

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：82601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19394

研究課題名（和文）血液脳関門を標的とした新興感染症の病態解明と創薬への応用

研究課題名（英文）Development of novel therapeutics against emerging infectious diseases by targeting blood&#8211;brain barrier

研究代表者

諫田 泰成（Kanda, Yasunari）

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・部長

研究者番号：70510387

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：現在、新型コロナウイルス感染症によりブレインフォグなどの長期症状が懸念されている。

そこで本研究では、ヒトiPS細胞由来の脳毛細血管内皮細胞（iPSC-BMEC）を作製し、SARS-CoV-2がACE2受容体を介して高効率で感染することを見出した。次に、SARS-CoV-2感染によりバリア機能が低下し、炎症性サイトカインの発現が誘導されることを見出した。さらに、RNA-Seq解析により、SARS-CoV-2が脳毛細血管内皮細胞のWnt経路をターゲットにする可能性を見出した。以上の結果より、SARS-CoV-2感染はWntシグナルを介して血液脳関門の機能低下を引き起こすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COVID-19重症化時に様々な神経症状を引き起こすことが知られており、long COVID-19と呼ばれるような長期症状が懸念されている。本研究において、血液脳関門の構成細胞である脳毛細血管内皮細胞を用いてSARS-CoV-2感染メカニズムを明らかにすることができることを明らかにした。これによりCOVID-19の病態メカニズムを解明し、long COVID-19の克服に向けて新たな治療薬や診断マーカーなどの開発につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) causes coronavirus disease 2019 (COVID-19) is associated with various neurological symptoms. Here we investigated the effect of SARS-CoV-2 on the CNS. We found that iPSC-derived brain microvascular endothelial like cells (iPSC-BMELCs) were infected with SARS-CoV-2 via its ACE2 receptor. SARS-CoV-2 infection resulted in decrease in TEER and induction of several proinflammatory genes, which are known to be elevated in patients with COVID-19. Furthermore, RNA-seq analysis revealed that SARS-CoV-2 targeted canonical pathway of Wnt signaling in iPSC-BMELCs. The Wnt activator partially inhibited the infection and the subsequent inflammatory responses. These findings suggest that SARS-CoV-2 infection causes BBB dysfunction via Wnt signaling. Thus, iPSC-BMELCs are a useful in vitro model for elucidating COVID-19 neuropathology and drug development.

研究分野：レギュラトリーサイエンス

キーワード：iPS細胞 COVID-19 SARS-CoV-2 脳毛細血管内皮細胞 血液脳関門 Wnt 後遺症 バリアー機能

1. 研究開始当初の背景

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) を引き起こす SARS-CoV-2 は重篤な肺炎を引き起こすだけでなく、重症化時に吐き気、めまい、頭痛、脳炎、てんかん発作など様々な神経症状を引き起こすことから、long COVID が問題となっている (Spudich et al., *Science*, 2022)。

神経症状を示す COVID-19 患者は、脳血流量の低下や血液脳関門の損傷が認められていると報告された (Patabendige et al., *Biochem Soc Trans.*, 2023)。従って、SARS-CoV-2 が中枢神経系に作用し長期症状につながる要因として血液脳関門などのバリア破綻による脳内への侵入が考えられる。

血液脳関門は、必要な栄養素だけを血中から取り入れ、外部の病原菌や有害物質から隔離される環境を保つ役割を果たしている。血液脳関門は主に脳毛細血管内皮細胞により構成され、タイトジャンクションを形成することにより恒常性を維持している。近年、ヒト iPS 細胞から脳毛細血管内皮細胞などの分化誘導法が開発されており、ヒト BBB モデルとして期待されている (Lippmann et al. *Stem Cells*, 2014)。

以上の情報から、COVID-19 と血液脳関門の関連が考えられるが、プライマリーの脳毛細血管内皮細胞には感染しないという報告 (Constant et al., *Front Immunol.*, 2021) とヒト iPS 細胞から作製した脳毛細血管内皮細胞では感染するとの報告 (Krasemann et al., *Stem Cell Reports*, 2022) があり、まだコンセンサスが得られておらず、さらに詳細な病態メカニズムなども明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究において、ヒト iPS 細胞から脳毛細血管内皮細胞を作製し、SARS-CoV-2 が感染するかどうかを明らかにする。また、ヒト iPS 細胞から作製した脳毛細血管内皮細胞のバリア機能 (TEER 値、炎症応答) に対する SARS-CoV-2 感染の影響を明らかにし、そのメカニズムを検討する。

