

令和 6 年 4 月 2 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11472

研究課題名(和文) SARS-CoV-2のS1による全身性炎症に対する運動の予防効果とメカニズム

研究課題名(英文) Preventive effect of exercise on systemic inflammation caused by S1 of SARS-CoV-2 and its mechanism

研究代表者

白土 健 (Shirato, Ken)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：60559384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：SARS-CoV-2による重度炎症におけるスパイク(S)タンパク質の役割とそのメカニズム、および習慣的運動の予防効果を明らかにするため、まず、Sタンパク質によるマクロファージの炎症性応答に対する習慣的運動の効果を*in vitro*実験で検討したが、習慣的運動は、少なくとも腹腔滲出マクロファージのSタンパク質に対する感受性には影響を及ぼさないことが示唆された。その後、海外の研究グループによって、SARS-CoV-2感染による全身炎症には、主にエンベロープ(E)タンパク質が寄与していることが報告された。そのため、Eタンパク質による全身炎症に対する習慣的運動の予防効果の検討を今後も継続していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的意義は、COVID-19の重度炎症において重要な役割を果たしている末梢血単球由来マクロファージのSタンパク質に対する感受性に対して、習慣的運動は抑制効果を及ぼさないことを示唆する実験結果を得た点にある。2021年11月頃に生じたデルタ株からオミクロン株への変異以降、COVID-19の重症化例はあまり見られなくなった。しかし、Eタンパク質やSタンパク質による全身炎症に対する習慣的運動の予防効果の検討を今後も継続することは、運動の抗炎症効果の科学的根拠の一端の明らかにし、健康増進における運動の有用性を立証する上で社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the role of spike (S) protein in severe inflammation caused by SARS-CoV-2 and its mechanism, and the preventive effect of habitual exercise on S protein-induced systemic inflammation, we first investigated the effects of habitual exercise on the pro-inflammatory response of macrophages triggered by the S protein. The results obtained from *in vitro* experiments suggested that habitual exercise does not affect at least the sensitivity of peritoneal exudate macrophages to the S protein. Subsequently, an overseas research group reported that the envelope (E) protein, rather than the S protein, mainly contributes to systemic inflammation caused by SARS-CoV-2 infection. Therefore, we plan to continue investigating the preventive effect of habitual exercise on systemic inflammation caused by the E protein.

研究分野：衛生学

キーワード：SARS-CoV-2 スパイクタンパク質 マクロファージ 炎症性応答 習慣的運動 シグナル伝達 インフラマソーム 機能性食品

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) による新型コロナウイルス感染症 2019 (COVID-19) は、2019 年 12 月に中国武漢市で第 1 例目の感染者が報告され、翌年の 3 月には WHO によるパンデミック宣言がなされた。当時の報告では、患者のおよそ 80% は軽症のまま軽快するが、14% は肺炎による呼吸困難および低酸素症、5% は呼吸不全、全身性ショック、多臓器不全など重症合併症を発症するとされていた¹⁾。その後、COVID-19 の重症度および死亡率には、重度炎症が深く関係していることが明らかになってきたが、当初は COVID-19 に対する有効かつ安全性の高い治療薬やワクチンが確立される保証はない状態であった。このような背景から、COVID-19 の重症者および死亡者を抑制するためには、SARS-CoV-2 による重度炎症機構を解明して、宿主の感受性対策を確立することが喫緊の課題だった。

COVID-19 の重症患者は、マクロファージ活性化症候群と類似したサイトカインストームによる全身炎症を呈する²⁾。重症患者の気管支肺泡洗浄液では、常在性肺泡マクロファージが減少している一方、炎症性単球由来マクロファージは著しく増加していることから、死細胞の除去能低下に伴う炎症性脂質メディエータの拡散が重度炎症の原因の一つと推定された³⁾。さらに、生体内で増殖したウイルスの構成成分も、マクロファージの toll 様受容体 (TLR) を介した炎症性応答を引き起こす。例えば、SARS-CoV-2 のヒト細胞への感染に寄与しているスパイクタンパク質の受容体結合領域である S1 も、特定の TLR に対して親和性を持つことがコンピュータ解析によって示唆されていた⁴⁾。

