

8 ヒトコロナウイルスの細胞侵入を決める因子の網羅的な解析

SARS-CoV-2 がどの臓器に侵入できるかを検討するために、コーネル大学の Feshotte ら¹⁾は、scRNA-seq 法を用いた網羅的な解析をおこなった。

COVID-19 患者における SARS-CoV-2 ウイルスは気管支肺胞洗浄液(BAL)、喀痰、鼻ぬぐい液から検出されるが、頻度が低くなるが気管支擦過細胞診、咽頭ぬぐい液、糞便からも検出され、さらに頻度は低くなるものの、血液や尿からも検出される。病理学的な検討では、死因として肺の損傷が最も考えられているが、SARS-CoV-2 ウイルスは、この他に心臓、腎臓にも障害を及ぼす。重症 COVID-19 患者ではしばしば肝臓障害が起こり、胃腸への感染も確認されている。最近では、男性患者の生殖機能にも障害をきたすことが報告されている。興味深いことに、SARS-CoV-2 は脳や脳脊髄液中でも確認されており、神経障害の原因にもなり得る。このように SARS-CoV-2 感染患者の幅広い臨床的な病態がなぜ起こるのかはわかっていない。このような病態が、ウイルスの直接感染によるものなのか、全身的な炎症反応、あるいは併存疾患による間接的なものなのかははっきりしないのである。これを解明するためには、ウイルスの指向性、すなわちどの組織、あるいは細胞種に SARS-CoV-2 感染が起こりやすいのかということを理解する必要がある。SARS-CoV-2 は新規のウイルスなので、細胞侵入の制御に関する知識は、SARS-CoV, MERS-CoV さらにはヒトコロナウイルス(hCoV)からのものである。これらのウイルスの一般的な細胞への侵入方法は、2段階になっていて、まず S タンパクが膜の受容体に直接結合し、第2段階として細胞のタンパク分解酵素により開裂をおこして膜との癒合をする。したがって、ウイルスの細胞指向性は、受容体だけでなく、その近傍にある都合の良いタンパク分解酵素の存在が必要である。SARS-CoV と SARS-CoV-2 ではこれらは、ACE2 と膜貫通型セリンタンパク分解酵素 2 (TMPRSS2)である。そのため、これら2つのタンパクの存在を検証する免疫組織科学的な検討などがなされてきた。最近では、単一細胞の遺伝子発現解析 (single-cell RNA-sequencing) の技術により、あらゆる組織の細胞レベルでの解析がなされてきた。しかしそれらの限界は、単一の臓器 (ないしは臓器システム) しか扱っていないこと (多くは肺)、それに ACE2 と TMPRSS2 だけに焦点をあて、他の因子を無視していることである。実際、幾つかの細胞 (例えば肺がん A549

細胞) では ACE2 なしでも感染がおこる。また、肺、気管支、鼻咽頭、食道、肝臓、胃など臨床的に感染が起きる臓器での実際の ACE2 の発現は健常人では認められない。また、II 型肺胞上皮細胞は、肺における最初の感染や障害の起こる細胞とされるが、ACE2 発現では結果がまちまちである。これらのことから、SARS-CoV-2 が感染を起こす際に、ACE2 発現の個人差があるのか、病状によって発現量が異なるのか、さらには ACE2 とは異なる侵入形式を持っているのかという可能性がある。たとえば、Basigin (BSG, CD147)は S タンパクとの相互作用があり、Vero, 293T 細胞では SARS-CoV および SARS-CoV-2 細胞の侵入を促進する。実際、SARS-CoV や hCoV はさまざまな細胞表面タンパクを侵入の際に利用し、それらは、ANPEP, CD209, CLEC4G, CLEC4M などがあり、さらに hCoV は膜表面のタンパク分解酵素である TMPRSS2 にかわって、他の TMPRSS2 ファミリーである TMPRSS4, さらに Cathepsins (CTSL/M), Furin などを利用する。また、これまでの研究では、宿主側の因子の発現を考慮していなかったが、それらは、LY6E, IFITM であり、hCoV や SARS-CoV-2 の侵入を拮抗阻害することが知られている。したがって、現状でのわれわれの SARS-CoV-2 の指向性に関する情報は非常に限定的であると言わざるをえない。

そこで、これらのギャップを修正するために、まず SCARFs (SARS-CoV-2 and Coronavirus-Associated-Receptors and Factors) とよばれる 28 のヒト遺伝子群を収集し、広範囲の正常組織における基礎的 RNA 発現量を網羅的に検索した。とくに、一般公開されているヒト着床前の受精卵、Maternal-Fetus interface (MFI)、男性と女性の性腺、14 の他の組織、鼻腔擦過細胞診 (健康な若年と高齢者) における scRNA-seq データを consistent normalization procedure を用いて SCARF 発現を検討した。また、ヒト、チンパンジー、マカクの臓器 (肺、腎臓、肝臓、心臓) を用いて、SCARF 発現が種の間で保存されているかどうかも検討した。

