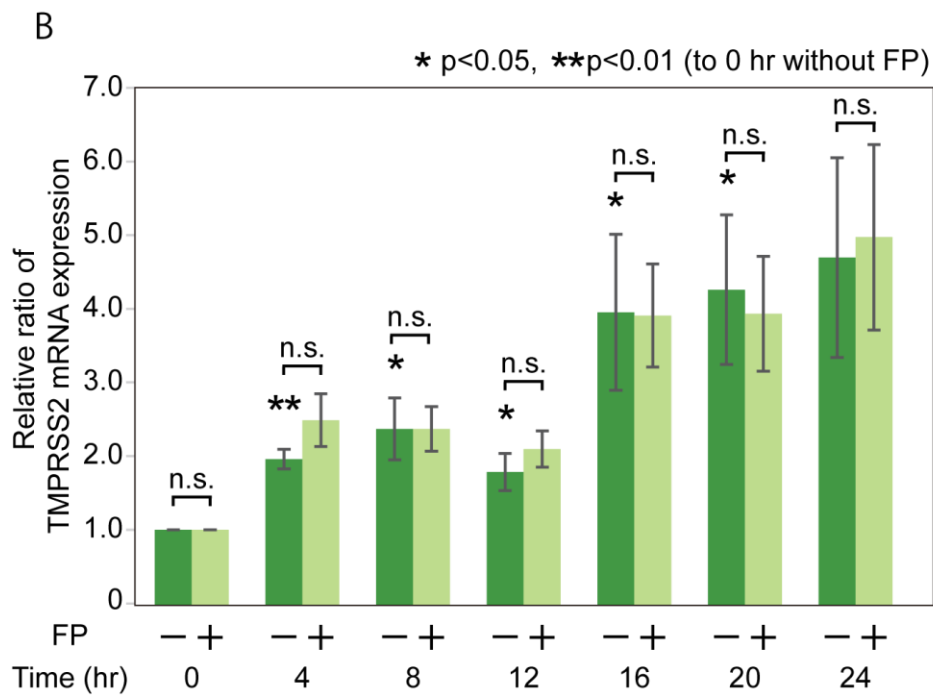
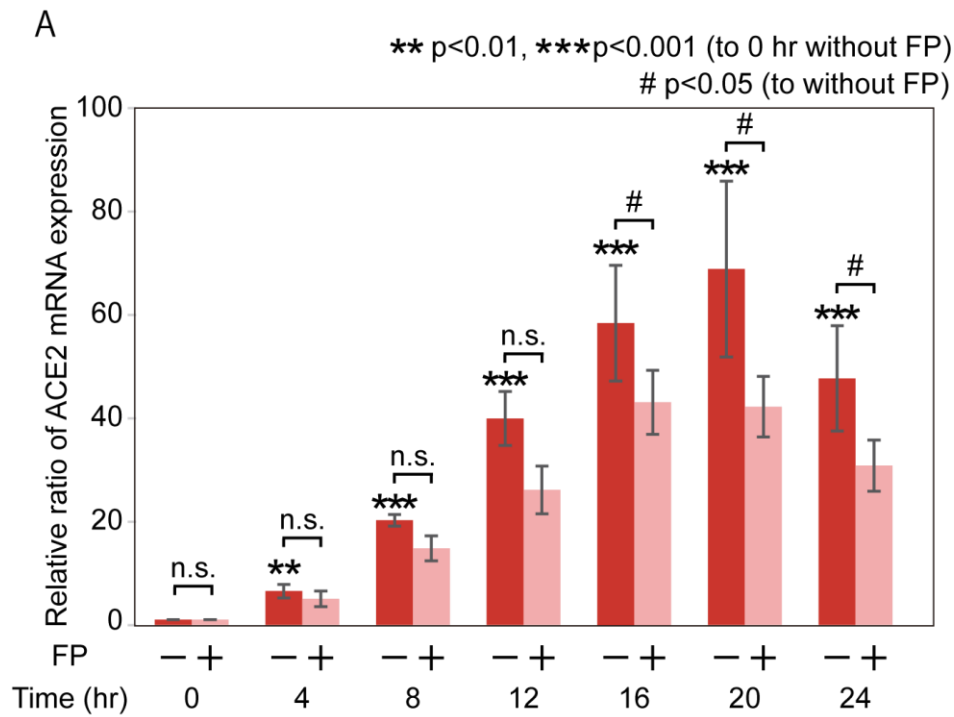


図 6. FP による ACE2 および TMPRSS2 発現誘導抑制の時間的变化

鼻腔上皮細胞を、Poly(I:C)を 10 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\pm$ 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。