一方、COVID-19 の重症化リスクは、肥満者および糖尿病患者において高いことも明らかにされた⁵⁾。従来、糖尿病患者は感染症のみならず、敗血症のリスクも高いことが知られていた⁶⁾。実際に、1 型および 2 型糖尿病マウスでは、白血球の貪食能が低下していることや⁷⁾、リポ多糖 (LPS) 投与による全身炎症が増悪することが実証されている⁸⁾。SARS-CoV-2 の S1 は、LPS と同様に多数の糖鎖が付加されている⁹⁾。しかし、SARS-CoV-2 による重度炎症機構における S1 の役割とそのメカニズムは明らかになっていなかった。

習慣的運動には、宿主の感染防御能を高める効果だけでなく、全身炎症を抑える効果があることも示唆されている。例えば、強制走運動を 8 週間負荷したマウスは、盲腸結紮穿刺誘発性敗血症による多臓器不全が改善した¹⁰⁾。自発走運動を 8 週間負荷したマウスも、便懸濁液誘発性敗血症による肺障害が軽減した¹¹⁾。しかし、COVID-19 における重度炎症に対する習慣的運動の予防効果については、実験科学的な根拠がまだ得られていなかった。SARS-CoV-2 による重度炎症機構における S1 の役割とそのメカニズムは何か、習慣的運動の予防効果はあるのか、という学術的「問い」を解明することにより、COVID-19 の重症者および死亡者を抑制するための科学的根拠に基づいた運動処方 の確立が期待できる。

2. 研究の目的

SARS-CoV-2 による重度炎症機構における S1 の役割とそのメカニズム、および習慣的運動の予防効果を実験科学的に明らかにすることにより、COVID-19 の重症者および死亡者を抑制するための科学的根拠に基づいた運動処方 の確立に貢献する。

3. 研究の方法

(1) S1 によるマクロファージの炎症性応答の細胞内シグナル伝達の解析

マウスから腹腔滲出マクロファージを採取した後、MAP キナーゼ阻害剤 U0126 (5 μM) の存在下または非存在下で、SARS-CoV-2 リコンビナントスパイクタンパク質 S1 サブユニット (S1: 100 ng/mL) または LPS (100 ng/mL) で 6 時間刺激した。培養上清中に分泌されたインターロイキン-6 (IL-6) の濃度を ELISA 法で測定した。

(2) S1 によるマクロファージの炎症性応答に対する習慣的運動の効果の解析

マウスを対照群と自発走運動群に分けて 10 週間飼育した。腹腔滲出マクロファージを採取して、S1 (100 ng/mL) または LPS (100 ng/mL) で 6 時間刺激した。培養上清中に分泌された IL-6 の濃度を ELISA 法で測定した。

(3) S1 による TLR4 シグナル伝達を介したマクロファージの炎症性応答に対する機能性食品の効果の解析

マウスから腹腔滲出マクロファージを採取した後、アスパラガス茎抽出物 (EAS: 2 mg/mL [アミノアップ社, 札幌]) の存在下または非存在下で、S1 (100 ng/mL) で刺激した。刺激 6 時間後の IL-1β および IL-6 の分泌レベルと mRNA レベルを ELISA 法と定量 PCR 法でそれぞれ分析した。刺激 1 時間後の NF-κB と c-Jun N 末端キナーゼのリン酸化レベル、刺激 6 時間後の MAP キナーゼのリン酸化レベルをウェスタンブロット法で分析した。

(4) NLRP3 インフラマソームを介したマクロファージの炎症性応答に対する機能性食品の効果の解析

マウスから腹腔滲出マクロファージを採取し、LPS (100 ng/mL) で 6 時間プライミングした後、EAS (2 mg/mL) の存在下または非存在下で、NLRP3 インフラマソーム活性化剤として、ニゲリシン (10 μM) または ATP (5 mM) で 1 時間刺激した。培養液中の IL-1β と活性型カスパーゼ-1 のレベルを ELISA 法とウェスタンブロット法でそれぞれ分析した。細胞内の不活性型カスパーゼ-1 のレベルをウェスタンブロット法で分析した。ASC とカスパーゼ-1 の相互作用の分析には共免疫沈降法を用いた。

