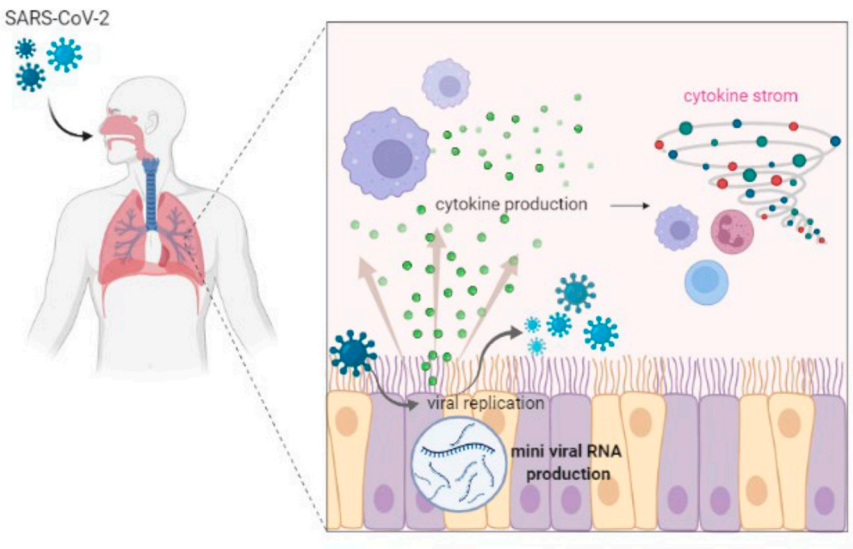
128　短鎖　viral　RNAに着目したCOVID-19重症化機序の解明	荒井　泰葉

【目的】自然界には様々な病原ウイルスが存在し、それぞれが特有の宿主をもつ。ウイルスはその進化の過程で変異を繰り返しており、変異の蓄積により時に特有の宿主と異なる新しい宿主への感染性を獲得する。現在ヒトで流行する季節性コロナウイルスや季節性インフルエンザウイルスも従来はラクダや水菌類などの野生動物を起源とし、長い間ヒトで流行する過程で完全なヒト適応性を獲得し、ヒトへの病原性や致死率を低下させた。一方で新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）や新型インフルエンザウイルスのように新興ウイルスがヒトにおいて初めて検知された際、ウイルスは本来の宿主からヒト宿主への適応過程の過渡期にあるため、ウイルスによるヒトへの病原性は高い傾向にある。現在世界で流行する SARS-CoV-2 は、重症肺炎・血栓症を伴うサイトカインストームによって重症化病態を引き起こす特徴をもつ。しかし、現在までに当該重症化メカニズムに関わるウイルス学的要因は解明されていない。本研究では SARS-CoV-2 がヒト宿主への適応過渡期の新興ウイルスである点に着目して、一般的な風邪を引き起こすウイルスである季節性コロナウイルスと比較することによりその重症化メカニズムを解明することを目的とした。

【方法】サイトカイン産生を誘導するウイルス側の因子を探索するべく、SARS-CoV-2 が産生する 200 nt 未満の RNA に着目し、SARS-CoV-2 又は季節性コロナウイルス感染細胞から抽出した 200 nt 未満の RNA を small-RNA sequence により解析した。当該解析結果に基づき、SARS-CoV-2 が感染細胞内で産生する不完全なウイルス RNA（短鎖 viral RNA）配列を同定し、当該配列を模した RNA を *in vitro* transcription（IVT）により合成した。IVT-RNA を細胞にトランスフェクションし、培養上清中のサイトカイン量を測定することにより RNA 配列及び長さによるサイトカイン誘導能の違いを検証した。さらに、これまで出現している SARS-CoV-2 変異株による短鎖 viral RNA の産生性を real time PCR により測定し産生量を比較した。

【結果】SARS-CoV-2 は季節性コロナウイルスと比較して多量に短鎖 viral RNA を細胞内に蓄積していた。これらの SARS-CoV-2 由来短鎖 viral RNA は細胞質内の RNA センサーに結合し、サイトカイン産生を誘導した。また、興味深いことに SARS-CoV-2 Wuhan 株及び Delta 株は短鎖 viral RNA の高い産生性を保有するにもかかわらず、SARS-CoV-2-Omicron 株においては当該 RNA の産生性は低い傾向にあった。

