

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11596

研究課題名（和文）肥満に伴う新型コロナウイルス感染の重症化に対するACE2の有用性

研究課題名（英文）Effects of ACE2 for the severity of SARS-CoV-2 infection associated with obesity

研究代表者

後藤 孔郎（Gotoh, Koro）

大分大学・医学部・講師

研究者番号：10457624

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の感染には、アンジオテンシン変換酵素2（ACE2）が不可欠である。SARS-CoV-2のヒト感染（COVID-19）を重症化させる要因に肥満があげられる。本研究では肥満モデル動物に対してACE2を全身投与すると、SARS-CoV-2のリコンビナントS1-recombinant binding domainタンパク（S1-RBD protein）の肺内への侵入が抑制されるか検討した。肥満のみならず非肥満動物に対してACE投与はS1-RBD proteinの肺内への侵入を抑制することを認め、ACE2がCOVID-19の治療で有効であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにACE2をdecoy proteinとして有効であるといった報告は、そのほとんどはIn vitroの実験である。今回、研究代表者らはIn vivoにおいてもACE2がdecoy proteinとして有効であることを認めた。本研究では、生きたSARS-CoV-2の代わりにS1-RBD proteinを用いた。体内におけるウイルスの臓器内感染動態を把握することは可能であり、decoy proteinとしてのACE2の有効性をあげるような研究を行う際に、本研究で用いた方法は特別な実験施設を必要とせず、多くの施設で簡便に行うことができ、今後のACE2製剤が急速に発展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) is essential for infection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Obesity is a factor that makes SARS-CoV-2 human infection (COVID-19) more severe. In this study, we investigated whether systemic administration of ACE2 to obese animals suppressed the entry of the SARS-CoV-2 recombinant S1-recombinant binding domain protein (S1-RBD protein) into the lungs instead of live SARS-CoV-2. In non-obese animals as well as obese animals, ACE2 administration was found to inhibit the entry of S1-RBD protein into the lungs, suggesting that ACE2 is effective in the treatment of COVID-19.

研究分野：肥満

キーワード：ACE2 Obesity LPS

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の感染には、アンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) が不可欠な受容体であることが明らかになっている。事実、肺組織には多くの ACE2 が発現しており、このことが肺炎の重症化に大きく関与している。SARS-CoV-2 には、ウイルス粒子表面に王冠様突起 (Spike) タンパク質 (S タンパク) が存在し、この S タンパクが受容体に結合してウイルスの RNA ゲノムが細胞内に侵入することで細胞内に感染する。このような ACE2 の S タンパクに対する親和性は SARS-CoV-2 では極めて高いことが報告されている。

(2) SARS-CoV-2 のヒト感染 (COVID-19) を重症化させる要因の 1 つに肥満が考えられている。実際、肥満が高度であるほど血中 ACE2 濃度が増加していることが認められたが、血中 ACE2 濃度上昇の origin は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、「食事誘導性肥満モデル動物に対して、1) 血中 ACE2 濃度や肺、小腸といった多臓器で ACE2 発現が変化しているか、2) SARS-CoV-2 のリコンビナント S1-recombinant binding domain タンパク (S1-RBD protein) を投与すると、臓器内での S1-RBD protein 移行に変化がみられるか、3) ACE2 の全身投与によって、S1-RBD protein の各臓器内移行に変化がみられるか」を検討することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) モデルの設定:

モデル動物の検討: 雄野生マウスに通常餌 (CNT; 脂肪成分 20%) または高脂肪餌 (HF; 脂肪成分 60%) 投与の 2 群を作製する。その後、2 週、4 週および 8 週間飼育した後、血中 ACE2 濃度の測定、小腸や肺などの多臓器における ACE2 発現を検討することで、適切な動物モデルを決定した。

ACE2 投与の検討: 通常餌を摂取させた雄野生マウスを用いて、recombinant mouse ACE2 (rmACE2, 200, 400, 800  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を腹腔内投与) といった複数の投与量を設定し、適正な rmACE2 投与量を決定した。