3. 研究の方法

1) 細胞

ヒト iPS 細胞株 802-3G を Repro CELL 社より購入し、マトリゲル (BD Biosciences) でコートしたディッシュを用いて mTeSR Plus 培地 (Stem Cell Technologies) にて培養した。

2) 脳毛細血管内皮細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞を DMEM/F12 基本培地で 6 日間、Human Endothelial-SFM (HE-SFM; Thermo Fisher Scientific) にレチノイン酸 (Tocris) と FGF2 (PeproTech) を添加した培地で 2 日間培養した後、フィブロネクチン (Fujifilm Wako) および IV 型コラーゲン (Nitta gelatin) コートした基板上へ再播種した。その後 HE-SFM にウシ臍帯血由来血清 (Fujifilm Wako) や A83-01 (Tocris) などを添加した培地で 4 日間くらい培養した (Aoki et al., *Fluids Barriers CNS*, 2020)。

3) SARS-CoV-2 の感染

国立感染症研究所より供与された SARS-CoV-2 オリジナル株 JPN/TY/WK-521 (Pezzotti et al., *Adv Sci (Weinh.)*, 2022) を用い、MOI=1 で細胞培養液へ添加した後、24 時間感染させた。

4) 細胞染色

細胞を 4%PFA で固定後、抗ヌクレオカプシド抗体 (GeneTex)、抗スパイク蛋白抗体 (Abcam)、抗 CD31 抗体 (Abcam)、抗 CLDN5 抗体 (Thermo Fisher Scientific)、抗切断型カスパーゼ 3 抗体 (Cell Signaling Technology) を用いて冷蔵・オーバーナイトで染色を行った。続いて Thermo Fisher Scientific 社の蛍光二次抗体を用いて室温・1 時間反応させた。さらに核を DAPI 染色

した後、コンフォーカル顕微鏡 (Nikon A1) を用いて観察を行い、画像を取得した。

5) 次世代 RNA シーケンス解析

SARS-CoV-2 感染前後の脳毛細血管内皮細胞から抽出した RNA を用いて次世代 RNA シーケンス解析を行い、ウイルス感染により発現が変動する遺伝子を探索した。

6) SARS-CoV-2 RNA コピー数の解析

ウイルス感染後、CellAmp Direct RNA Prep Kit (Takara Bio) を用いて RNA を抽出した。TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher Scientific)、2019-nCoV RUO Kit (Integrated DNA Technologies)、2019-nCoV_N positive control (Integrated DNA Technologies)、QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて qPCR を行った。

7) 脳毛細血管内皮細胞における遺伝子の発現解析

TRIzol 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を用いて RNA を抽出した。QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN)、QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて qPCR を行った。

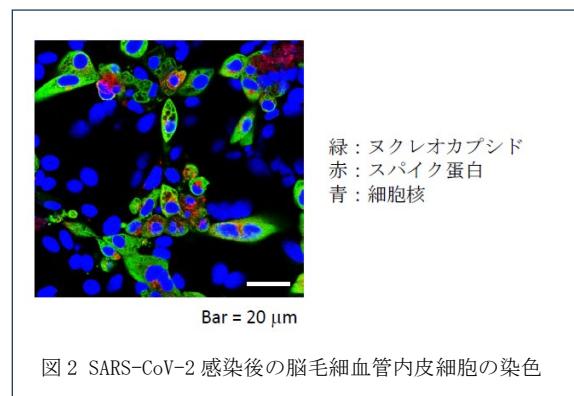
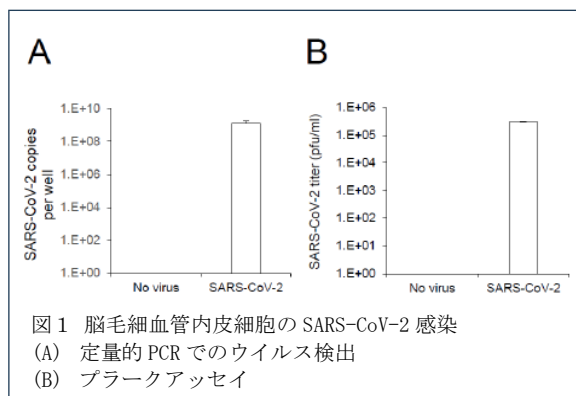
8) 経内皮電気抵抗 (TEER) 測定

