



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	SARS-CoV-2感染による血管内皮細胞のITGB3発現誘導と血栓形成への関与 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	伊藤, 航
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15957号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92576
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Wataru_Ito_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（歯学） 氏 名 伊 藤 航

学 位 論 文 題 名

SARS-CoV-2 感染による血管内皮細胞の ITGB3 発現誘導と血栓形成への関与

キーワード（5つ） SARS-CoV-2, S タンパク, 血管内皮細胞, ITGB3, 血栓形成

COVID-19 は2019年に武漢市より広まった SARS-CoV-2 を原因ウイルスとする感染症で、世界的な大流行（パンデミック）を引き起こし、非常に多くの死亡者を出した。COVID-19 の症状の特徴の一つとして、血管炎、血栓の発生率が高いことがあげられる。2020 年の報告によると、COVID-19 における血栓塞栓症の発症率は 21%であり、血栓塞栓症は死亡率を 74%も有意に増加させた。

SARS-CoV-2 は一本鎖 RNA ウイルスで、スパイク (S)、エンベロープ (E)、膜 (M)、ヌクレオカプシド (N) の 4 つの構造タンパク質で構成されている。SARS-CoV-2 の S タンパクは、ACE2 を主要な受容体として宿主細胞への侵入を媒介することが知られている。

血管内皮細胞は、血管の内腔を裏打ちする細胞で、生理的条件下では血栓形成を起こさないが、炎症や血管内皮障害により血栓形成促進性に変化する。COVID-19 における血栓形成機序として血管内皮細胞への SARS-CoV-2 感染による血管内皮の機能障害が示唆されているが、詳細な機序については未だ不明な点が多い。これまで我々は、重症化における血管内皮病態を明らかにするために、加齢マウスと若齢マウスにマウス馴化 SARS-CoV-2 (MA-P10) を感染させ、それぞれ重症化／非重症化マウスモデルを作製し、重症化マウス肺血管内皮細胞において、SARS-CoV-2 の取り込み、炎症性サイトカインや血栓形成関連遺

伝子の発現亢進がみられることを示した。しかし、SARS-CoV-2 感染による血栓形成の詳細なメカニズムは不明である。今回、我々は COVID-19 における血栓形成機序を明らかにするために、重症化マウスモデルを用いて、血管内皮細胞に焦点をあてて解析を行った。

まず重症化マウスモデルの肺において顕著な血栓形成がみられることを示した。同マウスの肺血管内皮細胞を単離し、RNA-seq を実施し、感染加齢マウスの肺血管内皮細胞において血小板凝集関連遺伝子の発現レベルが高いことを示し、感染加齢マウスの肺血管内皮細胞は血栓形成促進に働いていることが示唆された。

血管内皮細胞へのウイルス曝露と血栓形成の関連を評価するため、in vitro で血管内皮細胞に SARS-CoV-2 曝露後、血小板を添加して、接着した血小板数を比較した。コントロール血管内皮細胞と比較して SARS-CoV-2 曝露血管内皮細胞の接着血小板数が増加した。また S タンパクにより処理された血管内皮細胞においても接着血小板数が増加し、SARS-CoV-2 のみならず S タンパクによる刺激も血管内皮細胞における血小板への接着性を誘導することが示唆された。SARS-CoV-2 に曝露された血管内皮細胞が血栓形成を亢進する分子メカニズムを明らかにするため、SARS-CoV-2 感染マウス肺血管内皮細胞の RNA-seq データを用いて、感染加齢マウス肺血管内皮細胞において発現が亢進した血小板凝集関連遺伝子を抽出した。その中で、ほかの群と比較して感染加齢マウスの肺血管内皮細胞でとくに発現量の高いインテグリン $\beta 3$ (ITGB3) に着目した。免疫染色を行うと、感染若齢マウスに比べ、感染加齢マウス肺において ITGB3 陽性血管が多かった。さらに COVID-19 ヒト剖検肺を用いた ITGB3 免疫染色によって、ITGB3 陽性血管が存在することを示した。これらのことからマウスのみならずヒトにおいても SARS-CoV-2 感染肺においては血管内皮細胞において ITGB3 発現が亢進していることが示唆された。次に血管内皮細胞における ITGB3 発現亢進の機序をさぐるために、血管内皮細胞に SARS-CoV-2 曝露ならび S タンパク処理を行ったところいずれの刺激によっても血管内皮細胞の ITGB3 遺伝子発現が亢進した。これらのことから SARS-CoV-2 の S タンパクが血管内皮細胞の ITGB3 発現を亢進す

ることが示唆された．次に血管内皮細胞の ITGB3 発現をノックダウンし，血小板接着性への影響を評価したところ，コントロール血管内皮細胞と比較して ITGB3 ノックダウン血管内皮細胞に対する血小板接着数は減少した．これらのことから SARS-CoV-2 により誘導される血管内皮細胞の ITGB3 は血小板接着に関わることが示唆された．

最後に血管内皮細胞における SARS-CoV-2 刺激による ITGB3 発現亢進の機序について検討した．血管内皮細胞における S タンパク認識が ITGB3 発現を亢進すると考えられた．RNAseq により血管内皮細胞には ACE2 の発現がみられないことを見出していたため，他の受容体について検討することとした．これまで SARS-CoV-2 S タンパク受容体として報告される遺伝子のうち，マウス肺血管内皮細胞において発現のみられた NRP1, NRP2, BSG, KRM1, AXL が血管内皮細胞の S タンパク受容体の候補と考えられた．血管内皮細胞においてこれら 5 遺伝子をそれぞれノックダウンすると，コントロール血管内皮細胞と比較して NRP2 を除く 4 遺伝子をノックダウンした場合に血管内皮細胞内のウイルス RNA 量が減少した．さらに，SARS-CoV-2 曝露 / S タンパク処理による血管内皮細胞の ITGB3 発現誘導が NRP1, BSG, KRM1, AXL をノックダウンした血管内皮細胞で阻害された．これらのことから NRP1, BSG, AXL, KRM1 が血管内皮細胞における SARS-CoV-2 S タンパク受容体として機能し，ITGB3 発現誘導に関与していることが示唆された．

本研究により，我々は血管内皮細胞の NRP1, BSG, AXL, KRM1 が SARS-CoV-2 S タンパクを認識し，ITGB3 発現を亢進し，血小板凝集を促進することで血栓形成を促進することを示した．血管内皮細胞の ITGB3 が COVID-19 重症化の新しい治療標的となることが示唆された．