

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文概要

論文題目

新型コロナウイルス抗原に対する超高感度検出と 17 β -エスト
トラジオールによる感染減少の解明

Ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 and reduction
of infection by 17 β -estradiol

申請者

教誓 祐太

Yuta KYOSEI

生命理工学専攻 物理生物学研究

2023年12月

第1章 研究背景と目的

新型コロナウイルスは2019年12月から現在に至るまで世界中で感染拡大したエンベロープウイルスである。このウイルスは4つの主要なタンパク質(スパイクタンパク質、メンブレンタンパク質、エンベロープタンパク質、ヌクレオカプシドタンパク質)と一本鎖RNAによって構成される。

このウイルスに対する検査法・測定法は多岐にわたる。その中でもRNAに焦点を当てたPCR法は高感度な検出感度により、最も陽性検査の測定法として使用されている。しかし、測定時の溶液使用容量が少ないことによる偽陰性のリスクや、測定難易度の高さから測定者の技量に検出感度が左右されるなどの問題点もいくつか存在する。2020年4月に世界保健機関(WHO)は新型コロナウイルスの抗原検査の高感度測定の開発や研究は推奨しているが、現時点で診断・検査に抗原測定法を用いることは推奨していない(World Health Organization HPより)。これは、抗原検査には特異性の高い利点があるが、検出感度が低いという弱点があるためである。

加えて、新型コロナウイルスの感染は男女によって割合が異なる。新型コロナウイルス感染によって死亡数を男女の人種ごとに比較すると、有意に女性で低いことがわかっている(Rushovich *et al*, 2021)。性差によってウイルスの感染割合が異なる要因として喫煙者数や生活習慣、食生活など様々挙げられるがその中でも性ホルモンの違いが指摘されている。特に女性ホルモンであるエストラジオールはウイルスの感染を減少させる可能性があると言われている。しかし、性ホルモンによる感染減少の効果はいまだ明らかにされていない。

本研究では酵素サイクリング法とサンドイッチELISA法を組み合わせたチオNADサイクリングELISA法を用いてリコンビナントタンパク質と不活性化SARS-CoV-2の検出を行うことで超高感度な抗原検出について研究を行った。また、女性ホルモンによる新型コロナウイルスの感染減少メカニズムを解明するため、女性ホルモンの17 β -エストラジオールを用いて細胞感染実験を行った。

第2章 リコンビナントタンパク質を用いたチオNADサイクリングELISA測定

本研究ではチオNADサイクリングELISA法の新型コロナウイルス抗原に対する検出感度の検証を行うため、市販のリコンビナントタンパク質を用いて検出感度の算出を行った。本研究で着目したタンパク質はスパイクタンパク質とヌクレオカプシドタンパク質の2種類である。スパイクタンパク質は新型コロナウイルスに対して非常に特異的なタンパク質であり、新型コロナウイルスのみを検出することに適している。しかし、変異が起こりやすいタンパク質であるため安定性に欠けることが弱点である。スパイクタンパク質と比較して、ヌクレオカプシドタンパク質は非常に変異の少ない安定したタンパク質である。そのため検査・診断で測定対象として使用されることの多いタンパク質である。

しかし、変異株や近縁のウイルスでも配列が酷似しているため特異性に欠ける。この一長一短あるそれぞれのタンパク質をチオ NAD サイクリング ELISA によって、タンパク質濃度に対する吸光度を測定した。この結果から検量線を作成し検出感度および定量限界を算出した。その結果、スパイクタンパク質では検出限界として約 10^{-19} moles/assay(100 μ L)、ヌクレオカプシドタンパク質では約 10^{-17} moles/assay であることがわかった。これらの検出感度は超高感度検出として定義可能な 10^{-17} moles/assay 以下の検出感度(Gooding *et al*, 2019)であるため、チオ NAD サイクリング ELISA による新型コロナウイルス測定は超高感度検出法であると言える。

第 3 章 不活性化 SARS-CoV-2 による高感度検出

新型コロナウイルスの検査には SARS-CoV-2 を扱うことができる施設が必要になる。現在でも SARS-CoV-2 の取り扱いは BSL (バイオセーフティレベル)3 以上の施設が必要になる。したがって、通常の大学施設や研究機関では使用できない場合も多く存在する。そのため、本研究では SARS-CoV-2 の不活性化を行い、どの施設においても使用できる状態での検出を検討した。第 2 章で確立したチオ NAD サイクリング ELISA 法を用いて、30 分の UVB 照射によって不活性化した SARS-CoV-2 の測定を行った。スパイクタンパク質検出抗体を使用した検出では約 10^6 copies/assay、ヌクレオカプシドタンパク質の検出抗体を用いて検出を行った場合、約 10^4 copies/assay で検出することができた。新型コロナウイルスに感染した際の鼻腔粘液中に存在するウイルス量が約 10^6 RNA copies であるとされている(Sender *et al*, 2021)。本研究の検出感度は生体内ウイルス量を測定できる範囲内であることがわかり、検査法として使用できることを示唆している。

