

COVID-19 関連中枢神経障害に対する治療薬の開発研究

加瀬義高

慶應義塾大学医学部 生理学教室

【研究の背景及び目的】

COVID-19 は中枢神経系 (CNS) 障害を引き起こすことが報告されており (Mao et al., 2020; Kase et al., 2021)、脳炎、壊死性脳症 (Poyiadji et al., 2020)、認知機能障害 (Becker et al., 2021) などの臨床所見を有する。神経系の後遺症としては、ブレインフォグ (米国疾病対策センター) (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/clinical-care/post-covid-conditions.html>) などがあり、その臨床的特徴は多岐にわたる。COVID-19 による全身性の炎症や免疫細胞の異常動態は、このような神経障害と関連しているが (Hojyo et al., 2020)、SARS-CoV-2 が CNS の細胞に直接感染するかどうかはまだ十分に分かっていなかった。

そこで、本研究では COVID-19 関連神経障害の治療薬を創薬する目的のために、そもそも SARS-CoV-2 がニューロンをはじめとする中枢神経系の細胞へ感染するかどうかの実験を行った。SARS-CoV-2 などの RNA ウイルスは常に変異しており、この変異を反映して COVID-19 の臨床像は変化するが、変異ウイルスの CNS の細胞への感染性がどのように変化するのかが不明であり、実臨床を考慮した際にはこの点が重要になる。

また、CNS の細胞はニューロンだけでなく複数の細胞種から構成されているため、ウイルスが直接神経障害を引き起こしているかどうかを検証するためには、様々な細胞種を準備する必要がある。しかし、CNS の細胞は実験のためにヒトの脳から直接採取することはできないため、従来の方法では困難であった。

近年、human induced pluripotent stem cells (hiPSC) からニューロンだけでなく、他の CNS の細胞を誘導する方法が開発され、さらに、3次元培養法であるブレインオルガノイドの作製が可能になった。ここでは、当グループが開発した誘導法を用いて、hiPSC から大脳皮質ニューロン (Sato et al., 2021)、アストロサイト (Leventoux et al., 2020)、ミクログリア (Sonn et al., 2022)、脳オルガノイドの作製を行い、SARS-CoV-2 のオリジナル株と Delta 変異体、Omicron 変異体との感染力の違いを検討した。

【方 法】

hiPSC の培養

hiPSC 株 (CiRA; 京都大学) は、マイトマイシン C 処理した SNL マウス線維芽細胞フィーダー細胞とともに、0.5% ペニシリン-ストレプトマイシン (Nacalai Tesque, 26253-84) および 4ng/ml FGF-2 (PeproTech, 100-18B) 含有 standard human embryonic stem cell (hESC) 培養液 (Reprocell, RCHEMD001) で、5% の二酸化炭素下で培養された。

ニューロンの作成

hiPSC (201B7) を $3 \mu\text{M}$ SB431542 (Tocris, 301836-41-9) および 150nM LDN193189 (StemRD, 1062368-24-4) で 6 日間前処理した。その後、細胞を解離させ、ビタミン A を含まない 2% B27 サプリメント (Thermo Fisher, 17504-044) を添加したホルモンミックス (MHM)、 20ng/ml FGF-2、 $10 \mu\text{M}$ Y27632 (Nacalai Tesque, 08945-71)、 $1 \mu\text{M}$ retinoic acid (RA) (Sigma, R2625-1G) からなる神経細胞誘導培地で ultra low dish (Corning) に 1×10^5 細胞/mL の密度で播種させた。 $3 \mu\text{M}$ CHIR 99021 (Reprocell, 04-0004) および $10 \mu\text{M}$ SB431542 (Calbiochem, 301836-41-9) を 4% O₂, 5% CO₂ 条件下で 6 日間培養した。形成された neurosphere を単細胞に解離することにより継代し、神経細胞誘導培地、ビタミン A を含まない 2% B27、

20ng/ml FGF-2、10 μ M Y27632 および 1 μ M RA を補充した MHM で 4%O₂(低酸素)条件下で 6 日間培養を行った。

アストロサイトの形成

本研究では、フィーダーフリー-hiPSC から、既報のアストロサイト分化プロトコル (Leventoux et al., 2020) を使用して、アストロサイトを作成した。

