

令和2年度“オール近大”新型コロナウイルス感染症 対策支援プロジェクト研究報告書

企画題目	新型コロナ肺炎の初期症状に着目した新規感染機序の解析と感染予防法の開発
研究者所属・氏名	研究代表者：医学部病理学教室 伊藤彰彦 共同研究者：医学部病理学教室 萩山満・米重あづさ・木村竜一郎 共同研究者：神戸大学大学院医学研究科 高岡裕 共同研究者：名古屋大学医学部附属病院 菅野亜紀

1. 研究、開発・改良、提案目的・内容

COVID-19の初期症状 嗅覚異常に着目し、鼻腔内の嗅粘膜における感染成立の機序を解析するとともに、その機序に立脚した感染予防法の開発を目指す。SARS-CoV-2のヒト細胞膜上の受容体 ACE2（アンジオテンシン変換酵素2）とともに、嗅上皮に高発現している膜貫通分子 X（蛋白質）に注目する。SARS-CoV-2 スパイク蛋白 S1 と ACE2、並びに分子 X との結合について細胞培養系で解析し、その結合を阻害する物質・抗体の同定に取り組む。

2. 研究、開発・改良、提案経過及び成果

NIH3T3 線維芽細胞及び MDCK 腎上皮細胞を用いて遺伝子導入を行い、ACE2、或いは分子 X が細胞膜上に安定的に高発現する亜株を得た。NIH3T3 細胞培養系において培養液中に SARS-CoV-2 スパイク蛋白 S1 を添加した後、免疫染色にて S1 の局在を調べたところ、S1 は細胞表面に検出された（図1）。

S1 の局在を生細胞観察下に可視化するために、S1 を fluorescein 標識した。上記と同様に MDCK 細胞培養系に添加し、fluorescein 蛍光を検出したところ、S1 を細胞膜上に検出することが出来た。

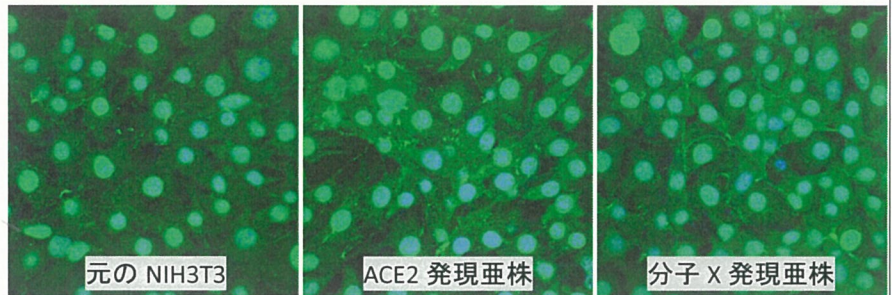


図1 S1の免疫染色(丸いのはDAPIによる核染)

蛍光の強度は ACE2 発現細胞の方が分子 X 発現細胞よりも強い傾向にあったが、鼻粘膜での発現量を比較したデータはないので、鼻粘膜での感染成立への寄与の大小について ACE2 と分子 X の比較は困難であった。ACE2 に劣らず分子 X が寄与する可能性は十分あると思われた。

上記培養系は S1 の ACE2 への結合、並びに S1 の分子 X への結合を半定量的に評価し得ると判断されたので、この結合を阻害する薬剤の候補として物質 A・B、及び抗分子 X 抗体を選出し、その作用を検定した。物質 A・B は抗ウイルス作用が知られる天然物であり、抗体は分子 X の細胞外領域に結合する単クローン抗体である。

ACE2、或いは分子 X を高発現する細胞亜株の培養系にこれら物質或いは抗体を fluorescein 標識 S1 とともに添加したところ、細胞膜上に存在する S1 の量が減少しているとのデータが得られた（図2）。ウエスタンブロットにて細胞に発現する ACE2 及び分子 X の量は不変であることを確認した（図3）。従って、物質 A・B は S1 の ACE2 への結合を阻害し、抗体は S1 の分子 X への結合を阻害していると考えられた。

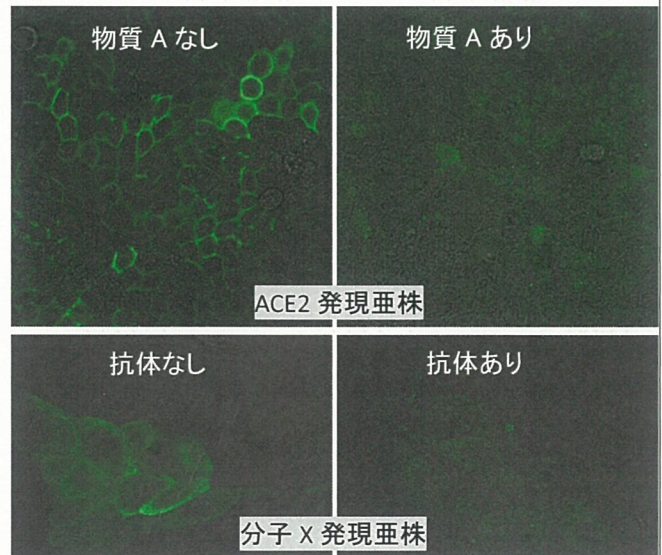


図2 MDCK 亜株の培養系に S1(蛍光標識)とともに物質 A 又は抗体を添加(右)した。左は溶媒、対照抗体の添加。

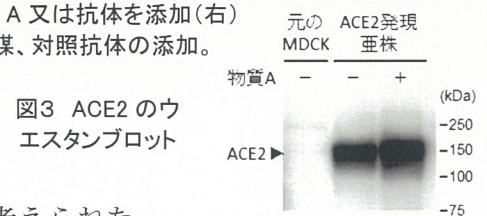


図3 ACE2のウエスタンブロット

3. 本研究と関連した今後の研究、開発・改良、提案計画

物質 A・B、及び抗分子 X 抗体の S1 結合阻害活性について、上述の細胞培養系での解析実験を諸条件下にて繰り返すことで、阻害活性の作用時間や投与至適濃度を確定する。

次いで、マウスへの点鼻投与実験を行い、個体レベルでの S1 結合阻害効果を検定する。具体的には、S1 の鼻腔内分布や残留量が物質 A・B、及び抗分子 X 抗体点鼻によってどのように変化するか調べる。

阻害効果が十分確認されれば、特許出願を行う。

4. 研究成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
朝日新聞	新聞(夕刊)	2020年9月8日
読売新聞	新聞(関西経済面)	2020年12月23日

5. 開発・改良、提案課題の成果発表等

現時点では論文発表には至っておりません。

論文公表の前に特許出願を考えており、企業との共同出願を計画中です。