

組織抗原を有する SARS-CoV-2 タンパク質に対するヒト・モノクローナル抗体の反応:自己免疫疾患への示唆

アリスト・ヴォイダニ、エルロイ・ヴォイダニ、ダティス・カラジアン

私たちは、抗 SARS-CoV-2 タンパク質抗体とヒト組織抗原との間で免疫反応性が生じるかどうか、また COVID-19 ウイルス・タンパク質とヒト組織との間の分子模倣が、その原因になり得るのか、を明らかにしようとした。私たちは、ヒト・モノクローナル抗 SARS-CoV-2 抗体(スパイク・タンパク質、核タンパク質)およびウサギ・ポリクローナル抗 SARS-CoV-2 抗体(エンベロープ・タンパク質、膜タンパク質)の両方を、55 の異なる組織抗原に適用した。SARS-CoV-2 抗体は 55 の組織抗原のうち 28 と反応し、バリア・タンパク質、消化管組織、甲状腺組織、神経組織などを含む多様な組織グループを呈することが分かった。また、BLAST を用いて選択的エピトープ・マッピングを行ったところ、スパイク・タンパク質と、核タンパク質と、ヒト組織抗原であるミトコンドリア M2、F-アクチン、TPO を有するその他の多くの SARS-CoV-2 タンパク質と、の間の類似性と相同性が示された。SARS-CoV-2 抗体と、異なる抗原グループとの間のこのような広範な免疫交差反応性は、COVID-19 の多系統疾患過程に一つの役割を演じ、疾患の重症度に影響を与え、感染しやすいサブグループの自己免疫発症を加速させ、既存の自己免疫疾患を持つ被験者の自己免疫を潜在的に悪化させるかもしれない。ごく最近、ヒト・モノクローナル抗体が、COVID-19 患者に使用することが認可された。本研究で使用されたヒト・モノクローナル抗体は、これらの認可された抗体とほぼ同一である。従って、私たちの結果は、私たち自身のヒト組織と、この恐るべきウイルスとの交差反応性から生じるかもしれない、COVID-19 による自己免疫や多系統疾患の潜在リスクを立証することができ、ひいては、差し迫って必要とされるワクチンや、そのために開発中の治療法が、この疾患に向けて使用するにあたって、本当に安全であることを保証できる。

導入

コロナウイルス感染症(COVID-19)は、今世紀における最大のグローバル公衆衛生上の懸念の一つとなってきた。COVID-19 パンデミックは、医療研究者らに対し、SARS-CoV-2 が世界中の人類にどのような影響を与え得るかを調査するよう直ちに呼び掛けた。もちろん、成功するワクチンと効率的な治療プロトコルの探索が最重要である一方で、自己免疫に焦点を当てた免疫学者らは、感染や新たに開発されたワクチン自体が交差反応性を介して自己免疫を引き起こす可能性があるかどうかを懸念している。交差反応性は、病原体と自己組織タンパク質との間にアミノ酸配列の相同性が存在する場合に発生する。このメカニズムにおいて、SARS-CoV-2 に対して形成された抗体はヒト組織タンパク質にも結合し、自己免疫反応性を引き起こす。十分に吟味されていないワクチンは、将来的に COVID-19 からの自由と引き換えに、自己免疫攻撃を許すことを意味するかもしれない。

SARS-CoV-2 との交差反応性の役割に関して、3つの重要な疑問がある。第一に、SARSCoV-2 感染に関連する多系統疾患において、交差反応性が一つの役割を演じているのか?第二に、交差反応性は SARS-CoV-2 誘発性自己免疫の病態生理学にどのように寄与するのか?第三に、SARS-CoV-2 の感染やワクチン接種による自己免疫の発症に懸念はあるのか?

交差反応性が COVID-19 感染の多系統反応に関与し得るかどうか、という第一の疑問から始めよう。私たちは、COVID-19 の全身性臨床症状のいくつかは、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質が、アンジオテンシン変換酵素 2(ACE2)を呈する組織の細胞膜と結合するだけでは説明できないため、その答えは尤もらしいと考えている。例えば、感染の極めて致命的な症状は、播散性血管内凝固症候群の発症である。凝固症候群は感染した被験者の死亡率の重要な指標となってきた。『ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディシン』の最近の書簡で、凝固症候群に苦しむ感染患者の血清学により、抗カルジオリピン自己抗体と抗 β 2 グリコプロテイン自己抗体のレベルが顕著に上昇していることが示された。これらの知見は、SARS-CoV-2 の病態生理学的後遺症の一部であるかもしれない自己免疫反応性の可能性を示唆している。中枢神経系疾患、皮膚疾患、消化器疾患、臓器疾患の臨床症状の一部が、自己免疫反応にも関連しているかもしれない可能性がある。

第二の重要な疑問は、SARS-CoV-2 感染が交差反応性の原因となり得るかどうかである。病原体誘発性交差反応性の発現には、2つの重要な基準が必要である。第一に、ウイルス病原体はヒト組織タンパク質と配列相同性を示さなければならない、第二に、免疫耐性が失われなければならない。ライオンズ・ワイラーは最近、ウイルス誘発性自己免疫の可能性を立証するために、重大な相同マッチング・パターンを探索する中で、SARS-CoV-2 タンパク質の免疫原性エピトープをマッピングし、ヒト・タンパク質と比較した。彼は、多くの SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質と核タンパク質をマッピングし、ヒト組織タンパク質配列に対して十分な交差反応性を同定した。また、COVID-19 感染による免疫耐性の欠損に関連した免疫調節障害の発見もいくつかある。ジアマレロス・ブルブリスは、重度の呼吸不全を伴う COVID-19 患者における複雑な免疫調節障害を記述した。免疫機能障害の独特なパターンには、①免疫調節障害、または単球における HLADR14 の著しい減少、②マクロファージ活性化症候群、③COVID-19 患者における、CD3+/CD4+/CD45+ T リンパ球、CD3-/CD16+/CD56+/CD45+ NK 細胞、CD19+/CD45+ B リンパ球、の健康な被験者よりも低い絶対数、が含まれる。SARS-CoV-2 のアミノ酸配列相同マッピングと、ヒト組織タンパク質と、を組み合わせた際に見られるこういった免疫学的シフトは、SARS-CoV-2 に感染した患者に交差反応性が潜在的に起こり得ることを示唆する免疫変数の組み合わせを組織化する。

第三の重要な疑問は、COVID-19 とヒト組織との交差反応性は、感染を経由して自己免疫疾患の発症へと繋がるのか、またはワクチン接種を直接的に經由して繋がるのか、ということである。殆どの自己免疫疾患の発症には3~18年かかるかもしれないので、これを明らかにすることは膨大なタスクとなり得る。シーガルとショーンフェルドは、感染しやすいサブ

グループにおいて、過去のワクチン接種がどのように交差反応性自己免疫を誘発したのか、という例を挙げることにより、ワクチン誘発性自己免疫への懸念を提起した。彼らは、ワクチン誘発型交差反応性が、どのように全身性エリテマトーデス、脱髄性自己免疫疾患、ナルコレプシー、体位性頻脈症候群、の発症へと繋がったのか、という具体的な例を挙げている。カンドウックとショーンフェルドは、非常に興味深い書簡で、SARS-CoV-2 スパイク糖タンパク質と肺サーファクタント関連タンパク質との間に見られるペプチド共有の問題に取り組んだ。彼らは、SARS-CoV-2 と肺サーファクタント・タンパク質が24 のペプチドのうち13 を共有しているがゆえに、SARS-CoV-2 感染後の免疫応答が、肺サーファクタント・タンパク質、そして、その後の SARS-CoV-2 との交差反応性を引き起こしているかもしれない、と示唆した。更に、かなり最近になって、彼らは、SARS-CoV-2 関連疾患に寄与する可能性のあるメカニズムとして、分子模倣の疑いのような証拠を提示した。その知見に基づき、彼らは、ワクチンに SARS-CoV-2 抗原全般を使用することを警告し、固有のペプチドのみを使用することが、おそらく SARS-CoV-2 感染と戦う最も効果的な方法だろう、と呼び掛けた。SARS-CoV-2 とヒト組織との潜在的な交差反応性を示す重大な警告サインを踏まえ、私たちは、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質、核タンパク質、エンベロープ・タンパク質、膜タンパク質、に対して作られた抗体と、多くの重篤疾患に関連する様々な自己免疫標的タンパク質と、の相互作用の研究に取り組んできた。これにより、私たちは、私たち自身のヒト組織と、この恐るべきウイルスとの交差反応性から生じるかもしれない、COVID-19 による自己免疫や多系統疾患の潜在リスクを立証することができ、ひいては、差し迫って必要とされるワクチンや、そのために開発中の治療法が、このパンデミックに向けて使用するにあたって、本当に安全であることを保証できる。

材料と方法

倫理ガイドライン

私たちは、米国国立衛生研究所発行の『実験動物の管理と使用に関する指針』1985 年 No.85-23 に適合した、動物に対する免疫プロトコルを用いている、認定され、規制された商業的供給元からヒト・モノクローナル抗体とウサギ・ポリクローナル抗体を購入した。

抗体と抗原

SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質 S1 および S2 ドメインに対して作られたヒト IgG1 モノクローナル抗体は、Novus Biologicals 社(米国コロラド州セントニアル)から購入した。SARS-CoV-2 核タンパク質に対して作られたヒト IgG1 モノクローナル抗体は、Native Antigen 社(英国オックスフォードシャー州ラングフォード・ロックス)から入手した。SARS-CoV-2 エンベロープ・タンパク質および膜タンパク質に対するウサギ IgG ポリクローナル抗体は、Antibodies Online 社(米国ペンシルベニア州リムリック)から購入した。

タンパク質

組換え SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質 S1 サブユニット、組換え SARS-CoV-2 スクロオカプシド・タンパク質、エンベロープ・タンパク質、膜タンパク質は、RayBiotech 社(米国ジョージア州アトランタ)から購入した。

グリア線維性酸性タンパク質、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ミオグロビン、血小板糖タンパク質、 α -シヌクレイン、アセチルコリン受容体、リソソーム、エラスターゼは、Calbiochem 社(米国カリフォルニア州サンディエゴ)から購入した。

壁細胞抗原、内因子、フィブリノゲン、ラミニン、甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)、チログロブリン(TG)、ミエロペルオキシダーゼ、コラーゲン・タイプV、ノイラミニダーゼは、MP Biologicals 社(米国オハイオ州ソロン)から購入した。

カルジオリピン、アクチン、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、トロポミオシン、ガングリオシド GM1、インスリン、肝ミクロソーム、トランスグルタミナーゼ(tTG)、エノーラーゼ、アミロイド β タンパク質、タウ・タンパク質、ソマトトロピン、ヒト血清アルブミン(HSA)、ジペプチジルペプチダーゼは、Sigma-Aldrich 社(米国ミズーリ州セントルイス)から購入した。

オクルディン、ゾヌリン、クローディン 5 および 6、 β -カテニン、アクアポリン-4(AQP4)、プレセニリン、ファイブリン、プロテイン・ジスルフィド・イソメラーゼ、小脳・腸管神経ニューロン核抗原、グルタミン酸受容体、ドーパミン受容体、インスリン受容体、グルタミン酸脱炭素酵素 65(GAD-65)の、すべて純度 90%を超えた異なるペプチドは、Biosynthesis 社(米国テキサス州ルイスビル)で合成された。

ミトコンドリア M2 抗体キットは、Trinity Biotech 社(米国ニューヨーク州ジェームズタウン)から購入した。

私たちは、①精製された F-アクチン抗原、②個々の抗原 —SS-A、SS-B、SM/RNP、Scl-70、セントロメア、PCNA、Jo1(いずれも核抗原または NA のために使用)— を加えた HEP-2 細胞の核と核小体、③精製された Sm、RNP、SS-A、SS-B、Scl-70、Jo1(いずれも可溶性核抗原または ENA のために使用)、④dsDNA のために使用した仔牛胸腺 DNA— でコーティングされたプレートを Inova Diagnostics 社(米国カリフォルニア州サンディエゴ)から購入した。

選定された 55 の抗原は、皮膚、消化器、脾臓、肝臓、心臓、筋肉、関節、甲状腺、脳、腸管神経、密着結合タンパク質、細胞成分を含む主要な自己免疫標的タンパク質を評価するための幅広い連絡網を提供する。私たちの選択は、これらヒト組織と SARS-CoV-2 タンパク質との間に顕著な相同性を初めて報告した初期のライオンズ・ワイラーの研究で使用されたヒト組織に触発された。一部重複はあるものの、第一に、COVID-19 の肺外症状に関与しているため、第二に、一般的な自己免疫疾患に関与する重要な標的タンパク質を反映しているため、私たちは以上の組織抗原を選んだ。

ヒト血清は、2020 年以前に Innovative Research 社から入手した。これらの血清は、Trinity

Biotech 製ミトコンドリア M2 抗体キットを用いてミトコンドリア M2 抗体の有無をスクリーニングした。多くのスクリーニング済み血清の中から、M2 抗体が陰性だった 4 つと、M2 抗体が陽性だった 4 つを選んだ。これら 4 つの陰性血清と 4 つの陽性血清は、ミトコンドリア M2 抗体キットのキャリブレーター、陰性対照群、陽性対照群と組み合わせて、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質と核タンパク質に適用した。

異なる組織抗原と、抗 SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質抗体、核タンパク質抗体、エンベロープ・タンパク質抗体、膜タンパク質抗体との反応

