

細胞外小胞を用いた COVID-19 制御戦略の構築

慶應義塾大学薬学部 薬物治療学講座 准教授

松崎 潤太郎

[背景・目的]

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19)の多くの患者は軽症にて改善するが、一部の患者では呼吸器状態の悪化および急性呼吸窮迫症候群(ARDS)を発症し ICUにおける集中治療が必要となり、最重症例では死亡率は50%以上となる。医療リソースの効率的な活用、それによる疾病予後の改善のために、感染早期段階での重症化予測手段の方策が盛んに研究されている。申請者らは SARS-CoV-2 感染患者の血液検体の分析から、血中の細胞外小胞(extracellular vesicles: EV)に含まれる coatmer protein complex, subunit beta 2 (COPB2)蛋白質量によって高い精度 (AUROC 0.85 [95%信頼区間, 0.73-0.97]、感度 100%、特異度 80%)で重症化の予測が可能であることを見出した (J Extracell Vesicles 10:e12092, 2021)。血中 COPB2 は、健常者では低値であるが予後良好な COVID-19 患者では著明に高値となり、予後不良な COVID-19 患者では健常者と同程度であった。このことから、COPB2 陽性の EV 分泌と、肺障害の軽減に何らかの関連性があるものと示唆された。

COPB2 は、2003 年の SARS (重症急性呼吸器症候群)の原因であった SARS-CoV-1 ウイルスの細胞内増殖を補助する分子としても過去に報告があり (J Virol 89:8318, 2015)、COVID-19 を含めてコロナウイルス性肺炎の病態形成に重要な役針を担っている可能性が極めて高い。COPB2 はゴルジ-小胞体間の蛋白質輸送を行う COPI を構成する分子であり、COPB2 をノックダウンすると小胞体ストレスへの抵抗性が減弱することが報告されている (J Mol Biol 433:167294, 2021)。COVID-19 感染時にも細胞は小胞体ストレスを受けることから、気道上皮細胞は小胞体ストレス曝露時に COPB2 含有 EV を授受することで互いにストレス抵抗性を高めている可能性が示唆された。

以上の背景に基づき、本研究は、COPB2 陽性の EV の有する生物学的意義の解明を行うことを目的とした。

[助成期間の成果]

まず公開されている肺のシングルセル RNA-seq 解析データの再解析により、肺において COPB2 は上皮細胞系に発現していることを確認した。COPB2 の細胞内動態を詳細に追跡するため、ヒト COPB2 に対する特異性の高いモノクローナル抗体を作成した (特許出願中)。この抗ヒト COPB2 抗体を用いて不死化ヒト気道上皮細胞株 (BEAS-2B) とヒト肺がん細胞株 (NCI-H1975) における COPB2 の細胞内局在を免疫染色で評価したところ、BEAS-2B ではゴルジ体に一致する分布を示すのに対し、NCI-H1975 では細胞質内にドット状に広く分布しており、その一部が後期エンドソームの指標である Rab7a と共局在していることがわかった。EV は後期エンドソームから多胞性エンドソームを経て産生されることから、NCI-H1975 由来

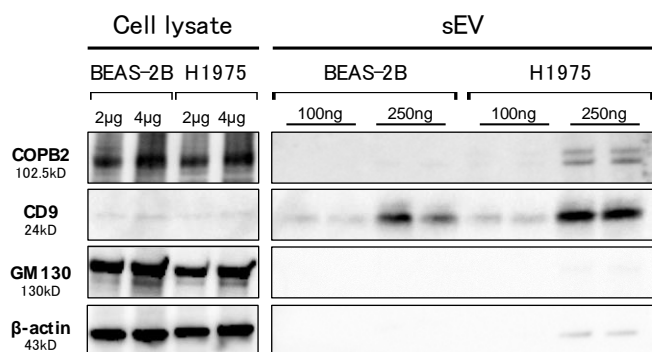


図 1. EV 中の COPB2 発現の定量

の EV には常に COPB2 が含まれているものと予想された。よこで各細胞の大量の培養上清より超遠心法にて EV を濃縮し、Western blot による蛋白質定量を行ったところ、BEAS-2B 由来の EV には COPB2 が存在しない一方、NCI-H1975 由来の EV には COPB2 が検出された (図 1)。

