

15 ヒトとマウスの脳における SARS-CoV-2 の神経浸潤

イエール大学の岩崎明子教授らのグループ¹⁾は、SARS-CoV-2 の神経浸潤について実験的な検討を行った。

COVID-19 患者では、意識障害や頭痛といった中枢神経障害があることが知られており、剖検例では脳組織から RNA 転写産物が、嗅球の血管内皮細胞ではウイルスタンパクが確認されている。しかし、SARS-CoV-2 が中枢神経系(CNS)で神経細胞に感染するかはわかっていない。ウイルスの侵入経路を可及的に理解することは、長期予後を解明し、その中枢神経への影響を予見しているわれわれにとって重要な意味を持つ。感染者の一部にしか中枢神経への浸潤がないこと、CNS 組織を直接検査する手立てがないこと、脳内でのウイルスの直接浸潤とウイルス血症とを区別することが困難なことなどにより、COVID-19 の神経疾患を系統立てて研究するのは難しい。そのため、中枢神経病理の問いに答えるような信頼できるモデルシステムが必要になる。そこで、ジカウイルス研究でのヒト脳のオルガノイドモデルを用いることで、CNS における SARS-CoV-2 の感染能力を確かめた。また、scRNA-seq 法によりウイルスに感染した細胞の転写の変化を明らかにした。SARS-CoV-2 の神経浸潤には ACE2 が主たる浸潤経路なのかは明らかになっていない。また、ACE2 とともに必要な TMPRSS2, Neuropilin-1 などが神経細胞にも必要なのかも不明である。そこで、転写プロファイリングと阻止抗体を用いて ACE2 と SARS-CoV-2 の S タンパクの神経感染への必要性を検討した。これらの所見が、生体でも認められるかを検討するために、神経浸潤能のある SARS-CoV-2 を用いたマウスモデルを用いて、感染領域の血管の再構築（血管そのものへの感染はない）を観察した。最後に、剖検例の脳組織を用いて SARS-CoV-2 の感染を証明し、ウイルス感染と虚血性梗塞が限局した領域で起こることを示した。

結 果

- 1) ヒト脳オルガノイドを用いた SARS-CoV-2 の神経浸潤と細胞死の再現
健康ヒトより樹立した人工多能性幹細胞(hiPSC)の Y1 と Y6 を用いて、前脳特異的神経幹細胞(hNPCs)を樹立した。さらに細胞死をみるために TUNEL 染色をおこない、hiPSC 由来の脳オルガノイドを作製した。感

染実験では、SARS-CoV-2 は MAP2 陽性の成熟神経細胞に認められた。また、同時に神経細胞の周辺で二極性の構造をとる SOX2 陽性細胞である神経幹細胞での感染も認めた。感染細胞は、オルガノイドの周辺部分に多く、ウイルスは電子顕微鏡でも確認され、ER 様の構造体から発芽する様子も捉えられた。これらの結果から、ウイルスは神経細胞で複製が行えることがわかった。オルガノイドへの浸潤は、広範囲の細胞死につながったが、TUNEL 陽性細胞は SARS-CoV-2 陰性が大半であった。細胞死が多いほど、SARS-CoV-2 陽性率が高くなったが、感染細胞はあきらかに死滅していなかった。これらのことより、神経細胞にウイルスは感染でき、その周囲で細胞死を誘発しているものと考えられた。

2) ヒト脳オルガノイドにおける単一細胞遺伝子発現プロファイリング

脳オルガノイドに多様な細胞があり、あるものは SARS-CoV-2 に感受性があり、その他は細胞死になることから神経浸潤の指向性とその結果を解明する理想的なモデルと考えられた。scRNA-seq を行うために、背側皮質マーカーである CTIP2, PAX6, TBR1 の染色を追加した。その結果、感染細胞は、CTIP2 陽性で PAX6 陰性細胞か、CTIP2/TBR1 同時陽性、PAX6 陰性であることがわかった。これは、神経細胞でも深層(layer 5/6)に分化する細胞である。感染前後でのプロファイリングの変化を検討したところ、SARS-CoV-2 の転写産物は広範囲の細胞クラスターで確認され、SARS-CoV-2 は神経細胞、放射状グリア、神経原細胞などに感染できると考えられた。クラスターごとの解析結果は、TUNEL の結果 (SARS-CoV-2 感染細胞と細胞死の細胞とは別) と一致した。次に、ジカウイルスとの比較を行ったところ、発現様式が重なるものはほとんどなく、SARS-CoV-2 では細胞分裂、オルガネラ開裂、代謝過程に関するものが亢進しているのに対し、ジカウイルスでは、I型インターフェロンに関する経路が亢進していた。次に、オルガノイド感染における細胞レベルでの検討を行った。SARS-CoV-2 感染細胞では、ウイルス転写関連の遺伝子が豊富であり、代謝経路である、電子伝達経路 (陽子伝達)、チトクローム c を酸素に運ぶ経路、NADH をユビキノンに運ぶ経路が亢進していたが、陰性細胞では、ミトコンドリア分解状態とともにアルコール代謝、コレステロール合成、細胞死などが亢進していた。これらの結