ミクログリアの形成

hiPSC からのミクログリア分化の詳細は、Sonn et al., 2022 にまとめられている。GeneJuice (Sigma-Aldrich, 70967) と Opti-MEM medium (Gibco™, 31985070) を用いて、ドキシサイクリン誘導性 PU.1-overexpression クローン hiPSCs を樹立した。次に、iPSC からのミクログリア細胞の作製を 2 段階に分けて行った。まず、hiPSC から造血前駆細胞を作製した (hiHPCs; ~ 18 日目)。複数のサイトカインと化学物質 (BMP4 (PEPROTECH)、CHIR99021 (Focus Biomolecules)、VEGF (Thermo Fisher Scientific)、FGF2 (PEPROTECH)、SCF (PEPROTECH)、IL-3 (PEPROTECH)、IL-6 (PEPROTECH) および IWR-1e (Thermo Fisher Scientific)) が供給された改変 StemPro™-34 SFM (1X) (Gibco™, 10639011) の培地で、造血前駆細胞を生成した。6 日目~18 日目の間、培地にドキシサイクリン (1 μ g/ml) を添加した。

次に、5 種類のサイトカイン (100 ng/ml IL-34, 50 ng/ml TGF β 1, 25 ng/ml M-CSF, 100 ng/ml CD200, 100 ng/ml CX3CL1, すべて PEPROTECH) を添加した修正 DMEM/F12 (1:1, Gibco™) 中でミクログリア様細胞を hiHPCs から分化させた (19 日~)。

脳オルガノイドの作製

STEMdiff Cerebral Organoid Kit (STEMCELL Technologies, ST-08570) のプロトコルに基づき、大脳オルガノイドを作製した。このプロトコルは、Lancaster らの先行研究 (Lancaster et al., 2013) を参考に考案された。0 日目に、hiPSC (414C2) を EB 形成培地 (Y27632 (ナカライテスク, 08945-71) 入り) に 9.0×10^4 /mL の密度で懸濁させた。合計 100 μ l の細胞懸濁液を 96 ウェル超低密着性プレート (9000 細胞/ウェル) に播種し、37°C、5%CO₂ の加湿雰囲気下でインキュベートした。2 日目と 4 日目に EB 形成用培地 (w/o Y27632) 100 μ l を添加した。5 日目に誘導培地と交換し、48 時間培養した。7 日目以降、オルガノイドを Matrigel Matrix (Corning, 356230) に包埋した。同日、溶液を Expansion Medium に交換し、オルガノイドを 72 時間培養した。10 日目からは、プレートをオービタルシェーカーで振盪し、オルガノイドを Maturation Medium で培養した。培地は 30 日目まで 4 日おきに交換した。

シュードタイプレンチウイルスの作製

SARS-CoV-2_S シュードタイプレンチウイルス、SARS-CoV-2_S (B.1.617.2 var/Delta) シュードタイプレンチウイルス、および SARS-CoV-2_S (B.1.1.529, Omicron) シュードタイプレンチウイルスは VectorBuilder によって合成された。蛍光レポーターとして EGFP を EF1a プロモーター下に挿入した (pLV-EF1a-EGFP)。

免疫染色

免疫染色のために、サンプルはポリ-L-オルニチン/フィブロネクチンでコートしたチャンバースライドグラスまたは 12 ウェルプレートにプレーティングし、4% PFA にて室温で 30 分間固定した。PBS で 3 回洗浄し、0.3% Triton X-100/PBS で 5 分間、室温で透過処理した。ブロッキングワン (Nacalai Tesque, 03953-95) で室温で 15 分間ブロッキングした後、スライドを以下の抗体とともに 4°C で一晩インキュベートした。マウス抗 β -III tubulin (Sigma-Aldrich, T8660-2ML; 1:500)、マウス抗 Nestin (Merck Millipore, MAB5326; 1:500)、ラット抗 GFAP、ウサギ抗 Iba1 (FUJIFILM, 019-19741; 1:500)。PBS で 3 回洗浄後、Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific, A-11034)、Alexa 555 (Thermo Fisher Scientific, A-21424; 1:500)、Alexa 555 (Thermo Fisher Scientific, A-21434; 1:500) または Alexa 555 (Thermo Fisher Scientific, A-21428; 1:500) を室温で 60 分間染色し、Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, B2883; 10 μ g/ml) で対比染色を施した。FLUOVIEW FV3000 (OLYMPUS) と LSM700 (Carl Zeiss) を用いて観察した。

