

SARS-CoV-2 がヒト心筋細胞に及ぼす影響の解明

肥後修一朗

大阪大学大学院医学系研究科 重症心不全内科治療学共同研究講座

【研究の背景】

SARS-CoV-2 により引き起こされる新興感染症 COVID-19 は全世界にパンデミックを引き起こし、短期間に世界的脅威となった。発生から約2年が経過し、本疾患に関わる多くの臨床データが得られるなかで、SARS-CoV-2 は急性期、及び慢性期に心筋障害を引き起こすことが明らかとなった。COVID-19 入院症例の19.7%に心筋障害が生じ、院内死亡率の独立した危険因子となることが報告され(*JAMA. 2020 Feb 7*)、SARS-CoV-2 による心筋炎発症例の報告が相次いでいる。更に、スパイク(S)タンパク質をコードする mRNA ワクチンの投与により、若年男性において心筋炎を発症することが明らかとなっており、ヒト病態モデルを用いた、SARS-CoV-2 がヒト心筋細胞に及ぼす影響の解明が必要と考え本研究計画を立案した。

【目 的】

iPS 細胞から分化させた心筋細胞を用いて、SARS-CoV-2 がヒト心筋細胞に与える直接の影響を解明することを目的とし、下記に示す3つの項目を目的とし推進した。

- ① ヒト iPS 分化心筋への SARS-CoV-2 感染動態の解明
- ② ゲノム編集を用いた SARS-CoV-2 受容体である ACE2 分子のライブライメーキング
- ③ 遺伝性心筋症疾患 iPS 細胞ライブラリを用いた SARS-CoV-2 感染と心筋症病態との関連の解明

【方 法】

- ① ヒト iPS 分化心筋への SARS-CoV-2 感染動態の解明

iPS 分化心筋を用いて、培地に添加した S タンパク質レセプター結合ドメイン(S-RBD)が心筋細胞に取り込まれるライブライメーキング系を確立する。S-RBD を用いた動態が明らかとなれば、BSL2 設備で実験可能な S-RBD を取り込んだシュードウイルスを用いた感染実験を行う(ウイルス学 本田知之先生との共同研究)。

- ② ゲノム編集を用いた SARS-CoV-2 受容体である ACE2 分子のライブライメーキング

CRISPR/Cas9 ゲノム編集を用いて、ACE2 分子をノックアウトした iPS 細胞、及び ACE2 遺伝子 3' 末端に蛍光タンパク質を挿入したライブライメーキング細胞を樹立する。ゲノム編集は、iPS 細胞に対してプラスミドベクターのエレクトロポレーションにより行う。相同組み換えにより蛍光タンパク質が導入された iPS 細胞をクローン化し、心筋に分化させた後、S タンパク質添加実験を行い、ACE2 の細胞内動態を確認する。

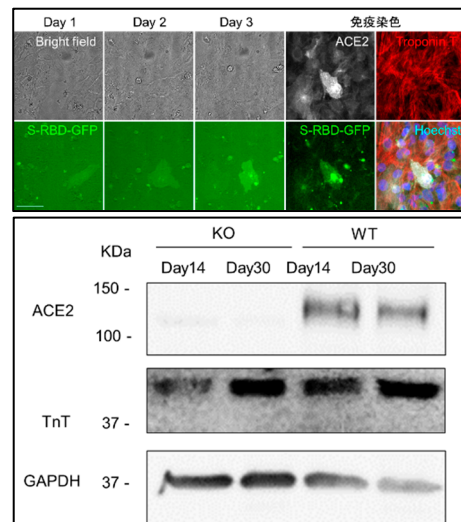
- ③ 遺伝性心筋症疾患 iPS 細胞ライブラリを用いた SARS-CoV-2 感染と心筋症病態との関連の解明

上述の基礎データの取得後に、遺伝性心筋症疾患 iPS 細胞ライブラリから分化させた心筋を用いて、SARS-CoV-2 の感染性と疾患変異との関連を明らかとする。細胞への感染性は、S-RBD タンパク質の取り込みや、ACE2 の動態解析、レポーター遺伝子を組み込んだシュードウイルスの感染実験により評価する。

【結 果】

- ① ヒト iPS 分化心筋への SARS-CoV-2 感染動態の解明
 ② ゲノム編集を用いた SARS-CoV-2 受容体である ACE2 分子のライブイメージング