SARS-CoV-2 が産生する短鎖 viral RNA とサイトカイン産生



128. 短鎖 viral RNA に着目した COVID-19 重症化機序の解明

荒井　泰葉

京都府立医科大学 大学院医学研究科 感染病態学教室

Key words：COVID-19, サイトカインストーム

緒　言

自然界には様々な病原ウイルスが存在し、それぞれが特有の宿主をもつ。ウイルスはその進化の過程で変異を繰り返しており、変異の蓄積により時に新たな宿主への感染性を獲得する。新型インフルエンザウイルスや新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）は元来野生動物内で維持されていたにもかかわらず、変異獲得後ヒトへの感染性を獲得することで出現した。このように我々は常に新興ウイルス感染症出現の脅威にある。ヒトの中で長期間流行することにより完全なヒト適応性を獲得している季節性ウイルスと異なり、新興ウイルスはまさにヒト宿主への適応過渡期にある。そのため従来利用していた宿主の host factor とは異なるヒトの host factor を利用して複製する必要があり、ウイルスポリメラーゼ蛋白質とヒト host factor 間の不適合性による複製のエラーが生じやすいと推測される。

SARS-CoV-2 が引き起こす新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は重症肺炎及び血栓症を伴うサイトカインストームをその病態の特徴とする。本研究では新興ウイルスである SARS-CoV-2 ウイルスがゲノム複製過程のエラーによって生じうる不完全なウイルス RNA（短鎖 viral RNA）に着目し、このエラーRNA によるサイトカイン誘導性を検証することを糸口とした COVID-19 の重症化機序を解明することを目的とした。

方法および結果

1. ヒト細胞内における SARS-CoV-2 及び季節性コロナウイルス由来短鎖 viral RNA 産生性評価

ヒト由来細胞（Calu-3 及び HCT-8 細胞）にそれぞれ SARS-CoV-2 Wuhan 株、季節性コロナウイルス（OC43）を感染させ、感染力価ピーク時に感染細胞を回収して、RNA を抽出した。RNA は 200 nt 未満及び 200 nt 以上の分画に分けて精製し、これらのうち 200 nt 未満の RNA を細胞由来 miRNA 量の減少とウイルス由来 RNA の三リン酸基のモノリン酸化を目的として、XRN-I 及び RPPH 酵素で処理後に、small RNA sequence により解析した。興味深いことに、SARS-CoV-2 は他の季節性コロナウイルスと比較して顕著に多量の短鎖 viral RNA を産生しており、その長さのピークは 61～70 b に分布していた（図 1）。