異なる組織抗原でコーティングされたすぐに使えるマイクロウェル・プレートに加え、組換え SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質、核タンパク質、エンベロープ・タンパク質、膜タンパク質を含む、1mg/mL 濃度のペプチドおよびタンパク質を、pH7.4 の 0.01M リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で 1:100 に希釈した。1 μ g の各抗原を含む 100 μ L を、一連の 96 ウェル・マイクロタイター・プレートに加えた。

室温(RT)で 8 時間、4 $^{\circ}$ C で 18 時間の培養の後、ELISA ワッシャーでプレートを 3 回洗浄し、抗体が抗原被覆ウェルに非特異的に結合するのを阻止するために、各ウェルに 200 μ L の 2%BSA+2%ドライ・ミルクを加えて、4 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。これらの抗原それぞれに SARS-CoV-2 抗体が結合するかどうかを調べるため、最適な希釈比率 1:200~1:400 にしたヒト抗スパイク・タンパク質とヒト抗核タンパク質、および希釈比率 1:200 にしたウサギ抗エンベロープ・タンパク質とウサギ抗膜タンパク質を 100 μ L、抗原でコーティングしたマイクロタイター・プレートの 4 つ 1 組のウェルに加えた。1 時間の培養と洗浄の後、アルカリ・ホスファターゼでラベリングした、最適に希釈した抗ヒト IgG または抗ウサギ IgG を、適切なプレートセットに加え、再び室温(RT)で 1 時間培養した。結合していない抗体の除去に対して、プレートを 5 回洗浄し、基質であるパラ・ニトロ・フェニル・リン酸を 100 μ L 追加し、405nm の ELISA 読取装置を用いて 30 分後に色の発生を測定した。4 つ 1 組の各ウェルの平均値を計算し、グラフに用いた。

各抗体との組織反応の割合は、以下の式に基づいて計算した。

$$\text{抗体との反応の\%} = \frac{\text{組織反応性の OD} - \text{背景 OD}}{\text{SARS-CoV-2 反応性の OD} - \text{背景 OD}}$$

ヒト・モノクローナル抗体とウサギ・ポリクローナル抗体が異なる組織抗原に結合する特異性を調べるため、これらの抗体を、健康な被験者から採取した同じ希釈比率のヒト血清、または非免疫ウサギ血清で置き換え、4 つ 1 組のウェルに加えた。更に、抗体やその他の試薬を、2%HSA でコーティングした 4 つのウェルと、2%BSA のみでコーティングした 4 つのウェルに加えた。その後、これらはネガティブ対照として使用した。これらの対照ウェルに他の試薬を添加後、OD を測定した。

SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質、核タンパク質、エンベロープ・タンパク質、膜タンパク質に対する連続希釈抗体と組織抗原との結合

異なる組織に結合する SARS-CoV-2 抗体の特異性を示すために、それぞれ 8 ウェルから成る 5 つの異なる種類の ELISA プレート 4 セットに、それぞれ SARS-CoV-2 抗原または異なる組織抗原をコーティングした。これらの抗原は、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質抗体、核タンパク質抗体、エンベロープ・タンパク質抗体、膜タンパク質抗体に対して中等度～強度の免疫反応性を示すために、選定された。SARS-CoV-2 抗体は 1:200～1:25,600 の範囲で連続的に希釈され、その後、各抗原でコーティングしたウェルに追加された。培養、洗浄、二次抗体の添加、その他の必要な ELISA ステップの完了後、405nm で OD を記録した。

同じ抗原の存在下での、様々な交差反応性組織抗原に対する、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質抗体、核タンパク質抗体、エンベロープ・タンパク質抗体、膜タンパク質抗体の結合の阻害

ELISA アッセイにおける阻害研究は、抗原に対する抗体の反応が特異的であることの証明を目的としている。これは、まず異なる試験管に、抗体に対する特異的抗原を、濃度を増加させて添加し、その後同じ抗原でコーティングされた ELISA プレート・ウェルにこの混合物を添加することで実施される。

例えば、M2 タンパク質に対する抗 SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質ヒト・モノクローナル抗体の結合が特異的であることを証明するために、以下のステップが講じられた。

1. ELISA プレートの 8 つの異なるウェルに、あらかじめ決められた異なる最適な濃度の M2 タンパク質をコーティングした。
2. その後、8 つの異なる試験管に、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質に対するヒト・モノクローナル抗体を、それぞれ 100 μ L 加えた。
3. 私たちは、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質モノクローナル抗体を含む 1 番目の試験管(#1)に M2 抗原を加えなかった。この試験管は、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質モノクローナル抗体と M2 タンパク質との非阻害性結合の度合いを示す基準対照として機能した。他の 7 つ試験管は、M2 タンパク質の濃度を増加させて注入した。試験管#2 は 2 μ g、試験管#3 は 42 μ g、試験管#4、5、6、7、8 はそれぞれ 8、16、32、64、128 μ g の M2 抗原を注入した。
4. SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質モノクローナル抗体と 0～128 μ g の M2 抗原から成る 8 つの試験管の内容物を個別に混合し、その後、各試験管の混合内容物を、ステップ #1 で記述した M2 タンパク質でコーティングされた 8 つの異なるウェルに加えた。

培養、洗浄、酵素でラベリングした抗ヒト IgG の添加、すべての ELISA ステップの完了の後、405nm で OD を記録し、SARS-CoV-2 抗体を含む試験管において、M2 タンパク質に対する抗 SARS-CoV-2 抗体の結合の阻害が、M2 タンパク質の濃度の増加に比例している様子を、図示的に示した。

これらのステップはすべて、SARS-CoV-2 核タンパク質抗体、エンベロップ・タンパク質抗体、膜タンパク質抗体、および MBP、GAD-65、アクチン、インスリン受容体、腸管上皮細胞といった抗原を用いた阻害研究にも同様に適用した。

SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質、核タンパク質と、ミトコンドリア M2 タンパク質、F-アクチンとの間に見られるアミノ酸配列の類似性

NIH/米国国立医学図書館の BLAST(ベーシック局所的アライメント検索ツール)配列マッチング・プログラムを用いて、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質、核タンパク質、および M2 タンパク質、F-アクチン、甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)を有するその他のたんぱく質との間に見られる、考えられ得る擬態度またはアミノ酸(AA)配列の類似度を調査した。

ミトコンドリア抗体が 0 レベル、低レベル、高レベルの血清と、ミトコンドリア M2 抗原、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質、核タンパク質との反応

原発性胆汁性胆管炎および関連疾患を患っている患者における抗体測定のために、Trinity Biotech 製の市販キットを用いて、私たちはまず、4 つの対照血清中と、M2 抗体陽性反応の 4 人の個体から採取した血清中の M2 抗体の有無を測定した。その後、キットの陰性対照キャリブレーター、低い陽性対照、高い陽性対照、更に 4 つの M2 抗体陰性血清と 4 つの M2 抗体陽性血清を、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質と核タンパク質の両方でコーティングされた ELISA プレートに適用した。キットの指示に従い、ELISA の手順を完了し、OD を取得した。

統計分析

STATA 14.2 ソフトウェアを用いて、反応性組織抗原に対して取得された OD と、非反応性組織抗原の平均 OD+3SD とを比較して統計分析を行った。対照群と抗原との間に見られる光学密度の平均差を評価するために、独立標本 *t* 検定を実施した。タイプ 1 誤差を考慮するために、多重比較の際、ボンフェローニ調整を行い、 α を <0.001 に設定した。

結果

本研究で私たちは、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質と核タンパク質に対して作られたヒト・モノクローナル抗体、および SARS-CoV-2 エンベロップ・タンパク質と膜タンパク質に対して作られたウサギ・ポリクローナル抗体の免疫反応度を、55 の異なる組織タンパク質とペプチドを使って測定した。ELISA の方法論を用いて、私たちは、健康な被験者から採取されたヒト血清と、非免疫ウサギ血清が、スパイク・タンパク質、核タンパク質、エンベロップ・タンパク質、膜タンパク質、または 55 の異なる組織タンパク質やペプチドと反応しないことを最初に見出した。これらすべての反応に対する ELISA の OD は、対照値の平均値を上まわる 3SD 以内、すなわち $OD < 0.25$ だった(表 1)。

表 1 SARS-COV-2 スパイク・タンパク質抗体、核タンパク質抗体、エンベロープ・タンパク質抗体、膜タンパク質抗体の、同じタンパク質および異なる交差反応組織抗原との% 反応性

抗原	スパイク タンパク質 OD	% 反応性	核タンパク質 OD	% 反応性	エンベロープ タンパク質 OD	% 反応性	膜タンパク質 OD	% 反応性
SARS-CoV-2	3.40	100 ++++	3.76	100 ++++	3.68	100 ++++	3.78	100 ++++
アクチン	0.74	17.6 +	1.1	27.1 ++	0.78	18.0 +	0.95	22.2 +
ミトコンドリア抗原 (M2)	1.52	41.8 +++	1.94	50.1 +++	2.03	53.4 +++	2.58	67.0 ++++
ENA	0.85	21.0 +	0.44	9.0 +	0.53	11.0 +	0.21	2.2 -
NA	1.34	36.2 ++	0.97	23.6 +	0.13	0.0 -	0.46	8.8 +
ヒストン	0.65	14.8 +	0.92	22.2 +	0.27	3.7 -	0.78	17.6 +
S100B	0.46	9.0 +	0.87	20.8 +	0.23	2.5 -	0.44	8.2 +
MBP	0.53	11.1 +	0.55	12.0 +	0.41	7.6 +	0.32	4.9 -
NFP	1.98	56 ++++	0.42	8.5 +	0.27	3.7 -	2.0	51.1 ++++
シナプシン	0.81	19.8 +	0.95	23.0 +	0.17	0.08 -	0.28	3.8 -
アミロイドβタンパク質	0.83	20.4 +	0.82	19.4 +	0.18	1.1 -	0.36	6.0 +
タウ・タンパク質	0.41	7.4 +	0.23	3.3 -	0.18	1.1 -	0.28	3.8 -
コラーゲン	0.45	8.6 +	0.65	14.8 +	0.18	1.1 -	0.85	19.2 +
α-ミオシン	0.72	17.0 +	0.89	21.3 +	0.36	6.2 +	0.94	21.2 +
トロポミオシン	0.21	1.2 -	0.25	3.8 -	0.25	3.1 -	0.58	12.1 +
TPO	0.98	25.1 ++	0.95	23.0 +	0.26	3.3 -	0.96	22.5 +
肝ミクロソーム	1.00	25.7 ++	1.00	24.4 +	0.17	0.08 -	0.30	4.4 -
PDH ペプチド	0.91	22.9 +	0.94	22.7 +	0.22	2.2 -	0.64	13.7 +
GAD-65	1.35	36.5 ++	1.08	26.5 ++	0.15	0.03 -	0.43	7.9 +
インスリン	0.25	2.5 -	0.16	0.4 -	0.15	0.03 -	0.97	22.8 +
インスリン受容体	0.72	17.0 +	1.77	45.5 +++	0.21	1.9 -	0.52	10.4 +
リン脂質	0.93	23.5 +	0.83	19.7 +	0.37	6.5 +	0.95	22.2 +
tTG-6	0.58	12.7 +	0.44	9.0 +	0.17	0.08 -	0.20	1.6 -
tTG-3	0.42	23.2 +	0.92	22.2 +	0.18	1.1 -	0.23	2.4 -
tTG-2	0.79	19.2 +	0.72	16.7 +	0.24	2.8 -	0.25	3.0 -
腸管上皮細胞	0.49	9.9 +	0.46	9.6 +	2.13	56.0 ++++	0.95	22.2 +
β-カテニン	0.95	24.1 +	0.56	12.3 +	0.24	2.8 -	0.15	0.3 -
クローディン	0.33	4.9 -	0.26	4.1 -	0.15	0.03 -	0.17	0.8 -
オクルディン+ゾヌリン	0.72	17.0 +	1.32	33.0 ++	0.61	13.2 +	1.12	26.9 ++

27 の他の組織 0.34 5.2 - 0.36 6.8 - 0.30 4.5 - 0.32 4.9 -

組織抗原と SARS-CoV-2 抗体との反応率は、「結果」のセクションで与えられた式に基づいて算出した。特定の SARS-CoV-2 抗体について、設定されたカットオフ・ポイントを超える反応率は有意とみなされ、その反応率を強度に応じて以下のように更に分類した。0～抗体固有のカットオフ・ポイントに基づく反応率=-すなわち有意ではない、カットオフ・ポイントに基づく反応率～25%=+すなわち弱い、25.1～40%=++すなわち中程度、40.1～55%=+++すなわち強い、>55%=++++すなわち非常に強い。

*27 のその他の組織は、グリア線維性酸性タンパク質、脳由来神経栄養因子、ミオグロビン、血小板糖タンパク質、 α -シヌクレイン、アセチルコリン受容体、リソソーム、エラスターゼ、壁細胞抗原、内因子、ラミニン、チログロブリン、ミエロペルオキシダーゼ、ノイラミニダーゼ、ガングリオシド GM1、エノーラーゼ、ソマトトロピン、ジペプチジルペプチダーゼ、アクアポリン-4、プレセニリン、フィブリン、プロテイン・ジスルフィド・イソメラーゼ、小脳・腸管神経ニューロン核抗原、グルタミン酸受容体、ドーパミン受容体、dsDNA。