SARS-CoV-2 のリコンビナント S1-recombinant binding domain (RBD) タンパク (S1-RBD protein) 投与の検討: 通常餌を摂取させた雄野生マウスを用いて、S1-RBD protein (10, 40, 100  $\mu\text{g}$ ) を腹腔内投与し、2 時間、4 時間、6 時間および 12 時間後に肺を採取し、S1-RBD protein の組織内含有量をみながら適切な条件を決定した。

(2) 肥満による血中 LPS 濃度、臓器内炎症性変化および小腸内腸管バリア機能の検討: 雄マウスに通常餌または高脂肪餌を摂取させ、CNT 群と HF 群に分け 4 週間飼育した。その後、血中 LPS 濃度、肺や小腸内の炎症性変化、小腸バリア機能として ZO-1 発現を評価した。

(3) LPS 投与による血中や肺内 ACE2 発現の変化および肺内炎症性変化の検討: 通常餌を摂取させた雄マウスに炎症惹起物質である lipopolysaccharide (LPS; 300  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ , 高脂肪餌を摂取させたマウスの血中 LPS 濃度と同等になる投与量) と PBS を 4 週間慢性投与した後、血中 ACE2 濃度、肺や小腸の ACE2 発現、肺内の炎症性変化を評価した。

(4) ACE2 投与による S1-RBD protein の臓器内侵入の抑制効果: 雄マウスに通常餌または高脂肪餌を摂取させ、CNT 群と HF 群に分ける。また各群を ACE2 群 (通常餌および高脂肪餌に rmACE2 を腹腔内投与)、とコントロール (albumin を腹腔内投与) 群に分ける。したがって、CNT + albumin 群、CNT + ACE2 群、HF + albumin 群、HF + ACE2 群の 4 群を作成する。その後、各群に対して S1-RBD protein (40  $\mu\text{g}$ ) を腹腔内投与し、6 時間後に肺および小腸を摘出した後、各臓器内の S1-RBD protein 含有量を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) モデルの設定

モデル動物の検討: 高脂肪餌 (HF) を 2 週摂取させても有意な変化はみられなかったが、4 週間摂取させると、血中 ACE2 濃度、肺内 ACE2 発現および小腸内 ACE2 発現の増加が認められた (図 1)。HF を 8 週間摂取させた場合でも 4 週間の摂取と同様の結果であった。

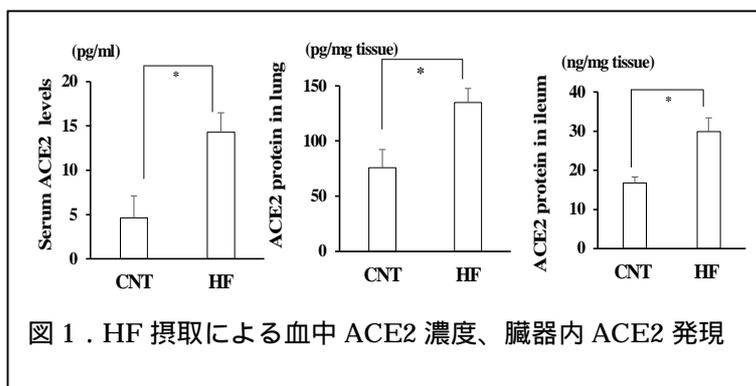


図 1. HF 摂取による血中 ACE2 濃度、臓器内 ACE2 発現

ACE2 投与の検討：rmACE2 を 800  $\mu\text{g}/\text{kg}$  腹腔内投与すると、有意に血中 ACE2 濃度の上昇が認められた (図 2)。

S1-RBD protein 投与の検討：通常餌を摂取させた雄野生マウスに S1-RBD protein (40  $\mu\text{g}$ ) を腹腔内投与後 6 時間で肺を採取すると、最も多くの S1-RBD protein 含有量の増加が認められた (図 3) したがって、上記の条件で以下の実験を行った。