一連の研究は、杏林大学動物実験委員会の承認を受けて実施した(承認番号:245, 2021-2023)。

4. 研究成果

(1) SARS-CoV-2 による重度炎症機構における S1 の役割とそのメカニズム

本研究計画の申請当初は、SARS-CoV-2 による重度炎症機構における S1 の役割と、そのメカニズムとして、TLR4 を介したマクロファージの炎症性応答の関与を個体レベルで明らかにすることを目的としていた。しかし、海外の研究グループが行った各種 TLR のノックアウトマウスを用いた実験によって、SARS-CoV-2 の感染による全身炎症は、TLR4 ではなく TLR2 を欠損させることで大きく抑制されること、さらに、マクロファージの炎症性応答の誘発には、スパイクタンパク質ではなく主にエンベロープタンパク質が寄与していることが明らかにされた¹²⁾。そのため、本実験計画については、際立った成果を新たに挙げるができなかった。

一方、S1 は LPS と同様に、マクロファージの TLR4 を介して NF-κB と c-Jun N 末端キナーゼをそれぞれ活性化することにより、IL-6 の遺伝子発現を促す¹³⁾。しかし、S1 による IL-6 mRNA の発現誘導は、MAP キナーゼの阻害剤 U0126 によってほぼ半減するが、LPS による IL-6 mRNA の発現誘導に対しては、U0126 の抑制効果が認められないことを新たに見出した(図1)。これらの結果から、S1 と LPS は、マクロファージの TLR4 を介して炎症性応答を引き起こすことは共通しているが、その細胞内シグナル伝達経路には相違があることが示唆された。

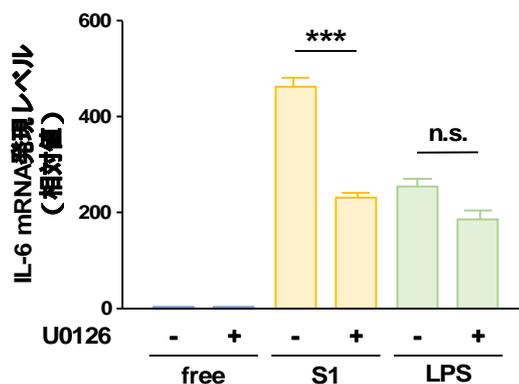


図1. S1 および LPS によるマクロファージの IL-6 mRNA 発現誘導に対する MAP キナーゼ阻害剤の効果。平均値 ± 標準誤差 (n = 3)。***p < 0.001。

(2) S1 による全身炎症に対する習慣的運動の予防効果

本研究計画の申請当初は、S1 による全身炎症に対する習慣的運動の予防効果を明らかにすることを目的としていた。しかし、上記の研究状況から、S1 によるマクロファージの炎症性応答に対する習慣的運動の効果を細胞レベルで検討するまでに留まった。S1 刺激後に腹腔滲出マクロファージから分泌された IL-6 の培養上清中の濃度を対照群と自発走運動群のマウスとの間で比較検討した結果、IL-6 の分泌誘導の程度は両群間で有意な差が認められなかった(図2)。従って、習慣的運動は、少なくともマウス腹腔滲出マクロファージの S1 に対する感受性には影響を及ぼさないことが示唆される。今後も引き続き、エンベロープタンパク質によるマウス全身炎症モデルを確立した上で、本実験計画を継続実施していく予定である。

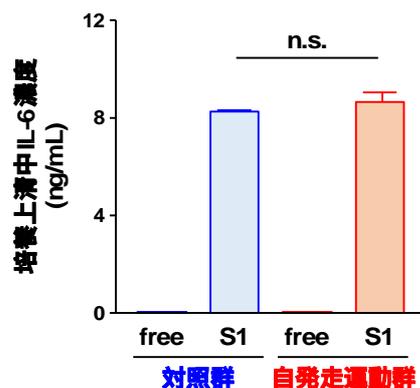


図2. S1 によるマクロファージの IL-6 分泌誘導に対する習慣的運動の効果。平均値 ± 標準誤差 (n = 5)。

(3) 本研究課題と関連が深いその他の研究成果

S1 による TLR4 シグナル伝達を介したマクロファージの炎症性応答に対する EAS の抗炎症効果を検討した。EAS は、S1 による NF-κB と c-Jun N 末端キナーゼの活性化には影響を及ぼさず、MAP キナーゼの活性化を抑制することによって、マウス腹腔滲出マクロファージの IL-1β と IL-6 の発現誘導を軽減することを明らかにした¹⁴⁾。