私たちの予想どおり、最も強い反応は、抗 SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質抗体と SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質(OD3.40 または非常に強い)、抗 SARS-CoV-2 核タンパク質抗体と SARS-CoV-2 核タンパク質(OD3.76 または非常に強い)、抗 SARS-CoV-2 エンベロープ・タンパク質抗体と SARS-CoV-2 エンベロープ・タンパク質(OD3.68 または非常に強い)、抗 SARS-CoV-2 膜タンパク質抗体と SARS-CoV-2 膜タンパク質(OD3.78 または非常に強い)の間で起こり、アッセイの最大検出限界(OD4.0)に近い。これらの SARSCoV-2 抗体は、55 の組織抗原のうち 28 と、低い OD から非常に高い OD で反応した。これら 28 の抗原は、ガット・プロテインやバリア・タンパク質、消化器系細胞、甲状腺、神経系、心臓、関節、皮膚、筋肉、ミトコンドリア、肝臓組織、そして自己免疫疾患のスクリーニングに用いられる抗原、を含む多様な組織群の集合体だった。27 の非反応性組織抗原に対する抗 SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質抗体の反応性の平均 OD+3SD は 0.34 だった。

この 0.34 の OD をカットオフとして用いて、私たちは、ヒト抗 SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質抗体がニューロフィラメント・タンパク質すなわち NFP と最も強く反応し(OD1.98)、次いで M2(OD1.52)、GAD-65(OD1.35)、核抗原すなわち NA(OD1.34)と強い反応を示すことを見出した。このスパイク・タンパク質抗体と、TPO および肝ミクロソームとの反応は、中程度(OD0.98、OD1.0)だった。別の 19 の抗原とスパイク抗体との反応は弱く、OD は 0.41~0.85 の範囲だった(図 1 参照)。

この抗体に対する適切なカットオフ・ポイント(OD0.36)を用いると、核タンパク質に対するヒト・モノクローナル抗体は、55 の試験抗原のうち 24 と、弱い反応性から非常に強い反応性を示した。これらは、スパイク・タンパク質抗体が反応した同じ 25 の抗原のうち 24 であり、多少の差異はあったものの、一般的に核タンパク質抗体の反応は、スパイク・タンパク質の反応と同等だった。核タンパク質抗体は、M2(OD1.94)およびインスリン受容体(OD1.77)と最も強い反応を、オクルディン+ゾヌリンと強い反応を示した(OD1.32)。GAD-65 およびアクチンとの反応は中等度(OD1.08、OD1.1)であったのに対し、他の 20 の組織抗原との反応は弱く、0.42~0.97 の範囲だった(図 2 参照)。

他の抗体と比較すると、OD0.30 のカットオフで、SARS-CoV-2 エンベロープ・タンパク質抗体と、55 の異なる試験抗原との相互作用は、わずか 8 の抗原に対してしか重要な結果を示さず、M2(OD2.03)および腸管上皮細胞抗原(OD2.13)としか非常に強い反応を示さなかった。アクチン(OD0.78)、オクルディン+ゾヌリン(OD0.61)、ENA(OD0.53)、MBP(OD0.41)、リン脂質(OD0.37)、 α -ミオシン(OD0.36)との反応性は低いと考えられる。エンベロープ・タンパク質抗体と、他の 47 の抗原との反応は、統計的に有意でないか、陰性だった(図 3 参照)。

OD0.32 のカットオフで、SARS-CoV-2 膜タンパク質抗体は、55 の試験抗原のうち 18 と反応した。この反応は、M2(OD2.58)と NFP(OD2.00)で非常に強かった。中程度の反応は、オクルディン+ゾヌリン(OD1.12)のみだった。この抗体と、追加の 15 の抗原との反応は低かった(OD は 0.36~0.95)(図 4 参照)。

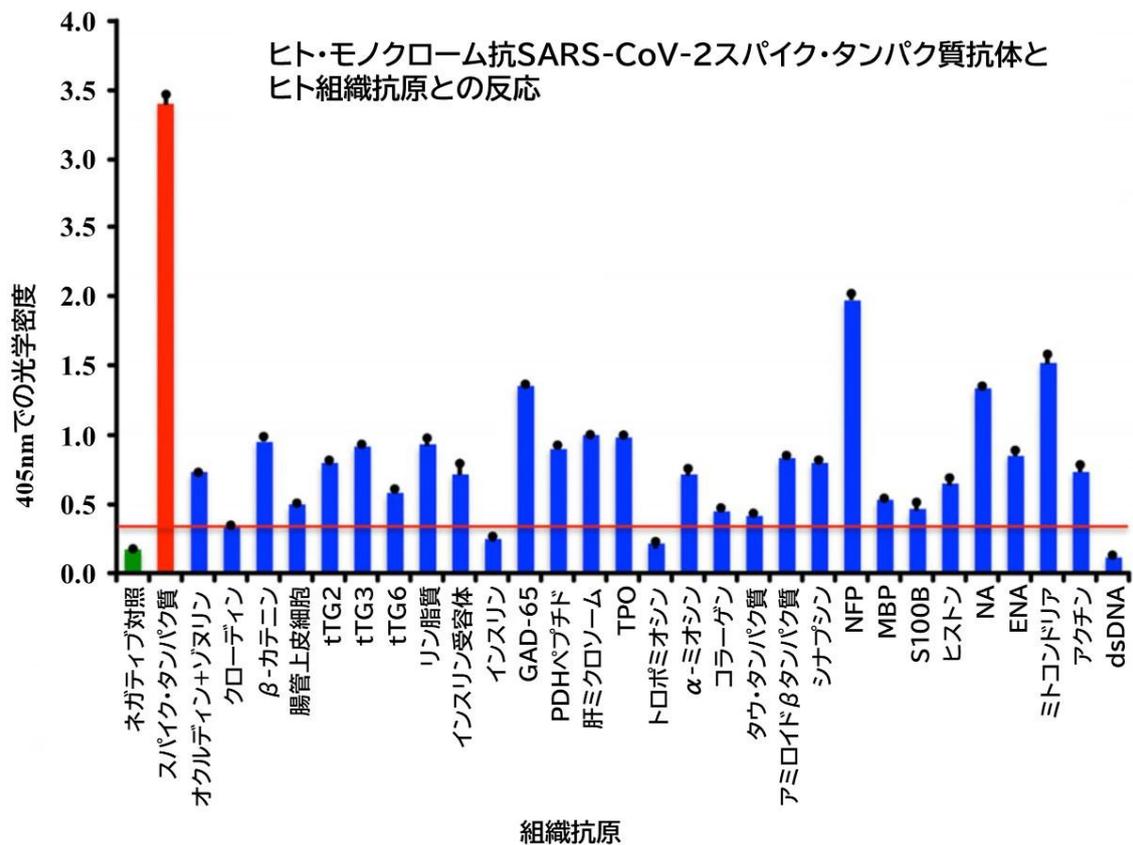


図1 抗SARS-CoV-2スパイク・タンパク質ヒト・モノクローナル抗体とヒト組織抗原との反応。それぞれの棒は、同じ抗原に対する4つの異なる値から算出した平均を表す。抗SARS-CoV-2スパイク・タンパク質抗体の、27の非反応性組織抗原との反応性の平均OD+3SDは0.34であり、これをカットオフ・ポイントとして、赤線で示した。このカットオフ・ポイントを超えるものはすべて有意である。

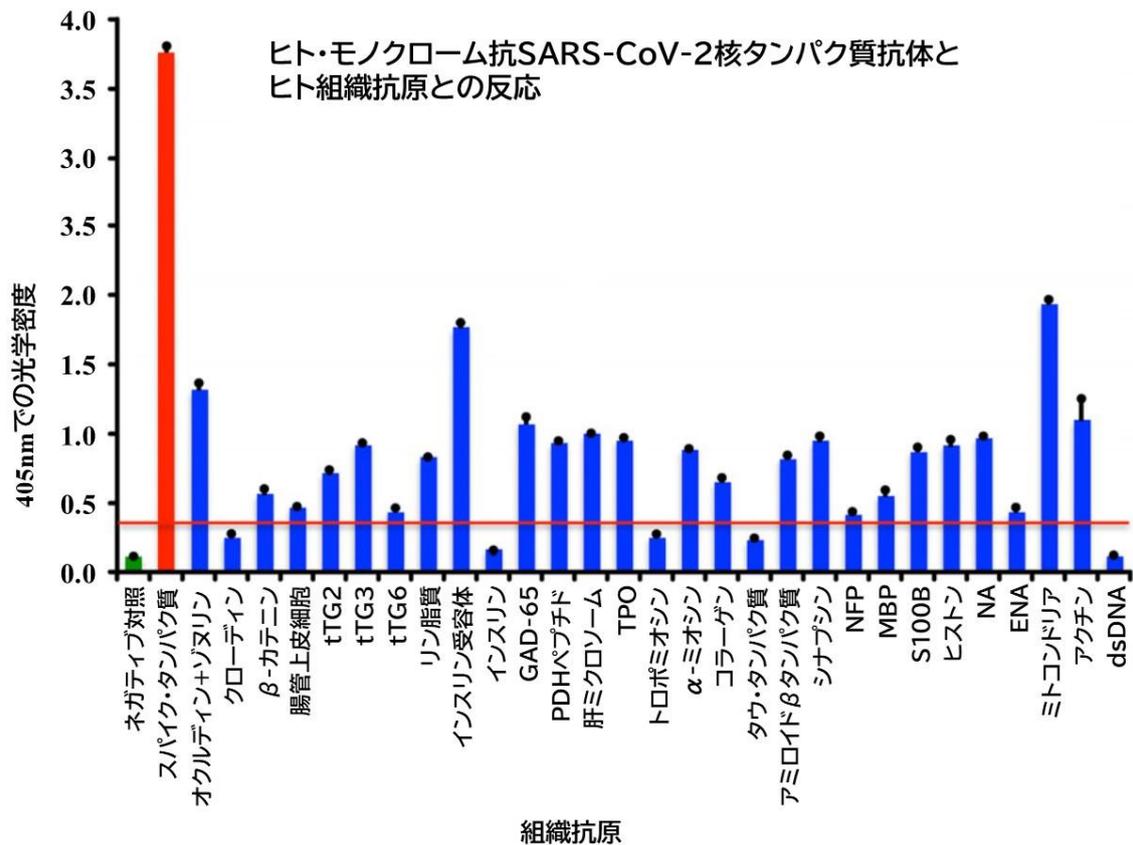


図2 抗 SARS-CoV-2 核タンパク質ヒト・モノクローナル抗体とヒト組織抗原との反応。それぞれの棒は、同じ抗原に対する4つの異なる値から算出した平均を表す。抗 SARS-CoV-2 核タンパク質抗体の、31の未反応組織抗原との反応性の平均 OD+3SD は 0.36 であり、これをカットオフ・ポイントとして、赤線で示した。このカットオフ・ポイントを超えるものはすべて有意である。

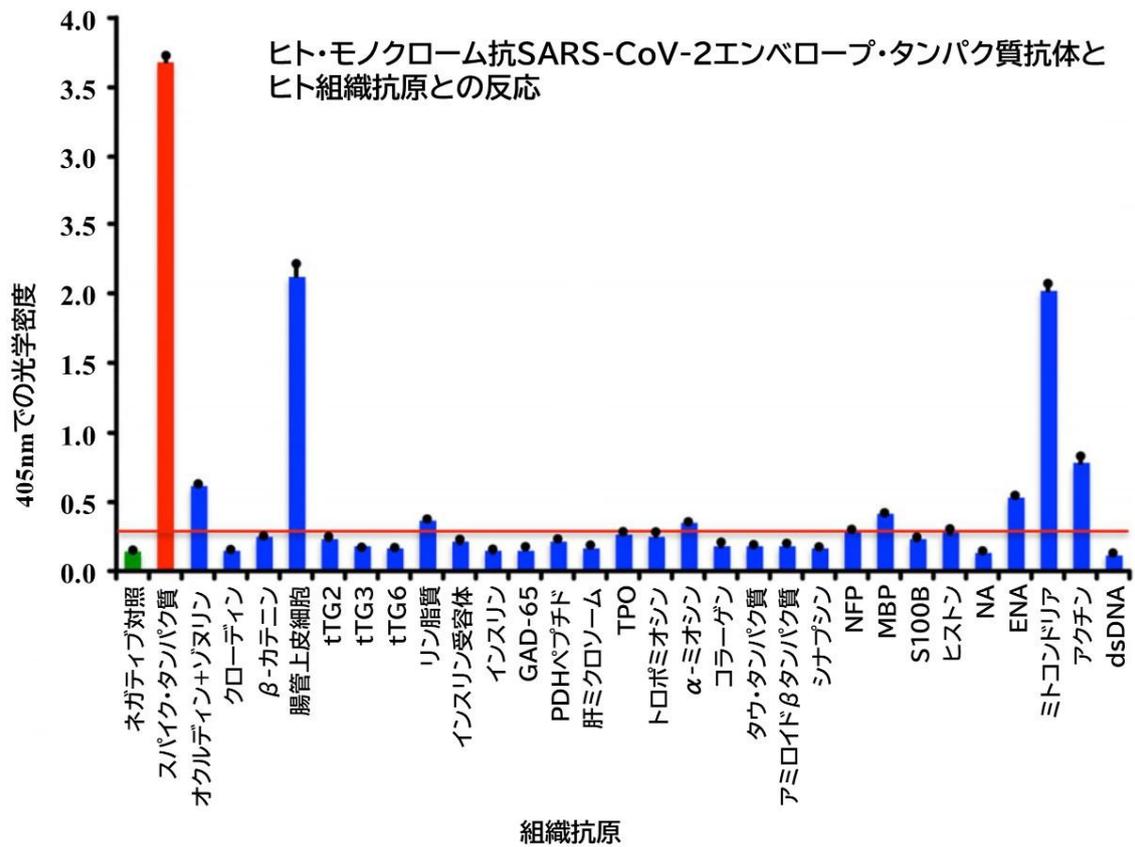


図3 抗SARS-CoV-2エンベロープ・タンパク質ウサギ・ポリクローナル抗体とヒト組織抗原との反応。それぞれの棒は、同じ抗原に対する4つの異なる値から算出した平均を表す。抗SARS-CoV-2エンベロープ・タンパク質抗体の、47の未反応組織抗原との反応性の平均OD+3SDは0.30であり、これをカットオフ・ポイントとして、赤線で示した。このカットオフ・ポイントを超えるものはすべて有意である。

