

## 新型コロナウイルス感染症の新たな重症化機序の解明

渡邊洋平

京都府立医科大学

### 【研究の背景】

申請者はこれまで、インフルエンザウイルスがヒトに適応する過程で獲得する変異を網羅的に同定するとともに、その宿主適応機構を解明してきた。その中で、季節性インフルエンザウイルスと比較して、ヒトから分離された鳥インフルエンザウイルスはヒト細胞内で多くの mini viral RNA を産生する事象を見出した。このことは、新興ウイルスがヒトに侵入する過渡期において、生体内で mini viral RNA を産生することで過剰の免疫応答を誘導する病態機序の存在を示唆する。興味深いことに、新型コロナウイルスが Vero 細胞で複製する過程でも、短鎖 RNA を産生している先行データを得ている。

### 【目 的】

これらの先行研究結果に基づき、「宿主適応の過渡期にある新型コロナウイルスが、ヒト生体内で mini viral RNA を過剰産生することを介して過剰な免疫応答を誘導する」という仮説を実証する。

### 【方 法】

新型コロナウイルス(以下、SARS-CoV-2)に加えて、ヒトで長期流行してかぜ症状のみを起こすヒトコロナウイルス(HCoV-229E, HCoV-OC43)を比較対象として用いて、以下の実験を実施した。

#### ① 感染細胞中で産生される mini viral RNA の解析

SARS-CoV-2、HCoV-229E、HCoV-OC43 をヒト由来細胞に感染させ、子孫ウイルスの力価がピークとなる感染期に細胞を回収して small RNA (<200nt)と large RNA (>200nt)に分画した。その後、RNA-seq 法により細胞内で合成された mini viral RNA を解読した。

#### ② 感染細胞から放出される mini viral RNA の解析

SARS-CoV-2 をヒト由来細胞に感染させ、①と同時期に培養上清を回収した。その後、エクソソームに特異的な表面マーカーを用いた免疫沈降法によってエクソソームを分画し、RNA-seq 法によりエクソソーム中の mini viral RNA を解読した。

#### ③ mini viral RNA の免疫誘導能の解析

SARS-CoV-2 をヒト由来細胞に感染させ、①と同時期に培養上清を回収した。その後、免疫沈降法によってエクソソームを精製し、含有される mini viral RNA 量を測定した。また①の結果より、SARS-CoV-2 が産生する mini viral RNA の中で代表的な RNA fragment の塩基配列を決定し、この配列を in vitro 転写で合成して合成量を測定した。その後、mini viral RNA をヒト由来細胞に導入し、発現誘導された IFN- $\beta$  を ELISA によって定量した。

## 【結 果】

各リードをコロナウイルスゲノムにマッピングした結果、HCoV-229E、HCoV-OC43 と比較して、SARS-CoV-2 は有意に多くの mini viral RNA をヒト細胞内で産生していた。また RNA fragment の塩基配列を確認したところ、5' ゲノム末端から 63nt をピークとするプラス鎖の mini viral RNA であることが明らかになった。

次に、SARS-CoV-2 が多量産生する mini viral RNA が細胞から放出されたエクソソーム中に存在するか確認した。その結果、細胞内で確認された mini viral RNA と同特性の mini viral RNA がエクソソーム中にも含有されていた。

さらに SARS-CoV-2 感染細胞から精製した mini viral RNA を用いてヒト由来細胞を刺激しようと試みたが、small RNA 分画に多くの host RNA が含まれるために viral RNA に特異的な誘導能を評価することが難しいことが明らかとなった。そこで、代表的な mini viral RNA fragment を in vitro 転写して細胞を刺激させた。その結果、SARS-CoV-2 が産生する mini viral RNA によって強い IFN- $\beta$  誘導が起こることが確認された。

## 【考 察】

新型コロナウイルスがヒト細胞内で過剰産生する mini viral RNA を介して強い IFN- $\beta$  を誘導している事象から、ヒト生体内において過剰な免疫誘導を惹起する要因となっていると考えられた。また、この異常な RNA がエクソソームによって細胞外に放出されることから、ウイルス感染自体に加えて、エクソソームを介して感染巣以外の臓器でも炎症が惹起される可能性が示唆された。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

今後は COVID-19 感染患者血中から mini viral RNA が検出されるかを確認するとともに、重要度との関連性を評価する臨床試験を実施予定である。mini viral RNA と重要度に相関性が確認された場合、SARS-CoV-2 感染症の新しい重症化マーカーになる可能性がある。

## 【参考・引用文献】

現在、上記の結果に関する論文を学術誌に投稿中である。