NLRP3 インフラマソームを介したマクロファージの炎症性応答に対する EAS の抗炎症効果も検討している。ニゲリシンおよび ATP 刺激による IL-1β と IL-18 の分泌増強は EAS によって軽減されたが、NLRP3 インフラマソームの活性化を必要としない LPS プライミング後の IL-6 の分泌誘導は EAS の影響を受けなかった(未発表)。さらに、EAS は、ニゲリシン刺激による活性型カスパーゼ-1 の細胞外放出と、それに伴う細胞内の不活性型カスパーゼ-1 の消失をいずれも抑制し、この抑制作用には、ASC とカスパーゼ-1 の相互作用の阻害が伴っていた(未発表)。すなわち、EAS は、マクロファージの TLR4 シグナル伝達を介した炎症性応答のみならず、NLRP3

インフラマソームを介した炎症性応答も抑制する作用を有することが示唆された。

また、COVID-19 を含む急性下気道呼吸器感染症におけるマクロファージの働きの概日時計制御機構について、最新の知見を纏めると共に^{15,16)}、肺泡マクロファージの基本的な役割とその加齢による働きの変化について、「貪食機能」、「炎症性応答」、「エフェロサイトーシス(死細胞に対する貪食機能)」に焦点を当てて纏めた¹⁷⁾。