【結 果】

SARS-CoV-2 は大脳皮質ニューロンにはほとんど感染しなかった

脳を構成する細胞には、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア、ペリサイトなどがある。我々はまずニューロンに着目した。SARS-CoV-2 がニューロンに直接感染することを示す様々な報告がある一方、ニューロンに直接感染しないとの報告もある(Meinhardt et al, 2021; Andrews et al, 2021; Crunfli et al, 2022)。そこで、hiPSC (Okita et al., 2011) から大脳皮質ニューロンを作製し、SARS-CoV-2 の感染性を検討した。

日本では SARS-CoV-2 を直接取り扱うにはいくつかの法的障壁があったため、SARS-CoV-2 のシュードタイプレンチウイルスを準備した。レンチウイルスのエンベロープに VSV-G の G タンパクの代わりに SARS-CoV-2 の S タンパクを発現させ、CNS の細胞への感染力を評価した。

さらに変異ウイルスの CNS の細胞への感染能力の変化を評価するため、世界で最初に報告された SARS-CoV-2 株(原株) (Wu et al, 2020)、いわゆる Delta 変異体(B.1.617.2 株) (Cherian et al, 2021; Planas et al, 2021)、Omicron 変異体(B.1.1.529 株) (Schmidt et al, 2022)に基づいて3種類のシュードタイプレンチウイルスを作製した。各 SARS-CoV-2 株のバリエーション S タンパク質は、VSV-G の代わりにこれらのレンチウイルスのエンベロープで発現させた。感染の指標として蛍光タンパク質レポーターEGFP を EF1a プロモーターのもとで用いた。また、我々のグループは以前、hiPSC から汎ニューロンではなく、大脳皮質ニューロンを作製したことを報告しており(Sato et al., 2021)、その手法を用いた。

hiPSC から作製したニューロンは、これらのシュードタイプレンチウイルスに感染させた(MOI:3)。翌日、培地をウイルスフリー培地に交換し、2日間の培養後にサンプルを固定し、免疫染色を行ったが、EGFPを発現する β -III-tubulin ニューロンは試料中に認められなかった。

SARS-CoV-2 のオリジナル株、Delta 変異体、Omicron 変異体は皮質ニューロンに感染することが困難であった。

SARS-CoV-2 はアストロサイトにほとんど感染しなかった

アストロサイトはニューロンの支持細胞として働き、近年、アストロサイトはニューロンネットワークの健全な機能に不可欠であると認識されている(Sofroniew et al., 2015年)。アストロサイトと疾患を関連付ける報告もあるため(Kidana et al., 2018)、各レンチウイルスのアストロサイトへの感染能を検討した。

アストロサイトをヒトの脳から直接採取することは困難であるため、実験には hiPSC からアストロサイトを誘導・作成した。我々のグループは以前、hiPSC からアストロサイトを高効率で作製することを報告し(Leventoux et al., 2020)、この技術を利用した。ニューロン実験と同様に、各シュードタイプレンチウイルスをアストロサイトに添加し(MOI:3)、サンプルを固定した後、アストロサイトマーカーであるGFAPとEGFPの発現量を確認した。実験の結果、いずれのシュードタイプレンチウイルスを添加しても、GFAP陽性細胞でEGFPを発現する細胞は認められなかった。

SARS-CoV-2 は脳オルガノイド内の神経幹細胞/前駆細胞 (Neural stem/progenitor cell; NS/PC) にほとんど感染しなかった

次に、各レンチウイルスのNS/PCへの感染性を調べるために、3次元培養による脳オルガノイドを作製した。脳オルガノイドは30日間培養した後、パラフィン切片を作製し、免疫染色を行った。

NS/PCのマーカーとしてNestin(Kase et al, 2019)を用い、各レンチウイルスに感染しているかどうかを調べたが、Nestin陽性細胞ではEGFPは発現していなかった。

SARS-CoV-2 は効率的にミクログリアに感染した

最後に、これらウイルスがミクログリアに感染する能力を調べた。ミクログリアはhiPSCから生成した(Sonn et al, 2022)。すると、ニューロン、アストロサイト、NS/PCを用いた実験とは異なり、シュードタイプレンチウイルスのレポーターであるEGFPがIba1陽性ミクログリアで発現していることがわかった。オリジナル株、Delta 変異株、Omicron 変異株のシュードタイプレンチウイルスは、ほぼすべてのIba1陽性ミクログリアに感染し、変異株間の感染性に差はなかった。