Poly(I:C)投与後の各時間での FP 投与群および FP 非投与群を比較における 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- 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 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- 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、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。

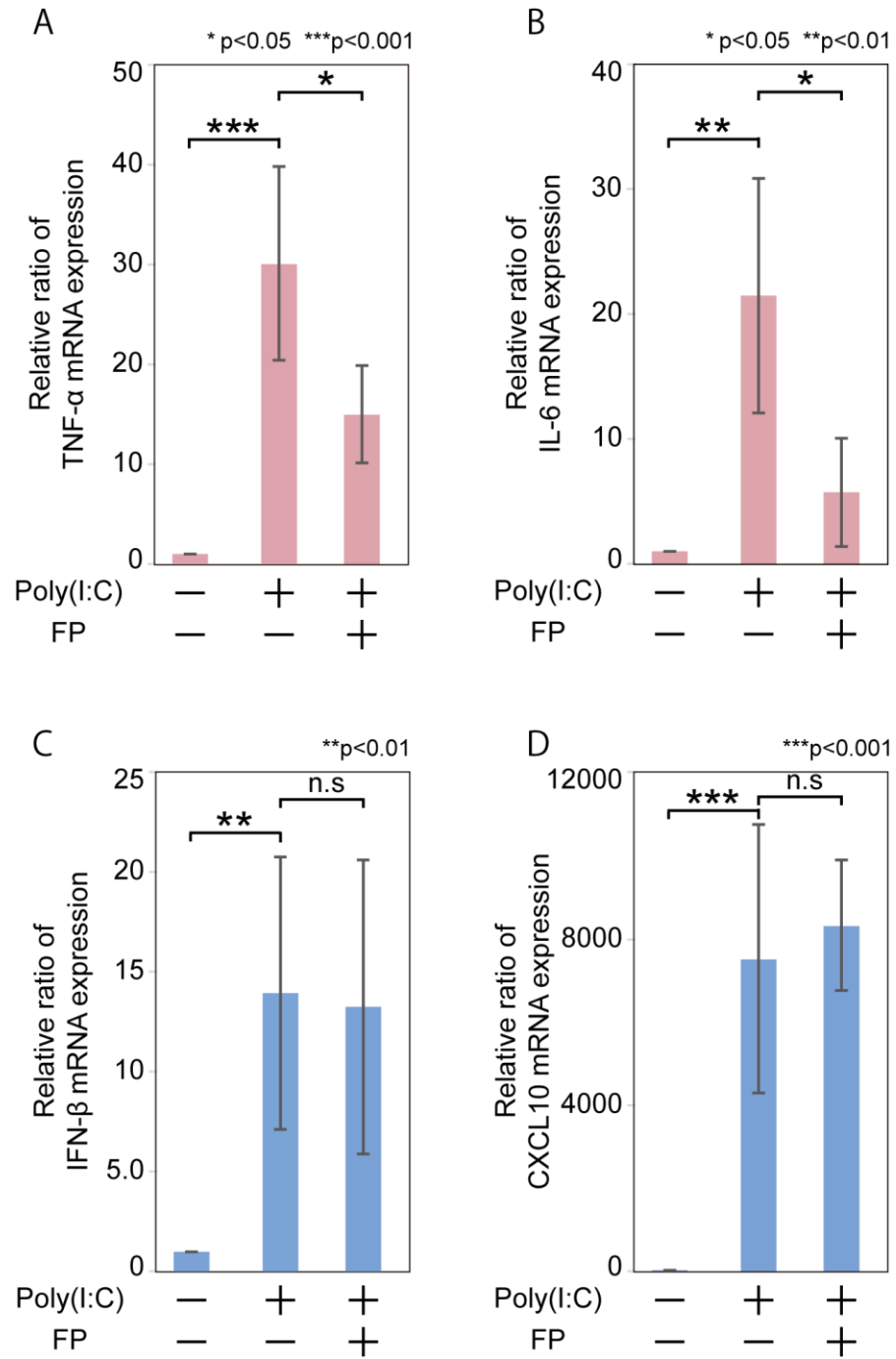


図 7. 鼻腔上皮細胞の Poly(I:C) および FP 投与による NF- κ B および IRF 標的遺伝子の mRNA 発現量の変化

TLR3 刺激として Poly(I:C) を 10 μ g/ml で投与し鼻腔上皮細胞を 8 時間におたり刺激した。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 $\pm$ 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- κ B 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)。