果は、感染細胞が酸素飽和状態であり、近傍細胞では低酸素状態であることを示す。代謝亢進状態は SARS-CoV-2 感染細胞で特徴的なことであり、宿主の神経細胞を乗っ取り、複製していることを示している。最後に、SARS-CoV-2 感染により、HIF1 α 染色でわかるように局所的な低酸素状態が誘導されていることが明らかになった。

3) 宿主の ACE2 が神経細胞の感染には必要

SARS-CoV-2 の神経浸潤での議論としては、CNS における ACE2 の mRNA の発現レベルが低いことが挙げられる。確かに、我々の scRNA-seq の検討でも ACE2 の発現は低かったものの、細胞クラスターでは検出可能であった。また、感染細胞の割合と、ACE2, TMPRSS2, Neuropilin-1 の発現とは相関がなかったが、ACE2 蛋白の細胞表面での発現の可能性は残される。これを支持する所見として、ACE2 蛋白の発現は、オルガノイドのチューブ状細胞の MAP-2 陽性ニューロンで見られたので、蛋白発現と mRNA レベルが相関しない可能性がある。加えて、剖検脳での検討で、皮質灰白質のニューロンでは ACE2 の発現が見られた。ニューロン感染での ACE2 の必要性を見るために、オルガノイドを抗 ACE2 抗体処理したところ、SARS-CoV-2 の感染が抑制されたので脳オルガノイドでの感染には ACE2 が必要であることを示している。

次に、脳脊髄液(CSF)に液性抗体が存在し、神経への感染を阻害するかどうかを検討した。その結果、感染した患者の CSF 中には S 蛋白に特異的な IgG 抗体が存在し、中和活性を持っていた。また、この抗体は、オルガノイドへの SARS-CoV-2 の感染を阻害した。

4) COVID-19 のマウスモデルにより SARS-CoV-2 の神経浸潤能を確認

生体での神経浸潤能を検討するために、K18 プロモーターを持ちヒト ACE2 を発現するトランスジェニックマウスを用いて実験を行った。SARS-CoV-2 の経鼻腔投与により、脳内のウイルス量が増加することが確認された。核カプシドに対する抗体を用いて感染 7 日目の脳内の局在を検討したところ、前脳全域に広範囲に存在し、皮質は不均一に感染していた。ウイルスは、筒状・斑状に感覚野で見られたのに対し、第 4 野では感染がなかった。感染細胞の密度を検討したところ、多くの脳領域

で濃度が高かったが唯一の例外は小脳であった。歯状回、淡蒼球、皮質第 4 層では密度が低かった。全体の脳で血管内皮細胞での発現はなかった。神経細胞への感染による、血管系への影響を見るために、核カプシド蛋白と CD31, Podocalyxin を重染色して検討した。皮質での血管に注目して、感染細胞と、血管内皮細胞の密度を検討した。その結果、正常な血管構築の破綻が皮質で認められ、上層での放射状血管で顕著であった。このことは、脳細胞への感染により、血管構築が改変され、正常な血流が代謝の活発な領域に取られてしまうことを示唆した。

SARS-CpV-2 の脳内感染と肺感染の予後を検討するために、アデノウイルス関連ベクター(AAV-hACE2)を経気管的ないしは脳槽経由で投与した。その後、SARS-CoV-2 を経鼻ないしは経脳室的に感染させた結果、経鼻感染したマウスは肺炎を併発したが体重減少や死亡することはなかった。しかし、経脳室感染したマウスは体重減少をきたし、死亡した。これはウイルス投与を 100 分の 1 にしても同じ結果だった。これによっても、脳でのウイルス複製がおこり、予後にも影響することが明らかとなった。