結 果

1) SCARF の収集

多くの因子の中で、まず SARS-CoV-2 が細胞に侵入するところに関与する分子に注目したが、それらは ACE2 と TMPRSS2 である。また、BSG も SARS-CoV や SARS-CoV-2 での関与が実験的に証明されている。さらに、SARS-CoV-2/hCoV-229E では、ANPEP, CD209, CLEC4G/M, MERS-CoV で

は DPP4 も候補である。次に、タンパク分解酵素としては、TMPRSS2 に加えて TMPRSS4, TMPRSS11A/B, Furin, Cathepsins (CTSL/B) などがある。また、いくつかの抑制因子(RFs)として SARS-CoV-2 では LY6E、SARS-CoV では IFITM1-3 がある。さらに、侵入後の複製早期の因子として、TOP3B, MADP1 (ZCRB1) を考慮した。最後に、RNA ウイルスの構築と輸送に関与し、SARS-CoV-2 の構造タンパクと関連するものとして、Rho-GTPase complex (RHOA, RAB10, RAB14, RAB1A)、AP2 complex (AP2A2, AP2M1)、CHMP2A を考慮した。このようにして、総計 28 の SCARFs が SARS-CoV-2 のヒト細胞への侵入と複製に影響を与える物質の候補となった。

2) 着床前受精卵の発育における SCARFs の発現

ACE2 は発生の初期段階 (ZGA, 8-cell stage) において最も豊富に発現していたことから、母親からの RNA の蓄積が考えられた。ACE2 は ZGA 以後 trophoctoderm 形成期にいたるまで発現が見られなかった。それに対し、TMPRSS ファミリーは ZGA 以前に有意な転写量を示した。多能性幹細胞(PSC) は IFITM1-3 の高発現が見られたが、ACE2 はみられなかった。さらに、他の PSC から派生した~60,000 種の細胞での scRNA-seq データでは、分化して 20 日目までは ACE2 の発現が見られなかった。これらのことから、PSC や分化の初期細胞では、SARS-CoV-2 の侵入による感染は起こりにくいと考えられた。

3) 胎盤胎児の境界における SCARFs の発現

trophoctoderm における TMPRSS2, ACE2 や他のコロナウイルスの受容体、たとえば ANPEP の高発現は、IFITMs の低発現とともに発達中の胎盤では SARS-CoV-2 の感染に脆弱である可能性が考えられた。これを確認するために、妊娠 1/3 期の MFI 由来の組織での~70,000 種類の細胞の転写を検討した。これには、胎児由来細胞と、母親由来の血液および脱落膜が含まれる。これらのクラスターの細胞は、主たる栄養膜細胞、脱落細胞、免疫細胞などで、ACE2 と DPP4 の発現は、cytotrophoblast (CTB) と syncytiotrophoblast (STB) で見られた。 ANPEP は胎児由来の細胞全てで豊富に発現が見られ、BSG は母由来ないしは胎児由来の細胞で見られたが、胎児で多かった。CLEC4M は脱落膜の血管周囲細胞で発現が強かった。興味深いことに、絨毛外栄養膜細胞(EVT)では ACE2, TMPRSS2 の発現は少なかったが、RFs である IFITM1-3, LY6E の発現

は中等度から高度であり、これは脱落膜細胞や免疫細胞でも見られた。TMPRSS2 を発現している細胞はその受容体を発現している細胞より少なかった。このように、母体胎盤境界部における SCARFs の発現は複雑であった。異なった胎盤細胞における SARS-CoV-2 の侵入をさらに細かく評価するために、受容体とタンパク分解酵素ないしは RFs との組み合わせの発現を調べた。CTB はもっともこの組み合わせが高発現であり、それらは、ACE2+TMPRSS2+(0.05%), ACE2+FURIN+(~3%), BSG+TMPRSS2+(0.8%), BSG+FURIN+(10%), DPP4+TMPRSS2+(0.6%), DPP4+FURIN+(~10%)であった。血管周囲細胞もやはり BSG+TMPRSS2+, DPP4+TMPRSS2+であったが、CTB にくらべると低頻度であった(0.5%)。興味深いことに、DPP4+細胞の一部(~20-80%)は、IFITM1-3 と LY6E を常に発現していたが、ACE2+と BSG+細胞が RFs を同時発現することは稀であった。ACE2+細胞は、TMPRSS2 や FURIN を同時に発現することが多かったが、これは CTB 細胞の一部に限られた。これらの結果より、妊娠 1/3 期では CTB が最も感染しやすいと考えられた。

4) 生殖器における SCARFs の発現

精巣ではこれまでの報告のようなクラスターを要約できる。すなわち、spermatogonia (SPG), spermatogonial stem cell (SSCs), spermatids (ST), マクロファージ, 血管内皮細胞, 免疫細胞などである。SCARFs 解析では、SPG と SSCs において ACE2, TMPRSS2, SPP4, ANPEP が高発現し、IFITM, LY6E などの RF は低かったことから、精子形成過程の初期での SARS-CoV-2 感染が示唆されたが、卵巣におけるクラスター細胞（顆粒膜, 免疫, 血管内皮, 血管周囲, 間質）では卵巣ないしは卵母細胞の感染の可能性は低いと考えられた。