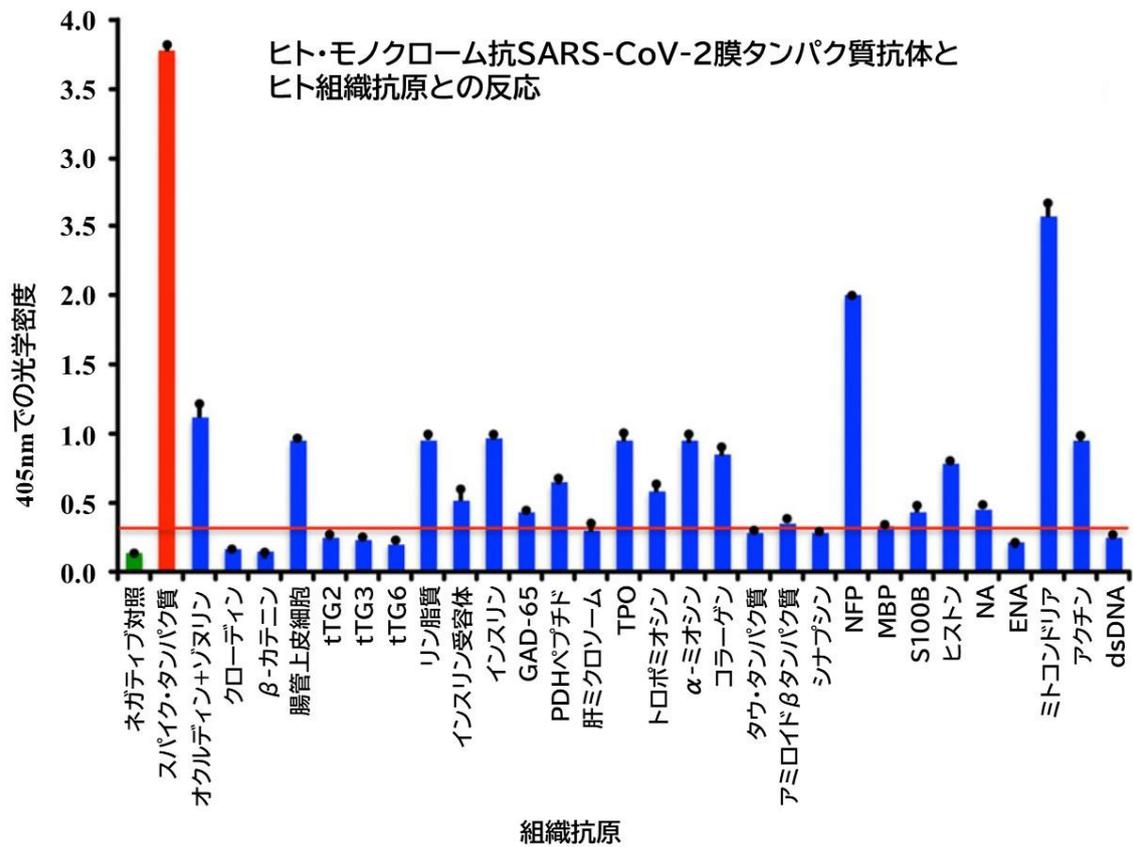


図4 抗SARS-CoV-2膜タンパク質ウサギ・ポリクローナル抗体とヒト組織抗原との反応。それぞれの棒は、同じ抗原に対する4つの異なる値から算出した平均を表す。抗SARS-CoV-2膜タンパク質抗体の、37の未反応組織抗原との反応性の平均OD+3SDは0.32であり、これをカットオフ・ポイントとして、赤線で示した。このカットオフ・ポイントを超えるものはすべて有意である。

dsDNA および残りの組織抗原との反応は、すべての非反応性組織抗原の平均 OD+3SD と有意な差はなかった。

これらすべての反応は図 1~4 にまとめている。

スパイク・タンパク質、核タンパク質、エンベロープ・タンパク質、膜タンパク質に対して作られた SARS-CoV-2 固有の抗体の、同じタンパク質および異なる組織抗原との反応性の割合は、表 1 にまとめている。

表 1 に示されているように、スパイク・タンパク質抗体は、55 の試験標的タンパク質のうち 25 と著しい反応を呈し、最も強い反応は NFP および M2 抗原で発生した。核タンパク質抗体は、55 の組織抗原のうち 24 と反応し、M2 とインスリン受容体が最も高い反応性を示した。エンベロープ・タンパク質抗体は、わずか 8 の異なる抗原と、弱い反応から非常に強い反応を示し、M2 と腸管上皮細胞抗原が最も顕著だった。最後に、膜タンパク質抗体は、M2 および NFP と非常に強く反応したが、追加の 16 の組織抗原とはそれほど強く反応しなかった。興味深いことに、M2 は、スパイク・タンパク質および核タンパク質に対して作られたヒト・モノクローナル抗体と、エンベロープ・タンパク質および膜タンパク質に対して作られたウサギ・ポリクローナル抗体のいずれとも強く反応した(表 1)。

ヒト組織抗原に結合する抗 SARS-CoV-2 抗体の分析特異性の実証

ヒト・モノクローナル抗 SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質抗体、ヒト・モノクローナル抗 SARS-CoV-2 核タンパク質抗体、ウサギ・ポリクローナル抗 SARS-CoV-2 エンベロープ抗体、ウサギ・ポリクローナル抗 SARS-CoV-2 膜抗体の分析特異性は、連続希釈研究および阻害研究によって確認された。図 5A~D に示されているように、これらの抗体と、4 つの異なる SARS-CoV-2 タンパク質および交差反応抗原との結合は、抗体の希釈に比例して顕著に減少した。例えば、抗スパイク・タンパク質抗体が 1:200 の希釈でスパイク・タンパク質と反応すると OD は 3.4 となり、希釈 1:800 で OD は 2.6 となり、希釈 1:25,600 で、OD は背景に非常に近い 0.39 となった。同じスパイク・タンパク質抗体と、M2、MBP、NFP、GAD-65 といった交差反応抗原との反応も、希釈に比例して減少した(図 5A)。同様の結果は、固定濃度のこれらと同じタンパク質、または 4 つの異なる交差反応組織抗原に、連続希釈された抗核タンパク質抗体、抗エンベロープ抗体、抗膜抗体を適用した場合にも得られた(図 5B~D)。

これらの抗体反応の特異性を更に示すため、同じ抗原でコーティングされた ELISA プレーットの液相に、0~128 μ g の濃度範囲で M2、MBP、NFP、GAD-65 を添加して阻害研究を行った。抗スパイク・タンパク質抗体と交差反応抗原とのベースライン非阻害反応と比較してみると、交差反応抗原の濃度を増加させて加え、続いて一次抗体を加えた結果、反応性の程度に比例して、抗スパイク・タンパク質抗体と交差反応組織抗原との結合に顕著な阻害が見られた。例えば、NFP 抗原による SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質抗体と NFP との結合や、M2 抗原による M2 との結合のこのような阻害は、MBP よりも顕著だった(図 6A 参

照)。同じ抗原でコーティングされたウェルに結合する抗核タンパク質抗体、抗膜タンパク質抗体、抗膜タンパク質抗体の類似の減少も、交差反応組織抗原を ELISA アッセイの液相に加えた際に観察された(図 6B~D)。ベースラインまたは対照試験管(試験管#1)と比較して、本阻害研究で使用された M2 抗原の異なる濃度に比例して OD が減少していることは、SARS-CoV-2 抗体と交差反応抗原との結合において特異性が認められることの証拠である。

SARS-CoV-2 タンパク質、ミトコンドリア M2 タンパク質、F-アクチン、TPO の間に見られるアミノ酸配列の類似性

BLAST を用いて、私たちは、SARS-CoV-2 タンパク質と、ミトコンドリア M2 タンパク質(スパイク・タンパク質に対して作られたヒト・モノクローナル抗体は、M2 タンパク質と非常に強く反応した)、F-アクチン(平滑筋の主要成分で、スパイク・タンパク質ヒト・モノクローナル抗体はこの抗原に対して中程度の反応を示した)、TPO(甲状腺自己免疫における標的抗原で、2 つのモノクローナル抗体と 1 つのポリクローナル抗体が中程度に反応した)との同一性の程度を広範囲に調査した(図 1)。ミトコンドリア M2、F-アクチン、TPO タンパク質との類似性を評価するために私たちが用いた SARS-CoV-2 に対するヒト・モノクローナル抗体は、軽度の症状から中等度の症状の患者において、最近になって人への使用が認可された一部のモノクローナル抗体ベース薬剤で使用されているものと非常に類似していた。表 2~6 に示されているように、SARS-CoV-2 タンパク質は、ミトコンドリア M2 タンパク質と非常に多くのペプチド配列を共有しており、同一性は 50%~78%の範囲であり、F-アクチンと 58%~63%、TPO と 50%~70%の同一性だった。私たちは、一部のペプチド配列は SARS-CoV-2 の複数の断片と一致 — 一例えば、アクチン配列 SIL-ASLSTF は、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質の鎖 A、B、C、E、並びに SARS-CoV-2 スパイク受容体結合ドメインの鎖 E における配列 SVLYNSASFSTF と交差反応した — することを見出した。同一性が 33%~49%の範囲のほぼ同数のペプチド配列も検出されたが、表には示していない。

0 レベル、低レベル、高レベルのミトコンドリア抗体を含む血清と、ミトコンドリア M2 抗原および SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質および核タンパク質との反応

私たちはまず、Trinity Biotech 製 M2 抗体キットから選んだキャリブレーターと、既知の M2 抗体レベルを持つ陽性対照が、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質と核タンパク質のいずれとも中程度に反応したことを見出した。更に、M2 抗体が上昇した 4 つの血清すべてが、同じ SARS-CoV-2 タンパク質と中程度に反応することも見出した。M2 抗体が検出されなかったレベルの 4 つの血清は、これらのタンパク質と反応しなかった(表 7)。私たちが、4 人の陽性患者の反応性の OD 値と、4 人の陰性患者の OD 値を比較したところ、結果は統計的に有意だった(表 7)。これらの結果は更に、交差反応抗体の産生を結果的にもたらす、SARS-CoV-2 と M2 タンパク質の間に見られる模倣を支持する。