5) COVID-19 患者剖検脳での SARS-CoV-2 の神経浸潤の証拠

COVID-19 患者で脳浸潤があるかどうかを、重症 COVID-19 で死亡した患者の脳組織を用いて検討した。その結果、COVID-19 患者の脳組織では、程度こそ違うものの明らかな SARS-CoV-2 の S 蛋白の発現が確認された。神経病理学的な検討では、陽性細胞は、皮質ニューロンや近傍の血管内皮細胞で見られた。重症広範囲脳症の患者では、MRI でも多発微小出血部位がみられたが、組織学的には多発する虚血性梗塞が皮質下白質で出血も伴って確認された。梗塞病変では組織の破壊と、限局性の細胞死が認められ、感染細胞は梗塞巣周辺により多く認められた。超急性期にはウイルス感染細胞は血管内皮細胞にも認められた。このような梗塞巣は皮質下白質（皮質ではなく）により多く認められた。他の検体では、ウイルス感染細胞は局所の虚血部位でも認めた。重要な点は、このような感染細胞の周囲にはリンパ球や好中球の浸潤が見られなかったことである。これは、ジカウイルス、狂犬病ウイルス、ヘルペスウイルスなどの脳症でみられる多くの免疫細胞の浸潤所見（T 細胞を含む）と異

なっており、SARS-CoV-2 は神経指向性があり感染もするが、免疫反応を起こさないことが示唆された。

考 察

今回の検討で、マウス並びのヒトにおいて SARS-CoV-2 の神経組織に感染することやその結果について明らかになった。COVID-19 における神経症状は、ウイルスの神経細胞への直接浸潤によることを示唆している。また、感染により、脳オルガノイドにおいて神経細胞死が確認された。これは、電子顕微鏡でも明らかであった。オルガノイドでの細胞死は、しかしながらウイルス感染細胞とかならずしも一致していなかった。scRNA-seq では、感染したオルガノイドでは、神経細胞の代謝の変化がみられたが、インターフェロンやそれによって刺激された遺伝子(ISG)がみられなかった。このことから、SARS-CoV-2 感染は他のジカウイルス感染とも異なり特異的であった。さらに精査すると、感染細胞の影響が近傍に及び、微小環境の変化が起きていることが示唆された。すなわち低酸素状況が組織の障害につながっている可能性がある。

ACE2 は少なくとも蛋白レベルでは発現しており、SARS-CoV-2 のオルガノイドへの感染に際し、機能的に必要であった。また、COVID-19 患者の CSF 中には抗体が存在していた。脳組織での ISG の誘導や炎症細胞の浸潤は認められなかったが、細胞死が起きていることを考慮すると、炎症反応の存在は否定できない。神経細胞の死によって下流の炎症反応が CNS でも起きる可能性はある。

マウスモデルを用いて、われわれは初めて SARS-CoV-2 の神経浸潤による脳血管の改変が起こり、オルガノイドや患者の脳でみられたような虚血がおきることを示した。

微小血栓を伴わない急性脳虚血の報告が COVID-19 患者の剖検例で報告されているが、それと同様に、虚血による組織障害と微小梗塞が COVID-19 患者の剖検例で明らかになった。神経浸潤と脳虚血を明確に関連づけることはできないが、仮説として、SARS-CoV-2 の神経浸潤により局所での低酸素状態が作られ、血管系に乱れによる脳血管の破綻が虚血性梗塞の原因となり、さらにウイルス感染をきたしやすくなると考えられる。脳オルガノイドはこれらをあきらかにするのに有用なモデルであった。

将来的な研究として、脳への侵入経路やその結果としての感染細胞を明らかにすることで、SARS-CoV-2 と虚血性梗塞の関連を明らかにすることができる

であろう。CNS への感染は鼻中隔、嗅球上皮細胞経由、あるいはウイルス血症であるかもしれないが、呼吸器にも増して、脳は感染高リスクの臓器と考えるべきであろう。

まとめとして、われわれの研究は、神経細胞が SARS-CoV-2 の標的になりうることを示した。またその結果、破滅的な結果である脳局所の虚血と細胞死が誘導された。この事実により、SARS-COV-2 の神経指向性や、神経障害を持つ患者の治療への合理的なアプローチが明らかになった。

文献

1) Song E, et al. Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain.

BioRxiv (Pre-print) 2020 doi: 10.1101/2020.06.25.169946