5) 成人組織細胞での網羅的解析

14 の臓器の 33 種類の細胞種類について解析した。まず ACE2 と TMPRSS2 の発現を見たところ、全細胞の >0.1% の発現を見たのは、大腸、小腸（空腸、十二指腸、回腸）、胆嚢、腎臓細胞であり、それ以外[肺での 1 型(AT1)、2 型(AT2)細胞を含め]での発現はほとんど見られなかった。発現は認められたものの、両方に同時に発現するものはさらに少なく、たとえば腎臓では、ACE2 と TMPRSS2 の同時発現は 0.01% の細胞でしか見られなかった。0.5-5% の発現が見られたものは、腸管細胞、近位尿細管細胞、杯細胞であった。肺での AT2 細胞は、DPP4,

BSG, ANPEP, TMPRSS2 and/or FRURIN を発現しており、ACE2 よりはこれらが侵入経路と考えられた。コロナウイルスの侵入に関する分子の発現は成人臓器で広範囲に認められたが、それらの細胞は、周皮細胞、アストロサイト、小脳ミクログリア、前立腺内分泌細胞、小腸腸管細胞、杯細胞、近位尿細管細胞に限られた。

6) 鼻粘膜上皮での発現

鼻粘膜上皮の細胞としては、繊毛細胞、分泌細胞、基底上細胞、NK 細胞などがある。NK 細胞の多くは DPP4 を発現しているが、その他の 3 つの上皮細胞は、あっても低～中程度の ACE2, ANPEP, NSG と TMPRSS2 を発現していた。ACE2 は繊毛細胞で高かったが、ANPEP は分泌細胞で発現していた。逆に、BSG はすべての鼻上皮細胞で発現していたが、基底上細胞でとくに強かった。TMPRSS2 は 3 つすべてで発現しており、分泌細胞が多かった (41%)。消化管と異なり、ANPEP, DPP4, ACE2 の同時発現は少なく、これらのうち一つの発現が見られた。これに対して、RFs である、IFITM3, LY6E はすべての上皮で見られ、最も高かったのは分泌ならびに基底上細胞であった。ACE2+TMPRSS2+ の繊毛細胞は、LY6E(85%), IFITM3(65%)と同時発現していた。まとめると、鼻粘膜上皮細胞は、SARS-CoV-2 の侵入を助ける受容体の組み合わせの発現が見られたが、同時に抑制因子の発現も見られた。

7) 鼻粘膜における SCARFs 発現の年齢の関与

若年層(24-30 歳)と高齢者(50-59 歳)との間で SCARFs の発現を検討した。その結果、ACE2, TMPRSS2, TMPRSS4 は繊毛細胞でいずれの年齢層でも発現が見られたが、ACE2+TNPRSS2+, ACE2+TMPRSS4+両方陽性の頻度は、高齢者で高かった。また、ANPEP+TMPRSS2+/4+の陽性頻度は、逆の傾向であった。TMPRSS2 の若年層の繊毛細胞での発現は増強していたが、高齢者では不変であった。これらの結果から、TMPRSS2 の発現頻度の変化が、若年から高齢者になるにしたがって生じると考えられた。

8) 種を超えた SCARFs の発現保存

ACE2 と DPP4 は組織や種族間で発現が異なっていた。例えば、チンパンジーの肝臓や肺の組織は、ヒトやマルクと比べて DPP4 が高かったが、ACE2 は低

かった。ヒトやチンパンジーの肝臓や肺の組織では ACE2 の発現はなかったがマルクの肝臓では ACE2, DPP4, ANEP, TMPRSS2 の発現が見られた。ACE2, DPP4, ANEP, TMPRSS2 の発現は3種の腎臓で共通に見られた。このことから、種を通じて、腎臓がもっとも感染しやすい臓器と考えられた。また、ヒトとマルクの早期の胚では感染性に差があると考えられた。

考 察

今回の検討で、今まで以上に多岐にわたる SARS-CoV-2 の侵入に関与する分子（促進と抑制）の scRNA-seq による網羅的な解析が可能であった。これにより、ウイルスの指向性の一端が明らかになり、発生初期での感染性は低いことや、妊娠初期での感染の可能性、精巣での感染の可能性が示唆された。成人臓器での発現では、消化管、腎臓さらに脳組織での感受性がみられたが、肺や心臓では ACE2 の関与は低いと考えられた。また、動物種によって結果に普遍性があったことから、これらを用いた動物実験は病態やワクチン開発には適切であると考えられた。しかしながら、今回の検討は、健常人の定常状態における転写の検討であるので、蛋白の発現状態や遺伝的・環境的な要因、例えば SARS-CoV-2 の感染によって、とくに ACE2 の発現状態に変化が生じる可能性はある。

文献

- 1) Singh M, Bansal V, and Feshotte C. A single-cell RNA expression map of human coronavirus entry factors. Cell Rep. 2020
doi: 10.1016/j.celrep.2020.108175