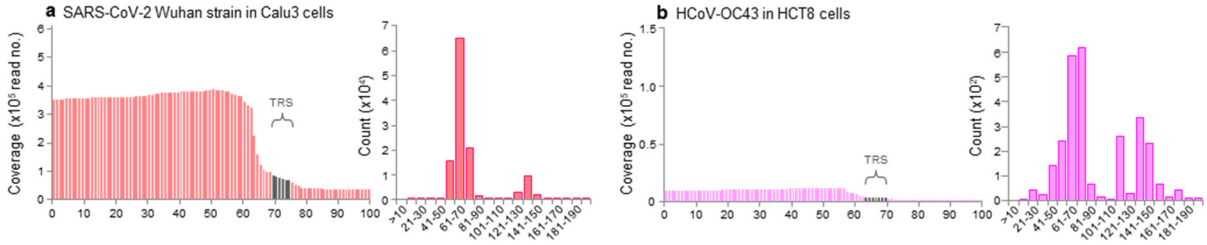


図 1. SARS-CoV-2 は季節性コロナウイルスと比較して短鎖 viral RNA を多く産生する

左パネル）コロナウイルスが産生する短鎖 viral RNA の read map。リードはウイルスの positive sense RNA にマップしている。

右パネル）コロナウイルスが産生する短鎖 viral RNA 長の分布。

2. SARS-CoV-2 由来短鎖 viral RNA のサイトカイン誘導能評価

Small-RNA-sequence の結果をもとに SARS-CoV-2 が産生する短鎖 viral RNA の代表配列（5’ 末端領域の 40 nt、60 nt、80 nt 及び 100 nt の配列）を選出し、これらの配列をもとに *in vitro* transcription（IVT）により RNA を合成した（IVT-RNA）。SARS-CoV-2 由来短鎖 viral RNA によるサイトカイン誘導能を評価するため、これら IVT-RNA を 293T 及び THP-1 細胞にトランスフェクションし、細胞培養上清中に分泌される IFN-β及び IL-6 量を測定した。40 nt 長の IVT-RNA を除き、60 nt、80 nt 及び 100 nt 長の IVT-RNA は両サイトカインの産生を強く誘導した（図 2a）。これら IVT-RNA の CIP 処理及び CAP-1 付加は、IVT-RNA によるサイトカイン誘導性を消失させた。さらに、IVT-RNA をトランスフェクションした細胞を double-stranded RNA（dsRNA）検出抗体（J2 抗体）を用いて免疫染色すると、60 nt、80 nt 及び 100 nt 長の RNA をトランスフェクションした細胞において、蛍光が観察された（図 2b）。これらの解析結果より、5’末端における三リン酸基及び RNA の二次構造が SARS-CoV-2 由来短鎖 viral RNA によるサイトカイン誘導に重要であることが示唆された。

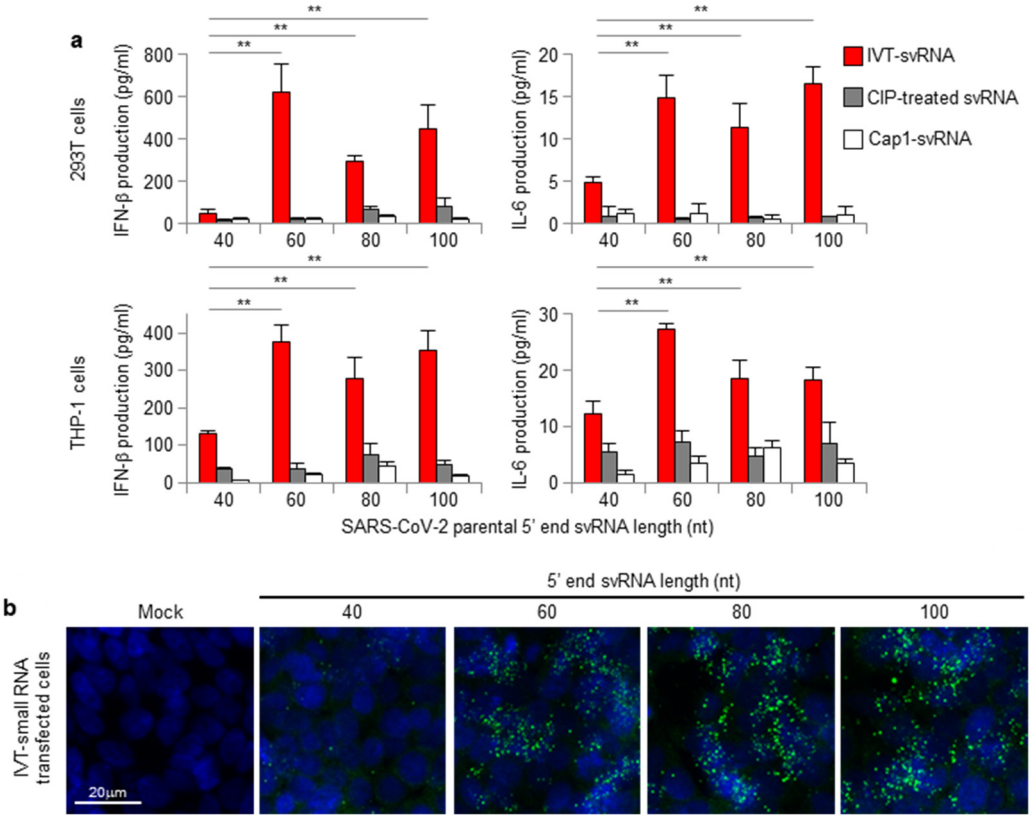


図 2. SARS-Cov-2 由来短鎖 viral RNA はサイトカイン産生を誘導する

a) 293T 細胞及び THP-1 細胞における SARS-CoV-2 由来短鎖 viral RNA の IFN-β及び IL-6 の産生誘導性。**$P<0.01$（Tukey’s multiple comparison test）。

