

SARS-CoV-2 感染における性差の化学遺伝学的な解析

大川 詩乃 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 川口 敦史 (筑波大学 医学医療系)

【背景と目的】

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は風邪症状が主であるが、一部は重症化して急性肺炎を引き起こす。その重症化要因として、高齢、呼吸器疾患、心血管疾患、糖尿病などが挙げられるが、人種や地域を問わず、顕著な性差があることも特徴的であり、男性は女性と比べて重症化率と死亡率が高い。現在、複数の抗ウイルス薬が開発されているが、ゲームチェンジャーとなるものはまだ存在せず、新たな治療薬の開発とその病態発現機構の解明は重要な課題である。これまでに、既承認薬ライブラリーから抗 SARS-CoV-2 活性を有する化合物をスクリーニングし、女性ホルモンであるエストラジオールの誘導体 (エストラムスチンリン酸エステルナトリウム、EMP) 及びエストロゲン受容体を制御する選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) が同定されており、女性ホルモンによって誘導される下流分子が SARS-CoV-2 の増殖に関与することが推測された。本研究では、EMP および SERM による SARS-CoV-2 複製阻害機構を理解することで、COVID-19 の重症例においてみられる性差を決定するメカニズムを明らかにすることを目的とする。

【材料と方法】

(1) ウイルス株

2020 年に日本国内で単離された従来株 SARS-CoV-2/JPN/TY/WK-521 株 (以下、SARS-CoV-2) を用いた。

(2) 既承認薬ライブラリーの抗 SARS-CoV-2 薬スクリーニング

約 1300 種の既承認薬から SARS-CoV-2 感染を抑制する化合物を細胞傷害性を指標に探索を行った。Vero-TM2 細胞に 10 μM の各化合物を添加し、SARS-CoV-2 を MOI=0.0001 で感染した。感染 48 時間後に WST-8 法により細胞生存率を評価した。

(3) EMP 及び SERM による SARS-CoV-2 の複製抑制活性

アフリカミドリザル腎由来 Vero-TM2 細胞と、ヒト II 型肺胞上皮細胞として、男性由来の A549 細胞と女性由来の H1975 細胞を用いた。各種エストラジオール誘導体を添加し、感染 24 時間後の培養上清中のウイルスゲノム量を RT-qPCR 法により定量した。

(4) ウイルスタンパク質の発現量解析

Vero 細胞と H1975 細胞に EMP と SERM を添加し、感染 6 時間後の Spike タンパク質と Nsp8 タンパク質の発現量をウェスタンブロット法により定量した。

【結果と考察】

抗ウイルス活性を示す化合物として同定された EMP 及び SERM をメスのアフリカミドリザル腎由来 Vero-TM2 細胞に添加することで、相乗的にウイルス産生量が抑制された (図 1)。次いで、細胞レベルでの性差を比較するため、ヒト II 型肺胞上皮細胞の H1975 細胞 (女性由来) と A549 細胞 (男性由来) で EMP

及び SERM の抗 SARS-CoV-2 活性を評価したところ、H1975 細胞では顕著にウイルス増殖が抑制されたところ、A549 細胞では抗ウイルス活性が低下し、細胞レベルでも性差が観察された。EMP 処理により、初期ウイルス遺伝子である Nsp8 タンパク質は発現するのに対し、後期ウイルス遺伝子であるスパイクタンパク質の発現は強く阻害されることから、EMP は SARS-CoV-2 の後期過程を抑制することが明らかになった (図 2)。また、女性ホルモンであるエストラジオールと比較して、EMP 及び SERM はエストロゲン受容体の転写活性を強く、長時間促進することが明らかになった。現在、EMP 及び SERM 処理によって誘導され、SARS-CoV-2 複製に関与する宿主遺伝子を同定するため、RNAseq 解析を行っている。

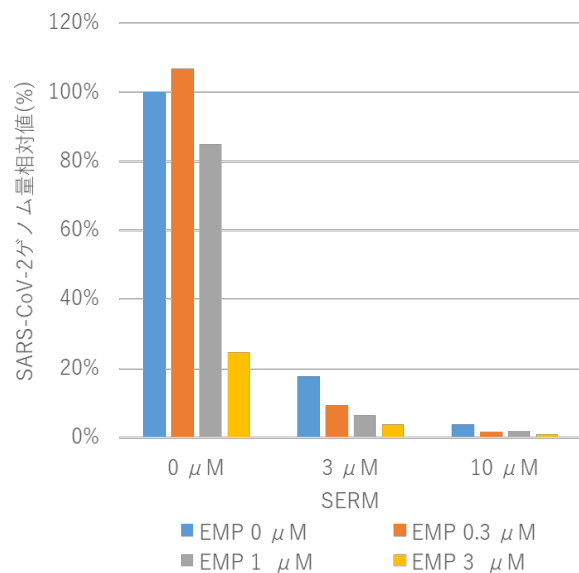


図 1 EMP 及び SERM による SARS-CoV-2 の複製抑制活性
ヒト肺由来 H1975 細胞に 0、0.3、1、3 μM の EMP 及び BZA を添加し、感染 24 時間後の培養上清中のウイルスゲノム量を RT-qPCR 法により定量した。

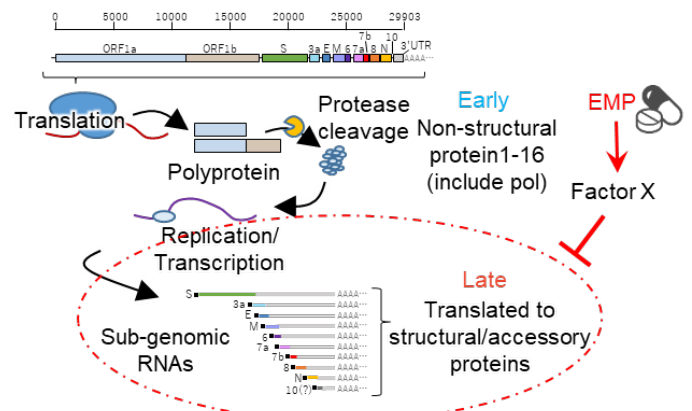


図 2 EMP は SARS-CoV-2 増殖においてウイルスポリメラーゼの産生以降を阻害する