TEER は Millicell ERS-2 Voltohmmeter (Millipore) を用いて測定した。空のトランスウェルの測定値をブランクとして差し引いた。

4. 研究成果

1) ヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞における SARS-CoV-2 の感染

まずヒト iPS 細胞から脳毛細血管内皮細胞を作製し、SARS-CoV-2 が感染するのかを検討した。SARS-CoV-2 (オリジナル株) を MOI=1 で 24 時間添加後、細胞より RNA を抽出し、ウイルス RNA プローブを用いて qPCR を行った。その結果、細胞内ウイルス RNA コピー数の顕著な増加が認められた (図 1A)。SARS-CoV-2 添加後の培養上清を用いてプラークアッセイを行った結果、培養上清中のウイルス力価が上昇することも確認できた (図 1B)。SARS-CoV-2 のヌクレオカプシド及びスパイク蛋白に対する抗体を用いて細胞染色を行った結果、SARS-CoV-2 のヌクレオカプシド及びスパイク蛋白の染色像が得られ、約 50% の効率で SARS-CoV-2 が感染することが分かった (図 2)。さらに SARS-CoV-2 スパイク蛋白と脳毛細血管内皮細胞マーカーである CD31 及び CLDN5 との共発現も認められた (図 3)。



次に SARS-CoV-2 の細胞侵入経路を明らかにするために、これまで SARS-CoV-2 受容体の報告がある分子に対する抗体あるいは阻害剤の影響を調べた。ACE2 中和抗体, CD147 抗体 Mep1azumab,

AXL 受容体阻害剤 Bemcentinib, NRP1 受容体阻害剤 EG00229 の影響を検討した。その結果、ウイルス感染は ACE2 中和抗体によってほぼ basal まで阻害されることを見出した (図 4)。一方、他の阻害剤などには影響が認められなかった。

以上より、SARS-CoV-2 は脳毛細血管内皮細胞の ACE2 を介して感染することが示唆された。

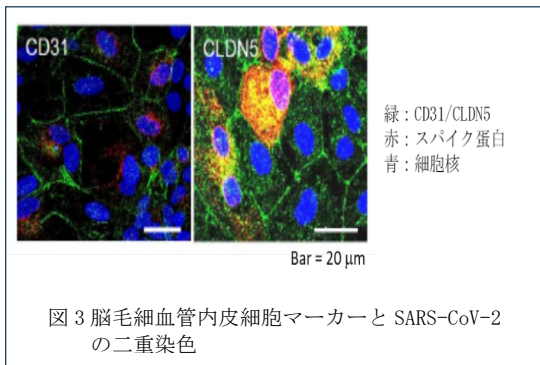


図 3 脳毛細血管内皮細胞マーカーと SARS-CoV-2 の二重染色

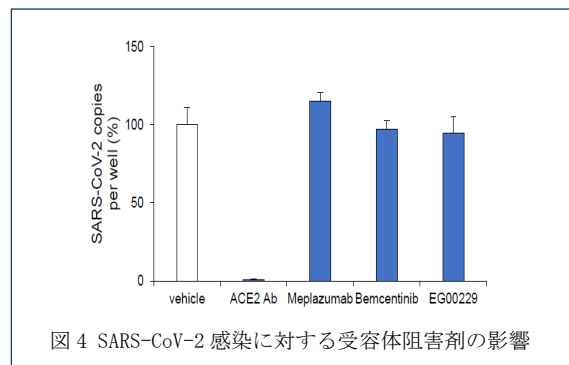


図 4 SARS-CoV-2 感染に対する受容体阻害剤の影響

2) ヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞の機能に対する SARS-CoV-2 感染の影響

SARS-CoV-2 感染による血液脳関門への影響を明らかにするために、感染後の経内皮電気抵抗 (TEER) や炎症応答について調べた。まずヒト iPS 細胞から作製した脳毛細血管内皮細胞において SARS-CoV-2 感染後の TEER を測定した結果、非感染のコントロールと比較して約 30%の低下が認められた (図 5)。

