

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 ( 医学 )	氏名	石徳理訓
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ①・2 項該当		
論文題目 Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 $\beta$ Upregulate NRP2 Expression and Promote SARS-CoV-2 Proliferation (腫瘍壊死因子とインターロイキン 1 $\beta$ は NRP2 発現を亢進させ SARS-CoV-2 増殖を促す)			
論文審査担当者			
主査	教授	保田 朋波流	印
審査委員	教授	坂口 剛正	
審査委員	准教授	河野 洋平	
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>COVID-19 は Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) の感染によって引き起こされる感染症であり、発熱や呼吸器症状を呈する。一部の COVID-19 患者では重症化し致死的となるが、近年ワクチンや中和抗体製剤が開発され致死率は低下した。しかし、近年 SARS-CoV-2 の変異種が出現し、その有効性は減弱しつつある。SARS-CoV-2 は宿主細胞上の angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) とスパイク蛋白を結合させることで細胞へ感染する。宿主細胞上に発現している Neuropilin-1 (NRP1) は SARS-CoV-2 と ACE2 との結合を補助することで SARS-CoV-2 の感染を促進する。NRP1 と同一のファミリーに属する NRP2 が存在し、NRP1 と同様 SARS-CoV-2 のスパイク蛋白と結合することが報告されているが、COVID-19 における NRP2 の役割はこれまで殆ど報告が存在しない。また、重症の COVID-19 患者では、しばしば炎症性サイトカインの発現亢進が認められるが、SARS-CoV-2 の増殖に対する影響は明らかになっていない。以前、申請者らの研究グループは滑膜組織に ACE2 が発現しており、IL-6 により発現が亢進することを報告した。この研究から滑膜組織や滑膜線維芽細胞は SARS-CoV-2 感染時の炎症環境下における宿主受容体制御の分析に適した検体となりうる事が明らかとなった。そこで、本研究では、NRP2 の発現と SARS-CoV-2 の増殖における炎症性サイトカインの役割を明らかにすることを目的とした。</p> <p>まず、初代培養滑膜線維芽細胞を IL-1<math>\beta</math> で刺激し、SARS-CoV-2 宿主受容体遺伝子の変化を RNA シークエンスで解析した。その結果、NRP2 を含む宿主受容体遺伝子の発現が IL-1<math>\beta</math> 刺激により上昇していた。また炎症性滑膜である関節リウマチ患者の滑膜と、非炎症性滑膜である変形性関節症患者の滑膜を対象に、免疫組織化学を行った。その結果、炎症性滑膜において NRP2 の発現亢進を認めた。そこで、初代培養滑膜線維芽細胞と不死化滑膜線維芽細胞株 (MH7A) に対して様々な炎症性サイトカイン刺激を行い NRP1、NRP2 の発現を調べた。その結果 TNF<math>\alpha</math>、IL-1<math>\beta</math> 刺激により NRP1、NRP2 の発現は亢進し、TNF<math>\alpha</math> 単独刺激に比べて TNF<math>\alpha</math> と IL-1<math>\beta</math> の共刺激により影響が大きいこと、また、NRP1 と比較し NRP2 で発現量が著明に増大することが明らかとなった。炎症性サイトカインによる NRP1、NRP2 の発現亢進は、受容体遺伝子上流の転写因子の関与を示唆していた。NRP1、NRP2 のプロモーター領域を用いたルシフェラーゼアッセイによってそれら活性がそれぞれ SP1 と NF-<math>\kappa</math>B によって増強されることが示された。炎症環境が SARS-CoV-2 の増殖へ与える影響を調べるため MH7A 細胞に対して TNF<math>\alpha</math> と IL-1<math>\beta</math> による共刺激を行い、SARS-CoV-2 を感染させた。その結果、共刺激により培養上清中の SARS-CoV-2 のコピー</p>			

数は増加し、NRP2 の発現増加と正の相関を示した。また共刺激により MH7A 細胞内のウイルス由来のヌクレオカプシドタンパク量は増加していた。次に、スパイク蛋白と宿主細胞への結合能力を、組み換えスパイク蛋白を用いて評価した。TNF $\alpha$  と IL-1 $\beta$  の刺激により、初代培養滑膜線維芽細胞と MH7A 細胞に対するスパイク蛋白の結合能力は増強された。これら結果より、炎症環境は SARS-CoV-2 の増殖、スパイク蛋白の結合能力の両方を増強しうることが明らかとなった。さらに SARS-CoV-2 の増殖に対する NRP2 の役割を評価するため、NRP2 の発現量とウイルス増殖の関係性を調べた。MH7A 細胞へ NRP2 発現プラスミドを導入し SARS-CoV-2 を感染させた。その結果、培養上清中の SARS-CoV-2 のコピー数は増加した。同様に、ショートヘアピン RNA の導入により NRP2 をノックダウンした MH7A 細胞を作成し、TNF $\alpha$  と IL-1 $\beta$  で共刺激を行い、SARS-CoV-2 を感染させた。その結果、TNF $\alpha$  と IL-1 $\beta$  の存在下では培養上清中のウイルス量は増加し、NRP2 ノックダウンによってウイルス量は減少した。これら結果から炎症環境下において NRP2 は SARS-CoV-2 の増殖に寄与していると考えられた。

以上の研究結果から、SARS-CoV-2 の増殖は炎症環境下において促進され、その過程で NRP2 が重要な役割を担っていることが明らかとなった。ウイルス由来抗原とは異なりヒト由来の抗原が短期間に変異を生じる可能性はほぼないため、NRP2 はウイルス変異株に影響されない COVID-19 治療の新規標的となる可能性がある。

以上の結果から、本論文は炎症環境下において NRP2 が SARS-CoV-2 の増殖を促進する可能性があることを示した重要な研究であると考えられる。

よって審査委員会委員全員は、本論文が石徳理訓に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。