

論文内容要旨

ACE2 expression and spike S1 protein-mediated
immune responses in oral mucosal cells

(口腔粘膜細胞における ACE2 の発現と Spike 蛋白
に関連する免疫応答)

Oral diseases, 2023, in press.

主指導教員：相川 友直教授

(医系科学研究科 口腔外科学)

副指導教員：太田 耕司教授

(医系科学研究科 公衆口腔保健学)

副指導教員：小松澤 均教授

(医系科学研究科 細菌学)

赤木 美沙季

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

【緒言】重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2(SARS-CoV-2)を原因ウイルスとする新型コロナウイルス感染症(COVID-19)は 2019 年より世界中で流行した。その受容体であるアンギオテンシン変換酵素 2(ACE2)は、レニン-アンギオテンシン系の制御蛋白であり血圧調整に関与する。標的細胞の発現する ACE2 が SARS-CoV-2 のエンベロープを構成するスパイク蛋白と結合することによってウイルスが細胞内に侵入することが報告されている。また、COVID-19 患者の喀痰や肺組織の ACE2 の発現は健常者より増加し、症状の重症化との関連性が示唆されている。SARS-CoV-2 の重要感染経路は飛沫感染であるため、口腔粘膜はウイルス感染に関与する重要部位であると考えている。しかしながら、口腔粘膜細胞における ACE2 の発現やその誘導に影響を与える因子については報告がない。

一方、TNF- α 、IFN- γ 、IFN- β などの炎症性サイトカインが過剰に分泌される、いわゆるサイトカインストームが進行することで、COVID-19 の重症度に関連する血液マーカーである白血球遊走因子 CXCL10 が上昇することが報告されている。これまでわれわれは炎症性サイトカインが口腔粘膜細胞における CXCL10 の発現を著明に増加させることを報告している。これらの報告から、口腔粘膜細胞における ACE2 がスパイク蛋白とともに、炎症性サイトカインで誘導される免疫応答を調節する可能性を考えた。

そこで本研究では、最初に、口腔粘膜細胞における ACE2 の発現と、核酸導入および炎症性サイトカイン添加による ACE2 の発現誘導を検討した。次いで、炎症性サイトカイン誘導性 CXCL10 の発現誘導に対する ACE2 の影響を検討した。

【方法】本研究では、不死化口腔粘膜上皮細胞(RT7)、不死化歯肉線維芽細胞(GT1)、正常口腔粘膜上皮細胞、正常歯肉線維芽細胞を用いた。ACE2 の発現を RT-PCR 法、蛍光免疫細胞染色によって検討した。両細胞における各種核酸(Single-stranded(ss)RNA(poly U), ssDNA(CPG ODN), double-stranded(ds)RNA(poly (I:C)), dsDNA (poly(dA:dT))の単独添加あるいはトランスフェクション試薬を用いた細胞内導入や、炎症性サイトカインによる ACE2 の発現誘導を Real-time PCR 法、Western blotting 法を用いて検討した。dsRNA, dsDNA 誘導性 ACE2 の発現誘導に対する細胞内受容体 RIG-I の影響は、特異的 siRNA のノックダウンで検討し、次いで RIG-I の下流に関連するシグナル伝達阻害剤の影響を検討した。核酸導入で誘導される ACE2 の発現に対する炎症性サイトカインの影響を Real-time PCR 法で検討した。炎症性サイトカイン誘導性 CXCL10 の発現に対するスパイク蛋白の影響と、それら免疫応答に対する ACE2 の特異的 siRNA のノックダウンによる影響を Real-time PCR 法、ELISA 法によって検討した。

【結果】RT7, GT1, 正常口腔粘膜上皮細胞、正常歯肉線維芽細胞において定常的な ACE2 mRNA の発現が認められた。また、蛍光免疫染色法によって RT7, GT1 において細胞膜、細胞質に ACE2 蛋白発現が示された。両細胞において各種核酸の単独添加や ssRNA, ssDNA の細胞内導入は ACE2 の発現に影響は示さなかった。しかしながら dsRNA, dsDNA の細胞内導入によって ACE2 の発現が誘導された。さらに dsRNA の細胞内導入によって分子量 120kDa の ACE2 蛋白が発現誘導されることを Western blotting 法によって確認した。両細胞における

dsRNA, dsDNA 誘導性の ACE2 の発現は, RIG-I のノックダウンや, NF- κ B 阻害剤, JAK/STAT 阻害剤によって減少した. TNF- α , IFN- γ , IFN- β の単独添加では, RT7 において IFN- β のみ ACE2 発現の増加を認めた. また, RT7 では IFN- γ が dsRNA 誘導性 ACE2 の発現を, TNF- α が dsDNA 誘導性 ACE2 の発現を, IFN- β が二本鎖核酸誘導性 ACE2 の発現をさらに増加させることが示された. 一方, GT1 において二本鎖核酸誘導性 ACE2 に対する TNF- α , IFN- γ , IFN- β の影響は認めなかった. スパイク蛋白は両細胞において CXCL10 発現誘導に影響を示さなかったが, 炎症性サイトカイン存在下では濃度依存的に CXCL10 発現を増加させた. この免疫応答は細胞特異的であった. これら両細胞のスパイク蛋白を介した免疫応答は ACE2 のノックダウンによって抑制された.

【考察】RNA ウイルスである SARS-CoV-2 は細胞に侵入後, 細胞内で dsRNA を複製する. 口腔粘膜細胞は ACE2 を定常的に発現しているが, SARS-CoV-2 感染時に細胞内に侵入した dsRNA を RIG-I が認識し, STAT1, NF- κ B シグナル伝達経路を介して ACE2 がさらに発現誘導される可能性が示唆された. 一方, スパイク蛋白はサイトカインストームに関連する炎症性サイトカイン誘導性 CXCL10 の発現を細胞特異的に増加させ, その応答には ACE2 が関係していることが示唆された. 口腔粘膜細胞における ACE2 は, 炎症性サイトカインと協調して, SARS-CoV-2 の侵入によって起こる感染や炎症の増悪に関与する可能性が示唆された.