(2) HF 群で血中 LPS 濃度の増加を認めた。また、炎症性マクロファージの特異的マーカーである CD11c を用いて免疫染色を行ったところ、HF 群で肺および小腸内での炎症性マクロファージ浸潤が亢進していた。さらに小腸でのバリア機能に必要なタンパクである ZO-1 タンパク発現についても免疫染色で評価したところ、HF 群で小腸の ZO-1 タンパクの発現低下が認められた (図 4)。これは HF 群で腸管バリア機能が低下していることを示唆するものである。

(3) CNT 摂取させたマウスに対して LPS を慢性投与すると、血中の ACE2 濃度、肺や小腸での ACE2 発現の増加、および肺内での炎症性マクロファージ浸潤の亢進が認められた。したがって、肥満による血中 LPS 濃度の増加が臓器内での炎症性変化をもたらすのみならず、臓器内の ACE2 発現も亢進させることを示唆する結果である。

(4) HF 群では S1-RBD protein の肺内への移行が増加したが、ACE2 を前もって投与しておく、S1-RBD protein の臓器内移行が軽減された。ACE2 の前投与による S1-RBD protein の肺内移行の抑制効果は CNT 群でも認められた。以上より、肥満に限らず非肥満に対しても ACE2 の前投与は S1-RBD protein の臓器内移行を抑制することが推測され、今後 COVID-19 の重症化予防に ACE2 投与が有効である可能性がある。

COVID-19 に対してワクチン接種がある程度有効であるが、ウイルス変異によりその有効性が低下する可能性がある。これまでに ACE2 を decoy protein として有効であるといった報告は数多くみられるが、そのほとんどは *In vitro* の実験である。今回、研究代表者らは生きた SARS-CoV-2 の代わりに S1-RBD protein の生体内での動態を検討し、S1-RBD protein が臓器内に移行していればその臓器は SARS-CoV-2 に感染しているとみなすモデルを用いて検討した。*In vivo* においても ACE2 が decoy protein として有効であることを認めた。S1-RBD protein によって体内におけるウイルスの臓器内感染動態を把握することは可能であり、decoy protein としての ACE2 の有効性をあげるような研究を行う際に、本研究で用いた方法は特別な実験施設を必要とせず多くの施設で簡便に行うことができ、今後の ACE2 製剤が急速に発展することが期待される。また、肥満が COVID-19 の重症化をもたらす要因として、血中 LPS 濃度の増加が推測された。