第 4 章 17β -エストラジオールによる SARS-CoV-2 の感染減少メカニズムの解明

本研究では女性ホルモンである 17β -エストラジオールによる SARS-CoV-2 が細胞への感染減少するメカニズムを解明するため、複数の実験を行って明らかにした。まず、実際に細胞への感染が減少するのか検討するため、SARS-CoV-2 を模した市販の模擬ウイルスと細胞を用いて細胞感染実験を行い、蛍光観察によって比較を行った。本研究では細胞としてアフリカミドリザルの肝臓細胞である VeroE6 細胞にヒト TMPRSS2(膜貫通型セリンプロテアーゼ 2)を発現させた VeroE6/TMPRSS2 細胞を使用した。この細胞は通常の VeroE6 細胞と比較して SARS-CoV-2 の感染効率が 10 倍良く、ヒトへの感染モデルとして使用するのに適した細胞である(Matsuyama *et al*, 2020)。各濃度に調整した 17β -エストラジオールを添加し、培養した VeroE6/TMPRSS2 細胞を培養後 1.0×10^5 cells/mL になるよう調整し、模擬ウイルスを感染させ蛍光観察によって蛍光強度の比較を行った。観察結果を画像として取得し ImageJ を用いて比較を行った。結果、 17β -エストラジオールを添加した細胞と添加していない細胞を比較すると、有意にエストラ

ジオールを添加した細胞で蛍光強度が減少し、ウイルスの感染が減少していることがわかった。

この SARS-CoV-2 の感染減少は、ウイルスが感染する際の結合箇所である ACE2(アンジオテンシン変換酵素 2)が 17β -エストラジオールによって細胞から解離し、可溶性 ACE2(sACE2)となっているため細胞への感染が減少したのではないかと仮定した。この仮定を検証するため、細胞培養中の培養液を採取し ELISA 法によって sACE2 量の測定を行った。この結果、 17β -エストラジオール添加量に比例して sACE2 量も増加していることがわかった。この結果によって、 17β -エストラジオール添加によって ACE2 が細胞から解離し、sACE2 となっているため、SARS-CoV-2 の感染が減少していることがわかった。

最後に解離した sACE2 が解離後、ウイルスに結合し細胞への結合力を減少させている可能性を考え、検討実験を行った。sACE2 の存在が確認できた細胞培養液と細胞感染実験で使用した模擬ウイルスの混合溶液を作成し、第 2 章で開発したチオ NAD サイクリング ELISA によって測定を行った。この結果、 17β -エストラジオール添加していない培養液との混合液と添加している培養液との混合液を比較すると、有意に 17β -エストラジオール添加している培養液を使用したもので吸光度が減少していることがわかった。 17β -エストラジオール添加量によって sACE2 量も増加しているため、sACE2 によって模擬ウイルスの結合力が低下していることになる。

これらの結果によって、 17β -エストラジオールは細胞の ACE2 を解離させ sACE2 とすることで SARS-CoV-2 の感染を減少させ、解離した sACE2 が感染前のウイルスに結合することで細胞への結合力を低下させるメカニズムを解明することができた。

第 5 章 本研究の総括およびチオ NAD サイクリング ELISA の応用研究

本研究において、抗原測定法であるチオ NAD サイクリング ELISA 法によって、新型コロナウイルスに対する超高感度な検出に成功した。また、不活性化 SARS-CoV-2 を使用して測定したことで抗原検査の中でも高感度は検出法であることを証明し、感染者の生体内ウイルス量よりも低い感度で測定できたことから検査法としても使用できる可能性を示唆した。加えて、チオ NAD サイクリング ELISA が応用研究として多様な環境下での測定でも使用可能か確かめるため、下水中の組成を模した人工汚水を作成し、下水中のウイルス測定のシミュレーションを行った。この結果、多くのきょう雑物が含まれた溶液の中でも一定の感度で測定することができた。また、細胞実験およびタンパク質定量法を用いて、 17β -エストラジオールによる SARS-CoV-2 の感染減少メカニズムの解明をすることに成功した。本研究の成果は、新型コロナウイルスに対する超高感度な抗原検出法を開発したのと同様にいままで曖昧に関係性が指摘されていたエストラジオールによる感染減少メカニズムを解明したことである。

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名：教誓 祐太

印

(2023年12月4日 現在)