b) SARS-CoV-2 由来短鎖 viral RNA をトランスフェクションした 293T 細胞における dsRNA の検出（スケールバー：20μm）。

3. SARS-CoV-2 由来短鎖 viral RNA の RIG-I による認識評価

SARS-CoV-2 ウイルスゲノムは細胞質内で転写・複製することから、ウイルスゲノム複製過程で産生される短鎖 viral RNA は細胞質内に蓄積されると推察される。そこで細胞質に存在する RNA 認識機構である RIG-I 及び MDA-5 を siRNA によりそれぞれ knock down し、当該機構による短鎖 viral RNA の認識とサイトカイン誘導性の関連を評価し

た。MDA-5 knock down 細胞におけるサイトカイン産生量と比較し、RIG-I knock down 細胞においては短鎖 viral RNA を模した IVT-RNA によるサイトカイン産生量が優位に減少した。このことから、SARS-CoV-2 由来短鎖 viral RNA は主に RIG-I 機構によって認識され、サイトカイン産生を誘導していることが示唆された（図 3a）。また、SARS-CoV-2 Wuhan 株感染細胞を溶解後、RIG-I 抗体により免疫沈降し、当該共沈産物より抽出した 200 nt 未満の RNA を図 1 同様に small RNA-sequence により解析した。その結果、図 1 で検出された短鎖 viral RNA と同様の配列及び長さの RNA が本解析においても検出された（図 3b）ことから感染細胞中においても短鎖 viral RNA は特異的に RIG-I に認識されていることが確認された。

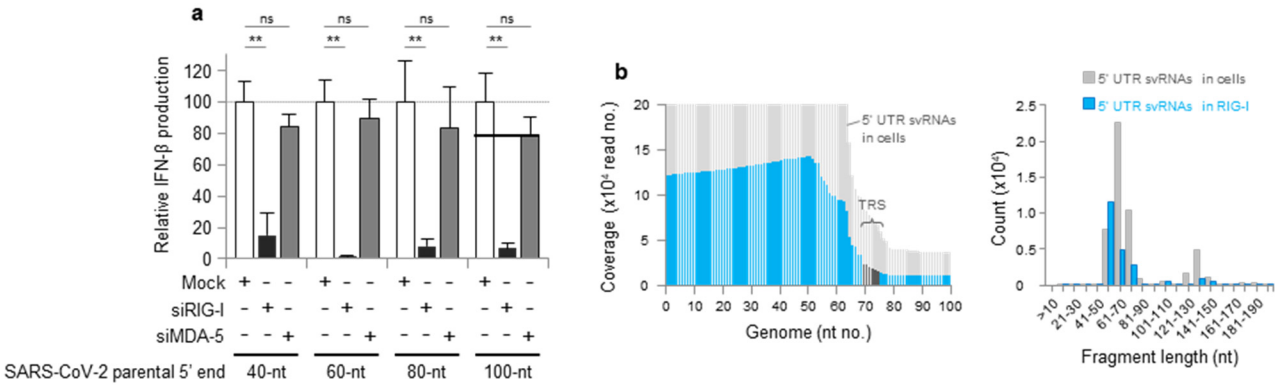


図 3. SARS-CoV-2 由来短鎖 viral RNA は RIG-I を介してサイトカイン産生を誘導する

a) RIG-I 又は MDA-5 ノックダウン 293T 細胞における SARS-CoV-2 由来短鎖 viral RNA のサイトカイン誘導性 。$^{**}P<0.01$（Tukey's multiple comparison test）。

b) 左パネル：RIG-I に結合した SARS-CoV-2 由来短鎖 viral RNA の read map。
右パネル：RIG-I に結合した SARS-CoV-2 由来短鎖 viral RNA 長の分布。