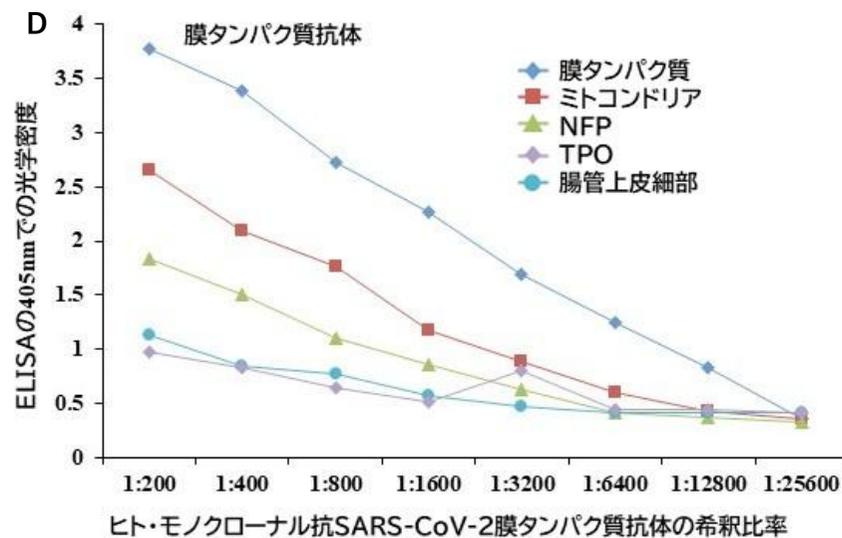
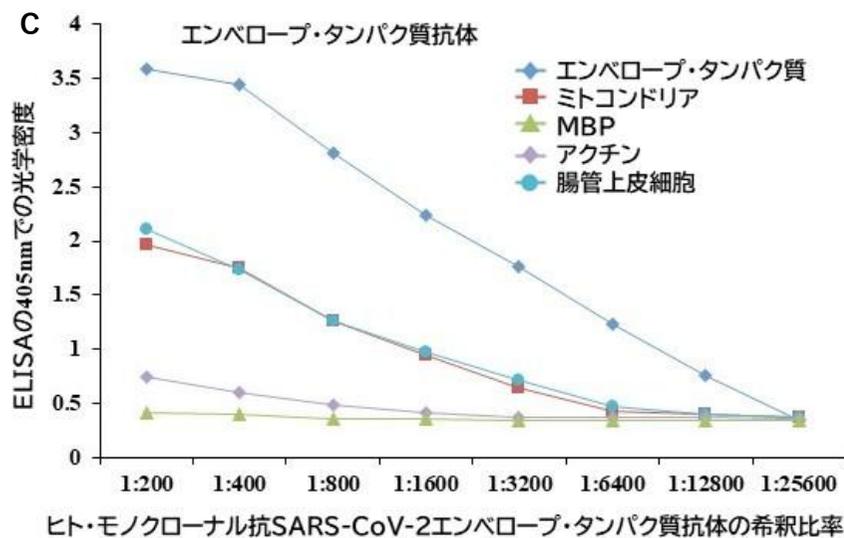
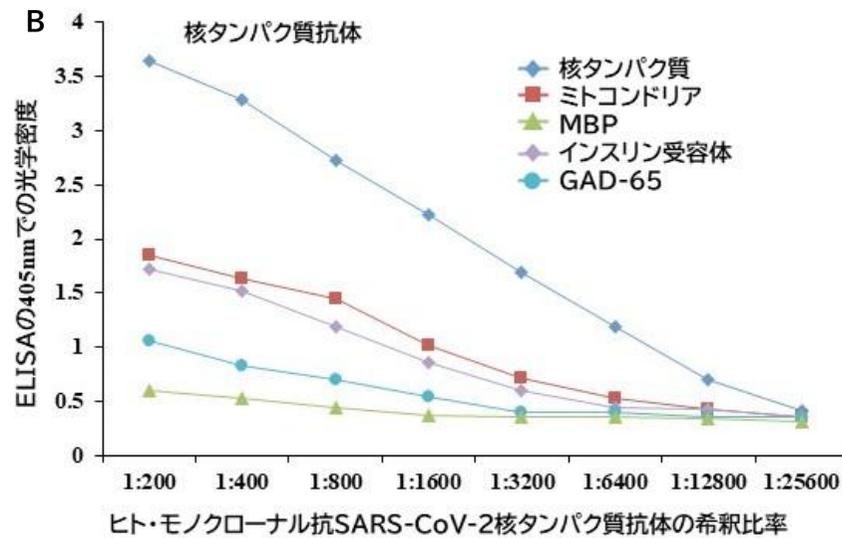
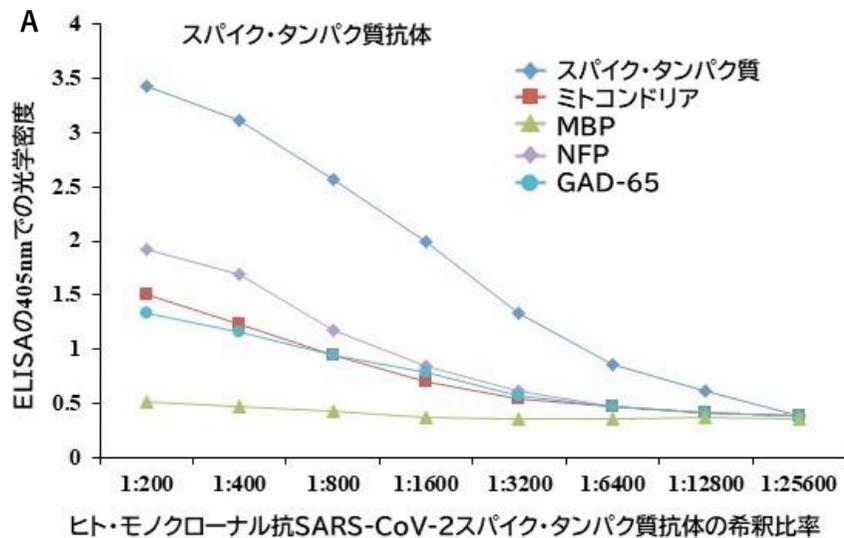


図5 希釈研究試験による分析特異性の実証

(A)様々な希釈のヒト・モノクローナル抗 SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質抗体と、スパイク・タンパク質(青色の菱形◆)、M2(赤色の四角■)、MBP(緑色の三角▲)、NFP(紫色の菱形◆)、GAD-65(水色の丸形●)との反応を示す。(B)様々な希釈のヒト・モノクローナル抗 SARS-CoV-2 核タンパク質抗体と、核タンパク質(青色の菱形◆)、M2(赤色の四角■)、MBP(緑色の三角▲)、インスリン受容体(紫色の菱形◆)、GAD-65(水色の丸形●)との反応を示す。(C)様々な希釈のウサギ・ポリクローナル抗 SARS-CoV-2 エンベロープ・タンパク質抗体と、エンベロープ・タンパク質(青色の菱形◆)、M2(赤色の四角■)、MBP(緑色の三角▲)、アクチン(紫色の菱形◆)、腸管上皮細胞(水色の丸形●)との反応を示す。(D)様々な希釈のウサギ・ポリクローナル抗 SARS-CoV-2 膜タンパク質抗体と、膜タンパク質(青色の菱形◆)、M2(赤色の四角■)、NFP(緑色の三角▲)、TPO(紫色の菱形◆)、腸管上皮細胞(水色の丸形●)との反応を示す。

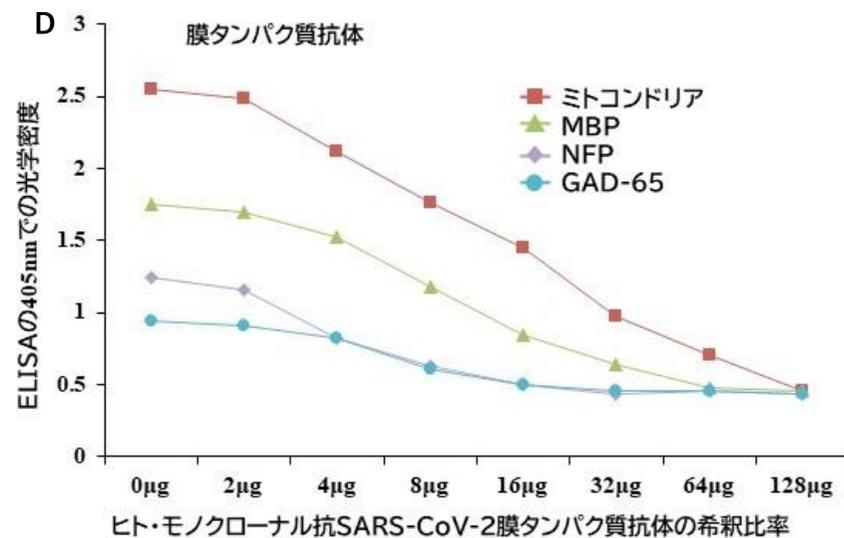
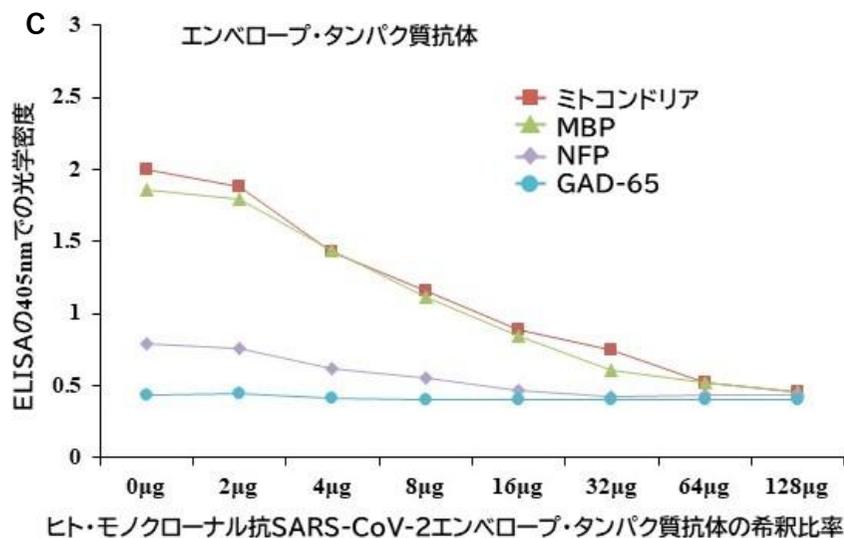
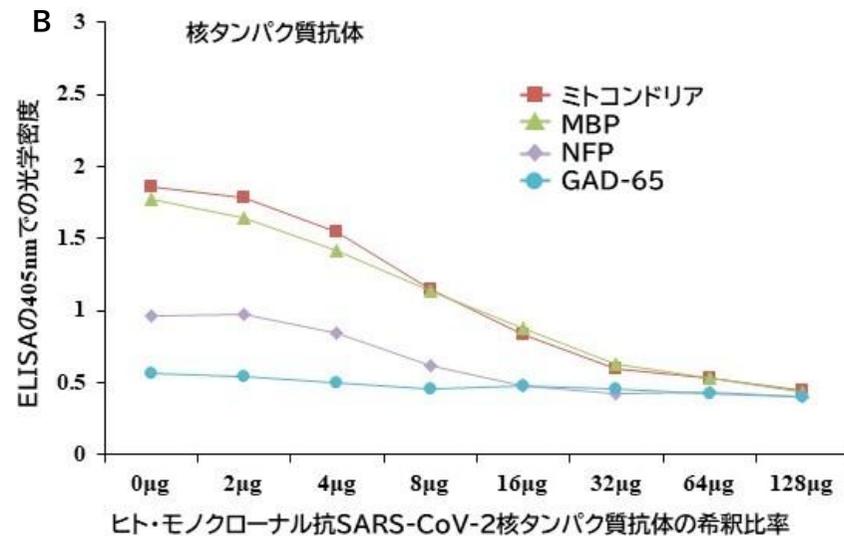
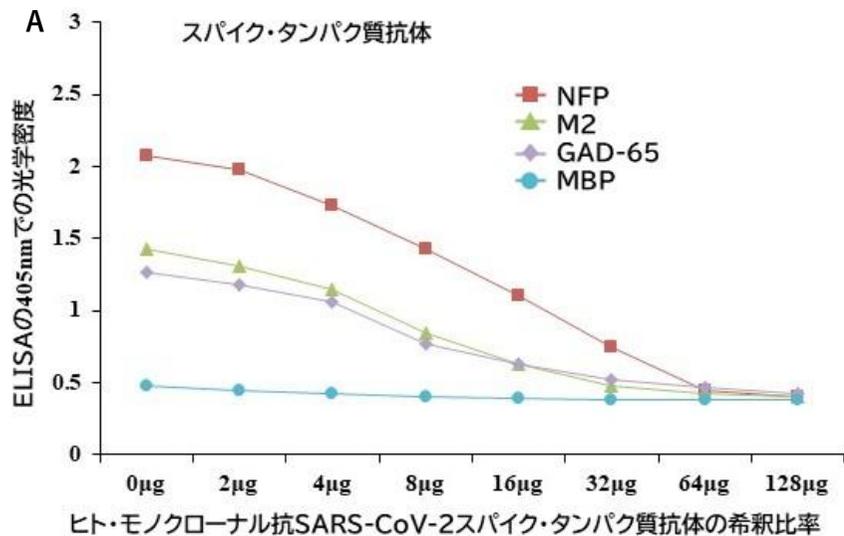


図 6 阻害研究による分析特異性の実証

(A) グラフは、NFP(赤色の四角■)、M2(緑色の三角▲)、GAD-65(紫色の菱形◆)、MBP(水色の丸形●)でコーティングされたプレートを用いて、ヒト・モノクローナル抗 SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質抗体と、液相内で異なる濃度にした同じ抗原との反応の阻害を示す。(B) グラフは、インスリン受容体(赤色の四角■)、M2(緑色の三角▲)、GAD-65(紫色の菱形◆)、MBP(水色の丸形●)でコーティングされたプレートを用いて、ヒト・モノクローナル抗 SARS-CoV-2 核タンパク質抗体と、液相内で異なる濃度にした同じ抗原との反応の阻害を示す。(C) グラフは、腸管上皮細胞(赤色の四角■)、M2(緑色の三角▲)、アクチン(紫色の菱形◆)、MBP(水色の丸形●)でコーティングされたプレートと用いて、ウサギ・ポリクローナル抗 SARS-CoV-2 エンベロープ・タンパク質抗体を、液相内で異なる濃度にした同じ抗原との反応の阻害を示す。(D) グラフは、M2(赤色の四角■)、NFP(緑色の三角▲)、腸管上皮細胞(紫色の菱形◆)、TPO(水色の丸形●)でコーティングされたプレートを用いて、ウサギ・ポリクローナル抗 SARS-CoV-2 膜タンパク質抗体と、液相内で異なる濃度にした同じ抗原との反応の阻害を示す。

表 2 SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質抗原、核タンパク質抗原、ミトコンドリア M2 抗原の間に見られる潜在的交差反応エピトープ

