The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain is internalized and promotes protein ISGylation in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes
Author(s)	奥野, 翔太
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/96279
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

[Format-P02]

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　　名 Name	奥野　翔太
論文題名 Title	SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain is internalized and promotes protein ISGylation in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes（SARS-CoV-2スパイク蛋白質受容体結合ドメインはヒトiPS細胞由来心筋細胞に取り込まれISG化を促進する）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

SARS-CoV-2を原因ウイルスとする新型コロナウイルス感染症（COVID-19）はパンデミックとして社会に大きな影響を与えた。ワクチンはパンデミックをコントロールするために重要なツールである。新規開発されたCOVID-19 mRNAワクチンはウイルス感染に必要なスパイク蛋白質をコードしており、その有効性に関しては明らかであるが、大規模接種開始後に観察研究においてmRNAワクチンと心筋炎発症に有意な関連があることが報告され重大な課題となっている。しかしながら、COVID-19ワクチン後心筋炎の機序は未だ明らかではない。考えられる機序のひとつに、産生されたスパイク蛋白質やそのペプチド断片が血液循環を介して直接的に心筋細胞に影響を与え、自然免疫応答に関する遺伝子発現を変化させるとする仮説が報告されている。また、スパイク蛋白質受容体結合ドメイン（S-RBD）はスパイク蛋白質の中でウイルスの受容体結合を担うドメインであり、多くの種類のCOVID-19ワクチンに共通した標的部位で、それ自体も炎症を惹起することが報告されている。本研究ではヒトiPS細胞由来心筋細胞に対するS-RBDの直接的な影響を検証することを目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

ヒトiPS細胞から分化誘導後28日のiPS細胞由来心筋細胞においてSARS-CoV-2の主要な受容体であるACE2が発現していることを確認した。精製S-RBD投与後の免疫染色では、S-RBDがACE2と細胞膜上で共局在し、細胞質内にも共局在して存在することを同定した。CRISPR/Cas9を用いた遺伝子編集によりACE2遺伝子にフレームシフト変異を導入することでACE2ノックアウト（KO）iPS細胞を作製した。ACE2野生型（WT）およびACE2-KOのiPS細胞由来心筋細胞に精製S-RBD投与後の免疫染色を比較したところ、ACE2-KOのiPS細胞由来心筋細胞ではS-RBDの細胞膜上や細胞質内での局在を認めず、S-RBDの細胞質内への取り込みはACE2依存的であることが示された。

S-RBDの取り込み過程を視覚化するために、S-RBDに緑色蛍光蛋白質を融合したS-RBD-sfGFPを作製し、エンドサイトーシス関連蛋白質との局在を評価したところ、S-RBD-sfGFP投与1時間後では早期エンドソームに発現する蛋白質（EEA1、RAB5A）と共局在することを同定した。そこで、早期エンドソームに発現するRAB5Aに赤色蛍光蛋白質を融合したDsRed-RAB5Aを強制発現させるアデノ随伴ウイルスを作製し、ウイルスによる形質導入後にS-RBD-sfGFPを投与することで、iPS細胞由来心筋細胞においてS-RBDが細胞膜に結合し、細胞質内でRAB5Aと共局在して移動する様子を共焦点顕微鏡でライブセルイメージングすることに成功した。また、S-RBD-sfGFPが投与24時間後にリソソームと共局在することも確認し、S-RBDがエンドリソソーム経路を介して細胞質内に取り込まれることを示した。

次に、取り込まれたS-RBDとiPS細胞由来心筋細胞の炎症との関連を評価するために、NF-kβ経路関連遺伝子の定量PCRアレイ解析とシングルセルRNA解析を行った。定量PCRアレイ解析ではS-RBD-sfGFP投与群でコントロールGFP群と比較して炎症促進性サイトカイン遺伝子の発現上昇を認めたが、シングルセルRNA解析ではiPS細胞より分化誘導させたiPS細胞由来心筋細胞は心筋細胞のクラスターと少数の非心筋細胞のクラスターに分離することができ、定量PCRアレイ解析で認めた炎症促進性サイトカイン遺伝子の発現変化は心筋細胞ではなく非心筋細胞のクラスター由来であることが示された。そこで成熟心筋細胞のクラスターのみを再解析することで、インターフェロン応答遺伝子（IFI6、ISG15、IFITM3)が有意に発現上昇することが同定された。また、ウイルスや異物に対する免疫応答に関連するユビキチン様蛋白質であるISG15に着目して解析し、ACE2-WTのiPS細胞由来心筋細胞においてS-RBD-sfGFP投与群でコントロールGFP群と比較してISG15蛋白質の発現が上昇し、ISG15による翻訳後修飾であるISG化を促進することを示した。

〔総　括(Conclusion)〕

SARS-CoV-2 S-RBDはiPS細胞由来心筋細胞にエンドリソソーム経路を介して取り込まれ、インターフェロン応答遺伝子を発現上昇させ、ISG化を促進させることを示した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　奥野　翔太

		（職）	氏　　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	坂田泰史
	副　査	大阪大学教授	妻木敦行
	副　査	大阪大学教授	猪阪善隆

論文審査の結果の要旨

本研究は、新型コロナウイルス感染症に対するmRNAワクチン後心筋炎の機序を考察するために、ヒトiPS細胞由来心筋細胞に対するSARS-CoV-2スパイク蛋白質受容体結合ドメインの直接的な影響を検証したものである。

研究の結果、スパイク蛋白質受容体結合ドメインがACE2依存的にエンドリソソーム経路を介して取り込まれることを示し、蛍光蛋白質を用いてその過程をライブセルイメージングすることに成功した。また、定量PCRとシングルセルRNA解析を用いて、スパイク蛋白質受容体結合ドメインの取り込みによりインターフェロン応答遺伝子の発現が上昇すること、さらに、ISG15蛋白質の発現が上昇し、ISG15による翻訳後修飾であるISG化が促進することを示した。

上記の研究結果から、スパイク蛋白質受容体結合ドメインがiPS細胞由来心筋細胞に取り込まれ、ISG化を促進することが示され、mRNAワクチン後心筋炎の機序解明の一助となることが期待される。

以上の理由から、本論文は学位に値すると考えられる。