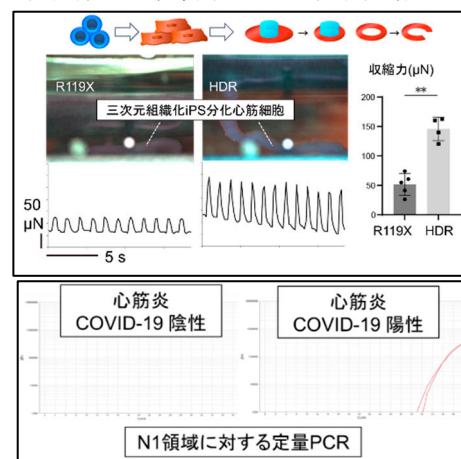
ヒト心筋細胞における S タンパク質の取り込み、細胞内輸送の一連の過程を検出するため、Expi293F システムを用いて、superfolder GFP (sfGFP)を融合させた S-Receptor binding domain (RBD)タンパク質を精製した。作成したタンパク質を心筋症症例から樹立した iPS 分化心筋に添加し、S-RBD が取り込まれる過程のライブイメージング系を確立した(右図上)。また、肥大型心筋症症例より樹立した iPS 細胞に対してゲノム編集を行い、WT 及び ACE2 KO iPS 分化心筋を樹立した(右図中)。iPS 分化心筋において S-RBD が ACE2 と融合し細胞内へ移動する過程を免疫染色にて確認し、更に ACE2KO iPS 分化心筋では S-RBD の取り込みが生じないことを検出し日本循環器学会にて報告した (Modeling of SARS-CoV-2 Spike Protein Internalization in Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes, 第 85 回日本循環器学会学術集会)。S-RBD における予備的知見が得られたため、全長の S タンパク質や L452R、N501Y 等高病原性変異導入タンパク質を作成し同様の実験を行うことを予定している。



- ③ 遺伝性心筋症疾患 iPS 細胞ライブラリを用いた SARS-CoV-2 感染と心筋症病態との関連の解明

重症心不全に移行した拡張型心筋症症例を対象としたゲノム解析、心筋病理解析から、ホモ接合型分子途絶変異によるデスモグレイン 2 欠損心筋症を同定した。本症例から樹立したアイソジェニック iPS 分化心筋細胞を用いた機能解析により、ゲノム編集による変異の修復、またアデノ随伴ウイルスによる遺伝子補充により、心筋収縮力が改善することを見出し報告した (Phenotypic Recapitulation and Correction of Desmoglein-2-deficient Cardiomyopathy using Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes, Hum Mol Genet. 2021 Jul 9;30(15):1384-1397)。他デスモグローム遺伝子変異から iPS 細胞ライブラリを構築しており、介在版機能異常と SARS-CoV-2 心筋障害との関連性の解明を進めていく予定である。

また、2020 年 4 月から、2021 年 11 月の期間において、大阪大学医学部附属病院に救急搬送となった劇症型心筋炎症例のうち、急性期心筋生検により心筋検体を得ることができた 3 症例を対象に、同意を取得の上心筋サンプルを用いた解析を行った。うち 2 症例は COVID-19 陰性、1 症例は COVID-19 陽性であり、うち陽性症例の心筋生検検体から抽出した RNA を用いた定量 PCR により、急性期心筋における SARS-CoV-2 の存在が確認された(右図)。



【考 察】

当初、S-RBD 取り込み過程のイメージングのため、相同組み換えを用いたゲノム編集により、ACE2 遺伝子 3'末端への蛍光タンパク質導入を試みたが、再三のエレクトロポレーションによる遺伝子導入、改変を試みるも相同組み換え株が得られなかった。ACE2 は X 染色体上の遺伝子であり、対象が男性肥大型心筋症から樹立した iPS 細胞のため片アレルからのみの発現であること、また遺伝子座そのものの特性が原因として考えられた。このため、細胞内輸送に関わる遺伝子を蛍光タンパク質との融合タンパク質としてサブクローニングし、AAV を用いた遺伝子導入によるイメージングを試みている。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

新興感染症 COVID-19 は全世界にパンデミックを引き起こし、急性期症状だけでなく多くの慢性期後遺症を惹起し、人類に多大な影響を及ぼしている。COVID-19 による心筋炎発症 (N Engl J Med. 2021 Aug 25)や、罹患後患者における心機

能低下に加え、Spike (S)タンパク質をコードする mRNA ワクチン投与が心筋炎発症に関連する (N Engl J Med. 2021 Aug 25) ことが明らかとなり、COVID-19 蔓延は今後の循環器診療に長期的に大きな影響を及ぼすことが予想される。次々に高病原性変異株が出現しパンデミックの出口が見えない中で、SARS-CoV-2 によるヒト心筋細胞障害モデルの樹立、病態解明は喫緊の課題であり、本研究開発で樹立した病態モデルを用いて、重症心不全との関連から研究を推進していきたい。