SARS-CoV-2 抗原	SARS-CoV-2 配列	マッピングされた開始端～終了端	ミトコンドリア M2 配列	ID(%)
鎖 A、スパイク・タンパク質	PQCVNLTT-RT	2～11	PHCS-TTYLRT	50
鎖 A、スパイク・タンパク質	KEIDRLNE	14～21	KEGDKINE*	63
鎖 A、スパイク・タンパク質	VAETGT	27～32	VAEGGT	83
鎖 A、スパイク・タンパク質	QLLVPRGS	49～56	QLL-GS	63
鎖 A、スパイク・タンパク質	DIPIGAGIC	654～662	DVPGAIIIC*	78
鎖 A、スパイク・タンパク質	LLQY-GS	738～743	LLQLLGS*	71
鎖 A、スパイク・タンパク質	IA-VEQDK	770～776	IAEVETDK*	75
鎖 A、スパイク・タンパク質	IKDFGGFNFSQI	794～805	IK-NFSAI*	50
鎖 A、スパイク・タンパク質	IA-VEQDK	801～807	IAEVETDK	75
鎖 A、スパイク・タンパク質	SKRS-FI	813～818	SKISVNDFI*	56
鎖 A、スパイク・タンパク質	RLITGRL-QSLQT	995～1,006	RVIAQRLMQSKQT*	62
鎖 A、スパイク・タンパク質	LMSFPQSAPH	1,049～1,058	LMQSKQTIPH*	50
鎖 A、スパイク・タンパク質	AGLIA-IV	1,222～1,228	AGLITPIV	75
鎖 A、核タンパク質	SP-RWYFY	60～66	SPGRRY-Y*	63

*この対象配列は、SARS-CoV-2 配列の複数の領域と一致した。

SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質は、ミトコンドリア M2 タンパク質と多数のペプチド配列を共有しており、同一性は 50%～78%の範囲だった。同一性の比率が 33%～49%の範囲にある、ほぼ同数のペプチド配列も検出されたが、この表には示されていない。

ペプチド・マッピングは、NIH/米国国立医学図書館の BLAST(ベーシック局所的アライメント検索ツール)配列マッチング・プログラムを用いて実施した。

表 3 SARS-CoV-2 タンパク質抗原とミトコンドリア M2 抗原との間に見られる潜在的交差反応エピトープ

SARS-CoV-2 抗原	SARS-CoV-2 配列	マッピングされた開始端～終了端	ミトコンドリア M2 配列
鎖 i、非構造タンパク質 1	LVPGFNEK	4～11	LVPADNEK
鎖 i、非構造タンパク質 1	VLL-RKNGNK	121～129	VLLVRKELNK
鎖 i、非構造タンパク質 1	DLGDELGTD	144～152	DLLAEIETD
鎖 i、非構造タンパク質 1	GD-ELGTD	146～152	GDLIAEVETD
鎖 A、非構造タンパク質 3	GIFGAD-PI	130～137	GVF-TDIPI
鎖 A、非構造タンパク質 7	SLLSVLLS	54～61	SMMSVTLS*
鎖 A、非構造タンパク質 8	LC-VD-EA	46～51	LCHIVEKEA
鎖 A、非構造タンパク質 9	MS-CAAGTT	15～22	MSPHCS-TT
鎖 A、非構造タンパク質 9	GR-FV-LA	41～46	GRVFDPLA
鎖 A、非構造タンパク質 10	TMGNSTV	1～7	TMG-TV
鎖 B、非構造タンパク質 10	GTGQA.IT	51～57	GTGPDGRIT
鎖 A、非構造タンパク質 12	VSAARLTP	14～21	VSVAVSTP
鎖 A、非構造タンパク質 12	AAISDY-DYYR	448～457	ADISAFADY-R
鎖 A、非構造タンパク質 12	EDQDALF-AYT	522～531	EDIEA-FKNYT
鎖 E、非構造タンパク質 13	ETTADIVVFDEISMAT	369～384	ETIANDVV-SLAT*
鎖 A、ヘリカーゼ NSP13	ETLKAT	138～143	ETDKAT
鎖 A、ヘリカーゼ NSP13	SAI-NRPQ	488～494	SAINPPQ
鎖 A、主要プロテアーゼ	TANPKTP	95～101	TASPPTP
鎖 A、非構造タンパク質 16	LLVDSDLN	94～101	LLVRKELN*
鎖 A、非構造タンパク質 16	VSDADST-LI	104～112	VSVAVSTPAGLI*
鎖 A、タンパク質 9b	RKTLNS-LE	58～65	RKELNKILE
鎖 A、ウリジル酸特異的エンドリボヌクレアーゼ	EVPPV-SIHNNTV	43～53	DVPIGAIICITV
鎖 A、ウリジル酸特異的エンドリボヌクレアーゼ	GVDIAANTVI	100～109	GVETIANDVV
鎖 A、ウリジル酸特異的エンドリボヌクレアーゼ	ASLNGVTL	184～191	ASMMSVTL

*この対象配列は、SARS-CoV-2 配列の複数の領域と一致した。

他の SARS-CoV-2 タンパク質も、M2 タンパク質と非常に高い同一性を示した。一部のペプチド配列は、SARS-CoV-2 の複数の領域と一致することが判明した。同一性の比率が 33%～49%の範囲にある、ほぼ同数のペプチド配列も検出されたが、この表には示されていない。

ペプチド・マッピングは、NIH/米国立医学図書館の BLAST(ベーシック局所的アライメント検索ツール)配列マッチング・プログラムを用いて実施した。

表 4 SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質抗原、核タンパク質抗原、アクチン抗原の間に見られる潜在的交差反応エピトープ

SARS-CoV-2 抗原	SARS-CoV-2 配列	マッピングされた開始端～終了端	アクチン配列	ID(%)
鎖 A、スパイク・タンパク質	GKIQDSLST	16～25	GSILASLS-T*	60
鎖 A、スパイク・タンパク質	STEKSNII	85～92	STMKIKII*	63
鎖 A、スパイク・タンパク質	IGAGICAS	697～704	IGGSILAS*	63
鎖 A、スパイク・タンパク質	PS-GRLVPR	1,210～1,217	PSIVGR-P	60
鎖 A、核タンパク質	SSSTKKS	15～21	SSSLEKS	71
鎖 A、核タンパク質	TEGALNTPK	90～98	TEAPLN-PK	67
鎖 A、スパイク・タンパク質	SVLYNSASFSTF	33～44	SIL-ASLSTF**	58
鎖 B、スパイク・タンパク質	SVLYNSASFSTF	48～59	SIL-ASLSTF**	58
鎖 C、スパイク・タンパク質	SVLYNSASFSTF	48～59	SIL-ASLSTF**	58
鎖 E、スパイク・タンパク質	SVLYNSASFSTF	37～48	SIL-ASLSTF**	58
鎖 E、スパイク受容体結合ドメイン	SVLYNSASFSTF	48～59	SIL-ASLSTF**	58

*この対象配列は、SARS-CoV-2 配列の複数の領域と一致した。

**これは、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質の異なる鎖および異なる部位で発生した、1つの配列間のマッチングの例である。

SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質は、F-アクチンとかなりの数のペプチド配列(58.63%)を共有した。一部のペプチド配列は、SARS-CoV-2 の複数の領域と一致することが判明した。例えば、アクチン配列 SIL-ASLSTF は、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質の鎖 A、B、C、E、並びに、SARS-CoV-2 スパイク受容体結合ドメインの鎖 E における配列 SVLYNSASFSTF と交差反応した。同一性の比率が 33%～49%の範囲にある、ほぼ同数のペプチド配列も検出されたが、この表には示されていない。

ペプチド・マッピングは、NIH/米国国立医学図書館の BLAST(ベーシック局所的アライメント検索ツール)配列マッチング・プログラムを用いて実施した。

表 5 SARS-CoV-2 タンパク質抗原とアクチン抗原との間に見られる潜在的交差反応エピトープ

SARS-CoV-2 抗原	SARS-CoV-2 配列	マッピングされた開始端～終了端	アクチン配列
鎖 A、非構造タンパク質 3	AE-VRTIK	3～9	AEREIVRDIK*
鎖 A、非構造タンパク質 3	SSFLEMKS	165～172	SSSLE-KS
鎖 B、非構造タンパク質 3	PSFLG	78～82	PSFLG*
鎖 B、非構造タンパク質 8	MAIASEFSSLP-SY	1～13	MATAASSSSLEKSY
鎖 B、非構造タンパク質 8	SSLP-SY	7～12	SSLEKSY
鎖 B、非構造タンパク質 10	ANSTVLS	9～15	AN-TVLS*
鎖 A、非構造タンパク質 12	LMPILT	241～246	LMKILT
鎖 A、非構造タンパク質 12	YEAMYT-PHTVL	921～931	YEG-YALPHAIL*
鎖 A、ヘリカーゼ NSP13	YIGDPAQ	400～406	YVGDEAQ*
鎖 A、ヘリカーゼ NSP13	DTVSAALVVDN	452～461	DDIAALVVDN*
鎖 A、ヘリカーゼ NSP13	CDVTDV-TQLY	57～66	CDV-DIRKDLY
鎖 A、ヘリカーゼ NSP13	PE-YFNSV	421～427	PERKY-SV*
鎖 A、3C 様プロテアーゼ	DR-Q-TA	185～189	DRMQKEITA*
鎖 A、パパイン様プロテアーゼ	RE-VRTIK	3～9	REIVRDIK
鎖 A、タンパク質 3a	TSSIVITSGDGT	164～176	TTGIVMDSGDGVT
鎖 A、レプリカーゼポリプロテイン 1ab	DR-Q-TA	187～191	DRMQKEITA*
鎖 E、SARS-CoV-2 受容体結合ドメイン	SVLYNSASFSTF	48～59	SIL-ASLSTF
鎖 A、ウリジル酸特異的エンドリボヌクレアーゼ	VDIA-ANTV	99～106	VDIRKDLYANTV
鎖 A、ウリジル酸特異的エンドリボヌクレアーゼ	EGYAFEH	250～256	EGYALPH

*この対象配列は、SARS-CoV-2 配列の複数の領域と一致した。

他の SARS-CoV-2 タンパク質も、F-アクチン・タンパク質と非常に高い同一性を示した。同一性の比率が 33～49%の範囲にある、ほぼ同数のペプチド配列も検出されたが、この表には示されていない。また、一部のペプチド配列は、SARS-CoV-2 の複数の領域と一致することも判明した。例えば、この表に示されているアクチン配列 SIL-ASLSTF は E 鎖における配列 SVLYNSASFSTF と反応し、SARS-CoV-2 受容体結合タンパク質も、表 4 に示すように、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質の鎖 A、B、C、E、並びに、SARS-CoV-2 スパイク受容体結合ドメインの鎖 E における配列 SVLYNSASFSTF と交差反応した。

ペプチド・マッピングは、NIH/米国国立医学図書館の BLAST(ベーシック局所的アライメント検索ツール)配列マッチング・プログラムを用いて実施した。

表 6 SARS-CoV-2 タンパク質抗原と TPO 抗原との間に見られる潜在的交差反応エピトープ

SARS-CoV-2 抗原	SARS-CoV-2 配列	マッピングされた開始端～終了端	TPO 配列	ID(%)
鎖 A、ヘリカーゼ	VLTSH-TVM	226～233	VL-SVTLVM*	67
鎖 A、スパイク・タンパク質 S1、S2	VLGQSKR-VD	1,020～1,028	VLEESKRLVD*	70
鎖 B、レプリカーゼポリプロテイン 1a	EDKRAKVTSAM-QTM	2～15	ESKRL-VDTAMYATM*	53
鎖 A、スパイク糖タンパク質	NLTRTQLPPA	48～58	NLKKRGILSPA*	55
鎖 A、スパイク・タンパク質 16	APGTAVLRQWLP	79～90	ASNTALAR-WLP*	58
鎖 A、スパイク・タンパク質 S1、S2	VTWFHAIHVS	49～58	VTR-HVIQVS*	60
鎖 A、レプリカーゼポリプロテイン 1ab	SAARLTPCGTG	6～16	SAA-CGTG*	64
鎖 A、レプリカーゼポリプロテイン 1a	LLSVLQQLR	13～21	LLRVHARLR*	56
鎖 A、スパイク糖タンパク質	FL-GRSLEV	1,221～1,228	FLAGDGRASEV	55
鎖 A、スパイク・タンパク質 3	ADIV-EEAKKV	21～30	ADAVYQEARKV*	64
鎖 A、主要プロテアーゼ	LNGLWLDDTVY	27～37	LNAHWSADAVY*	55
鎖 A、核タンパク質	PY-G-AN	77～81	PYEGYDSTAN*	50
鎖 A、スパイク糖タンパク質	WVLLSTFLGRSGGGL	1,219～1,233	WTLL-R-GGGL	53
鎖 A、スパイク糖タンパク質	VLYNSASFST	34～43	VLSNS-ST	60
鎖 A、ウリジル酸特異的エンドリボスクレアーゼ	SSGVDLGTENL	8～18	SSTLDLASINL	55
鎖 A、ウリジル酸特異的エンドリボスクレアーゼ	TENLYFQSNMS	15～25	TERLFVLSNSS	55
鎖 A、2'-O-チルトランスフェラーゼ	FV-SDADSTL	105～113	FVLSNS-STL*	60
鎖 A、ヘリカーゼ	LSYGIATVREV	147～1,578	LSTAIAS-RSV*	55
鎖 A、スパイク・タンパク質 S1、S2	PD-VD-LG	86～91	PDNIDVWLG	56
鎖 B、スパイク・タンパク質 3	RARAGEAANF-CALI	138～151	RARTG-PLFAC-LI*	53
鎖 A、スパイク糖タンパク質	YEQSGRENL	1,237～1,245	YELQGREQL*	67
鎖 A、スパイク糖タンパク質	YKLPDDFTG-CV	90～100	YELGDD-GRTCV*	54
鎖 A、3C 様プロテアーゼ	ELLQNGMNGRT	268～278	EL-GDDGRT*	55
4A8 と複合結合したスパイク・タンパク質	SPRRARSVASQ	671～681	SPQRA-AAQ*	55