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>○ [1] Kvosei Y, Yoshimura T, Ito E. Removal of Soluble ACE2 in VeroE6 Cells by 17β-Estradiol Reduces SARS-CoV-2 Infectivity. <i>Biol Pharm Bull.</i> 2023 Dec 1;46(12):1842-1845. doi: 10.1248/bpb.b23-00568. Epub 2023 Oct 21. PMID: 37866890.</p> <p>[2] Yamura S, Kawada N, Yamakado S, Kvosei Y, Watabe S, Yoshimura T, Murase Y, Mitarai S, Ito E. Non-amplification nucleic acid detection with thio-NAD cycling. <i>J Microbiol Methods.</i> 2023 Jan;204:106647. doi: 10.1016/j.mimet.2022.106647. Epub 2022 Dec 7. PMID: 36496031.</p> <p>○ [3] Kvosei Y, Namba M, Makioka D, Kokubun A, Watabe S, Yoshimura T, Sasaki T, Shioda T, Ito E. Ultrasensitive Detection of SARS-CoV-2 Spike Proteins Using the Thio-NAD Cycling Reaction: A Preliminary Study before Clinical Trials. <i>Microorganisms.</i> 2021 Oct 25;9(11):2214. doi: 10.3390/microorganisms9112214. PMID: 34835340; PMCID: PMC8619787.</p> <p>○ [4] Kvosei Y, Namba M, Yamura S, Watabe S, Yoshimura T, Sasaki T, Shioda T, Ito E. Improved Detection Sensitivity of an Antigen Test for SARS-CoV-2 Nucleocapsid Proteins with Thio-NAD Cycling. <i>Biol Pharm Bull.</i> 2021 Sep 1;44(9):1332-1336. doi: 10.1248/bpb.b21-00387. Epub 2021 Jun 19. PMID: 34148926.</p> <p>[5] Iha K, Kvosei Y, Namba M, Makioka D, Yamura S, Watabe S, Yoshimura T, Ito E. Zeptomole Detection of an Enzyme by a Simple Colorimetric Method. <i>Anal Sci.</i> 2021 Oct 10;37(10):1469-1472. doi:10.2116/analsci.21N009. Epub 2021 Mar 19. PMID: 33746140.</p> <p>○ [6] Kvosei Y, Namba M, Yamura S, Takeuchi R, Aoki N, Nakaishi K, Watabe S, Ito E. Proposal of De Novo Antigen Test for COVID-19: Ultrasensitive Detection of Spike Proteins of SARS-CoV-2. <i>Diagnostics (Basel).</i> 2020 Aug 14;10(8):594. doi: 10.3390/diagnostics10080594. PMID: 32823866; PMCID: PMC7459804.</p>
総説	<p>[1] Tsurusawa N, Chang J, Namba M, Makioka D, Yamura S, Iha K, Kvosei Y, Watabe S, Yoshimura T, Ito E. Modified ELISA for Ultrasensitive Diagnosis. <i>J Clin Med.</i> 2021 Nov 7;10(21):5197. doi: 10.3390/jcm10215197. PMID: 34768717; PMCID: PMC8585087.</p> <p>[2] Kvosei Y, Yamura S, Namba M, Yoshimura T, Watabe S, Ito E. Antigen tests for COVID-19. <i>Biophys Physicobiol.</i> 2021 Feb 10;18:28-39. doi: 10.2142/biophysico.bppb-v18.004. PMID: 33954080; PMCID: PMC8049777.</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名：教誓 祐太

印

(2023年12月4日 現在)

種類別	題名、発表・発行掲載誌名、発表・発行年月、連名者（申請者含む）
学会発表	<p>[1] 教誓祐太, 伊藤悦朗. アミロイドβ 42と40検出のためのチオNADサイクリングELISA法の開発 第61回 日本生物物理学会 (2023年11月14日-16日)</p> <p>[2] 教誓祐太, 矢村蒼, 難波茉由里, 吉村昭毅, 伊藤悦朗. チオNADサイクリングELISA法による新型コロナウイルスおよびインフルエンザウイルスA型の模擬汚水測定 第143年会日本薬学会 (2023年3月25日-28日)</p> <p>[3] 教誓祐太, 矢村蒼, 難波茉由里, 伊藤悦朗. 新型コロナウイルス並びにインフルエンザウイルスA型を検出するチオNADサイクリングELISA法の開発 第60回日本生物物理学会 (2022年9月28日-30日)</p> <p>[4] 教誓祐太, 難波茉由里, 吉村昭毅, 伊藤悦朗. 新型コロナウイルスのスパイク並びにヌクレオカプシドタンパク質における超高感度ELISA法の開発 第142回 日本薬学会オンライン大会 (2022年3月25日-28日)</p> <p>[5] Yuta kyosei, Naoki Kawada, Jyun-Hao Chang, Kanako Iha, Masatoshi Okamatsu, Yoshihiro Sakoda, Teruki Yoshimura, Rikiya Takeuchi, Toshiya Ohta, Kazunari Nakaishi, Satoshi Watabe, Etsuro Ito “Application of Ultrasensitive ELISA to Detection Nucleic Acids and Proteins:Avian Influenza Virus RNAand DENV NS1 Protein”ASM Microbe オンライン開催 (2020年6月17日-23日)</p>
日本語解説	<p>[1] 教誓祐太, 渡部聡, 伊藤悦朗. 超高感度抗原検査法の開発と応用 月刊ファームステージ 21巻5号 58-67ページ 2021年8月15日発行</p> <p>[2] 教誓祐太, 伊藤悦朗. 新型コロナウイルスの超高感度測定 生物物理 61巻2号 107-109ページ 2021年3月15日発行</p>
獲得研究費	<p>[1] 日本学術振興会 特別研究員(DC2) 2022年-2024年度</p> <p>[2] 早稲田大学 若手研究者育成・支援事業「アーリーバードプログラム」 2021年度</p> <p>[3] 早稲田オープン・イノベーション・エコシステム挑戦的研究プログラム(W-SPRING) 2021年-2022年度(途中辞退)</p>