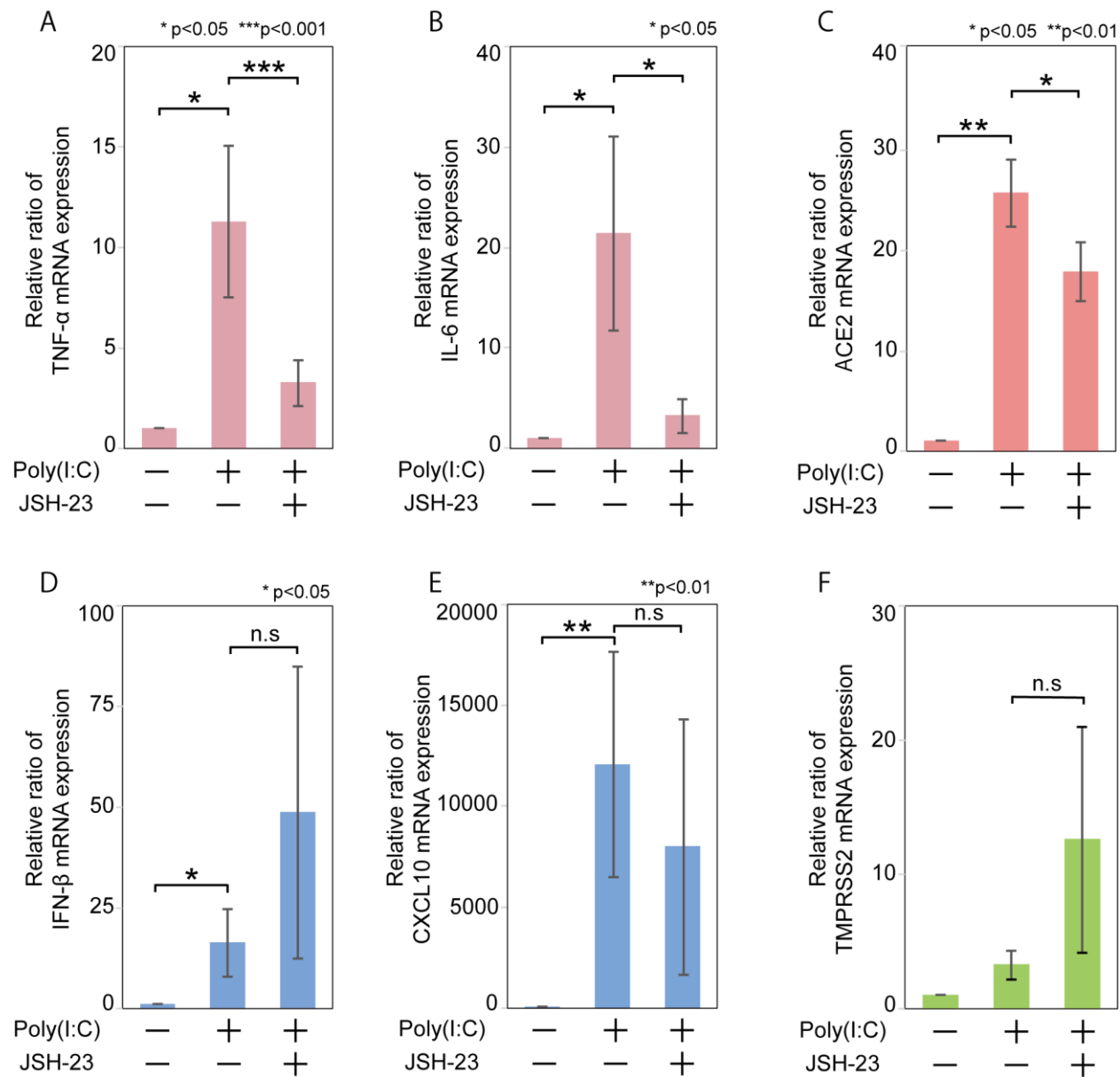


図 8. 鼻腔上皮細胞 TLR3 シグナルによる ACE2、TMPRSS2、NF- κ B および IRF 標的遺伝子の mRNA 発現の NF- κ B 阻害剤による変化

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 時間におたり、TNF- α 、IL-6、IFN- β および CXCL10 の測定では 8 時間にお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 $\pm$ 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

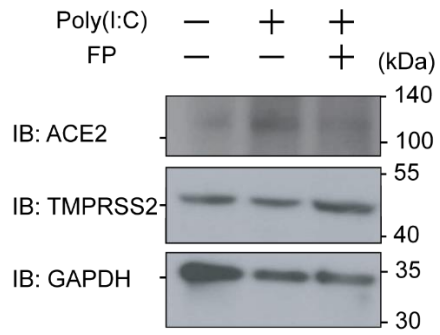
鼻腔上皮細胞の Poly(I:C) 刺激および FP 処理が ACE2 および TMPRSS2 のタンパク質発現量に与える影響を、イムノブロットティング法および免疫蛍光細胞染色法を用いて測定した。

