HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	炎症性疾患の予防、治療に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	村上, 薫
Description	配架番号：2852
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15918号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92195
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	MURAKAMI_Kaoru_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　村　上　薫

学 位 論 文 題 名

炎症性疾患の予防、治療に関する研究

(Research on prevention and treatment of inflammatory diseases)

リウマチなどの炎症性疾患は、感染症などを契機に引き起こされることが知られている。その中で、発表者は大学院在学中にいくつかのテーマで研究を行い、感染症と、感染症をきっかけに起こりうる炎症性疾患についての理解を深めた。

【背景と目的①】発表者の一つ目の研究は唾液を用いたSARS-CoV-2オミクロン株検出検査についてである。COVID-19 のクラスター感染を防ぐためには早期発見が重要であるにもかかわらず、時間のかかる逆転写定量ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）法による検査が依然として標準とされている。もう一つの主流である迅速抗原検査は、迅速かつ安価で、検査室に依存しない診断が可能であるが、これらの検査のほとんどは、VOC の出現以前に開発されている。現在流行の主流となっているオミクロン株は N タンパク質の変異により抗原検査による検出を回避することができる。そこで発表者のグループは迅速なスクリーニングが可能である唾液を用いた化学発光酵素免疫測定法（CLEIA）とイムノクロマト法（ICA）の有用性を、RT-PCR と比較して評価した。

【対象と方法①】SARS-CoV-2 患者 60 人から唾液を採取してオミクロン株ではないものを除いたのち、健常サンプル 60 人分の唾液と共に CLIEIA 法と RT-PCR 法、ICA 法と RT-PCR 法を比較した。

【結果①、考察】結果として、ICA の感度と特異度はそれぞれ 58.8%（95%CI: 44.2- 72.4%）と 100.0%（95%CI: 94.0-100.0% ）であった。これにより ICA 法によって SARS-CoV-2 の検査を行うことはそれほど適切ではないという結果に終わった。それに対し CLEIA の感度と特異度はそれぞれ 98.0%（95%CI：89.6-100.0%）と 100.0%（95%CI：94.0-100.0%）であった。CLEIA による抗原濃度の RT-PCR の Ct 値に対する一致度は 0.98 であり、CLEIA と RT-PCR の間に高い相関性があることが示された。

【結論】短時間かつ非侵襲的に検体を採取できる CLEIA は RT-PCR と比較して有用な検査法であるということが示された。

【背景と目的②】二つ目の研究として、発表者は阪大産研と共同で AI ナノポアを用いた新型コロナウイルス変異型の識別について研究を行った。

具体的な研究内容として、SARS-CoV-2 を含む病原性ウイルス変異体を迅速かつ正確に診断できるデジタルプラットフォームの開発は、パンデミックが過ぎ去り、with コロナの時代である現在、喫緊の課題として挙げられている。発表者の共同研究者である大阪大学の谷口教授は、以前に武漢 SARS-CoV-2 を 5 分以内に高い感度と特異性で検査できる人工知能（AI）-nanopore プラットフォームを報告したが、このプラットフォームがウイルスのどの部分を認識して、識別を行なっているかは不明であった。同様に、このプラットフォームが SARS-CoV-2 の変異型や臨床検体中のウイルスの存在を検出できるかどうかについても、さらなる研究が必要であった。

【対象と方法②】発表者はこれまでに発見された 6 種の SARS-CoV-2 ウイルスについて人

工知能（AI）-ナノポアプラットフォームを用いて測定をした。その後、COVID-19 患者の唾液検体から o 変異体を同定する実験を行った。
【結果②、考察】発表者の研究グループは、前述した人工知能（AI）-nanopore プラットフォームの改良版を用いて SARS-CoV-2 の変異型を識別できることを実証した。さらに、δ 型と o 型の S タンパクを発現する武漢 SARS-CoV-2 ウイルスを開発し、これを同定し、ウイルスの表面構造を識別できることを示した。最後に、このプラットフォームを使用して、COVID-19 患者の唾液検体から omicron 変異体を、それぞれ 100%と 94%の感度と特異度で同定することに成功した。
【結論】上記の結果から、改良型 AI-nanopore プラットフォームは、SARS-CoV-2 変異型の効果的な診断ツールであることが示され、今後はさらに多くの疾病の診断ができるようにデータを取得中である。
【背景と目的③】発表者の三つ目の研究は *Rhodobacter azotoformans* 由来 LPS（RAP99LPS）のウイルスに対する免疫増強作用についてである。わが国では特に *Rhodobacter azotoformans* の菌体成分が健康食品として利用されてきた。いくつかの紅色非硫黄細菌の LPS は、TLR4 を競合することで O157 など大腸菌依存性の食中毒を予防、治療できることがわかっているが、RAP99LPS 単体では免疫増強作用はないとされている。発表者は、この物質の免疫増強作用を検討した。
【対象と方法③】(1)まず、 RAP99LPS のマウス腹腔内投与は TLR4 受容体を介して免疫系を活性化し、脾腫を誘導した。(2)発表者は RAP99LPS が SARS-CoV2 を含む RNA ウイルス感染にどのような効果が見られるかを人工 RNA である poly(I:C)を用いて検討した。
【結果③、考察】(1)RAP99LPS の投与により種々の免疫細胞の数が増加し、血清中の種々の活性化サイトカインとケモカインの濃度を上昇させた。また、脾臓では、血管内皮細胞、線維芽細胞にて STAT3 と NFkB の同時活性化が認められ IL-6 アンプの活性化が示された。これは RAP99LPS そのものが免疫増強作用があることを示している。
(2)RAP99LPS 事前投与マウスでは、poly(I:C)投与後、COVID19 重症化の主因であるサイトカインストームを引き起こす STAT3 を活性化する IL-6、NFkB を活性化する TNFα、IL1β、IL-17A、STAT 活性化サイトカインの産生を減少させた。一方、免疫細胞を感染局所に集積するケモカイン発現は上昇した。
【結論】RAP99-LPS は TLR4 アゴニストであり、in vivo および in vitro において免疫細胞を活性化し、ケモカインおよびサイトカインを分泌する。
【背景と目的④】最後に、発表者は感染症によって起こりうる炎症性疾患の代表である関節リウマチの遠隔炎症についての研究を行った。リウマチは片側に炎症が生じると、もう片側にも炎症が生じる疾患であることが知られている。
【対象と方法④】この研究で発表者が所属するグループはリウマチモデルマウスを用いて、左足底関節にサイトカインを注射で投与し、炎症を起こさせた後に関節包や関連神経などを解析した。
【結果④、考察】上記の実験を行った結果、リウマチモデルマウスの左足関節の炎症シグナルがATPを中核とする感覚ニューロン-介在ニューロン間のクロストークを介して右側の足関節に広がることが示された。この神経経路を外科的に切除したり、薬物を使って阻害したりすると、反対側での炎症発生が抑制されたことから、ATPは神経伝達物質であると同時に炎症促進物質でもあり、局所炎症と反対側の炎症を誘発する神経経路の仲介役として機能しているというメカニズムがわかった。
【結論】この結果は、遠隔炎症ゲートウェイ反射と名付けられ、この神経経路を遮断することで、炎症性疾患、特に関節リウマチのように炎症が離れた位置まで広がる疾患に対する治療効果が期待できることを示している。