DPP4 は、CNS の細胞における SARS-CoV-2 の受容体として極めて重要な役割を担っている可能性がある

次に、それぞれのウイルスがなぜミクログリアのみに感染することができるのかを検討した。Andrewsらは、脳オルガノイドにおける SARS-CoV-2 の感染性を調べ、SARS-CoV-2 はニューロンに感染しにくい、dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) や CD147 を高発現するアストロサイトには感染することを報告した (Andrews et al., 2022)。さらに、アンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) は CNS に全く存在しないわけではないが、その発現量は低く、DPP4 と CD147 がコア受容体であるという結論に至った。

我々の実験系において、ACE2、DPP4、CD147 の発現をトランスクリプトームレベルで調べたところ、ACE2 はニューロン、NS/PC、アストロサイト、ミクログリアにおいて非常に低いレベルで発現していた。CD147 をコードする遺伝子である Basigin (BSG) は、すべての細胞で高レベルで発現しており、平均 TPM 値は約 20,000 を超えていた。しかし、DPP4 はミクログリアにおいて他の細胞よりも有意に高い値を示した。非ミクログリア細胞では、その発現は低かった。これらの結果から、DPP4 は、SARS-CoV-2 感染が中枢神経系の細胞で成立するか否かが必須の因子であることが示唆された。

【考察及び臨床的意義・臨床への貢献度】

COVID-19 は CNS に障害を与えるが、SARS-CoV-2 が直接 CNS の細胞に感染して毒性を発揮するかどうかを検証することは、治療戦略を開発する上で極めて重要である。

これまで、剖検脳、2次元培養、オルガノイドを用いた多くの研究が行われてきたが、これらの研究の多くは、SARS-CoV-2 のニューロンへの直接感染性に関して否定的な結果を報告している。今回の結果は、この結論を支持するものである。しかし、ウイルスの S タンパク質に変異があると、ミクログリアを含む CNS の細胞への感染能が変化するかどうかについてはよくわかっていなかった。

以前報告したように、SARS-CoV-2 の受容体である ACE2 は、脳の部位によって程度や量は異なるものの、ニューロンで発現はしている (Kase et al., 2020) し、低い ACE2 の発現は、アストロサイトや、ミクログリアにも認められる。Andrews らは、CNS における SARS-CoV-2 の受容体候補として、DPP4 と CD147 を示した (Andrews et al., 2022)。我々のミクログリアにおける DPP4 と CD147 の高い発現、および DPP4 の発現が低いニューロン、アストロサイト、NS/PC にシュードタイプレンチウイルスが感染できないことを考慮すると、MERS-CoV の受容体として機能する DPP4 は、CNS において SARS-CoV-2 の受容体として重要な役割を果たすと思われる。

脳実質で唯一の免疫担当細胞であるミクログリアは、COVID-19 によって異常に活性化されることが報告されており (Kishimoto-Urata et al., 2022)、SARS-CoV-2 がミクログリアに直接感染することができれば、より直接的にミクログリアの異常活性化を引き起こすことが予想される。Jeong ら (2022) は、ミクログリア cell line を用いて、SARS-CoV-2 がミクログリアに感染し、細胞死まで引き起こすことを明らかにしている。本研究では、SARS-CoV-2 の変異体 (Delta 変異体、Omicron 変異体) でもミクログリアに感染し、その感染効率に変化がないことを実証した。

一般に、ウイルス性疾患は、ヒトへの感染力が強い変異体でかつ、毒性の低い変異体が広まると考えられているが、この実験から、SARS-CoV-2 のミクログリアへの感染力は SARS-CoV-2 が出現当初から高いことが示唆された。このことが、SARS-CoV-2 出現時に COVID-19 関連の中枢神経疾患が多く報告された理由である可能性もある。

研究の限界

Andrews らは、皮質スライス培養と脳オルガノイドを用いて、アストロサイトが SARS-CoV-2 感染の主要な標的であることを報告した。それにもかかわらず、我々が作製したアストロサイトは、偽タイプのレンチウイルスに感染せず、DPP4 の発現量も低かった。この発現量と感染力の差の原因は、アストロサイトの作製方法の違いにあると思われる。我々が用いた hiPSC から転写因子を用いずにアストロサイトを誘導する手法では、ヒトの脳に存在するアストロサイトの特徴を全て反映できていない可能性がある。本手法では転写因子を導入せずにアストロサイトを作製しているため、DPP4 などの発現が実際のヒト脳内のアストロサイトの発現と一致しない可能性がある。一方、転写因子を導入したミクログリアと、成人ヒトのミクログリアの RNA-seq データと比較したところ、DPP4 の発現は同程度であった。

