

## 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.

広島大学大学院 医系科学研究科医歯薬学専攻 口腔外科学 赤木美沙季

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) 感染によって引き起こされる新型コロナウイルス感染症 2019 (COVID-19) は 2019 年から世界中で猛威を振るってきた。細胞表面に存在するアンギオテンシン変換酵素 2 (ACE2) は, SARS-CoV-2 のエンベロープ構成成分である Spike 蛋白の結合受容体として同定されている。また, COVID-19 患者は健常人より喀痰や肺組織の ACE2 の発現が増加し, 症状の重症化との関連性が示唆されている。そのため ACE2 の発現誘導メカニズムや ACE2 の新規機能を検討することはウイルスの感染制御や治療戦略の開発に大変意義深いと考えている。SARS-CoV-2 は飛沫感染が重要感染経路であるため口腔粘膜は感染に関与する重要部位であると考えられるが, 口腔粘膜細胞において ACE2 の発現誘導メカニズムや ACE2 を介した免疫応答については国内外に報告はない。本研究では, 口腔粘膜細胞に疑似感染を引き起こし, これらについて検討した。以前に確立された不死化ヒト口腔粘膜上皮細胞 (RT7) と不死化ヒト歯肉線維芽細胞 (GT1) を用いて実験を行った。

まず, ACE2 が口腔粘膜細胞に発現しているかを検討した。RT-PCR 法にて ACE2 mRNA 発現を, 蛍光免疫染色法にて ACE2 蛋白発現を検討した結果, 両細胞において定常的な発現を認めた。つぎに, ウイルス感染モデルとして用いられる様々な種類の合成核酸をトランスフェクション試薬である Lyovect と混合し核酸の細胞内導入を行った。両細胞において, 一本鎖 RNA, DNA の細胞内導入では ACE2 の発現誘導を認めなかったが, 二本鎖 RNA, DNA の導入では ACE2 mRNA の発現誘導を認めた。RNA ウイルスである SARS-CoV-2 は細胞に侵入後, 細胞内で二本鎖 RNA を大量に複製することが報告されている。これより, 口腔粘膜細胞において SARS-CoV-2 感染時に二本鎖 RNA を認識する経路が活性化し ACE2 発現が増加する可能性が示唆された。ACE2 mRNA の発現誘導は正常口腔粘膜上皮細胞および正常歯肉線維芽細胞でも同様の結果を得た。また, Western blotting 法にて二本鎖 RNA 導入による ACE2 蛋白の発現誘導を確認した。

RIG-I は, ウイルスの二本鎖 RNA を認識しウイルス感染に対する I 型 IFN 産生において機能する細胞質受容体として知られている。申請者の研究チームは, 口腔粘膜細胞が RIG-I を発現していること, これら細胞の RIG-I は二本鎖 RNA と二本鎖 DNA を認識し, NF- $\kappa$ B と STAT1 の活性化を促進して抗ウイルス因子遺伝子発現を増加させることをこれまで報告してきた。そこで, siRNA による RIG-I ノックダウンの ACE2 発現への影響について検討した結果, 両細胞において二本鎖核酸導入で誘導される ACE2 発現が抑制されることが示された。また, NF- $\kappa$ B 阻害薬である Bay11-7082 および STAT1 阻害薬である AG490 によって二本鎖

RNA 誘導性 ACE2 mRNA 発現が抑制された。したがって、SARS-CoV-2 のウイルス RNA は複製中に RIG-I によって感知され、NF- $\kappa$ B と STAT1 の活性化を介して抗ウイルス応答を促進する可能性が示唆された。

一方、COVID-19 患者は TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$  のような炎症性サイトカインが過剰に分泌され、サイトカインストームが進行することで様々な組織が傷害されることが報告されている。そこで、これらサイトカインの添加による ACE2 の影響を検討した結果、単独投与では RT7 において IFN- $\beta$  のみ ACE2 発現の増加を認めた。また、RT7 では IFN- $\gamma$  が二本鎖 RNA 誘導性 ACE2 の発現を、TNF- $\alpha$  が二本鎖 DNA 誘導性 ACE2 の発現を、IFN- $\beta$  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- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$  の影響は認めなかった。

これらのサイトカインは、SARS-CoV-2 感染重症度の血液マーカーである白血球遊走因子 CXCL10 の誘導に関与していること、CXCL10 は Spike 蛋白によって免疫細胞から誘導され、サイトカインストームを進行させることが報告されている。そこで、口腔粘膜細胞における炎症性サイトカインで誘導される CXCL10 に対する Spike 蛋白の影響を検討した。まず、CXCL10 の発現誘導に対する Spike 蛋白単独の影響を検討した結果、両細胞とも CXCL10 の発現誘導は認められなかった。つぎに、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$  で誘導される 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- $\gamma$ 、IFN- $\beta$  誘導性 CXCL10 の発現を、GT1 において TNF- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  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 発現が抑制されることが示された。したがって、Spike 蛋白は炎症性サイトカイン存在下における CXCL10 の発現を細胞特異的に増加させ、その応答には ACE2 が関係している可能性が示唆された。

以上より、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- $\kappa$ 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。

本研究は口腔粘膜細胞において ACE2 が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係している可能性を報告した。