<引用文献>

- 1) Merad, M. and Martin, J.C.: Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 20: 355-362, 2020.
- 2) Chen, G., Wu, D., Guo, W., Cao, Y., Huang, D., Wang, H., Wang, T., Zhang, X., Chen, H., Yu, H., Zhang, X., Zhang, M., Wu, S., Song, J., Chen, T., Han, M., Li, S., Luo, X., Zhao, J., and Ning, Q.: Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J. Clin. Invest.* 130: 2620-2629, 2020.
- 3) Liao, M., Liu, Y., Yuan, J., Wen, Y., Xu, G., Zhao, J., Cheng, L., Li, J., Wang, X., Wang, F., Liu, L., Amit, I., Zhang, S., and Zhang, Z.: Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat. Med.* 26: 842-844, 2020.
- 4) Choudhury, A. and Mukherjee, S.: In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. *J. Med. Virol.* 92: 2105-2113, 2020.
- 5) Zhou, Y., Chi, J., Lv, W., and Wang, Y.: Obesity and diabetes as high-risk factors for severe coronavirus disease 2019 (Covid-19). *Diabetes Metab. Res. Rev.* 37: e3377, 2021.
- 6) Shah, B.R. and Hux, J.E.: Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. *Diabetes Care* 26: 510-513, 2003.
- 7) Pettersson, U.S., Christoffersson, G., Massena, S., Ahl, D., Jansson, L., Henriksnäs, J., and Phillipson, M.: Increased recruitment but impaired function of leukocytes during inflammation in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *PLoS One* 6: e22480, 2011.
- 8) Schuetz, P., Castro, P., and Shapiro, N.I.: Diabetes and sepsis: preclinical findings and clinical relevance. *Diabetes Care* 34: 771-778, 2011.
- 9) Shajahan, A., Supekar, N.T., Gleinich, A.S., and Azadi, P.: Deducing the N- and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2. *Glycobiology* 30: 981-988, 2020.
- 10) Kim, D. and Kang, H.: Exercise training modifies gut microbiota with attenuated host responses to sepsis in wild-type mice. *FASEB J.* 33: 5772-5781, 2019.
- 11) Tyml, K., Swarbreck, S., Pape, C., Secor, D., Koropatnick, J., Feng, Q., Veldhuizen, R.A.W., and Gill, S.E.: Voluntary running exercise protects against sepsis-induced early inflammatory and pro-coagulant responses in aged mice. *Crit. Care* 21: 210, 2017.
- 12) Zheng, M., Karki, R., Williams, E.P., Yang, D., Fitzpatrick, E., Vogel, P., Jonsson, C.B., and Kanneganti, T.D.: TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nat. Immunol.* 22: 829-838, 2021.
- 13) Shirato, K. and Kizaki, T.: SARS-CoV-2 spike protein S1 subunit induces pro-inflammatory responses via toll-like receptor 4 signaling in murine and human macrophages. *Heliyon* 7: e06187, 2021.
- 14) Shirato, K., Takanari, J., and Kizaki, T.: Standardized extract of *Asparagus officinalis* stem attenuates SARS-CoV-2 spike protein-induced IL-6 and IL-1 β production by suppressing p44/42 MAPK and Akt phosphorylation in murine primary macrophages. *Molecules* 26: 6189, 2021.
- 15) Shirato, K. and Sato, S.: Macrophage meets the circadian clock: implication of the circadian clock in the role of macrophages in acute lower respiratory tract infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12: 826738, 2022.
- 16) Shirato, K. and Sato, S.: Chapter 2. Circadian clock regulation of macrophage functions. In: *Research Aspects in Biological Science Vol. 8* Dominguez-Mancera, B. (Ed.). Book Publisher International, London, UK. 2022. pp. 19-57.
- 17) Shirato, K., Kasuga, K., Sato, S., and Ishii, H.: Chapter 8. Physiological role of alveolar macrophage in acute lower respiratory tract infection: phagocytosis and aging. In: *Phagocytosis - Main Key of Immune System* Athari, S.S. and Nasab, E.M. (Eds.). IntechOpen, London, UK. 2023. pp. 121-143.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shirato K, Sato S	4. 巻 12
2. 論文標題 Macrophage Meets the Circadian Clock: Implication of the Circadian Clock in the Role of Macrophages in Acute Lower Respiratory Tract Infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 826738
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2022.826738	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Shirato K, Takanari J, Kizaki T	4. 巻 26
2. 論文標題 Standardized Extract of Asparagus officinalis Stem Attenuates SARS-CoV-2 Spike Protein-Induced IL-6 and IL-1 Production by Suppressing p44/42 MAPK and Akt Phosphorylation in Murine Primary Macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 6189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules26206189	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 白土 健, 春日啓介, 小笠原準悦, 高成 準, 石井晴之, 木崎節子, 苅田香苗
2. 発表標題 アスパラガス茎抽出物はマクロファージのNLRP3インフラマソームの活性化を抑制する
3. 学会等名 第94回日本衛生学会学術総会（鹿児島市）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Shirato K, Kasuga K, Ogasawara J, Takanari J, Ishii H, Kizaki T, Karita K
2. 発表標題 Suppressive effect of ETAS(R)50 on NLRP3 inflammasome activation in macrophages
3. 学会等名 The 31st Annual Meeting of International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (ICNIM2023) (Sapporo, Japan) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白土 健, 春日啓介, 小笠原準悦, 高成 準, 石井晴之, 木崎節子, 荻田香苗
2. 発表標題 アスパラガス茎抽出物はニゲリシンによるマクロファージのIL-1 分泌誘導を軽減する
3. 学会等名 第93回日本衛生学会学術総会 (東京)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shirato K, Takanari J, Ogasawara J, Kizaki T
2. 発表標題 ETAS(R)50 suppresses SARS-CoV-2 spike protein-induced pro-inflammatory responses in murine peritoneal exudate macrophages
3. 学会等名 The 30th Annual Meeting of International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (ICNIM2022) (Sapporo, Japan) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白土 健, 木崎節子
2. 発表標題 マクロファージのNO産生におけるO-結合型N-アセチルグルコサミン転移酵素の生理的役割
3. 学会等名 第92回日本衛生学会学術総会 (西宮市: WEB開催)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白土 健, 高成 準, 木崎節子
2. 発表標題 SARS-CoV-2 Sタンパク質によるマクロファージのIL-6/1 発現誘導に対するEASの阻害機序
3. 学会等名 第92回日本衛生学会学術総会 (西宮市: WEB開催)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白土 健, 木崎節子
2. 発表標題 マクロファージの誘導型一酸化窒素合成酵素とアルギナーゼの基質競合におけるO-結合型N-アセチルグルコサミン転移酵素の役割
3. 学会等名 第50回杏林医学会総会 (三鷹市: YouTube配信)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白土 健, 高成 準, 木崎節子
2. 発表標題 SARS-CoV-2スパイクタンパク質によるマクロファージの炎症性応答に対するETAS(R)50の抑制効果
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会 (東京: WEB開催)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Shirato K, Kasuga K, Sato S, Ishii H	4. 発行年 2023年
2. 出版社 IntechOpen, London, UK	5. 総ページ数 230
3. 書名 Chapter 8. Physiological role of alveolar macrophage in acute lower respiratory tract infection: phagocytosis and aging. In: Phagocytosis - Main Key of Immune System. Athari SS, Nasab EM (Eds.)	

1. 著者名 Shirato K, Sato S	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Book Publisher International, London, UK	5. 総ページ数 148
3. 書名 Chapter 2. Circadian clock regulation of macrophage functions. In: Research Aspects in Biological Science Vol. 8. Dominguez-Mancera B (Ed.)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------