まず、イムノブロット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、イムノブロット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

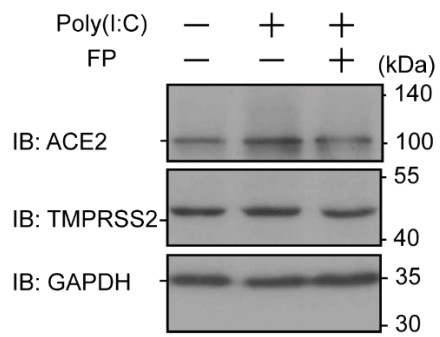
（ 0.770 ± 0.017 倍 vs Poly(I:C) 投与群、 $P < 0.001$ 、図 9C）。一方で、TMPRSS2 のタンパク質発現量は Poly(I:C) による有意な増加を認めず（ 1.083 ± 0.0394 倍 vs Poly(I:C) 非投与群、 $P = 0.213$ 、図 9D）、FP による有意な抑制を認めなかった（ 0.946 ± 0.0340 倍 vs Poly(I:C) 投与群、 $P = 0.208$ 、図 9D）。

引き続き、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）。

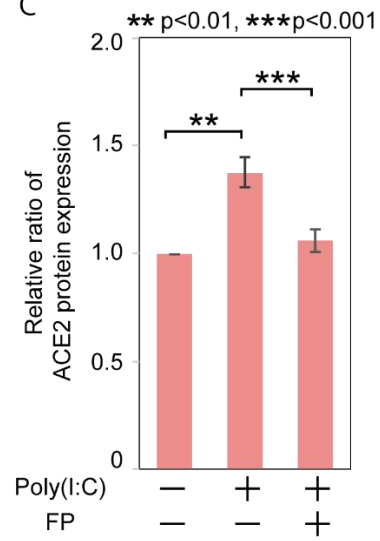
A



B



C



D

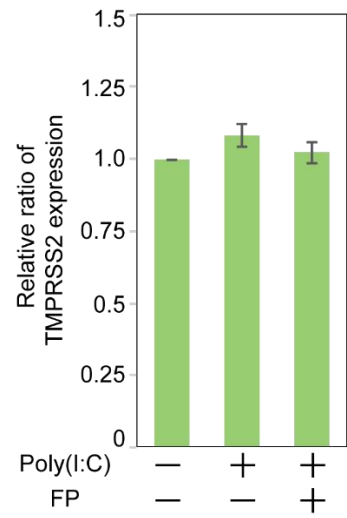


図 9. イムノブロッティング法での鼻腔上皮細胞 TLR3 刺激と FP 処理による ACE2 および TMPRSS2 のタンパク質発現量の変化

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。

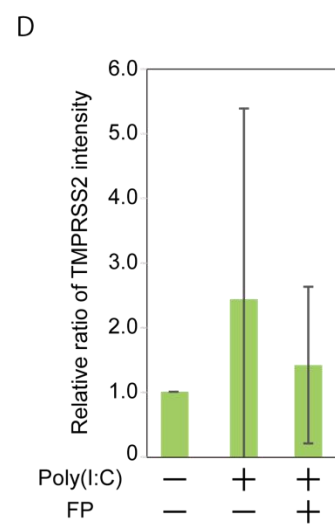
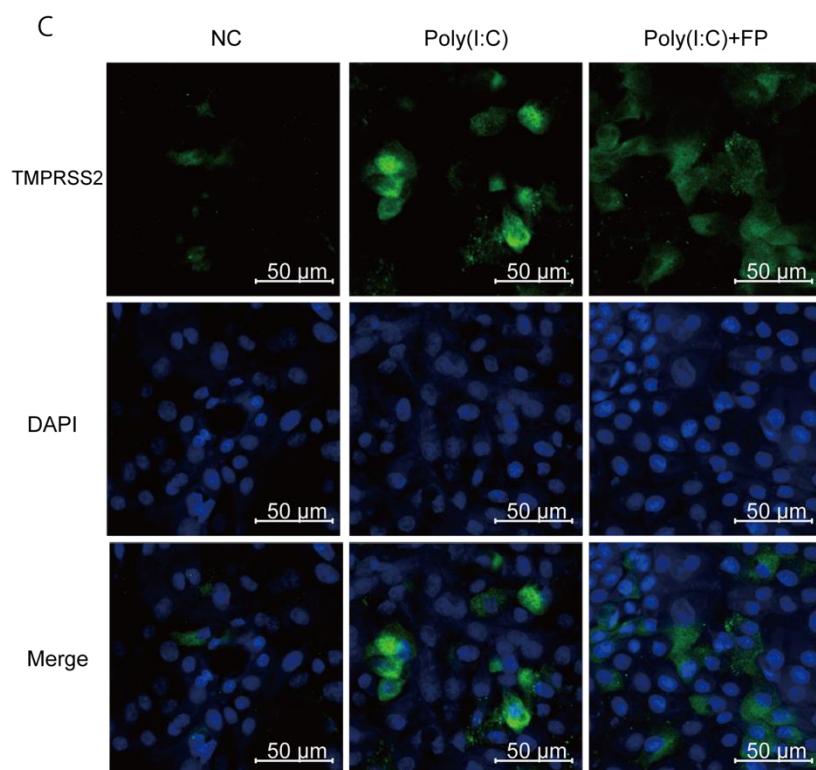
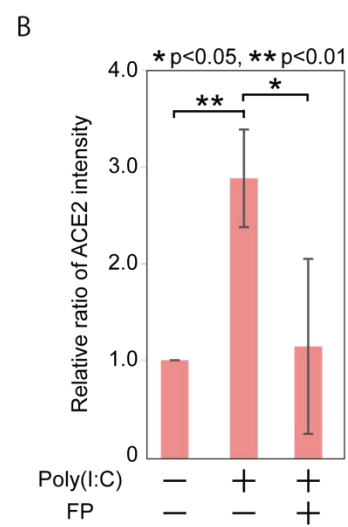
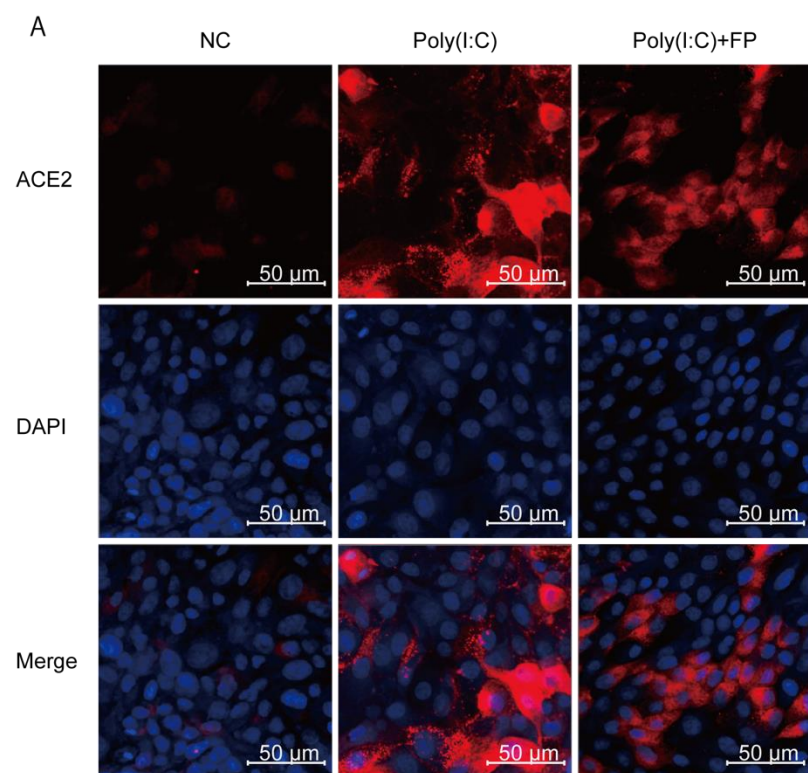


図 10. 免疫蛍光細胞染色法での鼻腔上皮細胞 TLR3 刺激と FP 処理による ACE2 および TMPRSS2 のタンパク質発現量の変化

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)。

一方、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、鼻腔上皮において、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- κ B α (I κ B α) 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- κ B の DNA への結合を阻害すること (Mukaida et al., 1994; Ray and Prefontaine, 1994)、NF- κ B の DNA への結合能を低下させること (De Bosscher et al., 1997) により NF- κ B 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- κ B 標的遺伝子と同様に、FP や NF- κ B 阻害剤で抑制された。このことから、ACE2 は NF- κ B 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- κ B 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- κ B 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、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。

- ① 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どう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：中藺彬、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 anti-viral 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., Dinno, 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 double-stranded 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 Fukushima, 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 TNF-alpha 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., Ramezanzpour, 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.