また、実験ではシュードタイプレンチウイルスを用いたため、変異による感染効率の変化は確認できたが、病原性の変化は確認できなかった。

【参考・引用文献】

- Andrews MG, Mukhtar T, Eze UC, et al. Tropism of SARS-CoV-2 for human cortical astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119(30):e2122236119.
- Becker JH, Lin JJ, Doernberg M, et al. Assessment of Cognitive Function in Patients After COVID-19 Infection. *JAMA Netw Open*. 2021;4(10):e2130645.
- Cherian S, Potdar V, Jadhav S, et al. SARS-CoV-2 Spike Mutations, L452R, T478K, E484Q and P681R, in the Second Wave of COVID-19 in Maharashtra, India. *Microorganisms*. 2021;9(7):1542. Published 2021 Jul 20.
- Crunfli F, Carregari VC, Veras FP, et al. Morphological, cellular, and molecular basis of brain infection in COVID-19 patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119(35):e2200960119.
- Hojyo S, Uchida M, Tanaka K, et al. How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality. *Inflamm Regen*. 2020;40:37.
- Jeong GU, Lyu J, Kim KD, et al. SARS-CoV-2 Infection of Microglia Elicits Proinflammatory Activation and Apoptotic Cell Death. *Microbiol Spectr*. 2022;10(3):e0109122.
- Kase Y, Okano H. Neurological pathogenesis of SARS-CoV-2 (COVID-19): from virological features to clinical symptoms. *Inflamm Regen*. 2021;41(1):15.
- Kase Y, Otsu K, Shimazaki T, Okano H. Involvement of p38 in Age-Related Decline in Adult Neurogenesis via Modulation of Wnt Signaling. *Stem Cell Reports*. 2019;12(6):1313-1328.
- Kidana K, Tatebe T, Ito K, et al. Loss of kallikrein-related peptidase 7 exacerbates amyloid pathology in Alzheimer's disease model mice. *EMBO Mol Med*. 2018;10(3):e8184.
- Kim, D., Paggi, J.M., Park, C. et al. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol* 37, 907-915 (2019).
- Kishimoto-Urata M, Urata S, Kagoya R, et al. Prolonged and extended impacts of SARS-CoV-2 on the olfactory neurocircuit. *Sci Rep*. 2022;12(1):5728.
- Leventoux N, Morimoto S, Imaizumi K, et al. Human Astrocytes Model Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *Cells*. 2020;9(12):2680. Published 2020 Dec 13.
- Mao L, Jin H, Wang M, Hu Y, Chen S, He Q, et al. Neurologic manifestations of hospitalized patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China [published online ahead of print, 2020 Apr 10]. *JAMA Neurol*. 2020:e201127.
- Meinhardt J, Radke J, Dittmayer C, et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci*. 2021;24(2):168-175.
- Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K.I., et al. (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 8, 409-412.
- Planas D, Veyer D, Baidaliuk A, et al. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature*. 2021;596(7871):276-280.
- Poyiadji N, Shahin G, Noujaim D, Stone M, Patel S, Griffith B. COVID-19-associated acute hemorrhagic necrotizing encephalopathy: CT and MRI features [published online ahead of print, 2020 Mar 31]. *Radiology*. 2020:201187.
- Sato T, Imaizumi K, Watanabe H, Ishikawa M, Okano H. Generation of region-specific and high-purity neurons from human feeder-free iPSCs. *Neurosci Lett*.
- Schmidt F, Muecksch F, Weisblum Y, et al. Plasma Neutralization of the SARS-CoV-2 Omicron Variant. *N Engl J Med*. 2022;386(6):599-601.
- Sonn I, Honda-Ozaki F, Yoshimatsu S, Morimoto S, Watanabe H, Okano H. Single transcription factor efficiently leads human induced pluripotent stem cells to functional microglia. *Inflamm Regen*. 2022;42(1):20. Published 2022 Jul 1.
- Sofroniew MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation [published correction appears in *Nat Rev Neurosci*. 2015 Jun;16(6):372]. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(5):249-263.

- Wu F, Zhao S, Yu B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China [published correction appears in Nature. 2020 Apr;580(7803):E7]. Nature. 2020;579(7798):265-269.