*この対象配列は、SARS-CoV-2 配列の複数の領域と一致した。

SARS-CoV-2 タンパク質は、TPO タンパク質と非常に高い同一性を示した。実際、同一性の比率が 33%～49%の範囲にあるペプチド配列も約 2 倍検出されたが、この表には示されていない。また、一部のペプチド配列は、SARS-CoV-2 の複数の領域と一致することも判明した。例えば、この表に示されている TPO 配列 VLEESKRLVD は鎖 A における VLGQSKR-VD と反応し、スパイク・タンパク質 S1、S2 も、他の SARS-CoV-2 タンパク質の配列とも交差反応した。

ペプチド・マッピングは、NIH/米国立医学図書館の BLAST(ベーシック局所的アライメント検索ツール)配列マッチング・プログラムを用いて実施した。

表 7 ミトコンドリア M2 抗体キットのキャリブレーターおよび対照、並びに M2 抗体が陰性レベルの 4 つの血清および陽性レベルの 4 つの血清と、M2 抗原でコーティングされたウェル、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質でコーティングされたウェル、SARS-CoV-2 核タンパク質でコーティングされたウェルとの反応

M2 抗体キット内に使われたキャリブレーターと対照の OD		血清と、M2 抗体がコーティングされたウェルとの反応		M2 抗体キット対照と、SARS-CoV-2 抗原がコーティングされたウェルとの反応	4 つの異なる血清と、SARS-CoV-2 抗原がコーティングされたウェルを使った、陰性 M2 抗体との反応		4 つの異なる血清と、SARS-CoV-2 抗原がコーティングされたウェルを使った、陽性 M2 抗体との反応			
		陰性 M2 ab	陽性 M2 ab		スパイクタンパク質	核タンパク質	スパイクタンパク質	核タンパク質	スパイクタンパク質	核タンパク質
ブランク	0.06	0.213	1.382	キット陰性	0.118	0.214	0.114	0.118	0.491	0.415
		0.241	1.434	対照	0.137	0.198	0.132	0.126	0.514	0.428
キャリブレーター	0.981	0.316	1.131	キット・キャリブレーター	0.489	0.513	0.212	0.183	0.465	0.452
	1.062	0.291	1.244		0.479	0.498	0.189	0.167	0.458	0.463
	1.011	0.179	1.861	キット高い	0.538	0.413	0.082	0.153	0.618	0.553
陰性対照	0.135	0.163	1.932	陽性	0.546	0.422	0.094	0.124	0.643	0.536
低い陽性	1.264	0.218	0.972	キット高い	0.612	0.484	0.178	0.141	0.386	0.378
高い陽性	1.975	0.226	0.958	陽性	0.594	0.476	0.155	0.123	0.395	0.369

すべての測定は繰り返して実施した。

M2 抗体キットの陰性対照および M2 抗体が陰性の 4 つの血清は、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質および核タンパク質と反応しなかったが、キットのキャリブレーター、低い陽性、高い陽性、加えて M2 抗体が上昇していた 4 つの血清は、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質および核タンパク質と中程度に反応した点に留意のこと。M2 抗体が陰性の 4 つの血清と SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質および核タンパク質との反応における OD を、M2 抗体が陽性の 4 つの血清と、同じ SARS-CoV-2 タンパク質との反応における OD と比較したところ、得られた p 値は統計的に有意だった($p < 0.0001$)。

考察

分子模倣や自己免疫疾患に関する査読付き研究は7,000以上発表されており、特定のウイルス病原体とヒト組織タンパク質との交差反応関係性は50以上認められている。最近の世界的なSARS-CoV-2の流行を受けて、この新しいウイルスに関連する多様な疾患と、それらが人体にどのような影響を与える可能性があるかを理解する関心が高まっている。いくつかの論文では、SARS-CoV-2とヒト・タンパク質との間に見られる分子模倣現象が述べられ、この模倣と、呼吸器を超えた多臓器疾患との関連を仮定している。その理由は、感染やワクチン接種に続くウイルス抗原に対する免疫応答が、ウイルスと配列相同性を共有するヒト組織抗原と交差反応を起こし、その結果、自己免疫反応性、ひいては明白な自己免疫疾患を引き起こす可能性がある、というものである。ライオンズ・ワイラーが、SARS-CoV-2の免疫原性エピトープをヒト・タンパク質と比較して、様々な組織と高い相同性を見出したとき、自己免疫の誘発に対するこのような提案メカニズムへの支持が提示された。これには心筋、骨格筋、甲状腺、腎臓、脳、下垂体、精巣、肺、血液、消化管、眼、肝臓、骨髄、脂肪組織、皮膚、多くの一般的なタンパク質、が含まれた。選定された55のヒト組織抗原に関する私たちのリストは、ライオンズ・ワイラーの研究で使用されたものと、避けようのない重複を共有しているが、私たちは更に進めて、私たちの選定にあたっては、COVID-19の肺外症状および一般的な自己免疫疾患の両方に関与することが知られている主要な標的ヒト組織タンパク質をベースにした。例えば、ライオンズ・ワイラーの研究は、心筋、骨格筋、甲状腺を調査したが、私たちは、 α -ミオシン、アクチン、TPOを研究した。ライオンズ・ワイラーは、脳、肝臓、消化管、皮膚を研究し、私たちは、SARS-CoV-2と、脳組織抗原(MBP、NFP、 β -アミロイド、 α -シヌクレイン、シナプシン、tTG-6)、肝ミクロソーム・ペプチド、M2タンパク質、PDHペプチド、皮膚抗原(tTG-2、tTG-3、上皮細胞抗原)との交差反応を調べた。また、私たちは、ライオンズ・ワイラーの研究では検証されなかったバリア・タンパク質といった多くの他の組織抗原も検討した。この概念の更なる証明を提供するため、本研究で私たちは、SARS-CoV-2ウイルスと戦うために免疫系が産生する自然抗体を模倣するヒト・モノクローナル抗体が、様々なヒト組織抗原に反応するかどうかを調べようとした。この免疫反応は、重症なCOVID-19を患う入院患者に認められる多臓器系疾患の原因であるかもしれない。

『Clinical Immunology』に掲載された初期の限定的な研究で、私たちは、SARS-CoV-2タンパク質に対するマウス・モノクローナル抗体とウサギ・モノクローナル抗体を用いて、この考えられ得る関連を調査した。当時、私たちが求めていたヒト抗体はまだ市販されていなかったが、利用可能な動物抗体は11~13のヒト組織抗原と交差反応性を示した。私たちの現在の研究では、SARS-CoV-2タンパク質に対するヒト・モノクローナル抗体を用い、私たちは、55の試験ヒト抗原のうち28に対して反応性を認めた。反応性ヒト抗原の個数に見られる差異は、ヒト・モノクローナル抗体の作製プロセスが、マウス・モノクローナル抗体やウサギ・モノクローナル抗体を産生する従来の方法とまったく異なるという事実に起因す

る。極めて多くの抗原とのこのような交差反応性は、重要な臨床的懸念を提起する。第一に、これらの交差反応関係性は、COVID-19 の全身性炎症の性質に一つの役割を演じているかもしれない。第二に、ウイルス性呼吸窮迫症候群に苦しむ多くの患者は、感染から回復した後も、自己免疫と関連しているかもしれない障害や QOL の低下に苦しみ続ける。第三に、SARS-CoV-2 と自己免疫の関係性を理解することで、実験的抗体薬や、ワクチンの開発および使用による潜在的な副作用の予測に役立つ可能性がある。特に、これらの抗体薬は、本論文執筆時点で最近のニュース・サイクルの中でも目立っており、大統領の治療にも使われているとさえ報じられた。このため、私たちは、本研究で使用した抗 SARS-CoV-2 抗体のうち2つは、実のところ、人体の免疫系が産生する自然抗体と同一のヒト・モノクローナル抗体であることを特に指摘すべきだと感じている。第四に、交差反応性は、COVID-19 が多系統疾患へ進行するリスク因子として一つの役割を演じているかもしれない。この可能性は、免疫バリア・タンパク質とウイルス抗原との交差反応性に関する私たちの知見で最も明確である。

私たちの研究では、SARS-CoV-2 抗体とバリア標的タンパク質（ α -オクルディン+ゾヌリン、 β -カテニン、S100B）との免疫反応性を見出した。これらのタンパク質は、バリアの完全性を維持する役割を担っている。これらの交差反応の相互作用は、感染しやすい個体において、肺バリア、腸管バリア、血液脳バリアの透過性を引き起こすかもしれない。最近のシステマティック・レビューとメタ分析では、年齢、喫煙、糖尿病、心疾患、呼吸器疾患を、COVID-19 による死亡率の増加および重症疾患のリスク増加に関連する重要なリスク因子として特定した。これらリスク因子は、どれ一つとして例外なく、免疫バリア・システムの透過性とも関連している。免疫バリアの透過性は、COVID-19 の重症度に関連する重要な中心的リスク因子であるかもしれないし、このメカニズムの一部は、SARS-CoV-2 と免疫バリア・タンパク質との交差反応性の複合的な影響とも関連しているかもしれない。これらのバリアの透過性は、ウイルスの体内への拡散を加速させ、体内のサイトカイン・ストームを潜在的に促進するかもしれない。更に、免疫バリアの透過性も、免疫調節障害や自己免疫疾患の発症を促進するかもしれない独立したメカニズムである。リン脂質に対する自己抗体が COVID-19 で見つかっており、それが凝固症候群による生命を脅かす合併症を引き起こす可能性があるため、このことは非常に懸念される問題である。

SARS-CoV-2 抗体と密着結合タンパク質の反応に加え、スパイク・タンパク質と核タンパク質に対して作られたヒト・モノクローナル抗体は、セリアック病に一つの役割を演じている腸粘膜内の酵素トランスグルタミナーゼ-2(tTG-2)と反応した。更に、SARS-CoV-2 エンベロープ・タンパク質に対して作られたウサギ・ポリクローナル抗体は、腸管上皮細胞抗原と強く反応した。SARS-CoV-2 と消化管組織抗原とのこのような交差反応は、COVID-19 の消化管症状の原因であるかもしれない。

また、私たちの研究では、特定の自己免疫パターンを引き起こすかもしれない複数の交差反応の相互作用も同定した。例えば、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質、核タンパク質、膜

タンパク質はいずれも TPO と交差反応することが分かった。更に、BLAST 配列マッチングを通じて、多くの TPO ペプチド配列が SARS-CoV-2 タンパク質の配列と相同性や類似性を共有していることが分かった。これらの知見は、SARS-CoV-2 に対して生成された抗体が自己免疫性甲状腺炎を促進するかもしれないことを示唆する。最近の症例研究では、SARS-CoV-2 感染後の亜急性甲状腺炎を同定した。これは COVID-19 による甲状腺交差反応性の最初の報告例であったかもしれない可能性がある。COVID-19 の甲状腺病態生理学に関するデータは現在入手できないが、SARS 患者は甲状腺濾胞細胞の破壊が見られ、SARS-CoV と SARS-CoV-2 のゲノム配列は非常に類似している。分子模倣による自己免疫性甲状腺疾患の発症と関連している感染も多い。SARS-CoV-2 と甲状腺標的タンパク質との交差反応性は、自己免疫性甲状腺疾患の発症にも繋がり得る可能性がある。この関係性が存在するかどうかを判定するためには、更なる研究を行う必要があるだろう。

NFP、MBP、GAD-65、 β -アミロイド、 α -シヌクレイン、シナプシン、tTG-6 を含む中枢神経系標的タンパク質とともに、複数の SARS-CoV-2 抗体の交差反応が同定された。他の組織抗原と比べて、NFP はスパイク・タンパク質との反応が最も強く(非常に強い)、膜タンパク質との反応は、M2 抗原と膜タンパク質の反応に次ぐ 2 番目の、非常に強いものだった。これらの神経タンパク質標的に対する抗体は、多発性硬化症、アルツハイマー病(AD)、運動失調といった神経自己免疫疾患の患者で検出される。神経損傷のマーカーであるニューロフィラメント軽鎖タンパク質が COVID-19 患者において高いレベルで検出された。

現時点では、スパイク・タンパク質抗体と 5 つの異なる神経抗原との反応、および核タンパク質抗体と 3 つの抗原との反応が、最近多くの論文で記述されている神経学的合併症や神経精神症状に寄与しているかどうか、分かっていない。コロナウイルスは、T 細胞や補体活性化を通じて中枢神経系に直接的な損傷を誘発する能力を有し、神経侵襲性の非常に高いウイルス特性を持つ。しかし、抗体とウイルス抗原との交差反応性も、神経自己免疫疾患の発症において立証された特徴である。SARS-CoV-2 の神経系における病態生理学的役割を評価する更なる研究では、直接的なウイルス誘発性病変と、交差反応性を通じた潜在的な抗体免疫反応性の両方を考慮する必要があるだろう。