この TEER の低下の要因を明らかにするために感染後に細胞死が起きているかどうかについて調べた。SARS-CoV-2 感染後の細胞をウイルスマーカーであるスパイク蛋白とアポトーシスマーカーである切断型カスパーゼ 3 の抗体を用いて二重染色を行ったところ、わずか一部の感染細胞において切断型カスパーゼ 3 の陽性が認められた (図 6)。しかし、顕微鏡で調べたところ、特に明瞭な細胞の構造変化を認めなかったことから、別のメカニズムが考えられた。

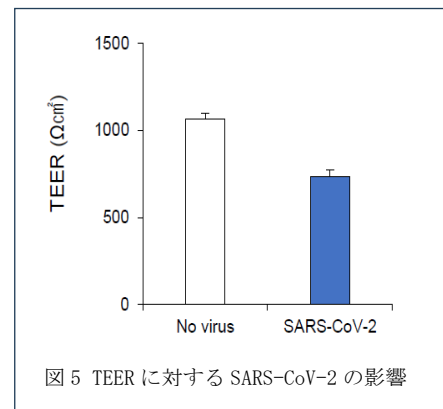


図 5 TEER に対する SARS-CoV-2 の影響

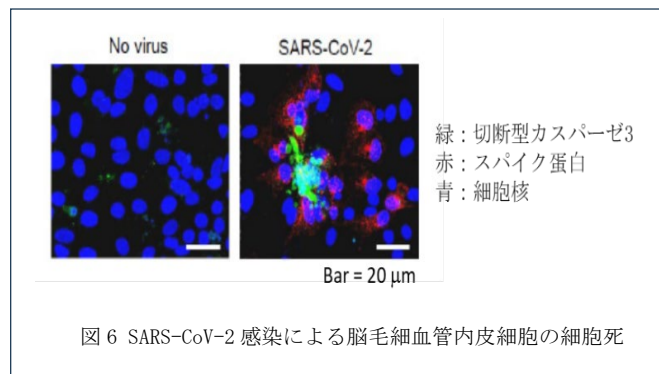


図 6 SARS-CoV-2 感染による脳毛細血管内皮細胞の細胞死

そこで感染後の細胞より RNA を抽出して、脳毛細血管内皮のタイトジャンクションマーカー (CLDN3、CLDN5、CLDN11、CLDN12) の遺伝子発現を調べたところ、感染により、CLDN3 と CLDN11 の発現が低下していることを明らかにした (図 7)。これらの結果から、タイトジャンクションの遺伝子発現低下により TEER の低下が誘導されたと考えられる。

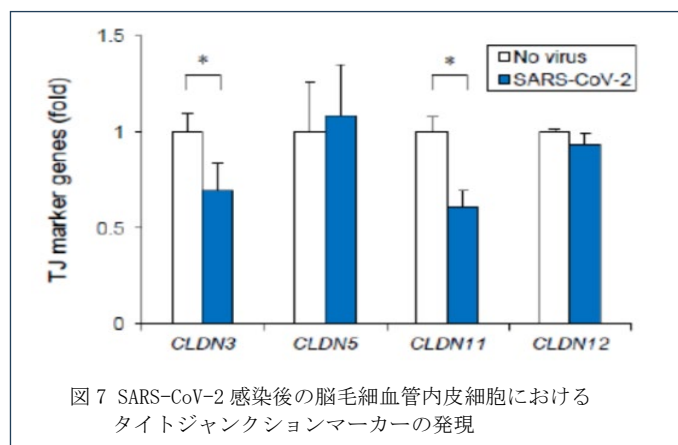


図 7 SARS-CoV-2 感染後の脳毛細血管内皮細胞におけるタイトジャンクションマーカーの発現

次に、SARS-CoV-2 感染後の脳毛細血管内皮細胞における炎症応答について調べた。COVID-19 患者において、SARS-CoV-2 感染により、各種細胞の活性亢進に基づくさまざまなサイトカインの過剰放出（いわゆるサイトカインストーム）が臓器障害を引き起こし、重症化の一つの主要な原因となっている。COVID-19 で血中濃度が上昇することが報告されている

