

論 文 要 旨

Silver nanoparticles reduce ACE2 expression via changing mitochondrial function in human fibroblast-like lung cell and periodontal ligament fibroblast cells.

銀ナノ粒子はヒト線維芽細胞様肺細胞株と歯根膜線維芽細胞に対し
ミトコンドリア機能の変化を介して ACE2 発現を減少させる

高橋 将世

【序論及び目的】

銀は様々な細菌やウイルスに抗菌効果を持つと報告されており、その抗菌メカニズムは主に細菌細胞膜の破壊や、タンパク質合成阻害である。また銀は広い抗菌スペクトルをもち、ナノ粒子化するとイオンの溶出量が増えその抗菌効果が増大する。さらに銀は食品としても使用されており、人体への影響は少ないとされている。そのため銀ナノ粒子(AgNP)は食品以外にも抗菌・消臭グッズや導電性インクなど、日常生活で汎用されている。最近 AgNP が SARS-CoV-2 自体を不活性化させるとの報告がされたが、AgNP の人体への影響はまだよくわかっていない。

SARS-CoV-2 のヒト細胞への感染は、ヒト細胞膜上に発現する ACE2 と SARS-CoV-2 表面にある Spike protein が結合し、その Spike protein が同じくヒト細胞膜上にあるプロテアーゼ TMPRSS2 によって開裂され、ヒト細胞内にウイルス RNA が侵入するという様式をとる。ここで重要なのが受容体として機能する ACE2 の発現である。

ACE2 は、元々生体内でアンジオテンシン II を分解することによりレニン・アンギオテンシン・アルドステロン系を負に調節し、高血圧や心不全に対して保護的に働いている。これまでに乳がん細胞で AKT のリン酸化を介して ACE2 の発現が減少する事、mTOR 阻害薬で治療を受けているがん患者の ACE2 発現が抑制されており、結果として COVID-19 に罹患しにくい事などが報告されている。また、AKT や mTOR は共にミトコンドリアの機能維持に関与すること、ACE2 遺伝子をノックアウトするとミトコンドリア呼吸鎖が阻害されること、SARS-CoV-2 は、生体内に侵入したあとミトコンドリアに移行しその膜電位を下げることなどが報告されている。これらのことから、ミトコンドリア機能が SARS-CoV-2 感染に重要と考えられた。そこで本研究では、AgNP が生体内においてミトコンドリア機能を介して SARS-CoV-2 の感染を制御するのではないかと仮説を立て、その仮説を検証する事を目的とした。

【材料及び方法】

実験材料には SARS-CoV-2 の感染を想定し、SARS-CoV-2 の感染先の一つである肺の線維芽細胞由来細胞 VA-13 と、SARS-CoV-2 の人体への入り口である口腔の歯根膜線維芽細胞由来細胞 HPLF を使用し、AgNP は株式会社ピカッショ提供の銀液を用い以下の 1-7 の実験を行った。

- 各細胞を培養し、0.01-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の AgNP を暴露し、曝露後 48 時間の細胞生存率を CCK-8 にて調べた。
- 細胞生存率が有意に低下しない 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の AgNP 曝露後 2h の ACE2 および TMPRSS2 の遺伝子発現変化を QPCR にて調べた。
- 細胞表面と Spike protein の結合をみるために Spike protein を Fluorescein Labeling Kit でラベルし、その蛍光強度をオールインワン顕微鏡 BZ-8000 にて観察した。
- ACE2、AKT のリン酸化、mTOR のタンパク質発現を Western Blotting にて検出した。
- AgNP の細胞内局在を MitoTracker との共染色、ミトコンドリアの Fe^{2+} 、活性酸素量、膜電位(Ψm)をそれぞれ、Mito-FerroGreen、MitoSOX、JC-10 を用いて検出した。
- ミトコンドリア活性化試薬であり、AKT の阻害薬としても知られているジクロロ酢酸ナトリウム(DCA)を AgNP 曝露前に処理し、その後の AgNP 処理で細胞内ヒドロキシラジカル量と Ψm が変化するかについて、HPF と JC-10 を用いて検出した。
- エンドサイトーシス阻害薬 Pitstop2 と Dynasore によって AgNP の効果が阻害されるかについて、ミトコンドリア活性酸素検出試薬である MitoSOX を用いて検討した。

【結果】

- AgNP 処理 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では細胞生存率が有意に減少した。AgNP 処理を行うと細胞は風船状の構造を形成し細胞死が起きた。
- AgNP 処理により ACE2、TMPRSS2 の遺伝子発現が有意に減少した。
- AgNP 処理により Spike protein の細胞表面への結合が有意に減少した。
- AgNP 処理により VA-13 では mTOR の減少、HPLF では pAKT の亢進が見られた。
- AgNP は細胞内でミトコンドリアに多く局在し、AgNP 処理によりミトコンドリア Fe^{2+} および活性酸素量が有意に上昇し、 Ψm は有意に減少した。
- DCA 処理により AgNP 処理で増加した細胞内ヒドロキシラジカル量と減少した Ψm がコントロールレベルに回復し、ACE2 遺伝子発現もコントロールレベルに回復した。
- AgNP 処理によるミトコンドリア活性酸素量の増加はエンドサイトーシス阻害薬にて阻害された。

【結論及び考察】

AgNP はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、主にミトコンドリアに局在する事が明らかとなった。取り込まれた AgNP はミトコンドリア内の鉄にイオンを渡し、 Fe^{2+} 量を増加させ Ψm を減少させてミトコンドリア機能障害を惹起すると考えられた。その結果、ミトコンドリア機能障害によりミトコンドリア活性酸素量が増加し、mTOR もしくは AKT シグナルを介し ACE2 発現が減少すると考えられた。ミトコンドリア機能を DCA にて活性化すると AgNP 処理による ACE2 発現変化がキャンセルされることから、AgNP の作用はミトコンドリアを介していることが推察される。これらの結果は、低濃度(0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)の AgNP 曝露によって、ミトコンドリア機能を介して口腔内細胞や肺細胞の ACE2 発現が抑制され、SARS-CoV-2 の感染を抑制できることを示唆している。