SARS-CoV-2 交差反応性は、アクチンや α -ミオシンを含む横紋筋と平滑筋に対する標的タンパク質でも同定された。アクチンは、組織の収縮性に寄与する、筋肉の主要な構成要素である。 α -ミオシンは心筋特異的収縮タンパク質である。私たちは、BLAST を用いてエピートープ・マッピングを行い、異なる SARS-CoV-2 タンパク質において配列の一致を示す多重文字列とその反復とともに、F-アクチンと様々な SARS-CoV-2 タンパク質との間に 58%~63%の同一性でペプチド類似性と相同性を示す文字列を多数発見した。現時点で、本研究で示された SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質および核タンパク質と、心臓および他の筋肉関連タンパク質との交差反応が、COVID-19 の心血管症状に関与しているかどうかは分かっていないが、これは、将来的に検討すべきよいテーマとなるだろう。

ミトコンドリア機能障害と、SARS-CoV-2 による多臓器疾患の誘発との類似性ゆえに、私た

ちは、ピルビン酸脱水素酵素複合体の一部である M2 を用いて、SARS-CoV-2 タンパク質に対して作られた 4 つの異なる抗体の反応性を測定した。このミトコンドリア抗原に対する抗体は、原発性胆汁性胆管炎(PBC)患者の 90%~95%で検出され、他の肝疾患や強皮症でも時折検出される。実際、ミトコンドリア M2 は、私たちの研究における 28 の交差反応抗原のうち、4 つの SARS-CoV-2 タンパク質抗体すべてと、強い反応~非常に強い反応を示した唯一の抗原だった(表 1)。更に、私たちは、M2 抗体に陰性の血清は、SARS-CoV-2 タンパク質と反応性を示さない一方で、M2 抗体に陽性の血清は、中等度の反応を示すことを見出した(表 6)。更に、これらの結果は、交差反応抗体の産生をもたらす、SARS-CoV-2 と M2 タンパク質との間に見られる模倣を支持する。興味深いことに、私たちは、ウイルス・スパイク・タンパク質および核タンパク質に対して作られたヒト・モノクローナル抗体を、肝ミクロソーム抗原およびピルビン酸脱水素酵素ペプチド E2(PDC-E2)サブユニットを使って試験した。このサブユニットの生体異物による修飾が、PBC の誘発に関与していると考えられている。ミトコンドリア抗体が、SARS-CoV-2 によって誘発される疾患の病因論にどのように寄与するかは分からないものの、SARS-CoV-2 タンパク質抗体と、M2、PDC-E2、肝ミクロソーム抗原との交差反応は、肝自己免疫において SARS-CoV-2 に及ぼす考えられ得る役割への更なる支持を与えている。私たち自身の知見は、肝臓の SARS-CoV-2 感染が COVID-19 患者の肝障害において重要な因子であるという、ワンらによる最近の知見を強化する。私たちは、SARS-CoV-2 タンパク質に対するミトコンドリア M2 のエピトープ・マッピングも BLAST により実施し、ミトコンドリア M2 配列が、アクチンよりも SARS-CoV-2 タンパク質と極めて高い類似性と相同性を持つ —特にスパイク・タンパク質の場合、同じペプチド鎖に見られる複数の反復、並びに、異なる種類の SARS-CoV-2 タンパク質に見られる配列の一致— ことを見出した。

最近、ホルダーとレディは、SARS-CoV-2 と免疫細胞との相互作用がどのように宿主細胞内のミトコンドリア活動を変化させ、感染細胞内でのウイルス複製 —COVID-19 患者の疾患の進行に寄与するかもしれない— にとって受容性の高い細胞内環境を提供するのか、を示した。更に、シュライナーらは、筋痛性脳脊髄炎/慢性疲労症候群の患者において、ヒト・ヘルペスウイルス 6(HHV-6)と HHV-7 によってミトコンドリアが強く断片化されることを示した。これがこの疾患の引き金であると考えられている。ミトコンドリア抗体の産生をもたらすこのようなミトコンドリアの断片化が SARS-CoV-2 とともに起きるかどうかは、今後の研究に十分に値する。

最後に、私たちは、混合性結合組織病(MCTD)に関与する、核抗原(NA)、可溶性核抗原(ENA)、ヒストン、コラーゲンを含む自己免疫標的タンパク質との交差反応性を特定した。SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質抗体は ENA、NA、ヒストンと反応し、核タンパク質抗体は NA、ヒストン、コラーゲンと反応し、膜タンパク質抗体はヒストン、コラーゲンと反応した。

SARS-CoV-2 タンパク質と自己免疫標的タンパク質との交差反応パターンは、COVID-19

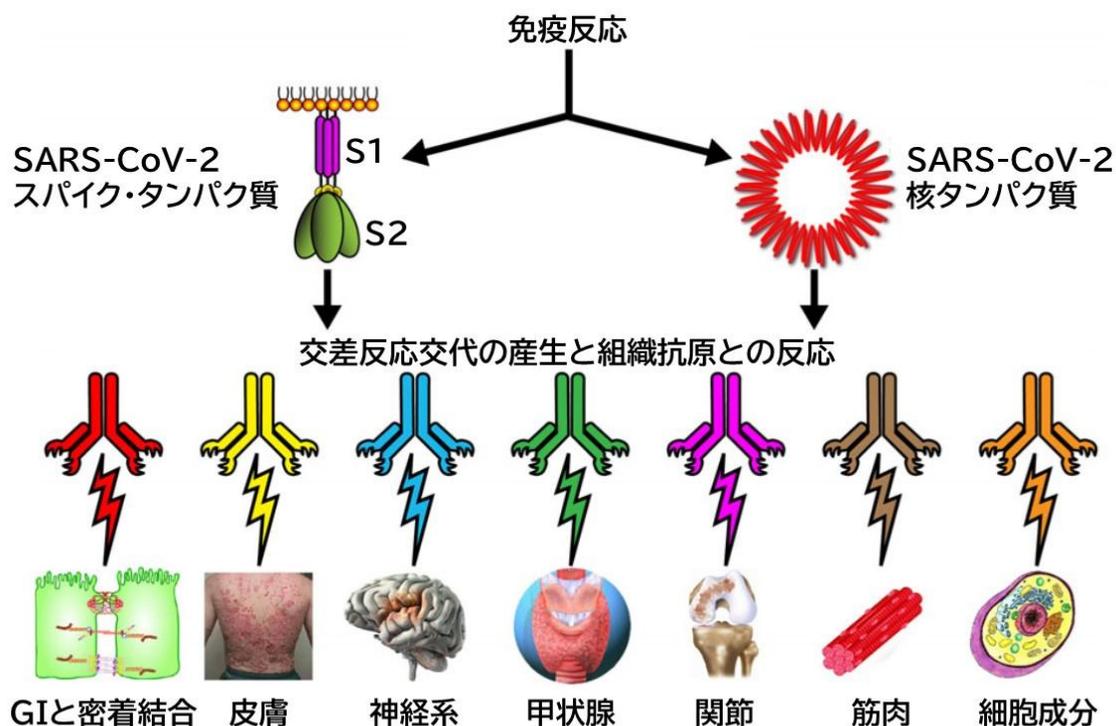


図 7 SARS-CoV-2 タンパク質と自己免疫標的タンパク質との考えられ得る関連性。SARS-CoV-2 タンパク質と自己免疫標的タンパク質との交差反応パターンは、COVID-19 による全身性炎症反応に一つの役割を演じ、感染しやすいサブグループにおいて感染後に自己免疫疾患の発症を引き起こすかもしれないし、或いは COVID-19 患者の重症度に潜在的に一つの役割を演じるかもしれない。

による全身性炎症反応に一つの役割を演じ、感染しやすいサブグループにおいて感染後に自己免疫疾患の発症を引き起こすかもしれないし、或いは COVID-19 疾患の重症度に潜在的に一つの役割を演じるかもしれない(図7参照)。ライオンズ・ワイラーが、交差反応性に対してヒト組織と SARS-CoV-2 とを比較したところ、彼が同定したヒト標的タンパク質の多くは全体的に同一性が低いものの、エピトープの短いセグメントにわたって局所的な同一性が高いことが分かった。彼の結果は、多数のタンパク質が様々な組織で発現していることを意味する。また、彼は、SARS-CoV-2 スパイク・タンパク質は神経免疫病理に一つの役割を演じていることが知られているが、SARS-CoV-2 ウイルスには他にも多数のタンパク質やポリプロテインを有しており、そのいずれもが感染時に抗原の源として機能し、自己免疫を引き起こす可能性がある、と述べた。私たち自身の BLAST 配列研究は、ミトコンドリア M2、アクチン、TPO のみにフォーカスしたが、私たちはすでに、これら3つのヒト組織抗原にタンパク質配列の重複を見出した。これらの抗原は、様々な SARS-CoV-2 タンパ

ク質において、また異なる文字列の中の多くの反復において、またウイルス・タンパク質の異なるサブユニットの中の配列において、一致が認められた。ライオンズ・ワイラーが述べたように、これらの配列やエピトープの一致はいずれも、SARS-CoV-2 抗体と交差反応することで自己免疫を引き起こす可能性がある。SARS-CoV-2 配列とヒト組織のこのような過剰な一致は、SARS-CoV-2 タンパク質に対して作られたモノクローナル抗体が、私たちの研究で 55 の組織抗原のうち、あまりにも多くの組織抗原と反応した理由を説明するかもしれない。私たちの研究は、一般的な交差反応抗体応答の同定に限定されており、BLAST 探索は 3 つのヒト組織に限定されているに過ぎない点は注意すべきである。この結果は、SARS-CoV-2 抗体が、組織抗原内部の立体配座エピトープに反応したことを示しているのかもしれない。私たちの研究デザインには、立体配座エピトープや非線形エピトープを捉える分析を特に含んでいなかったが、ウイルス配列との一致が認められる組織配列のいずれにしても、特に高い頻度で繰り返し発生する組織配列は立体配座エピトープである可能性がある。立体配座エピトープは、モノクローナル中和抗体の産生に重要なだけでなく、自己免疫疾患における自己抗体産生の主要な標的となり得る。私たちのリストの中で、SARS-CoV-2 と中等度以上の反応を示したその他の抗原も、その構造のあちこちに、自己免疫を潜在的に引き起こす可能性のある配列を持っているかもしれず、同様に追加的な注目と研究に値する。特定の交差反応エピトープを同定するための更なる研究には、特定のペプチド断片阻害研究、並びに計算モデルが必要だろう。SARS-CoV-2 の自己免疫における役割を明らかにするためには、より正確な立体配座自己エピトープの同定が必要である。

配列相同性は分子模倣の基礎でもあり、宿主細胞機構を利用するにあたって、ウイルスが採用する進化戦略である。非常に最近の論文で、アナンドらは、SARS-CoV-2 が独自の S1/S2 切断部位を進化させ、その結果、ヒト上皮性ナトリウム・チャンネル α サブユニット (ENaC-a) 上に、8-mer FURIN 切断可能ペプチドとまるっきりそっくりな模倣を招いている、と報告した。フーリンは、ACE2 および ENaC-a とともに、腸、膵臓、肺を含む複数の細胞タイプにわたり発現する。この模倣が、私たちの研究で SARS-CoV-2 タンパク質が多くのヒト組織抗原と反応した理由になるかどうかを判断するには、更なる研究が必要である。

分子模倣に関するもう一つの懸念は、ワクチンの安全性に果たすかもしれない潜在的役割である。文献では、交差反応に特異的なウイルス感染やワクチン誘発性自己免疫の症例の数々が報告されている。2009 年、H1N1 パンデミックを治療するために開発されたワクチンは、交差反応性ゆえに特にナルコレプシーを引き起こした。不活化スプリット・ウイルス粒子 (ASO3) は、視床下部に見られる偽善粒子と交差反応相同性を共有し、感染しやすい個体のサブグループにおいて、ワクチン接種後に、その物質の選択的破壊をもたらした。ASO3 を有するワクチン接種は、ワクチン未接種の個体と比べてナルコレプシーの発症率が 3 倍も増加する。

1970 年代後半のアメリカにおける豚インフルエンザの流行時、インフルエンザ・ワクチン接種の活用は、交差反応性ゆえにギラン・バレー症候群の発症リスクを 4~8 倍に増加させ

ることが判明した。ウイルス感染とワクチン接種の交差反応関係性も、多発性硬化症を引き起こす B 型肝炎やミエリン・タンパク質、全身性エリテマトーデス(SLE)を引き起こすヒト・パピローマウイルスや核タンパク質、1 型糖尿病を引き起こすコクサッキーウイルスや臍島細胞タンパク質、などで見つかった。ラジムらは、クロストリディオイデス・ディフィシルに対するワクチンのデザインにあたり、タンパク質をワクチン抗原として検討する前に、将来の考えられ得る副作用を避けるために、特別な注意を払って組織の交差反応エピート配列を分析し、除去すべきだ、と結論づけた。

JAMA のごく最近の論文で、トロゲンらは「絶望が科学的な原則や倫理的な研究価値の停止を招くことは、決して許されず、また許してはならない」と述べた。将来のワクチンに含まれる SARS-CoV-2 ペプチドがヒト組織抗原と交差反応するかもしれない、その結果、自己免疫を引き起こす可能性があるかどうかを調査するにあたって、私たち自身も、これらの原則と倫理的価値観を適用する。しかし、将来の自己免疫疾患の可能性は手強く、非常に現実的である一方で、ワクチン接種がなければ SARS-CoV-2 パンデミックは制御されずに拡大し、現在にも将来にも自己免疫を含む夥しい多系統疾患を持ち込むことになっていた点を忘れてはならない。最近認可されたヒト・モノクローナル抗体とワクチンが、COVID-19 によって引き起こされる多くの肺外症状やその他の疾患を防ぎ、最終的にこのパンデミックの終結の到来に役立てられることを私たちは期待する。