4. ヒト細胞内及びハムスター肺中における SARS-CoV-2 Delta 株及び Omicron 株の短鎖 viral RNA 産生性評価

SARS-CoV-2 はその出現以降、変異を蓄積することで、様々な variant に進化している。ウイルスの進化に伴い、SARS-CoV-2 の短鎖 viral RNA 産生性がどのように変化するのかについて評価するべく、Wuhan 株に加えて変異株である Delta 株及び Omicron 株がヒト細胞内（Calu-3 細胞）で産生する短鎖 viral RNA 量を real time PCR 法により測定した。本解析では、短鎖 viral RNA の代表配列を特異的に検出するための stem-loop RT primer を構築している。Wuhan 株及び Delta 株感染細胞においては感染後 120 時間まで同程度短鎖 viral RNA 産生量が増加し、その発現レベルは両株で同等だった。一方で、Omicron 株感染細胞においては、Wuhan 株及び Delta 株感染細胞にみられた感染経過時間に伴う短鎖 viral RNA の細胞内への蓄積は検出されなかった（図 4a）。さらに、ハムスターにウイルスを経鼻感染させ、感染後 5 日目において肺を採取し、肺中のおける短鎖 viral RNA 量を同様に real time PCR 法により測定した。Wuhan 株及び Delta 株感染ハムスターの肺中においては同程度の短鎖 viral RNA が検出されたのに対し、Omicron 株感染ハムスターの肺中における短鎖 viral RNA 量は検出限界以下であった（図 4b）。