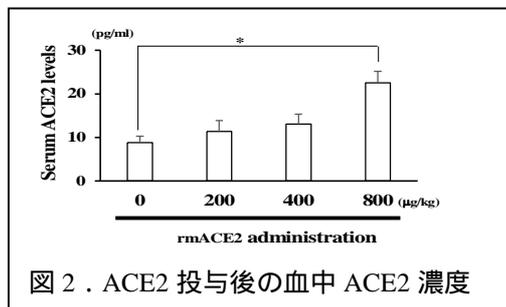


図 2 . ACE2 投与後の血中 ACE2 濃度

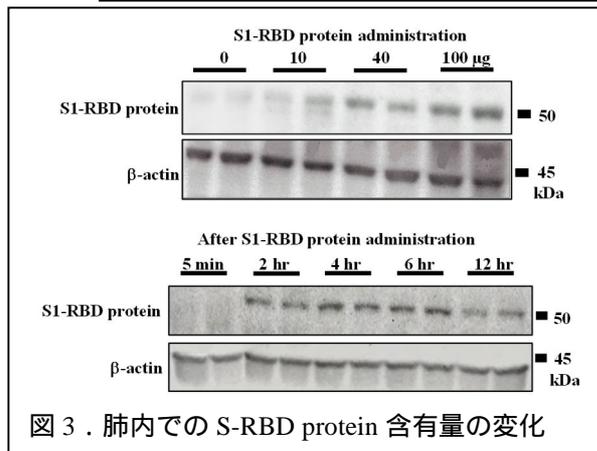


図 3 . 肺内での S-RBD protein 含有量の変化

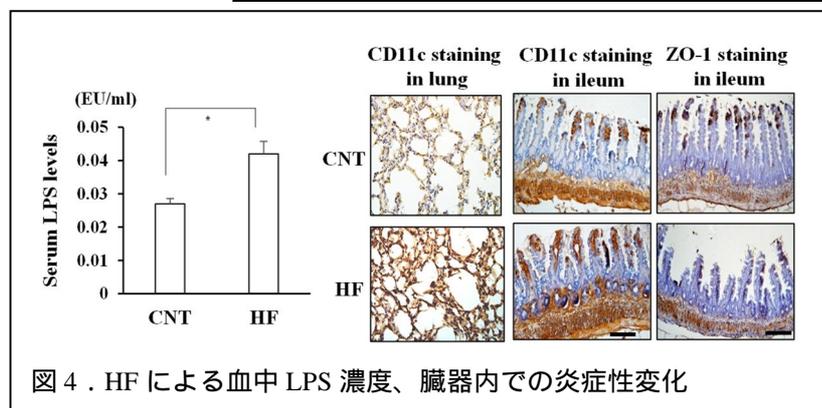


図 4 . HF による血中 LPS 濃度、臓器内での炎症性変化

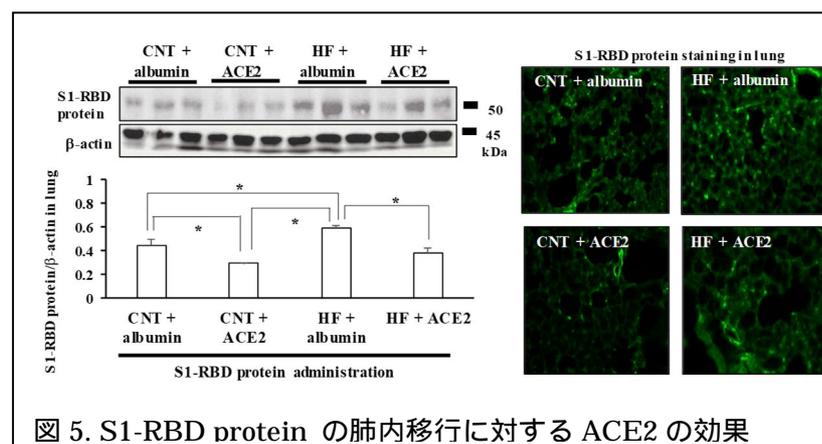


図 5 . S1-RBD protein の肺内移行に対する ACE2 の効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Gotoh K, Satoh F, Uesugi H, Noguchi T, Matsuda N, Sada K, Miyamoto S, Ozeki Y, Yoshida Y, Okamoto M, Masaki T, Kawabe T, Shibata H.	4. 巻 38
2. 論文標題 Susceptibility to recombinant SARS-CoV-2 spike protein entry in the lungs of high-fat diet-induced obese mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 e23656
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202301864RR.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤 孔郎, 野口 貴昭, 松田 直樹, 佐田 健太郎, 宮本 昇太郎, 尾関 良則, 吉田 雄一, 岡本 光弘, 正木 孝幸, 柴田 洋孝
2. 発表標題 新型コロナウイルス感染の重症化と肥満との関連に関する検討
3. 学会等名 日本内分泌学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	正木 孝幸  (Masaki Takayuki)  (00423715)	大分大学・医学部・准教授    (17501)	
研究分担者	柴田 洋孝  (Shibata Hirotaka)  (20245484)	大分大学・医学部・教授    (17501)	
研究分担者	加隈 哲也  (Kakuma Tetsuya)  (80343359)	大分大学・保健管理センター・准教授    (17501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	岡本 光弘  (Okamoto Mitsuhiro)  (80774546)	大分大学・医学部・助教     (17501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関