

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (歯学)	氏名	赤木 美沙季
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目			
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)			
論文審査担当者			
主査	教授	水野 智仁	印
審査委員	教授	宮内 睦美	
審査委員	准教授	飛梅 圭	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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。アンギオテンシン変換酵素 2(ACE2)は血圧調整に関与する一方, SARS-CoV-2 の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受容体として働くことが報告されている。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が, 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 CXCL10 が上昇することが報告されている。これまで申請者の研究チーム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。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, 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。また, 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。</p> <p>RT-PCR 法にて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において定常的な ACE2 mRNA の発現を認めた。また, 蛍光免疫染色法によって RT7, GT1 において細胞膜, 細胞質に定常的な ACE2 蛋白発現が示された。COVID-19 に関与していると報告がある 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。RT7 および GT1 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が, 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 Western blotting 法によって 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確認した。ACE2 発現に関連する経路を検討するため, 細胞質 RNA センサーである RIG-I を siRNA によってノックダウンしたところ, 二本鎖核酸誘導性の ACE2 の発現が減少した。また, 関連経路の阻害薬である NF-κB 阻害剤, JAK/STAT 阻害剤によっても二本鎖核酸誘導性の ACE2 の発現が減少した。炎症性サイトカインと細胞内導入された二本鎖核酸の組み合わせによる ACE2 発現への影響について検討した結果, 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。Spike 蛋白単独では両細胞において CXCL10 発現に対する影響は認めなかった。つぎに, TNF-α, IFN-γ, IFN-β で誘導される</p>			

CXCL10 の発現に対する Spike 蛋白の影響を検討した結果、RT7 において Spike 蛋白が IFN- γ 、IFN- β 誘導性 CXCL10 の発現を、GT1 において TNF- α 、IFN- β 誘導性 CXCL10 の発現を濃度依存的に増加させることが示された。SARS-CoV-2 の Spike 蛋白は ACE2 に結合し、宿主の免疫応答を調節することが報告されている。そこで、siRNA による ACE2 ノックダウンの CXCL10 発現への影響について ELISA 法で検討した結果、両細胞において Spike 蛋白と炎症性サイトカインで誘導された CXCL10 発現が抑制された。

口腔粘膜細胞は、定常的に発現する ACE2 を介してウイルスが細胞内に侵入した際に、複製された二本鎖核酸を RIG-I が認識し NF- κ B、STAT1 経路の活性化によって、ACE2 を発現誘導す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。

以上の結果から、本論文は口腔粘膜上皮細胞および歯肉線維芽細胞における ACE2 の発現やその発現誘導に影響を与える因子、Spike 蛋白に関連する ACE2 を介した免疫応答について新規の知見を述べたものと認められた。

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