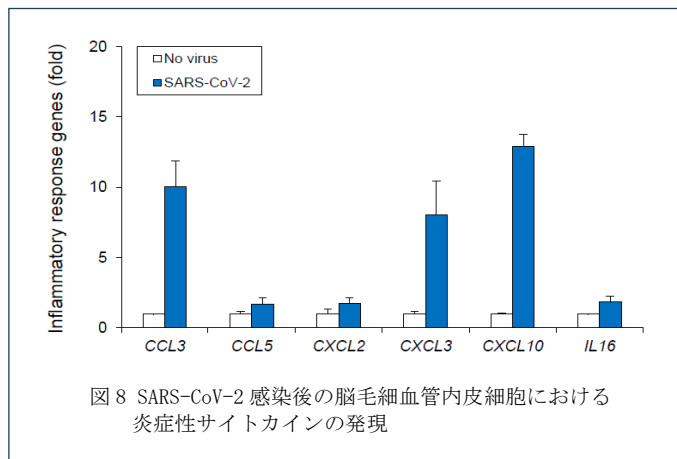


図8 SARS-CoV-2 感染後の脳毛細血管内皮細胞における炎症性サイトカインの発現

液性因子を検討したところ、脳毛細血管内皮細胞の SARS-CoV-2 感染により炎症性サイトカイン CCL3、CCL5、CXCL2、CXCL3、CXCL10、IL16 の発現上昇が認められた（図 8）。

以上より、SARS-CoV-2 感染により脳毛細血管内皮のバリア機能が低下することが示唆された。

3) ヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞におけるウイルス感染経路

ヒト iPS 細胞から作製した脳毛細血管内皮細胞における SARS-CoV-2 感染後のシグナル経路を明らかにするために、ウイルス感染前後の細胞から RNA を抽出し次世代シーケンス解析を行った。SARS-CoV-2 感染した脳毛細血管内皮細胞において、I 型インターフェロンシグナル分子を含むさまざまなインターフェロン関連遺伝子の発現上昇が認められた。

また、NGS データから DAVID による KEGG パスウェイ解析を行い、Wnt 経路がターゲットになることを示した。Wnt 経路の関与を調べるために、GSK3β阻害剤であり Wnt 活性化剤でもある CHIR99021 を用いたところ、用量依存的な感染抑制が認められ、3μM の濃度で細胞内ウイルスコピー数を約 63%低下させた（図 10）。

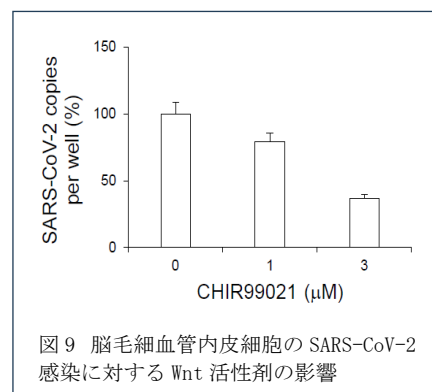


図9 脳毛細血管内皮細胞の SARS-CoV-2 感染に対する Wnt 活性化剤の影響

さらに、感染による炎症応答に対する効果も調べた結果、CHIR99021 によりウイルス感染時の炎症性サイトカイン CCL3、CCL5、CXCL2、CXCL3、CXCL10、IL16 の発現上昇が部分的に抑制された（図 11）。一方、CHIR99021 によりウイルス感染時のタイトジャンクションマーカー CLDN3、CLDN11 の発現低下は回復傾向にあったが、有意差は無かった。また感染後の TEER の低下も CHIR99021 添加で有意に回復しなかった。