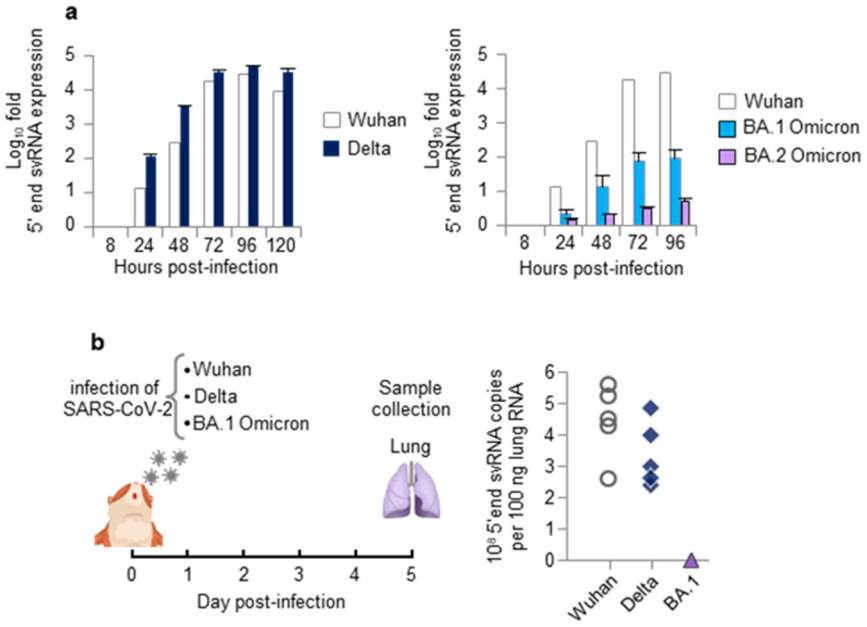


図 4. SARS-CoV-2 変異株による短鎖 viral RNA 産生性の違い

a) Calu-3 細胞に異なるウイルス変異株を感染させ、感染後経過時間における SARS-CoV-2 由来短鎖 viral RNA 量を測定。

b) ハムスターに異なるウイルス変異株を感染させ、感染後 5 日目における肺中の SARS-CoV-2 由来短鎖 viral RNA を測定。

考　察

本研究では、SARS-CoV-2 が季節性コロナウイルスと比較して、不完全なウイルスゲノム RNA である短鎖 viral RNA を感染細胞内に多量に産生していることを見出した。また、SARS-CoV-2 が産生する短鎖 viral RNA は、5' 末端に三リン酸基及び RNA 二次構造を保有する特徴から、細胞質内 RNA 認識機構である RIG-I に選択的に結合し、IFN-β及び IL-6 サイトカインの産生を誘導していると推察された。さらに興味深いことに、これらの短鎖 viral RNA は Wuhan 株及び Delta 株感染細胞、同ウイルス感染ハムスターの肺中において同程度に検出されるにも関わらず、Omicron 株感染細胞及びハムスターにおいては著しく低い傾向にあった。このような短鎖 viral RNA は通常は鳥類を自然宿主とする鳥インフルエンザウイルスが哺乳類細胞においてウイルス複製する際にも検出されており、サイトカイン産生誘導の一因子であると報告されている [1]。通常と異なる宿主でウイルスゲノムを複製する際は、複製エラーや複製調節不全が生じることによりこのような不完全なウイルス RNA が細胞内に蓄積されると推察されている。野生動物を自然宿主としている SARS-CoV-2 においても、当該ウイルスが病原性をもってヒトに検知された時点ではウイルスは完全なヒトでの適応性を獲得していない [2]。そのため本研究で検出された短鎖 viral RNA もウイルスの宿主適応過渡期に生じるウイルスゲノム複製エラーに起因して産生されている可能性が高いと推察される。実際に Omicron 株では短鎖 viral RNA の産生量が Omicron 株出現以前の流行株と比較して著しく減少したことを示す本研究の結果は、ウイルスの宿主適応進化と短鎖 viral RNA の産生量の関連性を部分的に裏付けるものである。今後は、Wuhan 株をヒト細胞で継続的に passage すると共に、継代ウイルスが産生する短鎖 viral RNA 量を解析することにより、ウイルス宿主適応メカニズムをより詳細に把握できると考える。

SARS-CoV-2 は重症肺炎及び血栓症を伴うサイトカインストームを特徴とする重篤な病態を引き起こす [3]。しかしながら、これらサイトカインストームを引き起こすウイルス学的要因は明らかになっていない。本研究で新たに検出した SARS-CoV-2 由来短鎖 viral RNA はウイルスの複製に伴って細胞内に蓄積されてサイトカイン産生を強く誘導する

ため、SARS-CoV-2 による過剰サイトカイン産生に起因する病態に関与している可能性がある。さらに興味深いことに、当該 RNA が感染細胞培養上清中のエクソソーム中にも含有されていることが確認済みであり、このことからウイルス感染の広がりに加えて、エクソソームに含まれる短鎖 viral RNA が全身の免疫応答を惹起して過剰な免疫誘導を引き起こす重症化病態も想定できる。

以上の本研究で得られた SARS-CoV-2 が産生する短鎖 viral RNA の知見と当該 RNA による病態関連性への理解は、SARS-CoV-2 によって引き起こされる重症化病態解明に貢献すると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都府立医科大学医学研究科感染病態学教室の渡邊洋平先生、大阪大学微生物病研究所遺伝情報実験センターの山中到先生、奥崎大介先生、大阪大学微生物病研究所感染機構研究部門高等共創研究院の岡本徹先生である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1) Te Velthuis AJW, Long JC, Bauer DLV, Fan RLY, Yen HL, Sharps J, Siegers JY, Killip MJ, French H, Oliva-Martín MJ, Randall RE, de Wit E, van Riel D, Poon LLM, Fodor E. Mini viral RNAs act as innate immune agonists during influenza virus infection. Nat Microbiol. 2018 Nov;3(11):1234-1242. doi: 10.1038/s41564-018-0240-5. Epub 2018 Sep 17. PMID: 30224800

2) Zhou H, Ji J, Chen X, Bi Y, Li J, Wang Q, Hu T, Song H, Zhao R, Chen Y, Cui M, Zhang Y, Hughes AC, Holmes EC, Shi W. Identification of novel bat coronaviruses sheds light on the evolutionary origins of SARS-CoV-2 and related viruses. Cell. 2021 Aug 19;184(17):4380-4391.e14. doi: 10.1016/j.cell.2021.06.008. Epub 2021 Jun 9.PMID: 34147139

3) Pedersen SF, Ho YC. SARS-CoV-2: a storm is raging. J Clin Invest. 2020 May 1;130(5):2202-2205. doi: 10.1172/JCI137647. PMID: 32217834