



Title	SARS-CoV-2感染重症化マウスモデルにおけるCelastrol の効果検討 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	手代木, 孝仁
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15959号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92593
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takahito_Teshirogi_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 手代木 孝仁

主査 教授 樋 田 京 子
審査担当者 副査 教授 長谷部 晃
副査 教授 城 戸 幹 太

学 位 論 文 題 名

SARS-CoV-2 感染重症化マウスモデルにおける Celastrol の効果検討

審査は審査担当者全員出席の下、対面形式の公聴会として行われた。はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われた。その内容を以下に示す。

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は重症性呼吸器症候群コロナウイルス（SARS-CoV-2）によって引き起こされるウイルス性疾患である。感染者数は世界中で7億7000万人以上報告されており、690万人以上が死亡している。COVID-19 重症化予防のために世界規模で集団ワクチン接種の取り組みが行われているが、新たな SARS-CoV-2 変異株出現によって感染者数の総数は増加しており、いまだ医療への負担が懸念される。我が国においても5類感染症に以降した今春以降も5000人を超える死亡者が報告されている。COVID-19 は発熱や咽頭痛、咳嗽などの呼吸器症状を呈し、一部の感染者では肺炎症状の悪化、血管炎、血栓症を発症して重症化する。単純胸部X線検査やCTによって広範なすりガラス様陰影が観察され、剖検肺の病理組織学的な所見においてはびまん性肺胞損傷、炎症性浸潤、血栓形成が報告されている。血栓塞栓症は COVID-19 の全症例の40%に観察されており、回復期の突然死、長期にわたる重篤な治療、多臓器不全の原因として報告されている。

現在、COVID-19 治療薬として抗ウイルス薬と SARS-CoV-2 ウイルスの中和抗体が使用されているが発症初期の患者が適応である。一方、中等症・重症以上の患者に承認されている薬剤は、抗炎症薬であるステロイドのみであり、重症 COVID-19 に有効な薬剤はいまだ存在しておらず、新たな治療薬の開発が望まれている。Hida らはこれまで腫瘍血管内皮細胞が、炎症性に変化しており Damage-associated molecular patterns (DAMPs) の1つ Biglycan が高発現していることを見出して、その阻害剤の探索を行ってきた。その中に文献的に Biglycan に対する抑制効果が報告されていた多年草タイワンクロヅル（中国名：雷公藤）から単離された天然化合物 Celastrol に注目し、Biglycan 発現腫瘍血管内皮細胞に対する抗炎症作用について明らかにしてきた（論文投稿準備中）。このことより申請者は血管内皮細胞の抗炎症効果を持つ Celastrol が重症 COVID-19 の血管炎に対して抑制効果を発揮するのではないかと考えた。最近の報告で Celastrol の上皮細胞に対する SARS-CoV-2 感染抑制効果が報告されていたが、in vivo における治療効果は検討されていなかった。そこで本研究では申請者らが既に樹立した SARS-CoV-2 感染重症化マウスモデルを用いて Celastrol の治療効果を検討した。本マウスモデルは加齢マウスにのみ血栓症を伴う致死性肺炎を発症するマウス馴化型 SARS-CoV-2 を用いて作成する（Aging Cell 2023, 申請者共著論文）。

まず in vitro 肺血管内皮細胞を用いて解析を行った。Celastrol は IL-6, TNF- α など LPS で誘導される炎症性サイトカインの発現亢進を抑制し、ACE2 過剰発現不死化肺毛細血管内皮細胞 iHMEC-L/ACE2 においてはウイルスの細胞内エントリーを抑制した。これは先行研究を支持する結果であった。またウイルス曝露による血管内皮細胞における炎症性サイトカインの発現上昇も抑制した。

次に、重症化マウスモデルを用いて in vivo における効果を解析した。Celastrol を感染初期の

マウスに 10 mg/kg で投与したところ、肺組織のウイルス遺伝子レベル低下が PCR により示され、Celastrol の抗ウイルス効果が明らかになった。しかし、50%のマウスに死亡がみられ 10mg/kg の投与量では毒性が出現することがわかった。次に 2mg/kg に減量して感染前から Celastrol を投与したところ、逆に肺組織内ウイルス量が増加し炎症の増悪がみられた。肺組織の免疫染色を用いた定量解析により、組織の好中球やマクロファージ数が減少していたことから、Celastrol の感染前からの投与はその抗炎症作用ゆえウイルス排除に重要な自然免疫を抑制してしまい、ウイルス感染を増悪させる可能性が考えられた。重症 COVID-19 に適応のあるステロイドの感染初期使用は症状を増悪させることが報告されているが、Celastrol にも適切な投与時期があることが示唆された。また、毒性出現を回避する適切な用量の設定の必要性も示された。次に感染後期に投与し重症化予防効果を検討した。対照群は感染後全マウスが死亡したのに対して、Celastrol 投与群では 40 % のマウスが生存し、生存個体の肺組織内の炎症所見はみられず、ウイルスタンパクは検出されなかった。これらのことにより重症化病態に対して Celastrol が抗炎症効果、抗ウイルス効果を示す可能性が示された。

本研究では Celastrol が SARS-CoV-2 の血管内皮細胞内侵入と血管炎症を抑制することを *in vitro* で示した。さらに重症化マウスモデルを用いて、Celastrol による COVID-19 に対する治療効果、重症化抑制薬としての可能性を初めて示し、Celastrol が重症 COVID-19 治療に応用可能であることが示唆された。

審査は審査担当者が提出論文の内容及び関連した学問分野について、口頭により試問する形式で行われた。以下にその項目を示す。

- 1) Celastrol による biglycan を阻害の機序について
- 2) これまでの COVID-19 治療薬と比較して Celastrol を新たに使用するメリットについて
- 3) Celastrol を用いた抗ウイルス効果の示した実験条件について
- 4) Celastrol の細胞毒性について
- 5) 抗炎症効果と自然免疫の抑制についての考察
- 6) Celastrol に投与によるマウスの死亡の原因について
- 7) 吸入による COVID-19 治療薬の肺への送達について
- 8) 武漢株以外の変異株の用いた検討について
- 9) Celastrol を治療薬と使用する際のコンパニオン診断の手法について
- 10) *In vitro*, *in vivo* 実験の Celastrol の濃度について

本研究は、Celastrol による SARS-CoV-2 感染における血管炎の抑制と重症化抑制効果を示した。本化合物の COVID-19 重症化抑制薬候補としての可能性を示し、大きな意義を持つものと評価された。また、上記の質疑応答から申請者は本研究内容を中心とした専門分野はもとより、関連分野について十分な理解と知識を有していることが確認された。

以上のことから、審査担当者全員は学位申請者が博士(歯学)の学位を授与されるに値するものと認めた。