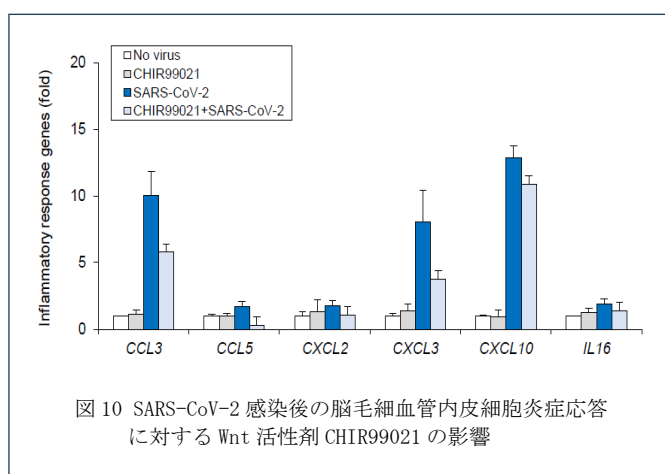


図10 SARS-CoV-2 感染後の脳毛細血管内皮細胞炎症応答に対する Wnt 活性化剤 CHIR99021 の影響

以上の結果より、SARS-CoV-2 感染は Wnt を介して血液脳関門の機能低下を引き起こすことを明らかにした。したがって、ヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞は、COVID-19 の病態解明や創薬に有用な in vitro モデルと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kato Y, Nishiyama K, Man Lee J, Ibuki Y, Imai Y, Noda T, Kamiya N, Kusakabe T, Kanda Y, Nishida M.	4. 巻 24
2. 論文標題 TRPC3-Nox2 Protein Complex Formation Increases the Risk of SARS-CoV-2 Spike Protein-Induced Cardiomyocyte Dysfunction through ACE2 Upregulation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24010102	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 -
1. 著者名 Yamada S, Noda T, Okabe K, Yanagida S, Nishida M, Kanda Y.	4. 巻 149
2. 論文標題 SARS-CoV-2 induces barrier damage and inflammatory responses in the human iPSC-derived intestinal epithelium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 139-146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2022.04.010	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 -
1. 著者名 Kato Y, Nishiyama K, Nishimura A, Noda T, Okabe K, Kusakabe T, Kanda Y, Nishida M.	4. 巻 149
2. 論文標題 Drug repurposing for the treatment of COVID-19	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 108-114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2022.04.007	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 -
1. 著者名 Yamada S, Hashita T, Yanagida S, Sato H, Yasuhiko Y, Okabe K, Noda T, Nishida M, Matsunaga T, Kanda Y.	4. 巻 21
2. 論文標題 SARS-CoV-2 causes dysfunction in human iPSC-derived brain microvascular endothelial cells potentially by modulating the Wnt signaling pathway.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Fluids Barriers CNS	6. 最初と最後の頁 32-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12987-024-00533-9	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11件(うち招待講演 3件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Yasunari Kanda
2. 発表標題 hiPSC-derived neural cells for chemical toxicity evaluation
3. 学会等名 Inaugural International Scientific Conference of the SAAT- SL (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yasunari Kanda
2. 発表標題 Current status and future challenge of developmental neurotoxicity
3. 学会等名 3rd Asian Congress for Alternative to Animal Experiment (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasunari Kanda
2. 発表標題 Development of SARS-CoV-2 infection model using human iPSC
3. 学会等名 The 21st International Congress of the European Society of Toxicology In Vitro (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasunari Kanda
2. 発表標題 Current status and future perspectives of toxicity testing using stem cell-derived 3D models
3. 学会等名 ICT2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satsuka A, Yamada S, Yanagida S, Hayashi S, Asakura H, Nishida M.
2. 発表標題 Development of SARS-CoV-2 infection model using human iPSC-derived cardiomyocytes
3. 学会等名 24th Japan-Korea Joint Seminar on Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 諫田泰成, 西田基宏
2. 発表標題 COVID-19の病態メカニズムに基づく創薬への展開
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 諫田泰成
2. 発表標題 ヒト iPSC 細胞由来分化細胞を用いた SARS-CoV-2 感染モデルの開発
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田茂, 野田隆政, 岡部かおり, 柳田翔太, 西田基宏, 諫田泰成
2. 発表標題 ヒト iPSC 細胞由来小腸上皮細胞を用いた SARS-CoV-2 感染モデルの開発
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 諫田泰成
2. 発表標題 パンデミックの不確実性と創薬
3. 学会等名 第35回 自然科学研究機構シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田茂、坡下真大、柳田翔太、佐藤寛之、安彦行人、岡部馨、野田隆政、西田基宏、松永民秀、諫田泰成
2. 発表標題 SARS-CoV-2感染によるヒト血液脳関門のバリア機能低下
3. 学会等名 第148回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柳田翔太、山田茂、坡下真大、佐藤寛之、安彦行人、岡部馨、野田隆正、西田基宏、松永民秀、諫田泰成
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来脳微小血管内皮様細胞のバリア機能に対するSARS-CoV-2感染の影響
3. 学会等名 フォーラム2023 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	坡下 真大 (Hashi ta Tadahi ro) (20613384)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・講師 (23903)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	山田 茂 (Yamada Shigeru)		

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