そこで細胞内の COPB2 をリアルタイムで追跡でき、かつ EV 中の COPB2 を少量の培地で簡便に定量するため、COPB2 に蛍光ラベルを付加した人工蛋白質を過剰発現する BEAS-2B および NCI-H1975 を、レンチウイルスベクターを用いて樹立した。さらに EV の脂質膜を構成するホスファチジルセリンと TIM4 が結合することを利用して、Tim4 固相化磁気ビーズによる EV のフローサイトメトリー解析技術を導入した。これによって、EV を破壊せずに COPB2 含有 EV の粒子割合を算出できるようになった。この手法は COPB2 含有 EV を増加させる薬剤スクリーニング等に適用でき、また小胞体ストレスを誘導する薬剤や、そのシグナルに関連する分子の阻害薬等を用いることによって、COPB2 含有 EV の分泌がどのようなメカニズムによって変動するのかを容易に探索することが可能となる。

[考察]

本研究は COVID-19 患者のバイオマーカー研究に端を発し、そこで同定された EV 中の COPB2 という蛋白質の分泌機構と生理学的機能解明を行うことによって、新たな感染症対策の手法を提案しようというものである。現時点では、その導入となる方法論を構築した段階であるが、研究をさらに加速させる土台を構築しえた。また BEAS-2B と NCI-H1975 の 2 種の細胞株で対照的な結果が得られていることから、細胞内 COPB2 が小胞体ストレス抵抗性を

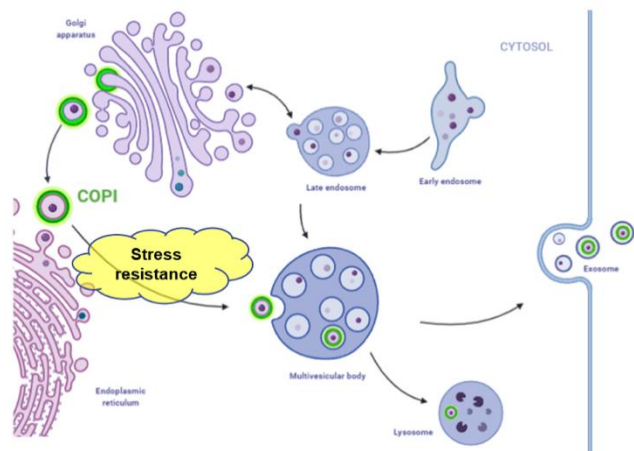


図 2. 小胞体ストレスに伴う COPB2 輸送の変容

を与える分子であり、EV を介してそれを周辺細胞に受け渡すことによってサイトプロテクティブな機能があるという仮説に矛盾しないデータが得られつつある (図 2)。

共同研究者の藤田らは、ヒト気道上皮細胞由来 EV の経気道投与が、肺線維化の改善に有効であることをすでに見出しており (J Extracell Vesicles 10:e12124, 2021)、EV 投与によって一定の治療効果が得られることは十分に期待できるが、COPB2 陽性 EV にその増強効果があれば、これが COPB2 陽性患者において COVID-19 が軽症となる要因であると考えられる。

[今後の見通し]

BEAS-2B と NCI-H1975 へ tunicamycin などの化合物により小胞体ストレス刺激を加えた際の COPB2 の細胞内挙動および EV への輸送の変動を追跡する。COPB2 の EV への輸送システムの活性化に伴って、COPB2 とカップリングしている蛋白質の変化を免疫沈降法で同定し、COPB2 輸送系の分子機構を追究する。また『化血研若手研究奨励助成』研究報告会をきっかけとして、京都府立医科大学の渡邊洋平講師との共同研究を計画中であり、COPB2 の発現量と細胞への SARS-CoV-2 感染効率 (virus titer) や、感染時の細胞生存率の関連を直接的に証明する実験系を検討している。さらに、慶應義塾大学医学部呼吸器外科の朝倉啓介教授との共同研究として、EV 中の COPB2 が呼吸器感染症のみならず、肺がんなど他の呼吸器疾患のバイオマーカーとして活用可能かどうかを探索する。